

Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques

Catherine Rydlewski
Laboratoire de Génétique, Hôpital Erasme, Bruxelles.

Anne-Sophie ADAM
Laboratoire hospitalier Universitaire de Bruxelles



Corata, Troyes, 26 septembre 2019



Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques

Rare or very rare haemolytic anaemias



- About 90 rare types of anaemia have been described
- Among them \pm 80% are inherited
- www.orpha.net

- [Aceruloplasminemia](#)
- [Adenylate kinase deficiency](#)
- [Alpha-thalassaemia - trait or carrier](#)
- [Autosomal dominant sideroblastic anaemia](#)
- [Beta-thalassaemia - trait or carrier](#)
- [CDA with thrombocytopenia \(GATA 1 mutation\)](#)
- [Congenital acanthocytosis](#)
- [Congenital dyserythropoietic anaemia type I](#)
- [Congenital dyserythropoietic anaemia type II](#)
- [Delta Beta-thalassaemia](#)
- [DMT1- deficiency anaemia](#)
- [Fanconi anaemia](#)
- [GLRX5-related Sideroblastic anaemia](#)
- [Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency](#)
- [Glutathione synthetase deficiency](#)
- [Haemoglobin D disease](#)
- [Haemoglobin H disease](#)
- [Haemoglobin M with anaemia](#)
- [Hereditary persistence of fetal haemoglobin](#)
- [Hereditary Stomatocytosis](#)
- [Hydrops fetalis](#)
- [Iron - refractory iron deficiency Anemia](#)
- [Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency](#)
- [Other thalassaemias](#)
- [Pancytopenia with malformations](#)
- [Pearson's Syndrome](#)
- [Phosphoglycerate kinase deficiency](#)
- [Pyruvate kinase deficiency](#)
- [Sickle cell trait](#)
- [SLC25A38-related Sideroblastic anaemia](#)
- [Triose phosphate isomerase deficiency](#)
- [Wolfram Syndrome](#)
- [Adenosine deaminase increased activity -ADA-](#)
- [Aldolase deficiency](#)
- [Atransferrinemia](#)
- [Autosomal recessive sideroblastic anaemia](#)
- [Beta-thalassaemia major \(and intermedia\)](#)
- [Compound heterozygous sickling disorders](#)
- [Congenital dyserythropoietic anaemia type I](#)
- [Congenital dyserythropoietic anaemia type III](#)
- [Diamond- Blackfan-Anemia](#)
- [Familial hypoplastic anaemia](#)
- [Gamma-glutamyl-cysteine synthetase deficiency](#)
- [Glucose phosphate isomerase deficiency](#)
- [Glutathione reductase deficiency](#)
- [Haemoglobin C disease](#)
- [Haemoglobin E disease](#)
- [Haemoglobin Lepore](#)
- [Hereditary Elliptocytosis](#)
- [Hereditary Spherocytosis](#)
- [Hexokinase deficiency](#)
- [Imerslund-Gräsbeck-Syndrom](#)
- [Keams-Sayre syndrome](#)
- [Mitochondrial myopathy sideroblastic anaemia](#)
- [Other types of congenitale dyserythropoetic Anemia](#)
- [Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria](#)
- [Phosphofructokinase deficiency](#)
- [Pyrimidine 5 nucleotidase deficiency](#)
- [Sickle cell anaemia](#)
- [Sideroblastic anaemia associated with ataxia](#)
- [Thiamine-responsive megaloblastic anemia](#)
- [Unstable haemoglobin](#)
- [X linked sideroblastic anaemia \(gene ALAS2\)](#)



Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques

Rare or very rare haemolytic anaemias



Clinical phenotypes	Genes	Location	Inheritance
RBC membranopathies			
Hereditary spherocytosis (HS)			
HS type 1	<i>ANK1</i>	8p11.21	AD/AR
HS type 2	<i>SPTB</i>	14q23.3	AD
HS type 3	<i>SPTA1</i>	1q23.1	AR
HS type 4	<i>SLC4A1</i>	17q21.31	AD
HS type 5	<i>EPB42</i>	15q15.2	AR
Hereditary elliptocytosis (HE)			
HE type 1	<i>EPB41</i>	1p35.3	AD
HE type 2	<i>SPTA1</i>	1q23.1	AD
HE type 3	<i>SPTB</i>	14q23.3	AD
Hereditary pyropoikilocytosis			
	<i>EPB41</i>	1p35.3	AR
	<i>SPTA1</i>	1q23.1	AR
	<i>SPTB</i>	14q23.3	AR
Dehydrated hereditary stomatocytosis 1	<i>PIEZO1</i>	16q24.3	AD
Dehydrated hereditary stomatocytosis 2	<i>KCNN4</i>	19q13.31	AD
Overhydrated hereditary stomatocytosis	<i>RHAG</i>	6p12.3	AD
Southeast Asian ovalocytosis	<i>SLC4A1</i>	17q21.31	AD
RBC enzymopathies			
G6PD deficiency	<i>G6PD</i>	Xq28	XR
Pyruvate kinase deficiency	<i>PKLR</i>	1q22	AR
Enolase deficiency	<i>ENO1</i>	1p36.23	AD
Adenylate kinase deficiency	<i>AK1</i>	9q34.11	AR
Glucose phosphate isomerase deficiency	<i>GPI</i>	19q13.11	AR
Pyrimidine 5' nucleotidase (UMPH1) deficiency	<i>NT5C3A</i>	7p14.3	AR
Gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency	<i>GCLC</i>	6p12.1	AR
Glutathione peroxidase deficiency	<i>GPX1</i>	3p21.31	AR
Glutathione reductase deficiency	<i>GSR</i>	8p12	AR
Glutathione synthetase deficiency	<i>GSS</i>	20q11.22	AR
Hexokinase deficiency	<i>HK1</i>	10q22.1	AR
Bisphoglycerate mutase deficiency	<i>BPGM</i>	7q33	AR
Phosphoglycerate kinase 1 deficiency	<i>PGK1</i>	Xq21.1	XR
Triosephosphate isomerase deficiency	<i>TP1</i>	12p13.31	AR
RBC hemoglobinopathies			
β-thalassemia, sickle cell disease	<i>HBB</i>	11p15.4	AD/AR
α-thalassemia	<i>HBA1</i>	16p13.3	AR
	<i>HBA2</i>	16p13.3	AR

Abbreviations: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; XR, X-linked recessive.



RARE AND VERY RARE ANAEMIAS

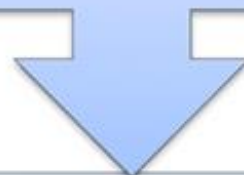
CLINICAL PHENOTYPE/LABORATORY TESTING



TRANSFUSION BEFORE DIAGNOSTIC TESTING

UNSOLVED CASES

DISCREPANCY BETWEEN CLINICAL PHENOTYPE AND DIAGNOSIS



NEXT GENERATION SEQUENCING



What is Next-Generation DNA Sequencing ?

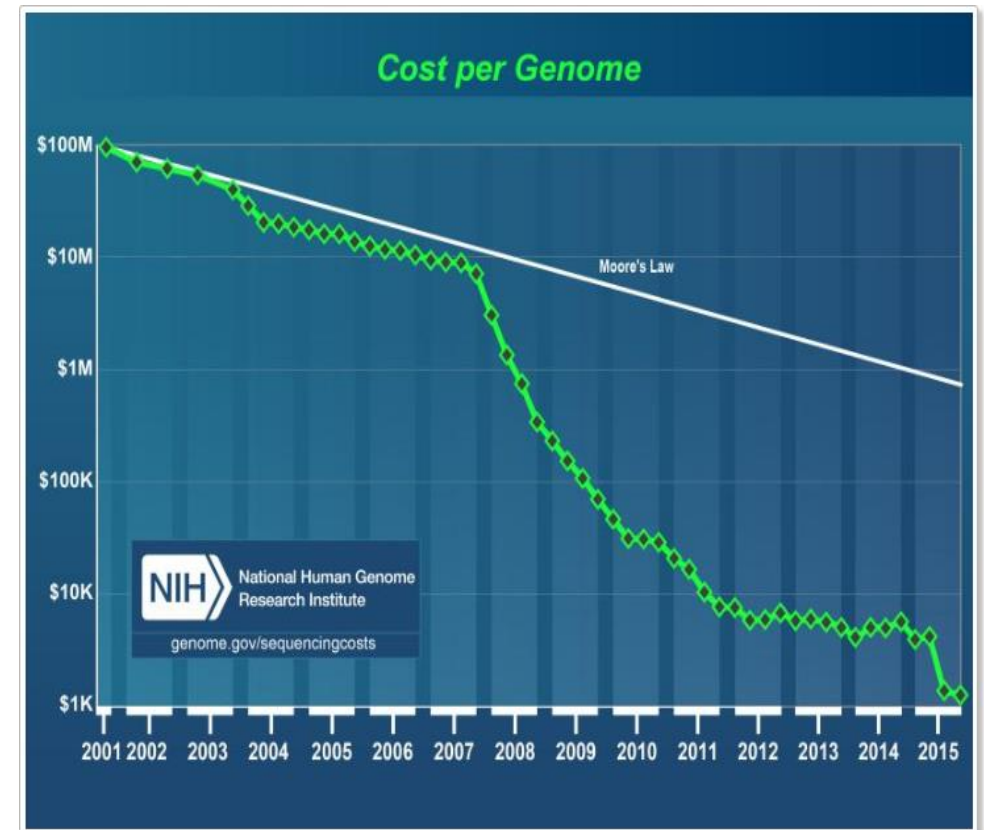
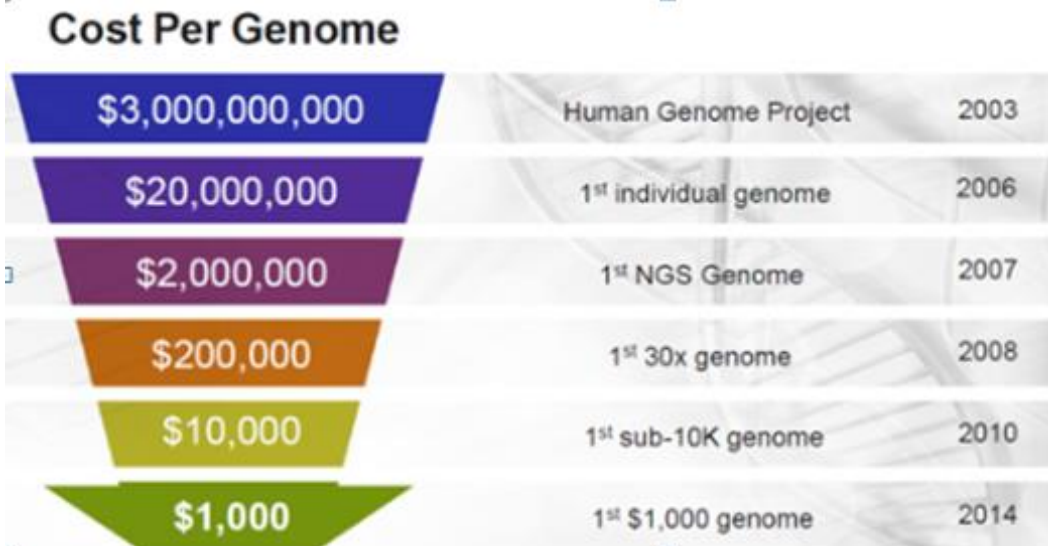
A high-throughput method used to determine a portion of the nucleotide sequence of an individual's genome. This technique utilizes DNA sequencing technologies that are capable of processing multiple DNA sequences in parallel. Also called massively parallel sequencing and NGS

NCI Dictionary of Genetics Terms



Rapid Evolution of Next Generation Sequencing Technologies

"The cost of sequencing a human genome was \$3 billion in 2000 and it took ten years. Now, it costs \$1,000 and takes a day or two."



Diminutions du coût du séquençage par nucléotides au cours des dernières années



Why Next Generation Sequencing ?

One can sequence hundreds of millions of short sequences (200bp) in a single run in a short period of time with a low per base cost

Benefits

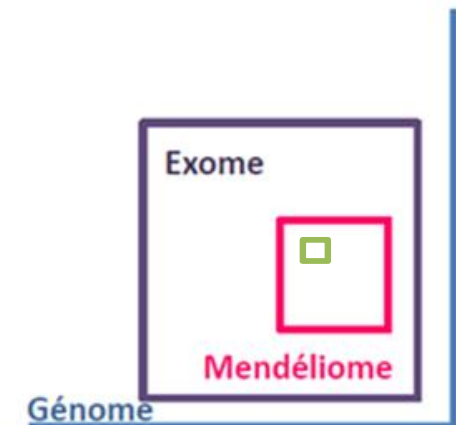
- More data produced with the same amount of input DNA
- Simultaneous screening of multiple genes in multiple samples
- Higher sequencing depth enables higher sensitivity
- Decreased sequencing cost per gene

Challenges

- High complexity of workflow and results
- Huge volume of data to analyze and to store
- Long turnaround time
- Ambiguous results with variants of uncertain significance

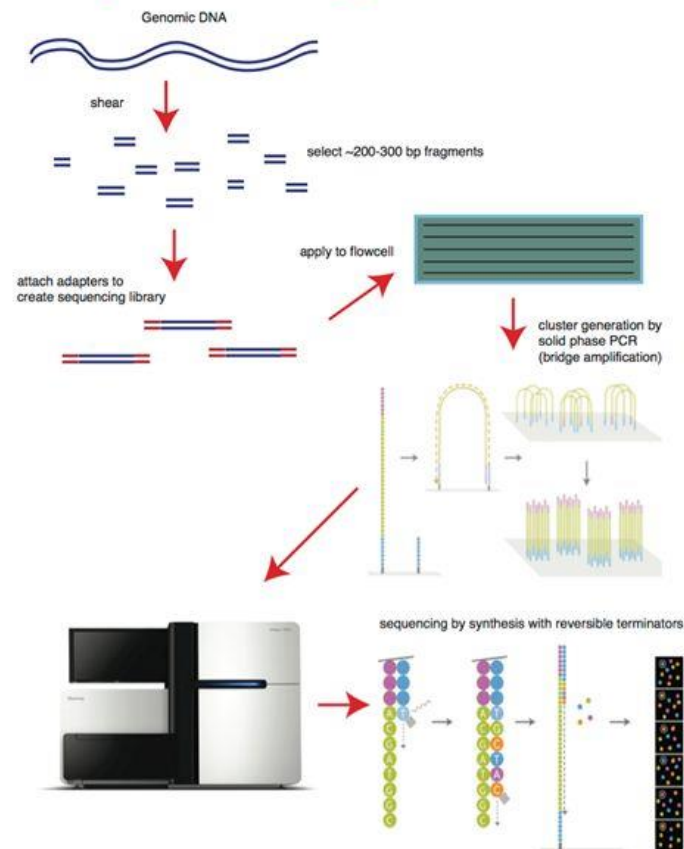


Term	Definition	Additional information
Genome	An organisme 's complete genetic material.	3000 million base pairs.
Exome	Part of the genome DNA that code for proteins.	20 000 coding genes. 30 million base pairs. Represents 1-3% of the whole genome.
Mendeliome	All genes known to be involved in Mendelian diseases, which are monogenic diseases whose inheritance within families complies with mendel's laws.	3000-4000 coding genes.
Gene panel	A select set of genes or gene regions that have known or suspected associations with the disease or phenotype under study.	10-100 genes.



Steps to Illumina sequencing

- Library construction
 - Fragment, attach adapter DNA
- Cluster generation
 - Add to flow cell
 - Bridge amplification
- Sequencing
 - Single base at a time, imaging
- Data analysis
 - Images transformed into basecalls and 'reads'



Apport du séquençage de nouvelle génération
dans le diagnostic des anémies hémolytiques



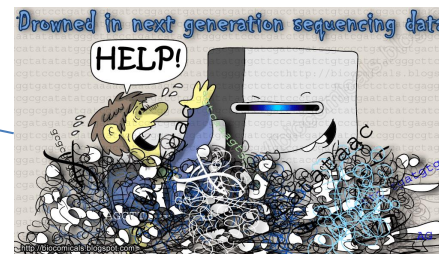
TAT of 6 months



1 week



1 week + 2 days importation



1 month

+/- 6 per day



“In house” panel of 4427 genes (mendeliome)

- a. Ataxia (524 genes)
- b. Congenital malformation syndromes (853 genes)
- c. Early onset epileptic encephalopathy (836 genes)
- d. Hereditary Hemolytic Anaemias due to unknown or doubtful origin (46 genes)
- e. Hereditary spastic paraplegia (160 genes)
- f. Neurodevelopmental disorders (1376 genes)
- g. Neuromuscular disorders (535 genes)
- h. Dermatogenetic panel, severe, rare and hereditary genodermatoses (374 genes)
- i. Obesity (70 genes)



Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques



AK1	adenylate kinase 1	AK1 deficiency	Enzymatic disorder
ALDOA	aldolase, fructose-bisphosphate A	ALDOA deficiency	Enzymatic disorder
ANK1	ankyrin 1	Spherocytosis	Membrane
BPGM	bisphosphoglycerate mutase	Anaemia to BPGM deficiency	Enzymatic disorder
C3	complement C3	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CD46	CD46 molecule	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CDAN1	codanin 1	Congenital dyserythropoietic anaemia type I	other
CFB	complement factor B	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CFH	complement factor H	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CFHR1	complement factor H related 1	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CFHR3	complement factor H related 3	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CFHR4	complement factor H related 4	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
CFI	complement factor I	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
DGKE	diacylglycerol kinase epsilon	Atypical haemolytic uraemic syndrome	other
EPB41	erythrocyte membrane protein band 4.1	Hereditary elliptocytosis (protein 4.1)	Membrane
EPB42	erythrocyte membrane protein band 4.2	Hereditary spherocytosis (protein 4.2)	Membrane
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	Anaemia to BPGM deficiency	Enzymatic disorder
GATA1	GATA binding protein 1	Congenital dyserythropoietic anaemia	other
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	Anaemia to G6P isomerase deficiency	Enzymatic disorder
GSS	glutathione synthetase	Anaemia to glutathione synthetase deficiency	Enzymatic disorder
GYPA	glycophorin A (MNS blood group)	Hereditary elliptocytosis (glycophorin A)	Membrane
GYPC	glycophorin C (Gerbich blood group)	Hereditary elliptocytosis (glycophorin C)	Membrane
HBB	hemoglobin subunit beta	Haemoglobinopathies	other
HK1	hexokinase 1	Anaemia due to hexokinase deficiency	Enzymatic disorder
KLF1	Kruppel like factor 1	Congenital dyserythropoietic anaemia	other
NTSC3A	5'-nucleotidase, cytosolic IIIA	Anaemia due to pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency	Enzymatic disorder
PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1		Enzymatic disorder
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	Anaemia due to phosphoglycerate kinase deficiency	Enzymatic disorder
PIEZO1	piezo type mechanosensitive ion channel component 1	Hereditary stomatocytosis (xerocytosis)	other
PIGA	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A	Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria	other
PIGT	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T	Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria	other
PKLR	pyruvate kinase L/R	Anaemia due to pyruvate kinase deficiency	Enzymatic disorder
SEC23B	Sec23 homolog B, coat complex II component	Congenital dyserythropoietic anaemia	other
SLC4A1	solute carrier family 4 member 1 (Diego blood group)	Hereditary spherocytosis	Membrane
SPTA1	spectrin alpha, erythrocytic 1	Hereditary elliptocytosis, spherocytosis ,	Membrane
SPTB	spectrin beta, erythrocytic	Hereditary elliptocytosis, spherocytosis ,	Membrane
STOM	stomatin	?	
THBD	thrombomodulin	?	
TP1	triosephosphate isomerase 1	Anaemia due to triose phosphate isomerase deficiency	Enzymatic disorder
UGT1A1	UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1	Gilbert syndrome	other
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A	quantitative trait loci (QTL) for HbF	other
HBG1	hemoglobin subunit gamma 1		other
HBG2	hemoglobin subunit gamma 2		other
MYB	MYB proto-oncogene, transcription factor	quantitative trait loci (QTL) for HbF	other



Multi-gene panel testing improves diagnosis and management of patients with hereditary anemias

Roberta Russo, Immacolata Andolfo, Francesco Manna, Antonella Gambale, Roberta Marra, Barbara Eleni Rosato, Paola Caforio, Valeria Pinto, Piero Pignataro, Kottayam Radhakrishnan, Sule Unal, Giovanna Tomaiuolo, Gian Luca Forni, Achille Iolascon

Am J Hematol. 2018 May;93(5):672-682.

Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing

R. Del Orbe Barreto, B. Arrizabalaga, A. B. De la Hoz, Á. García-Orad, M. I. Tejada, J. C. Garcia-Ruiz, T. Fidalgo, C. Bento, L. Manco, M. L. Ribeiro

Int J Lab Hematol. 2016 Dec;38(6):629-638.

Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias

Archana M. Agarwal, Roberto H. Nussenzveig, Noel S. Reading, Jay L. Patel, Nikhil Sangle, Mohamed E. Salama, Josef T. Prchal, Sherrie L Perkins, Hassan M. Yaish, Robert D. Christensen

Br J Haematol. 2016 Sep;174(5):808-14.



What we need to perform mendeliome

1. Inconclusive results of morphological and biochemical techniques.
2. EDTA blood samples (7 ml) from the affected patient (proband) and both parents (make results easier to analyse).
3. Genetic analysis prescription (signed informed consent attached to the prescription).



Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques

Genetic prescription (4 pages)
->available on our website

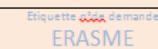
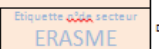
<http://www.ulbgenetics.be>

GENETIQUE HEREDITAIRE/PHARMACOGENETIQUE

Date prescription: _____ Cachet du médecin: _____ Signature du médecin: _____

www.ulbgenetics.be

Centre de Génétique
Hôpital Erasme
808, route de Leuven,
1070 Anderlecht
tel : 02/535 41 43

PATIENT		Indications Cliniques
Identifiant Patient Nom : Prénom : Naissance : ____/____/____ Sexe : <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F Rue : N° : CP : Commune : CT1/CT2 : ____/____ N° mutuelle : ____/____ N° NIS :		<input type="checkbox"/> Cas isolé <input type="checkbox"/> duo <input type="checkbox"/> trio <input type="checkbox"/> autre : <input type="checkbox"/> Suspicion d'affection génétique non-ciblée : <input type="checkbox"/> Suspicion d'affection génétique ciblée : <input type="checkbox"/> Suspicion d'une maladie métabolique : <input type="checkbox"/> Test anomalie génétique familiale : <input type="checkbox"/> Test pré-symptomatique : cas index : <i>(deux demandes indépendantes, uniquement après conseil génétique)</i> <input type="checkbox"/> Confirmation d'une anomalie génétique : <input type="checkbox"/> Pharmacogénétique :
Etiquette  demande ERASME	Etiquette  secteur ERASME	
Types de prélèvement et Analyses		
Cytogénétique <input type="checkbox"/> CGHarray 1,2 <input type="checkbox"/> Caryotype (remplacé par CGHarray au fœtus) <input type="checkbox"/> anomalie structure/nombre particulière : <input type="checkbox"/> anomalie en filaire mosaïque : <input type="checkbox"/> FISH rapide sur sang (analyse CGHarray à l'apogée) <input type="checkbox"/> sexe <input type="checkbox"/> trisomie : <input type="checkbox"/> autre : <input type="checkbox"/> FISH sur frottis jugal <input type="checkbox"/> Urine <i>(uniquement en accord intentionnel cas d'analyse sur urine)</i> <input type="checkbox"/> sexe <input type="checkbox"/> trisomie : <input type="checkbox"/> autre : <input type="checkbox"/> Culture fibroblastes/analyse métabolique <input type="checkbox"/> Culture fibroblastes/stockage <input type="checkbox"/> Cessure chromosomique <input type="checkbox"/> Lignée lymphoblastoïde/stockage	Mendéliens <input type="checkbox"/> Anomalies neurodéveloppementales 1,2 <input type="checkbox"/> Endophthalmie congénitale primaire 1,2 <input type="checkbox"/> Syndromes congénitaux rares 1,2 <input type="checkbox"/> Ataxie (sauf expansion de triplets) 1,2 <input type="checkbox"/> Désordres neuromusculaires héréditaires 1,2 <input type="checkbox"/> Parosmie osseuse héréditaire 1,2 <input type="checkbox"/> Neurosonie 1,2 <input type="checkbox"/> Dysplasie musculaire/tyrosémie 1,2 <input type="checkbox"/> Maladie du neurone moteur 1,2 <input type="checkbox"/> Choroïdite musculaire 1,2 <input type="checkbox"/> Syndrome myopathique congénital 1,2 <input type="checkbox"/> Sarcoplasme 1,2 <input type="checkbox"/> Pathologies endocrinologiques rares 1,2 <input type="checkbox"/> Pathologies dermatogénétiques rares 1,2 <input type="checkbox"/> Pathologies immunogénétiques rares 1,2 <input type="checkbox"/> Anémies hémolytiques héréditaires 1,2	Panel de gènes multiples <input type="checkbox"/> Fièvres périodiques 1,2 <i>→ Rempli 3 en page 3</i> <input type="checkbox"/> Microdophtalmie congénitale primaire 1,2 <input type="checkbox"/> Hydrodophtalmie congénitale primaire 1,2 <input type="checkbox"/> HTAF/Bandy-Osler-Weber 1,2 <input type="checkbox"/> Hypercholestérolémie - Dyslipidémie 1,2 <input type="checkbox"/> Score DLCH oligoprote, panel accepté à 8 ans détails cliniques justifiant le score sont fournis <i>→ rempli formulaire spécifique</i> <input type="checkbox"/> Hémochromatose 1,2 <i>→ rempli formulaire spécifique</i> <input type="checkbox"/> Porphyries 1,2 <i>→ jointure résultats analyses biochimiques</i> <input type="checkbox"/> Pancréatite héréditaire 1,2 <input type="checkbox"/> Cancers héréditaires 1,2 <i>→ rempli formulaire spécifique</i> <input type="checkbox"/> Gènes (si candidat) :
Analyses ciblées Neurologique/musculaire <input type="checkbox"/> Amyotrophie spinale (SMN2) <input type="checkbox"/> Ataxie spinocérébelleuse <input type="checkbox"/> SMA1 <input type="checkbox"/> SMA2 <input type="checkbox"/> SMA3 <input type="checkbox"/> SMA4 <input type="checkbox"/> SMA7 <input type="checkbox"/> Charcot-Marie-Tooth 1e (CMT1, duplication-PMP22) <input type="checkbox"/> Neuropathie périphérique (HNPP, duplication-PMP22) <input type="checkbox"/> Huntington (HTT) <input type="checkbox"/> Dystrophie Musculaire Gouy-Pharyngée (DMG) <input type="checkbox"/> Dystonie de torsion (DYT2)	Analyses ciblées Nanisme <input type="checkbox"/> Achondroplasie <input type="checkbox"/> Hypochondroplasie (ACMP) Gastro-entérologie / Pneumologie <input type="checkbox"/> Mucopolysaccharidose (MPS) à 25 mutations à compléter Hématologie <input type="checkbox"/> Drépanocytose <input type="checkbox"/> Hémochromatose (modificateurs) <input type="checkbox"/> HbE2, HbE1, HbE2L, HbE, AC12A) <input type="checkbox"/> Thalassemies <input type="checkbox"/> alpha <input type="checkbox"/> beta Anomalie du développement/métabolisme <input type="checkbox"/> Displasie urinaire (DUP) Chr: 7 = 11 = 14 = 25 <input type="checkbox"/> Phénylalaninurie (PAH) <input type="checkbox"/> Crase-Willi/Aosse/DRA <input type="checkbox"/> X-Fragile (FMR1) Pharmacogénétique <input type="checkbox"/> IL28B <input type="checkbox"/> TPMT <input type="checkbox"/> Syndrome de Gilbert (UGT1A1)	Analyses ciblées Endocrinologie <i>→ pour autres gènes prescrire un questionnaire</i> <input type="checkbox"/> Albright (GNAS) <input type="checkbox"/> McCune Albright (GNAS) <input type="checkbox"/> Alagoua/Triplice A syndrome (AAS) <input type="checkbox"/> Hypoparathyroïdisme (CASR) * <input type="checkbox"/> Hypoparathyroïdisme (CASR) * <input type="checkbox"/> Hyperthyroïdisme non auto-immun (TRHR) <input type="checkbox"/> Hypothyroïdisme (TRHR) * <input type="checkbox"/> Résistance aux β agon, thyroïdiennes (TRHR) <input type="checkbox"/> Nodos, EDGAR, Multiples endocrines/Lux/MRCC (MEN) <input type="checkbox"/> Récepteur FSH <input type="checkbox"/> Récepteur LH ORL/Ophthalmologie <input type="checkbox"/> Déficit auditif (GJB2, GJB3) <i>→ Rempli 3 en page 3</i> <input type="checkbox"/> Pégivose (LCE2E4) <input type="checkbox"/> Dystrophie cornéenne endothéliale (LCE2E2) <input type="checkbox"/> Microsphérodactylie-Glucoame-Lux-Crist. (LCE2E2) Médecine interne <input type="checkbox"/> Hémochromatose type 1 (HFE) <input type="checkbox"/> Hémochromatose <input type="checkbox"/> Séq. Transferrine > 45% <input type="checkbox"/> Diabète insipide néphrogénique (AVPR2) <input type="checkbox"/> Syndrome Néphroses d'antidiurèse (OSR) (AVPR2)
<input type="checkbox"/> Sanger : <input type="checkbox"/> Autre analyse : <input type="checkbox"/> Stockage d'ADN		<input type="checkbox"/> Consentement obligatoire <input type="checkbox"/> Consentement conseil <input type="checkbox"/> Signes cliniques et arbre obligatoires

EDTA Héparine Héparine Tube conique milieu de transport Tube frottis AMIB Urine

888040/0 Version 5 mai 2018 Page 1



Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques



Consentement éclairé en vue d'une analyse génétique

Le consentement est nécessaire pour : les analyses de séquençage massif de **panels**, d'**exome**, du **génom**, du **métabom**, du **transcriptom**, dans un cadre clinique ou recherche, pour les **expédions** à rétranger et pour les **arrays** (CGH- et SNP-) en recherche.

PATIENT et PARENTS

Identifiant Patient
Nom : Prénom : Naissance : / /

Identifiant Mère
Nom : Prénom : Naissance : / /

Identifiant Père
Nom : Prénom : Naissance : / /

Ce consentement vaut pour le patient, le patient et sa mère, le patient et son père, le patient et ses deux parents.
Si les réponses aux questions ci-dessous sont différentes pour les membres de la famille, veuillez faire un consentement pour chaque membre.

Présence d'un traducteur oui, non. Nom : Prénom :

	OUI	NON
1. Consentez-vous aux prélèvements de sang et à la conservation de l'ADN/ARN/Tissu pour l'indication demandée* ?		
2. Consentez-vous à la réalisation d'un ou plusieurs examen(s) moléculaire(s) à l'échelle du génome entier** ?		
3. Consentez-vous à la réanalyse des données dans le cadre diagnostique ?		
4. Consentez-vous à être informés de la découverte fortuite*** d'autres affections médicalement utiles ?		
5. Consentez-vous au partage dé-identifié, à la recherche et à la publication éventuelle de résultats ?		

*Une copie de l'application clinique sera mise à disposition dans un ou plusieurs hôpitaux pour lesquels peut être fait un rapport concluant formellement et définitivement quant à leur rôle pathogène (nécessitant de ré-évaluer la situation thérapeutique).
** Tests non ciblés qui peuvent être réalisés à l'avenir sur d'autres dans le but de faire le diagnostic chez le patient, par exemple : CGH-array, SNP-array, séquençage de **panels**, de **exome**, du génome, du métabome, du transcriptome.
*** Découvertes fortuites : une analyse génétique non ciblée pourrait conduire à la découverte fortuite de résultats génétiques étrangers à la condition pour laquelle le test a été réalisé, appelés résultats accoutumés ou incidentels. Ils sont remis que des résultats cliniquement utiles et actionnables.

Je comprends que je retiens le droit de changer ou retirer mes consentements à tout moment, et ce pour les différents points détaillés ci-dessus, et que l'enfant devenu majeur pourra modifier les choix faits par ses parents le concernant. Le retrait de mes différents consentements sera sans conséquence négative sur la prise en charge médicale non-génétique de la personne concernée par ce consentement. Je comprends que mon retrait ne peut concerner des résultats et des informations obtenus avant le date de ma demande de retrait. Je comprends que ma participation est bénévole et ne pourra en aucun cas m'apporter des avantages financiers.

Le coût des analyses génétiques est pris en charge par l'INAMI dans la plupart des situations. Si vous n'êtes pas couvert par une mutuelle, une assurance, un service social ou une association officiellement reconnus acceptant de couvrir les frais, ceux-ci (peuvent aller jusqu'à environ 1500 euros par personne selon l'analyse) vous seront, par défaut, imputés. Il est donc très important, avant tout test génétique, de vérifier avec votre médecin/généraliste prescripteur que les tests sont cliniquement justifiés et représentent une charge financière minimale ou acceptable pour vous.

A remplir par le patient, le(s) parent(s) ou le représentant légal

Je confirme avoir été bien informé(e) sur les objectifs et le type d'analyse(s) ci-dessus sélectionné(s) qui sera/seront réalisé(e)s dans le cadre de la condition susmentionnée.

J'ai reçu les informations nécessaires de la part du professionnel de santé et/ou ai lu le dépliant d'information correspondant. J'ai eu le temps et la possibilité de poser des questions et je suis satisfait(e) des réponses et des explications que j'ai reçues.

	Patient - Mère - Père* <small>(1/3) (1er le mari le plus ancien)</small>	Patient - Mère - Père* <small>(1/3) (1er le mari le plus ancien)</small>
Nom
Prénom
Date
Signature

A remplir par le professionnel de santé

Je confirme avoir informé et répondu aux questions du soussigné patient/parent/tuteur, au mieux de mes capacités concernant les résultats possibles et les limites du (des) test(s) ci-dessus sélectionné(s) et réalisé(s) dans le cadre de la condition susmentionnée.

Cachet

Nom
Prénom
Date
Signature

Le présent consentement sera conservé à l'Hôpital Erasme, 11 rue de Bruxelles, 2010 Bruxelles, Belgique. Tél : 02 207 70 20

Demandes, consentements et documents d'information : <http://ulbgenetics.be/documents/ulbgenetics>
Déclaration d'intérêt : <https://www.umc.nl/fr/ubg/ulbgenetics/declaration-d-interet>
Respect de la vie privée : <https://www.umc.nl/fr/ubg/ulbgenetics/declaration-d-interet>

041040 - Version 3 mars 2019 - Page 4

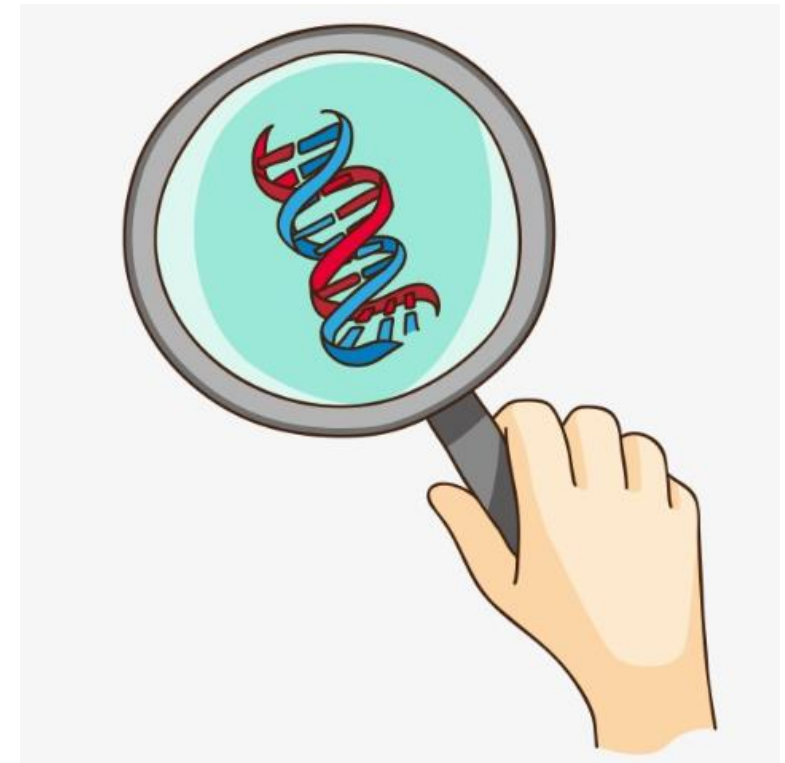


Apport du séquençage de nouvelle génération dans le diagnostic des anémies hémolytiques

Patient tested	Nomenclature code (INAMI)	Price (€)	with health insurance	without health insurance
Affected (proband case)	565493-565504	1407.87	1 X (8.8 €)	
Not affected (parent)	565456-565460	365	2 X (8.8 €)	
Total for a family (trio)			26.04 €	2137.87 €



First patients tested on the 22/01/2019...



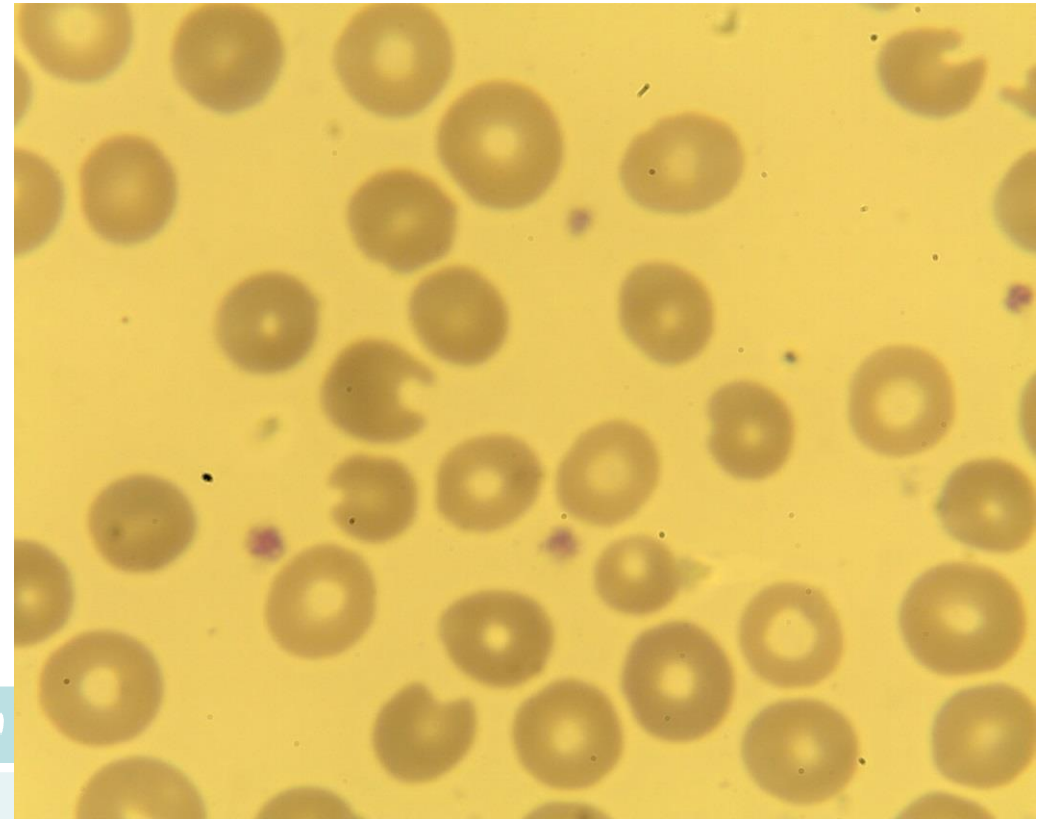
From 22/01/2019 until 26/09/2019

Simplex	8	1 positive 2 negatives 5 ongoing	PIEZO 1	
Duo	1	1 negative (1 incidental finding)	(MC4R)	
Trio	3	2 positives 1 negative	SPTA1 SEC23B	



CASE 1 : Boy (02/06/2017)

- Hemolytic anemia
- Poikilocytosis
- Schistocytes and bite cells
- No family history
- 1 RBC transfusion
- Work-up negative to date



	6/11/18	8/01/19
EMA binding (N<19%)	4%	9%
Cryohemolysis (N<10%)	25%	12%
Ektacytometry	N?	

Erythrocyte membrane defect ?

CASE 1 : Boy (02/06/2017)

Highlander result (TRIO analysis, hemoglobinopathy gene list)

patient	gene_symbol	exon_intron	evaluation	hgvs_dna	hgvs_protein	zygosity	depth_percentage	check_in_silico
ZH1900948ms	SPTA1	38	4	c.5432+1G>A		Heterozygous	46%	OK
ZH1900948ms	SPTA1	4	4	c.407T>C	p.Leu136Pro	Heterozygous	45%	OK
ZH1900948ms	HK1	10	2	c.1198C>T	p.Arg400Cys	Heterozygous	46%	OK

+ heterozygous α LELY variant_c.6531-12C>T (paternal allele, in *cis* with c.5432+1G>A)

public_comments_gene	evaluation_comments	snpeff_effect	snpeff_impact	sift_pred	pph2_hdiv_pred	pph2_hvar_pred	mutation_taster_pred
NM_HGMD = NM_highlanderEliptocytosis-2 130600 AD	Pyr(CR190916 : mutation non ré	SPLICE_SITE_DONOR	HIGH				DISEASE_CAUSING
NM_HGMD = NM_highlanderEliptocytosis-2 130600 AD	Pyr(CR190916:Gnomad:0.0014%,	NON_SYNONYMOUS_COD	MODERATE	DAMAGING	PROBABLY_DAMAGING	PROBABLY_DAMAGING	DISEASE_CAUSING
Hemolytic anemia due to hexokinase deficiency AReurodevelop	CR190916 : Gnomad 0.01%,	NON_SYNONYMOUS_COD	MODERATE	TOLERATED	POSSIBLY_DAMAGING	BENIGN	DISEASE_CAUSING



Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

5 Classes

Class I: Benign

Class II: Likely benign

Class III: Uncertain significance

Class IV: Likely pathogenic

Class V: Pathogenic

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
Population Data	MAF is too high for disorder <i>BA1/BS1</i> OR observation in controls inconsistent with disease penetrance <i>BS2</i>			Absent in population databases <i>PM2</i>	Prevalence in affecteds statistically increased over controls <i>PS4</i>	
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product <i>BP4</i> Missense in gene where only truncating cause disease <i>BPI</i> Silent variant with non predicted splice impact <i>BP7</i>	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product <i>PP3</i>	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before <i>PMS</i> Protein length changing variant <i>PM4</i>	Same amino acid change as an established pathogenic variant <i>PS1</i>	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease <i>PVS1</i>
Functional Data	Well-established functional studies show no deleterious effect <i>BS3</i>		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common <i>PP2</i>	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation <i>PM1</i>	Well-established functional studies show a deleterious effect <i>PS3</i>	
Segregation Data	Non-segregation with disease <i>BS4</i>		Co-segregation with disease in multiple affected family members <i>PP1</i>	Increased segregation data →		
De novo Data				<i>De novo</i> (without paternity & maternity confirmed) <i>PM6</i>	<i>De novo</i> (paternity & maternity confirmed) <i>PS2</i>	
Allelic Data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant <i>BP2</i> Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant <i>BP2</i>		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant <i>PM3</i>		
Other Database		Reputable source w/out shared data = benign <i>BP6</i>	Reputable source = pathogenic <i>PP5</i>			
Other Data		Found in case with an alternate cause <i>BP5</i>	Patient's phenotype or FH highly specific for gene <i>PP4</i>			



SPTA1 gene :

Coding for α -spectrin

Associated with HE, HS, HPP (AR et AD)

Variable phenotype

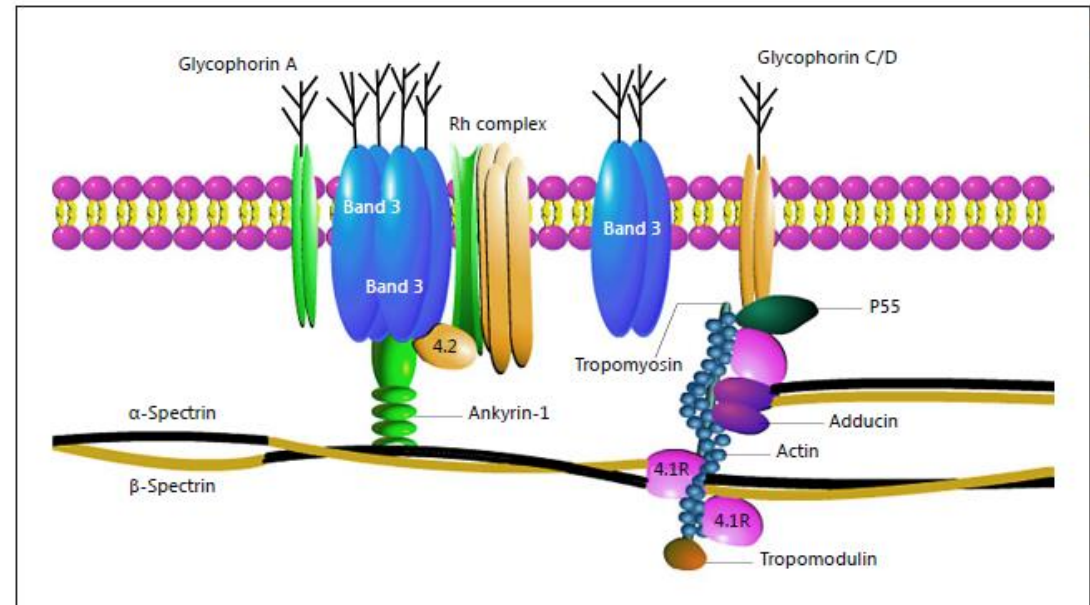


Fig. 1. Schematic presentation of erythrocyte membrane proteins. The erythrocyte membrane proteins regulating the elasticity and deformability in a vertical direction are band 3, ankyrin-1, protein 4.2, spectrin, and Rh complex. Those regulating the properties in a horizontal direction include spectrin, protein 4.1R, actin, adducin, tropomodulin, tropomyosin, and p55.

Acta Haematol 2018;139:60–66

CASE 1 : Boy (02/06/2017)

- Hemolytic anemia
- Poikilocytosis
- Schistocytes and bite cells
- No family history
- 1 RBC transfusion
- NGS revealed biallelic SPTA1 mutations (IV + IV)

→ **Diagnosis of hereditary pyropoikilocytosis (erythrocyte membrane defect)**



CASE 2 : Woman (14/12/1978)

- Hemolytic anemia since birth
- Splenectomy at 5y
- No familial history
- Liver iron overload
- Suspicion of CDA II (Congenital dyserythropoietic anemia) by SDS-PAGE



CASE 2 Woman (14/12/1978)

Highlander result (TRIO analysis, hemoglobinopathy gene list)

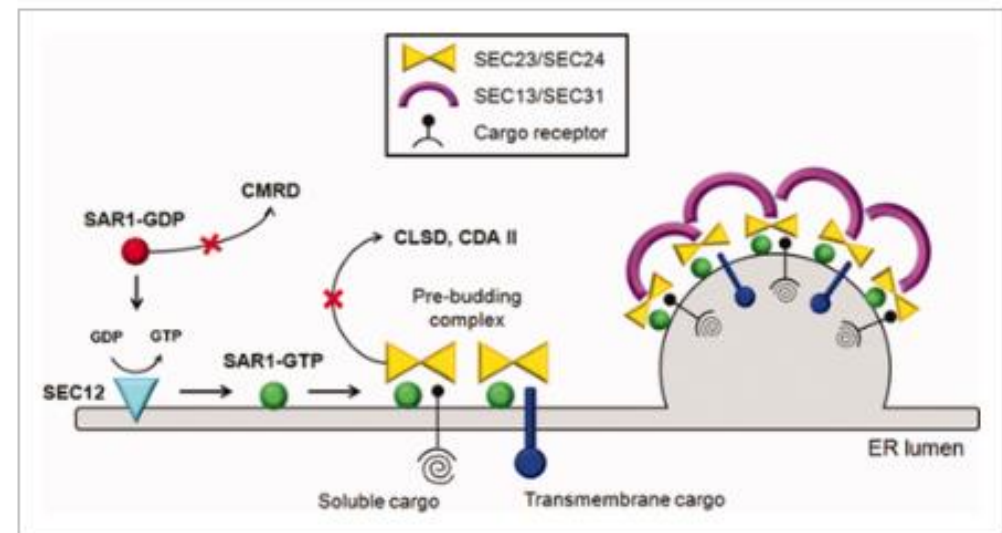
patient	gene_symbol	evaluation	hgvs_dna	hgvs_protein	zygosity	depth_proportion	check_index	consensus	public_comments_gene
ZH1902546ms	ANK1	2	c.4279T>C	p.Tyr142His	Heterozygous	46%	OK	0%	Spherocytosis, type 1 182900 AD Last modified by mmarango on
ZH1902546ms	ANK1	2	c.2502G>A	p.Lys834Lys	Heterozygous	47%	OK	1%	Spherocytosis, type 1 182900 AD Last modified by mmarango on
ZH1902546ms	SEC23B	5	c.40C>T	p.Arg14Trp	Heterozygous	53%	OK	0%	?Cowden syndrome 7 616858 AD 3 Dyserythropoietic anemia,
ZH1902546ms	SEC23B	4	c.1832G>C	p.Arg611Pro	Heterozygous	51%	OK		?Cowden syndrome 7 616858 AD 3 Dyserythropoietic anemia,

snpeff_effect	snpeff_impact	sift_pred	pph2_hdiv_pred	pph2_hvar_pred	mutation_taster_pred
NON_SYNONYMOUS_CODING	MODERATE				DISEASE_CAUSING
SYNONYMOUS_CODING	LOW				DISEASE_CAUSING
NON_SYNONYMOUS_CODING	MODERATE	DAMAGING	PROBABLY_DAMAGING	POSSIBLY_DAMAGING	DISEASE_CAUSING_AUTOMATED
NON_SYNONYMOUS_CODING	MODERATE	DAMAGING	PROBABLY_DAMAGING	PROBABLY_DAMAGING	DISEASE_CAUSING



SEC23B gene :

Coding for protein of the inner layer of COPII vesicle
 Associated with CDAII (Congenital dyserythropoietic anemia)
 Variable phenotype (AR)



[Am J Hematol. 2013 Feb;88\(2\):135-40](#)



CASE 2 : Woman (14/12/1978)

- Hemolytic anemia since birth
- Splenectomy at 5y
- No family history
- Liver iron overload
- Suspicion of CDA II by SDS-PAGE
- NGS revealed biallelic SEC23B mutations (IV + V)
→ **Molecular confirmation of CDA II (Congenital dyserythropoietic anemia)**



CASE 3 : Woman (18/06/1983)

Gastric Bypass followed a few years later by macrocytic anemia with stigmata of hemolysis without evidence of deficiency and in particular deficiency of vitamin B12 .

Origin of hemolytic anemia ?



CASE 3 : Woman (18/06/1983)

Highlander result (DUO analysis, hemoglobinopathy gene list)

patient	gene_symb	exon_intro_n_rank	evaluation	hgvs_dna	hgvs_protein	zygosity	epth_proportion	check_insili	consensus_MA	public_comments_gene
ZH1901878ms	ANK1	34	2	c.4145C>T	p.Ser1382Leu	Heterozygous	49%	OK	0%	Spherocytosis, type 1 182900 AD
ZH1901878ms	ANK1	22	2	c.2502G>A	p.Lys834Lys	Heterozygous	41%	OK	1%	Spherocytosis, type 1 182900 AD
ZH1901878ms	SPTB	22	2	c.4670A>G	p.Glu1557Gly	Heterozygous	56%	OK	0%	Anemia, neonatal hemolytic, fatal o

evaluation_comments	snpeff_effect	snpeff_impact	sift_pred	pph2_hdiv_pred	pph2_hvar_pred	mutation_taster_pre
CR190912:Gnomad:pas d'hor	NON_SYNONYMOUS_CODIN	MODERATE	TOLERATED	BENIGN	BENIGN	DISEASE_CAUSING
CR190912 :variant synonyme	SYNONYMOUS_CODING	LOW				DISEASE_CAUSING
or near-fatal 617948	NON_SYNONYMOUS_CODIN	MODERATE	TOLERATED	BENIGN	BENIGN	DISEASE_CAUSING



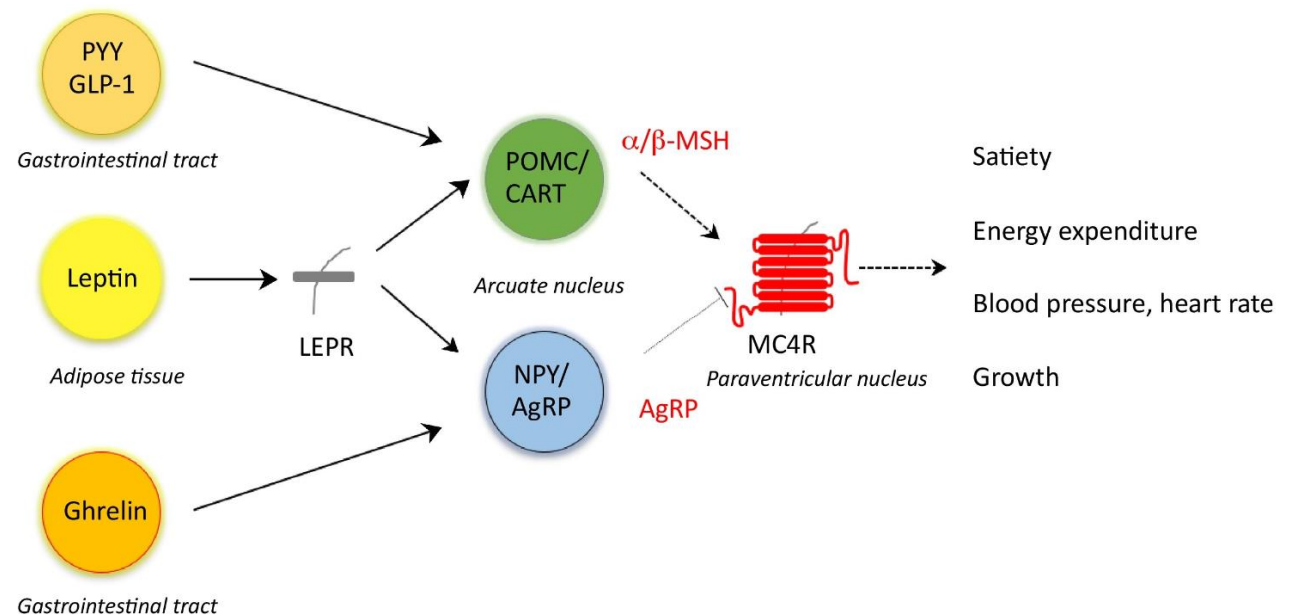
CASE 3 : Woman (18/06/1983)

Highlander result (DUO analysis, mendeliome STOP filter)

patient	gene_sym	exon_in tron_ra	evalua tion	hgvs_dna	hgvs_protein	zygosity	epth_pr oportio n	check_insilico
ZH1901878ms	GMPPB	8	0	c.979_980insGGGG	p.Glu327fs	Heterozygous	14%	NOT_OK
ZH1901878ms	PPP2R2C	1	2	c.54G>A	p.Trp18*	Heterozygous	52%	OK
ZH1901878ms	HLA-DRB1	2	0	c.303_304delGG	p.Arg101fs	Heterozygous	17%	NOT_OK
ZH1901878ms	HLA-DRB1	2	0	c.199delG	p.Val67fs	Heterozygous	26%	SUSPECT
ZH1901878ms	MC4R	1	4	c.148delG	p.Val50fs	Heterozygous	45%	OK
ZH1901878ms	MED25	16	2	c.1778_1779delAG	p.Gln593fs	Heterozygous	46%	OK
ZH1901878ms	TMPRSS6	15	2	c.1869-6_1869-2dupCCCCA		Heterozygous	44%	SUSPECT

MC4R gene :

- . A key regulator of body weight
- . Mutations cause early-onset severe obesity



[Trends Mol Med.](#) 2019 Feb;25(2):136-148



CASE 3 : Woman (18/06/1983)

Gastric Bypass followed a few years later by macrocytic anemia with stigmata of hemolysis without evidence of deficiency and in particular deficiency of vitamin B12 .

Origin of hemolytic anemia ?

→ Currently unknown



THANK YOU.....

DO YOU HAVE ANY QUESTIONS ?

