



Hôpital du Valais
Spital Wallis



Institut Central des Hôpitaux
Zentralinstitut der Spitäler

L'analyse génétique de l'hypercholestérolémie familiale

Dr Thomas von Känel, Chef du Service de Génétique médicale
072 603 48 50 / thomas.vonkaenel@hopitalvs.ch

Journée scientifique d'automne de l'ARL
10 septembre 2019



- La diversité génétique
- L'hypercholestérolémie familiale (FH)
- Le test génétique : remboursement, technique
- Interprétation des variants
- L'hypercholestérolémie polygénique



Nous sommes tous les mêmes



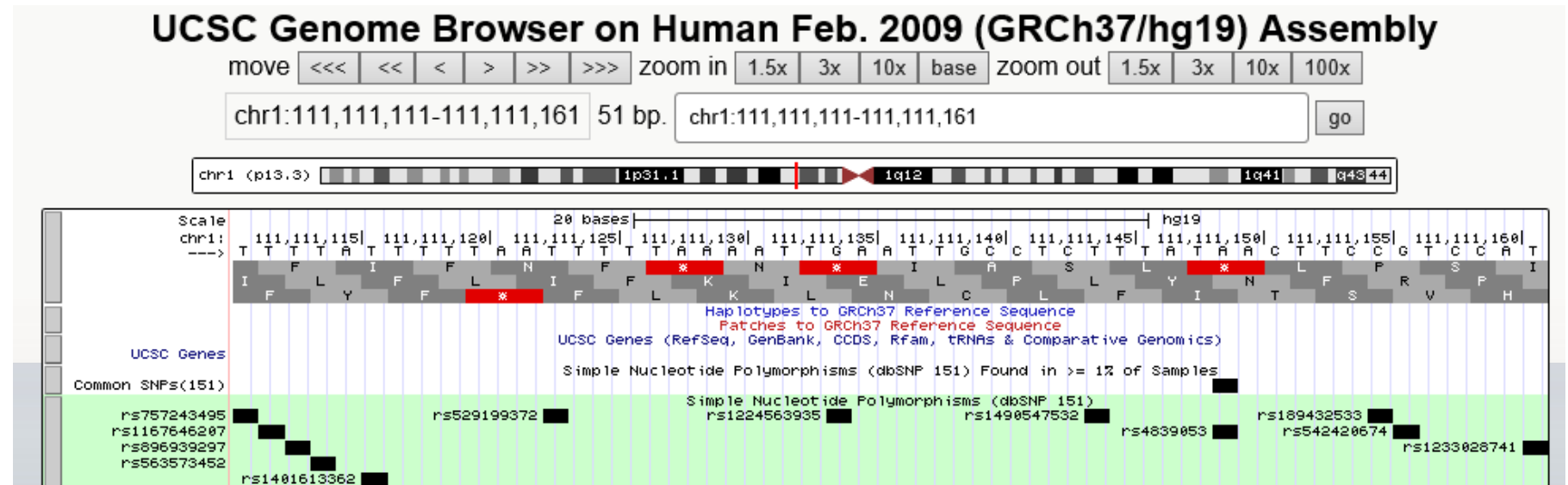
Nous sommes tous les mêmes – et tous différents



Nous sommes tous les mêmes – et tous différents



- 50 pb choisi à l'hasard : 13 *single nucleotide variants* (SNV) :



- La diversité dans les bases de données :
 - ClinVar : 503'065 variants uniques
 - gnomAD : 229 mio SNVs et 33 mio indels

La diversité dans la maladie et la mort

Maladies et problèmes de santé

Les 12 derniers mois, en % (2017)	Hommes	Femmes
Arthrose rhumatismale	10,2	18,6
Rhume des foins ou autres allergies	22,2	25,7
Dépression nerveuse	5,3	7,9
Asthme	4,6	5,6
Ostéoporose	0,8	5,4
Cancer, tumeur	1,8	1,5
Bronchite chronique, emphysème	2,1	2,6
Infarctus du myocarde	0,7	0,3
Attaque	0,4	0,4

Principales causes de décès

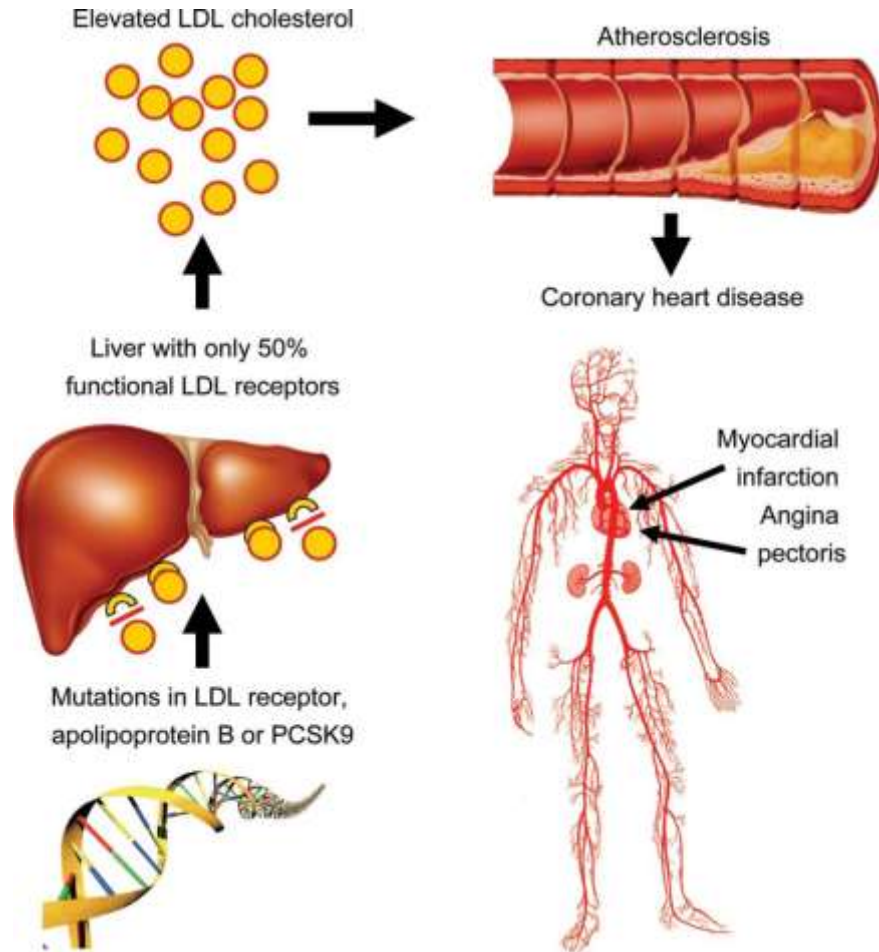
2016	Nombre de décès	
	Hommes	Femmes
Toutes les causes de décès	31 283	33 681
Maladies infectieuses	359	393
> Tumeurs malignes	9 371	7 830
Diabète sucré	573	701
Démence	1 789	3 975
> Maladies cardiovasculaires	9 357	11 355
Maladies de l'appareil respiratoire	2 183	1 925
Cirrhose du foie alcoolique	312	129
> Accidents et morts violentes	2 173	1 542

Hypercholestérolémie familiale (FH)

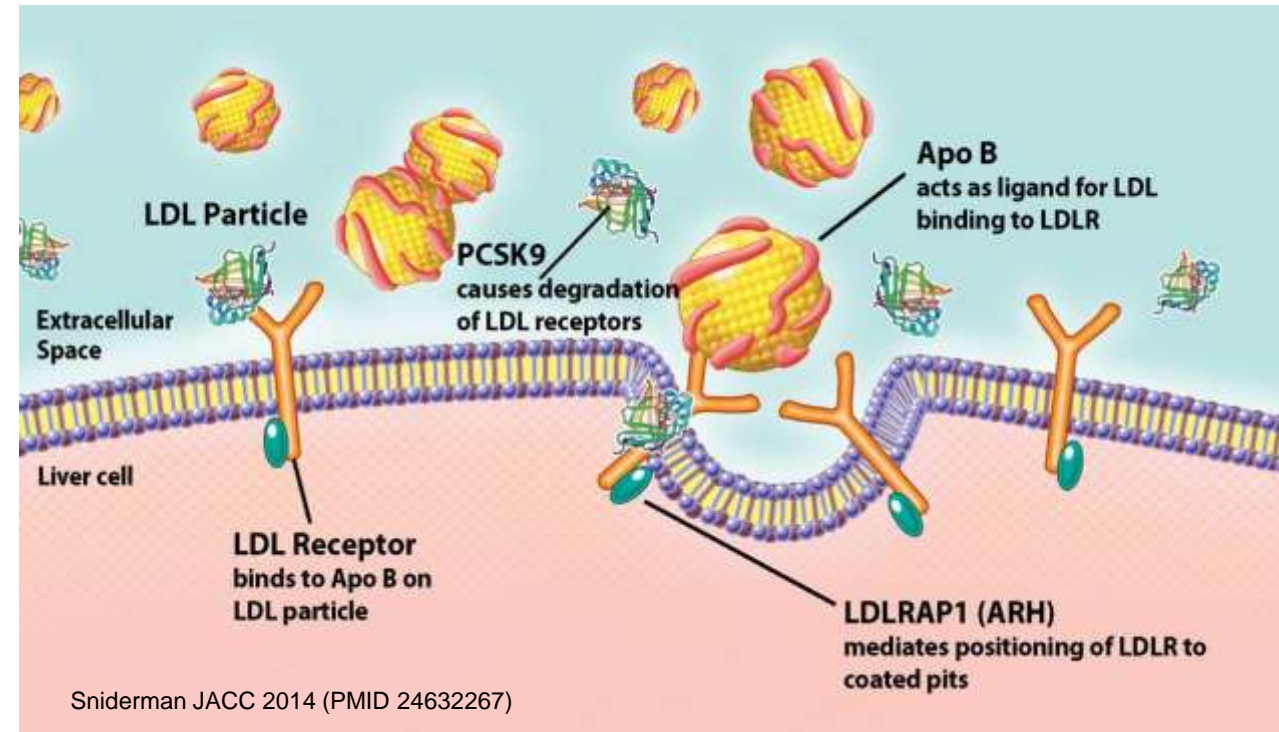
- Phénotype :
 - Cholestérol LDL fortement augmenté
 - Xanthomes tendineux / cutanés ; arc cornéen précoce (< 45 ans)
 - Maladie cardiovasculaire précoce (hommes non-traités : 50 % de risque d'événement cardiovasculaire avant l'âge de 50 ans)
- Traitement :
 - Statines, inhibiteurs PCSK9
 - Hygiène de vie
- Héritéité : autosomique-dominant
- Fréquence : environ 1:250



Hypercholestérolémie familiale : pathophysiologie



Nordestgaard EHJ 2013 (PMID 23956253)



- Variants pathogènes dans *LDLR*, *APOB* et *PCSK9*

Hypercholestérolémie familiale : diagnostic

Table 1. Dutch Lipid Clinic Network criteria for the diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia (hFH).^{33,34}

Criteria		Score
Family history	First-degree adult relative with <ul style="list-style-type: none"> • Premature coronary and/or vascular disease (male < 55 years; female < 60 years) • LDL-C > 95th percentile for age and gender • Tendon xanthomata and/or arcus cornealis 	1 1 2
	First-degree relative < 18 years with LDL-C > 95th percentile for age and gender	2
Clinical history	Patient with premature IHD (ages as above)	2
	Patient with other premature vascular and/or cerebrovascular disease (ages as above)	1
Physical examination	Tendon xanthomata	6
	Arcus cornealis prior to age 45	4
Laboratory analysis	LDL-C (mmol/L) <ul style="list-style-type: none"> • ≥8.5 • 6.5–8.4 • 5.0–6.4 • 4.0–4.9 	8 5 3 1
DNA analysis	Genetic test results confirming functional mutation in <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , or <i>PCSK9</i> gene	8

Critères du Dutch Lipid Clinic Network (DLCN)

Interprétation :

> 8 points : HF vraisemblable

6-8 points : HF probable

3-5 points : HF possible

< 3 points : pas de HF

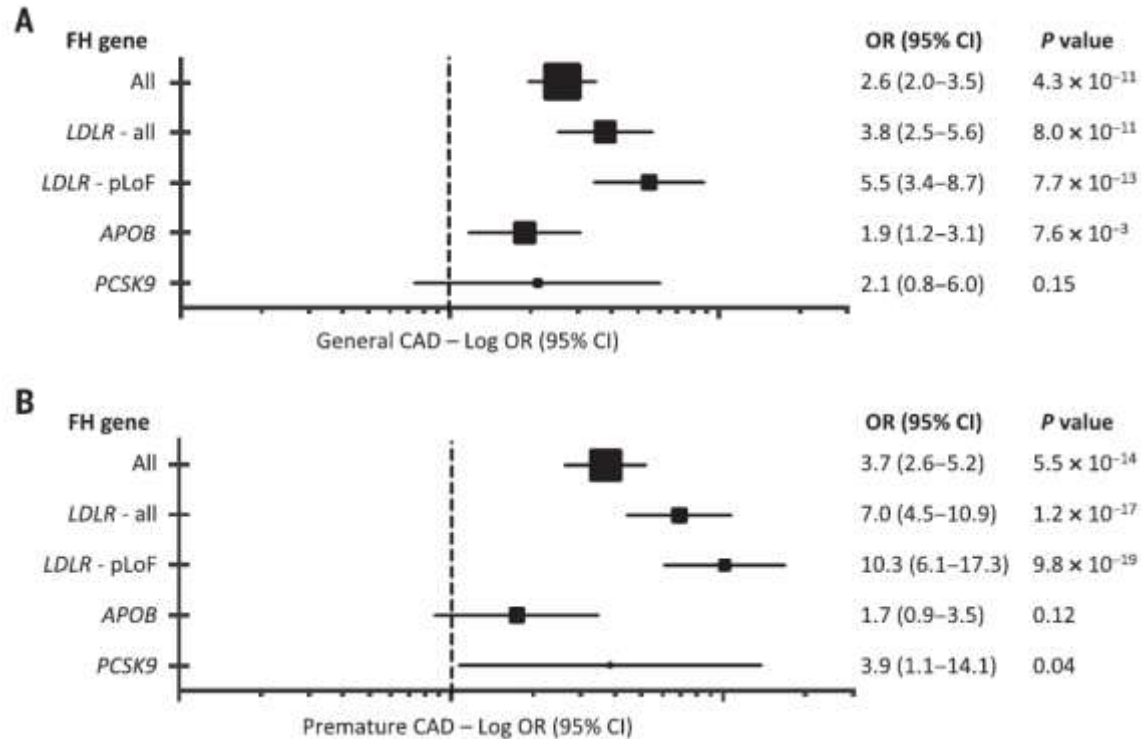
Calculateur sur :

www.gsla.ch

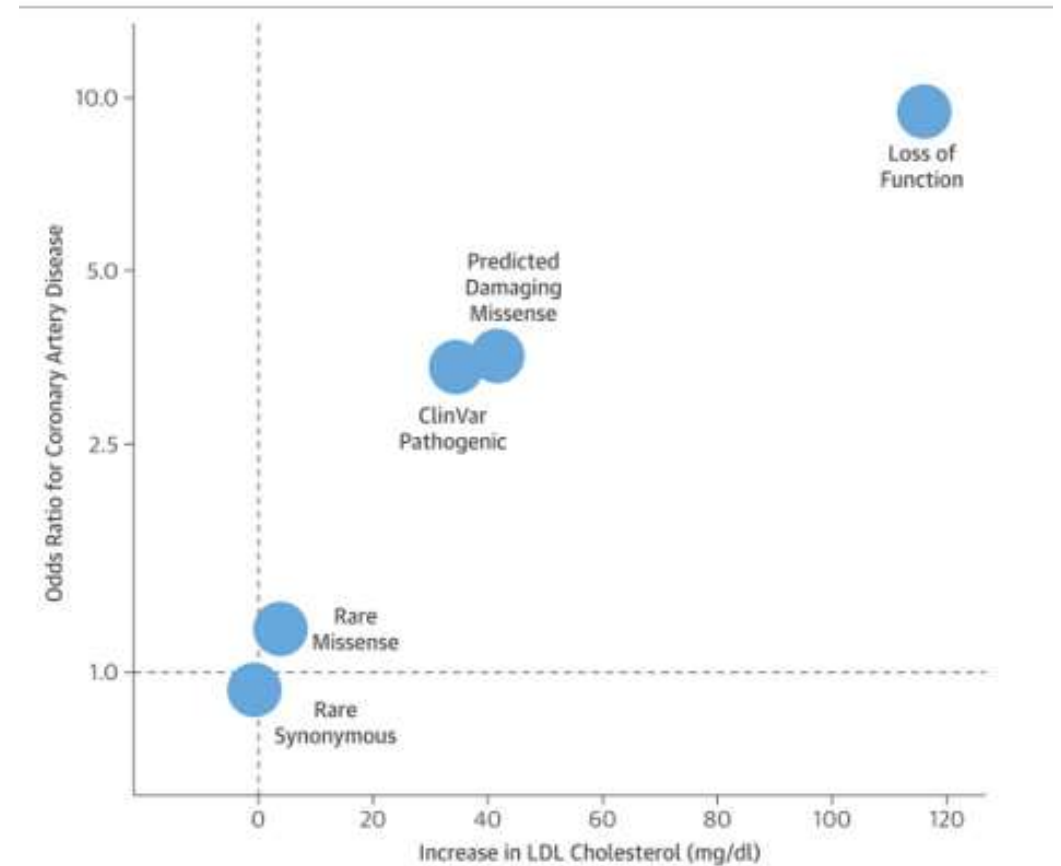
Diagnostic : test génétique

Gène	Type de variants pathogènes	Fréquence dans HF avérée	Phénotypes alléliques	Nombre de variants rapportés dans LOVD
<i>LDLR</i>	Variants pathogènes type « perte de fonction », donc aussi grandes délétions	60-80%	n.a.	1957
<i>APOB</i>	Variants pathogènes type faux-sens qui causent une protéine avec un ligand apoB dysfonctionnel	1-5%	Variants tronquants : hypobetalipoprotéinémie	718
<i>PCSK9</i>	Variants pathogènes type « gain de fonction » qui augmentent la dégradation des récepteurs LDL	Jusqu'à 3%	Variants « perte de fonction » : hypobetalipoprotéinémie, hypocholestérolémie	208

Corrélations génotype-phénotype



Abul-Husn, Science 2016 (PMID 28008010)

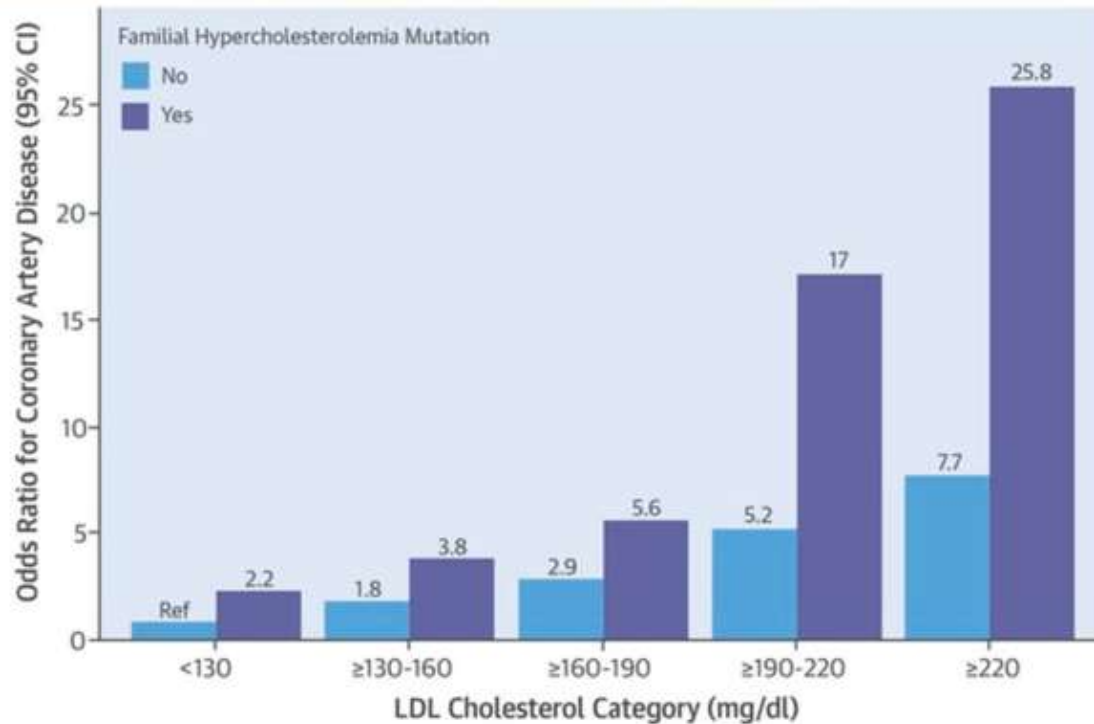


Khera, J Am Coll Cardiol. 2016 (PMID 27050191)

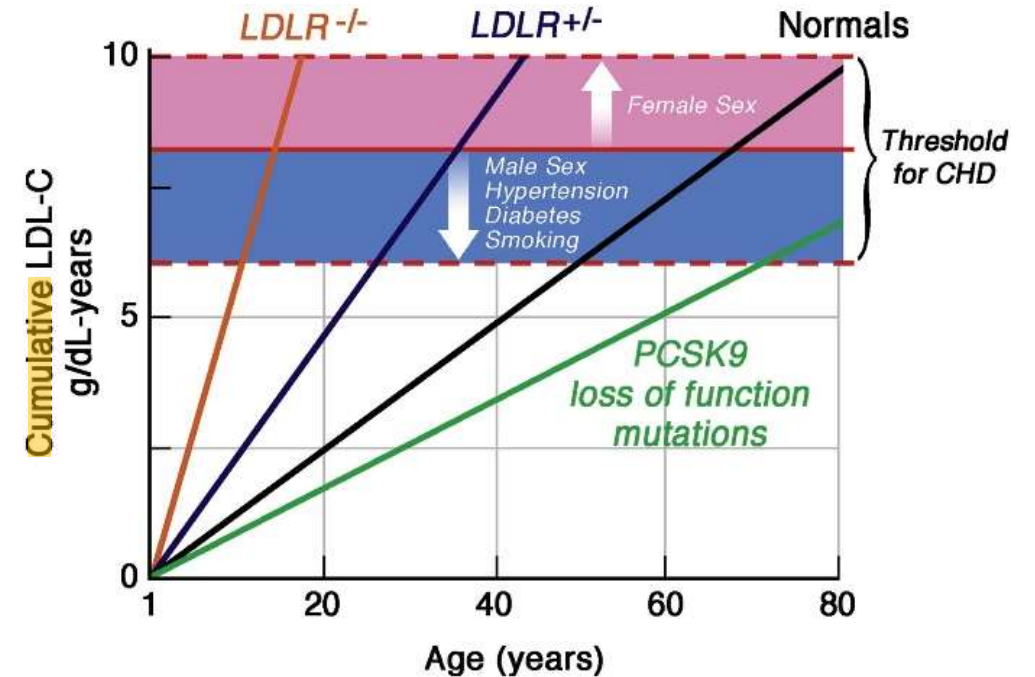
L'expression clinique est fortement associée au gène muté et au type de variant pathogène

Taux LDL identique ≠ risque identique

B. Impact of Familial Hypercholesterolemia Mutation Status on Coronary Artery Disease According to LDL Cholesterol Level



Khera, A.V. et al. J Am Coll Cardiol. 2016;67(22):2578-89.

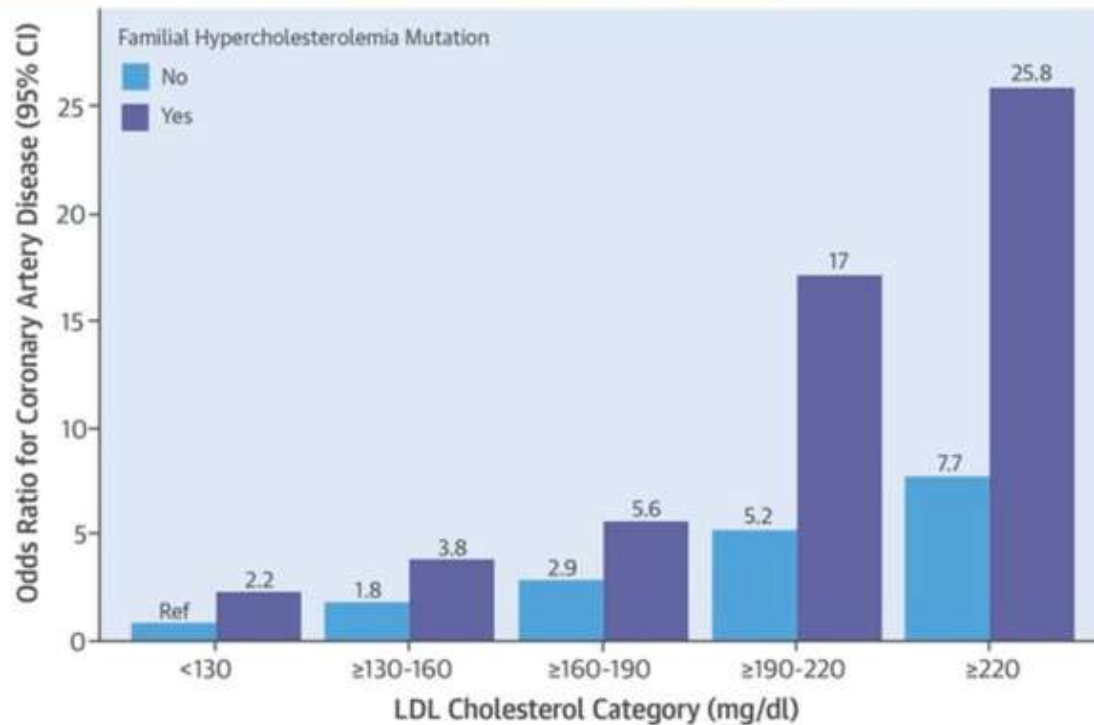


Sniderman JACC 2014 (PMID 24632267)

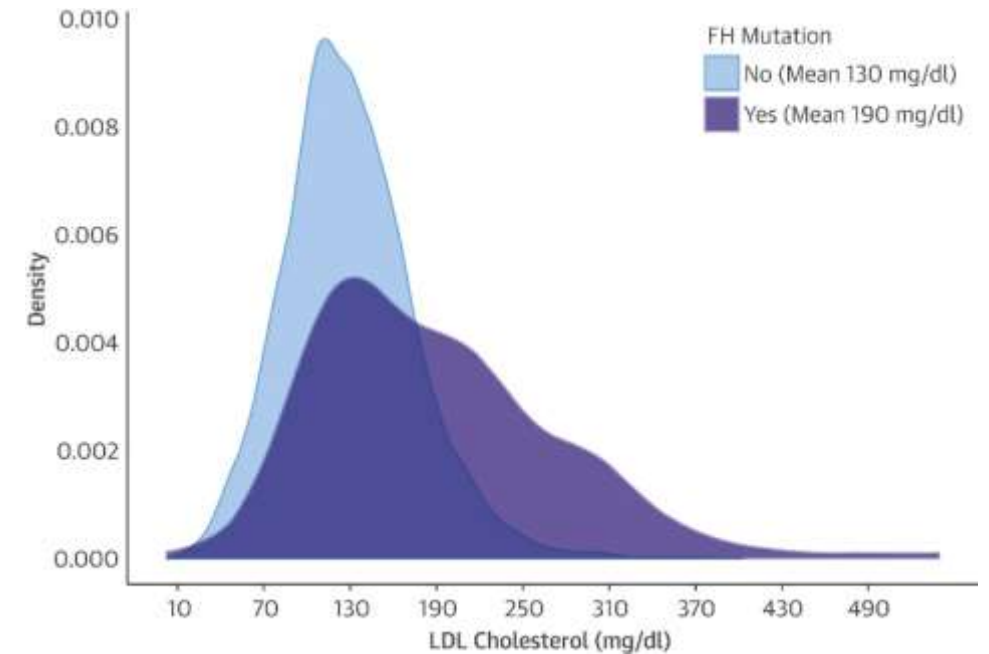
>>> Adapter la thérapie

Taux LDL identique ≠ risque identique

B. Impact of Familial Hypercholesterolemia Mutation Status on Coronary Artery Disease According to LDL Cholesterol Level



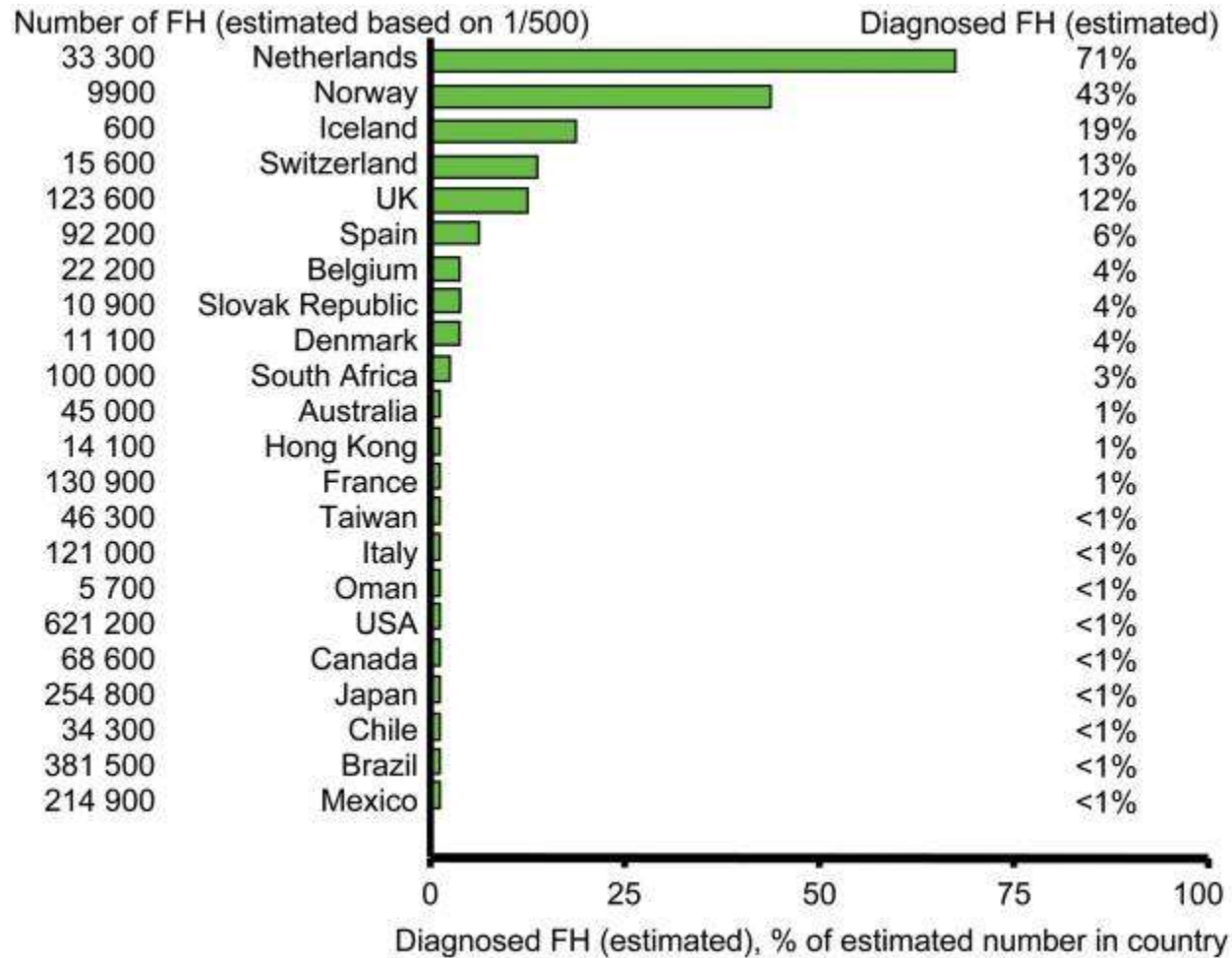
Khera, A.V. et al. J Am Coll Cardiol. 2016;67(22):2578-89.



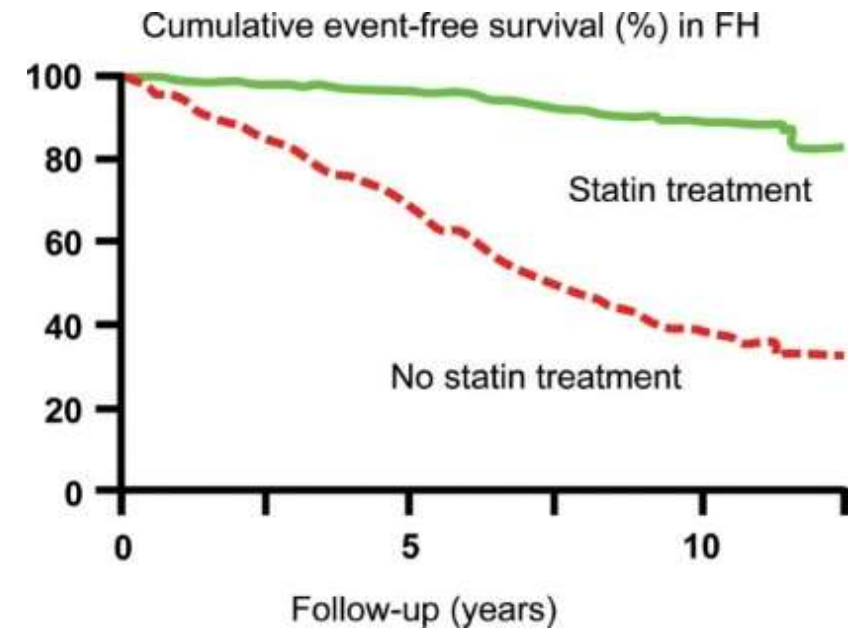
27% des individus avec un variant pathogène ont des taux de LDL-C <130 mg/dl >>> pénétrance incomplète pour le phénotype biochimique

>>> Adapter la thérapie

FH : sous-diagnostiquée et sous-traitée



- Copenhagen General Population Study : que 48% des personnes avec une FH recevaient des statines



Le test génétique : points à considérer

- Remboursement
- Technique
- Interprétation

Remboursement

- La FH ne figure pas sur la liste des analyses (LA)
- Pas grave : il y a les positions « maladies orphelines » !
- Mais : fréquence FH = 1:250...
- Demande pour ajouter la FH sur la LA
- Actuellement rabais à Sion (<1000.- au lieu de >3000.-)

No. pos.	NP	Dénomination (Analyses de génétique moléculaire)	Limitation	DL
2460.00	350	Maladie génétique rare (maladie orpheline) présentant les critères suivants: <ol style="list-style-type: none"> a. Prévalence génétique de la maladie égale ou inférieure à 1/2000 b. Maladie monogénique référencée dans le catalogue OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) 	1. Prescription des analyses seulement par des médecins titulaires du titre postgrade fédéral "génétique médicale" ou d'un titre postgrade fédéral le plus étroitement lié à la maladie faisant l'objet de l'examen selon la loi fédérale du 23 juin 2006 sur les professions médicales universitaires (loi sur les professions	G



Technique : quels gènes ?

of care for patients with definite or probable FH, as well as for their at-risk relatives. **Testing should include the genes encoding the low-density lipoprotein receptor (LDLR), apolipoprotein B (APOB), and proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9); other genes may also need to be considered for analysis based on patient phenotype.** JACC VOL. 72, NO. 6, 2018 AUGUST 7, 2018:662-80

JACC Scientific Expert Panel

Blueprint Genetics

Gene	Associated phenotypes
ABCA1	Tangier disease, ABCA1 deficiency, HDL deficiency, Familial hypoalphalipoproteinemia
ABCG5	Sitosterolemia
ABCG8	Sitosterolemia
<u>ALMS1</u> *	Alström syndrome
APOA1	Amyloidosis, systemic nonneuronopathic, Hypoalphalipoproteinemia
APOA5	Hyperchylomicronemia
APOB	Hypobetalipoproteinemia, Hypercholesterolemia
APOC2	Hyperlipoproteinemia, type Ib
APOC3	Apolipoprotein C-III deficiency
APOE	Sea-blue histiocyte disease, Dysbetalipoproteinemia, familial (Hyperlipoproteinemia), Lipoprotein glomerulopathy
CREB3L3	Hypertriglyceridaemia
GPIHBP1	Hyperlipoproteinemia, type ID
LDLR	Hypercholesterolemia
LDLRAP1	Hypercholesterolemia
LIPA	Wolman disease, Cholesterol ester storage disease
LMF1	Combined lipase deficiency
LPL	Lipoprotein lipase deficiency, Hyperlipoproteinemia, Combined hyperlipidemia, familial
PCSK9	Hypercholesterolemia

Hyperlipidemia Panel

APOB
APOE
CYP27A1
GHR
LDLR
LDLRAP1
LIPA
LPL
PCSK9

CENTIGENE
THE RARE DISEASE COMPANY

Panel Gene List: APOB, LDLR, LDLRAP1, PCSK9
Additional genes from our cardiology test menu may be added to this panel by selecting test code J556C.



Primary panel (4 genes)

APOB LDLR LDLRAP1 PCSK9

Panel details and technical assay limitations

Add-on for clinical overlapping conditions (2 genes)

ABCG5 ABCG8 > sitosterolemia

● ABCG5	1
● ABCG8	2
● APOB	4
● APOE	5
● CYP27A1	3
● LDLR	3
● LDLRAP1	3
● LIPA	2
● PCSK9	4

Genomics England PanelApp

Quelle technique ?

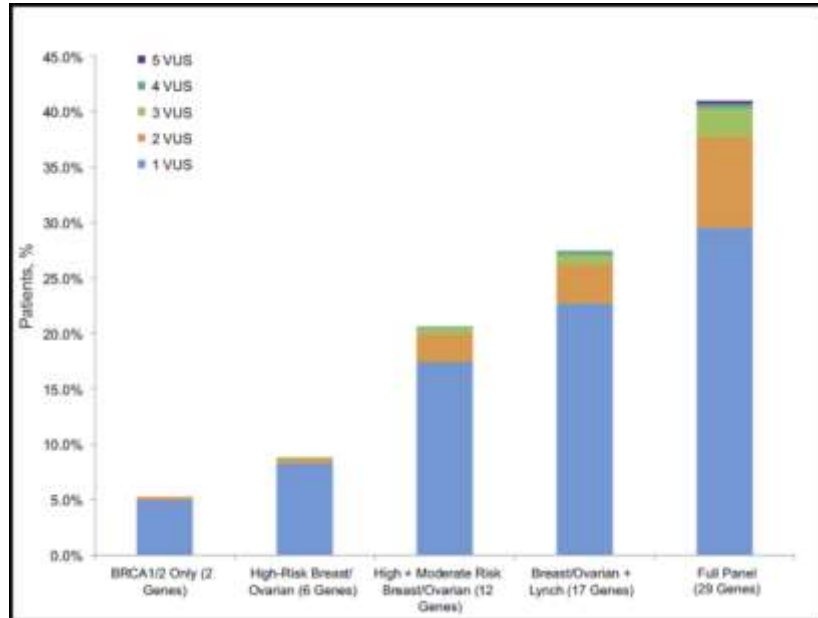
Quelle technique ?

- Séquençage ciblé :
 - On séquence un panel de gènes défini
 - (On n'analyse que les gènes demandés)
 - + Bonne sensibilité
 - + Coût et travail réduits
 - Pas de gènes additionnels
- Exome clinique / exome :
 - On séquence les exons de tous les gènes (avec impact clinique connu)
 - On n'analyse que les gènes demandés
 - + Analyse de gènes supplémentaires (p.ex. diagnostic différentiel ; exome complet : « nouveaux » gènes)
 - Sensibilité, coûts



Quels gènes : le plus est l'ennemi du bien

Plus de gènes = plus de VUS



Lincoln et al., J Mol Diagn. 2015 p533

Plus de gènes = plus de « Incidental Findings »

APOLIPOPROTEIN E; APOE

omim.org

HGNC Approved Gene Symbol: *APOE*

Cytogenetic location: *19q13.32* Genomic coordinates (GRCh38): *19:44,905,795-44,909,394* (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

[View clinical synopses as a table](#)

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
19q13.32	Alzheimer disease-2	104310	AD	3
	Hyperlipoproteinemia, type III	617347		3
	Lipoprotein glomerulopathy	611771		3
	Sea-blue histiocyte disease	269600	AR	3
	{?Macular degeneration, age-related}	603075	AD	3
	[Coronary artery disease, severe, susceptibility to]	617347		3

BTW :

American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing

In clinical exome and genome sequencing, there is potential for the recognition and reporting of incidental or secondary findings unrelated to the indication for ordering the sequencing but of medical value for patient care. The American College of Medical Genetics and Genomics

Phenotype	MIM - Disorder	PMID - GeneReviews Entry	Age of Onset	Gene	MIM - Gene	Inheritance*	Variants to Report [#]
Familial hypercholesterolemia	143890, 603776	No GeneReviews entry	Child	<i>LDLR</i>	606945	SD	KP & EP
				<i>APOB</i>	107730	SD	KP
				<i>PCSK9</i>	607786	AD	

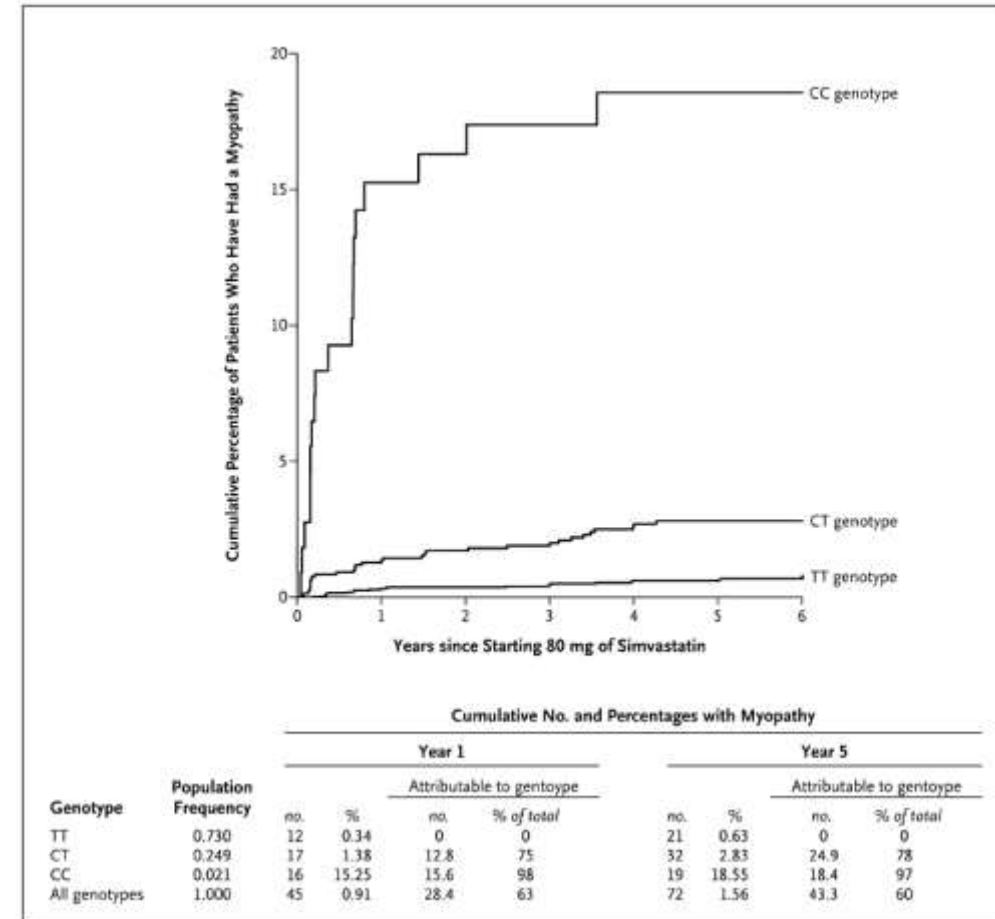
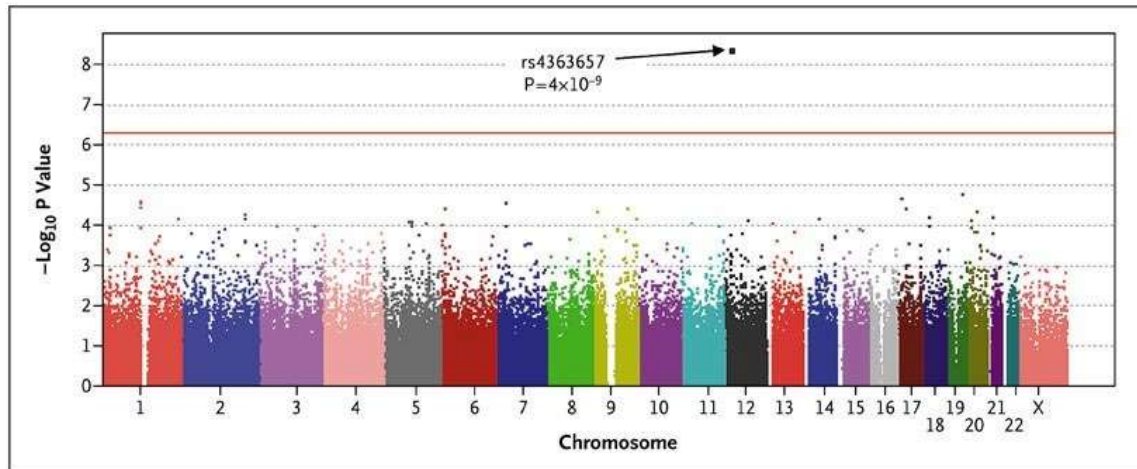
Mais aussi : plus peut être mieux

- Pourquoi ne pas intégrer un marqueur pharmacogénétique ? P.ex. *SLCO1B1*

SLCO1B1 Variants and Statin-Induced Myopathy — A Genomewide Study

The SEARCH Collaborative Group*

- Incidence de myopathie : 1 cas par 10,000 patients par an avec des doses standards de statines
- Prévalence de l'allèle C du variant *SLCO1B1* rs4149056 dans la population : 15%
- Odds ratio pour myopathie (CC vs TT) : 16.9

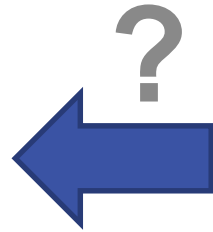


Interprétation des variants : petite répétition des principes

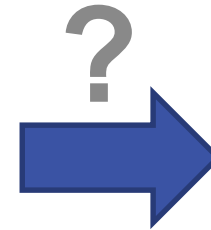
- Est-ce qu'un variant retrouvé explique le phénotype observé ?



Pathogenic : $P(\text{patho}) > 99\%$
Likely pathogenic : $P(\text{patho}) > 95\%$



VUS : $P(\text{patho})$ 5% à 95%



Benign : $P(\text{patho}) < 1\%$
Likely benign : $P(\text{patho}) < 5\%$

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Genetics
in Medicine

- **Critères (entre autres) :**
 - Fréquence dans la population
 - Type de mutation, prédictions
 - Bases de données, littérature
 - Tests fonctionnels, co-ségrégation



Interprétation des variants : un cas simple

- 31 variants ; tous fréquents dans la population générale

Variant List - sorted by: G1000>GnomAD>Frequency in Community																				Interpretation Scope: ADH basic				
P	...	P...	★	⚠	T...	Gene	Coding cons...	c.DNA	Protein	Depth	VF%	id	ref	alt	Genome pos...	RefSeq Id	Exon ID	dbSNP	G1000 ↑	Freq...	Freq...	Frequency...	ClinVar rating	Gno...
C	2			⚠	INDEL	LDLR	intronic	c.2312-91dupG		3175	22.0	46	CG	CGG	11238592	NM_000527	16			12	54	4088		0.0
C	2				INDEL	PCSK9	intronic	c.657+114delC		5060	48.8	9	ACCCC...	ACCCC...	55518190	NM_174936	4	rs397735050		10	44	10161	Uncertain sign...	0.0
C	1			⚠	INDEL	PCSK9	intronic	c.1503+54_1503+71delGTG...		5317	15.4	20	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs775704112		12	53	3811		0.0355
D	2			⚠	INDEL	PCSK9	inframe_3	c.63_65dupGCT	p.Leu23dup	4816	38.5	5	A	ACTG	55505552	NM_174936	1	rs113330492		4	21	3842	Benign/Likely ...	0.1211
D	2			⚠	INDEL	PCSK9	intronic	c.1503+56_1503+71delGTG...		5317	29.7	21	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs772583304		12	53	7071		0.1761
D					SNP	LDLR	intronic	c.940+36G>A		1910	49.0	38	G	A	11218226	NM_000527	6	rs13306513	0.0489	2	4	1340		0.0557
D					SNP	LDLR	intronic	c.2389+47G>A		3169	50.1	50	G	A	11238808	NM_000527	16	rs13306501	0.0783	3	6	1441	Benign	0.0632
D				⚠	SNP	PCSK9	missense	c.158C>T	p.Ala53Val	3940	41.9	6	C	T	55505668	NM_174936	1	rs11583680	0.0913	4	18	3650	Benign/Likely ...	0.1141
D					SNP	PCSK9	intergenic			1640	49.4	1	A	G	55504586			rs41294819	0.0935	4	20	1316		0.0
D					SNP	PCSK9	5'UTR	c.-64C>T		1320	51.4	3	C	T	55505447	NM_174936	1	rs45448095	0.0938	5	20	3248	Benign/Likely ...	0.0
D					SNP	LDLR	synonymous	c.1617C>T	p.= (p.Pro539Pro)	1664	48.7	41	C	T	11226800	NM_000527	11	rs5929	0.1218	2	6	1648	Benign/Likely ...	0.0747
D					SNP	PCSK9	intronic	c.657+114C>A		4808	51.4	10	C	A	55518198	NM_174936	4	rs7552350	0.1386	6	22	4078	Benign	0.0
D					SNP	LDLR	intronic	c.2389+46C>T		3174	49.8	49	C	T	11238807	NM_000527	16	rs2738460	0.2318	6	26	5654	Benign	0.2443
D					SNP	LDLR	3'UTR	c.*52G>A		1240	51.0	53	G	A	11242044	NM_000527	18	rs14158	0.2336	6	27	5753	Benign/Likely ...	0.2428
D					SNP	LDLR	intronic	c.2548-80G>A		1244	50.8	51	G	A	11241877	NM_000527	18	rs2116897	0.234	6	27	5669	Benign	0.0
D					SNP	LDLR	intronic	c.1706-69G>T		2429	99.6	43	G	T	11227466	NM_000527	12	rs7259278	0.2546	6	14	3757	Benign	0.0
D					SNP	LDLR	intronic	c.2548-42A>G		1234	49.1	52	A	G	11241915	NM_000527	18	rs6413504	0.351	7	38	10265	Benign	0.4496
D					SNP	PCSK9	intronic	c.658-7C>T		771	48.9	12	C	T	55518316	NM_174936	5	rs2483205	0.3942	8	42	10272	Benign/Likely ...	0.4195
D					SNP	PCSK9	intronic	c.657+82G>A		4668	99.9	8	G	A	55518166	NM_174936	4	rs625619	0.5493	11	47	10851	Benign	0.0
D					SNP	PCSK9	intergenic			2032	49.3	2	G	A	55504650			rs2479409	0.6014	11	48	4582	Pathogenic	0.0
D	1				SNP	LDLR	synonymous	c.1413A>G	p.= (p.Arg471Arg)	1299	99.9	40	A	G	11224265	NM_000527	10	rs5930	0.655	11	48	13684	Benign/Likely ...	0.6319
D					SNP	LDLR	intronic	c.1706-55A>C		2315	99.8	44	A	C	11227480	NM_000527	12	rs2738447	0.6641	10	45	11562	Benign	0.0
D					SNP	LDLR	synonymous	c.2232A>G	p.= (p.Arg744Arg)	2782	99.9	45	A	G	11233941	NM_000527	15	rs5927	0.7802	9	50	15058	Benign/Likely ...	0.7808
D				⚠	SNP	PCSK9	intronic	c.1503+67T>C		4463	98.4	24	T	C	55524387	NM_174936	9	rs563641	0.8686	12	53	11967	Benign	0.0
D					SNP	PCSK9	missense	c.1420G>A	p.Val474Ile	5097	99.7	17	G	A	55524237	NM_174936	9	rs562556	0.869	12	53	15094	Benign/Likely ...	0.8564
D					SNP	PCSK9	synonymous	c.1380A>G	p.= (p.Val460Val)	5212	99.8	16	A	G	55524197	NM_174936	9	rs540796	0.8692	12	53	15103	Benign/Likely ...	0.8564
D					SNP	PCSK9	missense	c.2009G>A	p.Gly670Glu	3687	99.8	27	G	A	55529187	NM_174936	12	rs505151	0.899	12	54	15531	Benign/Likely ...	0.9481
D				⚠	SNP	PCSK9	intronic	c.207+15A>G		4560	99.7	7	A	G	55505732	NM_174936	1	rs2495482	0.9085	12	54	13455	Benign/Likely ...	0.9281
D				⚠	INDEL	PCSK9	intronic	c.1503+58_1503+71delGTG...		5317	34.2	22	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs771257845	0.9115	12	53	10089		0.2916
D					SNP	PCSK9	synonymous	c.1026A>G	p.= (p.Gln342Gln)	950	99.9	13	A	G	55523033	NM_174936	7	rs509504	0.9818	12	54	15568	Conflicting int...	0.9958
D					SNP	LDLR	intronic	c.1060+7T>C		757	99.9	39	T	C	11221454	NM_000527	7	rs2738442	1.0	12	43	13687	Conflicting int...	0.9999

Interprétation des variants : encore un cas simple

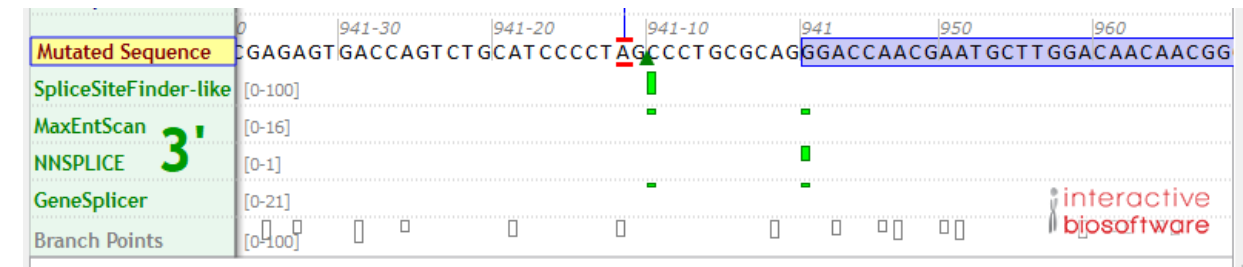
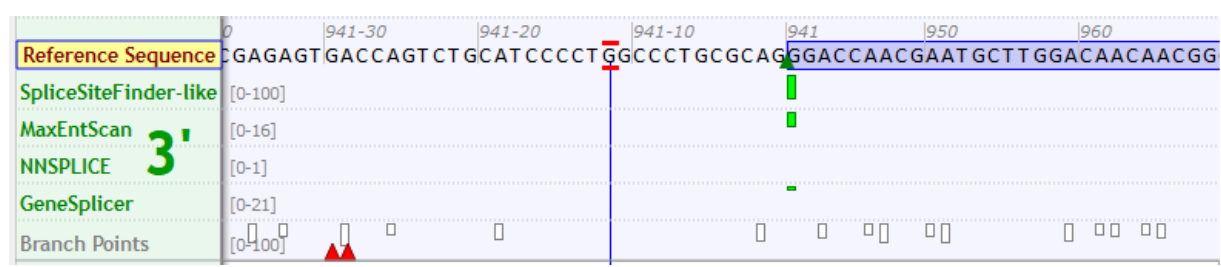
- *LDLR* : p.Gln33Ter (mutation stop ; pathogène dans littérature et dans ClinVar)

Variant List - sorted by: G1000>GnomAD>Frequency in Community																								
P	...	P...	★	!	T...	Gene	Coding cons...	c.DNA	Protein	Depth	VF%	id	ref	alt	Genome pos...	RefSeq Id	Exon ID	dbSNP	G1000	Freq...	Freq...	Frequency...	ClinVar rating	Gno...
A						LDLR	nonsense	c.97C>T	p.Gln33*	298	51.0	29	C	T	11210928	NM_000527	2	rs121908024	1	3	6	Pathogenic	0.0	
C	1					PCSK9	intronic	c.1503+60_1503+71delGTG...		4361	20.3	21	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs762196801	2	34	3545		0.0	
C	2					LDLR	intronic	c.2312-91dupG		1102	28.4	39	CG	CGG	11238592	NM_000527	16		2	41	4088		0.0	
C	2					PCSK9	intronic	c.1503+56_1503+71delGTG...		4361	23.8	19	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs772583304	2	37	7071		0.0	
C	2					PCSK9	intronic	c.657+114delC		1319	58.4	7	ACCCC...	ACCCC...	55518190	NM_174936	4	rs397735050	1	26	10161	Uncertain sign...	0.0	
C						PCSK9	intronic	c.658-36G>A		278	44.6	9	G	A	55518287	NM_174936	5	rs11800265	0.0391	1	6	1446	Uncertain sign...	0.0
C						PCSK9	intronic	c.657+9G>A		1316	42.5	4	G	A	55518093	NM_174936	4	rs11800243	0.0391	1	6	1533	Benign,Uncert...	0.0
C						PCSK9	intronic	c.524-11G>A		1308	42.6	3	G	A	55517940	NM_174936	4	rs11800231	0.0829	1	8	1605	Benign	0.0
C						PCSK9	intronic	c.657+76C>A		1314	42.5	5	C	A	55518160	NM_174936	4	rs11806638	0.1342	1	12	1790	Benign	0.0
C						LDLR	synonymous	c.1773C>T	p.= (p.Asn591Asn)	311	51.1	36	C	T	11227602	NM_000527	12	rs688	0.2758	2	28	10847	Benign	0.0
C						LDLR	intronic	c.1359-30C>T		338	49.4	33	C	T	11224181	NM_000527	10	rs1003723	0.2768	1	27	9639	Benign	0.0
C						LDLR	intronic	c.1060+10G>C		319	53.9	31	G	C	11221457	NM_000527	7	rs12710260	0.277	1	21	8841	Benign	0.0
C						LDLR	synonymous	c.1959T>C	p.= (p.Val653Val)	849	51.6	37	T	C	11230881	NM_000527	13	rs5925	0.3359	2	31	11058	Benign	0.0
C						LDLR	intronic	c.2548-42A>G		693	100.0	42	A	G	11241915	NM_000527	18	rs6413504	0.351	2	30	10265	Benign	0.0
B	2					PCSK9	splice_donor_+3	c.799+3A>G	p.?	282	46.1	10	A	G	55518467	NM_174936	5	rs2495477	0.4663	2	30	10031	Benign	0.0
C						PCSK9	intronic	c.657+82G>A		1312	57.6	6	G	A	55518166	NM_174936	4	rs625619	0.5493	2	31	10851	Benign	0.0
C	1					LDLR	synonymous	c.1413A>G	p.= (p.Arg471Arg)	339	49.6	34	A	G	11224265	NM_000527	10	rs5930	0.655	2	38	13684	Benign	0.0
C						LDLR	intronic	c.1706-55A>C		310	51.9	35	A	C	11227480	NM_000527	12	rs2738447	0.6641	2	35	11562		0.0
C						LDLR	synonymous	c.2232A>G	p.= (p.Arg744Arg)	468	48.7	38	A	G	11233941	NM_000527	15	rs5927	0.7802	2	40	15058	Benign	0.0
C						PCSK9	intronic	c.1503+67T>C		4171	98.9	23	T	C	55524387	NM_174936	9	rs563641	0.8686	2	40	11967	Benign	0.0
D						PCSK9	missense	c.1420G>A	p.Val474Ile	4235	99.6	15	G	A	55524237	NM_174936	9	rs562556	0.869	2	40	15094	Benign	0.0
C						PCSK9	synonymous	c.1380A>G	p.= (p.Val460Val)	4316	99.9	14	A	G	55524197	NM_174936	9	rs540796	0.8692	2	40	15103	Benign	0.0
D						PCSK9	missense	c.2009G>A	p.Gly670Glu	2979	99.7	27	G	A	55529187	NM_174936	12	rs505151	0.899	2	42	15531	Benign	0.0
C						PCSK9	intronic	c.207+15A>G		987	99.7	2	A	G	55505732	NM_174936	1	rs2495482	0.9085	2	42	13455	Benign	0.0
C						PCSK9	intronic	c.1503+58_1503+71delGTG...		4361	33.1	20	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs771257845	0.9115	2	36	10089		0.0
C						PCSK9	synonymous	c.1026A>G	p.= (p.Gln342Gln)	246	99.6	11	A	G	55523033	NM_174936	7	rs509504	0.9818	2	42	15568	Benign,Uncert...	0.0
C						LDLR	intronic	c.1060+7T>C		319	100.0	30	T	C	11221454	NM_000527	7	rs2738442	1.0	2	36	13687	Benign,Uncert...	0.0

Interprétation des variants : on augmente la difficulté

GENES		SNVs/INDELS		CNVs		FUSIONS		WARNINGS		Interpretation Scope: ADH bas														
Variant List - sorted by: G1000>GnomAD>Frequency in Community										save column preferences														
P	...	P...	★	⚠	T...	Gene	Coding cons...	c.DNA	Protein	Depth	VF%	id	ref	alt	Genome pos...	RefSeq Id	Exon ID	dbSNP	G1000	Freq...	Freq...	Frequency...	ClinVar rating	Gno...
C						LDLR	intronic	c.941-12G>A		406	49.5	35	G	A	11221316	NM_000527	7	rs879254734	1	1	2	Likely pathog...	0.0	
C		2				LDLR	intronic	c.1060+7_1060+10delTCCG...		409	99.3	36	TCCG	CCCC	11221454	NM_000527	7		1	11	1371		0.0	
B		2		⚠		PCSK9	inframe_3	c.63_65dupGCT	p.Leu23dup	1495	43.7	5	A	ACTG	55505552	NM_174936	1	rs371488778	1	21	3842		0.0	
C		2		⚠		LDLR	intronic	c.2312-91dupG		1834	27.3	43	CG	CGG	11238592	NM_000527	16		2	54	4088		0.0	
C		2		⚠		PCSK9	intronic	c.1503+56_1503+71delGTG...		5766	29.7	19	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs772583304	2	53	7071		0.0	
C		2				PCSK9	intronic	c.657+114delC		1826	98.5	9	ACCCC...	ACCCC...	55518190	NM_174936	4	rs397735050	2	44	10161	Uncertain sign...	0.0	
C						LDLR	synonymous	c.81C>T	p.= (p.Cys27Cys)	423	49.2	34	C	T	11210912	NM_000527	2	rs2228671	0.0569	2	12	3255	Benign	0.0

- **LDLR : c.941-12G>A** : variant intronique hors d'un site d'épissage
- ClinVar : 1x *pathogenic* ; 3x *likely pathogenic* ; 1x *VUS* ; 1x *benign*
- gnomAD (exomes de >100'000 individus) : pas retrouvé
- Littérature : test fonctionnel positif ; co-ségrégation avec le phénotype
- Alamut (prédiction des sites d'épissage) :



Interpréter les variants faux sens, ça peut être difficile

- *LDLR* : p.(Gln384Pro)

GENES		SNVs/INDELS	CNVs	FUSIONS	WARNINGS	Interpretation Scope: ADH																			
Variant List - sorted by: G1000>GnomAD>Frequency in Community																				save column preferences					
P	...	P	...	★	!	T	Gene	Coding cons...	c.DNA	Protein	Depth	VF%	id	ref	alt	Genome pos...	RefSeq Id	Exon ID	dbSNP	G1000	Freq...	Freq...	Frequency...	ClinVar rating	Gno...
B	4						SNP	LDLR	missense	c.1151A>C	p.Gln384Pro	1933	50.3	38	A	C	11222280	NM_000527	8	rs879254807	1	1	1	Likely pathog...	0.0
C	1	!					INDEL	PCSK9	intronic	c.1503+54_1503+71delGTG...		4739	15.2	17	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs775704112	4	53	3811		0.0
C	2	!					INDEL	LDLR	intronic	c.2312-91dupG		2050	18.7	41	CG	CGG	11238592	NM_000527	16		4	54	4088		0.0

- ClinVar : 1x *likely pathogenic*, 1x *pathogenic* ; LOVD : *probably affects function*
- gnomAD : pas retrouvé parmi 125'000 (?) individus « normaux » :

Variant ID	Source	Consequence	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number
19-11222248-T-C	E G	p.Gly373Gly	synonymous		2	282674
19-11222257-G-T	E	p.Lys376Asn	missense		1	251340
19-11222258-T-C	E	p.Cys377Arg	missense		1	251338
19-11222260-C-A	E	p.Cys377Ter	stop gained		1	251336
19-11222262-A-C	E	p.Gln378Pro	missense		2	251308
19-11222264-T-C	G	p.Cys379Arg	missense		1	31396
19-11222267-G-A	G	p.Glu380Lys	missense		1	31406
19-11222268-A-G	E	p.Glu380Gly	missense		1	251304
19-11222269-G-A	E	p.Glu380Glu	synonymous		1	251306
19-11222270-G-A	E	p.Glu381Lys	missense		1	251300
19-11222273-G-C	E	p.Gly382Arg	missense		1	251264
19-11222274-G-C	E	p.Gly382Ala	missense		1	251224
19-11222274-G-A	E	p.Gly382Asp	missense		1	251224
19-11222284-G-C	E	p.Leu385Leu	synonymous		1	251110
19-11222285-G-T	E	p.Asp386Tyr	missense		1	251080
19-11222289-C-T	E	p.Pro387Leu	missense		7	251022
19-11222291-C-A	E	p.His388Asn	missense		5	251004
19-11222295-C-T	E	p.Thr389Met	missense		5	250884

Interpréter les variants faux sens, ça peut être difficile

- *LDLR* : p.(Gln384Pro)

Variant List - sorted by: G1000>GnomAD>Frequency in Community																			
Gene	Coding cons...	c.DNA	Protein	Depth	VF%	id	ref	alt	Genome pos...	RefSeq Id	Exon ID	dbSNP	G1000	Freq...	Freq...	Frequency...	ClinVar rating	Gno...	
LDLR	missense	c.1151A>C	p.Gln384Pro	1933	50.3	38	A	C	11222280	NM_000527	8	rs879254807	1	1	1	Likely pathog...	0.0		
PCSK9	intronic	c.1503+54_1503+71delGTG...		4739	15.2	17	CGTGT...	C	55524339	NM_174936	9	rs775704112	4	53	3811		0.0		
LDLR	intronic	c.2312-91dupG		2050	18.7	41	CG	CGG	11238592	NM_000527	16		4	54	4088		0.0		

- ClinVar : 1x *likely pathogenic*, 1x *pathogenic* ; LOVD : *probably affects function*
- gnomAD : pas retrouvé parmi 125'000 (?) individus « normaux »
- Prédiction : 2x pathogène, 1x toléré
- Littérature (sélection) :
 - Fouchier 2001 (PMID 11810272) : retrouvé 1x (nommé Q363P)
 - Dedoussis 2004 (PMID 15200491) : retrouvé 1x (nommé Q363P)
 - Wang 2005 (PMID 15576851) : retrouvé 1x (nommé Q363P)
- Pas de publications avec tests fonctionnels ou analyses de co-ségrégation

LDLR : p.(Gln384Pro) : ça donne quoi selon Richards et al. ?

- ClinVar : 1x *likely pathogenic*, 1x *pathogenic* ; LOVD : *probably affects function*
- gnomAD : pas retrouvé parmi 125'000 (?) individus « normaux »
- Prédiction : 2x pathogène, 1x toléré
- Pas de publications avec tests fonctionnels ou analyses de co-ségrégation
- Applications des critères ACMG (Richards et al.) :

X PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium

X PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)

X PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation

_ PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls

Likely pathogenic

VUS

Interpréter les faux sens sans évidence, c'est du non-sens

- Revue systématique des variants FH (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*) listés dans les bases de données (LOVD etc.)
- 2'104 variants classifiés par Chora et al. selon les critères ACMG :
 - 705 variants : (likely) pathogenic
 - 1'470 variants : classification en principe seulement possible avec tests fonctionnels
 - Parmi ces 1'470 variants : 243 avec test fonctionnels (20% : pas de conclusion suite au test)

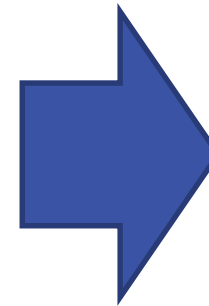
Analysis of publicly available *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis

Joana Rita Chora, MSc^{1,2}, Ana Margarida Medeiros, MSc^{1,2}, Ana Catarina Alves, PhD^{1,2} and Mafalda Bourbon, PhD^{1,2}

a null protein. This will avoid misdiagnosis. The example of the variant c.806G > A/p.(Gly269Asp) (formerly known as Gly248Asp) exemplifies very well this problem; this variant was considered disease-causing in all countries where it was described—Spain,²⁸ the Netherlands,²⁹ and Italy (FH Rome-3)—until in 2008 we reported complete lack of cosegregation in a Portuguese family where later a pathogenic variant was found.³⁰ In 2012 the functional assay was performed³¹ and it proved beyond any doubt that this variant had little or no effect on the *LDLR* function, being considered as benign. This was one of the most common variants in Spain³¹ and was described in other countries as mentioned before; reports had to be withdrawn and new reports had to be sent to the clinician and it had to be explained to the patient that the cause of their dyslipidemia had, in fact, not been found yet. To avoid this kind of situation an effort

Interprétation des variants : un aspect intéressant

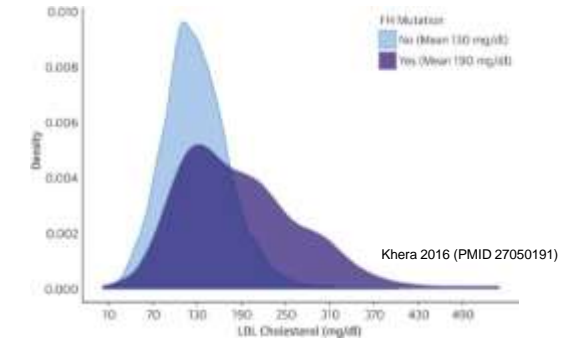
- Réévaluation des VUS de gènes de prédisposition au cancer
- 26'670 VUS uniques identifiés initialement
- Lors de la réévaluation : 2'048 VUS re-classifiés (8%)
 - 90% : (likely) benign
 - 10% : (likely) pathogenic



- Situation parmi les 92% des VUS non-re-classifiés ?
- Situation parmi les VUS FH ?

L'hypercholestérolémie polygénique

- FH : variants rares avec impact lourd
- Effet de beaucoup variants fréquents avec impact faible ?
- Talmud 2013 : effet cumulé de 12 variants fréquents :



Chromosome number	Gene	Minor allele	Common allele	GLGC weight for score calculation	Minor allele frequency			
					FH with known mutation (n=229)	FH without known mutation (n=221)	WHII controls (n=3020)	
rs2479409	1	PCSK9	G*	A	0.052	0.33	0.39	0.35
rs629301	1	CELSR2	G	T*	0.15	0.19	0.12	0.21
rs1367117	2	APOB	A*	G	0.10	0.35	0.37	0.33
rs4299376	2	ABCG8	G*	T	0.071	0.37	0.37	0.32
rs1564348	6	SLC22A1	C	T*	0.014	0.19	0.17	0.17
rs1800562	6	HFE	A	G*	0.057	0.06	0.08	0.07
rs3757354	6	MYLIP	T	C*	0.037	0.21	0.17	0.21
rs11220462	11	ST3GAL4	A*	G	0.050	0.14	0.13	0.13
rs8017377	14	MYN8N	A*	G	0.029	0.48	0.47	0.48
rs6511720	19	LDLR	T	G*	0.18	0.10	0.08	0.13
rs479358	19	APOE1	C	T	-	0.19	0.21	0.15
rs7412	19	APOE1	T	C	-	0.04	0.03	0.08
rs282	19	APOE	-	-	-0.9	-	-	-
rs283	19	APOE	-	-	-0.4	-	-	-
rs284	19	APOE	-	-	0.2	-	-	-
rs383	19	APOE	-	-	0	-	-	-
rs384	19	APOE	-	-	0.1	-	-	-
rs484	19	APOE	-	-	0.2	-	-	-

LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol. FH=familial hypercholesterolemia. WHII=Whitehall II. G=guanine, A=adamine, T=thymidine, C=cytosine. *Risk alleles (LDL-C raising). †APOE weights were based on haplotypic effects taken from Bennett and colleagues' study,²⁸ as described in the Methods section of our study.

Table 2. Global Lipid Genetic Consortium 12-SNP LDL-C gene score calculation

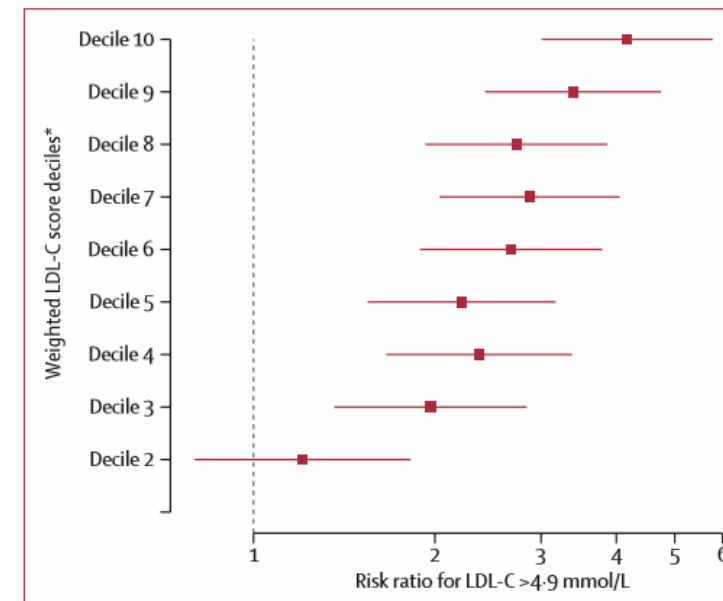
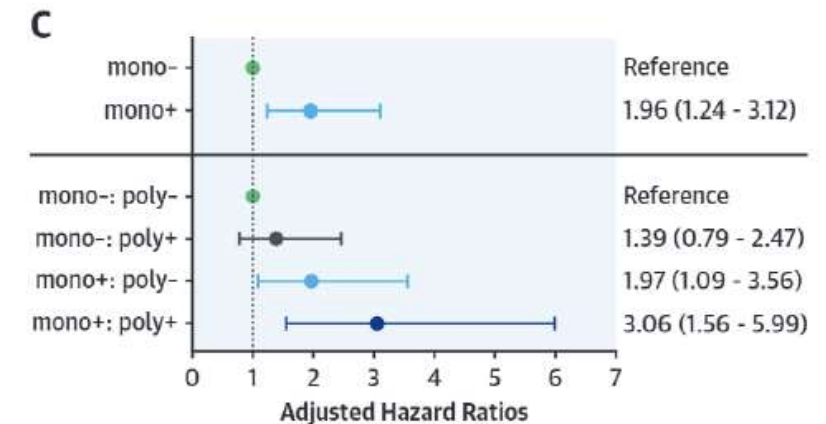
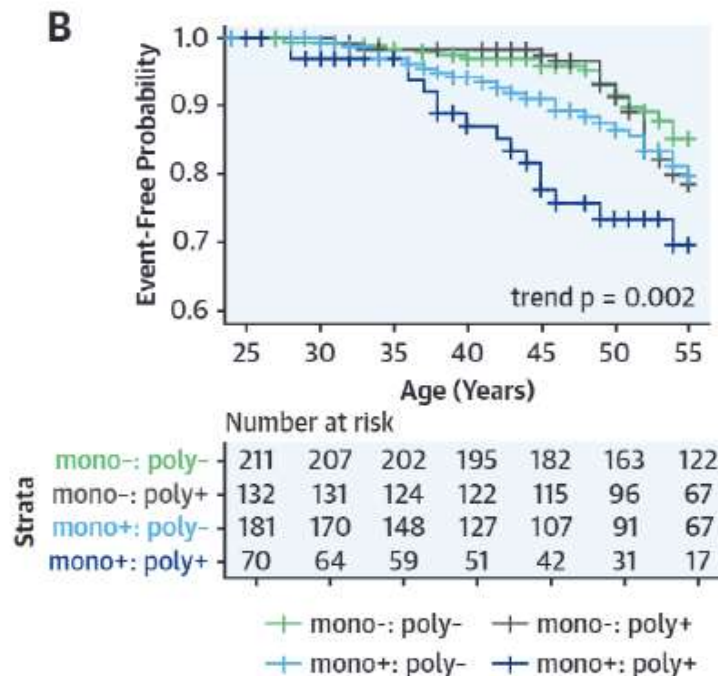
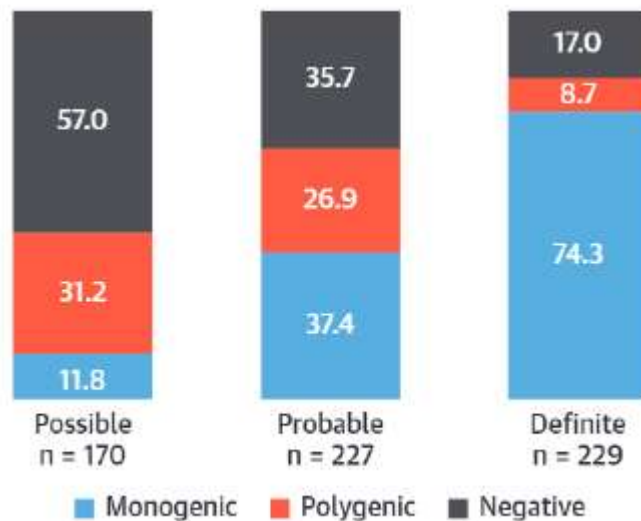


Figure 1: Risk ratio of participants in the WHII population having LDL-C >4.9 mmol/L according to gene score decile

LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol. WHII=Whitehall II. *Decile 1 used as reference.

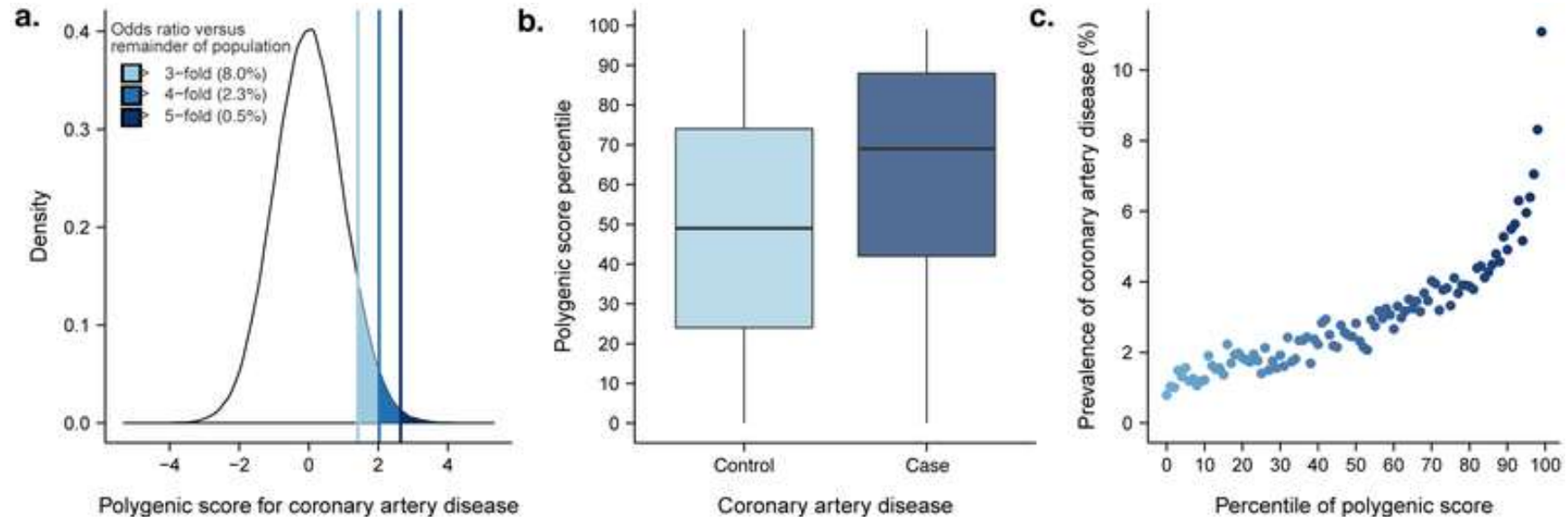
Combinaison d'hypercholestérolémie polygénique et familiale

- 626 patients avec FH possible, probable ou définitive
 - Recherche de mutations FH (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*)
 - Génotypage de 28 polymorphismes > calcul du *polygenic risk score* (PRS). $\geq 80\%$ percentile = « hypercholestérolémie polygénique »



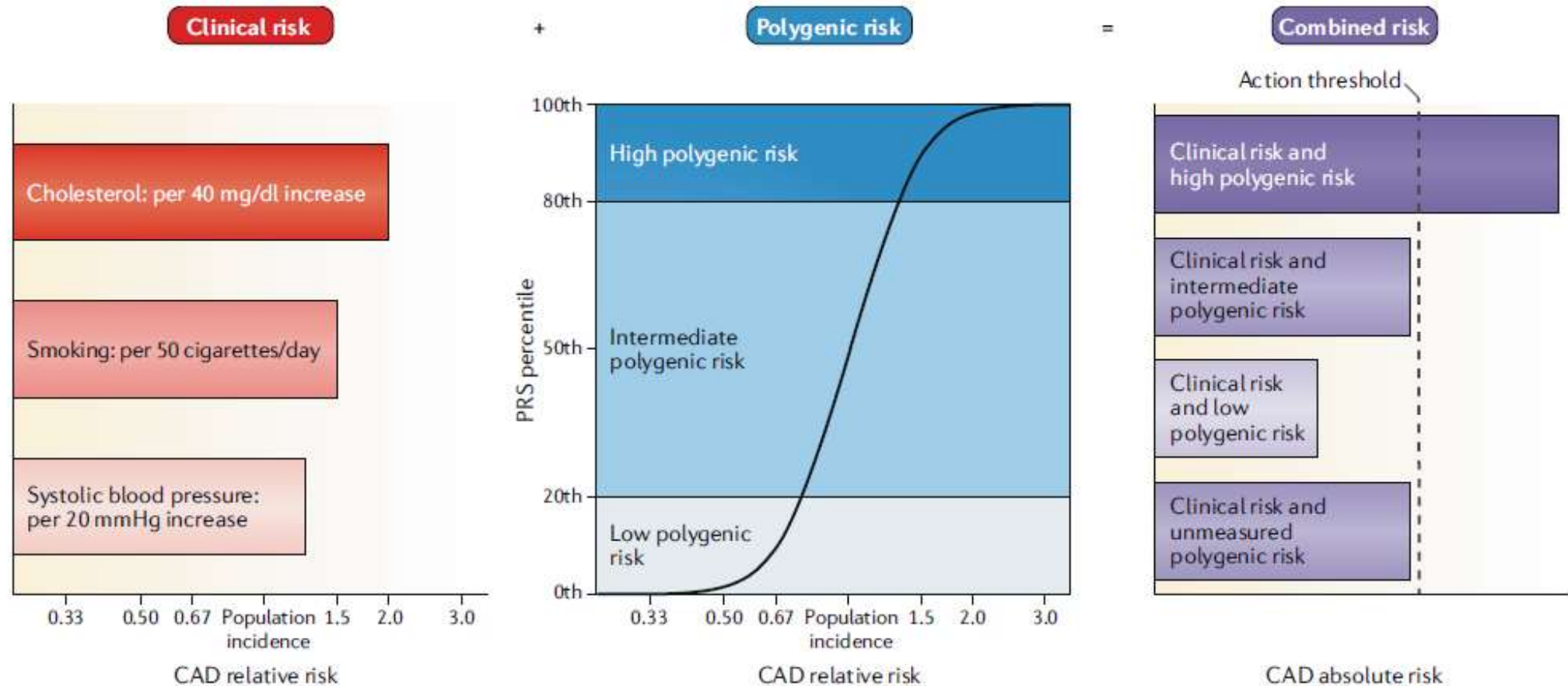
Polygenic risk scores (PRS) à grande échelle

- 288'000 personnes de la UK Biobank ; 6'630'150 variants génotypés



- 8% des cas : risque de CAD augmenté 3x selon leur PRS (= même effet qu'une mutation FH)
- Chiffres similaires pour diabète et autres maladies
- *"We propose that it is time to contemplate the inclusion of polygenic risk prediction in clinical care and discuss relevant issues."*

Combinaison des risques (poly-)géniques et cliniques



Envers une médecine prédictive hautement personnalisée
(Et si on ne veut pas savoir tout ça ?)

Les copy number variants (CNV)

- *LDLR* : 2-10% des mutations sont des grandes délétions / duplications

Structural Variation

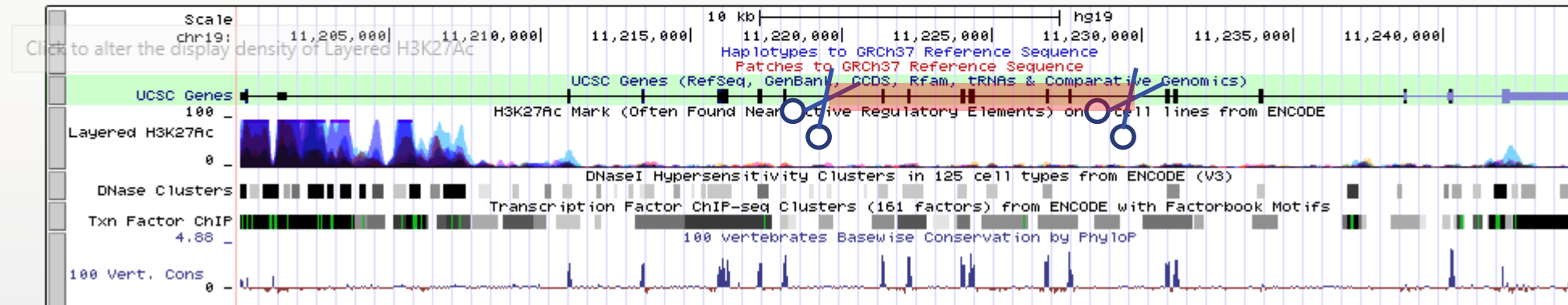
Reference	1	2	3			
Insertion	1	2	5	3		
Deletion	1	3				
Inversion	1	3	2			
Copy Number Variation	1	1	1	1	2	3
Tandem Duplication	1	1	2	3		
Dispersed Duplication	1	2	1	3		

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x 100x

chr19:11,200,038-11,244,505 44,468 bp. enter position, gene symbol, HGVS or search terms go

chr19 (p13.2) 19p13.3 19p13.2 p13.11 19p12 19q12 13.11 13.12 19q13.2 13.32 q13.33 13.42 13.43

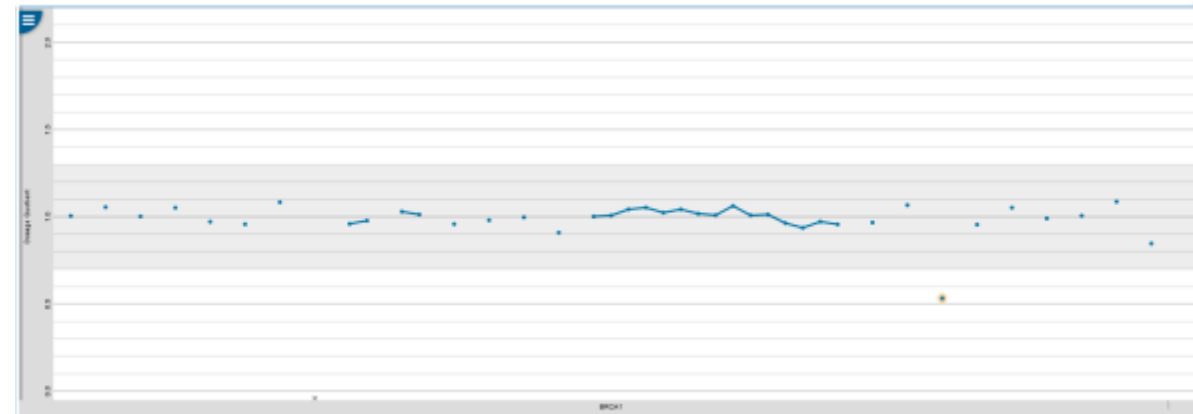
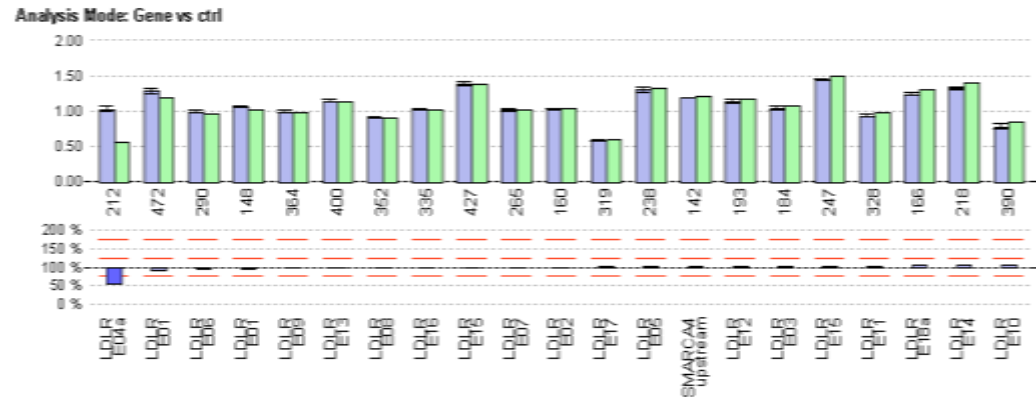


CNV dans *LDLR*

- LOVD : base de données *LDLR*

Effect	Reported	ClassClinical	Exon	DNA change (cDNA)	Protein	RNA change	DNA/Legacy
+?/+?	1	ACGS: 4	_1_1i	c.(?_-187)_(67+1_68-1)dup	p.0?	r.(?)	-
+/+	4	ACGS: 5	_1_2i	c.(?_-187)_(190+1_191-1)del	p.0?	r.(?)	FH Valencia-1, FH Siracusa
+/+	3	ACGS: 5	_1_6i	c.(?_-187)_(940+1_941-1)del	p.0?	r.(?)	FH Bologna-1, FH Bari-3
+/+	1	ACGS: 5	_1_7i	c.(?_-187)_(1060+1_1061-1)del	p.0?	r.(?)	-
+/+	1	ACGS: 5	_1_8i	c.(?_-187)_(1186+1_1187-1)del	p.0?	r.(?)	-
+/+	1	ACGS: 5	_1_12i	c.(?_-187)_(1845+1_1846-1)del	p.0?	r.(?)	-
+/+	1	ACGS: 5	_1_14i	c.(?_-187)_(2140+1_2141-1)del	p.0?	r.(?)	-
+/+	1	ACGS: 5	_1_15i	c.(?_-187)_(2311+1_2312-1)del	p.0?	r.(?)	-
+/+	2	ACGS: 5	_1_18_	c.(?_-187)_(?2584?)del	p.0?	r.(?)	-
+/+	1	ACGS: 5	3i_4i	c.(313+1_314-1)_(694+1_695-1)del	p.(Pro106_Ala232del)	r.(?)	-
+?/+?	1	ACGS: 4	3i_5i	c.(313+1_314-1)_(817+1_818-1)dup	p.?	r.(?)	-
+/+	5	ACGS: 5	3i_6i	c.(313+1_314-1)_(940+1_941-1)del	p.(Pro105_Gly314delinsArg)	r.(?)	FH Valencia-4, FH Vancouver-6, FH Petersburg
+?/+?	1	ACGS: 4	3i_6i	c.(313+1_314-1)_(940+1_941-1)dup	p.(Gly314Ala;Pro106_Cys313 dup)	r.(?)	-
+?/+	2	ACGS: 4	3i_8i	c.(313+1_314-1)_(1186+1_1187-1)dup	p.?	r.(?)	p.?

Dépistage des CNV : avant et après l'introduction du NGS



Avant : MLPA

- Gold standard
- Fonctionne avec un seul échantillon
- Laborieux
- Si délétion d'une seule sonde : SNV ou vraie délétion ?

Après : CNV by NGS

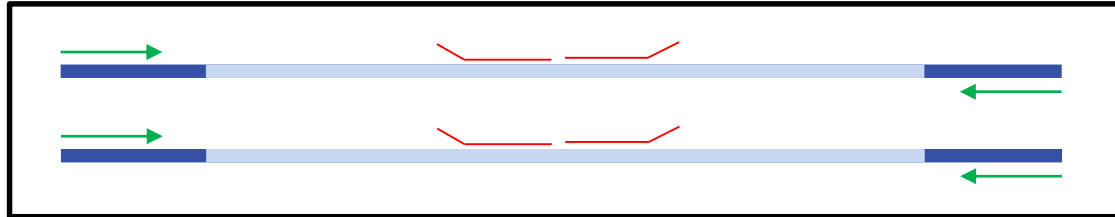
- Ne fonctionne pas toujours pour tous les amplicons
- Minimum 5 échantillons par run
- Si délétion d'un seul amplicon : SNV ou vraie délétion ?

SNV = Single Nucleotide Variant (= variant qui n'affecte qu'une base)

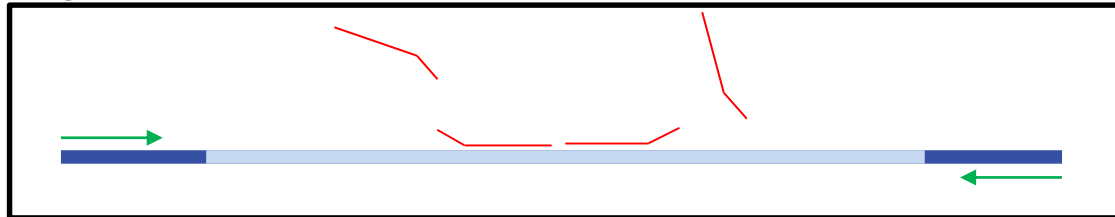
CNV by NGS : quelques détails pratiques

MLPA : vraie délétion ou SNV ?

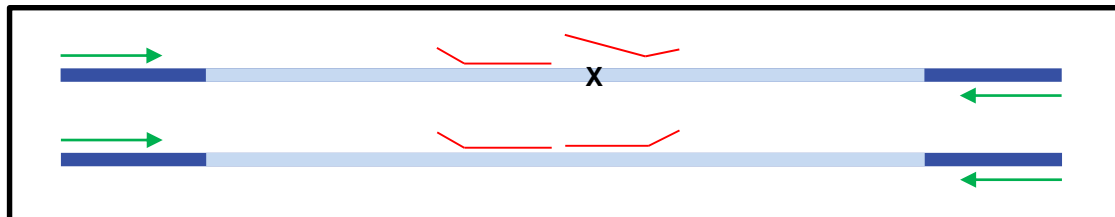
Pas de signal de délétion



Signal de délétion : vraie délétion



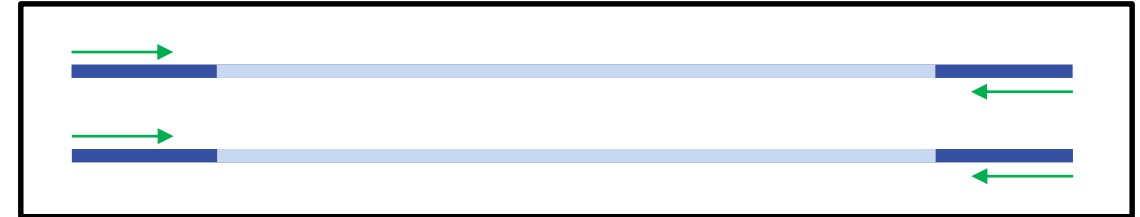
Signal de délétion : pas de délétion, mais SNV



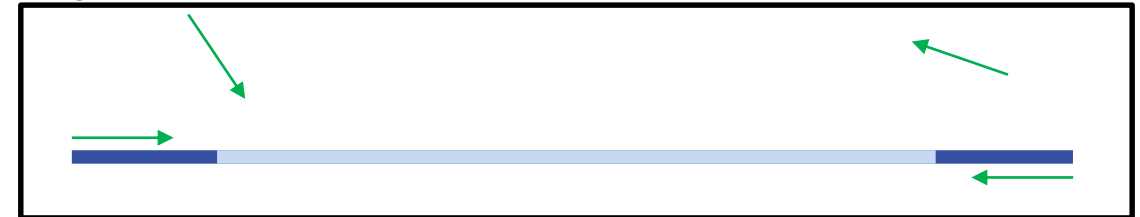
- > Confirmer avec un autre MLPA (= autres sondes)
- > Si pas disponible : au moins vérifier qu'il n'y a pas de SNV

CNV by NGS : vraie délétion ou SNV ?

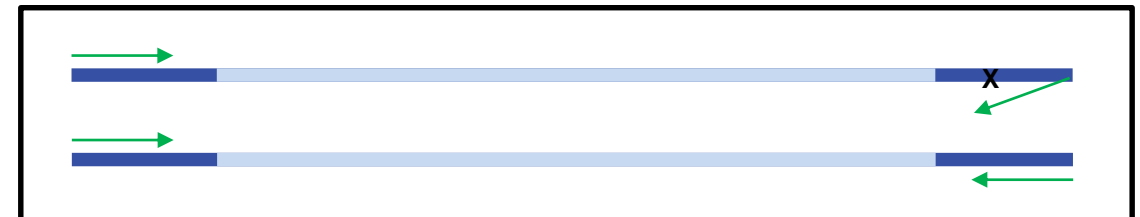
Pas de signal de délétion



Signal de délétion : vraie délétion



Signal de délétion : pas de délétion, mais SNV

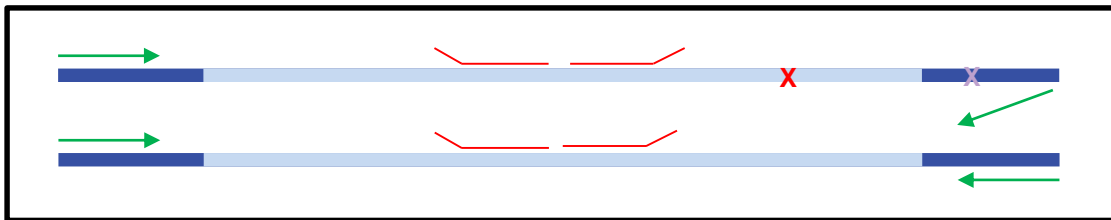


- > Confirmer en MLPA
- > Si MLPA négatif : *allelic dropout* ?

Allelic dropout : MLPA vs. CNV by NGS

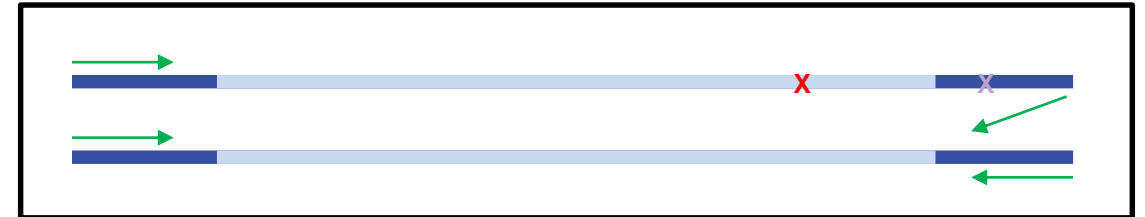
- CNV by NGS facilite les analyses. Mais on voit des choses qu'on ne voyait pas avant, donc le travail ne diminue pas nécessairement
- Exemple : un allèle avec un variant exonique et un variant intronique

Combinaison de Sanger et MLPA :



- Sanger (= qualitatif) : on ne voit pas le variant exonique
- MLPA (= quantitatif) : on voit qu'il y a deux copies
- Pas d'analyses supplémentaires, donc variant exonique non-identifié

Séquençage NGS et CNV by NGS

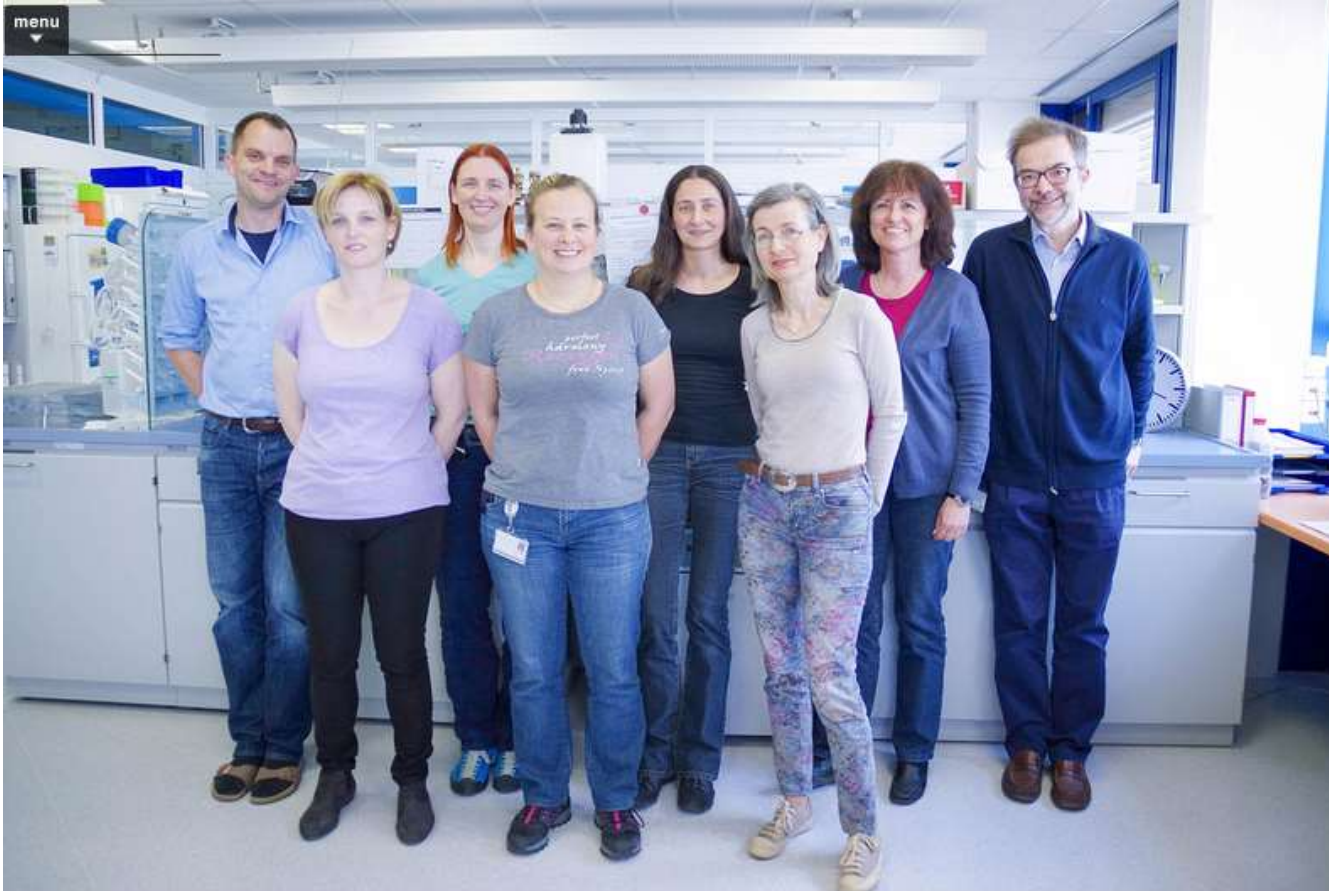


- Séquençage NGS (= qualitatif) : on ne voit pas le variant exonique
- CNV by NGS (= quantitatif) : on voit l'allelic dropout
- Analyses supplémentaires = variant exonique sera identifié

Attention : c'est encore différent avec le NGS basé sur la capture !

- Il est important d'identifier les individus FH tôt pour pouvoir les traiter tôt
- L'analyse génétique a été facilitée par le NGS (dans la plupart des cas)
- L'interprétation des variants peut être délicate
- Les *polygenic risk scores* émergent ; leur utilité dans la clinique doit encore être prouvée

Merci !



Dr Nathalie Brun
Dr Tinh-Hai Collet
Dr David Nanchen