



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.18 : BMOL 5-6

Date : 06/10/2020

Plage horaire : 10h30-12h30

Enseignant : Nicolas SEVENET

N°ISBN : 978-2-37366-088-3

Ronéistes

NICOLAS Anaïs – anaisnicolas1818@gmail.com

RAKOTONDRAINY Ilan – ilanrako@gmail.com

Principales techniques utilisées en diagnostic moléculaire (suite)

Plan du cours :

PARTIE A : GÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE

VII – Le NGS

VIII – Méthode d'identification des réarrangements de grande taille

A- QMPS (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments)

B- CGH-array

IX – Démarche diagnostique en oncogénétique

A- Organisation en France

B- Démarche diagnostique

PARTIE B : GÉNÉTIQUE TUMORALE

I – Type de prélèvement

A - Difficulté dû au prélèvement

B - Gestion du prélèvement

C- Extraction de l'ARN

D- Dosage des Ac. Nucléiques

E- Contrôle qualité

F- Points chauds

G- COSMIC

H- Plateforme génétiques tumorales en France

II — Points importants

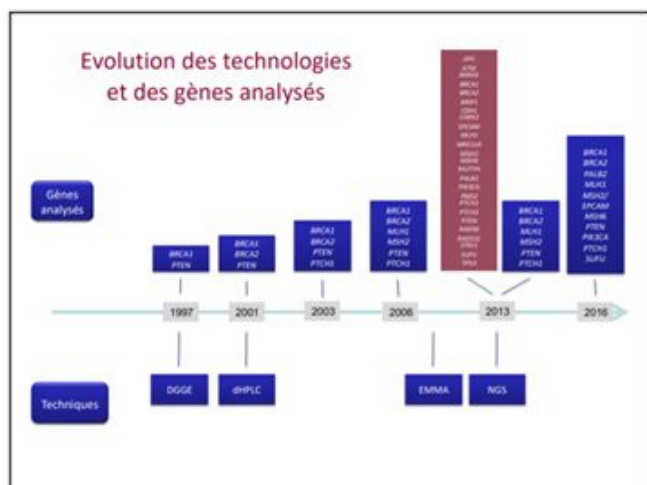
VII – Le NGS

Dans le **séquençage de nouvelle génération (NGS)**, il y a trois étapes. La première étape est la sélection des régions que l'on va séquencer au niveau de l'ADN génomique. Cette étape est aussi appelée la **préparation de librairies**. La deuxième étape consiste en la réalisation du séquençage en lui-même. Il existe deux types de séquençage possibles : le **séquençage par synthèse** ou le **séquençage par émission de proton**. Une fois que le séquençage est terminé, l'objectif va être d'aligner les séquences sur un génome de référence et de repérer toutes les variations par rapport à ce génome de référence.

On va chercher trois types de variation :

- Les **mutations ponctuelles** sont un changement d'un nucléotide par un autre ou de quelques nucléotides ou une délétion/insertion de quelques nucléotides. Toute variation **jusqu'à 50 nucléotides** peut être appelée mutation ponctuelle. Le NGS remplit parfaitement son rôle pour les mutations ponctuelles mais deux anomalies ne sont pas couvertes forcément par la NGS :
- **Les anomalies de structure** : comme par exemple la translocation entre deux chromosomes (une structure est cassée puis réarrangée). C'est le cas de la translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22 qui aboutit à un gène de fusion (BCR-ABL) qui code une protéine chimérique. La recherche des réarrangements de grande taille est une technique utilisée pour les anomalies de structure (on l'aborde plus loin dans le cours).
- **Les anomalies de nombre** sont la variation du nombre de chromosomes. Les technologies de référence pour les anomalies de nombre sont le **caryotype** (en cytogénétique) et les **microarrays** (ou biopuces à ADN) où on peut quantifier le nombre de copies d'un gène présent dans un organisme. Les anomalies de nombre sont appelées **CNV** pour « Copy Number Variation ». Variation correspond à des modifications physiologiques : le nombre de gènes peut varier de manière physiologique. Si on est dans une situation pathologique, on appelle ces anomalies des **CNA** pour « Copy Number Alteration ».

Cette diapositive n'est pas à retenir. Elle montre seulement, au niveau du laboratoire du professeur, l'évolution des techniques depuis 1997 où les premières techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic génétique (recherche des mutations ponctuelles des gènes) ont été mises en place. Petit à petit l'offre s'enrichit jusqu'en 2013 avec la révolution du NGS qui permet de rendre en diagnostic les gènes représentés en bleu.



Rendre en diagnostic signifie qu'on assure la totalité de la détection des trois types de mutation possibles au niveau du laboratoire. On s'engage à signer un résultat négatif, c'est-à-dire que l'on a tout mis en œuvre pour détecter une mutation si elle était présente dans l'échantillon. Si elle n'était pas présente dans l'échantillon, on est certain que le résultat que l'on signe est réellement un résultat négatif.

**Data generation
the same diagnostic set**

Genes	Chromosome	Genomic start	Genomic end	Strand orientation	Number of Exons	Total Exon size (bp)	NCBI RefSeq mRNA Nomenclature
HBOC genes	ATM	11	108 081 559	108 241 626	+	63	13147 NM_000051.3
	BRCA1	2	215 676 428	215 591 262	-	11	2607 NM_000485.2
	BRCA2	17	41 279 500	41 194 312	-	23	7207 NM_007294.3
	BRIP1	13	32 887 617	32 975 808	+	27	11386 NM_000059.3
	CDH1	17	59 942 920	59 754 547	-	20	8166 NM_052043.2
	CHEK2	16	98 769 195	98 871 444	+	16	4815 NM_054380.3
	CHEK2	22	29 139 622	29 081 731	-	14	1854 NM_007194.3
	MRE11A	11	94 229 040	94 148 466	-	20	5164 NM_005091.3
	PALB2	16	23 654 678	23 612 483	-	13	4058 NM_024675.3
	PTEN	10	89 621 195	89 730 532	+	9	5547 NM_000314.4
	RAD50	5	131 490 618	131 962 319	+	25	6957 NM_000732.3
	RAD51C	17	56 767 963	56 813 952	+	9	1282 NM_054216.1
	STK11	19	1 205 708	1 230 434	+	10	3276 NM_000405.4
OTHER genes	TP53	17	7 352 868	7 349 720	-	11	7589 NM_000546.5
	APC	5	112 005 202	112 219 936	+	16	10739 NM_000036.5
	EPCAM	2	47 094 287	47 616 167	+	9	1718 NM_002354.2
	MUH1	8	37 032 841	37 094 337	+	19	2662 NM_000249.3
	MSH2	2	47 628 263	47 712 340	+	16	3145 NM_000251.2
	MSH6	2	48 008 225	48 036 092	+	10	4328 NM_000179.2
	MUTYH	1	45 808 142	45 792 914	-	18	5921 NM_012222.3
	PKC3A	8	178 864 311	178 954 500	+	21	3712 NM_006218.2
	PMS2	7	6 050 737	6 050 870	-	15	2836 NM_000635.5
	PTCH1	9	98 281 247	98 209 244	-	24	7943 NM_000264.3
	PTCH2	1	45 330 616	45 263 516	-	22	4268 NM_003738.4
	SUFU	10	104 261 719	104 395 214	+	12	4948 NM_014380.3
25 genes					451	125937	

The same set of 25 genes is used for capture library in routine setting regardless the clinical indication from oncogenetic consultation

Genes are divided among their involvement mostly in breast carcinoma (HBOC) or other tumor types (OTHER)

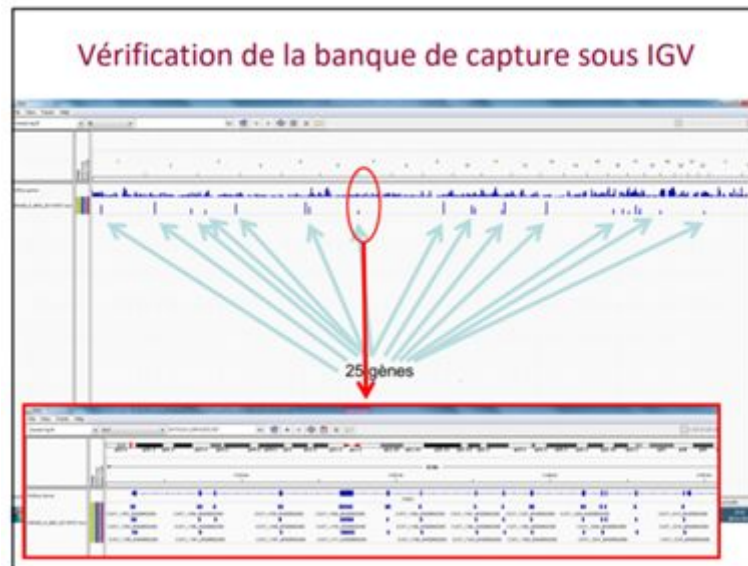
La **banque de capture** est ce qui permet de sélectionner la région à séquencer. Ici, la région à séquencer correspond à ces 25 gènes, en l'occurrence les séquences codantes (les parties exoniques). Les 25 gènes ont été groupés selon le grand type de pathologie auquel ils appartiennent : soit les gènes sont impliqués dans la prédisposition héréditaire au cancer du sein et des ovaires (HBOC : hereditary breast and ovarian cancer) soit ils sont impliqués dans d'autres prédispositions héréditaires (essentiellement le cancer colorectal). On va rechercher chez des patients si la survenue de leur tumeur à un très jeune âge est due à une anomalie qu'ils ont reçu de leurs parents ou si c'est simplement le fruit du hasard.

Nous utilisons cette banque chez tous les patients. Cela veut dire que chez une patiente qui nous est adressée pour une suspicion de cancer du sein héréditaire, on peut trouver une anomalie génétique responsable d'un cancer colorectal alors qu'elle n'en a pas encore développé. C'est ce qu'on appelle une **mutation incidente**, c'est-à-dire qu'on ne la recherchait pas (car sa famille n'était pas démonstratrice de cette prédisposition) mais on est quand même tombé dessus. Cela pose une question au niveau éthique : a-t-on le droit de rechercher chez un patient une anomalie génétique à laquelle il ne s'attendait pas ?

Exemple : Lors d'une radio des poumons, si on nous trouve une tache sur le foie, a priori on aurait envie que le radiologue nous informe de cette suspicion médicale qui va nécessiter des examens complémentaires, mais littéralement le médecin n'a pas à nous rendre les résultats car initialement on vient pour une radio pulmonaire. C'est ce qu'on appelle un **incidentalome** (= on détecte quelque chose qui n'était pas recherché). Le médecin nous demandera si on veut savoir l'information importante qu'il a à nous donner et il pourra nous la donner. Ici on est dans une situation **acquise**, le patient va pouvoir être guéri de cette anomalie soit par un traitement, soit en faisant une ablation du foie ou une partie du foie.

A l'inverse, en **génétique constitutionnelle** (génétique transmise par les parents), si on trouve une anomalie génétique dans les cellules sanguines, cela veut dire que l'anomalie est présente dans toutes les cellules du corps, on ne pourra **pas guérir** le patient. On ne peut pas faire disparaître une mutation appartenant à un patrimoine génétique.

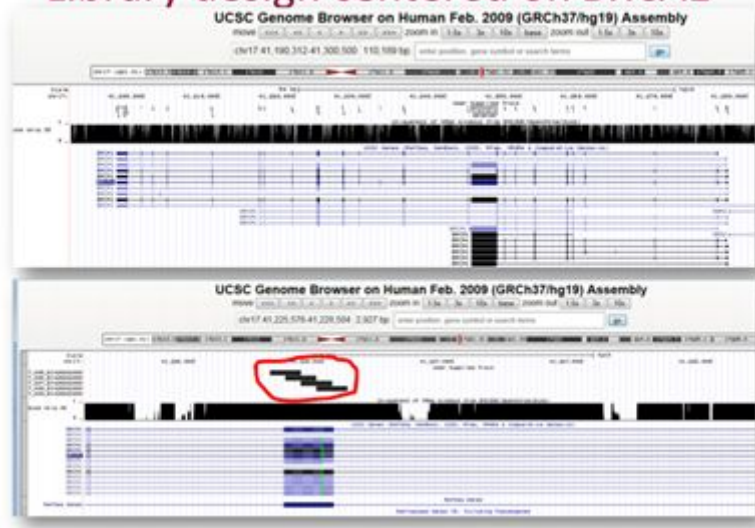
Dans le consentement éclairé, on va devoir signifier au patient qu'on est susceptible de trouver une anomalie génétique sans rapport avec la pathologie pour laquelle on fait la recherche de mutation et on va lui demander s'il accepte qu'on lui rende ces résultats.



On a, ci-dessus, la représentation du génome humain sur un logiciel appelé IGV. Les barres bleues représentent la quantité de gènes codant des protéines par chromosome. On voit que dans l'espèce humaine, ce sont **les plus petits chromosomes qui portent le plus de gènes**.

On a placé les 25 gènes capturés précédemment. On voit qu'on étudie des gènes répartis sur l'ensemble des chromosomes. On rentre plus en détail et on zoom sur un gène (encadré rouge sur la diapo). Les barres bleues correspondent aux exons et les lignes correspondent aux introns. On voit des petites flèches sur les lignes qui correspondent au sens de transcription du gène (ici c'est du télomère vers le centromère). Encore en-dessous, sous les séquences codantes on voit des petits carrés bleus correspondant aux oligonucléotides qui vont venir chercher les séquences indiquées dans le génome humain.

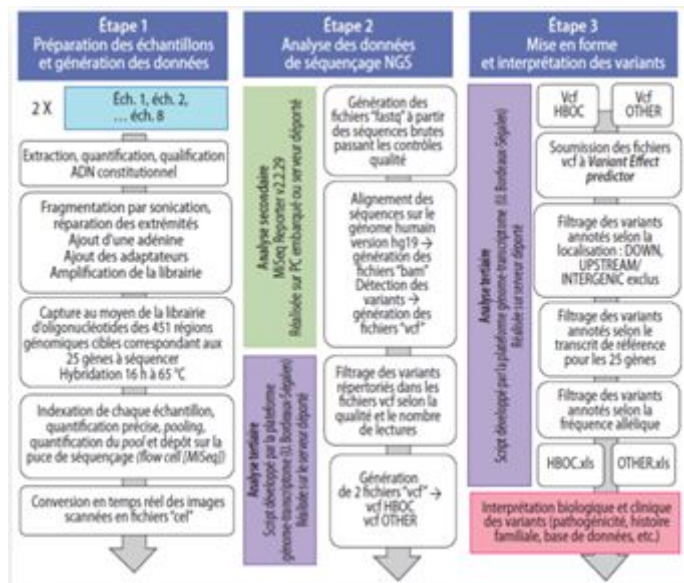
Library design centered on *BRCA1*



On zoom encore un peu plus. On est sur le gène de *BRCA1* et on voit que les oligonucléotides (entourés en rouge) sont chevauchant deux à deux pour s'hybrider aux séquences codantes. **Chevauchant deux à deux** signifie que chaque nucléotide de l'exon est couvert par deux oligonucléotides.

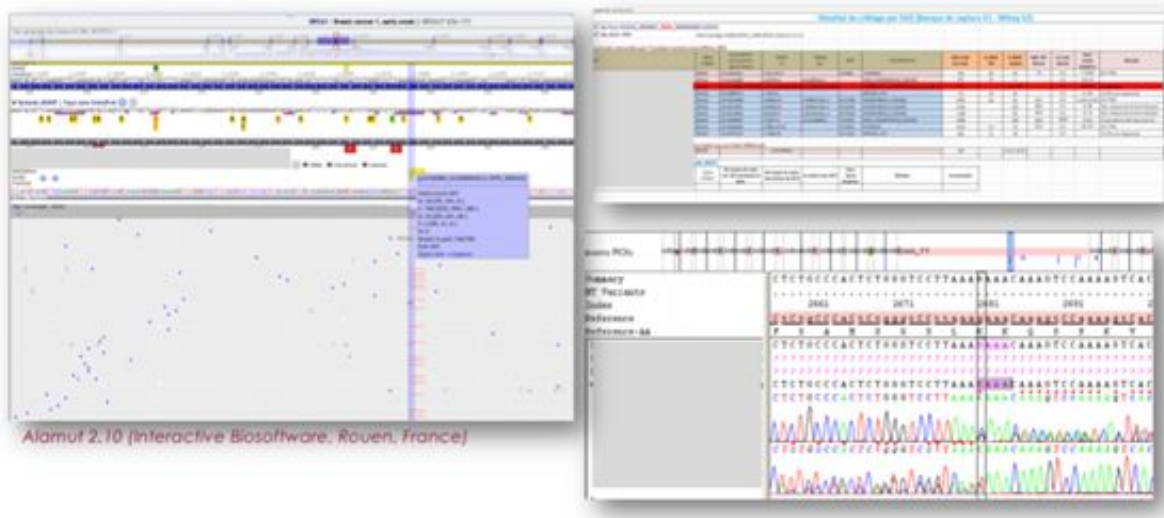
- Le flux diagnostic :

On travaille en série de 48 à 96 patients (norme internationale), on réalise la préparation de bibliothèques, le séquençage par synthèse, l'analyse informatique, l'alignement, la détection des variants et la mise en forme des résultats (analyse tertiaire).



Les étapes ne sont pas à retenir en détail, ce qui est à retenir est l'enchaînement des trois grandes étapes et à quoi elles correspondent (ce qui est dans les carrés blancs n'est pas à retenir).

On a nécessité d'avoir recours à des **bioinformaticiens** de façon à obtenir les résultats.

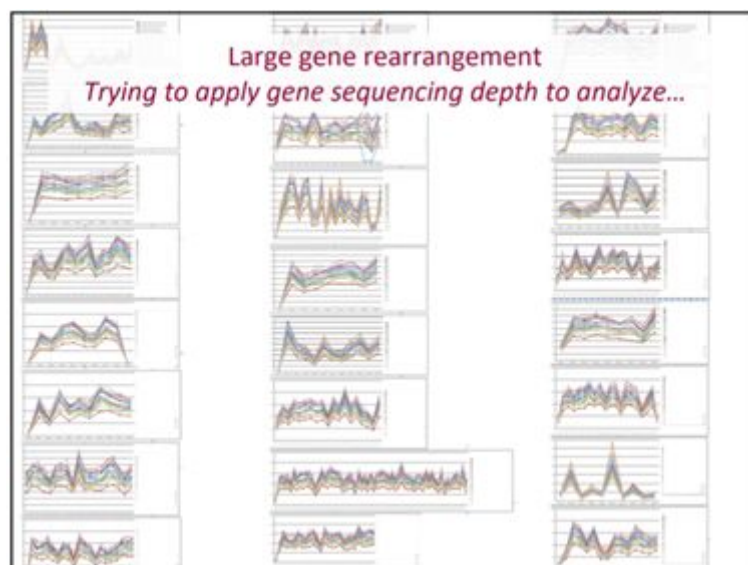


Tout résultat doit être **confirmé par un séquençage Sanger**. Sur l'image de gauche, on voit toutes les lectures du séquençage alignées par rapport au génome de référence. Les traits rouges représentent la délétion de 4 nucléotides et donc un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop. Sur l'image de droite, on a la confirmation par séquençage selon la méthode de Sanger avec un chevauchement des deux séquences correspondant aux deux allèles.

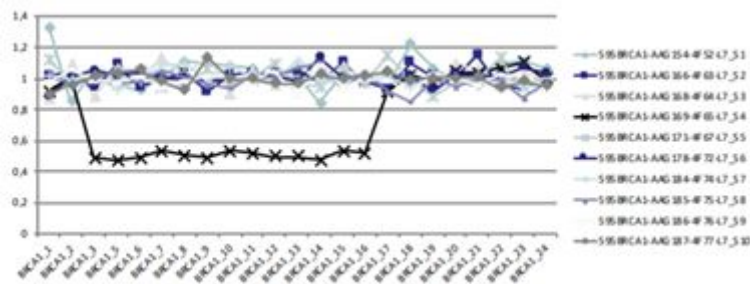
VIII – Méthode d'identification des réarrangements de grande taille

A- QMPS (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments)

On n'abordera que la partie gain ou perte d'un exon.



On a placé le taux de **profondeur** (nombre de fois qu'un nucléotide est lu) pour 16 patients sur les 25 gènes. En abscisse on a les exons et en ordonnée le nombre de lectures. On remarque que selon les exons on a des taux de profondeur qui varient. Cela est dû au fait que certaines séquences sont plus simples à séquencer que d'autres. Les exons qui sont beaucoup moins bien lus sont les exons 1 car ils sont très **riches en G/C** et donc plus **difficilement lisibles**.

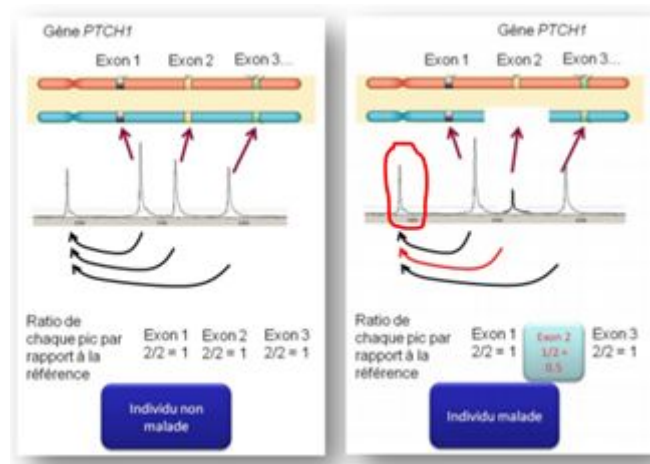


En faisant cela pour les 16 patients, on a pu détecter chez certains une division par 2 de la profondeur (ratio à 0,5 sur le gène BRCA1) correspondant à une délétion allant de l'exon 2 à l'exon 15. On a bien un réarrangement de grande taille. Ceci est une mutation délétère, elle est significative de la pathologie de la patiente.

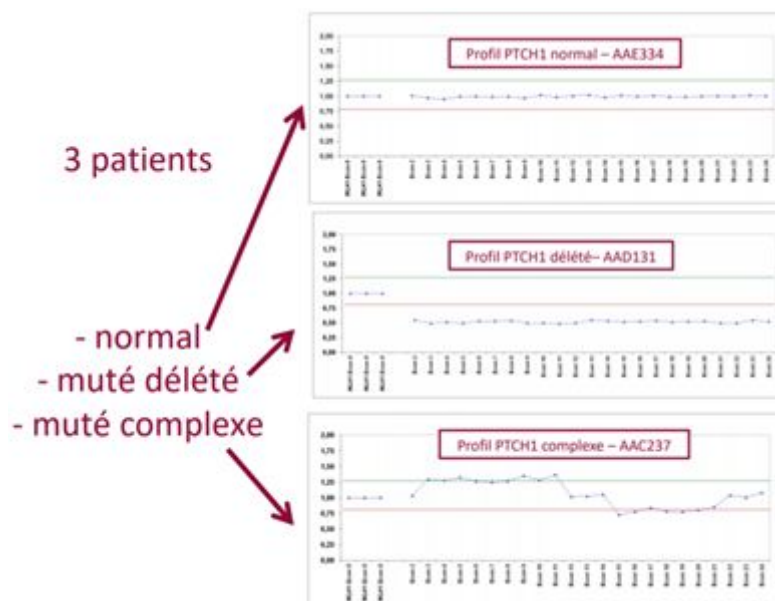
Comment va-t-on le confirmer ?

On ne va **pas pouvoir utiliser le séquençage Sanger** car il est basé sur la PCR. On est en génétique constitutionnelle donc on a un allèle sain et un allèle muté (un allèle du père et un allèle de la mère). Donc si on fait une PCR avec des oligonucléotides compris entre l'exon 2 et l'exon 15, ceux-ci vont s'hybrider à l'allèle sain et on va **amplifier l'allèle normal**, donc **on ne verra pas la perte des exons**.

On va donc devoir utiliser une technique qui va permettre non pas de détecter une mutation mais de mesurer un **rapport allélique**, c'est-à-dire de faire la différence entre deux allèles et un allèle à une position donnée. Pour se faire, lorsque l'on fait la PCR, on doit rester en **phase linéaire** de l'amplification. La phase linéaire débute à partir du moment où il y a le Ct (décollage de la courbe généralement entre le 15^{ème} et le 20^{ème} cycle) et va se poursuivre pendant 6 ou 7 cycles (environ jusqu'au 26^{ème} cycle). On arrêtera la PCR environ au 24^{ème} cycle, on fait donc une **PCR semi-quantitative**. « Quantitatif » car on est dans la phase de multiplication par deux et « semi » car ce n'est pas une quantification absolue : on ne peut pas dire le nombre d'exemplaires de gènes présents dans le tube.



On se réfère à une **référence interne** (pic entouré en rouge sur l'image ci-dessus) et à une **référence externe** (un patient qui n'a pas de mutation = individu non malade). Ci-contre est représenté un gène avec ses trois exons que l'on cherche à étudier. On fait le rapport entre ces exons et l'**exon de référence** qui n'a rien à voir avec le gène. On fait un **rapport d'aire sous la courbe** (normalisé entre les échantillons) entre le pic de l'exon 1 et le pic de l'exon de référence, le pic de l'exon 2 et le pic de l'exon de référence et le pic de l'exon 3 et le pic de l'exon de référence. Si les deux allèles sont identiques, on obtient des **ratios égaux à 1**. Si on a la perte d'un exon, on va avoir une amplification concernant cet exon qui va être diminuée par 2 par rapport au pic de référence, donc un **ratio = 0,5**. Si on a une duplication d'exon, l'amplification concernant cet exon va être multipliée par 2 par rapport au pic de référence, donc **ratio = 1,5**.



Ci-dessus, nous avons trois types de profils avec la représentation des 24 exons d'un gène à étudier (PTCH1) et un gène de référence. Les barres vertes et rouges représentent l'encadrement de la zone de normalité : on considère que les variations sont normales si elles sont comprises entre les deux barres car les ratios peuvent un peu bouger en fonction de la qualité de la PCR.

- La première représentation correspond à un **individu normal** avec un **ratio de 1**.
- La deuxième représentation correspond à un individu qui **a perdu tout le gène** avec un **ratio à 0,5**.
- La dernière représentation correspond à un profil très complexe où le gène a des exons **partiellement dupliqués** (**ratio = 1,25** et non pas 1,5), des **exons normaux** et des **exons délétés**. Ce patient est un enfant qui présentait une tumeur du cervelet et la réelle mutation est la perte des exons 15 à 21. La duplication des exons 3 à 12 correspond à un **CNV**, c'est-à-dire une variation du nombre de copies. Donc cet enfant a à la fois un **polymorphisme de répétition d'exon** et (situation normale sans rapport avec sa maladie) et une **mutation génétique** responsable de sa maladie.

Question d'un étudiant : Pouvez-vous nous réexpliquer pourquoi on ne peut pas faire ça avec la méthode Sanger ?

Réexplication de la méthode Sanger et réponse à la question par le professeur :

Lorsque l'on fait un **séquençage Sanger**, on a la séquence que l'on veut séquencer. On doit réaliser deux étapes pour connaître cette séquence de nucléotides. En premier lieu on fait une PCR pour amplifier notre fragment (avec deux oligonucléotides de part et d'autre du fragment). En deuxième lieu on fait la PCR de séquençage. C'est la même chose sauf que dans le tube il y a un seul oligonucléotide. Dans cette réaction on insère 1% de didésoxyribonucléotides triphosphate (ddNTP) qui vont s'incorporer de manière aléatoire et qui vont stopper la synthèse. On génère autant de fragments qu'il y a de bases à séquencer et on les sépare par électrophorèse capillaire. Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome (A en vert, C en bleu, G en noir, T en rouge) et passe devant une caméra.

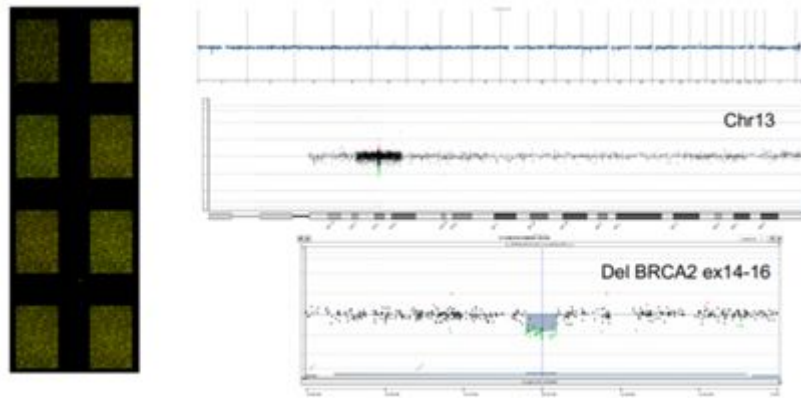
Pour un gène, on a deux allèles, un paternel et un maternel donc potentiellement un normal et un muté (ex : délété). Or, lorsque l'on fait la PCR d'amplification, on n'a pas d'amplification spécifique d'un gène d'origine paternelle ou d'origine maternelle : les oligonucléotides vont s'hybrider sur l'allèle paternel et sur l'allèle maternel. Lorsqu'on va faire la PCR de séquence, l'oligonucléotide **séquencera les deux allèles**.

Si on laisse la PCR aller jusqu'au bout (35^{ème} cycle), la PCR de l'allèle délété (raccourci) va démarrer un peu plus tard que la PCR de l'allèle normal du fait du manque de matériel au démarrage mais il y aura la **même quantité de matériel à la fin**. On ne verra donc pas de différence car **dans cette méthode on regarde seulement le résultat final**.

Avec la **QMPSF**, on ne va pas regarder le résultat final étant donné que l'on ne va pas jusqu'au bout de la PCR. On s'arrête en **phase linéaire** (vers le 26^e cycle) et là on verra une **différence de quantité** (on verra le retard d'une courbe par rapport à l'autre).

B- CGH-array

La **micro-array** est la mesure du nombre d'exemplaires d'un gène ou d'un exon. Elle permet de voir les **anomalies de nombre** et les **anomalies de structure uniquement si elles sont NON équilibrées** (ex : translocation avec perte de matériel).



Ci-dessus, on voit la totalité du génome de 8 patients étudiés simultanément, puis en-dessous on voit le gène d'intérêt BRCA2. On observe une **chute du nombre de copies** chez un patient qui correspond à une délétion des exons 14 à 16 de BRCA2. Les micro-array sont donc l'autre façon de **voir la perte ou le gain d'un exon**, par une technique différente qui est **l'hybridation**.

Il ne faut pas oublier que cette technique commence tout de même par une PCR pour le marquage des brins d'ADN. Cette technique consiste en la **co-hybridation de deux ADN** : un ADN de référence et un ADN à tester.

IX – Démarche diagnostique en oncogénétique

A- Organisation en France

En France, il y a 150 sites de consultation en oncogénétique (pour une suspicion de cancer héréditaire) et 26 laboratoires qui font les recherches génétiques. Il y a 100 000 tests effectués par an. Il y a deux obligations réglementaires : **l'autorisation de l'ARS** pour la réalisation des examens génétiques au niveau du **laboratoire** et **l'agrément du généticien** (par l'agence de la biomédecine).

L'agrément est personnel, il appartient au généticien, donc s'il déménage et qu'il va dans un autre laboratoire autorisé, il pourra toujours faire valoir son agrément. Cependant, s'il déménage et qu'il va dans un laboratoire non autorisé, il perd son agrément.

B- Démarche diagnostique

En premier lieu, il y a une consultation avec un médecin afin de déterminer s'il y a réellement suspicion de cancer héréditaire. Ensuite on fait la recherche génétique d'une mutation expliquant ce cancer héréditaire. Enfin le résultat revient au patient par l'intermédiaire d'une **consultation d'annonce du résultat**. Le résultat de génétique est rendu à un médecin qui le rend au patient. **Le résultat de génétique n'est jamais rendu directement au patient par le laboratoire.**

On a trois types de résultats :

- On ne trouve aucune mutation : le **résultat est négatif**. Le médecin dira au patient que dans la limite de nos connaissances actuelles, on ne peut pas expliquer pourquoi il y a autant de cas dans sa famille.
- On trouve une **anomalie génétique** → 2 cas de figure :
 - ★ 1^{ère} situation : L'anomalie est une **mutation délétère** (ex : codon stop ou décalage du cadre de lecture). Dans ce cas on peut affirmer que la mutation affirme le syndrome de prédisposition. Pour s'en assurer, on va pouvoir ensuite rechercher cette anomalie chez tous les membres de la famille qui sont malades.
 - ★ 2^{ème} situation : On caractérise un **variant**, c'est-à-dire une variation comme une mutation mais dont on ne sait pas si elle est délétère ou si c'est un polymorphisme. C'est ce qu'on appelle un **variant de signification inconnue**. On ne peut pas le mettre en lien avec la maladie mais on ne peut pas l'exclure non plus car c'est la première fois qu'on le voit (donc pas fréquent comme un polymorphisme) et pour autant ce n'est pas une mutation non-sens, pas un décalage du cadre de lecture. C'est par exemple une mutation faux-sens. Par des tests fonctionnels, il va falloir démontrer que cette mutation est réellement délétère.

Ces recherches d'anomalies génétiques sont effectuées chez le **cas index**, c'est-à-dire le premier patient de la famille qui se fait étudier génétiquement. **Le cas index est toujours une personne malade.**

Dans ces situations, on n'est jamais dans un contexte d'urgence. Le but n'est pas de traiter la tumeur du patient mais de trouver s'il y a une favorisation génétique à la survenue de sa tumeur (= prédisposition).

Important :

Uniquement dans le cas d'une **mutation délétère** : on peut proposer de rechercher cette mutation chez les membres de la famille non encore atteints. C'est ce qu'on appelle du **diagnostic présymptomatique**. On réalise ceci en séquençage **Sanger** car on sait ce que l'on recherche. La mutation est restreinte donc on n'utilise pas le NGS. Cette mutation est spécifique à la famille : c'est une **mutation privée**.

On a donc deux possibilités de résultats :

- L'individu sain n'est pas porteur de la mutation familiale. Il est donc exclu du risque de syndrome tumoral familial. Il ne fera pas plus de cancer que la population générale.
- L'individu est porteur de l'anomalie génétique familiale mais n'a pas encore de symptôme. On sait qu'au cours de sa vie, cet individu fera un cancer du même type que ceux observés dans la famille. Donc on va mettre en place des stratégies de surveillance suffisamment renforcées de façon non pas à éviter l'apparition d'un cancer (car ce n'est pas possible étant donné qu'il est porteur de l'anomalie) mais à le prendre en charge tellement tôt qu'il n'aura pas d'impact sur la survie du patient. On a des stratégies d'évitement du risque (**stratégies de prophylaxie**) qui sont extrêmement variables. Par exemple, les stratégies de prophylaxie dans le cancer du sein et de l'ovaire vont d'une surveillance par imagerie médicale jusqu'à une prophylaxie chirurgicale (enlever les ovaires à partir d'un certain âge ou enlever un sein normal et faire une reconstruction mammaire au cours du même geste = mastectomie).

Tout ceci est très encadré au niveau réglementaire et au niveau psychologique. Pour démarrer une séquence de traitements, il faut l'accord du patient évidemment mais il faut aussi obligatoirement appartenir à des **équipes pluridisciplinaires** qui sont déclarées. Ceci se fait exclusivement sous le contrôle d'équipes appartenant à des CHU ou à des centres de lutte contre le cancer.

PARTIE B : GÉNÉTIQUE TUMORALE

Aux côtés des techniques, il y a le type de prélèvement.

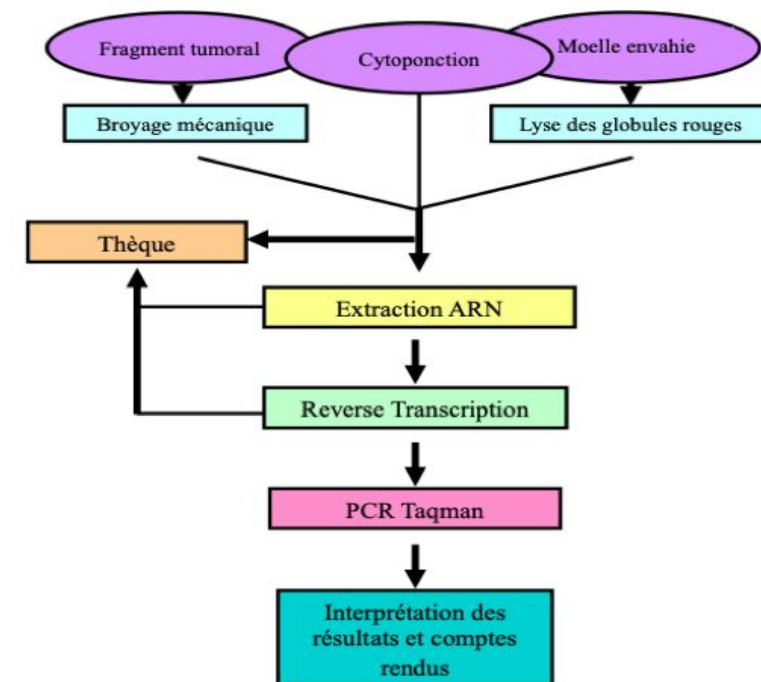
La deuxième partie de ce cours est consacrée à un changement de prélèvement, qui est la tumeur en elle-même.

I. Type de prélèvements

Qu'est-ce que je recherche au niveau de la tumeur ?

Je recherche les anomalies tumorales, c'est-à-dire présentes exclusivement dans les cellules tumorales, alors qu'avant on recherchait les anomalies présentes dans le corps entier, qui vont prédisposer au développement d'une tumeur. Dans le cas précédent, on pouvait être porteur mais asymptomatique. C'est le cas du diagnostic pré-symptomatique.

Quand on s'intéresse à la tumeur, on cherche les mutations exclusives aux cellules tumorales. Au niveau des techniques, schématiquement on va utiliser les mêmes que pour les études du sang : NGS, séquençage Sanger et Taqman. Pour la technique Taqman, on voit spécifiquement des cassures chromosomiques qu'on a besoin de trouver, ce sont ces fameuses translocations chromosomiques comme pour la leucémie myéloïde chronique. On utilisera essentiellement ces trois techniques.



A. Difficultés dû au prélèvement

Pourquoi ne regarde-t-on pas les réarrangements de grande taille ?

Avec ce type de prélèvement, on se confronte à au moins 2 difficultés :

- **1er grand problème est la gestion du prélèvement.** La difficulté vient du prélèvement en lui-même, que l'on obtient qu'après chirurgie (opération) ou biopsie (carotte de \varnothing tumorale avec une aiguille assez fine). Le matériel tumoral est très fragile, puisqu'il s'agit de matériel frais contrairement au sang qui peut se conserver une semaine à température 4°C ou 3j à température ambiante, même 28j à 4°C ou une semaine à température ambiante. A la différence du sang qui est un matériau robuste, la tumeur solide est un matériau très fragile. Donc il faut mettre en place des stratégies de préservation du matériel biologique.

Rappel : Si on veut étudier les ARN, il faut qu'on puisse prélever la tumeur et il faut qu'elle soit congelée dans les 15 min après sortie du corps car sinon les ribonucléases vont digérer les ARN.

Ce qui est dit ici est que : cellule congelée en azote liquide ou fraîche, ADN tumorale et ARN tumorale.

Si on n'est pas organisé pour travailler les Ac nucléique immédiatement alors on va travailler avec du matériel dit fixé en paraffine. Mais le problème est que la paraffine détruit les Ac nucléiques. Pour des PCR les fragments (100 à 150 Nt) seront tout petits si le prélèvement est inclus en paraffine, car l'ADN est dégradé. On ne pourra pas étudier l'ARN pour des fragments en paraffine car il sera partiellement dégradé, ce qui est problématique.

- **2e grand problème est que le prélèvement est hétérogène.** Quand on prélève un morceau de tumeur, le chirurgien qui fait le prélèvement va faire un prélèvement large pour enlever la totalité des cellules tumorales en un seul geste, pour ne pas laisser un reliquat tumoral. Sinon on a un risque métastatique ou de résurgence très élevé.

Dans le prélèvement on aura des cellules tumorales et des cellules normales (marge d'exérèse, exérèse étant le fait d'ôter le tissu pathologique). Pour que le geste soit propre il faut que la marge soit suffisamment importante soit d'au moins 20% (dans les petites tumeurs) du volume de la tumeur à enlever. Dans le cas des grosses tumeurs ce sera la limite que l'on peut enlever sans détruire l'organe ou le patient, mais on parlera toujours de marge d'exérèse.

C'est codé dans les comptes rendus opératoire par R0 = marge d'exérèse sans cellules tumorales. Parce que l'anatomopathologiste fera la fixation de tout et va regarder si dans les marges il n'y a aucune cellule tumorale. Il peut aussi le faire au cours du geste chirurgicale à ce moment-là l'anatomopathologiste dit si le chirurgien est bien positionné. Il faut qu'on ait une marge saine de 10 à 20% sans cellules tumorales. Sur la coupe on aura donc des cellules tumorales et saines.

On se retrouve avec une composition génétique foireuse car les cellules normales apportent une hétérogénéité génétique.

Exemple :

Si on a 2 allèles pour les cellules tumorales et 2 allèles pour les normales, on obtient 4 allèles au total et s'il n'y a qu'un seul allèle muté dans la tumeur muté alors on obtiendra 1 allèle muté vs 3 allèles normaux. Donc il se peut que je ne détecte pas la mutation due à une contamination par les cellules normales.

Si je suis dans les cas 80/20 (80% cellules tumorales et 20% cellules normales, mon nombre d'allèles mutés vaudra $0,8 \times 1$ et mon nombre d'allèles normaux vaudra $0,2 \times 1 + 2 \times 0,2 \times 1$). Il se peut qu'avec les techniques utilisées je ne détecte pas la mutation car j'aurais une contamination par les cellules normales. A 80% on verra la mutation.

Mais je peux me retrouver dans un cas avec 90% de cellules normales, dans ce cas je ne verrais pas la mutation. Dans ce cas là, ou dans les réarrangements de grande taille, je ne vois pas la mutation. Les allèles normaux vont polluer le résultat.

A retenir : Quand vous faites un diagnostic tumorale, il est beaucoup plus difficile de détecter une mutation car vous êtes pollué en réalité par 3 facteurs :

- **Pourcentage de cellules tumorales**
- **Clonalité de la tumeur (regroupement hétérogène de cellules en terme de contenu génétique = pluriclonale)**
- **Ploïdie de ma tumeur (le nombre de chromosomes que j'ai dans ma cellule tumorale). Par définition mes cellules tumorales ont un contenu génétique aberrant et je peux avoir 1, 2, 3... chromosomes qui vont porter une mutation, ou qui ne vont pas la porter et donc polluer.**

Tous ces éléments là font que les variants génétiques que l'on détecte ne sont pas à 50%.

Le ratio de 50% est le ratio de la génétique constitutionnelle. Je ne suis pas polluée, j'ai 2 allèles partout, dans toutes les cellules de mon corps. Donc lorsque j'ai une mutation, elle est présente sur un allèle mais pas sur l'autre.

Ici les ratio vont de 1% à parfois 90%.

Le ratio allélique, c'est à la présence de la mutation = $Q_t \text{ mutation} / Q_t \text{ d'allèles sauvages}$

Pourquoi, sur mon prélèvement final, je ne peux pas récupérer uniquement des cellules tumorales ?

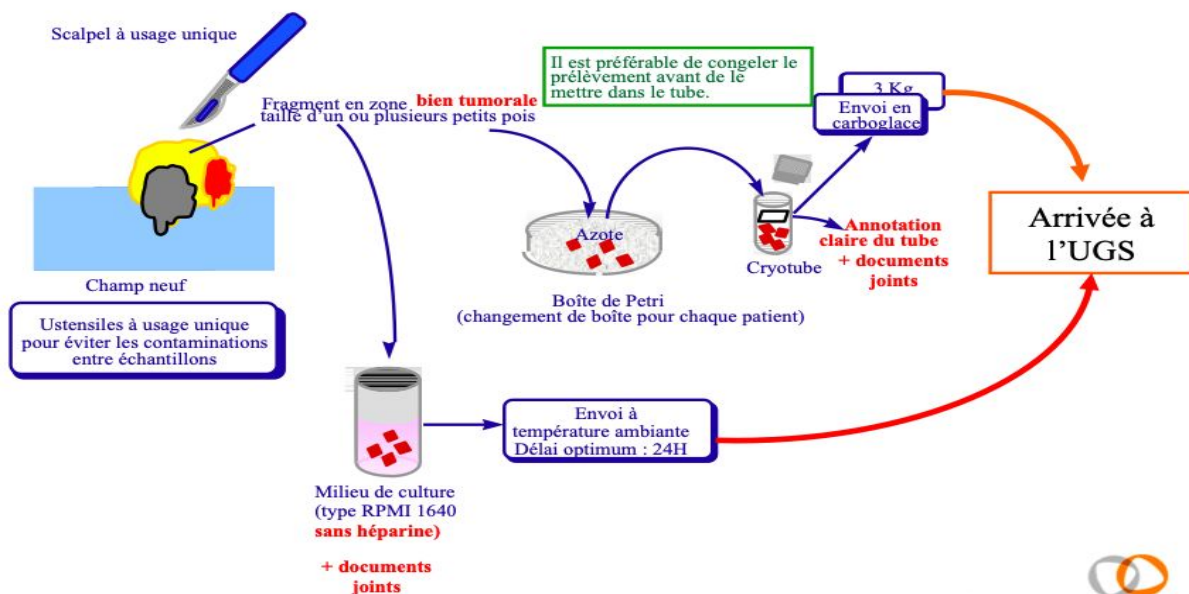
Quand le fragment est fixé en paraffine (là on ne parle pas de congélation), je ne pourrais extraire les Ac. nucléiques que sur une lame à partir d'une coupe représentant tout mon prélèvement donc je ne peux pas physiquement gratter uniquement les cellules tumorales et laisser les cellules normales car au sein des cellules tumorales on aura des vaisseaux sanguins (cellules normales), des fibroblastes (tissu de soutien non tumorale). On peut sélectionner la zone pour l'enrichir en cellules tumorales.

Dans le cas des prélèvements congelés, tout est mélangé et je vais tout extraire. On essaye de diminuer la quantité de cellules normales qui viennent polluer le prélèvement en limitant la zone.

B. Gestion du prélèvement

Dans toute biologie moléculaire, on s'intéresse au Taqman donc on va chercher les réarrangements de structure, c'est-à-dire des translocations dans les tumeurs solides, et ces translocations signent les tumeurs solides.

A tout prélèvement biologique on doit avoir une feuille de prescription qui est un bon de demande d'analyse tel que vous l'avez là.



Quand on prélève (prélèvement tumorale qui vient d'être sorti du corps humain : tumeur, vaisseaux, tissu conjonctif (tumeur solide)...), l'idée va être de sélectionner la tumeur et de la réduire en petits carrés pour la congeler ou la mettre en milieu de culture cellulaire.

Dans ce qui est présenté, pour étudier les anomalies de structures qui codent des transcrits chimériques, on a besoin de l'ARN.

Pourquoi pas l'ADN ?

On imagine que j'ai un gène A et B collés ensemble. Là je suis au niveau de l'ADN. Le transcrit codé comprend les 2 séquences codantes raboutées. Si je mets oligonucléotide de PCR de part et d'autre de la séquence (à peu près 400 Nt), j'arrive bien à voir, après RT PCR, mon transcrit chimérique, et je le séquence. Mais en réalité mon point de cassure au niveau de l'ADN peut se situer à des positions variables. Si je mets mes oligonucléotides de part et d'autres de manière, j'aurais très certainement une distance telle, et je ne connais pas où se situe le point de cassure sur l'ADN, que je ne pourrais pas faire de PCR, ni séquençage Sanger.

En partant du transcrit je réduis la taille et je vois directement le résultat qui permet de faire une déduction sur l'ADN.

(Si azote liquide au contact aluminium ou fer , la peau va se coller donc on doit couper le doigt. Ne jamais toucher)

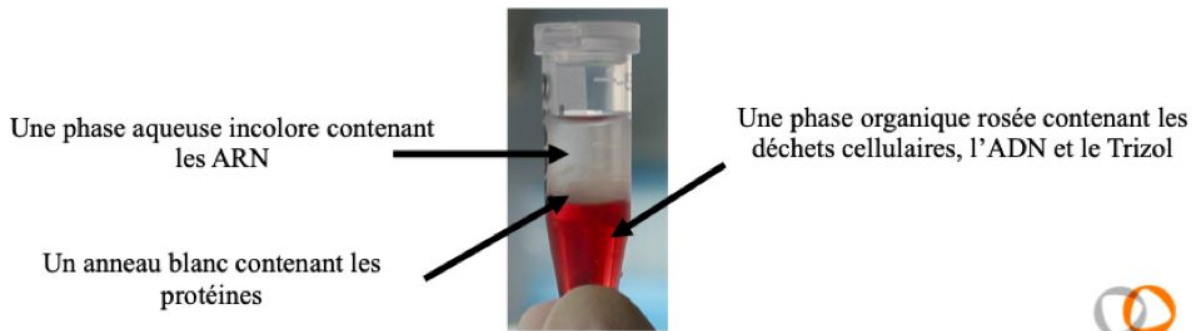
C. Extraction de l'ARN

Comment on extrait de l'ARN ?

D'abord on doit réduire en poudre le prélèvement pour accéder au niveau cellulaire. On le met dans un tube stérile de 2 ml avec une bille magnétique en acier puis on va agiter le tube à 10 mille tours / sec. La bille écrase tout à l'intérieur.

À la fin on extrait au phénol chloroforme (classique), on obtient ces 3 phases :

- Phase organique dans laquelle sont dilués les déchets cellulaires
- Précipité blanc à l'interface correspondant à la précipitation des protéines
- Phase aqueuse on retrouve ARN



Il suffira après d'utiliser de l'isopropanol pour précipiter les ARN.

Le dosage des ARN sera vu en TP.

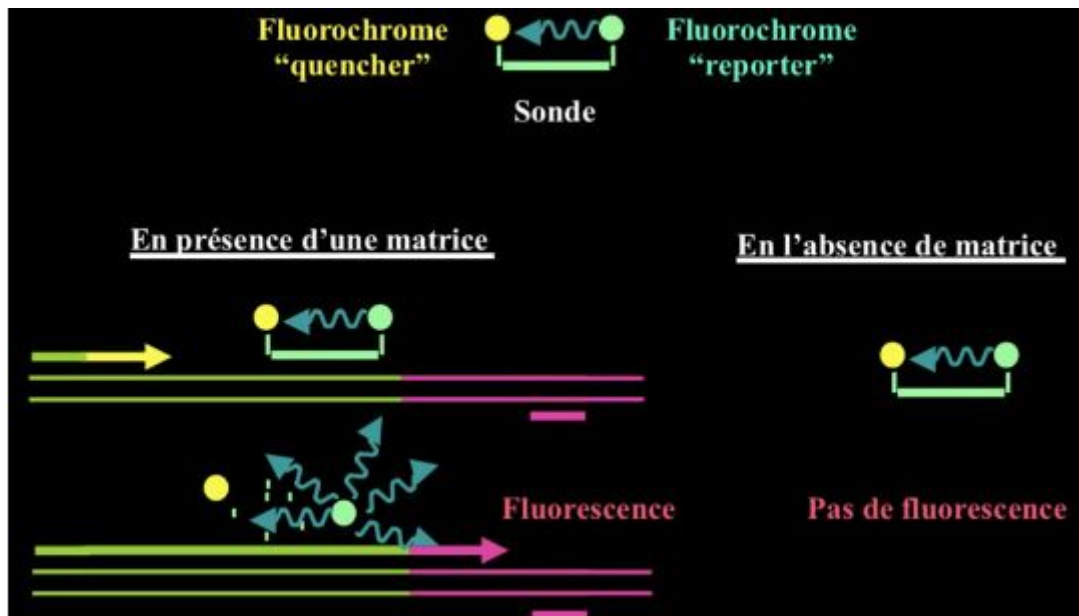
D. Dosage des Ac. Nucléiques

Les Ac Nucléiques absorbent à 260 nm, quel qu'il soit. En utilisant la loi de Beerlanbère et le coefficient d'extraction moléculaire spécifique de l'ARN, on va pouvoir déduire à partir de l'absorbance la concentration en ng / μ l ou μ g / mL la concentration en ARN de l'échantillon.

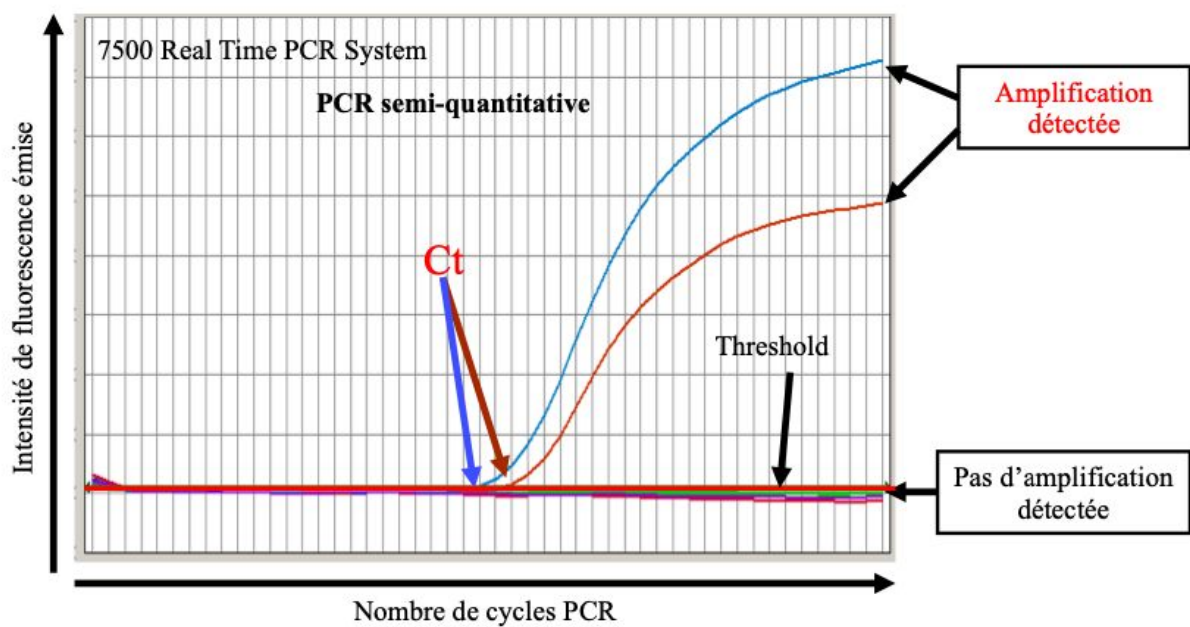
Donc j'ai des ARN et leur rapport = ratio d'absorbance 260/280 est supérieur à 2 ce qui permet de l'utiliser.

J'ai des ARN qui peuvent être utilisés. Dans ce cas là je vais utiliser la technique Taqman qui est une amplification des ARN après reverse-transcription (ADNc) en utilisant 3 amorces : sens, anti-sens et sonde (oligonucléotides) qui s'hybride au milieu du fragment de PCR.

Cette sonde possède un fluorochrome qui est inhibé par ce que l'on appelle un quencher. La fluorescence est inhibée pendant la réaction. Et lorsque la polymérase va commencer à amplifier, elle va digérer progressivement la sonde. Elle va séparer le quencher du reporteur, et la fluorescence va être émise. On peut suivre la quantité de fragments générée par la libération de la fluorescence. C'est ce qui fait la sigmoïde. C'est ce que l'on appelle une PCR semi-quantitative en temps réel.



On va pouvoir déduire la présence de la translocations, car la courbe de PCR va être générée et on pourra déduire la quantité de transcrits anormal présent par le Ct (moment où le cycle décolle) qui permet de quantifier de manière relative la quantité d'ARN (plus il est bas plus il y a de transcrits).

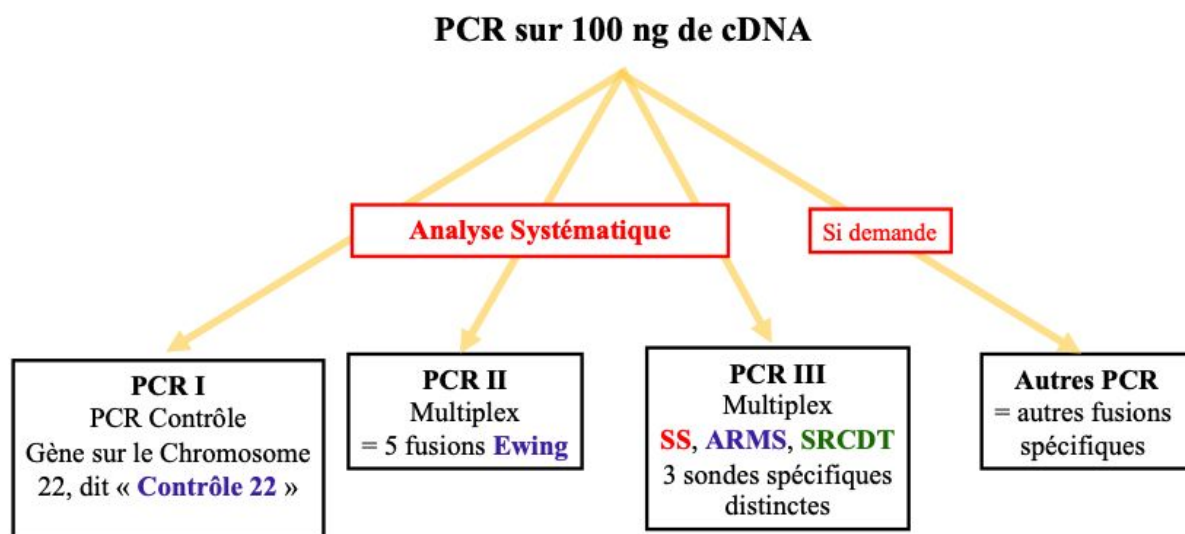


Rappel : Les ADNc n'ont pas d'introns car ce sont seulement les exons collés entre eux.

E. Contrôle qualité

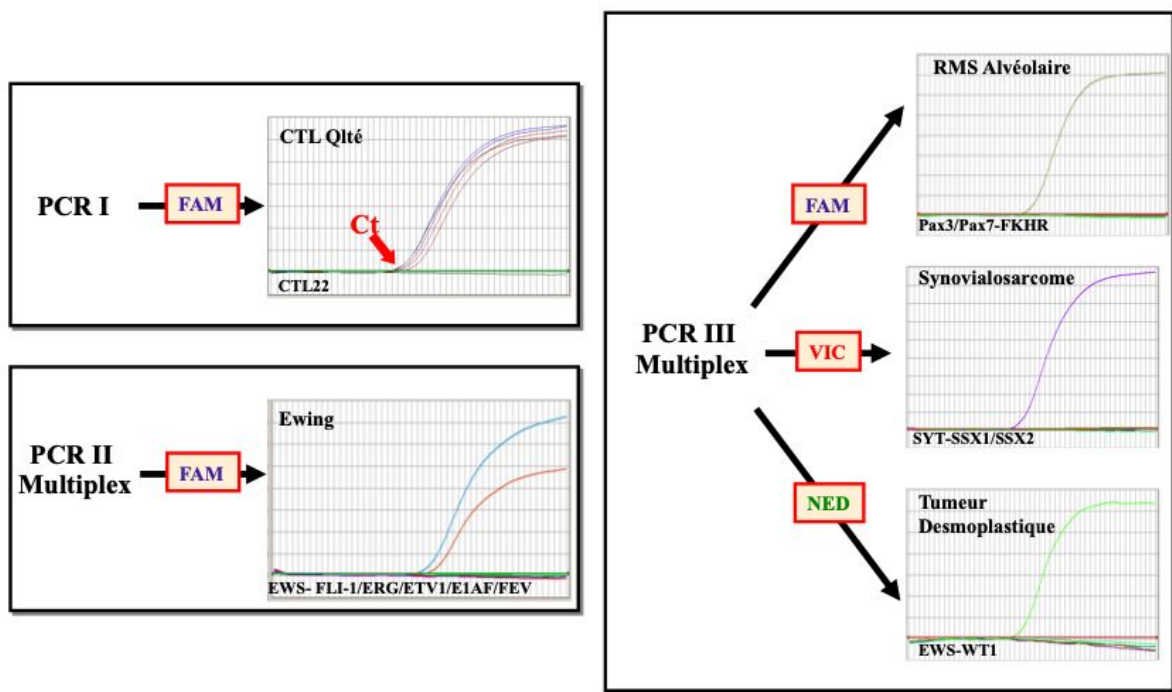
4 PCR sont mises en place :

- Une **PCR de contrôle qualité**. On prend un gène normal non réarrangé dont on va étudier le transcrit. Ça amplifie tout le temps, mais fait apparaître une courbe (courbe verte). On appelle cette courbe le **NTC** (no template contrôle). On met tous les composés de la PCR Taqman sauf la matrice initial (ADNc), soit la sonde, les amorces, la polymérase, le tampon d'amplification, mais on ne met pas de matrice (ADNc), donc il n'y a pas d'amplification.
- D'autre PCR, pour aller chercher la spécificité génétique de ces tumeurs, précédemment décrites.



Si j'avais une amplification dans le No Template Contrôle, cela signifierait que j'ai une **contamination** par un produit de PCR, si on n'a pas suffisamment segmenté nos pièces entre le propre et le salle (*sera vu en ED*).

Chez certains patients on peut détecter l'amplification selon le type de transcrit réarrangé qu'ils ont et également selon le type de tumeurs observés. Le transcrit est spécifique de la tumeur. **La présence du transcrit signe le diagnostic tumorale au niveau moléculaire. On dit dans ces cas-là que le résultat est pathognomonique, il apporte la connaissance de la pathologie. Il affirme le diagnostic tumoral, qui ne peut pas être contesté si on a mis tous les contrôles.**



Pour pouvoir répondre il faut forcément que vous ayez un ARN de bonne qualité c'est-à-dire que le transcrit soit amplifié sur notre contrôle du chromosome. Et si le contrôle s'amplifie mal, le Ct est trop élevé vous risquez de rendre les résultats non interprétables. Tous les chiffres sont rentrés dans le système de stockage du laboratoire et on aboutit à signer un compte rendu sur ces résultats positifs.

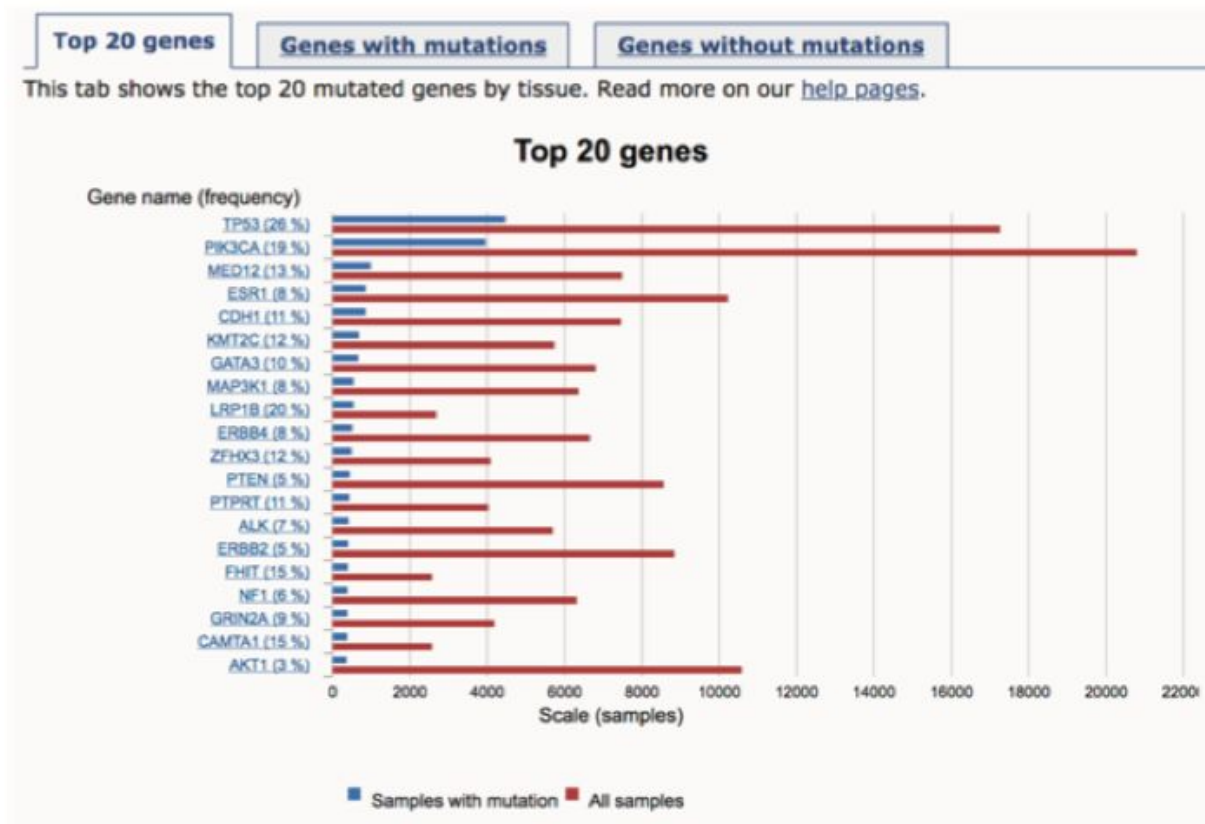
F. Points chauds

On utilise les mêmes techniques qu'en génétique constitutionnelle pour rechercher les variants. On recherche des mutations qui sont des **points chauds** de mutation. A la différence de la génétique constitutionnelle, en génétique tumorale (génétique des tumeurs fréquentes). Les gènes sont mutés de façon acquise, dominante, ne sont présentes que selon un seul exemplaire du gène, qu'un seul allèle et quasi toujours aux mêmes endroits (hot post).

G. COSMIC

On a une base de données COSMIC qui est le catalogue de mutation somatique (non transmise et sont restreints aux cellules tumorales, elles ne touchent pas la ligne reproductrice) dans le cancer. On peut trier par type tumorale le pourcentage de gènes mutés.

Carcinomes mammaires



Le nb d'échantillons qui portent la mutation en bleu par rapport au nb d'échantillons total. Dans les cancers du sein en générale sont dû à une mutation sur le gène P53. On peut voir que 1/4 des cancers du sein sont mutés pour P53. La 2e mutation la plus fréquente est la Pi3 Kinase (enzyme sous le récepteur membranaire HER2 qui est un récepteur aux facteurs de croissance). Soit activation PI3K qui permet de faire penser que l'enzyme est h24 activé.

H. Plateforme génétiques tumorales en France

La structuration de la génétique tumorale est un peu différente de celle de la génétique constitutionnel, on aura 28 plateformes (Bergonié et CHU sur bordeaux qui fait aussi la réunion) déclarées qui s'occupent de la génétique tumorale en France.

Le NGS on cherche mutations Hot post sur tous ces gènes. On a ici plus de 500 gènes recherchés, mais la préparation des échantillons est un peu différente. On est plus sûr de la capture mais sur de l'amplification par PCR à plus de 1500 oligonucléotides qui vont amplifier plus de 500 gènes pour préparer le matériel pour le NGS.

On ne peut pas utiliser la QMPSF pour détecter les réarrangements de grande taille car en réalité nous avons 3 facteurs de variation au niveau des cellules tumorales qui rendent la détection quasi impossible.

II. Points essentiels du cours

- Dans le cadre d'une question biologique pertinente, la technique fait la découverte
- Progrès majeurs de la biologie moléculaire dans les 20 dernières années grâce à l'apparition de la PCR (1986)
- Le séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger constitue une méthode de référence (gold standard)
- Devant l'augmentation du nombre de gènes, et du nombre de patients, les critères de veille technologique sont
 - Nécessité de techniques automatisées
 - Grande sensibilité
 - Information moléculaire exhaustive
- Le séquençage de nouvelle génération, par son approche massive et semi-quantitative est appelé à remplacer progressivement toutes les techniques existantes (MP + RGT)
 - Nécessité d'augmenter capacité et compétences en bioinformatique au sein des laboratoires de génétique moléculaire