

ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 1/10

Numéro de version : 1

Pour les versions révisées :

- Date de 1^{ère} mise en application :
- Numéro de l'ancienne version du document : ANPGM_
- Date de révision :

	Nom	Hôpital	Date
Rédacteur(s)	<i>Dr. Véronique Tardy-Guidollet</i> <i>Dr. Rita Menassa</i> <i>Pr. Yves Morel</i>	Pathologies Endocriniennes Rénales Musculaires et Mucoviscidose, CBPE, 59 Bd Pinel 69677 BRON Cedex	26/03/2018
Vérificateur(s)	<i>Dr. Christine Bellanné-Chantelot</i> <i>Dr. Claire Bouvattier-Morel</i> <i>Dr. Claire-Lise Gay</i>	Département de Génétique, Hôpital Pitié Salpêtrière CRMV GEN DEV 06/04/2018 Hôpital Bicêtre, APHP CRMV GEN DEV 10/04/2018 HFME, Hospices Civils de Lyon	28/05/2018
Filière	FIRENDO		
Approbateur(s)	<u>Pour le CA de l'ANPGM :</u> Benoît ARVEILER Cécile ACQUAVIVA Anne-Francoise ROUX Pascale SAUGIER-VEBER	 CHU Bordeaux CHU Lyon CHU Montpellier CHU Rouen	08/06/2018

**ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE
DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE**

Référence : ANPGM_133
Page 2/10

Numéro de version : 1

SOMMAIRE

I. Rappels sur la pathologie

II. Indications de l'analyse génétique

- A. *Proposant*
 - 1- *Forme classique*
 - 2- *Forme non classique*
 - 3- *Possible hétérozygote*
- B. *Apparenté*
- C. *Dépistage d'un conjoint*
- D. *Cas particulier du diagnostic prénatal*

III. Modalités de l'analyse génétique

- A. *Prise en charge du prélèvement à son arrivée au laboratoire*
- B. *Techniques d'analyse moléculaire*

IV. Arbres décisionnels pour l'analyse génétique

- A. *Forme classique*
- B. *Forme non classique*
- C. *Possible hétérozygote*
- D. *Conjoint*
- E. *Apparenté*
- F. *Cas particulier du diagnostic prénatal*
 - 1- *Femme enceinte avec un 1^{er} enfant atteint de forme classique*
 - 2- *Découverte d'une anomalie des OGE chez le fœtus d'une femme enceinte*

V. Délai de rendu des résultats

VI. Facturation

ETUDE DU GENE *CYP21A2* HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 3/10

Numéro de version : 1

I. Rappels sur la pathologie

L'Hyperplasie Congénitale des Surrénales (CAH) par déficit en 21-hydroxylase (21OH) est une maladie autosomique récessive due à des lésions touchant le gène *CYP21A2* situé en 6p21.3 (OMIM 201910). Cette maladie endocrinienne surrénalienne est responsable d'une altération de la synthèse du cortisol et de l'aldostérone et d'une hyperproduction d'androgènes surrénaliens convertis en périphérie en testostérone. Deux formes sont décrites, la forme sévère ou classique (FC), dépistée à la naissance par le Guthrie dont l'incidence dans les populations caucasiennes est de 1/15 000 naissances et la forme modérée ou non classique (FNC). La forme classique est caractérisée par une virilisation des OGE chez le nouveau-né féminin secondaire à l'hyperandrogénie pendant la vie fœtale, et d'une perte de sel néonatale due à l'hyponatrémie secondaire à la diminution de l'aldostérone : soit la perte de sel est clinique, survenant la 2^{ème} semaine de vie et la forme est dite classique avec perte de sel clinique, soit la perte de sel est biologique, attestée par l'hyponatrémie et la rénine élevée, le risque d'insuffisance surrénalienne aiguë existant alors en cas de stress. La forme non classique n'entraîne pas de virilisation des OGE chez la fille ni perte de sel, seules des manifestations liées à l'hyperandrogénie peuvent survenir dans l'enfance dans les 2 sexes, chez l'adolescente ou la femme adulte. Le diagnostic biologique repose sur le dosage de la 17OHP de base dans la forme classique, sur buvard et plasmatique, tandis qu'un test à l'ACTH est recommandé dans la forme non classique, le seuil diagnostique ayant été fixé à 36 nmol/L (Tardy et al, Horm. Res. 1996). De possibles simples hétérozygotes peuvent également être détectés par le test à l'ACTH (dosage du 21-désoxycortisol, seuil 1140 pmol/L), présentant des signes d'hyperandrogénie comme les formes non classiques mais n'étant pas atteints de déficit en 21-hydroxylase.

Le locus de la 21-hydroxylase a été largement décrit depuis 1984 avec comme particularité l'existence d'une région dupliquée en tandem renfermant le gène fonctionnel *CYP21A2* associé à la maladie et un pseudogène *CYP21A1P* très homologue et réservoir des 7 mutations les plus fréquentes (fréquence > 3 %) retrouvées sur 85 % des allèles CAH. Environ 130 mutations de sévérité variable sont décrites à ce jour (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp21.htm>), le phénotype des patients étant déterminé par l'allèle le moins sévère. Notre équipe a récemment fait le bilan de la répartition de lésions géniques (Tardy et al, JCEM 2010) dans les formes classique et non classique : mutations faux sens de sévérité variable, mutations non sens ou frameshift sévères, larges réarrangements sévères (délétion ou conversion génique de *CYP21A2* en *CYP21A1P*). Environ 5 % des allèles CAH portent au moins 2 mutations ponctuelles, ce qui souligne la nécessité d'une exploration complète du gène avant de conclure sur la sévérité du génotype. Enfin, une mutation rare (fréquence < 1 %) a été identifiée sur 6 % des allèles étudiés dans notre laboratoire, la plupart sont des mutations faux sens privées impliquant le développement d'études fonctionnelles in vitro et in silico (Menassa et al, JCEM 2008 ; Tardy et al, JCEM 2010).

Le diagnostic de la maladie est posé face à une symptomatologie clinique orientant vers la forme classique ou non classique et il impose une confirmation biologique (voir ci-dessous). L'étude moléculaire du gène *CYP21A2* permet de confirmer le diagnostic en identifiant les 2 lésions géniques et d'en préciser la sévérité afin d'optimiser le traitement substitutif. Dans la forme non classique, l'objectif chez l'enfant est d'éviter les conséquences d'une puberté précoce responsable d'une petite taille adulte et chez la femme de lutter contre l'hyperandrogénie et l'infertilité. De plus, l'étude moléculaire permet de proposer un conseil génétique correct aux patients et leurs familles en identifiant les couples à risque de forme classique, en sachant que le risque d'être porteur d'une lésion sévère dans la population générale est environ de 1/60. A noter que les FC portent systématiquement 2 lésions sévères et que 60 % des FNC sont hétérozygotes composites pour une mutation modérée et une mutation sévère (Tardy et al, Horm. Res. 1996). Le but ultime est de proposer une prise en charge prénatale aux femmes enceintes à risque de FC (Tardy et al, JCEM 2014) : détermination précoce du sexe fœtal sur sérum maternel, traitement prénatal par dexaméthasone proposé en cas de fœtus féminin, diagnostic prénatal précoce par ponction de villosités choriales ou tardif par amniocentèse.

ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 4/10

Numéro de version : 1

II. Indications de l'analyse génétique

A. Proposant

Des données cliniques et des dosages hormonaux sont indispensables à l'exploration moléculaire.

1- **Forme classique**

Avec perte de sel clinique : code ORPHANET ORPHA315306

Virilisante pure : code ORPHANET ORPHA315311

Critères diagnostiques	
Critères cliniques : <ul style="list-style-type: none"> . virilisation des OGE chez la fille . perte de sel clinique . avance d'âge osseux / âge chronologique 	Critères biologiques : normes selon laboratoire <ul style="list-style-type: none"> . Taux de 17OHP indispensable <ul style="list-style-type: none"> - sur buvard si dépistage néonatal (> 25 ou 50 nmol/L selon le seuil chez le nouveau-né > 32 SA) . - plasmatique (> 60 nmol/L ou 20 ng/ml) . Dosages complémentaires importants <ul style="list-style-type: none"> . Rénine (> 40 ng/l ou > 100 mUI/l), natrémie, kaliémie, glycémie . ACTH (> 40 pg/ml) . Δ4androstènedione, testostérone (ng/L ou nmol/L) . Ionogramme urinaire . Dosages sans intérêt pour le diagnostic <ul style="list-style-type: none"> . Aldostérone, 21-déoxycortisol

2- **Forme non classique**

Critères diagnostiques	
Critères cliniques : <ul style="list-style-type: none"> . prémature pubarche . âge osseux / âge chronologique . hirsutisme (degré) . troubles des règles . infertilité 	Critères biologiques : <ul style="list-style-type: none"> . Taux de 17OHP indispensable (nmol/L ou ng/ml) <ul style="list-style-type: none"> - sous ACTH +++ à T60 minutes (seuil 36 nmol/L ou 12 ng/ml) - de base, le matin, en phase folliculaire précoce (6 nmol/L ou 2 ng/ml) . Dosages complémentaires <ul style="list-style-type: none"> . ACTH, Δ4androstènedione, testostérone . Dosages inutiles <ul style="list-style-type: none"> . Aldostérone, 21-déoxycortisol, rénine, natrémie

3- **Possible hétérozygote**

ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 5/10

Numéro de version : 1

Critères diagnostiques = critères biologiques	
Mêmes signes d'appel que la FNC	Critères biologiques : . Test à l'ACTH indispensable : - Taux de 17OHP : problème du seuil, pic maximal < 36 nmol/L ou 12 ng/ml- Dosage complémentaire - pic maximal de 21-désoxycortisol > 1144 pmol/L ou 400 pg/ml

B. Apparenté

Le criblage du gène CYP21A2 doit être réalisé chez les parents d'un patient atteint de forme classique ou non classique pour confirmer la présence des lésions géniques identifiées, leur ségrégation chromosomique donc le génotype ; elle permet de confirmer l'existence de corrélations génotype-phénotype comme décrit dans la littérature (2 lésions sévères chez une FC, au moins 1 mutation modérée sur un allèle chez une FNC l'autre portant une lésion sévère ou modérée).

Par ailleurs, l'étude parentale permet de déterminer l'origine des lésions sévères et d'en proposer la recherche aux apparentés à risque.

Il est possible de réaliser une exploration de la totalité du gène chez les parents du cas index et dans la fratrie, ce dans le cadre du conseil génétique ou pour dépister une forme non classique asymptomatique. Ceci est discuté avec le prescripteur au cas par cas.

C. Dépistage d'un conjoint

Le risque d'être porteur d'une mutation sévère dans la population générale est environ de 1/60, chiffre déduit de l'incidence de la FC évaluée par le dépistage néonatal. Il est important de proposer le dépistage des conjoints :

- des patients atteints de FC
- des patients atteints de FNC avec une mutation sévère (60 % des cas)
- des hétérozygotes avec une mutation sévère
- des apparentés porteurs d'une mutation sévère.

D. Cas particulier du diagnostic prénatal

Un diagnostic prénatal peut être proposé aux couples à risque de forme classique. La prise en charge prénatale est standardisée (Morel *et al*, Ann. Endoc. 2003, Tardy *et al*, JCEM 2014) et le laboratoire en charge du DPN doit posséder une Habilitation délivrée par l'Agence Régionale de l'Hospitalisation.

III. Modalités de l'analyse génétique

A. Prise en charge du prélèvement à son arrivée au laboratoire

1- Sang total

Le clinicien adresse au laboratoire le prélèvement sanguin sur EDTA dédié à l'étude génétique accompagné des documents suivants :

- une copie du consentement éclairé signé par le médecin prescripteur et le patient majeur ou ses parents si le patient est mineur ;
- Une prescription médicale, un bon de commande pour les demandes extérieures;
- Pour les proposants, une feuille de renseignements type fournie par le laboratoire ;

ETUDE DU GENE *CYP21A2* HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 6/10

Numéro de version : 1

- Dans le cas d'apparentés, le lien de parenté avec le proposant et l'identité de ce dernier doivent être précisés, avec si possible un arbre généalogique.

2- Prélèvement fœtal

Le clinicien adresse soit des villosités chorales prélevées vers 11-12 SA, soit du liquide amniotique prélevé vers 14-16 SA, accompagné des documents suivants :

- Une copie du double consentement de la femme enceinte, consentement au prélèvement fœtal après information des risques et consentement au génotypage fœtal ;
- Une prescription médicale, un bon de commande pour les demandes extérieures ;
- Les caractéristiques de la grossesse au moment du DPN (terme, données échographiques).

B. Techniques d'analyse moléculaire

Le gène *CYP21A2* s'étend sur environ 3.2 kb et contient 10 exons.

L'étude de l'ADN génomique est réalisée par séquençage Sanger de la totalité du gène, depuis la région 5' régulatrice (c.-400) jusqu'à la 3' UTR (quelques dizaines de pb après le codon stop), en couvrant la totalité des exons et des introns. L'analyse des séquences est réalisée avec le logiciel SeqScape, tout nouveau variant est analysé à l'aide du logiciel Alamut (séquence de référence NM_000500.6).

La recherche de larges lésions (délétion ou conversion génique) est réalisée par technique MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) avec des sondes dirigées contre des exons du gène *CYP21A2* (kit P050, MRC Holland). Les résultats de MLPA sont analysés avec le logiciel Genemapper ou Coffalyser.

En cas d'étude familiale, notamment de diagnostic prénatal (cf §F), une étude de 7 microsatellites extragéniques situés en 6p21.3 est réalisée dont les résultats sont analysés avec Genemapper (exclure une contamination maternelle, diagnostic indirect du statut du fœtus).

IV. Arbres décisionnels pour l'analyse génétique

A. Forme classique

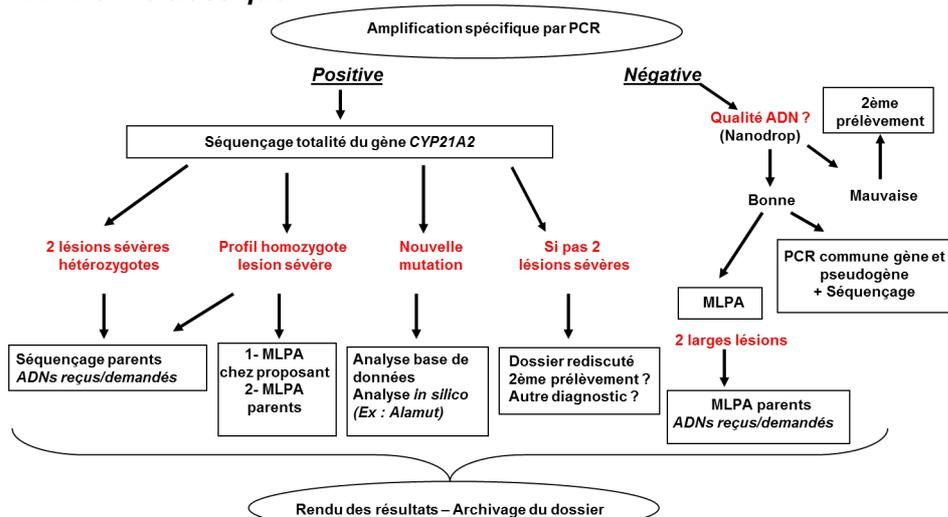


Figure 2 : étude FC et parents

ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 7/10

Numéro de version : 1

B. Forme non classique

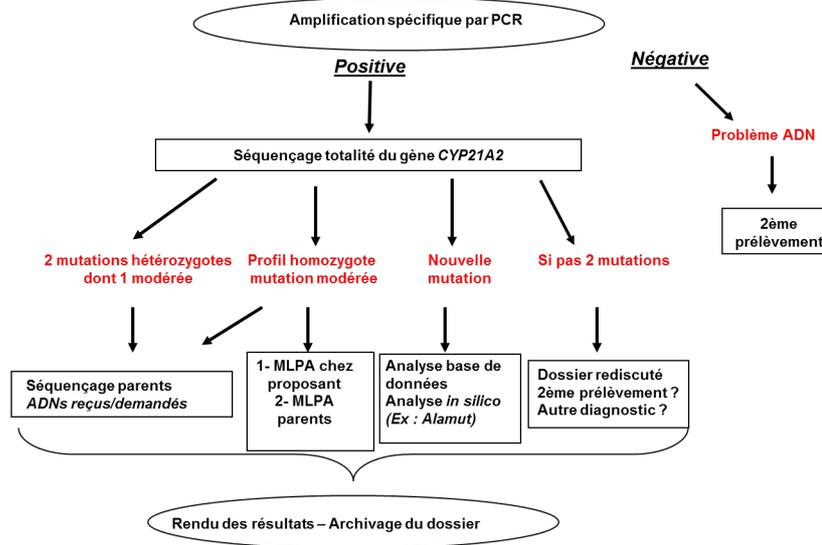


Figure 3 : étude FNC et parents

C. Possible hétérozygote

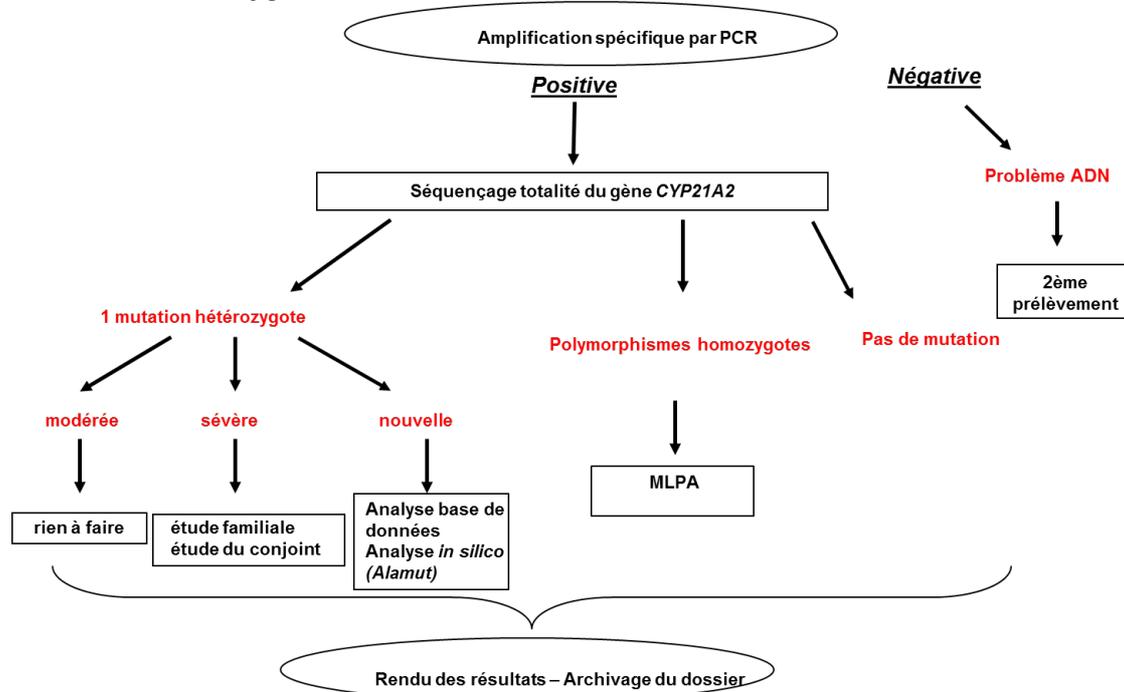


Figure 4 : étude d'un possible hétérozygote

D. Conjoint

- Génotypage d'emblée recommandé +++.

ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 8/10

Numéro de version : 1

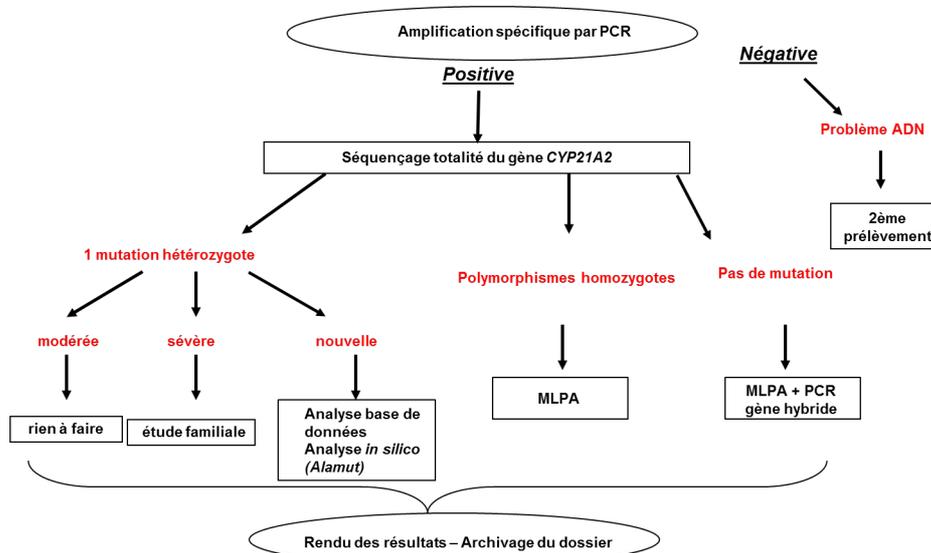


Figure 5 : étude d'un conjoint

- Test au Synacthène et génotypage si pic maximal de 21-désoxycortisol > à 1140 pmol/L ou 400 pg/ml.

E. Apparentés autre que les parents du cas index

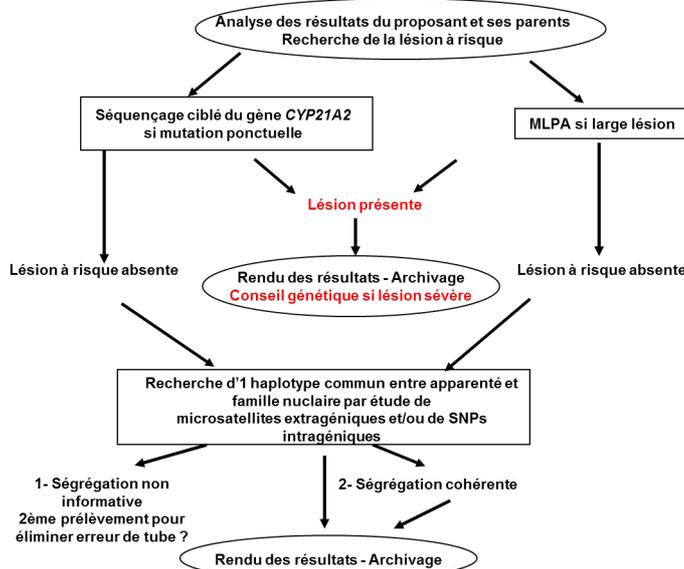


Figure 6 : étude d'un apparenté autre que les parents

ETUDE DU GENE *CYP21A2* HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE

Référence : ANPGM_133
Page 9/10

Numéro de version : 1

F. Cas particulier du diagnostic prénatal

Le laboratoire de référence pour le diagnostic prénatal est le laboratoire du CHU de Lyon.

1- Femme enceinte avec un 1^{er} enfant atteint de FC

La stratégie dépend du sexe du fœtus déterminé par le test SRY sur sang maternel (Tardy et al, JCEM 2014)
La ponction de trophoblaste est recommandée chez les fœtus féminins, l'amniocentèse proposée en cas de fœtus masculins.

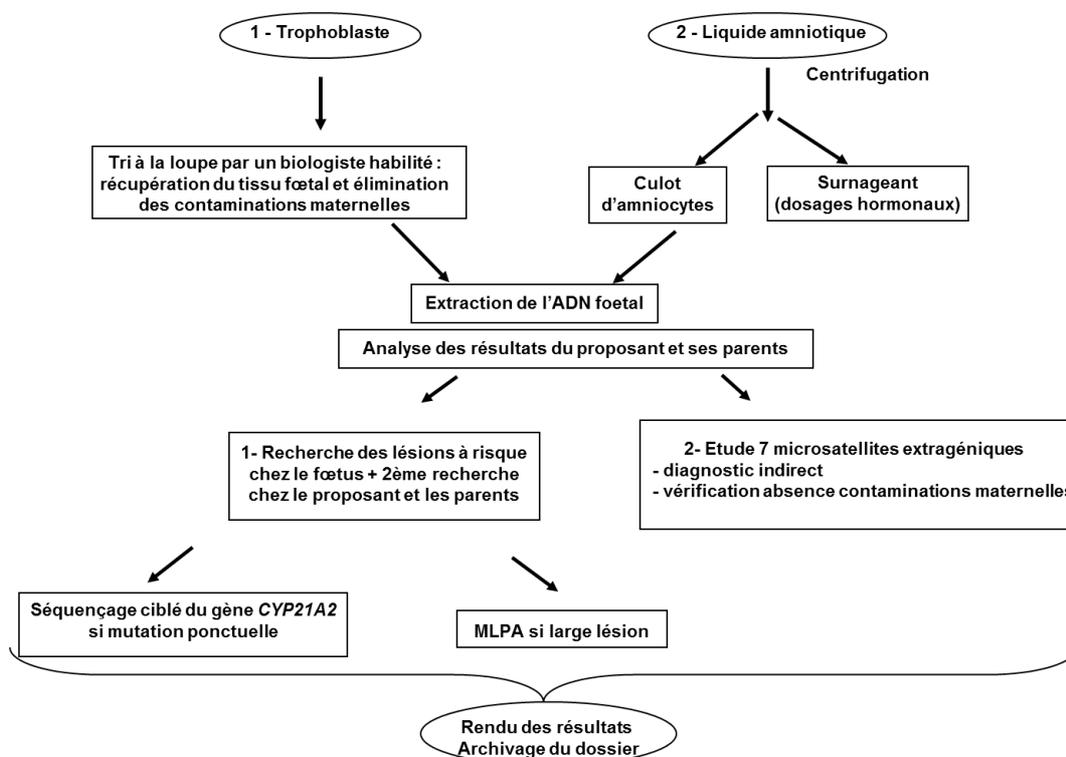


Figure 7 : Diagnostic prénatal

Une notice d'informations sur la prise en charge est disponible via notre laboratoire et les centres de références cliniques.

2- Couple sans enfant atteint à risque d'avoir un enfant atteint de FC

Couple composé d'un apparenté porteur d'une mutation sévère et dont le génotypage du conjoint a identifié chez ce dernier une mutation sévère. La prise en charge est celle proposée en 1-.

3- Découverte échographique d'une anomalie des OGE chez un fœtus féminin

La découverte échographique d'une anomalie des OGE chez le fœtus d'une femme enceinte peut conduire à la réalisation d'une amniocentèse pour détermination du sexe fœtal par caryotype et réalisation de dosages hormonaux. Si les résultats des dosages sont en faveur d'un déficit en 21-hydroxylase, l'étude moléculaire du gène *CYP21A2* sera réalisée à partir de l'ADN fœtal extrait des amniocytes, selon la même stratégie qu'un proposant (figure 2). Une détermination du sexe fœtal sur sérum maternel peut également être réalisée en première intention afin de confronter les données échographiques avec le sexe du fœtus.

ETUDE DU GENE CYP21A2 HORS NGS DANS L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES PAR DEFICIT EN 21-HYDROXYLASERéférence : ANPGM_133
Page 10/10

Numéro de version : 1

IV. Délai de rendu du résultat

Les résultats sont disponibles en 1-4 mois en l'absence de problème technique, ils sont rendus par écrit dans un délai variable notamment dépendant de l'urgence. La priorité est donnée aux couples avec grossesse et aux nouveau-nés au diagnostic incertain. En cas de diagnostic prénatal, le résultat est transmis en moins de 2 semaines sauf en cas de problème technique, par écrit dans un délai imposé par la date de consultation de la femme enceinte.

VI. Cotations

1- Cas index :

Séquençage de la totalité du gène = 5N906.

MLPA = N318.

2- Apparentés :

Mutations ponctuelles dans un même amplicon : N353

Mutations ponctuelles à partir de deux amplicons = N353+ N906

MLPA = N318

Mutations ponctuelles + MLPA = N353+N318

3- Diagnostic prénatal :

Fœtus : B700, ligne 4034.

Parents : B500, ligne 4033

Annexes :**Autre laboratoire réalisant l'étude du gène CYP21A2 hors NGS**

Laboratoire de biologie moléculaire, Hôpital La Pitié Salpêtrière, Paris (Dr. Christine BELLANNE CHANTELOT)

Laboratoire de biologie moléculaire, Hôpital Le Kremlin Bicêtre, Paris (Dr. Jérôme BOULIGAND)

Autres laboratoires réalisant l'étude du gène CYP21A2 par NGS (panel de gènes)

Laboratoire de biologie moléculaire, Hôpital Le Kremlin Bicêtre, Paris (Dr. Jérôme BOULIGAND)

Laboratoire de biologie moléculaire, Hôpital Robert Debré, Paris (Dr. Nicolas DE ROUX)