

FICHE SERVICE

RNA-Seq sur Cellules Unique

La plateforme GenomiqueENS propose une prestation de 3' mRNA-seq sur cellules uniques en combinant la technologie microfluidique de 10X Genomics et le séquençage haut débit d'Illumina (séquences courtes) **et/ou Nanopore (séquences longues)**.

Le RNA-seq sur cellules uniques (scRNA-seq) vise à analyser le transcriptome des différentes cellules dans un échantillon donné. Il permet ainsi d'étudier l'hétérogénéité cellulaire, de caractériser, sur la base de leur profil d'expression génique, les différentes sous-populations de cellules présentes dans un échantillon.

Qu'est-ce que la technologie 3'mRNA-seq de 10X Genomics ?

Le Chromium Controller développé par 10X Genomics est un équipement qui permet, à partir d'une suspension cellulaire, d'encapsuler individuellement de 500 à 10 000 cellules dans des gouttelettes renfermant l'ensemble des réactifs nécessaires à la lyse cellulaire et à la synthèse d'ADNc ainsi qu'une bille recouverte d'oligonucléotides spécifiques (Fig.1). Ces oligonucléotides sont constitués :

- d'une amorce PCR (Truseq Read 1 ou Nextera Read 1)
- d'un code-barres (BC), unique à chaque bille et donc à chaque cellule
- d'un Unique Molecular Identifier (UMI), une séquence aléatoire courte unique à chaque oligonucléotide sur la bille et donc à chaque transcrit ou molécule capturé(e)
- d'une queue poly (dT) pour la capture des ARN polyA+ des cellules cibles ou bien de séquences de capture spécifiques (Capture Seq 1 et 2) pour l'analyse simultanée de protéines de surface

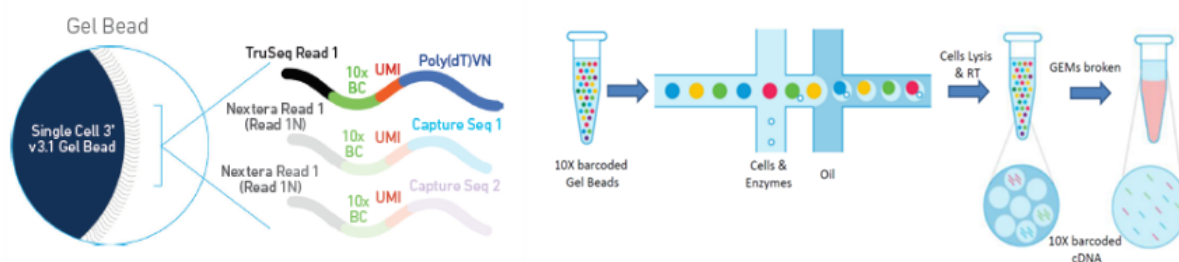


Fig.1 : Principe de la technologie (source : 10X Genomics)

Après isolement dans les nanogouttelettes, les cellules sont lysées par chauffage et les ARNm ainsi libérés sont retenus sur les billes par hybridation complémentaire grâce à leur queue polyA. Une réaction de transcription inverse permet de convertir les ARNm en ADNc marqués avec les codes-barres et UMI spécifiques. L'émulsion est alors brisée, les billes d'hydrogel sont dissoutes et la librairie de séquençage est finalisée sur l'ensemble des ADNc barre codés par addition des adaptateurs de séquençage et amplification par PCR.

Les librairies sont ensuite séquencées soit avec la technologie Illumina (NextSeq2000) soit Nanopore. Le read1 contenant le code-barres de la cellule et l'UMI est utilisé pour démultiplexer les cellules lors de l'analyse primaire. Le read 2 quant à lui est utilisé pour identifier et quantifier les transcrits.

Chromium Single Cell 3' Gene Expression Dual Index Library

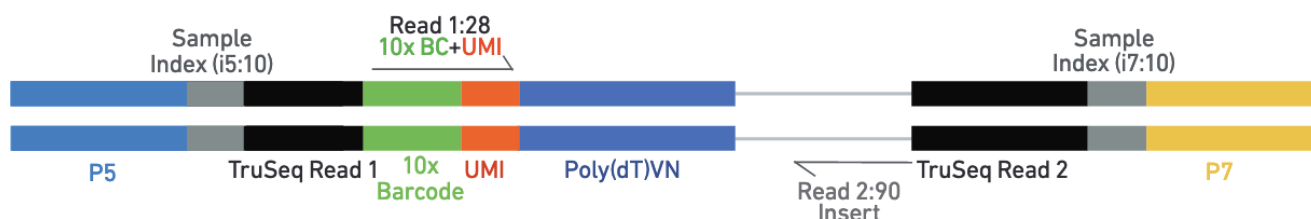


Fig.2 : Structure des librairies 3'mRNA-seq finales (source : 10X Genomics)

Quelles sont les possibilités offertes sur la plateforme GenomiqueENS ?

Pour les **utilisateurs externes** : nous n'acceptons que les cellules **fixées** du fait de l'absence d'infrastructure au sein de la plateforme permettant de travailler sur les cellules vivantes ; les cellules vivantes devant être traitées très rapidement.

Voici 2 protocoles de fixation que nous recommandons :

- Le protocole de cellules fixées pour les PBMCs de 10X Genomics
https://assets.ctfassets.net/an68im79xiti/71r5PbRPB1LeqRkuPltBzr/64cfaa099d0a7fd41f79a4aec643926/CG00039_Demonstrated_Protocol_FreshFrozenHumanPBMCs_RevE.pdf
- le protocole de fixation ACME (ACetic-MEthanol)
Garcia-Castro, H et al. ACME dissociation : a versatile cell fixation-dissociation method for single-cell transcriptomics . Genome Biol. 22, 89 (2021)

Pour tous modes de fixation, une mise au point préalable sera nécessaire.

Pour les **utilisateurs internes** : nous acceptons les cellules fixées et les cellules **vivantes** (voir ci-dessus pour les cellules fixées).

Pour les cellules vivantes :

- Le porteur de projet devra réaliser la manipulation jusqu'à l'obtention du ADNc en utilisant le Chromium 10X de la plateforme. Puis il pourra ensuite confier le ADNc à la plateforme afin de réaliser la fabrication de la librairie et le séquençage.
- De plus, le porteur devra acheter lui-même les réactifs 10X Genomics. Il pourra se mettre en contact avec la plateforme afin de savoir quels réactifs commander. Les autres réactifs nécessaires à la manipulation seront fournis par la plateforme.



- Une formation en amont leur sera dispensée si nécessaire sur l'utilisation du 10X Chromium afin de pouvoir réaliser la manip par eux-mêmes jusqu'à l'obtention de l'ADNc.

Comment planifier les expériences ?

Le porteur de projet doit planifier la date de l'expérience avec la plateforme au minimum 2 semaines avant le run. Pour les utilisateurs sur cellules vivantes ce délai sera plus grand puisqu'ils doivent commander les réactifs 10X Genomics nécessaires et suivre éventuellement une formation à l'utilisation du 10X Chromium.

De plus, afin de pouvoir compléter l'expérience dans les plages horaires de travail habituelles, il est souhaitable de déposer ses cellules sur la plateforme au plus tard à 12 h.

Le taux de capture sur le Chromium est estimé à environ 65% (65% des gouttelettes contiennent une cellule) en pratique il est plutôt de l'ordre de 50%. Il est conseillé de doubler le nombre de cellules à charger par rapport au nombre de cellules final souhaité.

Quels sont les services proposés ?

A) Pour la technique sur cellules fixées ACME ou autres types de fixation éventuellement* (**pour les utilisateurs externes et internes**)

*Une mise au point sera nécessaire pour toute fixation

- 1- Passage sur le 10X Chromium des cellules fixées
- 2- Contrôle du ADNc sur le Fragment Analyser
- 3- Préparation des banques
- 4- Quantification et vérification de la qualité des banques finales par Fragment Analyser.
- 5- Le séquençage avec le séquenceur NextSeq 2000 d'Illumina
- 6- L'analyse primaire des données par CellRanger

B) Pour la technique sur cellules vivantes (**pour les utilisateurs internes exclusivement**)

- 1- Contrôle du ADNc sur le Fragment Analyser
- 2- Préparation des banques
- 3- Quantification et vérification de la qualité des banques finales par Fragment Analyser
- 4- Le séquençage avec le séquenceur NextSeq 2000 d'Illumina
- 5- L'analyse primaire des données par CellRanger

Comment préparer les échantillons par le porteur de projet ?

Selon les recommandations de 10X Genomics, **dans des conditions optimales**, la suspension cellulaire chargée sur le Chromium doit présenter les caractéristiques suivantes :

- concentration : 700 à 1000 cellules/ μ l ;
- tampon de suspension : PBS 1X + 0.04 % BSA
- taille des cellules : 5 à 30 μ m.

Pour les cellules vivantes : taux de viabilité : >75% (90% est fortement recommandé)

Pour les cellules fixées : le contrôle de la qualité des ARNs obtenus après fixation et tri éventuel devra être réalisé par l'utilisateur au préalable de la manipulation de Single Cell.



Pour augmenter les chances d'atteindre le taux de récupération de cellules désirées, il est impératif d'éviter les agrégats de cellules et d'éliminer au maximum les débris cellulaires et les cellules mortes avant chargement sur le Chromium. Ces facteurs vont en effet impacter négativement le taux de récupération puisque les cellules mortes et les débris seront capturés au même titre que les cellules à analyser.

Pour les cellules vivantes : différents protocoles de dissociation cellulaire et de préparation de suspensions cellulaires sont disponibles à ces deux adresses :

- <https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/sample-prep>
- <http://www.worthington-biochem.com/tissuedissociation/default.html>

Pour la numération des cellules vivantes ou fixées: Un comptage manuel sur cellules de Malassez est **fortement recommandé** afin d'avoir un comptage précis du nombre de cellules à déposer

Quel type de séquençage choisir ?

Le type de séquençage dépend de la **profondeur** (nombre de lectures par échantillon) désirée. Nous proposons du séquençage en lecture courte (Illumina) ou **lecture longue (Nanopore)**. Les différents types de séquençage que nous proposons sur la plateforme sont décrit sur notre site web:

https://genomique.biologie.ens.fr/fr/offres_et_services/prestations#sequencage

Après l'analyse, quelles données / quel type de fichier récupère-t-on ?

Les fichiers de sortie dépendent du type de séquençage fait (Illumina/ Nanopore) et l'outil d'analyse choisi (Cell Ranger/ SiceLore). Quelques exemples sont décrit ci-dessous:

Séquençage Illumina avec Cell Ranger:

Lectures brutes :

- Lectures démultiplexées avec Cell Ranger (banques, cellules et transcrits)
- Fichiers de séquences (format FASTQ)

Analyses secondaires avec Cell Ranger :

- Alignement des lectures et comptage des transcrits par cellules
- Clusterisation et visualisation avec Loupe Cell Browser
- Rapport d'analyse en HTML
- Génome de référence utilisé pour l'analyse
- Annotations de référence utilisé pour l'analyse

Séquençage Nanopore avec SiceLore:

Lectures brutes :

- Contrôle qualité du séquençage ONT ToulligQC (fichiers HTML)

Analyses secondaires avec Cell Ranger :

- Lectures démultiplexées avec SiceLore (banques, cellules et transcrits)
- Alignement des lectures et comptage des transcrits par cellules
- Dossiers générés par les outils d'analyse comprenant les matrices de comptages au niveau gènes et transcrits, fichiers d'alignements au niveau gènes et transcrits
- Génome et annotations de référence prête à l'emploi pour IGV