

كلية الطب والصيدلة وطب الأسنان
FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET DE MÉDECINE DENTAIRE



جامعة سيدي محمد بن عبد الله - فاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

MEMOIRE PRESENTE PAR

DOCTEUR MERYEM HIMAFI

Née le 17/04/1996

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE SPÉCIALITÉ EN MÉDECINE

Option: Néphrologie

Sous la direction du Professeur : SQALLI HOUSSAINI TARIK Membre

associé : Professeur El BARDAI GHITA

Dr. TARIK SQALLI HOUSSAINI
Professeur en Néphrologie
CHU Hassan II - FES

Session juin 2025

DEDICACES

A mon Maître

Monsieur le Professeur Tarik SQALLI HOUSSAINI

À vous, Professeur Tarik,

Chef de service d'une rare pédagogie, d'une rigueur exemplaire, et d'une modestie admirable, je vous adresse toute ma gratitude et mon profond respect.

Vous incarnez, à mes yeux, ce que la médecine a de plus noble : un savoir immense, transmis avec précision, exigence, mais toujours avec humilité. Votre volonté constante de faire les choses de manière juste, réfléchie et bien faite nous inspire, nous guide, et nous responsabilise.

Vous êtes un Maître que l'on écoute avec attention, que l'on respecte profondément, et surtout, que l'on admire sincèrement. Merci pour votre engagement sans faille, pour la qualité de votre enseignement, et pour l'exemple humain et professionnel que vous représentez.

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

A Madame Le Professeur Nadia KABBALI

Je vous dédie ces lignes avec tout mon respect et ma profonde reconnaissance. Vous êtes une femme, qui incarne l'élégance du savoir alliée à la force tranquille de l'expérience.

À travers votre enseignement, j'ai appris comment faire face aux situations cliniques avec discernement, comment effectuer les gestes médicaux avec rigueur et responsabilité, et surtout, comment garder une main précise.

Toujours présente, toujours à l'écoute, vous avez été une source d'inspiration constante. Votre immense savoir, transmis avec douceur et assurance, m'a permis de grandir, de me structurer et de trouver ma place. Merci pour tout ce que vous êtes, et pour tout ce que vous transmettez.

A Madame Le Professeur CHOUHANI Basmat-Amal

Je vous adresse cette dédicace avec toute ma reconnaissance et mon admiration. Vous incarnez la calme assurance, la responsabilité exemplaire, et la compétence solide qui rassurent et inspirent.

Votre grand bagage professionnel, porté avec tant de discrétion et d'élégance, est une richesse précieuse pour nous. Vous avez toujours été présente, attentive et bienveillante, même dans les moments les plus exigeants.

Merci de nous transmettre votre savoir avec sérénité, et de nous montrer, par votre attitude, ce que signifie être un médecin à la fois compétent, humain et profondément engagé.

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

A Madame Le Professeur EL BARDAI Ghita

Je vous dédie ces mots avec une profonde reconnaissance. Vous avez été présente dans mes moments les plus difficiles, avec une constance et une bienveillance qui m'ont profondément touchée.

Vous avez toujours cru en moi, m'accordant une confiance précieuse qui m'a portée, même dans les instants de doute.

Vous êtes une femme de cœur, toujours à l'écoute de vos patients, investie, humaine, et profondément attachée à leur bien-être. Votre énergie contagieuse, votre motivation sans faille, et votre capacité à assurer l'activité du service avec rigueur et dynamisme forcent l'admiration.

Merci pour votre soutien, votre confiance et votre exemple de professionnalisme et de générosité.

A Monsieur Le Professeur ALLATA YASSINE

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et mon respect pour la richesse de votre bagage médical, que vous partagez avec une générosité rare.

Toujours présent, toujours prêt à nous transmettre votre savoir, vous incarnez pleinement le rôle de formateur engagé, de médecin pédagogue, soucieux de nous élever intellectuellement et humainement.

Merci pour votre disponibilité constante, votre rigueur, et votre volonté de nous éduquer avec exigence, clarté et bienveillance.

A Mon cher père HIMAFI ABDESSAMAD

Ce travail, je te le dédie avec toute la tendresse et l'admiration que j'ai pour
toi.

Tu as été présent à chaque étape de ma vie, dans les instants de joie comme
dans mes plus grands moments de difficulté. Tu as toujours tout fait pour
me voir heureuse, sans jamais compter tes efforts, tes sacrifices, ni ton
temps.

Tout au long de mon parcours en médecine, tu m'as soutenue avec
constance, encouragée avec force, et entourée d'un amour discret mais
indéfectible. Tu m'as élevée avec des valeurs solides, le sens du respect, de
l'engagement, et de l'effort.

Si aujourd'hui je franchis cette étape, c'est aussi grâce à toi. Merci, du fond
du cœur, pour tout ce que tu es et tout ce que tu as fait pour moi.

A Ma mère HIJRI FATIMA

Je te dédie ces lignes avec tout l'amour et la reconnaissance qu'aucun mot ne
pourra jamais vraiment exprimer.

Tu as sacrifié tant de choses pour m'élever, pour faire de moi une personne
respectueuse, forte, et ancrée dans de belles valeurs.

Tu as été plus qu'une mère : tu as été ma confidente, ma meilleure amie, ma
force tranquille dans les tempêtes. Tu as toujours cru en moi, même dans
mes moments de doute, et tu as su me pousser à évoluer, à grandir, à me
dépasser, sans jamais me juger.

Ton seul souhait a toujours été de me voir heureuse et forte, et si j'ai franchi
ce chemin, c'est grâce à ton amour, ta patience et ta présence constante.

A mon frère HIMAFI BILAL

Merci d'avoir toujours été là, avec ton énergie contagieuse, ta personnalité forte et affirmée, et ton soutien constant dans chaque étape de ma vie.

Tu as toujours voulu me voir plus forte, plus confiante, et tu m'as portée par ta force, tes mots justes et ton humour qui allège tout. Même dans les moments les plus tendus, tu as su me faire rire, me redonner courage, et me rappeler que je pouvais y arriver.

Tu es un pilier dans ma vie, un frère mais aussi un ami, un repère. Merci pour ton encouragement sans relâche, ta présence loyale, et ton amour discret mais solide.

A mon mari JANATI IDRISSE KHALID

Mon ami, mon confident,
Celui qui a su être présent à chaque étape,
dans les moments de doute comme dans les instants de joie.
Merci pour ton soutien indéfectible, ta patience, et ton amour constant.
Ce mémoire est aussi le fruit de ta présence à mes côtés.

A mon frère HIMAFI ILYASS

Bravo pour ton ambition, ta rigueur, et tout ce que tu accomplis avec
détermination et sérieux.
Tu as toujours été serviable, présent, et surtout profondément respectueux
envers moi, et cela signifie énormément.
Ta force tranquille et ton engagement m'inspirent, et je suis fière d'avoir un
frère comme toi à mes côtés.
Merci pour ta présence et ton soutien, discrets mais constants.

A mon frère HIMAFI MOHAMMED AMINE

À toi, mon petit trésor, Mohammed Amine,
Le plus chou, le plus rayonnant, celui qui a toujours su mettre de la lumière
dans mes journées.
Tu as été pour moi comme un petit fils, un petit être que je protège, que
j'aime profondément, et qui occupe une place immense dans mon cœur.
Ta chaleur, ta tendresse, ta façon d'être toujours attentionné, curieux et
plein de vie font de toi un rayon de soleil dans notre famille.

Tu aimes la vie avec une simplicité et une intensité qui m'émerveillent à
chaque instant.

A mon petit IDRISSI JANATI ABDERRAHMANE

Ma source infinie de joie et de bonheur.

Ton sourire a illuminé mes journées,
et ta présence m'a donné la force d'aller au bout de ce travail.

Ce mémoire t'est aussi dédié,
avec tout l'amour d'une maman.

PLAN

**APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES**

| | |
|---|----|
| PLAN | 10 |
| INTRODUCTION | 14 |
| RAPPELS..... | 16 |
| I. Technologies de séquençage : évolution et principes : | 17 |
| 1. Les technologies de séquençage :..... | 17 |
| A. La méthode de séquençage de Sanger | 17 |
| B. NGS | 19 |
| C. Séquençage de troisième génération : | 20 |
| 2. Aperçu des plateformes NGS (Illumina, PacBio, Oxford Nanopore) .. | 21 |
| A. Méthode illumina | 21 |
| a. Principe Fondamental de la Méthode Illumina | 21 |
| b. Applications et Protocoles | 23 |
| c Instruments Illumina..... | 23 |
| d. Avantages et Défis | 23 |
| B. Méthode Oxford nanopore | 28 |
| II. Maladies rénales et génétique..... | 31 |
| 1. Les néphropathies glomérulaires et la génétique..... | 31 |
| 2. 2. Les néphropathies tubulo–interstitielles et leur base génétique.. | 31 |
| 3. Les maladies rénales héréditaires | 32 |
| III. Le rôle des anomalies génétiques dans les maladies rénales..... | 33 |
| 1. Contribution des mutations monogéniques..... | 33 |
| 2. Contribution des polymorphismes complexes..... | 34 |
| 3. L'importance des tests génétiques dans le diagnostic des maladies rénales | 35 |
| IV. Applications de la NGS dans le Diagnostic Moléculaire des Maladies Rénales | 37 |
| 1. Diagnostic des Maladies Rénales Héréditaires | 37 |
| A. Exemples de Gènes Associés aux Syndromes Rénaux..... | 37 |

**APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES**

| | | |
|------|---|----|
| a. | Syndrome d'Alport | 37 |
| b. | Polykystose rénale autosomique dominante (PKD) | 37 |
| c. | Tubulopathies héréditaires..... | 38 |
| B. | Rôle de la NGS dans la Détection des Variants Rares et Pathogènes. | 38 |
| a. | Identification de Variants Pathogènes Rares..... | 38 |
| b. | Précision dans les Cas de Phénotypes Complexes | 38 |
| c. | Analyse des Variants de Signification Inconnue (VUS)..... | 39 |
| 2. | Stratification des maladies complexes grâce à la NGS..... | 39 |
| 3. | Utilisation de la NGS dans les biopsies rénales | 40 |
| | MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE..... | 42 |
| | MATERIELS ET METHODES | 43 |
| I. | Type de l'étude : | 44 |
| II. | Technique de prélèvement :..... | 44 |
| III. | Séquençage matériel utilisé : | 44 |
| IV. | Panel de gènes : | 46 |
| V. | Population d'étude : | 46 |
| | RESULTATS PRELIMINAIRES | 47 |
| I. | Résultats démographiques :..... | 48 |
| 1. | L'âge :..... | 48 |
| 2. | Le sexe : | 48 |
| 3. | Consanguinité :..... | 49 |
| II. | Résultats cliniques :..... | 50 |
| 1. | Antécédents familiaux :..... | 50 |
| 2. | Motif de consultation :..... | 51 |
| 3. | Signes extra-rénaux :..... | 51 |
| III. | Résultats biologiques : | 52 |
| IV. | Résultats génétiques : | 52 |

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

| | |
|---------------------|----|
| V. Evolution :..... | 54 |
| DISCUSSION | 55 |
| CONCLUSION | 61 |
| REFERENCES..... | 66 |
| RESUME | 72 |

INTRODUCTION

L'intégration des analyses génétiques basées sur l'ADN des patients dans la pratique médicale devient de plus en plus courante. Aujourd'hui, il est possible de séquencer le génome humain dans son intégralité, soit environ 3,2 milliards de nucléotides, en seulement quelques jours à quelques semaines, et ce, à un coût comparable à celui de certaines procédures d'imagerie avancée ou d'une hospitalisation de courte durée.

NGS est une nouvelle technologie pour le séquençage de l'ADN et de l'ARN ainsi que la détection de variants/mutations. Cette technologie combine les avantages de chimiothérapies de séquençage uniques, de matrices de séquençage différentes, et de technologies bioinformatiques. Une telle combinaison permet un séquençage parallèle massif de séquences d'ADN ou d'ARN de différentes longueurs, voire du génome entier, dans un laps de temps relativement court. Il s'agit d'une technologie de séquençage révolutionnaire après le séquençage de Sanger.

Le NGS (Next-Generation Sequencing) implique plusieurs étapes principales de séquençage. Par exemple, le NGS de l'ADN comprend la fragmentation de l'ADN, la préparation de la bibliothèque, le séquençage parallèle massif, l'analyse bioinformatique, ainsi que l'annotation et l'interprétation des variants/mutations.[33]

RAPPELS

I. Technologies de séquençage : évolution et principes :

1. Les technologies de séquençage :

A. La méthode de séquençage de Sanger

En 1977, Frederick Sanger développa une nouvelle méthode de séquençage de l'ADN basée sur la technique de terminaison de chaîne, dont l'ADN amplifié ou l'ADN complémentaire (ADNc) est hybridé à un amorce oligonucléotidique, puis étendu par l'enzyme ADN polymérase qui incorpore soit un mélange des quatre triphosphates de déoxynucléotides (dNTP : dATP, dGTP, dCTP, dTTP), soit des triphosphates de didéoxynucléotides (ddNTP : ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) qui provoquent l'arrêt de l'élongation de la chaîne. L'inclusion de concentrations limitantes de ddNTPs interrompt la réaction d'élongation dès leur incorporation, générant des fragments d'ADN de différentes longueurs et facilement distinguables.[1] Cette méthode est encore désignée sous le nom de méthode de Sanger pour le séquençage de l'ADN, devenant ainsi une méthode de référence en génétique clinique.

L'automatisation actuelle du séquençement de Sanger permet généralement la génération de séquences d'ADN allant jusqu'à 800-1 000 pb. Les principales limitations de cette méthode sont généralement des séquences de faible qualité dans les premiers 15-40 pb en raison de la fixation de l'amorce, ainsi qu'une incapacité à distinguer des différences de bases uniques dans des segments plus longs (par exemple, > 900 pb). En tenant compte de ces limitations, les logiciels d'analyse de séquences, tant commerciaux que non commerciaux, continuent d'évoluer afin d'aider l'utilisateur à évaluer et à

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

tailler automatiquement les données de mauvaise qualité. [1]

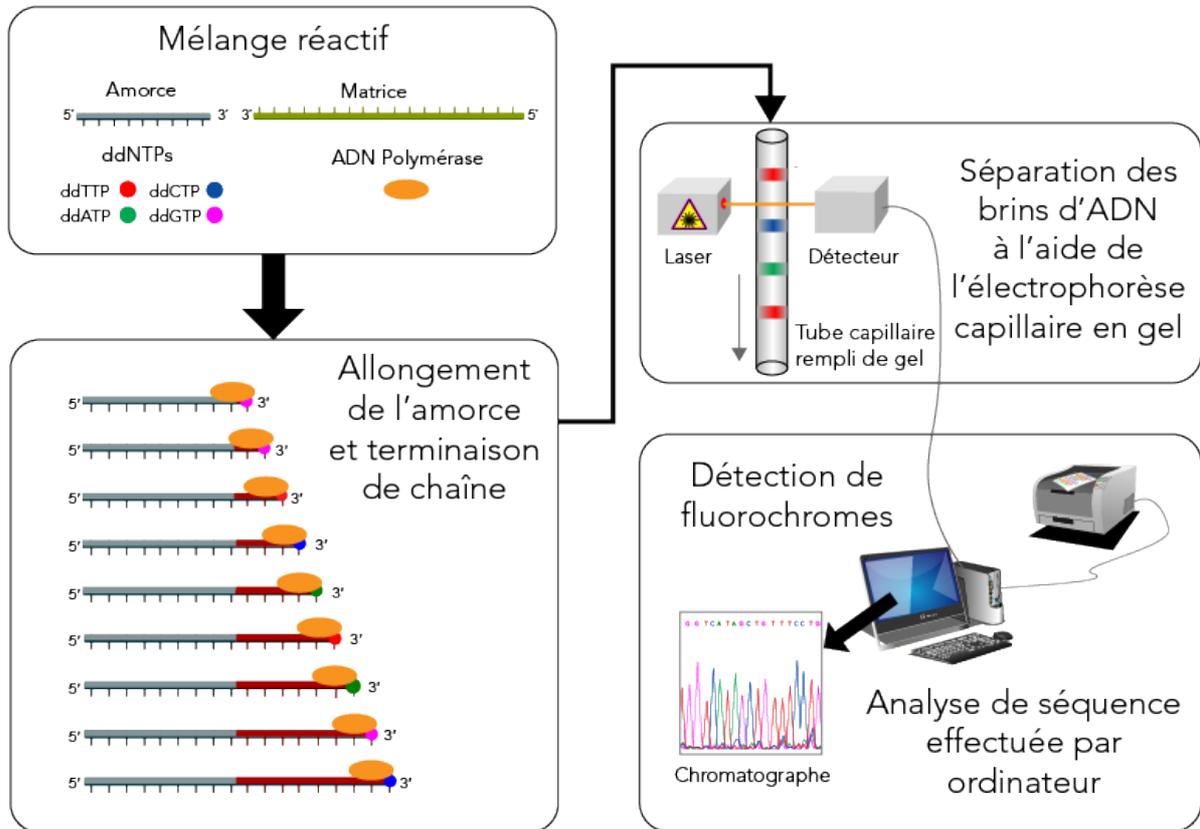


Schéma 1. La méthode de séquençage de Sanger

B. NGS

La séquençage de nouvelle génération (NGS), apparue en 2004, a permis aux chercheurs d'acquérir une compréhension plus approfondie des maladies génétiques. [3] Plus de 2 400 gènes pathogènes ont ainsi été identifiés[4], et plus de 150 maladies génétiques ont été mises en évidence grâce au séquençage de l'exome complet (WES). [5]

La principale différence réside dans le fait que, contrairement au séquençage de Sanger, les approches de séquençage massivement parallèle ne dissocient pas l'incorporation enzymatique des nucléotides de la séparation de l'échelle de séquence et de l'acquisition des données. En effet, les instruments NGS réalisent à la fois l'enzymologie et l'acquisition des données de manière orchestrée et progressive, permettant ainsi de générer des données de séquence à partir de dizaines de milliers à des milliards de modèles simultanément. Ainsi, le terme « massivement parallèle » fait référence à cette capacité accrue de génération de données, qui a entraîné des changements significatifs dans le séquençage de l'ADN et ses applications depuis son introduction.[2]

Le NGS rend le processus de séquençage beaucoup plus efficient en analysant simultanément des millions de fragments d'ADN au cours d'une seule séance de séquençage (Fig. 1). Grâce à cela, des panels de gènes dits « multi-gènes » permettent le séquençage parallèle de plusieurs centaines, voire milliers, de gènes associés à des maladies (de Koning et al., 2015)

C. Séquençage de troisième génération :

Peu de temps après l'introduction des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS), les technologies de séquençage de troisième génération (TGS) ont émergé. Les deux caractéristiques fondamentales et distinctives des nouvelles approches TGS, appelées séquençage de molécules uniques (SMS) et séquençage en temps réel, permettent de séquencer des molécules de nucléotides (ADN ou ARN) sans avoir besoin d'amplification PCR du modèle. Elles permettent également l'analyse en temps réel des données produites. La capacité du TGS à séquencer de l'ADN ou de l'ARN sans amplification préalable du modèle constitue une avancée majeure, principalement parce qu'elle améliore les biais introduits par la PCR lors de la construction de la bibliothèque. La première tentative de séquençement de molécules uniques a été réalisée en 2009, lorsque Helicos Bioscience a lancé HeliScope, un système d'analyse génétique effectuant le séquençage de molécules uniques en exploitant le phénomène de fluorescence [6], et impliquait un flux de préparation de bibliothèque qui était effectué avant le séquençage. En résumé, cette méthodologie comprend la fragmentation du modèle en courts fragments d'ADN (100–200 nt), suivie de la polyadénylation de ces fragments et de la génération de queues poly(A). Ensuite, l'ADN à queue poly(A) est hybridé à des amorces oligo-d(T), qui sont immobilisées sur une cellule de flux en verre jetable comportant 25 canaux pour le séquençage. Avant le séquençage, un traitement des extrémités 3' avec des enzymes terminales transférases est utilisé pour bloquer l'extension de l'ADN. Enfin, l'identification de la séquence d'ADN est basée sur l'émission de lumière

détectée par imagerie après l'incorporation d'un nucléotide fluorescent [7]. Bien que cette méthode ait simplifié le processus de préparation de bibliothèque, en évitant les étapes d'amplification PCR, elle a montré de sérieuses limitations concernant le séquençage long et coûteux, son coût élevé, les taux d'erreur élevés et, enfin, la production de lectures courtes (~32 pb). [8].

2. Aperçu des plateformes NGS (Illumina, PacBio, Oxford Nanopore)

A. Méthode illumina

a. Principe Fondamental de la Méthode Illumina

La méthode Illumina est une technologie de référence en matière de séquençage de nouvelle génération (NGS), largement utilisée pour ses performances et sa polyvalence. Illumina utilise le séquençage par synthèse (sequencing by synthesis, SBS), une technologie qui repose sur l'amplification de fragments d'ADN sur une lame en verre et la détection des bases par fluorescence. Le processus clé inclut :

- **Amplification en pont** : Les fragments d'ADN, après l'ajout d'adaptateurs spécifiques, sont fixés sur une lame contenant des oligonucléotides complémentaires. Une amplification répétée forme des clusters clonaux contenant environ 1 000 copies identiques par fragment.
- **Incorporation sélective des nucléotides** : Lors de la synthèse, des nucléotides fluorescents marqués, chacun correspondant à une base spécifique (A, T, G, C), sont incorporés. Ces nucléotides agissent

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

aussi comme des terminateurs de réaction, ce qui permet un contrôle précis cycle par cycle.

- **Détection par fluorescence** : Chaque base incorporée est détectée grâce à son signal fluorescent, avant le déblocage des terminateurs pour poursuivre les cycles. Cette méthode est répétée jusqu'à 300 cycles ou plus, générant des séquences de haute qualité

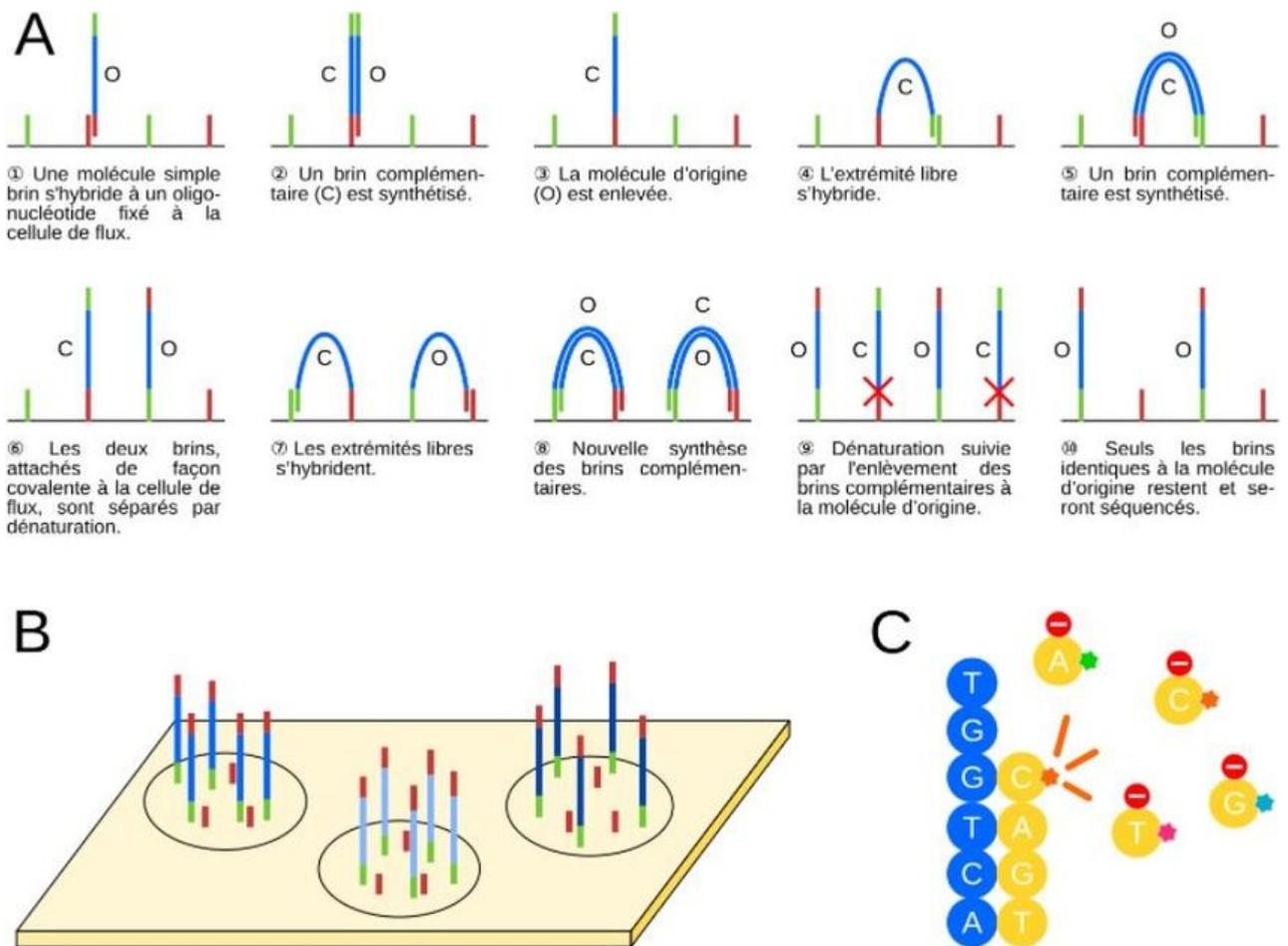


Figure 2. : (A) Etapes de séquençage par la méthode Illumina. (B) Plusieurs brins d'ADN sont amplifiés via l'attachement d'un adaptateur (vert) sur un oligonucléotide (rouge) fixé à la cellule de flux. (C) Lecture des nucléotides par imagerie grâce à un groupe fluorescent spécifique.

b. Applications et Protocoles

Illumina supporte divers protocoles de séquençage adaptés à de multiples besoins en recherche biomédicale et génétique :

- **Séquençage de génomes complets** pour l'identification des variations génétiques.
- **Séquençage ciblé ou d'exome** pour détecter des mutations spécifiques.
- **Transcriptomique (RNA-Seq)** pour l'analyse de l'expression génique.
- **Séquençage épigénétique (methylome)** pour étudier les modifications de l'ADN.
- **Metagénomique et CHIP-Seq**, pour explorer les populations microbiennes et les interactions ADN-protéines respectivement

c Instruments Illumina

Illumina offre une gamme d'instruments adaptés à différentes échelles de projets :

- **MiniSeq** : Idéal pour les petits projets avec un débit de 7,5 Gb par run.
- **MiSeq** : Convient aux études de séquençage à lecture longue (jusqu'à 300 pb par lecture).
- **NextSeq et NovaSeq** : Parfaits pour les projets à haut débit, pouvant atteindre plusieurs centaines de Gb par run. Ces options permettent une grande flexibilité pour ajuster la profondeur de séquençage et les coûts

d. Avantages et Défis

Avantages :

- Précision élevée grâce à la détection par fluorescence.

- Flexibilité avec des applications couvrant toute la génomique et des échelles de projets variées.
- Évolutivité pour les petits laboratoires comme pour les grands projets de consortium

Défis :

- Synchronisation des clusters : Une désynchronisation des réactions peut réduire la qualité des séquences.
- Gestion des données : Le volume de données généré est considérable, nécessitant des outils bioinformatiques robustes.
- Sur-clusterisation : Une surcharge de lames peut diminuer la précision des résultats

A- Méthode PacBio

Contrairement aux méthodes de séquençage de deuxième génération, les méthodes de séquençage de troisième génération, telles que celles développées par **Pacific Biosciences (PacBio)**, visent à séquencer des molécules longues d'ADN ou d'ARN. Le séquençage PacBio, connu sous le nom de **séquençage en temps réel à molécule unique (SMRT)**, présente des caractéristiques et des avantages spécifiques pour le séquençage de longue portée et l'analyse épigénétique.

a. Principe de la technologie SMRT

La méthode repose sur une cellule de flux SMRT contenant des **guides d'ondes à mode zéro (ZMW)**, de minuscules puits où se déroule la

réaction de séquençage. Un **polymérase d'ADN** lié au fond du puits incorpore des nucléotides marqués par des fluorophores. Chaque incorporation est détectée en temps réel grâce à l'imagerie fluorescente. Une fois le nucléotide ajouté, le marqueur fluorescent est libéré, permettant la prochaine incorporation. Ce processus peut être répété pour des molécules circulaires (appelées **SMRTbell**), ce qui améliore la précision grâce à la génération de séquences consensus circulaires (**CCS**).

b. Avantages principaux

- **Longues lectures** : Jusqu'à 30–50 kb ou plus, facilitant l'assemblage de génomes complexes.
- **Identification des modifications de base** : La mesure du temps entre les incorporations de nucléotides (**durée inter-impulsions, IPD**) permet de détecter des modifications épigénétiques comme la méthylation.
- **Assemblage génomique direct** : Utile pour des génomes microbiens ou des génomes de grande taille, souvent combiné avec des méthodes comme Illumina pour une précision accrue.

c. Limitations et solutions

Bien que le séquençage SMRT présente un **taux d'erreur initial élevé**, ces erreurs sont aléatoires. L'alignement de multiples lectures à partir d'un même gabarit corrige ces erreurs pour produire des séquences de haute précision. Des améliorations continues, telles que le chargement par billes magnétiques et l'isolation de fragments d'ADN de grande taille, visent à augmenter la fiabilité et la portée des lectures.

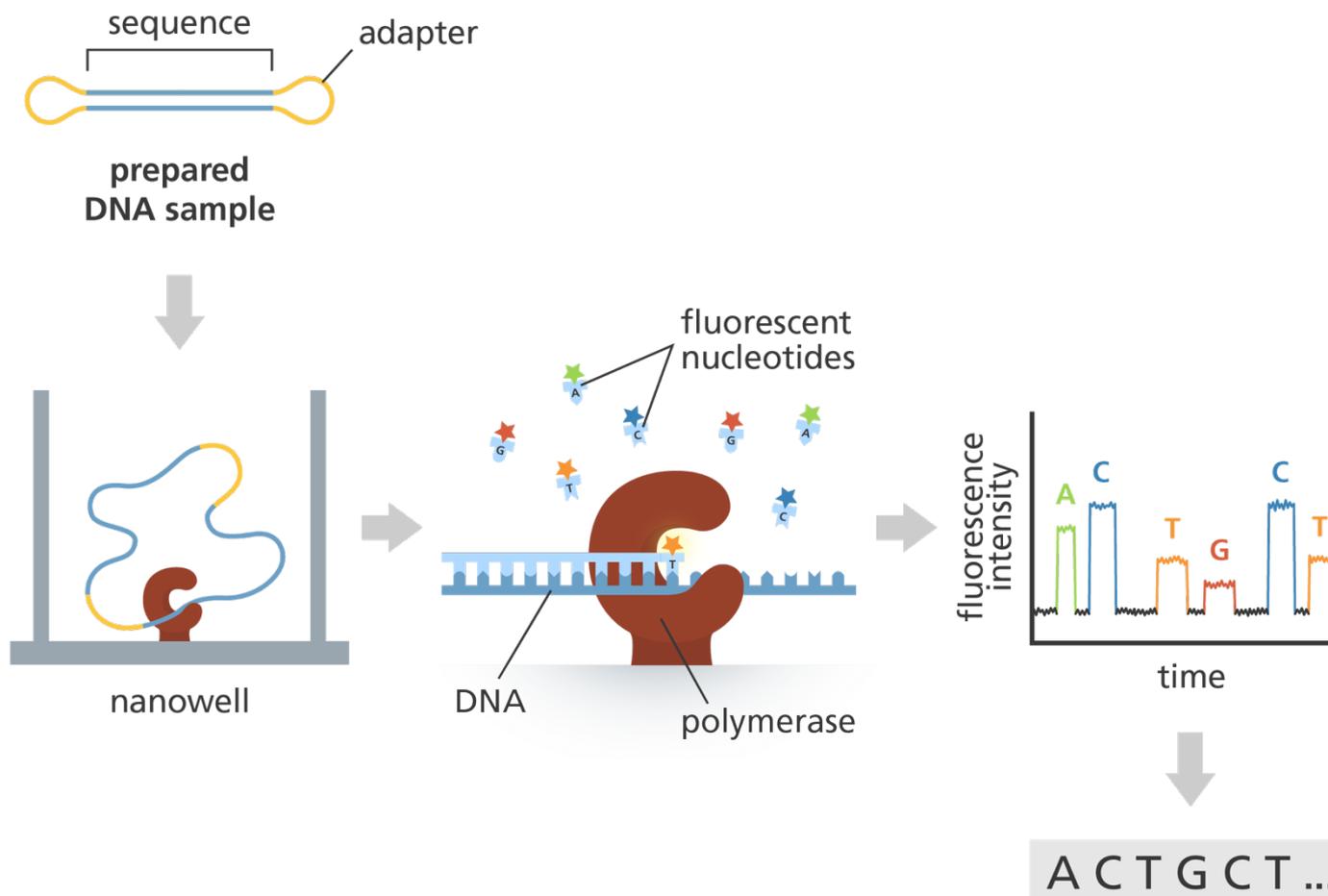


Figure 3 : Séquençage de molécule unique en temps réel (SMRT). Un échantillon d'ADN préparé est lié à la polymérase (brun) via un adaptateur (jaune) et est introduit dans la cellule de flux. Une ADN polymérase est attachée au bas de chaque nanofossé et un mélange de nucléotides marqués par fluorescence est ajouté. L'incorporation de chaque nucléotide fluorescent entraîne une éclat de lumière capturé dans les données vidéo brutes.

B. Méthode Oxford nanopore

La méthode de séquençage Oxford Nanopore repose sur l'utilisation d'un dispositif miniaturisé, le MinION, qui se distingue par sa taille compacte (10 × 3 × 2 cm) et sa facilité d'utilisation, nécessitant uniquement un port USB3 pour être opérationnel. Cette technologie utilise des nanopores pour séquencer directement des molécules d'ADN double brin (dsDNA). La préparation des bibliothèques, essentielle pour son fonctionnement, implique plusieurs étapes clés : la fragmentation de l'ADN, une éventuelle réparation des dommages, la modification des extrémités (end-repair et dA-tailing), la ligature d'adaptateurs spécifiques et la purification pour éliminer les contaminants. Deux adaptateurs principaux sont utilisés : l'adaptateur leader en forme de « Y » et l'adaptateur en épingle à cheveux, qui permettent le séquençage successif des brins « matrice » et « complémentaire ».[9]

Pendant le séquençage, une protéine motrice contrôle la vitesse à laquelle l'ADN passe à travers le nanopore, tandis qu'une protéine spécifique facilite le passage continu des deux brins. Les données générées peuvent être analysées par des appels de bases unidirectionnels (1D) ou bidirectionnels (2D), ces derniers offrant une meilleure qualité grâce à l'intégration des informations des deux brins. Cette approche innovante, combinant portabilité, simplicité et capacité à lire de longues molécules d'ADN, représente une avancée majeure dans le domaine du séquençage génomique.

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

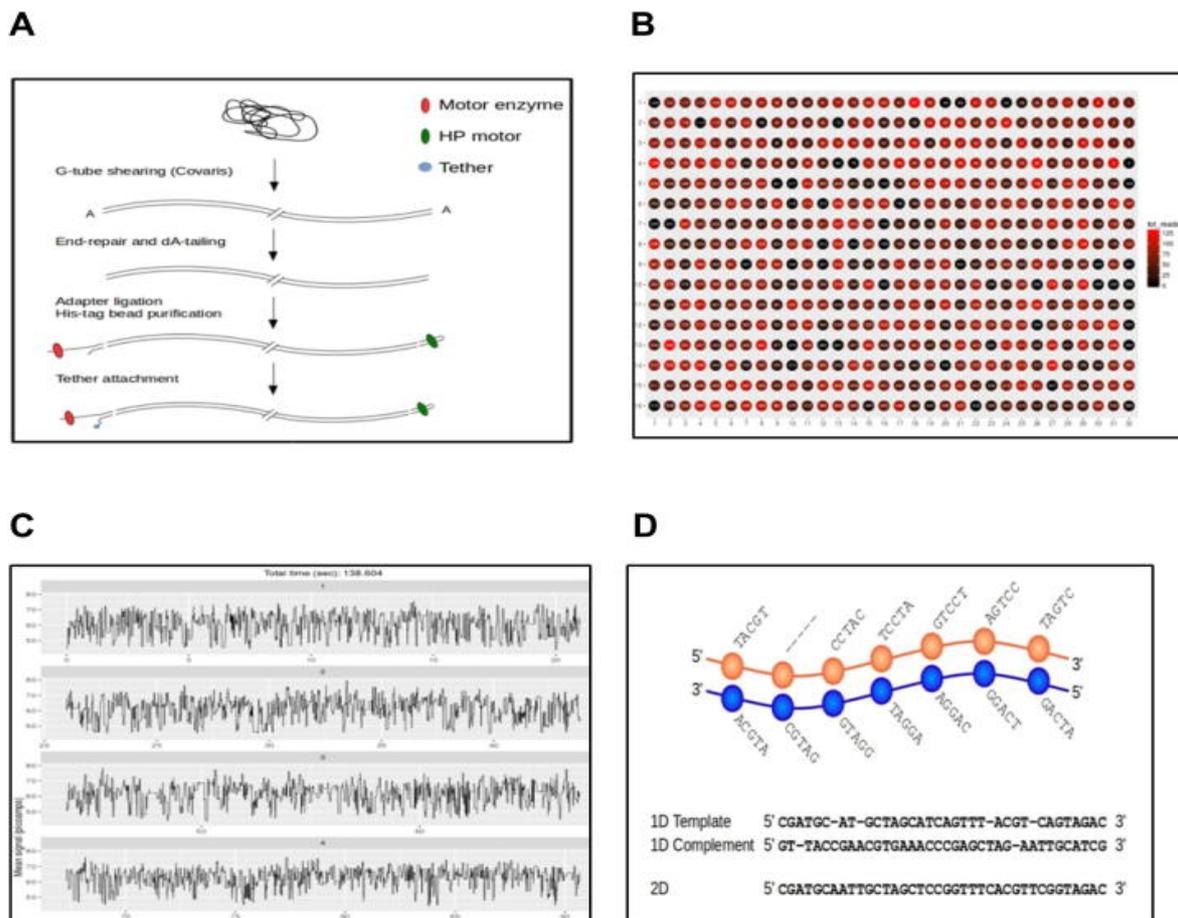


Figure 4 : Processus de séquençage Oxford Nanopore

- A. Schéma de préparation de la bibliothèque pour le kit de séquençage de l'ADN génomique (SQK-MAP-003).
- B. 512 canaux avec différents niveaux d'activité dans une cellule de flux, montrés dans différentes couleurs (les canaux les plus actifs sont en rouge).
- C. « Graphiques en zigzag » des signaux électriques fluctuants, qui peuvent être traduits en bases d'ADN.
- D. Décodage des 5-mers à partir des informations d'événements et alignement des appels de bases 1D et 2D.

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

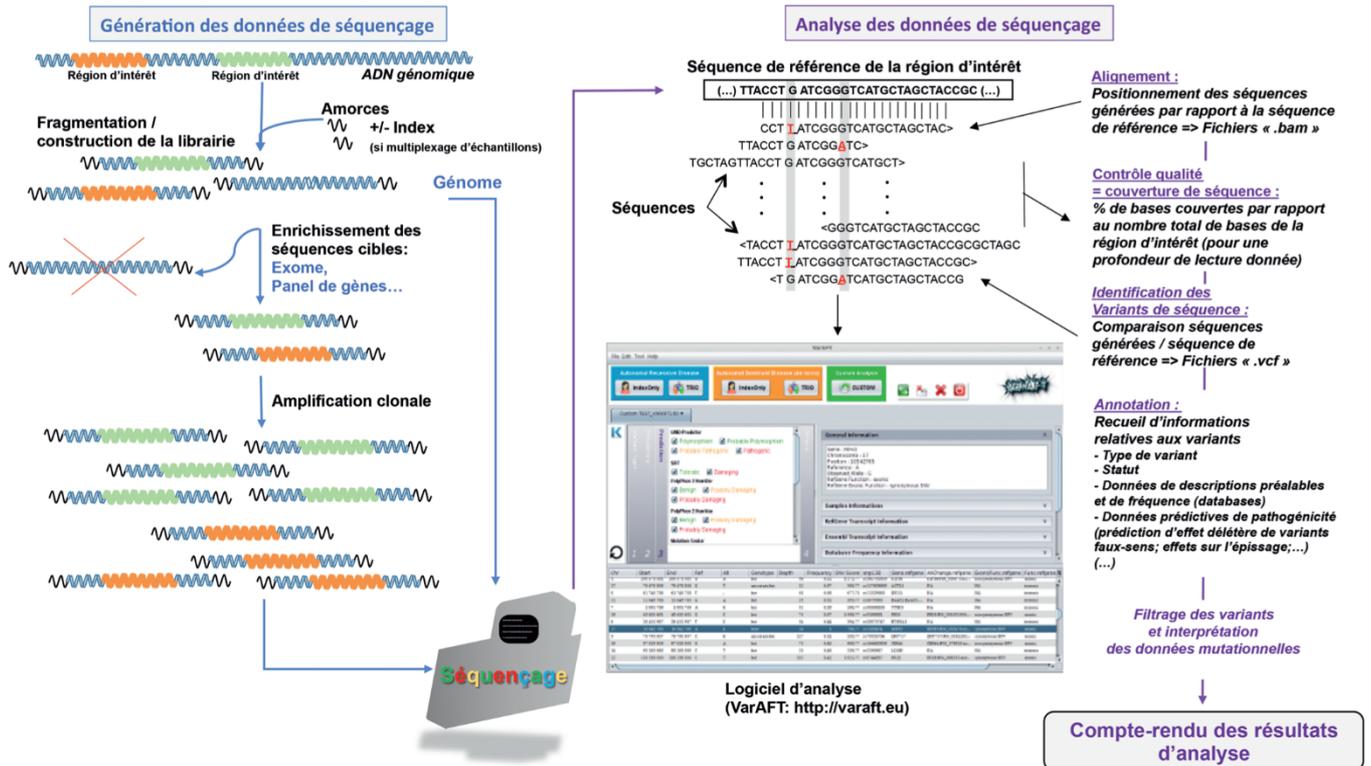


Figure 5 : Principales étapes de génération et d'analyse de données de NGS

II. Maladies rénales et génétique

1. Les néphropathies glomérulaires et la génétique

Les néphropathies glomérulaires regroupent un ensemble de maladies rénales affectant principalement les glomérules, unités filtrantes du rein. Parmi les pathologies les plus fréquentes, on retrouve le syndrome néphrotique et les glomérulonéphrites. Ces affections sont souvent d'origine immunitaire ou inflammatoire, mais des mutations génétiques spécifiques peuvent être responsables de formes héréditaires de néphropathies glomérulaires. Par exemple, des mutations dans les gènes NPHS1 (néphrine) et NPHS2 (podocine) sont liées à des formes héréditaires de néphropathie glomérulaire, provoquant des défauts dans la structure du podocyte, une cellule clé du glomérule. Les avancées récentes en génétique, notamment grâce à la NGS, ont permis d'identifier de nouveaux gènes et variants associés à des formes rares de néphropathies glomérulaires, facilitant ainsi un diagnostic moléculaire précis. Cela permet non seulement de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques sous-jacents mais aussi d'améliorer la prise en charge thérapeutique et la gestion des patients.

2.2. Les néphropathies tubulo-interstitielles et leur base génétique

Les néphropathies tubulo-interstitielles représentent un groupe de maladies rénales caractérisées par des lésions des tubules rénaux et du tissu interstitiel. Contrairement aux néphropathies glomérulaires, qui affectent principalement le filtre glomérulaire, les néphropathies tubulo-interstitielles

se manifestent par des altérations fonctionnelles du transport tubulaire et des désordres dans l'équilibre électrolytique. Bien que souvent d'origine environnementale ou toxique (par exemple, liée à l'exposition à des médicaments néphrotoxiques), certaines de ces affections ont une composante génétique bien documentée. Par exemple, des mutations dans le gène UMOD (uromoduline) sont associées à la néphropathie à uromoduline, une maladie rénale progressive. D'autres gènes ont été impliqués dans des formes rares de néphropathies tubulo-interstitielles, et l'utilisation de la NGS permet d'identifier ces anomalies génétiques même dans les cas cliniques les plus complexes. Ainsi, la génétique a un rôle majeur dans le diagnostic et le pronostic de ces pathologies.

3. Les maladies rénales héréditaires

Les maladies rénales héréditaires incluent des affections génétiques transmises de manière autosomique dominante ou récessive, caractérisées par des malformations rénales ou des déficiences fonctionnelles au cours de la vie. Les exemples les plus connus incluent la polykystose rénale (PKD) et le syndrome d'Alport. La polykystose rénale, souvent causée par des mutations dans les gènes PKD1 et PKD2, se traduit par la formation de kystes dans les reins, conduisant à une insuffisance rénale chronique. Le syndrome d'Alport, quant à lui, est lié à des mutations des gènes COL4A3, COL4A4 et COL4A5, et se caractérise par une atteinte progressive des glomérules, accompagnée de surdité et de troubles oculaires. L'identification précoce de ces mutations grâce au séquençage de nouvelle génération (NGS) a considérablement amélioré le diagnostic moléculaire et a permis de mieux comprendre les

mécanismes de ces maladies, facilitant ainsi une gestion thérapeutique plus ciblée et personnalisée.

Les progrès réalisés dans le domaine de la génétique rénale, notamment avec les technologies de séquençage de nouvelle génération, ont considérablement enrichi la compréhension des néphropathies glomérulaires, tubulo-interstitielles et héréditaires. Ces découvertes ont permis d'améliorer le diagnostic précoce, de clarifier le pronostic et d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, notamment pour les formes rares de maladies rénales. Cependant, les défis restent nombreux, notamment en matière d'interprétation des variantes génétiques et d'adaptation de ces connaissances à la pratique clinique quotidienne.

III. Le rôle des anomalies génétiques dans les maladies rénales

1. Contribution des mutations monogéniques

Les mutations monogéniques, c'est-à-dire les mutations sur un seul gène, sont responsables de nombreuses maladies rénales héréditaires. Ces mutations peuvent entraîner des déficiences dans les protéines nécessaires au fonctionnement normal du rein, ce qui conduit à des dysfonctionnements structurels et fonctionnels. Par exemple, la **polykystose rénale autosomique dominante** (PKDAD) est l'une des maladies rénales héréditaires les plus courantes, causée par des mutations dans les gènes *PKD1* et *PKD2*. Ces mutations conduisent à la formation de kystes dans les reins, perturbant la fonction rénale au fil du temps et pouvant entraîner une insuffisance rénale

chronique. De même, des mutations dans les gènes *COL4A3*, *COL4A4*, et *COL4A5* sont responsables du **syndrome d'Alport**, caractérisé par une néphropathie progressive, une surdité et des troubles oculaires [10].

Les mutations monogéniques jouent un rôle crucial non seulement dans les maladies rénales héréditaires, mais aussi dans les **néphropathies glomérulaires** comme celles causées par des mutations dans les gènes *NPHS1* et *NPHS2* (néphrine et podocine), impliqués dans le bon fonctionnement des podocytes. Ces mutations peuvent mener à des formes de néphropathie glomérulaire, y compris des formes héréditaires de syndrome néphrotique. Les tests génétiques, en particulier le séquençage de nouvelle génération (NGS), sont donc essentiels pour détecter ces mutations spécifiques et permettre un diagnostic précoce et précis, afin d'adapter les stratégies thérapeutiques et de prévention.

2. Contribution des polymorphismes complexes

Outre les mutations monogéniques, les **polymorphismes complexes** jouent également un rôle important dans le développement des maladies rénales. Ces polymorphismes, qui correspondent à des variations génétiques dans la population générale, sont souvent plus fréquents et influencent des traits de manière plus subtile mais cumulative. Dans les maladies rénales, les polymorphismes complexes peuvent interagir avec des facteurs environnementaux ou d'autres variantes génétiques, augmentant ainsi le risque de maladie rénale chronique (MRC) ou d'aggravation de l'insuffisance rénale.

Par exemple, des polymorphismes dans les gènes régulant le

métabolisme des lipides, tels que *APOL1*, ont été associés à des formes particulières de glomérulopathie, comme la **néphropathie focale et segmentaire** (FSGS) dans les populations afro-américaines. Ce gène a été identifié comme un facteur de risque majeur pour les patients atteints de maladie rénale en raison de ses variantes à risque, ce qui démontre l'importance des polymorphismes complexes dans la susceptibilité génétique aux maladies rénales [11].

Les polymorphismes associés à l'inflammation et au stress oxydatif, comme ceux du gène *TNF- α* , sont également étudiés pour leur rôle dans des pathologies comme la néphropathie diabétique, une des principales causes d'insuffisance rénale chronique. Ces polymorphismes complexes, bien que non déterminants à eux seuls, peuvent accentuer les risques de dégradation fonctionnelle du rein, particulièrement en interaction avec des facteurs environnementaux comme le diabète ou l'hypertension.

3. L'importance des tests génétiques dans le diagnostic des maladies rénales

L'intégration des tests génétiques, en particulier grâce à la technologie de **séquençage de nouvelle génération (NGS)**, a transformé le diagnostic des maladies rénales. Ces tests permettent de détecter de manière fiable et rapide les **mutations monogéniques** et d'identifier des **polymorphismes complexes** associés à une susceptibilité accrue aux maladies rénales. La **NGS** permet un séquençage de l'exome entier ou de gènes cibles spécifiques, facilitant l'identification de mutations rares et de variants de signification incertaine (VUS), dont l'importance clinique n'est souvent pas évidente.

L'utilisation des tests génétiques permet également de faire un **diagnostic moléculaire** plus précis des **néphropathies glomérulaires** et des **maladies rénales héréditaires**. Par exemple, pour les patients présentant un syndrome néphrotique, les tests génétiques peuvent rapidement identifier des mutations dans des gènes tels que *NPHS1* ou *NPHS2*, confirmant un diagnostic de néphropathie héréditaire et permettant de guider le traitement. De même, dans les **néphropathies tubulo-interstitielles**, les tests génétiques peuvent identifier des mutations rares et fournir une information essentielle sur l'évolution de la maladie et la réponse au traitement.

En outre, ces tests permettent une **médecine personnalisée**, où le traitement est adapté en fonction du profil génétique spécifique du patient. Cette approche peut améliorer les résultats cliniques, notamment en termes de prévention de la progression de la maladie, de choix thérapeutiques plus ciblés et de gestion optimale des risques associés aux variants génétiques.[12,13]

IV. Applications de la NGS dans le Diagnostic Moléculaire des Maladies Rénales

1. Diagnostic des Maladies Rénales Héritaires

A. Exemples de Gènes Associés aux Syndromes Rénaux

a. Syndrome d'Alport

Le syndrome d'Alport est une maladie héréditaire causée par des mutations dans les gènes COL4A3, COL4A4 et COL4A5, codant pour les chaînes de collagène IV essentielles à la structure et à la fonction de la membrane basale glomérulaire. Cette maladie se caractérise par une hématurie progressive, des troubles auditifs et parfois des atteintes oculaires.

Une étude récente a démontré que l'utilisation de la NGS permettait de détecter des mutations dans les gènes COL4A chez 80 % des patients présentant un phénotype compatible avec le syndrome d'Alport, réduisant ainsi les délais diagnostiques et facilitant la prise en charge clinique [14].

b. Polykystose rénale autosomique dominante (PKD)

La polykystose rénale, une des maladies génétiques les plus fréquentes, est causée principalement par des mutations dans les gènes PKD1 et PKD2. Ces mutations entraînent le développement de kystes multiples dans les reins, souvent associés à une progression vers l'insuffisance rénale terminale.

La NGS a permis d'identifier des mutations pathogènes dans PKD1 et PKD2 chez 85 % des patients avec une suspicion clinique de PKD, y compris des variants rares difficiles à détecter par les méthodes traditionnelles [15].

c. Tubulopathies héréditaires

Des maladies telles que le syndrome de Gittelman (SLC12A3) ou de Bartter (CLCNKB) bénéficient également de la NGS. Ces pathologies, souvent mal diagnostiquées en raison de phénotypes subtils ou variés, peuvent être rapidement identifiées grâce à l'analyse génétique ciblée.

Une méta-analyse a révélé que les panels NGS multigéniques augmentaient la détection des mutations causales dans les tubulopathies héréditaires par rapport aux tests séquentiels traditionnels [16].

B. Rôle de la NGS dans la Détection des Variants Rares et Pathogènes

a. Identification de Variants Pathogènes Rares

La NGS excelle dans la détection des mutations rares, même dans des gènes impliqués dans des maladies complexes. Par exemple :

- Les mutations dans le gène NPHS2, impliqué dans les syndromes néphrotiques héréditaires résistants aux stéroïdes, sont détectées avec une sensibilité accrue grâce à la NGS [17].
- Les variants rares dans des gènes comme WT1 et LAMB2 peuvent également être identifiés, facilitant le diagnostic moléculaire des glomérulopathies congénitales.

b. Précision dans les Cas de Phénotypes Complexes

La NGS est particulièrement utile dans les phénotypes rénaux complexes ou atypiques. Elle permet de diagnostiquer les patients présentant des formes cliniques chevauchantes entre plusieurs maladies génétiques.

- Une étude a montré que la NGS permettait de poser un diagnostic précis chez 60 % des patients présentant des phénotypes rénaux

atypiques, en identifiant des mutations dans des gènes inattendus [18].

c. Analyse des Variants de Signification Inconnue (VUS)

Les analyses bio-informatiques associées à la NGS permettent de caractériser les variants génétiques de signification inconnue (VUS), un problème fréquent dans les diagnostics moléculaires. Grâce à des bases de données telles que ClinVar et à des études fonctionnelles, de nombreux VUS sont reclassés comme pathogènes ou bénins, améliorant ainsi la prise en charge clinique.

2. Stratification des maladies complexes grâce à la NGS

La stratification des maladies rénales complexes est cruciale pour garantir une prise en charge adéquate des patients, particulièrement lorsque les phénotypes se chevauchent entre maladies d'origine génétique et pathologies acquises. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) s'impose comme un outil essentiel dans cette démarche, en permettant une exploration approfondie des gènes impliqués dans ces pathologies. Cette technologie révolutionnaire améliore considérablement le diagnostic différentiel et offre une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires sous-jacents.

Par exemple, le séquençage de l'exome a permis d'identifier des mutations pathogéniques dans plus de 9 % des cas étudiés. [19]

Ces résultats montrent comment le NGS peut orienter les diagnostics, notamment dans des cas où l'étiologie demeure incertaine. De même, une étude a démontré l'efficacité d'un panel de gènes spécifiques pour distinguer des maladies telles que la polykystose rénale autosomique dominante

(mutations dans PKD1 ou PKD2) des maladies kystiques rénales acquises, souvent associées à l'insuffisance rénale chronique. [20]

Dans une perspective clinique, ils ont souligné que le NGS facilite l'identification de phénotypes rares ou atypiques, tout en améliorant la classification des maladies. Ces avancées permettent également de guider le conseil génétique et de personnaliser les approches thérapeutiques pour les familles concernées. [21]

Enfin, une étude a rapporté que cette technologie a permis d'élucider des diagnostics génétiques dans environ un tiers des cas de maladies rénales chroniques d'étiologie inconnue, transformant ainsi la prise en charge de ces patients. [22]

Ces exemples illustrent le rôle transformateur du NGS dans la néphrologie moderne. En différenciant avec précision les maladies rénales d'origine génétique de celles acquises, cette approche pave la voie à une médecine personnalisée et plus efficace, répondant aux besoins spécifiques de chaque patient.

3. Utilisation de la NGS dans les biopsies rénales

L'intégration du séquençage de nouvelle génération (NGS) dans l'analyse des biopsies rénales a considérablement révolutionné la manière d'étudier et de classer les maladies rénales. En permettant une analyse transcriptomique approfondie des échantillons, le NGS offre une évaluation précise de l'expression génique, fournissant des informations critiques pour une stratification améliorée des pathologies rénales complexes. [21]

Par exemple, l'analyse transcriptomique par NGS a permis d'identifier

des signatures moléculaires spécifiques associées à des pathologies glomérulaires telles que la glomérulosclérose segmentaire et focale (FSGS) et la néphropathie diabétique. Ces signatures, obtenues à partir de profils d'expression différentielle des gènes, permettent non seulement de distinguer ces pathologies mais aussi de mieux comprendre leur progression et leurs implications cliniques .[22]

En outre, des études ont démontré que l'application du NGS aux biopsies rénales facilite la détection de marqueurs génétiques et transcriptomiques liés à des processus clés comme l'inflammation et la fibrose, des caractéristiques fondamentales des maladies tubulo-interstitielles chroniques. Par exemple, l'analyse des échantillons a permis d'identifier des réseaux de gènes impliqués dans la fibrose, tels que *TGFBI* et *COL1A1*, offrant des perspectives sur les mécanismes pathogéniques sous-jacents .[23]

Par ailleurs, l'identification de signatures moléculaires spécifiques grâce au NGS soutient le développement de traitements personnalisés. Certaines signatures transcriptomiques sont désormais utilisées pour prédire la réponse aux traitements immunosuppresseurs dans des maladies complexes comme le lupus rénal, renforçant ainsi le rôle du NGS dans la médecine de précision .[24]

Ainsi, l'utilisation du NGS dans les biopsies rénales dépasse le cadre diagnostique traditionnel. Cette technologie fournit une cartographie moléculaire des maladies, favorisant des classifications plus précises, des prédictions pronostiques fiables, et des traitements adaptés aux spécificités génétiques et moléculaires de chaque patient .[21]

MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE

MATERIELS ET METHODES

I. Type de l'étude :

Il s'agit d'une étude observationnelle, descriptive et prospective, portant sur 51 patients suivis dans différents centres, notamment le service de néphrologie du CHU Hassan II de Fès, le Centre d'hémodialyse Basma de Meknès.

II. Technique de prélèvement :

Un prélèvement sanguin a été réalisé après obtention du consentement éclairé et recueil de l'arbre généalogique. Deux flacons EDTA ont été prélevés pour l'analyse génétique.

III. Séquençage matériel utilisé :

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a été réalisé en plusieurs étapes standardisées, depuis l'extraction de l'ADN jusqu'à l'analyse des fichiers de résultats. L'ensemble du processus s'est déroulé selon un protocole in vitro, en utilisant la technologie Ion Torrent™.

Extraction de l'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons de sang total à l'aide de l'équipement Vitrogène, selon un protocole automatisé. La qualité de l'ADN a été vérifiée par spectrophotométrie et son intégrité confirmée avant l'étape suivante.

Préparation de la bibliothèque (Library preparation)

La préparation de la bibliothèque a été réalisée automatiquement sur le système Ion Chef™, à l'aide d'un kit de préparation adapté à la technologie Ion Torrent. Cette étape inclut la fragmentation de l'ADN, la ligation des

adaptateurs et l'amplification par PCR. Les fragments d'ADN préparés sont ensuite sélectionnés pour leur taille et purifiés.

Remplissage de la puce

Le remplissage de la puce a également été effectué à l'aide du système Ion Chef™, en utilisant la puce Ion 530™, qui permet un débit adapté à l'analyse de panels de gènes ciblés. Cette étape comprend la fixation des bibliothèques préparées sur des billes, leur amplification clonale (émulsion PCR) et leur chargement sur la puce.

Séquençage

Le séquençage a été effectué sur la plateforme Ion S5™ selon les recommandations du fabricant. Cette technologie permet le séquençage massif parallèle à partir de la puce 530, générant des données sous forme de fichiers bruts (BAM, FASTQ).

Analyse bio-informatique

Les données générées ont été analysées à l'aide du logiciel Torrent Suite™, incluant l'alignement des séquences au génome de référence (hg19 ou hg38), l'appel de variants, leur annotation et leur interprétation selon les standards de l'ACMG. Les variants d'intérêt ont été filtrés selon leur fréquence, leur impact fonctionnel et leur pertinence clinique.

IV. Panel de gènes :

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a été effectué à l'aide d'un panel ciblé de 48 gènes impliqués dans les maladies rénales héréditaires. (fichier ci-joint)

V. Population d'étude :

Tous les patients doivent répondre à nos critères d'inclusion et abordé sur une base d'une participation volontaire par suite d'information sur le but et les objectifs de l'étude.

Cette étude porte sur une population de patients adultes présentant une néphropathie suspectée d'origine génétique. Les patients inclus présentent des antécédents familiaux de pathologie rénale, suggérant une transmission héréditaire de la maladie.

Ces études ont mis en évidence l'importance du dépistage génétique chez les patients présentant des antécédents familiaux, permettant ainsi d'orienter le diagnostic et la prise en charge thérapeutique.

RESULTATS PRELIMINAIRES

I. Résultats démographiques :

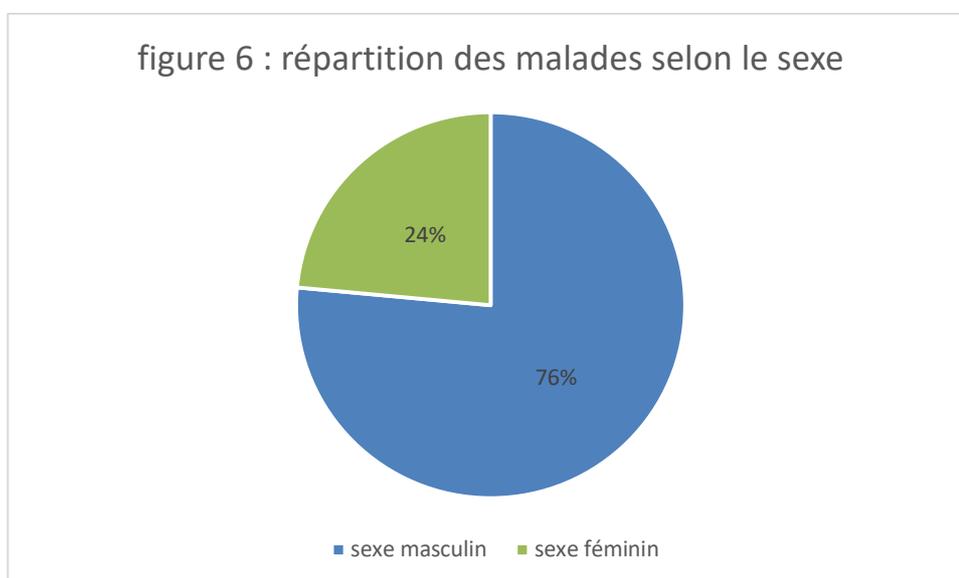
À ce jour, les résultats sont disponibles pour 8 patients, tandis que l'analyse des autres échantillons est en cours.

1. L'âge :

L'âge moyen des patients étudiés était de $39,25 \pm 15,8$ ans.

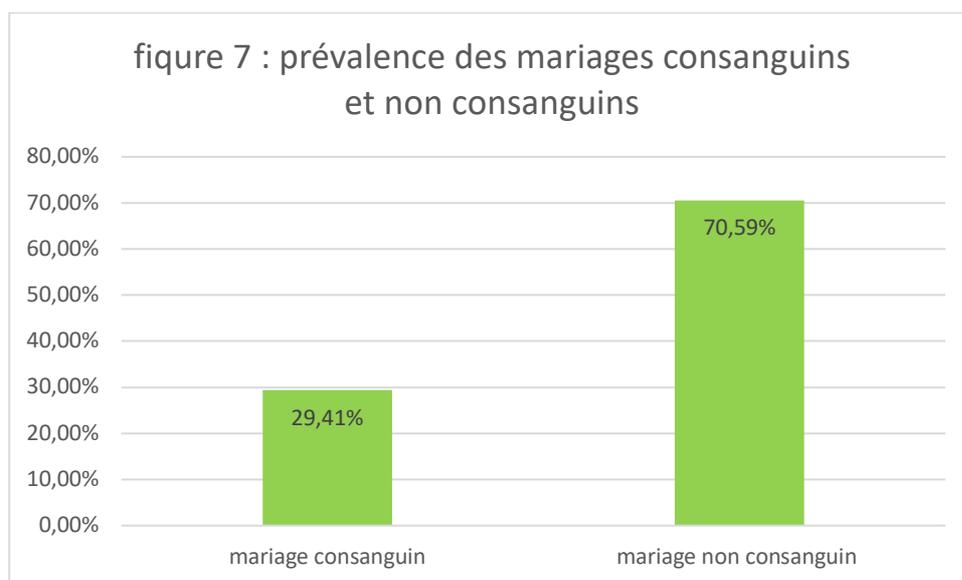
2. Le sexe :

Une prédominance masculine (76,47 %) (figure 3).



3. Consanguinité :

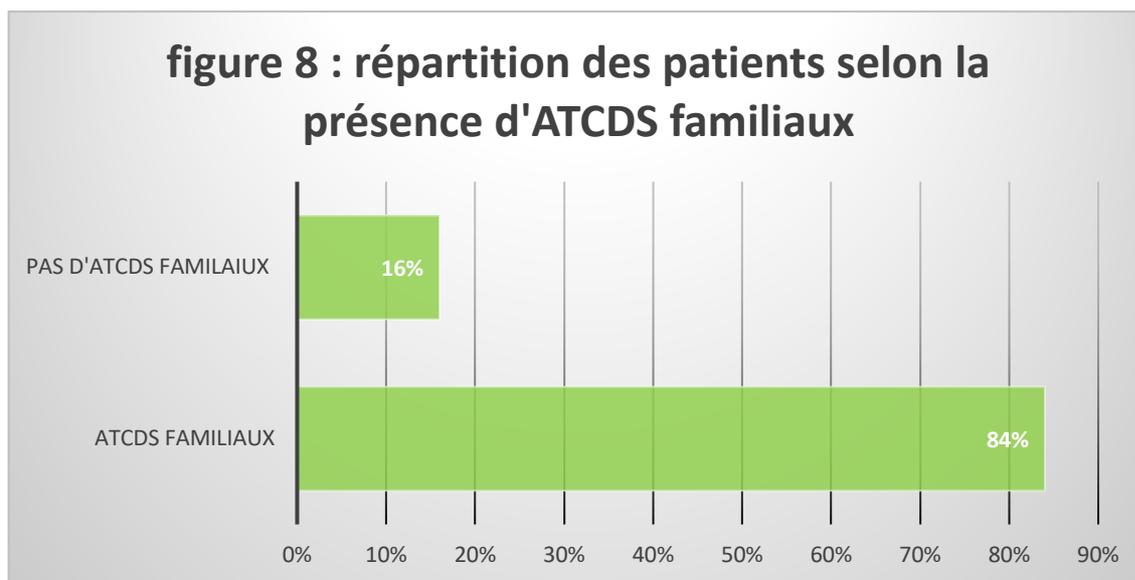
Une consanguinité était présente dans 29,41 % des cas (figure 4) , ce qui peut être un facteur prédisposant aux maladies rénales héréditaires en raison de l'augmentation du risque d'homozygotie pour certaines mutations pathogènes



II. Résultats cliniques :

1. Antécédents familiaux :

Parmi les 51 patients inclus dans l'étude, 16 % ne présentaient aucun antécédent familial de néphropathie, tandis que les 84 % restants avaient des antécédents familiaux évocateurs d'une origine héréditaire de la maladie. Cette forte proportion de patients avec une histoire familiale suggère une prédisposition génétique importante, renforçant ainsi la pertinence du recours au séquençage de nouvelle génération (NGS) pour l'identification des mutations impliquées (figure 5).



2. Motif de consultation :

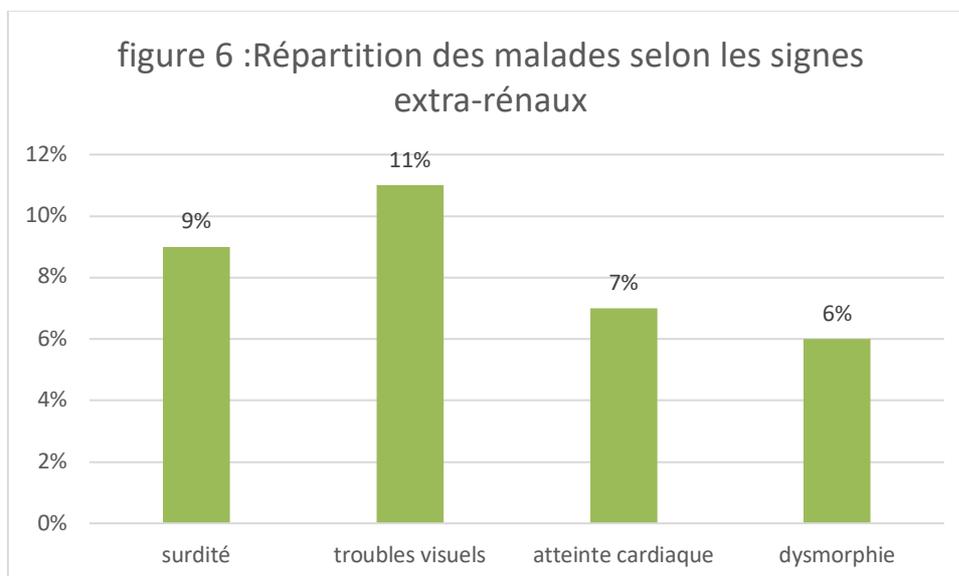
Les différents motifs de consultation sont regroupés dans le Tableau 1 :

| motif de consultation | nombre de patients | pourcentage % |
|----------------------------------|--------------------|---------------|
| syndrome œdémateux | 13 | 25,50% |
| des manifestations digestives | 20 | 39,20% |
| une altération de l'état général | 7 | 13,70% |
| dépistage familial | 4 | 7% |

Tableau 1 : Répartition des motifs de consultation dans notre série

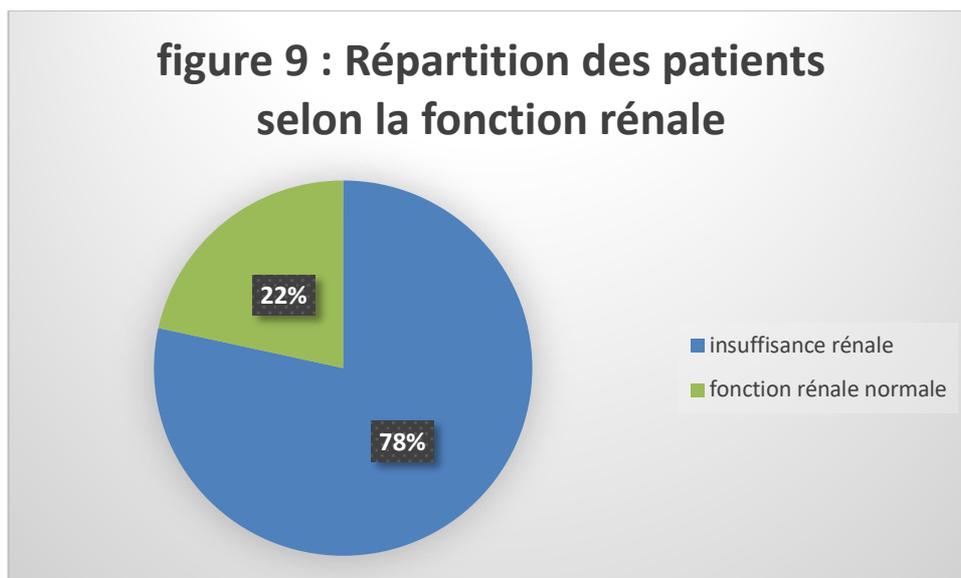
3. Signes extra-rénaux :

Des manifestations extrarénales telles qu'une surdité (9 %) et des troubles visuels (11 %), une atteinte cardiaque (7%) et une dysmorphie (6%) soulignant ainsi l'éventuelle implication de gènes syndromiques affectant plusieurs organes.



III. Résultats biologiques :

L'insuffisance rénale était présente dans 78,43 % des cas, témoignant d'une évolution souvent défavorable des néphropathies génétiques vers une atteinte rénale terminale nécessitant une prise en charge spécialisée.



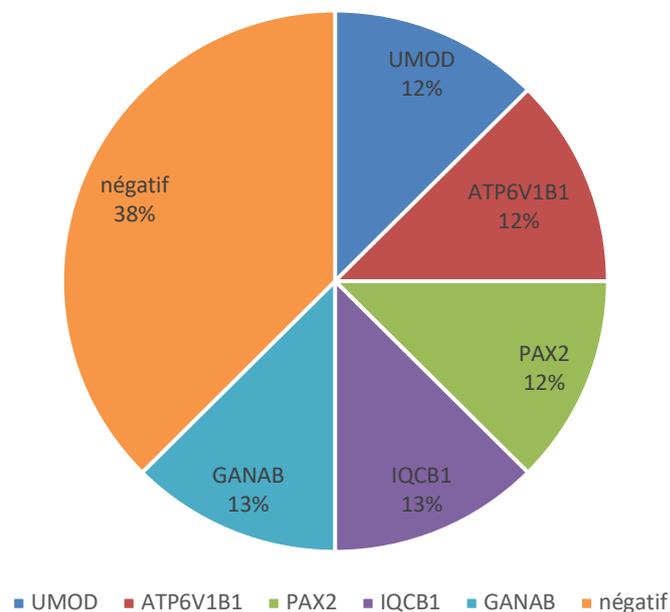
IV. Résultats génétiques :

L'analyse génétique est terminée pour 8 patients, tandis que l'examen des autres échantillons est toujours en cours. Parmi les patients testés, une mutation pathogène a été identifiée chez 27,7 %, mettant en évidence l'implication de plusieurs gènes d'intérêt. Les mutations détectées concernaient les gènes *UMOD*, *ATP6V1B1*, *IQCB1* et *PAX2*, connus pour leur rôle dans diverses formes de néphropathies héréditaires. Le gène *UMOD* est associé à la néphropathie tubulo-interstitielle autosomique dominante, tandis que *ATP6V1B1* est impliqué dans l'acidose tubulaire rénale distale avec surdité. Le gène *IQCB1* est connu pour être responsable du syndrome de Senior-Løken, associant une néphropathie et une rétinopathie, et *PAX2* est

impliqué dans le syndrome réno-oculaire.

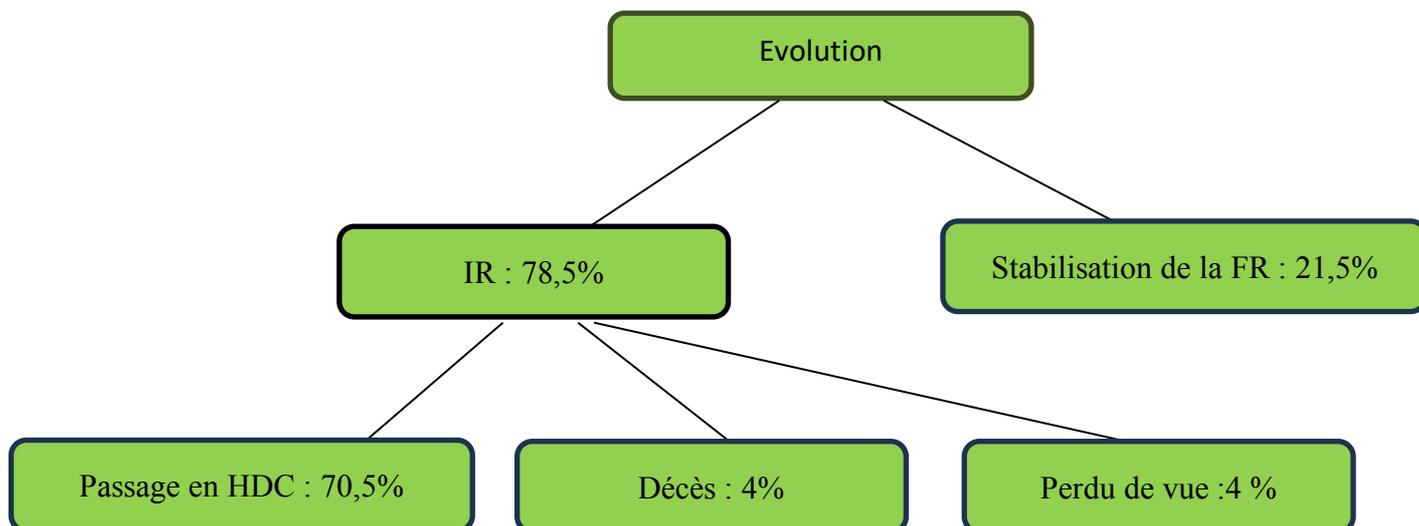
Ces résultats préliminaires confirment l'importance du NGS dans l'identification des causes génétiques des néphropathies héréditaires et ouvrent la voie à une meilleure stratification des patients en fonction de leur profil génétique.

Figure 10 : Répartition des mutations génétiques identifiées chez les patients atteints de néphropathies héréditaires



V. Evolution :

L'évolution était marquée par la stabilisation de la fonction rénale chez



DISCUSSION

Dans notre étude, l'âge moyen des patients était de $39,25 \pm 15,8$ ans. Cette moyenne est inférieure à celle rapportée dans une étude française où l'âge médian était de 48 ans [25]. Cette différence pourrait s'expliquer par des critères d'inclusion distincts ou des variations démographiques entre les populations étudiées.

Notre cohorte présente une prédominance masculine avec 76,47 % d'hommes. De même, l'étude française rapporte une proportion d'hommes de 56,9 % [25]. Cette surreprésentation masculine pourrait refléter une susceptibilité accrue des hommes aux néphropathies héréditaires ou une meilleure accessibilité aux soins pour cette population.

Nous avons observé une consanguinité dans 29,41 % des cas, tandis que l'étude française rapporte 11,7 % de consanguinité [25]. Cette différence notable peut être attribuée à des variations culturelles et géographiques influençant les pratiques matrimoniales, la consanguinité étant un facteur de risque reconnu pour les maladies génétiques récessives.

Les principaux signes cliniques relevés dans notre étude incluent une hypertension artérielle (47 %), une surdité (9 %), des troubles visuels (11 %) et une insuffisance rénale chronique (78,43 %). Ces manifestations sont cohérentes avec celles observées dans d'autres études sur les néphropathies héréditaires, bien que les pourcentages puissent varier en fonction des populations et des méthodologies utilisées.

Dans notre étude, des mutations pathogènes ont été identifiées chez 27,7 % des patients testés. Ce taux est comparable à celui rapporté dans une étude française récente, où le rendement diagnostique du séquençage de

l'exome était de 38 % [25].

Les gènes impliqués dans notre cohorte :

Gène IQCB1 : Une étude publiée dans *Kidney International* a analysé 834 patients atteints de néphronophtise et de ciliopathies associées. Les résultats ont montré que des mutations bialléliques dans le gène IQCB1 étaient présentes chez 4 % des patients, ce qui est cohérent avec la fréquence observée dans votre étude [26].

Gène PAX2 : Une recherche menée auprès d'une cohorte multiethnique nord-américaine a révélé que des mutations dans le gène PAX2 étaient responsables de 10 % des cas de dysplasie rénale hypoplasique chez les enfants. Cette fréquence est supérieure à celle observée dans votre étude, ce qui pourrait s'expliquer par des différences ethniques ou des critères d'inclusion distincts [27].

Gène UMOD : Bien que votre étude ait identifié des mutations dans le gène UMOD, les données spécifiques concernant la prévalence de ces mutations dans d'autres populations sont limitées. Cependant, il est établi que les mutations du gène UMOD sont une cause fréquente de néphropathie tubulo-interstitielle héréditaire [28].

Gène ATP6V1B1 : Les mutations de ce gène sont généralement associées à l'acidose tubulaire rénale distale avec surdité. La prévalence de ces mutations varie selon les populations, et les données spécifiques comparables à votre étude sont limitées [29].

L'une des principales études dans ce domaine est celle de **Bleyer et al. (2022)** qui a analysé l'efficacité d'un panel de gènes rénaux séquencés chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC). Les résultats ont montré un **rendement diagnostique de 39,3%**, ce qui signifie qu'environ **4 patients sur 10** ont pu obtenir une explication génétique à leur pathologie grâce au NGS. Parmi ces patients, **les mutations pathogènes ont été retrouvées dans plus de 150 gènes différents [30]**.

De manière similaire, l'étude de **de Haan et al. (2022)** s'est concentrée sur des patients atteints d'IRC d'étiologie inconnue et a mis en évidence un rendement diagnostique de **35%**, confirmant ainsi l'utilité du NGS pour clarifier des cas non résolus par les méthodes traditionnelles [31].

Enfin, les travaux de **Greillier (2023)** ont montré que, même après une biopsie rénale, environ **30 à 40% des maladies rénales indéterminées** pouvaient être expliquées par une analyse génétique approfondie grâce au NGS [32].

L'étude de **Bleyer et al. (2022)** a montré que les mutations de *PKD1/PKD2* représentaient environ **20% des diagnostics** établis par le NGS, tandis que les mutations des gènes *COL4A3-A5* étaient présentes chez **10 à 15% des patients [30]**.

L'apport du NGS est particulièrement important pour les patients chez qui la biopsie rénale est non concluante. En effet, **Greillier (2023)** a observé que **40% des cas de maladies rénales d'origine inconnue** ont pu être élucidés grâce à l'identification de mutations pathogènes dans des gènes spécifiques [32].

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

L'étude de de Haan et al. (2022) a démontré que chez 20% des patients diagnostiqués par NGS, un changement dans la prise en charge clinique a été réalisé suite aux résultats génétiques [31].

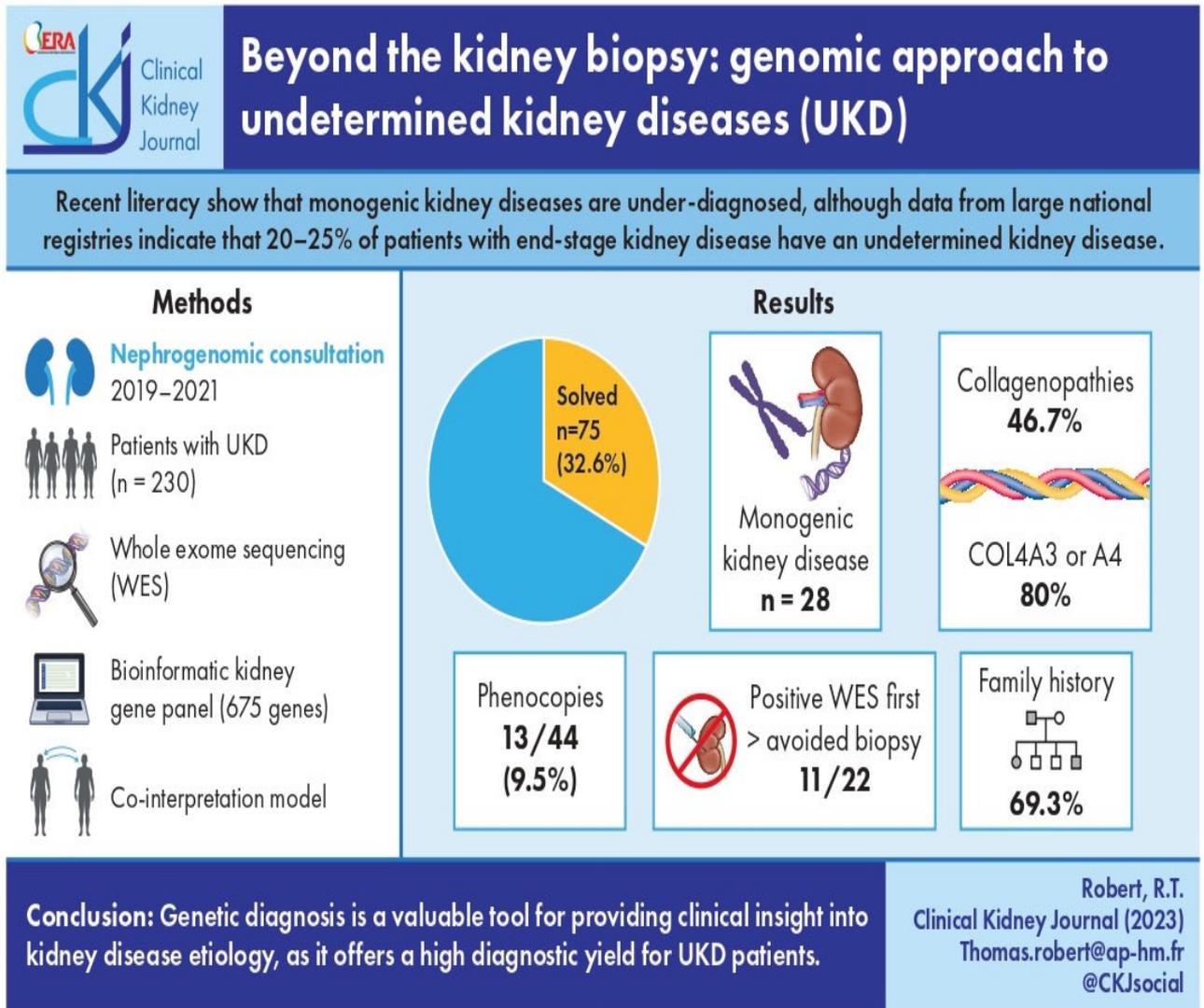


Figure 10 : apport du séquençage NGS par rapport à la PBR dans le diagnostic des maladies rénales héréditaires

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

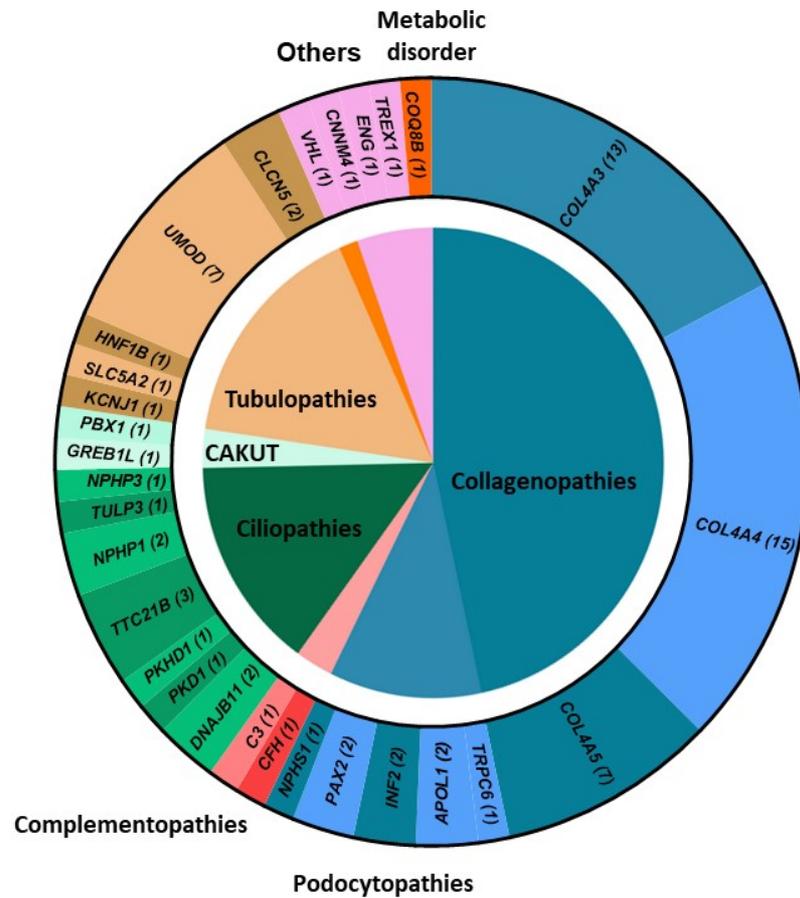


Figure 11 : Classification des maladies rénales génétiques en fonction des gènes impliqués.

CONCLUSION

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

Le NGS représente une avancée majeure dans le diagnostic des maladies rénales, offrant des perspectives prometteuses pour une médecine plus personnalisée. Les recherches futures devraient se concentrer sur l'élargissement des panels de gènes, l'amélioration des outils bioinformatiques, et l'évaluation de l'impact clinique et économique de ces technologies. Enfin, une meilleure compréhension des bases génétiques des maladies rénales ouvrira la voie à de nouvelles thérapies ciblées, améliorant ainsi la qualité de vie des patients.

APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES

ANNEXE I : formulaire de consentement éclairé du Patient :

أنا الموقع أسفله (الاسم العائلي والشخصي).....:

رقم بطاقة التعريف الوطنية.....:

رقم الهاتف.....:

بصفتي ولي الأمر.....:

أوافق على المشاركة في البحث.....:

أصرح أنني اطّلت و فهمت أهداف و منهجية الدراسة أو مشروع البحث قد تم شرحها بوضوح من طرف الباحثين، وقد وضح لي ما يلي:

المشاركة في هذه الدراسة إرادية وغير مدفوعة الأجر.

أنا حر في قبول أو رفض المشاركة.

يمكن أن أسحب موافقتي في أي وقت ممكن بدون أن يؤثر ذلك على مسيرتي العلاجية.

سأحظى بتحليلات تشخيصية أو سأساهم في تطوير البحث العلمي أو أشياء أخرى.

موافقتي لا تخلي مسؤولية الباحثين.

لا أعارض أن يتم الاحتفاظ بالعينة المستعملة في هذه الدراسة من أجل القيام بدراسات علمية مستقبلية.

أود أن أطلع على نتائج هذه الدراسة: نعم لا

أصرح أنني اطّلت جيدا على هذه الإستمارة المتعلقة بمشاركتي في هذا البحث وقد وضح لي هدف

الدراسة و جميع المعلومات المحيطة بها.

أوافق على المشاركة في هذا البحث بكل حرية. أقر أن الباحثين أجابوا عن جميع أسئلتني وأنني أخذت

قراري بكل حرية وعن دراية تامة.

تم في بتاريخ.....

اسم و توقيع الباحث

.....

**APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES**

Annexe II : Fiche de renseignement des patients en insuffisance rénale
chronique terminale :

NOM :

PRENOM :

Sexe : F M

Date de naissance :

Lieu de naissance :

Antécédents familiaux

Consanguinité : Oui

Non

Inconnu

Pays d'origine du père :

Pays d'origine de la mère :

Fonction rénale actuelle:

créatininémie $\mu\text{mol/l}$, DFG:

ml/min

(CKD EPI ou MDRD)

Dialyse oui/non

Age :

Patient greffé oui/non

Si oui : âge

Si non, en attente de greffe oui/non

Greffe par donneur vivant apparentée oui/non

Apparentés néphropathie (joindre l'arbre généalogique)

ATCD :

Age des premiers symptômes:

Préciser les symptômes :

Anomalie morphologique rénale: oui/non

Si oui, préciser : néphrocalcinose, kystes, rein unique, hypoplasie...

**APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION (NGS) DANS LE
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES RÉNALES**

Hématurie microscopique oui/non

Protéinurie oui/non

Si oui,

tubulaire/glomérulaire/mixte

Syndrome néphrotique oui/non

Biopsie rénale faite? oui/non

Description : lésions vasculaire, tubulaire, glomérulaire, aspécifiques :

Atteinte extra-rénale oui/non

- Hyper uricémie ou goutte avant 35 ans ? oui/non

- Diabète/surdité/atteinte ophtalmologique/atteinte

cardiaque/dysmorphie/anomalies squelettiques, rotules

/déficience intellectuelle/épilepsie/anomalies génitales...)

Conclusion personnelle:

REFERENCES

- [1] Beate M. Crossley. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring, 2021 Nov;82(11):801–811
- [2] W. Richard McCombie,¹ John D. McPherson,² and Elaine R. Mardis³, Next-Generation Sequencing Technologies 2019 Nov 1;9(11):a036798.
- [3] Need AC, Shashi V, Hitomi Y, et al. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 2012;49:353–61. 10.1136/jmedgenet-2012-100819
- [4] Sobreira NL, Cirulli ET, Avramopoulos D, et al. Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene. *PLoS Genet* 2010;6:e1000991. 10.1371/journal.pgen.1000991
- [5] Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2014;59:5–15. 10.1038/jhg.2013.114
- [6] Pushkarev D., Neff N.F., Quake S.R. Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nat. Biotechnol.* 2009;27:847–850. doi: 10.1038/nbt.1561.
- [7] Thompson J.F., Steinmann K.E. Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2010;92:7.10.1–7.10.14. doi: 10.1002/0471142727.mb0710s92.
- [8] Konstantina Athanasopoulou, Michaela A. Boti , Panagiotis G. Adamopoulos * , Paraskevi C. Skourou and Andreas Scorilas

- Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics 2021 Dec 26;12(1):30.
doi: 10.3390/life12010030
- [9] Hengyun Lu , Francesca Giordano , Zemin Ning, Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly 2016 Sep 17;14(5):265–279 doi: 10.1016/j.gpb.2016.05.004
- [10] Goh, S. Y., et al. (2020). "Genetic basis of inherited kidney diseases: Implications for clinical practice." *Journal of Nephrology* 33(2): 219–229.
- [11] Kopp, J. B., et al. (2018). "APOL1 risk variants and chronic kidney disease." *Nature Reviews Nephrology*, 14(7): 379–394.
- [12] Levey, A. S., et al. (2019). "Genetic testing for kidney disease: Current state and future directions." *American Journal of Kidney Diseases*, 74(4): 457–467.
- [13] Shah, R., et al. (2020). "The impact of genetic testing in kidney disease diagnosis." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15(3): 351–358.
- [14] Kashtan CE, Alport Syndrome and Genetic Testing, *Kidney International Reports*, 2021
- [15] Cornec-Le Gall E et al., Genetic and Clinical Implications of NGS in PKD, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2018.
- [16] Zhou W et al., Advances in NGS for Tubulopathies, *Clinical Genetics*, 2019.
- [17] Ruf RG et al., NPHS2 Mutations in Steroid-Resistant Nephrotic

Syndrome, *Frontiers in Pediatrics*, 2018.

- [18] Groopman EE et al., Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease, *New England Journal of Medicine*, 2018.
- [19] Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, et al. "Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease" *New England Journal of Medicine*, 2019; 380:142–151.
- [20] Bullich G, Domingo-Gallego A, Vargas I, et al. "A Kidney-Disease Gene Panel Allows a Comprehensive Genetic Diagnosis of Cystic and Glomerular Inherited Kidney Diseases" *PLOS ONE*, 2018; 13(3): e0193276.
- [21] Connaughton DM, Hildebrandt F. "Exploring the Impact and Utility of Genomic Sequencing in Nephrology" *Clinical Kidney Journal*, 2022; 17(3): 362–371.
- [22] Lata S, Marasa M, Li Y, et al. "Diagnostic Yield of Next-Generation Sequencing in Patients With Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology" *Frontiers in Genetics*, 2019; 10:1264.
- [23] Smith AC, Kitching AR. The Role of Macrophages in Glomerular Inflammation. *Nature Reviews Nephrology*. 2020; 16:554–568. DOI: 10.1038/s41581-020-0290-6.
- [24] Gast C, Fakhouri F, Fila M, et al. Advancing Genetic Testing in Kidney Diseases: Report From a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *American Journal of Kidney Diseases*. 2024. DOI: 10.1053/j.ajkd.2024.01.002.
- [25] Sophie Greillier. Approche génomique des maladies rénales

- indéterminées malgré biopsie rénale. *Sciences du Vivant [q-bio]*. 2022. ffdumas-03828916
- [26] Otto, E. A., Tory, K., Attanasio, M., Zhou, W., Chaki, M., Paruchuri, Y., ... & Hildebrandt, F. (2009). *Nephrocystin-5 gene (IQCB1) mutations cause juvenile nephronophthisis, retinal degeneration and liver fibrosis. Nature Genetics*, 41(8), 887–892.
- [27] Boyer, O., Woerner, S., Yang, F., Oake, A., Bedoukian, E., & Lifton, R. P. (2011). *Mutations in the PAX2 gene in a cohort of North American patients with renal hypodysplasia: lack of evidence for a hypermutable site. Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(12), 4019–4026.
- [28] Bolar, N. A., Golzio, C., Živná, M., Hayot, G., Van Hemelrijk, C., Schepers, D., ... & Karet Frankl, F. E. (2016). *Heterozygous loss-of-function SEC61A1 mutations cause autosomal-dominant tubulo-interstitial and glomerulocystic kidney disease with anemia. The American Journal of Human Genetics*, 99(1), 174–187.
- [29] Karet, F. E., Finberg, K. E., Nelson, R. D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S. A., ... & Lifton, R. P. (1999). *Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. Nature Genetics*, 21(1), 84–90.
- [30] Bleyer, A. J., et al. (2022). *Genetic Etiologies for Chronic Kidney Disease Revealed through Next-Generation Renal Gene Panel. 2022;53(4):297–306. doi: 10.1159/000522226*

- [31] de Haan, A., et al. (2022). *Diagnostic Yield of Next-Generation Sequencing in Patients With Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology* 2019 Dec 13:10:1264. doi: 10.3389/fgene.2019.01264
- [32] Greillier, S. (2023). *Approche génomique des maladies rénales indéterminées malgré biopsie rénale*
- [33] Qin,D.(2019).
Next-generation sequencing and its clinical application.
Cancer Biology & Medicine, 16(1), 4-10.

RESUME

Introduction

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) constitue une avancée majeure dans le domaine du diagnostic génétique. Cette technologie de séquençage à haut débit permet une identification rapide et précise des mutations impliquées dans diverses pathologies, notamment les maladies rénales héréditaires. En néphrologie, l'application du NGS contribue à une meilleure compréhension des bases génétiques des néphropathies, facilitant ainsi un diagnostic précoce et une prise en charge personnalisée des patients.

Méthodologie

Cette étude vise à évaluer l'apport du NGS dans l'optimisation du diagnostic moléculaire des maladies rénales héréditaires et à analyser son impact sur la stratégie thérapeutique des patients atteints de néphropathies génétiques.

Nous avons recensé 51 adultes pris en charge au sein du CHU Hassan II de Fès et du centre d'hémodialyse Basma de Meknès, présentant une suspicion de néphropathie d'origine génétique, associée à des antécédents familiaux de maladies rénales.

Un arbre généalogique a été renseigné pour chaque patient, et des prélèvements sanguins ont été effectués sur tubes EDTA afin d'extraire l'ADN. Chaque patient ou son représentant légal a signé un consentement éclairé avant toute analyse génétique.

L'analyse génétique a été réalisée à l'aide d'un panel ciblé de 48 gènes associés aux néphropathies héréditaires.

Résultats

L'âge moyen des patients étudiés était de $39,25 \pm 15,8$ ans, avec une prédominance masculine (76,47 %). Une consanguinité était présente dans 29,41 % des cas. Les principaux signes cliniques relevés comprenaient une hypertension artérielle (47 %), une surdité (9 %), des troubles visuels (11 %) et une insuffisance rénale chronique (78,43 %).

L'analyse génétique est terminée pour 8 patients, tandis que l'examen des autres échantillons est en cours. Une mutation pathogène a été identifiée chez 27,7 % des patients testés, impliquant les gènes *UMOD*, *ATP6V1B1*, *IQCB1* et *PAX2*.

Conclusion

Le recours au NGS permet d'améliorer significativement le diagnostic des néphropathies héréditaires en augmentant le taux de détection des mutations pathogènes. Cette approche offre la possibilité d'une prise en charge personnalisée, adaptée aux spécificités génétiques des patients, et ouvre la voie à des stratégies thérapeutiques innovantes basées sur la médecine de précision.

ABSTRACT

Introduction

Next-generation sequencing (NGS) represents a transformative advancement in genetic diagnostics. This high-throughput technology enables the rapid and precise identification of mutations underlying a wide range of disorders, particularly hereditary kidney diseases. In nephrology, NGS has significantly enhanced the understanding of the genetic architecture of nephropathies, facilitating early detection and enabling tailored therapeutic interventions.

Methodology

This study aims to assess the role of NGS in refining the molecular diagnosis of hereditary kidney diseases and to evaluate its impact on treatment strategies for affected patients.

A total of 51 adult patients receiving care at Hassan II University Hospital in Fez and the Basma Hemodialysis Center in Meknes were included, all presenting with suspected genetically linked nephropathy and a family history of renal disease.

For each patient, a detailed pedigree was established, and blood samples were collected in EDTA tubes for DNA extraction. Informed consent was obtained from all participants or their legal representatives before proceeding with genetic analysis.

Targeted sequencing was conducted using a panel comprising 48 genes associated with hereditary nephropathies.

Results

The mean age of the study population was 39.25 ± 15.8 years, with a male predominance (76.47%). Consanguinity was observed in 29.41% of cases. The most frequently reported clinical manifestations included hypertension (47%), hearing impairment (9%), visual disturbances (11%), and chronic kidney disease (78.43%).

Genetic analysis has been completed for eight patients, while the remaining samples are still under evaluation. A pathogenic mutation was identified in 27.7% of the tested individuals, implicating the **UMOD**, **ATP6V1B1**, **IQCB1**, and **PAX2** genes.

Conclusion

The implementation of NGS has substantially improved the diagnostic yield for hereditary nephropathies by increasing the detection rate of pathogenic mutations. This approach not only facilitates precision medicine by enabling patient-specific management but also paves the way for the development of innovative therapeutic strategies tailored to individual genetic profiles.