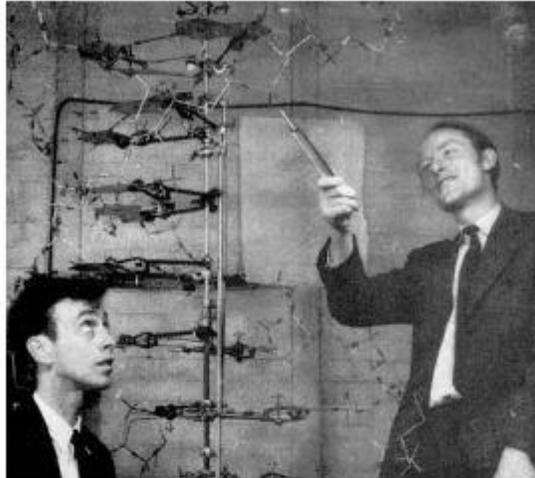


# Intérêt de la technologie NGS dans les amyloses

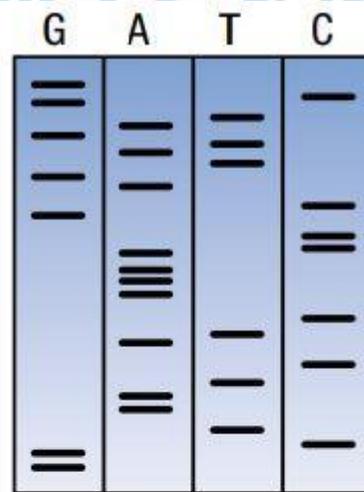
Dr Vianney POINSIGNON



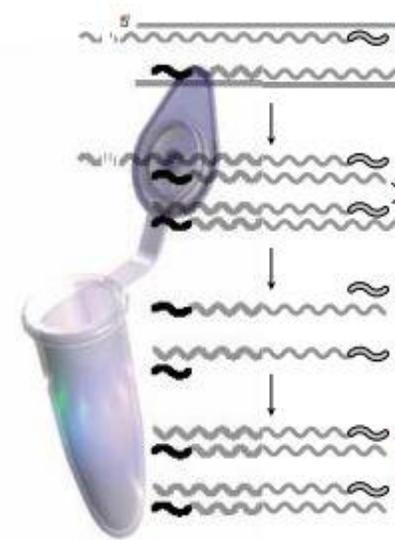
Gregor Mendel discovers laws of genetics 1865



James Watson and Francis Crick describe the double-helical structure of DNA 1953

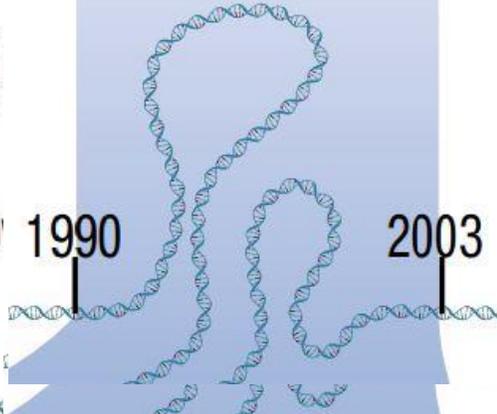


Frederick Sanger, Allan Maxam and Walter Gilbert develop DNA-sequencing methods 1977



The polymerase chain reaction (PCR) is in 1985

# Human Genome Project



and Department of Energy (DOE)

Rapid data-release guidelines established by the NIH and DOE

First gene for breast cancer (BRCA1) mapped

The Sanger Centre founded near Cambridge, UK, (later renamed the Wellcome Trust Sanger Institute)

The Wellcome Trust

US Equal Employment Opportunity Commission issues policy on genetic discrimination in the workplace

The HGP's mouse genetic mapping goal achieved

Bermuda principles for rapid and open data release established

Roundworm (*Caenorhabditis elegans*) genome sequenced

Genoscope (French National Genome Sequencing Center) founded near Paris

Single-nucleotide polymorphism (SNP) initiative begins

GTGCT GTCCT

Chinese National Human Genome Centers established in Beijing and Shanghai

Sequence of first human chromosome (chromosome 22) completed

Fruitfly (*Drosophila melanogaster*) genome sequenced

Mustard cress (*Arabidopsis thaliana*) genome sequenced

10,000 full-length human cDNAs sequenced

Draft version of rice genome sequence completed and published

Draft version of rat genome sequence completed

The HGP ends with all goals achieved

completed

To be continued...

FEAS COURTESY L. BLAMBE, CITY UNIV. NEW YORK; WATSON & CRICK COURTESY A. BARRINGTON BROWN/SP; SCIENCE CENTERS COURTESY AAAS

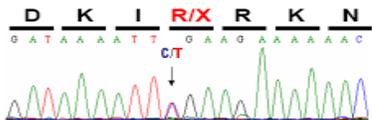
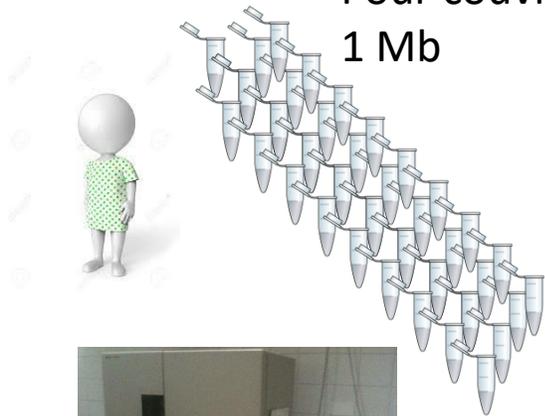
→ « Génome de Référence » pour aligner les séquences

# Le Séquençage « Haut Débit » (anciennement « NGS »)

Changement d'échelle : séquencer plus, plus vite, moins cher... accélérer le diagnostic ...

Par Sanger

3000 PCRs  
Pour couvrir  
1 Mb



Séquence 600 bp  
haute qualité (QV50)  
Méthode de référence



Séquençage nouvelle génération



23 à 96 patients



**Moyen débit à haut débit**

Capture ciblée de **plusieurs gènes (>100)** à l'exome entier (WES)

→ Analyse simultanée de **plusieurs patients**

( **Très haut débit : génomes entiers (WGS)**  
**Projet France Médecine Génomique... )**  
**Analyses en TRIO**



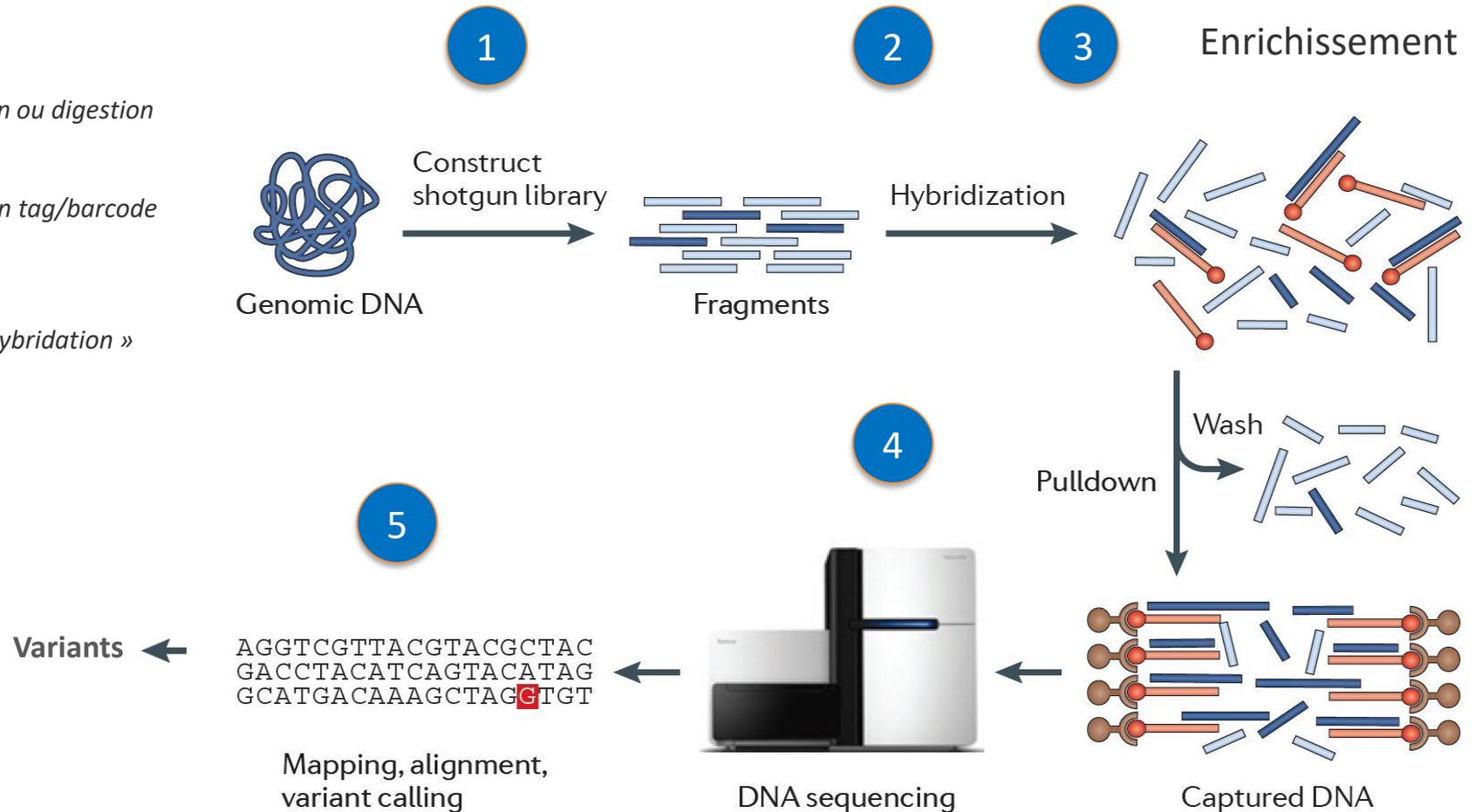
## Séquençage ciblé : principe général

### 5 étapes principales:

- 1 **Fragmentation ADN** (*sonication ou digestion enzymatique*)
- 2 **Préparation librairie** (*ajout d'un tag/barcode pour mélange de patients*)
- 3 **Enrichissement** (*Capture par « hybridation » des gènes d'intérêts*)
- 4 **Séquençage**
- 5 **Analyse bioinformatique**

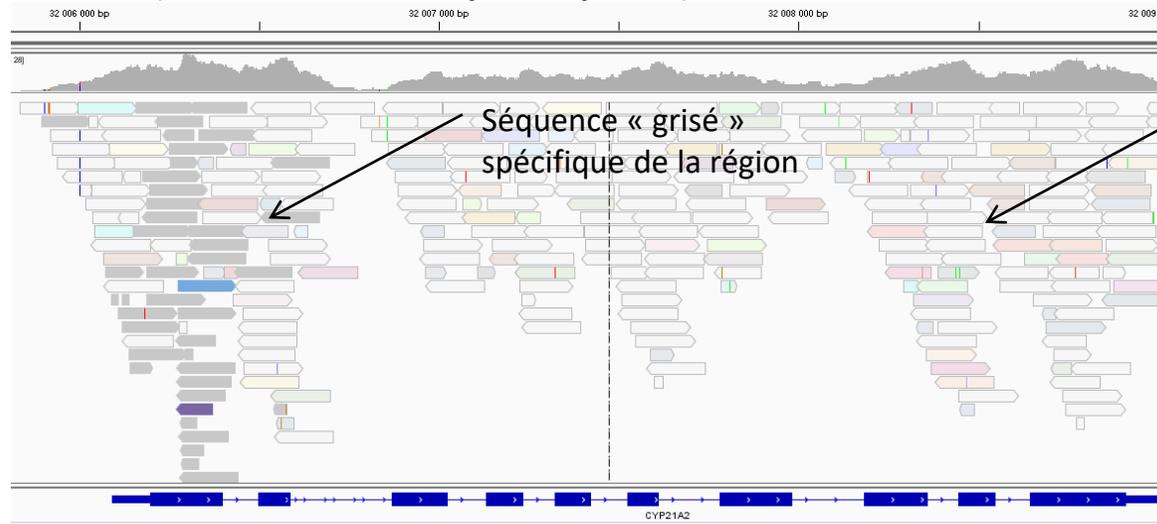
### Avantages

- Qualité des données
- Optimisation du coût
- Analyse simplifiée



## LIMITES : le séquençage haut débit ne permet pas de tout voir...

- **Régions répétées : pas de distinction entre différents locus**
  - Exemple locus *SMN1* +++
  - Exemple *CYP21A2* (Déficit en 21-hydroxylase)



Séquence « blanche »  
sur plusieurs  
locus

- **Positionnement *a posteriori* des séquences / référence du génome**  
Importance voire « Dépendance » de la Bioinformatique +++

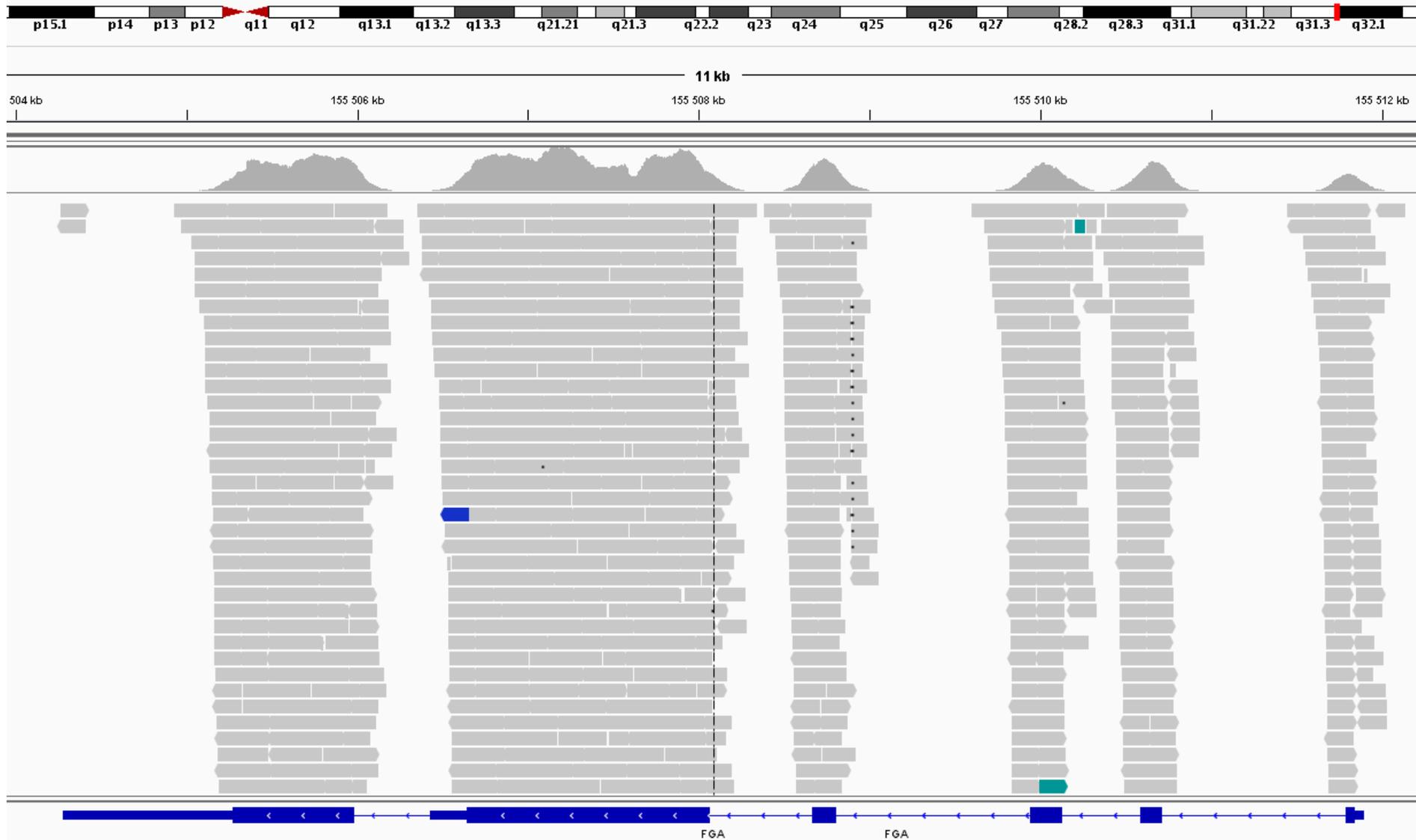
- > 100 variants par patients (panel de gènes, ciblé)
- > 10 000 variants pour un « exome entier »
- > 5 millions variants pour un « génome entier »

→ Comment interpréter ces nombreux variants ?

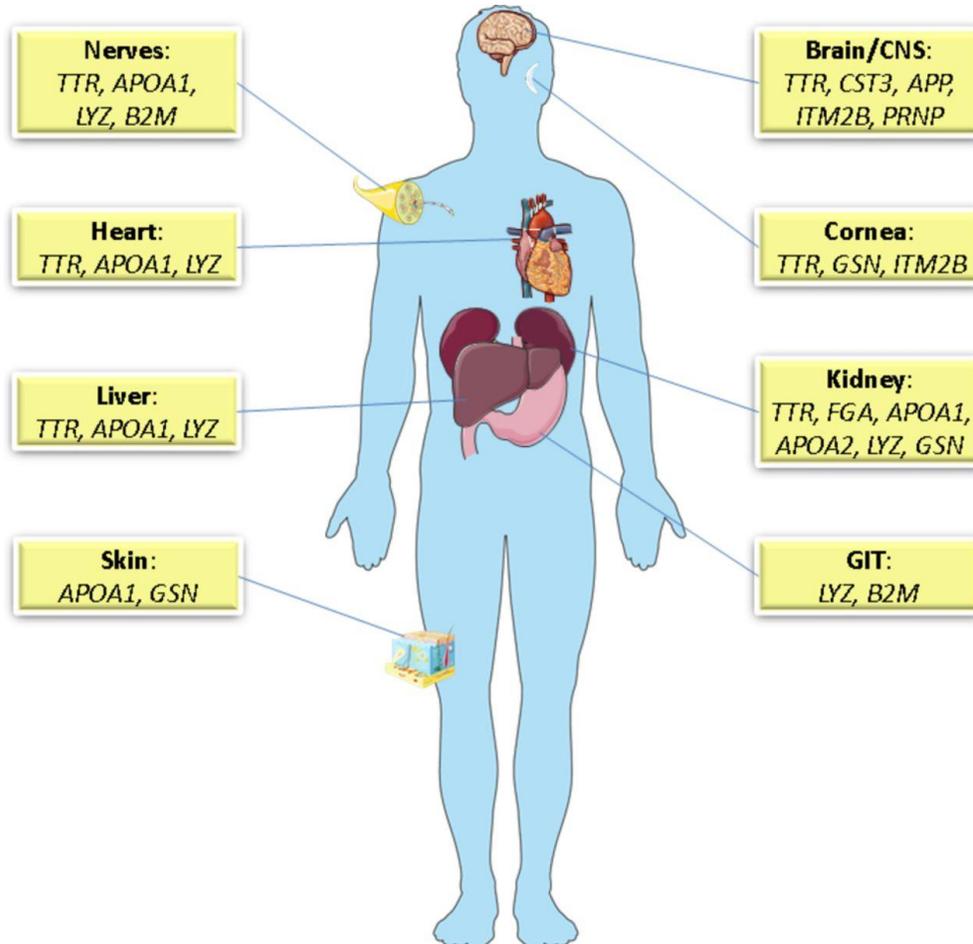
Réunions de concertations pluridisciplinaires +++  
discussion : génotype versus phénotype

Classification selon ACMG 2015 en 5 classes  
Fréquence dans la population générale  
Littérature : mutation décrite, caractérisée, lien / phénotype...  
Données de **ségrégation**, **transmission** \*  
Prédiction *in silico*

\***Enquête familiale** : permet de reclasser des variants



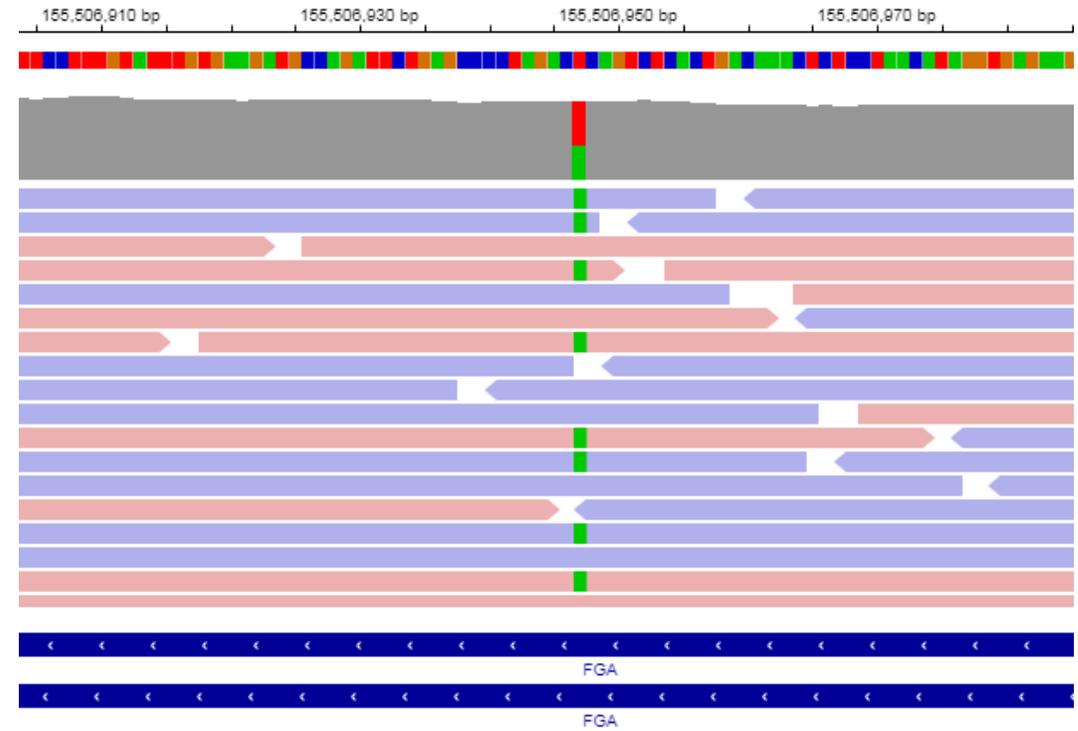
## LES AMYLOSES HEREDITAIRES



- Rare : 1 / 1 000 000 incidence annuelle amylose héréditaire
- Multidisciplinaire : neurologue, cardiologue, néphrologue, gastro-entérologue...
- Approches :
  - Gène le plus fréquent
  - Séquençage en cascade
  - Séquençage simultané : **haut débit !**

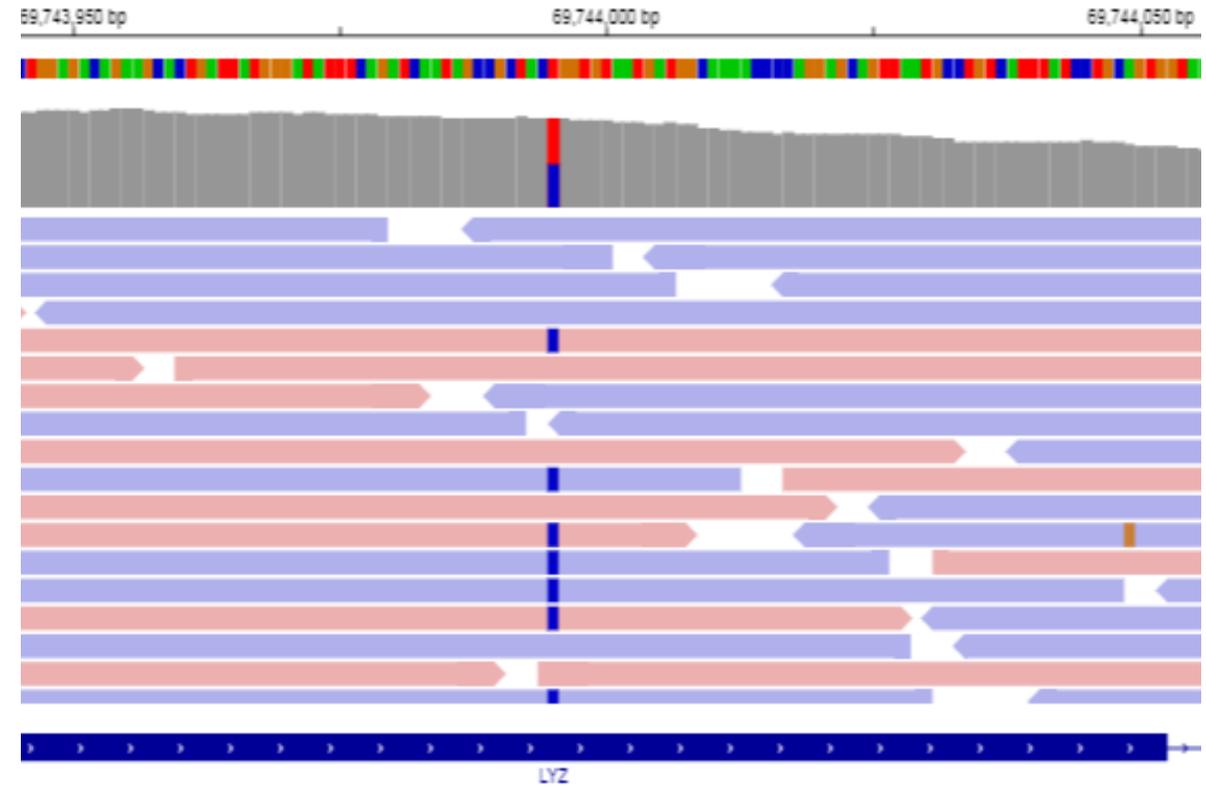
## Vignette clinique 1

- Femme, 80 ans, origine portugaise
- Insuffisance rénale d'aggravation rapide, avec un virage néphrotique franc depuis quelques mois, et un antécédent familial au premier degré.
- Notion d'amylose (à TTR ?) chez son frère sans résultat génétique retrouvé
- TTR : négative
- Passage sur le panel amylose :
  - Identification du variant : c.1634A>T p.(Glu545Val) hétérozygote dans le gène FGA (NM\_000508)
- Diagnostic d'amylose à fibrinogène



## Vignette clinique 2

- Homme, 74 ans
- Insuffisance rénale terminale diagnostiquée à 71 ans
- PBR : amylose
- Spectrométrie en faveur du lysozyme
- Antécédents familiaux : mère dialysée, fils bien portant
- Passage sur panel amylose
  - c.244T>C p.(Trp82Arg) hétérozygote dans le gène LYZ (NM\_000239)
- Confirmation du diagnostic d'amylose à lysozyme.



# Remerciements



Hôpital  
Bicêtre  
AP-HP

GMP

## Equipe technique

- Mélanie ANGELES
- Elodie DUPUIS
- Havva ERKUL
- Thomas LAMART
- Céline LEROUX
- Keerthana MURUGASAMY
- Chrislaine SAUJOT
- Odile TINMAR FOFANA

## Ingénieurs

- Lilia LADDADA
- Alexis PROUST

## Bioinformatique

- Kenneth CHAPPELL

## Biologistes

- Dr Abd El Kader AIT TAÏEB
- Caroline BERTHOT
- Pr Jérôme BOULIGAND
- Dr Clara LAFFITTE REDONDO
- Dr Maureen LOPEZ
- Dr Lucie TOSCA
- Pr Céline VERSUYFT

## Assistantes Médico-Administratives

- Dalila KOUCHA
- Françoise PEIGNE

## Cadre de santé

- Amandine ROUXEL

**MERCI POUR VOTRE  
ATTENTION !**