

INTRODUCTION

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive causée par des mutations du gène CFTR. Ces mutations affectent les poumons, le tractus digestif, les glandes sudoripares, le pancréas et l'appareil reproducteur (chez les hommes). Plus de 1800 mutations ont été répertoriées. Les trousse de diagnostic commercialisées permettent la détection des mutations les plus fréquentes (entre 20 à 36 mutations selon la trousse utilisée) et couvrent environ 80 % des mutations responsables de mucoviscidose classique. Le

séquençage de Sanger permet le criblage de la totalité de la séquence codante du gène et offre une meilleure détection de l'ensemble des mutations du gène CFTR. Cependant, la technologie demeure lourde et onéreuse. Nous décrivons une nouvelle stratégie de diagnostic basée sur la technique de séquençage nouvelle génération permettant la détection de l'ensemble des mutations du gène CFTR, y compris les grands réarrangements.

MATERIEL ET METHODE

Une étude pilote comprenant 70 patients testés en aveugle et 7 échantillons ADN de contrôles externes de qualité européen a été réalisée pour la recherche des mutations du CFTR. Après extraction des ADN, une PCR multiplex générant 32 amplicons de 300 paires de bases minimum, permet l'analyse simultanée des 27 exons du gène CFTR, des mutations de l'intron 11 (c.1811+1.6kbA>G), de l'intron 19

(c.3849+10kbC>T) et des régions 5' et 3'UTRs. Une réaction de Tagmentation utilisant le Kit Nextera permet de rajouter les Index 17 et 15 et générer les Clusters selon les recommandations du fabricant (Illumina) [Figure 1]. Les ADN des différents échantillons sont regroupés dans un seul tube et séquencés sur la plateforme de séquençage MiSeq (Illumina).

PROCESSUS ANALYTIQUE

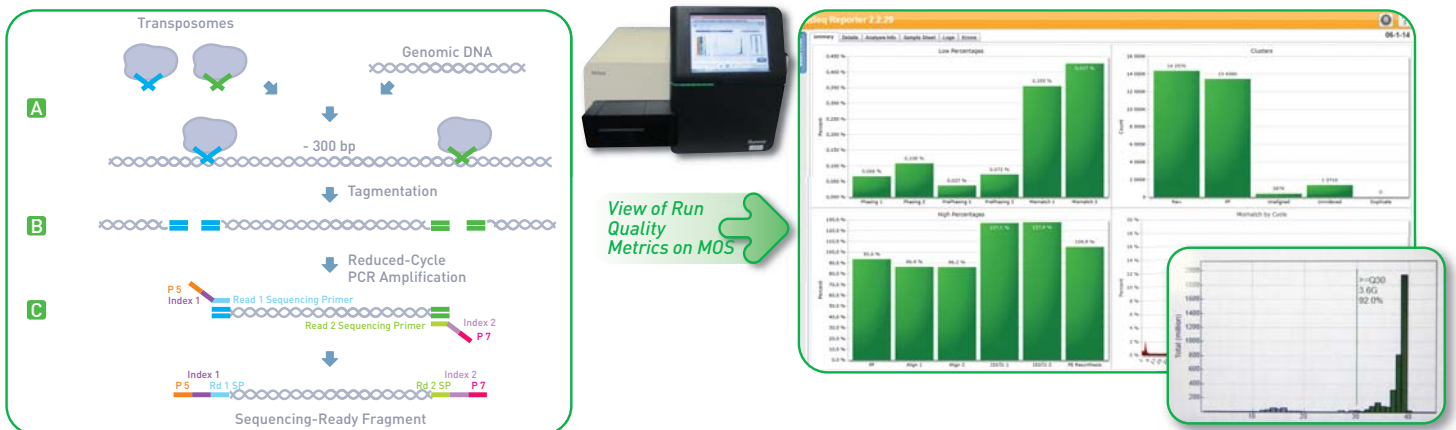


Figure 1 : Principe technique Nextera résumant le processus de génération des banques « Clusters ». A : Transposomes Nextera XT avec les adaptateurs sont combinés avec l'ADN cible. B : Tagmentation pour fragmenter et introduire les adaptateurs dans l'ADN cible. C : PCR permettant l'ajout des séquences de séquençage et des indices.



Figure 2 : Résultats NGS montrant la présence de la mutation F508Del à l'état hétérozygote et d'un variant polymorphe (A). Détection d'un grand réarrangement de 40 Kb par NGS correspondant à une délétion à l'état homozygote des exons 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 du gène CFTR (B). Profil normal ne présentant aucun réarrangement du gène CFTR (C).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des critères de qualité [reproductibilité, répétabilité, robustesse et de sensibilité] ont montré la conformité de la technologie NGS pour le séquençage du gène CFTR. Tous les résultats ont été comparés et ré-analysés par séquençage de Sanger.

Aucune discordance n'a été observée. L'approche NGS est en mesure d'identifier tous les types de mutations, y compris les grands réarrangements, les variants polymorphes Polythymidine (T)_n et (TG)_n avec un taux de couverture de plus de 98 % des mutations du gène CFTR.

CONCLUSION

Cette approche sensible, spécifique et moins couteuse est mieux adaptée au diagnostic de la mucoviscidose. Cette technologie devrait être facilement adoptée par les laboratoires de diagnostic moléculaire de routine.