

UE 1B :
Biomolécules, génome, bioénergétique,
métabolisme

ACTUALISATION
Fiche de cours n°24

Approches pan-génomiques

- ★ Notion tombée 1 fois au concours
- ★★ Notion tombée 2 fois au concours
- ★★★ Notion tombée 3 fois ou plus au concours

APPROCHES PAN-GENOMIQUES : TECHNIQUES GLOBALES	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Etudier de nombreux gènes sur 1 patient▪ Etudier de nombreux patients sur un petit nombre de gènes <p>Vue d'ensemble de la cellule à un moment t :</p> <ul style="list-style-type: none">○ des gènes○ des ARN○ des protéines <p>Cela peut constituer un état de référence, auquel on peut ajouter des états complémentaires</p> <p>Ce sont des techniques de recherche et de développement</p> <p>Lors des essais cliniques : profilage tumoral pour mieux cibler la thérapie</p>

POURQUOI UTILISER LES TECHNIQUES GLOBALES OU LARGES RAISONS DIAGNOSTIQUES	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Etudier le maximum de gènes avec le minimum de matériel à tester afin d'avoir une vue d'ensemble d'un état génétique ☑○ Les pièces opératoires (biopsies) sont de moins en moins importantes pour limiter les séquelles opératoires○ Le nombre de cellules à étudier est toujours plus petit <ul style="list-style-type: none">▪ Analyses d'impératifs diagnostiques en premier lieu :<ul style="list-style-type: none">○ Anatomo-pathologie macroscopique et microscopique○ Immuno-marquages○ Histologie○ Biologie moléculaire de routine▪ Les techniques larges interviennent après l'ensemble de la chaîne diagnostique ☑▪ Elles sont plutôt réservées à des domaines de la recherche et du développement▪ Essai clinique de phase précoce :<ul style="list-style-type: none">○ Tout patient pouvant être inclus dans un essai clinique en cancérologie peut bénéficier d'un « profilage tumoral » afin de déterminer la meilleure cible thérapeutique

POURQUOI UTILISER LES TECHNIQUES GLOBALES OU LARGES RAISONS BIOLOGIQUES	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Il est impératif d'avoir des moyens de grande échelle d'étude et d'interprétation de ce réseau génétique ☑▪ Les changements phénotypiques, comme la fonction, la réponse au stimulus ou la réponse à l'environnement d'une cellule sont majoritairement reliés à des changements génotypiques comme l'expression des ARNm <ul style="list-style-type: none">▪ Les anomalies génétiques ne sont pas nécessairement clonales : toutes les cellules d'un même tissu ne présentent pas les mêmes variations génétiques acquises▪ Exemple des tumeurs solides :<ul style="list-style-type: none">○ Diversité mutationnelle propre à chaque cellule tumorale au sein d'une tumeur donnée ☑○ Etudes de cette diversité par des approches de génomique et de séquençage de nouvelle génération

POURQUOI UTILISER LES TECHNIQUES GLOBALES OU LARGES RAISONS STRATEGIQUES ET FINANCIERES	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Enjeu lié à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale▪ Résultats difficiles à comparer
	<ul style="list-style-type: none">▪ Plan France Médecine Génomique▪ Développement de plateformes d'analyse communes automatisées▪ Enrichies en personnel compétent

PRINCIPALES APPLICATIONS	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Découverte de nouveaux agents pathogènes au travers des régions nucléiques nécessaires à leur pouvoir pathogène :<ul style="list-style-type: none">○ Étude exhaustive du microbiome▪ Découverte de nouvelles sous-classes de pathologies = nosologie :<ul style="list-style-type: none">○ Définies par des critères moléculaires  et non plus uniquement sur l'anatomopathologie et les données biochimiques○ Non reconnues à l'heure actuelle par les facteurs cliniques○ cas des sous-types de cancer
	<ul style="list-style-type: none">▪ A des fins de recherche▪ Caractérisation de mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies▪ Études de modèles animaux : cas des PDX (<i>patient derived xenografts</i>) :<ul style="list-style-type: none">○ Greffé d'une tumeur d'un patient chez une souris immunodéficience○ Tests de thérapies ciblées sur modèles animaux construits à partir de la tumeur du patient
	<ul style="list-style-type: none">▪ Identification de marqueurs génétiques associés aux pathologies▪ Caractérisation de facteurs pronostics d'évolution et/ou prédictifs de réponse à un traitement<ul style="list-style-type: none">○ Facteurs pronostics : facteurs qui vont permettre de suspecter l'évolution de la maladie○ Facteurs prédictifs : informations qui vont permettre d'orienter la thérapeutique<ul style="list-style-type: none">— Développement de la théranostique : la connaissance du statut biologique du patient détermine la stratégie thérapeutique : traitement ciblé▪ Caractérisation de régions nucléiques critiques lors de thérapies cellulaires ou géniques
	<ul style="list-style-type: none">▪ Empreintes génétiques :<ul style="list-style-type: none">○ Enquêtes judiciaires○ Vie privée

DOMAINES D'APPLICATION TECHNOLOGIQUE DES TECHNIQUES GLOBALES	
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Le projet Génome humain</u> : séquençage à grande échelle <ul style="list-style-type: none"> ◦ Sur environ 200 000 individus aujourd’hui appartenant à plus de 50 ethnies : génome global de référence ◦ 3 milliards de paires de bases ◦ Rapport de similitude entre le nombre de gènes codant des protéines et le nombre de gènes codant des ARN régulateurs de l’expression ◦ Le coût diminue de plus en plus ◦ Evolution du nombre de séquences connues ces dernières années : <ul style="list-style-type: none"> — Transcrits : de plus en plus de conditions et tissus testés — Petits variants : de plus en plus connus — Variants structuraux : inversion / duplication : le nombre connu est assez stable. Très difficile à détecter par les analyses globales • <u>Mutations ponctuelles, changements nucléotidiques de petite taille</u> • <u>Délétion, amplification, altération du nombre de copies (CNA)</u> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Biopuces génomiques : CGH-array • <u>Séquençage de nouvelle génération NGS ou SNG</u> : <ul style="list-style-type: none"> ◦ Détection des mutations ponctuelles et des altérations du nombre de copies simultanément
	<ul style="list-style-type: none"> • Biopuces d’expression • Serial analysis of Gene expression • RNA-séq
	<ul style="list-style-type: none"> • Tissue micro-array • Biopuces de protéome

DOMAINES DE LA GENETIQUE	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anomalies génétiques retrouvées dans l’ensemble des cellules de l’organisme ▪ Anomalie constitutive de la personne ▪ Forcément héritée d’un parent : <ul style="list-style-type: none"> ◦ Parents porteurs de l’anomalie, sains ou malade ◦ Parents apparemment pas porteurs, mais gamètes porteurs : mosaïcisme germlinal ▪ Domaine des maladies rares ▪ Risque de transmission du défaut génétique
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anomalie jamais transmise : ne touche pas la lignée germinale ▪ Anomalie restreinte uniquement aux cellules malades : clone tumoral ▪ Exemple : cancer du sein

BIOPUCES	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Support solide sur lequel on hybridise un acide nucléique préalablement marqué par un fluorochrome
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biopuces à ADN <ul style="list-style-type: none"> ◦ Description de l’état du génome ◦ CGH = Hybridation Génomique comparative ▪ Biopuces à ARN <ul style="list-style-type: none"> ◦ Description de l’état de transcription : transcriptome

PRINCIPE DE L'HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE CGH-ARRAY

	<ul style="list-style-type: none">▪ Hybridation simultanée et compétitive de 2 ADN génomiques marqués  avec des fluorophores différents sur des sondes, appelées aussi spots, immobilisés sur une lame ▪ A chaque spot correspond une localisation chromosomique : locus, gène, exon▪ Rapport pour chaque spot des intensités des émissions de fluorescence entre les 2 fluorophores : permet d'obtenir la différence de copies des deux ADN co-hybridés
	<ul style="list-style-type: none">▪ Nombre de copie des gènes  = nombre d'allèles▪ Toute perte ou gain de matériel chromosomique : anomalies quantitatives▪ Ne permet pas de détecter les anomalies chromosomiques équilibrées 
	<ul style="list-style-type: none">▪ Relier un génotype à un phénotype
	<ul style="list-style-type: none">▪ Comparaison d'un ADN extrait d'un tissu pathologique avec un ADN de référence sur la même lame avec 2 fluorophores différents

METHODOLOGIE DE L'HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE CGH-ARRAY

	<ul style="list-style-type: none">▪ Le marquage s'effectue dans des tubes différents ▪ Par multiamorçage au hasard : amorces de séquence aléatoire avec des dNTP marqués▪ Par convention :<ul style="list-style-type: none">○ L'ADN de référence est marqué par fluorescence en vert  par un dCTP marqué par la cyanine 3 ○ L'ADN à étudier est marqué en rouge  par la cyanine 5 
	<ul style="list-style-type: none">▪ Mélange des sondes marquées
	<ul style="list-style-type: none">▪ L'hybridation s'effectue de manière simultanée sur la même lame de verre  sur laquelle sont fixées de manière covalente  les ADN-sondes de séquences connues▪ Chaque spot d'ADN-sonde permet l'hybridation des éventuels ADN-cibles présents dans la solution d'hybridation ▪ Cycles de lavage par augmentation de la stringence
	<ul style="list-style-type: none">▪ Pour chaque spot, détection d'un niveau de fluorescence ▪ Le logiciel peut reconstruire un caryotype moléculaire à partir du ratio des intensités de fluorescence pour chaque spot de la biopuce génomique

RESULTATS DE L'HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE CGH-ARRAY

	<ul style="list-style-type: none">▪ L'ADN vert est l'ADN de référence d'un tissu sain, cette quantité de matériel ne varie pas : 2 allèles par gène▪ Seul l'ADN à étudier, pathologique, varie en quantité : perte ou gain
	<ul style="list-style-type: none">▪ Plus de fluorescence rouge que verte▪ Plus d'ADN à étudier que d'ADN de référence sur le spot considéré▪ Gain de matériel génétique à ce locus  : amplification de gène
	<ul style="list-style-type: none">▪ Moins de fluorescence rouge que verte▪ Moins d'ADN à étudier que d'ADN de référence sur le spot considéré▪ Perte de matériel génétique à ce locus
	<ul style="list-style-type: none">▪ Fluorescence rouge et verte similaire▪ Autant d'ADN à étudier que d'ADN de référence sur le spot considéré▪ Pas de modification au niveau de ce gène 

INTERPRETATION DES RESULTATS DU CGH-ARRAY	
	<ul style="list-style-type: none">▪ En reconstruisant un caryotype moléculaire, on peut établir un profil génétique ☑▪ Exemple de deux profils génétiques différents concernant le cancer du sein familial <div style="text-align: center;"><p>Log₂ Ratio allelique</p><p>Chromosomes</p><p>“SIMPLEX” (n=22)</p><p>“INSTABLE” (n=29)</p></div>
	<ul style="list-style-type: none">▪ Selon l'importance des remaniements génétiques▪ Plus les remaniements sont importants, moins le pronostic de la maladie est bon▪ Profil d'un cancer « simplex » :<ul style="list-style-type: none">◦ Pas d'évolution de la tumeur, pas de rechute◦ Conséquence : désescalade thérapeutique▪ Profil de cancer « instable » :<ul style="list-style-type: none">◦ Evolution de manière agressive, avec rechute précoce◦ Conséquence : intensification thérapeutique▪ Connaitre le devenir de la pathologie permet d'adapter la prise en charge médicale
	<ul style="list-style-type: none">▪ Utilisation d'une puce à haute résolution▪ La résolution, ou finesse d'étude du génome, dépend du nombre de spots représentant le génome codant et non codant sur la puce▪ On peut détecter la perte de quelques exons et introns au sein d'un gène

TRANSCRIPTOMIQUE : LES BIOPUCES D'EXPRESSION	
	<ul style="list-style-type: none"> Grâce à la quantité de transcrits par comparaison à un état de référence Etablissement d'un profil caractéristique d'un état biologique donné Corrélation entre l'évolution du profil génétique, ou ribotype, et l'état biologique Mise en évidence de voies de régulation Caractériser de nouveaux gènes par comparaison de leur fonction ou l'état d'expression dans lequel ils sont présents Application des biopuces au diagnostic et au pronostic tumoral
	<ul style="list-style-type: none"> La méthodologie diffère des biopuces à ADN dans les premières étapes uniquement : <ul style="list-style-type: none"> Extraction des ARNm d'un tissu donné à étudier Rétrotranscription, ou transcription inverse pour obtenir des ADN complémentaires ADNc ou cDNA Le marquage, en rouge, se fait lors de cette étape En parallèle dans un autre tube, des ARN de référence sont extraits, rétrotranscrits et marqués en vert. Mélange et co-hybridation sur lame Utilisation de biopuces d'expression contenant des spots d'oligonucléotides de régions transcrives
	<ul style="list-style-type: none"> Spot rouge : expression augmentée par rapport à la référence Spot vert : expression diminuée par rapport à la référence Spot jaune : même niveau d'expression par rapport à la référence
	<p style="text-align: center;">Les gènes sont différentiellement exprimés entre :</p> <ul style="list-style-type: none"> 2 types cellulaires 2 stades d'un même type cellulaire : développement, différenciation tissulaire 2 tissus <p style="text-align: center;">Le niveau d'expression est très dépendant de la situation physiologique</p> <ul style="list-style-type: none"> ARN d'un tissu sain du patient Mise en évidence de petites variations Perte de normalisation <p style="text-align: center;">Pool d'ARN de tissus sains :</p> <ul style="list-style-type: none"> Normalisation, standardisation de la référence Perte de l'information des petites variations d'expression

QUELLE BIOPUCE POUR QUELLE APPLICATION ?		
Nom	CGH-array	Biopuce d'expression
Echantillons étudiés, cibles	ADN génomique	ARN totaux
Support	Lame de verre	Lame de verre
Spots, sondes	Oligonucléotides : zones exoniques et introniques	Oligonucléotides : zones exoniques ADNc
Objectif	Mesure du nombre de copies alléliques Etablissement d'un caryotype : cytogénétique moléculaire	Profil d'expression : portrait moléculaire
Calcul des intensités	Normalisation aisée car tous les gènes sont en 2 copies	Normalisation complexe car le profil d'expression dépend de nombreux paramètres : niveaux d'expression...

APPLICATION DE LA TRANSCRIPTOMIQUE : PREDICTION DE L'EVOLUTION CLINIQUE DU CANCER DU SEIN	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Faire un profil de tumeurs et établir une signature moléculaire▪ Afin de prédire le devenir clinique du cancer du sein de chaque patiente
	<ul style="list-style-type: none">▪ Etude rétrospective sur 98 tumeurs primitives du sein, sporadiques, ont été classés en 2 groupes  en fonction de l'évolution des patients étudiés<ul style="list-style-type: none">○ Groupe à mauvais pronostic : patients ayant développés des métastases dans les 5 années suivant le diagnostic○ Groupe à bon pronostic : patients sans rechute plus de 5 ans après le diagnostic▪ Extraction des ARN▪ Amplification , marquage des ARN, biopuces, hybridation, lecture :<ul style="list-style-type: none">○ Puces à 25 000 spots d'ADN correspondant à 25 000 gènes▪ Statistiques : Initialement 5000 gènes retenus comme étant différemment exprimés avec une valeur statistiquement significative entre tous les groupes d'échantillon
	<ul style="list-style-type: none">▪ 70 gènes sont retenus ▪ Clustering supervisé : on constraint la classification sur les groupes de patients▪ Les gènes sont en colonne et les tumeurs en ligne▪ Les gènes sont classés en abscisse en fonction de la force de leur facteur de corrélation ▪ On réalise la corrélation par rapport au facteur « métastases »▪ Certaines tumeurs demeuraient classées dans le « mauvais pronostic » malgré l'absence de métastases▪ Les auteurs en déduisent que ces tumeurs évolueront vers des métastases
	<ul style="list-style-type: none">▪ L'analyse par biopuces a montré qu'avec une méthode globale d'analyse, il était possible de pronostiquer l'évolution d'une pathologie : outil pronostic
	<ul style="list-style-type: none">▪ On réduit à 50 gènes la classification pronostique des cancers du sein▪ Le profil d'expression de ces 50 gènes est étudié chez chaque patiente et comparé à un des profils de référence permettant de prévoir l'évolution de la tumeur de la patiente▪ Classification moléculaire des cancers du sein :<ul style="list-style-type: none">○ Luminal A : courbe de survie très haute sur 10 ans○ Luminal B : courbe de survie légèrement abaissée○ Basal-like○ HER2○ Normal-like

PRINCIPE DU SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION SNG OU NGS

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le Séquençage de Nouvelle Génération, SNG, permet de séquencer simultanément plusieurs centaines de milliers ou plusieurs millions de molécules d'ADN correspondant à tout ou une partie du génome ▪ Le séquençage de nouvelle génération n'est pas adapté au séquençage d'un petit nombre de nucléotide pour un seul patient : on lui préfèrera le séquençage de Sanger dans ce cas ▪ Deux technologies de SNG existent et diffèrent essentiellement par leur phase expérimentale : <ul style="list-style-type: none"> ○ Séquençage par émission de protons ○ Séquençage par synthèse, majoritaire
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La phase expérimentale comprenant : <ul style="list-style-type: none"> ○ <u>Préparation de la librairie</u> : sélection des fragments correspondant à la zone à séquencer par capture ou amplification multiplexée et préparation des échantillons à séquencer ○ <u>Amplification clonale</u> : génération de clusters de séquençage ou PCR en émulsion ○ <u>Séquençage en lui-même</u> ▪ La phase (bio)informatique comprenant les analyses primaires et secondaires <ul style="list-style-type: none"> ○ Génération des séquences reads : fastq ○ Reconstitution de la séquence par alignement informatique des fragments séquencés sur la séquence de référence : bam ○ Caractérisation de toute variation comparativement à la séquence de référence : appel et annotation des variants par les fichiers vcf ▪ La phase d'interprétation des résultats ou analyse tertiaire <ul style="list-style-type: none"> ○ Pour diagnostic ○ Pour recherche
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>La couverture</u> : le nombre de gènes séquencés ou l'étendue ou la dispersion du séquençage <ul style="list-style-type: none"> ○ On peut séquencer un génome entier ○ On peut séquencer seulement une partie du génome ○ On peut séquencer un exome, c'est-à-dire tous les exons ○ On peut séquencer le plus souvent un panel de gènes en fonction d'une pathologie : reséquençage ciblé ▪ <u>La profondeur</u> : nombre de fois qu'une base est lue ou séquencée à un endroit donné <ul style="list-style-type: none"> ○ La redondance fait la séquence
	<ul style="list-style-type: none"> • Technique : <ul style="list-style-type: none"> ○ Séquençage de Sanger : par terminaison de chaîne, nucléotide après nucléotide ○ Avec la SNG ce sont plusieurs milliers de séquençages parallèles • Capacité de séquençage et redondance : <ul style="list-style-type: none"> ○ Séquençage de Sanger : 400 bases en 1h30 ○ SNG : 1 génome répété 6 à 30 fois en une vingtaine d'heures

SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION SNG OU NGS PHASE EXPÉIMENTALE : SEQUENÇAGE PAR ÉMISSION DE PROTONS

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Préparation de la librairie, ou banque ou bibliothèque, de fragments à séquencer ▪ Fragmentation de l'ADN ▪ Contrôle des tailles ▪ Ajout d'amorces fluorescentes en 5' et 3' des fragments = adaptateurs
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR en émulsion ▪ Amplification clonale de la matrice sur billes, correspondant à la librairie avec les adaptateurs
	<ul style="list-style-type: none"> • Les billes sont placées dans le port d'injection de la puce de séquençage : une bille par puit • Lorsqu'un dNTP est inséré dans la séquence il y a émission d'un proton • Lecture d'un signal : variation du pH

SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION SNG OU NGS
PHASE EXPERIMENTALE : SEQUENÇAGE PAR SYNTHESE
TECHNOLOGIE ILLUMINA

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fragmentation de l'ADN  par sonication ▪ Contrôle des tailles ▪ Préparation : extrémités réparées et adaptateurs liés
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Les ADN simple brin après dénaturation sont fixés sur un support solide ▪ Un pont est réalisé et une PCR est faite ▪ Les deux brins sont séparés et partiellement décrochés ▪ Une PCR est réalisée sur chacun des simples brins décrochés
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajout progressif des dNTP bloquants fluorescents <ul style="list-style-type: none"> ○ Un cycle = passage des 4 dNTP ▪ Après chaque incorporation, un faisceau laser excite chaque dNTP qui émet une fluorescence qui est captée ▪ Le groupe bloquant est alors ôté de chaque nucléotide et la synthèse par complémentarité de bases se poursuit ▪ Séquençage réalisé en partant d'une extrémité ou de l'autre : séquençage « paired end »

SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION SNG OU NGS
PHASE INFORMATIQUE

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conversion des données de l'émission de protons ou des images de fluorescence en une séquence une données brutes « raw data » ▪ Génération de fichiers type bcl (Illumina)  						
	<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">Conversion</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Conversion des « raw data » en fichiers de séquence fastq </td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">Alignement </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ▪ A partir des fichiers Fastq → Fichiers Bam ▪ Alignement par rapport au génome humain de référence  </td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">Détection des variations par rapport au génome de référence</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ▪ A partir des fichiers Bam → Fichier Vcf ▪ Grâce à la profondeur, les variations peuvent être détectées : <ul style="list-style-type: none"> ○ <u>A l'état hétérozygote</u> : la moitié des lectures, ou read, comprend la variation   ○ <u>A l'état homozygote</u> : toutes les lectures comprennent la variation  </td></tr> </table>	Conversion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conversion des « raw data » en fichiers de séquence fastq 	Alignement 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A partir des fichiers Fastq → Fichiers Bam ▪ Alignement par rapport au génome humain de référence  	Détection des variations par rapport au génome de référence	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A partir des fichiers Bam → Fichier Vcf ▪ Grâce à la profondeur, les variations peuvent être détectées : <ul style="list-style-type: none"> ○ <u>A l'état hétérozygote</u> : la moitié des lectures, ou read, comprend la variation   ○ <u>A l'état homozygote</u> : toutes les lectures comprennent la variation 
Conversion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conversion des « raw data » en fichiers de séquence fastq 						
Alignement 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A partir des fichiers Fastq → Fichiers Bam ▪ Alignement par rapport au génome humain de référence  						
Détection des variations par rapport au génome de référence	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A partir des fichiers Bam → Fichier Vcf ▪ Grâce à la profondeur, les variations peuvent être détectées : <ul style="list-style-type: none"> ○ <u>A l'état hétérozygote</u> : la moitié des lectures, ou read, comprend la variation   ○ <u>A l'état homozygote</u> : toutes les lectures comprennent la variation  						
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Interprétation des résultats ▪ Annotation des variants détectés <ul style="list-style-type: none"> ○ Formules nucléotidiques ○ Formules protéiques ▪ Interprétation des variants détectés <ul style="list-style-type: none"> ○ polymorphisme ○ VSI ○ mutation délétère ▪ Filtrage des variants d'intérêt 						

SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION SNG OU NGS CAPACITES DE SEQUENÇAGE	
	<ul style="list-style-type: none">▪ Nombre d'échantillons▪ Couverture▪ Profondeur
	<ul style="list-style-type: none">▪ La capacité des outils de séquençage est indiquée en Gb▪ Cette capacité correspond à nombre d'échantillon x Profondeur x Couverture▪ Plus on recherche la profondeur, plus le nombre d'échantillons testable est faible▪ Exemple :<ul style="list-style-type: none">○ La technique Illumina possède une capacité de 30Gb, ce qui lui permet de séquencer 1 génome entier avec une profondeur de 10x○ On peut avec le même matériel séquencer 60 patients sur des régions ciblées, avec une profondeur de 1000 x