

GT RNAseq

Design expérimental

La conception d'une expérience de RNAseq et étapes clés pour garantir des résultats de qualité

- Définir les objectifs :

- Définir clairement les objectifs de l'étude pour en adapter la méthodologie
- Quelles questions biologiques essayez-vous de résoudre ?

→ **Comprendre ces objectifs guidera le reste de la conception expérimentale.**

Deux domaines d'explorations : génétique **constitutionnelle et somatique.**

- *Problématique d'urgences différentes – délai de rendu*

- **Rechercher des événements liés à l'analyse de transcrits présents dans un échantillon selon trois objectifs d'analyses**

1 Recherche de défaut d'épissage

2 Expression Génique

3 Fusion de gène

1 Recherche de défaut d'épissage :

Le processus **d'épissage alternatif** peut générer **différentes formes d'ARNm** à partir d'un même gène. Le séquençage de l'ARN peut révéler des variations d'épissage, offrant des informations sur la **diversité des transcrits produits par un gène en conditions physiologique et pathologique**. Ces défauts d'épissage peuvent être la cause de la pathologie.

2 Expression Génique :

Le séquençage de l'ARN permet **de mesurer le niveau d'expression des gènes**, c'est-à-dire la quantité d'ARN messenger (ARNm) produit par un gène particulier.

3 Fusion de gène :

La recherche de fusion de gènes est une analyse moléculaire visant à détecter des **anomalies génétiques dans lesquelles deux gènes distincts fusionnent pour former un gène hybride**. Ces fusions de gènes peuvent résulter de réarrangements chromosomiques, tels que des translocations, et sont souvent associées à certains types de cancers.

Tableau 1. Récapitulatif de la qualité des données selon la stratégie de séquençage

technique de sélection des ARNs	Épissage	Fusion	Expression	SNV/CNV calling	# d'échantillon par run
polyA	++	+	+	+	++
ribo déplétion	+/-	+/-	+/-	+/-	+
capture	+	+	+	+	++
3' RNA-Seq	-	-	++	-	++++

Enquête de recensement des technologies utilisées et état des lieux dans les centres de diagnostics

NOM / Laboratoire	Génétique constitutionnelle ou somatique	Questions biologiques (épissage, expression, fusion)	Nombre d'échantillons déjà analysés	Stratégie désiré (polyA, capture exonique, Ribodéplétion)	Kit d'extraction ARN	Contrôle qualité	Type de séquenceur	Ressources bioinformatique (pipeline d'analyse, outils d'analyse en place)	Données contrôles
Laboratoire de génétique moléculaire CHU Montpellier - Dr Mireille Cossée	Constitutionnelle	Épissage Expression	60	Poly A Capture exonique	Méthode d'extraction ARN : Extraction d'ARN à partir d'une biopsie musculaire (Trizol®/Chloroforme)	Dosage et qualité ARN Bioanalyzer 2100 Agilent	PolyA : Séquençage Integragen : Séquençage mRNASeq sur NovaSeq6000 Illumina à l'aide du kit : NEBNext® UltraTM II mRNA-Seq en lecture "Paired-End" de 2 fois 100 nucléotides - par échantillon Capture panel de 185 gènes : MiSeq Illumina	Epissage - FRASER - IRFinder - Expression DESeq2 - OutRider	Peu de données contrôles <10 échantillons

**Comprendre et adapter ses ressources en fonctions de
ses objectifs**

Tableau 1. Récapitulatif de la qualité des données selon la stratégie de séquençage

En cours de réalisation

Stratégie RNAseq / échantillons	Sang		Paxgene		Tissus	
	Méthode	Qualité	Méthode	Qualité	Méthode	Qualité
Poly A	Expression		Expression		Expression	+++
	Épissage		Épissage		Épissage	+++
	Fusion		Fusion		Fusion	
Ribo-déplétion	Expression		Expression		Expression	
	Épissage		Épissage		Épissage	
	Fusion		Fusion		Fusion	
Capture exonique	Expression		Expression		Expression	
	Épissage		Épissage		Épissage	
	Fusion		Fusion		Fusion	