



# SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT ÉRYTHROCYTAIRE

Pr Lydie Da Costa

Hématologie Biologique

Hôpital Bicêtre/Paul Brousse

Université Paris Saclay

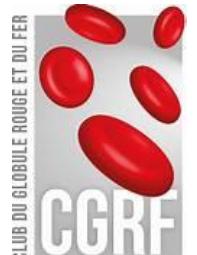
U1170, IGR



université  
PARIS-SACLAY

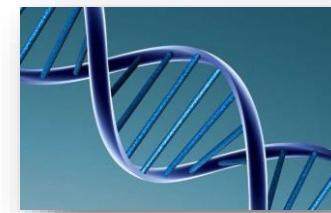


MC GRE  
FILIÈRE SANTÉ MALADIES RARES



# QU'EST CE QUE LE SHD ?

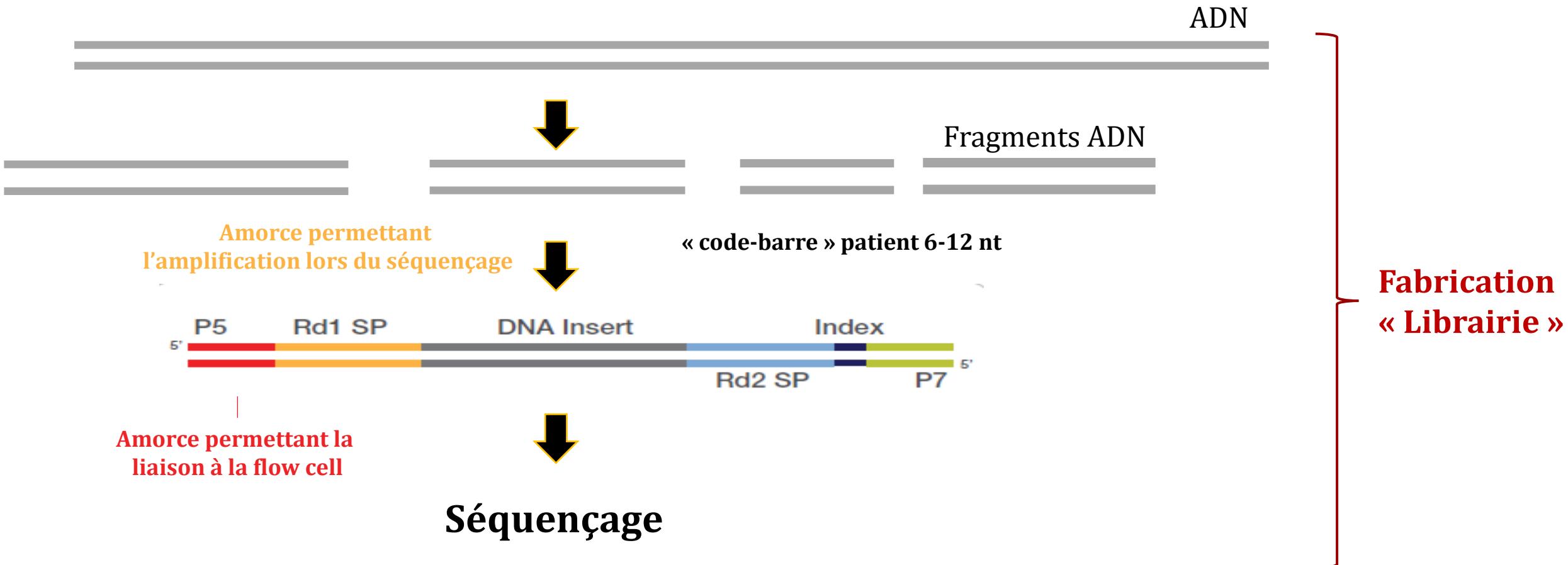
## TECHNIQUES



- SHD = séquençage haut débit (NGS, WES, WGS)
- Depuis 2008 *Bentley et al, Nature, 2008; Ng.S.B et al, Nature 2009*, vraiment en routine hospitalière en 2015
- Systèmes (séquenceurs et logiciels) capables d'analyser des millions voire des milliards de réactions de séquences du génome humain simultanément :
  - Gain en nombre d'informations recueillies
  - Gain de temps
  - Moins coûteux
- Nombreux séquenceurs et technologies, certaines étapes communes :
  - La préparation d'une librairie
  - Un séquençage
  - Des logiciels permettant la lecture et l'analyse des données (problème de stockage et exhaustivité des données)

Des nouveaux métiers : ingénieurs de plateforme, bioinformaticiens  
Evolution des techniciens dans leur métier

# FABRICATION DE LA LIBRAIRIE



- **Hybridation des amorces universelles** pour l'amplification et des séquences pour l'accrochage sur la flowcell
- **Indexation des patients**
  - **Index** : séquence courte qui permet d'identifier l'ADN d'un patient comme un code-barre, permettant l'analyse de plusieurs patients en même temps

# LE PRINCIPE DE LA CAPTURE SÉQUENCE

1. *La première fois on goutte à tous les bonbons*



Tous les patients à dépister (24-96)  
Tout l'ADN génomique de ces patients  
fragmenté et étiqueté

2. *Ensuite on ne prend que les bonbons « watermelon »*



La capture de séquences = ciblages des régions d'intérêt

3. *On ne va manger que les « watermelon »*



# LE SÉQUENÇAGE

Librairie prête à être séquencée

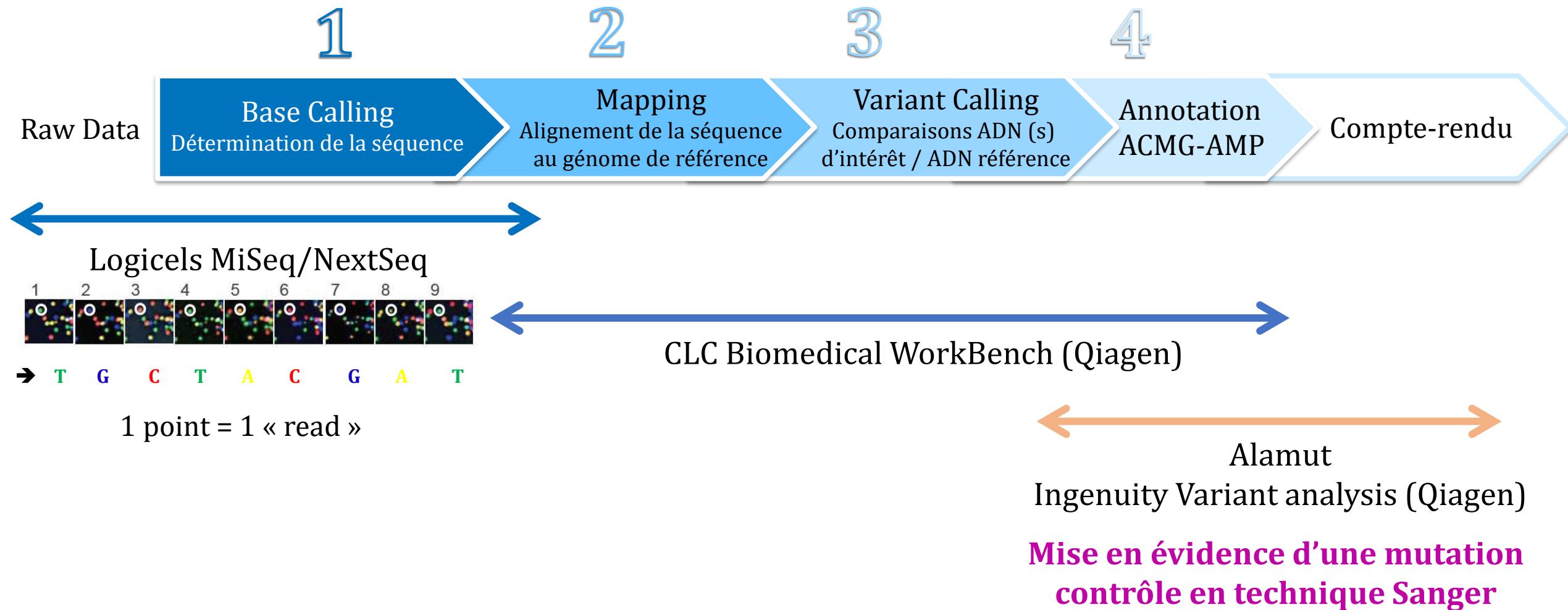
Séquençage sur séquenceur Illumina®

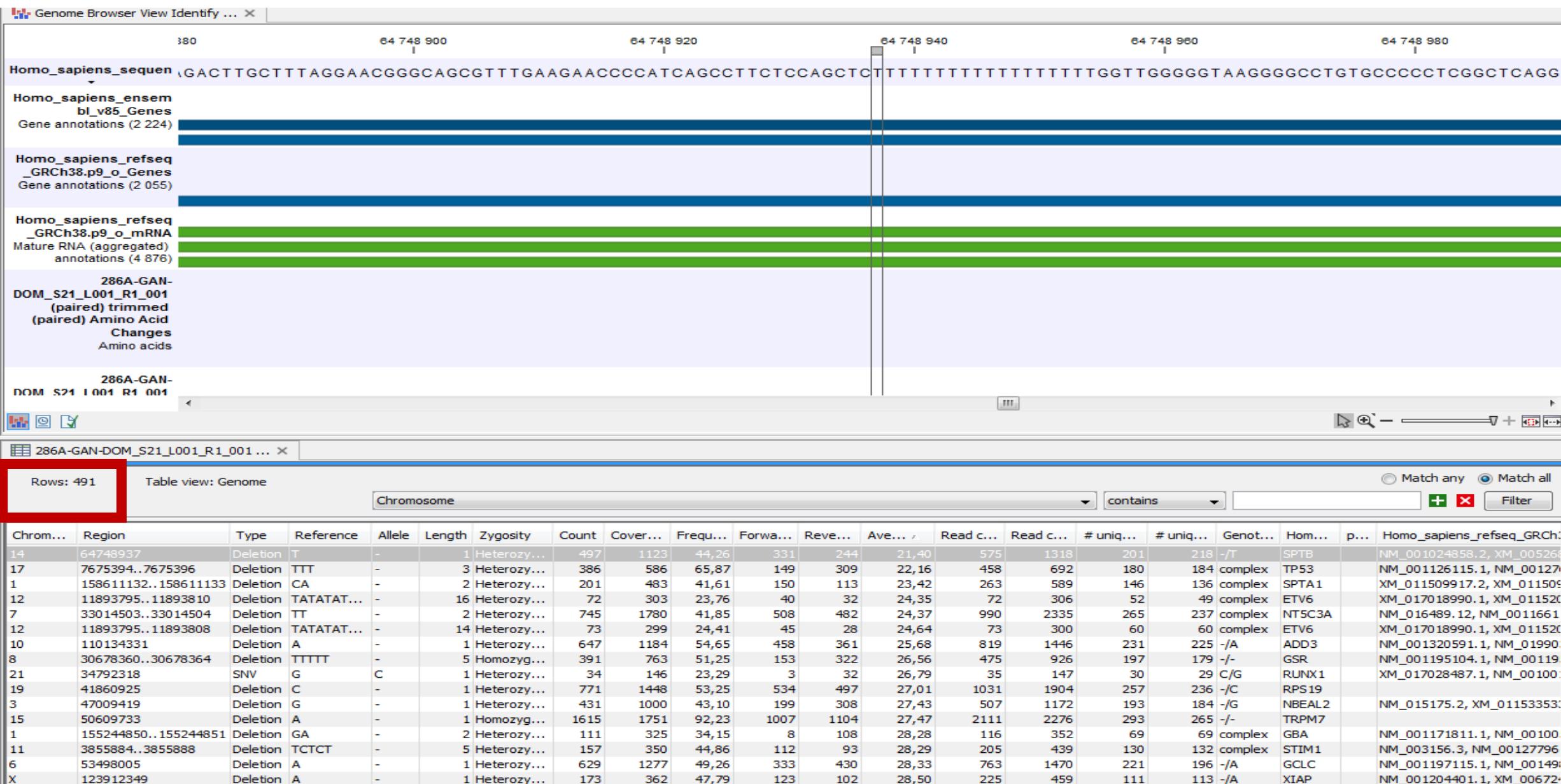
ADN simple brin : en milieu dénaturant (NaOH) et sur glace pour que l'ADN reste simple brin



# ANALYSE DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE

Géré par l'utilisateur







Comptage des Reads : nb bases lues 100X en moyenne (couverture minimum 30X) CLC Biomedical Workbench (Qiagen)

# ANNOTATION DES VARIANTS

- **Recommandations ACMG-AMP** *Richards et al., Genet Med, 2015; Amendola et al., Am J Hum Genet 2016*
- **L'interprétation finale reste à la seule appréciation et responsabilité du biologiste médical**
- **L'interprétation est toujours effectuée en fonction de l'état actuel des connaissances et des informations disponibles et repose sur :**
  - Des bases de données épidémiologiques (1000 génomes, ExAC, GnomAD, ...)
  - Des bases de données patients (ClinVar, HGMD, LOVD,..)
  - Données structurales – nature du variant
  - Prédictions bio-informatiques (Sift, polyphen, mutation taster, ...)
  - Données bibliographiques – attention !
  - Critères cliniques et généalogiques / donnés de ségrégation
  - Données fonctionnelles
- **L'interprétation des résultats repose sur un faisceau d'arguments qui ont un poids plus ou moins important :**
  - PVS = argument très fort (very strong)/PS = fort (strong)/PM = moyen (moderate)/PP = faible (supporting) en faveur de la pathogénicité
  - BA = argument fort/BS = faible en faveur du caractère bénin
- **L'interprétation des résultats consiste à combiner ces arguments pondérés et permet d'assigner une des 5 classes à un variant identifié :**
  - **Classe 1 = variant bénin**
  - **Classe 2 = variant probablement bénin**
  - **Classe 3 = variant de signification inconnue (études fonctionnelles complémentaires/ségrégation familiale)**
  - **Classe 4 = variant probablement pathogène**
  - **Classe 5 = variant pathogène**



**PRÉAMBULE  
INDISPENSABLE À  
TOUTE MISE EN PLACE  
D'UN SÉQUENÇAGE  
SHD – “ANÉMIE”**

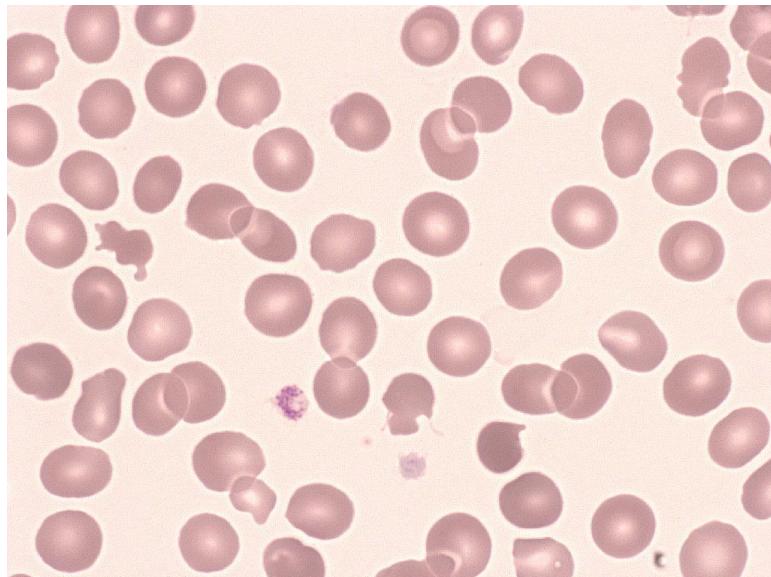
# PLACE DU DÉPISTAGE MOLÉCULAIRE DANS LES PATHOLOGIES ÉRYTHROCYTAIRES : QUAND LE PRATIQUER ?

- Se référer aux PNDS
- Se référer aux *guidelines*

- Obligatoire dans les défauts de l'érythropoïèse : anémie de Blackfan-Diamond, CDA
- Forme sévère transfusion-dépendante de façon rapprochée : bilan ektacytométrique ou autre test fonctionnel impossible
- Forme à révélation anténatale
- Forme à révélation néonatale
- Discordance EMA/EKTA pour la sphérocytose héréditaire
- Obligatoire dans le cas de suspicion de xérocytose héréditaire
- Avant splénectomie : éliminer une xérocytose héréditaire, risque de thromboses gravissimes voire mortelles, si splénectomie réalisée en cas de xérocytose méconnue
- Doute diagnostique
- Suspicion d'association de plusieurs pathologies érythrocytaires



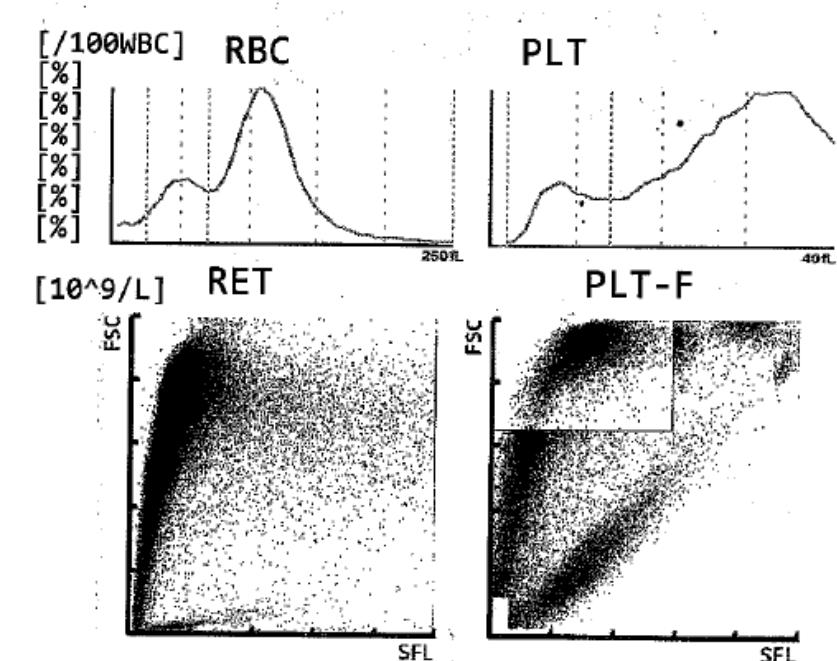
## Importance des données cytologiques



### Analyse des indices érythrocytaires et réticulocytaires

GB	14,32 G/L	(6,2-17,1)
GR	5,88 T/L	(3,78-6,17)
Hb	20,7 g/dL	(13,1-21,9)
Ht	55,7 %	(39,2-62,7)
VGM	94,7 fL	(92-112)
TCMH	35,2 pg	(32-39)
CCMH	<b>37,2 g/dL</b>	(31,5-36,5)
RET	7,02 %	
	<b>412,8 G/L</b>	
PLA	96 G/L	(150-450)

### Graphes issus des analyseurs d'Hématologie cellulaire



1

Toute analyse moléculaire doit venir à la **TOUTE FIN de l'analyse phénotypique clinique et biologique**, même si les prélèvements pour analyse moléculaire ont été réalisés

---

1

Toute analyse moléculaire doit venir à la **TOUTE FIN de l'analyse phénotypique clinique et biologique**, même si les prélèvements pour analyse moléculaire ont été réalisés

2

Les analyses moléculaires doivent être confirmées par les études de ségrégation familiale et les tests fonctionnels permettant de valider les variants identifiés (surtout les *VUS*)



*Importance du respect  
des LBMR*

1

Toute analyse moléculaire doit venir à la **TOUTE FIN de l'analyse phénotypique clinique et biologique**, même si les prélèvements pour analyse moléculaire ont été réalisés

2

Les analyses moléculaires doivent être confirmées par les études de ségrégation familiale et les tests fonctionnels permettant de valider les variants identifiés (surtout les *VUS*)



*Importance du respect  
des LBMR*

3

#### **Attention aux risques de dérives !**

- 2 voire plusieurs résultats rendus pour le même patient ... et pas toujours avec la même conclusion !
- Des analyses fonctionnelles en nombre excessif pour valider des variants (*VUS*) en cas de dépistage moléculaire réalisé en premier : embolisation des laboratoires diagnostiques !
- Le moléculaire qui l'emporte par rapport au fonctionnel

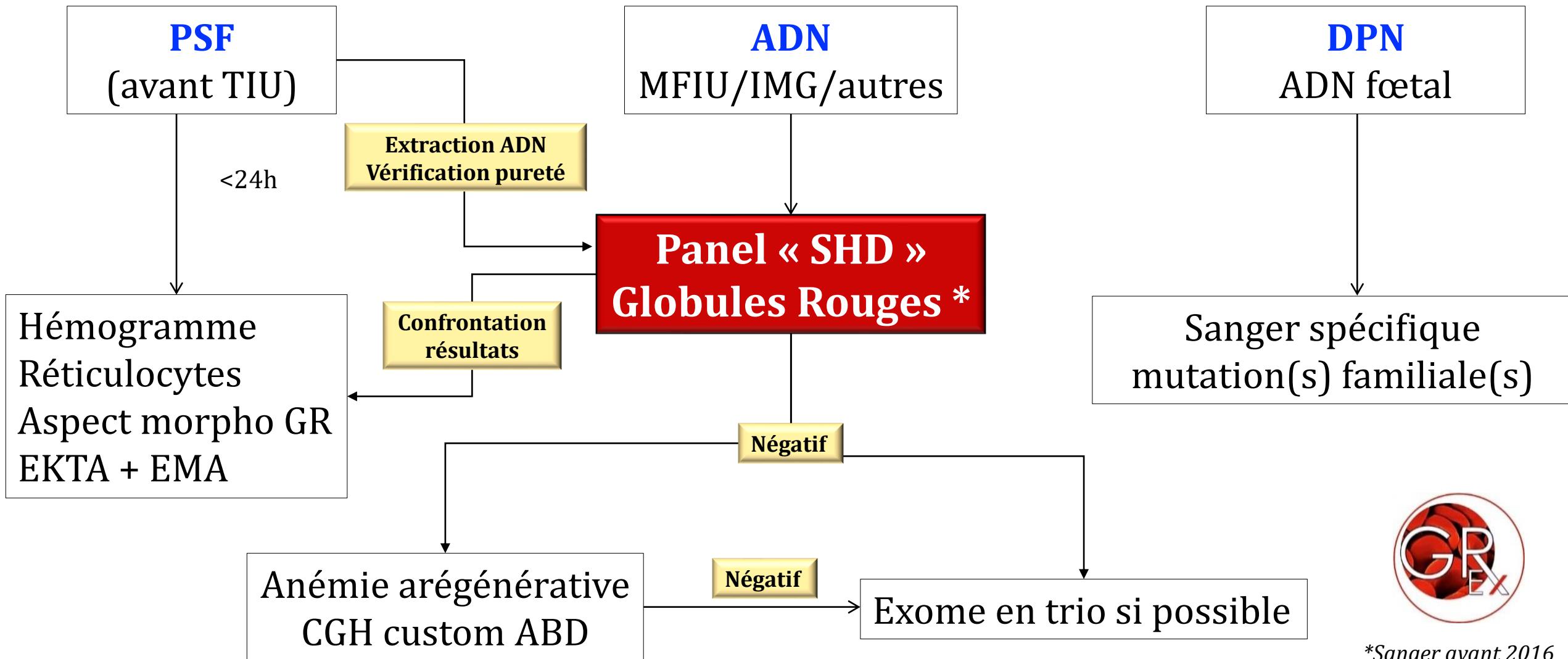


# **APPORT DU NGS DANS LE DIAGNOSTIC DES ANÉMIES RARES**

## **EXPÉRIENCE HÉMATOLOGIE BIOLOGIQUE, HÔPITAL BICÊTRE**

# PRISE EN CHARGE DES PRÉLÈVEMENTS FŒTAUX

## Hydrops fetal – Contexte anémie fœtale inexpliquée

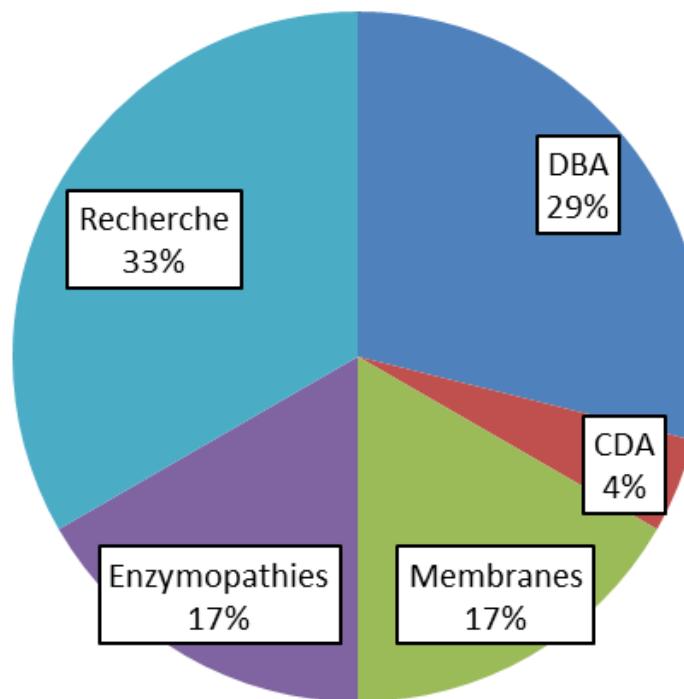


Depuis janvier 2017

## Targeted-NGS

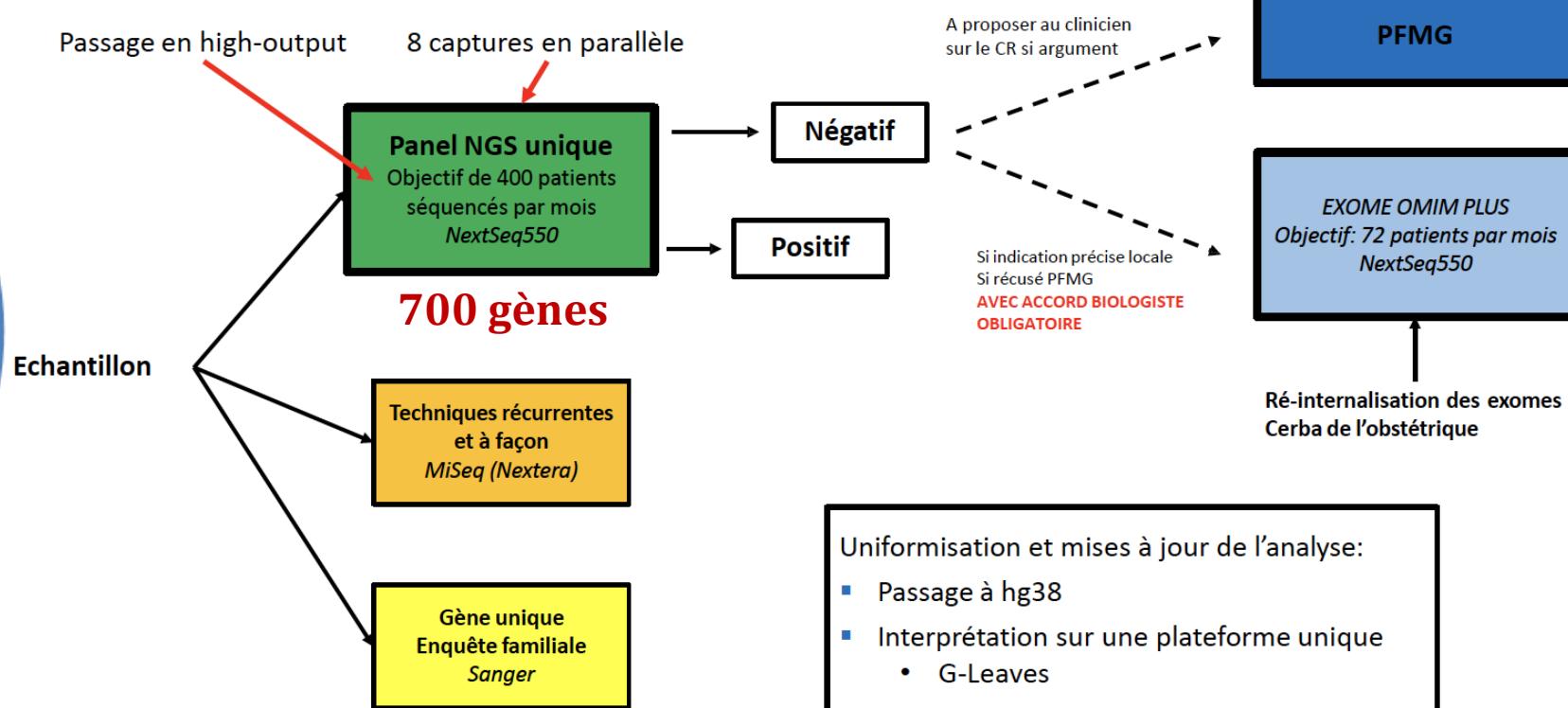
Panel 104 gènes

« Globules Rouges »



## Nouvelle organisation (BCT) - Pr J. Bouligand

### Proposition



Courtoisie Pr J. Bouligand

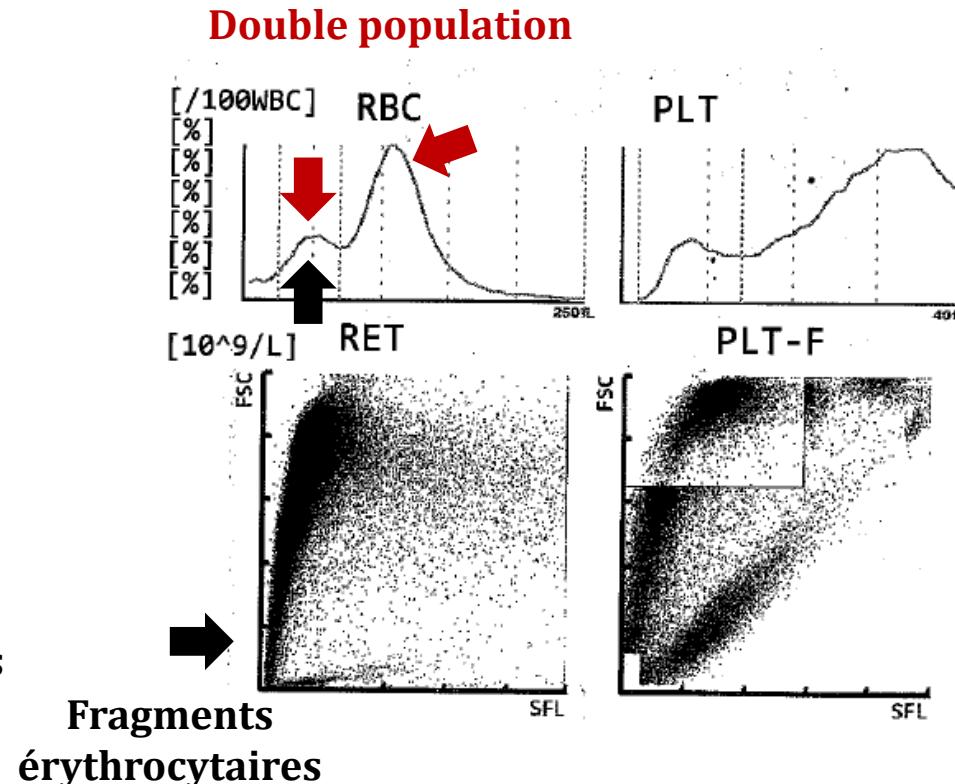
- Anémie de Blackfan-Diamond : 40 gènes*
- Dysérythropoïèses congénitales : 15 gènes*
- Anémies sidéroblastiques : 6 gènes*
- Pathologies de la membrane du GR : 43 gènes*

# CAS CLINIQUE K., HOSPITALISATION À J3 POUR ICTÈRE NÉONATAL

## Hémogramme & frottis sanguin

GB	14,32 G/L	(6,2-17,1)
GR	5,88 T/L	(3,78-6,17)
Hb	20,7 g/dL	(13,1-21,9)
Ht	55,7 %	(39,2-62,7)
VGM	94,7 fL	(92-112)
TCMH	35,2 pg	(32-39)
CCMH	<b>37,2 g/dL</b>	(31,5-36,5)
PLA	96 G/L	(150-400)
RET	7,02 % <b>412,8 G/L</b>	(170-323)

Hyperchromie  
Fausse thrombopénie = amas plaquettaires  
Réticulocytose → Hémolyse compensée



### Découverte fortuite d'elliptocytose

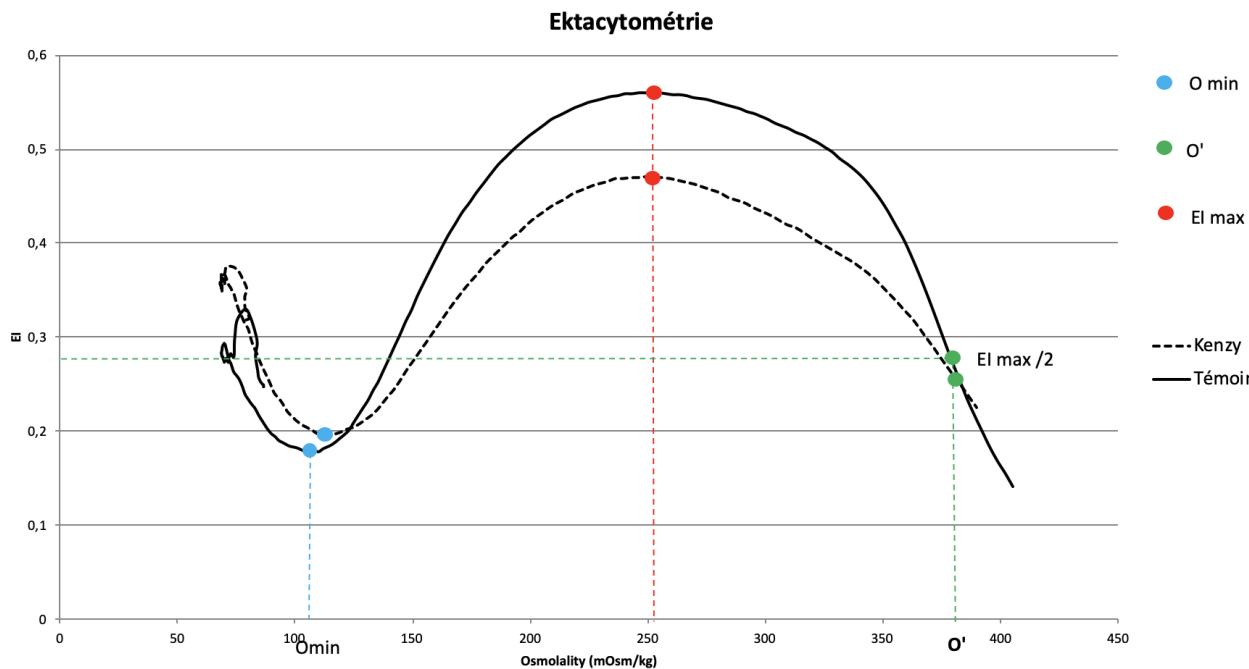
EH non sévère avec une poïkilocytose du nouveau-né ? EH sévère ?

- Ektacytométrie
- Biologie moléculaire



Poïkilocytose  
Polychromatophilie  
Fragments GR  
Microsphérocytes  
Elliptocytes

# Ektacytométrie



El max : ↓

O' / Point hyper: normal

Omin : normal

Très léger aspect trapézoïdal.

Curbe ektacytometrie anormale compatible avec une elliptocytose héréditaire.

# Bilan moléculaire

Présence d'une duplication hétérozygote de 3 NT au sein de l'exon 4 du gène *SPTA1*

Gène *SPTA1* (NM\_003126.3) : rs757679761  
**c.460\_462dup - p.(Leu155dup)**

Recommandations de l'ACMG-AMP : variant probablement bénin **classe 2 !!! À passer en 5** ; ClinVar (RCV000598724.1 et RCV000013700.19) : variant rapporté pathogène. Identifiée chez plusieurs de nos patients atteints d'elliptocytose héréditaire dans notre cohorte.

Polymorphisme alpha-LELY à l'état hétérozygote au sein de l'exon 40 et intron 45 (Alpha V/41 polymorphism)

Gène *SPTA1* (NM\_003126.3)

**c. 5572C>G - p.(Leu1858Val)**

rs3737515, ClinVar RCV000247499.1

**c.6531-12C>T - p. ?**

rs28525570, ClinVar RCV000249337.1

« Low-expression allele, Lyon »

Delaunay J, Dhermy D. Semin Hematol. 1993;30(1):21-33.)

# GÈNE *SPTA1* (NM\_003126.3)

## Exon 4

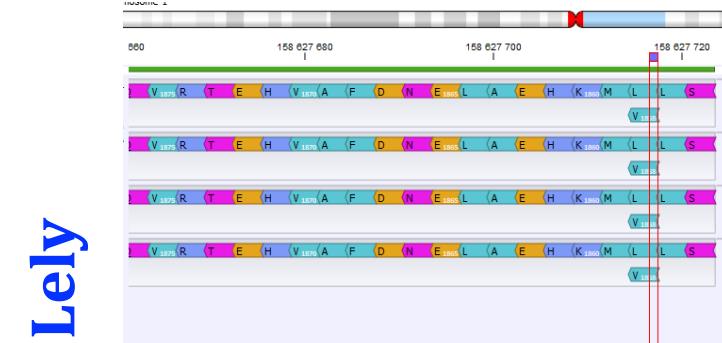
rs757679761

c.460\_462dup - p.(Leu155dup)



## Exon 40

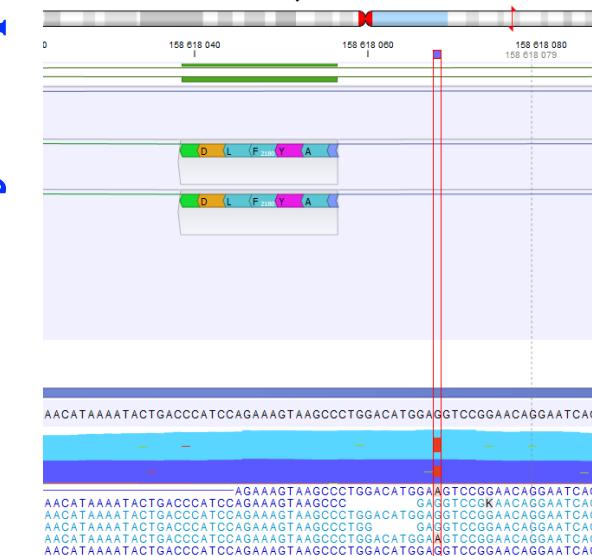
rs3737515, c.5572C>G - p.(Leu1858Val)



Polymorphism alpha Lely

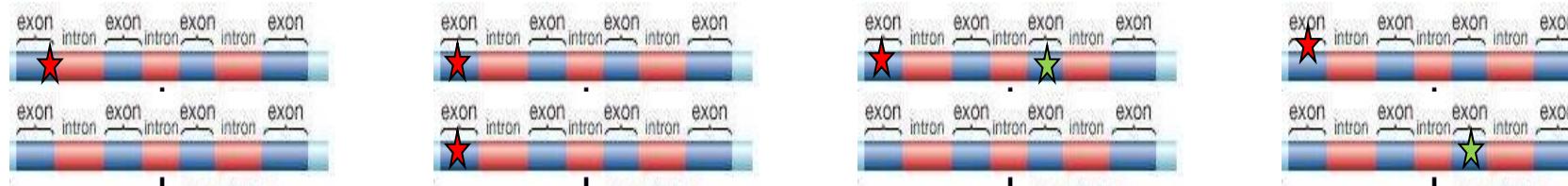
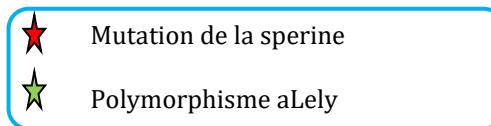
## Intron 45

rs28525570, c.6531-12C>T - p.?



# RECHERCHE DU VARIANT ALPHA-LELY

## *α LELY LOW EXPRESSION ALLELE FROM LYON*



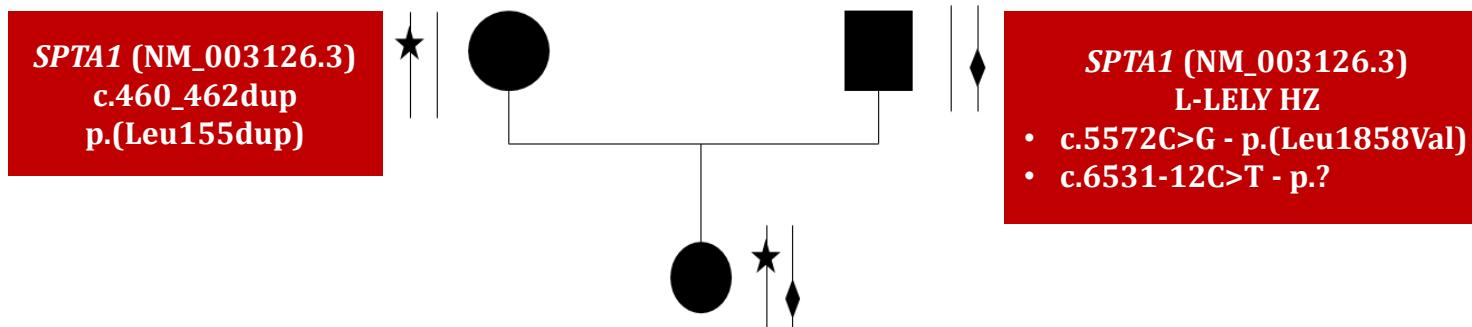
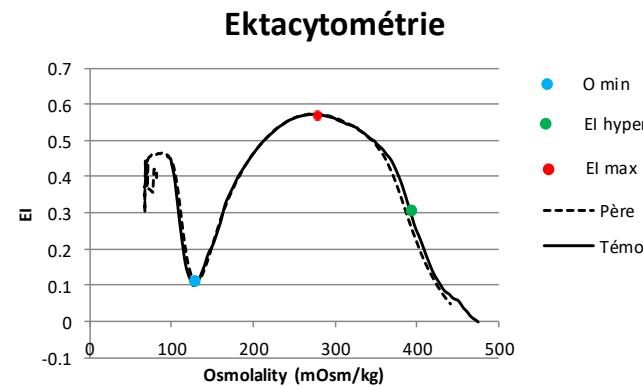
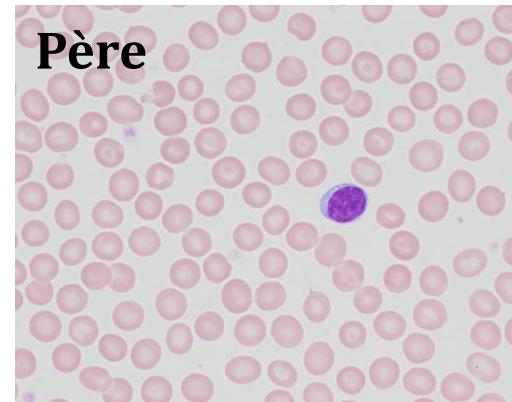
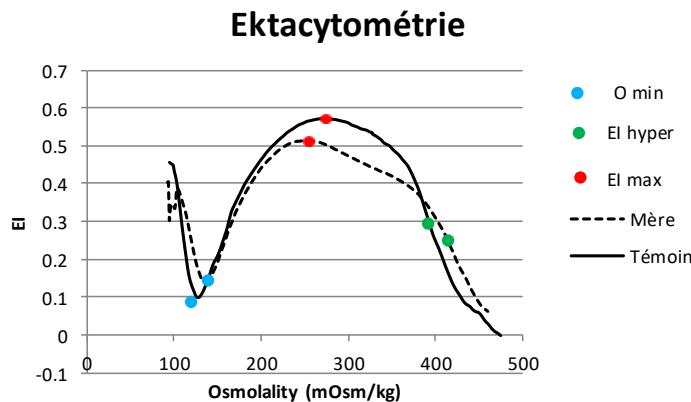
**L'α-LELY est une combinaison de deux mutations liées (exon 40 et intron 45) sur le gène de l'α-spectrine (SPTA1)**

- Mutation de l'exon 40 : la transition G> C conduit à la modification de l'acide aminé p.Leu1857Val
- Mutation de l'intron 45 : transition C>T à 12 nucléotides du site d'épissage 3 ' de l'exon 46.

→ Perte dans 50% des cas de l'exon 46 dans l'ARNm de la spectrine α,  
ce qui empêchera la protéine issue de l'allèle α - LELY de se dimériser

- Ce polymorphisme est responsable de la faible expression de l'allèle
- Le polymorphisme est complètement asymptomatique chez les hétérozygotes
- Mais également à l'état homozygote, en raison du grand excès de 3 à 4 fois des chaînes d'α-spectrine
- Mais quand **α LELY est associé *en trans* à une mutation du gène de la spectrine α, les formes de la spectrine mutée augmentent et sont responsables du phénotype PPH**

# ETUDE FAMILIALE INDISPENSABLE – ETUDE DE LA SÉGRÉGATION FAMILIALE – HÉMOGRAMME – EKTACYTOMÉTRIQUE – BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

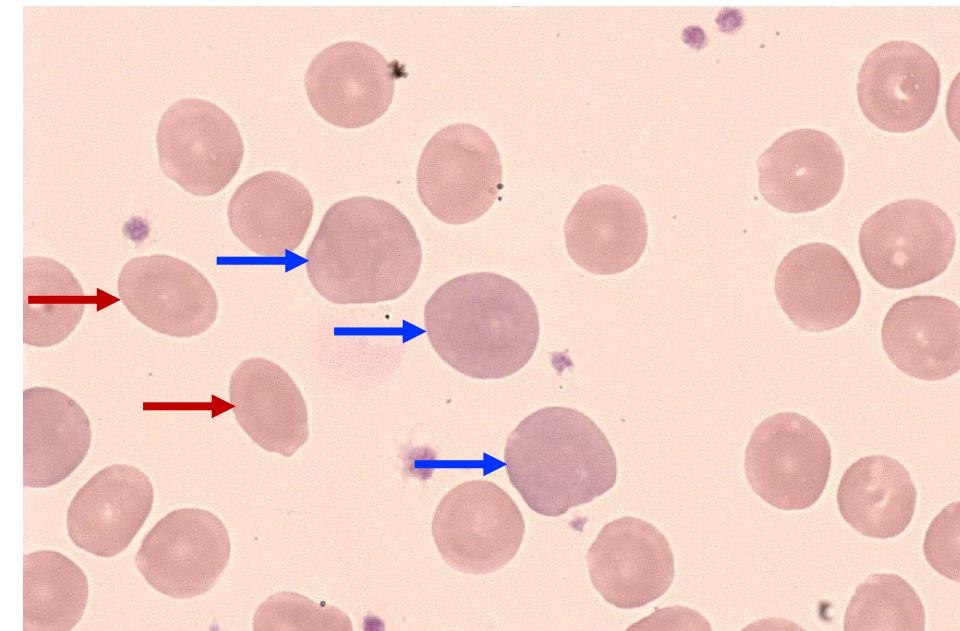


## Conseil génétique

Risque d'elliptocytose sévère : 25%  
→ Mort fœtale *in utero*  
→ *Hydrops fetalis*  
→ Ictère néonatal nécessitant photothérapie

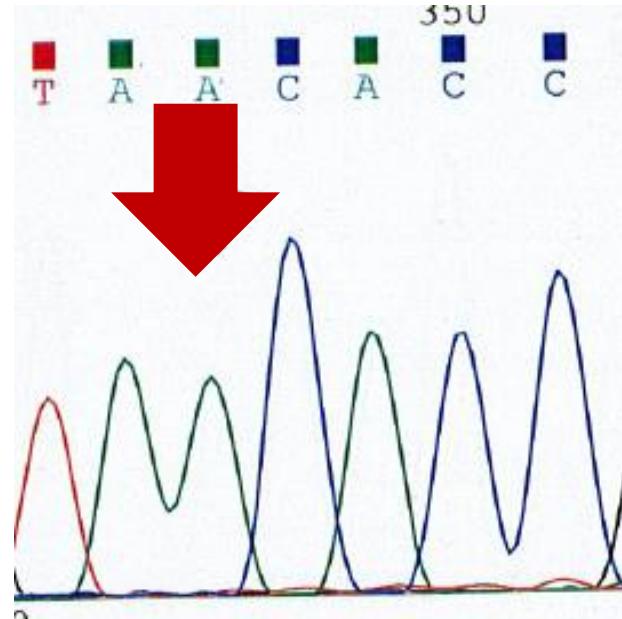
# CAS CLINIQUE. UNE SURPRISE DIAGNOSTIQUE !

- Adressé laboratoire d'Hématologie RDB Juin 2016 - Bilan "pathologies GR" (contexte pancytopenie néonatale puis anémie isolée dans un contexte de possible CDA)
- Hémogramme/réticulocytes :
  - Hb 6,7g/dL - VGM 93,1fl - CCMH 31,2 g/dL
  - Réticulocytes  $393,16 \times 10^9/L$
  - Thrombocytose  $508 \times 10^9/L$
  - Hyperleucocytose à  $19,65 \times 10^9/L$  à PNN
  - Frottis sanguin
    - Anisocytose/poikilocytose (RDW=18,6%)
    - **Polychromatophilie** →
    - **Elliptocytes 1<sup>er</sup> degré** →
    - Corps de Jolly
    - Erythroblastémie
  - Test EMA 5% négatif
  - Ektacytométrie : absence d'argument pour une pathologie de la membrane GR



# CAS CLINIQUE. UNE SURPRISE DIAGNOSTIQUE !

## SHD “PATHOLOGIES ÉRYTHROCYTAIRES”



### Mutation non-sens homozygote

Dans l'exon 10

**Gène *PKLR***

Apparition d'un codon stop prématuré

NM\_000298.5

**c.1299C>A**

**p.Tyr433\***

Mutation décrite pathogène *in silico*

Non répertoriée dans les bases de données ExAc, polyphen, sift, 1000 G

Parents dépistés et porteurs hétérozygotes

# CONCLUSION

- **Les nouvelles technologies de séquençage ont révolutionné le diagnostic des patients suspects d'être atteints d'une anémie arégénérative ou régénérative**
  - Plus rapides
  - Moins coûteux : ~ 200-300 euros/patient contre  $\geq 400$  euros juste pour un gène
  - Plus exhaustifs
  - Permettent de séquencer un panel de gènes larges ciblés pour le SHD
    - Identification d'associations étonnantes
    - Diagnostic des causes rares d'anémie aux tableaux phénotypiques pas toujours évidents
    - Très utiles pour les cas d'*hydrops fetalis*
- **Mais attention !**
  - 1 mutation identifiée en SHD/exome doit toujours être validée en Sanger (ex-récent)
  - Les SHD/exomes peuvent "passer à côté" des grandes (SHD) ou petites (exomes) délétions
  - Importance de toujours coller au phénotype du patient et de re-valider après identification de variations alléliques, la concordance avec les tests fonctionnels cellulaires et en tête de liste : **l'analyse cytologique**

## Service d'Hématologie Biologique BCT

Dr V. Picard

Dr S. Barreau

Dr A. Nasr Allah

Ludivine David-Nguyen

Dorin David-Ponn

Isabelle Marie

## Service de Pédiatrie et Hématologie de BCT

Dr C. Guittot

Dr C. Falguière

Pr L. Garçon

Dr C. Chantelat

## Service d'onco-hématologie pédiatrique RDB

Pr Thierry Leblanc

## Département de génétique, BCT

Pr J. Bouligand

A. Proust

# REMERCIEMENTS

- *Tous les centres nationaux*
- *Les médecins des centres de maladies rares*
- *Tous nos collaborateurs*
- *Membres du réseau DHOS des laboratoires GR*
- *Interlocuteurs Médecins et Biologistes*
- *Les patients et leurs familles*

