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-96692597). Séquençage sur Miseq Illumina. Ce test permet de rechercher les mutations ponctuelles, délétions et insertions de petite taille (indels <15bp).

Seuls les variants pathogènes (classe 5) et les variants probablement pathogènes (classe 4) sont rapportés. Concernant les variants inconnus ou incertains (classe 3), seuls ceux présents dans les gènes LDLR, PCSK9\*, APOE\* et APOB exons 26 et 29\* sont rapportés (\*exceptés les variants synonymes sans effet sur le splicing, les variants dans les zones UTR 5’/3’ et les variants introniques au-delà de +/-14pb). Dans les autres gènes, ils ne seront rapportés qu’en présence d’un autre variant de classes 4 ou 5 dans le même gène. Ces variants non rapportés pourront être communiqués sur demande lors d’un conseil génétique.

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

Le pourcentage moyen de couverture 30x est de 99.91% sur l’ensemble du panel et de 100% sur exons codants et bordures introniques (+/- 14 nucléotides) des gènes LDLR (région 5’ UTR à partir de la position c.-280 couverte également) , PCSK9, APOE et APOB (exons 26 et 29). 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 uniquement pour le gène LDLR (MLPA SALSA P062-LDLR 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:

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

Les zones dont la profondeur de couverture minimale n'est pas atteinte dans les gènes LDLR, PCSK9, APOE et APOB (exons 26 et 29) sont séquencées par Sanger. Une confirmation par Sanger est également réalisée 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 (excepté la zone couverte dans le gène LDLR), les variants situés dans des régions homopolymériques, les grandes délétions ou duplications (excepté dans le gène LDLR) 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 d’Hypercholestérolémie Familiale, si un variant prédisposant à une autre pathologie est identifié et ne peut mener à aucune action thérapeutique, il ne sera pas rapporté (ex : certains variants dans le gène APOE pour la maladie d’Alzheimer).