

Séquençage
Haut Débit :
NGS



« Anything's possible if you've got enough nerve » (Harry potter et l'ordre du pheonix)

Généthilde

Sommaire :

- I) Les étapes du NGS
- II) Préparation des échantillons
- III) Méthode Illumina
- IV) Méthode Thermofisher
- V) Analyse informatique

En quelques mots, le NGS permet de séquencer un très grand nombre de gènes en même temps. On parle de séquençage massif ! Aujourd'hui, deux plateformes sont utilisées pour le NGS, Illumina et ThermoFisher

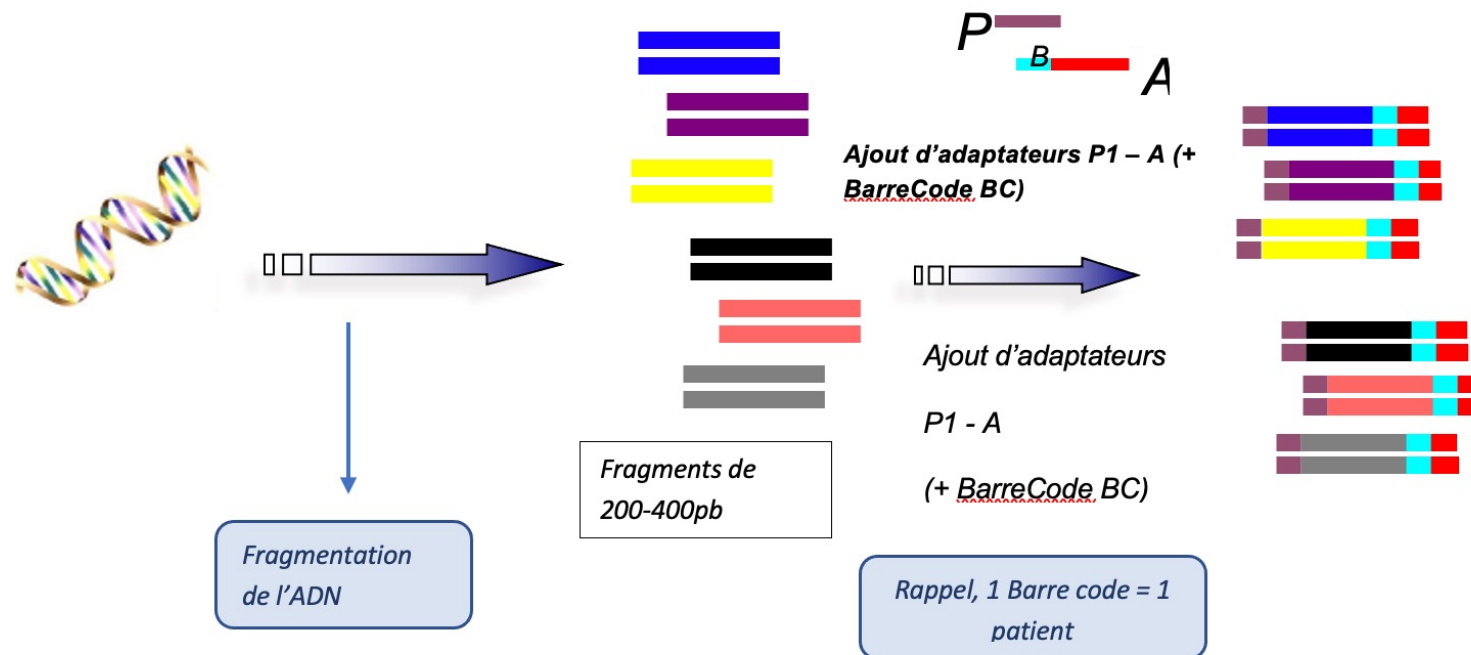
I) Les étapes du NGS

Le NGS se déroule en 4 étapes :

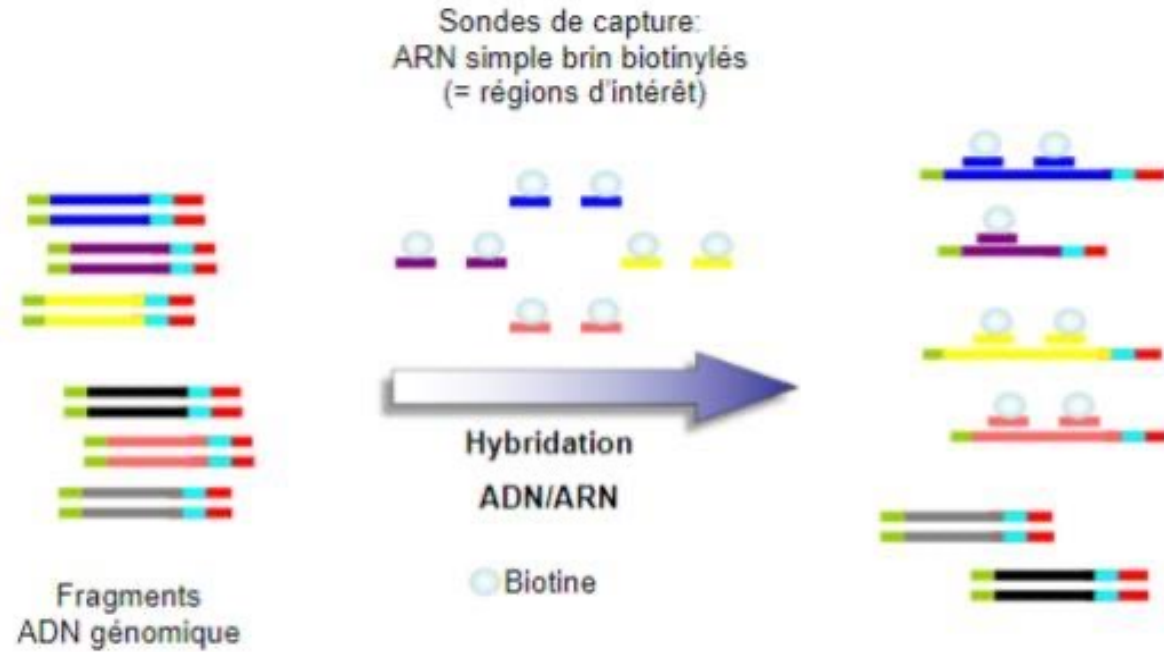
- préparation des fragments d'ADN
- enrichissement par PCR clonale
- Séquençage individuel des fragments avec des technologies différentes
- Analyse informatique

II) Préparation des échantillons

- Il faut dans un premier temps une coupure aléatoire de l'ADN afin d'obtenir des fragments de 200-400 pb
- Mise en place des adaptateurs P1 en 5' , A en 3' et les barres codes entre l'adaptateur A et l'ADN pour reconnaître le patient.

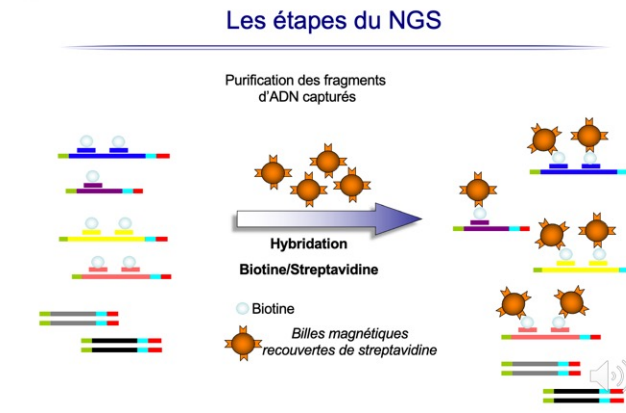


- Capture des séquences d'intérêts

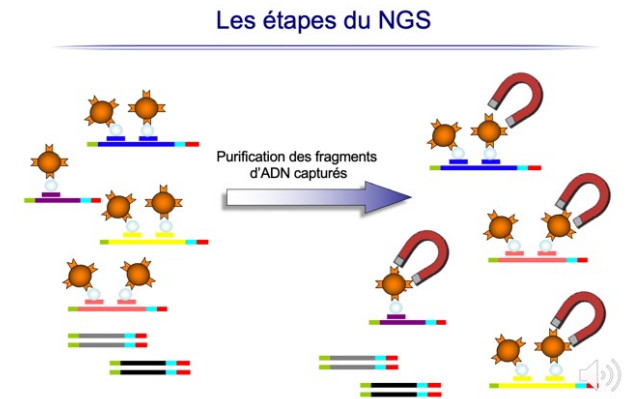


- Purification du mélange pour ne récupérer que les fragments d'intérêt. Pour cela il y a 3 étapes :

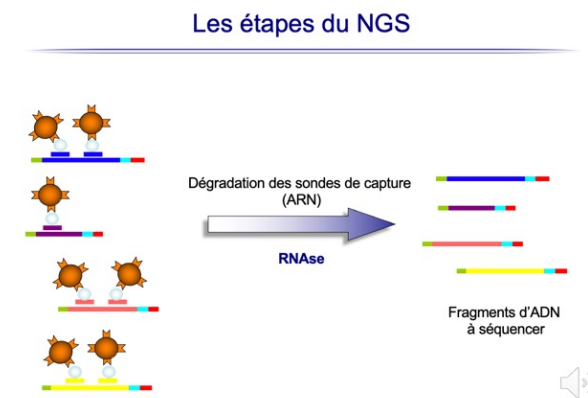
→ Ajout de billes magnétiques



→ Utilisation d'un aimant pour la récupération

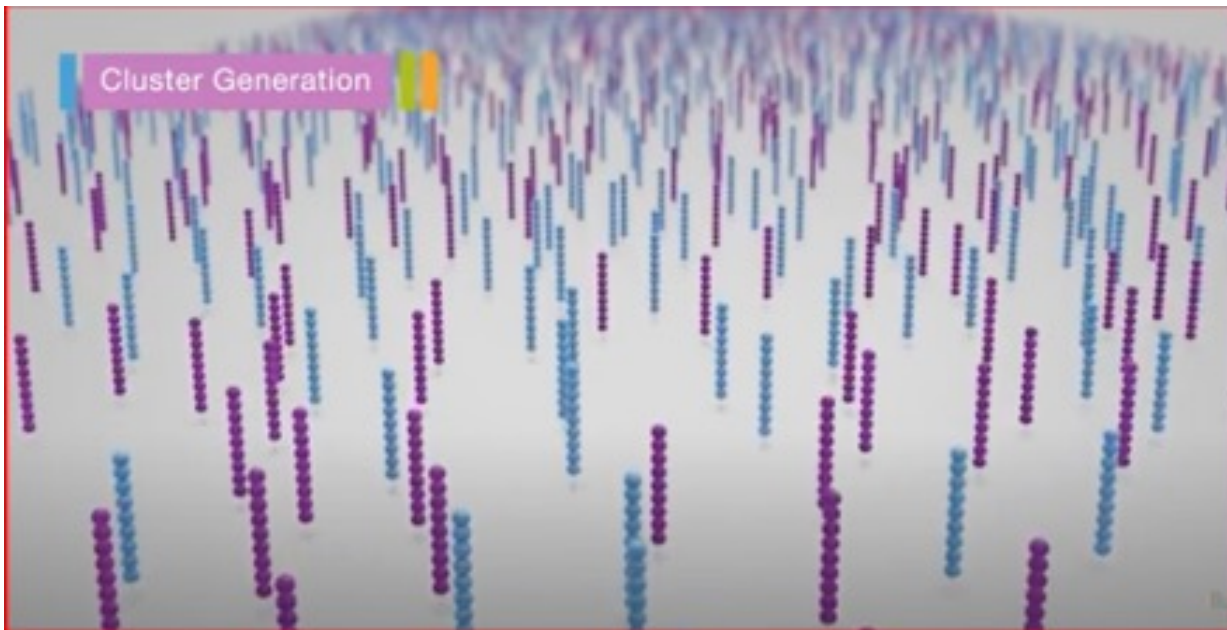


→ Dégradation des sondes de capture



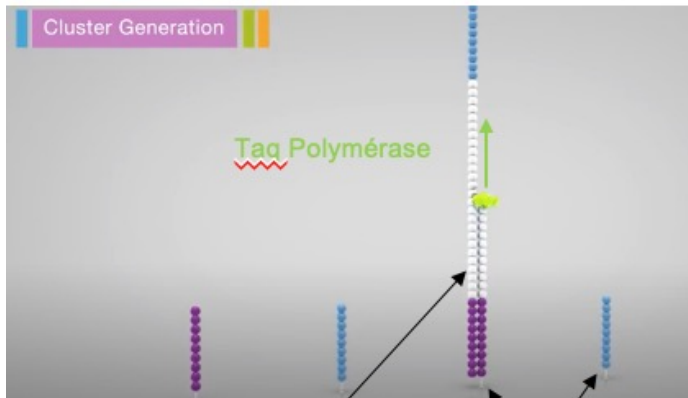
III) Méthode Illumina

Pour cette méthode on utilise une lame de verre sur laquelle est fixé des oligonucléotides complémentaires des adaptateurs

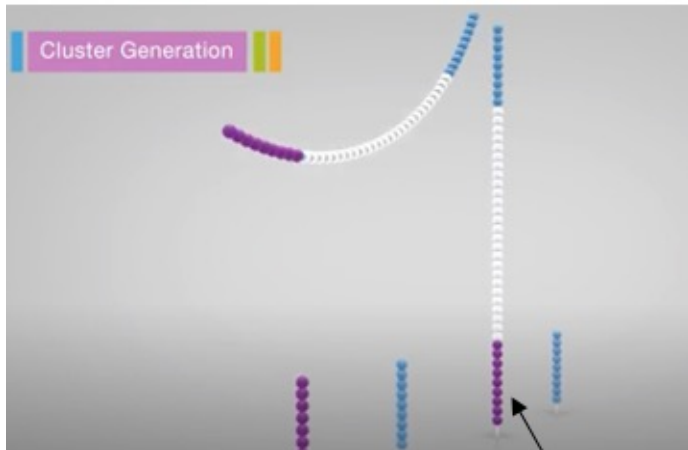


Après ajout des fragments d'ADN sur la lame, plusieurs étapes vont être répétées à la suite :

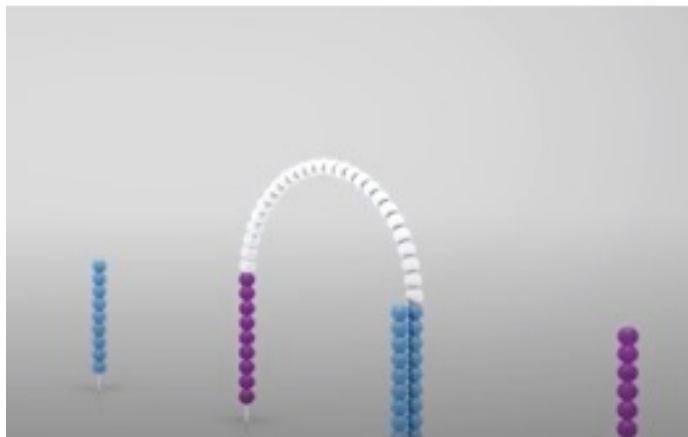
- 1) Amplification par PCR
- 2) Dénaturation et lavage
- 3) Formation d'un pont
- 4) PCR « Bridge » en cluster
- 5) Dénaturation et lavage



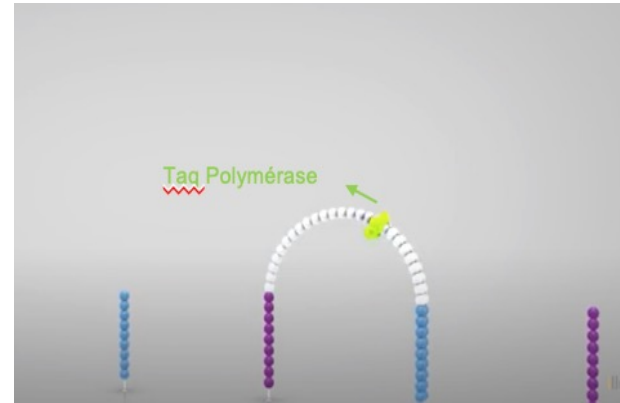
1)



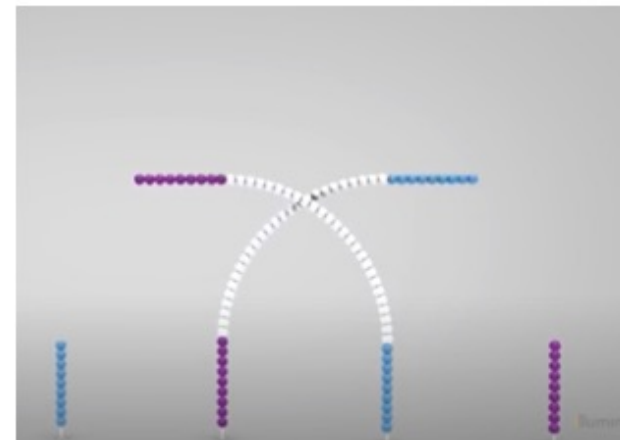
2)



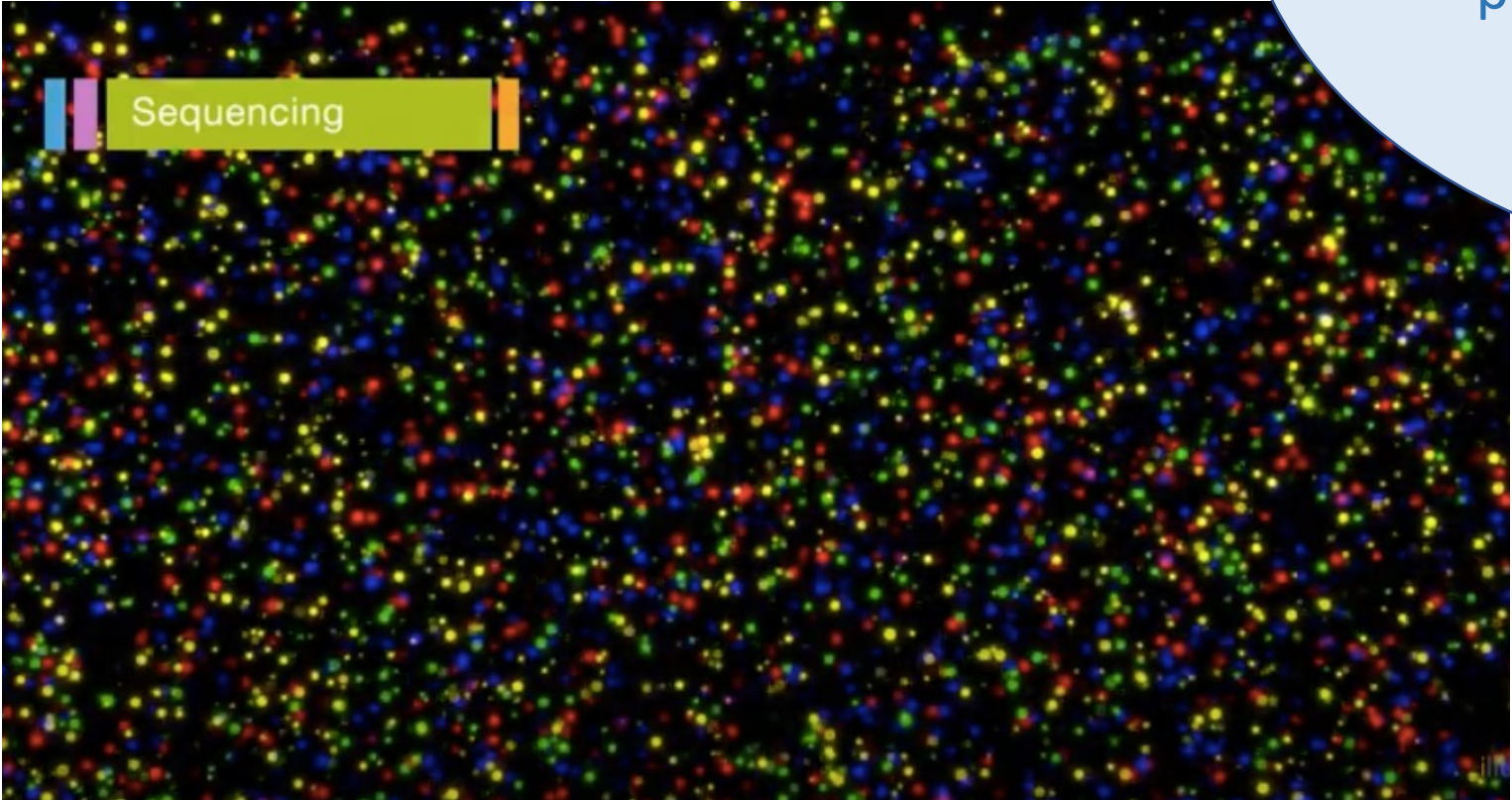
3)



4)



5)



Sequencing

The image shows a slide titled 'Sequencing' with a background of a dense, multi-colored dot matrix. The dots are in various colors including red, green, blue, yellow, and purple, representing different nucleotide bases. A light blue speech bubble is overlaid on the right side of the slide, containing text in French. The word 'Sequencing' is written in white on a green rectangular background in the top left corner of the slide.

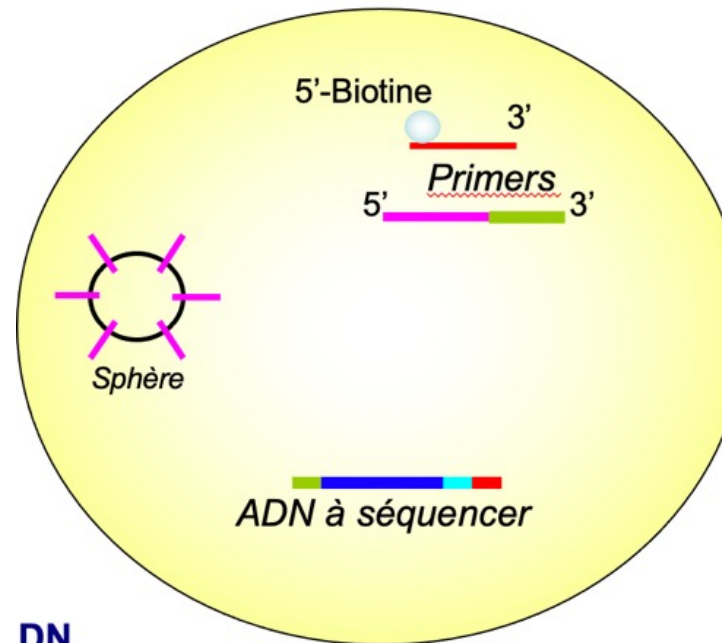
Une fois que les PCR en clusters sont effectués , il faut séquencer ! C'est avec l'analyse de la fluorescence des ddNTP par un automate qu'on pourra déterminer la séquence !!

IV) Méthode Thermofisher

Pour cette méthode on fait un mélange dans un microréacteur composé de:

- 1 sphère avec un primer
- 1 fragment d'ADN à purifier
- le milieu réactionnel de la PCR (primers, ADN polymérase, dNTP et

tampon)

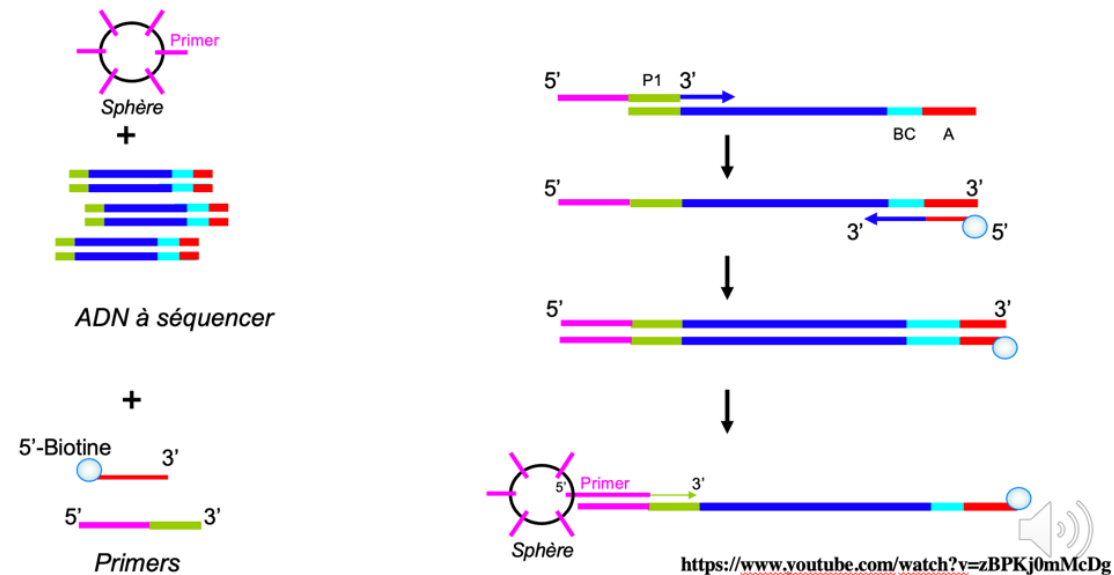


→ Dans un premier temps il faut amplifier les fragments d'ADN sur les sphères métalliques :

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ion torrent
0 * Δ O X □ + ≈

2- Amplification clonale par PCR en émulsion:

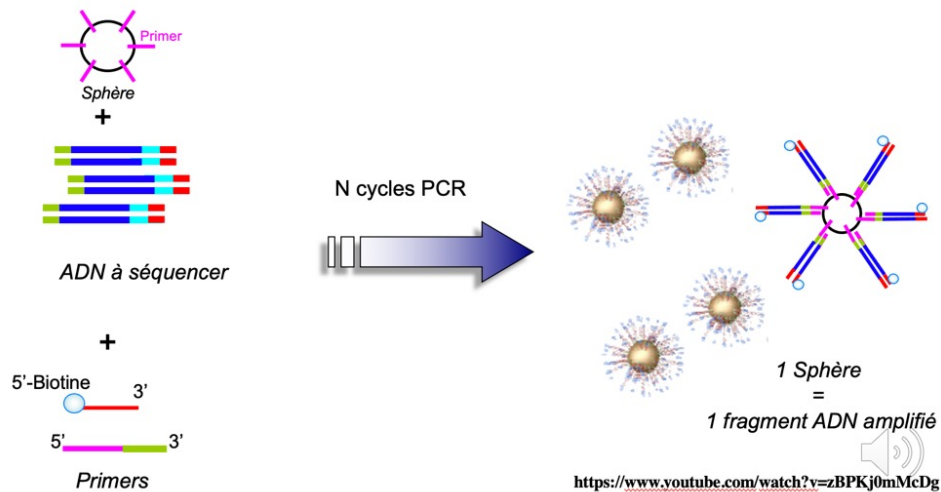


→ Ensuite on récupère les sphères avec les fragments d'intérêts

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ion torrent
△ * △ ○ × □ + ∞

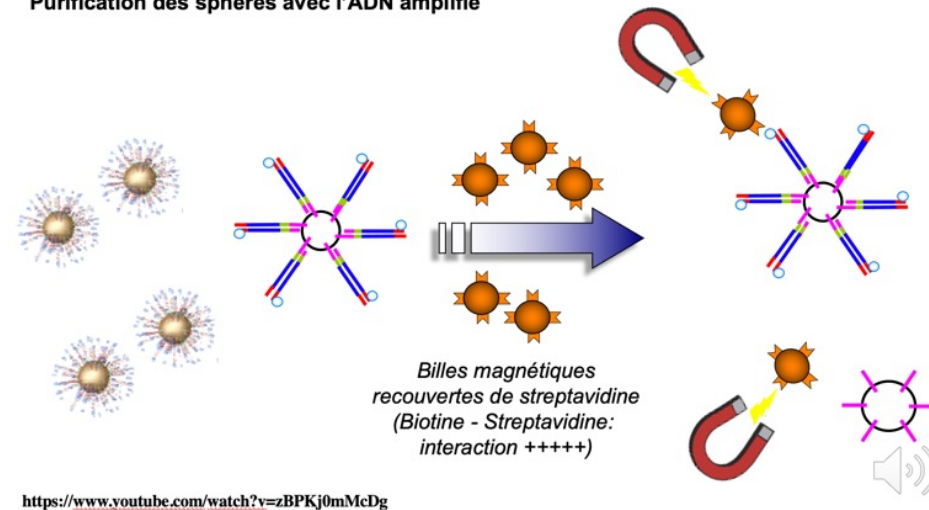
2- Amplification clonale par PCR en émulsion:



ThermoFisher
SCIENTIFIC

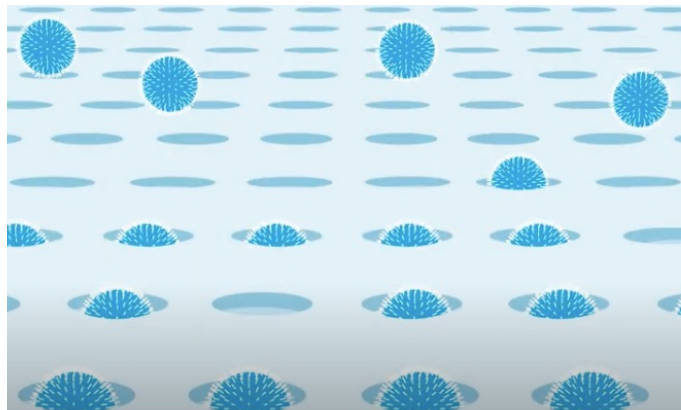
ion torrent
△ * △ ○ × □ + ∞

Purification des sphères avec l'ADN amplifié





Comme pour la méthode illumina, une fois que les fragments sont prêts il faut les séquencer. Par contre , ici ce n'est pas la fluorescence qui va le permettre mais la libération d'ions H^+ qui changent le pH.

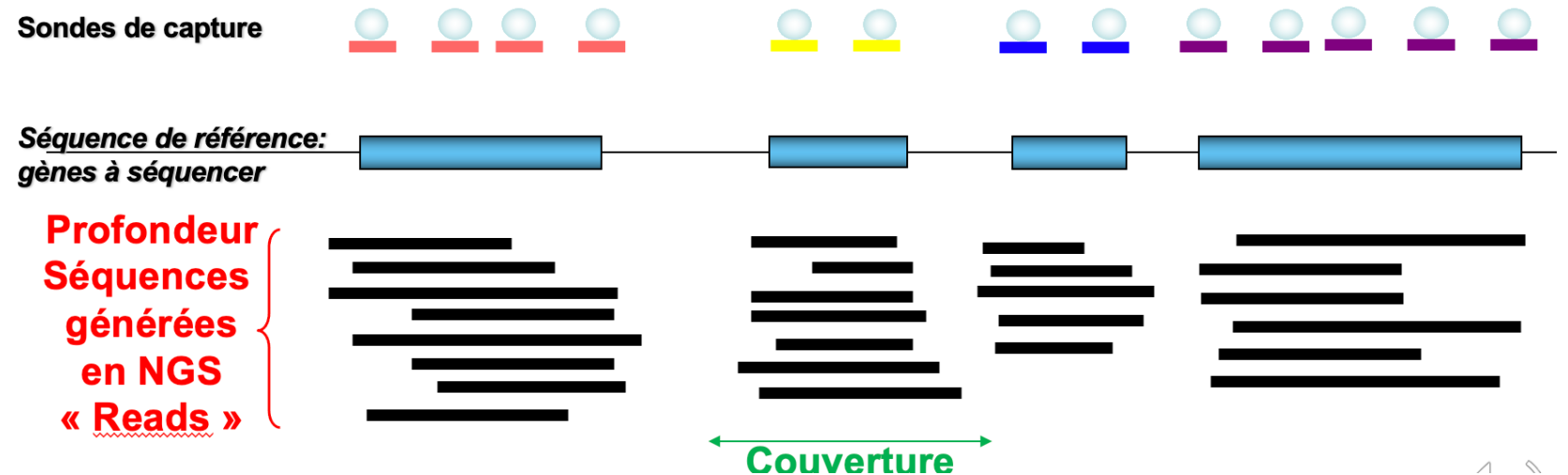


Contient :

- une amorce
- un ADN polymérase
- des dNTP

V) Analyse informatique

- Détermination des bases ou base calling
- Etape de contrôle de la qualité
- Alignement
- Analyse
- Annotation des variants
- Interprétation



QCM Time !!!!!



Toi impatient de répondre par ce que
t'as tout compris !!!!!

QCM 1- Quelle(s) est (sont) la(les) proposition(s) exacte(s) concernant la technique de séquençage haut débit (NGS) ?

A- Cette technique permet de séquencer un très grand nombre de gènes ;

B- L'analyse des données brutes de séquençage haut débit nécessite l'utilisation d'outils bio-informatiques puissants ;

C- Les séquences générées sont alignées sur une séquence de référence ;

D- Cette technique devrait être remplacée dans les prochaines années par le séquençage par la technique de Sanger ;

E- Les propositions A, B, C et D sont inexactes

QCM 1- Quelle(s) est (sont) la(les) proposition(s) exacte(s) concernant la technique de séquençage haut débit (NGS) ?

A- Cette technique permet de séquencer un très grand nombre de gènes ;

- Vrai ! (c'est le but !!)

B- L'analyse des données brutes de séquençage haut débit nécessite l'utilisation d'outils bio-informatiques puissants ;

- Vrai !

C- Les séquences générées sont alignées sur une séquence de référence ;

- Vrai ! C'est pour faire la comparaison !

D- Cette technique devrait être remplacée dans les prochaines années par le séquençage par la technique de Sanger ;

- Faux !!!! La technique de Sanger est arrivée avant !!

E- Les propositions A, B, C et D sont inexactes

- Faux

QCM 2 – Le séquençage haut débit (NGS) nécessite une étape importante d'analyse informatique. Concernant la chronologie des principales étapes de cette analyse informatique, indiquer la (ou les) réponse(s) exacte(s).

A- L'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, la détermination des bases, le contrôle qualité des lectures de séquences, l'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture

B- L'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture, le contrôle qualité des lectures de séquences, l'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, la détermination des bases

C- L'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture, l'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, le contrôle qualité des lectures de séquences, la détermination des bases

D- La détermination des bases, le contrôle qualité des lectures de séquences, l'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, L'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture

E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

QCM 2 – Le séquençage haut débit (NGS) nécessite une étape importante d'analyse informatique. Concernant la chronologie des principales étapes de cette analyse informatique, indiquer la (ou les) réponse(s) exacte(s).

A- L'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, la détermination des bases, la contrôle qualité des lectures de séquences, l'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture

- Faux

B- L'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture, le contrôle qualité des lectures de séquences, l'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, la détermination des bases

- Faux

C- L'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture, l'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, le contrôle qualité des lectures de séquences, la détermination des bases

- Faux

D- La détermination des bases, le contrôle qualité des lectures de séquences, l'alignement des séquences générées sur la séquence de référence, L'analyse de la profondeur et de la couverture de lecture

- Vrai !! C'est du cours !!

E- Les propositions A, B, C et D sont fausses

-Faux

Fin !!!!!!!



Les P1 trop contents d'avoir
compris !!!