

Emmanuelle GIRODON-BOULANDET, Catherine COSTA et Bruno COSTES*

Tests génétiques : intérêts et limites

RÉSUMÉ

Les tests génétiques, qui consistent à rechercher des mutations dans des gènes de maladies héréditaires, s'imposent comme des analyses biologiques à part et justifient d'un encadrement réglementaire strict et spécifique, compte-tenu des impacts sur la santé à long terme des personnes, des conséquences pour les membres de la famille et des implications éthiques. L'évolution des connaissances, liée au décryptage du génome humain, et les évolutions technologiques qui l'ont accompagnée conduisent aujourd'hui à une augmentation importante de la demande et de l'offre en matière de tests génétiques. Toutefois, le marché des trousseaux de recherche de mutations fréquentes ne concerne qu'un petit nombre de maladies héréditaires et les techniques de génétique moléculaire restent encore largement manuelles. Au-delà de la maîtrise technique, leur application à une pathologie donnée requiert une véritable connaissance de celle-ci au niveau clinique et moléculaire, chaque maladie posant en effet des problèmes spécifiques. L'organisation progressive des laboratoires en réseaux devrait à terme constituer une garantie de bonnes pratiques de l'utilisation des tests génétiques.

MOTS-CLÉS

Tests génétiques, génétique moléculaire, réseaux de laboratoires

Genetic tests : benefits and limits

SUMMARY

Genetic tests, which consist in seeking changes in genes of hereditary diseases, are apart from other biological analyses and profit from a strict and specific legal framing, taking into account impacts on long-term health, consequences for family members and ethical implications. Formidable evolution of knowledge, with the Human Genome Project completion, and considerable technological advances have resulted in an important increase in demand and offer of genetic tests. The market of kits for detection of frequent mutations relates to only few hereditary diseases and techniques of molecular genetics are still largely manual and not automated. Their applied use to a pathology requires technical skills and knowledge of clinical and molecular pathology, each disease rising specific problems. The organization of laboratories in networks should warrant good practices as regards to genetic tests.

KEYWORDS

Genetic tests, molecular genetics, network of laboratories

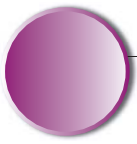
I - Introduction

Les tests génétiques ont une place tout à fait à part au sein des analyses biologiques. Leur pratique est de fait régie par des textes de loi spécifiques. Ils constituent le champ de la génétique moléculaire, reposant sur l'analyse des gènes responsables de maladies héréditaires et, plus largement, sur l'analyse du patrimoine génétique d'un individu, par les techniques d'étude de l'ADN ou de l'ARN. Même si les outils peuvent être communs à ceux utilisés en infectiologie pour analyser le génome de micro-organismes, ou bien en hématologie-cancérologie pour le diagnostic de certaines leucémies, la finalité des tests génétiques et l'encadrement des prati-

ques diffèrent. En effet, les caractéristiques génétiques d'un individu ne se modifient pas au cours du temps et leur étude est le plus souvent réalisée une fois pour toutes. C'est dire que le résultat d'un test génétique est fixé pour la vie. Par ailleurs, les résultats des tests génétiques ont des implications non seulement pour le diagnostic et la prise en charge de l'individu bénéficiant du test mais également pour les membres de sa famille.

Le domaine de la génétique moléculaire progresse aujourd'hui de façon permanente. Des évolutions fondamentales et technologiques comme le séquençage du génome humain, l'identification de nouveaux gènes, l'émergence et la montée en puissance de techniques d'étude innovantes, ont contribué à une augmentation significative de l'offre et

*Service de Biochimie et Génétique - Hôpital Henri Mondor - AP-HP, 51 Av., du Maréchal de Lattre de Tassigny - 94 010 Créteil Cedex
Tél. : 01 49 81 28 73 - Fax : 01 49 81 28 42 - E-mails : emmanuelle.girodon@creteil.inserm.fr - catherine.costa@creteil.inserm.fr - bruno.costes@creteil.inserm.fr



de la demande en matière de tests génétiques. La génétique moléculaire s'est initialement focalisée sur les maladies monogéniques graves de l'enfant avec des applications dans le domaine du diagnostic prénatal. Son champ d'investigation s'est élargi depuis quelques années aux maladies monogéniques de déclaration tardive chez l'adulte, comme par exemple la chorée de Huntington, et à l'oncogénétique (essentiellement cancers du colon et du sein). Plus récemment encore, ses domaines d'applications se sont ouverts aux maladies multifactorielles (hypertension artérielle, diabète) et à la personnalisation des traitements par l'étude des susceptibilités héréditaires impliquées dans les réponses aux médicaments ; on parle alors de pharmacogénomique. Ainsi, les tests ne s'effectuent plus seulement pour confirmer un diagnostic ou proposer un diagnostic prénatal aux parents d'un enfant malade mais pour prédire la survenue, ou définir un risque de survenue, d'une maladie à composante génétique. Quelle que soit la rapidité de l'évolution, celle-ci se heurte encore à des limites concrètes. Des limites qui se trouvent liées à la maîtrise des outils employés, à l'interprétation des résultats ou encore à la gestion clinique des informations obtenues. Ainsi, on ne dispose de tests fonctionnels permettant de démontrer le caractère pathogène d'une mutation identifiée chez un patient que pour un nombre toujours très restreint de maladies. Autre point important, cette discipline encore très jeune est marquée par une grande hétérogénéité au niveau des prises en charge génétiques, dans la prescription des examens, dans la démarche des laboratoires, voire dans l'interprétation des résultats. Cette situation tend toutefois à s'améliorer avec l'organisation progressive, en France, de réseaux de laboratoires, sous l'égide de l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire (ANPGM) et en relation avec les généticiens cliniciens. L'élaboration de guides de bonnes pratiques, la mise en place de contrôles de qualité européens et nationaux, l'adoption d'une démarche globale d'assurance qualité suivie par les laboratoires de génétique, sont autant d'éléments qui devraient garantir une certaine harmonisation dans la démarche de prise en charge des maladies génétiques. Le lecteur intéressé pourra consulter le compte-rendu d'un colloque tenu à l'Institut Pasteur les 26 et 27 janvier 2001 sur les enjeux des tests génétiques : « Du bon usage des diagnostics génétiques » (disponible en ligne à l'adresse <http://ist.inserm.fr/basisdiaggen/diaggen.html>).

II - Indications des tests génétiques

Les objectifs des tests sont variables selon les situations, les maladies et les gènes. On peut distinguer selon ces éléments cinq grandes catégories d'objectifs :

- 1) Poser, confirmer ou infirmer le diagnostic d'une maladie à caractère génétique chez une personne symptomatique.
- 2) Proposer aux couples présentant le risque de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie d'une « particulière gravité » un diagnostic prénatal ou un diagnostic préimplantatoire (1).
- 3) Identifier des anomalies génétiques chez des individus asymptomatiques, dans le but d'évaluer le risque de transmission d'une maladie génétique à leur descendance, soit du fait d'un antécédent familial (dépistage des hétérozygotes pour la mucoviscidose par exemple), soit du fait d'un programme de prévention en population générale pour une maladie relativement fréquente (dépistage des hétérozygotes pour la β -thalassémie dans certains pays du bassin méditerranéen).
- 4) Proposer un diagnostic pré-symptomatique pour des individus présentant un risque de développer :
 - une maladie génétique de révélation précoce, dans le cadre du dépistage néonatal systématique : par exemple, le diagnostic de la mucoviscidose chez les nouveau-nés avec une trypsinémie élevée, afin d'offrir une prise en charge précoce (2);
 - une maladie génétique de révélation tardive, comme la Chorée de Huntington (3);
 - un cancer lié à des mutations d'un gène de prédisposition (BRCA1 et BRCA2 pour le cancer du sein) (4).
- 5) Identifier des facteurs de risque génétiques prédisposant à la survenue de maladies multifactorielles dans un but de prévention (voir le cahier « Facteurs génétiques prédisposant à la thrombophilie » consultable en ligne à l'adresse <http://ist.inserm.fr/basisdiaggen/diaggen.html>) : prévention de la thrombose veineuse, réponse à un traitement pharmacologique (5), régime particulier pour les risques cardio-vasculaires.

Ainsi, les tests génétiques ont des applications de plus en plus larges : des maladies monogéniques, où la mutation d'une ou des deux copies d'un gène se révèle suffisante pour provoquer la maladie, aux maladies multifactorielles pour lesquelles l'interaction entre les gènes et les facteurs environnementaux n'est encore que très partiellement comprise, l'identification d'une mutation ne permettant que de prédire un risque de survenue d'une maladie. Cependant, même dans le cas des affections monogéniques, l'expression peut être très variable entre les individus atteints, cela au sein d'une même famille, démontrant ainsi l'influence d'autres facteurs génétiques et environnementaux. L'étude des gènes modificateurs de l'expression des maladies monogéniques constitue ainsi un nouveau champ des tests génétiques.

III - Encadrement et circuits des tests génétiques

En raison de la spécificité de la discipline, de ses impacts sur la santé à long terme des personnes, des conséquences pour les membres de la famille, des implications éthiques, sociales et économiques, du fait notamment de la crainte d'un usage détourné des données génétiques et d'un accès inapproprié par des tiers, la pratique des tests génétiques est encadrée par la loi de bioéthique du code de la santé publique (n°94-654 du 29 juillet 1994, révision n°2004-800 du 6 août 2004) et des décrets d'application, notamment le décret n°2000-570 du 23 juin 2000 (consultable en ligne à l'adresse www.legifrance.gouv.fr/).

1. Les analyses régies par ces textes

Elles comprennent trois types d'examens :

- les analyses de cytogénétique, ayant pour but de mettre en évidence des anomalies des chromosomes et comprenant l'établissement du caryotype ;
- les analyses de génétique moléculaire, y compris les analyses visant l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques ;
- les autres analyses de biologie médicale, définies par arrêté du ministre chargé de la santé après avis de l'Agence de la biomédecine, qui sont prescrites dans l'intention d'obtenir des informations équivalentes dans la détermination des caractéristiques génétiques d'une personne à celles obtenues par les analyses sus-mentionnées.

2. Autorisation des laboratoires et agréments des praticiens

Seuls les laboratoires d'analyse de biologie médicale ou situés dans des établissements publics de santé (sont exclus les laboratoires industriels et de recherche) peuvent être autorisés à pratiquer ces examens ; ils doivent disposer d'une structure des locaux et d'un équipement particuliers. Les praticiens, devant justifier de diplômes spécifiques et d'une expérience dans le domaine, obtiennent un agrément nominatif dans un laboratoire autorisé donné. Il existe deux types d'autorisation et d'agrément : pour la pratique du diagnostic prénatal d'une part, pour les « examens des caractéristiques génétiques des personnes » d'autre part, c'est-à-dire pour le diagnostic post-natal. Autorisations et agréments étaient jusqu'à présent délivrés par le ministère en charge de la santé. Les autorisations le seront bientôt par la direction de l'Agence Régionale de l'Hospitalisation, sur avis de l'Agence de la biomédecine, tandis que les agréments seront directement délivrés par l'Agence de la biomédecine. Autorisations et agréments sont délivrés pour cinq ans.

3. Conditions de prescription et de communication des résultats (voir encadré I)

1.1 - Prescription

Elle se fait dans le cadre d'une consultation de conseil génétique où des informations notamment sur l'intérêt et la portée des tests doivent être données.

Encadré I

Extraits du code de la santé publique (loi n°2004-800, décret n°2000-570, un nouveau décret est attendu).

- « Le consentement exprès de la personne doit être recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle a été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le consentement mentionne la finalité de l'examen. »
- « Le médecin consulté délivre une attestation certifiant qu'il a apporté à la personne concernée les informations définies [...] et qu'il en a recueilli le consentement dans les conditions prévues [...]. Cette attestation est remise au praticien agréé réalisant l'examen ; le double de celle-ci est versé au dossier médical de la personne concernée. »
- « Chez une personne asymptomatique mais présentant des antécédents familiaux, la prescription d'un examen des caractéristiques génétiques ne peut avoir lieu que dans le cadre d'une consultation médicale individuelle. [...] Cette consultation est effectuée par un médecin œuvrant au sein d'une équipe pluridisciplinaire rassemblant des compétences cliniques et génétiques. Cette équipe se dote d'un protocole type de prise en charge et se déclare au ministre chargé de la santé [...]. »
- « Lorsque l'examen est effectué sur un mineur, il ne peut être prescrit que si celui-ci peut personnellement en bénéficier dans sa prise en charge ou si des mesures préventives ou curatives peuvent être prises pour sa famille. »
- « Le compte-rendu d'analyse [...] commenté et signé par un praticien responsable agréé [...] doit être adressé exclusivement au praticien prescripteur des examens [...]. Le médecin prescripteur ne doit communiquer les résultats de l'examen [...] qu'à la personne concernée [...]. La communication des résultats doit se faire, dans le cadre d'une consultation médicale individuelle, sous une forme claire et appropriée. [...] La personne concernée peut refuser que les résultats [...] lui soient communiqués : dans ce cas, [...] le refus est consigné par écrit dans le dossier du malade. »
- « Lorsque l'examen requiert d'étudier les caractéristiques génétiques d'un ou plusieurs membres de la famille, il appartient à la personne concernée, sur les conseils du médecin prescripteur, d'obtenir le consentement de chacun d'eux. »
- « En cas de diagnostic d'une anomalie génétique grave, [...] le médecin informe la personne ou son représentant légal des risques que son silence ferait courir aux membres de sa famille potentiellement concernés dès lors que des mesures de prévention ou de soins peuvent être proposés à ceux-ci. [...] La personne concernée peut choisir d'informer sa famille par la procédure de l'information médicale à caractère familial. Elle indique alors au médecin le nom et l'adresse des membres de la famille dont elle dispose en précisant le lien de parenté qui les unit. Ces informations sont transmises par le médecin à l'Agence de la biomédecine qui informe, par l'intermédiaire d'un médecin, lesdits membres de l'existence d'une information médicale à caractère familial susceptible de les concerner et des modalités leur permettant d'y accéder. [...] Le fait pour le patient de ne pas transmettre l'information relative à son anomalie génétique [...] ne peut servir de fondement à une action en responsabilité à son encontre. »

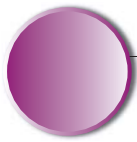


Tableau I

Quelques exemples de pathologie moléculaire de maladies. * kb : kilobases.

Maladies	Taille du gène*	Pathologie moléculaire
drépanocytose	2 kb	1 mutation ponctuelle
mucoviscidose	190 kb	> 1000 mutations ponctuelles
hémophilie A	186 kb	micro-inversions intra-chromosomiques et mutations ponctuelles
myopathie de Duchenne	>2000 kb	délétions, duplications et mutations ponctuelles
amyotrophie spinale infantile de type 1	20 kb	délétion partielle du gène SMN
syndrome de l'X-fragile	38 kb	amplification variable d'un triplet CGG
chorée de Huntington	180 kb	amplification variable d'un triplet CAG

- Le consentement du patient doit être recueilli par écrit.
- Le prescripteur doit transmettre au laboratoire une attestation d'information délivrée au patient et de recueil de consentement.
- Dans le cas d'une personne asymptomatique (famille d'un patient atteint d'une maladie récessive : mucoviscidose, myopathie de Duchenne, hémophilie, amyotrophie spinale) :
 - seul un médecin au sein d'une équipe pluridisciplinaire déclarée au ministère de la santé peut prescrire. Un médecin généraliste, un médecin spécialiste isolé ne peut prescrire dans ce cadre ;
 - la consultation médicale doit être individuelle.

1.2 - Communication des résultats

- Elle se fait au seul médecin prescripteur.
- Le laboratoire d'analyses médicales (LABM) transmettant les prélèvements ne peut être destinataire du résultat. Le LABM peut cependant être informé de la fin de l'étude pour la bonne tenue de ses dossiers.

IV - Approches, limites et outils

Les techniques de génétique moléculaire sont à l'origine issues des laboratoires de recherche et ont été ensuite progressivement transférées dans les laboratoires hospitaliers de diagnostic. Aujourd'hui, la grande majorité des tests génétiques est réalisée dans les laboratoires publics. Au niveau du secteur libéral, certains grands laboratoires exercent une activité qui reste limitée aux actes simples associés aux pathologies les plus fréquentes comme l'hémochromatose ou la mucoviscidose.

A l'origine, le développement des techniques a surtout été réalisé dans le domaine public. Toutefois, depuis un peu plus d'une quinzaine d'années, la diminution des crédits attribués au secteur public a contribué à réduire substantiellement les possibilités de recherche et c'est aujourd'hui dans des sociétés privées que sont conduits le plus de développements, utilisant de fait des équipements lourds.

On distingue classiquement deux approches de diagnostic génotypique (6, 7) :

- L'approche directe qui consiste, comme son nom l'indique, à rechercher les anomalies qui sont au niveau du gène directement responsables de la maladie.

- L'approche indirecte qui s'appuie sur l'identification du ou des chromosomes associé(s) à la maladie au moyen de marqueurs, séquences d'ADN non pathogènes en elles-mêmes, localisés à proximité ou idéalement dans le gène associé à la maladie. L'étude d'un sujet atteint, ou cas index, est dans ce cas obligatoire. Assortie d'un risque d'erreur, lié notamment à la recombinaison possible entre un marqueur et le gène, elle s'impose encore comme la seule approche envisageable dans différents types de cas : maladies impliquant un gène de localisation connue, mais pour lequel la séquence ou la pathologie moléculaire restent inconnues, pathologie moléculaire complexe rendant l'approche directe lourde à mettre en œuvre.

On dispose aujourd'hui en France de tests génétiques pour un grand nombre de maladies génétiques fréquentes. Nous invitons le lecteur intéressé par cette problématique, et plus globalement par les maladies rares, à consulter les serveurs d'information sur les maladies rares, Orphanet (www.orpha.net) et OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim). Toutefois, en dépit du séquençage complet du génome humain et du formidable potentiel d'investigation des outils de la bio-informatique, nombreuses sont encore les maladies génétiques rares pour lesquelles aucun test n'est encore disponible.

Les stratégies et approches moléculaires permettant d'identifier des anomalies génétiques montrent une diversité découlant directement de l'hétérogénéité des mécanismes moléculaires qui gouvernent les maladies génétiques (*tableau I*) (8). La plupart des maladies, comme par exemple la mucoviscidose et la myopathie de Duchenne, sont caractérisées par un grand nombre de mutations au sein d'un seul et même gène, on parle alors d'hétérogénéité allélique. Par ailleurs, plusieurs gènes peuvent être en cause pour une même maladie : on parle d'hétérogénéité de locus, comme pour certaines myopathies ou surdités. Ainsi, la pratique des généticiens moléculaires requiert une compétence à la fois technique et spécifique de la maladie pour en assurer la prise en charge adéquate au niveau du laboratoire.

Le praticien dispose aujourd'hui d'une vaste batterie d'outils dédiée à l'étude des anomalies génétiques. Ces techniques peuvent s'appliquer à l'ADN ou à l'ARN, ce dernier n'étant bien évidemment « disponible » que dans les tissus où le gène est exprimé. Il est parfois plus pertinent, notamment lorsque l'étude porte sur de grands gènes, de réali-

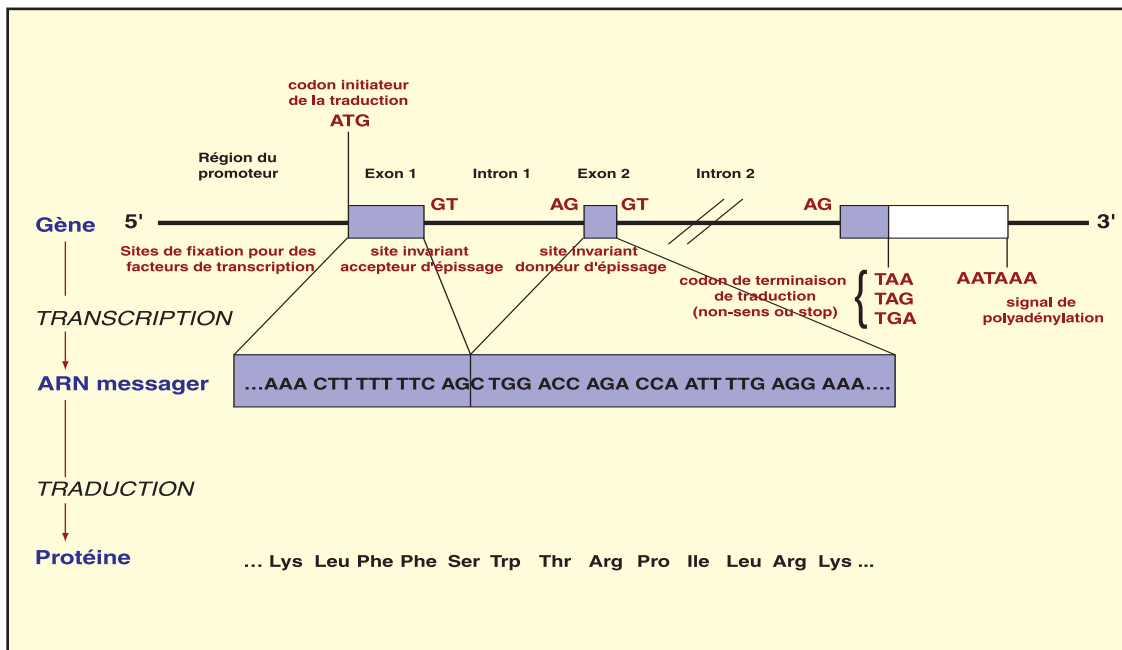


Figure 1
Structure d'un gène
et de ses produits.

ser les tests sur l'ARN, comprenant les séquences codantes constituées des exons et où se trouvent la majorité des mutations ponctuelles (figure 1).

Les méthodes de détection des mutations peuvent être scindées en deux sous-ensembles (6) :

- des techniques de détection ciblée fondées sur la recherche spécifique d'une ou plusieurs mutations connues ;
- des techniques permettant de détecter 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 ou de leur nature, elles sont communément appelées techniques de balayage.

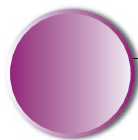
Les techniques de balayage présentent un intérêt majeur, elles permettent de définir le spectre de l'ensemble des mutations responsables d'une maladie, un résultat exploité pour mettre au point des tests spécifiquement adaptés au diagnostic moléculaire ciblé et qui seront utilisés en première intention.

Toutes les méthodes ont leurs limites et les laboratoires se doivent de parfaitement connaître les possibilités et les écueils des tests qu'ils mettent en œuvre. Cela doit être considéré en fonction de l'indication du test. Le lecteur intéressé par ces différents aspects trouvera plusieurs ouvrages consacrés aux outils de génétique moléculaire, à leurs principes, leurs applications et leurs limites (5-7, 9, 10). A titre d'exemple, le Tableau II illustre la diversité des outils utilisés pour le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose.

1. Techniques de détection ciblée (5, 10)

L'ensemble de ces techniques est appliqué à des fragments de gène amplifiés par PCR. L'offre industrielle s'est développée depuis quelques années et se concrétise aujourd'hui par la commercialisation de trousse – impérativement marquées CE

pour l'emploi en diagnostic - de détection automatisée ou semi-automatisée des mutations les plus fréquentes. La facilité d'utilisation de ces trousse place le geste technique à la portée de laboratoires non spécialisés. Cette « vulgarisation » n'est toutefois que très relative et doit être considérée avec prudence car, comme il a été déjà évoqué précédemment, une pratique avisée de ces tests doit intégrer une véritable connaissance de la pathologie clinique et de la pathologie moléculaire. Le dialogue avec le clinicien se révèle fondamental. L'interprétation d'un résultat négatif devra être menée en fonction des spécificités de chaque situation, d'autant que la facilité d'accès aux trousse commerciales entraîne une augmentation du nombre de demandes, c'est notamment vrai dans le cas de la mucoviscidose (11). De fait, l'interprétation de ce type de résultat soulève de véritables problématiques : doit-on arrêter les investigations génétiques, continuer l'étude en la recentrant sur des mutations plus rares ou encore est-il nécessaire de réorienter la recherche étiologique...? Autre inconvénient majeur, ces trousse exploitent des systèmes brevetés. La composition en réactifs n'est pas connue de l'utilisateur, une inconnue qui peut rendre la compréhension et la résolution du dysfonctionnement d'une analyse difficile, à moins de disposer d'autres outils d'analyse du gène. Ces difficultés illustrent toute l'importance des guides de bonne pratique et l'importance d'organiser les laboratoires en réseau avec la reconnaissance de laboratoires de référence. Aujourd'hui les trousse disponibles concernent un nombre faible de maladies héréditaires, pour lesquelles les demandes d'étude doivent être nombreuses et le test relativement sensible, c'est-à-dire que le taux de détection des mutations doit être important ; c'est notamment le cas pour la mucoviscidose, la bêta-thalassémie, le syndrome de l'X-fragile, le déficit en alpha1-anti-trypsine et l'hypercholestérolémie



		Mutations détectées	Sensibilité*	Avantages	Limites
Méthodes de détection ciblée des mutations	Analyse d'hétéroduplex (molécules double-brin présentant un mésappariement)	principalement F508del et I507del autres microinsertions/deletions		simple et rapide	profil de migration non spécifique d'une mutation
	Digestion par enzymes de restriction	en fonction de la séquence		simple et rapide	non spécifique (deux mutations voisines peuvent abolir le même site de restriction: G551D et R553X abolissent le même site de coupure HincII)
	Hybridation à des oligonucléotides spécifiques d'allèles (ASO)	trousse INNO-LiPA CFTR (Innogenetics) : 36 mutations	85%	rapide, plusieurs mutations à la fois automatisable avec un auto-laveur	
	amplification spécifique d'allèles (ARMS)	trousse Elucigen CF30 (Tepnel) : 30 mutations		rapide, plusieurs mutations à la fois	non distinction des homozygotes et des hétérozygotes (sauf pour F508del) pour la version actuellement utilisée en dépistage néonatal
	Ligation d'oligonucléotides (OLA)	trousse CF Assay (Abbott) : 33 mutations		rapide, plusieurs mutations à la fois	nécessite l'utilisation d'un séquenceur d'ADN
Méthodes de balayage	Electrophorèse en gradient d'agents dénaturants (DGGE)	toute mutation localisée dans les régions codantes et les bornes introniques	95%	sensible	mise au point difficile pas d'automatisation possible
	Chromatographie à haute pression en phase liquide et en conditions dénaturantes (DHPLC)		95%	rapide, semi-automatisée	séquençage systématique dans les régions très polymorphes appareil coûteux
	Analyse de la conformation de l'ADN simple-brin (SSCP)		80 - 90%	simple et rapide	sensibilité limitée
	Séquençage		95 - 100%	sensible	coûteux si utilisé en première intention
Recherche de remaniements	PCR multiplex fluorescente semi-quantitative	toute délétion, insertion, duplication	1-2%	simple et rapide	sensible à la méthode d'extraction duplications difficiles à détecter

Tableau II
Méthodes de détection des mutations du gène CFTR, impliqué dans la mucoviscidose. * taux de détection des mutations dans la population française. En mauve clair figurent les méthodes couramment utilisées par les laboratoires de diagnostic.

familiale essentielle. Les offres sont, en revanche, nombreuses dans les domaines de la prédisposition à la thrombose, de l'immunologie (typage HLA), de l'infectiologie et de la cancérologie.

2. Techniques de balayage et séquençage (5, 10)

Développées initialement en recherche dans le but d'identifier des mutations nouvelles dans des gènes afin d'établir un spectre de mutations ou bien pour valider un gène candidat pour une maladie, elles sont largement employées dans les laboratoires de diagnostic. Les recherches sont réalisées une fois encore sur des fragments de séquence amplifiés. La plupart des techniques résultent de développe-

ment « maison » et présentent une sensibilité variable en fonction du savoir-faire des laboratoires et des gènes étudiés. Idéalement, ces techniques doivent associer sensibilité, reproductibilité, innocuité, simplicité de mise en oeuvre et se prêter à l'étude simultanée de nombreux échantillons. La nature du gène étudié, sa longueur et sa structure, ainsi que le niveau de connaissance de la pathologie moléculaire associée sont également des facteurs essentiels pour le choix des techniques. On privilégie aujourd'hui celles présentant les procédures les plus simples et les plus automatisables. Signe de cette évolution, l'électrophorèse en gels dénaturants (DGGE), une technique sensible et reproductible appréciée par les laboratoires qui

en ont la maîtrise, a été peu à peu remplacée par la chromatographie liquide à haute pression en conditions dénaturantes (DHPLC).

Ces techniques offrent la possibilité de repérer une variation de séquence dans une région donnée du gène. Ensuite un séquençage ciblé de la région identifiée permet de caractériser la variation et de déterminer s'il s'agit d'une mutation délétère ou d'un polymorphisme sans conséquence pathologique. Certains laboratoires utilisent le séquençage direct sans technique préalable de repérage. La puissance de l'automatisation a toutefois un coût substantiel et l'investissement à réaliser dans l'ensemble des équipements nécessaires, automate de préparation des amplifications ou séquenceur d'ADN, constitue un frein majeur au développement de ces techniques dans un environnement hospitalier assujéti à la pression économique et aux priorités d'affectation des crédits.

Dans un certain nombre de situations, l'identification d'une variation de séquence dans un gène ne permet pas de répondre à la question posée, parce que le caractère délétère ou neutre de cette variation n'est pas clair et ne peut être démontré que par des études fonctionnelles laborieuses réalisées dans des laboratoires de recherche. Ces difficultés ne se posent pas pour les méthodes de criblage, parce que les mutations à détecter sont connues, mais sont quotidiennes pour les laboratoires qui utilisent les méthodes de balayage. C'est le cas en particulier des mutations faux-sens qui ont pour conséquence la substitution d'un acide aminé en un autre dans la protéine. Selon la localisation dans la protéine et le changement d'acide aminé, une mutation faux-sens pourra correspondre à un variant protéique fonctionnel ou à une protéine non fonctionnelle. A titre d'exemple, dans les cas de suspicion de mucoviscidose chez un fœtus sur signe d'appel échographique, la recherche de mutations a pour but de confirmer le diagnostic et de discuter une interruption médicale de grossesse. L'incertitude concernant le caractère délétère d'une mutation, et donc quant au diagnostic, est difficile à vivre pour les parents et toute l'équipe médicale.

3. Techniques de détection de remaniements géniques (5)

La détection de délétions, d'inversions, de duplications de fragments de gènes ou de gènes, qui peut encore s'appuyer sur la technique longue et laborieuse de transfert d'ADN mise au point en 1975 par Edwin Southern, le Southern Blot, a récemment bénéficié du développement de techniques de PCR quantitative en temps réel ou de PCR semi-quantitative multiplex. La sensibilité de ces techniques vis-à-vis de la détection de remaniements à l'état hétérozygote et leur relative simplicité ont contribué à rendre accessible le diagnostic de maladies où les grandes délétions sont fréquentes, comme le diagnostic des conductrices de la myopathie de Duchenne, le diagnostic des porteurs sains de l'amyotrophie spinale infantile, le diagnostic mo-

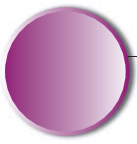
léculaire de la neurofibromatose, du rétinoblastome, du cancer du sein héréditaire, ou de la mucoviscidose. A plus grande échelle, les techniques de cytogénétique moléculaire comme l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) ou la technique d'hybridation génomique comparative (CGH arrays) permettent de détecter des segments chromosomiques sièges de délétions, de duplications ou d'amplifications. Leur application concerne cependant essentiellement la détection des aberrations chromosomiques constitutionnelles ou acquises (notamment en cancérologie).

4. De nouvelles technologies (5)

L'évolution technologique a aujourd'hui pour objectif l'automatisation et le développement à haut débit des analyses. La miniaturisation et le multiplexage, consistant à effectuer plusieurs analyses en une seule étape et en un seul tube, permettent de générer un grand nombre de données en un minimum de temps, en quelques jours au lieu de quelques semaines avec des techniques classiques. Ces technologies sont onéreuses car elles nécessitent un investissement important en équipement, mais elles deviennent intéressantes en terme de coût, rapportées à l'unité de test, dès lors que la demande est importante et que les analyses sont réellement effectuées à haut débit. Cela pourrait être le cas de programmes de dépistage de population, par exemple le dépistage néonatal de la mucoviscidose, les tests génétiques concernant environ 5000 nouveau-nés par an, ou le dépistage prénatal ou pré-conceptionnel des couples à risque pour la mucoviscidose, effectué dans quelques pays (Danemark, Etats-Unis). Les puces à ADN, qui permettent de réaliser plusieurs milliers d'hybridations en parallèle sur un support, offrent la possibilité de détecter simultanément un très grand nombre de mutations ponctuelles ou d'effectuer le séquençage d'ADN (pour un descriptif succinct de la technologie des puces à ADN voir notamment www.genopole.org/html/fr/connaître/cite/outils/puces.htm). Très employées en recherche, ces technologies sont encore dans une phase de développement dans le cadre d'applications diagnostiques.

Une autre application des puces à ADN consiste à étudier l'expression des gènes. Ciblées sur quelques gènes ou sur l'ensemble du génome, ces puces permettent de quantifier l'expression des gènes dans un type cellulaire ou un organe. Ce dernier type d'application reste pour l'instant cantonné au domaine de la recherche, avec un développement essentiellement en oncologie. Quant à la PCR en temps réel, elle a constitué une avancée majeure dans le diagnostic moléculaire. En effet, réaction et détection sont réalisées en tubes fermés et en une même étape, ce qui permet un important gain de temps, et garantit par ailleurs un risque minimal d'erreurs du fait du nombre limité d'interventions humaines. Cette technique utilise des marqueurs ou des sondes fluorescentes dont la chimie évolue constamment de façon à pouvoir offrir un plus grand débit d'analyses grâce au multiplexage, débit également accru par le développement par les industriels d'automates de plus en plus puissants.

Une nouvelle méthode d'étude originale des mutations



ciblées, basée sur la combinaison de plusieurs technologies existantes, la cytométrie de flux, les microsphères, la chimie traditionnelle et le laser a été développée ces dernières années par la société américaine Luminex (Austin, Texas, www.luminexcorp.com). Le système permet la détection de 100 mutations en une seule réaction.

On pourra également citer l'émergence de nouvelles techniques de « balayage » qui permettent d'analyser plusieurs milliers de gènes en 24 heures.

V - Vers une harmonisation des pratiques : les réseaux de génétique

La direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins (DHOS) prend en charge depuis 2001 le financement des activités complexes de génétique moléculaire qui ne sont pas couvertes par la nomenclature des actes de biologie médicale, sous la condition que les laboratoires s'organisent en réseaux. Un même laboratoire peut réaliser des analyses simples pour une maladie et des analyses complexes pour une autre. Quatre réseaux de génétique ont fait l'objet d'un financement : le réseau « mucoviscidose », qui a été le premier à se mettre en place ; le réseau des maladies neuromusculaires et neurosensorielles, le réseau « oncogénétique » et un réseau regroupant les autres maladies rares (hématologiques, cardio-vasculaires et rénales, endocrinologiques, métaboliques et maladies du développement). Chaque réseau regroupe des laboratoires, publics ou privés, de trois niveaux différents : **1**) ceux qui réalisent des examens simples (recherche de mutations fréquentes) ; **2**) ceux qui explorent l'ensemble de la pathologie moléculaire du gène (il s'agit d'analyses complexes), prenant le relais des précédents dans certaines situations et qui, à ce titre, font l'objet d'un financement ; **3**) ceux qui, parmi ces derniers, ont les missions de laboratoire de référence et bénéficient d'un soutien complémentaire pour l'animation du réseau, l'élaboration de fiches et guides de bonne pratique, la veille scientifique, l'organisation d'ateliers pour l'ensemble des laboratoires, où sont discutés l'évolution des techniques et les bonnes pratiques de réalisation des tests. Les dotations ainsi fléchées ont permis de renforcer les équipes en personnel et de remettre à niveau l'équipement, de façon cependant encore insuffisante compte-tenu de l'évolution fulgurante des techniques.

VI- Conclusion

La réalisation du projet génome humain, la remarquable évolution des connaissances dans le domaine de la génétique et le formidable essor technologique qui a accompagné ces progrès ont contribué à faire évoluer la génétique moléculaire. Toutefois, même si les équipements lourds et l'automatisation prennent progressivement place dans les laboratoires, la pratique de la génétique moléculaire repose encore très largement sur des techniques manuelles, non automatisées. Une

des caractéristiques les plus frappantes de cette discipline repose sur le fait que chaque pathologie s'impose comme une problématique spécifique vis-à-vis de laquelle des choix stratégiques et techniques doivent être effectués. Le défi posé au praticien se trouve sans cesse renouvelé, celui-ci doit acquérir une forte spécialisation mais doit également savoir évoluer, s'adapter de façon dynamique afin de tirer le meilleur parti de technologies évoluant de façon très rapide. Dans ce contexte, l'essaimage des connaissances et la généralisation des bonnes pratiques sont essentielles. Le développement progressif de réseaux de laboratoires contribue de façon significative à cette évolution et devrait constituer une garantie d'assurance qualité.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) STEFFANN J, FEYEREISEN E, KERBRAT V, ROMANA S, FRYDMAN N, Diagnostic prénatal et diagnostic pré-implantatoire : arbre décisionnel, nouvelles pratiques ? *Medicine Sciences*, 2005, 21, 987-992.
- (2) MUNCK A., SAHLER C., BRIARD ML, VIDAILHET M, FARRIAUX JP, Mucoviscidose : organisation du dépistage néonatal français, premiers résultats enregistrés. *Archives de Pédiatrie*, 2005, 12, 646-649.
- (3) FEINGOLD J., Maladies multifactorielles : un cauchemar pour le généticien. *Medicine Sciences*, 2005, 21, 927-933.
- (4) STOPPA-LYONNET D., LENOIR G., Prédispositions génétiques aux cancers : actualités et perspectives en 2005. *Medicine Sciences*, 2005, 21, 962-968.
- (5) BOGARD M., LAMORIL J., AMEZIANE N., Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris, *Elsevier*, 2005.
- (6) KAPLAN JC, DELPECH M., Biologie moléculaire et médecine. Paris, *Flammarion Médecine-Sciences*, 1996.
- (7) GOOSSENS M., MANDEL JL, MOUSTACCHI E., PAPADOPOULOU D., Mutations génétiques. In: Principes de génétique humaine Edited by J Feingold, M. Fellous, M. Solignac. Paris: Hermann, *Editeurs des sciences et des arts*, 1998.
- (8) HANNA N., PARFAIT B., VIDAUD D., VIDAUD M., Mécanismes et conséquences des mutations. *Medicine Sciences*, 2005, 21, 969-980.
- (9) BOGARD M., LAMORIL J., Biologie moléculaire en biologie clinique. III. Applications en génétique, Paris, *Elsevier*, 1999.
- (10) SERRE JL, et coll: Les diagnostics génétiques, Biotech.info édition. Paris, *Dunod*, 2002.
- (11) GIRODON-BOULANDET E., CAZENEUVE C., GOOSSENS M., Screening practices for mutations in the CFTR gene ABCC7. *Hum. Mutat.*, 2000, 15, 135-149.