



CATALOGUE DE NOS PRESTATIONS

PRESENTATION DE LA PLATE-FORME.....	3
DEFINITION DE LA PRESTATION	3
PRESTATIONS PROPOSEES.....	3
PREPARATION ADN A PARTIR DE MATERIEL VEGETAL	3
GENOTYPAGE SNP	3
GENOTYPAGE SSR	3
SEQUENÇAGE.....	3
ETUDE D'EXPRESSION SUR PUCE FLUIDIGM	4
MISE A DISPOSITION DU MATERIEL PLATEFORME	4
PREPARATION ADN A PARTIR DE MATERIEL VEGETAL.....	5
BROYAGE ET EXTRACTION AU METABISULFITE A PARTIR DE MATERIEL VEGETAL	5
<i>Broyage</i>	5
<i>Extraction</i>	5
BROYAGE ET EXTRACTION SBEADEX OKTOPURE LGC GENOMICS	6
<i>Broyage</i>	6
<i>Extraction</i>	6
GENOTYPAGE SNP	7
GENOTYPAGE PAR LA CHIMIE KASPAR COUPLEE A UNE LECTURE AU LC480	7
<i>Principe de la technologie</i>	7
<i>Descriptif de la manipulation</i>	7
GENOTYPAGE PAR LA CHIMIE KASPAR COUPLEE A UNE LECTURE AU BIOMARK.....	8
<i>Principe de la technologie</i>	8
<i>Descriptif de la manipulation</i>	8
GENOTYPAGE SNP ULTRA HAUT DEBIT AXIOM AFFYMETRIX LECTURE GENETITAN	9
<i>Principe de la technologie</i>	9
<i>Descriptif de la manipulation</i>	9
GENOTYPAGE SSR.....	11
MARQUAGE DIRECT OU MARQUAGE M13 EN PLAQUE 384	11
<i>Préparation des plaques de dilution</i>	11
<i>Préparation des plaques de travail en 384</i>	11
<i>Préparation et distribution du Mix PCR</i>	11
SEQUENCAGE	13
MISEQ ILLUMINA	13
<i>Principe</i>	13
ETUDE D'EXPRESSION SUR PUCE FLUIDIGM	14
<i>Principe de la technologie</i>	14
<i>Descriptif de la manipulation</i>	14
TRANSMISSION DES RESULTATS QUELQUE SOIT LA TECHNOLOGIE	14
STOCKAGE DES DONNEES ET DES ECHANTILLONS.....	15
MISE A DISPOSITION DU MATERIEL	15
<i>Organisation</i>	15
<i>Équipements</i>	15

Présentation de la plate-forme

La plate-forme propose un large éventail de technologies, du **Génotypage Microsatellites (SSR)** avec un séquenceur 96 capillaires ABI 3730XL, au **Génotypage de SNP** (Single Nucleotide Polymorphism), en simplex (chimie KASPar sur le LC480, en micro fluidique sur le Fluidigm de Biomark), ou en multiplex (technologie d'hybridation sur puce Affymetrix Axiom). L'autre part de son activité est consacrée au **Séquençage NGS**, avec le séquenceur MiSeq Illumina. Elle offre le choix d'un séquençage de novo de petit génome entier, de mélanges de génomes, de BACs ou de reséquençage de régions d'intérêt (amplicons).

Les équipements critiques ayant été identifiés, sont sous contrat de maintenance fournisseur ou répondent à un programme de maintenance défini et effectué par le personnel habilité de la plate-forme.

Définition de la prestation

Une discussion avec le responsable permet d'optimiser la stratégie d'analyse en fonction des besoins du client et des outils disponibles. Cet échange conduit à la rédaction d'une fiche demande de prestation qui sert de base à un devis.

Après acceptation du devis, une fiche de recommandations de préparation et d'envoi des échantillons est envoyée au client afin de porter à sa connaissance les précautions à respecter.

Un code est attribué à la prestation, ce dernier et le numéro de l'échantillon correspondant à la fiche de transfert sont notés sur le tube/plaque à chaque étape. Ce code projet est à rappeler dans l'objet de chacune de nos correspondances électroniques. Un membre de l'équipe plate-forme est identifié comme responsable de l'analyse. L'expertise des personnels de la plate-forme leur permet d'effectuer un contrôle de premier niveau des résultats.

A la fin de la prestation, un bilan des manipulations est effectué par l'équipe et une pré-facture est établie. Cette pré-facture est transmise au client qui devra nous envoyer un bon de commande correspondant.

Afin de d'optimiser sans cesse nos prestations, un questionnaire de satisfaction client sera envoyé annuellement.

Prestations proposées

Préparation ADN à partir de matériel végétal

1. Broyage et Extraction au Metabisulfite à partir de Matériel Végétal
2. Broyage et Extraction sbeadex Oktopure LGC Genomics

Génotypage SNP

1. Chimie KASPar couplée à une lecture au LC480
2. Chimie KASPar couplée à une lecture au Biomark
3. Hybridation sur Axiom Affymetrix

Génotypage SSR

Séquençage

1. MiSeq Illumina

Etude d'expression sur puce Fluidigm

Mise à disposition du matériel plateforme

Modalités d'accès au matériel de la plateforme pour les personnels permanents et non permanents de l'unité.

Préparation ADN à partir de matériel végétal

Broyage et Extraction au Metabisulfite à partir de Matériel Végétal

Nous contrôlons le matériel végétal afin qu'il réponde aux exigences de la plate-forme, s'il n'est pas conforme nous contactons le client afin de définir la conduite à tenir.

Broyage

Le matériel végétal est broyé mécaniquement, après immersion dans l'azote liquide, afin d'obtenir une poudre très fine nécessaire pour l'extraction d'ADN. Il est important de noter si des puits se sont cassés lors du broyage car ceux-ci ne généreront pas de résultats et seront considérés comme données manquantes. Cette information est signalée au client qui décide de nous renvoyer ou pas du matériel, ou de poursuivre l'extraction.

Extraction

Nous allons procéder à la lyse des composés cellulaires en ajoutant le tampon de lyse puis incubation à 95°C. Nous vérifions que les volumes sont bien homogènes dans tous les puits, si ça n'est pas le cas, nous ajustons les volumes.

Nous centrifugeons à 4000g pour pouvoir récupérer le surnageant contenant l'ADN que nous transférons dans une autre plaque pour précipiter l'ADN.

Une fois l'ADN culoté nous faisons un lavage pour purifier l'ADN. Ces étapes se font par retournement de la plaque avec le risque de perdre le culot, si cela se présente noter le puits vide et signaler au client qu'il n'y aura pas de résultats pour cet échantillon.

Le dosage de l'ADN une fois repris dans le tampon nous permettra de quantifier les échantillons et selon la technique appliquée sur ces échantillons nous ferons une dilution ou une concentration par évaporation. Le dosage de l'ADN se fait soit au Hoechst, un agent intercalant de l'ADN, soit en UV sur une nanoquant, à l'aide d'un spectro fluorimètre à plaque Tecan Infinite 1000 (sous contrat de maintenance).

Broyage et Extraction sbeadex Oktopure LGC Genomics

Nous contrôlons le matériel végétal afin qu'il réponde aux exigences de la plate-forme, s'il n'est pas conforme nous contactons le client et nous décidons de la conduite à tenir.

Broyage

Le matériel végétal est broyé mécaniquement, après immersion dans l'azote liquide, afin d'obtenir une poudre très fine nécessaire pour l'extraction d'ADN. Il est important de noter si des puits se sont cassés lors du broyage car ceux-ci ne généreront pas de résultats et seront considérés comme données manquantes. Cette information est signalée au client qui décide de nous renvoyer du matériel, ou de poursuivre l'extraction.

Extraction

Les étapes post broyage se déroulent pour partie sur robot Oktopure LGC Genomics. Les réactifs utilisés font partie des kits Sbeadex Plant Extraction. Les quantités des différents réactifs sont ajustées en fonction des espèces traitées. Nous allons procéder à la lyse des composés cellulaires en ajoutant le tampon de lyse dans les échantillons. Nous vérifions que le volume soit bien homogène dans tous les puits sinon nous ajustons le volume. (échantillons placés une heure à 60°C pour lyse).

L'extraction se fait dans l'Oktopure avec un kit sbeadex, ce kit peut être gardé à température ambiante jusqu'à la date de péremption. L'ADN se fixe sur les billes magnétiques, subi deux cycles de lavage et sera élué dans la plaque d'éluion puis dosé.

GENOTYPAGE SNP

Génotypage par la Chimie KASPar couplée à une lecture au LC480

Principe de la technologie

La chimie KASPar permet de réaliser du génotypage SNP en simplex. Elle repose sur l'utilisation d'assays comprenant 3 amorces ; 2 étant allèles spécifiques et l'autre commune. L'amplification spécifique de chaque allèle est alors couplée à une émission de fluorescence particulière.

La fluorescence est détectée par le Light Cycler 480 de Roche via un protocole de lecture en point final, permettant d'acquérir les données de génotypage.

Descriptif de la manipulation

Réception des échantillons

A la réception des échantillons, un contrôle visuel et/ou technique du conditionnement des échantillons et des échantillons eux-mêmes.

Dans le cas de matériel végétal non extrait, la correspondance entre les plans de plaques fournis au préalable et celui observé pour le matériel reçu est évalué (correspondance avec les puits vides). Nous évaluons aussi visuellement la quantité et la qualité du matériel réceptionné.

Pour des échantillons où l'ADN est déjà extrait, nous vérifions le volume d'ADN contenu dans les plaques (visuellement et par pipetage si nécessaire).

Si l'un des critères n'est pas respecté, nous contactons alors le client afin de convenir ensemble de la marche à suivre : soit un nouvel envoi sera réalisé, soit nous continuons la manipulation.

Répartition de l'ADN en plaque 384

L'ADN est réparti dans des plaques 384 blanches de manière robotisée.

Préparation et distribution du mix PCR

Les mix d'amorces et les mix PCR sont préparés manuellement puis distribués dans les plaques contenant l'ADN de manière robotisée.

PCR

L'amplification est réalisée sur des thermocycleurs selon un programme prédéfini.

Lecture au LC480

L'acquisition des données de fluorescence se déroule sur le LC480 de Roche.

Nous visualisons alors les profils obtenus pour déterminer s'il est nécessaire de rajouter des cycles .

Si les résultats ne nous semblent pas satisfaisants, le client sera alors contacté pour définir la conduite à tenir.

Les plaques PCR sont jetées une fois le lien transmis au client.

Génotypage par la Chimie KASPar couplée à une lecture au Biomark

Principe de la technologie

La chimie KASPar permet de réaliser du génotypage SNP en simplex. Elle repose sur l'utilisation d'assays comprenant 3 amorces ; 2 étant allèles spécifiques et l'autre constante. L'amplification spécifique de chaque allèle est alors couplée à une émission de fluorescence particulière.

L'ADN et les réactifs nécessaires à l'amplification sont distribués dans des puces IFCs (Integrated Fluidic Circuits) disponibles sous 2 formats (48 x 48 ou 96 x 96). L'amplification et la détection du signal de fluorescence sont réalisées dans le Biomark de Fluidigm.

Descriptif de la manipulation

Réception des échantillons

A réception des échantillons, nous nous assurons que ces derniers respectent les exigences définies dans la « feuille de recommandation pour la préparation et l'envoi des échantillons » en réalisant un contrôle visuel et/ou technique du conditionnement des échantillons et des échantillons eux-mêmes. Nous vérifions également que la plaque contient un puits vide qui nous servira de témoin négatif.

Dans le cas de matériel végétal non extrait, la correspondance entre les plans de plaques fournis au préalable et celui observé pour le matériel reçu est évaluée (correspondance entre les puits vides). Nous évaluons aussi visuellement la quantité et la qualité du matériel réceptionné.

Pour des échantillons où l'ADN est déjà extrait, nous vérifions le volume d'ADN contenu dans les plaques (visuellement et par pipetage si nécessaire) et on réalise la quantification de plusieurs échantillons pris au hasard dans la plaque (généralement sur 1/6^{ème} des échantillons) par un dosage UV.

Si l'un des critères n'est pas respecté, nous contactons alors le client afin de convenir ensemble de la marche à suivre : soit un nouvel envoi sera réalisé, soit nous continuons la manipulation.

Préparation des mix

Les différents mix sont préparés manuellement dans une plaque 96, en évitant de faire des bulles.

Préparation de la puce

Vérification de la conformité de la puce par injection d'huile puis mise sous pression.

La puce est soit utilisée dans l'heure qui suit pour être chargée, soit elle peut être conservée 24h à 4°C. Dans ce dernier cas, elle est à nouveau mise en pression avant utilisation.

Les différents mix sont injectés dans la puce. Aucune bulle ne doit avoir été générée, celles-ci sont source de données manquantes.

PCR

L'amplification est réalisée dans le Biomark de Fluidigm.

Avant de lancer la puce, nous la nettoyons afin d'éviter la présence de poussière, gênant la lecture.

Lecture au Biomark

L'acquisition des données de fluorescence se déroule sur le Biomark de Fluidigm.

Nous visualisons alors les profils obtenus pour déterminer si l'amplification a bien fonctionné, en tenant compte de l'intensité du signal de fluorescence et de la bonne séparation des clusters obtenus pour les échantillons et celui obtenu pour le puits contrôle « négatif ».

Si les résultats ne nous semblent pas satisfaisants (mauvaise séparation des clusters), le client sera alors contacté pour définir la conduite à tenir.

Les puces sont jetées après lecture.

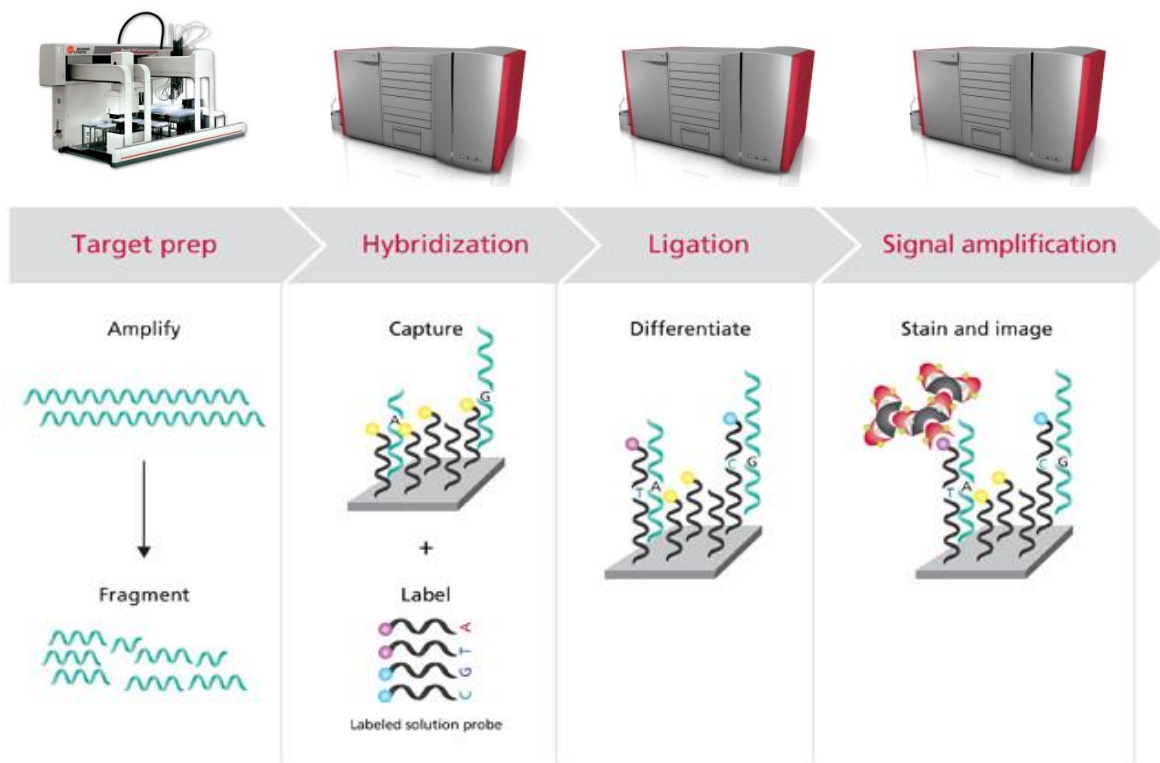
Génotypage SNP Ultra haut débit Axiom Affymetrix lecture Genetitan

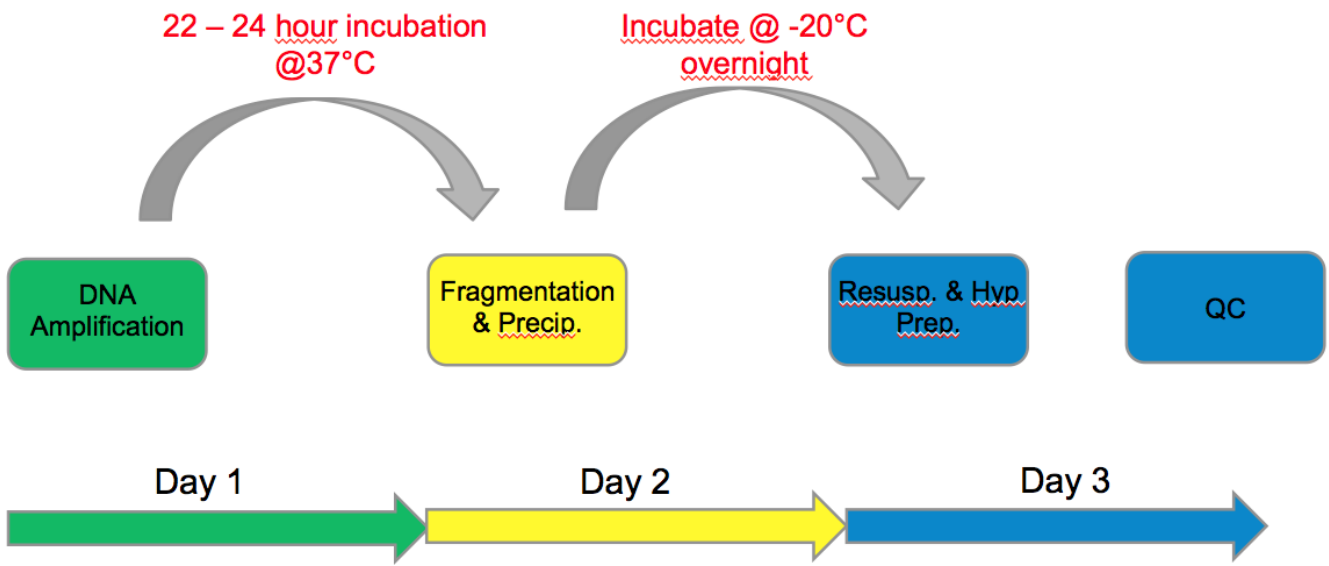
Principe de la technologie

Le Genetitan Affymetrix permet de réaliser du génotypage SNP par hybridation sur puce. Elle repose sur l'utilisation de GeneChip fournis par Affymetrix, espèce dépendante. Affymetrix dispose d'un catalogue de puce mais permet également la synthèse de puce à façon. Les formats de puce disponible vont de 24 à 384 individus génotypés par puce et de 1500 à 2,6 millions de SNP par individu. La lecture des puces se fait sur Genetitan MC à raison de 760 échantillons par semaine. La préparation des échantillons avant hybridation est robotisée sur FxP Beckman.

Avec le support d'ingénieur application Affymetrix, nous proposons la formation de nos clients à l'analyse de leurs résultats. L'analyse se fait à l'aide de 3 logiciels fournis, Genotyping Control et/ou Affymetrix Power Tools pour les contrôles qualités et SNP Polisher pour l'analyse du génotypage.

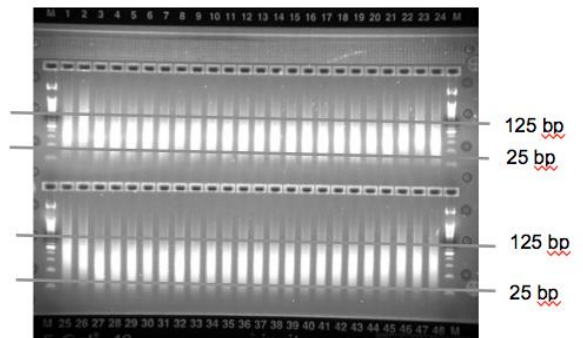
Descriptif de la manipulation





✓ **DNA Fragmentation**

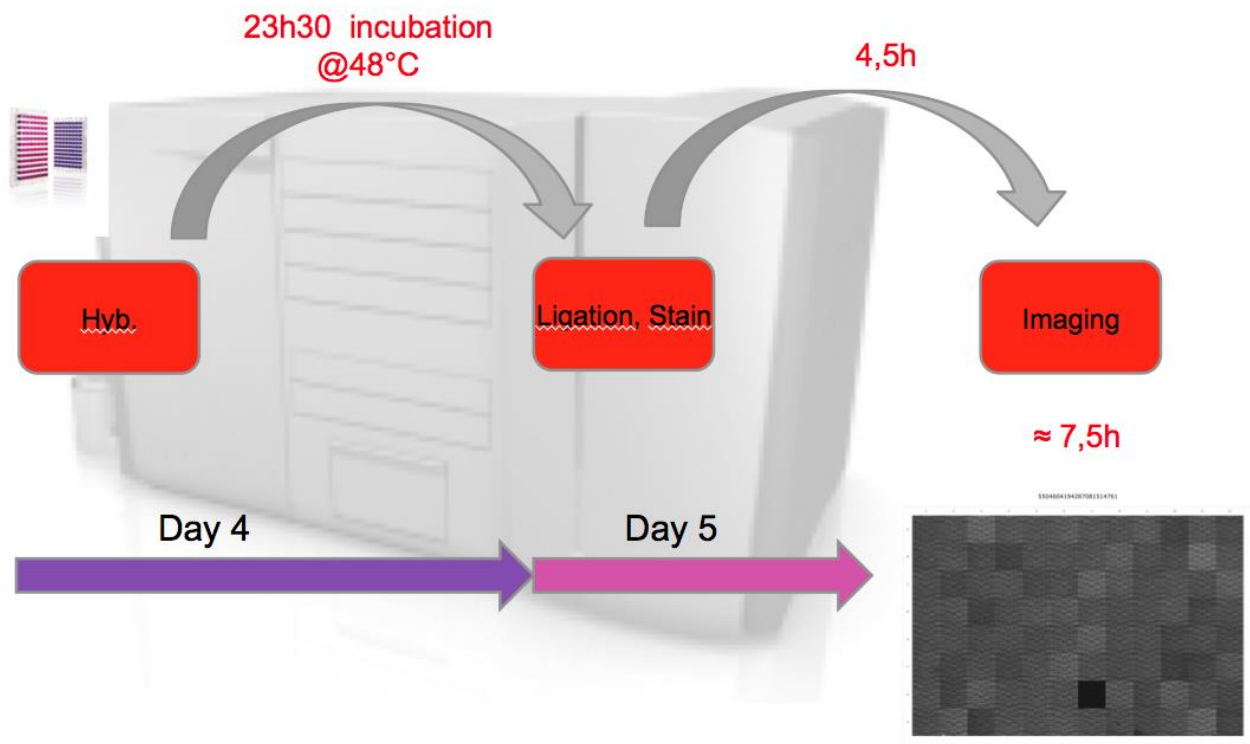
Use 4% E-gel, DNA should be between 25bp – 125 bp



✓ **DNA Yield**

OD 260 nm, 280 nm and 320 nm on Tecan Infinite 1000
The yield must be > 1200µg





GENOTYPAGE SSR

Marquage Direct ou Marquage M13 en plaque 384

Préparation des plaques de dilution

Pour le marquage SSR, les ADNs doivent être à la concentration de 10ng/μl et seront dilués ou concentrés par évaporation si besoin.

Si nous réalisons l'extraction, les échantillons sont systématiquement dosés en absorbance.

Si les échantillons sont fournis par le client, ces derniers sont dosés à la demande.

Préparation des plaques de travail en 384

Les plaques de travail sont préparées sur le robot qui distribue les échantillons selon l'ordre désiré et noté avec la date et le N° de prestation, nous vérifions que le volume est homogène sinon nous recommençons la distribution.

Préparation et distribution du Mix PCR

- **Le mix PCR** est préparé en fonction de la technique utilisée, soit en fluo M13 ou marquage direct, ce mix est distribué au robot selon le programme choisi, nous contrôlons le volume distribué, si tous les puits sont remplis, si ce n'est pas le cas nous corrigeons le volume. La plaque est placée dans un thermocycleur pour effectuer une amplification de l'ADN qui se déroule en plusieurs étapes :

- **dénaturation de l'ADN** : c'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue par élévation de la température à 95°C.
- **hybridation** : en abaissant la température à une température spécifique aux amorces, les amorces spécifiques s'hybrident sur les molécules simples brin d'ADN. Les amorces sont constituées de courtes séquences d'ADN complémentaires de la séquence de l'ADN à amplifier.

- **élongation** : à 72°C c'est la synthèse du brin complémentaire. Une enzyme polymérase (la Taq polymérase), ajoute à l'extrémité de l'amorce des nucléotides (dNTPs) présents dans le milieu réactionnel.

A la fin du cycle la plaque est diluée avec de l'eau pour être ensuite lu par le séquenceur capillaire la migration est vérifiée à l'aide d'un témoin de taille introduit dans la plaque.

Réception, préparation des plaques dépôt et lancement du séquenceur

A la réception des plaques PCR, nous contrôlons différents points :

- La présence de la fiche de transfert, l'état physique des plaques, contrôle visuel de l'homogénéité du remplissage (10µl de produit PCR minimum. En cas de volume insuffisant, nous ajoutons un volume d'eau Milli-Q).
- Ces différents points de contrôle sont ensuite reportés dans une fiche de contrôle à réception. Le client est prévenu en cas d'anomalie.

A partir des plaques PCR reçues, en suivant les plans de plaques, nous préparons les plaques 384 de dépôt séquenceur :

- Contrôle de la correspondance entre les noms de plaque et le plan.
- Mise en place sur le robot de pipetage, selon le programme convenant au type de dépôt :
 - o Dans le cas de plaques PCR 96, positionnement chronologique selon la destination dans la plaque 384 de dilution (par quart : A1, B1, A2, B2)
 - o Positionnement des plaques de dilution et de dépôt
 - o Distribution selon la dilution choisie par le client
 - o Dépôt de cette dilution dans la plaque de run, contenant un mélange de formamide et marqueur de taille (défini avec le client)

A l'issue du dépôt, les plaques de dépôt sont dénaturées sur thermocycleur (10mn à 95°C).

- Nous créons la ou les feuilles de route selon le ou les plans reçus du client.
- Nous importons les feuilles de route associées à ces plaques dépôt, et contrôlons la correspondance entre le nom de la feuille et la plaque.
- Les plaques sont ensuite chargées dans le séquenceur, pour génotypage.
- L'identité des plaques, la date, l'opérateur et le numéro de prestation sont tracés.
- La vérification des résultats sortis du séquenceur, est faite selon les critères suivants :
 - o Qualité du marqueur de taille (aspect et intensité)
 - o Qualité des marqueurs génotypés (définition et intensité)
- Ces données sont compressées, et déposées sur un serveur, un lien de téléchargement est envoyé au client qui dispose alors de 9 jours pour récupérer ces résultats.

SEQUENCAGE

MiSeq Illumina

Principe

Le séquenceur MiSeq Illumina vous permet d'accéder à des applications plus ciblées telles que le séquençage ciblé de gènes, la métagénomique, séquençage de petit génome, l'étude d'expression de gènes ciblés, le séquençage d'amplicons, et le typage HLA. Les nouveaux réactifs MiSeq permettent jusqu'à 15 Gb de sortie avec 25 Millions de reads en 2x300 pb.

Les qualités et quantités d'ADN initiales sont définies entre notre spécialiste NGS Véronique Gautier et le client conformément aux préconisations Illumina.

Chaque application sur le MiSeq donne lieu à une étude de faisabilité de la plateforme et un devis précis selon la spécificité de la demande. Nous bénéficions du support application Illumina pour la mise en place de nouveaux protocoles Illumina MiSeq.

Résultats

Les résultats sont rendus, soit sans traitement au client qui désire lui-même faire les analyses, soit après un premier assemblage avec les critères de qualité de cet assemblage.

Une demande de logiciel gratuit auprès d'Illumina peut-être faite sur internet. Ce logiciel doit être installé sur une configuration Windows 7.

ETUDE D'EXPRESSION SUR PUCE FLUIDIGM

Principe de la technologie

L'objectif est de quantifier l'expression de gènes à l'aide de l'intercalant de l'ADN EvaGreen sur le Biomark (Fluidigm).

Descriptif de la manipulation

Réception des échantillons

A réception des échantillons (ADNc et primers), nous nous assurons que ces derniers respectent les exigences définies dans la « feuille de recommandation pour la préparation et l'envoi des échantillons » en réalisant un contrôle visuel et/ou technique du conditionnement des échantillons et des échantillons eux-mêmes. Nous vérifions également que la plaque d'ADNc contient six puits vides qui seront utilisés pour les contrôles internes et la plaque de primers contient 1 puits vide pour l'amorce RNase P contrôle.

Si l'un des critères n'est pas respecté, nous contactons alors le client afin de convenir ensemble de la marche à suivre : soit un nouvel envoi sera réalisé, soit nous continuons la manipulation.

Préparation des mix

Les différents mix sont préparés manuellement dans une plaque 96, en évitant de faire des bulles.

Préparation de la puce

Vérification de la conformité de la puce par injection d'huile puis mise sous pression.

La puce est soit utilisée dans l'heure qui suit pour être chargée, soit elle peut être conservée 24h à 4°C. Dans ce dernier cas, elle est à nouveau mise en pression avant utilisation.

Les différents mix sont injectés dans la puce. Aucune bulle ne doit avoir été générée, celles-ci sont source de données manquantes.

PCR quantitative

L'amplification est réalisée dans le Biomark de Fluidigm.

Avant de lancer la puce, nous la nettoyons afin d'éviter la présence de poussière, gênant la lecture.

Lecture au Biomark

L'acquisition des données de fluorescence se déroule sur le Biomark de Fluidigm.

Nous visualisons alors les profils obtenus pour déterminer si l'amplification a bien fonctionné.

Si les résultats ne nous semblent pas satisfaisants (contrôle interne ADNc et amorce RNase P), le client sera alors contacté pour définir la conduite à tenir.

Les puces sont jetées après lecture.

Transmission des résultats quelque soit la technologie

Les résultats bruts sont déposés sur un serveur informatique, le lien est alors transmis au client par mail. Les données sont alors téléchargeables dans les 15 jours suivants.

Stockage des données et des échantillons

La conservation des échantillons tout au long de la prestation est définie par nos protocoles. La durée de conservation des échantillons est définie avec le client dans la fiche de demande de prestation (conservation standard de 3 mois sans garantie).

Concernant le stockage des données informatiques, celles-ci seront conservées en standard 3 mois (sans garantie).

Mise à disposition du matériel

Organisation

Avant chaque arrivée de personnel nouveau sur la plateforme, une fiche de demande d'utilisation de la plateforme doit être remplie et transmise au responsable de la plateforme.

A partir de cette demande, une date de formation est décidée, et le programme défini en fonction des besoins.

La formation est tracée et suivie sur la fiche « Evaluation de la Formation ». Une évaluation du stagiaire est effectuée et enregistrée sur cette fiche. Si celui-ci répond aux critères d'évaluation, il est habilité à manipuler le matériel pour lequel il a été formé.

Équipements

Les équipements mis à disposition sont :

Pour la salle d'extraction : un bain marie, les broyeurs, le robot d'extraction d'ADN.

Pour la salle développement technologique : appareil de fragmentation d'ADN (Covaris), un système de migration d'ADN sur puce (Tape Station Agilent), un évaporateur concentrateur, un système de dosage Qubit.

Pour la salle de préparation des mixes PCR : trois robots de pipetage, le système d'eau ultra-pure, la scelleuse automatique, 4 centrifugeuses.

Pour la salle ADN : un robot de pipetage, un spectro fluorimètre.

Pour la salle post-PCR : un robot de pipetage, une centrifugeuse, deux PCR en temps réel.

Dans toutes ces salles, les pipettes sont mises à disposition. Ces pipettes sont contrôlées chaque année.