



**Clarté, précision et simplicité dans
les tests génétiques**



IHG Pharmaco Ltd est une société apparentée à l'Université de Bristol, qui bénéficie de 10 ans d'expérience dans le domaine de la recherche, et qui a remporté deux prix SMART (en 1999 et en 2002).

La société a été créée en 1999 et depuis, 60 et plus kits diagnostiques ont été développés, dont grand nombre ont déjà été éprouvés dans des laboratoires des Services de santé britanniques.

La recherche et le développement se déroulent à l'École des sciences médicales de l'Université de Bristol alors que la Production se fait dans un centre annexe.



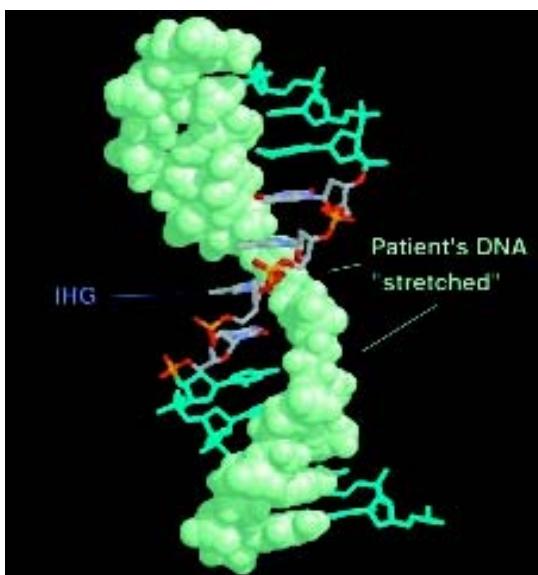
La médecine génétique et l'application des techniques diagnostiques rapides

La médecine génétique inclut des disciplines clés telles que :

- Le diagnostic des maladies génétiques
- La détermination des facteurs de risque génétiques
- La médecine légale
- La pharmacogénétique – la configuration génétique d'un individu détermine comment cet individu va réagir à telle ou telle molécule. Un aspect tout particulièrement important en thérapie anticancéreuse, car la configuration génétique d'un patient influence énormément le succès d'un traitement ou d'un schéma thérapeutique particulier.

Pour tirer profit des progrès réalisés dans ces disciplines, il est nécessaire de disposer de méthodes diagnostiques précises, rapides et faciles à utiliser. IHG Pharmaco a développé une technologie brevetée faisant appel à des générateurs hétéroduplex induits (IHG) pour détecter les snips ou SNP. Les principes fondamentaux de la technologie sont illustrés par l'image ci-dessous, à droite, où on peut voir le modèle d'un gène avec une mutation spécifique pour une maladie à transmission héréditaire.

L'un des deux brins d'ADN du patient (illustré en vert) a été remplacé par un brin « imitateur » d'ADN – un générateur hétéroduplex induit (IHG). De ce fait, la structure de l'ADN du patient est étirée dans la région où se situe l'anomalie génétique. Les 4 bases utilisées pour induire les hétéroduplex dans l'hélice sont représentées au milieu, les atomes individuels étant multicolorés.



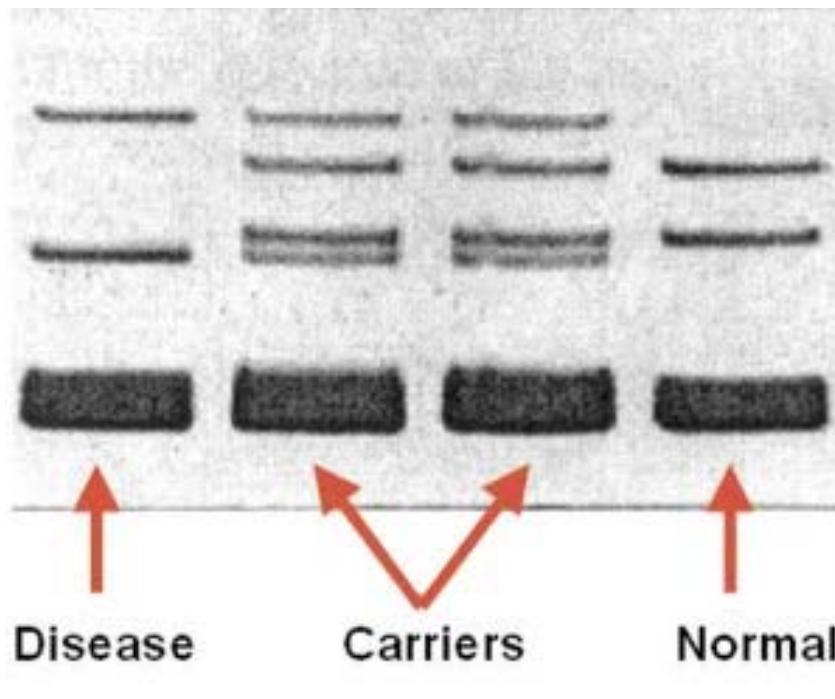
Légende : ADN étiré du patient
IHG = générateurs hétéroduplex induits

Utilisation des IHG pour le diagnostic génétique

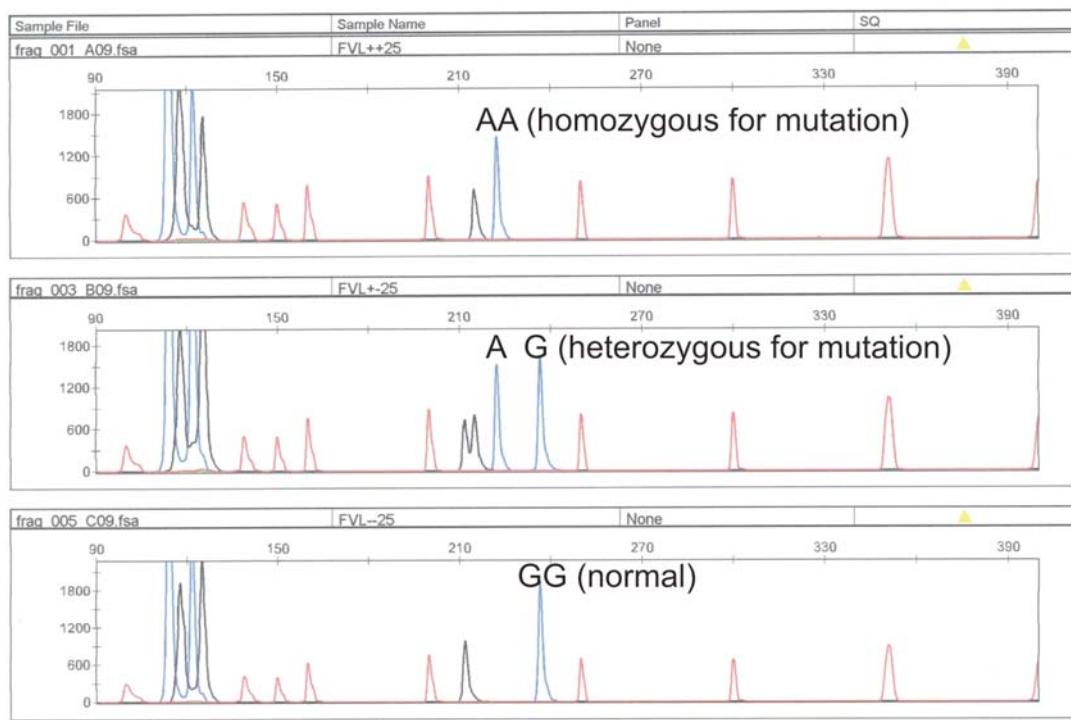
L'étirement de l'ADN du patient a pour effet de modifier sa structure, ce qui permet d'identifier avec précision :

- Les individus normaux non affectés par la maladie
- Ceux qui sont porteurs de la maladie sans être eux-mêmes affectés par celle-ci
- Ceux qui ont hérité de la maladie héréditaire et qui en souffriront.

L'image montre les résultats d'un diagnostic IHG d'un trouble fréquent de la coagulation sanguine (Facteur V Leiden) figurant sur l'affichage obtenu sur minigel PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) et sur celui obtenu par CE (électrophorèse capillaire).



Affichage obtenu sur minigel PAGE



Affichage obtenu par électrophorèse capillaire (CE)

Les snips (single nucleotide polymorphisms ou SNP) et les mutations

- Les snips (single nucleotide polymorphisms ou SNP) constituent le type le plus fréquent de variation génétique dans le génome humain. Ils représentent plus de 90 % de toutes les différences entre individus. Il est probable que ces modèles variables de snip expliquent grand nombre des caractéristiques phénotypiques complexes observées chez les humains. L'analyse des snips a le potentiel de prédire la prédisposition à tout un éventail d'affections cliniques dont, entre autres, le cancer, la maladie cardiovasculaire et la maladie mentale, et de faire de la thérapie médicamenteuse cible une réalité. Des millions et des millions de snips ont déjà été identifiés au sein du génome humain. Les snips sont dès lors vus comme d'importants marqueurs génétiques. Cela en raison de leur abondance dans le génome humain et de leur association possible avec de nombreux traits génétiques et avec la prédisposition à certaines maladies. Les snips peuvent se trouver à proximité les uns des autres dans une région de l'ADN et ils peuvent être transmis héréditairement en diverses combinaisons ou divers haplotypes.
- Les mutations sont une classe de snips qui créent des protéines aberrantes ou des différences au niveau de l'expression des protéines associées à des maladies métaboliques héréditaires classiques ou autres. Parmi de tels exemples, citons la mucoviscidose, la phénylcétonurie, l'anémie falciforme et la maladie de von Willebrand-Jürgens.

En quoi la technologie IHG est-elle pertinente aux snips et à la détection des mutations ?

Contrairement à de nombreux diagnostics ADN utilisés actuellement, un générateur hétéroduplex induit (IHG) est en mesure d'identifier des snips simples ou multiples et des haplotypes. Cela est possible grâce à l'unique profil de l'IHG. Pour de nombreuses applications, cela permet de réduire énormément le nombre de tests requis. L'haplotypage présente un grand avantage parce qu'il est de plus en plus apparent que ce sont les haplotypes, et non les génotypes, qui pourraient être d'une plus grande pertinence dans les études sur les maladies et l'expression des protéines. Les résultats de l'haplotypage à base d'IHG apportent des preuves indiscutables du lien physique des snips.

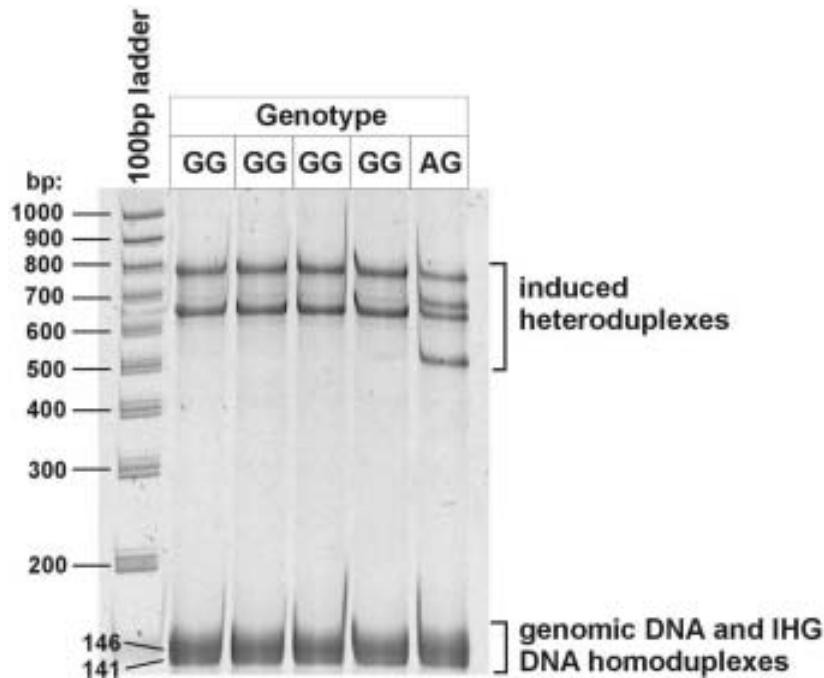
Quel est le mode d'action du réactif IHG ?

Un réactif IHG imite des régions de l'ADN au sein des gènes mais il se distingue d'elles par le fait qu'il possède un ou plusieurs « identificateurs ». Ces identificateurs se trouvent à proximité des snips dans l'ADN.

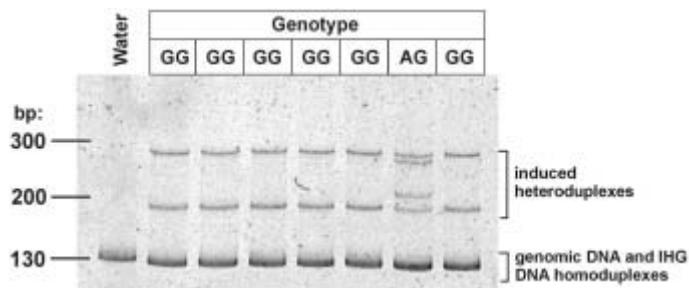
Quand l'ADN humain (contenant les snips en question) est mélangé au réactif IHG (contenant les identificateurs) sous certaines conditions expérimentales, il subit un changement structurel – l'ADN se plie et devient plus rigide – d'une manière spécifique au snip ou à la mutation responsable de la maladie.

Un réactif IHG simple possédant une combinaison d'identificateurs peut donner suite à la survenue de changements structurels uniques au niveau d'un seul snip ou d'un groupe de snips et des haplotypes. Ces changements sont induits par formation d'hétéroduplex et ils peuvent être détectés avec divers types de matériel.

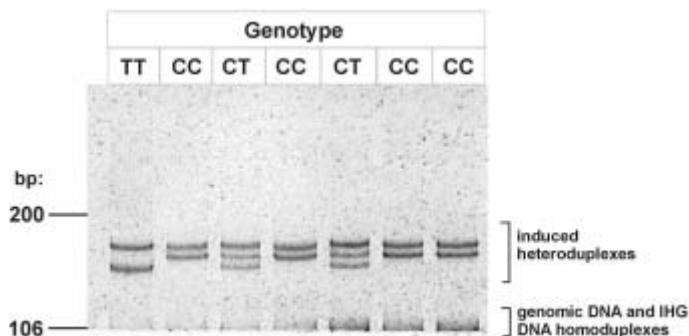
Minigels cliniques



Facteur V Leiden : minigel PAGE montrant les hétéroduplexes induits



Prothrombine : minigel PAGE montrant les hétéroduplexes induits



MTHFR : minigel PAGE montrant les hétéroduplexes induits

Quels sont les avantages de la technologie IHG ?

Un haut degré de précision

Cela signifie qu'il n'est pas nécessaire de refaire les tests.

Simplicité

Pas besoin de personnel hautement qualifié ou de formation de longue durée.

PCR avec simple éprouvette pour l'ADN génomique et pour l'ADN IHG, suivie d'une brève étape de mélange-chauffage-refroidissement. Pas besoin d'enzymes de restriction, de sondes, d'hybridation ou d'étapes de lavage, ou de plusieurs paires d'amorces.

Plateformes polyvalentes

Du gel faible technicité aux techniques microcapillaires haute technologie et WAVE

Pas besoin de se limiter à un seul type d'équipement. Convient aux laboratoires de divers degrés de sophistication et à ressources différentes.

Rendement flexible

Pas besoin d'analyser de grands lots.

Signifie que les résultats sont obtenus plus rapidement pour le patient.

Linkage

Uniquement un seul IHG en mesure d'identifier des snips simples, multiples ET des haplotypes.

Possibilité de multiplexage.

Économie de main-d'oeuvre et de temps sans perte de précision.

ADN témoins pour tous les allèles connus

Permet d'identifier de nouveaux allèles pour donner un nouvel aperçu du diagnostic des maladies.

Possibilité de développer de nouveaux tests en l'espace de quelques semaines

Permet de répondre rapidement aux besoins des clients et des marchés en voie de développement.

La technologie IHG soutient-elle la comparaison ?

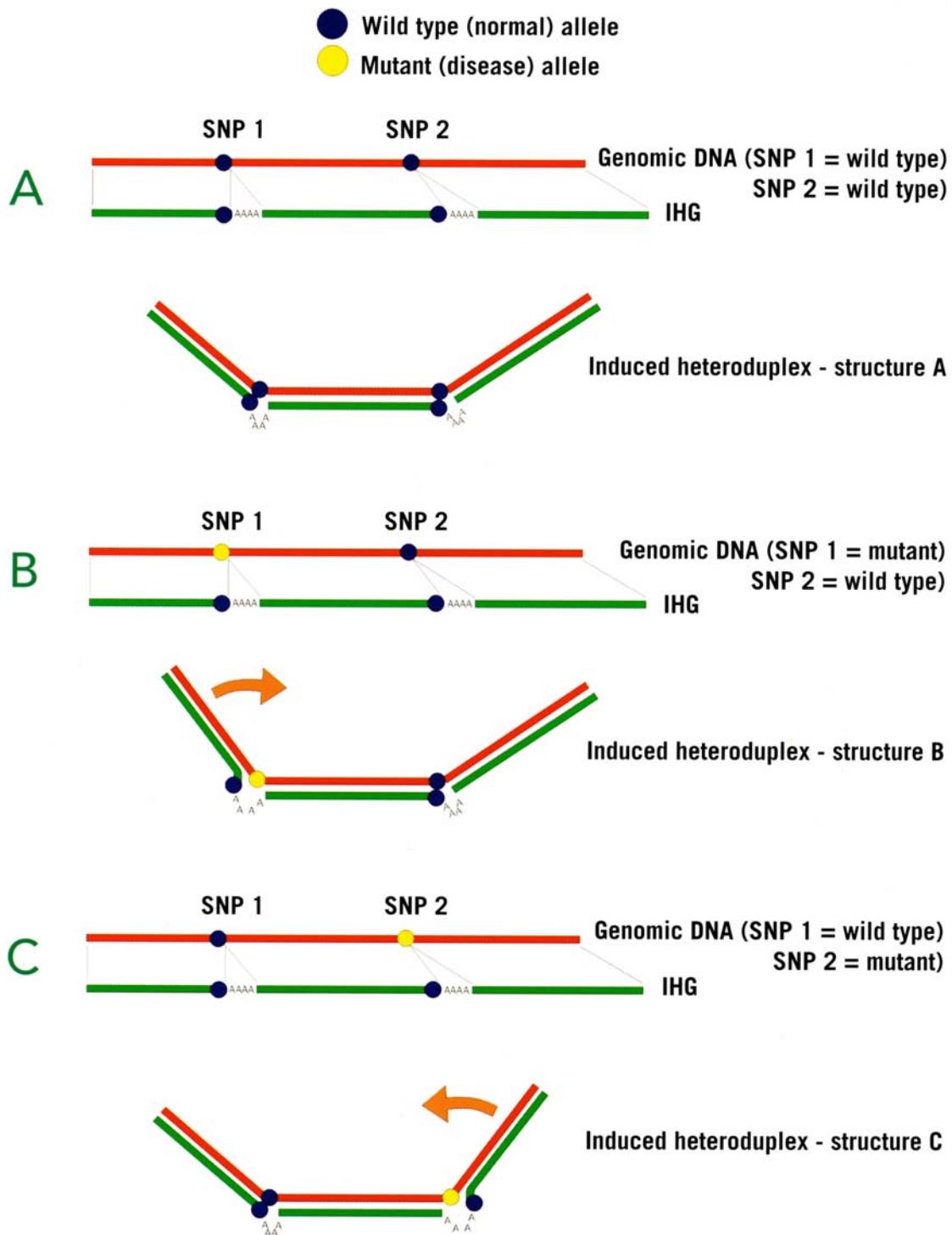
Method:	IHG	SSO dot	SSO reverse dot	SSP (ARMS)	RFLP	SSCP	Sequencing	RSCA	Gene Chip microarray
Identifies haplotypes without cloning?	✓	✗	✗	✗	some	some	✗	some	✗
All heterozygotes unequivocal?	✓	✗	✗	✗	✗	some	✗	some	✗
Single reagent for multiple SNPs?	✓	✗	✗	✗	✗	n/a	n/a	n/a	✗
Multiple probes/enzymes not required?	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗
Simple post-PCR manipulation?	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
Flexible instrument/gel platform?	✓	✓	n/a	✓	✓	✗	✗	✗	✗
Identifies new mutations?	✓	✗	✗	✗	✗	<80%	✓	some	✗
Rapid?	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✗
All allelic controls provided?	✓	✗	✗	✗	✗	✗	n/a	✗	✗

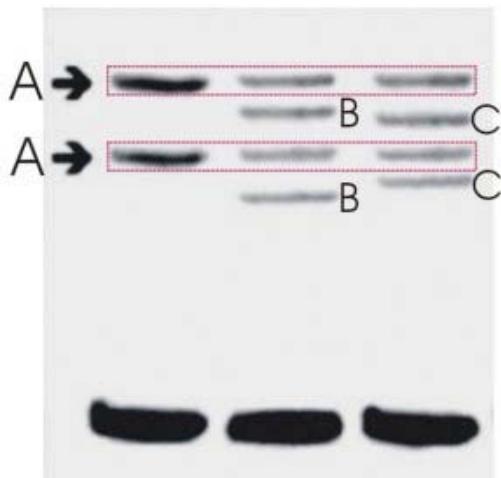
Les méthodes actuelles pour la détection des snips incluent celles qui suivent :

1. SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) Dot
2. SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) Reverse Dot
3. SSP (ARMS) : Sequence-Specific Primers (Amplification)
4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
5. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)
6. Séquençage direct
7. Reference Strand Conformational Analysis
8. Gene Chip Microarray/Microarray Sequencing

Les méthodes ci-dessus sont souvent intensives, demandent beaucoup de temps et manquent de précision. Elles sont aussi fréquemment dictées par la disponibilité de types existants de matériel. Plus fondamentalement, les tests actuels ne sont pas en mesure de déterminer quels sont les haplotypes que possède un individu (voir ci-dessus).

Comment un simple réactif IHG peut-il identifier 2 ou plusieurs snips et haplotypes individuels ?





Dans l'exemple de la page précédente, un simple IHG peut détecter 2 snips qui se trouvent dans la même région amplifiée d'ADN (illustrée en rouge). La séquence sauvage (normale) apparaît en bleu au niveau de chaque snip, la séquence mutante (maladie) apparaît en jaune (voir panneaux B et C). La structure tridimensionnelle des hétéroduplex formés avec l'IHG différent (représentés par les angles différents des « bras »), selon la présence d'une séquence sauvage ou mutante au niveau d'un ou de plusieurs sites snips. Ces différences de structure peuvent être détectées, à titre d'exemple, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou minigel (voir panneau ci-dessus). Dans la colonne de gauche, l'individu possède deux chromosomes normaux (conformation A), ce qui donne deux bandes caractéristiques (indiquées par des flèches), comme illustré.

Dans la colonne du milieu, l'individu a un chromosome normal et un muté au niveau du snip 1 (SNP 1) (profils A et B respectivement). Dans la colonne de droite, l'individu a un chromosome normal et un muté au niveau du snip 2 (SNP 2) (profils A et C, respectivement). Dans la pratique, on peut détecter 6 mutations ou plus dans une seule région de l'ADN avec un seul réactif IHG, par extension du principe, de manière à inclure, par exemple, plus d'insertions poly(A) aux endroits appropriés de l'IHG.

Les IHG peuvent aussi détecter des combinaisons différentes (haplotypes) de snips (non illustré). Par exemple, un profil différent de bandes serait observé si l'individu avait des mutations au niveau du site SNP 1 ainsi que du site SNP 2.

Kits de réactifs IHG en vente actuellement

Troubles de la coagulation

Facteur V Leiden (FVL)

FVL est le trouble de la coagulation héréditaire le plus fréquent. Entre 3 et 8 pour cent des populations caucasiennes (race blanche) des États-Unis et d'Europe sont porteurs d'une copie de la mutation FVL, alors qu'environ 1 personne sur 5000 en porte deux copies. C'est une mutation qui est moins fréquente dans d'autres populations. Le FVL augmente 3 à 8 fois le risque de thrombose veineuse dans le cas des individus hétérozygotes (individus ayant hérité d'un mauvais gène) et substantiellement plus, soit 30 à 140 fois plus, chez les individus homozygotes (individus ayant hérité de deux mauvais gènes).

Prothrombine (PTR)

La mutation G20210A du gène de la prothrombine est le second trouble de la coagulation le plus fréquent et il expose les individus hétérozygotes à un risque de thrombose 3 à 6 fois plus important. La PTR ne constitue qu'un petit facteur de risque de formation de caillot mais, lorsqu'elle est accompagnée d'autres facteurs de risque ou associée à d'autres troubles de la coagulation, ce risque est énormément accru.

Méthylènetetrahydrofolate-réductase (MTHFR)

La 5,10-méthylènetetrahydrofolate est l'enzyme métabolique qui intervient au niveau de la conversion de l'homocystéine en méthionine. Un degré d'activité réduit de la MTHFR (comme cela se produit en présence de la mutation C677T) fait monter le taux d'homocystéine. Cela est connu sous le nom d'hyperhomocystéinémie et constitue un facteur de risque de thrombose artérielle ainsi que veineuse. La possession de la mutation MTHFR peut impliquer un risque 5 fois plus grand de formation d'un caillot.

Les trois troubles de la coagulation et les mutations associées décrites ci-dessus peuvent être un important facteur de risque particulièrement pertinent dans les circonstances suivantes :

Pilules contraceptives

Toutes les femmes sont exposées à un risque (4 fois plus grand) de formation de caillot sanguin lorsque sous pilules contraceptives. Dans le cas d'une femme avec une mutation FVL, ce risque est multiplié 30 à 35 fois. Si une femme hérite d'une mutation PTR, le risque est multiplié par 3. Dans le cas des femmes avec plus d'une mutation, le risque est multiplié par 100.

Hormonothérapie de substitution (HRT)

Toutes les femmes sont exposées à un risque (2 à 4 fois plus grand) de formation de caillot sanguin lorsque sous HRT. Dans le cas d'une femme avec une mutation FVL, le risque est multiplié par 13 à 15. Dans le cas d'une femme avec deux mutations, ce risque est encore plus important.

Grossesse

Les caillots sanguins constituent la cause principale de décès de la mère durant la grossesse. Toutes les femmes enceintes sont exposées à un risque (5 à 6 fois plus grand) d'avoir un caillot sanguin. Dans le cas d'une femme avec une mutation FVL, ce risque est multiplié par 7 à 16 fois. Pour les femmes avec deux mutations, le risque est 40 fois plus important.

Chirurgie

Il y a toujours un risque de formation de caillot sanguin durant une intervention chirurgicale ou durant la période de réveil. Dans le cas d'une personne avec une mutation FVL, le risque est plus ou moins 20 fois plus important.

Vols au long cours ou autres voyages

Une personne avec un trouble de la coagulation à transmission héréditaire est exposée à un plus grand risque (pouvant être multiplié par 100) de formation de caillot sanguin durant un voyage au long cours (3 heures ou plus).

	Risque relatif avec 1 mutation	Risque relatif avec > 1 mutation
Pilules contraceptives	30-35	100
HRT	13-15	Plus élevé
Grossesse	7-16	40
Chirurgie	20	Plus élevé
Vols au long cours	10	Plus élevé

La présence de deux mutations multiplie le risque par 3, comparé au risque qu'implique une seule mutation. Avec des mesures prophylactiques, une sensibilisation appropriée et une prise en charge, ces risques peuvent être énormément réduits voire, dans certains cas, complètement éliminés.

Cancer

Le risque de thrombose veineuse chez les cancéreux est 7 fois plus élevé que chez les individus sains. Ce risque est 28 fois plus important chez les patients leucémiques. Les porteurs FVL et PTR sont 12 fois plus susceptibles de souffrir de thrombose que les individus avec cette mutation qui n'ont pas de cancer. Il a été recommandé de considérer une thérapie coagulante à titre de prophylaxie chez les patients avec un cancer qui sont exposés à un risque accru de thrombose veineuse.

Blom, J. W., Doggen, C. J., Osanto, S., Rosendaal, F. R. (2005). Old and new risk factors for upper extremity deep venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3 (11): 2471-8.

Kits de réactifs IHG qui seront bientôt mis sur le marché

- Phénylcétonurie: gène PAH
- Anémie falciforme : gène b-globine
- Hémochromatose C282Y et H63D
- β -thalassémie: gène HBB
- Mucoviscidose : gène CFTR
- Maladie de von Willebrand-Jürgens : gène vWF, variants 2A, 2B et 2N
- Carence en protéine de liaison au mannane : gène MBL
- TPMT* (*IHG-RT-PCR*)
- ApoE 2/3/4*
- ApoA IV
- Stromélysine-1 5T/6T
- BChE
- Facteur XIII
- HLA-A, B, C, DRB*
- N-Ras
- Polymorphismes promoteurs du gène de la cytokine : IL10*, TNFSF2*, IL6, TGFB*, IL1B

* = IHG d'haplotypage



IHG Pharmaco Ltd
Dept.of Cellular & Molecular Medicine
School of Medical Sciences (F59), University Walk, Bristol BS8 1TD
Tél. : +44 (0) 1285 750 264

Glossaire des termes

Allèle : le variant spécifique (nucléotide) d'un polymorphisme au niveau d'un seul locus sur un chromosome ; par exemple A, C, G ou T

Amplicon : une séquence amplifiée d'ADN engendrée par PCR.

Mucoviscidose : une maladie transmise héréditairement causée par des mutations du gène CFTR, caractérisée par une anomalie du transport des ions et qui affecte les muqueuses du poumon et de l'intestin.

DTI : Department of Trade and Industry (Département du Commerce et de l'Industrie).

Facteur V Leiden : la thrombophilie avec Facteur V Leiden se caractérise par une réponse anticoagulante médiocre à la protéine C activée (APC) et par un risque accru de thromboembolie veineuse. Le terme "facteur V Leiden" fait référence à la substitution G-à-A spécifique au niveau du nucléotide 1691 dans le gène pour le facteur V qui prédit le remplacement d'un seul acide aminé (Arg506Gln) au niveau de l'un des trois sites de clivage de l'APC dans la molécule du facteur Va. Le Facteur V Leiden est inactivé approximativement 10 fois plus lentement qu'avec le Facteur V normal et il persiste plus longtemps dans la circulation, d'où une production accrue de thrombine et un léger état hypercoagulable reflété par des taux élevés de fragment F1+2 de prothrombine et d'autres marqueurs activés de la coagulation. Les individus hétérozygotes pour la mutation du Facteur V Leiden sont exposés à un risque de thrombose veineuse légèrement accru ; les individus homozygotes sont exposés à un risque thrombotique bien plus élevé.

Microarray de puces à gènes : une collection de points microscopiques contenant des sondes d'oligonucléotides fixées à une surface solide telle que du verre, du plastique ou une puce de silicium qui forme un array. Celles-ci peuvent servir à génotyper ou à séquencer multiples régions d'un génome en utilisant des amplicons provenant de l'ADN du patient.

Génome : tout le complément génétique d'un individu, représentant tous les 46 chromosomes.

Génotype : la combinaison de deux allèles représentés par un locus polymorphe sur des chromosomes homologues ; par exemple, dans un polymorphisme A à G, les génotypes possibles seraient AA, AG ou GG.

Haplotype : la combinaison de deux ou de plusieurs allèles en des positions voisines physiquement liées dans le génome.

Hétéroduplex : un hybride mal apparié formé entre un amplicon IHG et un amplicon engendré par l'ADN du patient.

Hétérozygosité : possession d'allèles différents sur chaque homologue chromosomique.

Homozygosité : possession d'allèles identiques sur les deux homologues chromosomiques.

Identificateur : une série de nucléotides introduite dans un IHG en une position adjacente à un site polymorphe, dans le but d'induire la formation d'une boucle non appariée d'ADN dans les hétéroduplex formés avec des amplicons provenant de l'ADN du patient.

IHG : induced heteroduplex generator, soit générateur hétéroduplex induit.

MTHFR : l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque de coronaropathie, de thrombose veineuse et d'accident vasculaire cérébral largement reconnu. Elle est aussi impliquée dans la pathogénèse des anomalies des tubes neuraux, des mortinaiances et des fausses couches récurrentes. Des mutations au niveau du gène MTHFR sont la cause d'hyperhomocystéinémie.

Mutation : un changement au niveau de la séquence des nucléotides qui peut se produire dans les cellules du germe ou somatiques. Dans les cellules du germe, les mutations peuvent être transmises par hérédité aux descendants. Les mutations ont en général une fréquence de moins de 1 % dans la population.

PCR : Polymerase Chain Reaction – soit amplification en chaîne par polymérase ou ACP. Un procédé par lequel une séquence spécifique d'ADN peut être amplifiée en utilisant des cycles de recuit d'amorces, de prolongement d'amorces et de dénaturation par la chaleur.

Phénylcétonurie : une maladie à transmission héréditaire causée par des mutations dans le gène PAH, caractérisée par l'inaptitude d'un individu à utiliser l'acide aminé essentiel appelé phénylalanine.

Polymorphisme : une variation dans la séquence des nucléotides en une position donnée du génome, apparaissant dans la population avec une fréquence d'au moins 1 %.

Prothrombine : la mutation G20210A du gène de la prothrombine est un facteur de risque de thrombose fréquent qui accroît le risque de thrombose veineuse profonde, d'accident vasculaire cérébral et de fausse couche.

RSCA (Reference strand conformational analysis) : technique de génotypage dans laquelle on permet aux amplicons de l'ADN du patient de former des hétéroduplex avec des amplicons d'allèles se produisant naturellement (témoins) ; les hétéroduplex qui en résultent peuvent être séparés par électrophorèse et les profils peuvent servir à indiquer le génotype du patient.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) : une technique de génotypage dans laquelle des amplicons de l'ADN du patient sont digérés avec des endonucléases de restriction spécifiques d'allèles

Sickle cell disease = anémie falciforme : une maladie à transmission héréditaire causée par des mutations dans le gène HBB, caractérisée par des épisodes douloureux, de l'anémie (carence en globules rouges), des infections graves et des lésions dans les organes vitaux. Il existe plusieurs formes d'anémie falciforme. Ces formes s'appellent SS (les individus héritent d'un gène de l'anémie falciforme d'un parent) ; SC (l'enfant hérite d'un gène de l'anémie falciforme et d'un gène pour un autre type anormal de l'hémoglobine, HbC) ; et thalassémie S-bêta (l'enfant hérite d'un gène de l'anémie falciforme et d'un gène pour la thalassémie bêta, une autre anémie transmise par hérédité).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) : un polymorphisme impliquant un changement au niveau d'une seule base de nucléotides dans le génome.

SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism) : une technique de génotypage dans laquelle des amplicons de l'ADN du patient sont dénaturés par la chaleur puis rapidement refroidis pour induire la formation de duplex d'ADN intrabrin. Ces duplex sont ensuite séparés par électrophorèse pour former des profils à bandes spécifiques de génotypes dans des gels non dénaturants.

SSO (Sequence specific Oligonucleotide) dot : une technique dans laquelle des amplicons non marqués et immobilisés sont génotypés par hybridation avec un certain nombre d'oligonucléotides homologues marqués individuels.

SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide) reverse dot : une technique dans laquelle des amplicons marqués sont génotypés par hybridation avec un certain nombre d'oligonucléotides homologues non marqués immobilisés.

SSP (ARMS) : une technique de génotypage impliquant l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) de l'ADN du patient avec des amores d'oligonucléotides spécifiques de séquence (SSP). L'amplification ne se produira que si l'ADN du patient correspond exactement à la SSP. Aussi connue sous le nom de « amplification refractory mutation system» (ARMS)

Von Willebrand's disease : maladie de von Willebrand-Jürgens. Il s'agit d'une maladie transmise par hérédité causée par des mutations dans le gène VWF. C'est le trouble hémorragique héréditaire le plus fréquent ; il affecte les hommes et les femmes dans des proportions presque analogues. La plupart des cas sont peu graves, et l'hémorragie peut se déclencher après une intervention chirurgicale ou l'extraction d'une dent. Cette affection est aggravée par la prise d'aspirine ou d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). L'hémorragie peut diminuer durant la grossesse. La maladie est très fréquente et elle affecte au moins 1 % de la population. Des antécédents familiaux d'un trouble hémorragique constituent le facteur de risque primaire. En ce qui concerne la femme avec des règles abondantes ou prolongées, la maladie de von Willebrand-Jürgens est plus fréquente chez les femmes de race caucasienne que chez les femmes de race afro-américaine.

Type sauvage : l'allèle d'une séquence ADN polymorphe qui se produit le plus souvent.