

Intérêt de la technologie NGS dans les amyloses

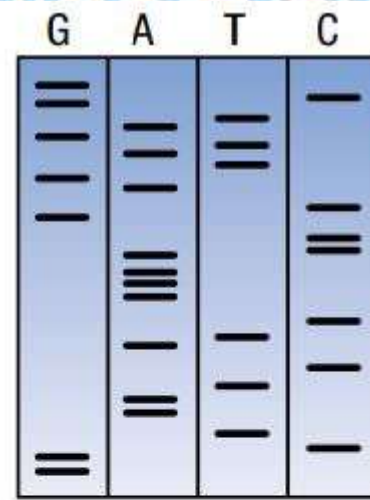
Dr Vianney POINSIGNON



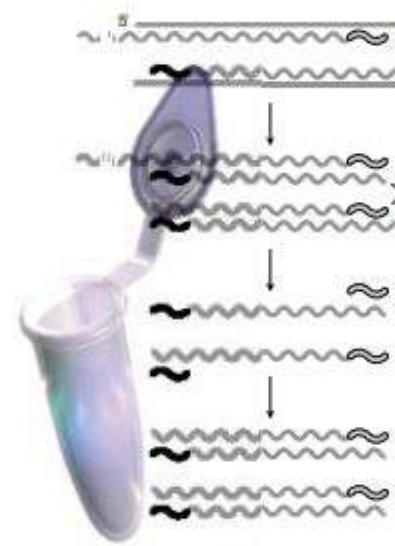
Gregor Mendel discovers laws of genetics
1865



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

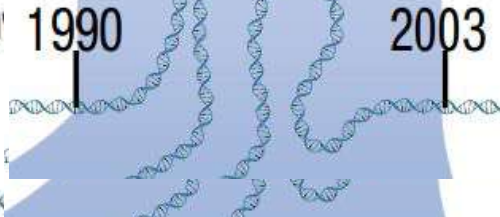


Frederick Sanger, Allan Maxam and Walter Gilbert develop DNA-sequencing methods
1977



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

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

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

Genoscope (French National Genome Sequencing Center) founded near Paris

Roundworm (*Caenorhabditis elegans*) genome sequenced

Single-nucleotide polymorphism (SNP) initiative begins

Chinese National Human Genome Centers established in Beijing and Shanghai

Fruitfly (*Drosophila melanogaster*) genome sequenced

Sequence of first human chromosome (chromosome 22) completed

Mustard cress (*Arabidopsis thaliana*) genome sequenced

10,000 full-length human cDNAs sequenced

amalian gene collection

Draft version of rat genome sequence completed

Draft version of rice genome sequence completed and published

The HGP ends with all goals achieved

completed

To be continued...

Executive order bans genetic discrimination in US federal workplace

→ « Génome de Référence » pour aligner les séquences

PEAS COURTESY I. BLAMIRE, CITY UNIV. NEW YORK; WATSON & CRICK COURTESY A. BARRINGTON BROWN/NSL; SCIENCE COVERS COURTESY AAAS

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

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

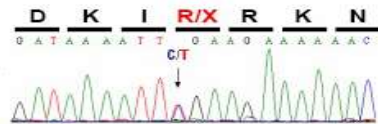
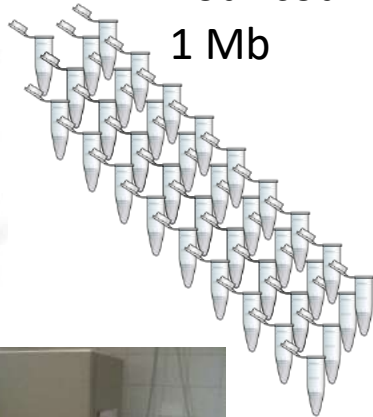
Par Sanger

3000 PCRs
Pour couvrir
1 Mb



Séquençage nouvelle génération

23 à 96 patients



Séquence 600 bp
haute qualité (QV50)
Méthode de référence

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**



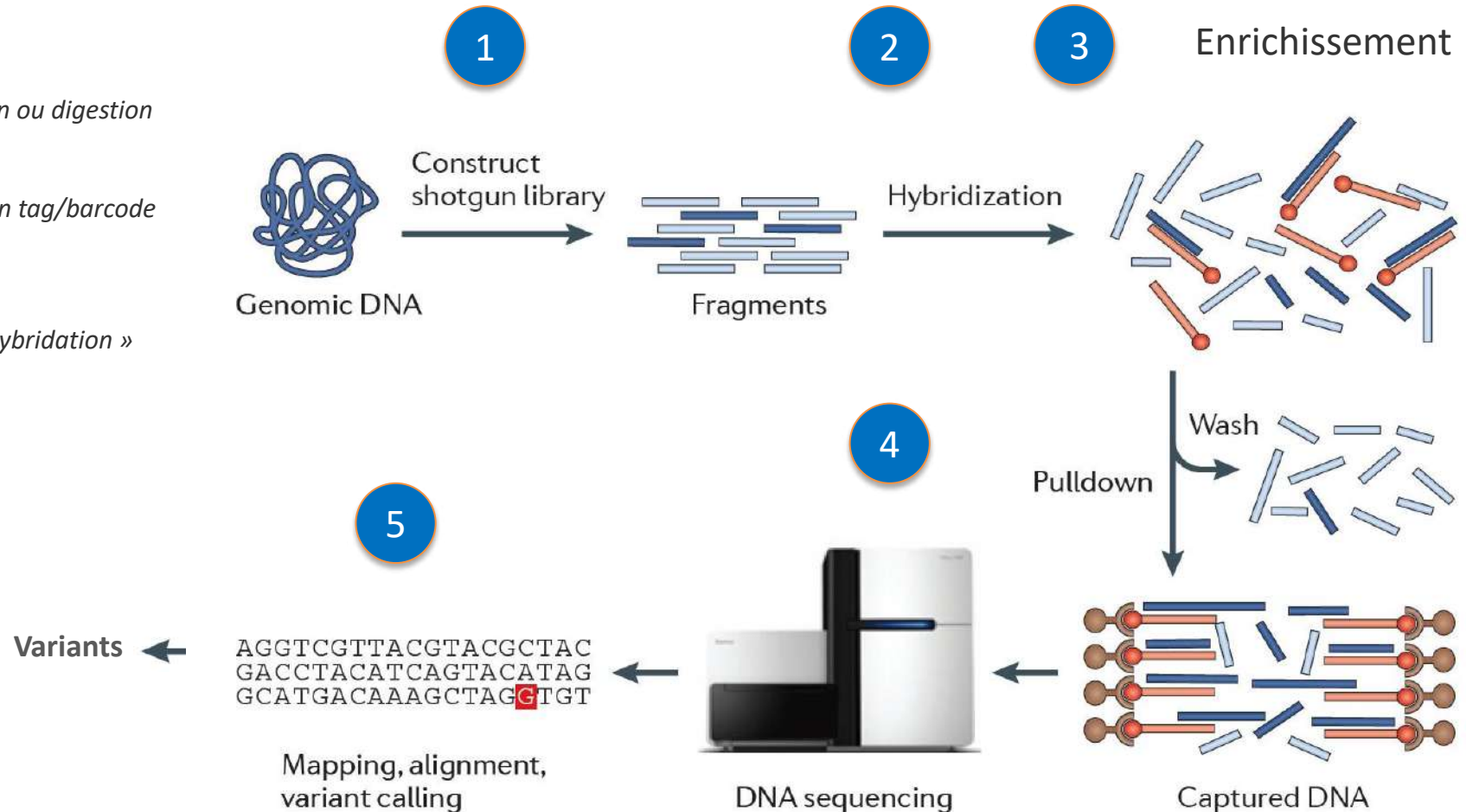
Séquençage ciblé : principe général

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**

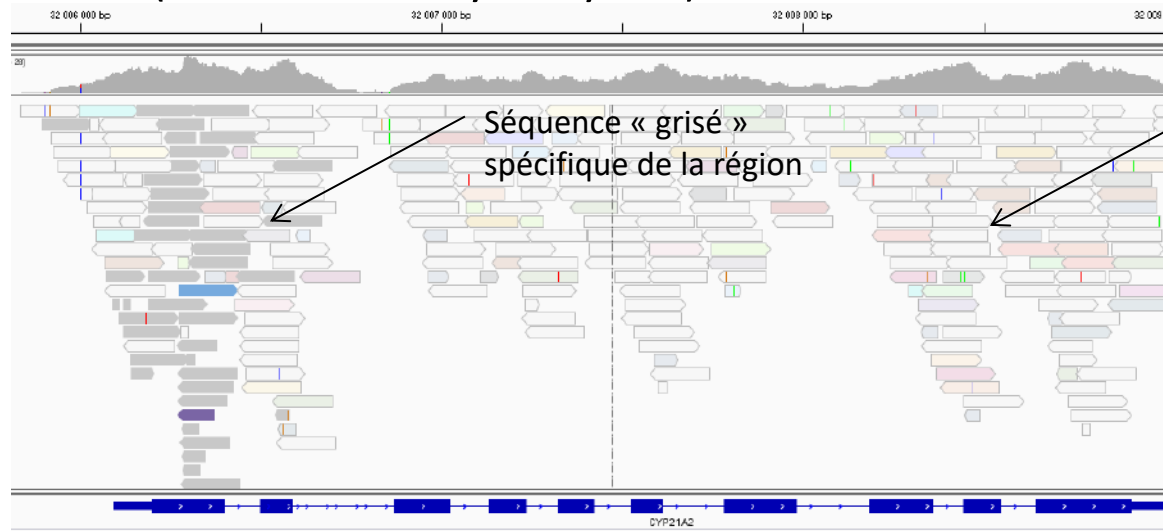
Avantages

- 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 +++

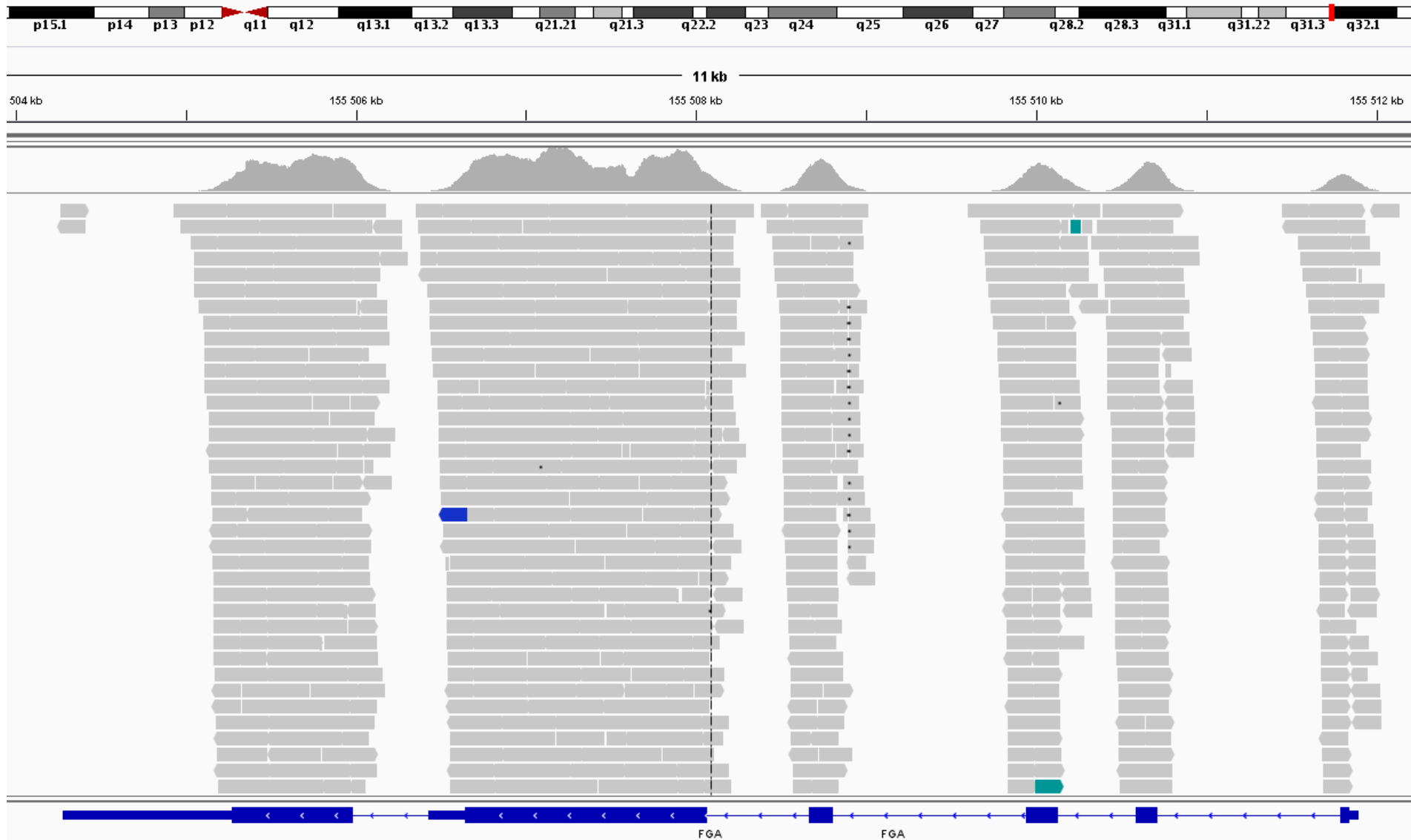
- > 100 variants par patients (panel de gènes, ciblé)
- > 10 000 variants pour un « exome entier »
- > 5 millions variants pour un « génome entier »

→ Comment interpréter ces nombreux variants ?

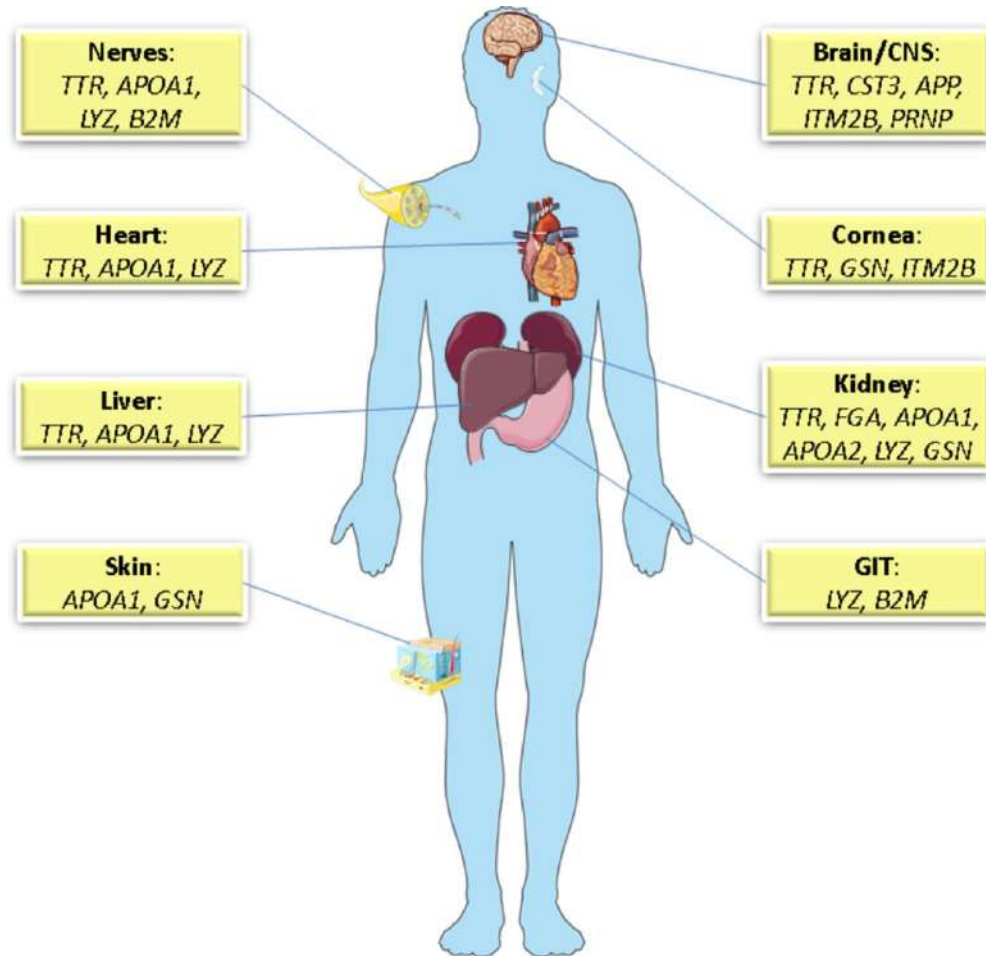
Réunions de concertations pluridisciplinaires +++
discussion : génotype versus phénotype

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



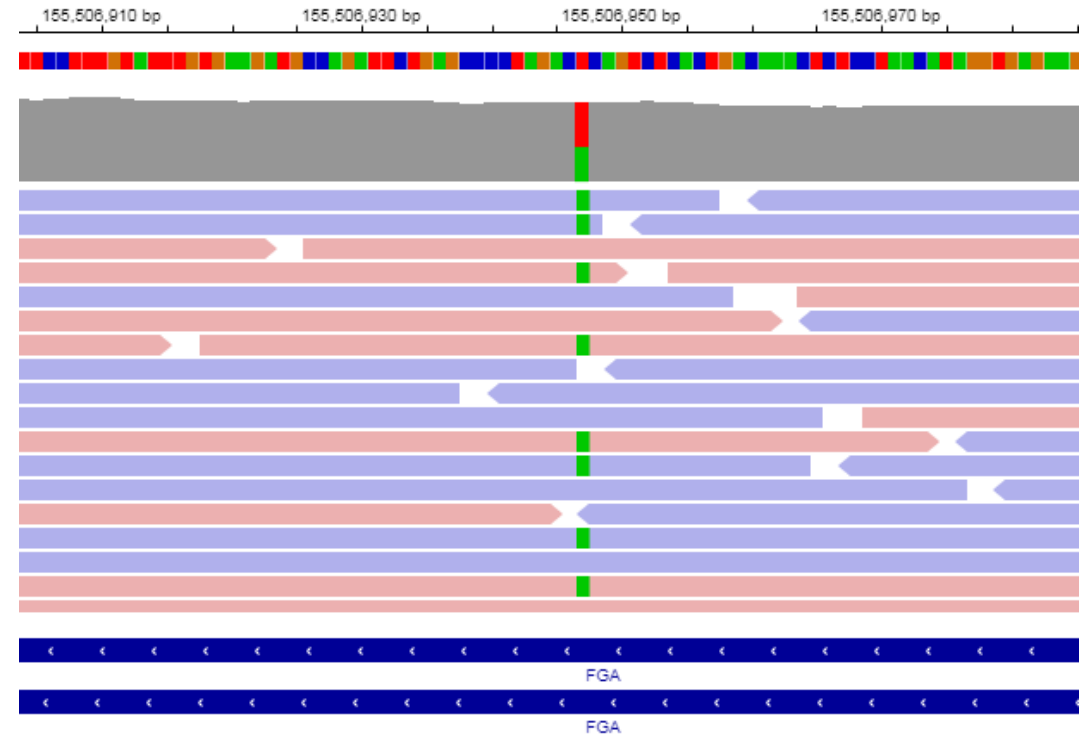
LES AMYLOSES HEREDITAIRES



- 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 !**

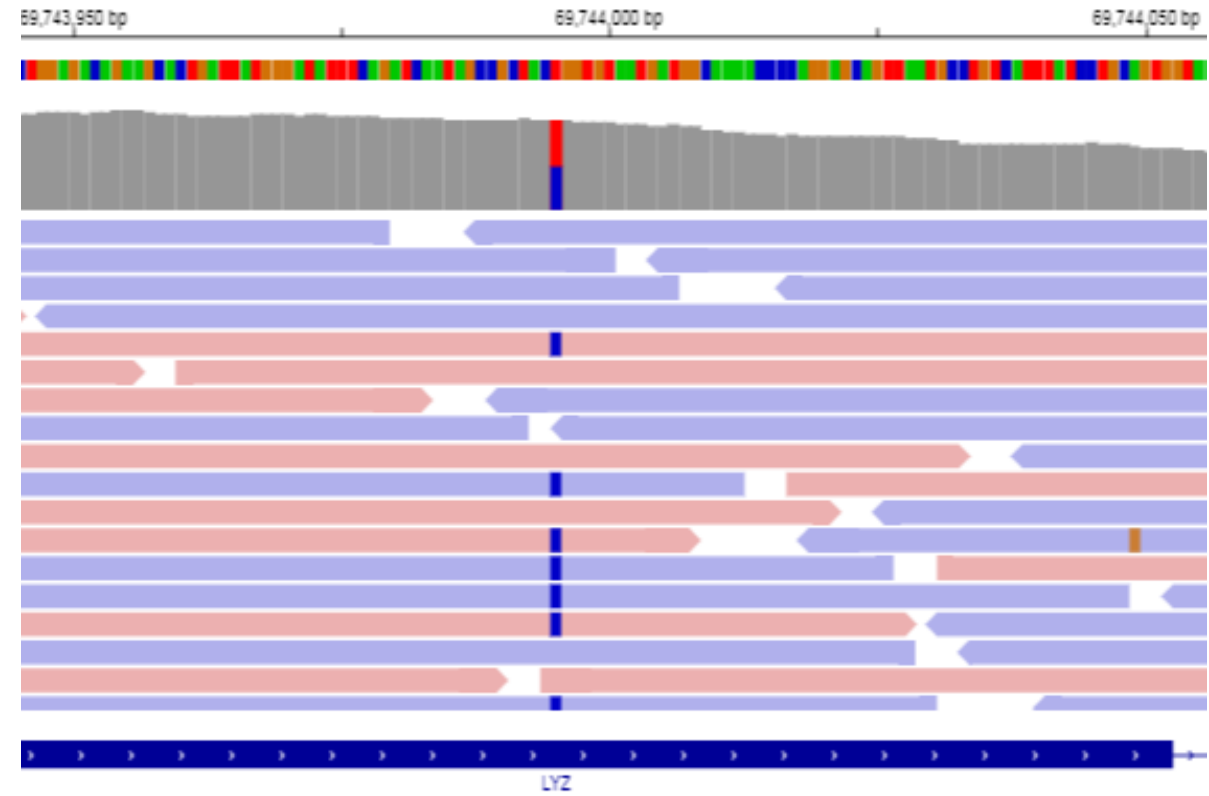
Vignette clinique 1

- 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

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 !**