

Diagnostics génétiques

par la technique de l'AD.N. recombinant

Howard Cann

Le diagnostic génétique détecte des gènes délétères qui déterminent les maladies héréditaires. Dans une famille dans laquelle existe une maladie héréditaire, il est utile de déceler chez les personnes apparentées et saines celles qui portent le gène délétère.

Pour une maladie autosomale récessive, les malades portent deux copies du même gène délétère (ils sont homozygotes) et beaucoup de personnes saines de la famille portent une seule copie de ce gène délétère (ils sont hétérozygotes). Il est important d'identifier de tels individus hétérozygotes à cause des risques qu'ils encourent de concevoir des enfants malades à la suite d'un mariage avec un autre individu hétérozygote qui porte le même gène.

Dans les maladies autosomales dominantes, les individus affectés sont hétérozygotes pour le gène délétère. Dans le cas de quelques désordres autosomals dominants, le porteur du gène délétère apparaît normal

à la naissance et au début de la vie alors que la maladie n'apparaît seulement qu'à un âge plus tardif. Parfois, dans d'autres maladies, une certaine proportion d'individus à risque ne développent jamais la maladie bien qu'ils soient hétérozygotes pour le gène délétère. Chez ces individus apparemment sains, il peut donc être extrêmement important, pour des raisons thérapeutiques et pour donner des conseils génétiques, de déceler ce gène délétère.

Dans le cas de maladies déterminées par des gènes sur le chromosome X, seulement les hommes sont affectés ; ces malades ayant hérité de leur mère normale d'une seule copie du gène délétère. Un homme hérite d'un seul chromosome X provenant toujours de sa mère. Les femmes normales qui portent un gène délétère lié au chromosome X doivent être averties du risque de concevoir un enfant malade.

De même il est important dans beaucoup de familles d'identifier les foetus à risque de diverses maladies héréditaires.

Les progrès récents de la biologie moléculaire rendent maintenant potentiellement possible le diagnostic génétique de beaucoup de désordres héréditaires, même si nous n'avons que peu ou aucune information sur les désordres chimiques qui les causent ou sur leur pathogénie. Cette approche du diagnostic génétique est fondée sur des tests capables de déceler un gène ou un marqueur génétique connu pour être très proche - peut-être même tout à côté sur le chromosome - du gène délétère. Ceux-ci sont très nombreux (environ 2000 sont connus, il y en a certainement beaucoup plus). Cette stratégie diagnostique demande beaucoup de marqueurs génétiques, afin d'établir la carte du génome humain. Une contribution importante de la génétique moléculaire a été le développement d'un grand nombre potentiel de marqueurs génétiques

dans l'ADN humain. Ces fragments sont appelés "fragments de restriction de longueurs variables" ou en anglais "restriction fragment length polymorphisms" (RFLPs).

Les marqueurs génétiques dans l'ADN. humain

Ces RFLPs sont générés à partir de l'ADN par des enzymes de restriction ou endonucléases, chacune d'elles coupant l'ADN d'une façon hautement spécifique au niveau d'un site de reconnaissance défini par une séquence nucléotidique particulière. Il y a de nombreux sites de reconnaissance pour chaque enzyme, tout au long de la grande molécule d'ADN contenue dans chacune des cellules et chacune des enzymes coupera l'ADN à tous les sites spécifiques donnant naissance ainsi à beaucoup, environ 1 million, de petits fragments. Le changement d'un seul ou de plusieurs nucléotides dû à une mutation à l'intérieur d'un site de restriction empêche l'enzyme de couper au niveau de ce site. Ainsi, dans une population humaine, il y aura des individus avec un certain site de restriction sur les deux chromosomes homologues, d'autres ne présenteront pas ces sites sur aucun de leur chromosome alors que d'autres n'en posséderont qu'un sur un seul de leur chromosome. Ces trois groupes d'individus peuvent donc être distingués par les différences de longueur des fragments générés dans une région donnée de l'ADN, coupé par une certaine enzyme.

Ces fragments d'ADN polymorphes sont des caractères mendéliens typiques. Ils observent strictement les lois de l'hérédité mendélienne. Ce sont d'utiles marqueurs génétiques pour diverses sortes de recherches génétiques y compris la cartographie du génome humain par la méthode du liaison ou "linkage". Des gènes proches les uns des autres sur le même chromosome ont tendance à être hérités ensemble des parents aux enfants. On dit que

ces gènes sont liés. Plus deux gènes sont éloignés l'un de l'autre sur le même chromosome, moins ils auront de chance d'être hérités ensemble car ils peuvent alors être séparés par une recombinaison "crossing-over" survenant entre les deux chromosomes homologues au cours de leur association à la méiose. Plus deux gènes sont proches sur le chromosome, plus il y aura de chance qu'ils ne soient pas séparés par recombinaison. Ainsi la distance entre deux gènes liés est proportionnelle à la fréquence des recombinaisons et cette fréquence est la mesure de leur distance génétique sur le chromosome. La cartographie utilisant la méthode de "linkage" détermine les gènes liés entre eux et leur distance en terme de fréquence de recombinaison.

Les résultats seront analysés en recherchant la transmission simultanée aux enfants de deux ou plus de deux gènes ou marqueurs génétiques ; ceci étant fait

L'A.D.N. cellulaire est facilement extrait à partir de leucocytes du sang périphérique. Les nombreux fragments résultant du clivage de la molécule d'A.D.N. sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose et transférés, in situ, du gel à un filtre qui les fixe. Les fragments de la région d'A.D.N. où se trouve le site de restriction peuvent être mis en évidence grâce à une sonde, c'est-à-dire un segment d'A.D.N. provenant de la région qui hybridera spécifiquement avec eux. Ces fragments combinés avec la sonde radiomarquée seront décelés par autoradiographie du filtre lavé. En cas de trois sites localisés dans la région détectée par la sonde, les individus qui possèdent le site au milieu de leurs gènes sur les deux chromosomes homologues donneront deux fragments résultant du clivage de ce site. Les individus chez lesquels ce site est absent donneront un seul fragment dont la longueur sera égale à la somme des deux fragments précédents; tandis que chez les individus qui sont hétérozygotes pour le site donneront trois fragments. Ces variations dans la population dues à la présence ou à l'absence d'un site de restriction particulier sont comparables aux variétés obtenues par des gènes spécifiques dont les formes variables (ou allèles) existent dans la population. Ces variations sont appelées polymorphismes. Les gènes polymorphes et les RFLPs impliquent la présence dans la population d'individus hétérozygotes qui, chacun, portent deux variantes différentes du gène ou, dans le cas d'un RFLP, donnent des fragments de restriction de différentes tailles qui peuvent être utilisés comme marqueur de chacun des chromosomes homologues à partir desquels ils ont été générés.

le plus souvent dans de nombreuses familles. La démonstration de la transmission simultanée de deux ou de plus de deux gènes ou marqueurs réclame des preuves non ambiguës de cette transmission des parents aux enfants. Pour obtenir cette certitude, au moins un parent de chaque famille doit être hétérozygote pour chacun des marqueurs génétiques dont on veut étudier le "linkage". Ceci est nécessaire pour pouvoir distinguer les combinaisons de marqueurs reçus par chacun des enfants. En comparant la combinaison de marqueurs génétiques reçus par chacun des enfants à celle du parent hétérozygote, il est possible d'identifier les enfants qui portent les combinaisons de ce parent et ceux qui résultent d'une recombinaison. Pour les gènes ou les marqueurs liés, un plus grand nombre d'enfants recevront la même combinaison portée par l'un ou l'autre des chromosomes parentaux qu'une combinaison qui résulte d'un "crossing-over". La fréquence des enfants portant la combinaison de gènes qui résultent d'un "crossing-over" est la mesure de la distance génétique entre ces marqueurs. Dans le cas de gènes étroitement liés aucun enfant ou un très petit nombre recevra une combinaison résultant d'un "crossing-over". Dans le cas où la distance génétique s'accroît entre les marqueurs, un plus grand nombre d'enfants recevra la combinaison recombinante. En pratique, beaucoup d'enfants sont habituellement nécessaires pour obtenir une estimation précise de la fréquence des "crossing-over".

Les RFLPs sont des marqueurs génétiques qui peuvent être utilisés pour la cartographie par "linkage" avec d'autres RFLPs ou gènes. Et l'un des buts de ce type de recherche génétique est d'établir la carte des gènes ou des marqueurs génétiques, régulièrement espacés de 10 à 20 unités de recombinaison sur tous les chromosomes. Au fur et à mesure que plus le nombre de RFLPs disponibles s'accroît, plus il est probable que ces marqueurs régulièrement espacés seront des RFLPs. Ceci signifie que chacun

des 50 à 100.000 gènes humains, comprenant des gènes délétères, seront à une distance mesurable de l'un ou de l'autre de ces marqueurs génétiques.

Le diagnostic génétique peut être réalisé grâce à la cartographie par "linkage". Un marqueur génétique et un gène délétère étroitement lié seront hérités ensemble. En recherchant la présence du marqueur, on peut ainsi suivre la présence d'un gène délétère. Ainsi dans une famille où il y a une maladie héréditaire et déjà des individus malades portant le marqueur génétique connu pour être près du gène délétère, les parents, les frères et les soeurs des individus affectés seront testés pour ce marqueur. Si les malades ont reçu la combinaison gène délétère-marqueur d'un ou des deux parents, alors les frères ou les soeurs sains qui ont un test positif pour le marqueur sont supposés porter le gène délétère. Pour la recherche d'un marqueur RFLP on utilise l'ADN cellulaire provenant des leucocytes du sang périphérique ou, dans le cas d'un fœtus, de cellules amniotiques ou de villosité choriale. Plus le marqueur génétique est près du gène délétère, plus on pourra accorder de confiance aux résultats du test du fait de la probabilité très basse d'une recombinaison qui aurait placé le marqueur sur le chromosome homologue. Il est idéal et parfois certainement faisable d'utiliser deux marqueurs étroitement liés et situés de chaque côté du gène délétère. Les individus qui héritent des deux marqueurs situés de chaque côté du gène délétère auront une presque certitude de recevoir celui-ci.

L'interprétation et l'information de la famille des résultats des tests revêtent un aspect à la fois crucial et technique. Le médecin qui discute ces résultats avec la famille doit comprendre les bases du test, ses limitations et le mode de transmission héréditaire de la maladie. Par exemple, dans le cas d'une maladie récessive

autosomale, on doit bien faire comprendre à un individu qui a été trouvé avec une simple copie du gène délétère qu'il n'y a aucune menace pour sa santé. Par contre il y a un risque de concevoir un enfant malade, et c'est naturellement la préoccupation essentielle. Cela dépend en grande partie du partenaire qui doit être lui-même porteur du même gène délétère. Ceci est particulièrement important quand le foetus a été testé. Il est probable que les parents prendront des décisions différentes selon la prédiction de santé (un seul gène délétère) ou de maladie et de handicap (deux copies du gène délétère).

Les diagnostics génétiques établis grâce aux RFLPs

Il y a déjà plusieurs exemples de diagnostics génétiques faits grâce aux RFLPs étroitement liés à des gènes délétères. Le diagnostic prénatal de l'anémie falciforme, de la thalassémie, de la phénylcétonurie et du déficit en 21 hydroxylases a été déjà pratiqué avec succès. Ces diagnostics génétiques sont le triomphe de la médecine prédictive, mais on doit souligner que pour chacune de ces maladies, un grand nombre de connaissances de base était déjà disponible permettant le diagnostic prénatal précoce dans les trois premières maladies et un traitement spécifique dans les deux dernières. Il y a encore beaucoup de maladies héréditaires mal comprises qui ne peuvent pas être traitées et pour lesquelles le diagnostic génétique manque. On peut considérer la maladie d'Huntington comme exemple typique.

La maladie d'Huntington est une maladie héréditaire autosomale dominante, atteignant le système nerveux central, spécialement de la ganglia basale. Tous ceux qui portent une simple copie du gène délétère de cette maladie peuvent présenter des dégénérescences de la ganglia basale et de certaines localisations du cortex

cérébral. La manifestation la plus connue est la chorea progressive. Cependant des détériorations intellectuelles et psychologiques peuvent aussi survenir. Tous les porteurs du gène délétère sont complètement normaux à la naissance. Jusqu'à présent il n'y avait aucun moyen de détecter ce gène à la naissance ou avant le début des manifestations cliniques qui surviennent généralement dans la 3ème ou la 4ème décennie de la vie après que le gène délétère ait déjà été transmis à des enfants. Quand la maladie commence, les manifestations surviennent progressivement et s'étalent sur une période de 15 à 20 ans. La mort survient alors qu'un délabrement complet physique (et souvent mental) s'est installé. La fréquence de la maladie d'Huntington est environ 1 pour 10.000 dans la plupart des populations. La nature dominante de cette maladie explique que l'on peut retracer le pedigree pathologique de chaque malade. Avec quelques rares exceptions ils ont toujours un parent malade. Cette maladie est connue déjà depuis 112 ans. Mais rien n'est encore sûr en ce qui concerne le défaut biochimique qu'elle exprime.

En 1984, le Docteur James Gusella a trouvé un RFLP qui est lié au gène de la maladie d'Huntington.

Deux familles atteintes de maladie d'Huntington, une famille de Noirs américains et une très grande famille vénézuélienne, ont été testées pour ce RFLP. Environ 100 individus dans ces familles ont été étudiés et dans tous les cas, à l'exception d'un seul, le RFLP qui marque l'haplotype du parent malade a été trouvé également chez les enfants malades indiquant que le gène délétère et le RFLP sont très fortement liés. La seule exception a été trouvée chez une fille qui possédait le RFLP marqueur de l'haplotype normal de son père malade. C'est un exemple de "crossing-over" entre le RFLP et le gène de la maladie d'Huntington. La fréquence de "crossing-over" a été estimée à 2 %, ce qui est une estimation de la distance

généétique entre le marqueur et le gène délétère.

D'autres études utilisant un panel de cellules hybrides homme-souris, chacune de ces cellules possédant un complément de chromosomes humains différents, ont montré que ce RFLP était localisé sur le chromosome 4 et grâce à des études un peu plus raffinées, sur le bras court de ce chromosome. Ainsi, par la liaison qui existe entre le RFLP et le gène de la maladie de Huntington, nous savons que ce gène délétère est situé sur le bras court du chromosome 4.

Quoique la liaison entre le gène de la maladie d'Huntington et un RFLP soit une découverte remarquable, nous devons faire attention en appliquant le diagnostic génétique par le RFLP. En effet, le RFLP est assez éloigné du gène délétère pour qu'il soit séparé dans, approximativement, 2 % des cas. Et comme seulement un seul "crossing-over" a été trouvé, la fréquence de celui-ci est assez imprécise et pourrait bien être plus élevée comme pourrait le montrer l'étude de nouvelles familles. Ainsi par le RFLP, présent chez un enfant d'un parent malade, on pourrait donner un diagnostic génétique incorrect dans environ 2 % des cas, peut-être plus. Ce niveau de précision du diagnostic génétique pourrait être acceptable mais la découverte d'un autre RFLP lié au gène délétère et localisé de l'autre côté de ce gène apporterait une amélioration certaine à la situation.

On ne sait pas avec précision si tous les cas de maladie d'Huntington sont réellement causés par le même gène, un ou plusieurs autres gènes localisés sur différents chromosomes pourraient aussi déterminer la maladie. Une telle hétérogénéité génétique est connue pour d'autres maladies héréditaires. Un plus grand nombre de familles doivent être étudiées pour leur liaison avec le RFLP avant que nous puissions être suffisamment confiants dans ce diagnostic génétique.

Néanmoins, il est évident que ce diagnostic génétique pour au moins quelques familles avec cette maladie dévastatrice, sera bientôt disponible et ceci, en dépit qu'il n'y ait aucune information sur son défaut biochimique primaire. La liaison établie entre le gène délétère et les marqueurs RFLP sera la base du diagnostic génétique et conduira à une meilleure connaissance de la maladie. En identifiant les individus qui portent le gène délétère, il sera possible d'entreprendre des recherches biochimiques et neurophysiologiques dès le stade pré-clinique, donc bien longtemps avant le début de la maladie.

La maladie d'Huntington est devenue un modèle pour le développement des tests de diagnostic génétique pour d'autres maladies héréditaires encore incomprises. La recherche d'un test du diagnostic génétique par la méthode de liaison avec un "marqueur" ADN est actuellement appliquée à un certain nombre d'autres maladies, telles que la fibrose kystique, la dystrophie musculaire de Duchenne et le neurofibromatose. Grâce à cette nouvelle approche, on peut espérer apprendre davantage sur beaucoup de maladies génétiques et ceci dans un proche avenir.

*Howard CANN
Généticien
Directeur de Recherche à l'INSERM*