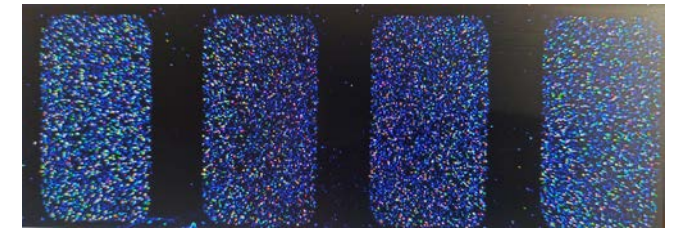




Réunion technique du 01/09/2022



La technique des microarrays

Gaëlle Angenard
Grégory Pinon

La transcriptomique

Définition:

Analyse de l'ensemble des transcrits d'ARN d'une population de cellules, d'un tissu, d'un organe à un instant donné dans une condition donnée

Objectifs majeurs:

- Etablir un catalogue des transcrits (ARNm, ARN non codants), prenant en compte les transcrits alternatifs
⇒ découverte de nouveaux gènes
- Etudier le changement de niveaux d'expression des transcrits au cours du développement / en fonction de différentes conditions
⇒ compréhension des processus physiologiques
⇒ Identifier des biomarqueurs exprimés différemment entre l'état malade vs sain
⇒ Distinguer les stades ou sous-types de la maladie
- Explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à un phénotype

Principales méthodes d'analyse de la transcriptomique

Méthodes	PCR en temps réel	Les puces à ADN	RNAseq
Principe	Amplification	Hybridation	Séquençage haut débit NGS (Next Generation Sequencing)
Application / Utilisation	Expression relative d'un gène	Recherche sur des gènes de séquences déjà connues	Approche non biaisée, pas d'à priori sur les séquences que l'on cherche
Intérêts	Rapide Bonne reproductibilité	Criblage à haut débit Peu coûteux Nombreux design de puces disponibles	Donne accès au transcriptome complet (adapté pour des gènes faiblement exprimés, miRNA, lncRNA, circRNA...), de façon quantitative. Pas besoin de génome ou de transcriptome de référence. Détection plus sensible
Limites	Rendement faible Sensible à la présence d'inhibiteurs (protéines, solvants organiques), manque de spécificité: formation de dimères d'amplifications	Besoin d'avoir la connaissance d'un génome / transcriptome de référence pour construire la puce. Limite de détection des gènes faiblement exprimés / détecte que les gènes annotés dans le génome	Coût non négligeable Analyse qui demande une certaine expertise

Les puces à ADN

Etude du transcriptome par l'observation simultanée de l'expression de gènes basée sur le principe d'hybridation

Puce à ADN:

support rigide (verre ou nylon) sur lesquels de courtes séquences d'ADN ont été déposées = sondes = oligonucléotides de synthèse: spécifiques d'un seul et unique gène

⇒ Puces commerciales prédéfinies / standardisées

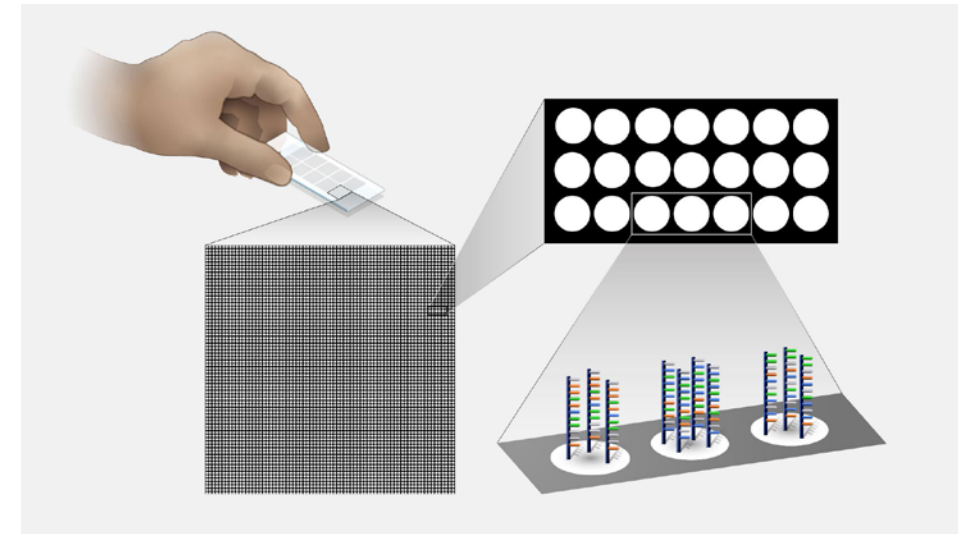
⇒ Puces commerciales à façon (design spécifique)

Nombre de sondes et de gènes définis suivant le type de puces:

Exemples:

Humain type agilent: 60 000 sondes qui couvrent 27 000 gènes (dont 100 sondes qui sont des contrôles positifs). 1600 euros / lame.

Zebrafish type agilent: 44 000 sondes qui couvrent 17 500 gènes



1. Extraction ARN



Nucleospin RNA kit

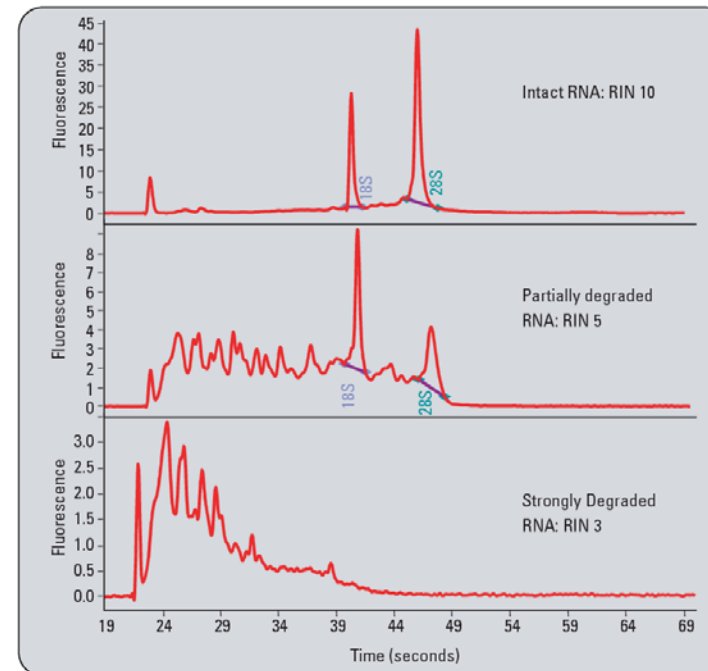
Echantillons: cellules- tissus- fluides

ARN

Dosage / qualité : Agilent Bioanalyzer



RIN (RNA Integrity Number)



2. Transcription inverse

⇒ Conversion des ARNm en ADN double brin complémentaire.

Addition de « spike » au pool d'ARN à rétrotranscrire : 10 ARN de plantes, synthétisés in vitro, polyadénylés et de concentration connue.

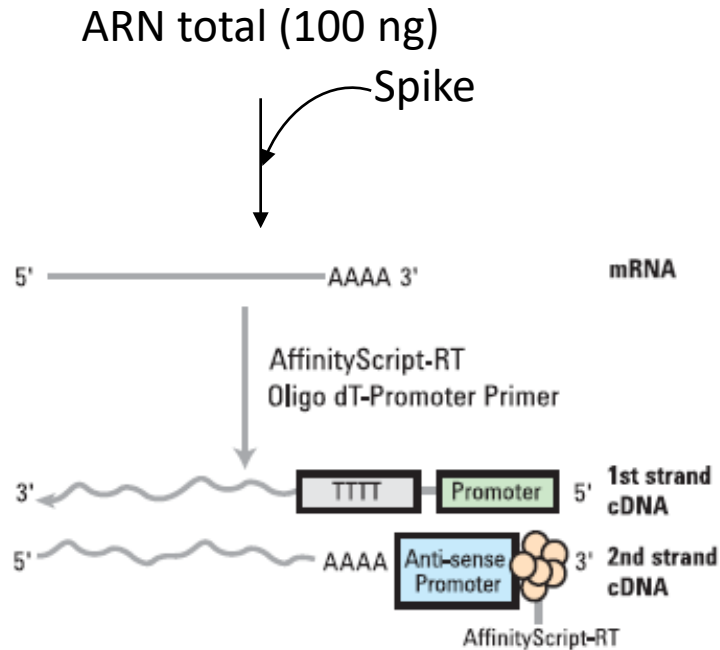
⇒ Servent à vérifier l'efficacité, la sensibilité et la linéarité de la procédure

Hybridation d'un primer contenant une séquence polydT et une étiquette « T7 ».

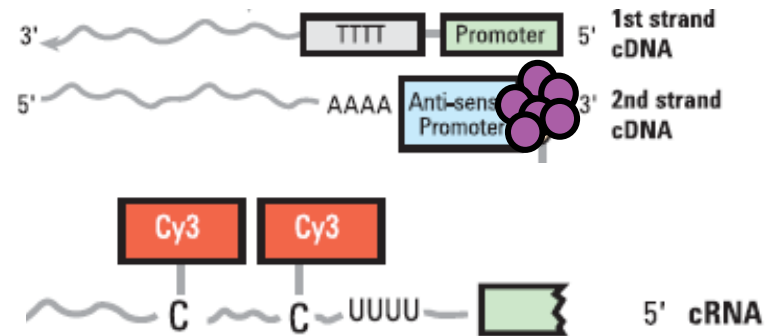
⇒ cible les ARN messagers à convertir en ADNc et introduit le promoteur de la T7 RNA polymérase

Addition du mélange réactionnel pour faire la transcription inverse.

⇒ tampon, dNTP, reverse transcriptase, ...



3. Transcription *in vitro* et marquage des ARNc avec de la cyanine 3



⇒ Amplification du matériel de départ

⇒ Incorporation d'un fluorochrome qui sert de signal de détection

Supplémentation de la réaction de transcription inverse avec les réactifs pour faire la transcription *in vitro*.
tampon, NTP, Cy3-CTP, T7 RNA polymérase, ...

4. Purification et dosage des ARNc marqués

⇒ Purification des ARNc pour se débarrasser des enzymes, du primer, des additifs, ...



Rendement ARN (μg) = $([\text{ARN}] \times \text{vol. élution}) / 1000$ > 0,825 μg

Spécificité du marquage ($\text{pmol}/\mu\text{g}$) = $([\text{Cy3}] / [\text{ARN}]) \times 1000$ > 6 pmoles / μg ARN

5. Fragmentation des ARN marqués

⇒ Permet une meilleure accessibilité et hybridation des ARN marqués sur les sondes spotées sur la lame de verre.

1 microarray



5 μ g - 500 μ L

4 microarrays

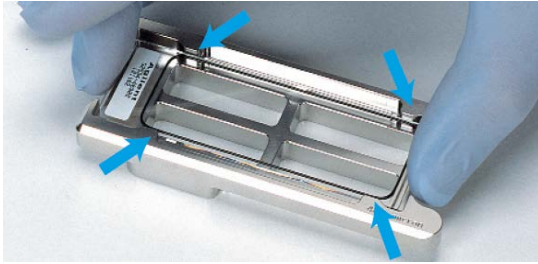


1,65 μ g - 110 μ L

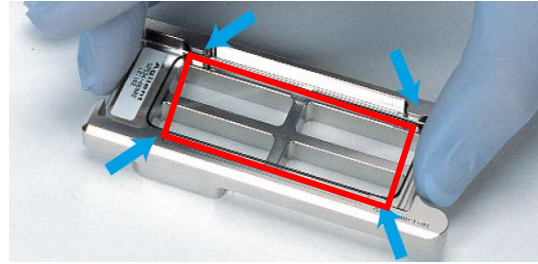
⇒ Dilution des ARN marqués dans un tampon qui bloque les sites de fixation aspécifiques
Addition du tampon de fragmentation pendant un temps précis
Blocage de la réaction de fragmentation par addition d'un diluant

6. Hybridation

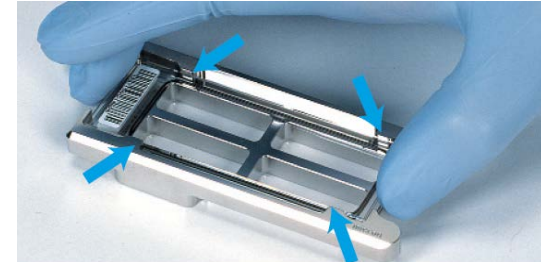
⇒ Mise en contact des échantillons d'ARN marqués avec les sondes spotées sur la lame de verre



Mise en place de la lame à joints dans la chambre



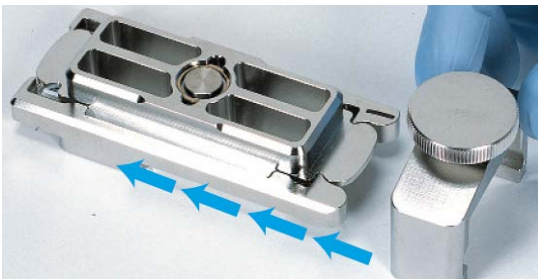
Dépôt de la solution d'ARNc fragmentés



Mise en place de la lame spottée avec les sondes



Mise en place du couvercle de la chambre



Positionnement du système de fermeture



S'assurer de l'étanchéité du système et de la formation d'une bulle mobile



Incubation dans le four à hybridation

7. Lavages

⇒ Les lavages ont pour but d'éliminer les ARN marqués et non hybridés aux sondes et d'éliminer les hybridations non spécifiques.

⇒ Sortir les lames de la chambre d'hybridation

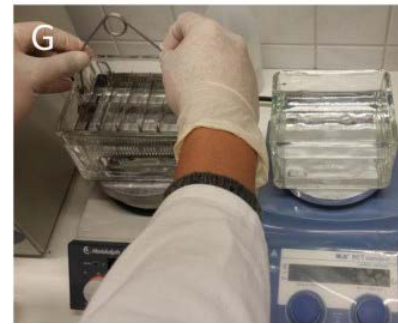
Séparer les lames dans un cristalliseur contenant du tampon 1

Placer la lame hybridée sur un portoir dans du tampon 1

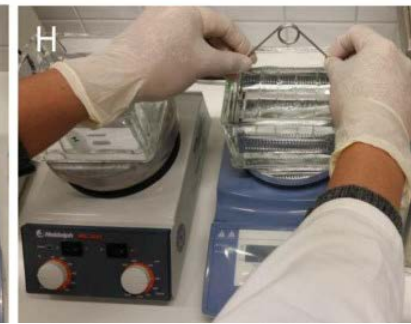
Placer le portoir dans du tampon 2 préchauffé à 37°C

Sortir la lame hybridée du support de lames d'un mouvement régulier pour éviter les traces de tampon: phase critique

Sécher la lame hybridée en la tapotant sur du papier absorbant



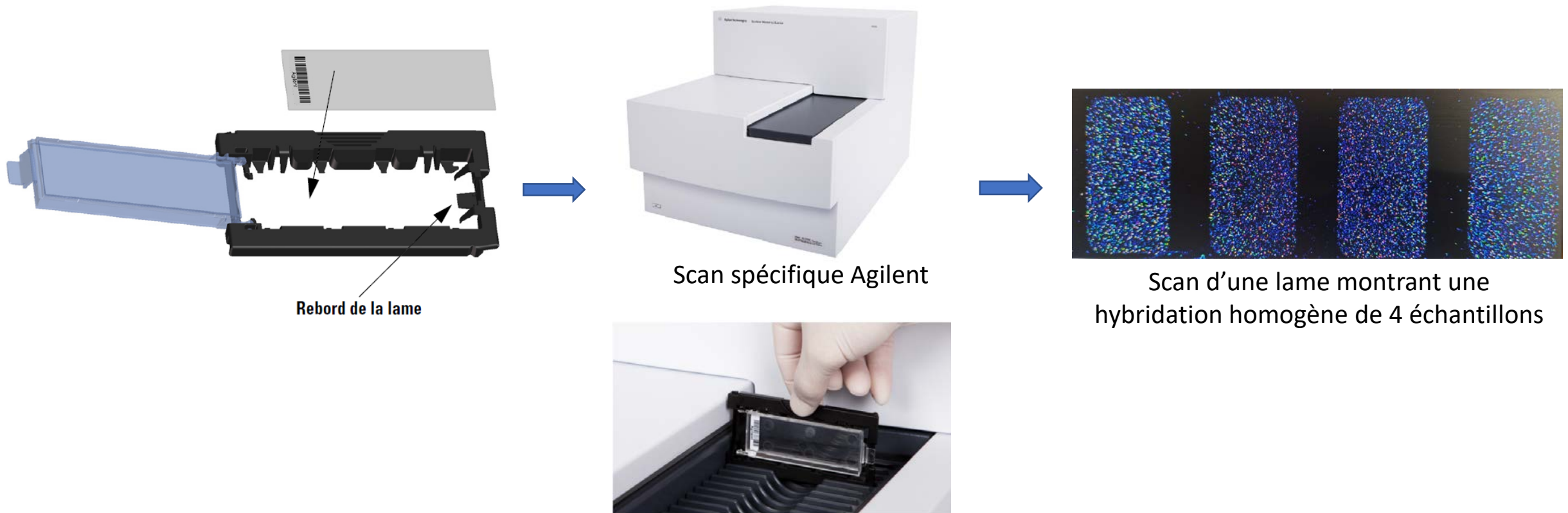
Wash buffer 1



37°C Wash buffer 2

8. Scan des lames

- ⇒ Le scan des lames a pour but d'acquérir une image qui reflète la quantité de fluorescence qui a été fixée sur les sondes = proportionnel au niveau d'expression des gènes
- ⇒ Cette acquisition se fait à l'aide d'un scanner spécifique par le biais d'un logiciel (Agilent Microarray) dans lequel il faut préciser le type de fluorochrome et le type de lame qui ont été utilisés.

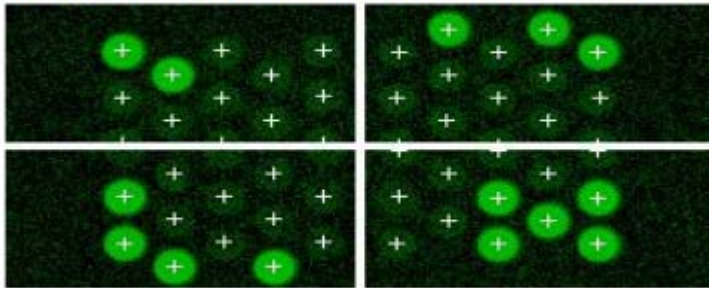


Extraction des données et contrôle qualité

⇒ Logiciel Agilent Feature extraction : association d'un spot à son amorce (gène)

⇒ Contrôle de l'efficacité et de la qualité de l'hybridation = QC REPORTS (1 fichier pdf qc report / échantillon)

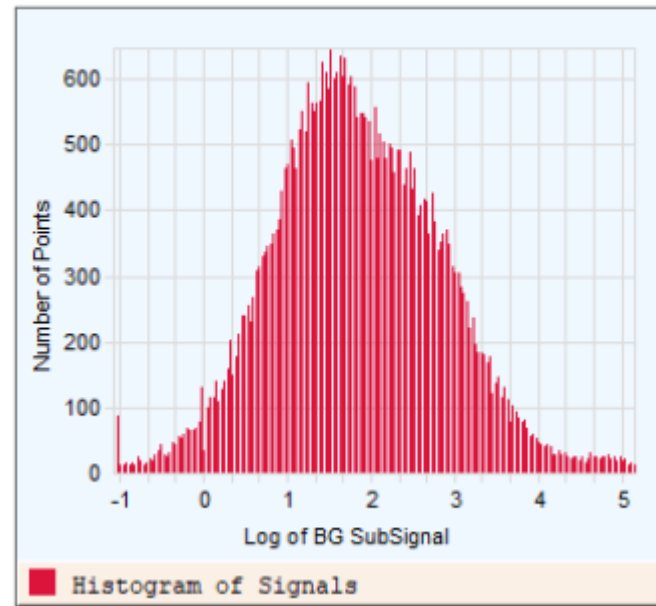
Spot Finding of the Four Corners of the Array



Grid Normal

Vérification de la position de
la grille de lecture

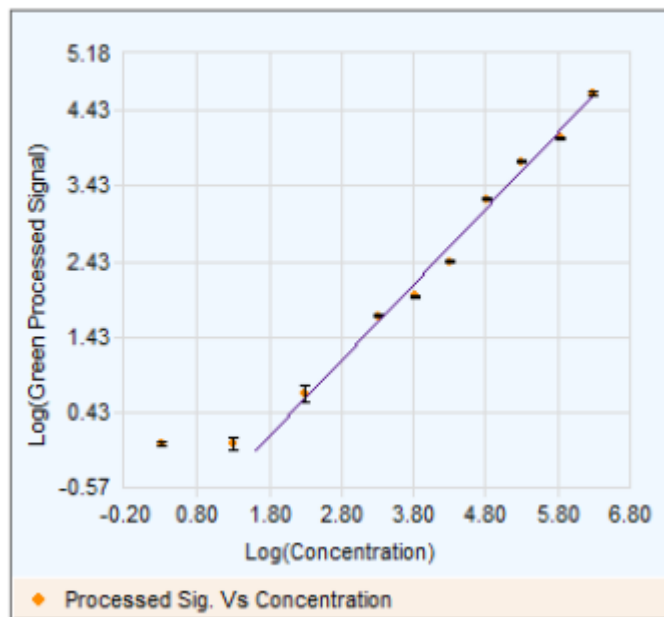
Histogram of Signals Plot



Histogramme représentant la distribution
des intensités de signal des spots

Contrôle qualité

Agilent SpikeIns: Log(Signal) vs. Log(Relative concentration) Plot



Vérification de la linéarité des intensités de signal des spike selon la concentration

Evaluation Metrics for GE1_QCMT_Jun14

Good (10)

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrcntFeatNonU...	0.00		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	24.21		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-1.27		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	0.92		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFil...	1.01		<15	>15
gNonCntrlMedCVPProcSig...	4.74		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVPProcSignal	2.68		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.00		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	0.10		0.01 to 2	<0.01 or >2

• Excellent • Good • Evaluate

Evaluation de plusieurs paramètres de contrôle

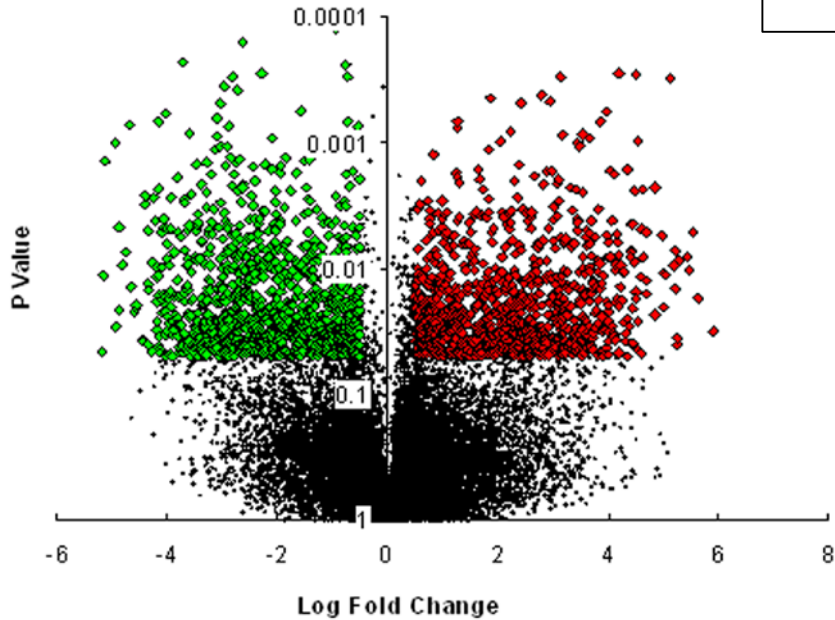
Analyse et représentations des données



Logiciel Genespring GX (Agilent):

- Outil clé en main
- Licence payante
- Etapes de normalisation et de filtration
- Analyse statistique (programmation logiciel R)

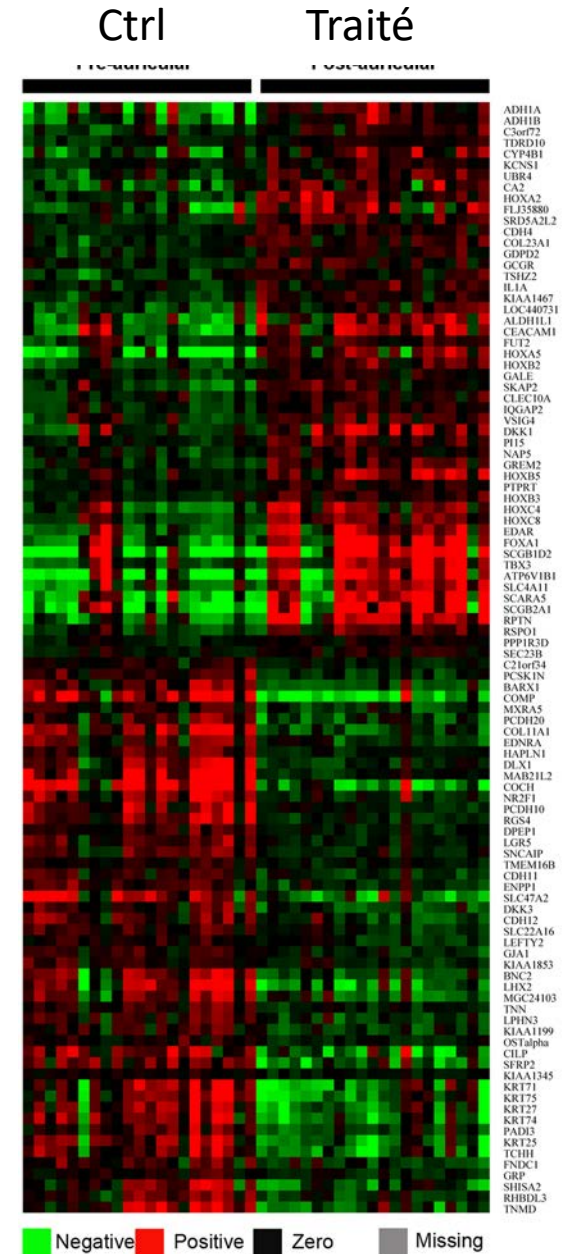
Représentation des gènes sur ou sous-exprimé par rapport à une condition contrôle

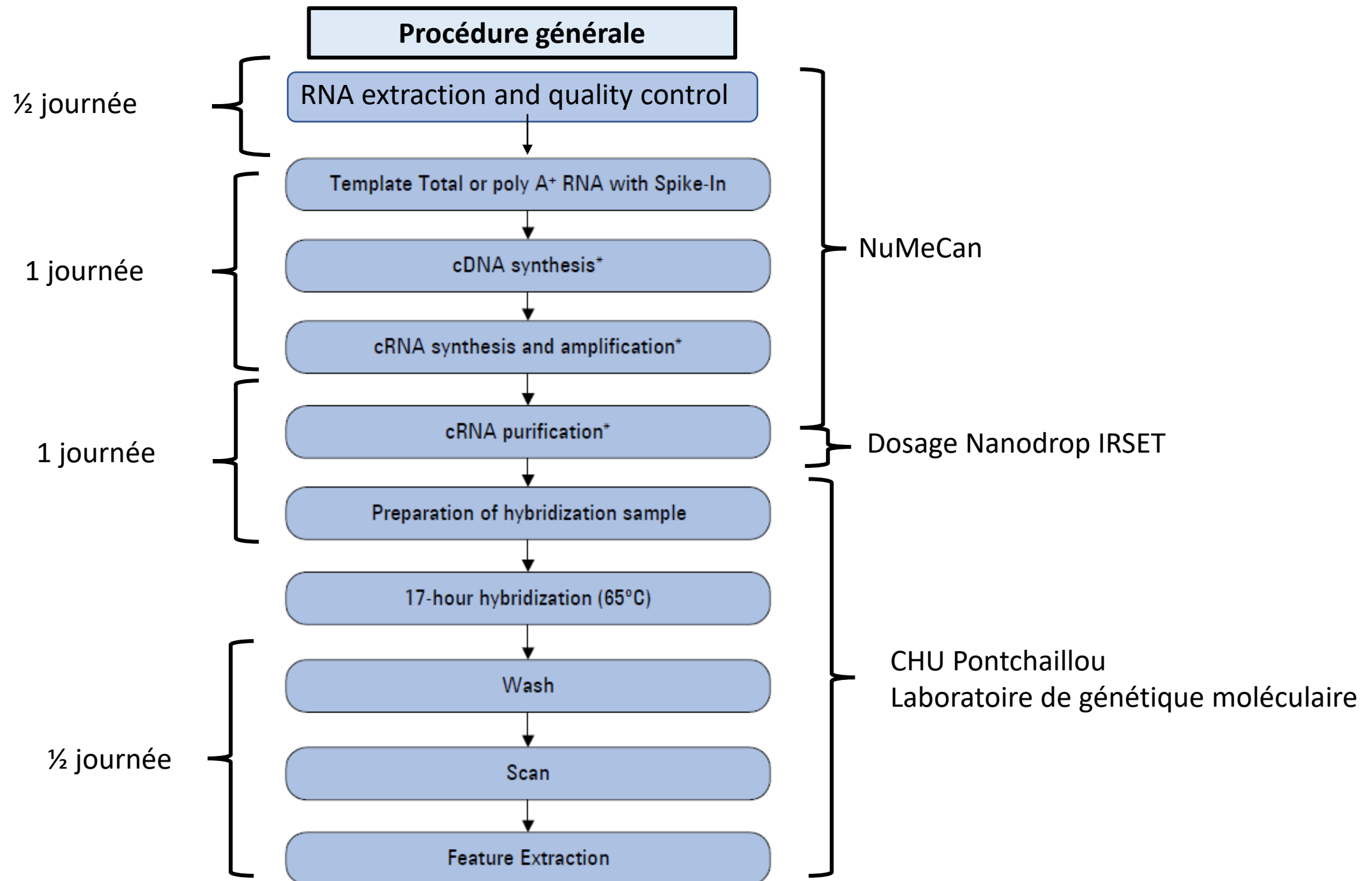


Volcano plot

Analyse de la p-value en fonction du fold-change

Heatmap= Classement des gènes et des conditions expérimentales en fonction de leur degré de similarité (clustering)





MERCI POUR VOTRE ATTENTION!

DES QUESTIONS?

