

RAPPELS de GENETIQUE



MODES DE TRANSMISSION

DIFFERENTS VARIANTS DE SEQUENCE

PATHOGENICITE

SEQUENCAGE SANGER vs NGS



CAS 1

Les laboratoires du réseau GenMAI (génétique des maladies autoinflammatoires) ont reçu "l'autorisation de réaliser l'activité de soins d'examen des caractéristiques génétiques d'une personne et identification d'une personne par empreintes génétiques à des fins médicales pour les analyses de génétique moléculaire", et les biologistes ont reçu les agréments correspondants.

Vous avez un patient pour lequel l'indication d'une analyse génétique d'une MAI est posée.
Vous ne savez pas où vous adresser, que faites vous ?

- **Orphanet**
- **Site du réseau GenMAI**
- **Site des centres de référence CEREMAI (pédiatrique) ou CERAIF (adultes)**

Vous avez trouvé les laboratoires de GenMAI, à qui et comment devez vous envoyer les prélèvements ?

- Envoi aux 3 laboratoires, ils se débrouilleront **NON**
- Envoi au labo le plus proche de chez vous **OUI sauf cas particulier (analyse non disponible, regroupement familial...)**

Conditions d'envoi

- Tous les jours de la semaine **NON il faut éviter la fin de la semaine**
- Dans un colis à -20°C **NON à température ambiante**
- Uniquement après accord avec le biologiste responsable du secteur
NON sauf cas particulier (NGS, protocole de recherche...), prévenir le labo dans tous les cas par mail. Attention aux pré-requis!



CAS 2

Une femme de 60 ans vous est adressée en consultation pour une maladie associant depuis l'âge de 4 ans des épisodes d'arthrite (genoux et chevilles) et d'ostéomyélite à début aigu. Les accès, qui peuvent durer plusieurs semaines, sont très douloureux et le liquide articulaire est purulent ; ces accès ont entraîné plusieurs hospitalisations. Lors des accès, on ne retrouve ni fièvre, ni hyperleucocytose. Trois de ses quatre filles (toutes majeures) présentent des signes similaires ayant débuté à 3 ans $\frac{1}{2}$ pour les deux premières et 7 ans chez la plus jeune. La patiente a présenté une acné péri-buccale à l'âge de 30 ans et sa fille aînée une acné kystique.

• Quel diagnostic pouvez-vous évoquer ?

Syndrome PAPA

• Quelles informations et documents transmettez-vous au laboratoire de génétique ?

Prescription, consentement, fiche clinique, bon de commande.

• A qui proposez-vous un prélèvement pour étude moléculaire ?

Cas index en première intention, puis parents et tous les symptomatiques de la famille avec proposition de conseil génétique (loi parentèle).

• Le laboratoire met en évidence chez la patiente à l'état hétérozygote la variation faux-sens p.Ala230Thr du gène *PSTPIP1*. Quelle sera la démarche du biologiste pour conclure quant à l'implication de la variation dans la maladie ?

Consultation de bases de données spécifiques (Infevers) et de bases de données de polymorphismes (Ensembl, ExAC...), localisation au sein de la protéine, conservation au cours de l'évolution, conséquences potentielles sur l'épissage, publications, ségrégation familiale cohérente. Pas de test fonctionnel en routine.



CAS 3

Tamara a 14 ans. Elle présente depuis l'âge de 2 ans des fièvres récurrentes, CRP >100 pendant les crises et genou qui gonfle régulièrement. Vous pensez à une fièvre périodique et vous demandez à votre infirmière ou votre externe de se charger de faire réaliser le test, en énumérant deux ou trois acronymes. Vous recevez un tube de sang, une copie de l'observation présente dans le dossier, un bon de commande pour « FMF et fièvre périodique », et le consentement.

Pourtant le laboratoire vous adresse une anomalie à la réception ! Pourquoi ?

Il manque l'arbre généalogique (statut et origine ethnique des parents surtout) ; ainsi que la prescription signée datée, et probablement beaucoup d'informations sur la présence ou l'absence de certains symptômes.

Du coup, vous allez sur le site et vous remplissez complètement le dossier de demande d'analyse.

1. Le laboratoire constate l'origine arménienne de Tamara, qu'elle présente aussi une aptose bipolaire, des adénopathies, parfois de l'urticaire, et qu'elle est « sujette aux infections ». Tous les autres membres de la famille sont asymptomatiques. Que fait le laboratoire ?

En fonction des premiers résultats (MEFV) il peut discuter avec vous de l'indication d'un autre gène (ici MKD) sans nécessité de réprélever, puis éventuellement conclure qu'un autre diagnostic est probable (PFAPA ?). D'autres questions complémentaires par exemple: Réponse à la colchicine ? peuvent orienter la demande complémentaire de tests.



CAS 3 (suite)

Tamara a 14 ans. Elle présente depuis l'âge de 2 ans des fièvres récurrentes, CRP >100 pendant les crises et genou qui gonfle régulièrement. Vous pensez à une fièvre périodique et vous demandez à votre infirmière ou votre externe de se charger de faire réaliser le test, en énumérant deux ou trois acronymes. Vous recevez un tube de sang, une copie de l'observation présente dans le dossier, un bon de commande pour « FMF et fièvre périodique », et le consentement.

2. Le laboratoire constate l'origine Arménienne de Tamara, qu'elle présente aussi une aphtose bipolaire, de l'urticaire au froid. L'arbre généalogique montre que la mère et la petite sœur ont les mêmes symptômes. La mère a en plus une surdité. Que fait le laboratoire ?

Comme les premiers résultats (MEFV) ne sont pas contributifs (ou même dès la réception du dossier), il peut discuter avec vous de l'indication d'un autre gène (ici NLRP3)

Vous envoyez une prescription complémentaire pour le gène MKD ou NLRP3, et le résultat revient non contributif. Qu'en déduisez-vous ?

- C'est une FMF même si on n'a pas trouvé de mutation dans MEFV
- *L'absence de mutations dans le gène MEFV n'exclue pas un diagnostic clinique de FMF, mais dans ce cas c'est peu probable (symptômes + transmission verticale cas 2)*
- Il faut prescrire encore 2 ou 3 autres gènes par exemple NLRP12, TNFRSF1A etc...
- *A partir de 2-3 gènes déjà analysés, il vaut mieux prescrire un NGS*
- Il faut demander un NGS
- *Oui dans ce cas l'intérêt est la recherche d'une mosaïque surtout dans le cas car la symptomatologie CAPS est convaincante.*



CAS 4

Vous voyez en consultation Matteo, âgé de 9 mois, qui depuis l'âge de 4 mois a présenté 4 crises fébriles (39-40°C) associées à un érythème maculaire. Matteo est accompagné de son père qui présente une fièvre récurrente depuis l'âge de 7 ans, avec des crises fréquentes depuis l'âge de 25 ans. Ces crises fébriles (39-40°C) sont accompagnées d'arthralgies diffuses et de myalgies, ainsi que d'un érythème maculaire migrant du tronc vers les membres en respectant les extrémités. Le père de Matteo est originaire des Landes ; sa mère est originaire de Nantes.

Quel est le mode de transmission le plus probable ?

Autosomique dominant.

Quelle(s) étude(s) moléculaire(s) envisagez-vous en première intention ?

Etude du gène TNFRSF1A (syndrome TRAPS), d'abord restreinte aux exons 2-3-4 puis étude totale du gène.

Cette première étude est négative. Une étude en NGS réalisée chez le père de Matteo met en évidence à l'état hétérozygote la variation faux-sens p.Val200Met (ou V198M) du gène *NLRP3* chez le père d'Hugo. En parcourant la littérature, vous voyez que cette variation a déjà été mise en évidence chez des patients présentant un syndrome de Muckle Wells, mais également chez certains patients présentant une maladie de Behçet, des migraines sévères ou d'autres atteintes neurologiques. Certaines publications récentes mentionnent que ce variant a une « pénétrance faible ». Au sein d'une étude réalisée chez des patients présentant un PFAPA, la variation a été mise en évidence mais ne ségrégeait pas avec la maladie dans plusieurs familles.

Que pouvez-vous faire pour aider à conclure sur l'implication de cette variation dans cette famille ?

Rechercher la variation chez Matteo. Cette variation n'est pas retrouvée. Ceci exclut donc l'implication du gène dans cette famille.

Quels éléments vont appuyer la conclusion du généticien moléculaire ?

Consultation de bases de données spécifiques (Infevers) et de bases de données de polymorphismes (Ensembl, ExAC...), localisation au sein de la protéine, conservation au cours de l'évolution, conséquences potentielles sur l'épissage, ségrégation familiale cohérente.



A propos du CAS 4

Analyse de la référence Rowczenio et al. *Arthritis Res Ther.* 2013, *Clinical characteristics in subjects with NLRP3 V198M diagnosed at a single UK center and a review of the literature.*

« Our findings that V198M was associated with a variety of CAPS and other autoinflammatory phenotypes in 12 cases and was identified in seven asymptomatic individuals emphasizes the complexity of the genetics of these syndromes. In our center, the allele frequency of V198M among patients with clinical evidence of fever syndrome, excluding the family screening, was 0.8%, twice that reported in European healthy controls [11]. »

Une fréquence allélique se calcule normalement en ne comptant que les cas indépendants. Sur les 19 hétérozygotes, on compte 10 cas index indépendants et 9 apparentés (2 malades et 7 asymptomatiques). Elle est donc plutôt de 0,61% dans la population de patients de cette étude.

Dans la base de données de sujets contrôle ExAC, la fréquence de l'allèle V200M chez les contrôles est de 0,83% (toutes origines géographiques confondues, 998/120876 allèles).

| | Patients | Contrôles ExAC | Total |
|-------------------|----------|----------------|--------|
| Allèles V200M | 10 | 998 | 1008 |
| Allèles non V200M | 1632 | 119878 | 121510 |
| Total | 1642 | 120876 | 122518 |

Chi-deux : 0,6851 (non significatif) → pas de différence de fréquence allélique

Dans la Figure 1, on voit que dans les 4 familles, sur les 13 sujets qui portent la variation à l'état hétérozygote (cas index ou apparentés au 1er degré à un porteur de la variation), 7 ne sont pas symptomatiques. Le lien entre l'existence d'un phénotype et la présence de la variation semble donc assez lié au hasard. On remarque que parmi les patients porteurs de la variation, au moins un présente une autre cause génétique (2 mutations non ambiguës dans MVK).

La fréquence de V200M observée chez ces patients de phénotypes variés est donc le reflet de la fréquence de cette variation dans la population générale. Elle ne permet donc pas de démontrer le caractère délétère de la variation.



CAS 5

André est né en 1991. Sa fiche clinique montre : depuis l'âge de 7 ans, fièvre, arthralgie, arthrite, myalgie, retard mental et staturo-pondéral, hépatosplénomégalie, adénopathies, facteur déclenchant froid, aphtes, douleurs thoraciques. Durée des crises 10 jours, CRP>100, bonne réponse aux corticoïdes. En 2014 sont demandés les 4 premiers gènes de fièvre récurrente.

Quelle est votre pronostic ?

FMF peu probable, TRAPS ? mais retard mental et staturo pondéral pas classique...Ca peut être tout et n'importe quoi...

Cette analyse est en effet non contributive. Comme il a un déficit intellectuel, il est vu aussi en consultation de génétique qui prescrit un exome en 2015. Le résultat est le suivant : *CECR1*, R169Q homozygote. Mutation déjà décrite dans le DADA2. Que s'est il passé?

Un rétro-phénotyping a mis en évidence deux épisodes d'ischémie cohérents avec l'implication de ce gène. Importance d'une bonne anamnèse.

La maman est à nouveau enceinte, elle souhaite connaître le risque pour son nouvel enfant d'avoir la même maladie qu'André, pouvez vous la rassurer?

Il faut demander un prélèvement des parents pour confirmer l'homozygotie. Sous réserve de pénétrance complète (probabilité d'exprimer la maladie si on est porteur des mutations), le risque à priori est de 1/4.

Les parents ne veulent pas prendre ce risque et souhaitent un DPI (diagnostic préimplantatoire), que leur dites vous?

Il y a peu de recul encore sur ces nouveaux gènes. Ils devront obtenir l'accord d'une consultation pluridisciplinaire de DPI.



CAS 6

Vous voyez en consultation un patient présentant une polyarthrite et une uvéite sévères. Il a été traité dès l'âge de 2 ans et a présenté des complications oculaires dès l'âge de 4 ans.

Quel diagnostic/gène évoquez-vous ?

Syndrome de Blau.

L'étude du gène que vous évoquiez met en évidence à l'état hétérozygote la variation faux-sens p.Arg334Trp. Le laboratoire implique cette variation dans la maladie de votre patient. Quels peuvent être les arguments en faveur de cette conclusion ?

Consultation de bases de données spécifiques (Infevers) et de bases de données de polymorphismes (Ensembl, ExAC...), localisation au sein de la protéine, conservation au cours de l'évolution, conséquences potentielles sur l'épissage, ségrégation familiale cohérente.

Le patient a un projet parental et vous interroge sur la possibilité de réaliser un diagnostic prénatal (DPN) ou un diagnostic pré-implantatoire (DPI). Quelles informations lui transmettez-vous ?

La recevabilité d'un DPN est étudiée par une équipe multidisciplinaire en CPDPN (centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal). L'étude est techniquement possible sur biopsie de trophoblaste (ou liquide amniotique). La recevabilité et la faisabilité d'un diagnostic pré-implantatoire sont étudiées par le centre de DPI. Les délais peuvent être longs et les échecs sont possibles.



CAS 7

Flore est une petite fille de 8 ans qui présente depuis l'âge de 5 ans des accès récurrents de fièvre à 39°C accompagnés de myalgies, d'un erythème migratoire. La fièvre dure plusieurs semaines. Personne d'autre n'est malade dans la famille. Un bilan complet a exclu une origine infectieuse, cancéreuse et autoimmune. Comme la CRP est très élevée pendant les crises, le pédiatre qui la suit pense à une maladie autoinflammatoire et vous adresse un prélèvement avec un dossier complet.

Quel gène(s) a-t-il demandé à votre avis?

TNFRSF1A

1. Le laboratoire répond : absence de mutation ponctuelle. Le diagnostic de TRAPS est-il définitivement exclu?

Il faut regarder la stratégie utilisée par le laboratoire, en général séquençage des exons 2-3-4. Le test n'est pas exhaustif, des mutations rares peuvent exister. Ou bien une mosaïque somatique non détectée par la technique de séquençage classique (Sanger). 1ère description ISSAID2015.

2. Le laboratoire répond : Variant de séquence p.Arg121Gln à l'état hétérozygote. Le diagnostic de TRAPS est-il complètement confirmé?

Ce variant (nom usuel R92Q doit normalement apparaître dans le compte rendu) est très discuté, et n'est vraisemblablement pas suffisant pour expliquer la maladie. Un des parents asymptomatiques est forcément porteur.

3. Le laboratoire répond C30S, et vous demande un prélèvement pour les parents. Aucune mutation n'est retrouvée! Comment l'expliquez-vous?

• *Le père n'est pas le père*

• *Mutation de novo apparue chez l'enfant (pas de risque à priori pour les futurs frères et soeurs). Déjà décrit mais rare dans le TRAPS.*

• *Mosaïque germinale chez un parent (repérable si récurrence du TRAPS dans la fratrie, risque difficile à calculer). Jamais décrit dans le TRAPS.*



CAS 8

Vous voyez en consultation un jeune homme de 28 ans qui présente depuis la première année de vie une atteinte digestive inflammatoire sévère (entérocolite ayant nécessité nutrition entérale et parentérale), une oligoarthritis asymétrique déformante et des éruptions cutanées. Il a présenté une splénomégalie dans l'enfance. Il a également présenté des crises fébriles avec éruption durant l'enfance. Il présente actuellement un syndrome inflammatoire biologique chronique (dernier bilan : CRP=70mg/L, SAA= 205mg/L (N<6), augmentation des gammaglobulines à 23g/L avec un micro-pic monoclonal à l'immunofixation). Ses deux parents sont originaires de la Creuse et ne se connaissent pas de lien de parenté ; ils sont asymptomatiques. Le patient est fils unique.

Quel diagnostic évoquez-vous ?

*Syndrome MKD (Mevalonate Kinase Deficiency) = syndrome d'hyper IgD (HIDS) : gène MVK.
L'atteinte digestive sévère et précoce peut également évoquer une anomalie de NLRC4.*

L'étude du gène que vous évoquiez met en évidence chez le patient à l'état hétérozygote deux variations : p.Ile268Thr et p.Gly326Arg.

Quels vont être les arguments du biologiste pour apprécier leur caractère délétère ?

Consultation de bases de données spécifiques (Infevers) et de bases de données de polymorphismes (Ensembl, ExAC...), localisation au sein de la protéine, conservation au cours de l'évolution, publications, conséquences potentielles sur l'épissage.

Que pouvez-vous envisager pour contribuer à préciser l'éventuelle implication de ces 2 variations ?

Recherche des variations chez les parents afin de déterminer si les variations sont situées sur le même allèle (allèle complexe, ne permettant pas d'expliquer une maladie récessive) ou sur 2 allèles différents (génotype hétérozygote composite, à confronter à l'appréciation du caractère délétère de chacune des variations).

Dosage de la mévalonaturie en crise.



CAS 8 suite

Vous voyez en consultation un jeune homme de 28 ans qui présente depuis la première année de vie une atteinte digestive inflammatoire sévère (entéocolite ayant nécessité nutrition entérale et parentérale), une oligoarthritis asymétrique déformante et des éruptions cutanées. Il a présenté une splénomégalie dans l'enfance. Il a également présenté des crises fébriles avec éruption durant l'enfance. Il présente actuellement un syndrome inflammatoire biologique chronique (dernier bilan : CRP=70mg/L, SAA= 205mg/L (N<6), augmentation des gammaglobulines à 23g/L avec un micro-pic monoclonal à l'immunofixation). Ses deux parents sont originaires de la Creuse et ne se connaissent pas de lien de parenté ; ils sont asymptomatiques. Le patient est fils unique.

L'étude familiale montre que la mère du patient porte la variation p.Ile268Thr à l'état hétérozygote. Le père ne porte aucune des deux variations.

Quelles études complémentaires doivent être réalisées ?

Réalisation d'un prélèvement de contrôle chez les parents et éventuellement le cas index. Le laboratoire peut rechercher une erreur d'identité ou une inversion d'échantillon par des études indirectes (dont le résultat n'est pas communiqué au patient).

Que concluez-vous si ces résultats sont confirmés ?

Mutation survenue de novo à un stade précoce du développement (risque de récurrence nul) ou mosaïque germinale chez un parent (risque de récurrence très faible). Pour les maladies dominantes, le caractère de novo d'une variation est un argument très fort en faveur de son caractère délétère. Dans le cas des maladies récessives, la mise en évidence d'une mutation de novo est exceptionnelle.