

# FICHE PRODUIT : ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE SUR PUCE AFFYMETRIX

## 1 Puces Affymetrix

Les puces d'expression Affymetrix (GeneChips) sont des puces à oligonucléotides de haute densité utilisées pour l'étude de l'expression génique grâce à une hybridation à une couleur, où chaque échantillon à comparer est hybridé sur une puce distincte. Sur la puce, chaque gène est représenté par un ou plusieurs set(s) d'oligonucléotides de 25-mer couvrant les régions transcrites de ce gène. Différents types de puce sont disponibles en fonction du nombre total d'oligonucléotides représentant un gène et de la région ciblée par ces sondes.

### 1.1 Puces 3'

Sur ces puces de première génération qui existent pour plus de 20 espèces, chaque transcrite est interrogé par un set de 11 à 16 paires d'oligonucléotides distinctes dirigé préférentiellement contre la région 3' des messagers, proche de la queue polyA. Chaque paire de sondes est constituée d'un oligonucléotide « perfect match » complémentaire à la séquence d'intérêt et d'un oligonucléotide « mismatch » identique au « perfect match » correspondant, à l'exception de la base centrale qui a été mutée. L'oligonucléotide « mismatch » est mis à profit pour détecter et éliminer le signal non spécifique.

### 1.2 Puces Gene

Sur ces puces dites « whole-transcript » et disponibles pour plus de 20 organismes modèles, chaque transcrite est interrogé par un set de 17-26 sondes « perfect-match ». Les oligonucléotides de 25-mer sont distribués sur toute la longueur du locus génomique. Sur les puces Gene les plus récentes (2.0 ST), en plus des sondes contre le contenu en ARNm de la base RefSeq, des oligonucléotides interrogent également les longs ARNs intergéniques non codants (LincRNAs).

### 1.3 Puces Exon

Ces puces, disponibles uniquement pour l'humain, la souris et le rat, ont été conçues pour le profilage d'expression aussi bien au niveau des gènes qu'au niveau des exons pour l'analyse de l'épissage alternatif. La plupart des exons d'une taille supérieure à 100 b sont représentés sur la puce par au moins un « probe set » constitué de 4 oligonucléotides « perfect match », avec un total de plus de 30 sondes pour la majorité des transcrits.

### 1.4 Puces XTA

Sur ces puces haute définition, disponibles uniquement pour l'humain, la souris et le rat, les sondes couvrent non seulement les transcrits codants et non-codants mais aussi les jonctions exon-exon connues. Chaque gène est interrogé, en moyenne par un set de 109 sondes (70 pour la puce Rat), chaque exon par un set de 10 sondes et enfin chaque jonction par un set de 4 sondes.

### 1.5 Puces Clariom S

Ces puces de dernière génération existent uniquement pour l'homme, la souris et le rat. Construites sur le modèle des puces Gene mais avec un contenu actualisé, elles visent à couvrir tous les gènes très bien annotés et répertoriés à ce jour par les bases de données suivantes : HUGO (Human), MGI (Mouse), RGD (Rat).

### 1.6 Puces Clariom D

Ces puces, disponibles uniquement pour l'humain, la souris et le rat, constituent la dernière version des puces haute définition Affymetrix avec un design similaire aux puces XTA. Le contenu des puces Clariom D souris

et rat est similaire à celui des puces MTA 1.0 et RTA 1.0, respectivement. En revanche, la puce Clariom D Humaine est une évolution majeure de la puce HTA v2.0. Elle présente en particulier un contenu avancé permettant d'interroger les LincRNAs et un contenu, actuellement caché mais qui sera accessible courant 2017, pour l'analyse de plus de 600 gènes de fusion.

## 2 Protocoles de préparation des cibles

Les puces Affymetrix utilisent des ARNc ou des ADNc biotinylés comme cibles. Plusieurs protocoles de synthèse sont utilisés en routine sur la plateforme. Le choix de la méthode la plus appropriée pour un projet dépend essentiellement de la quantité de départ d'ARN total et du type de puce sélectionné, comme décrit dans le tableau ci-dessous.

Kit utilisé	Quantité d'ARN total		Type de puce
	Minimal	Optimal	
MessageAmp™ Premier RNA Amplification Kit, Ambion	100 ng	600 ng	Puces 3'
WT Expression Kit, Ambion	100 ng	600 ng	Puces Gene, Exon et XTA
GeneChip® WT PLUS Reagent Kit, Affymetrix	100 ng	500 ng	Puces Clariom
GeneChip® Pico Kit, Affymetrix	100 pg	50 ng	Puces Clariom
Ovation Pico WTA System v2, NuGEN	500 pg	20 ng	Tous les types de puces

Si vous voulez comparer vos données avec des données générées précédemment, nous vous recommandons de choisir le même protocole de synthèse et le même type de puce s'ils sont encore disponibles.

## 3 Services fournis

1. Validation des échantillons départ : quantification et vérification de la qualité par spectrophotométrie (Varioskan) et/ou électrophorèse capillaire (Bioanalyzer).
2. Préparation des cibles biotinylées en utilisant un des protocoles listés ci-dessus.
3. Hybridation, lavage et scanning des puces selon les recommandations Affymetrix.
4. Extraction des données, normalisation et calcul du signal avec les algorithmes statistiques d'Affymetrix (version MAS 5.0) et/ou les algorithmes Robust Multiarray Average (RMA) à l'aide du logiciel « Expression Console » d'Affymetrix.

## 4 Préparation des ARN totaux par le porteur de projet

Le porteur de projet prépare les échantillons d'ARN total. La qualité des résultats sur puce dépend étroitement de la qualité des échantillons de départ. Ainsi, il est important de prendre des précautions pour éviter toute contamination (phénol, DEPC, ADN génomique) ou dégradation.

Il est également très important d'inclure des réplicats biologiques (> 3) dans le plan d'expérience. Un design randomisé et équilibré est recommandé. Nous conseillons également de préparer tous les échantillons en même temps afin de réduire l'effet batch. Si nécessaire, nous pouvons vous aider à chaque étape du montage de votre projet.

Caractéristiques des ARN totaux à fournir	
Quantité	Dépend du protocole de synthèse.
Qualité	DO260/DO280 $\geq$ 1.8. Pas de dégradation sur gel d'agarose ou RIN $\geq$ 7 sur un profil Bioanalyzer.
Conditions d'envoi	Dans de l'eau sur carboglace. Les tubes doivent être clairement identifiés et fournis avec un document décrivant la concentration et le volume total de chaque échantillon.

## 5 Contrôles qualité réalisés par la plateforme

Les résultats des contrôles qualité listés ci-dessous sont envoyés par e-mail au porteur de projet après chaque étape expérimentale.

1. Validation des échantillons de départ	
Quantité	> quantité minimale recommandée Dépend du protocole utilisé.
Qualité	DO260/DO280 $\geq$ 1,8. RIN $\geq$ 7 sur un profil Bioanalyzer.
2. Validation des cibles biotinylées	
Rendement	$\geq$ 20 $\mu$ g si quantité de départ $\geq$ 100 ng. $\geq$ 5 $\mu$ g si quantité de départ $\leq$ 20 ng.
Profil Bioanalyzer	Pic $\geq$ 1000-1500 bp si quantité de départ $\geq$ 100 ng. Pic $\geq$ 500-900 bp si quantité de départ $\leq$ 20 ng.
3. Qualité de l'hybridation sur puce 3'	
Spike d'hybridation BioB	« Présent » dans $\geq$ 50% des échantillons du projet.
Spikes d'hybridation BioC, BioD, Cre	« Présent » dans 100% des échantillons du projet.
Bruit de fond moyen	$\leq$ 150.
Bruit (variation de pixel à pixel)	$\leq$ 4.
Pourcentage de gènes détectés	$\geq$ 20-30%. Variant de moins de 10 à 15% entre des échantillons biologiquement équivalents.
Intensité globale de la puce (scaling factor)	Variant de moins de 2 à 3 fois entre des échantillons biologiquement équivalents.
4. Qualité de l'hybridation sur puce Gene, Exon, XTA et Clariom	
Intensité des spikes contrôles polyA <sup>+</sup> ajoutés à l'ARN total de départ (optionnel)	Ilys<I <sub>p</sub> he<I <sub>t</sub> hr<I <sub>d</sub> ap.
Intensité des spikes d'hybridation	IBioB< IBioC<IBioD<ICre.
Pos vs Neg auc	$\geq$ 0,80.

[all probe set rle mean]max – [all probe set rle mean]min	≤ 0,3 entre des échantillons biologiquement équivalents.
All probeset mad-residual mean	≤ 0,65.
Pourcentage de gènes détectés (uniquement pour les puces Exon)	≥ 20-30%. Variant de moins de 10 à 15% entre des échantillons biologiquement équivalents.

## 6 Remise des résultats

Le porteur de projet est informé par e-mail de la disponibilité de ses données de puce sur un serveur FTP de l'IGBMC. Les données suivantes sont fournies pour chaque projet :

- Fichiers bruts Affymetrix (fichiers ARR, CEL).
- Résultats d'expression normalisés et résumés (fichiers CHP) en format TXT ou XLS.
- Une copie de tous les contrôles qualité réalisés pendant le projet.
- Une copie des protocoles de référence utilisés ainsi qu'un bref « Matériels et Méthodes » en anglais.

**Selon les « Conditions Générales de la Plateforme GenomEast », le porteur de projet est responsable de la sauvegarde et de l'archivage de ses données. Après la remise des résultats, la plateforme s'engage à conserver les données brutes que pour une durée limitée de six mois.**

## 7 Analyse des données (optionnelle)

L'analyse différentielle de l'expression des gènes ou l'étude de l'épissage alternatif ne font pas partie des prestations standard, néanmoins, elles peuvent être réalisées en collaboration avec l'un des membres de la plateforme. Nous recommandons aux porteurs de projet souhaitant collaborer pour des analyses de nous contacter avant de commencer le projet afin de définir les analyses convenant le mieux à leurs besoins.