Année 2023, n°05

Date de parution: Avril 2023

Journal

TGML

Transcriptomic and Genomic Marseille Luminy

La plateforme « Transcriptomique et Génomique Marseille-Luminy » est intégrée à l'unité U1090 et est une des composantes de l'infrastructure distribuée France Génomique.

Accessible aux équipes de recherche publique et privée, elle donne accès à une large palette d'outils expérimentaux et bio-informatiques pour l'étude de la génomique fonctionnelle. L'accès à ces services se fait soit en prestation de service soit en collaboration sur la base d'une tarification adaptée et validée par l'Inserm. Les ingénieurs de la plateforme assurent le traitement et l'analyse de puces à ADN, la construction de librairies, le séquençage et les analyses de données (primaires et secondaires).

L'ensemble de l'activité de la plateforme est certifiée ISO 9001:2015 et NFX 50-900:2016. La plateforme est labellisée « Plateforme technologique Aix-Marseille » depuis 2016.

Ce numéro est pour nous l'occasion de dresser un bilan de l'année 2022 et de présenter les perspectives pour l'année 2023.

Bilan Prestations 2022

La plateforme est ouverte à l'ensemble de la communauté scientifique issue du monde académique ou privé (Figure 1). Le TGML est le collaborateur privilégié en génomique des laboratoires locaux (TAGC, CRCM,….), nationaux (IAB, Grenoble; IGMM & INRA, Montpellier;…….) et internationaux. Concernant le secteur privé, le TGML travaille avec différents acteurs dont GenXmap, OZ BioSCIENCES, ...

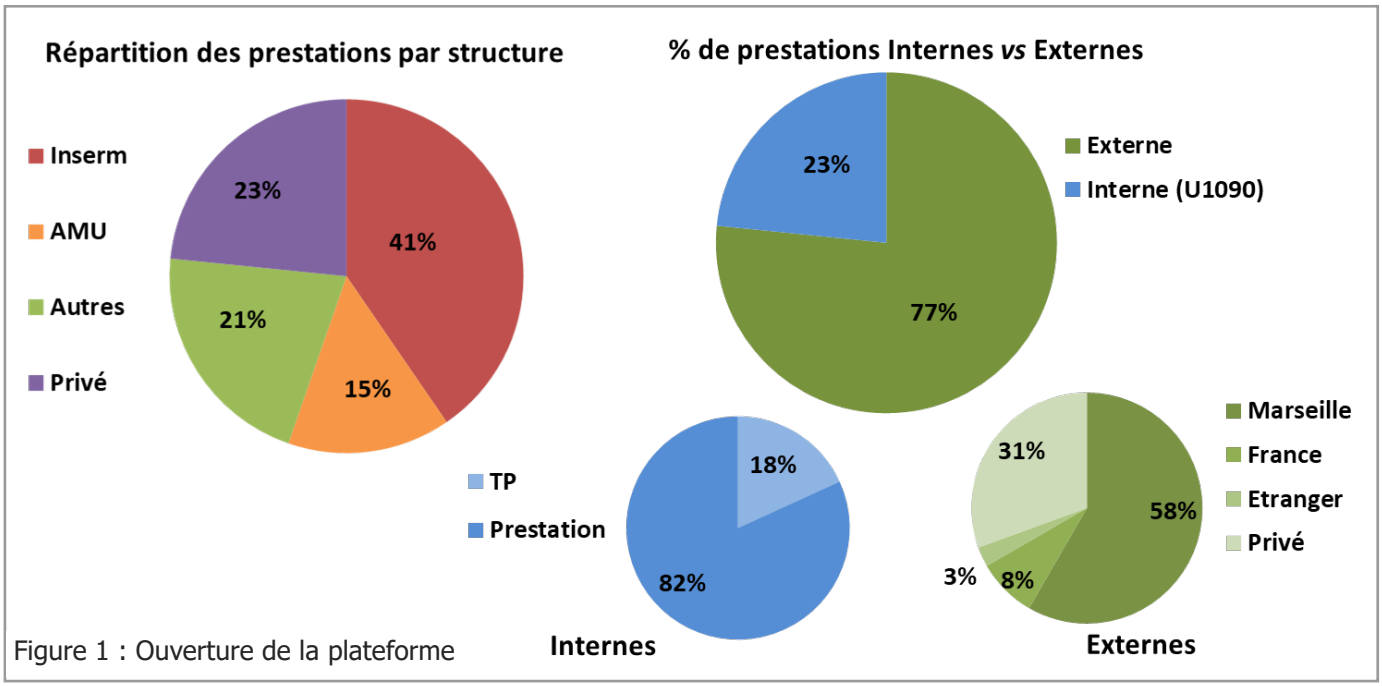

Figure 1 : Ouverture de la plateforme

La plateforme a traité plus de 1000 échantillons en 2022, dont la moitié pour des études de transcriptomiques. En effet, il y a eu une forte demande en transcriptomique (43% des projets), dont la moitié en cellules uniques. On note des demandes de *CellPlex* (9%), prestation mise en place en début d'année.
De plus, on observe une augmentation de la demande de séquençage de librairies et des contrôles qualités d'ARN (Figure 2) pour des sociétés privées.
Le retour des fiches satisfaction client montre 100% de satisfait ou très satisfait (Figure 3), avec de plus une fidélisation de nombreux collaborateurs.

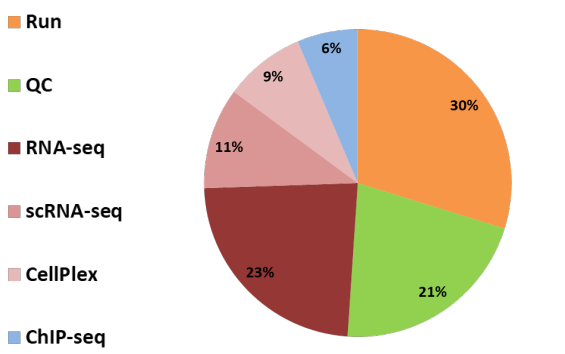

Figure 2 : Prestations réalisées

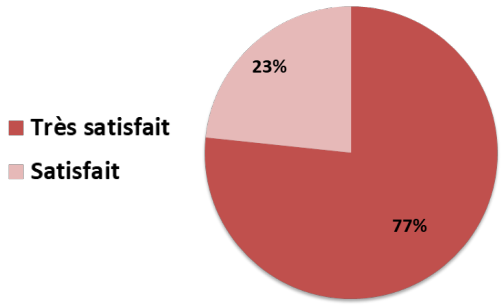

Figure 3 : Retour collaborateurs

Nouveaux équipements

Le TGML s'est dotée d'un *gentleMACS Octo Dissociator with Heaters* de *Miltenyi Biotec* (Figure 4 A). Cet équipement permet, à partir d'un tissu, d'extraire des noyaux afin de réaliser des études multi-omiques.
La plateforme a été lauréat de l'appel à projet recherche 2022 « volet plateforme » région PACA et de l'appel d'offre IBiSA, pour l'acquisition d'un séquenceur *NextSeq 2000* (Figure 4B) d'*Illumina,* en fin d'année, permettant d'augmenter le débit et de diminuer les coûts de séquençage.

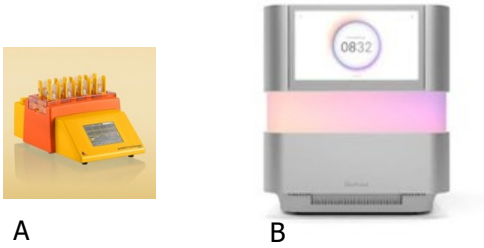

Figure 4 : Nouveaux équipements
A) *gentleMACS.* B) *NextSeq 2000*

Partenariat avec l'IHU Méditerranée Infection

Le TGML a un partenariat avec l'Institut Hosiptalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection de Marseille pour l'utilisation de leur séquenceur *Novaseq 6000 (Illumina)* qui permet de séquencer jusqu'à 10 milliards de reads avec un coût de séquençage 10x moins élevé. Nous utiliserons ce séquenceur pour des projets nécessitant un nombre de reads importants.

Recherche & Développement

L'année 2022 a été riche en développement par la proposition en prestation du ***CellPlex,*** l'optimisation de l'approche du **séquençage sur noyaux uniques** et le bêta-test du ***kit SparQ RNA-seq HMR*** de la société *Quantabio*.

CellPlex

Afin de travailler avec plusieurs échantillons simultanément, le TGML propose en prestation le *CellPlex* de la société *10X Genomics* (Figure 5). Cette approche permet de multiplexer les échantillons en amont du single-cell/nuclei RNA -seq par des marquages aspécifiques de cellules ou de noyaux grâce à des ancres lipidiques : les CMO (Cell Multiplexing Oligos).

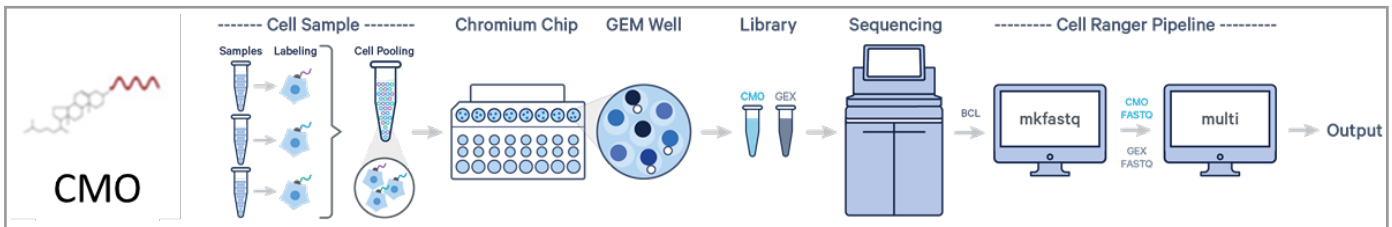

Figure 5 : Principe du *CellPlex*

Single-Nuclei RNA Sequencing (snRNA-seq)

Principe

Le snRNA-seq permet une détection de gènes comparable à celle obtenue en scRNA-seq et présente l'avantage de réduction du biais de dissociation, l'élimination des réponses au stress transcriptionnel induites par la dissociation ainsi que la possibilité de travailler avec les échantillons congelés ou des cellules fragiles.

Projet ECTOCAN

La plateforme développe des méthodes de séquençage sur noyaux uniques en collaboration avec l'équipe de Sophie Rousseaux de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences à Grenoble. Ce projet vise à étudier les activations génétiques ectopiques au cours de la transformation maligne et de la dissémination métastatique à l'aide d'analyses multi-omiques sur différents organes murins.

Choix de la méthode d'isolation des noyaux

Pour développer l'approche des noyaux, différents kits d'extraction ont été testés (*Nuclei EZ prep nuclei isolation* de *Sigma-Aldrich*, *Nuclei isolation kit* de *10X Genomics* et *Nuclei extraction buffer* de *Miltenyi Biotec)* sur différents types de tissus congelés (poumon, rein, foie, cerveau, PBMC, tumeurs). Le protocole sur le *gentleMACS* de *Miltenyi Biotec* a donné les meilleurs résultats. Le TGML s'est donc équipé de cet appareil.

Résultats Obtenus - Validation

La première expérience effectuée sur un échantillon de poumon entier sain de souris, nous a permis d'identifier 22 types cellulaires à partir des 10 000 noyaux (Figure 6).

Ces données comparées à la littérature (*Koenitzer et al., 2020*) montrent la même diversité et proportion des populations cellulaires.

De manière générale, les gènes de réponse au stress cellulaire sont très faiblement représentés dans le snRNA-seq *versus* scRNA-seq.

L'extraction de noyaux montre une réduction des biais dû au stress cellulaire (biais de dissociation et/ou de congélation). Ce qui a été confirmé dans ce premier snRNA-seq réalisé par la plateforme.

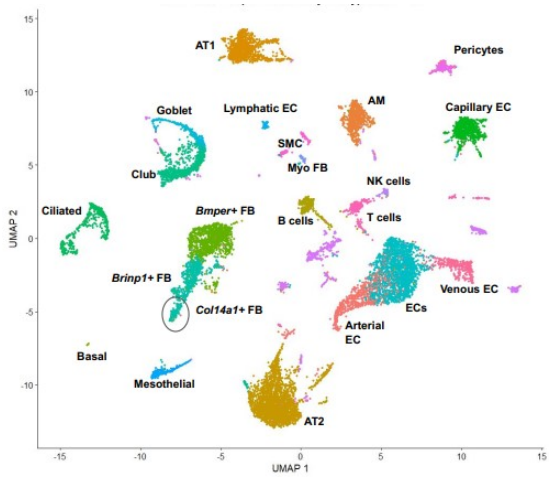

Figure 6 : Représentation UMAP montrant les différents types cellulaires identifiés dans un poumon entier de souris. AM = Alveolar Macrophages, FB = Fibroblast, EC = Endothelial Cells, SMC = Smooth Muscle Cells, MyoFB = Myofibroblasts, NK = Natural Killer, AT1/2 = Alveolar Type.

Bêta-testeur du kit SparQ RNA-seq HMR de la société Quantabio

La plateforme a été sollicitée par la société *Quantabio* pour tester un nouveau kit de préparation de librairies RNA-seq ribodéplétées. Ce dernier permet de préparer des librairies en moins de 5h à partir d'input de 1 à 1000ng d'ARN total en utilisant uniquement 3 tubes de réactions (Figure 7A).
Afin de le tester le kit, nous avons utilisé deux échantillons (condition « normal » et « treated ») pour lesquels nous avions déjà des résultats obtenus avec le kit *Illumina Stranded Total RNA Prep Ligation with Ribo-Zero Plus*.
Pour le kit *SparQ RNA-seq HMR*, les librairies ont été préparées à partir de 1000ng, 250ng et 25ng d'ARN et comparées aux librairies préparées avec le kit *Illumina* à partir de 1000ng d'ARN.
Nos analyses montrent une corrélation de 0,97 pour les 2 échantillons entre les deux kits (Figure 7B). De plus, on observe une très bonne corrélation avec le kit *SparQ* pour chaque échantillons avec les différents inputs (Figure 7C).
Les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions ont des niveaux d'expression similaires avec les deux kits (Figure 7D).

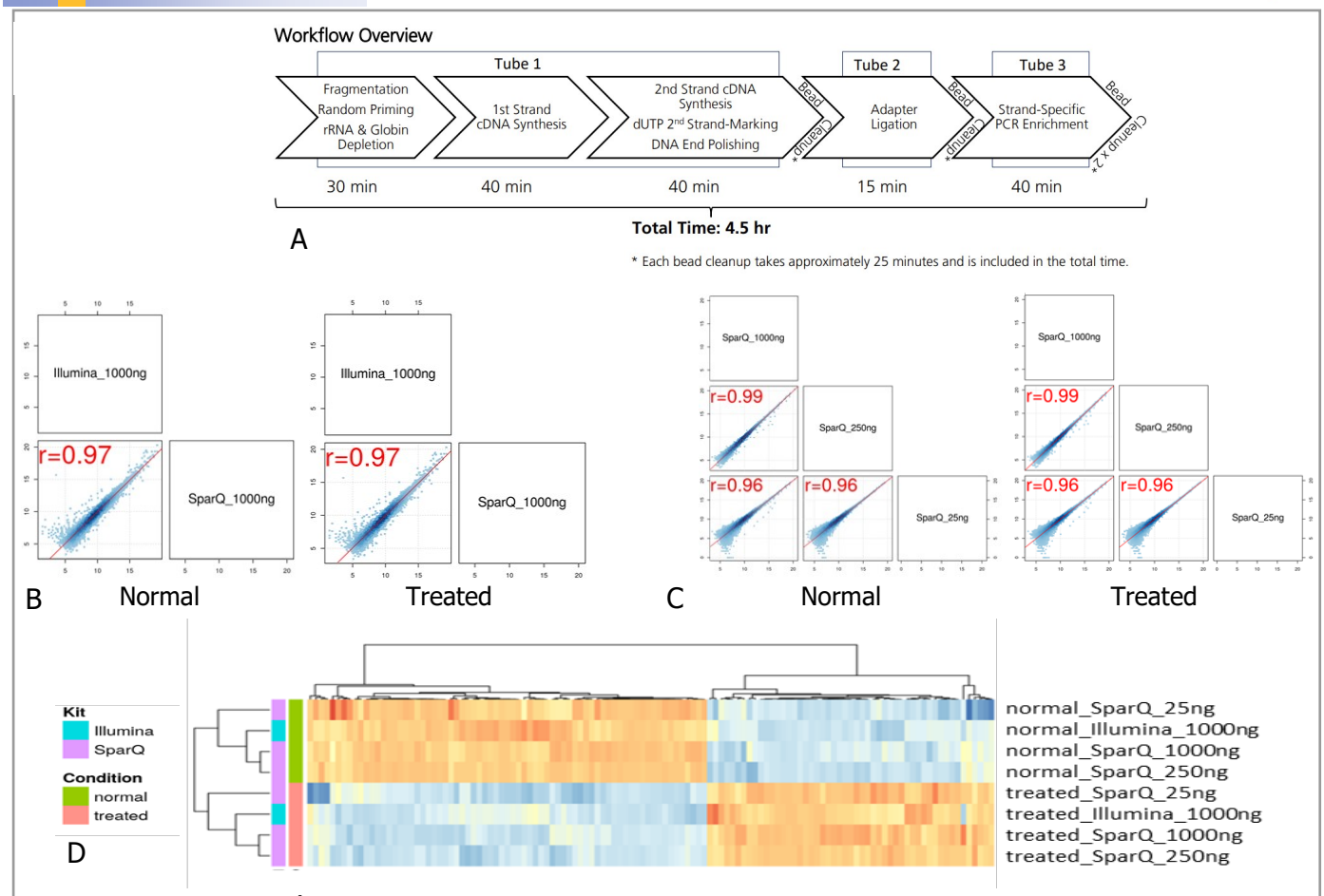

Figure 8 : Protocole et résultats de la comparaison de kits
A) Workflow expérimental kit *SparQ RNA-seq HMR*. B) Scatter plot du niveau d'expression des gènes pour l'échantillon 1 et 2 . C) Scatter plot du niveau d'expression des gènes en fonction des inputs D) Heatmap des niveaux d'expression des gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions (valeur absolue du log2FC > 2 et p-valeur ajustée < 0.05).

Perspectives pour 2023

La plateforme souhaite optimiser le processus d'extraction des noyaux sur des tissus complexes (cerveau, foie,…) et mettre en place l'ATAC-seq ainsi que l'approche multi-omique (ATAC-seq et RNA-seq) sur noyaux uniques afin de pouvoir les proposer en prestation.
Le TGML voudrait acquérir le *Chromium iX* de *10X Genomics* pour travailler à partir de cellules fixées.
La veille technologique sur la transcritpomique spatiale est toujours d'actualité.

Contacts

Adresse: Parc Scientifique de Luminy, Bâtiment TPR2, case 928
163 Avenue de Luminy
13288 MARSEILLE cedex 09
Téléphone : 04.91.82.87.13 / 06.17.25.70.34
Messagerie : tgml.tagc@inserm.fr

Direction TAGC: Pascal Rihet
Responsables plateforme: Béatrice Loriod & Denis Puthier
Personnels : Lisa Bargier, Charlyne Gard, Sebastien Nin, Myriam Ramadour, Romain Sprynski, Hortense Vachon

Retrouvez-nous sur le web !
https://tagc.univ-amu.fr/en/resources/transcriptomic-genomic-platform-marseille-luminy
@TGML_TAGC