

## ***Diagnostic indirect des maladies héréditaires***

### **1. Démarche diagnostique**

Dans la démarche diagnostique, il y a deux volets:

- ✓ La consultation diagnostique: *interrogatoire et examen clinique*
- On étudie l'histoire de la maladie
- Comme on est dans un contexte diagnostique, on dresse un arbre généalogique qui permet de définir éventuellement un mode de transmission.
- À partir des connaissances de la pathologie, on va pouvoir entreprendre un examen clinique ciblé.
- Examen clinique général.
  
- ✓ Les examens complémentaires
- Les analyses biologiques qui dépendent du contexte.
- Imagerie (IRM, Scanner ...)
- Des examens ciblés selon l'orientation entraînée par le diagnostic clinique.

Tous ces éléments permettent d'établir un **diagnostic clinique**. À la fin, on lance des analyses génétiques, qui permet de confirmer le diagnostic clinique par un **diagnostic génétique**.

### **2. Analyses génétiques**

Quand on veut faire des analyses génétiques, on pense à la **cytogénétique** :

- En première intention, on va faire un **caryotype constitutionnel standard**.
- Puis des examens un peu plus complets, comme du FISH.

Plus rarement, on va avoir besoin de la génétique moléculaire, où l'on différencie deux grandes parties:

- Le **diagnostic direct**: On recherche l'anomalie primaire dans le gène, on recherche donc la **mutation responsable** de la maladie.
- Le **diagnostic indirect**: On ne recherche pas l'anomalie, car soit le gène impliqué est inconnu, soit parce que la mutation n'a pas été identifiée, on utilise donc des **haplotypes**, et on fait une analyse de **ségrégation**: on suit un chromosome dans une famille. On doit avoir accès à différents membres de la famille (malades et sains) pour pouvoir identifier le chromosome qui ségrège avec la maladie et qui est donc porteur du gène muté.

### **3. Diagnostic moléculaire des maladies génétiques**

#### **3.1. Types de diagnostic moléculaire**

**Deux approches:**

- **Diagnostic direct**: Recherche de l'anomalie génétique primaire, avec l'**identification des mutations constitutionnelles délétères**.
- **Diagnostic indirect**: Utilisation de marqueurs informatifs (haplotypes: Arrangement linéaire ordonné des allèles sur un chromosome) avec la **coségrégation d'un phénotype avec un allèle particulier dans une famille**.

Le diagnostic indirect est actuellement utilisé surtout dans certaines situations particulières:

- **diagnostic prénatal** de certaines maladies (permet de savoir qu'on a des cellules de l'embryon, et pas de la mère)
- et plutôt en **complément** de l'étude directe
- **diagnostic pré-implantatoire** (pas la possibilité de séquencer tout le génome, car on a une trop petite quantité de cellules, et donc on identifie d'abord le chromosome qui ségrège avec la maladie)

La technique est aussi utilisée pour:

- la vérification de l'identité d'un échantillon
- les empreintes génétiques.....

## ***Diagnostic indirect des maladies héréditaires***

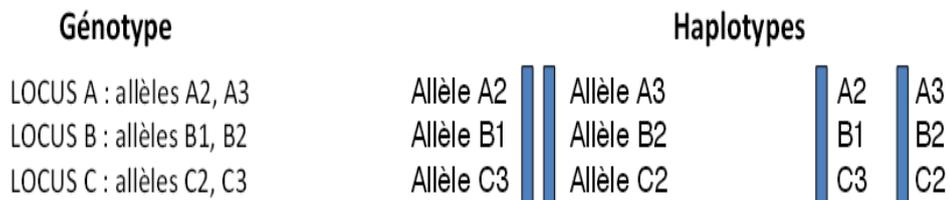
Pour cela, on utilise donc des **marqueurs** pour analyser la **coségrégation** marqueur/maladie. Il faut donc connaître la localisation du gène morbide ou au moins connaître le chromosome, les marqueurs **polymorphes** localisés à proximité ou dans le gène (il faut bien les choisir car s'il est trop loin, on peut se tromper à cause du crossing-over, en général, on prend en amont et en aval du gène étudié afin d'encadrer celui-ci avec des marqueurs microsatellites pour diminuer les erreurs).

✓ **Coségrégation familiale phénotype/marqueur.**

**C'est un suivi indirect de la transmission d'une mutation dans une famille.** On suit le marqueur qui se transmet en bloc avec le gène responsable de la maladie. On commence par le médecin, avec l'entretien, examen... qui fait penser à une maladie génétique, ce qui implique la famille, qui subit un examen indirect, et on crée un arbre généalogique avec chaque haplotype.

### **3.2. Principales contraintes du diagnostic indirect**

- 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, c'est-à-dire que plusieurs gènes sont responsables du même phénotype)
- Nécessite une certitude du diagnostic clinique chez les sujets
- Nécessite une étude familiale
- Nécessite une famille « informative »: parfois non concluant. Mais aussi un marqueur informatif, qui permet par exemple de différencier un chromosome d'origine paternelle ou maternelle.
- Risque d'erreur ou d'impossibilité de conclure en cas de recombinaison, pour cela, on encadre le gène avec des marqueurs microsatellites. Ce risque est dû au caractère indirect.



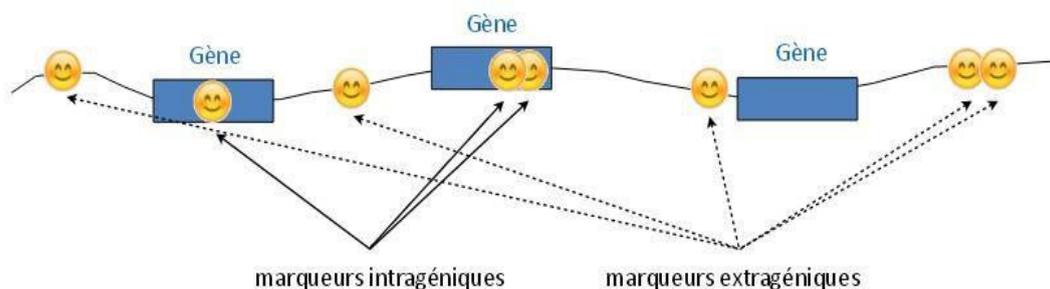
Les allèles proches sont transmis ensemble (« en bloc ») sauf s'il y a une recombinaison méiotique entre 2 locus.

### **3.3. Principe du diagnostic moléculaire indirect**

Les marqueurs génétiques « anonymes » peuvent être dans les introns, dans les exons, en aval ou en amont du gène, peu importe, l'important c'est que ce marqueur soit le **plus polymorphe possible** dans la population pour qu'il soit le plus **informatif**.

Le marqueur idéal doit être très **polymorphe**, distribué **partout** sur le génome, il ne doit avoir **aucun impact** sur le phénotype. Il faut connaître sa **localisation**. Il doit être le plus proche possible du gène ou du locus morbide impliqué.

On peut avoir des marqueurs **intragéniques** et **extragéniques**.



## Diagnostic indirect des maladies héréditaires

Les marqueurs n'ont **pas d'effet pathologique**. Les marqueurs sont utilisés pour suivre indirectement la transmission d'une mutation (connue ou non) dans une famille.

### 4. Types de marqueurs génétiques

#### a. Microsatellites (ou short tandem repeats/STR)

- Polymorphismes de **répétitions** (exemple: CACACACACA)
- Répartis **uniformément** dans le génome, tous les 25 à 100 kb
- **Multi-alléliques**
- **Les plus utilisés** pour le diagnostic indirect

#### b. Single Nucléotide Polymorphism (SNP)

- **Polymorphismes** au niveau d'un nucléotide
- **Très abondants** (1SNP/100 pb): plus de 1,5 millions de SNPs connus. Il y a donc une grande probabilité qu'on en trouve un à proximité de la mutation.
- Répartis **uniformément** dans le génome
- **Bi-alléliques**, il en faudra donc un grand nombre.

#### c. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

- Polymorphismes de restriction

**Autres:** délétions, insertions ...

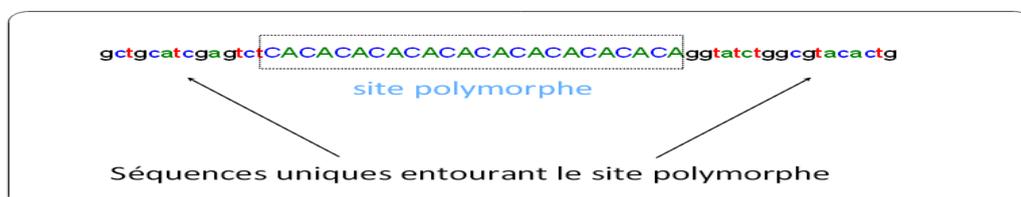
### 4.1. Marqueurs microsatellites

Le choix de la région d'intérêt dépend du diagnostic clinique et des connaissances. On sélectionne des marqueurs polymorphes de sorte à ce qu'ils soient des marqueurs informatifs dans la famille.  
L'amplification des régions par PCR permet d'obtenir des quantités suffisantes de séquences d'intérêt pour permettre leur détection (1 cellule contient environ 7 pg d'ADN, 3 milliards de pb).

L'analyse des produits amplifiés permet ainsi:

- la détection des allèles (taille des produits amplifiés)
- 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.



On sépare les allèles en fonction de leur taille.



### Diagnostic indirect des maladies héréditaires

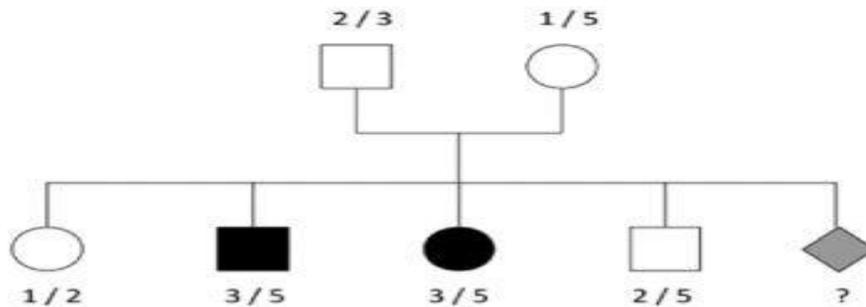
On détermine le statut de chaque individu pour le marqueur étudié:

- 1 bande (ou 1 pic) si c'est un homozygote.
- 2 bandes (ou 2 pics) si c'est un hétérozygote (*pour la plupart des individus*).

#### 5. Notion d'informativité

On va étudier deux cas de maladie autosomique récessive.

**Cas n° 1:** Allèles du marqueur 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 (asymptomatique).

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

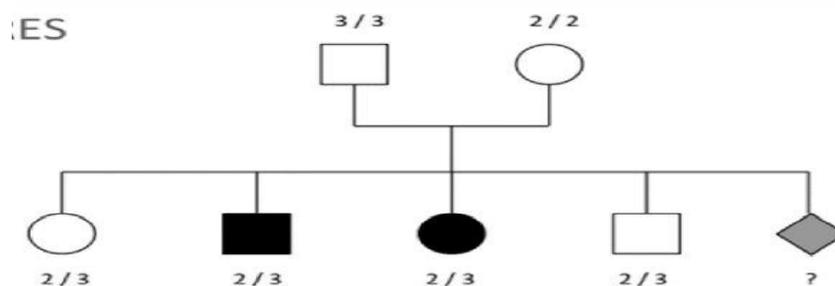
Il est ici possible de conclure: la famille est dite « informative ».

Le statut du fœtus si son génotype est:

- 1/2 → sain.
- 2/5 → sain mais porteur hétérozygote (porteur sain).
- 1/3 → sain mais porteur hétérozygote (porteur sain).
- 3/5 → atteint. Attention, ceci est vrai sauf s'il y a eu une recombinaison entre le marqueur et le locus morbide.

En pratique, on n'utilise jamais un seul marqueur.

**Cas n°2:** Allèles du marqueur liés au locus morbide



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 car il est incapable de dissocier les deux chromosomes du père et ceux de la mère. Il n'est pas possible de conclure: la famille est dite « non informative ».

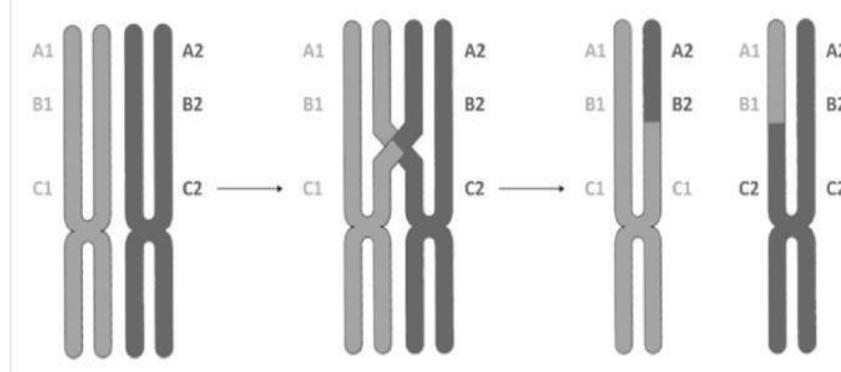
Il faut poursuivre l'étude avec d'autres marqueurs. L'utilisation d'un grand nombre de marqueurs à un intérêt si la famille est non informative et réduit la possibilité de recombinaisons.

## Diagnostic indirect des maladies héréditaires

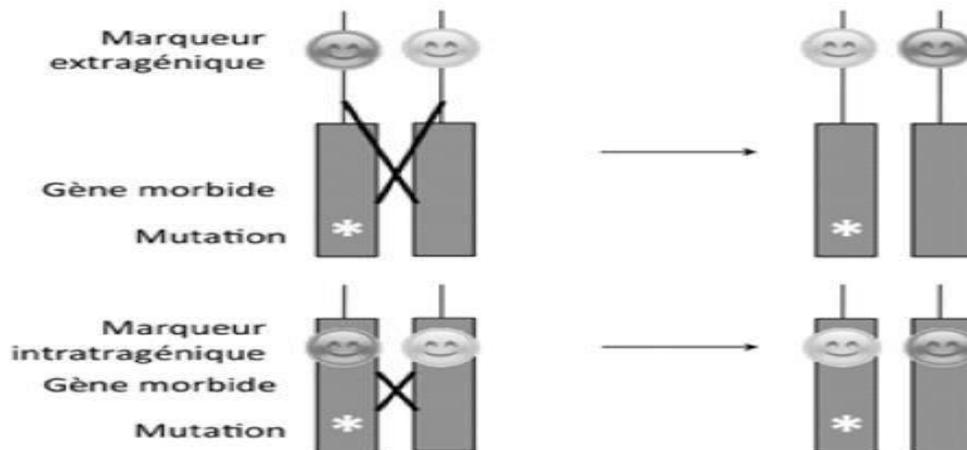
### 6. Notion de recombinaison

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. Le plus souvent ces recombinaisons sont équilibrées.

La recombinaison entre 2 locus dépend de la distance entre eux (1%: 1 Mb).



S'il y a crossing-over, l'allèle (marqueur) "gris foncé" n'est plus lié à l'allèle muté: il y 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, ils sont donc à utiliser de préférence. Ce risque dépend de la distance entre le marqueur et le gène impliqué dans la maladie.



### 7. 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.