

Analyses OMICs

Applications en immuno-allergologie

Dr Charline Miot

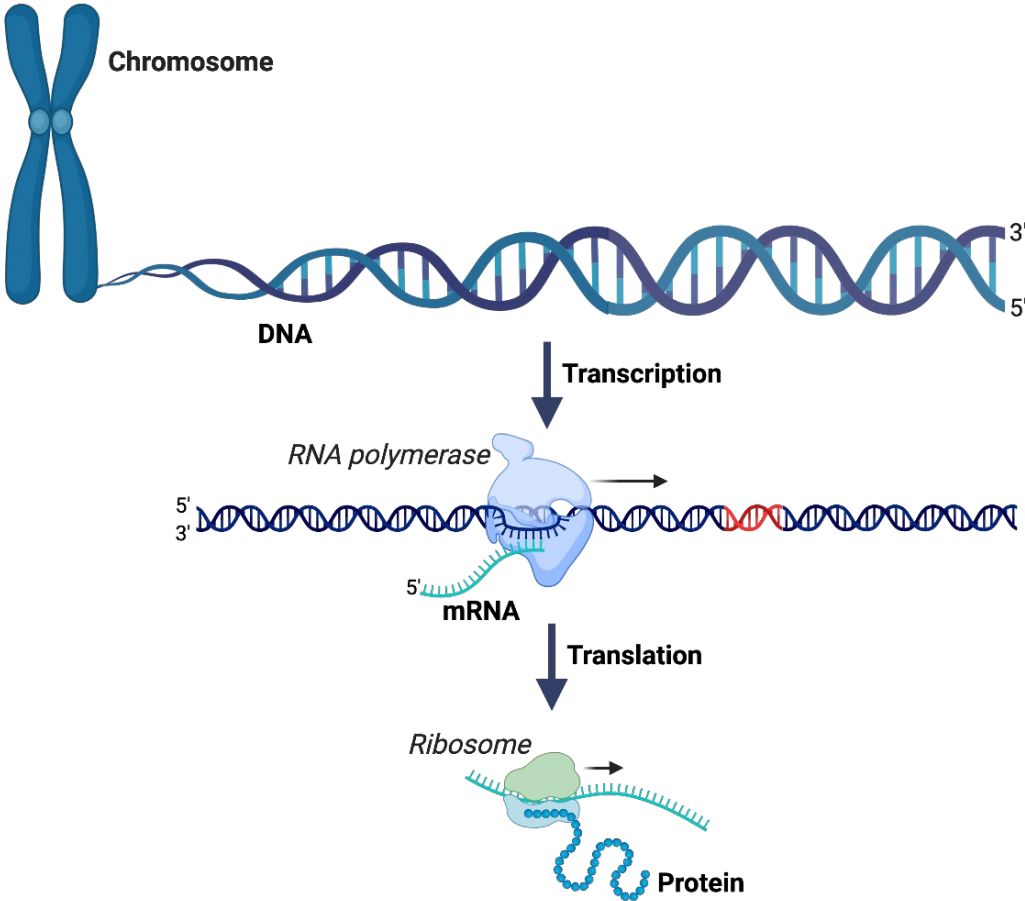
MCU-PH

Laboratoire d'immunologie et allergologie

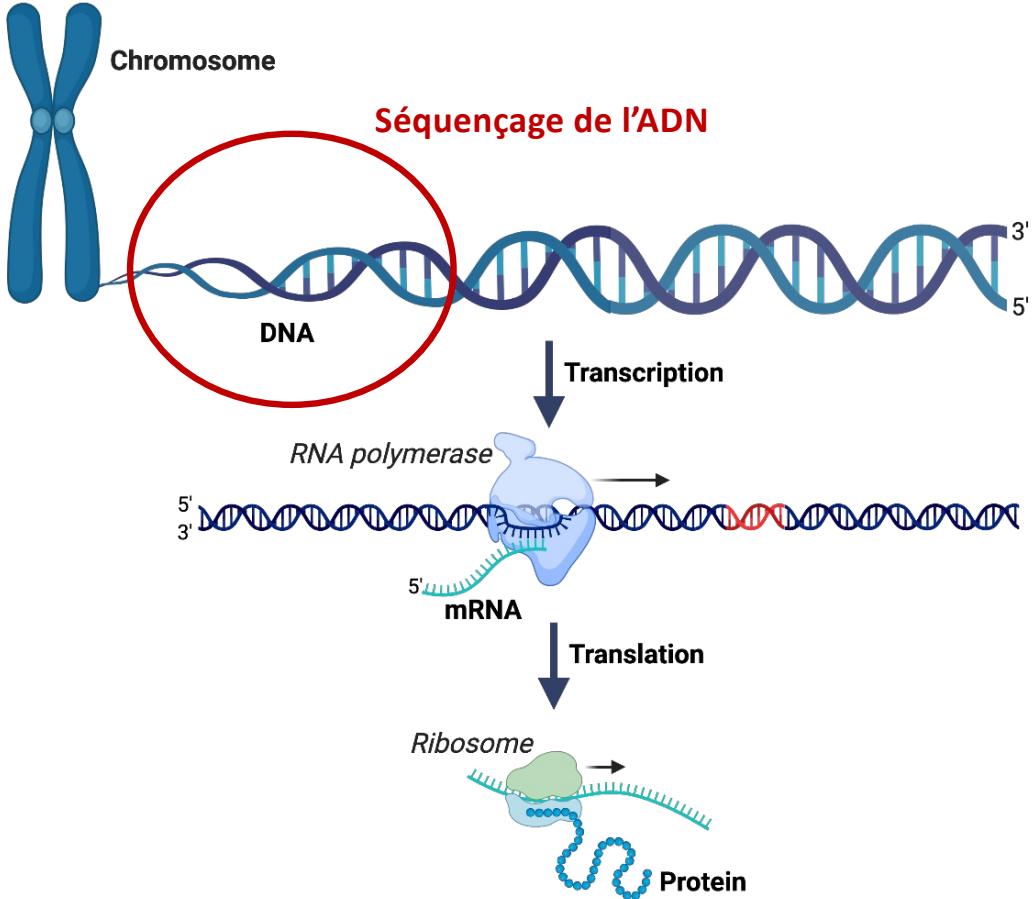
Unité d'onco-hémato-immunologie pédiatrique

CHU Angers

De l'ADN aux protéines



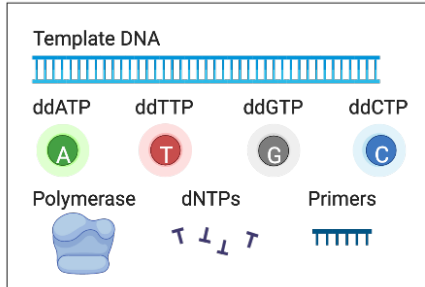
De l'ADN aux protéines



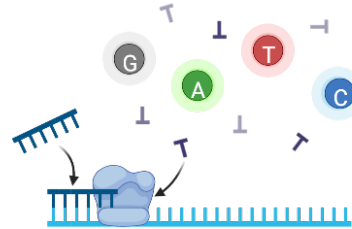
Séquençage Sanger

- Technique de référence
- Longue et fastidieuse

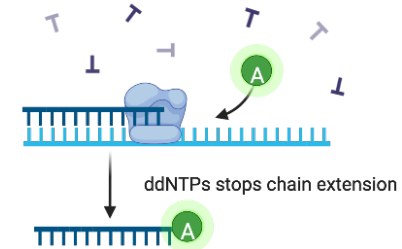
Reagents



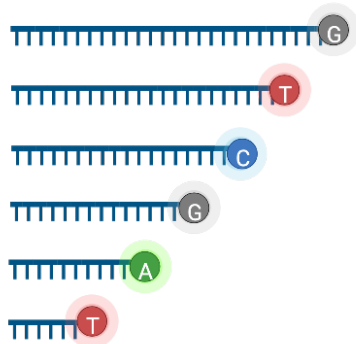
① Primer annealing and chain extension



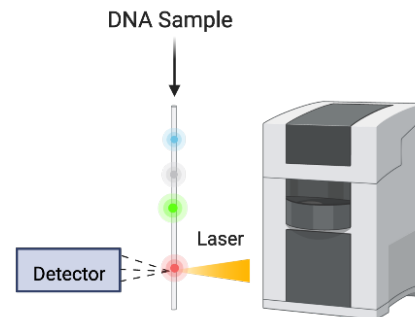
② ddNTP binding and chain termination



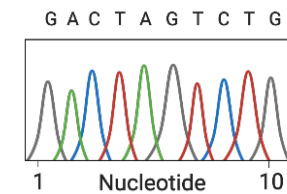
③ Fluorescently labelled DNA sample



④ Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection

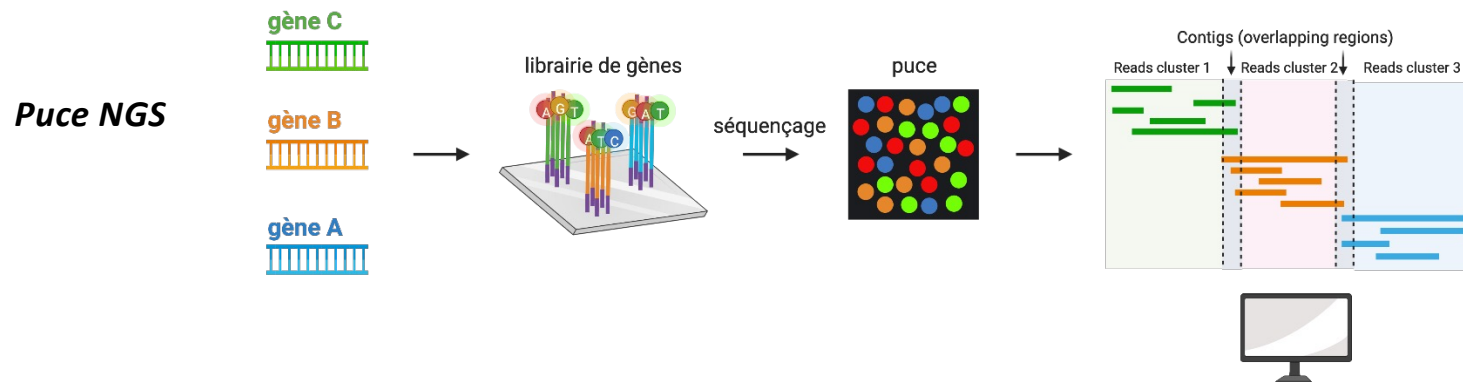
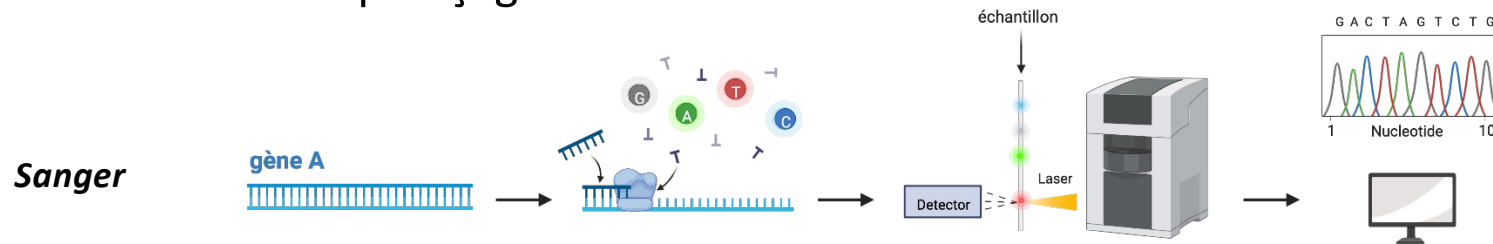


⑤ Sequence analysis and reconstruction

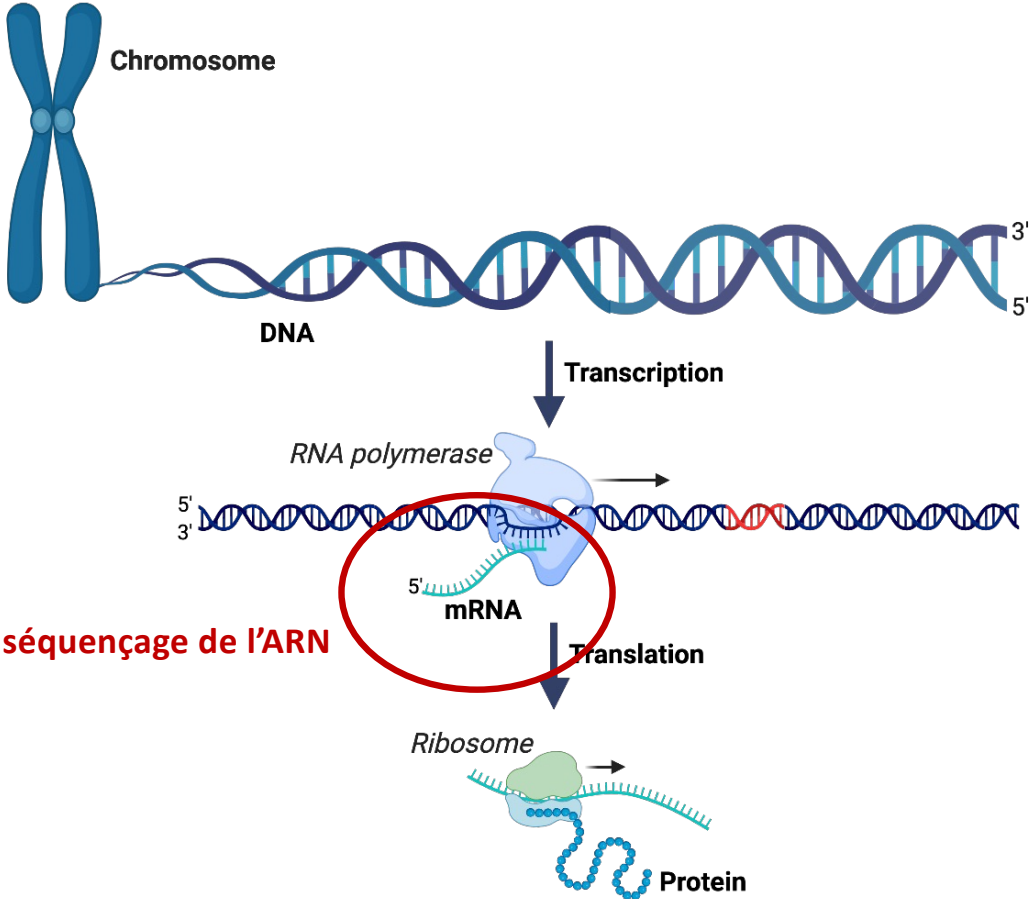


Développement des techniques NGS

- Technique rapide
- Bibliothèques d'amorces avec codes barres
- Couverture de séquençage variable

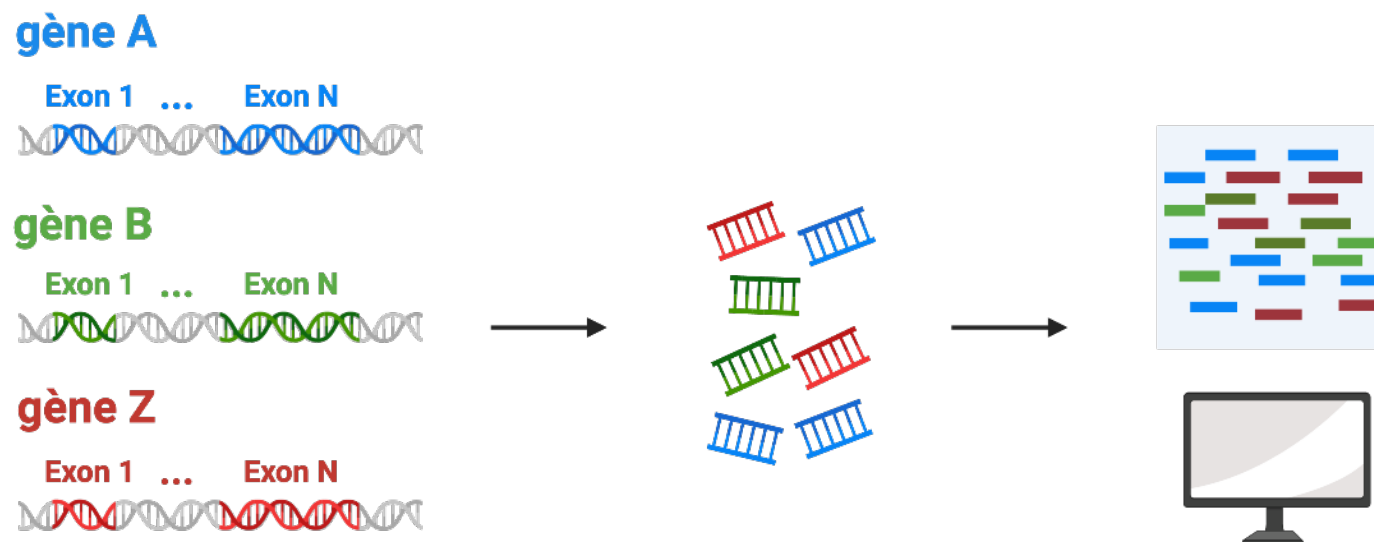


De l'ADN aux protéines



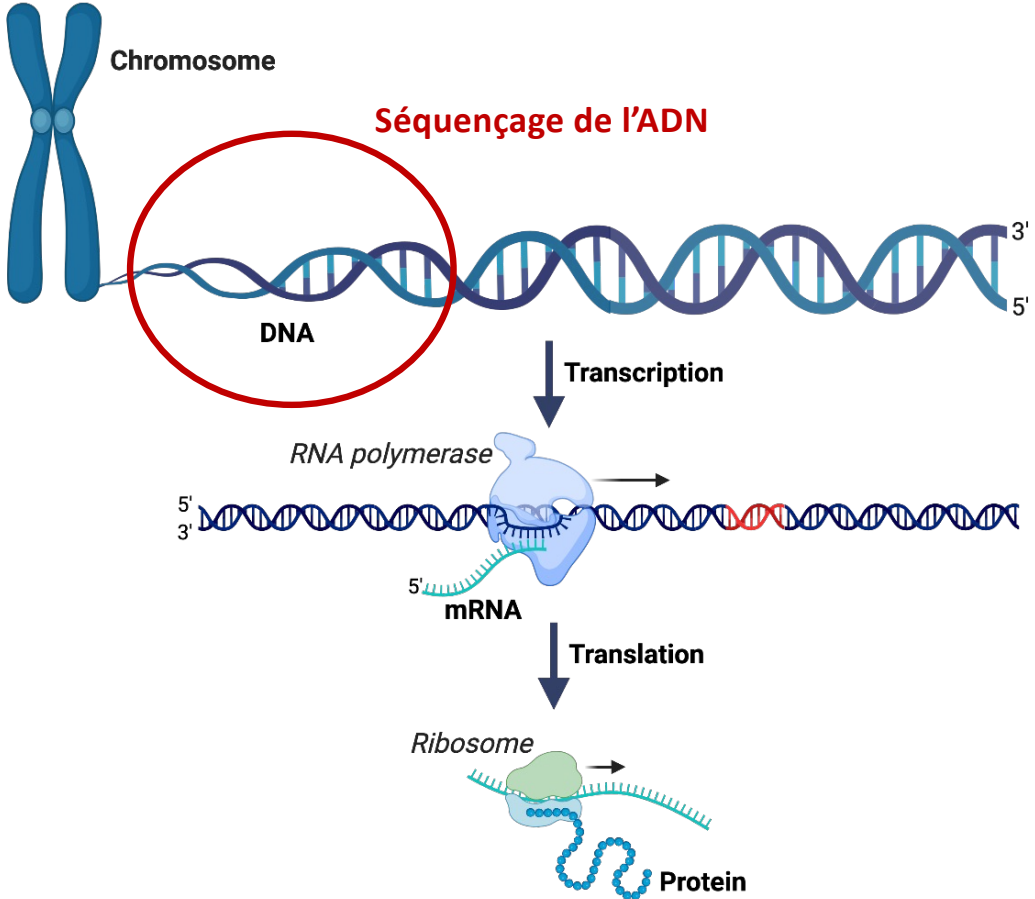
Whole Exome Sequencing WES

- Séquençage régions codantes de l'ADN (exons)



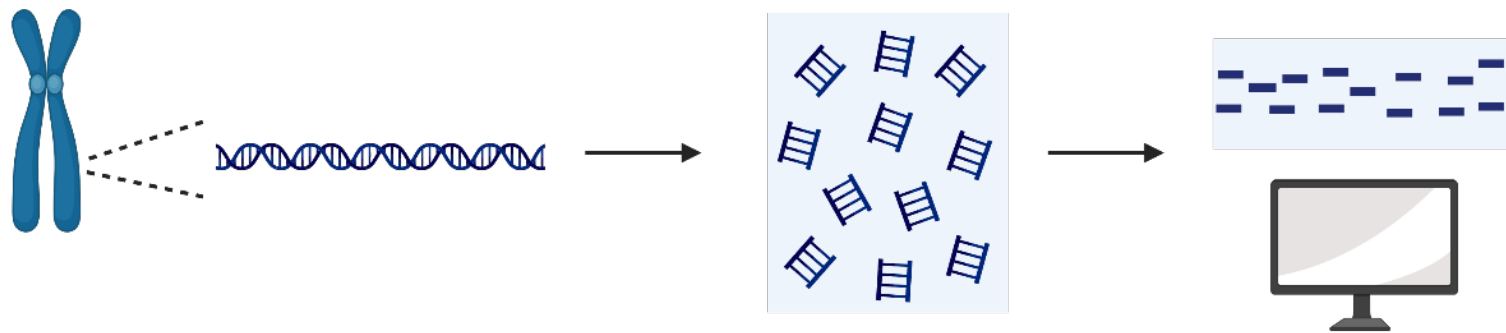
- Applications : recherche de mutations

De l'ADN aux protéines



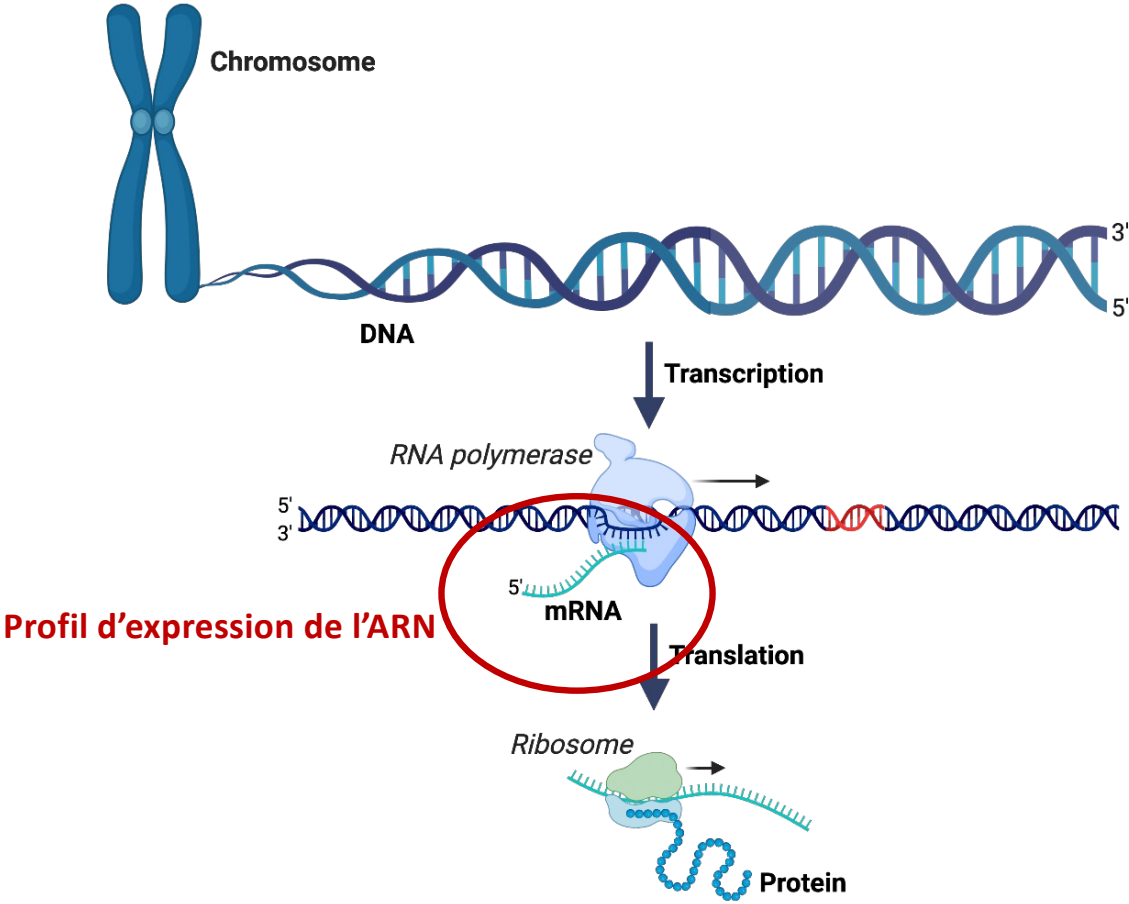
Whole Genome Sequencing WGS

- Séquençage de tout le génome, y compris les régions non codantes



- Applications : recherche de mutations, translocations

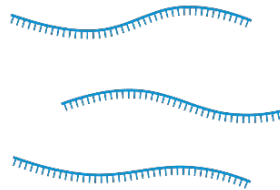
De l'ADN aux protéines



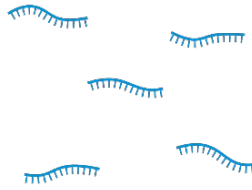
RNA-Seq

RNA Sequencing

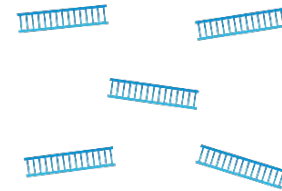
1 Isolate RNA from samples



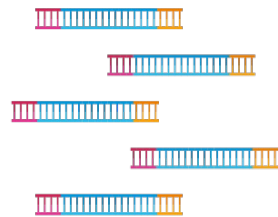
2 Fragment RNA into short segments



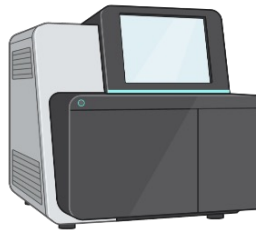
3 Convert RNA fragments into cDNA



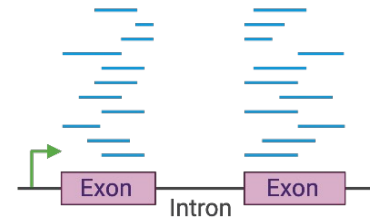
4 Ligate sequencing adapters and amplify



5 Perform NGS sequencing



6 Map sequencing reads to the transcriptome/genome



RNA-Seq

- Applications :

 - comparaison des profils d'expression entre des échantillons

 - analyse de variants de transcripts (épissage alternatif)

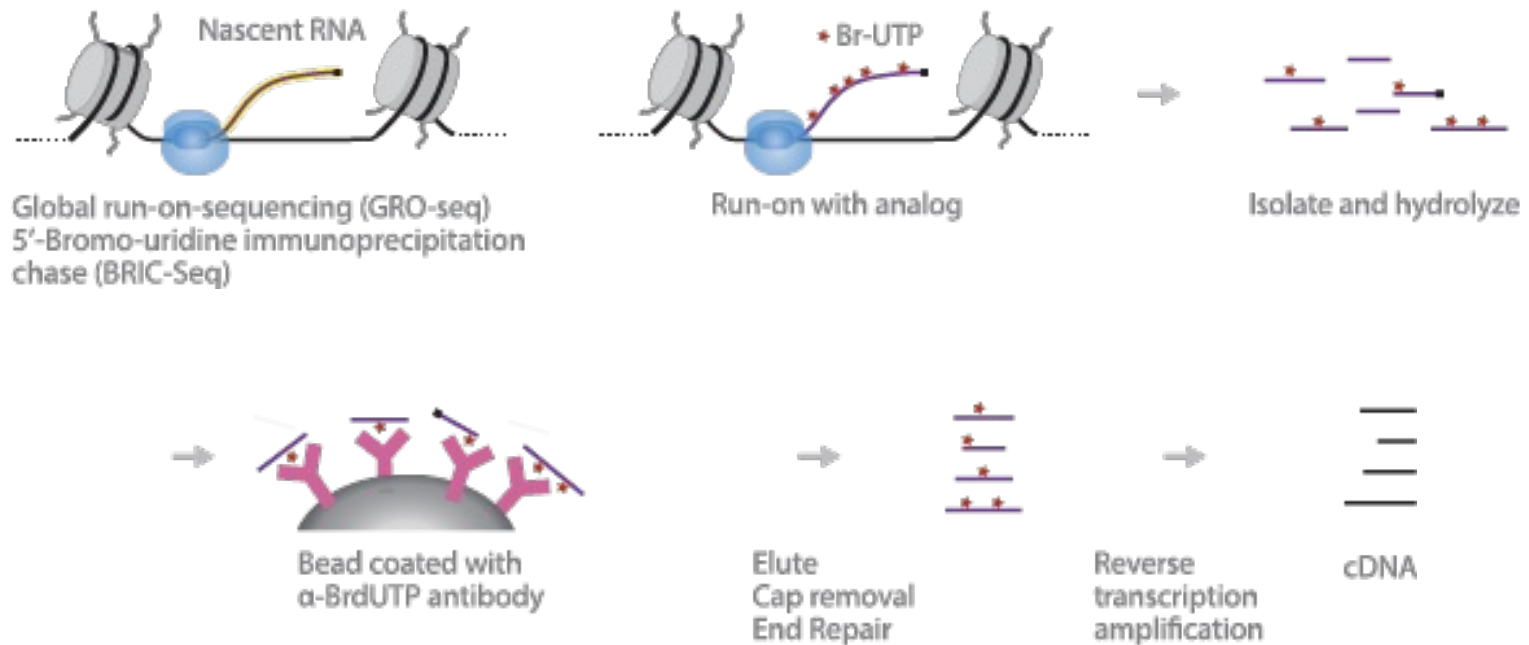
- Limites :

 - pas d'analyse possible des ARN à courte durée de vie

 - perte d'information sur les ARN de petite taille (comme les miRNAs) selon la technique d'extraction d'ARN utilisée et selon la profondeur de séquençage (nombre de reads par échantillons)

GRO-Seq

- Analyse des ARNm nouvellement synthétisés



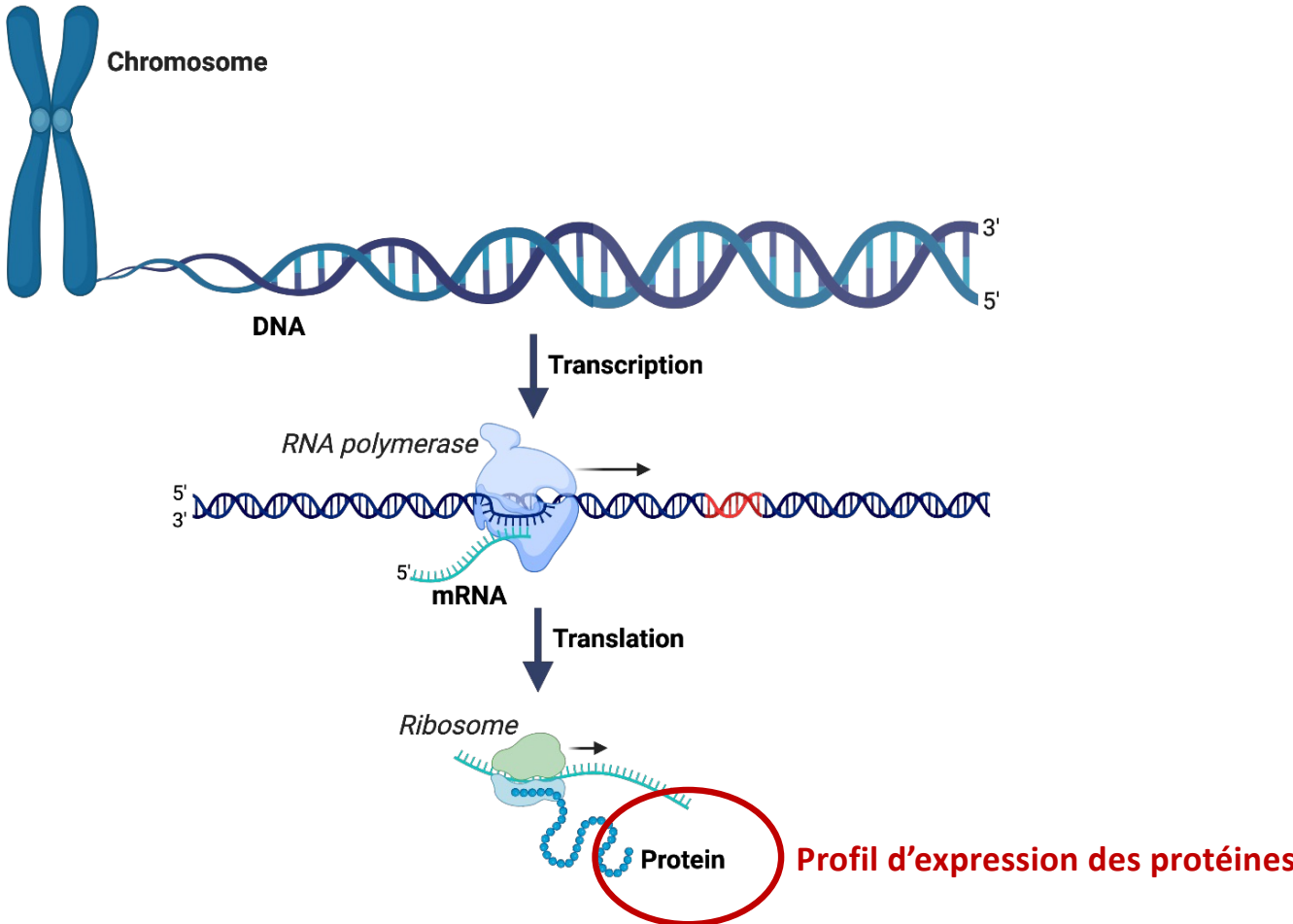
GRO-Seq

- Applications :

analyse fine de l'activité transcriptionnelle des cellules

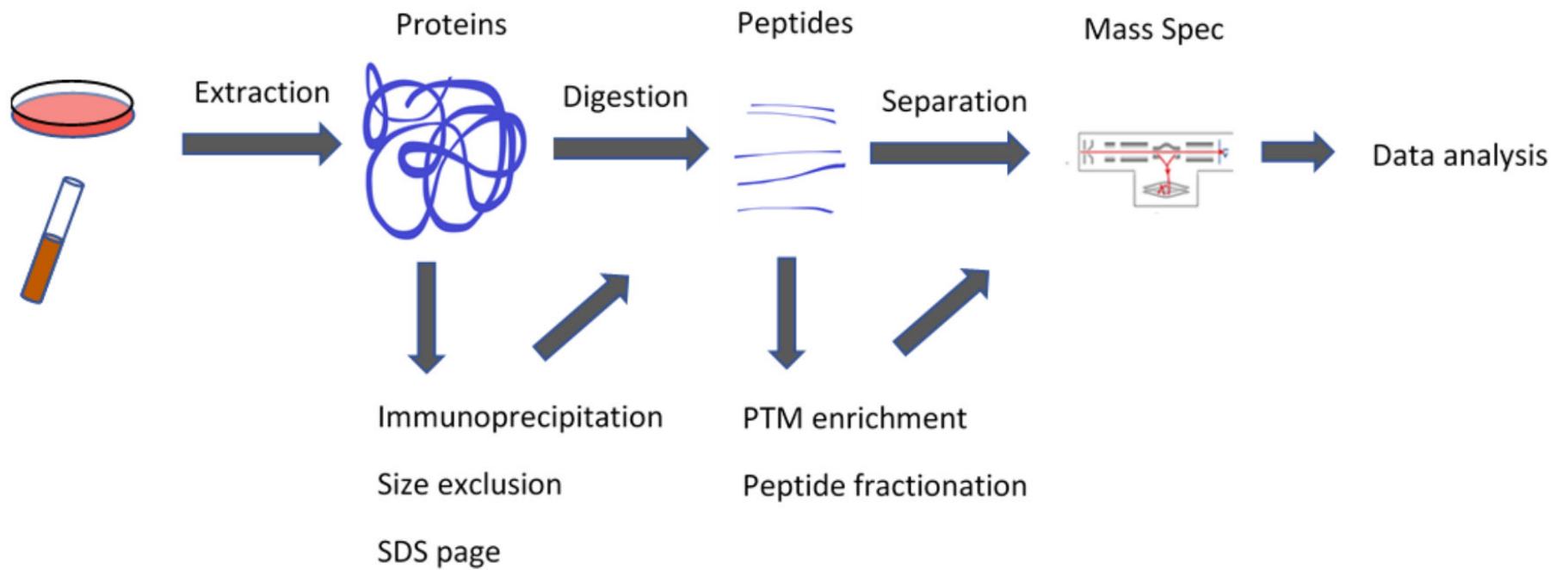
analyse de l'expression des ARN à courte durée de vie (codants et non codants)

De l'ADN aux protéines



Protéome

- Analyse des protéines par spectrométrie de masse



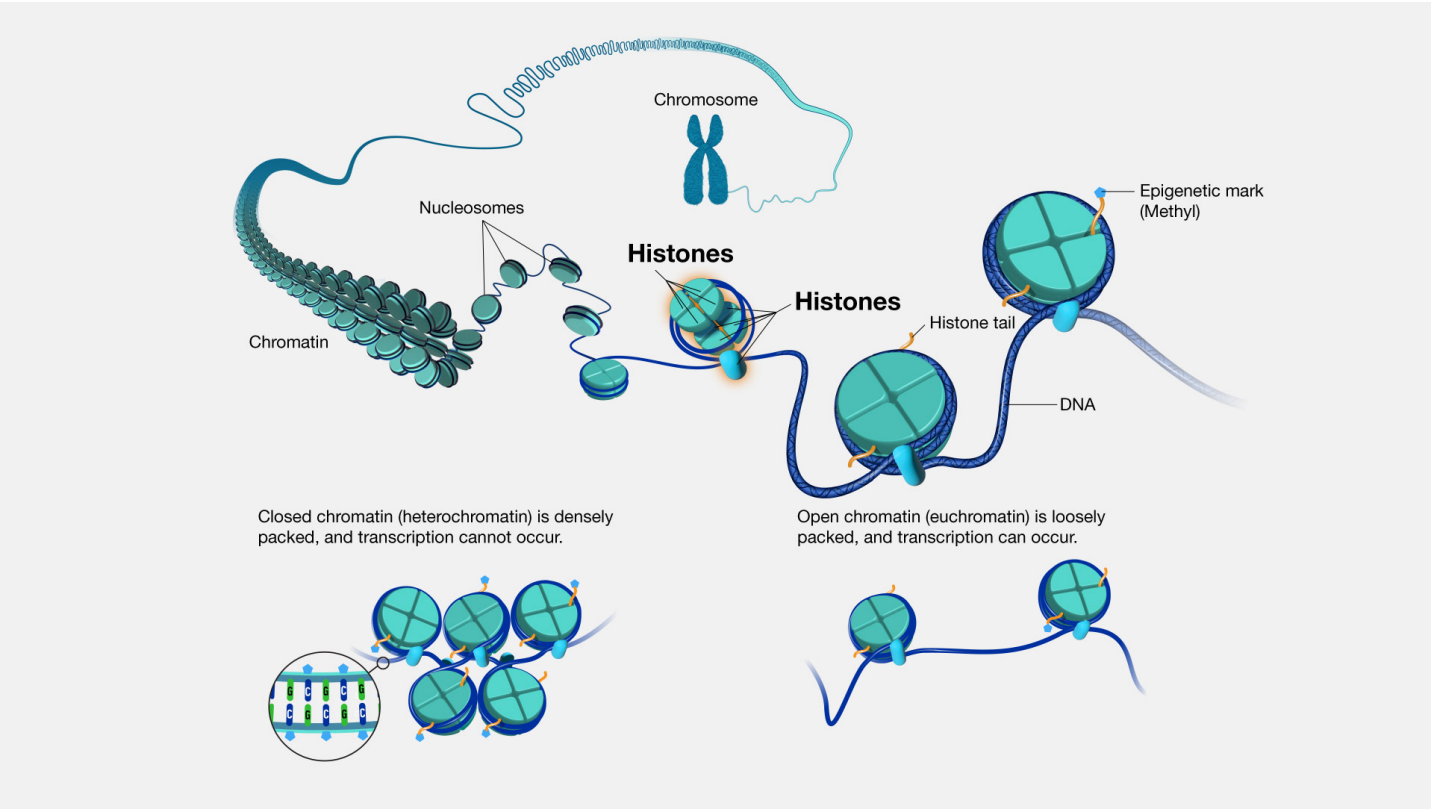
Protéome

- Applications :

Analyse des modifications d'expression protéiques selon différentes conditions

Analyse des modifications post-traductionnelles : phospho-protéome, ubiquitinylome, ...

Evaluation des modifications épigénétiques et de la dynamique chromatinienne

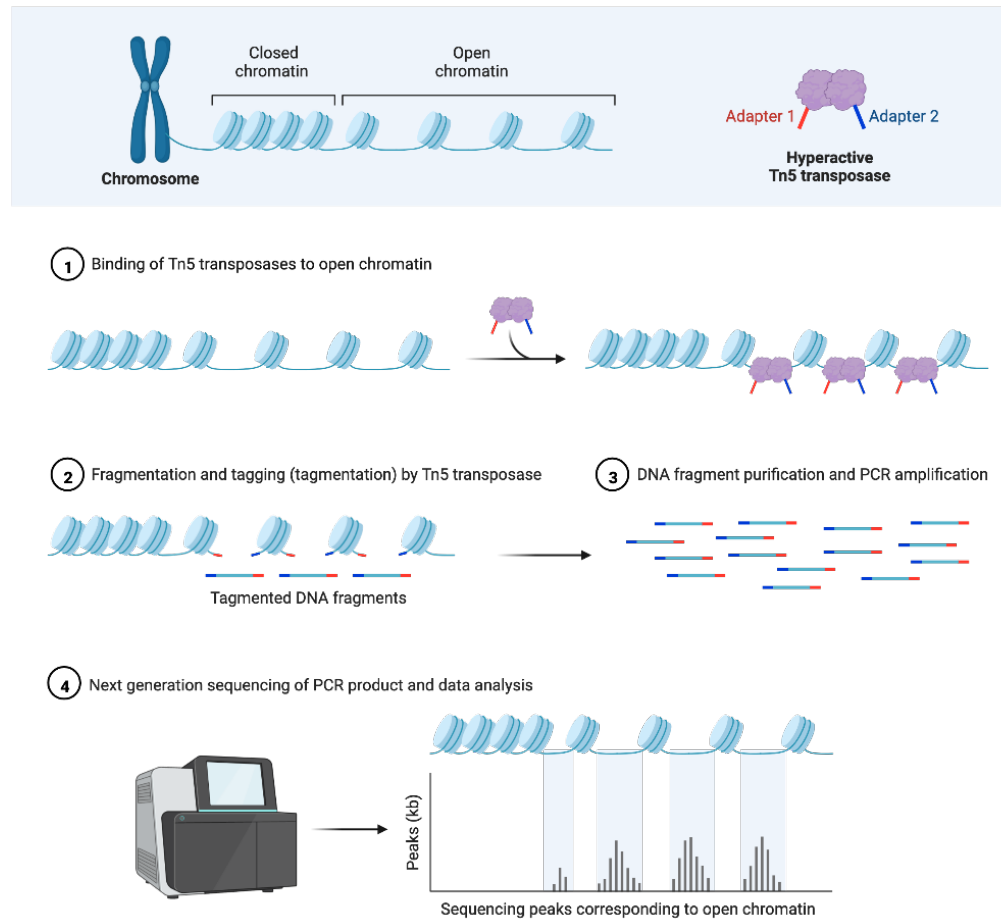


Evaluation des modifications épigénétiques et de la dynamique chromatinienne

- ATAC-Seq
- CHIP-Seq
- MeDIP-Seq

ATAC-Seq

- Cartographie des régions “ouvertes” de la chromatine



ATAC-Seq

- Applications :

analyse des modifications chromatinienne sur le promoteur d'un gène d'intérêt

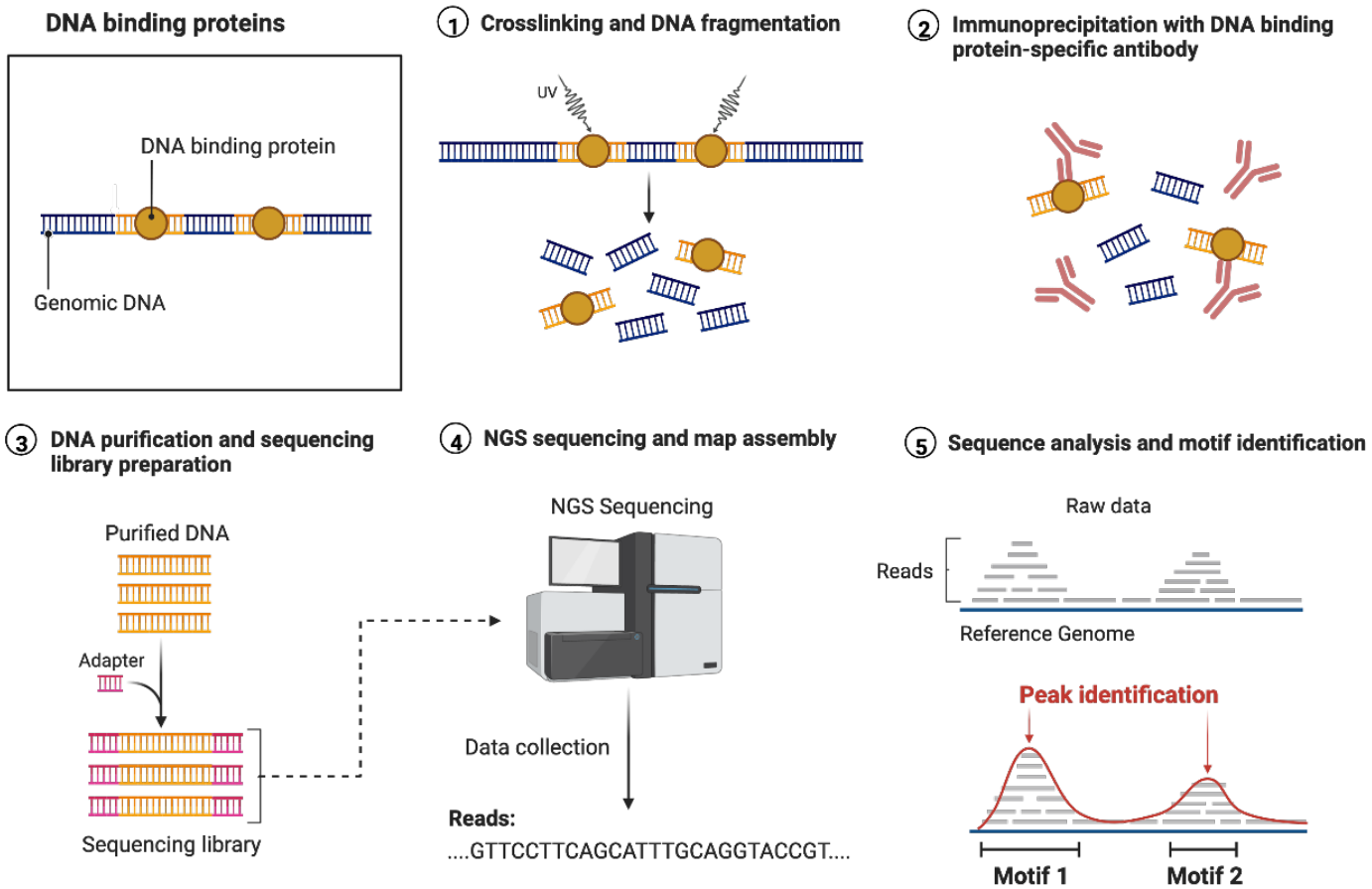
recherche de séquences consensus de facteur de transcription activateur ou

inhibiteur sur les zones ouvertes identifiées

validation des résultats par CHIP-Seq

CHIP-Seq

- Zones de liaison d'une protéine sur le génome



CHIP-Seq

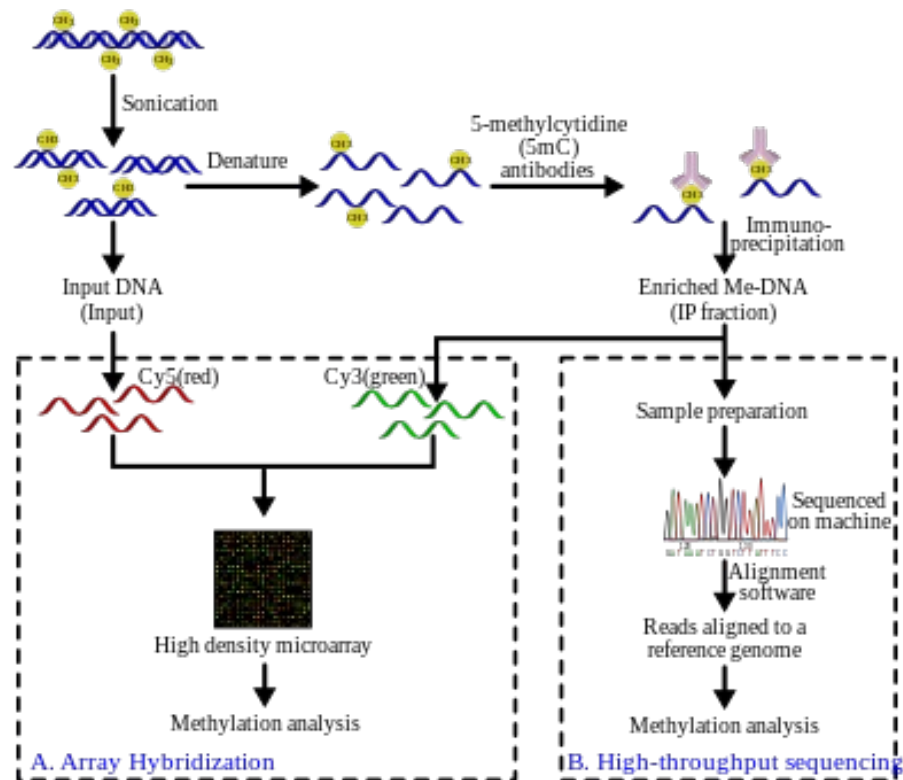
- Applications :

- identification des cibles génomiques d'une protéine

- analyse des modifications chromatinienne (modifications des histones) pour un gène d'intérêt

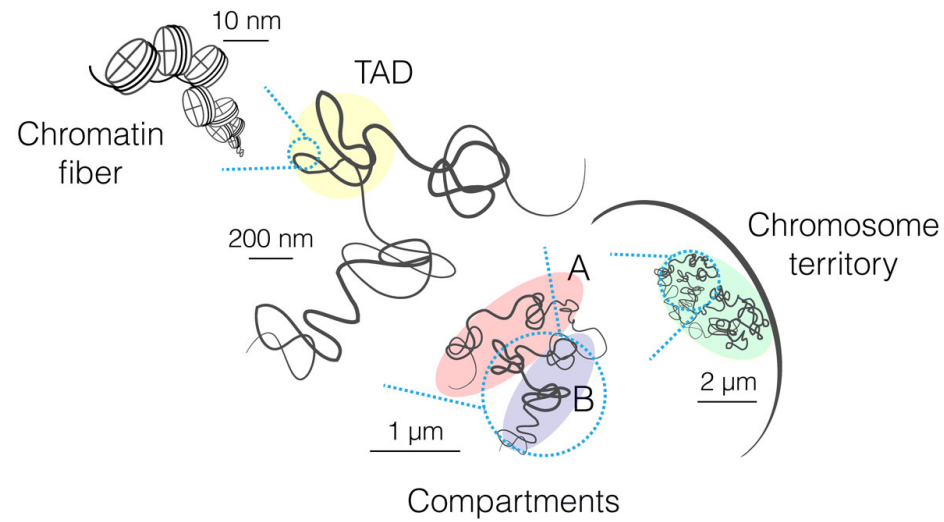
Méthylome – MeDIP Seq

- Cartographie des zones méthylées de l'ADN = répression de la transcription

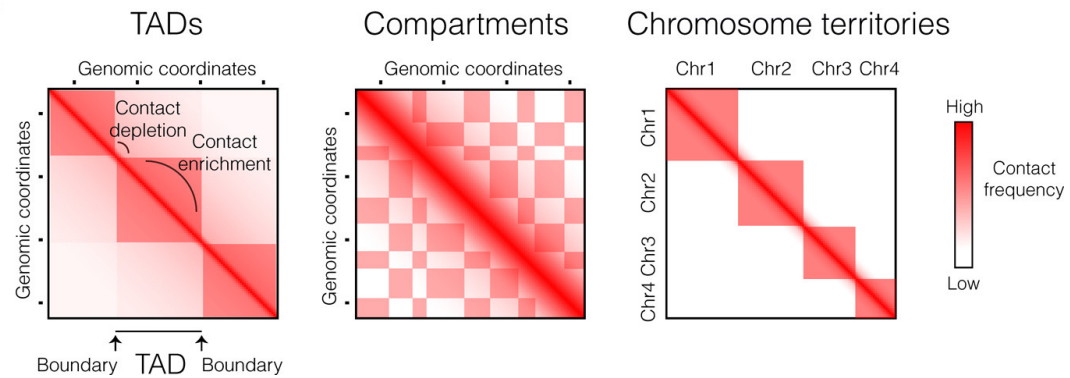


Evaluation de la dynamique chromosomique

A

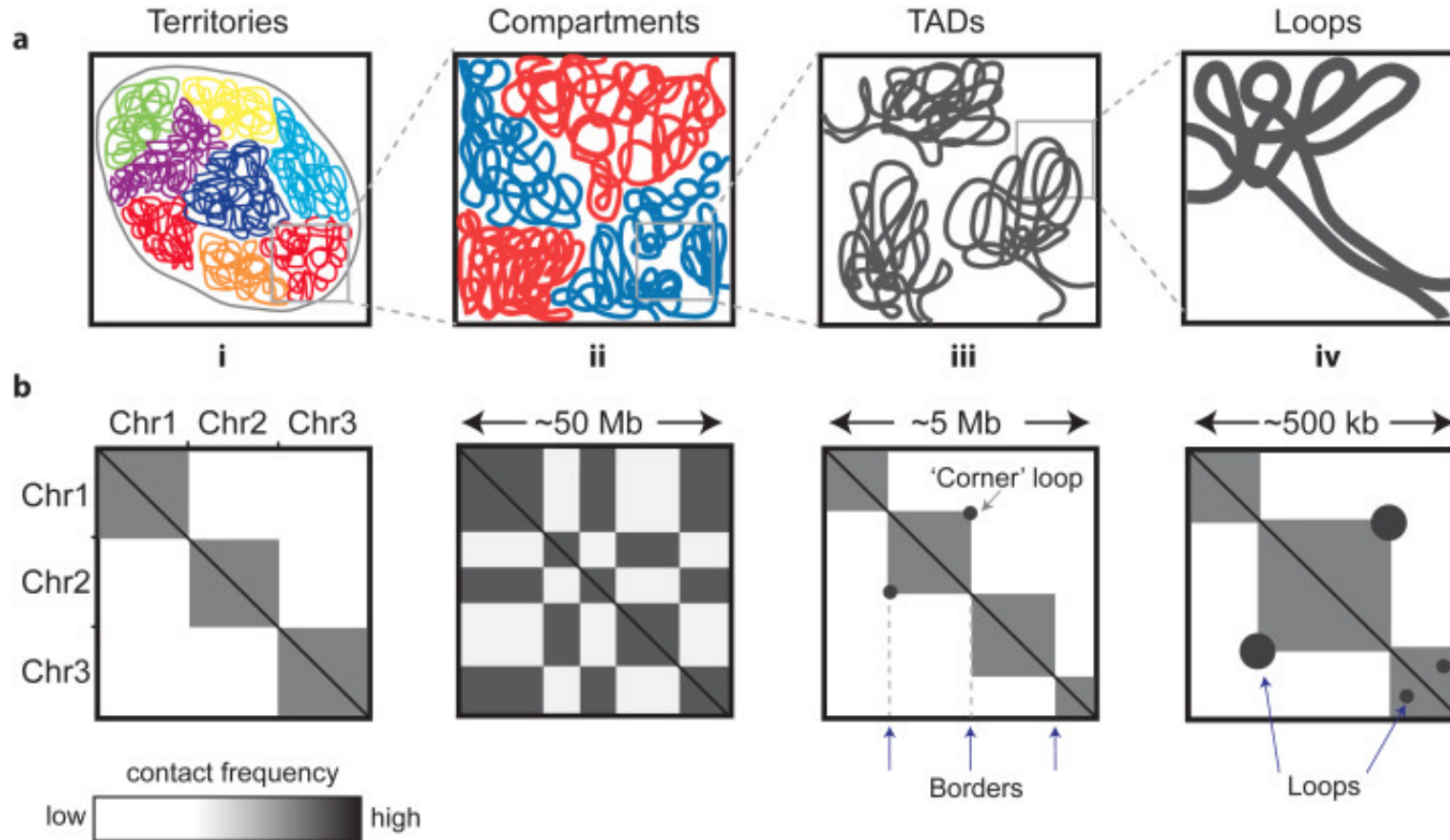


B



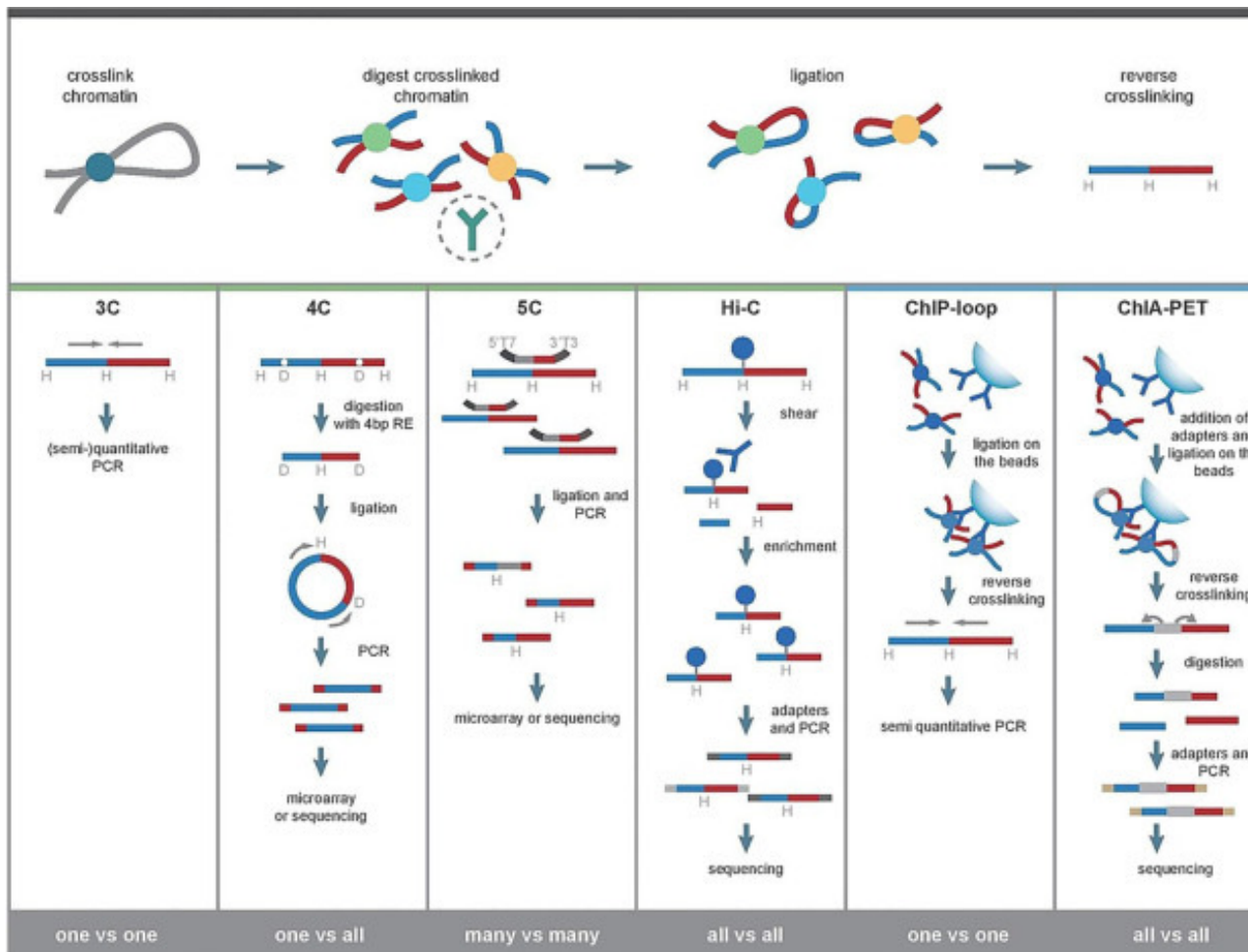
TAD : topologically associated domain

Evaluation de la dynamique chromosomique



Techniques de capture de la conformation chromosomique

- Cartographie des boucles d'interactions chromosomiques

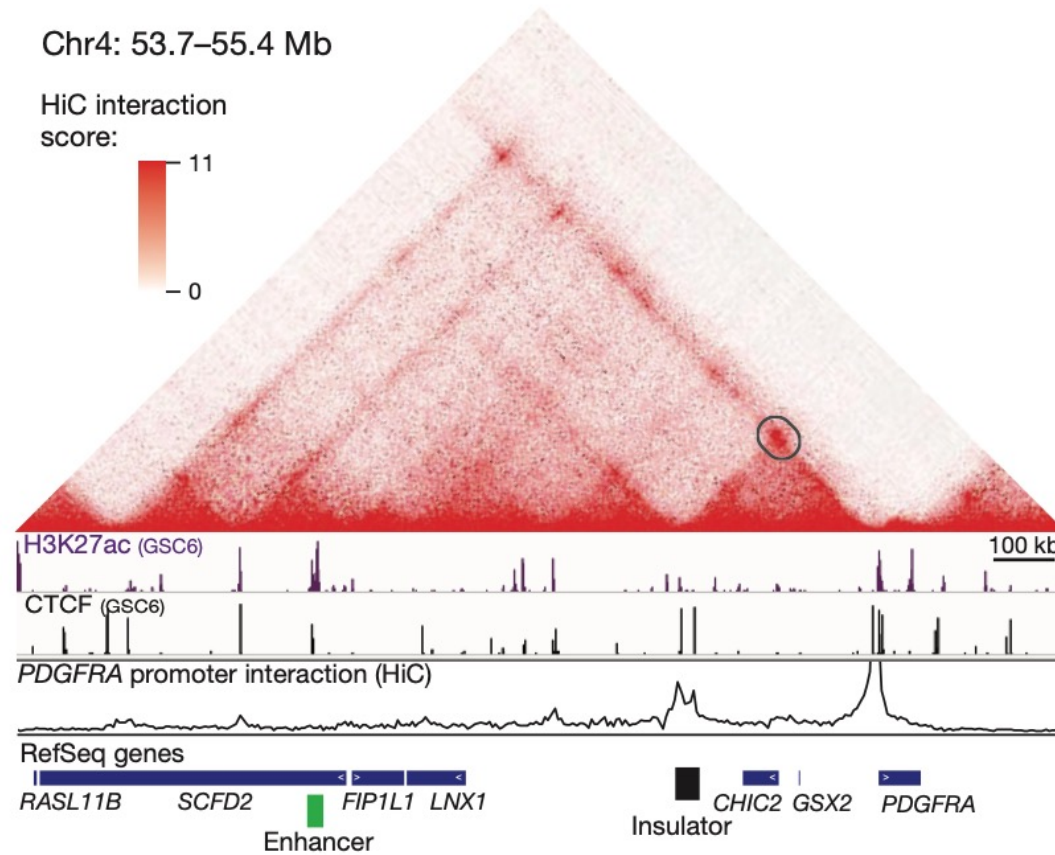


Importance des TADs en pathologie humaine

- Les gènes présents au sein d'un TAD sont corégulés
- Les contacts entre les éléments activateurs (enhancers) et les régions promotrices sont localisés au sein d'un TAD
- La perturbation de la structure des TADs peut entraîner des contacts ectopiques entre des éléments régulateurs et des régions promotrices hors du TAD :
 - expression ectopique de gènes normalement réprimés
 - rôle dans les cancers et les maladies du développement**

HiC

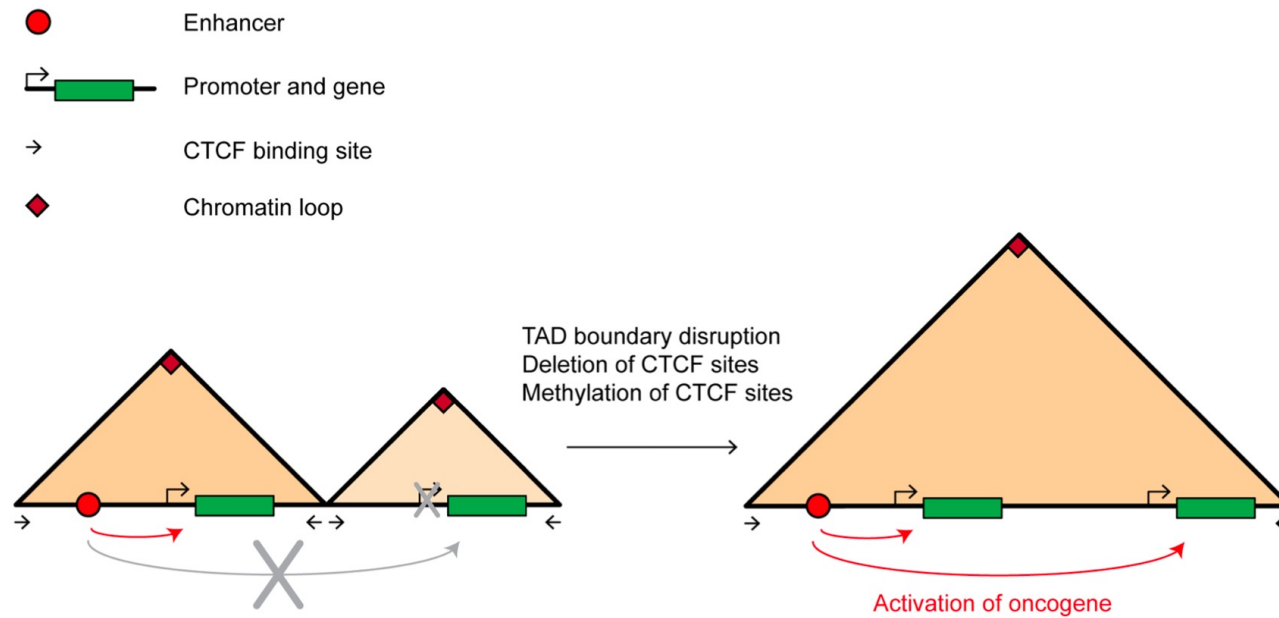
- Exemple d'application : perturbation des TADs dans les gliomes mutés IDH1



Flavahan et al., 2016

HiC

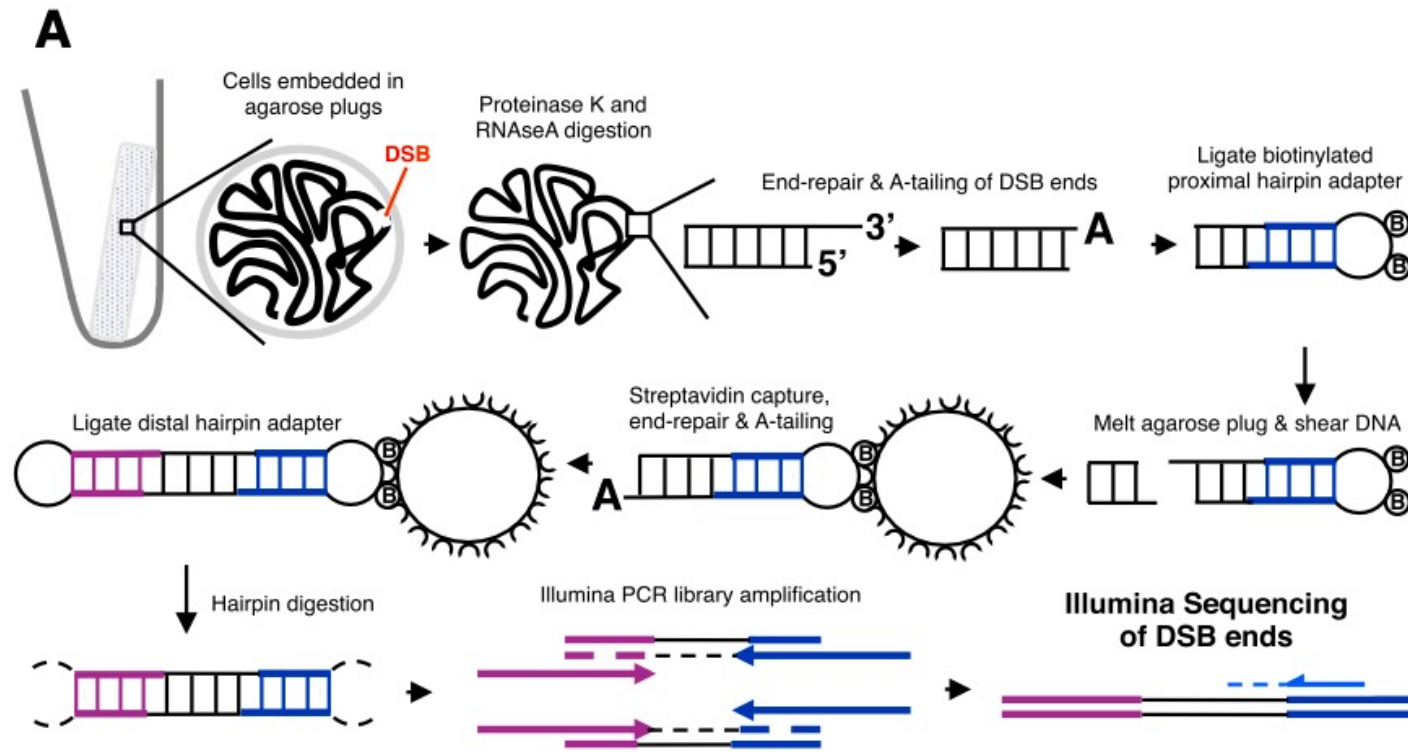
- Exemple d'application : perturbation des TADs dans les gliomes mutés IDH1



Valton et al., 2016

Evaluation des cassures double brin de l'ADN - End-Seq

- Cartographie des cassures double brins de l'ADN

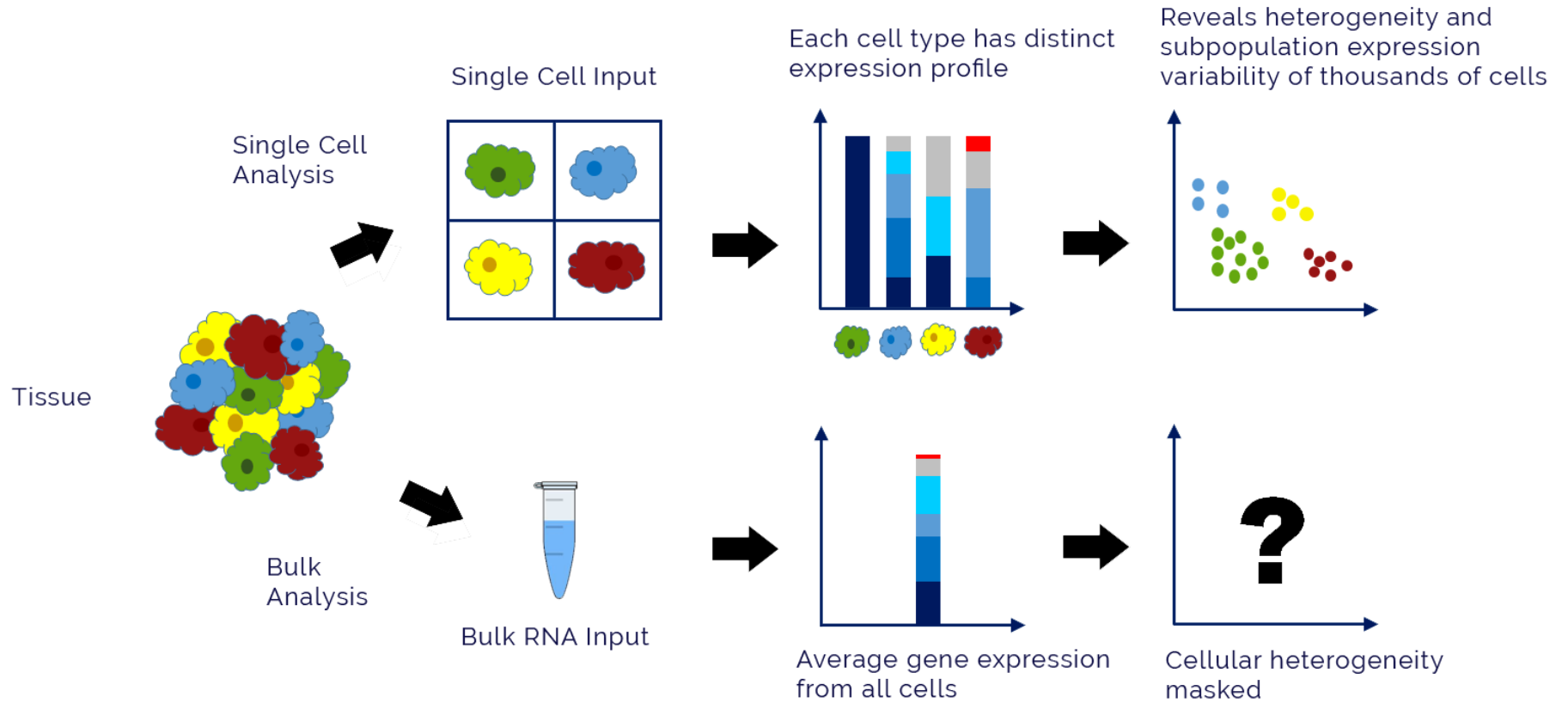


Canela et al., 2016

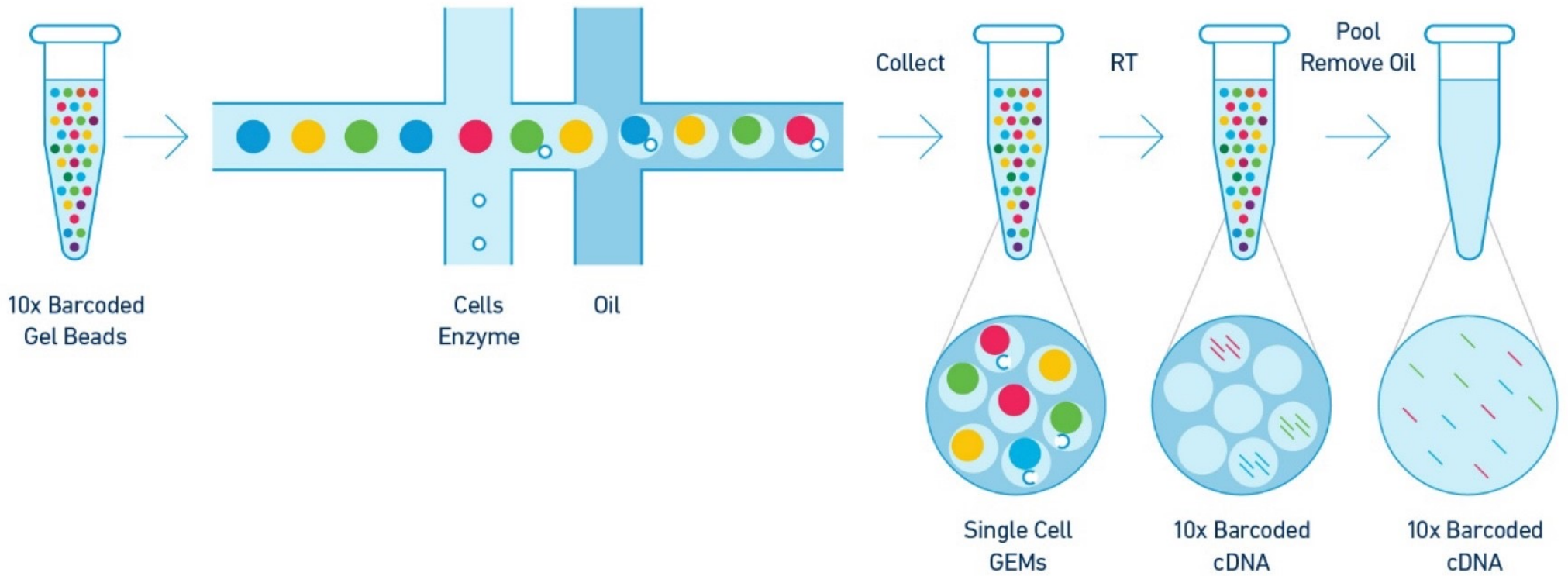
End-Seq

- Applications :
 - édition génique
 - recombinaison VDJ
 - commutation isotypique
 - chimiothérapie

Les analyses en single cell



Les analyses en single cell



Les analyses en single cell

- Applications :

DNA-Seq

RNA-Seq

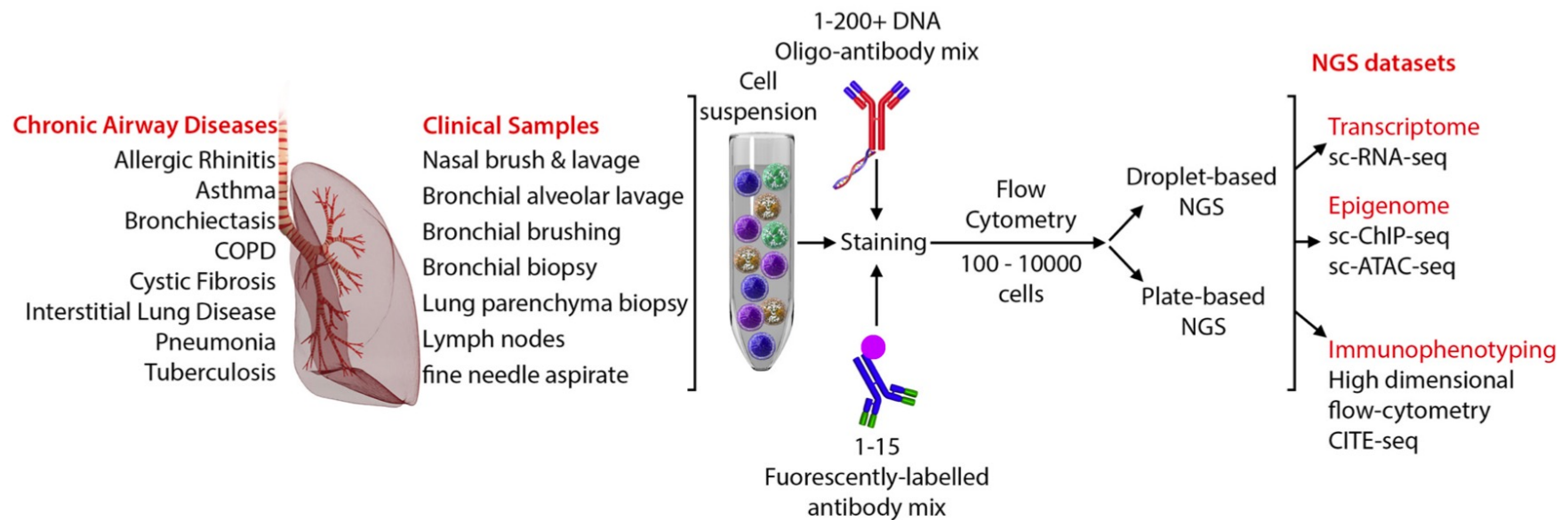
ATAC-Seq

CHIP-Seq (modifications des histones)

Méthylome

Les analyses en single cell

- Exemple d'application :



Seumois et al., 2019

Les analyses en single cell

- Exemple d'application :

