

Relevé de conclusions du Comité de plateforme GeT 05 novembre 2010

Présents : Jacques Batut, Hélène Berges, Olivier Bouchez, Nicolas Borot, Jean-Yves Bouet, Eric Delabesse, Cécile Donnadieu, Christophe Klopp, Véronique Le Berre, Jean José Maoret, Pascal Martin, Denis Milan, Olivier Neyrolles, Delphine Puertolas, Juliette Riquet, Nathalie Viguerie

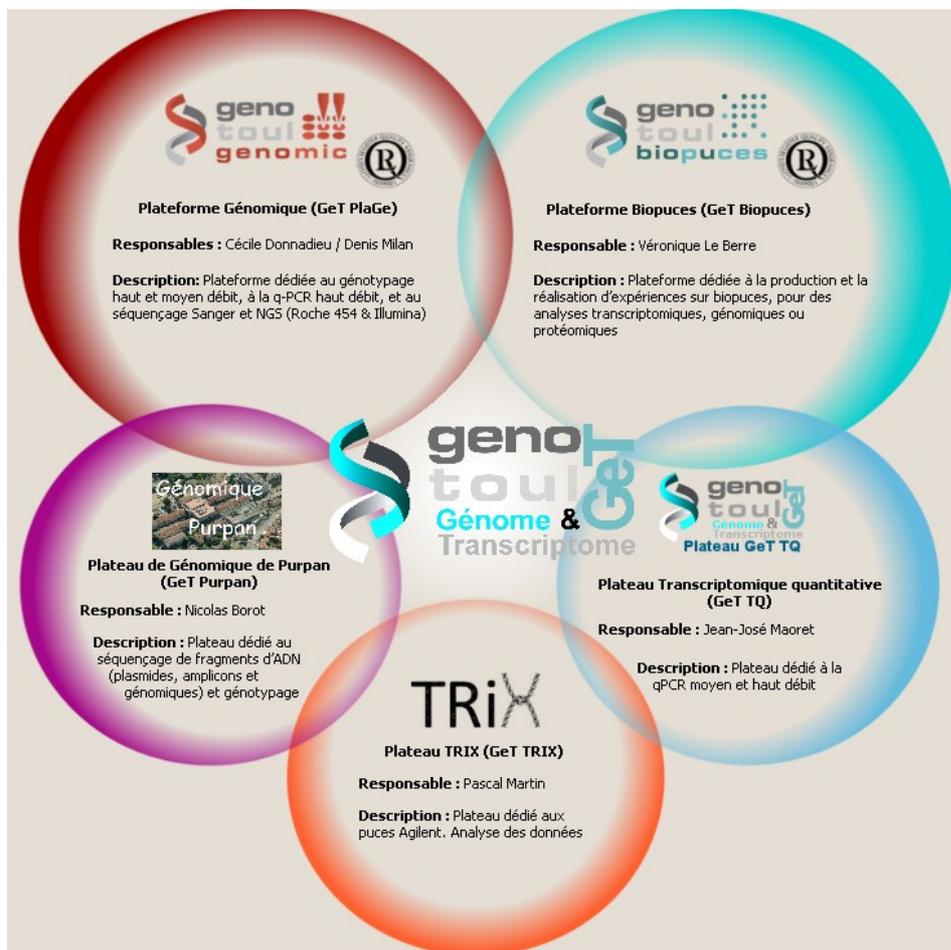
Excusé : Claude Chevalet

Absents : Pierre Brousset, Nicolas Chassaing

I - Présentation du nouveau périmètre de la plateforme – Denis Milan

Ce premier comité est le regroupement de plateformes et plateaux de génomique et transcriptomique de Toulouse qui ont décidé de se regrouper sous une même entité : Plateforme GeT (Génome et Transcriptome) – Cette nouvelle configuration entraîne la fusion des comités des anciennes plateformes PlaGe et Biopuces.

Voilà ci-dessous le nouveau périmètre de la plateforme GeT autour de 5 sites toulousains qui regroupera 23 personnes (titulaires, CDI's, CDD's).



Ce rassemblement devenait une évidence car Génomique et Transcriptomique sont de plus en plus proches à savoir :

- puces pour du génotypage ou du transcriptome
- PCR quantitative pour de l'expression ou du génotypage ?
- séquençage pour de l'ADN ou de l'ARN

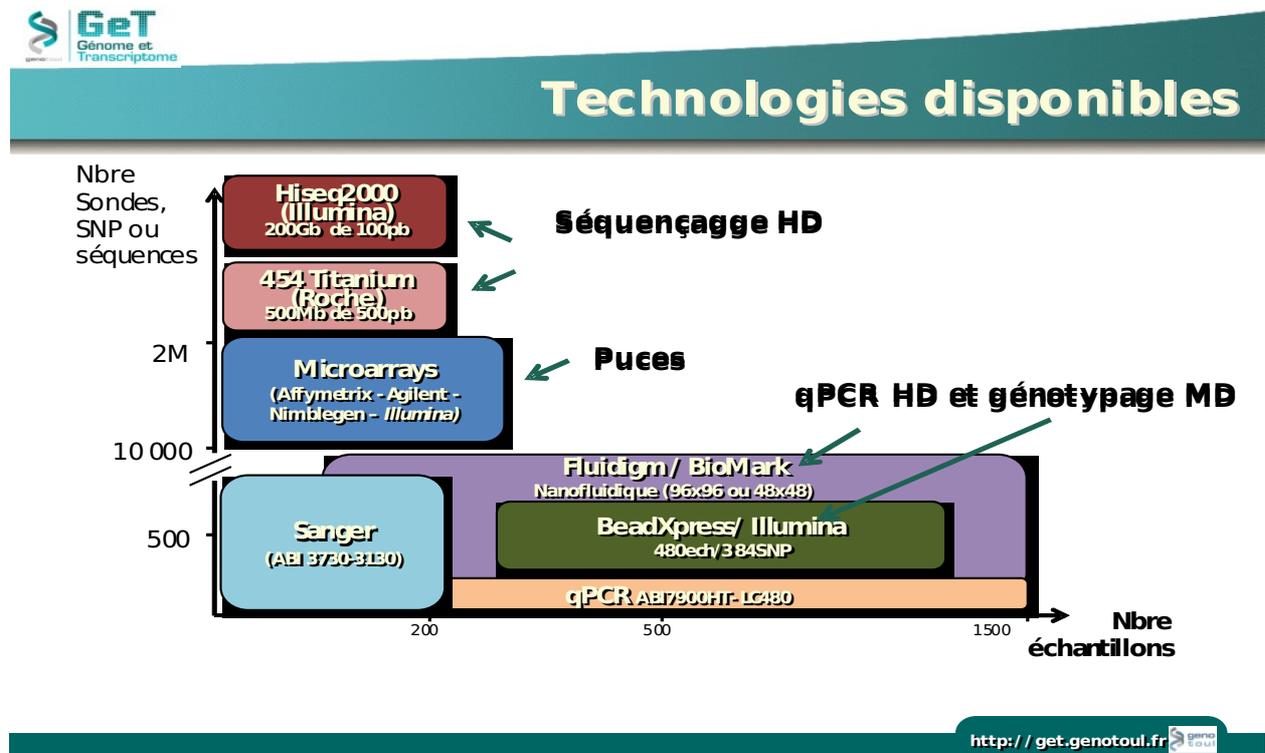
La plus value de ce regroupement permettra

- Une meilleure coordination des nouveaux investissements
- Une interaction dans la mise en place de nouvelles technologies
- Un partage de l'expertise de chacune des structures
- Une animation commune plus large.

La plateforme GeT est ouverte à tous les laboratoires publics ou privés, et propose :

- des projets en collaboration (type ANR, Région, Europe)
- des prestations de service
- la mise à disposition de machines soit par la formation d'un responsable technique par équipe ou laboratoire, la mise à disposition de matériels opérationnels
- le séquençage commun : réalisation des réactions de séquence ou le séquençage commun sur le ROCHE 454 GS FLX.

Les technologies disponibles s'articulent :



A tour de rôle les 5 responsables de plateaux présentent leur activité. Vous pourrez trouver sur le site <http://get.genotoul.fr> les exposés dans leur intégralité.

1 - Plateforme Get Biopuces - Véronique Le Berre – Site INSA

Plateforme dédiée à la production et la réalisation d'expériences sur biopuces, pour des analyses transcriptomiques, génomiques ou protéomiques. Elle est labellisée IBSA et certifiée ISO 9001 :2008 depuis mai 2010. Cette plateforme s'appuie, en terme de gestion, sur le SAIC de l' INSA.

Les microarrays utilisées sur cette plateforme font appel aux technologies Affymetrix, Nimblegen, Agilent ou puces par dépôts. Les domaines d'application s'articulant autour :

- Expression (mRNA – miRNA)
- Génotypage (CGH – hybridation génomique comparative ou CNV et SNP)
- chip on chip (Regulation de l'expression des gènes : épigénétique)
- capture de séquence (non validé)
- puces à protéines

2- Plateau TRiX – Pascal Martin – site de INRA – Toxalim - Saint Martin du Touch

Ce plateau est dédié aux puces Agilent et au service de proximité en qPCR pour la TGU Toxalim dont il dépend. De plus ce plateau développe des services en analyse statistique et intégration des données.

Il dispose de matériels pour l'extraction et QC des échantillons tels que :

- Fastprep 24 avecnCoolPrep sous sorbonne – MP bio (broyage RT ou froid)
- Biospec Nano – Shimazu (dosage / QC type Nanodrop)
- MultiNA-Shimazu (QC AND /ARN format 96 puits)
- Bioanalyseur 2100 – Agilent (QC ADN / ARN – 12 puits).

Mais également pour les puces Agilent :

- caisson anti-ozone – BioTray
- automate de pipetage
- four Agilent
- scanner Agilent (carrousel 48 lames, résolution 2 µm, gamme dynamique jusqu' à 10⁶, lecture des codes barres)
- scripts R d'analyse des données d'expression.

Ce plateau devrait récupérer de nouveaux locaux avant la fin de l'année. La validation du matériel est prévu d'ici en février 2011 et une mise en place du SI développé par PlaGe au cours du premier trimestre 2011. Le développement des services d'analyse d'expression se fera dès 2011.

3 - Plateforme Get PlaGe – Cécile Donnadieu – site INRA Auzeville

La plateforme est dédiée au génotypage haut et moyen débit, à la q-PCR haut débit, et au séquençage Sanger et NGS par le biais d'un séquenceur Roche 454 et HiSeq 2000 d'Illumina. Elle est labellisée IBSA et certifiée ISO 9001 :2000 depuis octobre 2008. Elle a un

partenariat fort avec la plateforme BioInformatique et devrait à moyen terme disposer d'une extension de bâtiment pour au total disposer d'une surface 450 m².

Les technologies développées sur cette plateforme s'appuient sur :

- BeadXPress – génotypage SNP
- Biomark de Fluidigm – PCR quantitative et SNP
- Roche GS FLX - séquençage HD
- Hiseq 2000 Illumina – séquençage THD – Il n'y a que 3 machines en France de ce type.

Pour résumer, la plateforme PlaGe prévoit :

- la finalisation de la mise en place de l'HISEQ
- l'acquisition de nouveaux outils dans le cadre du CPER – 2006-2012
- l'extension du bâtiment
- le développement de l'expertise autour de NGS en partenariat avec la plateforme BioInformatique, le développement de la préparation des librairies, ainsi que le développement des technologies d'enrichissement (exome capture, RainDance, Access array)
- faire de la veille technologique autour des machines dites de 3^{ième} génération.

La plateforme est également partie prenante dans les projets « Infrastructures distribuées InDiGen » et « équipements d'excellence – PHENEX » déposés dans le cadre du Grand Emprunt

4 – Plateau GeT Purpan - Nicolas Borot – IFR BMT - site Hopital Purpan

Ce plateau est dédié au séquençage de fragments d'ADN (plasmides, amplicons et génomique) et génotypage. Il dispose de matériel type :

- séquenceur Applied Biosystems 3130XL
- thermocycleurs Applied Biosystems 2700 et 9600
- Bioanalyseur Agilent 2100 en libre service

L'activité de ce plateau s'articule autour de séquences totales, séquences dépôts ?, séquence plaque et génotypages. Ces activités sont en constante augmentation mais reste fragile car il n'y a qu'un seul agent titulaire; les deux autres personnes sont vacataires INSERM

5 – Plateau TQ – Transcriptomique Quantitative –Jean-José Maoret – site Hopital Rangueil

Ce plateau est dédié à la quantification par qPCR moyen et haut débit. Une seule personne a en charge cette activité qui tourne autour :

- contrôle qualité et quantification des Acides Nucléiques : Nanodrop et Exépérion (Biorad)
- qPCR : 1 ABI 750 Fast, 2 ABI Stepone, 1 ABI 7900 HT Fast équipé d'un bloc Low Density Array Applied
- responsable technique pour les projets qPCR haut débit sur Biomark Fluidigm.

En termes de perspective et de développement, ce plateau s'oriente :

- vers une implication plus importante dans GeT-PlaGe en termes de gestion et de réalisation de projets QPCR à haut débit pour les équipes de l'IFR 150
- vers la mise en place d'un poste informatique équipé de logiciels d'analyse et de statistiques concernant les résultats de qPCR moyen et haut débit (prévu en novembre 2010)
- le test et la mise au point de la technique « taqman protein assay » permettant la quantification de protéines sur un appareil de qPCR.

A l'issue de ces présentations Denis Milan a tenu à rappeler que de manière générale, la plateforme GeT ne fait pas de la concurrence aux entreprises privées mais se positionne en complémentarité. Il faut trouver des axes où l'on apporte de l'innovation.

II – Les NGS (Présentation de Olivier Bouchez)

Les séquenceurs de 2^{ème} génération actuellement sur le marché les suivants :

- Genome Analyser IIX (solexa /Illumina)
- HiSeq 2000 (Illumina)
- Solid (Applied Biosystem)
- HeliScope (Helicos BioScience Corporation)
- GSFLX (454/Roche)

Sont disponibles sur Auzeville un GS FLX et un Hiseq2000.

Se pose alors la question de « Pourquoi deux séquenceurs HD ? »



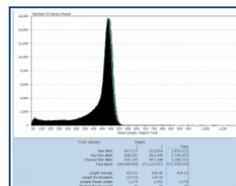
Séquençage sur le Roche 454 GS FLX

Spécifications :

- **1.2 M** de séquences/run
- Longueur moyenne des séquences : **450 pb**
- **500 Mb**/run
- Lames 2, 4, 8 et 16 régions
- Chimie **Titanium**
- Possibilité de réaliser des **multiplexages**

Applications:

- Séquençage **de novo**
- **Reséquençage** de régions d'intérêt (par LR-PCR ou capture de séquences Nimblegen)
- **Transcriptomique**
- Analyses **Epigénétiques** (Etudes de Méthylation)
- Analyses **Métagénomiques**



Roche 454 GS FLX

Depuis février 2009 :

- 60 runs réalisés
- 30 équipes différentes

Tarifs :

- ~10000 € /run 2 régions
- ~2000 € 1/8 run
- ~170 € /librairie

Depuis octobre 2009 : mise en place de runs de séquençage commun où différentes équipes peuvent passer sur le même run (8 régions).

Prévision : **1 run/mois ⇒ 6 runs réalisés**



HiSeq2000 (Illumina)

- 3^{ème} machine installée en France, en cours de validation par le fournisseur
- Technologie « sequencing by synthesis »
- Possibilité de multiplexage
- Applications :
 - séquençage de novo
 - re-séquençage génomes entiers/régions candidates
 - analyses épi génétiques
 - ChiP-seq
 - analyses transcriptomiques
 - identification et quantification de petits ARN
- Single read :
 - 100 Gb/run
 - Read size : 100 pb
 - 1 run = 4 jours
- Paired-end reads :
 - 200 Gb/run
 - Read size : 2x100 pb
 - 1 run = 8 jours

HiSeq2000 (Illumina)

- ✓ En cours de validation
- ✓ Formation en novembre, puis début de la phase pilote
- ✓ Fin de la validation ADNg : février 2011
- ✓ Début de validation mRNA-seq : février 2011
- ✓ Ouverture machine prévue vers juillet 2011

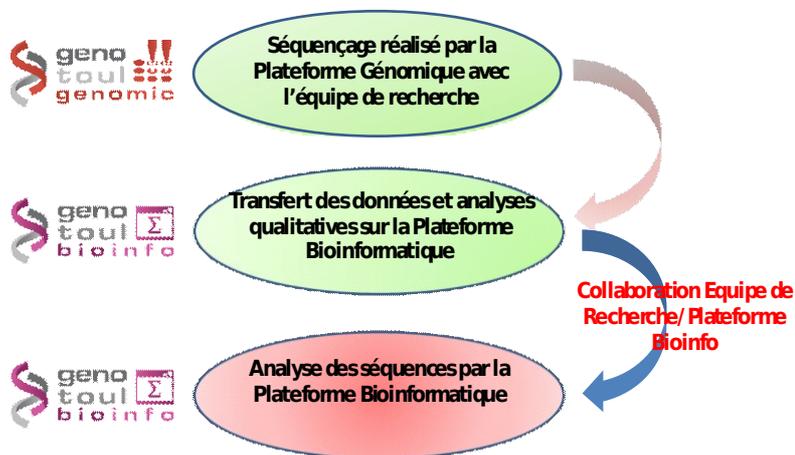


➤ Tarifs : ~10000 € / flowcell (=1/2 run) pour 1 librairie
1 librairie => 400 €

➤ Nouveaux protocoles bientôt disponibles

<http://get.genotoul.fr>

Séquençage THD : Réalisation et analyse



<http://get.genotoul.fr>

III – Discussion

A l'issue de ces présentations, il apparaît évident que tous les projets énoncés sont générateurs de besoins en 'ETP's. Sachant que les postes d'ITA sont difficiles à obtenir, il faut trouver une alternative ou des alternatives. Une piste est d'abonder du financement CDD's et c'est à

la plateforme de mutualiser pour avoir une personne à temps plein en continu. On a déjà ce type d'exemples via les SAIC tant de l'INP que de l'INSA.

Denis Milan fait part d'une des stratégies de son département : un ingénieur d'étude a été positionné sur la plateforme PlaGe et il est saturé par des programmes hors Toulouse (Rennes, Jouy,...).

Les grands programmes du grand Emprunt nous permettront de passer à une autre échelle. Il faut être capable d'adapter le nombre de personnel disponible en fonction de l'évolution de la plateforme. On se retrouve dans le public à devoir titulariser des personnels si on ne veut pas perdre de la compétence.

Il faut des CDD's longue durée (3 ans), en cumulant des ANR'S, pour garantir cette compétence et laisser le temps de construire des stratégies de pérennisation de poste.

La difficulté est d'arriver à trouver un équilibre entre la mutualisation entre sites et la proximité des équipes de recherche pour le matériel utilisé très souvent. Il faut éviter d'avoir à trop d'endroit des matériels qui ne fonctionnent pas ou qui sont sous-utilisés.