

# NGS

Diapo 2020-2021

# Introduction

- ◇ Séquençage nouvelle génération
- ◇ Séquençage massif, en parallèle , pas utilisé pour une mutation ciblée.
- ◇ Ddntps radiomarqués < ddntps fluorescents < NGS
- ◇ Maladies multigéniques (Charcot Marie Tooth), exome, génome (30 000 gènes humains),  
ARN DPNI

# DPNI

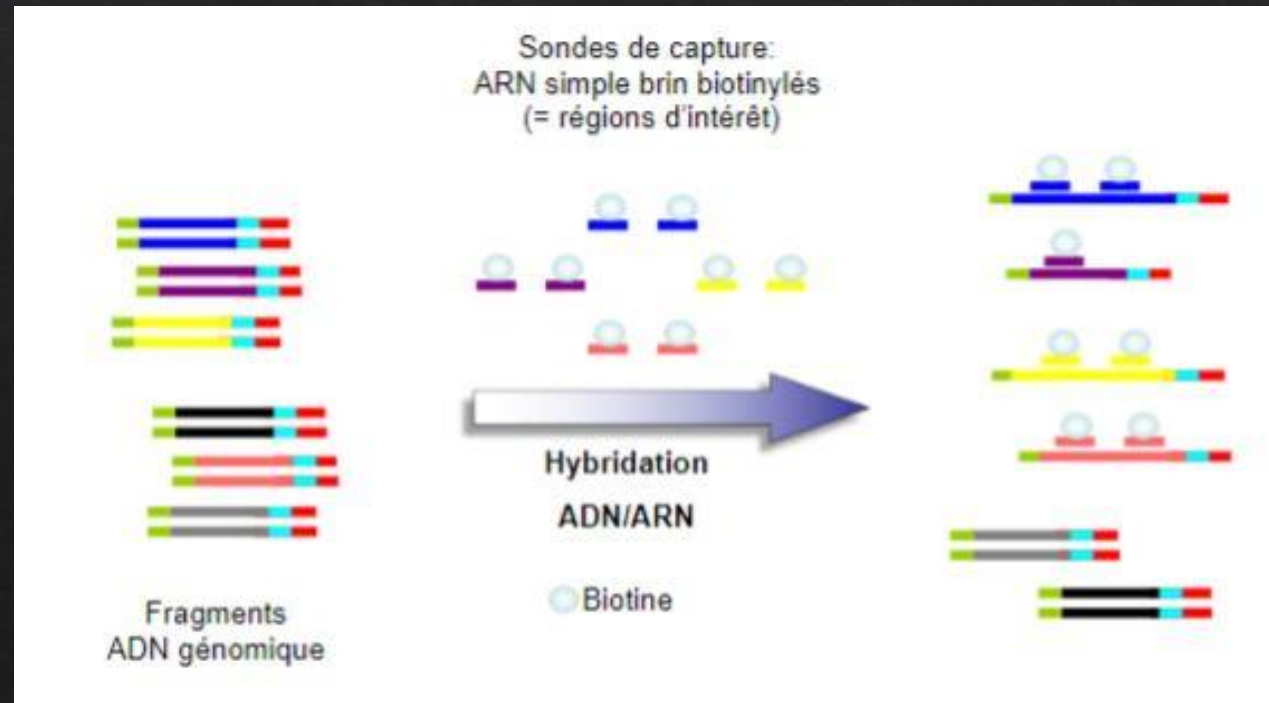
- ◇ Dépistage prénatal non invasif.
- ◇ Pour détecter une trisomie sans amniocentèse.
- ◇ Par prise de sang et séquençage quantitatif de l'ADN fœtal circulant fragmenté.
- ◇ S'oppose au DPN ->caryotype
- ◇ Un DPNI doit toujours être confirmé par un DPN

# Les premières étapes

- ◇ Communes à tous les NGS
- ◇ Fragmentation **endonucléases bactériennes**
- ◇ (comblement des extrémités cohésives par ADN polymérases)
- ◇ Ajout d'adaptateurs (**P1 en 5' / A en 3'**) et barre codes->ADN ligases

# Amplification clonale

- ❖ Ici Méthode par capture, différent selon le NGS
- ❖ Capture par **hybridation** de sondes d'**ARN** biotinylées.
- ❖ Hybridation ADN/ARN
- ❖ Liaison **biotine** /**Streptavidine**, puis aimantation et lavage.
- ❖ RNAses
- ❖ -> NGS=Amplification+séquençage

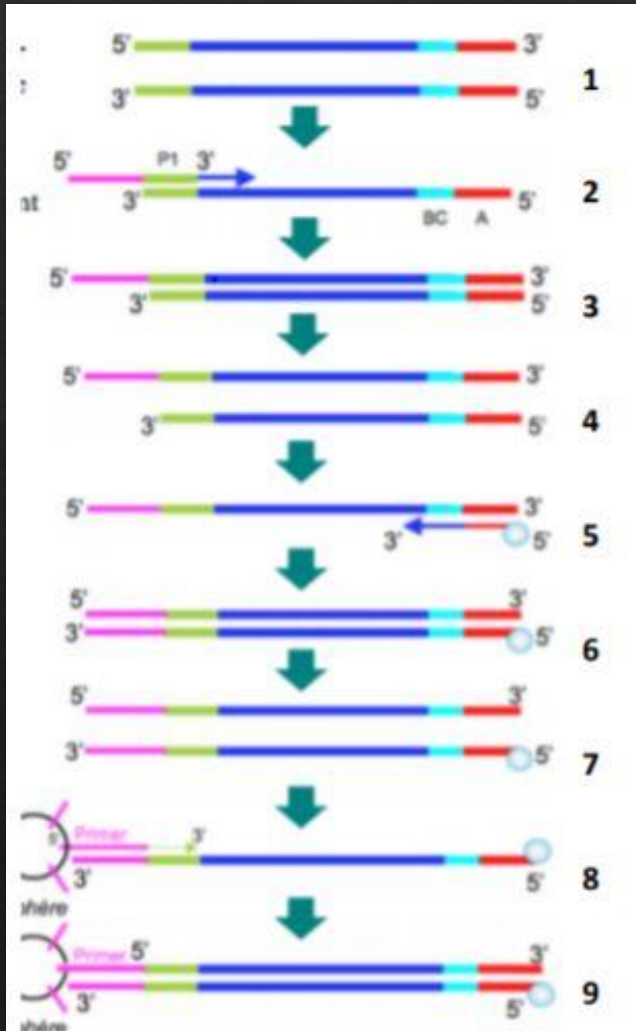




# Amplification clonale

- ◇ Amplification sur microréacteurs. (gouttelettes d'émulsion eau/huile)
- ◇ Contient: fragment, sphère métallique et ses primers, ADN polymérase+dntps+tampon, 2 types de primers libres
- ◇ +++PCR : amplifie les régions d'intérêt dans un mélange
- ◇ +++NGS : amplifie un fragment d'intérêt en intégralité
- ◇ cycles de température de la PCR
- ◇ 2 primers: 1<sup>er</sup> : complémentaire de P1+sphère ( rose et vert)
- ◇ 2<sup>nd</sup> : complémentaire de A avec biotine (rouge)

# Les étapes de l'amplification



1. Dénaturation par la chaleur (rend l'ADN à séquencer simple brin)
2. Hybridation du 1er type de primer sur P1 à l'extrémité 3' du fragment
3. Elongation de 5' en 3' par la polymérase.
4. Dénaturation (rend l'ADN nouvellement synthétisé simple brin)
5. Hybridation de l'amorce biotinylée sur A
6. Elongation de 5' en 3' par la polymérase
7. Dénaturation (rend l'ADN nouvellement synthétisé simple brin)
8. Hybridation du brin nouvellement synthétisé sur le primer de la sphère par complémentarité
9. Elongation → après plusieurs cycles la sphère est recouverte de multiple fragment d'ADN double brin identiques (=PCR clonale)

+++La PCR clonale est obtenue par NGS+++

++Chaque sphère a amplifié un seul fragment++

# Séquençage

- ◇ Séquençage sur puce dans puits : 1 puit=1 fragment
- ◇ Même matériel que le Sanger mais ajout de dntps séquentiellement
- ◇ Variation de Ph lors formation de la liaison phosphodiester



# Analyse informatique

- ◇ Détermination de la **séquence**
- ◇ Contrôle **qualité** (suppression des râtés)
- ◇ **Alignement** des séquences
- ◇ Analyse de la **profondeur** ( nombre de passages)
- ◇ Analyse de la **couverture** (% de la zone séquencée)

# QCM 1

- ◆ 1) A propos du NGS
- ◆ A) Le NGS utilise les ddntps.
- ◆ B) Lors du DPNI, on effectue une prise de sang à la mère puis on fragmente l'ADN fœtal circulant avec des endonucléases bactériennes pour l'amplifier et le séquencer
- ◆ C) Le NGS suit les mêmes étapes que la PCR pour amplifier les fragments ( hybridation, élongation, désintégration)
- ◆ D) Chaque sphère de NGS contient un seul fragment d'ADN en plusieurs exemplaires.

# QCM 1 correction

- ♦ 1) A propos du NGS
- ♦ A) Le NGS utilise les ddntps. **Faux, dntps -> La synthèse du brin complémentaire n'est pas bloquée par l'ajout d'une base.**
- ♦ B) Lors du DPNI, on effectue une prise de sang à la mère puis on fragmente l'ADN foetal circulant avec des endonucléases bactériennes pour l'amplifier et le séquencer. **Faux L'ADN foetal circulant est déjà fragmenté.**
- ♦ C) Le NGS suit les mêmes étapes que la PCR pour amplifier les fragments ( hybridation, élongation, désintégration). **Faux, dénaturation pas désintégration. Les pièges parenthèses sont classiques.**
- ♦ D) Chaque sphère de NGS contient un seul fragment d'ADN en plusieurs exemplaires.  
**Vrai**

# QCM 2

- ◇ 2) A propos du NGS
- ◇ A) Le DPN n'utilise pas le NGS
- ◇ B) Le NGS détermine la séquence nucléotidique par l'étude des variations de Ph lors de la formation de la liaison phosphoanhydride.
- ◇ C) L'analyse de la profondeur est l'analyse du nombre de fragments séquencés recouvrant une position sur la séquence de référence.
- ◇ D) Le contrôle de la qualité du séquençage permet d'éliminer les fragments mal séquencés pouvant induire des erreurs d'analyse.



# QCM 2 correction

- ◇ 2) A propos du NGS
- ◇ A) Le DPN n'utilise pas le NGS. **Vrai**
- ◇ B) Le NGS détermine la séquence nucléotidique par l'étude des variations de Ph lors de la formation de la liaison phosphoanhydride. **Faux, liaison phosphodiester. Lier les cours entre eux pour répondre plus facilement.**
- ◇ C) L'analyse de la profondeur est l'analyse du nombre de fragments séquencés recouvrant une position sur la séquence de référence. **Vrai**
- ◇ D) Le contrôle de la qualité du séquençage permet d'éliminer les fragments mal séquencés pouvant induire des erreurs d'analyse. **Vrai**