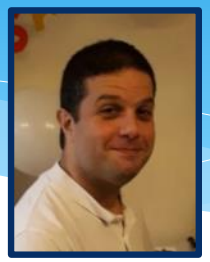
XXVIII^{ème} colloque ATC
Saint Malo,12 & 13 Septembre 2018

Mise en place de l'EXOME au sein de l'Unité Fonctionnelle de Génomique du développement

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS

Elodie LEJEUNE, Technicienne de laboratoire, UF de Génomique du développement (Dr Boris Keren), Département de génétique de PSL (Eric Leguern)

Présentation du laboratoire



* Hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris)
* Centre de Génétique Molécualire et Chromosomique : 10 unités fonctionnelles
* Partage des pièces techniques

* 6 Techniciennes
* 1 Biologiste temps plein et 1 Biologiste temps partiel
* 1 Bioinformaticien partagé
* 1 Sécretaire partagée

* Déficiences intellectuelles et maladies du développement

Avant l'arrivée de l'Exome

U. F. Cytogénétique

* Caryotype et FISH en post natal pour lesquels partage des locaux avec la CytoHématologie

* Puces Illumina : PSL-TRS-JVR-RDB

* Entre 2009 et 2014 : Chute de 57% de notre activité Caryo-FISH
  Augmentation de 57% de notre activité Puces

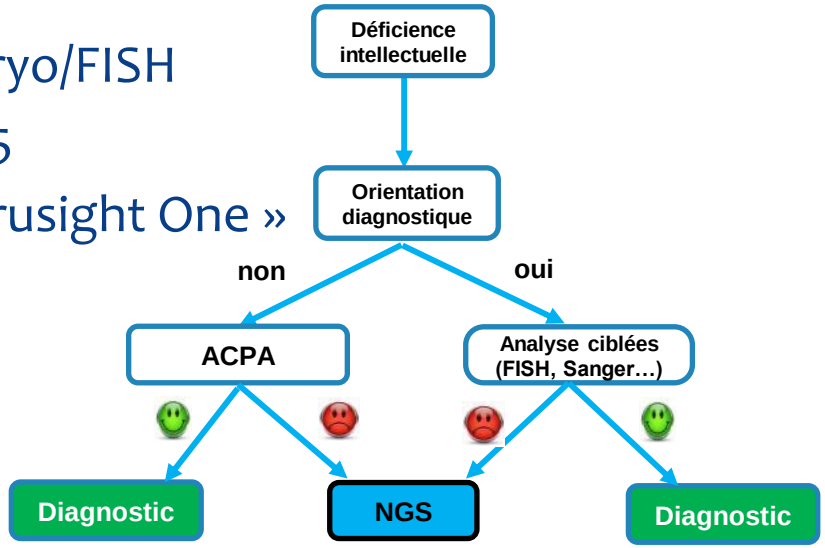
* Arrivée de l'Exome : 25 à 30% des patients avec Puces Neg pouvaient avoir un diagnostic

Passage à l'Exome

U. F. de Génomique du développement

* Changement de nom
* Moyens humains constant : Arrêt des caryo/FISH
* Transfert de l'activité à TRS en juillet 2015
* 1er test en avril 2014 : Exome clinique « Trusight One »

* Exome en trio : Enfant + parents
* Puce/X-Fragile/panel ciblés : Neg
* Prescription : Généticiens PSL/TRS



Qu'est ce que le NGS ?

* Next Generation Sequencing ou Séquençage de nouvelle Génération
* Séquencer en grandes quantités en un minimum de temps grâce séquenceur 2ème génération
* Plusieurs techniques, kits et automates possibles
* 4 Grandes étapes : Librairie – Amplification -Séquençage – Analyse

Techniques Testées

* Trusight One

-Kit Clé en main proposé par Illumina

- 4800 gènes soit 12Mb

-Tarif

- 4 jours de manip + 2x16h d'hybridation

- 36 échantillons/run, 1 run/semaine

- Design datant 2014

➢ Très vite obsolète

* MedExome

-Kit proposé par Roche

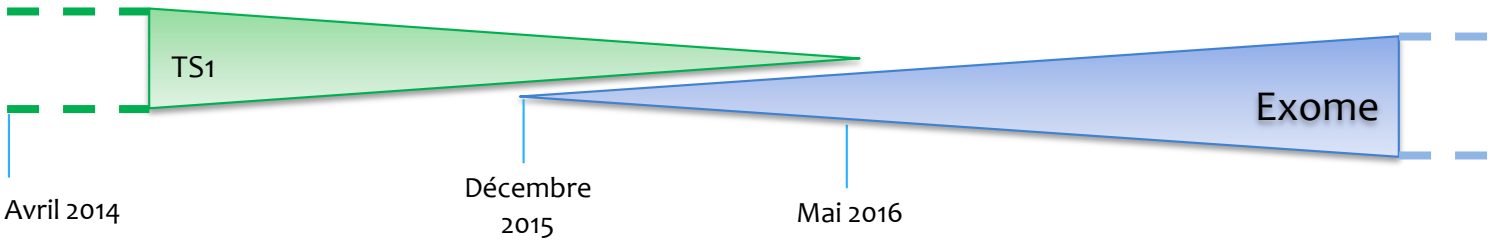
- Ttes régions codantes connues du génome soit 47Mb

-Tarif

- 2 jours de manip + 72h d'hybridation

- 12 échantillons/run, 2 runs/semaine

➢ En routine depuis Mai 2016

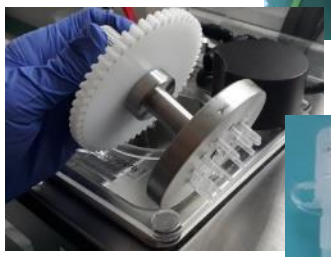


Préparation des ADN

* Dilution et fragmentation

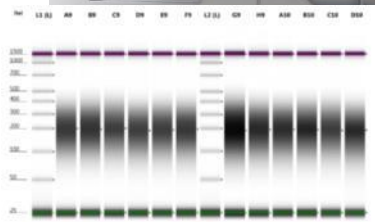
Bioruptor

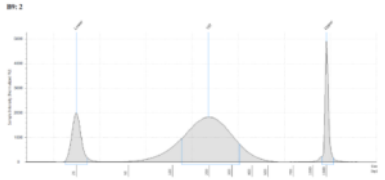
Fragmentation mécanique



TapeStation

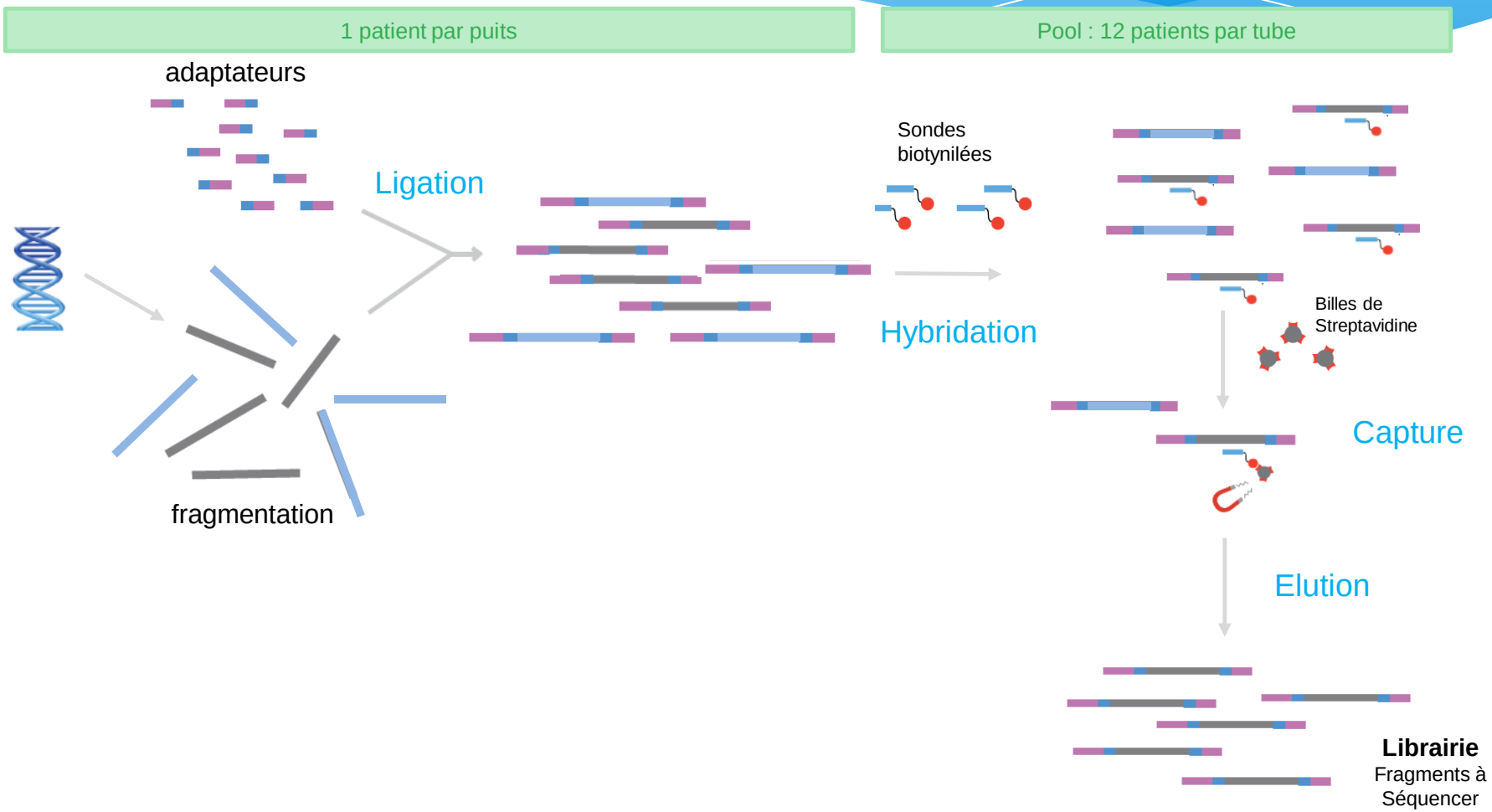
Vérification
Fragmentation





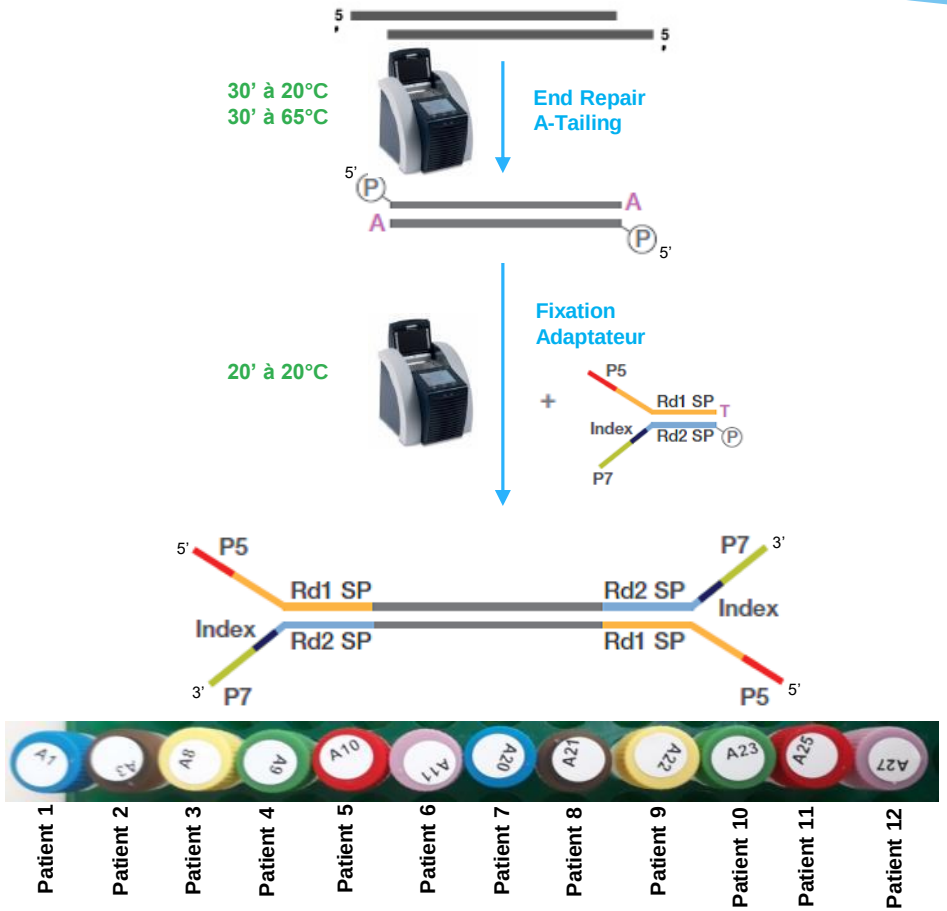
« Fabrication » de la librairie

* Par **capture :** ligation, hybridation, capture, élution



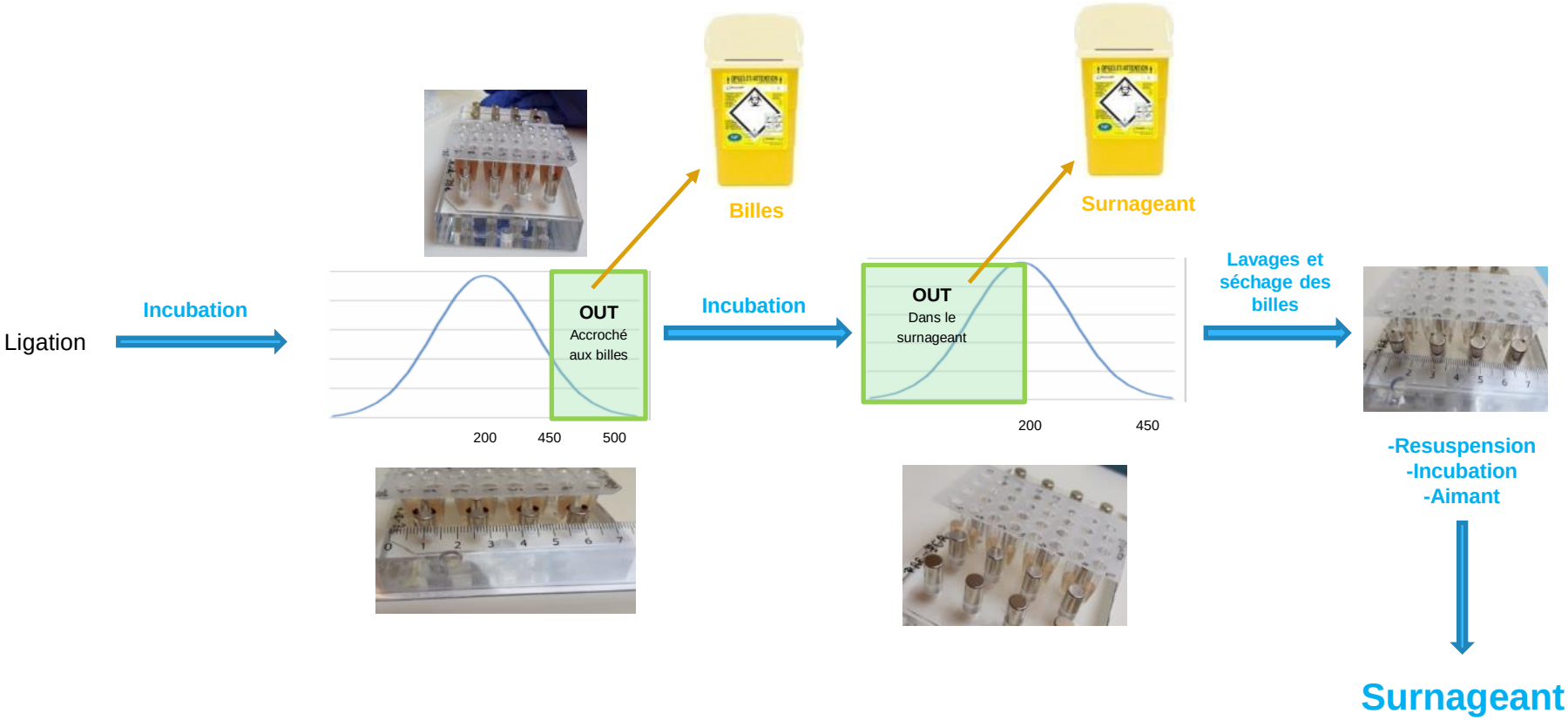
MedExome
« Fabrication » de la librairie

* **Etape 1 Ligation :** End Repair (Réparation) + A-Tailing (Adénylation) + Fixation Adaptateur



MedExome
« Fabrication » de la librairie

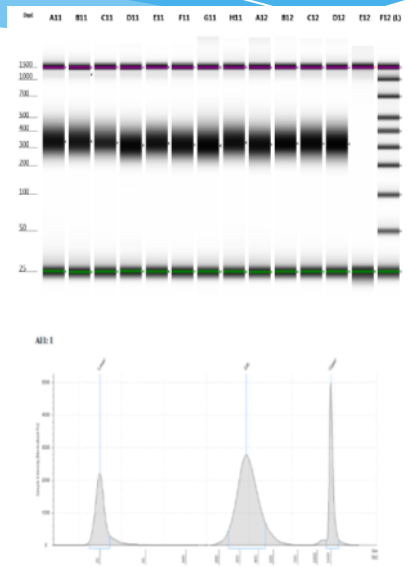
* Sélection des fragments compris entre 200 et 450 pb grâce à l'utilisation au ratio Quantité de billes/Quantité d'ADN



MedExome
« Fabrication » de la librairie

* Amplification par PCR des fragments obtenus

Température	Durée	
98°C	45sec	
98°C	15sec	7 cycles
60°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	1 min	
4°C	∞	



-Vérification sur TapeStation

-Dosage en Absorbance

Pool équimolaire des 12 échantillons pour obtenir dans 1 seul tube 1µg d'ADN

MedExome
« Fabrication » de la librairie

* **Etape 2 Hybridation**

1µg de librairie

+ COT DNA

+ Mix HE oligos Spécifique

+ HE oligos Universel

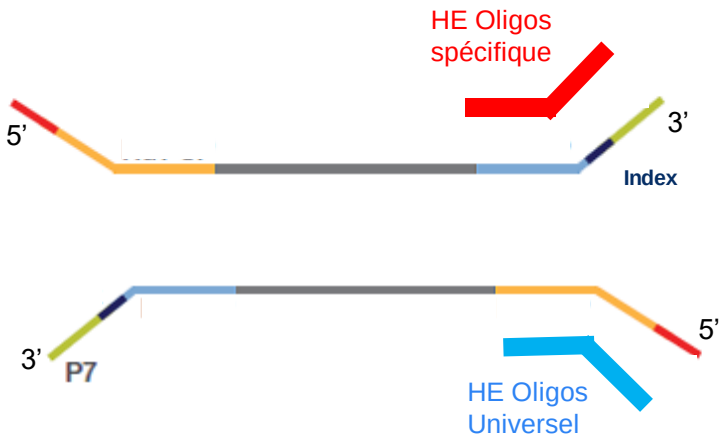
Concentration

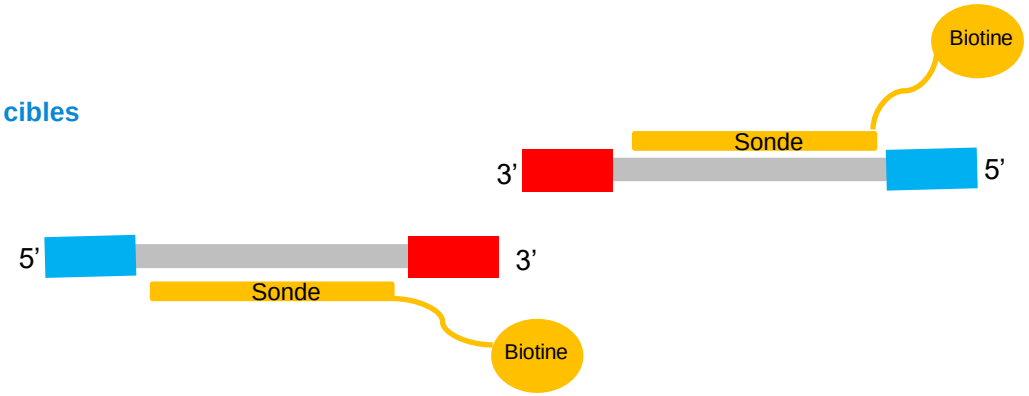
+ Tampons d'hybridation

Dénaturation

+ Sondes biotynilées des régions cibles

Incubation

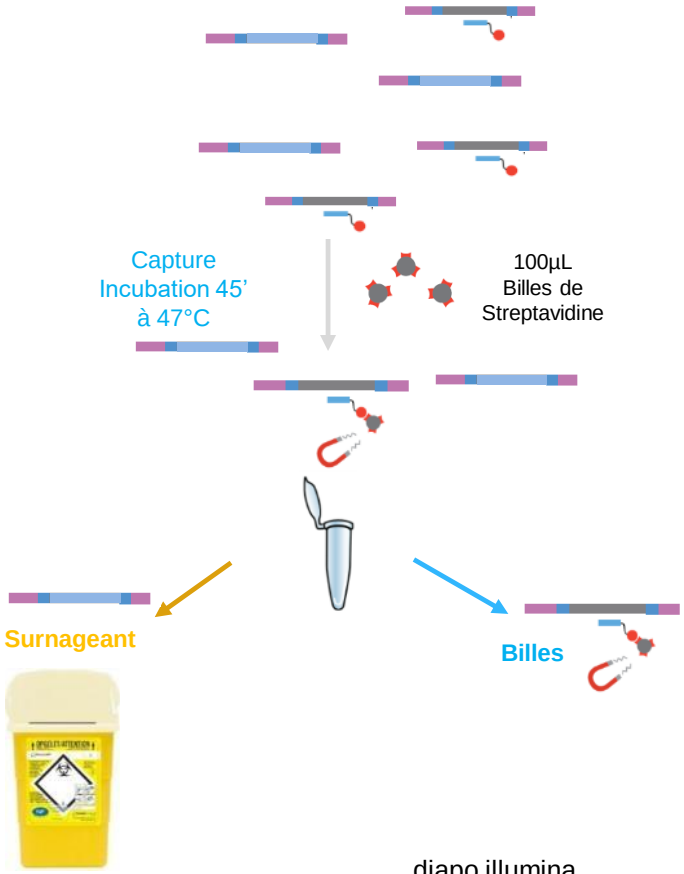




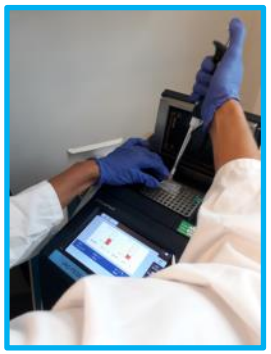
MedExome
« Fabrication » de la librairie

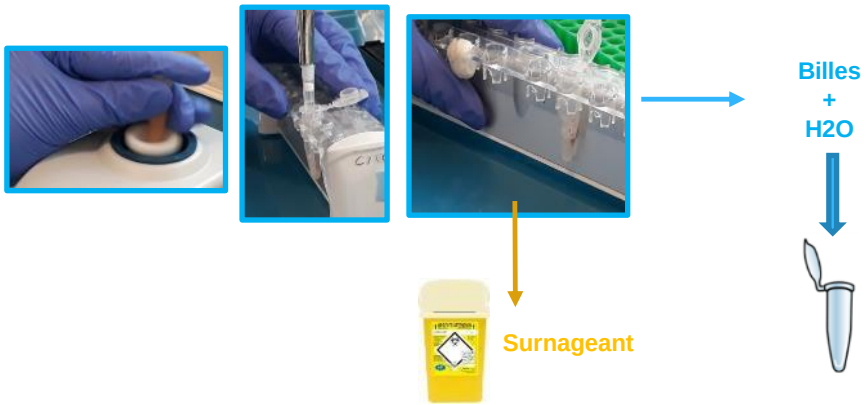
* Etape 3 Capture

par les billes de Streptavidine



* Lavages



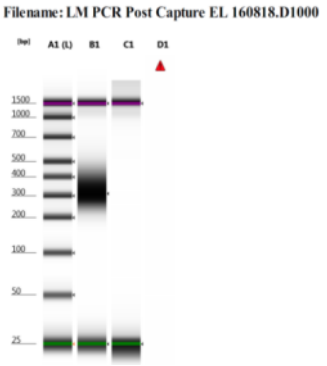


diapo illumina

MedExome
« Fabrication » de la librairie

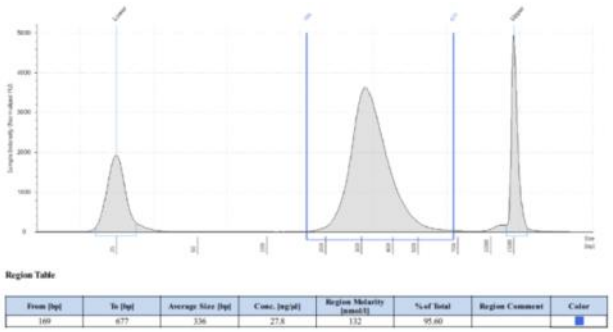
* Amplification par PCR des fragments obtenus

Témperature	Durée	Cycles
98°C	45 sec	1
98°C	15 sec	13
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	1 min	1
10°C	∞	



-Vérification sur TapeStation

-Dosage en Fluorescence



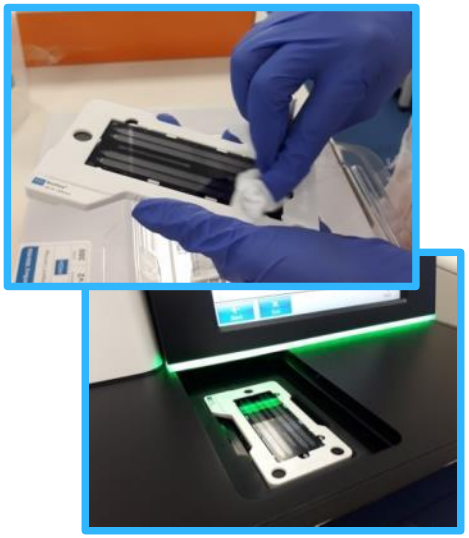
Region Table

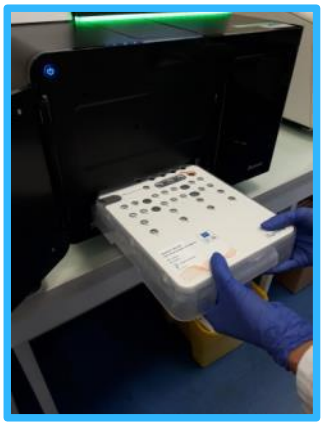
From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [ng/µl]	Region Molarity [nmol/l]	%of Total	Region Comment	Color
169	677	336	27.8	132	95.60		

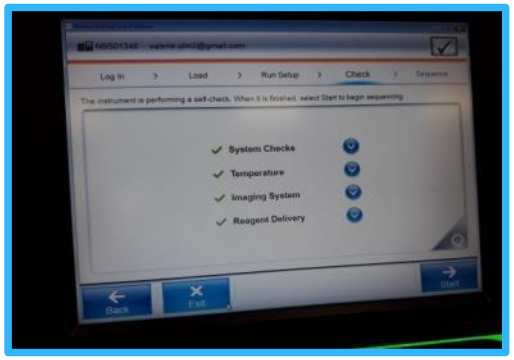
Dilution à 1.8pM

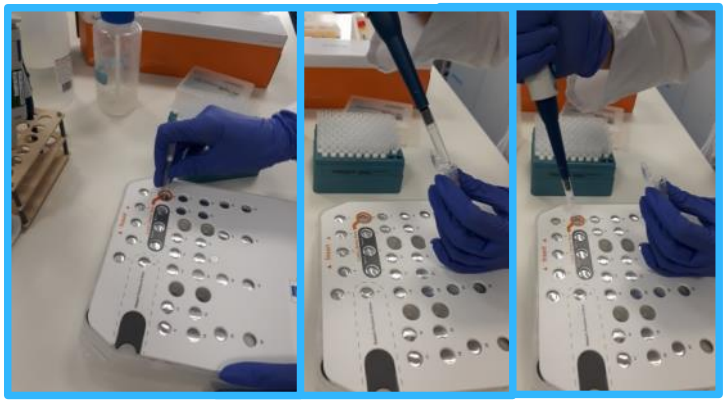
MedExome

* Passage sur Séquenceur NextSeq 500





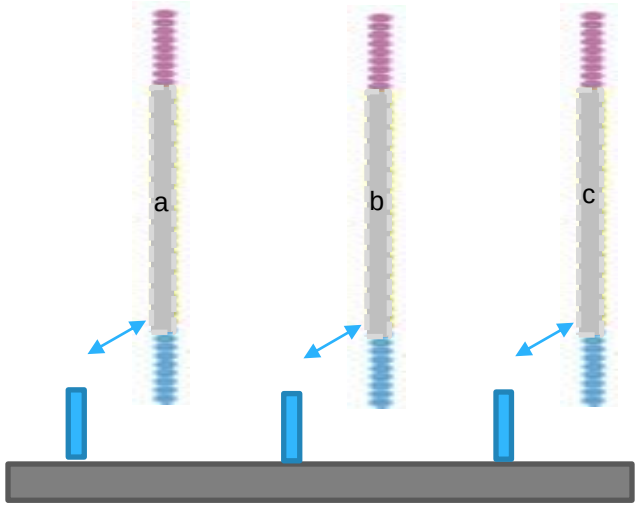




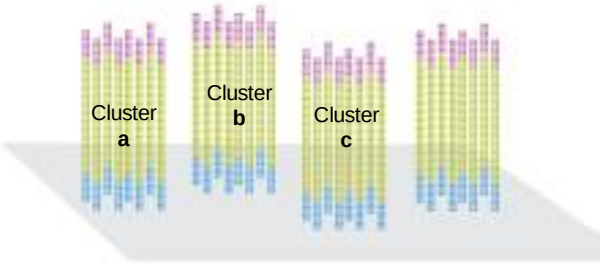
Amplification de la librairie

* La librairie est ensuite amplifiée soit sur support solide dans le Séquenceur :

Flow Cell



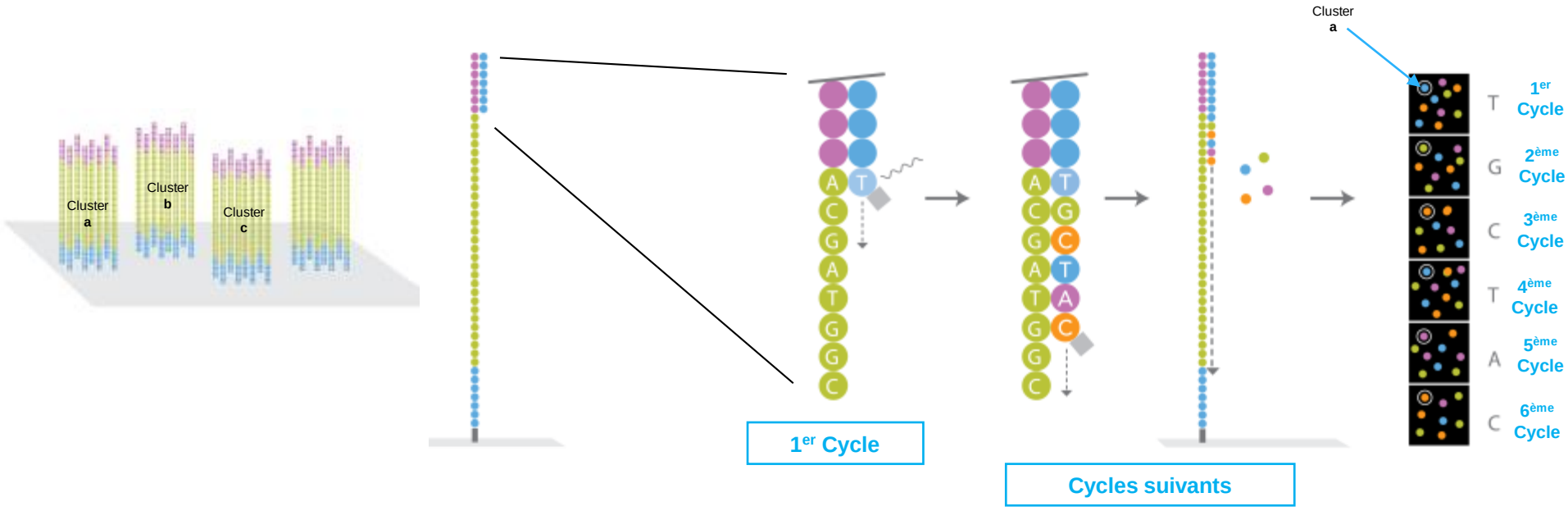
Amplification



1 Cluster = 1 séquence

Séquençage

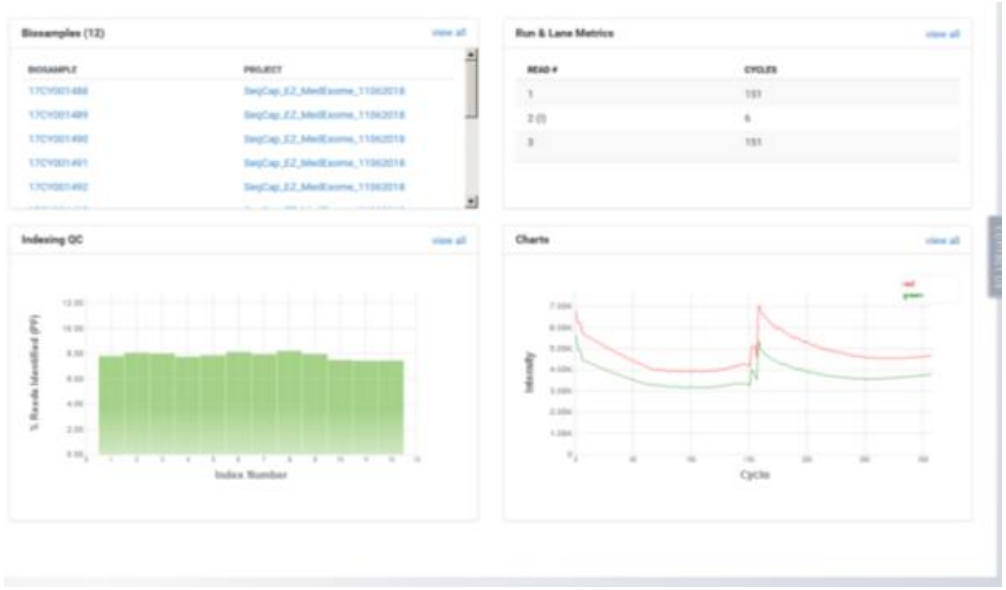
* Séquençage par synthèse :



➢ Séquence du Cluster A : TGCTAC

Séquençage

NB501346
Sequencing Complete
Run Name SeqCap_EZ_MedExome_30082018
Workflow FastQ
Q Score
Intensity
>=Q30
147.2Gb
84.9%
Q Score
Cluster Density
Clusters Passing Filter
Estimated Yield
End Run
Home


Biosamples (12)
Run & Lane Metrics
Indexing QC
Charts
Index Number
Cycle

Analyse

AGTCG[T]AAGTTCG

Séquenceur

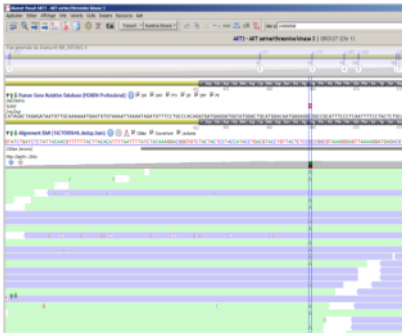
AGTCGAAGTTCGC

Fichier .bcl → *Démultiplexage* → **FastQ** → *Alignements* → **BAM** → *Détection des variants* → **VCF**

Analyse

VCF → *Annotation des variants* → Fichier Excel → *Application du filtre Transmission*

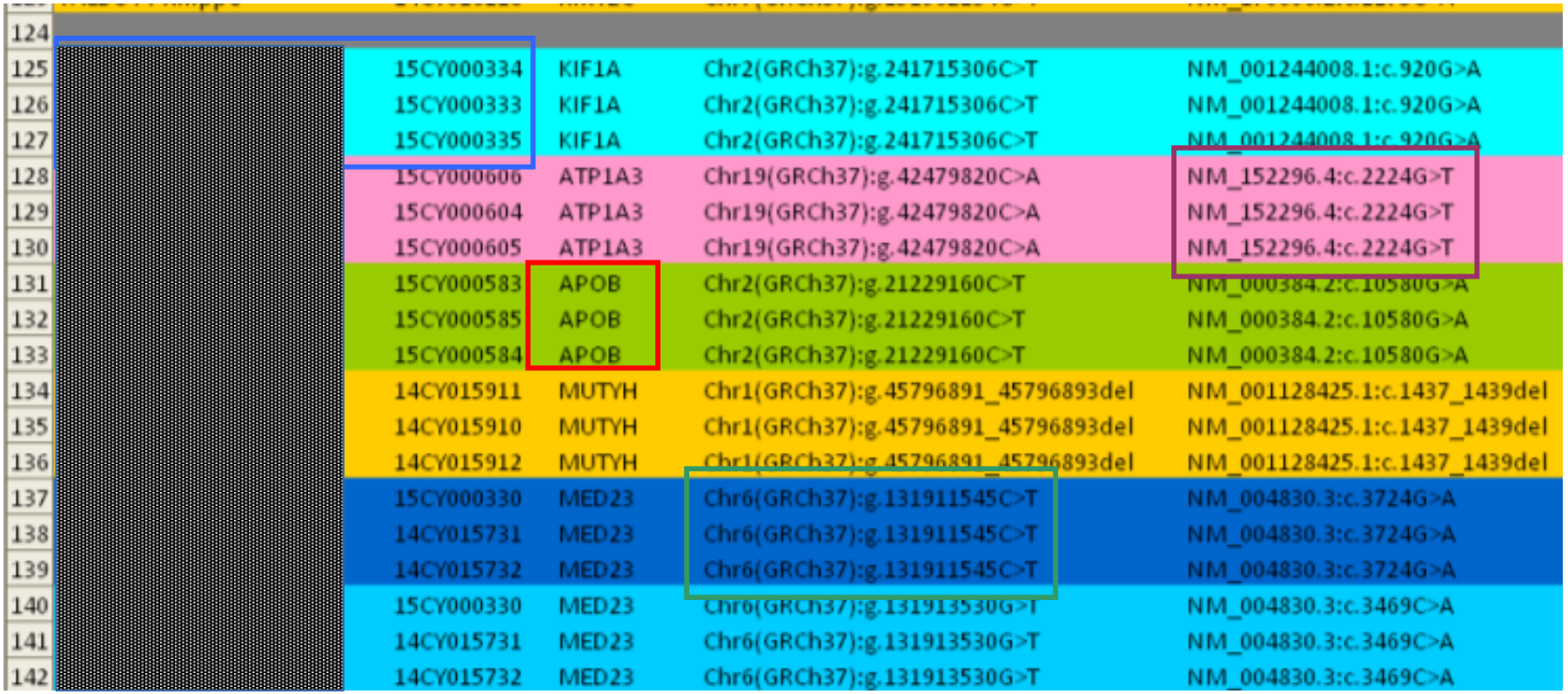
gene_nan	SIDG	HGMD_gene	clinvar_gene	omim_inf	chrom	pos_hg19	ref	alt	snpeff_co	gnom	warnings	fla
'PLEKHM2		0 Cardiomyopathy_	.	.	chr1	16042729	C	A	splice_regio		lowHTZ	TT
'DNAJB11		0 .	.	.	chr3	186302396	GTGTGTGTG1	G	splice_regio		GQ,lowHMZ	GC
'SYNGAP1	V	Intellectual_disab	Mental_retarda	AD	chr6	33405946	G	A	missense_va		.	AA
'SCAF8		0 .	.	.	chr6	155054975	A	C	missense_va		GQ,lowHTZ	CT
'UBR5		0 Long_QT_syndron	.	.	chr8	103424383	A	C	splice_regio		GQ,lowHTZ	CC
'NANOS1		0 Azoospermia,Olig	Spermatogenic_	AD	chr10	120789612	T	G	missense_va		DP20	tg
'NANOS1		0 Azoospermia,Olig	Spermatogenic_	AD	chr10	120789630	A	C	missense_va		DP20,lowHTZ	cg
'EPYC		0 Schizophrenia	.	.	chr12	91372041	TG	T	splice_regio		DP20	GC
'EPYC		0 Schizophrenia	.	.	chr12	91372043	A	T	splice_regio		DP20	TA
'ARHGAP23		0 .	.	.	chr17	36666286	T	G	missense_va		lowHTZ	AG
'TPM4		0 Macrothrombocyt	.	.	chr19	16187427	C	T	stop_gained		DP20,lowHTZ	AT
'LMTK3	C	Inflammatory_bo	.	.	chr19	49001840	T	G	missense_va		DP20,lowHTZ	GG
'LMTK3	C	Inflammatory_bo	.	.	chr19	49001849	T	G	missense_va		DP20	GG



Visualisation des BAM
Corrélation du phénotype

Diagnostic

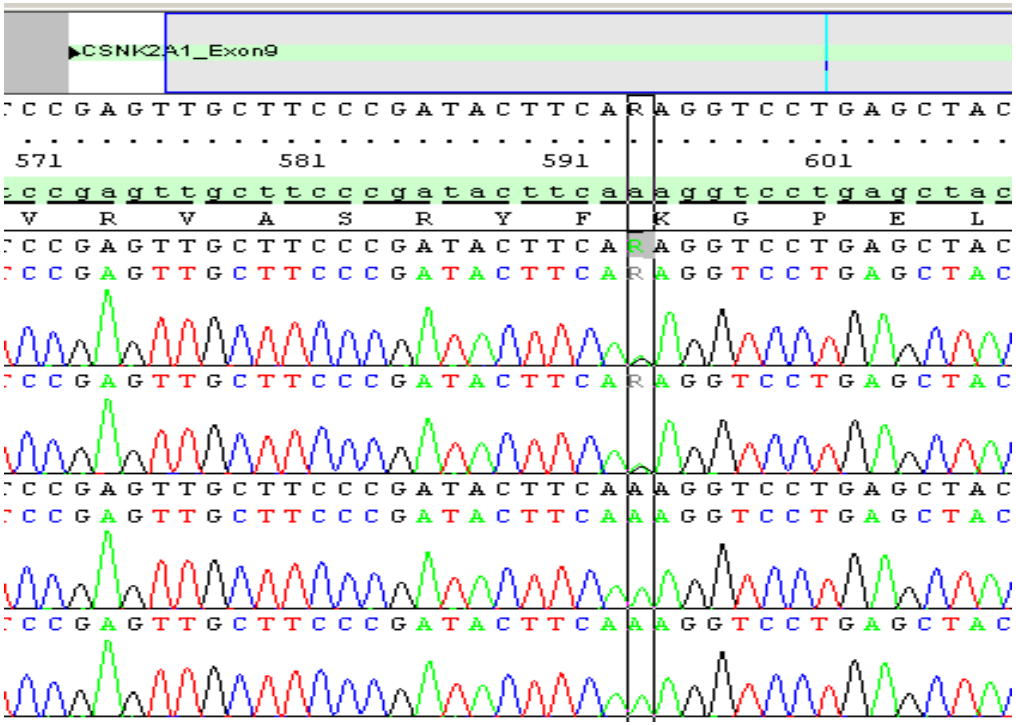
Vérification Sanger

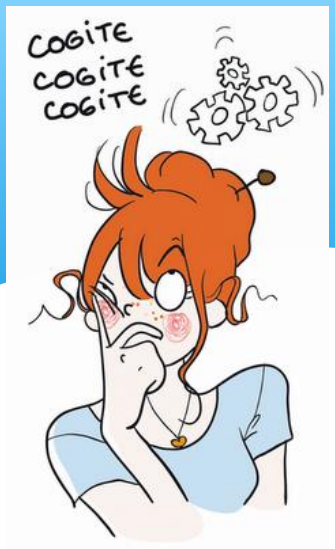


124				
125	15CY000334	KIF1A	Chr2(GRCh37):g.241715306C>T	NM_001244008.1:c.920G>A
126	15CY000333	KIF1A	Chr2(GRCh37):g.241715306C>T	NM_001244008.1:c.920G>A
127	15CY000335	KIF1A	Chr2(GRCh37):g.241715306C>T	NM_001244008.1:c.920G>A
128	15CY000606	ATP1A3	Chr19(GRCh37):g.42479820C>A	NM_152296.4:c.2224G>T
129	15CY000604	ATP1A3	Chr19(GRCh37):g.42479820C>A	NM_152296.4:c.2224G>T
130	15CY000605	ATP1A3	Chr19(GRCh37):g.42479820C>A	NM_152296.4:c.2224G>T
131	15CY000583	APOB	Chr2(GRCh37):g.21229160C>T	NM_000384.2:c.10580G>A
132	15CY000585	APOB	Chr2(GRCh37):g.21229160C>T	NM_000384.2:c.10580G>A
133	15CY000584	APOB	Chr2(GRCh37):g.21229160C>T	NM_000384.2:c.10580G>A
134	14CY015911	MUTYH	Chr1(GRCh37):g.45796891_45796893del	NM_001128425.1:c.1437_1439del
135	14CY015910	MUTYH	Chr1(GRCh37):g.45796891_45796893del	NM_001128425.1:c.1437_1439del
136	14CY015912	MUTYH	Chr1(GRCh37):g.45796891_45796893del	NM_001128425.1:c.1437_1439del
137	15CY000330	MED23	Chr6(GRCh37):g.131911545C>T	NM_004830.3:c.3724G>A
138	14CY015731	MED23	Chr6(GRCh37):g.131911545C>T	NM_004830.3:c.3724G>A
139	14CY015732	MED23	Chr6(GRCh37):g.131911545C>T	NM_004830.3:c.3724G>A
140	15CY000330	MED23	Chr6(GRCh37):g.131913530G>T	NM_004830.3:c.3469C>A
141	14CY015731	MED23	Chr6(GRCh37):g.131913530G>T	NM_004830.3:c.3469C>A
142	14CY015732	MED23	Chr6(GRCh37):g.131913530G>T	NM_004830.3:c.3469C>A

Vérification Sanger

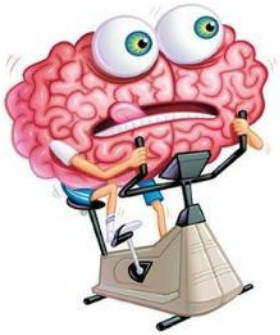
* Design de primer
* Polymerase Chain Reaction puis Réaction de Séquence
* Analyse de la séquence grâce à Logiciel SeqScape v2.6





Formations

* Formations techniques : Illumina et Roche
* Entre techniciennes de l'équipe mais aussi du centre
* Initiation à la bioinformatique, Plateforme de Bioinformatique de l'AP-HP
* Staff Clinico-Biologique



Ressenti des techniciennes face à ce changement

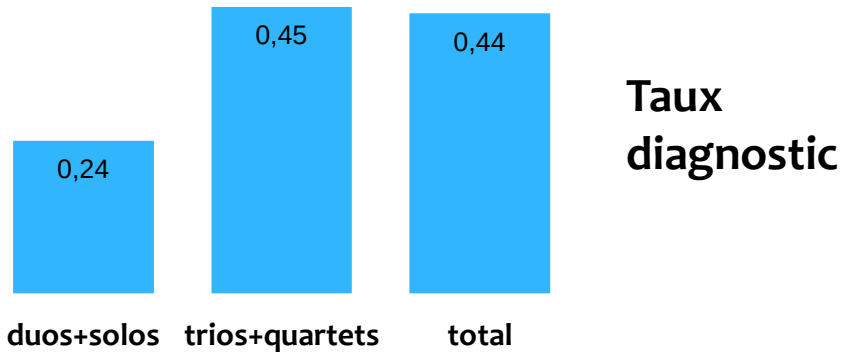
* Variabilité du nombre d'année d'expérience
* Techniciennes plus expérimentées : Nostalgie et Appréhension
* Techniciennes novices : Normalité et Sérénité
* + = Acquisition nouvelles compétences, plus d'autonomie et moins d'aléa techniques qu'en cytogénétique
* **Bilan après 3 ans : à l'aise, sereine ... Aucun départ suite à la mise en place** 😉

Résultats

* Augmentation du taux de diagnostic dans la DI
  - Puces : 10 à 15% de diagnostic
  - MedExome : 44% des diagnostic

* Etude de 655 cas index : 286 diagnostics dans 190 gènes
* 38% des gènes ABS du kit TS1

* Meilleur taux de diagnostic pour les trios



Cas clinique

* Petit garçon ayant une Encéphalopathie épileptique très sévère
  - mouvements anormaux dès les 1ers jours de vie
  - développement médiocre
  - PC Normal, IRM cérébrale normale
  - décès à 3,5 mois

* **Mère enceinte (20 SA)**

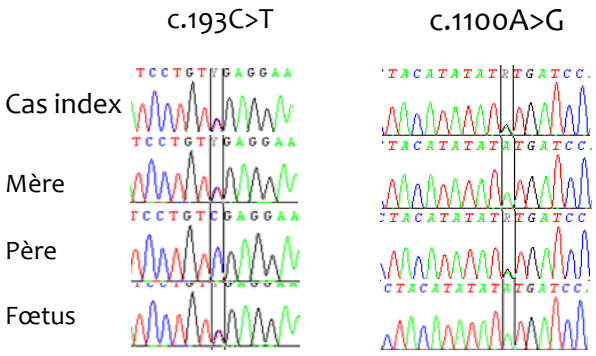
➢ Exome en trio en urgence

* UGDH : impliquée dans la biosynthèse des glycosaminoglycanes
* p.Arg65* + p.Tyr367Cys (CADD : 29,4), htz composite. GnomAD : 0 hmz
* Pas connu dans les bases de données

➢ Cohorte de 9 patients (H Hengel, B Reversade)

* Transmission AR. Phénotype : EE, DI sévère

* **DPN en 2016 puis DPN en 2018 avec 2 foetus non atteints**



Perspectives

* Élargissement de notre recrutement Centre de Référence Maladies Rares Déficience Intellectuelle
* **CNV** (Copy Number Variant) avec les données d'Exome
* Tester l'Exome proposé par **TWIST Bioscience**
* **Évaluation des Incidental findings** (projets FIND – collaboration avec Dijon, Laurence Faivre) – 100 patients
* Projet de recherche « **Exome ACC** » pour évaluer la faisabilité et l'intérêt de l'exome en prénatal chez les fœtus avec agénésie du corps calleux

Remerciements

UF de Génomique du développement

Biologistes
Caroline Nava
Boris Keren
Secrétaire
Catherine Aumont
Bioinformaticien
Julien Buratti

Techniciennes
Aurélie Lafitte
Claude Estrade
Corinne Mach
Elodie Lejeune
Sabina Karagic
Valérie Olin

PMT
Patricia Leite
Tuyet Pham
Cadres
Jean Bilala
Michel Szpytma

UF de Génétique Clinique

Cliniciens
Delphine Héron

Cyril Mignot
Perrine Charles
Sandra Whalen
Damien Haye
Isabelle Marey
Marie-Lorraine Monin
Solveig Heide
Aurélia Jacquette

Conseillère en génétique
Myrtille Spentchian

ARC
Anne Faudet

Hopital Trousseau

Alexandra Afenjar
Diane Doummar
Diana Rodriguez
Lydie Burglen
Marie-Laure Moutard
Thierry Billette
Sandra Chantot-Bastaraud
Jean-Pierre Siffroi

ICM

Yannick Marie
Emeline Mundwiller
Delphine Bouteiller
Agnès Rastetter

Internes et Stagiaires

Alinoë Lavillaureix
Thomas Courtin
Lise Larcher
Leila Qebibo