



Fiche 3 : Application à la génétique médicale

I) Achondroplasie

A) Généralités

C'est une **maladie rare**, mais qui reste la plus fréquente des **chondrodysplasies** (touche les cartilages, importants pour la croissance osseuse). **(1/15 000)**.

Le diagnostic est quasiment toujours évoqué **sur signes d'appel échographiques** (« fémurs courts »), notamment lors de l'échographie du 2^e trimestre.

(Il y a 3 échographies dans une grossesse : 1^{er} trimestre, 6 mois, fin de grossesse).

L'échographie à 6 mois vise à chercher des signes de malformations et des anomalies morphologiques chez le fœtus. Lors de la surveillance d'un fœtus, on réalise des mesures, ce sont des biométries fœtales, dans lesquelles on mesure la taille des os longs et notamment des **fémurs**.

B) Signe clinique

Chez un fœtus achondroplase, les fémurs seront beaucoup trop petits par rapport à la taille des fémurs habituels.

L'achondroplasie réunit plusieurs choses :

- Petite taille / **nanisme** : 130 cm,
- Membres courts**,
- Hyperlordose**,
- Mains courtes,
- Macrocéphalie** (appel échographique),
- Dysmorphie faciale** : front haut, ensellure nasale marquée,
- Intelligence normale** ++++,
- Complication neurologiques (myélopathie).

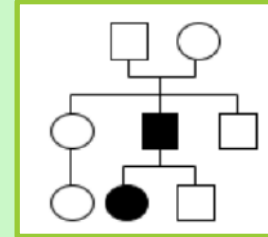


La seule manière de faire le diagnostic d'achondroplasie est par biologie moléculaire.

C) Transmission

C'est une maladie **monogénique**, qui se transmet selon un mode **autosomique dominant** (il suffit que l'un des deux allèles soit muté pour que l'enfant développe la maladie).

Un individu atteint a **1 risque sur 2** de transmettre la maladie, et donc 1 chance sur 2 de ne pas la transmettre à sa descendance (1 allèle sain et un muté).



Néanmoins, **90%** des enfants atteints d'achondroplasie naissent de parents **non atteints**. Ceci s'explique par le fait que dans la majorité des cas, cette maladie est due à une **néomutation**, qui apparaît lors du stade embryonnaire.

Cet individu sera ensuite capable de la transmettre (dans la minorité des cas). Les formes homozygotes sont plus graves que les hétérozygotes, mais ces formes ne se voient pratiquement plus aujourd'hui.

D) Génétique

On peut faire aujourd'hui le diagnostic d'achondroplasie génétiquement puisqu'on connaît le gène responsable : il s'agit de **FGFR3**, *Fibroblast Growth Receptor 3*. Ce dernier code pour **le récepteur d'un facteur de croissance fibroblastique**. Ce facteur de croissance est exprimé dans les chondrocytes (cellules du cartilage), et il régule la différenciation des ostéoblastes et joue un rôle majeur dans la formation osseuse. Ce gène est donc très important pour la **croissance normale des individus**.

*(Si vous ne comprenez pas exactement la formation osseuse via les ostéoblastes **pas de panique** vous aurez de merveilleux cours d'histo là-dessus au S2 !)*

FGFR3
Exon 10
Codon 380
1138

Dans le cas de l'achondroplasie, c'est toujours la même anomalie qui est responsable. C'est ce qui en fait un cas très simple en termes de diagnostic parce que dans la très grande majorité des maladies génétiques, nous retrouvons des mutations ou des gènes complètement différents.

Dans l'achondroplasie, c'est toujours le codon 380 du gène FGFR3 (15 kB*, avec 17 exons) qui est muté.

**kB = kilo base*

Une **guanine** est remplacée par une **adénine** ou une **cytosine**. Cette mutation nucléotidique engendre un remplacement du 1^{er} G qui code pour la **glycine**.

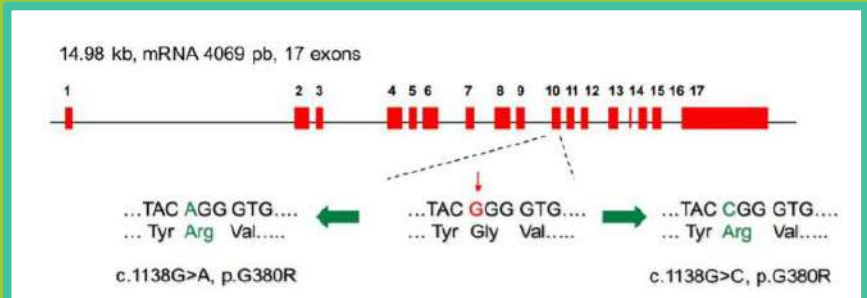
-Si on a **G > A**, la **glycine (GGG)** est remplacée par une **arginine (AGG)**,

-Si on a **G > C**, la **glycine (GGG)** est remplacée par une **arginine (CGG)**.

Les 2 mutations ont la même traduction protéique qui donnera la même maladie : l'achondroplasie. En effet, un allèle donnera la mauvaise protéine et l'autre la bonne protéine.

En résumé :

- On a 1 gène touché,
- 2 mutations possibles,
- Toujours au même endroit,
- Qui donne toujours la même traduction mutée.



E) Diagnostic et cas clinique

« Vous êtes à l'hôpital, et vous êtes appelé par l'équipe d'obstétrique pour une femme enceinte. L'échographiste a reconnu des signes lors de l'écho : fémurs courts faisant penser à une achondroplasie.

La seule manière de diagnostiquer ce fœtus comme malade et de prévoir la suite de la grossesse, c'est le diagnostic génétique par analyse moléculaire du gène FGFR3, en mettant en évidence une mutation. »



Devant un signe d'appel échographique :

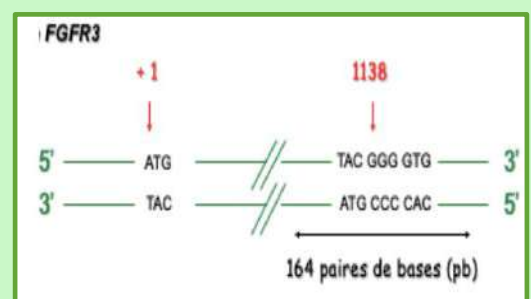
1. Ponction Amniotique :

Lors du prélèvement amniotique (6e / 7e mois de grossesse) on **extraît l'ADN** de cellules amniotiques.

Dans le liquide amniotique baignent des cellules amniotiques provenant de la desquamation de la peau du fœtus ou de l'épithélium urinaire.

2. Amplification par PCR :

Amplification d'un fragment d'ADN (amplicon) de **164 pdb** en encadrant la position 1138, position où siège la mutation. On va partir à la recherche d'une mutation potentielle.



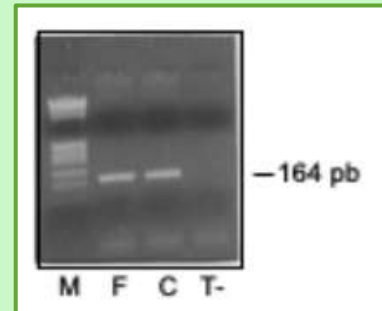
3.Vérification des amplicons sur gel :

Après la PCR, on vérifie qu'elle a fonctionné via un gel et une électrophorèse (on vérifie que la taille des amplicons est bonne). Suite à la coloration par bromure d'éthylène, vous obtenez sous UV le document à droite.

On remarque 4 pistes :

- M (marqueurs moléculaires),
- F (amplicons d'ADN fœtal),
- C (amplicon d'une ADN contrôle qui n'a pas l'achondroplasie),
- T- (témoin négatif noir à pas de contamination à résultats interprétables).


Vous noterez donc que les fragments originaux font 164 pb.




4.Digestions des amplicons par les enzymes :

Vos résultats sont bons : vous réalisez ensuite une digestion enzymatique pour savoir si le fœtus a une mutation, et si oui, laquelle.

On utilise pour cela deux enzymes : **Bfml** et **HpaII**.

 **Bfml** reconnaît la séquence « CTACAG » et coupe en cas de mutation **G >A**. Si elle ne coupe pas, la séquence n'est pas reconnue il n'y a pas la mutation qui remplace une guanine par une adénine.

 **HpaII** reconnaît la séquence « CCGG » et coupe en cas de mutation **G > C**.

Petit récap :

On fait 2 digestions :

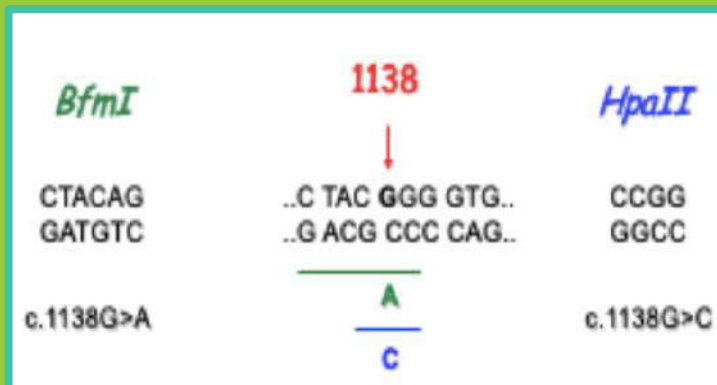
Bfml : Coupe = mutation G > A

Ne coupe pas = pas de mutation G > A

HpaII : Coupe = mutation G > C

Ne coupe pas = pas de mutation G > C

Aucunes enzymes ne coupent = aucunes mutations



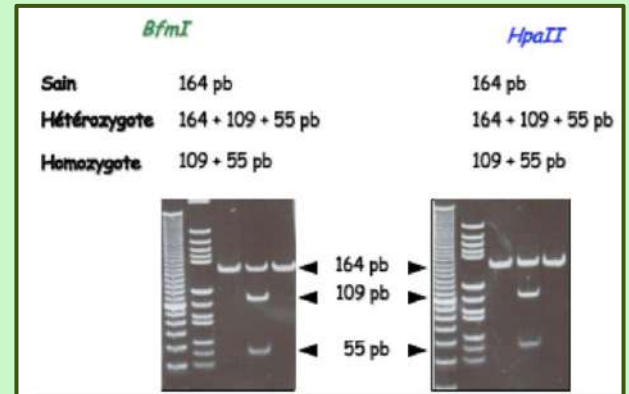
5.Vérification du séquençage :

Une fois la digestion faite, il faut analyser les produits obtenus sur **gel analytique** puis avec une **électrophorèse**.

Voici ce que vous obtenez :

Vous retrouvez à chaque fois (même raisonnement pour les deux enzymes, mais selon si on l'applique pour BfmI ou HpaII, on pourra savoir à quelle mutation on a à faire) :

- La colonne de **marqueurs de poids moléculaire**,
- Une piste avec un **fragment de 164 pb** (**amplicon foetal non digéré**),
- Une quatrième piste au profil totalement différent : c'est **l'ADN foetal après digestion**,
- La dernière colonne est un **ADN contrôle digéré**, chez un foetus **non achondroplase** : 164 pb.



Sur cette quatrième piste, vous avez 3 éléments :

- **Un fragment à 164 pb**, correspondant à l'allèle **sauvage** du foetus, non reconnu par l'enzyme : la mutation est **hétérozygote**,
- **2 nouveau fragments de poids moléculaires différents** : il s'agit de notre allèle **muté**, qui a été **coupé en 2 morceaux** car il présentait un site de reconnaissance pour l'enzyme. Nous avons donc un morceau plus lourd (109 pb) et un plus léger (55 pb).

En effet, on remarque que l'addition de nos deux poids donne le poids de départ ($109 + 55 = 164$). On peut donc en conclure que l'enzyme a coupé notre allèle car il y a eu un site de reconnaissance : l'allèle est muté donc le foetus porte la mutation définie selon l'enzyme utilisée.

Cette électrophorèse signe donc la présence d'allèle sauvage.

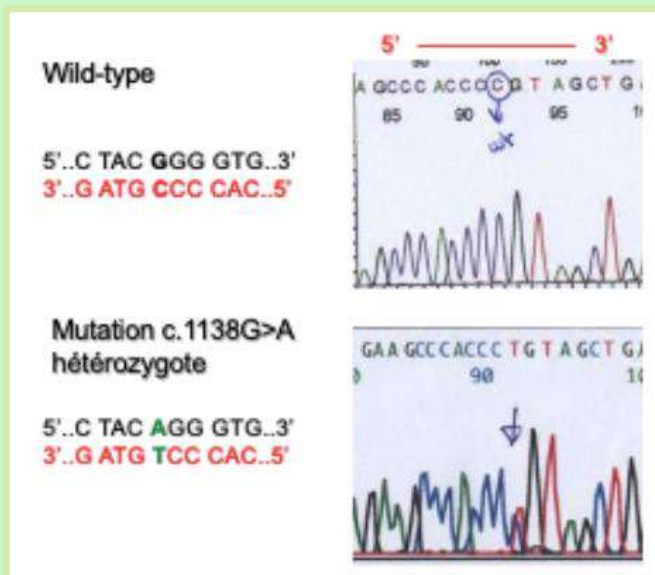
Si on obtient cette électrophorèse suite à la digestion par **BfmII**, alors la mutation est $G > A$.

Si, au contraire, on l'a avec HpaII, alors on a la mutation $G > C$.

À l'inverse, un foetus $G > A$ ne sera pas digéré par HpaII, et un foetus $G > C$ ne sera pas digéré par BfmI. C'est la coupure qui permet de faire le diagnostic.

6) Vérification par séquençage :

En biologie moléculaire, et surtout quand il s'agit de diagnostic prénatal, on essaie toujours d'avoir **une technique de confirmation du résultat**. L'une de ces techniques de confirmation qui a beaucoup évolué ces dernières années, c'est le **séquençage**. On peut, par technique de séquençage de type **Sanger**, lire **directement la séquence des gènes**.



Ici, nous sommes dans une région de l'exon 10 du gène FGFR3 qui correspond à **la séquence sauvage**.

On lit de la droite vers la gauche, et il faut lire l'allèle qui est en rouge. Si on part du G sur la position 96 (arbitraire), vous voyez que de droite à gauche on va lire : GATGCCCCAC.

Là, c'est une séquence qui correspond à un individu sans achondroplasie et qui a les deux exons 10 sauvages du gène FGFR3.

Si vous avez un **patient achondroplase**, vous voyez que le profil est différent, puisqu'on va bien lire GATG, mais que lorsqu'on arrive à une position normale d'un C (par complémentarité, un G), il y a un deuxième pic qui se superpose, pic correspondant à un T et par complémentarité à un A : la mutation est donc un G > A.

Le deuxième graphique appartient donc à un patient atteint d'achondroplasie. **Il y a un allèle FGFR3 sauvage, et un muté en 1138 G > A.**

Le **séquençage** est quelque chose d'extrêmement important, qui a beaucoup évolué ces dernières années. Nous avons des possibilités énormes avec ce que l'on appelle le séquençage haut débit (NGS)

Pas de panique !! le séquençage et le séquençage haut débit seront abordés en cours. Après la pré-rentrée je sortirai le cours complet avec le NGS, etc... Mais pour l'instant maitrisez bien l'intro (je vous ai mis le cours complet), et les fiches avec la PCR, digestion enzymatique...



PS : Philibert est encore là pour illuminer vos journées !

Cœurs sur vos petits ARNm, <3 <3 <3