

Etude d'1 CNV impliqué dans la coloration de la robe chez le porc

Présentation du Projet

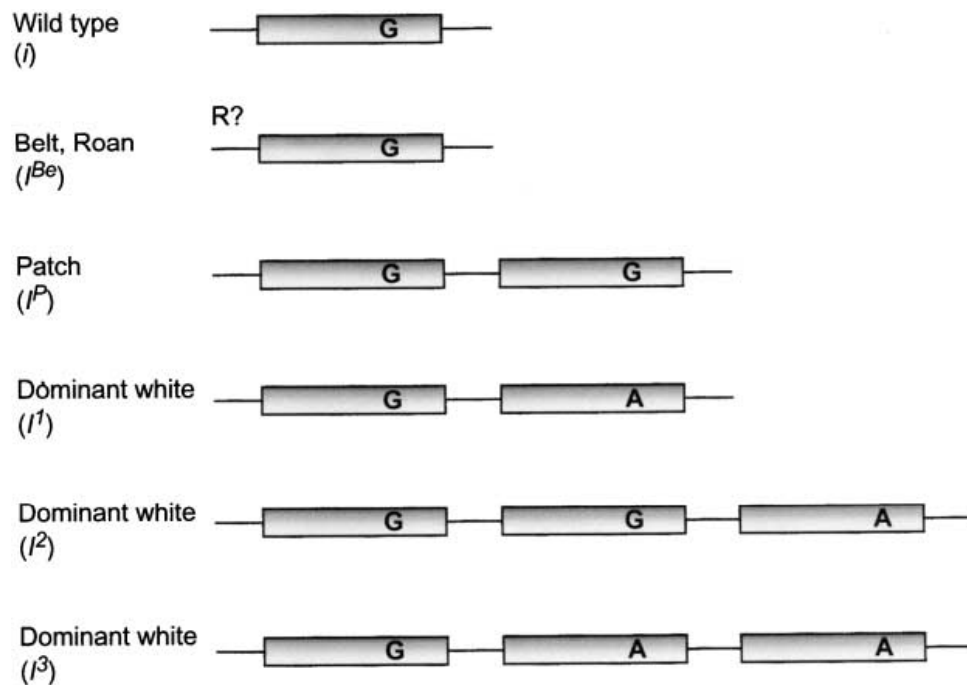
- Etude d'un CNV impliqué dans la coloration de la robe chez le porc

[Unexpectedly high allelic diversity at the KIT locus causing dominant white color in the domestic pig.](#)

Pielberg G, Olsson C, Syvänen AC, Andersson L.

Genetics. 2002 Jan;160(1):305-11.

PMID: 11805065 [PubMed - indexed for MEDLINE] [Free PMC Article](#)



Animaux colorés (Sanglier, Duroc, Meishan)

La duplication du gène induit l'extinction de la couleur

Animaux blanc (Large White, Landrace)

Présentation du Projet

- Nous souhaitons valider 3 Objectifs / DD-PCR :
- Analyse du CNV par Race
- Analyse du CVN intra famille
- Analyse Ech digérés vs Ech non digérés

- Animaux utilisés pour les Tests :

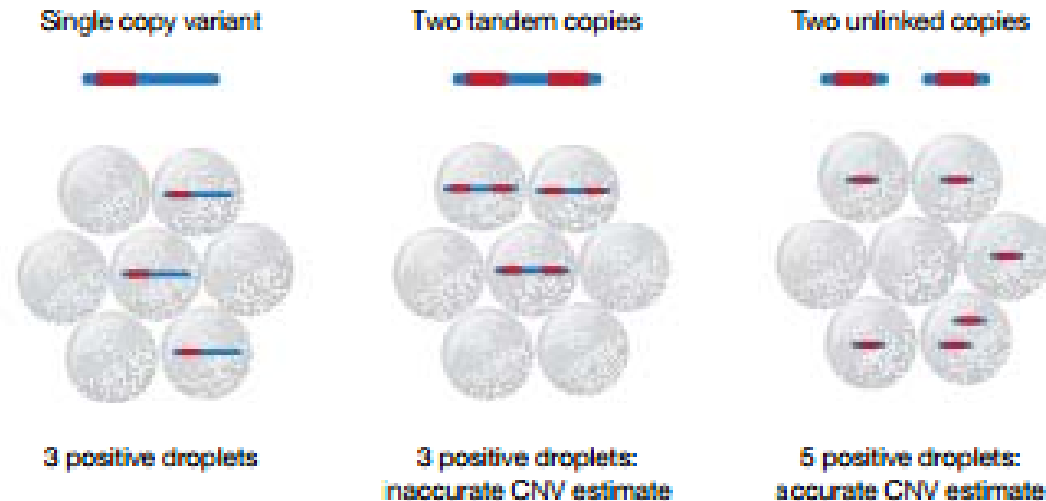
- 7 ind de la race Duroc
- 8 ind de la race Piétrain
- 8 ind de la race Landrace
- 6 ind F0 LargeWhite
- 6 ind F0 Meishan
- 29 ind F1 issus du croisement LW x MS



Réalisation de l'expérience en DD- PCR

Etapes préliminaires de la DD-PCR

1/ Digestion Enzymatique de l'ADNg:



La taille d'1 élément repliqué = 450Kb

Digestion par MSE I : TTAA

Vérification in-silico que cette enzyme ne coupe pas dans la zone à amplifier du gène d'intérêt (105pb) et du gène de référence (97pb).

Etapes préliminaires de la DD-PCR

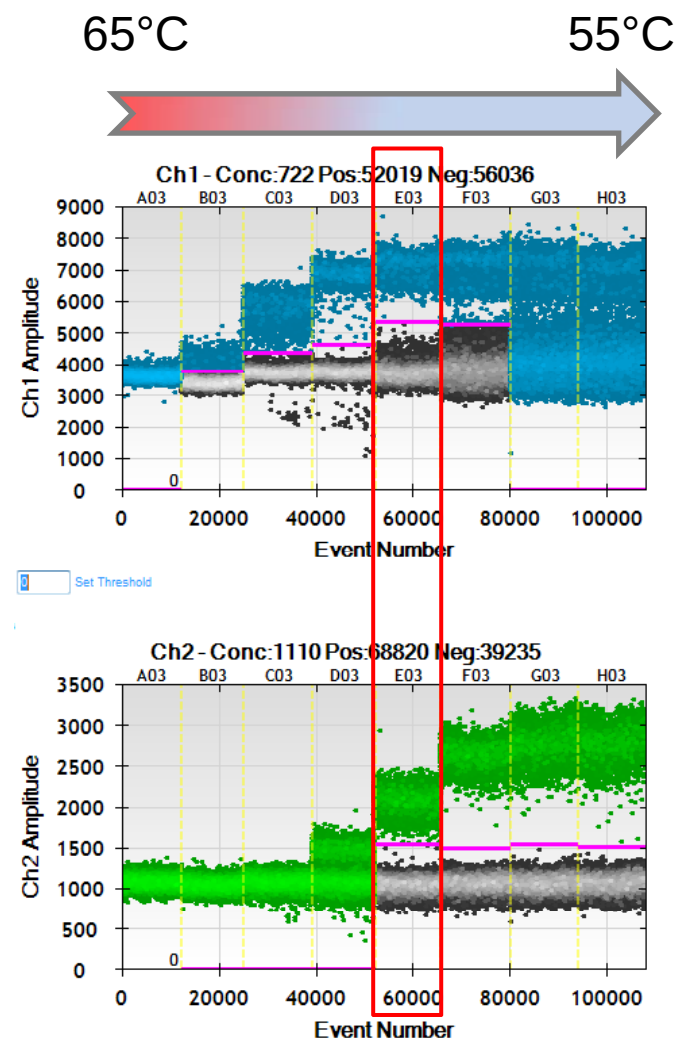
2/ Test des sondes / Gradient de température :

Sondes Hydrolyse (Sigma) = Type Taqman
 ESR 6-Fam (gène de Référence)
 Kit Hex (gène d'intérêt)

65 – 55°C 40 cycles

Pool d'ADN digéré à 5ng/μl

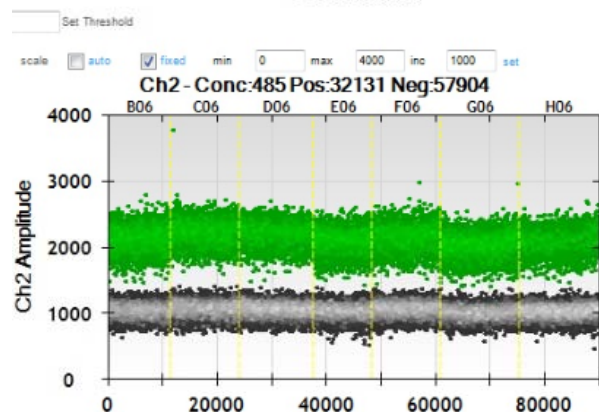
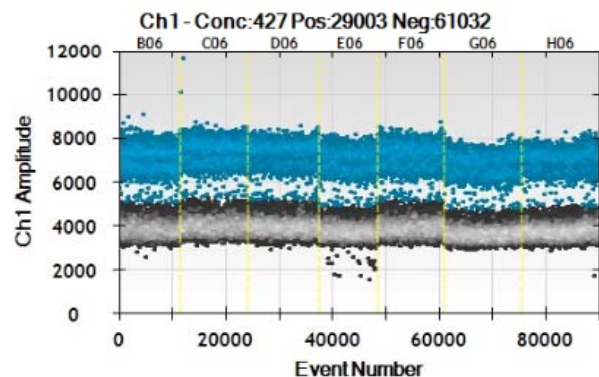
*	01	02	03	04	05
A	CUR	CUR	CUR		
B	CUR	CUR	CUR		
C	CUR	CUR	CUR		
D	CUR	CUR	CUR		
E	CUR	CUR	CUR		
F	CUR	CUR	CUR		
G	CUR	CUR	CUR		
H	CUR	CUR	CUR		



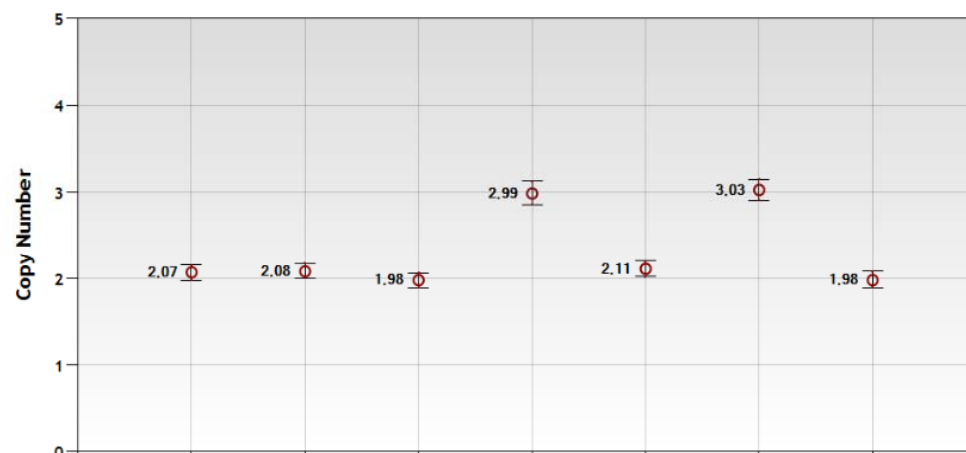
Condition retenue = puit E (soit 60°C)

Résultats de la DD-PCR Analyse / Race

- **Race Duroc** (nb de copie attendue = 2)



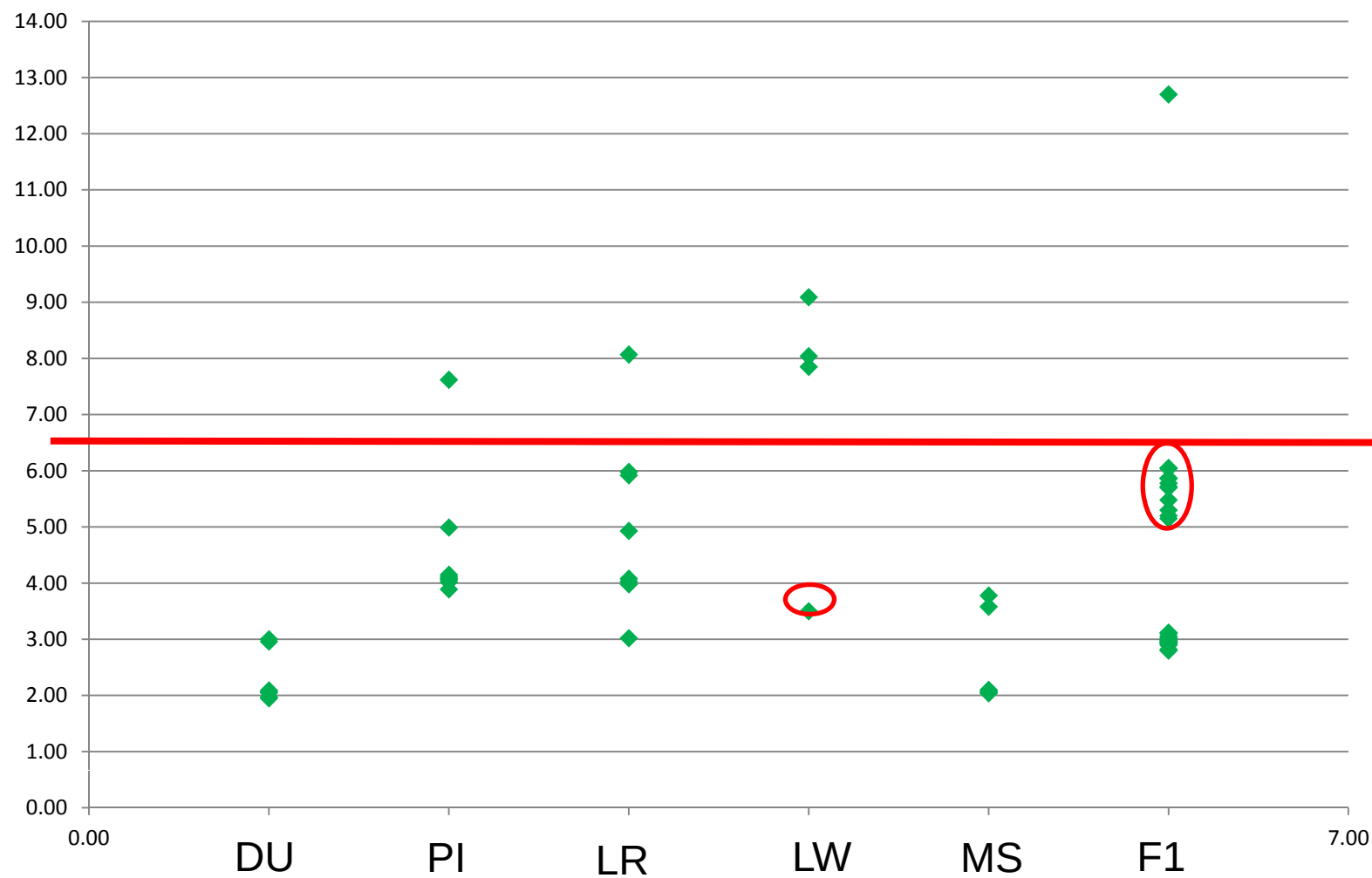
*	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	NN	RU	
B	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	
C	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	
D	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	
E	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	
F	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	
G	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	
H	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	RU	NN	RU	



5 ind DU présentent bien 2 copies comme attendues

2 ind DU présentent 3 copies mais ces 2 animaux ont un haplo commun non présent chez les 5 autres (estimé avec les SNP encadrant KIT) : **OK**

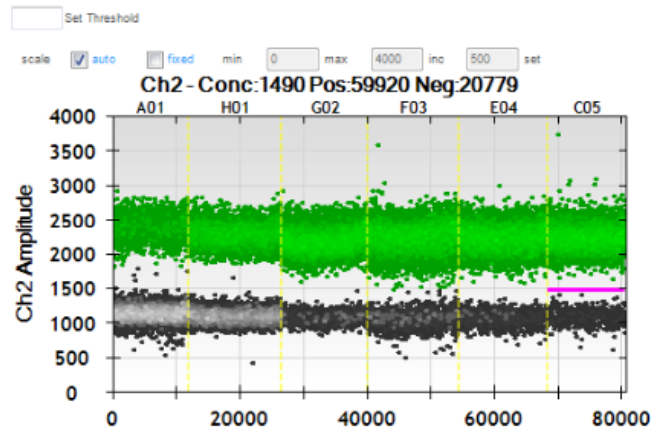
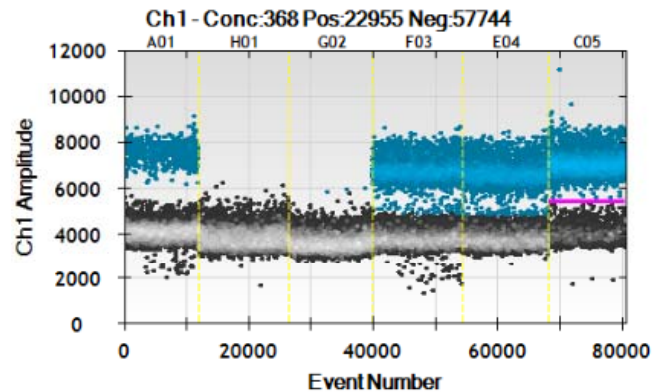
Nombre de copie de KIT /Ind / Race



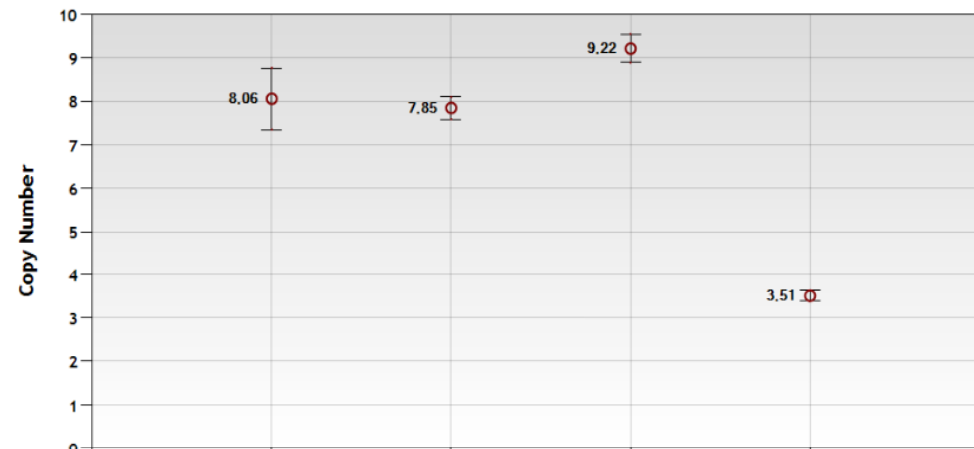
Analyse / Race

- Race Large White**

(nb de copie attendue $3 > \text{CNV} < 6$)



	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11
A	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CNN	CRU
B	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU
C	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU
D	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU
E	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU
F	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU
G	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU
H	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU	CRU



2 ind /6 qui n'ont pas fonctionné, peut être un problème avec le gène de référence

Tous les individus présentent bien un nombre de copies > 3

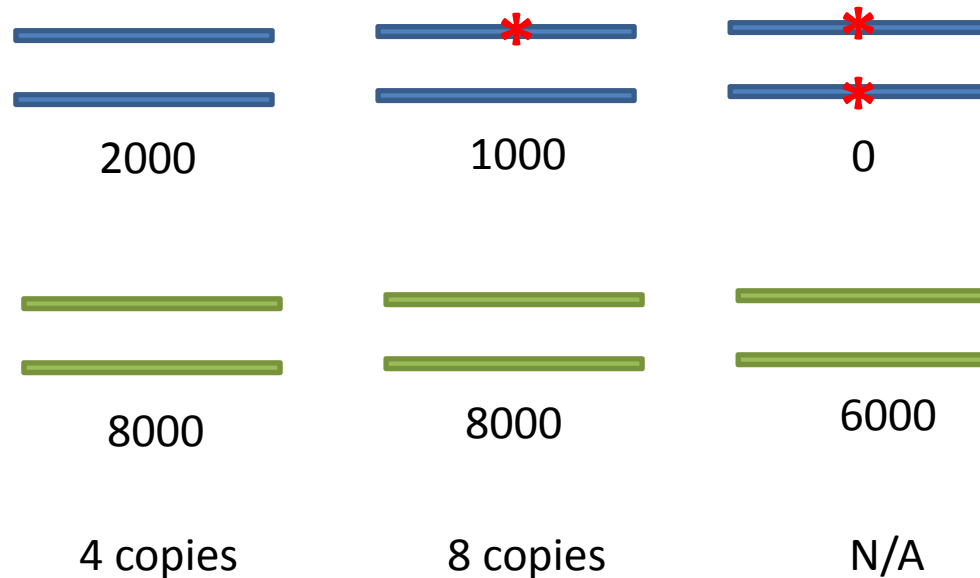
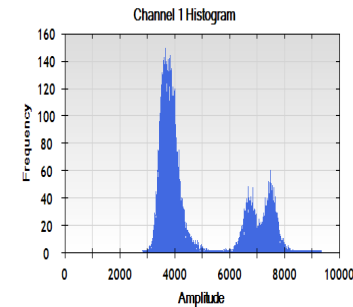
Nb de copie est assez élevés on attendait un nombre de 6 copies max ??

Problème possible avec le gène de référence ESR

La sonde possède un mismatch (1nv SNP/race) :

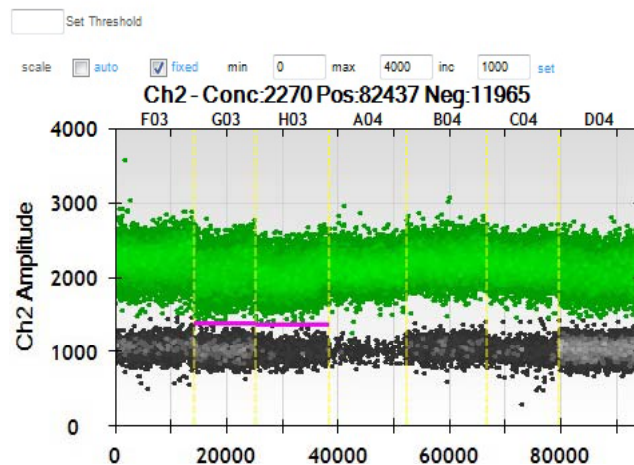
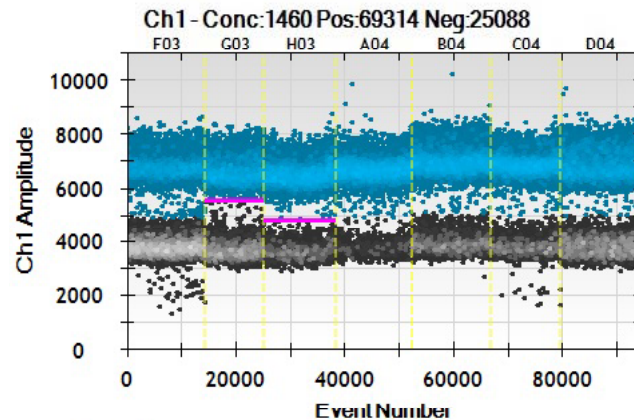
Faux négatif

Nb de copies surestimés



Analyse / Famille

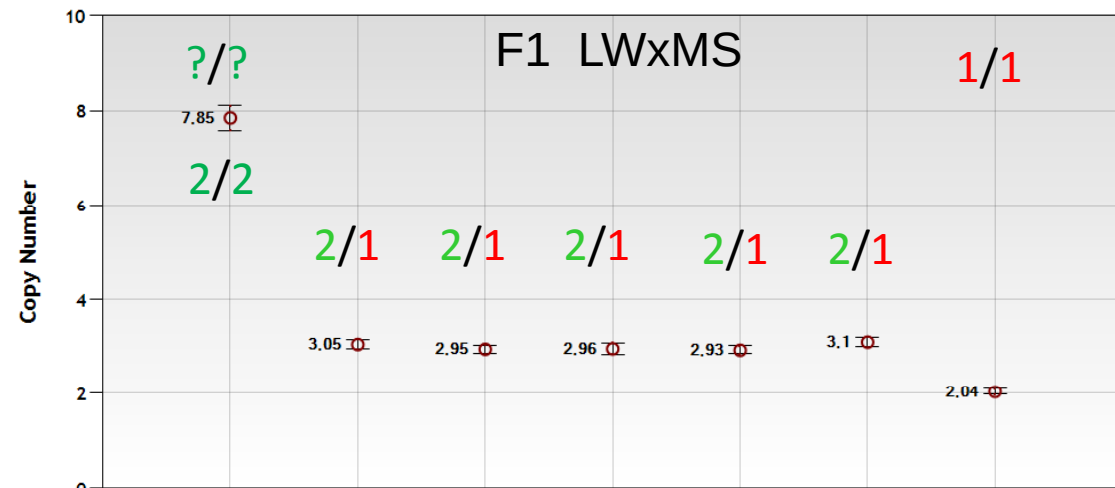
- Famille 4 : F0 LW x F0 MS



F0 LW

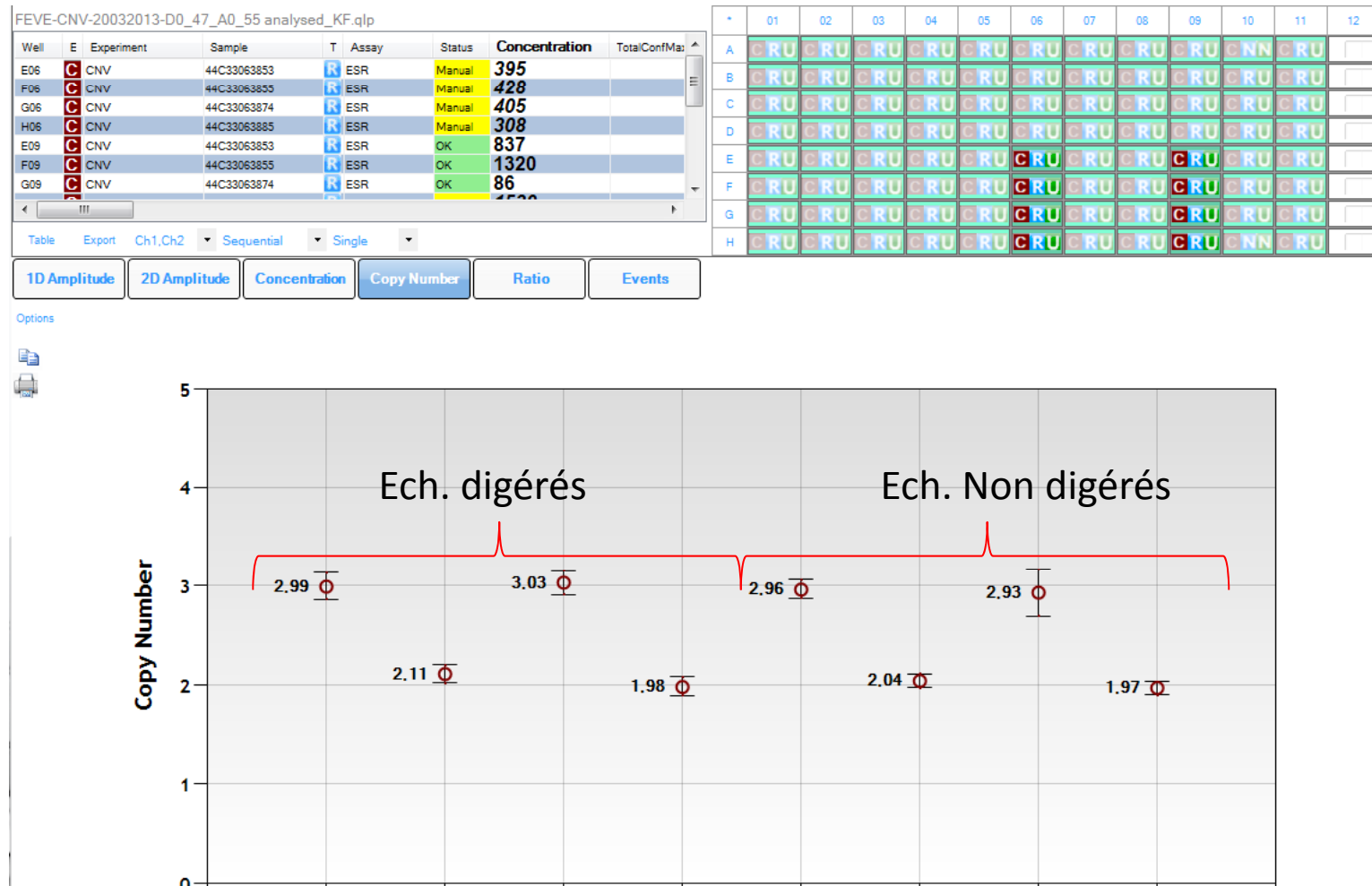


F0 MS



Analyse / Ech digérés vs non digérés

- Race Duroc



Bilan

- Facilité de mise en œuvre
- Facilité et rapidité d'interprétation des résultats.

➡ Technologie prometteuse pour analyse fine du nombre de CNV.

Comparatif avec d'autres Technologies

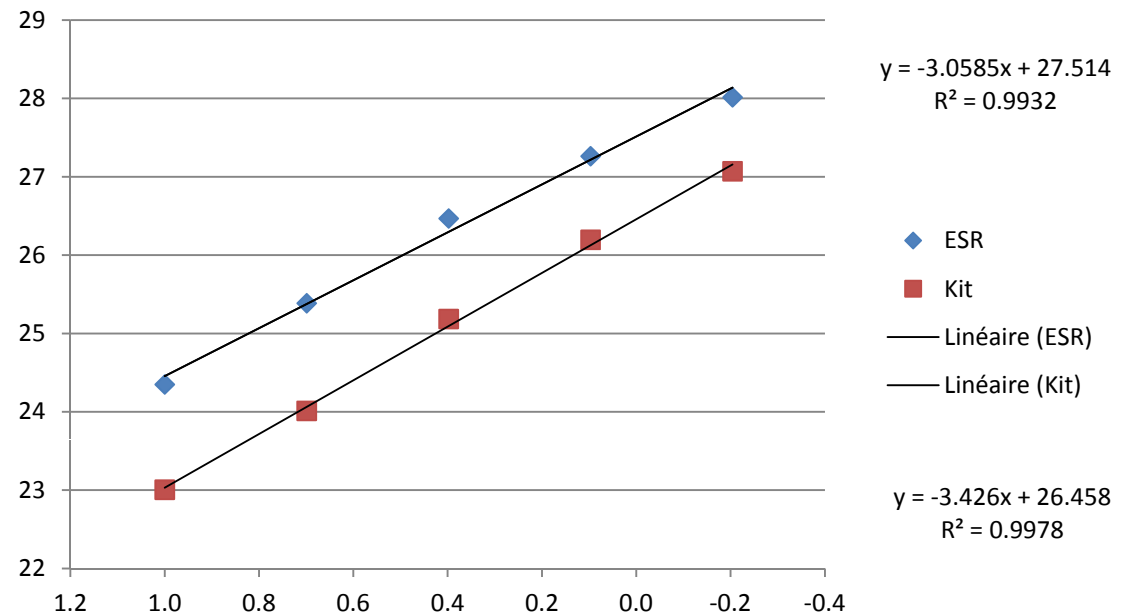
- PCR quant : ABI7900 HT
- Fluidigm (puce digital)

Test / PCR quant

- ADN génomique sans digestion (50 ng)
- 4 réplicats par échantillons
- Test efficacité des gènes

ESR Pente = -3,05
Eff = **2,13**
% eff = 112,75
R2 = 0,96

KIT Pente = -3,42
Eff = **1,96**
% eff = 96,06
R2 = 0,96



Calcul du nombre de copies / PCR quant

Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution.

Suzanne Weaver, Simant Dube, Alain Mir, Jian Qin, Gang Sun, Ramesh Ramakrishnan, Robert C. Jones, Kenneth J. Livak *

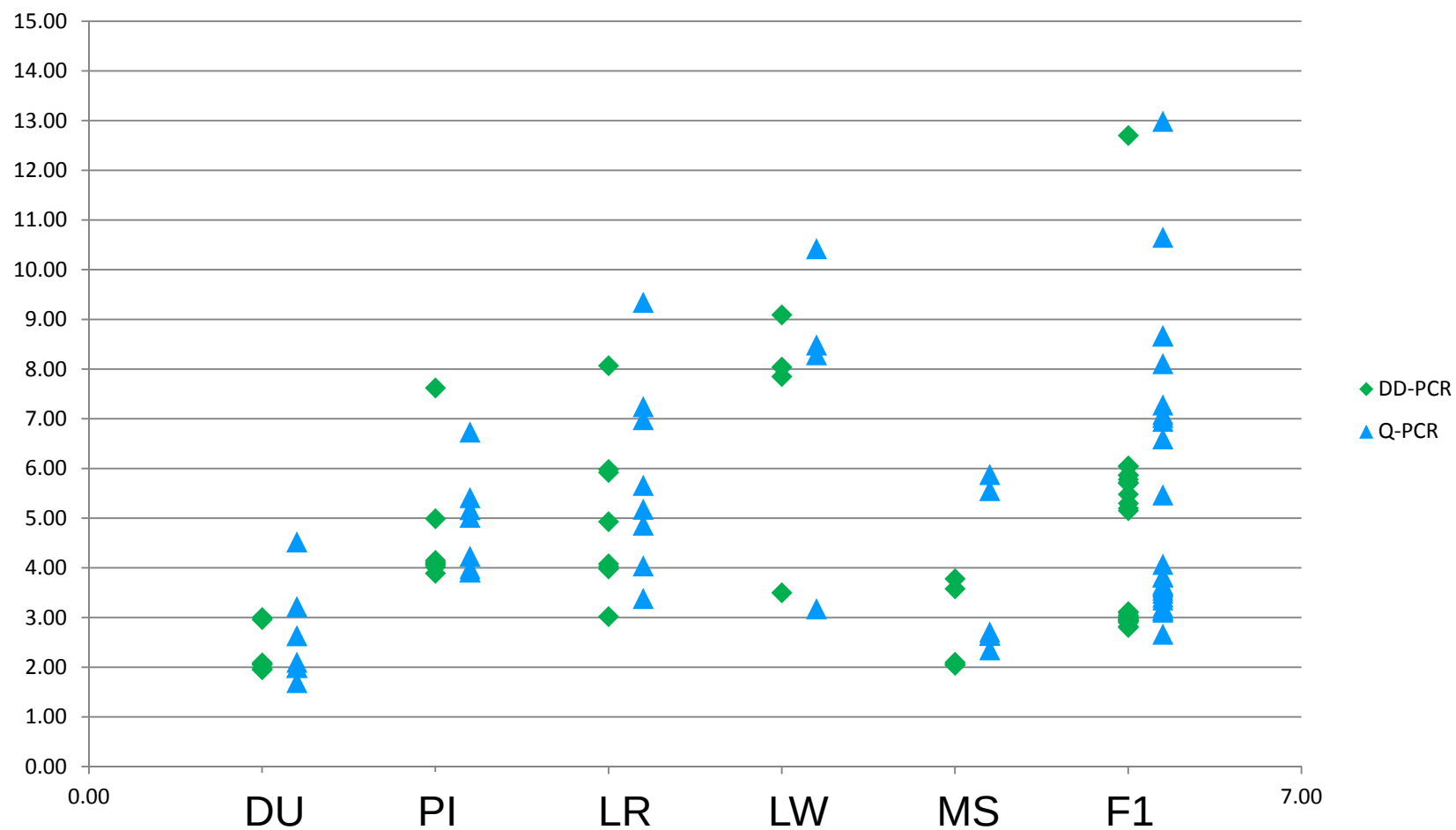
Fluidigm Corporation, 7000 Shoreline Court, Suite 100, South San Francisco, CA 94080, USA

Même formule qu'en Q-PCR classique

$$\Delta\Delta CT = (Ct \text{ ech cible} - Ct \text{ ech ref}) - (Ct \text{ calib cible} - Ct \text{ calib ref})$$

$$\text{Nb de copie / génome diploïde} = 2 * 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Résultats / ABI 7900HT



Test / Fluidigm Puce Digital

2 Formats de puces digital	12.765	(12 ech)
	48.770	(48 ech)

12 panel de
765 chambres

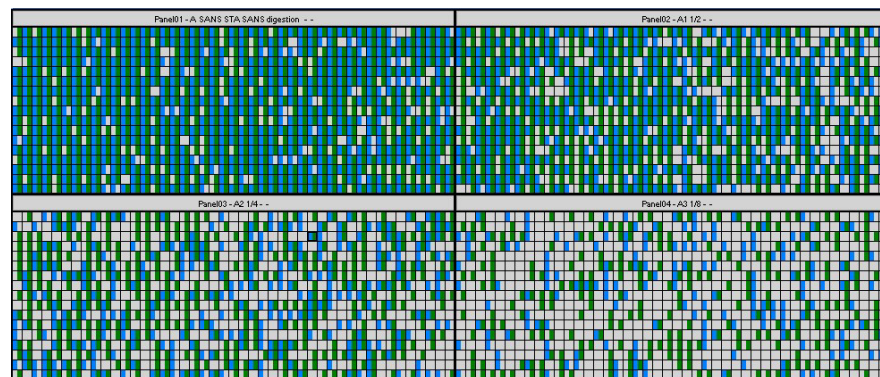
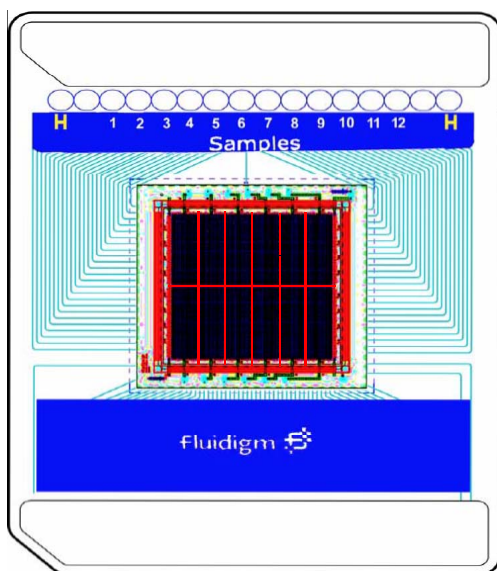


Tableau comparatif

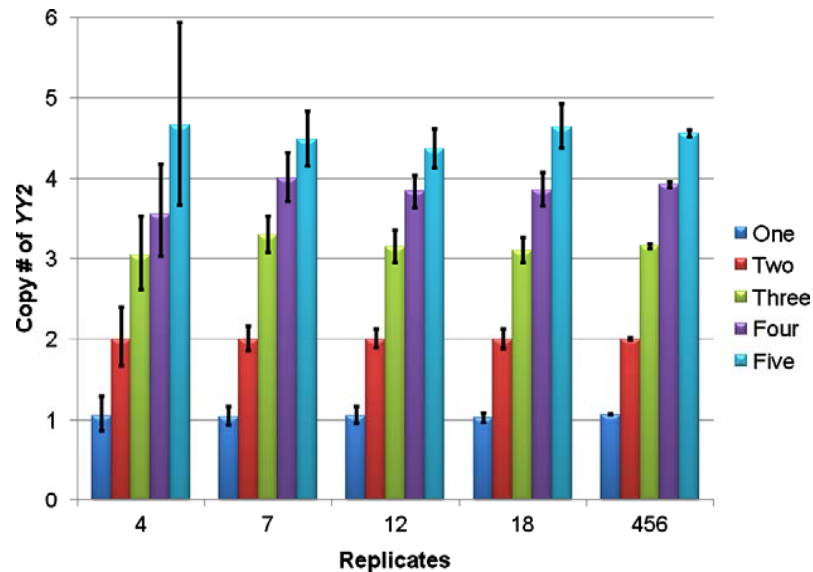
	Droplet Digital PCR	PCR quant / ABI7900 HT	Digital PCR / FLDM (48.770)
Etapes de séparation des CNV	Digestion	Aucune	Pré-amplification ou Digestion ?
Nb de puits	1 puits	4 à 18 puits	3 à 4 puits
Nb réplcats techniques	20 000 réplcats	4 à 18 réplcats	2310 à 3080 réplcats
Nombre d'ech / plaque	96 ech	96 à 21 ech	16 ou 12 ech
Temps Machine	ON + 2H + 2H	2H	15 min + 2 H Ou ON + 2 H
Coût (sans les sondes + frais annexes)	3 € / ech	0,50 € par puits 2 à 9€ / ech	2€ par puits 6 à 8 € / ech
Analyse	Automatisé dans le logiciel	En manuel	Semi-manuel

A faire

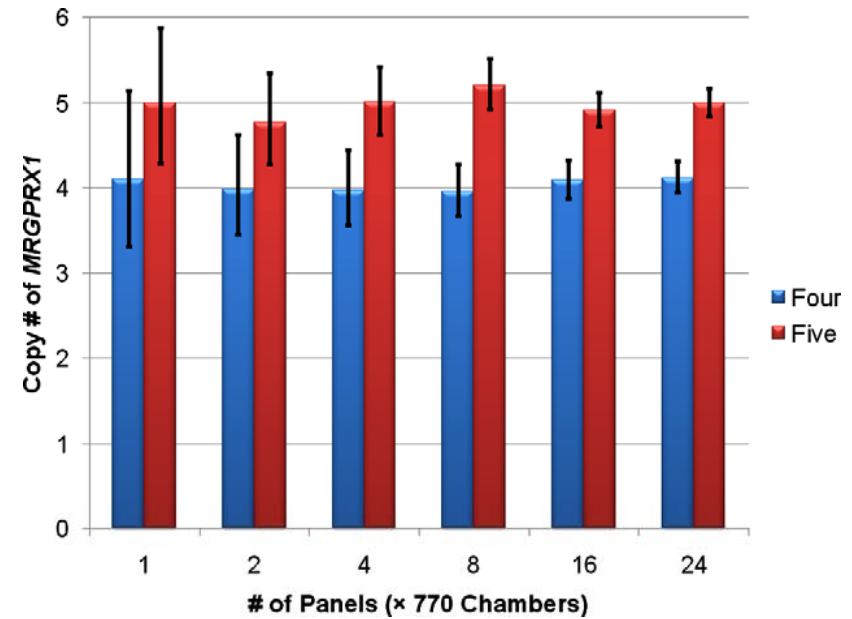
- Finir de tester la Digital PCR / FLDM
- Tester d'autres gènes de référence
- Refaire la plaque Test en DD-PCR avec le nouveau gène de référence.
- Si les résultats sont ceux attendus, ajouter des animaux complémentaires pour valider complètement la technologie.

Merci de votre attention !!!

Discussion Générale



Puces Fluidigm 96x96



Puces Digital 48 Ech