PLATEFORME CYTOMETRIE DU CRCM : **CATALOGUE DES PRESTATIONS ET SERVICES**

Évolution du document

N° de la Version	Date	Objet de la révision
01	15/12/2014	Création initiale du document
02	17/11/2016	Modification changement de responsable plateforme
03	05/01/2017	Modification « mise en forme et conservation des résultats » serveur disque M
04	11/07/2017	Modification des tarifs de prestations
05	11/12/2017	Confidentialité des données
06	26/12/2019	Modification des tarifs de prestations et ajout de l'Aurora
07	28/10/2020	Départ du Gallios

Diffusion

Informatique : Le document est accessible à tous en lecture seule dans le dossier Qualité se trouvant sur le réseau local du CRCM ainsi que sur la page de la Plateforme sur le site Internet du CRCM : http://crcm.marseille.inserm.fr/plateformestechnologiques/cytometrie/ et sur l'Intranet (Ressources /Plateformes/Plateforme Cytométrie).

Papier : Classeur

Groupe de travail

Nom	Fonction
TCHEOU Narcisse	Ingénieur Qualité (jusqu'au 12/03/2015)
MALLET Françoise	Technicienne Plateforme
THIBULT Marie-Laure	Responsable technique (Jusqu'au 31/10/2016)
RICHAUD Manon	Responsable technique (à partir du 01/11/2016)

SOMMAIRE

I. PRESENTATION 2

II. CE QUE VOUS SOUHAITEZ FAIRE : 3

1. ANALYSER DES POPULATIONS PAR CYTOMETRIE EN FLUX 3

2. TRIER DES POPULATIONS CELLULAIRES 5

A. Tri par billes magnétiques : Automacs PRO (Miltenyi) 5

B. Tri par Cytométrie de Flux : ARIA II et ARIA III (Becton Dickinson) 6

3. ANALYSER VOS DONNEES DE CYTOMETRIE 8

4. DOSER DES CIBLES MULITIPLEs PAR LE LUMINEX 9

III. DEMANDE DE PRESTATIONS ET ENGAGEMENTS 10

Demandes de Prestations 10

Engagements des Utilisateurs 10

Engagements de la PFC 11

IV. TARIFICATION 11

V. NOUS CONTACTER / NOUS SITUER 12

I. PRESENTATION

Bienvenue sur la Plateforme Cytométrie du CRCM !

La Plateforme Cytométrie (PFC) est une des 12 plateformes du Centre en Cancérologie de Marseille.

Depuis 2012, la PFC a pour vocation de satisfaire vos besoins en cytométrie, tri et analyse liés aux activités de recherche des laboratoires, et d'être ouverte à l'ensemble de la communauté scientifique académique (CNRS, INSERM, AMU…) et industrielle.

Notre Plateforme propose différents services :

- la mise à disposition d'outils de hautes technicités,
- la formation des utilisateurs

- les collaborations pour des projets de recherche et développement
- les prestations de service

Le personnel met tout en œuvre pour assurer son bon fonctionnement de la PFC :

- organisation de l'activité (agenda en ligne, stockage des données),
- formation / assistance des utilisateurs,
- suivi des projets et des analyses,
- maintenance et gestion du matériel et des équipements.

Notre Plateforme est engagée dans une démarche qualité. Celle-ci a pour vocation de garantir la qualité des manipulations réalisées et des données produites, et de satisfaire les exigences des collaborateurs de la Plateforme. Nos efforts s'articulent autour de 4 axes prioritaires :

- mettre à disposition une expertise de pointe en développant nos savoir-faire et compétences par le biais de formations et d'une veille scientifique et technologique active,
- proposer des technologies innovantes à la communauté scientifique et hospitalière,
- garantir la conformité des prestations en adéquation avec les exigences du client et mettre à disposition un parc d'équipement entretenu et performant,
- conforter et maintenir notre visibilité nationale et internationale par des actions de communication diverses.

Dans ce catalogue vous trouverez toutes les informations et recommandations concernant les services proposés par la PFC. Toutes ces activités sont réalisées dans le cadre de prestations de service ou de mise à disposition d'outils.

II. CE QUE VOUS SOUHAITEZ FAIRE :

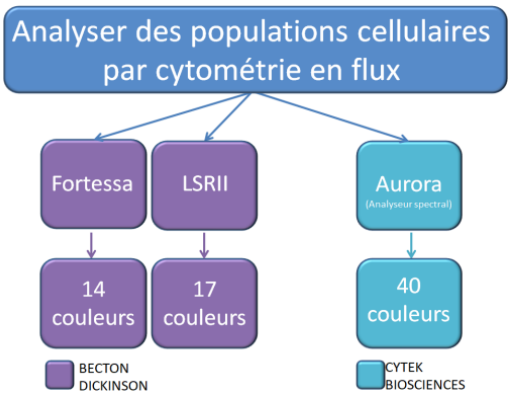
1. ANALYSER DES POPULATIONS PAR CYTOMETRIE EN FLUX

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes..) les caractéristiques individuelles de chaque particules telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent.

Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules,
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules,
- Les signaux de fluorescence
    - Fluorescence émise par la cellule elle-même (autofluorescence)
    - Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

4 cytomètres analyseurs sont proposés sur la PFC : ils diffèrent dans leur configuration lasers/nombres de canaux ou couleurs disponibles.



Equipement Lasers des cytomètres analyseurs :

- Fortessa / Lasers Violet 405nm, Bleu 488nm, Rouge 633nm
- LSR II / Lasers Violet 405nm, Bleu 488nm, Vert 561nm, Rouge 640nm
- Aurora / Lasers UV 350nm, Violet 405nm, Bleu 488nm, Vert 561nm, Rouge 640nm

CONDITIONS D'ACCES :

L'utilisation des instruments est strictement limitée à l'équipe de la PFC et aux personnes habilitées par la PFC, ayant reçu une formation. Pour les utilisateurs non habilités, les expériences seront conduites par une personne habilitée ou par les responsables des instruments. En conséquence, l'utilisateur devra informer le responsable de l'instrument afin de planifier avec lui les dates d'expérimentations.

Si vous voulez accéder à une formation, un document est disponible sur http://crcm.marseille.inserm.fr/plateformestechnologiques/cytometrie/ et est à retourner à tricellulaire.u1068@inserm.fr.

Aucune préparation cellulaire ne doit être réalisée sur la plateforme. La plateforme est strictement réservée à l'acquisition et à la ré-analyse des échantillons. Seule l'addition extemporanée de colorants vitaux est autorisée dans des conditions strictes de manipulation des cellules vivantes. L'analyse de levures, de bactéries, de prélèvements humains non qualifiés ou virus non activés, EST STRICTEMENT INTERDIT.

La préparation des échantillons doit répondre aux exigences indiquées dans le MO-33 (« Phénotypage Extracellulaire ») et disponible sur http://crcm.marseille.inserm.fr/plateformestechnologiques/cytometrie/.

Pour les utilisateurs internes, les réservations pour les analyseurs et postes d'analyse sont enregistrées selon le principe : premier arrivé/premier servi. Les réservations se font sur l'agenda en ligne http://grrlsr2.marseille.inserm.fr/ . Pour les utilisateurs externes, une demande de mise à disposition d'équipement doit être envoyée à tricellulaire.u1068@inserm.fr .

ENTRETIEN ET TRAÇABILITE :

Deux entretiens annuels sont assurés par la compagnie Becton Dickinson. Quotidiennement, l'état des cytomètres analyseurs est garanti par le personnel de la plateforme par l'acquisition de Billes CST (Disque M Cytometrie / Controle_qualite). Toutes les interventions ou procédures de lavages sont notées et conservées pour une traçabilité complète sur le « cahier de laboratoire » de chaque cytomètre analyseur.

Les billes CST sont à la disposition des utilisateurs dans le frigo de la plateforme afin de vérifier l'état des appareils au cours de la journée. Des billes 8 pics « Spherobeads » sont également disponibles afin d'assurer un suivi des différentes expériences au cours du temps ou l'utilisation d' « Application Settings ».

MISE EN FORME ET CONSERVATION DES RESULTATS :

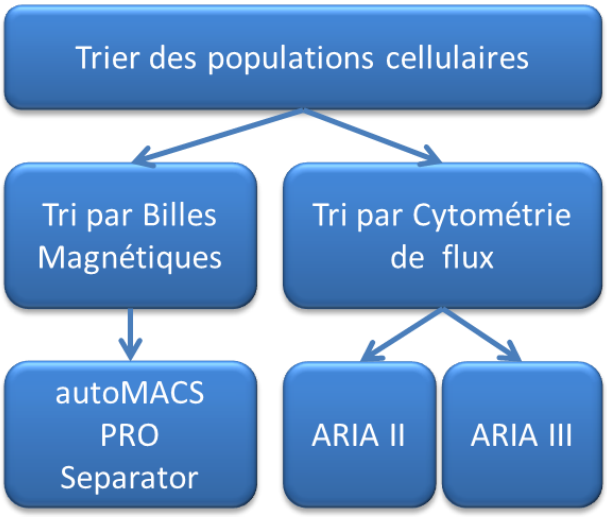
Vos résultats bruts (Fichiers FSC) sont conservés sur le réseau (Disque M : Cytometrie) pendant une durée de 5 ans. Pour les Utilisateurs externes au CRCM, vos résultats vous sont transmis par e-mail, CD ou clé USB fournie par le client.

CONFIDENTIALITE :

Si les données générées concernent un projet soumis à des règles de confidentialités, alors vos résultats seront également accessibles sur le réseau (Disque M : Cytometrie /Trieurs) dans un dossier à votre nom protégé par un mot de passe.

2. TRIER DES POPULATIONS CELLULAIRES

Le tri cellulaire permet de séparer physiquement et d'obtenir isolé un ou plusieurs type(s) de cellules. Deux sortes de tris sont accessibles sur la PFC : le tri par cytométrie en flux ou par billes magnétiques.



A. TRI PAR BILLES MAGNETIQUES : AUTOMACS PRO (MILTENYI)

Le principe du tri par billes magnétiques repose sur un marquage de la sous-population à isoler (ou à éliminer) par un anticorps spécifique couplé à une bille magnétique. Après marquage avec cet anticorps spécifique, les cellules sont introduites sous pression dans une colonne qui traverse le champ magnétique créé par un électroaimant. Les cellules qui sont entourées de billes métalliques sont retenues sur la colonne par cet aimant, alors que les cellules non marquées sont éluées et récupérées dans un premier tube. Dans un second temps, l'électro-aimant est arrêté et les cellules qui avaient été retenues sont libérées dans un second tube à essai.

Cette technique est utilisable :

- Seule s'il s'agit d'obtenir un fort enrichissement en quelques minutes sur un grand nombre de cellules,
- En synergie avec la cytométrie en flux pour raccourcir l'expérience.

L'AutoMACS Pro de Miltenyi Biotec (http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/automated-cell-separation/automacs-pro-separator.aspx) présente l'avantage de pouvoir traiter un très grand nombre de cellules, en un temps limité : 4 milliards de cellules au total en 10 minutes environ. Comparé aux autres systèmes commercialisés, l'Automacs cumule plusieurs avantages déjà détenus par les différents systèmes et ajoute les siens propres : une très grande automaticité, un maniement extrêmement simple et une très grande reproductibilité.

Le trieur est équipé du rack « MACS Reagent » et des 3 portoirs réfrigérés « Chills» 5, 15 et 50 ml.

CONDITIONS D'ACCES :

L'utilisation de l'Automacs PRO est strictement limitée à l'équipe de la PFC et aux personnes habilitées par la PFC. Les réservations pour l'Automacs PRO sont enregistrées selon le principe : premier arrivé /premier servi. Les réservations se font sur l'agenda en ligne (http://grrtri.marseille.inserm.fr/).

La préparation des échantillons doit répondre aux exigences indiquées par les fournisseurs dans les protocoles des différents kits utilisés.

ENTRETIEN ET TRAÇABILITE :

Un entretien annuel est assuré par la compagnie Miltenyi. Un changement des colonnes magnétiques est effectué tous les 15 jours par le personnel ou les utilisateurs.

Les références des réactifs utilisés ainsi que toutes les interventions ou procédures de lavages sont notées et conservées pour une traçabilité complète sur le « cahier de laboratoire » de l'AutoMACS Pro.

CONSERVATION DES RESULTATS :

Aucun fichier n'est émis par l'appareil et donc il n'existe pas de sauvegarde de vos données sur le réseau. Cependant toutes les procédures de tri et données (ex : volume de chaque fraction triée) sont conservées dans le menu « Log List » de l'Automacs pro.

CONFIDENTIALITE :

Si les données générées concernent un projet soumis à des règles de confidentialités, alors vos résultats seront également accessibles sur le réseau (Disque M : Cytometrie /Trieurs) dans un dossier à votre nom protégé par un mot de passe.

B. TRI PAR CYTOMETRIE DE FLUX : ARIA II ET ARIA III (BECTON DICKINSON)

L'analyse multiparamètrique d'une suspension cellulaire hétérogène permet de définir des sous-populations qui peuvent être séparées physiquement de la population globale.

Les cellules peuvent être isolées, purifiées, clonées ou enrichies, par marquages multicouleurs (entre 9 et 18 couleurs simultanées, selon l'appareil choisi).

- Aria III / Lasers UV 355nm, Violet 405nm, Bleu 488nm, Vert 561nm, Rouge 640nm
- Aria II / Lasers Violet 405nm, Bleu 488nm, Rouge 640nm

Après caractérisation de sous-populations cellulaires par analyse, les cellules peuvent être isolées avec des taux de pureté supérieurs à 99% avec un rendement qui peut être supérieur à 95 %. Ces cellules peuvent être remises en culture.

Le tri peut se faire de 1 à 4 voies et peut accepter différents supports de collection tels que des tubes Eppendorf 1.5 ml, tubes à hémolyse 5ml, Falcon 15ml, ainsi que des lames (destinées à la microscopie) et des plaques (de 6 à 96 puits quelle que soit la marque choisie).

CONDITIONS D'ACCES :

Aucune préparation cellulaire ne doit être réalisée sur la plateforme. La plateforme est strictement réservée à l'acquisition et à la ré-analyse des échantillons. Seule l'addition extemporanée de colorants vitaux est autorisée dans des conditions strictes de manipulation des cellules vivantes. L'analyse et le tri de levures, de bactéries, de prélèvements humains non qualifiés ou virus non activés, EST STRICTEMENT INTERDIT.

La préparation des échantillons doit répondre aux exigences indiquées dans le MO 37 (« Préparation des échantillons pour le tri cellulaire ») : la PFC peut décider de ne pas trier l'échantillon si les échantillons ne répondent pas à ces dernières (ex : échantillon non filtré, concentration non respectée,…).

Les réservations pour les trieurs doivent faire l'objet d'une demande de tri remplie et envoyée par mail à la PFC (document disponible sur à envoyer à tricellulaire.u1068@inserm.fr). L'agenda des trieurs peut être consulté en ligne (http://grrtri.marseille.inserm.fr/). La période de réservation ne pourra s'étendre au-delà d'un mois.

Pour une annulation concernant les trieurs Aria II ou III, celle-ci devra être signalée au plus tard la veille de la date prévue au planning et confirmée aux responsables techniques des instruments à tricellulaire.u1068@inserm.fr.

ENTRETIEN ET TRAÇABILITE :

Deux entretiens annuels sont assurés par la compagnie Becton Dickinson.

Quotidiennement, l'état des cytomètres analyseurs est garanti par le personnel de la plateforme par l'acquisition de Billes CST (http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSDiva_CST_ProdInfoSheet.pdf) et de billes Accudrops (http://www.bdbiosciences.com/external_files/Doc_Recon_2.0/is/tds/23-8292.pdf). Toutes les interventions ou procédures de lavages sont notées et conservées pour une traçabilité complète sur le « cahier de laboratoire » de chaque trieur.

MISE EN FORME ET CONSERVATION DES RESULTATS :

Vos résultats bruts (Fichiers FSC) ainsi qu'un document PDF (contenant la stratégie de gating choisie ainsi que tous les détails du tri) sont générés et conservés sur le réseau (Disque M : Cytometrie) pendant une durée de 5 ans.

Récupération des résultats :

- Utilisateurs externes au CRCM : le document PDF contenant la stratégie de gating choisie ainsi que tous les détails du tri seront envoyés par email. Les fichiers FSC sont transmis uniquement sur demande par email, CD ou clé USB fournie par le client.
- Utilisateurs internes au CRCM : les résultats sont accessibles sur le réseau (Disque M : Cytometrie / Trieurs).

CONFIDENTIALITE :

Si les données générées concernent un projet soumis à des règles de confidentialités, alors vos résultats seront également accessibles sur le réseau (Disque M : Cytometrie /Trieurs) dans un dossier à votre nom protégé par un mot de passe.

3. ANALYSER VOS DONNEES DE CYTOMETRIE

2 postes d'analyse [PC & Mac] sont disponibles sur la plateforme Cytométrie et équipés des logiciels d'analyse suivants :

- Kaluza (Beckman Coulter) [PC]
- Flow Jo (TreeStar) [PC & Mac]
- BD Diva Software (Becton Dickinson) [PC]
- OMIQ (analyses non supervisées)

CONDITIONS D'ACCES :

L'utilisation des postes d'analyse est strictement limitée à l'équipe de la PFC et aux personnes habilitées par la PFC, ayant reçu une formation. Si vous voulez accéder à une formation, un document est disponible sur http://crcm.marseille.inserm.fr/plateformestechnologiques/cytometrie/ et est à retourner à tricellulaire.u1068@inserm.fr.

Les réservations des postes d'analyse se font sur l'agenda en ligne (http://grrlsr2.marseille.inserm.fr/).

CONSERVATION DES RESULTATS :

Les postes d'analyse sont des ordinateurs pour le commun, les utilisateurs ne doivent donc pas stocker des dossiers personnels sur ces postes. La PFC ne saura être tenue responsable de la perte des fichiers de cytométrie produits et sauvegardés sur les stations d'acquisition et les stations de retraitement ou de la dégradation des fichiers sauvegardés.

4. DOSER DES CIBLES MULITIPLES PAR LE LUMINEX

Cette technologie, basée sur le principe d'un ELISA combiné à de la cytométrie en flux, permet le dosage simultané de nombreuses cibles protéiques ou nucléiques dans de faibles volumes d'échantillons.

Bio Plex 200 (BIO RAD: http://www.bio-rad.com/fr-fr/product/bio-plex-200-systems)

La technologie Luminex fait appel à l'utilisation de microsphères qui sont soit des billes en polystyrène soit des billes magnétiques colorées par un mélange de deux fluorochromes dont le ratio est connu et parfaitement défini pour chaque type de billes. Il existe ainsi un panel de 100 microbilles différentes suivant le mélange de fluorochromes réalisé. Ces billes, via leurs groupements carboxylates, servent ensuite de support solide à différentes molécules se liant de façon covalente par des groupements aminés.

Le Luminex est donc un système multi-analytique puissant qui permet d'analyser théoriquement jusqu'à 100 types d'analytes simultanément dans un même échantillon.

Le Bio-Plex est un système ouvert : plusieurs sociétés fournissent des kits avec des billes couplées à l'anticorps, détectant un ou plusieurs paramètres (Biorad, Millipore, eBioscience, Life Technologies, ...). Les paramètres sont spécifiques (humains, murins, primates). Les paramètres seront choisis selon votre choix. Des billes couplées « à façon » peuvent également être réalisées.

CONDITIONS D'ACCES :

L'utilisation du Bio Plex 200 est strictement limitée à l'équipe de la PFC. En conséquence, l'utilisateur devra informer le responsable de l'instrument afin de planifier avec lui les dates d'expérimentation : un formulaire de demande d'utilisation du Luminex est disponible sur http://crcm.marseille.inserm.fr/plateformestechnologiques/cytometrie/. La réservation de l'appareil se fait sur l'agenda en ligne http://grrlsr2.marseille.inserm.fr/ .

Aucune préparation cellulaire ne doit être réalisée sur la plateforme. La plateforme est strictement réservée à l'acquisition et à la ré-analyse des échantillons. L'analyse de levures, de bactéries, de prélèvements humains non qualifiés ou virus non activés, EST STRICTEMENT INTERDIT.

Pour une annulation concernant le Bio-Plex 200, celle-ci devra être signalée au plus tard la veille de la date prévue au planning et confirmée aux responsables techniques des instruments à tricellulaire.u1068@inserm.fr.

ENTRETIEN ET TRAÇABILITE :

Des procédures de Calibration et Validation sont effectuées mensuellement par le personnel de la plateforme. Un entretien annuel est assuré par la compagnie BioRad. Toutes les interventions et leurs descriptifs sont contenus dans « cahier de laboratoire » du Luminex. Les références des kits et des réactifs utilisés sont également notées et conservées pour une traçabilité complète sur ce cahier.

MISE EN FORME ET CONSERVATION DES RESULTATS :

- Vos résultats vous sont transmis par e-mail en fichier Excel. Vos résultats bruts sont transmis uniquement sur demande par email, CD ou clé USB fournie par le client. Ces derniers sont aussi conservés sur le réseau (Disque M : Cytometrie) pendant une durée de 5 ans à compter de la date d'envoi de vos résultats.

CONFIDENTIALITE :

Si les données générées concernent un projet soumis à des règles de confidentialités, alors vos résultats seront également accessibles sur le réseau (Disque M : Cytometrie /Trieurs) dans un dossier à votre nom uniquement accessible par mot de passe.

III. DEMANDE DE PRESTATIONS ET ENGAGEMENTS

DEMANDES DE PRESTATIONS

Différents Formulaires sont disponibles sur la page internet de la plateforme ou sur demande par email:

- Formulaire de Demande de Tri
- Formulaire de Demande de Mise à Disposition de cytomètre analyseur
- Formulaire de Demande d'utilisation du Bio-Plex 200

Ces documents sont à remplir et à envoyer à tricellulaire.u1068@inserm.fr.

ENGAGEMENTS DES UTILISATEURS

Seules les personnes ayant suivi une formation spécifique dispensée le personnel de la PFC sont habilitées à utiliser les instruments de façon indépendante (libre-service non assisté).

Tout utilisateur ayant reçu l'habilitation à utiliser un ou plusieurs instruments de la plateforme est responsable du matériel utilisé. Il doit en conséquence laisser le matériel dans un parfait état de fonctionnement et de propreté après utilisation (Liquide gaine réajusté et poubelles des cytomètres vidées, etc…). Ces indications sont consignées dans les documents fournis lors de la formation.

L'utilisateur devra signaler à la PFC tout problème technique qu'il aurait rencontré au cours de ses manipulations. L'inscription individuelle de chaque utilisateur sur le cahier de laboratoire disponible devant chaque appareil est obligatoire.

Lors de publications de données de cytométrie, les utilisateurs se doivent de faire apparaître la plateforme cytométrie dans les remerciements (« aknowledgments ») selon la formule suivante : « We are grateful to M Richaud and F Mallet for assistance with the use of the cytometry and cell sorting facility ».

ENGAGEMENTS DE LA PFC

La PFC ne pourra en aucune manière être tenue responsable d'une mauvaise utilisation des instruments par les utilisateurs formés, des résultats qui seront obtenus ou des pertes directes ou indirectes qui pourraient en résulter.

La PFC assure la sauvegarde des données brutes sur le Réseau : Disque Cytométrie (M): pendant une période de 5 années minimum. Les résultats restent la propriété des utilisateurs. La confidentialité des résultats vis-à-vis des autres utilisateurs n'est pas garantie par la PFC.

Lors de prestations externes, les fichiers de cytométrie peuvent être remis sur CD / DVD / clés USB. Dans ce cas, les supports sont à la charge du demandeur. La PFC ne fournit pas aux sites externes les logiciels nécessaires à l'exploitation des fichiers de cytométrie qui restent à la charge du demandeur.

IV. TARIFICATION

La tarification ouvre droit à l'utilisation du matériel dans les conditions décrites précédemment. Les tarifs sont établis en Euros HT (hors frais de gestion et TVA, applicables uniquement pour les utilisateurs externes).

Tarifs des Prestations de Cytométrie :

Tarifs à titre indicatif : Les tarifs indiqués sont revus chaque année par l'Inserm et modulés selon l'activité de la plateforme de l'année précédente.

Cytomètres Analyseurs Trieurs	**Tarif Académique sur site Inserm (euros HT/heure)**	**Tarif Académique hors Inserm hors site (euros HT/heure)**	**Tarif Industrie (euros HT/heure)**
Utilisation Trieurs ARIA IIu ou IIIsorp avec opérateur	139.36	172.11	240
Utilisation Analyseur BD LSRII avec opérateur	61,94	76,50	120
Utilisation Analyseur BD LSR Fortessa avec opérateur	53,34	65,87	100

Pour toute demande de devis concernant l'utilisation de l'analyseur spectral Aurora, envoyez la description de votre projet et vos questions à tricellulaire.u1068@inserm.fr.

V. NOUS CONTACTER / NOUS SITUER

CONTACTS

Site internet de la Plateforme : http://crcm.marseille.inserm.fr/plateformestechnologiques/cytometrie/

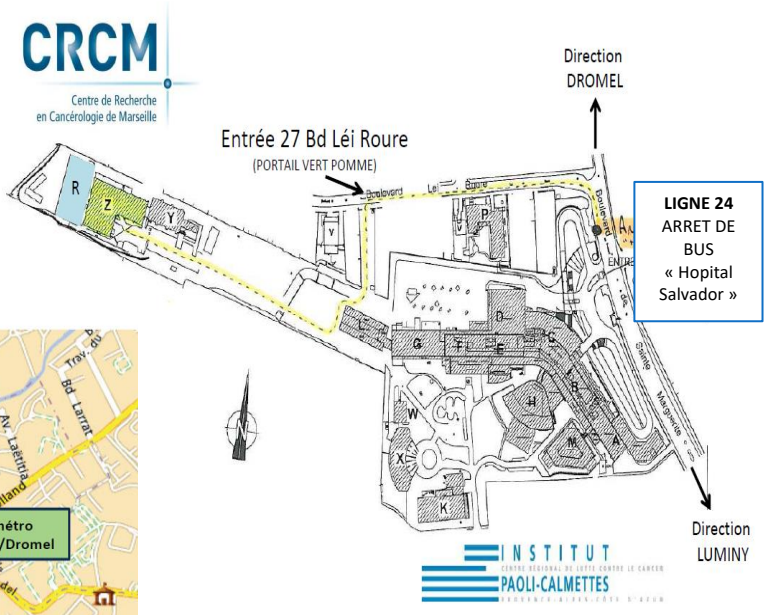
Coordonnées plateforme : tricellulaire.u1068@inserm.fr / 04 86 97 73 63

Direction scientifique : Pr Daniel OLIVE daniel.olive@inserm.fr

Responsable technique : Manon Richaud manon.richaud@inserm.fr

Personnel Plateforme : Françoise MALLET francoise.mallet@inserm.fr

Le service est assuré du lundi au vendredi de 8h30 à 18h00, hors jours fériés.

ADRESSE

Plateforme Cytométrie
CRCM Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille
INSERM U1038 / CNRS UMR7258 / AMU /
Institut Paoli-Calmette
27 Bd Léï Roure – BP 30059
13273 MARSEILLE Cedex 09