



Biologie et Génétique Moléculaire en Myologie

Diplôme Inter Universitaire de Myologie

Pascale Richard

Damien Sternberg

UF Cardiogénétique et Myogénétique Moléculaire

Avertissement

- Cette présentation sera centrée sur les maladies musculaires d'origine génétique
- Il convient de ne pas oublier les pathologies musculaires non génétiques, qui sont parfois des diagnostics différentiels
 - Pathologies inflammatoires et autoimmunes
 - Pathologies hormonales
 - Pathologies toxiques (médicamenteuses)
 - 0

La génétique, un travail d'équipe

Le Clinicien (Généraliste)/ Spécialiste

- Evoquer une origine génétique
- Prescrire les tests moléculaires

Le Généticien Clinique

- o Et ablir la généalogie
- Expliquer la maladie
- o Prescrire les tests moléculaires
- Rendre le résult at au patient
- o Faire le conseil génétique

Le « Para-clinicien »

- Morphologiste
- Neurophysiologiste
- Radiologue
- Autres spécialités biologiques
- Orient ent la recherche génétique

Le (Cyto) Génétique Biologiste Moléculaire

- Vérifie la conformité de la prescription (plans légal et médical)
- Vérifie l'orient at ion de la recherche génétique
- Prends en charge la réalisation des tests
- Interprète les analyses
- Rend un résult au prescripteur

Le Chercheur

Trouver le(s) mécanisme(s) qui vont de la (des) mutation(s) à la maladie (physiopathologie moléculaire), en exprimant la mutation dans un modèle

Trouver de nouveaux gènes parmi les cas restés négatifs en diagnostic

Pascale Richard - Damien Sternberg DU Myologie 2015

Objectifs <u>Médicaux</u> de la Génétique Moléculaire

Identification au niveau de l'ADN d'une ou plusieurs Anomalie(s) responsable(s) d'une maladie génétique

- Aide au diagnostic différentiel entre plusieurs phénotypes
- Confirmer un diagnostic clinique
- Envisager le pronostic d'une maladie
 - L'identification des anomalies permet d'effectuer des corrélations entre les génotypes et les phénotypes
- Améliorer le suivi thérapeutique
- Faire des analyse post mortem (autopsie médicale)
- Permettre le conseil génétique
 - Risque de transmission ou de récurrence (récessif / dominant / lié à l'X / de novo)
 - Diagnostic pré-symptomatique
 - o Prénatal
- Pascale Richard Pramien Sternberg DU Myologie 2015

Enjeux et difficultés particulières des investigations génétiques

> Législation

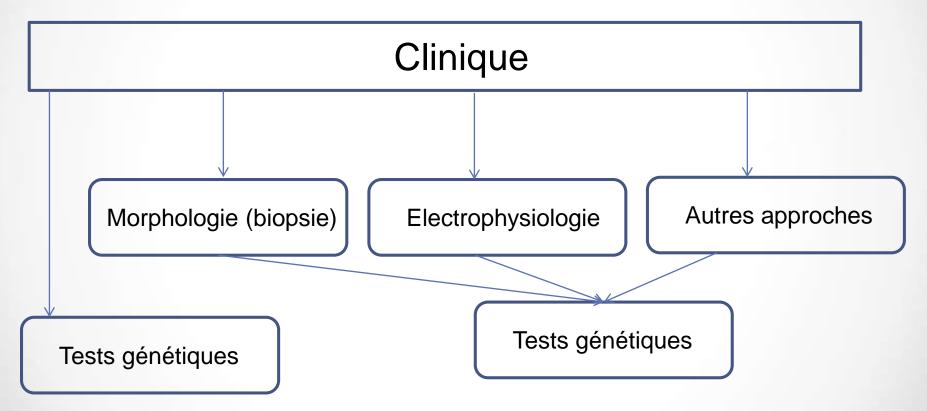
Pratique encadrée par une législation rigoureuse différente de celle des autres analyses biologiques

- □ **Consentement éclairé** signé du patient établi par le clinicien
- ☐ Accréditation du laboratoire (organisation, matériel)
- ☐ Autorisation des praticiens, techniciens spécialisés

Difficultés possible de la génétique moléculaire : en avertir le patient

- Délais d'obtention des résultats
- Résultats négatifs
- Difficultés d'interprétation
- Incidental findings (dans les approches pangénomiques : CGH array, exome)

Parcours diagnostique variable qui va de la clinique à la prescription d'un test génétique



Utilité des filières maladies rares (FILNEMUS) et des centres de référence ou de compétences pluridisciplinaires pour organiser un parcours cohérent (ex : hôpital de jour)

de jour)
Pascale Richard - Damien Sternberg
DU Myologie 2015

Quel(s) test(s) génétique(s) choisir en 2015

- Un ou deux gènes très bons candidats, voire une ou quelques mutations particulières dans un gène donné (Sanger)
- Panel ciblé (capture et NGS)
- Panel large (capture et NGS)
- Exome (utilité d'analyse en trio cas index + parents)
- CGH-array
- Génome Pascale Richard - Damien Sternberg DU Myologie 2015

Etape initiale de la démarche du diagnostic moléculaire

Essayer de cibler le(s) gène(s) à tester Faire une hypothèse (plus ou moins ciblée) et la tester

ENQUETE GENETIQUE Concerne la maladie et la famille

- Phénotype
- Mode de transmission
- Consanguinit é
- Origine et hnique
- Signes cliniques et paracliniques
- □ Age de début

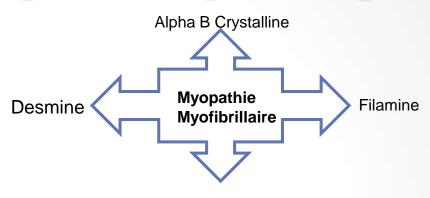
- ANALYSE DU GENE
- Concerne la stratégie d'analyse

Savoir ce que l'on veut obtenir en fonction de différents facteurs

- ADN ou ARNm (prélèvement)
- Nombre échantillons à tester
- Taille des gènes
- Présence de polymorphismes
- Rechercher des mutations inconnues
- Rechercher des mutations connues
 - Nature des anomalies à rechercher
 - Mutations ponctuelles
 - Ins/ del
 - Microdélétions chromosomiques

Notion d'hétérogénéité génétique

Une maladie donnée bien que MONOGENIQUE peut être déterminée par des mutations dans différents gènes



Notion d'hétérogénéité phénotypique

avec ou sans corrélations entre mutations et phénotypes

1 gène >> plusieurs maladies

Maladies systémiques Progeria, syndromes de vieillissement prématuré

Muscles striès cardiaques et squelettiques EDMD LGMD1B L-CMD DCM Lamines A/C

Adipose tissue

Nerf périphérique CMT

Adipòse tissue Lipodystrophies

Pascale Richard - Damien Sternberg
DU Myologie 2015

Les maladies neuromusculaires

- Un ensemble de pathologies variées touchant le nerf, le muscle ou la jonction neuromusculaire
- Une origine variable
 - Génétique,
 - inflammatoire (polymyosite, dermatomyosite) ou dysimmunitaire (polyradiculonévrites, myasthénie auto-immune)
 - dégénérative (SLA, peut-être myosite à inclusions)
 - infectieuse, toxique, tumorale,...
- Des maladies génétiques variées (près de 200)
 - Des maladies du muscle :
 - Dystrophies (Duchenne, Becker, Steinert, FSH...)
 - □ Dystrophies musculaires congénitales (DMC)
 - □ Myopathies congénitales
 - □ Myopathies myofibrillaires
 - □ Myopathies métaboliques
 - □ Canalopathies musculaires,...
 - du nerf : Charcot-Marie-Tooth, amyotrophie spinale...
 - de la jonction neuromusculaire : syndromes myasthéniques congénitaux.

Du symptôme à la demande d'examen génétique

Plusieurs étapes sont souvent nécessaires :

- 1. L'étape clinique : parfois phénotype évocateur d'emblée, le plus souvent porte d'entrée vers plusieurs diagnostics
- 2. L'électromyogramme (EMG)
- 3. Les examens biologiques
- 4. L'imagerie musculaire
- 5. Le bilan cardiorespiratoire
- 6. La biopsie musculaire
- 7. L'analyse Génétique

Mettre en évidence une anomalie moléculaire dans un gène pouvant expliquer le développement de la maladie.

Différentes approches

Séquençage complet du/des gène(s)

- 1. Exon par exon
- 2. A partir du cDNA

Recherche de mutation ciblée

 Mutations récurrentes (SMA, or repeat expansions; Myotonic dystrophy, OPMD ...)

Pour des maladies spécifiques

Séquençage complet de plusieurs gènes voire de l'exome: NGS

Identifier la mutation(s)

Analyses spécialisées

- 1. Délétions/duplications d'exons
 - 1. Quantification d'allèle
 - 2. CNVs

Analyse de liaison: Puces SNPs

Dépends de la structure de la famille et du diagnostic de apparentés

Danger des mutations de novo

Pascale Richard - Damien Sternberg
 DU Myologie 2015

En pratique

- Elaboration d'arbres décisionnels
 - Stratifier les analyses: choix des gènes
- Diagnostic de première approche
 - o P. ex. recherche (Sanger, NGS) de substitutions et petites ins/del
- Diagnostic de seconde approche
 - o P. ex. analyse des ARNm
 - P. ex. echerche de grands remaniements chromosomiques

Approches en séquentiel ou en parallèle (selon patient et suivi diagnostique)

Avec le Séquençage à haut débit

Phénotype évocateur

Phénotype non spécifique

Sans hétérogénéité génétique

Avec hétérogénéité génétique

- Recherche de mutation (DMOP, FSH..)
- Analyse d'un ou deux gènes

- Séquençage moyen débit des gènes fréquents
- Séquençage Haut débit de gènes ciblés
- Exome

Pascale Richard - Damien Sternberg
 DU Myologie 2015

Atteintes Musculaires Congénitales : Choix des gènes pour un panel

Myopathies

Dystrophies musculaires | Syndrômes myotoniques

Syndrômes myasthéniques

Anomalies de l'embryogenèse de la fibre musculaire

Dégénérescences de la fibre musculaire

Anomalies de la décontraction musculaire Anomalies de la ionction neuro-musculaire

Dominant

LGMD1A: Mvotilin LGMD1C: Caveolin-3, Bethlem: COL6A1, A2, A3 Central Core: RYR1

Myopathies Distales: MYH7 Emery-Dreifuss; LMNA

FSH: 4q35 PRKAG2

Myop. Myofibrillaires

DES β-crystallin FilaminC ZASP

Myop. Centro Nucléaires:

DNM2 DMOP: PABP2 IBMPDF: VCP

Lié à X

Barth: G4.5 (Tafazzin); Dystrophin

Emery Dreifuss: Emerin; Myop.Centro Nucléaires: Myotubularin: MTN

Maladie de Danon: LAMP-2

DU Myologie 2015

FHL1

Récessif

LGMD2A: Calpain-3 LGMD2B: Dysferlin; 2C: y-Sarcoglycan;

2D: a-Sarcoalycan: 2E: β-Sarcoglycan;

2F: δ-Sarcoglycan;

2G: Telethonin; 2H: TRIM32;

2I: FKRP: 2J: Titin; 2g24

Myop.CentroNucléaires -Amphiphysin (BIN1)

Alpha DG 2K: POMT1: 2M: Fukutin:

2N: POMT2

MYH2

Merosin (LAMA2) Caveolin 3

PTRF (Cavin)

DPM3 BIN1

Extracellular matrix protein defects

MDC1A: LAMA2 deficient UCMD: Col6A1, Col6A2,

Col6A3

ITGA7: Integrin-α7

Glycosyltransferases

FKRP (Fukutin-related protein)

Fukutin

POMT1 POMT2

POMGnT1

LARGE

Reticulum endoplasmique

RSMD1: SEPN1

Avec Atteinte Cardiaque

- LMNA
- FKRP
- DES
- •TTN

Myotonies dystrophiques

- Steinert: DM1- DMPK
- PROMM: DM2 7NF9

Myotonies nondystrophiques (myotonies congénitales), paralysies périodiques et hyperthermie maligne

- * Myotonie congénitale dominante (Thomsen),
- Mvotonie généralisée récessive (Becker).

•Gène SCN4A

- Paralysie périodique hyperkaliémique (hyperPP),
- Paralysie périodique normokaliémique (NormoPP),
- Paramyotonie congénitale (PC) ou maladie
- d' Eulenburg Mvotonie

- * Choline acetyltransferase; CHAT
- * Acetylcholinesterase deficiency: COLQ
- * Acetylcholine receptor, subunits;

CHRNA1, CHRNB1,

CHRND,

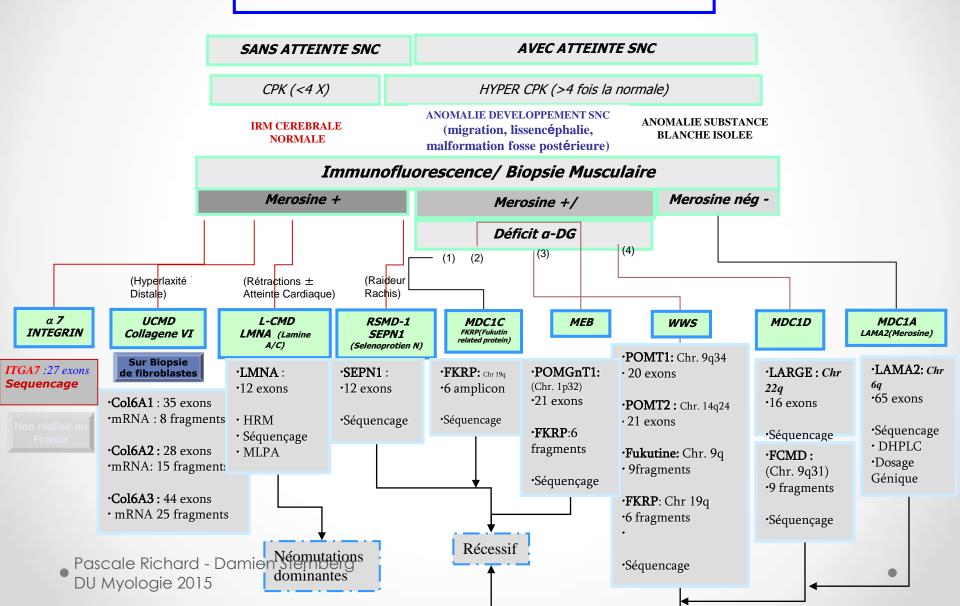
CHRNE

- * Rapsyn; RAPSN
- * Downstream of kinase-7; DOK7
- * Muscle-specific tyrosine kinase; MUSK
- * Agrin
- * SCN4A

Pascale Richard - Damien Sternberg

Arbre Décisionnel de l'époque Sanger

DYSTROPHIES MUSCULAIRES CONGENITALES



Rendements diagnostiques à attendre des investigations génétiques en 2015

- Rendements du Sanger très dépendants de pathologie /phénotype/précision de l'orientation (morphologie, EMG, imagerie) (de 90% à ... 5 %)
- Le rendements du NGS (panels) est également dépendant de la précision du phénotype
 - o Probabilité de présence de la (les) mutation(s) causale(s)
 - Possibilité d'interprétation et de rendu (corrélations)
- Le rendement du NGS (exome) sera dépendant de
 - Passage en trio ou en solo, possibilités d'analyse de ségrégation dans les familles multiplex
 - o Limitation par le nombre de variants et les difficultés d'interprétation
- Exemple d'une pathologie non spécifique mais précoce : l'arthrogrypose multiple congénitale (étude PHRC J Melki) – combinaison de panel (n=98) et d'exomes (n=86) : rendement = 50 %

Rendement diagnostic d'un panel syndromes myasthéniques congénitaux

	Càmas másatifs an								
D-4	Gènes négatifs en Patient Sanger		G>(-)	D4la-a	Ougstions à éalainain nann arras ann				
	Sanger 8	Panel	Gène(s)	Résultat	Questions à éclaircir pour avancer				
1		Exome	AGRN	Positif					
2	8	V1	DPAGT1	Positif					
3	5	V1	GFPT1	Positif					
4	4	V1	GFPT1	Positif					
5	5	V2	GFPT1	Positif					
6	10	V2	CHRNE?	Possible	De novo ?				
7	1	V2	ECEL1?	Possible	Effet fonctionnel du faux-sens?				
8	5	V2	MUSK?	Possible	Effet fonctionnel du faux-sens ? Effet sur l'épissage ?				
9	8	V2	PREPL?	Possible	Effet fonctionnel des faux-sens?				
10	3	V2	RYR1?	Possible	De novo ?				
11	7	V1	SCN4A?	Possible	De novo? Effet fonctionnel du faux-sens?				
12	5	V1	SCN4A?	Possible	De novo? Effet fonctionnel du faux-sens?				
13	6	V1	AGRN ??	Douteux	Effet fonctionnel du faux-sens ?				
14	9	V1	CACNA1S ?? LRP4 ??	Douteux	Effet fonctionnel des faux-sens?				
15	3	V2	ECEL1 ?? PREPL ??	Douteux	Effet fonctionnel des faux-sens ?				
16	5	V1	HSPG2 ??	Douteux	Effet fonctionnel des faux-sens?				
17	9	V1	MUSK ?? CLCN1 ??	Douteux	Effet fonctionnel des faux-sens ?				
18	8	V1	NEB ?? PLEC ??	Douteux	Effet fonctionnel des faux-sens?				
19	4	V1	PLEC ??	Douteux	Effet fonctionnel des faux-sens?				
20	3	V2	PREPL ?? LRP4 ??	Douteux	Effet fonctionnel du faux-sens?				
21	9	V1		Négatif					
22	8	V1		Négatif					
23	9	V1		Négatif					
24	4	V1		Négatif					
25	3	V1		Négatif					
26	2	V2		Négatif					

Pascale Richard - Damien Sternberg DU Myologie 2015

Rendement diagnostic d'un panel syndromes myasthéniques congénitaux

- 25 % de diagnostics positifs pouvant être rendus sans problème
- 25 % de diagnostics probables, mais nécessitant une validation par études complémentaire
 - Études familiales
 - Etudes fonctionnelles
- 25 % avec des variants douteux mais ne pouvant pas complètement être écartés
 - 0
- 25 % de diagnostics complètement négatifs

Nécessité d'une évaluation aussi rigoureuse et minutieuse que possible des variants douteux

Risques de rendements moins bons et de difficultés d'interprétation plus grandes dans certains cas

La probabilité de résultats négatifs ou ininterprétables, dans l'expérience des généticiens moléculaires, est corrélée à :

- Phénotypes peu précis, difficiles à classifier
- Cas sporadiques
 - Mais peuvent être récessifs ou dominants de novo
 - o Exemple: paralysie périodique hypokaliémique
- Phénotypes tardifs

Organiser un diagnostic génétique

- Organiser le transfert et l'adressage correct du prélèvement et du consentement
- Organiser le contact avec le laboratoire (prévenir en cas d'envoi) et la transmission des informations cliniques
- Organiser le suivi de la demande (relance du laboratoire, point à faire en cas de résultats négatifs dans une première intention, transfert de prélèvements à organiser le cas échéant)

Certaines demandes n'aboutissent pas faute de suivi Difficultés possibles liées aux limites d'organisation des services prescripteurs ou des laboratoires (secrétariat, suivi)

Anticiper les difficultés possibles (résultats négatifs dans la première approche, difficultés d'interprétation)

- Mise en banque de l'ADN, avec consentement adapté (y compris à la recherche)
- Obtenir la participation et les prélèvements des parents et des apparentés

Organiser la prise en charge d'un résultat positif

- Compléments d'investigations familiales pour permettre l'interprétation complète
 - o Étude des parents, si cela n'a pas encore été fait
 - o Etude de ségrégation mutation/maladie, pour argumenter le rôle causal
- · Seconde détermination, pour écarter toute erreur
- Conseil génétique à organiser (généticien clinicien)
 - Pour le cas index (risque pour descendance)
 - o Pour ses parents (contexte pédiatrique) :
 - Risque de récurrence
 - Indication et possibilité d'un diagnostic prénatal, voire préimplantatoire
 - Indication et possibilité d'un diagnostics présymptomatiques chez apparentés
- Pascale Richard Damien Sternberg
 DU Myologie 2015

Organiser la prise en charge d'un résultat négatif

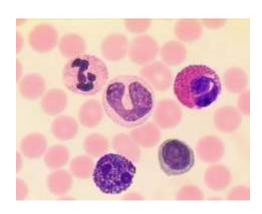
- Autres investigations génétiques plus poussées
 - o Dans un laboratoire de diagnostic
 - Ou transfert à un laboratoire de recherche
- Autres examens paracliniques
- Révision diagnostique à envisager
- Discussion et suivi nécessaires ++++
 - Possibilité de nouveau gène (collecter les prélèvements de la famille si elle veut bien participer)
 - Chercher comment avancer: travail collaboratif

L'analyse de l'ADN

Extraction

TISSUS

- Sang (leucocytes)
- Biopsie
 - •Peau
 - Muscle
 - Tissus
- •(Cheveux)
- •(Culot urinaire)
- •(Ecouvillon Buccal)
- Liquide Amniotique
- Villosités choriales



conviennent pour recherche directe d'une seule mutation



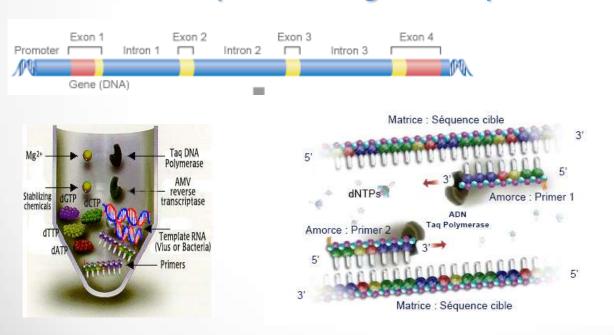
Pour les techniques de séquençage nouvelle génération (NGS), la quantité et la qualité d'ADN sont très importantes. Il existe des échecs du NGS liés à un ADN défectueux.

Approche classique PCR-séquençage Sanger Amplification de l'ADN

Cibler le gène et les séquences d'intêret puis les amplifier en tube

La PCR: polymerase chain reaction

Amplification in vitro des séquences d'un gène connu par une succession d'étapes d'élongation à partir d'amorces choisies

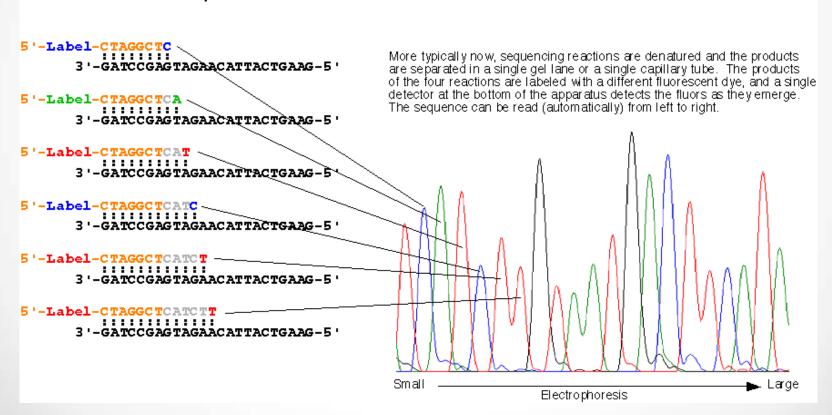




Pascale Richard - Damien Sternberg DU Myologie 2015

Approche classique PCR-séquençage Sanger Analyse de l'ADN Identification d'anomalies: séquençage

Déterminer la séquence nucléotidique primaire du fragment amplifié Puis la comparer a un ADN témoin



Pascale Richard - Damien Sternberg
DU Myologie 2015 Analyse fragment par fragment et gène par gène

Une révolution technologique Next generation Sequencing (NGS)

Séquençage a haut débit de grandes quantités de séquences

- Séquençage Sanger (PCRseq)
- Les gènes sont séquencés individuellement et selon une approche séquentielle qui dépends de la clinique
- Le séquençage d'un gène se fait par amplification de chaque exon (500 bp) individuellement
 - Long et fastidieux
 - Non exhaust if

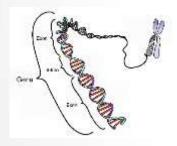
Pascale Richard - Damien Sternbergs DU Myologie 2015

- Séquençage nouvelle génération
- Plusieurs genes ciblés pour de nombreux patients peuvent être séquencés en 1 fois (20Gb)
- L'exome (toutes les séquences codantes) de plusieurs patients peuvent être séquencés ensemble (60Mb)
- Tout le génome d'un individu pourra être séquencé en 1 fois

NGS : Capacité de séquençage

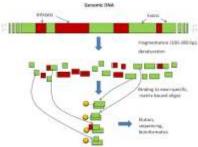
- <u>Génome</u>: beaucoup de séquences à analyser donc 98% de non codantes
- Exome: 30 000 gènes y compris des non codants (2% non analysé 10% mal analysé)
- Clinicome: 1000 gènes connus impliqués dans les maladies
- <u>Gènes ciblés:</u> Et ape préliminaire de l'enrichissement de séquences tout en contribuant à une diminution des coûts (on ne séquence que ce qui semble pertinent...)

Gène



- 1Kb à 100Kb
- 1 à 100 exons
- (max 360 exons)

Exome



- 30 megabases (Mb)
- 180 000 exons
- 1% du génome

Génome



- 3500 Mb (3,5 milliards de paires de nucléotides) – haploïde
- · 27000 à 30000 gènes

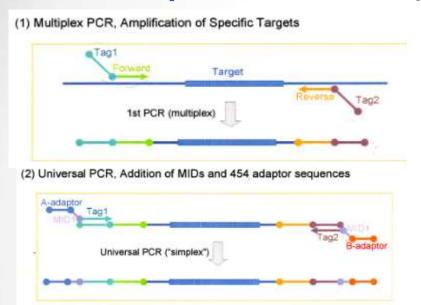




MySeq: 120 Mb -7.5 Gb HiSeq: 600 Gb

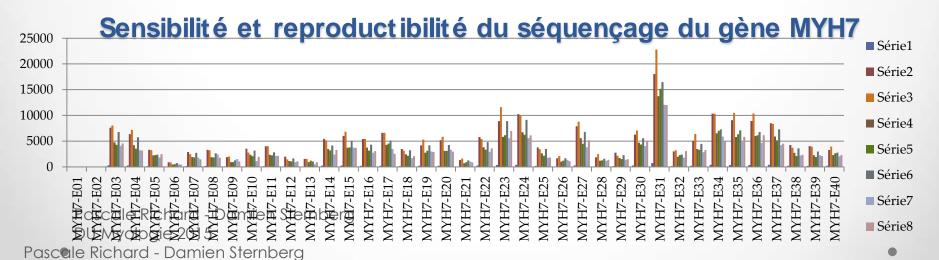


NGS Moyen et Haut débit Amplification multiplex de gènes d'intérêt

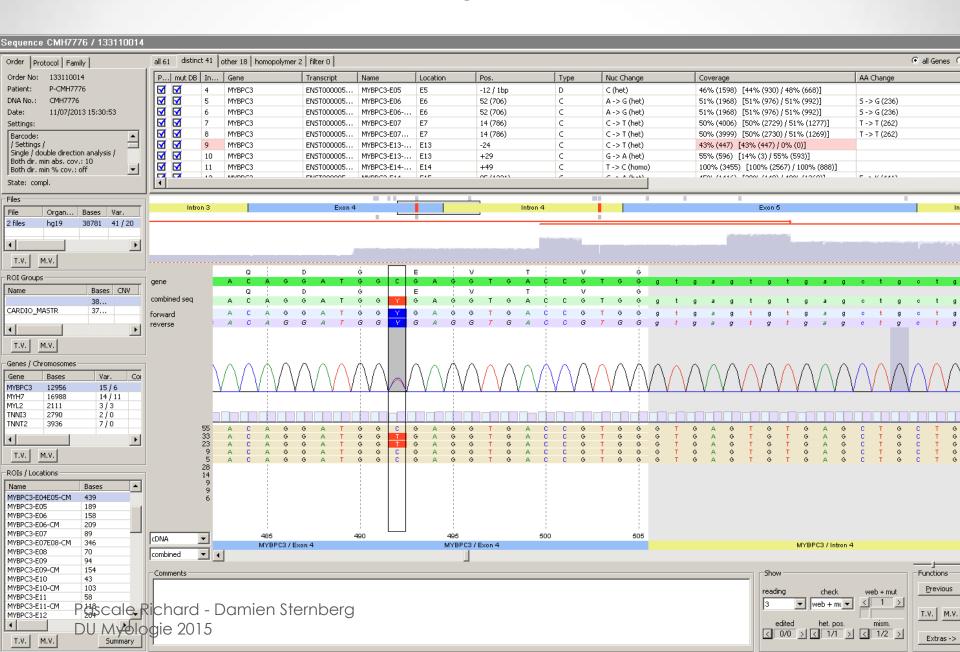


DU Myologie 2015

- ° Sélectionner les gènes d'intêret
- Les amplifier en morceaux mais tous ensemble = PCR Multiplex (EmPCR,..)
- ° Les séquencer tous ensemble
- ° Détection des signaux -→ analyse et Interprétation

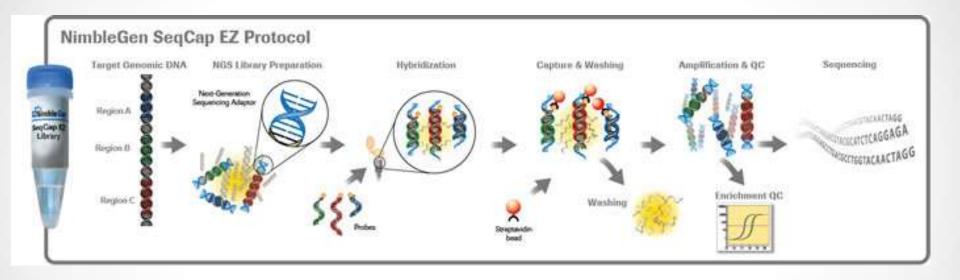


Exemple d'analyse des résultats



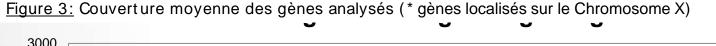
ENRICHISSEMENT des

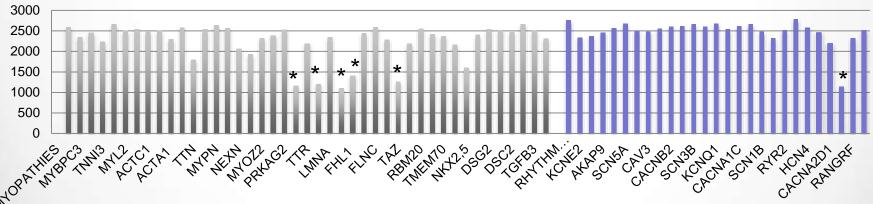
fragments par capture



Sensibilité du séquençage de 76 gènes après capture

<u>Test phase 2</u>: Plus de 95% des régions ciblées ont été capturées. La couverture moyenne de chaque séquence codant e capturée est représentée figure 3. Pour un gène localisé sur un autosome, cette couverture atteint 2500X et 1200X pour un gène sur le chromosome X (chez un homme). Cette couverture très important e permet également de détecter les variations de nombre de copies d'un gène (CNVs).



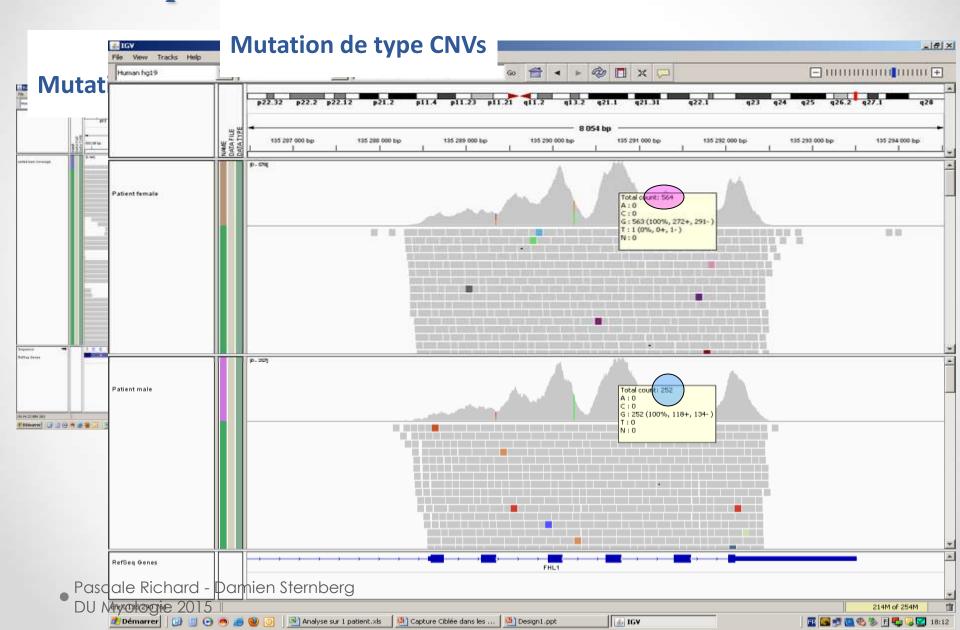


Présentation des variants identifiés

1 Ger 2 TNN 3 TNN 4 TNN 5 TNN 6 TNN 7 TNN 8 TNN 9 N/A 10 N/A	NE_0 Chi	1 deletion 1 snv 5 snv	D Genot het het het hom het	E t Variant_1 T>T/G C>C/A G>G/A C>T/T C>C/T CAGAAG>CA C>C/T	2321 1228 3491 1920 1207 932	G dbSNP ID_44 rs1104859 rs2365652 rs3729547 rs1573230 rs3729843 rs45533739	H Consequence_28 intron_variant intron_variant synonymous_variant intron_variant intron_variant	NM_00030 NM_00030 NM_00030	J _2' HGVSc_42 64.: NM_000364.2:c.601-404A>C 64.: NM_000364.2:c.601-514G>T 64.: NM_000364.2:c.348C>T 64.: NM_000364.2:c.233+67G>A	K HGVSp_43 NM_000364.2:c.348C>T(p.=)	L cDNA Positic P 0 0 417	M rotein Posii Ar 0 0 116 I		O odons_3: tC/atT
2 TNN 3 TNN 4 TNN 5 TNN 6 TNN 7 TNN 8 TNN 9 N/A	NT2 NT2 NT2 NT2 NT2 NT2 NT2 NT2	1 snv 1 snv 1 snv 1 snv 1 snv 1 snv 1 deletion 1 snv 5 snv	het het hom het het	T>T/G C>C/A G>G/A C>T/T C>C/T CAGAAG>CA	2321 1228 3491 1920 1207 932	rs1104859 rs2365652 rs3729547 rs1573230 rs3729843	intron_variant intron_variant synonymous_variant intron_variant	NM_00030 NM_00030 NM_00030	44.: NM_000364.2:c.601-404A>C 64.: NM_000364.2:c.601-514G>T 64.: NM_000364.2:c.348C>T	· -	0 0 417	0 0 116 I		_
3 TNN 4 TNN 5 TNN 6 TNN 7 TNN 8 TNN 9 N/A	NT2 NT2 NT2 NT2 NT2 NT2 NT2	1 snv 1 snv 1 snv 1 snv 1 deletion 1 snv 5 snv	het het hom het het	C>C/A G>G/A C>T/T C>C/T CAGAAG>CA	1228 3491 1920 1207 932	rs2365652 rs3729547 rs1573230 rs3729843	intron_variant synonymous_variant intron_variant	NM_00030 NM_00030 NM_00030	64.: NM_000364.2:c.601-514G>T 64.: NM_000364.2:c.348C>T	NM_000364.2:c.348C>T(p.=)	0 417	0 116 I	at	C/atT
4 TNN 5 TNN 6 TNN 7 TNN 8 TNN 9 N/A	NT2 NT2 NT2 NT2 NT2 NT2	1 snv 1 snv 1 snv 1 deletion 1 snv 5 snv	het hom het het	G>G/A C>T/T C>C/T CAGAAG>CA	3491 1920 1207 932	rs3729547 rs1573230 rs3729843	synonymous_variant intron_variant	NM_0003	64. NM_000364.2:c.348C>T	NM_000364.2:c.348C>T(p.=)	417	116 I	at	C/atT
5 TNN 6 TNN 7 TNN 8 TNN 9 N/A	NT2 NT2 NT2 NT2	1 snv 1 snv 1 deletion 1 snv 5 snv	hom het het	C>T/T C>C/T CAGAAG>CA	1920 1207 932	rs1573230 rs3729843	intron_variant	NM_0003	-	NM_000364.2:c.348C>T(p.=)			at	:C/atT
6 TNN 7 TNN 8 TNN 9 N/A	NT2 NT2 NT2	1 snv 1 deletion 1 snv 5 snv	het het het	C>C/T CAGAAG>CA	1207 932	rs3729843	_		54. NM 000364.2:c.233+67G>A		0	0		
7 TNN 8 TNN 9 N/A	NT2 NT2	1 deletion 1 snv 5 snv	het het	CAGAAG>CA	932		intron_variant					U		
8 TNN 9 N/A	NT2	1 snv 5 snv	het			rs45533739		NM_0003	54. NM_000364.2:c.164-50G>A		0	0		
9 N/A	1	5 snv		C>C/T		1340000703	splice_region_variant,	NM_0003	54. NM_000364.2:c.53-11_53-7delCTTCT		0	0		
	1		hot		1358	rs868407	intron_variant	NM_0003	54. NM_000364.2:c.42-58G>A		0	0		
10 N/A		_	met	C>C/T	3054	rs78838942								
	_	5 snv	hom	T>C/C	3161	rs10061598								
11 EBF	2	8 snv	hom	A>G/G	644	rs1994297	intron_variant	NM_0226	9. NM_022659.3:c.552-52170T>C		0	0		
12 MYE	BPC3	11 snv	het	G>G/A	585	rs2290146	intron_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.3815-66C>T		0	0		
13 MYE	BPC3	11 snv	het	G>G/A	719	rs3729802	intron_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.3627+49C>T		0	0		
14 MYE	BPC3	11 snv	het	C>C/T	1584	rs1052373	synonymous_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.3288G>A	NM_000256.3:c.3288G>A(p.=)	3343	1096 E	ga	aG/gaA
15 MYE	BPC3	11 snv	het	T>T/C	793	rs11570115	intron_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.3191-21A>G		0	0		
16 MY	BPC3	11 snv	het	G>G/T	1054		intron_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.2905+24C>A		0	0		
17 MY	BPC3	11 snv	het	T>T/C	1407	rs2856653	intron_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.2067+118A>G		0	0		
18 MYE	BPC3	11 snv	hom	A>G/G	2696	rs896818	intron_variant	NM_0002	66. NM_000256.3:c.1226+49T>C		0	0		
19 MYE	BPC3	11 deletion	het	AG>AG/A	2658	rs11570050	intron_variant,	NM_0002	66. NM_000256.3:c.506-12delC		0	0		
20 N/A	١	13 snv	het	A>A/T	1078									
21 MY	H7	14 snv	het	G>G/A	3968	rs45609633	intron_variant	NM_0002	77. NM_000257.2:c.5158-35C>T		0	0		
22 MYI	H7	14 deletion	het	AACACAC>A	3692		intron_variant	NM_0002	77. NM_000257.2:c.3099+105_3099+110d	elGTGTGTinsGTGT	0	0		
23 MYI	H7	14 deletion	het	AACACAC>A.	3692		intron_variant,	NM_0002	7. NM_000257.2:c.3099+105_3099+110d	elGTGTGT	0	0		
24 MYI	H7	14 deletion	het	GT>GT/G	1427		intron_variant,	NM_0002	7. NM_000257.2:c.895+69delA		0	0		
25 MYI	H7	14 snv	het	C>C/A	1425		intron_variant	NM_0002	77. NM_000257.2:c.895+68G>T		0	0		
26 MYI	H7	14 snv	het	C>C/A	1424		intron_variant	NM_0002	77. NM_000257.2:c.895+64G>T		0	0		
27 MYI	H7	14 snv	het	C>C/G	1427		intron_variant	NM_0002	77. NM_000257.2:c.895+61G>C		0	0		
28 MY	H7	14 snv	hom	G>A/A	2427	rs2069540	synonymous_variant	NM_0002	77. NM_000257.2:c.189C>T	NM_000257.2:c.189C>T(p.=)	291	63 T	ac	cC/acT
29 TNN	NI3	19 snv	hom	A>C/C	2326	rs7252610	intron_variant	NM_0003	3.4 NM_000363.4:c.373-10T>G		0	0		

Pascale Richard - Damien SternbergDU Myologie 2015

Exemples de renrésentation des résultats



Bioinformatique

Nouvel outil et nouveau métier pour les généticiens moléculaires

L'analyse vue par l'informaticien

- Appliquer les critères de qualité
- Aligner les régions séquencées sur la séquence de référence

L'analyse vue par le biologiste

- •1 exome: 150000 variants par patient
- •1 capture ciblée de 80 gènes entiers (3000 variants)
- •1 capture ciblée des exons de 80 gènes (150 variants)
- Eliminer les régions non ciblées (untargeted)

Intergéniques, Downstream and upstream, 5'UTR et 3'UTR Génes non capturés (miRNA,)
Introns ??

- Trier les variants restants en fonction de leur fréquence allèlique Enlever SNVs de fréquence 0.01 >> 0.99
- Eliminer sous réserve en fonction du contexte

Variants homozygotes: Attention Chromosome X

Pascale Richard Partia Presignation Propries : Attention aux sites cryptiques d'épissage DU Myologie 2015

Interprétation des mutations

La difficulté n'est pas de trouver des mutations mais de leur attribuer un rôle pathogène en relation avec la maladie

Critères de pathogénicité d'un variant

- 1. Modification de l'acide aminé (analyses in silico)
- 2. Rôle de la région protéique impliquée
- 3. Région conservée dans l'évolution des espèces
- 4. Coségrégation familiale si possible
- 5. Absence dans les bases de données de populations contrôles de même origine ethnique



- Une mutation qui ne change pas l'acide aminé n'est pas toujours un polymorphisme
- Un codon stop n'est pas toujours pathogène
- Des variations faux sens sont souvent des polymorphismes

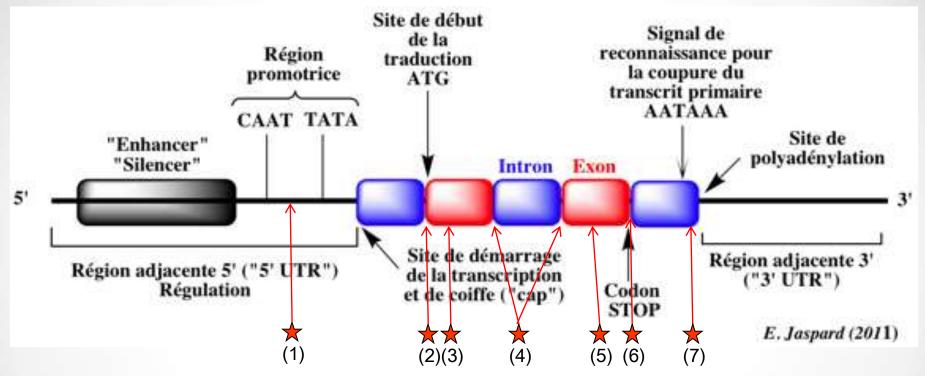
Cette interprétation n'est pas toujours possible

- 1. Faux positif: faux diagnostic, faux conseil génétique, faux traitement
- 2. Empêche d'avancer dans la réflexion de recherche du diagnostic

Complexité des techniques et de l'analyse NGS

- Manipulation délicate (nombreuses étapes manuelles délicates pour l'analyse des panels par capture-NGS); perspective d'automatisation
- Analyse Bioinformatique : pipelines à établir, à valider, à mettre à jour
- Développement des bases de données d'annotation et de corrélations (fréquence, phénotype(s), références bibliographiques):
 - LSDB (locus-specific mutation database)
 - EXAC, ClinVar, HGMD-Pro (payant)
- Interprétation des variants identifiés
 - Plan technique: faux positifs
 - Plan Biologique: relier un variant à la maladie (apparentés)
- Coût: 500/1500 euros par patient

Mutations géniques: localisation

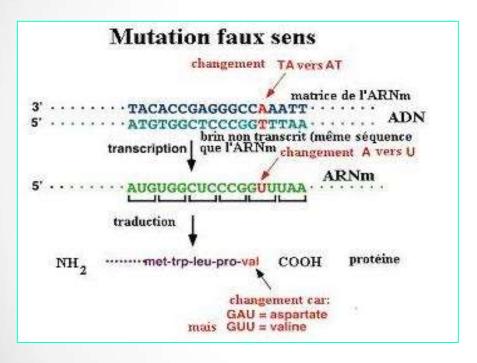


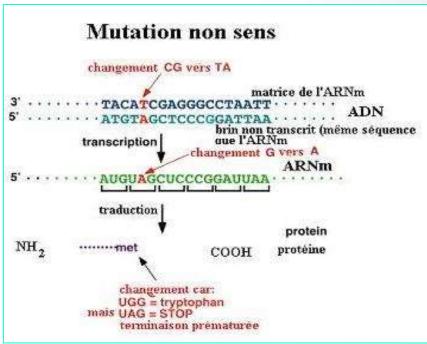
- (1) Modification quantitative de l'expression
- (2) Anomalie de l'initiation de la traduction
- (3) Substitution ou insertion/délétion Mutation pathogène ou Polymorphisme
- (4) Absence d'épissage (site donneur ou accepteur)
- (5) Site cryptique
- (6) Protéine allongée Pascale Richard - Damier Sternberg

 DU M(7) Anemalie de polyadénylation des ARNm

Nature des Mutations géniques

Substitutions de nucléotides



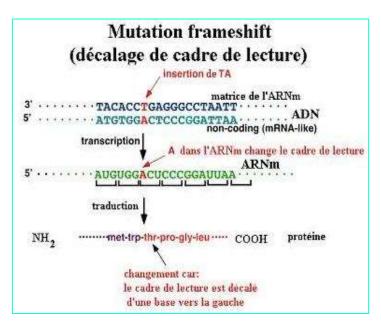


Insertion ou délétion de nucléotides

Le cadre de lecture

→ détermine la traduction donc est essentiel à la synthèse exacte de la

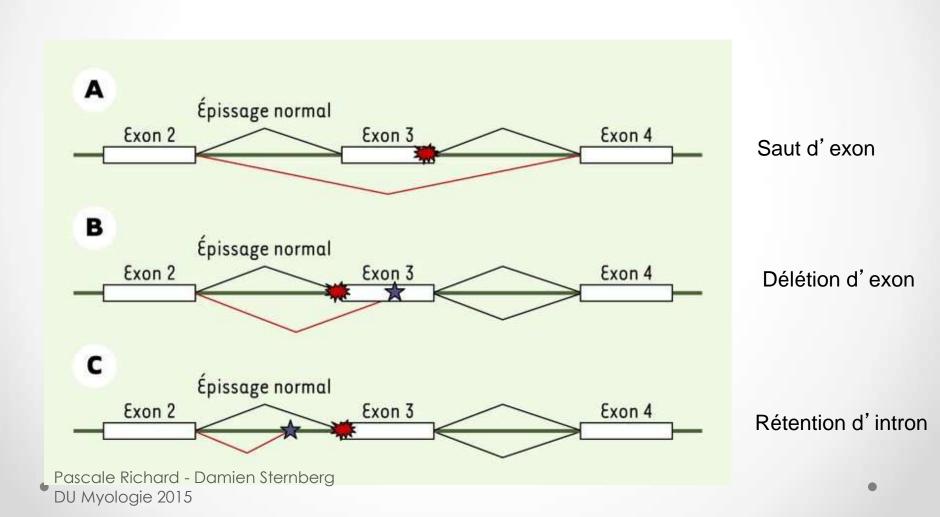
protéine



- Les délétions ou insertions sont de conséquences variables selon le nombre de nucléotides concernés :
 - o de 1 ou 2 nucléotides, elles décalent le cadre de lecture (codons)
 - de 3 nucléotides, elles aboutissent à la suppression d'un acide aminé dans la protéine exprimée
 - Pascalerarade done gue un bedles peuvent supprimer l'expression d'un ou de plusieurs DU Mexiogis, 2015 ire d'un gène entier.

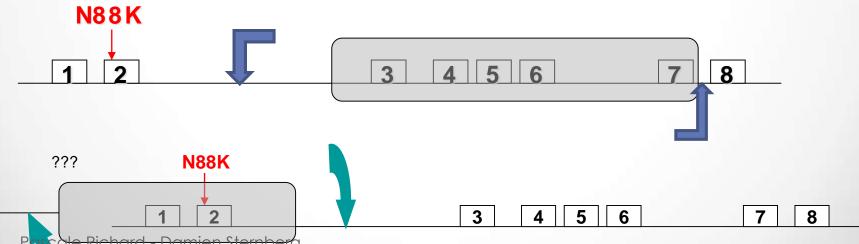
Les mutations d'épissage

Ce sont des substitutions de nucléotides qui entrainent une anomalie de l'épissage des ARNm



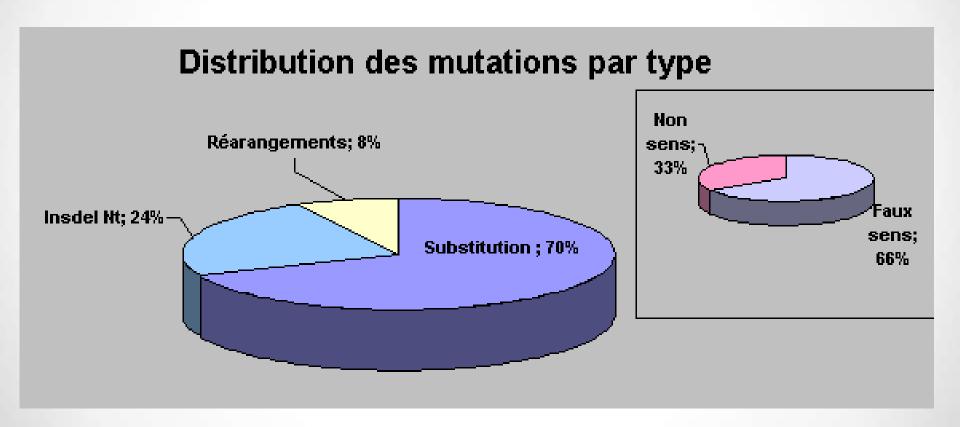
Remaniements intra chromosomiques

- Insertions ou délétions de plus grande taille
- Peuvent concerner un ou plusieurs exons entiers
- Dues a des recombinaisons intragéniques qui se produisent le plus souvent dans les parties non codantes entre des séquences homologues
 - o Entre 2 introns
 - Entre les parties 5' ou 3' et les introns



Le gène et ses altérations





100 000 mutations Mutation Faux sens : aboutit a la synthèse d'une protéine contenant une mutation décrites Mutation non sens : Aboutit a une élimination de l'ARN messager donc ne conduit pas a une protéine mutée

Pascale Richard - Damien Sternberg
DU Myologie 2015

Physiopathologie des mutations

Allèle « null » : allèle qui ne s'exprime plus

- Conséquence habituelle des stop, frameshift, mutations d'épissage, grands remaniements
- Mécanisme de régulation conduisant à l'élimination des messagers correspondants à l'allèle muté (allèle null avec perte d'expression)
 - Deux allèles « null » : équivalent d'un « knock-out » du gène
 - Allèle « null » hétérozygote : un second allèle (normal ou muté) s'exprime

Allèle muté exprimé

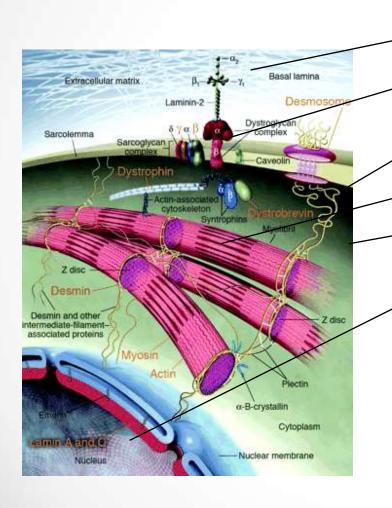
- Conséquence habit uelle des faux-sens
- La protéine mutée est synthétisée en quantité normale
 - Perturbe un assemblage moléculaire ou une fonction (gain de fonction, possible effet dominant négatif)

Beaucoup de gènes préséntent les deux métanismes en tente des mutaflons qui y sont identifiées

Pascale Richard - Damien Sternberg

Approche fonctionnelle des faux-

sens: les protéines du muscle



Matrice extra cellulaire

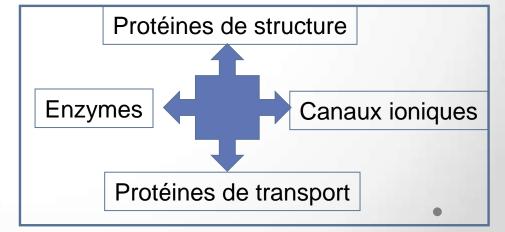
Membranaires

Filaments Intermédiaires

Sarcomériques

Cytosoliques - Mitochondriales

Nucléaires



Pascale Richard - Damien SternbergDU Myologie 2015

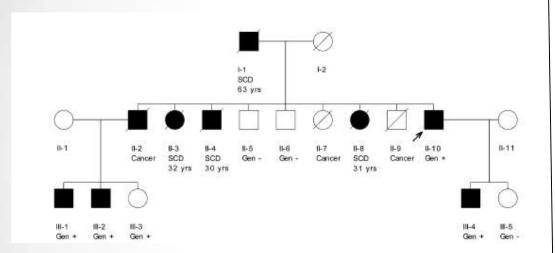
Analyse de L'ARN messager

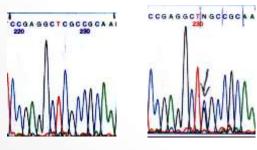
- Aspect qualitatif: l'ARNm est le reflet de la protéine
 - L'ADN génomique peut sembler normal et l'ARN messager sera anormal donc la protéine sera anormale
- Aspect quantitatif
 - L'expression ou la répression de certains gènes en fonction de conditions physiologiques ou pathologiques peut nécessiter la quantification des ARNm. Dans ce cas, il est nécessaire de travailler sur le tissu d'intêret
- Plus difficile à mettre en œuvre pour le clinicien (prélèvement) et le biologiste
- Plus délicate
 - □ ARNm sont plus fragiles
 - □ Cellules ou le gène s' exprime
 - □ Transcription illégitime (lymphoblastes)
 - Bien adaptée aux grands gènes avec de nombreux exons

Cas « Classiques »

Hétérozygote

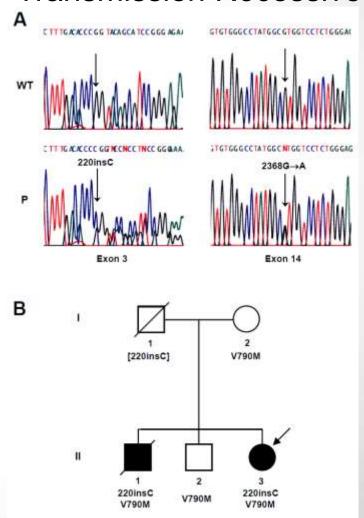
Transmission dominante



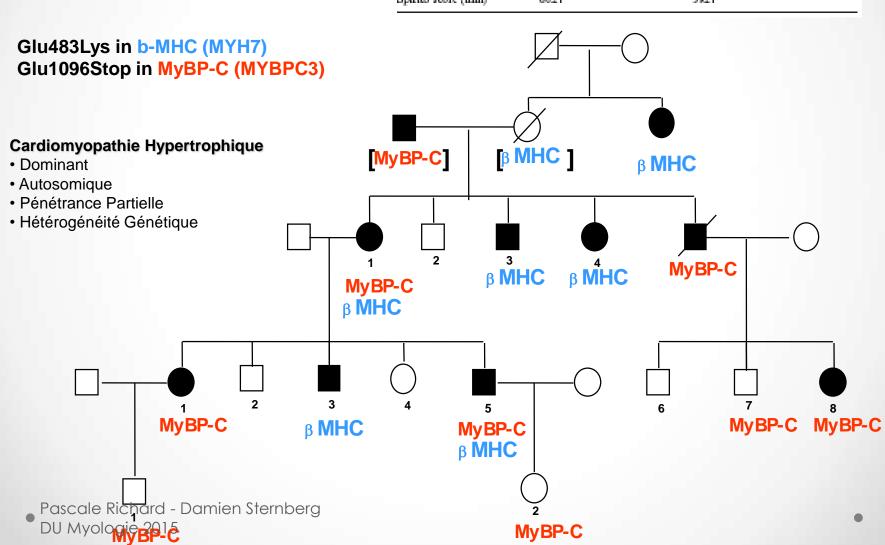


- Corrélation de la mutation trouvée avec le phénotype
- Coségrégation au sein de la famille
- Pascale Richard Damien Sternberg DU Myologie 2015

Transmission Récessive



Digénisme



la descendance

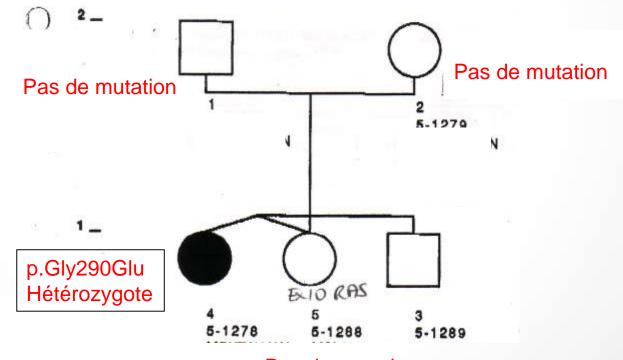
Deux mutations différentes dans une même famille Analyse de la mère Défibrillateur Mutée MYBPC3 IVS14-2:G>A Mutation connue Recherche chez le fils Mutation absente !!! Sportif de Ttt CMH Mort subite Ttt CMH compétition à 17 ans pdt sport « Confrontation » Rassurer et poursuivre le sport ?? clinico-génétique Nouvelle analyse Génétique -> 1) Arrêt du sport Pascale Richard - Da i i Transmission a
DU Myologie 2015 la descendance Autre Mutation dans le même gène

p.Gly507Arg

Néomutation

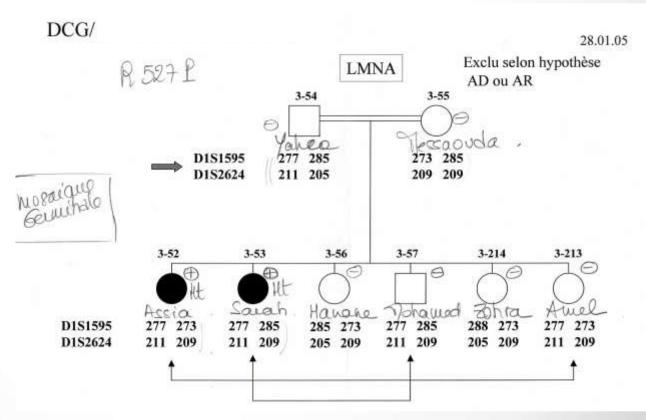
Collagénopathie

- * Autosomique récessif
- * dominant 60 % néomutations

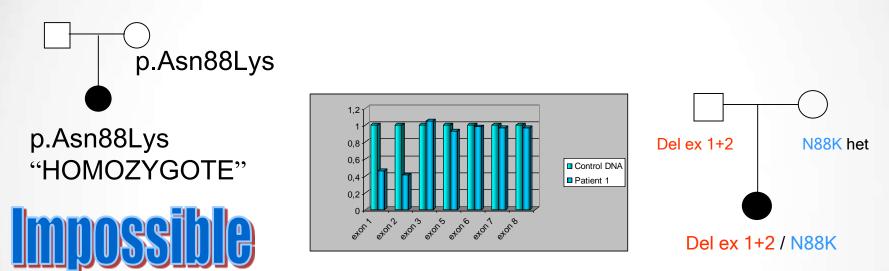


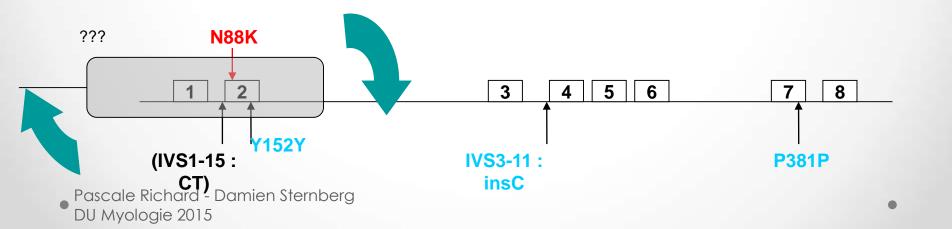
Pas de mutation

Cas « Particuliers » Mosaique Germinale



Remaniements Chromosomiques





Conclusion

- Pathologies souvent difficiles a diagnostiquer en génétique moléculaire: la moitié des patients restent sans anomalie identifiée, le NGS va apporter une amélioration incomplète
- Importance des examens complémentaires (BM, cardio, CPK) et du raisonnement diagnostique prenant en compte l'ensemble des éléments
- <u>Information des patients</u> quant aux bénéfices et aux limites à attendre en l'état actuel des technologies et des connaissances