

« INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES ET MALADIES RARES ENDOCRINIENNES, DU SOIN À LA RECHERCHE »

MARDI
10 DÉCEMBRE
2019



Interprétation/classification d'une variation génétique

Nelly BURNICHON

Service de Génétique – Hôpital européen Georges Pompidou – PARIS

Equipe « Génétique et Métabolisme des tumeurs rares » – INSERM U970 – PARCC HEGP

« INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES
ET MALADIES RARES ENDOCRINIENNES,
DU SOIN À LA RECHERCHE »

MARDI
10 DÉCEMBRE
2019

COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 3^{ème} ÉDITION -


FIRENDO
FILIÈRE MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

Contexte : PFMG 2025



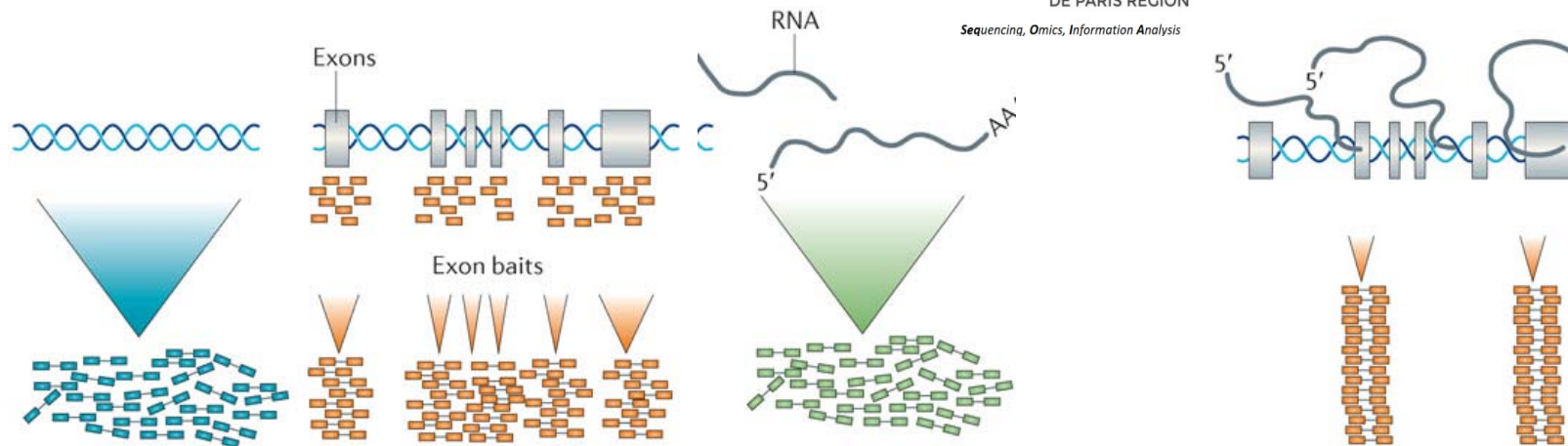
« INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES
ET MALADIES RARES ENDOCRINIENNES,
DU SOIN À LA RECHERCHE »

MARDI
10 DÉCEMBRE
2019



COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 3^{ème} ÉDITION -

Plateformes Séquençage haut-débit



Whole genome

Predominant applications:
• Structural variants
• Point mutations
• Copy number variation

3 Gb - haploide

Whole-exome (1%)

Predominant applications:
• Point mutations
• Copy number variation

30 Mb
≈180000 exons

Transcriptome RNA

Predominant applications:
• Gene expression
• Gene fusions
• Splice variants

PCR amplicon

Predominant applications:
• Point mutations
• Deletions

Panel
1-300 gènes



ROUTINE
DIAGNOSTIQUE

Pré-indications

FIRENDO

Anomalies sévères de la différenciation sexuelle d'origine gonadique et hypothalamo-hypophysaire
Insuffisance ovarienne primitive

RCP Firendo

CANCER (prévention + prise en charge apparentés)

Patients atteints de cancers dans un contexte d'antécédents familiaux sévères évocateurs
Cas extrêmes sporadiques jeunes

RCP GGC

CANCER (visée théranostique)

Cancer, pathologie maligne en situation de maladie réfractaire ou de rechute avec échec de traitement curateur
< 40 ans

RCP moléculaire

WGS
Trios

WES
RNAseq
T. congelée

Circuit

Patient/famille entrant dans champ de la pré-
indication



NGS panel de gènes majeurs négatif



Validation en RCP



Consultation génétique
consentement PFMG / Prélèvements sanguins



Envoi à plateforme de séquençage



Interprétation des résultats

Laboratoires
de Génétique



Interprétation d'une variation

Exemple d'un panel phéochromocytome/paragangliome

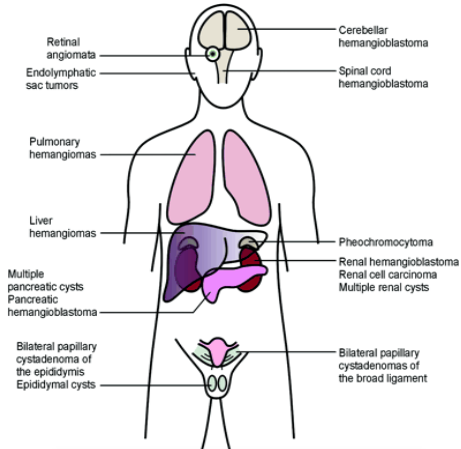
« INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES
ET MALADIES RARES ENDOCRINIENNES,
DU SOIN À LA RECHERCHE »

MARDI
10 DÉCEMBRE
2019

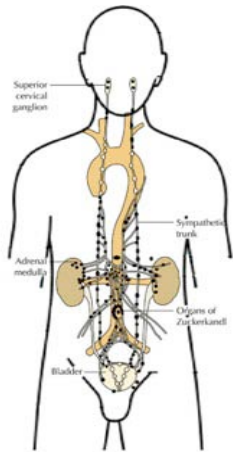


COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 3^{ème} ÉDITION -

2019 : >20 gènes de prédisposition



Von Hippel Lindau



PPGL héréditaire

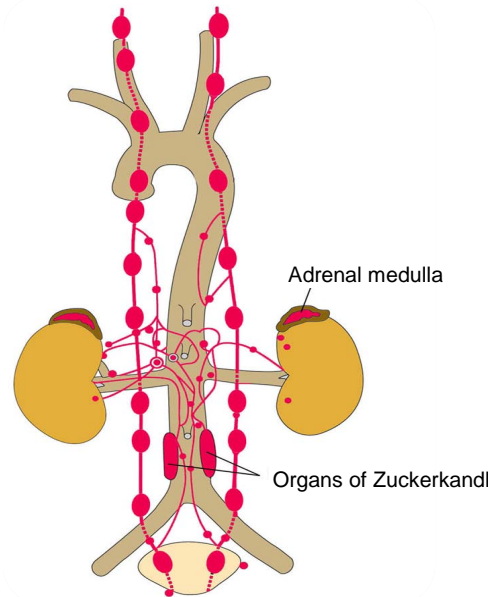
PPGL + Polyglobulie

(2012)

HIF2A/EPAS1

(2015)

PHD1/PHD2



Phéochromocytome familial

VHL

(2000-2001)

**SDHB
SDHC
SDHD**

(2009-2010)

**SDHA
SDHAF2**

(2013)

FH

(2015-2019)

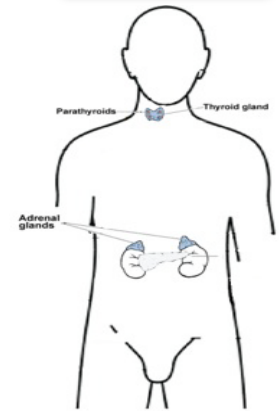
**MDH2
SLC25A11
GOT2**

**DNMT3A MET
DLST MERTK**

(2010-2011)

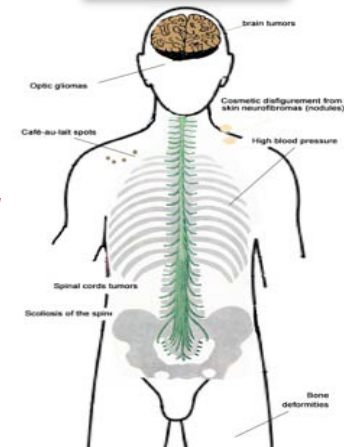
**TMEM127
MAX**

MEN2



RET

NF1



NF1

Recommandations internationales pour analyse NGS PPGL

CONSENSUS
STATEMENT



OPEN

EXPERT CONSENSUS DOCUMENT

Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas

18 experts
10 institutions
8 pays

The NGS in PPGL (NGSnPPGL) Study Group, Rodrigo A. Toledo^{1,2}, Nelly Burnichon^{3,4}, Alberto Cascon⁵, Diana E. Benn⁶, Jean-Pierre Bayley⁷, Jenny Welander⁸, Carli M. Tops⁹, Helen Firth¹⁰, Trish Dwight⁶, Tonino Ercolino¹¹, Massimo Mannelli¹¹, Giuseppe Opocher¹², Roderick Clifton-Bligh⁶, Oliver Gimm¹³, Eamonn R. Maher¹⁰, Mercedes Robledo⁵, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo^{3,4} and Patricia L. M. Dahia¹

Gènes d'intérêt

Table 1 | Genes involved in PPGL pathogenesis

Gene	Frequency of mutations detected in PPGLs (mutation type)	Refs
ATRX	<5% (S)	96,98
BRAF	<2% (S)	15,45
CDKN2A	<2% (S)	96
EGLN1/PHD2	<1% (G or S)*	99,100
EPAS1	6–12% (M or S)	19,43,52,77
FGFR1	~1% (S)	14
FH	1–2% (G)	24,43,101
H3F3A	<2% (M)*	14
HRAS	7–8% (S)	43,102
IDH2	<0.5% (S)	103
KIF1B	<5% (G or S)	18,104,105
KMT2D	<2% (G or S)*	106
MAX	1–2% (G or S)	107
MDH2	<2% (G)*	108
MERTK	<2% (G)*	14
MET	<2% (G) or <2–10% (S)*	14,96
NF1	3% (G) or 20–25% (S)	109,110
RET	5–6% (G or S)	44,111
SDHA	<1% (G or S)	112
SDHAF2	<1%	113
SDHB	8–10% (G)	43,111
SDHC	1–2% (G)	43,47,111
SDHD	5–7% (G)	43,111
TMEM127	1–2% (G)	43,114
TP53	<5% (S)	96
VHL	7–10% (G or S)	43,111

The numbers shown here are in part based on data generated by the TCGA ([The Cancer Genome Atlas](#)) Research Network for Pheochromocytoma and Paraganglioma (unpublished data, publicly available through [cBioPortal](#)). G, germ line; S, somatic; M, mosaic; PPGLs, pheochromocytomas and/or paragangliomas. *Frequency based on one or two clinical cases.

Table 4 | Gene panels of PPGLs based on current evidence

Gene	Review status*	Targeted panel [†]	Gene target area
FH	3	Basic	All coding exon–intron boundaries
MAX	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
NF1	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
RET	4	Basic	Exons 8, 10, 11, 13–16
SDHA	3	Basic	All coding exon–intron boundaries
SDHB	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
SDHC	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
SDHD	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
TMEM127	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
VHL	4	Basic	All coding exon–intron boundaries
EGLN1/PHD2	2	Extended	All coding exon–intron boundaries
EPAS1	4	Extended	Exons 9, 12
KIF1B	2	Extended	All coding exon–intron boundaries
MET	2	Extended	All coding exon–intron boundaries
SDHAF2	2	Extended	All coding exon–intron boundaries
ATRX	2	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
BRAF	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
CDKN2A	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
EGLN2/PHD1	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
FGFR1	2	Comprehensive	Exons 11, 13
H3F3A	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
HRAS	4	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
IDH2	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
KMT2D	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
MDH2	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
MERTK	1	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries
TP53	2	Comprehensive	All coding exon–intron boundaries

PPGLs, pheochromocytomas and/or paragangliomas. *Based on ClinVar, related to TABLE 2. [†]Related to TABLE 3.

Organisation en France



- 6 laboratoires
- Panel minimum
- Autres gènes en fonction des expertises

Cas index

21 gènes (DNA constitutionnel)
30 gènes (DNA tumoral)

- *SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD*
- *RET*
- *VHL*
- *NF1*
- *TMEM127*
- *EGLN1/PHD2*
- *EGLN2/PHD1*
- *FH*
- *MAX*
- *MDH2*
- *EPAS1/HIF2A*
- *GOT2*
- *H3F3A*
- *MERTK*
- *MET*
- *MITF*
- *SLC25A11*
- *ATRX, HRAS, FGFR1, H3F3B, IDH1, IDH2, IDH3B, SETD2, TERT* (somatique)



Hôpital européen Georges-Pompidou

Résultats panel NGS

Résultats NGS															
Gène	homo / htz ?	Reads	Ratio	Caller	Exon	Nomenclature Alamut g.	Nomenclature Alamut c.	Nomenclature Alamut p.	Fréq	deja_vu	similar_p rojects	in_this_r un	polyphen	sift	Classification variation
7	NF1	ho(01762)	100%	seq.uni	Intron 3	g.29486152G>A	c.288+41G>A	p.?	0.5441	1.6	11:236	24/25	-	-	SNP
8	NF1	he(453/4070)	89%	uni.seq	Exon 7	g.29508775G>A	c.702G>A	p.Leu234Leu	0.5452	1.6	11:259	24/25	-	-	à annoter
9	NF1	he(2791/741)	20%	seq	Intron 7	g.29508838C>T	c.730+35C>T	p.?	0.028	0.0	9:242	24/25	-	-	SNP
10	NF1	ho(02941)	100%	seq.uni	Intron 12	g.29541437T>C	c.1393-32T>C	p.?	0.5198	1.6	11:254	24/25	-	-	SNP
11	NF1	ho(01907)	100%	seq.uni	Intron 14	g.29546175T>C	c.1641+39T>C	p.?	0.5103	1.6	11:256	24/25	-	-	SNP
12	NF1	he(2799/455)	13%	seq.uni	Intron 24	g.29557966G>A	c.3197+23G>A	p.?	0.0081	0.0	11:260	24/25	-	-	SNP/Artefact
13	NF1	he(1367/1422)	50%	seq.uni	Intron 36	g.29653293T>C	c.5205+23T>C	p.?	0.6029	1.7	11:251	25/25	-	-	SNP
14	NF1	he(501/521)	50%	seq.uni	Intron 37	g.29654876T>A	c.5546+19T>A	p.?	0.4636	1.6	11:238	24/25	-	-	artefact (kit)
15	NF1	he(2138/2138)	50%	seq.uni	Intron 47	g.29670190C>G	c.7126+37C>G	p.?	0.8782	1.11	11:281	25/25	-	-	artefact (kit)
16	NF1	he(498/517)	50%	seq.uni	Intron 49	g.29679246G>A	c.7395-29G>A	p.?	0.4622	1.6	11:237	24/25	-	-	SNP
17	NF1	he(1917/293)	13%	uni	Intron 53	g.29685490del	c.7908-8del	p.?	0.0039	0.0	9:216	25/25	-	-	SNP
18	NF1	he(1937/289)	12%	seq	Intron 53	g.29685490del	c.7908-8del	p.?	-	0.0	9:241	24/25	-	-	SNP
19	SDHA	he(1790/1243)	40%	seq	Exon 1	g.218481T>G	c.11T>G	p.Val4Gly	-	0.0	9:242	24/25	0.713	-	artefact (run)
20	SDHA	he(2739/2966)	51%	seq.uni	Exon 3	g.224633A>G	c.309A>G	p.Ala103Ala	0.2002	0.0	11:101	8/25	-	-	SNP
21	SDHA	he(2351/414)	14%	seq.uni	Exon 5	g.226160A>C	c.619A>C	p.Arg207Arg	0.2169	0.0	11:98	8/25	-	-	SNP
22	SDHA	he(742/684)	47%	seq.uni	Exon 6	g.228362T>C	c.684T>C	p.Asn228Asn	0.2169	0.0	11:99	8/25	-	-	SNP
23	SDHA	ho(01610)	100%	seq.uni	Intron 6	g.230380A>G	c.771-11A>G	p.?	0.8633	0.0	11:285	25/25	-	-	SNP
24	SDHA	ho(04614)	100%	seq.uni	Exon 7	g.231111T>C	c.891T>C	p.Pro297Pro	0.6604	0.0	11:273	23/25	-	-	SNP
25	SDHA	he(1941/1864)	48%	seq.uni	Intron 7	g.231143T>C	c.895+28T>C	p.?	0.2169	0.0	11:99	8/25	-	-	SNP
26	SDHA	he(929/928)	49%	seq.uni	Exon 8	g.233734C>G	c.1038C>G	p.Ser346Ser	0.225	0.0	11:101	8/25	-	-	SNP
27	SDHA	he(424/423)	49%	seq.uni	Intron 12	g.251419C>T	c.1664-34C>T	p.?	0.1941	0.0	11:99	8/25	-	-	SNP
28	SDHA	he(843/848)	49%	seq.uni	Exon 13	g.251469G>A	c.1680G>A	p.Thr560Thr	0.2018	0.0	11:99	8/25	-	-	SNP
29	SDHA	he(2321/2514)	51%	seq.uni	Exon 13	g.251541A>G	c.1752A>G	p.Ala584Ala	0.217	0.0	11:100	8/25	-	-	SNP
30	SDHA	he(212/113)	34%	seq	Exon 14	g.254599A>T	c.1886A>T	p.Tyr629Phe	0.0913	0.0	9:83	8/25	0.006	0.3	SNP
31	SDHA	he(1766/2072)	53%	seq.uni	Exon 15	g.256472G>A	c.1932G>A	p.Val644Val	0.28	0.0	11:152	13/25	-	-	SNP
32	SDHA	he(2512/2317)	47%	seq.uni	Exon 15	g.256509G>A	c.1969G>A	p.Val657Ile	0.1607	0.0	11:84	6/25	0.033	0.63	SNP
33	VHL	he(751/501)	40%	uni	UTR	g.1018347L_10183481dup	c.-6L-51dup	p.?	-	0.0	1:2	1/25	-	-	VSI
34	VHL	he(1863/621)	25%	seq	UTR	g.1018347L_10183481dup	c.-6L-51dup	p.?	-	0.0	1:2	1/25	-	-	VSI
35	EGLN1	he(455/387)	45%	seq.uni	Exon 1	g.231557255C>G	c.380G>C	p.Cys127Ser	0.1555	0.0	10:216	22/25	-	0.73	SNP
36	SDHB	he(1321/1430)	51%	seq.uni	Exon 1	g.17380497G>T	c.18C>A	p.Ala6Ala	0.9537	7.211	11:283	25/25	-	-	SNP
37	SDHB	ho(01242)	100%	seq.uni	Intron 2	g.17371223C>T	c.200+33G>A	p.?	0.101	8.31	10:40	4/25	-	-	SNP
38	SDHB	ho(0442)	100%	seq.uni	Intron 2	g.17359676C>A	c.201-36G>T	p.?	0.957	8.221	11:285	25/25	-	-	SNP
39	MDH2	ho(01687)	100%	seq.uni	UTR	g.75677430G>C	c.-49G>C	p.?	0.9737	0.0	11:283	25/25	-	-	SNP
40	MDH2	he(1069/1360)	55%	seq.uni	Exon 1	g.75677504C>T	c.26C>T	p.Ala9Val	0.4263	0.0	11:181	11/25	-	0.2	SNP
41	MDH2	he(504/484)	48%	seq.uni	Intron 6	g.75692927C>T	c.633+17C>T	p.?	0.4799	0.0	11:183	11/25	-	-	SNP
42	MDH2	he(844/779)	47%	seq.uni	Intron 7	g.75694079T>G	c.734-41T>G	p.?	0.4661	0.0	11:184	11/25	-	-	SNP
43	EPAS1	ho(47/4563)	98%	seq.uni	Intron 8	g.46603671C>G	c.1035-7C>G	p.?	0.3493	2.12	11:187	19/25	-	-	SNP
44	MAX	he(238/74)	23%	seq.uni	Intron 1	g.65568305del	c.37-15del	p.?	0.0348	1.1	11:280	25/25	-	-	SNP
45	RET	he(376/390)	50%	seq.uni	Exon 13	g.43613843T>G	c.2307T>G	p.Leu769Leu	0.7225	1.11	11:274	24/25	-	-	SNP
46	SDHAF2	ho(01231)	100%	seq.uni	Intron 2	g.61205434G>A	c.261-42G>A	p.?	0.7213	1.11	11:252	24/25	-	-	SNP

Séquençage haut-débit

Human genome
Three billion base pairs (haploid)
Six billion base pairs (diploid)

Approximately three to four
million variants (SNVs)
compared to reference genome

~200,000 rare
or private variants

~20,000 variants
in exons of genes;
~300 predicted
loss-of-function
variants

Variation = Pathogène ?
Polymorphisme fréquent ?
Polymorphisme rare ?

« Mutation » ou polymorphisme non fonctionnel ?

Proposed Classification System for Sequence Variants Identified by Genetic Testing

Class	Description	Probability of being Pathogenic
5	Definitely Pathogenic	>0.99
4	Likely Pathogenic	0.95–0.99
3	Uncertain	0.05–0.949
2	Likely Not Pathogenic or of Little Clinical Significance	0.001–0.049
1	Not Pathogenic or of No Clinical Significance	<0.001

Testing Recommendations Associated with Each Class of Variant

Class	Clinical Testing	Surveillance Recommendations if At-Risk Relative is Positive	Research Testing of Family Members
5	Test at-risk relatives for variant	Full high-risk surveillance guidelines	Not indicated
4	Test at-risk relatives for variant*	Full high-risk surveillance guidelines	May be helpful to further classify variant
3	Do not use for predictive testing in at-risk relatives*	Based on family history (and other risk factors)	May be helpful to further classify variant
2	Do not use for predictive testing in at-risk relatives*	Treat as “no mutation detected” for this disorder	May be helpful to further classify variant
1	Do not use for predictive testing in at-risk relatives*	Treat as “no mutation detected” for this disorder	Not indicated

* Recommend continuing to test proband for any additional testing modalities available for the disorder in question, e.g. rearrangement testing.

Critères pour la classification des variations identifiées

	Bénin			Pathogène		
	BA/BS Suffisant/Fort	BP Faible	PP Faible	PM Moyen	PS Fort	PVS Très fort
Données épidémiologiques	Fréquence allélique trop importante par rapport à la fréquence de la pathologie (BA1/BS1) OU présence du variant chez les contrôles incohérente avec la pénétrance de la pathologie (BS2)			Variant absent des bases de données de populations contrôles (PM2)	Prévalence du variant chez les individus atteints significativement supérieure à celle des contrôles (PS4)	
Données structurales		Effet d'un variant faux-sens prédit bénin par l'ensemble des logiciels de prédiction de pathogénicité interrogés (BP4) Variant faux-sens dans un gène où seules les variants tronquants sont décrits comme associées à la pathologie (BP1) Variant synonyme sans impact prédit sur l'épissage, et pour lequel la séquence nucléotidique n'est pas très conservée chez les vertébrés (BP7) Indel en phase dans une région répétée sans fonction connue (BP3)	Effet d'un variant faux-sens prédit délétère par l'ensemble des logiciels de prédiction de pathogénicité interrogés (PP3)	Variant à l'origine d'un changement d'acide aminé différent à la même position qu'un variant faux-sens pathogène connu (PM5) Variant affectant la longueur de la protéine (concerne les indel en phase et pertes de codons stop) (PM4)	Variant à l'origine du même changement d'acide aminé qu'un variant pathogène connu (PS1), sauf si le variant n'est pas un variant faux-sens mais a un effet sur l'épissage	Variant ayant un effet nul prédit dans un gène où la perte de fonction est un mécanisme pathogène connu (PVS1)
Données fonctionnelles	Etudes fonctionnelles <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> bien établies montrant un impact non délétère du variant sur le gène ou son produit (cet argument peut inclure les résultats d'analyses fonctionnelles spécifiques en fonction de la pathologie concernée) (BS3)		Variant faux-sens dans un gène avec un faible taux de variants faux-sens bénins et dans lequel les variants faux-sens sont un mécanisme fréquemment responsable de la pathologie (PP2)	Variant non tronquant situé sur un hot spot mutationnel et/ou un domaine fonctionnel critique bien établi exempt de variants bénins (PM1)	Etudes fonctionnelles <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> bien établies montrant un impact délétère du variant sur le gène ou son produit (cet argument peut inclure les résultats d'analyses fonctionnelles spécifiques en fonction de la pathologie concernée) (PS3)	
Données de ségrégation	Variant ne ségrégeant pas avec la pathologie chez des apparentés atteints (BS4)		Données issues d'une seule famille : $N \leq 1/8$: argument faible (PP)* Données issues de plusieurs familles : $N \leq 1/4$: argument faible (PP)*	Données issues d'une seule famille : $N \leq 1/16$: argument moyen (PM)* Données issues de plusieurs familles : $N \leq 1/8$: argument moyen (PM)*	Données issues d'une seule famille : $N \leq 1/32$: argument fort (PS)* Données issues de plusieurs familles : $N \leq 1/16$: argument fort (PS)*	
Données de novo				Variant de novo sans confirmation de la paternité et de la maternité, si la pénétrance est considérée complète (PM6)	Variant de novo avec confirmation de la paternité et de la maternité (PS2)	
Données alléliques		Pour une pathologie à pénétrance complète de transmission autosomique dominante ou liée à l'X, co-occurrence du variant avec un variant pathogène en <i>trans</i> (dans le même gène), poids de l'argument laissé à l'appréciation du laboratoire (classé BP2 dans les critères ACMG initiaux) Co-occurrence du variant avec un variant pathogène en <i>cis</i> (dans le même gène): poids de l'argument laissé à l'appréciation du laboratoire (classé BP2 dans les critères ACMG initiaux)		Variant observé en <i>trans</i> avec un variant pathogène distinct, si la pathologie a une transmission récessive (poids de l'argument laissé à l'appréciation du laboratoire, pondération PM3 dans les recommandations ACMG-AMP initiales)		
Autres bases de données		Source documentée classant ce variant comme bénin (BP5)	Source documentée classant ce variant comme pathogène (PP5)			
Données additionnelles		Co-occurrence du variant avec un variant pathogène dans un autre gène impliqué dans la même pathologie : poids de l'argument laissé à l'appréciation du laboratoire (classé BP5 dans les critères ACMG initiaux)	Le phénotype du patient ou les antécédents familiaux sont très spécifiques pour le gène (PP4)			

Critères pour la classification des variations identifiées

PVS/S/M/P : Argument très fort/fort/moyen/faible en faveur de la pathogénicité du variant

BS/P : Argument fort/faible en faveur du caractère bénin du variant.

Classe 5 : Variant pathogène

- 1 **PVS** ET ≥ 1 **PS** OU
- ≥ 2 **PM** OU
- 1 **PM** ET 1 **PP** OU
- ≥ 2 **PP** OU

- ≥ 2 **PS** OU
- 1 **PS** ET ≥ 3 **PM** OU
- 2 **PM** ET ≥ 2 **PP** OU
- 1 **PM** ET ≥ 4 **PP**

Classe 4 : Variant probablement pathogène

- 1 **PVS** ET 1 **PM** OU
- 1 **PS** ET 1-2 **PM** OU
- 1 **PS** ET ≥ 2 **PP** OU
- ≥ 3 **PM** OU
- 2 **PM** ET ≥ 2 **PP** OU
- 1 **PM** ET ≥ 4 **PP**

Classe 3 : Variant de signification inconnue

Les arguments pondérés ne permettent pas de classer le variant dans une autre classe

Classe 2 : Variant probablement bénin

- 1 **BS** ET 1 **BP** OU
- ≥ 2 **BP**

Classe 1 : Variant bénin

- BA** OU
- ≥ 2 **BS**



American College of Medical
Genetics

Richards *et al.*, *Genet Med*
2015, modifié d'après Jarvik
and Browning, *Am J Hum*
Genet 2016)

Critères pour la classification des variations identifiées

1. Type de variation (tronquante ?)
2. Fréquence dans les databases de population (gnomAD)
3. Fréquences dans les databases spécifiques de gènes ou de maladies
4. Description dans la littérature
5. Prédictions *in silico*
6. Analyse de co-ségrégation dans les familles
7. Analyses fonctionnelles

OBJECTIF : La « mutation » identifiée peut-elle être utilisée au titre du diagnostic pré-symptomatique ?

Fréquence en population générale

gnomAD



genome aggregation database

Annotations

This variant falls on 5 transcripts in 1 gene.

missense

- [SDHB](#)
 - [ENST00000375499 *](#)
HGVS: p.Ser163Pro
Polyphen: ● benign
SIFT: ● tolerated

non coding transcript exon


- [SDHB](#)
 - [ENST00000463045](#)
 - [ENST00000475506](#)
 - [ENST00000485515](#)
 - [and 1 more](#)

Population Frequencies ?

Population	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency ▼
▶ European (Finnish)	542	25100	9	0.02159
▶ South Asian	554	30612	10	0.01810
▶ European (non-Finnish)	1970	129128	15	0.01526
▶ Other	87	7220	1	0.01205
▶ Ashkenazi Jewish	68	10370	0	0.006557
▶ Latino	143	35440	0	0.004035
▶ African	43	24962	0	0.001723
▶ East Asian	0	19952	0	0.000
Male	1962	153336	19	0.01280
Female	1445	129448	16	0.01116
Total	3407	282784	35	0.01205

Include: Exomes Genomes

Databases gène-spécifique



LOVD
Leiden Open Variation Database

TCA Cycle Gene Mutation Database
(formerly SDH Complex database)
Succinate dehydrogenase, subunit B (SDHB)

Curators: [Dr. J.P.L. Bayley](#) and [Dr. Peter E.M. Taschner](#)

LOVD v.2.0 Build 3
[Regist](#)

Home
Variants
Submitters
Submit
Documentation

View unique variants
Search unique variants
View all contents
Full database search
Variant listing based on patient origin
Database statistics
Switch gene

LOVD - Variant listings

[Unhide all columns](#) | [Hide Specific Columns](#) | [Hide all columns](#)

[About this overview \[Show\]](#)

218 entries

100 entries per page

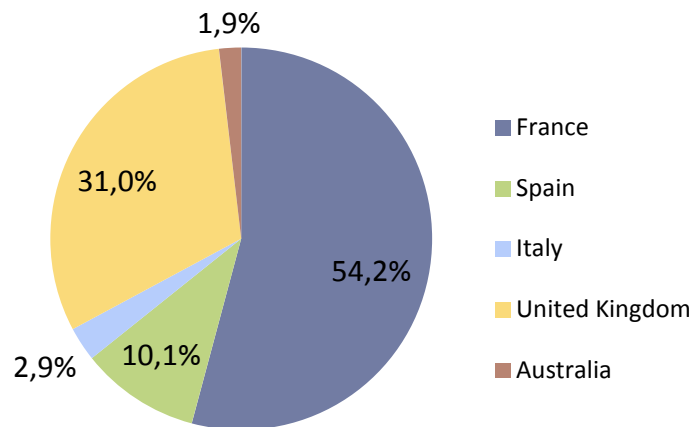
Exon	DNA change	Protein	Original description	Var_Type	Frequency	Var_remarks	SIFT	DB-ID	RNA chang
-	c.-139G>T (Reported 2 times)	-	'5 UTR	SNP	-	located in '5 UTR, Allelic freq controls 1/188; patients 2/646	-	SDHB_00119	-
-	c.1-198G>A	-	5' UTR	SNP	-	Allelic freq: controls 1/188; patients 1/646	-	SDHB_00192	-
1	c.-6G>A	-	5' UTR	SNP	-	Japan	-	SDHB_00149	-
1	c1-?_72+?del	p.?	Deletion Exon 1	Large deletion	-	Germany	-	SDHB_00166	-
1	c.1-16418_73-5173del	p.?	exon 1 deletion (20kb)	Large deletion	-	France, PCC	-	SDHB_00132	-
1	c.1-16416_72+3877del	p.?	exon 1 deletion (20kb)	Large deletion	-	France	-	SDHB_00193	-
1	c.1-10413_73-3866del (Reported 2 times)	p.?	deletion of exon 1 (16kb)	Large deletion	-	Spain, 15680 bp del incl. exon 1	-	SDHB_00131	-
1	c.1-?_72+?del (Reported 2 times)	p.?	Deletion Exon 1 (1 kb?)	Large deletion	-	Brazil	-	SDHB_00007	-
1	c.1-?_200+?del	?	-	Large deletion	-	Japan, deletion of exons 1 + 2	-	SDHB_00202	-
1	c.1-?_843+?del (Reported 3 times)	p.?	whole SDHB gene deletion	Large deletion	-	Spain	-	SDHB_00087	-
1	c.3G>A	p.Met1?	-	Nonsense	-	Germany	-	SDHB_00154	-
1	c.8C>G (Reported 2 times)	p.Ala3Gly	-	SNP	1.1%/8.5%	USA, France. Freq controls 0/1400 chromosomes, tolerated by SIFT analysis, conserved.	0.15	SDHB_00130	-
1	c.17_35del19 (Reported 2 times)	p.Ala6GlyfsX65	p.Ala6fs	Frameshift	-	France. Malignant Pheo	-	SDHB_00109	-
1	c.18A>C	-	p.Ala6Ala	SNP	3.5%	-	-	SDHB_00008	-
1	c.20_22delinsC	p.Leu7ProfsX55	-	Frameshift	-	China	-	SDHB_00191	-



Database *SDHB*



Centre	Submitted variants
France (5 labs)	376
Spain (CNIO)	70
Italy (Firenze)	20
UK (Cambridge)	215
Australia (Sydney)	13
TOTAL	694



Already reported in LOVD	
Yes	125
No	93
TOTAL	218

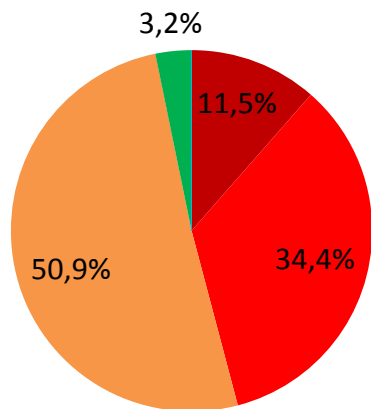
Recueil des données disponibles

- Informations cliniques
- Nature de la variation
- Données fonctionnelles ou tumorales
- Analyses *in silico*

Classification

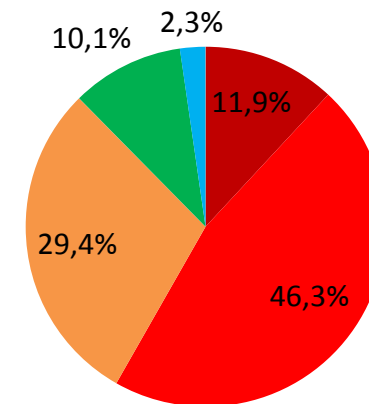
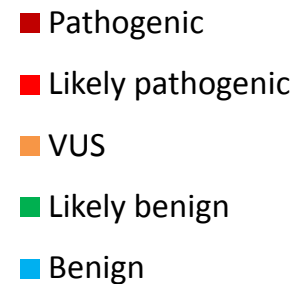
ACMG criteria

Class	Variants	Different variants	Percentage
Pathogenic	96	25	11.5%
Likely pathogenic	253	75	34.4%
VUS	330	111	50.9%
Likely benign	15	7	3.2%
Benign	0	0	0%
TOTAL	694	218	100%



NGSnPPGL study group criteria

Class	Variants	Different variants	Percentage
Pathogenic	189	26	11.9%
Likely pathogenic	307	101	46.3%
VUS	154	64	29.4%
Likely benign	30	22	10.1%
Benign	15	5	2.3%
TOTAL	694	218	100%



- ➔ Revue manuelle de chaque variation
- ➔ Groupe d'experts internationaux

Tests additionnels et fonctionnels

Type of material required	Test description	Expected results	Target gene	Target mutation type	Evidence level of test*
Tumour or leukocyte RNA	cDNA sequencing	Identification of aberrant RNA transcript	All PPGLs susceptibility genes	Splice mutations	B
Tumour DNA	Sequencing, MLPA, SNP array or microsatellite markers study (for copy number analysis)	Identification of LOH (by deletion or somatic mutation of the contralateral allele)	PPGLs tumour suppressor genes	All	B
	Methylation analysis	Identification of methylation of the contralateral allele	PPGLs tumour suppressor genes	All	B
Frozen tumour tissue	SDH enzymatic activity measurement	Loss of SDH enzymatic activity	<i>SDH</i>	All	A
	Fumarase enzymatic activity measurement	Loss of fumarase enzymatic activity	<i>FH</i>	All	A
	Succinate concentration	Accumulation of succinate	<i>SDH</i>	All	B
	Fumarate concentration	Accumulation of fumarate	<i>FH</i>	All	B
	Metabolome profiling by HRMAS NMR spectroscopy	Accumulation of succinate	<i>SDH</i>	All	C
FFPE tumour tissue section	SDHB/SDHD IHC	SDHB negative or SDHD positive IHC	<i>SDH</i>	All	A
	SDHA IHC	SDHA negative IHC	<i>SDHA</i>	All	A
	MAX IHC	MAX negative IHC	<i>MAX</i>	Truncating mutations	B
	2-SC IHC	2-SC positive IHC	<i>FH</i>	All	B
In vitro assay	PC12 rat pheochromocytoma cell-based luciferase reporter assay (mutagenesis)	Alteration of MAX regulatory effects on MYC	<i>MAX</i>	Missense	C
	Endomembrane localization or subcellular distribution of expressed mutant constructs by confocal microscopy	Intracellular distribution of TMEM127 mutant	<i>TMEM127</i>	Missense	C
	SDH cellular distribution	Loss of SDH mitochondrial localization	<i>SDH</i>	All	C
In vivo assay	In vivo succinate detection by magnetic resonance spectroscopy	Accumulation of succinate In vivo	<i>SDH</i>	All	C

Tests disponibles dans notre laboratoire

- o Recherche d'anomalie cDNA (variants d'épissage ou synonymes)
- o Recherche de perte d'hétérozygotie (gènes suppresseurs de tumeurs)
- o Immunohistochimie SDHA, SDHB, MAX, CAIX, FH (service d'anatomopathologie HEGP)
- o Mesure activité enzymatique SDH (INSERM U1141 – P Rustin)

Compte-rendu médical

- Variants des classes 1 et 2 ne devraient pas être reportés sur le compte-rendu
- Variants de classe 3 : à reporter selon intérêt clinique potentiel
- L'interprétation des résultats doit clairement préciser :
 - La responsabilité (supposée) du variant dans le développement de la maladie
 - Les éléments de preuve en faveur (ou non) de la pathogénicité
 - Les analyses additionnelles qui pourraient être réalisées pour aider à l'interprétation
 - Les échantillons nécessaires à ces analyses (tissu tumoral, etc.)
 - Si un dépistage génétique pré-symptomatique peut être proposé ou non aux apparentés du premier degré

Cas pratiques

« INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES
ET MALADIES RARES ENDOCRINIENNES,
DU SOIN À LA RECHERCHE »

MARDI
10 DÉCEMBRE
2019



COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 3^{ème} ÉDITION -

Cas n° 1

Syndrome de Carney-Stratakis

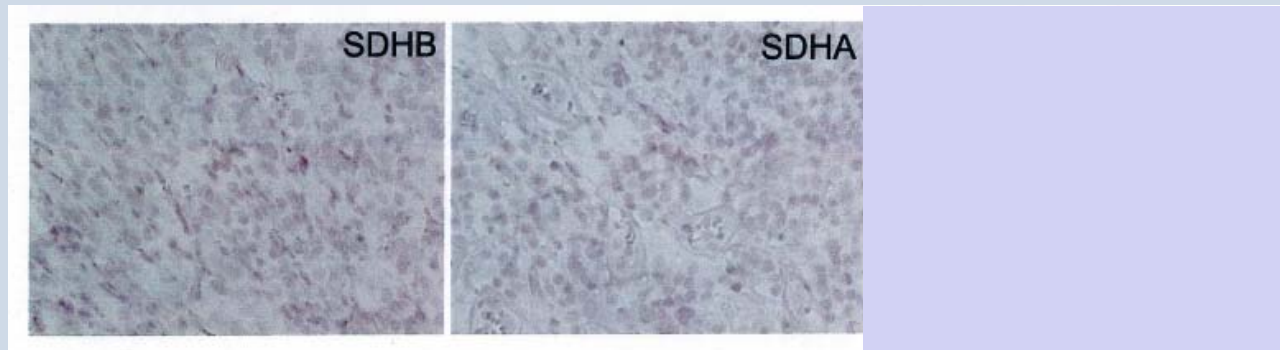
- ❖ PGL médiastinal (47 x 53 x 63 mm) + GIST (29 x 24 x 24 mm) 55 ans
- ❖ Sécrétion normétanéphrines > N; métanéphrines = N
- ❖ Aucune histoire familiale

- ❖ NGS ADN constitutionnel
 - Variation hétérozygote intron 6 *SDHA* c.771-21_771-13del
 - Signification inconnue

Demande de tissu tumoral

Cas n° 1

❖ Phénotypage immunohistochimique



❖ Perte d'expression SDHB et SDHA

→ *en faveur de la présence d'une mutation du gène SDHA*

❖ Analyse ARN (RT-PCR SDHA)



→ *Présence d'un allèle muté avec anomalie d'épissage : « saut de l'exon 7 »*

Cas n° 1

Syndrome de Carney-Stratakis avec VSI *SDHA* constitutionnel



Mise en évidence d'une **Perte d'hétérozygotie** dans tissus tumoraux avec **IHC SDHA** négative



Analyses complémentaires permettant la **classification** d'un variant



Dépistage pré-symptomatique proposé aux apparentés

Cas n° 2

- ❖ Homme 54 ans : PHEO bilatéral sécrétant de la noradrénaline
- ❖ Histoire familiale : cousine germaine opérée d'un PHEO gauche en 2000. PHEO droit en 2015.

- ❖ NGS ADN constitutionnel : **2 variations de signification inconnue**
 - Variation hétérozygote gène *MAX* c.296-14T>A
 - Variation hétérozygote gène *TMEM127* c.31G>T, p.Gly11Cys

Tissu tumoral

- ❖ NGS ADN tumoral
 - *présence de la variation MAX* avec fréquence allélique 74% > LOH
 - *présence de la variation TMEM127* avec fréquence allélique 57%
- ❖ IHC : Perte d'expression de la protéine MAX

Cas n° 2

- ❖ Recherche ciblée des 2 variations chez la cousine
 - Présence variation hétérozygote gène *MAX* c.296-14T>A
 - Absence variation hétérozygote gène *TMEM127* c.31G>T

CONCLUSION

- ❖ Variation du gène *MAX* :
 - ❖ Responsable de la pathologie dans cette famille
 - ❖ Dépistage familial pré-symptomatique possible
- ❖ Variation du gène *TMEM127* :
 - ❖ Variation de signification inconnue
 - ❖ Dépistage familial pré-symptomatique non pertinent

Cas n° 3

- ❖ Femme 43 ans : PGL carotidien non sécrétant
- ❖ Pas d'antécédents familiaux

- ❖ NGS ADN constitutionnel : **variation de signification inconnue**
→ **Variation hétérozygote synonyme gène *SDHB* p.Tyr61Tyr**

- ❖ Pas de modification de la séquence protéique
- ❖ Database gnomAD : 13/277 106
- ❖ Prédiction *in silico* : pas en faveur d'un impact sur l'épissage

Demande de tissu tumoral

Cas n° 3

Tissu tumoral : IHC

- ❖ Perte d'expression de la protéine SDHB > en faveur pathogénicité

Tissu tumoral : NGS somatique

- *Présence de la variation SDHB p.Tyr61Tyr avec fréquence allélique 55% > Absence de LOH*
- *Présence d'une variation SDHD p.Val153Hisfs*36*

CONCLUSION

- ❖ Variation du gène *SDHD* :
 - ❖ Responsable de la pathologie chez cette patiente
 - ❖ Variation pathogène somatique : Dépistage familial pré-symptomatique non indiqué
- ❖ Variation du gène *SDHB* :
 - ❖ Variation probablement non pathogène
 - ❖ Dépistage familial pré-symptomatique non pertinent

Conclusion

- Classification d'une variation
 - enjeu majeur pour le suivi du patient et le dépistage de ses apparentés
 - Travail long, pas de valorisation
- Dans le cadre du PFMG
 - Nombre de variations de signification inconnue ?
 - Recours aux experts +++
 - Problème des variations sur des gènes non connus pour être impliqués dans la pathologie
 - Outils fonctionnels disponibles ?