

NGS

1-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, s'oppose au DPN=amniocentèse suivi d'un **caryotype**, qui présente un risque de fausse couche).

+++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.

+++Une suspicion de trisomie détectée par DPNI doit toujours être confirmé 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 (3 milliard de

paires de bases, 30 000 gènes, 1 à 2 % du génome codant = exons seulement)

2-Les différentes étapes :

Les premières étapes sont communes à tous les NGS :

- on utilise un ADN génomique prélevé ou amplifié par PCR.
- 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!++)** combleront l'extrémité en un bord franc pour ajouter l'adaptateur facilement.*

+++Puis, pour tous les NGS on ajoute des adaptateurs et des barres codes :

- 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 ajoutées 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.

NGS

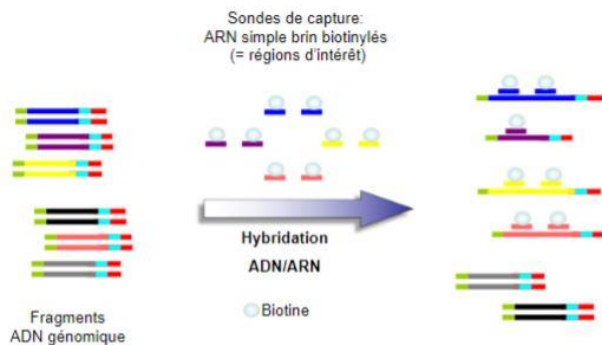
La 3^{ème} étape est différente selon les NGS :

+++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).

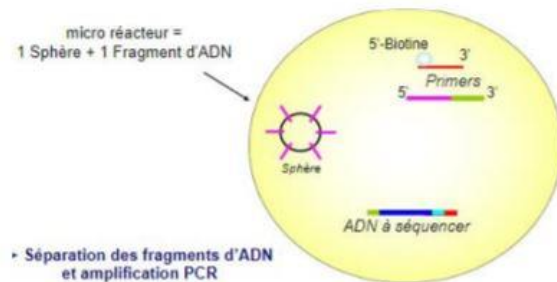
On observe une **hybridation ADN/ARN** des régions d'intérêt.

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)

++Le NGS permet l'amplification et le séquençage 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.

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
- une ADN polymérase+dntps+tampon.
- des **primers libres** +++

++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)**

NGS

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
→ 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++

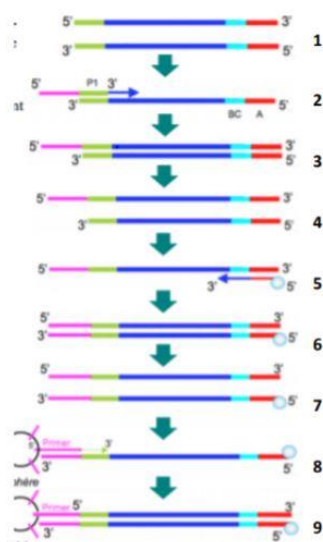
5-Le séquençage :

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

Dans cet 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 séquencé.

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.**

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+++

+++La PCR en émulsion et la détection des variations de Ph sont spécifiques des NGS de ION torrent alors que les premières étapes sont communes à tous les NGS+++

6-L'analyse Informatique :

+++Etape fondamentale pour déterminer la **séquence** à partir des variations de Ph détectées, éliminer les séquences de trop mauvaise **qualité**, réaliser un **alignement** des séquences, analyse de la **profondeur** 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 séquencé 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 séquencé. (Est-ce que j'ai des trous où je ne peux replacer aucun fragment ?)

Le NGS est donc très puissant ! Il est utile dans les maladies multigénique ou mal connue pour la recherche d'un nouveau variant nucléotidique=d'une nouvelle mutation dont on ne connaît pas les conséquences.

Fin !