

MAI pratiques pour les francophones

ATELIER « Indication et interprétation des tests génétiques »

Isabelle Jéru et Isabelle Touitou

8 Septembre 2012



Réseau national du diagnostic génétique des maladies auto-inflammatoires héréditaires

<http://genmai.chu-montpellier.fr/>

Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers.

Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I, Bennetts B, Austrup F, Ceccherini I, Costa JM, De Leener A, Gattorno M, Kania U, Kone-Paut I, Lezer S, Livneh A, Moix I, Nishikomori R, Ozen S, Phylactou L, Risom L, Rowczenio D, Sarkisian T, van Gijn ME, Witsch-Baumgartner M, Morris M, Hoffman HM, Touitou I.

Ann Rheum Dis. 2012 Jul 6. [Epub ahead of print]

Préambule

MALADIES MONOGENIQUES (hérédité simple ou Mendélienne) ET MALADIES MULTIFACTORIELLES

Les maladies monogéniques (Ex: fièvres récurrentes héréditaires - FRHs)

Un arbre généalogique bien renseigné peut apporter des informations précieuses sur le mode de transmission. Deux modes de transmission sont observés dans les FRHs :

- Transmission autosomique dominante: une mutation causale chez le cas index, retrouvée chez un des deux parents dans la très grande majorité des cas. Si la mutation n'est retrouvée chez aucun des deux parents, on parle de mutation « *de novo* » (apparition de la mutation dans l'un des gamètes parentaux). Des mutations *de novo* ont été identifiées chez certains patients TRAPS et CAPS (forme CINCA surtout).
- Transmission autosomique récessive: deux mutations causales chez le cas index, une sur chaque chromosome (vérifiable par l'analyse de l'ADN des parents). Le risque d'être malade augmente en cas de consanguinité.

Les maladies multifactorielles (Ex: Crohn, Behçet)

- Elles sont dues aux effets conjoints de facteurs génétiques de susceptibilité et de l'environnement.
- Chaque variant génétique a un effet très faible et insuffisant pour déclencher à lui seul la maladie.
- L'analyse moléculaire d'un gène ne peut donc pas signer le diagnostic.

LES DIFFERENTS VARIANTS DE SEQUENCE

Il faut différencier :

- Les mutations causales: variants de séquence de l'ADN directement responsables d'une maladie.
- Les polymorphismes: variants de séquence de l'ADN non pathologiques.
- Entre les deux:

Les variants de signification clinique inconnue (VUS): variants rares (substitutions++)

Les facteurs génétiques de susceptibilité (facteurs de risque) aux maladies communes (ex : HLAB51 dans la maladie de Behçet).

Différents éléments sont à prendre en compte pour déterminer le caractère pathogène d'une variation de séquence :

- Sévérité putative de la mutation sur la structure de la protéine (ex : codon stop - X - conduisant à une protéine tronquée ; mutation « *frameshift* » - fs - conduisant à un décalage du cadre de lecture et, le plus souvent, à une protéine tronquée).

Ce type de mutations est exceptionnel dans les FRHs. La quasi totalité des mutations connues à ce jour sont des mutations faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un acide aminé différent).

- Ségrégation de la mutation avec le phénotype dans la famille. Cependant, la très grande majorité des patients adressés pour un diagnostic moléculaire de FRH sont des cas sporadiques.

- Présence de la mutation dans la population générale (information disponible dans les banques de données, ou par l'étude de cohortes de sujets sains de même origine).

- Présence de la mutation dans une région de la protéine très conservée au cours de l'évolution.

- Présence de la mutation dans un domaine fonctionnel de la protéine (ex : site catalytique).

- Test fonctionnel : analyse biologique ou test *in vitro* démontrant que la protéine normale se comporte différemment de la protéine mutée.

Dans le cas des FRHs, il n'existe un test fonctionnel de routine que pour les MKD (dosage du mévalonate urinaire et/ou mesure de l'activité enzymatique de la mévalonate kinase à partir de lymphocytes).

LES DIFFERENTES STRATEGIES DE DIAGNOSTIC

(Les techniques utilisées sont indiquées dans le compte-rendu de résultats)

Recherche de mutations connues :

Rapides et peu onéreuses, ces techniques nécessitent la connaissance de la mutation à rechercher

(Indication : recherche familiale d'une mutation identifiée chez le cas index, confirmation par une deuxième technique de la présence d'une mutation identifiée par séquençage...).

Exemple : RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), cette technique peut être utilisée si la mutation conduit à la création ou à la perte d'un site de digestion enzymatique.

Techniques de criblage :

Ces techniques permettent de rechercher des mutations sans a priori sur les variations à identifier.

Exemples :

- DGGE (électrophorèse en gradient dénaturant), dHPLC (chromatographie), HRM (courbes de fusion) : ces techniques rapides ne permettent que de détecter la présence d'une variation de séquence dans une région et doivent être complétées par une seconde technique pour en déterminer précisément la nature.

- Séquençage: permet de lire base à base toute la séquence de la région génétique ciblée.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des analyses génétiques doivent être interprétés en fonction :

- du mode de transmission de la maladie (récessive ou dominante)

- du ou des types de mutations trouvées

- de l'exhaustivité du test (recherche de mutations fréquentes ou criblage de tout le gène).

Il est très difficile, long, et coûteux de rechercher l'ensemble des anomalies pouvant survenir dans un gène. Une telle approche est incompatible avec un diagnostic de routine. Ainsi, une analyse génétique de routine, qui ne confirme pas le diagnostic clinique, n'exclue pas formellement ce diagnostic. Il n'est par exemple pas rare de ne trouver qu'une seule mutation du gène *MEFV* chez des patients présentant des signes cliniques très évocateurs de FMF; avec les données actuelles, nous ne savons pas s'il existe des mutations du gène *MEFV* non détectées par la méthode utilisée ou si le patient possède une ou des mutations responsables d'une autre maladie auto-inflammatoire de symptomatologie proche.

Le caractère pathogène de certains variants de séquence, décrits initialement comme des mutations causales, est de plus en plus discuté, soit parce qu'ils sont fréquents dans la population générale (par exemple E148Q pour la FMF, R92Q et P46L pour le TRAPS, et V198M pour les CAPS), soit parce qu'il s'agit de variants rares dont le caractère pathogène reste à déterminer (VUS). Il est important de noter qu'une étiologie moléculaire n'est retrouvée que chez un nombre limité de patients quand on crible les gènes de FRH connus à ce jour.

CAS N°1

Vous recevez un échantillon sanguin avec les documents suivants :

- Nom Prénom date de naissance du patient
- Nom sans prénom d'un interne du service de rhumatologie de Caen
- Information clinique : 0
- Prescription : test de maladie autoinflammatoire

Quel(s) examen(s) génétique(s) mettez vous en route ?

CAS N°2

Noémie, 4 ans, vous est adressée pour des accès récurrents de fièvre à 40°C durant 6 jours en moyenne associés à un syndrome inflammatoire biologique. Ces épisodes s'accompagnent de douleurs abdominales, de vomissements, d'adénopathies cervicales, d'aphtes buccaux, et de rashes cutanés. Elle a déjà présenté 5 épisodes de même type sans cause apparente, sauf pour le premier qui est apparu après une vaccination.

- A quel diagnostic pensez-vous ?
- Quelles informations complémentaires pourraient vous conforter dans votre hypothèse ?
- Quelle analyse pouvez-vous prescrire en première intention ?

Le résultat revient positif.

- Quelle analyse pouvez-vous alors proposer aux parents ?

CAS N°3

Une jeune femme d'origine espagnole vous est adressée pour suspicion de FMF. Elle présente des accès répétés de fièvre depuis l'enfance durant 3-15j, accompagnés de myalgie et érythème migratoires. La colchicine n'est pas efficace. La cortisone est moyennement efficace. La CRP est à > 100mg/l pendant les crises et revient à la normale entre les crises. L'interrogatoire révèle que le frère a les mêmes symptômes et que le père est décédé d'amylose rénale de type AA. L'analyse du gène *MEFV* ne montre pas de mutation dans les exons 2,3,5 et 10.

- Quelle est votre interprétation ?
- Que proposez-vous ?

CAS N°4

Siméon, présente depuis l'âge de 2 ans des éruptions cutanées papulo-érythémateuses, de la fièvre, et un syndrome inflammatoire biologique. Les parents ont apporté avec eux le compte-rendu d'un service d'ophtalmologie qui indique que Siméon présente, depuis l'âge de 4 ans, une uvéite bilatérale qui pourrait faire évoquer un syndrome de Blau. L'enquête familiale vous apprend qu'aucun de ses deux parents n'est malade ; par contre, le grand-père paternel de Siméon aujourd'hui décédé aurait présenté des manifestations similaires.

- Ces observations sont-elles compatibles avec une maladie de transmission mendélienne ?

Le criblage du gène *NOD2* a mis en évidence la variation de séquence p.Ala612Thr à l'état hétérozygote chez Siméon et chez son père.

- Cela confirme-t-il le diagnostic ?

CAS N°5

Vous avez l'occasion d'analyser l'exon 10 du gène *MEFV* dans une fratrie magrébine dont 3 frères présentent un génotype homozygote M694V, et la petite sœur qui a aussi des symptômes, est hétérozygote M694V. Les autres frères et sœurs asymptomatiques ont soit 0, soit 1 mutation M694V.

- Comment interprétez-vous les résultats chez les 3 frères ?
- Comment interprétez-vous le résultat de la jeune sœur ?
- Vous complétez l'analyse des exons 2, 3 et 5 et découvrez que la maman et la jeune sœur ont le génotype [E148Q];[M694V]. Un des frères asymptomatiques est porteur du variant E148Q.
- Comment interprétez-vous ces résultats complémentaires ?

CAS N°6

Mathias, fils unique âgé de 10 ans vient en consultation avec ses deux parents. Il présente depuis l'âge de 5 ans des épisodes de fièvre à 38.5°C, une fois tous les six mois et durant en moyenne 24 heures. Les parents se souviennent avoir vu plusieurs fois des plaques de boutons chez Mathias mais ils ne se souviennent pas si ces manifestations cutanées étaient contemporaines de la fièvre. Mathias présente par ailleurs depuis l'âge de 6 ans une surdité de perception bilatérale appareillée. Les deux parents sont asymptomatiques.

- A quel diagnostic pensez-vous ?
- Quelle analyse allez-vous demander en première intention pour confirmer votre hypothèse?

Le résultat est positif.

- Quelle analyse pouvez-vous alors proposer ?

Le criblage moléculaire met en évidence la mutation p.Thr348Met à l'état hétérozygote chez Mathias, alors qu'elle n'est retrouvée chez aucun des deux parents.

- Pouvez-vous rassurer les parents quant à leur risque d'avoir un second enfant malade ?

CAS N°7

Des analyses complémentaires ont été réalisées chez la jeune femme N°3. On découvre une mutation C30R dans le gène *TNFRSF1A*.

- Comment interprétez-vous ce résultat complémentaire ?
- Que conseillez-vous ?

Cette jeune femme a pris des anti-TNF puis des anti-IL1 et va mieux. Elle a pu avoir un enfant. Son médecin ravi vous envoie une amie qui présente des symptômes qu'il décrit comme similaires. Cependant les crises sont plus courtes et les éruptions cutanées ressemblent à de l'urticaire. Elle a aussi des aphtes fréquents. Elle vient d'avoir une petite fille couverte d'urticaire à la naissance qui a fait deux méningites néonatales.

Vous réaliser comme indiqué sur la prescription un test de TRAPS, vous trouvez le variant R92Q dans l'exon 3.

- Comment interprétez-vous ce résultat complémentaire ?
- Que conseillez-vous ?