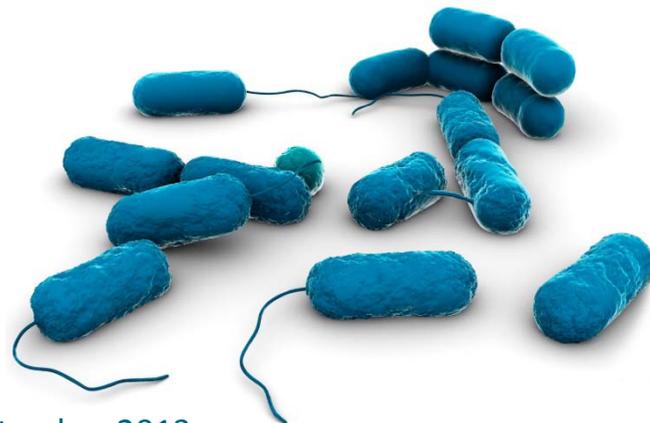
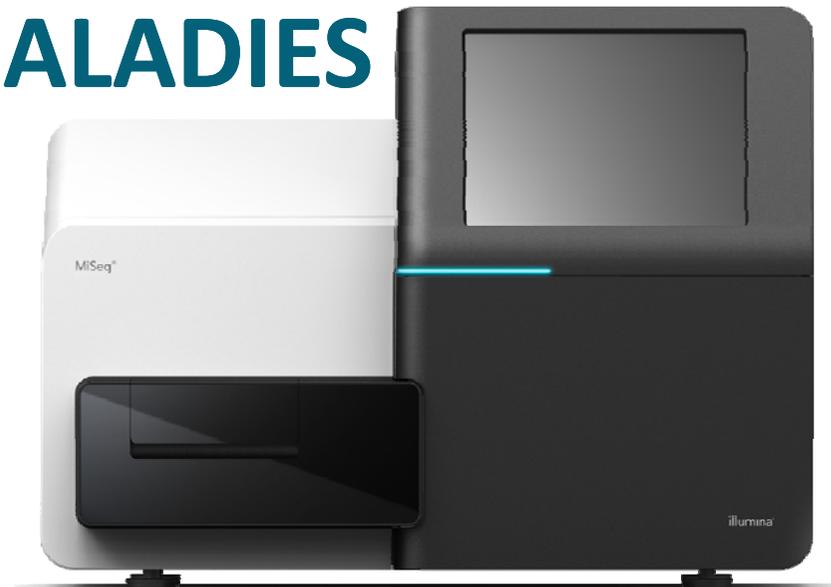


VALIDATION DU SÉQUENÇAGE MISEQ DANS L'ANALYSE DU MÉTAGÉNOME EN RELATION AVEC LES MALADIES MÉTABOLIQUES

Jérôme Lluch



vaiomer

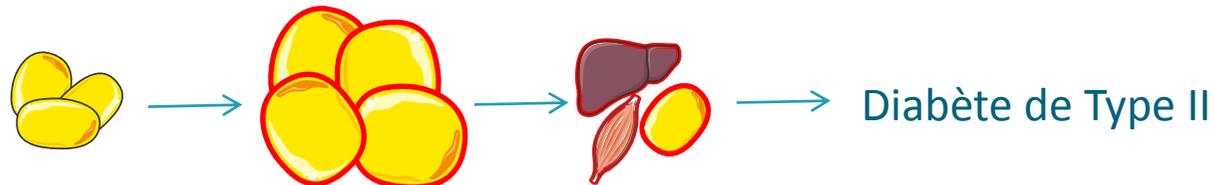
VAIOMER : A new paradigm for biomarker and drug discovery

- ✓ Start Up créée en 2011 par le Prof. Rémy Burcelin le Prof. Jacques Amar et le Dr Michael Courtney
- ✓ 14 personnes actuellement dont 7 recrutés en 2013
- ✓ Collaborations avec l'INSERM Toulouse SERVIER l'IRT BioAster de Lyon

MICROBIOTE TISSULAIRE



CASCADE INFLAMMATOIRE



**BIOMARQUEURS PRÉDICTIFS
ET CIBLES THÉRAPEUTIQUES**

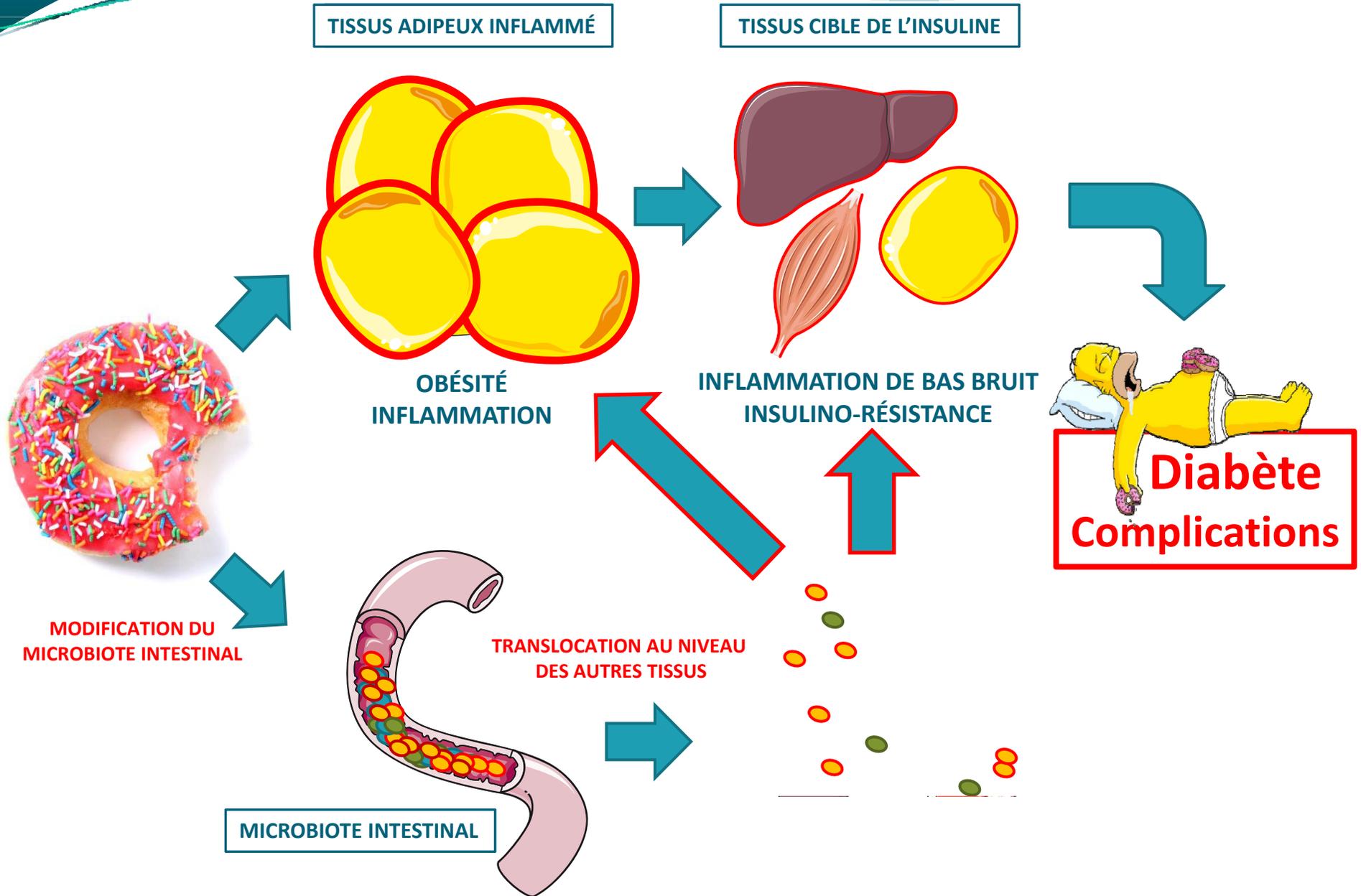
POURQUOI LE DIABÈTE DE TYPE II?

- ✓ Insulino-Résistance
- ✓ Plus de 347 Millions de personnes diabétiques de type II dans le monde
- ✓ Mortalité principalement due aux nombreuses complications (cardiovasculaires, gangrène, néfropathite)
- ✓ Traitements:
 - Mesures Hygiéno-diététiques
 - Traitements médicamenteux Oral : Metformine®

Diminution des symptômes mais pas de la mortalité
+
Nombre de personnes touchées en forte augmentation
(500 millions en 2030)

Problème de santé publique majeur

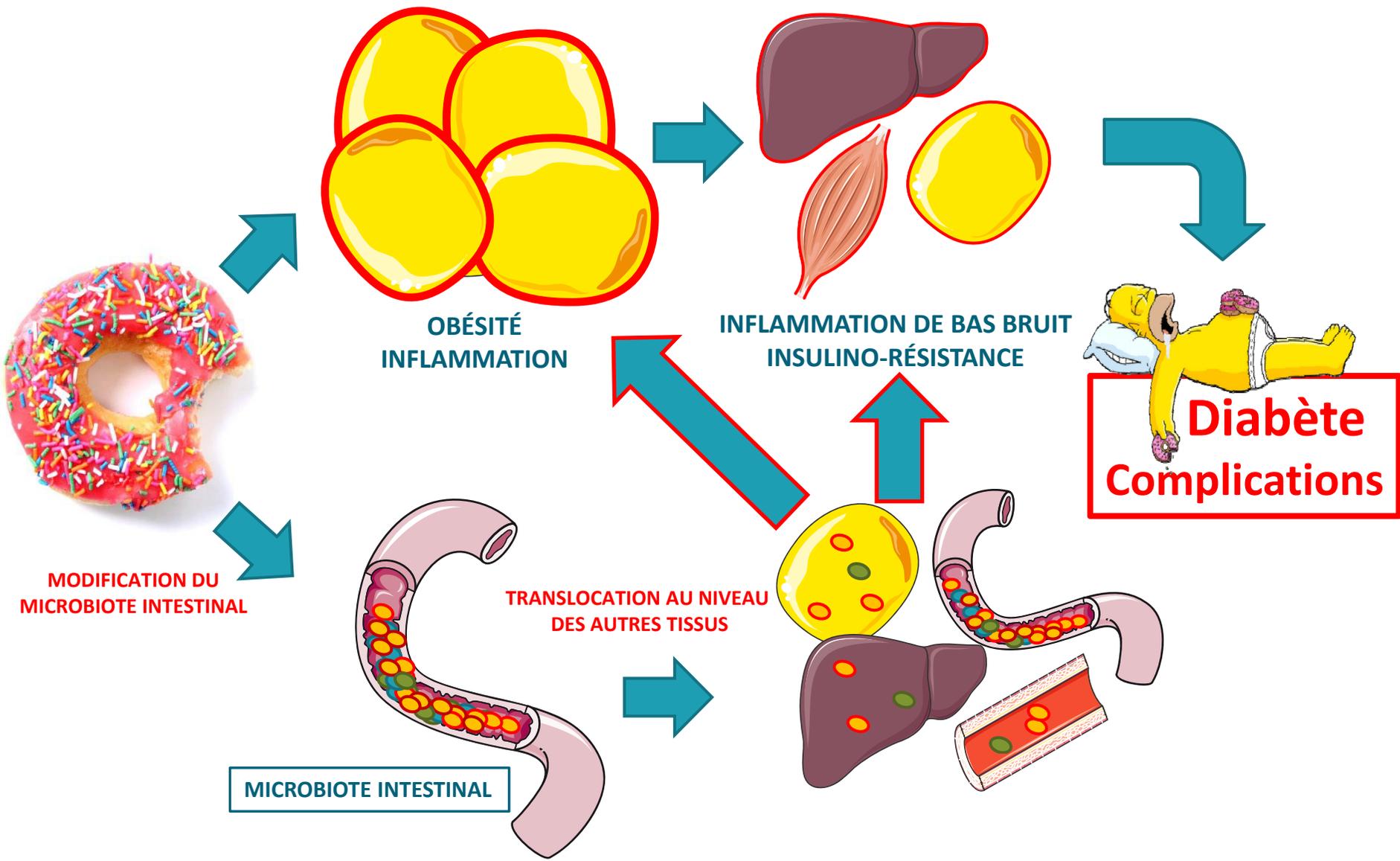
DTII: LE MODÈLE





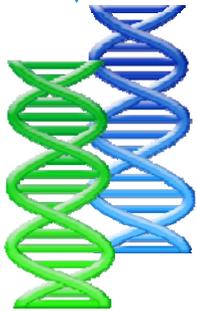
TISSUS ADIPEUX INFLAMMÉ

TISSUS CIBLE DE L'INSULINE





1.Extraction d'ADN (Eucaryote & Procaryote)

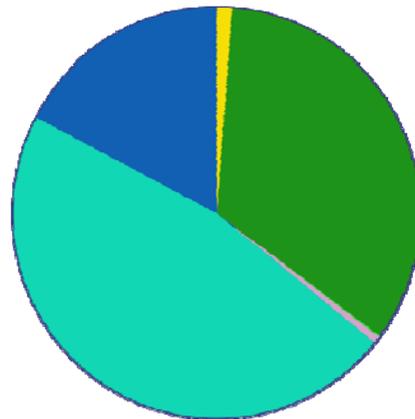


2.PCR 16S avec amorces universelles

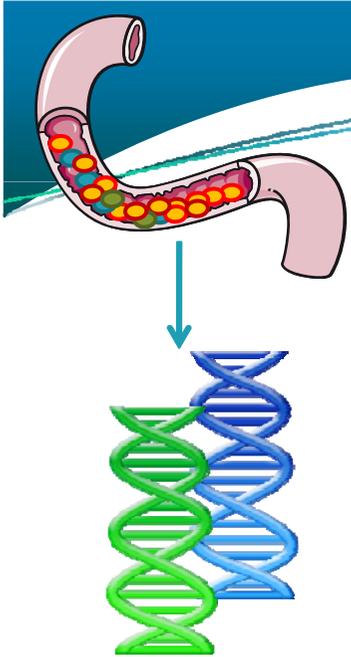


3.Séquençage NGS des amplifications

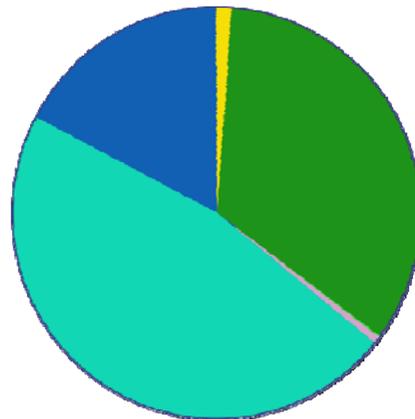
4.Comparaison des séquences aux bases de données disponibles (RDP NCBI greengenes)



**Composition du
microbiote tissulaire**



Condition 1
Régime normal



Condition 2
Régime gras

DU ROCHE GSFLX454 AU ILLUMINA MiSeq

	Roche GSFLX454	Illumina MiSeq
Nombre de reads	1 000 000	2x 15 000 000
Longueurs des reads	450-500pb	2x250pb
Multiplexage (index ou MID)	+ de 130	96
Durée de préparation	5 jours	3 jours
Durée d'un run	24 h	38h
Nombre d'éch Max /run	65	96 (1 000)
Nombre de reads/éch	15 000	156 250
Coût au run	15 000€	5 000€

LA SYNTHÈSE DES LIBRAIRIES: PCR 1

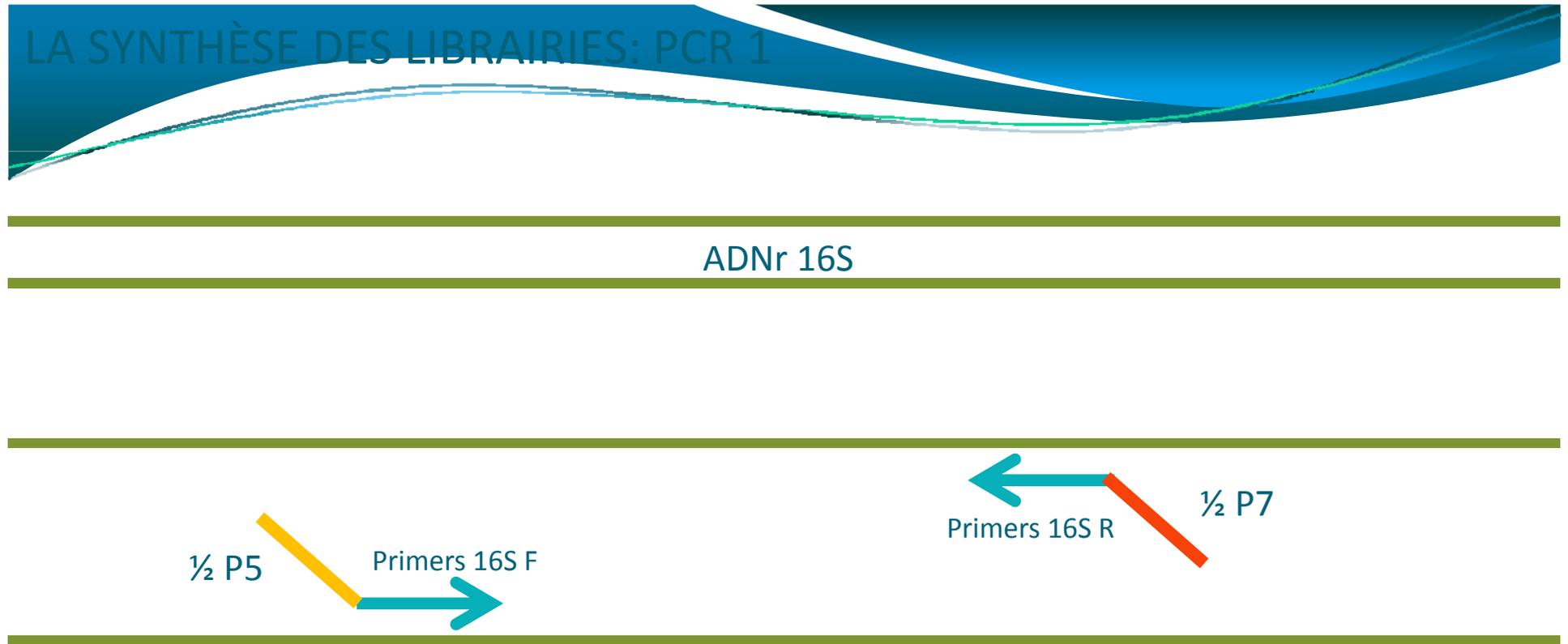
ADNr 16S

½ P5

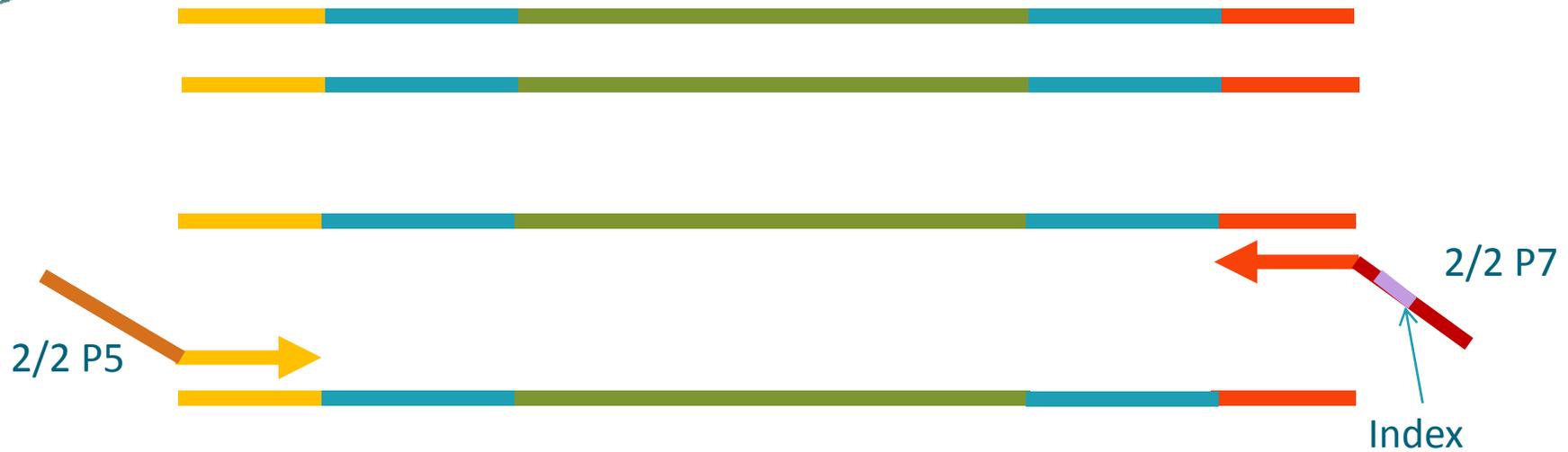
Primers 16S F

Primers 16S R

½ P7



LA SYNTHÈSE DES LIBRAIRIES: PCR 2



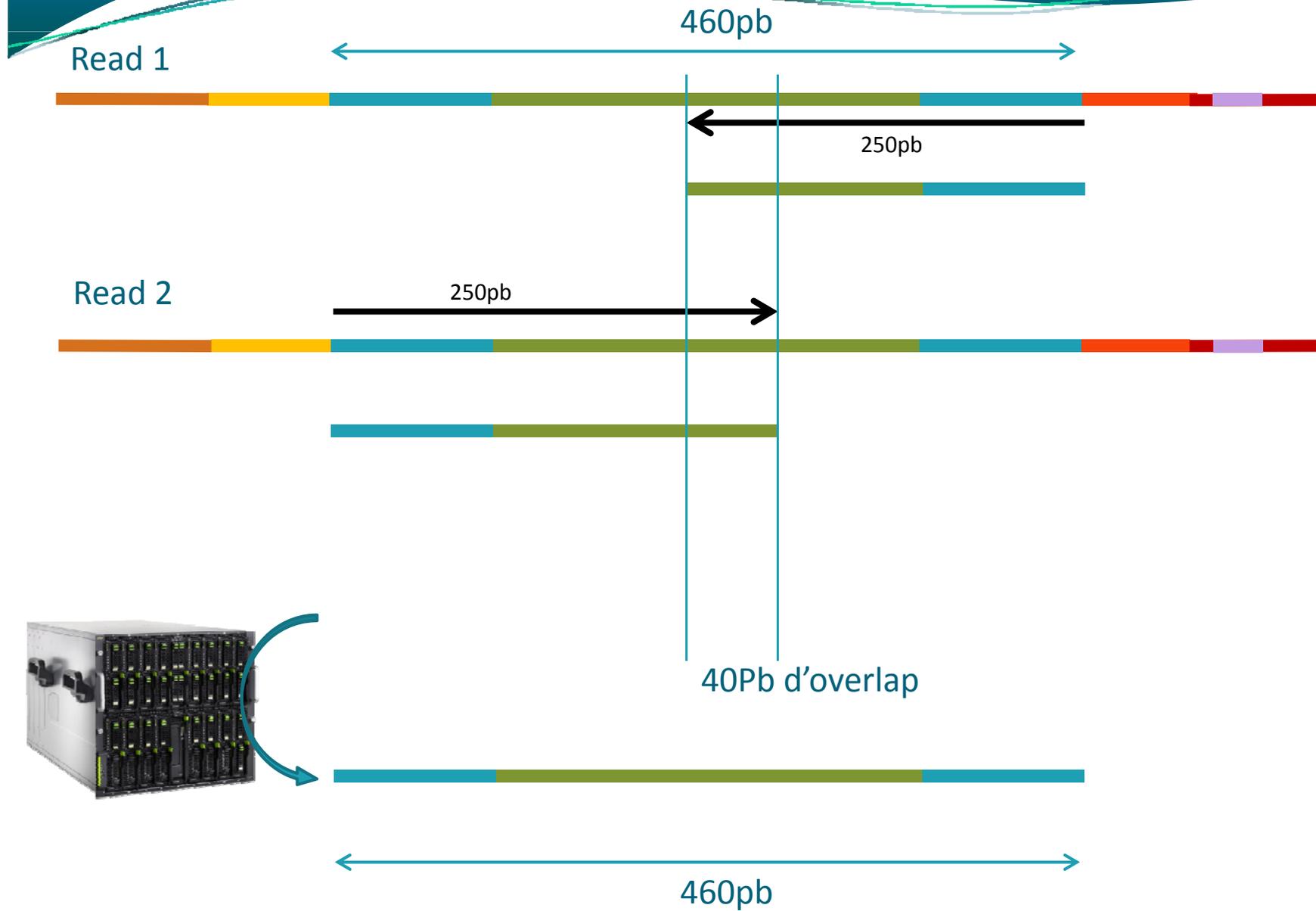
Librairie Miseq

1 Librairie = 2 PCRs

Réalisable en plaque 96 puits

Automatisable

LE SÉQUENÇAGE PAIRED END



LA VALIDATION TECHNIQUE: LES DONNÉES

	Données	# Reads	Attendu	Mediane	Moyenne	MIN	MAX
Primer A	Brutes	13 593 962	15 000 000	280 681	283 208	201 916	349 826
	Passing Filter	12 581 796	13 500 000	259 755	262 121	188 104	320 246
	Custom Filters*	5 972 436		126 106	124 426	56 548	191 284
Primer B	Brutes	14 613 382	15 000 000	308 821	304 446	68 354	541 136
	Passing Filters	13 292 150	13 500 000	281 586	276 920	62 012	487 760
	Custom Filters	5 228 630		112 184	108 930	25 294	175 162
TOTAL	Brutes	28 207 344	30 000 000	294 751	293 827	68 354	541 136
	Passing Filter	25 873 946	27 000 000	270 670	269 520	62 012	487 760
	Custom Filters*	11 201 066		238 290	116 678	25 294	175 162

*Custom Filters: >Q30 sur 90% du read

Caractéristiques Techniques fournisseurs : OK

LA VALIDATION TECHNIQUE: LES LIMITES ET POINTS D'ATTENTION

Primer	#OTU	#Kingdom	#Phylum	#Class	#Order	#Family	#Genus	#Species
Primer A	800	1	10	18	38	70	93	19
Primer B	2564	1	11	17	33	57	76	13

Choix du primer A

Réalisé avec Mothur

Zone de précision
de la méthode

Passing Filter	Phix	%
25 873 946	1 043 474	4

4% de phiX résiduel dans les « Passing Filters » Reads

Réalisé avec Bowtie2

Les contaminations

- Extérieurs ou environnementales :
PRÉLÈVEMENT EXTRACTION MANIPULATION CONSERVATION
- Réactifs
Primers longs vite dégradés
Taq synthétisées dans E.Coli réactifs et plastiques DNA Free.....humain
→ Séquençage d'H2O
→ Test de plusieurs Taq Polymérase

La faible quantité d'ADN Bactérien

- Amplification sur Tissus intestinaux: Facile !
1 PCR
- Amplification sur Sang Foie Tissus Adipeux: Difficile
2 à 5 PCR
Changement de Taq de condition d'amplification d'extraction

L'analyse bioinformatique

- Pipeline/logiciel d'analyse pas encore adapté
Adaptation et amélioration du logiciel disponible (mothur) qui est fait pour un overlap complet des 2 reads et non un overlap partiel

CONCLUSION

- Manipulations:** LIBRAIRIES FACILES A SYNTHÉTISER (2PCR + 1 QPCR)
RAPIDE: 2 jours pour les librairies 2H lancement de run 36H de run
MiSeq: Séquenceur très simple d'utilisation et d'entretien
- Technologies:** Chimie Illumina (SBS) fiable (faible taux d'erreurs)
Bonne reproductivité intra run
Longueur des reads proche de celle du 454 (hors XL+)
Nombre de reads très grand (Trop?)
- Coût:** 3 échantillons en Miseq pour le prix de 1 en 454
Gain de temps « hand on »

TECHNOLOGIE VALIDÉE POUR LA MÉTAGÉNOMIQUE

Plan de secours: GSFLX454



De validation:

- REPRODUCTIBILITÉ INTER RUN A TESTER
- VRAIE COMPARAISON MISEQ VS 454

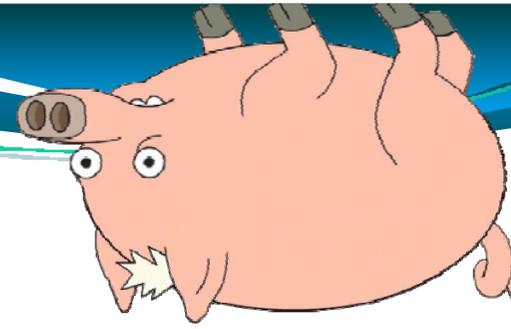
D'évolution technologique:

- NOMBRE D'INDEX PLUS IMPORTANT = PLUS D'ÉCHANTILLONS PAR RUN
180 disponibles prochainement?
- PASSAGE AU 2 X 300pb → Choix/Tests à faire Overlap plus grand ou séquences plus longues ?
- PASSAGE AU 2 X 300pb → Plus de reads OK si plus d'index
- FINALISATION DE NOTRE PIPELINE D'ANALYSE

MERCI À :



Get
Génome et
Transcriptome



Olivier Bouchez (*Chef NGS*)
Nathalie Marsaud (*ex-Chef Miseq*)
Sophie Valière (*Chef Miseq amplicons*)
Céline Jeziorski (*Chef Miseq pas amplicons*)

Pour les quelques mois de la mise au point du 16S...

...Et toute l'équipe des PlaGistes pour les 5 ans précédents.

vaiomer

Dr Michael Courtney (PDG de Vaimer)
Dr Benjamin Lelouvier (Chef du groupe Biologie Moléculaire)
Dr Florence Servant (Chef de l'unité Bioinformatique)
Et Céline Jean-Louis Gaëlle Manue Chantal Anne-Claire Carine et Sandrine



MERCI DE VOTRE ATTENTION