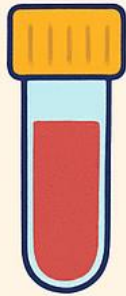




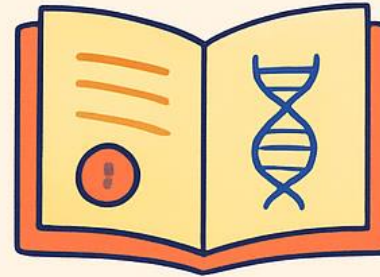
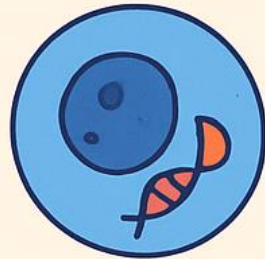
Diagnostic Moléculaire des patients atteints d'anémie de Blackfan-Diamond

22ème WE des Familles AFMBD 25-26-27 octobre 2025

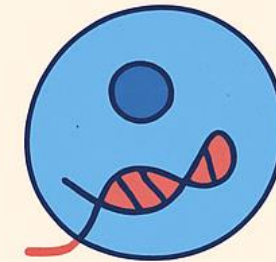
Du sang au résultat : comment on lit le livre de l'ADN



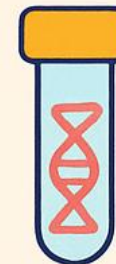
On commence avec un tube de sang ou un prélèvement de moelle osseuse



L'ADN est comme une bibliothèque ou un livre de recettes



On sort l'ADN des cellules



Grâce à ces analyses, on comprend mieux la maladie

Le résultat est transmis au médecin généticien qui l'explique

On lit des milliers de gènes en même temps
On cherche les différences
(= mutations)

On prépare ce matériel pour le lire avec une technique spéciale : le séquençage

Le parcours d'un tube de sang :

- Prélèvements
- Réception au centre de tri
- Transfert au laboratoire d'hématologie
- Déballage et vérification de la concordance de l'identité du patient (feuille + tubes)
- Enregistrement au laboratoire dans notre logiciel GENNO + dans la banque ADN
- Etiquetage des prélèvements
- Extraction de l'ADN
- Dosage de l'ADN
- Techniques moléculaires
- Analyse des résultats
- Validation technique puis biologique
- Rédaction du compte rendu et envoi du résultat au prescripteur

Réception au centre de tri

Effectué par les agents du centre de tri

Réception tous les jours dans une banette « BM »



Déballage et vérification de la concordance de l'identité du patient (feuille + tubes)

Effectués par les techniciennes de BM (Dorin, Annie et Ludivine)

Environ 1 à 2x/ semaine



Enregistrement au laboratoire dans notre logiciel GENNO et Banque ADN

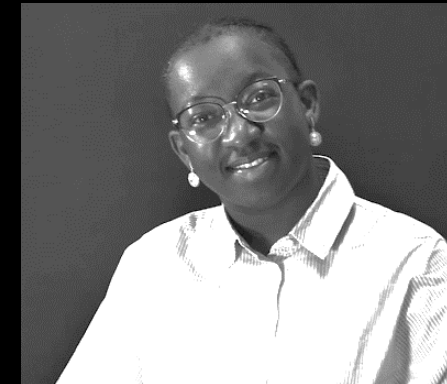
Effectué par les secrétaires (Mariam et Sabrina) et les techniciennes de BM (Dorin, Annie et Ludivine)

Environ 1 à 2x/ semaine, principalement le vendredi et lundi

En 2024 : 560
prélèvements
enregistrés
-Dont 91 DBA
-Dont 47 NGS
passés sur les 91

The screenshot displays the GENNO software interface with the following sections:

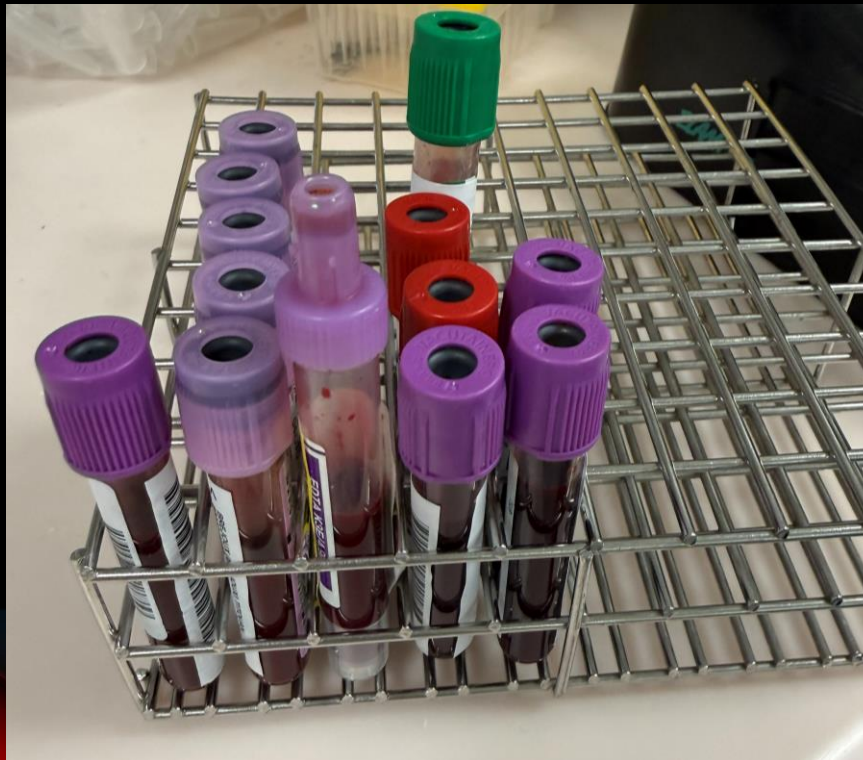
- Barre de menu (top):** Laboratoire, Paramétrage, Supervision, Demandes, Prélevements, Requêteur, Patient, Consulter.
- Barre d'outils (top):** Boutons pour gérer les demandes, séries, synthèses, numérisations, prescriptions, administration patients, équipements, et requêteurs.
- Section 'Demandes en cours' (left):**
 - GLOBULES ROUGE (1713) Temps : 0,47s
 - EKTA (1203) Temps : 0,05s
 - Anémie de Blackfan-Diamond (181) Temps : 0,04s
 - Anémie dysérythropoïétique congénitale (52) Temps : 0,04s
 - Anémie fœtale (17) Temps : 0,04s
 - Déficit en G6PD (7) Temps : 0,03s
 - Stockage Autres Patho (253) Temps : 0,04s
 - HEMOSTASE (454) Temps : 0,05s
 - Déficit congénital en fibrinogène (12) Temps : 0,03s
 - Maladie hémorragique (20) Temps : 0,06s
 - Maladie de von Willebrand (54) Temps : 0,04s
 - Mutation des facteurs II et V Leiden (243) Temps : 0,04s
 - Plaquettes (45) Temps : 0,04s
 - Thrombophilie (Protéine C/S/AT3) (80) Temps : 0,04s
 - TOUTES LES PATHOLOGIES (1833) Temps : 0,04s
 - NON CONFORMITES (54) Temps : 0,07s
- Section 'Validations' (bottom left):**
 - Synthèse Analytique NGS EKTA (97) Temps : 0,2s
 - Compte Rendu NGS EKTA (177) Temps : 0,9s
 - Synthèse Analytique NGS DBA (7) Temps : 0,05s
 - Compte Rendu NGS DBA (16) Temps : 0,14s
 - Synthèse Analytique Sanger EKTA (7) Temps : 0,05s
 - Compte Rendu Sanger EKTA (26) Temps : 0,18s
 - CR NGS/SANGER en COURS DE REDACTION/TERME (311) Temps : 0,16s
- Section 'Techniques en attente' (middle):**
 - Extractions-Dosages en attente (104) Temps : 0,94s
 - Extractions (100) Temps : 0,29s
 - Dosage (4) Temps : 0,17s
 - Techniques Générales en attente (186) Temps : 0,18s
 - Powerplex DPN (0) Temps : 0,18s
 - PCR (pour séquençage) (67) Temps : 0,17s
 - Séquençage (31) Temps : 0,13s
 - Design oligos (87) Temps : 0,15s
 - qPCR (1) Temps : 0,12s
 - NGS (3131) Temps : 1,17s
 - NGS EKTA (138) Temps : 0,63s
 - NGS DBA (23) Temps : 0,37s
 - NGS CDA (3) Temps : 0,42s
 - NGS FTS (0) Temps : 0,31s
 - NGS ciblés/Apparentés (87) Temps : 0,28s
- Section 'Techniques en cours' (right):**
 - Extractions-Dosages en cours (10) Temps : 0,6s
 - Extractions (3) Temps : 0,25s
 - Dosages (7) Temps : 0,2s
 - Techniques Générales (38) Temps : 0,32s
 - Powerplex DPN (0) Temps : 0,15s
 - PCR (pour séquençage) en cours (0) Temps : 0,12s
 - Séquençage en cours (38) Temps : 0,15s
 - qPCR (1) Temps : 0,2s
 - NGS (6727) Temps : 3,14s
 - Envoi ADN PBR-ABC (0) Temps : 1,32s
 - NGS dosage qubit (16) Temps : 1,36s
 - NGS Libraires (184) Temps : 1,34s
 - NGS Capture (2763) Temps : 2,26s
 - NGS SNaPshot (233) Temps : 1,49s



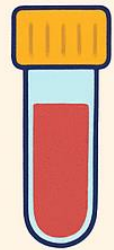
Etiquetage des prélèvements

Effectué par les techniciennes de BM (Dorin, Annie et Ludivine)

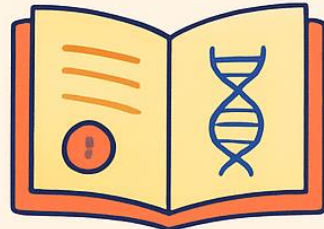
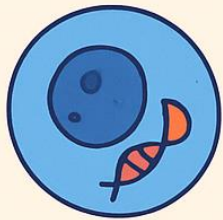
Environ 1 à 2x/ semaine, principalement le vendredi et lundi



Du sang au résultat : comment on lit le livre de l'ADN

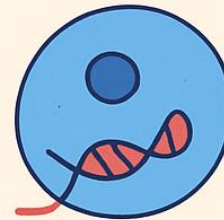


On commence avec un tube de sang ou un prélèvement de moelle osseuse



L'ADN est comme une bibliothèque ou un livre de recettes

Extraction et dosage



On sort l'ADN des cellules



On prépare ce matériel pour le lire avec une technique spéciale : le séquençage



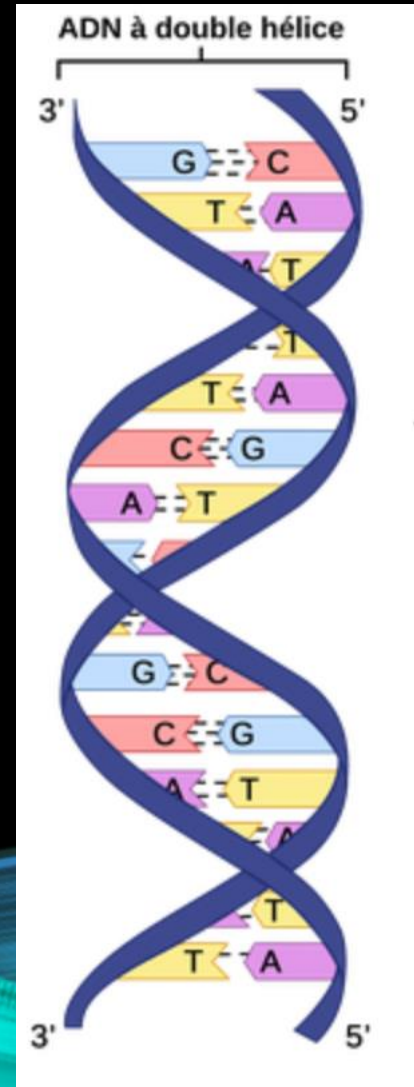
On lit des milliers de gènes en même temps
On cherche les différences (= mutations)



Le résultat est transmis au médecin généticien qui l'explique



Grâce à ces analyses, on comprend mieux la maladie



Extraction de l'ADN sur le QIAasympphony et Dosage de l'ADN au QiaExpert

Effectués par les techniciennes de BM (Annie, Dorin et Ludivine) de la plateforme du GMP (Génétique Moléculaire et Pharmacologie)

Actuellement exclusivement le mardi



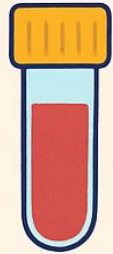
On dépose chaque
prélèvement dans
un des trous dispo



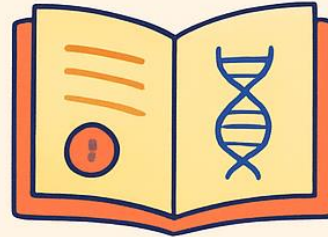
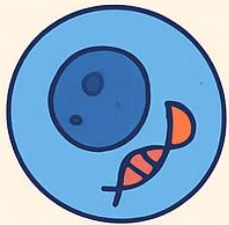
1 journée complète



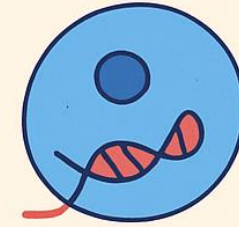
Du sang au résultat : comment on lit le livre de l'ADN



On commence avec un tube de sang ou un prélèvement de moelle osseuse



L'ADN est comme une bibliothèque ou un livre de recettes



On sort l'ADN des cellules

NGS : 11 étapes



On prépare ce matériel pour le lire avec une technique spéciale : le séquençage



Grâce à ces analyses, on comprend mieux la maladie

Le résultat est transmis au médecin généticien qui l'explique

On lit des milliers de gènes en même temps
On cherche les différences (= mutations)

NGS: Next Generation Sequencing

Effectué par les techniciens formés en NGS de la plateforme GMP (Génétique Moléculaire et Pharmacologie) en rotation (Biochimie, Hématologie et GMP)

Première étape :

Sortir les tubes d'ADN (beaucoup de boîtes...)



Deuxième étape :

Normaliser tous les ADN : utilisation du HAMILTON sauf certains tubes « particuliers » qui se feront à la main

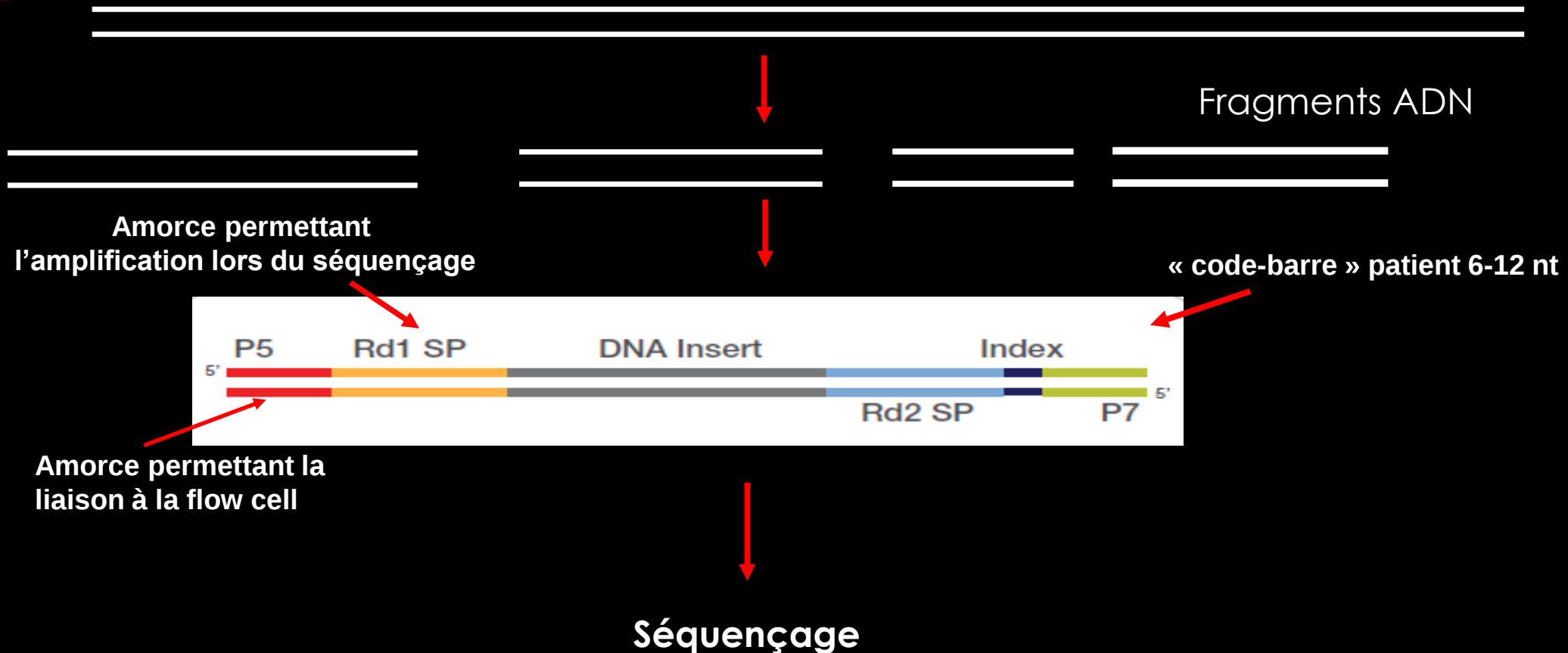
ADN final à 4ng/μL



1 journée

Fabrication de la librairie

ADN



Hybridation des amorces universelles permettant l'amplification et des séquences permettant l'accrochage sur la flowcell
Indexation des patients

Index : séquence courte qui permet d'identifier l'ADN d'un patient comme un code-barre
Ce qui permet l'analyse de plusieurs patients en même temps

NGS

Troisième étape :

Préparation de la bibliothèque NGS avec utilisation du Span8 (robot)

Description de la préparation de bibliothèques WGS

Temps pour
48
échantillons

Préparation robotisée
Biomek NXp Span8

Fragmentation enzymatique
+ End Repair / A-Tailing

1 h

Ligation de l'Adaptateur
Universel

1 h

Purification AMPureXP

1 h

PCR Pré-Capture avec
indexation

20 min

Préparation robotisée
Biomek 4000

Purification AMPureXP

40 min

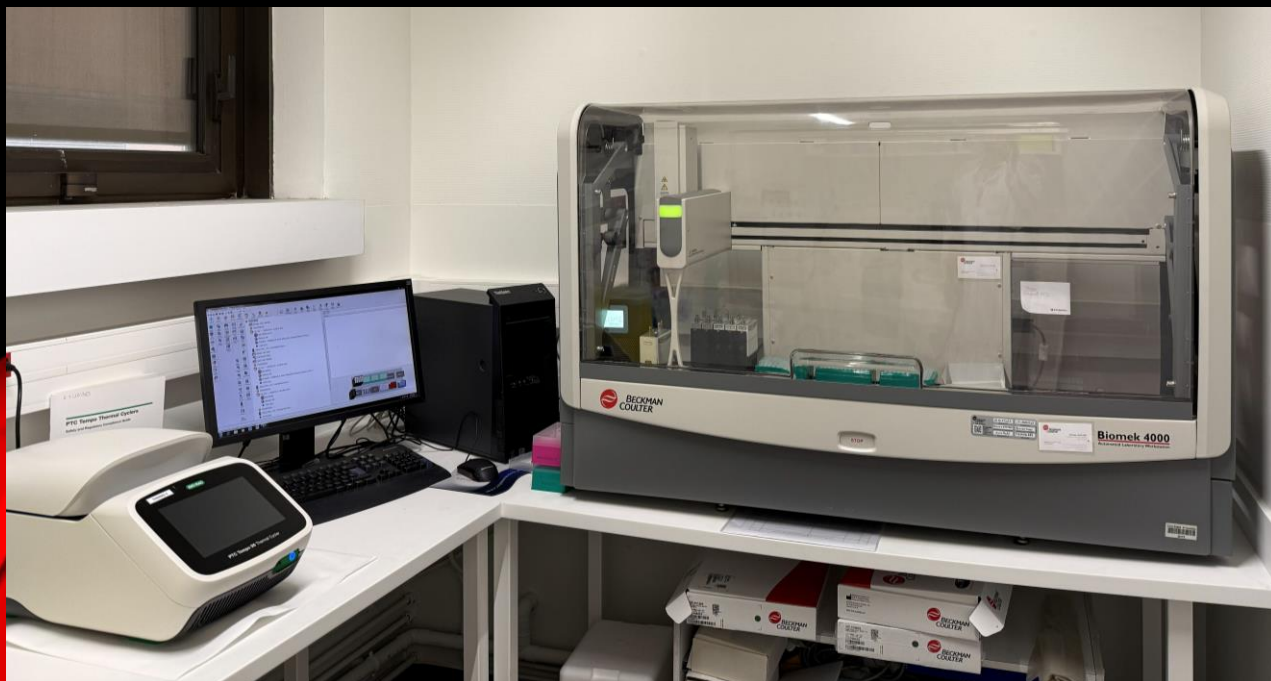
Capture par hybridation (Cf mode opératoire « Capture par hybridation_Technique robotisée ») et **séquençage Illumina** (Cf mode opératoire « MiSeq »)



NGS

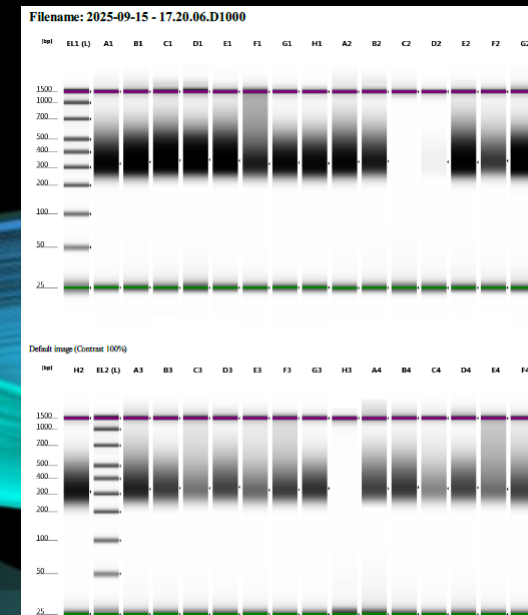
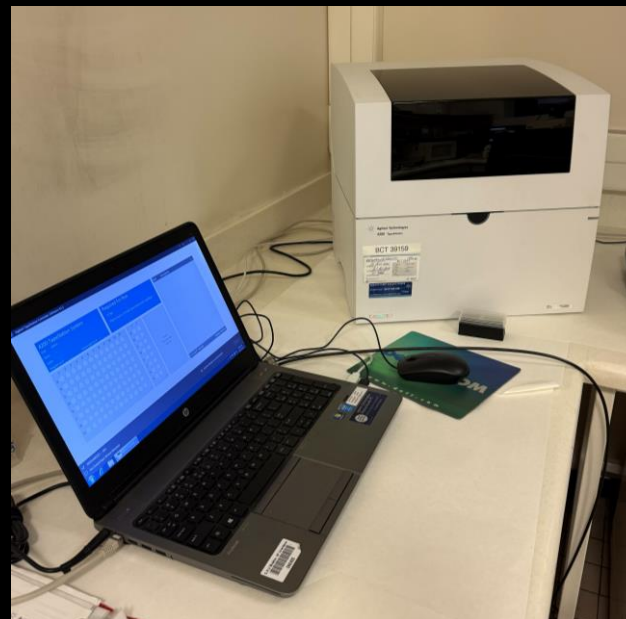
Quatrième étape :

Purification de nos librairies sur le Biomek



Cinquième étape :

Vérification de nos librairies sur la TapeStation



1 journée complète X2

NGS

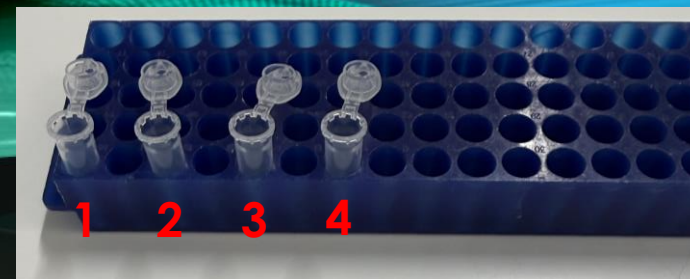
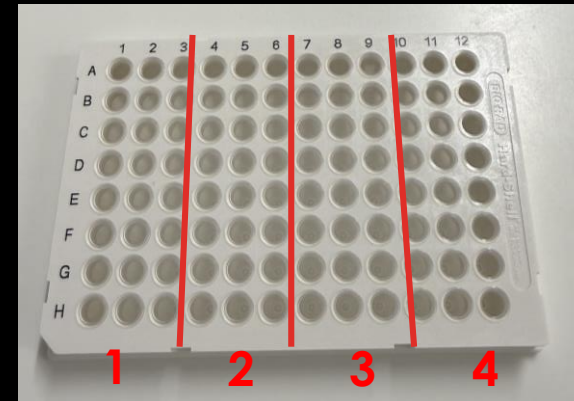
Sixième étape :

Dosage/Quantification de la librairie sur le Quant-Studio



Septième étape :

4 POOLS de 23 échantillons (+1 eau) de librairie à faire à la main : 1 POOL hémato- 1 POOL Biochimie et 2 POOL de GP



NGS

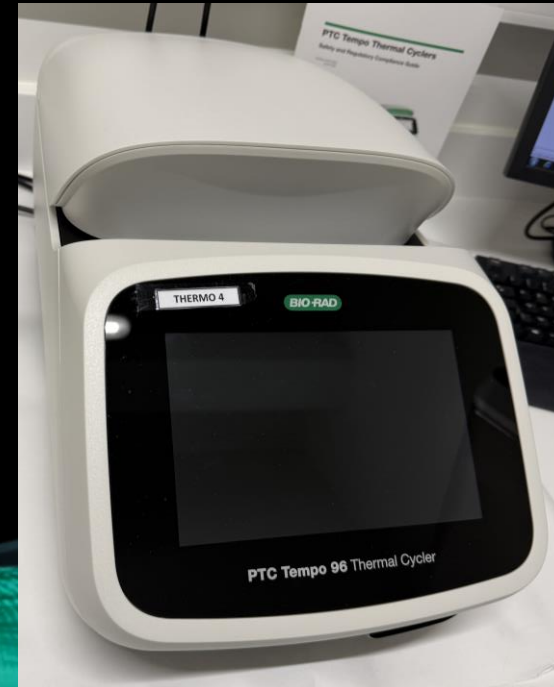
Huitième étape :

SpeedVac pendant 1h environ



Neuvième étape :

Capture toute la nuit (18h)



1 journée complète

NGS

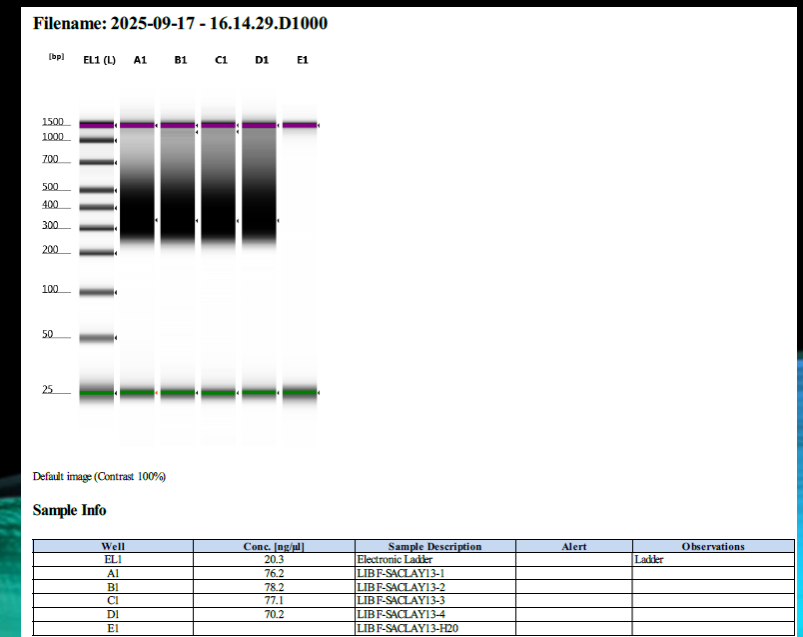
Dixième étape :

Purification des captures de librairies à la main et PCR post capture



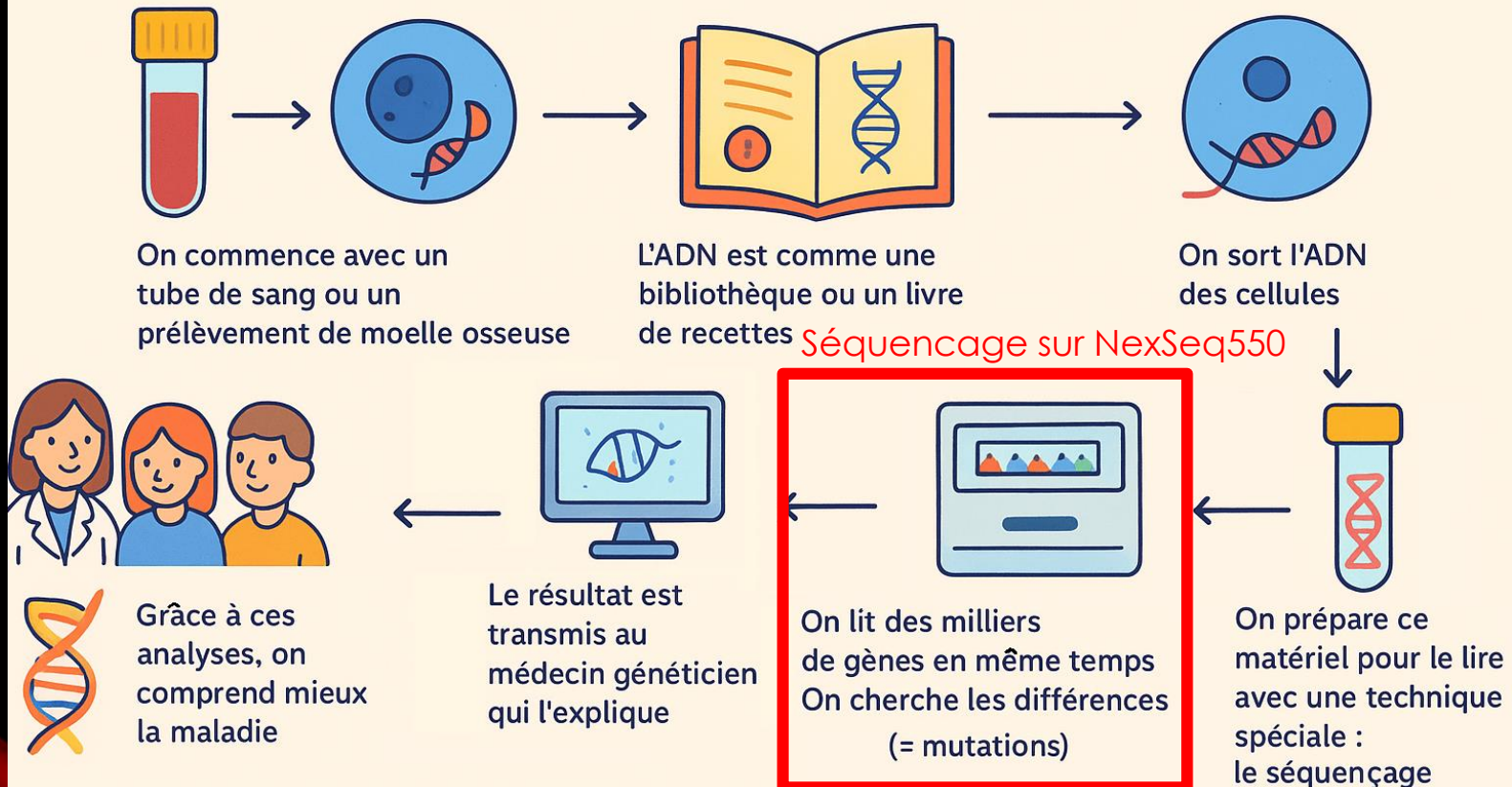
Onzième étape :

Vérification des produits de PCR post capture sur TapeStation



1 journée complète

Du sang au résultat : comment on lit le livre de l'ADN

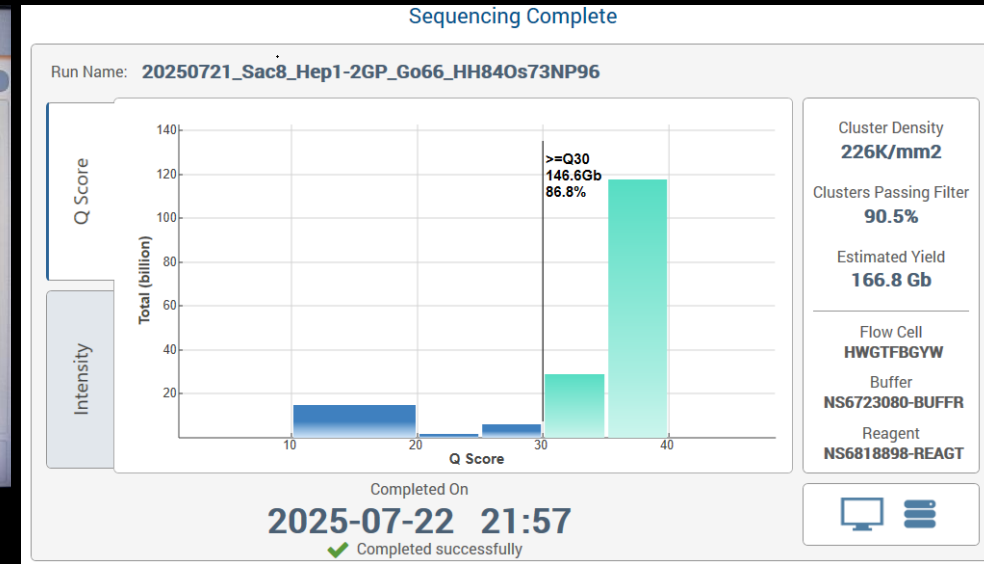
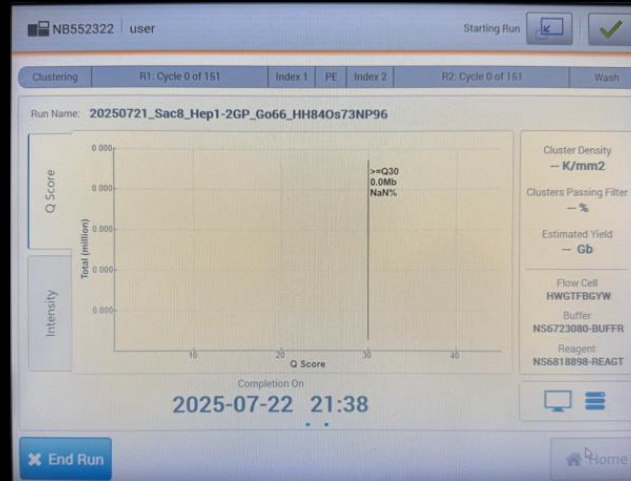


NGS

Séquencage sur NexSeq550

Douzième étape :

Lancement du NexSeq550

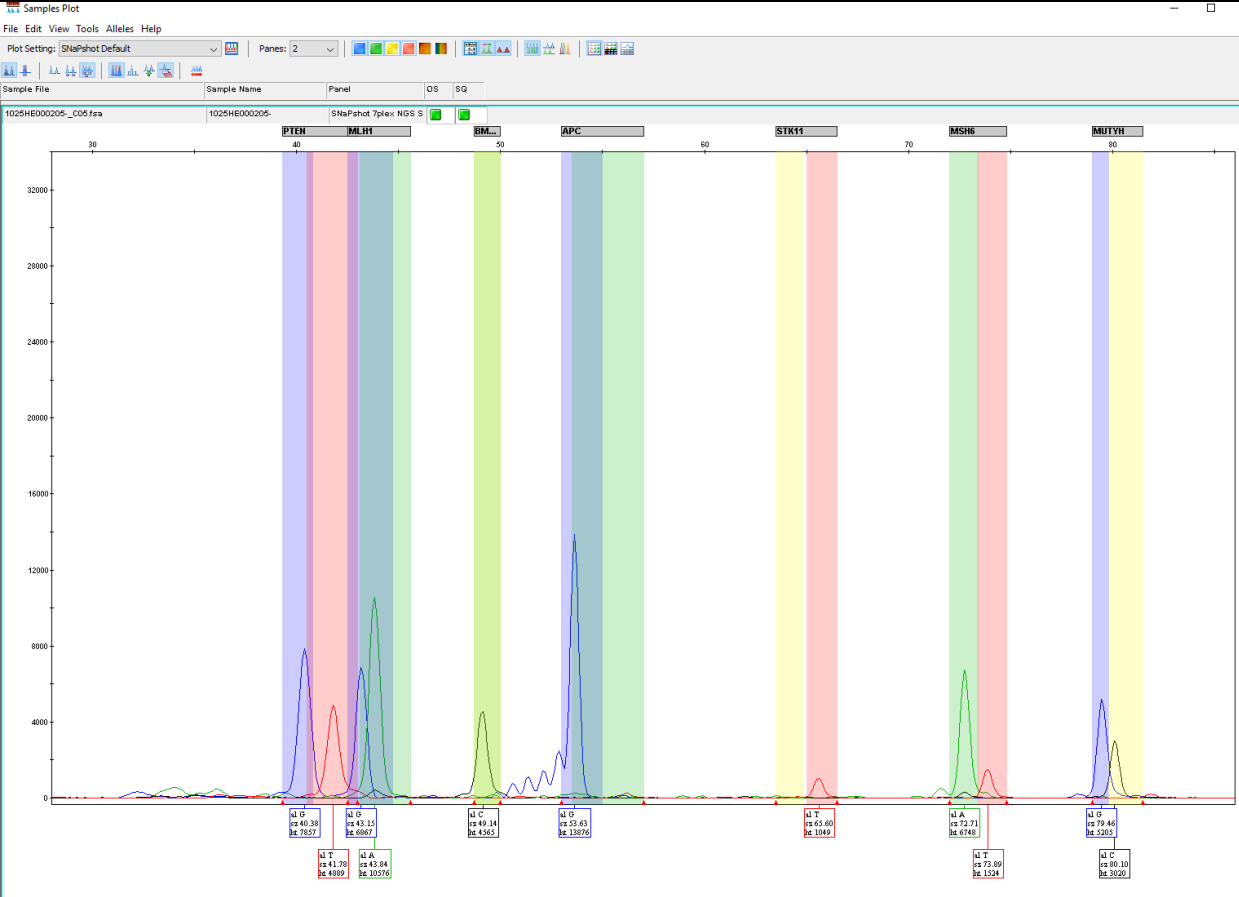


1/2 journée

3 jours

NGS

SNapShot: Identito-vigilance

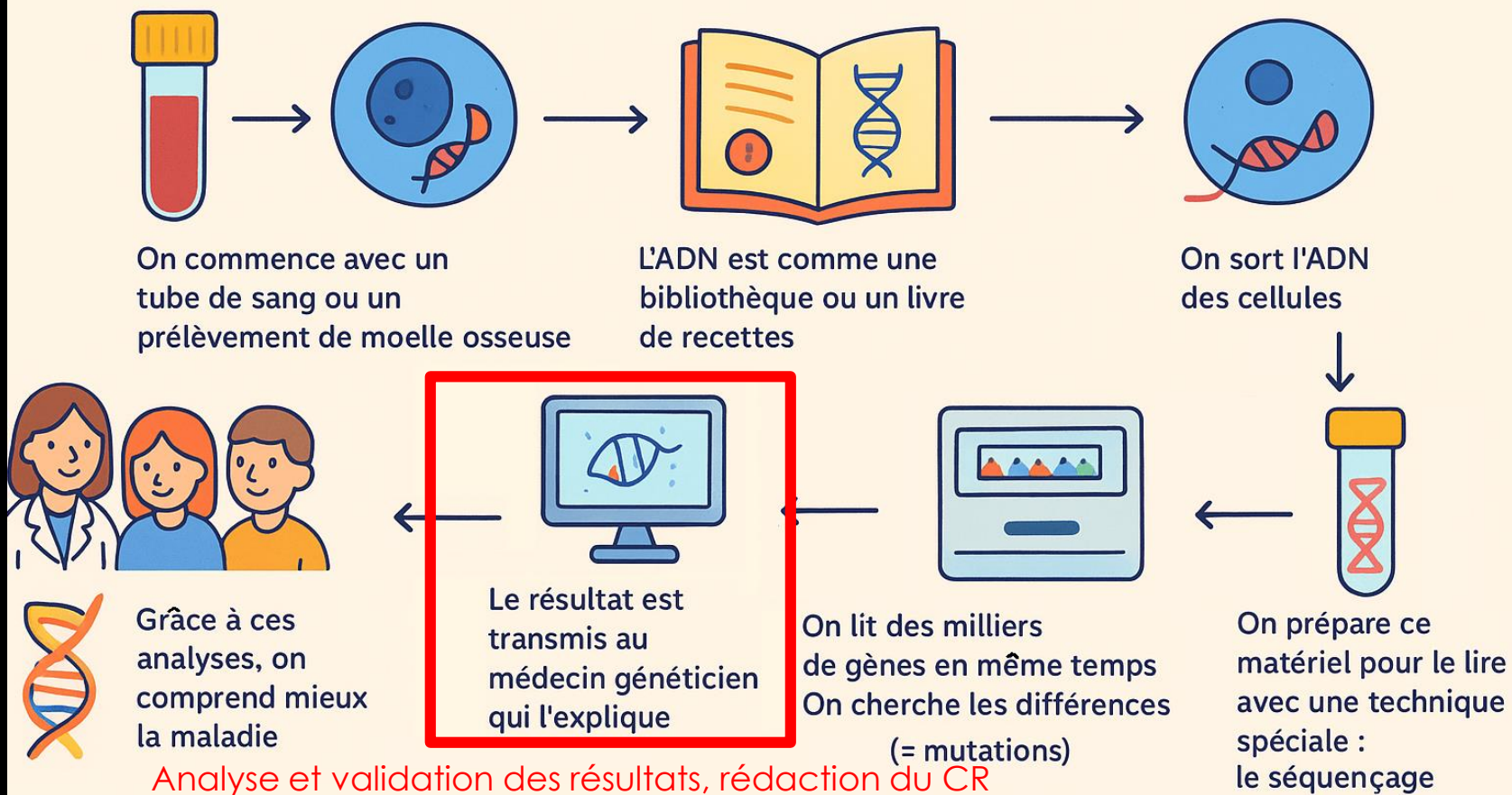


			REF	SNaP shot	REF NGS	ALT NGS	A,T,C,G
1025HE000205	chr1_45331833	MUTYH	GC	CG	C	G	0,0,46,53
1025HE000205	chr2_47803699	MSH6	AT	AT	A	T	65,67,0,0
1025HE000205	chr3_37042249	MLH1	GA	GA	A	G	59,0,0,45
1025HE000205	chr5_112827157	APC	GG	CC	T	C	0,0,151,0
1025HE000205	chr10_86876022	BMPR1A	CC	CC	C		0,0,164,0
1025HE000205	chr10_87961150	PTEN	GT	GT	T	G	0,72,0,60
1025HE000205	chr19_1219275	STK11	TT	AA	G	A	95,0,0,0

1025HE000181	chr1_45331833	MUTYH	GC	CG	C	G	0,0,27,30
1025HE000181	chr2_47803699	MSH6	AA	AA	A		109,0,0,0
1025HE000181	chr3_37042249	MLH1	GA	GA	A	G	40,0,0,34
1025HE000181	chr5_112827157	APC	GA	CT	T	C	0,86,60,0
1025HE000181	chr10_86876022	BMPR1A	CC	CC	C		0,0,137,0
1025HE000181	chr10_87961150	PTEN	TT	TT	T		0,111,0,0
1025HE000181	chr19_1219275	STK11			G	A	40,0,0,31

CHECK

Du sang au résultat : comment on lit le livre de l'ADN



NGS

Récupération des résultats :

Utilisation de plusieurs plateformes/logiciels (G-route puis Leaves couplé à QCI et Alamut)

G-route AP-HP

Décrire, importer et analyser un run

Données brutes

Données analysées

Intégrer avec les fichiers de données

G-route

Leaves

Search analysis

SACLAY-v1

PTOXMB-v1

EKTA-v2

EKTA47_RUN197

EKTA43v2_BiqT_RUN192

EKTA46v2_BiqT_RUN192

EKTA44v2_BiqT_RUN192

EKTA45v2_BiqT_RUN192

EKTA41v2_RUN182

EKTA39v2_RUN178

EKTA40v2_RUN178

EKTA38v2_RUN178

Overview

Cnv

Samples in analysis

Sample id	Patient id	Pathology	Undercovered target
1025GP007799_5143		HEPATO	199 targets
1025GP007860_5145		HEPATO	290 targets
1025GP007885_5146		HEPATO	241 targets
1025GP007999_5147		HEPATO	352 targets
1025GP008001_5148		HEPATO	284 targets
1025GP008005_5149		SURDITE	438 targets
1025GP008023_5150		NEURO	214 targets
1025GP008032_5151		HEPATO	242 targets
1025GP008035_5152		HEPATO	212 targets
1025HE000278_588		HEMATO	172 targets
1025HE000280_589		HEMATO	317 targets
1025HE000283_590		HEMATO	247 targets
1025HE000287_591		HEMATO	263 targets
1025HE000332_592		HEMATO	237 targets
1025HE000338_593		HEMATO	194 targets
1025HE000352_5184		HEMATO	235 targets
1025HE000354_5185		HEMATO	304 targets
1025HE000357_5186		HEMATO	279 targets

View selected samples

Leaves

Plusieurs jours

NGS

QCI

Clinical Insight

Variant ListVariant DetailsReview & Report

Accession ID (Test Product Code)
1024HE000073_S81-DBA2071 (ABC - Hereditary)

Age
-

Sex
Female

Ethnicity
-

Patient Phenotype(s)
Show

Phenotype: Diamond-Blackfan anemia

Age of Onset
Birth - 11 Years

Disease Prevalence
1/149254

Mode of Inheritance
Dominant

Gene
RPS26

Variant
c.9_12del
p.K4Ets*40

Population Frequency: 0% gnomAD
Genotype: Het
Impact: Frameshift

Computed Classification
Pathogenic
Diamond-Blackfan anemia

Open< PreviousNext >Use ClassificationView Bibliography

Filter Settings24 variants

Gene	Alteration	Phenotype	Proband	Mode Of Inheritance	Function	Impact	CADD Score	ClinVar	Max Population Frequency	Variant Findings	Publications	HGMD Accession
RPS26	c.9_12del p.K4Ets*40	Diamond-Blackfan anemia		dominant	yes	Frameshift	29.3	P(3)	0% gnomAD	13	8	CD122319 (DM)
PARP4	c.3228_3285+5delinsATCTTTGTTTCG	Hereditary Disorder		-	normal	-	-	-	0% gnomAD	-	-	-
PIEZO1	c.4313C>T p.P1438L	Dehydrated hereditary stomat...		dominant	normal	Missense	23.7	VUS(1)	0.0049% gnomAD (East Asian)	2	1	-
RPS6KB2	c.269C>T p.T90I	Hereditary Disorder		-	normal	Missense	15.95	-	0.6115% gnomAD (African)	-	-	-
PARP4	c.1384C>T p.R462C	Hereditary Disorder		-	normal	Missense	25.8	B(2)	4.5561% gnomAD (African)	1	0	-
PARP4	c.2972A>G p.X991R	Hereditary Disorder		-	normal	Missense	<10	B(2)	4.3568% gnomAD (African)	1	0	-
PARP4	c.3231C>T p.S1077S	Hereditary Disorder		-	normal	Synonymous	<10	-	4.2851% gnomAD (African)	-	-	-
PIEZO1	c.6829C>A p.L2277M	Dehydrated hereditary stomat...		dominant	normal	Missense	23.2	LP(1), LB(1), B(3)	3.8999% gnomAD (South Asian)	18	9	CM1911811 (DM?)
POLE	c.2559C>T p.I859I	Susceptibility to colorectal ca...		dominant	normal	Synonymous	<10	LB(2), B(14)	4.7160% gnomAD (African)	7	1	-
RPL15	c.11-241G>A	Diamond-Blackfan anemia		dominant	normal	-	<10	-	0.0942% gnomAD (European)	-	-	-
RPL5	c.3-3G>C	Diamond-Blackfan anemia		dominant	normal	Splicing	19.99	LB(9), B(5)	0.4841% gnomAD	13	4	CS190839 (DM)

ALAMUT

RPS26 (Ribosomal protein S26) Variation

NM_001029.5(RPS26):c.9_12del

MANE Select

Variant Overview

The deletion is located in 'NM_001029.5' exon 2.

Nomenclature HGVS:
cDNA Level: NM_001029.5(RPS26):c.9_12del
gDNA Level: Chr12(GRCh38):g.56042430_56042433del
Niveau des protéines: p.(Lys4Glufs*40)

This variant is in protein domain:

- Ribosomal protein S26e
- Ribosomal protein S26e superfamily

Effet sur le codage

The variation generates a 'Frameshift' as coding effect.

The frameshift starts at codon Lys4.
The new reading frame ends in a STOP codon at position 40.

External Databases

This variant is known to:
ClinVar (2025-01-20): [1076796](#) (Pathogenic** - Diamond-Blackfan anemia | Diamond-Blackfan anemia 10).

Accession ID	Test Product Code	State	Test Date
MGR1089-1024HE000008_S76	ABC - Hereditary hereditary	Pending	2025-07-07
MGR1090-1024HE000040_S75	ABC - Hereditary hereditary	Pending	2025-07-07
MGR033-1024HE000095_S74	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1214-1025HE000090_S82	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1183-1025HE000019_S81	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1179-1024HE001080_S80	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1170-1024HE001060_S55	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1169-1024HE001054_S54	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1165-1024HE001030_S53	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1160-1024HE001032_S52	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1159-1024HE001030_S35	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
DBA2140-1025HE000078_S43	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07
MGR1155-1024HE001044_S37	ABC - Hereditary hereditary	In Review	2025-07-07

HomeRPS26 NM_001029.5 (GRCh38 chr12)

View configurationDefaultTranscriptNM_001029.5Exon namingSystematic numbering (1..n)

TRANSCRIPT VIEWREGION VIEW

Vue générale du transcript NM_001029.5 (RPS26)

MANE Select

RPS26 - Ribosomal protein S26 | GRCh38 (Chr 12) | gnomAD SCORES OMIM* BRIDGES

Genome - chr12:56,042,347-56,042,519 (GRCh38) - 178 bps

Conservation Nucleotidique

Gène Homo sapiens ribosomal protein S26 (RPS26), mRNA

alamut

Frequences Alléiques

ClinVar

NGS

Identification des variants d'intérêts avant validation biologique par Dorin et/ou Ludivine

Plusieurs jours

Validation biologique des résultats par Lydie avec le dossier patient complet

1 jour/semaine

Préparation de la synthèse des résultats puis du CR par les techniciennes de BM GR (Dorin et Ludivine)

Plusieurs jours

Rédaction et validation du CR par Lydie- Impression puis envoi par les secrétaires (Mariam et Sabrina)

Plusieurs jours



Le parcours d'un tube de sang

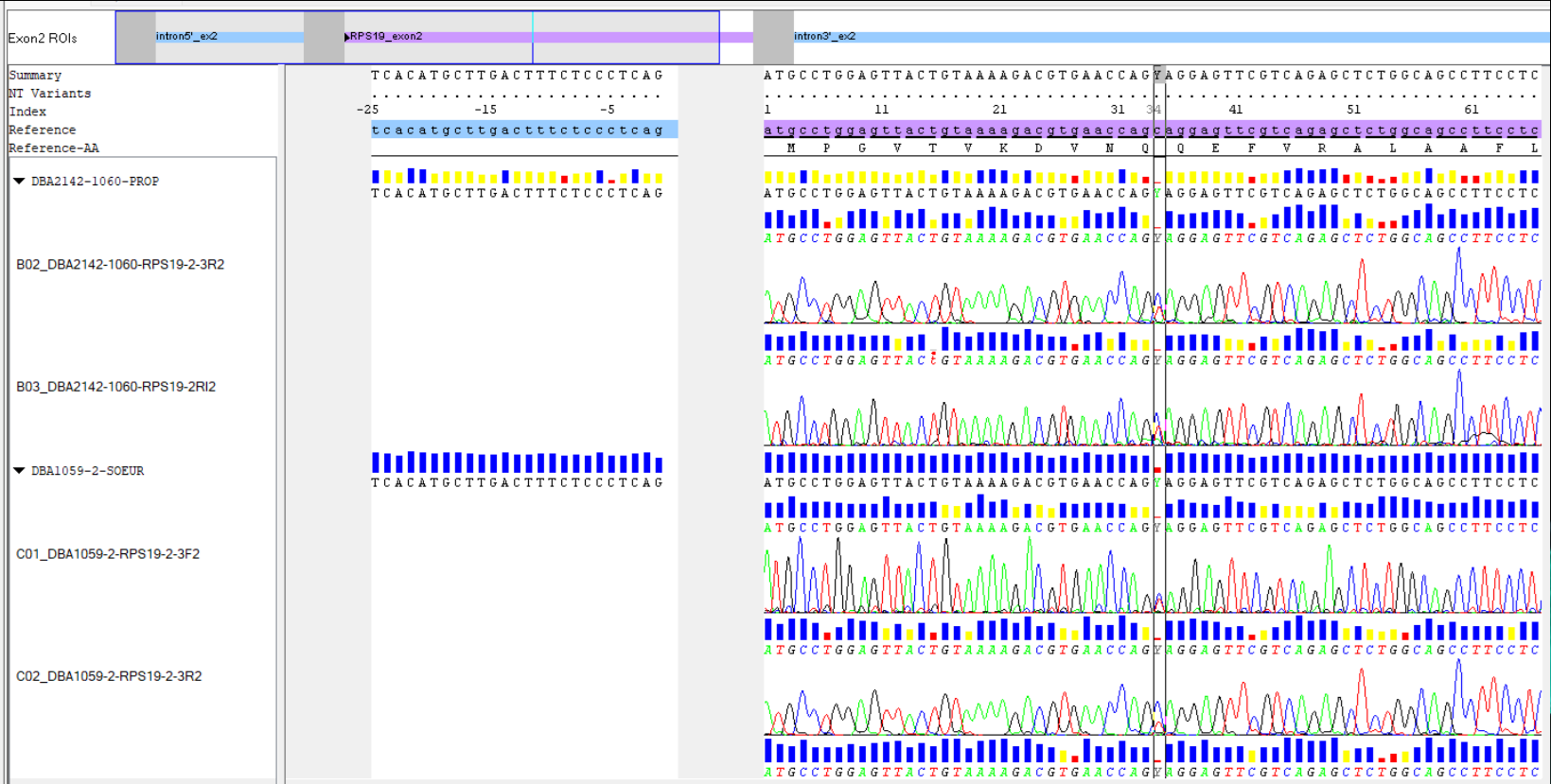
Au total :

- Prélèvements 1 jour
 - Réception au centre de tri 1 jour
 - Déballage et vérification de la concordance de l'identité du patient (feuille + tubes)
 - Enregistrement au laboratoire dans notre logiciel GENNO + dans la banque ADN
 - Etiquetage des prélèvements
 - Extraction sur le QIAAsymphony
 - Dosage au QiaExpert
 - Technique moléculaire : NGS et SNaPshot 10 jours
 - SANGER 2 jours
 - Analyse des résultats Plusieurs jours
 - Rendu au prescripteur Plusieurs jours
(validation biologique + CR)
- 1 jour
- 1 jour
- 1 mois minimum

SANGER

DBA 2142/1060-2							
1025HE000100_S10	RPS19	Exon 02	NM_001022:c.34C>T HTZ	Chr19(GRCh38):g.41860808C>T	p.(Gln12*)	Classe 5	stop_gained
	G6PD	Exon 4	NM_001042351.2:c.202G>A HTZ	ChrX(GRCh38):g.154536002C>T	p.(Val68Met)	Classe 5	missense_variant
	G6PD	Exon 5	NM_001042351.2:c.376A>G HTZ	ChrX(GRCh38):g.154535277T>C	p.(Asn126Asp)	Classe 2	missense_variant
EKTA 47	UGT1A1	Intron 1	NM_000463.2:c.-41_-40dup HOMO	Chr2(GRCh38):g.233760247_233760248dup	p.?	Classe 5	upstream_gene_variant

Utiliser pour les DPN et enquête familiale





SeqScape Software 4 – Mutations Report

Generated at: 07 oct. 2025 at 13:04:05 CEST

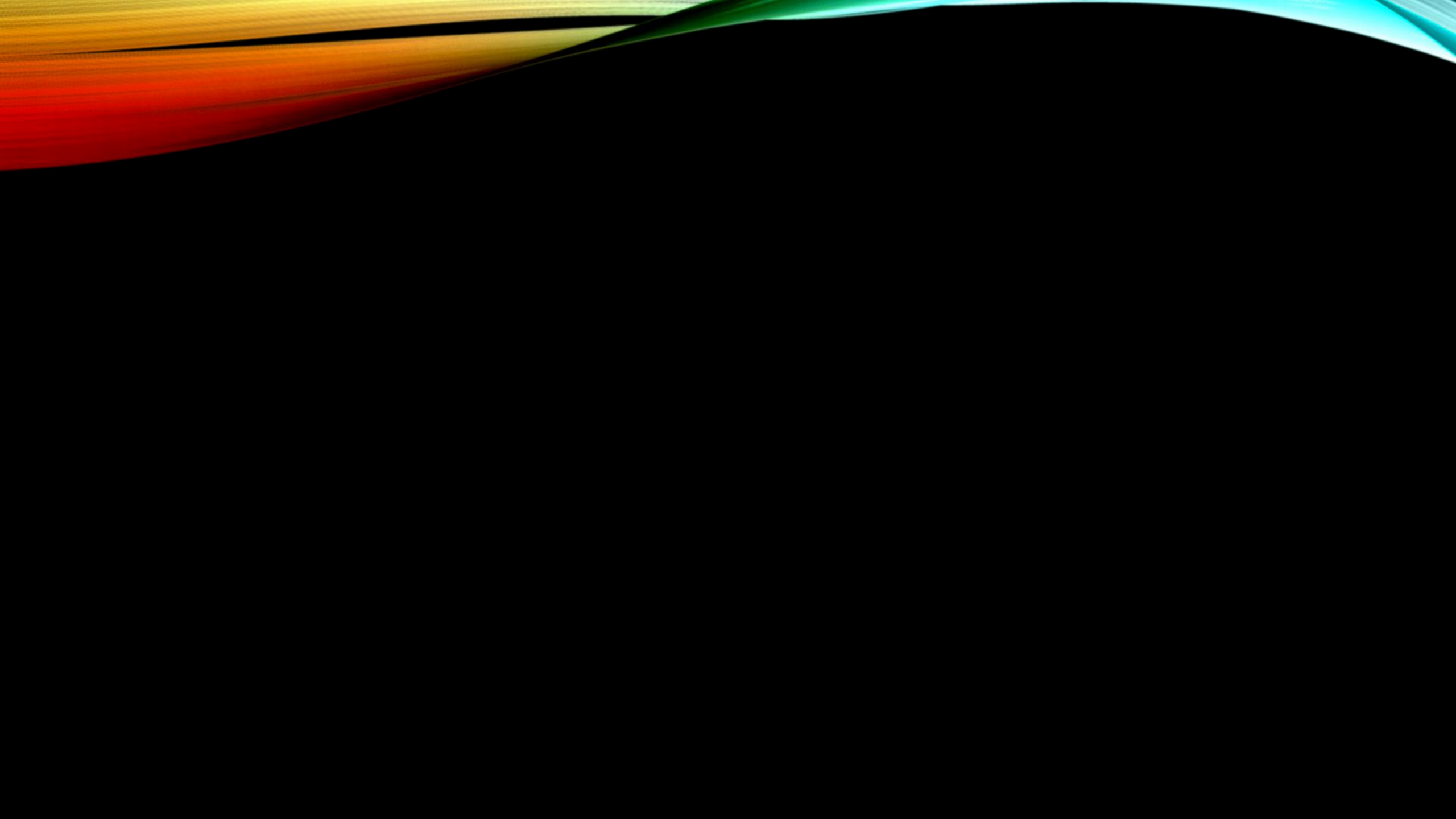
Specimen	Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV	Known	Effect	Aa Change	Description
DBA1059-2-SOEUR	34c>Y	RPS19_exon2	34	1	Sub	13	no	no ns ense	Q12[Q,*]	
DBA2142-1060-PROP	34c>Y	RPS19_exon2	34	1	Sub	3	no	no ns ense	Q12[Q,*]	

15 jours complets depuis la réception du tube



MERCI POUR VOTRE ATTENTION

- Merci : à l'association
- Aux familles et aux patients
- A Lydie et à tous nos collègues



TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

SÉQUENÇAGE NOUVELLE GÉNÉRATION

Séquençage par synthèse : Illumina

Adapté de l'auteur et de la NGS Illumina

