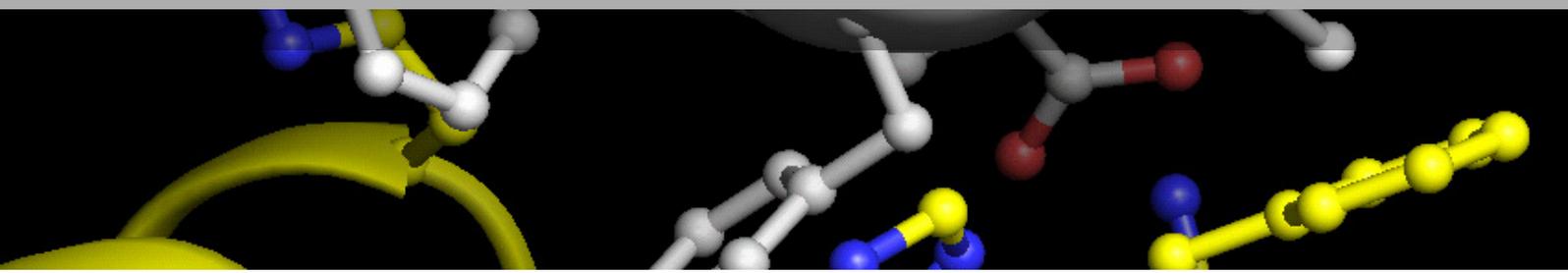




20



09



Rapport d'activité des plates-formes

Institut de biologie moléculaire des plantes (IBMP) - UPR 2357

Introduction	5
Production de plantes	7
Séquençage d'ADN	15
QPCR	23
Microscopie et imagerie	29
Cytologie	43
Bio-informatique	49
Biolmage	55
Métabolomique	63

Rapport d'activité 2009 des plates-formes IBMP / Sommaire détaillé

Introduction	5
➤ Production de plantes	7
1/ Présentation et caractéristiques des unités de cultures de plantes expérimentales	9
2/ Partenaire financier	10
3/ Coûts d'utilisation	10
4/ Recettes	10
5/ Activité et utilisateurs.....	11
6/ Veille technologique	12
7/ Budget prévisionnel	13
8/ Traçabilité de la production	13
9/ Remarques-perspectives	13
10/ Projet d'extension Végoia.....	14
➤ Séquençage d'ADN	15
1/ Présentation	16
2/ Missions.....	16
3/ Activité en 2009.....	17
4/ Bilan financier.....	19
5/ Budget prévisionnel.....	21
6/ Veille technologique	21
7/ Perspectives 2010.....	21
8/ Publications	21
➤ QPCR	23
1/ Présentation	25
2/ Missions.....	25
3/ Activité en 2009.....	25
4/ Bilan financier.....	27
5/ Budget prévisionnel.....	28
6/ Remarques 2009.....	28
7/ Perspectives 2010.....	28
8/ Publications	28
➤ Microscopie et Imagerie	29
1/ Présentation	31
2/ Matériels disponibles	32
3/ Domaines d'intervention.....	32
4/ Photos des appareils.....	33
5/ Description et coût des prestations fournies	36
6/ Facturation 2009.....	36
7/ Activité	36
8/ Publications	38
9/ Veille technologique	40
10/ Démarche qualité.....	41
11/ Budget prévisionnel	41
➤ Cytologie	43
1/ Présentation et Missions	45
2/ Equipement	45
3/ Prestations.....	46
4/ Utilisateurs.....	47
5/ Publications	47
6/ Consommables.....	47

➤ Bio-informatique	49
1/ Présentation	51
2/ Equipement	51
3/ Recette et coût financier.....	51
4/ Utilisateurs et thématiques abordées.....	51
5/ Publications	53
6/ Formation	54
7/ Veille technologique	54
8/ Remarques et perspectives.....	54
➤ Biolmage	55
1/ Introduction.....	57
2/ Evolutions de l'année 2009	57
3/ Perspectives et recommandations	59
4/ Annexe : charte d'utilisation de la plate-forme	61
➤ Métabolomique	63
1/ Présentation	64
2/ Missions.....	64
3/ Synthèse des thèmes scientifiques abordés.....	64
4/ Matériel et équipement disponibles.....	65
5/ Photos	65
6/ Budget prévisionnel.....	66
7/ Coût des prestations	67
8/ Recettes 2009	68
9/ Données des utilisateurs	68
10/ Publications	69
11/ Les actions de formation	70
12/ Veille technologique	70
13/ Les changements induits par Végoia	71
14/ Conclusion et perspectives.....	71

INTRODUCTION

Nos plates-formes technologiques sont pilotées par des ingénieurs au service d'équipes de recherche IBMP et extérieures à l'IBMP (CNRS, INRA, INSERM, Universités et quelques sociétés privées).

Afin de promouvoir leur transparence d'utilisation et d'évaluer l'apport de chaque plate-forme à la performance et à la visibilité de l'IBMP, chaque responsable de plate-forme rédige depuis 2005 un rapport d'activité annuel transmis au Collège de direction (anciennement Conseil scientifique) de l'IBMP, aux responsables des groupes de recherche de l'IBMP, ainsi qu'à l'ensemble des partenaires de nos plates-formes, le Directeur scientifique adjoint de l'INSB en charge de notre Unité, la Délégation Régionale Alsace, la Région Alsace, l'Université de Strasbourg, le président du site INRA de Colmar, les directeurs de différentes unités partenaires (IBMC, GMGM).

Le rapport 2009 présente huit plates-formes dont deux s'inscrivent dans un contexte inter-Unités, Microscopie & Imagerie (intégrée à la plate-forme d'imagerie cellulaire de l'Esplanade, PICSE), et Bio-Image (en lien avec l'IBMC, GMGM, et le Jardin botanique). L'IBMP assure, sur son budget, les coûts de maintenance des appareillages et les coûts de fonctionnement (tableau 1 ci-dessous).

Tableau 1 : coûts 2009 des plates-formes

Dépenses	Maintenance	Consommables	Infra	Total
€	38 028€	115 394€	89 737€	243 159€

Le rapport 2009 fait apparaître deux points majeurs, déjà relevés dans le précédent rapport : un taux d'utilisation très élevé et une participation active à l'excellence des résultats de l'IBMP.

Le tableau 2 ci-dessous indique un FI moyen des plates-formes supérieur d'1 point au FI moyen de l'Unité pour une contribution de 70% à la totalité des publications 2009 de l'Unité. Il est à noter qu'un certain nombre de publications contiennent des résultats obtenus de plus d'une plate-forme.

Tableau 2 : contribution scientifique des plates-formes

Plates-formes à production scientifique publiée ¹⁾	nombre publications ²⁾	FI moyen publications ³⁾
Microscopie et imagerie	35	9,2
Cytologie	4	12,9
Métabolomique	14	7,5
Bio-informatique	6	8,7
Q-PCR	3	7,7
FI Moyen plates-formes		9,2
FI moyen IBMP		8,1

¹⁾ : les plates-formes de production de plantes, de séquençage d'ADN et Bio-image fonctionnent en plate-forme de service.

²⁾ : Environ 20 % des publications ont fait appel aux services de plus d'une plate-forme.

³⁾ : FI = facteur d'impact des journaux dans lesquels sont publiés les articles scientifiques.

La plate-forme de Microscopie et d'Imagerie contribue fortement à la performance générale de l'Unité. C'est pourquoi nous voulons maintenir sa compétitivité en investissant dans le matériel. En 2009, l'IBMP a financé sur ses fonds propres le remplacement du microscope confocal le plus ancien pour un modèle plus récent (120 000 €). Nous avons également acquis un microscope électronique à balayage avec le soutien financier de l'Université et de plusieurs équipes partenaires.

Notre production de plantes ne cesse de croître : 30 000 en 2000, 261 000 en 2009, à surface constante au sol. Nous avons transformé certaines logettes existantes pour augmenter la surface utile de culture et la qualité de l'éclairage. Cependant cela reste insuffisant pour relever les défis des criblages génétiques qui requièrent beaucoup de surface. Le constat est simple, nous sommes arrivés à saturation. Le projet VEGOIA d'extension de l'IBMP a pour but d'augmenter nos capacités de

production de plantes. Malheureusement, les contraintes urbanistiques et financières ne permettront pas de réaliser complètement les outils nécessaires au développement de l'IBMP.

Fin 2009, nous avons créé une nouvelle plate-forme de production de protéines. L'objectif est de donner des moyens supplémentaires aux équipes pour répondre aux nouveaux enjeux de la biologie intégrative qui nécessitent l'identification de la fonction de nombreuses protéines le plus souvent dans un contexte de complexes protéiques d'analyse difficile. L'obtention de protéines purifiées en constitue donc une étape déterminante pour laquelle il faut une technologie et une expertise fortes. La production de protéines dans des systèmes hétérologues, cellules d'insectes, cellules végétales, devient un enjeu déterminant pour préserver la compétitivité et l'attractivité des équipes de recherche. Cette nouvelle plate-forme, localisée à l'IBMP, mais ouverte aux autres laboratoires du campus, sera en interaction forte et complémentaire avec la plate-forme mutualisée IBMC-IBMP de protéomique. Le CNRS a soutenu le projet avec un poste d'ingénieur de recherche recruté en octobre dernier. L'IBMP investit, en 2010, 100 000 € en travaux d'aménagement de locaux et divers matériels. Une demande de soutien à l'Université est en cours pour compléter l'équipement de la plate-forme.

D'année en année, les chiffres indiquent que nos plates-formes technologiques participent de manière active à la performance de l'Unité tout en restant ouvertes à des équipes extérieures (par exemple 27% et 25% d'utilisateurs extérieurs pour les plates-formes de séquençage d'ADN et de Microscopie et Imagerie).

Cependant, cette politique a également ses limites. D'une part, financièrement et spatialement, il devient difficile de créer une nouvelle plate-forme sans envisager un remplacement. D'autre part, il y a des technologies peu accessibles en raison des coûts en matériel et en personnels. Nous pensons particulièrement au séquençage haut débit pour l'identification rapide d'une mutation (quelques semaines au lieu de trois ans avec les méthodes actuelles) dans un organisme donné (plante ou animal). Le trop peu de développement de cette technologie sur le site de Strasbourg, malgré la concentration de laboratoires de biologie à forte reconnaissance internationale, et le manque d'espace en culture de plantes à l'IBMP ont décidé Olivier Voinnet à accepter l'offre de l'ETH de Zürich. Cependant, avec son implication forte et avec le soutien du CNRS, nous travaillons à mettre en place une collaboration contractuelle (la formule retenue est un LEA, Laboratoire Européen Associé) entre l'ETH, l'Université de Zürich et l'IBMP-CNRS sur la base de projets scientifiques complémentaires. Cette collaboration donnera une nouvelle visibilité à l'IBMP, élargissant la panoplie de technologies de pointe par effet de synergie. Il en résultera également une augmentation du potentiel de consolidation et d'attractivité d'équipes de recherche de stature internationale.



Pascal Genschik, directeur



Serge Kauffmann, directeur adjoint

plantes

expérience

optimisation

traçabilité

Plate-forme Production de plantes

20
09

1/ Présentation de la plate-forme serres et caractéristiques de nos unités de cultures de plantes expérimentales

Le service serres est composé de 4 serristes CNRS et d'un agent universitaire à mi-temps et a pour rôle de produire les plantes expérimentales pour l'ensemble de l'institut en répondant au mieux aux besoins expérimentaux réglementaires et en veillant également à l'entretien et au bon fonctionnement de nos outils de production.

Une commission serres a été créée en 2007 à l'initiative de Richard Wagner dans le but de réunir les différentes personnes, serristes, expérimentateurs et direction afin de cibler les besoins et de prendre des décisions collégiales stratégiques pour la bonne marche du service de production végétale. Cette commission se réunit au minimum deux fois par an voire plus si le besoin s'en fait sentir.

Nos unités de production sont réparties sur 3 sites géographiques identifiés : IBMP, IBMC et Institut de Botanique.

Le tableau ci-dessous résume l'ensemble de nos surfaces de culture IBMP.

- Total représente la somme de la surface au sol et technique
- Au sol représente la totalité des surfaces de culture au sol
- Utile représente la surface de culture dédiée aux plantes (tablettes) sans les allées dans les serres et les logettes
- Technique regroupe les surfaces des locaux de travail et techniques

	total	au sol (m2)	utile (m2)	technique
IBMP sous-sol et logettes	259,55	162,30	147,12	97,25
IBMP logettes bâtiment	62,62	62,62	41,12	0,00
IBMP toiture	266,01	163,81	77,45	102,20
IBMC	162,00	162,00	77,74	0,00
Logettes Botanique	103,10	76,10	63,68	27,00
Total des surfaces au sol	853,28	626,83	407,11	226,45

Ensemble du parc d'outils et des sites de production de plantes expérimentales

Année	Coût global	N b	Outils et site de production de plantes expérimentales
1977		2	Serres IBMC (location)
1987		1	Serres IBMP sous-sol
1999	1 000 000 €	1	Serres IBMP toiture
2002	10 000 €	1	Aménagement logettes 514 conditions arabidopsis (Strader 4 tubes néons)
	15 000 €	3	Aménagement logettes Botanique conditions arabidopsis
2003	10 000 €	2	Aménagement logettes 313&416 conditions arabidopsis (4 tubes néons)
2004	5 000 €	1	Aménagement logette botanique conditions tabac (4 tubes néons)
	4 900 €	1	Remplacement insectproof serre sous-sol
2005	46 000 €	1	Autoclave TBM
2005	9 000 €	1	Groupe froid logettes sous-sol, secrétariat & direction RDC
2006	18 000 €	1	Remplacement des luminaires serre sous-sol IBMP
	3 800 €	1	Mise à jour et carte automate des serres toiture
	4 600 €	1	Imprimante à étiquettes & logiciel
2007	1 800 €	1	Armoire & PC Serveur pour imprimante à étiquette
	20 000 €	2	Aménagement logettes sous-sol conditions arabidopsis
	11 500 €	1	Machine à laver
2008	12 000 €	1	Aménagement local de travail sous-sol & installation machine à laver
	7 380 €	1	Remplacement automate des serres sous-sol
	16 530 €	1	Remplacement des luminaires compartiment 2 serres IBMC pour la culture de brachypodium
2009	18 700 €	1	Aménagement logette 613 en conditions arabidopsis (4 tubes néons)
	61 960 €	2	Aménagement logette 513 en conditions arabidopsis (6 tubes néons) et logette 316 en conditions autre culture (10 tubes néons)
	4 000 €	1	Remplacement des toiles d'ombrage latérales extérieures en serre toiture
2010	82 550 €	1	Aménagement des logettes 413 et 414 en conditions arabidopsis (10 tubes néons)

2/ Partenaire financier à l'acquisition d'équipement



3/ Coûts d'utilisation

Les coûts de la culture de plantes expérimentales ont été validés par la Délégation Alsace du CNRS en 2009 et englobent la fourniture des matières premières, les fluides, la main d'œuvre, l'entretien et l'amortissement des installations pour une durée donnée et un type d'expérience souhaité par les chercheurs.

Plate-forme production de plantes					
Code Article entité publique*	Code Article Laboratoires CNRS	Dimension du pot (Ø cm)	Prix HT du pot entité publique* + Laboratoire CNRS	Code Article	Prix HT du pot
1688	1689	7/7/6.2	0.60	1690	1.20
1691	1692	8	0.70	1693	1.30
1694	1695	9	0.85	1696	1.40
1697	1698	10	0.95	1699	1.50
1700	1701	11	1.10	1702	2.10
1703	1704	13	1.50	1705	2.50
1706	1707	16	3.30	1708	5.00
1709	1710	19	4.50	1711	6.20
1712	1713	32	68.00	1714	74.00
1715	1716	50	160.00	1717	165.00

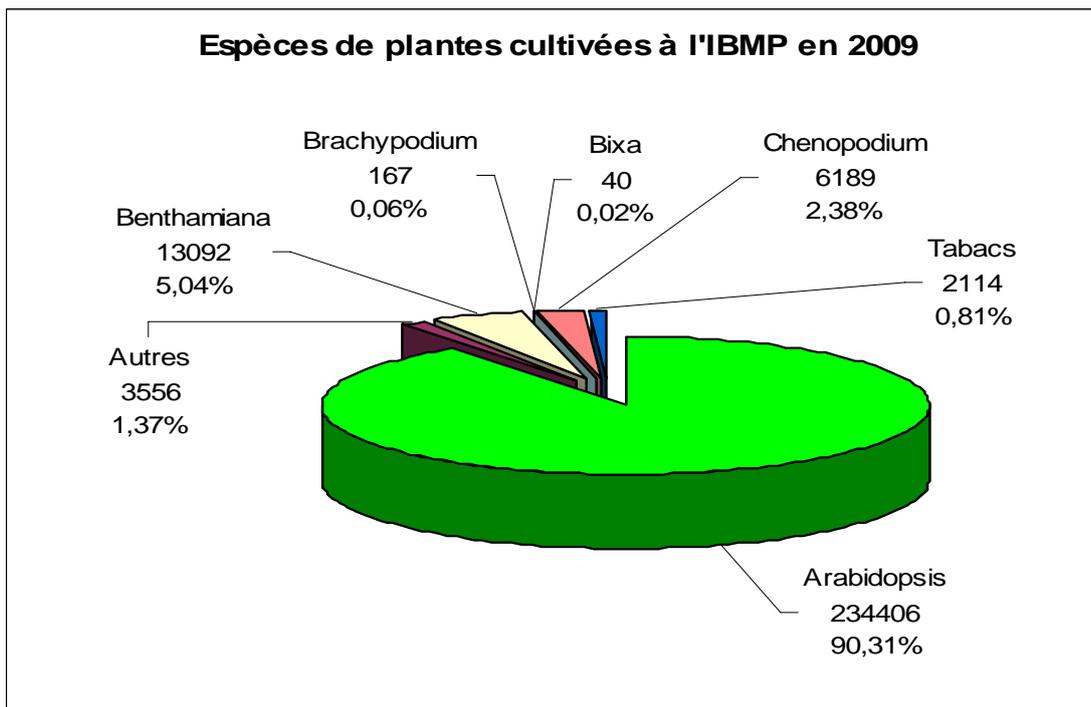
4/ Recettes de la plate-forme serres

Les facturations 2009 de plantes expérimentales produites pour les personnes partenaires ou extérieures à l'IBMP sont basées sur les nouveaux chiffres ci-dessus.

Vu la saturation de nos unités de production, nous ne pouvons répondre que parcimonieusement à ces demandes. En 2009 la plate-forme n'a facturé aucune prestation.

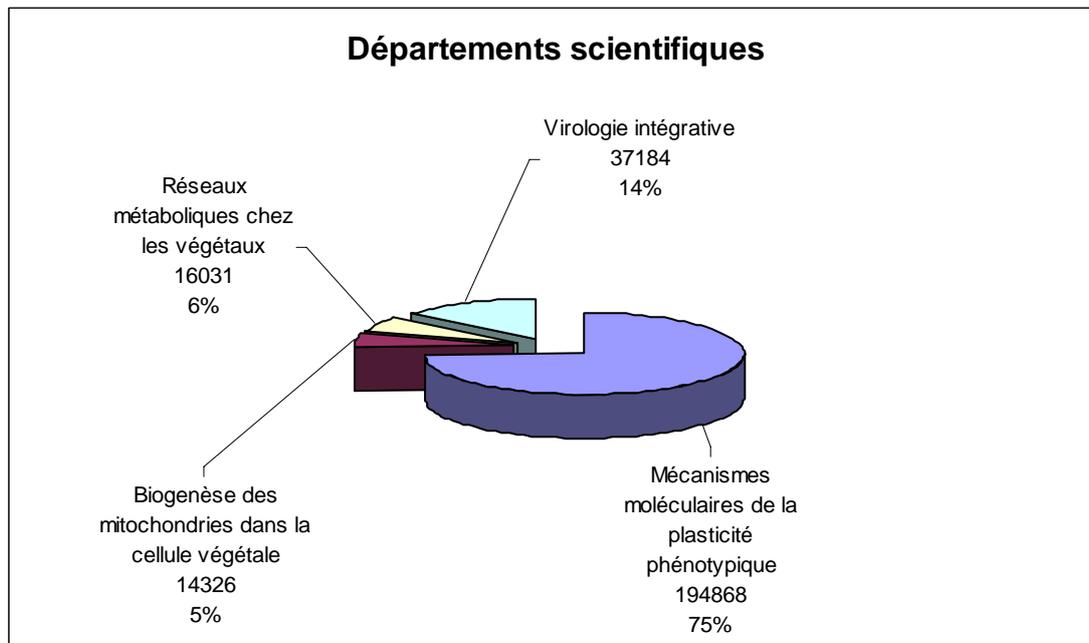
5/ Activité et utilisateurs de la plateforme

En 2009 le service serres a produit 261 573 plantes d'une trentaine d'espèces différentes.

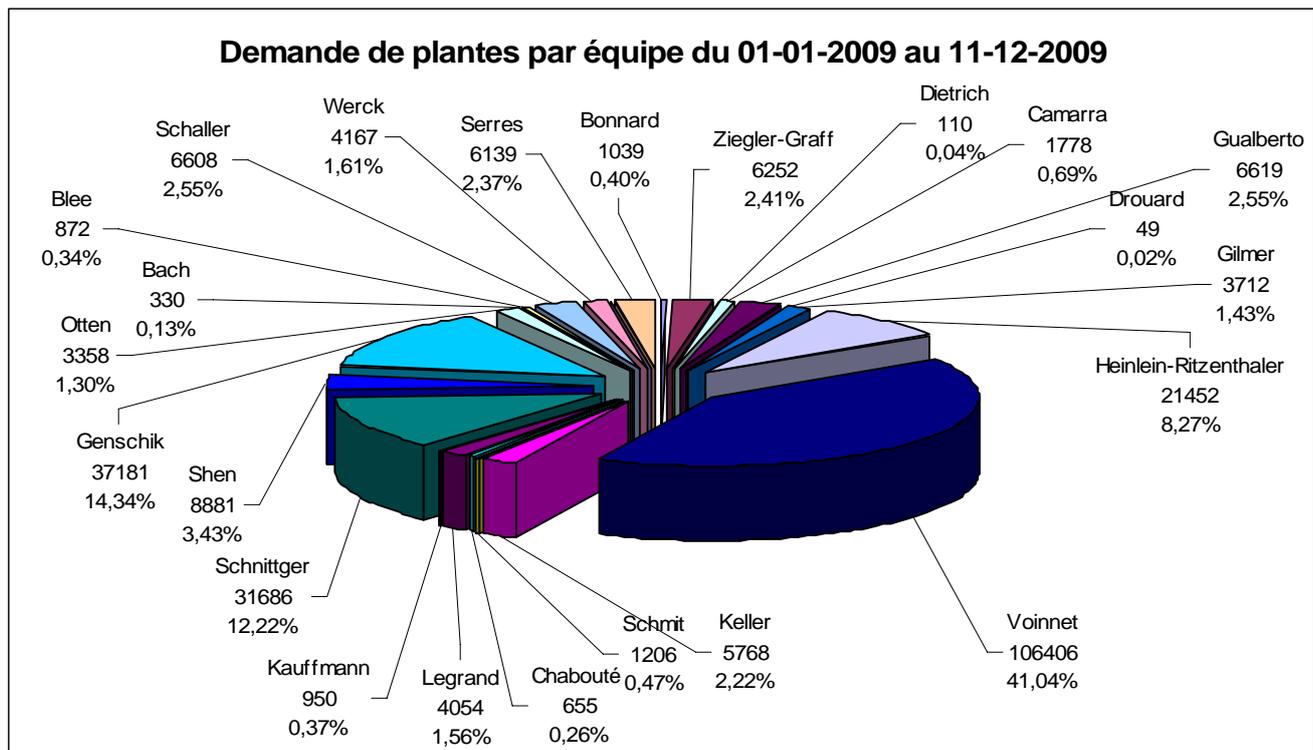


Autres plantes englobe: Œillet d'inde, Kalanchoe, Navet, Colza, Poivron, Lotus, Petit pois, Pomme de terre, Tomate, Ipomée, Phyllanthus, Cleavelandii.

Tabacs englobe toutes les espèces de nicotiana produites sauf le N. benthamiana



Il est à noter que la refonte des départements de recherche ne permet pas cette année un comparatif d'évolution par rapport à 2008.



6/ Veille technologique

Mise aux normes

Mise aux normes des logettes Arabidopsis à l'IBMP et à l'Institut de Botanique par la mise en place d'un système de récupération des graines au niveau des écoulements, obligatoire pour la culture d'Arabidopsis. Une étude de faisabilité sera réalisée en même temps que le projet d'extension Végoia. (Voir site du CNRS <http://www.cnrs.fr/infoslabos/reglementation/CGGplantes.htm>)

Réaménagement de surfaces de culture

L'accueil d'une nouvelle équipe en fin d'année 2007 a généré de nouveaux besoins en termes de production de plantes. Nous y avons répondu partiellement par le réaménagement en luminaires d'une serre IBMC en 2008 et en 2009 par l'aménagement d'une logette en condition Brachypodium.

Des mesures d'intensité lumineuse ont montré une déficience d'éclairage sur Arabidopsis en logette. A la connaissance du problème, l'IBMP a décidé d'augmenter le nombre de tubes néons sur l'ensemble des nouvelles constructions ou transformations de logettes et ainsi passer de 4 à 10 tubes néons. Cette augmentation de luminosité n'est pas anodine en termes de coût sur une logette car outre les néons, le câblage et la consommation supplémentaires, cela nécessite aussi un redimensionnement de la production de froid soit un surcoût d'environ 25% par logette.

En prévision du projet d'extension Végoia, des réaménagements de nos logettes de culture, permettraient de couvrir les pertes en surface de culture durant la phase des travaux.

Essais d'éclairage aux leds

L'IBMP et l'entreprise Henssler vont signer un contrat de partenariat fin mars 2010 afin de tester différents éclairages aux leds dès que les freins administratifs et techniques seront levés. L'objectif de ce partenariat est de déterminer si l'éclairage aux leds peut convenir aux plantes expérimentales. En cas de succès le potentiel d'application est vaste et répondra aux directives du Grenelle de l'environnement par des économies substantielles d'énergie estimées à environ 50% (électricité et climatisation) et permettra à l'IBMP de montrer sa forte volonté dans la démarche **protection de l'environnement**.

7/ Budget prévisionnel 2010

Fonctionnement courant	40 000,00 €
Réparations	25 000,00 €
Contrat de maintenance	5 000,00 €
Transformation de 2 logettes	82 000,00 €
Total	152 000,00 €

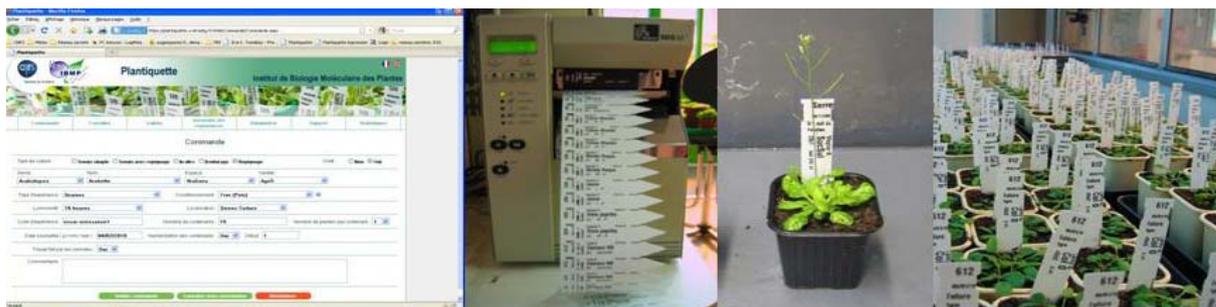
8/ Traçabilité de la production

Imprimante à étiquettes

Dans le cadre d'une politique de traçabilité et d'identification de chaque expérience, l'IBMP a acheté une imprimante à étiquettes avec son logiciel de pilotage et d'impression ainsi qu'un ordinateur dédié. Plantiquette a été le nom choisi pour le futur système d'impression d'étiquette et de base de données.

L'ensemble a été installé provisoirement en mars 2007 et les impressions étaient réalisées par le responsable des serres. Depuis septembre 2007, un stagiaire en contrat d'alternance (Master2), encadré **par le service informatique de la Délégation Alsace**, se charge du développement et de la programmation de la base de données et interface web. Après les betas tests effectués par la commission serres au printemps 2008, l'ensemble du système de commande de plantes et d'impression d'étiquettes a été mis à la disposition des utilisateurs en automne. 2009 fut l'année d'essai en condition réelle et a nécessité quelques mises à jour par le service informatique de la Délégation Alsace.

La version définitive comprenant l'édition d'étiquette, la base de données et les statistiques devait être finalisée pour l'été 2010 et sera transposable pour d'autres unités expérimentales de production végétale. Le logiciel sera présenté au prochain module de formation national organisé par le réseau des serristes du CNRS.

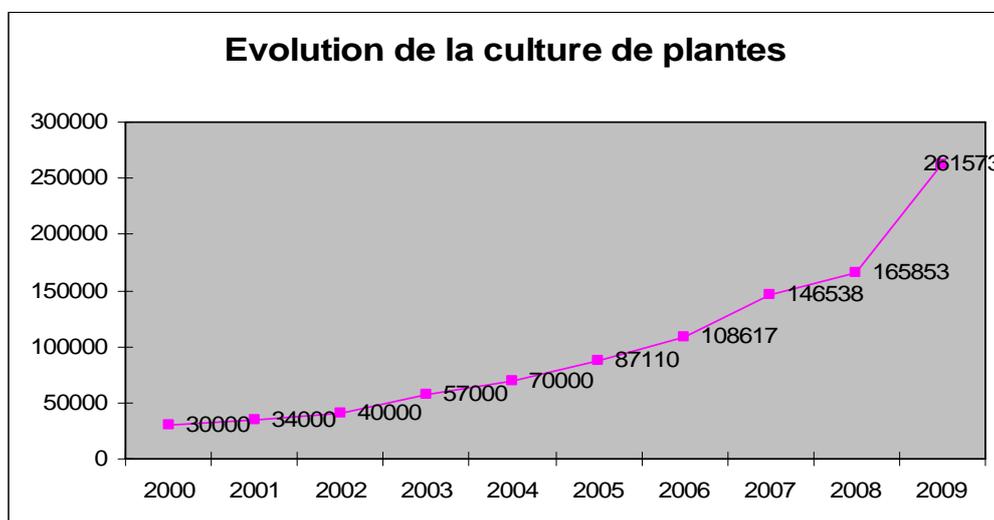


9/ Remarques - Perspectives

Augmentation de la production annuelle

La production annuelle de plantes expérimentales de la plateforme serres est en progression constante depuis l'année 2000. La mise en route de plantiquette en 2008 a permis d'identifier et de quantifier précisément l'ensemble des plantes produites à l'IBMP.

Une augmentation très significative du nombre de plantes produites cette année par rapport à 2008 représente près de 100 000 plantes supplémentaires cultivées sur l'année 2009 soit 57% d'augmentation.



Depuis l'année 2000 notre production de plantes a été multipliée par huit avec le même nombre de serristes et par des réaménagements et l'optimisation de surfaces de culture. Cette augmentation de plantes s'explique en partie par l'accueil à l'institut de nouvelles équipes en 2002, en 2007 et l'obtention de 2 ERC en 2008. Cela représente une charge de travail supplémentaire et une pression accrue sur les surfaces de culture.

Le service serres a toujours essayé de répondre au mieux à toutes les demandes. Cette augmentation de la charge de travail fait **qu'actuellement nous sommes arrivés au maximum de nos capacités de production**. En découle des problèmes phytosanitaires avec la perte en qualité des plantes expérimentales cultivées qui a accentué les divergences au sein du service et engendré de fortes tensions avec les expérimentateurs. Celle-ci a aussi provoqué la remise en question des compétences du service serres par un grand nombre d'expérimentateurs et contribué à plusieurs réunions de crise. Un certain nombre de pannes et manquement de suivi d'entretien inhérent au service serres ont également leur part de responsabilités aux différentes tensions.

Début 2010, le départ de Mlle Bailly du service serres n'arrange en rien la situation et sans moyen supplémentaire il sera extrêmement difficile de garantir le bon fonctionnement du service.

Vieillessement des installations

Le temps et le soleil ont des effets sur les matériaux des serres, qu'il faudra intégrer dans le plan de maintenance de l'année 2010.

- Remplacement des toiles d'ombrage de la serre toiture (12 000€ environ)
- Vérification et réfection de l'étanchéité des serres (prix en fonction du travail)
- Vérification et graissage annuel des ombrages, moteurs, crémaillères, ouvrant, fin de course etc (2 000€ environ + remplacement de pièces)

10/ Projet d'extension Végoia

Le projet d'agrandissement de l'IBMP est une nécessité pour sortir de la promiscuité de travail et accueillir de nouvelles équipes de recherche mais cela engendrera beaucoup de nuisance et un grand bouleversement des méthodes de travail des habitués du service serres et du suivi de leurs plantes. L'extension augmentera la charge de travail du service et aura un impact direct sur la plate-forme serres avant, pendant et après les travaux. La liste ci-dessous énumère de manière non exhaustive l'impact de Végoia sur le service serres.

Avant les travaux

- Mise en place de surfaces de culture pour compenser la perte des serres et des logettes du sous-sol
- Essais de croissance des plantes et test des installations avant la réception des travaux
- Réorganisation de la répartition de l'ensemble des surfaces de culture du bâtiment IBMP
- Réorganisation temporaire du mode de fonctionnement du service serres
- Déménagement du local de travail, du PC serveur pilotant les serres et du serveur de plantquette
- Déplacement de la machine à laver, de l'autoclave et de la station de traitement des eaux usées
- Suppression du bureau des serristes

Pendant les travaux

- Optimisation des conditions de culture après la réorganisation des surfaces
- Transport accru des plantes
- Travailler dans le provisoire
- Difficulté de stockage du matériel et des fournitures
- Essais de croissance des plantes et test des installations avant la réception des travaux

Après les travaux

- Réorganisation complète du mode de fonctionnement du service serres
- Mise en place des règles de fonctionnement par la commission serres
- Emménagement dans les nouvelles structures et prise en main des installations
- Optimisation des conditions de culture après la réception des travaux
- Journée « Portes ouvertes » : visite et explication des installations et du mode de fonctionnement pour tout l'IBMP

Richard Wagner
Responsable plate-forme production de plantes

adn

capillaire

bases

1000

Plate-forme Séquençage d'ADN

20

09

1/ Présentation

- **1996** : Création du service commun de séquençage d'ADN

- **2002** : Mise en place d'une plateforme fédérative de séquençage d'ADN

→ Partenariat pour l'acquisition d'un séquenceur à électrophorèse en capillaire (16 x 80cm) ABI3100 d'Applied Biosystems

- Région Alsace
- IBMP : UPR-CNRS 2357
- ULP : Laboratoire de Génétique, Microbiologie, Environnement, Strasbourg-France
- Société Tépral (Brasseries Kronenbourg), Strasbourg-France

➤ *Personnel*

- Mr Alioua Abdelmalek – ingénieur d'étude - IE2- CNRS malek.alioua@ibmp-cnrs.unistra.fr
Affecté à 50% depuis la création de la plateforme de QPCR

➤ *Equipements*

- 1 séquenceur à électrophorèse en capillaire (16 x 80cm) ABI 3130XL (acquis en 2002)
- 1 station de pipetage (robot Biomek 3000) (acquis en 2006 et partagé avec la plateforme QPCR)
- 2 thermocyclers ABI 9700 pour plaque PCR 96 puits

➤ *Capacité d'analyse (2009)*

Capacité théorique annuelle: 20 640 séquences de 900 à 1 000 nucléotides. (Calcul basé sur un service théorique à 50% de temps, les autres 50% étant dédiés à la plateforme QPCR)

En 2009 : 28 662 analyses
211 utilisateurs
12 laboratoires

2/ Missions

Le service est organisé en plate-forme fédérative de séquençage. Ses missions sont les suivantes :

- Réalisation des réactions de séquençage d'ADN à partir d'échantillons d'ADN (plasmides divers ou produits de PCR) préalablement purifiés et quantifiés
- Réalisation des réactions de séquençage d'ADN directement à partir de colonies ou cultures bactériennes.
- Transmission des résultats en toute confidentialité sous forme de fichiers informatiques
- Optimisation des protocoles de séquençage et de génotypage
- Veille technologique
- Gestion administrative et financière de la plateforme

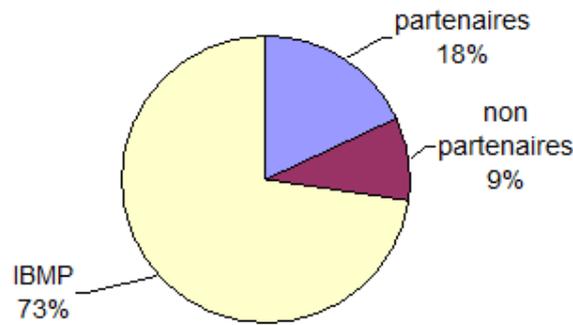
➤ *Expertise*

Le service assure un suivi personnalisé de la production :

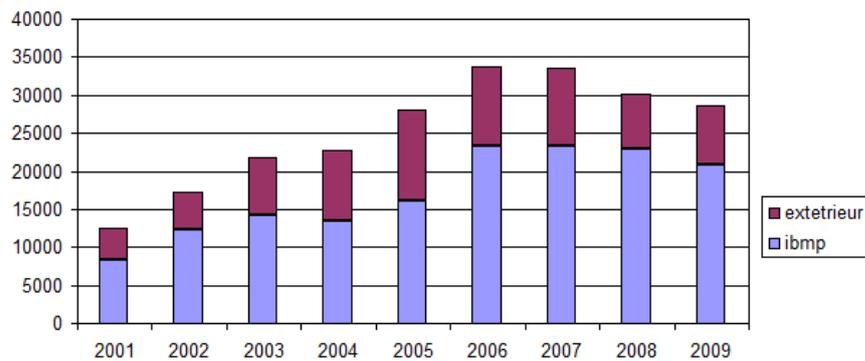
- Un contrôle visuel quotidien est réalisé sur l'ensemble des séquences
- Notation des séquences selon la longueur de lecture (résolution)
- Diagnostic des problèmes de séquençage d'ADN
 - Problèmes de qualité d'échantillon ; présences d'impuretés type sels ou autre
 - Problème de concentration d'échantillon
 - Problème de clonage : mélange de matrices
 - Problème d'hybridation des amorces
 - Problème de structure

3/ Activité en 2009

En 2009, l'activité de la plateforme s'élève à 28 662 analyses. La répartition des travaux de séquençage entre l'IBMP et les utilisateurs externes est de l'ordre de 3/4-1/4.



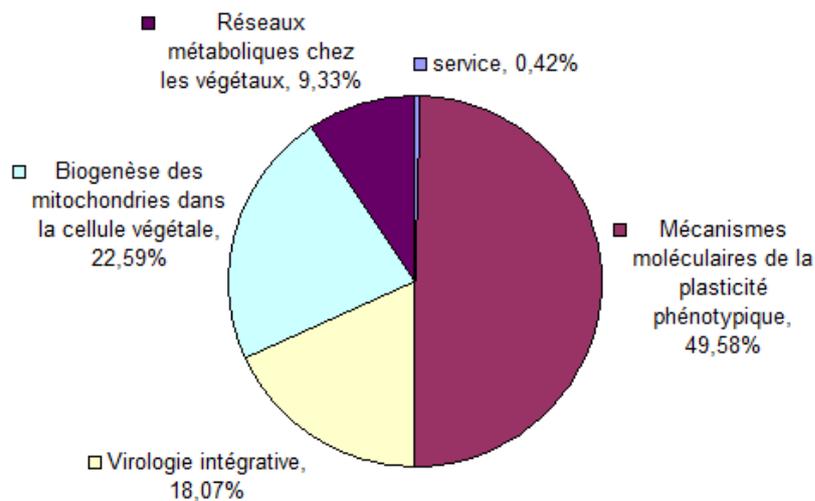
Séquençage d'ADN 2009- répartition de l'activité



Evolution de l'activité de séquençage d'ADN de 2001 à 2009

➤ Bilan utilisateurs IBMP

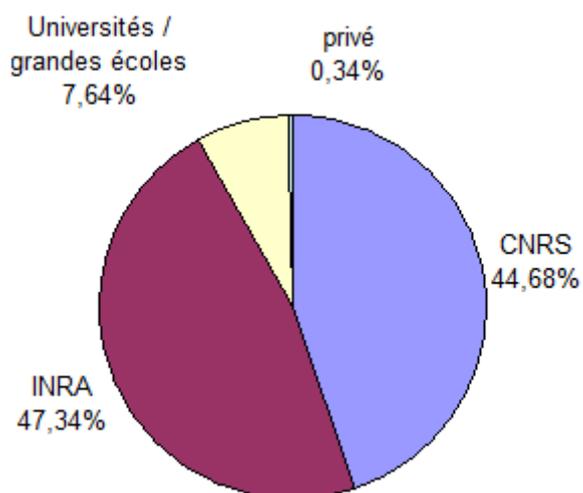
4 départements, 18 équipes, 124 utilisateurs



Plateforme de séquençage	plateforme de séquençage	88
Total Plateforme de séquençage		88
Mécanismes moléculaires de la plasticité phénotypique	genschik	2929
	otten	501
	schmit	630
	Schnittger	1746
	shen	2122
	voinnet	2371
Total Mécanismes moléculaires de la plasticité phénotypique		10300
Virologie intégrative	gilmer/ziegler-graff	2377
	heinlein/ritzenthaller	473
	keller	903
Total Virologie intégrative		3753
Biogenèse des mitochondries dans la cellule végétale	bonnard	1066
	dietrich	629
	drouard	1095
	gualberto/gagliardi	1903
Total Biogenèse des mitochondries dans la cellule végétale		4693
Réseaux métaboliques chez les végétaux	blee	51
	legrand	150
	werck	665
	bach/schaller	792
	camara/rahier	281
Total Réseaux métaboliques chez les végétaux		1939
Total IBMP		20773

➤ *Bilan utilisateurs externes*

4 organismes publics et privés, 15 laboratoires, 86 utilisateurs



CNRS	ESBS	UPR 7175	862
	CENTRE DE NEUROCHIMIE	UPR-CNRS 2356	184
	IBMC	UPR-CNRS 9022	927
	IGBMC	UMR 7104	26
	ISIS	UMR 7006	26
	GENETIQUE-IPCB	UPR 7156	1499
INRA	INRA COLMAR	bdv	210
	INRA COLMAR	gav	2200
	INRA COLMAR	MSV	339
	INRA COLMAR	vive	451
	INRA COLMAR	vva	534
Universités / grandes écoles	UNIVERSITÉ DE REIMS	BBMP/ BAILLIEUL.F	385
	UDS-chimie	rohmer-m	142
	ensaia	HEHN A	76
privé	GENE SIGNAL	COLIN S	27
			7888

4/ Bilan financier

➤ Dépenses/ coût de fonctionnement :

	désignation	Qté	prix unitaire HT	remise %	cout HT
4352759	FG 3130XL POP7-7 ml	3	568,00 €	20	1 363,20 €
4352759	FG 3130XL POP7-7 ml	3	580,00 €	20	1 392,00 €
4311320	HI DI FORMAMIDE 25 mL	6	37,00 €	20	177,60 €
4311320	HI DI FORMAMIDE 25 mL	3	38,00 €	20	91,20 €
4336699	5x seq buffer medium	1	1 056,00 €	20	844,80 €
4315930	FG CAPILLARY 16X50 CM	1	921,00 €	15	782,85 €
4319899	FG CAPILLARY 16X80 CM	1	921,00 €	15	782,85 €
402824	FG GA 10X BUFFER/EDTA-25 ml	3	107,00 €	20	256,80 €
4363929	FG 3130XL POP7-28 ml	2	500,00 €	10	900,00 €
4363929	FG 3130XL POP7-28 ml	1	500,00 €		500,00 €
sqbf	5x seq buffer medium	1	50,00 €	10	45,00 €
4311320	HI DI FORMAMIDE 25 mL	3	32,00 €	10	86,40 €
5003,1	BDTV3,1-500 rxn	1	3 000,00 €	10	2 700,00 €
717254	pointes AP96-P20	20	45,60 €		912,00 €
717254	pointes AP96-P20	10	57,00 €	30	399,00 €
	FILMS PCR ALUMINIUM	3	84,50 €		253,50 €
	consommables magasin	1	1 000,00 €		1 000,00 €
	frais de port	1	206,00 €		206,00 €
	contrat de maintenance séquenceur	1	11 670,00 €		11 670,00 €
	contrat de maintenance robot	1	2 678,80 €		2 678,80 €
	Amortissement du matériel (sur 5 ans)	1	13 800,51 €		13 800,51 €
	infrastructure (81,29€/m2) (50%)	1	1 560,77 €		1 560,77 €

TOTAL HT	42 403,28 €
TOTAL TTC	50 714,33 €

➤ Facturation et Recettes :

Tarifs	Désignation	privé	EPST
1654	Analyse par microtube (prix de la séquence d'ADN) -Laboratoire CNRS		3,75 €
1661	Analyse par microtube (prix de la séquence d'ADN) - entité publique*		3,75 €
1662	Analyse par microtube (prix de la séquence d'ADN)	7,00 €	
1663	Analyse par plaque 96 puits (prix par plaque) - Laboratoire CNRS		340,00 €
1664	Analyse par plaque 96 puits (prix par plaque) - entité publique*		340,00 €
1665	Analyse par plaque 96 puits (prix par plaque)	550,00 €	
1666	Analyse génotypage (prix pour 16 échantillons) - Laboratoire CNRS		25,00 €
1667	Analyse génotypage (prix pour 16 échantillons) - entité publique*		25,00 €

laboratoire	Unité	code	Qté	prix unitaire HT	coût HT
NEUROCHIMIE	UPR CNRS 2356	1654	171	3,75 €	641,25 €
IPCB	UMR 7156	1654	263	3,75 €	986,25 €
GENETIQUE	UMR 7156	1654	1192	3,75 €	4 470,00 €
GENETIQUE	UMR 7156	1666	10	25,00 €	250,00 €
UNIV REIMS	BBMP	1654	381	3,75 €	1 428,75 €
IGBMC	UPR 7175	1654	26	3,75 €	97,50 €
INRA Colmar	bdv	1661	122	3,75 €	457,50 €
INRA Colmar	bdv	1664	0,92	340,00 €	312,80 €
INRA Colmar	gav	1661	258	3,75 €	967,50 €
INRA Colmar	gav	1664	22,28	340,00 €	7 575,20 €
INRA Colmar	msv	1661	170	3,75 €	637,50 €
INRA Colmar	msv	1664	1,55	340,00 €	527,00 €
INRA Colmar	vive	1661	229	3,75 €	858,75 €
INRA Colmar	vive	1664	2,3	340,00 €	782,00 €
INRA Colmar	vva	1661	218	3,75 €	817,50 €
INRA Colmar	vva	1664	0,92	340,00 €	312,80 €
CHIMIE	UMR7123	1654	108	3,75 €	405,00 €
ENSAIA	ENSAIA-HEHN	1661	59	3,75 €	221,25 €
ESBS-GUTH	UPR7175	1654	275	3,75 €	1 031,25 €
ESBS-DAUL	UPR7175	1654	227	3,75 €	851,25 €
ESBS-DAUL	UPR7175	1663	5	340,00 €	1 700,00 €
ISIS	UMR7006	1654	26	3,75 €	97,50 €
IBMC	UPR9002	1654	423	3,75 €	1 586,25 €
IBMC	UPR9002	1663	4,66	3,75 €	17,48 €
GENE SIGNAL	GENE SIGNAL SAS	1662	39	7,00 €	273,00 €
				Total HT	27 305,28 €

5/ Budget prévisionnel 2010

désignation	PRIX HT	Prix remisé HT	Qté	cout HT
Kit de calibration	2 530,00 €	2 013,85 €	1	2 013,85 €
CAPILLAIRES 16X50 CM	941,00 €	762,21 €	2	1 524,42 €
10X BUFFER/EDTA-500 ml	215,00 €	172,00 €	1	172,00 €
HI DI FORMAMIDE 25 mL	38,00 €	30,40 €	12	364,80 €
MICROPLAQUES 96 puits X 500	2 191,00 €	1 095,50 €	1	1 095,50 €
frais de carboglace	32,00 €	32,00 €	1	32,00 €
POLYMERE 10X28ml	3 700,00 €	3 570,00 €	1	3 570,00 €
BDTV3,1-500 rxn	3 500,00 €	3 060,00 €	2	6 120,00 €
FILMS PCR ALUMINIUM	84,50 €	84,50 €	3	253,50 €
consommables magasin	500,00 €		1	500,00 €
contrat de maintenance automate	2 678,80 €		1	2 678,80 €
contrat de maintenance séquenceur	13 180,00 €		1	13 180,00 €
Infrastructure	1 560,77 €		1	1 560,77 €
			TOTAL HT	33 065,64 €
			TOTAL TTC	39 546,51 €

6/ Veille technologique

Début 2009, Appliedbiosystems lançait la commercialisation d'une nouvelle série de séquenceurs à électrophorèse en capillaires, la série 3500. En novembre 2009, Appliedbiosystems nous informait de l'arrêt des ventes des séquenceurs des séries 3100 et 3130, leur maintenance continuera d'être assurée jusqu'en décembre 2014. Notre séquenceur est donc concerné.

7/ Perspectives 2010

2009 aura montré les limites du mode de fonctionnement des plateformes de séquençage et de QPCR dans les conditions actuelles.

L'augmentation de la demande d'analyses en QPCR, certes prévisible, est telle que l'équilibre entre les activités de séquençage et QPCR est compromis dans les conditions actuelles.

Plusieurs solutions sont envisageables, notamment :

- aide humaine contractuelle ou pérenne
- mettre l'accent sur la formation en QPCR afin que les utilisateurs aient plus d'autonomie

➤ Rappel des perspectives 2009 :

Test méthode de séquençage par Rolling Circle PCR : (collaboration avec A. Berr)

Pour le séquençage direct à partir de colonie bactérienne, de stocks glycérol, plasmides, sans purification.

Avantages : - très fort rendement d'amplification

- séquençage direct sans phase de purification (ex : minipreps)

Les premiers tests réalisés montrent un excellent rendement de PCR, mais la qualité du séquençage n'est pas tout à fait celle obtenue avec une purification. A suivre.....

Aujourd'hui la technique est au point et validée.

Ayant poussé l'analyse plus loin, il s'avère qu'il est possible de séquencer directement à partir de colonies ou cultures bactériennes sans étape intermédiaire, donc sans RC-PCR.

Ce séquençage direct sur colonies ou cultures bactériennes est actuellement proposé en routine, en interne, et trouve de plus en plus d'adeptes. L'externalisation de ce procédé est à l'étude.

8/ Publications scientifiques

Coupling of denaturing high-performance liquid chromatography and terminal restriction fragment length polymorphism with precise fragment sizing for microbial community profiling and characterization.

Penny C, Nadalig T, Alioua M, Gruffaz C, Vuilleumier S, Bringel F.

Appl Environ Microbiol. 2010 Feb;76(3):648-51. Epub 2009 Nov 30.

Alioua Abdelmalek
Responsable plate-forme séquençage d'ADN

analyse

gene

expression

statistique

Plate-forme Q-PCR

20
09

1/ Présentation

- **2007** : Mise en place d'une plateforme pour l'analyse d'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel

➤ *Personnel*

- Mr Alioua Abdelmalek – Ingénieur d'étude - IE2-CNRS - malek.alioua@ibmp-ulp.u-strasbg.fr
Affecté à 50%

➤ *Equipements*

- 1 instrument Roche LC480 pour la PCR quantitative en temps réelle à haut débit en plaque 384 puits (acquis en 2008 sur fonds propres IBMP)
- 1 thermocycler Biorad i-cycler pour PCR en temps réelle en plaque 96 puits (acquis en 2003 sur fonds propres IBMP)
- 1 station de pipetage (robot biomek 3000) (acquis en 2006), partagé avec la plateforme de séquençage d'ADN
- 1 station PC pour l'analyse des résultats

➤ *Capacité d'analyse*

Capacité théorique annuelle: 83 000 réactions. (Calcul basé sur un service théorique à 50% de temps, les autres 50% étant dédiés à la plateforme de séquençage d'ADN)

En 2009 : 136 088 réactions
47 utilisateurs
3 laboratoires

2/ Missions

Le service est organisé en plate-forme pour l'analyse d'expression de gènes. Les missions sont :

- Test de gènes référence -collection de couples d'amorces
- Validations des kits et réactifs
- Probe and primer design (taqman ou sybgreen)
- Réalisations et optimisation des réactions de QPCR
- Support technique et logiciel
- Suivi de l'évolution technologique et logicielle de la plateforme
- Formation des nouveaux utilisateurs
- Logistique de la plateforme et la maintenance des différents automates
- Suivi administratif de la plateforme

En 2009 l'activité de la plateforme a augmenté de 40% par rapport à l'année 2008.

Jusqu'à 50% du temps et de la capacité totale de la plateforme sont accessibles en libre-service pour les utilisateurs confirmés.

3/ Activité en 2009

- *Test de gènes référence*

A partir d'une collection de gènes, recherche des 2 ou 3 gènes les plus stables pour un organisme donné, pour un tissu donné et dans des conditions expérimentales données. Logiciel utilisé : Genorm et calcul des Δct . Ainsi la plateforme dispose de 3 sets de normalisation pour les organismes suivants : Arabidopsis thaliana, Nicotiana tobaccum (tabac) et Solanum tuberculum (pomme de terre).

- *Probe and primer design*

Pour un gène donné recherché de couple d'amorce ayant les meilleures spécificité et efficacité en Q-PCR pour un protocole défini à l'avance. Logiciel utilisé : Universal Probe Library (Roche). Calcul de l'efficacité avec LinReg.

- *Réalisations et optimisation des réactions de QPCR*

Réalisation de QPCR en microplaque 96 et 384 puits. Pipetage manuel ou automatisé selon le nombre de réactions à réaliser.

- *Analyse statistique des résultats*

Analyse statistique des résultats de QPCR : quantification relative par la méthode des $\Delta\Delta Ct$.

Analyse plaque par plaque ou en mode « gene study » permettant de normaliser et d'analyser une centaine de plaques en même temps pour les études portant sur un grand nombre de gènes.

- *Support technique et logiciel*

Aider les utilisateurs pour la configuration et la réalisation de leur expérience, support technique pour la synthèse des cDNA.

Formation à l'utilisation des différents logiciels

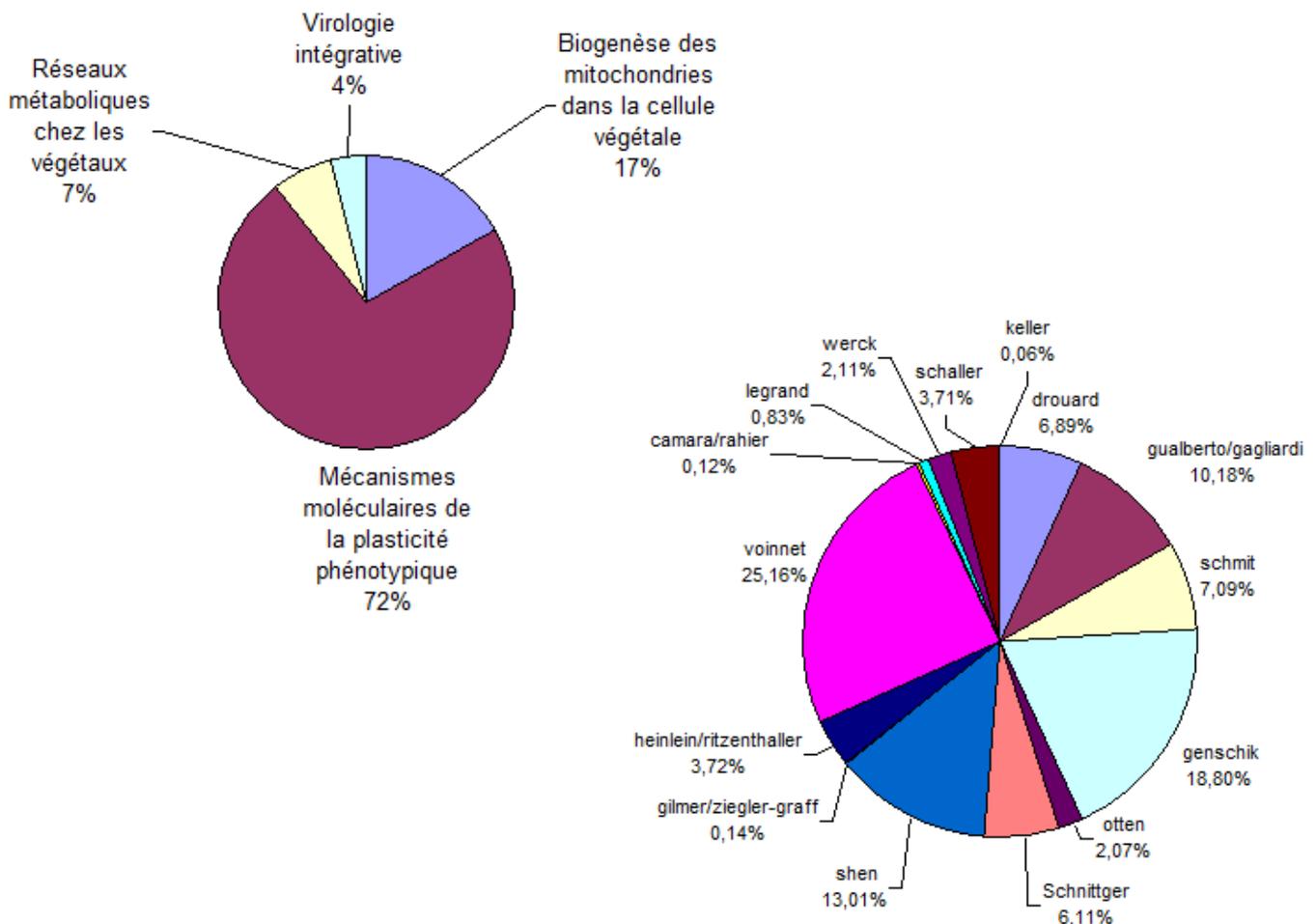
- *Formation permanente CNRS*

En 2009, deux sessions de 2,5 jours ont été réalisées par le responsable de la plateforme et E.Lechner (IR, groupe de P. Genschik).

corps	nb
DR	1
CR	2
MC	1
IE	1
POST DOC	4
IE-CDD	1
total	10

➤ *Bilan utilisateurs IBMP*

135 168 réactions réalisées, 45 utilisateurs



➤ *Bilan utilisateurs externes*

920 réactions réalisées, 2 utilisateurs

laboratoire	équipe	utilisateur	Nb de réactions
IBMC- UPR9002	pfeffer	perrot	422
	Total pfeffer		422
ISIS – UMR 7006	griffiths	granieri	498
	Total griffiths		498
			920

4/ Bilan financier

➤ *Dépenses/ coût de fonctionnement 2009*

désignation	quantité	prix HT	remise %	cout remisé HT
LC480 MULTIWELL 50X PLATE384+ FILMS	10	410,00€	30	2 870,00€
LC480 SYBR GREEN I MASTER 10X5ML	13	1 540,00€	30	14 014,00€
EmboutsAP96-P20	20	45,60€		912,00€
EmboutsAP96-P20	10	57,00€	30	399,00€
contrat de maintenance robot	1	2 678,80€		2 678,80€
Amortissement du matériel (2006-2010)	1	13 800,51€		13 800,51€
infrastructure (81,29€/m2) (50%)	1	1 560,77€		1 560,77€

total HT	36 235,08€
total TTC	43 337,16€

➤ *Facturation et Recettes 2009*

Facturation			
1668	Analyse par plaque 384 puits (prix par plaque) - Laboratoire CNRS		115,00 €
1669	Analyse par plaque 384 puits (prix par plaque) - entité publique*		115,00 €
1670	Analyse par plaque 384 puits (prix par plaque)	250,00 €	
1671	Design et test d'amorces (prix du gène) - Laboratoire CNRS		33,00 €
1672	Design et test d'amorces (prix du gène)	33,00 €	

laboratoire	Unité	code	Qté	prix unitaire HT	coût HT
ISIS	UMR7006	1668	1,1	115,00 €	126,38 €
IBMC	UPR9002	1668	1,3	115,00 €	149,14 €
				Total HT	275,52 €

5/ Budget prévisionnel 2010

Pour 120 000 réactions :

désignation	quantité	prix HT	remise %	coût remisé HT
LC480 MULTIWELL 50X PLATE384+ FILMS	7	410,00€	30	2 009,00€
LC480 SYBR GREEN I MASTER 10X5ML	12	1 540,00€	30	12 936,00€
Embouts AP96-P20	100	57,00€	30	3 990,00€
contrat de maintenance robot	1	2 678,80€		2 678,80€
Amortissement du matériel (2006-2010)	1	13 800,51€		13 800,51€
infrastructure (81,29€/m ²) (50%)	1	1 560,77€		1 560,77€
			total HT	36 975,08€
			total TTC	44 222,20€

6/ Remarques 2009

Utilisation de la plateforme

Du fait de l'acquisition d'un nouvel instrument à haut débit la sollicitation de la plateforme pour l'analyse d'expression de gènes a presque doublé par rapport à l'année dernière.

Malgré cette augmentation des capacités de la plateforme, il est parfois difficile de répondre à toutes les demandes.

Cette sollicitation toujours plus forte risque de mettre en péril l'équilibre séquençage/QPCR. Quoi qu'il en soit l'activité de séquençage reste prioritaire par rapport à la QPCR.

L'apport de la PCR quantitative est considérable, tant au niveau de la qualité des résultats que du confort et de la facilité à la mettre en œuvre. Toutefois le mode de fonctionnement reste perfectible, notamment en ce qui concerne le mode d'accès et les réservations en ligne. Une charte de fonctionnement a été proposée.

L'activité 2009 est globalement positive au regard des réponses apportées aux chercheurs.

7/ Perspectives 2010

- Accentuer la formation pratique à la QPCR afin que les utilisateurs aient plus d'autonomie.
En accord avec E. Lechner, (IR, groupe de P. Genschik), nous proposerons :
 - 1 session de formation pour les doctorants, dans le cadre de l'Ecole doctorale.
 - 2 sessions de formation dans le cadre de la formation permanente CNRS.
- Développer d'avantage les analyses en sonde taqman ou équivalent
- Mettre en place un mode de gestion et d'assurance qualité plus robuste

8/ Publications scientifiques

Achard P., Gusti A., Cheminant S., Alioua A., Dhondt S., Coppens F., Beemster G. and Genschik P.
Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis.
Curr. Biol., 19:1188-1193, 2009.

Roa H., Lang J., Culligan K. M., Keller M., Holec S., Cognat V., Montane M. H., Houlne G. and Chaboute M. E.
Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in Arabidopsis.
Plant Physiol., 151(1):461-471, 2009.

Berr A., Xu L., Gao J., Cognat V., Steinmetz A., Dong A. and Shen W. H..
SET DOMAIN GROUP25 Encodes a Histone Methyltransferase and Is Involved in FLOWERING LOCUS C
Activation and Repression of Flowering.
Plant Physiol., 151(3):1476-1485, 2009.

Alioua Abdelmalek
Responsable plate-forme QPCR

microscope

cellule

fluorescence

observation

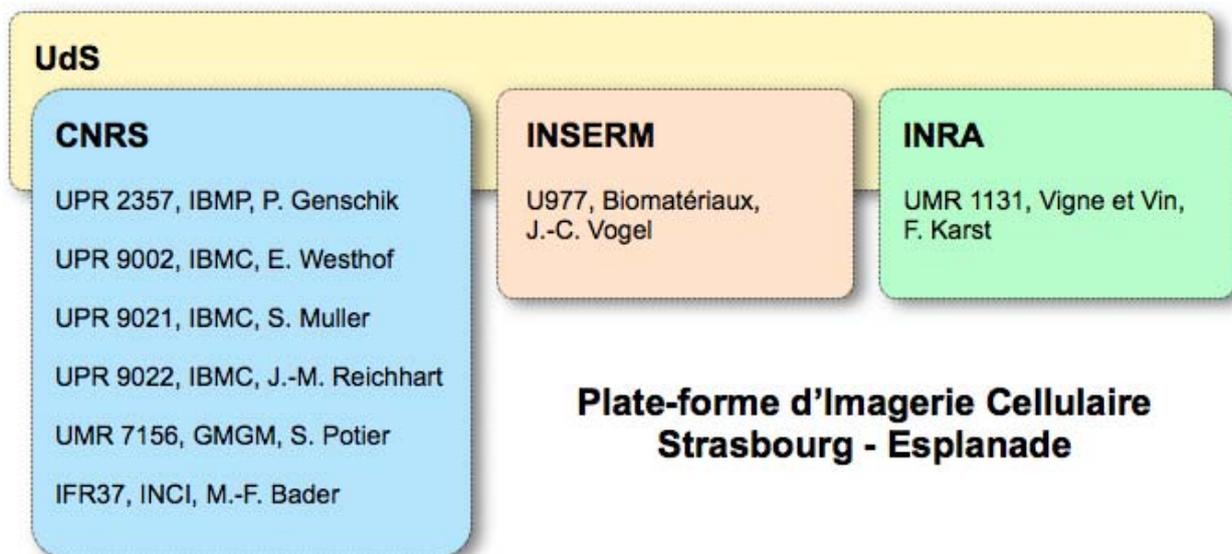
Plate-forme Microscopie et Imagerie

20
09

1/ Présentation de la plate-forme d'imagerie cellulaire Strasbourg Esplanade

La plate-forme RIO d'imagerie cellulaire Strasbourg Esplanade (PICSE) a été créée en 1998. Son programme scientifique a pour but l'étude, par différentes techniques de microscopie, de l'expression spatio-temporelle de gènes d'organismes supérieurs, animaux ou végétaux, et l'étude des biomatériaux par la caractérisation des processus biophysiques et biologiques aux interfaces.

La plate-forme adhère à la *charte des plate-formes technologiques en sciences du vivant* et a obtenu un label RIO en 2001, 2004 et 2006.



➤ Missions de la plate-forme

- Soutenir l'activité de recherche des équipes internes et externes à la plate-forme
- Développer et implanter de nouvelles méthodologies
- Assurer la formation du personnel aux nouvelles techniques par l'organisation de formations individuelles ou collectives dans le cadre de formations permanentes CNRS
- Participer à l'enseignement supérieur et à l'animation scientifique en direction du public
- Assurer le bon fonctionnement du matériel commun

➤ Personnel affecté à la plate-forme

- Jérôme Mutterer, IR1 CNRS (IBMP), 100% plate-forme, Dr en Biologie Moléculaire et Cellulaire, responsable microscopie confocale, optique et imagerie.
- Mathieu Erhardt, IR1 CNRS (IBMP), 100% plate-forme, Dr en Biologie Moléculaire et Cellulaire, responsable microscopie électronique.

2/ Matériels disponibles dans la plate-forme de l'IBMP

Machine	Année d'acquisition	Prix d'achat (€)	Maintenance	Co-financements
Microscope électronique à transmission Hitachi H600	1983	100 000	8 000	CNRS : 100%
Microscope à fluorescence Leica DMRB	1995	32 755	0	Eq. AM Lambert, Fondation Koerber : 100%
Stéréomicroscope à fluorescence Leica	1997	12 702	0	Eq. G Hahne : 100%
Microscope à fluorescence Nikon E800	1998	59 437	0	IBMP : 100%
Microscope confocal Zeiss LSM510-Meta	1999	225 743	4 000	Région Alsace : 30% ULP : 20%, CNRS : 50%
Microscope à fluorescence 4D rapide Nikon TE2000	2003	58 941	0	Région Alsace : 30%, PPF : 70%
Stéréo microscope à fluorescence Nikon SMZ1500	2003	18 161	0	IBMP : 100%
Microscope confocal Zeiss LSM510-405	2007	243 600	4 000	Région Alsace : 30%, PPF : 70%
Macroscopie Leica	2008	40 800	0	ANR : 70% Eq. V Ziegler-Graff : 30%
Microscope à fluorescence Zeiss Apotome	2008	86 500	0	Eq. Schnittger, ERC : 70%
Appareil photo Macro Nikon D80	2008	1 579	0	IBMP : 100%

Deux nouveaux appareils ont été achetés au cours de cet exercice : un nouveau confocal Zeiss LSM700 en remplacement du confocal 1 et un mini-microscope électronique à balayage Hitachi TM1000.

Machine	Année d'acquisition	Prix d'achat (€)	Maintenance	Co-financements
Zeiss LSM700	2010	120 000		IBMP : 100%
MEB TM1000	2010	53 000	0	conseil scientifique UDS : 75% UPR2357, UPR9021, UPR9022, U977, UMR7156 : 25%

3/ Domaines d'intervention de la plate-forme

La plate-forme de microscopie intervient dans le domaine de la biologie végétale et animale mais aussi dans le domaine de la microbiologie et des biomatériaux.

Biologie végétale :

- Mécanismes moléculaires de l'assemblage du cytosquelette des plantes
- Rôle de la protéolyse dans le contrôle du cycle cellulaire et le développement chez les plantes
- Mécanismes épigénétiques dans la signalisation du développement des plantes
- Caractérisation fonctionnelle des protéines virales de plantes
- Biosynthèse et fonctions des isoprénoïdes et des stérols chez les plantes
- Etude des mécanismes de transport de molécules vers les mitochondries
- Rôles de la recombinaison dans la transmission du génome mitochondrial
- Biogenèse des cytochromes de type c
- Rôles de la dégradation des ARN dans l'expression des génomes végétaux
- Etude du déplacement des protéines virales dans une plante infectée
- Interactions entre virus et plantes hôtes
- Biologie du développement dans la cellule végétale
- Mécanismes et rôles biologiques du RNA Silencing chez les eucaryotes

Biologie animale :

- Etude des nanotubes fonctionnalisés et leur interaction avec les cellules
- Identification de nouveaux modulateurs de l'immunité innée chez les insectes
- Structure et fonction des ARN

Microbiologie :

- Métabolisme de l'arsenic chez les bactéries arsénophiles

Biomatériaux :

- Adhésion cellulaire et biominéralisation
- Interactions protéines-biomatériaux et protéines-cellules

4/ Photos des appareils



Confocal Zeiss LSM 700 (2010)



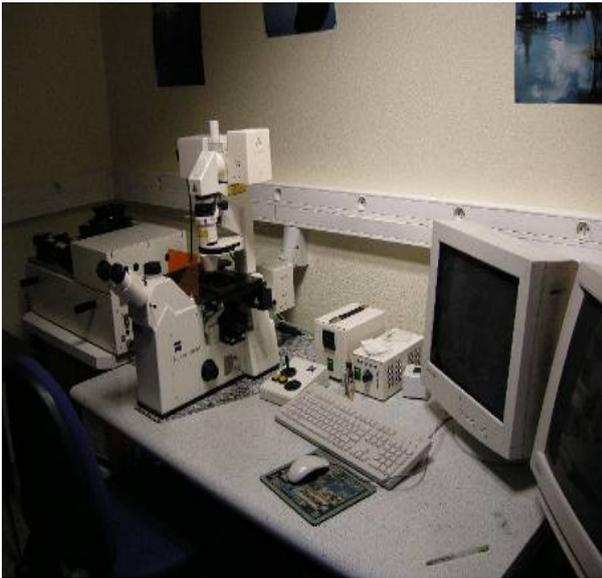
Macroscopie à fluorescence
Z16APO Leica (2008)



Confocal Zeiss LSM 510-405 (2007)



Plaque des financeurs du microscope
Confocal Zeiss LSM 510-405



Confocal Zeiss LSM 510 META (1999)



Plaque des financeurs du microscope
Confocal Zeiss LSM 510-Meta



Epifluorescence Nikon E800 (1998)



Vidéomicroscope Nikon TE2000 (2003)



Microscope électronique à transmission
Hitachi H600 (1983)



Loupe Leica à épifluorescence (1997)



Epifluorescence Leica DMRB (1995)



Loupe Nikon à épifluorescence
SMZ1500 (2003)

5/ Description et coût des prestations fournies par la plate-forme

Comme pour l'ensemble des plates-formes de l'IBMP, le coût des prestations est identifié et facturé selon un barème publié au Bulletin Officiel du CNRS.

Coût interne et établissements publics : le calcul du coût horaire est calculé sur la base de : total des dépenses (amortissement + maintenance + consommables + coût d'infrastructure au m²) divisé par le nombre d'heures d'observation.

Coût établissements non publics : le calcul tient compte du tarif horaire d'un ingénieur de recherche.

Les tarifs sont basés sur l'heure d'utilisation du Microscope électronique à transmission (MET), du microscope optique (Optique), et des microscopes confocaux (Confocal)

	MET	Optique	Confocal
Consommables	4200 €	3898 €	7602 €
Contrat de maintenance	8000 €	2000 €	8000 €
Autres dépenses	0 €	0 €	9500 €
Amortissement	0 €	25460	48720 €
Infrastructure	1230 €	3240 €	1620 €
Total des frais annuels	13430 €	34638 €	75462 €
Nombre prestations en 2008	850 h	2000 h	3900 h
Coût unitaire, hors frais de personnel	15,8 €	17,32 €	19,35 €
Frais de personnel (€/heure) ¹	44 €	44	44 €
Coût unitaire, frais de personnel inclus	59,8 €	61,32	63,35 €
Taxation 12%, délégation Régionale alsace			
Tarif EPST, inclus 12% prélèvement Délégation Régionale	18 €/h	20,50 €/h	23 €/h
Tarif hors-EPST, inclus 12% prélèvement Délégation Régionale	68 €/h	70 €/h	72 €/h

1 : Personnel réalisant la prestation, 2 ingénieurs de recherche

6/ Facturation 2009

Recettes externes pour la microscopie optique :

Inserm U977	5 692 €
UPR9002	184 €
UPR9022	10 534 €
UPR9021	1 184 €
ISIS	460 €

Recettes externes pour le microscope électronique :

UPR9021	2 826 €
GMGM	495 €

7/ Activité de la plate-forme

En termes de volume, le temps d'utilisation des principaux microscopes utilisés dans la plate-forme est d'environ 6 000 heures :

Appareil	Heures d'utilisation	Heures par jour ouvrable
Microscope confocal LSM 510-meta	558 h	2,23
Microscope confocal LSM 510-405/561	2 572 h	10,29
Microscope électronique	703 h	2,81
Nikon E800 (fond clair et fluo)	731 h	2,92

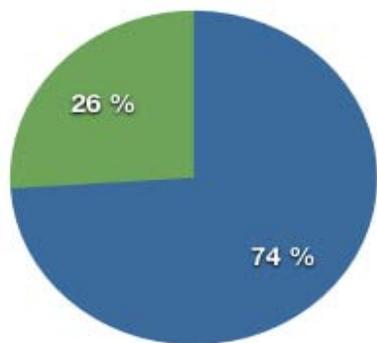
Les autres équipements tels que petits microscopes, loupes binoculaires ou loupe à fluorescence sont utilisés régulièrement et entretenus, mais sans contrôle d'accès.

Sur les principaux équipements, **2 250** créneaux horaires ont été réservés. Sur une base de 250 jours ouvrables annuels, cela représente un total de plus de **9 expériences par jour**.

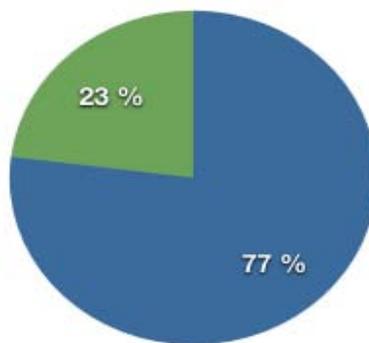
➤ *Ouverture de la plate-forme à des équipes extérieures*

Cette ouverture est pour nous obligatoire vis-à-vis des partenaires ayant contribué au projet et ou au financement initial du matériel et elle est aussi un des points demandés pour l'obtention du label GIS-IBISA.

Ouverture - microscopie optique



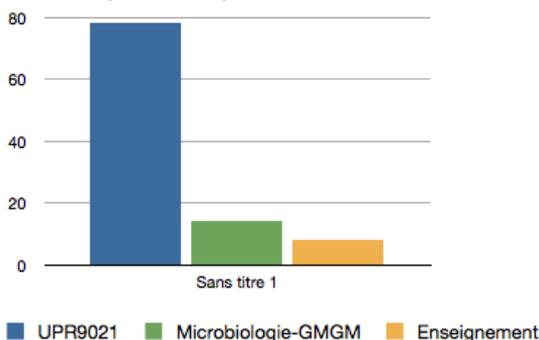
Ouverture - microscopie électronique



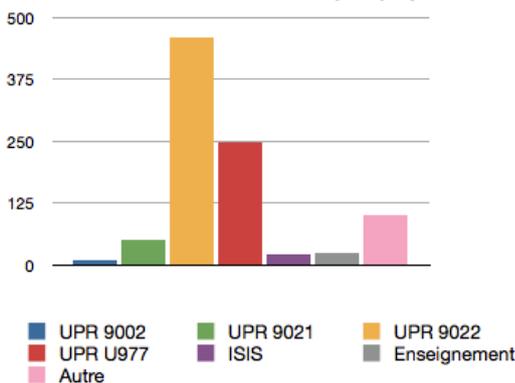
● Interne ● Externe

En moyenne, 1/4 du temps d'utilisation des microscopes est attribué à des chercheurs hors IBMP.

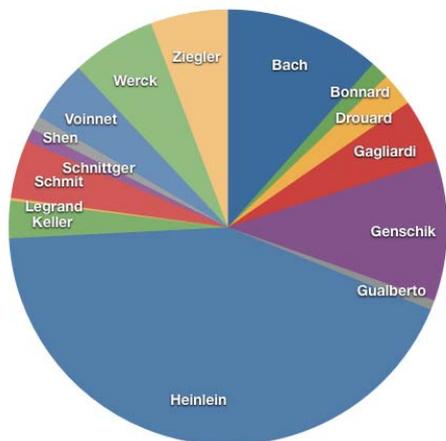
Microscope électronique utilisateurs extérieurs



Utilisation extérieure - microscopie optique

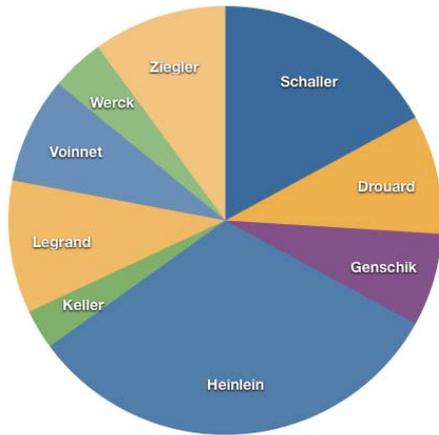


Utilisation des microscopes de la plateforme par des utilisateurs hors IBMP



Les principaux utilisateurs sont : département Virologie intégrative 43%, département Réseaux métaboliques chez les végétaux 11%, département Mécanismes Moléculaires de la Plasticité Phénotypique 10%.

Répartition de l'utilisation des microscopes confocaux entre les équipes IBMP



Les principaux utilisateurs sont : département Virologie intégrative 42%, département Réseaux métaboliques chez les végétaux 21%.

Répartition de l'utilisation du microscope électronique entre les équipes IBMP

Commentaires :

Rappel des règles en vigueur :

1. Les demandes d'utilisation doivent être saisies dans le système de réservation disponible à l'adresse suivante : <http://activplanning-ibmp.u-strasbg.fr/>
2. Toute personne dûment formée peut réserver les microscopes sans accord préalable
3. Chaque équipe dispose d'un crédit permanent de 9 heures à réserver dans le futur (quota flottant par laboratoire)
4. Les plages horaires encore libres dans les 2 prochains jours sont accessibles hors quota
5. Les plages horaires débutant après 18 h sont accessibles hors quota
6. Les données utilisateur doivent être sauvegardées immédiatement en fin de session, pour se prémunir des pannes informatiques

8/ Publications 2009

En 2009, la plate-forme d'imagerie cellulaire a contribué à 35 publications dont le facteur d'impact moyen atteint 9,16. Comme en 2008, ce FI moyen est supérieur au FI moyen de l'Unité pour la même période et qui est de 8,1. (Publications hors IBMP signalées par *)

1. Thomann A., Lechner E., Hansen M., Dumbliauskas E., Parmentier Y., Kieber J., Sheres B. and Genschik P. Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *Plos Genet.*, 5:1-14, 2009.
2. Xu L., Ménard R., Berr A., Fuchs J., Cognat V., Meyer D. and Shen W.H. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes AtUBC1 and AtUBC2 play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in Arabidopsis Thaliana. *Plant J.*, 57:279-288, 2009.
3. Covelli L., Klein E. and Gilmer D. The first 17 amino acids of the beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein are sufficient to activate transcription in a yeast one-hybrid system. *Arch Virol*, 154(2):347-351, 2009.
4. Gerber E., Hemmerlin A., Hartmann M., Heintz D., Hartmann M. A., Mutterer J., Rodriguez-Concepcion M., Boronat A., Van Dorsselaer A., Rohmer M., Crowell D. N. and Bach T. J. The Plastidial 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway Provides the Isoprenyl Moiety for Protein Geranylgeranylation in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell*, 21(1):285-300, 2009.
5. Ratti C., Hleibieh K., Bianchi L., Schirmer A., Autonell C. R. and Gilmer D. Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in Beta macrocarpa. *Virology*, 385(2):392-399, 2009.
6. Voinnet O. Origin biogenesis and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136:669-687, 2009.
7. Gusti A., Baumberger N., Nowack M., Pusch S., Eisler H., Potuschak T., De Veylder L., Schnittger A. and Genschik P. The Arabidopsis thaliana F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development. *PLoS ONE*, 4(3):1-10, 2009.
8. Crowell D. N., Hemmerlin A., Gerber E., Hartmann M., Heintz D., Rohmer M. and Bach T. J. A role for plastids in plant protein isoprenylation. *Plant Signaling Behavior*, 4(3):217-218, 2009.

9. Lee J.Y., Lee H.S., Wi S.J., Park K.Y., Schmit A.C. and Pai H.S. Dual functions of *Nicotiana Benthamiana* Rae1 in interphase and mitosis. *Plant J.*, 59:278-291, 2009.
10. Liu Z., Zhu Y., Gao J., Yu F., Dong A. and Shen W. H. Molecular and reverse genetic characterization of nucleosome assembly protein1 (NAP1) genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 59:27-38, 2009.
11. Sambade A. and Heinlein M. Approaching the cellular mechanism that supports the intercellular spread of Tobacco mosaic virus. *Plant Signaling Behavior*, 4:35-38, 2009.
12. Shen W. H. and Xu L. Chromatin remodeling in stem cell maintenance in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 2:600-609, 2009.
13. (*) Tillich M., Hardel S. L., Kupsch C., Armbruster U., Delannoy E., Gualberto J. M., Lehwark P., Leister D., Small I. D. and Schmitz-Linneweber C. Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(14):6002-6007, 2009.
14. Marrocco K., Thomann A., Parmentier Y., Genschik P. and Criqui M. C. The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic *Arabidopsis* cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development*, 136(9):1475-1485, 2009.
15. Liu Z., Gao J., Yu F., Dong A. and Shen W. H. A truncated *Arabidopsis* NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1 AtNAP1;3T alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the *Atnap1;3-2* mutant. *Molecular Plant*, 2:688-699, 2009.
16. Hofmann C., Niehl A., Sambade A., Steinmetz A. and Heinlein M. Inhibition of Tobacco mosaic virus movement by expression of an actin-binding protein. *Plant Physiol.*, 149:1810-1823, 2009.
17. (*) Couturier J., Koh C. S., Zaffagnini M., Winger A. M., Gualberto J. M., Corbier C., Decottignies P., Jacquot J. P., Lemaire S. D., Didierjean C. and Rouhier N. Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J Biol. Chem.*, 284(14):9299-9310, 2009.
18. Zhao Z., Zhu Y., Erhardt M., Ruan Y. and Shen W. H. A Non-canonical Transferred DNA Insertion at the BR11 Locus in *Arabidopsis thaliana*. *J. Integr. Plant Biol.*, 51(4):367-373, 2009.
19. Achard P., Gusti A., Cheminant S., Alioua A., Dhondt S., Coppens F., Beemster G. and Genschik P. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, 19:1188-1193, 2009.
20. (*) Charriere F., O Donoghue P., Helgadottir S., Marechal-Drouard L., Cristodero M., Horn E. K., Soll D. and Schneider A. Dual targeting of a tRNA^{Asp} requires two different aspartyl-tRNA synthetases in *trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, 284(24):16210-16217, 2009.
21. Ruiz-Ferrer V. and Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60:485-510, 2009.
22. (*) Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B. and Chong J. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol.*, 9:54, 2009.
23. Boutant E., Fitterer C., Ritzenhaller C. and Heinlein M. Interaction of the Tobacco mosaic virus movement protein with microtubules during the cell cycle in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 237:3-12, 2009.
24. Gibbings D.J., Ciaudo C., Erhardt M. and Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*, 9:1143-1149, 2009.
25. (*) Mertz D., Vogt C., Hemmerle J., Mutterer J., Ball V., Voegel J. C., Schaaf P. and Lavallo P. Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation. *Nat. Mater.*, 8(9):731-735, 2009.
26. Compagnon V., Diehl P., Benveniste I., Meyer D., Schaller H., Schreiber L., Franke R. and Pinot F. CYP86B1 is required for very long chain omega-hydroxyacid and alpha omega -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiol.*, 150(4):1831-1843, 2009.
27. Delannoy E., Le Ret M., Faivre-Nitschke E., Estavillo G. M., Bergdoll M., Taylor N. L., Pogson B. J., Small I., Imbault P. and Gualberto J. M. *Arabidopsis* tRNA adenosine deaminase arginine edits the wobble nucleotide of chloroplast tRNA^{Arg}(ACG) and is essential for efficient chloroplast translation. *Plant Cell*, 21(7):2058-2071, 2009.
28. Matsuno M., Compagnon V., Schoch G. A., Schmitt M., Debayle D., Bassard J. E., Pollet B., Hehn A., Heintz D., Ullmann P., Lapierre C., Bernier F., Ehling J. and Werck-Reichhart D. Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. *Science*, 325:1688-1692, 2009.
29. Roa H., Lang J., Culligan K. M., Keller M., Holec S., Cognat V., Montane M. H., Houlne G. and Chaboute M. E. Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 151(1):461-471, 2009.

30. Berr A., Xu L., Gao J., Cognat V., Steinmetz A., Dong A. and Shen W. H. SET DOMAIN GROUP25 Encodes a Histone Methyltransferase and Is Involved in FLOWERING LOCUS C Activation and Repression of Flowering. *Plant Physiol.*, 151(3):1476-1485, 2009.
31. (*) Berglund A. K., Pujol C., Duchene A. M. and Glaser E. Defining the determinants for dual targeting of amino Acyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts. *J. Mol. Biol.*, 393:803-814, 2009.
32. Thiebeauld O., Schepetilnikov M., Park H. S., Geldreich A., Kobayashi K., Keller M., Hohn T. and Ryabova L. A. A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation. *EMBO J.*, 28:3171-3184, 2009.
33. Tritsch D., Hemmerlin A., Bach T. J. and Rohmer M. Plant isoprenoid biosynthesis /via/ the MEP pathway/ in vivo/ IPP/DMAPP /ratio/ produced by (/E/)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase in tobacco BY-2 cell cultures. *Febs Lett.*, :(sous presse), 2009.
34. Bouvier-Nave P., Berna A., Noiriél A, Compagnon V., Carlsson A.S., Banas A., Stymne S. and Schaller H. Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase 1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol.*, :(sous presse), 2009.
35. Dissmeyer N., Weimer A.K., Pusch S., De Schutter K., C. Lessa Alvim Kamei, Nowack M. K., Nowack B., Duan G.L., Zhu Y.G., De Veylder L. and Schnittger A. Control of cell proliferation organ growth and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the Arabidopsis Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell*, :(sous presse), 2009.

9/ Veille technologique

- Un système de microscopie permettant de réaliser des sections optiques rapides a été demandé au PPF 2009-2012 pour l'imagerie des événements intra-cellulaires rapides tel que le trafic de vésicules et la dynamique du cytosquelette. Notre demande a été accueillie favorablement par l'université et ce projet devrait se réaliser en 2010. La demande initiale en 2007 se basait sur un système à disque de Nipkow, mais d'autres technologies équivalentes ou supérieures sont maintenant disponibles (Particulièrement le système d'illumination rapide en lumière structurée Vivatome).
- Plusieurs équipes partenaires trouveraient un intérêt immédiat à disposer d'un système permettant de réaliser des mesures de temps de vie de fluorescence (FLIM). Cette technique est à l'heure actuelle la plus robuste pour caractériser les interactions moléculaires par fluorescence, car elle est quantitative et insensible à certains paramètres difficilement contrôlables dans les autres approches. Des tests sont prévus en février 2010.
- Notre premier microscope confocal a été acquis en 1999. Grâce à la reconnaissance de la plate-forme nous avons pu bénéficier d'une offre exceptionnelle de mise à jour de cette station d'imagerie, en partenariat avec la société Carl Zeiss France. L'installation d'un microscope LSM700 nous permettra de rester à la pointe de la technique de microscopie confocale. Cet appareil, plus rapide, plus sensible et plus robuste (coût 120 000 euros) est entièrement financé par l'IBMP. L'ancien système LSM510 est remis en service au sein de la plateforme dans l'unité partenaire U977 qui a pris à sa charge la réparation, le déménagement et la mise à jour du système.
- Achat d'un mini microscope électronique à balayage avec un financement réparti comme suit :
 - 80% Conseil scientifique de l'université 40 000 euros
 - 20 % IBMP + partenaires (UPR9002, UPR9021, UMR7156, Inserm U595) 10 000 euros
 Cet appareil sera fonctionnel au mois de février 2010 et permettra de caractériser les surfaces des différents organismes et biomatériaux étudiés par les unités partenaires, avec une résolution qui n'était pas disponible jusqu'alors.
- Formations réalisées en 2009 par les ingénieurs de la plate-forme :
 - Formation traitement d'images avec ImageJ (4 jours, 20 participants)
- Formations réalisées en 2010 par les ingénieurs de la plate-forme :
 - Formations traitement d'images avec ImageJ
 - Formation cytologie végétale
 - Formation hybridation in situ
 - Formation Acquisition de séquences spectrales, temporelles et spatiales à l'aide de différents instruments optiques

10/ Démarche qualité

Dans le cadre du projet 'Qualité en Recherche – CONECTUS', la plate-forme IBMP s'est engagée au cours de l'année 2008, dans une démarche Qualité avec le soutien d'un consultant (Philippe Turnani HIPOS Consultants) financé par la Délégation Régionale Alsace. Après la réalisation de l'état des lieux de la plate-forme, la documentation a été revue et mise en conformité pour les documents de base : fiche utilisateur, formation, cahiers d'utilisation, manuel d'utilisation des appareils, procédures, protocoles. Avec la mise en place de cette étape, la plate-forme peut maintenant s'engager dans une seconde phase : celle de l'amélioration continue de la qualité.

11/ Budget prévisionnel

- microscopie électronique à transmission : contrat de maintenance..... 8 000 euros
 - révision ultramicrotome..... 1 200 euros
 - consommables TEM (selon réaffutages etc.)..... 4 000 euros
 - consommables Optique (selon pannes lasers etc.)..... 11 000 euros
 - remplacement des 2 écrans phosphore du microscope électronique
(écran de visualisation et écran de la caméra) env. 3 000 euros
 - un objectif zoom polyvalent pour l'appareil photo D80
(nous n'avons pour l'instant qu'un objectif macro) env. 500 euros
 - Mini MEB (en cours d'achat) env. 50 000 euros

 - Boîtiers d'accès sécurisé aux données utilisateur pour tous les
postes env. 1 500 euros
- Ces boîtiers ont pour objectif de faciliter le transfert des données vers le serveur de sauvegarde Biolmage.

Mathieu ERHARDT
Responsable plate-forme microscopie électronique

Jérôme MUTTERER
Responsable plate-forme microscopie confocale, optique et imagerie

tissus

coloration

immuno-
localisation

hybridation

Plate-forme Cytologie

20
09

1/ Présentation et Missions

La plate-forme propose des études cytologiques et histologiques ainsi que diverses analyses dont l'hybridation *in situ* et l'immunocyto-localisation, pour obtenir des images de tissus biologiques en microscopie photonique.

Ses principales missions :

- Effectuer des analyses histologiques et cytologiques sur coupes de tissus, ou tissus et organes entiers.
- Valoriser les études biochimiques ou de biologie moléculaire en localisant des composés ou des produits de gènes, grâce aux outils indispensables que sont l'hybridation *in situ* et l'immunolocalisation.
- Assurer la veille technologique de la plate-forme.
- Former les utilisateurs aux techniques utilisées sur la plate-forme et les accompagner jusqu'à leur autonomie.
- Mettre au point et écrire des protocoles qui sont à la disposition des utilisateurs.
- Encadrer des stagiaires de tous horizons.
- Mettre à la disposition des utilisateurs des documents bibliographiques et photographiques, notamment sur les différents stades du développement des plantes.
- Pour l'hybridation *in situ*, disposer d'un stock de marqueurs moléculaires (ex : wuschel, stm pour le méristème, aintegumenta pour les téguments des ovules etc...) qui servent de contrôle et permettent une localisation plus précise des gènes étudiés par les utilisateurs de la plate-forme, notamment au cours du développement des plantes.
- Constantes mises au point de nouvelles techniques pour améliorer les analyses. Un stage à l'INRA de Versailles (plate-forme de cytologie), m'a permis d'affiner des techniques et de ramener à l'IBMP de nouveaux protocoles d'études des plantes.
- Préparation des travaux pratiques (Hybridation *in situ* sur fleurs de *Nicotiana tabacum*) pour les étudiants de master I.

2/ Equipement disponible à la plate-forme

- Un microtome motorisé Leica RM 2155 (4 500 \$ US)
- Un microtome manuel Reichart-Jung AG Heidelberg (ancien modèle)
- Un four à hybridation Bioblock Scientific (1 400 euros)
- Deux étuves Memmert (étuve à paraffine) (700 et 500 euros)
- Une étuve Jouan (400 euros)
- Une loupe binoculaire Zeiss Stemi 2000 (900 euros)
- Une loupe binoculaire Nikon équipée d'un appareil photo Nikon coolpix P5000
- Une étuve à vide Flam et Cie
- Une platine chauffante Kunz HP-3 (535 euros)
- Un déplisseur à eau rond kunz HIS-2 (655 euros)
- Un microscope inversé Nikon TMS (950 euros)

Achat équipement 2009

Distributeur de paraffine KUNZ, coût 3500 euros. Acheté par l'IBMP en collaboration avec José GUALBERTO et Véronique ZIEGLER-GRAFF



3/ Prestations de la plate-forme : études histologiques d'une plante

Etude histologique des différents tissus :

avec du matériel frais -avec ou sans fixation

- Par simple observation entre lame et lamelle de tissus entiers comme les racines, les feuilles, les plantules, les fleurs ou une coupe à main levée de tiges ou autres tissus. Pour comparer plantes sauvages et mutant
- Après coloration ex : Bleu de toluidine, éosine ou autre
- Visualisation au microscope à fluorescence, de structures en utilisant le DAPI (noyaux), le calcofluor et l'iodure de propidium (parois)
- Mise en évidence de structures particulières comme la lignine dans les faisceaux conducteurs (phloroglucinol) ou l'amidon (lugol) ou les lipides (rouge Soudan)
- Mise en évidence de tanin, cristaux, sable grâce à des réactifs spécifiques
- Coloration spécifique de grains de pollen (Alexander staining)
- Observation des échantillons après révélation GUS

avec du matériel fixé et inclus dans le paraplast

Sur coupes

Fixation des échantillons

Déshydratation

Inclusions

Coupes au microtome

Dans le but :

- de colorer et mettre en évidence les différents types cellulaires d'un tissu
- d'affiner des observations après révélation GUS pour localiser plus précisément le précipité bleu

Etudes spatio-temporelles de l'expression d'un gène

Localisation des protéines : IMMUNOCYTOLOCALISATION

Inclusion en paraplast

Coupes microtome

Immunocyto-localisation

- déparaffinage
- prétraitement
- anticorps primaire
- anticorps secondaire
- révélation
- observation et photos

Pour localiser les ARN messagers : HYBRIDATION in situ

Préparation des sondes marquées :

- transcription in vitro des ARN anti sens marqués à la digoxigénine ou Biotine ou FITC
- estimation quantité des sondes
- raccourcissement des sondes par hydrolyse alcaline

Hybridation in situ sur coupes (HIS)

Déparaffinage

Prétraitement

Hybridation

Lavages stringents

Révélation des hybrides par immunologie (Ac anti DIG, anti biotine, anti FITC)

Observation et photos

Hybridation in situ in toto (WISH)

Expériences réalisées en tubes ou paniers (strainers)

Protocoles comme pour HIS sur coupes mise à part :

Fixation spécifique des échantillons entiers

Prétraitement à l'histoclear

Technique des empreintes

Pour avoir un rapide aperçu de la présence et de la localisation d'une protéine dans des tiges, des pétioles, des feuilles, une empreinte est effectuée sur de la nitrocellulose. La suite de l'expérience se déroule comme un western blot.

4/ Utilisateurs de la plate-forme cytologie

Les utilisateurs sont essentiellement originaires de l'IBMP.

Utilisateurs extérieurs :

Université de Strasbourg (UdS) Strasbourg
Université Haute Alsace (UHA) Colmar

Utilisateurs IBMP :

Les chercheurs de 12 équipes de l'IBMP ont utilisé la plate-forme.

Chercheurs équipes

IMBAULT Patrice J. Gualberto	MARI-ORDONNEZ A O. Voinnet
GIEGE Philippe G. Bonnard	SMETANA Ondrej M.E. Chabouté
COMPAGNON Vincent D. Werck	DUMBLIAUSKAS E. P. Genschik
MICHYIO D. Werck	MAROCCO K. P. Genschik
GRIENENBERGER E M. Legrand	CRQUI M.C P. Genschik
LALLEMAND Benjamin M. Legrand	LECHNER Esther P. Genschik
BARTOLAMIOL D. V. Ziegler	BUREAU M. P. Genschik
CHAPUIS S. V. Ziegler	MENARD R. WH Shen
DUNOYER Patrice O. Voinnet	BERR Alexandre WH. Shen
WULFF B O. Voinnet	MOLITOR A. WH. Shen
BARBIER H. A. Schnittger	BOUVIER FI B. Camara
SCHALLER Hubert T. Bach	

5/ Publications

- 1) Xu L. and Shen WH Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis* **Curr. Biol.** 2008 18 , 1966-1971.
- 2) XU, L., ZHAO, Z., DONG, A., SOUBIGOU-TACONNAT, L., RENOU, J.-P., STEINMETZ, A. and SHEN, W.-H. (2008) Di- and tri- but not mono-methylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Cell. Biol.**, 28, 1348-1360.
- 3) CYP86B1 is required for very long chain -hydroxyacids and , -dicarboxylic acids synthesis in root and seed suberin polyester. Vincent Compagnon*, Patrik Diehl*, Irène Benveniste, Denise Meyer, Hubert Schaller, Lukas Schreiber, Rochus Franke and Franck Pinot. **Plant Physiol.** 2009
- 4) Xu L., Ménard R., Berr A., Fuchs J., Cognat V., Meyer D. and Shen W.H. The E2 ubiquitinconjugating enzymes AtUBC1 and AtUBC2 play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in *Arabidopsis Thaliana*. **Plant J.**,57(2), janv. 2009.
- 5) Small RNA duplexes, not their precursors, function as mobile silencing signals between plant cells Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carington J.C., and Voinnet O. accepté dans Science 2010

Le FI moyen des journaux dans lesquels sont publiés les travaux de cette plate-forme est de 12,87 à comparer avec le FI moyen de l'Unité pour l'année 2009 qui est de 8,1.

Article soumis

SET DOMAIN GROUP2 poises genes for transcription required in *Arabidopsis* gametogenesis"
Berr A. McCallum E.Menard R. Meyer D. Fuchs J. Dong A. and Schen WH. Soumis à PNAS.

6/ Consommables

<i>Désignation</i>	<i>Prix matériel</i>
- Pincés	36,00 €
- Fixateur	120,00 €
- Mat. inclusion + coupes	560,00 €
- Chimie proteinase K	21,80 €
- Calcofluor	33,50 €
- Fast Red TR/naphtol	80,50 €
- HistoClear	133,80 €
- Enzymes T3 RNA POL	92,00 €
- T7 RNA POL	276,00 €
- Sp6 RNA pol	184,00 €
- Autres::HIS DIG RNA Lab mix	333,80 €
- FITC RNA Lab mix	164,86 €
- Anti DIG AP	134,00 €
- Substrat AP	162,00 €
- BCIP salt	87,17 €
- NBT salt	89,78 €
Total :	2 509,21 €

Durée des différentes analyses

Une analyse cytologique demande environ 20 heures de travail réparties sur une semaine :

- Fixation 1-2 heures
- Déshydratation et préparation à l'inclusion 8 heures
- Inclusion 1-4 heures
- Coupe au microtome 2-4 heures
- Coloration 2-4 heures (déparaffinage - réhydratation – coloration - montage des lames)
- Observation microscope 2-5 heures ou plus.

Une analyse de l'expression de gènes par **Hybridation in situ ou immunolocalisation** dure 15 jours à 3 semaines, une étude cytologique de 10 à 15 jours.

Denise Meyer
Responsable plate-forme cytologie

séquence

alignement

annotation

phylogénie

Plate-forme Bio-informatique

20
09

1/ Présentation de la plate-forme

La plateforme Bio-Informatique a pour vocation de répondre aux besoins des différentes équipes de l'IBMP.

Les activités sont principalement :

- L'analyse des données biologiques : analyse de séquences (recherche de similarités, alignement, recherche de motifs, analyse fonctionnelle, prédiction de structures secondaires, phylogénie), analyse des données de transcriptome, ...
- Le développement et la mise en place d'outils et bases de données spécifiques.
- La formation des utilisateurs aux méthodes et outils bioinformatiques.

2/ Equipement de la plate-forme

La plate-forme est équipée :

- d'un Mac Pro quadri Xéon. Achat : septembre 2008. Montant : 2 190 euros
- d'un accès à la plate-forme Biologie.

Les outils utilisés sont majoritairement des outils disponibles gratuitement (licences de type GNU ou similaires) :

- La suite logicielle pour l'analyse de séquences EMBOSS
- Logiciels d'alignements : Clustal, Muscle, Jalview
- Logiciels de phylogénies et visualisations d'arbres : Phylips, phyML, treedyn
- Recherche de similarités : NCBI-blast, wu-blast
- Recherche de motifs : PatMan, MEME
- Annotation des séquences issues de banques de petits ARN : nexalign, bowtie, bwa

La licence avancée Genevestigator pour l'analyse des données d'expression a été renouvelée pour l'année 2010.

3/ Recette et coût financier

Les prestations de la plate-forme ne sont pas facturées car majoritairement destinées aux équipes de l'IBMP. Le travail réalisé se fait donc sous forme de collaborations et de publications faisant apparaître le nom du personnel de la plate-forme.

Le coût de la plate-forme pour l'année 2009 est de 496,54 euros, il se compose :

- d'un moniteur d'ordinateur : 305,15 euros
- de deux disques durs : 191,39 euros

Le budget prévisionnel pour 2010 est constitué :

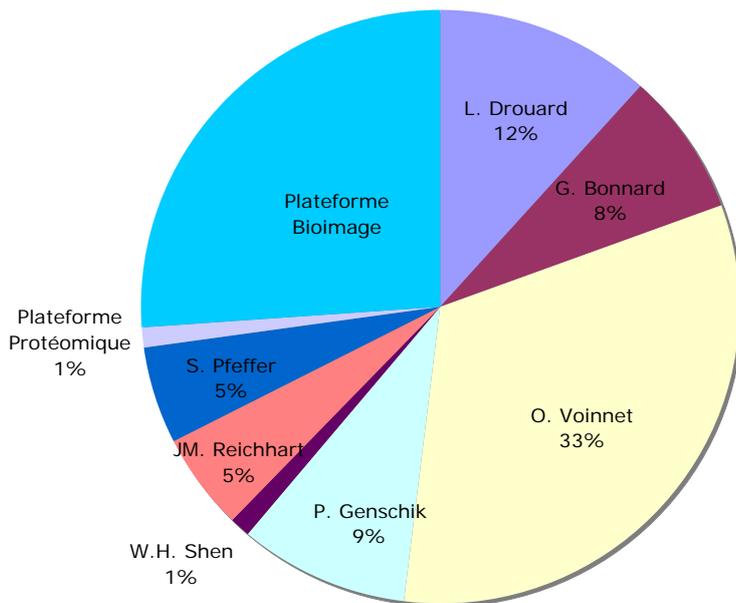
- du renouvellement de la licence Genevestigator (janvier 2010) : 590 euros
- de consommables : < 100 euros
- de participations à des formations et/ou colloques : ~500 euros

4/ Utilisateurs de la plate-forme et thématiques abordées

La plate-forme est utilisée principalement par l'IBMP, mais également par d'autres instituts de par ses collaborations (ex : IBMC). Elle est sollicitée à 95% pour répondre aux besoins des différentes équipes, le reste étant consacré à des activités internes de la plate-forme (veille technologique, auto-formation, mise en place d'outils). Les demandes sont soit ponctuelles (analyses de séquences, analyses phylogénétiques et analyses de données de puces à ADN essentiellement) ou demande une implication plus importante dans un projet de recherche [ex : Annotation de banques de petits ARNs – Equipe O. Voinnet].

➤ **Les utilisateurs en 2009**

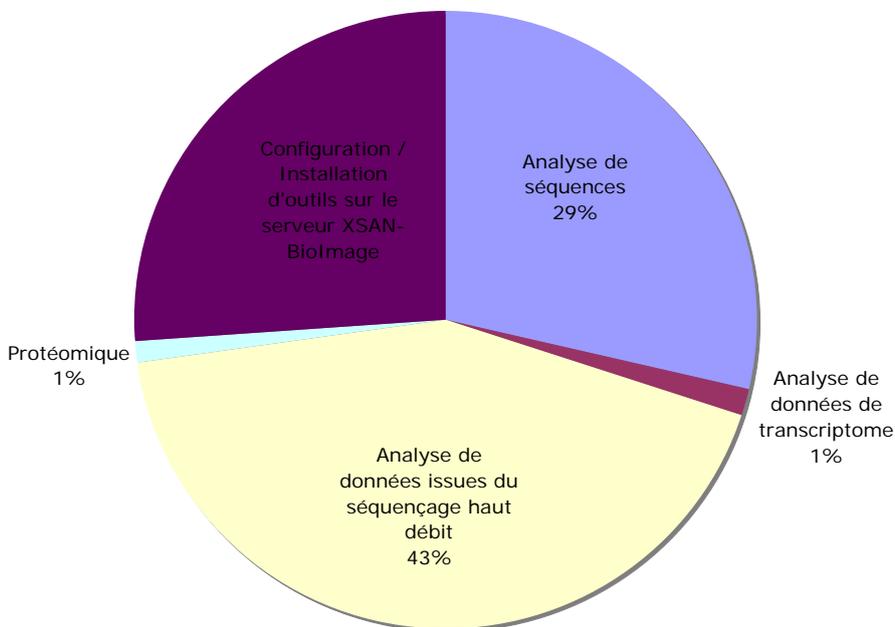
Utilisateurs de la Plateforme Bioinformatique par équipe



L'année 2009 montre moins de diversité au niveau des utilisateurs que les autres années, cette différence s'explique par l'absence d'activités pendant 6 mois en 2009 (congé maternité).

➤ **Les principaux thèmes abordés en 2009**

Répartition des activités de la Plate-forme



Une des activités majeure de la plate-forme depuis maintenant deux ans est le **traitement et l'analyse de données issues du séquençage haut-débit**, plus particulièrement l'analyse de banques de petits ARNs. Ce projet, porté par O. Voinnet, amène la plateforme à travailler en collaboration avec des équipes extérieures : S. Pfeffer – IBMC et JM. Reichhart – IBMC.

Cette thématique a demandé une forte implication tant pour le choix des outils et leur développement, leur mise en place sur le serveur XSAN-Bioimage et le développement d'une base de données (**miRNAute**) pour le stockage et l'analyse de ces données (projet devenu possible grâce à l'obtention d'un **contrat d'apprentissage CNRS** d'un étudiant en Master de Bioinformatique).

La deuxième activité est articulée autour de **l'analyse de séquences biologiques**, que ce soit pour de la recherche de similarités, de motifs ou de la phylogénie (pour les équipes de L. Drouard, G. Bonnard et P. Genschik).

D'autres activités plus secondaires concernent **l'analyse statistique de données de transcriptome** (équipe W.H. Shen) ou l'installation d'outils sur le serveur XSAN-Bioimage tels que la base de données de protéomique **PRIMS**.

Face à la masse de données produites par les différentes plate-formes (Protéomique, Microscopie, Métabolomique) et équipes (séquençage haut-débit, puces à ADN), l'institut s'est doté d'un **serveur XSAN-Bioimage** fin 2007. De par ses compétences, la plate-forme est fortement impliquée dans la mise en place et l'exploitation de ce serveur (25% des activités de la plateforme) ainsi que dans la formation des équipes impliquées dans la plateforme Biolmage (plate-forme de Protéomique, UPR 9022, GMGM, ...).

Sur le serveur sont maintenant disponibles un certain nombre d'outils et de bibliothèques bioinformatiques. Les outils développés dans le cadre de l'annotation et de l'analyse des banques de petits ARNs sont disponibles en intranet sur le serveur, permettant ainsi aux biologistes d'être autonomes dans leurs utilisations (<http://bioimage.u-strasbg.fr/bioinfo>).

5/ Publications

Berr A, Xu L, Gao J, Cognat V, Steinmetz A, Dong A, Shen WH. SET DOMAIN GROUP25 encodes a histone methyltransferase and is involved in FLOWERING LOCUS C activation and repression of flowering. *Plant Physiol.* 2009 Nov;151(3):1476-85.

Ciaudo C, Servant N, Cognat V, Sarazin A, Kieffer E, Viville S, Colot V, Barillot E, Heard E, Voinnet O. Highly dynamic and sex-specific expression of microRNAs during early ES cell differentiation. *PLoS Genet.* 2009 Aug;5(8):e1000620.

Roa H, Lang J, Culligan KM, Keller M, Holec S, Cognat V, Montané MH, Houlné G, Chabouté ME. Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2009 Sep;151(1):461-71.

Vinogradova E, Salinas T, Cognat V, Remacle C, Drouard L. Steady-state levels of imported tRNAs in Chlamydomonas mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic Acids Research Advance Access published on January 12, 2009.*

Xu L, Ménard R, Berr A, Fuchs J, Cognat V, Meyer D, Shen WH. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 2009 Jan;57(2):279-88.

Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009 Sep;11(9):1143-9. Epub 2009 Aug 16. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2009 Oct;11(10):1272.

Facteur d'impact moyen : 8,68

6/ Formation

Aucune action de formation n'a eu lieu en 2009.

La plate-forme intervient habituellement en Master de biologie végétale pour une sensibilisation à la Bioinformatique.

Une étude est en cours pour la mise en place de formations Bioinformatique au niveau du CNRS (en collaboration avec l'IGBMC).

7/ Veille Technologique

La production massive de données biologiques et leur diversité impliquent la nécessité d'avoir des outils bioinformatiques de plus en plus performants en termes de capacités de stockage et de calculs. L'évolution du serveur en termes de mémoire, capacité de stockage et lames de calculs sont donc indispensables à l'exploitation des nouvelles données générées.

8/ Remarques & Perspectives

Une majeure partie des activités de la plate-forme est actuellement tournée vers le séquençage haut débit, plus particulièrement pour l'identification de petits ARNs. D'autres projets autour de cette technologie telle que l'expression de gènes ou le séquençage de génome sont à l'étude. Ils impliqueront la mise en place de nouvelles méthodes et outils d'analyses, notamment au niveau statistiques.

Valérie Cognat
Responsable plate-forme Bioinformatique

calcul

cluster

serveur

stockage

Plate-forme Biolmage

20
09



Serveur Biolmage

1/ Introduction

Pour ce qui est de l'historique et des missions de la plate-forme, je renvoie le lecteur au rapport de février 2009 qu'il n'est pas nécessaire de reprendre ici.

En préambule, nous pouvons signaler que le fonctionnement de la plate-forme a été correct tout au long de l'année 2009, sans panne majeure. La plate-forme Biologie Image suscite un intérêt grandissant auprès des partenaires et nous ne pouvons que nous en féliciter. Le point noir essentiel reste le facteur humain avec l'indisponibilité de Valérie Cognat pendant une bonne partie de cet exercice, ce qui a grevé le déploiement de nouveaux outils de bio-informatique. Ce point mérite une attention particulière dans la mesure où elle est actuellement la seule personne compétente sur la plate-forme pour la mise en place de logiciels dédiés, ce qui est un souci majeur pour la pérennité de cet outil.

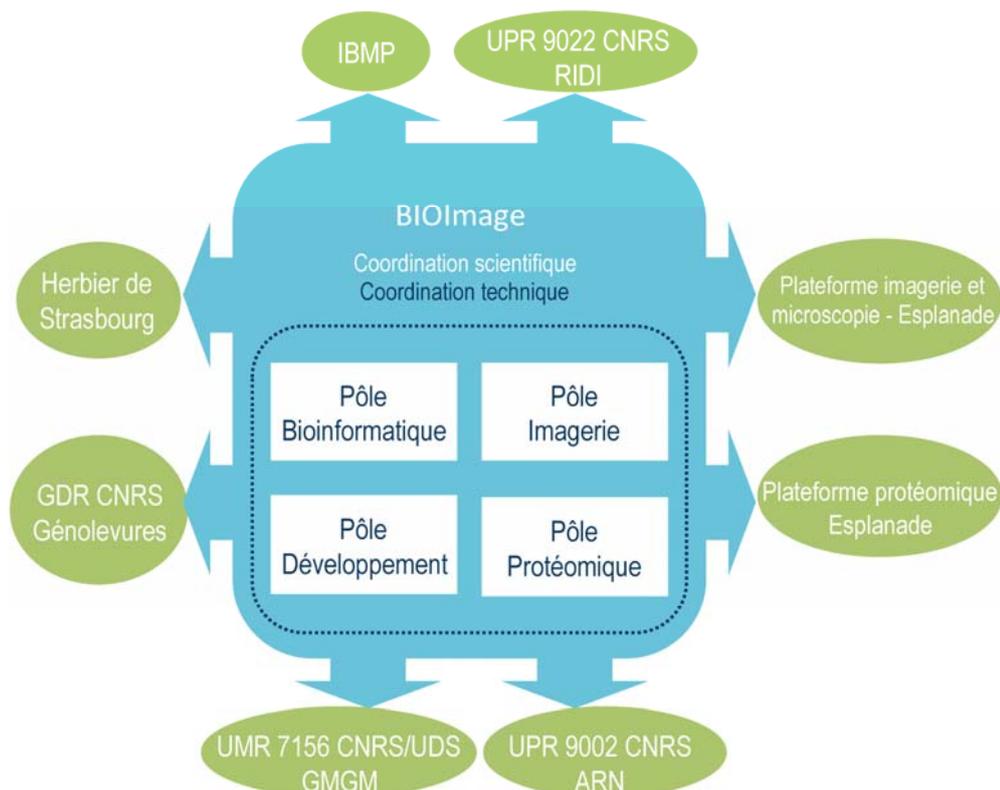
2/ Evolutions de l'année 2009

a) Evolution en terme d'organisation

Un comité de pilotage a été mis en place à la mi-2009 afin de formaliser un point de rencontre des différents partenaires pour définir et financer le fonctionnement de la plate-forme. Sont présents normalement dans ce comité un représentant de haut niveau de chaque partenaire ainsi que Magali Daujat et moi-même pour la partie technique et prospective. Nous pouvons regretter le faible nombre de participants lors de cette première assemblée. Néanmoins, le comité a autorisé la mise en place d'une charte de fonctionnement de Biologie Image permettant notamment d'éviter les problèmes causés par le développement de logiciel directement sur le serveur de production (voir annexe). D'autre part, cette réunion a permis de prendre des décisions concernant l'augmentation de mémoire du serveur ainsi que l'achat d'un poste de travail pour l'herbier afin de faciliter la numérisation des planches.

Valérie Cognat a demandé en milieu d'année 2009 (suite au entretien annuel d'activité) son rattachement à la plate-forme Biologie Image, ce qui a été accepté par la Direction. Cette situation est très positive car cela lui permettra ainsi de piloter les actions et les missions du pôle Bioinformatique.

L'organisation et les missions de la plate-forme Biologie Image peuvent se définir au travers de différents pôles de compétences présentés dans le schéma ci-dessous.



Une réunion s'est tenue avec le GMGM en fin d'année 2009. En effet, cette unité souhaite maintenant vraiment utiliser la plate-forme. Nous avons rappelé à cette occasion les possibilités mais aussi les limites de notre aide, principalement pour des raisons humaines (disponibilité). Nous avons souligné combien il serait important que les bio-informaticiens se rapprochent et échangent leurs expériences afin que les développements bénéficient à tous. Nous espérons vivement qu'une dynamique puisse se mettre en place avec ce groupe. De leur côté, il est apparu que leur réseau rencontre d'énormes problèmes techniques liés à son obsolescence. Un test réalisé pour l'herbier de l'université a déjà pointé du doigt les matériels actifs de l'institut de botanique.

Afin de communiquer plus facilement avec les différents utilisateurs, partenaires et membres du comité de pilotage, etc. des listes de diffusion ont été créées.

b) Evolutions matérielles

Pôle Bioinformatique

Des tests menés par Valérie Cognat ont montré que le logiciel BLAST (et ses dérivés) est obsolète dans son algorithmique face aux ordinateurs actuels. Elle a pu constater que les logiciels de nouvelle génération comme Nexalign ou Bawtie sont infiniment plus performants. En effet, un calcul sous BLAST qui prend 490 minutes, passe respectivement pour Nexalign et Bawtie à 51 minutes et 1 minute pour un résultat comparable... En revanche, pour que cette puissance puisse s'exprimer, il faut des ordinateurs avec beaucoup de mémoire vive (RAM). Notre priorité a donc été d'augmenter au maximum possible la RAM de l'ensemble du cluster. Ont contribué à parts égales dans cet investissement les groupes d'Olivier Voinnet, Jean-Marc Reichhart et Sébastien Pfeffer qui sont les principaux utilisateurs actuels de ces logiciels.

Pôle Système

Le point concernait l'encombrement du SAN par les données de sauvegarde de l'IBMP. Une réflexion a été menée afin de délimiter le périmètre du système d'informations de la plate-forme au regard de celui de l'IBMP. Il nous est apparu nécessaire de réserver le SAN, dans la mesure du possible, aux usages du calcul scientifique et des images de l'herbier et de microscopie.

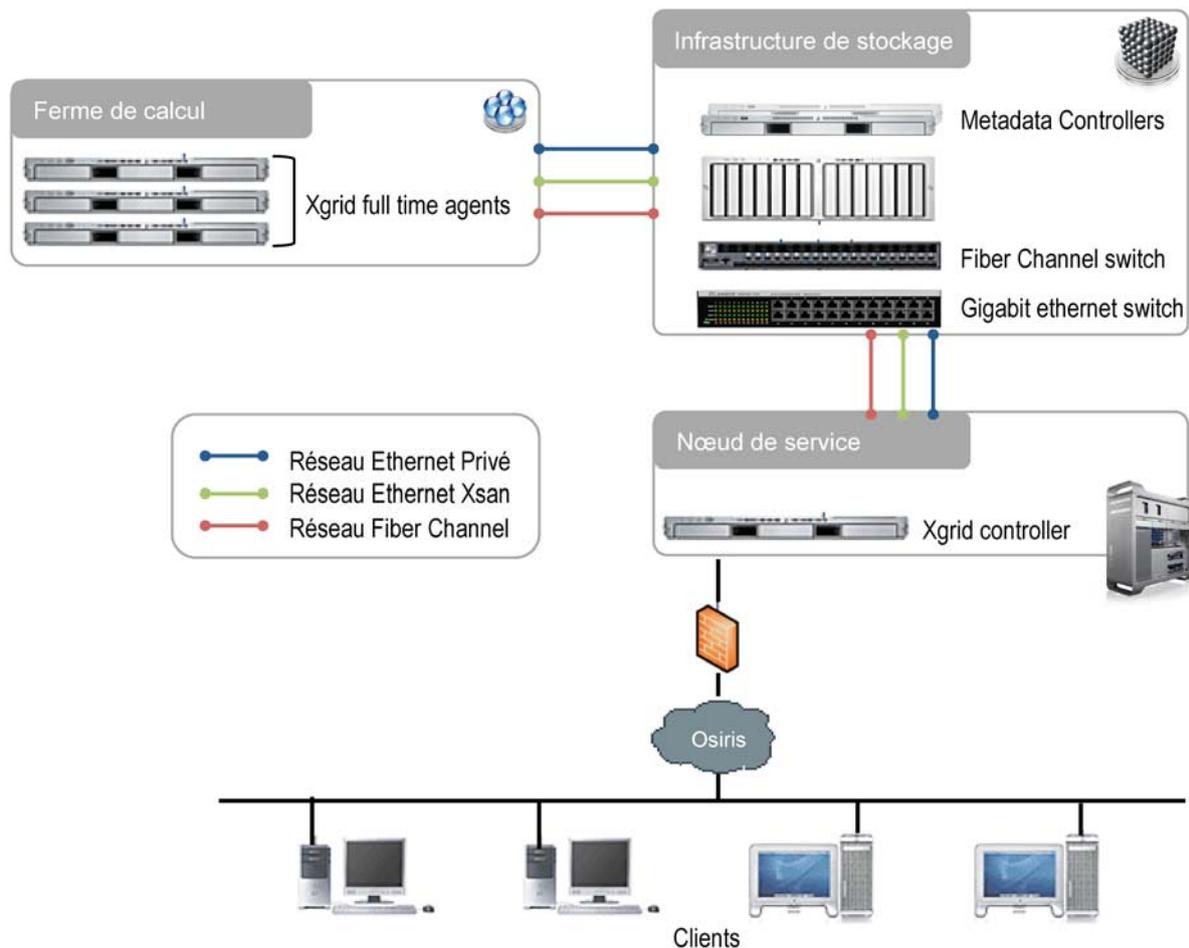
Ainsi, une solution RAID pour la sauvegarde des données a été recherchée et notre choix s'est porté sur la baie smartRAID Drobo Pro. Cette baie a été choisie pour trois raisons essentielles :

- d'une part, contrairement aux baies RAID classiques, elle assure un découplage entre volume physique et volume logique, ce qui permet une grande souplesse d'exploitation ;
- d'autre part, elle intègre le protocole iSCSI (SCSI sur ethernet) qui permet de délocaliser facilement le matériel (voir plus loin);
- enfin, cette baie a un coût bien inférieur aux baies RAID classiques.

A ce jour, le Drobo Pro a été formaté à sa capacité maximale, soit 16 To, et 5 disques de 2 To ont été installés soit une capacité effective de 10 To pour 7,2 To utilisables. Son taux d'occupation est de 70 % de sa capacité réelle. Nous avons rencontré quelques difficultés au début de l'exploitation (déconnexions intempestives) qui ont été résolues par la mise en place de nouveaux firmwares puis par l'utilisation du iSCSI. Il s'est avéré que ce dernier protocole est très efficace et il est de ce fait envisageable de mettre en place pour un coût dérisoire un répliquat des données de l'IBMP au niveau de la délégation régionale du CNRS. En effet, un transport de VLAN (extension de réseau internet) de l'IBMP vers la DR ainsi qu'une deuxième baie Drobo seraient suffisants alors que les solutions envisagées jusque là nécessitaient la mise en place d'un serveur distant plus onéreux et moins souple (ordinateur, baie RAID et solution de management à distance).

Un serveur de développement de logiciels (sandbox.u-strasbg.fr) a été mis en place pour la plate-forme. En effet, compte tenu des implications de la nouvelle charte d'utilisation de Biolmage, il a été convenu qu'il ne serait plus possible de programmer en direct sur le serveur de production. Un MacPro, assez semblable par son architecture au serveur Biolmage, a donc été configuré afin de finaliser les développements logiciels pour la plate-forme. Il est accessible à l'ensemble des utilisateurs de Biolmage.

Le schéma ci-dessous présente l'architecture physique de la plateforme BioImage à ce jour.



Pôle Imagerie

Un MacPro, actuellement dédié aux développements logiciels pour la manipulation d'images, sera intégré à la plate-forme BioImage afin de mettre en production la plateforme logicielle client-serveur Omero. Un stagiaire a initié le développement d'un système de visualisation et d'annotation de grandes images, nécessaire et innovant pour l'exploitation des planches de l'herbier et des images issues de la plate-forme de microscopie.

3/ Perspectives et recommandations

a) niveau fonctionnel

Nous pouvons déjà pointer du doigt ce que sont les «points noirs» de la plate-forme à ce jour : d'une part le manque de personnel bio-informaticien et d'autre part la non maîtrise de la clustérisation notamment par le procédé Xgrid. L'absence prolongée de Valérie Cognat a clairement révélé la faiblesse de la plate-forme du côté humain. Sur elle repose l'intégralité du savoir-faire bio-informatique mis en place, et cette situation est déraisonnable. Si une collaboration étroite avec le GMGM pouvait déboucher sur une mutualisation des compétences, il faudrait saisir cette opportunité afin de pérenniser les savoirs mis en place. Au cours de cette année, il serait primordial de mettre en place une commission bio-informatique qui pourrait être animée par Valérie Cognat.

Pour la partie maîtrise d'Xgrid, nous ne désespérons pas de trouver la formation adéquate. Là aussi, il serait important que cette formation soit réalisée avec des partenaires programmeurs sur la plate-forme.

En ce qui concerne les points positifs, le serveur a actuellement une bonne stabilité et les services ont été très rarement interrompus de manière inopinée. Nous souhaitons en cette année 2010 mettre en place un portail unique d'accès web qui permettrait à l'intégralité des personnels des laboratoires partenaires d'accéder à l'ensemble des logiciels de bio-informatique et autres mis en place afin d'augmenter significativement les services rendus par la plate-forme.

D'autre part, la numérisation de planches de l'herbier est enfin sur les rails et nous espérons avoir un prototype de démonstration opérationnel au courant du premier trimestre 2010. Le but de ce prototype est d'intéresser des investisseurs externes aussi bien privés (Epson, Apple) que publics (Région Alsace, Chambre d'agriculture). Des contacts informels ont déjà eu lieu avec le directeur régional de la société Epson qui fournit actuellement le scanner dédié à cette tâche; ce dernier s'est montré très intéressé. Nous espérons que le prototype nous permettra de concrétiser cet intérêt par une collaboration plus étroite avec si possible le don de matériel (scanner surtout).

Enfin, la mise en production d'Omero (base de données d'images de microscopie et protocoles) devrait aussi intervenir dans le courant de cette année 2010.

b) niveau matériel

Côté matériel, deux évolutions sont à envisager à plus ou moins brève échéance; pour cela, il nous faut déjà réfléchir aux financements nécessaires.

Pour la partie la moins onéreuse, et dans le cadre de la PSSI (Politique de Sécurité des Systèmes d'Information), il est envisageable de mettre en place la redondance de sauvegarde des données de l'IBMP. Une salle pré-équipée a été construite par la DR Alsace du CNRS. La réalisation de ce projet nécessite une collaboration avec la DI de l'Université pour le transport de VLAN et l'achat d'une deuxième baie Drobo Pro équipée aussi avec au moins 10 To de disque. Le coût estimatif haut de cette extension est de 2 500 €.

Le second point concerne le passage du cluster sous Mac OS 10.6 qu'il faudra envisager au plus tard pour 2011. Cette évolution est nécessaire pour assurer l'évolution des services logiciels ainsi que le maintien du SAN. Ce passage s'avérera relativement onéreux car il implique des changements structurels au niveau du cluster. En effet, le logiciel pilotant le SAN ne fonctionne plus sur plate-forme PowerPC G5 qui constitue encore nos métacontrôleurs. Cela implique le remplacement de ces derniers par des machines sous processeurs Intel. De plus, il est nécessaire de faire appel à une prestation externe pour la «mise à plat» des serveurs et leur «reconstruction» ce qui renchérit le processus. Néanmoins, nous avons réfléchi à la manière de limiter les coûts matériels et il nous apparaît que les noeuds de calcul 1 et 2 qui sont assez anciens pourraient être utilisés comme nouveaux méta-contrôleurs. Les métacontrôleurs actuels pourraient alors devenir serveurs de services dédiés (web). Afin de compenser la perte de puissance du cluster causée par la suppression de deux noeuds de calcul, l'achat d'une lame octo-core de nouvelle génération suffirait à combler le manque généré. Le coût estimatif haut de cette mise à jour logicielle et matérielle est de 10 000 €, ce qui représente une somme déjà conséquente.

Jean-Luc Evrard
Responsable plate-forme Biolmage

Annexe

Charte d'utilisation de la plate-forme Biolmage

Le comité de pilotage lors de la réunion du 25 juin 2009 a défini une charte d'utilisation de la plate-forme Biolmage.

Cette charte a pour but de définir quelques règles élémentaires permettant de garantir une bonne qualité de service au niveau de la plate-forme Biolmage. Les idées principales en sont de mettre en place des protocoles pour l'élaboration de projets et la mise en place de nouveaux outils logiciels sur le serveur.

1- Un comité technique constitué de Valérie Cognat, Magali Daujat et Jean-Luc Evrard est créé. Il a pour mission d'assurer le bon fonctionnement de la plate-forme et la veille technologique nécessaire aux projets.

2- La plate-forme est ouverte à tous, cependant une participation financière sera demandée aux nouveaux entrants. Le montant de ce financement sera dépendant du projet soumis et avalisé par le comité de pilotage sur proposition du comité technique de la plate-forme.

3- Pour tout nouveau projet, les participants devront en informer Jean-Luc Evrard, ou à défaut le comité technique, le plus tôt possible afin d'établir la faisabilité du projet et/ou de définir les investissements humains ou techniques nécessaires.

4- L'accès à la plate-forme ne sera possible aux partenaires que sous deux protocoles : http/https et ssh. Les protocoles type VNC et ARD seront arrêtés au 1 septembre 2009.

5- Pour le déploiement d'un nouveau logiciel, les modalités suivantes s'appliqueront et nécessiteront une planification avec le comité technique :

a- chaque partenaire développera le logiciel souhaité dans sa composante sur une machine sous Mac OS X serveur (de préférence Intel).

b- lorsque le logiciel sera considéré comme «mature», il sera validé par le développeur sur un serveur de test localisé et financé par l'IBMP. Cette étape aura pour but de valider le logiciel dans un environnement mimant le serveur Biolmage. Les ajustements nécessaires seront apportés le cas échéant.

c- dans l'étape de validation, le concours de Valérie Cognat ou Magali Daujat pourra être apporté pour aider le développeur de la composante à modifier son logiciel pour l'adapter à l'architecture du serveur (pas pour corriger les bugs du logiciel).

d- lorsque le logiciel sera validé, il sera alors déployé sur le serveur Biolmage par le comité technique.

e- l'accès au logiciel se fera au travers de pages web. Le cas échéant, une feuille de style pourra être fournie aux composantes par le comité technique.

6- La mise en commun des outils à travers le portail web est fortement encouragée afin que chaque partenaire de la plate-forme puisse profiter des meilleurs outils présents sur le serveur.

métabolome

**spectrométrie
de masse**

**chromato-
graphie**

lipidomique

Plate-forme Métabolomique

20
09

1/ Présentation de la plate-forme Métabolomique

La plate-forme Métabolomique de l'IBMP a été créée en décembre 2007, elle est localisée au 5^{ème} étage de l'Institut de Botanique. Elle a été gérée initialement par Delphine Debayle (IR2) et Dimitri Heintz (IR2). Delphine Debayle a demandé une mutation et a quitté la plate-forme en septembre 2009. Elle a été remplacée par Raphaël Lugan qui est arrivé début janvier 2010 en CDD.

2/ Les missions de 2009

- Développement de nouvelles méthodes basées sur des techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse pour l'analyse de phytohormones et de lipides de plantes.
- Diffusion de l'information par l'organisation de séminaires (INRA Colmar, IBMP groupe Genschik). Des réunions avec chacun des partenaires ont été organisées dans le but d'informer les groupes de recherche des possibilités analytiques offertes par la plate-forme. Ces réunions permettent également d'être à l'écoute et de recenser les besoins.
- Assistance des chercheurs dans la préparation des échantillons et dans l'exploitation des résultats.
- Gestion du bon fonctionnement des systèmes présents sur la plate-forme.
- Enseignement des techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse aux L2 BioInfos et aux M2 SNV. Organisation de travaux pratiques de Phytochimie.
- Présentation de la plate-forme aux étudiants de l'INSAIA de Nancy.
- Développement d'un système de management de la qualité ISO9001 (qui sera achevé en 2010).

3/ Synthèse des thèmes scientifiques abordés

Les thèmes scientifiques développés sur la plate-forme s'articulent autour de différents axes à savoir, la lipidomique, la génomique fonctionnelle pour l'identification de nouveaux gènes, l'analyse de phytohormones impliquées dans des réponses de stress biotique/abiotique et l'étude de métabolites de micro-organismes impliqués dans les mécanismes de dépollution de l'environnement.

- Approche métabolomique quantitative pour l'analyse des phytohormones impliquées dans des réponses de stress biotique/abiotique. Le dosage simultané de différentes hormones, dans un extrait de plante, est possible. Cela permet de mieux comprendre le rôle et la contribution de chacune des hormones dans la mise en place des mécanismes de défense des plantes en réponse aux différents stress.
- Utilisation de la métabolomique comme outil de génomique fonctionnelle. L'objectif est l'identification de gènes de fonction inconnue qui sont impliqués dans le métabolisme des monoterpènes et séquiterpènes des plantes.
- Approche lipidomique qui consiste à développer des outils pour l'analyse des lipides constitutifs des membranes biologiques. Ceci dans le but de mieux comprendre, à la fois les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse de certains lipides, mais aussi les mécanismes de stockage et compartimentalisation cellulaire chez les végétaux.
- Utilisation de la métabolomique comme outil de génomique fonctionnelle, pour l'identification de la fonction de gènes inconnus de la famille des Cytochromes P450 (CyP450). L'objectif consiste à identifier et caractériser des substrats et des produits d'enzyme CyP450. La nature des produits et des substrats analysés appartient à de nombreuses familles (flavonoïdes, phénylpropanoïdes, acides aminés).
- Approche métabolomique chiométrique pour l'étude de métabolites de micro-organismes de l'environnement, capables de survivre dans les milieux contaminés par les polluants organiques et inorganiques.

4/ Le matériel et l'équipement disponibles sur la plate-forme

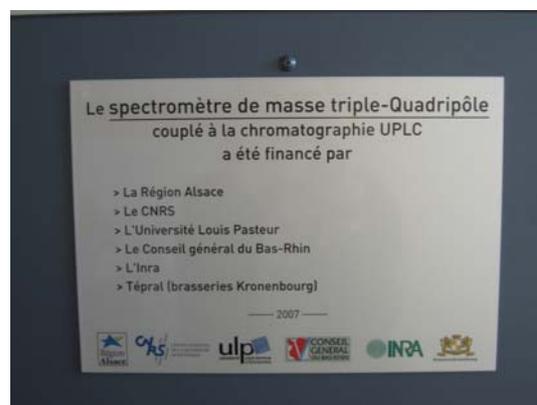
Equipements	Nature des équipements	Acquisition/coût d'achat/ Maintenance (en HT)
UPLC-MS/MS Waters Acquity/Quattro Premier XE	Chromatographie liquide/spectromètre de masse triple quadripôle	2007 / 290000€ / 70784 €
HPLC-UV-Fluo Waters 626(pompe)/712(autosampler) 996(UV)/474(fluorescence)	Chromatographie liquide/détecteur UV et à Fluorescence	1997 / Assemblage de plusieurs appareils
GC-MS Agilent 6890 Series/5973Network	Chromatographie gazeuse/spectromètre de masse simple quadripôle	2001/ 89985 €
GC-FID Varian 3900	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	2002 / 15250 €
GC-FID Varian 3400CX	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	1997 / 11540 €
GC-FID Varian 3400CX	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	1996 / 12470 €
GC-FID Fisons Inst 8000 series	Chromatographie gazeuse/Détecteur à ionisation de flamme	1995
Source APPI/APCI	Source d'ionisation pour LC-MS/MS	2008/20000 €

5/ Les photos des appareils présents sur la plate-forme

UPLC-MS/MS



plaque des financeurs



GC-FID



Financement :
GC/FID Varian 3900: Rhobio/IBMP
GC/FID Varian 3400 CX: IBMP/CNRS
GC/FID Fisons: EC Biotechnology

Générateur d'air pur



Générateur d'hydrogène



GC-MS

Financement Human Frontier



Chaîne HPLC

Financement IBMP, CNRS



6/ Budget prévisionnel de fonctionnement de la plate-forme pour 2010

Le budget de fonctionnement pour 2009 avait été estimé à 24 950 euros. Nous avons finalement dépensé 16 500 euros. L'économie s'est faite sur les colonnes et les solvants. Le budget prévisionnel de fonctionnement de la plate-forme pour 2010 est de **81 505 €**. La partie urgente à gérer sera le GC MS. Cet appareil à 9 ans et il est fortement utilisé. Il y a des pièces coûteuses qu'il faudra bientôt remplacer (ex pompe turbo 6 000 €, module ESP 2 000 €). Pour éviter cela la société Agilent propose un forfait de maintenance préventive et curative, qui prend tout en charge. Cette formule est très avantageuse sur le plan financier, elle évitera également des immobilisations longues de l'appareil en cas de panne. La forte demande d'analyse de monoterpènes nécessite un équipement particulier du type GC-MS mixte qui est à la fois un GC FID et un GC-MS avec double colonne et un mode d'injection spécifique pour les volatiles. L'achat d'un tel appareil GC-MS mixte qui est beaucoup plus sensible que le GC-MS actuel permettrait d'analyser des volatiles et autres familles de molécules peu abondantes (sesquiterpènes et certains isoprénoïdes par exemple).

L'achat d'un GC-MS mixte reviendrait à 55 000 €. Une mise à jour d'un de nos GC-FID serait souhaitable (logiciel + ordinateur reviendrait à 4 500€) Pour la préparation de certains échantillons, nous souhaiterions faire l'acquisition d'un thermomixer.

Cette année la démarche qualité se soldera par le passage de la plateforme à la certification ISO9001 qui a un coût (4 000 € sur 3 ans à négocier avec la délégation du CNRS).

maintenance du système d'eau	900
filtres des générateurs	900
bouteilles Hélium + cartouche	400
GC MS maintenance	7 000
GC-MS mixte MS et FID	55 000
certification	4 000
filtres de la hotte	400
25 paquets vials UPLC	3 700
thermomixer réfrigéré	2 255
tubes GC	1 000
solvants	1 450
GC-FID jouvence	4 500
total en euros HT	81 505

7/ Coût des prestations

La plate-forme Métabolomique a effectué des prestations non payantes en 2009 pour les membres des laboratoires supports de la plate-forme. Néanmoins, une tarification précise des différentes prestations a été mise en place et validée par le CNRS (ci-dessous).

Code Article	Nature des prestations	Prix HT €
	Plate-forme métabolome – LCMS/MS – Laboratoire CNRS	
1718	Injection seule (prix de l'échantillon à analyser)	54.00
1719	Injection + conseil (prix de l'échantillon à analyser)	59.50
1720	Injection + conseil + préparation échantillon (prix de l'échantillon à analyser)	61.70
	Plate-forme métabolome – LCMS/MS – entité publique*	
1721	Injection seule (prix de l'échantillon à analyser)	54.00
1722	Injection + conseil (prix de l'échantillon à analyser)	59.50
1723	Injection + conseil + préparation échantillon (prix de l'échantillon à analyser)	61.70
	Plate-forme métabolome – LCMS/MS –	
1724	Injection seule (prix de l'échantillon à analyser)	170.00
1726	Injection + conseil (prix de l'échantillon à analyser)	200.00
1727	Injection + conseil + préparation échantillon (prix de l'échantillon à analyser)	230.00
	Plate-forme métabolome – GC/MS – Laboratoire CNRS	
1728	Injection seule (prix de l'échantillon à analyser)	22.00
1729	Injection + conseil (prix de l'échantillon à analyser)	27.50
1730	Injection + conseil + préparation échantillon (prix de l'échantillon à analyser)	32.00
	Plate-forme métabolome – GC/MS – entité publique*	
1731	Injection seule (prix de l'échantillon à analyser)	22.00
1732	Injection + conseil (prix de l'échantillon à analyser)	27.50
1733	Injection + conseil + préparation échantillon (prix de l'échantillon à analyser)	32.00
	Plate-forme métabolome – GC/MS –	
1734	Injection seule (prix de l'échantillon à analyser)	68.00
1735	Injection + conseil (prix de l'échantillon à analyser)	85.00
1736	Injection + conseil + préparation échantillon (prix de l'échantillon à analyser)	136.00
* Entité publique = c'est une personne morale de droit public dotée d'un comptable public, exemple université, INRA, CNRS, INSERM.		

8/ Recettes 2009

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale. UMR 5168 CEA CNRS INRA. Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (IRTSV), CEA Grenoble 476,80 euros HT.

Les partenaires :

- Achat par l'UDS d'une plaque d'extraction en phase solide SPE pour TP de Phytochimie 450 €
- Achats par l'équipe Schaller d'une colonne et prés-colonnes UPLC-C18 1 060 €

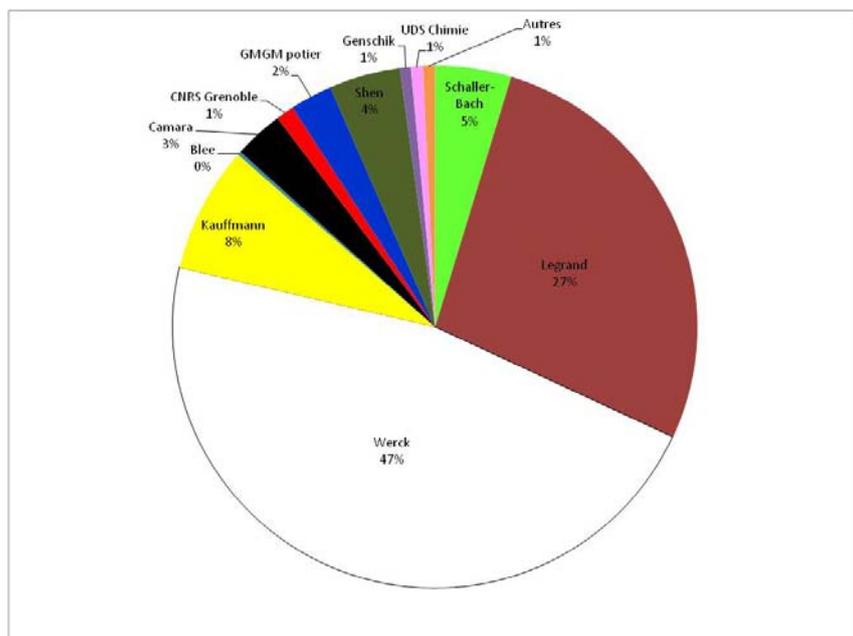
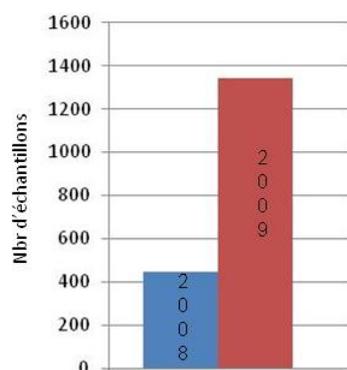
9/ Les données des utilisateurs de la plate-forme

➤ UPLC-MS/MS

Les pourcentages d'utilisation ont été déterminés en fonction du nombre d'échantillons fournis par les différents laboratoires. Nous ne prenons pas en compte le nombre d'injections qui ont été réalisées pour chaque échantillon (très variable d'une équipe à l'autre).

En tout, nous avons analysé 1 344 échantillons en 2009, soit une augmentation de plus de 300 % par rapport à 2008 (en 2008 il y avait 446 échantillons). L'appareil depuis sa mise en service indique 5 854 injections. Cela fait une moyenne de plus de 3 injections pour un échantillon.

Echantillons analysés par LC-MS/MS



Répartition de l'utilisation du l'UPLC-MS/MS en 2009

➤ GC-MS

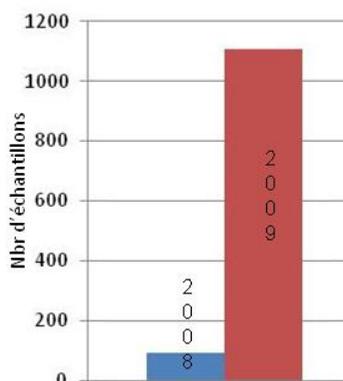
Le GC-MS a été installé sur la plate-forme courant septembre 2008, il est en libre service.

La maintenance du système est réalisée par nos soins avec la participation de certains collègues. Un système de réservation en ligne (via le site de l'IBMP) a été mis en place pour la réservation du système GC-MS.

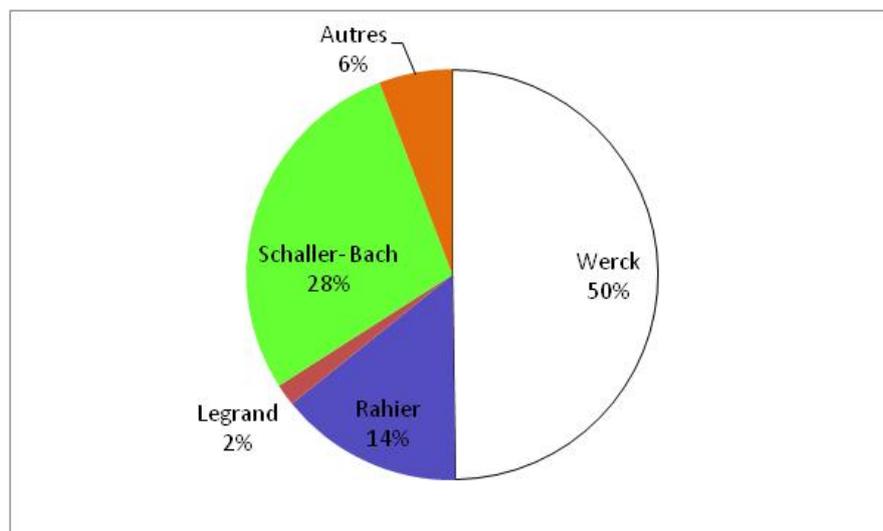
En 2008, de la mi-septembre à la fin de l'année, 93 échantillons avaient été injectés.

Sur l'ensemble de l'année 2009, il a eu **1 109** échantillons injectés.

Echantillons analysés par GC-MS



Pour l'année 2010, nous proposons de sous-traiter la gestion de la maintenance du GC-MS à travers un contrat avec Agilent qui assure une maintenance préventive et curative illimitée.



Répartition de l'utilisation du système GC-MS en 2009

10/ Les publications dans lesquelles la plate-forme est impliquée en 2009

➤ Publications équipes IBMP

- 1) Schaller H. Sterol and Steroid Biosynthesis and Metabolism in Plants and Microorganisms. In: Comprehensive Natural Products Chemistry II, Vol1 (Structural Diversity), chapter 8. L.N. Mander & Hung-Wen (Ben) Liu Eds, Elsevier, in press.
- 2) Bouvier-Navé P, Berna A, Noiriél A, Compagnon V, Carlsson AS, Banas A, Stymne S, Schaller H. Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol.* 152, 107-119 (2010).
- 3) Debolt S, Scheible WR, Schrick K, Auer M, Beisson F, Bischoff V, Bouvier-Navé P, Carroll A, Hematy K, Li Y, Milne J, Nair M, Schaller H, Zemla M, Somerville C. Mutations in UDP-Glucose: Sterol Glucosyltransferase in Arabidopsis Cause Transparent Testa Phenotype and Suberization Defect in Seeds. *Plant Physiol.* 151, 78-87 (2009).
- 4) Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F. CYP86B1 is required for very long chain omega-hydroxyacid and alpha, omega -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiol.* 150, 1831-43 (2009).
- 5) Sauveplane V., Kandel S., Kastner P.E., Ehling J., Compagnon V., Werck-Reichhart D. and Pinot F (2009). "Arabidopsis thaliana CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants." *Febs J* 276(3): 719-35.
- 6) Serra O, Soler M, Hohn C, Sauveplane V, Pinot F, Franke R, Schreiber L, Prat S, Molinas M, and Figueras M (2009) CYP86A33 targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae and impairs the periderm's water barrier function. *Plant Physiology* 149: 1050-1060.
- 7) Dobritsa AA, Shrestha J, Morant M, Pinot F, Matsuno M, Swanson R, Moller BL, and Preuss D. (2009). CYP704B1 is a Long-chain Fatty Acid {omega}-Hydroxylase Essential for Sporopollenin Synthesis in Pollen of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 151: 574-589.
- 8) Li-Beisson Y, Pollard M., Sauveplane V., Pinot F., Ohlrogge J. and Beisson F. (2010) Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers requires the synthesis of cutin polyester. *PNAS* sous presse.
- 9) Li H., Sauveplane V., Pinot F., Werck-Reichhart D., Diehl P., Schreiber L., Franke R., Zhang P., Chen L., Gao Y., Liang W., Zhang D. (2010) CYP704B2 catalyzing the omega?-hydroxylation of fatty acids is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice. *Plant Cell*, Sous presse

10) Gerber E., Hemmerlin A., Hartmann M., Heintz D., Hartmann M. A., Mutterer J., Rodriguez. Concepcion M., Boronat A., Van Dorsselaer A., Rohmer M., Crowell D. N. and Bach T. J. The Plastidial 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway Provides the Isoprenyl Moiety for Protein Geranylgeranylation in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell*, 21(1):285-300, 2009.

11) Crowell D. N., Hemmerlin A., Gerber E., Hartmann M., Heintz D., Rohmer M. and Bach T. J. A role for plastids in plant protein isoprenylation. *Plant Signaling Behavior*, 4(3):217-218, 2009.

12) Mialoundama A. S., Heintz D., Debayle D., Rahier A., Camara B. and Bouvier F. Abscisic acid negatively regulates elicitor-induced synthesis of capsidiol in wild tobacco (*Nicotiana plumbaginifolia*). *Plant Physiol.*, 150:1556-1566, 2009.

13) Matsuno M., Compagnon V., Schoch G. A., Schmitt M., Debayle D., Bassard J. E., Pollet B., Hehn A., Heintz D., Ullmann P., Lapiere C., Bernier F., Ehling J. and Werck-Reichhart D. Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. *Science*, 325:1688-1692, 2009.

14) Rahier A, Bergdoll M, Génot G, Bouvier F, Camara B. Homology modeling and site-directed mutagenesis reveal catalytic key amino acids of 3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/C4-decarboxylase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2009 Apr;149(4):1872-86.

➤ *Publications équipes hors IBMP*

1) Nieweg K, Schaller H, Pfrieder FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem.* 109, 125-34 (2009).

2) Fuhr H., Gotze S., Specht A., Erban A., Gallien S., Heintz D., Van Dorsselaer A., Kopka J., Braun H. P. and Horst W. J. Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. *J. Exp. Bot.*, 60(6):1663-1678, 2009.

3) Heintz D., Gallien S., Wischgoll S., Ullmann A. K., Schaeffer C., Kretschmar A. K., Van Dorsselaer A. and Boll M. Differential membrane proteome analysis reveals novel proteins involved in the degradation of aromatic compounds in *Geobacter metallireducens*. *Mol. Cell. Proteomics*, 2009.

4) Kung JW, Löffler C, Dörner K, Heintz D, Gallien S, Van Dorsselaer A, Friedrich T, Boll Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *M. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Oct 20;106(42):17687-92.

Le FI moyen des journaux dans lesquels sont publiés les articles scientifiques ayant fait appel aux services de la plate-forme est de **7,492**, tout proche du FI moyen de l'unité pour la même période soit 8,1. Il faut également souligner les 4 articles issus de groupe hors IBMP traduisant l'ouverture de la plate-forme.

➤ *Publication sans comité de lecture en 2009*

Book review: Dimitri Heintz. *Plant Proteomics & Metabolomics: Technologies, and Strategies, and Applications*, G.K. Agrawal, R. Rakwal (Eds.), John Wiley & Sons Limited, The Atrium, Southern Gate Chichester, West Sussex, UK (2008). 764 pp., Price: USD 93.95, ISBN: 0470069767. *Plant Science*, 2009.

11/ Les actions de formation

- Secouriste du travail (recyclage)
- Séminaire des ACMO (mise à jour)

12/ Veille technologique

Une attention toute particulière a été portée aux publications ciblant les méthodes d'analyse et l'enrichissement des composés volatiles de plantes. Il faut à présent envisager d'inclure dans les protocoles de préparation des échantillons des méthodes de chromatographie « non classique » et multi-dimensionnelles pour améliorer la séparation des composés faiblement présents dans les plantes.

13/ Les changements induits par VEGOIA

Il n'y a pas d'information précise pour le moment à ma connaissance, mais il me semble qu'il faudra bien prendre en compte les différents aspects critiques de la plateforme qui sont : la nuisance sonore (on est déjà à 65db), le besoin d'espace pour les machines, une climatisation performante, un grand nombre de prises de courant. Il faudra bien configurer le système d'évacuation de l'air (ou Sorbonne) qui doit être efficace pour éliminer les vapeurs de solvants dangereuses pour la santé.

14/ Conclusion et perspectives

En 2009 nous avons participé à 18 projets scientifiques différents qui étaient plus ou moins avancés. Ces projets ont générés plus de 1 300 échantillons analysés par LC MS/MS et plus de 1 000 échantillons analysés par GC MS. Pour la partie LC MS/MS par exemple nous avons une augmentation de plus de 300 % de l'activité par rapport à 2008. Plus d'une quinzaine de publications ont été produites en 2009. Le vieillissement et l'usure des machines vont nécessiter une maintenance accrue en 2010-2011. Ceci équivaldra à une immobilisation de plus en plus fréquente des machines. La maturité de la plupart des projets laisse présager le besoin d'aller maintenant vers plus de sensibilité et vers plus de résolution, actuellement impossible à faire sur la plate-forme. Pour l'ensemble de ces raisons, l'acquisition d'un spectromètre de masse à haute résolution type (Q-TOF ou Orbitrap.) serait indispensable en complément du triple-Q. Nous devons également nous interroger sur la nécessité d'une deuxième GC-MS mixte pour répondre à la demande d'analyse de molécules peu abondantes comme par exemple les composés volatiles.

Dimitri Heintz
Responsable plate-forme Métabolomique



IBMP

12 rue du général Zimmer
67084 Strasbourg cedex

T 03 88 41 72 00
ibmp-upr2357@ibmp-cnrs.unistra.fr

F 03 88 61 44 42
<http://www.ibmp.fr>

