

# UE11 - Analyse du génome



## Résumé de la Ronéo 3

Méthode de Sanger, puis séquenceur automatique et maintenant **séquençage haut débit** (*reste à confirmer par un Sanger*).

NGS = séquençage massif en parallèle de molécules d'ADN individuellement séparées et amplifiées sous forme de clone ou de molécule unique.

→ Il y a différentes sociétés, on s'intéresse à *Life Technologies*.

Les différentes étapes sont : extraction de l'ADN (ou produit PCR) / fragmentation / ajout d'adaptateurs + barre codes / **amplification PCR clonale avec fixation des fragments sur des sphères** / **séparation par PCR en émulsion**.

### I. Préparation des échantillons

- **Fragmentation de l'ADN** (des endonucléases coupent l'ADN **SANS** spécificité en morceaux de 200-400 pb, **PAS** des enzymes de restriction).
- **Ajout d'adaptateurs** (pour les extrémités 5' et 3' soient les mêmes pour **TOUS** les fragments. Du coup on aura besoin que d'un seul couple de primers pour l'amplification PCR) **et de barre-codes** (spécifiques d'un seul patient).
- **Ajout de ligases** (lier les BC et les adaptateurs), et d'une **ADN polymérase**.
- Isolement des régions exoniques d'intérêt : on **ajoute des sondes de captures** (=ARN simple brin **biotinylé**). Il y a **hybridation** entre ARN / ADN d'intérêt.
- Purification des fragments d'ADN capturés : **on ajoute des billes magnétiques recouvertes de streptavidine** (affinité ++ avec la biotine). Elles accrochent l'ADN où l'ARN s'est fixé !  
*Nb : les tubes sont placés dans un aimant.*
- **Dégradation des sondes de capture** grâce à une RNase.

### II. Amplification clonale par PCR en émulsion

L'ADN à séquencer est capturé par une sphère grâce à une émulsion. On a besoin :

**1 gouttelette (= 1 microréacteur) ⇔ 1 fragment d'ADN**

1 microréacteur contient :

- ✓ 1 sphère où sont fixés des primers
- ✓ ADN polymérase
- ✓ Des dNTP
- ✓ 2 primers dont 1 biotinylé
- ✓ Un tampon

Pour amplifier l'ADN :

- **Dénaturation** *via chaleur* de l'ADN double brin ;
  - **Hybridation de l'amorce P1** en 3' du brin d'ADN ;
  - **Synthèse** de 5' en 3' du 1<sup>er</sup> brin complémentaire *par l'ADN polymérase* ;
  - **Hybridation de l'amorce biotinylée** en 3' du **nouveau brin synthétisé** ;
  - **Synthèse du brin complémentaire** du brin nouvellement synthétisé (*la biotine est donc en 5'*).
- ☞ l'hybridation avec le primer de la sphère est possible avec ce brin !

### III. Purification des sphères avec l'ADN amplifié

On se sert de l'**interaction streptavidine/ biotine** : les sphères sont fixées à des billes magnétiques recouvertes de **streptavidine**. On place les tubes dans un aimant et on élimine toutes les fragments qui ne se sont pas attirés.

### IV. Séquençage individuel des sphères

#### 1) Séquençage :

On utilise une **puce** avec un support où il y a un grand nombre de **puits** dans lesquels on place les fragments d'ADN : **1 puit ⇔ 1 sphère**.

- On utilise 1 amorce ; 1 ADN polymérase ; et des dNTP.

- On injecte les dNTP les 1 après les autres dans la machine. ☞ S'il y a complémentarité : l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire et libère un H<sup>+</sup> ce qui va créer une **variation de pH** détectée par la machine.

#### 2) Analyse informatique :

L'ordinateur trie et réaligne les séquences sur la séquence de référence.

### V. Diagnostic prénatal

☞ **DPN** : **invasif** (amniocentèse) avec risque important de fausse couche. Sert à réaliser un **caryotype**.

☞ **DPNI** : **non invasif** (prise de sang). On utilise un **NGS** pour faire une analyse **QUANTITATIVE**. Sert au diagnostic des trisomies 13, 18 et 21.