

AMBM

Association Marocaine
de Biologie Médicale

Apport du NGS au diagnostic des Déficits immunitaires primitifs

Mai 2024

PRÉSENTÉ PAR :
PR. Bougenouch Laila

AMBM
Association Marocaine
de Biologie Médicale

9^{èmes} **JOURNÉES NATIONALES
DE BIOLOGIE PRATICIENNE**

02 03 et 04 Mai 2024
Ateliers Congrès
Casablanca
Hôtel Hyatt Regency

Sous le thème :
20 **Ans au Service du Dialogue
Clinico-Biologique**



Conférences



Communications
Affichées



Ateliers

Un engagement et une passion
qui transcendent le temps :
dédiés à l'excellence en Biologie
Médicale Marocaine.

La date limite pour soumettre les résumés des communications affichées est le 10 Avril 2024

06 00 02 27 63 secretariatambm@gmail.com www.ambmmaroc.net



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Introduction

- ❖ Groupe de pathologies immunologiques très variées
- ❖ 485 maladies, répertoriées dans la classification de l'International Union of Immunological Societies
- ❖ Maladies rares (< 1/2000 naissances)
- ❖ La diversité des atteintes génétique → **Phénotypes variables !!**
La nécessité d'évoquer un DIP à tout âge.
- ❖ Un diagnostic précoce est primordial (**pronostic vital !!!**):
- ❖ Plus de 480 gènes sont associés aux DIH.
- ❖ Recours au NGS

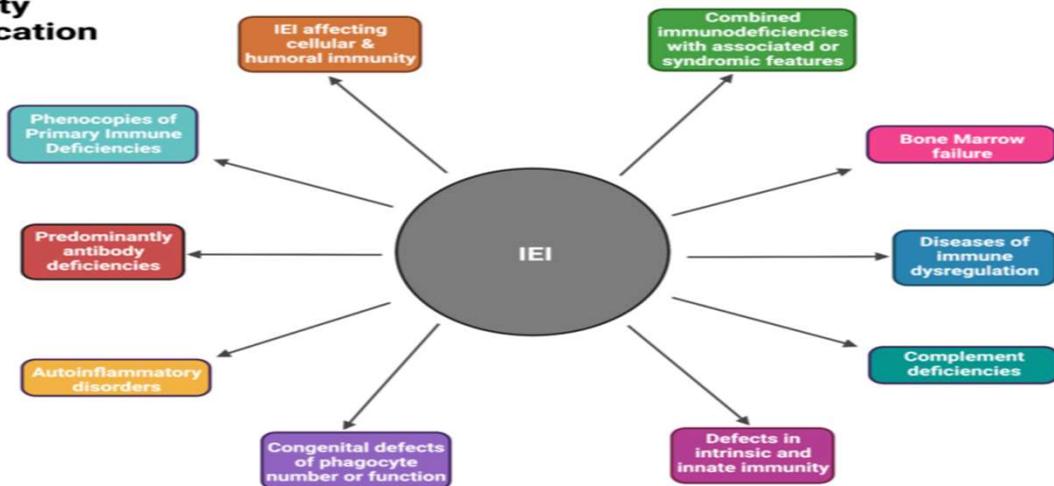
Définition

Incapacité du système immunitaire à assurer:

- ❖ Une défense efficace contre les microorganismes
- ❖ Un contrôle de l'autoimmunité
- ❖ Un contrôle de la lymphoprolifération
- ❖ Un contrôle du développement des tumeurs

Classification

Inborn errors of immunity classification





9èmes Journées Nationales de Biologie Praticienne



REVIEW ARTICLE
Inborn errors of immunity associated with characteristic phenotypes
 Mainé Luellah Demaret Bardou, Marina Teixeira Henriques, Anete Sevciovic Grumach

Centro Universitário Saúde ABC, Faculdade de Medicina, Serviço de Referência em Doenças Raras, Imunologia Clínica, Santo André, São Paulo, SP, Brazil
 Received 9 October 2020; accepted 26 October 2020
 Available online 19 December 2020

Syndromes	Examples
Congenital thrombocytopenia	Wiskott-Aldrich syndrome
Other DNA repair defects	Ataxia-telangiectasia
Immune-osseous dysplasia	Cartilage-hair hypoplasia
Thymic defects	Di George syndrome/Vicardifacial/11q24.1 deletion
Hyper-IgE Syndrome	
Defects of Vitamin B12 and folate metabolism	
Anhidrotic ectodermal dysplasia with immune deficiency	NR60
Others	Purine nucleoside phosphorylase deficiency Calcium Channel Defects



9èmes Journées Nationales de Biologie Praticienne

Classification

Disorder	Genetic basis	Comment
IgA deficiency	Unknown	Commonest PID (7)
CVID	Unknown (by definition)	Patients with causative genetic defects are reclassified as CVID-like disorders (3, 8)
TH1	Unknown	Retrospective diagnosis (9)
Idiopathic CD4 lymphopenia	Unknown	Increasingly recognised with the advent of new-born screening (10)
Good's syndrome	Unknown	Thymic abnormalities may contribute to the combined immunodeficiency (11)
SCID (and many other similarly well- characterised disorders)	Mostly known	Not all patients with a SCID phenotype have an identifiable mutation
Phenocopies	Acquired disorders	Can be identified by genetic sequencing (2)
Epigenetic defects	Acquired disorders	Difficult to identify (12)

CVID, Common Variable Immunodeficiency Disorders; SCID, Severe Combined Immunodeficiency; TH1, Transient Hypogammaglobulinemia of Infancy.



9^{èmes} Journées Nationales de Biologie Praticienne

Manifestations cliniques

Infections plus fréquentes

- Au moins quatre otites moyennes aiguës dans l'espace d'un an^{a)}.
- Au moins deux sinusites graves dans l'espace d'un an.
- Au moins deux pneumonies dans l'espace d'un an.

Infections plus sévères/persistantes/inhabituelles

- Prise d'antibiotiques pendant plus de deux mois sans amélioration des symptômes.
- Abcès profonds et récidivants de la peau et/ou d'autres organes.*
- Infection fongique persistante de la muqueuse buccale ou de toute autre muqueuse.*
- Nécessité d'antibiotiques intraveineux pour traiter les infections.*
- Au moins deux infections profondes y compris septicémie^{b)}.*
- Maladie causée par des germes habituellement inoffensifs (par ex. mycobactéries atypiques).*
- Complications suite aux vaccins vivants (tuberculose, rougeole, varicelle).*

Autres manifestations systémiques

- Retard staturo-pondéral ou de croissance.
- Auto-immunité.
- Cancer.

Anamnèse familiale

Déficits immunitaires congénitaux ou symptômes similaires chez d'autres membres de la famille.

- a) Ce critère varie d'un pays à l'autre entre 4-8 OMA/an.
- b) Vu l'aspect potentiellement fatal, nous proposons de réaliser un bilan dès la première infection de ce type.

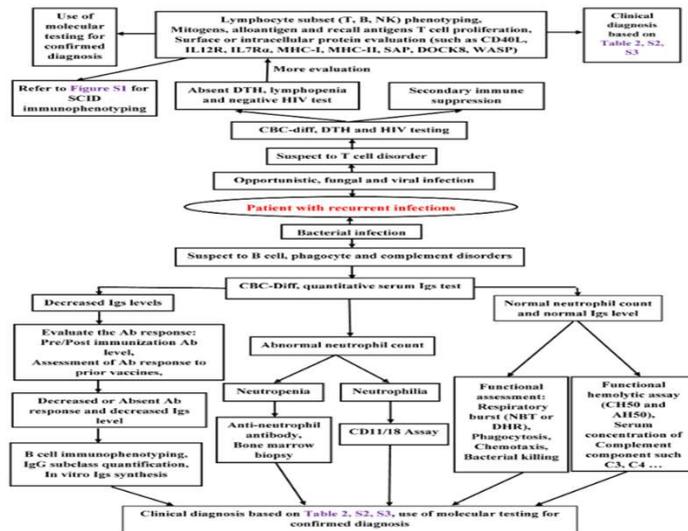
* Si le patient présente un de ces drapeaux rouges, nous proposons de l'adresser directement en immunologie pour un avis spécialisé.

Modified from Jeffrey Modell Foundation.



9^{èmes} Journées Nationales de Biologie Praticienne

Démarche diagnostique



DOI: 10.2174/1871530319666190828125316



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Bilan de première intention

- ❖ Numération Formule Sanguine
- ❖ Dosage pondéral des immunoglobulines sériques (IgG, IgA, IgM)
- ❖ Sérologies post-vaccinales et/ou post-infectieuses
- ❖ Radiographie du thorax chez l'enfant
- ❖ Scanner thoracique
- ❖ Scanner sinusien
- ❖ Echographie ou scanner abdominal
- ❖ Sérologie HIV, recherche protéinurie à la bandelette etc....



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Bilan de deuxième intension

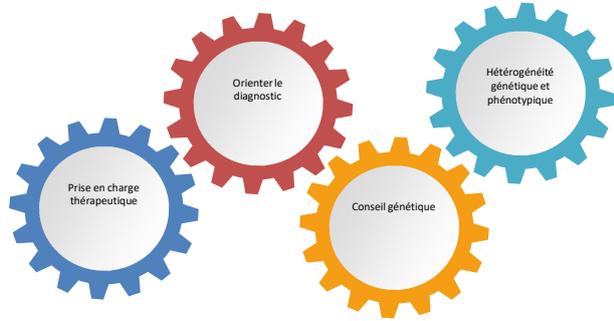
- ❖ Marqueurs lymphocytaires de surface :
Phénotypage lymphocytaire : CD3, CD4, CD8 (LcT) ; CD19 (LcB), CD16, 56 (NK), IgM, IgD (LcB naifs), CD27(LcB mémoires), CD40-L (LcB)
- ❖ Étude fonctionnelle des lymphocytes :
Test de transformation lymphoblastique (TTL)
- ❖ Exploration du complément :
CH50, C3, C4: déficit de la voie classique, déficit des fractions C1 à C9
AP50, dosage des composés D, H, I et properdine
- ❖ Étude fonctionnelle des PN et dosage des IgE



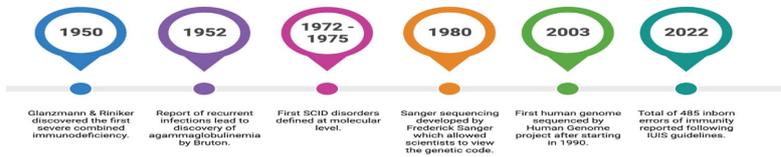
9 èmes journées Nationales de Biologie Praticienne

Explorations génétiques

- ✓ **Confirmation** du diagnostic (Présentation phénotypique aspécifique).
- ✓ Clarifier la **transmission** de la maladie et son **expression** potentielle.
- ✓ Constituer des **registres** permettant de mieux comprendre les associations génotype-phénotype.
- ✓ Développer de nouvelles **cibles thérapeutiques**.

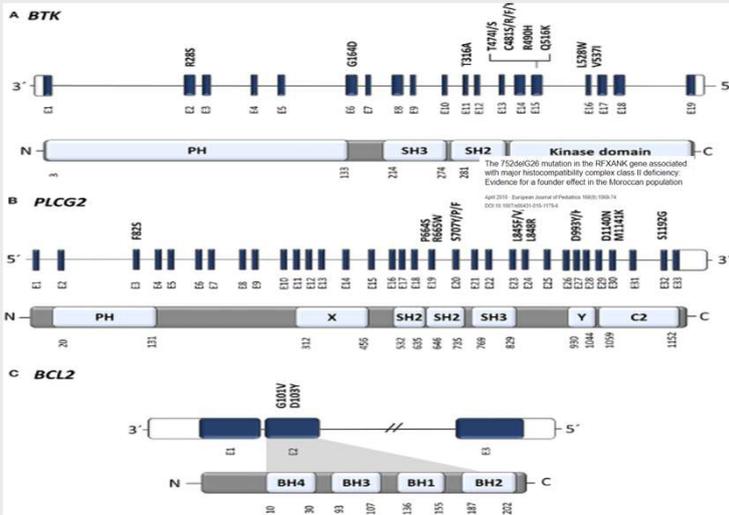


The Discovery of Inborn Errors of Immunity



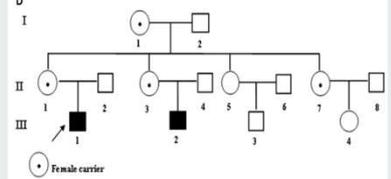
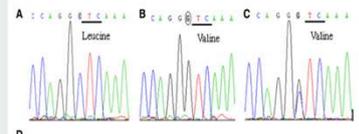
9 èmes journées Nationales de Biologie Praticienne

Explorations génétiques



The 752delG26 mutation in the RFXANK gene associated with major histocompatibility complex class II deficiency: Evidence for a founder effect in the Moroccan population

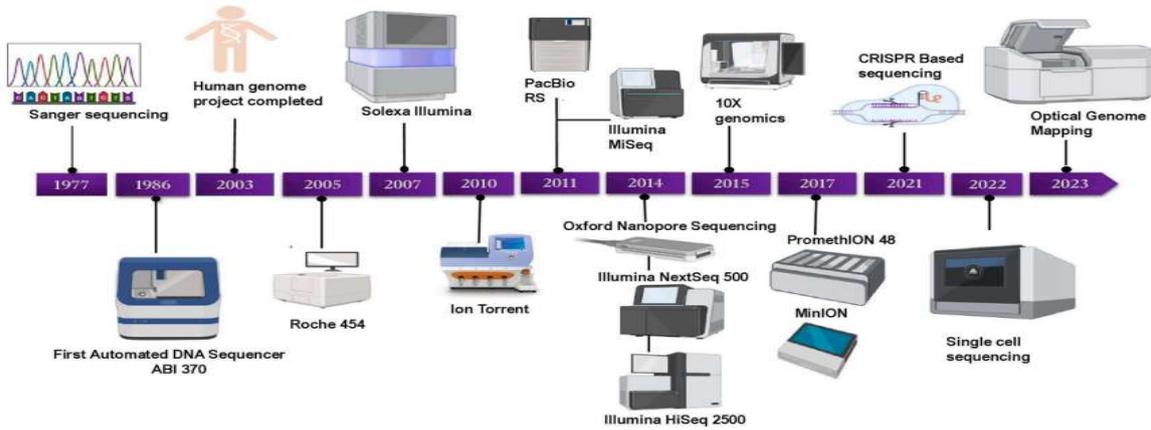
Article in European Journal of Pediatrics, April 2013





9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Explorations génétiques



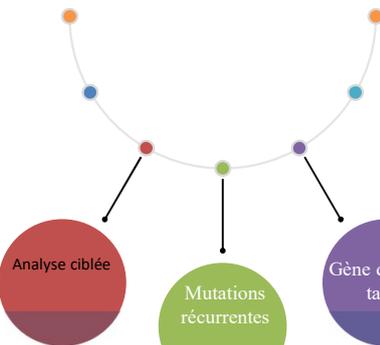
Clinica Chimica Acta 551 (2023) 117568 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37839516/>



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Séquençage classique

Limites des analyses ciblées



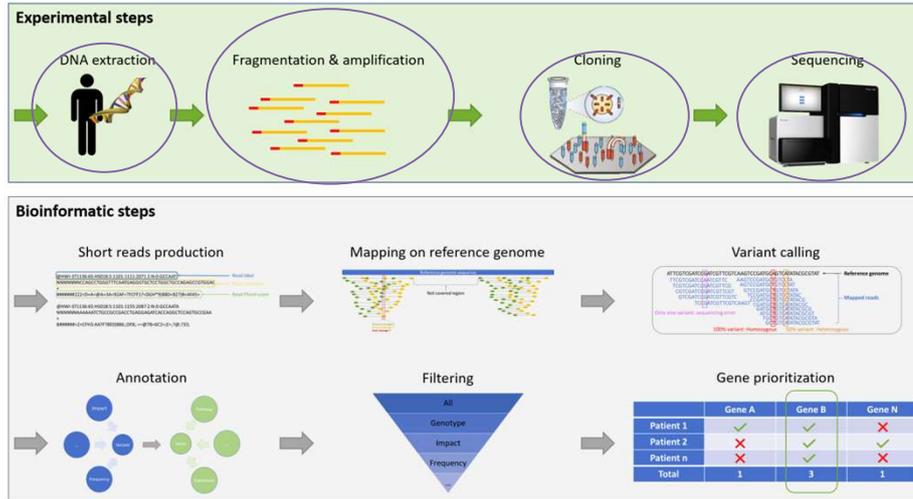
- ✓ Parallélisation limitée.
- ✓ Taille des fragments séquencés jusqu'à 1000 pb.
- ✓ Coût par base élevé.

« technique de choix »



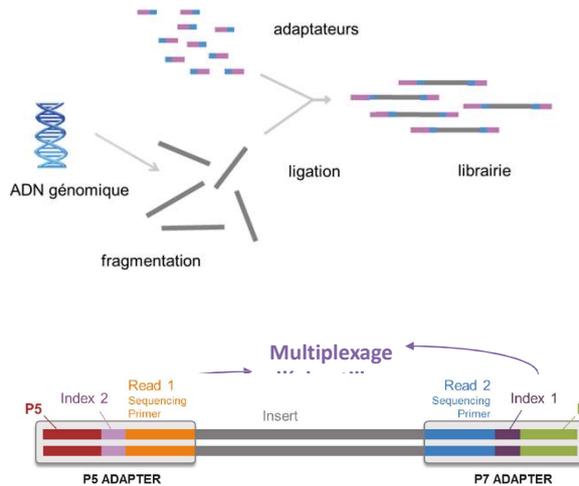
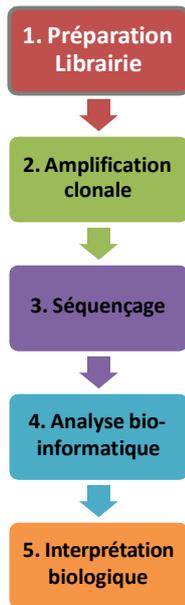
9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Le séquençage nouvelle génération



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

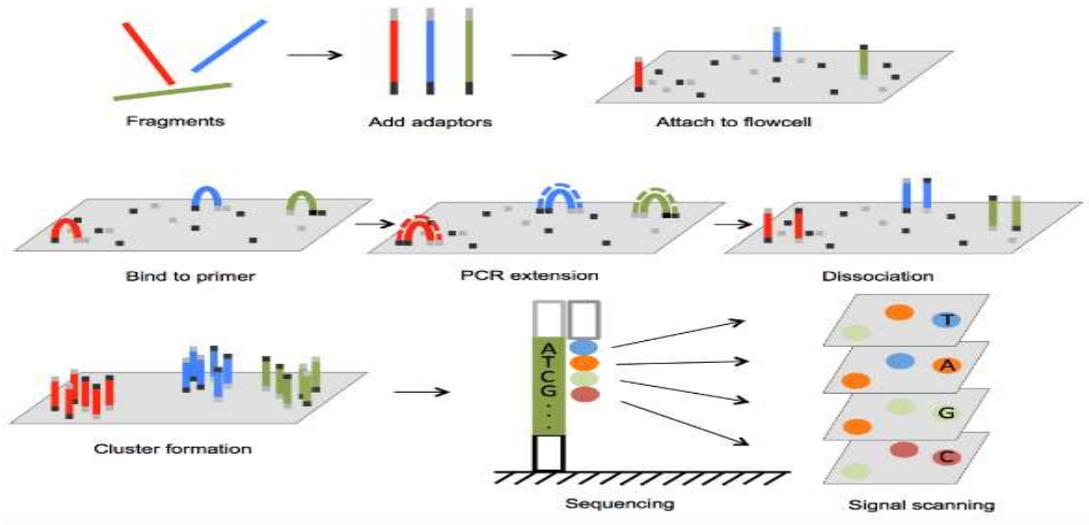
La librairie





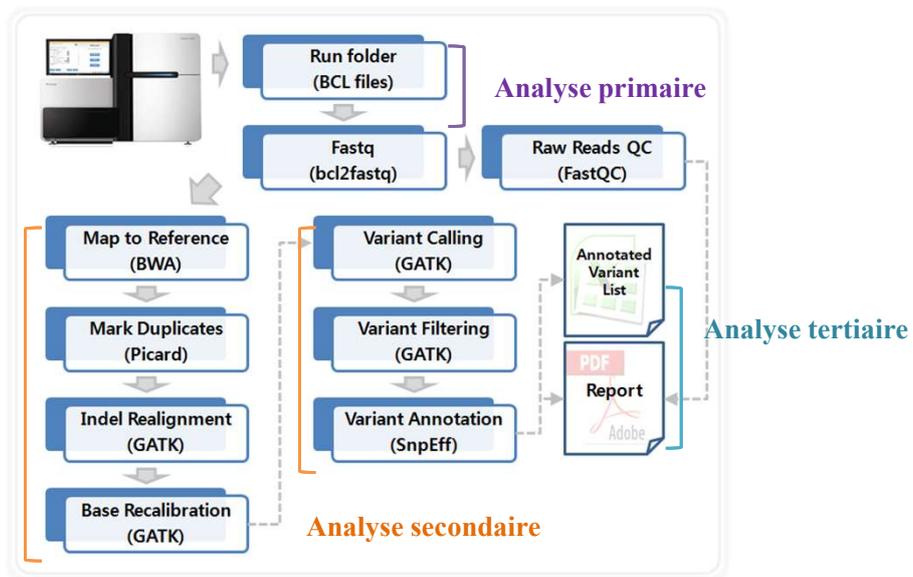
9 èmes journées Nationales de Biologie Praticienne

Le séquençage nouvelle génération



9 èmes journées Nationales de Biologie Praticienne

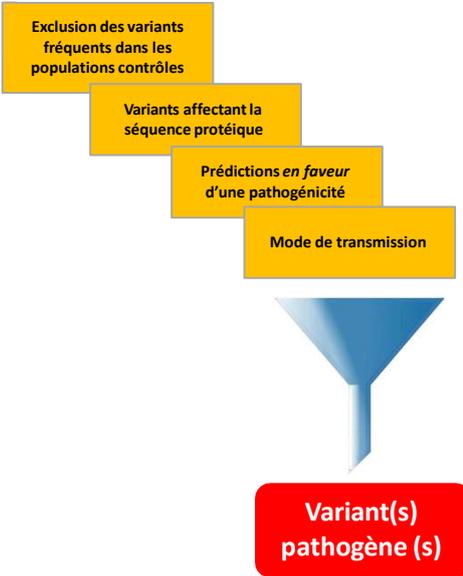
Analyse bio-informatique des données NGS: Workflow





9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Interprétation des variants



Les risques
Si critères de filtre

Trop stringents
➤ Risque de faux-négatifs

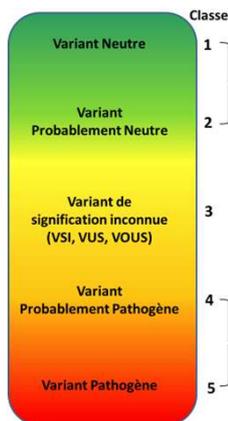
Trop permissifs
➤ Trop de variants à évaluer

➤ Expertise clinico-biologique



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Interpretation des variants



- ☐ **Données épidémiologiques**
 - Bases de données de populations
- ☐ **Effet du variant sur la fonction de la protéine**
 - Nature du variant nucléotidique
 - Prédications *in silico* de pathogénicité
 - Données fonctionnelles
- ☐ **Ségrégation familiale**
- ☐ **Phénotypes**

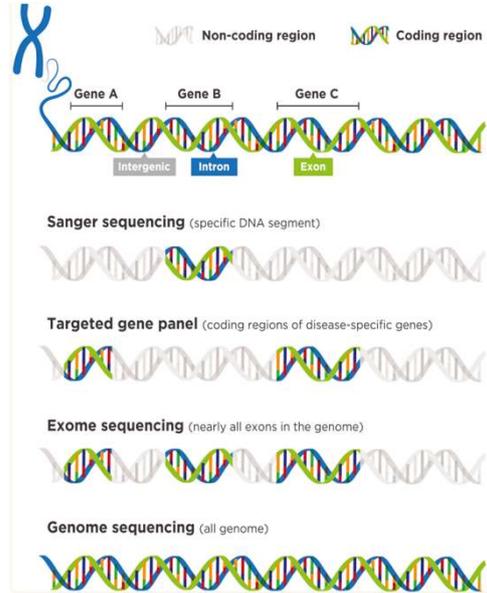
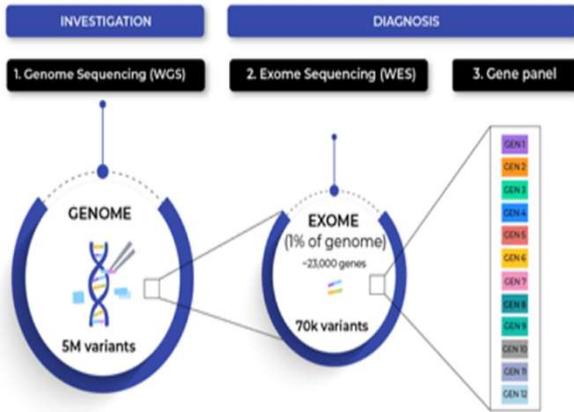
Base gnomAD
120 000 exome+génomomes

g.856145C>T <Exomes+Genomes>		
Filter: PASS		
Max AF in populations: 1.63%		
	Allele Freq	Hom Freq
All	0.15%	0.0015%
African	1.63%	0.017%
Latino	0.049%	
Ashkenazi Jewish		
East Asian		
South Asian	0.0033%	
Eur. (Non-Finnish)	0.0032%	
Eur. (Finnish)		
Other	0.031%	

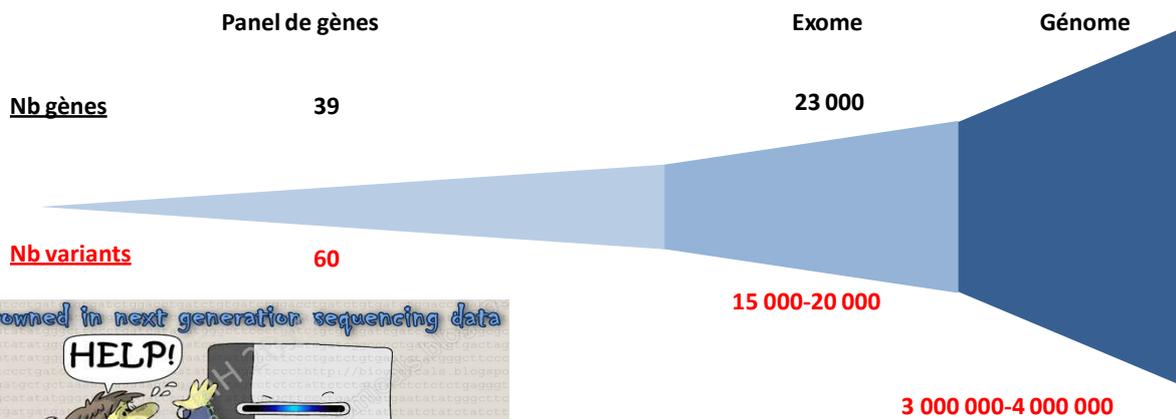
Richards et al, Recommendations ACMG, 2015



9^{èmes} Journées Nationales de Biologie Praticienne



Défi : nombre et interprétation des variants



Juin 2019



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Avantages
Très grande sensibilité analytique
Séquençage de l'exome/génome complet avec une large gamme d'altérations génomiques détectées (délétions, translocations, nombre de copies).
Adapté aux différents types de prélèvements (tissu tumoral fixe au formol, ADN libre circulant, cellules tumorales circulantes).
Découverte de nouveaux variants génétiques et une meilleure compréhension de l'oncogenèse et de la progression tumorale.
Délai d'analyse et de réponse diminué.
Inconvénients
Nécessité d'un consentement spécifique incluant l'analyse mutationnelle somatique et germinale.
Variabilité de performance des différentes plateformes de NGS.
Coût par test élevé.
Coût des équipements modérément élevé.
Expertise informatique pour l'interprétation et le traitement des données.
Nécessité d'un fort investissement institutionnel en terme de capacité de stockage des données.
Pertinence des nouveaux polymorphismes découverts.
Veille éthique quant à l'utilisation des données constitutionnelles (mutation germinales).



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Analysis	Commonly Used Tools
Common Analysis	
Quality check of sequences	FastQC [90], FASTX-toolkit [91], MultiQC [92]
Trimming of adaptors and low-quality bases	Trimmomatic [93], Cutadapt [94], fastp [95]
Alignment of sequence reads to reference genome	BWA [96], Bowtie [97], dragMAP [98]
Reports visualization	MultiQC [92]
Whole-Genome Sequencing/Whole-Exome Sequencing/Targeted Panel	
Removal of duplicate reads	Picard [99], Sambamba [100]
Variant calling (single-nucleotide polymorphisms and indels)	GATK [101], freeBayes [102], Platypus [103], VarScan [104], DeepVariant [105], Illumina Dragen [106]
Filter and merge variants	bcftools [107]
Variant annotation	ANNOVAR [108], ensemblVEP [109], snpEff [110], NIRVANA [111]
Structural variant calling	DELLY [112], Lumpy [113], Manta [114], GRIDDS [115], Wham [116], Pindel [117]
Copy number variation (CNV) calling	CNVnator [118], GATK gCNV [119], cn.MOPS [120], cnvCapSeq(targeted sequencing) [121], ExomeDepth (CNVs from Exome) [122]



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

MIT
Technology
Review

DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.

1 One protein unzips the DNA helix into two strands.

2 A second protein creates a pore in the membrane and holds an "adapter" molecule.

3 A flow of ions through the pore creates a current. Each base blocks the flow to a different degree, altering the current.

4 The adapter molecule keeps bases in place long



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Phacogen

First generation

Second generation
(next generation sequencing)

Third generation





Sanger Sequencing
Maxam and Gilbert
Sanger chain termination

454, Solexa
Ion Torrent
Illumina

PacBio
Oxford Nanopore
Illumina Novaseq Series

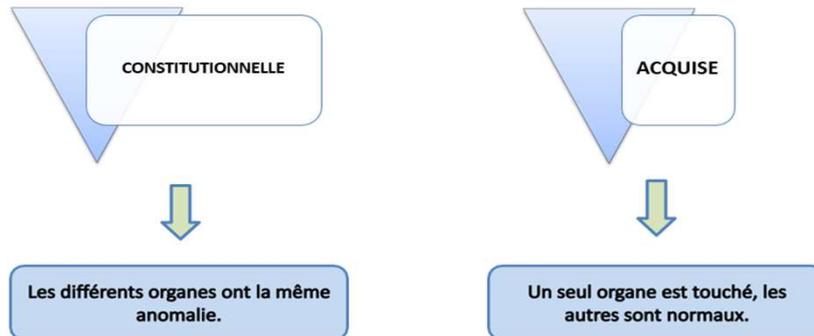
Short-read sequencing

Long-read sequencing



9 èmes journées Nationales de Biologie Praticienne

« Analyse génétique », Quel type de prélèvement?



9 èmes journées Nationales de Biologie Praticienne

« Next Generation Sequencing », NGS : pourquoi ?

Fonctionnement pré-NGS (Sanger):

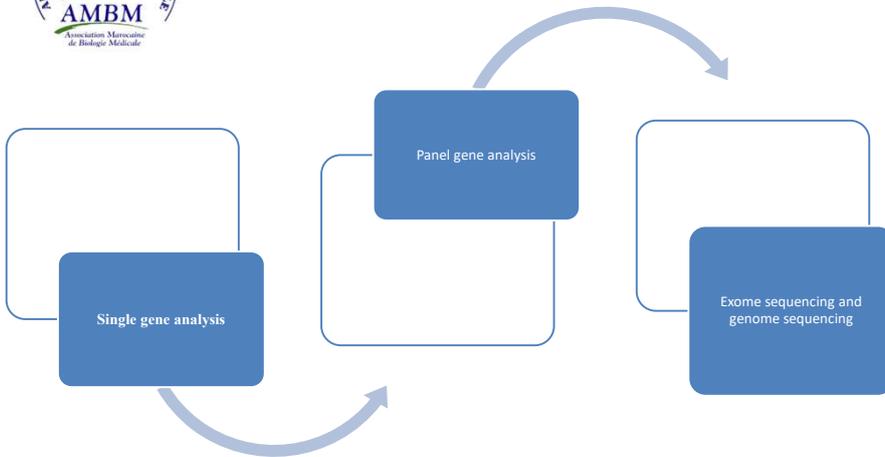
- Plusieurs centres de diagnostic pour des gènes différents / pathologie
- Plusieurs prélèvements du même patient (1/centre)
- Délai de résultat élevé (plusieurs années)
- Coût élevé +++

Fonctionnement post-NGS:

- 1 centre de diagnostic pour la plupart des gènes de la pathologie
- 1 prélèvement pour toutes les analyses
- Délai de résultat en baisse (quelques mois)
- Coût faible --- / régions explorées
- Synthèse des résultats



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

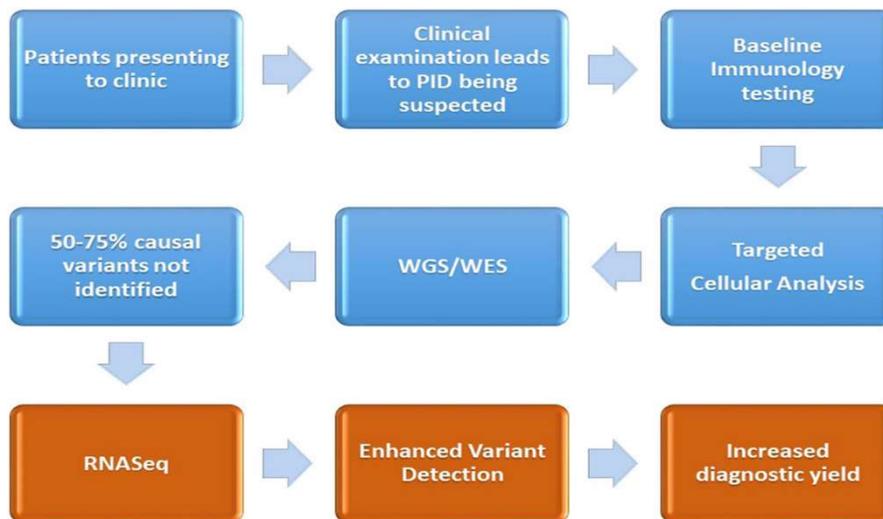


Catégories de DIH	Nombre de gènes	Exemples de gènes
Immunodéficiences combinées sévères (IDCS)	13	ADA, JAK3, RAG1, RAG2
Immunodéficiences combinées	33	CD40L, CD8A, ICOS, ZAP70
Immunodéficiences combinées avec caractéristiques associées ou syndromiques	37	ATM, BLM, TBX1, WAS
Déficits en anticorps	22	AICDA, BTK, IGHM, PIK3R1
Dérégulations du système immunitaire	36	AIRE, CECR1, FOXP3, IL10
Déficits congénitaux de la fonction et/ou du nombre phagocytaire	27	CYBB, G6PC3, ELANE, RAC2
Déficits en immunité innée et intrinsèque	28	CXCR4, IFNGR1, MYD88, STAT2
Maladies autoinflammatoires	13	MEFV, MVK, NLRP3, NLRP12
Déficits du système du complément	31	CFB, CFD, CFH, CFI
Phénotopies des DIH	3	NRAS, KRAS
Indéfinies	118	TLR1, TLR2, TRAF1, TRAF2

25–60%



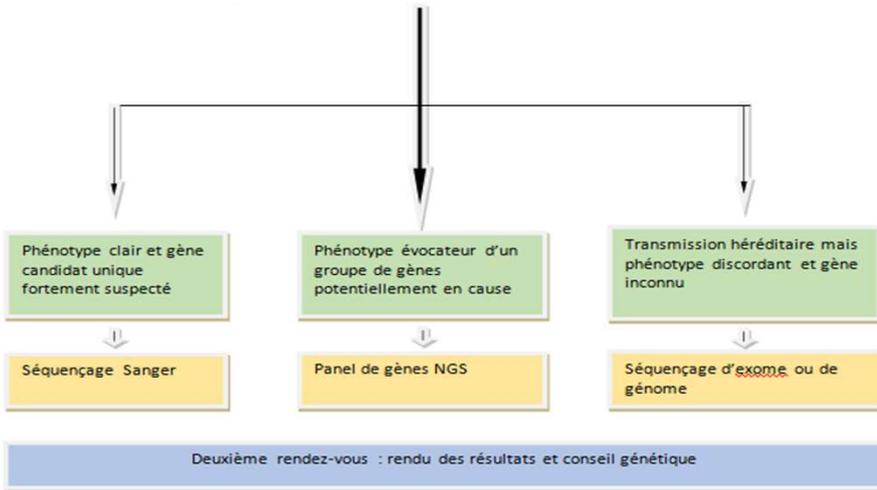
9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne



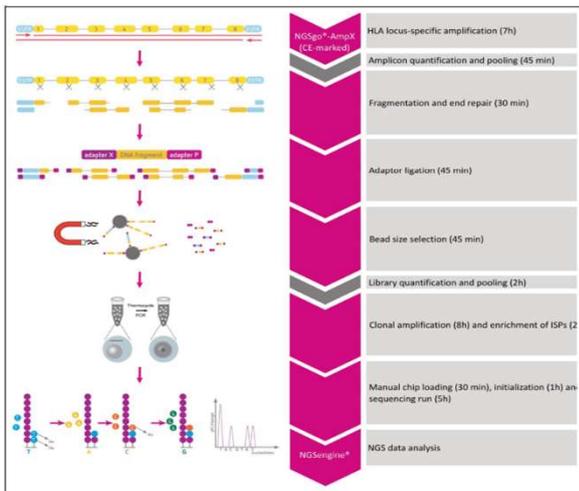


9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Anamnèse familiale et ou phénotype évocateur d'un déficit immunitaire primitif



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne



[Int. J. Neonatal Screen](#) 2023 Jun; 9(2): 22.
Published online 2023 Apr 11. doi: [10.3390/ijns9020022](https://doi.org/10.3390/ijns9020022)

PMCID: PMC10123688
PMID: [37092516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37092516/)

Genomic-Based Newborn Screening for Inborn Errors of Immunity: Practical and Ethical Considerations

[Jovanka R. King](#),^{1,2,3} [Kalle Grill](#),⁴ and [Lennart Hammarström](#)^{5,*}

Lynn Wein Bush, Academic Editor and Olaf Bodamer, Academic Editor

• [Author information](#) • [Article notes](#) • [Copyright and License information](#) • [PMC Disclaimer](#)

Source: GenDX. Accurate HLA typing by NGS using the IonTorrent PGM with a platform specific developed and tested workflow [affiche présentée au congrès de IASHI à Denver en 2014]. Disponible à : <http://www.gendx.com/downloads/posters/GenDx%20ASHI%20posters%202014%20ion%20Torrent.pdf>.



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Journal of Clinical Immunology
<https://doi.org/10.1007/s10875-022-01398-z>

ORIGINAL ARTICLE



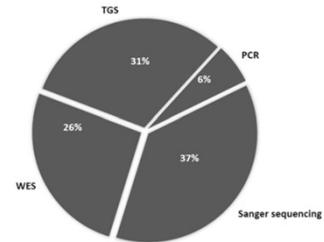
Genetic Diagnosis of Inborn Errors of Immunity in an Emerging Country: a Retrospective Study of 216 Moroccan Patients

Abderrahmane Moundir¹ · Hind Ouairi¹ · Ibtiha Benhsalen^{1,2} · Lella Jeddane^{1,3} · Nouredine Rada⁴ · Naïma Armezouli⁵ · Zineb Joudadi⁶ · Fatima Adnane⁷ · Naïma El Hafidi⁸ · Amina Kili⁹ · Asmaa Sourhanbour Drissi^{1,7} · Abdeladim Babakhouya⁸ · Sarra Benmiloud⁸ · Mohamed Hbib⁸ · Noufissa Benajiba⁹ · Mustapha Hida⁸ · Mohamed Bouskraoui⁴ · Chafiq Mahraoui¹⁰ · Brahim Admou¹¹ · Jalila El Bakkouri^{1,7} · Fatima Aïal^{1,2} · Ahmed Aziz Bousfilha^{1,2} 

Received: 1 June 2022 / Accepted: 27 October 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Table 1 General data of the Moroccan registry of inborn errors of immunity

	Number	Percent
Patients in the Moroccan IEI registry	742	100%
Patients without a genetic diagnosis	526	71%
Patients with a genetic diagnosis n=216 (29%)		
Patients tested in the framework of thesis projects	87	40%
Patients tested in the framework of international collaborations	129	60%
Total genetic disorders	55	100%
Novel genetic disorders	7	13%
Mutations found	171	100%
Novel mutations	58	34%



Diagnostic : 29%



9^{èmes} journées Nationales de Biologie Praticienne

Conclusion

- ❖ L'étude génétique joue un rôle très important dans le diagnostic des déficits immunitaires primitifs.
- ❖ Le choix de l'étude doit être fait en fonction des phénotypes des patients.
- ❖ En cas d'analyse par NGS, l'interprétation des mutations retrouvées doit se faire en tenant compte du tableau clinique du patient, du mode de transmission de la pathologie et les directives des consensus
- ❖ L'incorporation de WES et WGS avec le bilan immunologique aidera à démêler les phénotypes complexes et à renforcer la découverte de nouveaux gènes.

AMBM

Association Marocaine
de Biologie Médicale

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

Mai 2024

PRÉSENTÉ PAR :
PR. Bouguenouch Laila

AMBM
Association Marocaine
de Biologie Médicale

9^{èmes} JOURNÉES NATIONALES
DE BIOLOGIE PRATICIENNE

02 03 et 04 Mai 2024
Ateliers Congrès

Casablanca
Hôtel Hyatt Regency

Sous le thème :
20 Ans au Service du Dialogue
Clinico-Biologique



Conférences



Communications
Affichées



Ateliers



Un engagement et une passion
qui transcendent le temps,
dédiés à l'excellence en Biologie
Médicale Marocaine.



La date limite pour soumettre les résumés des communications affichées est le 10 Avril 2024

06 00 02 27 63

secretariatamb@gmail.com

www.ambmmaroc.net