

PLACE DE LA GÉNÉTIQUE DANS UN BILAN DE DÉPISTAGE

Prof. Dr med. Daniel Schorderet, spécialiste FMH en génétique médicale, Rue de la Vigie 5, 1003 Lausanne
daniel.schorderet@unilabs.com

Introduction | Historique

Le séquençage complet du génome humain a stimulé de nombreux espoirs. Initialement, ces espoirs étaient ceux des patients atteints de maladies génétiques, mais rapidement il s'est avéré que notre patrimoine génétique en disait beaucoup plus sur notre personnalité. Il est devenu la cible de nombreuses compagnies qui nous veulent du bien. Cet article essaie de faire la part des choses entre espoir légitime et fantasme Frankensteinien.

L'ADN contenu dans les chromosomes contient l'ensemble des caractéristiques d'un être vivant. Son code, basé sur l'assemblage et la lecture de quatre nucléotides A, C, G et T, est universel. Il se retrouve aussi bien dans des bactéries que chez les mammifères. Dans les espèces diploïdes et en particulier chez l'homme, les chromosomes se trouvent en paires, sauf pour les chromosomes sexuels du mâle qui sont uniques : X et Y. Comme chaque membre d'une paire provient d'un parent, les enfants sont le mélange des caractères de leurs ascendants. Ce mélange est encore augmenté par le phénomène du crossing-over (enjambement en français). Ce mécanisme permet lors de la méiose de mélanger les caractères héréditaires d'un parent de telle façon que ses cellules germinales représentent un mélange de segments de chromosomes maternels et paternels. C'est ce qui les rend à la fois unique et très proche de leurs parents.

Si le mélange et la transmission des gènes a permis l'évolution des différentes espèces, cela ne se fait pas sans risque, la nature essayant par tous les moyens de s'adapter à l'environnement existant. Cette approche finalistique de la nature nous permet de l'approprier et d'en faire un partenaire actif dans notre choix de vie. Mais rien n'est plus faux. Tout cela ne repose que sur le hasard, la nature produisant des milliards de possibilités et seules celles qui seront les plus aptes survivront.

Même si la très grande majorité des nouvelles mutations ne se situe pas dans des séquences codantes, il arrive parfois qu'une mutation change la séquence d'un gène et potentiellement modifie la fonction de sa protéine. Il y a alors mutation.

Maladies héréditaires

mendéliennes :

dominantes - récessives

Depuis les travaux de Gregor Mendel publiés en 1866, qui a d'ailleurs donné naissance à la géné-

tique mendélienne, nous savons qu'il existe deux types de mutations, dominantes et récessives. Les maladies dominantes sont souvent l'expression d'une protéine anormale qui exerce une fonction différente. Elles se retrouvent de génération en génération et le risque de transmettre la mutation est de 50% à chaque méiose. Heureusement, toutes les personnes qui héritent la mutation ne développent pas obligatoirement la maladie. Il existe une pénétrance variable et les maladies à pénétrance de 100% sont rares. Cela complique évidemment le conseil génétique. Parmi les maladies à pénétrance complète, on peut citer la chorée de Huntington en cas de nombre de triplets supérieurs à 40. Parmi les maladies à pénétrance incomplète, on peut citer le cancer du sein. Il a été calculé qu'un pour cent des femmes naissait avec une prédisposition génétique à développer un cancer du sein ou de l'ovaire. Mais toutes ces femmes ne développeront pas un cancer du sein, même si elles vivent jusqu'à 80 ans.

L'autre forme classique de transmission de mutations est la transmission récessive, dont l'exemple le plus frappant chez nous est la mucoviscidose. Dans cette situation, les deux allèles d'un gène doivent être mutés pour que la maladie se déclare. Là également, l'âge d'apparition et la gravité de la maladie dépendent de la pénétrance.

A côté des maladies mendéliennes, il existe également des maladies mitochondriales, épigénétiques ou plurifactorielles dans lesquelles se mêlent l'hérédité et l'environnement.

Le séquençage par la technique dite de Sanger

Frederik Sanger dont les travaux furent honorés par deux prix Nobel, le premier pour ses travaux sur l'insuline en 1958, l'autre en 1980, a mis au point une technique de séquençage qui porte son nom. Bien que déjà révolutionnaire à l'époque, cette technique s'est vraiment popularisée lorsqu'elle fut associée à la PCR (polymerase chain reaction) développée par Kary Mullis, un autre prix Nobel.

L'utilisation du séquençage selon Sanger a ouvert le diagnostic moléculaire, mais cette technique est fastidieuse et onéreuse. Elle repose sur le séquençage individuel de tous les exons d'un gène. Dans le cas d'une suspicion de syndrome de Marfan par exemple, il faut séquençer les 65 exons codant du gène FBN1. Même si techniquement il est possible de le faire, le coût très important de

cette analyse fait que seuls quelques centres universitaires pouvaient la proposer (Figure 1 | Page 12). Ceci a eu deux conséquences. D'une part, de nombreux patients ont dû renoncer à bénéficier d'un diagnostic moléculaire précis. D'autre part, le diagnostic moléculaire s'est concentré sur les maladies fréquentes, dont les gènes n'ont que peu d'exons, et qui présentaient des mutations préférentielles. Ainsi, le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose ou de l'hémochromatose se fait dans presque tous les laboratoires suisses qui proposent des analyses moléculaires, alors que le séquençage des gènes de la maladie d'Usher, une cécité associée à une surdité, ne se faisait que dans deux centres en Suisse.

Le séquençage à haut débit

Dès le milieu des années 2000, une technique appelée séquençage parallèle massif ou « next generation sequencing » souvent abrégé NGS, s'est popularisée. Cette approche est composée de trois phases. Dans la première phase, les séquences d'intérêt sont « pêchées » à l'aide de sondes moléculaires préalablement synthétisées. Le produit de cette pêche constitue une librairie. La 2e phase consiste à amplifier par PCR ces fragments d'ADN et à leur mettre un code-barre. Enfin, ces fragments amplifiés sont séquencés selon diverses techniques qui diffèrent selon la marque du séquenceur utilisée. Les régions séquencées dépendent de la séquence des sondes. Ces sondes peuvent cibler un gène spécifique, un ensemble de gènes comme dans différents panels disponibles commercialement, différentes mutations d'un groupe de gènes, l'ensemble de tous les exons, comme dans le « whole exome sequencing » ou la totalité du génome comme dans le « whole genome sequencing ». Le séquençage à proprement parler génère des millions de petites séquences, appelées « reads » qui sont positionnées sur le génome par des programmes informatiques et permettent de reconstituer la séquence cible d'un patient (Figure 2 | Page 12).

Cette technique possède plusieurs avantages : automatisation, rapidité d'exécution, possibilité de séquencer en parallèle des milliers de séquences de milliers de gènes, possibilité de déterminer pour certaines applications une fréquence des allèles mutés (surtout utile dans les mutations somatiques des cancers), bas coûts. Elle possède également des désavantages : ne permet que rarement de voir de grandes délétions ou insertions, identifie beaucoup de mutations ce qui entraîne des difficultés à déterminer s'il s'agit d'une mu-

tation causale ou d'un variant « normal » de la séquence et, selon les kits utilisés pour obtenir la librairie initiale, il y a la possibilité d'identifier des mutations dans des gènes non liés à la pathologie actuelle, mais potentiellement pathogéniques. Par exemple, l'analyse d'un exome complet, pourrait potentiellement identifier une mutation dans le gène BRCA1, responsable de certains cancers du sein chez un patient souffrant d'une rétinopathie pigmentaire. L'analyse d'un génome entier pose encore plus de problèmes.

2. Utilité pratique du séquençage à haut débit

Le séquençage à haut débit a rapidement remplacé le séquençage traditionnel. Ce dernier reste quand même utile pour valider des mutations identifiées par séquençage à haut débit ou pour identifier des porteurs de mutations spécifiques dans une famille.

Le séquençage à haut débit représente l'ultime étape d'un processus diagnostique qui commence par le kit d'amplification, aussi appelé enrichissement, du panel de gènes. Il existe aujourd'hui un grand nombre de « panels » qu'ils soient maison comme notre panel d'analyse de plus de 130 gènes responsables de maladies cécitantes¹ ou commerciaux. Parmi ces derniers, on peut citer le TruSight One d'Illumina qui permet l'amplification de 4813 gènes². Parmi ces gènes, on retrouve des gènes impliqués dans les différentes formes de cancers héréditaires, les maladies métaboliques, cardiaques, ophtalmiques, neurologiques, etc. Il est également possible d'utiliser des kits plus spécifiques comme le TruSight Cancer qui amplifie 94 gènes spécifiquement impliqués dans divers cancers héréditaires. D'autres compagnies que ce soit en Europe, aux USA ou ailleurs dans le monde proposent également divers panels d'enrichissement spécifique.

L'avantage d'utiliser un panel de gènes spécifiques est d'optimiser l'amplification et le séquençage des gènes d'intérêts. Pour une réaction de séquençage, le nombre de « reads » reste identique. Il est donc possible de séquencer plus de gènes, chacun avec moins de « reads » ou de séquencer moins de gènes avec pour chacun plus de « reads ». Cette couverture de gènes qu'on rapporte sous le concept de profondeur de séquençage (deep sequencing) permet d'apprécier la vraisemblance du résultat. Ce n'est pas la même chose d'avoir une mutation hétérozygote couvrant 33% de 10 « reads » ou de 250 « reads ». Un nombre élevé de « reads » permet également d'identifier des mutations en mosaïque.

Plutôt que d'utiliser plusieurs panels différents, il est possible de séquencer également la totalité des exons de tous les gènes (Whole exome se-

quencing). Cette approche a l'avantage de pouvoir associer des gènes à certaines maladies ou syndromes jusque là sans diagnostic moléculaire. Ainsi, des mutations touchant une seule copie du gène LRP5 sont responsables d'un tableau clinique qui associe ostéoporose, ostéopérose, fractures multiples, surdité. Il n'est pas évident d'imaginer de prime abord que des mutations touchant les deux allèles de ce gène soient associées à une vitrorétinopathie exsudative, une forme gravissime de malformation oculaire³.

Le grand désavantage de l'approche par exome complet, mis à part que le panel n'amplifie pas la totalité des exons, malgré les promesses des vendeurs, mais approximativement 85% d'entre eux, est que seules les séquences codantes (exons) sont analysées. Or, il est de plus en plus évident qu'un grand nombre de mutations touche également les introns, créant de nouveaux transcrits par épissage aberrant ou les séquences régulatrices perturbant ainsi une expression correcte. Le séquençage du génome complet s'est donc imposé tout naturellement. Il a l'avantage de séquencer l'ensemble du patrimoine génétique.

Diagnostic de maladies génétiques

Le NGS permet d'identifier avec plus ou moins de facilité l'origine moléculaire d'un nombre toujours grandissant de maladies héréditaires. Il nécessite peu d'ADN, est économique d'un point de vue asséurologique, rapide pour le patient et permet un diagnostic moléculaire dans un pourcentage important de cas. Là où il fallait parfois plusieurs années, le séquençage à haut débit permet de donner un diagnostic moléculaire en moins de trois mois. Parfois même, en moins d'une semaine.

Diagnostic prénatal non-invasif

Le NGS permet également d'amplifier l'ADN fœtal présent normalement dans le plasma de la mère durant la grossesse. Dans ce test, les sondes moléculaires sont dirigées vers 20'000 régions polymorphiques du génome. En comparant ces régions polymorphiques à celles de la mère, il est possible d'identifier des régions à un (monosomie) ou à trois allèles fœtaux (trisomie). Etant donné les progrès auxquels il est raisonnable de s'attendre, il est probable que dans un avenir proche le diagnostic de mutations ponctuelles dans n'importe quel gène puisse être fait par cette technique.

Le coût de la plupart de ces analyses est normalement pris en charge par la LAMal. Il se peut, selon le type d'analyse, qu'une demande spécifique de garantie de prise en charge soit nécessaire. Toutefois, certaines prestations ne peuvent être

demandées que par des médecins spécialistes en génétique médicale FMH. Il est souvent plus facile pour un médecin généraliste d'envoyer son/sa patient/e à un généticien médical qui s'occupera de tout.

Diagnostic de prédisposition

La recherche génomique, en particulier les analyses d'association génomique, a permis l'identification de polymorphismes associés à certains états pathologiques. On connaît depuis longtemps l'association entre APOE et la maladie d'Alzheimer. L'allèle APOE*E4 du gène APOE augmente fortement le risque de développer la maladie et ce risque est maximum chez les individus homozygotes pour l'allèle E4. Depuis ces premières découvertes, d'autres ont été rapportées : Y402H (le codon tyrosine en position 402 du cDNA est changé en histidine) du complément facteur H dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou la mutation Leyden du facteur V (R506Q) impliqué dans les thromboses. Depuis, plusieurs panels permettent, en interrogeant certaines régions de gènes, de calculer un risque d'avoir une intolérance nutritionnelle, un accident thromboembolique, une hypertension, un glaucome, etc.

Il va sans dire que ces analyses ne permettent que d'identifier des facteurs de risque et que les interactions avec l'environnement sont capitales pour augmenter ou diminuer ces risques. Il est toutefois intéressant de voir avec quel acharnement l'homme essaie d'identifier certains facteurs génétiques dont l'influence est quand même marginale alors que des facteurs exogènes comme la fumée et l'alcool ne sont pas pris en compte dans la prévention.

Médecine personnalisée

Le concept de médecine personnalisée s'est développé depuis quelques années. Il repose sur le fait que chaque être humain est unique et qu'il réagit différemment en fonction de son génome. Il existe donc un continuum entre l'état de bien-être et celui de maladie et ce continuum est modulé par notre patrimoine génétique. Il est évident que l'histoire familiale est un indicateur très important dans le pronostic vital d'un individu. Les maladies mendéliennes modifient le risque de façon extraordinaire, allant même jusqu'à une prédiction de 100% pour certaines maladies. À côté de ces prédictors majeurs, il existe des marqueurs pas forcément génétiques, qui permettent d'identifier des personnes à risque pour certaines pathologies : le poids, la pression artérielle, les habitudes personnelles, etc. Depuis l'apparition du séquençage à haut débit, de nombreux facteurs génétiques sont intégrés dans cet algorithme de

PLACE DE LA GÉNÉTIQUE DANS UN BILAN DE DÉPISTAGE

Prof. Dr med. Daniel Schorderet, spécialiste FMH en génétique médicale, Rue de la Vigie 5, 1003 Lausanne
daniel.schorderet@unilabs.com

santé. Alors qu'habituellement le séquençage de gènes à risque pour induire le développement de cancers n'était entrepris que dans des situations où l'histoire familiale le suggérait, il est maintenant possible d'analyser l'ensemble des gènes responsables de maladies monogéniques et ceci pour un coût relativement bas.

La génomique des cancers, aussi appelée pharmacogénomique, s'invite également dans le choix des thérapies en caractérisant le profil génétique des tumeurs. Plusieurs exemples ont récemment démontré son importance. Vingt-cinq à 30% des cancers du sein surexpriment HER2, un récepteur à un facteur de croissance, ce qui correspond à un mauvais pronostic. L'inactivation spécifique de ce récepteur à l'aide d'un anticorps monoclonal permet une amélioration de la survie du patient.

Il est difficile aujourd'hui de prévoir si la pharmacogénomique sera plus utile que les techniques traditionnelles. Ce qui est certain c'est que la pratique de la médecine sera de plus en plus dictée par le résultat des analyses génétiques. Ceci n'est pas sans poser des problèmes éthiques.

Ethique et loi

La capacité d'identifier des caractéristiques personnelles s'accompagne également d'un devoir de prudence quant à leur utilisation. En Suisse, la loi fédérale sur l'analyse génétique humaine (LAGH) du 8 octobre 2004 règle certains aspects. Dans sa mise à jour du 1er janvier 2014, elle a pour but d'assurer la protection de la dignité humaine et de la personnalité et de prévenir à la fois les analyses abusives et l'utilisation abusive des données génétiques. Plusieurs points y sont abordés en particulier sur le conseil génétique. L'article

13 mentionne que seul un médecin peut prescrire une analyse génétique et que si l'analyse génétique est présymptomatique, prénatale ou visant à établir un planning familial il doit en plus être au bénéfice d'une formation postgrade adéquate. Le même article mentionne également que le médecin prescripteur d'une analyse génétique veille à ce que la personne concernée reçoive un conseil génétique.

En plus de la loi sur les analyses génétiques, il existe également diverses recommandations sur les analyses génétiques, la sécurité des données et leur utilisation. En 2012, la Commission présidentielle des Etats-Unis d'Amérique « PRIVACY and PROGRESS in Whole Genome Sequencing » a proposé que les acteurs générant ou finançant la récolte de données du génome entier mettent en place des structures qui garantissent le consentement éclairé, la possibilité de transmettre des résultats inattendus, la confidentialité de ces données et l'accès à ces données par leurs donateurs. Cette commission insiste également sur l'importance que les recherches sur le génome humain soient faites au bénéfice du plus grand nombre de personnes.

Conclusion

L'analyse génétique qu'elle soit limitée à la recherche d'une mutation familiale ou qu'elle implique le séquençage du génome entier n'est pas anodine. Il est nécessaire que le médecin praticien envisage les conséquences éthiques et légales et décide s'il est capable de les assumer. Un nombre croissant de laboratoires en Suisse propose à leur client la possibilité d'obtenir un conseil génétique donné par des médecins au bénéfice d'une formation FMH en génétique médicale. Il serait dommage de ne pas en profiter.

RÉFÉRENCES

- 1 | Schorderet D.F. et al. IROme, a new high-throughput molecular tool for the diagnosis of inherited retinal dystrophies. *BioMed Research International* Volume 2013: 198089; 2013.
- 2 | http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit.html
- 3 | Kheir V. et al. Potential blindness in children of patients with hereditary bone disease. *Osteoporosis Int*, 27(2): 841-4, 2016

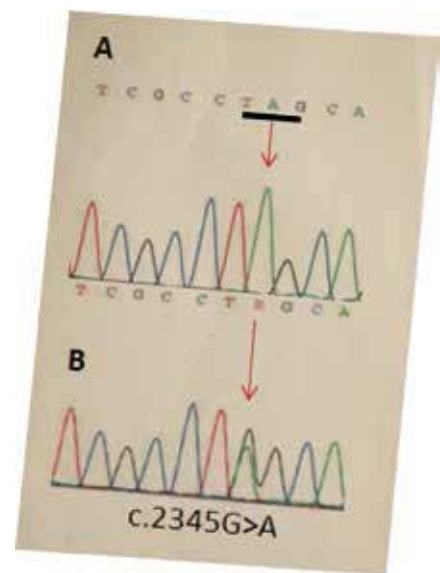


Figure 1 | SÉQUENÇAGE SELON SANGER D'UNE PARTIE DU GÈNE ABCA4, RESPONSABLE DE LA MALADIE CÉCITANTE DE STARGARDT. EN A, ON RETROUVE UNE MUTATION HOMOZYGOTE. EN B, UNE MUTATION HÉTÉROZYGOTE CARACTÉRISÉE PAR LA SUPERPOSITION DES TRACES DES DEUX ALLÈLES. LA LÉGENDE INDIQUE QUE LE NUCLÉOTIDE G À LA POSITION 2345 DU CDNA EST MUTÉ EN A.

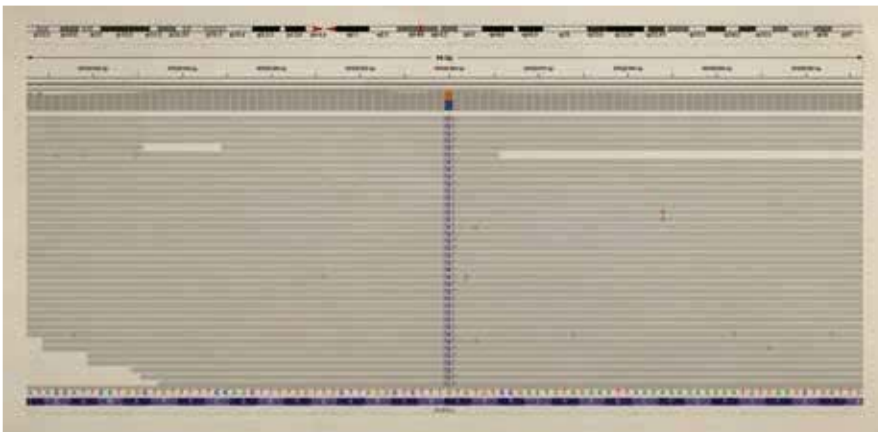


Figure 2 | SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT ET VISUALISATION D'UNE PARTIE DU GÈNE ELOV4. LE CODON ATG EST MUTÉ EN ATC. LA SÉQUENCE SE LIT DE DROITE À GAUCHE ET REPRÉSENTE LA SÉQUENCE COMPLÉMENTAIRE DU GÈNE. IL S'AGIT D'UNE MUTATION HÉTÉROZYGOTE DU CODON TYROSINE À LA POSITION 270 EN CODON STOP. CETTE MUTATION EST RESPONSABLE D'UNE FORME DOMINANTE DE MALADIE DE STARGARDT, UNE RÉTINOPATHIE. SEULES LES NUCLÉOTIDES QUI DIFFÈRENT DE LA SÉQUENCE NORMALE SONT REPRÉSENTÉS SUR CETTE IMAGE (ICI, LE C).