

DIAGNOSTIC INDIRECT

DEMARCHE DIAGNOSTIQUE DANS LES MALADIES GENETIQUES

Démarche diagnostique dans les maladies génétiques

Consultation diagnostique

Interrogatoire et examen clinique

- Histoire de la maladie
- Arbre généalogique/mode de transmission
- Examen clinique ciblé
- Examen clinique général

Examens complémentaires

- Analyses biologiques selon le contexte
- Imagerie
- Examens ciblés selon orientation

Analyses génétiques

Diagnostic clinique

Diagnostic génétique

L'interrogatoire et l'examen clinique associés à des examens complémentaires, qui ne sont pas forcément génétique (biochimie, imagerie...), permettent d'aboutir à un diagnostic clinique. **Le but de l'analyse génétique va être de confirmer ou non ce diagnostic clinique.**

ANALYSE GÉNÉTIQUE

On peut faire des analyses de :

- cytogénétique (caryotype standard, FISH...);
- génétique moléculaire ;
 - soit par **diagnostic direct** : séquençage du gène et recherche de l'anomalie génétique primaire ; ce qui est de plus en plus fait à l'heure actuelle ;
 - soit par **diagnostic indirect** : en essayant de connaître le locus de l'anomalie et d'analyser son mode de ségrégation dans une famille par des haplotypes. Cette méthode a été utilisée pendant de nombreuses années quand on connaissait les gènes (on savait à peu près où ils étaient), mais on ne savait pas aller chercher directement la mutation dans le gène.

HAPLOTYPES

- Les haplotypes sont les arrangements linéaires ordonnées des allèles sur un chromosome, c'est-à-dire qu'on va s'intéresser à la position des allèles qui peuvent être des marqueurs et qui sont proches de l'allèle incriminé.
- Partant du principe que les allèles proches sont transmis ensemble (en bloc) sauf s'il y a une recombinaison méiotique entre 02 locus.

OBJECTIF DU DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE (DIRECT ET INDIRECT)

L'objectif du diagnostic moléculaire est d'établir un diagnostic précis par l'identification de l'anomalie génétique. Cela a un intérêt de certitude diagnostic pour permettre une prise en charge adaptée (les recommandations de certaines mutations ne sont pas les mêmes en terme de suivi) et un conseil génétique adéquat (risque d'être porteur, risque de récurrence...)

Il y a deux approches :

- diagnostic direct qui consiste en la recherche de l'anomalie génétique primaire permettant l'identification de mutations constitutionnelles délétères ;
- diagnostic indirect qui à l'aide de marqueurs informatifs (haplotype) va permettre d'étudier la coségrégation d'un phénotype avec un allèle particulier dans une famille.

Dans le diagnostic direct, on a donc **un individu** auquel on fait des analyses ; alors que dans le diagnostic indirect il faut disposer d'**une famille** suffisamment grande pour avoir des sujets sains et des sujets malades afin de savoir quel est l'haplotype qui ségrège avec la maladie.

DIAGNOSTIC INDIRECT

Actuellement, on utilise le diagnostic indirect dans certaines situations particulières (très restreintes) :

- diagnostic prénatal de certaines maladies
- et plutôt en complément de l'étude directe
- diagnostic pré-implantatoire : analyse d'une seule cellule afin de savoir si le fœtus a hérité ou pas du marqueur pathologique / haplotype morbide (faire du séquençage sur une cellule n'est pas possible en raison de la trop faible quantité d'ADN : analyse directe impossible dans ce cas).

La technique est aussi utilisée pour :

- vérification de l'identité d'un échantillon : par exemple, quand on réalise un diagnostic prénatal, cette technique permet de confirmer que le prélèvement réalisé est bien celui du fœtus et non celui de la mère par contamination (car le prélèvement peut être sanglant) ;
- empreintes génétiques ;
- autres applications.

Ce type d'analyse n'est réalisable que si l'on dispose des 3 éléments suivants :

1- des marqueurs polymorphes intragéniques et/ou flanquant le gène étudié, à forte hétérozygotie. Dans le cas de marqueurs flanquants, il est indispensable de connaître la distance génétique, voire physique qui les sépare du gène « maladie »;

2- des individus clés de la famille (sujets sains et atteints, conjoints) afin de pouvoir établir l'emplacement précis des marqueurs, sans ambiguïté;

3- de temps pour réunir les prélèvements de la famille, établir de façon aussi précise que possible leur statut (examens cliniques et biologiques), et obtenir une informativité suffisante au locus « maladie » (repérer les polymorphismes qui permettent de suivre la ségrégation de l'allèle muté).

L'utilisation de marqueurs pour analyser la coségrégation marqueur/maladie nécessite de :

- connaître la localisation du gène morbide : si on ne connaît pas le locus du gène, on ne peut aller trouver les marqueurs de polymorphisme qui vont l'entourer ;
- connaître des marqueurs polymorphes localisés à proximité ou dans le gène ;
- étudier la coségrégation familiale phénotype/marqueur : il faut que les marqueurs ségrègent toujours avec la maladie.

Tout cela permet donc de réaliser un suivi indirect de la transmission d'une mutation dans une famille.

Ainsi, pour chaque famille, l'étude va être différente.

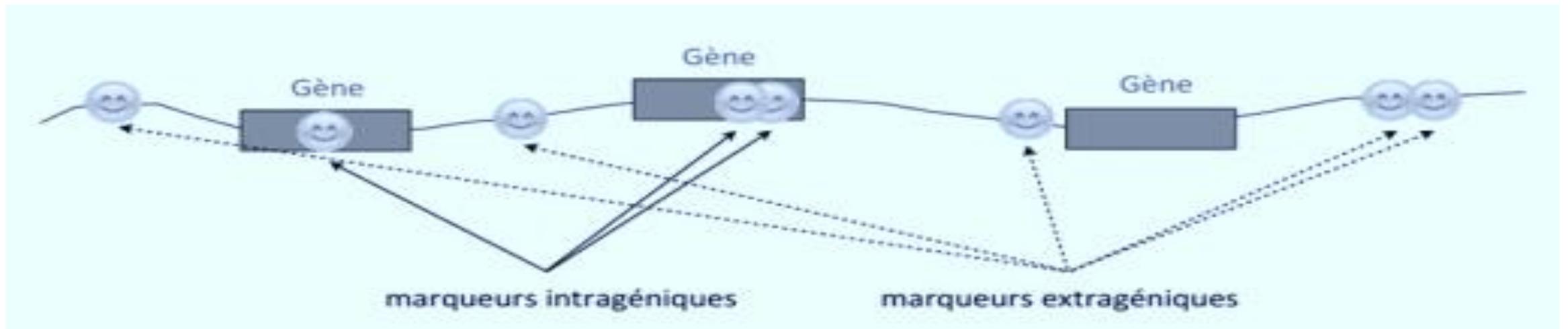
Principales contraintes :

- nécessite de connaître le gène impliqué (ou le locus) pour choisir les marqueurs à utiliser (le problème se pose s'il y a hétérogénéité génétique)
- nécessite une certitude du diagnostic clinique chez les sujets
- nécessite une étude familiale
- nécessite une famille suffisamment grande pour qu'elle soit « informative »
- risque d'erreur ou d'impossibilité de conclure en cas de recombinaison (ségrégation du marqueur d'un côté et la mutation de l'autre alors qu'il sont liés chez tous les autres individus).

LES ALLÈLES PROCHES SONT TRANSMIS ENSEMBLE (« EN BLOC »)
SAUF S'IL Y A UNE RECOMBINAISON MÉIOTIQUE ENTRE 2 LOCUS.

Principe

Il faut sélectionner des marqueurs à proximité du ou dans le gène/locus morbide impliqué (les marqueurs peuvent donc être intragéniques ou extragéniques).



Les marqueurs n'ont pas d'effet pathologique.

Il existe différents types de marqueurs :

- Microsatellites (ou Short Tandem Repeats : STR) : polymorphismes de répétitions, répartis uniformément dans le génome, tous les 25 à 100 kb. Ce sont ceux qui sont le plus utilisés car souvent mutlialléliques et non homozygotes pour ces régions.
- Single Nucleotide Polymorphism (SNP) : polymorphisme au niveau d'un nucléotide
 - très abondants (1 SNP/1 kb) : > 1,5 millions de SNPs connus
 - répartis uniformément dans le génome
 - bi-alléliques
- Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) : polymorphismes de restriction. Il s'agit de marqueurs de polymorphismes qui réagissent avec des enzymes de restriction.
- Autres : délétions, insertions...

Il faut retenir que la plupart du temps ce sont les microsatellites qui sont utilisés.

LES MARQUEURS MICROSATELLITES

- Le choix dans la région d'intérêt dépend du diagnostic clinique et des connaissances.
- On sélectionne les marqueurs de polymorphisme (marqueurs informatifs dans la famille) puis on procède à une amplification des régions par PCR de ces marqueurs ce qui permet d'obtenir des quantités suffisantes des séquences d'intérêt pour permettre leur détection.
- L'analyse des produits amplifiés permet ainsi la détection des allèles (taille des produits amplifiés) et la détermination du génotype.
- Ce sont des séquences d'ADN répétées en tandem d'un motif de 2 à 10 pb et dont la taille totale est inférieure à 100 pb.
- Ils sont très polymorphes et répartis uniformément sur l'ensemble du génome, principalement dans les séquences intergéniques et intragéniques (rarement dans les séquences codantes) et constituent d'excellents marqueurs génétiques.

gctgcatcgagtcCACACACACACACACACACACACAggtatctggcgtacactg

site polymorphe

Séquences uniques entourant le site polymorphe

On sépare les allèles en fonction de leur taille.

gctgcatcgagtcCACACACACACACACACACACACAggtatctggcgtacactg

allèle "12 répétitions"

gctgcatcgagtcCACACACACACACACACACACACACACACAggtatctggcgtacactg

allèle "15 répétitions"

On détermine le statut de chaque individu pour le marqueur étudié :

- 1 bande (ou 1 pic) si c'est un homozygote ;
- 2 bandes (ou 2 pics) si c'est un hétérozygote.

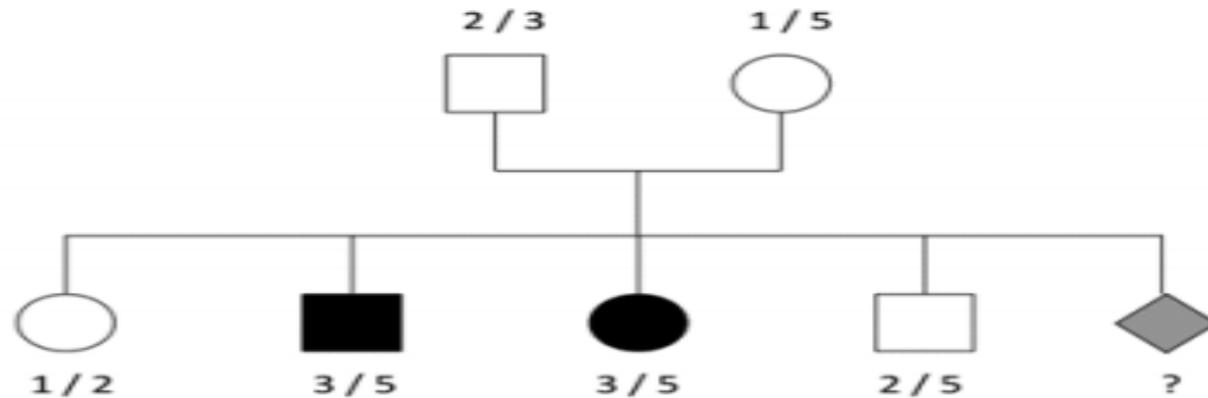
RESUME

- Il s'agit d'une étude au niveau de la liaison marqueurs-maladie avec utilisation de marqueurs polymorphes intragéniques ou extragéniques pour analyser la coségrégation d'un phénotype avec un allèle particulier dans une famille.
- Il repose sur des méthodes de PCR de marqueurs situés dans le / près du locus morbide (si possible) afin de minimiser les risques d'erreurs dus à des événements de recombinaison.
- Les marqueurs microsatellites sont vraiment des marqueurs de premier choix.

NOTION D'INFORMATIVITÉ

Il s'agit d'une maladie autosomique récessive.

Cas n° 1 : Quels allèles du marqueur sont liés au locus morbide ?



L'allèle « 3 » paternel et l'allèle « 5 » maternel sont liés au locus morbide.

Si on hérite de 3 et de 5, on est malade ; si on hérite ou de 3 ou de 5, on est hétérozygote.

Il y a coségrégation de ces allèles du marqueur avec les allèles mutés du gène.

Il est ici possible de conclure : la famille est dite « informative ».

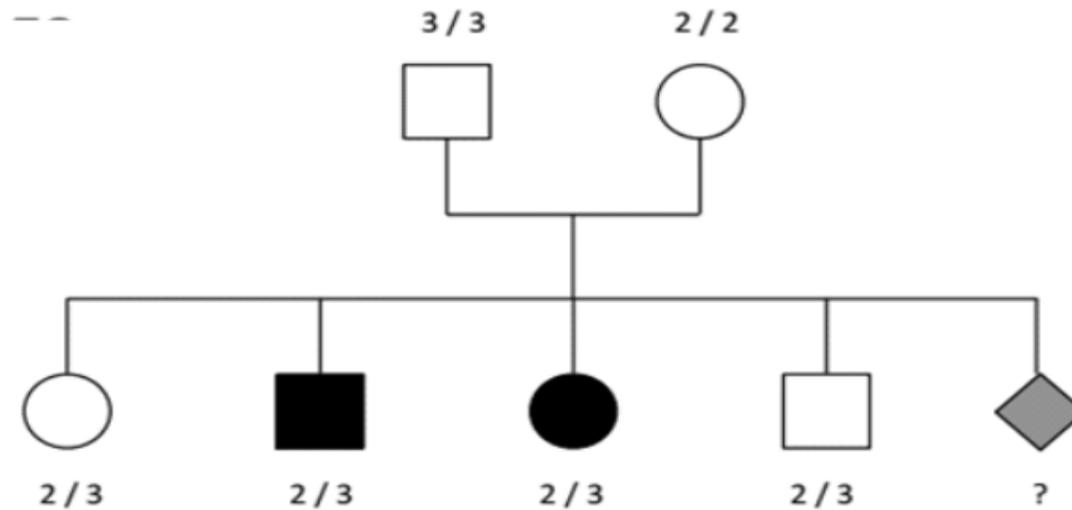
Quel est le statut du fœtus si son génotype est :

- 1/2 ? → sain ;
- 2/5 ? → sain mais porteur hétérozygote ;
- 1/3 ? → sain mais porteur hétérozygote ;
- 3/5 ? → atteint.

Chaque famille aura des marqueurs différents puisque les polymorphismes sont uniques pour chaque individu.

Cas n°2 : Quels allèles du marqueur sont liés au locus morbide ?

Ici les données ne permettent pas de distinguer quels allèles du marqueur sont liés aux allèles mutés du gène en cause.

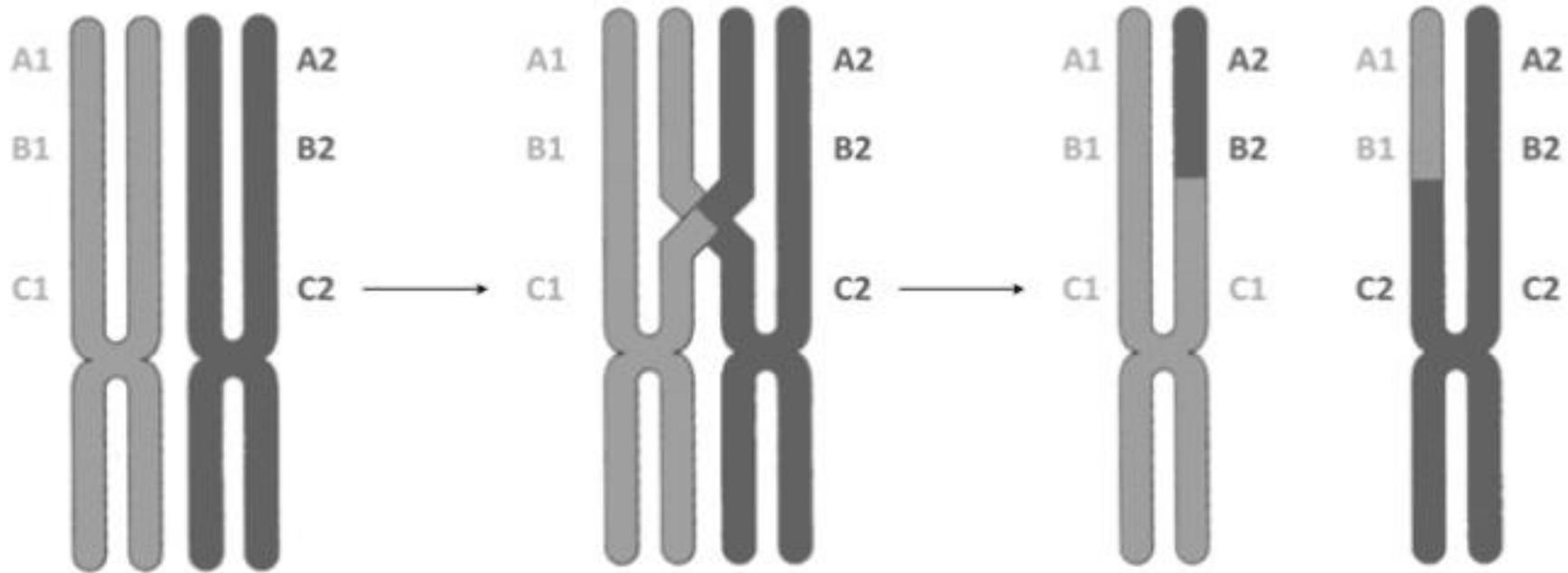


Le marqueur n'est pas informatif. Il n'est pas possible de conclure : la famille est dite « non informative ». Il faut poursuivre l'étude par l'analyse d'autres marqueurs.

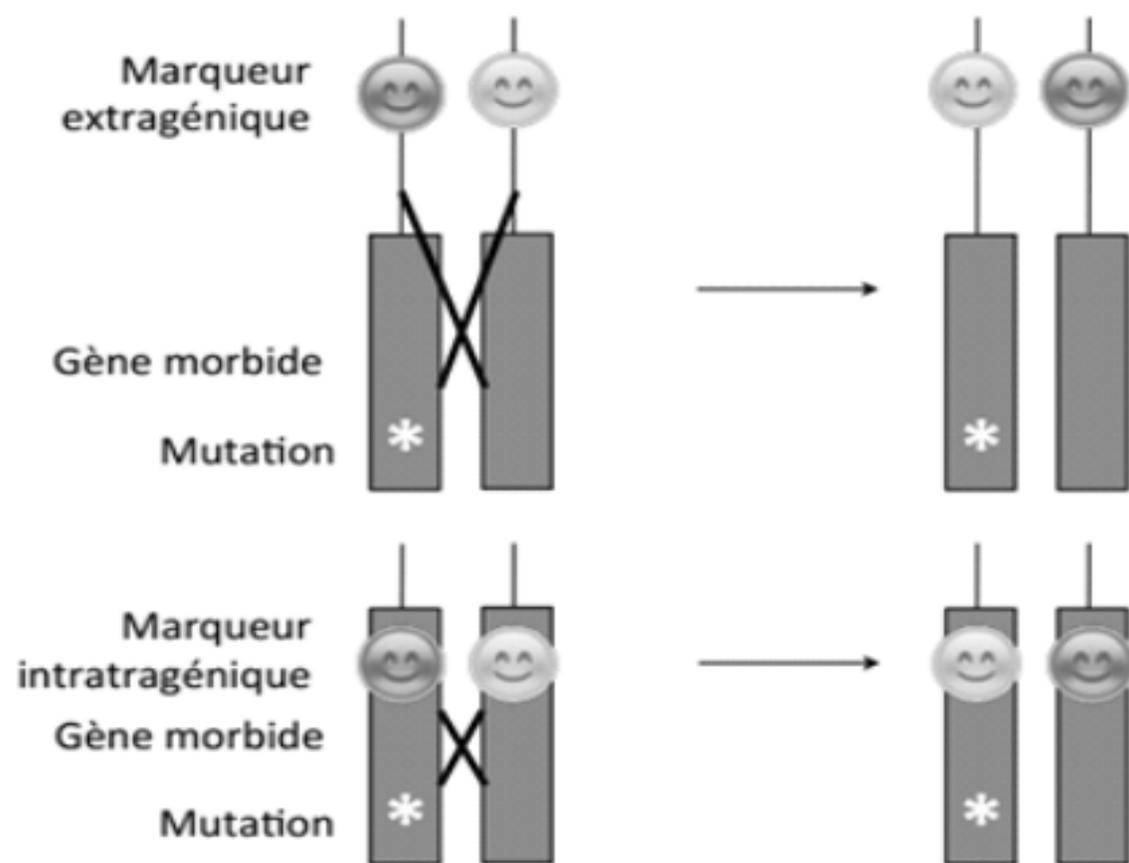
L'utilisation d'un grand nombre de marqueurs à un intérêt si la famille est non informative et réduit la possibilité de recombinaisons.

NOTIONS DE RECOMBINAISON

Pendant la méiose, les crossing-over provoquent l'échange de matériel génétique entre chromosomes homologues d'une même paire : il y a brassage génétique, échange de segments d'ADN avec l'autre chromosome de la paire et donc réarrangement du matériel génétique.



La recombinaison entre 2 loci dépend de la distance entre eux : 1 % (1 cM) = 1 Mb



S'il y a crossing-over, l'allèle (marqueur) « rouge » (gris foncé) n'est plus lié à l'allèle muté : il a donc un risque d'**erreur de conclusion**, que le marqueur soit intra ou extragénique ! Il y a toutefois moins de recombinaisons pour les marqueurs intragéniques : à utiliser de préférence !

Ce risque dépend de la **distance entre le marqueur et le gène** impliqué dans la maladie.

RESUME

- En pratique, on utilise simultanément plusieurs marqueurs de loci proches (on fait plusieurs marqueurs au sein d'un même locus global) ce qui permet de réduire les problèmes de non-informativité et de recombinaisons.
- Au lieu de déterminer les allèles d'un marqueur lié à l'allèle muté (...du gène impliqué dans la famille étudiée), nous allons déterminer les allèles de plusieurs marqueurs liés à l'allèle muté (haplotype lié à l'allèle muté)

CALCUL DE RISQUE

- Le diagnostic indirect comportant toujours un risque d'erreur, il est important de le chiffrer et de l'intégrer aux données cliniques et biologiques disponibles pour établir le risque que présente un individu d'être porteur de la mutation familiale.
- Ce risque dépend initialement du mode de transmission de la maladie (risque ou probabilité a priori).
- Il sera ensuite précisé en intégrant de façon séquentielle les données cliniques et biologiques, puis moléculaires (probabilités conditionnelles).
- Selon le théorème de Bayes, les probabilités a priori et conditionnelles peuvent être combinées pour obtenir une probabilité a posteriori.
- Le calcul de la probabilité est facilité grandement par l'utilisation du programme LINKAGE qui prendra en compte le risque a priori et les probabilités conditionnelles dont celle liée à l'analyse moléculaire.