



Panorama Génotypage

Aurélie Berard - Etude du Polymorphisme des Génomes Végétaux





Le Génotypage SNP

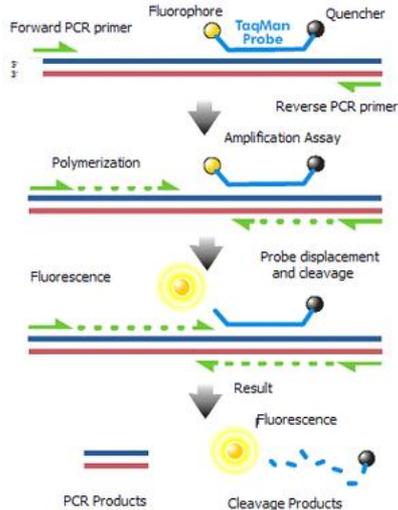
- ❖ **Technologie par hybridation**
- ❖ **Méthodes utilisant le séquençage**
 - Existantes
 - Récentes
- ❖ **Enquête Panorama Génotypage**

Technologies par hybridation

Méthodes utilisant le marquage moléculaire

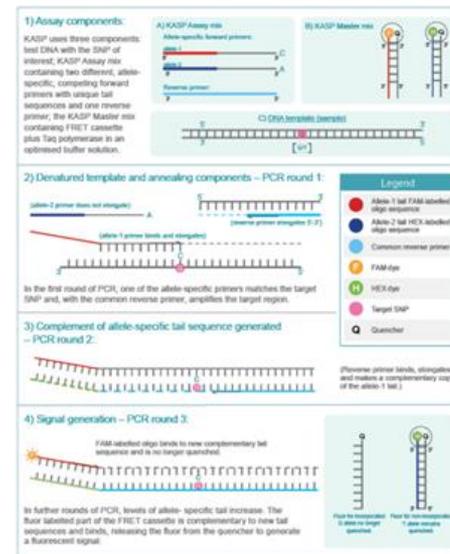
Principe: marquer des fragments d'ADN (sondes) pour suivre la présence d'un marqueur dans le génome à génotyper

❖ Méthodes en simplex: Hybridation liquide: TaqMan™ (Thermo Fisher)



Utilisation combinée de sondes marquées allèles spécifiques et de l'activité 5' nucléase de la polymérase

KASPar™ (LGC Group)



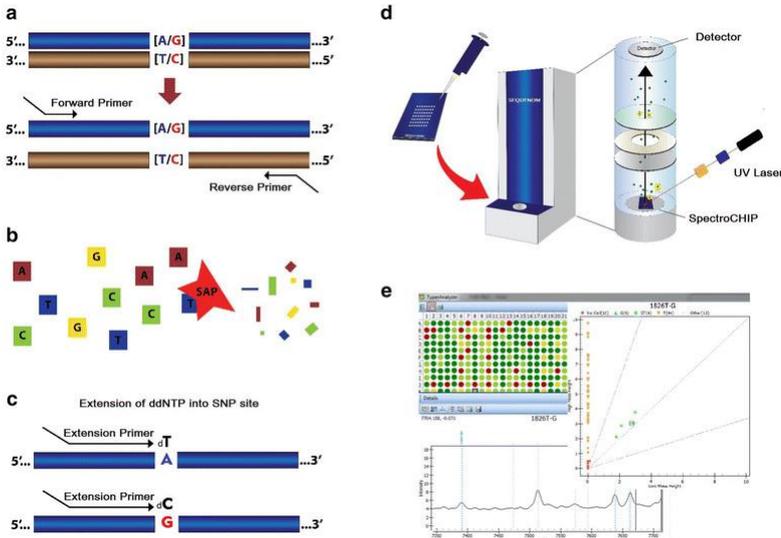
Utilisation de sondes allèles spécifiques, de cassettes FRET portant un fluorochrome et la PCR

Haut débit d'individus mais bas/moyen débit de marqueurs

Technologies par hybridation

❖ Méthodes en multiplex: Hybridation liquide

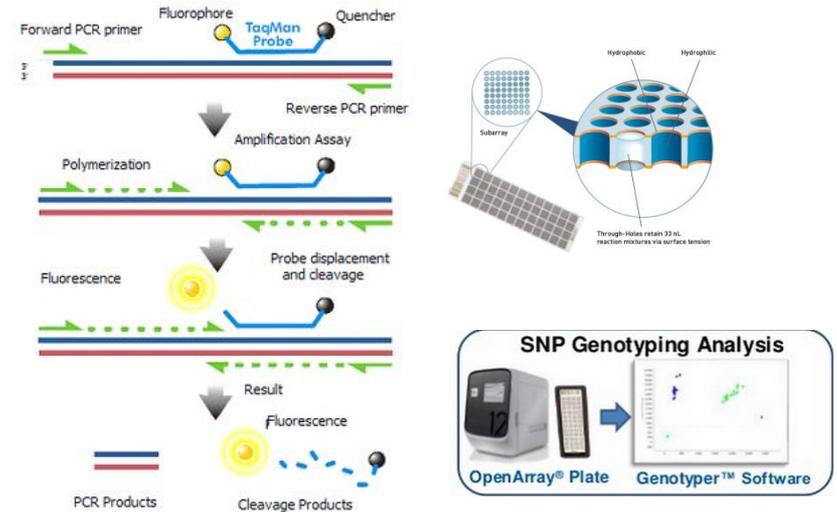
Iplex Gold™ (Sequenom): Spectrométrie de masse



Extension d'une base d'un primer hybridé juste en amont du SNP puis identification par spectrométrie de masse, grâce à la masse différente de la base ajoutée

Haut débit d'individus et moyen débit de marqueurs

TaqMan™ OpenArray™ (Thermo Fisher)



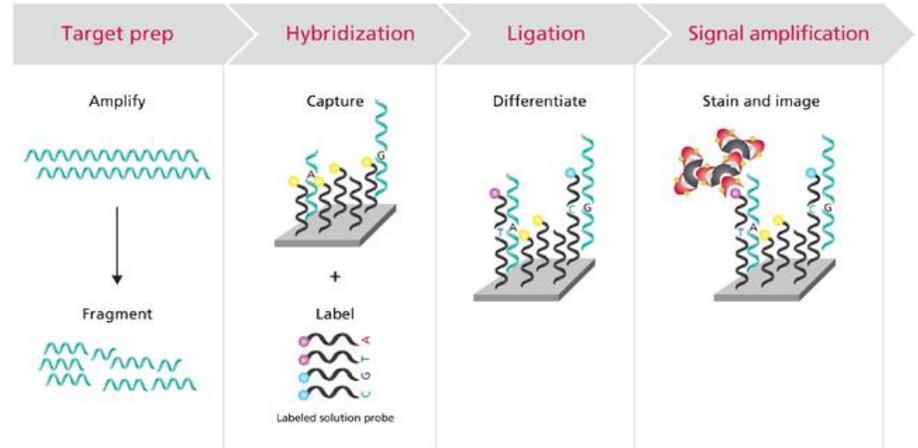
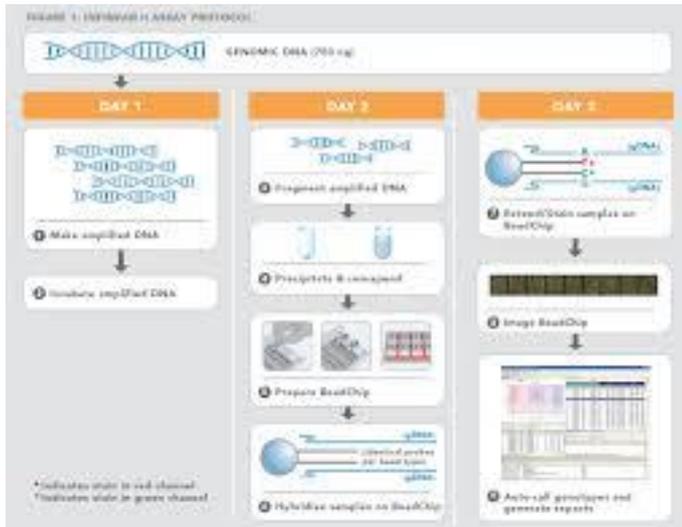
Version de Taqman™ sur puce permettant d'augmenter le nombre d'individus ou de marqueurs

Technologies par hybridation

❖ Méthodes en multiplex: Hybridation solide sur puces

Infinium™ (Illumina)

Axiome™ (Affymetrix)



Amplification de tout le génome puis fragmentation. Hybridation sur une lame qui contient des billes enrobées d'amorces spécifiques. Extension du produit hybridé avec des nucléotides marqués puis détection du signal avec un scanner.

Amplification de tout le génome puis fragmentation. Hybridation sur lame où sont fixées des amorces spécifiques. Hybridation et ligation de sondes marquées aux fragments déjà hybridés et détection du signal,

Très haut débit d'individus et de marqueurs
Résultats fiables mais ticket d'entrée élevé



Technologies par hybridation

- ❖ Méthodes robustes, fiables, peu de données manquantes,
- ❖ Méthodes ne nécessitant pas de compétence particulière en bioinformatique, car à chaque fois il existe un logiciel dédié pour l'analyse des génotypes.
- ❖ Méthodes assez peu modulables en terme ajout ou d'élimination de marqueurs (puces).
- ❖ Seul un polymorphisme déjà connu pourra être détecté.
- ❖ Méthodes installées depuis longtemps et très largement utilisées dans les projets scientifiques.

Méthodes utilisant le séquençage

Principe: Utiliser le séquençage haut débit pour séquencer tout ou partie d'un génome de plusieurs individus et ainsi déterminer le génotype.

L'existant

❖ Séquençage de génomes complets

Re-séquençage whole genome à faible profondeur :
- envisageable pour petit génome
- coûts librairies trop élevés pour haut débit d'échantillons

❖ Séquençage de génomes réduits

- Restriction enzymatique: GBS /RAD-Seq

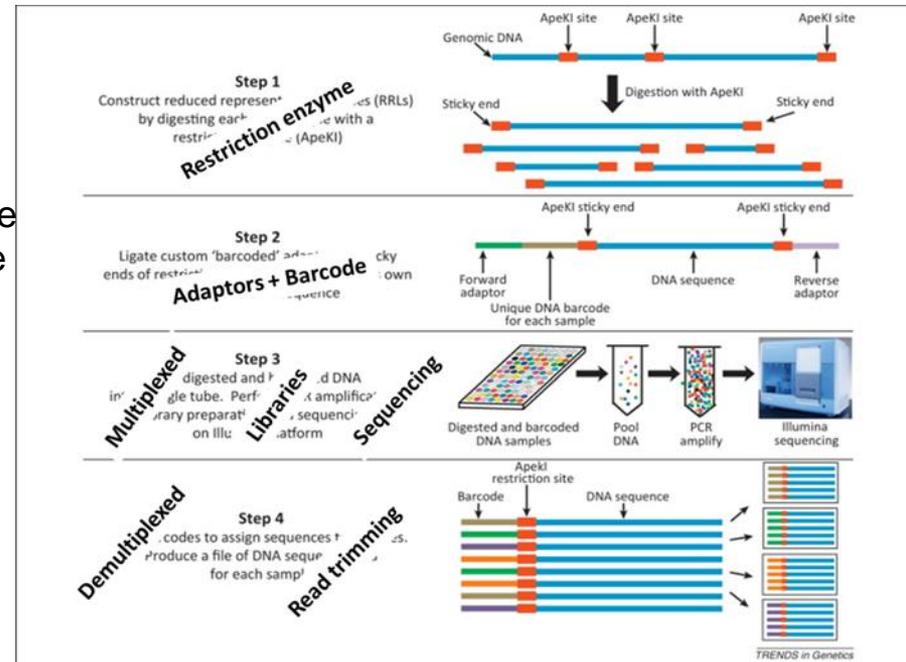
Utilisation d'une ou plusieurs enzymes de restriction pour fragmenter le génome puis ligation d'adaptateurs+barcode
Multiplexage d'individus, sizing éventuel puis séquençage NGS.

Faible coût

Génotypage de nombreux SNP

Mais beaucoup de données manquantes

Technologie brevetée par KeyGene et nécessite l'achat d'une licence pour son utilisation



TRENDS in Genetics

Méthodes utilisant le séquençage

L'existant

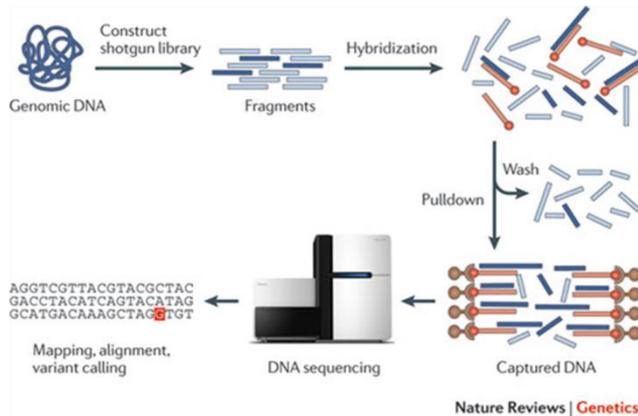
❖ Séquençage de Génomes réduits

- Capture par hybridation de régions d'intérêt: Exome capture

1- Design baits



2- Capture and sequencing



Principe: capturer des régions d'intérêts grâce à l'hybridation de sondes cibles pour enrichir les librairies produites, puis réaliser un séquençage NGS

Séquençage de régions codantes
Moins cher que le WGS
Long Workflow

Méthodes utilisant le séquençage

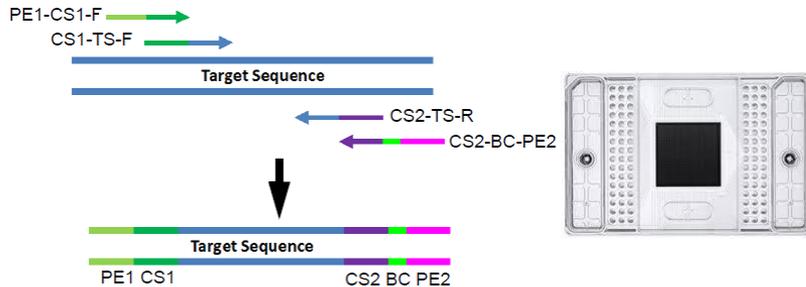
L'existant

❖ Séquençage de Génomes réduits

- Séquençage d'amplicons:

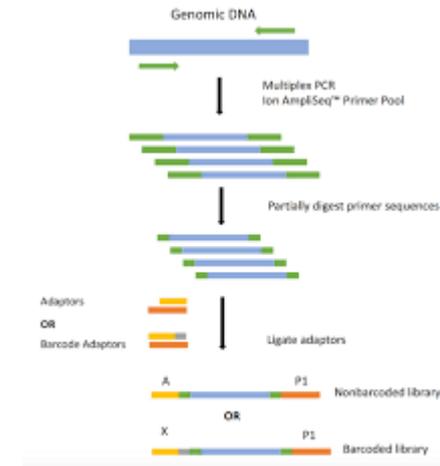
Production par PCR de 1 ou plusieurs amplicons ciblés puis séquençage haut débit

Access Array™ (Fluidigm)



PCR en simplex ou multiplex (jusqu'à 10-plex) réalisées en micro fluidique et séquençage sur séquenceurs Illumina

Ampli-Seq™ (Thermo Fisher)



PCR en multiplex
Séquençage sur Ion Proton (Thermo Fisher) uniquement mais ouvert depuis peu au séquençage sur séquenceurs Illumina

Méthodes utilisant le séquençage

- ❖ Méthodes qui réutilisent le principe d'hybridation de sondes et de ligation ou d'extension d'amorces et qui le combinent à un séquençage NGS

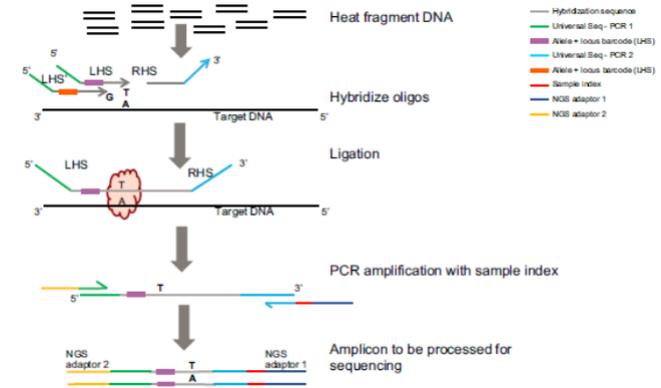
L'existant

- Eureka Genotyping™ (Thermo Fisher)

Principe: ligation entre une sonde allèle spécifique et une sonde immédiatement en aval, amplification, puis séquençage NGS,

Multiplex jusqu'à 384 individus

Orientation commerciale réserve pour le moment la technologie au génotypage de très nombreux échantillons (>5000): « Solution for Agrigenomics »



Le récent

- Truseq Genotyping Ne™ (Illumina):

Principe: 2 sondes nucléotidiques encadrent la région d'intérêt. Hybridation des sondes, extension de la 1^{ère} sonde jusqu'à la 2nde et ligation, amplification puis séquençage NGS.

Multiplex jusqu'à 384 individus

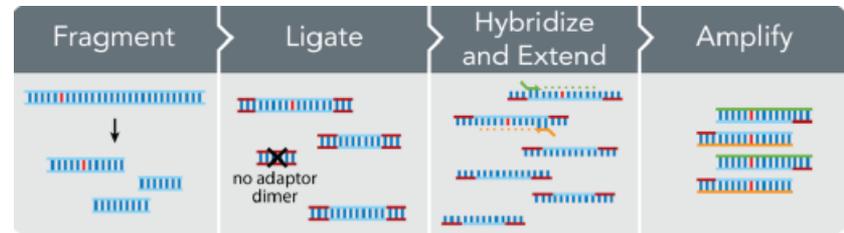
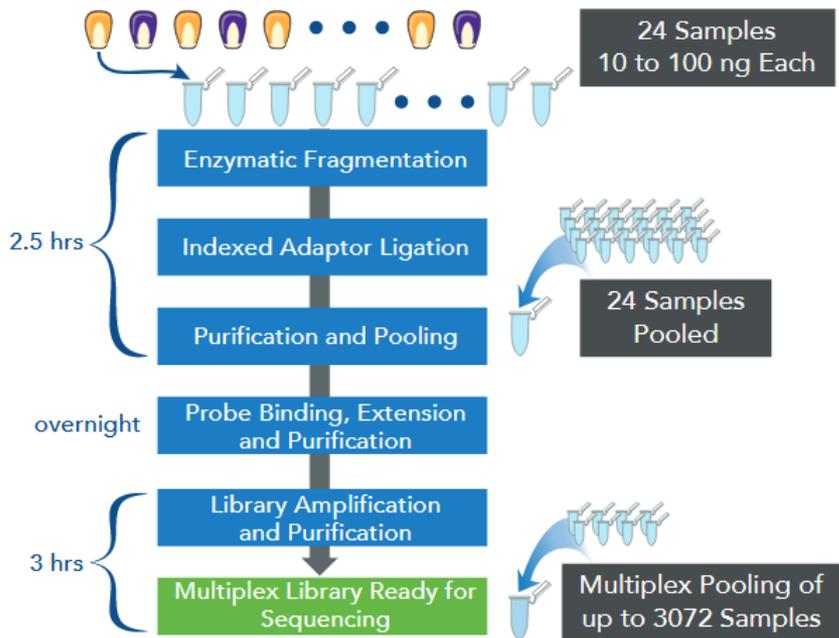
Coût: package complet qui comprend le design des sondes, un test, la construction des bibliothèques et le séquençage.

Méthodes utilisant le séquençage

Le récent

❖ Allegro Target Genotyping™ (NuGen)

Principe: Hybridation et extension de plusieurs bases d'une sonde spécifique, amplification puis séquençage NGS partiel du brin synthétisé



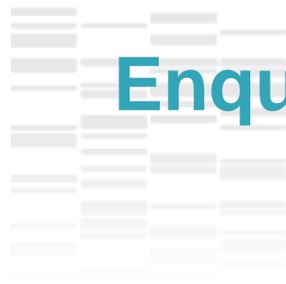
Multiplexage jusqu'à 3072 individus si utilisation du dual indexing

Coût: plus avantageux que le Truseq Ne™, mais ne comprend que le design et la construction de bibliothèques auxquels il faut rajouter le séquençage



Méthodes utilisant le séquençage

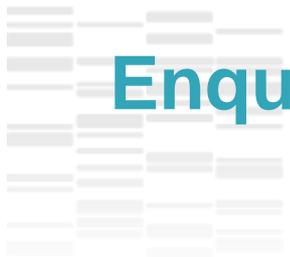
- ❖ Pour certaines méthodes contrairement aux technologies par hybridation il est à priori possible de détecter d'autres polymorphismes, en fonction des contraintes fournisseurs et des longueurs de séquençage PE ou SR.
- ❖ Données non exploitables directement, méthodes nécessitant un traitement bio-informatique, déjà existant et utilisé en routine.
- ❖ Baisse des coûts et augmentation des capacités de séquençage en font des méthodes qui commencent à être exploitées pour le génotypage.



Enquête Panorama Génomique

Enquête adressée aux plateformes et quelques partenaires scientifiques: 3 questions

- ❖ 1. Aujourd'hui quelle(s) technologie(s) de génomique est(sont) la(les) plus choisie(s) pour répondre aux projets de recherche ?
- ❖ 2. Entre 2016 et 2018 quelle a été l'évolution des technologies de génomique utilisées ?
- ❖ 3. Comment voyez-vous l'avenir des technologies de génomique ?



Enquête Panorama Génomique

❖1. Aujourd'hui quelle(s) technologie(s) de génotypage est(sont) la(les) plus choisie(s) pour répondre aux projets de recherche ?

Aujourd'hui sur les plateformes les demandes de génotypage se font majoritairement pour du génotypage sur puce d'hybridation : Axiom Affymetrix™ ou Infinium™ Illumina car faible coût au point mais pas forcément le plus adapté aux projets de recherche (quelques centaines d'individus sur quelques centaines ou milliers de marqueurs).

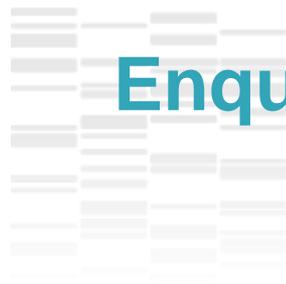
Pour d'autres c'est le GBS ou le reséquençage ciblé qui est le plus utilisé.

❖2. Entre 2016 et 2018 quelle a été l'évolution des technologies de génotypage utilisées ?

Peu d'évolutions constatées sur ce laps de temps, perte de vitesse SNP bas débit (type Kaspar sur puce Fluidigm).

Une réticence à l'utilisation du GBS due au brevet KeyGene pour certains ou au contraire une augmentation des demandes pour d'autres.

Peu de nouveauté de génotypage et une difficulté à conseiller les équipes.



Enquête Panorama Génomique

❖3. Comment voyez-vous l'avenir des technologies de génomique ?

Si les prix du séquençage continuent de baisser, peut-être qu'à terme, il ne sera plus nécessaire de faire du génomique ciblé mais que tous les échantillons seront séquencés et de fait génomés.

Avec l'évolution des prix de séquençage et des capacités des séquenceurs, probablement le reséquençage massif d'individus sera une des options pour ceux qui auront le budget adapté.



Merci pour votre attention.