



La technologie Veracode

**Cécile Donnadieu, Amandine Marty
Julie Mautord & Denis Milan**

**Plateforme Génomique
Génopole Toulouse Midi-Pyrénées**

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



La Plateforme Génomique

Présentation de la PlaGe

- Plateforme de **Génotypage** et **Séquençage**
- Activités complémentaires :
 - Gestion de banques (repiquage, dépôt sur Macro/Micro arrays)
 - PCR quantitative
- En place dès **2000** (création de la Génopole), nouveau bâtiment inauguré en Septembre **2007**
- Plateforme opérationnelle **IBiSA depuis 2008 (RIO dès 2006)**, 
- Plateforme stratégique reconnue par l'INRA en **2008**
- Certifiée **ISO 9001:2000** en octobre **2008** 
- Plus d'infos : <http://genomique.genotoul.fr>

L'équipe PlaGe

- Un personnel **dédié** :
 - Denis MILAN (D.R. INRA) Resp. Scientifique (20%),
 - Cécile DONNADIEU (I.E. INRA) Resp. Technique et Opérationnel,
 - Gérald SALIN (I.E. INRA) Resp. Informatique,
 - Marion DANEYROLE (T.R. INRA) Gestionnaire (20 %)
 - X, Poste IR en 2010

- Frédéric MARTINS (CDD A.I.) Biologiste
- Julie MAUTORD (CDD I.E.) Biologiste
- Olivier BOUCHEZ (CDD I.R.) Biologiste
- Julien FREMEZ (Stagiaire Informatique)



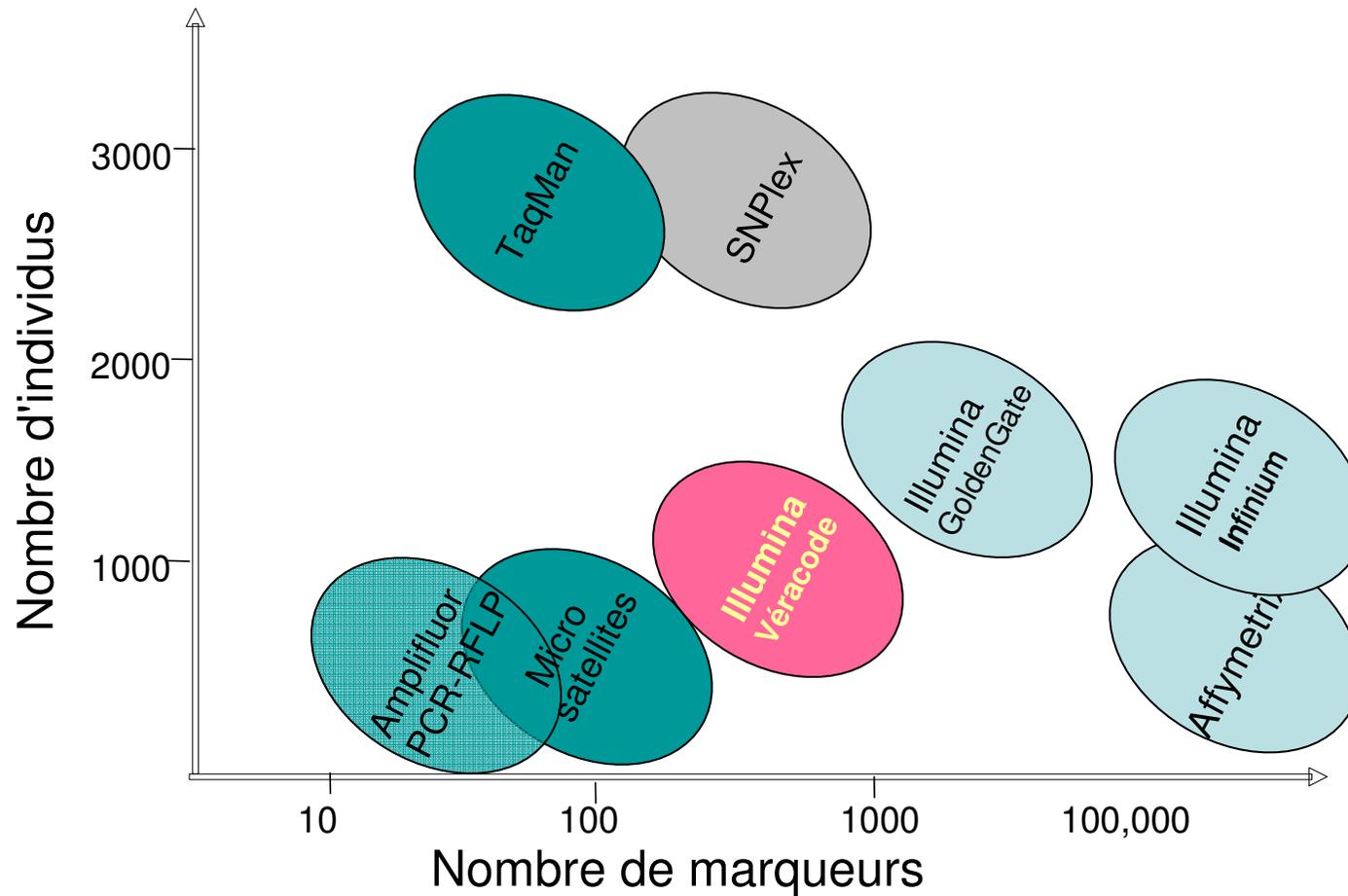
Mode d'accès à la PlaGe

- Accès avec accompagnement du personnel Plateforme qui apporte son **expertise technologique** et qui transmet un savoir faire:
 - Conseils scientifiques et techniques
 - Binôme et étroite collaboration avec l'équipe de recherche pour la réalisation de vos projets
- **Mise à disposition de la plateforme technologique :**
 - Formation d'un responsable technique par équipe ou laboratoire
 - Réalisation par le RT des projets de l'équipe/du laboratoire
- Séquençage **commun**



La technologie Véracode sur le Beadxpress

Une nouvelle technique en 2007



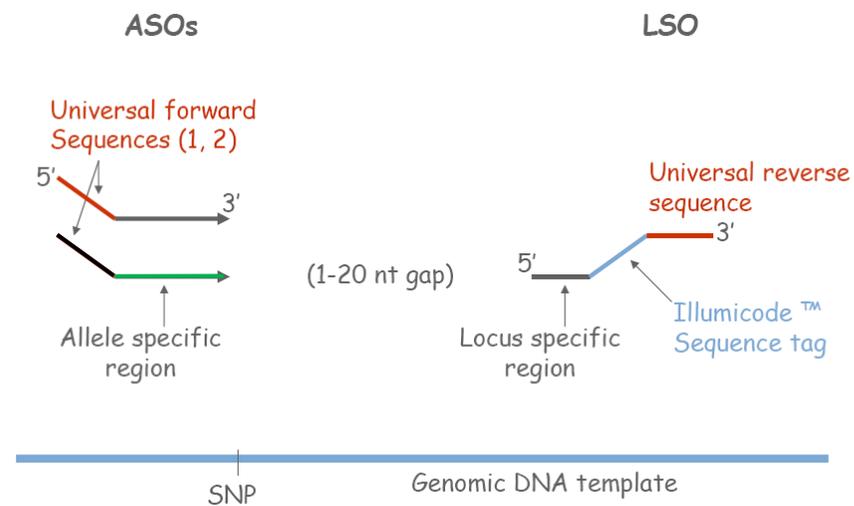
Typage SNP sur BeadXPress

- Acquisition de la machine en 2007 (la première livrée en France)
- Analyse de jeux de **48, 96, 144 ou 384 SNP**
- Première échelle de commande **480 individus**
- **Plaques 96 – 1 ech / puit – 384 SNP**
- Quatre projets pilotes :
 - **Homme** (maladie auto immune)
 - **Souris** (carto QTL hémochromatose)
 - **Poule** (QTL portage des salmonelles)
 - **Porc** (carto fine QTL engraissement)
- **0.05 € / Génotype** en 384 (480 ech)
- Espèces végétales passées depuis 12 mois: Arabidopsis, Vigne, Pois, Maïs, Tournesol, Pin



Choix des SNP

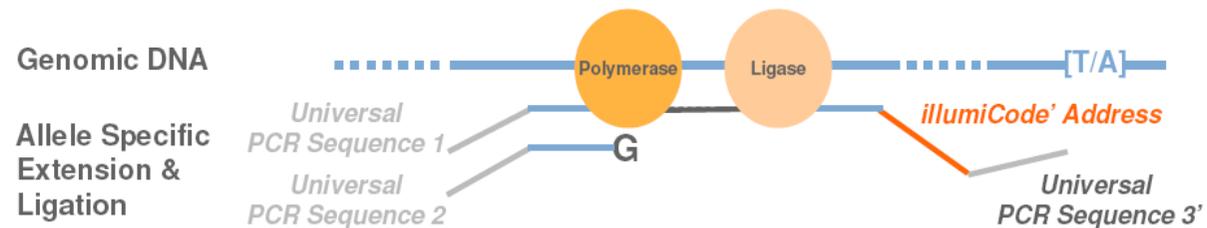
- Design des SNP



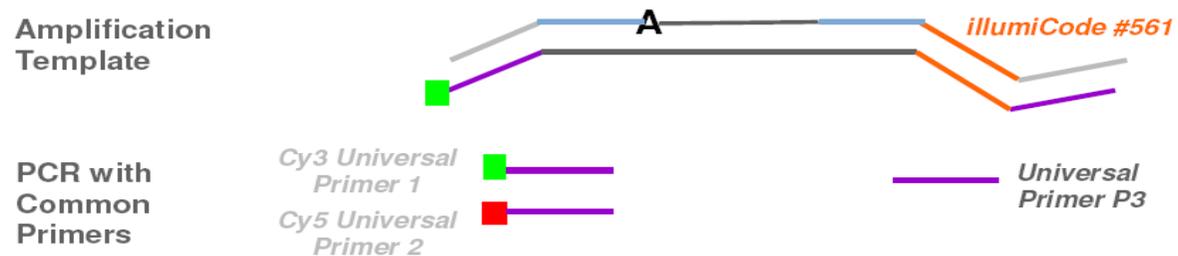
- Soumission à Illumina d'un fichier en ligne ou par mail
- Obtention d'un score de qualité par SNP (Illumina)
- Choix définitif des SNP intégrant score et position

Principe de la chimie GoldenGate

- Allèle spécifique extension - Ligation

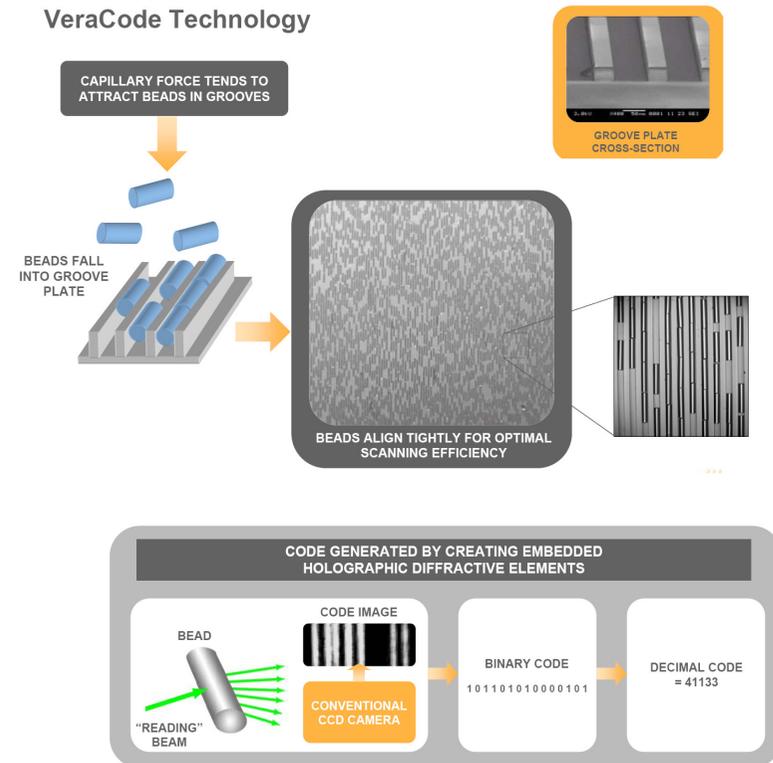
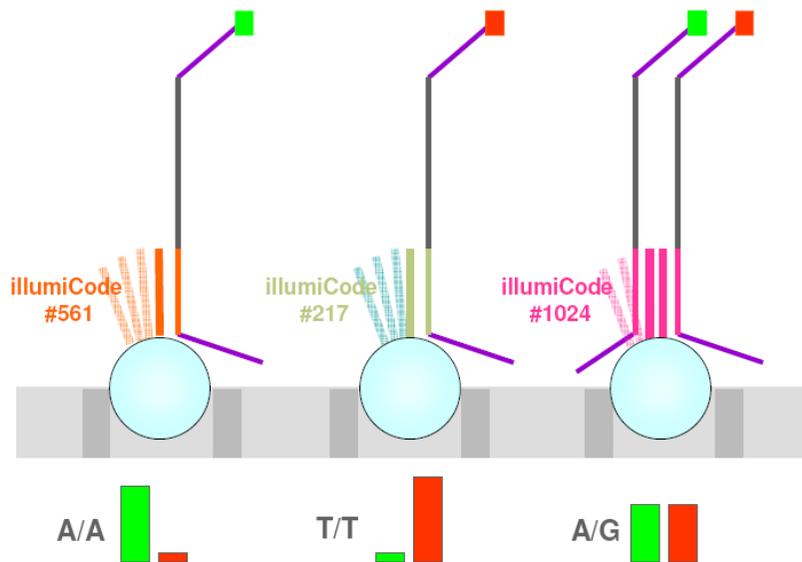


- Amplification



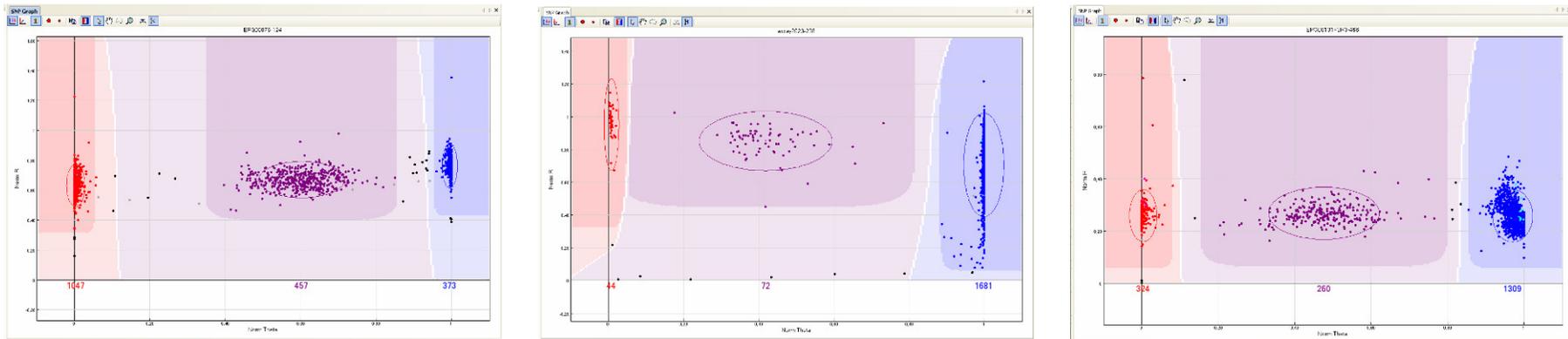
Principe de technologie Veracode

- Identification du SNP par reconnaissance de l'IllumiCode associé



La lecture des données

- Présentation identique à des données 7900 – LC480

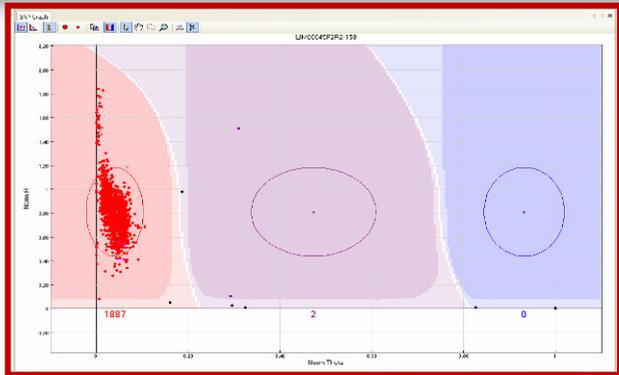


- Procédure systématique pour analyser la qualité des données produites (proposée par le CNG)

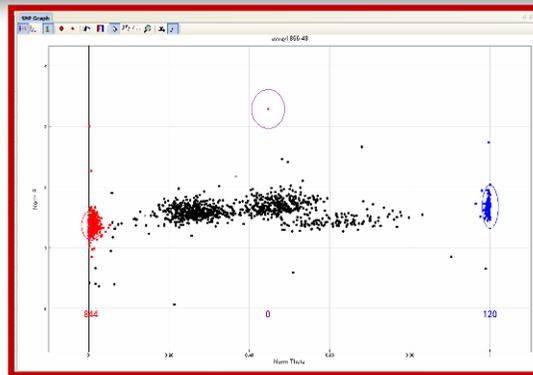
Contrôles internes Illumina (homme & souris)

- Contrôle de la spécificité d'extension de l'enzyme
- Contrôle de l'uniformité de la PCR (PCR Uniformity)
- Contrôle des sexes (Gender)
- Contrôle de l'extension (Extension Gap)
- Contrôle de la 1ère hybridation (First Hybridization) : spécificité d'hybridation des ASOs
- Contrôle de la 2nd hybridation (Second Hybridization): efficacité de l'hybridation des ADNsb marqués sur les cylindres de verre.

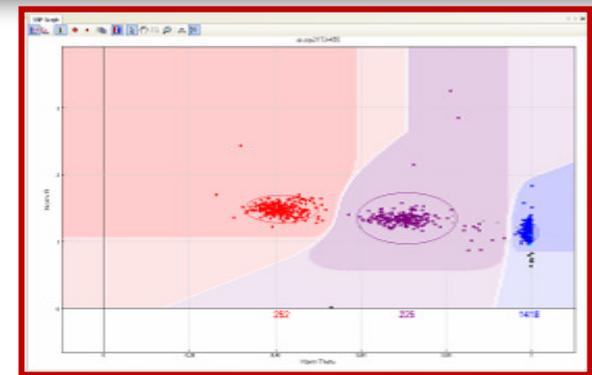
Exemples de situations délicates (végétal)



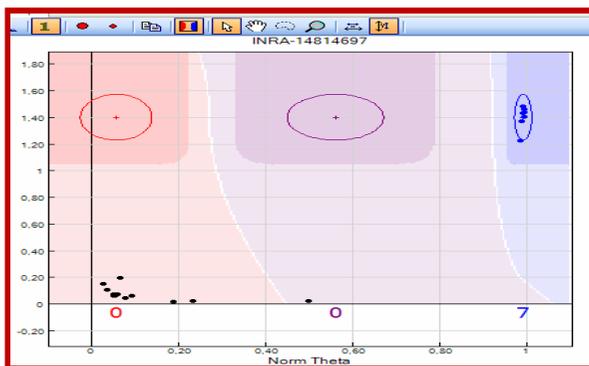
Monomorphe



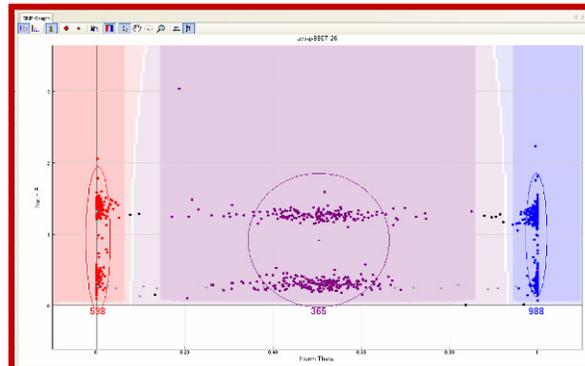
Multilocus



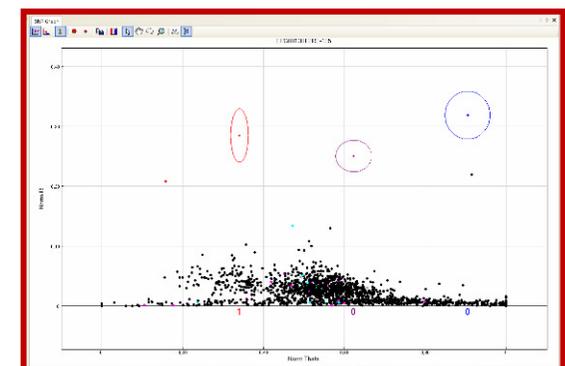
Bilocus dont un locus monomorphe



Allèle nul



Effet de synthèse



Inexploitable



Les petits + en terme d'organisation

L'organisation des pièces et la traçabilité

- Utilisation de primers Universels nécessitant de bien séparer les pièces pré et post PCR
- Mise en place d'un suivi code barre pour les réactifs environ une 20 aine de réactifs livrés par OPA
(attention aux dates de péremption 3 mois sur certains réactifs)
- Mise en place d'une tracking sheet pour le suivi des n° de lot en cours de manip



Retours d'expérience des utilisateurs pilotes

Etude gènes candidats maladies auto immune Hapmap

- 3 projets différents sur les 12 derniers mois
 - Dermatite atopique (480 ech famille – 210 SNP)
 - Polyarthrite rhumatoïde (288 ech famille – 96 SNP)
 - Détermination marqueur Rejet de greffe (480 ech – 2x96SNP)
- Utilisation des contrôles internes
- 1 SNP passé en Taq man et en BeadXpress
- 2 plaques identiques passées à 6 mois d'intervalle

Bilan Global: 85% Succès

Marqueurs déjà passés en Goldengate 1536 au CNG sur les parents (marqueurs QTL résistance aux salmonelloses)

- 2 projets sur les 12 derniers mois :
 - Region QTL déjà identifiée (480 ech F0, F1, F2 – 96 SNP)
 - tout génome (480 ech F0, F1, F2 – 384 SNP)

Bilan Global

- 98,9 % Succès sur F1, 96,83 % succès sur l'ensemble

Projet in silico dans une région 8 Mb (QTL gras)

- 96 marqueurs :
 - 71 hors région répétée
 - 25 avec SNP dans zone Repeat

Statut	Nombre	%
OK	14	56%
Abandonnés	11	44%

Bilan Global:

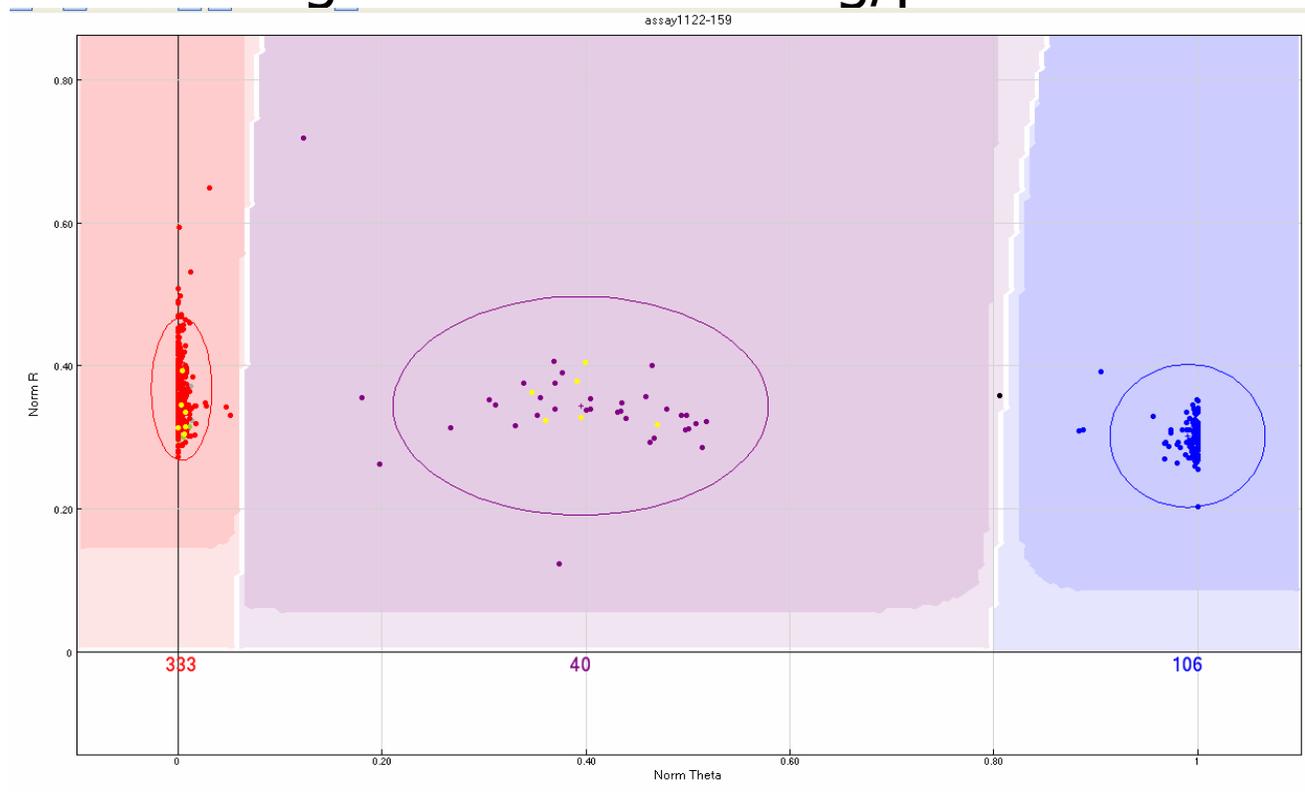
73 % Succès global, 3 Monomorphes, MAF = 29 %

(en gros LINE Ok, SINE abandonnés)

79 % parmi les SNP sans répétition connue

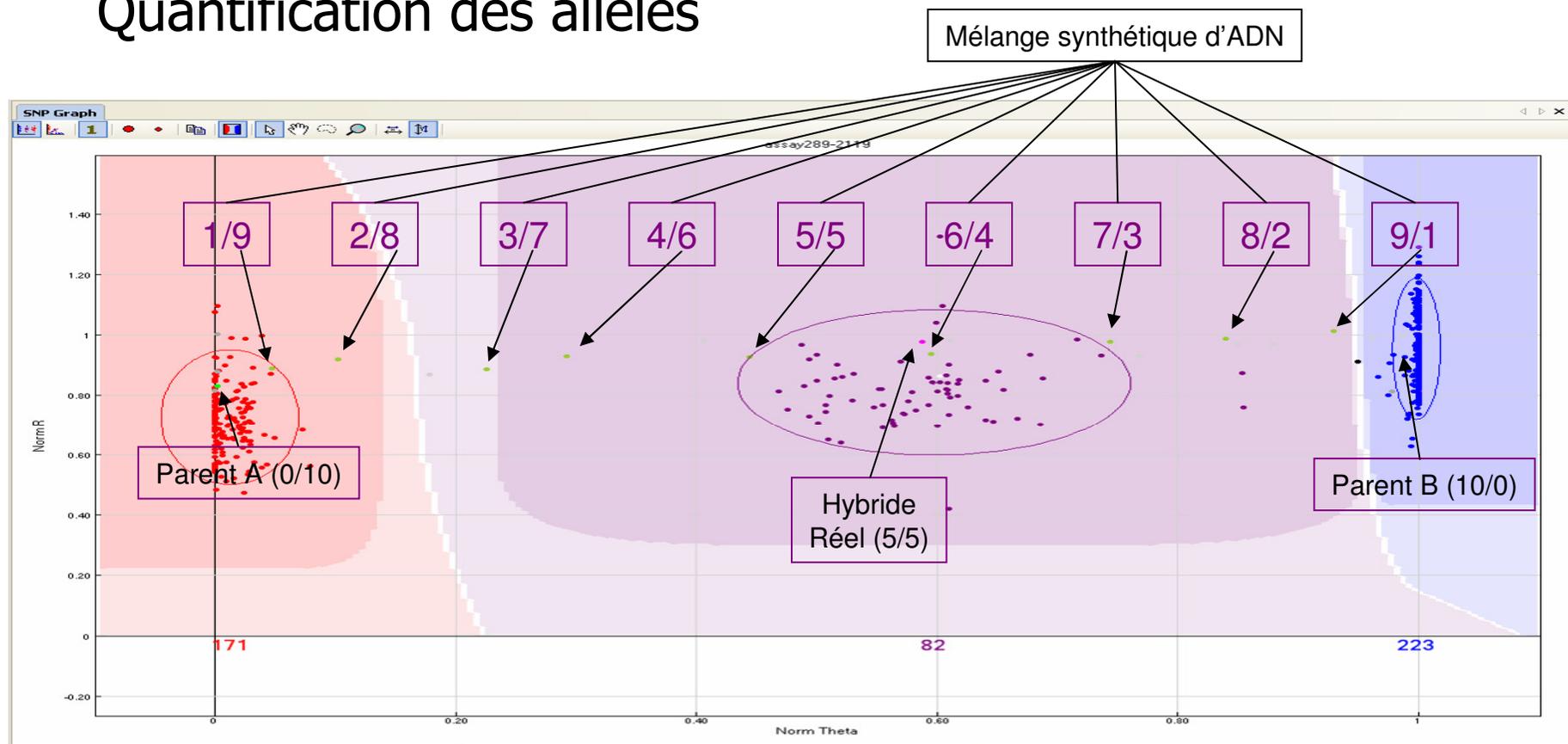
Validation sur le Maïs (Euralis)

Influence de la concentration en ADN
gamme de 5 à 50ng/ μ l



Caractère quantitatif testé sur le Maïs (Euralis)

Quantification des allèles





Conclusion

Technique Robuste

SNP indépendants

Échelle de 480 individus

Quantité d' ADN

Attention à l'équilibre homo-hétéro



L'avenir de la PlaGe

Les acquisitions du CPER et IBISA

- Investissement de **4.3 Millions €**
PF Génomique + Bioinformatique
- Renouvellement du matériel actuel
- Acquisition de nouveaux matériels :
 - Atelier extraction d'ADN+CQ
 - **Séquenceur Roche GS Flx Titanium (2009)**
 - **Fluidigm (2009)?**
 - **SNP Haut débit (2010)?**



La plateforme tourne grâce ...

- A l'INRA (bâtiment, 2 postes IE permanents, CPER ...)
- Au SAIC de l'INP (CDD, gestion de la facturation)
- Aux Subventions de :
 - FEDER (personnel sur 2 ans)
 - RNG (maintenance, équipement)
 - Région Midi-Pyrénées (Bâtiment, CPER, PRAI)



avec le soutien de l'Union européenne (FEDER)

- Aux organismes partenaires de la Génopole



Inserm



- A la Plate-forme Bioinformatique (hébergement serveur)
- Aux équipes qui y travaillent !!

