Hôpitaux Universitaires Est Parisien
Saint-Antoine • Rothschild
Trousseau La Roche-Guyon • Tenon

Pôle de Biologie Médicale et Pathologie
(Dr M. VAUBOURDOLLE)

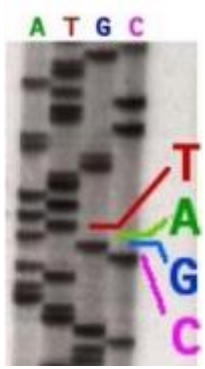
Département de Génétique Médicale (Pr J.P. SIFFROI)
UF de Génétique Moléculaire (Pr S. AMSELEM)
Site Trousseau

Utilisation du séquençage nouvelle génération pour le diagnostic des maladies rares

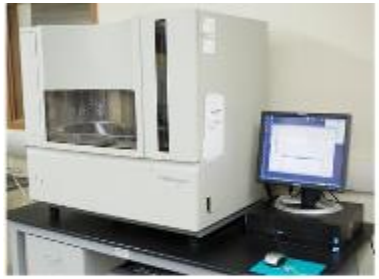
Florence Dastot – Le Moal

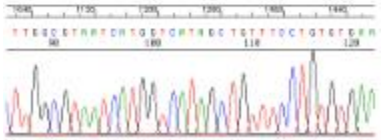
le Séquençage Nouvelle Génération ou NGS

1977
Séquençage Sanger

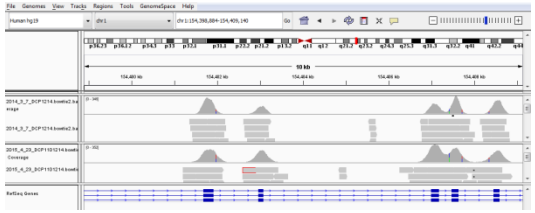


1995
Séquençage par électrophorèse capillaire





2005
Séquençage de nouvelle génération

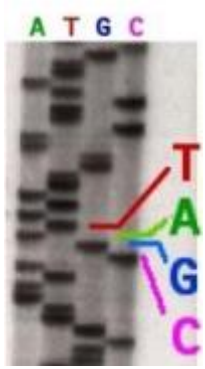


nombre d'échantillons
longueur des séquences lues

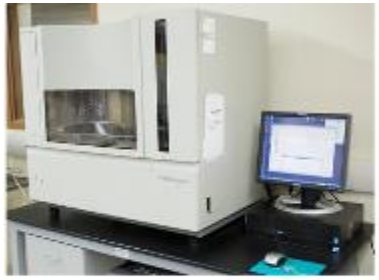
temps

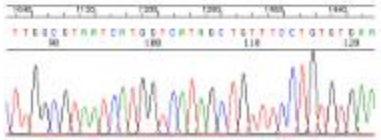
le Séquençage Nouvelle Génération ou NGS

1977
Séquençage Sanger

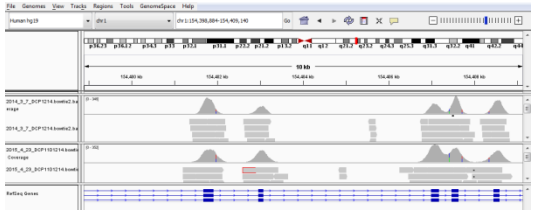


1995
Séquençage par électrophorèse capillaire

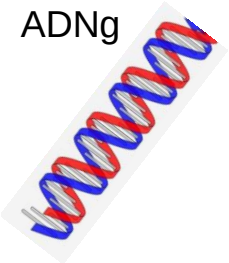




2005
Séquençage de nouvelle génération



ADNg

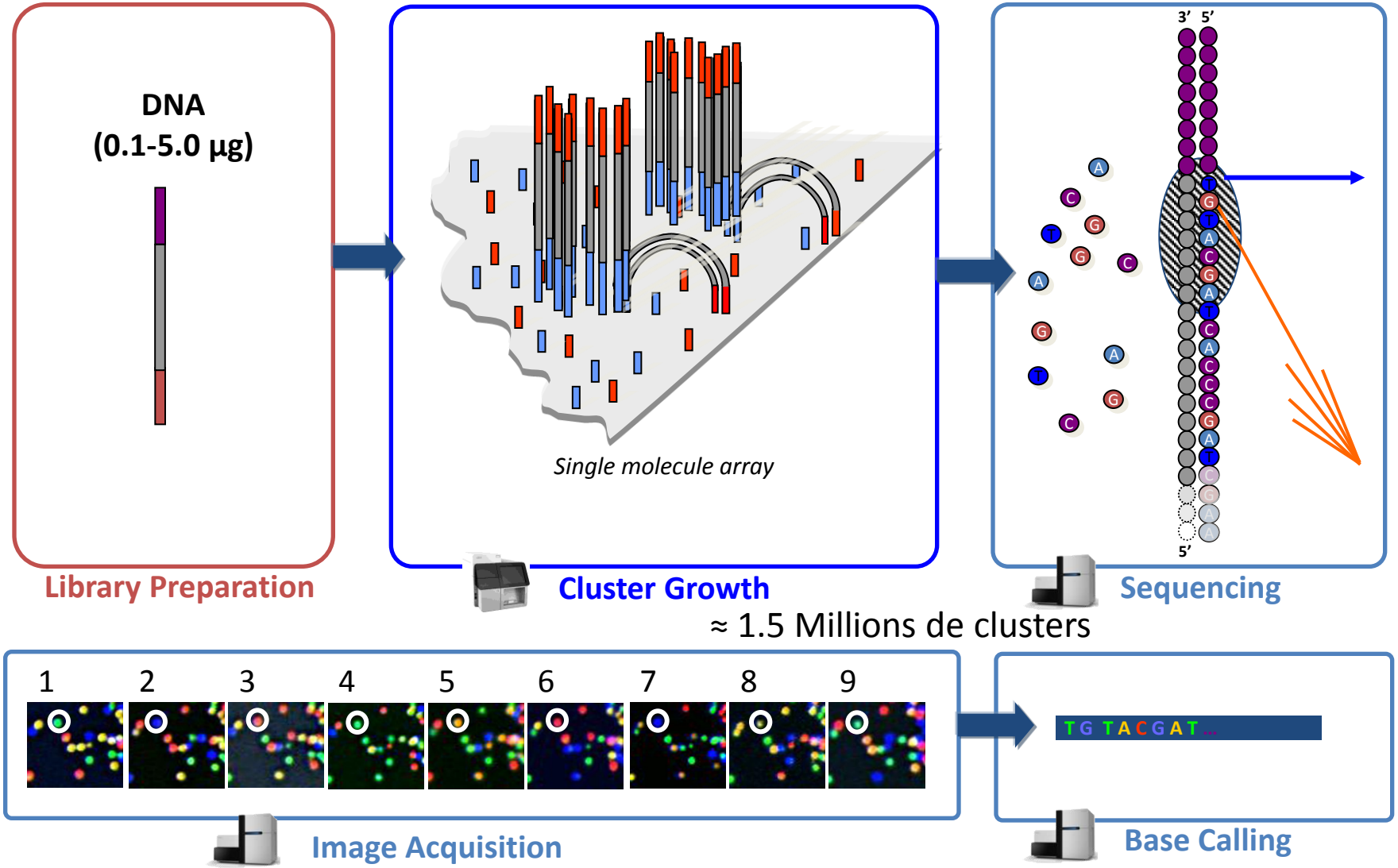


Librairie → Amplification → Séquençage → Analyse de données

Whole génome Exome Panel ciblé

Technique de séquençage Illumina

Illumina Sequencing Technology Overview



Pourquoi le NGS ?

- Nombreux gènes
- Gènes de grande taille avec de nombreux exons (>80)
- Gènes avec forte homologie de séquence
- Evolution au cours du temps du nombre de gènes à séquencer
- Recherche de délétions/duplications potentielles

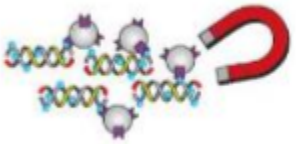
Préparation des librairies

Différentes stratégies

Nombreux kits commerciaux

Capture

Amplicon



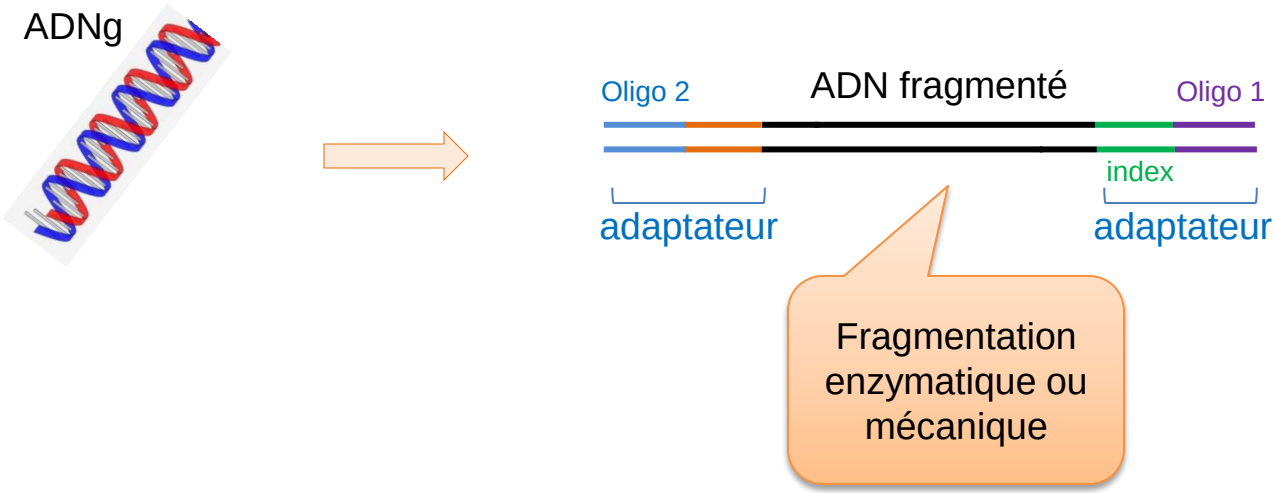
Hybridation de l'ADN à des sondes couvrant les régions d'intérêt

Amplification des régions d'intérêt par PCR

Préparation de librairies

Capture

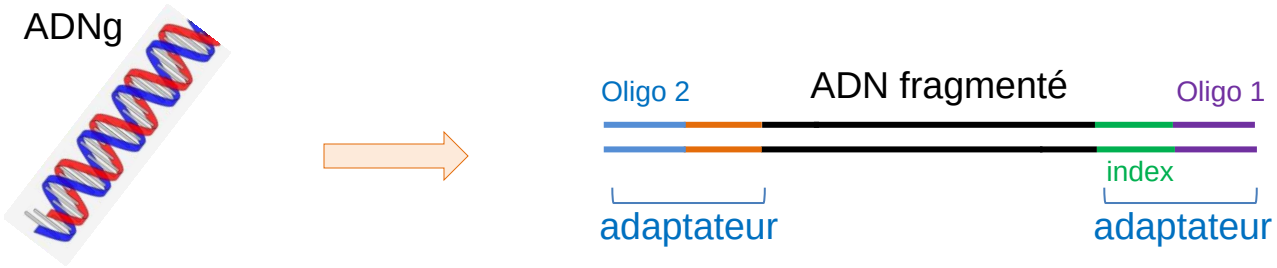
1) Fragmentation de l'ADN génomique et ligation des adaptateurs



Préparation de librairies

Capture

1) Fragmentation de l'ADN génomique et ligation des adaptateurs



2) Hybridation en solution avec des sondes complémentaires biotinylées (20-72h)

3) Lavage et récupération des hybrides avec des billes magnétiques

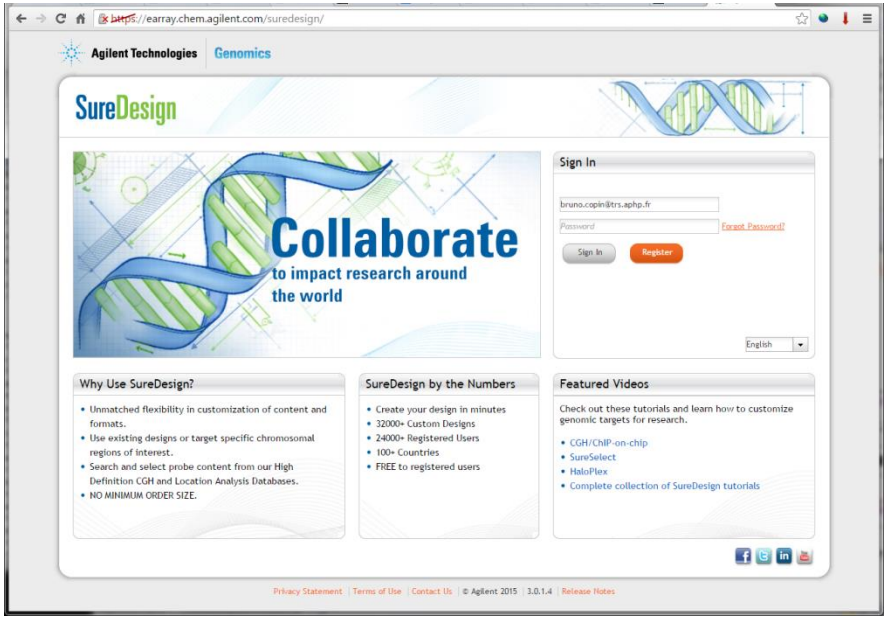
Préparation du design pour la capture

Besoin d'un fichier (BED) indiquant les positions des régions chromosomiques à capturer en fonction de la référence choisie (Build)

Régions plus difficiles à capturer :

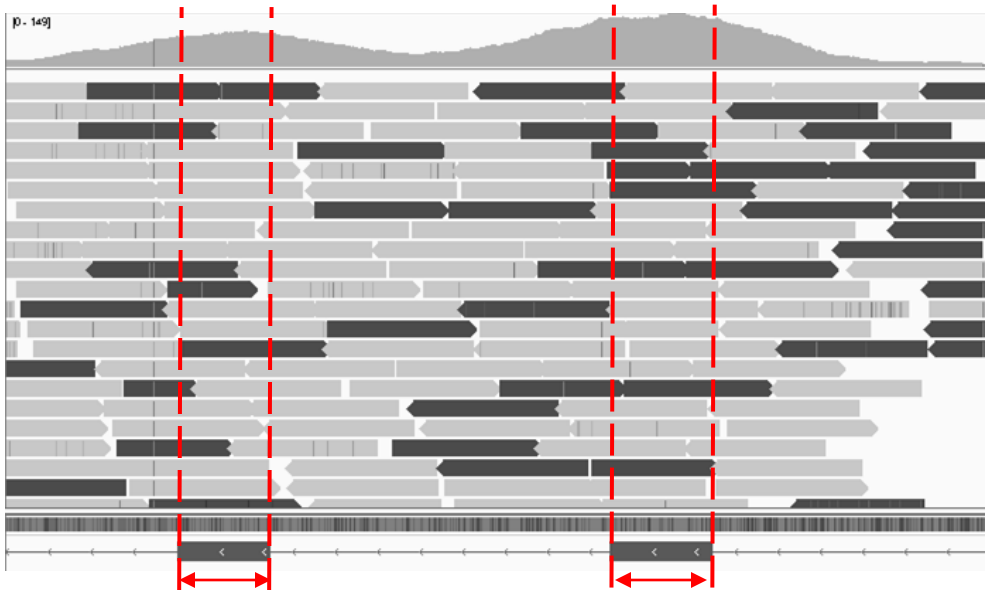
- régions riches en GC
- régions fortement homologues
- régions UTR

Exemple : Outil en ligne d'Agilent https://earray.chem.agilent.com/suredesign/



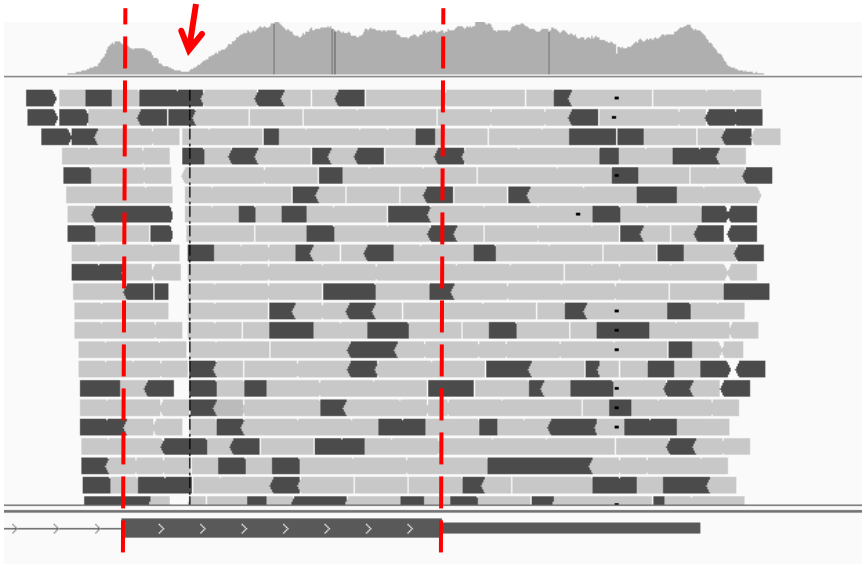
Validation de la capture

Vérification de la couverture des régions d'intérêts



Profondeur > 50X

région mal capturée



Matériel disponible au laboratoire

fragmentation

Biorupteur
(Diagenode)

Contrôles qualité

QuBit
(Invitrogen)

TapeStation 4200
(Agilent)

séquençage

MiSeq
(Illumina)

NextSeq
(Illumina)

Capacités de séquençage

MiSeq (Illumina)

	MiSeq Reagent Kit v2				MiSeq Reagent Kit v3	
Read Length	1 × 36 bp	2 × 25 bp	2 × 150 bp	2 × 250 bp	2 × 75 bp	2 × 300 bp
Total Time*	~4 hrs	~5.5 hrs	~24 hrs	~39 hrs	~21 hrs	~56 hrs
Output	540–610 Mb	750–850 Mb	4.5–5.1 Gb	7.5–8.5 Gb	3.3–3.8 Gb	13.2–15 Gb

	MiSeq Reagent Kit v2 Micro	MiSeq Reagent Kit v2 Nano	
Read Length	2 × 150 bp	2 × 250 bp	2 × 150 bp
Total Time*	~19 hrs	~28 hrs	~17 hrs
Output	1.2 Gb	500 Mb	300 Mb

NextSeq (Illumina)

NextSeq 550 System High-Output Kit*			NextSeq 550 System Mid-Output Kit*		
Read Length	**Total Time†**	**Output**	**Read Length**	**Total Time†**	**Output**
2 × 150 bp	29 hrs	100–120 Gb	2 × 150 bp	26 hrs	32.5–39 Gb
2 × 75 bp	18 hrs	50–60 Gb	2 × 75 bp	15 hrs	16.25–19.5 Gb
1 × 75 bp	11 hrs	25–30 Gb			

Automatisation du process

Investissement matériel nécessaire :

- blocs chauffants
- barreaux aimantés
- bras pour déplacer les plaques

⇨ Gain de temps

⇨ Préparation d'un plus grand nombre d'échantillons en simultané

⇨ Pénibilité diminuée

⇨ Reproductibilité augmentée

Coût par échantillon

		Coût total	Coût/éch
Capture Roche	réactifs		52,4€
	capture	7056€	24,5€
Séquençage MiSeq/Illumina	Run V3-600	1155€	48,1€
QC	Purification (Billes)		1,3€
	Tapestation		7,9€
		TOTAL :	134,2€