

Un NextSeq 2000 à la PGTB !

Le NextSeq 2000 est le dernier séquenceur commercialisé par Illumina, leader mondial du séquençage short-reads. Ce séquenceur haut-débit est basé, comme l'ensemble de la gamme Illumina, sur la technologie de séquençage SBS (Sequencing By Synthesis) qui offre les meilleures qualités de lecture (85% > Q30 en 2x150 pb sur le NextSeq 2000). A l'instar du séquenceur bas-débit iSeq 100 (déjà en service à la PGTB) et du séquenceur très haut-débit NovaSeq, le NextSeq 2000 utilise des flow cell structurées pour un rendement et une qualité supérieurs aux flow cell classiques. Le NextSeq 2000 est un séquenceur haut-débit offrant une grande flexibilité, avec trois formats de flow cell pour des débits allant jusqu'à plus d'un milliard de lectures uniques, ainsi que différentes configurations de séquençage :



Flow Cell	Lectures	Rendement (2 x 150 pb)	Séquençage possible
P1	Jusqu'à 100 millions	Jusqu'à 30 Gb	2x150 pb
P2	Jusqu'à 400 millions	Jusqu'à 120 Gb	2x50 pb, 2x100 pb, 2x150 pb
P3	Jusqu'à 1.2 milliard	Jusqu'à 330 Gb	2x50 pb, 2x100 pb, 2x150 pb

Le NextSeq 2000 est particulièrement adapté aux projets de RNA-seq, single-cell, séquençage *de novo*, reséquençage total ou ciblé (panels de gènes), métagénomique, CHIP-Seq, Methyl-Seq, Génotypage par Séquençage (GBS), séquençage d'ADN ancien... Il a été mis en service le 22 novembre 2021 à la PGTB et vient compléter notre parc de séquenceurs Illumina déjà en service (iSeq 100 et MiSeq) :

	 iSeq 100	 MiSeq	 NextSeq 2000
Applications et Méthodes	Application principale ■	Application principale ■	Application principale ■
Séquençage petits génomes	●	●	●
Séquençage grands génomes			●
Exome et grands panels			●
Séquençage ciblé (amplicons, petits panels)	●	●	●
Séquençage SSR	●	●	
Métagénomique ciblée (16S, ITS, ...)		●	●
Métagénomique et métatranscriptomique			●
Single-cell			●
RNA-Seq			●
miRNA et petits RNA	●	●	●
ChIP-Seq		●	●
Méthylation du génome			●
Spécifications techniques			
Durée de séquençage	10-19h	4-55h	11-48h
Rendement maximal	1.2 Gb	15 Gb	330 Gb
Nombre maximal de lectures	4 millions	25 millions	1200 millions
Longueur maximale de lecture	2 x 150 pb (2 x 250 bp début 2022)	2 x 300 pb	2 x 150 pb



Analyse rapide avec Bio-IT DRAGEN. Le NextSeq 2000 embarque la plateforme intégrée Bio-IT DRAGEN (Dynamic Read Analysis for GENomics), une solution ultra-rapide et précise pour l'analyse secondaire des données produites par le séquenceur. Plusieurs outils sont déjà disponibles sur le NextSeq 2000 : alignement, appels de variants, Copy Number Variation (CNV), expression différentielle, gènes de fusion, single cell...

Séminaire de présentation du NextSeq 2000 de la PGTB le vendredi 3 décembre 2021

La PGTB organise en collaboration avec Illumina, une demi-journée virtuelle consacrée à ce nouveau séquenceur NextSeq2000. Au programme : présentation des activités de la PGTB, caractéristiques techniques du NextSeq 2000, domaines d'applications principaux, préparation des librairies ADN et ARN... Ce séminaire se terminera par un temps d'échange entre les participants, la PGTB et les experts technique et applicatif d'Illumina. Contactez-nous à pgtb@inrae.fr pour assister à ce séminaire, nous espérons vous y voir nombreux !

Zoom sur une technique d'amplification spécifique, simple, rapide et peu coûteuse : l'amplification isothermale à médiation par boucle (LAMP).

La méthode LAMP consiste en une amplification de l'ADN en une seule étape, effectuée à température constante pendant environ 60 minutes et produisant une quantité considérablement élevée d'ADN comparable à la PCR. Cette méthode utilise un ensemble de quatre à six amorces, comprenant deux amorces internes (FIP et BIP), deux amorces externes (F3 et B3) et optionnellement deux amorces de boucle (LF et LB) qui sont spécifiques de six à huit régions indépendantes de la séquence cible (Figure 1).

L'amorce interne directe (FIP) s'hybride pour initier la synthèse du premier brin de la séquence cible par la Bst polymérase. L'amorce externe directe (F3) s'hybride ensuite et déplace le premier brin synthétisé. L'amorce FIP contient une séquence complémentaire à la région F1 du brin cible, ce qui facilite la formation d'une structure en boucle. De même, l'amorce interne BIP s'hybride au premier brin nouvellement synthétisé pour créer une matrice finale avec des séquences complémentaires à F1 à une extrémité et B1 à l'autre. Ces régions complémentaires se replient et s'hybrident aux régions F1 et B1 de la séquence cible pour former une forme d'haltère. L'étape d'amplification cyclique utilise la structure en forme d'haltère simple brin comme matériau de départ pour une amplification supplémentaire où seules les amorces internes (FIP et BIP) sont utilisées. A la fin de la réaction, des structures en « épingle » sont formées en grande quantité (Figure 1). En outre, une procédure LAMP accélérée, utilisant deux amorces de boucle supplémentaires (LF et LB), a été développée pour une spécificité et une efficacité de réaction améliorées.

L'amplification par la méthode LAMP produit des quantités substantielles de produits finaux qui peuvent être visualisés directement à l'œil nu (i) par la présence de turbidité générée par un sous-produit de l'amplification, le pyrophosphate de magnésium, qui forme un précipité blanc devenant de plus en plus visible avec le temps de réaction ou (ii) par changement colorimétrique lorsque l'on ajoute des indicateurs colorés (Figure 2). Il est également possible de mesurer en temps réel la fluorescence émise par les produits LAMP en ajoutant un intercalant de l'ADN ou encore de visualiser les produits d'amplification LAMP en réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose.

La méthode LAMP offre des avantages par rapport à la PCR (Tableau 1). Contrairement à la PCR, elle n'est pas sensible à la présence d'inhibiteurs ; de plus, elle fonctionne dans des conditions isothermales (à température constante), ce qui ne nécessite pour fonctionner qu'un bain-marie ou un bloc chauffant alors que la PCR requiert d'avoir à disposition un thermocycleur pour assurer les différentes étapes des cycles d'amplification. De plus, la LAMP est facilement applicable sur le terrain car les produits de la réaction peuvent être directement observables à l'œil nu.

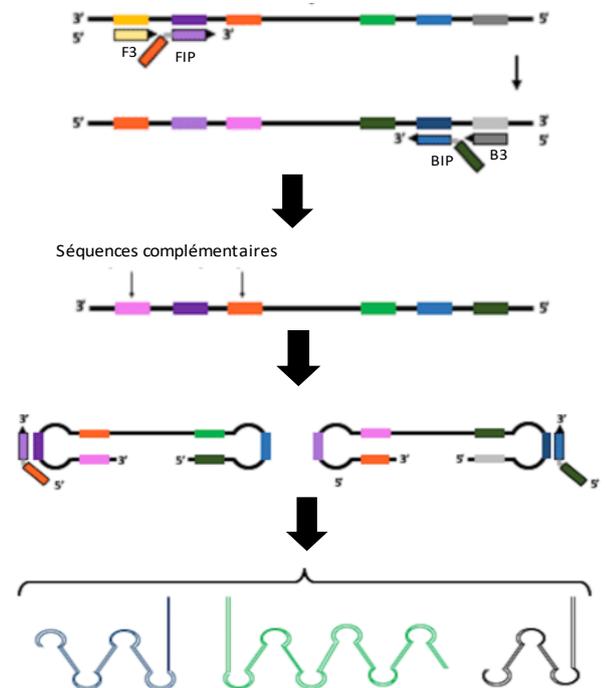


Figure 1 : Schéma synthétique d'une réaction LAMP.
D'après M. Riddha Manna 2019

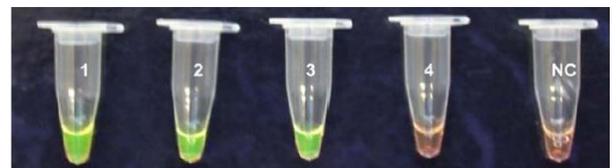


Figure 2 : Visualisation à l'œil nu de réactions LAMP obtenues par ajout d'un indicateur coloré. Les réactions positives sont de couleur jaune (1, 2 et 3) alors que les réactions négatives sont de couleur marron (4 et NC). (Source : ZK Njiru et al. ; 2008 ; doi.org/10.1371/journal.pntd.0000147.g003)

	PCR	LAMP
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> Sensible 	<ul style="list-style-type: none"> Sensible et spécifique (amplification de 6 à 8 régions de l'ADN cible) Facile, Rapide, Peu coûteux
	<ul style="list-style-type: none"> Amplification avec un thermocycleur 	<ul style="list-style-type: none"> Amplification réalisée dans un bloc chauffant à température constante Nécessite un équipement simple et peu coûteux
	<ul style="list-style-type: none"> Interprétation des résultats sur gel d'électrophorèse ou écran de thermocycleur 	<ul style="list-style-type: none"> Interprétation des résultats visuellement par présence ou non de turbidité (production d'un précipité blanc de pyrophosphate de Mg), par changement colorimétrique après ajout d'un colorant spécifique ou changement de pH, par détection de fluorescence, ou par gel d'électrophorèse
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> Sensible à la présence d'inhibiteurs 	<ul style="list-style-type: none"> Contaminations croisées
	<ul style="list-style-type: none"> Réaction longue 	<ul style="list-style-type: none"> Multiplexage LAMP difficile

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la réaction LAMP en comparaison de la PCR.
D'après C. Gallas-Lindemann et al., 2017 ; doi: 10.5772/intechopen.70804

La LAMP, de par sa sensibilité, sa spécificité, sa rapidité et sa simplicité est une très bonne technique moléculaire pour détecter des espèces d'intérêt (espèces rares, invasives ou pathogènes) à moindre coût. De plus, cette technique offre l'avantage de pouvoir travailler également sur des matrices ARN en couplant la rétrotranscription à la LAMP (RT-LAMP) pour détecter par exemple des virus à ARN. Enfin, il est également possible d'utiliser les produits d'amplification LAMP pour faire du séquençage Illumina ou Oxford Nanopore à des fins de diagnostic.



Review

Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology

Stefano Panno ^{1,*}, Slavica Matić ^{2,†}, Antonio Tiberini ^{3,†}, Andrea Giovanni Caruso ^{1,†}, Patrizia Bella ¹, Livio Torta ¹, Raffaele Stassi ¹ and Salvatore Davino ^{1,4,*}



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification coupled to nanopore sequencing (LampPORE) for the detection of SARS-CoV-2 infection at scale in symptomatic and asymptomatic populations

Anetta Ptasińska ^{1,†}, Celina Whalley ^{1,†}, Andrew Bosworth ^{1,2}, Charlotte Poxon ¹, Claire Bryer ¹, Nicholas Machin ³, Seden Gripton ⁴, Emma L. Wise ^{4,5}, Bryony Armson ^{4,6}, Emma L.A. Howson ^{4,7}, Alice Goring ⁴, Gemma Snell ⁸, Jade Forster ⁸, Chris Mattocks ⁸, Sarah Frampton ⁸, Rebecca Anderson ⁸, David Cleary ⁸, Joe Parker ⁸, Konstantinos Boukas ⁸, Nichola Graham ⁸, Doriana Cellura ⁸, Emma Garratt ⁸, Rachel Skilton ⁸, Hana Sheldon ⁸, Alla Collins ⁸, Nusreen Ahmad ⁸, Simon Friar ⁸, Daniel Burns ⁸, Tim Williams ⁸, Keith M. Godfrey ⁹, Zandra Deans ^{10,11}, Angela Douglas ¹⁰, Sue Hill ¹⁰, Michael Kidd ^{1,12}, Deborah Porter ¹⁰, Stephen P. Kidd ⁴, Nicholas J. Cortes ^{4,13}, Veronica Fowler ¹⁴, Tony Williams ^{8,15}, Alex Richter ¹⁶, Andrew D. Beegs ^{1,2,*}

Malgré ses nombreux avantages, cette méthode présente néanmoins certaines limites. La conception des amorces est assez compliquée car elle nécessite de concevoir 4 à 6 amorces spécifiques. De plus, le multiplexage reste difficile et des problèmes de contaminations croisées sont régulièrement détectés.

La PGTB développe actuellement dans le cadre du projet LABEX AGIS, des tests de diagnostic rapide pour la détection d'espèces cibles (espèces rares ou menacées, envahissantes, parasites ou pathogènes) par amplification isothermale de type LAMP. Ainsi, nous travaillons sur la détection par LAMP de l'esturgeon européen (*Acipenser sturio*) à partir de filtres d'eau de rivière afin de détecter spécifiquement cette espèce rare dans le bassin versant de la Gironde - Garonne-Dordogne, en collaboration avec Marie-Laure Acolas de l'UR EABX. Nous étudierons également, en association avec Cécile Robin de l'UMR BIOGECO, la possibilité de détecter directement à partir d'échantillons de sol, la présence de *Phytophthora cinnamomi* et *Phytophthora cambivora*, protistes oomycètes responsables de la maladie de l'encre chez le châtaignier.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[†]

Kelly A. Curtis*, Donna L. Rudolph, S. Michele Owen



ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41587-021-00966-9>

LAMP-Seq enables sensitive, multiplexed COVID-19 diagnostics using molecular barcoding

Kerstin U. Ludwig¹, Ricarda M. Schmithausen², David Li^{3,4,5,6}, Max L. Jacobs^{7,8}, Ronja Hollstein¹, Katja Blumenstock⁷, Jana Liebing⁹, Mikołaj Ślabicki^{3,10,11}, Amir Ben-Shmuel¹², Ofir Israeli¹³, Shay Weiss¹², Thomas S. Ebert⁷, Nir Paran¹², Wibke Rüdiger⁷, Gero Wilbring², David Feldman¹⁴, Bärbel Lippke¹, Nina Ishorst^{1,15}, Lara M. Hochfeld¹, Eva C. Beins¹, Ines H. Kaltheuner¹⁶, Maximilian Schmitz¹⁶, Aliona Wöhler¹⁷, Manuel Döhla^{2,18}, Esther Sib², Marius Jentsch⁷, Jacob D. Borrajo^{3,6}, Jonathan Strecker^{3,4,5,6}, Julia Reinhardt⁹, Brian Cleary², Matthias Geyer¹⁶, Michael Hölzel¹⁹, Rhiannon Macrae^{3,4,5,6}, Markus M. Nöthen¹, Per Hoffmann^{2,19}, Martin Exner², Aviv Regev^{3,20,21,22,23,24}, Feng Zhang^{3,4,5,6,23} and Jonathan L. Schmid-Burgk^{3,4,5,6,7}



université
de BORDEAUX



pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr



@PGT_Bordeaux

Ne pas jeter sur la voie publique

Crédits photos : INRAE, Pixabay et PGTB

Textes et conception graphique de la PGTB