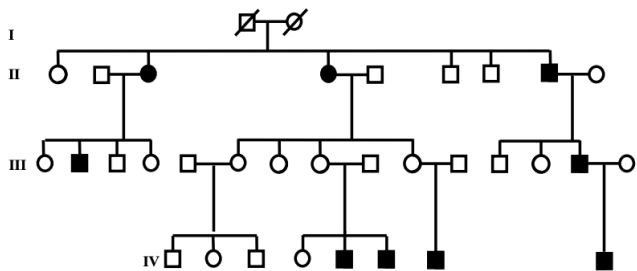
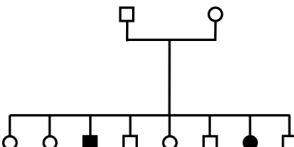
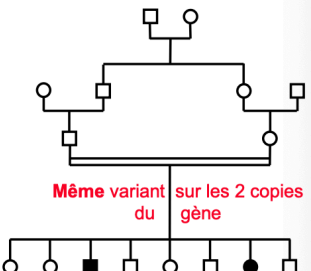
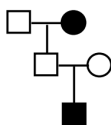


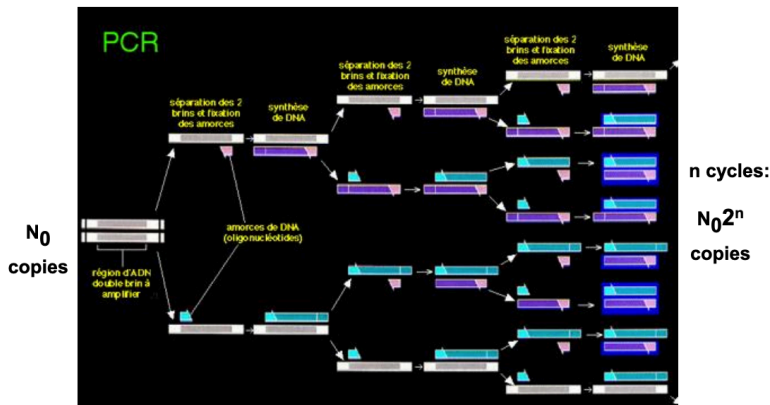
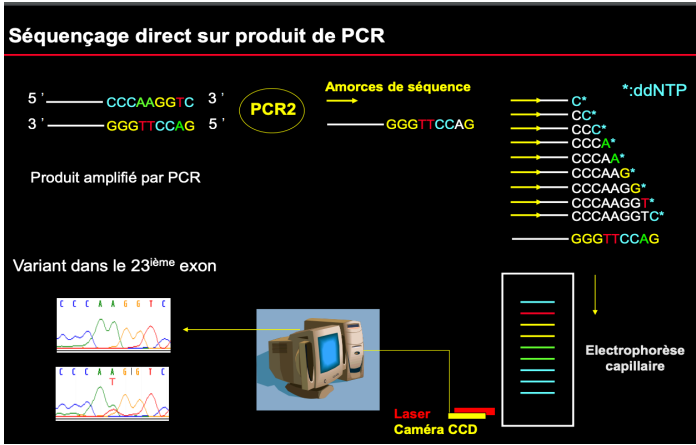
Indications et méthodes de l'analyse de l'ADN pour le diagnostic des maladies génétiques

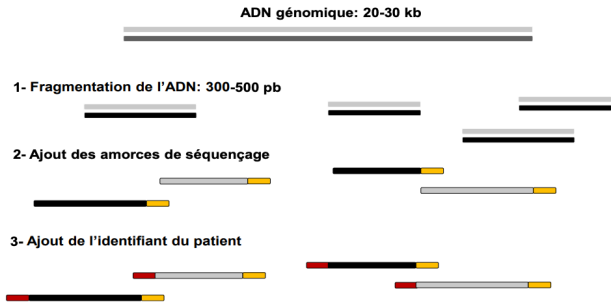
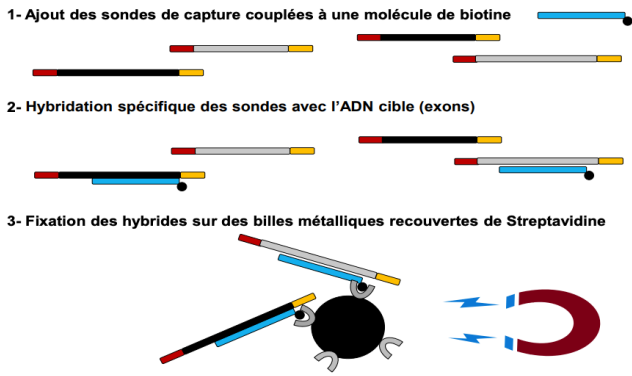
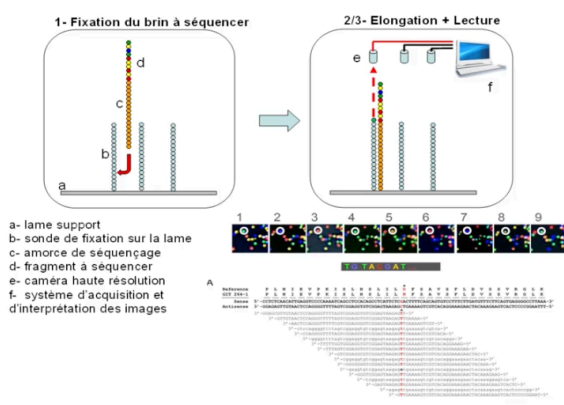
Pr Leguern

GÉNÉRALITÉS	
Diagnostic positif	➤ Le diagnostic positif : Recherche d'un variant pathologique chez un sujet atteint (permet de poser le diagnostic) - Confirmation du diagnostic (+++ en neurologie) - Formes de début, formes frustres - En vue d'un diagnostic prénatal, dans le cadre d'un conseil génétique
Conseil génétique	➤ Le conseil génétique : recherche d'hétérozygote pour les conjoints de porteur pour les maladies fréquentes (risque pour le couple d'avoir un enfant atteint)
Diagnostic prénatal	➤ Le diagnostic prénatal : maladie grave à début précoce - Mucoviscidose - Amyotrophie spinale - Myopathie de Duchenne...
Diagnostic pré symptomatique	➤ Le diagnostic pré symptomatique : maladie à révélation tardive. - Formes familiales de cancer (BRCA1 ; BRCA2) - Maladie de Huntington ; - Formes familiales de cardiopathies, ... (Les sujets veulent savoir s'ils sont porteurs de la mutation)
LE DIAGNOSTIC POSITIF	
La démarche du clinicien	➤ Définir le phénotype du cas index : - Éléments cliniques - Examens complémentaires - Évolution de la maladie. ➤ L'arbre généalogique : - Utiliser les symboles « officiels » - Mettre le nom et le prénom de tous les individus représentés - Leur date de naissance (ou l'âge) - Indiquer ceux qui ont eu un prélèvement (*) - Indiquer les personnes décédées. ➤ Le prélèvement de sang veineux doit être envoyé au laboratoire : - Après information au patient avec signature d'un consentement (+++) - Toujours accompagné d'une synthèse du dossier clinique - 7 à 10 ml de sang au moins de 48h à température ambiante
Quel est le mode de transmission ? 1 seul variant pathologique à identifier	➤ Autosomique dominant, dominant ou récessif lié à l'X - Neurofibromatose (AD) - Maladie de Marfan (AD) - Myopathie de Duchenne (RX) → pas de transmission père-fils  1 seul variant pathologique à identifier

Quel est le mode de transmission ? 2 variants pathologiques à identifier	➤ Autosomique récessif - Mucoviscidose - Phénylcétonurie - Déficit en 21-OH 2 variants pathologiques à identifier  Même variant du sur les 2 copies gène 
Le problème des cas isolés	Très fréquents en France : (pourquoi a-t-on un problème de cas isolés ?) - Fratrie de petite taille - Perte de la mémoire familiale - Pathologie cachée dans les familles  R → 0 AR  R = 0,50 AD  R = 0,50 Variant de novo  R = 0 Phénocopie - <u>AR</u> : autosomique récessive secondaire à la consanguinité. Donc, la probabilité que le VP soit transmis à la génération suivante est quasi nulle. - <u>AD</u> : R = 0,50 - <u>Variant de novo</u> : on a une mutation chez l'enfant, mais lorsque l'on prélève les parents, on s'aperçoit que le variant n'est ni chez le père ni chez la mère. Comme l'enfant est hétérozygote pour la mutation et qu'il est atteint, on a une transmission AD. Donc, 50% de chance de le donner à la génération suivante. - Toutefois, le risque peut aussi être égale à 0. En effet, certaines maladies ressemblent à des maladies génétiques mais ne le sont pas. C'est ce qu'on appelle des phénopies. (+++) (pour faire simple, vous prenez une mif où vous avez pleins d'individus atteints par la maladie, du genre épilepsie, et là vous avez un gosse qui présente un tableau clinique hyper similaire mais ce phénotype n'est pas dû au VP qui est dans la famille = bah ça c'est la phénocopie.)
Hétérogénéité génétique ?	➤ Quand une maladie génétique peut être due à des variants pathologiques dans des gènes différents NON : (alors 1 maladie = 1 gène) Mucoviscidose ; Myopathie de Duchenne ; Phénylcétonurie... ➤ 1 seul gène à analyser

Hétérogénéité génétique ?	➤ Hétérogénéité génétique ? OUI: Plusieurs gènes à analyser (délai des résultats) •Hémophilie (A et B), mais l'activité FVIII et FIX permet d'orienter l'étude; •Neurofibromatose; •Formes familiales de cancer du sein (BRCA1 et BRCA2); → Tous les gènes sont-ils connus ? NON → Quelle est la proportion de familles pour lesquels on trouve un variant pathologique dans les gènes connus? <i>(1 maladie = 2 gènes = hétérogénéité génétique. Le problème c'est peut-on identifier la mutation dans toutes les familles qui ont un cancer du sein familial ? Et bah non ... Il faut bien expliquer quand on prélève la patiente qui a un cancer du sein, qu'on va tester les 2 gènes qu'on connaît BRC1 et BRC2 (mais que ces 2 gènes ce n'est que 20% des familles de cancer du sein). Il ne faut pas qu'elle se dise « Ah bah oklm j'ai pas de VP dans BRC1 et BRC2 donc j'ai pas de cancer du sein »</i>
Hétérogénéité allélique ?	➤ Définition : quand une maladie génétique peut être due à des variants pathologiques différents du même gène ➤ NON : Drépanocytose : la mutation Q26V dans le gène de la B-globine (homogénéité allélique) ➤ 1 seul variant pathologique à rechercher ➤ Cette situation est rarissime
Hétérogénéité allélique ?	➤ Hétérogénéité allélique ? OUI - Mucoviscidose (1000 variants pathologiques différents) - Myopathie de Duchenne - Phénylcétonurie..... ➤ Tout ou partie du gène à explorer ➤ Variants pathologiques dans le gène du récepteur aux LDL
Les questions	➤ Quel est le type de variants pathologiques identifiés dans le gène ? - Variants ponctuels, Petite insertion/duplication dans la séquence codante : •Mucoviscidose •Drépanocytose •Phénylcétonurie.

	- Réarrangements génomiques : • <i>Myopathies de Duchenne</i> • <i>Charcot-Marie-Tooth 1A et neuropathie héréditaire</i> • <i>Neurofibromatose (NF1).</i> - Les variants instables : • <i>Maladie de Huntington</i> • <i>La maladie de Steinert</i> • <i>L'X fragile</i>
LES OUTILS MOLÉCULAIRES	
Généralités	- Aujourd'hui, la majorité des techniques d'identification de variants est basée Sur l'amplification in vitro ou polymerase chain reaction (PCR +++) - Ensuite, c'est le séquençage direct sur produits de PCR qui est utilisé majoritairement pour identifier les variants ponctuels et les petits réarrangements de la séquence codante et des segments adjacents (sites d'épissage) - Aujourd'hui se développent des techniques de séquençage haut débit, Next Generation Sequencing (NGS)
Le principe de la PCR	 Diagram illustrating the principle of PCR. It shows a double-stranded DNA template (N_0 copies) being heated to separate into two single strands. Primers (amorce de DNA) bind to the single strands, and DNA synthesis (synthèse de DNA) occurs using a polymerase. This process repeats for n cycles, resulting in $N_0 \cdot 2^n$ copies of the DNA.
Les 3 étapes de la PCR	- La dénaturation de l'ADN double brin à 95°C - L'hybridation du couple d'amorces (primers) sur chacun des brins d'ADN à une température fonction de la composition nucléotidique de l'amorce (entre 50 et 60°C) - L'élongation, c'est-à-dire la synthèse du brin complémentaire par la Taq polymérase à 72°C
Séquençage direct sur produit de PCR	 Diagram illustrating direct sequencing of PCR products. It shows a PCR product being amplified and then sequenced using a primer. The resulting fragments are separated by capillary electrophoresis, and the sequence is read using a laser and CCD camera. The diagram also shows a variant in the 23rd exon. 1- On fait une PCR classique. 2- Puis, on en refait une 2^e (PCR2). Puis électrophorèse Ça s'est bien quand on connaît la mutation.

LE NGS : ETAPE 1	La préparation des librairies ADN génomique: 20-30 kb  1- Fragmentation de l'ADN: 300-500 pb 2- Ajout des amorces de séquençage 3- Ajout de l'identifiant du patient 1-Fragmentation de l'ADN : 300-500 pb (grâce aux ultrasons, ou traitements enzymatiques) 2-Ajout des amorces de séquençage (en jaune) 3-Ajout de l'identification du patient (on mélange les librairies des patients, en rouge).
LE NGS : ETAPE 2	La Capture  1- Ajout des sondes de capture couplées à une molécule de biotine 2- Hybridation spécifique des sondes avec l'ADN cible (exons) 3- Fixation des hybrides sur des billes métalliques recouvertes de Streptavidine 1-Ajout des sondes de capture couplées à une molécule de biotine (en bleu) 2-Hybridation spécifique des sondes avec l'ADN cible (exons) 3-Fixation des hybrides sur des billes métalliques recouvertes de Streptavidine
LE NGS-ETAPE 3 : Le séquençage	LE NGS-Etape 3: Le séquençage  -La profondeur : nombre de fois qu'une séquence d'ADN donnée a été lue. -La couverture : % de la région d'intérêt qui a été lue au moins une fois.
Les possibilités du NGS	- Tester plusieurs dizaines de gènes dans un même « Panel ciblé de gènes » - Tester la séquence codante de tous les gènes du génome : « Exome » - Séquencer le génome d'un individu (exome + toutes séquences hors exons) - Détecter les variants ponctuels (+++) et les réarrangements génomiques (+)

Le variant est-il pathologique ?

➤ Arguments en faveur de la responsabilité d'un variant :

>> Ségrégation du variant : (avec la maladie)

- Ségrégation parfaite avec la maladie dans la famille
- Variant apparu de novo concomitamment au phénotype

>> Variant non retrouvé dans une population contrôle : le rechercher dans les bases de données sur les polymorphismes du génome humain (1000G, dbSNP, ExaC, GnomAD,...)

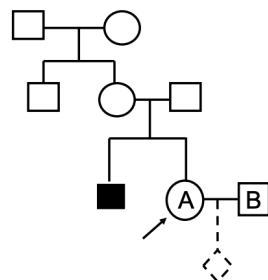
>> Type du variant : Codon stop prématuré

>> Résidu touché très conservé dans l'évolution

>> Tests fonctionnels.

LE CONSEIL GÉNÉTIQUE

Conseil génétique (1)



Le frère de Mme B est **homozygote pour $\Delta F508$** comme près de **50% des patients** en France. On la recherche donc chez Mme B

Mucoviscidose
Fréquence Malades: 1/2500
Fréquence Hétérozygotes: 1/25

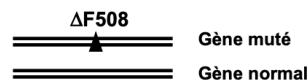
A, 24 ans est saine donc risque H: 2/3
B, sain, risque H: 1/25
(si pas de consanguinité)
Risque transmission à leur enfant: 1/4

Donc $2/3 \times 1/25 \times 1/4 = 1/150$

Mucoviscidose:

- **AR**: on cherche 2 variants;
- **Homogénéité génétique**: gène CF;
- **Hétérogénéité allélique**: oui
- **Type de variant pathologique**: ponctuel ou délétion de qq pb
- 1 variant pathologique (70%) $\Delta F508$ (délétion de 3bp)

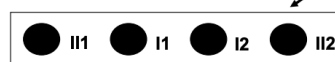
Conseil génétique (2) : ASO



1- Amplification des 2 copies par PCR

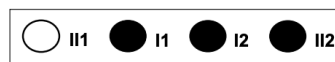
2- Dénaturation de l'ADN et dépôt sur une membrane:

3- Hybridation avec une sonde mutée



4- Déshybridation de la sonde mutée:

5-hybridation avec une sonde de séquence normale:

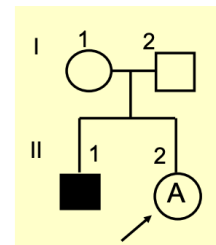


$\Delta F508 / \Delta F508$

$\Delta F508 / +$

$\Delta F508 / +$

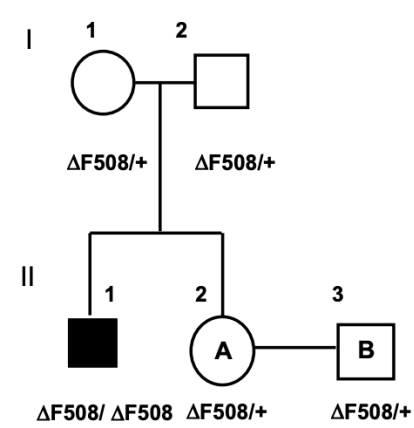
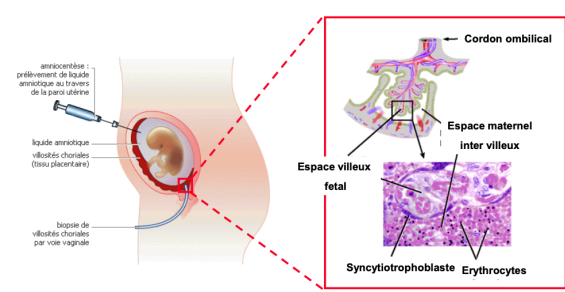
$\Delta F508 / +$

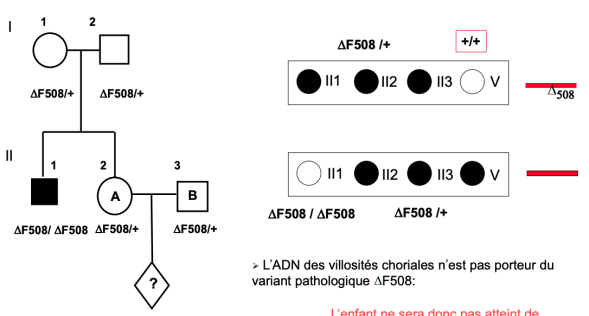
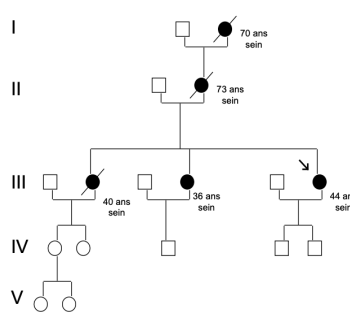


$\Delta F508$

● La sonde radiomarquée s'est hybridée avec l'ADN cible: il y a complémentarité parfaite

○ La sonde radiomarquée ne s'est pas hybridée avec l'ADN cible: il y a complémentarité imparfaite

Conseil génétique (3)	- Le risque de A pour sa descendance a été majoré par les résultats du test moléculaire : de 1/150 à 1/100 - Un test moléculaire a été pratiqué chez son Conjoint II.3: DF508/+ - Le risque d'avoir un enfant atteint pour le couple est 1/4 >> La demande d'un diagnostic prénatal est justifiée 
LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL	
Le contexte	➤ <u>Il est indispensable de connaître :</u> - Le(es) VARIANT(S) responsable(s) dans la famille - Le(s) porteur(s) dans le couple. ➤ Information lors d'1 (ou plusieurs) consultations de conseil génétique ➤ <u>Approbation par une commission multidisciplinaire :</u> - Maladie sévère en termes de pronostic vital et/ou fonctionnel - Pour laquelle il n'existe pas de traitement.
En pratique (1)	➤ <u>Prélèvement de villosités choriales :</u> - Entre 10-12 SA - Risque maternel faible (métrorragies, hémorragies intrapéritonéales, infection, Iso-immunisation Rh) ; - Risque fœtal 2-5% (avortement) - 10-20 mg de tissu. ➤ <u>Avant l'extraction d'ADN :</u> - Élimination de tout tissu maternel (dissection de la caduque) - Recherche d'une anomalie de nombre des chromosomes. ➤ <u>Extraction d'ADN :</u> - Durée : ½ journée ± 1 nuit - Quantité : 500 ng-5 µg - Utilisable pour toute technique (pb de quantité pour le Southern blot). 
En pratique (2)	➤ <u>Techniques PCR privilégiées :</u> - Demande peu d'ADN (50 ng) - Rapide < 7j ➤ <u>Recherche ciblée du (des) variant(s) pathologiques :</u> - Puisqu'il(s) est (sont) connus - Seulement une partie du gène est explorée (1 exon par exemple) ➤ <u>Confirmation de l'absence de contamination maternelle :</u> - Par analyse de marqueurs microsatellites - Il faut au moins avoir l'ADN de la mère+++

En pratique (3)	1- Prélèvement des villosités chorales 2- Extraction d'ADN 3- Analyses moléculaires de l'ADN : des villosités chorales, de la mère II.2, du père II.3, de témoins positifs pour chacune des mutations, de témoins négatifs 4- <u>Recherche ciblée de : $\Delta F508$ par technique ASO</u>  > L'ADN des villosités chorales n'est pas porteur du variant pathologique $\Delta F508$: L'enfant ne sera donc pas atteint de mucoviscidose
LE DIAGNOSTIC PRÉSYMPTOMATIQUE	
Le contexte	<u>Il est indispensable de connaître :</u> - Le(es) VARIANT(S) responsable(s) dans la famille - Le diagnostic moléculaire se pratique dans le cadre d'un protocole de diagnostic pré symptomatique - Chez sujet asymptomatique majeur à risque pour la maladie
Exemple du cancer du sein familial	 Cancer du sein familial: > AD: un seul variant à identifier > Hérédogénéité génétique: BRCA1 BRCA2 (15 à 20% des familles+++) > Hérédogénéité allélique: oui > Type de variant: ✓ Ponctuel ✓ Réarrangement génomique
En pratique	➤ Prélèvement effectué lors d'une consultation programmée dans le cadre d'un protocole de diagnostic pré symptomatique ➤ Le délai de rendu des résultats est fixé lors de la consultation de prélèvement : 1 mois p.e. (la date de la consultation est fixée) ➤ <u>Recherche ciblée du variant pathologique :</u> >> Car il est connu >> Seulement une partie du gène est explorée (1 exon par exemple) >> Analyse faite en duplicat (la stratégie dépend du laboratoire)
Prise en charge de femmes porteuses de variants pathologiques des gènes BRCA1 ou BRCA2	➤ <u>Diagnostic précoce</u> - Examen direct (2-3/an), mammographie annuelle à partir de 30 ans - Dépistage par IRM mammaire (1/an) ➤ <u>Chirurgie prophylactique</u> - Ovariennne : recommandée à partir de 35 ans - Mastectomie : à discuter ➤ <u>Chimio-prévention :</u> - Tamoxifène, proposé à partir de 50 ans (sur 5 ans)