

Déficiência intellectuelle

*EO Médecine de précision et thérapie
ciblée*

Pr Sandra Mercier (sandra.mercier@chu-nantes.fr)
Pr Stéphane Bézieau (stephane.bezieau@chu-nantes.fr)
Service de génétique médicale
CHU Nantes



CENTRE DE REFERENCE
Anomalies du développement
et syndromes malformatifs

Objectifs pédagogiques

- Comprendre les enjeux de la médecine de précision en termes de génétique, appliquée à la déficience intellectuelle:
 - révolution technologique liée au séquençage haut débit
 - avantages pour l'établissement d'un diagnostic à l'échelle individuelle
 - questions éthiques à l'échelle individuelle, mais surtout collective

Plan

- **Introduction:**
 - définition de la DI
 - épidémio
 - étiologies
- **Médecine de précision:**
 - séquençage haut débit : étude d'exome / génome
 - 3 exemples (diagnostic / recherche)
- **Questions éthiques**

Introduction

- **Définition de la déficience intellectuelle?**

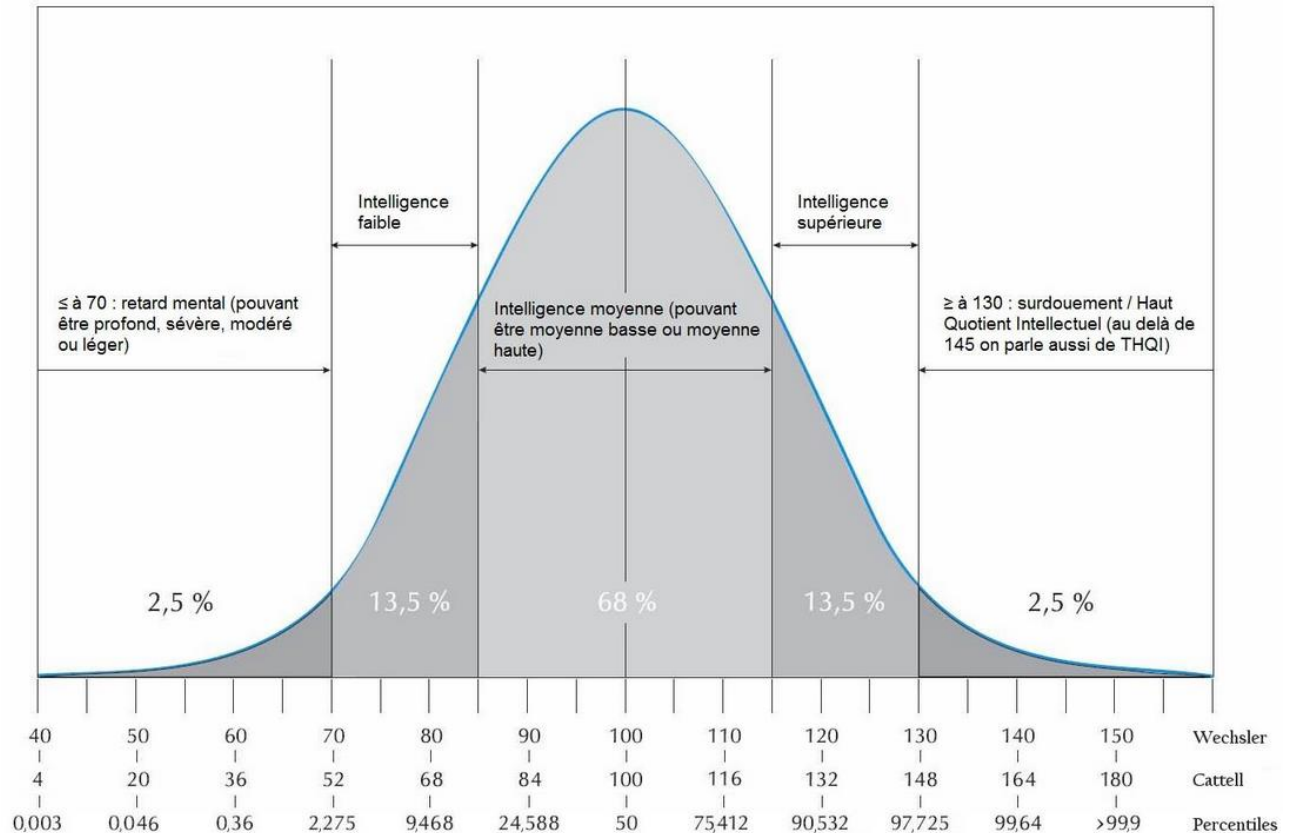
Définition de la déficience intellectuelle

American Association on Intellectual and Developmental Disabilities

- En 1992:
Diminution significative des facultés intellectuelles
ET
déficit des comportements adaptatifs
(conceptuels, sociaux et pratiques) survenant au cours de la période de développement intellectuel
- En 2008 : « Retard mental » => « Déficience intellectuelle »

QD / QI

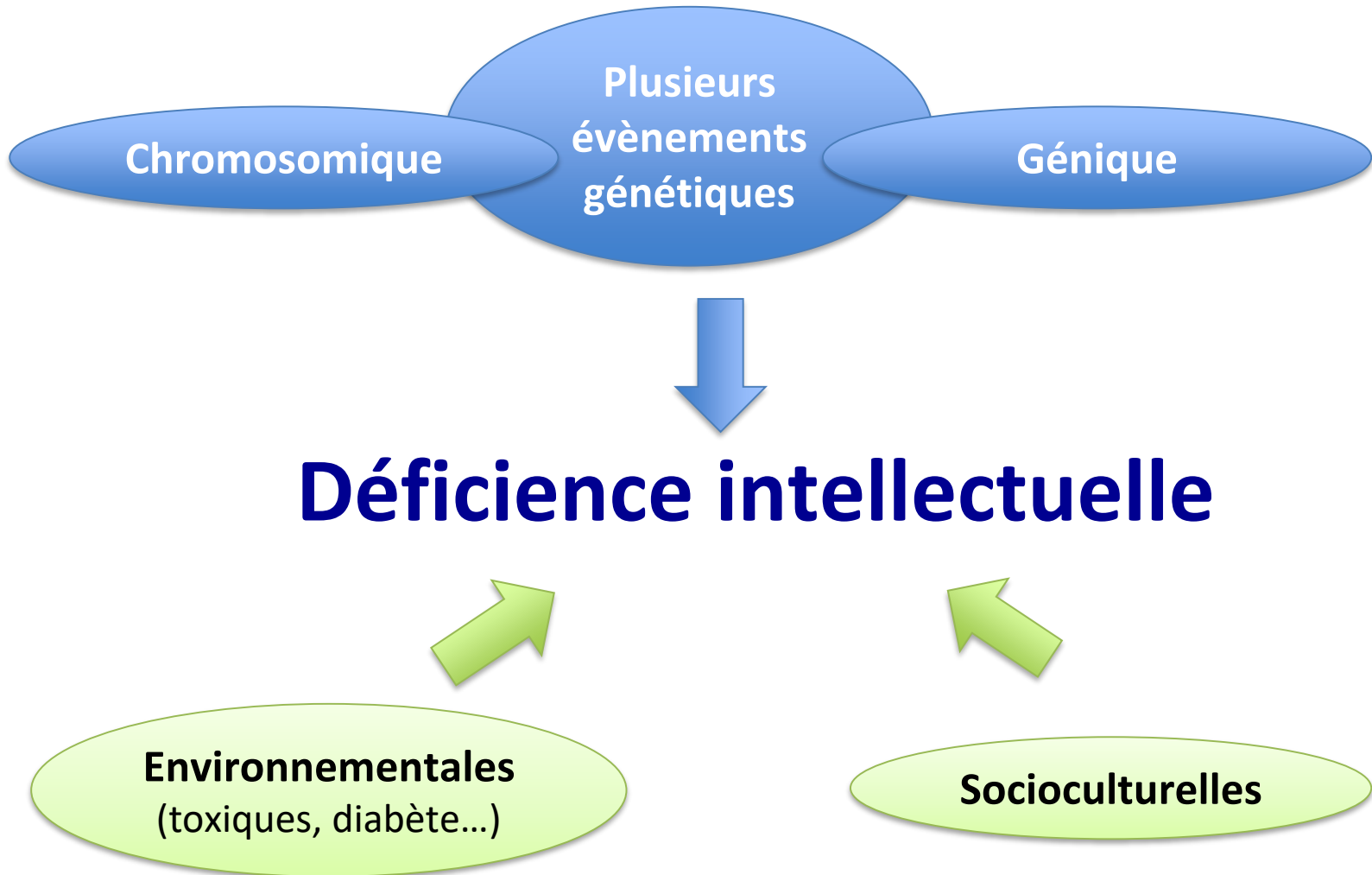
- Echelles d'évaluation du QD ou QI:
 - ex: échelle de Wechsler
- DI: $QI < -2 \text{ DS}$
- $QI < 70$: 2-3% de la population
 - $50 < QI < 70$: légère
 - $35 < QI < 49$: moyenne
 - $20 < QI < 34$: sévère
 - $QI < 19$: profonde



Epidémio

- Prévalence : 2-3 % population
- Comorbidité : trouble du spectre autistique, épilepsie, déficit sensoriel...
- Sex ratio :
 - M :F = 1,3 :1 (RLX)

Etiologies



En pratique, consultation de génétique clinique


- *Anamnèse* : ATCD familiaux, consanguinité ?
- *Examen clinique* :
 - Dysmorphologie
 - Signes neuro, atteinte sensorielle
 - Evolution : « fixée », régression
 - Troubles comportementaux spécifiques

⇒ **DI syndromique ou isolée?**


Syndrome « connu »


Etudes ciblées: FISH, gène


Pas d'orientation clinique

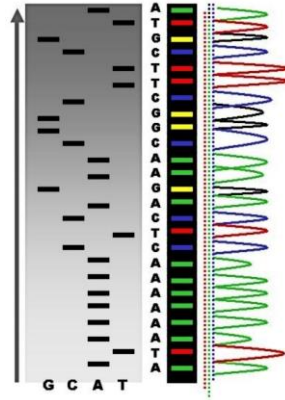

Etudes pangénomiques / larges:
CGH array, panel de gènes, exome, génome

Plan

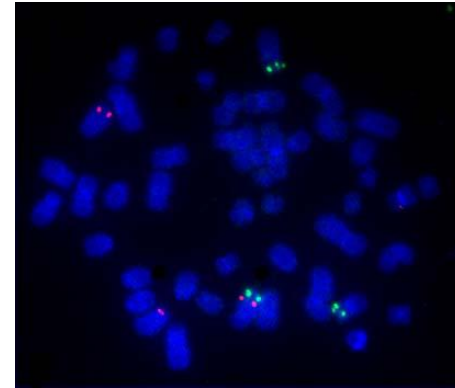
- **Introduction:**
 - définition de la DI
 - épidémio
 - étiologies
- **Médecine de précision:**
 - séquençage haut débit : étude d'exome, génome
 - 3 exemples (diagnostic / recherche)
- **Questions éthiques**

Les différentes techniques d'analyse en génétique

APPROCHES CIBLEES

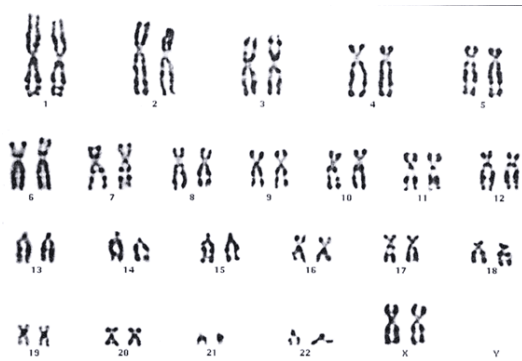


Séquençage Sanger

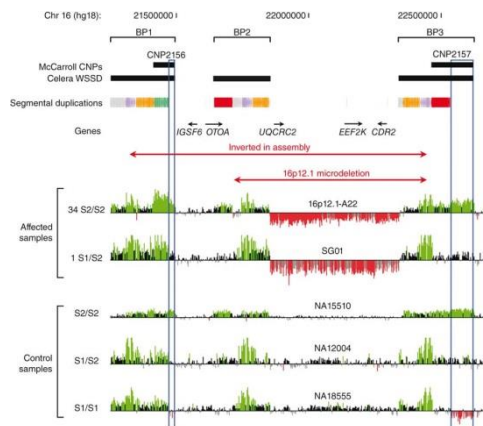


FISH

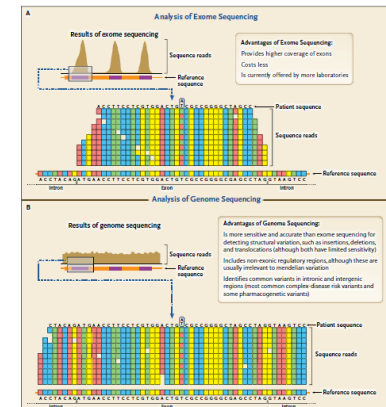
PANGENOMIQUES



Caryotype

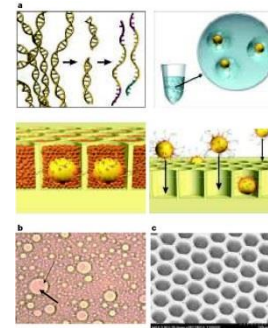
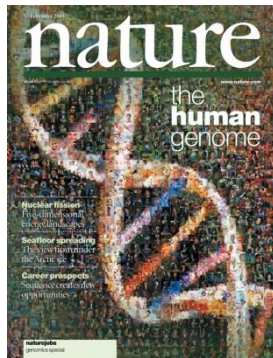


CGH



Next Generation Sequencing

Séquençage génome humain



1977
Séquençage
Sanger

2001
Draft génome
humain

2005
Début NGS:
séquenceur 454

1990
Lancement
Human Genome
Project

2003
Génome humain
complet

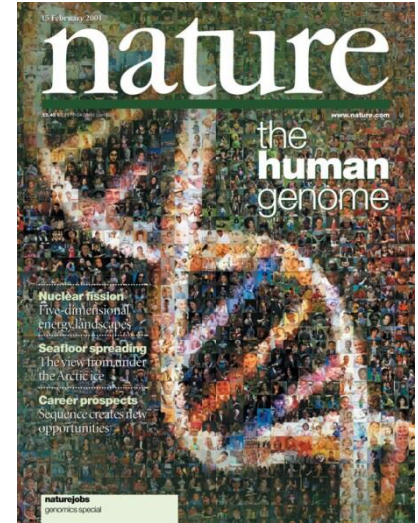
2008
Génome humain
par seq. Illumina



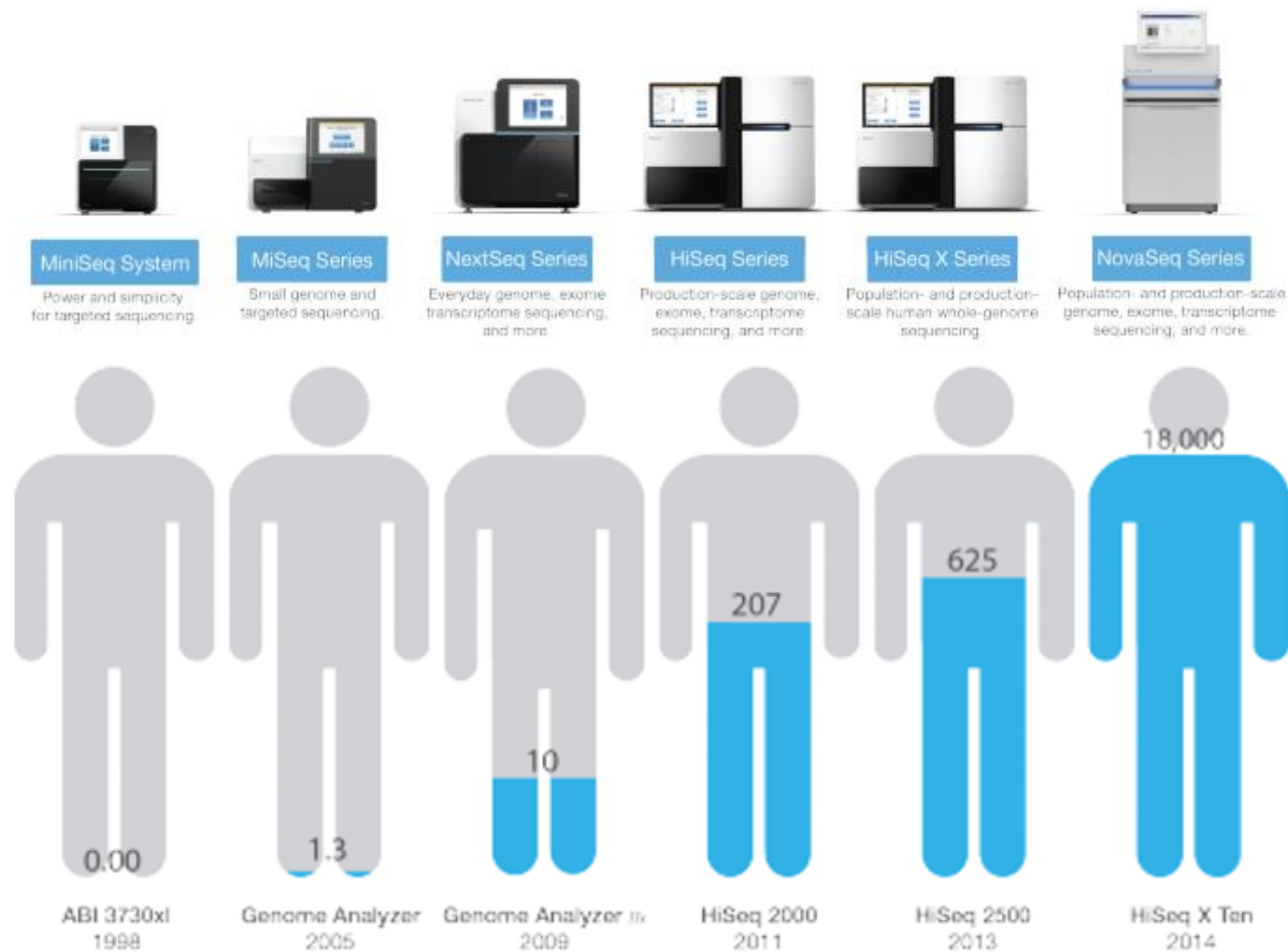
Séquençage complet du génome humain : Human Genome Project (HGP) 1988

- Equivalent 4 génomes complets en réalité
- Séquençage partiel (Fev 2001, Celera)
- Séquençage complet (2004 consortium public)

12 ANS DE TRAVAIL...2 MILLIARDS d'EUROS



- *Nurk S et al. 2022. The complete sequence of a human genome. Science 376, 44-53*
- 200 millions de paires de base séquencées en plus par rapport à la première séquence 20 ans avant.
- Régions répétées, centromères, télomères
- 2000 gènes candidats en plus
- 99 gènes prédits comme codant des protéines
- 2 millions de variations jamais décrites



2022



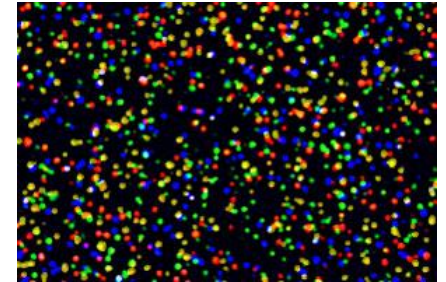
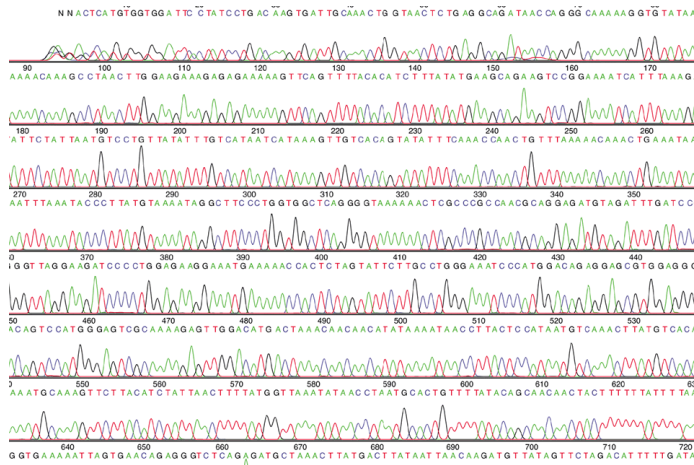
Coût du génome en 2023 : 100 à 200 euros
Coût de l'appareil : 1,3 millions d'euros

NovaSeq X Plus peut
générer plus de
20 000 génomes entiers par
an, soit 2,5 fois le débit des
séquenceurs précédents

Séquençage haut débit (NGS)



Sanger: 1 réaction = 1 séquence



NGS: 1 réaction = 10^5 - 10^9 séquences



Fichiers plusieurs Go

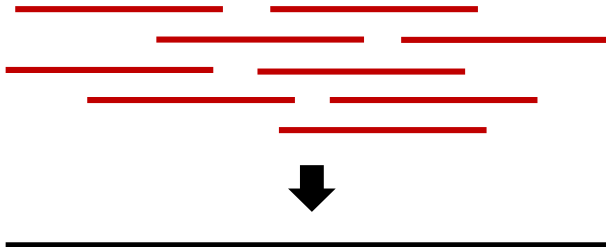
```
@M01626:70:000000000-A6E12:1:1101:14394:1725 1:N:0:5
GCACGATTACTTGCCTACGCTCTTACGACGCTTTTCATCAACTTTCCATTGAATTTTTTCTGTGAACCTGGTTTTATTTTTTCTTTTCTTTTTCACAAGTCCAATCATT
TCTGTATCTAATTTTTGTTAGGACTTTTCACGGTATTACGACGATCAGGTCGTATGTATCTTGAATTCACCGTTT
+
1>1>1>1BDD1AFEF1A11AAAFG3B00A00AAABF2FF21AABBB42AD111DFGDEAEADA1D12DFE00B0F2BFFGHGECFFGFGGHHHF2>210B>>11B81BF
BBF2B2BBF21FGHE1<0B21<1BBGHF20//??/0F22//<//>F.0<.<.-<./=0<<00<0=DH00:=.:.
@M01626:70:000000000-A6E12:1:1101:15300:1737 1:N:0:5
TTCAATACAAGACCCCTTACTTCCTTTTCTATACCTTTTCCGTAATTTCCATAATCGCGTAAGTAGCAACAGATTCAACTTTATTAAGATTAATACCTAAGAAGCTTT
GAACCACTTTGTTCCATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACATAATTACGTTTTATTCTGCTGCTTGGGTTACTAAAAATAAACCATCCCAACCATAGCGCTTATTGCGGCATCA
ACAACATAAACCAATCGTTTGAGTATCCATGTTAATTTAAACATCGGACATCCACCCCTTCCCCCCCCCTCC
+
>AA11D3BB1111AFAEAF1AAFEAFEGGHCFF3D3B2DFGGHGF0B0/ADBFF2F21F2//A/A//0D22BA1B000AB01DF2DFGGG20D20112BB1F2FCF11011FFGF
121B?0?BFG1FGFF2BBB1BFFGGFHB>GGHFB22F1<D1BG2BA<GFF2GGFH2@<G1@CG1A/AF/101111?11F1D...>0.1>.-<D00/<-<=<0:;-:/:0
0:0...9C0CFA./;...=0.;00;0000000//9/9//9-9--9//9/-;--;--9--;-;
@M01626:70:000000000-A6E12:1:1101:16123:1748 1:N:0:5
```


NGS

De novo



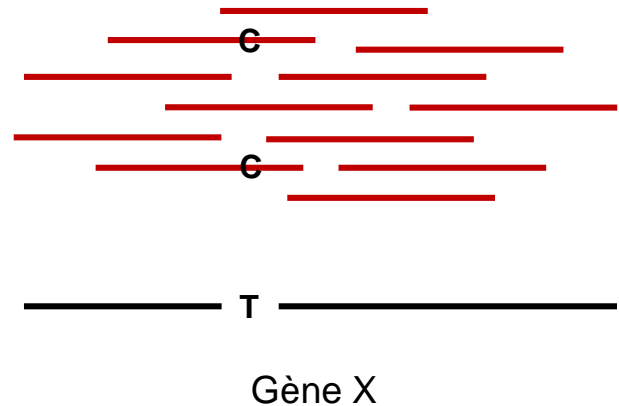
Assemblage des reads pour
séquencer des génomes



Reséquençage



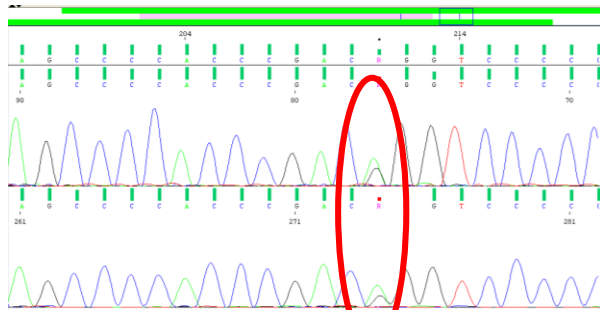
Analyse des variations par
rapport à un génome connu



Notion indispensable en NGS : couverture et profondeur de couverture (ex : 50 X)

NGS

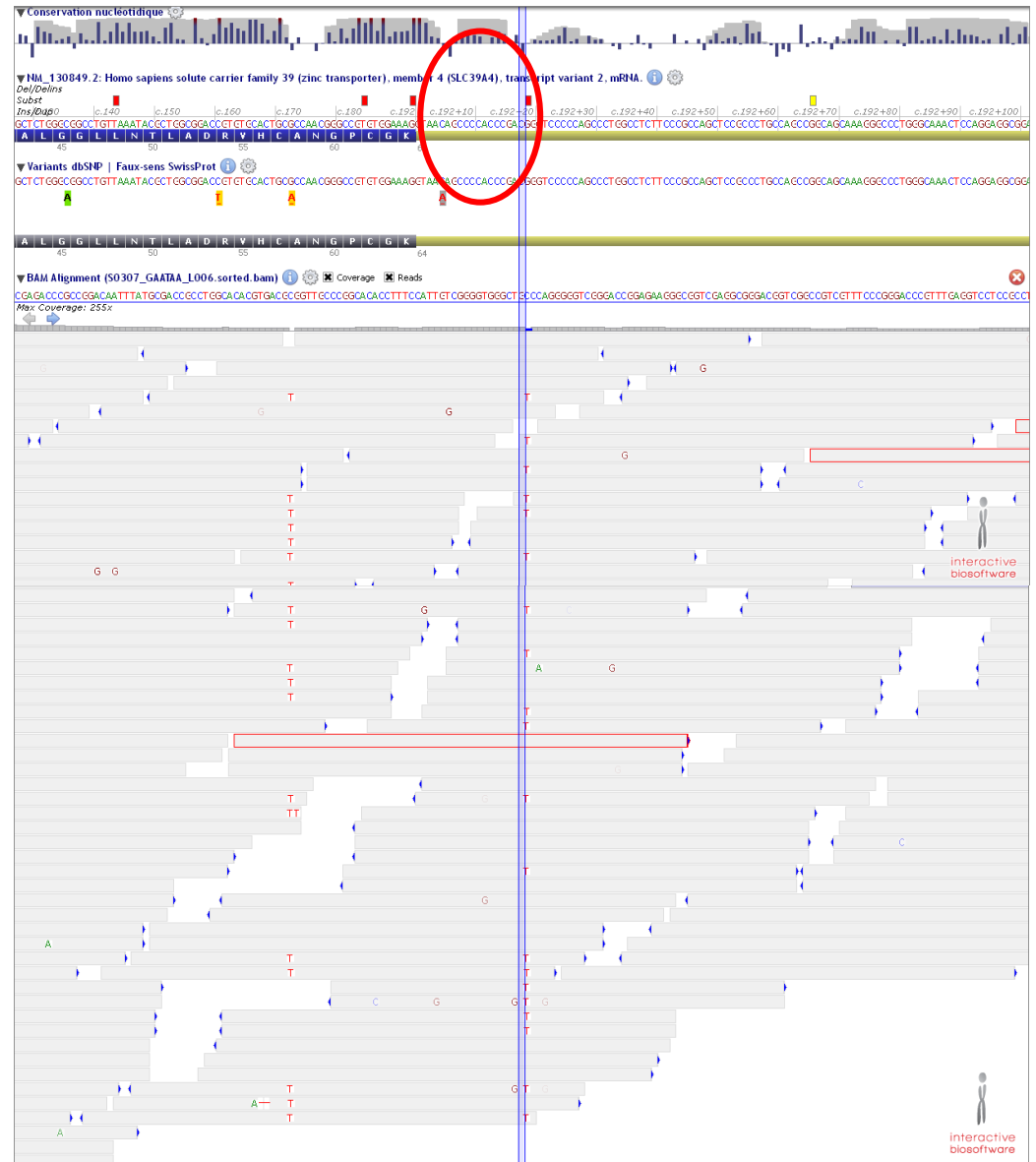
Séquence Sanger

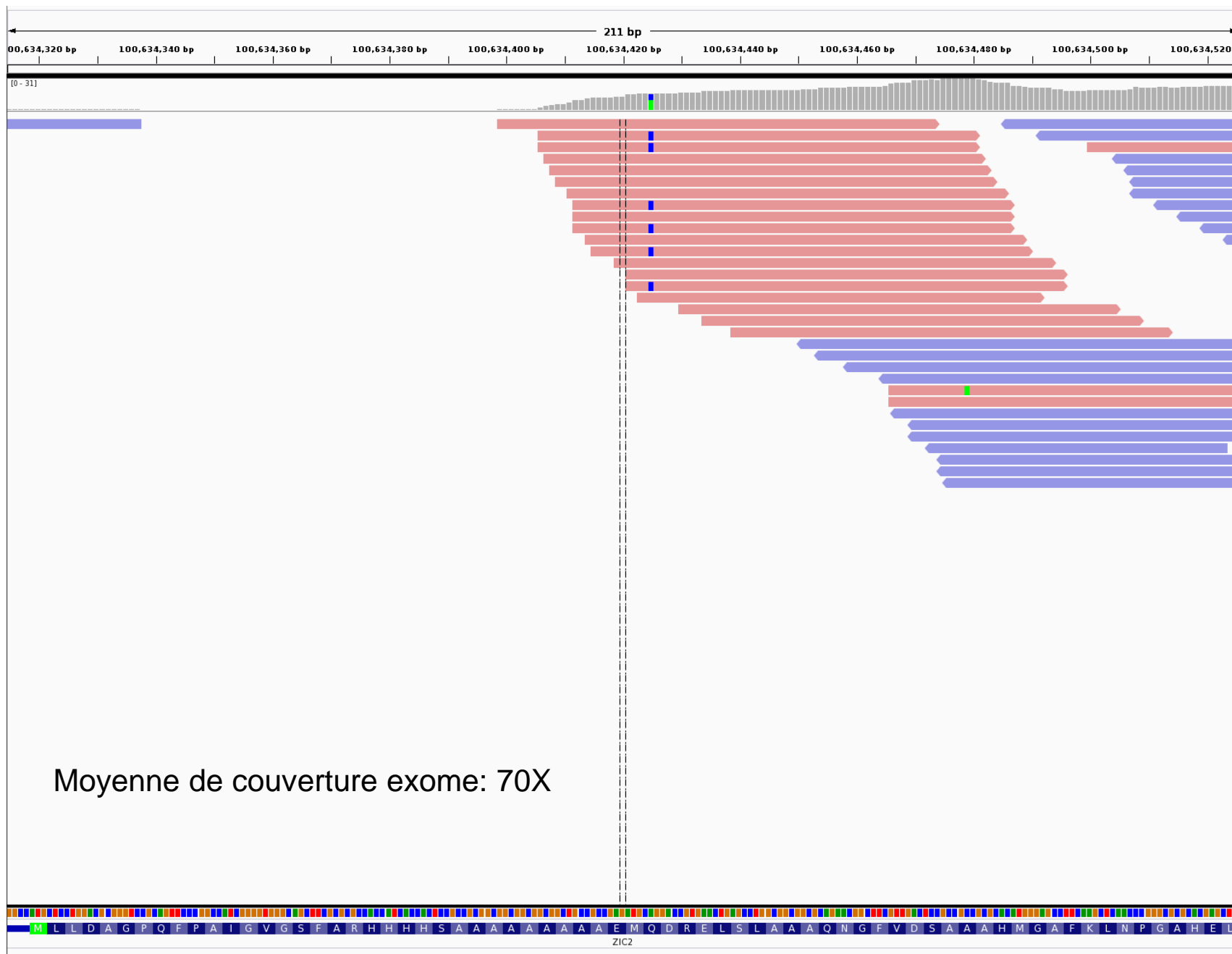


Mutation *SLC39A4*
c.192+19G>A

Seuil diagnostique minimum 30 X
En profondeur de couverture.

Exome 50X, 100 X de moyenne



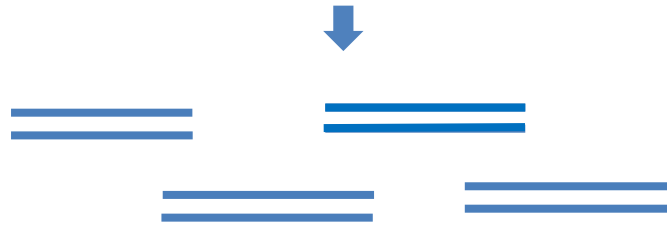


Exome: technique

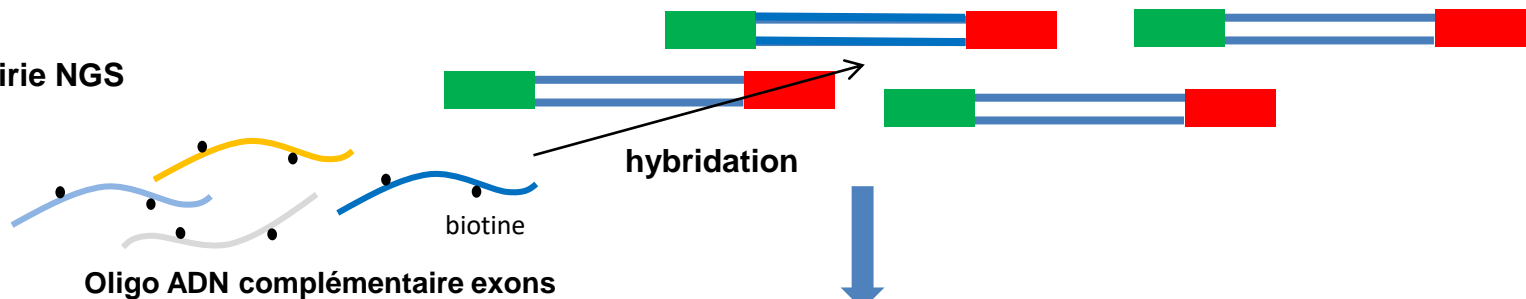
ADN génomique



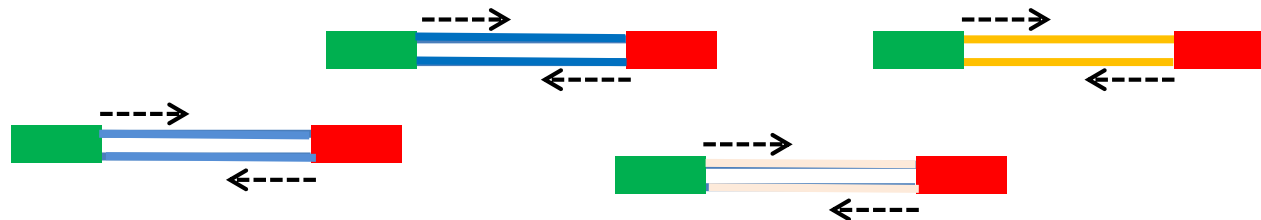
ADN fragmenté (200-300pb)



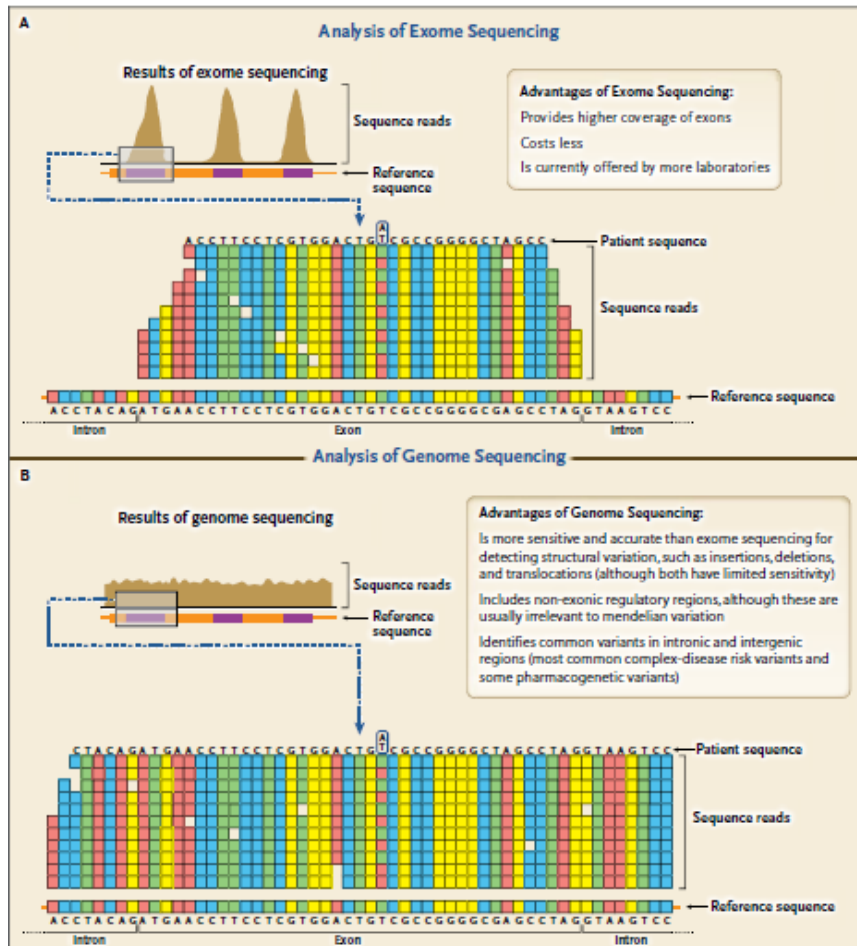
Librairie NGS



Seq Illumina



NGS pangénomique : Génome



Avantages du génome/exome :

- Etude régions géniques et intergéniques
 - Couverture plus homogène
 - Plus adapté à la détection de CNV
- Même si difficile

Limites du génome :

- Complexité de l'analyse (4 millions de variations par génome)
- Stockage informatique
- Amplification de triplets pas en routine
- Détection possible mais difficile des variants de structure

A l'échelle de l'exome, more.....

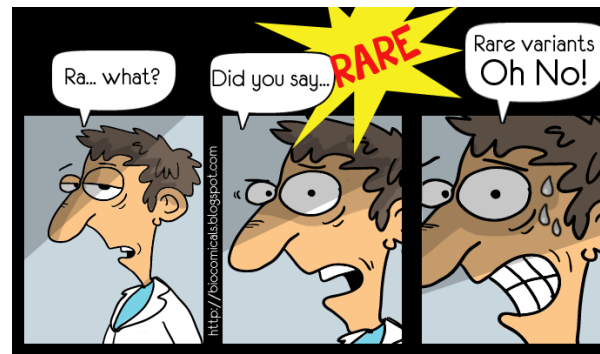


Table 2. SNPs Identified through Whole-Genome Sequencing of DNA from the Proband.*

SNP Type	No. of SNPs
Nongene	2,255,102
Gene	1,165,204
Intron	1,064,655
Promoter	60,075
3' UTR	16,350
5' UTR	3,517
Splice regulatory site	2,089
Splice site	112
Synonymous	9,337
Stop→stop	17
Nonsynonymous	9,069
Stop→gain	121
Stop→loss	27
Total	3,420,306

Lupski et al. 2010

How does one pinpoint a causal variant?

Exome

40 000 à 70 000 variants

100 000 avec les artefacts !

Une étape essentielle bioinformatique et utilisation de filtres

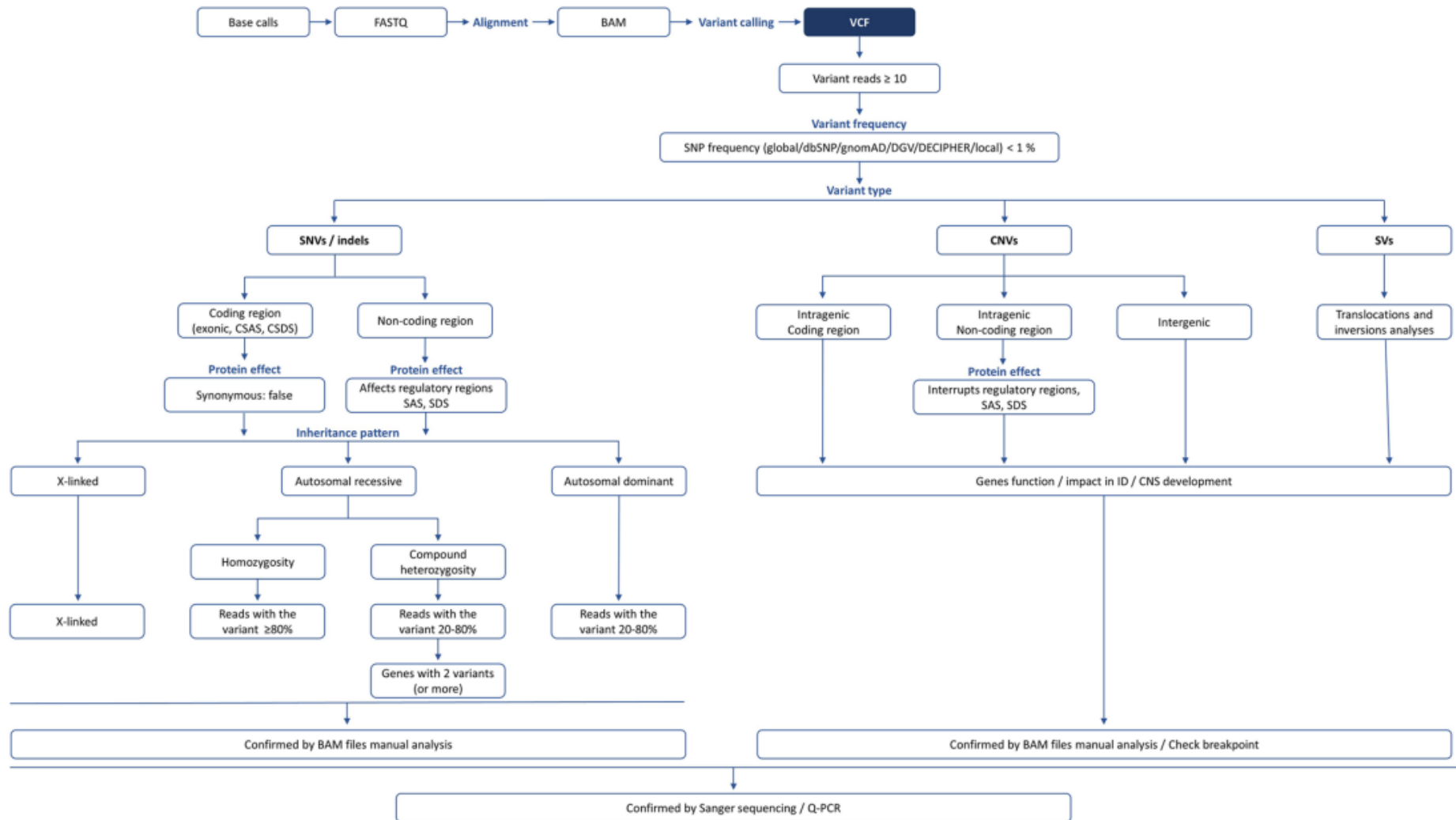


Fig. 4 Variant filtering flowchart. SNP – single nucleotide polymorphism; DGV – database of genomic variants; SNVs – single nucleotide variants; CNVs – copy number variants; SVs – structural variants; CSAS – canonical splicing acceptor site; CSDS – canonical splicing donor site; SAS – splicing acceptor site; SDS – Splicing donor site; Q-PCR – quantitative PCR

Interprétation des variants sélectionnés

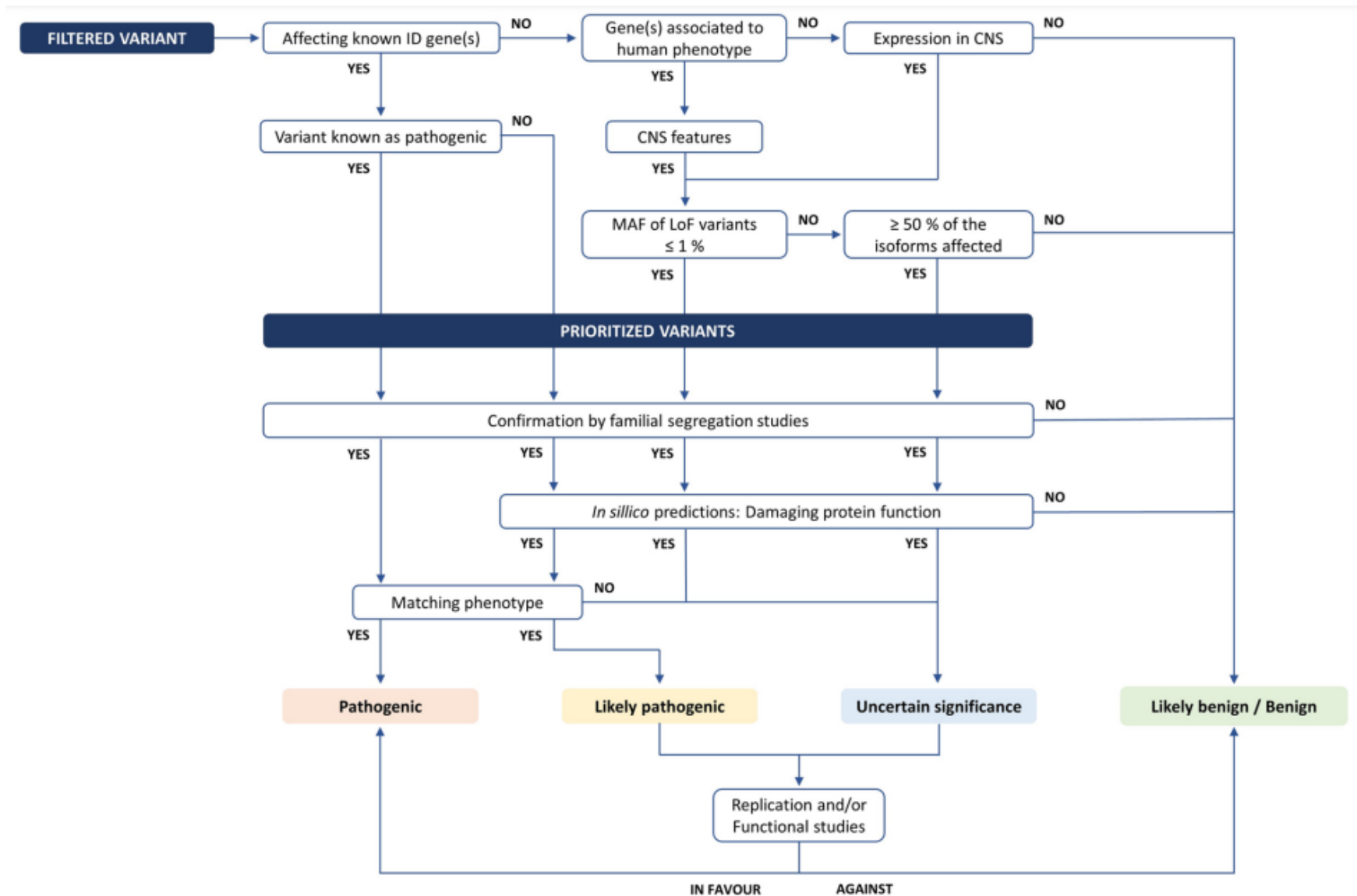


Fig. 5 Variant classification flowchart. ID – intellectual disability; CNS – central nervous system; MAF – minor allele frequency; LoF – loss of function. Adapted from Schuurs-Hoeijmakers et al. [16]

Approche EXOME dans l'identification des causes de DI

2012 NEJM

ORIGINAL ARTICLE

Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability

Joep de Ligt, M.Sc., Marjolein H. Willemsen, M.D., Bregje W.M. van Bon, M.D., Ph.D.,
Tjitske Kleefstra, M.D., Ph.D., Helger G. Yntema, Ph.D., Thessa Kroes, B.Sc.,
Anneke T. Vulto-van Silfhout, M.D., David A. Koolen, M.D., Ph.D.,
Petra de Vries, B.Sc., Christian Gilissen, Ph.D., Marisol del Rosario, B.Sc.,
Alexander Hoischen, Ph.D., Hans Scheffer, Ph.D., Bert B.A. de Vries, M.D., Ph.D.,
Han G. Brunner, M.D., Ph.D., Joris A. Veltman, Ph.D.,
and Lisenka E.L.M. Vissers, Ph.D.

100 Trio exome sequencing:

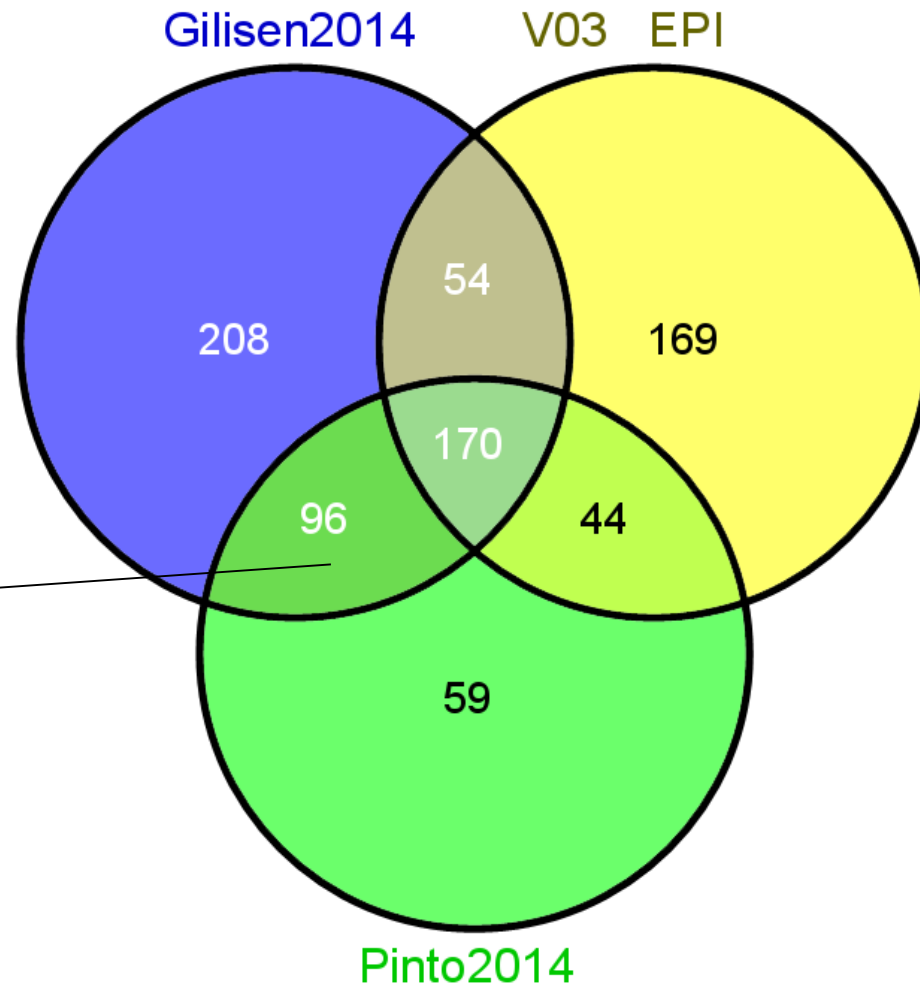
- 13 mutations de novo gène connus
- 3 nouveaux gènes DI
- 19 potentiels nvx gènes

Diagnostic 16%

Gènes communs DI listes Gilisen, 2014 et Pinto, 2014

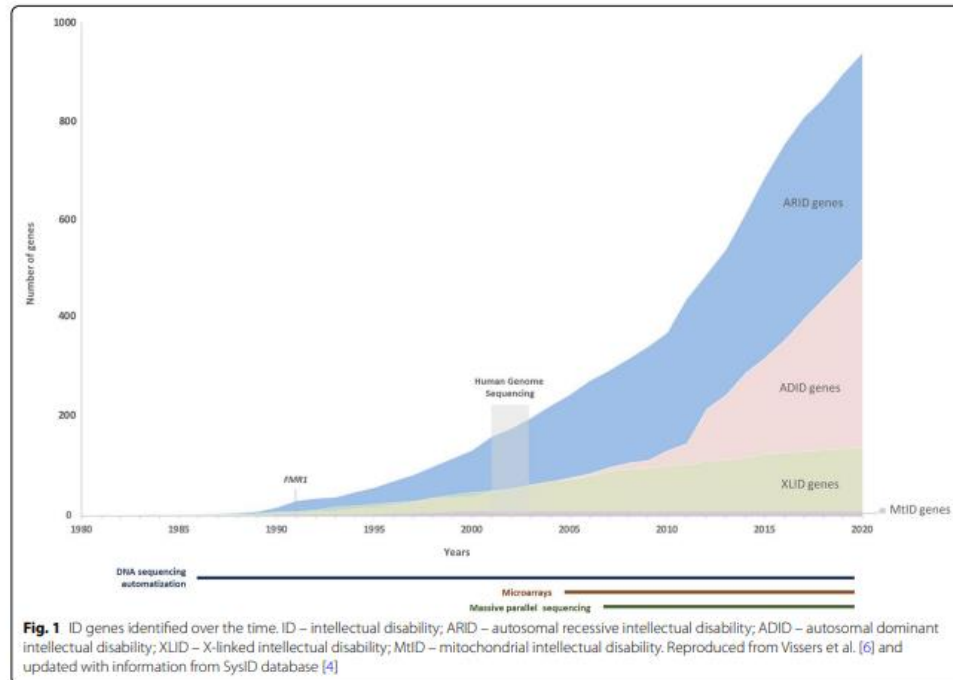


ABCD1	FANCB	POMT1
ACTB	FGFR2	POMT2
ACTG1	FH	PVRL1
ANKH	FKRP	RAB18
ARL6	FKTN	RAB3GAP1
ASXL1	GALE	RAB3GAP2
ATP6V0A2	GFAP	RAF1
BBS1	GNS	RARS2
BBS10	GPR56	RPGRIP1L
BBS12	INPP5E	SHOC2
BBS2	KAT6B	SIL1
BBS4	KCNJ11	SLC12A6
BBS5	KIAA1279	SLC4A4
BBS7	KIF11	SMAD4
BBS9	KIF7	SNAP29
BRAF	KRAS	SOS1
C7orf11	L2HGDH	SPRED1
CC2D2A	LAMA2	SRCAP
CEP290	LARGE	SUOX
CHKB	MAP2K1	TGFBR1
COG8	MAP2K2	TGFBR2
COL4A1	MCOLN1	TMEM237
CYB5R3	MGAT2	TMEM67
DLD	MKKS	TPK1
DMD	MOCS1	TRIM32
DNMT3B	MOCS2	TTC8
DPYD	MPDU1	
EFTUD2	NDP	
ELOVL4	NEU1	
ERCC2	NPHP1	
ERCC3	PAX6	
ERCC5	PCNT	
ERCC6	PGK1	
ERCC8	POLR3A	
EXOSC3	POLR3B	



LA DI HETEROGENE AU PLAN GENETIQUE

PARTICIPER SIGNIFICATIVEMENT A LA COURSE AUX NOUVEAUX GENES IMPLIQUES DANS L'ID



Maia et al. BMC Genomics (2021) 22:909

EVALUER EN TERME DE DIAGNOSTIC L'APPROCHE EXOME TRIO

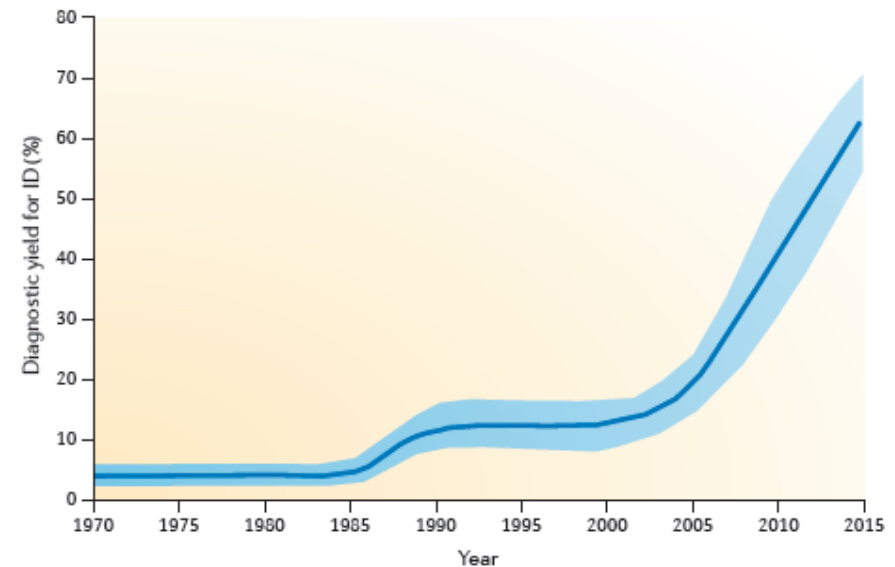


Figure 2 | Diagnostic yield for ID over time. Graphical overview of the diagnostic yield for moderate to severe intellectual disability (ID) (excluding Down syndrome, which represents 6–8% of all ID) over time. Solid line indicates the mean of published studies, and the shaded background indicates the lower and upper boundaries of reported diagnostic yields. In the 1970s, conventional karyotyping became a routine diagnostic test and provided a conclusive diagnosis in 3–6.5% of ID cases. The diagnostic yield increased by 6–10% after the introduction of both Sanger sequencing and targeted fluorescence in situ hybridization (FISH) in the 1990s¹²⁰. At the beginning of this century, genomic microarrays were introduced, increasing the diagnostic yield by another 15–23%^{25,32}. The introduction of whole-exome sequencing in 2010 and onwards added a diagnostic yield of 24–33%^{4,7,10}, and a first pilot study using whole-genome sequencing added a further 26% in 2014 (REF. 5), accumulating to an overall diagnostic yield of 55–70% for moderate to severe ID. Interestingly, a higher diagnostic yield has been observed for moderate to severe ID (IQ score <50) compared with mild ID (IQ score 50–70)^{120–122}. As an example, subtelomeric aberrations explain 0.5% of mild ID and 7.4% of moderate to severe ID. Since the introduction of genomic microarray technology, the diagnostic yield per category of ID is less well documented. This is also the case for differences in diagnostic yield between males and females.

Vissers et al, Nature reviews Genetics 2015

Les différentes stratégies des approches exomes

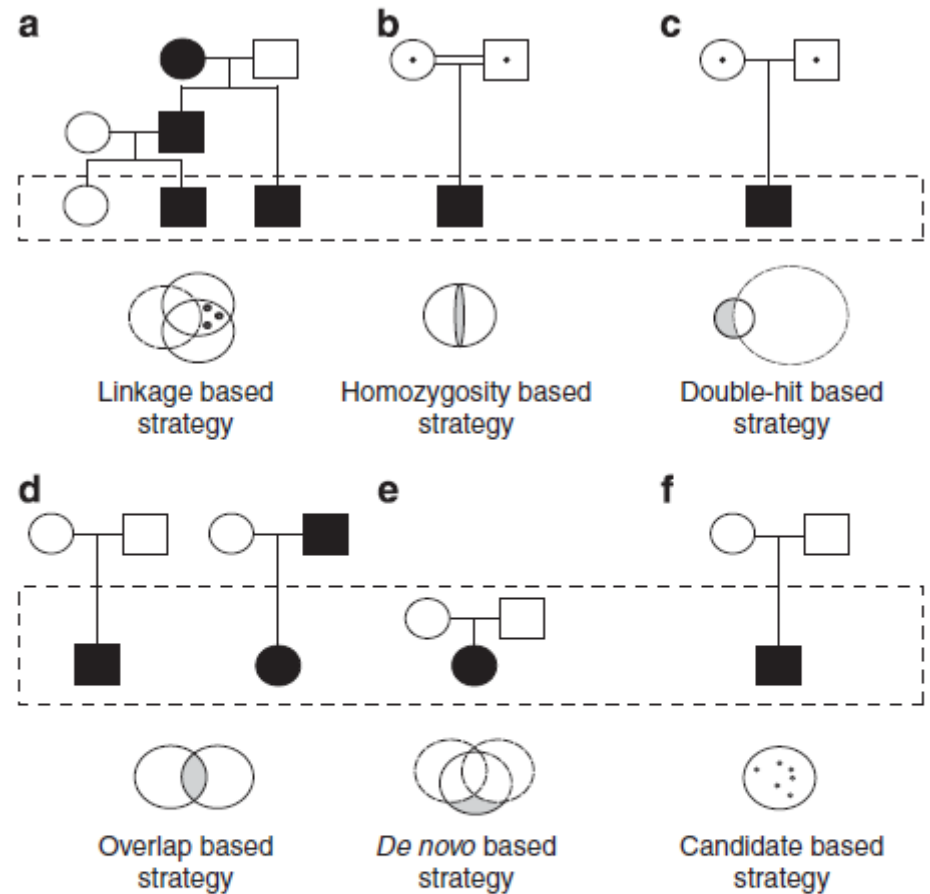


Figure 3 Disease gene identification strategies for exome sequencing. The strategies (a–f) are detailed in the main text. Pedigrees indicate the inheritance model loosely underlying the strategy; filled symbols represent affected individuals, empty symbols represent presumably healthy individuals, and carriers are depicted by a symbol with a dot. Dashed rectangle encloses individuals that are exome sequenced. Circles below each pedigree symbolize sets of genetic variants identified in the exomes. Solid circles represent variants from affected individuals, whereas dashed circles represent variants from unaffected.

HUGODIMS : Objectif de l'étude

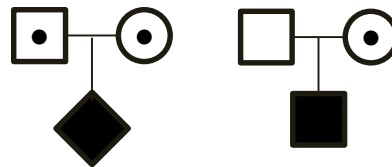
- **Identifier les causes moléculaires** de déficience intellectuelle modérée ou sévère par **séquençage d'exome** selon une approche par **trios**

- Hypothèses

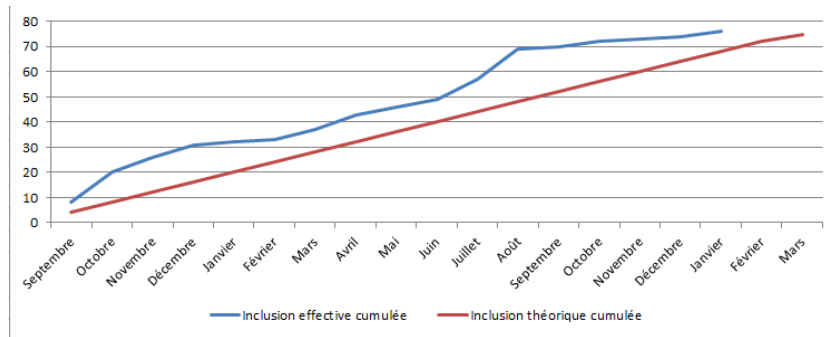
1. Mutation *de novo*



2. Transmission **récessive autosomique ou liée à l'X** pour les patients sans mutation *de novo* identifiée



HUGODIMS : Analyse exome Trios DI



76 patients inclus, 70 analysés, 67% de diagnostic

Recherche - innovation

Identification des causes génétiques de déficience intellectuelle

Un gigantesque bond en avant

Coordonné par le service de génétique médicale, le projet Hugodims a permis une avancée considérable dans l'identification des facteurs génétiques responsables de déficience intellectuelle.

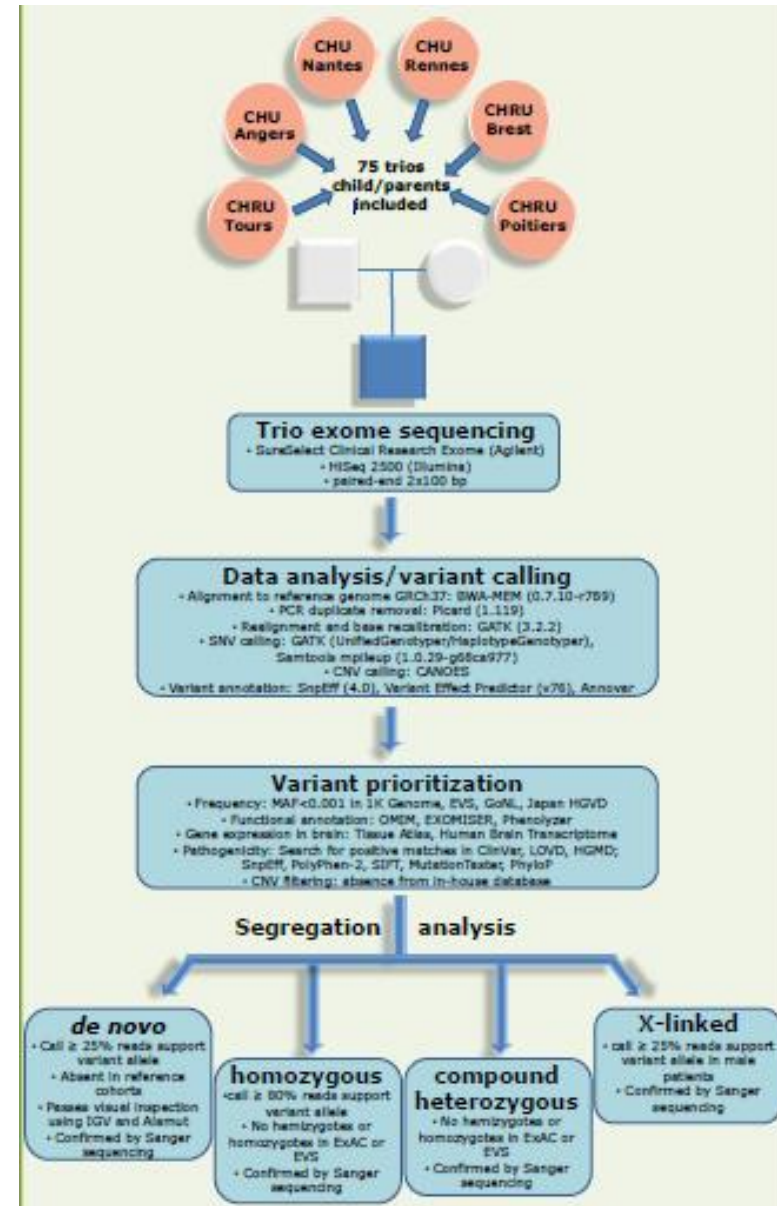
La déficience intellectuelle (DI) est une pathologie fréquente (environ 2% de la population générale, soit 1,3 million de personnes en France) souvent responsable d'un handicap sévère. Les formes les plus sévères de DI ont fréquemment une origine génétique difficile à déterminer en raison du très grand nombre de gènes en cause.

Le service de génétique médicale du CHU de Nantes (P^r Stéphane Béziau, D^r Bertrand Isidor) coordonne le projet Hugodims, cofinancé par un PHRC interrégional et l'ARS Poitou-Charentes, qui a pour but d'identifier les causes génétiques de DI chez 75 enfants recrutés dans six CHU (Angers, Brest, Nantes, Poitiers, Rennes et Tours). Le projet repose sur une approche de séquençage haut-débit réalisée sur la plateforme Biogenouest (responsable : R. Redon) de 25000 gènes chez les enfants. La méthode a consisté à séquençer également les 25000 gènes présents chez les parents pour identifier plus facilement

la mutation responsable car, dans la majorité des cas, l'anomalie n'est pas héritée. Ce projet a permis d'identifier la mutation en cause pour 45% des patients atteints de DI sévère, parfois dans des gènes connus, mais aussi de nouveaux gènes comme le gène CHAMP1*. Ces résultats permettent de donner un conseil génétique fiable aux parents et d'éventuellement proposer un diagnostic prénatal ou préimplantatoire. Cette étude a également révélé de nouveaux mécanismes responsables de ces maladies.

Cette approche réalisée pour la première fois en France démontre sa faisabilité et permet de passer de 10-12% de causes génétiques identifiées par les techniques classiques à plus de 50%. Le transfert en routine du séquençage haut débit reste cependant lié à son financement et aux capacités de réalisation des plates-formes actuelles.

*[Isidor et al, Hum Mut 37:354-358, 2016]



Le séquenceur utilisé pour réaliser les analyses.

Une pathologie fréquente

La déficience intellectuelle touche 2% de la population, parmi lesquels 85% présentent une déficience intellectuelle légère, 10% une déficience moyenne, 3 à 4% une déficience grave et 1 à 2% une déficience profonde.

Analyse bio-informatique: pipeline

Fichier de séquences

Read 1

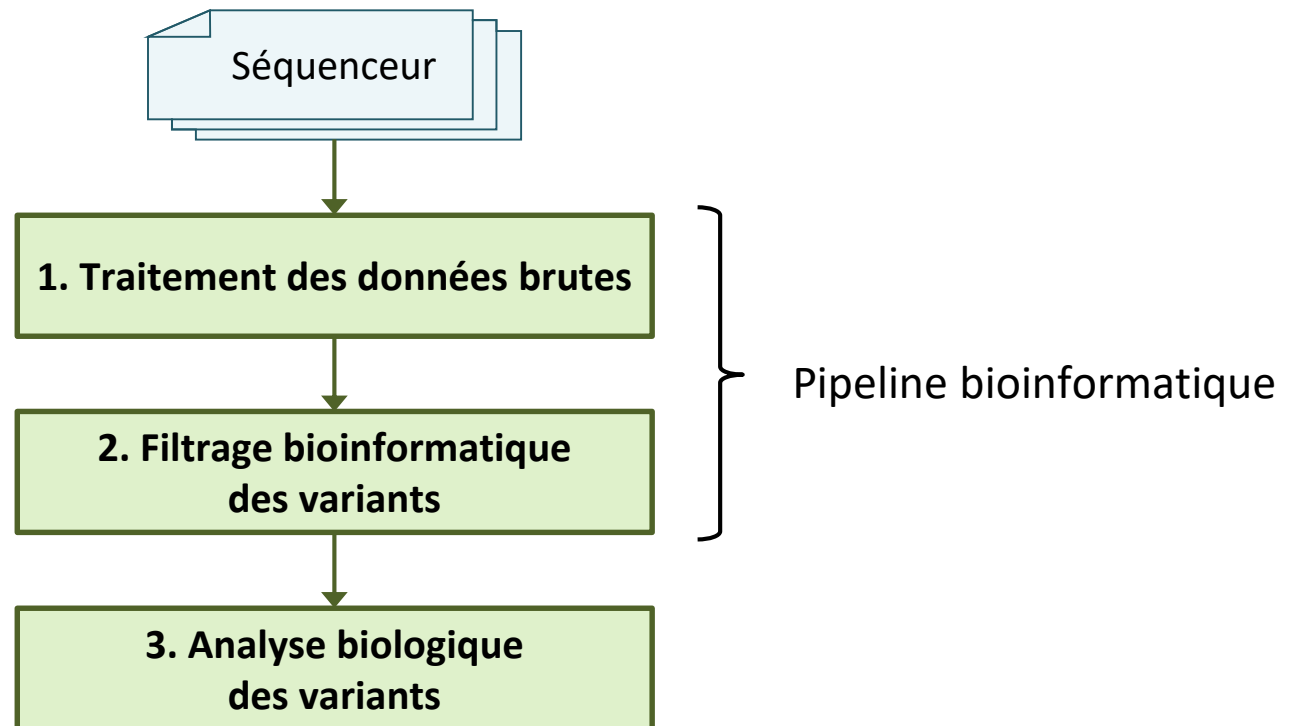
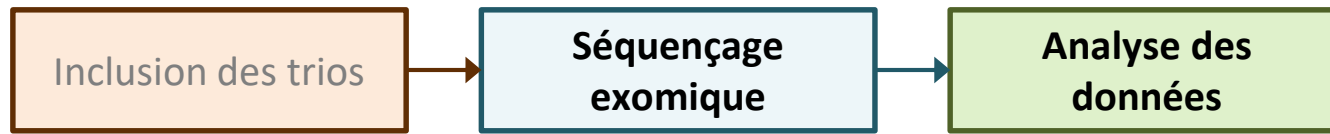
```
@M01626:70:000000000-A6E12:1:1101:15300:1737 1:N:0:5
TTCAATACAAGAGCCCTTACTTCCTTTTCTATACCTTTTCCGTAATTTCCATAATCGCCGTAAGTAGCAACAGATTCATTAACCTTTATTAAGATTAATACCTAAGAACTTT
GAACCACTTTGTTCCATCTGTTCTTTTGCTTTTTCAACATAATTACGTTTTATTCTGCCTGCTTGGGTTACTAAAATAAAACCATCCCAACCATTAGCGCTTATTGCGGCATCA
ACAACATAACCAATCGTTTGAGTATCCATGTTAATTTAAACATCGGACATCCACCCCTTCCCCCTCCC
+
>AA11D3BB1111AFEAAF1AAFEAFEGGHCF3D3B2DFGGHGF0B0/ADBFF2F21F2//A/A//0D22BA1B000AB@1DF2DFGGG2@D2@112BB1F2FCF11011FFGF
121B?0?BFG1FGFF2BBB1BFFGGFHF>GGHFB22F1<D1BG2BA<GFF2GGFH2@<G1@CG1A/AF/1@1111?11F1D..>>0.1>.>.<DD0/<-<<.=<0::->-:/0
```

x env. 30 millions

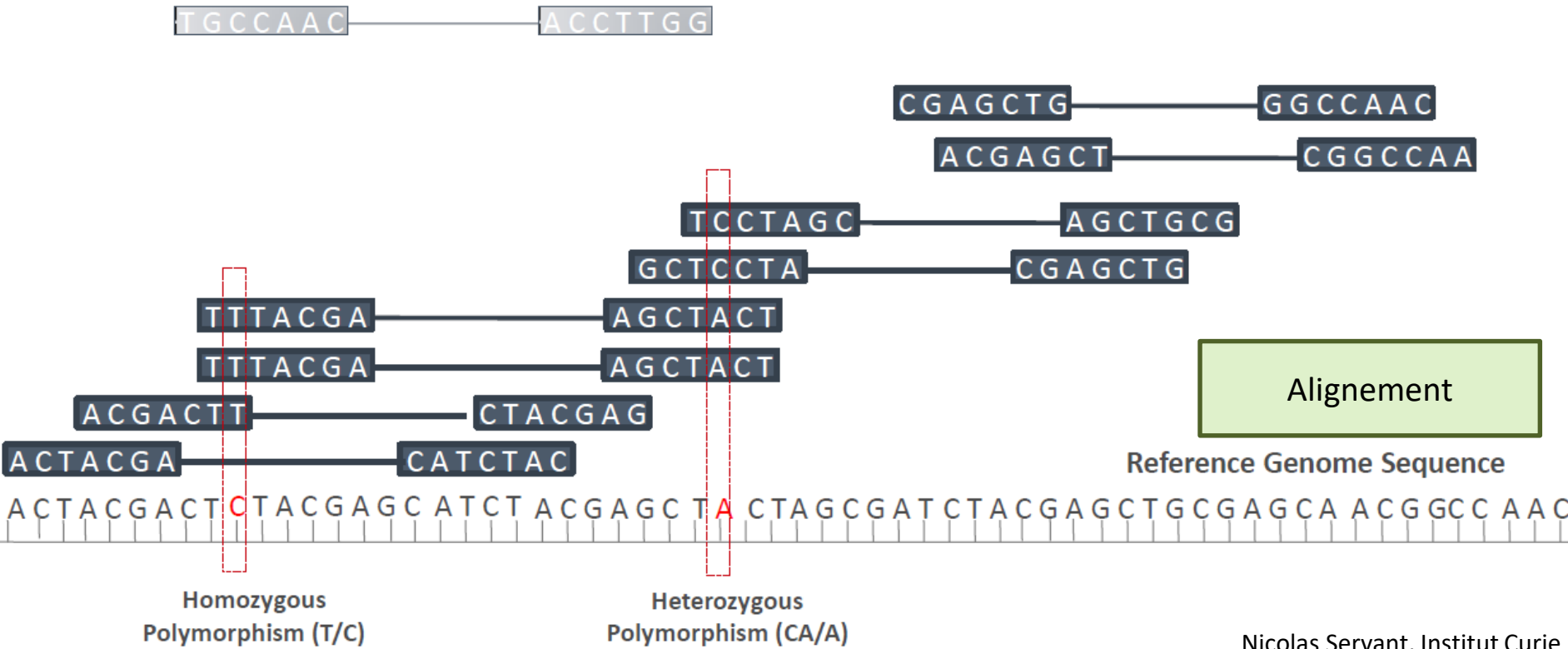
Read 2

```
@M01626:70:000000000-A6E12:1:1101:14394:1725 1:N:0:5
GCACGATTACTTGCTCTACGCTCTTTACGACGCTTTTCATCAACTTTCCATTGAATTTTTCTTGTAACCTGGTTTTATTTTTTCTTTTTCTTTTTCACAAGTCCAATCATT
TCTGTATCTAATTTTGTAGGACTTTTCACGGTTATTACGACGATCACGGTCGTATGTATCTTGAAATTCACCGTTT
+
1>1>11>>1BDD1AFE1A11AAAFG3B00A00AAABF2FF21AABBA2AD111DFGDEAEADA1D12DFE00BB0F2BFFGHGECFFGFGGHHHF2>210B>>11BB1BF
```

x env. 30 millions



1. Traitement des données brutes



Alignement

Variant calling

2. Filtrage bioinformatique des variants

Variants identifiés

135 000

Variants **codants** non synonymes et **d'épissage**

16 000

Variants **rare**s

De novo < 0,1 %

200

Variants absents
des autres **parents**

9

Récessif < 1 %

130

Lié à l'**X** < 1 %

15

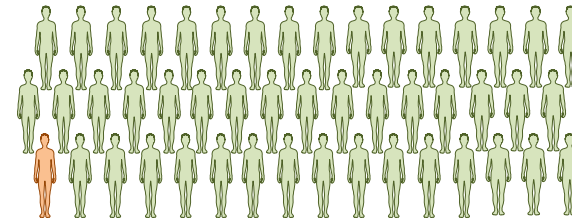
Validation des
variants

Analyse de la
pathogénicité

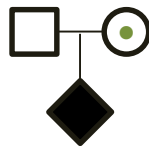
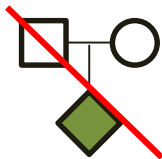
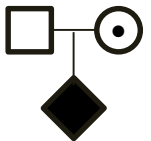
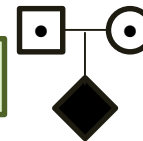
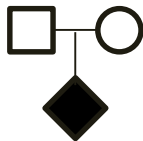
Variant 1 : chromosome 4, position 524, référence C, alternative - (délétion)
Variant 2 : chromosome 4, position 541, référence A, alternative TA (insertion)
Variant 3 : chromosome 4, position 527, référence A, alternative T
Variant 4 : chromosome 4, position 519, référence A, alternative - (délétion)
Variant 5 : chromosome 4, position 523, référence G, alternative T

Exon

TAACATCTGAGT GAT AGTCGCCATAAATTG
GCTGAGT GATCGGTA GGCTGAGTCGCCATA
TGATCGGTAACATCGCCATAATTGGCTGAGTCG
CGGTAACATCGCCATAATTGGCTG
ACATCGCCATAATT



62 000
exomes



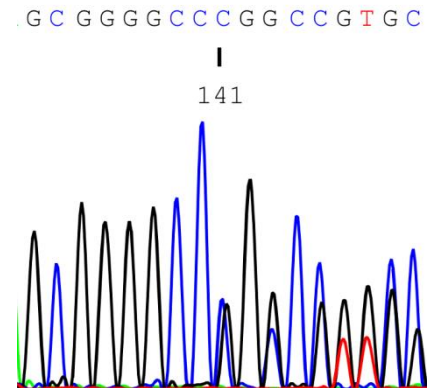
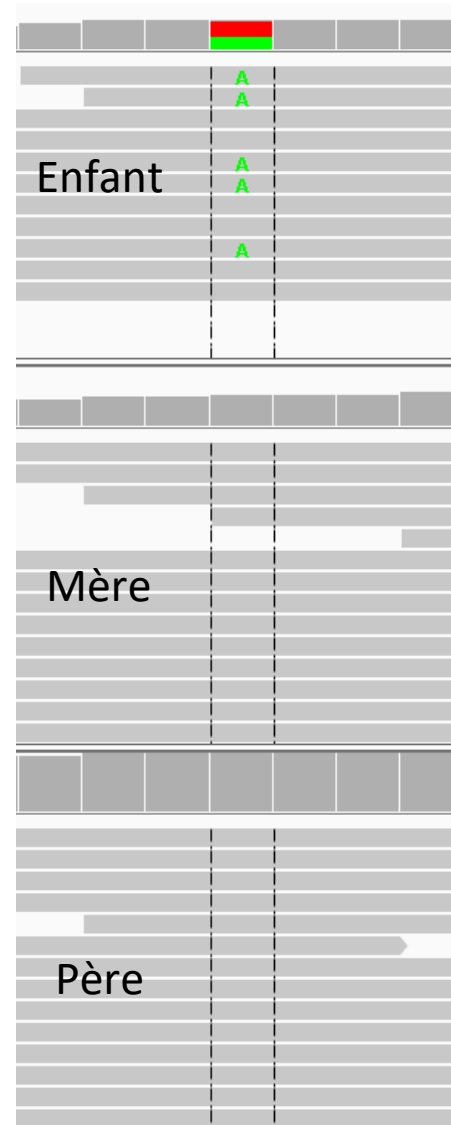
3. Analyse bioinformatique des variants

Validation IGV
et / ou Sanger

1 500 gènes connus de DI

Outils de prédiction *in silico*
Expression tissulaire
Littérature...

Phénotype



Bases de données

- **1000 genomes**, différentes origines
- **Exome Sequencing Project**: fréquence des variants chez 6500 individus issu sain ou atteints de maladies « complexes »: cardiovasculaire ou pulmonaires.
- **Exome Aggregation Consortium (EXAC)**:
 - 60706 individus
 - Divers projets: Bulgarian Trios, Finland-United States Investigation of NIDDM Genetics (FUSION), Inflammatory Bowel Disease, METabolic Syndrome In Men (METSIM), Myocardial Infarction Genetics Consortium, Swedish Schizophrenia & Bipolar Studies, Schizophrenia Trios from Taiwan, The Cancer Genome Atlas (TCGA), T2D-GENES, ESP, 1000G...
 - Individus avec affections pédiatriques sévères éliminés
- **GnomAD**

Prédictions de pathogénicité

- Scores prenant en compte:
 - SIFT: base sur la conservation de l'acide aminé chez les orthologues (sur non-synonymes connus: 69% délétères)
 - Polyphen-2: alignement de séquence + données de structure (accessibilité protéique, distance physico-chimique des aa...)
 - ...

#Chr	Start	End	Ref	Alt	SIFT_score	SIFT_pred	Polyphen2_H VAR_score	Polyphen2_H VAR_pred	LRT_score	LRT_pred	MutationTaster _score	MutationTaster _pred
chr17	79094294	79094294	G	A	0.73	T	0.031	B	0.005	N	1.000	N
chrX	74334634	74334634	C	G	0.26	T	0.117	B	0.100	N	1.000	N
chr3	38167338	38167338	G	C	0.07	T	0.998	D	0.000	D	1.000	D
chr5	80626334	80626334	C	G	0.02	D	0.129	B	0.000	D	1.000	D
chr2	111806832	111806832	T	A	0.92	T	.	.	0.000	D	1.000	D
chr16	20429546	20429546	C	G	0	D	0.981	D	0.000	D	1.000	N
chr1	120438351	120438351	C	A	0.27	T	0.88	P	0.107	N	1.000	N
chr10	135083881	135083881	G	A
chr19	1507270	1507270	C	T	0	D	0.994	D	0.001	D	1.000	D



Orthologues (Source: Ensembl) i

Homme	S	E	E	G	L	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Macaque	i	E	E	G	L	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Rat	S	E	E	G	L	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Toupaille de Belanger		E	E	G	L	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Chien	S	E	E	G	L	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Vache	S	G	E	G	G	A	K	R	P	T	R	F	L	H	L	S	H
Opossum		E	E	G	L	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Xénope	S	E	E	G	M	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Tétraodon		E	E	G	M	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F
Poisson zèbre		E	E	G	M	L	K	R	K	Q	R	R	Y	R	T	T	F



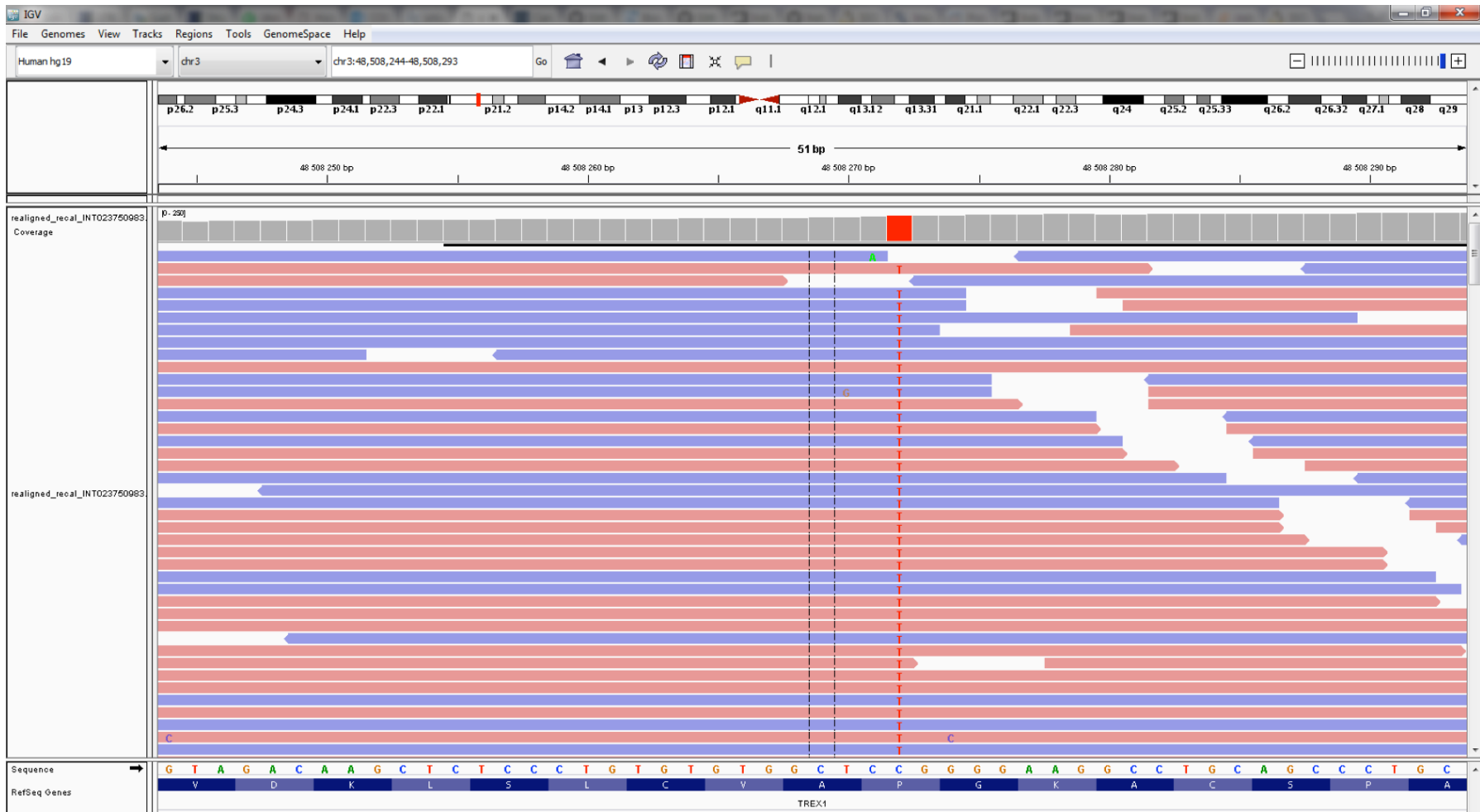
Exemple 1

- Garçon: unique enfant d'un couple non apparenté, origine arménienne
- Encéphalopathie
- Retard staturopondéral
- PC: -6 DS => microcéphalie ++
- IRM cérébrale: N à 9 mois

⇒ ***Examens génétiques:***

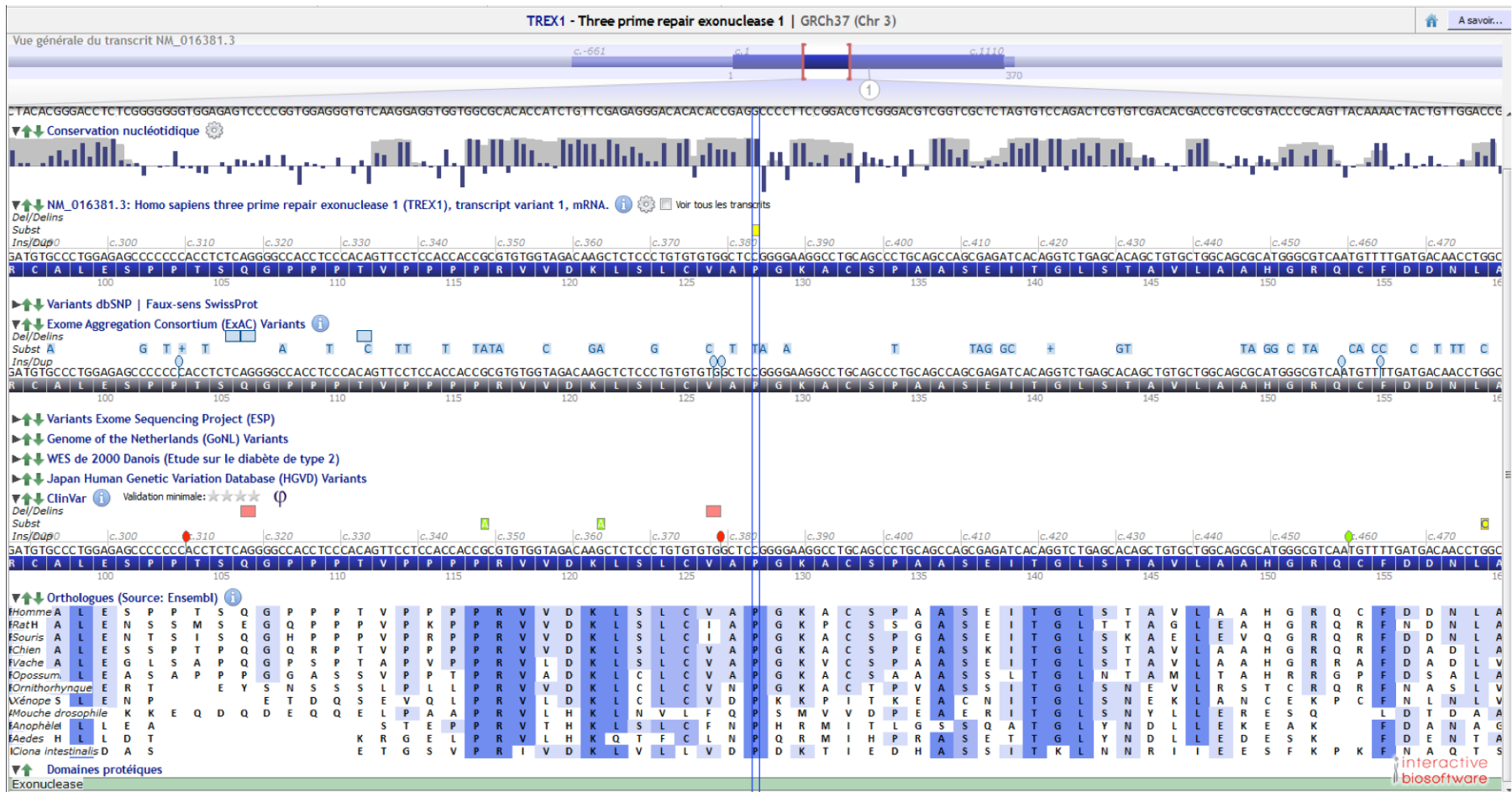
- CGH array (puce à ADN): N
- Exome

Etude d'exome



TREX1 : chr3 exon1 c.383C>T p.P128L

Etude d'exome



TREX1 : chr3 exon1 c.383C>T p.P128L , homozygote

***TREX1*: syndrome d'Aicardi-Goutières**

- Interféronopathie

	Syndrome d'Aicardi-Goutières	Patient
Encéphalopathie	+	+
Epilepsie	+ (50%)	-
Engelures des extrémités	+ (40%)	-
Episodes fébriles aseptiques	+	-
Microcéphalie	+	+
HSMG	+	-
Hypothyroïdie	+	+
Thrombocytopénie	+	-
Elévation des transaminases	+	-
Calcifications des noyaux gris centraux, leucodystrophie (TDM, IRM)	+	-?

Variant causal pour ce patient?

Pathogénicité du variant?

- Variant rare: 2/121 068 (ExAc), non publié
- Logiciels bioinfo (SIFT, POLYPHEN): pathogène
- Avis Yanick Crow (réfèrent Necker): mutation déjà identifiée en Espagne

	Syndrome d'Aicardi-Goutières	Patient
Encéphalopathie	+	+
Epilepsie	+ (50%)	-
Engelures des extrémités	+ (40%)	-
Episodes fébriles aseptiques	+	+ (arthrite des genoux)
Microcéphalie	+	+
HSMG	+	-
Hypothyroïdie	+	+
Thrombocytopénie	+	-
Elévation des transaminases	+	+ (hépatite aiguë)
Calcifications des noyaux gris centraux, leucodystrophie (TDM, IRM)	+	-?
Signature interféron	+	+

=> Variation confirmée dans gène connu de DI / Tableau clinique concordant

Diagnostic confirmé

- Surveillance et PEC médicales adaptées
- Conseil génétique: autosomique récessif (risque de récurrence = 25%)

Diagnostic prénatal

Biopsie de trophoblaste



12 SA

Diagnostic pré-implantatoire

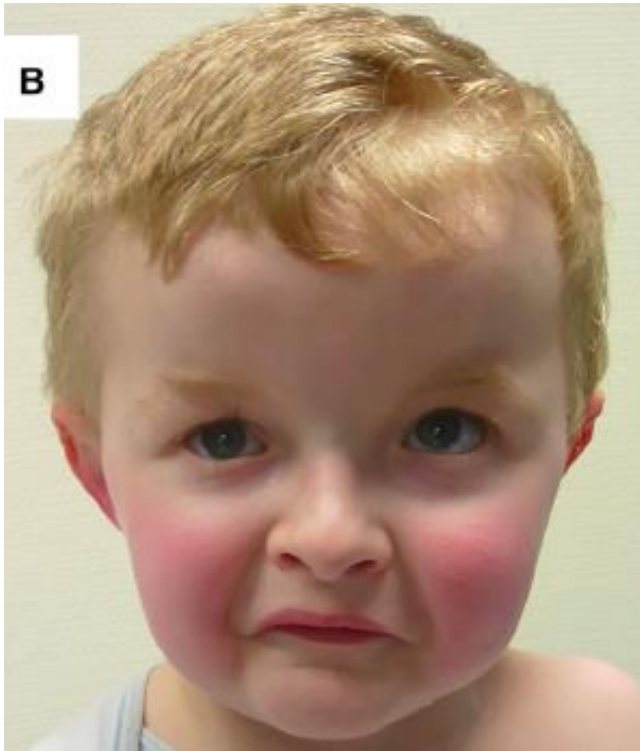
FIV (ICSI)



Recherche de la mutation dans *TREX1*

Interruption Médicale de Grossesse?

Transfert d'un embryon sain



Exemple 2

DI

Symptômes autres que DI :

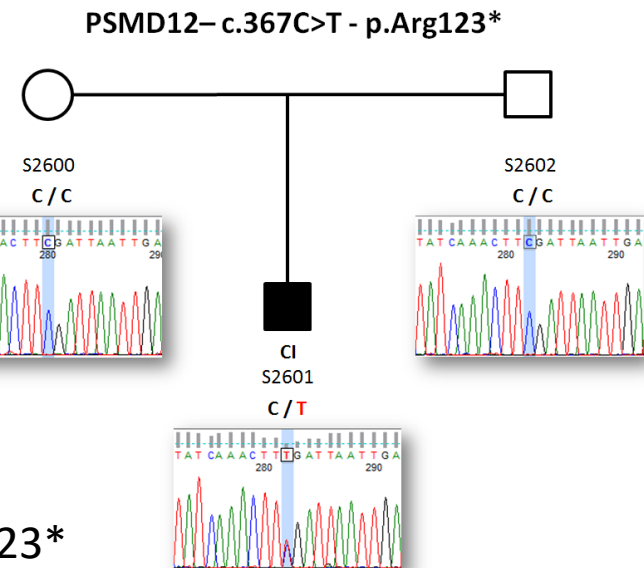
Surdité

Malformations rénales

Agénésie du pouce

Hypospade

Atteinte ophtalmo (hypermétropie, ERG anormal)

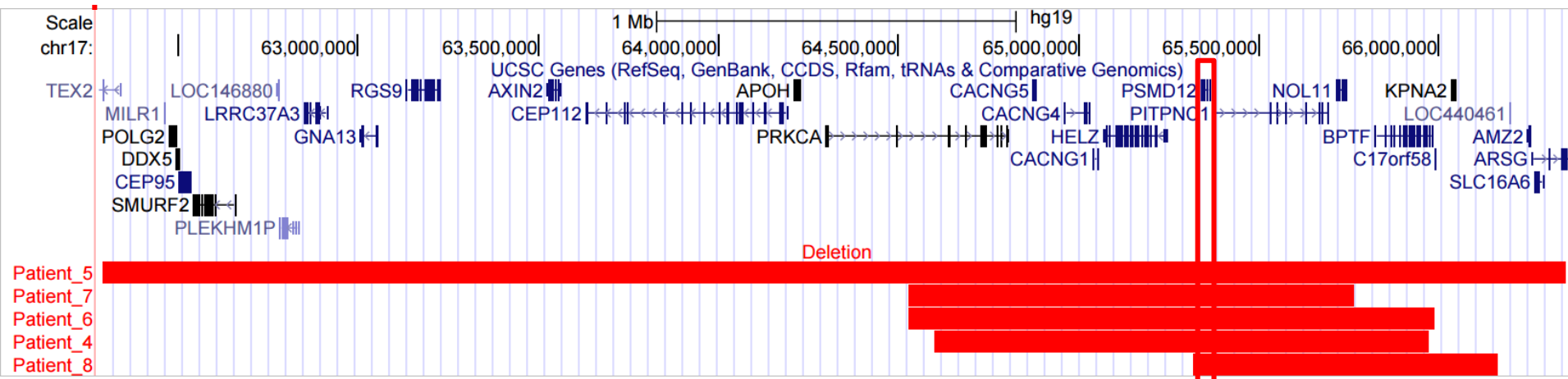
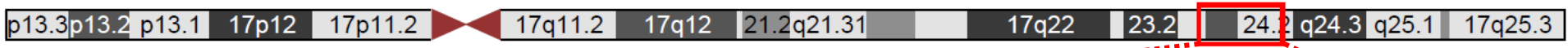


PSMD12

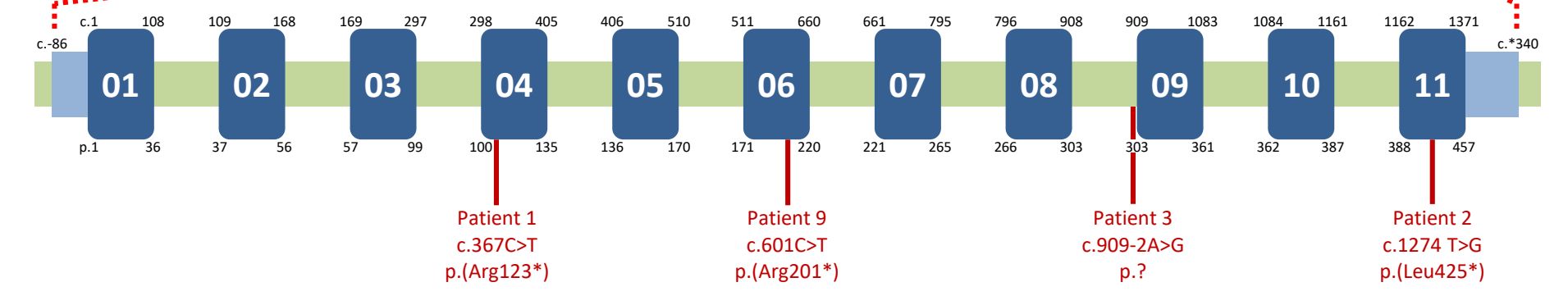
c.367C>T p.Arg123*

Gène non publié en DI

chr17 (q23.3-q24.2)



NM_002816.3_PSMD12



Identification of a *PSMD12*-associated NDD



P. Stankiewicz

• International collaboration

❖ HUGODIMS ↔ BCM, SSC, GeneDx...

❖ 10 patients w/ syndromic ID

✓ ID

③

Congenital abnormalities (kidney, heart)

①

✓ Microcephaly

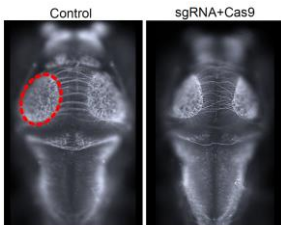
②

Retrognathism

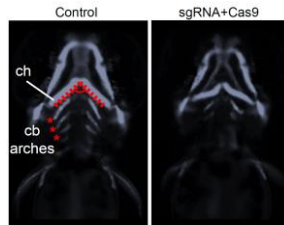
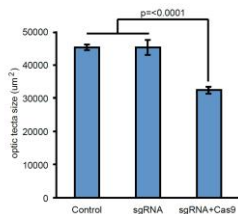
❖ Aggregation of *de novo* truncating SNV and CNV deletions

• Zebrafish modeling:

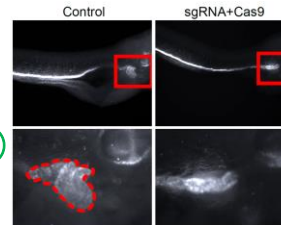
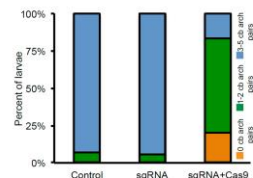
❖ C. Golzio (Fr) / N. Katsanis (USA)



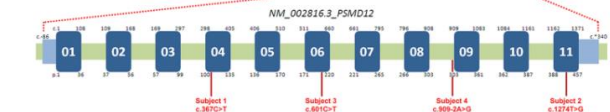
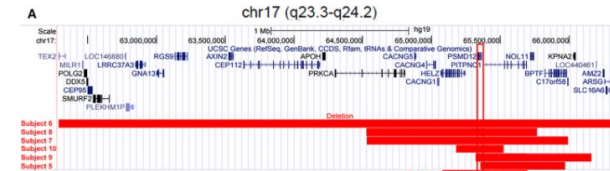
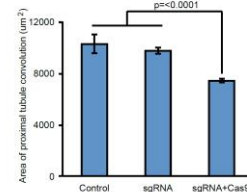
①



②

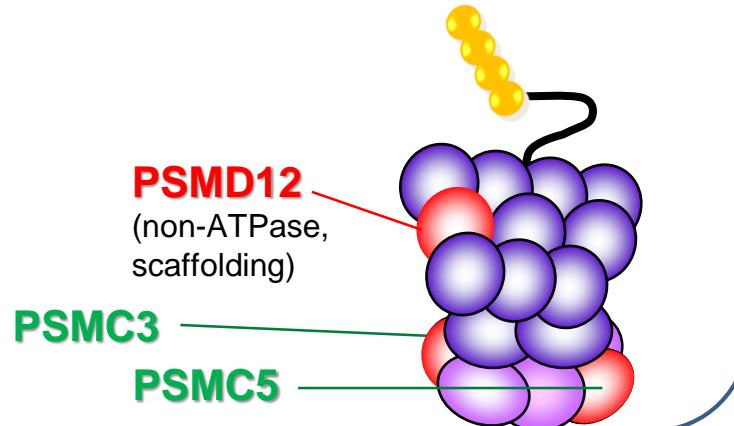


③

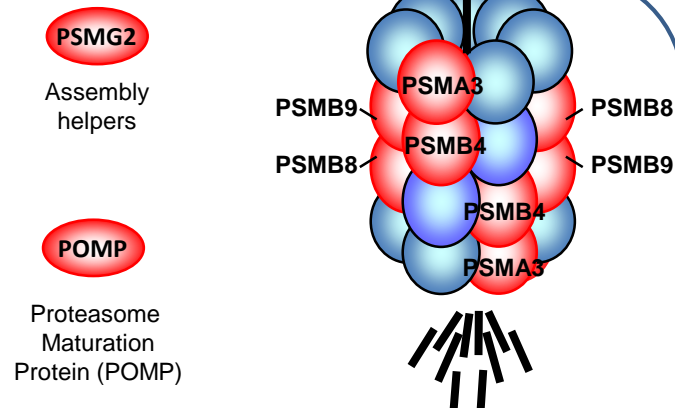


Stankiewicz-Isidor syndrome (STISS)
MIM : 617516

⇒ Etude fonctionnelle sur le dysfonctionnement du protéasome lié à des Mutations dans PSM12 et mutations d'autres gènes du protéasome

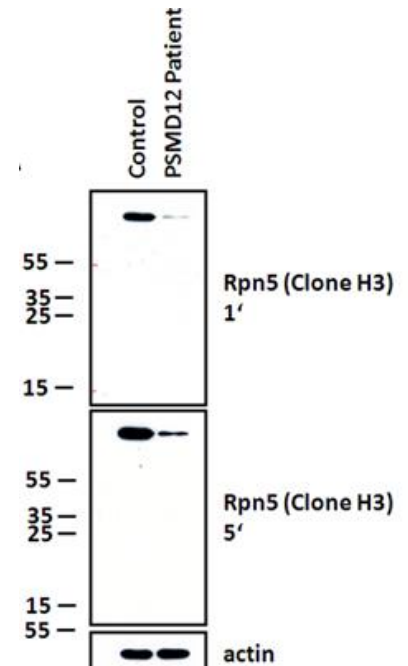
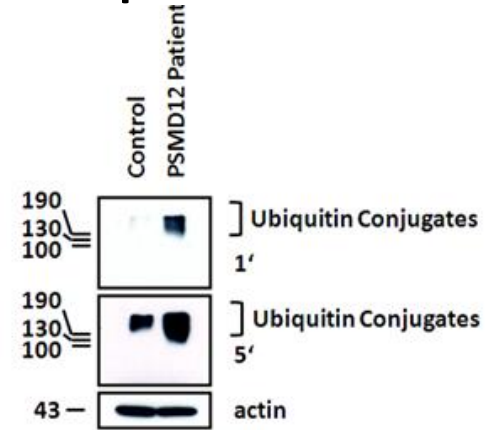


19S
regulatory
particle

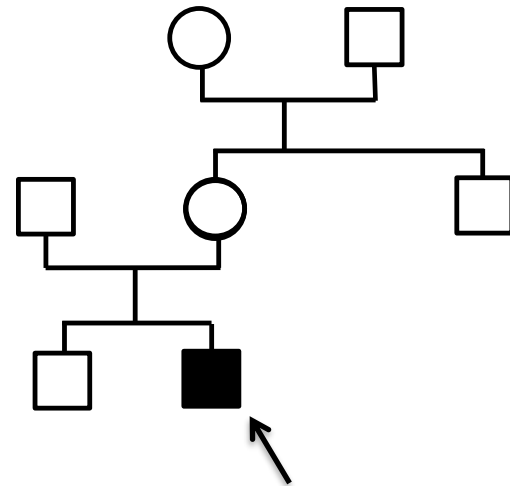


20S
proteolytic
core
particle

20S variants induce an AR auto-inflammatory phenotype (CANDLE/PRAAS)



Exemple 3



Clarté de la nuque= 6,1 mm (46,XY)

Marche 19-20 mois

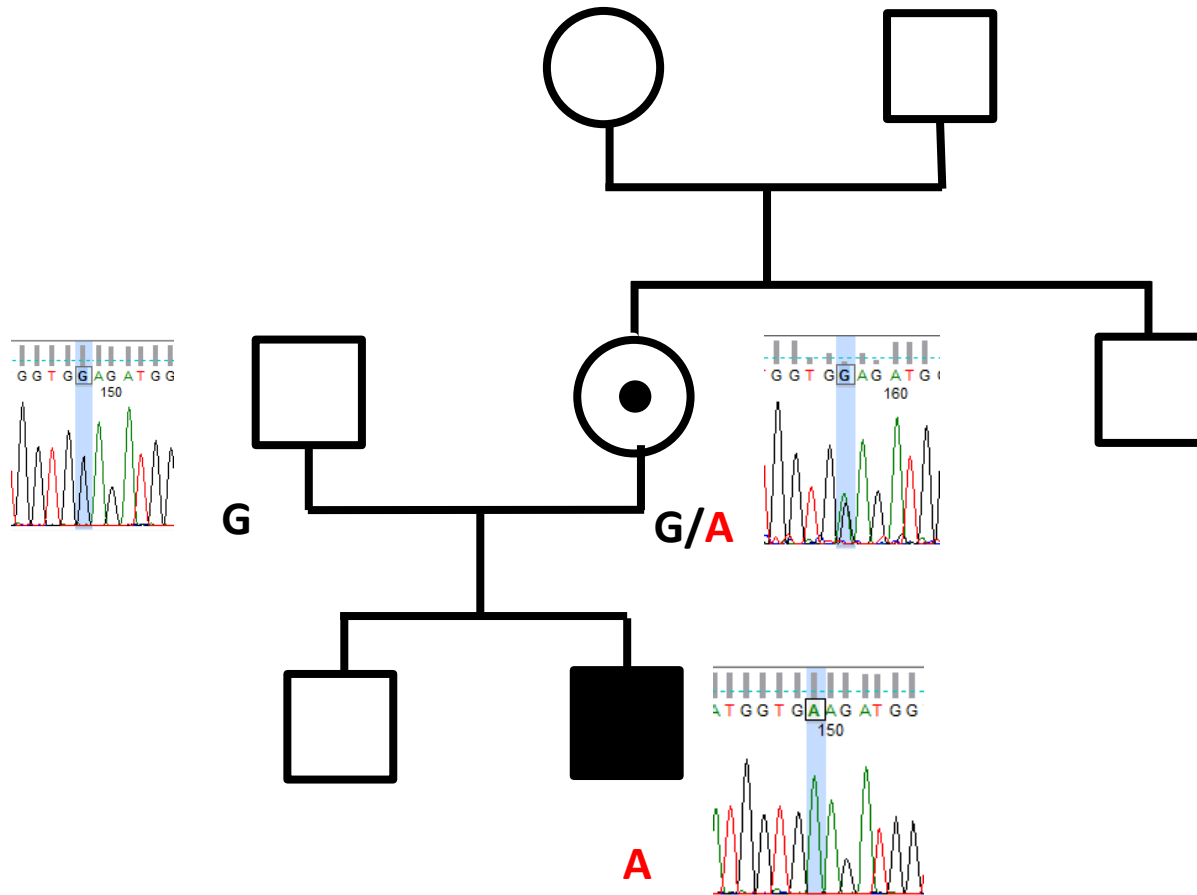
Langage: 1ers mots à 34 mois

Stéréotypies, colères

Projet de recherche HUGODIMS:
exome en trio

USP9X: c.5669G>A; p.Gly1890Glu

Variant hérité de la mère, chr. X



REPORT

Mutations in *USP9X* Are Associated with X-Linked Intellectual Disability and Disrupt Neuronal Cell Migration and Growth

Claire C. Homan,¹ Raman Kumar,^{2,3,4} Lam Son Nguyen,^{4,12} Eric Haan,^{4,5} F. Lucy Raymond,⁶ Fatima Abidi,⁷ Martine Raynaud,^{8,9} Charles E. Schwartz,⁷ Stephen A. Wood,¹⁰ Jozef Gecz,^{1,2,4,11,*} and Lachlan A. Jolly^{4,11,*}

Table 1. Summary of Key Clinical Features of Affected Individuals

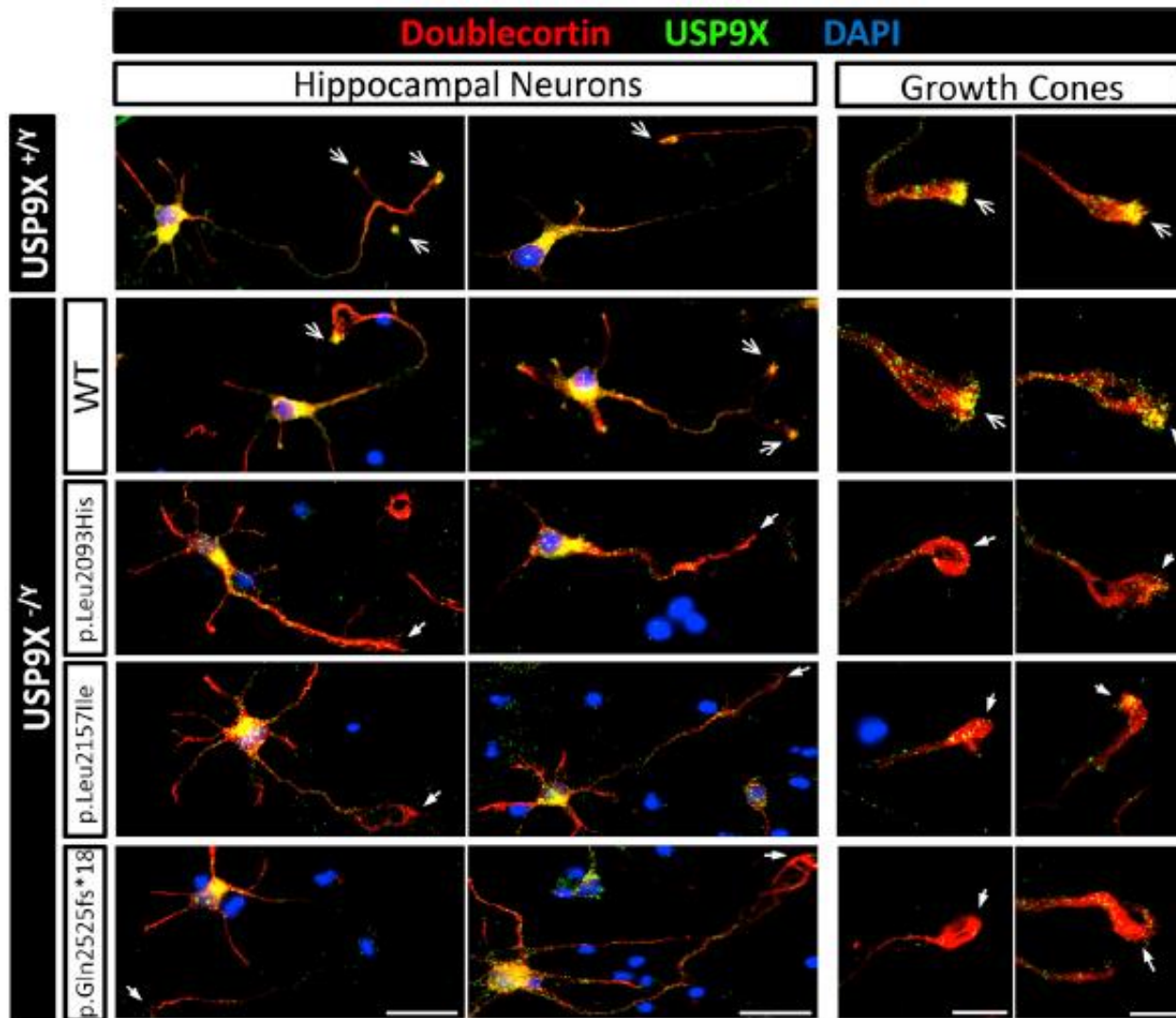
	Family 1	Family 2	Family 3
USP9X mutation	c.6278T>A (p.Leu2093His)	c.6469C>A (p.Leu2157Ile)	c.7574delA (p.Gln2525fs*18)
Number of affected males	1	1	3
Neurological Features			
ID (severity)	1/1 (mild)	1/1 (mild)	3/3 (mild-moderate)
Autism	0/1	1/1	1/3
Aggression	1/1	0/1	0/3
Obsessiveness	0/1	1/1	1/3
Hypotonia	1/1	1/1	3/3
Dysmorphic Features			
Craniofacial	relative macrocephaly and prominent forehead	0/1	0/3
Digital	broad thumbs and great toes	broad thumbs and curling toenails	0/3

Growth

	age 21 months: Ht: 78.5 cm (3%) Wt: 11.4 kg (25%) HC: 50.5 cm (95%)	age 12 months: Ht: 70.4 cm (3%) Wt: 7.87 Kg (<3%) HC: 44.7 cm (3%–25%)	ND
		age 9 years: Ht: 124 cm (5%) Wt: 24.1 kg (10%)	
Other	hyperextensible joints and skin, constipation	IUGR, ectopic left kidney, tracheomalacia, gastroesophageal reflux, upper airway congestion, hypospadias, retractable left testis	ND

Abbreviations are as follows: Ht, height; Wt, weight; HC, head circumference; IUGR, intrauterine growth restriction; %, percentile; ND, no data.

=> Rôle dans la migration et la croissance neuronale



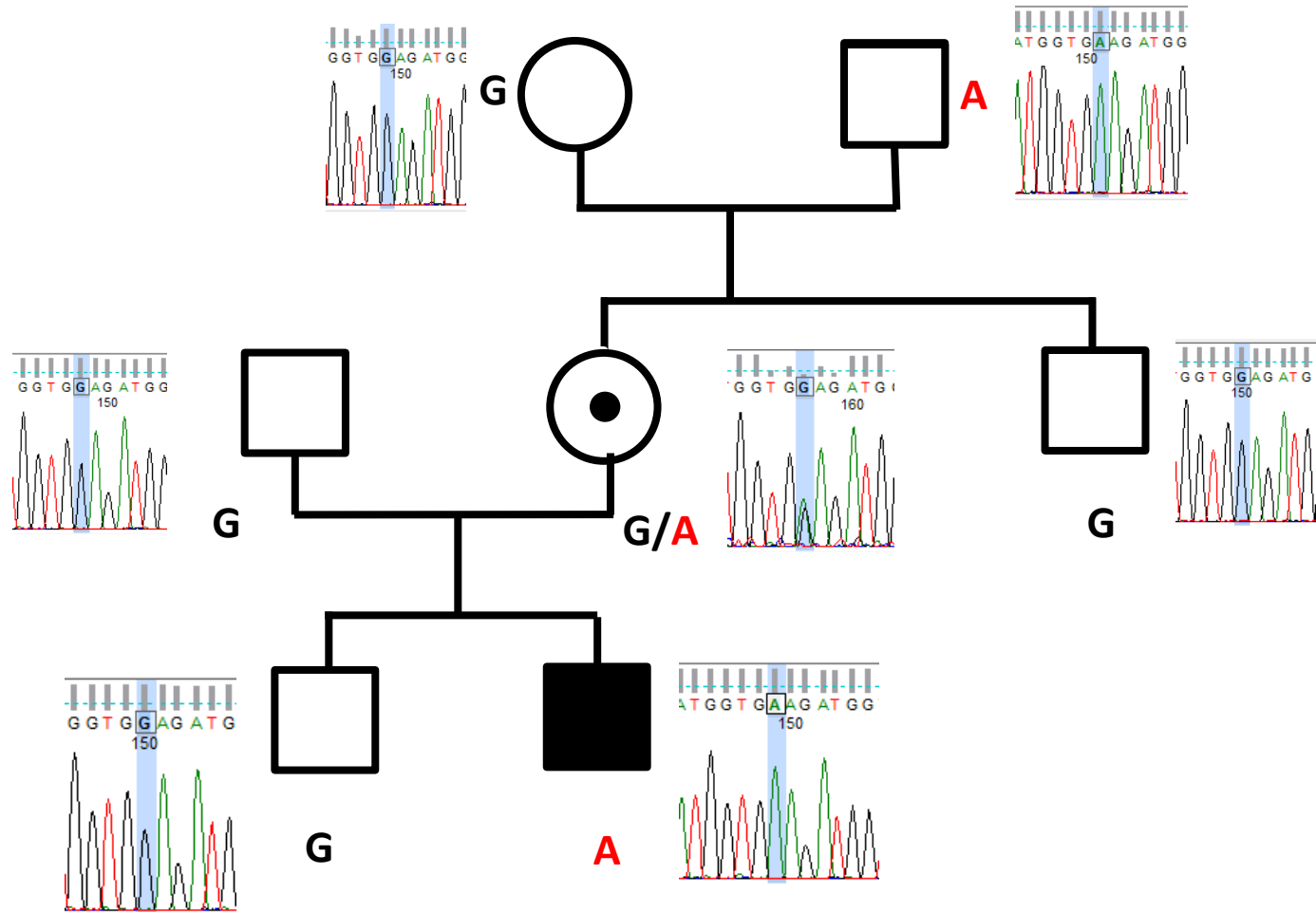
Diminution de la co-localisation de USP9X et DCX au niveau du cône de croissance de l'axone

Pathogénicité du variant?

- **USP9X, c. 5669G>A, p.Gly1890Glu**
- Nature de la variation?
- Que proposez-vous?

USP9X: c.5669G>A; p.Gly1890Glu

Variant hérité de la mère, chr. X

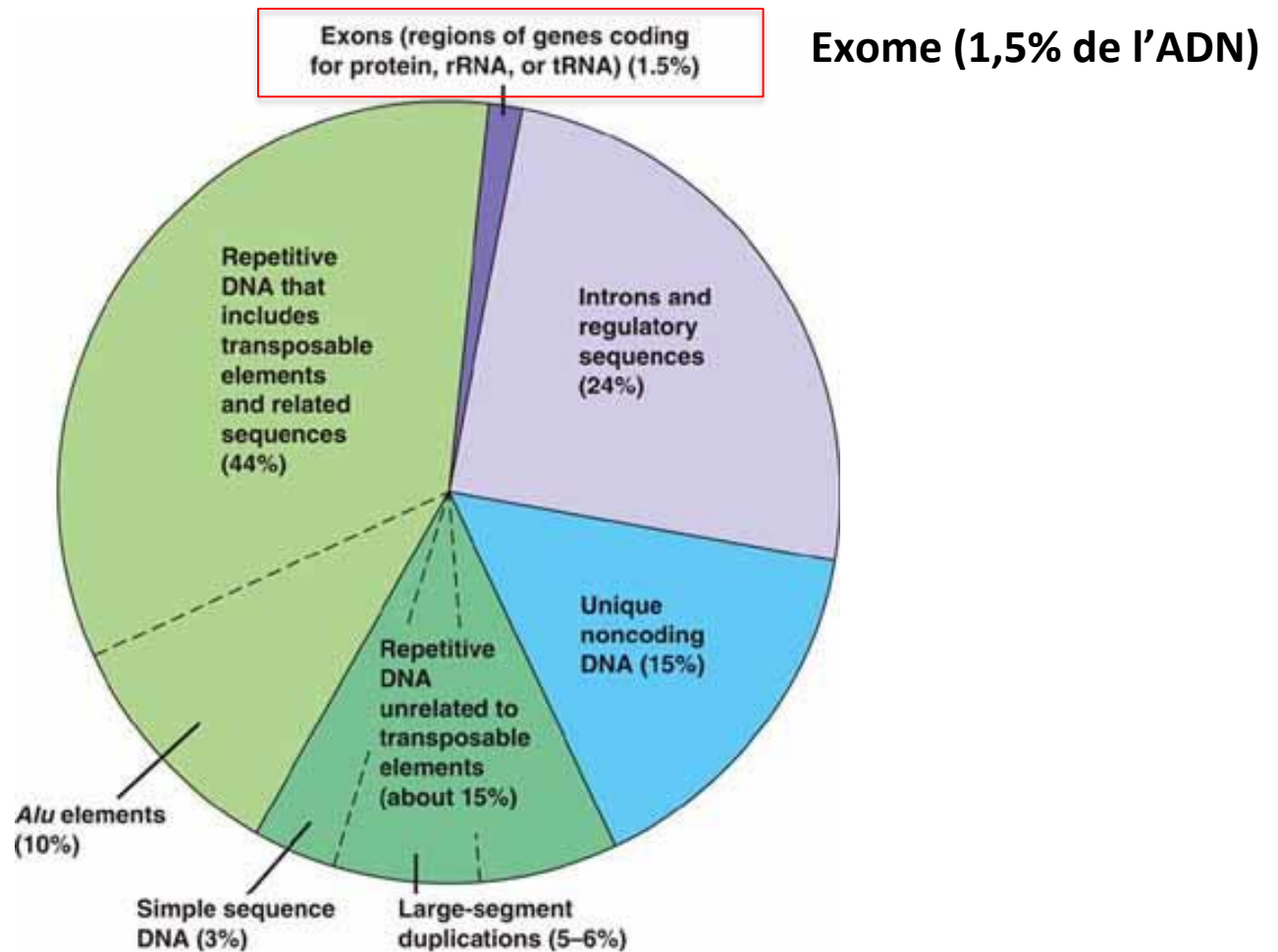


Grand-père asymptomatique porteur du variant, pas en mosaïque

⇒ **Gène connu DI, mais variant probablement non pathogène**

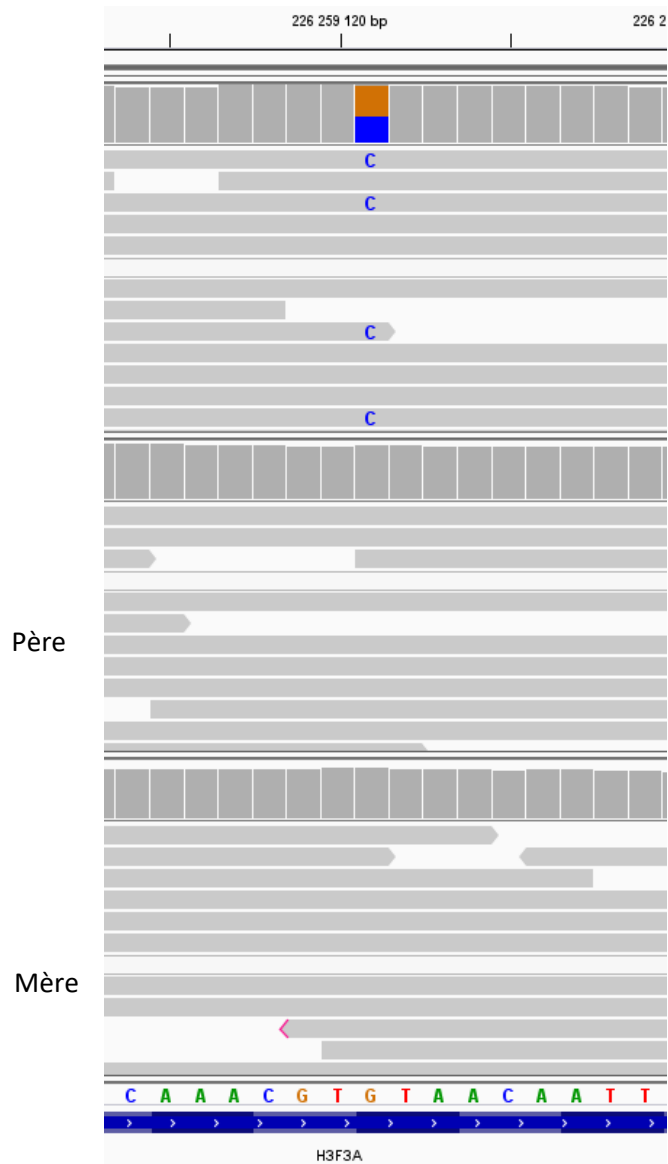
⇒ **Etude de génome (projet de recherche)**

Génome Vs Exome



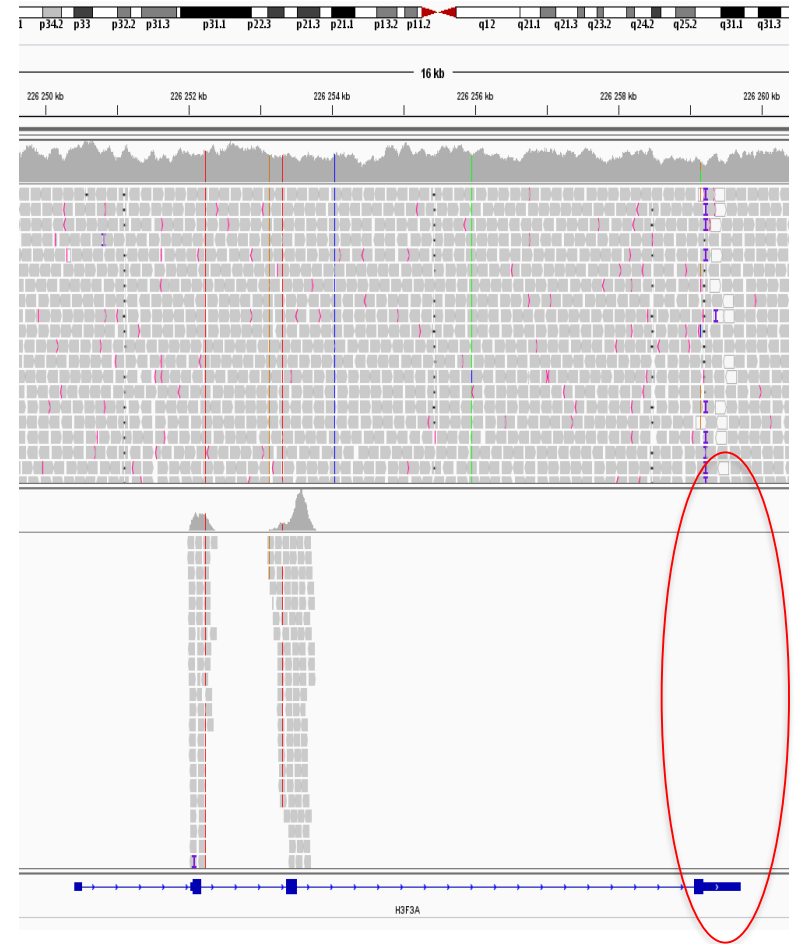
Néomutations dans *H3F3A* codant l'histone H3.3

c.352G>C;(p.V118L)

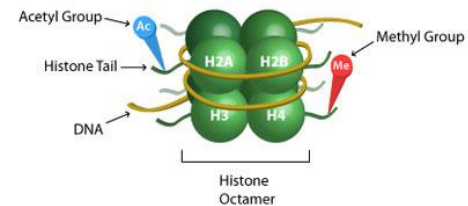


Genome

Exome



H3F3A



DI liée à des mutations dans *H3F3A* et *H3F3B*



Contexte : vers une médecine génomique



- Maladies concernées
 - Maladies rares
 - Cancers héréditaires ou non (+ analyses tumeurs)
 - Maladies complexes
- Enjeu de santé publique
- Scientifique et clinique
- Technologique
- Economique

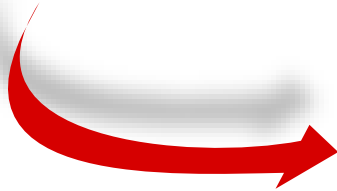


Objectif : réduire l'errance diagnostique / séquençage de milliers de génomes

Vers la thérapie?

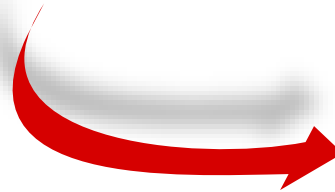
DIAGNOSTIC

Identification de « nouveaux » gènes



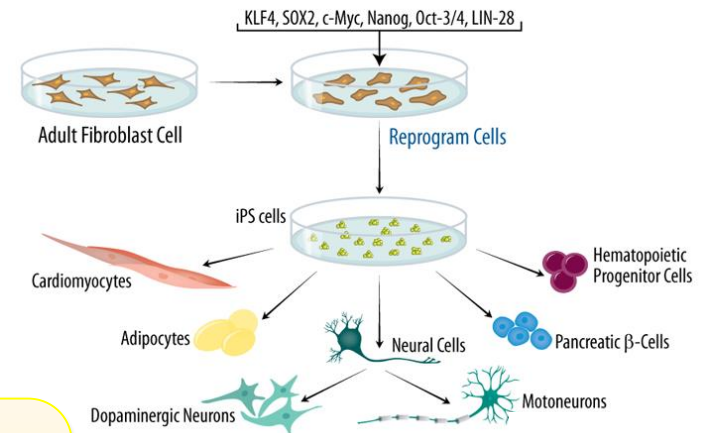
PHYSIOPATHOLOGIE

Validation fonctionnelle
sur modèles cellulaires / animaux



THÉRAPEUTIQUE

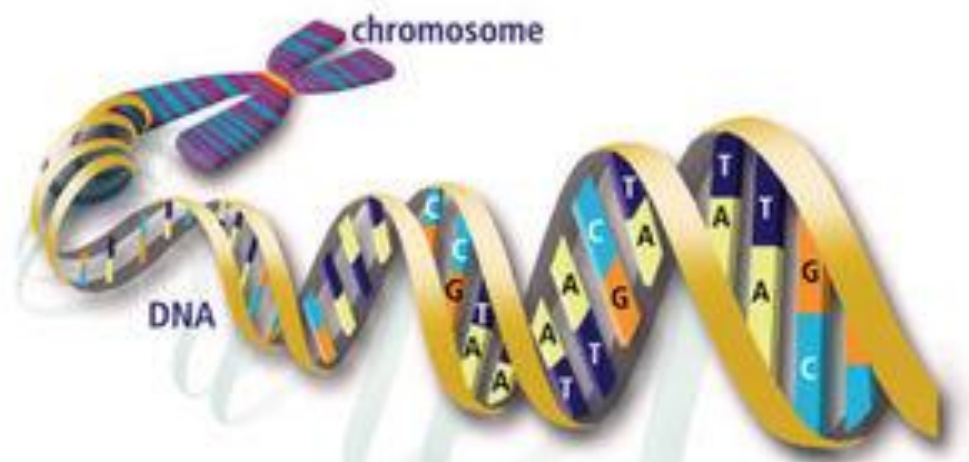
Criblage moléculaire
Thérapie génique...



https://www.youtube.com/watch?v=BUvt96BJ8-A&feature=emb_logo

Plan

- **Introduction:**
 - définition de la DI
 - épidémio
 - étiologies
- **Médecine de précision:**
 - séquençage haut débit : étude d'exome
 - 3 exemples (diagnostic / recherche)
- **Questions éthiques**



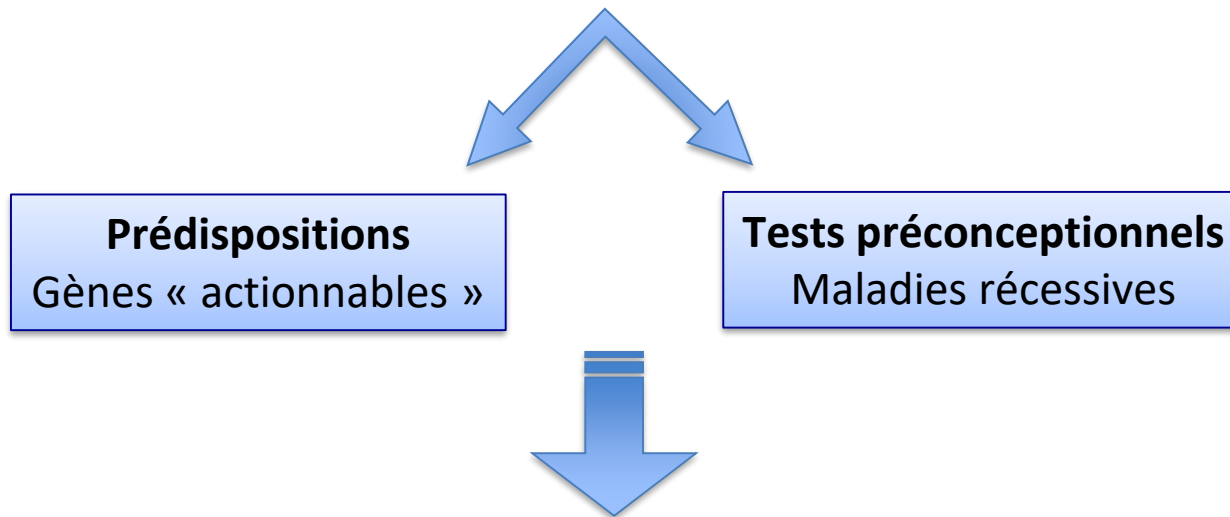
a	Light microscope	G-banded karyotype	Microarray	Whole-exome sequence	Whole-genome sequence	
Appearance				CGGATGATTACCCGTT G.....GCTC TAGCTAGCTATA....	CGGATGATTACCCGTT GATATAGCTCTCGCTC GCTCTAGCTAGCTATA GGCTATGGGTGGGGGC	
Resolution	Entire chromosome	5–10 Mb	50–100 kb	1 bp	1 bp	
Number of loci probed	N/A	~500	~0.05–2 million	~50 million	3 billion	
Variants detected	Aneuploidy, polyploidy	Variants >5 Mb	Copy number variants	Coding regions	Majority of variants	
Variants per person	0 or 1	0 or 1	10–100s	~20,000	4–5 million	
Diagnostic yield	Low					High
Incidental findings	Low					High

Données additionnelles

- *Définition:*

Mise en évidence d'une anomalie ou prédisposition génétique, indépendante de la pathologie recherchée (donnée primaire):

- **données incidentes:** découverte fortuite
- **données secondaires:** recherche active



Vers une médecine préventive / prédictive ?

American College of Medical Genetics and Genomics

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG POLICY STATEMENT

**Genetics
in Medicine**

ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing

Robert C. Green, MD, MPH^{1,2}, Jonathan S. Berg, MD, PhD³, Wayne W. Grody, MD, PhD⁴⁻⁶, Sarah S. Kalia, ScM, CGC¹, Bruce R. Korf, MD, PhD⁷, Christa L. Martin, PhD, FACMG⁸, Amy L. McGuire, JD, PhD⁹, Robert L. Nussbaum, MD¹⁰, Julianne M. O'Daniel, MS, CGC³, Kelly E. Ormond, MS, CGC¹¹, Heidi L. Rehm, PhD, FACMG^{2,12}, Michael S. Watson, PhD, FACMG¹³, Marc S. Williams, MD, FACMG¹⁴ and Leslie G. Biesecker, MD¹⁵

Disclaimer: These recommendations are designed primarily as an educational resource for medical geneticists and other health-care providers to help them provide quality medical genetic services. Adherence to these recommendations does not necessarily ensure a successful medical outcome. These recommendations should not be considered inclusive of all proper procedures and tests or exclusive of other procedures and tests that are reasonably directed to obtaining the same results. In determining the propriety of any specific procedure or test, geneticists and other clinicians should apply their own professional judgment to the specific clinical circumstances presented by the individual patient or specimen. It may be prudent, however, to document in the patient's record the rationale for any significant deviation from these recommendations.

Tests « obligatoires »

Table 1 Conditions, genes, and variants recommended for return of incidental findings in clinical sequencing

Phenotype	MIM-disorder	PMID-Gene Reviews entry	Typical age of onset	Gene	MIM-gene	Inheritance ^a	Variants to report ^b
Hereditary breast and ovarian cancer	604370 612555	20301425	Adult	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	113705 600185	AD	KP and EP
Li–Fraumeni syndrome	151623	20301488	Child/adult	<i>TP53</i>	191170	AD	KP and EP
Peutz–Jeghers syndrome	175200	20301443	Child/adult	<i>STK11</i>	602216	AD	KP and EP
Lynch syndrome	120435	20301390	Adult	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i>	120436 609309 600678 600259	AD	KP and EP
Familial adenomatous polyposis	175100	20301519	Child/adult	<i>APC</i>	611731	AD	KP and EP
<i>MYH</i> -associated polyposis; adenomas, multiple colorectal, <i>FAP</i> type 2; colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive, with pilomatricomas	608456 132600	23035301	Adult	<i>MUTYH</i>	604933	AR ^c	KP and EP
Von Hippel–Lindau syndrome	193300	20301636	Child/adult	<i>VHL</i>	608537	AD	KP and EP
Multiple endocrine neoplasia type 1	131100	20301710	Child/adult	<i>MEN1</i>	613733	AD	KP and EP
Multiple endocrine neoplasia type 2	171400 162300	20301434	Child/adult	<i>RET</i>	164761	AD	KP
Familial medullary thyroid cancer ^d	1552401	20301434	Child/adult	<i>RET</i>	164761	AD	KP
<i>PTEN</i> hamartoma tumor syndrome	153480	20301661	Child/adult	<i>PTEN</i>	601728	AD	KP and EP
Retinoblastoma	180200	20301625	Child	<i>RB1</i>	614041	AD	KP and EP

Liste définie de pathologies (69 gènes) concernant:

- Prédisposition au cancer
- Maladies vasculaires: Ehlers Danlos, Loeys-Dietz
- Cardiomyopathie, troubles du rythme cardiaque...
- Susceptibilité à l'hyperthermie maligne

Débats

Genetics
in Medicine

ACMG POLICY STATEMENT

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG policy statement: updated recommendations regarding analysis of secondary findings in clinical NGS testing

© 2014 John Wiley & Sons A/S.
Published by John Wiley & Sons Ltd
CLINICAL GENETICS
doi: 10.1111/cge.12460

GENETICS Molecular and Personalized Medicine

Clin Genet 2015; 87: 301–310
Printed in Singapore. All rights reserved

Review

Predictive genetic disorders in mind: arguments for and against guidelines

MEETING REPORT

Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing

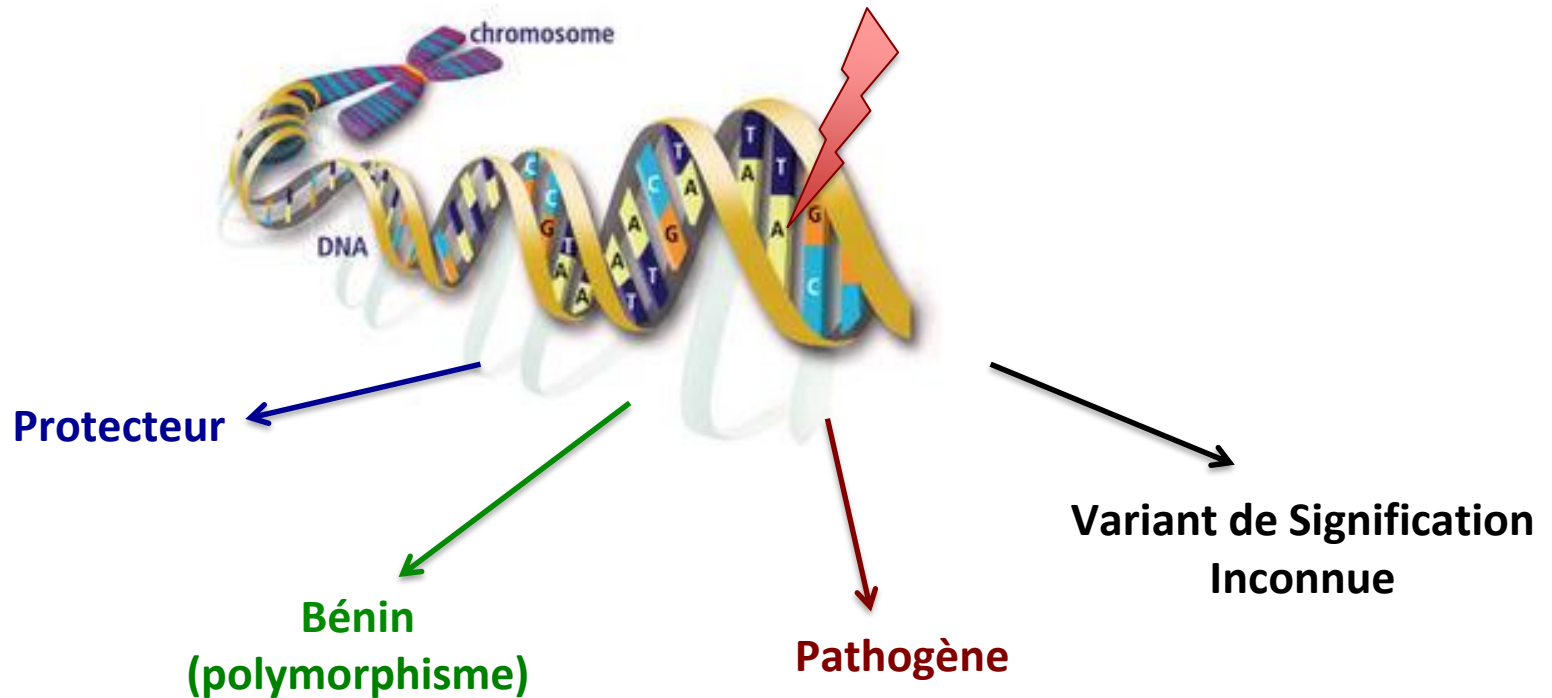
Jayne Y Hehir-Kwa^{*,1,2}, Mireille Claustres³, Ros J Hastings⁴, Conny van Ravenswaaij-Arts⁵, Gabrielle Christenhusz⁶, Maurizio Genuardi⁷, Béla Melegh⁸, Anne Cambon-Thomsen⁹, Philippos Patsalis¹⁰, Joris Vermeesch¹¹, Martina C Cornel¹², Beverly Searle¹³, Aarno Palotie¹⁴, Ettore Capoluongo¹⁵, Borut Peterlin¹⁶, Xavier Estivill^{17,18,19} and Peter N Robinson^{20,21,22}

European Journal of Human Genetics (2015) 23, 1601–1606
© 2015 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1018-4813/15
www.nature.com/ejhg

npg

=> intérêt de l'enfant

Difficultés d'interprétation des données



Analyse de NGS:

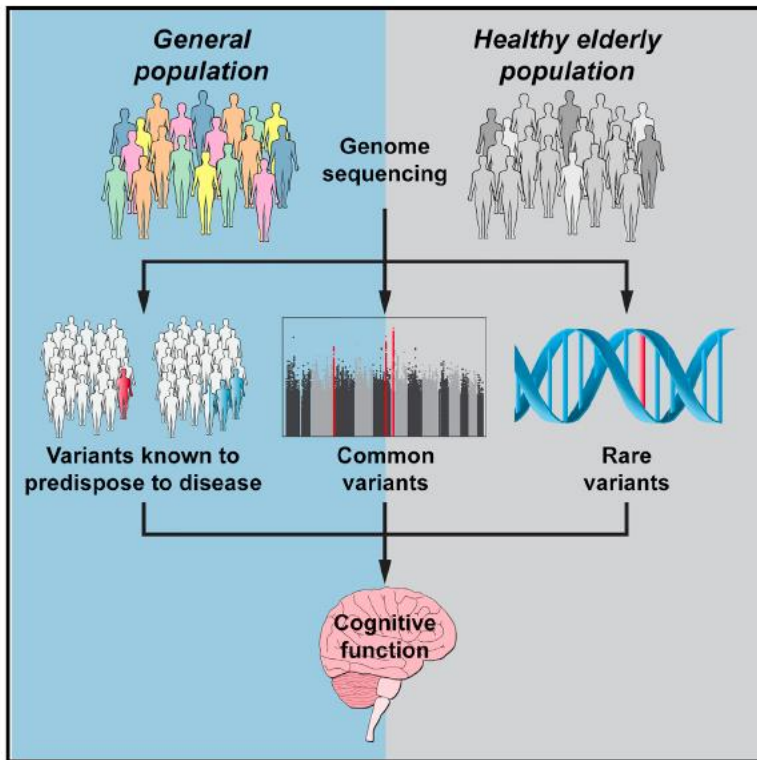
- Généticiens biologistes, bioinformaticiens
- Outils bioinformatiques
- Confrontation clinico-moléculaire

Difficultés d'interprétation des données

- Variant « pathogène » identifié dans des cas familiaux :
quid en population générale?



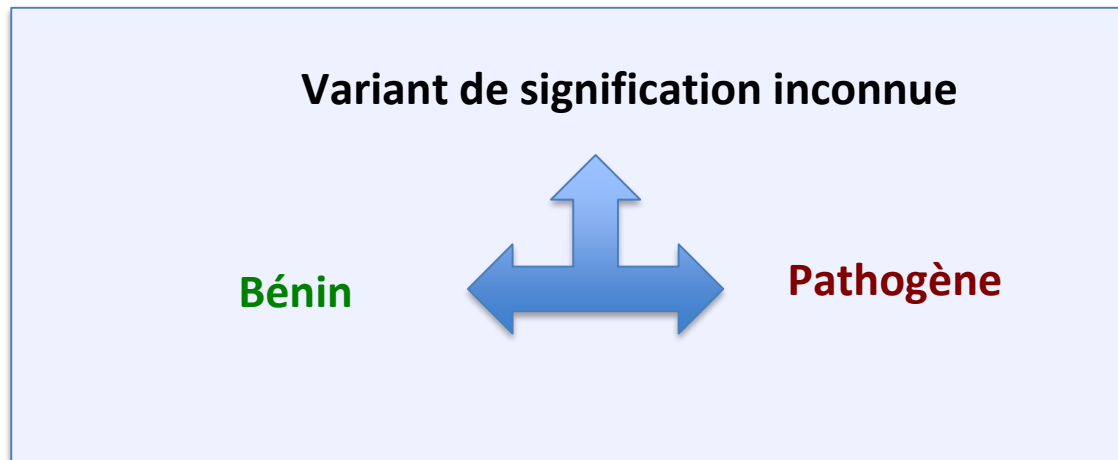
Difficultés d'estimation du « sur-risque » potentiel



- En l'absence d'ATCD familiaux
 - Etudes chez des personnes âgées:
 - Cohorte Wellderly (> 80 ans, USA)
- Pas de différence significative pour les variants de l' ACMG !**
- Facteurs protecteurs à prendre en compte: génétiques, surtout environnementaux, hygiène de vie, etc.

Evolution des connaissances dans le temps

- Changement du caractère pathogène / bénin d'un variant :



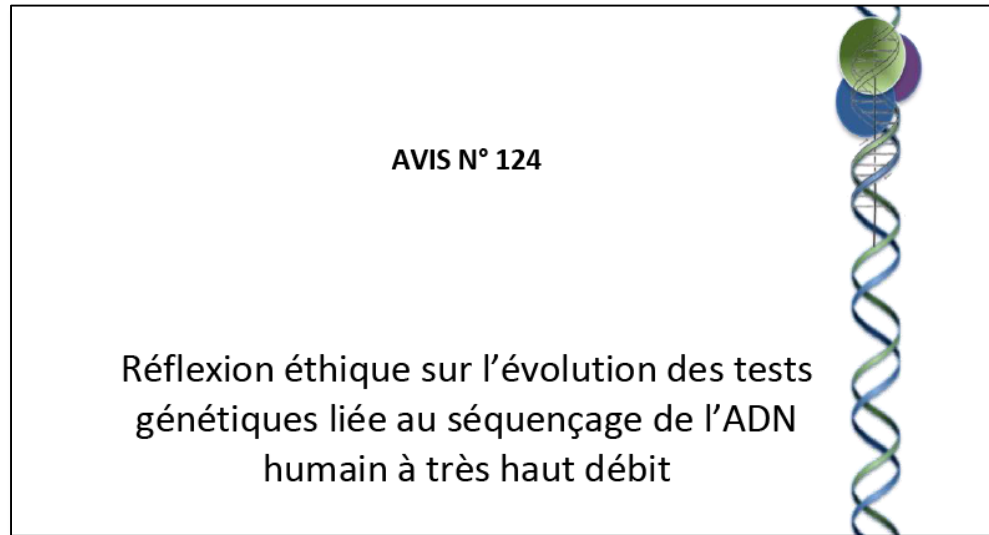
BRCA2: variants **pathogènes** => VSI

- Comment gérer la réinterprétation des données de NGS?

c.6937+1G>A
c.6901G>T (p.(Glu2301*))

Comité Consultatif National d'Ethique

janvier 2016



Unesco 2002 : « *Génétique, jusqu'où peut-on aller trop loin ?* »

CCNE: « **jusqu'où a-t-on le droit d'aller ?** »

« Cette évolution technique risque de nous faire passer d'une génétique dont **l'objet central était d'expliquer la maladie**, à une génétique dont l'objectif principal deviendrait la **prédiction de cette maladie**, avec le **risque d'atteinte à la liberté** que cela comporte dans un **objectif de santé publique** **possiblement interventionniste**. »

Actualités en France

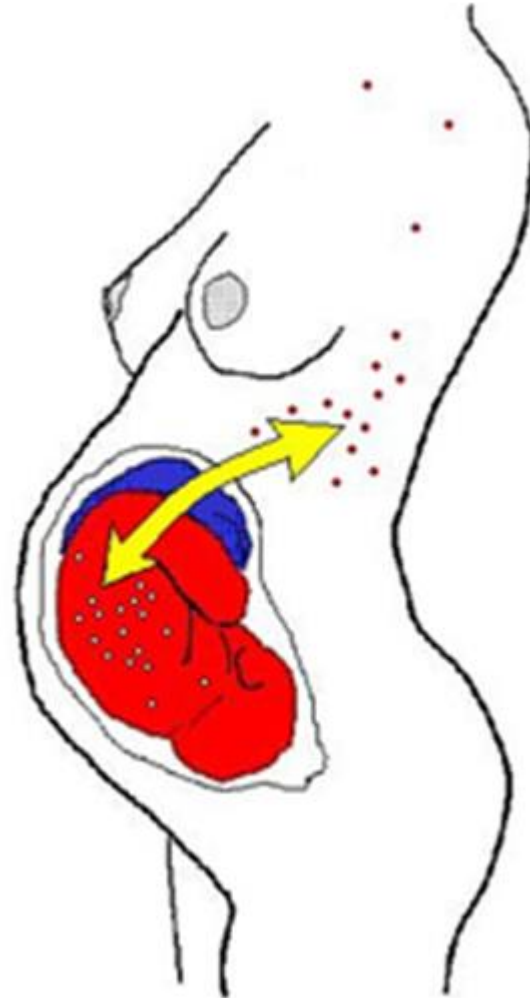
- **Révision des lois de Bioéthique**
 - Rendu des données incidentes mais pas secondaires
 - Pas de tests préconceptionnels en population générale
- **Plan France Médecine Génomique**
 - Actuellement: données secondaires non proposées
 - Protocole en cours DEFIDIAG: données secondaires proposées aux parents

Autre application: prénatale

- **Diagnostic prénatal non invasif: (10 SA)**

Prise de sang maternel

- Sexe foetal
- Rhésus
- Trisomie 21
- ...NGS : exome, génome



DPN non invasif: séquençage haut débit

RESEARCH ARTICLE

GENOMICS

Noninvasive Whole-Genome Sequencing of a Human Fetus

Jacob O. Kitzman,^{1*} Matthew W. Snyder,¹ Mario Ventura,^{1,2} Alexandra P. Lewis,¹ Ruolan Qiu,¹ LaVone E. Simmons,³ Hilary S. Gammill,^{3,4} Craig E. Rubens,^{5,6} Donna A. Santillan,⁷ Jeffrey C. Murray,⁸ Holly K. Tabor,^{5,9} Michael J. Bamshad,^{1,5} Evan E. Eichler,^{1,10} Jay Shendure^{1*}

Analysis of cell-free fetal DNA in maternal plasma holds promise for the development of noninvasive prenatal genetic diagnostics. Previous studies have been restricted to detection of fetal trisomies, to specific paternally inherited mutations, or to genotyping common polymorphisms using material obtained invasively, for example, through chorionic villus sampling. Here, we combine genome sequencing of two parents, genome-wide maternal haplotyping, and deep sequencing of maternal plasma DNA to noninvasively determine the genome sequence of a human fetus at 18.5 weeks of gestation. Inheritance was predicted at 2.8×10^6 parental heterozygous sites with 98.1% accuracy. Furthermore, 39 of 44 de novo point mutations in the fetal genome were detected, albeit with limited specificity. Subsampling these data and analyzing a second family trio by the same approach indicate that parental haplotype blocks of ~300 kilo-base pairs combined with shallow sequencing of maternal plasma DNA is sufficient to substantially determine the inherited complement of a fetal genome. However, ultradeep sequencing of maternal plasma DNA is necessary for the practical detection of fetal de novo mutations genome-wide. Although technical and analytical challenges remain, we anticipate that noninvasive analysis of inherited variation and de novo mutations in fetal genomes will facilitate prenatal diagnosis of both recessive and dominant Mendelian disorders.

2012

=> Nécessité d'un encadrement légal et éthique

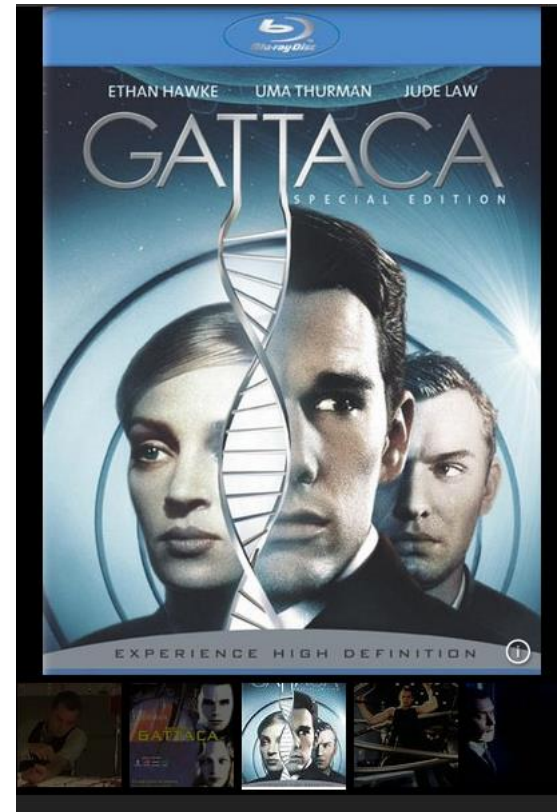
Conclusions

Apport considérable du NGS pour le diagnostic dans la DI:

- ⇒ avantages à l'échelle individuelle: PEC, conseil génétique, traitement à l'avenir...
- ⇒ questionnement par rapport aux données additionnelles

Perspectives

- ✓ Quid de la **généralisation** des études de **séquençage haut débit** en population?
- ✓ Quid de l'**encadrement légal / éthique** (en France, ailleurs)?
- ✓ Vers une **médecine prédictive**?
 - ⇒ **enjeu sociétal**
 - ⇒ **révision des lois de bioéthique**



1997

Primum non nocere