

Une nouvelle technologie de séquençage HTS à l'ICH

S. Arcioni, T. von Känel, Institut Central des Hôpitaux, Hôpital du Valais, Sion

Analyses génétiques : différentes technologies

Le séquençage à haut débit (*High Throughput Sequencing*, HTS, ou NGS) permet de séquencer de multiples régions génomiques chez plusieurs patients simultanément. Ces dernières années la capacité de séquençage a encore augmenté, et il est désormais routinier de séquencer l'exome (toutes les régions du génome qui codent pour des protéines ; analyse nommée *Whole Exome Sequencing*, ou WES) lors de l'analyse des gènes associés aux maladies rares. Mais malgré ces développements, le séquençage de l'exome n'est pas le premier choix pour toutes les analyses génétiques (figure 1): il reste par exemple difficile d'identifier des extensions de répétitions avec le HTS, ce qui rend le diagnostic du syndrome de l'X-fragile ou de la maladie de Huntington impossible par cette technique. Comme les coûts du HTS restent plutôt conséquents (typiquement plus de 3000.- par analyse), il n'est pas indiqué de faire l'exome pour des analyses qui ne portent que sur quelques variants pathogènes (« mutations »), comme p.ex. ceux associés à la thrombophilie (facteur V Leiden et prothrombine). Finalement, certaines régions de l'exome sont difficiles à séquencer avec la technique WES et seront par conséquent mal couvertes. Dans ce cas, le séquençage à haut débit ciblant des gènes d'intérêt va typiquement être plus sensible que l'analyse WES, car la réduction des régions d'intérêt (quelques dizaines de gènes plutôt que les 20'000 gènes de l'exome) permet de cibler très soigneusement les régions à analyser.

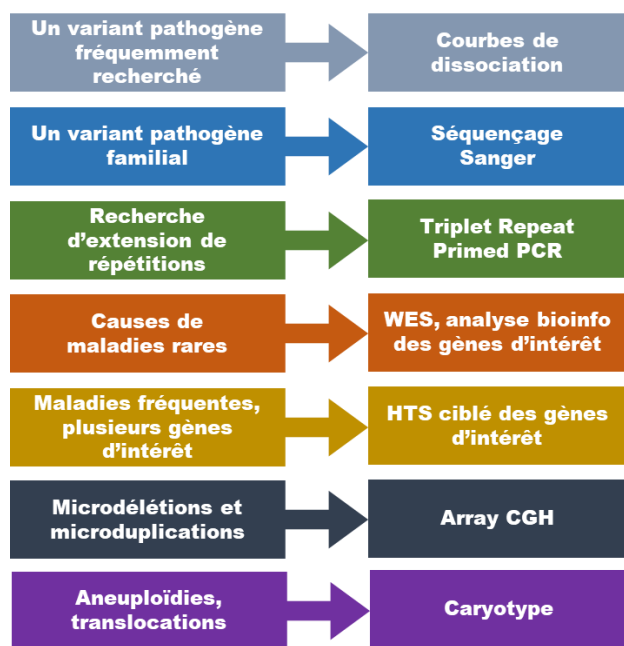


Figure 1: Différentes analyses génétiques pour différentes questions cliniques (la liste est simplifiée et non-exhaustive). Source : Institut Central des Hôpitaux

Une nouvelle approche HTS

Une des analyses les plus fréquemment demandées au laboratoire de génétique est le séquençage des gènes associés aux prédispositions au cancer (voir Caduceus Express 09/2016 et 11/2017). Le nombre des demandes justifie le développement d'un panel HTS ciblé pour cette analyse.

Les prédispositions ainsi que les gènes à analyser ont considérablement évolué ces dernières années : p.ex. les demandes pour l'analyse des prédispositions au cancer de la prostate ou au mélanome sont devenues fréquentes, ce qui a aussi impacté les choix des gènes à analyser. C'est une des raisons qui a incité le laboratoire de génétique de l'ICH à renouveler ce panel, tout en tenant compte également des derniers développements médicaux (séquençage de 43 gènes au lieu de 27 ; tableau 1) et techniques (technologie QIAseq au lieu d'amplicons).

La technologie QIAseq de la firme Qiagen [1] se base sur une fragmentation de l'ADN, suivie de l'ajout d'une séquence contenant l'adaptateur, un index moléculaire unique et un barcode d'identification du patient. Puis une extension, avec des amorces spécifiques des régions d'intérêt d'un côté et de l'autre la séquence complémentaire de l'adaptateur, est

réalisée. Finalement les fragments ainsi préparés sont amplifiés afin d'obtenir des librairies prêtes à être séquencées sur un instrument MiSeq de la firme Illumina. L'introduction des index moléculaires uniques (technique UMI) permet d'identifier et ainsi d'éliminer les duplicatas de PCR lors du HTS, ce qui augmente la fiabilité des données obtenues.

Cette technologie a été choisie pour les raisons suivantes :

- Très bonne sensibilité non seulement pour la détection des variants ponctuels et des petites insertions/délétions, mais aussi pour les grands réarrangements comme les *copy number variants*.
- Très bonne spécificité grâce à la réduction du bruit de fond lors du séquençage.
- Possibilité de rajouter de nouveaux gènes au panel, cela grâce à des boosters.
- Possibilité d'effectuer des analyses sur de l'ADN circulant.
- Facile à manipuler (un seul tube d'amorces par panel).
- Traitement des données générées au sein de l'HVS (pas de service cloud pour l'analyse bioinformatique).

Lors de la validation du nouveau panel, ces avantages théoriques ont été confirmés et ont démontré leur utilité. Le laboratoire se réjouit de pouvoir profiter de cette nouvelle technologie en routine à partir de janvier 2022. A noter que la technologie est en cours de validation également pour d'autres analyses, notamment des panels pour les tissus fixés et inclus en pathologie.

ACD	CDK4	MSH6	PTEN
APC	CDKN2A	MUTYH	RAD51C
ATM	<i>CHEK2</i>	NBN	RAD51D
AXIN2	EPCAM	NTHL1	RNF43
BAP1	GALNT12	<i>PALB2</i>	RPS20
<i>BARD1</i>	GREM1	PMS2	SMAD4
BMPR1A	HOXB13	POLD1	STK11
<i>BRCA1</i>	MITF	POLE	TERF2IP
<i>BRCA2</i>	MLH1	POT1	TERT
<i>BRIP1</i>	MSH2	PRKAR1A	<i>TP53</i>
<i>CDH1</i>	MSH3	PRSS1	

Tableau 1 : Les 43 gènes séquencés lors des analyses de prédisposition au cancer. La sélection des gènes analysés (« panel virtuel ») change en fonction du type de prédisposition recherchée : les gènes prédisposant au cancer du sein sont en italique, ceux associés au cancer des ovaires sont soulignés, et ceux aux cancers digestifs sont en gras. Les gènes pour les autres prédispositions qui peuvent être analysées avec le nouveau panel (prostate, pancréas, mélanome) ne sont pas marqués.

Consultation génétique et interprétation des variants

Deux aspects importants de chaque analyse HTS ne sont cependant pas touchés par cette nouvelle technologie :

D'une part, le rôle du médecin généticien clinicien reste essentiel face à ces développements. Une consultation de conseil génétique est recommandée par la loi avant et après le test génétique et permet de discuter avec les patients des implications du diagnostic génétique pour le patient lui-même, pour ses apparentés et d'aborder les limites du test ainsi que la possibilité de la découverte de variants de signification inconnue et de résultats inattendus [2].

D'autre part, l'interprétation des variants identifiés (voir Caduceus Express 10/2019) est toujours autant exigeante qu'autrefois. En effet, bien que les outils bioinformatiques facilitent grandement la tâche, le nombre de variants identifiés, et par conséquent à interpréter, augmente.

Littérature

- 1) Chang et al.: Correlation of genomic alterations between tumor tissue and circulating tumor DNA by next-generation sequencing. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Nov;144(11):2167-2175
- 2) Filges et al.: Entwicklung der genetischen und genomischen Medizin in der Schweiz. *Schweiz Arzteztg*. 2018;99(41):1418-1420

Personnes de contact

Séverine Arcioni severine.arcioni@hopitalvs.ch
 (Biologiste-responsable technique)

Thomas von Känel, PhD thomas.vonkaenel@hopitalvs.ch
 (Spécialiste FAMH en génétique médicale)

Consultations génétiques à l'ICH ich.genetique@hopitalvs.ch