

INTRODUCTION

Les traitements par antivitamine-K (AVK) et thiéno-pyridines (clopidogrel) utilisés en hémostase présentent une variabilité de sensibilité intra- et interindividuelle importante. Cette variabilité résulte de la combinaison de facteurs physiopathologiques, environnementaux et génétiques. Parmi de nombreux polymorphismes décrits dans la littérature, plusieurs sont clairement identifiés comme étant associés à une hypersensibilité ou une

résistance partielle ou complète à ces molécules. Il s'agit pour les AVK de mutations des gènes VKORC1 et CYP2C9 et pour le clopidogrel des gènes CYP2C19 et P2Y12 (cette dernière étant cependant plus controversée selon les publications). Nous montrons ici les résultats de premiers essais réalisés pour la mise en place de la recherche de ces polymorphismes par séquençage en NGS (séquençage nouvelle génération).

MATERIEL ET METHODE

- **Prélèvement** : sang total EDTA
- **Extraction manuelle** : trousse QIAGEN blood mini Kit (volume d'éluion : 200µL)
- **Amorces** : design «maison»
- **Techniques de séquençage direct** : séquençage nouvelle génération sur MiSeq (Illumina) avec utilisation du kit Nextera XT (Illumina) versus méthode de Sanger sur 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).
- **Mutations recherchées relatives à une hypersensibilité aux AVK** : 9 échantillons d'ADN de résultats connus sauvages et mutés
 - **VKORC1** : -1639 G>A (rs 9923231) et 1173C>T (rs 9934438) en déséquilibre de liaison
- **CYP2C9** : allèle *2 p.Arg 144 Cys (c.430 C>T) (rs1799853) et allèle *3 p.Ile 359 Leu (c.1075 A>C) (rs1057910)
- **Mutations recherchées relatives à une résistance aux thiéno-pyridines (clopidogrel)** : 5 échantillons d'ADN de résultats connus sauvages et mutés
 - **CYP2C19** : allèle *2 g.24154G>A (c.681G>A) (rs4244285) et allèle *3 g.22948 G>A (c.636G>A) (rs4986893)
 - **P2Y12** : g.49903C>T (i-T744C) (rs2046934)
- **Mutations recherchées relatives à une hypersensibilité aux thiéno-pyridines (clopidogrel)** : 3 échantillons d'ADN de résultats connus sauvages et mutés
 - **CYP2C19** : allèle *17 g.4195C>T (c.-806C>T) (rs 12248560)

RÉSULTATS

Les résultats sont comparés entre 2 techniques de séquençages sur site (Sanger et NGS).

Les résultats des différentes mutations recherchées (VKORC1 1639 G/A ; CYP2C9 430 C/T et 1075 A/C ; CYP2C19 681 G/A, 636 G/A et 806 C/T ; P2Y12 744 C/T) sont concordants pour les échantillons testés entre la technique Sanger et la technique NGS (exemple d'un patient en Sanger et NGS en figures 1 et 2).

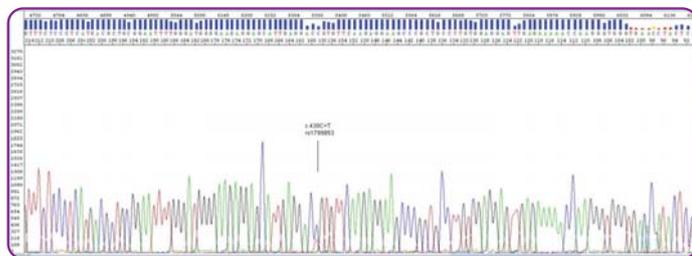


Figure 1 : exemple de résultat d'un patient hétérozygote CYP2C9 *1*2 430C/T en technique Sanger

Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency	Depth	Filter	rsSNP	RefGene	Result
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96701953	19818	SNP	T>T/C	0.41	4994	PASS		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96701973	49073	SNP	A>A/G	0.41	4993	PASS		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96702067	17620	SNP	C>C/T	0.18	4996	LowVariantFreq	rs1799853	CYP2C9 *2	c.430C>T
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96702115	4810	SNP	C>C/T	0.12	5000	LowVariantFreq		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96702116	2362	SNP	A>A/C	0.1	4991	LowVariantFreq		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96702138	29282	SNP	A>A/G	0.26	4999	PASS		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96702141	25742	SNP	A>A/C	0.25	4993	PASS		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96702144	13144	SNP	T>T/C	0.17	4998	LowVariantFreq		CYP2C9 *2	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96740998	13969	SNP	A>A/G	0.19	4995	LowVariantFreq		CYP2C9 *3	
dortmund1-2013-c2r9	chr10	96741005	33335	SNP	A>A/G	0.36	4994	PASS		CYP2C9 *3	

Figure 2 : exemple de résultat du même patient hétérozygote CYP2C9 *1*2 430C/T en technique NGS

REMARQUES :

Pour un échantillon homozygote CYP2C9 sauvage *1*1, la présence du polymorphisme SNP c.429C>T, décrit comme possible interfèrent sur la position 430 (fausse positivité *2) a été identifiée lors du séquençage.

Lors du séquençage P2Y12, nous avons également trouvé 2 mutations g.50947TG et g.50947GG et 1387 C>T pour 2 échantillons, mutations également décrites dans certains cas de résistance au clopidogrel.

CONCLUSION

Les premiers essais réalisés de séquençage en NGS pour les mutations VKORC1, CYP2C9, CYP2C19 et P2Y12 impliquées dans la variabilité de réponse aux AVK ou clopidogrel sont satisfaisants et corrélés à notre technique classique Sanger. Il convient cependant de compléter ces essais à plus grande échelle et de les étendre à d'autres polymorphismes adaptés à l'origine géographique des patients (notamment afroantillais).