

UE11 : Séquençage Haut Débit (Next Generation Sequencing)

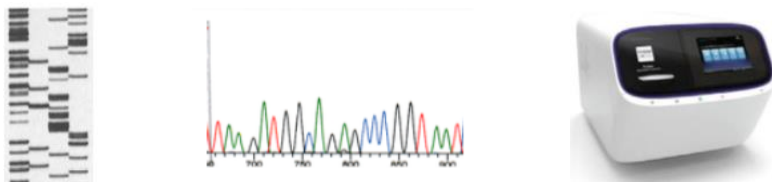
I. Evolution des techniques

1977 : Séquençage « manuel » (Sanger)

1993 : Séquenceurs « automatiques » (Sanger)

2001 : Séquençage de 95% du génome humain (~ 30 000 gènes)

2007 : Séquençage haut débit « NGS »



♦ Méthode de Sanger = Technique de référence ++

Tout variant identifié en NGS sera toujours confirmé par un séquençage Sanger.

Remarque : Aujourd'hui, grâce au NGS, il suffit d'une semaine pour séquencer tout le génome humain (3 milliards de pb), au lieu de plusieurs années.

II. Séquençage haut débit

⇒ Séquençage massif en parallèle de molécules d'ADN individuellement séparées et amplifiées sous forme de clones ou de molécules uniques

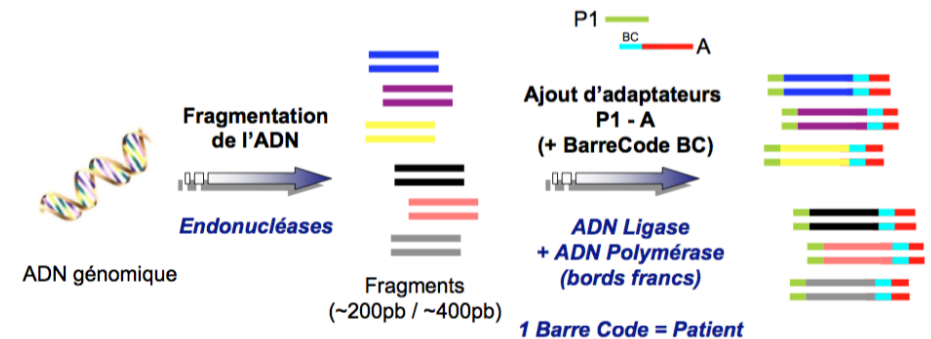
3 plateformes :

- **Illumina** = Capture des fragments d'ADN et amplification sur support solide (lame en verre)
- **Roche** = Fixation sur billes d'agarose et amplification clonale par PCR en émulsion
- **Life Technologies** (avec la technologie **Ion Torrent**) = Fixation sur des sphères et amplification clonale par PCR en émulsion

A. Etapes du NGS

1. Préparation des échantillons

Exemple de la **méthode par capture** des régions d'intérêt à séquencer



- 1) **Fragmentation aléatoire** de l'ADN en petits morceaux de **200 à 400 pb** par des **endonucléases** (qui coupent l'ADN double brin sans avoir de spécificité)
- 2) Ajout d'**adaptateurs P1 et A** aux **extrémités 5' et 3'** des fragments d'ADN + **Barre Code (BC)** spécifiques à chaque patient + **ADN ligase** + **ADN polymérase**

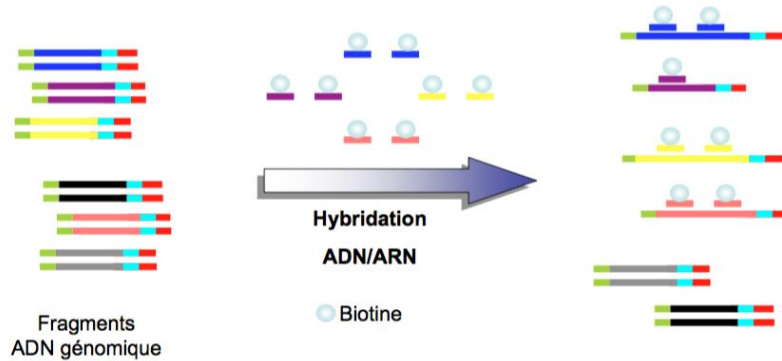
Remarque 1 : Grâce aux **adaptateurs**, on n'a plus besoin que d'un **seul couple de primers** pour l'amplification par PCR car tous les fragments auront les **mêmes extrémités 5' ou 3'**.

Remarque 2 : On peut **séquencer plusieurs patients en même temps**, dans une même réaction. Lors de la préparation des échantillons, on a 1 patient, 1 tube, mais au moment du séquençage, on va pouvoir mélanger les échantillons grâce aux **Barre Code** (séquences d'une dizaine de nucléotides bien définis).

Ces BC permettent de savoir exactement quel fragment appartient à quel patient.

→ **1 BC = 1 patient**

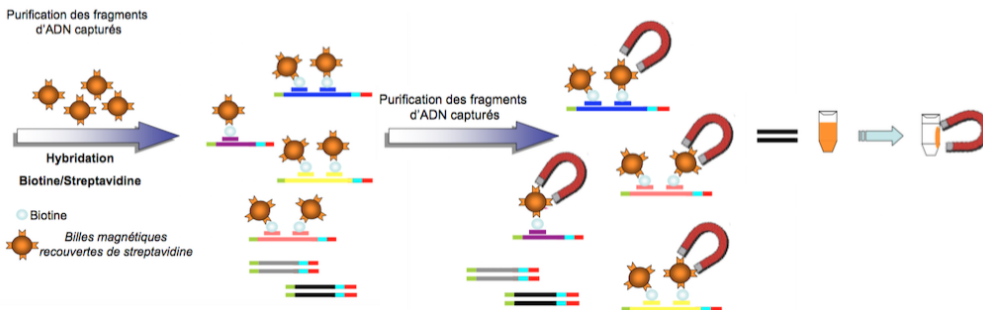
Il y a un tri par un traitement informatique : le séquenceur reconnaît la séquence du BC et attribue l'ADN qu'il est en train de séquencer au bon patient.



3) Ajout de **sondes de capture** (ARN simple brin **biotinylés**) spécifiques des régions d'intérêt

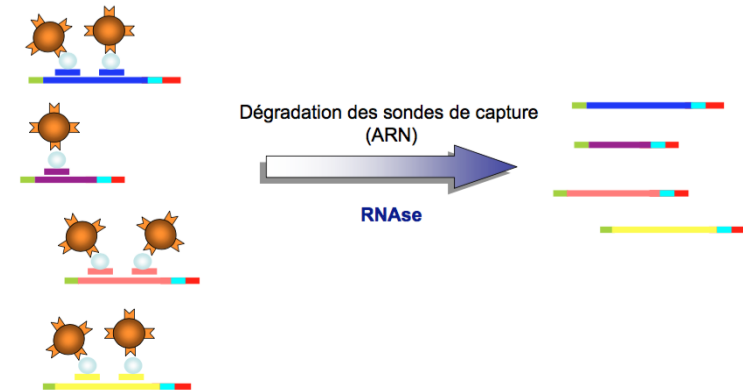
→ Les **régions d'intérêt** à séquencer sont **reconnues** par les sondes de capture (⇒ **Hybridation ADN/ARN**) contrairement aux régions qui ne nous intéressent pas.

Remarque : La **biotine** est une protéine permettant la **formation d'un complexe avec la streptavidine** lors de l'étape de purification.



4) **Purification** des fragments d'ADN capturés : Ajout de **billes magnétiques recouvertes de streptavidine** (⇒ **Hybridation biotine/streptavidine**) + **Aimant**

→ L'aimant contre la paroi permet d'attirer les billes magnétiques et de recupérer nos populations d'intérêt. Les autres fragments sans billes sont **éliminés après plusieurs éluions**.



5) **Dégradation** des sondes de capture (= ARN) grâce aux **RNases**

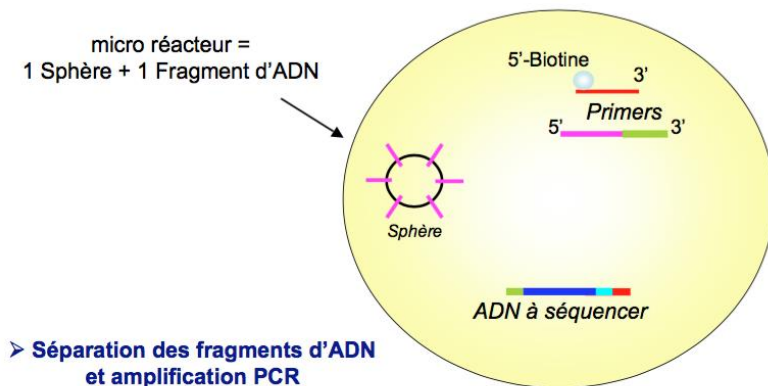
Les séquences d'intérêt ont été isolées ; il faut maintenant les **séparer** et les **amplifier** par PCR avant de les séquencer.

2. Amplification clonale par PCR en émulsion

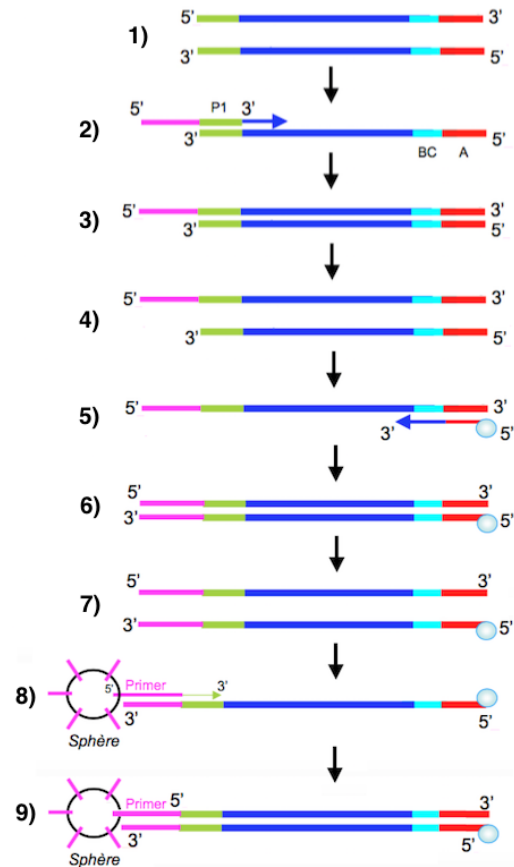
→ **Formation de « micro réacteurs »**

Un **micro réacteur** comprend : **1 sphère** + **1 seul fragment d'ADN** + **2 primers** (dont un **biotinylé** ++)+ **ADN polymérase** + **dNTP** + **tampon**.

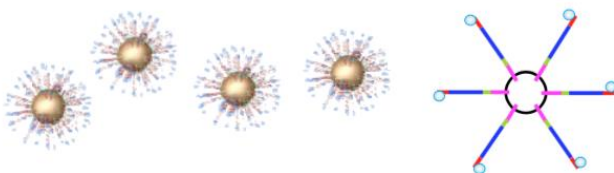
Mêmes étapes que la PCR classique : **Dénaturation, Hybridation, Elongation**



Etapes :



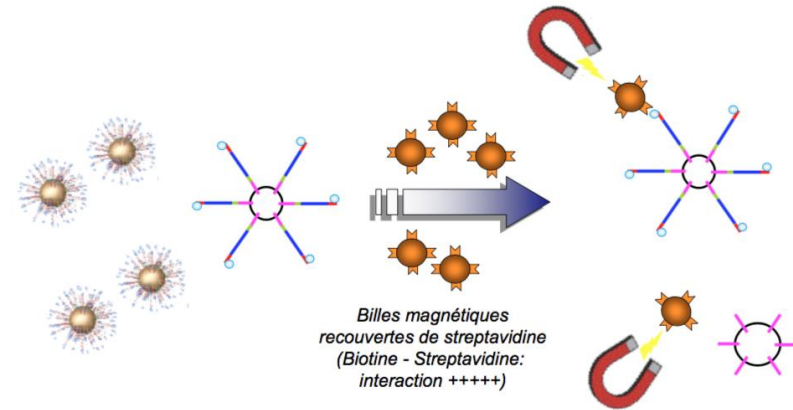
Remarque : L'hybridation avec le primer situé sur la sphère ne peut se faire qu'avec le dernier brin nouvellement synthétisé.



1 Sphère = 1 fragment ADN amplifié

→ Au bout de **n cycles** : Sphères recouvertes de fragments PCR avec une **extrémité 5' biotinylée**

3. Purification des sphères avec l'ADN amplifié



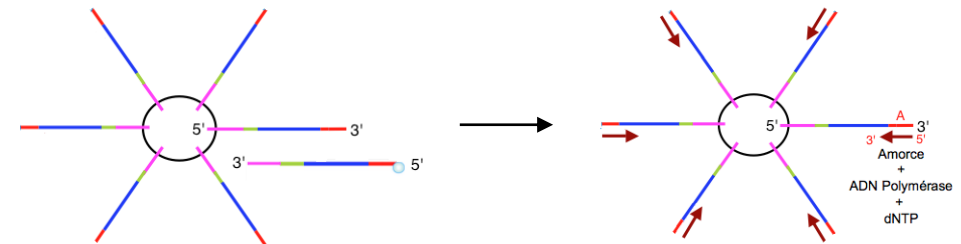
→ **Purification** : Ajout de **billes magnétiques** recouvertes de **streptavidine** (⇒ *forte interaction biotine/streptavidine ++*) + **Aimant**

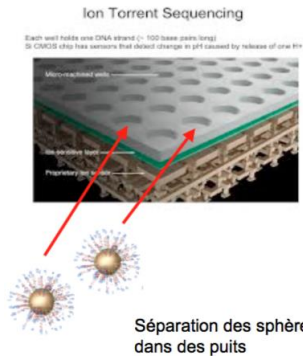
Intérêts : Récupérer les **sphères avec ADN amplifié** + **Éliminer les sphères sans ADN amplifié** (= pas d'extrémités biotinylées)

4. Séquençage individuel des sphères

→ Etape de **dénaturation/hybridation** juste avant de charger les sphères sur la puce :

- **Dénaturation** à 95°C de l'ADN double brin fixé sur la sphère afin de **libérer le brin biotinylé en 5'** (*ne servant pas pour le séquençage*)
- **Hybridation d'une amorce** (*complémentaire du primer A*) sur l'**extrémité 3' du brin non biotinylé**



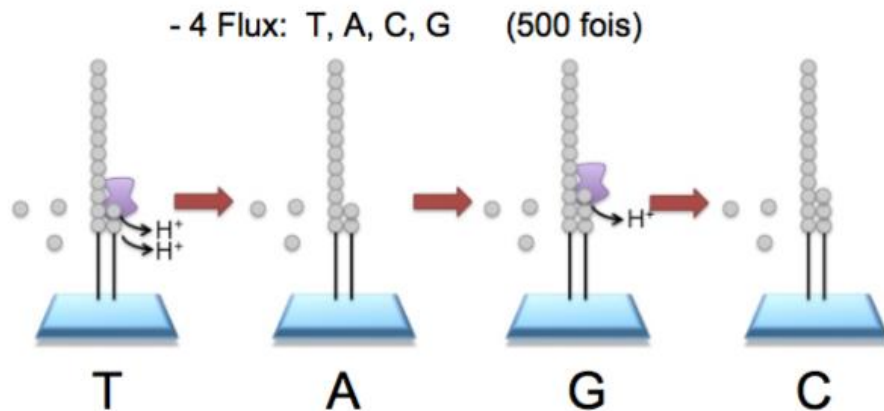


→ Pour le séquençage, on utilise une **puce** avec un **support métallique composé d'un grand nombre de puits (1 à 11 millions)** dans lesquels on va placer les fragments d'ADN à séquençer.

Remarque : Le nombre de puits étant **variable en fonction de la puce utilisée**, le nombre de réactions de séquençage possibles varie aussi.

⇒ **Séparation des sphères dans les puits** ; chaque puits ne pouvant accueillir qu'une seule sphère

⇒ Utilisation d'une **amorce**, d'une **ADN polymérase** et de **dNTP**

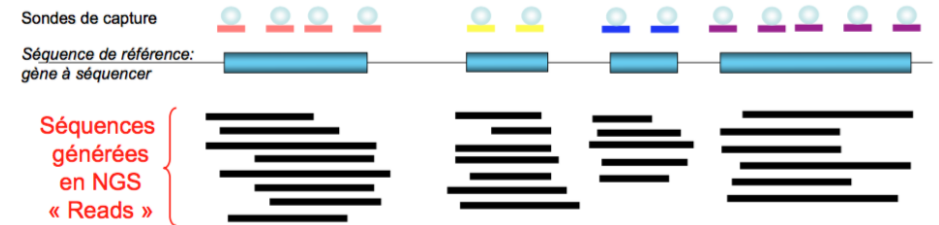


⇒ Injection des dNTP **les uns après les autres** par la machine :

- S'il y a **complémentarité** : **Synthèse** par la polymérase + **Libération d'un ion H⁺** → Création d'une **variation du pH** (détectée par la machine)
- S'il n'y a **pas complémentarité** : **Pas de variation du pH**

L'appareil mesure du pH **en continu** et envoie les dNTP **un par un**, donc en fonction de la **variation du pH** et du **dNTP envoyé**, on connaît au final l'**ordre des nucléotides**, c'est-à-dire la **séquence de notre ADN génomique**.

5. Analyse informatique



⇒ **Très complexe** : **Tri** et **réalignement** sur la séquence de référence de toutes les séquences (de fragments aléatoires de 200 à 400 pb) lues par le séquenceur

⇒ **Extrêmement puissant** : Une même position nucléotidique est lue entre **1000 et 3000 fois**.

⇒ Permet de **détecter les changements nucléotidiques** (identification possible des **variants pathogènes**)

Remarque : Malgré tout, il reste nécessaire de **confirmer les résultats par un séquençage Sanger**.

B. Applications du NGS

Le séquençage NGS est **de plus en plus utilisé** : *appareil de base dans certains laboratoires (immunologie, virologie, etc...)*

- ⇒ **Séquençage de plusieurs gènes** (panel de plusieurs centaines de gènes)
- ⇒ **Séquençage d'exome** (séquences codantes d'un génome)
- ⇒ **Séquençage du génome entier** (peu utilisé en diagnostic)
- ⇒ **Diagnostic prénatal non invasif** (recherche des trisomies 13, 18, 21)

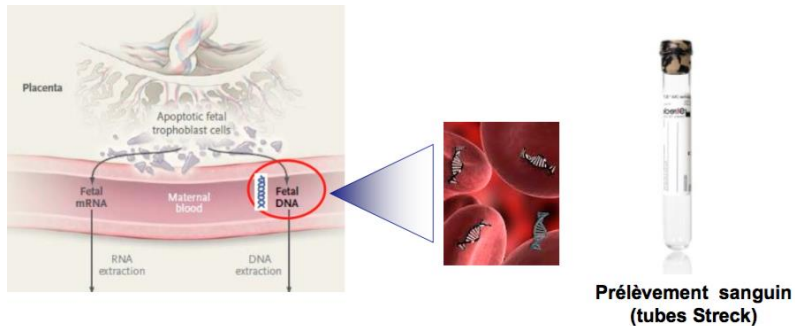
III. Diagnostic Prénatal Non Invasif (DPNI)

→ Utilisé maintenant **en routine** pour **rechercher les trisomies 13, 18 et 21**

Diagnostic Prénatal	Diagnostic Prénatal Non Invasif
Prélèvement très invasif	Prélèvement non invasif
Amniocentèse (récupération du liquide amniotique)	Prise de sang (récupération de l' ADN fœtal circulant)
Réalisation d'un caryotype	NGS
Risque de fausse couche	/

ADN fœtal circulant :

- **Origine fœtale** (*cellules trophoblastiques*)
- **Apparition précoce** dans la circulation maternelle
- **Quantité augmentant** pendant la grossesse



Etapes du DPNI :

- 1) **Extraction** de l'ADN circulant à partir du plasma
- 2) **Préparation** des échantillons (*adaptateurs, barre code, etc...*)
- 3) **Amplification clonale** (PCR en émulsion)
- 4) **Purification** des sphères
- 5) **Séquençage**
- 6) **Analyse bio-informatique**

Le DPNI est une analyse **QUANTITATIVE** car on recherche une **sur-représentation chromosomique** (*chromosome surnuméraire*), et non pas une variation nucléotidique.



SCHEMA BILAN

