

Génétique et prise en charge prénatale des Hyperplasies Congénitales des Surrénales par déficit en 21-Hydroxylase

Dr. Véronique TARDY-GUIDOLLET

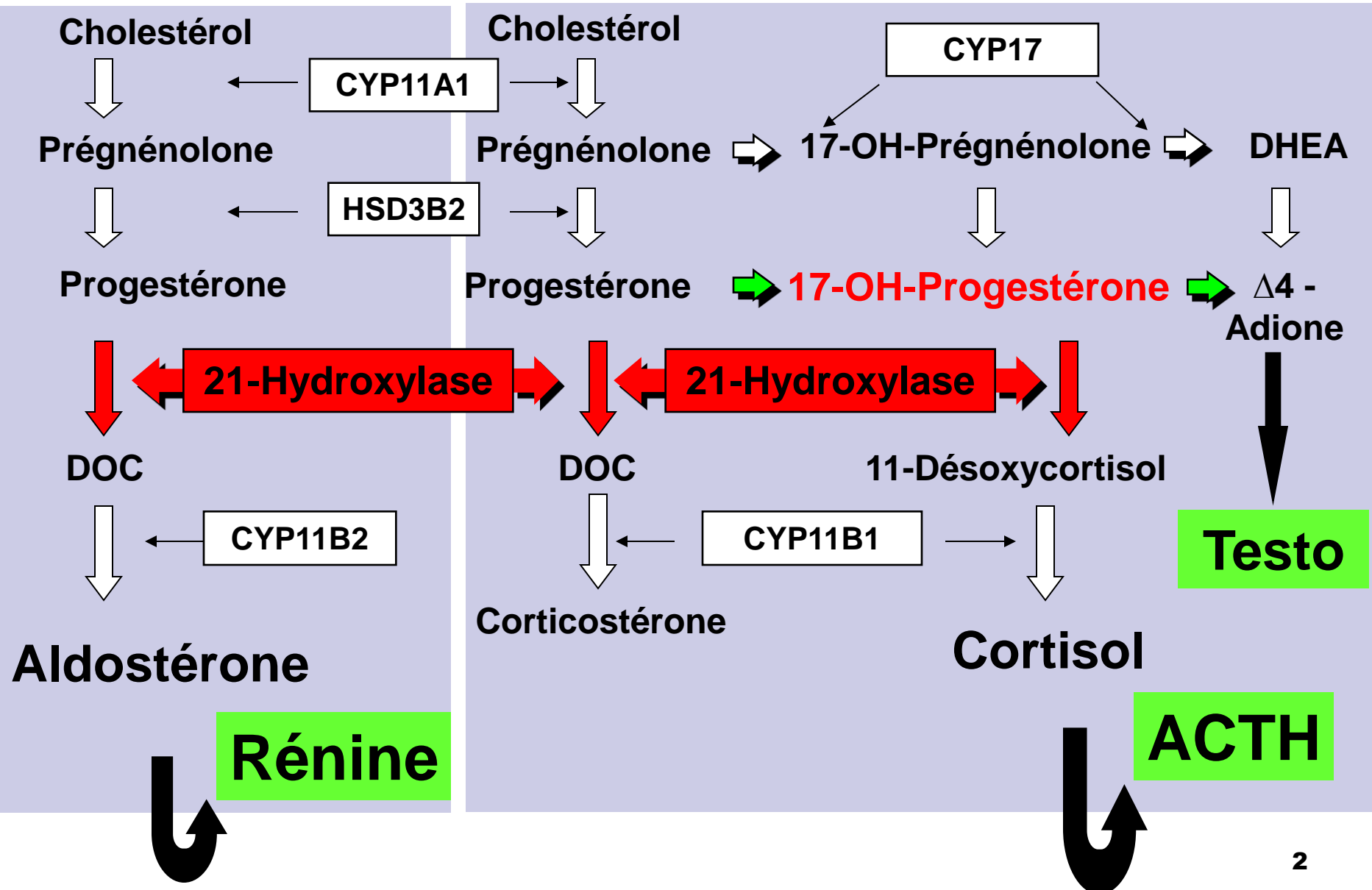
veronique.tardy@chu-lyon.fr

**Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares
Centre de Biologie et Pathologie Est - LYON**

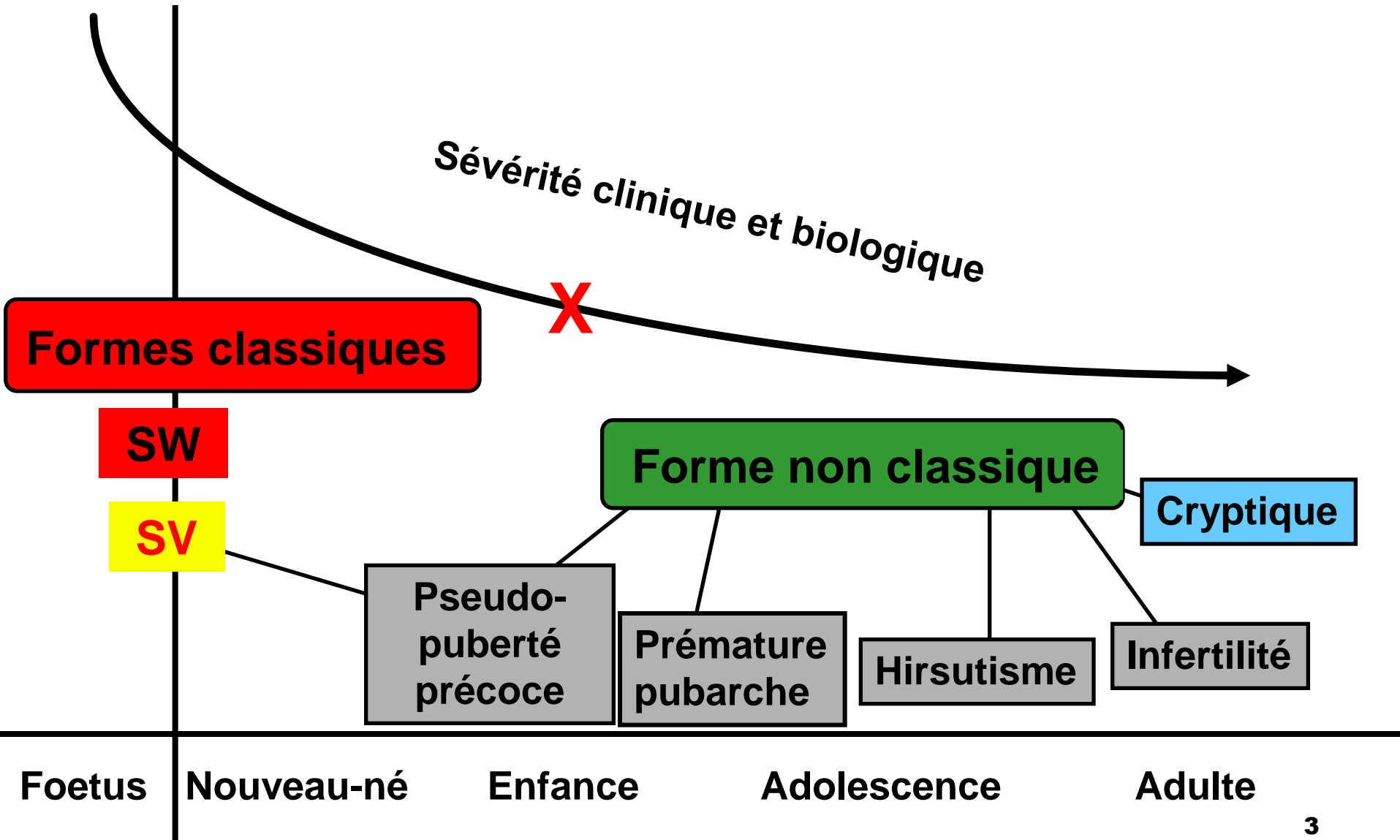
DES Endocrinologie, Lyon, 16 juin 2016



Synthèse des hormones stéroïdes dans les surrénales



Formes cliniques du déficit en 21-hydroxylase



Critères de classification

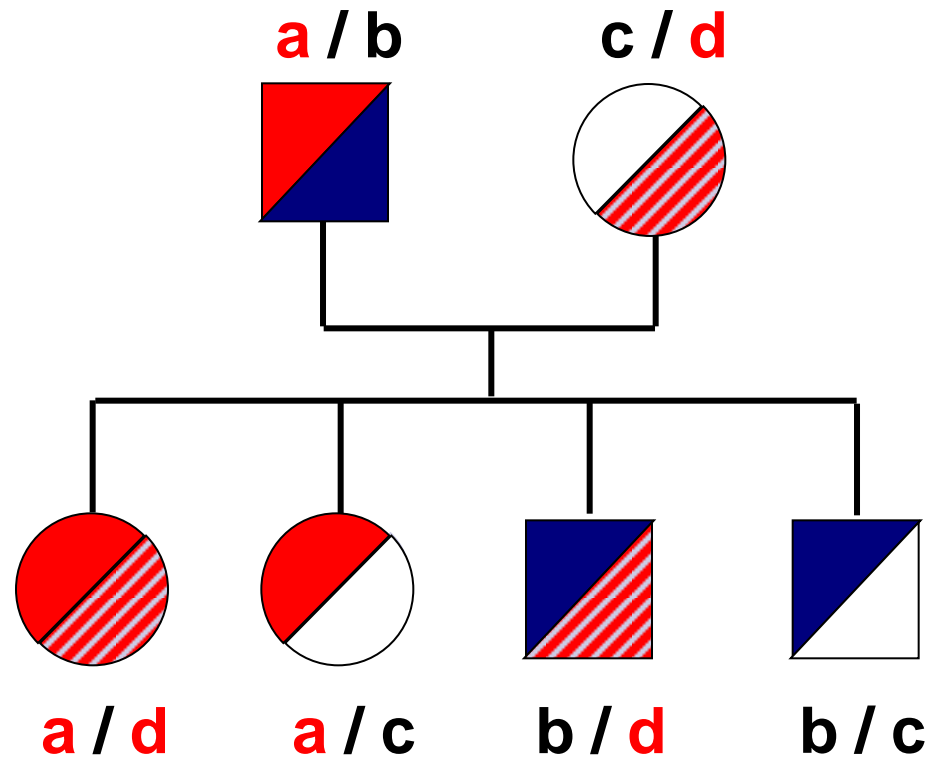
1- Signes dus directement à l'atteinte enzymatique

- Perte de sel
- Hypoglycémie
- Augmentation de la 17OHP
- Dépistage néonatal
- Follow-up clinique et biologique

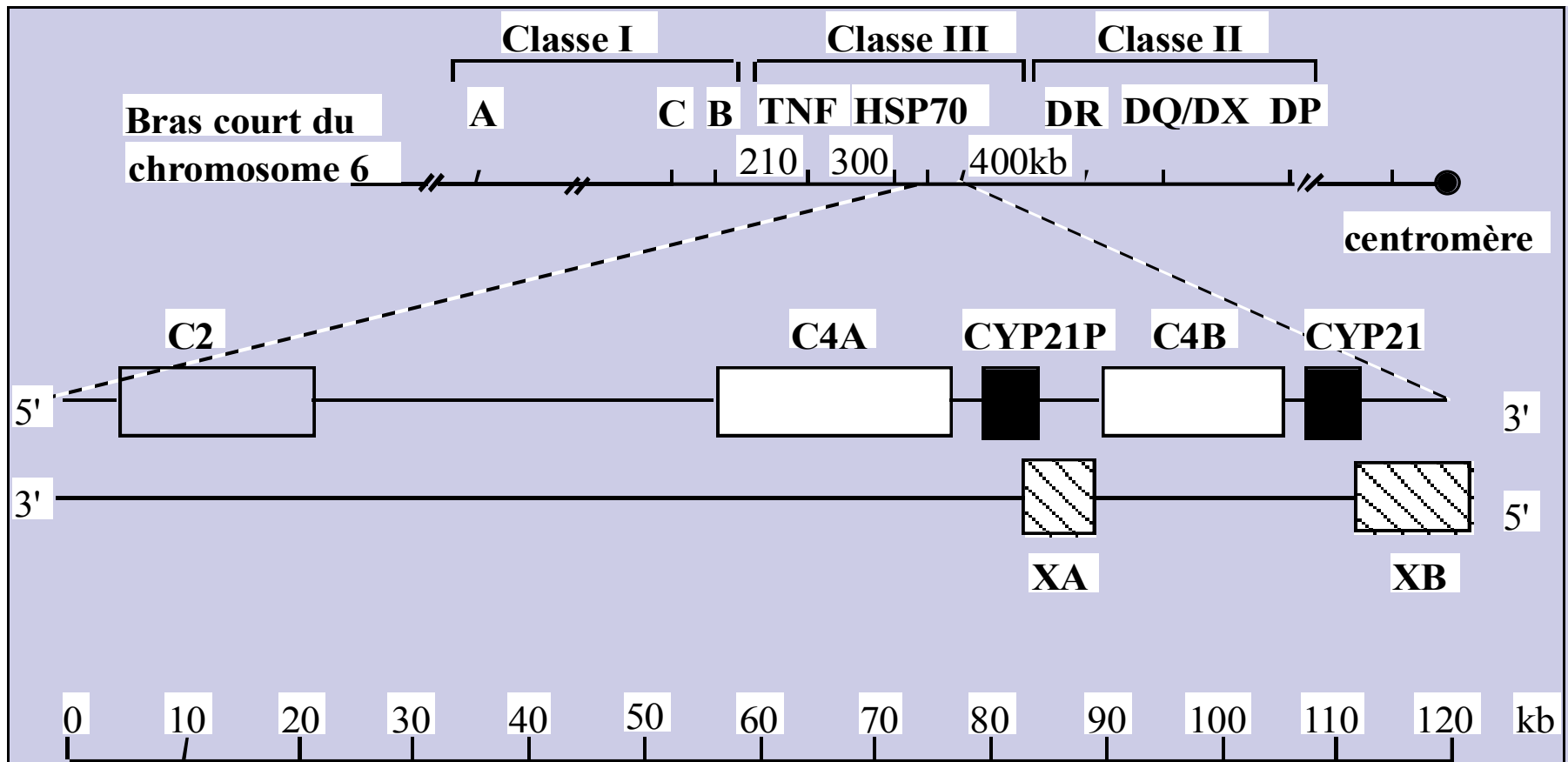
2- Signes secondaires à l'hyperandrogénie

- Virilisation néonatale chez la fille (variable)
- Autres :
 - prémature pubarche
 - avance âge osseux
 - avance staturale
 - hirsutisme
 - troubles des règles
 - infertilité
- Follow-up (taille définitive,.....)
- En général asymptomatique chez l'homme

Maladie autosomique récessive



Les gènes associés au déficit en 21-hydroxylase



Homologie de séquence entre les fragments dupliqués

C4A-CYP21A1P-XA

C4B-CYP21A2-XB

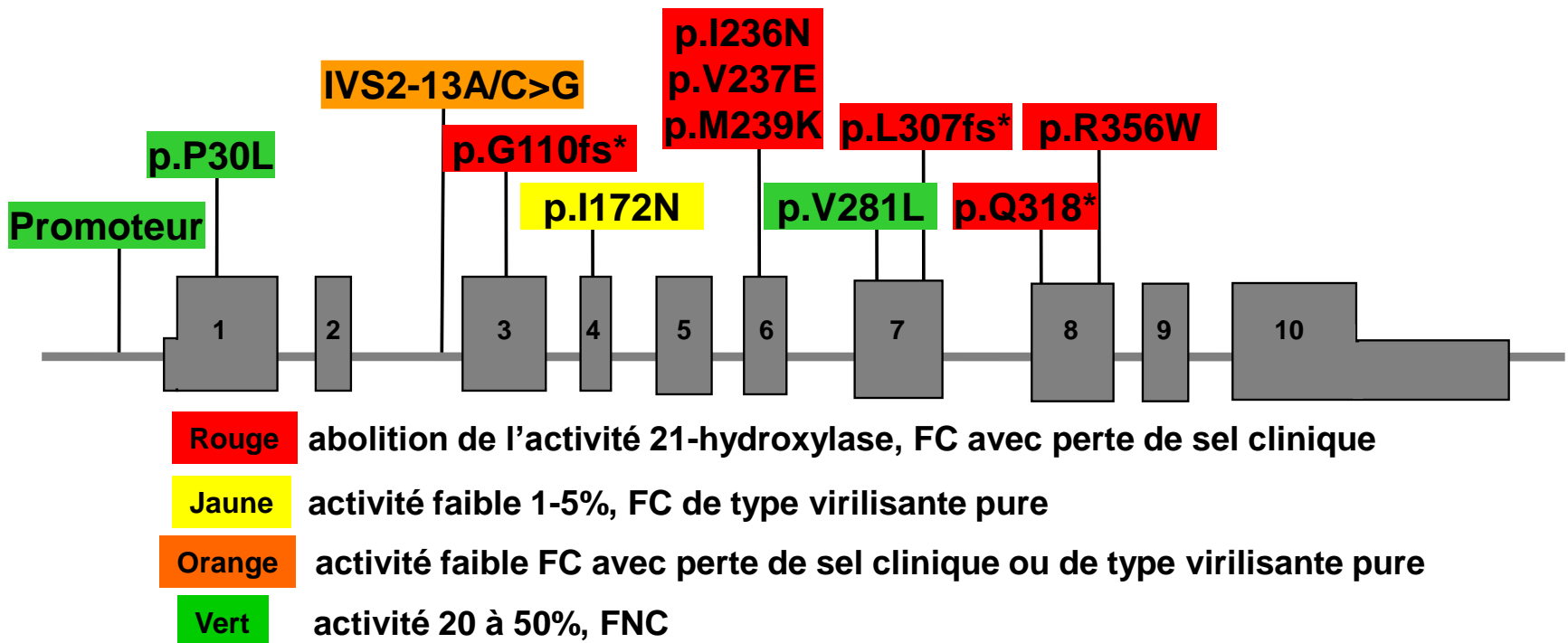
→ recombinaisons homologues lors de la méiose

Lésions géniques – 1

(6400 allèles CAH, 3200 patients) (Tardy et al. JCEM 2010)

1 - Mutations ponctuelles de retentissement variable (80 %)

- Homologie de séquence entre *CYP21A2* et *CYP21A1P* à 98 %
- *CYP21A1P* réservoir des mutations les plus fréquentes identifiées chez les patients survenant par microconversion génique



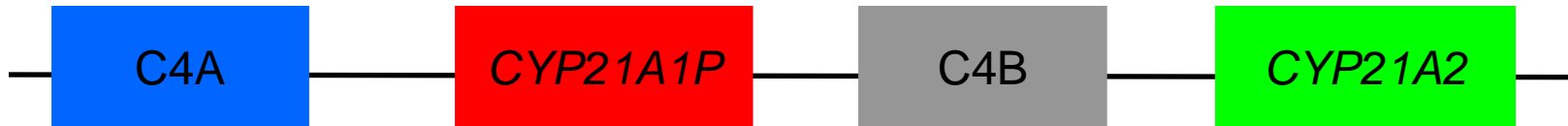
- Plus de 130 mutations décrites dans la littérature

Lésions géniques – 2

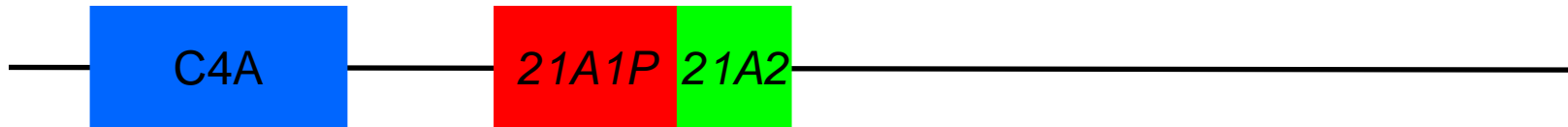
(6400 allèles CAH, 3200 patients) (Tardy et al. JCEM 2010)

2 - Large lésions abolissant l'activité 21OH (20%)

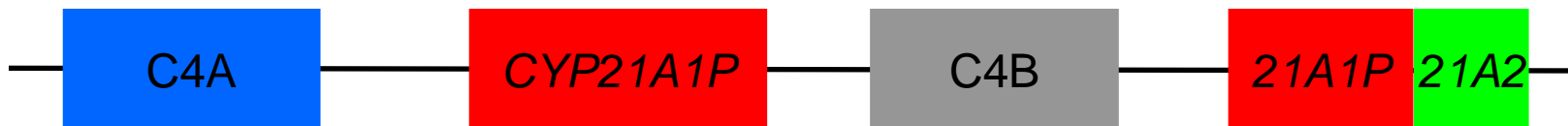
- Locus 6p21.3 normal



- Délétion : perte de matériel génique, gène hybride *CYP21A1P-CYP21A2* non fonctionnel



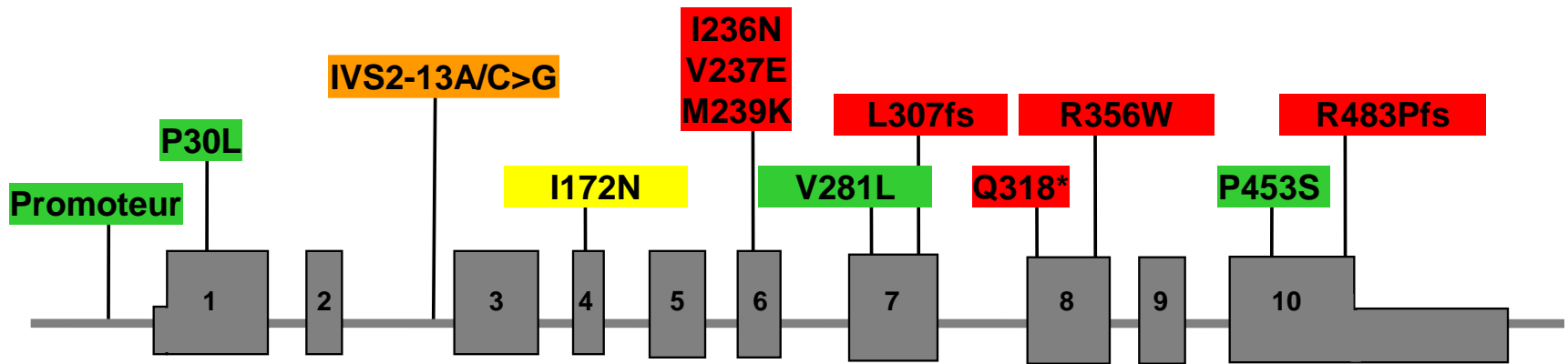
- Conversion génique : pas perte de matériel génique, gène hybride *CYP21A1P-CYP21A2* non fonctionnel



Lésions géniques dans les FNC (Tardy et al. JCEM 2010)

1 - Grandes lésions (8 %)

2 - Mutations ponctuelles isolées et fréquentes (>1%) (92 %)



Modérées = 67 %

p.V281L 56 %	p.P453S 5 %	p.P30L 3 %	Promoteur 1 %
--------------	-------------	------------	---------------

Sévères = 18 %

IVS2-13A/C>G 9 %	p.I172N 4 %	p.Q318* 3 %
------------------	-------------	-------------

➤ Fréquence comparable aux autres équipes

Speiser et al, JCI 1992 ; Wedell et al, Acta Paed 1998 ; Krone et al, JCEM 2000

Corrélations génotype - phénotype

1 - Formes classiques (2200 patients)

→ 1 lésion sévère sur les deux allèles

- Forme classique avec perte de sel clinique (SW)

p.Q318* / p.Q318*	(homozygote)
p.Q318* / p.L307fs*	(hétérozygote composite)
p.Q318* / Large lésion	(hémizygote)

- Forme virilisante pure (SV)

p.I172N / p.I172N
p.I172N / Large lésion

- Forme classique avec ou sans perte de sel clinique

IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G
IVS2-13A/C>G / Large lésion

Corrélations génotype - phénotype

2 - Formes non classiques FNC (2300 patients)

→ 1 lésion modérée sur au moins un allèle

- 1 mutation modérée sur un allèle (60 %)

p.V281L / p.Q318* ou large lésion

p.V281L / p.I172N

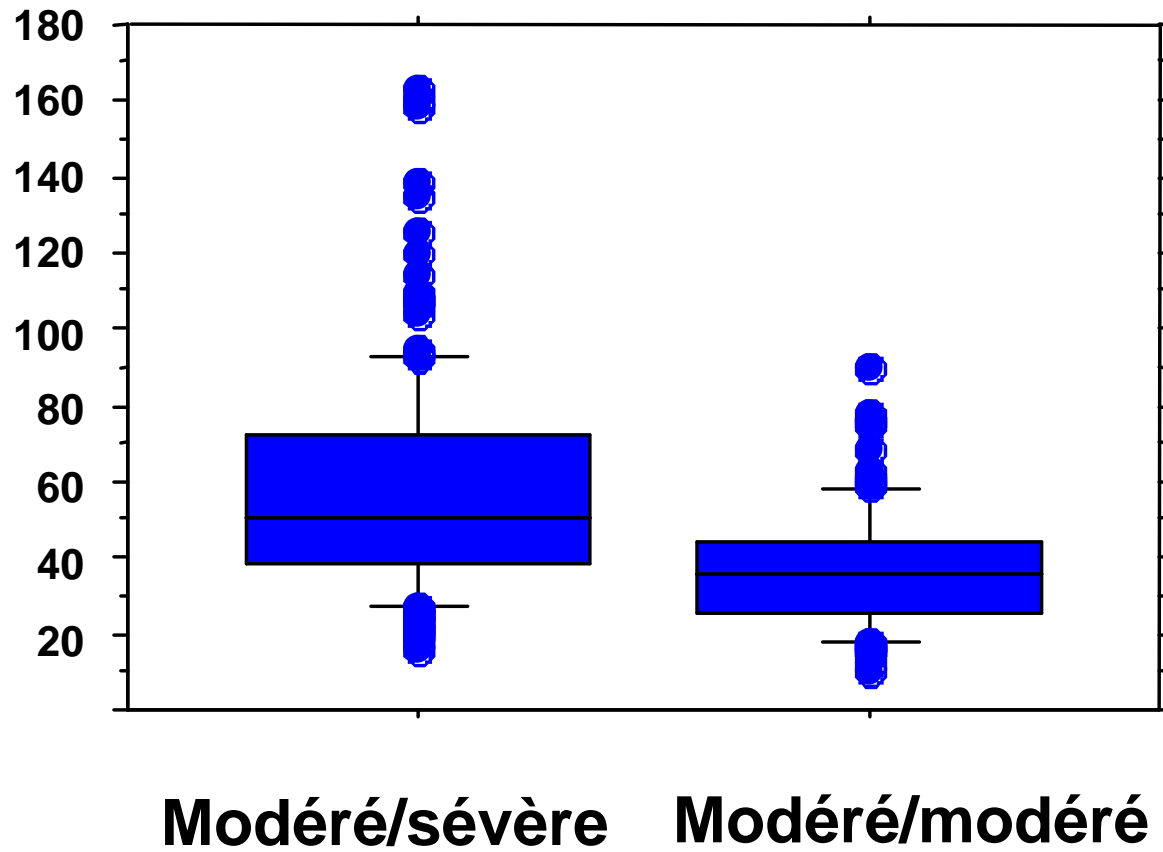
- 1 mutation modérée sur les deux allèles

p.V281L / p.V281L

p.V281L / p.P30L

Pic de 17OHP sous Synacthène® en fonction du génotype

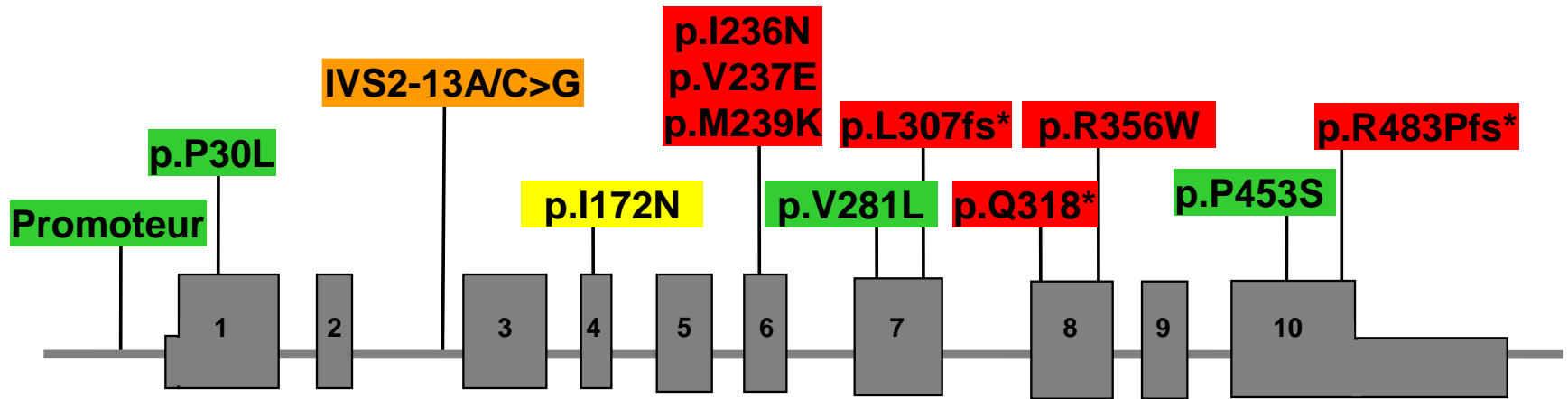
17-OHP sous ACTH (ng/ml)



(Young *et al*, Ann. d'Endoc. 2010, Consensus SFE 2008)

Lésions géniques (6400 allèles, 3200 patients)

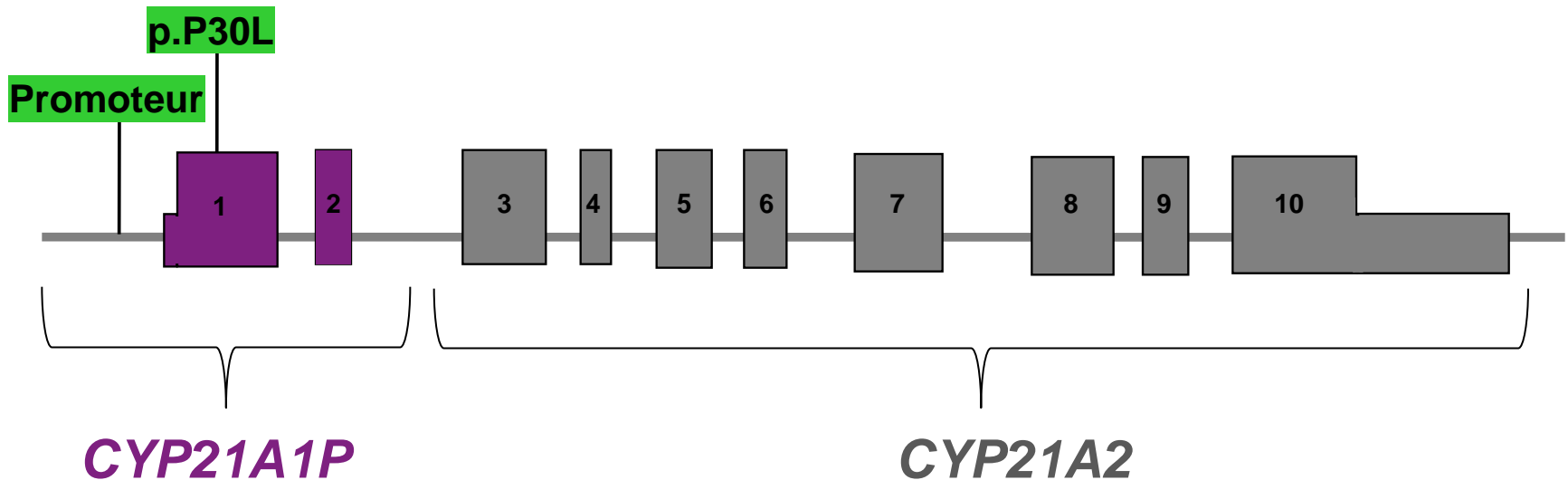
- 1 - **Largees lésions** (délétions, conversions) (20%)
- 2 - **Mutations ponctuelles isolées et fréquentes (>1%)** (69%)



- 3 - **Mutations multiples** (5 %)
- 4 - **Réarrangements complexes** (< 1%)
- 5 - **Mutations rares** (6 %)

Génotype avec 2 phénotypes différents

Conversion génique de l'extrémité 5' du gène *CYP21A2* en son pseudogène *CYP21A1P*



- Mutation du promoteur isolée ou mutation p.P30L isolée = FNC
- Conversion génique de l'extrémité 5' du gène *CYP21A2* en son pseudogène *CYP21A1P*

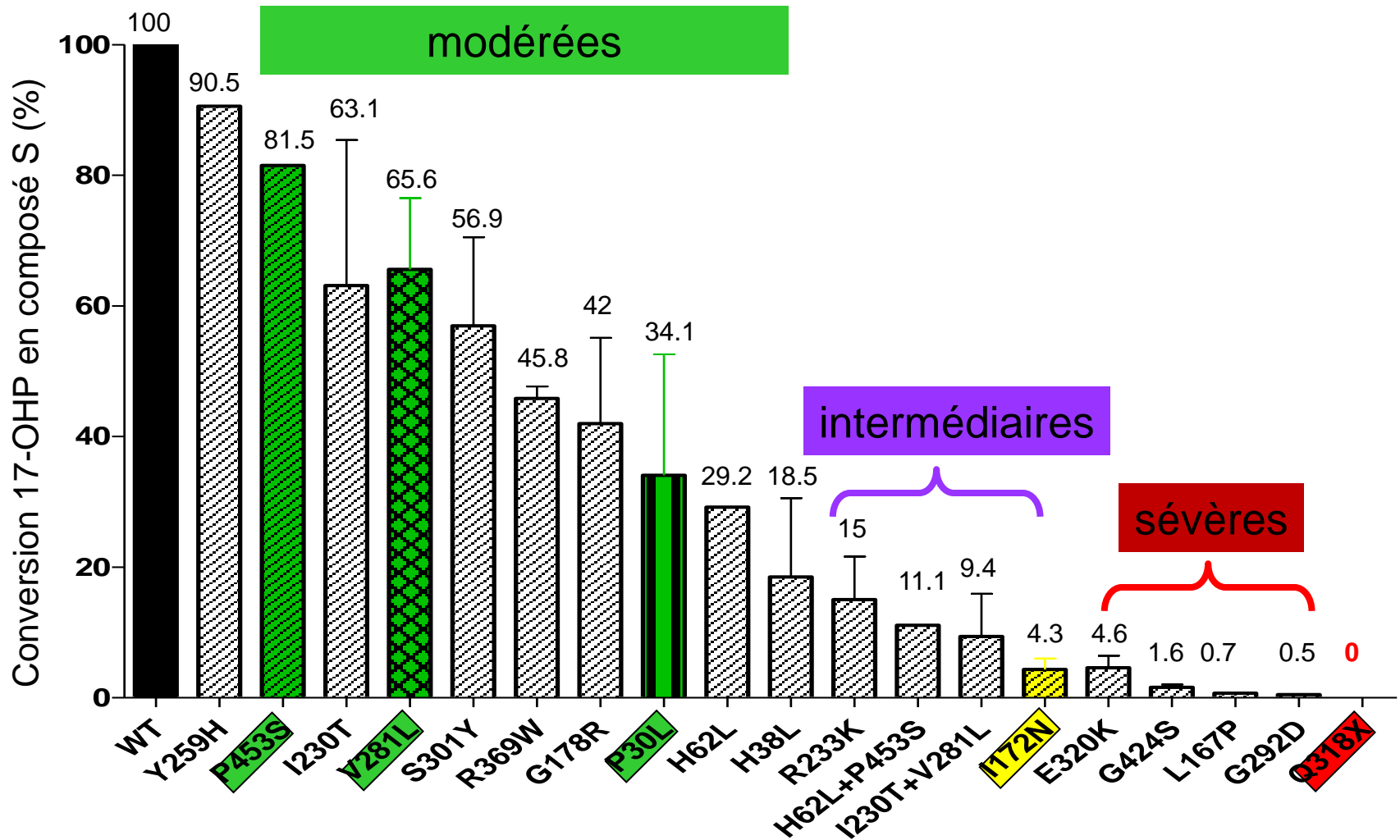
Forme non classique ou forme virilisante pure
Données clinico-biologiques au diagnostic, évolution

Analyse de la sévérité des 110 mutations rares

- **Analyse approfondie du phénotype**
limitations dans certains cas
(mutation modérée sur l'autre allèle, hétérozygote, données phénotypiques insuffisantes, conjoint...)
- **Analyse des caractéristiques de la mutation**
Décrite ou non : bases de données (Logiciel Alamut)
Nature : 23 non-sens + frameshifts
87 faux-sens, souvent privées
Conservation de l'acide aminé, conséquences du changement
- **Etudes fonctionnelles *in vitro***
Semi-quantitatives, cinétiques
Une trentaine de mutations testée à ce jour
- **Analyse *in silico***
Modèle protéique par bioinformatique
Relations structure-fonctions

Etudes fonctionnelles des nouveaux mutants

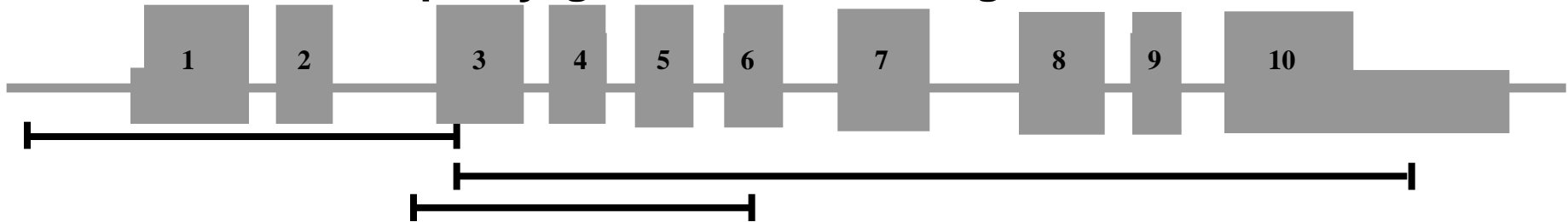
Mesure activités 21-hydroxylase relatives



Stratégie d'exploration du cas index

1- Recherche de mutations ponctuelles en 1^{ère} intention

- Cas index : Amplification spécifique par PCR du gène *CYP21A2*
Séquençage de la totalité du gène



- Parents :
Etude indispensable pour confirmer la ségrégation des mutations
Amplification spécifique et séquençage ciblé

2 - Recherche de larges lésions (del / conv) en 2^{ème} intention

Par technique MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)
Si positive, analyse des parents

3 – Etude indirecte de 7 microsatellites extragéniques en 6p21.3

➤ **Objectif = corrélation biologie moléculaire et phénotype**

Etudes familiales

1- Etude des apparentés

Fratrie, apparentés plus éloignés.....

Selon le résultat du CI et ses parents (Séquençage ciblé, MLPA)

Etude indirecte de 7 microsatellites

Exclure une erreur dans la chaîne de traitement du tube

Confirmer une mutation *de novo* chez le CI (1 %)

2- Etude des conjoints

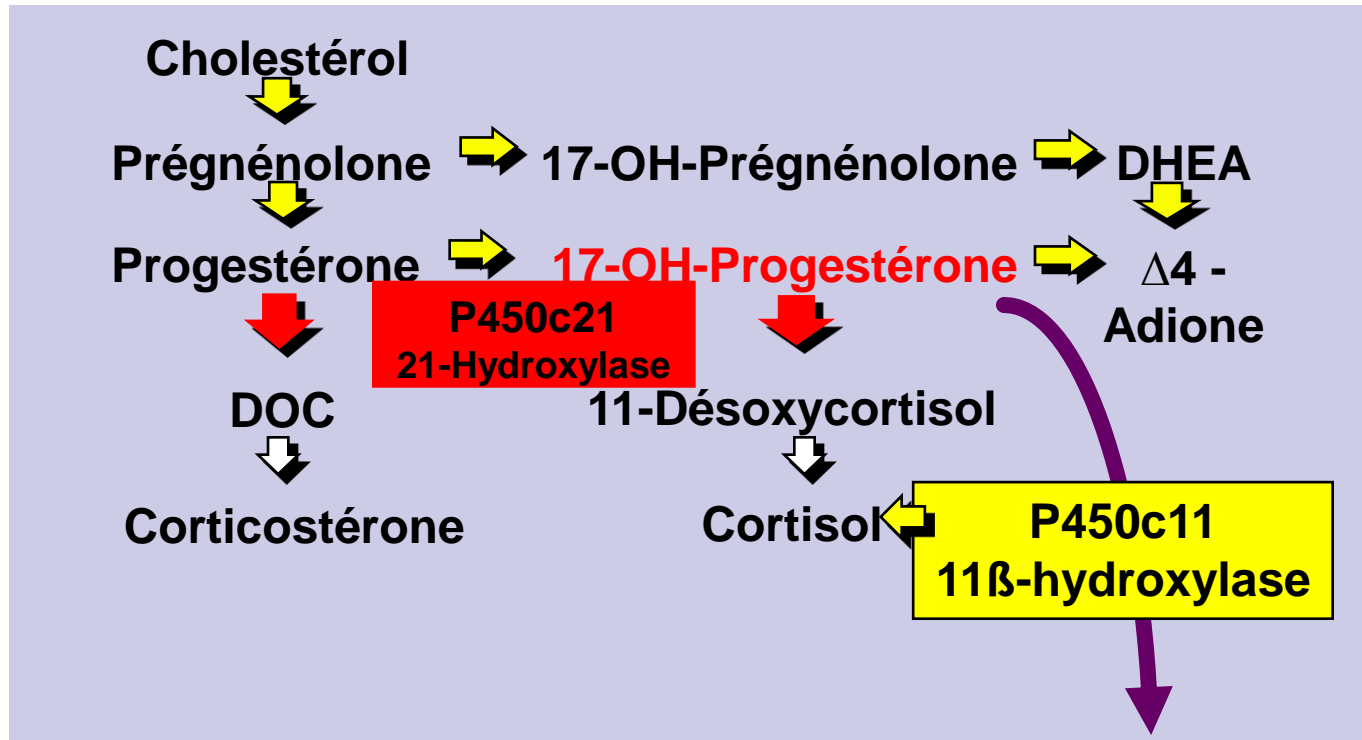
Risque d'être porteur d'une lésion sévère 1/60

Séquençage de la totalité du gène + Analyse MLPA

Contrôle sur 2^{ème} prélèvement si nécessaire

➤ **Objectif = détecter les porteurs de mutation sévère**

Dépistage biochimique du conjoint par dosages du 21-désoxycortisol sous Synacthène®



21-désoxycortisol

➤ Abandonné depuis 2011

- ✓ VPP mauvaise (45% seuil 400 pg/ml ou 1140 pmol/L), FN, coût
- ✓ Seule indication : nouveau variant chez un conjoint

Pourquoi faire une étude génétique

- Contribuer au diagnostic

1 - Le confirmer

- ✓ **Forme classique**
Le plus souvent clinique et biologie suffisent
Parfois doute : prématurés, dépistage limite...

- ✓ **Forme non classique**
17OHP sous Synacthène® > 30-36 nmol/L

(Bidet *et al*, JCEM 2010, Tardy *et al*, Horm. Res. 1996)

17OHP de base > 6 nmol/L (consensus SFE 2013)

2 - En préciser la sévérité, aider au traitement

3 - Affiner les seuils biologiques

- Proposer un conseil génétique

- Identifier les sujets avec mutation **rouge** ou **jaune**
- Diagnostic prénatal si risque de forme classique

Modalités de l'étude du gène *CYP21A2*

- **Prélèvement de sang total sur EDTA : 2 tubes de 4 ml**
- **Documents obligatoires**
 - ✓ Prescription médicale signée par le clinicien
 - ✓ Consentement génétique
 - ✓ Données cliniques et biologiques
- **Exploration de la totalité du gène *CYP21A2***
 - ✓ Séquençage de tout le gène : Résultat < 1 semaine
 - ✓ Recherche de larges lésions par MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) : Résultat < 2 semaines
- **Coût**
 - ✓ B500 (135 euros pour un B=0,27 euros)
 - ✓ BHN pour un patient prélevé en CH

! Attention

**Un résultat génétique est confidentiel
Information à la parentèle (décret 2013)**

Conseil Génétique

- Couples avec un 1er enfant atteint de FC (SW ou SV)

Risque récurrence = $\frac{1}{4}$

Risque d'avoir 1 fille virilisée = $\frac{1}{8}$

- Couples avec un sujet porteur d'une mutation sévère

FC, 60 % FNC (Tardy *et al*, Horm Res 1996) , apparenté, hétérozygote

Risque pour le conjoint d'avoir une mutation sévère = $\frac{1}{60}$

Risque de FC pour les enfants du couple

FC + conjoint = $\frac{1}{120}$

($1 \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{2}$)

FNC / apparenté / hétérozygote + conjoint = $\frac{1}{240}$

($\frac{1}{2} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{2}$)

Prise en charge d'une grossesse à risque de FC

- **Génotypage familial**
- **Information éclairée des (futurs) parents**
 - ✓ Par l'endocrinologue pédiatre ou adulte, le généticien
 - ✓ Outils disponibles pour la grossesse :
Diagnostic prénatal, Traitement prénatal,
Détermination sexe fœtal sur sang maternel
 - ✓ Notice d'information
- **Double consentement obligatoire pour le DPN**
 - ✓ Risque de fausse couche lié au prélèvement fœtal
 - ✓ Accord pour la réalisation du DPN

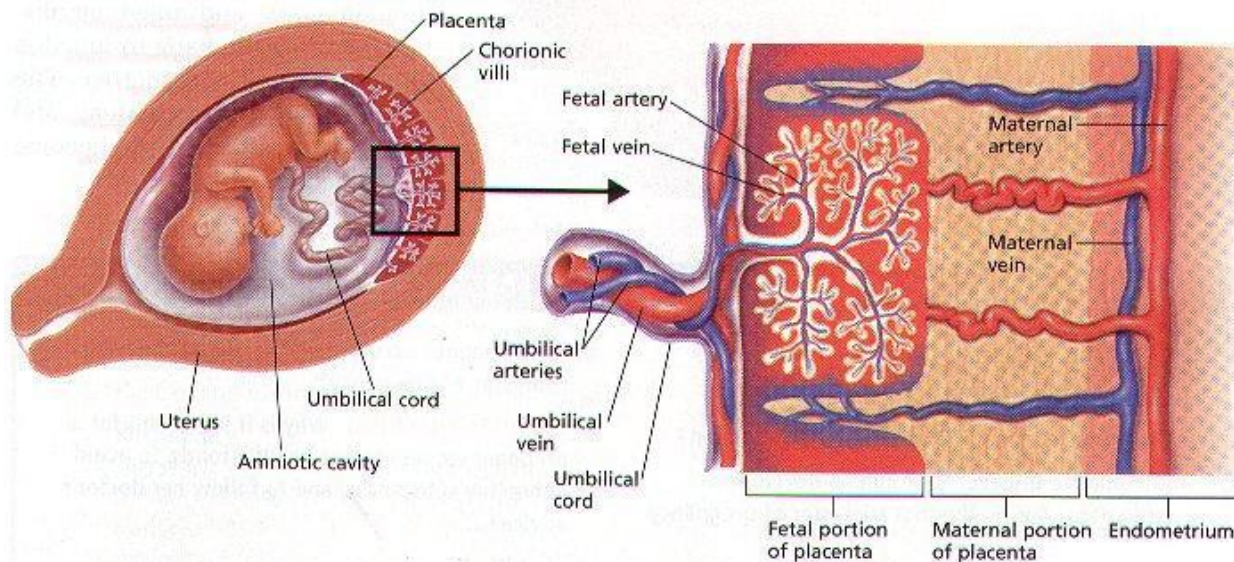
Diagnostic prénatal

! Double consentement obligatoire

1- DPN précoce par ponction de villosités choriales (PVC)

9-10 SG (11-12 SA)

- ✓ Génotypage dans un Laboratoire de BM Habilité + caryotype



Diagnostic moléculaire en urgence

- ✓ Etude ciblée du gène *CYP21A2* (étude préalable CI et parents)
- ✓ Etude de microsatellites extragéniques

Résultat en 3-4 jours, arrêt ou non de la DEX, IMG

Diagnostic prénatal

2- DPN plus tardif par ponction de liquide amniotique (PLA)

12-14 SG (14-16 SA)

- ✓ Génotypage et Dosages hormonaux (10 ml de LA frais)
Laboratoire de BM Habilité / Biochimie Foetale Habilité
- ✓ Caryotype + cultures (10 ml de LA frais) en Cytogénétique

➤ Diagnostic moléculaire idem PVC

- ADN foetal extrait du culot d'amniocytes / de cultures

➤ Diagnostic biochimique

- Dosage des hormones stéroïdes : 17OHP, 21-DF, Δ 4A, T
- Résultat informatif pour la FC (SW +++ / SV)
- Problème si mère sous DEX

3- Coût d'un DPN

- ✓ BM = B700 (187 euros) + BHN si CH
- ✓ Dosages hormonaux

Traitement prénatal

- **Proposé depuis 1979 aux couples à risque de forme classique de déficit en 21OH ou 11OH et qui souhaitent garder une fille atteinte**
(David et Forest, J Ped 1984)
 - Inutile chez les garçons et les filles saines (7 grossesses sur 8)
 - Pas d'AMM
- **Dexaméthasone versus Hydrocortisone**
 - Passage placentaire, $\frac{1}{2}$ vie + longue, pas d'inactivation par 11 β -HSD2
 - **20 μ g/kg/jour en 2 à 3 prises, max 1.5 mg/j, < 6 SG jusqu'à naissance**
- **Information éclairée des parents bien avant la grossesse**
 - Centres de référence
 - Notice avec balance bénéfices / risques
 - Fœtus : troubles neuro-cognitifs
 - Mère : prise de poids, vergetures, acné, HTA, diabète
- **Suivi par un endocrinologue référent**
 - Analyses des facteurs de risque
 - Mères traitées toute la grossesse : suivi mensuel

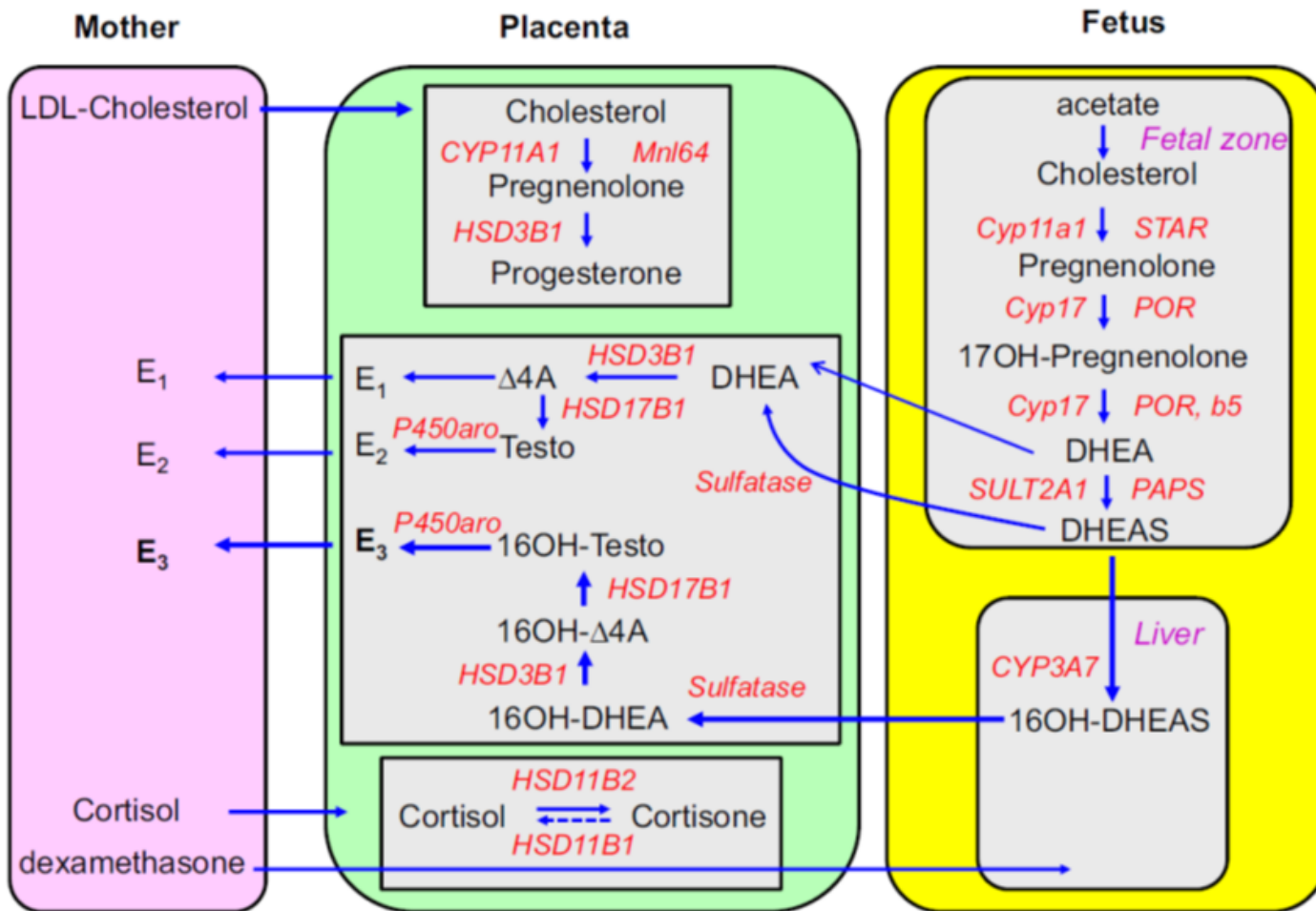


Fig. 2. Pathway of biosynthesis and metabolism of steroids during pregnancy.

Détermination précoce du sexe foetal

Intérêts : ne pas traiter inutilement les garçons

Contraintes : traiter efficacement les filles atteintes

- Détermination du sexe foetal sur sérum maternel
“Test SRY” (Laboratoire Cerba, Jean-Marc COSTA)

- ✓ ADN foetal libre dans le sang maternel
- ✓ Maladies liées à l’X, entre 6 et 11.4 SG (Costa *et al*, 2001)
- ✓ Intérêt dans les HCS, avant 6 SG (Y Morel & JM Costa)
 - Déficit en 21-hydroxylase*
 - Déficit en 11-hydroxylase*
- ✓ Attention : protocole de prélèvement particulier
(tube sec avec gel séparateur, décantation, centrifugation)
- ✓ Non informatif dans les grossesses gémellaires
- ✓ A la nomenclature depuis février 2011
(4084, B500, JO du 15-02)

Prise en charge de la femme enceinte en France

Consultation dès le retard de règles
Datation échographique

Test SRY : 4.4 - 5.4 SG (6.4 - 7.4 SA)

SRY-

DEX < 6 SG (8 SA)

Contrôle SRY
8 SG (10 SA)

SRY-

PVC 9-10 SG (11-12 SA)
- Etude gène *CYP21A2* (Bron)
- Caryotype

Si fille atteinte
dosages stéroïdes mensuels chez la mère
(Bron) + surveillance échographique

SRY+

OU

PLA 12-14 SG (14-16 SA)
- Etude gène *CYP21A2* (Bron)
- Dosages hormonaux (Bron)
- Caryotype

Pas de DPN
Prise en charge néonatale

French experience 2002 – 2011 (258 cases)

(Tardy-Guidollet *et al*, JCEM 2014)

- 255 fetuses at risk of 21OHD, 3 fetuses at risk of 11OHD
134 males and 124 females
- Sensitivity of *SRY* test: 64 males with *SRY* < 5.4 WG (48%)
 - 58 *SRY* +
 - 6 *SRY* - test < 4 WG (3)
test at 4.2 WG (2) and 5.6 WG (1)
- Data of the 134 males
 - 14 CAH / 120 unaffected
 - No DEX for 92 males
 - No prenatal diagnosis (95) / AF (30) or CVS (9)
- Data of the 124 females
 - 14 CAH with 21OHD, 3 CAH with 11OHD (sisters)
 - DEX for 112 females
 - CVS (105) or AF (12) / no prenatal diagnosis (7)
- No malformation in the 154 children *in utero* treated with DEX

Positions internationales pour la DEX

- **En 2010** Endocrine Society's Clinical Practice Guidelines
(Speiser *et al*, 2010)
- **En Suède**
Arrêt de la DEX en 2010 (Hirvokoski *et al*, JCEM 2012)
Pas de confirmation des effets neurocognitifs publiés...
(Wallenstein *et al*, Horm Res 2015)
- **Aux USA**
DEX maintenue avec études de suivi (MI New *et al*, JCEM 2014)
- **En France**
DEX au cas par cas, respect de la décision des parents
DEX acceptée surtout si 1ère fille HCS virilisée (72%)
Plus de garçons traités, exposition courte chez les filles
PHRC national pré-DEX

Cas 1

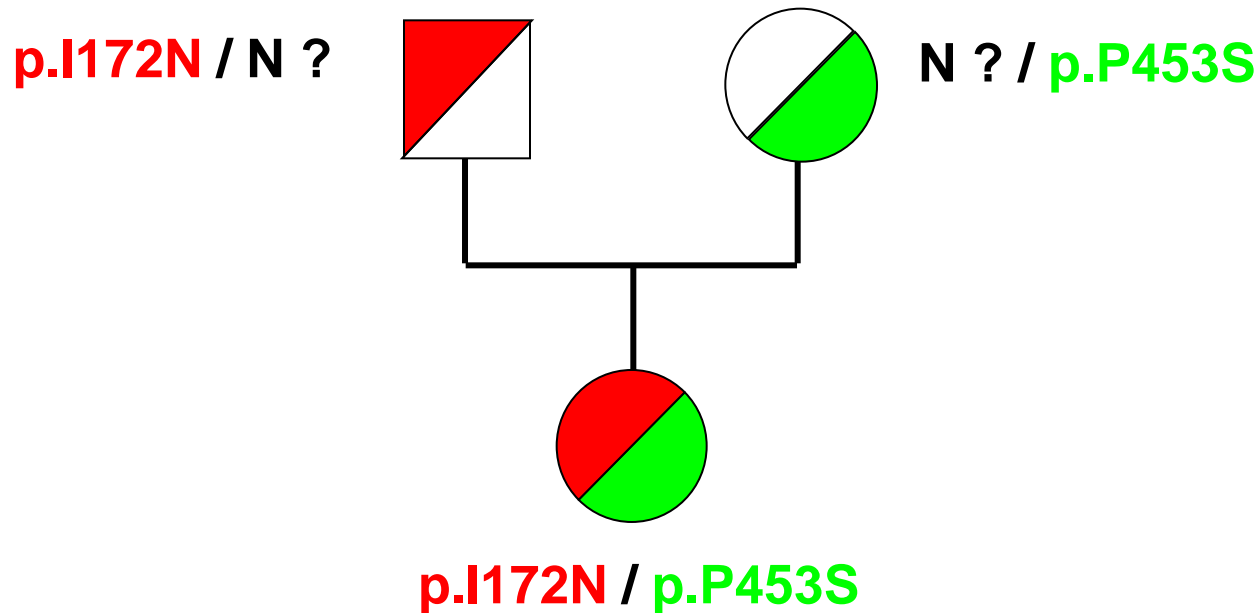
Melle A. consulte à 6 ans pour premature pubarche apparue à 4 ans et une avance de l'âge osseux à 8 ans

Dosages	Résultats	Valeurs normales
17 OHP (nmol/L)	55,2	0,3 – 3,0
ACTH (ng/ml)	84,2	10 – 40
Testostérone (nmol/L)	1,1	< 0.3
Δ 4-A (nmol/L)	5,4	0.4 – 0.8

Etude du gène *CYP21A2* = p.V281L/p.I172N

- **Forme non classique de déficit en 21OH**
- **Parents à prélever pour confirmation diagnostique**

Conseil génétique : Cas 1



- Est-ce que les parents désirent d'autres enfants ?
- Si oui, exclure le risque de forme classique et mutation sévère sur l'autre allèle de la mère
- Séquençage complet du gène *CYP21A2* chez la mère
- Génotypage de la fratrie (même si mineurs)
- Génotypage des apparentés du père
- Dépistage du conjoint de la patiente à l'âge adulte

Cas 2

Melle H. présente un SOPK diagnostiqué à 16 ans face à des cycles irréguliers : pas de preuve diagnostique
Face à l'hyperandrogénie biologique : test Synacthène® à 18A

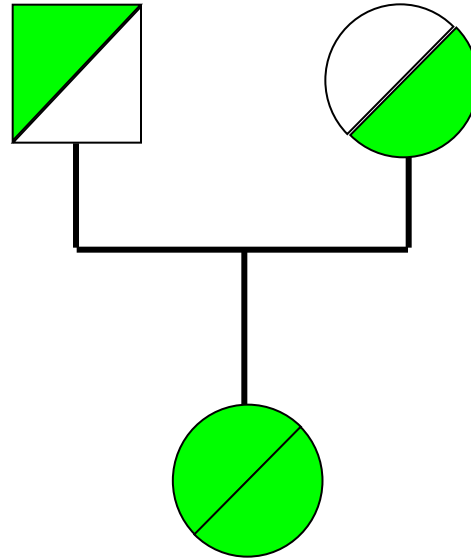
Dosages	Résultats	Valeurs normales
<u>Pic de 17 OHP</u> (nmol/L)	94	< 36
Testostérone (nmol/L)	2,8	0.6-1,8
Δ 4-A (nmol/L)	9,10	2,8 – 6,3

- **Pas d'étude du gène CYP21A2, mise sous HC 20 mg/J**
- **Démarrage d'une 1^{ère} grossesse : naissance garçon sain**
- **Démarrage d'une 2^{ème} grossesse et consultation à 17 SA !**
 - **Etude du gène CYP21A2 en urgence (séquençage)**
 - **Génotype p.P30L/p.V281L**
 - **Pas de dépistage du conjoint ni de prise en charge prénatale**
 - **Arrêt de l'Hydrocortisone**

Conseil génétique : Cas 2

p.P30L / N

N / p.V281L



p.P30L / p.V281L

- Etude des parents : génotypage ciblé
- Pas d'étude des apparentés

Cas 3

Mme L. consulte à 38 ans pour hirsutisme, spanioménorrhée et infertilité

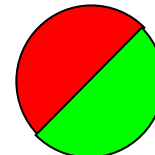
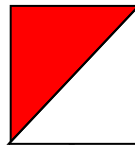
Dosages	Résultats	Valeurs normales
17 OHP (nmol/L)	30	0.3 – 4,5
Testostérone (nmol/L)	1,5	0.6-1,8
Δ 4-A (nmol/L)	13,5	2,8 – 6,3

- **Etude du gène *CYP21A2* = p.P453S/p.Q318***
 - **Forme non classique de déficit en 21OH**
 - **Parents prélevés pour confirmation diagnostique**
- **Mise sous Hydrocortisone 15 mg/jour avant l'étude du conjoint : démarrage d'une grossesse...**

Cas 3 : Dépistage du conjoint

- Prélèvement en urgence du conjoint pour génotypage : séquençage de tout le gène *CYP21A2* en 3 jours

IVS2-13A/C>G / N



p.Q318* / p.P453S



- Risque de FC = $\frac{1}{4}$, risque de fille virilisée = $\frac{1}{8}$
- Prise en charge prénatale

Cas 4

**Melle D. consulte à 26 ans pour hirsutisme et asthénie, surpoids
Débute une grossesse malgré l'hyperandrogénie**

Dosages	Résultats	Valeurs normales
17 OHP (nmol/L)	27	0.40 – 3,3
ACTH (ng/ml)	31,7	10 – 40
Testostérone (nmol/L)	9,1	0.6-1,8
Δ 4-A (nmol/L)	26,9	2,8 – 6,3

- **Suspicion forme non classique face au taux de 17OHP :
Hydrocortisone puis dexaméthasone !**
- **Etude du gène *CYP21A2* = Aucune mutation**
 - **Forme non classique de déficit en 21OH écartée**
 - **Arrêt des glucocorticoïdes**
- **Face à l'urgence de la grossesse, le conjoint a été d'emblée exploré !**