Séquençage Haut Débit (NGS):

----------------------------------------

Préparation des librairies et enrichissement avec des sondes de capture ciblées sur les gènes d’intérêt via la technologie Twist (Twist custom panel ref TE-99058871). Séquençage sur Miseq Illumina. Ce test permet de rechercher les mutations ponctuelles dans les 44 gènes du panel.

Seuls les variants pathogènes (classe 5) et les variants probablement pathogènes (classe 4) sont rapportés. Concernant les variants inconnus ou incertains (classe 3), pour les pathologies récessives, ils ne seront rapportés que s’ils sont retrouvés à l’état hétérozygote composite avec un variant de classe 4 ou 5 ou si la corrélation avec le phénotype du patient est interpellante. Les variants de classe 3 non rapportés pourront être communiqués sur demande lors d’un conseil génétique (à l’exception des variants à tendance bénigne : variants synonymes, introniques non conservés et sans effet sur le splicing ou à une fréquence trop élevée).

La numérotation des nucléotides suit la nomenclature HGVS : le A du codon d’initiation ATG est noté + 1 (http://www.hgvs.org).

La profondeur de couverture minimale acceptée au niveau des exons codants et bordures introniques (+/- 14 nucléotides) est de 30X sur les autosomes ainsi que sur les chromosomes X chez les individus féminins et à plus de 15X sur les chromosomes X/Y chez les individus masculins. La validation de cette technologie a été réalisée dans les limites des régions capturées et incluses dans les régions de haute confiance (définies par le consortium GA4GH). Le pourcentage moyen de couverture 30x est de 99.86% sur l’ensemble du panel. Un descriptif général du panel (liste des gènes et leur transcrit ciblé, détail des pathologies, pourcentage de couverture 30x,..) est disponible sur notre site internet (https://www.chuliege.be/jcms/c2\_17345742/fr/genetique/biologie-moleculaire-constitutionnelle).

La sensibilité et la précision de cette technologie ont toutes deux été estimées à 100% pour les mutations ponctuelles.

Recherche de réarrangements de grande taille:

---------------------------------------------------------------

Les réarrangements de grande taille sont recherchés dans les 8 gènes couverts par le kit MLPA SALSA P220-Obesty probemix (MRC Holland)) avec les limites techniques suivantes :

- la détection de réarrangements est uniquement possible dans les régions ciblées par les sondes présentes dans le kit

- les inversions neutres, les translocations et les mosaïques ne peuvent pas être détectées

- les bordures exactes des réarrangements de grandes tailles ne peuvent être localisées précisément au moyen de cette technique.

Séquençage Sanger:

---------------------------

Une confirmation par Sanger est réalisée uniquement pour les variants pathogènes (classe 5) ou probablement pathogènes (classe 4) et de signification inconnue (classe 3) lorsqu’ils sont rapportés et qu’ils sortent du cadre du dossier de validation (couverture >15x, zones hors HCR, …). Les indels seront également automatiquement confirmées par Sanger.

Analyse des données:

-----------------------------

L’analyse bioinformatique est réalisée par le pipeline Humanomics version v\_3.5. L’interprétation des variants est réalisée à partir de la plateforme Alissa Interpret (Agilent Technologies) version 5.3.

Limites techniques :

--------------------------

Les variants introniques (>14bp de l’exon codant), les variants des régions promotrices et UTR, les variants situés dans des régions homopolymériques, les grandes délétions ou duplications (excepté dans les8 gènes couverts par la MLPA) ou autres anomalies structurelles ne sont pas mises en évidence par notre test. Ce test n’est pas validé pour la détection de mutations mosaïques ni de mutations somatiques et ne convient pas pour la détection d’expansions de répétitions nucléotidiques (ex : pathologies à triplets,...).

Découvertes secondaires:

----------------------------------

Cette analyse étant réalisée dans le cadre clinique de l’obésité sévère précoce, si un variant prédisposant à une autre pathologie est identifié et ne peut mener à aucune action thérapeutique, il ne sera pas rapporté.