

# Déclaration de conflits d'intérêts

**Nom :**

**J'ai, ou ai eu** durant les trois dernières années, une affiliation, des intérêts financiers ou autres intérêts avec un organisme industriel ou commercial de type :

- Rémunération / Bourse / Honoraires
- Orateur / Consultant
- Autre :

*Nom de l'organisme / des organismes :*



**Je n'ai pas de conflit d'intérêt**

SFTS

2021

XXX<sup>e</sup> CONGRÈS  
MARSEILLE  
24-26 novembre 2021  
PALAIS DU PHARO

# Les anémies hémolytiques constitutionnelles de causes multiples dévoilées par le séquençage haut-débit

Dr Lamisse MANSOUR-HENDILI

PH - Laboratoire génétique Hôpital Henri Mondor, Créteil, Fonfantalot

Equipe 2 IMRB : Transfusion et maladies du globule rouge, Pr Pirenne

Groupe Pr Bartolucci



UNIVERSITÉ  
PARIS-EST CRÉTEIL  
VAL DE MARNE

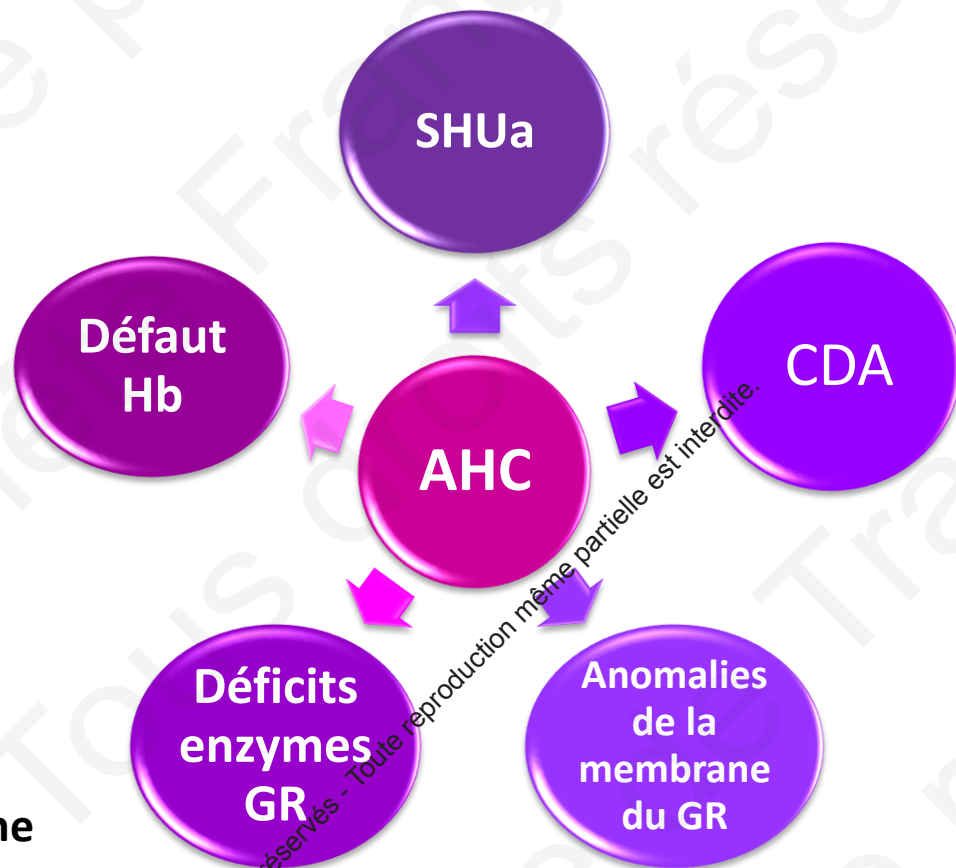
© Société Française de Transfusion Sanguine. Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

## Contexte médical et scientifique

### Les anémies hémolytiques constitutionnelles (AHC)

Exploration de patients AHC par  
technologie  
Séquençage Haut Débit (SHD)

**Nombreux variants de signification  
incertaine (VSI) identifiés nécessitant une  
analyse fonctionnelle**



- Elliptocytose héréditaire
- Sphérocytose héréditaire
- Stomatocytoses héréditaires

# Méthodologie

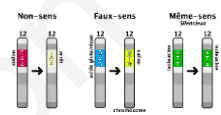
Patients



G  
E  
N  
O  
T  
Y  
P  
E

ADN - Sang total  
- Cheveux  
- peau

SHD



Analyse fonctionnelle

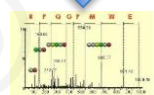
Variations de  
séquence dont  
VSI



ARN

Approche classique

Résultats pour 25 patients



Protéine

Protéomique toujours en test  
WB fait pour HK1

Plasma,  
sérum, sang  
total

Courbe de densité des GR

Etude de la **déformabilité du GR** en osmoscan avec LORACA

Etude fonctionnelle variants **PIEZO1 et KCNN4** (collaboration avec Roscoff, Dr Egée)

Mesure du contenu en eau et mesure des contenus en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>

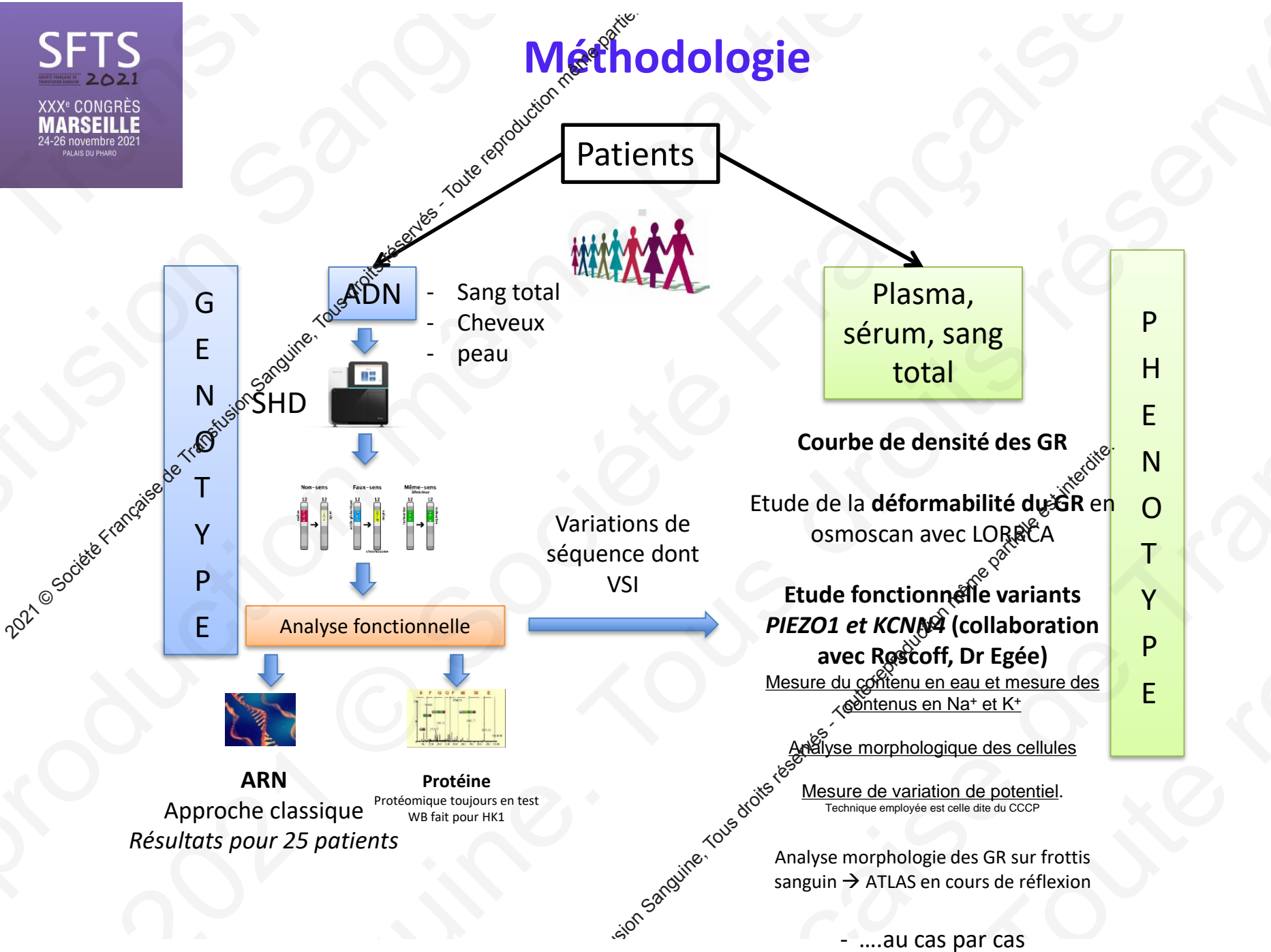
Analyse morphologique des cellules

Mesure de variation de potentiel.  
Technique employée est celle dite du CCCP

Analyse morphologie des GR sur frottis sanguin → ATLAS en cours de réflexion

- ....au cas par cas

P  
H  
E  
N  
O  
T  
Y  
P  
E



# AH constitutionnelles

## Cas des associations complexes de plusieurs anomalies du GR

Dans notre laboratoire 30% de résultats positifs AHC rendus avec plusieurs variations d'intérêt

Quelques exemples:

**1 patient beta-thalassémie majeure + stomatocytose héréditaire déshydratée + elliptocytose**

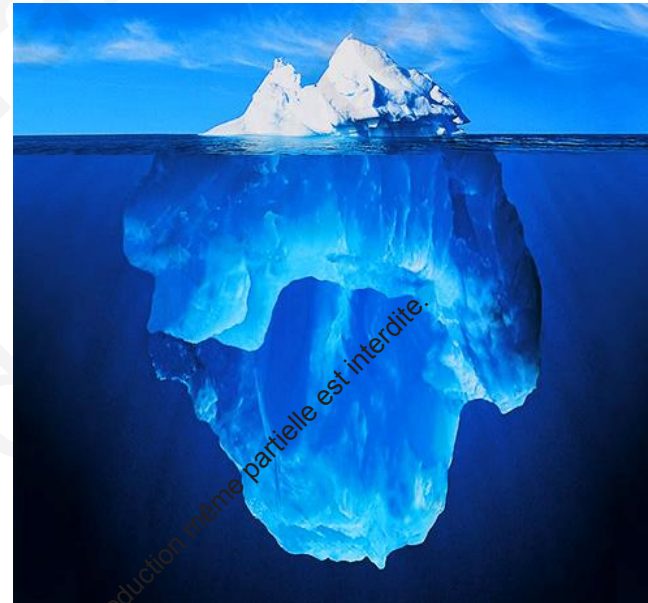
**1 patiente S/S + stomatocytose héréditaire déshydratée**

**1 patient GARDOS + VSI *PIEZO1***

Tous ces cas restent indétectables par les seules études phénotypiques incapables aujourd'hui de détecter ces associations

Seul le diagnostic moléculaire via le SHD peut les mettre en évidence

On ne voit que la partie émergée de l'iceberg; plus fréquent qu'on ne le pense



# AH constitutionnelles

## Cas des associations complexes de plusieurs anomalies du GR

- Beaucoup de publis sur  $\alpha$  thal et beta thal
- Sur SDM et G6PD
- Sur variants Hb et SDM
- Elliptocytose et alpha thal, elliptocytose et déficit en PK et déficit en G6PD....
- OSEA et thalassémie
- Moins mais de plus en plus sur *PIEZO1* et *SPTA1*...SH, *SPTA1* et trait beta thal
- Il y a en aura de plus en plus avec les pathologies de membrane depuis l'utilisation du NGS dans la prise en charge diagnostique de ces pathologies

### Hemoglobin C trait accentuates erythrocyte dehydration in hereditary xerocytosis

Elizabeth Yang<sup>1</sup>, Erin B. Voelkel<sup>2</sup>, Kimberly Lezon-Geyda<sup>3</sup>, Vincent P. Schulz<sup>3</sup>, and Patrick G. Gallagher<sup>3,4</sup>

### A NEW $\beta^0$ -THALASSEMIA MUTATION (CODON 102, AAC>A TCAC) IN COEXISTENCE WITH A HETEROZYGOUS *P4.2 NIPPON* GENE

ELSEVIER

journal homepage: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

#### Letter to the Editor

Concurrent  $\beta$ -thalassaemia trait and Southeast Asian ovalocytosis associated with clinically significant iron loading



Pediatr Blood Cancer 2015;62:1680–1681

#### LETTER TO THE EDITOR

Co-Inheritance of G6PD and PK Deficiencies in a Neonate Carrying a Novel *UGT1A1* Genotype Associated to Crigler–Najjar Type II Syndrome

> J Pediatr Hematol Oncol. 2017 Mar;39(2):e69–e70. doi: 10.1097/MPH.0000000000000750.

#### Coinheritance of Hereditary Elliptocytosis and Defectual Hemoglobin H Disease

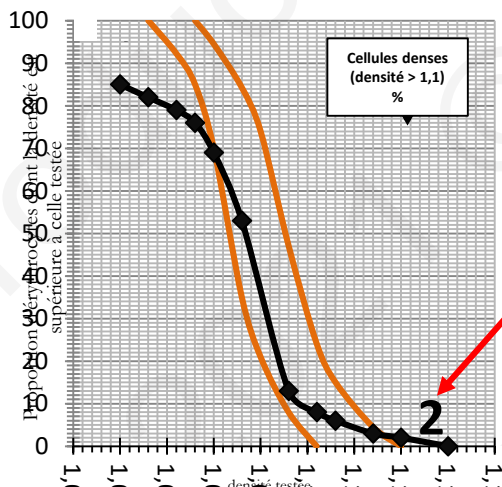
Amtrak Charoenkwan<sup>1</sup>, Rungrote Natesirinikul, Worawut Choeprasert, Natchanon Kulsumritpon, Orapan Sanglarporn

# AH constitutionnelles

## Cas des associations complexes de plusieurs anomalies du GR

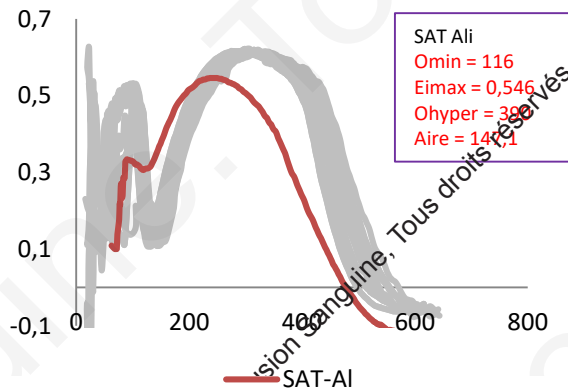
Nomenclature nucléotidique	Nomenclature Protéique	Exon	statut	gnomAD AF %	littérature	Prediction <i>in silico</i>	Classe ACMG
<b>SAT Ali</b>							
Beta thalassémie majeure avec thromboses +++ splénectomisé en 1981, thrombose portale en 2006, sous EPO (arrêté) et hydrema, transfusé toutes les 4 semaines; sous Xarelto depuis 2017, inclus dans essai clinique sous luspatercept en 2018 (antagoniste TGF beta) depuis et arrêté en 2018, depuis thromboses à répétition malgré l'anticoagulation							
PIEZO1	c.6056G>A	p.R2019H	exon 42	hétérozygote	0,0013% (2 htz/77522)	ND	délétère 3
SPTB	c.7759C>T	p.P920L	exon 14	hétérozygote	ND	ND	délétère 3
SPTA1	c.6531-12C>T			hétérozygote		Ittiwut <i>et al</i> 2018	
HBB	c.92+6T>C		Intron 1	hétérozygote			5
HBB	c.315+1G>A		Intron 2	hétérozygote			5

SAT ali beta thal + SPTB + PIEZO1



SAT ali

Malgré la transfusion récente (1 mois) et la persistance d'HbA à 65%



Complexe de conclure à cause des transfusions itératives

2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

# AH constitutionnelles

## Cas des associations complexes de plusieurs anomalies du GR

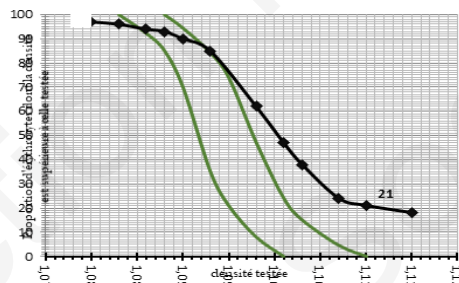
MIL JP

Anémie hémolytique congénitale avec une surcharge en fer +++ identifiée comme GARDOS, fibrillation auriculaire, histoire familiale AD, 1 fils avec même profil phénotypique porteur *KCNN4* R352H +/-

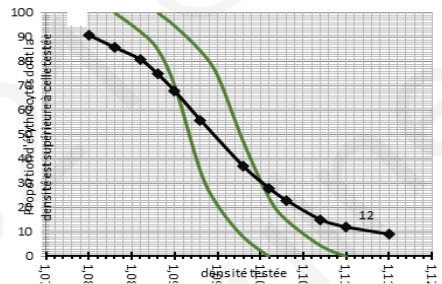
<i>KCNN4</i>	c.2055G>A	p.R352H	exon 7	hétérozygote	ND		délétère	5
<i>PIEZO1</i>	c.3629C>T	p.A1210V	exon 25	hétérozygote	0,007% (13 htz/92310)	ND	bénin	3

t-test p= 0,00146  
Sur 3 ans

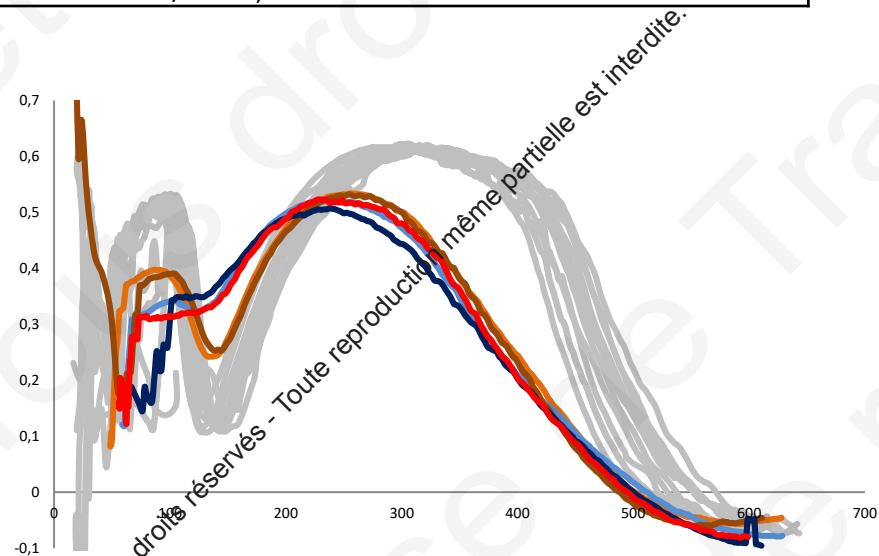
Courbe de densité en gradient de phtalates : JP a deux fois plus de cellules denses que son fils



JPM\_2020\_GARDOS\_KCNN4 R352H +  
PIEZO1 J0\_21% cellules denses



RM\_2020\_GARDOS\_KCNN4 R352H\_J0\_12%



MIL JP 2018\_J0 MIL Rom\_2018\_J0 MIL JP\_2020\_J0  
Mil Rom\_2020\_J0 LES\_Syl\_GARDOS A322V

Profil osmoscan : Omin normal chez JP =  
résistance osmotique normale

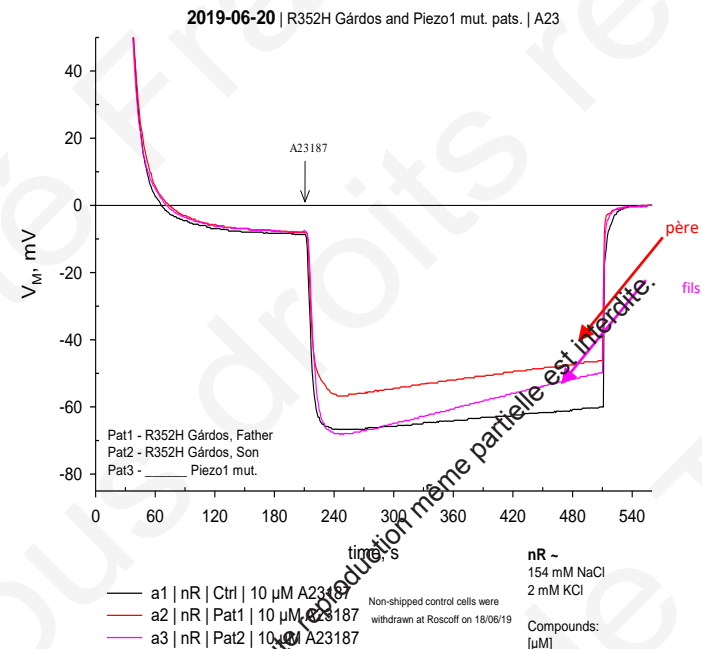
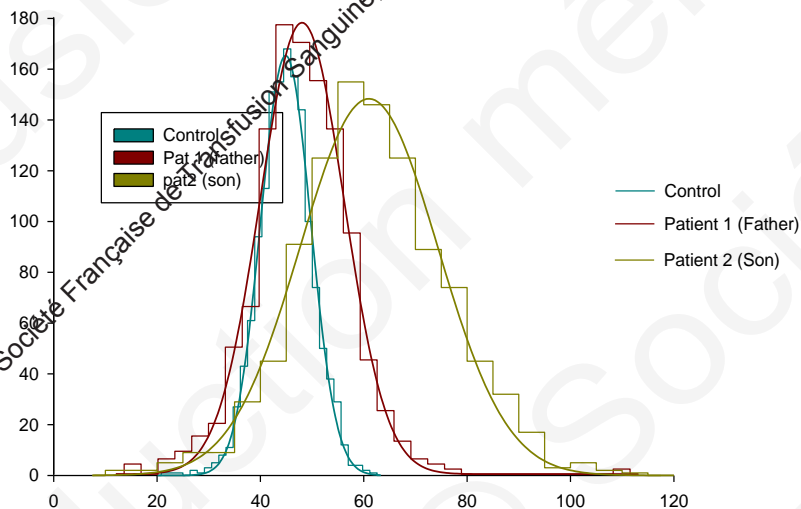


# AH constitutionnelles

## Cas des associations complexes de plusieurs anomalies du GR

VGM = 102 VGM=112

Projected cell area - histogram  
Gardos Patients 27/06/2019  
R352H



Surface des cellules plus importantes chez les deux patients % témoin mais avec des cellules plus petites pour le père. Pente de repolarisation moins importante pour le père % fils, reflet activité cationique non sélective moins importante chez le père

R352H mutation « gain de fonction »

Les différences constatées entre le père et le fils (tous les deux splénectomisés) sont probablement dues à l'association chez le père du variant *PIEZO1*

# AH constitutionnelles

## Cas des associations complexes de plusieurs anomalies du GR

### NOUB TCHA

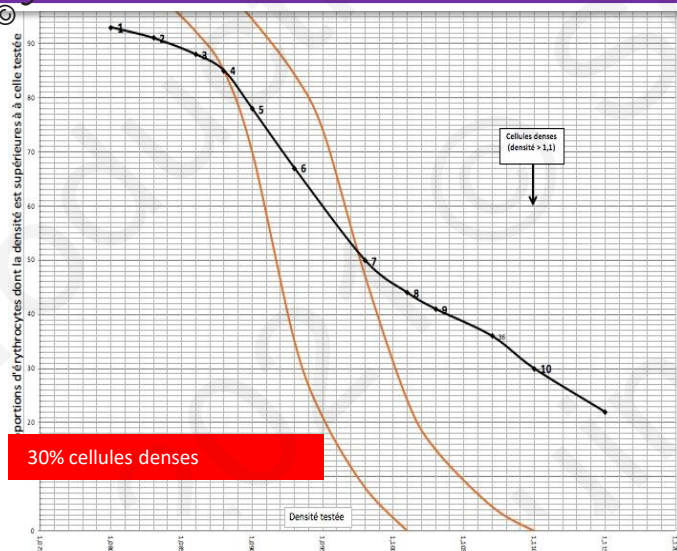
Patiente S/S gravissime, maladie hémolytique très sévère avec une expression faible de de l'hémoglobine foetale et 30% de cellules denses.

Transfusée 7 à 10 fx dont certains épisodes sont reliés au paludisme. Une seule fois elle a présenté une intolérance à la transfusion avec apparition d'œdème de la face

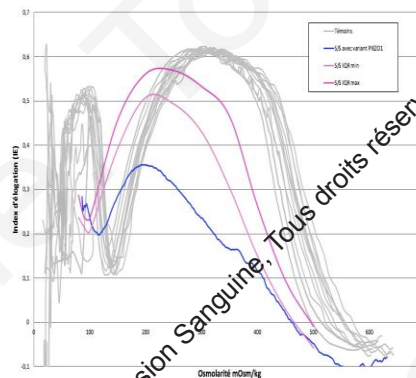
Drépanocytose S $\beta$ , Hb de base à 5 g/dl, profil hyperhémolytique. Pas de déficit G6PD. Pas de carence vitaminique ni martiale. TCD vérifié négatif. Traitée par Siklos<sup>®</sup>+EPO. dernières transfusions le 30/04/20 et le 30/03/21. Syndrome de Li-Fraumeni muté TP53 associé

PIEZO1	c.5089C>T	p.L1697F	exon 37	hétérozygote	ND	ND	délétère	3+
PIEZO1	c.1031C>T	p.Ala344Val	Exon 9	hétérozygote	0,0034%	ND	bénin	2
SPTA1	c.3064A>T	p.Asp1021Val	Exon 22	hétérozygote	0,040%	ND	Non conclusifs	3
HBB	c.20A>T	p.Glu6Val		homozygote				5

### NOUB TCHA S/S + PIEZO1

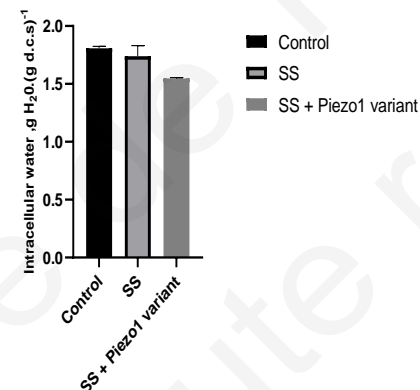


### NOUB TCHA Ste S/S + PIEZO1



NOUB TCHA  
Omin = 116  
Eimax = 0,356  
Ohyper = 336  
Aire = 82,4

### 31/03/2021 SS et SS avec variant Piezo1



hémolyse +++  
Diminution du contenu =  
déshydratation +++

# Conclusions

- Différences fines vues sur certains paramètres de tests phénotypiques utilisés en post-SHD
- Associations non détectées d'emblée en pratique de routine courante de ces tests
- Limites liées au « juste » contrôle (normal et positif - = parfois intra-familiaux, intérêt +++ étude génétique familiale)
- Limites liées aux transfusions itératives (cas beta thalassémie)
- Pas d'outil miraculeux pour étudier la fonction des VSI même dans le monde du GR
- Encore moins pour les associations de variants
- SHD outil très puissant, utile et efficace dans ces pathologies
- Mise en évidence de beaucoup de VSI, qu'il faut au maximum classer à l'aide de techniques locales réorientées (densité) et **via des collaborations**, en attendant des plateformes de génomique fonctionnelle



SFTS

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE TRANSFUSION SANGUINE 2021

XXX<sup>e</sup> CONGRÈS  
**MARSEILLE**  
24-26 novembre 2021  
PALAIS DU PHARO

## Un grand merci

### Equipe 2 Pr Pirene, IMRB, Créteil

Groupe du Pr Bartolucci : **Nicolas Hebert**, Laura Bencheikh, Laurent Kiger, Kim Anh Nguyenpeyre...

**Service UMGGR** : infirmières, infirmières de coordination (**Cécile Aubrun** et Caroline Naze), tous les praticiens et surtout **Dr Clara Noizat**, Dr De Luna, Pr Habibi, Dr Martino

L'ensemble du personnel technique et médical du **Laboratoire de génétique et biochimie Mondor** : Christine Gameiro, Céline Latouche, Anne Perron, Valérie Ortonne, **Dr Stéphane Moutereau**, Christophe, Sylvie, Suzel, Dr Ariane Lunati

L'ensemble du personnel technique et médical du **Laboratoire d'Hématologie Mondor** : **Dr Bouchra Badaoui**, Dr Violaine Tran Quang et tous les autres

Merci au personnel du **centre de tri (L2E) du GH Henri Mondor**



### Co-auteurs abstract :

**Sihem Tarfi, Bouchra Badaoui, Gonzalo de Luna, Clara Noizat, Abdelrazak Aissat, Christine Gameiro, Emmanuelle Faubert, Véronique Picard, Stéphane Moutereau, Caroline Makowski, Claire Barro, Frédéric Garban, Amna Jebali, Pablo Bartolucci, Benoît Funalot et Frédéric Galactéros**

### Dr Stéphane Egée et son équipe

CNRS / Sorbonne Université  
Station Biologique de Roscoff

### Pr Galactéros et Filière MCGRE

**Dr Funalot**

Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

**SFTS**

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE  
TRANSFUSION SANGUINE 2021

XXX<sup>e</sup> CONGRÈS  
**MARSEILLE**  
24-26 novembre 2021  
PALAIS DU PHARO

2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partie.

Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

**SFTS**

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE  
TRANSFUSION SANGUINE 2021

XXX<sup>e</sup> CONGRÈS  
**MARSEILLE**  
24-26 novembre 2021  
PALAIS DU PHARO

2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partie.

Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

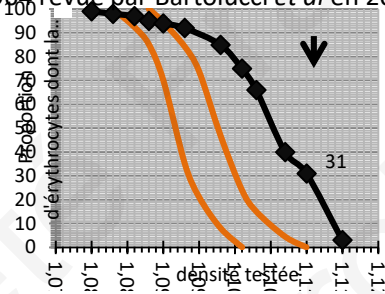
# Méthodologie : ressources locales

## Mesure de la densité érythrocytaire au laboratoire de biochimie, Henri Mondor

Technique du gradient de phthalate selon la méthode de Danon et Marikovsky 1964 revue par Bartolucci *et al* en 2012

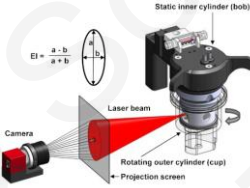


Permission Dr Noizat

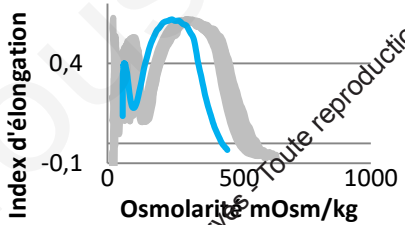


Courbe de densité GR Patient  
PIEZO1

## Mesure de la déformabilité des GR en gradient osmolaire : osmoscan avec LORRCA



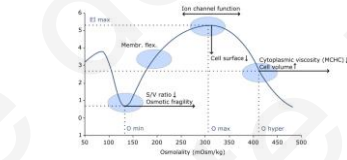
Osmoscan LORRCA PIEZO1



### Normes sur 17 témoins sains

- Omin [127,26;152,85]
- Ohyper [422,27;486,67]
- Aire [168,06;184,51]
- Eimax [0,6117;0,6253]

**Medicine**  
Characterization of Sickling During Controlled Automated Deoxygenation with Oxygen Gradient Ektacytometry  
doi: 10.3791/60213 Published: November 5, 2019  
Minke A.E. Rab<sup>1,2</sup>, Brigitte A. van Oirschot<sup>1</sup>, Jennifer Bos<sup>1</sup>, Celeste K. Kanne<sup>3</sup>, Vivien A. Sheehan<sup>3</sup>, Eduard J. van Beers<sup>2</sup>, Richard van Wijk<sup>1</sup>



<https://rrmechatronics.com/product/rbc-2/lorrca/>

## Méthodologie : Réseau collaboratif = ressources externes



UTRECHT  
**Pr Richard van Wijk**

**HK1**

VSI STOP homozygote  
Déjà décrit dans papier  
BJH

Mesures activité  
enzymatique HK-R  
normales Western blot  
HK-R, pas de formes  
protéiques anormales,  
Km légèrement  
augmenté sur ATP non  
significatif?

Demeure un VSI



NANTES  
**Dr Betty Gardie**

**EPO**

Mutation point de  
branchement  
intronique  
Deux familles avec  
polyglobulie  
congénitale

IPS, RNAseq, étude  
glycosylation EPO faite  
à AFLD (agence  
française lutte contre  
le dopage)

Envoi produits de  
saignées



FONTENAY AUX  
ROSES  
**Dr Zahra Kadri**

**GATA1**

1 VSI faux sens  
hémizygote ND dans  
*GATA1* chez 1 patient  
avec anémie  
hémolytique et  
thrombopénie

Cultures de CD34+  
montrent un problème  
au niveau érythropoïèse

mais tous frères même  
BP sont porteurs du  
VSI....



ROSCOFF  
**Dr Stéphane Egée**

**PIEZO1 et KCNN4**

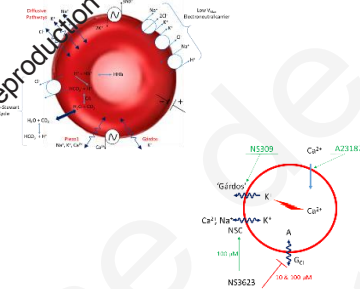
Etude fonctionnelle  
électrophysiologique de  
variants *PIEZO1* et  
*KCNN4*

Collaboration fructueuse  
résultats pour 10  
patients *KCNN4* et  
*PIEZO1*

1 publication acceptée à  
AJH sur un cas de Gardos

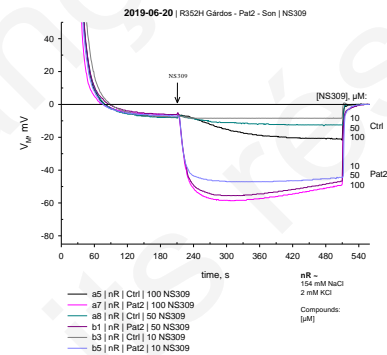
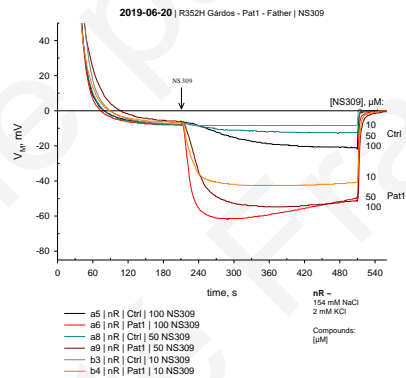
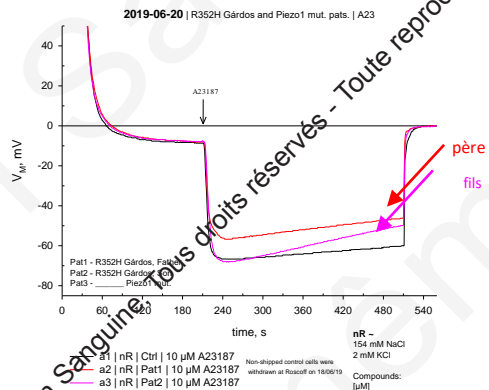
1. Mesure du contenu en eau et mesure des contenus en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>
2. Analyse morphologique des cellules
3. Mesure de variation de potentiel.  
Technique employée est celle dite du CCCP

$$\Delta V_m = -61.5 \Delta \text{pH}_{\text{ext}}$$



Permission Dr Egée





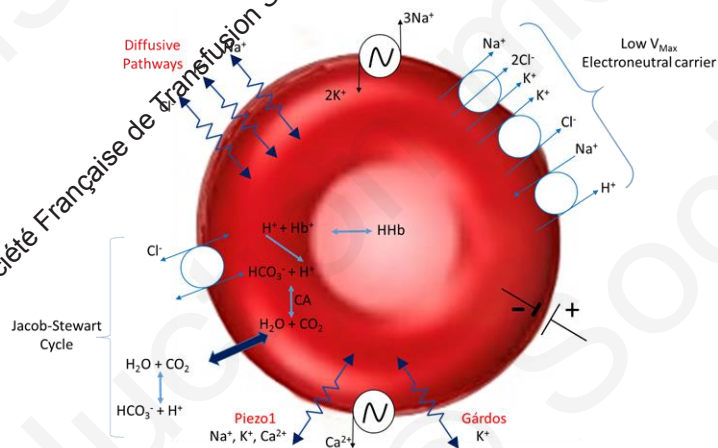
Mutation	Omin 2018/2020	Aire 2018/2020	Eimax 2018/2020	Ohyper 2018/2020
MIL_JP <i>KCNK4</i> R352H +/- et <i>PIEZO1</i> A1210V+/-N	137/142	141,6/140	0,534/0,532	390/388
MIL_Rom <i>KCNK4</i> R352H+/-	118/120 (J1)	140,3/133,9	0,524/0,507	379/379
LES_Syl = « témoin positif » <i>KCNK4</i> R322V+/-	62	139,3	0,523	381
Normes (17 sujets sains)	127,5 ; 151,5	166,79 ; 182,79	0,606 ; 0,634	416,33 ; 488,33
Interprétation	Omin diminué chez fils et « témoin positif » mais normal chez père = résistance osmotique normale chez le père		Eimax diminué = diminution de la surface et de la déformabilité	Diminution Ohyper identique = déshydratation

2021 © Société Française de Transfusion Sanguine. Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

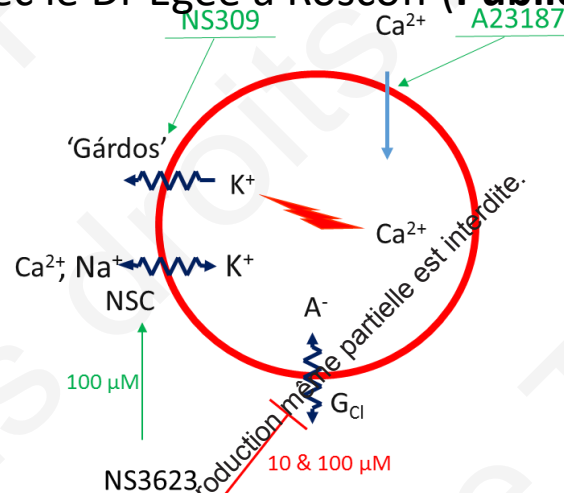
## 6. Mise en place d'un réseau collaboratif

1. Présentation du réseau

2. Cas des études des variants *PIEZO1* et *KCNN4* avec le Dr Egée à Roscoff (**Publication AJH letter to editor 2021**)



Courtoisie Dr Egée



Exploration de 9 Cl  
Confirmation effet délétère  
pour 5 mutations (2 *KCNN4*  
et 3 *PIEZO1*)