

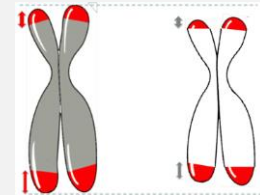
5È JOURNÉE NATIONALE



MALADIES RARES IMMUNO-HÉMATOLOGIQUES



APPORTS ET LIMITES DE LA GÉNÉTIQUE : TELOMEROPATHIES



Caroline KANNENGISSER

Génétique moléculaire Hôpital Bichat (Pr C. Boileau)
-Inserm U1152 PHERE

20/06/2019



ASSISTANCE
PUBLIQUE



Université
de Paris



« Téloméropathie »

Maladie constitutionnelle

GLOSSAIRE : profondeur, couverture...

PLAN :

-Etat des lieux des panels NGS et WES

- en diagnostic
- et recherche

-Perspectives des WGS au RNAseq...

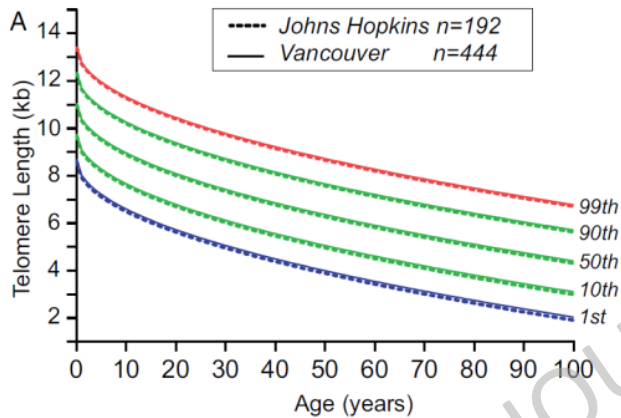


« Téloméropathies » = Syndromes de diminution des télomères

« **Syndromes of telomeres shortening** » (Armanios, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009)

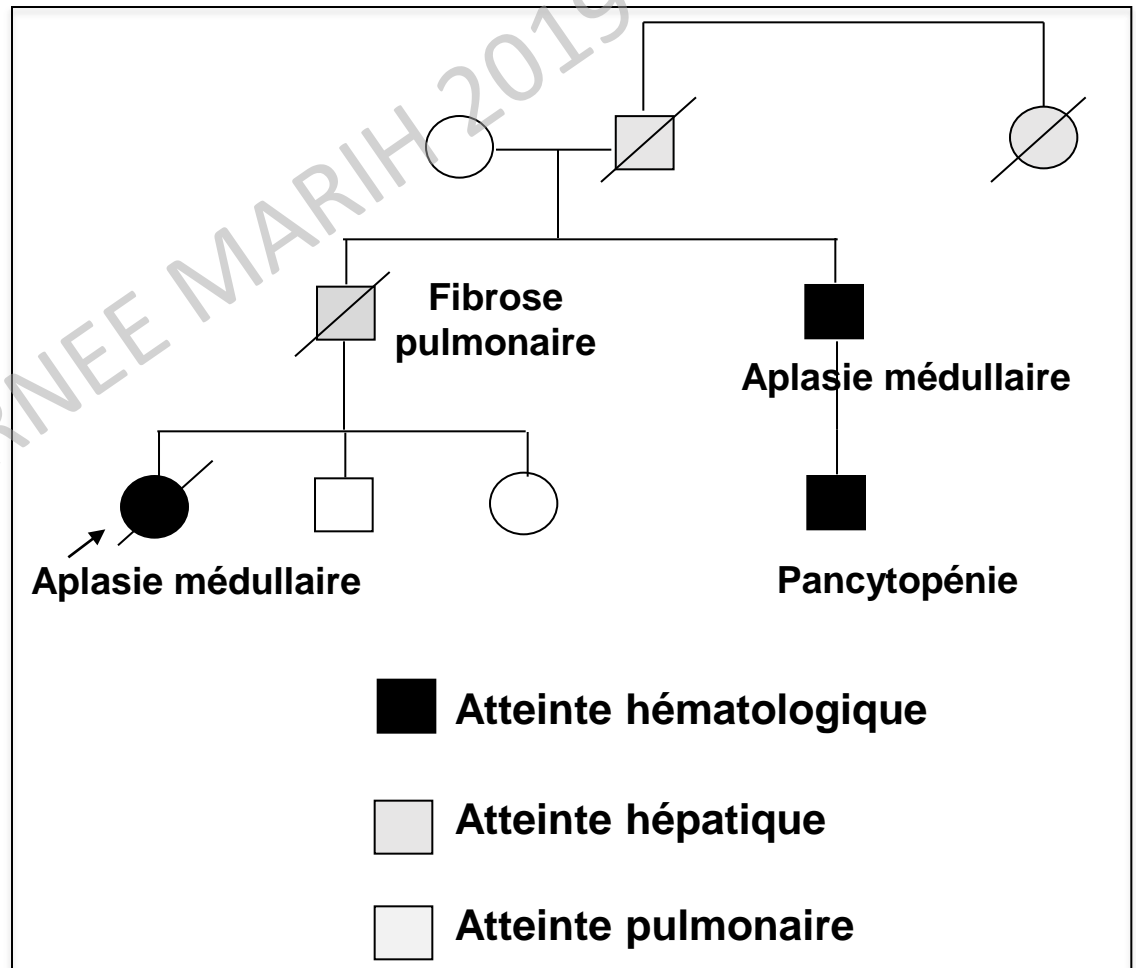
« **the (short) telomere syndrome** » (Armanios, *Nature Rev Genet* 2012)

- = The telomere syndrome
- = Telomere disease
- = Telomere biology disorder (TBD)
- = Telomere related gene disease
- = Telomerase deficiency disease











Alder et al., PNAS 2018

**Mutation constitutionnelle
d'un TRG
(telomere-related gene)**



Comparaison panel NGS / WES

	Panel NGS	WES
<ul style="list-style-type: none">• Couverture• Profondeur		
<ul style="list-style-type: none">• Nombre de cibles		
<ul style="list-style-type: none">• Recherche de CNV		
<ul style="list-style-type: none">• Recherche de nouveaux gènes		

SEQUENCAGE D'EXOME EN RECHERCHE

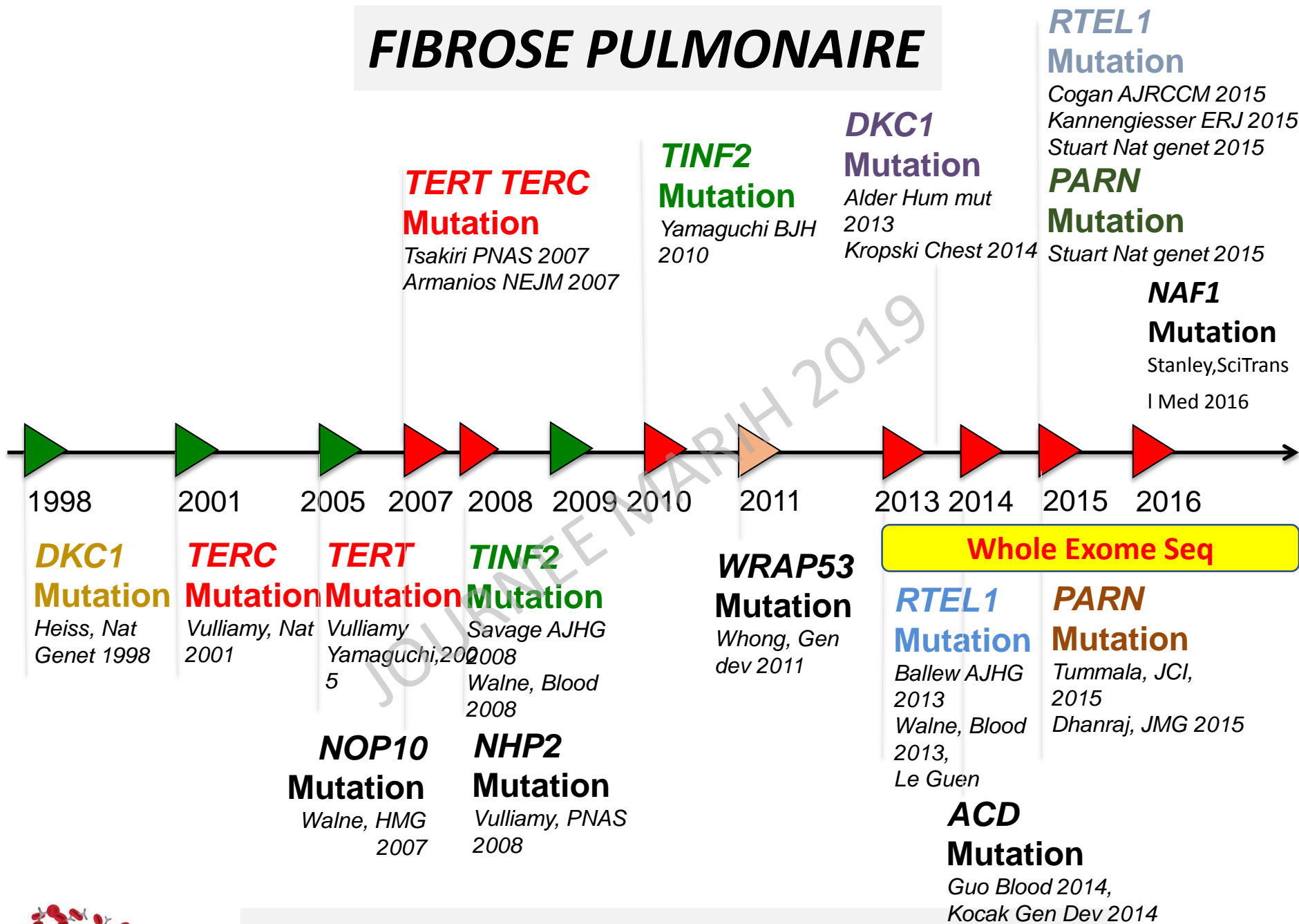
APPORTS

Identification de nouveaux
gènes en séquençant les
patients atteints
(RECHERCHE)

- RTEL1, PARN,
NAF1

JOURNEE MARIH 2019

FIBROSE PULMONAIRE



DYSKERATOSE CONGÉNITALE, BMF

SEQUENCAGE D'EXOME

Identification de nouveaux gènes en séquençant les patients atteints (RECHERCHE)

- RTEL1, PARN, NAF1

Description de nouveaux phénotypes en séquençant d'autres patients

- Phénotype rénal PARN

Whole-Exome Sequencing in Adults With Chronic Kidney Disease

A Pilot Study

Sneh Lata, PhD; Maddalena Marasa, MD; Yifu Li, MD; David A. Fasel, BS; Emily Gropman, BA; Vaidehi Jobanputra, PhD; Hila Rasouly, PhD; Adele Mitrotti, MD; Rik Westland, MD, PhD; Miguel Verbitsky, PhD; Jordan Nestor, MD; Lindsey M. Slater, MD; Vivette D'Agati, MD; Marcin Zaniew, MD; Anna Materna-Kirylyuk, MD; Francesca Lugani, MD; Gianluca Caridi, PhD; Luca Rampoldi, PhD; Aditya Mattoo, MD; Chad A. Newton, MD; Maya K. Rao, MD; Jai Radhakrishnan, MD; Woojin Ahn, MD; Pietro A. Canetta, MD; Andrew S. Bomback, MD; Gerald B. Appel, MD; Corinne Antignac, MD; Glen S. Markowitz, MD; Christine K. Garcia, MD; Krzysztof Kiryluk, MD; Simone Sanna-Cherchi, MD; and Ali G. Gharavi, MD

Ann Intern Med. 2018

n = 92 maladie rénale chronique de l'adulte

Characteristic	K017	K018	K060
Clinical diagnosis	CKD of unknown cause, Tubulointerstitial nephropathy with dysplastic features on biopsy	CKD of unknown cause, Tubulointerstitial nephropathy with dysplastic features on biopsy	CKD of unknown cause, no kidney biopsy available
Sex	Male (father)	Female (daughter)	Female
Age at presentation	44 y	23 y	48 y
Kidney outcome	ESRD, has undergone kidney transplantation	ESRD, has undergone kidney transplantation	ESRD, has undergone kidney transplantation
Follow-up clinical findings	Work-up for interstitial lung disease 3 y after study enrollment	None	Secondary hyperparathyroidism, normal findings on chest radiography at age 50 y, macrocytic anemia
Sequence variant [†]	c.554+1G>A	c.554+1G>A	c.C643T: p.Q215*

SEQUENCAGE D'EXOME

APPORTS

Identification de nouveaux gènes en séquençant les patients atteints

- RTEL1, PARN, NAF1

Description de nouveaux phénotypes en séquençant d'autres patients

- Phénotype rénal PARN

LIMITES

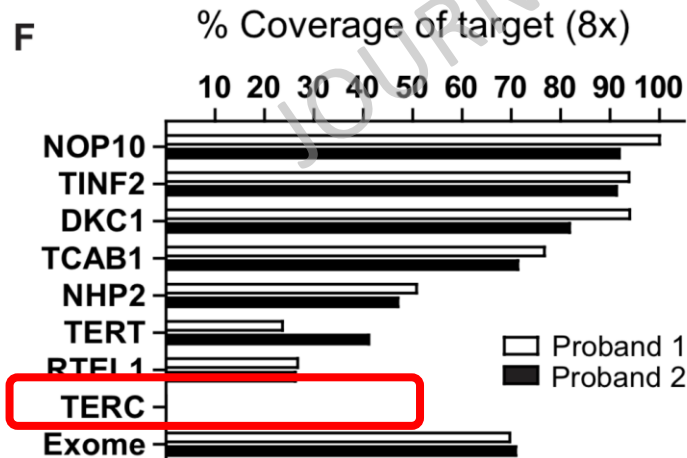
Couverture et une profondeur imparfaites

- Ex DKC1
- TERC
- Promoteur de TERT

Telomere Phenotypes in Females with Heterozygous Mutations in the Dyskeratosis Congenita 1 (*DKC1*) Gene

Jonathan K. Alder,¹ Erin M. Parry,¹ Srinivasan Yegnasubramanian,¹ Christa L. Wagner,¹ Lawrence M. Lieblich,² Robert Auerbach,³ Arleen D. Auerbach,⁴ Sarah J. Wheelan,¹ and Mary Armanios^{1,5*}

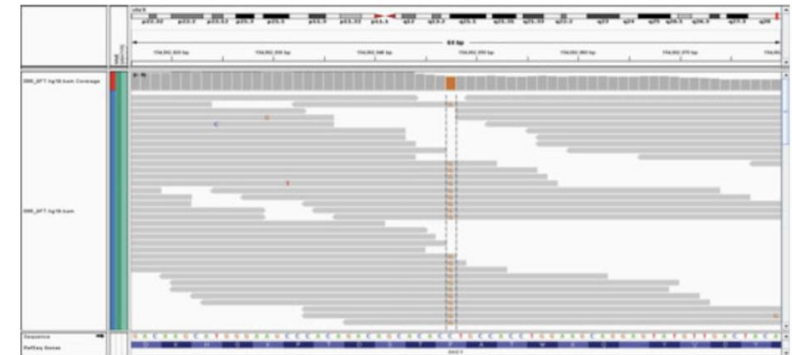
SureSelect Human Exome 38-Mb Kit (Agilent, Santa Clara, CA), and the **ABI SOLiD** sequencing platform (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Manual inspection of candidate telomere gene sequences using the **Integrative Genome Viewer**

**A**

Thr49Ser 2X !!

**B**

Pro409Arg



TERC toujours manquant (Lab Genève WES routine, TERC Sanger)

Mutations acquises du promoteur de *TERT*

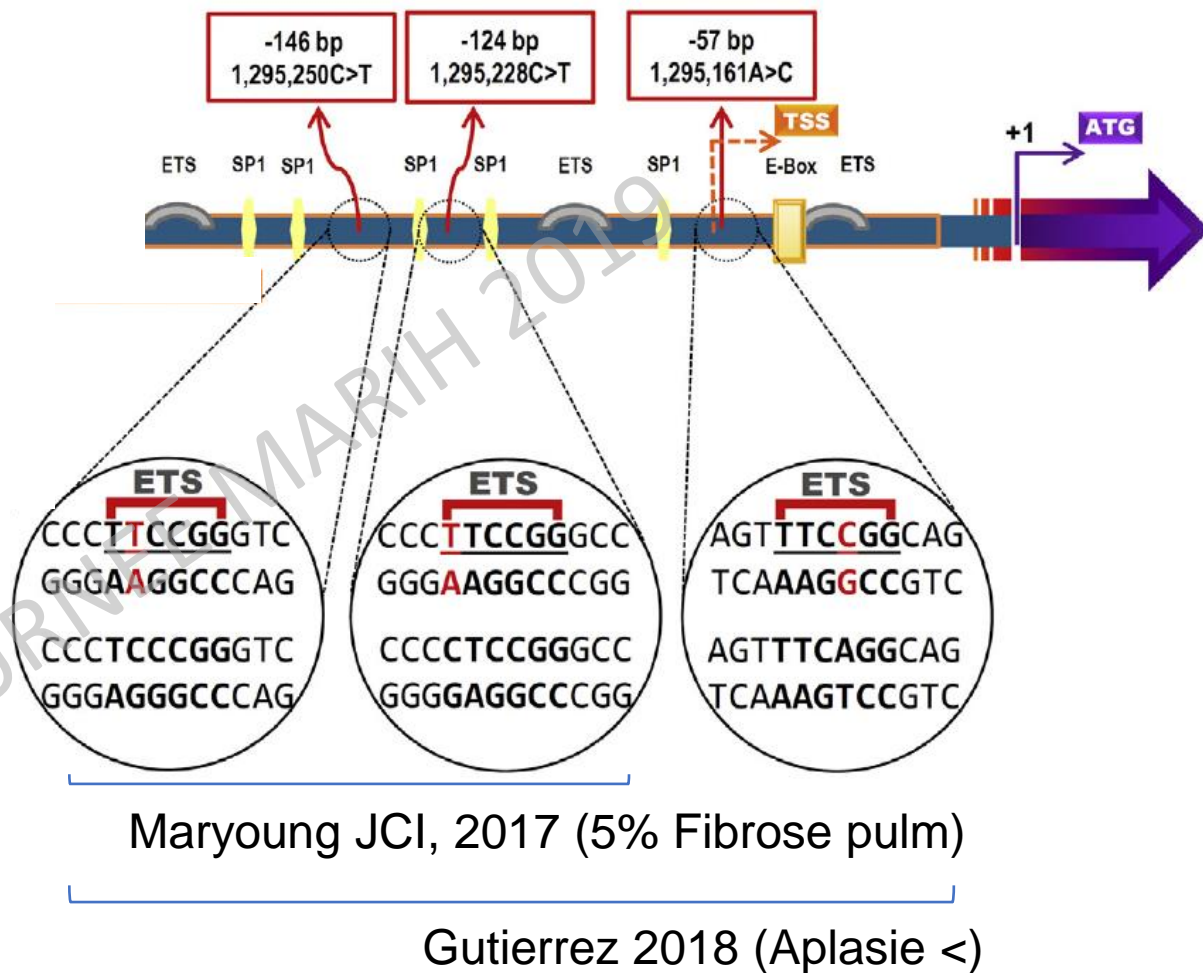
Non vues en WES

Adapted from

B. Heidenreich, R. Kumar / Mutation Research 771 (2017) 15–31

Mutations somatiques gain de fonction

- dans le cancer
(Mélanome,
gliome...)
- dans les
téломéropathies
Avantage sélectif
cellulaire



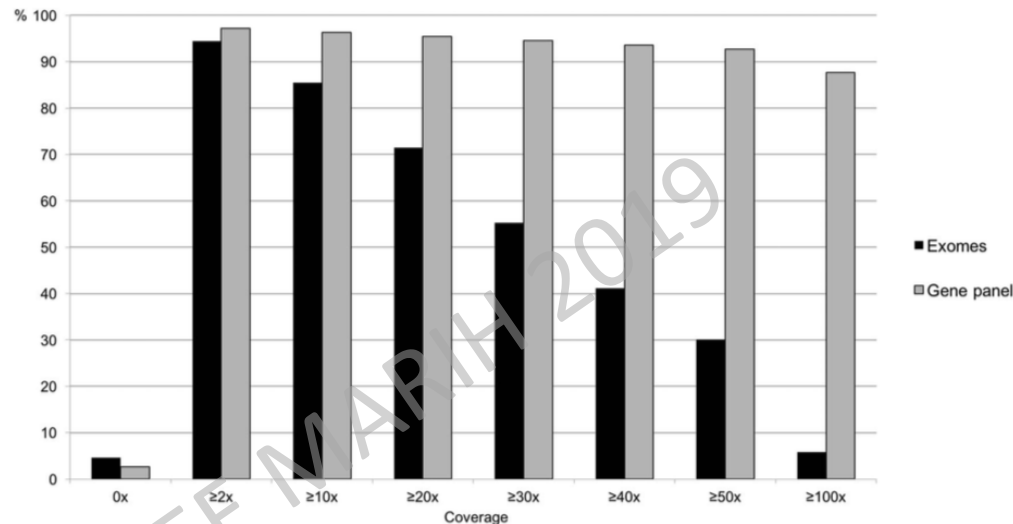
- Nécessité de techniques très sensibles (panel NGS++ ou PCR digitale)

Comparison panel NGS / WES

TABLE 2. Genes Included in the Targeted Gene Panel, Associated Clinical Syndromes and Mode of Inheritance

Gene	Clinical Syndrome	Mode of Inheritance
<i>ADAM17</i>	ADAM17-deficiency	AR
<i>IL2RA</i>	CD25-deficiency	AR
<i>CYBA</i>	Chronic granulomatous disease	AR
<i>CYBB</i>	Chronic granulomatous disease	XR
<i>NCF1</i>	Chronic granulomatous disease	AR
<i>NCF2</i>	Chronic granulomatous disease	AR
<i>NCF4</i>	Chronic granulomatous disease	AR
<i>DKC1</i>	Dyskeratosis congenita	AR/AD
<i>RTEL1</i>	Dyskeratosis congenita	AD
<i>TERC</i>	Dyskeratosis congenita	AR/AD
<i>TERT</i>	Dyskeratosis congenita	AD
<i>TINF2</i>	Dyskeratosis congenita	XR
<i>WRAP53</i>	Dyskeratosis congenita	AR
<i>STXBP2</i>	Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5	AR
<i>IL10</i>	IL-10 deficiency	AR
<i>IL10RA</i>	IL-10RA deficiency	AR
<i>IL10RB</i>	IL-10RB deficiency	AR
<i>LRBA</i>	LRBA-deficiency	AR
<i>IKBKG</i>	NEMO-deficiency	XR
<i>TTC7A</i>	TTC7A deficiency	AR
<i>WAS</i>	Wiscott-Aldrich-Syndrome	XR
<i>FOXP3</i>	X-linked immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy	XR
<i>XIAP</i>	X-linked lymphoproliferative syndrome 2	XR
<i>ATG16L1</i>	Susceptibility gene	—
<i>IRGM</i>	Susceptibility gene	—
<i>NOD2</i>	Susceptibility gene	—
<i>DEFB1</i>	Susceptibility gene	—
<i>IL23R</i>	Susceptibility gene	—

AR, autosomal recessive; AD, autosomal dominant; XR, X-Linked recessive.



Percentage of target region bases covered by the indicated number of reads in gene panel sequencing compared with WES in 25

Targeted Gene Panel Sequencing for Early-onset Inflammatory Bowel Disease and Chronic Diarrhea

Inf Bowel Dis 2017

Britt-Sabina Petersen, PhD,¹ Dietrich August, MD,² Renate Abt, MD,³ Moudjahed Alddafari, PhD,⁴ Lida Atarod, MD,⁵ Safa Baris, MD,⁶ Hemant Bhavsar, MD,⁷ Florian Brinkert, MD,⁸ Mary Buchta,² Alla Bulashevskaya, PhD,² Ronnie Chee, MD,⁹ Ana I. Cordeiro, MD,¹⁰ Naghi Dara, MD,¹¹ Gregor Dückers, MD,¹² Aisha Elmarsafy, MD,¹³ Natalie Frede, MD,² Nermeen Galal, MD,¹³ Patrick Gerner, MD,¹⁴ Erik-Oliver Glocker, MD,^{15,38} Sigune Goldacker, MD,² Jutta Hammermann, MD,¹⁶ Peter Hasselblatt, MD,¹⁷ Zuzana Havlicekova, MD, PhD,¹⁸ Katrin Hübscher,² Milos Jesenak, MD, PhD, MBA,¹⁸ Neslihan E. Karaca, MD,¹⁹ Elif Karakoc-Aydiner, MD,⁶ Mahboubeh M. Kharaghani, MD,²⁰ Sara S. Kilic, MD,²¹ Ayca Kiykim, MD,⁶ Christoph Klein, MD, PhD,²² Christian Klemann, MD,^{23,24} Robin Kobbe, MD,⁸ Daniel Kotlarz, MD, PhD,²² Martin W. Laass, MD,¹⁶ T. Ronan Leahy, MD,²⁵ Mehrnaz Mesdaghi, MD, PhD,²⁶ Sally Mitton, MD,²⁷ João F. Neves, MD,¹⁰ Birol Öztürk, MD,²⁸ Luis F. Pereira, MD, PhD,²⁹ Jan Rohr, MD,² Jessica L. R. Restrepo, MSc,² Gunda Ruzaika, BSc,³⁰ Nadia Saleh, MD,³¹ Suranjith Seneviratne, MD,³² Ebru Senol, MD,²⁸ Carsten Speckmann, MD,² Daniel Tegtmeyer, MD,¹⁴ Paul Thankam, MD,³³ Jutte van der Werff ten Bosch, MD, PhD,³⁴ Horst von Bernuth, MD, PhD,³⁵ Sebastian Zeissig, MD,^{36,37} Yvonne Zeissig, MD,¹⁶ Andre Franke, PhD,¹ and Bodo Grimbacher, MD²

SEQUENCAGE D'EXOME

APPORTS

Identification de nouveaux gènes en séquençant les patients atteints

- RTEL1, PARN, NAF1

Description de nouveaux phénotypes en séquençant d'autres patients

- Phénotype rénal PARN ?

LIMITES

Couverture et une profondeur imparfaites

- DKC1
- Manque le promoteur

Difficulté à identifier les CNV

Chimie et algorithme en cours d'amélioration (ex Twist Bioscience)

SEQUENCAGE D'EXOME

APPORTS

Identification de nouveaux gènes en séquençant les patients atteints

- RTEL1, PARN, NAF1

Description de nouveaux phénotypes en séquençant d'autres patients

- Phénotype rénal PARN ?

LIMITES

Couverture et une profondeur imparfaites

- DKC1
- Manque le promoteur

Difficulté à identifier les CNV
Algorithme en cours d'amélioration

Difficulté à identifier les autres gènes en cause (RECHERCHE)

➤ « Héritabilité manquante »
Missing heritability

- Héritabilité épigénétique

DIFFICULTE D'IDENTIFIER DE LES « NOUVEAUX » GENES PAR WES/WGS DANS LES TELOMEROPATHIES : **hérédité manquante** Exemple des fibroses pulmonaires familiales

The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis

Jonathan A. Kropski¹, Timothy S. Blackwell^{1,2,3,4} and James E. Loyd¹

Missing heritability and future genetic discovery

Cumulatively, available literature suggests that rare variants in FIP genes *SFTPC*, *SFTPA2*, *ABCA3*, *TERT*, *hTR*, *DKCI*, *TINF2* and *RTEL1* comprise 15–20% of FIP cases (table 2). However, it is possible that selection of families for these candidate-based genetic studies, as well as founder effects in certain populations, may have overestimated the frequency of some variants among all FIP families. While common genetic variants also confer FIP risk and may explain as much as 30% of FIP risk [32], there remains substantial “missing heritability”.



Difficulté d'obtenir des ADNs des apparentés atteints car

Souvent Décédés

FIBROSE PULMONAIRE =maladie à partir de 65 ans/ grave

HYPOTHESES GENETIQUES :

Transmission dominante 85% des cas

Expressivité variable



Pénétrance incomplète des mutations des TRG
(telomeres related genes)

Interaction gène-environnement+++

Héritabilité épigénétique

Phénocopie

CAS INEXPLIQUES

60-70% des fibroses pulmonaires

40-50% des dyskératoses congénitales

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES PAR WES/WGS

Difficultés d'analyse des séquençages d'exome

Nombre de Variations « retenus »



Autosomique Récessif/ consanguinité

Autosomique récessif

Néo-mutation

Voie candidate

Autosomique Dominant

Oligogénisme

Hérédité complexe



Hypothèse De transmission

Difficultés pour identifier les bases génétiques de cette famille

Héritabilité épigénétique

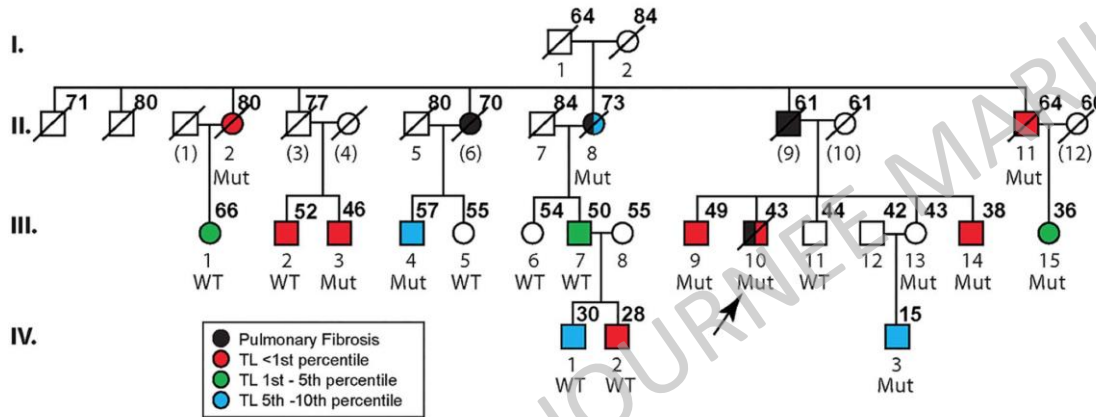
FIBROSE PULMONAIRE liée au gène PARN

COMMUNICATIONS

Epigenetic inheritance of telomere length obscures identification of causative *PARN* locus

Chao Xing,^{1,2} Christine Kim Garcia^{1,3}

J Med Genet: first publish

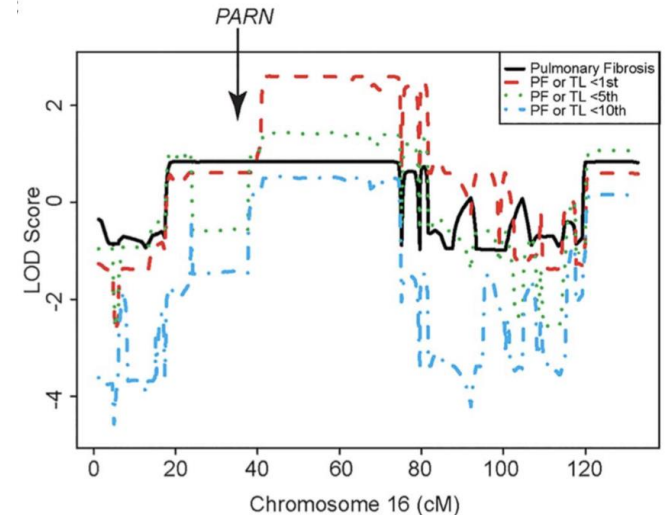
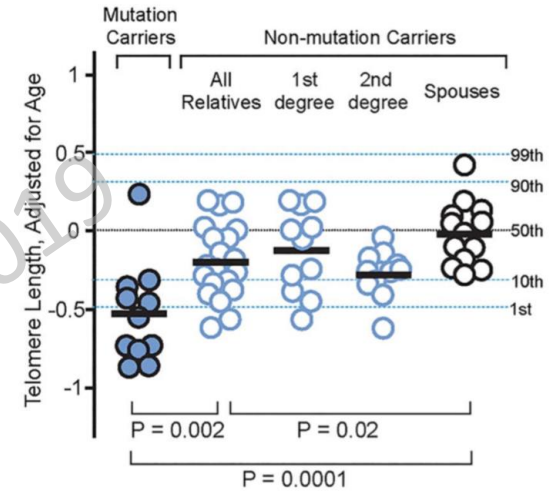


***PARN* c.529C>T (Gln177*) mutation**

Phénomépie IV.28

➤ **Téломères courts**

➤ **NON PORTEUR DE LA MUTATION**



SEQUENCAGE D'EXOME EN DIAGNOSTIC

APPORTS

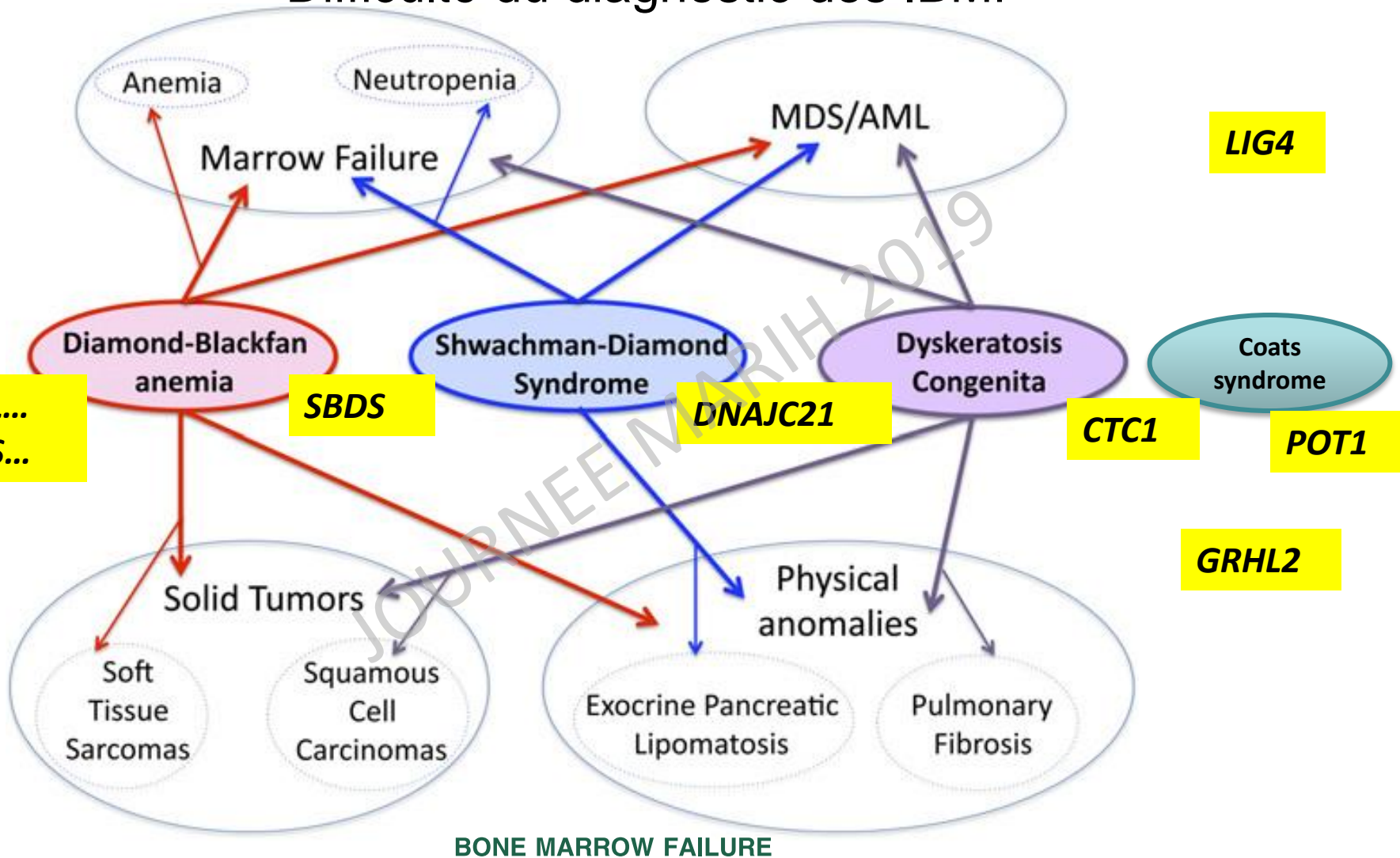
Données disponibles pour les gènes connus et aussi les potentiels nouveaux gènes qui seront identifiés ensuite!

- PHENOTYPES CHEVAUCHANTS (++)

JOURNÉE MARIH 2019

Des phénotypes chevauchants

Difficulté du diagnostic des IBMF



Adapté d'après **Marrow failure: a window into ribosome biology**

Davide Ruggero¹ and Akiko Shimamura^{2,3,4}

Blood, 2014

SEQUENCAGE D'EXOME EN DIAGNOSTIC

APPORTS

Données disponibles pour les gènes connus et aussi les potentiels nouveaux gènes qui seront identifiés ensuite!

- RTEL1, PARN, NAF1
- PHENOTYPES CHEVAUCHANTS (+++)

Optimisation organisationnelle dans un laboratoire
Eviter de gérer plusieurs panels NGS (mise à jour design, équipes techniciens..., validation de méthode accréditation COFRAC)

LIMITES

Idem RECHERCHE

Couverture et une profondeur imparfaites

- Ex Genève (séquençage TERN)
- Manque le promoteur

Difficulté à identifier les CNV

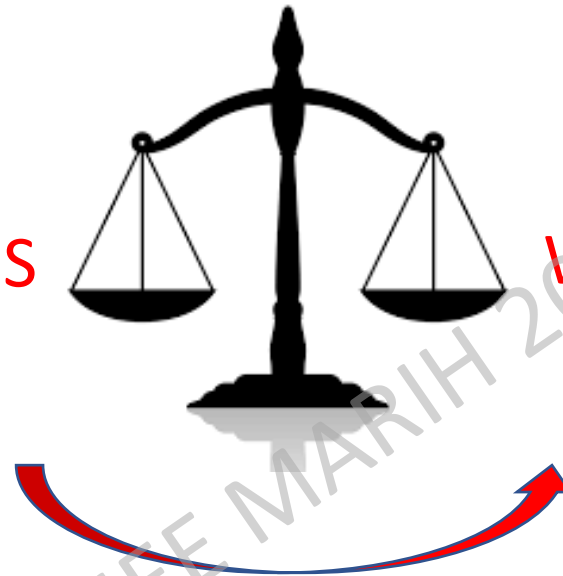
- Certaines techniques plus reproductibles et amélioration des algorithmes

La question demeure

Dépend des indications (présentation syndromique ?)

-
COUVERTURE ET
PROFONDEUR

panel NGS



WES

-PHENOTYPES
CHEVAUCHANTS
-ORGANISATION
LABO

Données incidentales

Si un patient/famille a bénéficié de plusieurs panels successifs ?
Expérience /Suisse ou Belgique

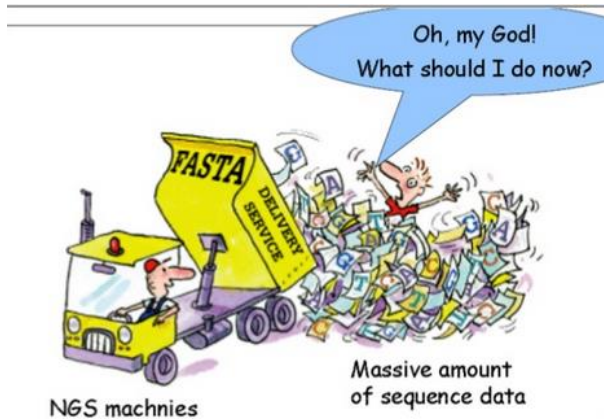
- **PERFORMANCES DES TECHNIQUES**
- **COUTS**
- **ORGANISATION (RH, délai...)**
- **URGENCE DE LA PRESCRIPTION (délai)**

COMPROMIS

➤ Etat des lieux à faire (en cours) MaRIH

GENOMIQUE LIMITES

Big data : grands nombres de variants identifiés



Cooper GM, Shendure J. (2011) Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet.*;12(9):628-40.

➤ LA DIFFICULTE DE L'INTERPRETATION DES VARIANTS CLASSIFICATION DES VARIANTS

CONCLURE SUR CLASSE 3 « UNCLASSIFIED »

85% des variants de TERT sont des variants faux-sens, rares.

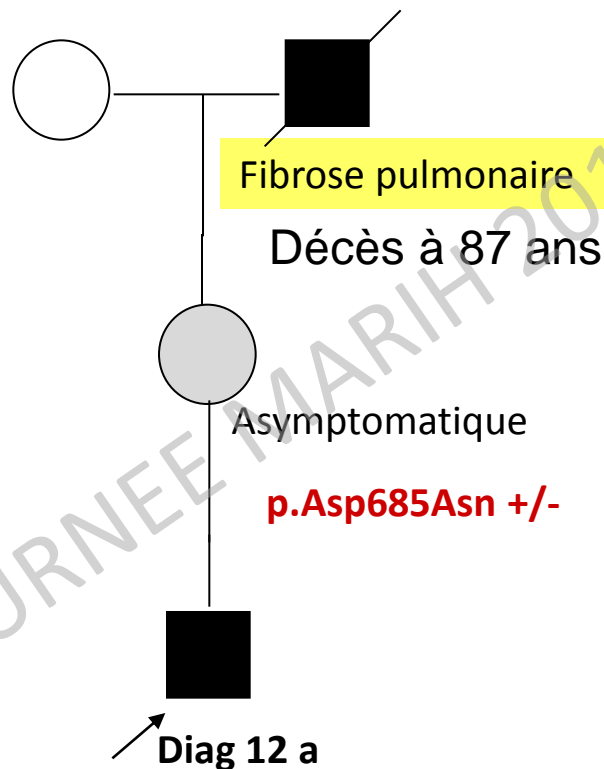
Nécessité de test fonctionnel ou un test de phénotypage

➤ Ex : mesure taille télomères

Les téloméropathies

Famille S

mutation *TERT* **c.2053G>A** , p.Asp685Asn



Aplasia médullaire
moelle hypoplasique avec
signes de dysmyélopoïèse

Taille des télomères ↓

p.Asp685Asn +/-

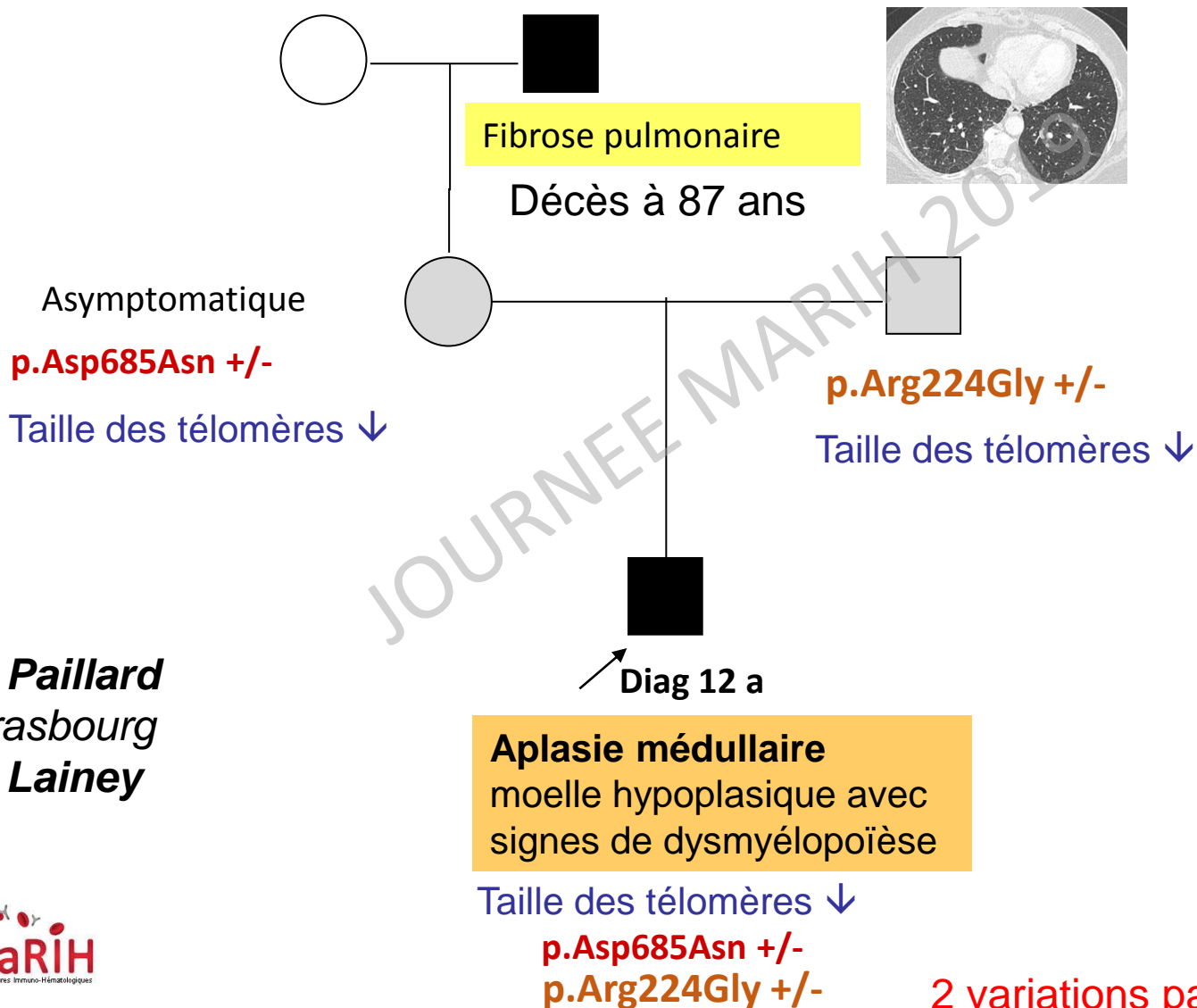
(p.Arg224Gly +/-)

Non rendu (prédit bénin)

Dr Paillard
Hématologie
Strasbourg

Les téloméropathies

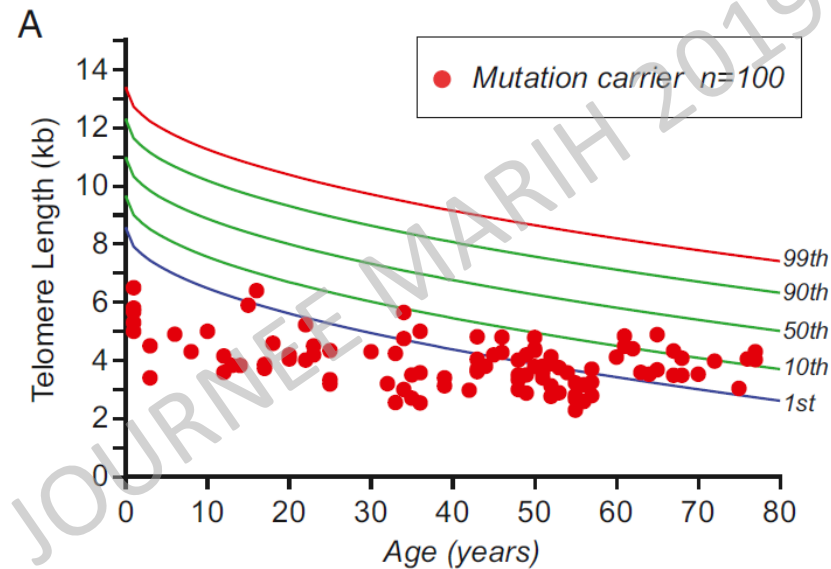
Famille S



Dr Paillard
Strasbourg
Dr Lainey

LIMITE DE LA GENETIQUE POUR LA MESURE DE LA TAILLE DES TELOMERES EN DIAGNOSTIC

Le flow FISH est considéré comme le Gold Standard



Alder et al., PNAS 2018
(mutations *TERT*, *TERC*, *RTEL1*, *PARN*, *DKC1*, *TINF1*, *NAF1*)

Perspective des WGS

WGS

Pré-indications HAS (cf Plan FG2025 pas de rendu données incidentales)



Identification des variations ou remaniements plus lointains ou plus complexe

- Exemple : translocation par WGS
- Exemple des variations plus lointaines
- Aborder l'hérédité complexe

Problématique des incidentalomes en diagnostic

RNAseq

Rechercher le gène causal par séquençage ARN haut débit

- Cumming, Sci Transl Med. 2017
- Kremer et al, 2017
- Gonorazky et al, 2019

Plate forme de tests fonctionnels en routine (mini gène, mutagenèse, transfection, zébrafish...)

DEFI DE L'ERE POST-GENOMIQUE



M

E

R

C

I

DE VOTRE ATTENTION