

Du gène au test

L'évolution des connaissances en génétique entraîne une augmentation de la demande de tests génétiques. Or la fiabilité de ces tests et leur utilisation posent des problèmes spécifiques.

**Emmanuelle
Girodon**

Praticien hospitalier
en génétique, CHU
de Créteil

De la connaissance du gène au test utilisable en clinique

Le domaine de la génétique moléculaire, l'étude des gènes responsables de maladies, est en constante évolution. L'achèvement du programme « génome humain », la découverte incessante de gènes, le progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires des maladies génétiques, parallèlement au développement quelquefois fulgurant des techniques, concourent à l'augmentation de l'offre et de la demande de tests génétiques. La génétique moléculaire, initialement tournée vers les maladies monogéniques graves de l'enfant (telles la myopathie de Duchenne, la mucoviscidose), avec un but essentiellement de diagnostic prénatal, se tourne depuis quelques années vers les maladies monogéniques de déclaration tardive, chez l'adulte (telle la chorée de Huntington), ainsi que vers l'oncogénétique (les cancers du colon, du sein) et, plus récemment, vers les maladies multigéniques ou multifactorielles, comme l'hypertension artérielle ou le diabète. Cela s'effectue dans un but de diagnostic, de meilleure prise en charge de la maladie, mais aussi dans un but de diagnostic présymptomatique : c'est l'« ère » de la prédiction génétique.

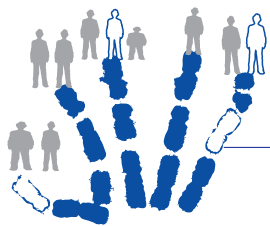
À cette considérable évolution s'opposent encore certaines limites : des techniques mêmes, de l'interprétation des résultats d'étude (les tests fonctionnels qui permettent de démontrer le caractère pathogène d'une mutation identifiée chez un patient ne sont disponibles que pour très peu de maladies), de la gestion clinique des résultats. Il existe également une grande hétérogénéité des prises en charge génétiques, dans

la prescription des examens, dans la démarche des laboratoires, voire dans l'interprétation des résultats. Cette hétérogénéité devrait progressivement s'effacer. Le décret d'application du 23 juin 2000 de la loi bioéthique du 29 juillet 1994 encadre les conditions de prescription et de réalisation des tests génétiques, qui concernent la cytogénétique (l'étude des chromosomes), la génétique moléculaire, et quelques tests analysant des protéines, produits des gènes. La pratique de la génétique moléculaire en France s'organise en réseaux entre les laboratoires et avec les généticiens cliniciens, élaborant des recommandations nationales suivant les recommandations européennes, appliquant une démarche d'assurance qualité et instaurant progressivement un contrôle de qualité des tests. Tout cela devrait garantir une certaine harmonisation dans la démarche de prise en charge des maladies génétiques.

Stratégies, outils et limites de la génétique moléculaire

La génétique moléculaire s'est initialement développée dans les laboratoires de recherche, et a été progressivement transférée dans les laboratoires hospitaliers de diagnostic. Quelques grands laboratoires privés ont une activité de génétique moléculaire, qui reste réservée aux actes simples pour les maladies les plus fréquentes (hémochromatose, mucoviscidose). Le développement technologique, resté dans le domaine public jusque dans les années quatre-vingt-dix, se fait à présent majoritairement dans les entreprises privées, en partie faute de moyens dans le système public.

Le diagnostic génotypique peut être abordé selon deux approches : l'approche directe consiste à rechercher les anomalies d'un gène responsables de la maladie ; l'approche indirecte consiste à repérer le(s) chromosome(s) associé(s) à la maladie à l'aide de marqueurs ADN, non pathogènes en eux-mêmes, situés à proximité ou, au mieux, dans le gène de la maladie (tableau 1) [29]. Cette approche implique obligatoirement d'étudier



un sujet atteint (appelé cas index). Elle est assortie d'un risque d'erreur lié notamment à la recombinaison possible entre un marqueur ADN et le gène. Elle est encore la seule possible pour un grand nombre de maladies, pour lesquelles la localisation du gène est connue, mais la séquence de celui-ci ou la pathologie moléculaire ne le sont pas, ou bien la pathologie moléculaire est complexe et l'approche directe lourde.

L'hétérogénéité des mécanismes moléculaires gouvernant les maladies génétiques définit autant de stratégies et d'approches moléculaires permettant d'identifier les anomalies génétiques responsables [46]. La très grande majorité des maladies se caractérise par une hétérogénéité allélique, c'est-à-dire qu'un grand nombre de mutations d'un même gène peuvent être responsables d'une maladie (mucoviscidose, myopathie de Duchenne). D'autres maladies encore sont associées à une hétérogénéité de locus, c'est-à-dire que plusieurs gènes peuvent être impliqués dans une même maladie (un seul gène par famille) (certaines myopathies, surdités, ou rétinites pigmentaires). La pratique des généticiens moléculaires requiert à la fois une compétence technologique et une compétence spécifique des maladies prises en charge dans le laboratoire (tableau 2).

Il existe une grande variété d'outils d'étude des anomalies génétiques. Ceux-ci peuvent s'appliquer à l'étude de l'ADN, présent dans toutes les cellules de l'organisme, donc dans les lymphocytes sanguins, ou à celle de l'ARN, dont l'accessibilité est limitée aux cellules des tissus où le gène est exprimé. Lorsque le gène s'exprime dans les lymphocytes sanguins ou dans d'autres cellules facilement accessibles, il peut être avantageux d'étudier l'ARN, qui contient une majeure partie de la séquence du gène où se trouvent les mutations, plutôt que l'ADN, en particulier pour certains grands gènes.

Parmi les méthodes de détection des mutations, on distingue celles fondées sur la recherche spécifique d'une ou plusieurs mutations connues (techniques de « criblage »), de celles dites de « balayage » (*scanning* en anglais), qui détectent n'importe quelle variation de séquence dans une séquence d'ADN ou d'ARN de quelques centaines de paires de bases, sans préjuger de leur localisation ni de leur nature [23]. Ce sont ces dernières qui permettent de déterminer le spectre des mutations les plus fréquentes responsables d'une maladie, et, de là, de définir et mettre au point les outils de criblage les mieux adaptés au diagnostic moléculaire, qui sont ainsi utilisés en première intention. Toutes les méthodes ont leurs limites et il ne serait pas judicieux de vouloir imposer une technologie particulière pour une application donnée, mais les laboratoires se doivent de parfaitement connaître les avantages et limites des tests qu'ils utilisent. De plus, les avantages et limites de certaines techniques sont à considérer selon les indications du test génétique. Certains aspects des techniques peuvent constituer, selon l'indication, un avantage ou un inconvénient.

tableau 1

Approches du diagnostic génotypique et leurs limites

Diagnostic direct	Diagnostic indirect
Principe	Principe
Identification de(s) allèle(s) morbide(s) par mise en évidence de la (des) lésion(s) responsable(s) de la maladie Seule approche possible dans certaines situations :	Identification de(s) allèle(s) morbide(s) par leur liaison à un (des) allèle(s) marqueur(s), en étudiant la cosegrégation, au sein de la famille, des allèles du (des) marqueur(s) avec la maladie Cas index indispensable dans la grande majorité des situations
<ul style="list-style-type: none"> ● absence de cas index (décédé ou absent) ● diagnostic incertain ● hétérogénéité génétique 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hétérogénéité génétique ● Informativité ● Néomutation, mosaïcisme germinal
Limites	Limites
<ul style="list-style-type: none"> ● Hétérogénéité moléculaire ● Anomalies plus ou moins connues ● Grand gène 	<ul style="list-style-type: none"> ● Recombinaison ● Fausse paternité
	Risques d'erreurs
	<ul style="list-style-type: none"> ● Recombinaison ● Fausse paternité

tableau 2

Quelques exemples de pathologie moléculaire de maladies

Maladies	Taille du gène*	Pathologie moléculaire
Drépanocytose	2 kb	1 mutation ponctuelle
Mucoviscidose	230 kb	> 1 000 mutations ponctuelles
Hémophilie A	186 kb	Micro-inversions intra-chromosomiques et mutations ponctuelles
Myopathie Duchenne	>2 000 kb	Délétions++, duplications et mutations ponctuelles
Amyotrophie spinale infantile de type 1	20 kb	Délétion partielle du gène SMN
X-fragile	38 kb	Amplification variable d'un triplet CCG
Chorée de Huntington	180 kb	Amplification variable d'un triplet CAG

* kb : kilobases

Techniques de « criblage » [23, 39]

Toutes sont appliquées à des fragments de gène amplifiés un nombre considérable de fois (PCR). Cette amplification, obtenue en quelques heures, permet de travailler à partir d'infimes quantités d'ADN.

On assiste à un développement, par les industriels, de trousse commerciales qui détectent les mutations les plus fréquentes et sont automatisées ou semi-automatisées. Ces trousse sont très simples à utiliser, et leur application semble bien standardisée. Leur utilisation génère un surcoût par rapport aux techniques « maison » en termes de réactifs, mais permet une économie en temps personnel. Les trousse qui existent sur le marché ne concernent que peu de maladies, pour lesquelles les demandes d'étude doivent être relativement nombreuses et le test relativement rentable, c'est-à-dire que le taux de couverture des mutations doit être important : c'est le cas pour la mucoviscidose, la β -

thalassémie, le déficit en alpha1-anti-trypsin et l'hypercholestérolémie familiale essentielle. De telles troupes se développent beaucoup plus dans les domaines de l'infectiologie et de la cancérologie que dans le domaine des maladies héréditaires graves de l'enfant.

La simplicité de l'utilisation des troupes commerciales a un revers : ces troupes deviennent à la portée du laboratoire qui n'a pas le savoir de la pathologie. Or l'utilisation de techniques appliquées à une pathologie requiert non seulement une maîtrise technique, mais également une connaissance de la pathologie clinique et de la pathologie moléculaire. Le dialogue avec le clinicien est à cet égard essentiel. En particulier, il faut savoir, en fonction des situations, interpréter un résultat négatif, ce d'autant que la facilité d'accès aux troupes commerciales risque d'entraîner une augmentation du nombre de demandes (c'est le cas pour la mucoviscidose). Faut-il arrêter les investigations génétiques ou, au contraire, faut-il poursuivre l'étude du même gène à la recherche de mutations plus rares, ou bien encore faut-il réorienter la recherche étiologique ?

Un inconvénient majeur de ces troupes est que les systèmes sont fermés ; l'utilisateur ignore la composition des réactifs. Aussi, il lui sera difficile de comprendre la cause d'un dysfonctionnement d'une analyse et de trouver le remède, à moins de disposer d'autres outils d'analyse du gène. C'est là que la notion de réseau entre les laboratoires et la reconnaissance de laboratoires de référence a toute son importance.

Techniques de balayage [39]

Appliquées également à des fragments de gènes amplifiés par PCR, elles restent encore le plus souvent des techniques « maison », dont la sensibilité varie selon les laboratoires. Ces méthodes se sont développées initialement dans le cadre de la recherche afin de pouvoir identifier des mutations nouvelles dans des gènes de maladies, que ce soit pour établir un spectre de mutations dans un gène de maladie, ou pour valider un gène candidat pour une maladie. Elles sont maintenant appliquées en routine dans certains laboratoires de diagnostic qui sont considérés comme des laboratoires de référence dans la mesure où, étudiant un gène de maladie de façon relativement « exhaustive », ils font plus que rechercher les anomalies les plus fréquentes, et peuvent ainsi prendre le relais d'autres laboratoires dans certaines situations. Les laboratoires préfèrent les techniques qui allient sensibilité, reproductibilité, innocuité, simplicité de mise en œuvre et possibilité d'étudier de nombreux échantillons à la fois. Le choix des méthodes pour le diagnostic dépend également du gène lui-même, de sa longueur, de sa structure et de ce que l'on connaît de la pathologie moléculaire. Encore une fois la tendance est à la simplification et à l'automatisation des procédures. Par exemple, l'électrophorèse en gels dénaturants (DGGE) est une méthode sensible et reproductible appréciée des laboratoires de

diagnostic qui en ont la maîtrise, mais n'est pas automatisable. Une autre méthode, la chromatographie à haute pression en conditions dénaturantes (DHPLC), apparaît prometteuse du fait de la simplicité de sa mise en œuvre et de son caractère semi-automatisé. La limite au développement de cette technique est le coût élevé de l'appareil (500 000 à 600 000 F). De fait, la simplification et l'automatisation des procédures imposent des équipements lourds et coûteux : séquenceur d'ADN, automate de préparation des réactions d'amplification de l'ADN, ce qui constitue un frein à l'évolution des laboratoires. Certaines entreprises privées offrent aux laboratoires de diagnostic et de recherche des prestations de séquençage de l'ADN, mais peu de laboratoires y ont recours.

Techniques de détection de remaniements géniques

La détection de tels remaniements (délétions, inversions, duplications de fragments de gènes ou de chromosomes) fait historiquement appel à la technique de « *Southern blot* », qui impose de travailler avec 10 à 20 fois plus d'ADN que la technique de PCR, ce qui constitue une difficulté pour le diagnostic prénatal par exemple, et impose un délai de rendu de résultats de 7 à 10 jours. Encore considérée comme une technique de référence que les laboratoires de diagnostic doivent continuer à maîtriser, elle est supplantée, d'une part par les techniques de PCR-longue, qui amplifient de très longs fragments d'ADN (10 à 30 kilobases), d'autre part par les techniques de PCR quantitative en « temps réel » qui permettent, en quelques heures, de déterminer le nombre de copies d'un gène chez un sujet donné, et de faire ainsi le diagnostic de délétion ou de duplication.

Nouvelles technologies

Les puces à ADN, dont le principe repose sur l'hybridation à un très grand nombre d'oligonucléotides immobilisés sur un support miniaturisé, permettent en particulier, dans le cadre du diagnostic moléculaire, de faire du séquençage d'ADN, ou de détecter simultanément un très grand nombre de mutations ponctuelles [8]. Cette technologie très puissante, susceptible de révolutionner la pratique des laboratoires de génétique moléculaire, est encore dans une phase de recherche et de développement, et reste pour l'instant hors de portée des moyens financiers des laboratoires publics de diagnostic.

Conclusion

Malgré une formidable évolution des connaissances en génétique et les considérables progrès technologiques des dernières années, la pratique de la génétique moléculaire repose toujours sur des techniques manuelles, non encore automatisées. Chaque maladie pose des problèmes spécifiques, aussi bien stratégiques que techniques. Cela requiert des praticiens une haute spécialisation et une capacité à s'adapter à des méthodes constamment évolutives. ■