



La génétique et l'anémie de Blackfan-Diamond

Lydie Da Costa
Ludivine David-NGuyen
Isabelle Marie

28-30 Octobre 2023



Différentes étapes pour le diagnostic génétique

- Information et signature d'un consentement éclairé par le patient si >18 ans ou un des 2 parents si <18 ans (obligation légale)
- Prélèvement sang veineux (2 tubes EDTA, volume adapté à l'âge)
- Extraire de l'ADN et quantification
- Technique de séquençage haut débit (t-NGS)
- Analyse des variations alléliques (logiciels et prédiction *in silico* de la pathogénicité)
- Rendu au médecin prescripteur

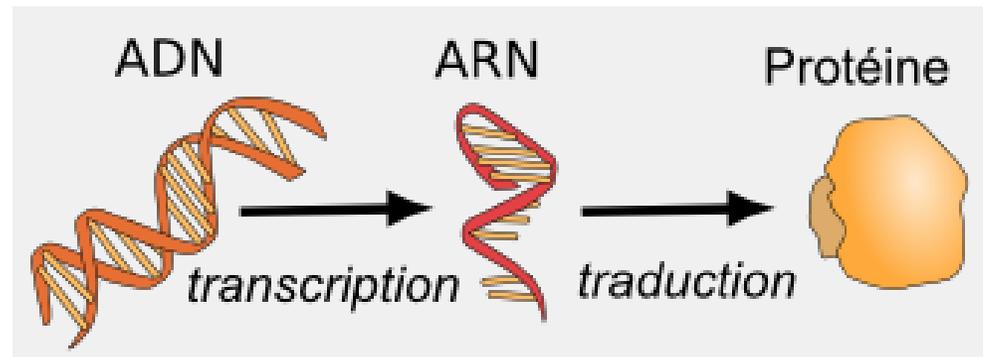
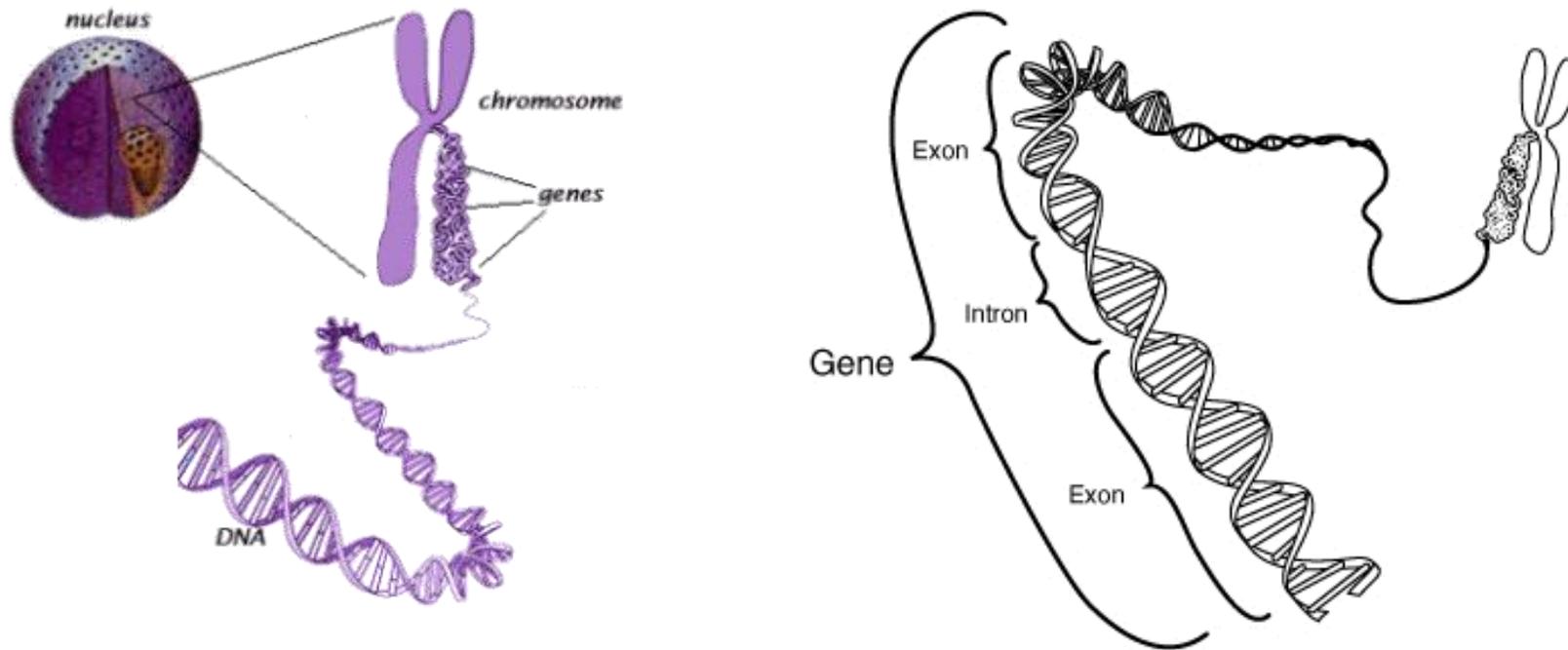
Extraction de l'ADN

ADN=

Toute la mémoire de la génétique

= Un livre avec beaucoup de phrases (gènes) qui contiennent des mots (exons) à lire
mais qui peut avoir des fautes d'orthographe ou de syntaxe = mutations

Amplification de chaque exon (= un mot dans la phrase)
(= séquence codante d'un gène pour la transcription de l'ADN en ARNm
et la fabrication de la protéine)



Extraction de l'ADN

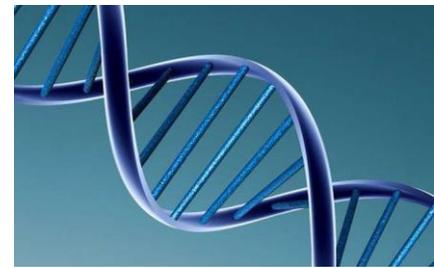








Qu'est ce que le NGS? Techniques



- NGS= Next generation sequencing
- 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 reactions de séquences du génome humain en même temps :
 - ➔ Gain en nombre d'informations recueillies
 - ➔ Gain de temps
 - ➔ Moins coûteux
- Nombreux séquenceurs et technologies mais elles partagent toutes certaines étapes :
 - La préparation d'une librairie
 - Un séquençage
 - Des logiciels permettant la lecture et l'analyse des données (problème de stockage et exhaustivité des données)

Le principe de la capture séquence

La première fois on goutte à tous les bonbons



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

On utilise les sondes de capture
pour ne récupérer que les fragments d'intérêt
93 gènes impliqués dans les pathologies du
globule rouge dont 39 gènes « ABD » (Roche)

Ensuite on prend que les bonbons « pastèque »



La capture de séquences = ciblage des régions d'intérêt

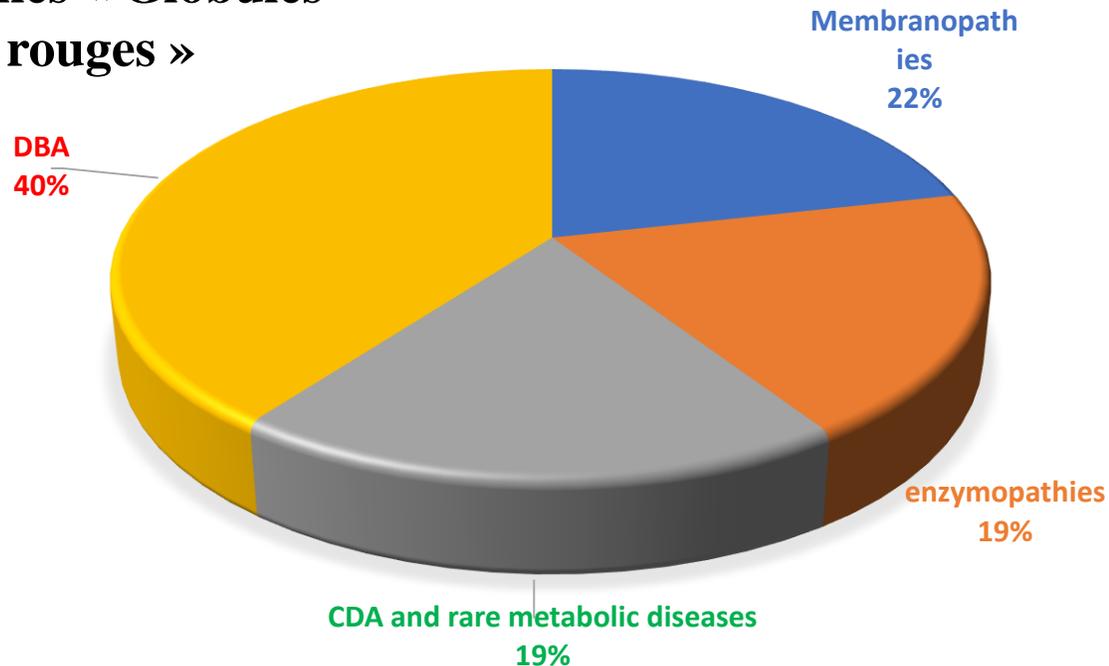
On va manger que les bonbons « pastèques »



Analyse des variations alléliques par t-NGS – application à l'ABD

- Depuis 2016 : **Next Generation Sequencing (targeted-NGS)**
- Roche “NimbleGen SeqCap EZ” library et illumina flowcell (Flowcell standard 2*150) –
- Miseq ou Nextseq, analysés avec CLC Biomedical workbench (Qiagen)

93 gènes « Globules rouges »



Diamond-Blackfan anemia:

39 gènes
(avant seulement 9 gènes screenés par Sanger)

Dysérythropoièses Congénitales:

19 gènes (avant seulement 3 gènes screenés)

Pathologies de la membrane érythrocytaire:

21 gènes (avant seulement 2 gènes screenés)

Enzymopathies:

19 gènes (pas screené avant par Sanger)



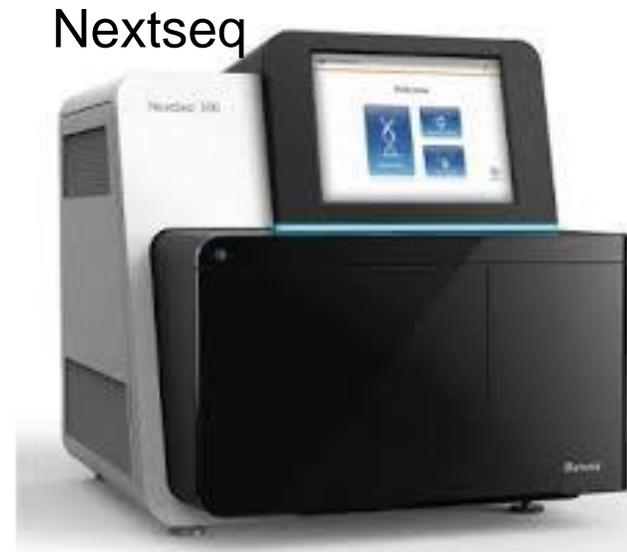
Le séquençage



Librairie prête à être séquencée

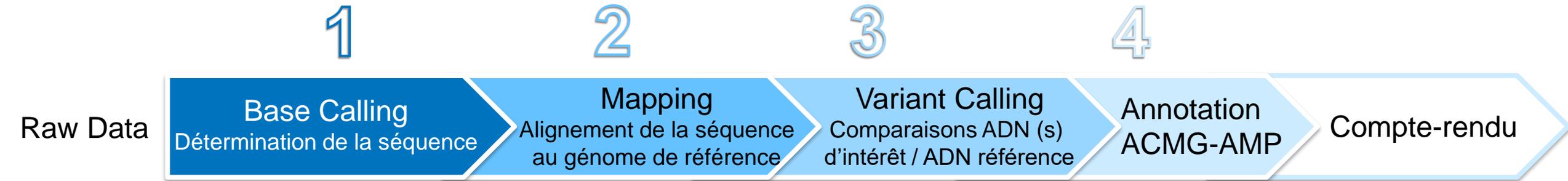
Séquençage sur séquenceur Illumina®

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

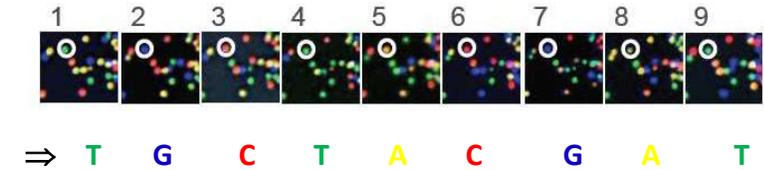


Analyse des données de séquençage

Géré par l'utilisateur



Logiciels MiSeq/NextSeq



1 point = 1 « read »



CLC Biomedical WorkBench (Qiagen)



Alamut

Ingenuity Variant analysis (Qiagen)

Mise en évidence d'une mutation
contrôle en technique Sanger/ NGS ciblé



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

Genome Browser View Identify ... x

380 64 748 900 64 748 920 64 748 940 64 748 960 64 748 980

Homo_sapiens_sequen (GACTTGCTTTAGGAACGGGCAGCGTTTGAAGAACCCCATCAGCCTTCTCCAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTGGGGGTAAAGGGGCCTGTGCCCCCTCGGCTCAGG

Homo_sapiens_ensembl_v85_Genes
Gene annotations (2 224)

Homo_sapiens_refseq_GRCh38.p9.o_Genes
Gene annotations (2 055)

Homo_sapiens_refseq_GRCh38.p9.o_mRNA
Mature RNA (aggregated) annotations (4 876)

286A-GAN-DOM_S21_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) Amino Acid Changes Amino acids

286A-GAN-DOM_S21_L001_R1_001

286A-GAN-DOM_S21_L001_R1_001 ... x

Rows: 491 Table view: Genome

Chromosome contains Filter

Chrom...	Region	Type	Reference	Allele	Length	Zygoty...	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_005261
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_001271
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_011505
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

Annotation des variants

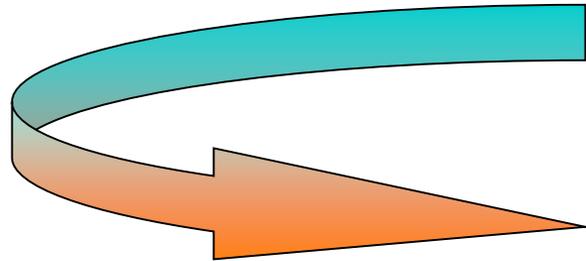
- **Recommandations ACMG-AMP** (*Richards et al., Genet Med, 2015; Amendola et al., Am J Hum Genet 2016*)
- **L'interprétation finale reste à la seule appréciation et responsabilité du biologiste médical**

- **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
 - Prédiction bioinformatiques (Sift, polyphen, mutation taster, ...)
 - Données bibliographiques –attention!
 - Critères cliniques et généalogiques / Données de ségrégation
 - Données fonctionnelles

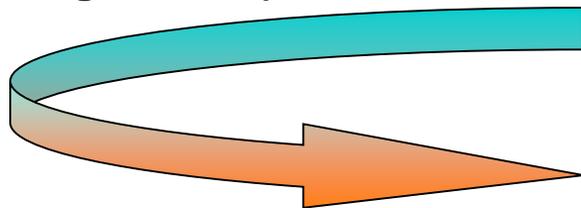
- **L'interprétation des résultats repose sur un faisceau d'arguments qui ont un poids plus ou moins important :**
 - argument très fort (very strong)/fort (strong)/moyen (moderate)/faible (supporting) en faveur de la pathogénicité
 - argument fort pour caractère bénin/argument faible en faveur du caractère 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**

Depuis été 2016



Si tous les gènes impliqués dans l'ABD ne présentent pas de variations alléliques (! grandes délétions non diag en NGS)



Si tous les gènes impliqués dans l'ABD ne présentent pas de variations alléliques ni de grandes délétions

Recherche de variations alléliques par NGS (développement en 2015)

Service hématologie Biologique et département de génétique pour l'utilisation du Miseq

Librairie Roche "NimbleGen SeqCap EZ" et puce illumina (Flowcell standard 2*150) et Passage sur un Miseq/Nextseq

Recherche de grandes délétions par CGH/SNP

Service hématologie Biologique et cytogénétique, RDB

- HumanOmniExpress-12 v1.0 Analysis BeadChip Kit (>700 000 loci) / Genome studio software
- Pucés Custom

Séquençage d'exomes

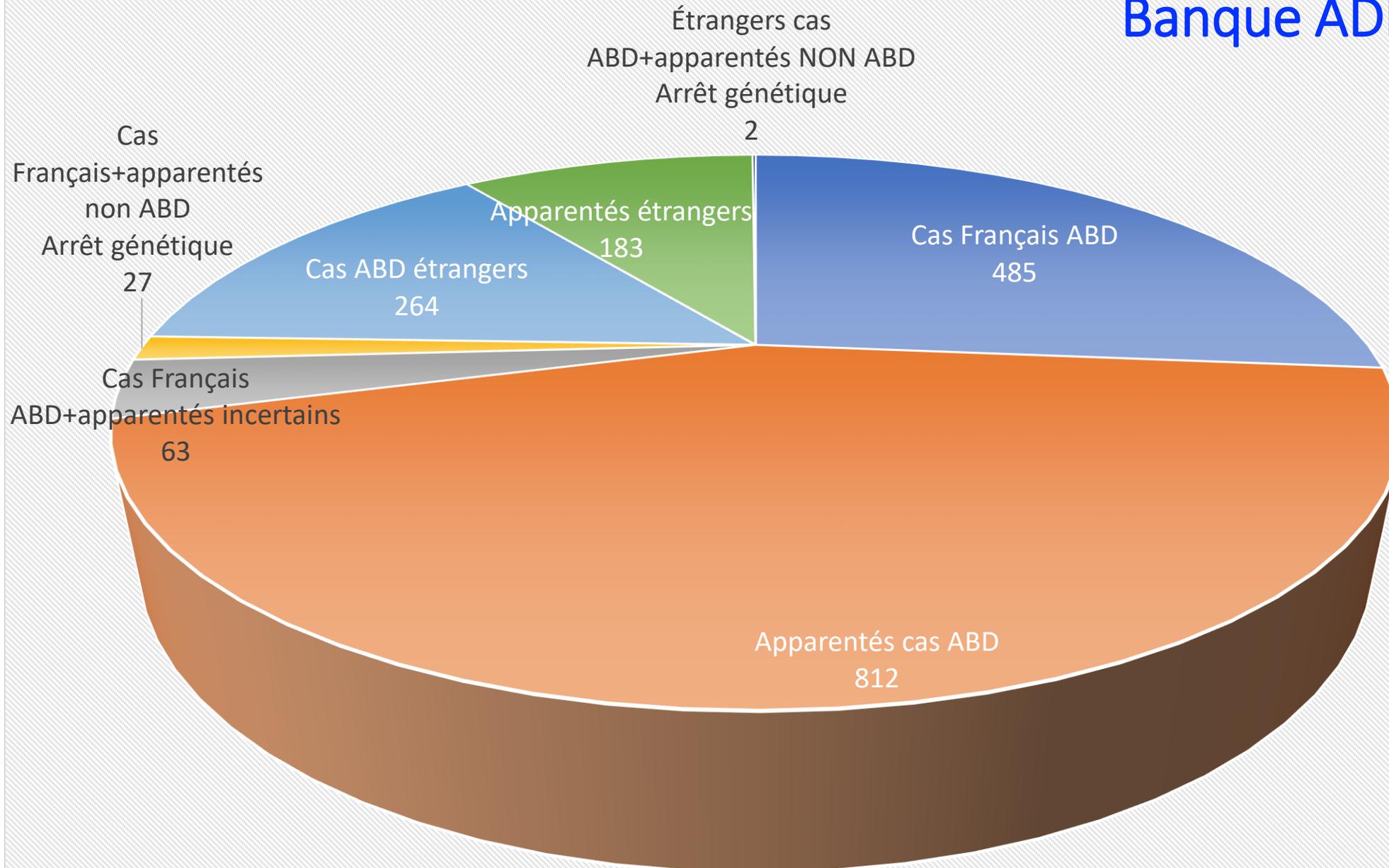
Plateforme Imagine, Necker



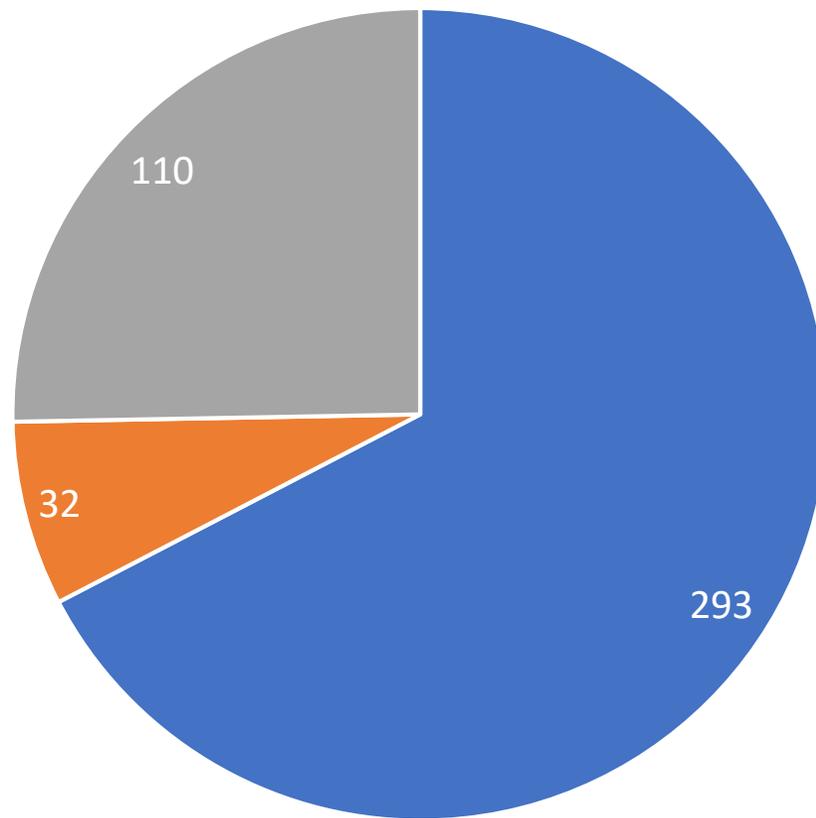
Séquençage de génomes

Plateforme SEQOIA, Broussais

Banque ADN "ABD"



435 patients enregistrés dans le registre ABD



■ Total mutations + délétions ■ Plus d'ADN/refus ■ Pas de génotype

La suite ...

- Screening des nouveaux patients ABD
- Continuer la banque d'ADN
- Mutation au laboratoire d'Hématologie de Bicêtre – retour à la maison !!!! : là où le registre et la banque d'ADN ont été constitués
- Amélioration de l'efficacité on espère : 2 ETP techniciens et recrutement d'un AHU d'ici 2-3 ans
- Collection et génération de lignées cellulaires EBV systématiquement pour des analyses fonctionnelles pour valider les gènes candidats et les mutations de signification inconnues
- ARN banking pour:
 - Maturation des ARNr (northern et Electrophorèse capillaire) – transfert en routine d'un test en cours de validation en recherche (PE Gleizes)
 - analyses fonctionnelles des ARN pour valider les nouveaux gènes et les mutations de signification inconnue



Alyson MacInnes

Marcin Wlodarski

Pierre-Emmanuel Gleizes, Marie-Françoise O'Donohue

Charlotte Niemeyer, Miriam Erlacher

Hanna Tamary

Irma Dianzani, Ugo Ramenghi

Dagmar Pospisilova

Katarzyna Albrecht

Sule Unal, Nurten Akarsu, Arda Cetinkaya

Denis Lafontaine

Kaan Boztugn Leo Krager

Riekelt Houtkooper

Marije Bartels



Thierry Leblanc

Isabelle Marie

Ludivine David NGuyen

Drs Odile Fenneteau, Marine Delecourt



Jessica Platon

Nicolas Jankovsky

Hakim Ouled-Haddou

Loïc Garçon



Michael Dussiot

Olivier Hermine

Exome sequencing platform (C. Bole, C. Masson, P. Nitschke)



Narla Mohandas

Anu Narla

Lionel Blanc



Jérôme Larghero

Thomas Domet



Merci beaucoup de votre attention

Lydie Da Costa
Service d'Hématologie Biologique
Hôpital Bicêtre
Le Kremlin Bicêtre, France
lydie.dacosta@aphp.fr
+33-1-45-21-20-06
+33-1-45-21-40-16/+33-1-45-21-35-94 (secrétaires)

