

# 51<sup>èmes</sup> journées de Biologie Praticienne

## Le séquençage de nouvelle génération (NGS) aujourd'hui et demain dans les laboratoires de Biologie médicale

Vendredi 1<sup>er</sup> décembre 2017

**Maison de la Chimie**

**Marc Delpech**



# Le séquençage de Nouvelle Génération (NGS) : une révolution

- **Capacité de séquençage** (en une seule fois)
  - Avant 2005 : quelques centaines à quelques milliers de bases (**1<sup>ère</sup> génération**)
  - 2006 : 20 millions de bases (**2<sup>ème</sup> génération**)
  - 2007 : 2 à 3 milliards de bases
  - 2010 : 9 milliards de bases
  - 2012 : Gamme d'appareils permettant de séquencer de 20 à 200 milliards de bases
  - 2014 : 1.800 milliards de bases
  - 2016 : 6.000 milliards de bases
- **Et maintenant des appareils capables de séquencer des molécules une à une, dont certains sont miniaturisés (3<sup>ème</sup> Génération)**

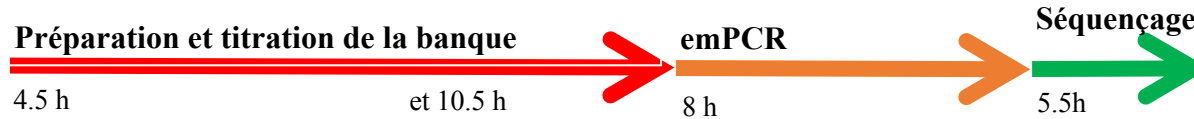
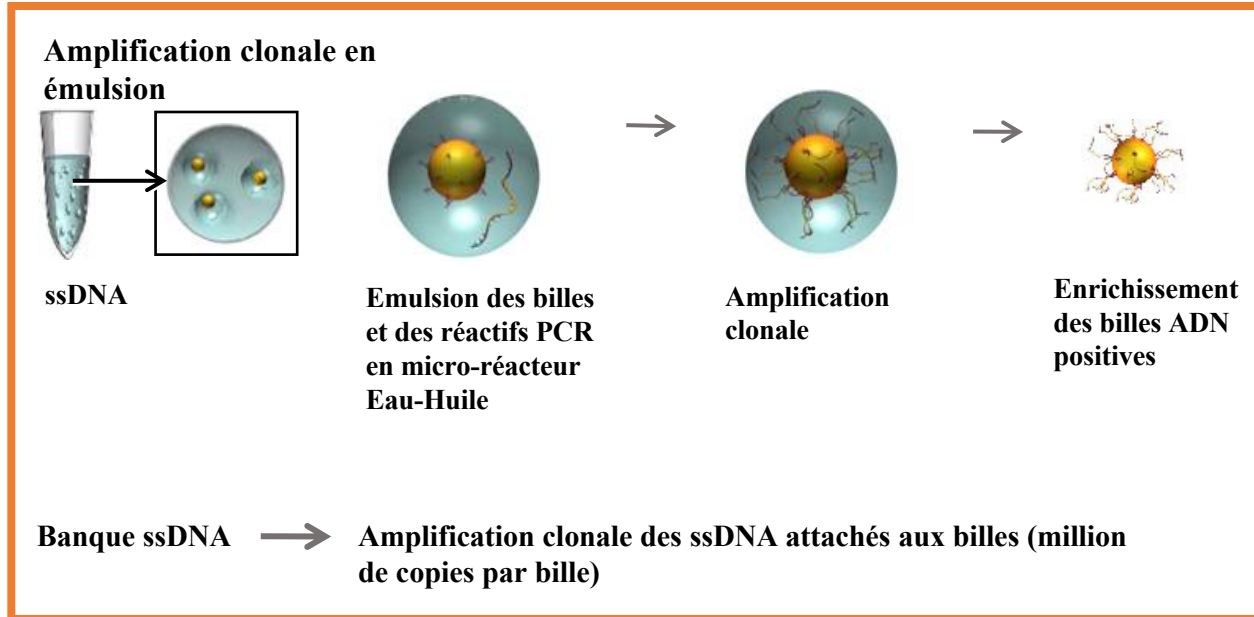
# Le premier système commercialisé, le 454 de Roche



## La deuxième génération à partir de 2006

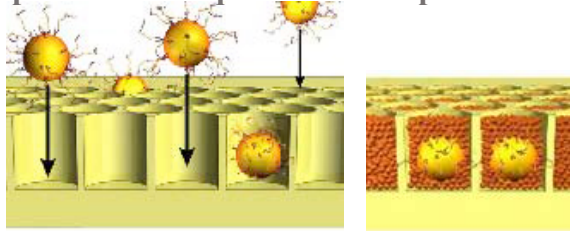
	GS20 - FLX 454 –Roche	Solexa 1G Illumina	SOLiD ABI
Technologie	Synthèse	Synthèse	Ligation
Longueur lue en pb	250 pb 500 pb	30-40 pb	25-50 pb
Longueur totale lue par run	2006 : 20 Mb 2008 100 Mb 2009 : 1 Gb	2006 : 1-1,6 Gb 2010 : 9 Gb	2007 : 2-3 2009 : 9 Gb

# emPCR- Amplification clonale

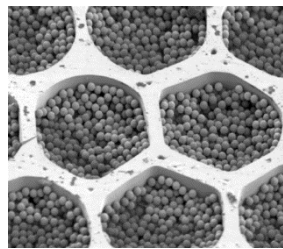


# La réaction de séquençage

Dépot des billes dans la PicoTiterPlate  
portant la banque d'ADN simple brin



- Dépot dans chaque puits d'une seule bille portant l'ADN amplifié clonalement



- Diamètre des puits: 44  $\mu\text{m}$
- La plaque contient  $1.6 \times 10^6$  puits

Document Roche®

# Il existe 3 approches pour le NGS

- **Le séquençage ciblé de panels de gènes**
  - Le séquençage est limité à un panel de gènes
  - C'est l'approche utilisée très majoritairement en Biologie Médicale
- **Le WES (Whole Exome Sequencing)**
  - C'est le séquençage de toutes les parties codantes du génome ou exons
- **Le WGS (Whole genome Sequencing)**
  - C'est le séquençage de la totalité du génome d'un individu

# Les principales applications dans les laboratoires d'analyse médicale

- Prénatal
  - Sexe foetal
  - Rh foetal
  - Trisomie 21
  - Diagnostic de quelques maladies héréditaires
- Cancérologie
  - Biomarqueurs
  - Décision thérapeutique
  - Mécanismes de résistance
  - Clonalité
  - Métastases
- La Microbiologie
  - Identification
  - Résistance
- Transplantation
- Inflammation



D'abord

**Les outils et leur utilisation**

# Les premiers systèmes 2006



Roche GS20



Illumina Solexa



ABI SOLiD

# Evolution des systèmes - 2012



**HiSeq 2000**  
**26 à 200 Gb**



**IIx 8 à 45 Gb**



**IIe 3 à 20 Gb**

Images



# Toujours plus puissants - 2014



**HiSeq X Ten**  
**900-1800 Gb**

Images



# La puissance augmente encore 2016 - 2017



## **NovaSeq 5.000**

**167 – 2.000 Gb**

**Temps de run 19 – 40 h**

**Lecture par run 1,4 – 6,6 Gb**

## **NovaSeq 6.000**

**167 – 6.000 Gb**

**Temps de run 19 – 40 h**

**Lecture par run 1,4 – 20 Gb**

Images



# Le plan français « France Médecine génomique 2025 »

- Fait suite à un rapport demandé par Manuel VALLS alors premier ministre
- Décision de créer 12 plateformes nationales de grand séquençage **uniquement dédiées au diagnostic médical.**  
**Mais deux seulement dans un premier temps**
- Chacune
  - Devra séquencer 18.000 génomes complets par an
  - Aura un budget de **200 à 300 millions d'euros par an**
- Appel d'offres avec 2 lauréats (désignés le 17 juillet 2017)
  - Lyon (AURAGEN)
  - Paris (SEQOIA)
- La partie technique sera réalisée par le privé
- A Paris il a été décidé de créer un centre informatique pour le stockage et l'analyse des données qui sera ouvert à tous les hôpitaux de l'APHP

# Les systèmes dédiés aux laboratoires de Biologie Médicale

# Les deux systèmes les plus utilisés



10 Mb to 1 Gb

## Thermo Fisher PGM

90-minute run times

35–400\* bp reads

Images **ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

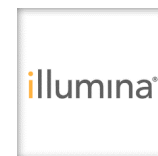


## Illumina MiSeq

25 millions de reads

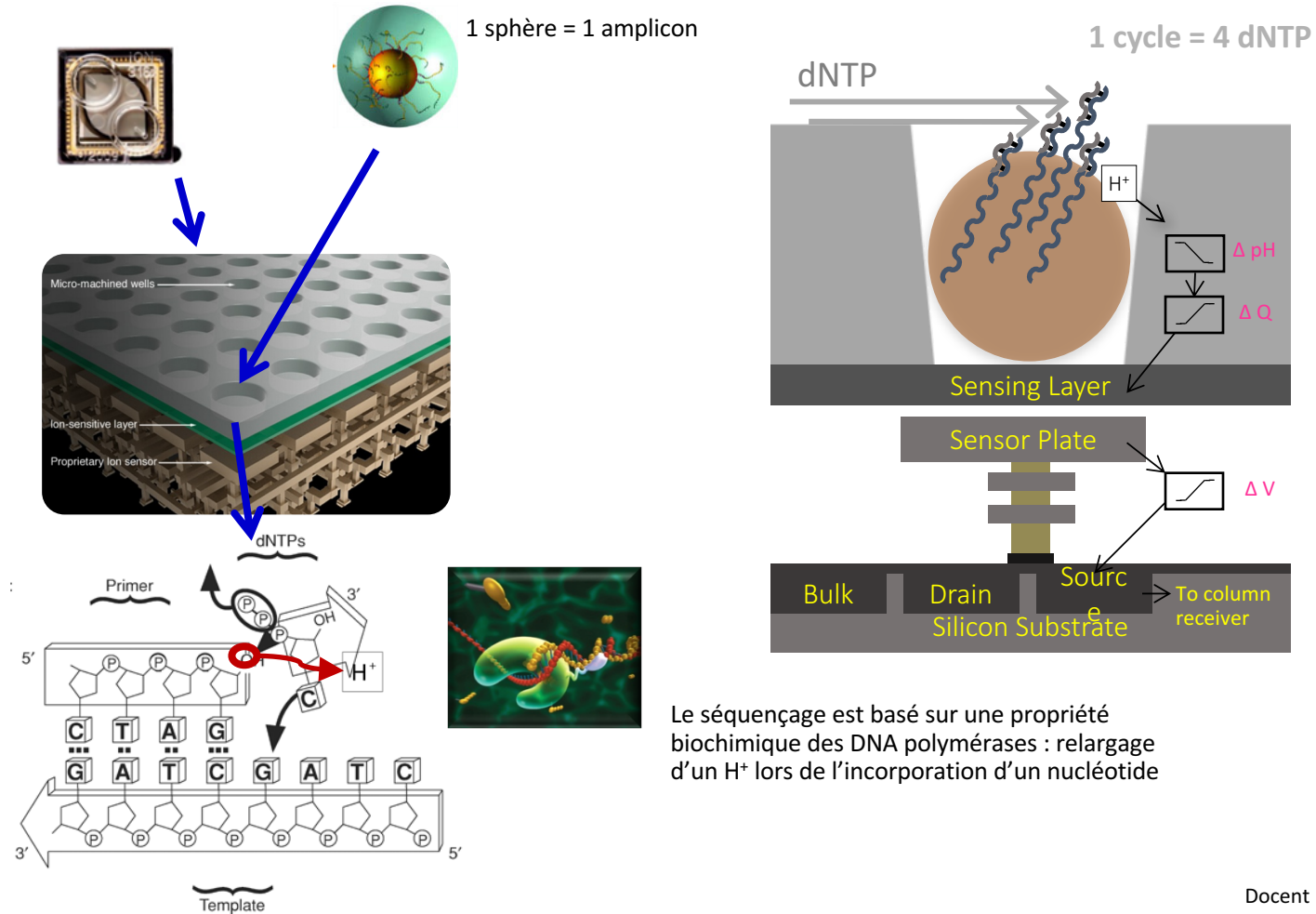
2x300\* bp reads

Images





# Séquençage sur le Ion PGM System®



# Un système pour la Biologie Médicale mais plus universel : La séquence de la totalité du génome en quelques heures

**16 to 120 Gb**

**Sequencing run time : 15-29 h**



**Illumina NextSeq 550**

Images



Vraisemblablement les  
systèmes du futur

Le séquençage de 3<sup>ème</sup>  
génération

# Une troisième génération avec les systèmes qui séquencent des molécules uniques



**Sequel System**

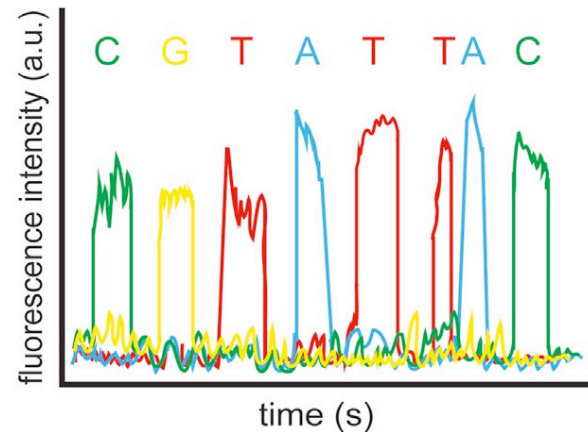
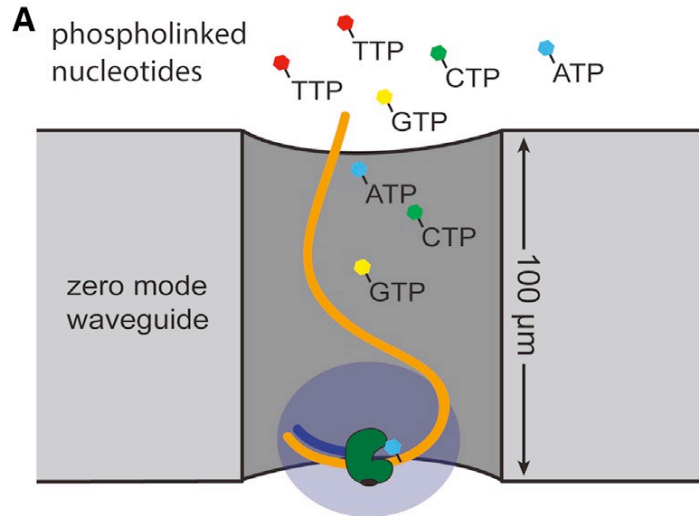


**PacBio RS II**

**Séquençage une à une  
de chaînes d'ADN de 20 à 150 kb**

# Le principe

## Single-molecule real-time (SMRT) sequencing



Diamètre des puits 70 nm, hauteur 100 nm (longueur d'onde visible : 400 à 700 nm)

D'où un volume éclairé de 20 zeptolitres  $20 \times 10^{-21}$  litre

Pas d'amplification par PCR préalable

Permet de séquencer des molécules d'ADN de 20kb à 150 kb

Permet dans le même temps de détecter les cytosines méthylées (mesure de vitesse)

Problème : les erreurs de séquençage

# Le séquençage de molécules uniques miniaturisé

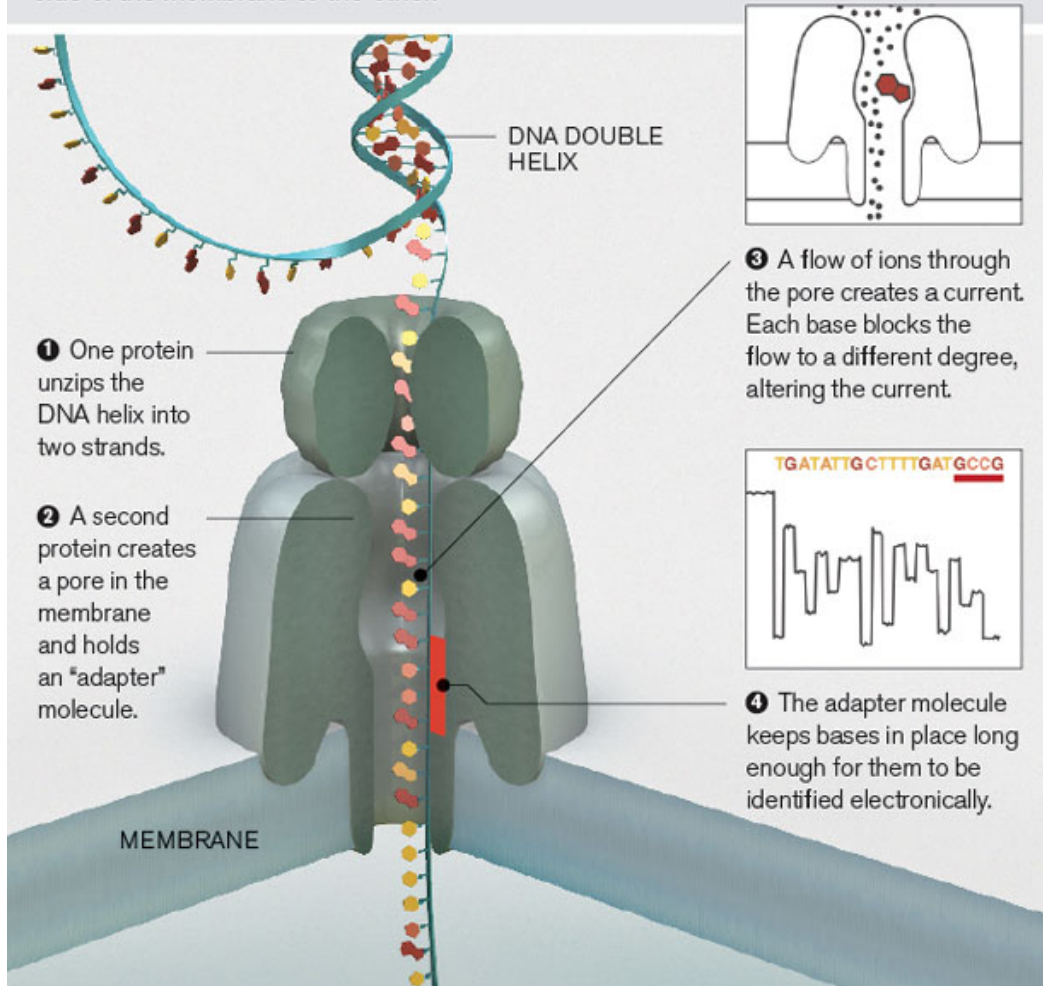
## Oxford Nanopore

200 ng d'ADN  
20-400 bases/seconde/pore  
Cartouche avec 2000 nanopores  
 $10^6$  bp/seconde  
Fragments jusqu'à 150 kb  
10 à 20 Gb au total



# Le système de séquençage Nanopore

DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.



Il est possible d'en associer 5



Grid**ION**X5

**50 à 100 Gb**

 Oxford  
**NANOPORE**  
Technologies™



Ou même 48

PromethION



# Ou encore la simplicité absolue



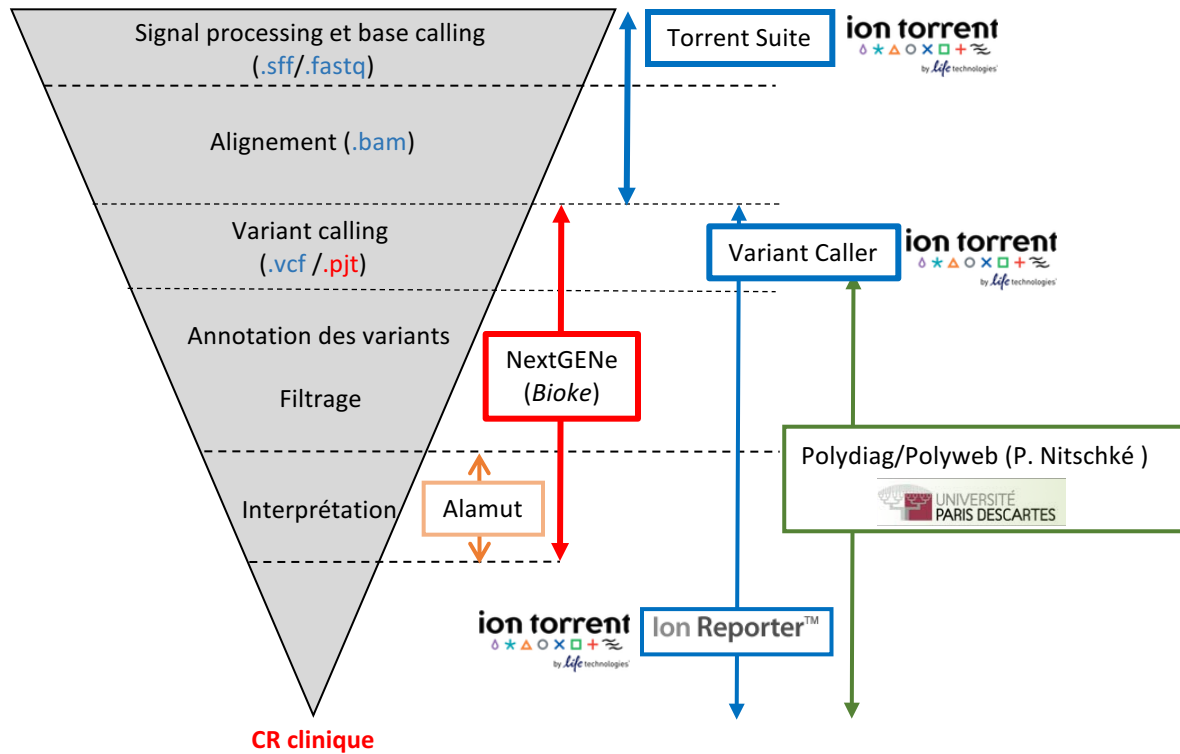
# Encore plus simple demain



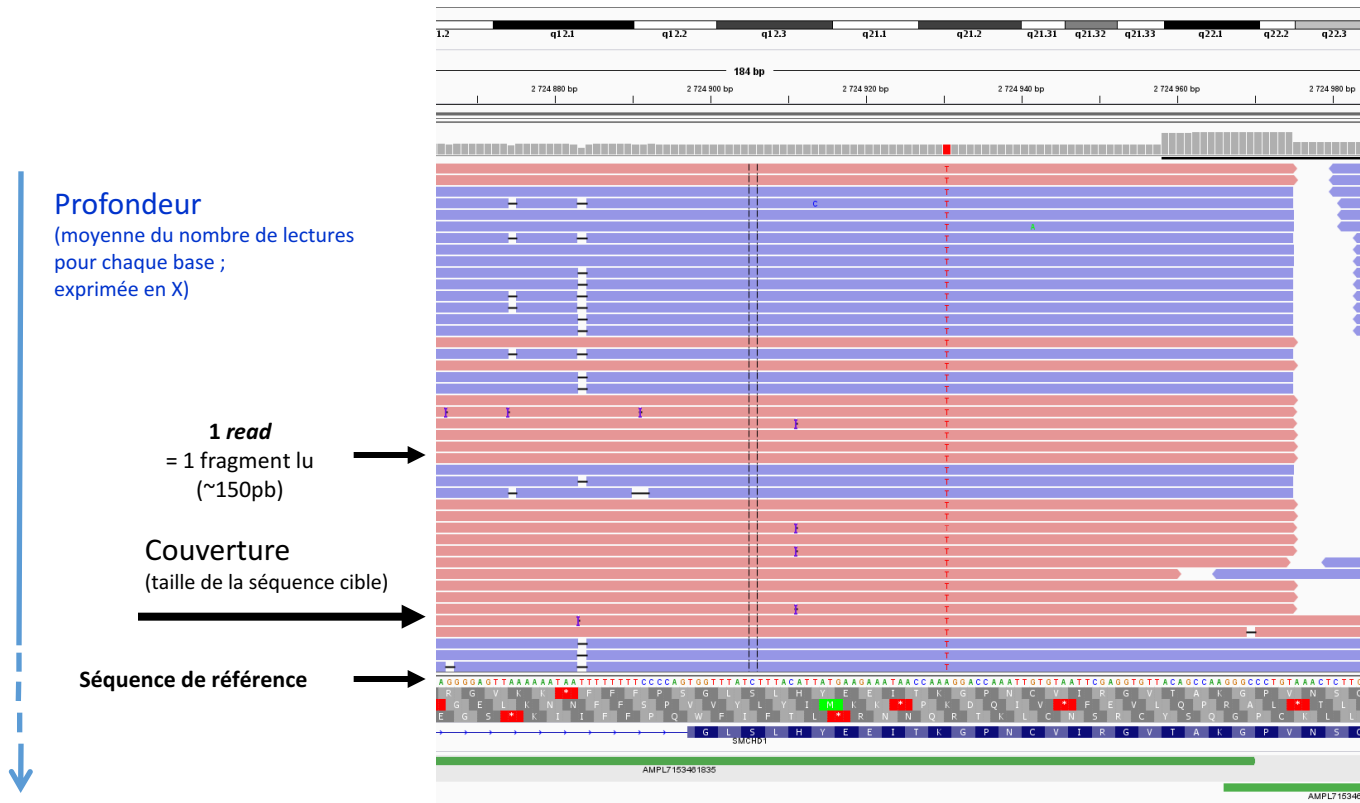
# Un vrai problème : la masse des données



# Le « pipeline » informatique



# Analyse bio informatique



Capacité de séquençage  $\Leftrightarrow$  nombre patients x couverture x profondeur

# Plateforme NGS- COCHIN

ASSISTANCE  
PUBLIQUE  HÔPITAUX  
DE PARIS


 **Inserm**

 **HÔPITAUX UNIVERSITAIRES  
PARIS CENTRE**  
Cochin • Port-Royal • Tarnier • Broca  
La Collégiale • La Rochefoucauld • Hôtel-Dieu



 **institut cochin**  
CENTRE DE RECHERCHE

Plan national  
maladies rares  
Qualité de la prise  
en charge,  
Recherche, Europe :  
une ambition  
renouvelée.

**Neurofibromatoses**  
S'informer  
pour agir  
  
Association  
Neurofibromatoses  
et Raskinhausser

 **UNIVERSITÉ  
PARIS DESCARTES**

Bâtiment Jean Dausset, HUPC  
COCHIN, Paris,



Ion PGM™ Sequencer



Ion Chef™  
Instrument



Ion Proton™ System



Nextseq 500

Dans notre laboratoire, en moins  
de deux ans

**Le séquençage classique a été  
remplacé par le NGS**



## # 200 Gènes - 850 Kb de séquence codante

Pathologies	Gènes	Taille (kb)
Dystrophies musculaires	<i>DMD</i>	73,2
NF1/syndrome de Legius	<i>NF1, SPRED1</i>	20,6
Hémophilies A et B	<i>F8C, F9</i>	18,6
Mucoviscidose	<i>CFTR</i>	10
Pancréatites chroniques	<i>PRSS1, CASR, SLC9A1, SLC26A9, SLC26A6, SPINK1, SLC9A3, CTSC</i>	29
Hypogonadismes hypogonadotropes	<i>KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, SEMA3A, HS6ST1, WDR11, CHD7, GNRHR, GNRH1, KISS1R, KISS1, TACR3, TAC3, SOX10</i>	54
Insuffisances ovariennes	<i>NOBOX, GALT, EIF2S2, MSH5, EIF2B4, DIAPH2, NHA, XPNPEP2, BMP15, SR1, EIF2B2, DMC1, FOXL2, FOXA1, FOXA3, FSHR, GPR3, NR5A1, PGRMC1, BHLHB9, FIGLA, NBN, ATM, GDF9, EIF2B1</i>	52,5
Métabolisme phosphocalcique	<i>CASR, GCM2, PTH, GNAS, PTH1R, PTHLH, PDE4D, IHH, AP2S1, GNA11, PRKAR1A, PHEX, FGF23, SLC34A1, SLC9A3R2, SLC34A3, DMP1, GALNT3, CYP27B1, VDR, CYP24A1</i>	48
Vitréo-rétinopathies	<i>COL9A2, COL11A1, KCNJ13, VCAN, COL9A1, TSPAN12, ATOH7, LRP5, FZD4, COL2A1, NDP</i>	60
Syndrome de Sotos	<i>SETD2, DNMT3A, NSD1</i>	30,6
Encéphalopathies	<i>CDKL5, CNTNAP2, CSDE1, IQSEC2, KIAA1279, MBD5, MECP2, MEF2C, MLL, NRXN1, SLC9A6, SOX5, SRY, STXBP, TCF4, UBE3A, ZEB2</i>	115
Malformations corticales	<i>CUL4B, WDR62, GPR56, KIAA1279, TUBA1A, TUBB2B, LIS1, DYNC1H1, KIF2A, TUBB5, NOTCH3, CCND2, DCX, ACTB, ACTG1, CDC27, TUBA8, SNAP29, KIF5C, FLNA, ARX, TUBG1, EML1, RELN, OCLN, RITN, NDE1, C6ORF70, RABGAP1, MAP3K4</i>	183,5
FSHD1/FSHD2	<i>SMCHD1, région4q</i>	21,8
Myopathies des ceintures	<i>ANO5, CAPN3, CAV3, DYSF, EMD, FKRP, LMNA, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, TRIM32</i>	64,3
NF2/Schwannomatoses	<i>NF2, SMARCB1, SMARCE1, SUFU, LZTR1</i>	14,5
HNPCC et polypose colique	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, APC, MUTYH, POLE, POLD1, AXIN2, BMPR1A, SMAD4, STK11, PTEN, GREM1, CDH1</i>	48
Prédispositions aux tumeurs endocrines	<i>CDKN2A, ARMC5, AP2S1, CDKN1B, CDKN2B, AIP, PRKAR1A, CDC73, CASR, CDKN1A, CDKN1C, CDKN2C, MEN1, DAXX, GNA11</i>	29

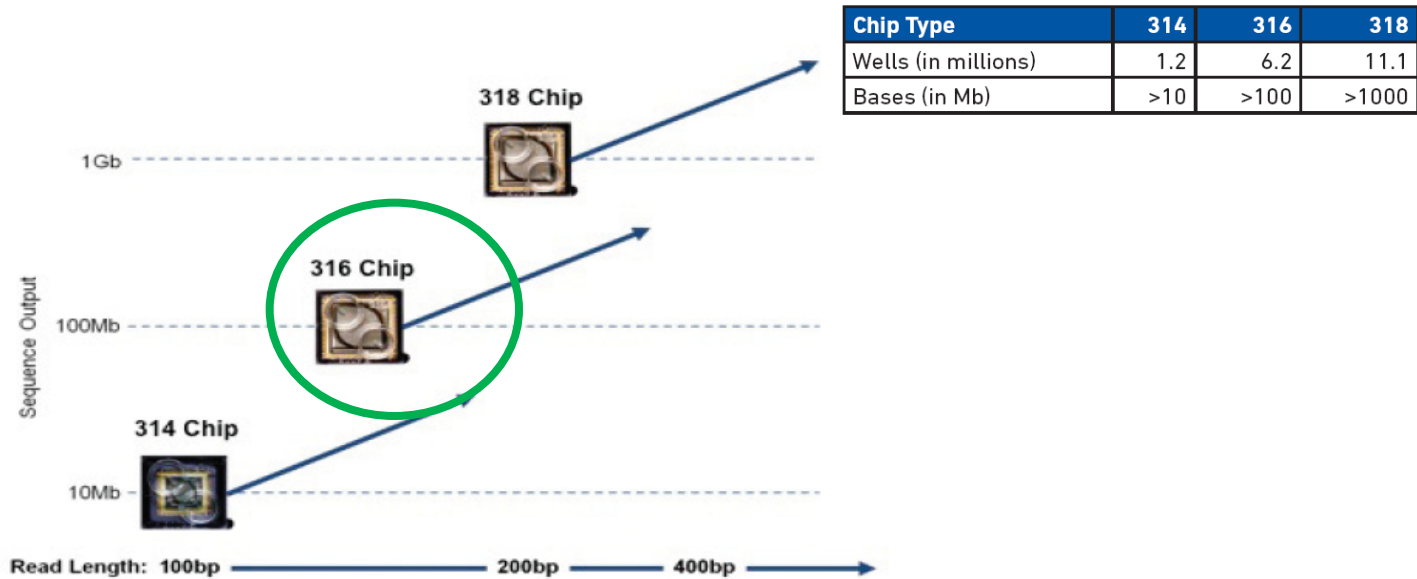
Marc Delpech, Michel Goossens, Michel Vidaud

Cherif Beldjord, Thierry Bienvenu, Audrey Briand, Eric Clouser, Catherine Costa, Laurence Cuisset, Catherine Dodé, Emmanuelle Girodon-Boulandet,

Nadim Hamzoui, Marc Jeanpierre, France Leturcq, Juliette Nectoux, Béatrice Parfait, Eric Pasmant, Sophie Valleix, Dominique Vidaud

Nicole Palaysi, Chrystel Leroy, Philippe Goussard

# Choix de la puce

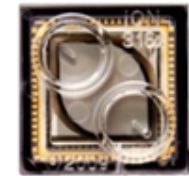


$$40 \times 25 \times 100 = 100 \text{ Mb}$$

Taille du design (Kb)

Nb d'échantillons/run

Profondeur moyenne

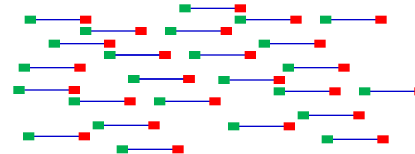
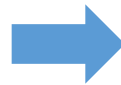


Puce 316  
100Mb  
(~6 M puits)

# Préparation des banques de fragments : « *Library* »

---

- Par amplification (PCR) ou capture (hybridation) de l'ADN ou du cDNA et/ou sélection des molécules à séquencer (ADN immuno-précipité)
- Ligation à bout franc d'adaptateurs spécifiques à chaque technologie pour permettre une amplification par PCR.



# Il est possible d'analyser des dizaines de patients en même temps

- Pour cela on ajoute une étiquette spécifique pour chaque patient lors de la constitution de la banque
  - CCCCCCCCCCAAAA patient 1
  - TTTTTTCCCCCAAAA patient 2
  - Etc.
- Lors de la lecture de la séquence, la lecture de l'étiquette indique à qui appartient la séquence qui suit

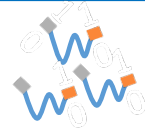
## « Wet Lab »

life  
technologies™



**Dessin des primers**

Ampliseq designer



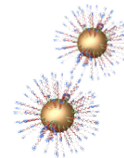
**Préparation de la librairie**

Kit Ion AmpliSeq™



**PCR en émulsion**  
Amplification clonale

Ion OneTouch™ Instrument



**Enrichissement**

Ion OneTouch™ ES

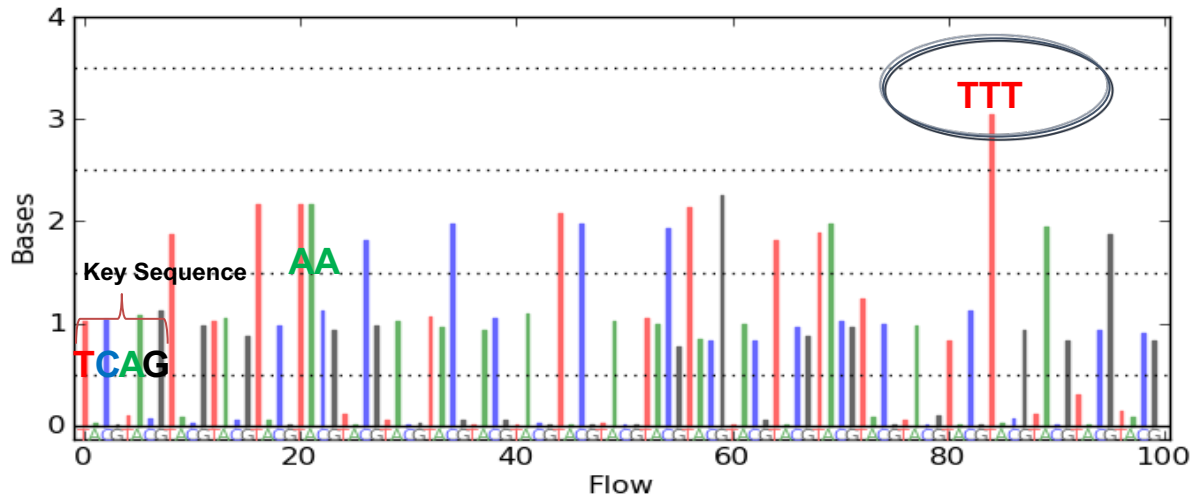


**Séquençage sur puce Ion 318™**

Ion PGM™ sequencer



# Ionogramme généré



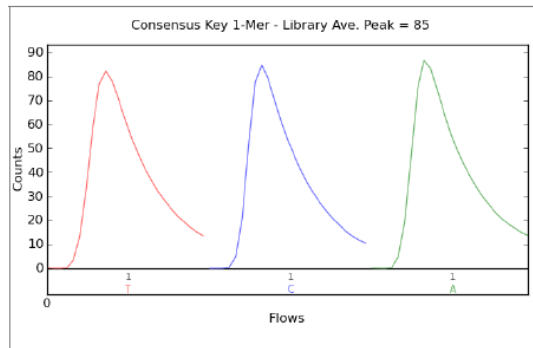
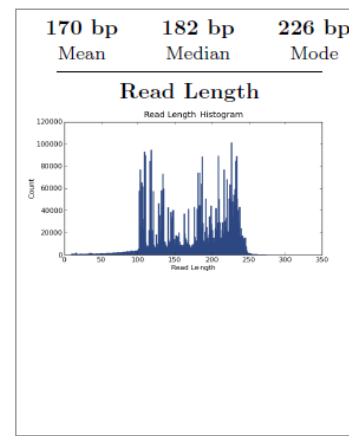
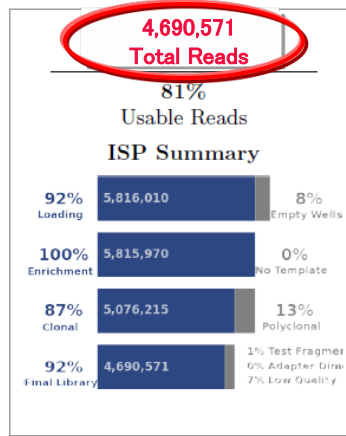
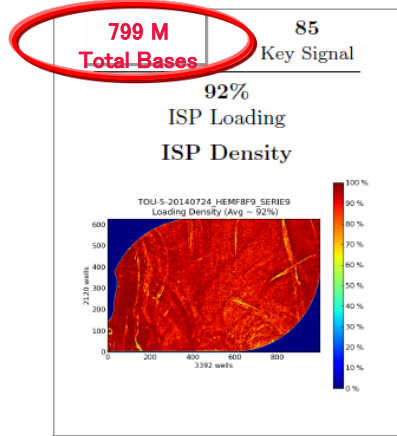
Séquence: **TTG****TAG****TT****C****TTAA**...



Limite de la méthode : « tassement » du signal dans les régions d'homopolymères

# Rapport de séquençage

## Run Summary



<b>Addressable Wells</b>	<b>6,354,416</b>	
With ISPs	5,816,010	91.5%
Live	5,815,970	100.0%
Test Fragment	53,536	00.9%
Library	5,762,434	99.1%
<b>Library ISPs</b>	<b>5,762,434</b>	
Filtered: Polyclonal	739,755	12.8%
Filtered: Low Quality	331,253	05.7%
Filtered: Primer Dimer	855	00.0%
<b>Final Library ISPs</b>	<b>4,690,571</b>	<b>81.4%</b>

# Exemple de mutation faux-sens hétérozygote

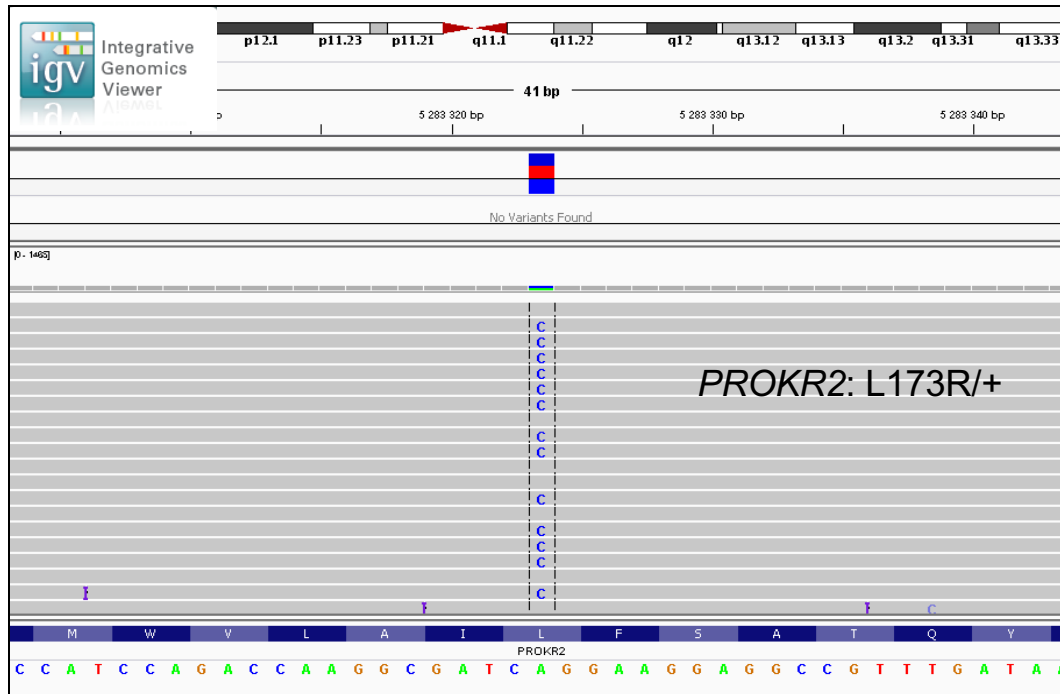


## Rapport variant caller

Position	Gene	TargetID	Type	Zygoty	Ref	Var	Var Freq	Ref Cov	Var Cov
5283323	PROKR2	AMPL4660769085	SNP	Het	A	C	48.8	40	39

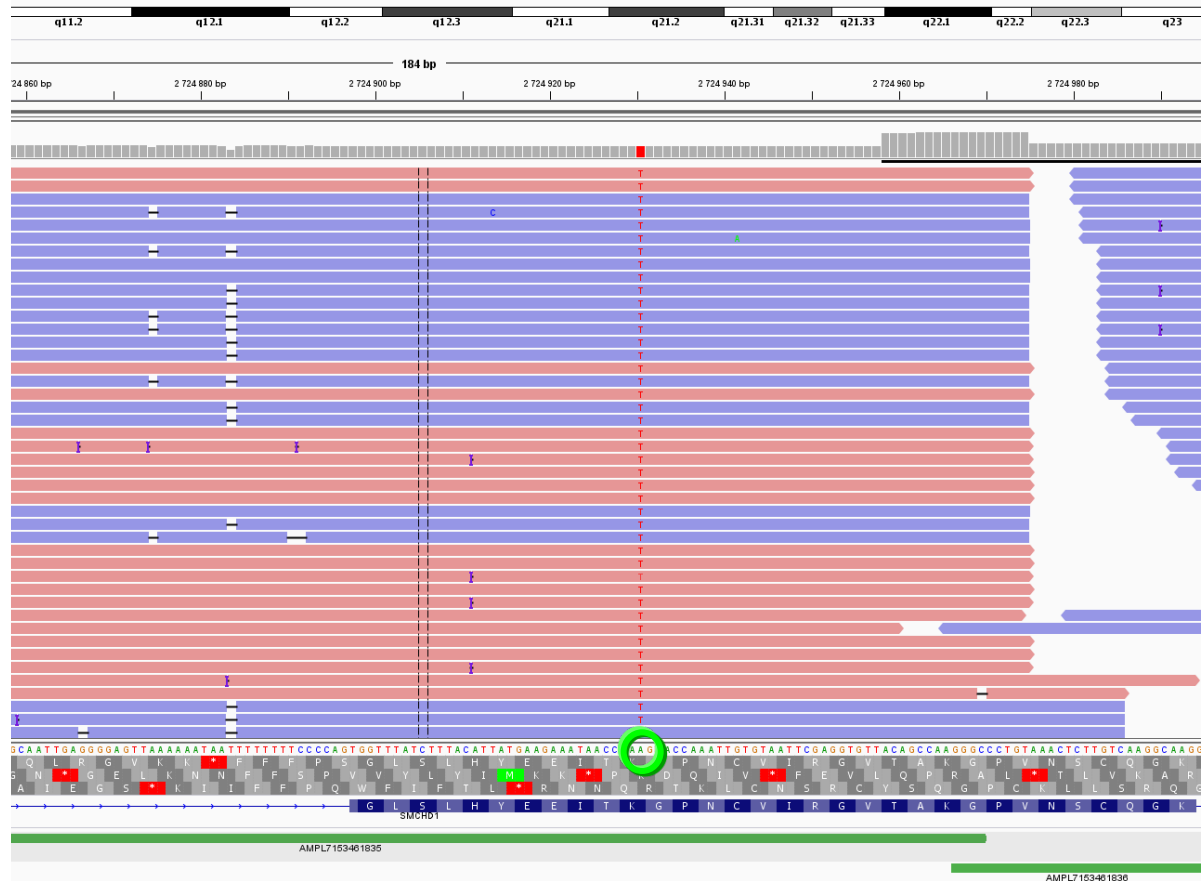


Position	Gene	CDS	Chr	Ref	Coverage	Score	Mutation call	AA change
5283323	PROKR2	2	20	A	83	13	A>AC	173L>LR

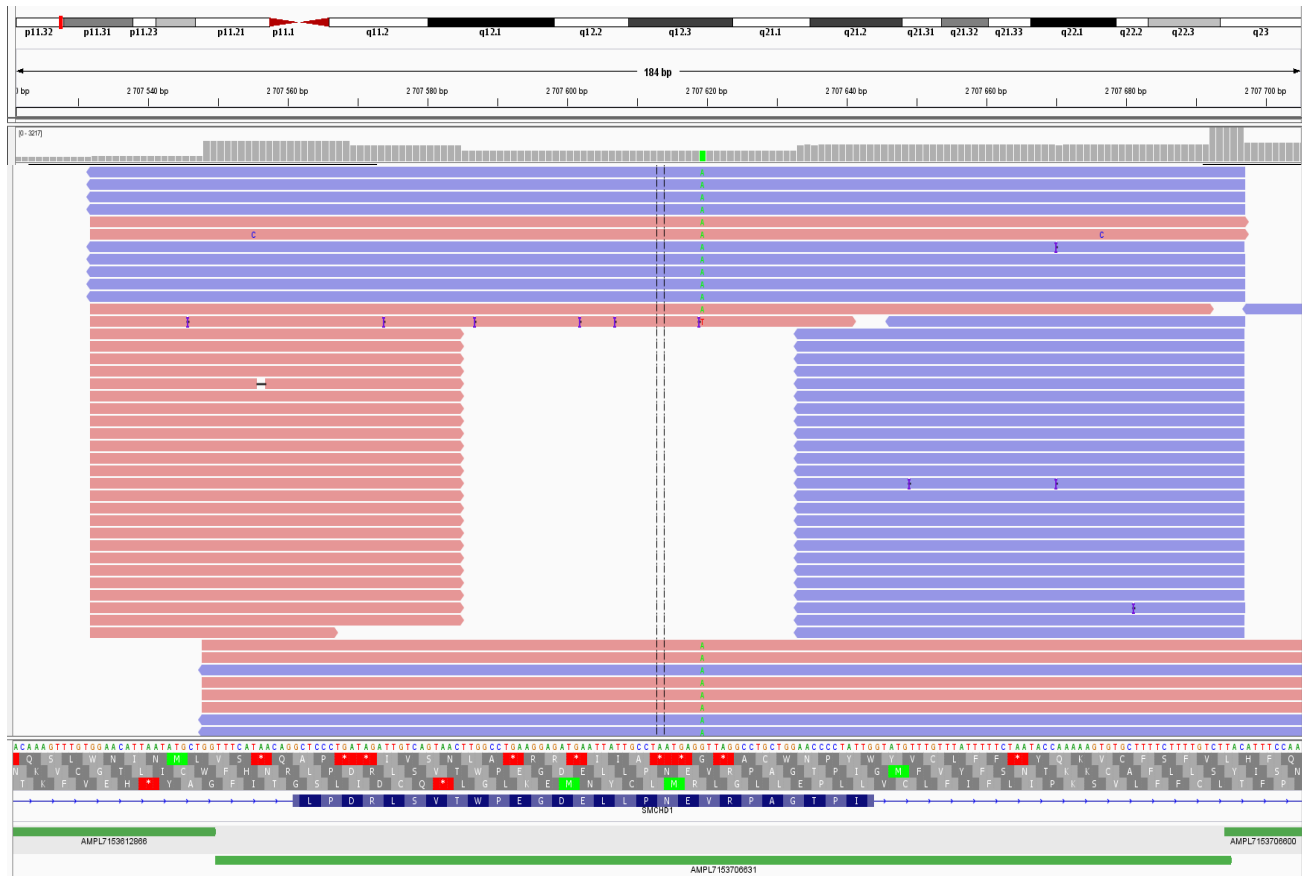




# Exemple de mutation faux-sens homozygote



# Exemple de détection de délétion de 50 nucléotides

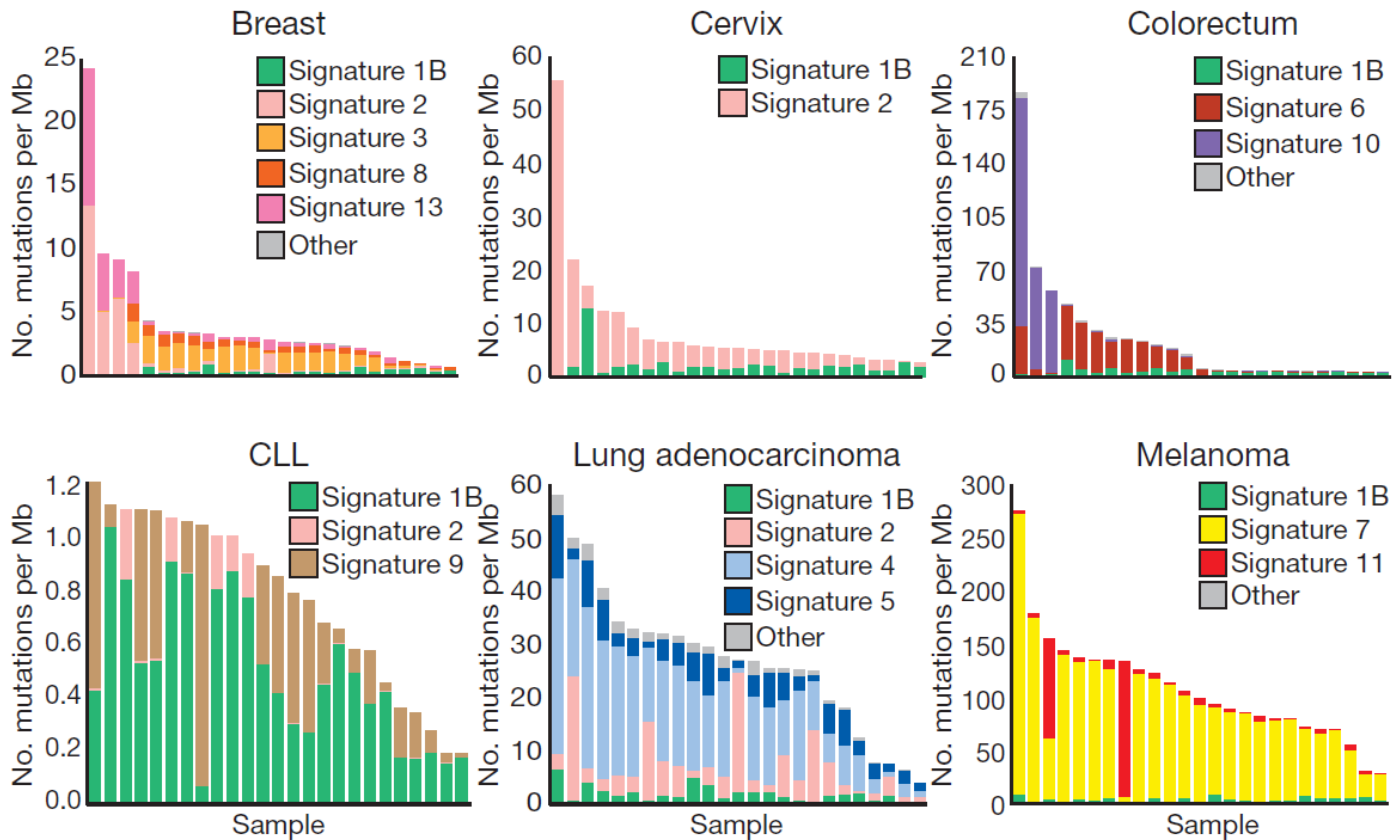


# Applications en cancérologie

- **Biomarqueurs**
- **Décision thérapeutique**
- **Mécanismes de résistance**
- **Clonalité**
- **Métastases**

# Il faut distinguer

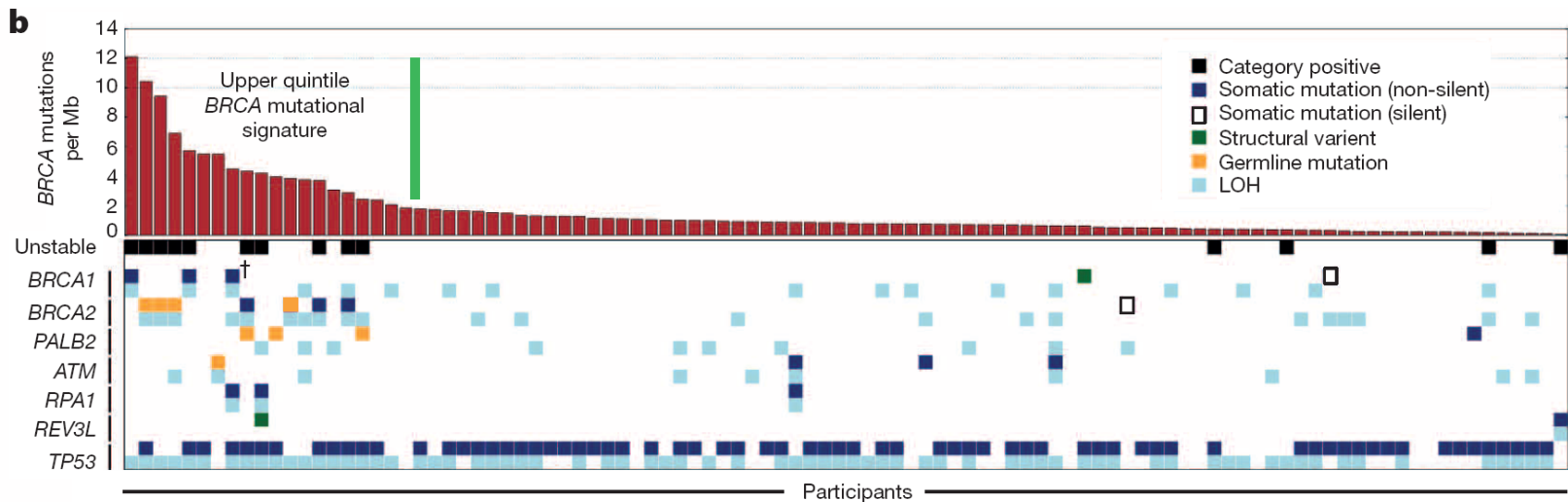
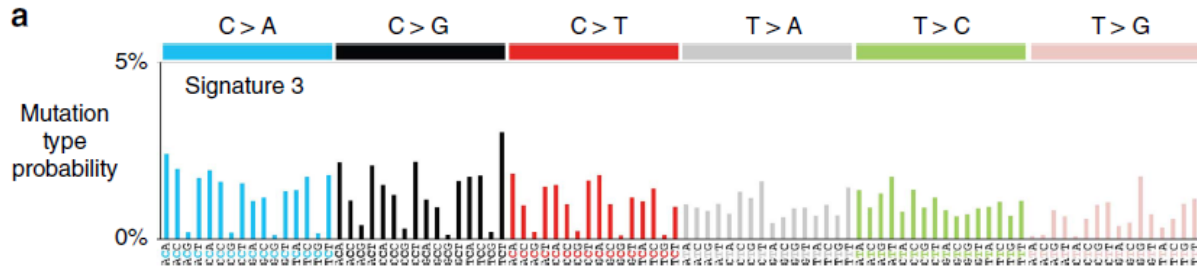
- L'oncogénétique constitutionnelle
- L'oncogénétique somatique



**Signatures of mutational processes in human cancer**

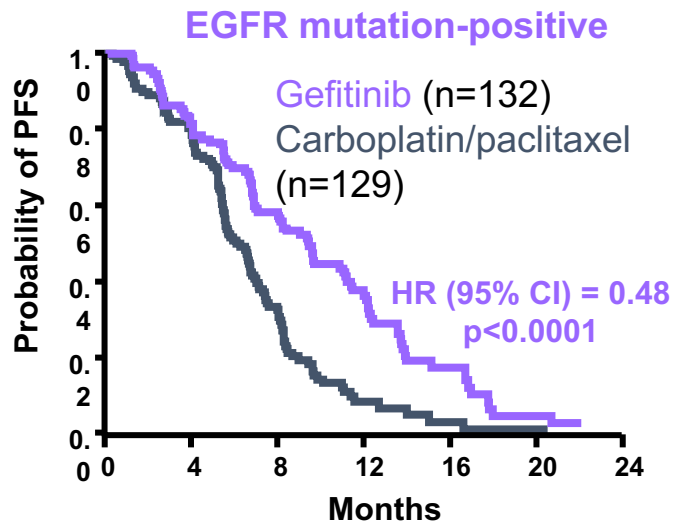
# Adenocarcinomes du pancréas

association signature BRCA / instabilité chromosomique / mutation HR (GL ou S)

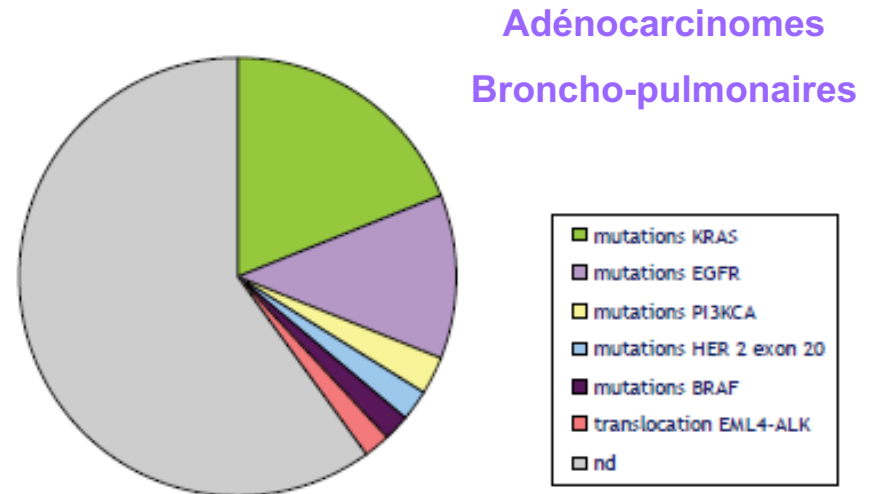


Wadell N et al, Nature 2015

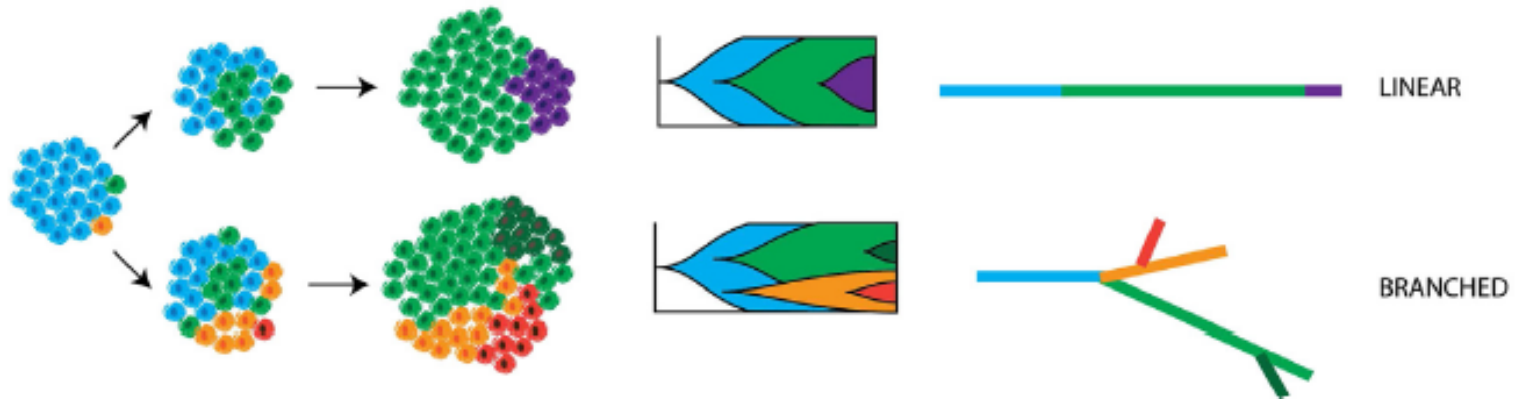
# Classification moléculaire des cancers : base de la médecine de précision



Mok T, N Engl J Med 2009

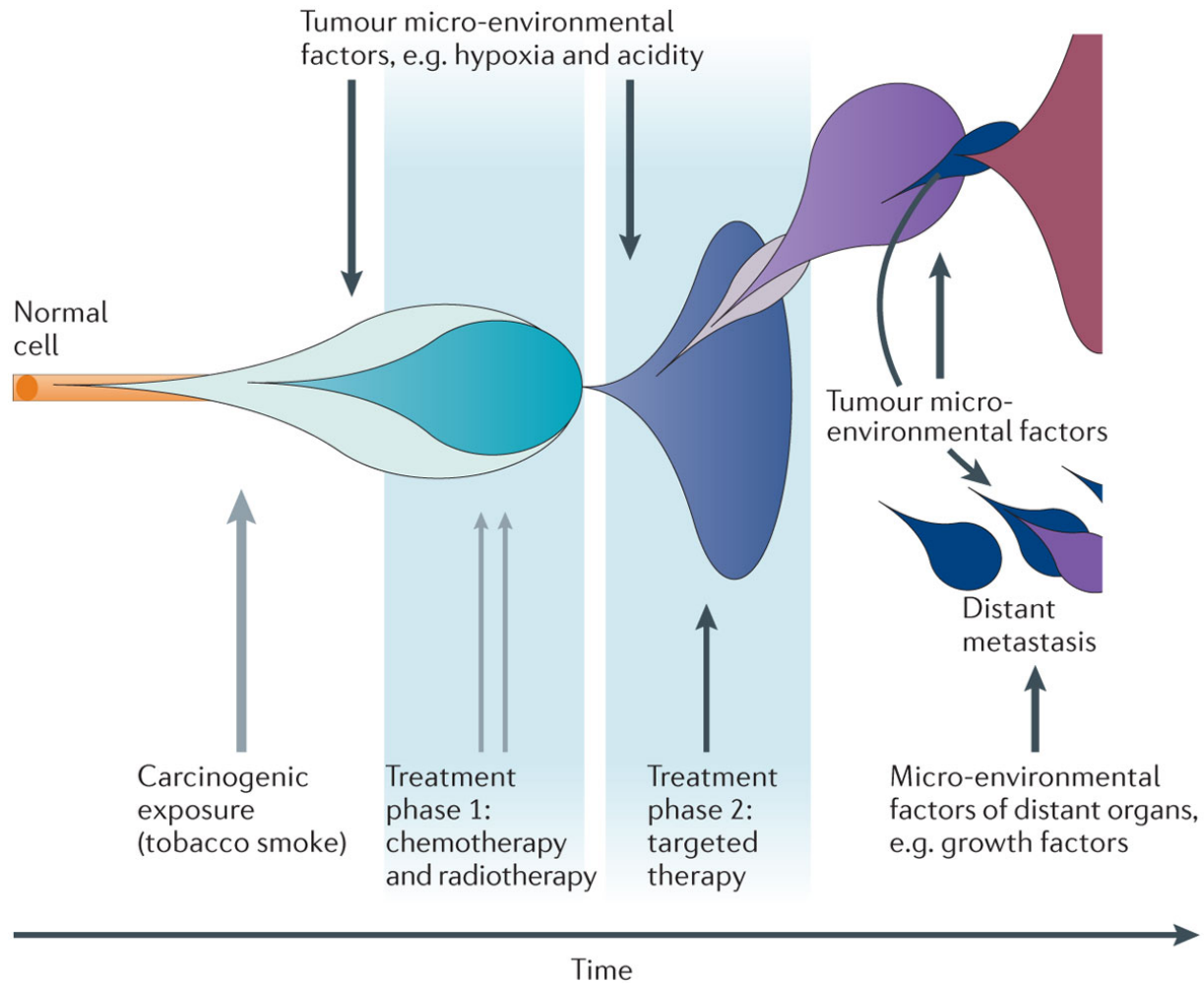


# Evolution clonale tumorale

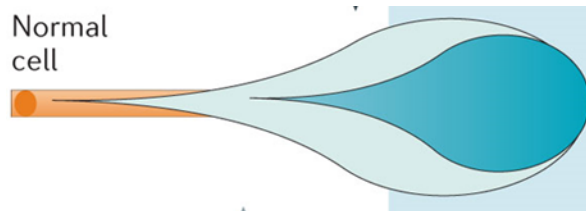


*R Burrell, C Swanton. Molecular Oncology 2014, 8: 1095-1111*





# Indications oncogénétique somatique



1 - Anomalie « driver »

Pouvant être ciblée par un traitement?

K poumon : mut *EGFR*

Mélanome : mut *BRAF*

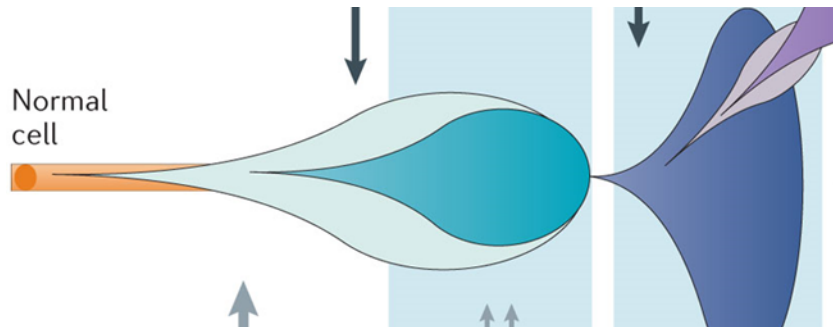
K ovaire : mut *BRCA1/2*

2- Anomalie « driver »

Conférant résistance au traitement ?

K colo-rectal : mut *RAS (KRAS, NRAS)*

# Indications oncogénétique somatique



1 - Anomalie « driver »  
Pouvant être ciblée par un traitement?

K poumon : mut *EGFR*

Mélanome : mut *BRAF*

K ovaire : mut *BRCA1/2...*

2- Anomalie « driver »  
Conférant résistance I au traitement ?

K colo-rectal : mut *RAS (KRAS, NRAS)...*

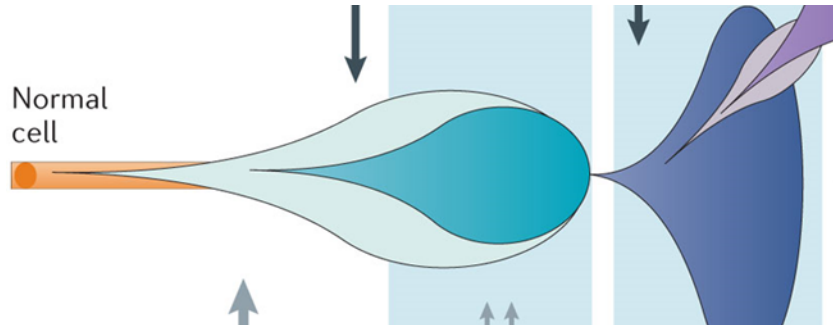
3 - Anomalie associée à résistance et  
pouvant être ciblée par un traitement?

K poumon : mut *EGFR, mut ALK...*

4 - Anomalie « actionnable » ?

Essai clinique, hors AMM....

# Indications oncogénétique somatique



Choix du prélèvement :

- Tumeur I ou II (fixée)
- Plasma

1 - Anomalie « driver »  
Pouvant être ciblée par un traitement?

K poumon : mut *EGFR*

Mélanome : mut *BRAF*

K ovaire : mut *BRCA1/2...*

2- Anomalie « driver »  
Conférant résistance à au traitement ?

K colo-rectal : mut *RAS (KRAS, NRAS)...*

3 - Anomalie associée à résistance et  
pouvant être ciblée par un traitement?

K poumon : mut *EGFR, mut ALK...*

4 - Anomalie « actionnable » ?

Essai clinique, hors AMM....

TKI-EGFR (AMM)

Erlotinib  
Gefinitib  
Afatinib  
Osimertinib

TKI-ALK (AMM)

Crizotinib  
Ceritinib  
Alectinib.....

Anti-BRAF (essais)

Vemurafenib  
Dabrafenib

TKI-MET (essais)

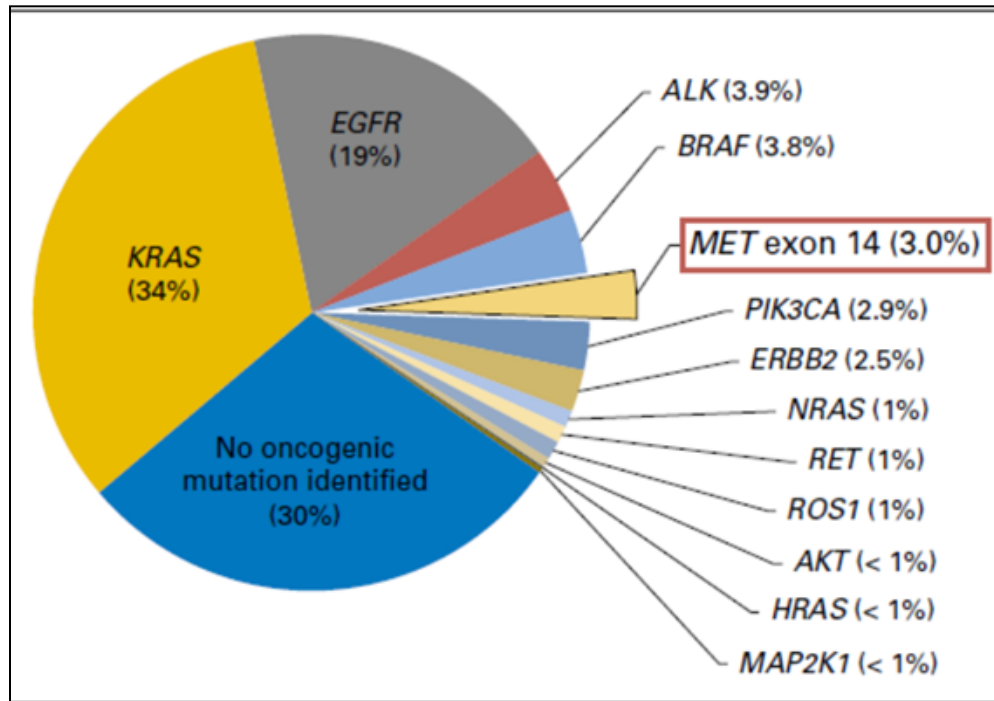
Crizotinib...

TKI-RET (essais)

Cabozantinib...

TKI-ROS1 (essais)

Crizotinib...



Service de Pneumologie  
Service de Chirurgie thoracique  
Service de Radiologie

**Types de prélèvement:**

- Pièce opératoire
- Biopsies sous scanner, bronchiques
- EBUS, liquide pleural, péricardique ...

**Service d'Anatomie Pathologique**

A Lupo, MC Charpentier, D Damotte,  
B Burroni, A Rouquette

ADN extrait  
Tissu fixé

**Service de Génétique  
moléculaire**

K Leroy, E Pasmant

**Plateforme FISH**

Réarrangements *ALK*,  
*ROS1* et *RET* et  
amplification *MET*

**Plateforme NGS**

dosage Fluorimétrie  
Séquençage NGS (panels  
de gènes ciblés)

**CR commun pathologiste et moléculaire :**

- Diagnostic histologique et % de cellules tumorales
- Diagnostic des anomalies moléculaires (Mutations gènes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *TP53*...)

**Table 1. Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Research Panel v2.**

<b>Sample type</b>	FFPE samples
<b>Application</b>	Somatic mutation detection
<b>Genes</b>	<i>KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBX7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2</i>
<b>Pairs of primers and amplicon length</b>	92 pairs of primers in a single pool 92 amplicons with an average length of 162 bp
<b>Input DNA required</b>	10 ng

# Adenocarcinomes du poumon

- Au diagnostic ou à la progression sous traitement ciblé anti-EGFR, anti-ALK
- Tissu ou plasma

→ Panel Oncomine solid tumor DNA kit

EGFR exons 18, 19, 20, 21 (10%)	→ TKI-EGFR de 1 <sup>er</sup> , 2 <sup>ème</sup> , 3 <sup>eme</sup> génération
KRAS exons 2, 3 (30%)	
BRAF exon 11, 15	→ Essais cliniques (vemurafenib, dabrafenib)
ERBB2 exon 20	→ Essais cliniques
MET exon 14 (mal couvert)	→ Essais cliniques (crizotinib)
ALK exons 22, 23,25	→ TKI-ALK de 1 <sup>ere</sup> , 2 <sup>ème</sup> , 3 <sup>ème</sup> génération
TP53 (>50%)	Informativité du test, absence contamination



# Adenocarcinomes colo-rectaux

→ Panel Oncomine solid tumor DNA kit

KRAS exons 2,3, 4 NRAS exons 2, 3, 4	Contre-Indication aux traitements anti-EGFR (mAb)
BRAF exon 11, 15	MSI sporadique (vs Lynch) Facteur pronostique (intensification CT ?)
PIK3CA exons 10,21	Essais cliniques, intérêt de l'aspirine en adjuvant ?
TP53, FBXW7, SMAD4...	Informativité du test, absence contamination

# Mélanomes

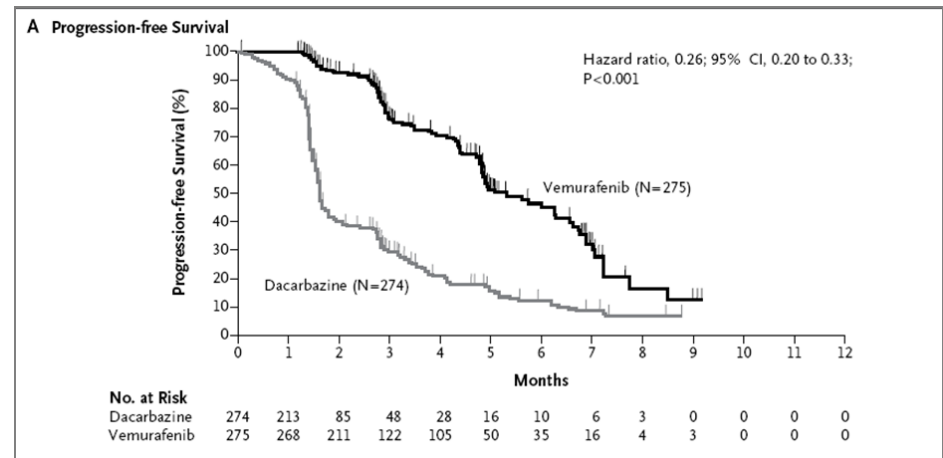
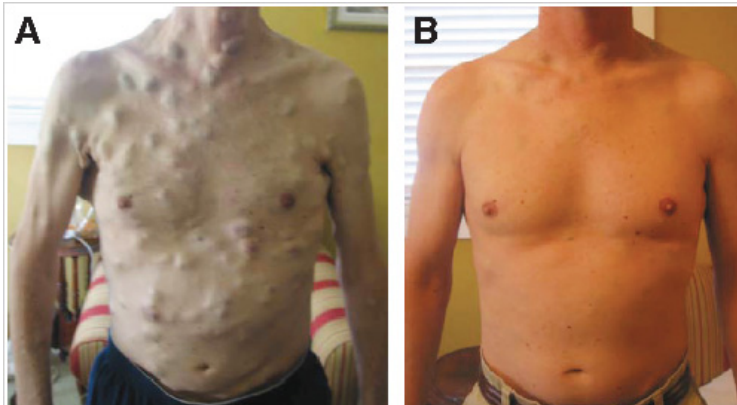
→ Panel Oncomine solid tumor DNA kit

BRAF exon 15 (V600)

→ Traitements anti-BRAF

NRAS exons 2,3

→ Essais cliniques



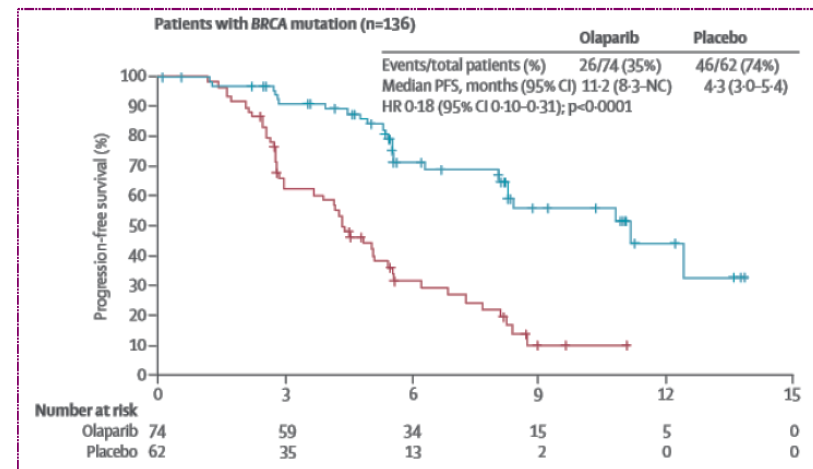
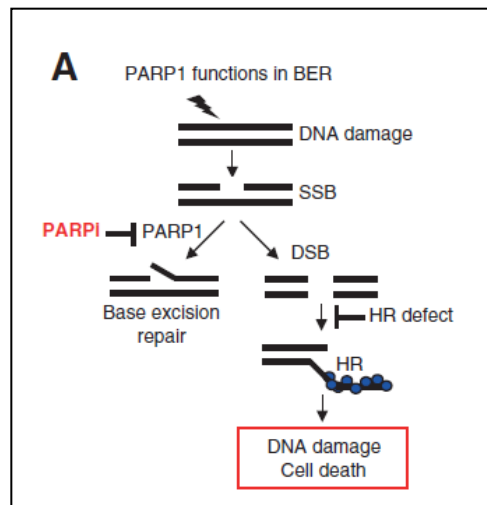
*Chapman et al, N Engl J Med 2011*

# Cancers de l'ovaire

→ Panel BRCA1/2 (community → early access TF)

BRCA1/2

→ Traitement par Inhibiteurs de PARP



# La cancer du colon dans le laboratoire avant 2014

- **Gènes APC et MYH analyse envoyée à un autre laboratoire**
- **Gènes MLH-1 et MLH-2 : séquençage Sanger dans le laboratoire**
- **Gènes MSH6 et PMS2 analyse envoyée à un autre laboratoire**
- **Plusieurs mois étaient nécessaires pour avoir un résultat**

# Dans le laboratoire depuis 2014

- Tous les gènes impliqués dans la polypose adénomateuse familiale sont **séquencés en un seul run** de NGS
- Tous les gènes impliqués dans l'HNPC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer)/syndrome de Lynch Syndrome sont **séquencés en un seul run** de NGS
- Tous les gènes possiblement responsables sont séquencés chaque semaine chez 24 patients
- Résultat fourni en **une semaine et non un mois**

L'outil est donc puissant, mais il se pose le problème de l'accès au tissu à analyser

- **Dans le cadre du diagnostic prénatal le prélèvement de tissu foetal présente un risque d'avortement spontané**
- **Dans le cadre du cancer Il n'est possible d'avoir du tissu tumoral que si une intervention chirurgicale ou une biopsie est réalisée et cette dernière n'est pas toujours possible**

## Early report

## Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

*Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat*

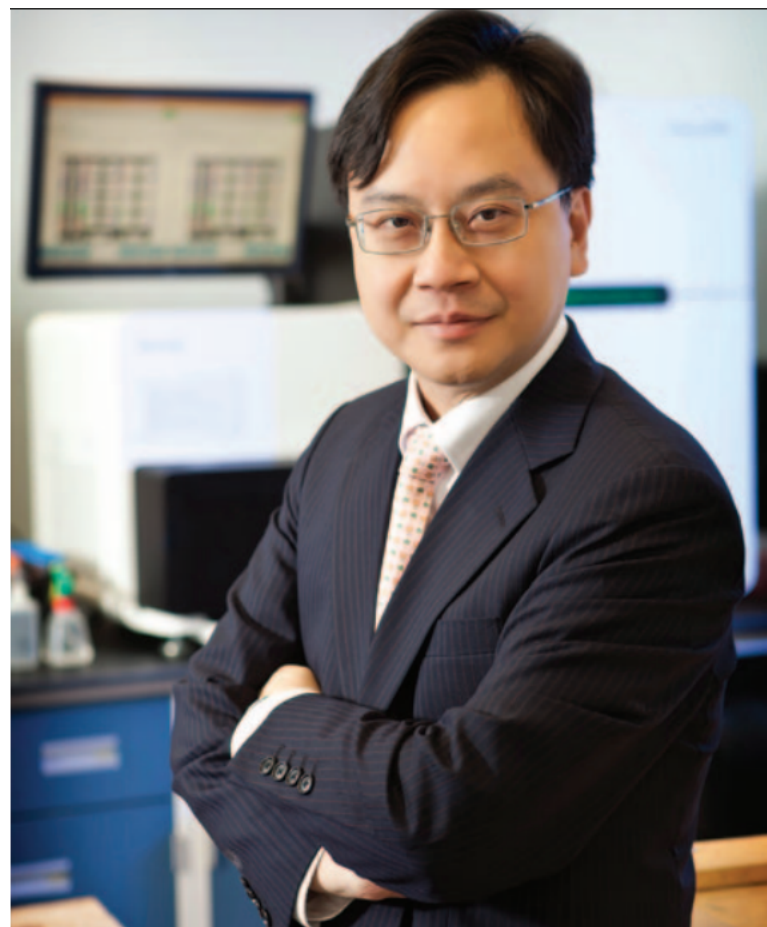
### Summary

**Background** The potential use of plasma and serum for molecular diagnosis has generated interest. Tumour DNA has been found in the plasma and serum of cancer patients, and molecular analysis has been done on this material. We investigated the equivalent condition in pregnancy—that is, whether fetal DNA is present in maternal plasma and serum.

**Methods** We used a rapid-boiling method to extract DNA from plasma and serum. DNA from plasma, serum, and nucleated blood cells from 43 pregnant women underwent a sensitive Y-PCR assay to detect circulating male fetal DNA from women bearing male fetuses.

**Findings** Fetus-derived Y sequences were detected in 24 (80%) of the 30 maternal plasma samples, and in 21 (70%) of the 30 maternal serum samples, from women bearing male fetuses. These results were obtained with only 10  $\mu$ L of the samples. When DNA from nucleated blood cells extracted from a similar volume of blood was used, only five (17%) of the 30 samples gave a positive Y signal. None of the 13 women bearing female fetuses, and none of the ten non-pregnant control women, had positive results for plasma, serum or nucleated blood cells.

**Interpretation** Our finding of circulating fetal DNA in maternal plasma may have implications for non-invasive prenatal diagnosis, and for improving our understanding of the fetomaternal relationship.

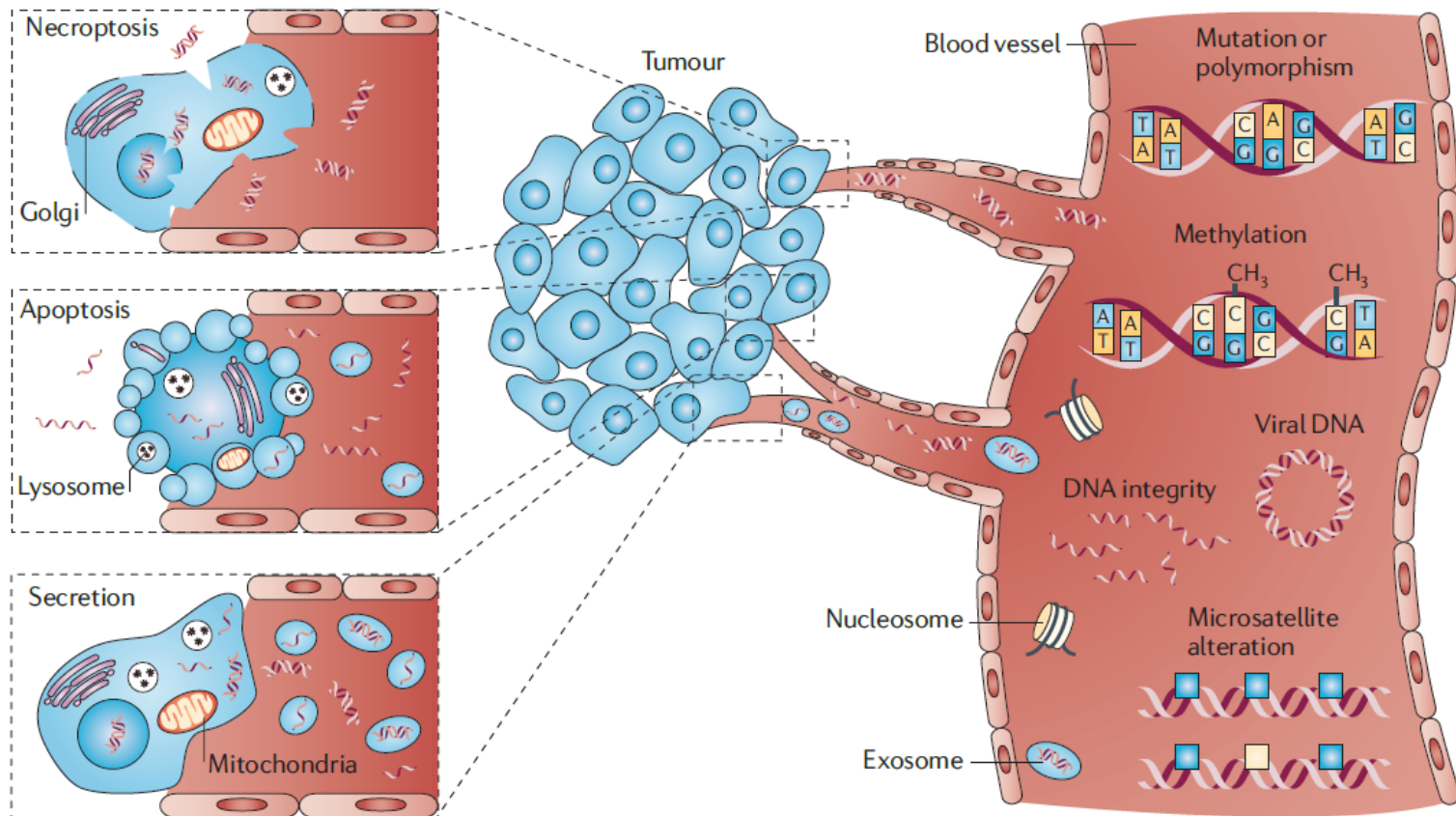


# Il se pose aussi un problème de sensibilité

- **Dans le cadre du diagnostic prénatal le sang de la mère ne contient que quelques copies d'ADN foetal mélangé à son propre ADN circulant qui est très majoritaire**
- **Dans le cadre du cancer, qu'il s'agisse d'une biopsie ou d'ADN tumoral circulant l'analyse porte sur un mélange d'ADN normal et d'ADN tumoral**



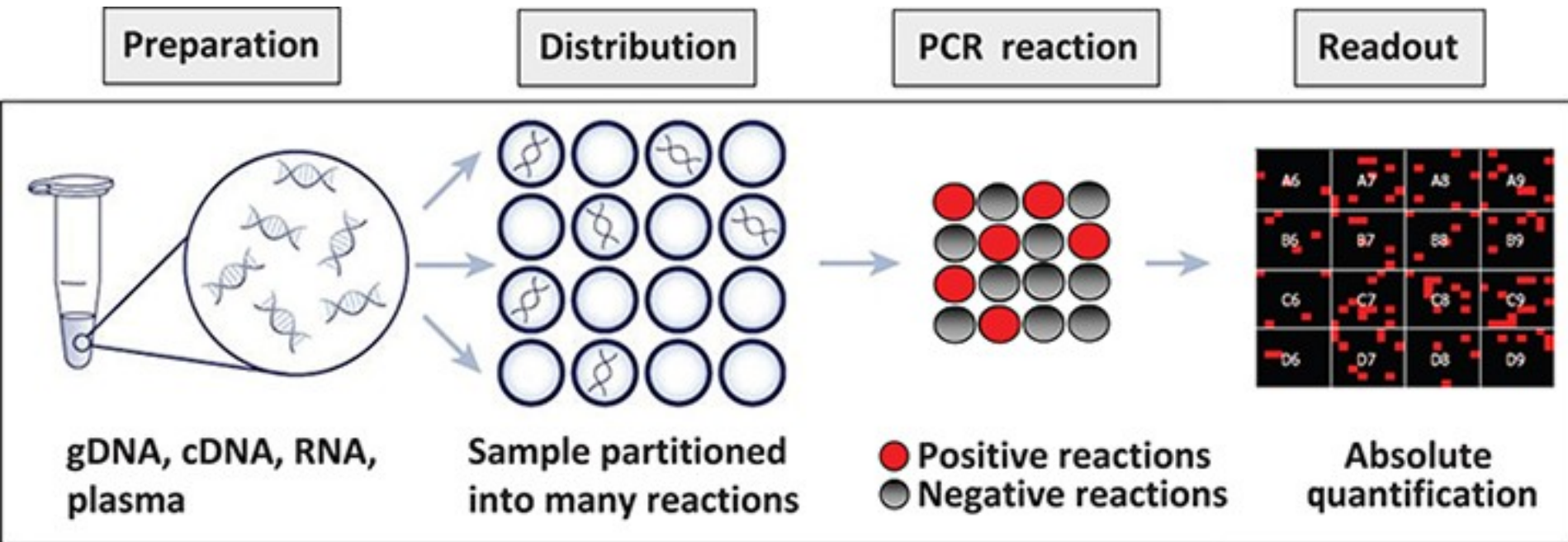
# La biopsie liquide



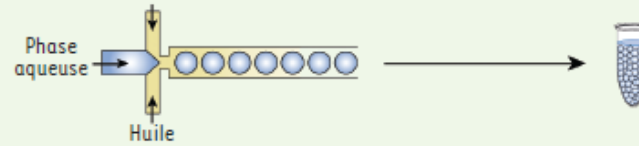
Pour résoudre le problème de la  
sensibilité

**Une nouvelle méthode a été  
développée : La PCR Digitale**

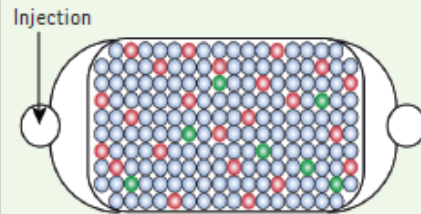
# Principe de la PCR Digitale



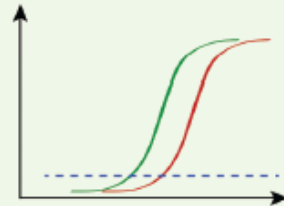
**1 Encapsulation des molécules d'ADN**



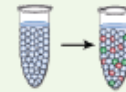
**2 Réinjection, thermocyclage et mesure de fluorescence sur puce (éventuellement en temps réel)**



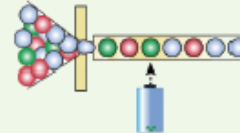
**3 Analyse des signaux de fluorescence**



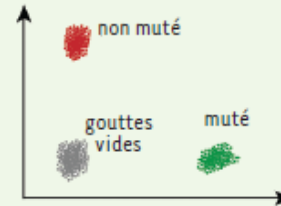
**2 Thermocyclage hors puce**



**3 Réinjection et mesure de fluorescence en flux continu par un laser**



**4 Analyse des signaux de fluorescence**



# Systeme à 200.000 micro-chambres de Fluidigm

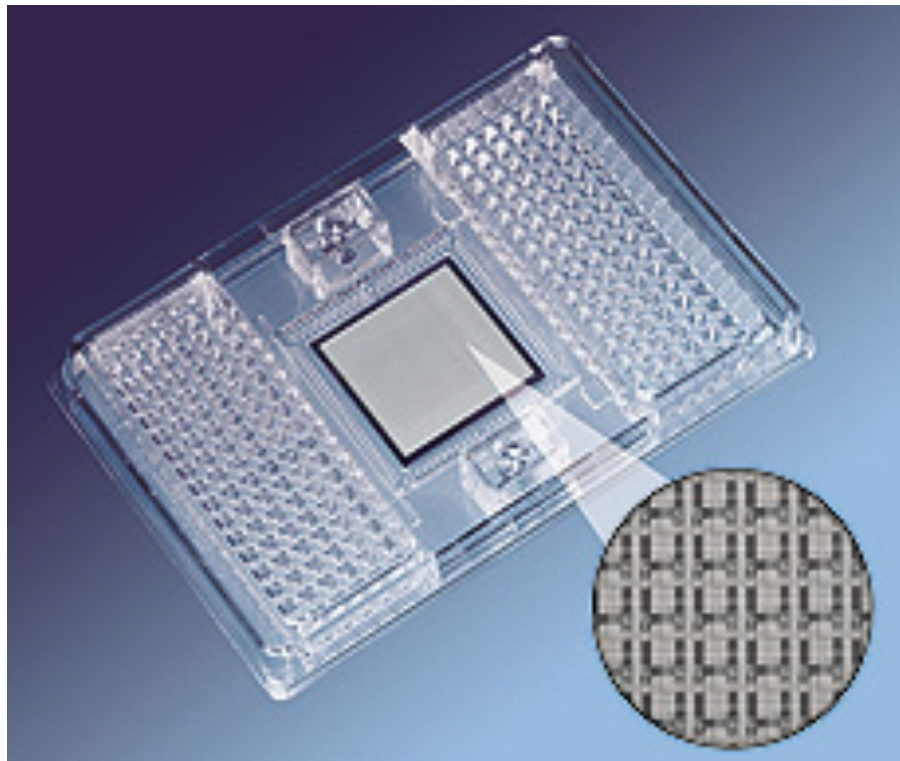
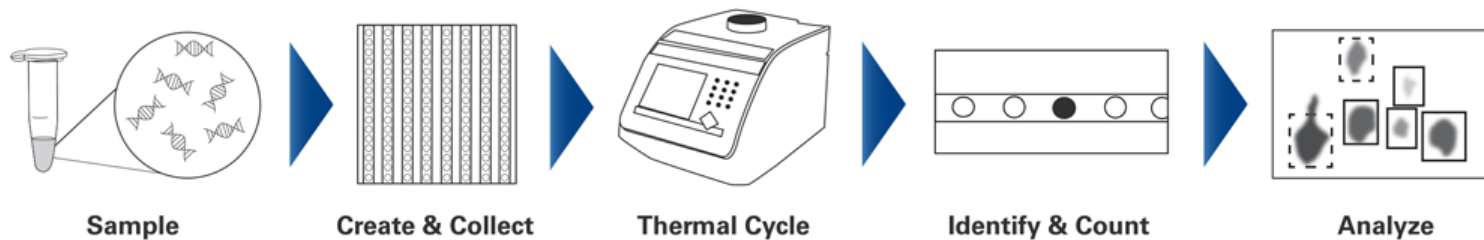


Image Fluidigm

# Système RainDance

10.000.000 de gouttes de quelques pl  
dans chacun des 8 canaux


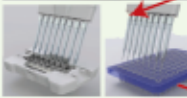
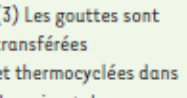




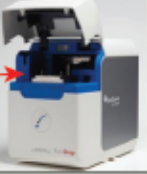


# Les systèmes à puits

Fournisseur	Instrument et prix	Nombre de compartiments	Processus	qPCR	Analyse multiplex
Fluidigm Corporation	BioMark™ HD \$ 250 000	Puce 12 entrées : 9 180 partitions de 6 nL	(1) Échantillons chargés dans le Digital Array 	Oui	5 couleurs/5 cibles (la 5 <sup>e</sup> couleur est l'ultraviolet)
	EP1™ \$ 150 000	Puce 48 entrées : 36 960 partitions de 0,85 nL	(2) Le Digital Array est placé dans le contrôleur (3) Le système BioMark réalise le thermocyclage et l'analyse de fluorescence 	Non	5 couleurs/5 cibles
Life Technologies	OpenArray® RealTime PCR System \$ 140 000 et QuantStudio™ 12 k Flex \$ 90 000-\$ 190 000	Par plaque, 3 072 partitions de 33 nL (analyse de 3 à 4 plaques en parallèle)	(1) Chargement des échantillons avec le système AccuFill  (2) Thermocyclage (3) Analyse des données	Oui	2 couleurs/2 cibles
SlipChip	Plate-forme SlipChip N/A  Plate-forme rotationnelle multivolume N/A	1 280 partitions de 2,6 nL  640 partitions 160 partitions de 125 nL 160 partitions de 25 nL 160 partitions de 5 nL 160 partitions de 1 nL	  	Oui	***


\*\*\*: il n'y a pas de système de détection dédié pour cette plate-forme, le constructeur mise sur des systèmes de détection déjà présents dans les laboratoires (microscope à fluorescence, etc.)

# Les systèmes à flux de gouttes

Fournisseur	Instrument et prix	Nombre de compartiments	Processus	qPCR	Analyse multiplex
<b>Bio-Rad</b>	<b>Système QX100™</b> (2 machines : générateur et analyseur de gouttes) \$ 89 000	20 000 gouttes de 1 nL (8 échantillons en parallèle)	<p>(1) Échantillons chargés dans la puce</p>  <p>(2) Transfert de la puce dans le générateur de gouttes</p>  <p>(3) Les gouttes sont transférées et thermocyclées dans des microtubes</p>  <p>(4) Détection de la fluorescence des gouttes avec l'analyseur</p> 	Non	2 couleurs/2 cibles
<b>RainDance Technologies</b>	<b>RainDrop™ Digital PCR</b> (2 machines : générateur et analyseur de gouttes) \$ 100 000	5 à 10 millions de gouttes de 5 pL (8 échantillons en parallèle)	<p>(1) Échantillons chargés dans la puce</p>  <p>(2) Transfert de la puce dans le générateur de gouttes (<i>source</i>)</p>  <p>(3) Les tubes contenant les gouttes sont thermocyclés</p>  <p>(4) Détection de la fluorescence des gouttes avec l'analyseur (<i>sense</i>)</p> 	Non	2 couleurs/10 cibles

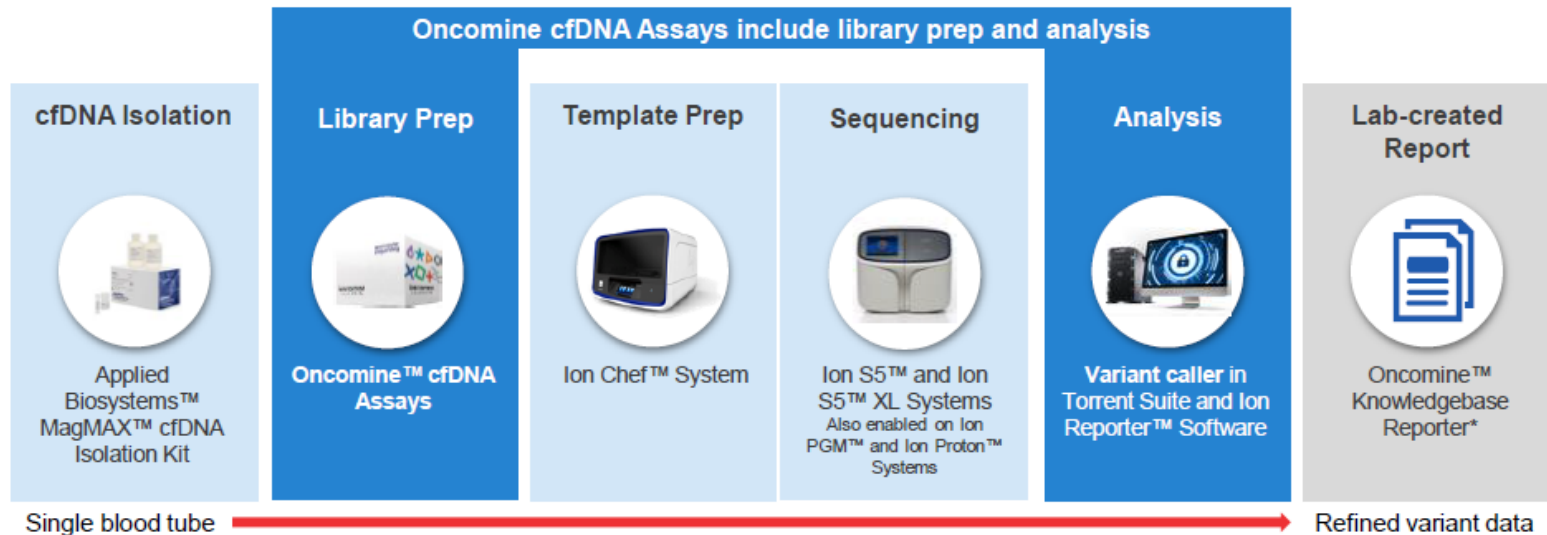


Méthode de détection	Sensibilité	Adaptée à ce type d'échantillon
Séquençage par la méthode Sanger	> 10 %	Tissu tumoral
Pyroséquençage	5-10 %	Tissu tumoral
<i>High resolution melting</i> (HRM)	5 %	Tissu tumoral
Séquençage nouvelle génération	2 %	Tissu tumoral
qPCR en temps réel*	1-10 %	Tissu tumoral
BEAMing, PCR digitale	< 0,01 %	ADN tumoral circulant, variants rares dans le tissu tumoral



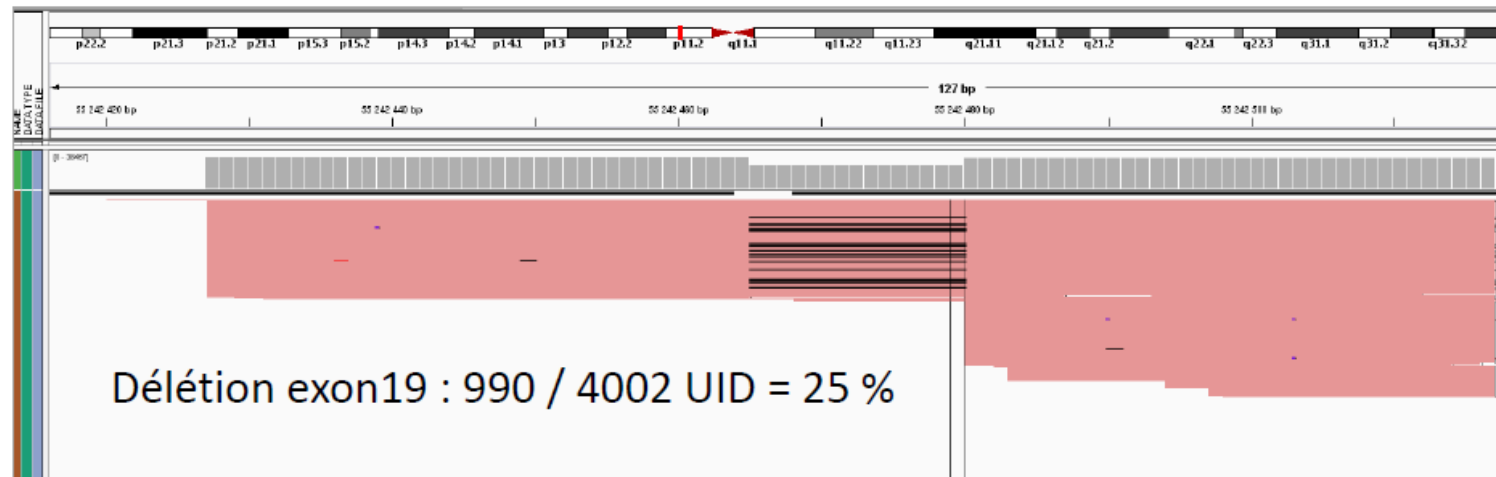
# La procédure avec l'ADN plasmatique est a même qu'avec l'ADN extrait d'une tumeur

## Oncomine Cell-free DNA Assays



# Analyse des ADNs plasmatiques tests (EGFR)

Statut EGFR de référence (NGS Oncomine™ solid Tumour DNA)	n	concordance	Résultats avec le kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay*
Pas de variant détecté	4	😊	Pas de variant détecté (n=4)
del19 VAF > 1,5 %	5	😊	Détection dans 5/5 cas



# Analyse des ADNs plasmatiques tests (TP53)

Statut TP53 de référence (NGS Oncomine™ solid Tumour DNA)	Résultats avec le kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay* (UID)
Neg (n=10)	Neg (n=10)
R282W (0,18%)	R282W (0,17 %)
R273C (3,9%)	R273C (5,0 %)
C176Y (11%)	C176Y (9%)
Y220C (0,56%) + H179R (0,59%)	Y220C(0,44% )+ H179R (0,52%)
R196* (0,61%)	Non couvert par le design
V274A (3%)	Détectée dans IGV, non callée VC

Le NGS et la PCR digitale sont  
aussi des outils formidables pour

**Le diagnostic prénatal**

# L'ADN foetal dans le sang de la mère

- Une première estimation ; 3 à 6% de l'ADN circulant dans le sang de la mère
- Les derniers résultats montrent qu'il y en a en général plus : 4 à 35% (en routine 10 à 15%)
- On sait maintenant qu'il en faut au moins 4% pour obtenir un résultat exploitable en diagnostic
- La quantité varie en fonction de l'âge de la grossesse :
  - 4 à 6% vers 5 SA et on en trouve jusqu'à l'accouchement
  - En pratique le diagnostic est fait entre la 9 SA et 12 SA
- La durée de vie de l'ADN dans le sang de la mère n'est que de quelques minutes
- Il disparaît complètement 30 min après l'accouchement

# Avec le NGS

**Le diagnostic des aneuploïdies est possible à partir du sang de la mère**

## C'est utile car les résultats du dépistage classique sont mauvais

- Il ne détecte que 85 à 90% des fœtus atteints
- Il y a 4,5 à 5% de faux positifs (20% il y a quelques années) conduisant à un caryotype inutile
- Environ 50.000 fœtus sont étudiés pour rien. Avec un risque de perte du fœtus lié à l'acte de 1%, cela fait environ cela fait environ 500 fœtus perdus pour rien



# Le diagnostic prénatal des maladies héréditaires est aussi concerné

- La détermination du sexe du fœtus

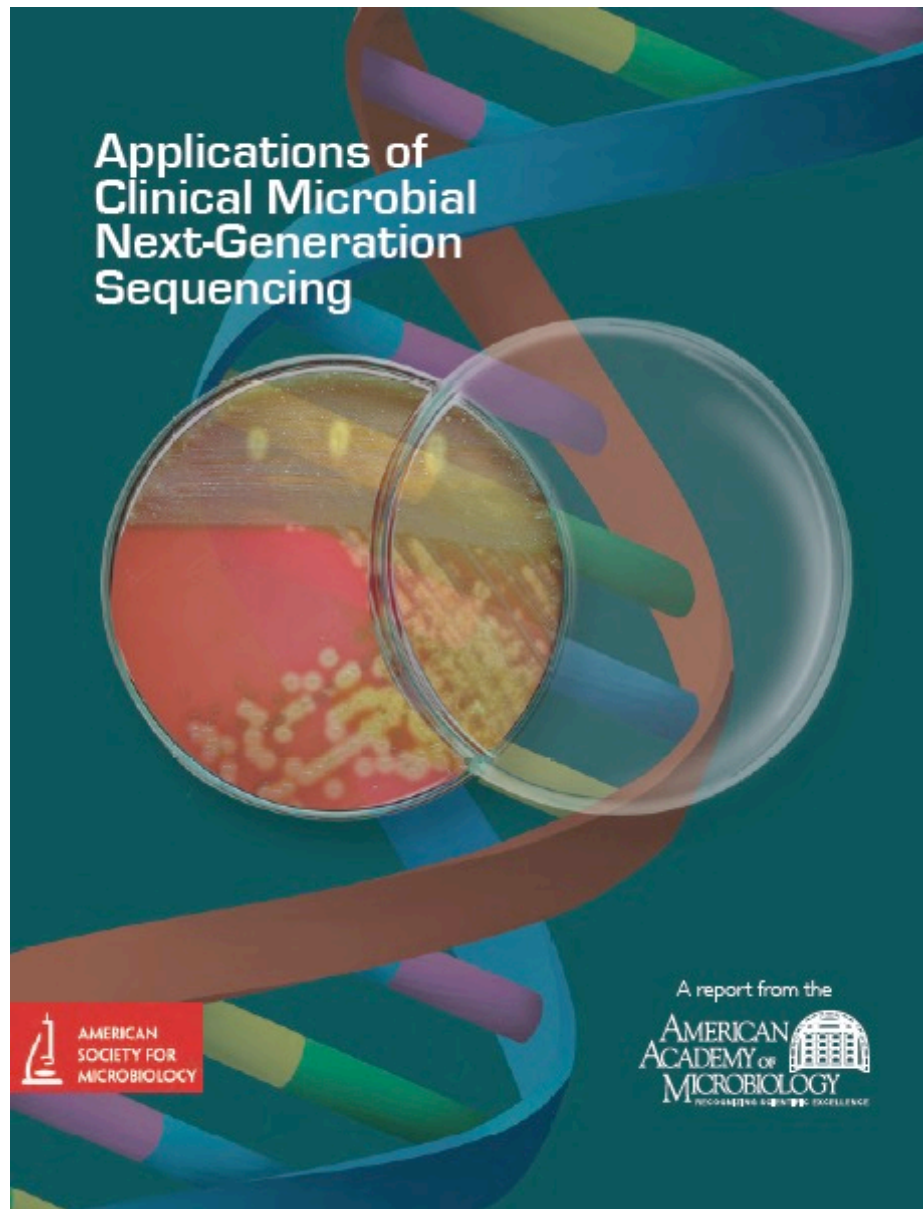
Maladies mendéliennes : détection de la mutation transmise par le père et absente chez la mère

- Maladies autosomiques dominantes : achondroplasie

- Maladies autosomiques récessives : identification des fœtus ayant un risque de  $\frac{1}{2}$  d'être atteints

# Le NGS

**Un outil bientôt incontournable en  
Microbiologie**



**Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in April 2015.**

## Quelques communiqués de presse

**Eurofins lance des tests NGS accrédités pour l'identification non ciblée de l'ensemble des bactéries d'une matrice**

**bioMérieux et Illumina signent un accord pour co-développer une solution de Séquençage Nouvelle Génération (NGS) pour le suivi épidémiologique des infections bactériennes**

18 Novembre 2014

**bioMérieux EpiSeq™ : LA SOLUTION de choix pour une meilleure gestion des épidémies nosocomiales, tirant profit d'un NGS performant, *Powered by Illumina™***

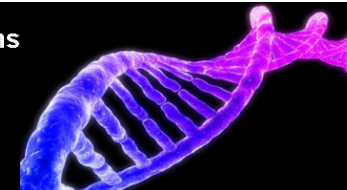
### **Une nouvelle ère dans le diagnostic microbiologique**

Habituellement, la détection des agents pathogènes résistants se fait à l'aide de l'amplification des acides nucléiques par réaction en chaîne par polymérase et par séquençage de Sanger. Cela devrait changer avec l'introduction d'une plateforme de séquençage nouvelle génération (NGS) dans la routine du diagnostic.

08:45	Accueil des participants
09:15	Application des NGS à l'étude d'un pathogène alimentaire : Escherichia coli productrice de Shiga toxine (STEC) Sabine Delannoy, Anses
09:45	Whole-genome mapping : nouvelle méthode de typage des isolats - avantages et limites Lucie Plourde, Sanofi-Pasteur
10:15	Séquençage de nouvelle génération du VIH en pratique courante Stéphanie Raymond, CHU Toulouse Jacques Izopet, CHU Toulouse
10:45	Pause-café
11:15	Analyse comparative de la sensibilité du séquençage métagénomique et de la PCR pour détecter un simulant d'agent pathogène (Bacillus atrophaeus) dans des échantillons environnementaux Dephine Plaire, CEA, Laboratoire de transcription et de génomique
11:45	Génotypage de résistance du VHC par séquençage à haut débit, applications et implémentation en routine diagnostique Christophe Rodriguez, CNR Hépatites virales B, C, delta, Plateforme NGS du Laboratoire de Virologie, Hôpital H. Mondor
12:15	Comparaison séquençage à haut débit versus séquençage Sanger dans la détection de variants minoritaires pour l'étude des résistances aux anti-rétroviraux de patients naïfs infectés par le VIH. Kazali Alidjinou, Institut de Microbiologie, CHU Lille Joséphine Deldalle, Institut de Microbiologie, CHU Lille Christophe Hallaert, Institut de Microbiologie, CHU Lille
12:45	Pause déjeuner
13:45	Comparaison de deux outils bio-informatiques pour l'épidémiologie des infections à Clostridium difficile. Rémi Le Guern, Institut de Microbiologie, CHU Lille Christophe Hallaert, Institut de Microbiologie, CHU Lille
14:00	Traçage moléculaire par NGS à haute précision pour Mycobacterium tuberculosis et Staphylococcus aureus Philip Supply, CNRS, Institut Pasteur de Lille
14:30	Deeplex-MycTB, un nouvel outil de diagnostic de Mycobacterium tuberculosis basé sur le NGS Cyril Gaudin, Genoscreen, Lille
15:00	Plus d'excuses pour ne pas passer au NGS ! Gaël Kaneko, BioMérieux
15:30	PathoTRACK, une plateforme d'analyse de données de séquençage haut débit pour le NRBC Stéphane Cruveiller, CEA - Institut de Génomique, Evry
16:00	Exploitez largement vos données bio-informatiques du NGS ! Bruno Pot, Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgique

## Le NGS et ses Applications

Mardi 31 mai 2016  
ASIEM, Paris



# A l'évidence la cible à terme est

## L'utilisation de la métagénomique pour l'identification sans a priori des bactéries

### Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection

*Robert Schlberg, MD, MPH; Charles Y. Chiu, MD, PhD; Steve Miller, MD, PhD; Gary W. Procop, MD; George Weinstock, PhD; the Professional Practice Committee and Committee on Laboratory Practices of the American Society for Microbiology; the Microbiology Resource Committee of the College of American Pathologists*

By combining unbiased sequencing, rapid data analysis, and comprehensive reference databases, metagenomics can be applied for hypothesis-free, universal pathogen detection, promising to improve diagnostic yield for syndromic testing of these infections.

Arch Pathol Lab Med—Vol 141, June 2017

Le problème central et bloquant

**La qualité et l'exhaustivité  
des bases de données**

# Quelques pistes de réflexion

- Le NGS aura des incidences sur l'organisation de la Biologie
- Le rêve est devenu un cauchemar pour certains Biologistes (comme moi)
- Que faire de l'information trouvée (en dehors de celle qui concerne la question initiale)