



Diagnostic étiologique génétique de la déficience intellectuelle de causes rares et des anomalies du développement

Intérêt majeur du séquençage haut débit d'exome dans l'attente du séquençage haut débit de génome

Filières AnDDI-rares et Défiscience

Auteurs : Pr Laurence Olivier-Faivre, Pr Christel Thauvin-Robinet (ANDDI rares)

Dr Delphine Héron (DéfiScience)

Relecteurs : Pr Jean-Paul Bonnefont, Pr Damien Sanlaville, Pr David Geneviève (responsables axe diagnostic génétique de la filière AnDDI-Rares), Dr Julien Thevenon, Pr Vincent Desportes, Dr Lydie Burglen, Dr C Depienne, Dr B Keren (Défiscience)

Dr P Saugier et Dr B Gérard (ANPGM)

Introduction

La déficience intellectuelle (DI) et les anomalies du développement (AD) sont des affections fréquentes (2 à 3% de la population, véritable question de santé publique), pour lesquels il existe une hétérogénéité majeure sur le plan étiologique. Pour la DI, on considère actuellement que les causes génétiques représentent de un quart à la moitié des causes identifiées, et que chaque cause de DI d'origine génétique ne représente qu'une très petite portion des étiologies, estimée pour chacune à moins de 1%, (en dehors de la trisomie 21 et du syndrome de l'X fragile, cause héréditaire la plus fréquente). Parmi les causes génétiques de DI/AD, on distingue les anomalies chromosomiques visibles sur un caryotype, les microréarrangements génomiques déséquilibrés variés (identifiés par la technique de CGH-array ou Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA), les anomalies monogéniques, et les anomalies génétiques non mendéliennes (dont phénomène d'empreinte parentale...). Les modes de transmission sont très variables, dominant autosomique (le plus souvent sporadique, lié à une mutation *de novo*), récessif autosomique, récessif lié à l'X, dominant lié à l'X ou mitochondriaux. La proportion de causes indéterminées augmente lorsque la DI est légère (causes multifactorielles). L'évolution des technologies, initialement les méthodes d'hybridation génomique comparative (CGH: *comparative genomic hybridization*) sur matrice ordonnée (microréseau ou *array*) – plus communément appelée CGH-array (ou ACPA Analyse Cytogénétique par Puce à ADN)-, et plus récemment de séquençage haut débit (*Next Generation Sequencing, NGS*) ont permis de faire reculer la fraction de DI de

cause indéterminée au profit des causes génétiques, et le nombre de gènes identifiés ne cesse de s'accroître.

Difficultés du diagnostic étiologique

Les éléments qui conditionnent le diagnostic étiologique génétique des DI/AD sont les suivants :

- Il existe une hétérogénéité génétique majeure du fait du nombre considérable de gènes impliqués dans la DI : 450 gènes impliqués dans la DI à ce jour, 600 gènes si on considère les troubles du neuro-développement dans leur ensemble. Il en est de même pour les syndromes malformatifs dans DI.
- Il en résulte que chaque cause de DI d'origine génétique ne représente qu'une très petite proportion des étiologies, estimée pour chacune à moins de 1%, (en dehors de la trisomie 21 et du syndrome de l'X fragile, cause héréditaire la plus fréquente). Ainsi, chaque cause génétique de DI est une maladie rare, voire exceptionnelle; pour certains gènes, une ou deux familles seulement dans le monde ont été identifiées.
- La majorité des gènes sont responsables de DI non syndromiques, c'est-à-dire non reconnaissables cliniquement
- De nombreux gènes restent à identifier. De nouveaux gènes sont identifiés chaque mois. Aussi, les bilans génétiques négatifs doivent être régulièrement actualisés.
- Il existe plus de 5000 syndromes rares connus d'origine monogénique, dont un grand nombre inclut une DI.

Aussi, porter un diagnostic étiologique de DI/AD constitue un véritable défi. Ceci explique que plus de 40% des patients n'ont pas de cause identifiée après les investigations appropriées.

Intérêt du diagnostic étiologique dans la DI/AD

Pourtant, le diagnostic étiologique permet de répondre à des interrogations fondamentales des familles et à améliorer la prise en charge des patients. La littérature sur le sujet s'accorde à dire que tous les enfants avec retard de développement (*DD developmental delay*) ou déficience intellectuelle (DI) doivent avoir une évaluation (« *comprehensive evaluation* ») dans le but d'en établir l'étiologie, et plusieurs auteurs (*Romano 2009, Shevell...*) énumèrent les « bénéfices potentiels » pour les patients, leurs parents et même pour les praticiens. On peut citer :

- Pour les patients, leurs parents et les familles
 - Répondre à la question du « pourquoi », et nommer la maladie, ce qui peut donner le sentiment d'avoir plus de prise sur elle. Les parents d'enfants DI font souvent l'expérience d'un sentiment de perte de contrôle, et un diagnostic

étiologique peut contribuer à donner le sentiment de reprendre le contrôle de la situation, et offrir l'opportunité d'améliorer la santé et le devenir fonctionnel

- Déculpabiliser les parents, puisque la cause est "extérieure".
- Préciser le pronostic et la trajectoire développementale, en particulier lorsque l'enfant est petit. Même s'il est important de souligner qu'il peut exister une grande variabilité pour un même diagnostic étiologique.
- Mettre en place un suivi médical approprié, avec une surveillance adaptée et un dépistage systématique des complications associées. Même si la question d'un traitement curatif n'est pas aujourd'hui au premier plan dans la DI d'origine génétique, cela ne signifie surtout pas qu'il n'y a rien à faire. Il y a certaines pathologies où des traitements ont prouvé leur efficacité sur certains symptômes (traitement de l'épilepsie dans les déficits en synthèse de la créatine, ou le déficit en GLUT1, traitement par Mélatonine des troubles du sommeil dans le syndrome de Smith-Magenis, et par extension pour d'autres syndromes...). Par ailleurs, certains syndromes nécessitent une prise en charge médicale particulière, comme le syndrome de Williams ou la micro-délétion 22q11. Enfin, certaines prises en charge précoces ont permis d'améliorer considérablement le pronostic de certains syndromes, avant l'apparition de symptômes délétères (obésité morbide dans le syndrome de Prader-Willi...)
- Accéder aux protocoles thérapeutiques
- Eviter de nouveaux examens inutiles et potentiellement invasifs
- Adapter la prise en charge socio-éducative : envisager des aides et interventions appropriées, un planning éducatif, une guidance prédictive....
- Aider au support familial : associations de patient et suivi social, lien entre les familles avec le même diagnostic....
- Préciser le conseil génétique et évaluer le risque de récurrence pour les parents: celui-ci n'est possible de façon fiable que si on a la certitude du diagnostic étiologique. Sinon, on reste dans des probabilités généralistes qui ont peu d'intérêt pour le couple concerné. Mettre en évidence qu'une anomalie génétique est accidentelle permet de rassurer (au risque de mosaïque germinale près). À l'inverse, montrer qu'il s'agit d'une anomalie transmise (par exemple liée au chromosome X) peut permettre au couple de prendre des décisions, en particulier celle de recourir à un diagnostic prénatal, et le cas échéant à une interruption médicale de grossesse, ou alors à un diagnostic pré-implantatoire.

- Préciser le conseil génétique dans la famille élargie, en identifiant les personnes à risque de transmettre, pouvoir proposer un dépistage des transmetteurs (trices) en particulier dans la DILX, puis potentiellement un conseil prénatal, et/ou un diagnostic prénatal (ou pré-implantatoire) aux couples à risque.
- Un point important (et assez nouveau), souligné par *Moeschler* en 2014, concerne l'intérêt pour les patients d'être suivis dans des centres où d'autres patients avec la même pathologie sont également pris en charge, et par un (des) clinicien(s) expert(s) et expérimenté(s). Même si cela est difficile à mesurer, il considère que cette « touche curative » (« *healing touch* ») est un facteur favorisant le devenir psychosocial des patients et de leurs familles et contribue au bien-être global de la famille.
- Sur le plus long terme, un autre intérêt est l'augmentation des connaissances dans la physiopathologie de la DI, permettant d'identifier les voies de signalisation, et d'envisager potentiellement des cibles thérapeutiques.

- Pour les praticiens

L'intérêt du diagnostic étiologique pour les praticiens eux-mêmes permet l'acquisition progressive d'une certaine expérience sur des pathologies rares : connaissance d'autres patients avec des pathologies identiques, de leur devenir, des possibilités de prise en charge, des avancées de la recherche et des programmes de recherche en cours (pour une meilleure compréhension de la maladie, des protocoles thérapeutiques...). Et tout élément qu'il est possible de partager avec les parents, leur donnant ainsi l'impression qu'un certain contrôle est possible. C'est bien dans ce sens que les Plans Maladies Rares 1 puis 2 ont été mis en place en France depuis 2005, permettant d'abord la labellisation de Centres de Références Maladies Rares, pour les « Anomalies du Développement et syndromes malformatifs » (CLAD) et pour les DI de causes rares, qui ont été regroupés au sein de deux filières de santé nationales (AnDDI-rares et Déficience) lors du 2^{ème} Plan National Maladies Rares.

Séquençage haut débit de nouvelle génération (SHD) en diagnostic

L'émergence des techniques de séquençage haut débit de nouvelle génération (SHD), qui permet le séquençage d'un grand nombre de paires de bases d'ADN en une seule réaction de séquençage, est un véritable bouleversement technologique des 5 dernières années dans le diagnostic moléculaire des maladies rares, à l'origine du développement du séquençage ciblé de panels de gènes et du SHD d'exome (SHD-E).

1. Panels de gènes

Dans les panels de gènes sélectionnés, le SHD est utilisé pour réaliser le séquençage ciblé et simultané de gènes déjà connus comme impliqués dans une pathologie génétique (*Mamanova et coll., 2010*), permettant l'analyse simultanée en parallèle de ces gènes. Ces panels ont été développés pour assurer un niveau de qualité (couverture et profondeur de lecture) répondant aux exigences du diagnostic, et pour permettre un haut débit d'analyses grâce au multiplexage permettant de diminuer les coûts d'analyse. La taille de ces panels peut varier de quelques gènes à plusieurs dizaines, voire centaines de gènes selon l'hétérogénéité de la pathologie génétique étudiée (*Hoischen et coll., 2010 ; Meder et coll. 2011 ; Jones et coll., 2011*).

2. SHD d'exome (SHD-E)

Le SHD-E permet le séquençage et l'analyse d'au moins 90% des régions codantes en un seul examen (*Singleton et coll., 2011*). Il a démontré, initialement dans le cadre de la recherche, une particulière efficacité pour la mise en évidence des bases moléculaires de pathologies mendéliennes, quelle que soit la pathologie considérée, son mode de transmission et l'histoire familiale associée. En diagnostic, cette stratégie s'avère tout à fait adaptée à l'étude de pathologies jusque-là résistantes aux techniques conventionnelles de génétique telles que les maladies rares, sans récurrence familiale, cliniquement et génétiquement hétérogènes. La DI isolée et les nombreux syndromes rares avec anomalies du développement en sont des bons exemples (*Ng et al., 2010 ; Thauvin-Robinet et al., 2013 ; Thauvin-Robinet et al., 2014*). Les données de séquençage permettent non seulement l'identification de variations de séquence mais aussi d'anomalies chromosomiques par l'utilisation d'algorithmes dédiés (*Krumm et coll., 2012 ; Fromer et coll., 2012 ; Hayes et coll., 2013*). Le SHD-E présente cependant certaines limites : non détection de variations causales dans les régions non codantes ou régulatrices ; absence de détection de certains types de mutations comme les répétitions de triplets, absence de détection de modifications épigénétiques ; défaut de couverture de certaines régions codantes

Le Tableau 1 montre la comparaison du séquençage Sanger, du séquençage ciblé d'un panel de gènes et du SHD-E faisant apparaître les spécificités à chaque stratégie de séquençage.

Tableau 1 : Comparaison entre test gène unique (Sanger), panel de gènes ciblés, SHD d'exome ou de génome (d'après Xue et coll., 2014)

	Test gène unique (Sanger)	Panel de gènes ciblés	SHD d'exome ou de génom
Méthode	Séquençage Sanger	SHD	SHD
Phénotype	Signes cliniques spécifiques orientant vers une maladie associée à un gène	Maladies génétiquement hétérogènes	Signes non spécifiques: hétérogénéité génétique extrême
Génétique	Gènes connus	Gènes causaux bien définis	Tous les 20.000 gènes dont les 4.500 gènes bien définis en génétique médicale
Analyse	Peu de variations de signification inconnue	Variations de signification inconnue limitée (environ 5 pour un panel de 200 gènes)	Nombre de variations de signification inconnue très important (500)
Avantages	Pas de données non sollicitées	Bonne couverture des bases analysée Peu de risque de trouver des données non sollicitées	Possibilité de réanalyse des nouveaux gènes décrits en fonction des avancées scientifiques
Inconvénients	Analyse séquentielle lente et coûteuse	Restreint aux gènes identifiés au moment du design du panel	Possibilité de trouver des données non sollicitées Couverture moins importante et nombre de régions non couvertes plus importante

Intérêt du séquençage haut débit de nouvelle génération (SHD) dans la DI/AD

L'apport du SHD au diagnostic étiologique des DI/AD est considérable et peut être utilisé selon 3 stratégies différentes: (1) séquençage ciblé d'un panel de gènes (*Targeted Sequencing*), (2) séquençage de l'exome (SHD-E ; *Whole Exome Sequencing, WES*), qui

correspond au séquençage de toutes les régions codantes du génome), et (3) séquençage du génome entier (SHD-G ; *Whole Genome Sequencing, WGS*). Le séquençage haut débit de génome (SHD-G) développé actuellement en recherche ne sera pas disponible en diagnostic avant quelques années car il impose des choix stratégiques et politiques majeurs, notamment dans en terme d'investissement et de réorganisation des acteurs clinico-biologiques impliqués dans le diagnostic des maladies rares.

Arguments en faveur de l'utilisation du SHD-E dans le diagnostic étiologique de la DI/AD

- a. Extrême hétérogénéité génétique de cette affection, et rareté de chacun des gènes impliqués (<1%)
- b. Possibilité d'analyses dynamiques consistant en une nouvelle analyse bio-informatique des données, sans avoir à refaire de nouvelles analyses moléculaires. Sachant qu'un nombre très important de nouveaux gènes reste à identifier parmi les pathologies ultra-rares, cette stratégie présente donc un immense intérêt puisqu'à chaque nouvelle analyse bio-informatique, de nouveaux gènes seront pris en considération.
- c. Rendement diagnostique important, de 25-50% selon les séries, supérieure à celle des panels ciblés (tableau 2). Le rendement diagnostique du SHD-E des AD/DI varie en fonction des populations étudiées (cas sporadiques ou récurrence familiale, consanguinité, sévérité de la DI, stratégie trio ou solo dans les cas sporadiques) et de la façon dont les auteurs considèrent que l'implication d'une mutation ou d'un gène est retenue (gène déjà connu dans la DI ou nouveau gène avec mutation pathogène). La stratégie en trio a longtemps été considérée en recherche comme augmentant de 10% le taux d'identification de mutation causale par rapport à la stratégie solo. Dans le domaine du diagnostic, des études en solo (cas index seul) ou en trio (cas index et parents) ont été réalisées. Les deux plus importantes séries de plus de 1000 patients montrent le même taux de diagnostic de 27% alors que l'une utilisait une stratégie solo (*Yang et coll., 2014*) et l'autre une stratégie trio (*Wright et coll., 2014*). Ces taux diagnostiques sont cependant difficilement comparables car le recrutement des patients (sur la clinique et/ou le mode de transmission, le caractère familial ou sporadique) varie d'une étude à l'autre. Toutefois, lorsque de mêmes études comparent les stratégies solo contre trio, la conclusion est que la stratégie en trio permet d'obtenir un taux diagnostique significativement supérieur (*Farewell et al. 2014, 37% vs 21%, Lee*

et al. 2014, 31% vs 22%), et permet de gagner du temps d'interprétation. Cette différence est également retrouvée dans l'analyse diagnostique en génome entier (Taylor et al. 2015, 57% vs 21%).

Ainsi, si l'on considère l'ensemble de ces données, et le développement des connaissances depuis ces deux dernières publications, le rendement diagnostique du SHD-E seul peut être estimé à un peu plus de 30% de diagnostic génique chez les patients atteints de AD/DI (jusqu'à 60 à 70% dans les populations consanguines), augmentant progressivement grâce aux relectures possibles au fur et à mesure de l'avancée des connaissances génomiques et à l'amélioration des techniques (notamment en terme de couverture). Comme il permet également l'identification d'une majorité des microremaniements chromosomiques (10% de diagnostic additionnel), le rendement diagnostique total attendu du SHD-E est d'au moins 40%. Plusieurs publications recommandent ainsi son utilisation en première intention dans le diagnostic de la DI non reconnaissable cliniquement (Rauch et coll., 2012).

Tableau 2 : revue de la littérature de l'utilisation du SHD-E dans les AD/DI

Références	Nombre de patients inclus	Description de la population d'étude	Stratégie utilisée	Résultats	Commentaires
Vissers et coll., 2010	10	DI sporadique	Trio	60% de diagnostic	Rendement diagnostique élevé mais biais d'échantillonnage (10 familles)
Najmabadi et coll., 2011	136	DI Principalement modérée et sévère	Solo	57% de diagnostic 27% de diagnostic potentiel supplémentaire	Rendement diagnostique élevé car familles consanguines
Need et coll., 2012	12	DI et/ou anomalies du développement sporadique	Trio	50% de diagnostic	Rendement diagnostique élevé mais biais d'échantillonnage (12 familles)
De Ligt et coll., 2012	100	DI sévère sporadique QI < 50	Trio	16% de diagnostic 23 autres mutations de novo potentiellement pathogènes	Rendement diagnostique faible car capture de SHD-E ancienne de moins bonne qualité malgré biais d'échantillonnage (DI sévère)

Rauch et coll., 2012	51	DI sévère non syndromique QI < 60	Trio	51% de diagnostic	Rendement diagnostique élevé car biais d'échantillonnage (DI sévère)
Yang et coll., 2013	250	Suspicion de cause génétique (80% d'enfants avec atteinte neurologique)	Solo	25% de diagnostic	-
Lee et coll., 2014	814	Suspicion de cause génétique (37% retard de développement)	Solo, trio ou Autre	28% de diagnostic chez les patients avec retard de développement	Compare analyse en trio vs solo : 31% de diagnostics vs 22%
Farwell et coll., 2014	500	Suspicion de cause génétique (64% DI et/ou retard de développement)	Solo, trio ou Autre	30% de diagnostic certain + 12% de diagnostic incertain (nouveaux gènes)	DI dans 2/3 de la cohorte. Compare analyse en trio vs solo : 37% de diagnostics vs 21%
Iglesias et coll., 2014	115	Suspicion de cause génétique (25% retard de développement)	Trio essentiellement	34% de diagnostic chez les patients avec retard de développement	-
Yang et coll., 2014	2000	Suspicion de cause génétique (26% avec atteinte neurocognitive et 55% avec atteinte neurocognitive syndromique)	Solo	27% de diagnostic pour les patients avec atteinte neurocognitive, 25% si atteinte syndromique	-
Srivastava et coll., 2014	78	Troubles neuro-développementaux (retard de développement, DI, troubles autistiques)	Trio	41% de diagnostic	Rendement diagnostique élevé mais biais d'échantillonnage (excès de formes graves type encéphalopathies)
Wright et coll., 2014	1133	Anomalies du développement (87% DI ou retard de développement)	Trio	27% de diagnostic	-
Yavarna et coll., 2015	149	Suspicion de cause génétique (majorité DI et/ou atteinte neurocognitive)	Solo	60% de diagnostic	Rendement diagnostique élevé car majorité de familles consanguines et formes familiales

- d. Nombre très important de patients sans diagnostic, ne permettant pas de prédire un bon rendement diagnostique avec les gènes connus, et le nombre très important de nouveaux gènes qu'il reste à identifier parmi les pathologies ultra-

rare, comme le suggère le nombre très important de maladies génétiques du développement avec une très faible prévalence. Ainsi, de l'ordre d'une centaine de nouveaux gènes responsables de DI sont publiés chaque année, rendant obsolète les panels limités et posant la question de multiplier ces analyses au fur et mesure de leur mise à jour. Tandis que le séquençage d'exome et de génome permettra une analyse dynamique au fur et à mesure des années, sans avoir à refaire de nouvelles analyses moléculaires, à partir d'une nouvelle analyse bioinformatique des données. L'argumentaire d'anticiper la formation des généticiens sur des analyses pangénomiques est également à considérer, même s'il est moins prépondérant.

Le séquençage haut débit de génome (SHD-G)

Quelques publications suggèrent que le SHD-G pourrait à lui seul augmenter le taux diagnostique jusqu'à 60% chez les individus avec AD/DI, grâce à une couverture meilleure que le SHD-E et l'identification de certaines mutations non identifiées par le SHD-E. En plus de cet intérêt, il est également attendu que l'intégration avec succès de la médecine génomique dans la pratique clinique aura un impact économique substantiel sur la prévention et les applications thérapeutiques dans la prochaine décennie. Cependant, le SHD-G est actuellement développé principalement en recherche. Il ne sera pas disponible en diagnostic avant quelques années car il impose des choix stratégiques et politiques majeurs, notamment dans en terme d'investissement (dont le cout beaucoup plus important généré par le stockage des données) et de réorganisation des acteurs clinico-biologiques impliqués dans le diagnostic des maladies rares.

Séquençage haut débit et intérêt médico-économique

Très peu d'études médico-économiques ont été réalisées dans un but de comparaison entre des techniques classiques et le SHD. Pour les AD/DI, quelques auteurs relatent le coût total des bilans étiologiques antérieurement réalisés chez certains patients, démontrant l'intérêt économique du SHD chez ces patients qui bénéficient de nombreuses explorations étiologiques séquentielles et coûteuses (*Need et coll. en 2012 ; Yang et coll., 2013*). En 2014, Soden et coll. rapportent une étude diagnostique de SHD-E chez 119 enfants atteints de troubles neuro-développementaux avec un taux diagnostique de 45%. Le coût médian de l'ensemble des examens réalisés antérieurement par patient n'ayant pas permis d'aboutir à un diagnostic était de 19 100 \$US. En considérant un taux diagnostique de 40%, le SHD-E

aurait un rapport coût-efficacité meilleur que le bilan usuel, du moment où celui-ci coûtait 2 996 \$US par individu. Outre le coût, le délai d'obtention du diagnostic est largement raccourci grâce à l'approche SHD. En 2013, dans une série américaine de 45 enfants probablement atteints d'une maladie génétique, des résultats préliminaires montraient un délai au diagnostic plus court avec le séquençage haut débit d'exome/génome comparativement aux analyses génétiques standards, un nombre moindre de consultations génétiques et un rapport coût-efficacité *a priori* favorables (Towne et coll., 2013).

Tout récemment, une étude rétrospective a été menée chez 40 enfants suspects de maladie génétique (dont la moitié atteinte d'anomalies du développement ou de maladie neurologique) ayant bénéficié d'un SHD-E avec un taux diagnostique de 30% (Valencia et coll., 2015). Cette étude a examiné le nombre et le type de tests génétiques réalisés antérieurement au SHD-E : 48% des patients (19/40 patients) avaient bénéficié d'au moins quatre tests génétiques dont 3/19 avaient eu plus de dix tests. Le nombre médian de tests génétiques antérieurs de la cohorte était d'environ quatre, avec un coût significativement plus élevé de ces tests par rapport au SHD-E pour certains patients. Les auteurs suggèrent l'efficacité du SHD-E par la réduction du délai diagnostique et le coût des tests génétiques alternatifs, et concluent au fait qu'il devrait être utilisé en première intention. L'ensemble de ces données conforte l'intérêt économique du SHD-E dans les maladies rares très hétérogènes, telles que les AD/DI, limitant les délais d'errance diagnostique et évitant la répétition d'examens étiologiques coûteux.

Organisation actuelle du séquençage haut débit en France

Grâce au SHD, la génétique médicale connaît un véritable bouleversement technologique. Le déploiement du SHD dans le diagnostic des AD/DI a été réalisé à une vitesse très variable selon les pays, certains pionniers ayant privilégié la mise en place du SHD-E dans la routine diagnostique depuis plusieurs années (de Ligt et coll., 2012; Biesecker et Green, 2014). Selon les indications, les laboratoires développent différentes stratégies : ils favorisent le séquençage ciblé de panels de gènes pour des groupes homogènes de pathologies et s'orientent plus volontiers vers le SHD-E pour des pathologies très hétérogènes.

En France, 53 laboratoires de génétique moléculaire labellisés assurent le diagnostic de plus de 1200 maladies monogéniques regroupées par sous-groupes (mucoviscidose, maladies neuromusculaires, maladies neurologiques, DI, anomalies du développement, maladies cardiaques...). L'ensemble des activités de ces laboratoires est structuré en réseaux et coordonné par l'ANPGM (Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire).

Dans le cadre du Plan National Maladies Rares, la DGOS a financé l'acquisition de plateformes de séquençage de moyen débit, adaptées à l'analyse de petits panels de gènes.

Il existe donc en France un réseau de laboratoires de génétique moléculaire compétents dans le domaine DI/AD, comportant des laboratoires ayant une expertise dans certains syndromes avec DI, et des laboratoires plus « généralistes » qui ont une stratégie de grands panels ou d'exome en première ligne. L'existence de ces deux expertises est très complémentaire.

a. AD ou DI syndromique

Lorsqu'il existe un syndrome suspecté ou un cadre syndromique, le séquençage Sanger et/ou les petits panels peuvent être adaptés en cas d'homogénéité génétique ou d'une hétérogénéité limitée (exemple : Dravet, Cornelia de Lange...). Ces petits panels de gènes ciblés sont mis en place par des laboratoires référents ayant une expertise dans ces pathologies.

Lorsqu'il n'existe pas de syndrome suspecté, l'approche exome est logique, car il n'est pas possible de designer un panel anomalies du développement.

b. DI isolée, plusieurs stratégies ont été mises en place, dans l'attente de la mise en place du SHD-E (fig 1)

- l'ANPGM et les filières « DéfiScience » et « ANDDI » ont défini conjointement une liste des 44 gènes majoritairement impliqués dans ce cadre clinique (« panel DI44 »). Ce panel, ciblé sur les 44 gènes les plus fréquemment impliqués dans la DI, a un rendement diagnostique estimé à environ 10 à 12%. Le choix de déployer largement un petit panel de 44 gènes s'est imposé, pour améliorer à court terme le taux diagnostique de la DI en tenant compte des contraintes actuelles des laboratoires de diagnostic génétique moléculaire de France (absence de financement des réactifs de SHD, séquenceur de moyen débit et absence de structure bioinformatique dans les hôpitaux). **Ce panel DI44 correspond à une solution transitoire en attendant la mise en place d'une organisation nationale ou régionale permettant le déploiement du SHD à plus grande échelle.** La plupart des laboratoires de génétique moléculaire en France ont choisi cette approche (Figure 1), permettant ainsi une égalité d'accès d'un « kit minimal » accessible à tous les patients avec DI sur le territoire.

- D'autres laboratoires français ont pu élargir au séquençage de plusieurs dizaines ou centaines de gènes : Marseille (panel DI70), Strasbourg (panel DI459), Lyon (panel DI459), Tours (panel DI280). Le grand panel DI459, composés de 459 gènes impliqués ou susceptibles d'être impliqués dans la DI, a été développé par l'équipe de Strasbourg (Redin et coll., 2014) et présente un rendement diagnostique estimé à plus de 25%.

- Enfin, d'autres laboratoires de génétique moléculaire de Dijon et, depuis peu Marseille, réalisent le SHD-E en diagnostic avec l'analyse ciblée sur les gènes OMIM (gènes décrits dans la base données *Online Mendelian Inheritance in Man*).

- Le laboratoire de la Pitié-Salpêtrière (Paris, APHP) a fait un choix intermédiaire, d'un panel commercial explorant les 4800 gènes impliqués en pathologie humaine (TruSightOne, clinical exome), à la fois pour les DI isolées ou syndromiques sans hypothèse clinique. La rentabilité est d'environ 30%, et augmente avec la gravité de la DI, et la présence d'une épilepsie associée.

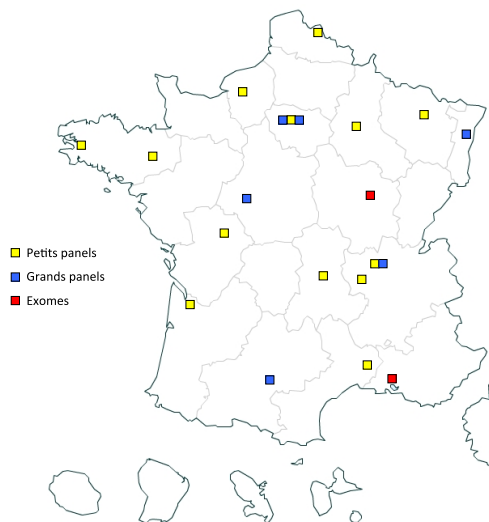


Figure 1: Organisation des laboratoires de génétique moléculaire en France en 2015 pour le SHD pour la déficience intellectuelle (données filières de santé AnDDI-rares et Défiscience)

Arbre décisionnel

1. Stratégie d'exploration génétique d'une DI jusqu'à l'arrivée du séquençage haut débit

- a. Etape clinique
- b. Etape génétique
 - pan-génomique (caryotype remplacé récemment par ACPA),
 - ciblée gène par gène (par argument de fréquence comme X fragile, ou sur une suspicion clinique).

Si l'expertise clinique ne permet pas de cibler l'étude d'un gène en particulier, il est estimé que ces différents outils aboutissent à un diagnostic étiologique chez seulement 20 à 30%

des patients, au prix parfois de nombreux examens biologiques coûteux, d'une errance médicale, de consultations répétées, d'une attente prolongée des parents pouvant entraîner des choix difficiles en terme de reproduction.

2. Stratégie d'exploration génétique d'une DI depuis l'arrivée du séquençage haut débit

a. Etape clinique

L'avènement des techniques de NGS rend fondamentale l'expertise clinique, préalable indispensable à la prescription correctement ciblée des analyses génétiques, qui permettront d'étayer le diagnostic et d'effectuer le conseil génétique. Dans un grand nombre de cas, un « regard croisé » associant neuro-pédiatre, généticien clinicien et parfois pédo-psychiatre est nécessaire.

L'étape clinique peut permettre de poser d'emblée une hypothèse diagnostique, en particulier s'il existe des signes associés (formes syndromiques), et orienter vers les laboratoires de référence de la pathologie ou du groupe de pathologies concerné.

En l'absence de suspicion clinique, ou lorsque celle-ci n'est pas confirmée, l'orientation se fait vers les études pangénomiques et en particulier le NGS (panel DI ou exome suivant les possibilités d'accès). L'interprétation des variants nécessitera un retour à la clinique pour leur interprétation. Cette coordination, entre cliniciens et biologistes, formés aux analyses pangénomiques, est un élément essentiel dans la bonne prise en charge des patients atteints de AD/DI et de leur famille.

L'enjeu de l'étape clinique est à la fois médical (faire le bon diagnostic) et économique (ne pas prescrire de multiples analyses coûteuses inutiles). Ce haut niveau d'expertise est garanti par le 1^{er} Plan National Maladies Rares, qui a labellisé 8 Centres de Référence Maladies Rares (CRMR) pour les « Anomalies du Développement et syndromes malformatifs » (CLAD) et 2 CRMR pour la DI de causes rares, qui ont été regroupés au sein de deux filières de santé nationales (AnDDI-rares et Défiscience) lors du 2^{ème} Plan National Maladies Rares.

b. Examens génétiques disponibles pour le bilan étiologique lorsque l'étape clinique ne permet pas d'évoquer une étiologie particulière.

- L'ACPA a remplacé le caryotype et l'étude des télomères à la recherche de remaniements déséquilibrés (même si seules les techniques de cytogénétique conventionnelle et de FISH permettent d'identifier un remaniement équilibré, ou de localiser la position d'un segment dupliqué).

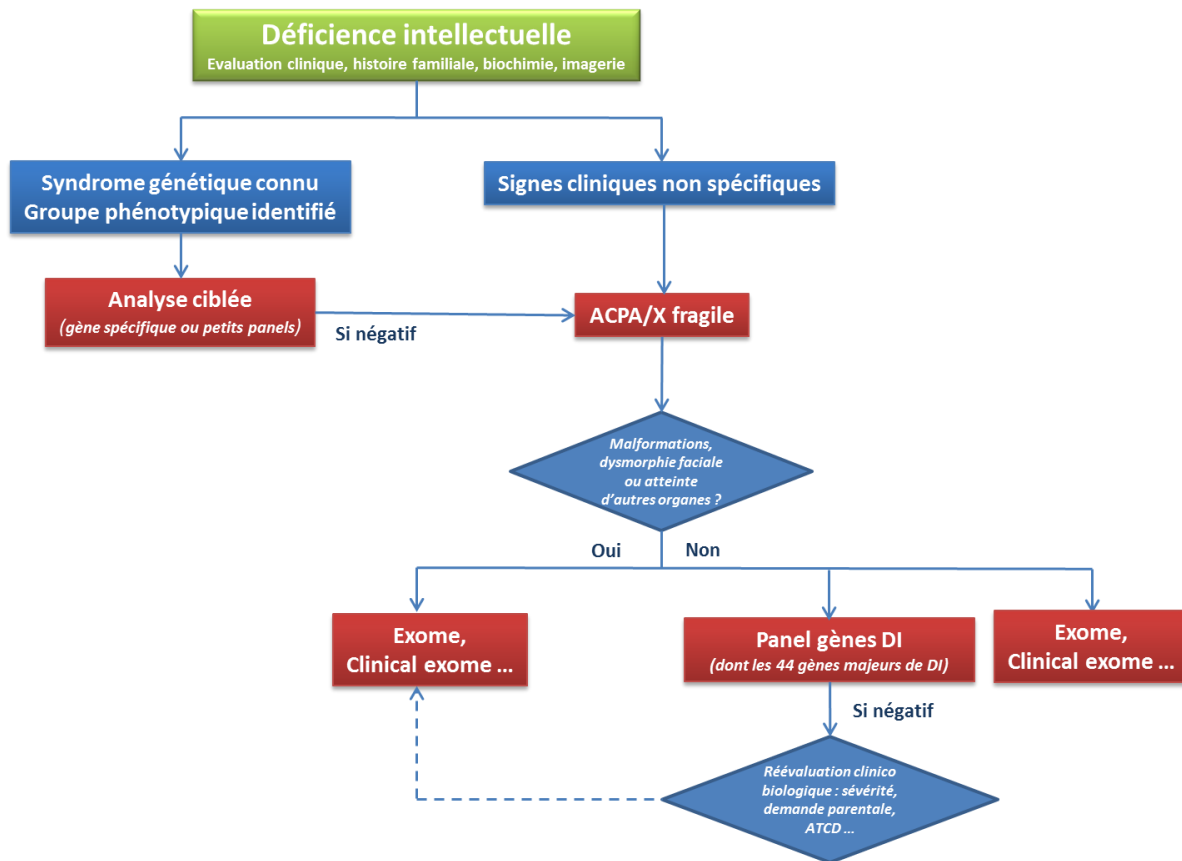
- La FISH garde toute sa place pour la confirmation d'un diagnostic de syndrome microdélétionnel cliniquement suspecté, et pour la confirmation des anomalies mises en évidence en ACPA.
- La recherche d'une mutation complète du gène FRAXA (X fragile) est indiquée quel que soit le sexe (sauf syndrome polymalformatif).
- SHD (panel ou SHD-E). Il est capital de garder à l'esprit que, même à partir d'un panel de gènes connus, l'interprétation des données pose des difficultés à la fois techniques (déterminer le variant causal) et éthiques (résultats non sollicités).

Les filières AnDDI-Rares et DéfiScience proposent un arbre décisionnel (fig2) qui repose sur la situation clinique (suspicion d'un diagnostic ou non) et qui tient compte de la diversité des options stratégiques de SHD (séquençage ciblé ou SHD-E). Cet arbre décisionnel sera amené à évoluer rapidement en fonction des éléments médico-économiques et de la structuration nationale.

- l'existence d'un diagnostic très probable après l'examen clinique ou la recherche de malformations qui ferait prescrire une analyse ciblée ou NGS par petit panel ciblé (en cas d'hétérogénéité génétique modérée).

- en l'absence de suspicion diagnostique, l'absence de financement de ces analyses de SHD-E qui ne figurent pas sur la liste du RIHN (référentiel des actes innovants hors nomenclature) et les problèmes d'accès à des plateformes très haut-débit sur le plan national nous empêche de définir le SHD-E comme choix prioritaire dans cette indication. La multiplicité des stratégies décrites sur l'arbre décisionnel témoigne de la multiplicité des approches utilisées en pratique.

Figure 2 : arbre décisionnel pour le diagnostic moléculaire des déficiences intellectuelles



Perspectives et conclusion

Le déploiement du SHD dans le diagnostic des AD/DI présente des enjeux majeurs, en raison du bénéfice attendu pour les patients (prise en charge et pronostic), et leurs familles (accès au conseil génétique). Ce choix s'intègre par ailleurs dans un choix stratégique majeur pour la France dans le diagnostic des maladies rares et de la médecine génomique. En effet, la France accuse un retard important dans le SHD car son investissement dans ces technologies reste actuellement très limité. Contrairement à d'autres pays comme le Royaume-Uni, les Pays-Bas, les Etats-Unis et la Chine, la France ne dispose pas d'infrastructures nationales de SHD capables de réaliser des milliers d'analyses d'exome ou de génomes par an. Plusieurs plateformes de SHD, publiques ou privées, effectuant le séquençage et l'analyse d'exome au titre de la recherche, existent mais leur capacité actuelle totale s'avère insuffisante par rapport aux besoins nationaux en termes de diagnostic. A l'heure où des choix politiques majeurs s'imposent, notamment dans l'investissement d'une ou plusieurs plateformes publiques de SHD très haut débit, les filières AnDDI-rares et Défiance ne peuvent que soutenir activement le déploiement de ces structures pour le séquençage de génomes entiers, perspective attendue pour le diagnostic dans la DI. Cependant, dans l'attente d'une mise en place effective, qui prendra quelques

années, les filières AnDDI-rares et Déficience proposent dans ce document un arbre décisionnel pour l'utilisation du SHD en contexte diagnostique prenant en compte la situation clinique et la situation du niveau d'équipements des laboratoires en France.