

Place et avenir du séquençage haut-débit

Olivier Bouchez

<http://get.genotoul.fr>
genomique@toulouse.inra.fr



La Plateforme GeT

- Expertise et mise à disposition d'une plateforme technologique en génomique :**
 - Séquençage
 - Génotypage
 - Analyse d'expression
- Regroupement** des 2 plateformes IBiSA (PlaGe et Biopuces) et des 3 plateaux toulousains



Plateforme Génomique

- Plateforme en place dès **2000** (création de la Génopole)
- Plateforme **RIO** en **2006** puis **IBiSA 2008**
- Plateforme **stratégique INRA** (une des neuf) en **2008**
- Plateforme certifiée **ISO 9001:2000** en octobre **2008**



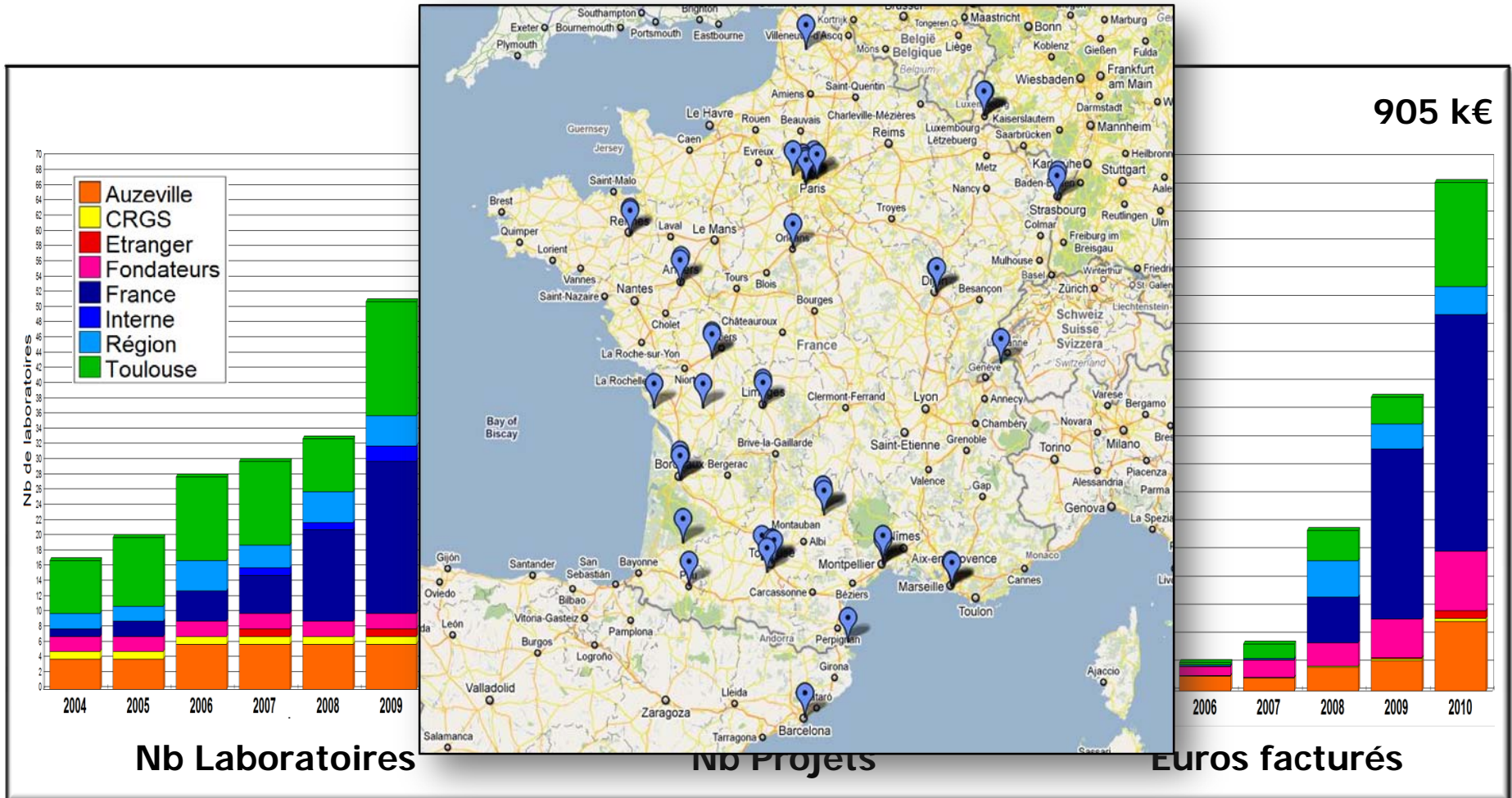
- Bâtiment 250 m² en 2008, qui sera étendu à **500 m² en 2013**



- **Un partenariat avec la plateforme Bioinformatique**



Indicateurs d'activité de PlaGe





GET
Génome et
Transcriptome

Les technologies actuelles de séquençage nouvelle génération

Life technologies



SOLID™ 5500 (XL)

Séquençage par ligation
2 flowchips
Longueur :
75 bp (fragment)
75 bp x 35 bp (paired-end)
Up to 60 bp x 60 bp (mate-paired)
Débit : 90 Gb/flowchip
Temps de run : 7 jours



Ion Torrent Personal Genome Machine

Séquençage par synthèse (mesure pH)
Longueur : 100 bp
Débit : 10 Mb à 1 GB (2012)
Temps de run : 2 heures



GS FLX 454

Pyroséquençage

1 plaque

Longueur :

~400 pb (700 pb fin d'année)

Débit : 1 million de séquences

Temps de run : 10h



GS Junior

Pyroséquençage

1 plaque

Longueur : ~400 pb

Débit : 100000 séquences

Temps de run : 10h



HiSeq 2000

Séquençage par synthèse
2 flowcells
Longueur : 2 x 100 pb
Débit : >300 GB/flowcell
Temps de run : 10 jours



MiSeq

Séquençage par synthèse
Longueur : 2 x 150 pb
Débit : >1 GB
Temps de run : 27 h



GET
Génome et
Transcriptome

Exemples d'application

Contrôle qualité international HIV

A Multicenter Collaborative Study on HIV Drug Resistance Testing using 454 Massively Parallel Pyrosequencing

BB Simen¹, MS Braverman¹, I Abbate², J Aerssens³, Y Bidet⁴, O Bouchez⁵, C Gabriel⁶, J Izopet⁷, HH Kessler⁸, A Radonic⁹, K Metzner¹⁰, R Paredes¹¹, P Recordon-Pinson¹², J Sakwa¹³, GG Schmitz-Agheguian¹⁴, and MP Däumer¹⁵,
on behalf of the 454 HIV Alphastudy Group

¹454 Life Sciences, A Roche Company, Branford, CT, USA; ²National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani, Rome, Italy; ³Tibotec-Virco Virology bvba, Mechelen, Belgium; ⁴Centre Jean Perrin / Clermont; Universités, Clermont-Ferrand, France; ⁵Plateforme Génomique Toulouse/Laboratoire Génétique Cellulaire, Toulouse, France; ⁶Blutzentrale Linz, Linz, Austria; ⁷INSERM U563, Toulouse, France; ⁸Medical University of Graz, Graz, Austria; ⁹Robert-Koch-Institute, Berlin, Germany; ¹⁰University Hospital Zuerich, Zuerich, Switzerland; ¹¹Institut de Recerca de la SIDA – IrsiCaixa, Badalona, Spain; ¹²CHU de Bordeaux et EA 2968, Université Victor Segalen, Bordeaux, France; ¹³LIFElab-National Genomics Platform, Durban, South Africa; ¹⁴Roche Applied Science, Penzberg, Germany; ¹⁵Institute of Immunology and Genetics, Kaiserslautern, Germany

Florence Nicot

Objectifs

- Performance analytique de la technologie Roche 454 GS FLX
- Pertinence clinique de variants résistants minoritaires

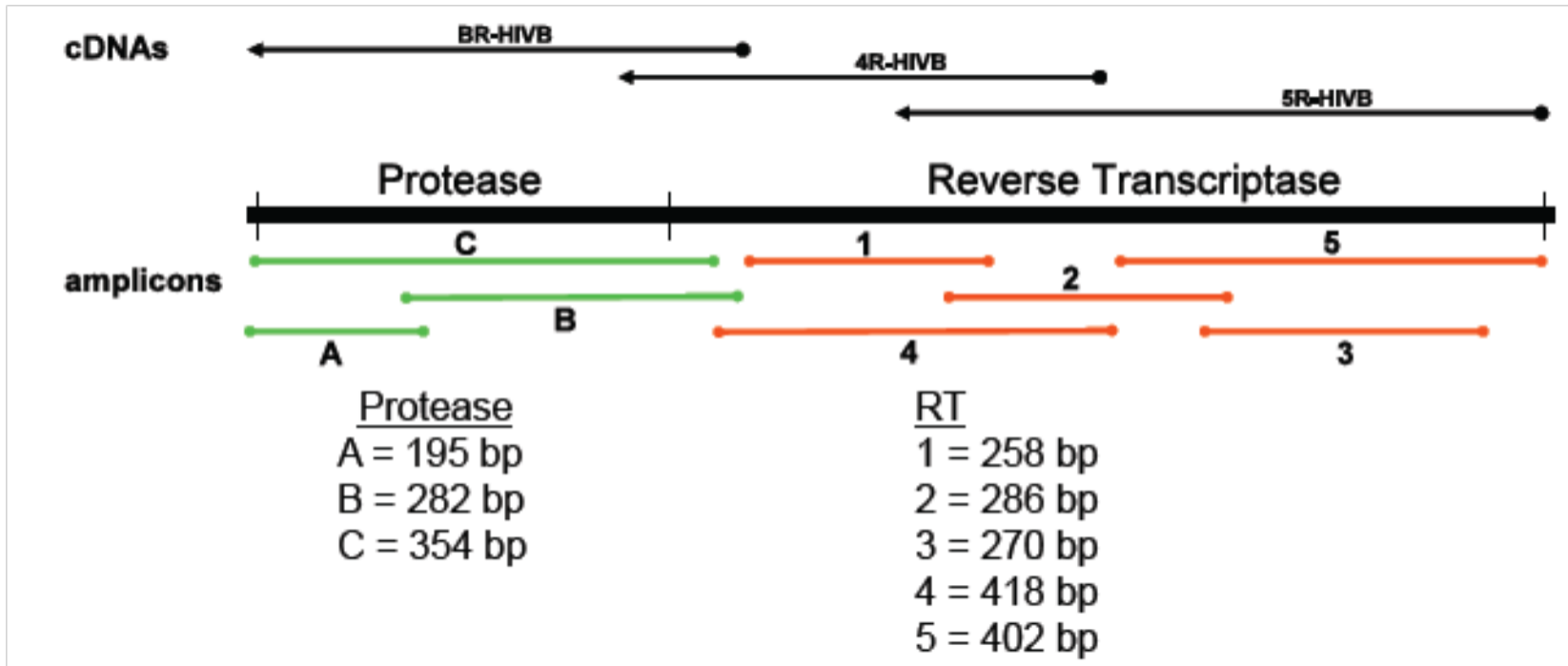
- ✓ Gène de la polymérase : étude de la protéase et transcriptase inverse du HIV

- ✓ Comparaison des performances d'un protocole de séquençage haut-débit du HIV sur Roche 454 GS FLX dans 11 sites différents.

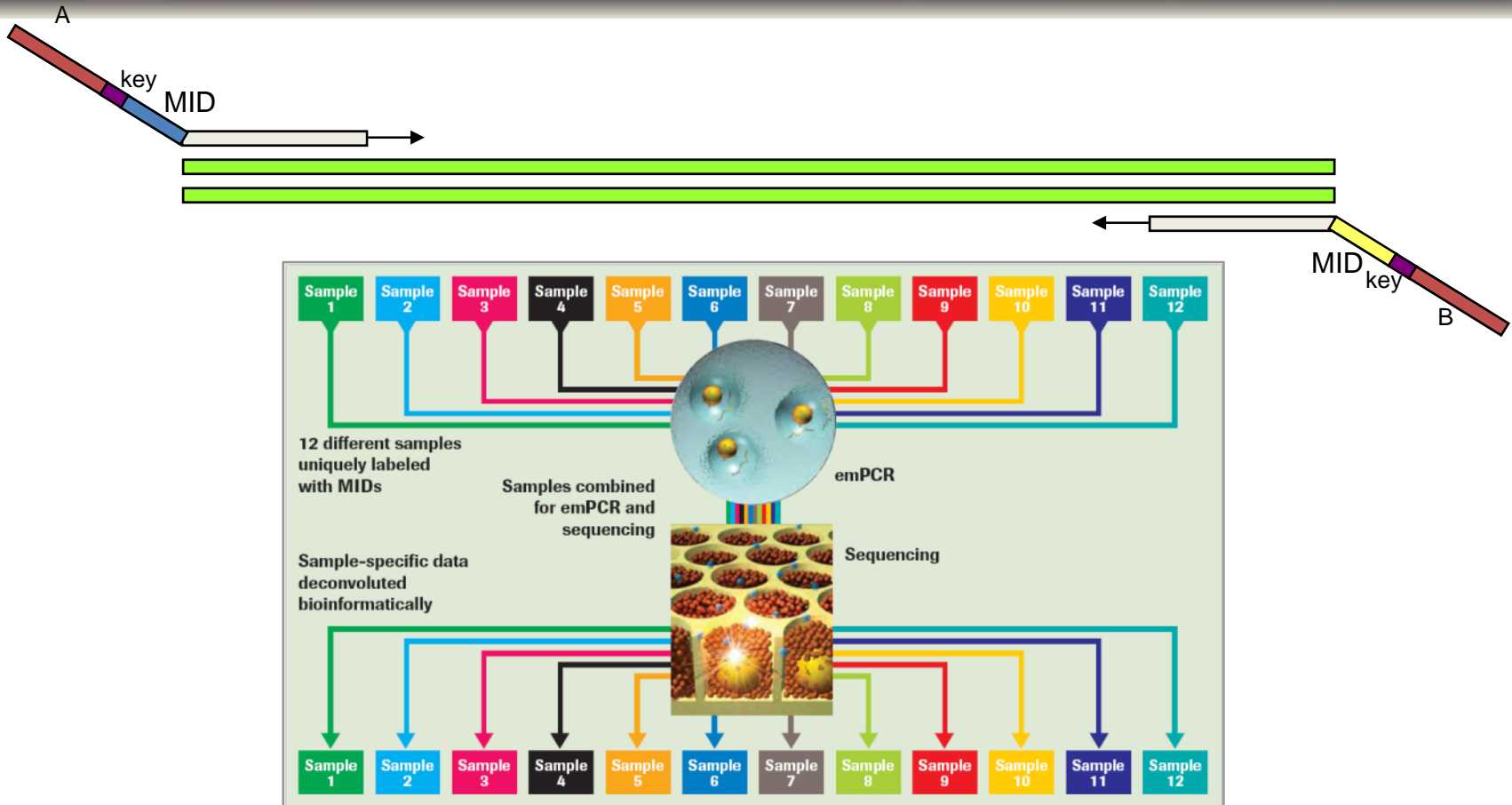
- ✓ Etude de non-infériorité du séquençage haut-débit *versus* la technique de référence pour le séquençage (Sanger)

Florence Nicot

Stratégie de séquençage



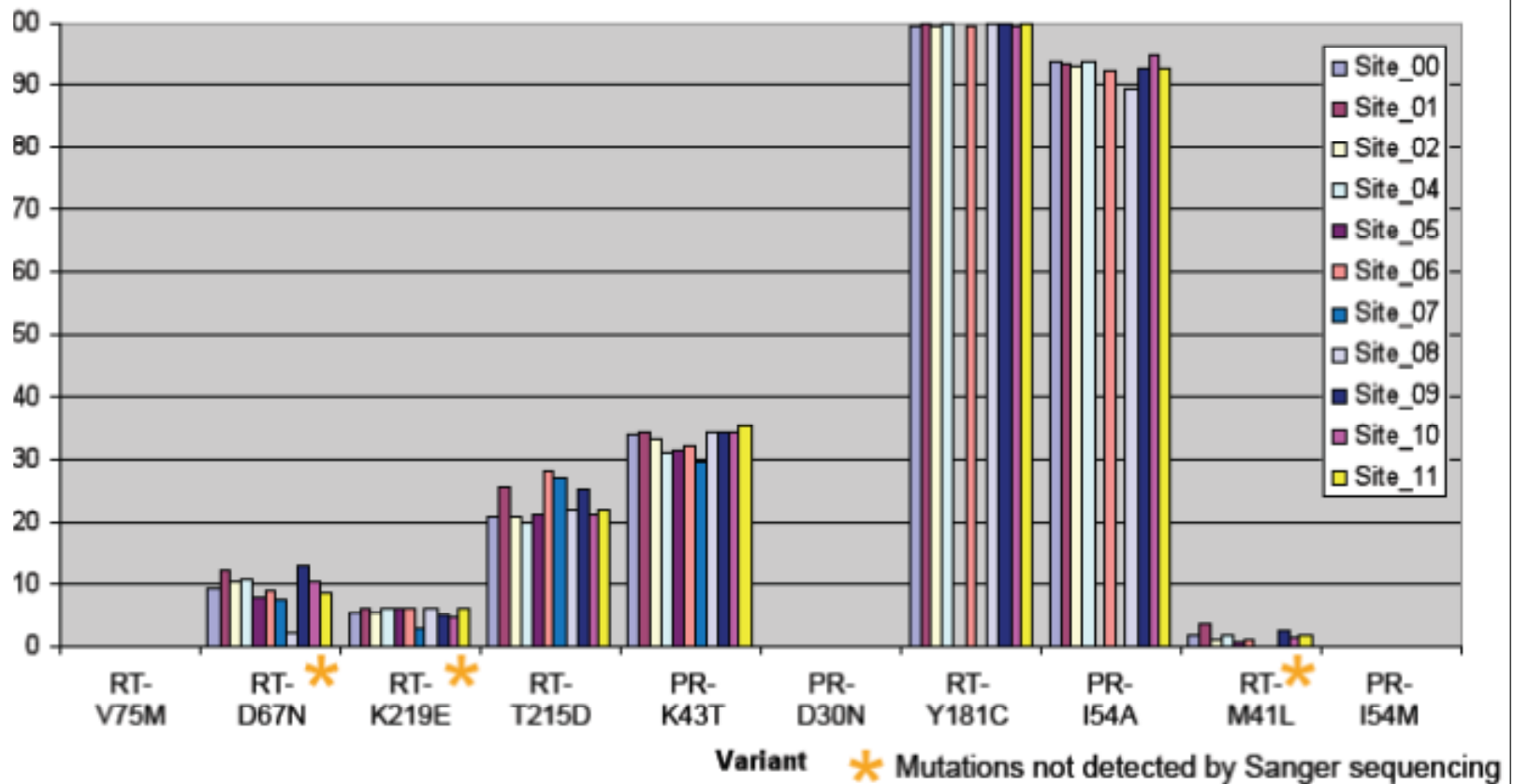
Amplicons



Longueur de lecture = 250 bp

Florence Nicot

Analyse de 10 variants pré-sélectionnés



Simen, Antiviral Ther, 2010

Comparaison séquençage haut-débit/Sanger

	Concordance avec Sanger	Non détecté par Sanger
Mutations de résistance	120/120 (100%)	34*
Polymorphismes	79/81 (98%)	nd

*** Détectés avec des fréquences de 1-10%**

Contrôle qualité international HIV

A Follow-up of the Multicenter Collaborative Study on HIV-1 Drug Resistance and Tropism Testing using 454 Massively Parallel Pyrosequencing



[EP St. John](#)¹, [GS Turenchalk](#)¹, [I Abbate](#)², [J Aerssens](#)³, [O Bouchez](#)⁴, [C Gabriel](#)⁵, [J Izopet](#)⁶, [K Meixenberger](#)⁷, [KJ Metzner](#)⁸, [R Paredes](#)⁹, [J Sakwa](#)¹⁰, [GG Schmitz-Agheguian](#)¹¹, [A Thielen](#)¹², [M Victor](#)¹¹, [MS Braverman](#)¹, [BB Simen](#)¹ and [MP Däumer](#)¹³ on behalf of the 454 HIV Alpha Study Group

¹ 454 Life Sciences - A Roche Company, Branford, CT, USA; ² National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani", Rome, Italy; ³ Tibotec-Viropo bvba, Beerse, Belgium; ⁴ Plateforme Génomique Toulouse/Laboratoire Génétique Cellulaire, Toulouse, France; ⁵ Blutzentrale Linz, Linz, Austria; ⁶ INSERM U563, Toulouse, France; ⁷ Robert Koch-Institute, Berlin, Germany; ⁸ University of Zurich, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; ⁹ Institut de Recerca de la SIDA - InsiCaixa, Badalona, Spain; ¹⁰ Technology Innovation Agency-National Genomics Platform, Durban, South Africa; ¹¹ Roche Applied Science, Penzberg, Germany; ¹² Max-Planck-Institute for Informatics, Germany; ¹³ Institute of Immunology and Genetics, Kaiserlautern, Germany

- Nouvelle étude sur 11 sites différents en Europe, coordonnée par Roche
- Séquences de ~400 pb, chimie Titanium

Kits commerciaux : HLA

TISSUE ANTIGENS
IMMUNE RESPONSE GENETICS



Tissue Antigens ISSN 0001-2815

A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing

C. L. Holcomb¹, B. Höglund¹, M. W. Anderson², L. A. Blake³, I. Böhme⁴, M. Egholm³, D. Ferriola⁵, C. Gabriel⁶, S. E. Gelber¹, D. Goodridge⁷, S. Hawbecker⁸, R. Klein⁹, M. Ladner⁸, C. Lind⁵, D. Monos⁵, M. J. Pando², J. Pröll⁶, D. C. Sayer⁷, G. Schmitz-Agheguian¹⁰, B. B. Simen³, B. Thiele⁹, E. A. Trachtenberg⁸, D. B. Tyan², R. Wassmuth⁴, S. White⁸ & H. A. Erlich¹

1 Roche Molecular Systems Inc. (RMS), Pleasanton, CA, USA

2 Stanford University, Stanford, CA, USA

3 454 Life Sciences – A Roche Company, Branford, CT, USA

4 Department of Medicine I, Technical University of Dresden and DKMS Life Sciences Lab, Dresden, Germany

5 Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA

6 Red Cross Transfusion Service of Upper Austria, Linz, Austria

7 Conexio Genomics, Perth, Australia

8 Children's Hospital & Research Center Oakland, Oakland, CA, USA

9 Institute of Immunology and Genetics, Kaiserslautern, Germany

10 Roche Applied Science, Penzberg, Germany

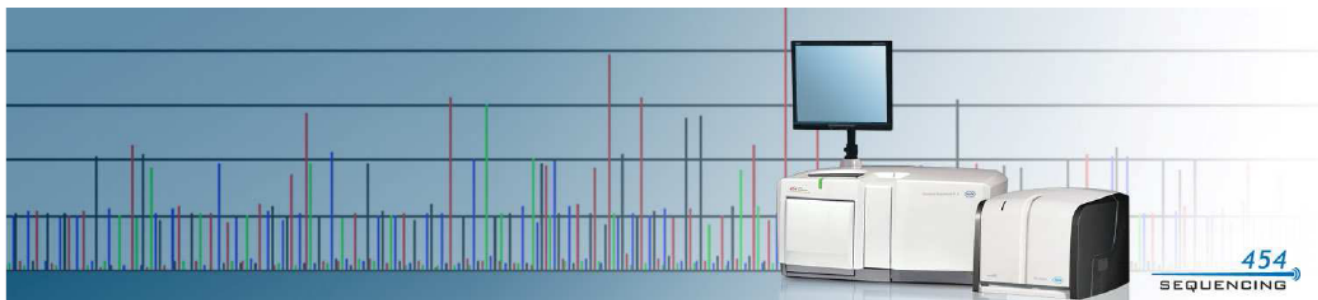
Kits commerciaux : HLA



www.454.com

GS GType HLA Primer Sets

*Single Pass, High-Resolution HLA Sequence-Based Typing
with GS FLX and GS Junior Systems*

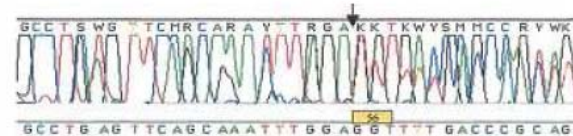
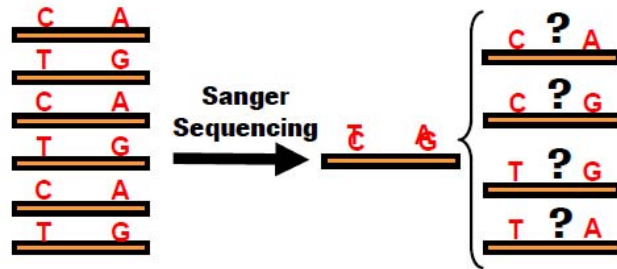


Kits commerciaux : HLA

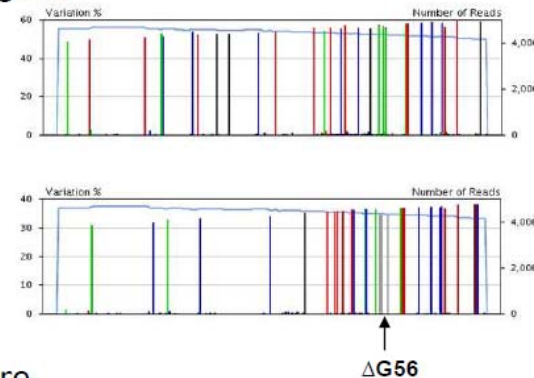
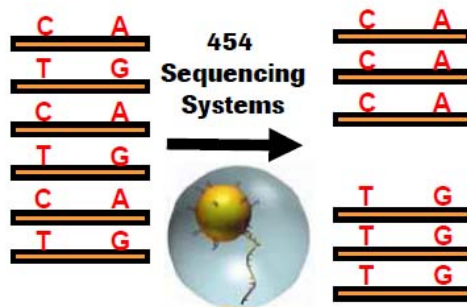
454 Sequencing System-Based HLA Typing vs. Capillary-Based Typing

Resolution des ambiguïtés

Sanger 



Mélange de séquences = séquences mélangées



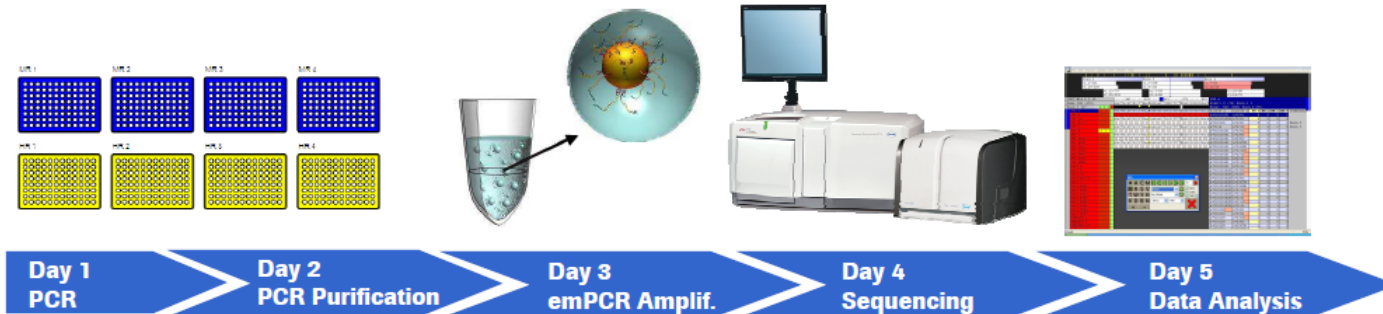
Séquence clonale = 1 ADN = 1 bille = 1 lecture

454
SEQUENCING

Kits commerciaux : HLA

Le Workflow

Le génotypage complet d'un échantillon en 5 jours



Perform high-resolution allele assignment without requiring additional sequencing run iterations, as is traditionally required with capillary-based SBT assays.

10 ng d'ADN nécessaire par amplicon, soit 140 ng total

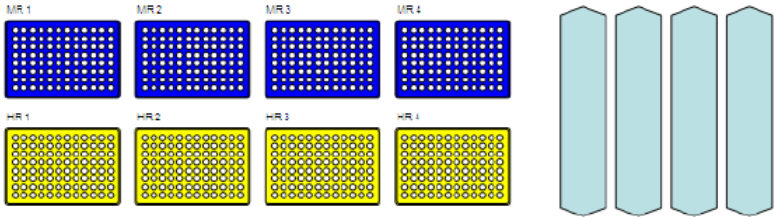
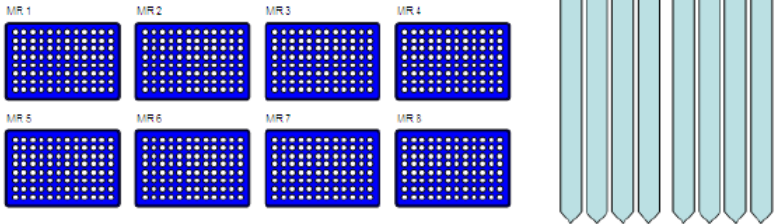

 454
 SEQUENCING

Kits commerciaux : HLA

Options for Sequencing *GS FLX System*



Nombre
d'échantillon

<p>HR on GS FLX 1 MR kit + 1 HR kit = 40 samples @ 14 Amplicons / sample</p> 	<p>40</p>
<p>MR on GS FLX 2 MR kits = 80 samples @ 8 Amplicons / sample</p> 	<p>80</p>

Kits commerciaux : HLA

GS GType HLA Primer Sets

Typage HLA avec le GS FLX & le GS Junior



- Deux sets de primer
 - Plaque 1 : Résolution Moyenne
 - Plaque 2 : Résolution Haute (à combiner avec la plaque 1)
- Multiplexe de plus de 10 échantillons / plaque
- Adapté au génotypage HLA sur les 2 systèmes GS FLX et GS Junior
- Données compatible avec le logiciel spécifique 454 System Conexio
- For life science research use only. Not for use in diagnostic procedures.



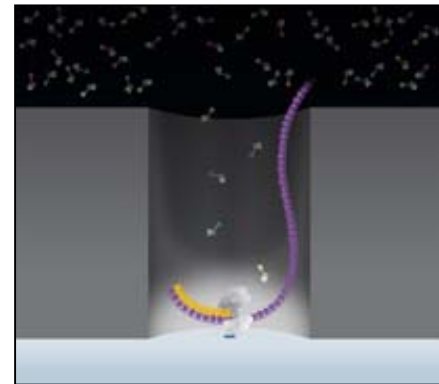


GET
Génome et
Transcriptome

L'avenir du séquençage

PacBio RS (Pacific Biosciences)

- ✓ Disponible mi-2011
- ✓ Single molecule sequencing
- ✓ 964 pb (v.1), 50000 seq., 50 Mb/run
- ✓ 15 minutes/run
- ✓ 5% d'erreur, mais possibilité de séquencer plusieurs fois le même ADN
- ✓ Prix échantillon ???





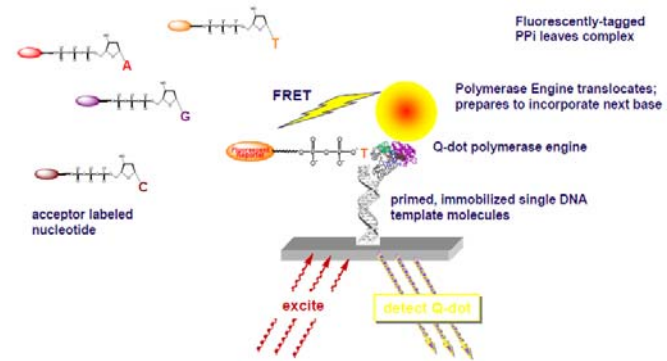
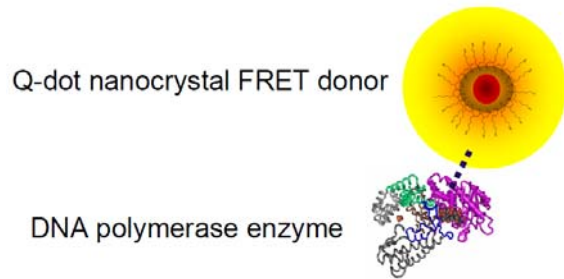
BioPortfolio

FDA Seeks PacBio Sequencer for Rapid Pathogen ID

GenomeWeb | The Food and Drug Administration seeks to purchase a Pacific Biosciences sequencer to develop new methods for rapid pathogen identification, according to a request for information published on the Federal Business Opportunities website earlier...

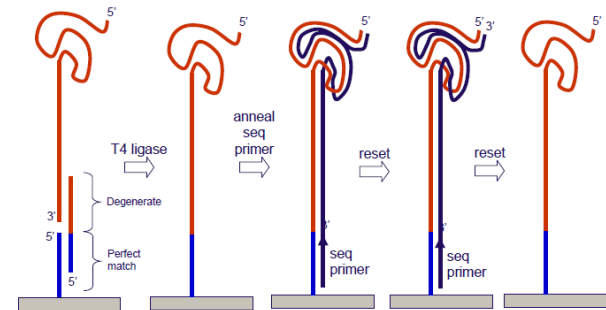
<http://www.bioportfolio.com/news/article/411743/Fda-Seeks-Pacbio-Sequencer-For-Rapid-Pathogen-Id.html>

Polymerization + detection engine



Sample Preparation and Attachment to Substrate

Molecular Redundancy: Template Attachment For Iterative Sequencing



Improved Accuracy

	2010/11	2012
Incorporation rate (per second)	2-4	5-10
Average read length	1k-1.5k	5k-10k
Run cost	~\$200	~\$200
'Raw' throughput	~1.4 Gbp/day	~8 Gbp/day
Run time	~20 mins	~20 mins
Data per run (Gbp)	0.04-0.06	0.13-0.26
Accuracy	85-90%	90-95%
# iterative sequence passes	~7	~4
Iterative throughput	~0.2 Gbp/day	~2 Gbp/day
Run time	~ 2.5 hours	~1.5 hours
Data per run (Gbp)	0.04-0.06	0.13-0.26
Accuracy	~99.9%	~99.9%
Run Cost	~\$300	~\$300

L'équipe Génomique

Une équipe de 16 personnes dont 6 permanents INRA et 3 personnels accueillis pour des projets d'instituts.

Informatique & bioinformatique

Gérald Salin (IE INRA)
Julien Fremez (AI INP)

Biologistes Moléculaires NGS

Olivier Bouchez (IR INRA)
Jérôme Lluch (AI INP)
Eugénie Robe (AI INP)
Emeline Lhuillier (AI INP)

Direction

Denis Milan (DR INRA)

Dir Adjointe & Qualité :
Cécile Donnadieu (IE INRA)

Projets Départements ou Centres

Diane Esquerré (IE INRA DGA)
Jean José Maoret (IE INSERM I2MC)
Nathalie Marsaud (IE INSA)

Prévention

Sophie Leroux (AI INRA)

Gestion

Marion Daneyrole (TR INRA)

Biologistes Moléculaires Génotypage, qPCR, autres

Fredéric Martins (AI INP)
Sophie Ruzafa Serrano (IE INP)
Sophie Valière (TR INP)





GET
Génome et
Transcriptome

Merci de votre attention