



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.18 : BMOL 4

Date : 29 /09/2020

Plage horaire : 11 ½ à 12 ½

Enseignant : SEVENET NICOLAS

N°ISBN : 978-2-37366-088-3

Ronéistes

Essobai Meftah Omaïma – omaimaessobai@gmail.com

Laroche Bertille- bertillelaroche@orange.fr

Principales techniques utilisées en diagnostic moléculaire. Stratégies diagnostiques

Plan du cours :

I – Introduction

A - Génétique constitutionnelle : test génétique - statut génétique

B - Stratégies de caractérisation d'un variant dans l'ADN

II - L'environnement de réalisation des analyses - Accréditation des laboratoires de biologie médicale

A– Process organisationnel encadré par le COFRAC

B– Système de management de la qualité (SMQ)

C - Gestion des portées d'accréditation - validation de méthode

III - Contrôles interne et externe de la qualité

A - Contrôles Interne de Qualité (CIQ) et Contrôle Interne de Laboratoire (CIL)

B - Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)

IV - Encadrement réglementaire

A - Autorités de tutelle

B - Autorisation d'exercice des laboratoires et Agrément de signature des examens

V - Techniques de préparation des acides nucléiques

A - Prélèvement d'ADN

B - Prélèvement d'ARN

VI - Recherche d'une mutation au niveau de l'ADN

VII - Le NGS

A.Introduction

A. Génétique constitutionnelle : test génétique - statut génétique

On va rechercher une anomalie génétique qui est présente dans les cellules sanguines, le matériel biologique le plus facile à obtenir est d'extraire l'**ADN** de leucocytes, pour cela on fait une prise de sang au pli du coude et on prélève le sang sur un tube sur **anticoagulant**(EDTA). Le principe est que lorsque le sang est en dehors du corps humain il coagule immédiatement, un caillot sanguin (= agrégation de cellules) se forme.

La coagulation donne deux phases le **caillot sanguin** constitué d'une masse de cellules et une phase liquide et jaune qu'on appelle le **sérum**. Si je recueille du sang avec de l'anticoagulant je ne peux plus faire du caillot donc la façon pour séparer les éléments du sang est de faire une **centrifugation** à une vitesse moyenne, les éléments vont se séparer par densité, on va pouvoir retrouver des cellules diverses et variées (**hématies= GR, leucocytes=GB..**) ensuite on retrouve des débris cellulaires(**plaquettes**) et un liquide qu'on appelle le **plasma**. Donc finalement le sérum est du plasma dépourvu de facteurs de la coagulation.

En génétique constitutionnelle à la recherche d'une mutation c'est différent de la biochimie. Le test génétique ne sera réalisé qu'une seule fois au cours de notre vie pour la recherche de cette mutation, c'est un résultat **unique** et **définitif**. Cet aspect définitif est assez angoissant pour le patient, c'est pour ça que le résultat n'est jamais rendu par le laboratoire au patient, le résultat est toujours rendu au médecin et celui-ci le rend au patient, c'est une obligation légale en France. On estime en France qu'il y a besoin d'une **explication médicale** pour rendre un résultat génétique.

Ainsi le test génétique permet de déterminer un **statut** (présence ou pas de la mutation), donc si vous êtes porteur vous avez un risque de transmettre la mutation à votre descendance (vous transmettez la mutation à un cas sur deux).

Tout ceci a une répercussion non seulement dans la prise en charge médicale liée à la pathologie mais aussi une prise en charge psychologique (comment j'accepte mon statut avec cette mutation).

B. Stratégies de caractérisation d'un variant dans l'ADN

Concernant les stratégies de caractérisation d'une anomalie génétique, on est sur un modèle double : soit on sait ce que l'on cherche, soit on ne le sait pas.

- Premier cas où l'on ne sait pas ce que l'on cherche : c'est une hypothèse **a priori de non connaissance**. On va rechercher la présence d'un **variant**. On fait ce qu'on appelle une **recherche première**. C'est une stratégie assez large.
- Deuxième cas où l'on sait ce que l'on cherche : on va effectuer **une recherche ciblée** de ce variant-là.

Il peut y avoir un cas entre les deux, c'est la notion de **mutation fréquente**, si on prend comme exemple la mucoviscidose (délétion de phénylalanine en position 508) on peut commencer le diagnostic par rechercher cette mutation fréquente dans la population. Ceci nous permet d'aller plus vite.

Si le patient est porteur le biologiste gagne au niveau du temps, prise en charge, ect..mais si le patient n'est pas porteur il y a deux possibilités :

- Soit il n'en est réellement pas porteur
- Soit il est porteur d'une autre mutation, dans ce cas il repart au démarrage du diagnostic, il faut aller chercher toutes les mutations possibles. Ici le biologiste a perdu du temps.

En génétique constitutionnelle il y a en général une absence d'urgence (souvent on a plusieurs mois pour rendre le diagnostic).

Il y a 3 notions qu'il faut prendre en compte pour le diagnostic :

- **Encadrement réglementaire de l'exercice de la génétique moléculaire au niveau constitutionnel**
- **Accréditation** (certifier que je travaille dans des conditions suffisamment satisfaisantes pour être certain que dans le prélèvement que j'étudie je ne vois pas de mutation). La responsabilité du biologiste est dans la **signature d'un résultat négatif** et pas dans un résultat positif. Pour un résultat négatif nous devons nous assurer que nous avons tout mis en œuvre en termes de contrôle de qualité pour être certain que dans le prélèvement qu'on étudie il n'y pas de mutation présente, il y a une grande responsabilité puisque si on signe que le résultat est négatif le patient n'est plus surveillé.
- **Contrôle interne et externe de qualité.**

II - L'environnement de réalisation des analyses - Accréditation des laboratoires de biologie médicale

A– Process organisationnel encadré par le COFRAC

De façon à vous assurer que le résultat négatif que vous obtenez est réellement valable le Comité français de l'accréditation (**COFRAC**) a mis en place **la Norme ISO 15189** qui décrit un processus organisationnel, cette organisation résulte d'une loi qui date d'une dizaine d'années et qui va reposer sur deux piliers :

- un **pilier opérationnel** : tous vos processus de réalisation expérimentaux sont décrits dans **des modes opératoires** (des protocoles).
- **Un système de management de la qualité (SMQ)** : on certifie que la personne qui va réaliser le mode opératoire est habilitée à le faire, cette habilitation repose sur deux choses, ses **compétences** et son **expérience**, je vais m'assurer que lorsqu'elle va apprendre la technique elle saura la refaire toute seule.

Avec ce système, avant de réaliser une expérience tout seul, on en fait trois pour acquérir de l'expérience et on sera encadré par **un tuteur**. Cette habilitation vaut pour tous les domaines de laboratoires et pour toutes les étapes.

Dans ce **processus organisationnel** il y a deux étapes :

- La première fois que vous avez accrédité votre laboratoire il y a ce qu'on appelle **l'audit**, il y a un auditeur certifié qui vient vérifier que tout le processus que vous avez mis en place permet de vous assurer de la pertinence du résultat.
- **Surveillance** : tous les deux ans quelqu'un vient vérifier que vos procédures ne changent pas.

B– Système de management de la qualité (SMQ)

Tous les processus d'habilitation et certification reposent sur **une base documentaire** qui comprend le **mode opératoire** et un **tutorat** (quelqu'un d'expérimenté va suivre la personne qui va apprendre l'expérience). Toutes ces bases documentaires vont être gérées, les versions doivent être mises à jour, ect.

C - Gestion des portées d'accréditation - validation de méthode

Soit on travaille avec des réactifs vendus par des fournisseurs certifiés ou agréés. On appelle ça une **portée A**. On ne fait qu'utiliser un kit qui a déjà été développé. Tout est connu (sensibilité, mode d'utilisation...).

Et la **portée B** est une portée flexible, vous avez développé un test chez vous, elle est plus compliquée puisqu'il faut faire une **validation de méthode**, c'est-à-dire explorer l'ensemble des critères qui permettent de réaliser la technique.

III - Contrôles interne et externe de la qualité

A - Contrôles Interne de Qualité (CIQ) et Contrôle Interne de Laboratoire (CIL)

Il sert à qualifier un robot ou **un automate**, celui-ci doit être passé autant de fois que l'analyse est réalisée dans une journée ou dans une semaine. *A Pellegrin, sur le plateau de biologie, il y a environ 1500 ionogrammes qui sont faits chaque matin.*

Donc vous passez un contrôle de qualité à l'ouverture de la chaîne diagnostique à 6 ou 7 heures du matin et vous allez en repasser un toutes les heures de façon à être certain qu'il n'y a pas de déviation dans vos résultats, ensuite il va être repassé le soir pour la préparation d'automate sur la nuit. C'est **extrêmement régulier**.

B. Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)

L'accréditation a amené à faire une Évaluation Externe de la Qualité (que l'on faisait moins).

Le fournisseur nous transmet un témoin positif. On doit retrouver toutes les mutations qui sont dans ce témoin-là. On ne les connaît pas. On travaille à l'aveugle. Le contrôle est effectué par un organisme central certifié.

Une autre solution est un autre laboratoire qui a sorti un résultat, il nous transmet ses échantillons, on envoie les nôtres. Le but est de retrouver le même résultat.

IV - Encadrement réglementaire

A - Autorités de tutelle

On a pleins d'autorités de tutelle :

- La **HAS** (Haute Autorité de Santé)

- La **DGS** (Direction Générale de la Santé), la **DGOS** (Direction Générale de l'Organisation des Soins), au niveau du ministère.

B - Autorisation d'exercice des laboratoires et Agrément de signature des examens.

Comme vous vous adressez à un **patrimoine constitutionnel** et que la mutation que vous allez détecter le patient ne pourra jamais s'en séparer, vous devez être autorisé légalement à réaliser cette analyse de génétique.

Il y a deux niveaux d'autorisations :

- Le **laboratoire** est autorisé à réaliser des analyses de génétique moléculaire (Par l'Agence Régionale de Santé (**ARS**)).
- Les **généticiens biologistes** sont habilités à signer les résultats. C'est donc un agrément qui est délivré **par l'Agence de la Biomédecine**. Il n'est valable que pour 5 ans. Il s'appelle **agrément de signature des examens des caractéristiques génétiques d'un individu à des fins médicales**, c'est le même niveau que l'agrément des caractéristiques génétiques d'un individu à des fins judiciaires.

Résumé : une organisation certifiée et un encadrement réglementaire permettent de sortir un résultat génétique.

V. Techniques de préparation des acides nucléiques

Dans la génétique constitutionnelle on réalise l'extraction de l'ADN à partir de cellules nucléées du sang circulant recueilli sur anticoagulant. On peut avoir un autre matériel qu'un tube de sang.

A. Prélèvement d'ADN

Le prélèvement d'entrée donne de l'ADN constitutionnel (constitutif de la personne humaine).

Le plus simple c'est une prise de sang total, toujours sur anticoagulant (EDTA). On ne veut pas de caillot qui se forme au niveau du sang.

On peut avoir **des frottis buccaux**. On va gratter la joue avec un écouvillon en plastique et on le place dans une solution et on récupère des **cellules buccales/jugales**. Ça peut être intéressant de prélever de la salive chez les patients pour lesquels on n'arrive pas à prélever du sang (par exemple des enfants très petits)

La deuxième chose en termes d'aspect réglementaire est que la détermination de mutation impose de réaliser cette caractérisation sur deux prélèvements différents de façon à être certain que la mutation est présente chez le patient. Les deux prélèvements sont généralement **un tube de sang** et un prélèvement de **cellules jugales**.

Ça peut être aussi des cellules de la salive, on parle de **prélèvement salivaire**, celui-ci est moins riche en cellules que l'intérieur de la joue

Pour les greffes de moelle osseuse, on aura une disjonction entre patrimoine génétique circulant issu de la greffe et le patrimoine génétique qu'il possède (la peau...). Par définition, toute la moelle osseuse a été nettoyée. Quand on cherche une mutation, on la cherche au niveau du sang. L'équipe du prof savait que la personne était forcément porteuse mais ils ne retrouvaient pas la mutation. Ils ont appris plus tard que la personne avait subi une greffe. Ils ont donc prélevé des fragments de peau.

B. Prélèvement d'ARN

On travaille en **permanence à 4°C** pour être certains de ne pas activer les ribonucléases. Les prélèvements peuvent être du tissu fraîchement isolé mais entre le moment où on extrait du corps humain et le moment où on le travaille pour extraire l'ARN il ne doit pas s'écouler plus de 15 minutes. Puis il est congelé en azote liquide puis conservé à -80°C.

Lorsque la mutation devient plus importante en taille on va mettre en place d'autres stratégies que le NGS. Il y a deux types dont on va parler la **PCR multiplex quantitative** et la **CHR array**.



VII - Le NGS

Le principe de NGS est le **séquençage** des milliards de fragments d'ADN correspondant à tout ou une partie du génome d'un individu.

Si c'est tout le génome c'est ce qu'on appelle **séquençage génomique** et si c'est une partie de ce génome on peut avoir deux grands types : soit ce qu'on appelle **l'exome** soit un fragment de cet exome là et donc on parle de **panel de gène**.

Dans le principe macroscopique du NGS, on commence par isoler la fraction de génome que vous souhaitez séquencer, ce qu'on appelle **la préparation des librairies**.

Ensuite on réalise le séquençage de cette fraction-là. Pour séquencer il y a deux techniques .

Une fois qu'on obtient les résultats nous avons trois étapes :

1° ÉTAPE : Je réorganise selon un modèle de génome universelle ,accepté au niveau mondial avec tous les éléments séquencés , je les remet dans le bon ordre , c'est ce qu'on appelle **l'alignement**

2° ÉTAPE : Je compare à toutes les positions de génome toutes les variations possibles, on le nomme **l'appel des variants**. Et lorsque j'ai fait une liste de mes variants on va dire je les **annote** (je leur donne une formule nucléotidique)

3° ÉTAPE : une fois les avoir annotées je dis si c'est un **polymorphisme** ou une **mutation**.

Entre deux individus j'aurais environ 2 millions de variations génétiques et parmi ces variations certaines seront communes entre les deux personnes et d'autres seront unique à chaque individu.

Les variations communes permettent d'établir un pourcentage d'allèles variants dans ma population. En revanche sur l'un des individus étudiés on aura des variations uniques, dans ce cas il y a deux explications possibles :

- Variation très rare que je n'ai jamais vu chez un autre individu, on peut considérer ça **un polymorphisme excessivement rare**.
- Ca peut être aussi une mutation reliée à une pathologie que la personne n'a pas et qu'elle pourra développer plus tard.

En France on n'a pas le droit réglementairement de faire un test génétique si la personne n'est pas malade, aux Etats Unis vous avez le droit de le faire.