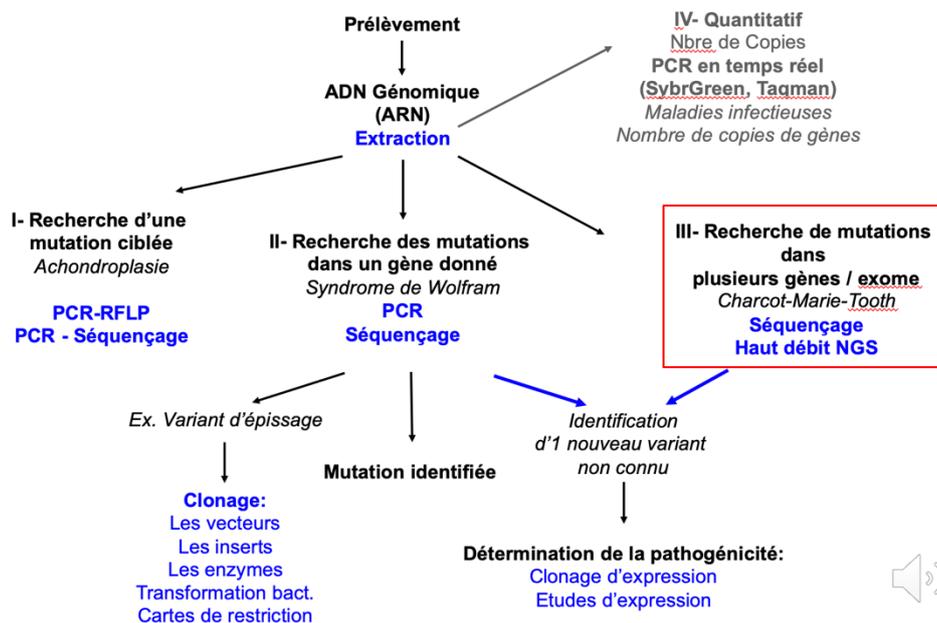


# Le Séquençage Haut Débit : la NGS

## I – Principe

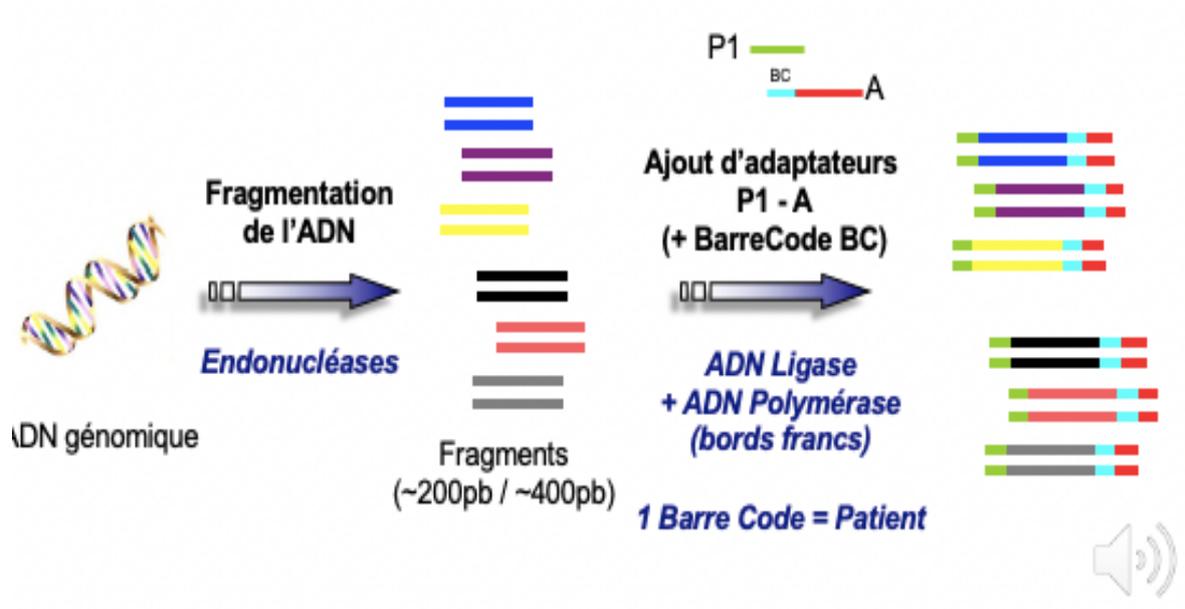


(ce schéma c'est vraiment +++ une fois qu'on a vu tous les cours, ça permet d'avoir un plan global)

- On a vu des techniques pour repérer une mutation ciblée et on a aussi vu comment séquencer un gène donné. Maintenant on souhaite séquencer **plusieurs gènes** voire **l'exome entier**.
- Avec les méthodes vues dans les cours précédents, on mettrait trop de temps pour séquencer des séquences aussi grandes. Mais grâce à l'amélioration des nouvelles technologies et à la miniaturisation des systèmes, la NGS est capable de séquencer tout le génome humain en peu de temps.
- C'est une technologie assez récente, les 1ères machines sont apparues en 2007 et ça a révolutionné la biologie moléculaire.
- La NGS a **plusieurs avantages ++** : elle permet une amplification et un séquençage massif **sous forme de clones +** (c'est-à-dire de molécules uniques )
- Actuellement il existe 2 plateformes qui utilisent des technologies différentes : **Illumina** et **ThermoFisher**
- Quelle que soit la plateforme, la NGS se déroule en **4 étapes principales** :
  1. La préparation des échantillons
  2. La PCR Clonale (qui permet à la fois une amplification et l'obtention de molécules d'ADN identiques)
  3. Le séquençage
  4. L'analyse bio-informatique
- Les étapes 1 et 4 sont identiques chez Illumina et ThermoFisher

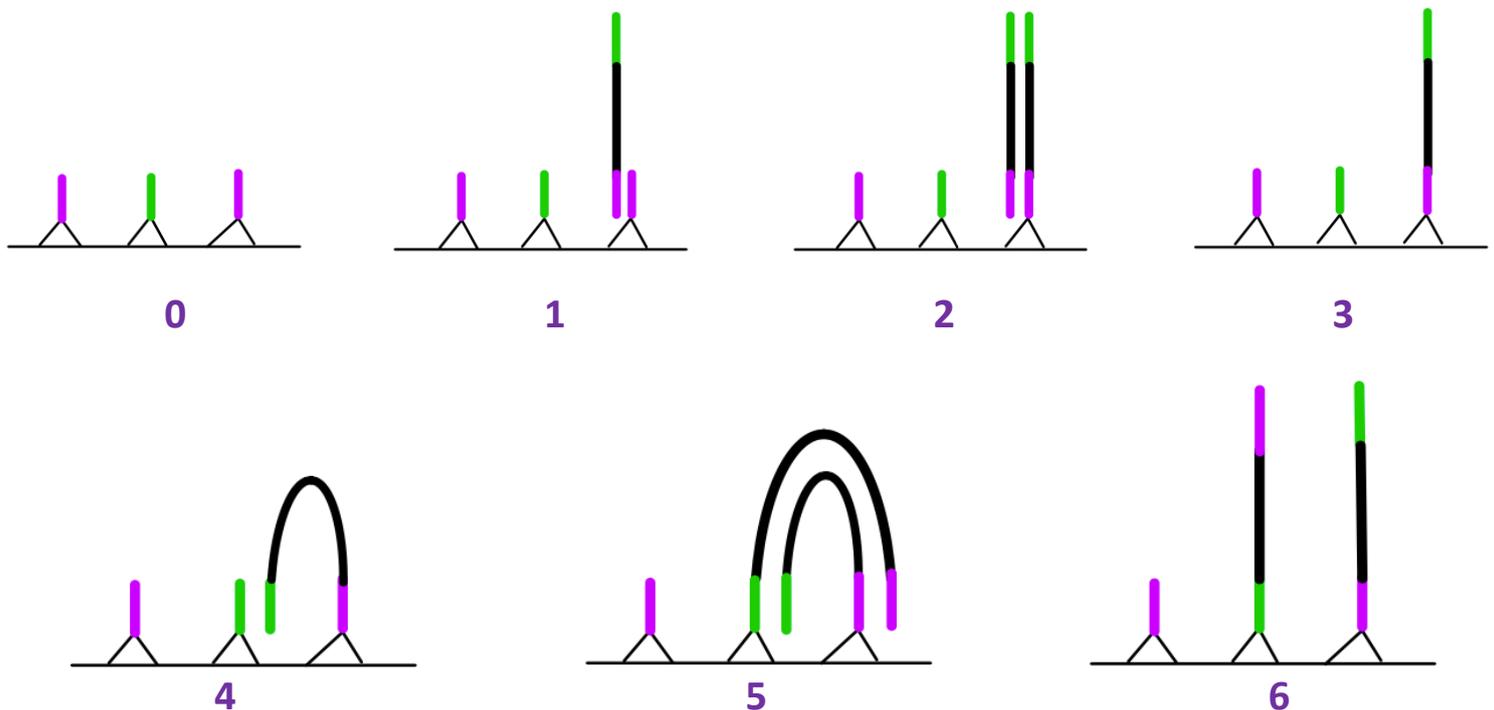
## II- Étape 1 : Préparation des échantillons

- On va vouloir séquencer de longues séquences d'ADN. On va donc commencer par **fragmenter** toutes nos séquences pour avoir plein de petits morceaux.
- Ensuite on va ajouter des **barre-codes** : elle vont servir à **identifier nos patients**. Dans les étapes suivantes on va mélanger l'ADN de plusieurs patients pour avoir un séquençage en même temps (c'est une séquence d'environ une dizaine de nucléotides).
- Enfin on ajoute des **adaptateurs** de chaque côté des fragments. Cela nous permet d'avoir une **séquence de nucléotides connus**, qui par la suite pourront former une séquence complémentaire avec nos primers (de la même manière que les bornes en amont et en aval dans la PCR). Il y a 2 types d'adaptateurs :
  - ⇒ Ceux en 5' sont les adaptateurs **P1**
  - ⇒ Et ceux en 3', les adaptateurs **A**



## III – Illumina

### 1) Étape 2 : PCR Clonale



<b>Étape 0</b>	La PCR clonale s'effectue sur une <b>lame de verre</b> aussi appelée <b>Flow Cell</b> . Les brins sont des <b>oligonucléotides</b> (=courts segments de chaînes d'acides nucléiques). Ceux en 5' correspondent à la même séquence des adaptateurs (vert) Ceux en 3' correspondent à la séquence complémentaire (violet)
<b>Étape 1</b>	On ajoute nos fragments d'ADN qui viennent se fixer par complémentarité aux oligonucléotides en 3'
<b>Étape 2</b>	Élongation
<b>Étape 3</b>	On fait un lavage et une dénaturation Les 2 brins se « détachent » Le 1 <sup>er</sup> fragment part lors du lavage Mais le brin qui vient d'être synthétisé <b>reste</b> car <b>il est accroché</b> à la lame de verre
<b>Étape 4</b>	La séquence qui vient d'être synthétisée a créé à son extrémité une séquence complémentaire à la séquence d'oligonucléotide en 5' Il va y avoir la <b>formation de pont</b> car les 2 séquences vont s'apparier
<b>Étape 5</b>	Élongation
<b>Étape 6</b>	Dénaturation et lavage. Les 2 brins étant fixés à la plaque, on obtient 2 séquences d'ADN simple brin

<b>Étape 7</b>	On répète les étapes 4-5-6
<b>Étape 8</b>	On finit par créer un <b>cluster</b> , c'est à dire qu'on a un trèèèèès grand nombre de brins <i>(entre le cluster et la PCR je sais que ça fait vachement covid)</i>
<b>Étape 9</b>	Pour terminer, on clive tous les brins reverse pour ne garder que les brins sens qui sont les brins ayant la même séquence que l'ADN original

## 2) Étape 3 : Séquençage

- On réalise le séquençage **directement sur la lame**
- Chez Illumina, on utilise des **nucléotides fluorescents**. La machine mesure la fluorescence émise par les DNTPs

## IV- ThermoFisher

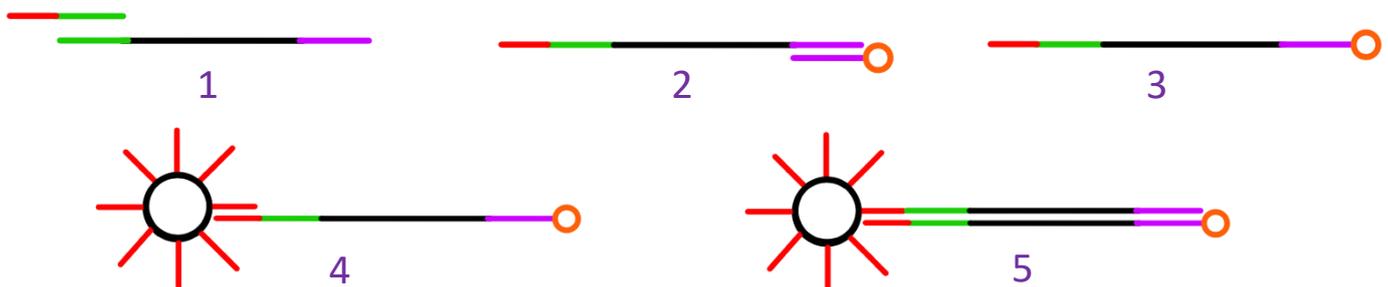
### 1) Étape 2 : PCR Clonale

- Ici la PCR réalisée dans un **micro réacteur** créé par un **système d'émulsion** contenant une **sphère métallique** *(j'avoue on comprend pas grand-chose, si tu veux que je t'explique un peu plus en détail viens sur le fofo, là je vais pas surcharger la fiche. Sinon apprends ça par cœur et tu verras calmement ce que ça veut dire en cours).*
- On a 2 types de primers :



⇒ Le 1<sup>er</sup> contient une séquence complémentaire à l'adaptateur P1 et une séquence identique aux primers situés sur la sphère métallique

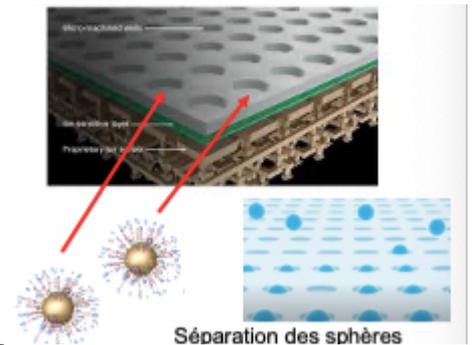
⇒ Le 2<sup>e</sup> contient l'adaptateur A et de la biotine à son extrémité *(pareil je vais pas trop expliquer pourquoi il y a de la biotine, c'est un peu complexe. Même chose si t'es trop curieux viens sur le fofo mais je vais pas interroger là-dessus à l'EB)*



1. Le 1<sup>er</sup> primers vient s'apparier avec notre fragment d'ADN
2. Il y a une élongation. Puis le 2<sup>e</sup> primers vient s'apparier avec le nouveau brin
3. Il y a de nouveau une élongation
4. Enfin la séquence en amont de P1 va pouvoir s'apparier avec les primers situés sur la sphère métallique
5. Finalement l'élongation va pouvoir se faire **directement sur la sphère métallique**
6. Ce processus se fait sur plusieurs brins jusqu'à ce que la sphère soit remplie de brins d'ADN

## 2) Étape 3 : Séquençage

- On va séparer nos sphères en les plaçant individuellement dans des puits (1 sphère = 1 puits). Les puits sont contenus dans de toutes petites puces.
- Pendant la synthèse, on crée des liaisons phosphodiester entre les nucléotides.
- Lors de ces liaisons, un ion H<sup>+</sup> est libéré et cela a pour conséquence de modifier le pH
- La machine va envoyer 1 à 1 les DNTPs (d'abord A puis T...)
- Si elle remarque un changement de pH, alors elle retranscrit le DNTPs qui a été envoyé.



### +++ IMPORTANT À RETENIR +++

#### PCR :

- Illumina → plaque en verre + cluster
- ThermoFisher → sphères métalliques + microréacteur

#### Séquençage :

- Illumina → Fluorescence
- ThermoFisher → Variation de pH

## V – Étape 4 : Analyse Bio-Informatique

- Cette dernière partie est très importante et il ne faut pas du tout la négliger
- C'est grâce à toutes les avancées en informatique que la NGS peut être aussi efficace
- Plusieurs étapes :
  - ⇒ Contrôle qualité : on élimine les séquences où il s'est produit un souci dans les étapes antérieures
  - ⇒ Reconstitution des séquences : on se rappelle qu'on avait fragmenté tous nos brins et qu'il faut reconstituer la séquence d'origine (comme un puzzle)
  - ⇒ Analyse du séquençage : on vérifie si le séquençage a été correctement réalisé
  - ⇒ Annotation des variants : on notes tous les variants que l'on repère → Localisation / intron ou exon / Conséquence sur la protéine etc...
  - ⇒ INTERPRÉTATION +++ : c'est bien évidemment la partie la plus importante, avec tous les variants que l'on a trouvés, il faut essayer de comprendre lesquels sont susceptibles de causer une pathologie.

*Et voilà c'est la fin de la dernière fiche de cette tut rentrée pour la génétique. J'avoue que la partie sur ThermoFisher est un peu floue. En fait le plus important c'est que vous compreniez les principes, ensuite vous reverrez tout en cours. Bon courage pour l'Examen Blanc !*

*Mini dédi : à ma meilleure amie qui m'a supportée, à mes copines de SF qui m'ont permis de continuer à faire des apéros (d'ailleurs big up si t'es à SF), à ma famille d'amour qui a été d'un soutien incroyable, à mes copains de PASS en particulier David (courageeee) et plus généralement au PASS GANG ! Et la plus grosse dédi pour la fin : **TOI qui es là aujourd'hui** ☺!!*

*Le Tutorat est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.*