

## RECHERCHE



L. Michel-Calemard

## → NOUVELLES APPROCHES de diagnostic moléculaire

DANS LA POLYKYSTOSE HEPATORENALE AUTOSOMIQUE RECESSIVE (PKR) BASÉES SUR LA TECHNOLOGIE NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS) PAR DR LAURENCE MICHEL-CALEMARD  
*Rapport d'étape pour AIRG-France*

La polykystose hépatorénale autosomique récessive (PKR) est une maladie héréditaire rénale et hépatique causée par des mutations du gène *PKHD1*. Sur le plan phénotypique on distingue deux formes : la forme sévère, souvent diagnostiquée chez le fœtus par la présence de gros reins à l'échographie, responsable de décès en période périnatale et la forme modérée dont l'âge de diagnostic varie de la période anténatale jusqu'à l'âge adulte. Les formes modérées avec souvent une atteinte hépatique prédominante (fibrose hépatique congénitale) semblent beaucoup plus fréquentes qu'on ne le pensait. Elles sont maintenant mieux diagnostiquées grâce à l'étude génétique.

La protéine anormale fibrocystine/polyductine est localisée au niveau du cil primitif des cellules notamment rénales et hépatiques. Elle agit en synergie avec d'autres protéines ciliaires codées par des gènes responsables de différentes maladies rénales kystiques. On parle donc de plus en plus souvent de ciliopathies. Des mutations dans d'autres gènes de ciliopathies peuvent donner des symptômes qui ressemblent à ceux de la PKR. On parle de diagnostic différentiel. De plus, certaines mutations dans d'autres gènes, si elles sont associées à des mutations de *PKHD1*, vont parfois moduler le phénotype des patients. On va alors parler de digénisme.

Du fait de la grande taille du gène *PKHD1* (67 exons - les exons sont les parties d'un gène qui codent pour la protéine) et du grand nombre de mutations différentes, le diagnostic moléculaire de la PKR est fastidieux. Actuellement ce diagnostic fait appel à des techniques classiques de biologie moléculaire et notre laboratoire propose, depuis la découverte du gène *PKHD1* en 2002, une recherche de mutation par séquençage Sanger des 67 exons du gène. Avec le séquençage Sanger, chaque exon est étudié de façon indépendante, ce qui signifie que pour un seul patient, on va devoir faire au moins 67 analyses différentes.

Notre équipe, adossée au Centre de Référence Maladies Rénales Rares Néphrogones, a réuni, depuis plus de 12 ans, une importante cohorte de patients - 285 familles- avec un diagnostic phénotypique de PKR. Pour un grand nombre d'entre elles, le diagnostic génotypique a pu être complètement (61 % avec 2 mutations) ou partiellement (5 % avec 1 mutation) résolu.

Ceci nous a permis de proposer une prise en charge des grossesses suivantes, avec la réalisation d'un diagnostic prénatal. Pour les autres familles (34 %), aucune mutation n'a pu être mise en évidence avec les techniques traditionnelles. Nous effectuons également l'exploration d'un autre gène (*HNF1B-TCF2*) dont les mutations peuvent être responsables de maladies kystiques des reins et qui est un des diagnostics différentiels de la PKR en période prénatale.





Ceci nous a permis d'apporter un diagnostic étiologique dans 10 familles qui nous avaient été initialement adressées pour PKR.

La technologie de séquençage haut-débit ou Next-Generation Sequencing (NGS) constitue une révolution technique pour l'exploration moléculaire des maladies génétiques. Elle permet d'explorer en une seule fois la totalité d'un gène, un groupe de plusieurs gènes ciblés (panel de gènes), voire, dans certaines applications, un exome ou un génome entier.

Les Hospices Civils de Lyon s'étant récemment dotés d'une plate-forme de NGS, nous avons sollicité le financement de l'AIRG de 15 000 euros par an sur 3 ans afin de choisir, évaluer et à terme transférer en routine le diagnostic de la PKR par NGS.

Le financement nous a permis d'avancer dans notre projet. Nous avons décidé de tester plusieurs approches et de ne pas nous limiter à l'étude du gène *PKHD1* mais d'utiliser la puissance de l'outil NGS pour analyser un panel de gènes responsables de maladies kystiques rénales, notamment certains gènes de ciliopathies et le gène *HNF1B*.

Nous avons pu acheter des réactifs pour tester un premier panel de 23 gènes incluant *PKHD1*. Avec ce premier panel nous avons pu analyser 71 patients, dont 64 avaient déjà eu une étude de *PKHD1* et/ou *HNF1B* avec les techniques classiques.

Les résultats nous ont montré que toutes les mutations qui avaient été mises en évidence en séquençage Sanger ont été retrouvées en NGS. Chez les patients ayant une seule mutation de *PKHD1* ou aucune mutation, nous n'avons pas découvert de

mutation additionnelle dans ce gène. La stratégie NGS ne nous a donc pas permis, pour l'instant, de trouver plus de mutation que le séquençage Sanger mais elle permet en revanche une analyse plus rapide, en un seul tube. Nous avons également testé 8 nouveaux patients en NGS en première intention pour voir si la technique était transférable en diagnostic. Chez 3 patients, nous avons identifié deux mutations de *PKHD1*, chez 2 autres des mutations dans d'autres gènes de ciliopathies et chez les 3 autres patients nous n'avons pas mis en évidence de mutation.

Ces résultats intermédiaires sont très encourageants puisqu'ils montrent que le transfert du diagnostic moléculaire de la PKR en NGS est tout à fait réalisable. Par ailleurs, la rapidité d'obtention des résultats va nous permettre de faire face à la demande croissante de diagnostics pendant la grossesse, après la découverte de gros reins chez des fœtus.

#### Les futurs essais font se focaliser sur deux points :

- 1 → L'achat de nouveaux réactifs pour tester un nouveau panel de gènes et une stratégie « exome » qui permet une analyse de tous les exons du génome.
- 2 → L'analyse bio-informatique des données obtenues en NGS, ce qui représente un travail délicat. Le financement obtenu va nous permettre de choisir la technologie la plus efficace et de mettre au point une analyse robuste des données.

Le but de ces essais est de choisir la technologie la mieux adaptée au diagnostic de la PKR mais également à l'exploration, si cela est possible, d'autres gènes responsables de maladies kystiques rénales notamment certains gènes de ciliopathies et le gène *HNF1B*.

Nous remercions vivement l'AIRG-France pour ce financement sans lequel cette étude n'aurait pas été réalisable. ■

#### DR LAURENCE MICHEL-CALEMARD

→ Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares, Centre de Biologie et Pathologie Est Centre de Référence Maladies Rénales Rares Néphrogones, Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Femme Mère Enfant Hospices Civils de LYON