



Mot de la direction

Les beaux jours s'installent et les conditions de travail commencent à s'améliorer. Ce contexte permet de se projeter de façon plus optimiste dans la réalisation de nouveaux projets, ce que nous vous souhaitons.

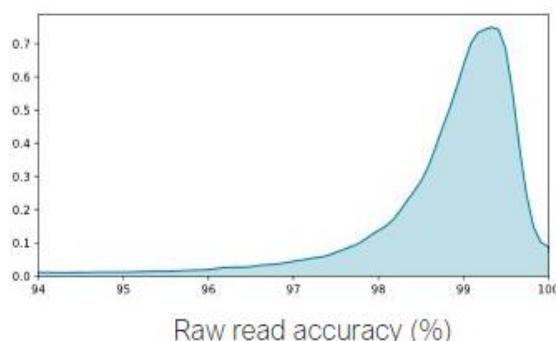
De notre côté, nous allons à accueillir un nouveau séquenceur Illumina NextSeq 2000 dès la rentrée. Ce séquenceur a été choisi pour pouvoir monter en débit par rapport à notre offre actuelle en séquençage courts fragments Illumina iSeq100 et MiSeq. Il permettra de mieux répondre à vos besoins pour des applications de transcriptomique (RNAseq), de métagénomique, de single cell ou de séquençage de génomes complets ou ciblés par amplicons ou capture. Une journée d'animation autour des nouvelles possibilités offertes par cette machine sera organisée à l'automne ; nous espérons vous y voir nombreux !

En parallèle, la PGTB a obtenu son renouvellement de certification qualité ISO 9001 et NFX 50-900 pour les trois prochaines années : nous sommes donc à vos côtés avec la meilleure qualité de service possible pour vous accompagner dans vos projets.

Enfin, si vous voulez en savoir davantage sur nos activités ou un domaine particulier d'application de la génomique qui intéresserait votre unité ou équipe de recherche, contactez-nous afin d'organiser une présentation adaptée à vos centres d'intérêts, en présentiel dans votre laboratoire ou en visioconférence.

Du nouveau en séquençage long read !

Lors du London Calling 2021, Oxford Nanopore a présenté plusieurs nouveautés. Sa nouvelle chimie Q20+, pour le moment accessible en early access, offre désormais une précision de lecture >99%.



La nouvelle technologie Duplex, où l'on séquence successivement le brin matrice puis le brin complémentaire, permet quant à elle d'obtenir des résultats de séquençage de très haute précision (Q30, soit >99.9%), d'après les tous premiers résultats des tests internes.

Oxford Nanopore a par ailleurs présenté d'importantes avancées dans la caractérisation des méthylations 5mC en natif, sans modification de l'ADN, grâce à une amélioration des algorithmes d'interprétation du signal. Les résultats obtenus, avec une profondeur pourtant deux fois moindre, surpassent de manière très répétable ceux obtenus par les approches classiques (conversion bisulfite + séquençage Illumina) :

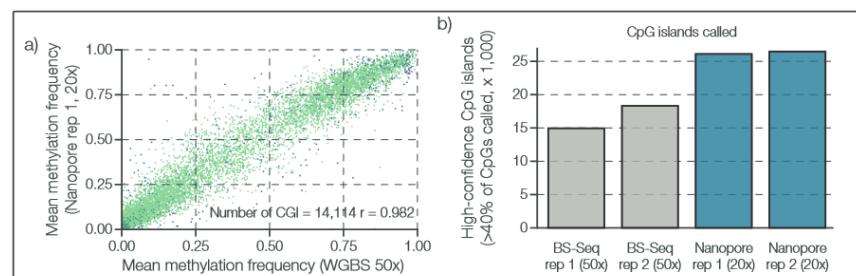


Fig. 2 Methylation frequency in CpG islands and reproducibility of calls

La PGTB est équipée de séquenceurs Oxford Nanopore depuis 2018. Si cette technologie en constante amélioration vous intéresse, contactez-nous à pgtb@inrae.fr !

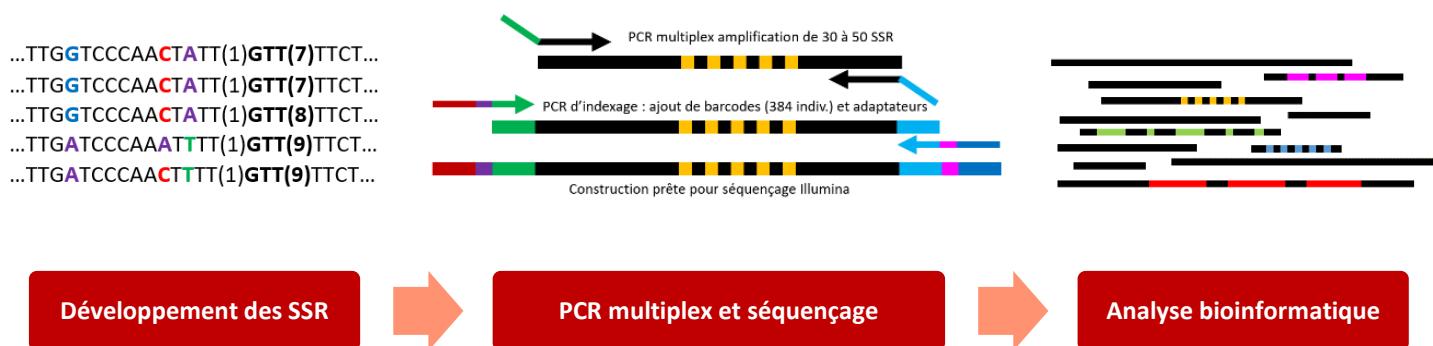
Le génotypage de microsatellites par séquençage : une approche innovante et clé en main pour l'analyse de la diversité génétique

Les marqueurs microsatellites, qui sont constitués d'un nombre variable de répétitions de motifs oligonucléotidiques, présentent plusieurs avantages pour les études de diversité génétique neutre en populations naturelles. D'une part, étant particulièrement abondants au sein des génomes, il est facile d'identifier des marqueurs polymorphes en séquençant une fraction du génome d'un individu. D'autre part, chaque marqueur étant multi-allélique, un nombre limité de marqueurs est souvent suffisant pour atteindre la quantité d'information nécessaire pour, par exemple, décrire la structure génétique des populations ou effectuer des recherches de parentés.

Les marqueurs microsatellites se démarquent donc des marqueurs SNP qui nécessitent des études de séquençage en population afin d'identifier les polymorphismes pertinents et dont le caractère bi-allélique nécessite davantage de marqueurs pour atteindre une résolution suffisante. Les microsatellites représentent donc une alternative complémentaire aux SNP particulièrement intéressante dans le cadre de l'étude d'espèces orphelines du fait d'un coût de développement et de génotypage optimisé.

Alors que les séquenceurs sur lesquels se base le génotypage de microsatellites par électrophorèse capillaire classique deviennent de plus en plus rares au sein des laboratoires et des plateformes du fait des coûts de maintenance élevés, il nous est apparu nécessaire de pouvoir proposer une alternative reposant sur des méthodes de séquençage haut-débit (SSRseq).

A l'issue d'un projet de R&D validant la méthode SSRseq sur plusieurs espèces (Lepais *et al.*, 2020), la PGTB propose désormais une suite d'analyse intégrant l'identification de microsatellites, la mise au point d'un protocole d'amplification multiplexe, le séquençage des amplicons et l'analyse bioinformatique nécessaire à l'établissement du tableau de génotypes.



Chaque nouveau projet est validé par l'analyse de plusieurs dizaines d'individus répétés afin d'identifier les marqueurs fiables (marqueurs polymorphes, marqueurs avec des très faibles taux d'erreurs entre réplicats... ; typiquement 50% des marqueurs développés) et optimiser les paramètres d'analyse bioinformatique pour chaque marqueur.

Ainsi sur les 22 espèces étudiées à ce jour, représentant une large diversité d'organismes (arbres, poissons, plantes herbacées, champignons, crustacés, insectes, algues et mammifères), 1323 marqueurs ont été développés et 679 ont été validés avec une moyenne de 30 marqueurs fiables par développement.

L'accès à la séquence des allèles permet d'identifier précisément l'ensemble des polymorphismes contenus dans les zones flanquantes ou les motifs répétés sous forme de microhaplotypes et de différencier des allèles de même longueur, ce qui n'était pas possible auparavant (+ 37% d'allèles en moyenne mais reste très variable entre espèces allant de + 5% à + 113%). L'analyse bioinformatique automatisée permet en outre de générer plus facilement des génotypes comparables entre projets ou entre laboratoires.

Le SSRseq se prête particulièrement bien aux développements en parallèle. Nous avons par exemple séquéncé plusieurs multiplexes ciblant au total une centaine de marqueurs nécessaires pour densifier des cartes génétiques chez les châtaigniers (Laurent *et al.*, 2020) et combiné à la fois des marqueurs nucléaires et cytoplasmiques pour des études en populations chez les châtaigniers ou les aloes.

Les analyses de génétique des populations comparatives sont également facilitées grâce au développement et à l'application du SSRseq chez plusieurs espèces (jusqu'à 8 espèces jusqu'à présent) partageant des caractéristiques biologiques communes (espèces proches, espèces en interaction biotique, espèces invasives) ou partageant le même écosystème (génotypage des communautés).

Alors que nous maîtrisons bien l'analyse SSRseq appliquée aux génomes haploïdes et diploïdes, nous travaillons actuellement sur des raffinements permettant de génotyper les espèces polyploïdes. Une perspective à plus long terme est d'augmenter le nombre de marqueurs étudiés grâce à des approches de ciblage par hybridation de sondes. En effet, le séquençage de génomes complets en population chez les espèces modèles met en lumière le rôle fonctionnel de variations associées à certains locus microsatellites (Fotsing *et al.*, 2019). Ainsi, le génotypage à grande échelle au-delà des mutations ponctuelles (Press *et al.*, 2019) va devenir essentiel pour mieux comprendre le rôle d'une plus grande diversité de variations génomiques dans l'évolution et l'adaptation des espèces (Xie *et al.*, 2019).

Fotsing SF, Margoliash J, Wang C, Saini S, Yanicky R, Shleizer-Burko S, Goren A, Gymrek M. 2019. The impact of short tandem repeat variation on gene expression. *Nature Genetics* 51:1652–1659. DOI: 10.1038/s41588-019-0521-9.

Laurent B, Larue C, Chancerel E, Guichoux E, Petit RJ, Barreneche T, Robin C, Lepais O. 2020. Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species. *Conservation Genetics Resources* 12:567–580. DOI: 10.1007/s12686-020-01157-5.

Lepais O, Chancerel E, Boury C, Salin F, Manicki A, Taillebois L, Dutech C, Aissi A, Bacles CFE, Daverat F, Launey S, Guichoux E. 2020. Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8:e9085. DOI: 10.7717/peerj.9085.

Press MO, Hall AN, Morton EA, Queitsch C. 2019. Substitutions are boring: Some arguments about parallel mutations and high mutation rates. *Trends in genetics* 35:253–264. DOI: 10.1016/j.tig.2019.01.002.

Xie KT, Wang G, Thompson AC, Wucherpennig JI, Reimchen TE, MacColl ADC, Schluter D, Bell MA, Vasquez KM, Kingsley DM. 2019. DNA fragility in the parallel evolution of pelvic reduction in stickleback fish. *Science* 363:81–84. DOI: 10.1126/science.aan1425.

