



Evolution technologique du cadre des tests génétiques

Denis MILAN

Plateforme Génomique
Génopole Toulouse Midi-Pyrénées
denis.milan@toulouse.inra.fr

Pour toute utilisation du contenu de cette présentation, veuillez citer l'auteur, son organisme d'appartenance, la plateforme « Génétique et société », l'atelier et la date. Merci.

En guise d'introduction

- Une évolution importante des techniques et des couts
- Ce que l'on imaginait mais pensait impossible devient possible :
 - typage de millions de SNP,
 - identification exhaustive du polymorphisme d'un individu

Quelles sont les évolutions technologiques ?



Les (nouvelles) techniques de génotypage

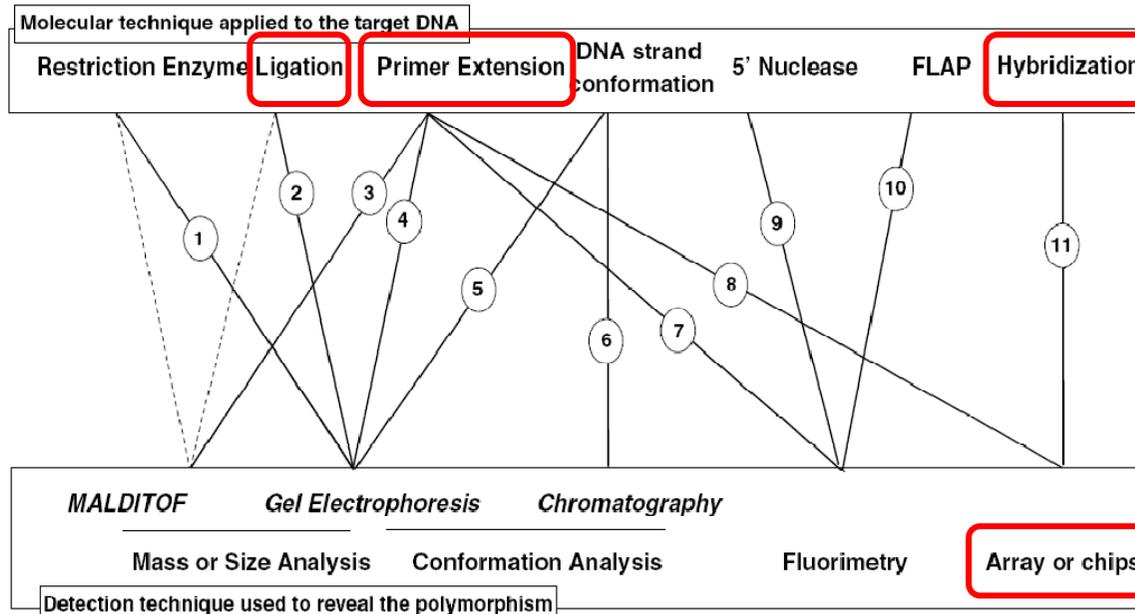
Microsatellites

- Coût d'une **PCR standard** + 1 amorce **marquée** + 0.10 € séquenceur
- Environ **0.3 - 0.5 €** / point de consommables + machines
- Prix de **1.35 €** / point Labogena (GIE Animal)
- Génome scan 120 marqueurs : **36 à 162 € / individu**

Avantage & Inconvénients des μ sat

- Quelques avantages :
 - Très **polymorphes**
 - Assez facile à **développer** (surtout si la séquence est dispo)
 - Assez facile à typer à **moyenne échelle** (jusqu'à 10.000 génotypes produits sur la PF / jour)
 - Bien adaptés aux **études familiales**
- Quelques inconvénients :
 - Analyse **difficilement** complètement **automatisable**
 - Polymorphisme **non causaux**
 - Pas adapté aux études de **Déséquilibre de liaison** sur populations (mutation, densité)

D'innombrables techniques ...



1 : PCRRFLP , 2 : LAR or OLA, 3 : Good Assay, 4 : Minisequencing techniques, Snapshot ..., 5 : SSCP or DGGE, 6 : DHPLC, 7 : Pyrosequencing, READit, 8 : SNP it, 9 : Taqman, 10 : Invader Assay, 11 : Microarray or DNA chips

Genet. Sel. Evol. 34 (2002) 275-305 275
 © INRA, EDP Sciences, 2002
 DOI: 10.1051/gse:2002099

Review

A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics

Alain VIGNAL^{a*}, Denis MILAN^a,
 Magali SANCRISTOBAL^b, André EGGEN^b

^a Laboratoire de génétique cellulaire, Inra, chemin de Borde-Rouge, Auzeville BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France
^b Laboratoire de génétique biochimique et de cytogénétique, Inra, domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

(Received 11 February 2002; accepted 8 March 2002)

Abstract – During the last ten years, the use of molecular markers, revealing polymorphism at the DNA level, has been playing an increasing part in animal genetics studies. Amongst others, the microsatellite DNA marker has been the most widely used, due to its easy use by simple PCR, followed by a denaturing gel electrophoresis for allele size determination, and to the high degree of information provided by its large number of alleles per locus. Despite this, a new marker type, named SNP, for Single Nucleotide Polymorphism, is now on the scene and has gained high popularity, even though it is only a bi-allelic type of marker. In this review, we will discuss the reasons for this apparent step backwards, and the pertinence of the use of SNPs in animal genetics, in comparison with other marker types.

SNP / mikrosatellite / molecular marker / genome / polymorphism

1. INTRODUCTION: OLDER TYPES OF MOLECULAR GENETIC MARKERS

Molecular markers, revealing polymorphisms at the DNA level, are now key players in animal genetics. However, due to the existence of various molecular biology techniques to produce them, and to the various biological implications some can have, a large variety exists, from which choices will have to be made according to purposes.

Two main points have to be considered, when using molecular markers for genetic studies. As seen from the molecular biologist's point of view, the genotyping procedure should be as simple and have as low a cost as possible, in

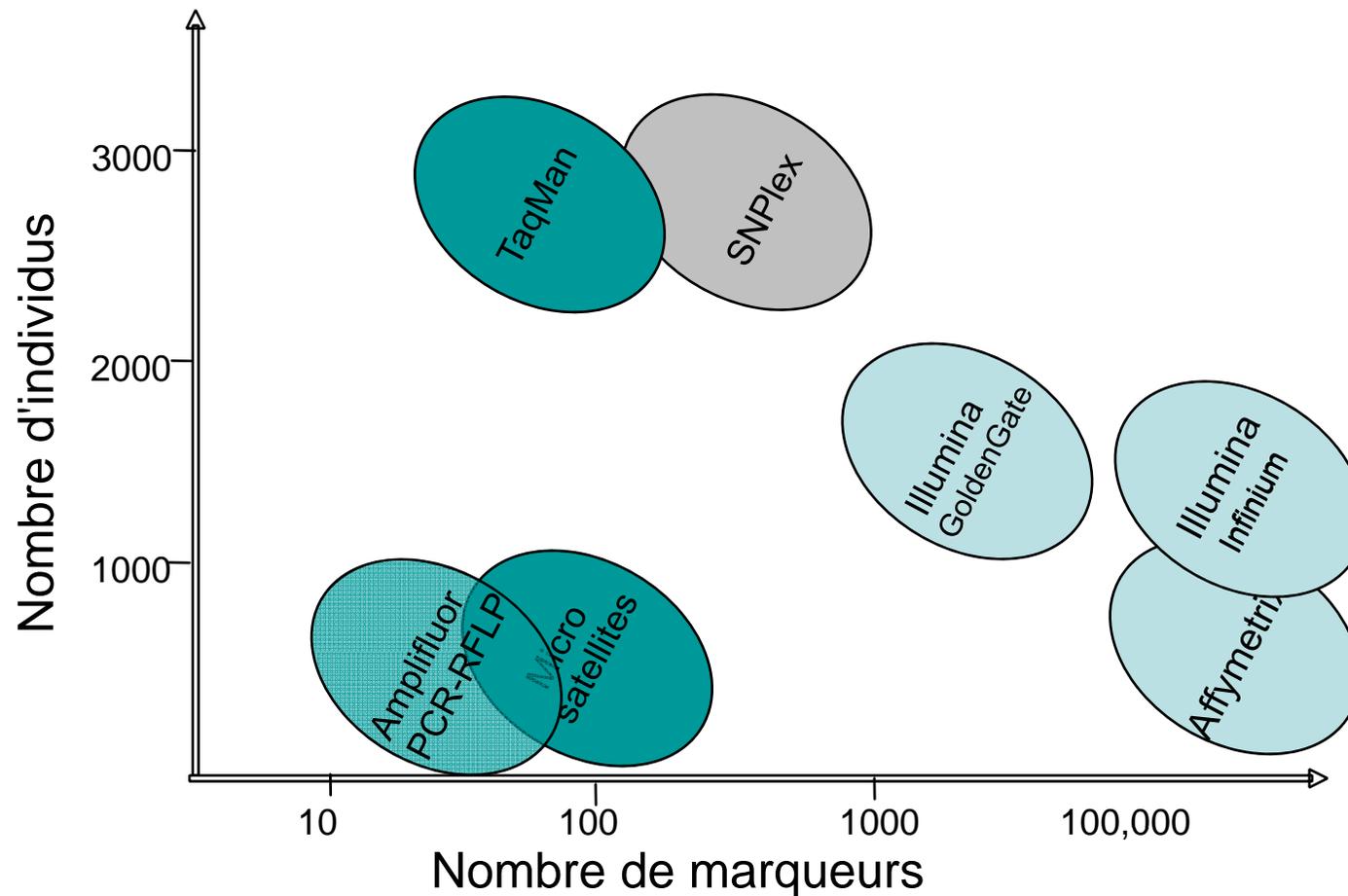
* Correspondence and reprint requests:
 E-mail: vignal@toulouse.inra.fr

Vignal , Milan, San Cristobal, Eggen (2002), Genet Sel evol

D'innombrables techniques ...

La technique universelle n'existe pas

Les techniques pour faire quoi ...



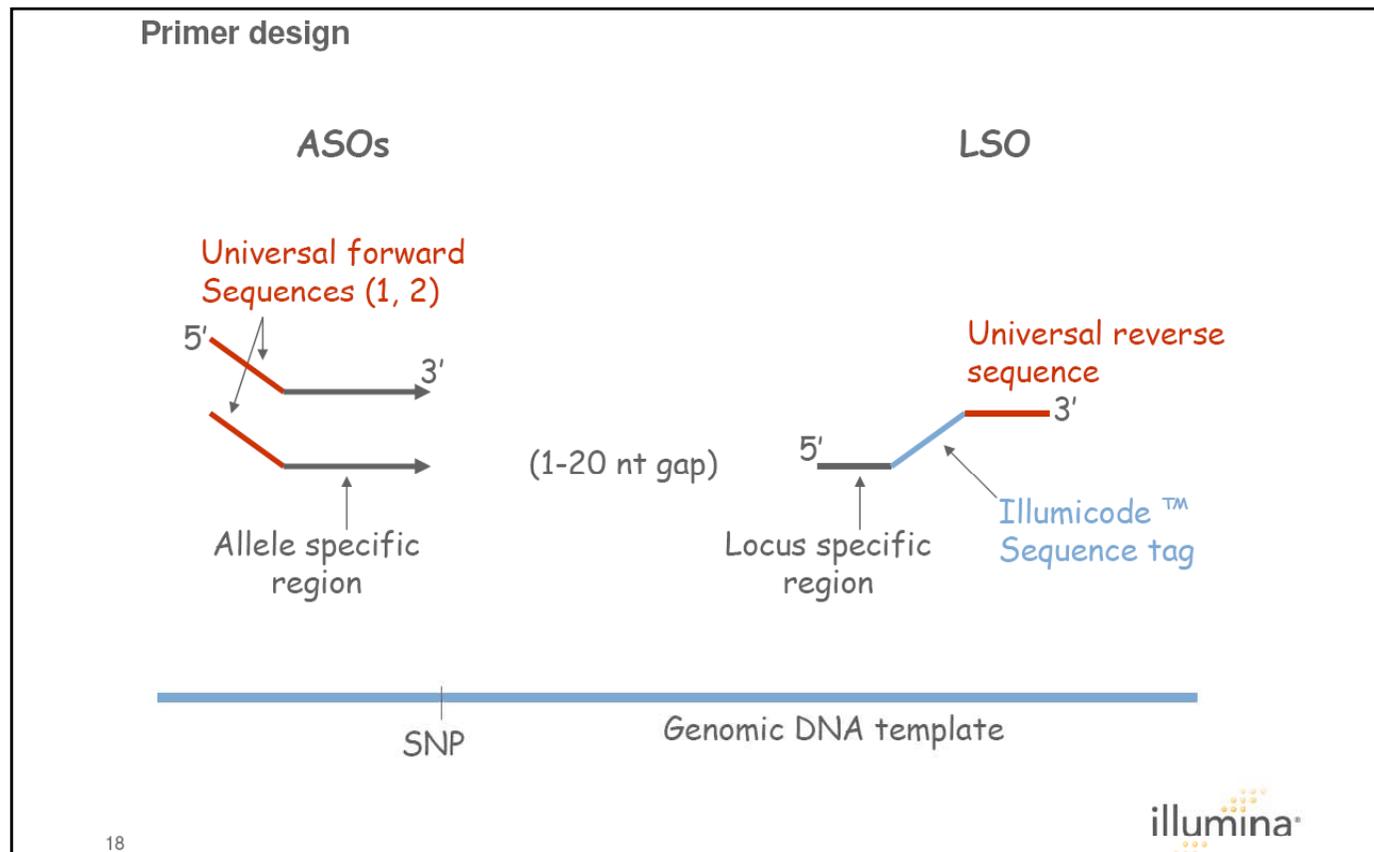
Affymetrix

- **Hybridation** Allèle spécifique
- Utilisation d'amorces **25 mers**
- Surtout utilisables pour des **puces commerciales**
- **Puces à façon surtout pour l'homme**
- Coût de l'ordre de **160-313 € /puce** (10 k façon, 1.8 M HSA)



Projet prioritaire de la **Plateforme Biopuces** de la Génopole

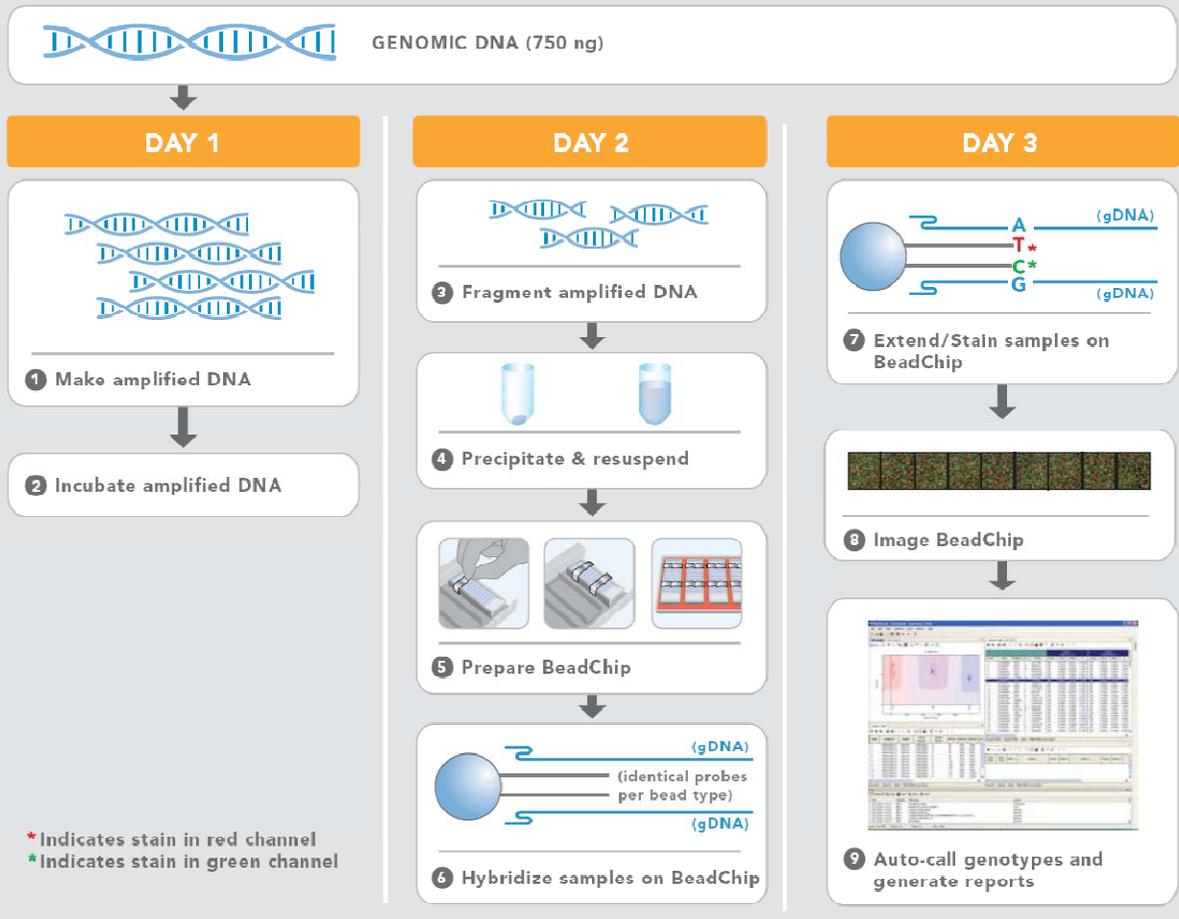
Illumina Goldengate



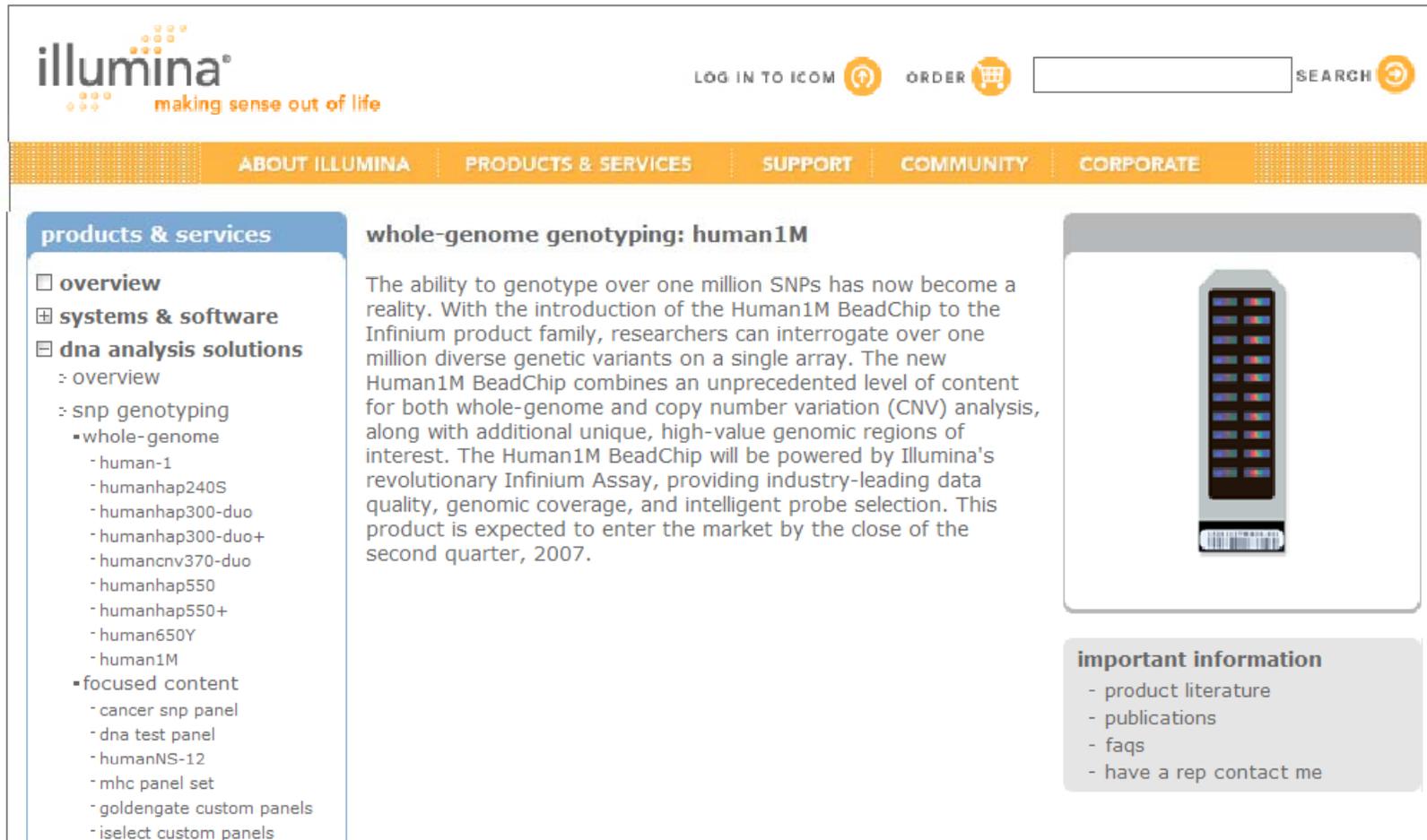
18

Infinium II (Illumina)

FIGURE 1: INFINIUM II ASSAY PROTOCOL



Infinium : 1 million SNP humain



illumina
making sense out of life

LOG IN TO ICOM ORDER SEARCH

ABOUT ILLUMINA PRODUCTS & SERVICES SUPPORT COMMUNITY CORPORATE

products & services

- overview
- systems & software
- dna analysis solutions
 - overview
 - snp genotyping
 - whole-genome
 - human-1
 - humanhap240S
 - humanhap300-duo
 - humanhap300-duo+
 - humancnv370-duo
 - humanhap550
 - humanhap550+
 - human650Y
 - human1M
 - focused content
 - cancer snp panel
 - dna test panel
 - humanNS-12
 - mhc panel set
 - goldengate custom panels
 - iselect custom panels

whole-genome genotyping: human1M

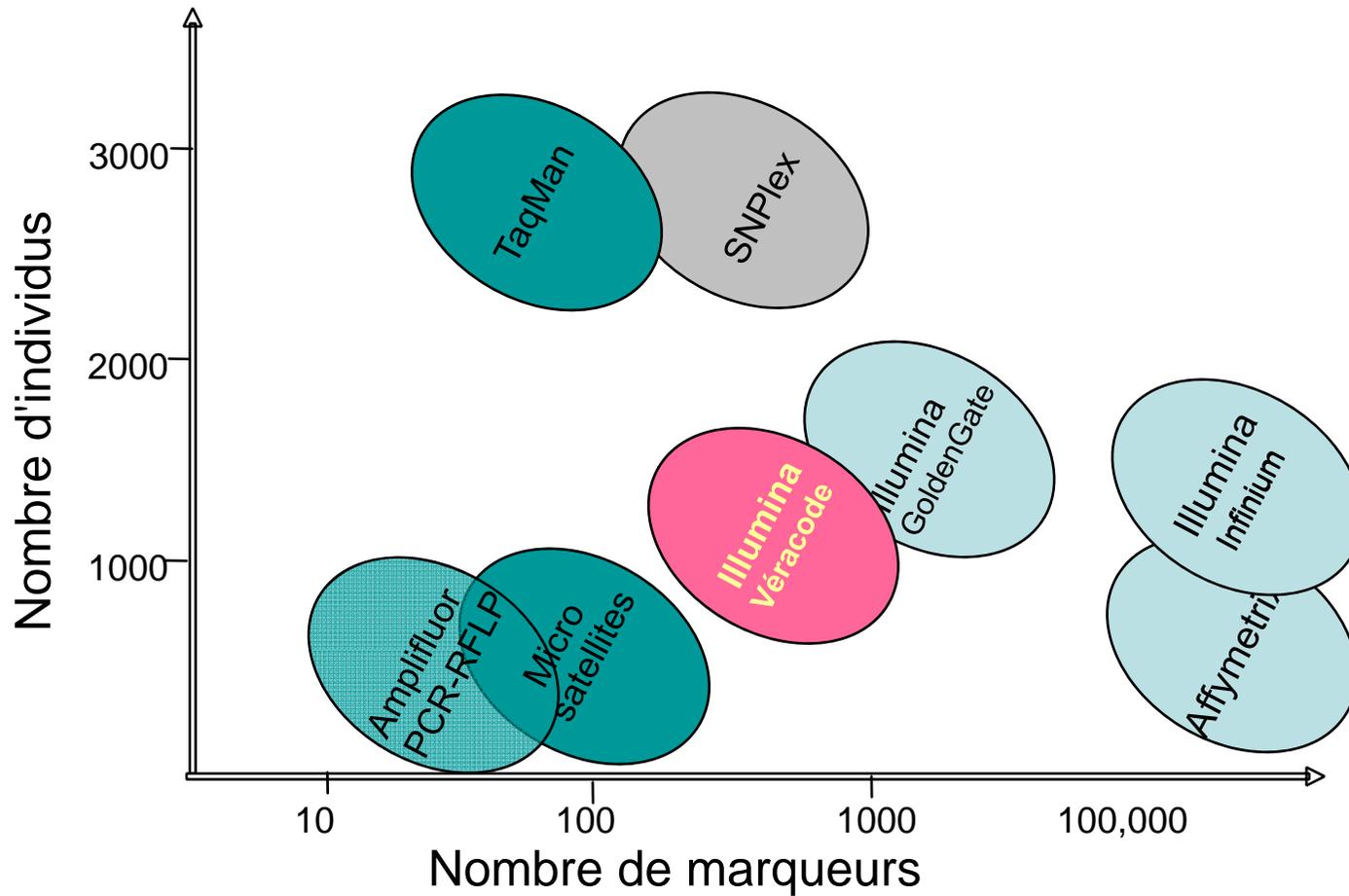
The ability to genotype over one million SNPs has now become a reality. With the introduction of the Human1M BeadChip to the Infinium product family, researchers can interrogate over one million diverse genetic variants on a single array. The new Human1M BeadChip combines an unprecedented level of content for both whole-genome and copy number variation (CNV) analysis, along with additional unique, high-value genomic regions of interest. The Human1M BeadChip will be powered by Illumina's revolutionary Infinium Assay, providing industry-leading data quality, genomic coverage, and intelligent probe selection. This product is expected to enter the market by the close of the second quarter, 2007.



important information

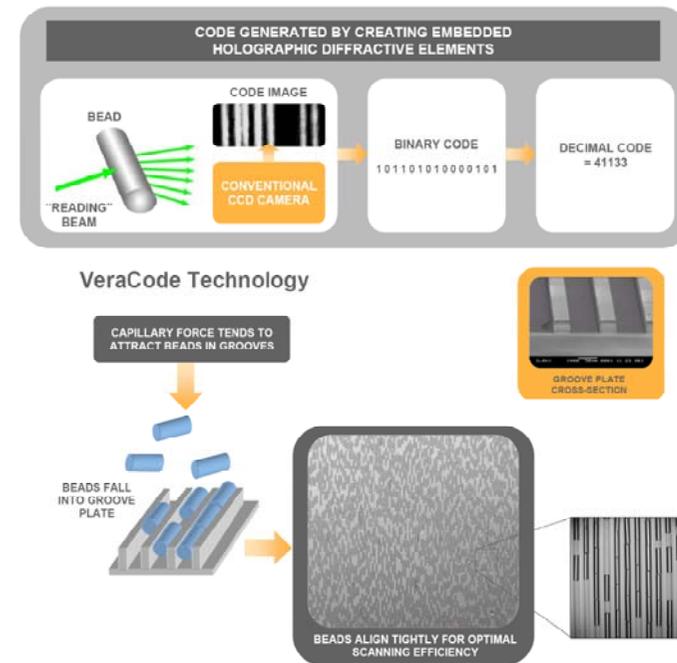
- product literature
- publications
- faqs
- have a rep contact me

Une nouvelle technique complémentaire



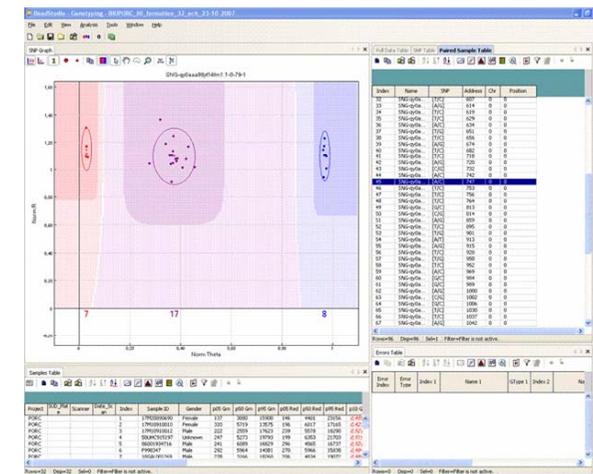
Goldengate & Veracode

- Technique **Goldengate**
- Jeux de **96 ou 384** SNP
- Coûts (labos publics)
 - 96 : **0.11 € / génotype**
 - 384 : **0.05 € / génotype**
- Première échelle de commande : **480 individus**
- Analyse du **transcriptome (96 ou 384 gènes)**



Typage SNP sur BeadXPress

- Acquisition de la machine (la première livrée en France) en octobre 2007
- Analyse de jeux de **96 ou 384 SNP**
- Quatre projets pilotes :
 - **Homme** (maladie auto immune)
 - **Souris** (carto QTL hémochromatose)
 - **Poule** (QTL portage des salmonelles)
 - **Porc** (carto fine QTL engraissement)
- 100 % succès pour les marqueurs déjà connus





Les nouvelles techniques de séquençage

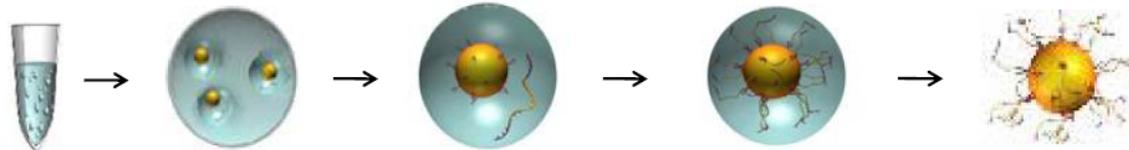
Les objectifs

- Le génome séquencé pour **1000 \$**
- Evolution des coûts de séquençage :
 - Génome humain (3 giga bases) : **1 à 3 milliard \$**
 - Génome mammifère : **20-40 millions \$**
 - **Reséquençage** : 3 Gb en profondeur 10 x pour **50 000 €**

Les nouvelles technologies

- Séquençage massivement parallèle :
400 000 à 100 M fragments
- Technologies proposées :
 - Roche 454
 - Solexa (Illumina)
 - SOLID (Applied Biosystems)

Amplification clonale en émulsion



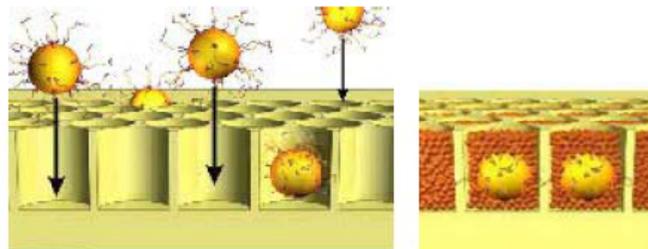
Mélange des fragments sstDNA à un excès de bille

Création de microréacteur avec les billes et les réactifs PCR

Amplification clonale à l'intérieur des microréacteurs

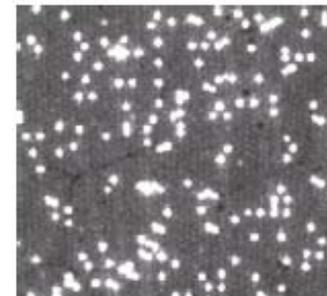
Enrichissement des billes "positives"

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



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

- Injection consécutive des nucléotides (A puis T, puis G, puis C)
- L'incorporation du nucléotide injecté induit une émission lumineuse



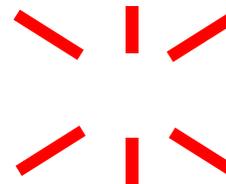
Bille de capture à ADN contenant des millions de copies d'un fragment d'ADN clonal

A A T C G G C A T G C T A A A G T C A

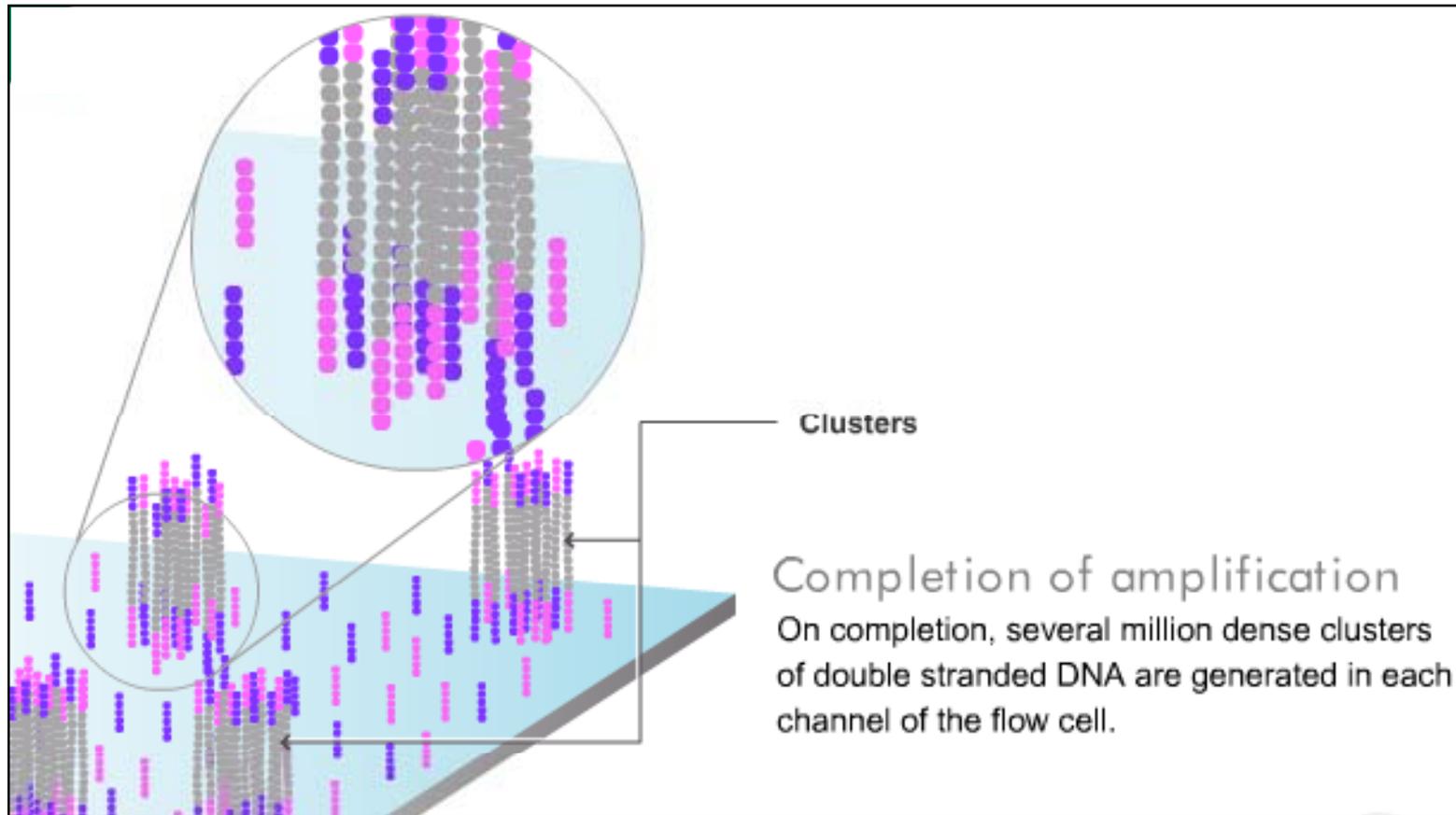
Fixation de l'amorce

G

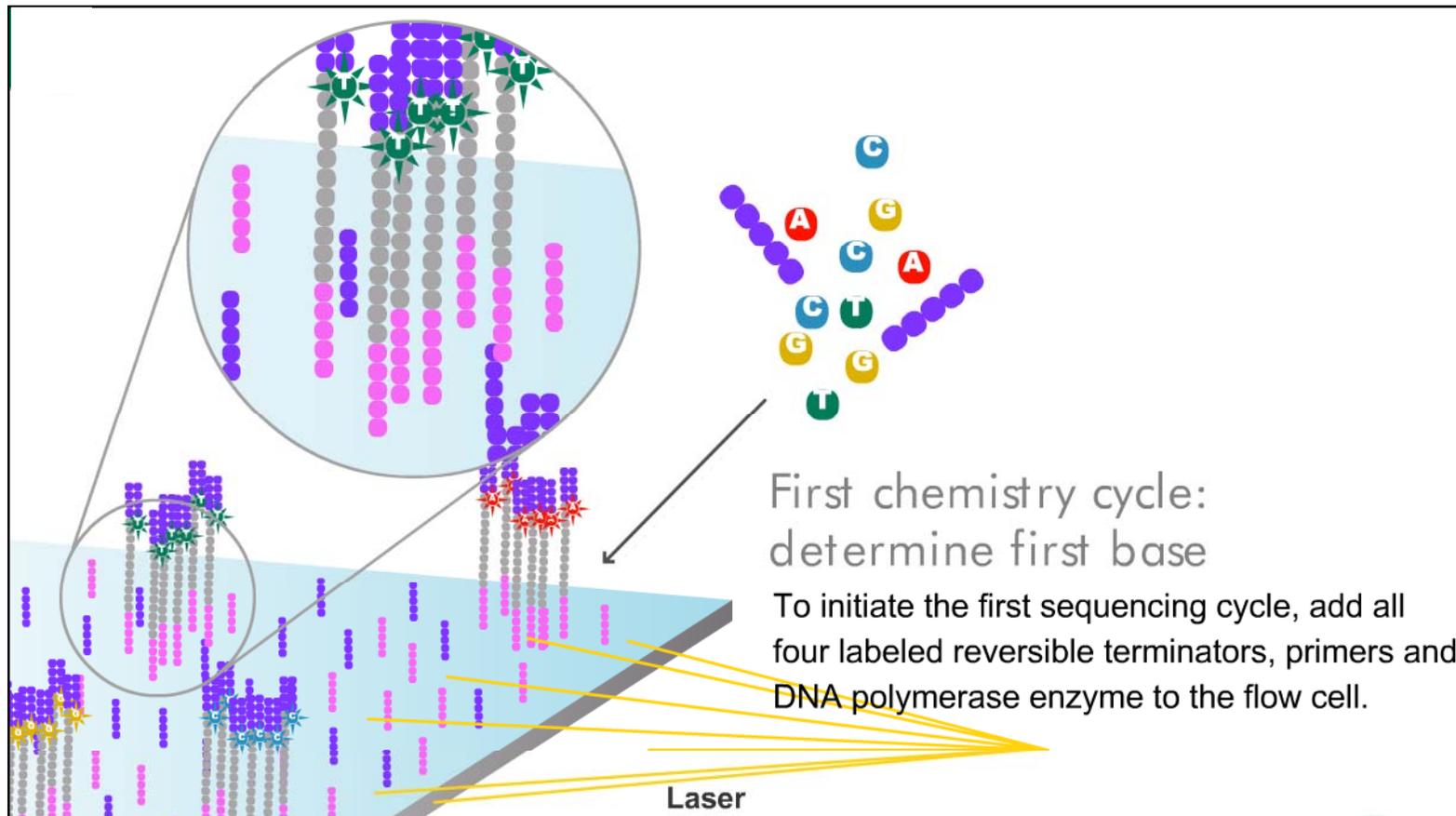
- Identification des puits donnant un signal (et quantification)



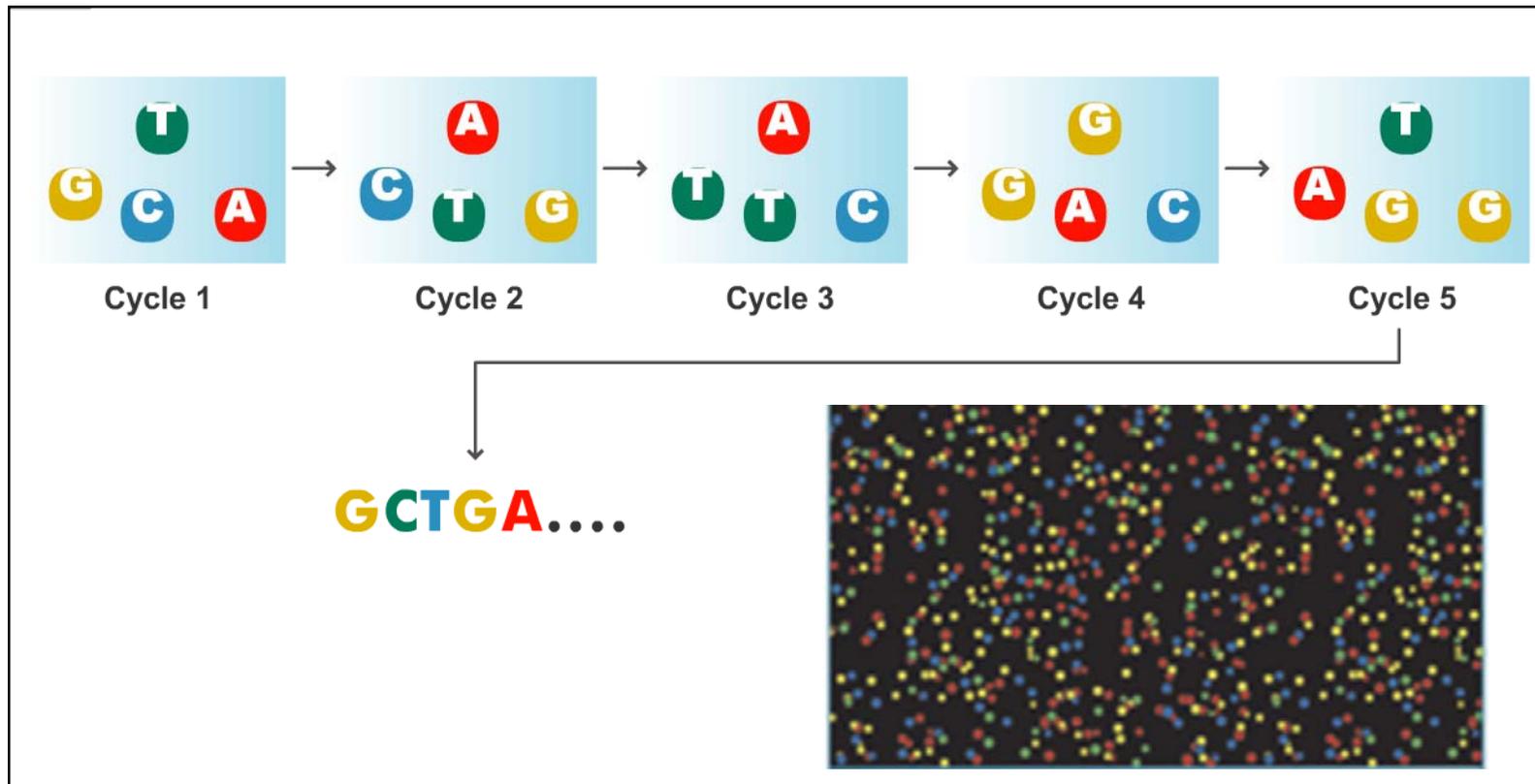
Solexa



Solexa



Solexa



Comparaison des techniques

	Roche	Solexa
Taille	150 Mb -> 1 Gb	1 Gb -> 3 Gb
Longueur	250 b -> 500 b	35 b -> 35 x 2 b
Données	Go	To
Couts	++ (8 k€)	+ (3k€)

SOLID (Applied) ~ Solexa

Applications

- **Reséquençage** de banques :
 - Génomique (microorganismes, fragments PCR Long Range)
 - ORFéome
- Etude de **transcriptome** :
 - SAGE-like
 - Séquences promotrices, interactions protéines-ADN
- Séquençage **grande profondeur** :
 - Mutations cellulaires rares (cancérologie) ...
 - Epissage alternatif
- Séquençage **commun** (1 Gb = 100 x 10 Mbases)
- Génotypage



Conclusions

Convergence Génomique - Séquençage

- Possibilité d'utiliser des **techniques d'enrichissement** en quelques régions du génome
 - Soit par hybridation (1 ‰ – quelques Mb)
 - Soit par l'utilisation de site de restriction
- Puis **Séquençage systématique** (nécessité de jouer sur la profondeur de lecture pour assurer le génotypage).
- Génotypage de mutations connues + découvertes de **nouveaux polymorphismes** inconnus.

Les évolutions dans le génotypage

- Microsatellites : 150 € / animal pour 110 marqueurs
- SNP Goldengate : 150 € / animal pour 4500 SNP
- SNP Infinium : 165 € / animal pour 7600 SNP
- A terme (maintenant pour l'homme) 200 € pour 1 million de SNP
- L'évolution : **Plus de données pour un cout stable**

Les acquisitions du CPER

- Investissement de **4.3 Millions €**
PF Génomique + Bioinformatique
- Renouvellement du matériel actuel
- Acquisition de nouveaux matériels :
 - Atelier extraction d'ADN+CQ
 - **Séquenceur nouvelle génération (2009)**
 - 150 Mo à 1 Go pour 1 à 192 ech., 200-500 bp
 - Reséquençage, séquençage régional, transcriptome, cancérologie ...
 - **SNP Haut débit Beadstation (2010)**
 - Puces SNP 1536 SNP Goldengate
 - Puces Infinium 550 k



Quelques questions pour finir ...

- Sources de SNP :
 - SNP in silico vs SNP validés (**source des séquences**)
 - Puces **commerciales** génériques vs puces **à façon**
 - Tests **ciblés** vs analyses **pangénomique**
- Convergence Génotypage – Séquençage
 - SNP connus vs découverte de **nouvelles mutations**

Quelques questions pour finir ...

- La génomique devient **omniprésente** voire **envahissante** :
 - Tests des **susceptibilités** (déclenchement ou intensité) aux maladies
 - **Pharmacogénomique** (optimisation traitements, nouveaux médicaments)
- A coté des banques d'ADN, les **banques de données** deviennent stratégiques, les méthodes de mining de l'information aussi.
- Dans 10 (?) ans : Les sociétés proposeront pour Noel un cadeau tendance : **La séquence de VOTRE génome !**

Comment anticiper et prévenir les dérives ?