

Objectifs 2015

Réaliser une cartographie détaillée des compétences et outils à disposition actuellement

Identifier les insuffisances de valorisation des actes diagnostiques actuels ou à venir

Identifier les risques démographiques et les besoins en ressources humaines pour les prochaines années

Commission Outils Diagnostiques

Animateurs:

Pascale Marcorelles, Mireille Cossée, Yann Péréon

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

Commission Outils Diagnostiques : Génétique moléculaire

Animateur: Mireille Cossée



Objectifs 2014-2015



- Mettre à jour l'état des lieux géographique**

Avec gènes étudiés dans chaque laboratoire (ciblé/NGS, liste de gènes)

- Recenser les gènes sans laboratoire expert en France**

Etat des lieux géographique 2015

☐ Myopathies

14 laboratoires recensés

- 9 font NGS
- 5 analyse ciblée (DM,DMD, pas NGS)

☐ CMT

7 laboratoires recensés

- tous font NGS

☐ Mitochondriopathies

11 laboratoires recensés

- tous font NGS avec
 - 11: ADN mitochondrial
 - 7: Gènes nucléaires ciblés

☐ SMA

12 laboratoires recensés

☐ Neuropathies amyloïdes familiales

2 laboratoires

Etat des lieux du sous-groupe Myopathies

❑ 14 laboratoires effectuant le diagnostic génétique de myopathies

dont 9 avec activité en NGS prévue ou déjà utilisée en diagnostic

❑ Hétérogénéité des listes de gènes NGS

- ✓ **Approche moyennement ciblée** (design ou filtres) sur liste de gènes en fonction de l'orientation clinique et paraclinique
Ex. Syndromes myasthéniques, myopathies rétractiles
- ✓ **Approches non (ou très peu) ciblée** : liste de gènes large

Esquisse d'un arbre décisionnel commun pour les tests génétiques en myologie

Cliniciens
Anatomopathologistes
Radiologues ...

L'orientation clinique et paraclinique

Analyse ciblée vers un gène
ou un très petit nombre de
gènes

Approche moyennement ciblée, à
indications resserrées définies
par clin et examens paracliniques

Très grand nombre de
gènes possibles

Diagnostics évoqués :

- DMD
- FSHD ...



Liste des analyses très
ciblées

- DMD
-

Diagnostics évoqués :

- Syndromes myasthéniques
- Myopathies rétractiles.....



Listes de gènes de ciblage
intermédiaire



**Diagnostics
difficiles ou peu précis**



Listes de gènes de
ciblage large

**Participation des autres acteurs de la commission « outils diagnostiques »
et des cliniciens: 2016**

Sous-groupe CMT

Mise à jour de l'ancien document ANPGM (2011) dans le cadre du NGS : schémas de réalisation du diagnostic, aide à la prescription (contexte clinique, listes de gènes, bilan de la stratégie Sanger sur 30 gènes, orientation avec les résultats ENMG).

Document à valider et à diffuser par la filière

Réseau des Laboratoires de Diagnostic Moléculaire des
Maladies Génétiques Neurologiques, Musculaires, Neurosensorielles et Retards Mentaux
Arbres décisionnels – Réalisation du diagnostic moléculaire

**Neuropathies Héritaires Sensitives et Motrices
(Maladie de Charcot-Marie-Tooth - CMT)**
et
Neuropathies héréditaires périphériques apparentées

SOMMAIRE

I. Liste des laboratoires de diagnostic moléculaire.....	2
II. Rappels sur la pathologie.....	2
III Prescription des analyses génétiques en fonction du contexte clinique.....	3
A. Proposant.....	3
B. Fiche de renseignements pour les CMT.....	4
C. Fiche de renseignements pour les CMT Spinaux - dHMN.....	5
D. Apparenté non atteint.....	6
E. Diagnostic prénatal.....	6
F. Enquête familiale.....	6
IV. Liste des gènes impliqués.....	7
V. Réalisation des analyses génétiques chez un proposant.....	11
A. Principes.....	11
B. Réalisation des analyses pour les CMT.....	12
C. Réalisation des analyses pour les CMT Spinaux.....	12

Sous-groupe SMA

- ❑ **Rédaction d'une deuxième version d'arbre décisionnel pour le diagnostic des amyotrophies spinales infantiles (mai 2015)**
 - ✓ Rédaction des indications par deux cliniciens référents (un neuropédiatrie et un neurologue)
 - ✓ Actualisation des stratégies de diagnostic moléculaire

Va être soumis à validation par les cliniciens de la filière (Centres de Référence)

Sous-groupe Mitochondriopathies

- Prendre en compte la composante biochimique indispensable au diagnostic et à la prise en charge de ces pathologies**

- Révision des arbres décisionnels : complexe**

- ✓ Hétérogénéité clinique et génétique +++, un même gène peut entraîner différentes présentations cliniques

- ✓ En 1^{ère} intention: liste consensus minimale de 10 gènes nucléaires + ADN mitochondrial

Etat des lieux des labos experts (référents)

❑ **Discordance entre la totalité de gènes prévus en NGS et l'état des lieux des laboratoires experts:**

« Trop de gènes...pas assez d'experts... »

❑ **Actions prévues:**

- **Répertoire de laboratoires experts internationaux**
(données de ORPHANET www.orpha.net et GENETESTS www.genetests.org)
- **Développer de nouvelles expertises sur le plan national**
- **Développer l'homogénéisation de l'interprétation de variants pour des gènes pour lesquels le laboratoire n'est pas expert**
 - Gènes sans labos experts
 - Eviter de « surcharger » les labos experts existants

Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence

Stratégie d'interprétation complexe

Outils de prédiction de pathogénicité variés

Bases de données incomplètes

Interprétations publiées erronées....



Risque d'interprétations discordantes entre différents laboratoires

Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence

Travail d'adaptation des recommandations ACMG (Richards et al. 2015)

5 catégories de variants

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

Genetics
inMedicine

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD³, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹³ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

Table 5 Rules for combining criteria to classify sequence variants

Pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PVS1) AND <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR (b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR (d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR (ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Stand-alone (BA1) OR (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	<ul style="list-style-type: none"> (i) Other criteria shown above are not met OR (ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

VUS →

Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence

□ Détermination des outils d'interprétation bioinformatique de pathogénicité à utiliser

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

RICHARDS *et al* | Interpretation of sequence variants

Table 2 In silico predictive algorithms

Category	Name	Website	Basis
Missense prediction	ConSurf	http://consurftest.tau.ac.il	Evolutionary conservation
	FATHMM	http://fathmm.biocompute.org.uk	Evolutionary conservation
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org	Evolutionary conservation
	PANTHER	http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp	Evolutionary conservation
	PhD-SNP	http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	Evolutionary conservation
	SIFT	http://sift.jcvi.org	Evolutionary conservation
	SNPs&GO	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go	Protein structure/function
	Align GVGD	http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MAPP	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index.html	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MutPred	http://mutpred.mutdb.org	Protein structure/function and evolutionary conservation
	PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2	Protein structure/function and evolutionary conservation
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php	Alignment and measurement of similarity between variant sequence and protein sequence homolog
	nsSNPAnalyzer	http://snpanalyzer.uthsc.edu	Multiple sequence alignment and protein structure analysis
Condel	http://bg.upf.edu/fannsdb/	Combines SIFT, PolyPhen-2, and MutationAssessor	
CADD	http://cadd.gs.washington.edu	Contrasts annotations of fixed/nearly fixed derived alleles in humans with simulated variants	
Splice site prediction	GeneSplicer	http://www.cccb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml	Markov models
	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/	Position-dependent logic
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html	Maximum entropy principle
	NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2	Neural networks
	NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Neural networks
FSPLICE	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fsplce&group=programs&subgroup=find	Species-specific predictor for splice sites based on weight matrices modeling	
Nucleotide conservation prediction	GERP	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html	Genomic evolutionary rate profiling
	PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	Conservation scoring and identification of conserved elements
	PhyloP	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	Conservation scoring and identification of conserved elements
		http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/help-pages/phyloP.txt	Alignment and phylogenetic trees: Computation of <i>P</i> values for conservation or acceleration, either lineage-specific or across all branches

In silico tools/software prediction programs used for sequence variant interpretation.

Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence

□ Détermination des bases de données de variants à utiliser

□ Accès à Human Gene Mutation Database (HGMD-Pro/Biobase)

Table 1 Population, disease-specific, and sequence databases

Population databases	
Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/	Database of variants found during exome sequencing of 61,486 unrelated individuals sequenced as part of various disease-specific and population genetic studies. Pediatric disease subjects as well as related individuals were excluded.
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS	Database of variants found during exome sequencing of several large cohorts of individuals of European and African American ancestry. Includes coverage data to inform the absence of variation.
1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org	Database of variants found during low-coverage and high-coverage genomic and targeted sequencing from 26 populations. Provides more diversity compared to the Exome Variant Server but also contains lower-quality data, and some cohorts contain related individuals.
dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	Database of short genetic variations (typically ≤ 50 bp) submitted from many sources. May lack details of the originating study and may contain pathogenic variants.
dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	Database of structural variation (typically > 50 bp) submitted from many sources.
Disease databases	
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	Database of assertions about the clinical significance and phenotype relationship of human variations.
OMIM http://www.omim.org	Database of human genes and genetic conditions that also contains a representative sampling of disease-associated genetic variants.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.org	Database of variant annotations published in the literature. Requires fee-based subscription to access much of the content.
Locus/disease/ethnic/other-specific databases	
Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html	The Human Genome Variation Society site developed a list of thousands of databases that provide variant annotations on specific subsets of human variation. A large percentage of databases are built in the Leiden Open Variation Database system.
Leiden Open Variation Database http://www.lovd.nl	
DECIPHER http://decipher.sanger.ac.uk	A molecular cytogenetic database for clinicians and researchers linking genomic microarray data with phenotype using the Ensembl genome browser.
Sequence databases	
NCBI Genome http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	Source of full human genome reference sequences.
RefSeqGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg	Medically relevant gene reference sequence resource.
Locus Reference Genomic (LRG) http://www.lrg-sequence.org	
MitoMap http://www.mitomap.org/MITOMAP/ HumanMitoSeq	Revised Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.

Projet d'homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence

Procédure homogénéisée d'interprétation

- ❑ **Tableau excel commun avec tous les critères d'interprétation:**
en cours d'élaboration

- ❑ **Variants rares difficiles à interpréter : groupes de discussion (*mailing lists*)**

- ❑ **Variants pour lesquels les laboratoires experts n'ont pu aboutir à une réponse consensuelle : réunions de confrontation clinico-biologiques :**
 - Acteurs du diagnostic + équipes de recherche
 - Réunions physiques ou visioconférences (GEM NGS ?)

- ❑ **Contrôles qualité:**
 - ✓ Echanges de fichiers de variants pour interprétation en aveugle
 - ✓ Echanges d'ADN : en cours dans groupes mitochondriopathies

Objectifs 2015-2016

- Mettre à jour les arbres décisionnels (SMA, CMT: OK)**

- Mettre en place une nouvelle organisation nationale du diagnostic génétique avec le séquençage haut débit (NGS)**
 - Redéfinir les missions des labos experts, en lien avec ANPGM et autres filières
 - Etablir des listes de gènes à analyser en 1^{ère} intention en fonction des orientations phénotypiques, en lien avec les autres acteurs du diagnostic

=> visibilité / site Web

- Mettre en place la stratégie d'homogénéisation nationale de l'interprétation des variants**

- Bases de données de variants partagées ?**

Organisation

☐ Réunions de travail régulières

Coordonnateurs (MERCI !!!!)

Laboratoires des sous-groupes

☐ Interactions avec l'ANPGM (Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire)

- Groupes de travail NGS (aspects technologiques, bioinformatiques, compte-rendus, bases de données, aspects éthiques ...)

- Groupe de travail Cotation-RIHN (référentiel hors nomenclature)

☐ Interactions à venir

- Commissions de diagnostic génétique d'autres filières (cardio, déficience intellectuelle...)

- Autres acteurs de la commission « outils diagnostique »

- Cliniciens: mailing listes des Centres de Référence