

**THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 11 décembre 2020  
Par Mme LECIGNE Claire**

---

**Apport des panels de séquençage haut débit ciblé sur le  
diagnostic de différentes formes de surdité héréditaire (formes  
isolées et formes syndromiques)**

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Monsieur le professeur Thierry BROUSSEAU**  
Faculté de Pharmacie, Université Lille

**Directeur de Thèse :** **Madame le Docteur Isabelle FAJARDY**  
Faculté de Pharmacie, Université Lille

**Assesseur(s) :** **Madame le Docteur Claire-Marie DHAENENS**  
Faculté de Médecine, Université Lille  
**Madame le Docteur Catherine VINCENT-DELORME**  
Faculté de Médecine, Université Lille





### Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

03.20.96.40.40 - ☎ : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**





## Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA



## Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

## Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie

M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire

Mme	DUTOIT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie

M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

## REMERCIEMENTS

Au président de jury,

**Le Professeur Thierry Brousseau**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Institut de Biochimie

Centre de Biologie et Pathologie

Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre institut depuis mon premier stage d'externat. Vos conseils et votre soutien ont été très précieux tout au long de mes années d'internat.

À ma directrice de thèse,

**Le Docteur Isabelle Fajardy**

Praticien Hospitalier

Secteur Marqueurs Prédicatifs des Maladies chroniques

Centre de Biologie et Pathologie

Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

Vous avez été la première à me faire découvrir le monde de la génétique. Toujours à l'écoute, vous avez partagé avec moi votre expérience quotidienne et je vous remercie pour votre encadrement et votre disponibilité dans ce travail de thèse.

**Le Docteur Marie-Claire Dhaenens**

Praticien hospitalier

Secteur Génopathies

Centre de Biologie et Pathologie

Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger cette thèse. Soyez assurée de mes sincères remerciements.

**Le Docteur Catherine Vincent-Delorme**

Praticien Hospitalier

Génétique Médicale

Centre de Référence des surdités génétiques

Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour m'avoir fait partager votre point de vue clinique et pour m'avoir conviée à vos consultations. J'espère que l'avenir nous donnera l'occasion de maintenir notre collaboration clinico-biologique.

Je tiens également à présenter mes remerciements aux personnes suivantes :

Aux biologistes du CBP qui m'ont suivie au cours de mon internat et qui m'ont transmis leur savoir avec pédagogie et patience : Isabelle, Lucie, Jaime, Caroline, Catherine, Amel, Sylvie et Nadine.

Aux biologistes d'Hématologie du CH de Lens : Emilie, Christine et Corine.

Aux biologistes de cytogénétique de Jeanne de Flandres : Thomas, Mélanie, Perrine, Elise, Sonia, Catherine et Agnès et à William, mon co-interne.

À Léo, qui a été mon pilier tout au long de l'internat.

À Popo, pour ta bonne humeur et ta spontanéité.

À tous les autres co-internes avec qui j'ai partagé mes stages, mes gardes et mon quotidien : Guigui, Gatien, Maël, Romane, Camille, Ryane, Geoffrey, Benjamin, Augustin, Angèle, Thibault, Doriane, Youssef, Mika et tous les autres.

À toute l'équipe technique du secteur MPMC avec qui ce fût un plaisir de découvrir la génétique : Amandine, Nicolas, Véronique, Malika et Maxence. À Sophie, qui s'est toujours préoccupée de moi comme une mère et a su me conseiller dans les moments les plus importants.

À Anne-Charlotte qui a agi dans l'ombre pendant près d'une année et qui a été une aide précieuse à chaque entrevue.

À Caroline, toujours disponible pour discuter des divers aspects techniques à travers mes stages.

Aux techniciens des secteurs de Biochimie – PTI et d'Immunologie qui m'ont accompagnée avec bienveillance pendant mes quatre années d'internat.

À tous celles et ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail et qui ont pris le temps de lire et de corriger cette thèse : Marin, Maman, Louis, Benjamin et Stéphanie.

À toutes les personnes – biologistes, techniciens, ingénieurs, cliniciens, informaticiens et pleins d'autres - qui m'ont accompagnée et formée au cours de mon cursus.



# Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	19
TABLE DES TABLEAUX.....	23
INTRODUCTION .....	27
<b>I. Physiologie de l'oreille</b>	<b>27</b>
A. Le son et l'oreille .....	27
B. Anatomie et fonctionnement de l'oreille .....	27
<b>II. Surdités héréditaires</b>	<b>32</b>
A. Epidémiologie des surdités héréditaires .....	32
B. Sémiologie des surdités .....	34
C. Diagnostic de la surdité.....	36
<b>III. Surdités isolées, syndromiques ou neuropathies auditives</b>	<b>39</b>
A. Surdités non syndromiques ou isolées .....	39
B. Surdités syndromiques .....	45
C. Neuropathies auditives (NA) .....	52
<b>IV. Le Séquençage génétique</b>	<b>54</b>
A. De la découverte de l'ADN au séquençage haut débit.....	54
B. Le NGS dans le diagnostic des surdités .....	58
C. Apport du bilan génétique dans une découverte de surdité .....	60
D. L'avenir du séquençage : l'exome WES et le génome WGS .....	62
E. Création des filières .....	63
F. Le diagnostic des surdités au laboratoire du CHU de Lille.....	67
<b>V. Objectifs du travail</b>	<b>71</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>73</b>
<b>I. La technique NGS</b>	<b>73</b>
A. Choix de la technique .....	73
B. Extraction de l'ADN.....	73
C. Préparation de la librairie .....	74
D. Amplification clonale .....	75
E. Séquençage.....	78
<b>II. Traitements des données ou « data managing »</b>	<b>80</b>
A. Analyse primaire = « base calling » et fichier .fastQ .....	80
B. Analyse secondaire par GATK.....	81
C. Utilisation d'un double workflow ou pipelines .....	83
<b>III. Interprétation biologique des résultats NGS</b>	<b>84</b>
A. Application de filtres.....	84
B. Classification selon les recommandations de l'ACMG .....	88
<b>IV. Technique Sanger</b>	<b>91</b>
<b>V. Etude des CNV (copy number variations)</b>	<b>92</b>
<b>VI. Étude rétrospective des résultats NGS validés</b>	<b>95</b>

A.	Collecte des dossiers.....	95
B.	Mise au point du panel.....	95
C.	Recueil des données cliniques et génétiques.....	96
D.	Analyse des données.....	96
E.	Analyse des résultats NGS.....	97
<b>RÉSULTATS.....</b>		<b>99</b>
<b>I.</b>	<b>Profil des demandes en France</b>	<b>99</b>
A.	Description de la provenance des demandes.....	99
B.	Description clinique des patients.....	103
<b>II.</b>	<b>Résultats des analyses NGS</b>	<b>105</b>
A.	Généralités.....	105
B.	Taux de positivité.....	105
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>119</b>
<b>I.</b>	<b>Profils des demandes</b>	<b>119</b>
A.	Prescripteurs plus nombreux.....	119
B.	Nombreuses demandes pour des formes syndromiques.....	119
C.	Majorité de surdité de perception.....	120
D.	Caractéristiques cliniques des patients.....	121
<b>II.</b>	<b>Résultats de l'analyse panel NGS-surdité</b>	<b>122</b>
A.	Taux de positivité.....	122
B.	Type de variations génétiques détectées.....	125
C.	Résultats de l'analyse des CNV.....	125
<b>III.</b>	<b>Résultats en fonction de la suspicion clinique initiale</b>	<b>126</b>
<b>IV.</b>	<b>Analyses complémentaires</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>133</b>
<b>I.</b>	<b>Points forts</b>	<b>133</b>
<b>II.</b>	<b>Limites</b>	<b>133</b>
<b>III.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>134</b>
<b>IV.</b>	<b>Perspectives</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>137</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>145</b>

# Table des illustrations

<u>Figure 1</u> : Échelle de niveaux sonores en fonction des intensités en dB .....	27
<u>Figure 2</u> : Vue transversale de l'oreille humaine (2) .....	28
<u>Figure 3</u> : Représentation de l'oreille moyenne (6) .....	29
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de l'oreille interne (7).....	29
<u>Figure 5</u> : Représentation en 3D des différentes parties de l'oreille interne (8,9) .....	30
<u>Figure 6</u> : Photographie en microscopie optique des stéréocils (10) .....	31
<u>Figure 7</u> : Photographie de l'organe de Corti au microscope optique (11).....	31
<u>Figure 8</u> : Proportion des facteurs environnementaux et génétiques dans les surdités neurosensorielles (18) .....	33
<u>Figure 9</u> : Classification des surdités selon la perte auditive (22) .....	34
<u>Figure 10</u> : Arbre diagnostique d'une surdité bilatérale (21) .....	36
<u>Figure 11</u> : Comparaison d'audiogrammes des différentes formes de surdité.....	39
<u>Figure 12</u> : Tomodensitométrie avec présence d'une dilatation de l'aqueduc du vestibule à gauche, absente à droite (31).....	41
<u>Figure 13</u> : Photographies d'anomalies de l'oreille externe (36) .....	47
<u>Figure 14</u> : Patients présentant un syndrome de Waardenburg (39) .....	48
<u>Figure 15</u> : Frise chronologique de la « révolution ADN » (18) .....	54
<u>Figure 16</u> : Coût par génome et par mégabase par année (18).....	56
<u>Figure 17</u> : Comparaison entre la quantité de <i>data</i> générée et leur coût par année (Gb = gigabases) (18) .....	57
<u>Figure 18</u> : Principe de la technologie Nanopore d'Oxford (60) .....	57
<u>Figure 19</u> : Frise historique des gènes identifiés selon la méthode de découverte et avancées du séquençage haut débit (26).....	59
<u>Figure 20</u> : Place des analyses moléculaires dans le diagnostic de surdité .....	61
<u>Figure 21</u> : Carte mondiale du réseau Orphanet (72) .....	65
<u>Figure 22</u> : Parcours des analyses prises en charge par SeqOIA .....	66
<u>Figure 23</u> : Répartition du territoire français entre les plateformes SeqOIA et AURAGEN en fonction de la population (74).....	67
<u>Figure 24</u> : Résultats du taux de positivité de la connexine <i>GJB2</i> au CHU de Lille (n=1774).....	68
<u>Figure 25</u> : Conduite à tenir devant les différents types de variants mis en évidence par technique NGS .....	70

<u>Figure 26</u> :	Principe d'enrichissement par circularisation avec kits Haloplex (81).....	74
<u>Figure 27</u> :	Représentation d'une flowcell (83) .....	76
<u>Figure 28</u> :	Synthèse du brin complémentaire par élongation et élimination du brin initial (83).....	76
<u>Figure 29</u> :	Formation du « pont » (83) .....	76
<u>Figure 30</u> :	Représentation des 2 brins fixés de manière covalente à la flowcell (83)	77
<u>Figure 31</u> :	Formation d'un cluster par « bridge PCR » (83) .....	77
<u>Figure 32</u> :	Cluster contenant un brin d'ADN et son brin complémentaire à gauche et cluster composé uniquement du brin natif à droite (83).....	77
<u>Figure 33</u> :	Représentation de la création des clusters sur la flowcell (84) .....	78
<u>Figure 34</u> :	Lecture de la fluorescence et détermination de la séquence d'ADN par le séquenceur (84) .....	79
<u>Figure 35</u> :	Schéma récapitulatif du séquençage par « synthèse » d'Illumina (84)...	79
<u>Figure 36</u> :	Représentation des fluorescences capturées par le séquenceur à un instant t du séquençage (83) .....	80
<u>Figure 37</u> :	Visualisation d'un fichier .fastQ (85) .....	81
<u>Figure 38</u> :	Visualisation d'un fichier .bam sur le logiciel Alamut Visual.....	82
<u>Figure 39</u> :	Capture écran du fichier .vcf exporté sur Excel .....	83
<u>Figure 40</u> :	Schématisation des grandes étapes bio-informatiques de l'analyse secondaire des données obtenues par NGS.....	84
<u>Figure 41</u> :	Capture écran d'une fenêtre du logiciel Alamut Visual (88).....	85
<u>Figure 42</u> :	.....Outils de prédiction concernant l'épissage sur Alamut Visual	87
<u>Figure 43</u> :	Méthode de sélection des variants candidats .....	90
<u>Figure 44</u> :	Schéma de la technique Sanger (18) .....	91
<u>Figure 45</u> :	Electrophorégramme avant et après automatisation de la lecture.....	92
<u>Figure 46</u> :	Comparaison de la détection des réarrangements géniques via CGH-Array à gauche et via NGS à droite .....	93
<u>Figure 47</u> :	Exemple de résultats de MLPA pour la confirmation d'une délétion : homozygote à gauche et hétérozygote à droite.....	94
<u>Figure 48</u> :	Exemple résultats de qPCR pour la confirmation d'une délétion .....	94
<u>Figure 49</u> :	Carte de France répertoriant la provenance des différentes demandes entre 2014 et 2017 .....	100
<u>Figure 50</u> :	Carte de France répertoriant la provenance des différentes demandes entre 2017 et 2020 .....	100

<u>Figure 51</u> : Répartition des suspicions cliniques (n=1228) .....	101
<u>Figure 52</u> : Syndromes les plus fréquemment suspectés au cours du temps.....	102
<u>Figure 53</u> : Résultats des analyses NGS entre 2014 et 2017 en haut (n=555) et entre 2017 et 2020 en bas (n=674) .....	105
<u>Figure 54</u> : Résultats globaux des analyses NGS entre 2014 et 2020 (n=1229) ....	106
<u>Figure 55</u> : Résultats des panels NGS surdité en fonction de la suspicion diagnostic initiale .....	111
<u>Figure 56</u> : Résultats du panel NGS-surdité dans les suspicions de surdités syndromiques (n=505).....	114
<u>Figure 57</u> : Résultats des panels NGS-surdité en fonction du syndrome suspecté	114
<u>Figure 58</u> : � gauche, taux diagnostic du NGS en fonction du panel de gènes ; à droite, taux diagnostic en fonction du nombre de gènes dans le panel (18)....	124



# Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des surdités en fonction de leur mode de transmission génétique (18) .....	33
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principales formes de surdités isolées à transmission récessive .....	43
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principales formes de surdités isolées à transmission dominante.....	44
Tableau 4 : Principaux syndromes impliquant une surdité neurosensorielle .....	51
Tableau 5 : Avantages et inconvénients : panel de gènes versus WES (66) .....	63
Tableau 6 : Avantages et inconvénients de l'enrichissement par circularisation d'Haloplex.....	73
Tableau 7 : Répartition des demandes en fonction des deux groupes de panel NGS surdité (n=1224) .....	99
Tableau 8 : Répartition des suspicions cliniques au cours du temps.....	101
Tableau 9 : Syndromes les plus fréquemment suspectés (n=513) .....	102
Tableau 10 : Répartition en fonction de leur type de surdité et du temps (n=1228)	103
Tableau 11 : Répartition des patients en fonction de leurs différentes caractéristiques cliniques et au cours du temps .....	104
Tableau 12 : Comparaison des taux de positivité retrouvés en fonction des caractéristiques cliniques des patients avec ceux retrouvés dans la littérature	107
Tableau 13 : Caractéristiques cliniques des patients ayant eu un diagnostic moléculaire positif (n=378) .....	109
Tableau 14 : Caractéristiques des variations mentionnées dans les comptes rendus (n=530).....	110
Tableau 15 : Répartition des résultats des panels NGS surdité en fonction de la suspicion diagnostic initiale .....	110
Tableau 16 : Caractéristiques des résultats NGS pour les suspicions de surdités non syndromiques .....	112
Tableau 17 : Principaux gènes retrouvés dans les suspicions de surdité isolée et nombre de fois où ils ont été rendus aux prescripteurs .....	113
Tableau 18 : Statut du cas index vis-à-vis des variations mentionnées chez les patients ayant une suspicion de surdité syndromique .....	115

Tableau 19 : Caractéristiques des résultats NGS pour les suspicions surdités syndromiques .....	116
Tableau 20 : Principaux gènes retrouvés dans les suspicions de surdités syndromiques et nombre de fois où ils ont été rendus aux prescripteurs .....	117

# Liste des abréviations

**ACMG** : American College of Medical Genetics and Genomics

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ANPGM** : Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire

**AVIESAN** : Alliance Nationale Pour Les Sciences De La Vie Et De La Santé

**BAM** : Binary Alignment Map

**BIAP** : Bureau International d'Audiophonologie

**BOR** : Branchio-Oto-Rénal

**CA** : Conduction Aérienne

**CBP** : Centre de Biologie Pathologie

**CCE** : cellules ciliées externes

**CCI** : cellules ciliées internes

**CCMR** : Centres de Compétence Maladies Rares

**CGH-Array** : Hybridation Génomique Comparative sur micro réseau d'ADN

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CMV** : CytoMégaloVirus

**CNV** : Copy Number Variation

**CO** : Conduction Osseuse

**CRMR** : Centres De Référence Maladies Rares

**dB** : décibel

**ddNTP** : didésoxyribonucléotide

**DFNA** : surdité neurosensorielle isolée autosomique dominante

**DFNB** : surdité neurosensorielle isolée autosomique récessive

**DFNM** : surdité neurosensorielle isolée mitochondriale

**DFNX** : surdité neurosensorielle isolée liée à l'X

**DFNY** : surdité neurosensorielle isolée liée à l'Y

**dNTP** : désoxyribonucléotides

**ECG** : électrocardiogramme

**FSMR** : filières de santé maladies rares

**HCSP** : Haut Conseil de la santé publique

**HUGO** : HUman Genome Organisation

**Hz** : Hertz

**IGV** : Integrative Genomics Viewer

**IRDiRC** : International Rare Diseases Research Consortium

**kDa** : kilodalton

**MLPA** : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

**MPMC** : Marqueurs Prédicatifs des Maladies Chroniques

**NA** : Neuropathie Auditive

**NGS** : Séquençage Nouvelle Génération

**NSAN** : Non-Syndromic Auditory Neuropathy

**OEA** : Oto-Emissions Acoustiques

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ORL** : Oto-Rhino-Laryngologie

**PAM** : Perte Auditive Moyenne

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PEAA** : Potentiels Evoqués Auditifs Automatisés

**PEAP** : Potentiels Evoqués Auditifs Précoces

**qPCR** : PCR quantitative ou PCR en temps réel

**RCP** : Réunion De Concertation Pluridisciplinaire

**SAM** : Sequence Alignment Map

**SAS** : Statistical Analysis System

**SNV** : Single Nucleotide Variant

**STHD** : Séquençage Très Haut Débit

**USIN** : Unité De Soins Intensifs Néonataux

**VCF** : Variant Call Format

**VSI** : Variant de Signification Inconnue

**WES** : Whole Exome Sequencing

**WGS** : Whole genome Sequencing

# INTRODUCTION

## I. Physiologie de l'oreille

### A. Le son et l'oreille

Le son se définit comme une onde se déplaçant dans la matière. Ces vibrations sonores sont caractérisées par une fréquence (en Hz) et par une intensité évaluée en décibels (dB).

La fréquence correspond au nombre de vibrations par seconde : le son est perçu comme aigu si elles sont nombreuses et graves s'il y en a peu.

Un décibel désigne, quant à lui, la plus petite différence de niveau sonore perceptible par l'oreille humaine : il différencie un son « fort » d'un son « faible » (1).

L'oreille est un organe permettant la transmission et la perception des sons. L'oreille humaine est capable d'entendre les sons situés entre 20 et 20 000 Hz mais elle perçoit les sons à partir de 0 dB (seuil d'audition) et les supporte jusqu'à 130 dB (seuil de douleur) (2,3).

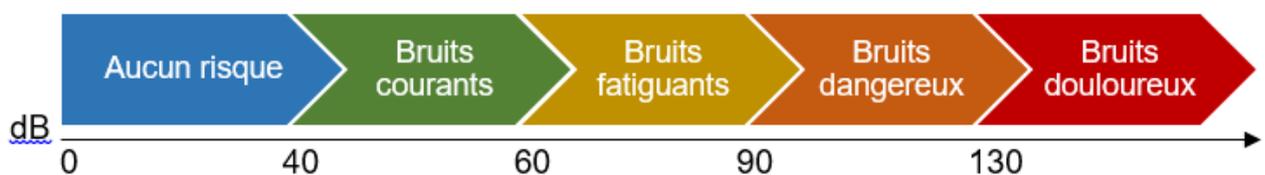
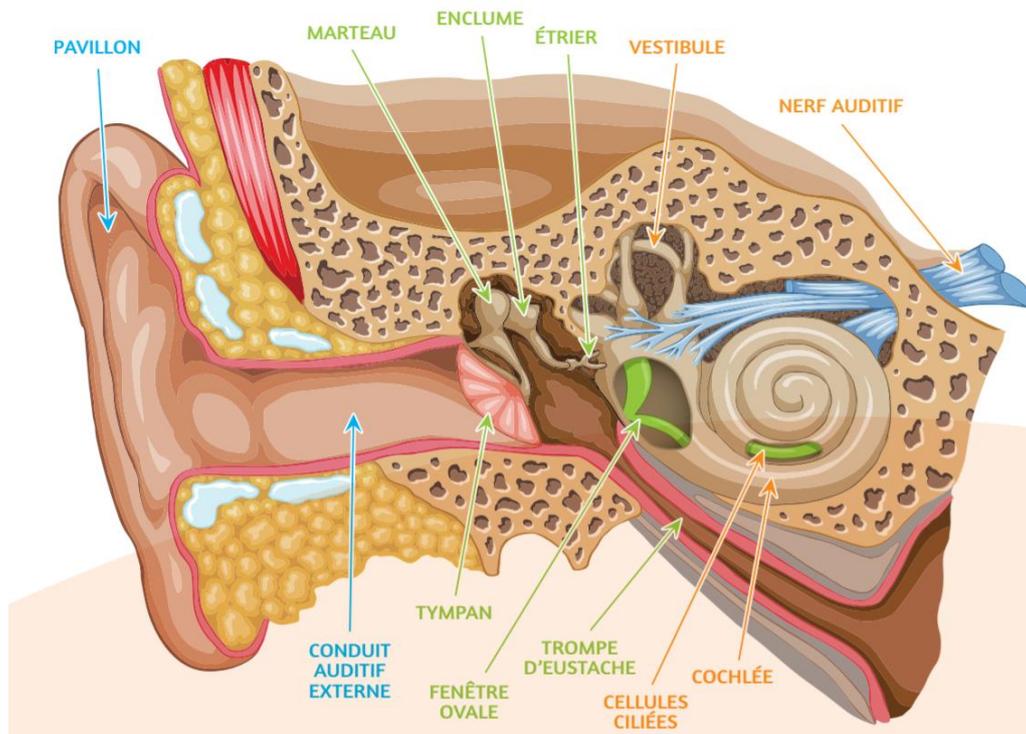


Figure 1: Échelle de niveaux sonores en fonction des intensités en dB

### B. Anatomie et fonctionnement de l'oreille

L'oreille est divisée en trois parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne.



**Figure 2 : Vue transversale de l'oreille humaine (2)**

*En bleu, l'oreille externe ; en vert, l'oreille moyenne ; en orange, l'oreille interne*

### 1. L'oreille externe

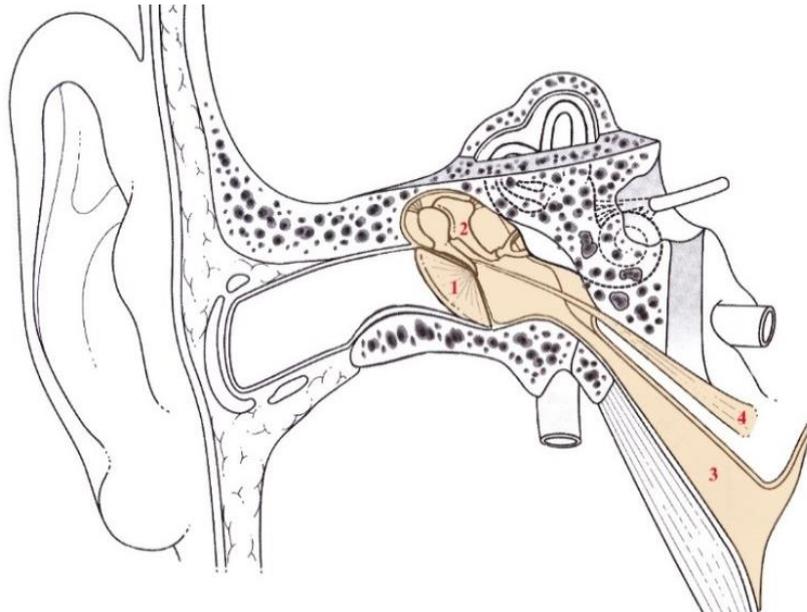
Les sons arrivent au niveau de l'**oreille externe** qui est composée du pavillon, partie visible de l'oreille, et du conduit auditif externe. Ils vont ensuite faire vibrer la membrane tympanique plus communément appelée tympan.

### 2. L'oreille moyenne

Les vibrations sont transmises à l'**oreille moyenne** au niveau de la caisse du tympan. Cette dernière contient la chaîne des osselets, les trois plus petits os du corps humain : le marteau, l'enclume et l'étrier. En réponse à la vibration du tympan, ces os se mettent en mouvement autour d'un axe (4).

De nombreux autres éléments interviennent également pour articuler ces osselets : le ligament antérieur du marteau, le ligament postérieur de l'enclume, le nerf de la corde du tympan et le tendon du muscle tenseur du tympan (5).

Dans l'oreille moyenne se trouve aussi la trompe d'Eustache qui est un conduit faisant communiquer la caisse du tympan avec le pharynx. Il permet d'équilibrer des pressions des deux côtés des tympans (4).

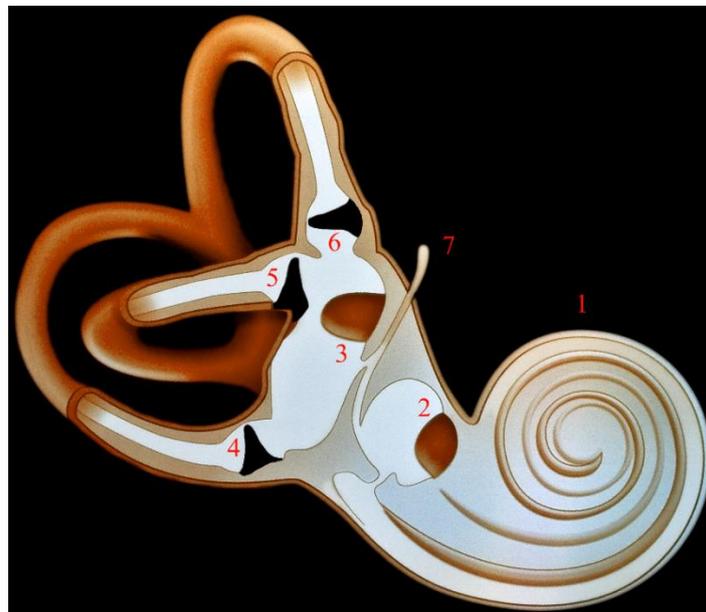


**Figure 3 : Représentation de l'oreille moyenne (6)**

1) Tympan 2) Chaîne des osselets 3) Trompe d'Eustache 4) Muscle du marteau

### 3. L'oreille interne

Les vibrations du tympan sont transmises le long de la chaîne des osselets jusqu'à la base de l'étrier pour arriver au niveau de l'**oreille interne**. Cette dernière est composée du labyrinthe osseux et du labyrinthe membraneux (5).



**Figure 4 : Représentation schématique de l'oreille interne (7)**

1-Cochlée 2-Sacculle 3-Utricule 4-Ampoule du canal postérieur 5-Ampoule du canal externe 6-Ampoule du canal supérieur 7-Canal endolymphatique

### **a. Le labyrinthe osseux**

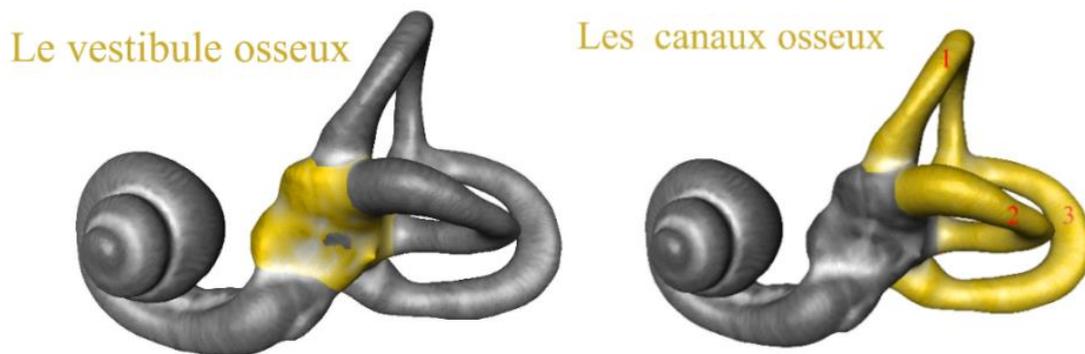
Le labyrinthe osseux est composé de périlymphe, un liquide qui vibre sous l'influence du mouvement de l'étrier. Il est composé de différentes parties :

- Le vestibule jouant un rôle dans l'équilibre ;
- Les trois canaux semi-circulaires : canal externe ou latéral, canal supérieur ou antérieur et canal postérieur ;
- Le labyrinthe antérieur comprenant l'ensemble de la cochlée qui a une forme de limaçon, l'aqueduc du limaçon et le conduit auditif interne.

La cochlée se divise elle-même en deux portions : sa portion ascendante est appelée rampe vestibulaire alors que la portion descendante est appelée rampe tympanique. Le canal cochléaire situé entre les rampes vestibulaire et tympanique contient un autre fluide : l'endolymphe. Deux entités flexibles séparent l'endolymphe de la périlymphe : ce sont la membrane de Reissner et la membrane basilaire. En réponse aux ondes, elles produisent des vibrations qui se propagent le long de la rampe vestibulaire (5).

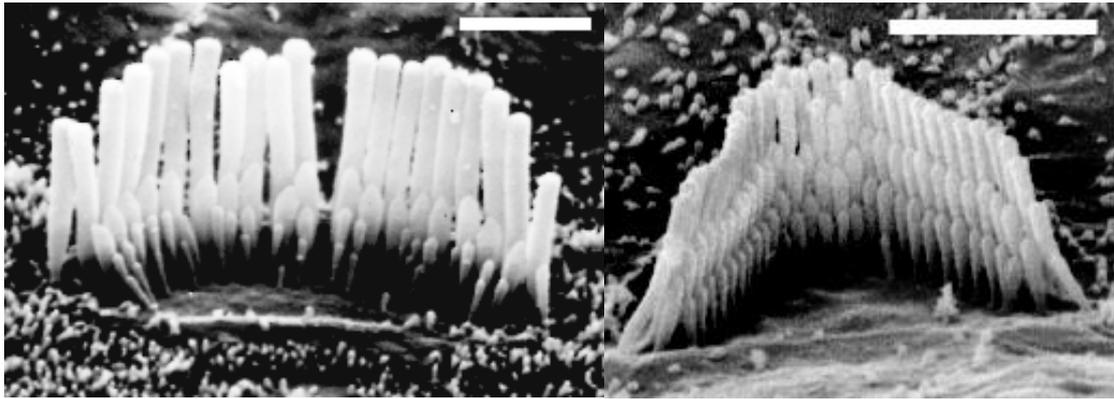
### **b. Le labyrinthe membraneux postérieur et antérieur**

Le labyrinthe membraneux postérieur est composé de deux parties : la première est constituée des canaux semi-circulaires et la deuxième correspond au vestibule osseux, divisé en saccule et utricule.



**Figure 5 : Représentation en 3D des différentes parties de l'oreille interne (8,9)**

Le labyrinthe membraneux antérieur contient la cochlée qui est un organe creux rempli d'endolymphe et tapissé de cellules sensorielles ciliées. Ces dernières sont coiffées de stéréocils, structures filamenteuses groupées et libres de vibrer et de se plier contre la membrane tectoriale pour libérer des neurotransmetteurs (5).

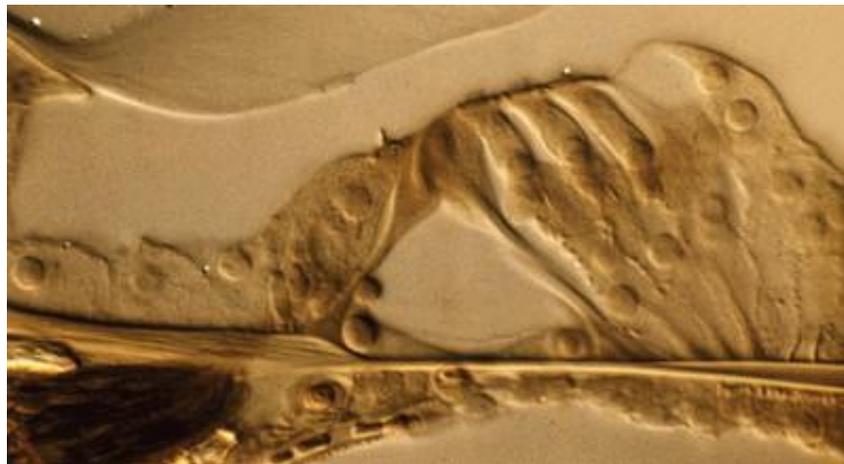


**Figure 6 : Photographie en microscopie optique des stéréocils (10)**

*A gauche : organisation linéaire dans les cellules ciliées internes (CCI) ;*

*A droite : organisation en W dans les cellules ciliées externes (CCE)*

Ces cellules sont disposées le long de la membrane basilaire de façon **tonotopique** : celles qui sont à la base de la cochlée réagissent aux sons les plus aigus alors que celles qui sont à l'apex de la cochlée réagissent aux sons les plus graves. Cet ensemble vient constituer l'organe de Corti, responsable de la transduction auditive correspondant à la transformation du mouvement des cellules ciliées en message électrique. Ce dernier est véhiculé par le nerf auditif vers les régions du cerveau constituant le cortex auditif (4,5).



**Figure 7 : Photographie de l'organe de Corti au microscope optique (11)**

L'ensemble de ces événements est responsable de notre perception acoustique des sons environnants.

## II. Surdités héréditaires

### A. Epidémiologie des surdités héréditaires

La surdité est le handicap sensoriel le plus fréquent (12). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elle touche environ 1 à 2 naissances sur 1000 (12,13) et 1 enfant sur 700 avant l'âge adulte (14). En France, cela représente 800 enfants par an (15).

Les causes de la surdité sont très variables et ont une origine soit environnementale soit génétique. Elles ne sont pas toujours faciles à mettre en évidence à cause de la grande hétérogénéité à la fois clinique et génétique (16). C'est pourquoi de nombreuses surdités restent encore inexplicables malgré les différentes explorations réalisées.

Les dernières estimations montrent que l'environnement est responsable de 20% à 30% des surdités (17). Elles peuvent être la conséquence des étiologies suivantes :

- Prématurité,
- Méningites bactériennes (notamment à pneumocoque),
- Anoxie néonatale,
- Embryofoetopathies (par exemple infection à CMV),
- Traumatismes sonores,
- Médicaments ototoxiques (aminosides, furosémide, sels de platine ou azithromycine).

Entre 60% et 80% des surdités de l'enfant sont expliquées par la génétique (16). Ce taux est en constante augmentation grâce aux nouvelles connaissances et aux progrès techniques. Chez l'adulte, il reste plus compliqué à déterminer mais il est probablement aussi important (14).

Les progrès techniques et les connaissances croissantes en génétique ont permis d'identifier de nombreuses formes génétiques de surdité, impliquant plusieurs centaines de gènes différents (18). Ces gènes sont répertoriés sur la base de données *Hereditary Hearing Loss Homepage*. Cette page spécifique aux surdités héréditaires est régulièrement mise à jour et disponible gratuitement en ligne (19).

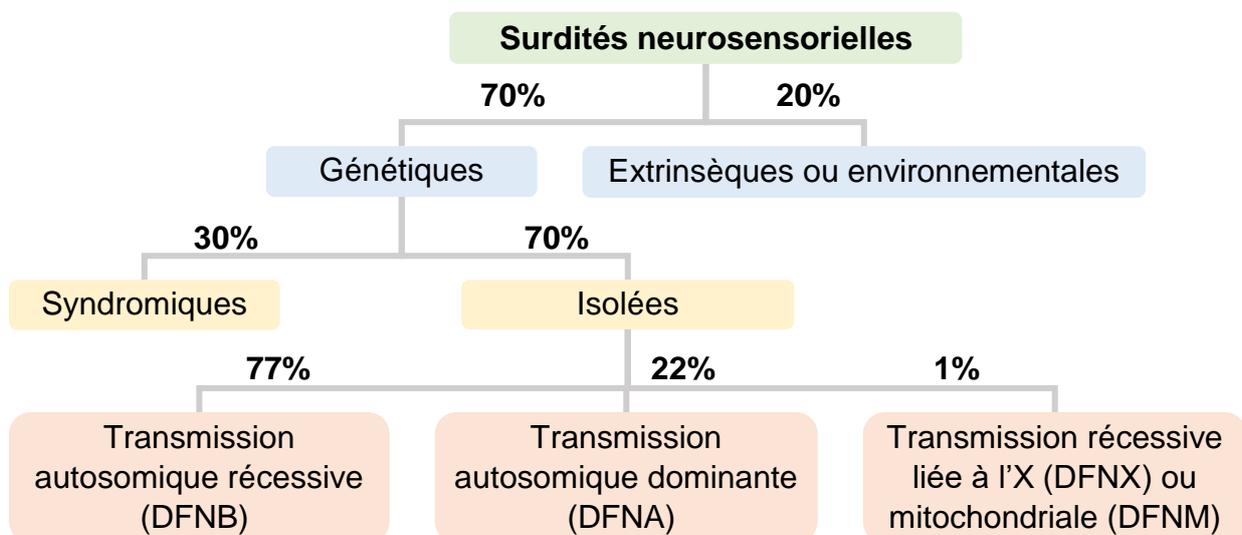
Les modes de transmission génétique sont variés et une nomenclature selon *HUGO Gene Nomenclature Committee Accession* permet de classer les surdités.

Mode de transmission génétique	Pourcentage
Surdité de transmission autosomique récessive (DFNB)	77%
Surdité de transmission autosomique dominante (DFNA)	22%
Surdité de transmission liée à l'X (DFNX)	1%
Surdité de transmission liée à l'Y (DFNY)	<1%
Surdité de transmission liée à l'ADN mitochondrial (DFNM)	<1%

**Tableau 1 : Classification des surdités en fonction de leur mode de transmission génétique (18)**

Les surdités génétiques présentent la particularité d'avoir une relation génotype-phénotype complexe (20). En effet, un même gène possède parfois plusieurs modes de transmission génétique. Il est également possible qu'un gène soit impliqué à la fois dans une forme de surdité isolée et dans une forme syndromique incluant une surdité. Par exemple, le gène *SIX1* est impliqué dans une surdité à transmission autosomique dominante et dans le syndrome BOR. Le gène *COL11A2*, quant à lui, peut avoir un mode de transmission à la fois autosomique dominant ou autosomique récessif.

La majorité des surdités d'origine génétique sont des **maladies monogéniques** (16), c'est-à-dire qu'un seul gène est responsable de la d ficiency auditive et la transmission à la descendance se fait selon le modèle Mendélien. C'est pour cette raison qu'il est important de déterminer le mode de transmission génétique. Le conseil génétique permet alors d'informer les familles du risque de récurrence dans la descendance.



**Figure 8 : Proportion des facteurs environnementaux et génétiques dans les surdités neurosensorielles (18)**

## B. Sémiologie des surdités

Une surdité doit être correctement caractérisée afin de cibler les gènes à analyser et faciliter l'interprétation des résultats. Plusieurs critères permettent ainsi de classer les surdités.

### 1. L'âge d'apparition de la surdité et l'âge au diagnostic

La surdité est qualifiée de congénitale lorsqu'elle est détectée dès la naissance. Avant l'âge de 3-4 ans, le point d'appel est généralement un retard d'acquisition du langage : on parle alors de surdité pré-linguale. À l'opposé, la surdité est considérée comme post-linguale lorsqu'elle est diagnostiquée plus tardivement.

L'âge du diagnostic dépend du retentissement sur le développement du langage qui est lui-même fonction de la sévérité de la surdité. Un retard de diagnostic et donc de prise en charge ont de lourdes conséquences dans le développement du langage. Afin d'éviter cette situation, le dépistage néonatal a été mis en place en France à partir de 2012 (13).

### 2. La sévérité de la surdité

Selon le Bureau International d'Audiophonologie BIAP (16), la sévérité de la surdité est définie par le seuil minimal de perception des sons par l'oreille la moins atteinte : elle est classée de légère à totale (en dB) (21).

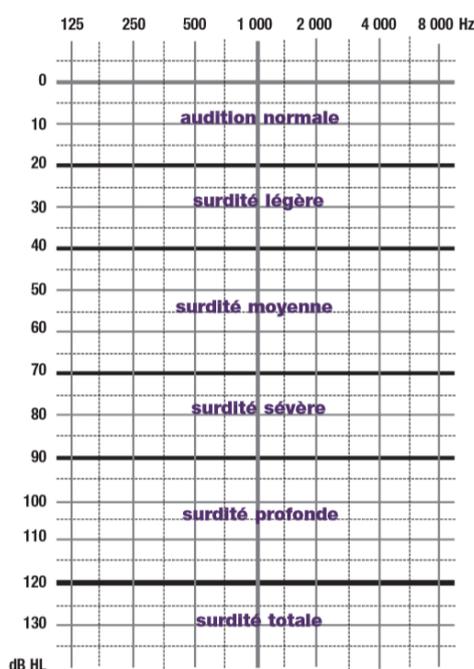


Figure 9 : Classification des surdités selon la perte auditive (22)

### 3. Le caractère stable ou évolutif

Dans la plupart des cas, la surdité débute avec une sévérité qui reste constante au cours du temps mais il est possible d'observer une dégradation plus ou moins progressive au fil des années. L'évolution de la surdité peut aussi être fluctuante ou se faire par poussées.

### 4. Le mode de transmission génétique

Pour rappel, tous les modes de transmission génétique sont observés dans les surdités génétiques (DFNB, DFNA, DFNX, DFNY, DFNM).

### 5. Origine du trouble auditif

#### **a. *Surdités de transmission***

Les surdités de transmission correspondent à une atténuation de l'onde sonore lors de son passage à travers le conduit auditif externe et l'oreille moyenne (21). Elles n'excèdent pas en général 60dB de perte auditive (sévérité légère à moyenne) (22).

La grande majorité d'entre elles sont considérées comme acquises, la plupart étant la conséquence d'otites séreuses (15). La prise en charge consiste en un traitement médical et/ou chirurgical.

#### **b. *Surdités de perception ou neurosensorielle***

Dans les surdités de perception, l'onde sonore arrive jusqu'à la cochlée mais la perception du son est diminuée par une pathologie en aval : il s'agit d'une anomalie de la cochlée, du nerf cochléaire ou des voies centrales de l'audition (21).

La gravité de ces surdités est variable, allant de légère à totale en fonction des patients (15). Les surdités de perception sont les plus fréquemment rencontrées à la naissance (22). Lorsque le diagnostic est établi, une consultation génétique est recommandée afin de réaliser un bilan étiologique.

En termes de traitement, un appareillage est possible dès les trois premiers mois de vie et l'implant cochléaire dès six mois de vie en cas de surdité profonde. La précocité de la prise en charge est importante car il a été démontré que la réhabilitation est optimale quand la chirurgie a lieu avant les 15 premiers mois de vie (15).

### c. Surdités mixtes

Parfois, la surdité est mixte, combinant une surdité de transmission à une surdité de perception c'est-à-dire associant une anomalie de l'oreille externe ou moyenne avec une anomalie de l'oreille interne ou du nerf auditif.

## 6. Surdités syndromiques ou isolées

En fonction des signes cliniques associés, les surdités sont classées en deux groupes : 70% sont des formes isolées non syndromiques et 30% sont des formes syndromiques associant une surdité à des déficits fonctionnels ou à des malformations (18).

## C. Diagnostic de la surdité

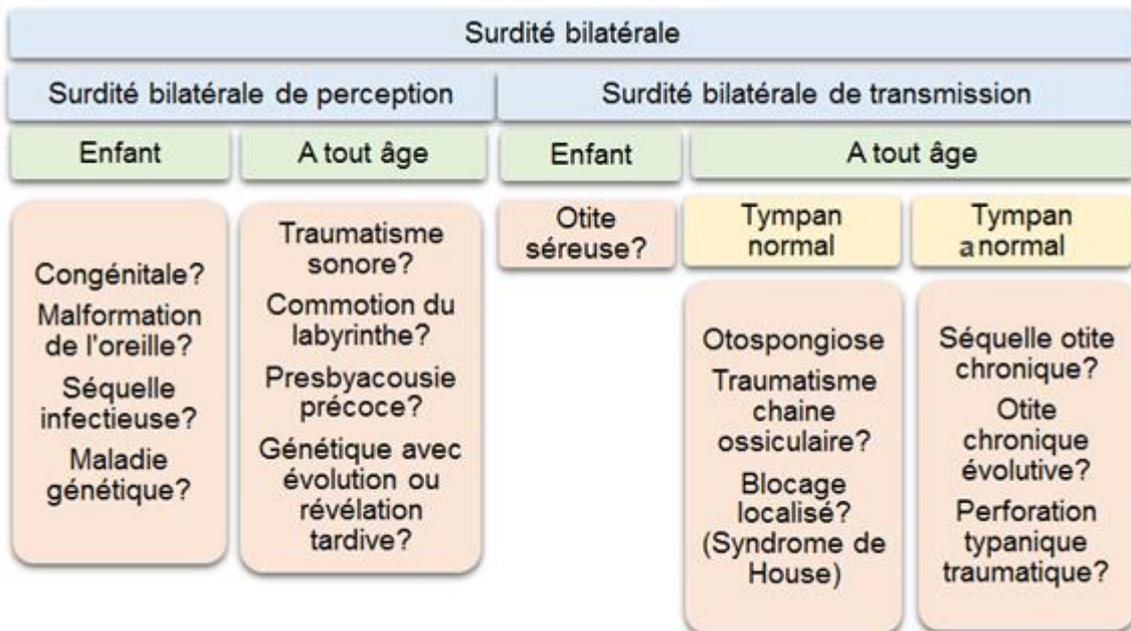


Figure 10 : Arbre diagnostique d'une surdité bilatérale (21)

### 1. Dépistage précoce de la surdité permanente néonatale.

#### a. *Mise en place*

Motivés par l'irréversibilité des séquelles verbales engendrées par la surdité, un groupe de travail de l'HAS (Haute Autorité de Santé) et un programme financé par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie ont été formés en 2004 afin de discuter de l'intérêt d'un dépistage néonatal systématique dans les maternités. Le but de celui-ci est de favoriser un diagnostic et une prise en charge plus rapides de la surdité congénitale bilatérale (23). Suite à ce programme, est apparu l'arrêté du 23 avril 2012,

proposant le dépistage néonatal chez tous les nourrissons à 24 heures de vie et au plus tard avant la fin du troisième mois de vie. En effet, une prise en charge avant l'âge de six mois permet d'améliorer l'acquisition du langage et les capacités de communication de l'enfant.

Avec ce dépistage, environ 1% à 2% des nouveau-nés présentent une réponse anormale. Une vérification dans un centre de référence de diagnostic a lieu avant l'âge d'un mois. Une fois confirmée, la surdité est explorée et caractérisée par des examens complémentaires. Le dépistage précoce de la surdité permanente en période néonatale a ainsi fortement contribué à l'augmentation des demandes d'analyse moléculaire des principaux gènes impliqués par séquençage haut débit (NGS).

### ***b. OEA ou PEAA ?***

Deux méthodes de dépistage de la surdité néonatale sont disponibles à ce jour: les oto-émissions acoustiques OEAs ou les potentiels évoqués auditifs automatisés PEAA. La simplicité de ces examens leur permet d'être réalisés en 15 à 30 min par les sages-femmes, les puéricultrices ou les aides-soignantes. Ils sont effectués pour chaque oreille et les résultats sont exprimés en réponse binaire (15).

Les OEAs peuvent être spontanés ou provoqués par une stimulation du conduit auditif externe. De faibles émissions sonores réflexes au niveau des cellules ciliées externes (CCE) sont alors enregistrées pour obtenir les OEAs. Elles sont considérées comme absentes à partir d'une perte d'audition supérieure à 30 dB. Les faux négatifs sont extrêmement rares (15) mais de nombreux nourrissons doivent être testés une seconde fois à cause du taux élevé de faux-positifs (13).

Les PEAA correspondent à l'enregistrement de l'activité électrique de la cochlée et du nerf auditif. La stimulation se fait par des clics de 35 dB sur des fréquences aiguës entre 2000 et 4000Hz (15). Au-delà de ces seuils, aucune réponse ne sera enregistrée. Contrairement aux OEAs, cette technique présente l'avantage d'être plus fiable et donc de ne pas avoir à recourir à de nombreuses confirmations (<1%). Elle permet aussi de localiser l'atteinte auditive responsable de la surdité. Cependant, son coût initial continue à être relativement élevé à cause du prix des consommables. De plus, elle ne permet pas de réaliser une étude de l'audition fréquence par fréquence et ne prend pas en compte les fréquences graves. Elle reste malgré cela aujourd'hui

l'examen de choix dans les services de néonatalogie et dans les services de réanimation (15).

## 2. Pendant l'enfance

En France, l'audition est surveillée par des examens cliniques prévus sur le carnet de santé: à 4 mois, à 9 mois, à 24 mois puis à 4 ans (13).

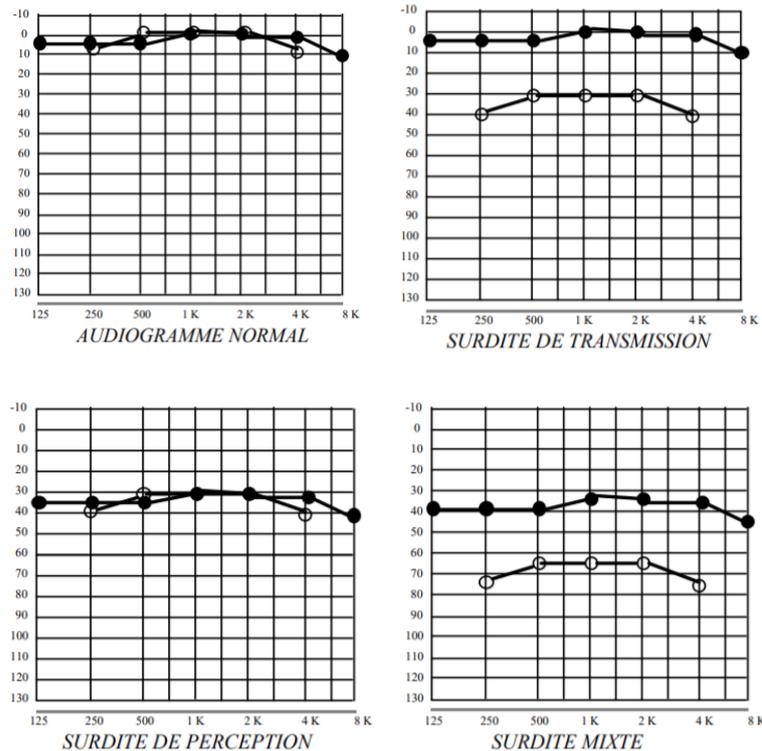
Dès 6 mois de vie, une surdité est évoquée devant l'absence de réaction aux bruits, l'absence d'orientation vers la source sonore ou en cas de troubles du comportement (agressivité, anxiété, apathie). Jusqu'à l'âge de 2 ans, la surveillance de l'audition se fait par le réflexe d'orientation investigation. Le principal point d'appel reste cependant le retard d'acquisition de la parole. Entre 2 et 4 ans, on utilise le test de désignation et/ou la répétition à voix moyenne. Après cet âge, les audiomètres de dépistage deviennent possibles, accompagnés ou non du test de désignation ou de la répétition sans lecture labiale (15).

Une surdité évolutive est suspectée en cas de dégradation du langage. Si des antécédents familiaux sont signalés, une surveillance accrue est recommandée (17).

## 3. Audiométrie tonale et audiogramme

La réalisation d'une audiométrie tonale est nécessaire pour quantifier le type et le degré de sévérité de la surdité. C'est l'examen le plus simple pour mesurer l'audition d'un individu. Pour cela, le patient est isolé avec un casque dans une cabine et chaque oreille est testée séparément pour chaque fréquence (de 125 à 8000 Hz et jusqu'à 120 dB) (24).

Les PAM ou pertes audiométriques moyennes en dB sont mesurées et reportées sur l'audiogramme en fonction des fréquences en Hz (22). Ces seuils auditifs sont définis à la fois en conduction aérienne et en conduction osseuse. La conduction osseuse évalue l'oreille interne et le nerf auditif. Un vibreur est placé sur la mastoïde pour stimuler directement la cochlée. La conduction aérienne, quant à elle, mesure l'ensemble de l'oreille (externe, moyenne, interne et nerf auditif).



**Figure 11 : Comparaison d'audiogrammes des différentes formes de surdité.**  
*Courbe noire = conduction osseuse ; courbe blanche = conduction aérienne (25)*

### III. Surdités isolées, syndromiques ou neuropathies auditives

#### A. Surdités non syndromiques ou isolées

Selon le site *Hereditary Hearing Loss Homepage*, 121 gènes sont impliqués dans les formes non-syndromiques de surdité, dont 49 possédant une transmission autosomique récessive, 76 une autosomique dominante et 5 liée à l'X (19).

De nombreux gènes sont impliqués dans les surdités non syndromiques. Une classification en fonction de leurs *loci* a été établie (16) :

- 64 DFNA, numérotées de DFNA-1 à DFNA-64 (20%)
- 95 DFNB, numérotées de DFNB-1 à DFNB-95 (75%)
- 5 DFNX, numérotées de DFNX-1 à DFNX-5 (2-5%)
- 7 DFNM, numérotées de DFNM-1 à DFNM-7 (1%)
- DFNY

## 1. Formes isolées à transmission récessive

Les formes de surdité isolée touchent 1,33 naissance pour 1000 (26). Chez les enfants âgés de 5 ans, ce chiffre augmente à 2,7 enfants sur 1000 (26). Elles sont généralement pré-linguales, stables et de gravité sévère à profonde (27) (tableau récapitulatif en annexe 1).

### **a. *DFNB1 (MIM #220290)***

La surdité autosomique récessive de type DFNB1 (MIM#220290) est la forme la plus couramment retrouvée parmi les surdités génétiques. Elle est fréquemment causée par la variation c.35delG du gène *GJB2* (Gap Junction protein Beta 2, 26kDa) se situant au *locus* 13q12 et contenant deux exons dont seul le deuxième est codant.

*GJB2* code pour la connexine 26, une protéine transmembranaire s'assemblant en hexamères pour former des connexons. Ces derniers constituent des jonctions communicantes entre les cellules de la cochlée et permettent la circulation des ions potassium. Plus rarement, c'est le gène *GJB6* qui se trouve à proximité du gène *GJB2* qui est impliqué via de grandes délétions.

En France, cette surdité concerne environ 60% des surdités non syndromiques congénitales autosomiques récessives dont 30% à 40% concernant des cas sporadiques, c'est-à-dire les patients sans antécédents familiaux (16).

Cliniquement, il s'agit d'une surdité neurosensorielle congénitale, avec une prédominance sur les fréquences aiguës et stable pour deux tiers des cas (17). Elle est bilatérale et de gravité sévère ou profonde (16). Les courbes audiométriques sont plates ou descendantes (20). Il n'y a pas de malformations au niveau de l'oreille interne, les épreuves vestibulaires et le scanner des rochers sont normaux (16).

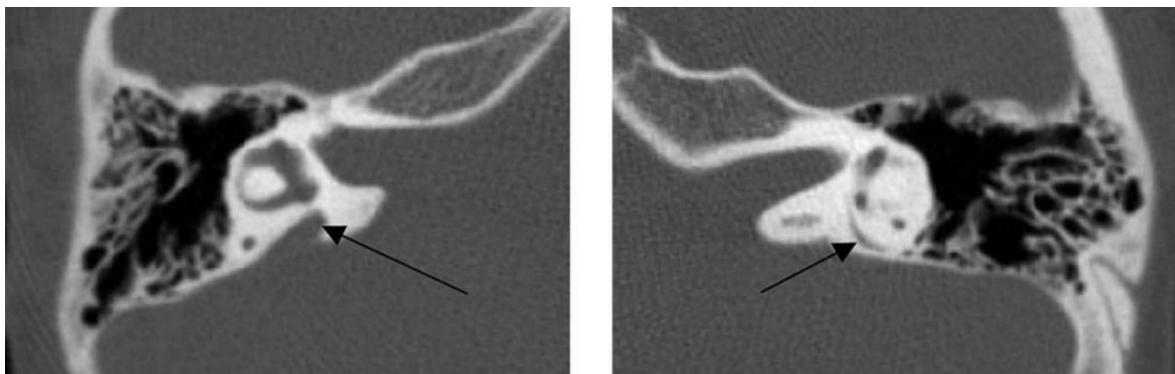
Au niveau génétique, la délétion récurrente c.35delG induit la synthèse d'une protéine tronquée. Elle représente près de 70% des variations du gène *GJB2* détectées en France (16). Ce phénomène peut s'expliquer par la forte prévalence des porteurs hétérozygotes dans la population générale européenne ; elle est estimée entre 2,5% et 4% en France, en Espagne et en Italie (20). Ce pourcentage dépend des ethnies composant les pays : il est beaucoup plus faible dans d'autres pays européen et il est proche de zéro en Asie.

Une détection de cette délétion a été mise en place en routine devenant ainsi l'un des tests moléculaires les plus prescrits. En effet, cette analyse est assez simple à réaliser car le gène *GJB2* ne contient que deux exons. De plus, elle possède un taux diagnostique relativement élevé (28). Lorsqu'il est positif, cet examen affirme l'origine génétique de la surdité et le patient est informé sur le risque de récurrence et le faible risque d'aggravation. Il permet également de préciser un mode de transmission lorsque celui-ci n'est pas évident. Lorsqu'il est négatif, des investigations plus larges peuvent être menées via l'analyse par NGS des panels de gènes ou de l'exome WES (Whole Exome Sequencing).

#### **b. *DFNB4* (MIM #600791)**

Le deuxième gène le plus fréquemment mis en cause dans les surdités récessives isolées est le gène *SLC26A4* (historiquement *PDS*) codant pour la protéine pendrine. Cette forme de surdité est appelée DFNB4 et est retrouvée dans 5% à 6% des cas de surdité. Elle ressemble très fortement au syndrome de Pendred car elle touche le même gène mais ne provoque pas d'atteinte thyroïdienne. La surdité peut avoir une évolution progressive ou fluctuante (16).

Il y a généralement une malformation de l'oreille interne de type dilatation de l'aqueduc du vestibule et/ou une dilatation cochléo-vestibulaire, appelée « malformation de Mondini » (16) : l'imagerie des rochers est fondamentale pour poser le diagnostic car elle oriente le diagnostic génétique. 40% des surdités associées à une malformation de l'oreille interne sont en effet expliquées par des variations dans le gène *SLC26A4* (29). 4 variants sont fréquemment mis en évidence : L236P, T416P, E384G et IVS8+1G>A (30).



**Figure 12 : Tomodensitométrie avec présence d'une dilatation de l'aqueduc du vestibule à gauche, absente à droite (31)**

**c. DFNB9 (MIM #601071)**

Les variations dans le gène *OTOF* codant pour l'otoferline sont aussi couramment retrouvées, notamment la variation Q829X en Espagne (20). Ce gène est impliqué dans le trafic vésiculaire présynaptique des cellules ciliées interne. Il fut longtemps considéré comme une cause majeure des neuropathies auditives. Aujourd'hui certains le considère comme impliquée dans des « fausses neuropathies auditives » car l'implant cochléaire semble tout à fait fonctionner lorsque le gène *OTOF* est touché.

Elles sont responsables d'une surdité pré-linguale, de gravité sévère à profonde. Malheureusement, cette forme de surdité est diagnostiquée tardivement car elle présente la particularité de conserver les OEAs durant les premières années de vie. Elle n'est donc pas mise en évidence lors du dépistage néonatal.

**d. DFNB2 (MIM #600060)**

Le gène *MYO7A* est à la fois exprimé au niveau de l'oreille interne et de la rétine. Ce gène fait parti de ceux ayant une transmission autosomique récessive ou autosomique dominante (DFNA11 et DFNB2). La surdité est pré- ou post-linguale, profonde et stable. Elle est parfois accompagnée d'une rétinite pigmentaire, impliquant le gène *MYO7A* dans le syndrome d'Usher.

**e. DFNB3 (MIM #600316)**

*MYO15A* code pour une protéine associée à la whirlin (codé par *WHRN*) qui permettant l'élongation des stéréocils. La surdité est de transmission autosomique récessive (DFNB3), pré-linguale, sévère à profonde et stable.

**f. DFNB16 (MIM #603720)**

Les variations dans le gène *STRC* sont connues pour être responsables d'une surdité pré-linguale, stable et touchant les fréquences aigües. La délétion complète du gène est très fréquente : elle est retrouvée à 1,6% à l'état hétérozygote dans la population générale européenne (18). Lorsque la délétion emporte avec elle le gène *CATSPER2*, les hommes souffrent alors du syndrome de surdité-infertilité masculine.

**g. DFNB18 (MIM #614945), DFNB22 (MIM #607039) et DFNB28 (MIM #609823)**

Ces trois formes de surdité se manifestent avant l'apparition du langage. Elles sont plutôt modérées si les variations touchent le gène *OTOG* (DFNB18), sévères si elles sont situées sur *OTOA* (DFNB22) et jusqu'à profonde lorsque *TRIOBP* (DFNB28) est en cause. Des troubles vestibulaires ont aussi été rapportés dans la surdité DFNB18.

Gène	Phénotype associé	Particularités du phénotype
<i>GJB2</i>	DFNB1 ou DFNA3	Code pour la connexine 26 (CX26) Surdité congénitale, sévère ou profonde, stable et touchant les fréquences aigües Pas de malformations de l'oreille
<i>MYO7A</i>	DFNB2 ou DFNA11 ou USH1B	Localisée dans les épithéliums pigmentaires, cochléaires et vestibulaires Surdité pré- ou post-linguale, profonde, stable
<i>MYO15A</i>	DFNB3	Protéine associée la whirlin (gène <i>WHRN</i> ) impliquée dans l'élongation des stéréocils Surdité pré-linguale, sévère à profonde, stable
<i>SLC26A4</i>	DFNB4 ou syndrome de Pendred	Surdité pré- ou post-linguale progressive ou fluctuante Variants fréquents : L236P, T416P, E384G et IVS8+1G>A Présence d'une malformation de Mondini
<i>OTOF</i>	DFNB9	Surdité pré-linguale, sévère à profonde, stable OEA conservées les premières années de vie et implant cochléaire efficace : pseudo-NA
<i>STRC</i>	DFNB16	Protéine située dans CCE de l'oreille interne Surdité dans l'enfance, stable, touchant les fréquences aigües Si délétion de <i>CATSPER2</i> , surdité + infertilité masculine = syndrome deafness-infertility
<i>OTOG</i>	DFNB18	Code pour l'otogéline Surdité pré-linguale et modérée Troubles vestibulaires
<i>OTOA</i>	DFNB22	Surdité pré-linguale, modérée à sévère
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	Surdité pré-linguale, sévère à profonde

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principales formes de surdités isolées à transmission récessive**

## 2. Formes isolées à transmission dominante

Les formes à transmission génétique autosomique dominante sont quant à elles plutôt post-linguales et évolutives (tableau récapitulatif en annexe 2).

Dans ce type de transmission, les courbes d'audiométrie sont parfois caractéristiques d'un gène : c'est notamment le cas avec les anomalies du gène *TECTA* qui donnent des courbe « en cupule ». Les liens entre courbe audiométrique et gène impliqué sont répertoriés sur le site « AudioGene v4 : Audioprofiles » et permettent d'orienter la recherche génétique (32).

La surdité DFNA2 (MIM #600101) impliquant les gènes *KCNQ4* ou *GJB3* est la forme la plus fréquente de surdité isolée autosomique dominante. Ce gène est impliqué dans un canal potassium voltage dépendant au niveau des cellules ciliées externes. Les variations faux-sens induisent un effet dominant négatif alors que les délétions provoquent plutôt une haplo insuffisance (30). La surdité débute sur les fréquences aiguës entre 1 an et 30 ans (20). Elle progresse ensuite avec une perte d'environ 1 dB par année avec la présence d'acouphènes (17).

Gène	Phénotype	Particularités du phénotype
<i>KCNQ4</i> <i>GJB3</i>	DFNA2	Surdité dans la première décennie Touchant les fréquences aiguës En moyenne, perte d'un dB par an
<i>MYH14</i>	DFNA4	Surdité pré-linguale, progressive, légère à modérée
<i>MYO6</i>	DFNA22 ou DFNB37	Surdité dans la première décennie, progressive, touchant toutes les fréquences Parfois associée à une cardiomyopathie hypertrophique
<i>TECTA</i>	DFNA 8/12 ou DFNB21	Impliquée dans la structure de la membrane tectoriale Surdité dans la première décennie, de sévérité moyenne, stable ou progressive, touchant les fréquences aiguës
<i>COCH</i>	DFNA9	Cochline située dans la matrice extra-cellulaire de la cochlée Surdité débutant à l'adolescence sur fréquences aiguës Progresse de 3-4dB par an jusqu'à toucher toutes les fréquences et devenir profonde à 60ans

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principales formes de surdités isolées à transmission dominante**

### 3. Forme isolée liée à l'X : DFNX2 (MIM #304400)

Le gène *POU3F4* code pour un facteur de transcription intervenant dans la morphogénèse (20). Il est responsable de la forme la plus retrouvée dans les surdités

isolées liées au chromosome X. Elle concerne 0,5% des surdités sévères de l'enfant (17). Chez les hommes, elle donne une surdité mixte, de gravité sévère à profonde, rapidement progressive, débutant durant l'enfance et associée à une dysfonction vestibulaire. Les femmes souffrent éventuellement d'une surdité mixte isolée.

L'imagerie des rochers montre une dilatation du conduit auditif interne et de la partie cochléo-vestibulaire ainsi qu'une disparition du modiolus (9) (noyau central de la cochlée). Il existe un risque de geysier massif du périlymphe provoquant une cophose (16). La chirurgie de stapédecotomie est donc contre-indiquée dans cette forme particulière et le traitement consiste à la pose d'un implant cochléaire (17).

D'autres gènes situés sur le chromosome X peuvent également être responsables de surdités lorsqu'ils sont touchés par une anomalie : *AIFM1* (*DFNX5*), *COL4A6*, *GPRASP2*, *PRPS1*, *SMPX* et *TBL1X* (voir annexe 3).

## **B. Surdités syndromiques**

Plus de 500 syndromes incluant une surdité ont à ce jour été décrits (14). Le diagnostic est principalement basé sur les symptômes cliniques mais la biologie moléculaire est un argument qui conforte le clinicien. Cependant, un syndrome peut avoir plusieurs *loci* associés et les signes cliniques décrits sont parfois peu constants et peu spécifiques (annexe 4).

### **1. Syndrome d'Usher**

Le syndrome d'Usher se caractérise par une surdi-cécité précoce et évolutive: il associe une surdité congénitale avec une rétinite pigmentaire (33). Des troubles vestibulaires (troubles de l'équilibre) sont également fréquemment rapportés. Le signe d'appel est généralement un trouble de la vision nocturne.

Il existe 3 principaux types de syndrome d'USHER : ils sont tous de transmission autosomique récessive. Cependant, les gènes impliqués sont différents donnant des phénotypes hétérogènes (34).

Le traitement consiste à poser précocement un implant cochléaire bilatérale afin de permettre à l'enfant de développer un langage le plus tôt possible. (16)

Une base de données appelée Ushbase répertoriant tous les variants classés pathogènes et impliqués dans le syndrome d'Usher est accessible depuis 2005 (35).

### - Type I

Il représente un peu moins de 40% des cas et se caractérise par une altération vestibulaire marquée, une surdité congénitale bilatérale profonde et des signes oculaires apparaissant avant l'âge de 20 ans (33). Un syndrome d'Usher de type I est suspecté chez tout enfant souffrant d'une surdité associé à un retard d'acquisition de la marche supérieur à 18 mois (20). L'électrorétinogramme est alors le seul examen prouvant l'absence de rétinite pigmentaire (16).

Au niveau génétique, cinq gènes peuvent être impliqués : *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G* ainsi que le locus *USH1E*.

### - Type II

Il concerne près de 60% des patients et peut être causé par les gènes *USH2A*, *GPR98* (*ADGRV1*) et *DFNB31* (*WHRN*) (33). Il donne une surdité congénitale de gravité moyenne à sévère, stable, mais sans trouble vestibulaire. En comparaison au type I, la rétinite pigmentaire arrive plutôt vers l'âge de 30 ans.

### - Type III

Il est le plus sévère mais le moins fréquent (moins de 3% des cas) (33). Les symptômes apparaissent à l'adolescence voire plus tardivement avec une surdité modérée et progressive avec ou sans trouble vestibulaire et une rétinite pigmentaire progressive pouvant évoluer jusqu'à la cécité. Le gène impliqué dans cette forme s'appelle *CLRN1*.

## 2. Syndrome Branchio-Oto-Rénal (BOR)

La surdité est ici associée à des anomalies de l'oreille externe avec notamment des oreilles mal ourlées ou des enchondromes. Des anomalies de l'oreille moyenne ou de l'oreille interne sont également parfois observées. La surdité peut donc être à la fois transmissionnelle, neurosensorielle, ou mixte. Le développement anormal des arcs branchiaux durant l'embryogenèse a pour conséquence la présence de fentes, de fistules préhélicéennes ou de kystes branchiaux à la naissance (16).

Une échographie rénale permet d'objectiver les anomalies pouvant être responsables d'une insuffisance rénale chronique : malformation de l'arbre urinaire, hypoplasie ou agénésie rénale, dysplasie rénale ou encore kystes rénaux. Lorsque ces anomalies sont sévères et dépistées durant la grossesse, elles constituent une indication pour une interruption volontaire de grossesse (20).



**Figure 13 : Photographies d'anomalies de l'oreille externe (36)**

Les gènes responsables de ce syndrome BOR sont *EYA1* sur le chromosome 8 ou *SIX1* sur le chromosome 14. La transmission génétique se fait selon un mode autosomique dominant et l'expressivité intra-famille et inter-famille est très variable.

### 3. Syndrome de Pendred

La surdité de perception engendrée par ce syndrome est souvent d'origine cochléaire, pré-linguale, de sévérité variable et évolutive (37). La surdité n'est pas profonde d'emblée mais des paliers d'aggravation brutale suivis de phases de récupération souvent partielles entraînent un handicap conséquent et des angoisses pour le patient (16). Un défaut de transport de l'iode au niveau de la glande thyroïde cause l'apparition d'un goitre à l'adolescence (20). Des troubles de l'équilibre sont également décrits.

L'imagerie des rochers montre des anomalies morphologiques de l'oreille interne avec une dilatation de l'aqueduc du vestibule et une cochlée incomplète de type malformation de « Mondini » uni- ou bi-latérale (16).

Ce syndrome se transmet sur un mode autosomique récessif. Il est causé par des variations dans le gène *SLC26A4* sur le chromosome 7, codant pour la pendrine et également responsable de la forme de surdité autosomique récessive DFNB4 (37).

### 4. Syndrome de Waardenburg

Ce syndrome est la cause la plus fréquente de surdité syndromique à transmission autosomique dominante. Il est cependant très hétérogène, aussi bien sur le plan clinique que génétique (38).

La surdité de perception est unilatérale ou bilatérale, pré-linguale, stable et profonde dans 35% des cas (20). Des anomalies génétiques provoquent l'absence de

mélanocytes, les cellules synthétisant les pigments. C'est pourquoi les patients présentent souvent des anomalies de pigmentation : mèche de cheveux blancs frontale, cheveux blancs avant l'âge de 30 ans, hétérochromie irienne, yeux vairons ou d'un bleu très clair, taches de dépigmentation cutanée (16,38). Des dysmorphies faciales sont également observées : dystrophie des canthi internes, synophris, racine du nez proéminente ou hypoplasie des ailes du nez (16,38).



**Figure 14 : Patients présentant un syndrome de Waardenburg (39)**

Il existe 4 grands types de syndrome de Waardenburg :

- **Type I**

Il est causé par des variations du gène *PAX3* situé sur le chromosome 2 et codant pour la protéine *PAX3* (paired box protein). Il est caractérisé par la présence d'une dystopie des canthi (40).

- **Type II**

Il n'y a pas de dystopie canthale mais l'hypoacousie et l'hétérochromie irienne sont plus largement présentes. Le type II est principalement expliqué par des variations dans les gènes *MITF*, *SNAI2* et *SOX10* (41).

- **Type III**

Il est le plus rare et se caractérise par la présence d'anomalies des membres, en plus des autres symptômes classiques du Waardenburg. Les variations dans le gène *PAX3* sont également impliquées dans cette forme (42).

#### - **Type IV**

Le type IV concerne les formes associant un syndrome de Waardenburg avec un syndrome de Hirschsprung. Ce dernier se définit comme un trouble congénital de la motilité intestinale causé par une absence de ganglion dans le côlon terminal. Cette anomalie implique les gènes *EDNRB* et *EDN3*.

### 5. Syndrome de Stickler

Ce syndrome correspond à une atteinte du tissu conjonctif provoquant une arthro-ophtalmopathie héréditaire progressive (43). Le patient présente des manifestations oculaires avec une forte myopie, une cataracte précoce et parfois un strabisme. Il y a également des anomalies oro-faciales avec une séquence de Pierre Robin plus ou moins complètes et des problèmes ostéoarticulaires. La surdité n'est pas toujours présente et sa sévérité est variable (20).

Le syndrome de Stickler est causé par des anomalies des chaînes  $\alpha$  du collagène. Le type 1 est causé par le gène *COL2A1* et le type 2 par *COL11A1*. Des variations dans le gène *COL11A2* donne le type 3 qui se caractérise par une absence d'atteinte oculaire (43).

Il est en général de transmission autosomique dominante. De rares formes autosomiques récessives ont été décrites, impliquant les gènes *COL9A1* et de *COL9A2*.

### 6. Syndrome d'Alport

Le syndrome d'Alport se caractérise principalement par des anomalies rénales avec l'apparition d'une hématurie microscopique puis macroscopique (20). Il y a également une protéinurie, signe de glomérulopathie. L'évolution est progressive jusqu'à atteindre le stade d'insuffisance rénale terminale à un âge estimé entre 30 ans et 50 ans (16). Chez les garçons, les formes sont plus sévères avec une hématurie microscopique dès l'âge de 3 ans alors que les filles présentent des formes plus atténuées avec une hématurie microscopique qui n'apparaît qu'autour de 9 ans. Le diagnostic se fait à partir d'une biopsie rénale qui permet l'observation de la membrane basale glomérulaire en microscopie électronique.

La surdité est en général d'origine cochléaire, post-linguale et progressive pendant la première décennie. Des anomalies oculaires ont également été rapportées.

L'expression phénotypique de ce syndrome est variable et le mode de transmission génétique est différent en fonction du gène impliqué : les variations du gène *COL4A5* codant pour la chaîne alpha 5 du collagène IV seraient responsables des formes à transmission liée à l'X, soit environ 80% des cas.

Concernant les modes de transmission autosomique récessif (15% des cas) et autosomique dominant (5% des cas), ils seraient dus à des mutations dans les gènes *COL4A3* et *COL4A4* codant respectivement pour les chaînes alpha 3 et 4 du collagène de type IV (44). Ces formes particulières touchent aussi sévèrement les filles que les garçons.

Syndromes de transmission autosomique récessive		
Gènes impliqués	Type de surdité	Autres signes cliniques
<b>Syndrome d'USHER</b>		
<u>Type I</u> : MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G, USH1E	Congénitale, profonde et stable	Rétinite pigmentaire évolutive et troubles de l'équilibre (retard d'acquisition de la marche)
<u>Type II</u> : CPR98 et DFNB31, USH2A	Congénitale, moyenne à sévère, stable	
<u>Type III</u> : CLRN1	Evolution progressive à partir de l'adolescence	
<b>Syndrome de Pendred</b>		
SLC26A4	Pré-linguale, sévérité variable et évolution par paliers	Goitre thyroïdien, troubles de l'équilibre, malformation de Mondini
<b>Syndrome de Jervell et Lange Nielsen</b>		
KCNQ1 ou KCNE1	Congénitale et profonde	Allongement QT, mort subite
Syndromes de transmission autosomique dominant		
<b>Syndrome BOR</b>		
Eya1 ou SIX1	Surdité de transmission, de perception ou mixte	Anomalies de l'oreille externe et des arcs branchiaux, anomalies rénales
<b>Syndrome de Waardenburg</b>		
Types I et III : PAX2 Type II : MITF, SNAI2, SOX10	Pré-linguale, stable et profonde	Anomalies de la pigmentation (cheveux blancs, hétérochromie irienne) et dysmorphie faciale
<b>Syndrome de Stickler</b>		
Type I : COL2A1 Type II : COL11A1 Type III COL11A2	Sévérité variable	Arthro-ophtalmopathie  Type III : pas d'atteinte oculaire
Syndromes à transmission génétique variable : syndrome d'Alport		
Lié à l'X : COL4A5  Autosomique récessif : COL4A3  Autosomique dominant : COL4A4	Post-linguale Progressive	Anomalies rénales (protéinurie) +/- oculaires

**Tableau 4 : Principaux syndromes impliquant une surdité neurosensorielle**

## **C. Neuropathies auditives (NA)**

### **1. Définition**

Les neuropathies auditives, appelées également désynchronisations auditives, sont des formes particulières de surdité, caractérisées par une désynchronisation des influx nerveux au niveau du nerf cochléaire (45).

Ce phénomène est la conséquence d'une atteinte sélective des cellules ciliées internes CCI ou de la synapse entre ces CCI et le nerf cochléaire. Il est également possible d'observer une atteinte du nerf auditif, des neurones du ganglion de Corti ou encore des voies auditives du tronc cérébral.

### **2. Epidémiologie**

Chez les personnes atteintes de déficience auditive, la prévalence de ces neuropathies auditives est estimée entre 4 et 11 % des surdités congénitales. Selon la HAS, elle serait dix fois plus importante chez les enfants ayant effectué un séjour en unité de soins intensifs néonataux USIN (13).

Cependant, la méconnaissance clinique et le manque de systématisation des tests objectifs laissent penser que cette prévalence est aujourd'hui fortement sous-estimée.

### **3. Principaux gènes impliqués**

Parmi les patients atteints de NA, 8 sur 10 présentent des polyneuropathies, majoritairement des atrophies optiques, traduisant un phénomène de dégradation neuronale périphérique plus générale.

Tout comme dans les surdités « classiques », les neuropathies auditives sont divisées en neuropathies auditives syndromiques ANSD (*auditory neuropathy spectrum disorder*) et en neuropathies auditives isolées appelées NSAN (*non-syndromic auditory neuropathy*).

La forme syndromique la plus décrite est la maladie de Charcot-Marie-Tooth impliquant le gène *MPZ* ou *CMT1* (myelin protein zero). Ce syndrome de transmission autosomique dominant est défini comme étant une neuropathie héréditaire sensitivo-motrice. Il est associé à une atrophie optique et touche les gaines de Schwann.

Le syndrome de Mohr Tranebjaerg-Jensen est caractérisé par une neuropathie congénitale profonde et une atrophie optique sévère et progressive dès l'adolescence.

Des troubles comportementaux et psychiatriques, un retard des acquisitions et des neuropathies périphériques ont également été décrits. Ce syndrome touche les hommes car il est causé par le gène *TIMM8A*, situé sur le chromosome X.

Dans les formes isolées, le gène de l'otoferline *OTOF* peut être impliqué via son implication dans le transport des vésicules pré-synaptiques dans les CCI (locus DFB9). Il possède une transmission autosomique récessive.

Au niveau mitochondrial, le gène *OPA1* codant pour une protéine membranaire est aussi responsable de neuropathie auditive associée à une atrophie optique. Le mode de transmission décrit est de type autosomique dominant. *TMEM126A* codant pour une protéine transmembranaire est impliqué dans les neuropathies auditives de transmission autosomique récessive associée à une atrophie optique plus précoce et plus sévère que celles causées par les variations dans *OPA1*. Enfin, sept familles ont été décrites avec des variations dans le gène *FDXR* qui intervient dans l'homéostasie du fer. Elles présentent des neuropathies auditives autosomiques récessives plus ou moins associées à une atrophie optique. À cause du dysfonctionnement mitochondrial, des cardiopathies et des neuropathies périphériques ont également été rapportées pour *OPA1*, *TMEM126A* et *FDXR*.

#### 4. Diagnostic et prise en charge

La suspicion de NA commence généralement par des résultats paradoxaux entre l'audiométrie vocale et l'audiométrie tonale. En effet, les otoémissions acoustiques spontanées et provoquées (OEAP) sont normales, preuve que les cellules ciliées externes sont fonctionnelles. Par contre, les potentiels évoqués auditifs précoces (PEAP) sont très altérés voire absents. Cela signifie que les patients distinguent correctement les sons ambiants mais leur compréhension du langage est altérée. Les scores d'intelligibilité sont donc toujours plus dégradés que ce que laissent penser les seuils obtenus en audiométrie tonale.

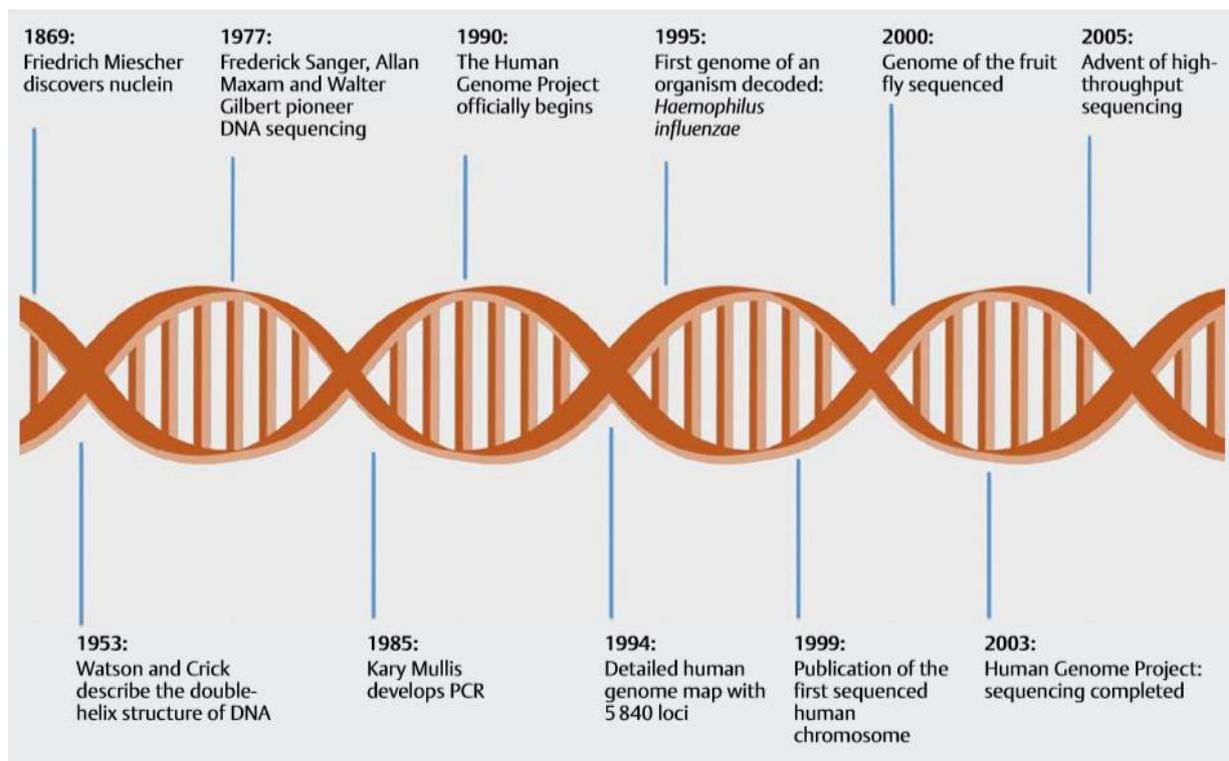
Du fait des étiologies très variables, les caractéristiques cliniques des surdités liées aux neuropathies auditives sont extrêmement hétérogènes : hypoacousie de perception de sévérité variable allant de légère à profonde, généralement bilatérale (mais des neuropathies auditives unilatérales ont déjà été décrites dans la littérature), prédominant sur les fréquences graves avec des niveaux de seuil fluctuants selon les tests et évoluant dans le temps.

Les appareils auditifs conventionnels sont rarement efficaces et l'implant cochléaire ne fonctionne que s'il permet de renforcer le synchronisme des neurones auditifs. Il faut donc que ces derniers soient indemnes afin de répondre correctement à la stimulation électrique.

## IV. Le Séquençage génétique

### A. De la découverte de l'ADN au séquençage haut débit

#### 1. La « révolution ADN »



**Figure 15 : Frise chronologique de la « révolution ADN » (18)**

Les premières notions d'hérédité ont été pour la première fois rapportées par Gregor Mendel et ses petits pois (46). Il donne ainsi son nom aux lois mendéliennes, encore utilisées aujourd'hui pour décrire les modes de transmission des maladies héréditaires.

L'histoire de la génétique se poursuit par la mise en évidence d'une substance inconnue présente dans les leucocytes et appelée nucléine par Friedrich Miescher en 1869 (47). À partir de ce moment, les découvertes sur l'ADN humain se multiplient : Walther Flemming initie l'étude des chromosomes, Wilhelm Johannsen invente le mot

« gène » et les notions de « phénotype » et de « génotype » (48). La structure en double hélice de l'ADN a ensuite été mise en évidence en 1953 par le britannique Francis Crick et l'américain James Watson (49). Ces derniers préciseront par la suite l'ensemble de la structure chimique sucres-phosphates de l'ADN.

Les premières véritables analyses de cytogénétiques deviennent possibles en 1959 avec la découverte de l'implication des chromosomes humains en pathologie, notamment dans le syndrome de Down (plus couramment connu sous le nom de trisomie 21).

En 1977, Frederick Sanger, Allan Maxam et Walter Gilbert réalisent une avancée majeure en mettant au point des méthodes de séquençage de l'ADN (50,51). La technique Sanger présente l'avantage d'être rapide et moins toxique que celle de Maxam et Gilbert. Elle reste encore aujourd'hui la technique de référence en séquençage (52). Cependant, depuis sa création, les nucléotides ne sont plus marqués par radioactivité mais par des fluorochromes émettant à des longueurs d'onde propres à chaque type de nucléotide.

La PCR (Polymérase Chain Reaction), c'est-à-dire l'amplification en chaîne par polymérase, est conçue en 1985 par Kary Mullis (53). Elle permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN, ouvrant ainsi de nombreuses possibilités en biologie moléculaire.

En 1994, une première carte du génome humain contenant 5840 *loci* est disponible (54). Le séquençage du premier génome d'*haemophilus influenzae* est réalisé en 1995 puis celui de *drosophila melanogaster* en 2000 (55).

## 2. Human Genome Project

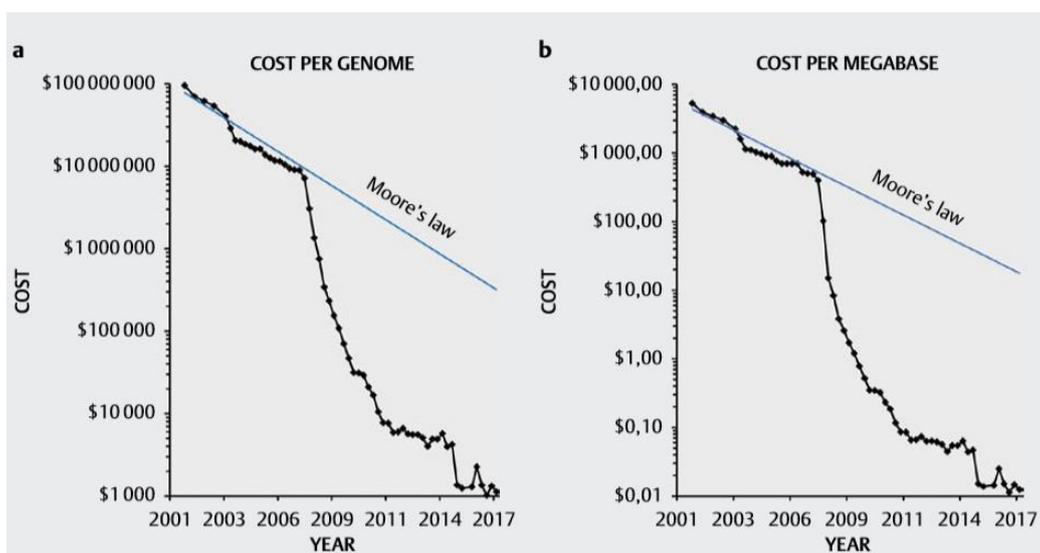
À partir de 1990, le séquençage complet du génome humain appelé Human Genome Project a débuté grâce à la mise en place de la technique de séquençage Sanger. Il a fallu 15 ans et un budget de 3,7 milliards de dollars pour que ce projet collaboratif international se termine en 2003. Une ébauche de la séquence d'ADN pouvant servir de « séquence de référence » est disponible avec 2 ans d'avance par rapport à la date initialement prévue (26). Au total, 3,25 milliards de nucléotides ont été séquencés, composant les quelques 25 000 gènes du génome humain et représentant seulement 1,2% du génome (56).

### 3. L'émergence du séquençage haut débit ou séquençage de nouvelle génération (NGS)

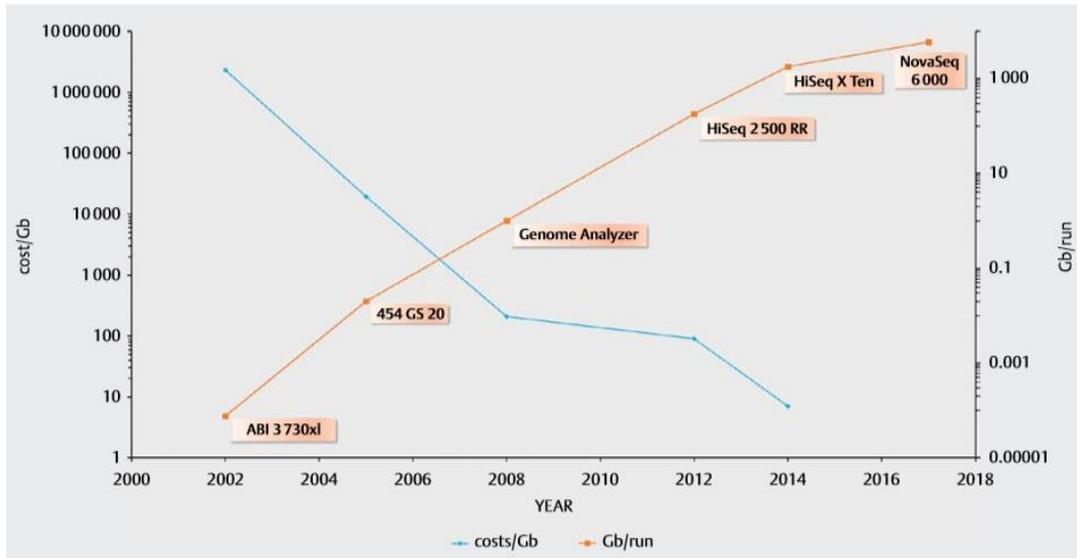
En 2005, pour augmenter la vitesse et le rendement, le groupe George Church a mis au point la méthode de séquençage haut débit ou séquençage nouvelle génération (NGS) : c'est ainsi qu'il a été possible d'étudier plusieurs gènes simultanément chez différents patients (57). Cela a aussi eu l'avantage de diviser le coût du séquençage par 9 par rapport à la technique Sanger. La méthode NGS a ainsi été élue méthode de l'année en 2007 (58).

Différentes techniques de NGS ont vu le jour depuis. La plus utilisée de nos jours est le séquençage par synthèse du laboratoire Illumina. On peut parfois retrouver le pyroséquençage développé par le laboratoire Roche ou encore la ligation et la détection d'ions H<sup>+</sup>, toutes les deux mises au point par le laboratoire Thermofisher. De plus, la technique NGS n'a cessé de s'améliorer, avec des séquences analysées de plus en plus longues et d'une qualité croissante. Ces progrès ont permis l'essor du NGS, le propulsant sur le devant de la scène en matière de séquençage.

Le séquençage d'un génome humain par NGS est devenu possible en moins de 20 heures et pour un coût inférieur à 1000 dollars. Selon les études, la puissance informatique est multipliée par 2 tous les 2 ans et le coût du séquençage est quant à lui divisé par deux. Si cette progression continue, un génome humain coûterait moins de 100 dollars d'ici une dizaine d'années (59).

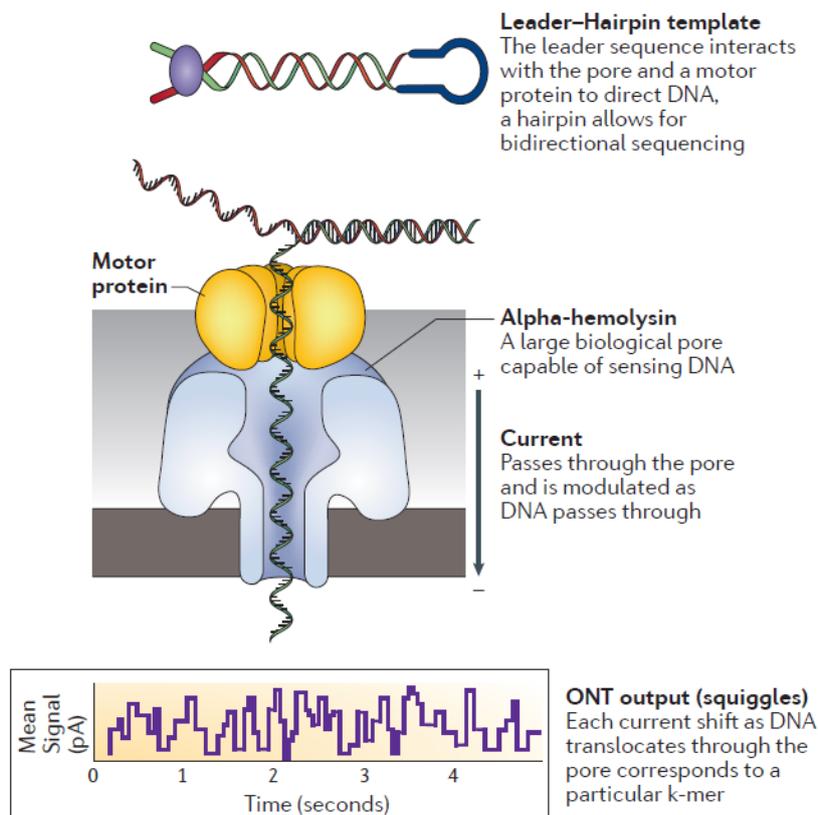


**Figure 16 : Coût par génome et par mégabase par année (18)**



**Figure 17 : Comparaison entre la quantité de *data* générée et leur coût par année (Gb = gigabases) (18)**

Aujourd'hui, de nouvelles méthodes de séquençage appelées « séquençage de troisième génération » basées sur l'étude de longs fragments d'ADN sont en cours de développement par Illumina et Oxford Nanopore (60).



**Figure 18 : Principe de la technologie Nanopore d'Oxford (60)**

#### 4. Analyse des panels de gènes par NGS

Aujourd'hui, la stratégie de séquençage la plus répandue est basée sur l'étude d'un panel de gènes aussi appelé la capture d'exons. Dans la majorité des cas, un panel correspond à une thématique ou à un type de pathologie (ex : panel de gènes sur les surdités héréditaires). La création d'un panel de gènes demande une grande réflexion en amont sur le choix des gènes étudiés : il faut intégrer des gènes pouvant expliquer la pathologie sans intégrer des gènes générant des résultats peu significatifs. Ils sont sélectionnés en fonction de leur description dans la littérature et de leur implication dans la pathologie. Dans les maladies récessives, l'étude de famille consanguine peut aussi être un des moyens de découvrir l'implication de nouveaux gènes.

La taille de ces panels a tendance à croître mais reste très dépendante des besoins cliniques. En effet, le nombre de gènes analysés est proportionnel au risque d'identification de variants de signification inconnue (VSI) ou de découvertes fortuites, allongeant ainsi significativement le temps d'analyse biologique. Une découverte fortuite est la mise en évidence, par hasard et sans lien direct avec l'indication prescrite, d'une variation pathogène dans un gène présentant un intérêt médical c'est-à-dire nécessitant une prise en charge. Aujourd'hui, selon les recommandations de l'ACMG, 57 variants doivent être communiqués au prescripteur même s'ils sont de « découverte incidentale ». Il faut donc trouver le bon équilibre pour avoir un panel donnant un bon ratio diagnostique en minimisant les VSI et les découvertes fortuites.

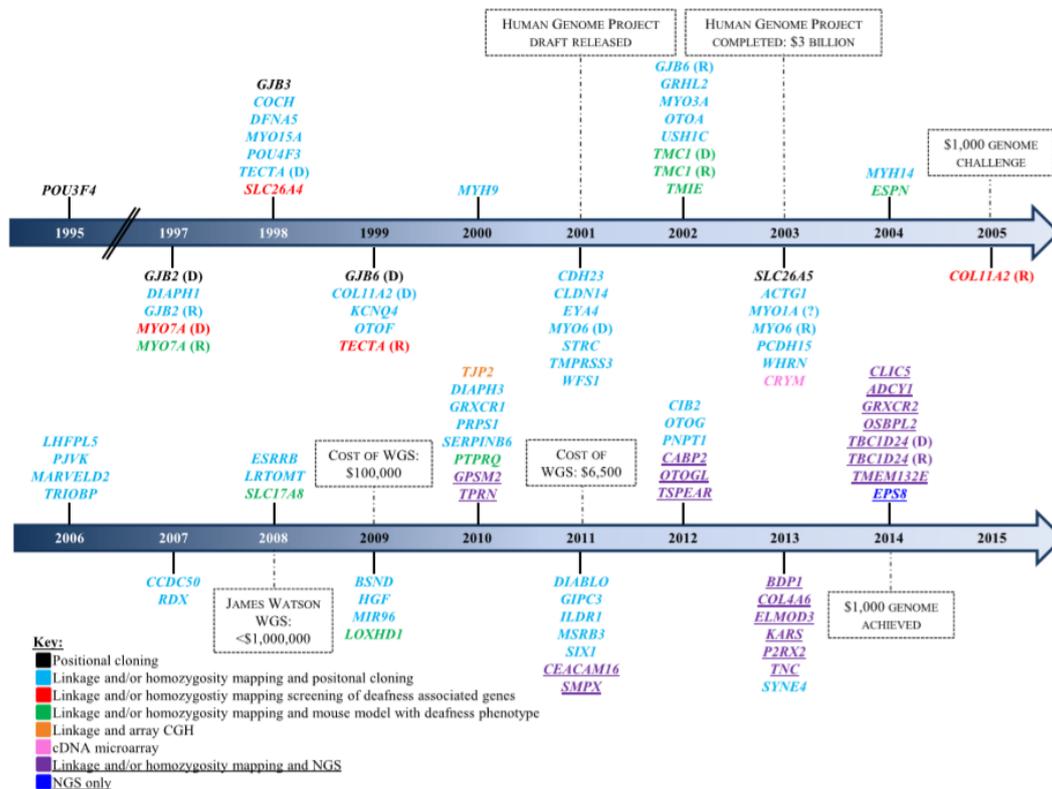
### **B. Le NGS dans le diagnostic des surdités**

#### 1. Identification des gènes de surdité

L'implication de la variation c.35delG de *GJB2* a pour la première fois été mise en évidence dans une famille pakistanaise en 1977 (61). De nombreux gènes ont ensuite été étudiés et leur lien avec la surdité a été établi. Depuis 2005, l'utilisation du NGS a permis l'identification de nouveaux gènes responsables de surdité (62).

Désormais utilisé en routine dans le diagnostic des surdités, l'analyse des panels de gènes par NGS possède un taux de positivité entre 10% et 83% (en moyenne 41%) en fonction de la taille du panel utilisé (63). 6000 variations différentes dans plus de 150 gènes ont été répertoriées en 2017 (64). Grâce aux progrès théoriques et

techniques, ce chiffre augmente constamment et continuera probablement à croître. De nouveaux gènes continuent encore aujourd'hui d'être impliqués dans les surdités héréditaires, venant étayer les panels de gènes NGS-surdité qui voit leur taille grandir d'année en année.



**Figure 19 : Frise historique des gènes identifiés selon la méthode de découverte et avancées du séquençage haut débit (26)**

## 2. Particularités des surdités héréditaires

Les découvertes des variations génétiques se basent sur la comparaison des individus sains avec les individus malades et sur la répétition de leurs variations pour faire le lien génotype-phénotype (18). Cependant, ce lien n'est pas toujours très clair dans les surdités, notamment lorsque la pénétrance n'est pas complète ou quand il y a un chevauchement phénotypique. Le patient ne présente pas forcément le phénotype habituellement associé au gène ou n'est pas reconnu par le clinicien. De plus, l'éthnie est à prendre en considération car les variants retrouvés sont différents : il y a, par exemple, très peu de porteurs de la délétion *GJB2* c.35delG en Asie.

Aujourd'hui, les recherches se sont essentiellement concentrées sur des causes monogéniques mais des combinaisons de variants impliqués dans les mêmes voies

physiologiques ont également été décrites. Par exemple, le promoteur du gène *SLC26A4* contient un élément de régulation transcriptionnelle se fixant sur le gène *FOX11*. En conséquence, des variations dans cet élément de régulation ou dans le gène *FOX11* peuvent être responsables d'un syndrome de Pendred ou d'une surdité isolée de type DFNB4 (30).

Certains variants, classés comme pathogènes à leur découverte, ont vu leur classification se modifier suite à leur découverte chez un trop grand nombre de sujets asymptomatiques : c'est notamment le cas du variant *GJB2* M34T, dont la pathogénicité a été révisée à plusieurs reprises mais reste très controversée .

Dans le cas des surdités à transmission autosomique récessive, il a été rapporté la notion de porteur sain, c'est-à-dire des patients ayant un statut hétérozygote pour un variant pathogène : il est donc asymptomatique mais transmet ce variant pathogène à sa descendance selon le modèle mendélien.

### **C. Apport du bilan génétique dans une découverte de surdité**

Lorsqu'une surdité neurosensorielle est diagnostiquée, il est recommandé de réaliser un bilan étiologique. Celui-ci comprend un interrogatoire détaillé ainsi qu'une audiométrie chez le cas index et sa fratrie. Une tomodensitométrie des rochers est également conseillée afin de visualiser une malformation de l'oreille (par exemple, une malformation de Mondini) (22).

Des examens complémentaires sont prescrits afin de chercher une forme syndromique : par exemple, un examen thyroïdien et une bandelette urinaire pour le syndrome d'Alport et BOR. Il faut aussi une consultation ophtalmologique régulière pour le syndrome d'USHER et de Stickler (17,22). Un ECG est également réalisé pour éliminer un le syndrome Jervell et Lange-Nielsen (allongement de l'espace QT responsable de morts subites) (20).

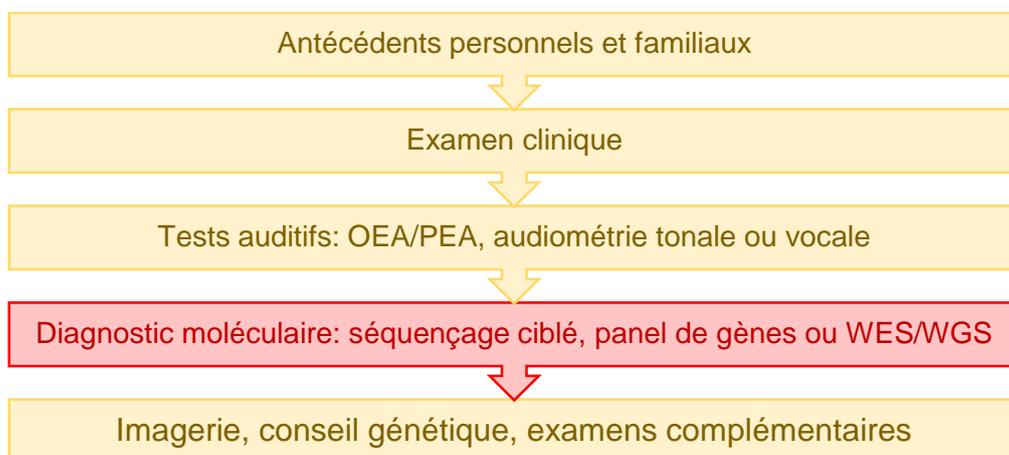
Cependant, l'ensemble de ces examens ne suffisent pas pour affirmer avec certitude l'origine génétique de la surdité. Une consultation génétique et un bilan génétique sont donc proposés pour rechercher des variations pathogènes dans les gènes les plus fréquemment impliqués dans les surdités. Lorsqu'une variation pathogène est identifiée, cela permet au patient de mettre un nom sur l'étiologie de sa surdité. Il est également possible de prédire le pronostic et l'évolutivité des signes cliniques (18).

Si l'anomalie mise en cause est impliquée dans une forme syndromique, des examens complémentaires spécifiques sont réalisés et une surveillance accrue des complications est mise en place (16). Des traitements spécifiques et une prise en charge adaptée pourront être mis en place précocement : surveillance de certains paramètres cliniques ou biologiques, appareillage des enfants en très bas âge...

Lors de la consultation génétique, la ségrégation familiale est proposée pour mettre en évidence l'anomalie génétique chez les apparentés afin de diagnostiquer d'autres membres de la famille. Cela peut également se révéler utile pour préciser le mode de transmission génétique quand la pénétrance est incomplète ou quand l'expressivité clinique est variable. Un conseil génétique est alors dispensé pour discuter du risque de récurrence pour les futures grossesses dans la famille. Pour les cas les plus sévères, par exemple dans le syndrome d'Usher de type I, un diagnostic prénatal peut également être envisagé (13).

D'un point de vue économique, des examens complémentaires coûteux et non contributifs sont évités (63): en cas d'atteinte du nerf auditif (neuropathies auditives sans anomalies du gène *OTOF*), la pose d'un implant cochléaire est déconseillée car inefficace (18).

Les différents examens génétiques sont également utilisés dans le domaine de la recherche : les connaissances croissantes en génétique permettent d'élucider petit à petit les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les surdités héréditaires. À plus long terme, certains protocoles thérapeutiques basés sur des technologies innovantes comme la thérapie cellulaire ou la thérapie génique se baseront sur ces connaissances pour proposer à des patients des traitements personnalisés/ciblés.



**Figure 20 : Place des analyses moléculaires dans le diagnostic de surdité**

## **D. L'avenir du séquençage : l'exome WES et le génome WGS**

Les guidelines de la BAAP de 2015 prévoient une maîtrise de plus en plus poussée du NGS. Cela permettrait une analyse accessible d'un nombre de gènes de plus en plus grand, et ce, pour un moindre coût. Le principal inconvénient des panels de gènes réside dans le besoin de mettre à jour régulièrement la liste des gènes analysés qui ne sera jamais exhaustive et pour laquelle il faut refaire la totalité de l'analyse à chaque changement. Afin de remédier à cela, l'étude de la totalité des exons appelée WES (*Whole Exome Sequencing*) voire une étude de l'ensemble du génome appelée WGS (*Whole Genome Sequencing*) ont été mises au point. Jusqu'ici utilisée dans le cadre de la recherche ou pour des dossiers complexes, il est maintenant envisageable de les mettre en place en routine.

Ces techniques présentent l'avantage d'obtenir des données très exhaustives qui peuvent être ré-analysées de nouveau si l'hypothèse diagnostic change ou si la littérature évolue. Elles apportent aussi une plus-value dans les pathologies présentant des signes cliniques très hétérogènes ou dont le mécanisme moléculaire n'est pas encore clairement établi. Aujourd'hui, de plus en plus de variations introniques profondes sont décrites comme pathogènes : par exemple, dans le syndrome d'Usher, une variation intronique active un site de splice cryptique (65). Le WGS permet de mettre en évidence ce type de variation et de ré-analyser les données si de nouvelles informations sont découvertes.

Cependant, comme avec les panels de gènes très étendus, la probabilité de découvrir des variants de signification inconnue ou de faire des découvertes fortuites est fortement augmentée. Afin de faciliter l'analyse, il est souvent demandé des prélèvements parentaux afin de réaliser des « trio » mais ils ne sont malheureusement pas toujours disponibles. Il est également nécessaire de posséder des logiciels performants ayant une puissance de calcul très élevée. Une grosse capacité de stockage pour ces données très volumineuses doit aussi être prévue. Le stockage représente un coût financier non négligeable car il n'est autorisé que sur des serveurs informatiques certifiés « hébergeur de santé ».

Chaque thématique choisit la stratégie de séquençage la plus adaptée en fonction de ses besoins, des connaissances acquises et de l'évolution technique (nombre de

gènes, rendement diagnostique, couverture, coût, moyens techniques, stockage des informations).

	<b>Panels</b>	<b>WES</b>
<b>Avantages</b>	<p>Gènes inclus connus et validés pour la pathologie en cause</p> <p>Meilleure interprétation des variants</p> <p>Peu de découvertes fortuites</p> <p>Coût réduit</p> <p>Meilleure couverture</p>	<p>Tous les gènes codants inclus</p> <p>Dépistage des phénotypes atypiques</p> <p>Analyse rétrospective possible des gènes nouvellement et régulièrement identifiés</p>
<b>Inconvénients</b>	<p>Temps et efforts pour le développement et la mise en place</p> <p>Liste des gènes rapidement obsolètes</p> <p>Ré-analyse des nouveaux gènes impossibles</p> <p>Phénotypes atypiques associés à des gènes non inclus non diagnostiqués</p> <p>Multiplication des panels = identifier le « bon » panel pour le « bon » patient + tentation d'utiliser plusieurs panels successifs</p>	<p>Couverture variable (fiabilité d'une analyse négative ?)</p> <p>Coût actuellement plus élevé</p> <p>Identification de variant causal difficile en l'absence des parents</p> <p>Risque de mise en évidence de « découvertes incidentales »</p>

**Tableau 5 : Avantages et inconvénients : panel de gènes *versus* WES (66)**

## **E. Création des filières**

### **1. L'enjeu des maladies rares**

L'épidémiologie des surdités montre que cette pathologie n'est pas rare dans la population générale mais qu'elle regroupe de nombreuses maladies rares qui peuvent avoir une origine génétique. La notion de génétique reste très étroitement liée à la notion de maladies rares, dans la mesure où plus de 80 % de ces dernières ont une origine génétique déterminante (67). Il y a donc une part de surdités non génétiques et une part de surdités génétiques qui ne sont pas considérées comme « rares ».

Les maladies génétiques sont difficiles à élucider car leurs mécanismes physiopathologiques ne sont pas ou que partiellement connus, créant ainsi une errance diagnostique majeure et freinant le développement des thérapies ciblées. En effet, seule 1 personne sur 2 atteintes d'une maladie rare dispose d'un diagnostic précis. Ce dernier est en général retardé car il met en moyenne 5 ans avant d'être posé pour plus d'un quart des patients (68).

## 2. Les Plans Nationaux de Santé Publique Maladies Rares

### **a. Premier Plan : CRMR, CCMR et Orphanet**

Grâce à des mouvements associatifs, le milieu des années 1980 a été marqué par une prise de conscience concernant les maladies rares et leur enjeu en matière de santé publique. La France a été le premier pays européen à mettre en place un Plan National de Santé Publique Maladies Rares entre 2004 et 2008 (69). Ce premier plan a permis la création de 109 Centres de Références Maladies Rares (CRMR) et Centres de Compétence Maladies Rares (CCMR). Cela a facilité l'accès au diagnostic et le suivi des patients (70).

Le centre de référence des surdités génétiques créé en 2000 par le Dr Sandrine Marlin coordonne le réseau national. Ce dernier est composé d'un site à La Pitié-Salpêtrière (Dr Isabelle Mosnier), d'un autre à Lille (Dr Catherine Vincent-Delorme) et de 20 centres de compétences réparties en France (71).

Durant cette période, le portail français Orphanet a été amélioré : l'objectif de ce serveur est de collecter des informations qualitatives sur les maladies rares et de les mettre à disposition des professionnels de santé et du grand public. Une nomenclature (code ORPHA pour chaque maladie) est également en train d'être mis en place afin d'améliorer la visibilité des maladies rares dans les systèmes d'information de santé et de recherche. Un annuaire de services experts par maladie et une encyclopédie des maladies rares sont disponibles gratuitement en ligne afin de guider les patients et les professionnels de santé (72).



**Figure 21 : Carte mondiale du réseau Orphanet (72)**

***b. Filières de santé maladies rares (FSMR)***

Un deuxième Plan National Maladies Rares a été lancé entre 2011 et 2016. Ses principaux objectifs étaient l'amélioration continue de la prise en charge des malades et le renfort de la recherche sur les maladies rares via la coopération européenne et internationale. La mesure phare consiste à créer la fondation maladies rares qui coordonne les actions des différents acteurs (387 CRMR et 1800 CCMR) et mutualise leurs ressources (73).

Il a également permis la mise en place des 23 filières de santé maladies rares (FSMR). Chaque FSMR regroupe les acteurs impliqués dans une maladie rare afin d'organiser des actions transversales : professionnels de santé, laboratoires de diagnostic, unités de recherche, universités, structures éducatives, sociales et médico-sociales, associations de malades... Il existe également depuis 2017 une collaboration avec les réseaux européens de référence sur les maladies rares (73).

Concernant les maladies sensorielles de la vision et de l'audition, la FSMR concernée s'appelle la filière SENSGENE, coordonnée par le Professeur Hélène Dollfus du CHU de Strasbourg. Celle-ci comprend, entre autre, le centre de référence de surdités génétiques (voir annexe 5) (14)

### c. Diagnostic et traitement pour chacun

Face au succès des deux premiers plans nationaux, la France lance un troisième plan national en 2018. Celui-ci a pour but d'encourager le partage de l'innovation afin de développer un diagnostic et un traitement pour chaque patient.

Pour cela, l'accès aux traitements est facilité et l'errance diagnostique doit être diminuée grâce à un dépistage et une prise en charge précoces via des dépistages néonataux. Le rôle des filières de santé maladies rares est renforcé pour coordonner les actions, accompagner les étapes clés du diagnostic et promouvoir la recherche et l'innovation. Les malades et leur entourage expriment aussi le besoin d'un parcours de santé plus clair et un accompagnement plus important en cas de handicap. Enfin, ce plan a pour but de favoriser le partage des données en valorisant la recherche et l'innovation, notamment grâce à la dynamique européenne et internationale.

### d. Plan France médecine génomique 2025

Le plan France médecine génomique 2025, piloté par la HAS/AVIESAN, a été lancé en 2020. Il a défini les 51 pré-indications pour lesquelles un séquençage très haut débit (STHD) du génome entier apporterait une plus-value par rapport aux techniques utilisées en routine. Une de ces pré-indications concerne les surdités syndromiques et malformatives, portée par le Dr Sandrine Marlin.

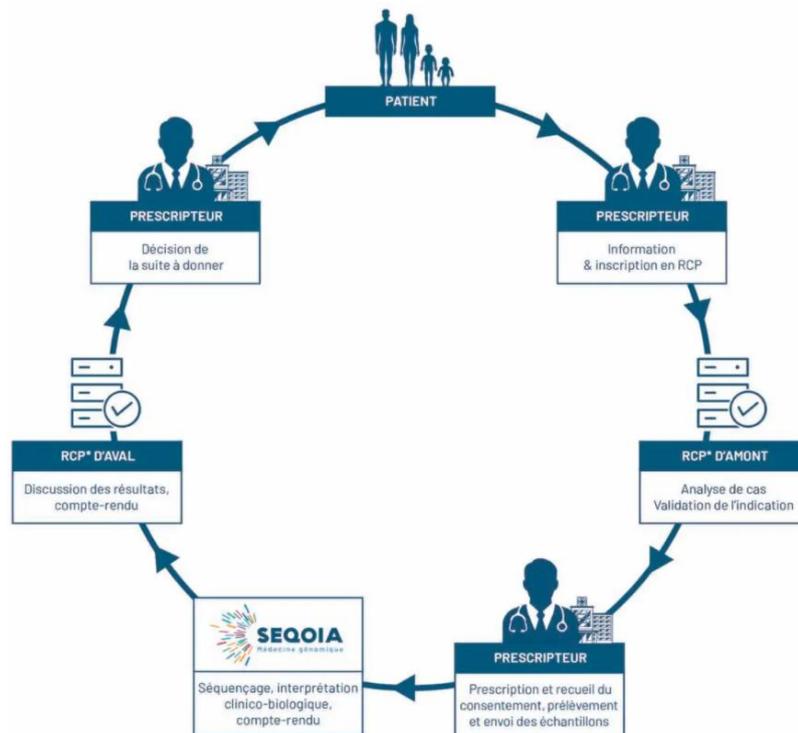
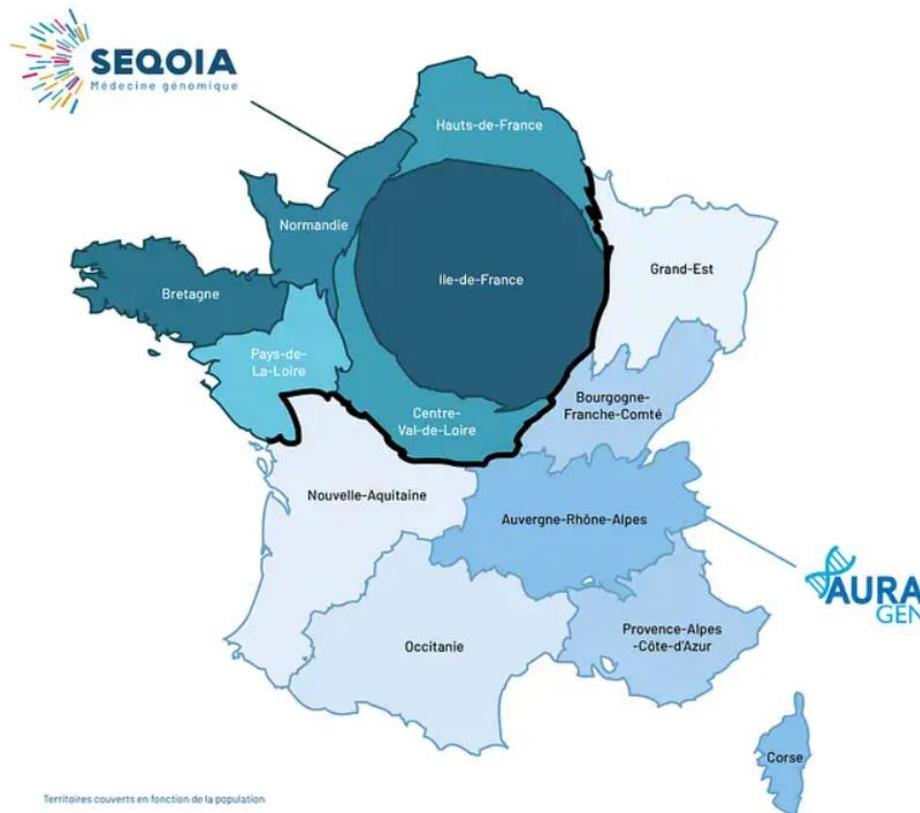


Figure 22 : Parcours des analyses prises en charge par SeqOIA

Pour bénéficier de cette nouvelle technologie de médecine génomique, le médecin prescripteur doit être référencé par les filières de santé maladies rares et la prescription est obligatoirement validée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

Les deux plateformes de séquençage retenues sont la plateforme SEQOIA et la plateforme AURAGEN : elles seraient capables dès aujourd'hui de séquencer l'équivalent de 18 000 génomes par an.



**Figure 23 : Répartition du territoire français entre les plateformes SeqOIA et AURAGEN en fonction de la population (74)**

## **F. Le diagnostic des surdités au laboratoire du CHU de Lille**

### **1. Organisation globale**

Le pôle du Centre de Biologie Pathologie (CBP) du CHU de Lille possède plusieurs secteurs réalisant des analyses de biologie moléculaires et qui sont labellisés pour les maladies rares depuis 2004-2006.

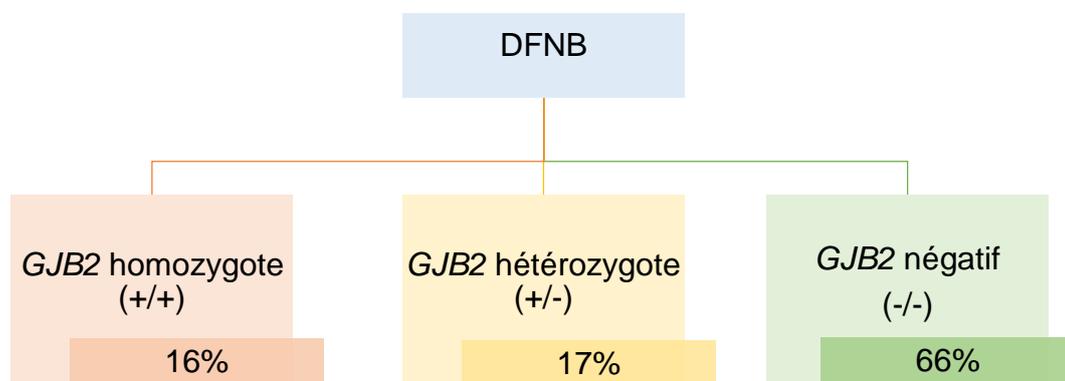
L'unité fonctionnelle des Marqueurs Prédicatifs des Maladies Chroniques (MPMC) fait partie du laboratoire de Génopathies du CBP et effectue depuis plusieurs années des

analyses de biologie moléculaire, y compris celles concernant les surdités héréditaires. Le service travaille en collaboration avec le Centre constitutif des surdités génétiques du CHU de Lille (CRMR) de la filière maladies rares SENSGENE. Des conseils et des recommandations destinés aux associations de patients sont mis en place afin d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients et de leurs familles. Grâce aux réseaux nationaux comme Orphanet, le service est régulièrement sollicité pour des expertises ponctuelles sur des dossiers cliniques complexes.

## 2. Place du séquençage des gènes GJB2 et GJB6

Avant la mise en place du séquençage haut débit, cinq gènes impliqués fréquemment dans les surdités héréditaires étaient séquencés : *GJB2*, *GJB6*, *SLC26A4*, *OTOF* et *COCH*. Le taux de positivité théorique de cette stratégie est de 40% mais il n'est que de 16% dans la pratique. Ce pourcentage est confirmé par une étude espagnole qui retrouve un taux de 18,9% de positif pour leur analyse préalable qui étudie *GJB2*, *GJB6*, *OTOF* et *MT-RNR1* (75). Le grand nombre de surdités inexplicées a motivé la mise en place d'un panel de gènes par séquençage haut débit à partir de 2014.

Aujourd'hui, l'examen de première intention en cas de surdité neurosensorielle de transmission autosomique récessive reste le séquençage des gènes *GJB2* et *GJB6*. Lorsque le résultat de cette analyse est négatif ou douteux (variation hétérozygote n'expliquant pas entièrement la surdité du patient), le prélèvement est alors passé en panel de gènes NGS-surdité. En cas de surdité neurosensorielle de transmission autosomique dominante ou de formes syndromiques, la technique NGS-surdité est réalisée sans analyse préalable.



**Figure 24 : Résultats du taux de positivité de la connexine *GJB2* au CHU de Lille (n=1774)**

### 3. Création des panels de gènes surdités

Le premier panel de gènes réalisé en routine était composé de 123 gènes sélectionnés en fonction des données de la littérature et des demandes des généticiens. Rapidement, ce panel a évolué et de nouveaux gènes ont été intégrés, donnant ainsi le panel 2 de 146 gènes puis le panel 3 de 170 gènes et enfin le panel 4 actuel de 214 gènes mis en place en 2020 (liste de gènes étudiés dans ce panel en annexe 6).

À chaque changement de panel, une revue de la littérature est effectuée afin de mettre à jour la liste des gènes fortement impliqués dans les surdités. Un gène, récemment découvert ou avec une fonction nouvelle, est inclus dans le panel s'il y a suffisamment d'arguments pour associer le gène à la surdité (76). Ces arguments comprennent l'association du gène à une surdité de perception ou mixte, une publication établissant le lien génotype-phénotype dans minimum deux familles différentes ou une publication démontrant la co-ségrégation phénotypique avec les variants touchant le gène en question (75). La classification d'Abou Tayoun permet de diviser cette association génotype-phénotype en 3 classes en fonction de la force des arguments (76).

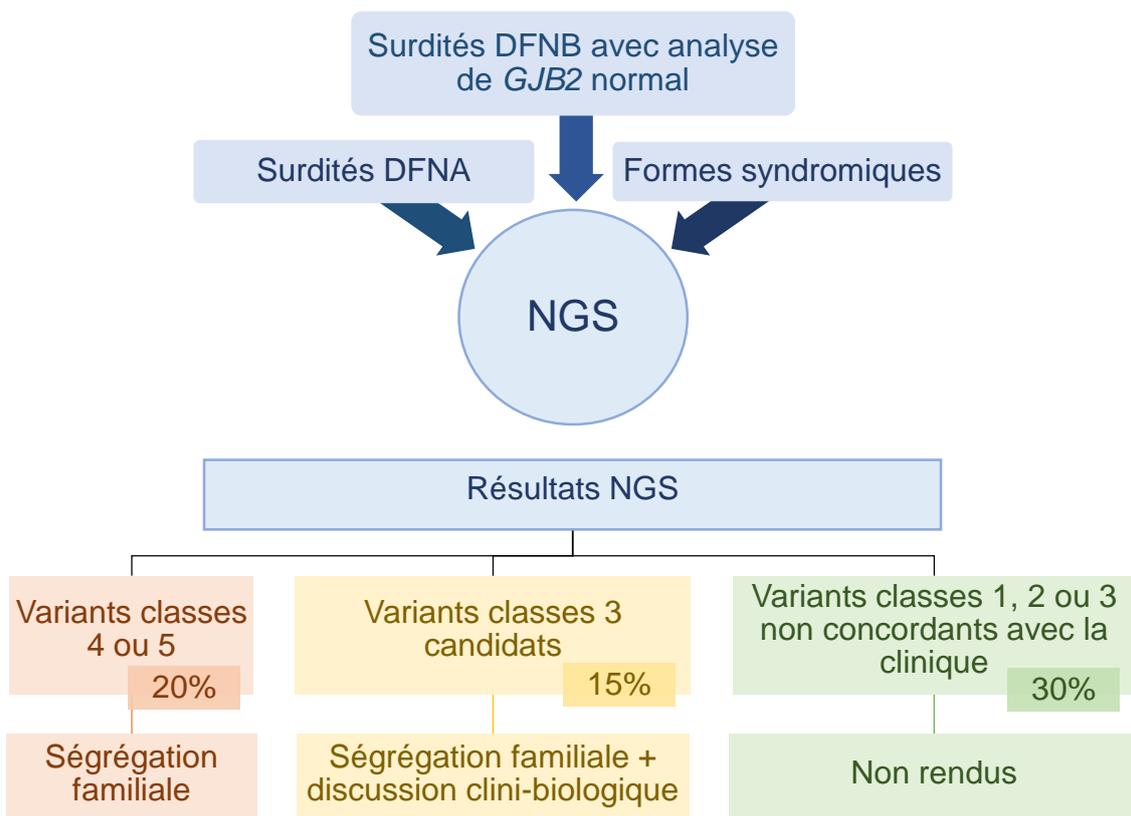
### 4. Déroulement de l'analyse panel NGS-surdité

Le Centre de Biologie Pathologie est équipé d'un Plateau Commun de Biologie Moléculaire qui met à disposition tous les automates et le matériel nécessaire à la réalisation de séquençage de panels de gènes. En 2017, près de 10 380 examens génétiques moléculaires ont été réalisés dans l'enceinte du CBP.

Ainsi, l'extraction de l'ADN se fait automatiquement sur Chemagic et sa qualité est vérifiée par automate SAFAS. Le pôle a choisi la chimie Haloplex Agilent d'enrichissement par circularisation comme méthode de préparation des bibliothèques. Ces dernières sont préparées à l'aide des robots Bravo et sont contrôlées par quantification et normalisation via Bioanalyseur. Les échantillons sont ensuite passés sur les séquenceurs Illumina NextSeq550 ou MiSeq. Les données récoltées sont stockées sur les serveurs BioInfo et des logiciels adaptés sont à disposition des techniciens et des biologistes afin de procéder à l'analyse des *data* générées. Les ADN extraits sont stockés dans des congélateurs pour une durée indéfinie. Les fichiers de résultats sont copiés et stockés sur les serveurs internes du CHU de Lille (serveur Isilon). Les comptes rendus sont imprimés en double afin de conserver une copie pour l'archivage, sous format papier pendant 30 années minimum.

Les variants géniques d'intérêt mis en évidence par cette analyse sont ensuite confirmés. Lorsque ce sont des variants ponctuels, la vérification se fait par séquençage Sanger. Quand il s'agit de réarrangements géniques, la technique MLPA peut être employée si un kit est disponible au laboratoire. Dans le cas contraire, la confirmation de la variation se fera par technique qPCR. Ils sont également soumis à une ségrégation familiale lorsque les prélèvements des apparentés sont disponibles.

Concernant les dossiers les plus complexes ou lorsqu'il y a une suspicion clinique précise dont le gène n'est pas couvert par notre panel, le service peut envoyer les échantillons à des laboratoires experts : par exemple, certains ADN sont transférés à Montpellier pour les syndromes d'USHER. A l'inverse, des prélèvements nous parviennent parfois pour un avis d'expertise. C'est le cas dans le syndrome BOR car le service est le seul en France à proposer le séquençage NGS pour les gènes *TSHZ1*, *EYA1* et *SIX1*.



**Figure 25 : Conduite à tenir devant les différents types de variants mis en évidence par technique NGS**

Le compte-rendu est rédigé et signé par un biologiste puis envoyé au médecin prescripteur en accord avec les dispositions réglementaires en vigueur (décrets 2000-

570 du 23/06/00 et 2008-321 du 04/04/08). Il sera remis et communiqué explicitement au patient lors d'une consultation médicale afin que ce dernier comprenne les enjeux de ce résultat. En cas de prélèvement venant d'un laboratoire extérieur, un courrier est également envoyé au laboratoire préleveur afin de lui signaler que le résultat de l'analyse a été envoyé au prescripteur.

## **V. Objectifs du travail**

L'objectif de ce travail de thèse est d'effectuer un bilan des résultats obtenus par séquençage haut débit des gènes impliqués dans les surdités héréditaires, syndromiques ou non syndromiques dans le laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire de Lille. Pour cela, une étude rétrospective a été réalisée en reprenant tous les dossiers ayant bénéficiés d'une demande « panel NGS surdité » depuis sa mise en place en 2014.

La première partie du travail consiste à dessiner une cartographie des demandes de panel NGS surdité afin de déterminer le profil des demandes et leur évolution dans le temps (entre 2015 et 2019). Les données récoltées sont également utilisées pour décrire cliniquement les patients et sont comparées aux données retrouvées dans la littérature.

La deuxième partie du travail est l'évaluation de l'apport de la technique NGS dans le diagnostic des surdités par rapport au séquençage d'une poignée de gènes. L'objectif est de déterminer quels sont les variants des gènes les plus fréquemment retrouvés par la technique NGS en fonction du type de surdité observé. Enfin, la concordance entre les variants rendus sur les comptes rendus et l'hypothèse diagnostic de départ est évaluée. Lorsque les données sont disponibles, les résultats obtenus sont comparés avec ceux rapportés dans la littérature.



# MATERIEL ET METHODES

## I. La technique NGS

### A. Choix de la technique

Aujourd'hui, la principale méthode de séquençage haut débit utilisée au CHU de Lille est la technologie Illumina. Une plateforme commune équipée de 3 séquenceurs Illumina (2 MiSeq et 1 NextSeq550) est mise à la disposition des services effectuant des analyses de biologie moléculaire. Tout en étant adaptée au débit du pôle, cette technique est fiable, rapide et économique (77).

La technique NGS se décompose en 4 étapes : la préparation de la « librairie », l'amplification clonale, le séquençage et l'analyse des données (78). Dans le cadre de l'analyse des gènes de la surdité, la librairie est préparée à partir d'un enrichissement par circularisation avec les kits Haloplex (Agilent Technologies).

Avantages	Inconvénients
Facile, rapide et reproductible	Nombre de régions étudiées limité
Petite quantité d'ADN nécessaire	Régions répétées ou pseudogènes non couvertes
Grande profondeur des <i>reads</i>	Répartition hétérogène = régions parfois non couvertes
Grands fragments bien alignés	Peu d'évolution possible

**Tableau 6 : Avantages et inconvénients de l'enrichissement par circularisation d'Haloplex**

Concernant l'étape de séquençage, l'automate le plus couramment utilisé dans les CHU est le NextSeq550 d'Illumina car il permet de réaliser des séries de 48 patients (79).

### B. Extraction de l'ADN

Avant de débiter la préparation de la librairie, il faut tout d'abord procéder à l'extraction de l'ADN. Pour cela, les services cliniques prélèvent 2 tubes EDTA qu'ils envoient au

laboratoire accompagnés du bon d'analyse et des documents nécessaires à la réalisation de l'analyse. Les prélèvements venant de l'extérieur (hors-CHU Lille) sont envoyés au laboratoire soit sous forme de tube EDTA soit sous forme d'ADN déjà extraits localement.

L'extraction leucocytaire est alors réalisée automatiquement sur le robot Hamilton Chemagic Star. Les membranes cellulaires sont lysées par l'ajout de tampon et d'une protéinase. L'ADN va ensuite se fixer sur des billes magnétiques grâce à une seconde solution tampon. Après lavage et élution, il est quantifié sur un spectrophotomètre Dropsense. En cas d'indisponibilité de l'automate ou d'extraction à faire en urgence, une méthode manuelle d'extraction de l'ADN est possible.

### C. Préparation de la librairie

La préparation de la librairie correspond à l'étape d'enrichissement où les échantillons sont préparés pour le séquençage.

La librairie est préparée à partir des kits Haloplex (Agilent Technologies), permettant à un enrichissement par circularisation divisé en 4 étapes : digestion de l'ADN, hybridation des sondes, purification et enfin amplification par PCR (80).

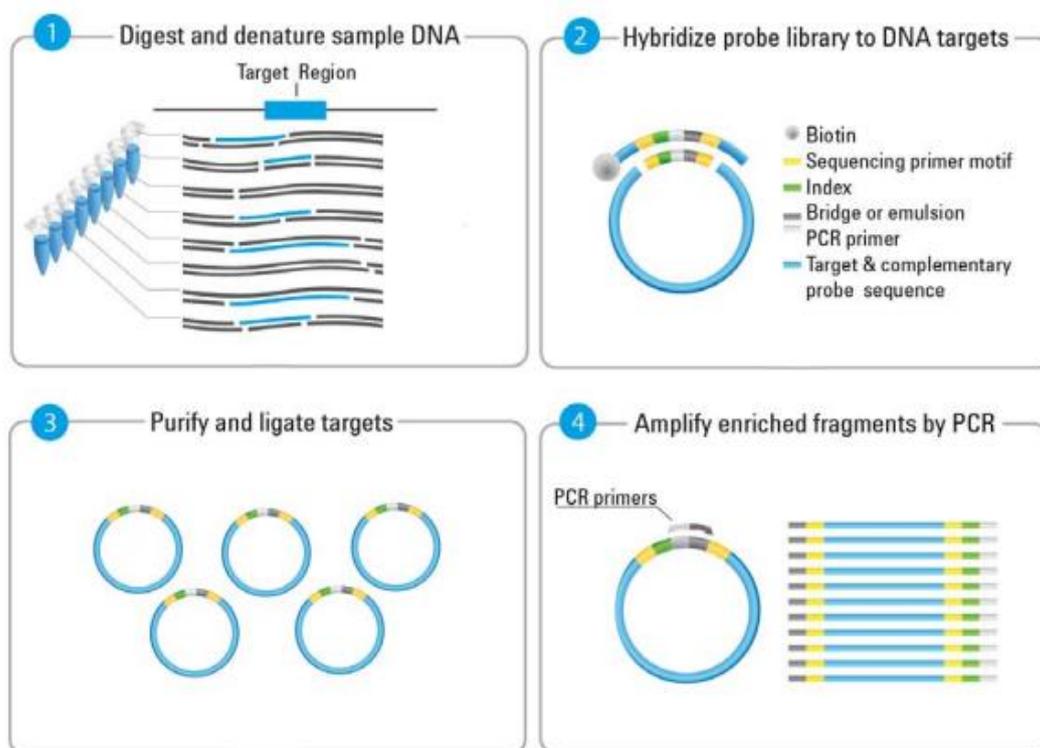


Figure 26 : Principe d'enrichissement par circularisation avec kits Haloplex (81)

La première étape consiste à digérer l'ADN par huit couples d'enzymes de restriction différents donnant des fragments de taille variable (80). Puis, lors de l'hybridation, les produits de digestion sont mis en contact avec les sondes Haloplex. Ces dernières vont se fixer par hybridation aux deux extrémités des fragments d'ADN. Elles possèdent une extrémité marquée à la biotine et apportent les nucléotides nécessaires à la préparation de la librairie c'est-à-dire :

- Les index identifiant les séquences de chaque patient ou « barcode »,
- Les adaptateurs universels spécifiques de la flowcell : séquences P5 et P7,
- les amorces de séquençage propres aux régions ciblées.

Les motifs contenus dans la sonde sont donc incorporés dans le fragment d'ADN.

Le terme « librairie » désigne l'ensemble régions géniques d'intérêt contenant à chaque extrémité les adaptateurs oligonucléotiques apportés par les sondes Haloplex. Cette hybridation des sondes provoque une circularisation du fragment d'ADN (82).

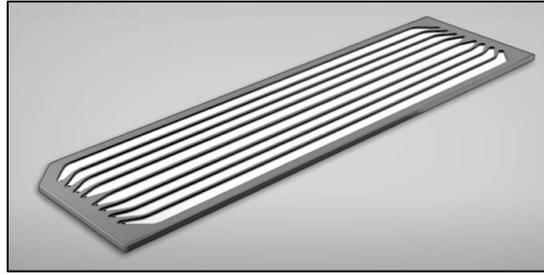
Une élution est ensuite réalisée avec des billes aimantées coatées à la streptavidine lors de la troisième étape : on capture les fragments d'ADN qui nous intéressent sur ces billes aimantées et on élimine les ADN non hybridés. Une circularisation parfaite des fragments ou « halos » est obtenue grâce à une ADN ligase. Enfin, ces halos sont amplifiés par technique PCR utilisant des amorces universelles (82).

Il est nécessaire que les concentrations d'ADN composant une librairie soit similaires. En effet, si cela n'est pas le cas, des échantillons risquent d'être sous-représentés, faussant les données issues du séquençage et rendant l'analyse ininterprétable. Après une étape de quantification et de normalisation, tous les échantillons sont « poolés » ou « multiplexés » c'est-à-dire qu'ils sont mélangés dans un milieu réactionnel unique.

## **D. Amplification clonale**

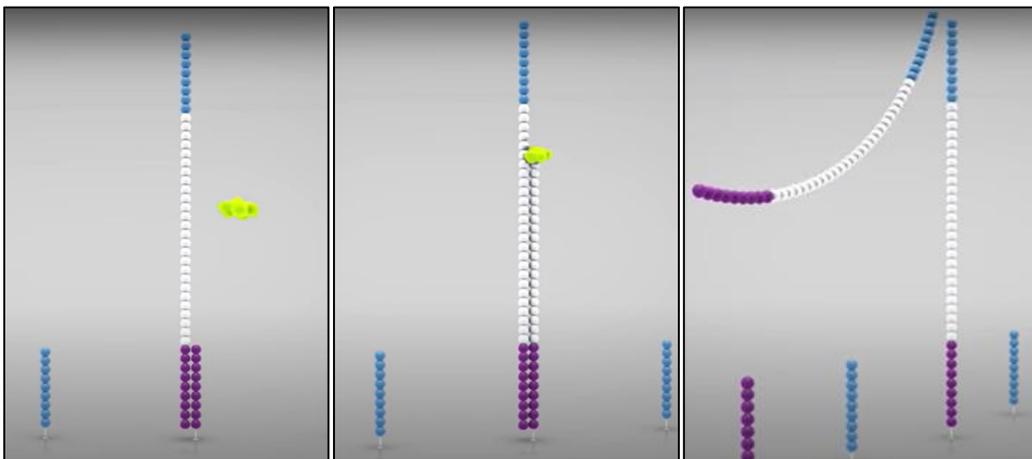
L'étape d'amplification clonale est réalisée directement sur la flowcell à l'intérieur de l'automate Illumina via la « bridge PCR » : un brin d'ADN est copié de proche en proche, rassemblant ainsi des brins d'ADN identiques, appelés clusters.

La flowcell désigne le support solide sur lequel se passe l'ensemble des réactions d'amplification et de séquençage.



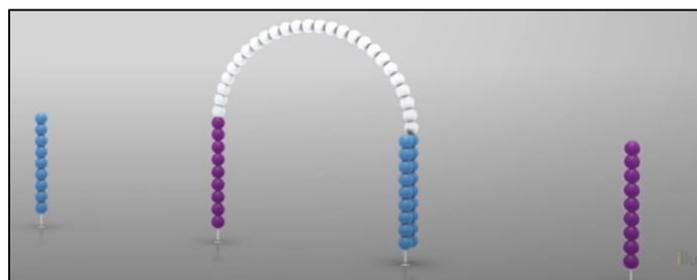
**Figure 27 : Représentation d'une flowcell (83)**

Sa surface est recouverte de séquences complémentaires aux séquences P5 et P7 apportées par les sondes Haloplex lors de l'étape d'enrichissement. Grâce à cette complémentarité, les brins d'ADN s'hybrident le long de la flowcell et le brin complémentaire est synthétisé par élongation.



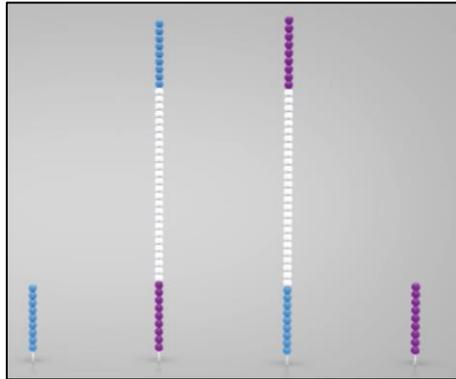
**Figure 28 : Synthèse du brin complémentaire par élongation et élimination du brin initial (83)**

Le brin initialement fixé par hybridation à la flowcell est éliminé : il ne reste alors que le brin complémentaire lié de manière covalente à la flowcell. Il se replie et s'hybride avec la deuxième séquence complémentaire (P5 ou P7), formant ainsi un « pont », d'où le nom de « bridge PCR ».



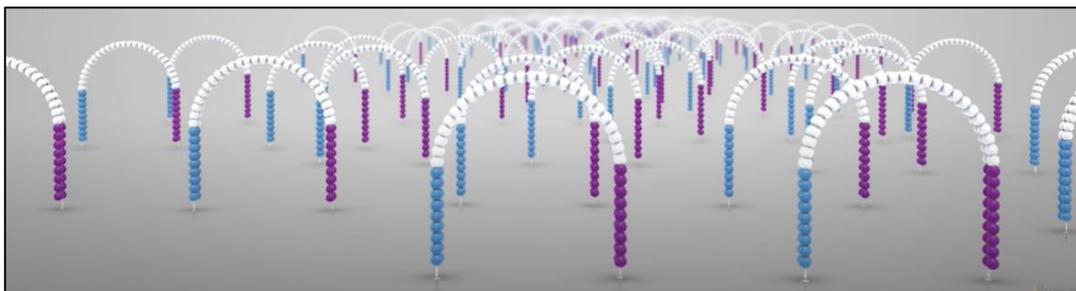
**Figure 29 : Formation du « pont » (83)**

Le processus se répète avec une hybridation et une dénaturation. Au final, deux brins natifs et complémentaires d'ADN sont liés de façon covalente à la flowcell.

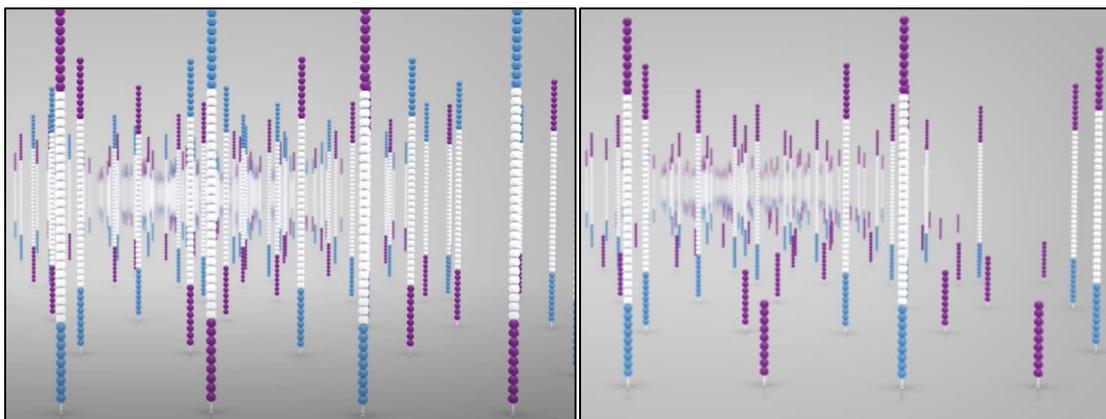


**Figure 30 : Représentation des deux brins fixés de manière covalente à la flowcell (83)**

Ce processus de « bridge PCR » est réalisé à de multiples reprises afin d'obtenir un grand nombre de copies de ces deux brins d'ADN.

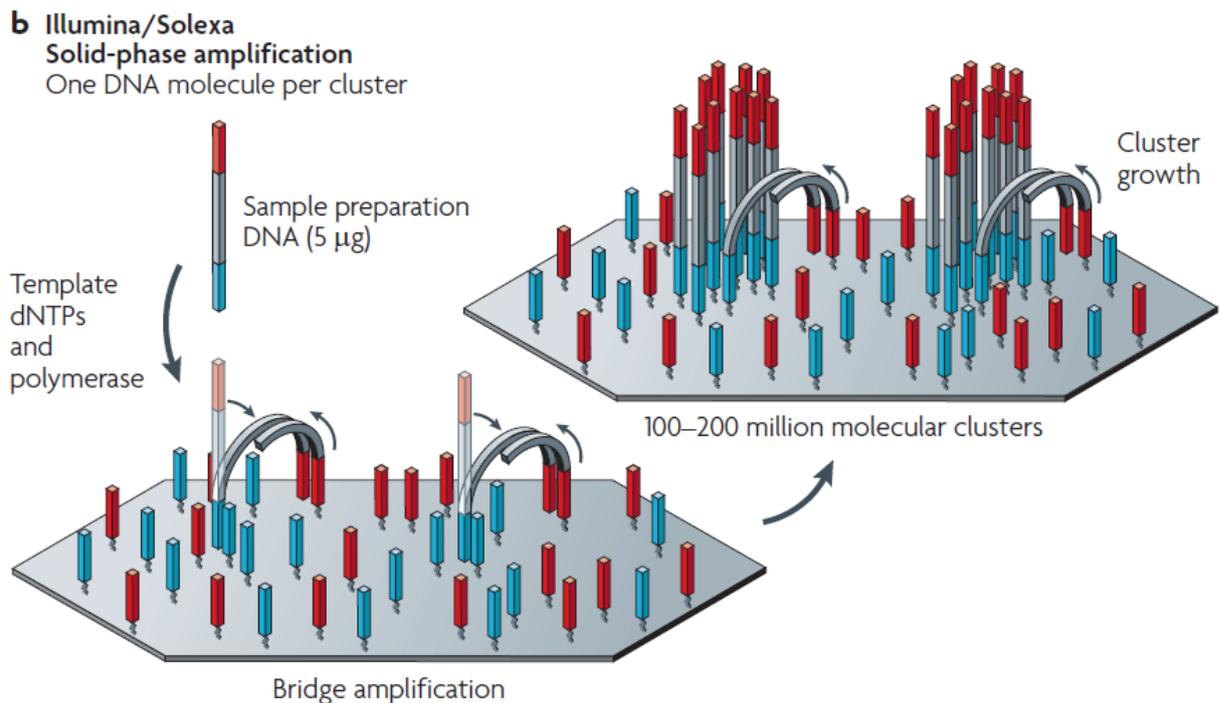


**Figure 31 : Formation d'un cluster par « bridge PCR » (83)**



**Figure 32 : Cluster contenant un brin d'ADN et son brin complémentaire à gauche et cluster composé uniquement du brin natif à droite (83)**

Les brins complémentaires sont éliminés par clivage pour ne sélectionner que les brins natifs: c'est ainsi qu'un seul cluster est formé, regroupant des brins d'ADN strictement identiques.

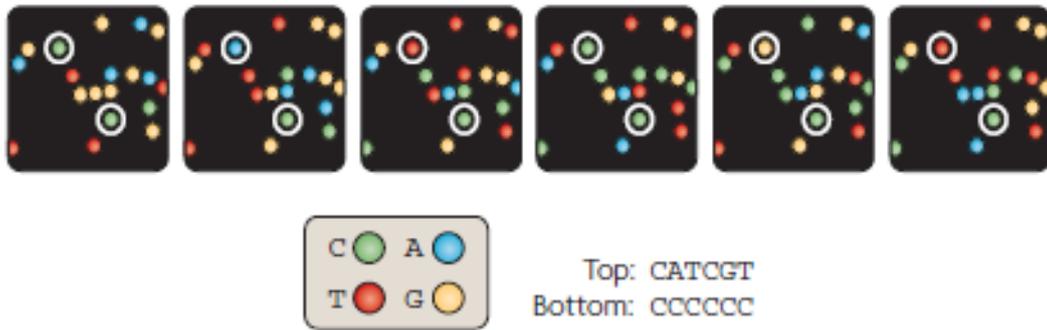


**Figure 33 : Représentation de la création des clusters sur la flowcell (84)**

## **E. Séquençage**

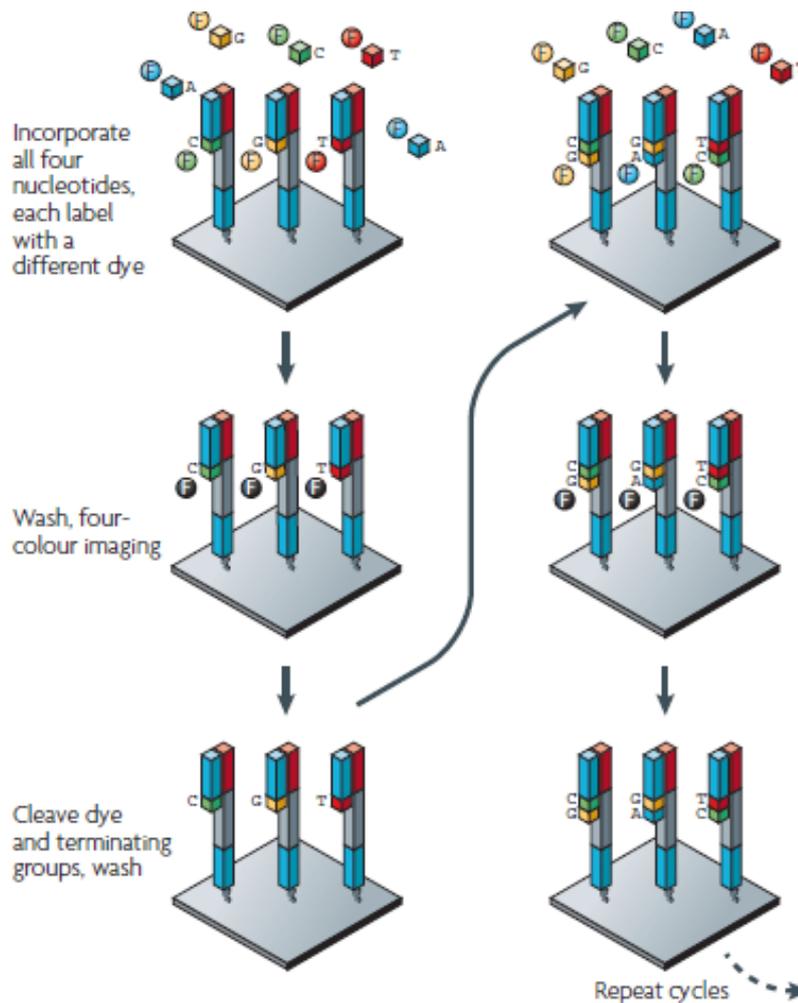
À la fin de l'amplification clonale, la flowcell est parsemée de différents clusters. Le séquençage d'Illumina est basé sur une technique similaire à celle du Sanger, par synthèse du brin complémentaire à la séquence du brin d'ADN fixé à la flowcell.

La première étape est l'hybridation d'une amorce universelle au brin d'ADN constituant le cluster. Les nucléotides sont ensuite incorporés un à un pour synthétiser le brin complémentaire. Ils possèdent tous un terminateur de chaîne réversible. Les 4 types de nucléotides (A, C, T, G) sont marqués par un fluorochrome émettant à une longueur d'onde spécifique afin de les différencier. À chaque cycle, grâce à l'émission de fluorescence captée, le séquenceur détermine la séquence d'ADN complémentaire.



**Figure 34 : Lecture de la fluorescence et détermination de la séquence d'ADN par le séquenceur (84)**

L'effet terminateur de chaîne est ensuite retiré via un clivage chimique, libérant ainsi l'ADN pour le cycle suivant. Cette opération est répétée, nucléotide après nucléotide, jusqu'à l'obtention de la séquence complète du brin d'ADN complémentaire à celui fixé sur la flowcell.



**Figure 35 : Schéma récapitulatif du séquençage par « synthèse » d'Illumina (84)**

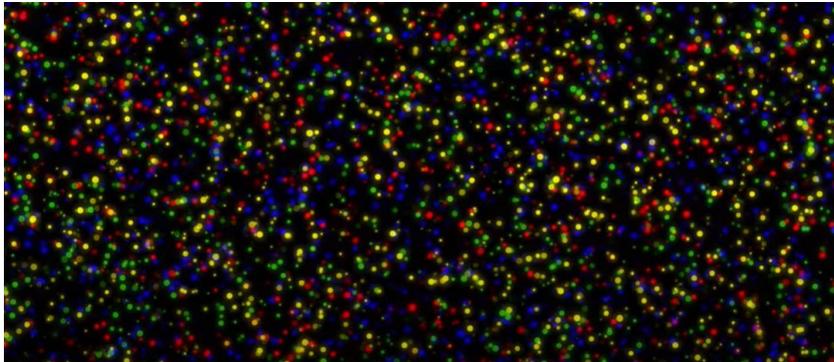
## II. Traitements des données ou « *data managing* »

Le séquençage haut débit génère des données brutes massives qui ne sont pas directement interprétables à la sortie de l'automate. Les outils bio-informatiques sont donc essentiels au traitement et à l'analyse de ces *data*. Pour cela, différents pipelines, également appelés *workflows*, sont utilisés pour obtenir une liste de variants annotés propre à chaque patient.

L'analyse des données de séquençage est divisée en trois grandes parties :

- L'analyse primaire des données qui correspond à la reconstitution de la séquence d'ADN analysée ;
- L'analyse secondaire qui consiste à aligner la séquence retrouvée à une séquence de référence et à identifier les variants par rapport à cette séquence de référence ;
- L'analyse tertiaire qui englobe l'interprétation biologique des résultats.

### A. Analyse primaire = « base calling » et fichier .fastQ



**Figure 36 : Représentation des fluorescences capturées par le séquenceur à un instant t du séquençage (83)**

À chaque nucléotide incorporé, le séquenceur a capturé une image de la fluorescence. Chaque nucléotide étant marqué par un fluorochrome d'une longueur d'onde différente, il fait correspondre le signal lumineux au bon type de nucléotide et le transforme en donnée informatique. En plus de son identification, l'outil informatique va également associer un score qualité à chaque base séquencée.

Avec ces informations, il génère un fichier texte, appelé *Fasta Quality* ou .fastQ, composé de trois lignes pour chaque séquence : la première donne l'identification de

la séquence de référence, la deuxième celle de la séquence analysée et la troisième le score qualité Phred assigné à chaque base. Ce score logarithmique estime avec précision la probabilité d'erreur d'identification de chaque base. Ainsi, un score Phred de 30, noté Q30, correspond à une probabilité de 99,9% d'avoir correctement identifié la base ou encore une chance sur 1000 d'avoir fait une erreur d'identification sur cette base.

```

read 1 @SRR062641.6751359
CGCCCGGCCAATCATTGTGGTTTTAAGTCACTAAGTTTGAGGCTATTTTGTTTTACAGCAAAAAGCTAACTGATGCA
+
CBLNPGJQQJPPQPQPQRGPPPPRRRQQRPSPRGQQQLRRRMEPQQPMJHQEHEKMMFIIRH?SI IHKNJIKRL

read 2 @SRR062634.16249693
CTAAGTTTGAGGCTATTTTGTTTTACAGCAAAAAGCTAACTGATGCAGACAGGGACAAGTCAGTCTCATCTCTGTGC
+
ALKMOOOOPPQJQOPPPPPQPPPPPRJQRQQQQRPPRQPPFQSQPRLIMHKSNRJQORMFELRPQNQRQJQR

read 3 @SRR062634.20060465
CTCCCAGCTTCCAACAGACCCTGTCCCAGCTCCCTCCAAGCTGAGTGTGGCCTGATACCTACCAGTGGAGCGAGG
+
D?KMPQEPGCPQNPQIQIGR@DPERQHEKBED=HCHG8EHFDCD6<329@<:69A<6, ;<967>;=C:>AA8BBE

```

**Figure 37 : Visualisation d'un fichier .fastQ (85)**

C'est lors de cette étape qu'a aussi lieu le démultiplexage : les index ou barcodes permettent de redistribuer les séquences analysées au bon patient. De ce fait, à partir d'une seule analyse, il y a la création d'autant de fichiers .fastq qu'il y a de patients présents dans la librairie.

## **B. Analyse secondaire par GATK**

### **1. Trimming**

Afin de faciliter l'analyse des données, les amorces, les index et les bases qui ont obtenues un mauvais score Phred sont éliminés : c'est le « *trimming* » (= lavage).

### **2. Alignement**

Après ce « lavage », l'outil bio-informatique aligne la séquence analysée avec le génome de référence. Au laboratoire de Lille, la séquence de référence utilisée est celle de février 2009, appelée GRCh37 ou hg19.

Cette étape génère la création d'un fichier .sam (*Sequence Alignment Map*) contenant 11 critères différents (annexe 7). Ce fichier étant d'une très grande taille, il est compressé en format .bam (*Binary Alignment Map*). Ce dernier peut être importé dans les logiciels de visualisation comme IGV ou Alamut Visual. L'utilisateur visualise alors les reads, leurs tailles, leurs sens, les zones artéfactuelles, leurs couvertures, leurs profondeurs ainsi que les variations détectées par rapport au génome de référence.

La couverture correspond au rapport entre le nombre de bases séquencées sur le nombre total de bases ciblées. La profondeur désigne le nombre de reads aligné de façon exploitable à une position nucléotidique donné, c'est-à-dire le nombre de fois où une base est lue. La région est considérée comme couverte lorsqu'il y a une profondeur d'au moins 30 reads (notée 30 X) pour chaque position nucléotidique.

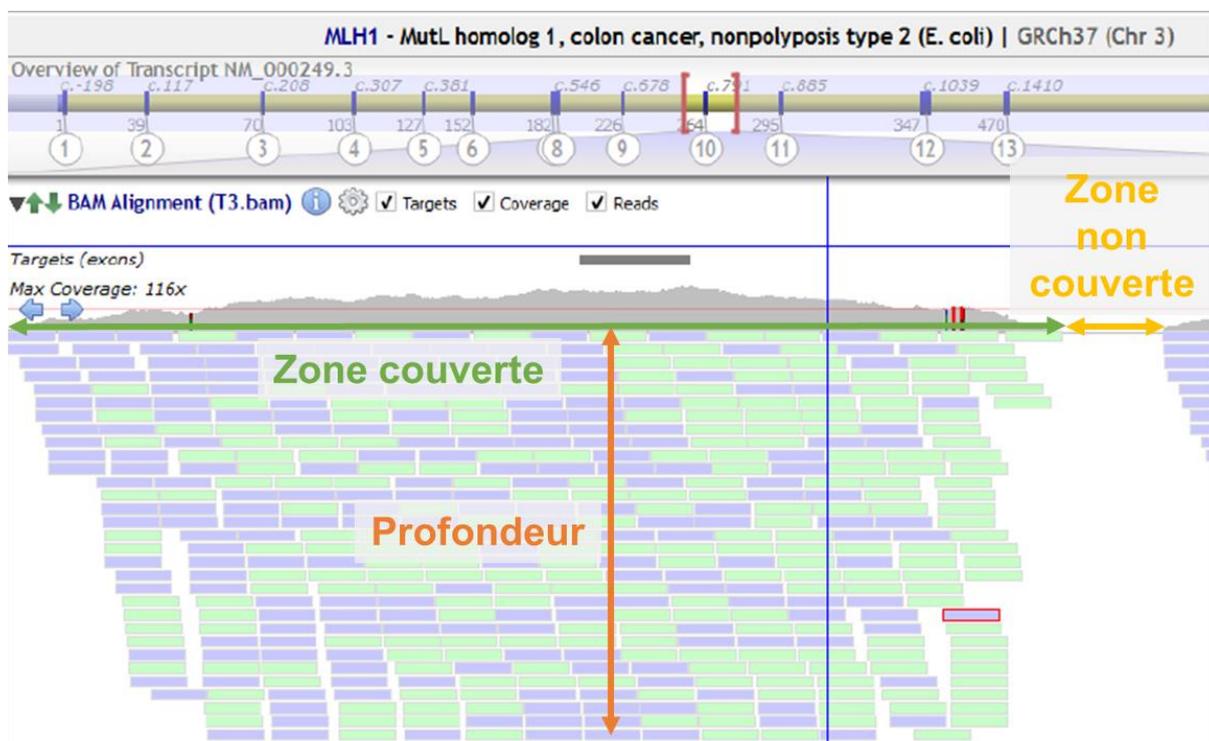


Figure 38 : Visualisation d'un fichier .bam sur le logiciel Alamut Visual

### 3. Elimination des duplicats de PCR

Un duplicat de PCR est défini comme deux *reads* ayant les mêmes coordonnées nucléotidiques et le même score d'alignement CIGAR (*Concise Idiosyncratic Gapped Alignment Report*). Ils apparaissent généralement lors de la PCR qui est réalisée pendant la création de la librairie. Afin de ne pas fausser les fréquences alléliques, un seul *read* est compatibilisé (86).

## 4. Réalignement autour des indels

En fonction des informations récoltées dans les bases de données, le logiciel informatique détecte les régions qui doivent être en partie réalignées afin d'éliminer des faux positifs.

## 5. Variant Calling et annotations

Cette étape est la plus importante : pour chaque patient, une liste de variations par rapport au génome de référence est créée. Le logiciel génère alors un fichier au format *.vcf* (*Variant Caller Format*) contenant les informations caractérisant chaque variant : le chromosome, la position génomique, la base de référence, la base altérée, la qualité de la base, l'identification du variant par des bases de données (Rs), la fréquence allélique dans la population générale, la référence du variant dans la littérature...

Au CHU de Lille, ces résultats sont transférés vers des portails internes appelés DVDAlanine et Anatole puis exportés sur un tableau Excel servant de base pour l'exploitation de ces variants.

Chromosome	Position	Ref	Alt	Nb pré-évenement	Gène	Exon	Fonction	Transcript	Nucléotidique	Protéique	profondeur_ref_BSO_BW_A_Enrichment	profondeur_alt_BSO_BW_A_Enrichment	vaifreq_ref_BROAD_v0_beta	profondeur_ref_BROAD_v0_beta	profondeur_alt_BROAD_v0_beta	vaifreq_alt_BROAD_v0_beta
chrX	153170980	T	G	31	AVPR2	1	splice_region_variant&intron	NM_001146151.1	c.26-6T>G	p.Ser70Asn	14	456/97,45%	14	456/97,45%		
chr16	56548501	C	T	306	BBS2	2	missense_variant	NM_031888.3	c.209G>A	p.Met52Thr	60	1447/96,08%	77	1455/95,89%		
chr1	16380196	T	C	30	CLCNKB	16	missense_variant	NM_000895.4	c.1685T>C	p.Ala56Pro	27	2718/99,45%	27	2718/99,45%		
chr3	190106074	G	C	11	CLDN16	1	missense_variant	NM_006580.3	c.166G>C	p.Ala56Pro	731	649/47,03%	675	649/49,02%		
chr3	190106071	AG	A	11	CLDN16	1	frameshift_variant&feature_t	NM_006580.3	c.164delG	p.Ala56LeufsTer16	1140	642/36,64%	1138	640/36,67%		
chr2	227919458	T	A	21	COL4A4	30	splice_region_variant&intron	NM_000092.4	c.2717-5A>T		238	247/51,75%	238	247/51,75%		
chr2	227892619	C	T	553	COL4A4	42	splice_region_variant&synor	NM_000092.4	c.4080G>A	p.Ala1280SerfsTer2	1178	1045/87,37%	1232	1049/86,78%		
chr3	132400909	C	CT	1	NPHP3	27	frameshift_variant&feature_e	NM_153240.4	c.3837dupA	p.Ala1280SerfsTer2	57	575/91,77%	64	578/90,34%		
chr1	243456418	C	T	1	SDCCAG8	6	missense_variant	NM_006642.3	c.572C>T	p.Thr191Ile	1129	817/42,45%	1131	819/42,62%		
chr16	48580713	T	C	31	SLC12A1	23	missense_variant&splice_re	NM_000338.2	c.2873T>C	p.Val958Ala	15	1464/99,66%	15	1464/99,66%		
chr16	56904687	C	G	31	SLC12A3	6	missense_variant	NM_001126108.1	c.791C>G	p.Ala264Gly	87	4260/98,99%	87	4270/98,71%		
chr9	140127546	G	C	3	SLC34A3	6	missense_variant	NM_001177317.1	c.539G>C	p.Gly180Ala	413	338/45,2%	413	338/45,2%		
chr17	42331922	A	T	1	SLC4A1	16	missense_variant	NM_000342.3	c.1999T>A	p.Ser667Thr	703	623/47,06%	694	616/47,4%		

Figure 39 : Capture écran du fichier *.vcf* exporté sur Excel

En fonction des besoins définis par le biologiste, différents filtres sont appliqués afin de faciliter l'analyse et de mettre en évidence les variants ayant un score qualité élevé, une faible prévalence dans la population générale et des critères de pathogénicité.

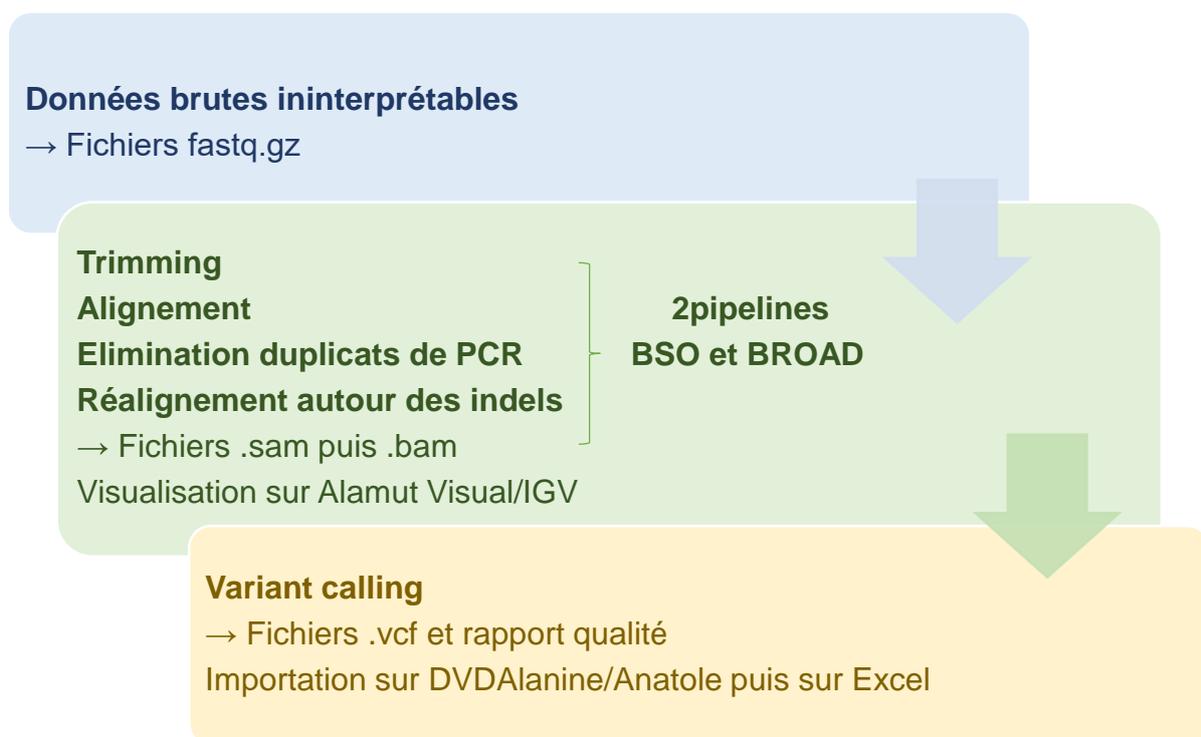
Au cours de cette étape, un rapport qualité est également généré: celui-ci permet d'obtenir le taux de couverture pour chaque patient et pour chaque gène étudié afin de s'assurer que chaque patient a bénéficié d'un séquençage satisfaisant et repérer les régions qui ont été mal ou trop peu couvertes.

## C. Utilisation d'un double workflow ou pipelines

Selon l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire (ANPGM), il est recommandé de combiner des *workflows* différents. En effet, ils présentent tous leurs

propres spécificités, donnant ainsi *in fine* une liste de variants légèrement différente. Cela signifie que certaines variations éliminées par un premier workflow sont parfois conservées par le second. Cette vérification garantit une analyse exhaustive de tous les variants et une diminution du taux de faux négatifs. Chacun d'entre eux possède ses avantages et ses limites en matière de détection de mosaïques, de CNV, d'alignement en présence d'un pseudogène. Les workflows choisis sont donc les plus adaptés aux gènes étudiés et à la taille du panel.

Dans le cadre du panel de gènes des surdités, les workflows sont le MiSeq Reporteur également appelé BSO (Illumina) et le BROAD (logiciel interne au CHU de Lille).



**Figure 40 : Schématisation des grandes étapes bio-informatiques de l'analyse secondaire des données obtenues par NGS**

### **III. Interprétation biologique des résultats NGS**

#### **A. Application de filtres**

À ce niveau de l'analyse, le biologiste obtient un fichier .vcf où chaque variant est annoté. Cependant, chaque génome humain dénombre près de 3 millions de variants différents (87). Il est donc nécessaire de mettre au premier plan les variants intéressants et potentiellement impliqués dans le phénotype du patient.

La liste du fichier .vcf contient en moyenne une centaine de variants par patient. Cependant, elle sera réduite à une dizaine de variants grâce à l'application de filtres supplémentaires définis en fonction des besoins du biologiste. Ce dernier analyse ensuite les variants restants un par un afin d'évaluer leur pathogénicité. Pour cela, il s'aide d'une combinaison d'informations détaillées ci-dessous : les données de séquençage, les caractéristiques du variant, le gène impliqué, les bases de données disponibles et les outils de prédiction *in silico*.

## 1. Données de séquençage

Les données du séquençage sont accessibles sur le logiciel Alamut Visual en important les fichiers .bam du patient analysé. Afin d'éliminer les potentiels artéfacts et les faux-positifs, les variants retenus ont une profondeur de lecture >30X et une balance allélique >30% (car les variations recherchées ici sont constitutionnelles, les patients ont soit une balance allélique aux alentours de 50% s'ils sont hétérozygotes pour la variation détectée et aux alentours de 100% s'ils sont homozygotes). La visualisation sur Alamut Visual permet également de vérifier la couverture et la profondeur de la région, de visualiser les reads et l'environnement de la base étudiée.

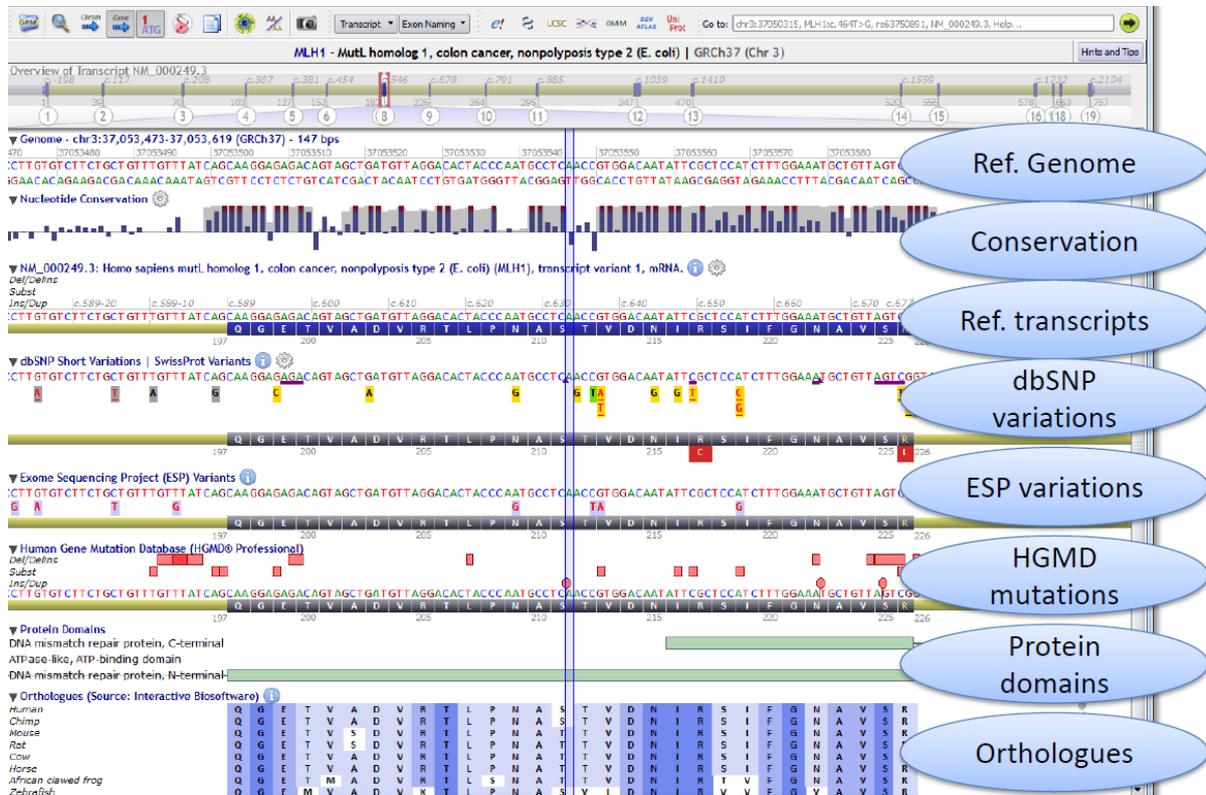


Figure 41 : Capture écran d'une fenêtre du logiciel Alamut Visual (88)

## 2. Données structurales du variant

Chaque variant possède des caractéristiques données par le logiciel Alamut Visual : la conservation du nucléotide et de l'acide aminé au cours de l'évolution, le type de variation (faux-sens, non-sens, insertion, délétion, synonyme, intronique), l'écart physico-chimique entre les acides aminés si c'est une variation faux-sens, la position dans le domaine fonctionnel de la protéine synthétisée... Ces données sont à prendre avec précautions car elles sont à interpréter en fonction du mécanisme physiopathologique du gène et de la pathologie étudiés.

## 3. Gène impliqué

Des informations relatives au gène peuvent être consultées via la base de données OMIM : cela permet de vérifier la concordance génotype-phénotype et la concordance entre le mode de transmission décrit avec les antécédents familiaux rapportés.

## 4. Consultation des bases de données

Ces dernières années, de nombreuses bases de données ont vu le jour, apportant chacune des informations différentes et complémentaires. Certaines ont été créées dans le cadre d'un projet ponctuel (GnomAD ou ExaC), d'autres sont alimentées au jour le jour grâce à leur mode de fonctionnement collaboratif (ClinVar ou dbSNP). Cependant, malgré leurs mises à jour régulières, elles ne sont pas encore exhaustives.

Il est donc possible de consulter les bases répertoriant les variants présents dans la population générale « contrôle » comme GnomAD, ExaC ou dbSNP. Des informations peuvent aussi être récoltées grâce à des bases de patients : bases de données locales, ClinVar ou HGMDPro. Il existe également des bases de données spécifiques à une thématique, un gène ou un type de pathologie : elles sont en général plus fiables car plus ciblées et fournissent davantage de preuves cliniques et de tests fonctionnels par rapport aux bases de données « générales ».

Le biologiste combine ces bases de données afin d'avoir une description complète de la variation retrouvée : fréquence dans la population générale, descriptions dans la littérature scientifique ou médicale, tolérance du gène touché aux différents types de variations.

Un variant est considéré comme polymorphique si sa fréquence en population générale est > 1%. Au contraire, un variant absent dans la population générale possède une probabilité plus importante d'avoir des conséquences délétères.

## 5. Outils de prédiction bio-informatiques

Les outils de prédiction donnent différents scores qui se basent sur des algorithmes bio-informatiques. La base de données Varsome concerne les variations faux-sens ou les insertions/délétions en phase et combine neuf logiciels de prédiction sur les conséquences protéiques : DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM, MutationAssessor, MutationTaster, PROVEAN. Le logiciel Alamut Visual s'intéresse aux variants ayant des conséquences sur l'épissage via les outils de prédiction suivants : SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE et GeneSplicer.



Figure 42 : Outils de prédiction concernant l'épissage sur Alamut Visual

## 6. Données de ségrégation familiale

Lorsque des prélèvements sont disponibles chez les apparentés, l'étude de ségrégation familiale précise le mode de transmission génétique. Cela permet de déterminer si le variant étudié co-ségrège avec la pathologie, et s'il est hérité d'un des parents ou de survenue *de novo*. Ces informations sont importantes car elles permettent de préciser la pathogénicité du variant et d'adapter le conseil génétique.

Cependant, il existe dans certains cas une pénétrance incomplète ou une phénocopie donnant une variabilité d'expression du phénotype.

## 7. Mise en évidence de variants associés

Comme dit précédemment, les surdités héréditaires sont considérées comme une pathologie monogénique. De ce fait, si un variant possède tous les arguments en faveur de sa pathogénicité et concorde avec la clinique et le mode de transmission suspecté, les autres variants analysés sont considérés comme probablement bénins.

Quand deux variants différents sont mis en évidence sur un même gène, il est intéressant de savoir s'ils sont en position *cis* ou *trans* car cela permet de savoir s'il s'agit d'un allèle complexe (en *cis*) ou d'un allèle hétérozygote composite (en *trans*). Cela constitue une information supplémentaire dans le mode de transmission génétique et parfois dans le mécanisme moléculaire impliqué dans la pathologie.

Enfin, lorsque seul un mode de transmission autosomique récessif est décrit, un deuxième événement touchant ce gène doit être recherché.

## 8. Données fonctionnelles

La génomique fonctionnelle permet d'étudier la fonction d'un gène, sa régulation et les interactions des ARN et des protéines qu'ils produisent. Pour cela, diverses conditions physiologiques sont appliquées sur les génotypes sauvages et mutants afin d'analyser le transcriptome et le protéome. Même si elles sont rarement réalisées à cause de leur complexité, les études fonctionnelles constituent un argument fort en faveur ou en défaveur de la pathogénicité d'un variant.

## **B. Classification selon les recommandations de l'ACMG**

Ce faisceau d'arguments permet de classer les variants un à un selon les recommandations de 2015 de l'ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) et de l'ANPGM (Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire) (89).

### 1. Classification des variants

Cette classification se base sur 28 critères plus ou moins pondérés par un nombre de points. Ces derniers donnent une somme qui divise les variants en cinq grandes

classes (annexes 8, 9 et 10). Ainsi, l'interprétation des variants est harmonisée et les variations inter- et intra- laboratoires sont limitées (64,89).

- **Classes 1 et 2 : variants bénins ou probablement bénins**

Ces variants modifient peu ou pas la protéine produite ou sont considérés comme des polymorphismes si leur fréquence dans la population générale est >1%.

- **Classe 3 : variants de signification indéterminée (VSI ou VOUS)**

Ces variants sont difficiles à interpréter : les outils et les données disponibles à ce jour ne permettent pas d'exclure ou d'affirmer l'implication de ce type de variant dans la pathologie du patient. Ils ne peuvent pas être utilisés pour la modification de la prise en charge du patient et sont réévalués en fonction de l'évolution des connaissances.

- **Classes 4 et 5 : variants probablement pathogènes ou pathogènes**

Ces variants présentent des arguments forts en faveur de leur pathogénicité : ils ont soit une lourde conséquence sur la protéine (variations non-sens ou avec un décalage du cadre de lecture) soit ils sont déjà décrits dans la littérature comme pathogènes. Le diagnostic moléculaire est considéré comme établi et le lien de causalité entre les variants et le phénotype est affirmé.

## 2. Place des réunions de concertations pluridisciplinaires

En cas de doute ou de difficultés dans la classification d'un variant, le biologiste a la possibilité de présenter le dossier lors des réunions de concertations pluridisciplinaires (RCP) locales ou nationales. Au cours de celles-ci, un dialogue avec le clinicien a lieu afin de débattre et de confronter les différents arguments en faveur ou en défaveur de l'implication du variant dans la pathologie du patient. Lorsque le doute persiste, un avis peut également être demandé à un centre expert dans la pathologie concernée.

## 3. Le problème des VSI

Les VSI (variant de signification inconnue) constituent un problème majeur dans ce type d'analyse de biologie moléculaire. Malgré l'avancée des connaissances, il est encore courant de mettre en évidence un variant non connu des différentes bases de données (locales, de population générale et médicales). Les outils de prédiction *in silico* sont parfois discordants concernant la nature délétère de ce variant. L'état actuel

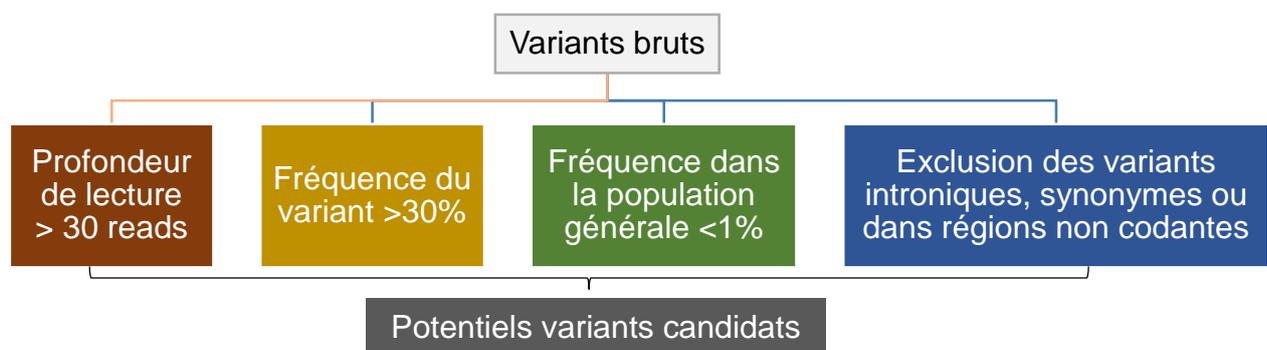
des connaissances, les données bibliographiques et les prédictions ne permettent pas d'obtenir assez d'arguments en faveur ou en défaveur de la pathogénicité du variant.

Le nombre de VSI mis en évidence reste très important : une étude rapporte 82% de VSI sur 5900 variants analysés en NGS-surdité dans une cohorte de 1119 patients présentant une surdité (63). Une étude espagnole montre que 61,9% des dossiers rendus positifs en panel de gènes NGS-surdité contiennent des variants non décrits par les bases de données disponibles (HGMD professionnel, OMIM, PubMed ? dbSNP, 1000 Genomes Project, ESP, ExAC, ClinVar) (75).

La place du biologiste dans l'analyse de ces VSI est primordiale puisqu'elle requiert généralement une analyse fine avec une revue de littérature et un dialogue avec le prescripteur. Le temps biologique passé sur un variant est à prendre en considération lors du choix de la stratégie d'analyse car il est en moyenne de 40 minutes par VSI (75). Ces VSI sont donc aujourd'hui considérés comme des variants de découverte fortuite et ne sont pas utilisés dans l'élaboration de la prise en charge du patient et de sa famille. Ils peuvent être réévalués à la demande en fonction de l'évolution de la littérature ou de nouveaux éléments clinico-biologiques et des études complémentaires peuvent également être demandées (étude de ségrégation familiale, étude de l'épissage, étude fonctionnelle, explorations cliniques complémentaires).

Au laboratoire du CHU de Lille, le rendu d'un VSI dépend de son lien avec la pathologie suspectée. Lorsqu'il semble ne pas être responsable des signes cliniques du patient, il n'est pas mentionné dans le compte rendu. Dans le cas contraire, il est traité comme un variant de classe 4 ou 5 : par conséquent, il est vérifié par une seconde technique et décrit dans le compte rendu d'analyse.

#### 4. Variants « candidats »



**Figure 43 : Méthode de sélection des variants candidats**

Les variants dits « candidats » se trouvent dans les fichiers .vcf, ne sont pas éliminés par les différents filtres et présentent les caractéristiques suivantes :

- Classe 3 et possédant des arguments en faveur d'une implication dans la pathologie du patient.
- Classe 4 ou 5 (même sans lien apparent avec la pathologie du patient).

Ils vont alors être vérifiés par la seconde technique de séquençage afin d'éliminer d'éventuels faux-positifs. En fonction du type de variation, ils sont confirmés soit par séquençage Sanger (pour les SNP) soit par recherche de réarrangements géniques par MLPA ou qPCR (pour les CNV) puis soumis à une ségrégation familiale lorsque les prélèvements des apparentés sont disponibles.

#### IV. Technique Sanger

La technique Sanger est une méthode dite par synthèse. Des amorces se fixent par hybridation aux extrémités du fragment d'ADN ciblé. Une ADN polymérase réalise ensuite la synthèse du brin d'ADN complémentaire *in vitro*. Pour cela, le milieu réactionnel contient deux types de nucléotides : les dNTP c'est-à-dire des désoxyribonucléotides « classiques » et les ddNTP (didésoxyribonucléotides), des nucléotides privés de leur groupement hydroxyle en 3', marqués par un fluorochrome et possédant un effet terminateur de chaîne (51). L'ADN polymérase intègre aléatoirement l'un ou l'autre type de nucléotide et l'élongation s'arrête lorsqu'un ddNTP est incorporé. De ce fait, plus le ddNTP est intégré tardivement, plus le fragment d'ADN sera grand. En faisant une migration sur un gel de polyacrylamide, ces fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille (18).

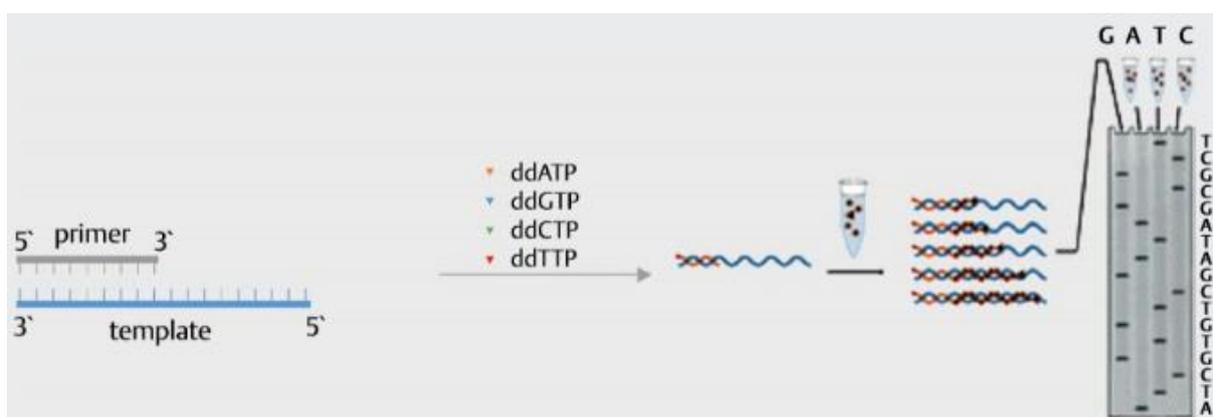
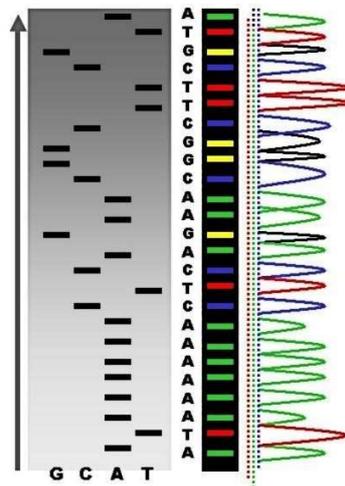


Figure 44 : Schéma de la technique Sanger (18)

La révélation de la fluorescence propre à chaque type de ddNTP et la détermination de la taille du fragment d'ADN permettent la reconstitution de la séquence d'ADN : le graphique obtenu à partir de cette lecture s'appelle un électrophorégramme. Fiable et précise, cette méthode est encore considérée comme le gold standard du séquençage.



**Figure 45 : Electrophorégramme avant et après automatisation de la lecture**

## V. Etude des CNV (copy number variations)

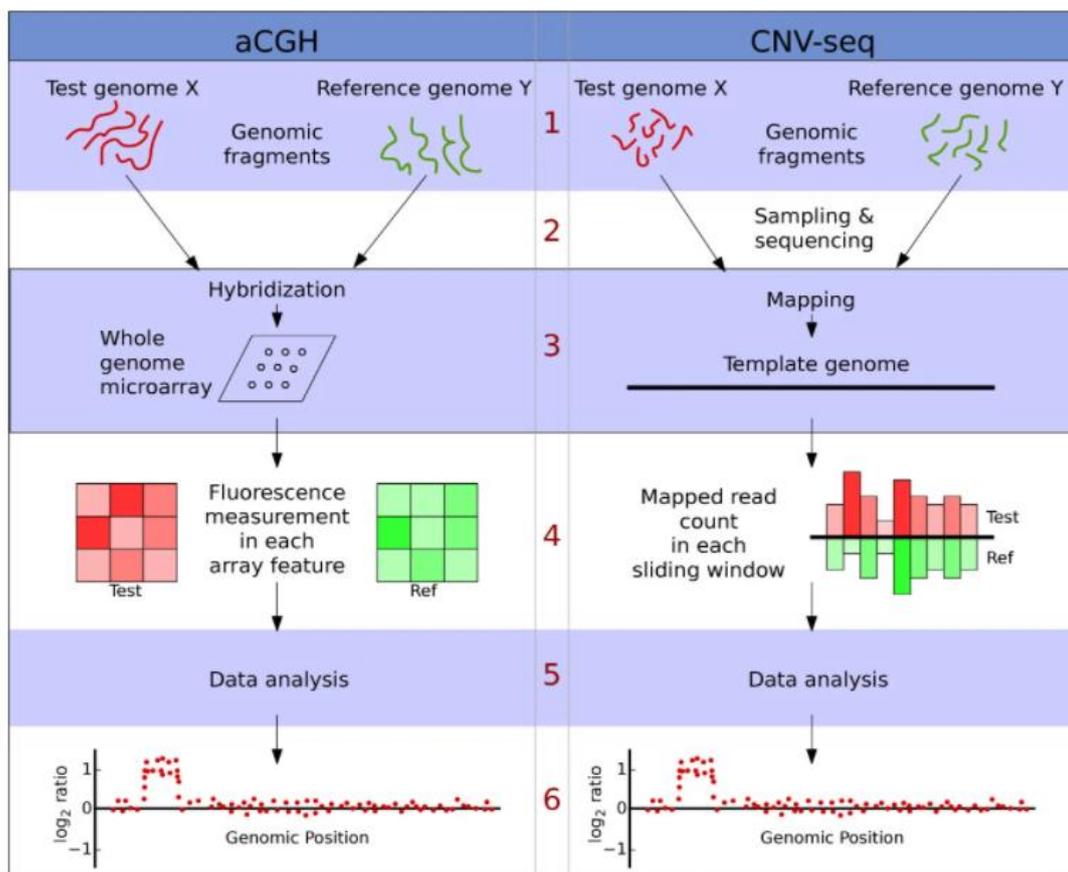
La technique NGS est capable de dépister les grands réarrangements géniques notés CNV (*copy number variations*) en plus des SNV (*single nucleotide variant*).

Une étude de panel de gènes peut difficilement être exhaustive si elle n'inclut pas l'analyse des CNV. En effet, près de 5% à 10% de la population générale seraient porteur d'une large délétion ou d'une large duplication d'une taille supérieure à 500 kb avec une fréquence inférieure à 0,05% (90). Ces grands réarrangements représentent environ 9,5% de notre génome et sont fréquemment impliqués en pathologie (18). Il est donc nécessaire de regarder si les gènes étudiés dans notre panel ne sont à sujets à de grandes variations (délétions ou duplications).

Un modèle mathématique robuste a permis d'élaborer une méthode comparative similaire à celle utilisée pour l'analyse des CGH-Arrays. Il prend en compte la couverture et le nombre total de *reads* pour chaque région analysée. Le principe est basé sur la comparaison d'un patient par rapport à l'ensemble des autres patients de la librairie qui servent en quelque sorte de « pool témoins ».

Pour arriver à détecter ces CNVs, un calcul de ratio est effectué entre la couverture d'une région génomique pour un patient sur la moyenne des couvertures pour cette même région de l'ensemble des patients composant la librairie analysée.

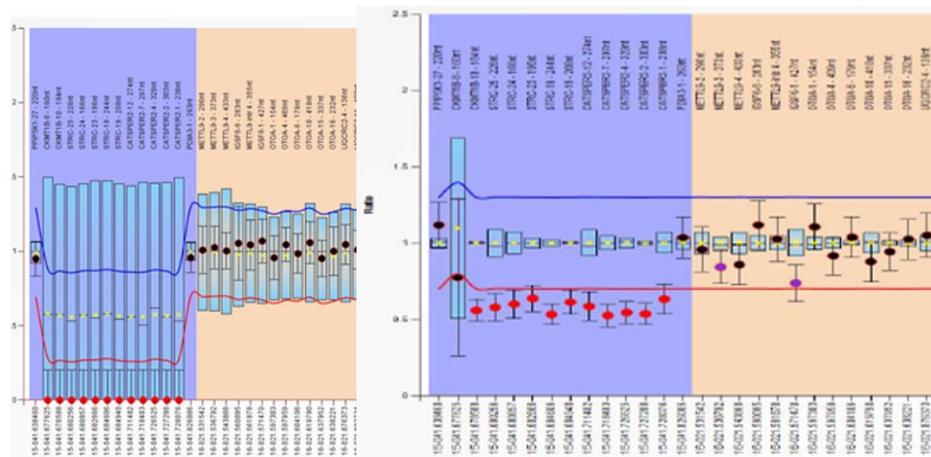
Lorsque le ratio est  $<0.6$ , cela signifie que la région génomique est sous-représentée chez le patient analysé. Si au moins 3 régions consécutives ont un ratio  $<0.6$ , cela signifie que le patient est probablement porteur d'une délétion sur cette zone. À l'inverse, le patient est probablement porteur d'une duplication lorsqu'au moins 3 régions consécutives possèdent un ratio  $>1.5$ .



**Figure 46 : Comparaison de la détection des réarrangements géniques via CGH-Array à gauche et via NGS à droite (91)**

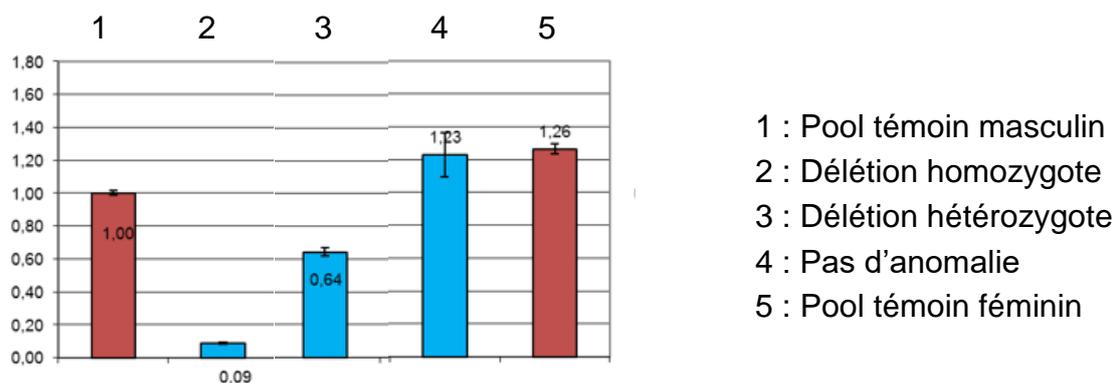
Lorsqu'une anomalie est suspectée, une vérification par une seconde technique est indispensable pour éliminer les artefacts et les faux positifs. Lorsqu'un kit spécifique du/des gène(s) concerné(s) est disponible au laboratoire, la confirmation se fait par technique MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). S'il n'y a pas de kit à disposition, la technique qPCR est utilisée.

La MLPA est une méthode semi-quantitative basée sur la PCR et utilisant des sondes fluorescentes spécifiques à l'ADN ciblée. En comparant le nombre de sondes du patient avec celui d'un ADN de référence, il est possible de déterminer si le patient est porteur d'une délétion ou d'une duplication.



**Figure 47 : Exemple de résultats de MLPA pour la confirmation d'une délétion : homozygote à gauche et hétérozygote à droite**

La qPCR, également appelée PCR quantitative ou PCR en temps réel permet d'amplifier l'ADN ciblée et de suivre la cinétique de la réaction par détection de fluorescence. En extrapolant ces valeurs, il est possible de déterminer la quantité d'ADN initialement présente, qui est comparé avec des ADN « témoins ».



**Figure 48 : Exemple résultats de qPCR pour la confirmation d'une délétion**

Les échantillons venant de l'extérieur sous la forme d'ADN déjà extrait sont problématiques pour l'analyse de leur CNV. En effet, la technique d'extraction interfère avec la technique de capture. Ce phénomène s'explique en partie par la sensibilité de la PCR à la qualité de l'ADN et à la salinité du tampon. Une phrase mentionnant que les CNV sont ininterprétables est alors intégrée dans le compte rendu.

## **VI. Étude rétrospective des résultats NGS validés**

### **A. Collecte des dossiers**

Une étude transversale descriptive a été menée rétrospectivement à partir des dossiers sous format papier stockés actuellement dans l'enceinte du Centre de Biologie Pathologie de Lille.

La population étudiée est composée de l'ensemble des patients pour lesquels une demande de panel-NGS surdité a été réalisée et dont le résultat a été rendu au médecin prescripteur. Seul le dossier du sujet index a été pris en compte, les demandes d'étude de ségrégation familiale sont intégrées dans la rubrique « ségrégation familiale » du cas index. Dans chaque dossier devaient se trouver le consentement éclairé de biologie moléculaire et la fiche de renseignements cliniques disponibles sur le catalogue des analyses (annexes 11 et 12).

Au total, le recueil de données a permis l'inclusion de 1228 patients. L'étude réalisée couvre ainsi une période de six ans, allant de la mise en place de l'analyse en 2014 jusqu'en mars 2020.

41 dossiers datant des années 2014 et 2015 n'ont pas eu de résultats rendus au prescripteur car ils avaient été sélectionnés pour la mise au point de la méthode NGS et 82 dossiers n'ont pas été retrouvés sous leur format papier.

### **B. Mise au point du panel**

Durant cette période, le nombre de gènes étudiés dans le panel NGS-surdité n'a cessé d'augmenter. La sélection des gènes étudiés dans notre panel est réalisée en consultant les données de la littérature, la liste des gènes étudiés dans d'autres CHU et en dialoguant avec les cliniciens prescripteurs. En effet, lors de sa mise en place en 2014, seuls 123 gènes étaient inclus dans le « panel 1 ». Dès 2015, grâce aux nouvelles descriptions dans la littérature, de nouveaux gènes ont été intégrés au panel, donnant ainsi le « panel 2 » comprenant l'étude de 146 gènes puis à partir de 2017, le « panel 3 » étudiant 170 gènes (67 dans DFNB, 35 dans DFNA, 6 lié à l'X, 68 formes syndromiques). Enfin, le panel actuel appelé « panel 4 » a été mis en place à partir de fin 2019 et inclut l'étude de 214 gènes impliqués dans les surdités. Les nouveaux

gènes de ce panel sont en partie ceux qui ont été récemment mis en cause dans les neuropathies auditives isolées ou syndromiques.

### **C. Recueil des données cliniques et génétiques**

La première partie du travail a donc été de retrouver ces dossiers et de les étudier successivement par ordre alphabétique et de compléter les différentes informations qu'ils fournissent dans un tableur via le logiciel Microsoft Excel 2010. Ce dernier a été divisé en cinq catégories différentes afin de regrouper toutes les données nécessaires à la bonne compréhension de chaque dossier.

- Informations relatives au patient : nom, prénom, date de naissance.
- Informations relatives au prélèvement : numéro échantillon, date de la demande, numéro de panel, prescripteur, ville/CH du prescripteur.
- Renseignements cliniques : suspicion clinique initiale, type de surdité, âge d'apparition de la surdité, surdité bilatérale/unilatérale/asymétrique, sévérité de la surdité, présence ou non de malformations au niveau de l'oreille, autres renseignements cliniques, présence ou non d'antécédents familiaux, surdité évolutive ou non, présence de l'audiométrie dans le dossier, présence de facteurs exogènes, présence d'une consanguinité au sein de la famille.
- Rendus de résultats : positif/négatif/VSI, gène(s) dans le(s)quel(s) se trouve(nt) le(s) variant(s), positions génomiques des variants, changements protéiques induits par ces variations, statut hétérozygote/homozygote/hémizygote pour ces variants, type de variations (faux-sens, non-sens, délétion, insertion...).
- Ségrégation familiale.

Après retranscription de l'ensemble des données à partir des dossiers papiers sur un tableau Microsoft Excel, l'ensemble des analyses statistiques descriptives des données ont été effectuées avec le logiciel SAS (*Statistical Analysis System*).

### **D. Analyse des données**

Une cartographie des demandes de panel NGS surdité a été dessinée afin d'apprécier le profil des demandes nationales entre 2014 et 2020. Afin de comparer l'évolution dans le temps, il a été choisi de diviser l'ensemble des demandes en deux : le premier groupe est constitué des analyses effectuées entre 2014 et 2017 c'est-à-dire celles qui

ont été réalisées avec le panel « 1 » et le panel « 2 », qu'on note « panel 1+2 ». Le second groupe regroupe les analyses réalisées entre 2017 et 2020 c'est-à-dire, celles qui ont été effectuées avec le panel « 3 » et le panel « 4 » qu'on note « panel 3+4 ».

Les suspicions cliniques (DFNB, DFBA, syndromique, NA) ont été analysées selon les mêmes modalités : « panel 1+2 », « panel 3+4 », « total des demandes ». Les syndromes les plus couramment suspectés ont été mis en évidence à partir de l'ensemble des demandes. Le profil des patients est décrit en fonction du type de surdité, de l'âge d'apparition de la surdité, de son caractère uni- ou bilatérale, de la gravité de la surdité, de la présence de malformations des oreilles, de la présence d'autres signes cliniques et de la présence d'antécédents familiaux.

## **E. Analyse des résultats NGS**

Grâce aux résultats de l'ensemble des bilans analysés, l'apport de la technique NGS dans le diagnostic des surdités par rapport au séquençage d'une poignée de gènes a été démontré. Le taux de positivité (positifs/VSI/négatif) a été déterminé sur la globalité des demandes, sur les groupes « panel 1+2 » et « 3+4 » et selon la suspicion clinique.

Par la suite, seuls les positifs ont été conservés afin d'établir le profil clinique des patients ayant une analyse moléculaire positive. Le type de mutation impliqué dans le rendu des résultats positifs a pu être comparé à une étude.

Les gènes ayant des variants pathogènes ou VSI les plus fréquemment retrouvés ont pu être dégagés parmi les différentes catégories (DFNA, DFNB, NA et syndromique). Le profil des variations a pu être dessiné en fonction du gène impliqué, du type de variation, de l'état hétérozygote-homozygote de la variation.

La concordance entre la suspicion clinique initiale et le diagnostic moléculaire rendu a également été effectuée afin de se rendre compte du taux de concordance.



# RÉSULTATS

## I. Profil des demandes en France

### A. Description de la provenance des demandes

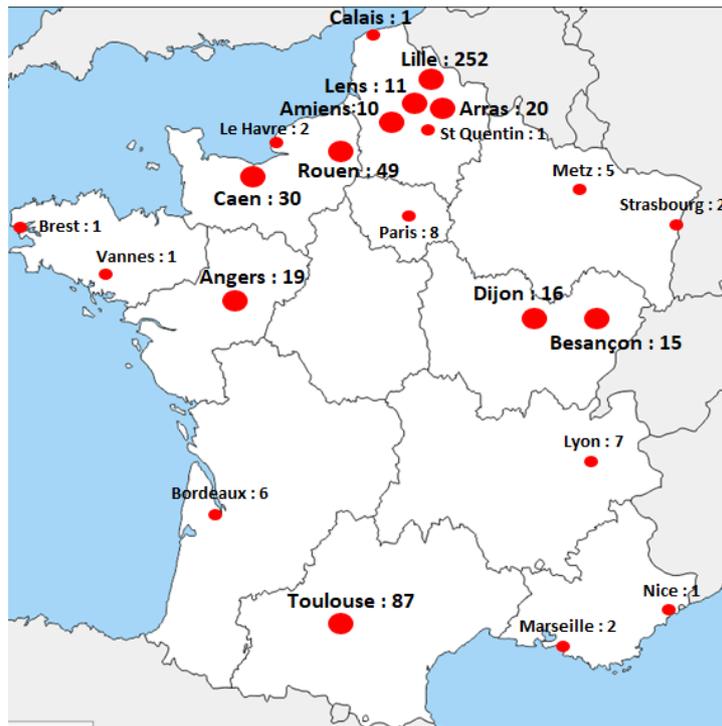
Au total, entre 2014 et 2020, un total de 1224 prélèvements a été adressé au CBP de Lille avec une demande de NGS-surdité.

	<b>Panel 1+2 (2014-2017)</b>	<b>Panel 3+4 (2017-2020)</b>	<b>Total</b>
<b>Lille</b>	252 (45%)	240 (35%)	492 (40%)
<b>Extérieur</b>	298 (55%)	434 (65%)	732 (60%)
<b>Total</b>	550	674	1224

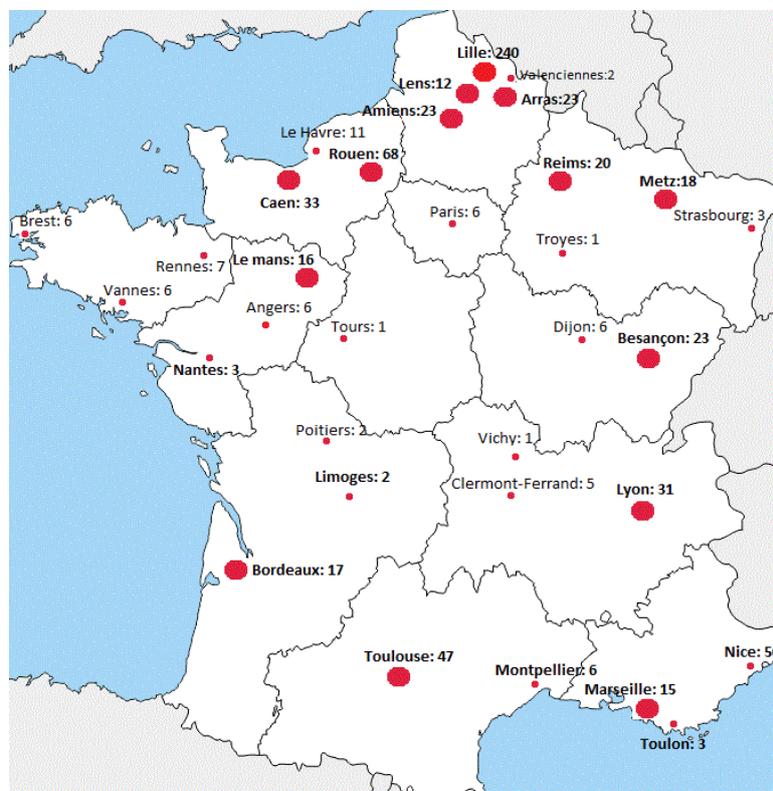
**Tableau 7 : Répartition des demandes en fonction des deux groupes de panel NGS surdité (n=1224)**

Concernant les panels 1+2, c'est-à-dire les panels utilisés entre 2014 et 2017, 554 échantillons ont été reçus au laboratoire, 252 venant du CHU de Lille (45%) et 298 venant de l'ensemble de la France (55%). Concernant les panels 3+4 c'est-à-dire ceux mis en place entre 2017 et 2020, 674 patients ont été inclus dans ce travail dont 240 venant du CHU de Lille (35%) et 434 du reste de la France (65%).

Avec le temps et l'évolution des panels, le nombre de prélèvements venant du secteur lillois reste globalement stable, tandis que le nombre de demandes NGS-surdité a augmenté pour les demandes venant de l'extérieur au fil des années.



**Figure 49 : Carte de France répertoriant la provenance des différentes demandes entre 2014 et 2017**



**Figure 50 : Carte de France répertoriant la provenance des différentes demandes entre 2017 et 2020**

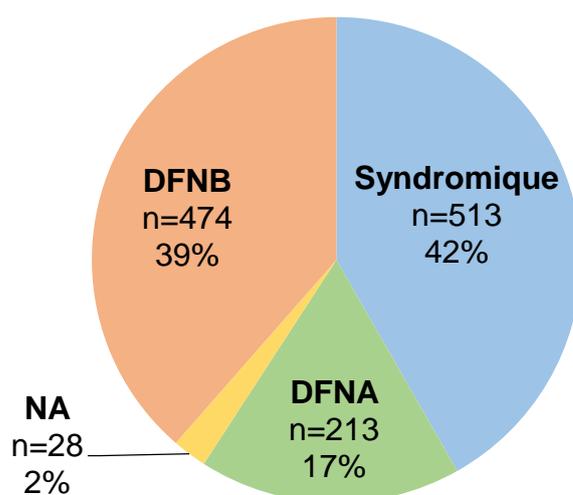
En plus de leur nombre croissant, les demandes viennent aussi également de villes et de prescripteurs plus variés que lors de la mise en place de cette technique.

Quand le clinicien effectue une demande de panel NGS-surdité, il doit préciser sur l'ordonnance le type d'analyse qu'il souhaite effectuer ainsi que la suspicion clinique afin d'aider le biologiste dans l'analyse des résultats. En fonction de l'anamnèse et de l'examen clinique, les prescripteurs s'orientent vers une surdité soit syndromique soit non-syndromique. Ils déterminent également, grâce aux antécédents familiaux rapportés, le mode de transmission génétique : autosomique dominante, autosomique récessive ou liée à l'X.

La répartition des patients en fonction de leur suspicion clinique initiale et du mode de transmission génétique suspecté est stable au cours du temps pour chaque catégorie.

Suspicion clinique	Panel 1+2 2014-2017	Panel 3+4 2017-2020	Total
<b>Syndromique</b>	224 (41%)	289 (44%)	513 (42%)
<b>Non syndromique</b>	318 (59%)	369 (56%)	687 (57%)
- DFNA	111 (20%)	102 (16%)	213 (17%)
- DFNB	207 (38%)	267 (40%)	474 (39%)
<b>Total</b>	542	658	1200

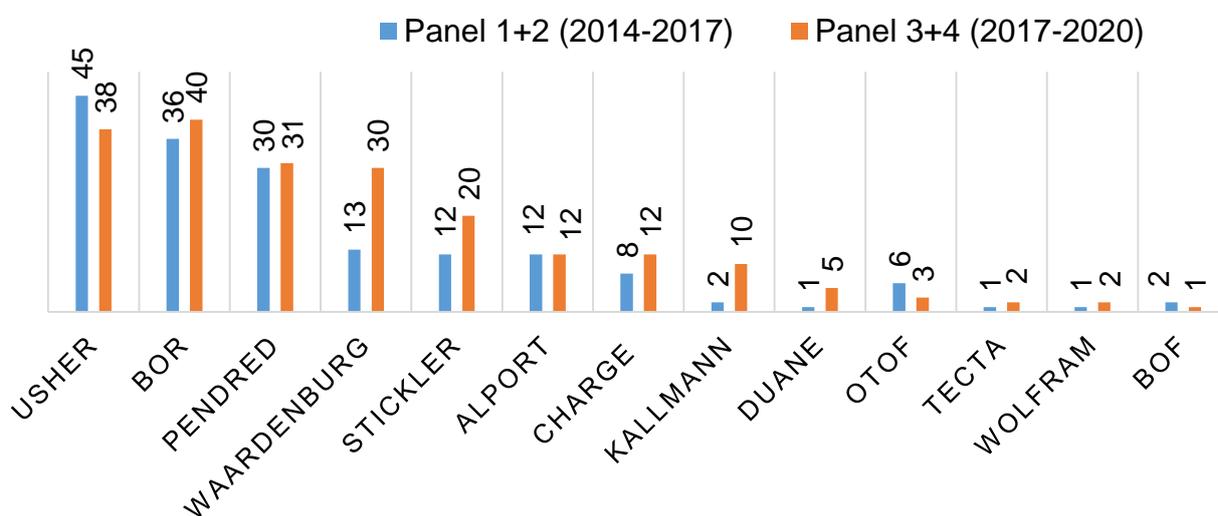
**Tableau 8 : Répartition des suspicions cliniques au cours du temps**



**Figure 51 : Répartition des suspicions cliniques (n=1228)**

NOM DU SYNDROME	NOMBRE ET POURCENTAGE
Syndrome d'Usher	83 (16,1%)
Syndrome BOR	76 (14,8%)
Syndrome de Pendred	61 (11,8%)
Syndrome de Waardenburg	43 (8,4%)
Syndrome de Stickler	32 (6,2%)
Syndrome d'Alport	24 (4,7%)
Syndrome de Charge	20 (3,9%)
Autres syndromes	174 (33,9%)

**Tableau 9 : Syndromes les plus fréquemment suspectés (n=513)**



**Figure 52 : Syndromes les plus fréquemment suspectés au cours du temps**

Lors des consultations, certaines formes de surdit e sont plus souvent suspect ees, notamment les syndromes les plus fr equents ou ceux pr esentant des atteintes tr es sp ecifiques. Sur l'ensemble des demandes reçues au laboratoire du CHU de Lille entre 2014 et 2020, les syndromes qui se d emarquent sont : le syndrome d'USHER, le syndrome BOR, le syndrome de Pendred, le syndrome de Waardenburg, le syndrome de Stickler, le syndrome d'Alport et le syndrome de Charge. Cette r epartition n'a pas  evolu e entre 2014 et 2020.

## **B. Description clinique des patients**

Lorsque le clinicien réalise une demande de panel NGS-surdité, il doit également fournir au laboratoire une fiche de renseignements cliniques afin d'aider le biologiste dans l'interprétation des résultats. Elle donne des informations cruciales pour préciser le tableau clinique du patient : le type de surdité (perception ou transmission), la sévérité, l'atteinte uni- ou bilatérale, l'évolutivité et l'association à d'autres signes cliniques. Lorsque cela est possible, le clinicien complète aussi un arbre généalogique afin de connaître le nombre de personnes déficientes auditives dans la famille. Cette feuille est disponible en ligne sur le catalogue des analyses du laboratoire (annexe).

Malheureusement, elle n'a pas été mise en place dès le début de la mise en place de l'analyse et reste encore aujourd'hui très souvent incomplète. Elle demeure pourtant essentielle car le tableau clinique permet aux biologistes de cibler certains gènes lors de l'analyse des variants.

	<b>Panel 1+2 (2014-2017)</b>	<b>Panel 3+4 (2017-2020)</b>	<b>Total</b>
<b>Perception</b>	503 (91%)	577 (86%)	1080 (88%)
<b>Transmission</b>	7 (1%)	9 (1%)	16 (1%)
<b>Mixte</b>	16 (3%)	24 (4%)	40 (3%)
<b>Pas de surdité</b>	11 (2%)	29 (4%)	40 (3%)
<b>Neuropathie auditive</b>	3 (1%)	3	6 (1%)
<b>Surdité inflammatoire</b>	0	1	1
<b>Aucun renseignement clinique</b>	14 (2%)	31 (5%)	45 (4%)

**Tableau 10 : Répartition en fonction de leur type de surdité et du temps  
(n=1228)**

Une très grande majorité des demandes concernent des surdités de perception (88%), ce qui est en accord avec les indications du panel NGS-surdité. Une fois ces renseignements cliniques répertoriés, le profil des patients a pu être dressé au cours du temps et en fonction de chaque catégorie de caractéristiques cliniques.

	<b>2014-2017 Panel 1+2 n=554</b>	<b>2017-2020 Panel 3+4 n=674</b>	<b>Total n=1228</b>
<b>Age d'apparition de la surdité (n=817)</b>			
- Congénitale	185 (47%)	206 (49%)	<b>391 (48%)</b>
- Pré-linguale	30 (8%)	44 (10%)	<b>74 (9%)</b>
- Post-linguale	180 (45%)	172 (41%)	<b>352 (43%)</b>
Total	395	422	<b>817</b>
<b>Uni ou bi-latérale (n=955)</b>			
- Bilatérale	396 (91%)	439 (85%)	<b>835 (87%)</b>
- Unilatérale	31 (7%)	60 (11%)	<b>91 (10%)</b>
- Asymétrique	9 (2%)	20 (4%)	<b>29 (3%)</b>
Total	436	519	<b>955</b>
<b>Gravité de la surdité (n=734)</b>			
- Cophose	17 (5%)	15 (4%)	<b>32 (4%)</b>
- Profond	89 (27%)	104 (26%)	<b>193 (26%)</b>
- Sévère	58 (18%)	90 (22%)	<b>148 (20%)</b>
- Moyenne	135 (41%)	153 (38%)	<b>288 (40%)</b>
- Légère	31 (9%)	42 (10%)	<b>73 (10%)</b>
Total	330	404	<b>734</b>
<b>Malformations oreilles (n=1228)</b>			
Présence	99 (18%)	138 (20%)	<b>237 (19%)</b>
Absence	455 (82%)	536 (80%)	<b>991 (81%)</b>
<b>Autres signes cliniques (n=1228)</b>			
Présence	148 (27%)	252 (37%)	<b>400 (33%)</b>
Absence	406 (73%)	422 (63%)	<b>828 (67%)</b>
<b>ATCD familiaux (n=1228)</b>			
Présence	242 (44%)	266 (39%)	<b>508 (41%)</b>
Absence	312 (56%)	408 (61%)	<b>720 (59%)</b>

**Tableau 11 : Répartition des patients en fonction de leurs différentes caractéristiques cliniques et au cours du temps**

## II. Résultats des analyses NGS

### A. Généralités

Une fois le séquençage réalisé sur les automates Illumina Nextseq550 ou Miseq, les données récoltées sont stockées sur les serveurs BioInfo et analysées avec les logiciels à disposition au Pôle de Biologie Pathologie du CHU de Lille. À partir du fichier .vcf et selon les recommandations de l'ANPGM, les variants retrouvés sont classés en fonction des renseignements cliniques, des résultats de l'imagerie, des tests fonctionnels d'audiométrie et de l'ensemble de l'anamnèse.

Trois résultats sont possibles :

- Positif : variant(s) de classes 4 ou 5. Les variants pathogènes sont confirmés par une seconde technique et décrits dans le compte-rendu.
- VSI : variant(s) de classe 3
- Négatif : variant(s) de classe 1, classe 2 ou classe 3 non concordant avec la clinique. Ces variants bénins ne sont pas mentionnés dans le compte-rendu.

### B. Taux de positivité

#### 1. Evolution au cours du temps

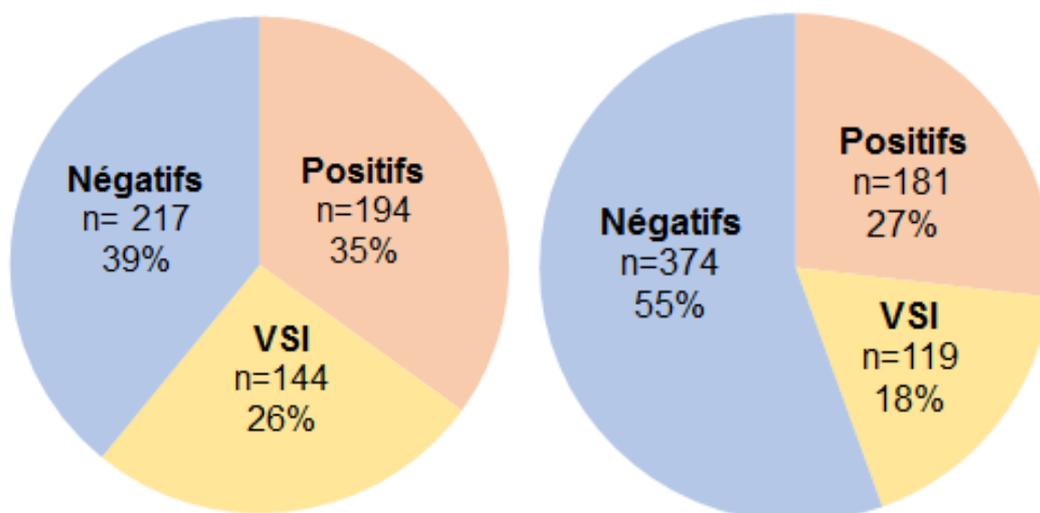
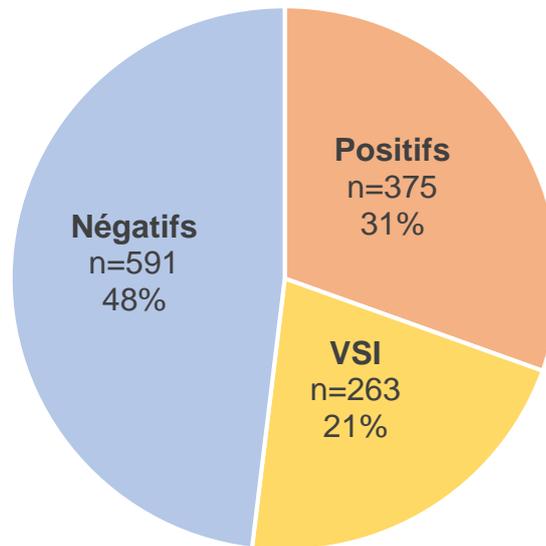


Figure 53 : Résultats des analyses NGS entre 2014 et 2017 en haut (n=555) et entre 2017 et 2020 en bas (n=674)

Contrairement aux prévisions, le taux de positivité n'a pas augmenté au cours du temps : 35% de positif entre 2014 et 2017 contre 27% entre 2017 et 2020.



**Figure 54 : Résultats globaux des analyses NGS entre 2014 et 2020 (n=1229)**

## 2. Taux de positivité en fonction des caractéristiques cliniques

Pour chaque caractéristique clinique, un taux de positivité a pu y être associé et comparé par rapport aux pourcentages de positivité retrouvés dans un article de la littérature qui a étudié une cohorte similaire à la nôtre (n=1119) sur un panel de gènes surdités comprenant 66 ou 89 gènes (63) .

	<b>Ensemble des bilans n=1228</b>	<b>Nombre de dossiers positifs</b>	<b>Taux de positivité</b>	<b>Taux de positivité dans la littérature</b>
<b>Age d'apparition de la surdité (n=817)</b>				
- Congénitale	391 (48%)	140	36%	44% (63) 40% (75)
- Pré-linguale	74 (9%)	29	39%	29% (63)
- Post-linguale	352 (43%)	101	29%	28% (63)
<b>Uni ou bi-latérale (n=955)</b>				
- Bilatérale	835 (87%)	275	33%	44% (63) 44,5% (75)
- Unilatérale	91 (10%)	11	12%	1% (63), 1/5 (75)
- Asymétrique	29 (3%)	6	21%	22% (63)
<b>Gravité de la surdité (n=734)</b>				
- Cophose	32 (4%)	9	28%	
- Profond	193 (26%)	55	28%	
- Sévère	148 (20%)	46	31%	
- Moyenne	288 (40%)	108	38%	
- Légère	73 (10%)	15	21%	
<b>Malformations oreilles (n=1228)</b>				
Présence	237 (19%)	55	23%	
Absence	991 (81%)	323	33%	
<b>Autres signes cliniques (n=1228)</b>				
Présence	400 (33%)	140	35%	27% (63)
Absence	828 (67%)	238	29%	42% (63)
<b>ATCD familiaux (n=1228)</b>				
Présence	508 (41%)	174	34%	45% (63)
Absence	720 (59%)	204	28%	37% (63)

**Tableau 12 : Comparaison des taux de positivité retrouvés en fonction des caractéristiques cliniques des patients avec ceux retrouvés dans la littérature**

### 3. Caractéristiques des dossiers rendus positifs (n=378)

Pour cette partie de l'étude, seuls les dossiers ayant été rendus avec un diagnostic moléculaire positif ont été sélectionnés.

#### **a. Caractéristiques cliniques**

Le nombre de dossiers positifs et leur pourcentage a été déterminé pour chaque caractéristique clinique disponible dans les dossiers de ces patients.

Ces résultats sont à interpréter avec précautions car ils dépendent du nombre de dossiers ayant chaque caractéristique clinique : par exemple, peu de dossiers mentionnent la présence clinique d'une neuropathie auditive car c'est une pathologie peu connue et donc peu diagnostiquée. De plus, de nombreux dossiers ne contiennent aucun renseignement clinique.

<b>Origine de prescription</b>	
- Intérieur (région lilloise)	156 (41,3%)
- Extérieur (hors région lilloise)	220 (58,2%)
<b>Numéro de panel</b>	
- 1+2	194 (51,3%)
- 3+4	184 (48,7%)
<b>Suspicion clinique</b>	
- DNFA	75 (19,8%)
- DFNB	131 (34,7%)
- NA	7 (1,9%)
- Syndromique	165 (43,7%)
<b>Type de surdité</b>	
- Perception	340 (89,9%)
- Transmission	2 (0,5%)
- Mixte	13 (3,4%)
- NA	2 (0,5%)
- Pas de précision sur la surdité	11 (2,9%)
- Pas de surdité	9 (2,4%)
<b>Age d'apparition de la surdité</b>	
- Congénitale	140 (37,0%)
- Pré-linguale	29 (7,7%)
- Post-linguale	101 (26,7%)

<b>Gravité de la surdité</b>	
- Cophose	9 (2,4%)
- Profond	55 (14,6%)
- Sévère	46 (12,2%)
- Moyenne	108 (28,6%)
- Légère	15 (4,0%)
<b>Uni ou bi-latérale</b>	
- Bilatérale	275 (72,8%)
- Unilatérale	11 (2,9%)
- Asymétrique	6 (1,6%)
<b>Malformations oreilles</b>	
- Présence	55 (14,6%)
- Absence	323 (85,4%)
<b>Autres signes cliniques</b>	
- Présence	140 (37,0%)
- Absence	238 (63,0%)
<b>ATCD familiaux</b>	
- Présence	174 (46,0%)
- Absence	204 (54,0%)

**Tableau 13 : Caractéristiques cliniques des patients ayant eu un diagnostic moléculaire positif (n=378)**

***b. Caractéristiques des variations retrouvées***

Sur l'ensemble des dossiers positifs étudiés, chaque variant rendu a été étudié. Tous les variants mentionnés et décrits sur les comptes rendus ont été décrits en fonction du type de variation et du statut des patients.

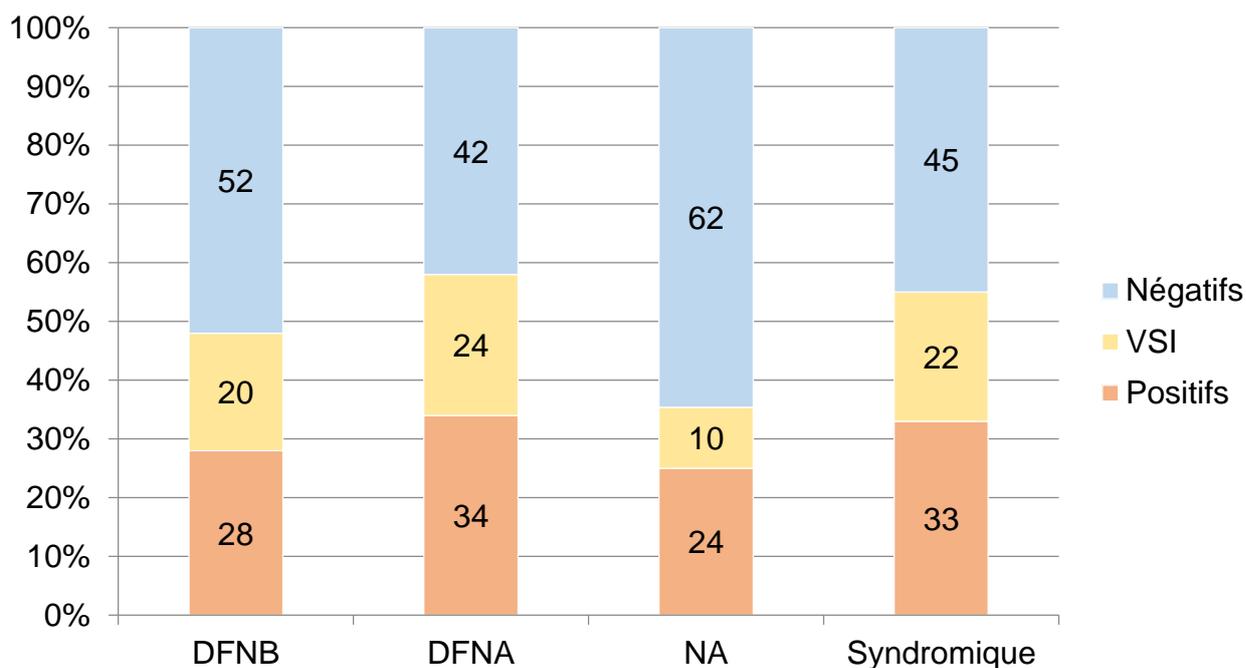
Type de variations retrouvées	
Faux-sens	280 (52,8%)
Ins/del CNV	140 (26,4%)
Non-sens	80 (15,1%)
Splice	30 (5,6%)
Statut du patient	
Hémizygote	8 (1,5%)
Hétérozygote	454 (85,7%)
Homozygote	67 (12,6%)
NR	17 (3,2%)

**Tableau 14 : Caractéristiques des variations mentionnées dans les comptes rendus (n=530)**

#### 4. Répartition en fonction de la suspicion clinique initiale

	DFNB	DFNA	NA	Syndromique	Totaux
<b>Positif</b>	131 (28%)	73 (34%)	7 (24%)	165 (33%)	376 (31%)
<b>VSI</b>	98 (20%)	50 (24%)	3 (10%)	111 (22%)	262 (21%)
<b>Négatif</b>	245 (52%)	90 (42%)	18 (62%)	237 (45%)	590 (47%)
<b>Totaux</b>	474	213	28	513	1228

**Tableau 15 : Répartition des résultats des panels NGS surdité en fonction de la suspicion diagnostic initiale**



**Figure 55 : Résultats des panels NGS surdité en fonction de la suspicion diagnostic initiale**

Pour cette partie, les différents types de surdité ont été séparés en 4 groupes en fonction de leur suspicion clinique initiale et de leur mode de transmission : surdité à transmission autosomique récessive (DFNB), autosomique dominante (DFNA), neuropathies auditives (NA) et surdités syndromiques. Les Neuropathies Auditives ont été mis dans un groupe à part entière car elles constituent une entité particulière dans les surdités et de nombreux gènes impliqués dans ces formes n'ont été ajoutés au panel qu'en 2020. Les autres modes de transmission n'ont pas été étudiés car ils ne concernaient qu'une minorité de patients.

Pour chaque type de transmission, plusieurs paramètres ont été étudiés : le résultat NGS, le nombre de variants concordant avec le groupe, le type de variation ainsi que le statut du patient pour la(les) variation(s) mentionnée(s) sur le compte rendu.

**a. Pour les surdités non-syndromiques**

	DFNB (n=474)	DFNA (n=213)	NA (n=28)
<b>Résultats NGS</b>			
Positifs	131 (28%)	73 (34%)	7 (24%)
VSI	98 (20%)	50 (24%)	3 (10%)
Négatifs	245 (52%)	90 (42%)	18 (62%)
<b>Concordance avec la transmission suspectée</b>			
Nombre gènes	41/74	22/38	2/7
Nombre de variants	281/356 (78,9%)	119/178 (80,4%)	9/16 (56,3%)
<b>Types de variation</b>			
Faux-sens	179	100	15
Non-sens	37	11	3
Délétion	83	19	2
Insertion/duplication	16	9	1
Epissage/intron	15	4	1
Synonyme	2	1	0
<b>Statut du patient</b>			
Hétérozygote	288	139	15
Homozygote	45	2	1
Hémizygote	3	2	

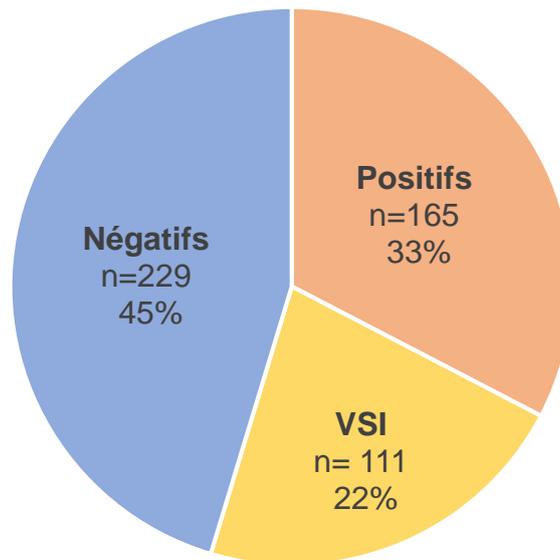
**Tableau 16 : Caractéristiques des résultats NGS pour les suspicions de surdités non syndromiques**

Enfin, les gènes les plus fréquemment rendus ont été listés par ordre décroissant avec le nombre de fois où ils ont été mentionnés dans le résultat envoyé au prescripteur.

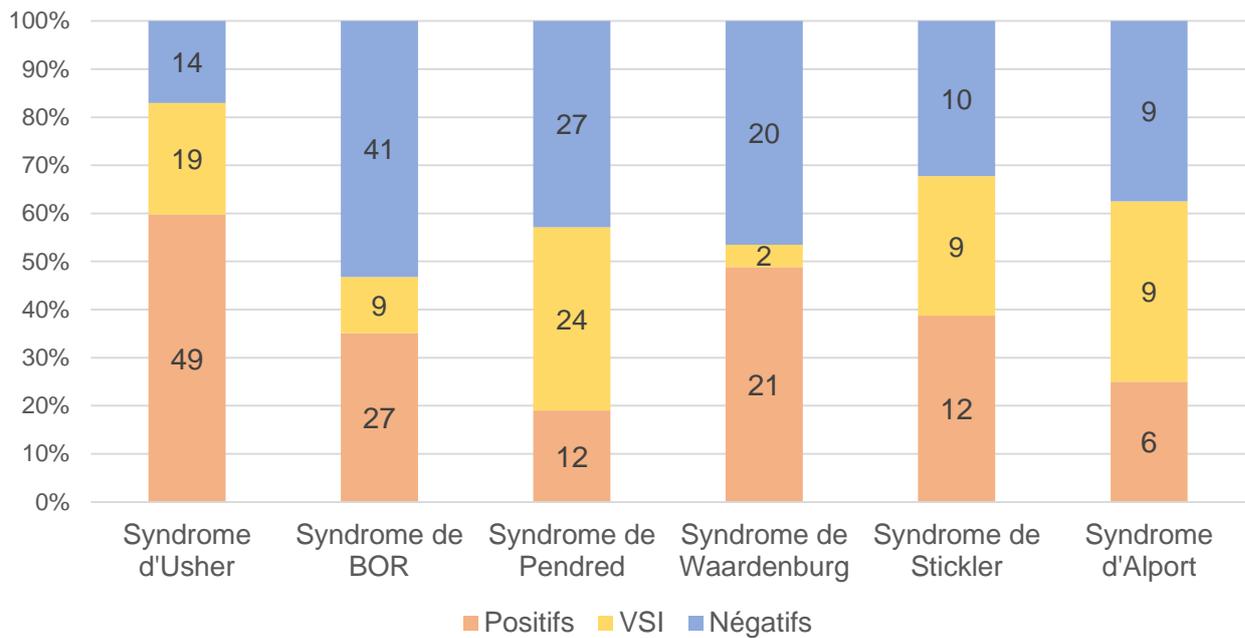
DFNB	DFNA	NA
<i>GJB2</i> (58)	<i>MYO6</i> (17)	<i>LOXDH1</i> (6)
<i>MYO15A</i> (42)	<i>MYO7A</i> (15)	<i>OTOF</i> (3)
<i>STRC</i> (37)	<i>GJB2</i> (13)	<i>MYO15A</i> (2)
<i>MYO7A</i> (22)	<i>TECTA</i> (13)	<i>USH2A</i> (2)
<i>USH2A</i> (15)	<i>MYH14</i> (10)	
<i>LOXHD1</i> (13)	<i>KCNQ4</i> (9)	
<i>SLC26A4</i> (13)	<i>ACTG1</i> (7)	
<i>TECTA</i> (10)	<i>WFS1</i> (7)	
<i>TRIOBP</i> (9)	<i>COCH</i> (6)	
<i>OTOA</i> (8)	<i>SLC26A4</i> (6)	
<i>OTOG</i> (8)	<i>EYA4</i> (5)	
<i>TMPRSS3</i> (6)	<i>SIX1</i> (5)	
<i>GPR98</i> (5)		
<i>OTOF</i> (5)		
<i>PCDH15</i> (5)		
<i>TBC1D24</i> (5)		

**Tableau 17 : Principaux gènes retrouvés dans les suspicions de surdit e isolée et nombre de fois o u ils ont  t e rendus aux prescripteurs**

**b. Pour les surdités syndromiques**



**Figure 56 : Résultats du panel NGS-surdité dans les suspicions de surdités syndromiques (n=505)**



**Figure 57 : Résultats des panels NGS-surdité en fonction du syndrome suspecté**

Types de variation	
Faux-sens	90 (36,4%)
Non-sens	47 (19,0%)
Délétion	68 (27,5%)
Insertion/duplication	15 (6,1%)
Epissage/intron	24 (9,7%)
Synonyme	3 (1,2%)
Statut du patient	
Hétérozygote	347 (92,0%)
Homozygote	22 (5,8%)
Hémizygote	8 (2,1%)

**Tableau 18 : Statut du cas index vis-à-vis des variations mentionnées chez les patients ayant une suspicion de surdité syndromique**

	Usher (n=83)	Bor (n=77)	Pendred (n=63)	Waardenburg (n=43)	Stickler (n=31)	Alport (n=24)	Total
<b>Résultats NGS</b>							
<b>Positifs</b>	49 (59%)	27 (35%)	12 (19%)	21 (49%)	12 (39%)	6 (25%)	127
<b>VSI</b>	19 (23%)	9 (12%)	24 (38%)	2 (5%)	9 (29%)	9 (37%)	72
<b>Négatifs</b>	15 (18%)	41 (53%)	27 (43%)	20 (46%)	10 (32%)	9 (38%)	122
<b>Concordance avec la transmission suspectée</b>							
<b>Variants concordants</b>	101/116 (87,1%)	17/48 (35,4%)	35/50 (70,0%)	14/29 (48,3%)	15/27 (55,6%)	5/16 (31,3%)	187/286 (65,4%)
<b>Types de variation</b>							
<b>Faux-sens</b>	56	23	40	9	15	12	155
<b>Non-sens</b>	21	8	2	5	5	0	41
<b>Délétion</b>	27	7	3	10	3	3	53
<b>Insertion</b>	2	0	1	1	0	0	4
<b>Epissage Intronique</b>	4	5	3	3	3	0	18
<b>Synonyme</b>	1	0	0	0	0	0	1
<b>Statut du patient</b>							
<b>Hétérozygote</b>	104	40	47	26	25	11	253
<b>Homozygote</b>	9	4	1	1	1	2	18
<b>Hémizyote</b>	1	0	0	1	0	2	4

**Tableau 19 : Caractéristiques des résultats NGS pour les suspicions surdités syndromiques**

<b>Syndrome d'Usher</b>	<b>Syndrome BOR</b>	<b>Syndrome de Pendred</b>	<b>Syndrome de Waardenburg</b>	<b>Syndrome de Stickler</b>	<b>Syndrome d'Alport</b>
<i>USH2A</i> (67)	<i>EYA1</i> (12)	<i>SLC26A4</i> (32)	<i>PAX3</i> (7)	<i>COL2A1</i> (8)	<i>CHD23</i> (3)
<i>MYO7A</i> (22)	<i>GJB2</i> (5)	<i>GJB2</i> (3)	<i>GJB2</i> (5)	<i>COL11A1</i> (5)	<i>COL11A2</i> (2)
<i>ADGRV1</i> (10)	<i>SIX1</i> (5)	<i>FOXI1</i> (2)	<i>SOX10</i> (4)	<i>GJB2</i> (5)	<i>COL4A3</i> (2)
<i>GJB2</i> (4)	<i>COL4A3</i> (3)	<i>GPR98</i> (2)	<i>EDN3</i> (2)	<i>USH2A</i> (2)	<i>COL4A4</i> (2)
<i>WFS1</i> (2)	<i>TSH21</i> (3)		<i>ILDR1</i> (2)		
<i>PDZD7</i> (2)	<i>CHD7</i> (2)		<i>PTPRQ</i> (2)		
	<i>COL4A4</i> (2)		<i>TMC1</i> (2)		
	<i>PCDH15</i> (2)				

**Tableau 20 : Principaux gènes retrouvés dans les suspicions de surdités syndromiques et nombre de fois où ils ont été rendus aux prescripteurs**

## 5. Résultats des CNV

Concernant l'analyse des CNV, 41 anomalies dont 35 délétions et 6 duplications ont été mises en évidence et confirmées par une seconde technique. 32 d'entre elles ont été classées comme pathogène ou probablement pathogènes selon les critères de l'ACMG, ce qui représente 8,5% des dossiers rendus positifs.

La variation la plus fréquemment retrouvée est la délétion homozygote du gène *STRC* concernant l'ensemble du gène, de l'exon 1 à l'exon 29, responsable de la forme de surdit   appel  e DFNB16. Sur l'ensemble des patients, cette d  l  tion a   t   mise en   vidence 23 fois dont 21 fois    l'  tat homozygote et 2 fois    l'  tat h  t  rozygote. Cela repr  sente 56% des CNV d  tect  s et 6% des dossiers positifs.

# DISCUSSION

Un bilan a été réalisé sur les analyses concernant les surdités héréditaires et réalisées sur le panel de gènes par technique NGS. Ce travail rétrospectif a permis l'étude des dossiers traités entre 2015 et 2020 dans le laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

La cartographie et le profil des demandes ont été évalués en fonction de l'évolution de la technique. Les patients ont été décrits en fonction de leurs caractéristiques cliniques. Ces données ont pu être comparées avec celles de la littérature lorsqu'elles étaient disponibles.

Le taux de positivité démontre l'apport de la technique NGS dans le diagnostic des surdités génétiques. Les gènes les plus fréquemment retrouvés ont été mis en évidence en fonction du type de surdité. Enfin, la comparaison entre les variants rendus et l'hypothèse diagnostic de départ montre une bonne concordance entre le diagnostic clinique et le diagnostic moléculaire établi.

## I. Profils des demandes

### A. Prescripteurs plus nombreux

L'évolution croissante du nombre de prescripteurs est expliquée en grande partie par l'amélioration de la communication aux différents praticiens médicaux. En effet, grâce à la mise en place des filières, l'analyse des panels en NGS-surdité a été mise en ligne sur le site Orphanet. Elle s'est ainsi fait connaître et est devenue accessible auprès de tous les prescripteurs du territoire français.

De plus, au cours de ces dernières années, les consultations de génétique et d'ORL ont été davantage développées. Le dialogue entre les différents acteurs de santé a été également favorisé grâce aux RCP mises en place par le réseau Sensgene.

### B. Nombreuses demandes pour des formes syndromiques

Selon la classification des surdités neurosensorielles, 54% d'entre elles ont une transmission autosomique récessive, 15% une transmission autosomique dominante et 30% s'inscrivent dans une forme syndromique. Sur l'ensemble des demandes

incluses dans ce travail, elles sont respectivement de 39%, 17% et 42%. Les formes syndromiques sont donc surreprésentées au détriment des formes isolées à transmission autosomique récessive.

Près de 42% des demandes concernent une suspicion syndromique comprenant une surdité. Cette forte proportion s'explique notamment par la précocité et la sévérité de certains tableaux cliniques. Par définition, dans ces formes syndromiques, il y a une atteinte de plusieurs organes donnant des signes cliniques plus « bruyants » par rapport à une surdité isolée. Cela motive le patient à demander une consultation en génétique clinique afin d'identifier la cause de ses symptômes et d'avoir un conseil génétique de qualité. Le clinicien souhaite généralement avoir une confirmation de son diagnostic clinique par un diagnostic moléculaire concordant afin de d'améliorer la prise en charge et le suivi du patient et de sa famille.

Cette tendance est aussi due à un biais de sélection nationale : en effet, de nombreux laboratoires en France séparent les surdités syndromiques des surdités non syndromiques en ayant recours à des panels différents. Parmi ceux possédant un panel de surdités syndromiques, rares sont ceux qui ont inclus les gènes impliqués dans le syndrome de Stickler ou le syndrome BOR. Si le clinicien suspecte un de ces syndromes, il a à sa disposition les sites Orphanet et Sensgene afin de trouver un laboratoire expert effectuant l'analyse de ces gènes. Par exemple, le laboratoire de Lille reçoit des demandes d'analyses pour les gènes *TSHZ1*, *EYA1* et *SIX1* car il est le seul en France à les avoir inclus dans son panel NGS-surdité. Cette expertise peut être en partie responsable du grand nombre de demandes concernant ces syndromes.

### **C. Majorité de surdité de perception**

Le panel NGS-surdité est indiqué dans le cadre des surdités de perception. Sa prescription peut également concerner les surdités mixtes ou les neuropathies auditives. Elle n'est cependant pas recommandée pour les surdités de transmission car celles-ci n'ont généralement pas d'origine génétique.

Cette indication semble très bien respectée car seuls 16 dossiers présentant une surdité de transmission ont fait l'objet d'une demande de panel NGS-surdité. 4 d'entre eux ont été envoyés dans le cadre d'une suspicion d'un syndrome BOR où le patient peut présenter une surdité d'origine uniquement transmissionnelle mais où la

demande de panel NGS-surdité est tout à fait indiquée. Concernant les autres dossiers, ils font généralement l'objet d'une demande de panel NGS-surdité lorsqu'il s'agit d'une surdité qui semble héréditaire aux regards des antécédents familiaux. Pour certains, il s'agit également d'une erreur liée à la méconnaissance des indications de l'analyse. Ce dernier cas de figure semble être de plus en plus rare au fil des années grâce à la communication promue par les filières de santé.

Les 40 dossiers mentionnant clairement l'absence de surdité sont généralement des patients présentant une clinique syndromique typique : il est dans ce cas utile d'adresser une demande pour un panel NGS-surdité à condition que les gènes suspectés soient présents dans le panel. En effet, dans les formes syndromiques, la surdité n'est pas toujours présente lors de l'apparition des premiers symptômes et peut se manifester ultérieurement. Il s'agit également de demandes spécifiques de la part des cliniciens. Ils cherchent parfois à analyser un gène particulier de notre panel qui expliquerait le tableau clinique d'un patient (même si celui-ci ne présente aucun problème auditif).

#### **D. Caractéristiques cliniques des patients**

Les caractéristiques cliniques des patients permettent de dresser le profil « type » des patients. La majorité d'entre eux présentent une surdité congénitale ou post-linguale, bilatérale, de sévérité moyenne, sans malformations au niveau des oreilles, sans autres signes cliniques et sans antécédents familiaux de surdité.

Cependant, ces résultats sont à interpréter avec prudence car certaines catégories cliniques sont parfois sous-estimées : c'est par exemple le cas des surdités pré-linguales dont les limites d'âge sont floues et variables en fonction des publications et des prescripteurs. Certaines surdités sont diagnostiquées tardivement : elles sont classées en post-linguale alors que leur apparition était probablement pré-linguale voire congénitale. C'est également le cas avec la catégorie « asymétrique » qui est rarement mentionnée : les cliniciens mentionnent plus souvent une surdité bilatérale, même s'il existe une asymétrie de sévérité de surdité entre les deux oreilles. Enfin, certaines surdités étaient unilatérales à leur début puis ont progressé vers une atteinte bilatérale. Concernant la sévérité de la surdité, il aurait été judicieux de rassembler les

classes « profonde » et « cophose » car il est difficile de différencier ces deux catégories.

Enfin, ce travail a été réalisé rétrospectivement et les dossiers comprennent rarement l'ensemble des informations demandées voire aucun renseignement clinique pour 45 d'entre eux. Pour les catégories « malformations des oreilles », « autres signes cliniques » et « antécédents familiaux », elles étaient considérées comme négatives lorsqu'aucune information prouvant le contraire n'était mentionnée dans le dossier du cas index. Il est nécessaire de rappeler aux prescripteurs que ce manque d'informations peut être responsable d'une moins bonne interprétation des variants retrouvés et ainsi être la cause d'un diagnostic erroné. Il est donc primordial de veiller à l'envoi de ces informations au laboratoire d'analyse et les réclamer en cas d'oubli.

## **II. Résultats de l'analyse panel NGS-surdité**

### **A. Taux de positivité**

#### **1. Taux de positivité non augmenté malgré l'évolution du panel au cours du temps**

L'évolution du panel laissait penser que le taux de positivité augmenterait parallèlement avec le nombre de gènes étudiés. Cette hypothèse est d'ailleurs mentionnée dans la littérature : une augmentation de 2% de dossiers positifs est observée avec le panel OtoSCOPE qui passe de 66 gènes (v4) à 89 gènes (v5) (63).

##### ***a. Élargissement des prescriptions***

Ce phénomène s'explique en partie par l'élargissement des prescriptions. La mise en ligne de l'analyse sur le site Orphanet a permis d'informer les prescripteurs du territoire français. Cela a contribué à l'augmentation du nombre de demandes. En contrepartie, cela a également eu comme conséquence l'apparition de demandes atypiques, non spécifiques ou n'entrant pas dans le cadre des indications de l'analyse. Ces dossiers sont donc plus complexes que les autres et la probabilité de mettre en évidence un variant pathogène décrit chez ces patients est donc plus faible.

##### ***b. Gènes fréquents intégrés au panel dès 2014***

La deuxième raison concerne la conception des panels utilisés. En effet, en analysant un nombre croissant de gènes analysés, le nombre de dossiers avec un diagnostic

moléculaire positif aurait dû augmenter. Cependant, les premiers panels mis en place au laboratoire de Lille contenaient déjà les gènes les plus couramment retrouvés dans la littérature. L'ajout de gènes au panel n'a donc pas d'influence significative sur le taux de positivité global. L'enrichissement des panels a pour but une amélioration qualitative et non quantitative des résultats. Il permet ainsi au biologiste d'affiner ses recherches et de mettre en évidence des variations sur des gènes impliqués dans la pathologie d'un petit nombre de patients. Par exemple, les gènes intégrés au panel en 2020 (panel 4) sont des gènes découverts récemment, d'occurrence rare ou des gènes impliqués dans les neuropathies auditives. De plus, ils sont encore méconnus des prescripteurs et donc rarement suspectés. Grâce à l'ajout de ces gènes, certaines pathologies sous-estimées comme les neuropathies auditives seront probablement mieux diagnostiquées dans le futur.

#### ***c. Meilleure capacité discriminative du biologiste***

Enfin, le taux de positivité dépend de l'analyse des données de séquençage. Une expertise très pointue dans les domaines de la biologie et de la génétique est alors requise. Cette technique n'ayant vu le jour que très récemment, des améliorations à différents niveaux ont contribué à accroître la qualité de l'analyse des données. Ainsi, l'augmentation de la puissance des logiciels bio-informatiques a diminué le nombre d'artéfacts. La précision croissante des logiciels a participé à la baisse du taux des faux positifs. Les différentes bases de données (locales, de population générale ou médicales) continuent encore aujourd'hui d'être incrémentées, augmentant ainsi le nombre et la qualité des informations qui s'y trouvent. Les biologistes ont continué à se former et à s'adapter à l'utilisation de ces différents outils, perfectionnant ainsi leur capacité discriminative au fil des années.

#### ***d. Rôle des RCP dans la limitation du rendu de VSI***

Le dialogue entre cliniciens et biologistes a été renforcé. Il a favorisé les échanges constructifs sur les variants problématiques et a contribué à limiter le nombre de VSI rendus. Dans les dossiers complexes, les RCP proposent parfois la prescription d'un exome (WES) voire d'un génome (WGS) aux patients ayant un panel NGS-surdité négatif ou n'expliquant pas la totalité du tableau clinique. En fonction de l'évolution des connaissances et du phénotype du patient, d'autres examens complémentaires peuvent aussi être proposés pour trouver l'étiologie de la surdité du patient.

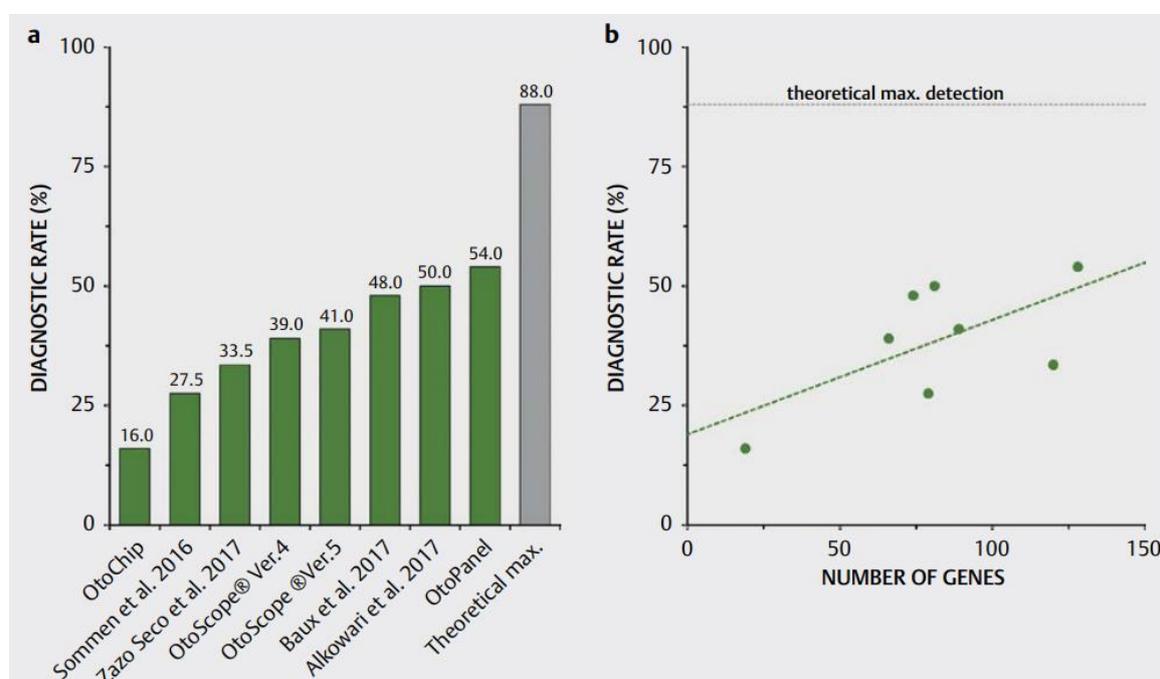
## 2. Taux de positivité global satisfaisant

Malgré sa stabilité, le taux de positivité global du panel NGS-surdité reste très satisfaisant. En effet, près de 16% des surdités sont déjà expliquées grâce à l'exploration des gènes *GJB2* et *GJB6* réalisée préalablement par technique Sanger. À cela s'ajoutent les 31% de diagnostics moléculaires positifs effectués via le panel NGS-surdité. Au total, le ratio diagnostic est estimé à 47%, soit près de la moitié des surdités.

Les 21% de VSI ne constituent pas des informations perdues : ils peuvent être analysés de nouveau à la lumière des nouvelles connaissances afin de préciser leur implication dans le phénotype du patient.

En continuant d'étoffer la technique et les connaissances, le taux diagnostic théorique maximal de 88% pourrait être atteint dans le futur (18).

Ces résultats sont très satisfaisants en comparaison avec ceux retrouvés dans la littérature. Le taux de positivité des panels NGS-surdité est variable : entre 10% et 83% avec une moyenne de 41% (39% sur une cohorte de 1119 patients (63) et 42% sur une cohorte de 50 patients (75)).



**Figure 58 : À gauche, taux diagnostic du NGS en fonction du panel de gènes ; À droite, taux diagnostic en fonction du nombre de gènes dans le panel (18)**

### **3. Taux de positivité dans les surdités unilatérales**

Concernant les patients présentant une surdité unilatérale, il est rapporté dans la littérature un taux de positivité <1% (63). Dans une autre étude, le seul dossier positif présentant une surdité unilatérale est un patient présentant un syndrome de Waardenburg. Cela pousse certains prescripteurs à ne pas prescrire de panel NGS-surdité chez ce type de patients. Or, le taux de positivité lillois pour cette catégorie de patients est de 12.5%.

Cette différence ne s'explique pas uniquement par le fait que nos panels contiennent plus de gènes que ceux qui ont été réalisés.

Le nombre de demandes concernant les suspicions de syndrome de Waardenburg ou BOR contribue à comprendre ce phénomène. En effet, les patients touchés par ces syndromes peuvent présenter une surdité unilatérale. Sur les 11 dossiers positifs avec une surdité unilatérale, 10 mentionnaient une surdité syndromique de transmission autosomique dominante : 4 syndromes BOR, 4 syndromes de Waardenburg, 1 syndrome de Stickler et 1 syndrome de Charge. Toutes ses suspicions cliniques ont été confirmées au niveau moléculaire grâce à l'analyse du panel NGS-surdité.

La prescription d'un panel de gènes chez un patient atteint d'une surdité unilatérale est donc justifiée s'il présente des signes cliniques de ses syndromes. Elle est en revanche beaucoup moins contributive dans le cas d'une surdité unilatérale isolée.

### **B. Type de variations génétiques détectées**

Dans la littérature, les variations génétiques retrouvées sont majoritairement des faux sens à 49% puis des insertions ou délétions à 36%, des variations non-sens à 8% et des variations introniques à 6% (63). Les résultats de cette étude sont comparables : ils sont respectivement de 53%, 26%, 15% et 6%.

### **C. Résultats de l'analyse des CNV**

Sur 41 anomalies détectées et confirmées, 32 ont été classées comme pathogènes selon les critères de l'ACMG, soit 8,5% des dossiers rendus positifs. Deux études différentes, l'une sur 50 patients, l'autre sur 1119, montrent un taux de positivité en

CNV de 19% pour l'une et de 20% pour l'autre. La littérature rapporte 18,5% de CNV contributifs au diagnostic des patients présentant une surdité (18).

La délétion du gène *STRC* est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans l'analyse des CNV de notre étude. Ce résultat n'est pas étonnant, étant donné la forte prévalence de cette délétion dans la population à l'état hétérozygote. Elle est estimée à 16% dans les dossiers avec un diagnostic moléculaire positif (63). Dans cette étude, elle n'est retrouvée que dans 6% des dossiers positifs, soit moitié moins que le taux mentionné dans la littérature.

Ce faible ratio diagnostic peut être expliqué par la technique de détection des CNV qui reste à améliorer sur le panel NGS-surdité. De nombreux CNV sont malheureusement rendus ininterprétables à cause de la technique Haloplex qui est sensible à l'étape de PCR. Un changement de technique améliorerait peut-être l'analyse des CNV des ADN extraits non localement. Cela permettrait d'être plus exhaustif et d'améliorer la qualité du rendu des résultats.

### **III. Résultats en fonction de la suspicion clinique initiale**

#### **1. Résultats du NGS**

Les taux de résultats positifs, VSI, ou négatifs sont équivalents que la surdité soit de transmission autosomique récessive, autosomique dominante ou syndromique : environ 30% de résultats positifs, 20% de résultats contenant un VSI et 45% de résultats négatifs. Ces résultats montrent que le taux de positivité global reflète correctement l'ensemble des formes de surdité (31% de résultats positifs, 21% de résultats VSI et 48% de résultats négatifs).

Les données d'une étude espagnole montrent un taux de positivité de 47,6% pour les surdités à transmission autosomique récessive et 38,1% pour les surdités à transmission autosomique dominante (75) : les résultats obtenus dans ce travail de thèse ne sont pas comparables à ceux de l'étude espagnole car ils n'ont pas différencié les surdités syndromiques des surdités non syndromiques. Leurs résultats positifs sur les surdités à transmission autosomique dominante sont étonnement nombreux par rapport à leurs prévisions mais aucune explication complémentaire n'a été donnée.

Concernant les neuropathies auditives, la littérature montre que ces formes particulières de surdité sont très largement méconnues et sous diagnostiquées. Les gènes impliqués dans ces NA n'ont d'ailleurs été intégrés au panel qu'en 2020. Cependant, sur les 109 échantillons passés sur ce nouveau panel et intégrés à cette étude, aucun n'a mis en évidence des variations pathogènes sur l'un de ces gènes (*CAV1*, *ROR1*, *SMAD4*, *TMTC2*, *PTRH2*, *SLC52A3*). Il serait intéressant de reproduire cette étude avec un nombre d'échantillons plus conséquent.

## 2. Surdités non syndromiques

### a. **Caractéristiques des variations pathogènes**

Dans les surdités isolées, la majorité des variants retrouvés sont des variants faux-sens et présents à l'état hétérozygote chez le patient.

Le nombre plus élevé de délétions retrouvées dans les surdités à transmission autosomique récessive s'explique par les fortes prévalences des délétions c.35delG de *GJB2* et du gène *STRC*, respectivement de 1,89% et 1,6% en Europe (18).

Il n'est pas surprenant de trouver plus de porteurs homozygotes pour des variations pathogènes dans les surdités autosomiques récessives car ce sont généralement des patients issus de familles consanguines. En effet, sur les 58 familles consanguines incluses dans l'étude, 30 ont présenté un résultat positif au panel NGS-surdité (52%) dont 24 avec une variation homozygote absente des bases de données et classée comme pathogène selon les critères de l'ACMG (41%). Les données génétiques de ces familles peuvent servir dans la mise en évidence de nouveaux gènes ou la découverte de l'implication d'un gène connu dans un phénotype de surdité.

La concordance entre la suspicion clinique et les variants retrouvés est relativement bonne : 78,9% des variants touchent un gène à transmission autosomique récessive lorsque ce mode de transmission été suspecté et 80,4% pour les suspicions à transmission autosomique dominante.

Peu de variations synonymes sont classées comme étant pathogènes : ce sont majoritairement des variations modifiant les sites consensus d'épissage, accepteur ou donneur. Ces modifications ont pour conséquence une forte probabilité de saut d'exon, ce dernier pouvant être responsable du phénotype du patient.

### **b. Gènes majoritaires**

Les gènes les plus fréquemment retrouvés dans notre cohorte concorde parfaitement avec ceux mentionnés dans la littérature et dans les résultats préliminaires présentés par le service MPMC de Lille (30,63,75). Ces gènes sont ceux qui ont une variation avec une grande fréquence, ceux dont les signes cliniques sont les plus spécifiques ou ceux dont les profils audiométriques sont les plus typiques (75).

### **c. Cas particulier de *SLC26A4***

4 variations majoritaires sont rapportées dans *SLC26A4* : L236P, T416P, E384G, IVS8+1G>A. Sur l'ensemble des demandes, elles sont respectivement retrouvées 2 fois (dont 1 homozygote), 2 fois, 1 fois et 6 fois. L236P et T416P représentent 23,1% et 12,8% des variations de *SLC26A4* au Royaume Uni (92) alors qu'ici c'est la c.1001+1G>A qui est la plus fréquemment retrouvée : ceci pourrait être expliqué par la différence de population ou d'ethnie entre les deux cohortes.

Ces quatre variants constituent 74% des variations retrouvées dans *SLC26A4* (20). Cependant, dans notre cohorte, elles ne sont retrouvées que dans 11 dossiers positifs sur les 26 mentionnant un variant *SLC26A4* soit 42%.

Selon la table des données, 54 patients présentent une malformation de Mondini : pour 14 d'entre eux, le panel NGS-surdité a été rendu positif. Parmi eux, 7 contiennent un variant dans *SLC26A4*, représentant ainsi 50% des dossiers positifs et 13% des patients présentant une malformation de Mondini. Sur les 46 dossiers où un variant pathogène dans *SLC26A4* a été retrouvé, 25 d'entre eux présentaient une dilatation de l'aqueduc du vestibule soit 54,3%.

## **3. Surdités syndromiques**

Le laboratoire présente un très bon taux diagnostique pour les syndromes d'Usher (59% de dossiers positifs) avec une bonne concordance entre les variants mentionnés (87%). Ces données peuvent être reliées à la très bonne expertise du laboratoire dans ce syndrome et notamment sur le gène *USH2A*.

Les résultats sont également très satisfaisants chez les patients présentant cliniquement un syndrome de Waardenburg. En effet, le panel NGS-surdité a permis de retrouver chez la moitié d'entre eux un variant pathogène pouvant expliquer leur surdité. Cependant, la concordance est assez basse, à 48%, probablement due à la très grande hétérogénéité clinique et génétique de ce syndrome.

Concernant le syndrome BOR, le ratio diagnostic chute à 27% de dossiers positifs. Plus de 40% des dossiers adressés pour une suspicion d'un syndrome BOR sont rendus négatifs. Il faut signaler que le laboratoire de Lille est l'un des seuls en France à analyser les gènes de ce syndrome, les demandes sont donc plus larges et/ou atypiques. De plus, les signes cliniques du syndrome BOR sont moins spécifiques et ce syndrome est connu comme ayant une expressivité intrafamiliale et interfamiliale extrêmement variable. Cela permet d'expliquer la faible concordance entre les variants retrouvés qui n'est que de 35%.

Les résultats du panel NGS-surdité concernant le syndrome de Pendred présentent la particularité d'avoir plus de VSI (24%) sur de dossiers positifs. Cependant, les variants mentionnés sur les comptes rendus sont plutôt en adéquation avec la suspicion du syndrome de Pendred (70%). Il serait intéressant de reprendre ces dossiers et de les étudier à la lumière des nouvelles connaissances afin de reclasser certains VSI. Chez de nombreux patients avec une clinique évocatrice d'un Pendred sont porteurs d'une hétérozygotie simple d'un variant pathogène impliqué dans le syndrome de Pendred. Une technique MLPA pour mettre en évidence un grand réarrangement génique a été réalisée chez eux mais aucune n'a détecté d'anomalie pathogène. Une analyse recherchant un évènement intronique profond pourrait être réalisée pour compléter l'analyse moléculaire chez ces patients.

Le recrutement de patients n'a pas été assez conséquent pour avoir un véritable recul sur les syndromes de Stickler et d'Alport. Cependant, le taux de positivité reste entre 20% et 40% (39% pour le syndrome de Stickler et 25% pour le syndrome d'Alport) avec une concordance des variants retrouvés de 56% pour le syndrome de Stickler et de 31% pour le syndrome d'Alport. Les pourcentages un peu bas dans le syndrome d'Alport sont en partie justifiés par la grande hétérogénéité génétique et clinique lié à ce syndrome.

Les variants retrouvés dans ces principaux syndromes touchent majoritairement les gènes connus pour être impliqués dans ceux-ci. Il n'a pas été mis en évidence de gènes candidats dans un de ces syndromes.

#### **IV. Analyses complémentaires**

D'autres thématiques basées sur l'analyse de panels de gènes sont proposés au laboratoire du CHU de Lille, dont certaines sont complémentaires avec la nôtre : par

exemple, le panel « ophtalmologie » étudie les également gènes impliqués dans le syndrome d'Usher. Il y a aussi le panel « néphropathie » qui étudie certains gènes impliqués dans le syndrome d'Alport.

Concernant les surdités d'origine mitochondriale, elles n'ont pas été traitées dans ce travail de thèse. En effet, elles sont étudiées dans un panel différent, lui-même réalisé dans le service de Génopathies par Claire-Marie Dhaenens. Ce dernier permet, entre autres, de diagnostiquer les surdités neurosensorielles mitochondriales non syndromiques qui peuvent être secondaire à une exposition aux aminoglycosides. La variation la plus retrouvée est alors la m.1555A>G qui a une prévalence de 0,2% dans la population générale (92).

Le plateau commun de séquençage du laboratoire du CHU de Lille a vu en 2020 l'arrivée d'un nouvel automate de séquençage : le NovaSeq 6000 (Illumina). Ce dernier possède « un rendement pouvant atteindre 6 Tb et 20 milliards de lectures en moins de deux jours » (93). Ces performances permettent d'envisager la réalisation du séquençage de l'exome (WES) localement. Dans le cadre des surdités, au vu du fort taux de positif en panel NGS, cette analyse ne concernerait que les dossiers négatifs ou comportant un variant pathogène sur un gène de transmission récessif sans deuxième événement pathogène. Cette stratégie est encore à discuter mais l'arrivée de cet automate représente l'opportunité de diminuer le nombre de surdités inexplicables et d'accroître l'expertise du service.

Grâce au plan France Génomique 2025, une dizaine de dossiers sont aujourd'hui éligibles au séquençage du génome (WGS) par la plateforme SeqOIA. Dans un futur proche, le séquençage génomique deviendra accessible à un grand nombre de patients, permettant un diagnostic et une prise en charge médicale personnalisés. L'analyse d'un grand nombre de profils génétiques permettra une meilleure compréhension des variations génétiques pathogènes et la mise au point de traitements personnalisés (74).

De multiples variants pathogènes ont été mis en évidence dans des gènes de transmission autosomique récessive. Cependant, dans de nombreux cas, le patient présente une hétérozygotie simple, c'est-à-dire qu'aucun second événement pathogène n'a pu être détecté. L'analyse génétique ne permet donc pas d'impliquer cette seule variation pathogène dans le phénotype des patients. Pour certains gènes

particuliers, des études complémentaires dans le cadre de la recherche ont alors pu être menées pour confirmer le diagnostic : c'est notamment le cas avec le gène *USH2A*. Certains ADNs ont été envoyés au laboratoire du Professeur Hannie Kremer aux Pays-Bas à la recherche d'un second événement ou d'une variation intronique profonde pathogène. Sur la douzaine d'échantillons envoyés, deux sont revenus positifs dont un contenant un variant pathogène qui n'avait pas été repéré lors de l'analyse biologique des données.



# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## I. Points forts

Cette étude a récolté un grand nombre de données sur l'ensemble des demandes envoyées au laboratoire (n=1228). Ces informations ont permis de dresser un profil reflétant la réalité avec une étendue des possibilités, aussi bien sur le plan clinique que sur le plan génétique. En effet, la cohorte analysée comprend un grand nombre de patients présentant des phénotypes très hétérogènes et le panel NGS-surdité contient un grand nombre de gènes, donnant ainsi des situations très différentes.

Malgré l'utilisation de plus en plus courante du Whole Exome Sequencing voire du Whole Genome Sequencing, l'étude des panels de gènes reste toujours d'actualité dans le cadre des surdités. En effet, de nombreuses surdités sont déjà expliquées en première intention par le séquençage des gènes *GBJ2* et *GJB6*. En combinant cette analyse avec le panel de gènes, cela permet d'obtenir un taux de positivité très satisfaisant. De plus, le WES/WGS exige d'avoir des prélèvements parentaux afin de limiter les rendus de VSI. Cependant, les surdités peuvent être diagnostiquées tardivement ou apparaître à l'âge adulte, ce qui limite les prélèvements en trio (parents décédés, perdus de vue...). Ces analyses pourront cependant être mises en place pour essayer de résoudre les dossiers ayant des bilans négatifs. Le maintien du dialogue clinico-biologique et des réunions de concertations pluridisciplinaires (RCP) est essentiel pour s'adapter aux avancées théoriques et techniques.

## II. Limites

Ce travail consistait à une analyse rétrospective, ce qui présente comme inconvénient l'omission d'un grand nombre de données, notamment au niveau des caractéristiques cliniques. Ainsi, de nombreux patients ont été exclus de cette étude, faute de données.

La technologie Haloplex possède également ses limites puisqu'elle génère un grand nombre d'artefacts. A cela s'ajoute le problème de la capture qui rend les CNV ininterprétables si l'ADN a été extrait par une technique différente. Un changement de technologie avec un enrichissement par capture est envisagé afin d'améliorer l'analyse des CNV et de certaines régions mal couvertes avec la technologie Haloplex.

Le cas des variations présentes à l'état de mosaïque n'a pas été évoqué au cours de ce travail. Elles seraient très rarement impliquées dans les surdités mais elles sont également très peu mises en évidence avec la technique NGS. A cela s'ajoutent Les variations introniques, les variations structurales n'impliquant qu'un exon et les zones non ou mal couvertes qui ne sont pas détectées en panel de gènes NGS.

Aujourd'hui, le mode de transmission de certains gènes n'est pas encore complètement élucidé. Il serait intéressant de les identifier avec précision, avec par exemple l'étude des familles avec consanguinité. Cela pourrait améliorer la finesse de l'analyse moléculaire et augmenterait le rendement de l'analyse moléculaire (94).

### **III. Conclusion**

L'étude des panels de gènes est aujourd'hui un outil diagnostique et pronostique dans les surdités héréditaires syndromiques et non-syndromiques. La mise au point du séquençage nouvelle génération (NGS) en 2005 a permis d'étudier de nombreux gènes responsables des différentes formes de surdité.

Par rapport au séquençage de quelques gènes par technique Sanger, cette technique a su montrer sa supériorité dans le diagnostic des surdités héréditaires. Ainsi, depuis sa mise en place au CHU de Lille en 2014, 375 patients ont pu connaître l'étiologie de leur surdité, favorisant ainsi une meilleure prise en charge, un suivi adapté et un conseil génétique de qualité.

Cette étude rétrospective a permis d'apprécier l'évolution du profil des demandes nationales concernant cette analyse ainsi que les caractéristiques cliniques des patients. Les gènes les plus fréquemment retrouvés pour chaque type de surdité ont également pu être mis en évidence.

### **IV. Perspectives**

Près de 1% des gènes humains seraient nécessaires à l'ouïe (95). Même si nous les connaissons de mieux en mieux, il reste encore aujourd'hui de nombreux gènes à explorer et de multiples étiologies de surdités à élucider.

À partir des données récoltées dans ce travail, des gènes candidats à des études fonctionnelles peuvent être recherchés afin de comprendre certains mécanismes moléculaires.

Récemment, des études ont montré qu'une petite proportion des surdités avait une origine polygénique, notamment dans les surdités tardives ou secondaires à des traumatismes. Il s'agit de gènes modulateurs, encore très peu connus aujourd'hui, et qui augmenteraient la sensibilité au bruit. Des variations dans le gène *Dclk1* serait responsable d'une majoration progressive des seuils auditifs avec l'âge et les variations dans le gène *C1orf174* induirait une moins bonne récupération de l'ouïe suite à des traumatismes sonores (96).

Depuis 2020, grâce à l'arrivée de l'automate NovaSeq d'Illumina, l'étude de l'exome (WES) peut être prescrit et réalisé au Centre de Biologie Pathologie de Lille.

Dans le cadre du plan France Génomique 2025, des envois d'ADN à la plateforme SeqOIA sont possibles afin de séquencer le génome (WGS) des cas complexes. À plus long terme, elle a pour but d'intégrer la médecine génomique dans le système de soins.

Au Royaume-Uni, se pose la question de la place du diagnostic néonatal de la surdité via les analyses moléculaires. Certains projets encouragent la réalisation d'un génome WGS pour tous les nouveau-nés (97). Cependant, cette stratégie semble encore difficilement réalisable aujourd'hui au vu du coût, du temps d'analyse et de nombreux problèmes éthiques.



# Bibliographie

1. Lorenzi A, Camilleri M, Chaix B. Voyage au centre de l'audition - Spécialités [Internet]. 2017. Disponible sur: <http://www.cochlea.org>
2. Zylberberg P, Association JNA. Echelle des décibels et Anatomie de l'oreille [Internet]. 2018. Disponible sur: <https://www.journee-audition.org/pdf/guide-decibels.pdf>
3. Surdi-info - Centre national d'information sur la surdité - Comprendre le monde sonore [Internet]. Disponible sur: <https://www.surdi.info/loreille-et-son-fonctionnement/comprendre-le-monde-sonore/>
4. L'anatomie de l'oreille [Internet]. Disponible sur: <https://www.surdi.info/loreille-et-son-fonctionnement/anatomie-de-l-oreille/>
5. Migeot JL. Physiologie de l'oreille [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=PNjOKVaIJLw>
6. Descouens D. English: The middle ear [Internet]. 2009. Disponible sur: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:OreilleMoyenneSchema.jpg>
7. Descouens D. Oreille Interne [Internet]. 2009. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Oreille\\_Interne.png](https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Oreille_Interne.png)
8. Braga J. Human bony labyrinth / Computed tomography 3D / vestibule [Internet]. 2009. Disponible sur: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vestibule.png?uselang=fr>
9. Braga J. Human bony labyrinth / Computed tomography 3D / semicircular canals [Internet]. 2009. Disponible sur: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Canaux\\_osseux.png?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Canaux_osseux.png?uselang=fr)
10. Pujol R, Nouvian R. Cellules Ciliées, stéréocils, mecano-transduction [Internet]. Disponible sur: <http://www.cochlea.eu/cellules-ciliees>
11. Pujol R, Lenoir M. Organe de Corti [Internet]. Disponible sur: <http://www.cochlea.eu/cochlee/organe-de-corti>
12. Morton CC, Nance WE. Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. *N Engl J Med*. 18 mai 2006;354(20):2151-64.
13. Corbillon E. Evaluation du dépistage néonatal systématique de la surdité permanente bilatérale. HAS; 2007 janv.
14. Surdités génétiques [Internet]. Site internet maladies rares de l'hôpital Necker. 2018. Disponible sur: <http://www.maladiesrares-necker.aphp.fr/surdites/>
15. Loundon N. Surdité de l'enfant. *La revue du praticien -médecine générale*. oct 2014;(928):688-9.
16. Blanchard M, Thierry B, Marlin S, Denoyelle F. Aspects génétiques de la surdité. *Arch Pédiatrie*. août 2012;19(8):886-9.

17. Marcolla A, Bouchetemble P, Lerosey Y, Marie J-P, Dehesdin D. Surdités d'origine génétique. *Ann Otolaryngol Chir Cervico-Faciale*. juin 2006;123(3):143-7.
18. Vona B, Müller M, Dofek S, Holderried M, Löwenheim H, Tropitzsch A. Big data in der Diagnostik genetischer Schwerhörigkeit. *Laryngo-Rhino-Otol*. mars 2019;98(S01):S32-81.
19. Hereditary Hearing Loss Homepage [Internet]. Disponible sur: <https://hereditaryhearingloss.org/>
20. Denoyelle F, Marlin S. Surdités de perception d'origine génétique. *EMC - Oto-Rhino-Laryngol*. nov 2005;2(4):343-64.
21. Eshraghi A., Surdité de l'adulte : réparer ou compenser, *La revue du praticien*, 2009.
22. Roman S, Elziere M, Nicollas R, Triglia J-M. L'audition de l'enfant de 3 à 12 ans. *Rev Prat*. 2011;4.
23. Evaluation du dépistage neonatal systématique de la surdité permanente bilaterale\_Avis de la HAS. HAS; 2007 janv.
24. Dauman R. Physiopathologie de la surdité, entendre et comprendre. *Rev Prat*. 2009;5.
25. Les explorations fonctionnelles en otologie [Internet]. yumpu.com. Disponible sur: <https://www.yumpu.com/fr/document/read/16550224/2les-explorations-fonctionnelles-en-otologie>
26. Vona B, Nanda I, Hofrichter MAH, Shehata-Dieler W, Haaf T. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Mol Cell Probes*. oct 2015;29(5):260-70.
27. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*. 1 oct 2002;63(1):73-94.
28. Mahdiah N, Rabbani B. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: A meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol*. janv 2009;48(6):363-70.
29. Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, Loundon N, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet*. juin 2006;14(6):773-9.
30. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res Mutat Res*. 1 mars 2009;681(2):189-96.
31. Wémeau J-L, Vincent C, Dubrulle F, Ladsous M. Syndromes de Pendred et surdités apparentées: une même entité? *Bull Académie Natl Médecine*. avr 2015;199(4-5):601-16.
32. AudioGene v4: Audioprofiles [Internet]. [cité 18 nov 2020]. Disponible sur: <https://audiogene.eng.uiowa.edu/audioprofiles>

33. BLANCHET C, HAMEL C. Syndrome d'Usher - Orphanet [Internet]. 2009. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=662&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=usher&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Usher&title=Syndrome%20d\\_Usher&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=662&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=usher&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Usher&title=Syndrome%20d_Usher&search=Disease_Search_Simple)
34. Meunier I. Compte-rendu du staff multi-sites Sensgene sur les syndromes d'Usher. 2020.
35. UMD-USHbases [Internet]. [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.umd.be/usher.html>
36. Le syndrome Branchio-Oto-Rénal (BOR) | AP-HM [Internet]. [cité 27 oct 2020]. Disponible sur: <http://fr.ap-hm.fr/site/orl-pediatrique/soins/syndrome-branchio-oto-renal>
37. SMITH R. Syndrome de Pendred - Orphanet [Internet]. 2013. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=558&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=pendred&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Pendred&title=Syndrome%20de%20Pendred&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=558&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=pendred&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Pendred&title=Syndrome%20de%20Pendred&search=Disease_Search_Simple)
38. PINGAULT V. Orphanet: Syndrome de Waardenburg [Internet]. 2015. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=663&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=waardenburg&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg&title=Syndrome%20de%20Waardenburg&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=663&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=waardenburg&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg&title=Syndrome%20de%20Waardenburg&search=Disease_Search_Simple)
39. Waardenburg syndrome [Internet]. Waardenburg syndrome ~ MEDICAL ROOM. 2011. Disponible sur: <http://medicostud.blogspot.com/2011/09/waardenburg-syndrome.html>
40. PINGAULT V. Orphanet: Syndrome de Waardenburg type 1 [Internet]. 2015. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=219&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=waardenburg-1&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-1&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%201&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=219&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=waardenburg-1&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-1&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%201&search=Disease_Search_Simple)
41. PINGAULT V. Orphanet: Syndrome de Waardenburg type 2 [Internet]. 2015. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=220&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=waardenburg-2&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-2&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%202&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=220&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=waardenburg-2&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-2&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%202&search=Disease_Search_Simple)
42. PINGAULT V. Orphanet: Syndrome de Waardenburg type 3 [Internet]. 2015. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=221&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=waardenburg-3&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-3&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%203&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=221&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=waardenburg-3&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-3&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%203&search=Disease_Search_Simple)

bin/Disease\_Search.php?lng=FR&data\_id=221&Disease\_Disease\_Search\_diseaseGroup=waardenburg-3&Disease\_Disease\_Search\_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Waardenburg-type-3&title=Syndrome%20de%20Waardenburg%20type%203&search=Disease\_Search\_Simple

43. LE MERRER M. Syndrome de Stickler - Orphanet [Internet]. 2008. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=824&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=stickler&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Stickler&title=Syndrome%20de%20Stickler&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=824&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=stickler&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Stickler&title=Syndrome%20de%20Stickler&search=Disease_Search_Simple)
44. HEIDET L, LENNON R. Syndrome d'Alport - Orphanet [Internet]. 2020. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=630&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=alport&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Alport&title=Syndrome%20d\\_Alport&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=630&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=alport&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Alport&title=Syndrome%20d_Alport&search=Disease_Search_Simple)
45. Masson E. Neuropathie auditive : clinique et revue de la littérature. EM-Consulte [Internet]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/78332/neuropathie-auditive-clinique-et-revue-de-la-litt>
46. Mendel, Gregor: Expériences sur les hybrides de plantes. Dans: Negotiations of the Natural Research Association in Brno 4 (1866), pp. 3-47. Disponible sur: [http://www.deutschestextarchiv.de/book/view/mendel\\_pflanzenhybriden\\_1866?p=14](http://www.deutschestextarchiv.de/book/view/mendel_pflanzenhybriden_1866?p=14)
47. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* févr 2005;278(2):274-88.
48. Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):72.
49. Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. 1953;
50. Efstratiadis A, Kafatos FC, Maniatis T. The primary structure of rabbit  $\beta$ -globin mRNA as determined from cloned DNA. *Cell.* 1 avr 1977;10(4):571-86.
51. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5463-7.
52. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* oct 2008;26(10):1135-45.
53. Saiki R, Scharf S, Faloona F. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science.* 1985;(230):1350-4.
54. Buetow KH, Weber JL, Ludwigsen S, Scherpbier-Heddema T, Manion F, Quillen J, et al. A Comprehensive Human Linkage Map with Centimorgan Density. 1994;265:6.

55. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. 2000;287:12.
56. Sevilla G. New Guinness World Records Title Set for Fastest Genetic Diagnosis. Rady Children's Hospital San Diego 2018 [Internet]. 12 févr 2018; Disponible sur: <https://www.rchsd.org/about-us/newsroom/press-releases/new-guinness-world-records-title-set-for-fastest-genetic-diagnosis/>
57. Accurate Multiplexed Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome | Science [Internet]. Disponible sur: <https://science.sciencemag.org/content/309/5741/1728.long>
58. Method of the Year 2008. *Nat Methods*. janv 2009;6(1):1-1.
59. Wang B. Illumina Introduces the NovaSeq Series—a New Architecture Designed to Usher in the \$100 Genome sequence [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://www.nextbigfuture.com/2017/01/illumina-introduces-novaseq-series-a-new.html>
60. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. juin 2016;17(6):333-51.
61. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness.pdf. *Nature*. 1 mai 1997;387:80-3.
62. Shearer AE, Smith RJH. Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care. *Otolaryngol Neck Surg*. août 2015;153(2):175-82.
63. Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet*. avr 2016;135(4):441-50.
64. Azaiez H, Booth KT, Ephraim SS. Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes. *Am J Hum Genet*. 4 oct 2018;(103):484-97.
65. Khan AO, Becirovic E, Betz C, Neuhaus C, Altmüller J, Riedmayr LM, et al. A deep intronic CLRN1 (USH3A) founder mutation generates an aberrant exon and underlies severe Usher syndrome on the Arabian Peninsula. *Sci Rep*. 3 mai 2017;7(1):1-10.
66. Buntinx W, Cans C, Colleaux L. Déficiences intellectuelles - Inserm. Montrouge: EDP Sciences. 2016. (Expertise collective).
67. Les maladies rares qu'est-ce que c'est ? [Internet]. Disponible sur: <https://www.sensgene.com/les-maladies-rares/les-maladies-rares-c-est-quoi>
68. DGOS. Les maladies rares [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/article/les-maladies-rares>
69. Plan maladies rares 2005-2008.
70. [evaluation\\_plan\\_maladies\\_rares\\_2005-2008.pdf](#).

71. Centre Surdités Génétiques - Centre de Référence des surdités génétiques [Internet]. Disponible sur: <https://www.sensgene.com/les-centres-de-referance/centre-surdites-genetiques-centre-de-referance-des-surdites-genetiques>
72. Orphanet: À propos d'Orphanet [Internet]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education\\_AboutOrphanet.php?lng=FR#RDpolicies](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutOrphanet.php?lng=FR#RDpolicies)
73. Plan national maladies rares. févr 28, 2011.
74. Laboratoire SeqOIA. Le territoire couvert par le laboratoire en médecine génomique SeqOIA [Internet]. Disponible sur: <https://laboratoire-seqoia.fr/nos-activites/>
75. Cabanillas R, Diñeiro M, Cifuentes GA, Castillo D, Pruneda PC, Álvarez R, et al. Comprehensive genomic diagnosis of non-syndromic and syndromic hereditary hearing loss in Spanish patients. *BMC Med Genomics*. déc 2018;11(1):58.
76. Abou Tayoun A, Al turki S, Oza A. Improving hearing loss gene testing: a systematic review of gene evidence toward more efficient next-generation sequencing-based diagnostic testing in interpretation. *Genet Med*. 9 juin 2015;18(6):545-53.
77. Illumina. Miseq specification sheet [Internet]. 2011. Disponible sur: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/miseq-data-sheet-770-2011-001-translations/miseq-specification-sheet-770-2011-001-fra.pdf>
78. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
79. Illumina. Système de séquençage NextSeq 550 [Internet]. Disponible sur: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/nextseq-550-system-spec-sheet-770-2013-053-translations/nextseq-550-system-spec-sheet-770-2013-053-fra.pdf>
80. HaloPlex Target Enrichment Manual [Internet]. 2018. Disponible sur: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9900-90001\\_HaloPlex\\_Target\\_Enrichment%20\\_Manual.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9900-90001_HaloPlex_Target_Enrichment%20_Manual.pdf)
81. HaloPlexExome Manual. 2015.
82. Institut National du Cancer. Séquençage de nouvelle génération d'un panel de gènes pour l'analyse en génétique somatique - Validation de la méthode. 2016 mars.
83. Technology | Key Illumina technology overviews [Internet]. Disponible sur: <https://www.illumina.com/science/technology.html>
84. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet*. janv 2010;11(1):31-46.
85. Saad C. Caractérisation des erreurs de séquençage non aléatoires: application aux mosaïques et tumeurs hétérogènes.

86. Cadoret C, Deloger M, Ouimette F, Servant N, Syx L. NGS & Cancer : Analyses épigénétiques 20, 21, 22 novembre 2019. 2019;84.
87. Lupski J, Reid J, Gonzaga-Jauregui C. Whole -Genome Sequencing in a Patient with Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *The New England Journal of Medicine*. 362<sup>e</sup> éd. 2010;1181-91.
88. Université de Rouen. Atelier NGS-diag BioInfo Rouen - Alamut [Internet]. 2015. Disponible sur: <http://bioinfo.univ-rouen.fr/ngs-diag/talks/alamut.pdf>
89. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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. *Genet Med*. mai 2015;17(5):405-23.
90. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, et al. Population Analysis of Large Copy Number Variants and Hotspots of Human Genetic Disease. *Am J Hum Genet*. 13 févr 2009;84(2):148.
91. Xie C, Tammi MT. CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing. *BMC Bioinformatics*. 6 mars 2009;10(1):80.
92. McDermott JH, Molina-Ramírez LP, Bruce IA, Mahaveer A, Turner M, Miele G, et al. Diagnosing and Preventing Hearing Loss in the Genomic Age. *Trends Hear*. janv 2019;23:233121651987898.
93. Illumina. Specification sheet: Novaseq-6000 (770-2016-025-fra) [Internet]. Disponible sur: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/novaseq-6000-system-specification-sheet-770-2016-025-translations/novaseq-6000-system-specification-sheet-770-2016-025-fra.pdf>
94. Avraham KB, Kanaan M. Genomic advances for gene discovery in hereditary hearing loss. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1 sept 2012;23(3):93-7.
95. Friedman TB, Griffith AJ. Human Nonsyndromic Sensorineural Deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 1 sept 2003;4(1):341-402.
96. Ingham N, Rook V, Di Domenico F. Functional analysis of candidate genes from genome-wide association studies of hearing. *Hear Res*. 1 mars 2020;387:107879.
97. Morton C. SEQuencing a Baby for an Optimal Outcome (SEQaBOO). [cité 16 nov 2020]; Disponible sur: <https://grantome.com/grant/NIH/R01-DC015052-01>



# Annexes

Locus	Gène	Localisation chromosomique	Âge d'apparition	Mode évolutif
DFNB1	<i>GJB2</i> (ancien <i>CX26</i> ) <i>GJB6</i> (ancien <i>CX30</i> )	13q11/13q12	Prélinguale	Stable Fréquences aiguës
DFNB2	<i>MYO7A</i>	13q12	Pré- ou postlinguale	Profonde stable
DFNB3	<i>MYO15</i>	17p11.2	Prélinguale	Stable
DFNB4	<i>SLC26A4</i> (ancien <i>PDS</i> )	7q31	Pré- ou postlinguale	Variable
DFNB5		14q12	Prélinguale	
DFNB6	<i>TMIE</i>	3p14-p21		Stable
DFNB7/11	<i>TMC1</i>	9q13-q21 (surdité légère ou moyenne entre 0 et 10 ans devenant profonde prédominant sur les aiguës entre 10 et 20 ans) (Inde-famille de Bédouins)	Prélinguale	Progressive Fréquences aiguës
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	Postlinguale	Rapidement progressive
DFNB9	<i>OTOF</i>	2p22-p23	Prélinguale	Stable Fausse neuropathie auditive
DFNB12	<i>CDH23</i>	10q21-q22	Prélinguale	Stable Toutes fréquences
DFNB13		7q34-36	Prélinguale	Progressive
DFNB14		7q31	Prélinguale	Stable
DFNB15		3q21-q25 - 19p13	Prélinguale	Stable
DFNB16	<i>STRC</i>	15q15	1 <sup>re</sup> décennie	Stable Prédominance fréquences aiguës
DFNB17		7q31		Profonde stable
DFNB18	<i>USH1C</i>	11p15.1		
DFNB20		11q25-qter	Prélinguale	
DFNB21	<i>TECTA</i>	11q22-q24	Prélinguale	Stable Courbe en U
DFNB22	<i>OTOA</i>	16p12.2	Prélinguale	
DFNB23	<i>PCDH15</i>	10p11.2-q21		
DFNB26		4q31		
DFNB27		2q23-q31	Prélinguale	
DFNB28		22q13	Prélinguale	
DFNB29	<i>CLDN14</i>	21q22.3	Prélinguale	
DFNB30	<i>MYO3A</i>	10p11.1	2 <sup>e</sup> décennie	Progressive Initialement fréquences aiguës
DFNB31	<i>WHRN</i>	9q37-q34	Prélinguale	Progressive Initialement fréquences aiguës
DFNB32		1p13.3-22.1	Prélinguale	Profond Stable
DFNB33		9q34.3	1 <sup>re</sup> décennie	
DFNB35		14q24.1-24.3	Prélinguale	Stable Toutes fréquences
DFNB36	<i>ESPN</i>	1p36.3	Prélinguale	
DFNB37	<i>MYO6</i>	6q13	Prélinguale	
DFNB38		6q26-q27	Prélinguale	Toutes fréquences
DFNB39		7q11.22-q21.12	Prélinguale	Stable
DFNB40		22q	Prélinguale	Toutes fréquences
Pas de nom de locus	<i>GJA1</i> (ancien <i>CX43</i> ) Implication dans une surdité non syndromique actuellement démentie			
Pas de nom de locus	<i>PRES</i>			

## Annexe 1 : Surdités isolées à transmission récessive (20)

**Tableau 1** Surdités autosomiques dominantes DFNA.

Locus	Gène	Localisation chromosomique	Âge d'apparition	Mode évolutif
DFNA1	<i>DIAPH1</i>	5q31	1 <sup>re</sup> décennie	Progressive Fréquences graves
DFNA2	<i>GJB3</i>	1p35.1	1 <sup>re</sup> /2 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA3	<i>KCNQ4</i>	1p34	Prélinguale	Fréquences aiguës
	<i>GJB2/GJB6</i>	13q11-q12/13q12		Stable
DFNA4	<i>MYH14</i>	19q13	1 <sup>re</sup> /2 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA5	<i>DFNA5</i>	7p15	1 <sup>re</sup> /2 <sup>e</sup> /3 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA6/14/38	<i>WFS1</i>	4p16.1	Prélingual	Progressive Fréquences graves
DFNA7		1q21-q23	Postlinguale	Progressive Fréquences aiguës
DFNA8/12	<i>TECTA</i>	11q22-q24	Prélinguale	Stable ou progressive
DFNA9	<i>COCH</i>	14q12-q13	1 <sup>re</sup> décennie	Fréquences aiguës ou centré sur 2 kHz
DFNA10	<i>COCH</i>		2 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA10	<i>EYA4</i>	6q23	Postlinguale	Toutes fréquences
DFNA11	<i>MYO7A</i>	11q13.5	2 <sup>e</sup> /5 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA13	<i>COL11A2</i>	6p21.3	Prélinguale	Toutes fréquences d'abord moyennes
DFNA15	<i>POU4F3</i>	5q31	1 <sup>re</sup> décennie	Progressive
DFNA16		2q24	Postlinguale	Progressive
DFNA17	<i>MYH9</i>	22q11.2	2 <sup>e</sup> /4 <sup>e</sup> décennie	Courbe plate ou en U
DFNA18		3q22	Postlinguale	Progressive
DFNA20/26		17q25	3 <sup>e</sup> décennie	Fréquences aiguës
DFNA21		6p21	1 <sup>re</sup> décennie	Progressive fluctuant
DFNA22	<i>MYO6</i>	6q13	Postlinguale	Fréquences aiguës
DFNA23		14q21-q22	Prélinguale	Progressive
DFNA24		4q	1 <sup>re</sup> décennie	Fréquences aiguës puis toutes fréquences
DFNA25		12q21-24	Postlinguale	Progressive
DFNA27		4q12	Âge de début variable	Fréquences aiguës
DFNA28	<i>TFCP2L3</i>	8q22	Postlinguale	Progressive
DFNA30		15q25-26	1 <sup>re</sup> décennie	Fréquences aiguës
DFNA31		6p21.3	2 <sup>e</sup> -4 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA34		1q44	1 <sup>re</sup> décennie	Fréquences aiguës
DFNA36	<i>TMC1</i>	9q13-q21	3 <sup>e</sup> -4 <sup>e</sup> décennie	Progressive
DFNA41		12q24-qter	Postlinguale	Fréquences aiguës
DFNA43		2p12	1 <sup>re</sup> décennie	Rapidement progressive
			Postlinguale	Fréquences aiguës puis toutes fréquences
			2 <sup>e</sup> -3 <sup>e</sup> décennie	Progressive

(suite page suivante)

## Annexe 2 : Surdités isolées à transmission dominante (20)

(suite)

Locus	Gène	Localisation chromosomique	Âge d'apparition	Mode évolutif
DFNA44		3q28-29	Postlinguale	
DFNA47		9p21-22	Postlinguale	Progressive
DFNA48	<i>MYO1A</i>	12q13-q14	2 <sup>e</sup> -3 <sup>e</sup> décennie	Fréquences aiguës
DFNA49		1q21-q23	Postlinguale	Progressive
DFNA50		7q32	1 <sup>re</sup> décennie	Fréquences aiguës ou toutes fréquences
Pas de nom de locus	<i>CRYM</i>		Postlinguale	Progressive
			2 <sup>e</sup> décennie	Toutes fréquences

### Annexe 2 (suite) : Surdités isolées à transmission dominante (20)

**Tableau 3** Surdités liées à l'X DFN (DFN1 et DFN5 ne sont pas citées, n'étant pas des surdités non syndromiques après réexamen des patients).

Locus	Gène	Localisation chromosomique	Âge d'apparition	Mode évolutif
DFN2		Xq22	Prélinguale	Stable
DFN3	<i>POU3F4</i>	Xq21.1	Prélinguale	Toutes fréquences
DFN4		Xp21	Prélinguale	Surdité mixte avec geysers labyrinthiques en cas de platinotomie
DFN6		Xp22	Postlinguale	Toutes fréquences
				Progressive
				Fréquences aiguës

### Annexe 3 : Surdités isolées à transmission liée à l'X (20)

Nom du syndrome	Mode de transmission	Gènes en cause	Principaux signes à rechercher chez les sujets sourds et/ou dans la famille	Examens nécessaires
Waardenburg type I	Autosomique dominant (expressivité variable)	<i>PAX3</i>	Mèches blanches ou cheveux blancs précoces. Yeux vairons ou très bleus. Dépigmentation rétinienne au FO	Interrogatoire ++ Examen clinique ++ Examen ophtalmologique avec FO systématique
Waardenburg type II	Autosomique dominant (expressivité variable)	<i>MITF</i> <i>SLUG</i>	± Dystopie canthale (type I, III) ± Malformations des extrémités (type III)	
Waardenburg type III	Autosomique dominant (expressivité variable)	<i>PAX3</i>	± Maladie de Hirschsprung (type IV)	
Waardenburg type IV	Autosomique récessif	<i>EDNRB</i> <i>EDN3</i> <i>SOX10</i>		
Branchio-oto-rénal	Autosomique dominant (expressivité variable)	<i>EYA1</i> <i>Autre gène localisé en 1q31</i>	Anomalies de l'oreille externe et/ou moyenne. Fistules ou kystes branchiaux Malformations rénales	Interrogatoire Examen clinique Échographie rénale sur orientation clinique seulement
Stickler	Autosomique dominant (expressivité variable)	<i>COL2A1 (STL1)</i> <i>COL11A1 (STL2)</i> <i>COL11A2 (STL3)</i>	Fente palatine, association de Robin. Aspect marfanoïde Anomalies squelettiques et cartilagineuses STL1 et 3 : très forte myopie	Examen clinique Examen ophtalmologique systématique
Usher	Autosomique récessif	<i>MYO VIIA</i> <i>CDH23</i> <i>PCDH15</i> <i>USH1C</i> <i>SANS</i> <i>USH 2A</i> <i>USH3</i>	Rétinite pigmentaire progressive aboutissant à la cécité. Troubles initiaux : vision nocturne Souvent : troubles vestibulaires avec retard de la marche	Examen ophtalmologique systématique avec FO Électrorétinogramme systématique chez le nourrisson sourd profond si retard à la marche
Pendred	Autosomique récessif	<i>PDS</i>	Évolution fluctuante de la surdité. Goitre hypo- ou euthyroïdien apparaissant au cours de l'enfance Malformation de l'oreille interne	Examen clinique Scanner des rochers Scintigraphie thyroïdienne avec test au perchlorate sur orientation clinique seulement
Jerwell et Lange-Nielsen	Autosomique récessif	<i>KvLQT1</i> <i>KCNE1(IsK)</i>	Malaises. Mort subite	ECG systématique dans les surdités congénitales apparemment isolées
Alport	Dominant lié à l'X Autosomique récessif Autosomique récessif	<i>COL4A3</i> <i>COL4A4</i> <i>COL4A5</i>	Hématurie puis protéinurie => insuffisance rénale	Bandelette urinaire systématique

ECG : électrocardiogramme ; FO : fond d'œil.

#### Annexe 4 : Surdités syndromiques principales (20)

# UN RÉSEAU NATIONAL DE CENTRES DE SOINS

## CENTRE SURDITÉS GÉNÉTIQUES



### CENTRES DE RÉFÉRENCE

-  Hôpital Necker Enfants Malades-APHP, *CENTRE SURDITÉS GÉNÉTIQUES*, Dr Sandrine MARLIN (COORDONNATEUR)
-  CHU Lille, Dr Catherine VINCENT-DELORME
-  APHP- Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Dr Isabelle MOSNIER

### CENTRES DE COMPÉTENCES

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● AP-HM, site CHU Timone Enfant, Paris</li> <li>● CHU Nantes, Hôtel Dieu</li> <li>● CHU Rouen</li> <li>● CHU Toulouse, site Purpan</li> <li>● CHRU Tours, Hôpital Bretonneau</li> <li>● CHRU Nancy, Hôpital d'Enfants</li> <li>● CH Le Mans</li> <li>● CHU Clermont-Ferrand – site ESTAING</li> <li>● CHU Rennes, Hôpital Pontchaillou</li> <li>● HUS Strasbourg, Hôpital de Hautepierre</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● CHU Grenoble Alpes</li> <li>● CHU de Limoges, Hôpital Mère-Enfant</li> <li>● CHU de St Etienne, Hôpital Nord</li> <li>● CHU de Dijon, Hôpital d'enfants</li> <li>● CH La Réunion – site : GHSR</li> <li>● Hospices Civils de Lyon</li> <li>● APHP- CHU Robert Debré</li> <li>● CHU de Reims, Hôpital Maison Blanche</li> <li>● CHU de Besançon, Saint Jacques</li> <li>● CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin</li> </ul> |
|--|---|

Centres labellisés par le Ministère de la Santé



## Annexe 5 : Carte de France des centres Sensgene

<b>Surdités non syndromiques</b> Dominante (DFNA)  (45 gènes)	ACTG1, CD164, CCDC50, CEACAM16, COCH, COL11A2*, CRYM, DIABLO (SMAC), DIAPH1, DMXL2, DSPP*, EYA4, GJB2*, GJB3, GJB6*, GRHL2, GSDME (DFNA5), HOMER2, <u>IFNLR1</u> , KCNQ4, KIAA1199 (CEMIP), KITLG, <u>LMX1A</u> , MCM2, MYH14, MYH9, MYO6*, MYO7A*, <u>NLRP3</u> , OSBPL2, P2RX2, <u>PDE1C</u> , <u>PLS1</u> , <u>POU4F3</u> , <u>REST</u> , <u>SIX1*</u> , <u>SLC9A3R1</u> , SLC17A8*, TBC1D24*, TECTA, TJP2, TMC1*, <u>TNC</u> , <u>TRRAP</u> , WFS1*
Récessive (DFNB)  ( 77 gènes)	ADCY1, ATP2B2, BDP1, BSND, CABP2*, CDC14A, CDH23*, <u>CLDN9</u> , CIB2, CLIC5, CLDN14, COL11A2*, ELMOD3, EPS8, EPS8L2, <u>ESRP1</u> , DCDC2, ESPN, ESRRB, <u>GAB1</u> , GIPC3, GJA1, GJB2*, GJB6*, GPSM2, <u>GRAP</u> , GRXCR1, GRXCR2, HGF, ILDR1, KARS, LHFPL5, LOXHD1*, LRTOMT, MARVELD2, MET, <u>METTL13</u> , <u>MPZL2</u> , MSRB3, MTAP, MYO15A, MYO3A, MYO6*, MYO7A*, NARS2, OTOA, OTOF*, OTOG, OTOGL, PCDH15*, PDZD7*, PJKV (DFNB59), PNPT1*, <u>PIPSK2</u> , PTPRQ, RDX, RIPOR2 (FAM65B), <u>ROR1*</u> , S1PR2, SERPINB6, SLC26A4*, SLC26A5, SLITRK6*, <u>SPNS2</u> , STRC, SYNE4, TBC1D24*, TMC1*, TMEM132E, TMIE, TMRSS3, TPRN, TRIOBP, TSPEAR, USH1C*, <u>WBP2</u> , WHRN*
Lie à l'X (6 +1)	AIFM1 (DFNX5)*, COL4A6, <u>GPRASP2</u> , POU3F4, PRPS1, SMPX, TBL1X
<b>Surdités syndromiques ( N=88)</b> USHER	MYO7A*(USH1B), USH1C*, CDH23 (USH1D), PCDH15* (USH1F), SANS (USH1G), USH2A, ADGRV1(USH2C, GPR98), WHRN*(USH2D), CLRN1 (USH3), HARS, PDZD7 (USH3B)
Branchiooculofacial -BOF	TFAP2A
BOR	EYA1, SIX1*, (SIX5)
cérébrooculofacial-COFS	ERCC2
Alport	COL4A3, COL4A4, COL4A5*
Charge	CHD7, SEMA3E
Pendred	SLC26A4*, FOXI1, KCNJ10,
Perrault*	CLPP, HARS2, HSD17B4, LARS2
Stickler	COL2A1, COL9A1, COL9A2, COL11A1, COL11A2,
Jervel et Lange Nielsen	KCNE1, KCNQ1
Norrie	NDP
Waardenburg et Hirschprung	ECE1, EDNRB, EDN3, MITF, PAX3, SNAI2, SOX10,
Treacher Collins	POLR1C, POLR1D, TCOF1
Kallmann	ANOS1(KAL1), FGF8, FGFR1, PROK2, PROKR2
Townes Brooks	SALL1, SALL4
PHARC	ABHD12
Harboyan	SLC4A11
Myopie surdité (ANSD)	SLITRK6*
Déficit transporteur riboflavine (ANSD)	SLC52A2, <u>SLC52A3</u>
Insuffisance hypophysaire et surdité	LHX3
Atrésie congénitale	TSHZ1
Alagille	JAG1
LAMM, Muenke	FGF3, FGFR3
Barakat (HDR) Microphthalmie Plebalidisme et surdité Mohr-Tranebjaerg (MTS) (ANSD)	GATA3 SOX2 KIT TIMM8A
Wolfram	WFS1*
Charcot-Marie-Tooth et surdité <u>Syndrome d'Emberger Duane</u> <u>microtie</u>	PMP22 <u>GATA2</u> , CHN1, HOXA2, MAN2B1
<b>Neuropathies auditives [17]</b> isolées (NA, RA, X) Syndromiques (ANSD)	AIFM1* AUNA, CABP2*, <u>CAV1</u> , LOXHD1, OTOF*, <u>ROR1*</u> , <u>SMAD4</u> , SLC17A8*, TBC1D24*, <u>TMTG2</u> , C10ORF2 (TWNK), CMT1 (MPZ), ERAL1, ERCC4, ERCC6, ERCC8, ERCC8, FDXR, FXN, OPA1, PNPT1*, <u>PTRH2</u> , SLC19A2, TMEM126A

*nouveaux gènes panel V4], (\*) gènes appartenant à plusieurs groupes*

## Annexe 6 : liste des gènes étudiés dans le panel NGS-surdité en 2020

Col	Champ	Type	Brève description
1	QNAME	Chaîne	NOM de la séquence requête
2	FLAG	Int	FLAG au niveau des bits
3	RNAME	Chaîne	NOM de la séquence de référence
4	POS	Int	POSITION 5' (basée sur 1) de l'alignement
5	MAPQ	Int	Qualité MAPping
6	CIGAR	Chaîne	Chaîne de caractères CIGAR
7	RNEXT	Chaîne	Réf. nom du <i>read</i> apparié / prochaine <i>read</i>
8	PNEXT	Int	Position du <i>read</i> apparié / prochaine <i>read</i>
9	TLEN	Int	Longueur de séquence observée ou d'insertion (paired-end)
10	SEQ	Chaîne	segment SEQUENCE
11	QUAL	Chaîne	Qualités de base ASCII selon l'échelle Phred QUALity + 33

### Annexe 7 : liste des critères d'un fichier .sam

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical <math>\pm</math>1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>)</li> <li>• Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene</li> <li>• Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact</li> <li>• Use caution in the presence of multiple transcripts</li> </ul>
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G&gt;C or G&gt;T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (<u>both</u> maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is &gt;5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg 156His is pathogenic; now you observe Arg 156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

## Annexe 8 : Critères ACMG utilisés pour classer les variants pathogènes (89)

Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	<p>BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see <a href="#">Table 6</a>)</p> <p>BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4 Lack of segregation in affected members of a family</p> <p>Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.</p>
Supporting	<p>BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease</p> <p>BP2 Observed in <i>trans</i> with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant in any inheritance pattern</p> <p>BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function</p> <p>BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease</p> <p>BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p> <p>BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved</p>

## Annexe 9 : Critères ACMG utilisés pour classer les variants bénins (89)

Pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Very strong (PVS1) <i>AND</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) <math>\geq 1</math> Strong (PS1–PS4) <i>OR</i></li> <li>(b) <math>\geq 2</math> Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i></li> <li>(c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) <i>OR</i></li> <li>(d) <math>\geq 2</math> Supporting (PP1–PP5)</li> </ul> </li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Strong (PS1–PS4) <i>OR</i></li> <li>(iii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) <math>\geq 3</math> Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i></li> <li>(b) 2 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> <math>\geq 2</math> Supporting (PP1–PP5) <i>OR</i></li> <li>(c) 1 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> <math>\geq 4</math> supporting (PP1–PP5)</li> </ul> </li> </ul>
Likely pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Very strong (PVS1) <i>AND</i> 1 moderate (PM1–PM6) <i>OR</i></li> <li>(ii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> 1–2 moderate (PM1–PM6) <i>OR</i></li> <li>(iii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> <math>\geq 2</math> supporting (PP1–PP5) <i>OR</i></li> <li>(iv) <math>\geq 3</math> Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i></li> <li>(v) 2 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> <math>\geq 2</math> supporting (PP1–PP5) <i>OR</i></li> <li>(vi) 1 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> <math>\geq 4</math> supporting (PP1–PP5)</li> </ul>
Benign	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Stand-alone (BA1) <i>OR</i></li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Strong (BS1–BS4)</li> </ul>
Likely benign	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) <i>OR</i></li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Supporting (BP1–BP7)</li> </ul>
Uncertain significance	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Other criteria shown above are not met <i>OR</i></li> <li>(ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory</li> </ul>

**Annexe 10 : combinaison de critères pour la classification de variants (89)**



POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE L'expertise du CHU au service de la région.

**INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE**

**- SECTEUR TOXICOLOGIE ET GENOPATHIES -**

**FICHE CLINIQUE POUR L EXPLORATION DE LA SURDITE** ☎ 03.20.44.49.60

**COORDONNEES DE L'ORGANISME DEMANDEUR** mars-16

Demandeur \_\_\_\_\_  
 Adresse \_\_\_\_\_  
 CP \_\_\_\_\_ Ville \_\_\_\_\_  
 Téléphone \_\_\_\_\_ Télécopie \_\_\_\_\_  
 E mail \_\_\_\_\_

**PATIENT**

Nom \_\_\_\_\_  
 Nom d'épouse \_\_\_\_\_  
 Prénom \_\_\_\_\_  
 Né(e) le \_\_\_\_\_  
 Sexe  F  M

**SERVICE CLINIQUE**

Nom du ou des \_\_\_\_\_  
 Médecins \_\_\_\_\_  
 prescripteurs \_\_\_\_\_  
 Date de l'examen \_\_\_\_\_  
 Votre référence \_\_\_\_\_  
 Service/Unité \_\_\_\_\_

**RENSEIGNEMENTS CLINIQUES**

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE CHEZ UN SUJET ATTEINT DE SURDITE**

Cas index isolé  
 Etude familiale :  Père  Mère (d'un sujet atteint)

**CARACTERISTIQUE DE LA SURDITE DE LA PERSONNE ATTEINTE**

Surdité de :  Perception  Transmission  
 Importance du déficit auditif :  Léger  Moyen  Sévère  Profond  
 Atteinte :  Symétrique  Asymétrique  
 Evolutivité :  Stable  Evolutive  
 Surdité :  Isolée  Associée à d'autres signes cliniques

Nombre de personnes déficientes auditives dans la famille : .....

**ARBRE GENEALOGIQUE**

**EXAMENS COMPLEMENTAIRES**

Fond d'oeil :  Non réalisé  Normal  Anormal : (résultat) .....

Scanner du rocher :  Non réalisé  Normal  Anormal : (résultat) .....

Epreuves vestibulaires :  Non réalisées  Normales  Anormales : (résultat) .....

Hématurie, protéinurie :  Non  Oui : (résultat) .....

Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille  
 Bd du Professeur J. Leclercq  
 59037 LILLE Cedex

**Annexe 11 : Fiche de renseignements cliniques**

**CONSENTEMENT EN VUE D'UN EXAMEN DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES A DES FINS MEDICALES ET LA CONSERVATION DES ECHANTILLONS DANS UNE BANQUE D'ADN OU UN CENTRE DE RESSOURCES BIOLOGIQUES**

<u>IDENTIFICATION DU PATIENT</u>	<u>IDENTITE DU REPRESENTANT LEGAL</u>
NOM .....	<input type="checkbox"/> Titulaire de l'autorité parentale <input type="checkbox"/> Tuteur
Prénom : .....	NOM : .....
Nom de jeune fille : .....	Prénom : .....
Date de naissance : .....	Date de naissance : .....

Je soussigné(e), Mme, Mr ..... déclare avoir bénéficié d'une consultation auprès du Dr ..... et avoir été informé(e) de la nature des examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisés :

- Chez moi-même
- Chez mon enfant mineur ou la personne dont je suis tuteur : NOM..... Prénom : .....

Les examens génétiques demandés concement la maladie (ou groupe de maladies) suivante(s):

**Je reconnais** avoir reçu l'ensemble des informations me permettant la compréhension des conditions de réalisation, des limites et de la finalité de cet acte biologique et des conséquences des résultats pour moi-même, mon enfant mineur ou la personne dont je suis tuteur et éventuellement la famille.

**Je donne mon consentement** pour la réalisation de ces analyses mais à tout moment, je peux demander que l'étude génétique soit interrompue ou que les résultats ne me soient pas communiqués.

**J'autorise** le recueil, la saisie et le traitement informatique des données médicales nécessaires à cet examen.

**J'autorise** la conservation au laboratoire du matériel biologique issu du prélèvement mais à tout moment, je peux en demander la destruction. Dans ce cas, j'en informerai le médecin désigné ci-dessus.

**Le résultat est confidentiel.** Il me sera rendu et expliqué en consultation par le médecin qui l'a prescrit.

**J'ai compris** que si une anomalie génétique responsable d'une prédisposition ou d'une affection grave était mise en évidence, je devrai permettre la transmission de cette information aux apparentés potentiellement concernés. J'ai été averti que mon silence pouvait leur faire courir des risques ainsi qu'à leur descendance, dès lors que des mesures de prévention, y compris de conseil génétique ou de soins peuvent être proposées. Ainsi, lors du rendu de résultat, je devrai choisir entre : 1) Assurer moi-même la diffusion de l'information 2) Autoriser le médecin prescripteur à diffuser l'information génétique aux membres de la famille potentiellement concernés.

<b>J'accepte</b> , si mes résultats, ceux de mon enfant mineur ou de la personne dont je suis tuteur apparaissent médicalement essentiels pour les apparentés, qu'ils puissent être utilisés dans leur intérêt, y compris après mon décès, celui de mon enfant mineur ou la personne dont je suis tuteur.	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
<b>J'accepte</b> , si le diagnostic restait en suspens, l'utilisation ultérieure des échantillons biologiques pour d'autres analyses génétiques à visée diagnostique en fonction des progrès et des connaissances.	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Au cas où l'analyse réalisée révélerait une caractéristique génétique sans lien avec la raison pour laquelle elle est prescrite, <b>je souhaite</b> en être informé, si en l'état actuel des connaissances, ces résultats peuvent avoir une conséquence pour ma santé, celle de mon enfant mineur ou la personne dont je suis tuteur.	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
<b>J'autorise</b> le stockage et l'utilisation pour la recherche scientifique, du prélèvement après la réalisation des analyses à visée diagnostique, sans que l'on doive me recontacter.	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON

Fait à ..... le .....SIGNATURE du patient ou de son représentant légal

**ATTESTATION DE CONSULTATION MEDICALE INDIVIDUELLE**

ATTESTATION DU MEDECIN PRESCRIPTEUR	Signature et cachet :
Nom, Prénom du médecin prescripteur : .....	
certifie avoir informé le patient sus nommé sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du patient dans les conditions du code de la santé publique (article n°R1131-4 et 5).	

**Rappel concernant la législation** fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne : Le médecin prescripteur doit conserver le consentement écrit, les doubles de la prescription et de l'attestation et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés. Le laboratoire agréé réalisant les examens doit disposer de la prescription et de l'attestation du prescripteur, adresser le compte rendu d'analyse de biologie médicale commenté et signé par un praticien responsable agréé, exclusivement au médecin prescripteur des examens génétiques.

**Loi n°2011-814 du 7/07/2011** relative à la bioéthique ; **décret 2013-527 du 20 juin 2013** relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à des fins médicales ; **loi 78-17 du 6 janvier 1978** relative à l'informatique et aux libertés. **Arrêté du 27 mai 2013** définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales.

Les règles de bonnes pratiques de prescription d'une analyse génétique sont consultables sur le site du PBPG :

<http://biologiepathologie.chru-lille.fr/documents/127870.htm>

**Annexe 12 : Consentement éclairé à faire signer par le patient**

Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2019/2020

**Nom : LECIGNE**

**Prénom : Claire**

**Titre de la thèse :**

Apport des panels de séquençage haut débit ciblé sur le diagnostic de différentes formes de surdité héréditaire (formes non syndromiques et formes syndromiques)

**Mots-clés :**

Séquençage haut débit, génétique humaine, surdité, syndromique non-syndromique

---

**Résumé :**

Contexte : En France, la surdité est le déficit neurosensoriel le plus fréquent puisqu'elle touche 1 enfant sur 1000. Depuis sa commercialisation en 2005, le séquençage nouvelle génération (NGS) a permis l'identification de nombreux gènes responsables des formes de surdité isolée et des formes syndromiques.

Méthode : Depuis 2014, le laboratoire du CHU de Lille réalise un panel de gènes NGS-surdité pour diagnostiquer l'étiologie des surdités. Pour cela, il utilise l'enrichissement par circularisation d'Haloplex et les séquenceurs NextSeq550 d'Illumina. Après analyse bio-informatique, les variants retrouvés chez 1228 patients ont été classés selon les recommandations de l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire puis vérifiés par une seconde technique. Une analyse des CNV et une étude de ségrégation ont été réalisées lorsque cela était possible.

Résultats : Depuis 2014, le profil national des demandes de panel NGS-surdité ne cesse de se diversifier avec une forte proportion de suspicions syndromiques. Le taux de positivité n'a pas augmenté au cours du temps. Les patients ont été décrits en fonction de leurs caractéristiques cliniques et de leur résultat d'analyse moléculaire. Les gènes majoritaires pour chaque type de surdité ont ainsi pu être mis en évidence.

Conclusion : Grâce au séquençage de nouvelle génération, de nombreux patients ont pu connaître l'étiologie de leur surdité, permettant une meilleure prise en charge, un suivi adapté et un conseil génétique de qualité.

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Monsieur le professeur Thierry BROUSSEAU**

Faculté de Pharmacie, Université Lille

**Directeur de Thèse :** **Madame le Docteur Isabelle FAJARDY**

Faculté de Pharmacie, Université Lille

**Assesseur(s) :** **Madame le Docteur Claire-Marie DHAENENS**

Faculté de Pharmacie, Université Lille

**Madame le Docteur Catherine VINCENT-DELORME**

Faculté de Médecine, Université Lille