

Tests Pyroséquençeur Q24 Qiagen et Droplet Digital PCR Biorad

Validation de résultats Hi-Seq par Pyroséquençage et dd-PCR



- Dispositif expérimental
- Echantillons testés sur Q24 à Jouy et problèmes rencontrés
- Attentes des tests effectués



- Marqueurs testés et profils d'expression
- Bilan ddPCR

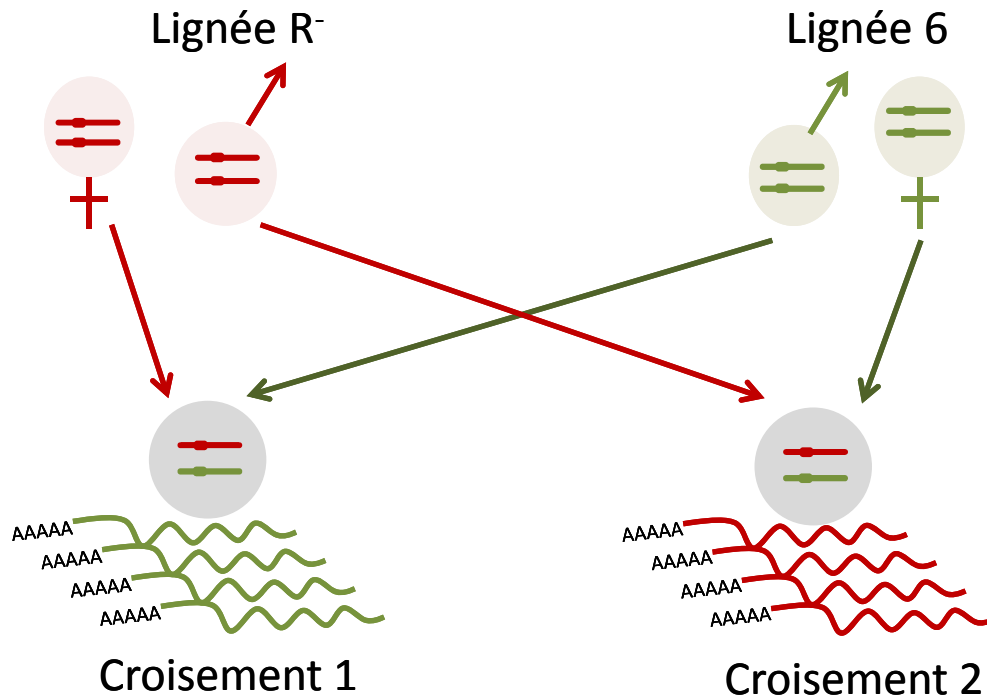


- Marqueurs testés et profils d'expression
- Bilan pyroséquenceur

Recherche d'empreinte parentale chez l'embryon de poule par séquençage d'ARN



© INRA



Choix des lignées :

- Distantes génétiquement
- Les plus consanguines possible

→ **2 298 622 SNP** discriminant les parents (ADN génomique)

Croisements réciproques :

Embryons récupérés : 6 mâles et 6 femelles par sens de croisement

Extraction ARNm – séquençage

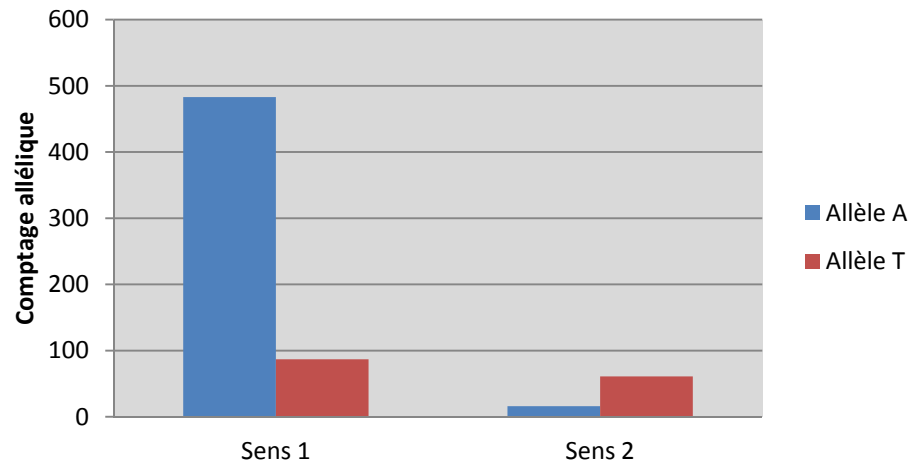
- 6 lignes de séquençage
- Chaque embryon en triplicat

→ **200 Gb de séquences**
96 candidats très faiblement exprimés

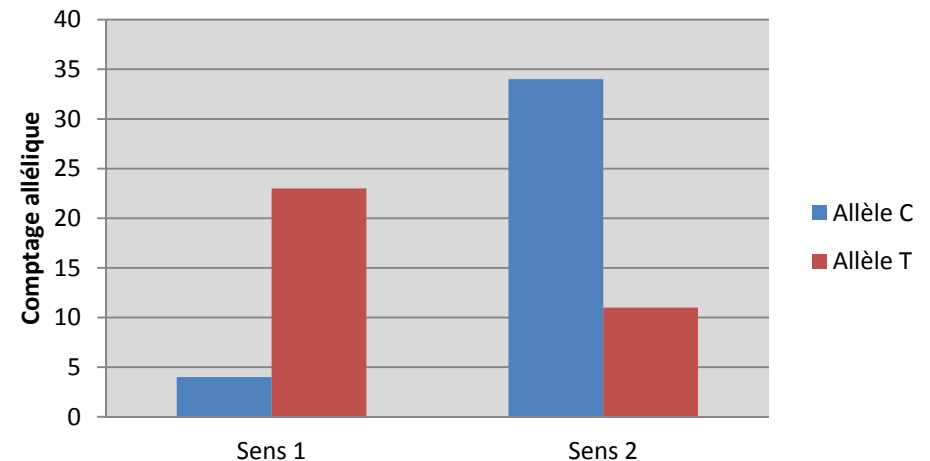
Candidats à l'empreinte analysés

Recherche de locus où un allèle est exprimé dans un sens de croisement et l'autre allèle dans l'autre sens de croisement

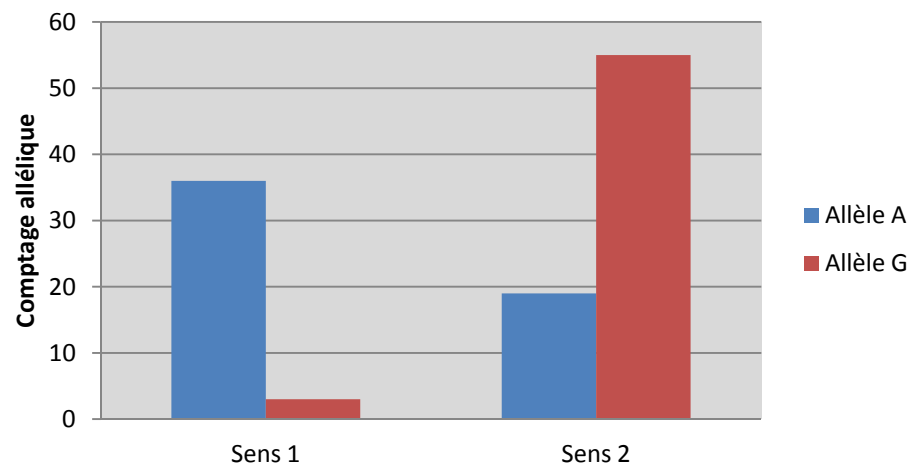
HiSeq : Candidat EMP003



Hiseq : Candidat EMP004



HiSeq : Candidat EMP005



Nécessité de valider par une autre méthode

→ Sanger non quantitatif

→ Pyroséquençage utilisé dans publications
RNAseq

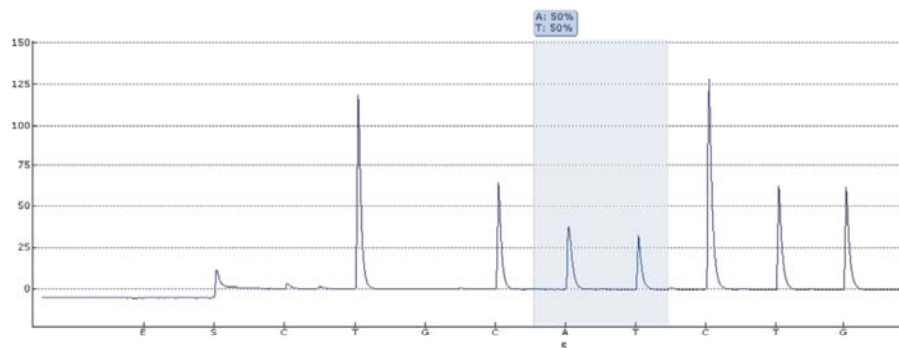
→ ddPCR comme autre opportunité

Certains candidats passés en pyroséquençage à Jouy montrent des profils inattendus

ADN

Sample ID: ADN_7127_F14_EMP003

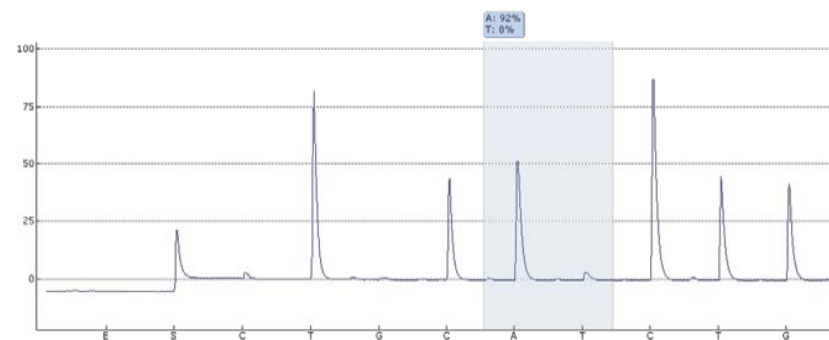
Note:
Analysis version: 1.0.10



ARN

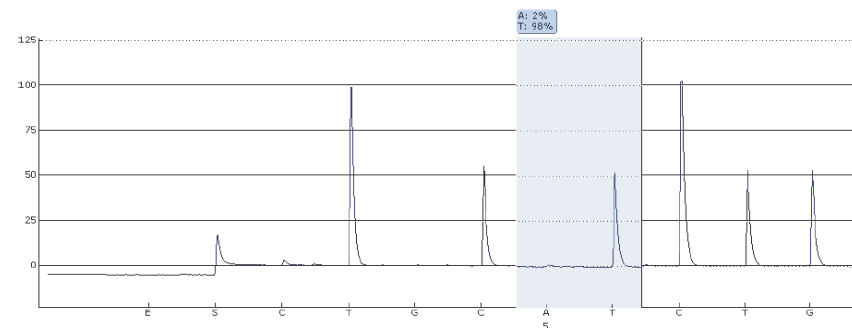
Sample ID: ARN_7127_F14_EMP003

Note:
Analysis version: 1.0.10



Sample ID: ARN_7127_M20_EMP003

Note:
Analysis version: 1.0.10



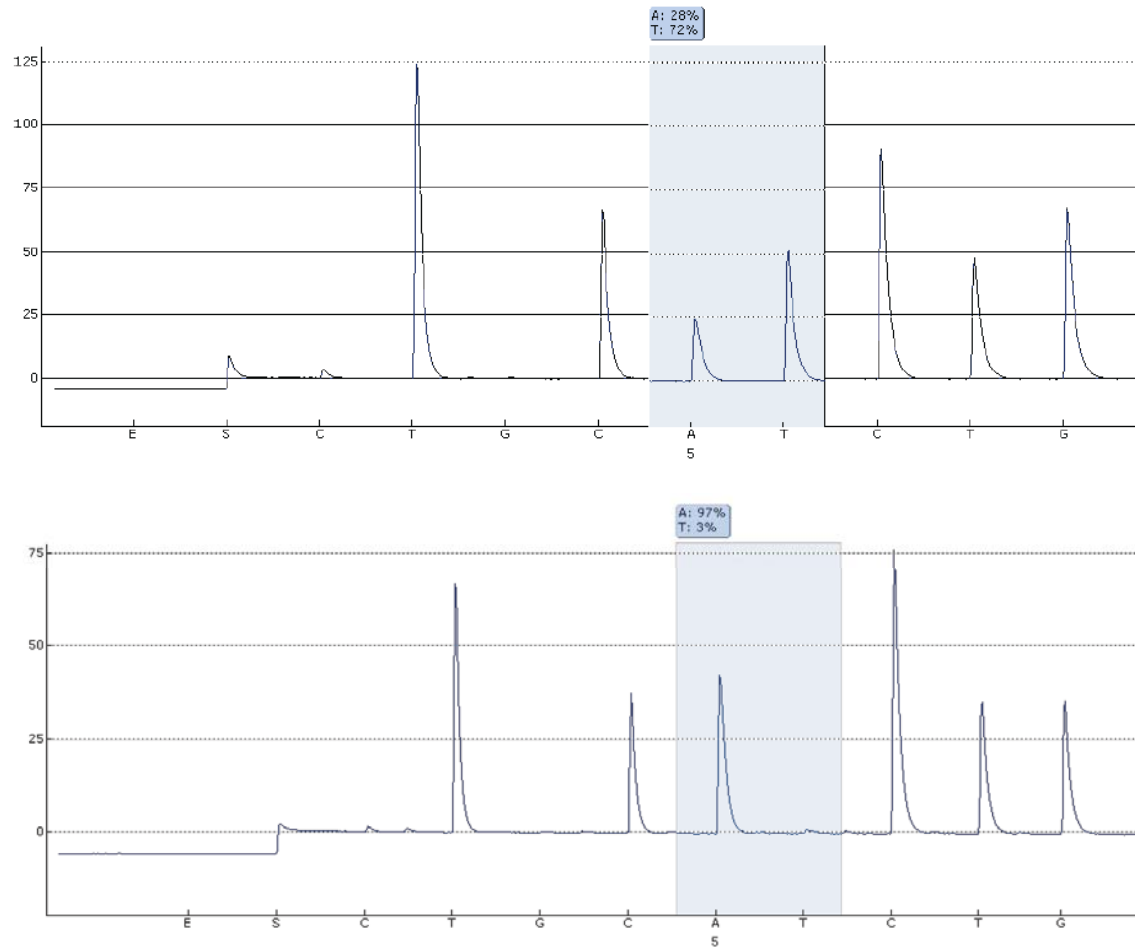
ADN : proportions 50/50

ARN : Extinction **aléatoire** d'un allèle **au sein**
du même sens de croisement

Des échantillons repassés à Jouy montrent des profils d'expression différents

Sample ID: ARN_8303_F7_EMP003

Note:
Analysis version: 1.0.10



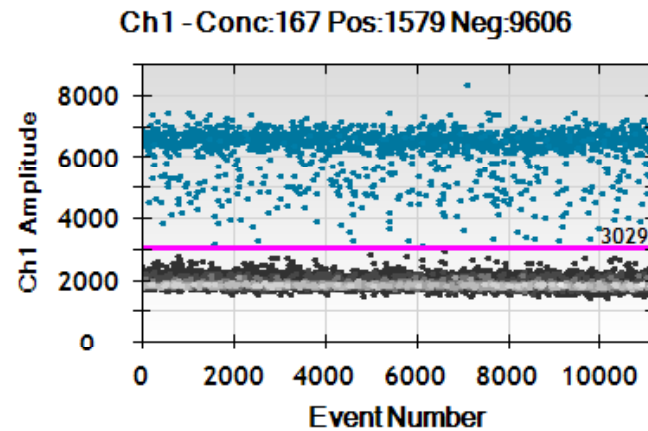
Attentes des tests de candidats sur pyroséquenceur et DD-PCR

- Confirmation de biais alléliques sur candidats testés
→ EMP003 et EMP005
- Test de la capacité de détection de biais à une échelle d'expression très faible
→ EMPtest

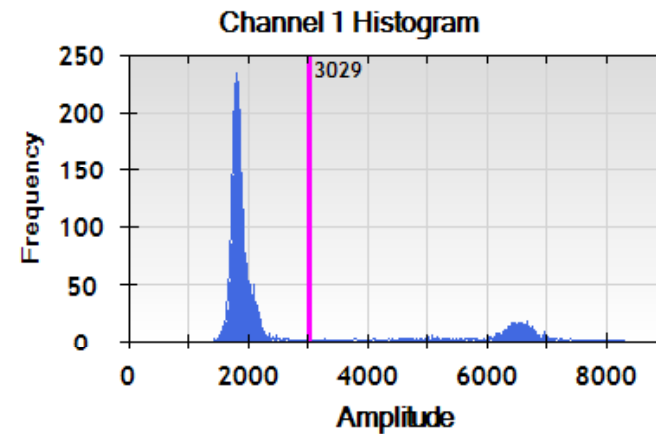
Droplet Digital PCR



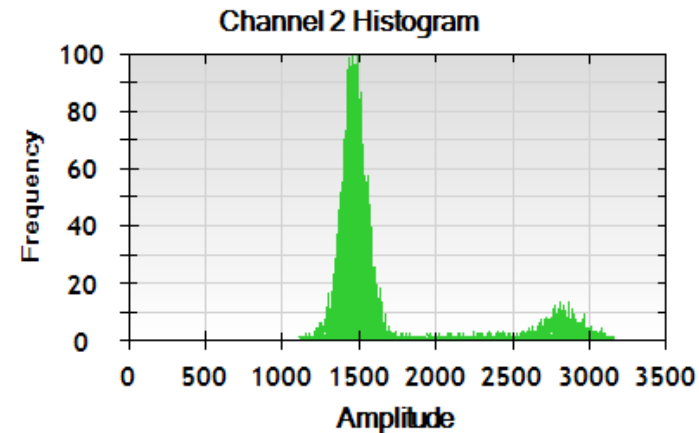
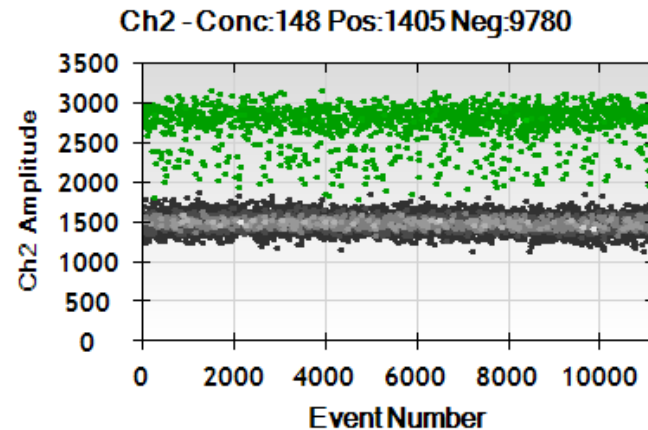
EMP003 en droplet (cDNA)



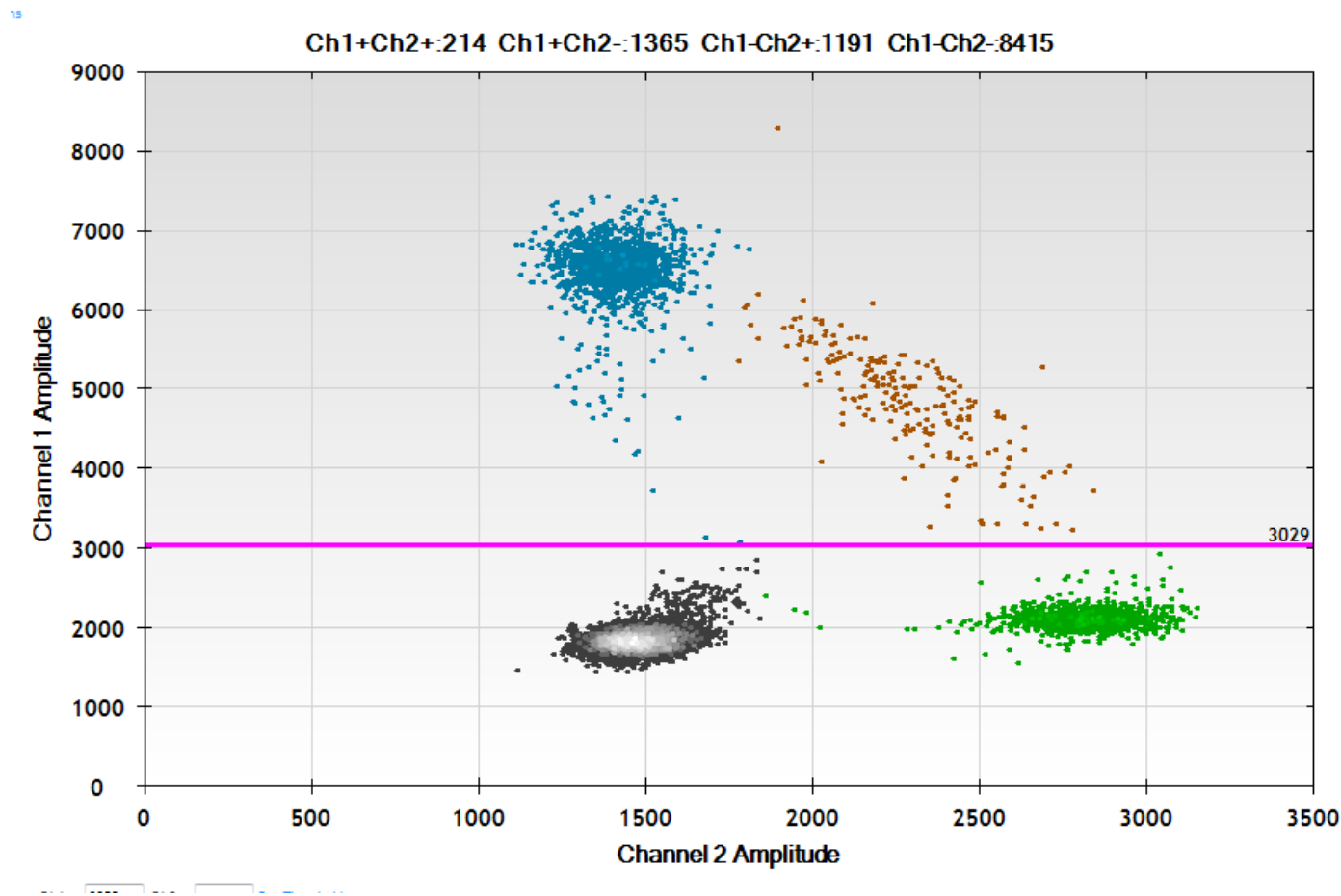
3029 Set Threshold



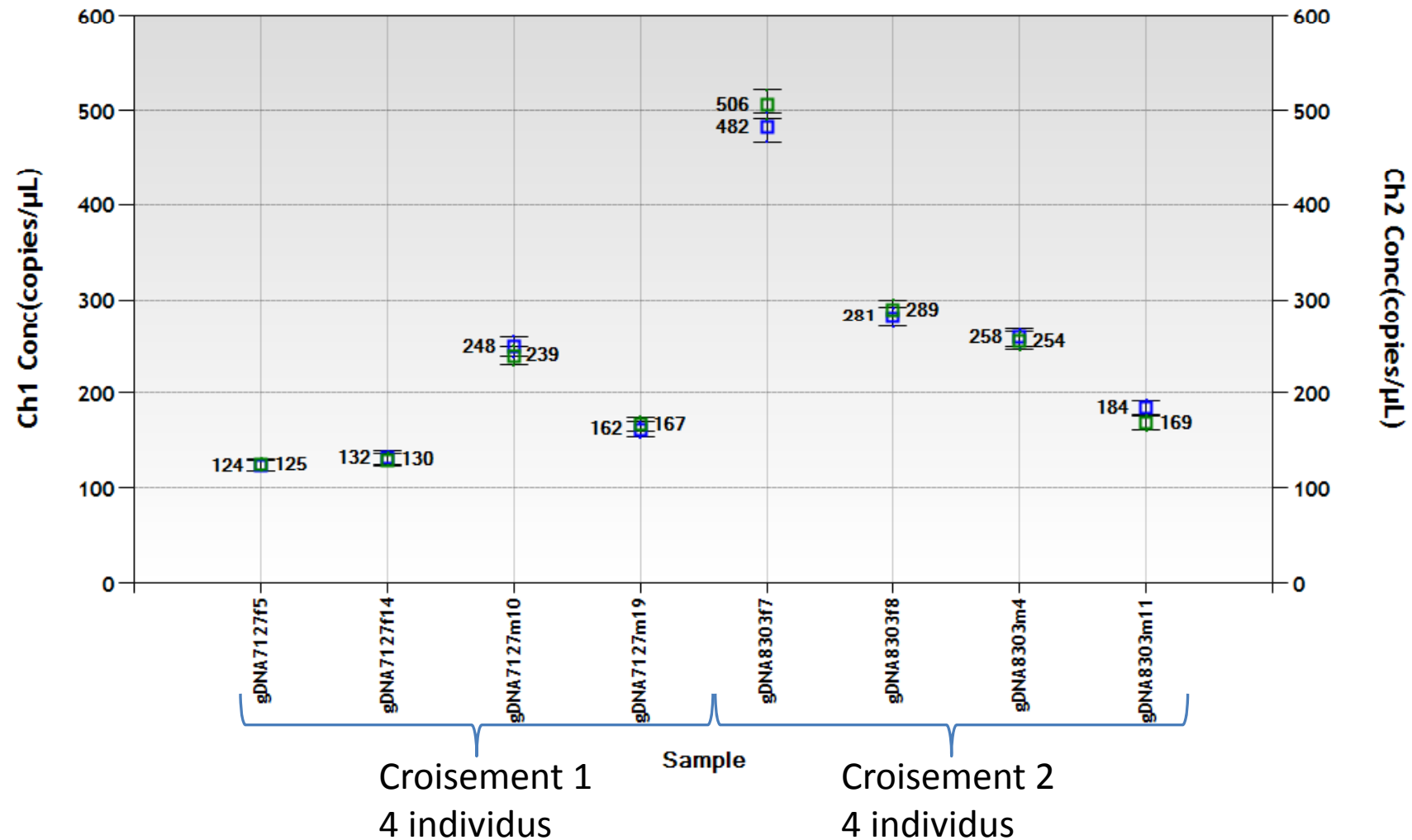
log



EMP003 en droplet (cDNA), vue 2D



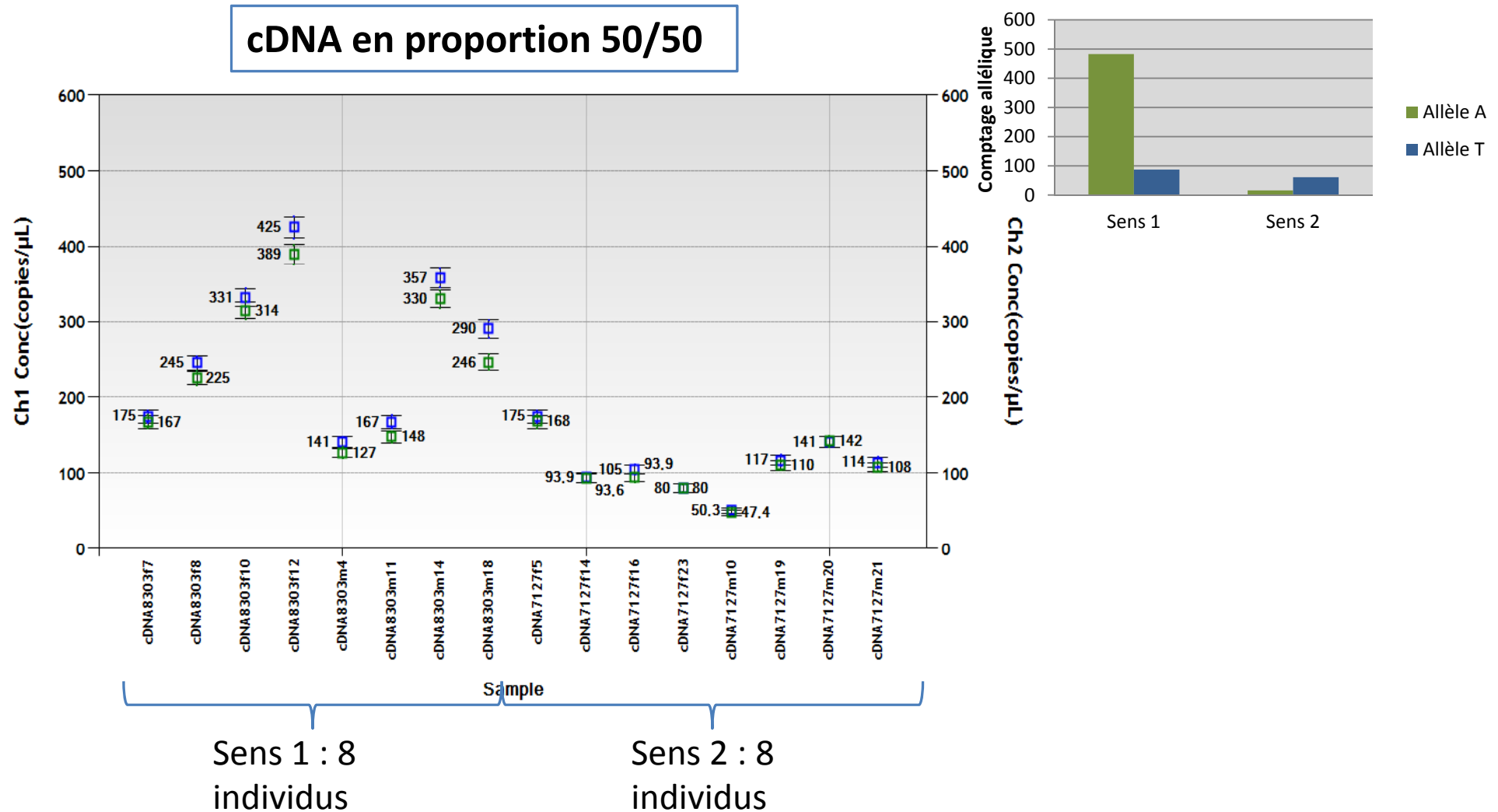
EMP003 en droplet (ADNg embryons), résultats



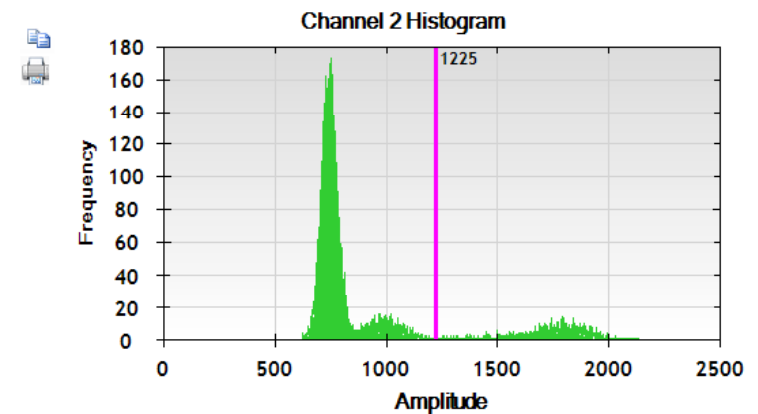
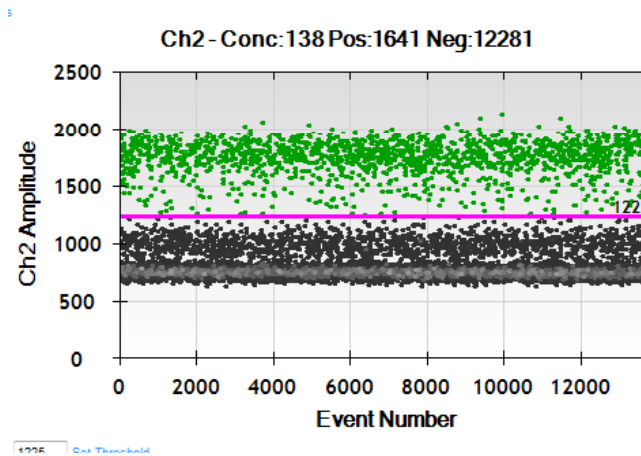
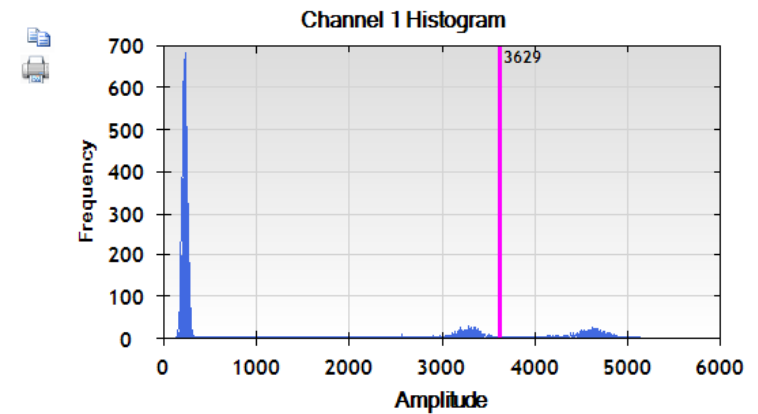
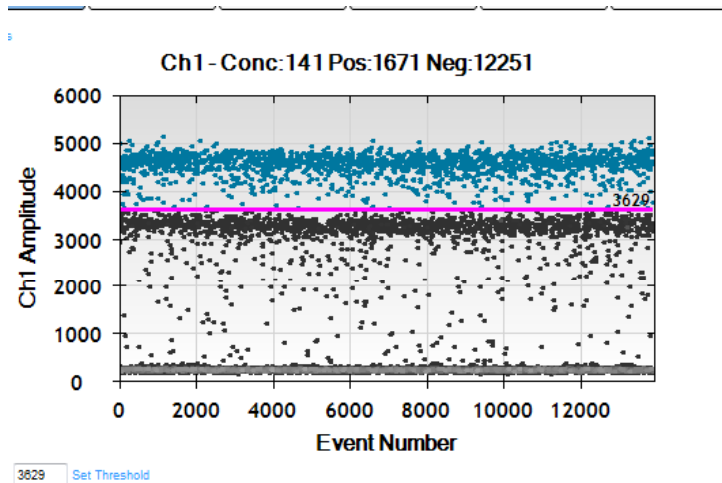
ADN génomiques en proportion 50/50

EMP003 en droplet (cDNA embryons), résultats

HiSeq : Candidat EMP003



EMP005 en droplet (cDNA), sondes LNA : vue 1D

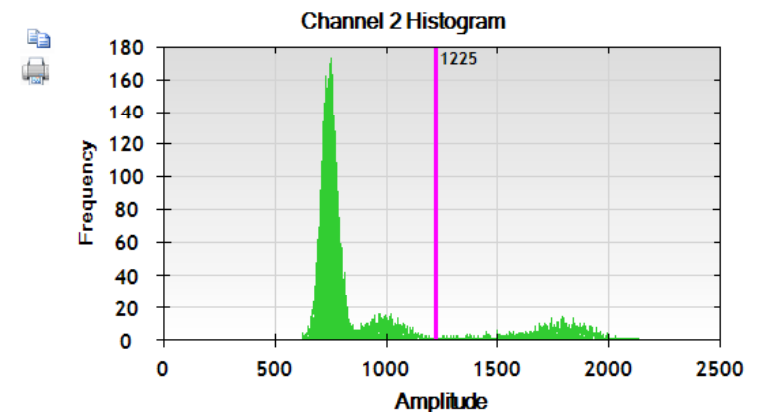
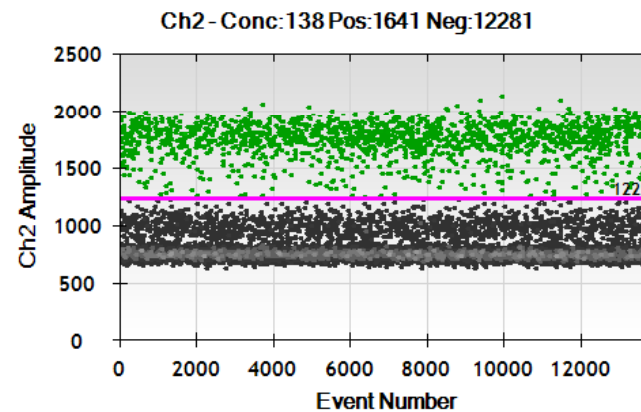
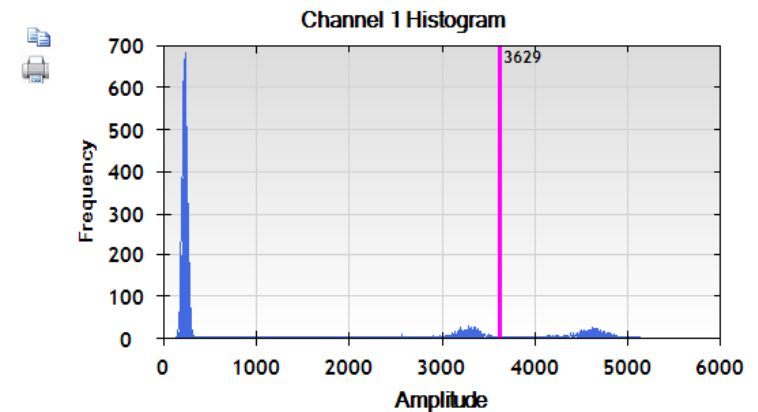
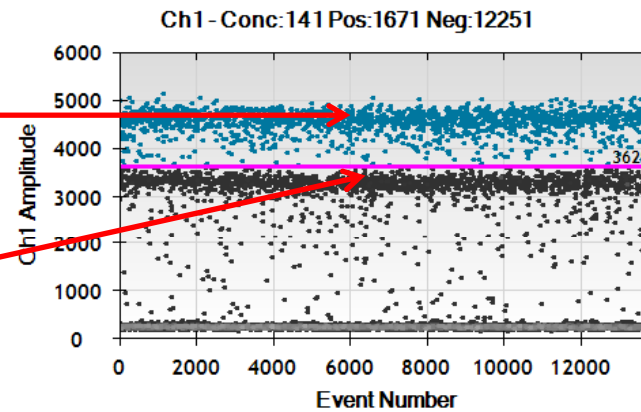


EMP005 en droplet (cDNA), sondes LNA : vue 1D

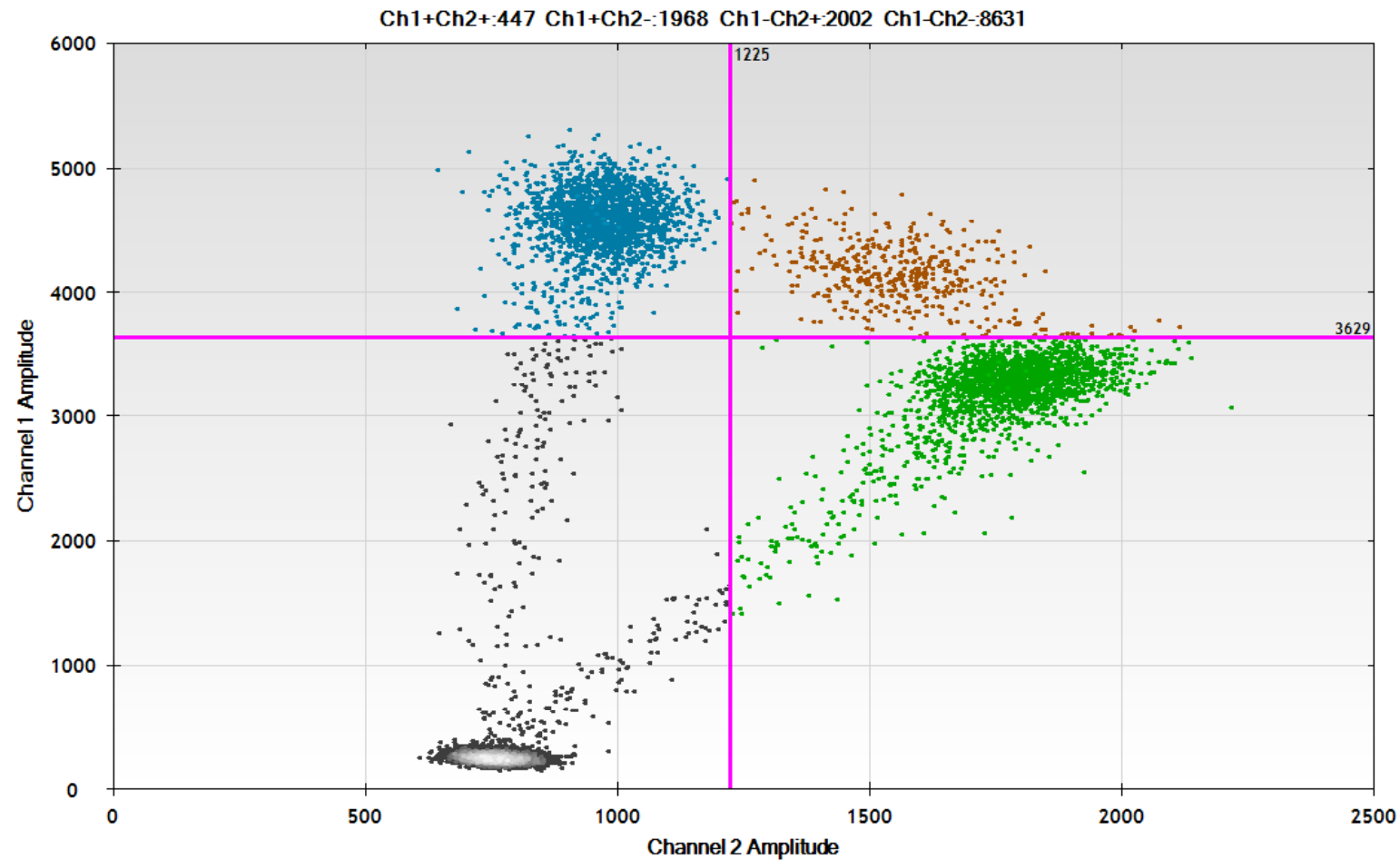
Problème de **spécificité** des sondes

Specific hybridization

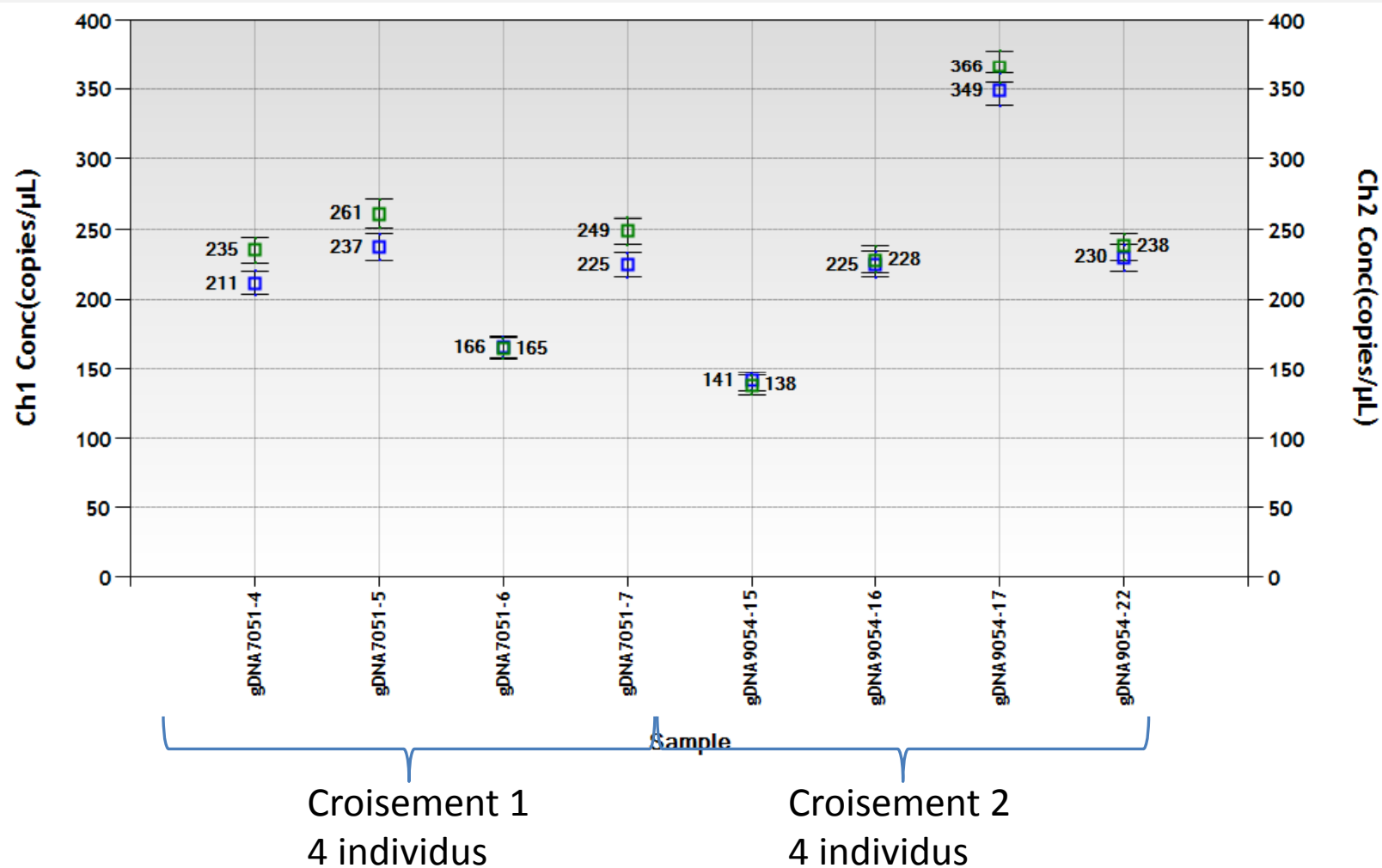
Cross hybridization



EMP005 en droplet (cDNA), sondes LNA : vue 2D



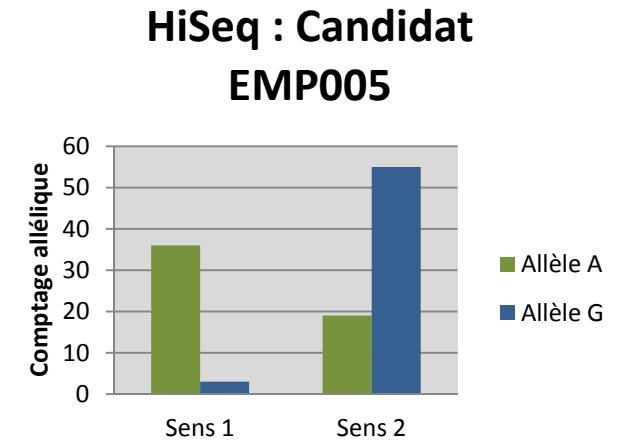
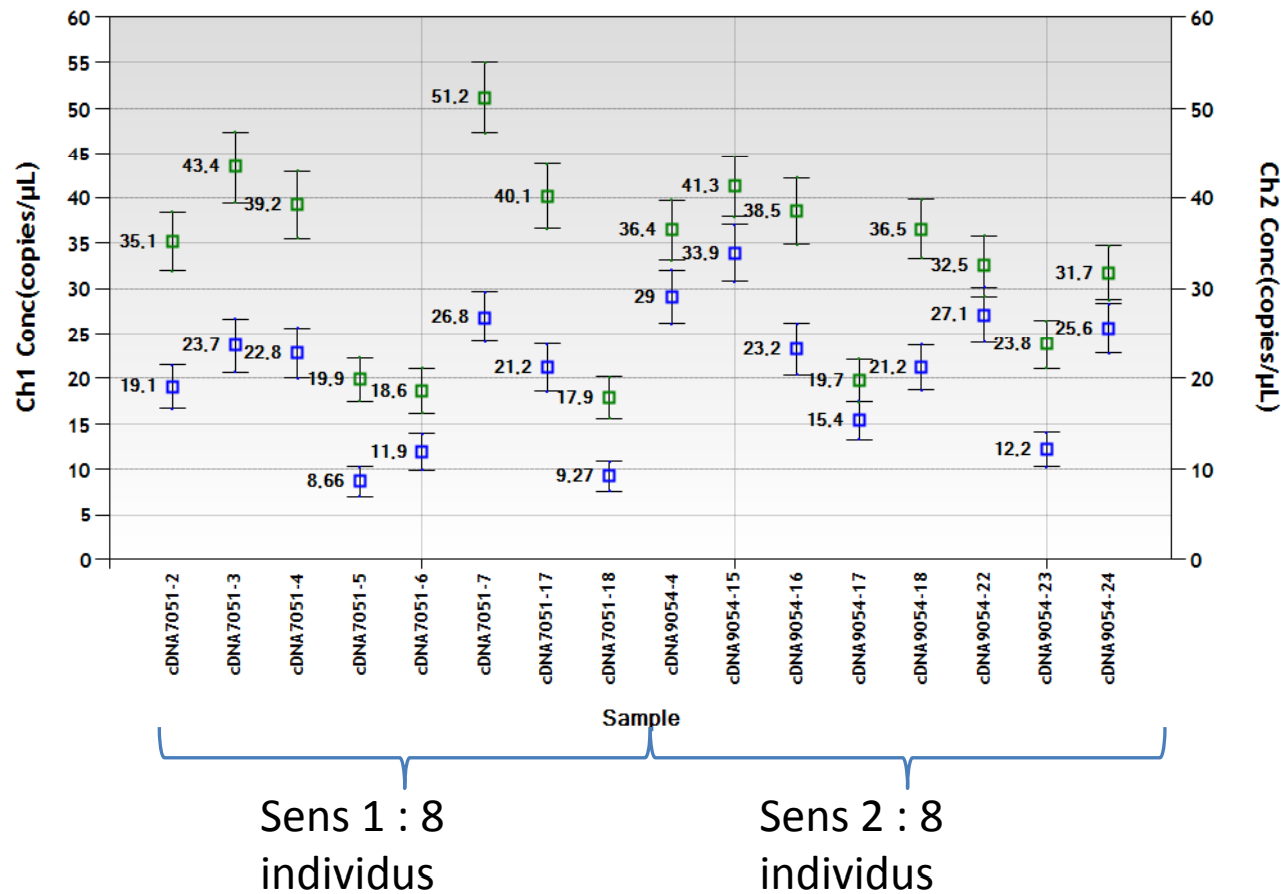
EMP005 en droplet (ADNg embryons), résultats



ADN génomiques en proportion 50/50

EMP005 en droplet (cDNA embryons), résultats

Biais allélique toujours dans le même sens



Bilan des résultats après ddPCR

Résultats non concordants avec Hiseq

→ Remise en cause des résultats Hiseq

Répétable en cDNA par rapport aux résultats de pyroséquençage des échantillons testés sur la machine de Jouy en ARN

→ cDNA permet des résultats plus fiables ?

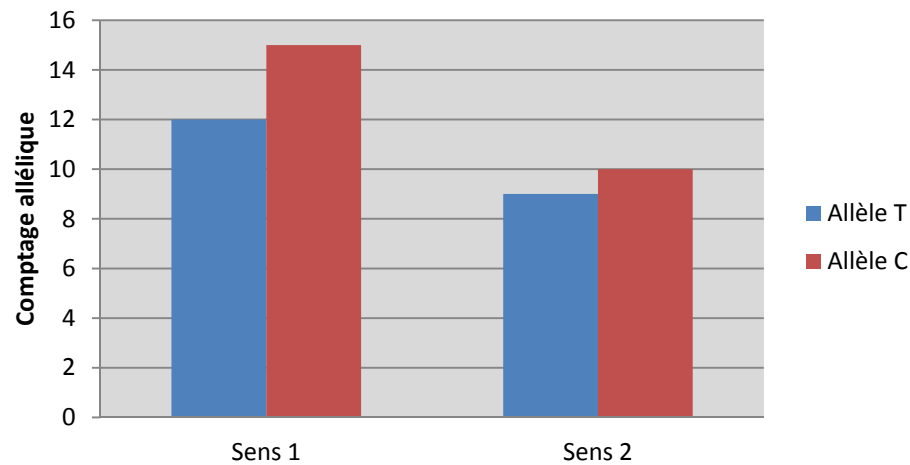
→ Pyroséquenceur non fiable ?

Pyroséquençeur



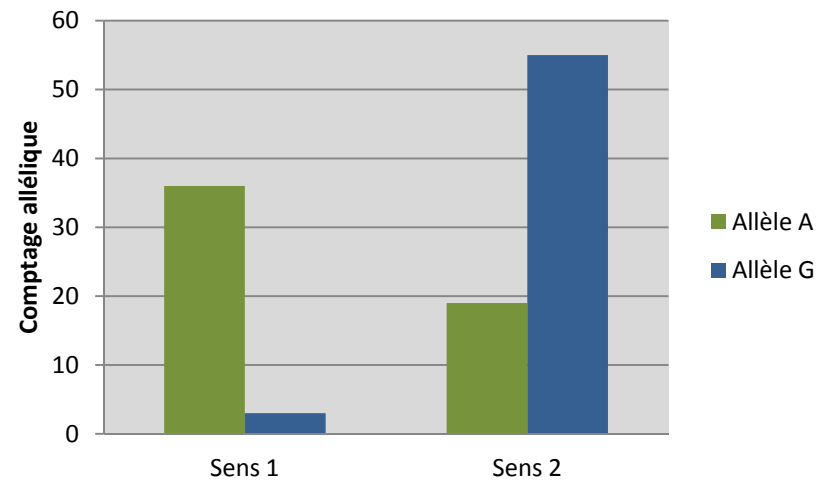
Echantillons à analyser

HiSeq EMPtest



Expression "non biaisée"

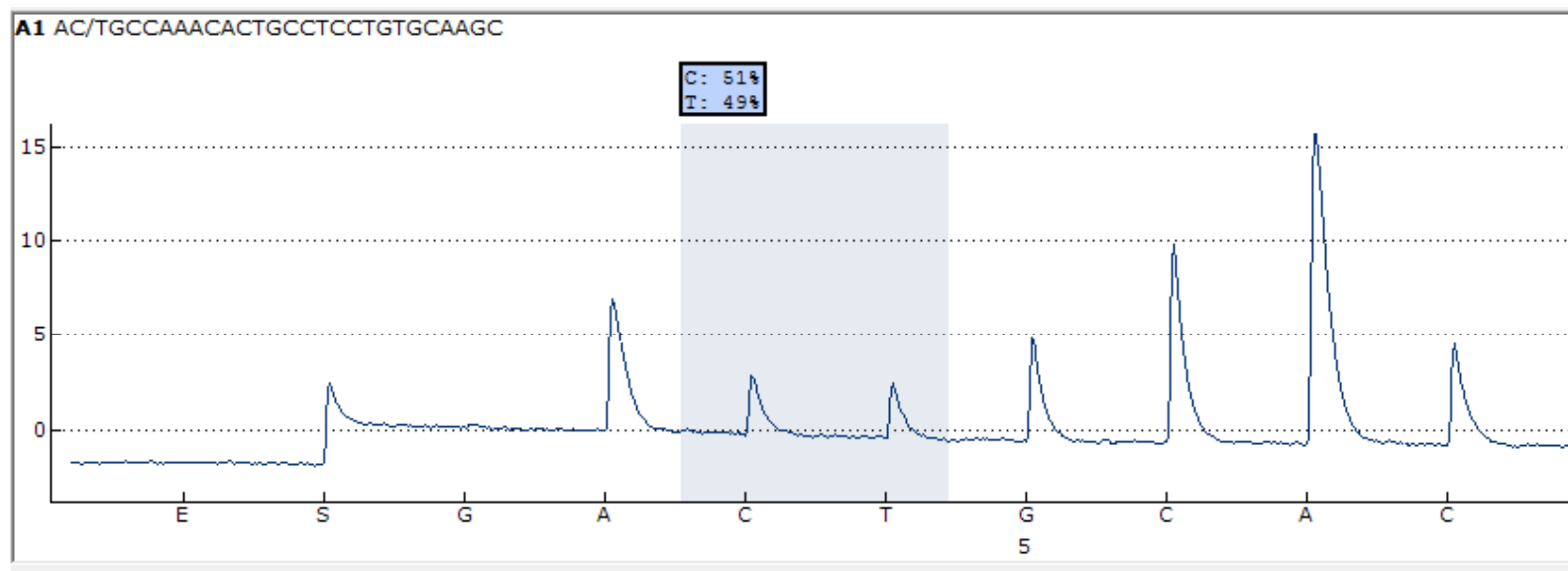
HiSeq : Candidat EMP005



Expression "biaisée"

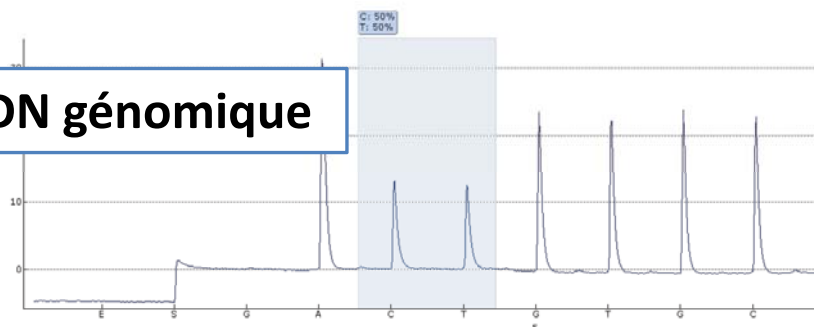
EMPTest en pyroséquençage : fonctionnement à faibles profondeurs

cDNA embryon → expression biallélique **dans les proportions attendues !**
(Sur tous les embryons étudiés)

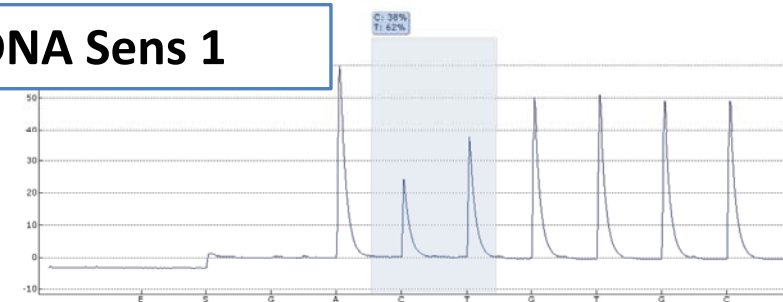


EMP005 en pyroséquençage (cDNA) : biais allélique toujours dans le même sens, PCR Qiagen

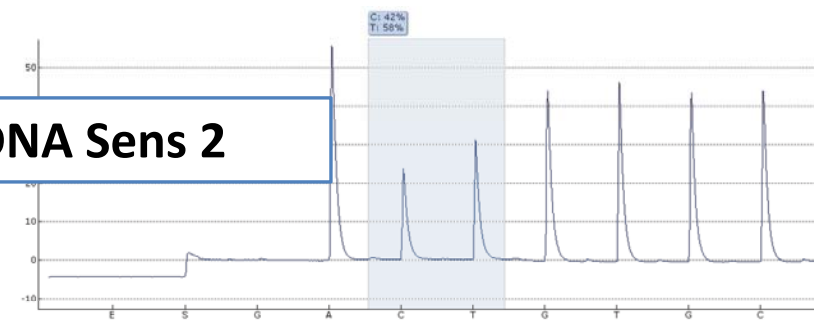
ADN génomique



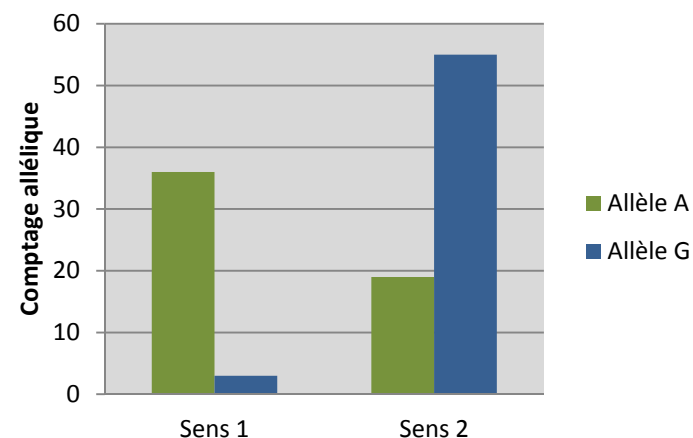
cDNA Sens 1



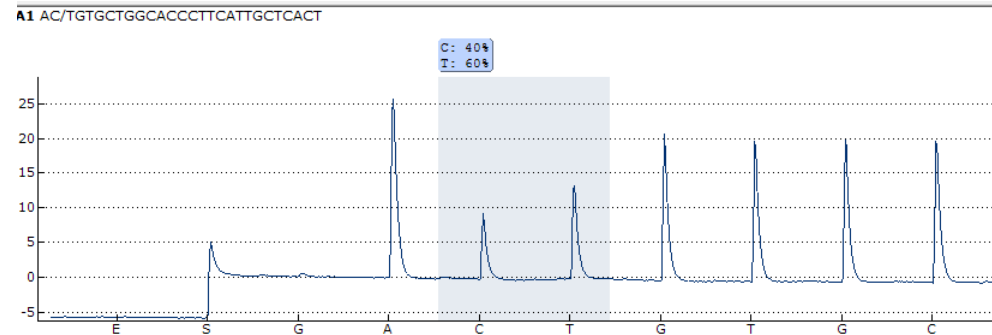
cDNA Sens 2



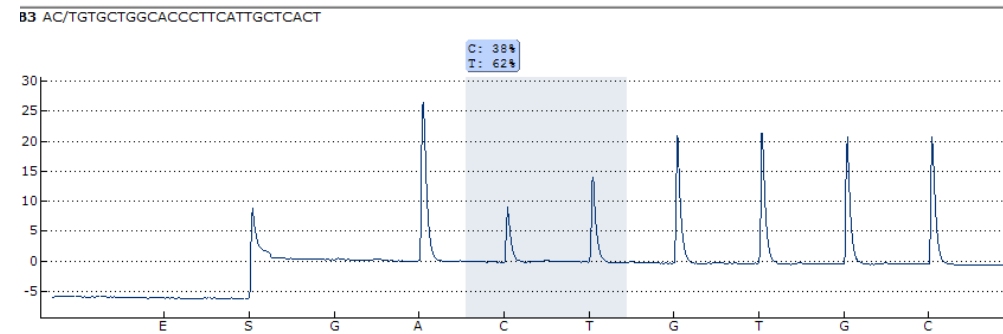
HiSeq : Candidat EMP005



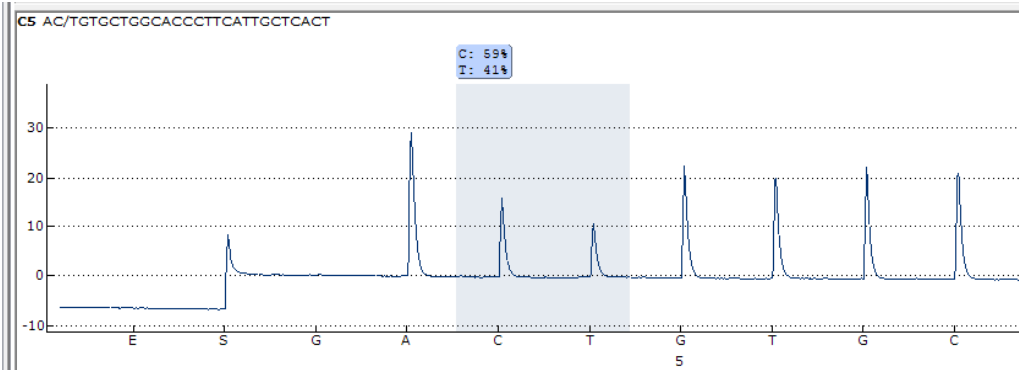
EMP005 en pyroséquençage (cDNA) : PCR classique



cDNA Sens 1



cDNA Sens 2



**ADN génomiques pas
toujours en proportion
50/50**

Bilan des résultats après Pyroséquençage

➔ Résultats répétables

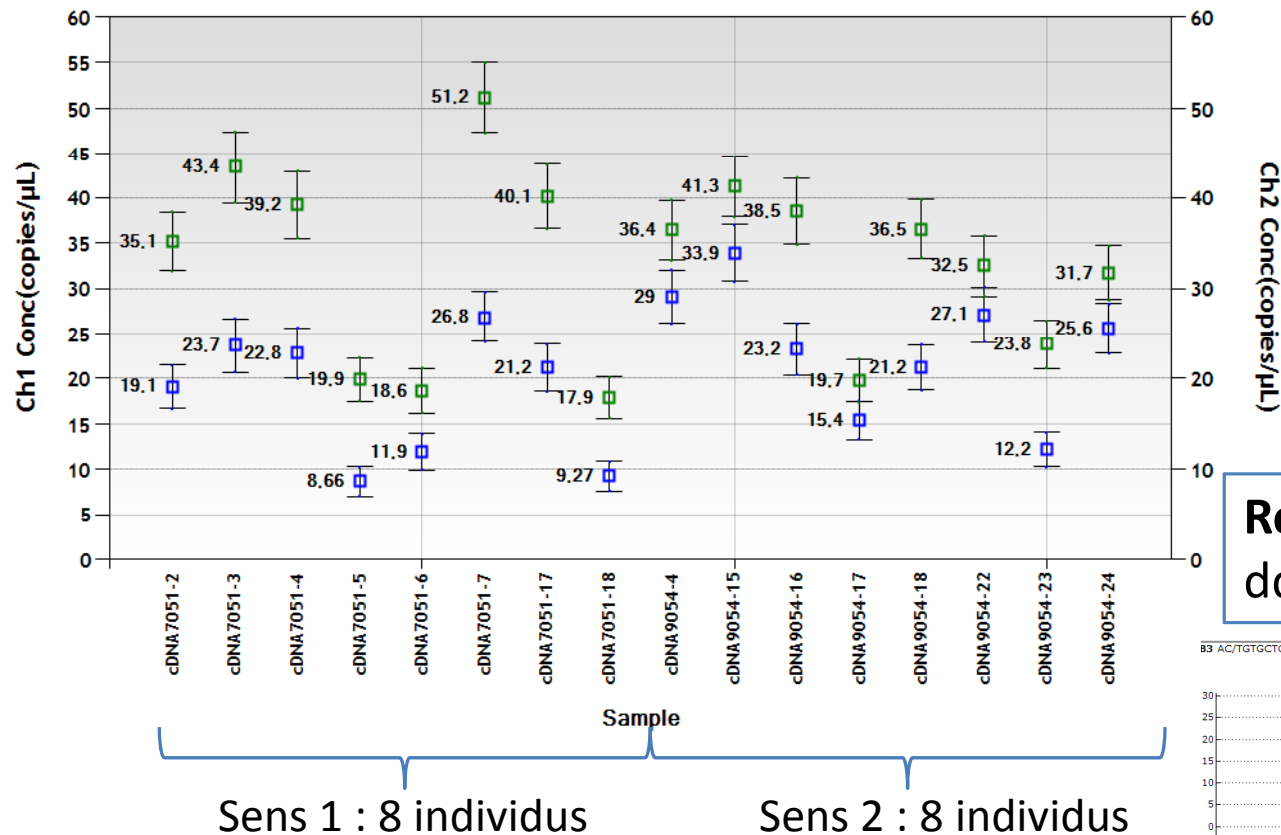
Remise en cause du **kit One-Step RT-PCR**

➔ Partir de cDNA avant le séquençage (matrices très faiblement exprimées)

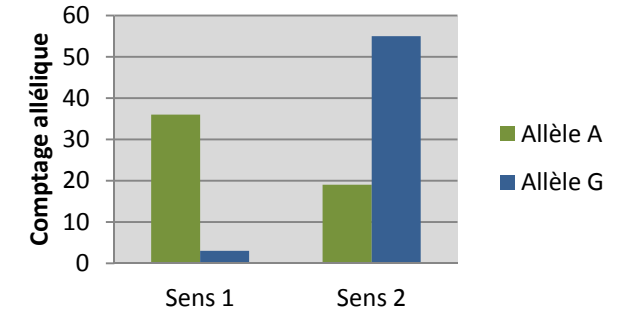
Pas de confirmation Hiseq

Comparaison résultats EMP005 ddPCR-pyroséquenceur

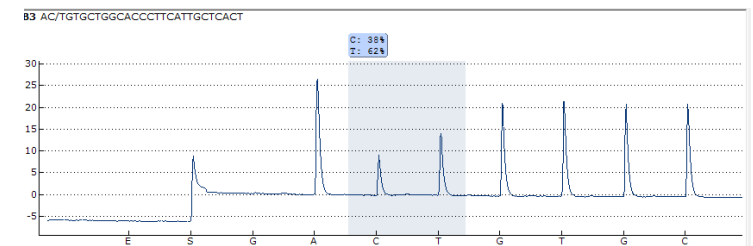
Biais allélique toujours dans le même sens



HiSeq : Candidat EMP005



Résultats comparables entre ddPCR et pyroséquençage



Conclusions

Sur les deux appareils

- ☐ Facile à prendre en main depuis les manipulations jusqu'aux analyses
- ☐ Analyse possible de matrices très faiblement exprimées (EMPtest + résultats concordants entre deux techno)

Pyroséquençage

- ☐ Durées de manipulations faibles et prix faible / échantillon

Droplet Digital PCR

- ☐ Débit d'échantillons plus élevé