



Nutrition **O**bésité **R**isque **T**hrombotique



Les différentes thrombopénies constitutionnelles

MC ALESSI

SFH 15-17 mars 2017



Approches pangénomiques

Séquençage



Scanner



Images



Fichiers fastq

```
@SRRO06511.105 8_1_663_27 length=36
ATAGCGGCACTGTTGGTTCGCTTGTTCCTTTGAGTC
+
IIII7II-9/0;+8I<03.+%-,&"+'($,#"'&"
@SRRO06511.112 8_1_829_108 length=36
AGAATTTTATGTATCTGGATGCAATAAAAAATGATG
+
II@IIIIIIIIIIIIII1DII>0<I?>869;64(+/%
@SRRO06511.490 8_1_351_672 length=36
AGCACCGCGCGTGTGTCCCCATGCTCCACACCTCT
+
IO>0A,I2H):$)6)#4$.>'&.$)"%7"1%)&&
@SRRO06511.632 8_1_79_187 length=36
ATGCCGAAAGGTATCGGTAAACCGTTGAAATTCTTC
+
IIIIII<I;II57G;II.I0**32.--)$32++9),
@SRRO06511.726 8_1_300_437 length=36
ACCACGTGGACTTCCAGGAOCATGAGGCCAAATTGG
+
T1R5-TTTTT\3 T&0- -4(V&V1&+1"4/QV"b#"
```

Liste de
Variants

Annotation



Variants
Annotés

Filtrage

Modèle Génétique



**Thrombopénie
16 gènes
2009-2017**

Fichiers
BAM

Alignement

sur le génome



Contrôle de qualité



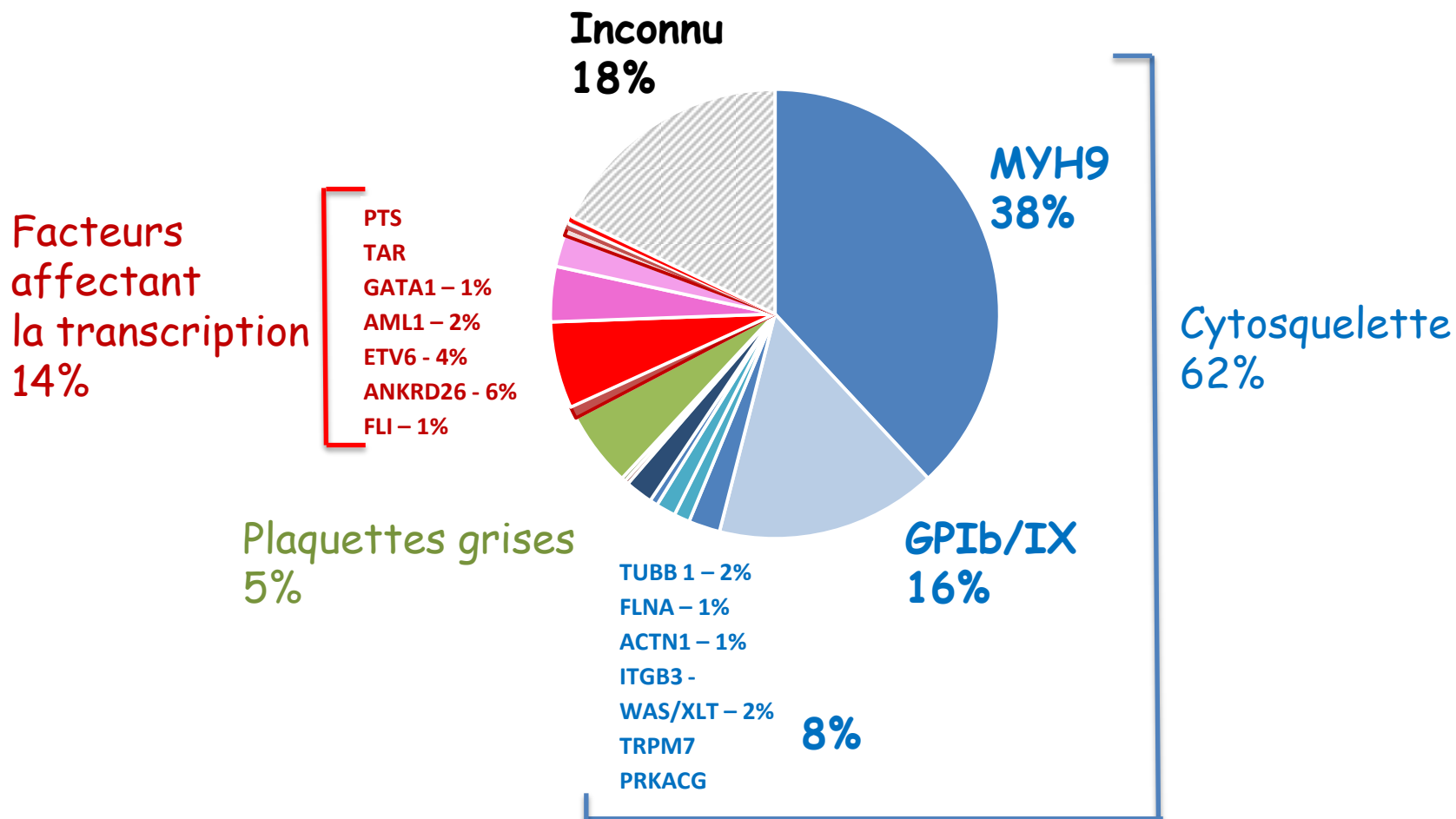
**BAM
filtrés**

Détection
des variants



Thrombopénies héréditaires

352 cas (cartes de soins - CRPP)



Anomalies de régulation du cytosquelette

Syndrome de Jean Bernard Soulier

Syndrome de Di Georges / del 22q11

Pseudowillebrand

Forme monoallélique GPIb/XI

De Marco J Clin Invest. 1990

Miller, J.L Blood, 1992.

Vettore, S., Haematologica, 2008.

Kunishima, S Eur J Haematol, 2006.

Savoia, A., Blood, 2001.

Kunishima, S., Am J Hematol, 2001.

Noris, P., et al., Haematologica, 2012

Sivapalaratnam S, Blood. 2017

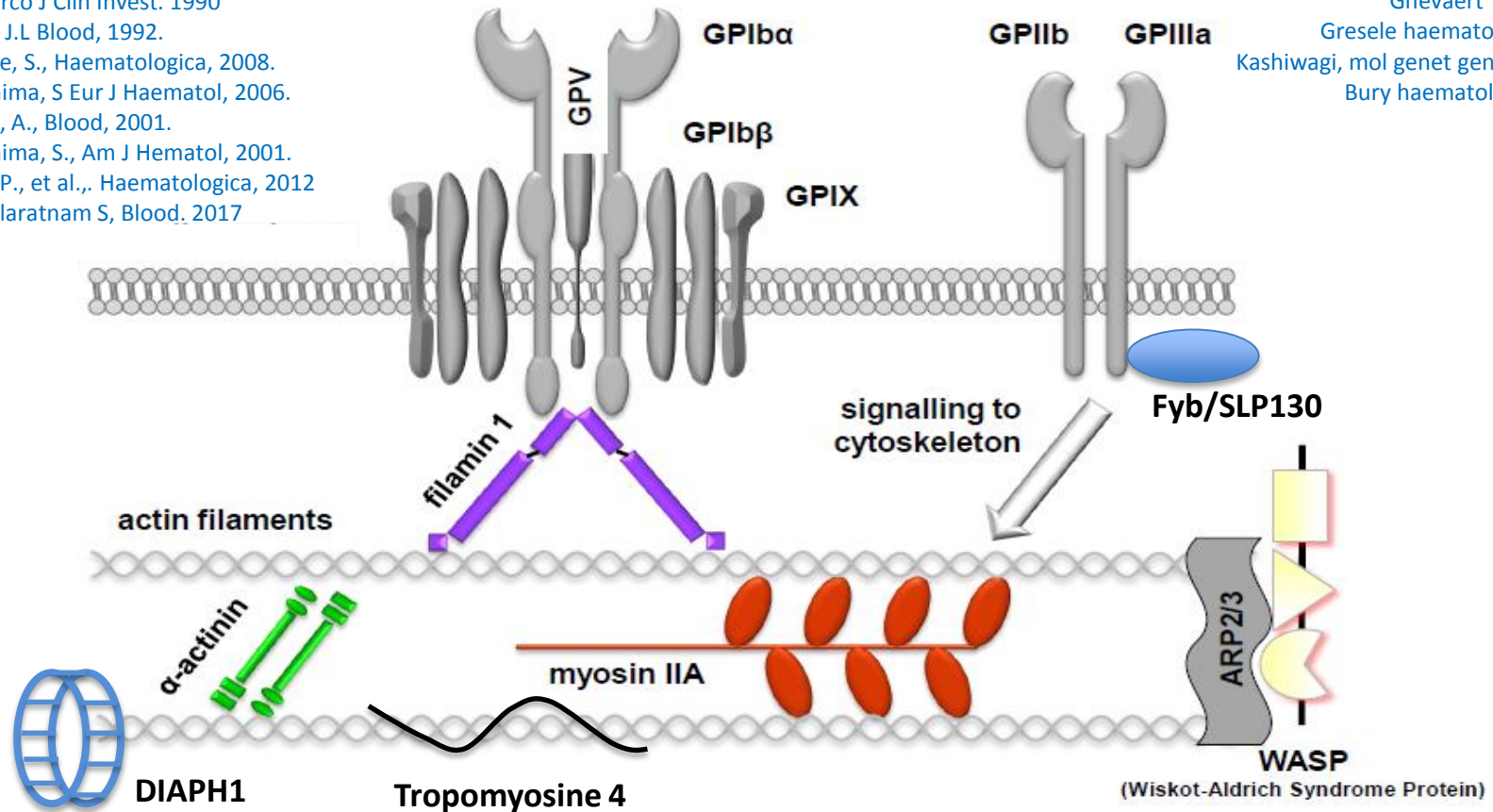
IIbIIIa variants gain de fonction

Ghevaert blood 2008

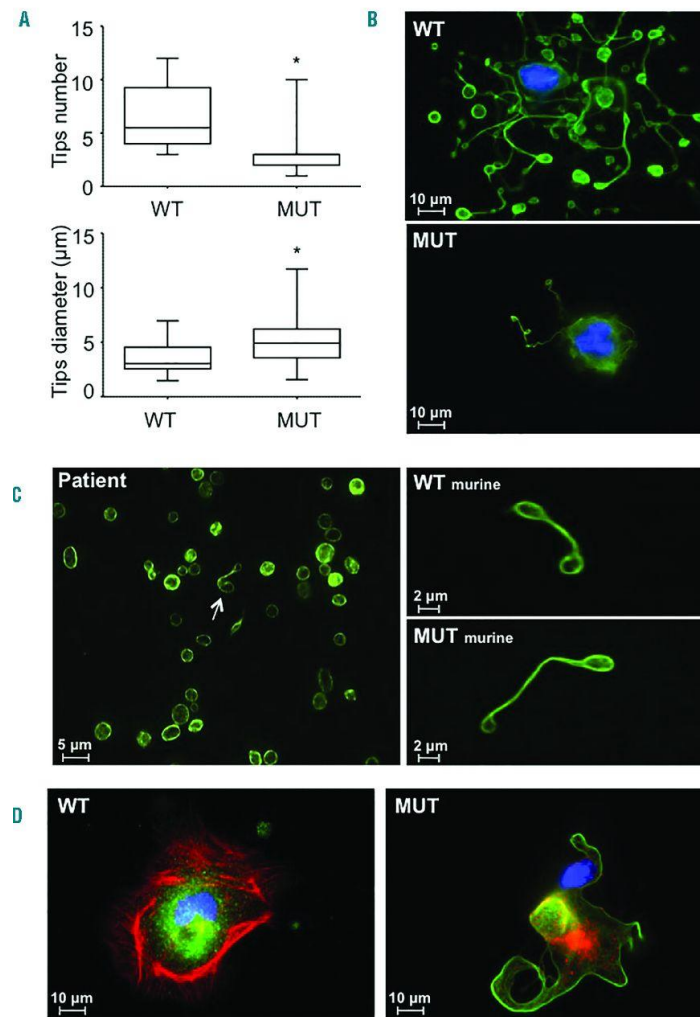
Gresele haematologica 2009

Kashiwagi, mol genet gen med 2013

Bury haematologica 2016



IIbIIIa constitutively active



Loredana Bury et al. Haematologica 2016

ACTUALITES : FYB - ADAP - SLP130

p.W131X, p.Tyr462X

Saignements

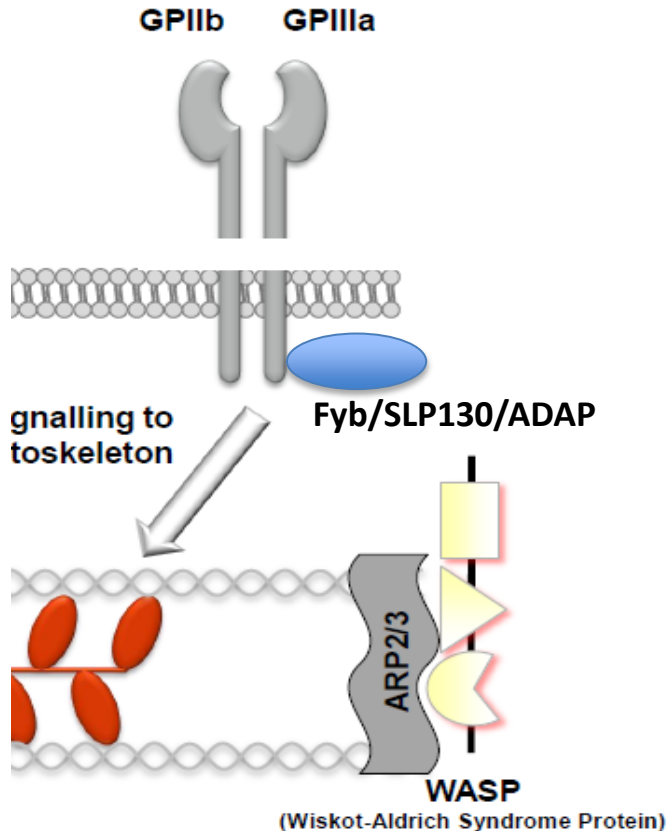
Thrombopénie parfois sévère (AR)

5-69G/L

VPM = 5-6 fl

Signes associés

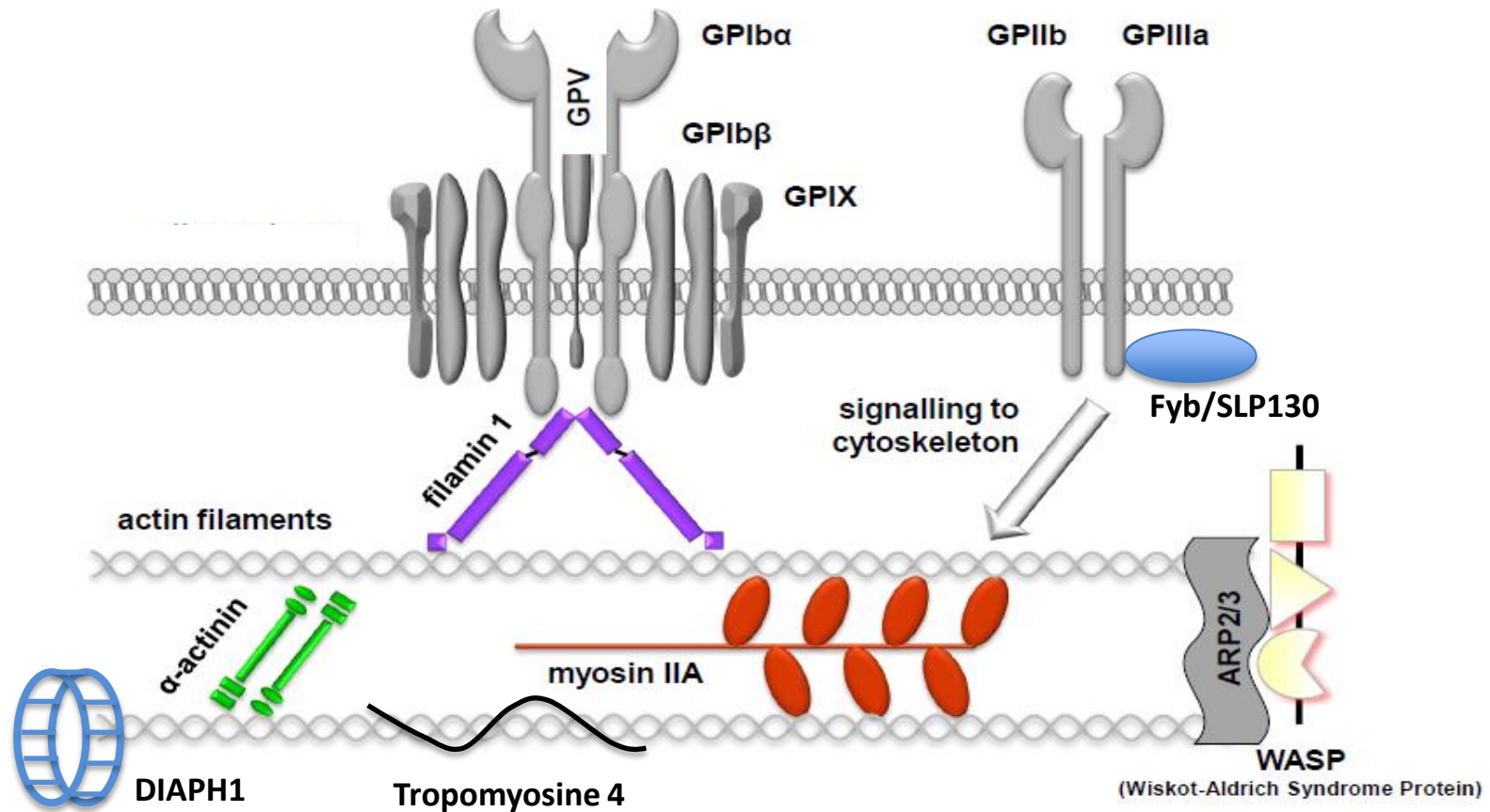
Eczema ?



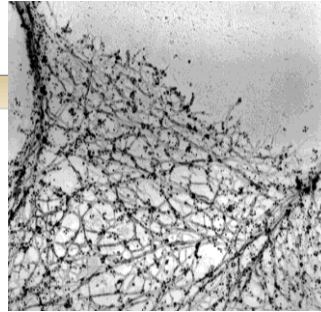
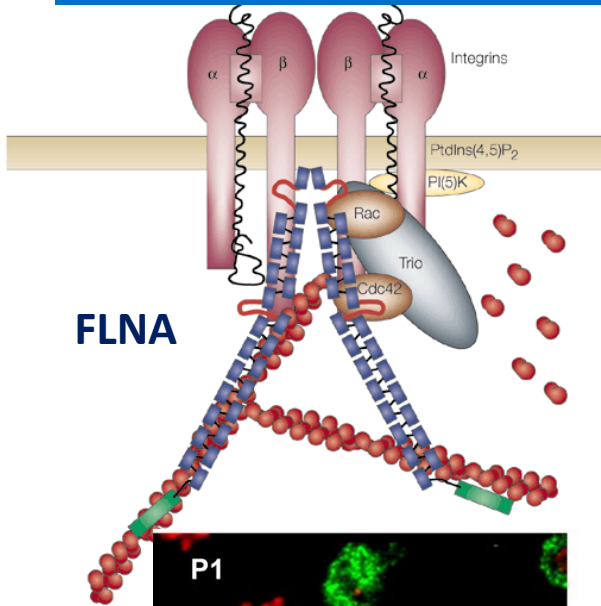
H Hamamy, BMC Med Genet 2014

Levin C, J Thromb Haemost 2015

Anomalies de régulation du cytosquelette

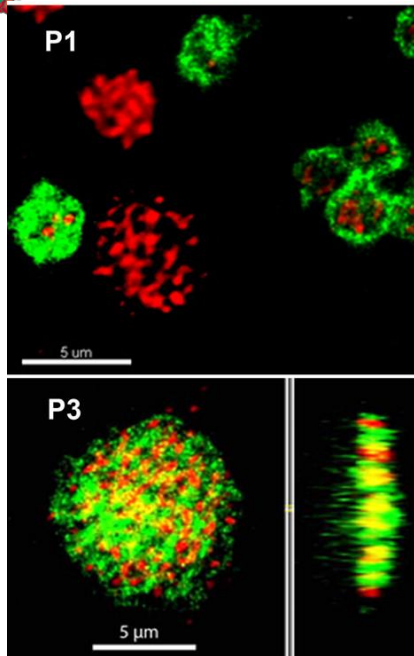


ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE - ACTUALITES FILAMINE A



Mutations FLNA Filaminopathies (lié à l'X) :

Large spectre phénotypique : épilepsie, dysplasie osseuse, malformations cardiovasculaires, obstruction intestinale ...
+/- thrombopénie



Thrombopénie isolée (*Glu1803Lys*)

(*P Nurden, Blood 2011*)

50-80G/L

Hétérogénéité de taille Diamètre : $3.20 \pm 0.82 \mu\text{m}$ ($2.97 \pm 0.67 \mu\text{m}$)

Hétérogénéité de distribution de la FLNA ,

Dysfonction plaquettaire (*Berrou E, ATVB 2013*)

Agrégation plaquettaire, sécrétion, GPVI signal,

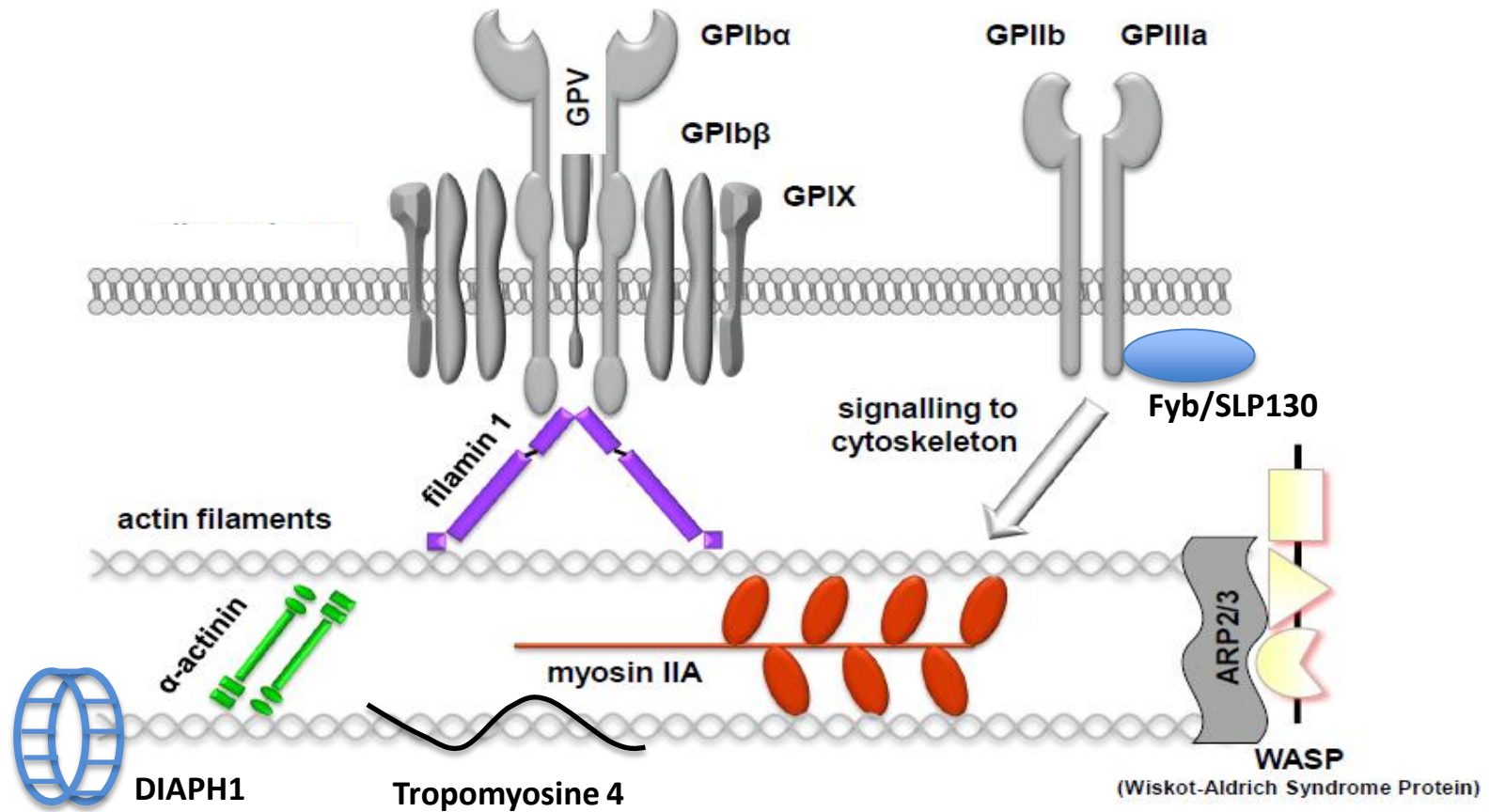
Croissance caillot sur collagène

PRKACG (AR) (*Manchev VT, Blood 2014*) (*p.I74M*)

5-8G/L, saignement

Diminution de l'expression de la FLNA dans le MK (dégradation)

Anomalies de régulation du cytosquelette



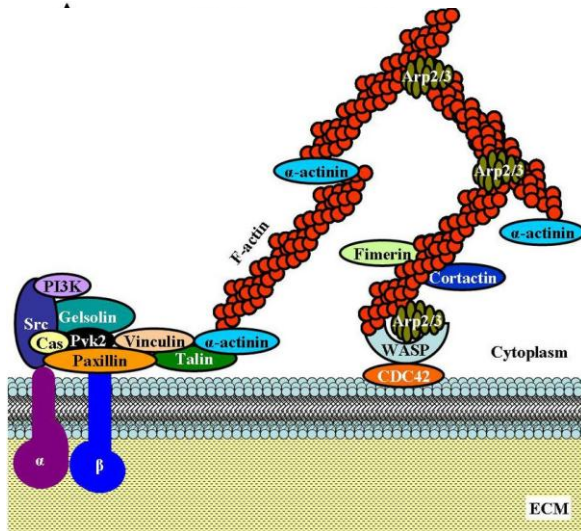
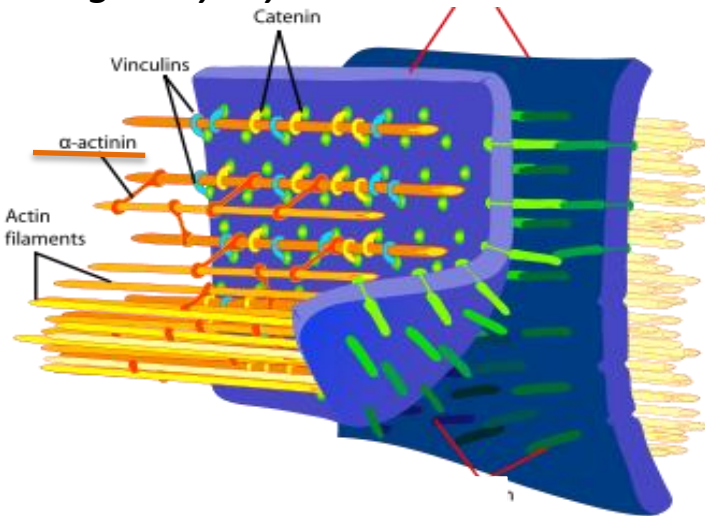
ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE - ACTUALITES

Actinine 1 - ACTN1

ACTN1 >> ACTN4

plaquettes
mégacaryocytes

Mutations ACTN1 4-5% des formes de thrombopénie (AD)



Thrombopénie modérée

103 ± 26 G/L
[46-166 G/L]

Macroplaquettes

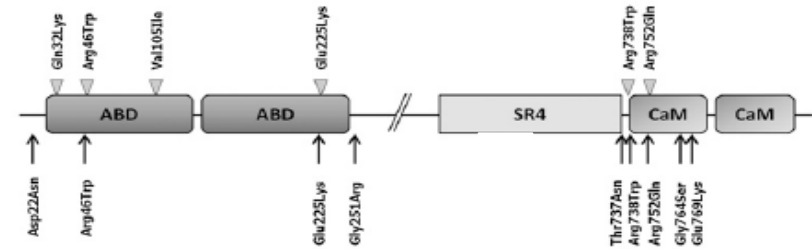
VPM 12,6+/- 1,7fl

Diamètre

3.2 ± 0.5 μm

Ctrl : 2.4 ± 0.3 μm

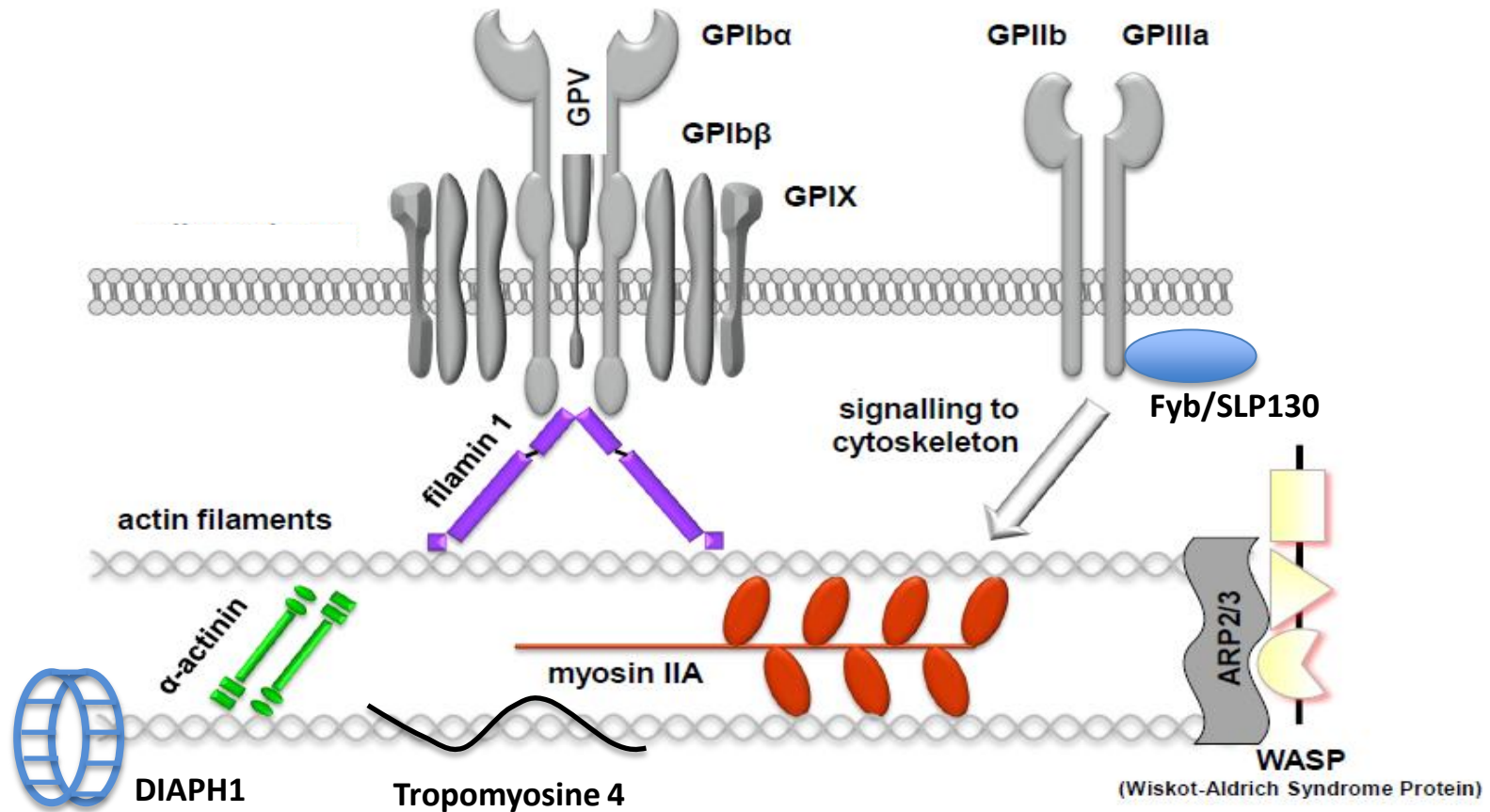
Bottega R, Blood. 2015



de l'affinité à l'actine *Murphy AC, FEBS Lett. 2016*
Modification de l'assemblage des filaments

Kunishima S, Am J Hum Genet. 2013, Gueguen P, PLoS One. 2013, Yasutomi M, Ann Hematol. 2016

Anomalies de régulation du cytosquelette



ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE - ACTUALITES

DIAPH 1 - TPM4

Diaph 1

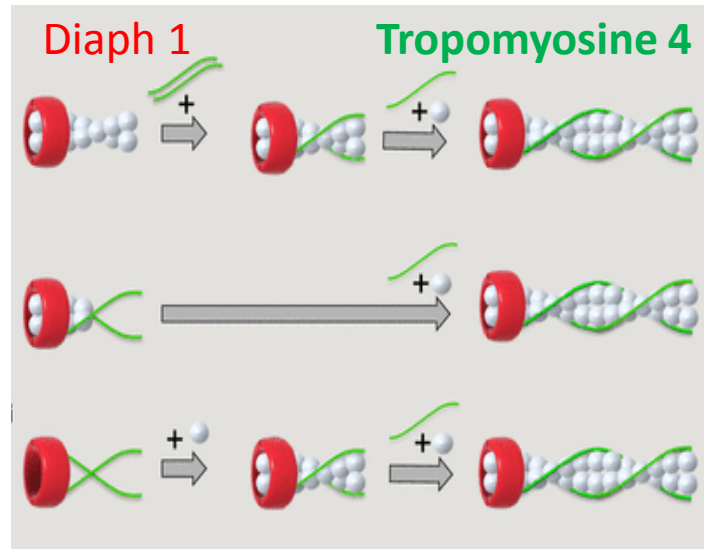
2 familles : R1213*

Diaph 1 constitutivement actif

Macrothrombopénie (AD)

63-147 G/L , VPM : 11,2-14,3

**Surdité de perception
neurosensorielle**
(précoce et sévère)



Tropomyosine 4

2 familles : R69*

Macrothrombopénie (AD)

80-140 G/L , VPM : 12-15

**[TMP4]//formation
des proplaquettes**

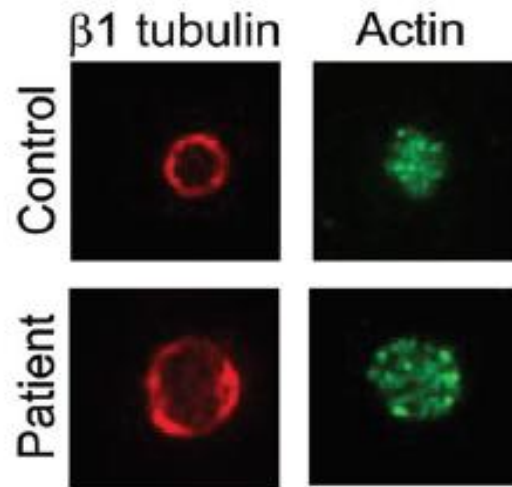
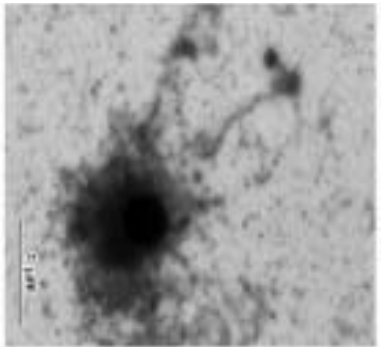
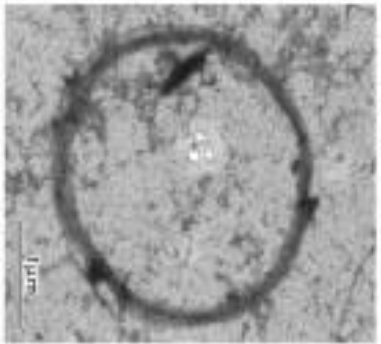
**Thrombus réduit sur
matrice de collagène**

ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE - ACTUALITES

Tubuline 1 - TUBB1

2 familles japonaises : *R318Wp.F260S*

1 famille française : *p.Q423**



Macrothrombopénie (AD)

111+/-13 [97-125)

VPM : 13,8

Anomalie de la production
des plaquettes

Destruction périphérique

Kunishima S, Blood. 2009

Kunishima S, Eur J Haematol. 2014

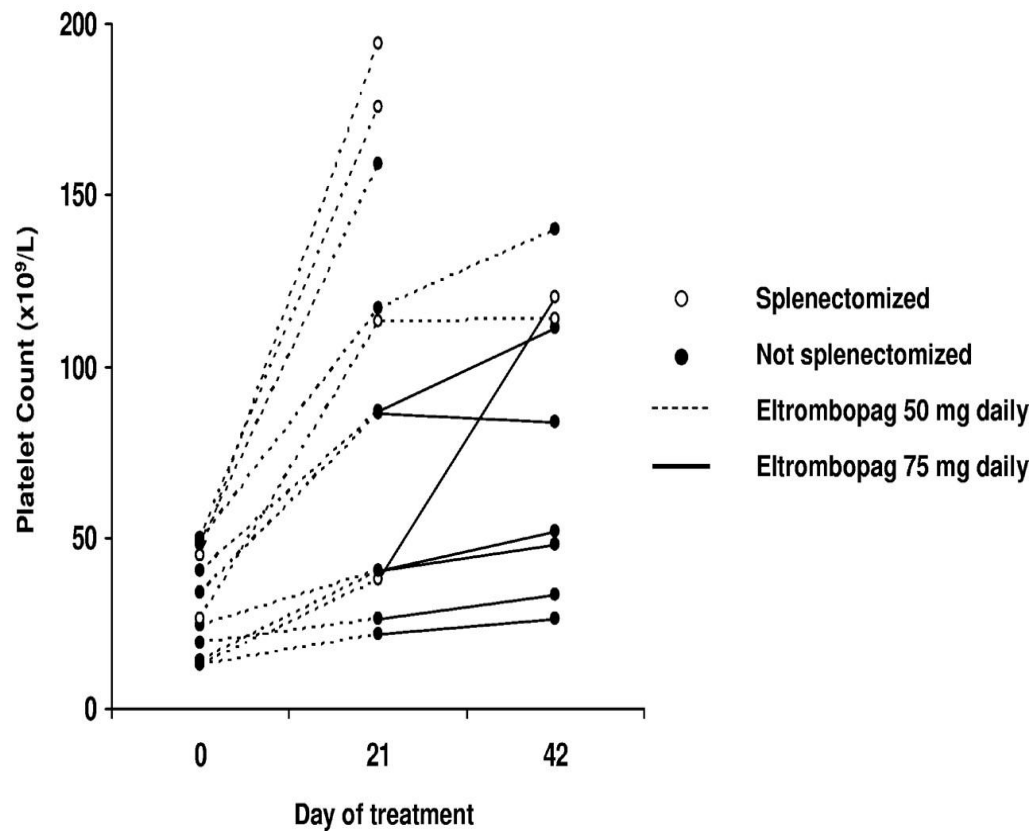
Fiore M Clin genet 2016

« Take home message »

Thrombopénies par anomalies du cytosquelette

- Fréquentes
- Nombreux nouveaux gènes
- Transmission surtout AD (*FYB* AR, *PRKACG* AR)
- Liées à l'organisation de l'actine et de la tubuline
- Parfois syndromique (DIAPH 1 , FLNA)
- Eligibilité aux agonistes de la thrombopoïétine ?

Evolution de la numération plaquettaire chez 12 patients porteurs d'un syndrome MYH9 (MYH9-RD) traités par eltrombopag

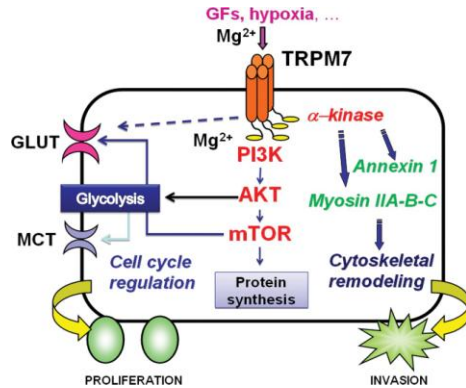


Sélection < 50 × 10⁹/L
Exclusion : risque thrombose
creatinine < 20 mg/ml

Eltrombopag 50 mg/j, 3 semaines
Stop si 150 G/L
+ 3 semaines à 50 mg/j si 100-150 G/L
+ 3 semaines à 75 mg/j si <100 G/L

ANOMALIES MOINS BIEN DEFINIES ACTUALITES

❑ TRPM7 *Transient receptor potential cation channel, subfamily member 7*

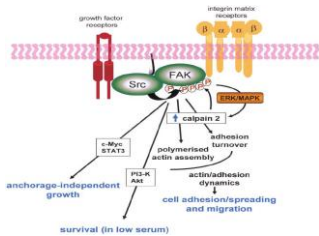


p.C721G and p.R902C - AD

50-94 G/L, VPM : 10,5-11,5, FA paroxystique
Supplémentation en magnésium

Sritt S, Nat commun 2016

❑ SRC *Src Family kinase*



p.E527K - AD

Mutation gain de fonction (➡ phosphorylation tyr)
68-140 G/L, VPM : 9,1-13, saignement, myelofibrose, atteinte osseuse
Défaut de maturation MK, défaut de formation des PPT

Turro E, Sci Transl Med 2016

❑ SLFN14 *Schlafen 14*

p.K218E, p.K219N, p.V.220D, p. R222W - AD

Région liant ATP/GTP

(prolifération, différenciation, localisation nucléaire)

68-140 G/L, VPM : 9,1-13, saignement, déficit en granules denses

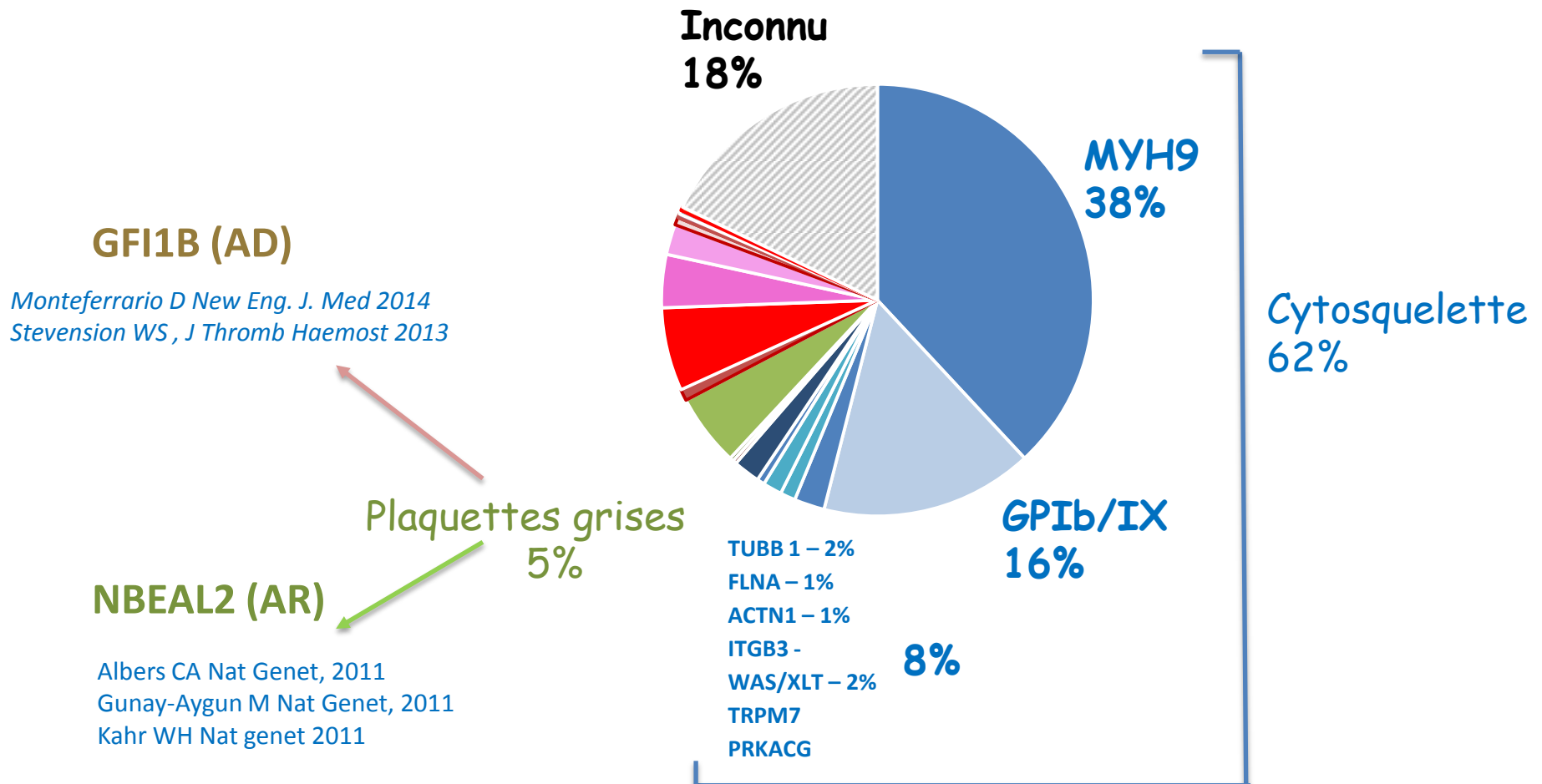
Expression réduite dans les plaquettes

Fletcher SJ, J Clin Invest 2015

Marconi C, Thromb Haemost 2016

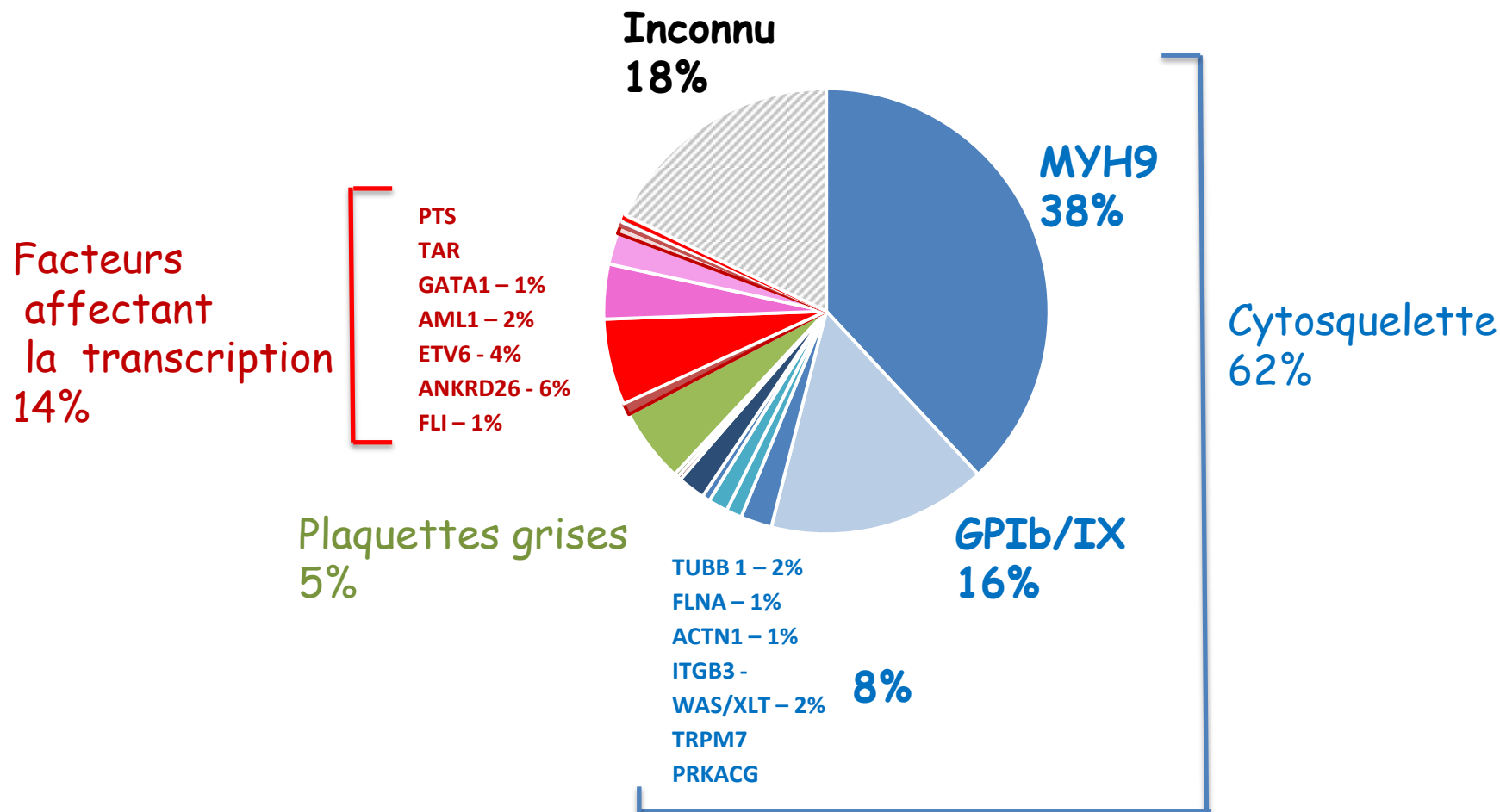
Thrombopénies héréditaires

352 cas (cartes de soins - CRPP)



Thrombopénies héréditaires

352 cas (cartes de soins - CRPP)



RUSAT (thrombopénie amégacaryocytaire avec synostose radio ulnaire) – ACTUALITES – MECOM



RUSAT : Thrombopénie sévère (10G/L) néonatale évoluant vers l'aplasie (AD)

HOXA 11 - Thompson AA nat genet 2000

Deletion de la région 3q26 incluant **MECOM** - Nielsen M, J Med Genet 2012

MECOM - Am J Hum Genet 2015

Microdeletion 3q26.2q26.31 incluant **MECOM** - Bouman A, Am J Med Genet A 2016

MECOM : Phénotype hématologique plus sévère

Thrombopénie néonatale 5-89 G/L

Sévère anémie néonatale 2,7 et 4 g/dl

Synostose bilatérale + anomalie des doigts

fente palatine, dysarthrie

Surdité (otite chronique médiane)

ACTUALITES : FLI1 - 11q24,1-q24,3

1990

2000

2010

2020

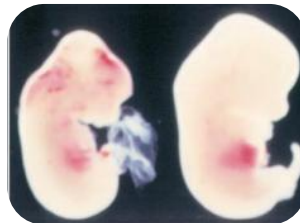
1993

Favier *et al.*
Syndrome Paris-Trousseau



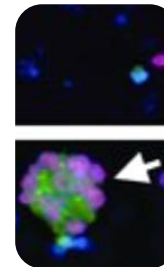
2003

Hart *et al.*
Souris *Fli1*^{-/-}



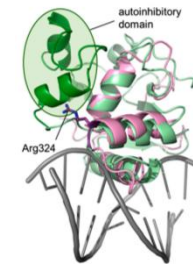
2004

Raslova *et al.*
Implication FLI1 dans PTS

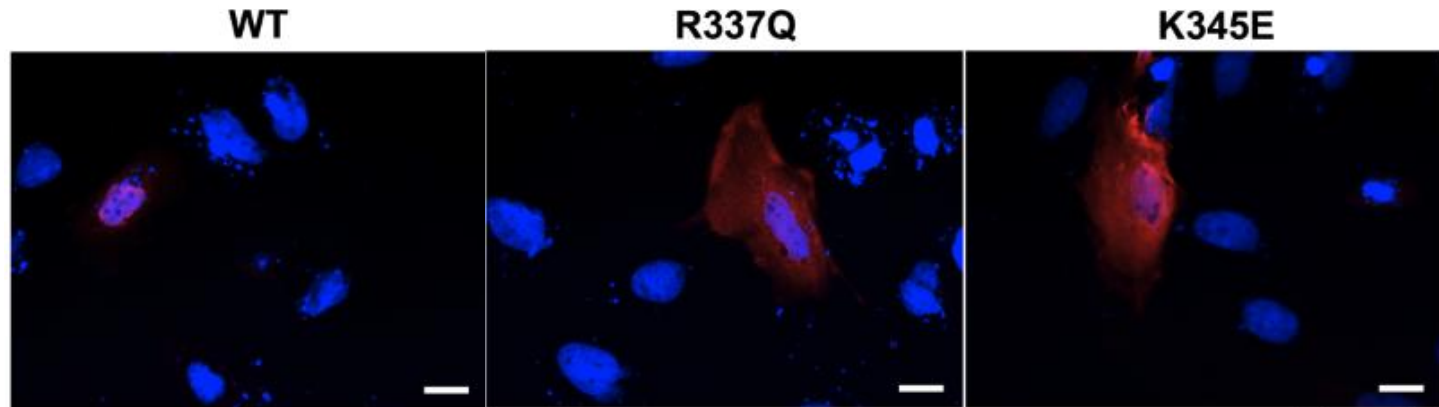


2013/15

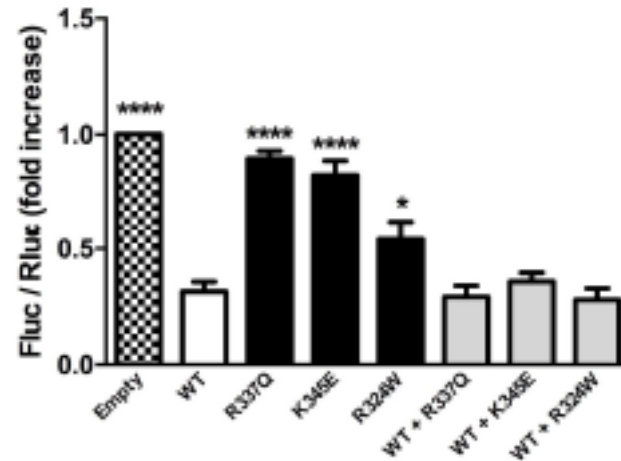
Stockley *et al.*
Stevenson *et al.*
Variants FLI1 et thrombopénie
constitutionnelle



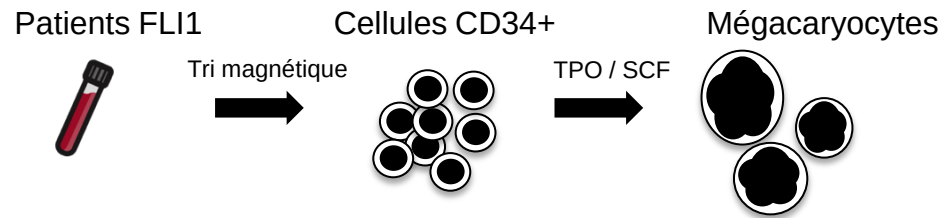
Variants FLI1 : défaut d'accumulation nucléaire



FLI1
DAPI

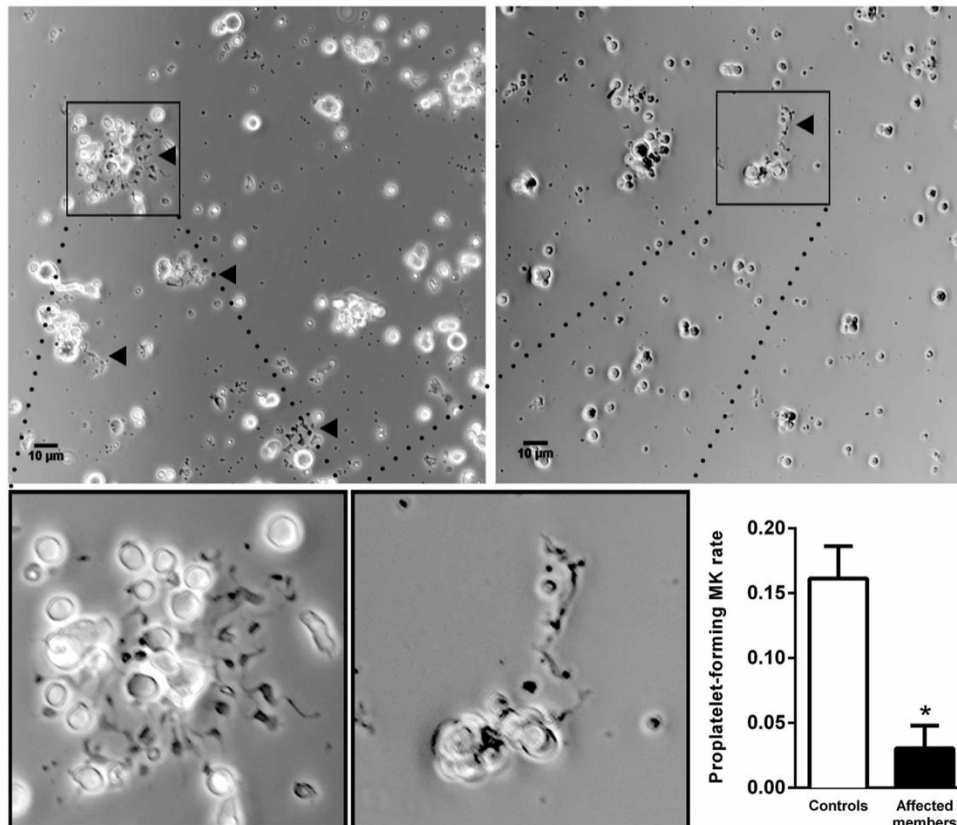


Variants FLI1 : défaut de formation des plaquettes



Témoin

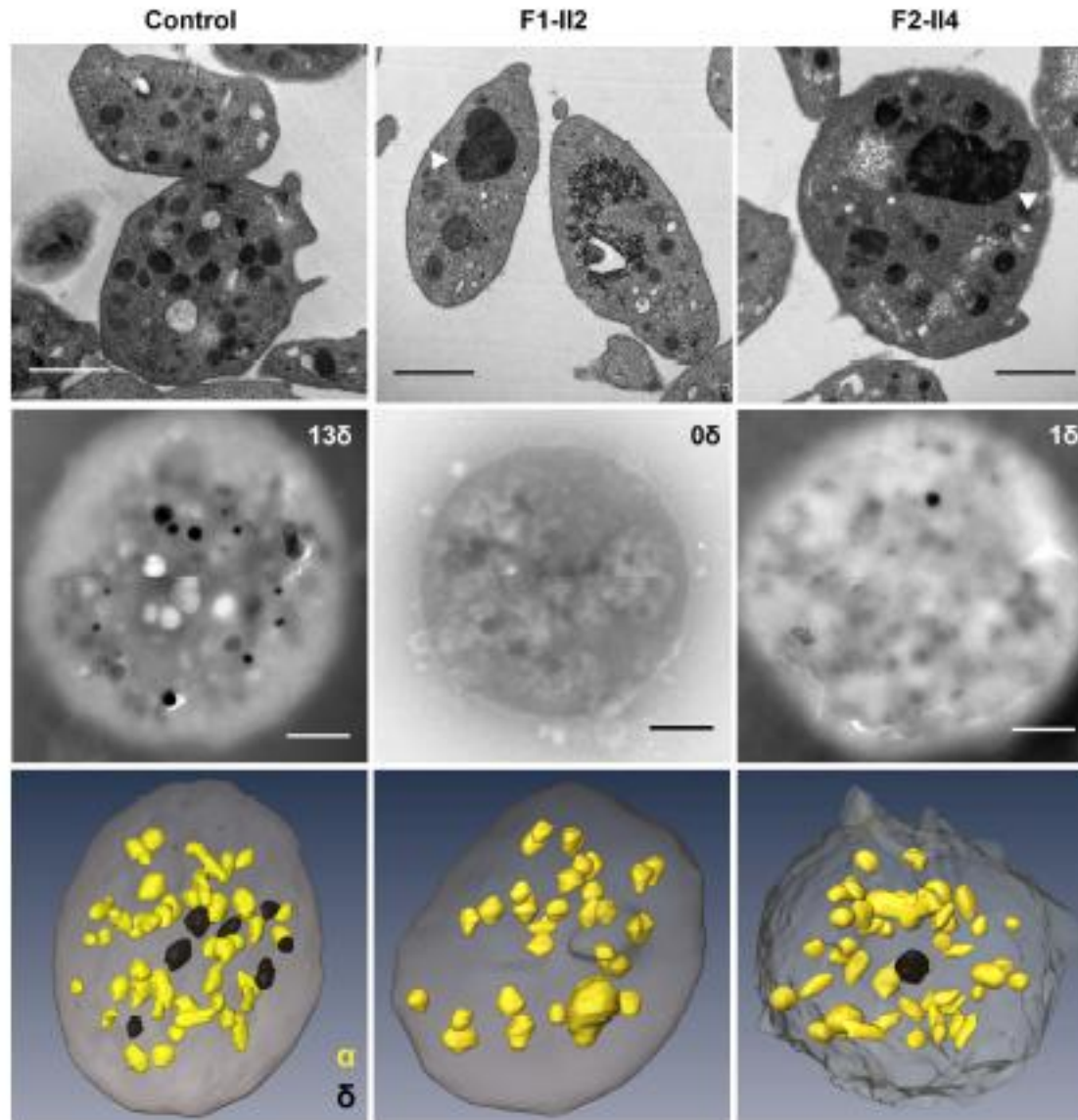
Patient FLI1



J13-14

Variants FLI1 : défaut granulaire

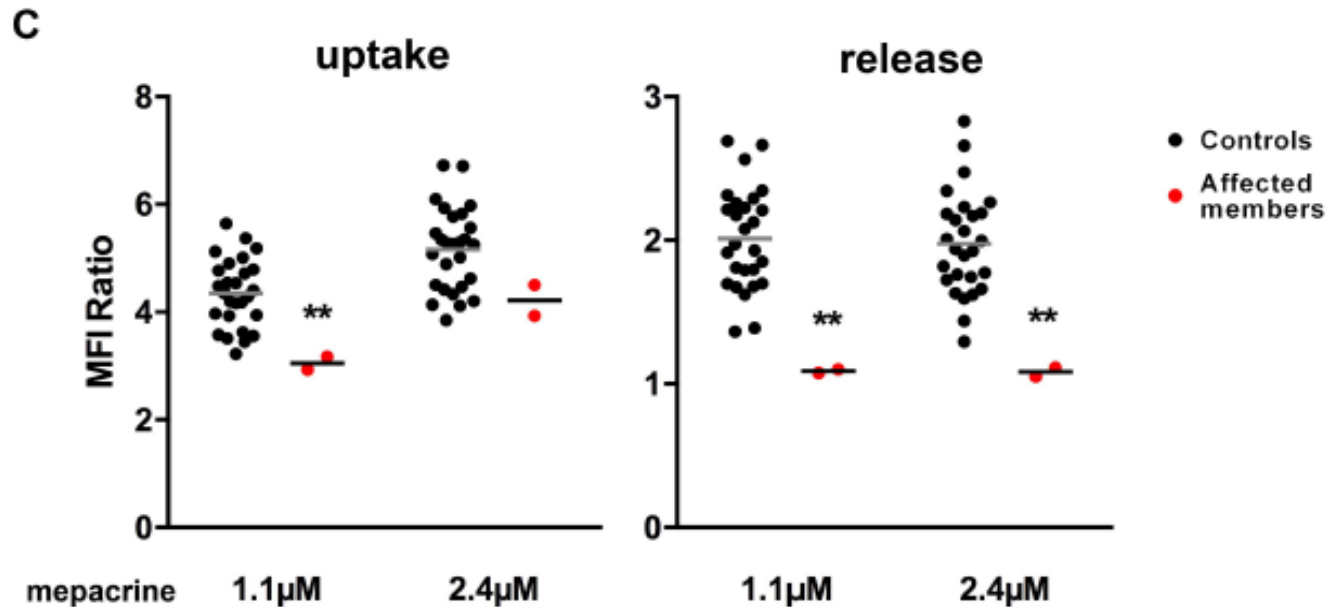
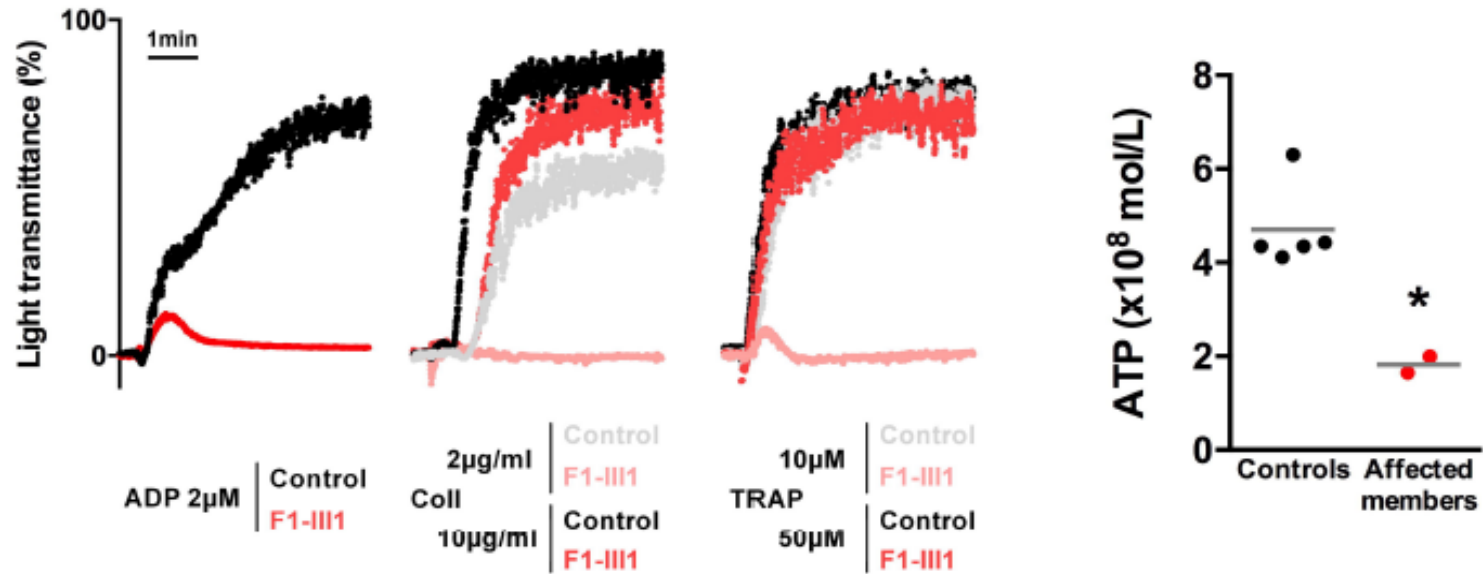
B



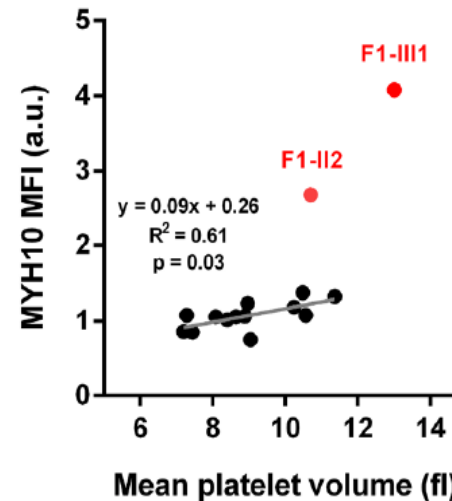
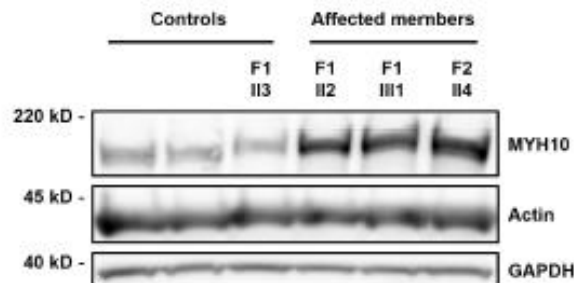
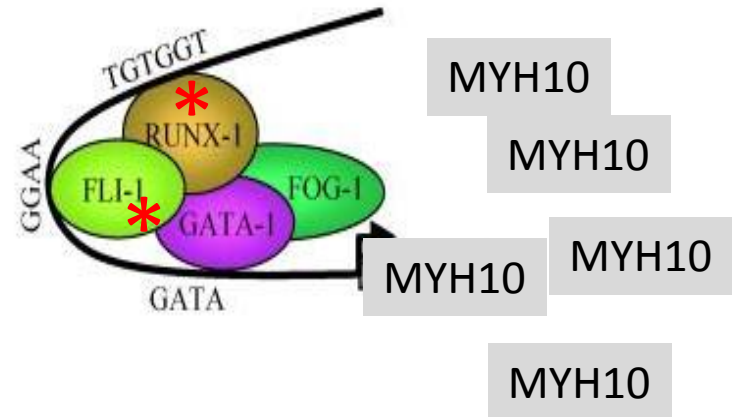
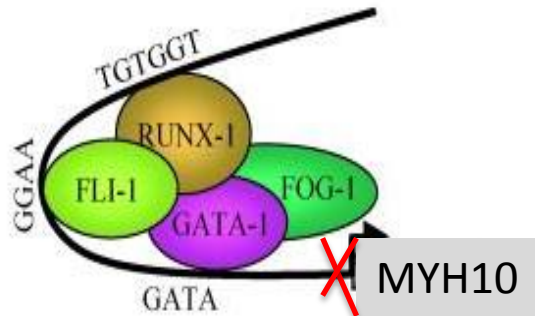
*(JC Bordet,
Unité d'hémostase
Bron)*

*(Anita Eckly,
Inserm 949
Strasbourg)*

Variants FLI1 : défaut granulaire dense

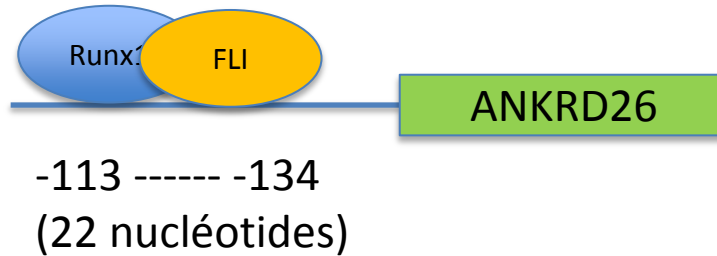


MYH 10 une méthode d'orientation diagnostique



ACTUALITES : ANKRD26

Thrombopénie THC2, **AD**, 10p11,1-p12



78 individus (21 familles) (*Noris P, Blood 2014*)

Thrombopénie parfois sévère : **8,5-94 G/L**

Plaquettes pâles de taille normale

Hémorragie sévères rares

26 cas de chirurgie sans couverture (plaquettes >50 G/L)

Dysmégacaryocytopoïèse

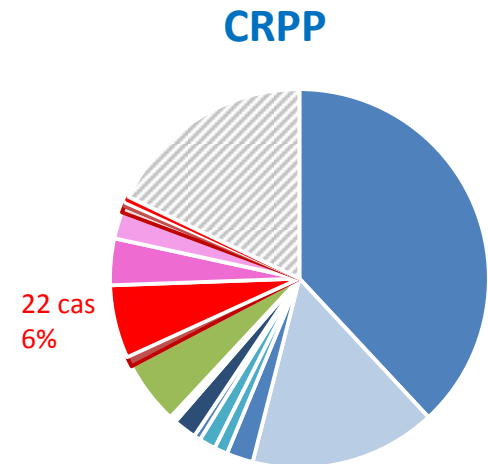
TPO x 7

Manifestations hématologiques

Taux d'hémoglobine : 15-16g/dl (9 cas/78)

Cancer hématologique : 11 individus (9 familles)

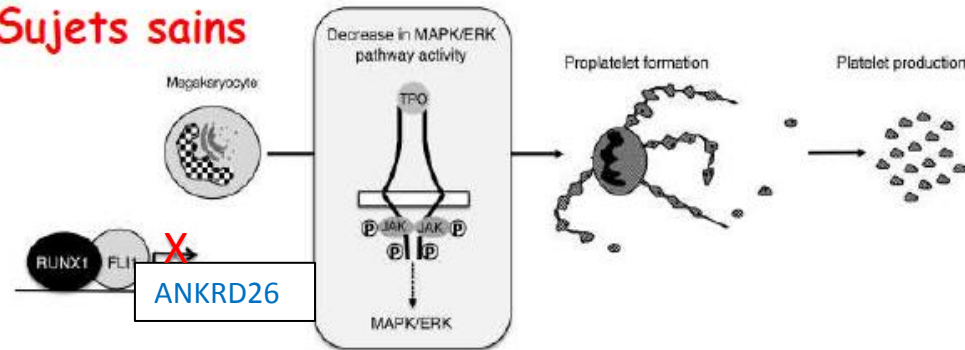
6 LAM, 1 LMC, 1 LLC, 6 LA non définies



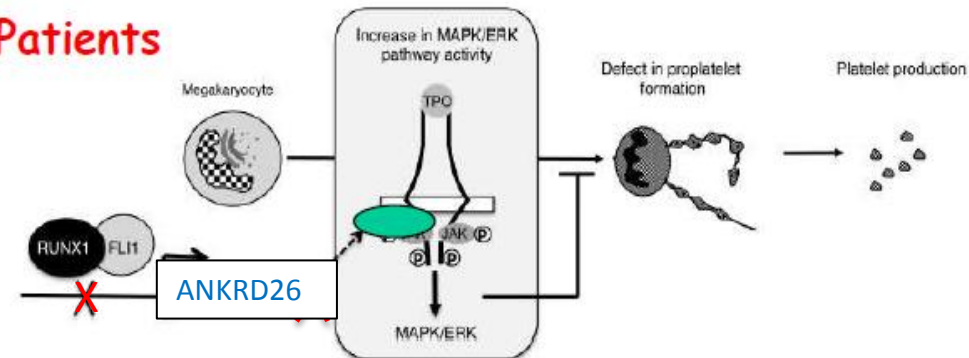
Pippucci T, Am J Hum Genet 2011
Noris P, Blood 2011

ANKRD26, mécanismes mis en jeu

Sujets sains



Patients



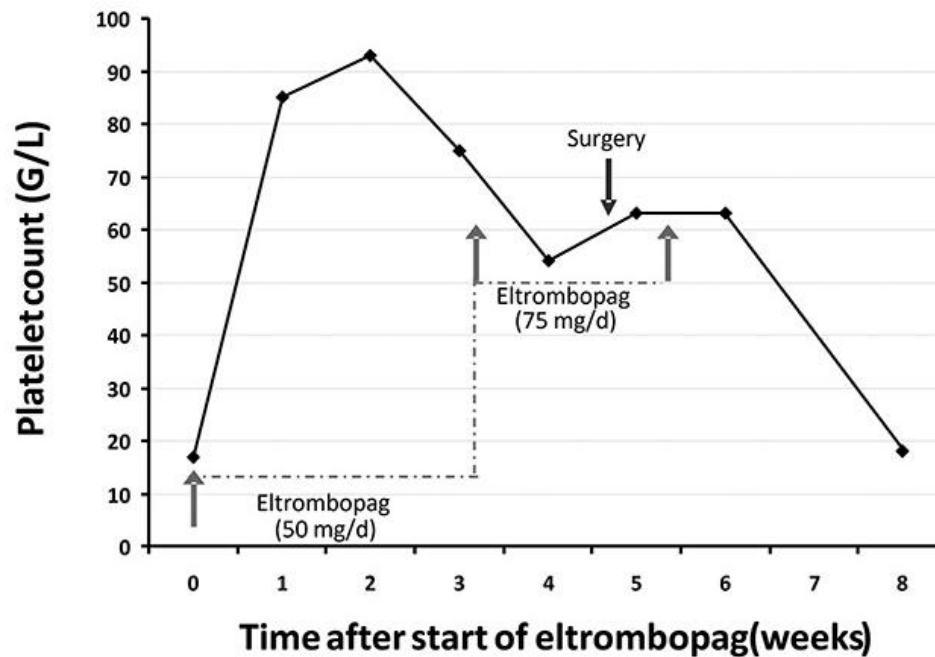
ANKRD26 et agoniste de la thrombopoïétine ?

Homme 67 ans

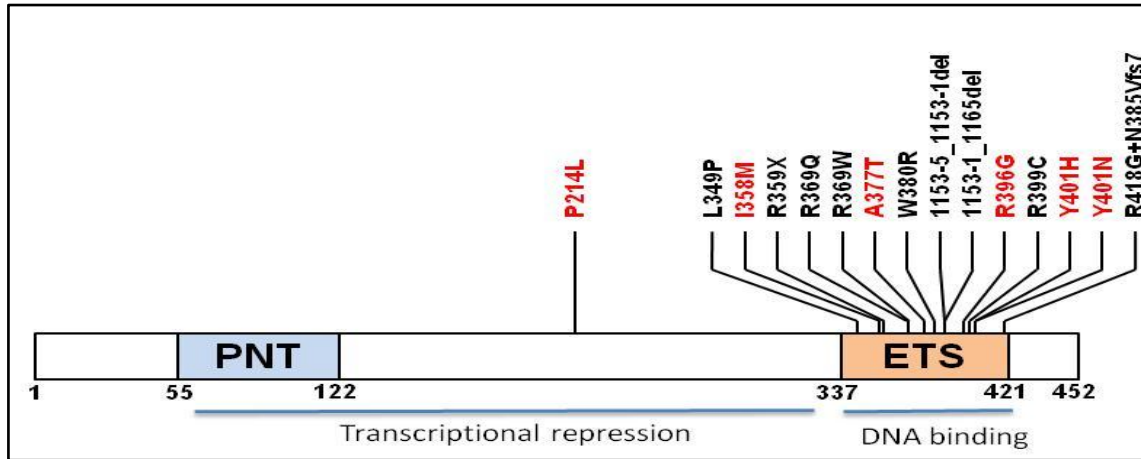
c.-118C>T

Chirurgie L4-L5

Numération plaquettaire 16 G/L



ACTUALITES : ETV6



Thrombopénie : 38-134 G/L

VPM : 7,2-12,4

Corrigée par la splénectomie chez une patiente

Transmission AD

Zhang MY, Nat Genet 2015

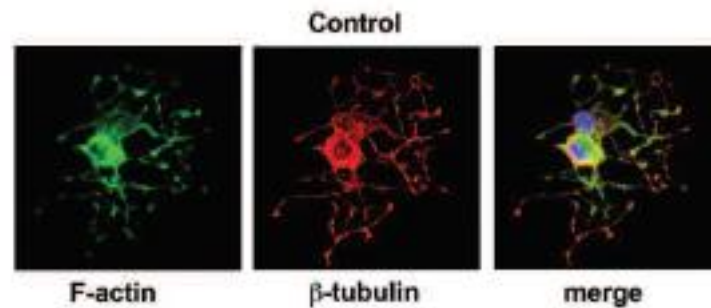
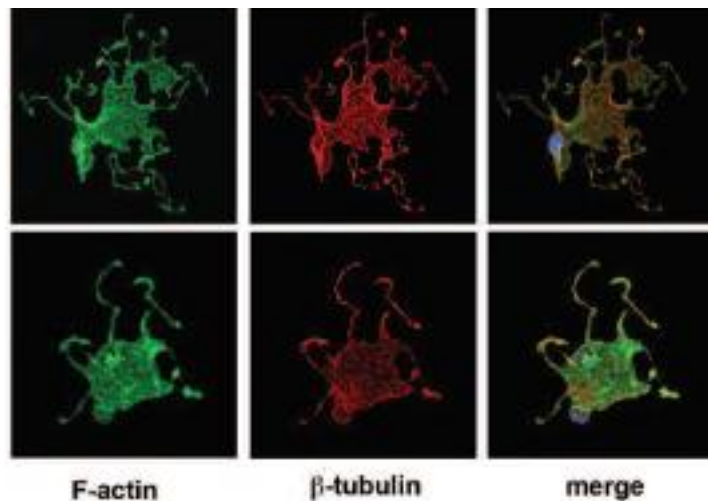
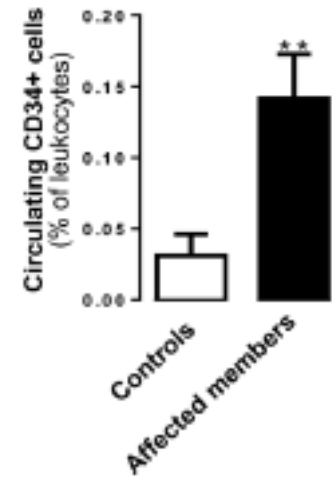
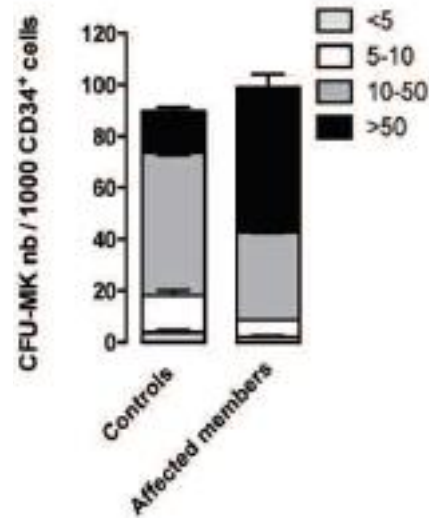
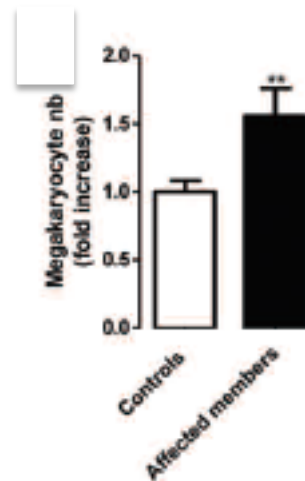
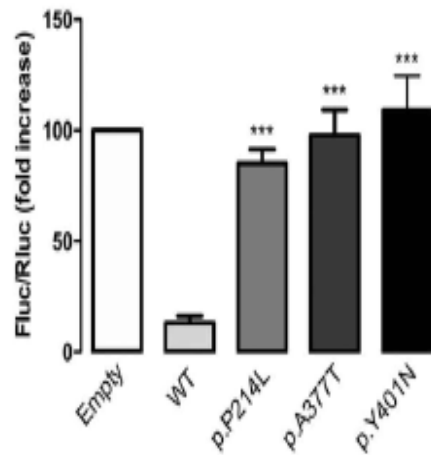
Noetzli L, Nat Genet 2015

Topka S, PLoS Genet. 2015

Poggi M, Haematologica 2016

Melazzini F, Haematologica 2016

ACTUALITES : ETV6



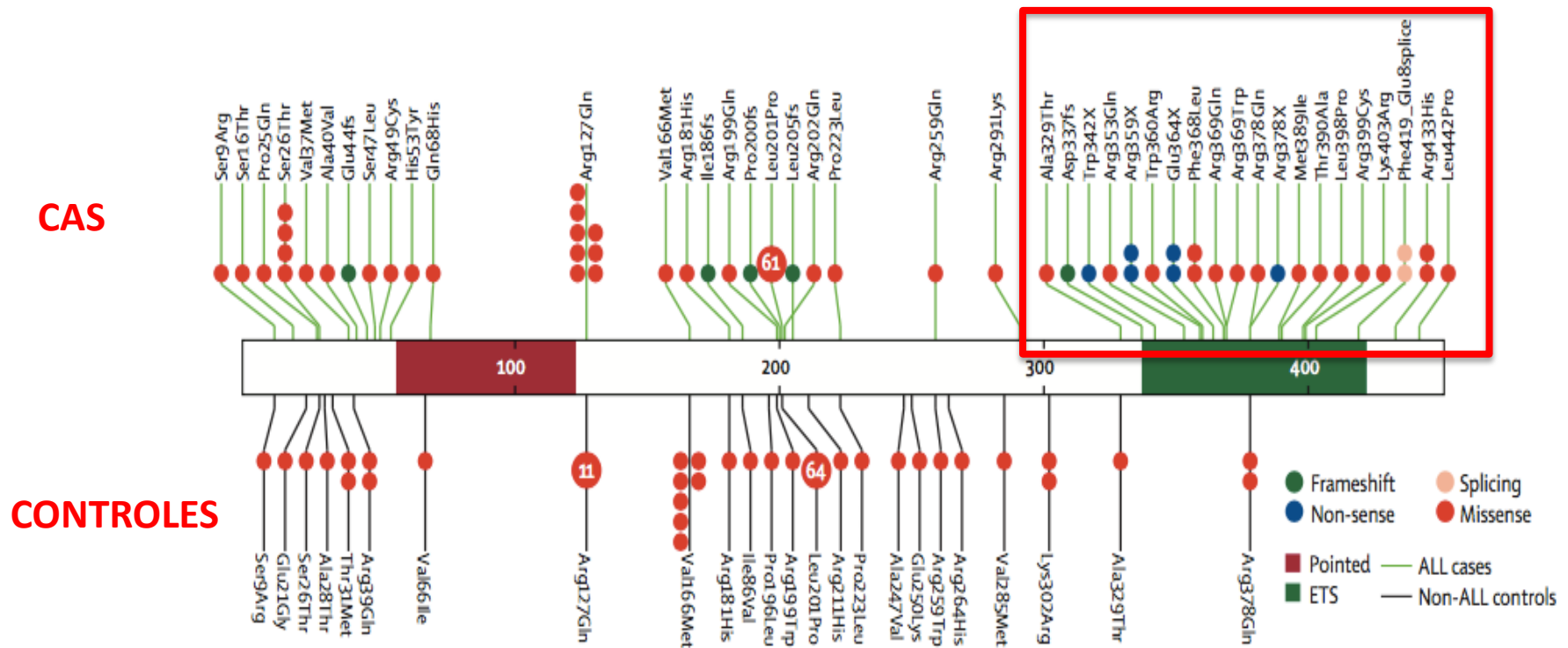
MUTATIONS GERMINALES ETV6 ET ONCOHEMATOLOGIE

18 familles étudiées dans la littérature 15 ont une histoire onco-hématologique (22 cas)

- 3 familles (**5 cas** : LAL-pre B, SMD, myeloma, LMMC, LAPM)
 - Cancer colorectal *Zhang MY, Nat Genet 2015*
- 3 familles (**5 cas** : LAL-pre B, LAL non définie)
Noetzli L, Nat Genet 2015
- 2 familles (**5 cas** : LAL-pre B, LAL non définie)
 - renal cell cancer and duodenal adenocarcinoma *Topka S, PLoS Genet. 2015*
- 3 /6 familles (**3 cas** : 1 LAM-M0, 2AREB)
Poggi M, Haematologica 2016
- 4 familles (**4 cas** : LAL B, 1 non définie)
Melazzini F, Haematologica 2016

MUTATIONS GERMINALES ETV6 ET ONCOHEMATOLOGIE

Screening des variants constitutionnels de ETV6 chez 4,405 enfants atteints de LAL



31 variants ETV6 (1%)

Leucémie B hyperdiploïde du grand enfant

« Take home message »

Anomalies de réponse aux facteurs de transcription

- Moins fréquentes (15%)
- VPM normal voire peu augmenté
- Transmission AD
- élévation de MYH10 (Runx1, Fli1)
- Risque oncohématologique (ETV6, Runx1, ANKRD26)

Approches pangénomiques

Séquençage



Scanner



Images



Fichiers fastq

```
@SRRO06511.105 8_1_663_27 length=36
ATAGCGGCACTGTTGGTTCGCTTGTTCCTTTGAGTC
+
IIII7II-9/0;+8I<03.+%-,&"'('$,#"'&"
@SRRO06511.112 8_1_829_108 length=36
AGAATTTTATGTATCTGGATGCAATAAAAAATGATG
+
II@IIIIIIIIIIIIII1DII>0<I?>869;64(+/%
@SRRO06511.490 8_1_351_672 length=36
AGCACCGCGCGTGTGTCCCCATGCTCCACACCTCT
+
IO>0A,I2H):$)6)#4$.>'&.$)"%7"1%)&&
@SRRO06511.632 8_1_79_187 length=36
ATGCCGAAAGGTATCGGTAAACCGTTGAAATTCTTC
+
IIIIII<I;II57G;II.I0**32.--)$32++9),
@SRRO06511.726 8_1_300_437 length=36
ACCACGTGGACTTCCAGGAOCATGAGGCCAAATTGG
+
T1R5-TTTTT\3 T&0- -&/(V&V1&+1"â/(V"â&#"
```

Liste de
Variants

Annotation



Variants
Annotés

Filtrage

Modèle Génétique



**Thrombopathie
1 gène
2014**

Fichiers
BAM

Alignement

sur le génome



Contrôle de qualité



**BAM
filtrés**

Détection
des variants



Déjà connues

Facteurs de transcription

FLI1, GATA1, RUNX1



Récepteurs de surface

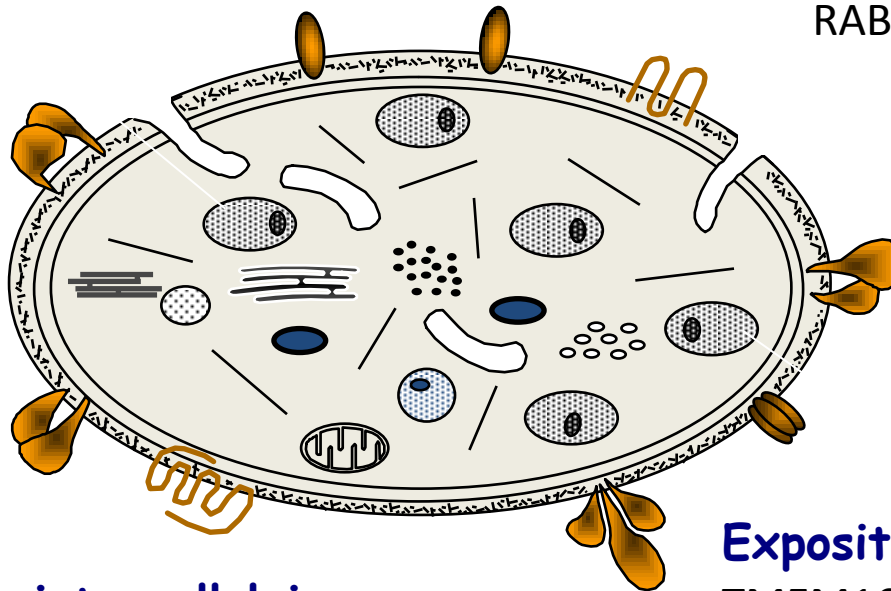
ITGA2B/ITB3, GP6, P2RY12, TBXA2R

Transport vésiculaire

HPS, BLOC, DNTB1, AP3B1,
RAB27, VSP33B, VIPAR

Contenu granulaire

PLAU



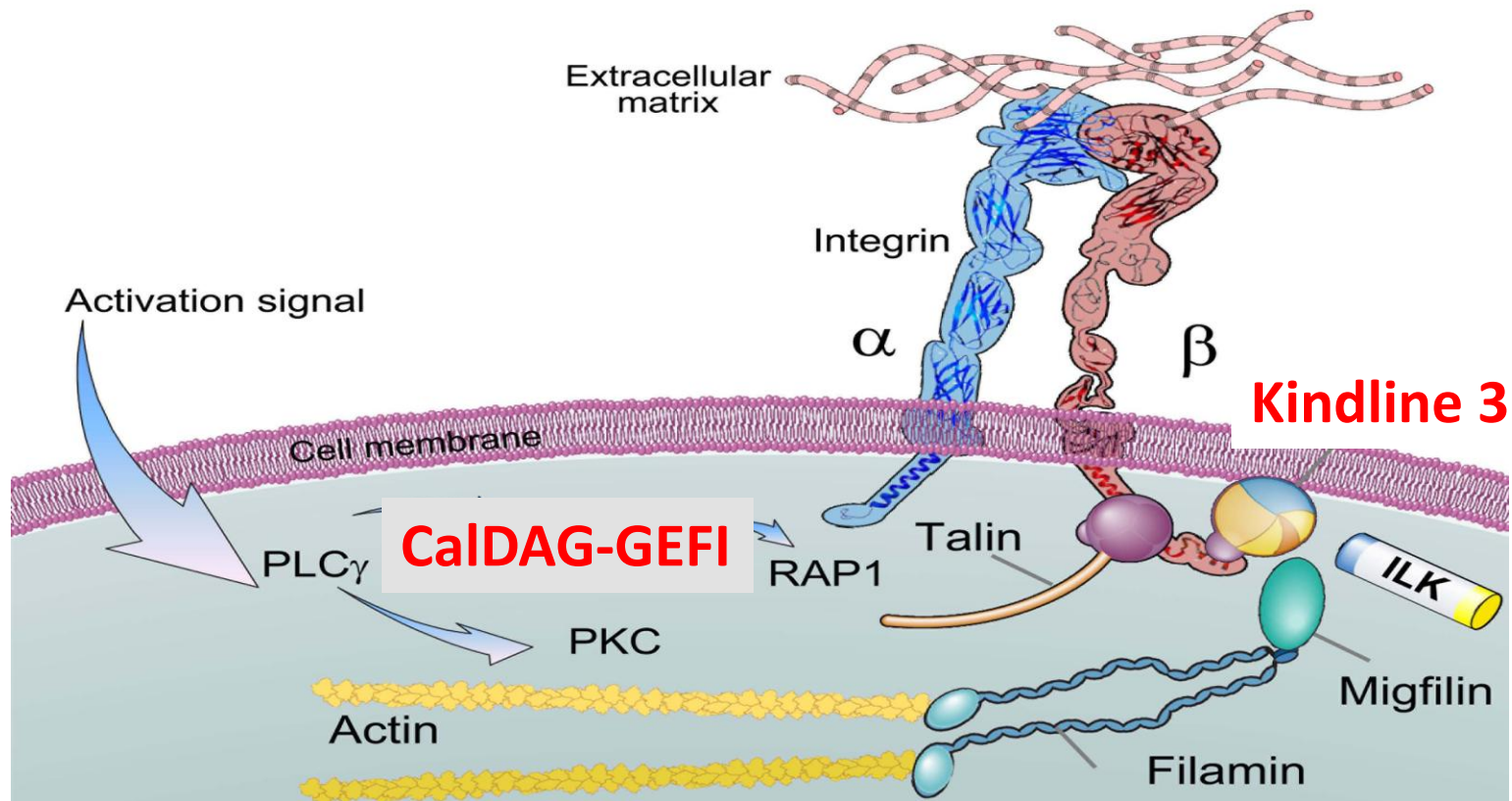
Messagers intracellulaires

GNAS, TBXAS1, PTPN11

Exposition de la PS

TMEM16F(ANO6)

ACTUALITES MESSAGERS INTRACELLULAIRES « L'INSIDE OUT »

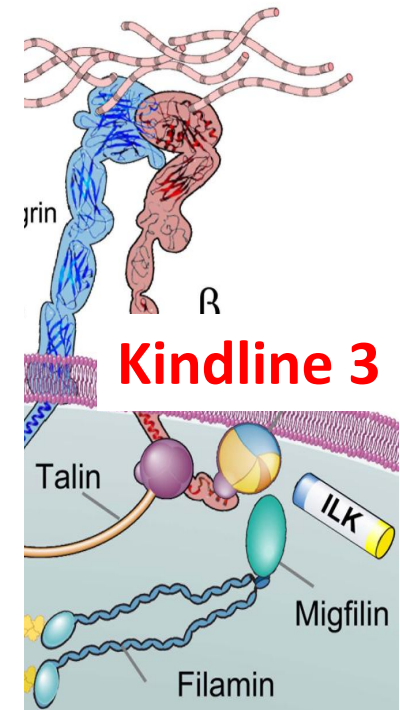
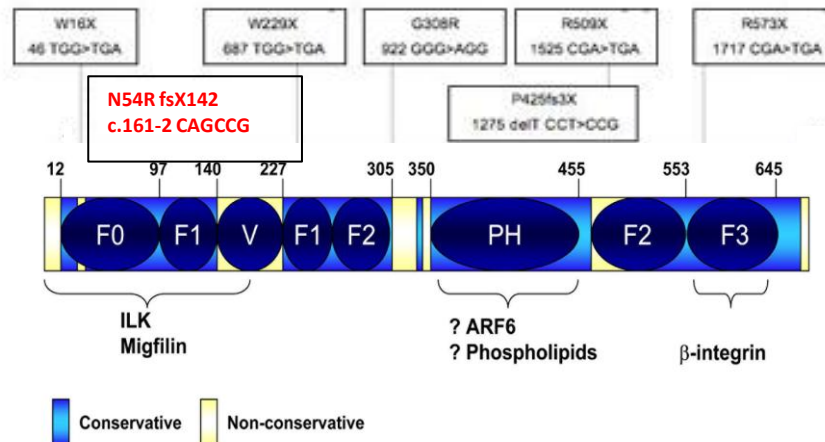


Le déficit en kindline 3 (*FERMT3*) LADIII (AR)

- Mime la thrombasthénie de Glanzmann (Saignements, Absence d'agrégation)

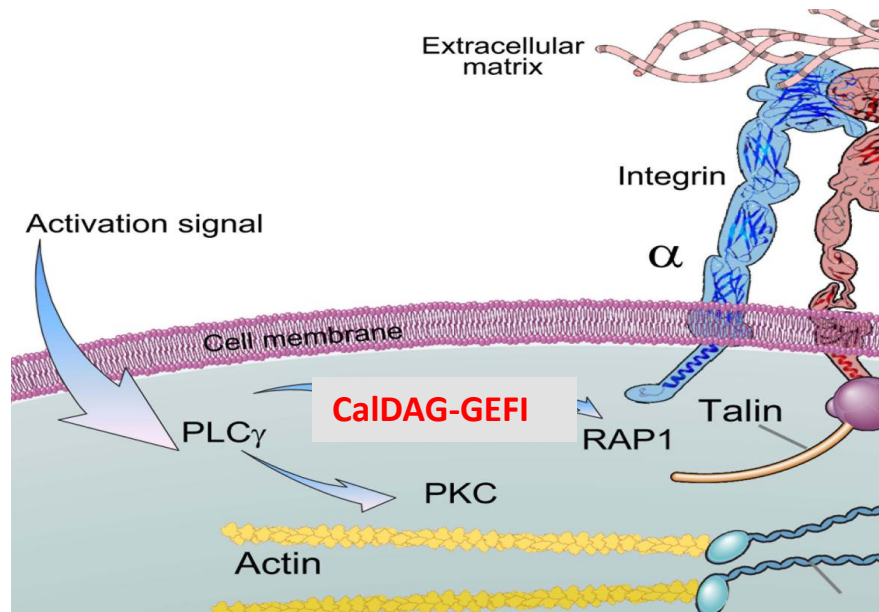
Mais

- Niveau normal de IIbIIIa
- Défaut d'activation de la IIbIIIa
- Déficit immunitaire (infection, déficit Ig, hyperleucocytose)

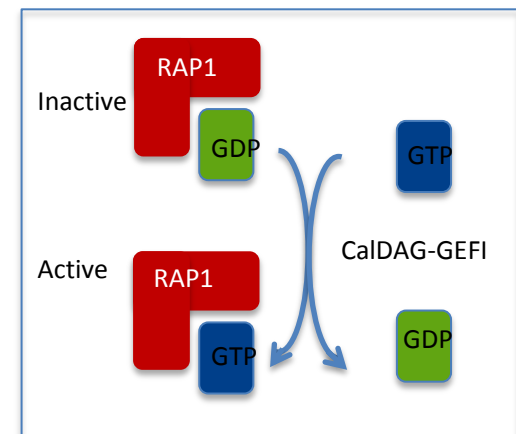


Kuijpers, 2009 ; Malinin, 2009; Svensson, 2009; McDowall, 2010; Sabnis 2010; Robert, 2011,

Actualités : Le déficit en CalDAG-GEF1 (AR)

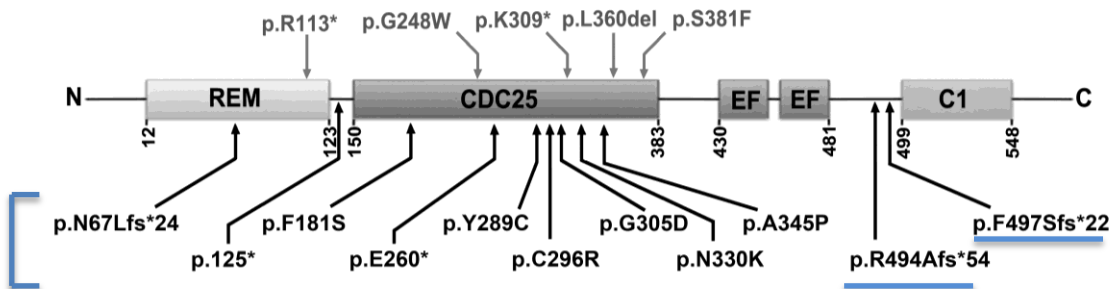


Calcium Diacylglycerol Guanine nucleotide Exchange Factor I



Actualités : Le déficit en CalDAG-GEF1 (AR)

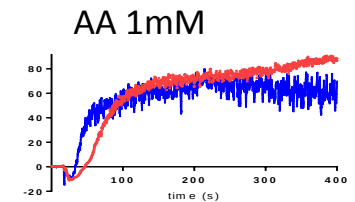
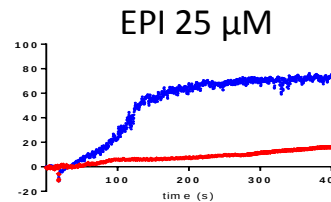
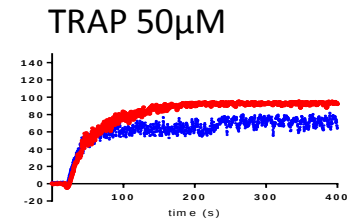
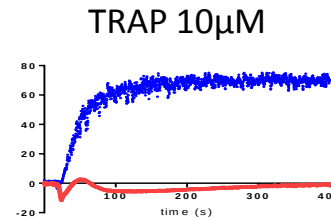
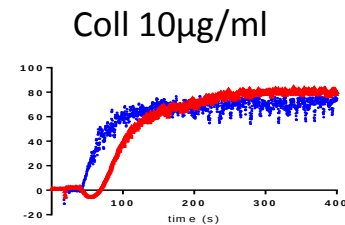
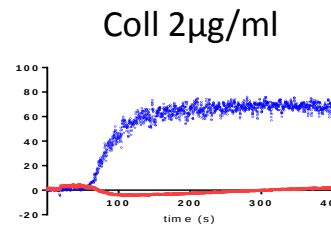
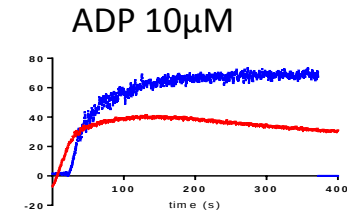
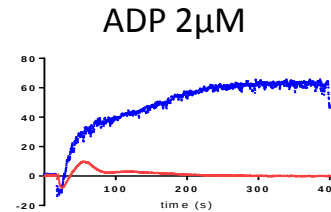
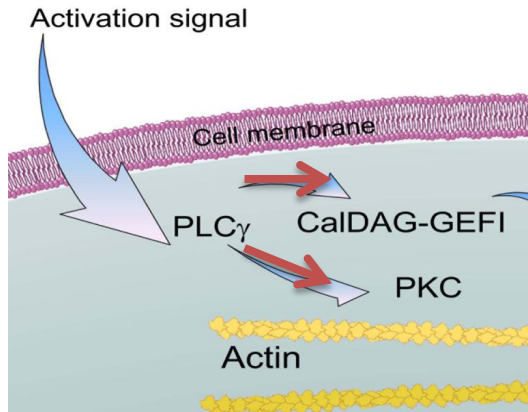
11 Nouveaux variants



Age de découverte précoce : 1-14 ans
Symptomatologie cutanéomuqueuse
7/9 : bénéficier de transfusions

Actualités : Le déficit en CalDAG-GEF1 (AR) PROFIL D'AGREGATION

■ Témoïn
■ Patient





Nutrition Obésité Risque Thrombotique

Unité Mixte de Recherches INSERM 1062 / INRA 1260 / AMU

Equipe 3 :

Groupe plaquette - Groupe Thrombose

M Canault

PE Morange

M Poggi

L Goumidi Ing

F Peiretti

G Thomas

P Saultier

P Suchon



Coordination jusqu'en 2014

Alan et Paquita Nurden

Coordination actuelle

Chef de projet : Elsa Alvarez

Coordination: MC Alessi

Hopital :

Consultation

C Pouymayou

C Falaise

Platelet exploration

L Zuccharelli (tech)

S Simon (tech)

V Matarese (tech)

Genetic (NGS)

N Saut (Eng)

A Rostan (A. Eng)

Collaborateurs

JC Bordet Unité d'Hémostase Biologique, Bron

D Tregouet Inserm, UMR_S 1166, Paris

JF Deleuze CNG, CEA, Evry

A Eckly UMR_S949 INSERM, Strasbourg

F Malerque Immunotech

H Raslova, Inserm, UMR_S 1009, Paris

P Bongrand, P Robert, Inserm, UMR_S 1067, Marseille

T.W. Kuijpers, Sanquin institute, Amsterdam

