

Quelles technologies de séquençage au service de toxicologie alimentaire?

Du Sanger à la 3^{ème} Génération

séquence unique

séquençage « NGS »

Sanger



16 ou 48 capillaires

NGS - short reads

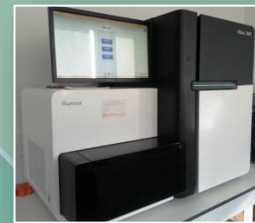
Ion Torrent

Ion PGM
2 Gb
400 pb



Illumina

HiSeq 3000
700 Gb
2 x 150 pb



Ion Proton
13 Gb
200 pb



3 x MiSeq
15 Gb
2 x 300 pb



3G - long reads

PacBio RsII
70 000 reads - 20 kb



Un mot de Sanger

Sanger

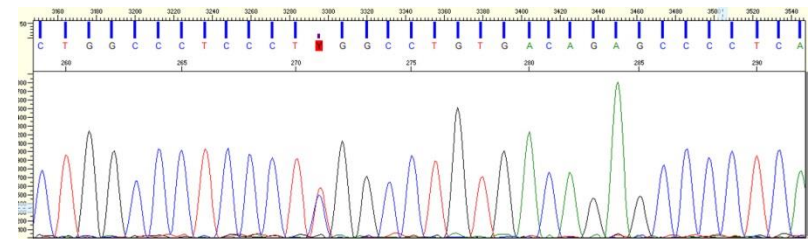


16 ou 48 capillaires
→ 850 pb ≈

2 analyseurs génétiques disponibles sur GeT :

- ⇒ 1 x 16 capillaires
* service de **séquençage** à l'unité quotidien
- ⇒ 1 x 48 capillaires
* **accès en autonomie** pour lancer les runs

Les 2 analyseurs génétiques peuvent passer des runs de séquences, et **d'analyse de fragments**



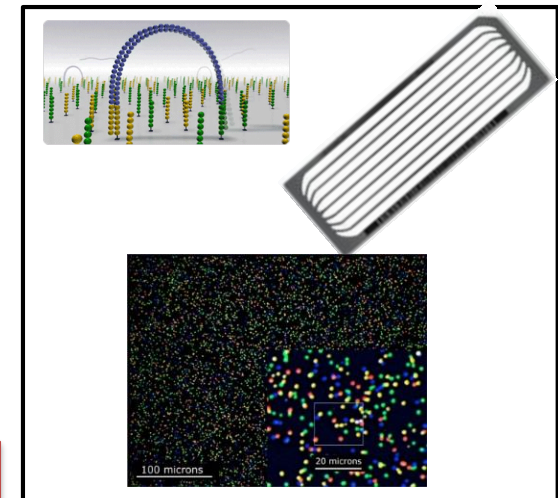
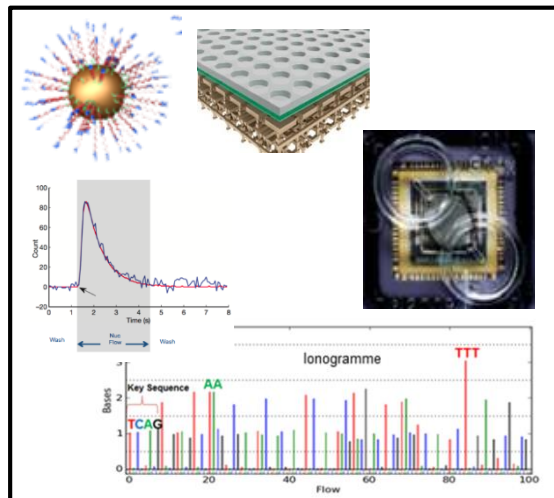
Dye Set	Filter Set	Blue	Green	Yellow	Red	Orange
DS-30	D	6-FAM	HEX	NED	ROX	
PowerPlex	F	FL	JOE	TMR	CXR	
DS-33	G5	6-FAM	VIC	NED	PET	LIZ

+ 6 couleurs disponible sur Purpan pour 2016

NGS : Ion Torrent et Illumina



Ion Torrent	Illumina
Modulable : 4 tailles de puces possibles ↔ 4 débits de 50 Mb à 13 Gb	Très gros débit : 2 Gb à 90 Gb / lane * mode high throughput disponible
Lectures en 1 x 200 pb ou 1 x 400 pb	Lectures 1 x 50 pb à 2 x 300 pb
Solutions intégrées avec analyses pré-paramétrées sur logiciel accessible	Nombreux développements Données gérées sur clusters PF BioInfo
Perspective : Proton ⇒ S5 + modulable?	Perspective : ajout d'un MiniSeq ? Evolution vers HiSeq4000 ?



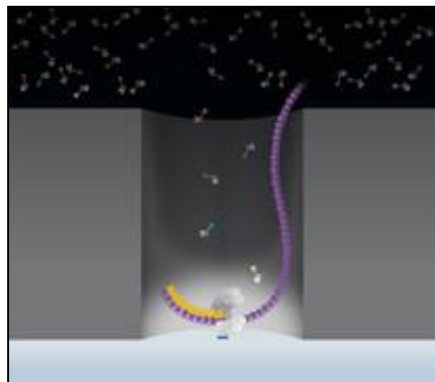
3^{ème} Génération : le PacBio RsII



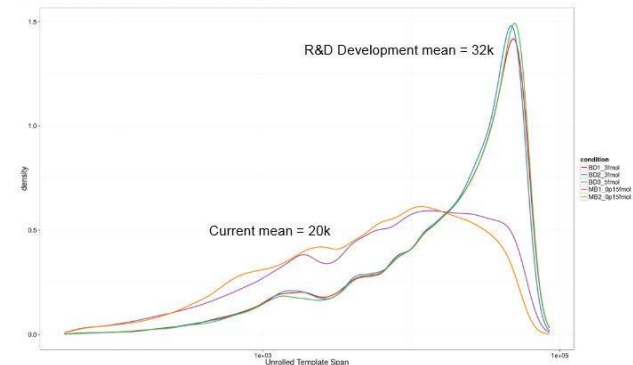
- + Séquençage molécule unique
- + Pas d'étape de PCR
- + Taille des séquences : 15-20 kb \Rightarrow 40 kb
- Beaucoup d'erreur pour l'instant (>10%)



Erreurs aléatoires \Rightarrow corrigées par la profondeur de séquençage



SAMPLE DATA FROM R&D



Targeting 2016 Release

NGS : quelles applications ?

Génomique Re-séquençage

- Whole Genome
- Whole Exome
- Panels de gènes
- Hotspots

Transcritomique Expression

- Whole transcriptome
- Transcrits pleine longueur
- Petits ARN
- RNAseq ciblé

Epigénétique

- Whole Genome
- Ciblé

Métagénomique

- 16S
- Amplicons

Génomique – Reséquençage/Séquençage *de novo*

➤ Whole Genome

Actuellement :

- Construction de bibliothèques "PCR-free"
- 1 run HiSeq = 8 génomes de 3Gb en 30X ≈ 2,5 jours

⇒ Recherche de mutations sans a priori

Autres applications possibles :

- Séquençage en PacBio RSII sur 100 SMRT cells pour obtenir 1 génome de 3 Gb en 30X
- Séquençage en PacBio RSII sur 1 SMRT cell d'un génome bactérien en 100X

⇒ Séquençage de novo, recherche de réarrangements chromosomiques, détection des haplotypes, recherche de SNP...

Technologies compatibles

Illumina HiSeq 3000



PacBio RSII



Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goats

Gwenola Tosser-Klopp^{1,2*}, Philippe Bardou^{1,2,3}, Olivier Bouchez^{1,2,4}, Cédric Cabau^{1,2,3}, Richard Crooijmans⁵, Yang Dong⁶, Cécile Donnadieu-Tonon^{1,2,4}, André Eggen⁷, Henri C. M. Heuven⁸, Saadiah Jamli⁹, Abdullah Johari Jiken⁹, Christophe Klopp^{3,10}, Cynthia T. Lawley⁷, John McEwan¹¹, Patrice Martin^{12,13}, Carole R. Moreno¹⁴, Philippe Mulsant^{1,2}, Ibouniyamine Nabihoudine^{1,2,3}, Eric Pailhoux^{15,16}, Isabelle Palhière¹⁴, Rachel Rupp¹⁴, Julien Sarry^{1,2}, Brian L. Sayre¹⁷, Aurélie Tircazes¹⁴, Jun Wang¹⁸, Wen Wang^{6,18}, Wenguang Zhang^{6,19*} and the International Goat Genome Consortium[†]

Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle

Hans D Daetwyler¹⁻³, Aurélien Capitan^{4,5}, Hubert Pausch⁶, Paul Stothard⁷, Rianne van Binsbergen⁸, Rasmus F Brøndum⁹, Xiaoping Liao⁷, Anis Djari¹⁰, Sabrina C Rodriguez⁴, Cécile Grohs⁴, Diane Esquerré¹¹, Olivier Bouchez¹¹, Marie-Noëlle Rossignol¹², Christophe Klopp¹⁰, Dominique Rocha⁴, Sébastien Fritz⁵, André Eggen⁴, Phil J Bowman^{1,3}, David Coote^{1,3}, Amanda J Chamberlain^{1,3}, Charlotte Anderson¹, Curt P VanTassell¹³, Ina Hulsegge⁸, Mike E Goddard^{1,3,14}, Bernt Gulbrandsen⁹, Mogens S Lund⁹, Roel F Veerkamp⁸, Didier A Boichard⁴, Ruedi Fries⁶ & Ben J Hayes¹⁻³

Detection of Haplotypes Associated with Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2

Sébastien Fritz^{1,2}, Aurelien Capitan^{1,2}, Anis Djari³, Sabrina C. Rodriguez^{2,3}, Anne Barbat², Aurélie Baur^{1,2}, Cécile Grohs², Bernard Weiss², Mekki Boussaha², Diane Esquerré⁴, Christophe Klopp³, Dominique Rocha², Didier Boichard^{2*}

Génomique - Reséquençage

➤ Whole Exome (humain)

⇒ Recherche mutations / biomarqueurs,
+ abordable que whole genome

- **En développement : AmpliSeq Exome Kit (Life Tech)**
 - + : rapide à mettre en œuvre, moins cher que la capture, kit "clef en main" avec pré-paramétrage d'analyse bio-info
détection CNV possibles
 - : que CDS, - uniforme que des kits de capture, gérable pour des cohortes petites à moyennes

- **Développements envisageables : Nextera Rapid Capture exome**
 - + : existe en version "expanded" comprenant UTRs et miRNA, nécessite uniquement 50 ng input (eq. AmpliSeq)
 - : Nécessite 8 Gb de séquençage par exome en 2x75 pb, valable pour de grosse cohortes (≈ 115 exomes en 8j / 23 exomes en 20h / 5 exomes profonds en 20h)

Technologies compatibles

Ion Proton



Illumina HiSeq



Génomique - Reséquençage

➤ Séquençage ciblé (panel, hotspots)

- ⇒ Recherche / typage mutations / biomarqueurs sur régions d'intérêt
- ⇒ Possibilité de recherche en profondeur

Déjà disponible :

- AmpliSeq (Life Tech) Custom Panel
- AmpliSeq (Life Tech) Ready-to-use Panel
Ex : Comprehensive Cancer Panel
- TruSight (Illumina) kits
Ex : TruSight Amplicon Cancer Panel
- TruSeq Custom Amplicon Kit

Technologies compatibles

Ion PGM



Ion Proton



Illumina MiSeq



Transcriptomique - Expression

➤ Séquençage whole transcriptome

⇒ Identification / quantification

Disponible :

RNAseq orienté des ARN messagers sur HiSeq en 2 x 150 pb

➤ Séquençage transcrits pleine longueur

En cours développement : sur PacBio RslI

⇒ Transcrits de fusion, transcrits alternatifs

➤ Séquençage petits ARN

Disponible : sur Ion Proton

< 100 pb - séquençage orienté

Technologies compatibles

Illumina HiSeq



PacBio RslI



Ion Proton



Transcriptomique - Expression

➤ RNAseq ciblé ⇒ Expression

Possibilité de développer des panels customs :
Sur Ion Torrent et sur Illumina

➤ RNAseq ciblé - gene fusion

Existent sur Ion Torrent ou Illumina :

- RNA apoptose / RNA cancer panel
- TruSight RNA Pan-Cancer...
- custom

Technologies compatibles

Ion PGM



Ion Proton



Illumina MiSeq



Analyses transcriptomiques

[PLoS One](#), 2013 Oct 1;8(10):e74183. doi: 10.1371/journal.pone.0074183.

High-throughput RNA sequencing of pseudomonas-infected Arabidopsis reveals hidden transcriptome complexity and novel splice variants.

[Howard BE](#), [Hu Q](#), [Babaoğlu AC](#), [Chandra M](#), [Borghi M](#), [Tan X](#), [He L](#), [Winter-Sederoff H](#), [Gassmann W](#), [Veronese P](#), [Heber S](#).

Department of Computer Science, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, United States of America.

Abstract

We report the results of a genome-wide analysis of transcription in *Arabidopsis thaliana* after treatment with *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. Our time course RNA-Seq experiment uses over 500 million read pairs to provide a detailed characterization of the response to infection in both

[Proc Natl Acad Sci U S A](#), 2013 Oct 28. [Epub ahead of print]

Differential expression of olfactory genes in the southern house mosquito and insights into unique odorant receptor gene isoforms.

[Leal WS](#), [Choo YM](#), [Xu P](#), [da Silva CS](#), [Ueira-Vieira C](#).

Department of Molecular and Cellular Biology, University of California, Davis, CA 95616.

Abstract

The southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*, has one of the most acute and eclectic olfactory systems of all mosquito species hitherto studied. Here, we used Illumina sequencing to identify olfactory genes expressed predominantly in antenna, mosquito's main olfactory organ. Less

[Front Genet](#), 2013 Aug 2;4:145. doi: 10.3389/fgene.2013.00145. eCollection 2013.

Mammalian miRNA curation through next-generation sequencing.

[Brown M](#), [Suryawanshi H](#), [Hafner M](#), [Farazi TA](#), [Tuschl T](#).

Laboratory of RNA Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University New York, NY, USA.

Abstract

Characteristic small RNA biogenesis processing patterns are used for the discovery of novel microRNAs (miRNAs) from next-generation sequencing data. Here, we highlight and discuss key criteria for mammalian - specifically human - miRNA database curation based on small RNA sequencing data. Sequence reads obtained from small RNA cDNA libraries are aligned to reference genomic regions, and miRNA genes are revealed by their

➤ Conversion bisulfite

Disponible en whole genome sur HiSeq
RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)

➤ Etude des lncRNA/petits ARN

Adaptation des protocoles RNAseq (ribodepletion vs sélection poly-A)

➤ CHIP-seq/MedIP-seq

Compatible Illumina

➤ Méthylome "direct"

Possible sur PacBio RslII

Technologies compatibles

Illumina HiSeq



PacBio RslII



Métagénomique - Metabarcoding

➤ 16S - clef en main

- 7 régions variables sur 9
- Paramétrages analyses sur Ion Reporter
- Faible nombre échantillons

➤ 16S full length

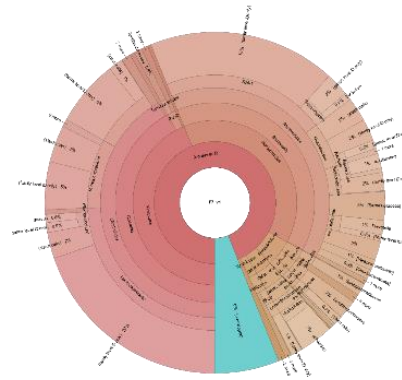
- Possible sur PacBio RslI

➤ Amplicons customs

- Mise au point sur Illumina - automatisation construction librairies
- > 300 barcodes disponibles
- 1 région 300-400 pb

➤ Whole metagenome / transcriptome

- Sur HiSeq



Technologies compatibles Ion PGM



PacBio RslI



Illumina MiSeq



Illumina HiSeq



Analyses métagénomiques

The Characterization of Novel Tissue Microbiota Using an Optimized 16S Metagenomic Sequencing Pipeline

Jérôme Lluch^{1,2}*, Florence Servant¹*, Sandrine Païssé¹, Carine Valle¹, Sophie Valière^{2,3}, Claire Kuchly^{2,3}, Gaëlle Vilchez^{2,3}, Cécile Donnadieu^{2,4}, Michael Courtney¹, Rémy Burcelin⁵, Jacques Amar^{5,6}, Olivier Bouchez^{2,4}, Benjamin Lelouvier^{1*}

Lactobacillus sakei modulates mule duck microbiota in ileum and ceca during overfeeding

F. Vasai,* K. Brugirard Ricaud,*¹ L. Cauquil,†‡§ P. Daniel,# C. Peillod,|| K. Gontier,* A. Tizaoui,¶
O. Bouchez,** S. Combes,†‡§ and S. Davail*

Diversity and spatiotemporal dynamics of bacterial communities: physicochemical and others drivers along an acid mine drainage

A. Volant¹, O. Bruneel¹, A. Desoeuvre¹, M. Héry¹, C. Casiot¹, N. Bru², S. Delpoux¹, A. Fahy³,
F. Javerliat³, O. Bouchez⁴, R. Duran³, P. N. Bertin⁵, F. Elbaz-Poulichet¹ and B. Lauga³

A venir sur GeT en NGS ?

Ion S5 (remplace Proton)

- Machine intermédiaire PGM / Proton
- + modulable que Proton (3 puces)
- + autonome



MiniSeq (Illumina)

- Même chimie que les systèmes Illumina (+ proche NextSeq) : ≈ compatibilité des bibliothèques
- Petit à moyen débit
- Modulable



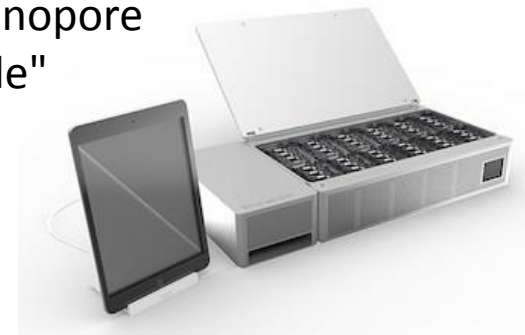
Sequel (PacBio)

- Même chimie que PacBio (SMRT),
- Débit + important
- Même taux d'erreur

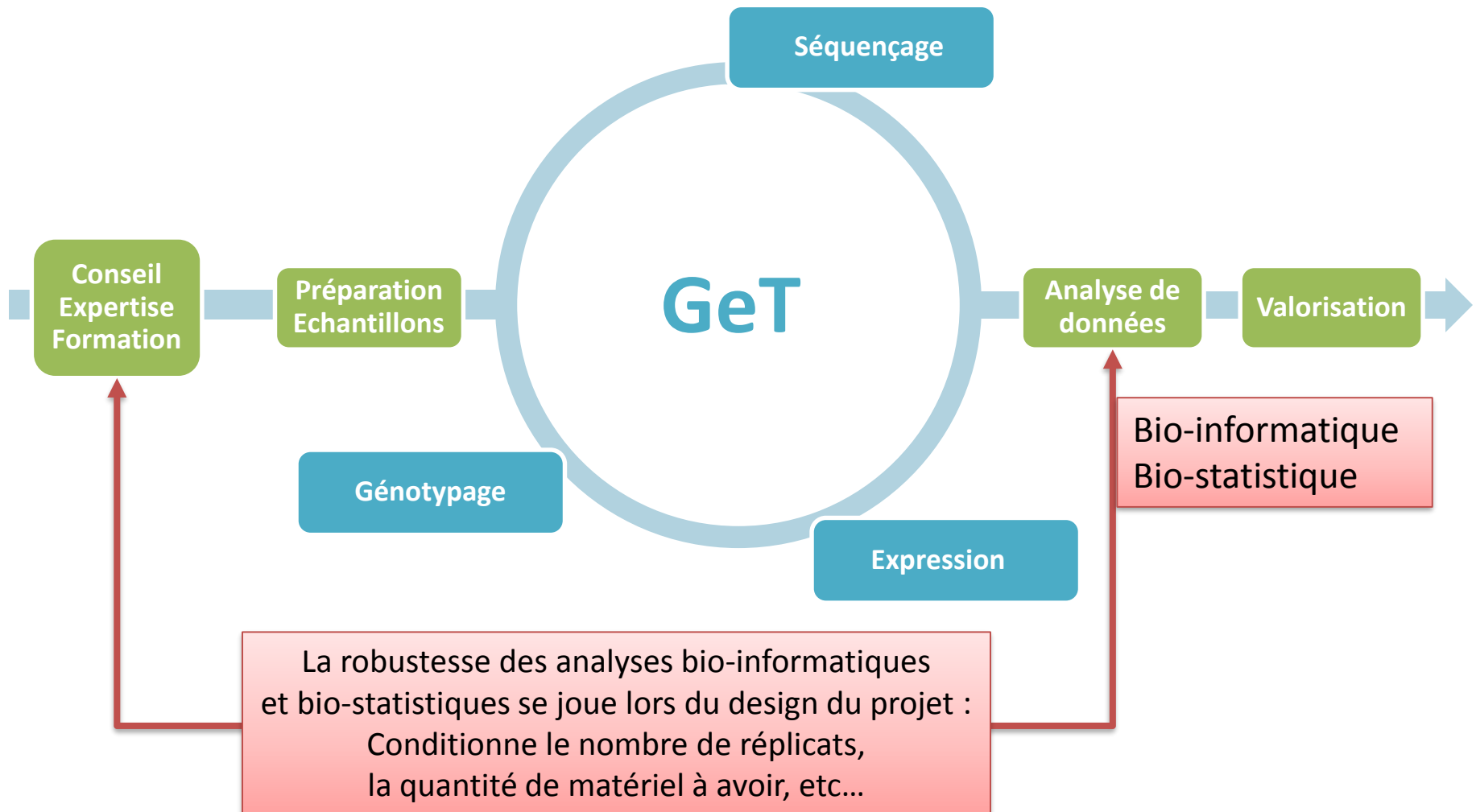


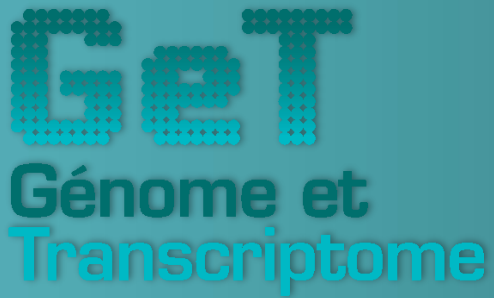
PromethION (Oxford Nanopore)

- Technologies Nanopore
- "MinION multiple"



Démarche construction projets



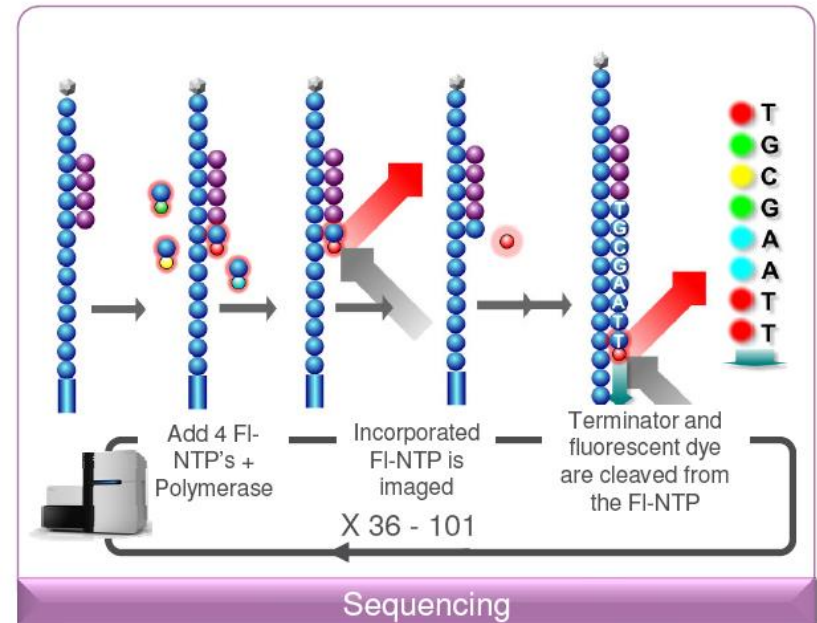
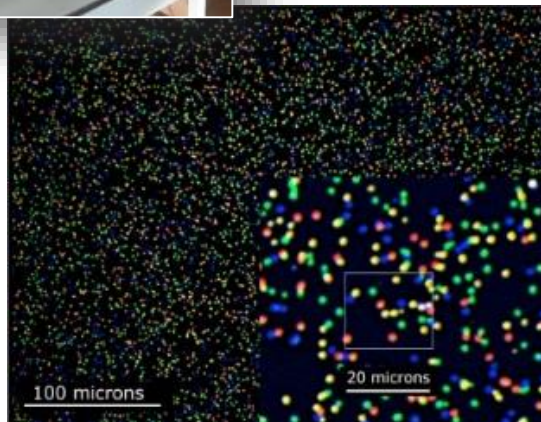
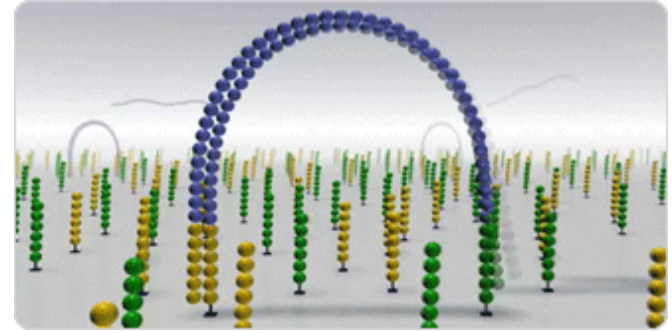
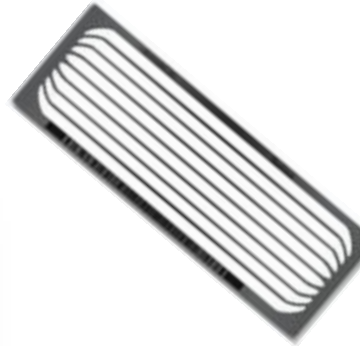


Merci de votre attention !

Place aux questions...

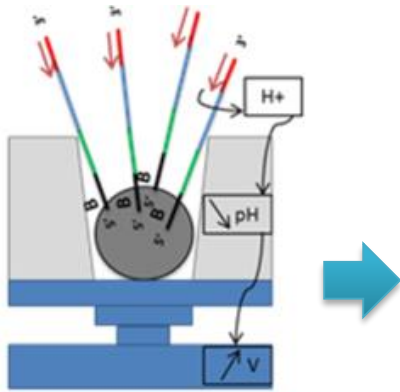
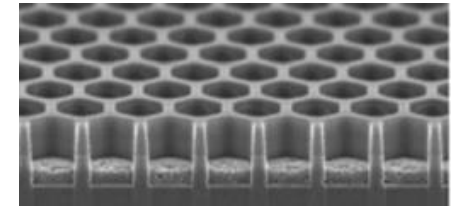
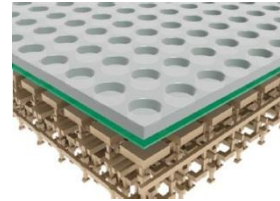
Chimie Illumina en détails

- Séquençage par Synthèse
- Détection par fluorescence

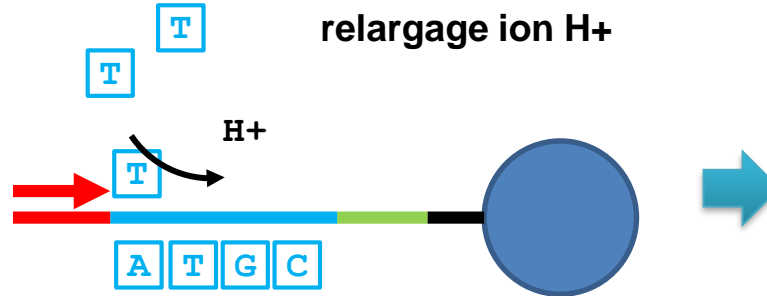


Chimie Ion Torrent en détails

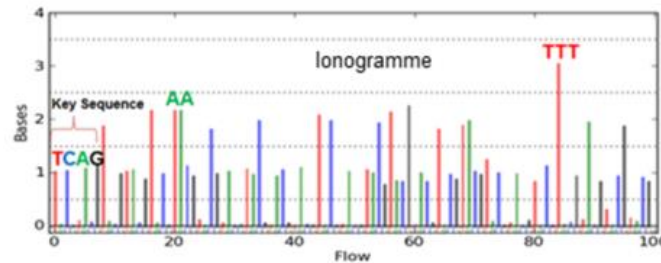
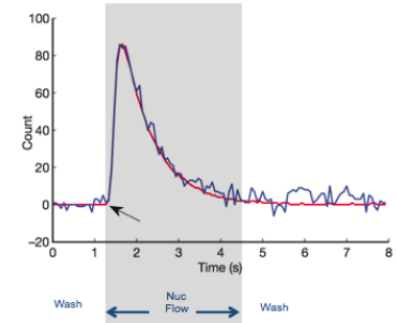
- Séquençage par Synthèse
- Par semi-conduction



Flow de dNTP
relargage ion H⁺



différence de potentiel
détectée par la machine

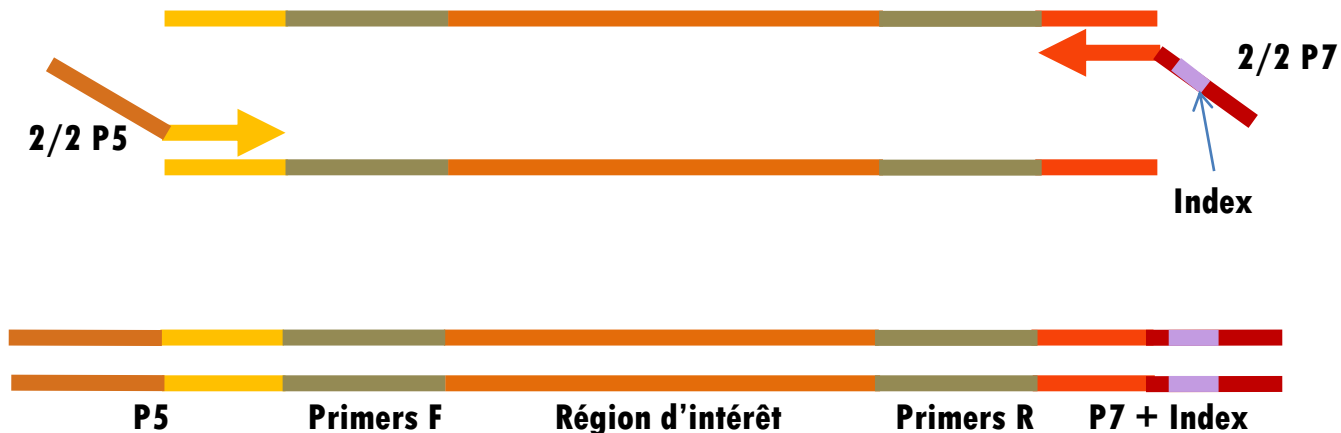


Séquençage amplicons sur Illumina

PCR1 (classique, 30 à 35 cycles) : amplification région cible

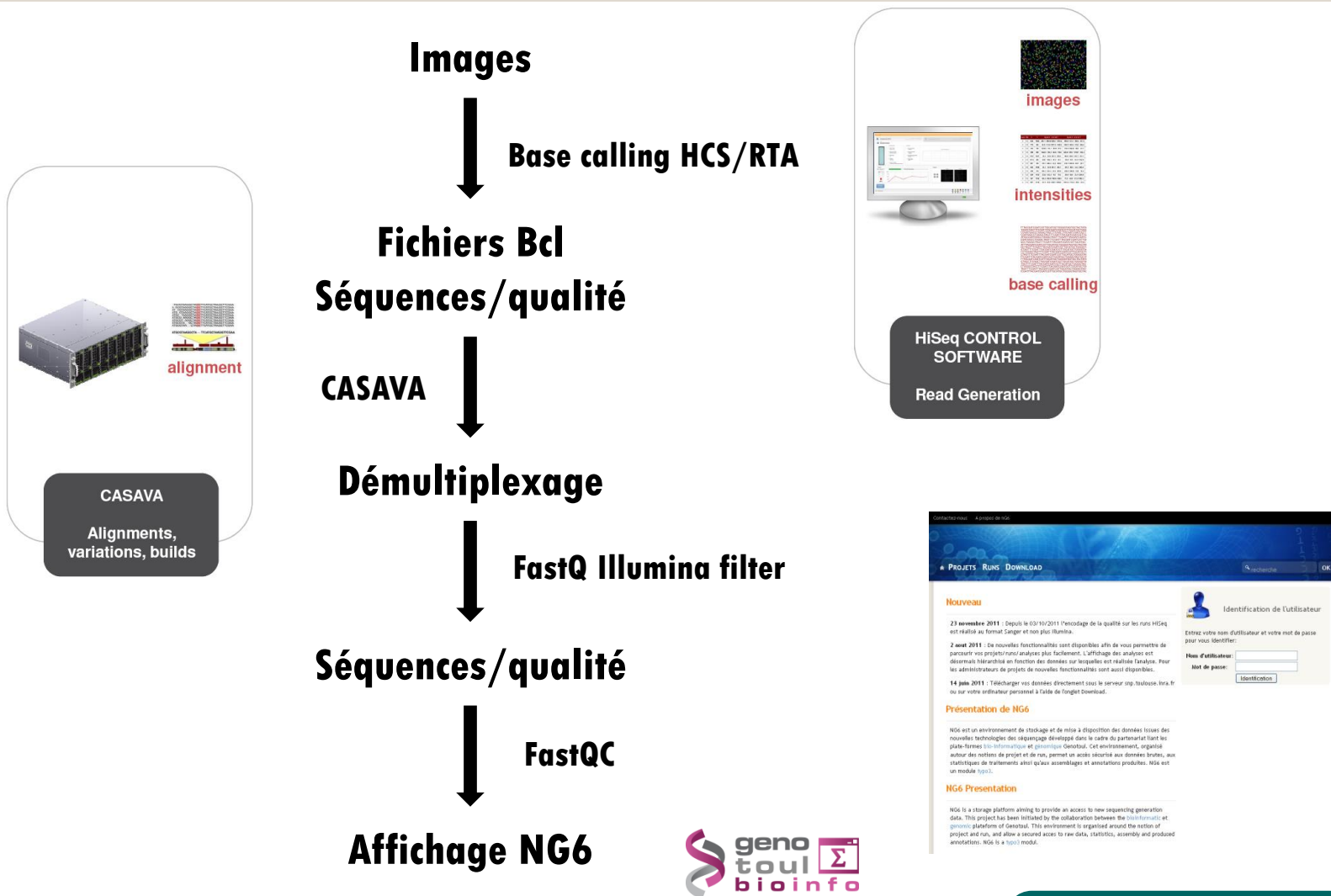


PCR2 (réduite, 10 à 12 cycles) : ajout adaptateurs + index



1 Librairie = 2 PCRs, Réalisable en plaque 96 puits, Automatisée

Analyses qualitatives des données Illumina



Génomique - Reséquençage

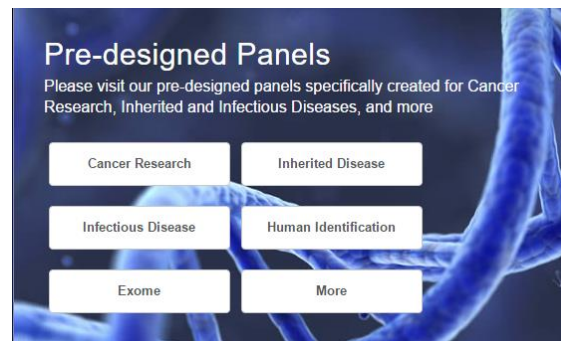
➤ Séquençage ciblé (panel, hotspots)

- ⇒ Recherche / typage mutations sur régions d'intérêt
- ⇒ Possibilité de recherche en profondeur

Peut être réalisé :

- **Sur Ion Torrent : tout type de panels AmpliSeq**
 - Custom - humain et souris - 200 ou 400 pb
 - Communautaires - 200 pb
 - Ready-to-use : panels dédiés cancérologie - 200 pb
 - Cancer Hotspot Panel v2 *FFPE
 - Comprehensive Cancer Panel *FFPE

⇒ www.ampliseq.com



Technologies compatibles

Ion Torrent



Génomique - Reséquençage

➤ Séquençage ciblé (panel, hotspots)

- ⇒ Recherche / typage mutations sur régions d'intérêt
- ⇒ Possibilité de recherche en profondeur

Des développements peuvent être envisagés:

- Sur Illumina 2x75 ou 2x150pb
 - TruSight Tumor 15
 - TruSight Myeloid
 - TruSight Amplicon Cancer Panel

 - TruSeq Custom Amplicon Kit
existe une version low input - FFPE
⇒ DesignStudio Illumina

Technologies compatibles

Illumina MiSeq



Illumina MiniSeq ?