

TECHNOLOGIE DE SÉQUENÇAGE ET CELLULES DE FLUX

LES RÉCENTES AVANCÉES TECHNIQUES

EN PLACE AU GENOSCOPE

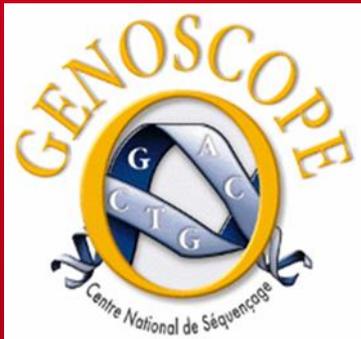


Colloque EPGV - Evry | 03 octobre 2018

Arnaud LEMAINQUE

DE LA RECHERCHE À L'INDUSTRIE

cea



www.cea.fr

Issus d'organismes uni ou pluricellulaires

Virus

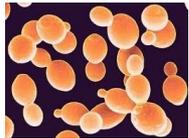


Procaryotes



Eucaryotes

Champignons



Protistes



Plantes



Animaux



Issus de milieux complexes



Station d'épuration des eaux



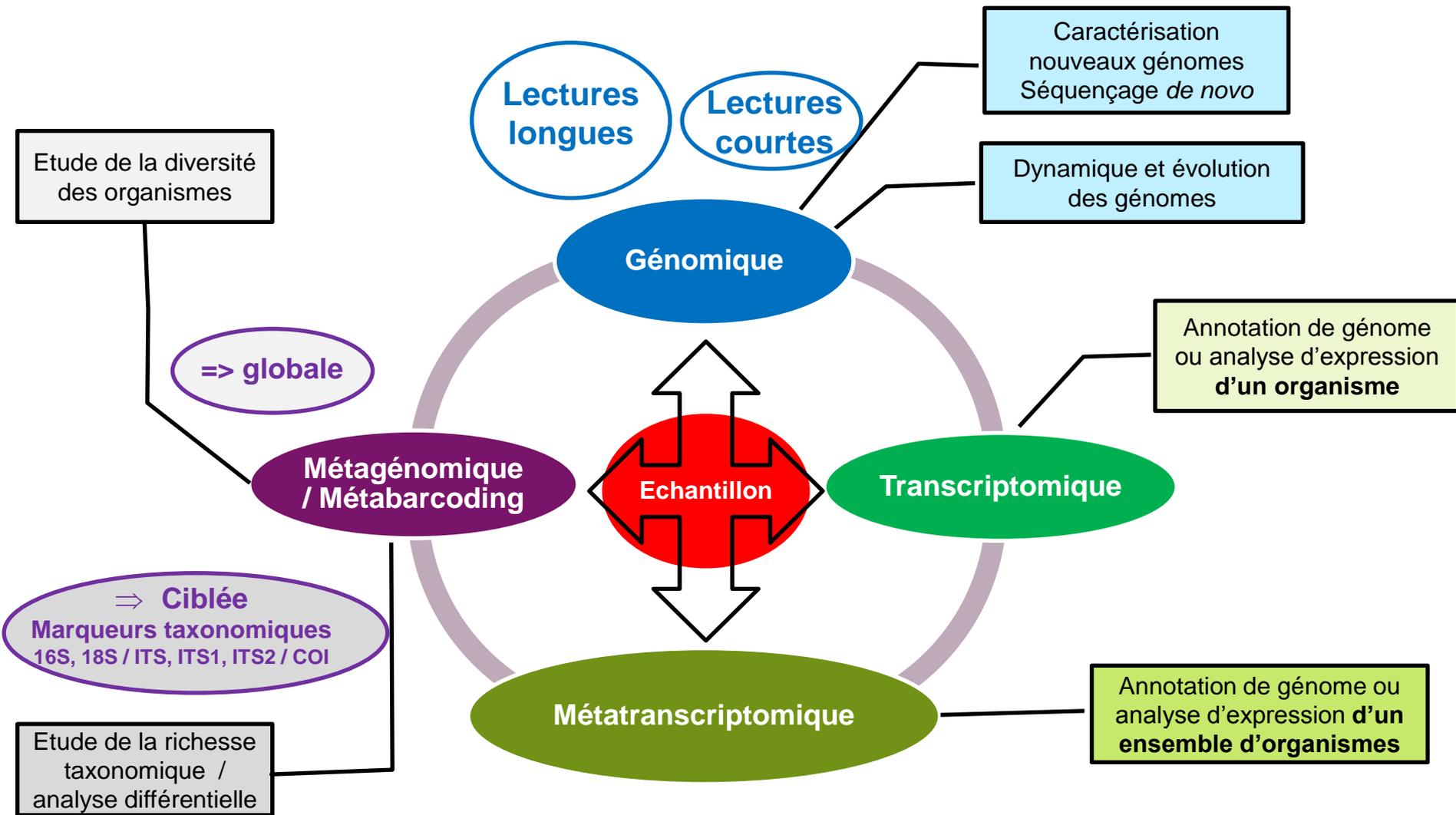
Sols



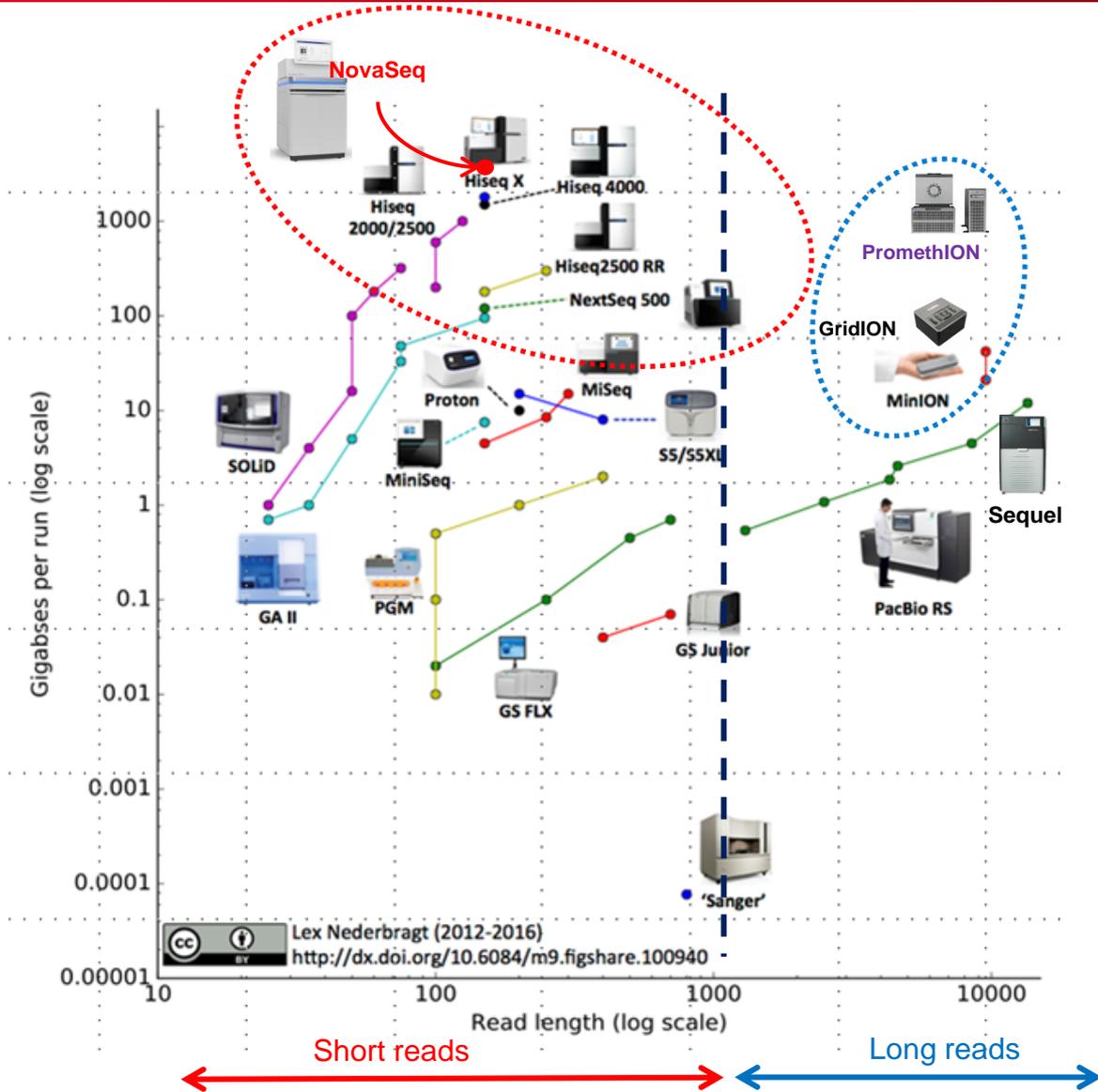
Tara Océans

Tara Polar Circle

Tara Pacifique



Quelles techniques pour quel(s) objectif(s)?



Lectures courtes 2x150, 2x250, 2x300 bases

HiSeq 4000



x 2

860 Gb / 24h

NovaSeq 6000



x 1

3.000 Gb / 24h

HiSeq 2500



x 2

160 Gb / 24h

Illumina
4.033 Gb / jour

MiSeq



x 2

13 Gb / 24h

Lectures longues 1 à plus de 100 Kb

MinION



x 6

24 Gb / 24h

512 canaux par flow cell

Oxford Nanopore Technologies

500 Gb / -24h



1 x

PromethION - 24 flow cells
3.000 canaux par flow cell

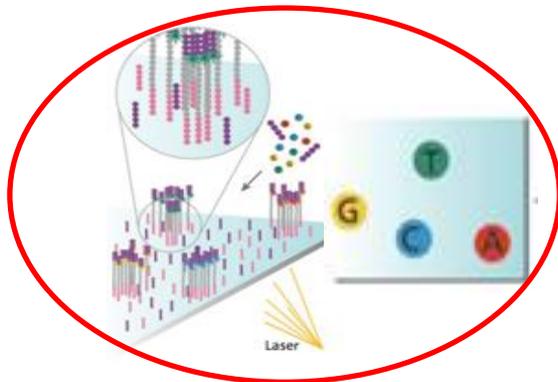
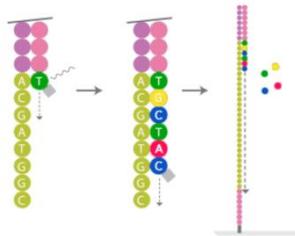
Illumina

Technique *Sequencing By Synthesis*

Fragments d'ADN amplifiés

Détection par fluorescence

15 millions à 10 milliards de colonies
par cellule de flux selon le séquenceur



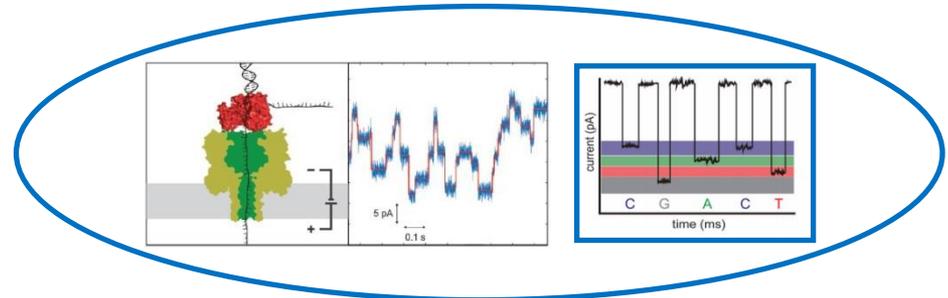
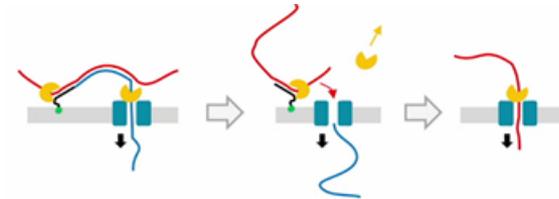
Oxford Nanopore Technologies

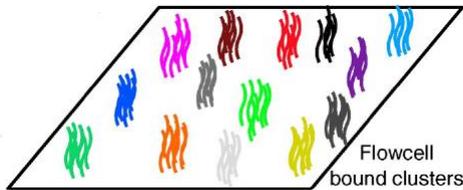
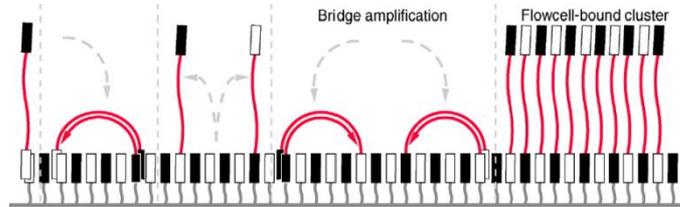
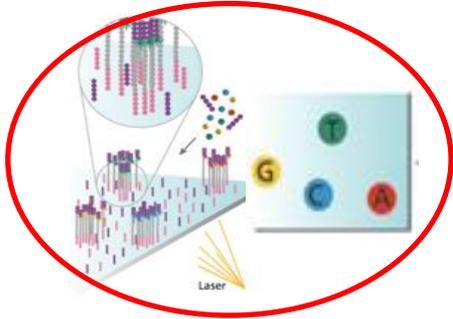
Séquençage par nanopore

Molécule unique - Pas de PCR - Temps réel

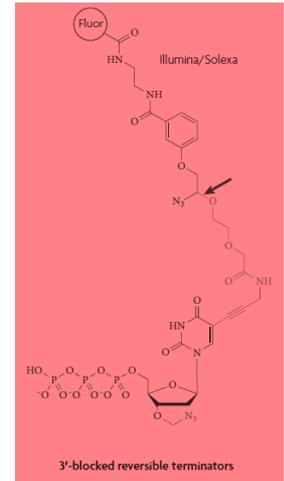
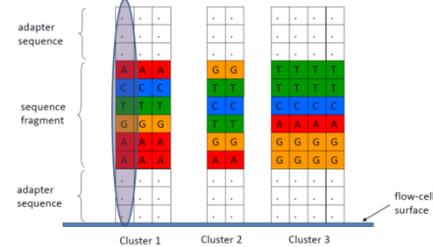
Détection ampérométrique

512 à 3000 canaux
par cellule de flux selon le séquenceur





Sequence clusters on the flow cell

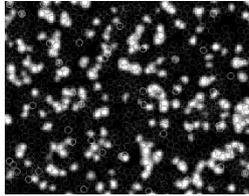


Termineur réversible

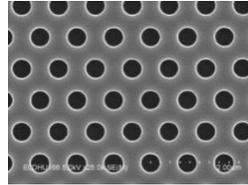
A chaque cycle, ajout d'un nucléotide modifié

- Extrémité 3'OH protégée
- Fluorochrome sur nucléobase

Couplée à l'optimisation des cellules de flux



HiSeq 2000



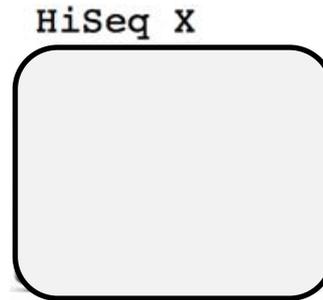
HiSeq 4000 - HiSeq X - NovaSeq 6000



HiSeq 2500



HiSeq 4000



HiSeq X



NovaSeq 6000



4 couleurs différentes
2 lasers / 4 caméras

4-Channel Chemistry				
	A	G	T	C
Image 1	●			
Image 2		●		
Image 3			●	
Image 4				●
Result	A	G	T	C

Système optique spécifique

NovaSeq 6000

2-Channel Chemistry				
	A	G	T	C
Image 1	●		●	
Image 2	●			●
Result	A	G	T	C

2 couleurs différentes
1 laser / 2 caméras



1 Tb - 6 jours



1,5 Tb - 3,5 jours



1,8 Tb - 3 jours



6 Tb - 2 jours

Palette de fluorophores remaniée

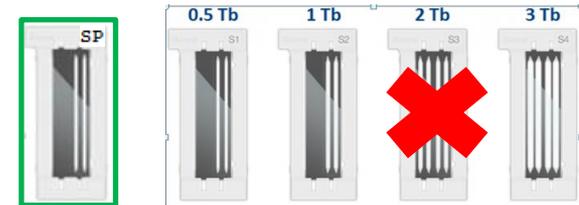
Nouvelle chimie de surface qui augmente le rapport signal/bruit



NovaSeq 6000



Consommables codés RFID



Flow cell SP
disponible fin 2018

Coût d'un run

Flow cell	Longueur de lecture (pb)		
	2 x 50	2 x 100	2 x 150
SP	\$ 3 276,00		\$ 5 200,00
S1	\$ 5 928,00	\$ 8 112,00	\$ 9 360,00
S2	\$ 10 374,00	\$ 14 196,00	\$ 16 380,00
S4		\$ 27 768,00	\$ 32 012,00

Rendement par flow cell

Flow cell	Longueur de lecture (pb)		
	2 x 50	2 x 100	2 x 150
SP	65 - 80 Gb		200 - 250 Gb
S1	134 - 167 Gb	266 - 333 Gb	400 - 500 Gb
S2	333 - 417 Gb	667 - 833 Gb	1000 - 1250 Gb
S4		1600 - 2000 Gb	2400 - 3000 Gb

Coût à la Gbase

Flow cell	Longueur de lecture (pb)		
	2 x 50	2 x 100	2 x 150
SP	40,95 à 50,40 \$		20,80 à 26 \$
S1	35,50 à 44,23 \$	24,36 à 30,49 \$	18,72 à 23,40 \$
S2	24,88 à 31,15 \$	17,04 à 21,28 \$	13,10 à 16,38 \$
S4		13,88 à 17,35 \$	10,67 à 13,34 \$

Nature du nanopore

Lipoprotéine CsgG (nonamère)
3,5 nm
8,5 nm
0,9 nm

Plus de 6.000 systèmes installés

MinION > 6000
GridION ~ 100
PromethION ~ 60

Banque Nanopore

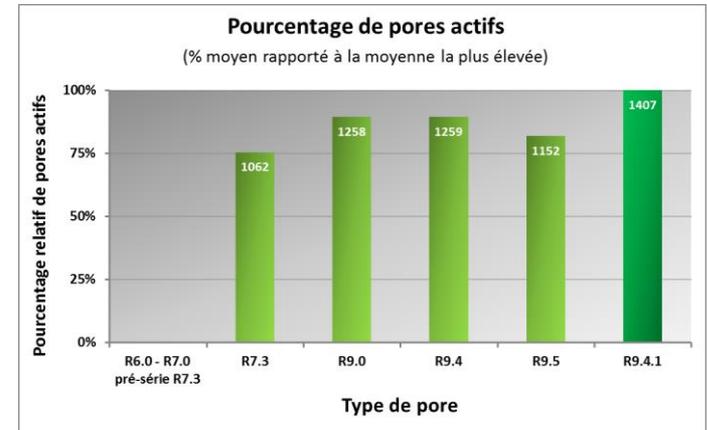
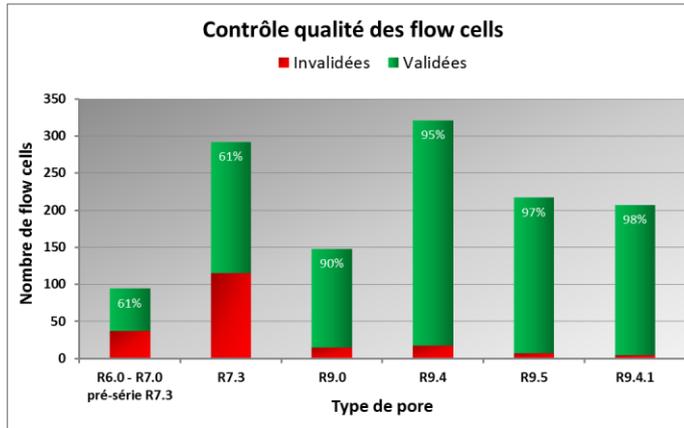


Séquençage

cis
trans
ASIC (détection)
Current (pA)
Time (ms)
G A TCAC A GG T

Gestion de plus de 1280 flow cells de MinION depuis le début du MAP (2014)

Contrôle qualité

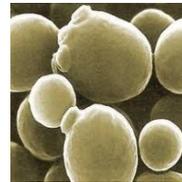


Utilisation en séquençage

Plus de 1400 Gbases générées

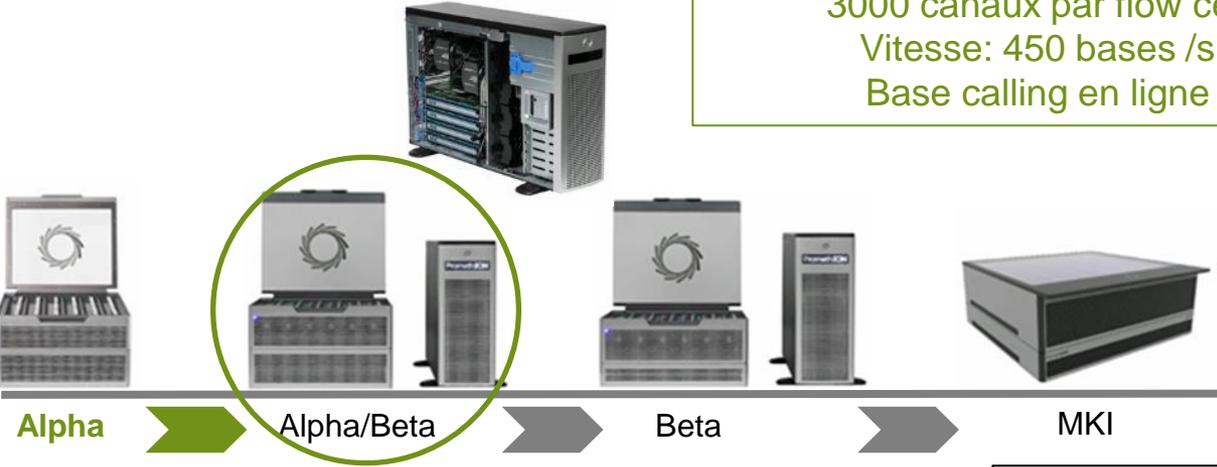
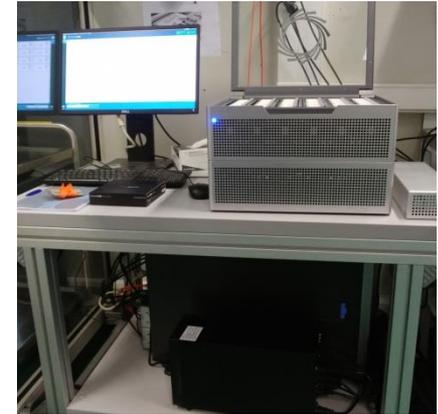
Plus de 50 organismes séquencés parmi lesquels

- de nombreux génomes bactériens,
- 22 génomes de levure,
- 4 génomes de champignon,
- une quinzaine de génomes de plantes dont Musa (600 Mb) mais...



PromethION

Gestion simultanée de 24 flow cells
3000 canaux par flow cell
Vitesse: 450 bases /s
Base calling en ligne



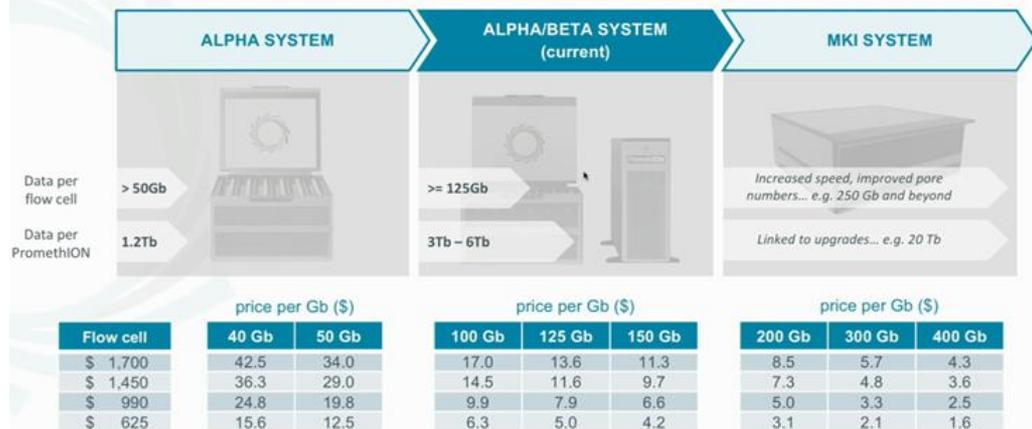
PromethION Early Access Programme

76 flow cells reçues à ce jour
12 flow cells non validées
64 flow cells avec plus de 6900 nanopores actifs en moyenne par flow cell

Comparaison Runs Nanopore - PromethION (génomme de plante)					
Flow cell	Nb bases	Nb séquences	Taille (moyenne)	N50	Qualité moyenne
PromethION	60 063 524 187	7 548 948	7 956	27 586	10,4
MinION	7 479 444 612	797 187	9 382	27 019	11,8

PROMETHION RELEASE PLAN

Product evolution



Commande

Montant	Nbre Flow cells	Coût unitaire
\$ 24 000,00	12	\$ 2 000,00
\$ 244 800,00	144	\$ 1 700,00
\$ 734 400,00	576	\$ 1 275,00
\$ 1 123 200,00	1152	\$ 975,00
\$ 1 800 000,00	2880	\$ 625,00

Coût par Gbase - - - - - >

Gbases	25	50	100	150	200	300
\$	80	\$ 40	\$ 20	\$ 13	\$ 10	\$ 7
\$	68	\$ 34	\$ 17	\$ 11	\$ 9	\$ 6
\$	51	\$ 26	\$ 13	\$ 9	\$ 6	\$ 4
\$	39	\$ 20	\$ 10	\$ 7	\$ 5	\$ 3
\$	25	\$ 13	\$ 6	\$ 4	\$ 3	\$ 2

Cette semaine

ASIC C remplacée par ASIC D sur flow cell MinION
(ASIC D déjà présente sur flow cell PromethION)

En cours

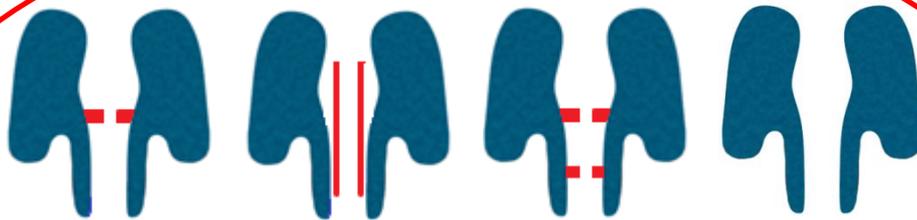


6 pores de chargement
sur flow cell PromethION



A venir

Réduction du taux d'erreur



Nanopore avec tête de lecture pointue
R9.4.1 et R9.5.1

Nanopore avec tête de lecture longue
R8 (lysénine)

Nanopore avec tête de lecture multiple
R10

Autre évolution
R9.6...

Flongle: flow cell de MinION de 128 canaux à environ 100\$ pour 1 Gbases

Nouveau kit 1D²

RNA direct: 70 à 500 bases/s

Illumina

=> iSeq 100 commercialisé en 2018

Plus d'optique

Combinaison semi-conducteur (CMOS) / Diode / SBS

La suite...?

Quantapore...

Combinaison de nanopores protéiques et de nanopores à l'état solide

Pas de protéine motrice

Détection par fluorescence (CMOS)

100.000 nanopores annoncés par entité

Lectures de l'ordre de la kilobases

A suivre...

...?

...?

Qu'attend-on des techniques mises à notre disposition

- Des techniques simples à mettre en œuvre, raisonnables quant au coût d'investissement, faciles à maintenir et évolutives (pérennité raisonnable),
- Des techniques en adéquation avec les besoins réels des utilisateurs (débit, longueurs de lecture, taux d'erreurs, coût, ...),
- Des protocoles simplifiés réduisant à la fois le coût en réactifs, le temps de préparation et les contraintes de réalisation,
- Des techniques dont les analyses en aval s'intègrent facilement avec l'existant,
- En bref, des éléments qui existent en "*pièces détachées*" chez les divers fournisseurs du marché actuel sans qu'il existe un hybride idéal...
- Au final, quelque chose qui reste encore inaccessible pour le moment et qui impose la stratégie du compromis en permanence!

Toute l'équipe du Laboratoire de Séquençage En particulier Corinne CRUAUD, Karine LABADIE et Aude PERDEREAU

Laboratoire d'Informatique Scientifique

Equipe Bioinformatique

Jean-Marc AURY

Stefan ENGELEN

Benjamin ISTACE

Sabrina DAVIDAS

Léo d'AGATA

Sébastien FAYE

Caroline BELSER

Equipe Système

Claude SCARPELLI

Eric DOUTRELEAU

Denis DEBAUSSART

Directeur du Genoscope

Patrick WINCKER

Et l'ensemble des collaborateurs...

Equipe Développement

Guillaume ALBINI

Julie GUY

Ekrame JACOBY

Gaëlle SAMSON

