



# SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT ÉRYTHROCYTAIRE

**Pr Lydie Da Costa**

Hématologie Biologique

Hôpital Bicêtre/Paul Brousse

Université Paris Saclay

U1170, IGR



# QU'EST CE QUE LE SHD ?

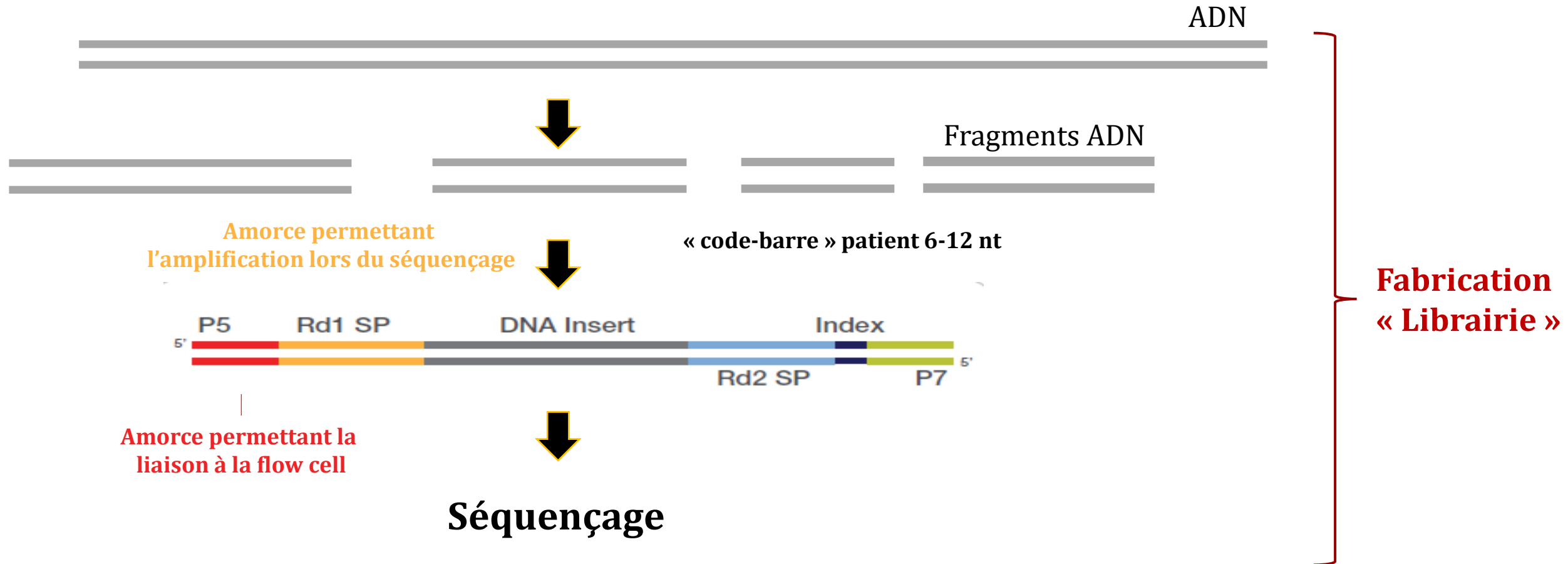
## TECHNIQUES



- 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

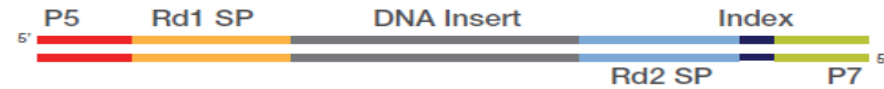
# FABRICATION DE LA LIBRAIRIE



- **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

Recours à des sondes de capture  
pour ne récupérer que les fragments d'intérêt  
90 gènes GR et autres gènes choisis (Roche)

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



La capture de séquences = ciblage des régions d'intérêt



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



# LE SÉQUENÇAGE

Librairie prête à être séquencée

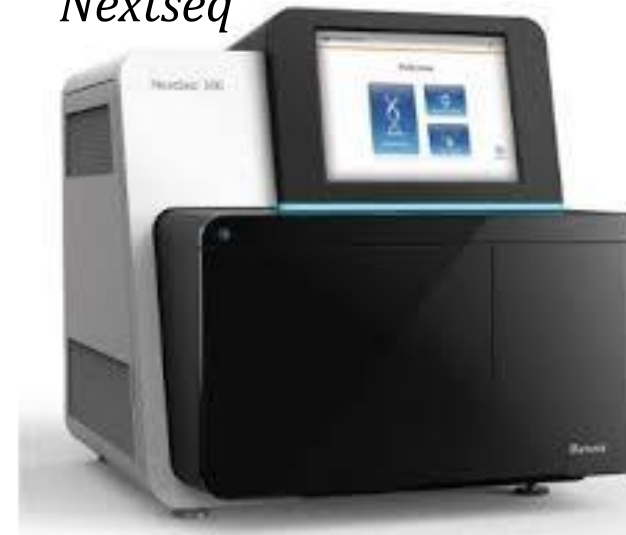
Séquençage sur séquenceur Illumina®

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

*Miseq*



*Nextseq*



# ANALYSE DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE

Géré par l'utilisateur

1

2

3

4

Raw Data

**Base Calling**  
Détermination de la séquence

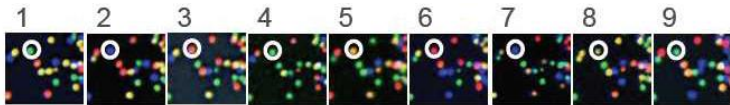
**Mapping**  
Alignement de la séquence  
au génome de référence

**Variant Calling**  
Comparaisons ADN (s)  
d'intérêt / ADN référence

**Annotation**  
ACMG-AMP

Compte-rendu

Logiciels MiSeq/NextSeq



→ T G C T A C G A T

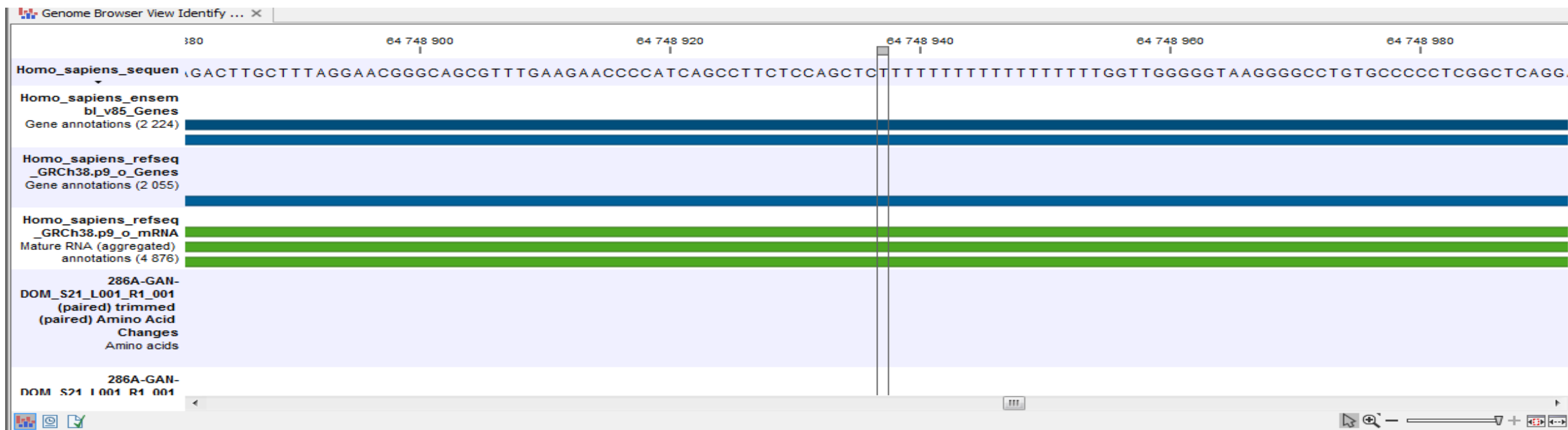
1 point = 1 « read »

CLC Biomedical WorkBench (Qiagen)

Alamut

Ingenuity Variant analysis (Qiagen)

**Mise en évidence d'une mutation  
contrôle en technique Sanger**



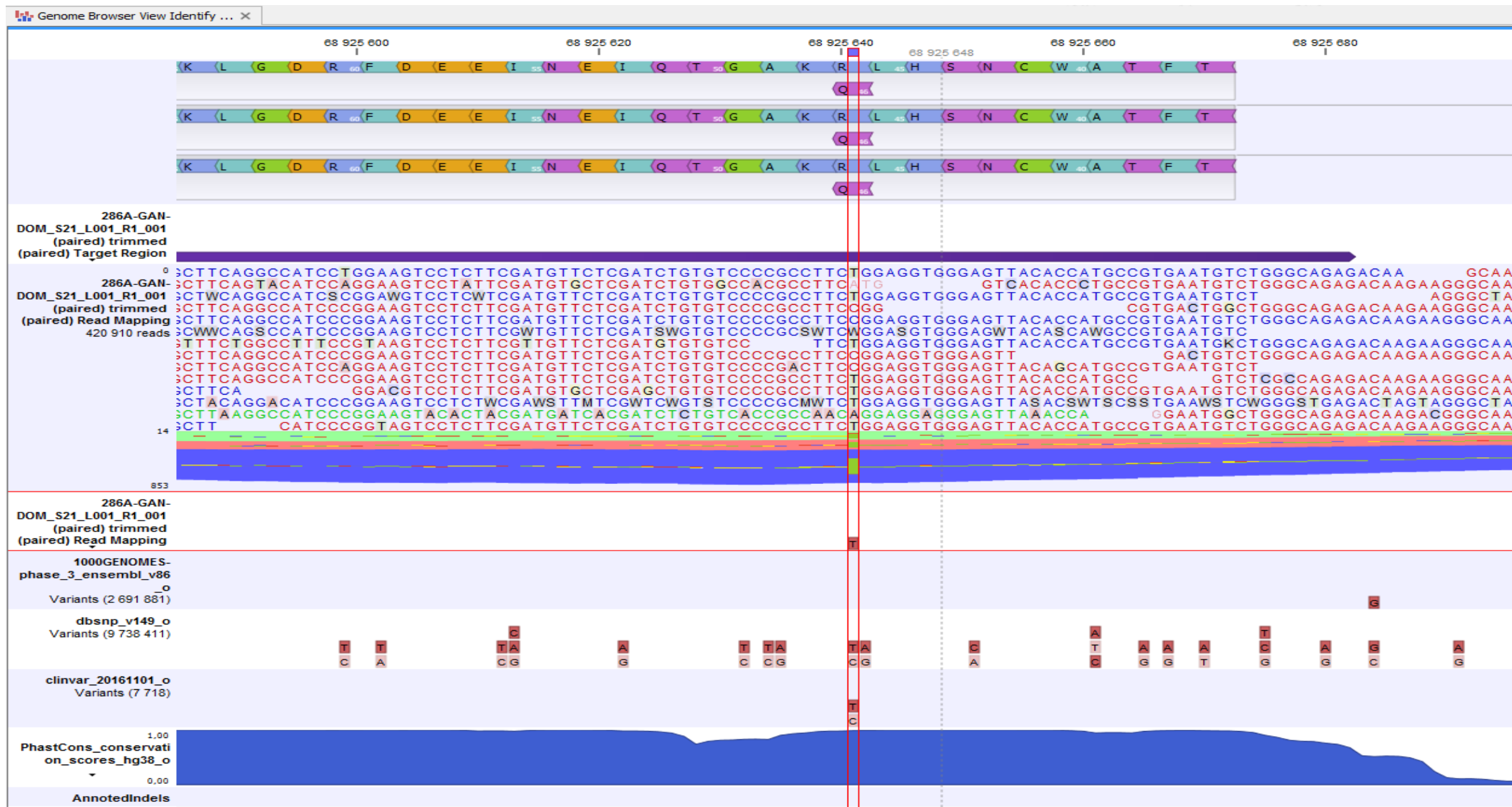
286A-GAN-DOM\_S21\_L001\_R1\_001 ... X

Rows: 491 Table view: Genome

Chromosome contains Filter

Match any Match all

Chrom...	Region	Type	Reference	Allele	Length	Zygosity	Count	Cover...	Frequ...	Forwa...	Reve...	Ave...	Read c...	Read c...	# uniq...	# uniq...	Genot...	Hom...	p...	Homo_sapiens_refseq_GRCh...
14	64748937	Deletion	T	-	1	Heterozy...	497	1123	44,26	331	244	21,40	575	1318	201	218	-/T	SPTB		NM_001024858.2, XM_005263
17	7675394..7675396	Deletion	TTT	-	3	Heterozy...	386	586	65,87	149	309	22,16	458	692	180	184	complex	TP53		NM_001126115.1, NM_001270
1	158611132..158611133	Deletion	CA	-	2	Heterozy...	201	483	41,61	150	113	23,42	263	589	146	136	complex	SPTA1		XM_011509917.2, XM_011509
12	11893795..11893810	Deletion	TATATAT...	-	16	Heterozy...	72	303	23,76	40	32	24,35	72	306	52	49	complex	ETV6		XM_017018990.1, XM_011520
7	33014503..33014504	Deletion	TT	-	2	Heterozy...	745	1780	41,85	508	482	24,37	990	2335	265	237	complex	NT5C3A		NM_016489.12, NM_0011661
12	11893795..11893808	Deletion	TATATAT...	-	14	Heterozy...	73	299	24,41	45	28	24,64	73	300	60	60	complex	ETV6		XM_017018990.1, XM_011520
10	110134331	Deletion	A	-	1	Heterozy...	647	1184	54,65	458	361	25,68	819	1446	231	225	-/A	ADD3		NM_001320591.1, NM_01990
8	30678360..30678364	Deletion	TTTTT	-	5	Homozyg...	391	763	51,25	153	322	26,56	475	926	197	179	-/-	GSR		NM_001195104.1, NM_00119
21	34792318	SNV	G	C	1	Heterozy...	34	146	23,29	3	32	26,79	35	147	30	29	C/G	RUNX1		XM_017028487.1, NM_00100
19	41860925	Deletion	C	-	1	Heterozy...	771	1448	53,25	534	497	27,01	1031	1904	257	236	-/C	RPS19		
3	47009419	Deletion	G	-	1	Heterozy...	431	1000	43,10	199	308	27,43	507	1172	193	184	-/G	NBEAL2		NM_015175.2, XM_01153353
15	50609733	Deletion	A	-	1	Homozyg...	1615	1751	92,23	1007	1104	27,47	2111	2276	293	265	-/-	TRPM7		
1	155244850..155244851	Deletion	GA	-	2	Heterozy...	111	325	34,15	8	108	28,28	116	352	69	69	complex	GBA		NM_001171811.1, NM_00100
11	3855884..3855888	Deletion	TCTCT	-	5	Heterozy...	157	350	44,86	112	93	28,29	205	439	130	132	complex	STIM1		NM_003156.3, NM_00127796
6	53498005	Deletion	A	-	1	Heterozy...	629	1277	49,26	333	430	28,33	763	1470	221	196	-/A	GCLC		NM_001197115.1, NM_00149
X	123912349	Deletion	A	-	1	Heterozy...	173	362	47,79	123	102	28,50	225	459	111	113	-/A	XIAP		NM_001204401.1, XM_00672



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 / données 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 :**
  - **Classe1 = 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”**

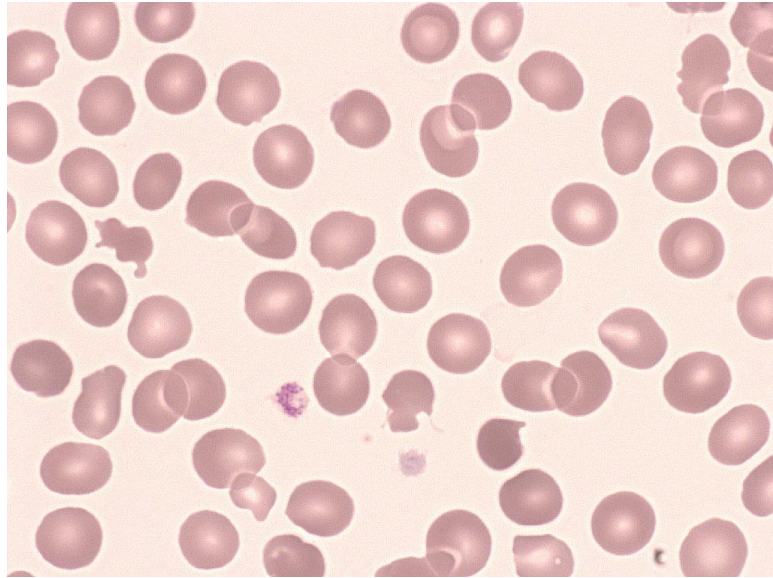
# PLACE DU DÉPISTAGE MOLÉCULAIRE DANS LES PATHOLOGIES ÉRYTHROCYTAIRES : QUAND LE PRATIQUER ?

- 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 érythrocytométrique 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



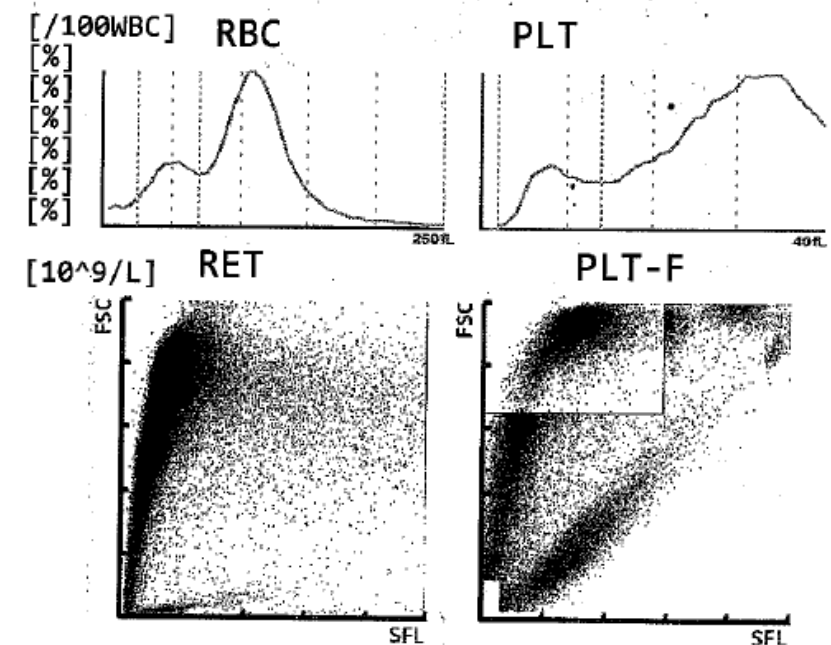
## Importance des données cytologiques



## 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**

# Hydrops fetalis – Contexte anémie fœtale inexpliquée

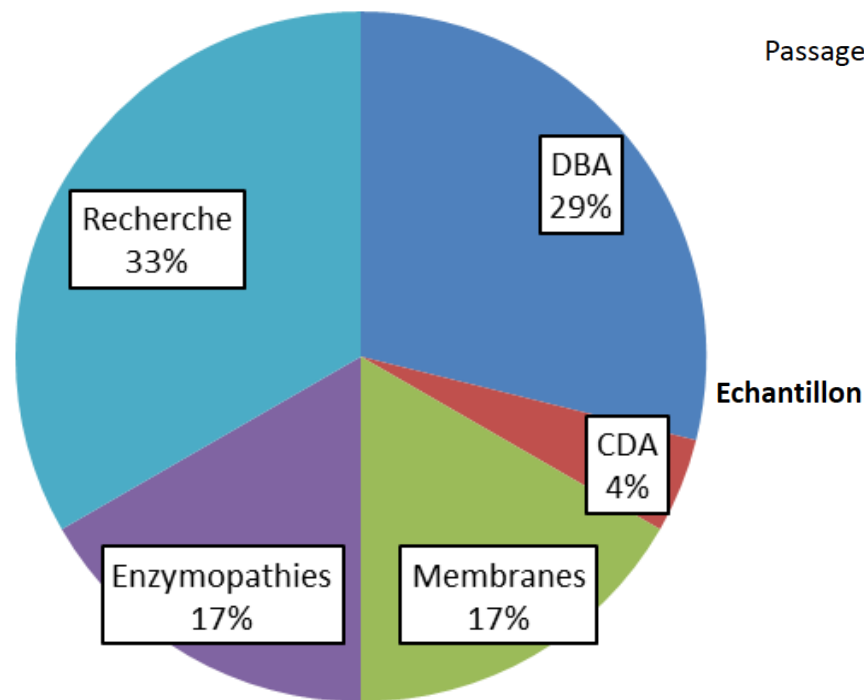


Depuis janvier 2017

## Targeted-NGS

Panel 104 gènes

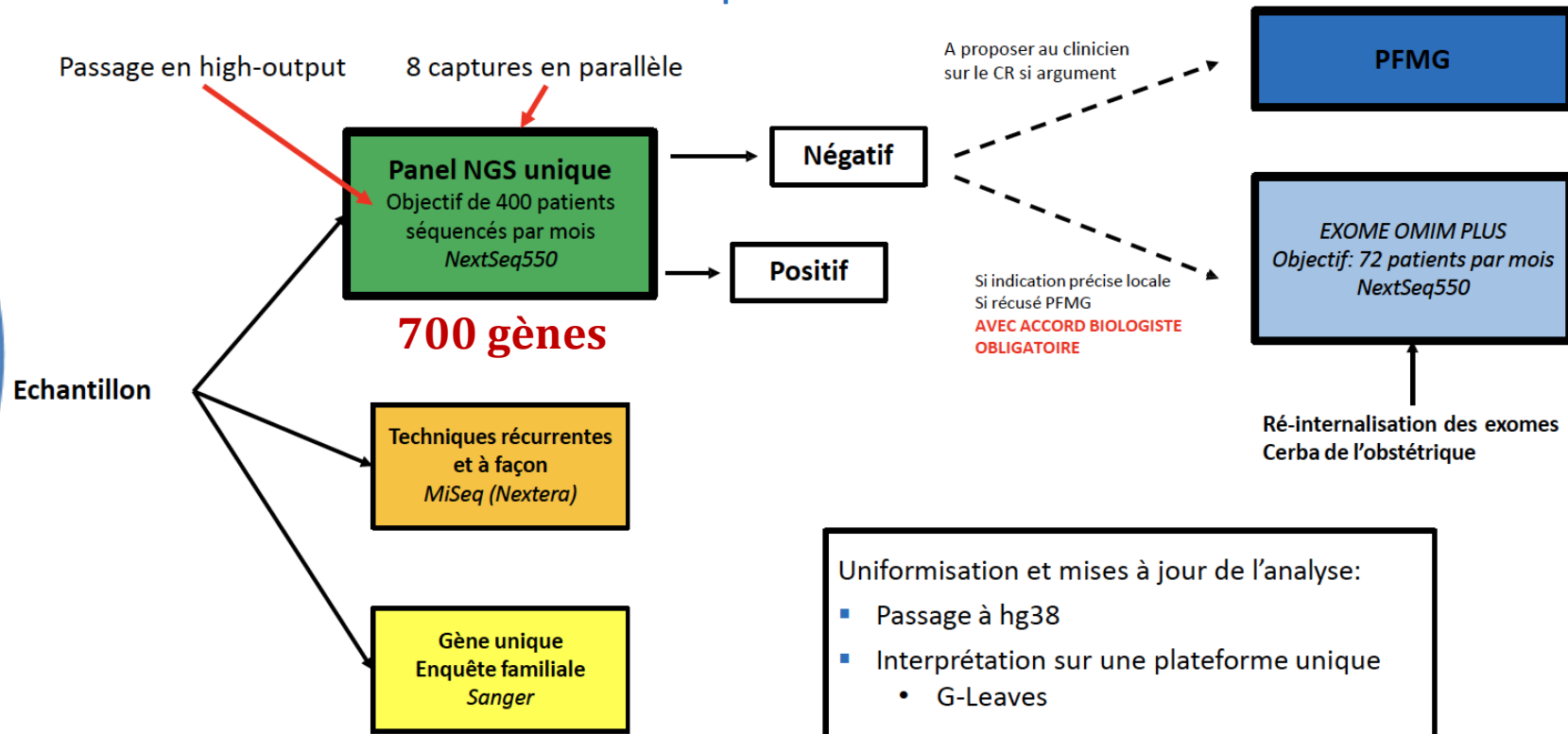
« Globules Rouges »



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

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

### Proposition



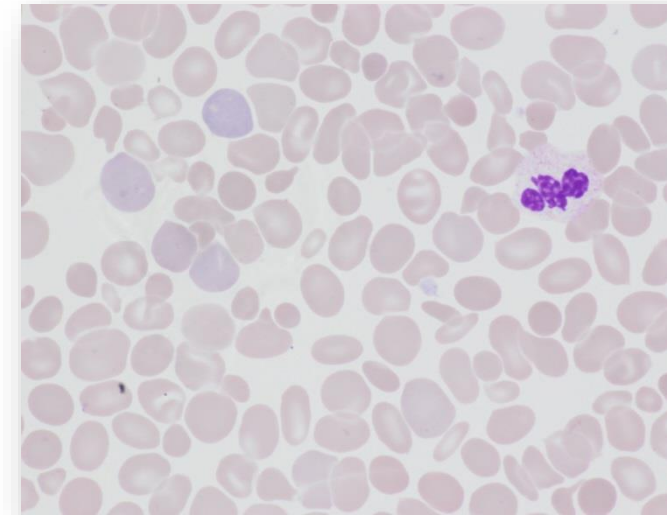
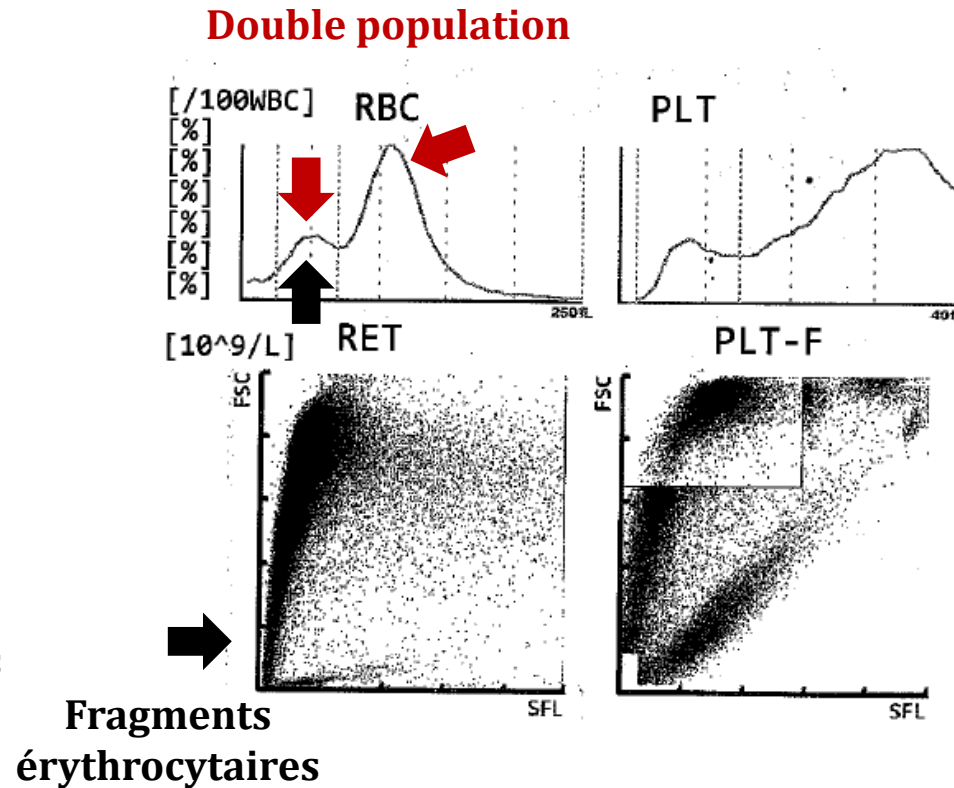
Courtoisie Pr J. Bouligand

# 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



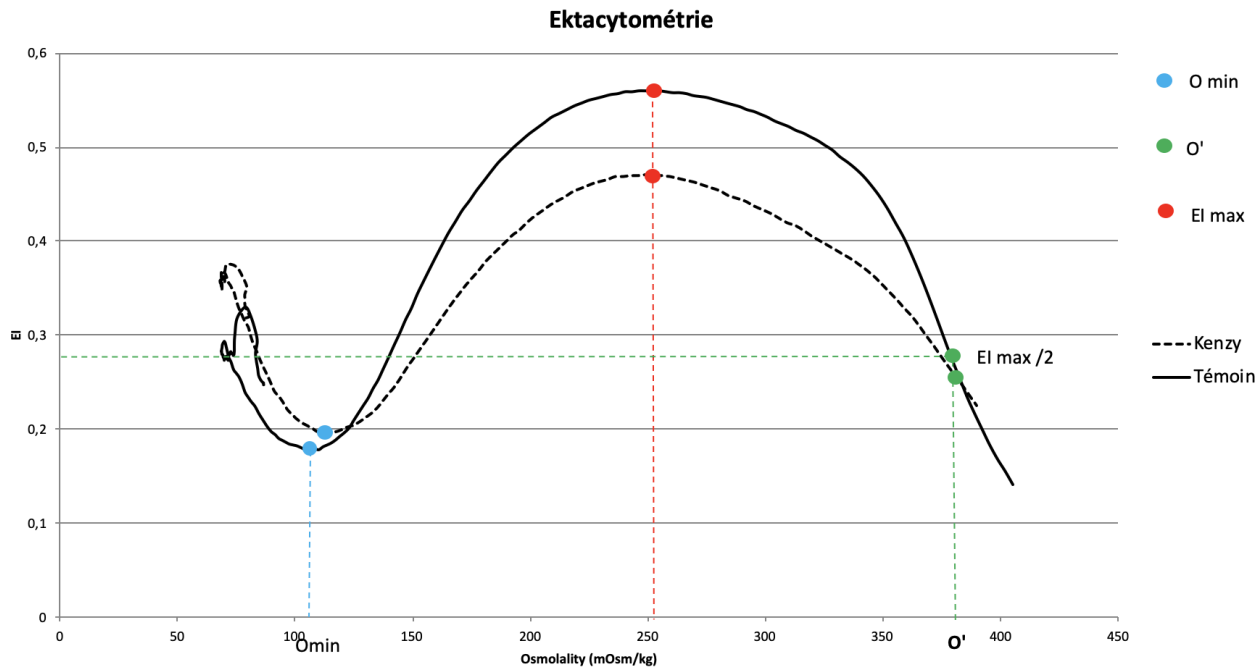
Poïkilocytose  
Polychromatophilie  
Fragments GR  
Microsphérocytes  
Elliptocytes

## Découverte fortuite d'elliptocytose

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

- Ektacytométrie
- Biologie moléculaire

# Ektacytométrie



El max : ↓

O' / Point hyper: normal

Omin : normal

Très léger aspect trapézoïdal.

Courbe ektacytométrie 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)

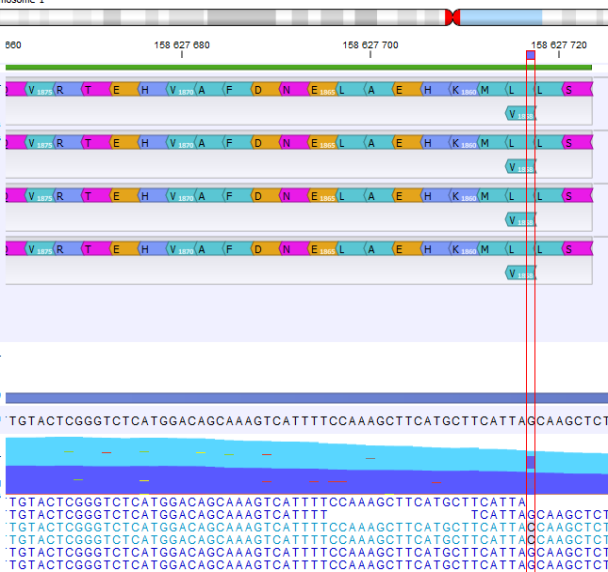
Exon 4  
rs757679761

c.460\_462dup - p.(Leu155dup)

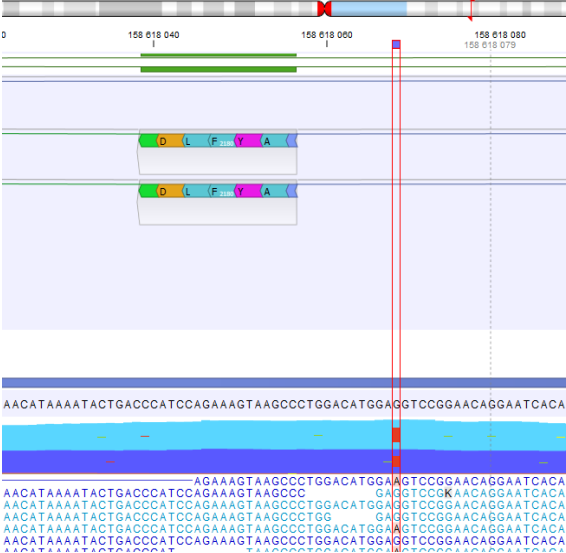


Polymorphisme alpha Lely

Exon 40  
rs3737515, c.5572C>G - p.(Leu1858Val)

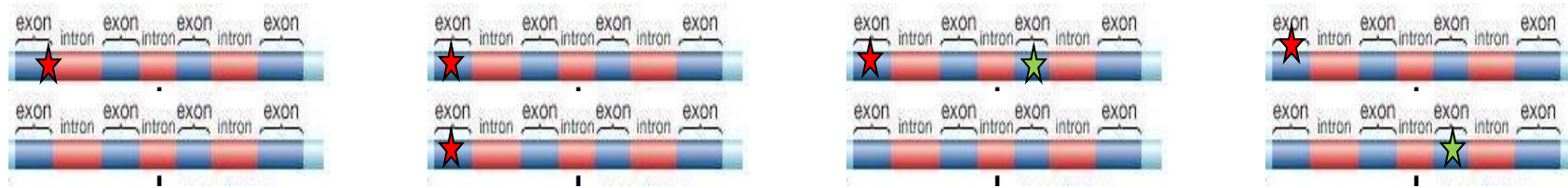
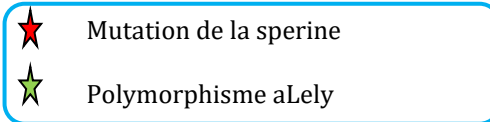


Intron 45  
rs28525570, c.6531-12C>T - p.?



# RECHERCHE DU VARIANT ALPHA-LELY

## $\alpha$ LELY *LOW EXPRESSION ALLELE FROM LYON*



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

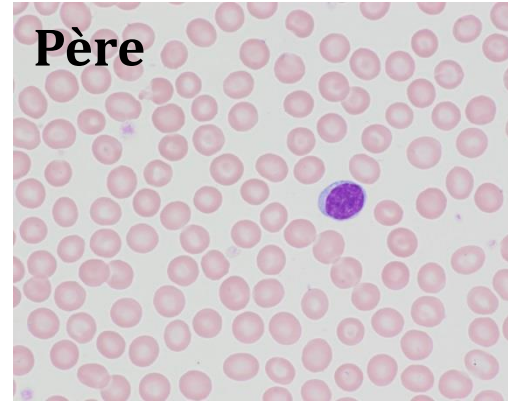
- Mutation de l'exon 40 : la transition G> C conduit à la modification de l'acide aminé p.Leu1857Val
- Mutation de l'intron 45 : transition C>T à 12 nucléotides du site d'épissage 3 'de l'exon 46.



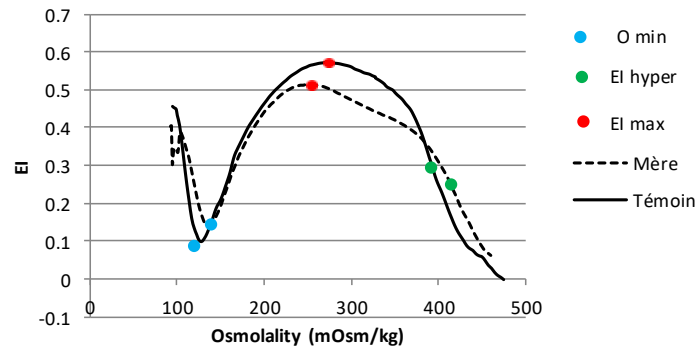
Perte dans 50% des cas de l'exon 46 dans l'ARNm de la spectrine  $\alpha$ , ce qui empêchera la protéine issue de l'allèle  $\alpha$  - LELY de se dimériser

- ➔ 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' $\alpha$ -spectrine
- ➔ Mais quand  **$\alpha$  LELY est associé *en trans* à une mutation du gène de la spectrine  $\alpha$ , les formes de la spectrine mutée augmentent et sont responsables du phénotype PPH**

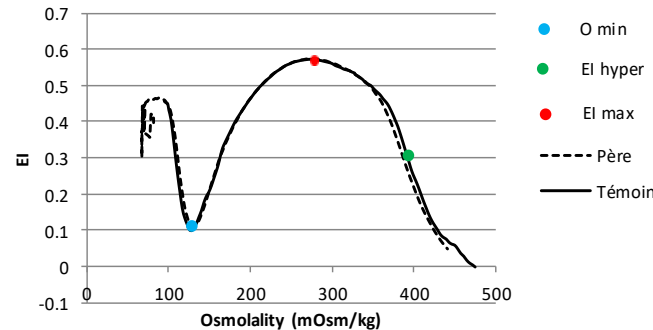
# ETUDE FAMILIALE INDISPENSABLE – ETUDE DE LA SÉGRÉGATION FAMILIALE – HÉMOGRAMME – EKTACYTOMÉTRIQUE – BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



Ektacytométrie



Ektacytométrie



## Conseil génétique

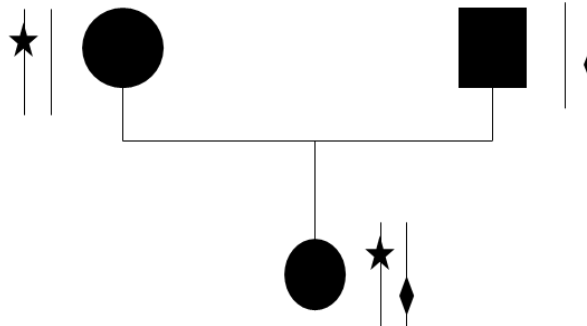
Risque d'elliptocytose sévère : 25%

→ Mort foétale *in utero*

→ *Hydrops fetalis*

→ Ictère néonatal nécessitant photothérapie

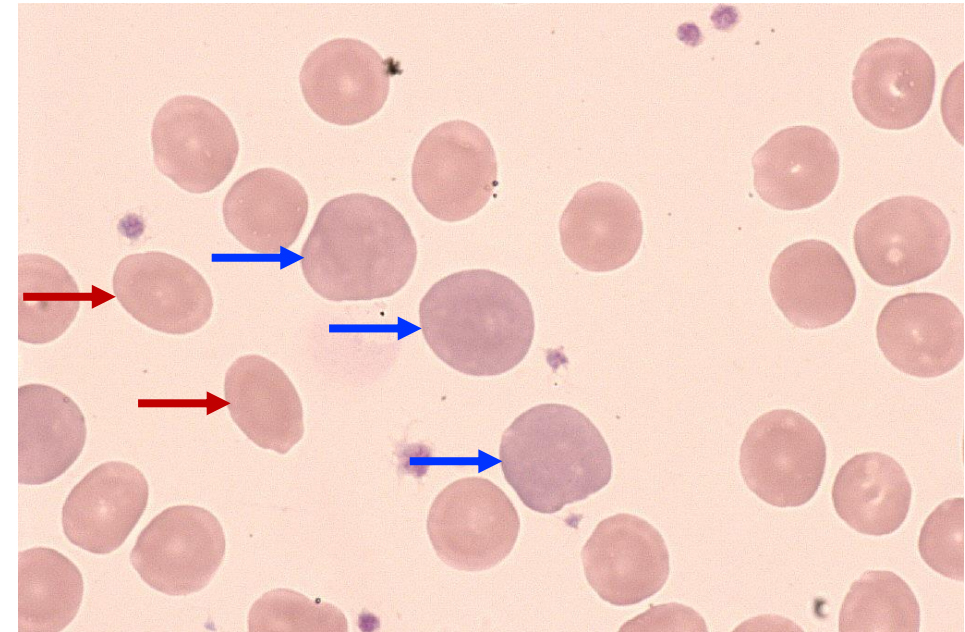
**SPTA1 (NM\_003126.3)**  
c.460\_462dup  
p.(Leu155dup)



**SPTA1 (NM\_003126.3)**  
L-LELY HZ  
• c.5572C>G - p.(Leu1858Val)  
• c.6531-12C>T - p.?

# CAS CLINIQUE. UNE SURPRISE DIAGNOSTIQUE !

- Adressé laboratoire d'Hématologie RDB Juin 2016 – Bilan “pathologies GR” (contexte pancytopénie 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 x10<sup>9</sup>/L
  - Thrombocytose 508 x10<sup>9</sup>/L
  - Hyperleucocytose à 19,65 x10<sup>9</sup>/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

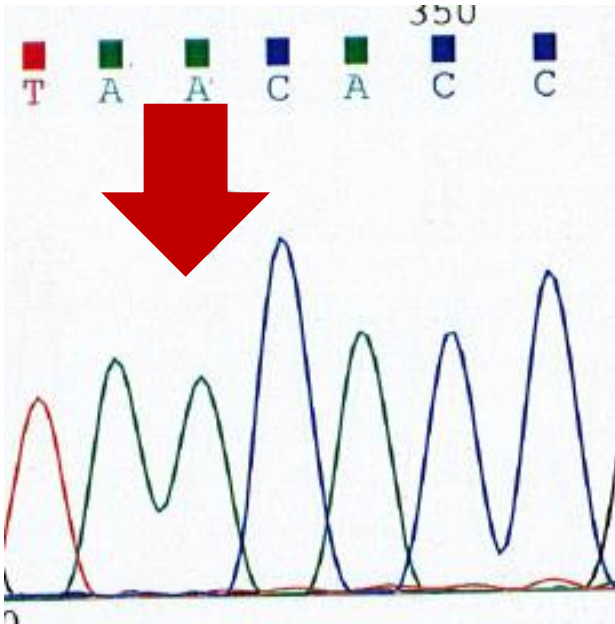
**c.1299C>A**

**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 : ~ 200-300euros/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. Guitton

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*



Reconnue par le Ministère de la Santé

