

Diagnostic génétique des anémies complexes

13e Journée nationale de la filière MCGRE 11 mars 2022

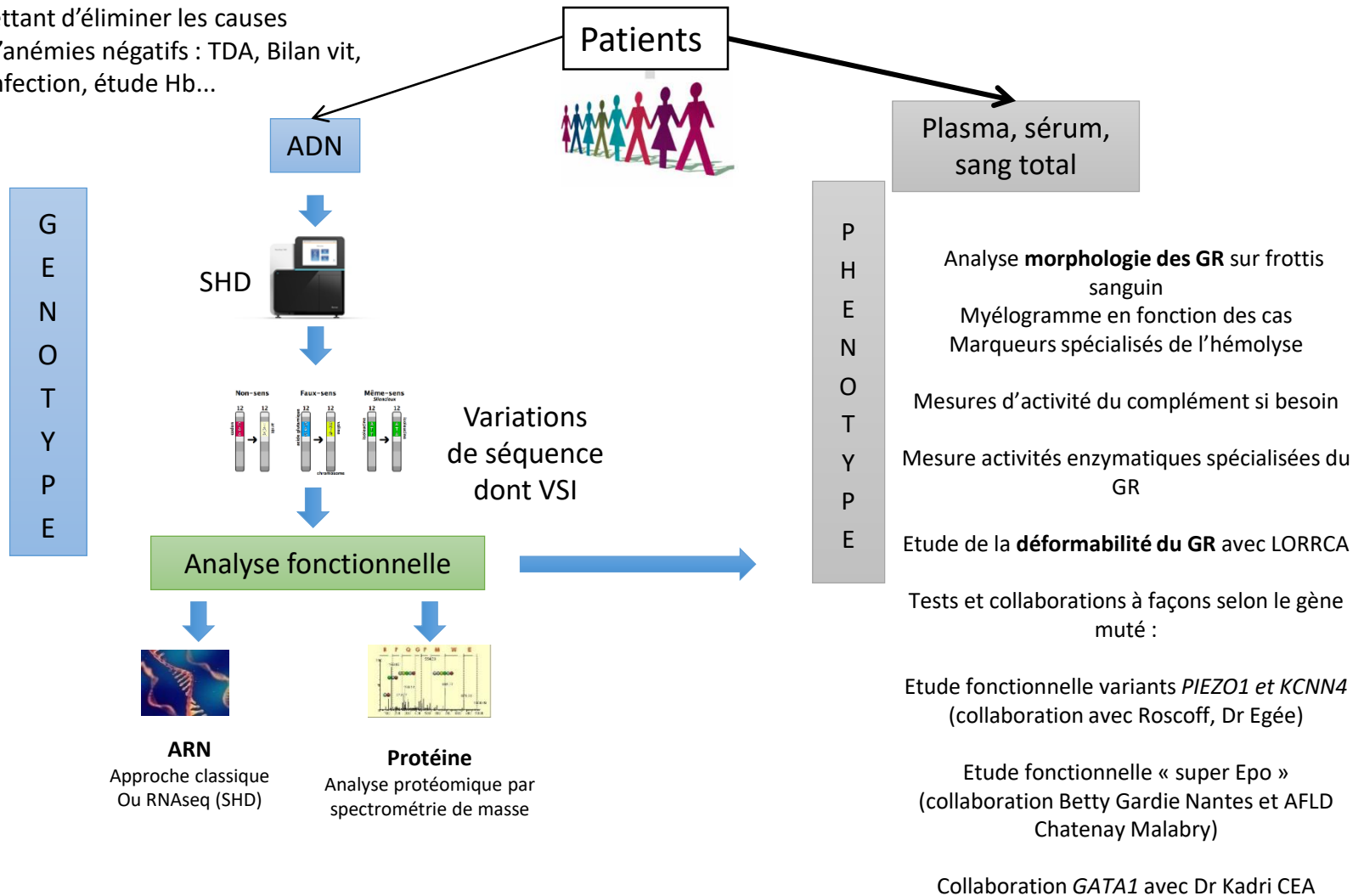
Lamisse Mansour-Hendili

Département de génétique Hôpital Henri Mondor Créteil

Stratégie diagnostique des anémies complexes

Interrogatoire ++

Tests permettant d'éliminer les causes courantes d'anémies négatifs : TDA, Bilan vit, G6PD, PK, infection, étude Hb...



La génétique? Pour qui? Pourquoi?

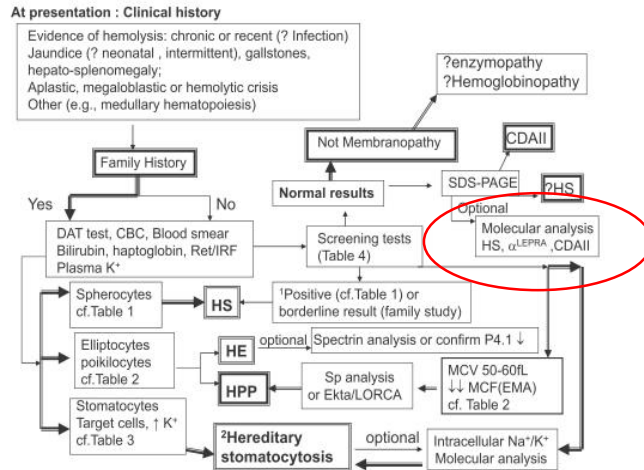
- La génétique vient en confirmation ou complément de certains diagnostics phénotypiques clairs

Exemples : affirmer le type de déficit pour G6PD, rechercher des polymorphismes modulateurs pour la drépanocytose, rechercher une alpha thalassémie associée, rechercher des variants complexes Hb...)

- **Indispensable :**

- En cas de **DPN (conseil génétique)** il faut connaître la mutation pour effectuer le DPN
- Si transfuso-dépendance (tests phénotypiques ininterprétables)
- Nouveau-né
- Devant cas complexe avec tests phénotypiques ininterprétables
 - Par exemple association de plusieurs maladies du GR : S/S + DHSt, elliptocytose beta tha majeure + DHSt ; ovalocytose mélanésienne + DHSt + déficit en G6PD...

Stratégie diagnostique suivant King *et al* 2015

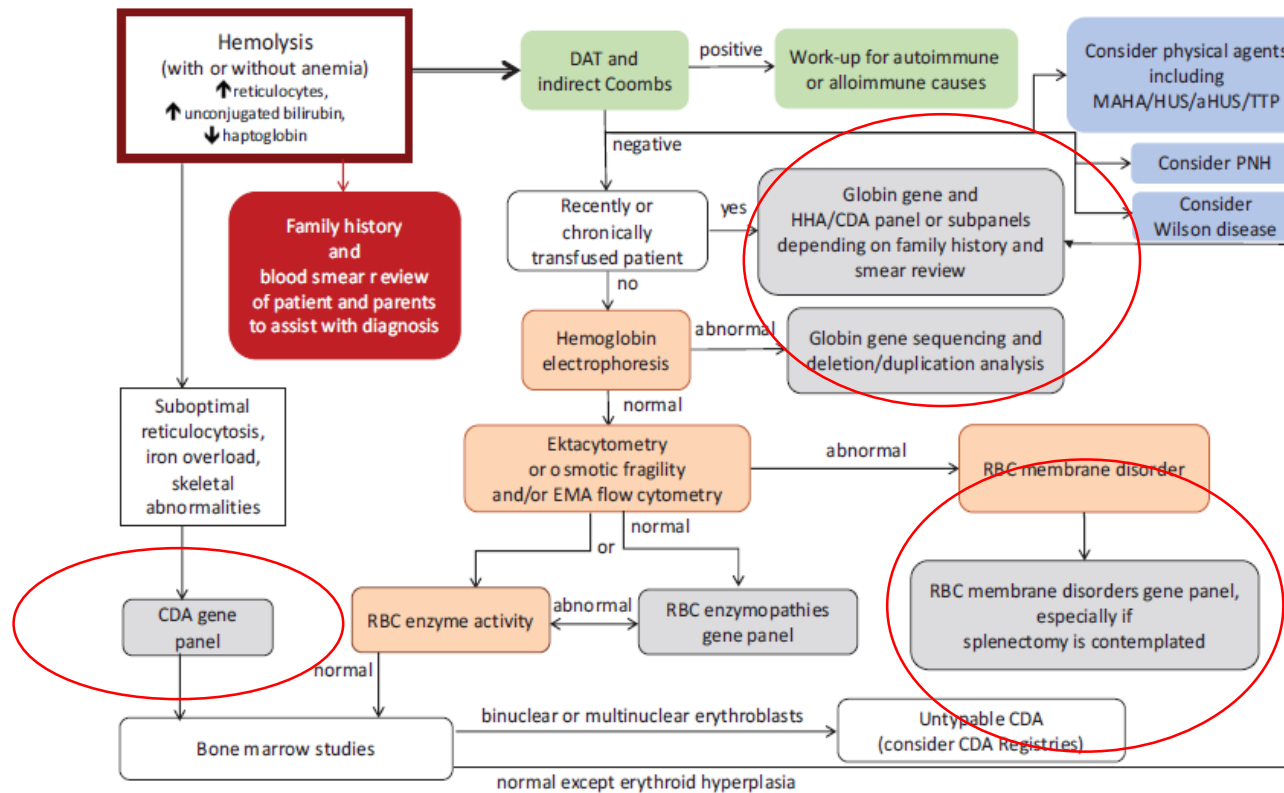


Aujourd'hui elles tendent à être modifiées en replaçant la génétique plus haut dans l'arbre diagnostique

Figure 6. Diagnostic flow chart for HS, HE, and HSt. ¹Exclusion of CDAII when test results are within in HS but the patient's clinical presentation is not typical of HS. Exclusion of hemoglobinopathy (e.g. unstable Hb) when the test result is mildly HS-like for a patient whose MCV is < 65 fL and the blood smear shows anisocytosis and poikilocytic red cells. ²: exclusion of HS.

Recommandations de 2015 avant ère « genomics » où le diagnostic génétique n'était réservé qu'à certains cas très limités

Stratégie diagnostique suivant Kalfa 2021



En 2021 les
panels NGS ont
plus de place

**Le phénotype est indispensable avant le test génétique
pour orienter et également après le résultat pour
confirmer ce dernier.**

Techniques de biologie moléculaire utilisées

- **Techniques classiques, bas débit**

- Séquençage Sanger
- Recherche de grands réarrangements
- Recherche de mutations ciblées

- **Techniques dites “haut débit” = NGS = next generation sequencing ou SHD = séquençage haut débit**

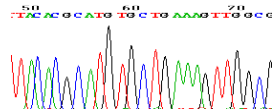
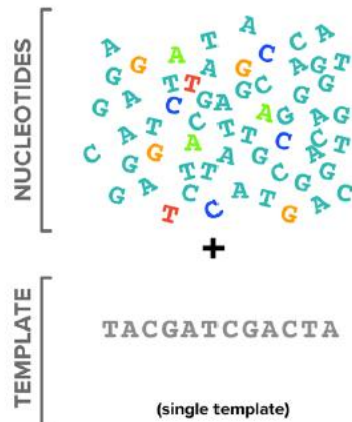
- Explore plusieurs gènes simultanément, ce n'est plus du séquentiel mais du simultané
- On parle de panels de gènes ciblés sur telle ou telle pathologie (arbres ANPGM, CDA, membrane du GR, enzymopathies, liste minimale de gènes étudiés)
- Capture exomique voire du génome entier (PFMG 2025 préindications de la filière MCGRE)



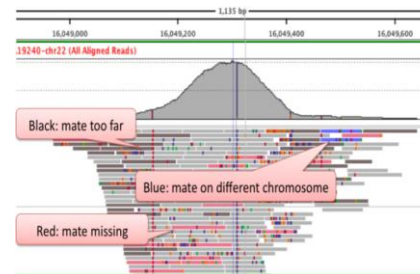
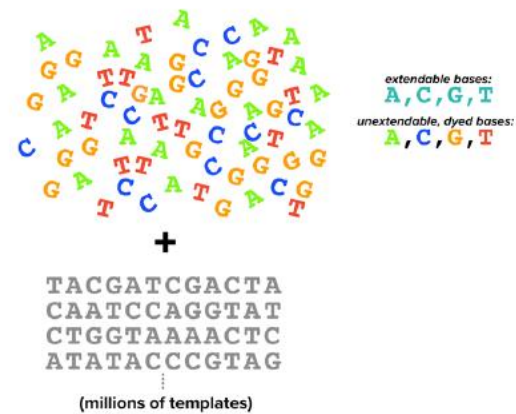
Qu'est ce que le NGS ou SHD?

Curr Genet Med Rep (2015) 3:158–165

SANGER:

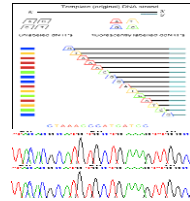


NGS:

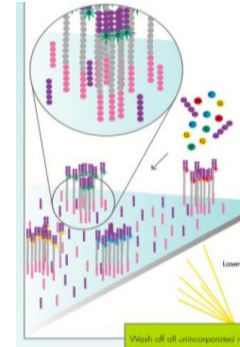


Bref Historique

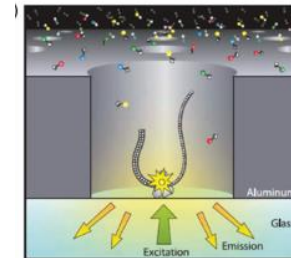
Séquençage 1^{ère} génération
1975-1977
Sanger



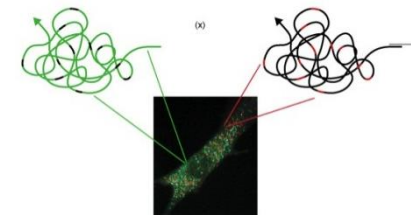
Séquençage 2^{ème} génération
2005
Next **G**eneration **S**equencing
Roche, **I**llumina, Ion Torrent



Séquençage 3^{ème} génération
2009
Single **M**olecule **S**equencing
Pas d'amplification
Oxford nanopore, Pacific biosciences



Séquençage 4^{ème} génération
Séquençage NGS *in situ* (dans un tissu directement
par exemple des ARNs). Single cell RNA Seq
« Tissue expression profile » + puissance du NGS



Workflow : de l'ADN aux résultats



Préparation de
la « library »

adaptateurs, codes-barres,
purification, quantification,
pool

Capture

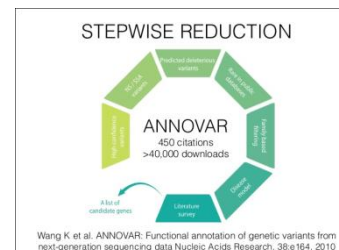
ou

Amplicons

Séquençage

Données
brutes .bcl
→ fastQ

Alignement et
analyse
interprétative

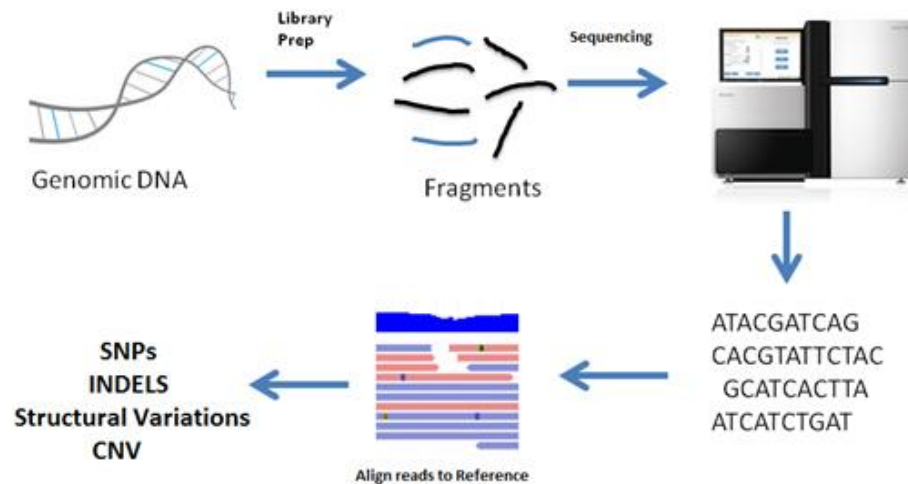


Applications

- ADN
 - Targeted resequencing
 - Exome
 - Génome
- ARN
 - RNAseq
- Mosaïcisme
 - Mutations somatiques en oncologie



Place du Whole genome sequencing



Toute l'information
généétique nucléaire
Régions codantes (2%) et
non codantes (98%)

Plan France Medecine Génomique 2025

- Développer une filière nationale de médecine génomique et intégrer le STHD dans le parcours de soin.
- Pré-indication MCGRE - Maladies constitutionnelles du GR en impasse diagnostique :
 - anémie ou hémolyse inexpliquée
 - polyglobulie vraie idiopathique
- Exemple des cas pédiatriques ou adulte en errance diagnostique
- Résolution d'un cas pédiatrique syndromique grâce au WGS en 2020 →
- Publication d'une lettre en 2021 dans l'AJH

Spécificités du diagnostic génétique

- Régi par une législation stricte en France qui définit les bonnes pratiques relatives à cet exercice
 - *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*
 - [JORF n°0130 du 7 juin 2013](#)
 - *Section 1 : Examen des caractéristiques génétiques d'une personne et identification par empreintes génétiques à des fins médicales (Articles R1131-1 à R1131-20-5) Sous-Section 6 : Conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle (Articles R1131-20-1 à R1131-20-5)*
 - *loi de bioéthique n°2021-1017 du 2 août 2021*
- Nécessite un **consentement éclairé du patient** (doit être conservé dans dossier patient), envoi **attestation de recueil de consentement au laboratoire** avec **informations clinico-biologiques complètes +++** (histoire familiale ++)
- Résultat est **remis au médecin prescripteur qui seul a le droit de rendre ce résultat au patient dans le cadre d'une consultation dédiée**
- Le patient **doit informer ses apparentés** (note relative à l'information à la parentèle), si ne peut pas ou ne veut pas l'équipe médicale peut s'en charger dans des conditions strictement définies

Spécificités du diagnostic génétique

- Parfois après le résultat, **besoin d'explorations complémentaires** pour affirmer le caractère pathogène ou non des variations génétiques retrouvées :
- **Analyse génétique complémentaire** : ddPCR, Q-PCR, LR-PCR, panel plus étendu de genes si consentement le permet
- **Étude de la ségrégation familiale** (ADN parents, fratrie, enfants si majeurs, pour les mineurs apparentés possible si symptomatique ou si analyse est indispensable pour l'intérêt familial...)
- **Etude de transcrits** (exemple tubes Paxgene pour ARN, disponible sur demande aux labos de génétique)
- **Prélèvement autres tissus que le sang** peut également être demandé : bulbes capillaires, biopsie de peau etc etc pour affirmer le caractère constitutionnel ou non d'un variant
- **Tests phénotypiques spécialisés complémentaires** : parfois au cas par cas et gène dépendant (test fonctionnel *PIEZO1* ou *KCNN4*, exploration complément,...), LORRCA, courbe de densité GR...

Spécificités du diagnostic génétique

- Avoir conscience que **le délai peut être long car interprétation complexe**
 - Avec l'apogée du NGS de plus en plus de VSI → besoin ++ étude fonctionnelle et tests complémentaires au cas par cas
- Une **réanalyse à posteriori** selon avancées de la science peut permettre de mettre en évidence une nouvelle cause génétique alors inconnue

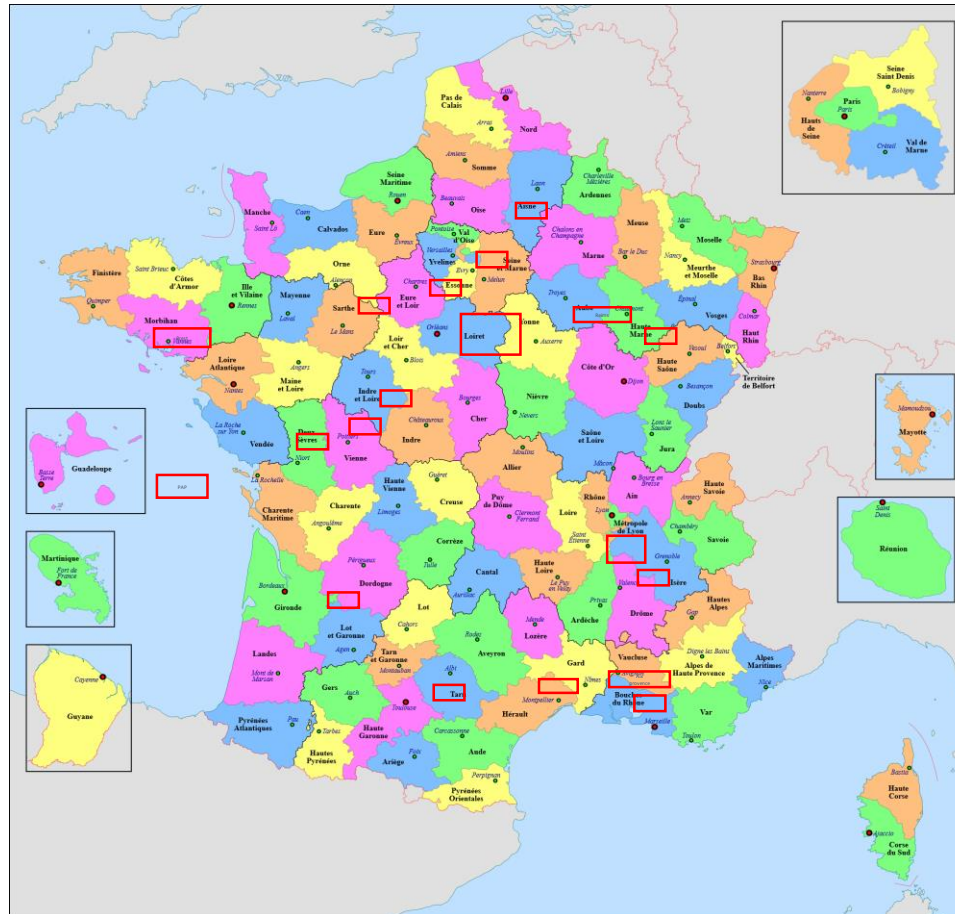


Spécificités du diagnostic génétique

Un résultat de génétique est rendu à un moment donné avec les **limites liées à l'état actuel des connaissances scientifiques et médicales** et les **limites liées à la technologie utilisée et aux outils d'analyse**

Réseau de laboratoires de la filière MCGRE

<https://filieremcgre.fr/wp-content/uploads/2019/06/Laboratoires-francais-impliques-dans-le-diagnostic-des-pathologies-de-la-filiere-de-sante-MCGRE.pdf>



Partout en France
Plusieurs centre
d'expertise
Ne réalisent pas tous
les mêmes analyses
Tableau sur site de la
filière

Site orphanet pour
analyses spécialisées

Les RCP dans la filière MCGRE

- Plusieurs types de RCP sont en place dans la filière MCGRE, diagnostique et/ou thérapeutique
- Différents périmètres géographiques (de locales à nationales, voire internationales).
- Ces RCP sont destinées à tout médecin impliqué dans la prise en charge de patients atteints de maladies rares couvertes par la filière MCGRE (voir la [liste des pathologies](#)) sur le territoire national (métropole et outre-mer).

Les RCP dans la filière MCGRE

Cas des RCP nationales

- Filière MCGRE pour anémies complexes 2 RCP nationales où sont discutés aussi les inclusions en WGS
- RCP GR zone Sud Lyon (1x/mois)
- RCP GR Zone Nord Créteil (2x/mois)
- Accessibles à distance via Shareconfre

Merci de votre attention

Merci à la filière MCGRE

Merci aux patients et à l'ensemble des prescripteurs