

Apport des exomes dans le diagnostic prénatal des anomalies génétiques

C. Pangalos

InterGenetics, Athènes. Grèce

Grâce aux techniques de séquençage de nouvelle génération qui nous permettent de séquencer massivement tous les exomes de gènes connus de l'ADN humain, nous sommes définitivement entrés dans l'ère de la médecine génomique. Cette nouvelle "arme de choc" génétique nous permet de découvrir théoriquement la base moléculaire de toute maladie génétique, chez un individu affecté, qui n'a pas été diagnostiqué auparavant au cours d'examens génétiques conventionnels. Ces progrès se sont révélés particulièrement précieux pour détecter l'origine génétique de maladies rares ou complexes et pour révéler la pathogénicité des mutations associées à des maladies génétiques communes, telles que le cancer, l'autisme, le retard mental, qui présentent une hétérogénéité génétique considérable.

Le diagnostic prénatal bénéficie aussi largement de ces progrès. La cause génétique sous-jacente des malformations fœtales et autres anomalies fœtales structurelles est souvent insaisissable, conduisant à une incapacité à fournir un diagnostic précis et une évaluation détaillée des risques pesant sur le fœtus ou la future reproduction du couple parental. A cette fin, de nouvelles approches génomiques, basées sur le séquençage massif en parallèle, conduisant au séquençage de l'exome entier (WES) ont été récemment appliquées [1, 2], ainsi que dans notre laboratoire [3], dans une tentative de donner un aperçu de diagnostic dans ce domaine très sensible. Cependant, l'étendue du potentiel diagnostic qui s'offre à nous soulève de nouvelles questions relatives à l'usage optimal de ces nouvelles technologies, à la définition du rôle des généticiens, ainsi que des implications bioéthiques qui en découlent.

Prévention par l'analyse génomique des maladies génétiques à transmission récessive liées à la consanguinité

Il est avéré que la consanguinité multiplie par 6 le risque

d'apparition d'une maladie génétique récessive, par rapport au reste de la population, ce qui constitue un problème majeur surtout dans les communautés où le taux des mariages entre cousins germains oscille entre 25-60 % [4]. Parmi ce type de maladies sévères, nous incluons les hémoglobinopathies, plusieurs troubles métaboliques ainsi que des malformations congénitales. Plusieurs centaines d'enfants atteints naissent chaque année dans ces communautés, ce qui contribue de manière décisive à une mortalité et une morbidité infantiles importantes, ainsi qu'à des problèmes sanitaires qui pèsent lourdement sur le plan financier et émotionnel de celles-ci.

Afin de faire face à ce problème, nous avons conçu et appliqué dans notre laboratoire un test dénommé Progenomis® destiné aux couples présentant un risque élevé de concevoir un enfant atteint d'une maladie génétique récessive. Nous avons soigneusement sélectionné 680 gènes impliqués dans des maladies génétiques récessives graves et avons procédé à l'analyse par séquençage parallèle massif de ces gènes chez les deux partenaires reproductifs. Ces gènes se manifestent dans un état homozygote ou double hétérozygote, à une fréquence d'au moins 1 sur 200 à 1 sur 300 naissances. Typiquement, les hétérozygotes porteurs d'une maladie récessive sont asymptomatiques et ne révèlent normalement pas de cas pathologiques dans leurs familles. Par conséquent, ces individus ne peuvent pas être identifiés par un autre moyen que cette analyse génomique massive. Il est d'ailleurs révélateur que ce soit seulement après la naissance d'un enfant atteint que le diagnostic de l'affection soit établi, ainsi que les risques relatifs pour les futurs enfants. Il est évident que la révélation préconceptionnelle d'une homozygotie ou d'une double hétérozygotie chez un couple apporte une information extrêmement précieuse concernant leurs risques reproductifs, et par conséquent une aide précieuse au regard des mesures appropriées pour la prévention de la naissance d'un enfant affecté. Cela permet une planification efficace de prévention, en

appliquant un protocole prénatal ou préimplantatoire et en tenant compte des mutations géniques connues. Suite au test Progenomis®, un rapport clinique final est présenté, contenant toutes les informations relatives ainsi que des recommandations concernant les actions possibles. Les options reproductives sont discutées dans le contexte d'une séance de conseil génétique personnalisée.

Une approche de séquençage de l'exome ciblée

Cette approche permet le diagnostic des troubles génétiques associés à des résultats anormaux de l'échographie fœtale. Il est avéré que les anomalies fœtales détectées au cours d'échographies sont observées dans environ 3 à 5 % des grossesses, tandis que 20 à 25 % des décès périnatals seraient imputables à des anomalies congénitales [5]. Dans la pratique clinique quotidienne, si la détection prénatale et la prévention des troubles congénitaux graves sont généralement atteintes à travers différents niveaux d'examen échographiques du fœtus au cours de toute la grossesse, le diagnostic précis de l'anomalie génétique sous-jacente reste cependant souvent difficile et insuffisant en raison d'une hétérogénéité clinique et génétique considérables [6] ; tandis que dans la plupart des cas, un historique des antécédents familiaux ou d'autres risques identifiables de prédisposition à la maladie, font cruellement défaut [7]. Afin de régler les importants problèmes mentionnés ci-dessus dans le diagnostic prénatal, notre groupe a développé une stratégie ciblée de séquençage de l'exome, appelée test Fetalis®, basée sur une large série de 758 gènes associés à des maladies génétiques qui peuvent présenter des anomalies fœtales structurales détectables dans tous les trimestres de la grossesse par échographie de routine et/ou par d'autres techniques de surveillance fœtale (par exemple, échocardiogramme, IRM, etc...) [3].

La liste de ces gènes et de ces troubles a fait l'objet d'une soigneuse compilation en utilisant des données provenant de diverses sources cliniques [8-11]. Les 758 gènes du test Fetalis® et de l'algorithme variante de priorisation (Konialis C et Agioutantis Z, données non publiées), ont été spécialement conçus pour l'évaluation hiérarchisée des variantes génétiques, basée sur un maximum de trois principaux résultats cliniques échographiques, sélectionnables par l'utilisateur, en utilisant la terminologie importée du *Human Phenotype Ontology* (HPO) [10] et des données de Phenomizer [12,

<http://compbio.charite.de/phenomizer/>]. Dans plusieurs cas, où les termes HPO et / ou Phenomizer et les associations de gènes n'étaient pas disponibles, elles ont été élaborées et incorporées dans la base de données de "pipeline" EMA-foeto-placentaire.

Le pipeline bio-informatique Fetalis® est couplé à d'autres fonctions de filtrage des variantes du WES dans le pipeline de l'EMA, telles que le taux des mutations pathogènes, les variantes de la fréquence dans la population (1000 GP, NHLBI Exome Variant Server - EVS, ExAC consortium, basées sur des données des variantes locales).

Cette approche génomique a été cliniquement appliquée à 30 cas de fœtus chromosomiquement euploïdes (déterminés par une analyse préalable analyse aCGH), impliquant 4 produits d'avortement et 26 grossesses en cours, présentant tous diverses anomalies échographiques. La stratégie de séquençage ciblée de l'exome Fetalis® a globalement permis un diagnostic clinique dans 11 des 30 cas (37 %, Tableau I, cas 1-11).

Dévoiler la cause génétique sous-jacente des anomalies échographiques des fœtus est une tâche difficile et le diagnostic génétique prénatal est généralement limité à la recherche de possibles déséquilibres chromosomiques. Cependant, alors que même l'aCGH ne révélera la cause génétique sous-jacente d'une pathologie que dans moins de 15 % de ces cas [13,14], on aboutit rarement à un diagnostic précis et les conseils nécessaires concernant les risques associés à la grossesse en cours, ainsi que le risque de récurrence pour les grossesses ultérieures, sont insuffisants, lacunaires et reposent sur des connaissances empiriques.

Utilité clinique de ce type d'approche

Plusieurs questions importantes concernant l'utilité clinique de ce type d'approche, dans le cadre d'un dépistage prénatal, méritent d'être abordées et examinées. Tout d'abord, l'interprétation des résultats après le test WES ou WGS à grande échelle est entravée par la complexité de l'analyse des données, ainsi que par les difficultés concomitantes et le temps requis pour la priorisation des variantes et l'évaluation clinique finale. Dans un second temps, l'analyse des données WES va inévitablement conduire à la découverte d'un grand nombre de résultats fortuits, sans rapport avec les résultats échographiques rapportés, soulevant des problèmes de conseil génétique et d'épineuses questions éthiques. Le troisième et le plus important des points, est lié à l'évaluation clinique de nombreuses variantes WES de signification inconnue, un phénomène très courant dans ces types d'études.

Notre approche ciblée de l'analyse de l'exome surmonte un grand nombre de ces limitations et préoccupations. Le nombre de variantes correspondant aux 758 gènes

Tableau 1 : Test Fetalis® : signes échographiques fœtales, résultats du séquençage de l'exome, diagnostic de la maladie et issue de la grossesse

Cas	Semaine de gestation	Signes échographiques	Antécédents	Variants de gènes détectés	Diagnostic - syndrome	Confirmation et/ou issue de la grossesse
1	Abortus, 27 sem	Malformations multiples des membres	No	EVC2 c.2776G > A (p.E926K) & c.707T > C (p.V236A), double hétérozygote	Syndrome d'Ellis-van Creveld (AR)	Parents porteurs
2	Abortus, 22 sem	RCIU, contractures articulaires, hydrocéphalie légère, diminution des mouvements fœtaux	Oui	NEB c.11060C>T (p.A3687V) & c.11333T > C (p.I3778T), double hétérozygote	Myopathie nemaline (AR)	Parents porteurs, les deux mutations présentes chez le fœtus précédemment atteint
3	Abortus, 18 sem	Hypoplasie de la main droite de l'antébrachium, de la poignet et des phalanges	No	COL3A1 c.811C > T (p.R271X), hétérozygote	Syndrome d'Ehlers-Danlos IV (AD)	Héritée du côté paternel, mutation présente chez oncle affecté
4	12 sem	Augmentation de la translucidité nucale (NT : 4,8 mm) et hygiroma kystique du 1 ^{er} trimestre	No	PTPNI1 c.181G > A (p.D61N), hétérozygote	Syndrome de Noonan (AD)	Mutation de novo, connue pathogène, interruption de la grossesse
5	23 sem	Anomalies IRM du cerveau	Oui	ASS1 c.725C > T (p.T242I) & c.971G > T (p.G324V), double hétérozygote	Citrullinémie (AR)	Parents porteurs, interruption de grossesse, résultats similaires dans la grossesse précédente
6	24 sem	Fœtus mâle avec arthrogrypose et micrognathie	Oui	VMA21 c.94_96delTTC (p.Phe32del) Lié à l'X, homozygote	Myopathie congénitale avec autophagie excessive, liée à l'X	La grossesse précédente terminée, fœtus de sexe masculin avec des résultats identiques Mère porteuse de la mutation
7	27 sem	Rotation du vermis cérébelleux, élargissement de la cisterna magna	Oui	Z1C1 c.1208C > A (p.S403Y), hétérozygote	Association Dandy-Walker, VOUS	Héritée du côté maternel, grossesse précédente terminée avec des résultats identiques, grossesse terminée
8	22 sem	Défait du septum interventriculaire	No	PROKR2 c.518T > G (p.L173R), hétérozygote	Syndrome de Kallmann à PROKR2 (AD)	Né vivant, 5 mois correction chirurgicale de la malformation cardiaque, aucune autre anomalie
9	13 sem	Augmentation de la translucidité nucale	No	NPC2 c.441+1G > A, homozygote	Maladie de Niemann-Pick C2	Parents porteurs, interruption de la grossesse
10	21 sem	IUGR et os longs courts	No	SOS1 c.1829T > C (p.I610T), hétérozygote COL9A2 c.1549G > A (p.G517S), hétérozygote	Syndrome de Noonan Dysplasie épiphysaire multiple	Interruption de la grossesse
11	25 sem	Tumeur du rein droit. Kystes rénaux multiples. Augmentation de la translucidité échographique rénale. Distinction peu claire de graisse rénale corticale et médullaire.	No	TSC2 c.934C > T, hétérozygote	Sclérose tubéreuse	Interruption de la grossesse

12	22 sem	RCIU, court or nasal, courts os longs, hypoplasias possible	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 9 mois, aucune anomalie signalée
13	22 sem	Clinodactylie unilatérale	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 6 mois, aucune anomalie signalée
14	18 sem	Polydactylie de la main droite	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 5 mois, légère déformation pseudo-polydactylie corrigée chirurgicalement, aucune autre anomalie
15	21 sem	Hydronéphrose, intestin échogène, brachymélie	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 5 mois, aucune anomalie signalée
16	24 sem	Hydronéphrose	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 4 mois, aucune anomalie signalée
17	24 sem ¹	Humérus court, fémur court, intestin échogène	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 4 mois, aucune anomalie signalée
18	23 sem	Augmentation de la translucidité nucale (NT:4,2 mm), hygroma kystique au 2 ^{ème} trimestre	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
19	23 sem	Poignet serré congénital	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
20	31 sem	Ventricules légèrement élargis	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 4 mois, aucune anomalie signalée
21	31 sem	Os longs gros dans les membres supérieurs et inférieurs	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
22	24 sem	Augmentation de la translucidité nucale	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
23	14 sem	Augmentation de la translucidité nucale (NT:3,0 mm)	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
24	28 sem	Club foot et court fémur court	No	Pas de mutation pathogène	-	Interruption de la grossesse
25	12 sem	Augmentation de la translucidité nucale (NT:3,0 mm)	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
26	Abortus, 18 sem	Spina bifida, talibes equinovarus unilatéraux	No	Pas de mutation pathogène	-	Interruption de la grossesse
27	29 sem	Os longs courbés et microcéphalie	No	Pas de mutation pathogène	-	Interruption de la grossesse
28	29 sem	Bec de lièvre	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant. Seule anomalie observée : Bec de lièvre isolé
29	31 sem	Fémur court	No	Pas de mutation pathogène	-	Né vivant, à 3 mois, aucune anomalie signalée
30	18 sem	IUGR modéré	No	Pas de mutation pathogène	-	Anomalies congénitales multiples : micrognathie, communication interventriculaire, gorge atérielle de type 2

Sem : semaine ; RCIU : retard de croissance intra-utérin ; AR : autosomique récessif ; AD : autosomique dominant ; VOUS : variante de signification inconnue

inclus dans le test Fetalis® est d'un ordre de grandeur inférieur aux données issues d'un WES et ce fait, combiné à la rapidité du protocole de laboratoire et au pipeline de priorisation EMA-fœto-placentaire, nous offre un très bon rapport coût-efficacité, un diagnostic simplifié en un temps opportun, souvent inférieur à une semaine, au cours de la grossesse. En parallèle, la décision de se limiter, dans le cadre d'une grossesse en cours, à l'évaluation clinique et au rapport des variantes pathogènes connues ou des variantes pathogènes obligatoires, réduit considérablement le nombre de découvertes fortuites et la notification des variantes de signification inconnue (VOUS), ce qui simplifie le conseil génétique précédant et suivant les tests.

Tout ce qui précède devient encore plus important, sinon primordial, lors de la pratique d'analyses sur les fœtus présentant des anomalies échographiques couramment rencontrées dans le cadre du diagnostic prénatal de routine. Bien que l'on puisse faire valoir que le but principal et l'utilité du séquençage prénatal de l'exome résident probablement dans la recherche d'anomalies échographiques à caractère hautement pathologiques [15], il s'avère que, dans la pratique clinique quotidienne, la réalité est tout à fait différente. En effet, l'obstétricien et les parents souhaitent s'assurer qu'une information échographique d'importance mineure (par exemple des organes génitaux ambigus) ne constitue pas "la pointe de l'iceberg", dissimulant d'autres caractéristiques phénotypiques, beaucoup plus graves, non apparentes ou identifiables lors de l'examen échographique du fœtus en développement.

Pour illustrer davantage les points mentionnés ci-dessus, on pourrait peut-être comparer l'approche ciblée à l'application d'une aCGH ciblée, par opposition à une aCGH de haute résolution, dans le diagnostic prénatal [13,16-18]. Le test Fetalis®, stratégie ciblée de séquençage de l'exome, pourrait être considéré comme une aCGH ciblée, qui se concentre sur les régions de pathogénicité connue, similaire à la mise en œuvre focalisée d'une aCGH prénatale de résolution inférieure [17]. Bien qu'il puisse ne pas détecter certaines des anomalies qui pourraient être captées par une analyse WES plus approfondie, il a l'avantage d'éviter : (a) les VOUS, (b) les analyses approfondies de la famille ou d'onéreuses analyses WES-trio, (c) un conseil génétique complexe. Il est indubitable que ces inconvénients ne peuvent pas être compensés par un taux de détection plus élevé.

Par ailleurs, la stratégie du test Fetalis® est flexible et son rendement diagnostique va certainement augmenter, sans pour autant compromettre sa clarté. Bien que le pipeline Fetalis® vise et évalue actuellement des variantes détectées seulement dans les 758 gènes, la

première étape de l'analyse comprend l'élaboration d'une bibliothèque de l'ensemble de l'exome (WES) ainsi que des données concernant l'ensemble des variantes de l'exome sont facilement disponibles. Au fur et à mesure que nous acquérons des connaissances plus détaillées, le pipeline peut continuellement incorporer de nouveaux gènes et variantes pathogènes identifiés au moyen d'enquêtes de WES postnatales à partir d'études faites chez des nouveau-nés et des enfants gravement atteints.

Il semble donc que cette approche puisse offrir un diagnostic en temps opportun au cours de la grossesse, tout en surmontant les nombreux pièges liés aux NGS prénatals à grande échelle. Elle illustre les avantages potentiels, les défis et les développements futurs de cette stratégie de test, grâce à la volonté générale de ses concepteurs de maintenir un équilibre judicieux et souhaitable entre une augmentation du potentiel de diagnostic et les indésirables "zones grises" dans le diagnostic prénatal.

Conclusion

Force est de constater que le séquençage prénatal de l'exome a vocation à devenir rapidement un outil de diagnostic de routine. Cependant, comme il est appliqué dans un cadre très sensible et vulnérable, il nous appartient de l'utiliser avec précaution et de prendre toutes les mesures nécessaires afin de ne pas étendre son champ d'application au-delà d'un point où il deviendrait plus problématique et moins pertinent que les questions qu'il était censé résoudre.

Bien que le nombre de cas présenté soit encore un peu limité pour nous permettre de chiffrer précisément le rendement diagnostique, il serait extrêmement utile de procéder à une étude de collaboration étendue dans le but de résoudre les questions relatives au potentiel diagnostique de cette approche dans les différentes catégories d'anomalies échographiques, telles que des malformations cardiaques, les dysplasies squelettiques etc...

Il est évident que des études génomiques, en exploitant l'énorme potentiel offert par les puissantes technologies de séquençages parallèles massifs, ont déjà contribué à une meilleure compréhension des causes sous-jacentes des maladies humaines, tandis qu'elles offrent parallèlement un outil cliniquement indispensable pour résoudre les énigmes complexes de diagnostic dans la pratique clinique quotidienne.

Références

- 1- Alamillo CL et al. Exome sequencing positively identified relevant alterations in more than half of cases with an indication of prenatal ultrasound anomalies. *Prenat Diagn.* 2015;35:1073-8.
- 2- Chitty LS et al. Current controversies in prenatal diagnosis 2 : should a fetal exome be used in the assessment of a dysmorphic or malformed fetus? *Prenat Diagn.* 2016;36:15-9.
- 3- Pangalos C et al. First applications of a targeted exome sequencing approach in fetuses with ultrasound abnormalities reveals an important fraction of cases with associated gene defects. *PeerJ.* 2016;4:e1955.
- 4- Lihadh Al-Gazali L et al. Genetic disorders in the Arab world. *BMJ.* 2006;333:831-4.
- 5- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on overall prevalence of major birth defects - Atlanta, Georgia 1978-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57:1.
- 6- Schramm T et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34:160-70.
- 7- Long G, Sprigg A. A comparative study of routine versus selective fetal anomaly ultrasound scanning. *J Med Screen.* 1998;5:6-10.
- 8- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). 2016. World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
- 9- Stenson PD et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med.* 2009;1:13.
- 10- Köhler S et al. The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D966-D974.
- 11- GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). University of Washington, Seattle. 1993–2010. <http://www.genetests.org>.
- 12- Köhler S et al. Clinical diagnostics in human genetics with semantic similarity searches in ontologies. *Am J Hum Genet.* 2009;85:457-64.
- 13- Konialis C, Pangalos C. Dilemmas in prenatal chromosomal diagnosis revealed through a single center's 30 years' experience and 90,000 cases. *Fetal Diagn Ther.* 2015;38:218-32.
- 14- Hillman SC et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:610-20.
- 15- Filges I, Friedman JM. Exome sequencing for gene discovery in lethal fetal disorders-harnessing the value of extreme phenotypes. *Prenat Diagn.* 2015;35:1005-9.
- 16- Ganesamoorthy D et al. Meeting the challenge of interpreting high-resolution single nucleotide polymorphism array data in prenatal diagnosis: does increased diagnostic power outweigh the dilemma of rare variants? *BJOG.* 2013;120:594.
- 17- Ahn JW et al. A new direction for prenatal chromosome microarray testing: software-targeting for detection of clinically significant chromosome imbalance without equivocal findings. *Peer J.* 2014;2:e354.
- 18- Oneda B et al. High resolution chromosomal microarrays in prenatal diagnosis significantly increase diagnostic power. *Prenat Diagn.* 2014;34:525-33. ■