



3^{ème} journée annuelle Filnemus

Commission outils diagnostiques

Génétique moléculaire

Mireille COSSEE

Laboratoire de Génétique Moléculaire
CHU Montpellier – Université Montpellier



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Paris – 30 novembre 2016

Sous-groupes, en adéquation avec l'organisation ANPGM en réseau de laboratoires

- ✓ Myopathies (myopathies, dystrophies musculaires, jonction neuromusc)
- ✓ Maladie de Charcot-Marie-Tooth
- ✓ Amyotrophie spinale infantile
- ✓ Mitochondriopathies
- ✓ Neuropathies amyloïdes familiales

Mireille Cossée

France Leturcq

Martin Krahn

Valérie Biancalana

Julien Faure

Damien Sternberg

Eric Leguern

Philippe Latour

Pascale Saugier-Veber

Vincent Procaccio

Claude Jardel

CHU, Montpellier

APHP, Cochin, Paris

APHM, Marseille

CHU, Strasbourg

CHU, Grenoble

APHP, Pitié-Salpêtrière, Paris

APHP, Pitié-Salpêtrière, Paris

CHU, Lyon

CHU, Rouen

CHU, Angers

APHP, Pitié-Salpêtrière, Paris



Actions réalisées 2015-2016

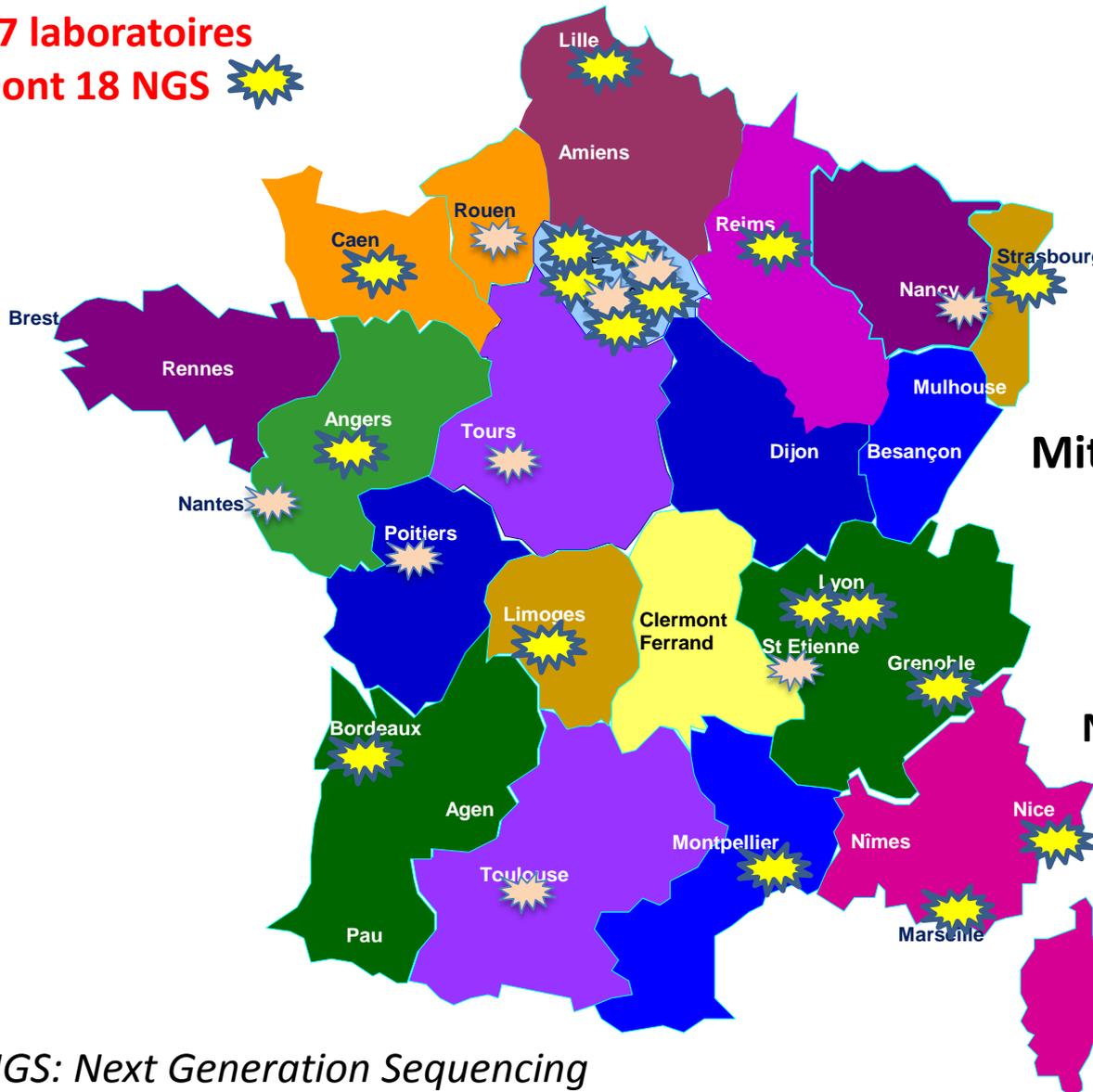
1) Etat des lieux national de l'offre diagnostique moléculaire

Actions réalisées 2015-2016

1) Etat des lieux national de l'offre diagnostique moléculaire

27 laboratoires

Dont 18 NGS



Myopathies n=14 (NGS= 9)

CMT n=7 (NGS)

Mitochondriopathies n=11 (NGS)

SMA n=12 (pas de NGS)

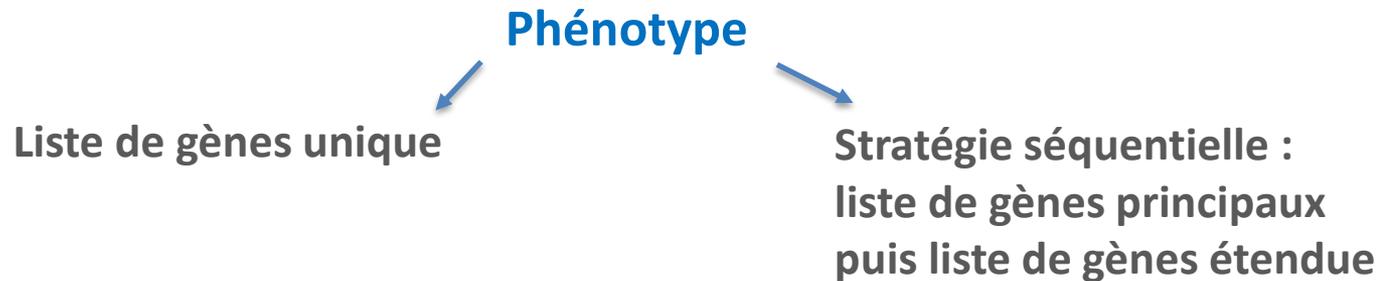
Neuropathies amyloïdes familiales
n=2 (pas de NGS)

NGS: Next Generation Sequencing

Actions réalisées 2015-2016

2) Harmonisation nationale de la démarche diagnostique avec le NGS

- Hétérogénéité ++ des listes de gènes selon les laboratoires
- Harmonisation nationale des panels de gènes à analyser



Avantages:

- Visibilité pour les cliniciens – site Web Filnemus
- Prérequis à l'actualisation arbres décisionnels
- Démarche harmonisée du diagnostic moléculaire => égaliser les chances d'accès au Dc

Difficultés:

- Hétérogénéité clinique et génétique +++
- Consensus de tous les laboratoires, et des experts cliniciens
- Ne pas confondre avec arbres décisionnels

Objectifs 2016-2017

1) Etat des lieux de l'offre diagnostique de chaque laboratoire / panel

2) Actualisation des arbres décisionnels

- Rédaction par groupes de pathologies
 - Validation tous laboratoires du groupe
 - Validation par les cliniciens référents
- Diffusion site Web Filnemus et ANPGM



Ne pas confondre arbres décisionnels et listes de gènes.

Un arbre décisionnel peut faire appel à plusieurs listes de gènes

Ex. tableau évoquant CMT et myopathie distale



Panel CMT



Panel myopathies distales

Concertation++ entre les différents sous-groupes
lors finalisation des arbres décisionnels

Objectifs 2016-2017

1) Etat des lieux de l'offre diagnostique de chaque laboratoire / panel

2) Actualisation des arbres décisionnels

- Rédaction par groupes de pathologies
 - Validation tous laboratoires du groupe
 - Validation par les cliniciens référents
- Diffusion site Web Filnemus et ANPGM

NB. Certaines pathologies : pas de NGS

- Expansions de triplet (Steinert ...)
- FSH
- Grands remaniements *DMD*

Objectifs 2016-2017

3) Homogénéisation de l'interprétation des variants de séquence

Cf Martin Krahn

➤ Immunomarquages des protéines

- **Enquête auprès de la sous-commission anatomopathologie (P. Marcorelles):**
listing des Ac utilisés en IHC dans chaque laboratoire
- **Enquête auprès des labos WB (F. Leturcq)**
- **Enquête auprès des labo recherche (G. Bonne)**

➤ Tests fonctionnels autres

- **Enquête auprès des labo recherche (G. Bonne)**

➤ Mise en place d'un réseau national « plateforme validation des variants NGS Titine »

- Nombreux variants
- Nombreux isoformes
- Transmission récessive ou dominante

=> projet transversal au sein de Filnemus (généétique, anatomopathologie, clinique, recherche, bases de données ...)

Objectifs 2016-2017

4) Redéfinition des missions des laboratoires experts

Groupe de travail ANPGM-NGS

5) Evaluation de l'efficacité diagnostique du NGS ciblé (jusqu'en 2018)

REQUETE de la DGOS

OBJECTIFS: évaluer l'efficacité du NGS ciblé / chaque panel

- Taux de diagnostic positifs
- Nombre de patients sans diagnostic



Evaluer les besoin en séquençage de plus haut débit :

Exome (WES) ou génome (WGS)

Plan France Genomics 2025

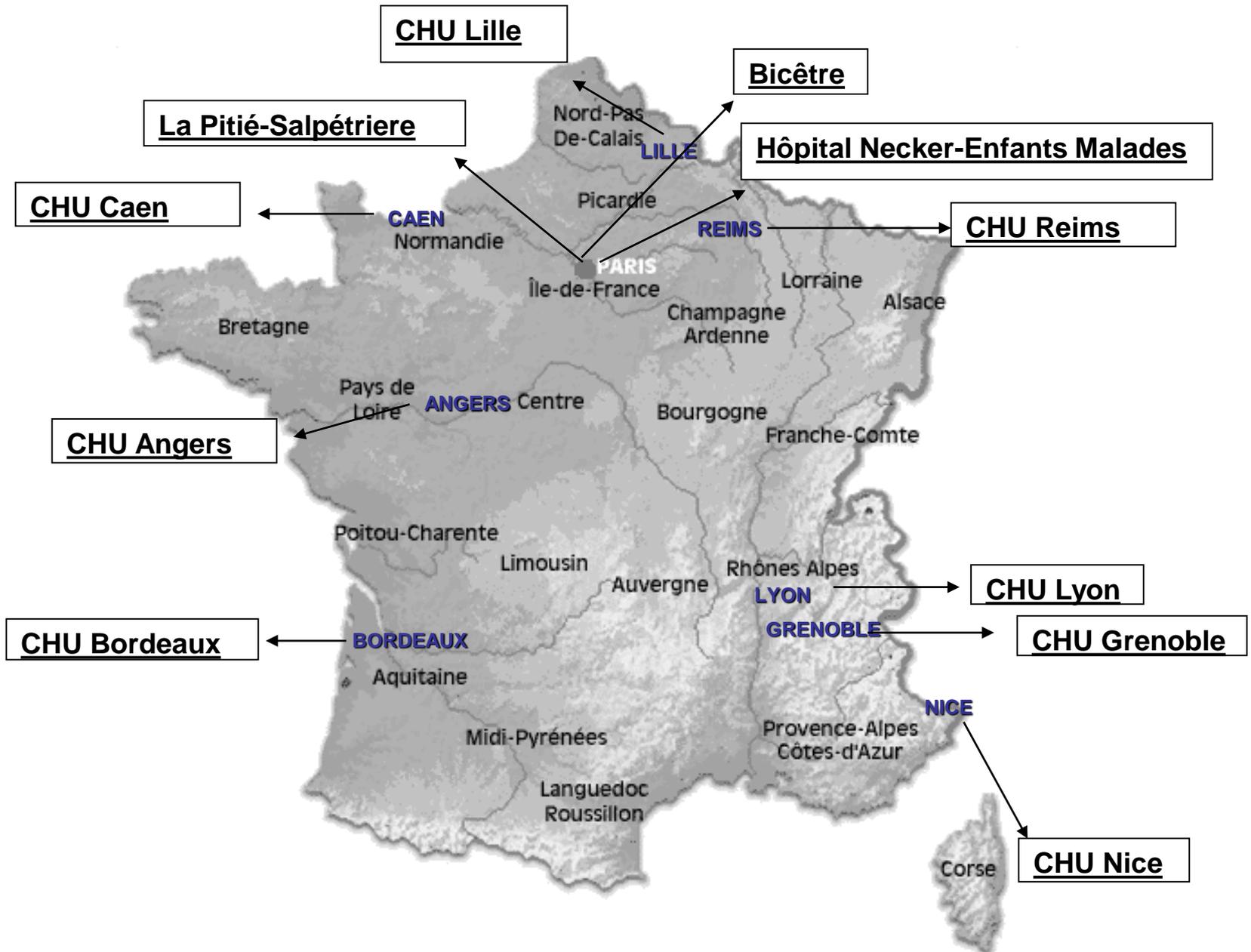
MOYENS

- Chargé de Recherche ½ ETP 1 an
- Aidera aussi à la réalisation des autres objectifs

Sous groupe mitochondriopathies

- **11 centres diagnostiques couvrant le territoire Français:** Angers, Bordeaux, Caen, Grenoble, Lille, Lyon, Paris (Bicêtre, Pitié, Necker), Reims et Nice.
- **Réseau actif:**
 - Réunion présentielle (1/an) et conf calls (2/an) pour harmonisation des pratiques
 - Contrôle qualité inter laboratoire : 2015 NGS ADNmt, recherche délétion; 2016 NGS et test des pipelines informatiques.
 - Arbres décisionnels: ADNmit ; ADN nucléaire («Mitome ») ; présentations neuromusculaires;
 - Évaluation du rendement diagnostique NGS encours (bilan mai 2017)
 - Evaluation médico- économique ADN mitochondrial (PMRE en cours d'évaluation)
- **Offre diagnostique :**
 - Aspect biochimique (Chaîne respiratoire, BN-PAGE..) **n=10**
 - Génétique moléculaire: **n=11**
 - NGS ADNmt dans tous les centres
 - NGS core panel 10 gènes dans 8 centres
 - NGS de panels élargis des gènes nucléaires actuellement connus (Mitome) **n=5**
 - **Exomes à prévoir**

Réseau des laboratoires mitochondriaux
11 laboratoires diagnostics



Errance Diagnostique pour les maladies mitochondriales

Apport du NGS mitochondrial

Pathologies hétérogènes ++ (clinique, âge, biochimique, moléculaire...)

Problématique des déficits mitochondriaux secondaires++

Staff Analyse clinico-biologique:
Différenciation des Déficiets primaires vs secondaires

Déficiets
mitochondriaux
primaires

Déficiets
mitochondriaux
secondaires

**Criblage total NGS
ADN mitochondrial**

Estimation NGS
15-20% patients
diagnostiqués

NGS ADNmt
négatif

**Gènes nucléaires mitochondriaux
ciblés: Mitome (panel 200-300 gènes)
ou autres panels ciblés spécialisés**

Estimation NGS
10-20% patients
diagnostiqués

NGS ciblé
négatif

Analyse Exome

Critères cliniques - antécédents familiaux
évoquant une maladie mitochondriale

Paramètres métaboliques/biochimiques

Paramètres histologiques/morphologie
mitochondriale

Neuroimagerie

Données enzymologiques/biochimiques

Données moléculaires ADNmt :
+/- déplétion , délétions multiples

Estimation NGS
10-20% patients
diagnostiqués

Journée NGS 2017

A vos agendas !!

Parties muscles, nerfs

Illustration de cas résolus ...

Quand ? Vendredi 17 mars 2017

Où ? Institut de myologie

Homogénéisation nationale du diagnostic génétique des myopathies par Séquençage de Nouvelle Génération



Martin KRAHN
Département de Génétique Médicale - APMH
INSERM UMR_S 910 - Aix-Marseille Université



FILNEMUS
Commission Outils diagnostiques
Sous-groupe Génétique Moléculaire

Coordonateurs :

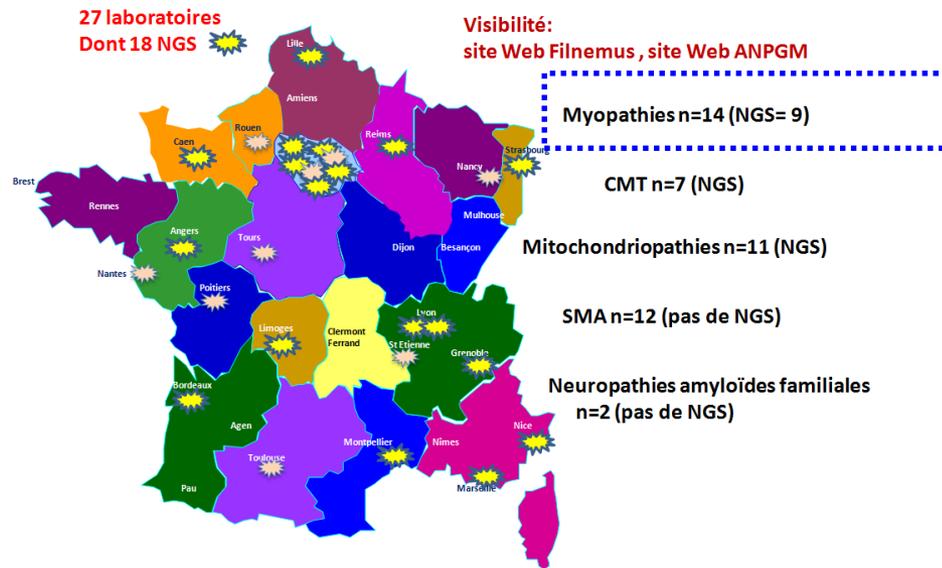
Mireille Cossée
Martin Krahn
France Leturcq
Juliette Nectoux
Valérie Biancalana
Julien Faure
Vincent Procaccio
Claude Jardel
Damien Sternberg
Eric Leguern
Philippe Latour
Pascale Saugier-Veber



- **2015** Etat des lieux national des laboratoires impliqués dans le diagnostic génétique des myopathies
- **2015-2016** Proposition de listes de gènes nationales consensuelles pour le diagnostic génétique des myopathies par NGS
- **2016-2017** Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence

2015: Etat des lieux national

Laboratoires impliqués dans le diagnostic génétique des myopathies



- Grande diversité des approches NGS mises en place par les laboratoires depuis 2012-2013
 - Panels de gènes restreints*
 - Panels de gènes larges*
 - +/- Inclusion de gènes de diagnostic différentiel, gènes candidats, ...*
 - Thématiques diverses*
- Hétérogénéité de l'offre diagnostique
 - Manque de visibilité pour les cliniciens

■ **Action engagée:**
Détermination de listes de gènes nationales consensuelles

2015-2016: Détermination de listes de gènes nationales consensuelles pour le diagnostic génétique des myopathies par NGS

Proposition de listes de gènes nationales consensuelles
pour le diagnostic génétique par séquençage de nouvelle génération
Thématique MYOPATHIES

FILNEMUS
Commission Outils diagnostiques
Sous-groupe Génétique Moléculaire

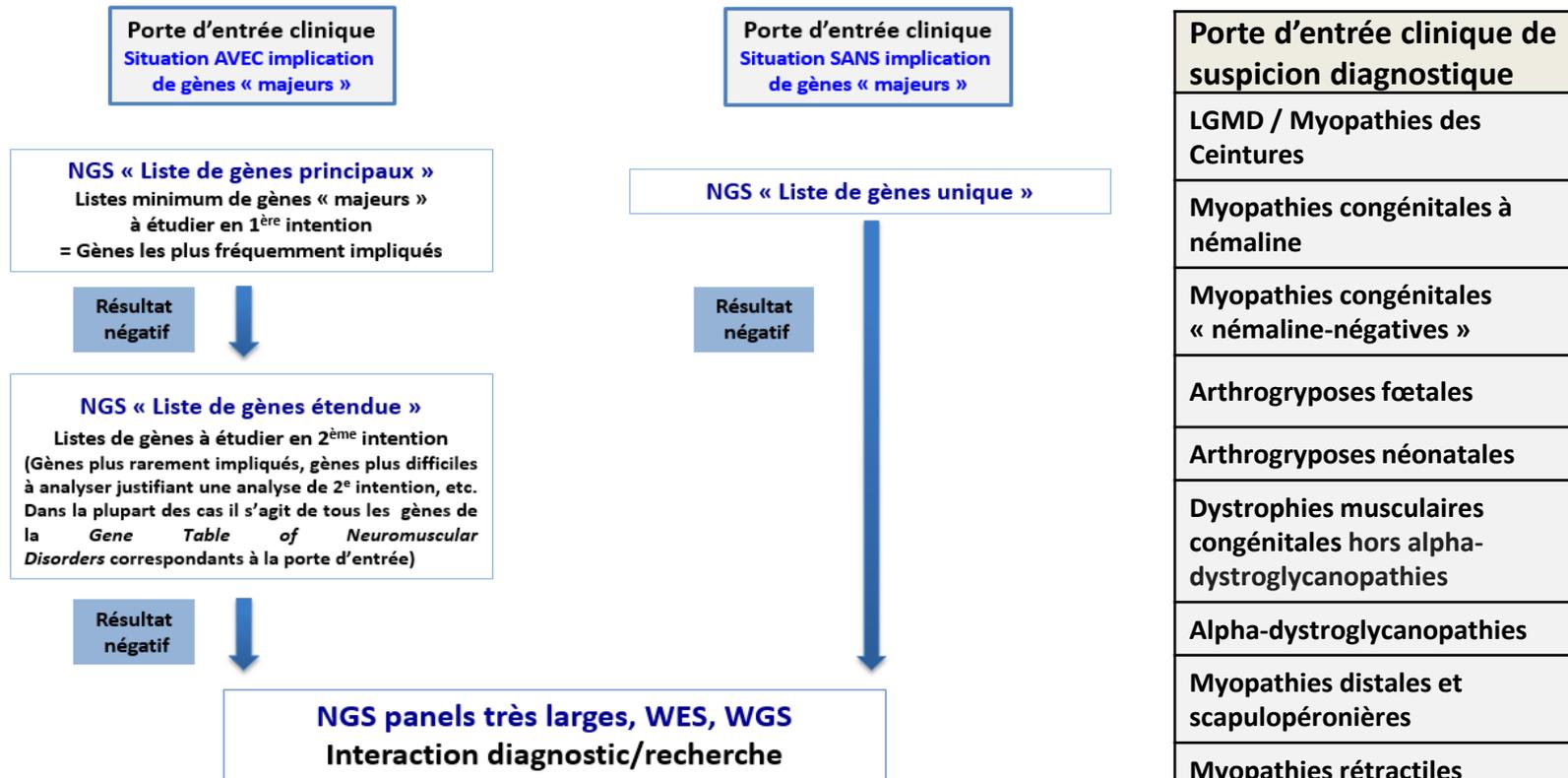
Groupe de travail :
Valérie BIANCALANA (CHU Strasbourg)
Céline BOUCHET SERAPHIN (Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris)
Cécile BOURDAIN-ACQUAVIVA (CHU Lyon)
Mireille COSSEE (CHU Montpellier)
Julien FAURE (CHU Grenoble)
Roseline FROISSART (CHU Lyon)
Martin KRAHN (CHU Timone, Marseille)
France LETURCQ (Hôpital Cochin, Paris)
Judith MELKI (Hôpital Kremlin-Bicêtre, Paris)
Corinne METAY (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris)
Laurence MICHEL-CALEMARD (CHU Lyon)
Juliette NECTOUX (Hôpital Cochin, Paris)
François PETIT (Hôpital Bécclère, Paris)
John RENDU (CHU Grenoble)
Nathalie SETA (Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris)
Damien STERNBERG (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris)



- 14 portes d'entrée cliniques retenues
- Selon les thématiques:
 - Listes de gènes UNIQUES
 - Listes de gènes RESTREINTES et ETENDUES

Porte d'entrée clinique de suspicion diagnostique
LGMD / Myopathies des Ceintures
Myopathies congénitales à némaline
Myopathies congénitales « némaline-négatives »
Arthrogryposes fœtales
Arthrogryposes néonatales
Dystrophies musculaires congénitales hors alpha-dystroglycanopathies
Alpha-dystroglycanopathies
Myopathies distales et scapulopéronières
Myopathies rétractiles
Myopathies myofibrillaires et Myopathies à inclusions
Myasthénies congénitales
Paralysies périodiques
Myotonies non dystrophiques
Myopathies métaboliques

2015-2016: Détermination de listes de gènes nationales consensuelles pour le diagnostic génétique des myopathies par NGS



Exemple: Myopathies des Ceintures

- **Liste principale:** *CAPN3, DYSF, ANO5, SGCG, SGCA, FKR, CAV3*
- **Liste étendue:** *MYOT, LMNA, (CAV3), DNAJB6, DES, TNPO3, HNRNPDL, (CAPN3), (DYSF), (SGCG), (SGCA), SGCB, SGCD, TCAP, TRIM32, (FKR), TTN, POMT1, (ANO5), FKTN, POMT2, POMGnT1, PLEC, DES, TRAPPC11, GMPPB, ISPD, GAA, LIMS2, DAG1, LAMA2, FHL1, COL6A1, COL6A2, COL6A3*

2015-2016: Détermination de listes de gènes nationales consensuelles pour le diagnostic génétique des myopathies par NGS

Porte d'entrée clinique
Situation AVEC implication
de gènes « majeurs »

NGS « Liste de gènes principaux »
Listes minimum de gènes « majeurs »
à étudier en 1^{ère} intention
= Gènes les plus fréquemment impliqués

Résultat
négatif

NGS « Liste de gènes étendue »
Listes de gènes à étudier en 2^{ème} intention
(Gènes plus rarement impliqués, gènes plus difficiles
à analyser justifiant une analyse de 2^e intention, etc.
Dans la plupart des cas il s'agit de tous les gènes de
la *Gene Table of Neuromuscular Disorders* correspondants à la porte d'entrée)

Résultat
négatif

NGS panels très larges, WES, WGS
Interaction diagnostic/recherche

Porte d'entrée clinique
Situation SANS implication
de gènes « majeurs »

NGS « Liste de gènes unique »

Résultat
négatif

Porte d'entrée clinique de
suspicion diagnostique

LGMD / Myopathies des
Ceintures

Myopathies congénitales à
némaline

Myopathies congénitales
« némaline-négatives »

Arthrogryposes fœtales

Arthrogryposes néonatales

Dystrophies musculaires
congénitales hors alpha-
dystroglycanopathies

Alpha-dystroglycanopathies

Myopathies distales et
scapulopéronières

Myopathies rétractiles

Myopathies myofibrillaires et
Myopathies à inclusions

Myasthénies congénitales

Paralysies périodiques

Myotonies non dystrophiques

Myopathies métaboliques

➤ Visibilité nationale de l'offre diagnostique

Site *FILNEMUS* et *ORPHANET*

➤ Homogénéité des stratégies d'analyses interlaboratoires

➤ Répartition nationale d'expertise

Extension d'expertise / Interactions locales laboratoires-cliniciens

2015-2016: Détermination de listes de gènes nationales consensuelles pour le diagnostic génétique des myopathies par NGS

■ Groupe de cliniciens impliqués dans l'évaluation du document de travail :

Shahram ATTARIAN; Frédérique AUDIC; Christine BARNERIAS; Anthony BEHIN; Claude CANCES; Brigitte CHABROL; Jean-Marie CUISSET; Andoni ECHANIZ -LAGUNA; Bruno EYMARD; Pascal LAFORET; Armelle MAGOT ; Philippe PETIOT; Jean POUGET; Susana QUIJANO ROY; François RIVIER; Sabrina SACCONI ; Emmanuelle SALORT-CAMPANA ; Tanya STOJKOVIC ; Guilhem SOLE; Jon Andoni URTIZBEREA.

➤ Remarques principales:

- Intégration de gènes de « diagnostic différentiel » ?
- Intégration d'autres thématiques ?
FSHD, Pathologies avec amplifications/Steinert...
- Ajout de certains gènes « récents »

➤ Proposition pour répondre à ces points importants

- 
- Intégration de la problématique dans les arbres décisionnels
 - Prévu dans le cadre de l'actualisation des listes

Projets et Perspectives pour 2017

➤ **Actualisation des arbres décisionnels
avec intégration des listes de gènes consensuelles**

➤ **Ajout de listes supplémentaires pour d'autres « portes d'entrée »**

➤ **Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants**

Commission	Outils diagnostiques	
n° action –	Organisation des laboratoires de biologie moléculaire dans le cadre du NGS : vers une interprétation optimale et homogène sur le plan national des variants de séquence	
	L'argumentaire	Les objectifs

1. Adaptation des recommandations ACMG
2. Utilisation Human Gene Mutation Database
3. Echanges d'expertise pour l'interprétation de variants rares
4. Echanges de données interlaboratoires
5. Répertoire des laboratoires proposant des tests fonctionnels

Proposition de listes de gènes nationales consensuelles pour le diagnostic génétique par séquençage de nouvelle génération Thématique MYOPATHIES

FILNEMUS

Commission Outils diagnostiques
Sous-groupe Génétique Moléculaire

Groupe de travail :

Valérie BIANCALANA (CHU Strasbourg)
Céline BOUCHET SERAPHIN (Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris)
Cécile BOURDAIN-ACQUAVIVA (CHU Lyon)
Mireille COSSEE (CHU Montpellier)
Julien FAURE (CHU Grenoble)
Roseline FROISSART (CHU Lyon)
Martin KRAHN (CHU Timone, Marseille)
France LETURCQ (Hôpital Cochin, Paris)
Judith MELKI (Hôpital Kremlin-Bicêtre, Paris)
Corinne METAY (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris)
Laurence MICHEL-CALEMARD (CHU Lyon)
Juliette NECTOUX (Hôpital Cochin, Paris)
François PETIT (Hôpital Bécclère, Paris)
John RENDU (CHU Grenoble)
Nathalie SETA (Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris)
Damien STERNBERG (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris)



■ Groupe de cliniciens impliqués dans l'évaluation du document de travail :

Shahram ATTARIAN; Frédérique AUDIC; Christine BARNERIAS; Anthony BEHIN; Claude CANCES; Brigitte CHABROL; Jean-Marie CUISSET; Andoni ECHANIZ -LAGUNA; Bruno EYMARD; Pascal LAFORET; Armelle MAGOT ; Philippe PETIOT; Jean POUGET; Susana QUIJANO ROY; François RIVIER; Sabrina SACCONI ; Emmanuelle SALORT-CAMPANA ; Tanya STOJKOVIC ; Guilhem SOLE; Jon Andoni URTIZBEREA.



COMMISSION OUTILS DIAGNOSTIQUES

Travaux du sous-groupe Neuropathies Périphériques Héréditaires

3^{ème} Journée Annuelle de la Filière FINEMUS

Paris – 30 Novembre 2016

Présentation P. LATOUR

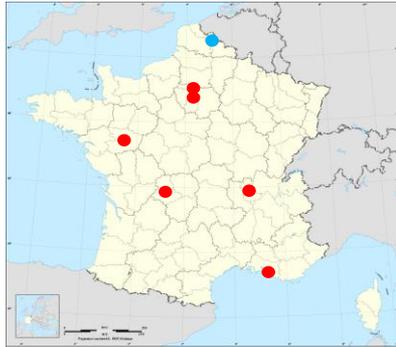
Sous-Groupe des laboratoires - Neuropathies Périphériques Héréditaires

- Périmètre 2015-2016:
 - **Atteintes distales et longueur dépendantes.**
(type maladie de Charcot-Marie-Tooth)
Fréquence estimée : 1/2500 (?)
- OBJECTIFS :
 1. **Elaborer des recommandations** pour les **panels de séquençage nouvelle génération (NGS)**
 2. **Proposer une offre uniforme sur le territoire**
(pas de perte de chance)
 3. **Evaluer** le coût / efficacité du NGS
 4. **Travailler au niveau national :**
 - Harmonisation de l'interprétation des variants.
 - Mise en commun des observations difficiles.
 - Réfléchir aux études fonctionnelles.

2015



■ Recensement des laboratoires



● Duplication PMP22 (~50% des CMT) : Lille

- Duplication PMP22 + NGS :
1. Angers
 2. Limoges
 3. Lyon
 4. Marseille
 5. Paris - Bicêtre
 6. Paris - Salpêtrière

■ 3 portes d'entrée = ENMG (Dyck et Lambert)

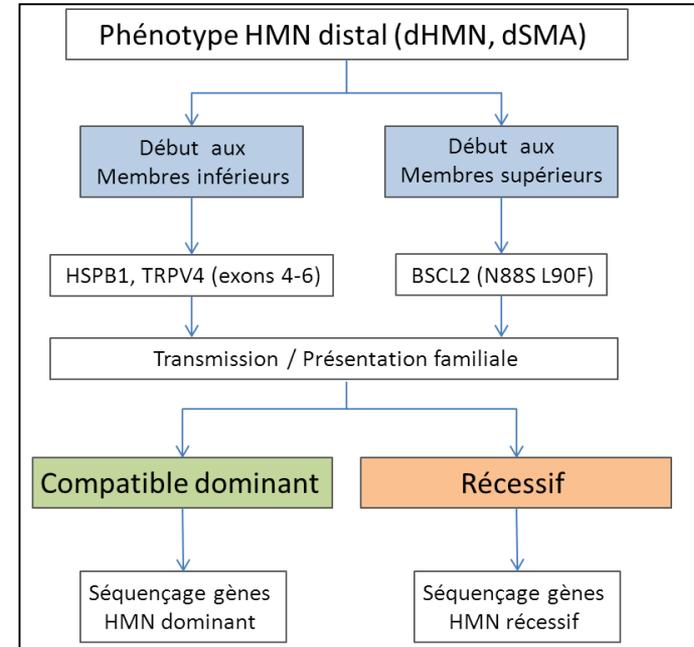
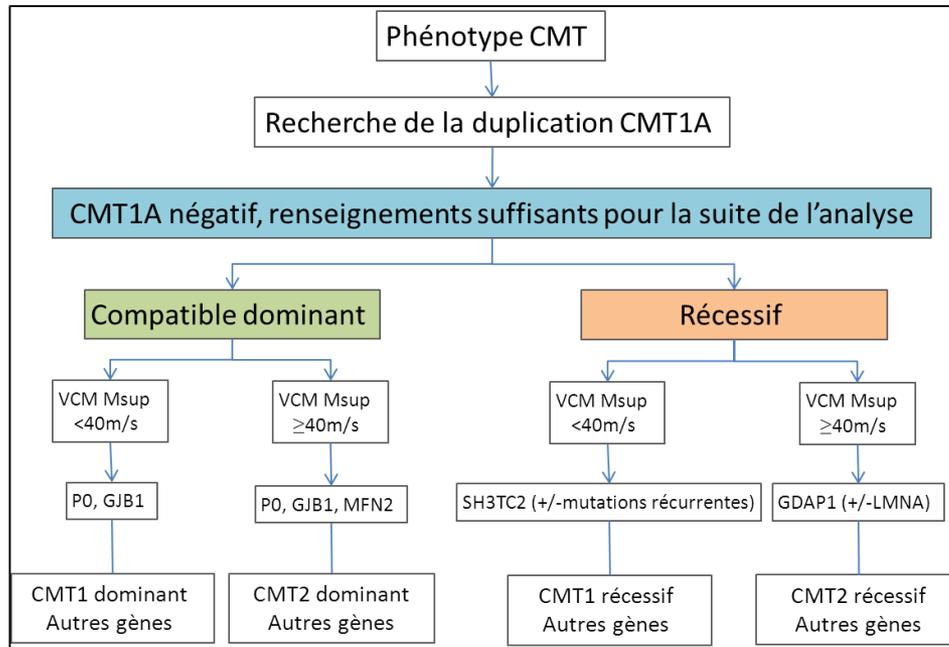
- Formes sensibles et motrices : Charcot-Marie-Tooth (CMT)
- Formes motrices pures : dHMN / dSMA / CMT 'spinal'.
- Formes sensibles pures : HSN.

■ 3 listes de gènes sur mots clés OMIM : 78 gènes.

- Certains gènes peuvent être sur plusieurs listes.
- Certains gènes avec mutations dominantes ou récessives.
- 🖱️ **1 seul panel**

2015

■ Deux schémas de réalisation des analyses :

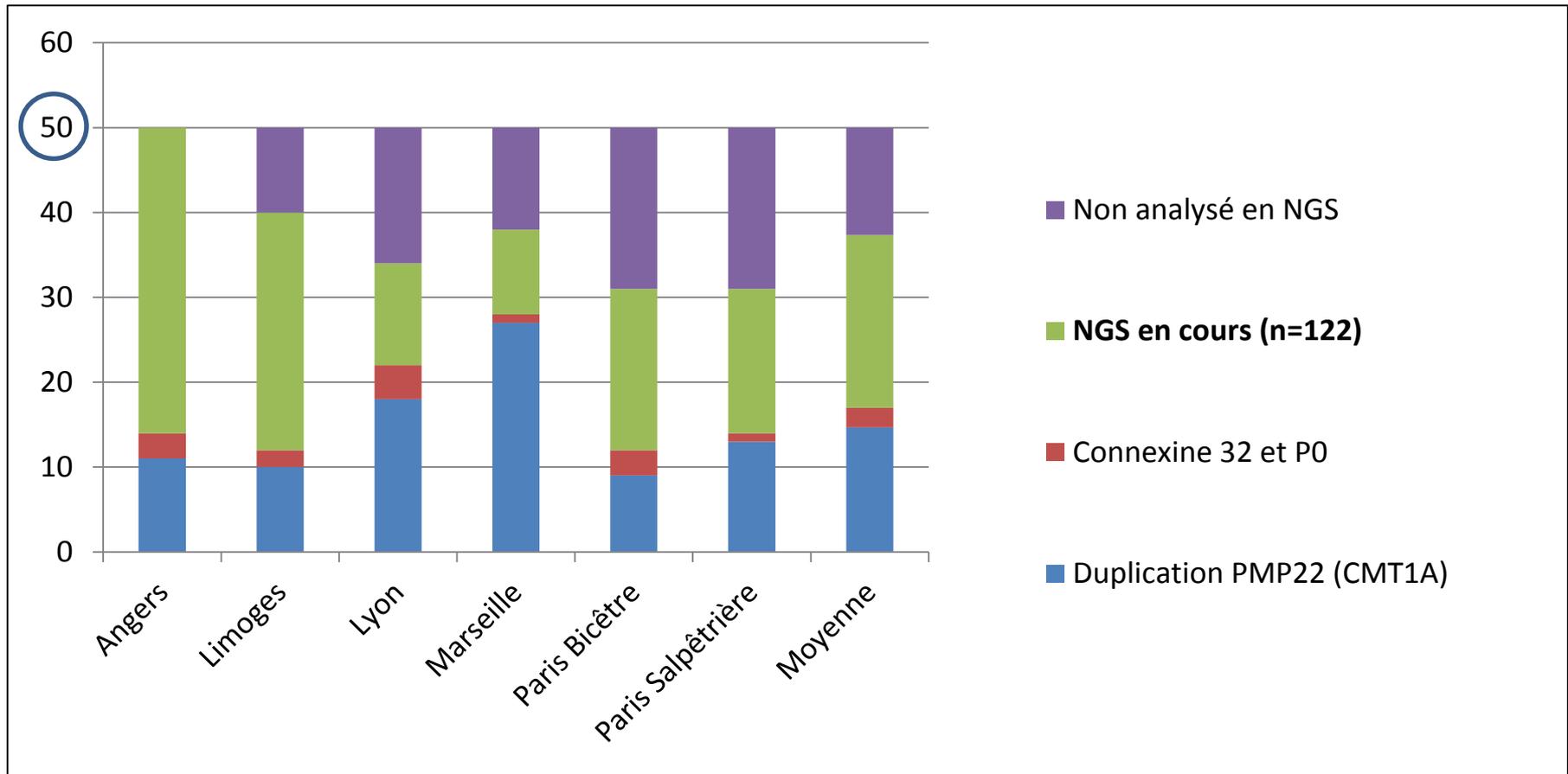


- Cas sporadiques laissés en suspens
- Les schémas de réalisation laissent la possibilité de se limiter aux mutations les plus fréquentes

2016 : Evaluation (formes sensitivo-motrices)

- **Constitution d'une cohorte de 300 cas index de CMT**
 - Tous les laboratoires participent ($n=6$).
 - Chaque laboratoire constitue une série de **50** cas index de CMT (HMSN)
 - Série **exhaustive** : c'est-à-dire tous les cas consécutifs adressés pour diagnostic de CMT '**comme ils viennent**'.
 - Toutes formes de CMT : myéliniques, axonaux, non typés.
 - Tous modes de présentation : cas familiaux et sporadiques.
 - Non retenus : formes motrices ou sensibles pures (ENMG)
- **Objectifs**
 - Evaluer l'efficacité du panel dans les conditions réelles de la prescription
 - Affiner les recommandations de 2015, en particulier pour les cas sporadiques

Evaluation de la cohorte CMT (juin 2016)



- 56% de cas sporadiques
- L'analyse finale sera affinée selon le mode de transmission et l'âge au prélèvement

Echéancier pour 2017

- Fin mars : bilan de l'étude de la cohorte CMT. (retours pour 4 labos sur 6 actuellement)
- Fin juin: soumission d'un article en français (Revue Neurologique).
- Juin : 3^{ème} assemblée plénière annuelle (Paris) :
 - Besoin de 2 ou 3 cliniciens référents pour nous aider dans les phénotypes des neuropathies motrices pures et sensibles pures.
 - ? Coordination avec le sous-groupe amyotrophies spinales infantiles SMN (?).
- ? Deuxième semestre : participation à la **rédaction des PNDS CMT**

Remerciements



Angers : Marie-Claire MALINGE

Lille : Nathalie ROUAIX, Isabelle VUILLAUME

Limoges : Corinne MAGDELAINE, Anne-Sophie LIA, Franck STURTZ

Marseille : Nathalie BONELLO-PALOT

Paris : Anne MANTEL, Jérôme BOULIGAND, Bruno FRANCOU

Paris : Eric LeGUERN



Guenaëlle PIGUET-LACROIX, Manon SILVESTRE

Thomas SIMONET