

Plateau Génotypage -Séquençage de la Plateforme de Génomique Environnementale ISEM – labellisé CeMEB

L'objet du présent texte est de définir le mode de fonctionnement du plateau **GenSeq** (Génotypage - Séquençage) de l'**ISEM** (Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier), labellisé **CeMEB** (labex Centre Méditerranéen de l'Environnement et de la Biodiversité). Ce texte est l'objet de modifications régulières afin de suivre les évolutions (des moyens) du plateau technique.

1 Description du Plateau technique séquençage-génotypage

Le plateau technique (PT) est situé dans des locaux de l'UMR 5554 (ISEM) sur le Campus triolet, Bâtiment 24, 1^{er} étage de l'université de Montpellier. Il est placé sous la responsabilité d'Erick Desmarais et Frédérique Cerqueira qui assurent son fonctionnement quotidien. Il propose à ses utilisateurs des prestations d'analyses génétiques classiques dans le domaine de l'analyse de la biodiversité sauvage.

Il est équipé d'un automate pour l'extraction d'acides nucléiques Thermo KingFisher Flex, d'un séquenceur capillaire Applied Biosystems 3500XL DNA Analyzer, un séquenceur nouvelle génération Illumina MiSeq, deux machines PCR Eppendorf MasterCycler, une machine PCR Mastercycler nexus, un spectrophotomètre NanoDrop 8000, un fluorimètre Qubit, un sonicateur Covaris S220, un collecteur automatique de fragments d'ADN Pippin Prep de SAGE, un réfrigérateur et un congélateur pour la conservation des échantillons et réactifs, une centrifugeuse de paillasse, un vortex à plaque, une centrifugeuse à plaque... Deux automates de pipetage Beckman-Coulter sont disponibles pour la mise en œuvre de protocoles sur des grandes séries d'échantillons ; l'un -Biomek NXp span 8- est réservé à la manipulation d'ADN natifs avant amplification par PCR, l'autre -Biomek4000- est disponible pour la manipulation d'ADN après leur amplification par PCR. Enfin, un appareil de type Fragment Analyzer d'Agilent pour l'évaluation quantitative et qualitative des acides nucléiques est également installé.

Le PT est ouvert pendant les horaires normaux d'ouverture du laboratoire ISEM du lundi au vendredi (8H30-17H30 en semaine, 17H00 le vendredi).

L'accès aux services du plateau est conditionné à une inscription via une fiche d'accueil de projet (voir paragraphe 1.1). Les données recueillies sont le nom, prénom, adresse électronique professionnelle, adresse professionnelle et numéro de téléphone professionnel des utilisateurs du plateau. Elles sont mises à jour tous les ans et détruites en cas de départ ou sur simple demande. Ces données sont utilisées pour l'envoi des résultats des prestations réalisées et des factures correspondantes, d'informations relatives au fonctionnement du plateau et en cas de problème avec le traitement des projets.

Citation des travaux réalisés avec le concours de GenSeq :

Afin de rendre plus visibles les contributions des plateformes aux différents travaux de recherche des laboratoires utilisateurs, il est demandé aux utilisateurs de les mentionner dans les remerciements des articles, par exemple sous la forme suivante :

Ce travail, via l'utilisation de la plateforme GenSeq de l'Institut des Sciences de l'Evolution labellisée CeMEB, a bénéficié de l'appui d'une aide de l'État gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme "Investissements d'avenir" portant la référence ANR-10-LABX-04-01".

“Data used in this work were (partly) produced through the GenSeq technical facilities of the « Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier » With the support of LabEx CeMEB, an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01).”

Un exemplaire de chaque article publié devra être envoyé au personnel du PT (PPT) pour recensement. Les stages de mastères seront également recensés.

1.1 Accueil des projets.

L'accès au PT dans le cadre d'un projet est soumis à un examen préalable de la faisabilité dudit projet en fonction des possibilités techniques et des disponibilités des équipements. Cet examen est réalisé par le PPT après discussion avec le porteur du projet et réception d'une fiche d'accueil de projet (fournie par GenSeq) dûment renseignée. **Cette feuille d'accueil de projet est indispensable** pour pouvoir commencer à apporter des échantillons à analyser et pour pouvoir réserver en ligne certains appareils. Elle nous permet d'établir les prévisions d'utilisation sur les semaines ou les mois à venir et ainsi de constituer les stocks nécessaires à la bonne réalisation des projets. Si ces fiches de projets sont suffisamment renseignées, il sera possible d'établir une estimation du budget nécessaire à la réalisation des manipulations qui sera envoyée au chef de projet.

Pour tout montage de projet de grande ampleur faisant l'objet d'une demande de financement il est nécessaire de discuter en amont avec le PPT.

Le PT est ouvert prioritairement aux équipes du labex CeMEB. Cependant, dans la mesure où les possibilités d'accueil le permettent, il est également ouvert à toute autre unité académique ainsi qu'aux acteurs issus du monde socio-économique.

Cas des collaborations : les utilisateurs externes pourront bénéficier des tarifs appliqués aux unités du Labex CeMEB dans le cas de collaboration étroite par exemple dans le cas d'un co-encadrement de stage ou de thèse.

1.2 Déontologie des réservations

Pour un certain nombre d'équipements, une réservation doit être déposée auprès du PPT, soit par courrier électronique, soit directement à l'adresse suivante : <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>. Le planning d'occupation des équipements est également consultable à cette adresse. Pour déposer des demandes de réservations, il est toutefois nécessaire d'être inscrit sur le plateau GenSeq, inscription qui est inféodée à la fourniture d'une fiche d'accueil de projet en bonne et due forme.

Toutes les réservations doivent être réalisées quand l'utilisateur a l'assurance de disposer au moment voulu des échantillons à analyser. Les réservations ne peuvent pas impliquer la mobilisation d'un appareil au bénéfice d'un seul utilisateur (sauf période exceptionnelle) afin de ne pas pénaliser d'autres utilisateurs. L'attribution des plages horaires sera faite de façon équitable entre tous les utilisateurs. Il est donc possible que des échantillons soient reportés à une semaine ultérieure pour assurer cette équité.

1.3 Mode de fonctionnement de GenSeq

1.3.1 Ce qui est à la charge du plateau technique

Le plateau technique assure le fonctionnement et l'entretien routinier des appareils qui sont à sa charge. Il met à disposition des utilisateurs un congélateur et un frigo où peuvent être stockés pendant une semaine maximum les échantillons en attente d'analyse. Le personnel du PT (le PPT) gère les flux de passage des analyses en fonction des règles définies dans les paragraphes « Mode d'accès à l'appareil » ci-dessous, propres à chaque appareil. D'une manière générale, le PPT n'assure pas la production des produits finaux à analyser. Le terme « Produit final » désigne tout échantillon prêt à être analysé sur un des appareils de GenSeq et

qui ne nécessite plus aucune intervention de la part du PPT. Il contrôle la qualité des analyses réalisées sur les appareils qu'il gère et s'assure que celles-ci sont pratiquées dans les meilleures conditions.

En cas de problème avec des résultats d'analyses, le PPT pourra re-analyser les données brutes avec les utilisateurs et en fonction de ses compétences, conseiller des modifications de protocoles afin d'améliorer l'acquisition des données.

En cas d'apparition de nouveaux protocoles ou produits concernant directement l'utilisation des appareils communs, l'opportunité de mettre en place ces nouveautés sera évaluée par le PPT et cela se fera conjointement avec les équipes intéressées. De même, une évaluation des différents réactifs concurrentiels sera réalisée et réactualisée régulièrement (par exemple par une négociation annuelle avec les fournisseurs) et les produits les plus compétitifs seront proposés aux utilisateurs.

Le plateau technique a également mis en place un groupement d'achat qui permet des négociations avec les fournisseurs et de bénéficier des meilleurs tarifs. Un tel groupement d'achat porte sur tous les consommables qu'il est possible d'inclure selon deux catégories : ceux nécessaires à l'élaboration des « Produits finaux » (Kit de séquençage, amorces marquées, etc... propres à chaque labo) et ceux nécessaires au fonctionnement des appareils du plateau (capillaires, tampon électrophorèse, et...). Le PT ne gère que les stocks des consommables nécessaires au fonctionnement des appareils à l'électrophorèse, à charge pour chaque unité de gérer ses propres commandes pour le reste en faisant référence au plateau GenSeq. Cependant et afin de réduire les coûts par l'achat de gros conditionnements, le PPT peut acheter certains consommables (Kits de purification, etc...) qui seront ensuite rétrocédés sous forme d'aliquotes aux laboratoires. Cela peut signifier une diminution de la liberté de choix des utilisateurs en termes de références disponibles en fonction de ce qui aura été convenu lors de la négociation.

1.3.2 Ce qui est à la charge de l'utilisateur

L'utilisateur assure financièrement et pratiquement la production des produits finaux à analyser. Il bénéficie bien sûr des tarifs accordés au plateau. Il doit signaler si ses échantillons nécessitent des conditions particulières de traitement et vient récupérer en fin d'analyse les produits résiduels.

Il analyse ses résultats au sein de son propre laboratoire à l'aide des outils qu'il possède ou sur l'ordinateur mis à disposition par la plateforme si son laboratoire ne dispose pas des logiciels d'analyse des résultats des électrophorèses capillaires. Dans ce cas, à la fin

de son projet, il prendra en charge la sauvegarde de ses résultats analysés et des paramètres d'analyses correspondants.

1.4 Responsabilités

Certains appareils sont laissés en libre accès aux utilisateurs après formation et suivant les instructions du PPT. En cas de panne provoquée par une utilisation non conforme, il pourra être demandé à l'utilisateur responsable de prendre en charge les frais de remise en état de l'appareil concerné.

2 Services et prestations proposées

2.1 Mesures d'hygiène et de sécurité

Le port de la blouse et de gants sont obligatoires pour les prestations ou les lieux de travail qui le nécessitent. L'utilisateur s'engage à ranger et nettoyer la paillasse, à vider la poubelle de paillasse et à rapporter ses boîtes vides. Il devra respecter les espaces de travail post-PCR et pré-PCR.

2.2 Electrophorèse capillaire pour Séquençage/Génotypage

Cette prestation est assurée grâce à un séquenceur ABI3500xL (24 capillaires). Il est équipé de capillaires 50 cm et alimenté en polymère de type POP7. L'appareil a été calibré pour les kits BigDye Terminator V3.1 pour les séquences et pour des kits en 4 ou 5 couleurs (voir tableau ci-dessous) pour le génotypage de locus microsatellites.

Dye Set	Filter Set	Blue	Green	Yellow	Red	Orange
DS-30	D	6-FAM	HEX	NED	ROX (Marqueur de taille)	
DS-33	G5	6-FAM	VIC	NED	PET	LIZ (Marqueur de taille)

Plusieurs durées de migrations sont prédéfinies aussi bien pour le séquençage que le génotypage. Elles sont déterminées en fonction de la taille des fragments à analyser. Il est également possible d'ajuster ponctuellement la durée de migration pour des applications particulières telles que l'analyse de très grands ou très courts fragments.

Le tableau ci-dessous résume les durées des électrophorèses en fonction de la taille des fragments et du nombre d'échantillons.

Type d'analyse	Durée par nombre d'échantillons passés sur le 24 capillaires						
	24	48	72	96	2X96	3X96	4X96=384
Analyse de fragment 400 pb	45 min	1H15	1H45	2H15	4H15	6H15	8H15
Analyse de fragment 500 pb	52 min	1H30	2H10	2H45	5H10	7H40	10H10
SnapShot	30 min	45 min	1H	1H15	2H30	3H45	5H
Séquence 400 pb	30 min	1H	1H30	2H	4H	6H	8H
Séquence 600 pb	45 min	1H30	2H15	3H	6H		
Séquence 800 pb	1H	2H	3H	4H	8H		
Séquence > 900 pb	2H	4H	6H	8H	16H		
Analyse de Minisatellite 1200pb	2H	3H50	5H40	7H30	14H45	22H00	29H15

De ces durées découlent le nombre et la fréquence des chargements quotidiens des appareils : Les électrophorèses sont démarrées deux fois par jour : à **9H30** le matin pour une durée totale inférieure à 8 heures et à **17H30** pour une durée totale pouvant atteindre 12 heures.. Le week-end est réservé en priorité pour tout ce qui dépasse une durée de 12 heures.

2.2.1 Modalité d'accès à l'électrophorèse capillaire

2.2.1.1 Réservations

Pour la réservation des séquenceurs, les utilisateurs doivent **impérativement** envoyer un message **le vendredi matin** à l'adresse genseq-contact@umontpellier.fr pour réserver des plages d'utilisation **pendant la semaine suivante**. Un planning prévisionnel des électrophorèses à venir est alors établi par le PPT (consultable sur le site de réservation <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>) et un message automatique est envoyé à l'utilisateur concerné pour lui signifier l'horaire de passage de ses échantillons. Ceux-ci peuvent être apportés à l'avance et stockés sur le PT ; le PPT se chargera de les passer sur l'appareil en optimisant au maximum le temps d'utilisation de l'appareil. Cette réservation d'une semaine sur l'autre est la garantie d'une planification optimale des électrophorèses et permet une meilleure gestion des consommables dont la durée de vie sur l'appareil est limitée.

2.2.1.2 Mise en œuvre

Seul le PPT peut manipuler les séquenceurs. Les utilisateurs apportent les échantillons prêts à être chargés sur les appareils. Il est demandé d'apporter les échantillons correctement identifiés au plus tard la veille de l'électrophorèse pour être stockés au frigo ou congélateur. Les échantillons seront réceptionnés le matin entre **8h45** et **9h30** ou en fin d'après-midi entre **16h00** et **17h00**. Les « feuilles de route » correspondantes établies selon les modèles fournis

par GenSeq devront également être fournies. Les résultats sont communiqués aux utilisateurs **non présents sur le campus Triolet de l'UM** par courrier électronique ou par serveur FTP en début et en fin de journée. Cependant, cet envoi sera suspendu pour les utilisateurs ne récupérant pas leurs plaques d'échantillons après leur électrophorèse dans un délai de 15 jours.

2.2.2 Analyse des résultats d'électrophorèse capillaire

Un poste informatique est mis à la disposition des utilisateurs pour analyser les résultats des électrophorèses réalisées avec les séquenceurs. Il est pourvu du logiciel d'analyse de séquences SeqScape version 2.5 et du logiciel d'analyse de fragments GeneMapper version 5.0. Il est néanmoins recommandé de nous contacter avant de venir l'utiliser afin de s'assurer de sa disponibilité. Le plateau technique assure une formation des nouveaux utilisateurs appelés à utiliser ces logiciels. Par contre, le plateau n'assure pas les sauvegardes des résultats des analyses menés sur les ordinateurs mis à la disposition des utilisateurs. En début d'année les projets et paramètres associés de l'année n-1 seront supprimés.

2.2.3 Archivage des données d'électrophorèse capillaire

Les résultats des analyses pratiquées sur les séquenceurs sont sauvegardés tous les mois sur un système de sauvegarde qNAP délocalisé afin d'assurer leur sauvegarde pendant une année. Au-delà, il revient aux utilisateurs d'assurer la pérennité de leurs données.

2.3 Service de séquençage Méthode de Sanger

Le plateau technique propose aux utilisateurs un service de séquençage à façon à partir de matrices quantifiées par nos soins. Ce service inclut la purification du produit de PCR, son dosage au Nanodrop, la réaction de séquençage, la purification des séquences et le passage sur le séquenceur.

Accès : Cette prestation fait l'objet d'une discussion préalable détaillée entre les utilisateurs et le PT concernant les contrôles de qualité concernant les produits à séquençer, leur nature et la diversité des amorces à utiliser.

Mise en œuvre : Le séquençage est réalisé par le personnel du plateau en fonction de la disponibilité des appareils, automate de pipetage et séquenceurs capillaires.

Après restitution des résultats, les plaques de PCR et de séquences purifiées seront jetées au bout d'une semaine.

Archivage : Les données seront conservées une année (Cf. § 2.2.3)

2.4 Séquençage haut-débit

GenSeq dispose d'un appareil Illumina de type MiSeq depuis le début 2016. Plusieurs types de prestation sont proposés autour de cet appareil :

2.4.1 Séquençage de banques déjà construites

Il s'agit du séquençage sur séquenceur MiSeq de banques de fragments d'ADN préparées en dehors du plateau technique et compatibles avec le séquençage Illumina.

Accès : il faut prendre contact avec F. Cerqueira qui gère plus spécialement le MiSeq. Selon la disponibilité de l'appareil et des consommables nécessaires à son fonctionnement, un rendez-vous est pris pour apporter les échantillons à séquencer. Le demandeur devra également fournir tous les renseignements nécessaires au paramétrage du séquenceur.

Mise en œuvre : Cet appareil est uniquement manipulé par le PT de Genseq. Les échantillons seront conservés 15 jours après restitution des résultats.

Analyse des résultats : Hormis une analyse primaire en fin de séquençage permettant de s'assurer du bon déroulement du séquençage et de vérifier la qualité des séquences restituées, aucune analyse supplémentaire par le PT n'est prévue. Les résultats sont mis à disposition des utilisateurs via le service sécurisé FileSender du réseau RENATER pour un téléchargement direct.

2.4.2 Service de séquençage d'amplicons

Il s'agit du séquençage d'amplicons dans le cadre de projets de barcoding environnemental, d'analyse de diversité bactérienne ou fongique dans des échantillons naturels.

Accès : En premier lieu, toute demande d'une prestation de ce type est soumise à une discussion et une analyse conjointe du projet se concluant par l'écriture d'une fiche de projet spécifique et détaillée. Le projet ne démarrera que lorsque tous ses détails en auront été précisés.

Mise en œuvre : Une partie des expérimentations est réalisée par le demandeur (PCR locus spécifiques avec des amorces pourvues d'extensions nécessaire à la suite du protocole) qui confie ensuite les produits obtenus au PT. Celui-ci se charge de les indexer, de les rendre compatible avec le séquençage Illumina puis de réaliser le séquençage sur MiSeq. Les échantillons seront conservés 15 jours après restitution des résultats.

Analyse des résultats : Une analyse primaire des résultats sera réalisée en sortie de séquenceur pour évaluer la qualité du séquençage. En fonction de la disponibilité des

ressources correspondantes (base de données des séquences de référence), il pourra être réalisé une analyse secondaire pour évaluer la diversité des séquences obtenues.

2.4.3 Fabrication et séquençage de banques à façon

Cette prestation est prévue pour une mise en place progressive et s'appuie sur l'utilisation de l'automate de pipetage Biomek Nxp. Il n'est pas possible de réaliser tous les types de banques existants ; sont mises en place en priorité celles concernant plus le domaine de l'analyse de la Biodiversité et pour lesquelles l'automatisation est un avantage.

Accès : Comme pour le séquençage d'amplicons, toute demande d'une prestation de ce type sera soumise à une discussion et une analyse conjointe du projet se concluant par l'écriture d'une fiche de projet spécifique et détaillée. Le projet ne démarrera que lorsque tous ses détails en auront été précisés.

Mise en œuvre : Cette prestation sera réalisée par le personnel du plateau technique avec éventuellement la participation du demandeur s'il le souhaite. Des utilisateurs aguerris pourront être formés pour la mise en œuvre de protocoles validés et bien standardisés sur l'automate.

2018 : fabrication simultanée de 48 banques d'ARN suivant le protocole Illumina TruSeq mRNA stranded.

2019 : fabrication de banques génomiques suivant le protocole ddRAD.

2.4.4 Archivage des données de séquençage haut-débit

Les résultats obtenus sur séquenceur haut-débit sont stockés sur notre système de sauvegarde pendant **3 mois**.

2.5 Manipulation automatisée d'échantillons

2.5.1 Pipetage automatique d'ADN non amplifiés

Il s'agit de prestations concernant spécifiquement la manipulation automatisée d'échantillons d'ADN n'ayant pas subi au préalable une amplification par PCR. Elles sont réalisées avec un robot pipeteur Biomek Nxp span 8 à 8 canaux de pipetage indépendants permettant des pipetages automatiques entre 1 et 1000 µl. En dehors de la préparation de banques de fragments pour le séquençage haut-débit (chapitre précédent), cet automate est disponible pour la préparation des plaques de lysats cellulaires utilisées en entrée du robot d'extraction KingFisher (voir plus bas) et la normalisation des solutions d'ADN extraits.

D'autres protocoles impliquant des pipetages complexes de grandes séries d'échantillons peuvent être développés sur demande.

Accès : Cet automate n'est pas en accès libre : prendre contact avec GenSeq pour son utilisation.

2.5.2 Pipetage automatique d'ADN amplifiés

Il s'agit de prestations concernant spécifiquement la manipulation d'échantillons d'ADN ayant subi au préalable une amplification par PCR. Elles sont réalisées avec un robot pipeteur Biomek 4000 permettant des pipetages automatiques entre 1 et 1000 µl.

2.5.2.1 Purification d'acides nucléiques

Le plateau a mis en place deux méthodes sur la base de kits utilisant des billes magnétiques : une pour la **purification des réactions de PCR** et l'autre pour celle **des réactions de séquences Sanger**. Ces kits utilisent des billes magnétiques qui permettent des purifications rapides, simples, automatisables et très efficaces. Ils permettent en outre de réduire la quantité de réactifs de séquençage à utiliser tout en conservant un signal optimal.

2.5.2.2 Préparations d'échantillons

Plusieurs applications de pipetage ont été développées telle que le reformatage de 4 plaques 96 puits de produits de PCR (préalablement préparés dans la formamide et marqueur de taille) en une plaque 384 puits adaptée aux séquenceurs.

2.5.2.3 Réservation et mise en œuvre

Il faut prendre contact avec le personnel du plateau technique afin de planifier le moment où la prestation pourra être réalisée. Les utilisateurs apportent ensuite leurs échantillons et le PPT assure la mise en route du robot et son fonctionnement.

Certains utilisateurs réguliers d'une même méthode sur l'appareil pourront être formés à l'utilisation de l'automate et se charger eux-mêmes de la mise en route du protocole. Dans ce cas, ils devront déposer une demande de réservation de l'automate sur le site <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>. Ils recevront alors un message précisant la date et l'heure de disponibilité de l'appareil. Chaque utilisation devra être notée sur un registre mis à disposition en mentionnant le nombre d'échantillons traités, le type et le volume total du kit utilisé ou la méthode utilisée selon l'application mise en œuvre.

2.5.3 Développement de nouvelles méthodes

Le développement de nouvelles méthodes doit faire l'objet d'une discussion détaillée concernant les objectifs de cette méthode et visant à déterminer l'intérêt d'une telle méthode pour la communauté.

2.6 Extractions, évaluation et traitements des acides nucléiques

2.6.1 Extractions automatisées ADN ARN

GenSeq a validé plusieurs protocoles d'extraction automatisée d'ADN ou ARN sur automate KingFisher de Thermo. Ils permettent la production d'extraits d'acides nucléiques en grandes séries rapidement et de façon reproductible à partir d'une très grande variété d'organismes. Ces extraits sont ensuite utilisables pour toute application en génomique des populations.

Réservation : une demande de réservation de l'automate devra être déposée sur le site <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>. Une fois la demande validée, un message précisant la date et l'heure de disponibilité de l'appareil sera envoyé.

Mise en œuvre : Le PT tient à la disposition des demandeurs des protocoles détaillés concernant l'utilisation des kits qu'il a validés. Il fournit également toute la vaisselle spécifique nécessaire au fonctionnement de l'automate d'extraction. Par contre, l'utilisateur doit fournir le kit d'extraction et autres consommables nécessaires aux extractions, puis procéder lui-même au traitement de ses échantillons après avoir appris comment fonctionne l'appareil. Chaque utilisation devra être notée sur un registre mis à disposition en mentionnant les consommables utilisés et le nombre d'échantillons traités,

Associé à cette prestation, deux blocs chauffant-agitant sont mis à disposition des utilisateurs pour procéder à la lyse de leurs échantillons. Ils sont également réservables sur le site <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>.

2.6.2 Sonication

Un sonicateur Covaris S220 est disponible pour la fragmentation d'ADN, d'ARN, de la chromatine ou même des tissus biologiques. Un panel très complet de méthodes pour le paramétrage de l'appareil est disponible pour réaliser la plupart des applications possibles avec ce genre d'équipement. Un seul échantillon peut être fragmenté à la fois avec une durée pouvant aller de quelques dizaines de secondes à quelques minutes.

Réservation : il est impératif de réserver l'utilisation du sonicateur sur le site <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/> afin que le PPT puisse préparer le sonicateur. La tranche minimale de réservation pour le sonicateur est de 1 heure.

Mise en œuvre : Dans la mesure du possible, l'appareil sera démarré et mis à réfrigérer une heure avant l'arrivée de l'utilisateur. Celui-ci sera assuré de cette mise en service par l'acceptation de la réservation qu'il aura déposée sur le site de réservation. Le PT peut fournir plusieurs types de tubes correspondant aux différents volumes et méthodes de sonication, adaptés à la taille de fragments souhaités et au matériel biologique. L'utilisateur devra apporter toute autre vaisselle dont il pourrait avoir besoin et procèdera lui-même aux sonications de ses échantillons. Chaque utilisation devra être notée sur un registre mis à disposition en mentionnant le nombre et le type de tubes de sonication utilisés ainsi que la durée d'utilisation en unités de créneau d'utilisation, c'est-à-dire une heure.

2.6.3 Dosage des acides nucléiques

2.6.3.1 Spectrophotomètre NanoDrop 8000

Un spectrophotomètre micro volume de type Nanodrop 8000 est disponible. Il permet de réaliser des dosages en absorbance et fluorescence sur des volumes d'échantillons très faibles (classiquement 1,5 µl). Huit échantillons sont mesurables simultanément et un spectre est réalisé en quelques secondes. Cet appareil permet de doser acides nucléiques et protéines très facilement et permet entre autres de normaliser les concentrations d'acide nucléique pour les applications où cela est indispensable : analyse d'AFLP, séquençages, qPCR.

Réservation et mise en œuvre : Cet appareil est réservable directement sur le site <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>. Des pipettes mono et multicanaux sont disponibles mais l'utilisateur doit apporter ses cônes 10µl et la solution de dilution des échantillons afin de réaliser le « blanc ». Des instructions d'utilisations sont affichées à proximité de l'appareil et il est impératif de bien les lire. Les fichiers de résultat des dosages devront être aussitôt récupérés par l'utilisateur (apporter une clé USB), aucune sauvegarde ne pouvant être faite sur le plateau technique. Chaque utilisation devra être notée sur un cahier mis à disposition.

2.6.3.2 Fluoromètre Qubit

Un spectro-fluoromètre de type Qubit est disponible pour réaliser des dosages en fluorescence des acides nucléiques. Un seul échantillon est mesurable à la fois. Cet appareil

permet de doser plus spécifiquement que par absorbance les acides nucléiques et protéines par addition d'un composé fluorescent.

Réservation et mise en œuvre : Cet appareil est réservable directement sur le site <https://genseq.umontpellier.fr/GRR/>. Les tubes spécifiques de l'appareil ainsi qu'un kit de dosage des ADN sont disponibles sur le PT. L'utilisateur doit apporter ses cônes et procéder lui-même aux dosages. Chaque utilisation devra être notée sur un registre mis à disposition en mentionnant le nombre de tubes pour Qubit ainsi que le type de kit et les volumes de réactif utilisés.

2.6.3.3 Fragment Analyzer

Cet appareil d'électrophorèse capillaire permet de visualiser le profil électrophorétique de préparations d'ADN ou d'ARN pour en contrôler la taille et la qualité. Sous certaines conditions, une quantification des ADN peut être effectuée à partir de ces profils. Il permet le passage d'échantillons disposés sur une plaque 96 puits par ligne ou par plaque entière.

Accès et réservation : Se renseigner et réserver auprès du personnel de la plateforme.

Mise en œuvre : Cette prestation sera réalisée par le personnel du plateau technique avec la participation du demandeur pour l'analyse des grandes séries d'échantillons. Des utilisateurs aguerris et réguliers pourront être formés pour la mise en œuvre de l'appareil.

Analyse des résultats : Une analyse simple sera réalisée en fin d'électrophorèse pour valider la migration et un rapport sera envoyé à l'utilisateur. Le logiciel d'analyse est libre et pourra être distribué sur demande pour des analyses plus détaillées des résultats.

Archivage : Les données seront conservées un an.

3 Prise en charge financière

Le plateau technique travaille avec une grille tarifaire établie selon les règles édictées par les tutelles de l'ISEM sur la base du calcul du coût complet des prestations.

Le suivi des analyses effectuées sur le PT est assuré par la tenue de registres sur lesquels sont portés le nombre et la nature des prestations effectuées pour chaque utilisateur, et pour certaines prestations les consommables utilisés. En fonction de ces registres, chaque équipe se verra facturer périodiquement le coût des analyses qu'elle a réalisées. Une demande de bon de commande accompagné d'un relevé des analyses concernées sera ainsi envoyée aux utilisateurs qui retourneront alors un bon de commande au plateau technique. Les services financiers de l'université ou du CNRS gèreront la suite des opérations, comme l'envoi des

factures aux utilisateurs. Un relevé mensuel des utilisations pourra être envoyé à chaque équipe en cas de besoin.

Les plus gros utilisateurs recevront plusieurs factures dans l'année, ce qui permettra d'alimenter un budget de fonctionnement pour le renouvellement des stocks de réactifs.

3.1 *Fonctionnement de base*

L'achat des consommables spécifiques nécessaires au fonctionnement et à la maintenance des équipements est assuré par le PT. Ce coût est facturé aux utilisateurs au prix coûtant des réactifs éventuellement majoré selon les manipulations pour prendre en compte les mises au point et essais divers ainsi qu'une partie du coût de la maintenance.

Les réparations éventuelles sont prises en charge par la souscription d'un contrat d'entretien couvrant l'ensemble des frais.

3.2 *Analyse d'échantillons*

Lorsque la prestation proposée nécessite l'achat de réactif nécessaires à l'élaboration des « Produits finaux », le PT prend en compte le coût de ces réactifs dans la facturation des analyses après leurs réalisations. Cette facturation finale comprend donc le coût réel de chaque type d'analyse, incluant le fonctionnement des appareils et la fourniture de tous les réactifs nécessaires.

D'une manière générale, toute analyse réalisée est due : aucune surfacturation n'étant appliquée pour amortir l'effet des essais multiples, cela permet de maintenir le coût unitaire de chaque prestation au plus bas. Par contre le PT ne peut pas constituer de réserve de fonds pour pouvoir se permettre de recommencer plusieurs fois la même analyse jusqu'à obtention de résultats satisfaisants.

En cas de litige pour le règlement des sommes dues, les directeurs de laboratoire pourront être appelés à se prononcer pour régler au mieux le problème.

3.3 *Grille tarifaire*

Se renseigner auprès de GenSeq.

Tableau récapitulatif sur le mode de réservation et la récupération des données

Au préalable : envoyer la "fiche d'accueil de projet" en cours complètement renseignée

Prestation	Mode de réservation	Moment ou particularité de la réservation	Document à fournir	Modalités récupération data
Electrophorèse capillaire	genseq-contact@umontpellier.fr	vendredi semaine N-1	cf Checklist pour infos à fournir	clef USB pour les labos sur la fac de sciences et serveur pour les externes
Service séquençage	genseq-contact@umontpellier.fr	vendredi semaine N-1	Demande service séquençage	messengerie
Run MiSeq	genseq-contact@umontpellier.fr	le plus rapidement possible passage par ordre d'arrivée	Fiche "Préparation Run MiSeq GenSeq"	FileSender
Banque d'amplicons	genseq-contact@umontpellier.fr	le plus rapidement possible, nécessite plusieurs rencontres pour le montage du projet	Fiche d'accueil de projet de séquençage d'amplicon. Photos. Fichier échantillons.	FileSender
Sonication	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	réservation nécessitant une validation		
Extraction automatisée	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	réservation nécessitant une validation		
Utilisation Biomek4000	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	réservation nécessitant une validation		
Utilisation BiomekNxp	genseq.contact@umontpellier.fr	réservation après discussion du projet		
Fragment Analyzer	genseq-contact@umontpellier.fr	réservation après discussion du projet	Fichier échantillons	messengerie
Nanodrop	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	réservation directe		
QuBit	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	réservation directe		
Agitateurs chauffants	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	réservation directe		

Mise à jour : Septembre 2019.

Tableau récapitulatif des appareils

Prestation	Mode de réservation	Modalité d'utilisation
Electrophorèse capillaire	genseq-contact@umontpellier.fr	Personnel GenSeq uniquement
MiSeq	genseq-contact@umontpellier.fr	Personnel GenSeq uniquement
Sonicateur Covaris S220	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	Formation. Libre accès après mise en route de l'appareil
Automate KingFisher Flex	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	Formation. Libre accès
Automate Biomek4000	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	Formation. Libre accès
Automate BiomekNxp	genseq.contact@umontpellier.fr	Formation. Libre accès
Fragment Analyzer	genseq-contact@umontpellier.fr	Formation. Libre accès
Agitateurs chauffants	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	Libre accès
Nanodrop	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	Libre accès
QuBit	https://genseq.umontpellier.fr/GRR/	Libre accès
Machines PCR		Demande auprès de GenSeq