

NGSMise à jour de la fiche NGS pour PASS/LAS (Ronéo 3-3, nouveautés en vert)MAJ 2 avec la ronéo 5, partie sur le DPNI1-Introduction :

Le NGS (Next génération séquençage → technique récente) est une technique innovante permettant un séquençage massif, de différentes molécules d'ADN **en parallèle**, individuellement amplifiées (**clones ou molécules uniques**).

Les techniques ont évoluées : séquençage manuel (ddntps **radiomarqués**), puis séquençage automatique (ddntps **fluorescents**), puis NGS (haut débit).

Elle est utilisée pour séquencer plusieurs gènes en même temps (**maladie multigénique**, ex : le syndrome de **Charcot Marie Tooth**), l'**exome** (ensemble des exons=parties des gènes qui donnent les protéines), un **génomme entier**, une analyse de l'**ARN**, ou pour réaliser un **+++DPNI+++** (dépistage pré natal non invasif, réalisé par prise de sang, analyse de l'ADN foetal circulant (**trophoblastique** et **déjà fragmenté à 200 pb**) dans le sang maternel (**sur tube Streck**), s'oppose au DPN=amniocentèse suivi d'un **caryotype**, qui présente un risque de fausse couche).
->Le DPNI suit les étapes d'amplification clonale de séquençage et d'analyse bio-informatique.

+++Le DPNI est une analyse quantitative permettant de chercher une surexpression des gènes d'un chromosome (ex: K 21)+++ → on compte le nombre de chromosomes on ne cherche pas les mutations.(on compte le nombre de séquences=reads-> Analyse de la PROFONDEUR de lecture)

Le DPNI est une méthode de dépistage mais pas de diagnostic.

+++Une suspicion de trisomie détectée par DPNI doit toujours être confirmée par DPN+++

→ Pas utilisé en pratique pour la recherche d'une mutation ciblée.

Le NGS a permis d'achever le séquençage du génome humain au complet à l'aide de **séquenceurs capillaires puis NGS (3 milliard de paires de bases, 30 000 gènes, 1 à 2 % du génome codant = exons seulement)** (avant le NGS on avait commencé le séquençage du génome humain au complet avec des séquenceurs dits capillaires)

2-Les différentes étapes :

Les premières étapes sont communes à tous les NGS (dans le cours on traite des NGS de 2 plateformes/sociétés-> Illumina et Thermofischer=Life technology=technologie Ion torrent. Il existe aussi la société Roche qui est plus en retrait sur le marché):

- on utilise un ADN génomique prélevé ou amplifié par PCR.(**échantillons ou librairies**)

-Le NGS nécessite une fragmentation de l'ADN en portions de 200 à 400 paires de bases (par des endonucléases **++BACTERIENNES++** qui coupent de façon aléatoire en fragments de 200 à 400 pb) (*Endonucléases = qui coupent au milieu/Exonucléases =qui coupent aux extrémités.*)
*Si les extrémités générées par les endonucléases sont cohésives, des **++ADN polymérases++(PAS ARN polymérase!++)** comblent l'extrémité en un bord franc pour ajouter l'adaptateur facilement.*

+++Puis, pour tous les NGS on ajoute des adaptateurs (oligonucléotides de séquence connue)et des barres codes :

NGS

-Le barre code est une portion d'ADN de séquence connue rajoutée à la fin d'un fragment afin d'identifier à quel patient le fragment appartient. Des outils bio-informatiques permettent d'attribuer les résultats au patient. Les barres codes permettent de travailler sur l'ADN de plusieurs patients en même temps.

- Les Adaptateurs sont des séquences d'ADN ajoutés en 5' (Adaptateur P1)++ et en 3' (adaptateur A) ++ du brin afin que les extrémités de tous les fragments soient identiques. Ils permettent de travailler avec les mêmes amorces.+++

Ils sont ajoutés par des ++ADN ligases++

Les barre code sont différents selon les patients, alors que les adaptateurs sont identiques pour tous les patients.

Le barre code est placé entre le fragment d'ADN et l'adaptateur A → à la fin du fragment mais avant l'adaptateur car on veut des extrémités identiques.

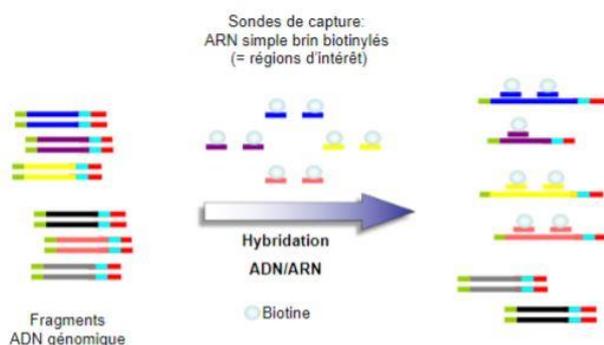
La 3^{ème} étape est différente selon les NGS :

+++C'est l'amplification clonale+++

On en étudiera une : **la méthode par capture.** ++ (capture des régions d'intérêt de l'ADN, à amplifier, ++par hybridation de sondes++

(Les sondes sont de petits fragments aux bases complémentaires des régions d'intérêt. Elles s'hybrident par complémentarité des bases

3-Les sondes de capture.



Les sondes de capture sont constitués d'ARN **simple brin biotinylés** (attaché à une molécule de biotine).

On observe une **hybridation ADN/ARN** des régions d'intérêt.

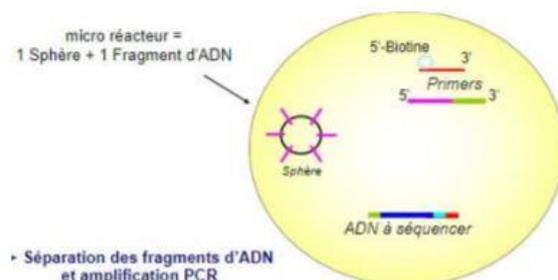
La biotine a une forte affinité avec la **streptavidine**. La streptavidine a des propriétés magnétiques. On ajoute des billes de streptavidine au mélange d'ADN. Les régions d'intérêt se fixent sur la streptavidine via la sonde de capture biotinylée. Les billes de streptavidine sont récupérées avec un **aimant**, puis lavées.

Puis, les sondes de capture sont dégradées par des **RNAses** (dégradation de l'ARN dans le complexe ADN/ARN)

Interaction biotine/streptavidine = Biotine-STREP
Biotine et streptavidine sont 2 protéines.
Les billes de streptavidine sont marrons.

++Le NGS permet l'amplification et le séquençag des fragments d'intérêt++

4-Phase d'amplification clonale :



Pour amplifier les fragments, on utilise des **microréacteurs** → permettent de séparer les fragments (1/microréacteur) et de les amplifier = de les cloner
Dans le NGS étudié on réalise une amplification sur support **solide** = sphères magnétiques.

NGS

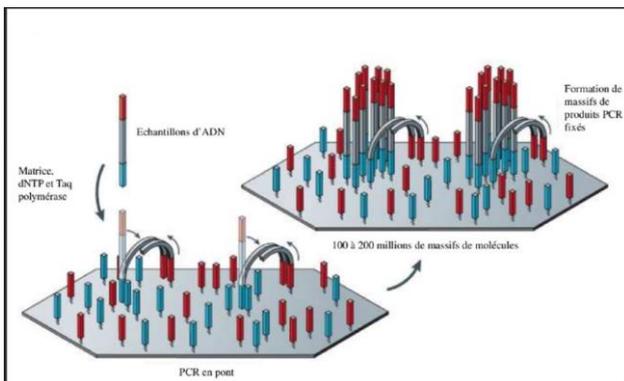
Un sphère magnétique (support solide attaché à plusieurs primers = amorces de début) est contenu dans chaque microréacteur = gouttelette d'une émulsion eau/huile.

Chaque gouttelette/microréacteur contient :
 -le fragment

- la sphère métallique avec ses primers (la sphère métallique et l'émulsion sont spécifiques de ThermoFischer, la PCR d'Illumina est réalisée sur une lame de verre=Flow Cell et est appelée PCR en pont ou en cluster=grand nombre de brins)
- une ADN polymérase+dntps+tampon.
- des primers libres +++ (appelés couple de primers=1 primer sens et un primer reverse)Ce sont des oligonucléotides.

Les primers sont dits fixés sur la lame de verre chez Illumina. On réalise alors une PCR clonale avec la Taq polymérase.

Le fragment est HYBRIDÉ sur la lame de verre à une amorce attaché sur la lame, puis la Taq polymérase le réplique. Le nouveau brin est attaché de manière covalente à la lame de verre (prolongation de l'amorce). Ainsi lors d'un lavage c'est le brin D'ORIGINE qui part et le brin NEO-FORMÉ reste attaché.



On parle de PCR en pont car le brin néo formé (simple brin après lavage) va venir hybrider son extrémité libre sur les autres primers fixés à la sphère-> forme de pont. La Taq le rend double brin. Et chaque brin garde un primer -> ils redeviennent verticaux (arrêt de la structure en pont). On ne

garde que les brins sens attachés clivage d'un seul type de primer.

++Dans la PCR on amplifie les régions d'intérêt dans un MELANGE de fragments . Dans le NGS, le fragment d'intérêt est cloné dans son intégralité+++

(essayer de bien voir la différence entre les deux ça aide à comprendre)

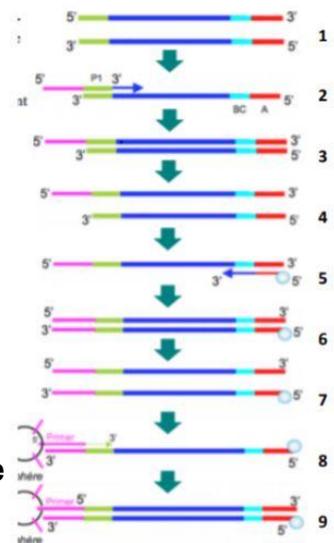
On suit les mêmes étapes que la PCR : hybridation, élongation, dénaturation (avec les cycles de température).

On retrouve 2 types de primers dans le microréacteur :

- l'un complémentaire au primer de la sphère+ à l'adaptateur P1 (5' du fragment)
- l'autre complémentaire de l'adaptateur A +possédant de la biotine (pour pouvoir récupérer les sphères amplifiées via la streptavidine cf partie 3)

Les étapes :

1. Dénaturation par la chaleur (rend l'ADN à séquencer simple brin)
2. Hybridation du 1^{er} 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



NGS

→ 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++

5-Le séquençage :

L'intérêt du NGS est sa capacité à séquencer tous les fragments précédemment clonés.

Dans cette exemple, on utilise une puce de quelques centimètres avec plusieurs millions de puits de petit diamètre (1 seule sphère rentre par puit). → 1 puit = 1 fragment séquençé.

Pour Illumina, le séquençage se fait sur la lame de verre. On ajoute 1 primer libre et des nucléotides fluorescents. On mesure la fluorescence émise par les dntps après excitation (on obtient comme une « photo » avec tous les dntps fluorescents en même temps.

Pour le séquençage, on ajoute tous le matériel de synthèse d'ADN (comme pour un séquençage Sanger) SAUF que les dntps sont ajoutés séquentiellement/l'un après l'autre.(500 fois dans un run de séquençage)

Si le nucléotide ajouté correspond bien au nucléotide complémentaire de la séquence, une liaison phosphodiester est créée par l'ADN polymérase entraînant une variation de Ph (libération d'un H+, le Ph du milieu s'acidifie)

+++Le NGS détecte donc les variations de Ph pour déterminer la séquence du brin d'ADN+++ (Pour thermoFischer on détecte les variations de Ph = technologie des semi conducteurs. Pour Illumina on reste sur une détection de fluorescence)

+++La PCR en émulsion et la détection des variation de Ph sont spécifiques des NGS de ION

torrent alors que les premières étapes sont communes à tous les NGS+++

6-L'analyse bio-Informatique :

+++Etape fondamentale pour :

- déterminer la **séquence** à partir des variations de Ph détectées, (-> **détermination des bases= base calling, les données obtenues deviennent des données de séquence**),
- éliminer les séquences de trop mauvaise **qualité (contrôle qualité)**,
- réaliser un **alignement** des séquences,
- analyse de la **profondeur (20 fois minimum pour un séquençage de bonne qualité)** et de la **couverture**.+++

L'alignement consiste à repositionner les séquences du patient sur le génome de référence afin de pouvoir comparer le patient et la référence pour trouver une mutation.

L'analyse de la profondeur est l'analyse du nombre de copies obtenues pour une base/une région précise (j'ai séquençé 100x la base A qui est muté en C → La mutation est déterminée avec fiabilité).

L'analyse de la couverture est l'analyse du pourcentage de la région couverte par au moins un fragment séquençé.(Est ce que j'ai des trous où je ne peux replacer aucun fragment ?)

Egalement étape d'annotation=localisation+classification des variants.

Etape d'interprétation des variants =Expertise clinico-biologique :interprétation du variant dans son contexte clinique, déterminer LE variant responsable de la pathologie.

Le NGS est donc très puissant ! (il appartient au multi-OMICS= recherche sur génome, protéome etc...) Il est utile dans les maladies multigénique ou mal connue pour la recherche d'un nouveau

NGS

***variant nucléotidique=d'une nouvelle mutation
dont on ne connaît pas les conséquences.***

***Peut être utilisé pour développer des
thérapeutiques de médecine personnalisée.***

Fin !