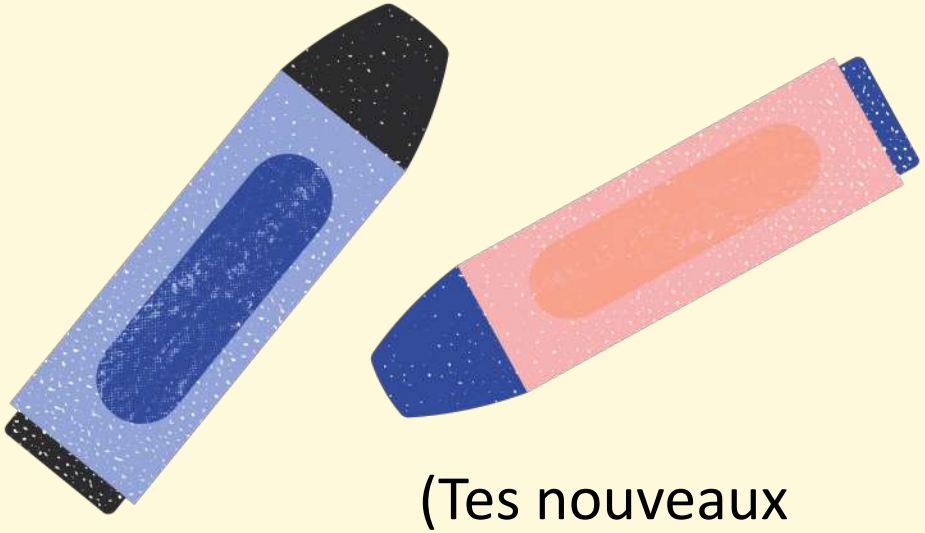
La génétique continue avec …

Le séquençage Haut Débit aka la NGS *(pour les intimes)*

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

PLAN

I- Principes
II- Etapes
III- Illumina
    1)PCR Clonale
    2) Séquençage
IV- ThermoFisher
    1) PCR Clonale
    2) Séquençage
V- Analyse bio-informatique

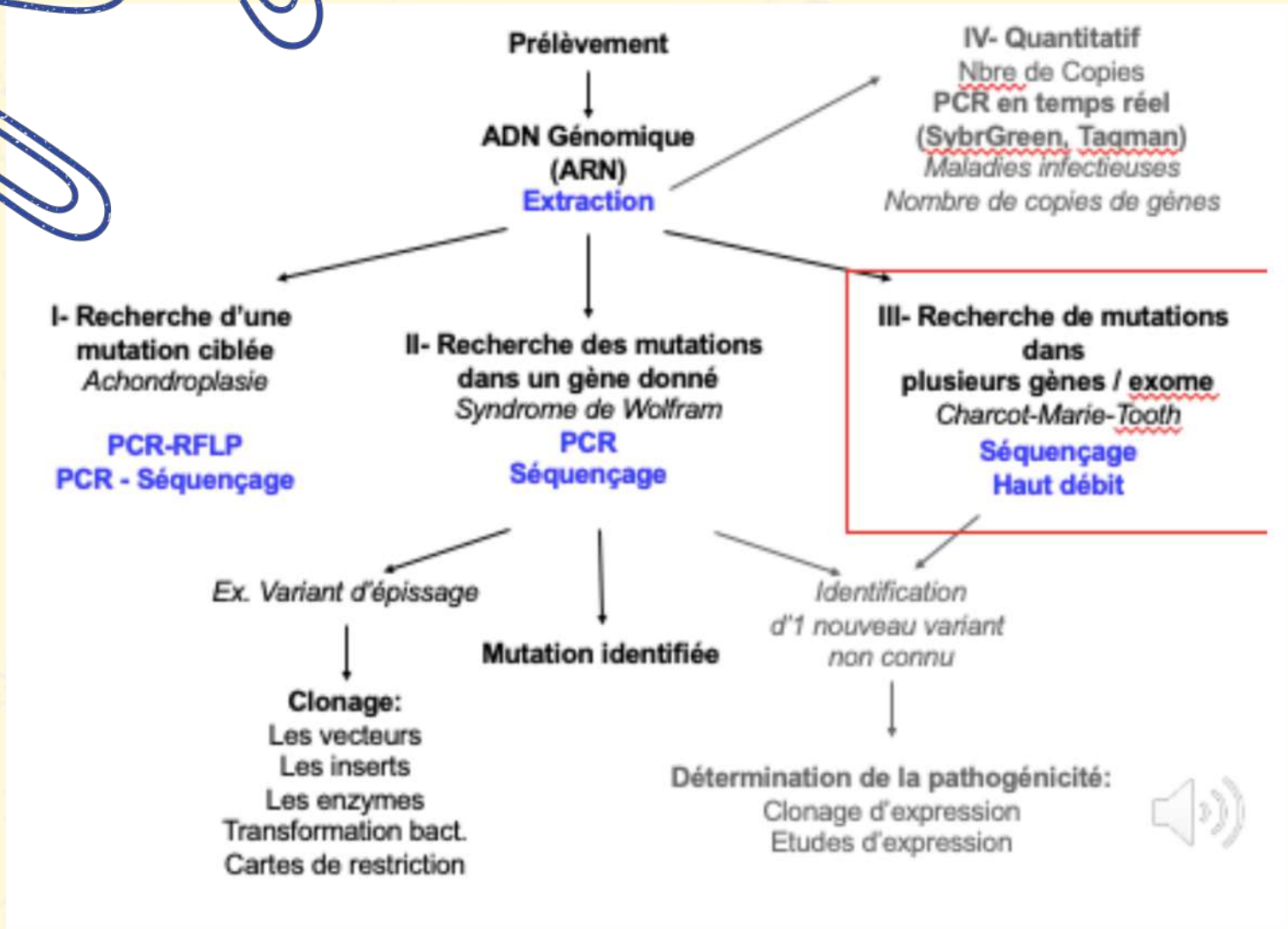


(Tes nouveaux meilleurs amis en P1)

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

I - Principes

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



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

- Les avantages de la NGS ++
  → Amplification massive
  → Séquençage massif
  → **Sous forme de clones (molécules uniques)**

- 2 plateformes avec des processus différents : Illumina et ThermoFisher

- 4 étapes :
  1. Préparation des échantillons
  2. PCR Clonale (amplification)
  3. Séquençage
  4. Analyse bio-informatique

- Etapes 1 et 4 identiques chez Illumina et ThermoFisher

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

II - Etape 1

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

1. Fragmenter l'ADN en plusieurs petits fragments

2. Ajout de **barre-code** → identification des patients

3. Ajout des adaptateurs →permet d'avoir une séquence connue :

5' → P1 3' → A

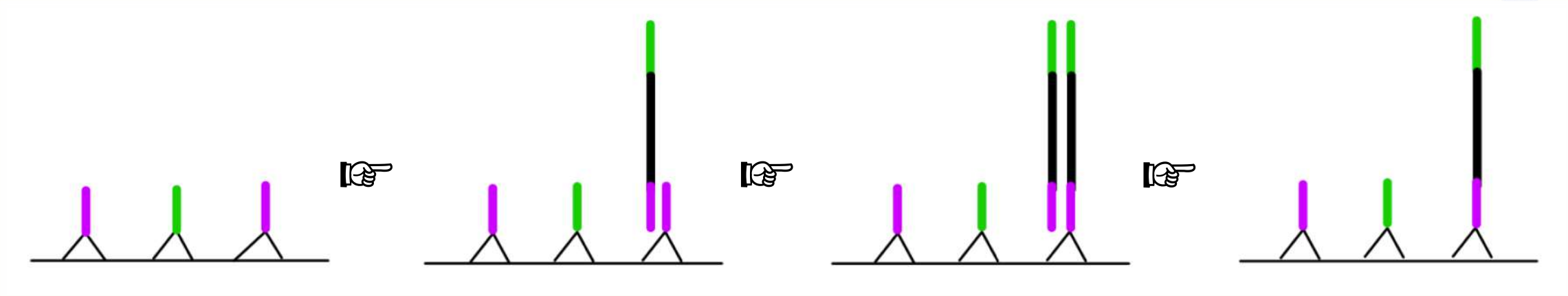
Toi qui cherche ton cerveau que
t'as perdu depuis longtemps

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

III - ILLUMINA

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

++ Réaliser sur <u>lame de verre</u> ou <u>FlowCell</u> ++



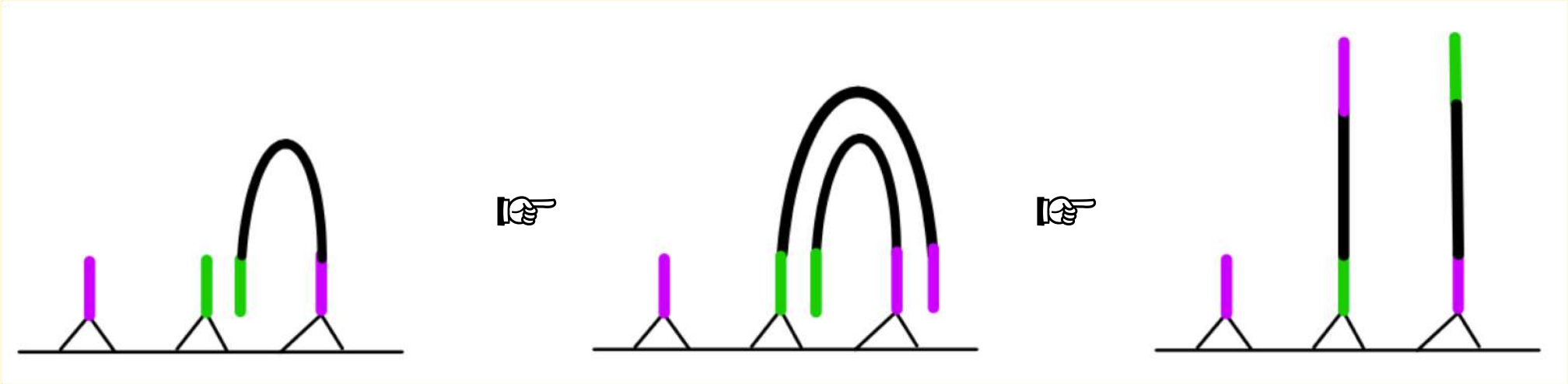
Oligonucléotides 5'
Oligonucléotides 3'
Lame

1- Ajout des fragments d'ADN qui viennent se fixer par complémentarité

2- Elongation

3- Lavage + dénaturation
↳ le 1er fragment part mais celui qui vient d'être synthétisé reste car il est accroché

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



4- Formation de pont

5- Elongation

6- Dénaturation et lavage

7 - Répétition

8 - Formation d'un cluster = grand nb de brins

9 - On clive les brins reverse pour ne garder que les brins sens = même séquence que l'ADN original

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

Séquençage :

- Directement réalisé sur la lame
- **Lecture par FLUORESCENCE émise par DNTPs**

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

IV - ThermoFisher

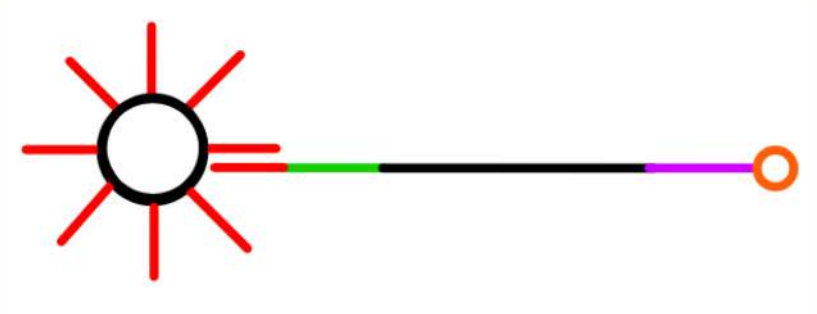
Le Tutorat niçois est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

++ Réalisé dans un micro réacteur créé par un système d'émulsion contenant une sphère métallique ++

2 types de primers :

1 2 3

4 5



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

- PCR Clonale → 1 sphère = même fragment ADN
- Dénaturation

<u>Séquençage (en gros) :</u>

- Liaison phosphodiester → envoie un H+ → **modification du pH**
- On envoie 1 à 1 un type de DNTPs
- Si changement de pH → automate retranscrit le DNTPs en question

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

+++ IMPORTANT A RETENIR +++

PCR :

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

Séquençage :

- **Illumina → Fluorescence**
- **ThermoFisher → Variation de pH**

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

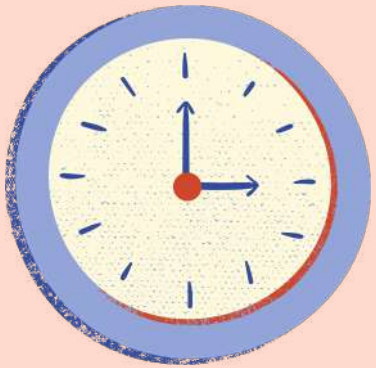
V - Analyse bio-informatique

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

- Partie très importante

- Plusieurs étapes :
  - ❖ Contrôle qualité
  - ❖ Reconstitution des séquences
  - ❖ Analyse si la séquence est correcte
  - ❖ Annotation sur les variants
  - ❖ **INTERPRETATION ++**

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



QCM TIME

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

QCM 1 : A propos de la NGS, indiquez la ou les bonne(s) réponse(s) :

A) Les barres-codes servent à reconnaître les patients
B) Pour la PCR Clonale, Illumina utilise des plaques en verre
C) Pour le séquençage, ThermoFisher utilise la fluorescence
D) L'analyse bio-informatique c'est pas une partie vraiment très importante quoi
E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

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

Réponses

QCM 1 : AB

A) Vrai
B) Vrai
C) Faux : ThermoFisher : variation de pH
D) Faux : Évidemment
E) Faux

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

QCM 2 : A propos de Illumina, indiquez la ou les bonne(s) réponse(s) :

A) La plaque de verre se nomme également FlowCell
B) Au moment du lavage et de la dénaturation, le 1er fragment d'ADN ajouté reste accroché à la plaque
C) A la fin de la PCR clonale, on clive tous les brins reverse
D) Les primers d'oligonucléotides A possèdent à leur extrémité de la biotine
E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

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

Réponses

QCM 2 : AC

A) Vrai
B) Faux : justement il part, c'est le brin qui vient d'être synthétisé qui reste
C) Vrai
D) Faux : Vrai mais c'est pour ThermoFisher (attention aux énoncés +)
E) Faux

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

CLAP DE FIN POUR LA GÉNÉTIQUE

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