

# Recherche de mosaïcisme par NGS du gène MEN1 dans les cas non résolus de Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1

Auteurs : Arnaud Lagarde<sup>1</sup>, Brigitte Delemer<sup>2</sup>, Antoine Tabarin<sup>3</sup>, Amira Mohamed<sup>1</sup>, Catherine Roche<sup>1</sup>, Anne Barlier<sup>1</sup>, Pauline Romanet<sup>1</sup>.



**Affiliations :** <sup>1</sup>Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, AP-HM Laboratoire de Biologie Moléculaire, Hôpital La Conception, Marseille, France, <sup>2</sup> Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Reims, FRANCE, <sup>3</sup> CHU Bordeaux, Bordeaux, FRANCE.

## Contexte :

Les mosaïcismes somatiques sont décrites dans de nombreux cancers héréditaires dont la néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1), un syndrome dû à une mutation germinale du gène *MEN1*, qui se caractérise par l'association de plusieurs lésions du système endocrine : hyperparathyroïdie (HPT, 90-95%), tumeurs neuroendocrines digestives (TNED, 30-70%), adénomes hypophysaires (HYP, 30-40%). Or, ces mutations en mosaïque dont la fréquence allélique (FA) est inférieure à 10% sur sang total sont indétectables par un séquençage Sanger entraînant des diagnostics tardifs ou de faux-négatifs. Le séquençage à haut débit (NGS) offre la possibilité de détecter ces mutations en mosaïque. Le challenge est de diminuer le seuil de détection en différenciant les artéfacts des vraies mosaïques. Des stratégies de NGS ultra-profond ont été développées mais nécessitent de présélectionner les patients. Les indexes moléculaires uniques (UMI) sont des adaptateurs composés d'une séquence aléatoire de 12 nucléotides attribuée à chaque molécule d'ADN originale en début de préparation des bibliothèques. Ils permettent d'augmenter la sensibilité et spécificité des analyses de mutations à faibles fréquences allélique en supprimant les artéfacts de séquençage survenant pendant l'amplification (Figure 1). Notre étude vise à évaluer, dans une activité de routine, l'apport de bibliothèque incorporant des UMI pour la détection des mutations en mosaïque du gène *MEN1*.

## Matériel & Méthodes :

Nous avons mis au point en routine le séquençage d'un panel de gènes incluant le gène *MEN1* à l'aide du kit de préparation des bibliothèques NGS « Qiaseq targeted custom panel DNA » (Qiagen) à façon, et séquençé sur un MiSeqDx (Illumina), les données sont analysées sur le logiciel CLC genomic Workbench (Qiagen).

La recherche de mosaïcisme de *MEN1* a été validée à l'aide des données générées par le séquençage de mutations en mosaïques simulées par dilution de l'ADN de 2 patients porteurs d'une mutation hétérozygote de *MEN1* avec un ADN d'un patient non muté.

Ensuite nous avons réalisé une analyse rétrospective de patients présentant au moins 2 lésions du spectre de la NEM1, adressés entre mai 2018 et mai 2020 pour une analyse génétique au laboratoire de biologie moléculaire du Pr Anne Barlier, Hôpital La Conception, APHM, et pour lesquels l'analyse NGS de première intention était négative.

Tous les patients ont donné leur consentement éclairé pour une analyse génétique dans le cadre de la NEM1.

## Résultats de la validation de la méthode:

Les gammes de mutations en mosaïque ont été réalisées par une série de dilution de 2 patients porteurs d'une mutation hétérozygote (c.1252G>A p.Asp418Asn et c.1546dupC p. Arg516Profs\*15) avec un ADN d'un patient non muté. Toutes les mutations de *MEN1* ont été retrouvées jusqu'à une fréquence allélique de 1% (corrélation théo./obs. R<sup>2</sup>=0,96). L'utilisation des UMIs a permis de réduire le nombre de faux positifs (FA entre 0,5-10%) sur *MEN1* de 40,6 en moyenne [25;51] à 0,5 [0;2] par patient (Figure 2).

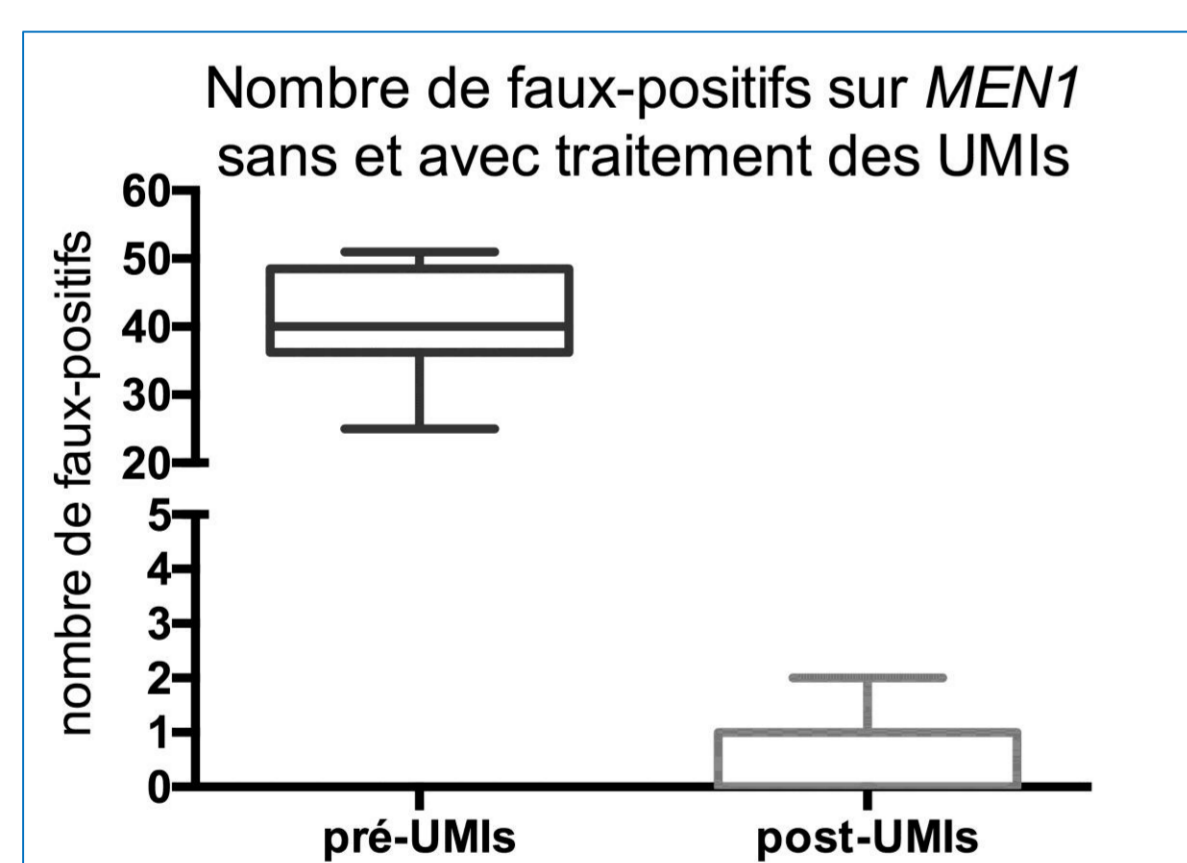


Figure 2 : nombre de variants faux positifs moyens par point de la gamme (n=10) lors de la recherche de mosaïcisme du gène *MEN1* sans traitement informatique des UMIs et après traitement informatique des UMIs.

## Résultats cliniques:

Nous avons analysés 49 patients (Table 1). Un total de 39 patients présentaient 2 lésions du spectre NEM1, 8 avaient 3 lésions, 1 patient 4 lésions et 1 patients 5 lésions. **Trois patients présentant une mutation en mosaïque sur *MEN1*** à fréquence allélique de 2 à 9 % ont pu être détectés (Figure 3). Les 3 mosaïques ont été confirmées par une seconde technique sur un prélèvement sanguin ou somatique.

	Hyperparathyroïdie primaire	Adénome hypophysaire	Tumeur neuroendocrinienne digestive	Lésion des surrénales	Tumeur neuroendocrinienne thymique	Méningiome	Lésion cutanée	Enfant avec une lésion du spectre NEM1
nombre de patients (% du total)	39 (80%)	32 (76%)	14 (30%)	10 (25%)	6 (14%)	1	1	2
Moyenne d'âge au diagnostic de la lésion (min-max ; années)	62,6 (39-86)	57,7 (18-80)	59,1 (39-86)	63,4 (40-86)	58,6 (51-72)	39		

Table 1 : caractéristiques cliniques des patients inclus dans

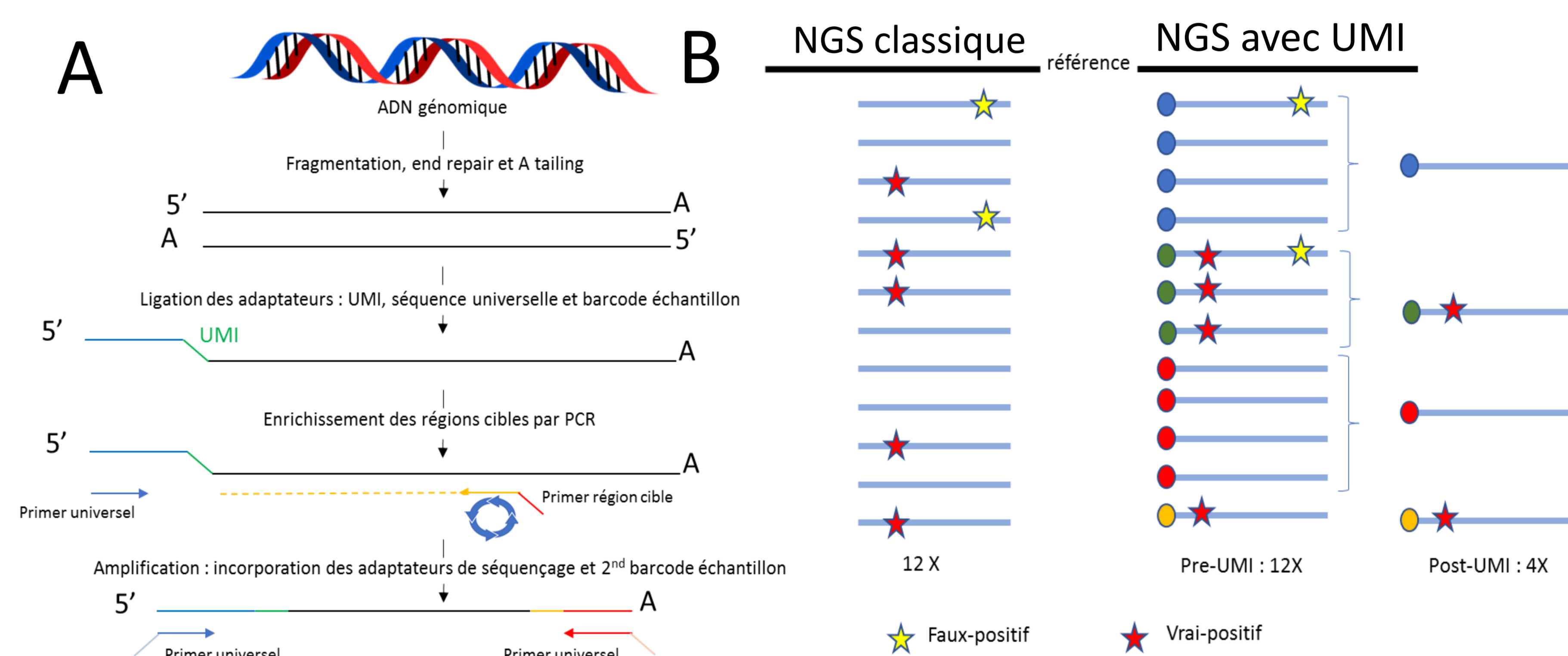


Figure 1 : principe des UMIs pour le NGS :

A/ Les UMIs sont ajoutés à chaque molécule d'ADN originale en début de préparation des bibliothèques avant toute amplification. B/ Après séquençage, les duplicats de PCR sont regroupés (fragments avec un UMI identique) informatiquement en Big-UMI, ramenant la lecture des variants sur le nombre original d'allèle et non sur un compte brut incluant les duplicats de PCR. Si des variants ne sont pas présents dans >75% des lectures d'un Big-UMI, ce sont des artéfacts d'amplification et ils sont éliminés. Par exemple, sur une région avec une profondeur de lecture à 12X, à partir d'une bibliothèque classique le vrai-positif est détecté à 42% (5/12) et le faux-positif à 17% (2/12). Avec une bibliothèque incluant des UMIs, la profondeur de lecture finale est de 4X et seul le vrai positif est détecté avec une fréquence de 50%.

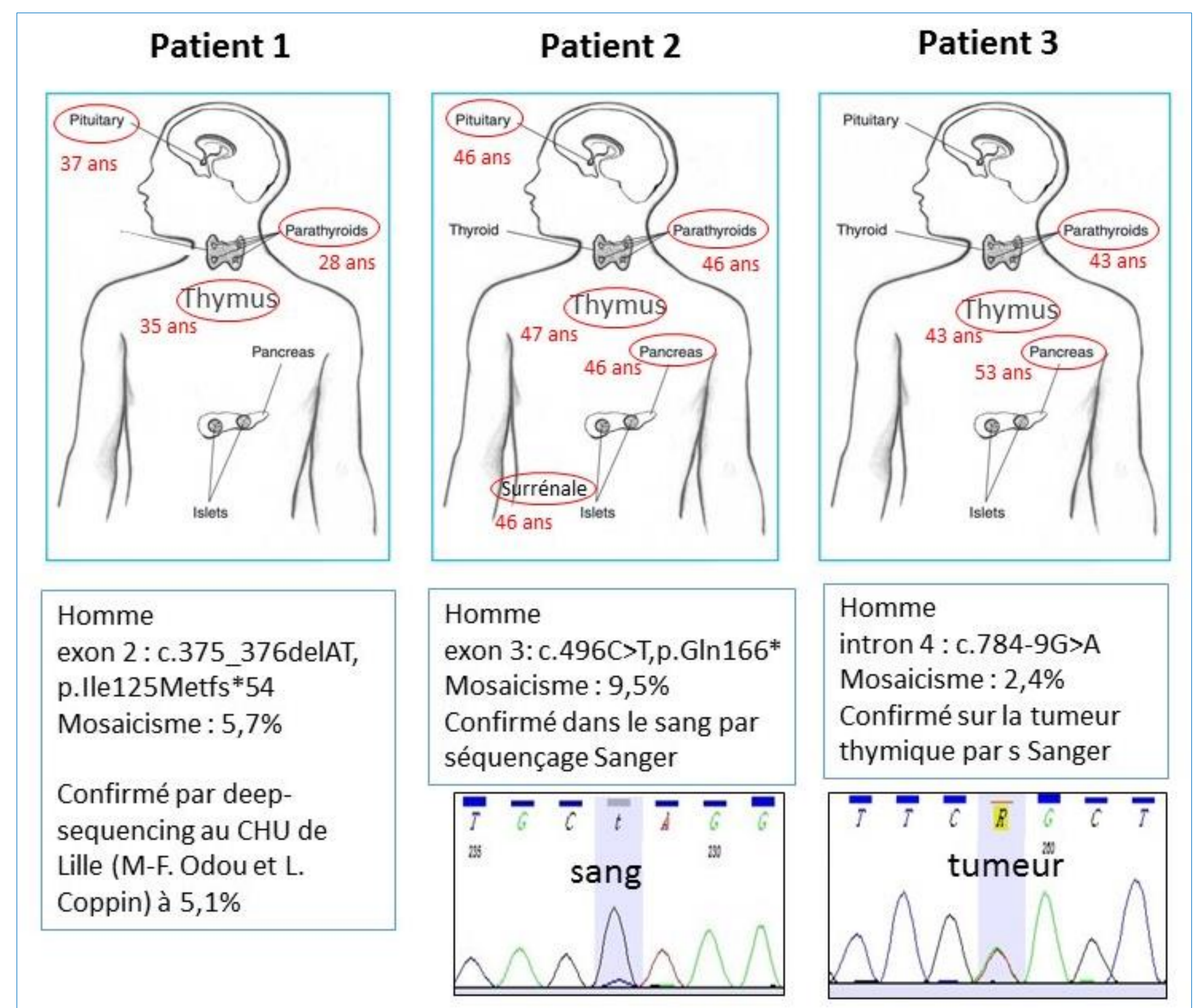


Figure 3 : caractéristiques cliniques et génétiques des patients présentant un mosaïcisme sur le gène *MEN1*

## Conclusion :

Cette méthode d'analyse par NGS incluant les UMIs permet de diminuer le bruit de fond des faux-positifs présents sous les 10 % de fréquence allélique, et ainsi détecter de façon fiable des mutations en mosaïque sur *MEN1* jusqu'à un 1 % à partir de runs de routine (800X en moyenne).

Une première analyse de 49 cas a permis d'identifier 3 cas confirmés de mosaïque sur *MEN1*. Une étude plus large sur des cas de *MEN1* non résolus est en cours.