

E) Les tests génétiques

1) Qu'est-ce qu'un test génétique?

Les tests génétiques englobent deux grandes catégories d'application : d'une part, le **test prédictif, le dépistage des porteurs de gènes délétères et le test diagnostique**, et d'autre part, les **empreintes génétiques**. Le test prédictif, le dépistage des porteurs et le test diagnostique sont décrits ci-après. Les empreintes génétiques sont décrites en fin de chapitre.

On sait que les maladies héréditaires sont associées à des anomalies dans certains gènes ou chromosomes particuliers. Ainsi, on sait que plusieurs maladies sont liées à des mutations génétiques particulières, comme la maladie Tay-Sachs et la fibrose kystique. (ou mucoviscidose) **Le test prédictif, le dépistage des porteurs et le test diagnostique** permettent d'évaluer l'ampleur de ces anomalies dans chaque génome.

Avant d'examiner comment les techniques de dépistage génétique sont employées pour déceler ces maladies et d'autres, il nous faut comprendre comment les gènes défectueux peuvent déclencher la maladie.



Photographie : Conseil national de recherches du Canada

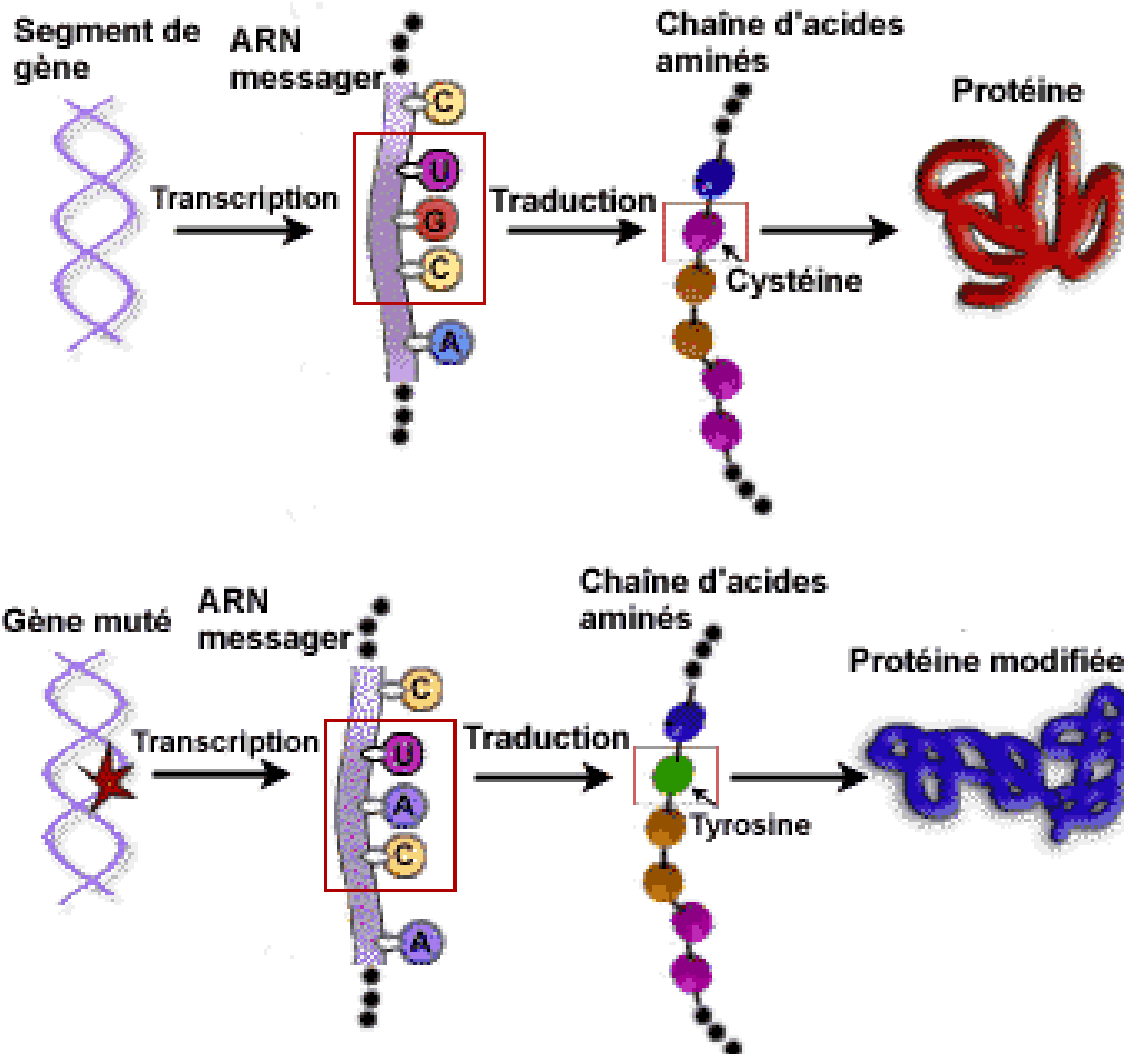
2) Comment les gènes défectueux déclenchent-ils la maladie?

Comme mentionné dans la section sur les composantes biologiques, de nombreux gènes sont transcrits en ARN messager, qui, en fin de compte, synthétise les protéines. Ce sont les protéines qui sont responsables d'importants processus cellulaires. Si un gène particulier est défectueux, son produit protéique ne sera peut-être pas fabriqué ou encore il fonctionnera mal ou de manière trop agressive. **Les symptômes d'une maladie génétique sont le résultat de l'interruption de processus cellulaires vitaux provoquée par l'absence ou le mauvais fonctionnement de protéines.**

Par exemple, la fibrose kystique est généralement provoquée par l'absence d'un segment de gène¹ qui donne lieu à une malformation de la protéine de transport membranaire de la cellule. Cette malformation entraîne en fin de compte l'accumulation d'un épais mucus dans les poumons et les voies aériennes du corps. Les cancers sont provoqués par des cellules qui se divisent et prolifèrent de manière incontrôlable. Les gènes défectueux, que l'on appelle oncogènes, peuvent donner lieu à une prolifération cellulaire.

L'absence ou le mauvais fonctionnement d'une protéine peut être le résultat d'une mutation génétique. Une *mutation* génétique est simplement une altération des nucléotides qui constituent un gène. Elle peut prendre la forme du remplacement d'un nucléotide par un autre, ce qui entraîne la substitution d'un acide aminé par un autre sur la chaîne protéique qui en résulte. Par exemple, la séquence d'ARN UGC code pour un acide aminé appelé *cystéine* dans la chaîne protéique résultante. Si le nucléotide guanine (G) était remplacé par un nucléotide adénine (A), la nouvelle séquence UAC coderait pour la *tyrosine*, un acide aminé différent. La protéine produite pourrait prendre une forme différente, car la cystéine peut

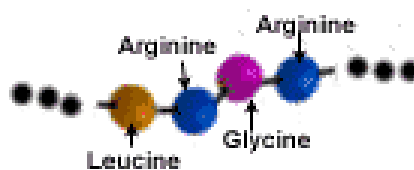
former des liaisons particulières avec d'autres segments de la chaîne protéique (appelée liaisons disulfures), ce qui n'est pas le cas de la tyrosine.



La perte ou le gain d'un nucléotide dans une séquence génétique constitue un autre type de mutation, qui peut entraîner la production d'une protéine tout à fait différente, car la « phase de lecture » est modifiée. Envisageons l'exemple suivant : supposons que la version normale d'un brin d'ARN messenger renferme ce qui suit :



La chaîne d'acides aminés codée pour cette séquence est



Ceci se produit, car UUG code pour la leucine, CGA et CGG codent pour l'arginine, et GGG code pour la glycine.

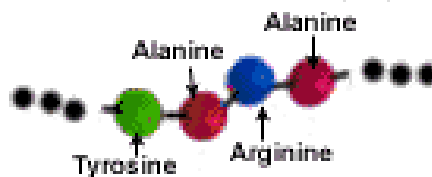
Imaginons maintenant qu'on ajoute une adénine (A) supplémentaire après la première uracile (U) :



Comme les nucléotides sont toujours « lus » en triplet par un ribosome lors de la fabrication d'une protéine, ils seront lus comme suit :



Maintenant, la séquence d'acides aminés sera :



car UAU code pour la tyrosine, GCG code pour l'alanine et AGG code pour l'arginine. En conséquence, l'ajout d'un seul nucléotide donne lieu à une séquence complètement différente d'acides aminés (et donc de protéine), car la phase de lecture est décalée d'un seul nucléotide! **D'autres types de mutations entraînent la suppression ou la multiplication de longs segments d'ADN.** En d'autres termes, ou les protéines associées ne sont pas du tout fabriquées, ou elles sont beaucoup plus courtes ou plus longues, ce qui réduit leur capacité de faire leur travail correctement.

3) Comment se produit la mutation génétique?

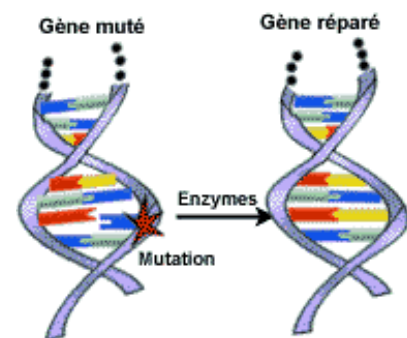
Les mutations génétiques peuvent soit être *héréditaires* soit être *acquises* pendant la vie d'une personne. Une mutation *héréditaire* sera présente dans toutes les cellules d'une personne et sera transmise à sa descendance, car les cellules reproductrices de la personne (**sperme ou ovule**) **renferment la mutation**.

Les mutations *acquises* peuvent se produire dans l'ADN de cellules individuelles sous l'action de nombreux facteurs possibles. Par exemple, des mutations dans l'ADN des cellules de la peau peuvent être provoquées par l'**exposition aux rayons ultraviolets du soleil**. Les mutations génétiques dans d'autres cellules peuvent être provoquées par des erreurs qui se produisent juste avant la division cellulaire, pendant laquelle une cellule réplique son ADN avant de se diviser en deux.



En général, les mutations qui se produisent sont rapidement réparées, avant que la mutation ne soit transmise aux cellules des descendants, par une **batterie d'enzymes qui scrutent constamment l'ADN pour déceler les erreurs**. Toutefois, parfois, ces enzymes de réparation échouent, ce qui entraîne des mutations non corrigées susceptibles de provoquer des troubles.

Il convient de noter que **90 à 95 p. 100 de tous les cancers sont attribuables à des mutations acquises² et non héréditaires**. En conséquence, l'absence de mutations cancérogènes avant la naissance ou à un jeune âge ne garantit pas qu'une personne n'aura pas un cancer plus tard dans sa vie par suite d'une ou de plusieurs mutations acquises.



4) Effectue-t-on des tests génétiques en recherchant des mutations uniquement dans un échantillon d'ADN?

Habituellement, on effectue les tests prédictifs et diagnostiques et le dépistage des porteurs pour déceler des mutations génétiques en examinant l'ADN d'une personne. Cependant, il ne s'agit pas de la seule méthode employée pour déterminer si l'ADN d'une personne a subi une mutation particulière.

Il existe un autre moyen de déceler la présence de mutations. Lorsqu'on constate l'absence ou le mauvais fonctionnement d'une protéine -- et quand on peut les attribuer à une mutation (ou

plusieurs mutations) d'un *simple gène* - on parle de **test génétique fonctionnel**. Le test fonctionnel a l'avantage de pouvoir démontrer non seulement la présence d'un gène muté, mais aussi qu'il fabrique une protéine anormale ou encore qu'il ne fabrique aucune protéine.

Si l'on peut déceler des mutations dans l'ADN d'une personne en examinant ses protéines, c'est parce que des gènes particuliers codent pour un ARN messager particulier qui, à son tour, code pour des protéines distinctes. En conséquence, une **analyse de l'ARN ou des protéines d'une personne (ou leur absence, si un gène défectueux empêche leur production!)** peut révéler la présence d'une mutation génétique particulière dans l'ADN d'une personne.

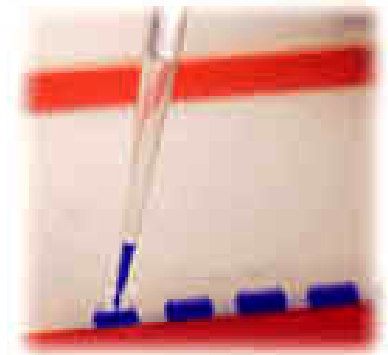
5) Tests génétiques à l'aide de l'ADN : a) test direct et b) analyse de liaison

Voir en fin de chapitre pour obtenir des illustrations étape par étape du processus de test génétique

a) Test direct de l'ADN

Le test direct vise à déceler une mutation génétique particulière (ou plusieurs mutations) que l'on sait à l'origine de maladie. Pour ce faire, on peut examiner l'ADN d'une personne, l'ARN, les protéines ou d'autres produits d'expression génique. **Le test direct de l'ADN est réalisé comme suit :**

- Tout d'abord, on prélève un échantillon des cellules de l'individu à tester. En général, on utilise des cellules sanguines, car ce sont les plus faciles à prélever.
- Ensuite, on extrait l'ADN des cellules. Presque toutes les cellules du corps d'une personne contiennent une série identique et complète d'ADN. En conséquence, l'ADN obtenu d'une cellule, quelle qu'elle soit, peut être utilisé pour déceler une mutation.
- L'ADN est rompu à l'aide d'enzymes appelés **endonucléases de restriction**. Ces enzymes coupent l'ADN en des sites précis.
- Les morceaux sont ensuite triés selon leur taille à l'aide d'une technique appelée **électrophorèse en gel**, comme suit : l'ADN est placé dans un gel d'agarose (produit semblable à de la gelée fabriqué à partir d'algues marines) et on applique un potentiel électrique. Comme l'ADN est chargé négativement, il se déplacera à travers le gel vers le pôle positif. Mais les morceaux plus petits rencontreront moins de résistance que les plus gros, ce qui signifie qu'ils se déplaceront plus rapidement dans le gel.
- Après quelques heures, les fragments d'ADN auront été organisés en fonction de leur taille, les fragments les plus petits ayant été le plus loin, alors que les plus longs auront peut-être à peine bougé par rapport à leur position de départ.
- Ensuite, **les fragments d'ADN sont transférés sur une feuille de nylon**. Le nylon, placé au-dessus du gel, absorbe l'ADN, de sorte que tous les brins d'ADN sont



Photographie : Conseil national de recherches du Canada

transférés tout en gardant leur position relative en fonction de leur taille. Pendant ce processus d'absorption, l'ADN bicaténaire est séparé en brins uniques.

- La feuille de nylon à laquelle l'ADN s'est fixé est placée dans une solution avec des sondes spéciales d'ADN. **Les sondes d'ADN ont été conçues en laboratoire pour se lier à un fragment de gène porteur d'une maladie connue.** Une sonde repère son image symétrique sous la forme du gène infecté et s'y lie.
- Les sondes d'ADN sont radioactives, de sorte que toute sonde qui se lie à la feuille de nylon (et donc à un gène porteur de maladie) peut être décelée³. **On superpose une pellicule photographique sur la feuille de nylon aux fins de détection.** Les gènes porteurs de la maladie qui se sont liés aux sondes d'ADN apparaîtront sur le film comme une série de bandes foncées. Par conséquent, les bandes foncées sur le film à l'endroit prévu (souvenez-vous que l'emplacement de la bande indique la taille du fragment d'ADN) révéleront la présence d'un gène porteur de la maladie.

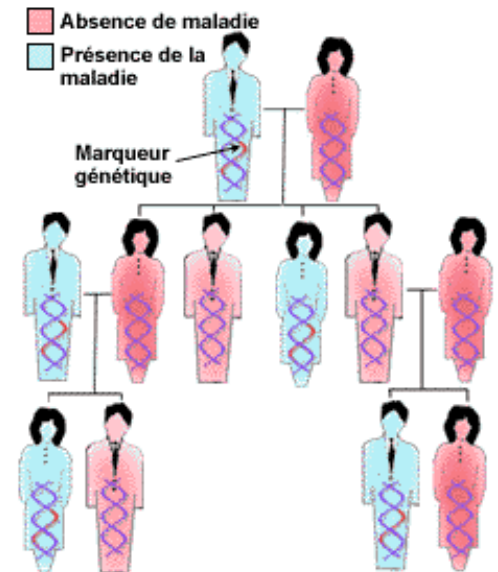
Le test direct est actuellement possible pour des maladies comme la fibrose kystique, la chorée de Huntington (affection qui survient chez les personnes d'âge moyen et qui provoque la démence, puis la mort²), **la dystrophie myotonique** (l'affection musculaire héréditaire la plus courante chez les adultes qui entraîne un affaiblissement et une atrophie musculaire⁴) et **l'achondroplasie** (affection provoquant des difformités osseuses pendant l'enfance et entraînant le nanisme).^{5 6}

Il convient de noter que le test direct ne prédit pas infailliblement avec précision le début d'un trouble génétique. **Les personnes touchées par une certaine mutation génétique ne connaîtront pas toutes la maladie et certaines personnes atteintes ne présenteront pas la mutation recherchée.** Le déclenchement d'un trouble génétique peut aussi dépendre de l'exposition à certaines conditions dans l'environnement d'une personne, ou la maladie peut être provoquée par une autre mutation non recherchée. Par exemple, bien que l'on ait constaté que de nombreuses mutations soient à l'origine de la fibrose kystique, il serait très onéreux et laborieux d'effectuer les tests pour toutes les déceler. On recherche plutôt les 13 mutations les plus courantes, qui représentent environ 88 p. 100 de tous les cas (ce pourcentage varie en fonction de l'origine ethnique). De toute évidence, une personne présentant l'une des mutations plus rares non recherchées pourrait être atteinte de la maladie même si son test génétique était négatif.⁷

Comme ces tests ne sont pas prédictifs à 100 p. 100, l'information obtenue doit être interprétée en tenant compte des antécédents familiaux et, dans certains cas, du diagnostic établi par le médecin au terme de l'examen physique.

(b) Analyse de liaison

Il est également possible de déceler les maladies génétiques sans rechercher les mutations génétiques particulières qui les provoquent. **Il est possible de déceler les maladies génétiques en recherchant les *marqueurs génétiques* chez les membres de familles ayant déjà présenté une affection donnée.** On appelle ce type de test **analyse de liaison**. Les marqueurs génétiques sont des segments d'ADN dont héritent systématiquement les personnes porteuses de la maladie mais qu'on ne retrouve pas chez les membres de la famille qui en sont exempts. Ces segments génétiques sont grands et peuvent contenir de nombreux gènes, ce qui signifie que l'anomalie génétique responsable de l'affection n'aura peut-être pas été déterminée. Dans le cadre de la recherche de marqueurs génétiques, il convient de comparer l'ADN du candidat avec des échantillons d'ADN provenant de membres de sa famille qui sont porteurs de la maladie et de membres en bonne santé.^{8,9}



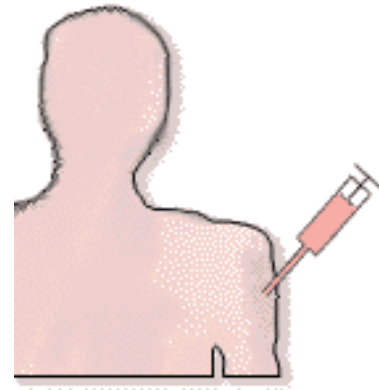
On peut utiliser l'analyse de liaison pour déceler plusieurs maladies héréditaires, y compris le cancer du sein et l'hémophilie. Il convient de noter que l'analyse de liaison n'est pas exacte à 100 p. 100 et n'a de sens que lorsqu'on examine l'information sur un patient en tenant compte de ses antécédents familiaux. Une analyse de liaison positive pour le cancer du sein où une région chromosomique appelée BRCA-1 est examinée pourrait signifier que les risques de cancer du sein sont de l'ordre de 80 p. 100, mais uniquement si le résultat est corroboré par les résultats des tests effectués sur d'autres membres de la famille porteurs et non porteurs.

6) EMPLOI DU TEST DIRECT OU DE L'ANALYSE DE LIAISON GÉNÉTIQUE

TEST PRÉDICTIF

Le test direct et l'analyse de liaison génétique peuvent être employés pour identifier les personnes qui risquent d'attraper une maladie, et ce, avant l'apparition des symptômes. On appelle ce genre de test un *test prédictif*. On l'effectue afin **d'examiner les troubles familiaux attribuables à une anomalie génétique connue.**

Mais que vous révèle un test prédictif? Un test précis vous indiquera si vous *présentez ou non une mutation génétique liée à la maladie*. Vous *contracterez ou non la maladie selon le mode d'interaction de la mutation avec plusieurs autres facteurs*. En d'autres termes, ce n'est pas parce qu'il y a une mutation que la personne contractera *obligatoirement la maladie*, bien que dans de nombreux cas, les risques soient *relativement élevés*

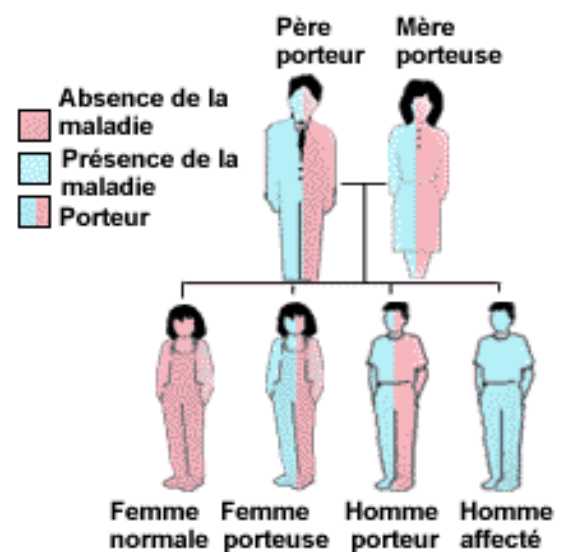


Par ailleurs, un test négatif ne garantit pas à la personne qu'elle n'aura pas la maladie en question, mais qu'elle court le même risque de contracter la maladie par une *mutation acquise* que d'autres personnes n'ayant pas hérité de la mutation. Souvenez-vous que plus de 90 p. 100 des cancers sont provoqués par des mutations acquises. De plus, un membre d'une famille ayant des antécédents concernant un trouble génétique donné peut avoir hérité d'un gène de susceptibilité différent et inconnu non décelé par le test.

DÉPISTAGE DES PORTEURS

Parfois, les gens **sont porteurs d'une partie du patrimoine génétique d'un trouble héréditaire, mais ne sont pas affectés par la maladie elle-même**. C'est pourquoi, au sein d'une même famille ayant des antécédents d'une maladie héréditaire donnée, des membres bien portants peuvent avoir des enfants atteints du trouble en question.

On peut avoir recours au dépistage des porteurs pour aider les couples en bonne santé dont l'un ou les deux conjoints ont des antécédents familiaux d'un certain trouble héréditaire. Le test peut permettre de déterminer si l'un d'entre eux est porteur d'une partie du patrimoine génétique du trouble et donc si le risque de donner naissance à un enfant affecté est élevé. Les tests directs ou l'analyse de liaison peuvent être effectués pour des maladies comme la fibrose kystique, la drépanocytose (présence d'une hémoglobine anormale, et problèmes sanguins) ...



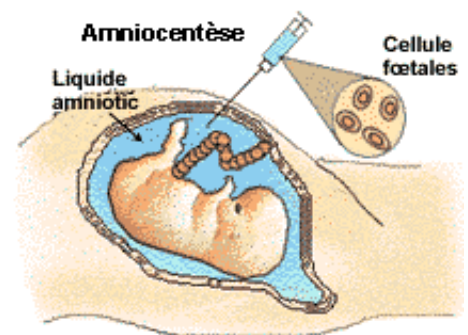
TEST DIAGNOSTIC

Examen du nouveau-né

Il est possible de vérifier la présence de mutations génétiques, l'absence de protéines et de produits géniques ou encore la présence de protéines ou de produits géniques anormaux dans le sang prélevé de nouveau-nés. Ainsi, on peut effectuer des tests pour détecter la présence d'un enzyme appelé phénylalanine hydroxylase. L'absence de cet enzyme entraîne une affection rare mais traitable appelée **phénylcétonurie** (trouble de la transformation de la phénylalanine)¹⁰ Le test direct et l'analyse de liaison pour d'autres affections peuvent également être effectués, entre autres le test pour le **syndrome de Down** (plus connu sous le nom de trisomie 21 ou mongolisme), provoqué par la présence d'un chromosome 21 surnuméraire (les individus normaux ont seulement une paire de chaque chromosome)

Tests prénatals

Il est possible d'effectuer des tests directs et des analyses de liaison sur un fœtus avant sa naissance afin de prédire et de diagnostiquer des troubles héréditaires. Pour ce faire, on analyse l'ADN tiré des cellules fœtales comme on isole et analyse l'ADN de cellules humaines adultes. Il est cependant plus difficile de prélever des cellules fœtales que des cellules sur un adulte. Dans ce dernier cas, on peut utiliser les globules blancs obtenus d'un prélèvement sanguin. Actuellement, on obtient les cellules fœtales en procédant à une **amniocentèse** ou à un **prélèvement des villosités choriales**. Ces deux techniques prévoient l'extraction de cellules fœtales du liquide amniotique ou du placenta à l'aide d'une aiguille enfoncée dans l'utérus de la mère.



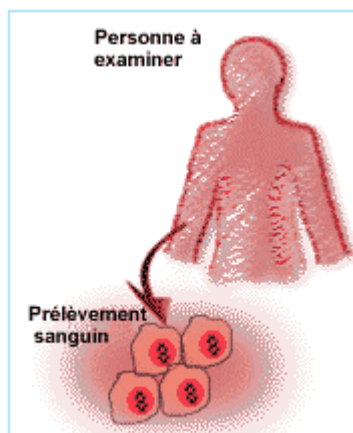
Malheureusement, ces deux procédures présentent un faible risque de fausse couche. C'est pourquoi l'on recherche actuellement des méthodes plus sûres. On pourrait par exemple tirer parti du fait que les cellules fœtales s'écoulent dans le courant sanguin de la mère -- à raison d'une cellule sur un million de cellules sanguines de la mère. En novembre 1996, les scientifiques de l'Université de Californie ont annoncé qu'ils avaient réussi à isoler des globules rouges fœtaux immatures du courant sanguin de la mère, qui pourraient servir pour des tests génétiques. Cette nouvelle procédure en est encore au stade expérimental et, en septembre 1998, elle n'avait pas encore été approuvée en vue d'une utilisation générale.

Liste des ouvrages de référence

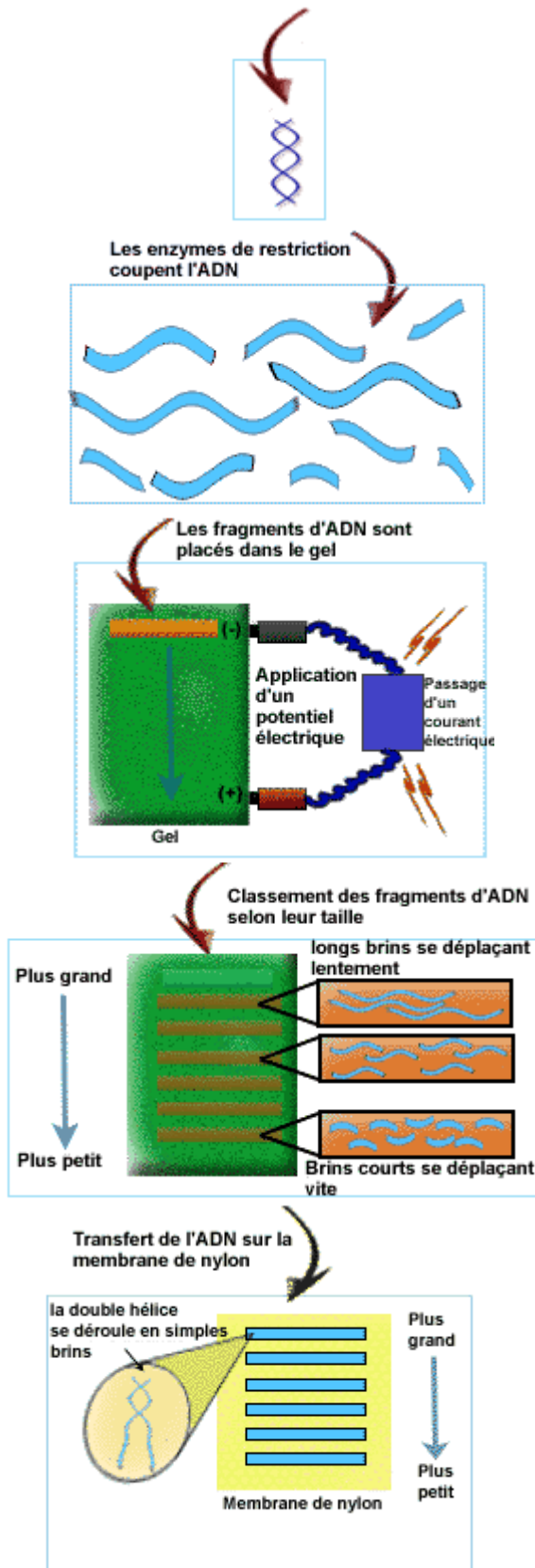
1. « What is Genetic Testing » sur la page d'information sur la fibrose kystique de l'Université du Michigan [Cité le 5 août 1998]
<http://www.phd.msu.edu/cf/fam.html#geneticstest>

2. U.S. Department of Health and Human Services, Understanding Gene Testing, National Cancer Institute, États-Unis, 1995, p. 11-16
3. « DNA Fingerprinting in Human Health and Society » dans Access Excellence Genentech - About Biotech [Cité le 6 août 1998]
http://www.gene.com/ae/AB/IWT/DNA_Fingerprinting_Basics.htm
4. « Bulletin: Gene for Myotonic Dystrophy Discovered » dans Réseau canadien sur les maladies génétiques [Cité le 27 août 1998]
<http://www.cgdn.generes.ca/articles/Myotonic.html>
5. « Paediatric Bone Disorders » dans WorldOrtho Electronic Textbook [Cité le 27 août 1998] http://www.worldortho.com/database/etext/bone_disorders.html
6. « Test Descriptions » dans University of Utah DNA Diagnostic Laboratory [Cité le 27 août 1998] <http://www-medlib.med.utah.edu/dnadx>
7. « Cystic Fibrosis Mutation Screen » dans University of Utah DNA Diagnostic Laboratory [Cité le 27 août 1998] <http://www-medlib.med.utah.edu/dnadx>
8. « What is Genetic Testing? » dans Ethical, Legal and Social Issues dans Science [Cité le 5 août 1998] <http://www.lbl.gov/Education/ELSI/genetic-testing.html>
9. « What is Genetic Testing » sur la page d'information sur la fibrose kystique de l'Université du Michigan [Cité le 5 août 1998]
<http://www.phd.msu.edu/cf/fam.html#geneticstest>
10. V.E. Schuett, ed., « What is PKU? » sur la page d'accueil de PKU News [Cité le 2 septembre 1998] <http://www.wolfenet.com/~kronmal/about/about.htm>

Dépistage génétique de maladies



1. Prélèvement de cellules de la personne.



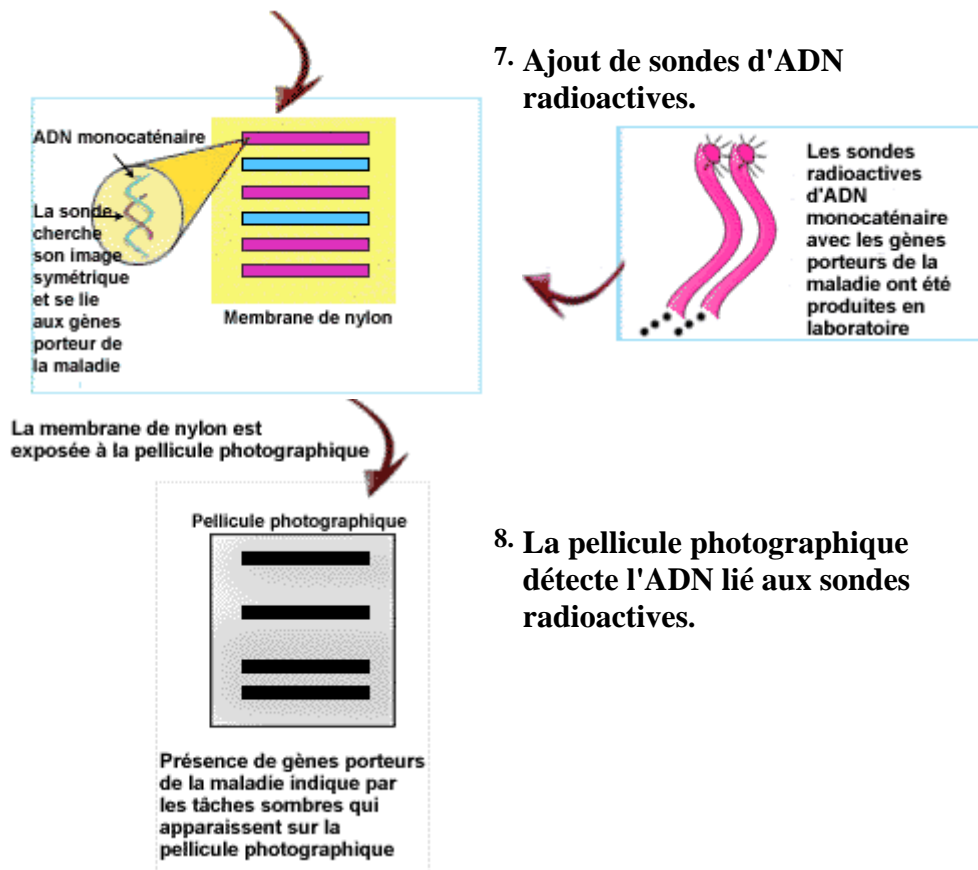
2. Extraction de l'ADN des cellules.

3. L'ADN est coupé en fragments bicaténaires.

4. Électrophorèse en gel des fragments d'ADN.

5. Les morceaux d'ADN courts ont parcouru une plus grande distance dans le gel que les fragments longs.

6. La membrane de nylon est placée au-dessus du gel et absorbe l'ADN. Au cours du processus, la double hélice d'ADN se déroule en simples brins.



7) Les empreintes génétiques

La séquence complète d'ADN d'une personne est composée de plus de trois milliards de nucléotides. Bien que la séquence soit identique dans une proportion de 99,9 p. 100 à celle des autres êtres humains, il reste 0,1 p. 100, soit quelque trois millions de nucléotides, qui est propre à la personne en question. Par conséquent, à l'exception des jumeaux monozygotes, dont les séquences d'ADN sont pareilles, personne n'a exactement le même ADN que son voisin. Cette distinction génétique peut s'avérer un puissant outil pour *identifier des personnes*, au même titre que les empreintes digitales propres d'une personne.

Comme presque toutes les cellules du corps d'une personne contiennent la même série complète d'ADN, l'ADN isolé de sang séché, de sperme ou même d'un cheveu retrouvé sur les lieux d'un crime peut être comparé à l'échantillon d'ADN prélevé d'un suspect et permet de prouver si ce dernier était présent sur les lieux du crime, de la même façon que le permettraient les empreintes digitales. Guy Paul Morin, de l'Ontario, au



Canada, a été condamné à tort pour meurtre, puis disculpé grâce au test d'ADN plus de 10 ans plus tard.¹ À l'aide d'une procédure appelée amplification en chaîne par la polymérase (ACP), qui reproduit rapidement l'ADN, on peut analyser l'ADN sur de minuscules quantités de tissus, ce qui rend la tâche difficile au criminel qui veut faire disparaître toute preuve des lieux d'un crime.

Les empreintes génétiques peuvent également être utilisées dans les tests de paternité pour identifier les parents biologiques d'un enfant ou à la suite d'accidents graves, de catastrophes ou de guerres pour identifier les morts. Cette puissante technologie n'est pas seulement utile pour identifier les humains. Le Service canadien des forêts en Colombie-Britannique met actuellement au point des méthodes pour « établir les empreintes génétiques » d'arbres précieux de sorte à pouvoir les retracer en cas de vol.²

Comment procède-t-on?

En théorie, on peut établir les empreintes génétiques en séquençant des génomes entiers et en les comparant pour voir s'ils correspondent. Mais il faudrait des années pour déterminer la séquence exacte des trois milliards de nucléotides qui composent l'ADN d'une personne, procédure qui serait par ailleurs extrêmement coûteuse. Heureusement, la différence entre les gens se concentre dans des régions particulières de leur ADN. Ces régions, constituées de courts segments de 15 nucléotides hautement répétés, s'appellent *minisatellites*.

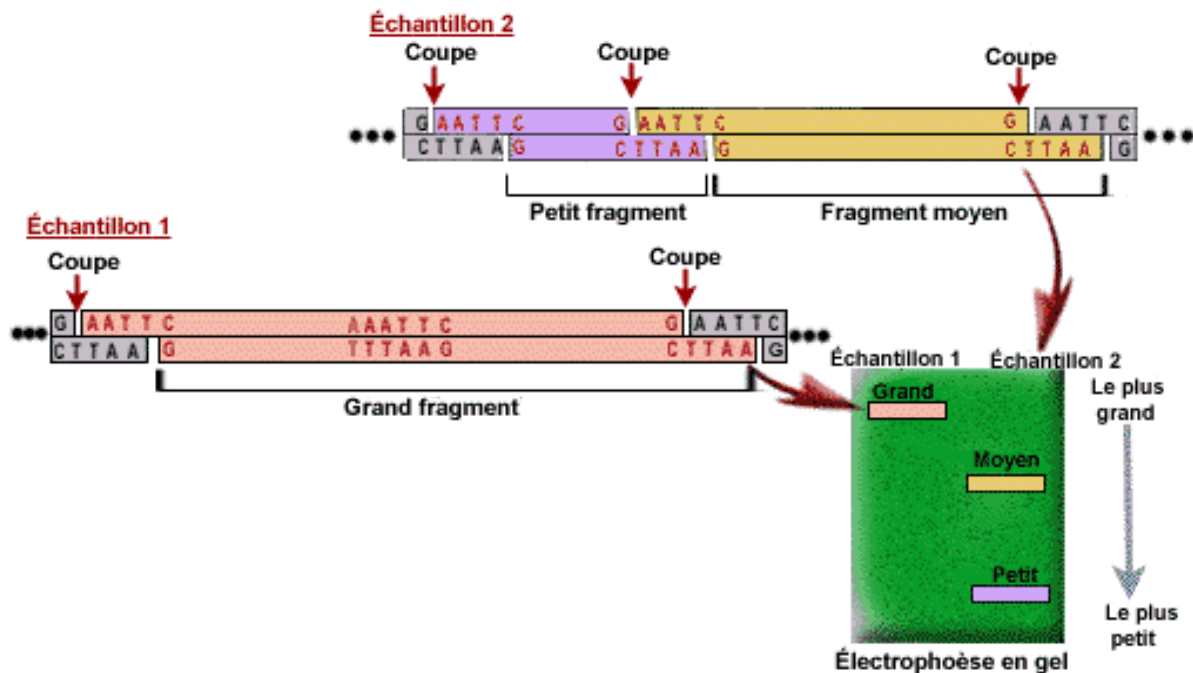
L'emplacement et le nombre de répétitions de tout minisatellite particulier sont fort variables. La probabilité que deux personnes sans liens familiaux aient un minisatellite possédant le même emplacement et le même nombre de répétitions est d'environ 1 sur 10 milliards. Lorsque plusieurs minisatellites sont analysés en même temps, la probabilité diminue encore et est à toutes fins pratiques de zéro.³

Il nous suffit donc de localiser certains de ces minisatellites et d'en déterminer la longueur. Celle-ci donne une indication du nombre de répétitions de la séquence de 15 nucléotides.

La technique employée dans le dépistage génétique de maladies est similaire à celle des empreintes génétiques. Elle est illustrée 2 pages avant.

Tout d'abord, l'ADN est découpé à l'aide d'enzymes appelés **endonucléases de restriction**, qui coupent l'ADN en des sites distinctifs. Comme l'emplacement de ces sites varie d'une personne à l'autre, il en sera de même pour la longueur des fragments qui en résultent. Dans l'illustration ci-après, l'enzyme utilisé, l'*Eco RI*, reconnaît la séquence GAATTC (sa séquence complémentaire CTTAAG correspond à GAATTC à l'envers!) et coupe entre le G et le premier A.

Les fragments sont ensuite classés selon leur taille, puis incubés avec des sondes d'ADN. Les sondes ont été conçues de sorte à se lier à des minisatellites particuliers. En général, on utilise simultanément cinq à dix types de sondes qui reconnaissent différents minisatellites. Lorsqu'une sonde se lie à un fragment d'ADN, elle permet de le détecter.



On compare les fragments détectés des deux échantillons. Si les fragments sont tous de la même taille, on peut conclure que les deux échantillons proviennent du même individu. Enfin, on utilise des ordinateurs pour calculer la probabilité que cette correspondance soit le fruit d'une pure coïncidence. Ce calcul peut être très compliqué, puisque la fréquence de différentes compositions d'ADN de différents gènes varie selon la population.⁴ En général, les probabilités d'une telle coïncidence sont de 1 sur plusieurs milliards, ce qui fait des empreintes génétiques une méthode d'identification des personnes extrêmement fiable.

Liste des ouvrages de référence

1. « Ensuring justice » dans The Ottawa Citizen (le 4 juillet 1996) [Cité le 3 septembre 1998] http://www.ottawacitizen.com/ARCHIVE_1996/july4/dia/dia1/dia1.html
2. « Telling the Wood from the Trees » dans The Economist, le 25 juillet 1998, p. 78.
3. P.H. Raven et G.B. Johnson, Biology, troisième édition., (St. Louis: Mosby Year Book, 1992), 364

4. E.S. Lander, « Use of DNA in Identification » dans MIT Biology Hypertext [Cité le 3 septembre 1998

<http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/rdna/landerfinger.html>

Complément:



Graph B A A X

La puce à ADN

Des diagnostics immédiats

Pas plus grande qu'une boîte d'allumettes, cet outil médical permettra de détecter en un temps record les maladies génétiques et facilitera le décryptage du génome actuellement en cours. Aujourd'hui dans les laboratoires. Demain chez votre médecin?

Le 30 octobre 2000

***Santa Clara* envoyé spécial**

La puce mise au point par Affymetrix à Santa Clara (Californie), la Genechip ou puce à ADN devrait bouleverser les méthodes de travail de tous ceux qui, à un titre ou un autre, s'occupent des questions de santé. Après-demain, dès demain peut-être, ce petit bijou pas plus grand qu'une boîte d'allumettes qui combine les trouvailles des technologies de l'information et les acquis des sciences de la vie permettra de diagnostiquer en un temps record, de quelques heures à quelques minutes, la prédisposition ou le développement de maladies génétiques chez des patients, de repérer l'évolution prévisible de leurs «fondamentaux héréditaires» (tendances à l'obésité, calvitie, etc.) mais aussi de détecter la présence de virus dans l'eau, dans l'air, dans les aliments, ou bien l'intrusion des fameux organismes génétiquement modifiés (OGM) dans les produits issus de l'industrie agroalimentaire. Le matériel de fabrication de cet outil de rêve ou de cauchemar ressemble grosso modo à celui des classiques semi-conducteurs de l'informatique, mais en lieu et place des circuits, les puces sont «gravées» avec du «vivant», des morceaux d'ADN, le support du programme génétique humain.

Des milliers de gènes. Réservées pour l'instant aux chercheurs des grands laboratoires pharmaceutiques qui travaillent sur la détection des gènes et la préparation de nouveaux médicaments, les puces à ADN vont envahir un jour hôpitaux et peut-être même les dispensaires des médecins. Le PDG d'Affymetrix, Steve Fodor, a fait le choix de puces à «high density» ADN et aujourd'hui il ne le regrette pas : *«Nos puces permettent de repérer en une seule fois non pas quelques gènes, mais des milliers [actuellement près de 12 000, sur les puces les plus performantes]. C'est capital, car nous répondons ainsi au souci de la génétique moderne qui considère le génome comme un ensemble, une association de milliers de gènes. Nos puces peuvent contenir des centaines de milliers de bases, ce qu'aucun concurrent n'offre aujourd'hui. Or cette densité reste indispensable pour mieux comprendre toutes les implications biologiques que présente le génome humain. En outre, ce choix répond aussi à des coûts de revient»,* nous a-t-il expliqué.

Ce chapitre récent de la révolution génomique s'appuie sur une ancienne découverte de la biologie moléculaire : la complémentarité des deux longs filaments en double hélice de l'ADN. Ceux-ci sont composés de quatre «bases» (oligonucléotides) fonctionnant par paires : les bases d'adénine (A) d'un brin de l'ADN s'apparient avec les bases de thymine (T) de l'autre brin, les bases de guanine (G) avec les bases de cytosine (C). Et vice versa.

Il y a une dizaine d'années plusieurs équipes de chercheurs (lire page suivante le texte de Francis Gallibert) mettent au point une méthode permettant d'identifier les séquences des trois milliards de paires de bases qui composent l'ADN : c'est le séquençage par hybridation (1). Les scientifiques cherchent parallèlement des solutions pour effectuer en une seule fois l'analyse de plusieurs séquences génétiques. Certaines techniques automatisées existent déjà dans les laboratoires, mais souvent lourdes, imparfaites, elles nécessitent un matériel coûteux et encombrant. Ce sera le coup de génie des chercheurs d'Affymetrix de répondre à cette demande : installés au cœur de la Silicon Valley, ils savent que les puces électroniques permettent de réaliser simultanément de nombreuses opérations et qu'elles sont promises à des progrès exponentiels. La puce à ADN façon Affy voit le jour au tout début des années 90 et fait appel aux techniques de la photolithographie (lire ci-dessous et infographie page 63) utilisées pour graver les puces de silicium.

Pour l'heure, les choix de Steve Fodor semblent avoir payé. Très proche voisine de Yahoo et autres ex-start-up désormais prospères, Affymetrix emploie près de 700 personnes dans plusieurs corps de bâtiments bas et sans caractère, bien dans la note tristounette de la Silicon Valley. Résultat : la valeur boursière de la société de Fodor approche les 3 milliards de dollars, et pour l'instant les concurrents sérieux, au moins au plan de la réalisation industrielle, sont encore rares. Elle possède déjà ses titres de gloire avec, notamment, dès 1991, la mise au point d'une puce permettant d'analyser les mutations du virus du sida (VIH). Un grand laboratoire américain l'utilise déjà pour effectuer ses tests, la puce opère sur une séquence de 1 500 paires de bases du génome VIH-1 et repère les mutations causant des résistances à certains médicaments .

Dans sa collection de produits déjà commercialisés, Affy propose aussi la puce G110 qui «travaille» sur les séquences génétiques les plus couramment impliquées dans divers cancers humains. Ou encore une puce qui permet de détecter les mutations du gène P53 (un suppresseur de tumeurs) actives dans de nombreux cancers. Du coup, Affy engrange les clients et partenaires prestigieux de l'industrie pharmaceutique, affolés à l'idée de loper le virage Biochip: les Suisses Roche et Novartis, les Américains de Bristol-Myers, les Anglais de Glaxo-Wellcome ou le Japonais Takara Shuzo.

En France, Affy s'est associé avec BioMérieux, filiale de Pasteur-Mérieux, engagé avec la Lyonnaise des eaux dans un programme d'analyse microbiologique de l'eau. A terme, BioMérieux voudrait lancer des puces capables d'identifier des myco-bactéries et divers germes pathogènes. Pour l'instant, Affymetrix reste la seule société capable de participer à un programme aussi ambitieux. Steve Fodor n'entend pas modifier le cap : «*Notre désir est de doper nos puces : encore plus d'informations génétiques et de meilleure qualité. Bientôt, nous pourrions accrocher 60 millions de bases sur une seule puce. Cela permettrait de séquencer les 50 prochains gènes du Human Genom Project en moins d'un an*», affirme-t-il.

La recherche s'emballe. Néanmoins, depuis quelques années, la recherche sur de nouveaux types de biopuces s'emballe. Une équipe de la Purdue University, dans l'Indiana, affirme avoir mis au point une puce à base de silicium sur lequel s'accroche des milliers de protéines. Avantage par rapport aux puces à ADN classiques : les protéines interagissent avec des molécules spécifiques. Le champ d'investigation s'en trouve donc beaucoup plus resserré et précis, et ces puces deviennent l'outil idéal dans la chasse aux bactéries. D'après les universitaires associés au projet, le système est fiable. Michael Ladisch, un des concepteurs, envisage des dizaines d'applications possibles : d'abord le diagnostic médical de maladies communes. Mais aussi la détection d'agents bactériens présents dans divers environnements. Lors d'un conflit militaire, des capteurs, éparpillés sur le champ de bataille, donneraient l'alerte en cas d'attaque chimique ou biologique. Le même dispositif, recyclé sur des exploitations agricoles, permettrait d'enrayer dès leur apparition diverses infections bactériennes touchant les animaux. Les essais de la Purdue Biochip se poursuivent en laboratoire. Les brevets sont déjà rédigés. Première application concrète annoncée : la réalisation de capteurs destinés à détecter très tôt la présence dans les aliments de listeria, cause de nombreux décès.

Longtemps assoupie, la recherche française tente de rattraper son retard. Le Commissariat à l'énergie atomique (CEA) pilote un projet de puce différent de la technique Affymetrix (lire ci-dessous). A l'Ecole centrale de Lyon, l'équipe d'Eliane Souteyrand mène des recherches prometteuses, le projet Rosa. Mais, pour l'heure, Affymetrix domine encore de la tête et des pieds le marché. Ainsi, au grand dam de Francis Gallibert, responsable du génome à la direction du CNRS, le ministère de la Recherche a subventionné l'acquisition de puces et «lecteurs» Affy pour équiper les labos du Centre de l'Inserm. Steve Fodor est en train de réussir son pari : faire de sa société une sorte d'Intel de la génétique.

ALAIN LÉAUTHIER

- (1) Aujourd'hui d'autres méthodes de séquençage sont utilisées par les grands laboratoires publics (tels ceux des centres associés au Human Genom Project, le HGP) ou privés (comme la société américaine Celera, dirigée par le généticien et homme d'affaires Craig Venter) lancés dans la course au décryptage du génome humain.

Comment fonctionnent les biopuces

Les plus courantes utilisent les techniques de la photolithographie.

La surface des puces ADN excède rarement quelques millimètres de côté avec un support en verre ou en silicium. On y fixe, par réaction chimique, des «sondes», c'est-à-dire de courts brins d'ADN dont on connaît la séquence (soit l'agencement particulier des quatre bases, A-T, C-G).

On peut fixer des sondes synthétisées à l'avance ou, comme Affymetrix, les synthétiser *in situ*, directement sur la puce. Il faut alors déposer les couches successives des quatre bases sur les sites correspondant aux séquences génétiques souhaitées. La technique est celle de la photolithographie: grâce à un masque on éclaire la zone à activer alors que les autres sont opaques. L'opération est répétée pour chaque base et autant de fois qu'il y a de sondes.

D'après Francis Gallibert, responsable du génome au CNRS, la méthode d'Affymetrix est imparfaite: environ 5 % des sondes ne s'accrocheraient pas correctement. Les techniciens de Santa Clara rétorquent que la très grande densité des sondes installées sur leurs puces compense largement cet inconvénient.

Les chercheurs français du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) sont en tout cas plutôt d'accord avec l'avis de Francis Gallibert et de quelques autres puisqu'ils travaillent à l'élaboration de puces dotées de sondes synthétisées à l'avance, fixées sur un support en silicium. Une fois la puce programmée, on y injecte l'échantillon à analyser marqué par fluorescence : les brins d'ADN s'hybrideront alors avec les séquences complémentaires des sondes de la puce. Celle-ci est ensuite éclairée par le laser d'un scanner qui active les marqueurs fluorescents: on obtient l'image des séquences pour lesquelles la complémentarité a fonctionné.

Mais de nouvelles techniques de lecture sont à l'étude. L'équipe d'Eliane Souteyrand à l'Ecole centrale de Lyon a ainsi montré que la phase d'hybridation modifie les propriétés électriques des sondes au contact d'un support en silicium. C'est cette modification qui sera désormais lue, occasionnant un énorme gain de temps.

En fait la conception même des biopuces ne cesse de se modifier. Les firmes américaines Rosetta Inpharmatics et Microfab ont ainsi inventé une puce en détournant des cartouches d'impression à jets d'encre pour imprimer les brins d'ADN sur un support en plastique. Nettement moins cher, et tout aussi fiable le procédé a séduit Canon, le géant japonais de l'imprimante et Bill Gates, le fondateur de Microsoft. La course aux biopuces du futur n'est pas près de s'arrêter.

Comment voyez-vous le développement des puces à ADN dans l'avenir?



Le militant

Un risque pour la confidentialité génétique

Laurent Dianoux est président de l'association Génétique et Liberté à laquelle participe, entre autres, Jacques Testard.

L'existence des biopuces renforce le processus d'industrialisation des outils de la biologie. L'avancée technologique est telle qu'on pourra bientôt mettre le génome entier d'un mammifère sur une seule puce. Cela rend brutalement caducs les arguments rassurants qui avaient cours dans les débats bioéthiques, postulant qu'il était impossible d'obtenir le profil génétique complet d'un individu et qu'au pire, en cas de réalisation, le coût en serait bien trop élevé pour être généralisé. Une fois de plus, comme pour le clonage, comme pour la procréation médicalement assistée, la technique prend l'éthique de court.

L'utilisation de ces outils en génétique humaine va amplifier une vision déterministe du tout-génétique selon laquelle nos prédispositions aux maladies communes (cancer, diabète, maladies cardio-vasculaires...), notre façon de répondre différemment aux médicaments, nos troubles métaboliques mais aussi nos comportements (sociaux, culturels, sexuels) ont un fondement génétique. Tout se jouerait sur le 0,1 % de différence en séquence que deux humains ont entre eux. Les biopuces permettent de déterminer au moins l'essentiel, sinon la totalité, de cette différence. La perspective semble exaltante : enfin des diagnostics et des traitements à la carte !

Or il n'est pas sûr qu'il y ait des gènes majeurs dans ces maladies communes, les gènes de susceptibilité ont un risque relatif très faible et les mutations ont des variabilités de pénétrance. Vu la très grande variabilité interindividuelle qui résulte de l'interaction permanente entre les trois domaines le terrain génétique, les facteurs épigénétiques et les facteurs dits environnementaux, rien ne dit que les biopuces puissent discerner des catégories d'individus différentes et d'évaluer de façon fiable un risque. La physiopathologie et la pratique de la médecine n'ont pas forcément à gagner à cette vision de la génétique.

La définition du profil génétique individuel va générer une masse d'informations, et là est bien la question : comme pour les tests génétiques, dont certains sont inutiles et d'autres mal interprétés, que fera-t-on de cette information démultipliée ? Comment va-t-on analyser les résultats, évaluer leur utilité, leur portée ? Quelles seront les conséquences de cette nouvelle connaissance et les droits pour la personne et son entourage sur ces informations ? Ne risque-t-on pas de développer des pratiques discriminatoires qui seront présentées comme un élément de médecine préventive, autrement dit dans l'intérêt de la personne ?

Ce développement technique explosif ne fait qu'aggraver la question de la confidentialité des données génétiques. Sans doute, en France, un cadre juridique existe, qui devrait permettre d'empêcher l'usage individuel de l'information génétique et interdire la réalisation de tests prédictifs à des fins de discrimination économique ou sociale. Mais comme le souligne le Conseil d'Etat (1) : *«Après la lutte contre les inégalités sociales, comment prévenir une prise en compte dangereuse des inégalités biologiques ?»* C'est dans la mise en œuvre des superbes principes (droit à la non-discrimination et à la protection de la confidentialité des données génétiques) que le bât blesse.

Quant au principe de confidentialité des données génétiques, il est sans doute reconnu par l'article 7 de la Déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme, mais avec une portée très relative, puisque l'article 9 prévoit que la loi peut limiter la confidentialité *«pour des raisons impérieuses»*. L'Histoire nous l'a appris : les Etats ont une imagination sans bornes pour découvrir ces *«raisons impérieuses»*.

(1) *«Les lois bioéthiques cinq ans après»*. Rapport du Conseil d'Etat, novembre 1999, p. 71.



DR

Le biochimiste

Utile pour la pharmacie et l'agroalimentaire

par FRANCIS GALLIBERT

Francis Gallibert est professeur de biochimie à la faculté de médecine de Rennes, directeur scientifique adjoint du département des sciences de la vie du CNRS, en charge du génome.

Le champ d'application des puces à ADN est très vaste. Elles permettent d'analyser les variations quantitatives d'expression des ARN messagers (1) en comparant des situations biologiques. Les autres utilisations concernent le génotypage et son corollaire la recherche de mutations, le diagnostic microbiologique aussi bien en pathologie que dans la recherche de contaminants microbiens dans des prélèvements très divers (aliments, eaux, sols, etc.).

Le concept «puces à ADN», ou plutôt à oligonucléotides, date de la fin des années 80. Il doit beaucoup, sinon tout, à Southern, qui imagina l'utilisation de puces à oligonucléotides dans le cadre d'une nouvelle méthode de séquençage de l'ADN proposée indépendamment et parallèlement par des chercheurs tchèque et russe (Dramac et Mirzabikov). Cette méthode par hybridation repose sur l'idée que la connaissance de tous les oligonucléotides (8 à 10 résidus) hybridant spécifiquement sur une chaîne d'ADN par comparaison à ceux qui n'hybrident pas doit permettre d'en déduire la séquence nucléotidique de cette chaîne. Le principe extrêmement élégant de la proposition amena Southern à imaginer et à construire sur un support solide des dizaines d'oligonucléotides qu'on pouvait tester en parallèle par hybridation sur la chaîne d'ADN de séquence inconnue. Après avoir suscité beaucoup d'espoir, la méthode de séquençage par hybridation n'a rien donné, mais le concept des puces à ADN était né.

Très peu de temps, après ce concept à été repris par Lander au Whitehead Institute et développé industriellement par la firme Affymetrix aux Etats-Unis pour analyser les variations ponctuelles de séquence génomique entre individus de la même espèce (génotypage). Les choix technologiques pris et développés, bien que très astucieux et à certains égards efficaces, se sont révélés être un frein au développement des puces en raison du coût de fabrication des masques et du peu d'adaptabilité de la méthode défauts particulièrement gênants en recherche.

D'autres chercheurs ont développé depuis des puces avec une méthode relativement simple et abordable par les laboratoires de biologie des milieux académiques.

De cette évolution, brièvement retracée, il ne faudrait pas en conclure que l'évolution des techniques de fabrication des puces est terminée. En réalité, de nombreux problèmes subsistent, et on peut prédire qu'on reviendra à des puces à oligonucléotides lorsque les problèmes de chimie de surface, notamment, seront correctement solutionnés. Tous les stades depuis la conception, la construction mais aussi la détection des hybrides formés (avec amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité), l'analyse informatique et bio-informatique des données constituent des enjeux majeurs à maîtriser.

Or, la maîtrise de cette technologie en termes de savoir-faire mais aussi d'accessibilité économique est essentielle aux laboratoires publics et privés pour l'exploitation des données de séquençage des génomes dont dépendent pour une part importante les secteurs de la pharmacie et de l'agroalimentaire. Ceci suppose un effort de recherche technologique et un développement important de sociétés de services offrant la construction à façon de puces à ADN, gage d'une baisse importante des coûts de leur utilisation. Il est primordial que ce qui

s'est passé il y a quinze ans avec l'offre massive d'oligonucléotides de synthèse à façon se reproduise avec les puces à ADN.

(1) ARN messagers : copie de l'ADN qui permet à la cellule de fabriquer les protéines sur commande