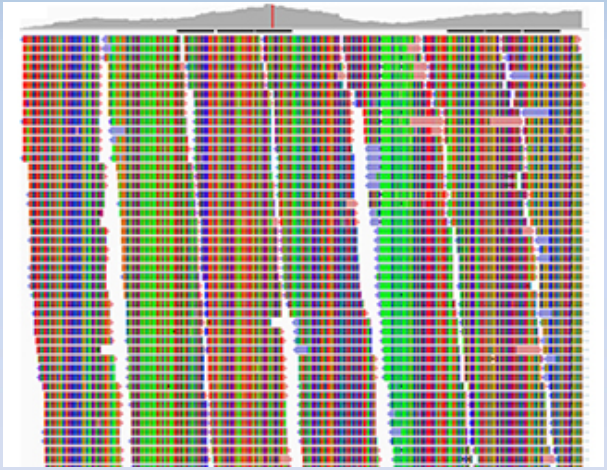
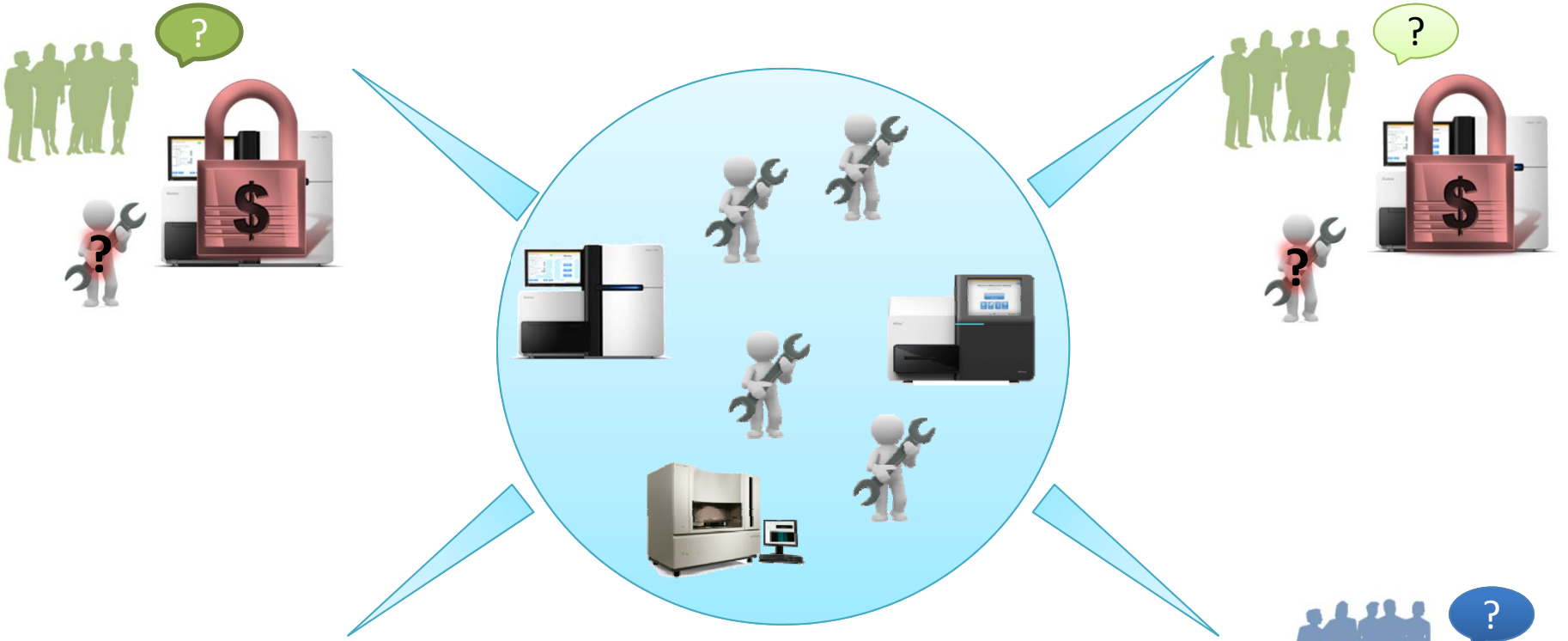
La plateforme au service des scientifiques d'Auzeville et d'ailleurs : le développement du Single Cell - RNAseq



Association des Jeunes Scientifiques d'Auzeville
16/06/2016
GENTHON Clémence / KUCHLY Claire

GeT
Génome et Transcriptome

A quoi sert une plateforme technologique ?



Notre rôle :

Mettre à disposition des équipes du MATERIEL et des COMPETENCES

- Mettre à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique des outils innovants dans le domaine de l'analyse des génomes
- Acquérir et transférer les savoirs faire et l'expertise en lien avec ces technologies (on privilégie la formation et l'accès en autonomie des utilisateurs)

GeT
Génome et Transcriptome

Comment travaille-t-on ?

équipe de recherche

get-plage@genotoul.fr

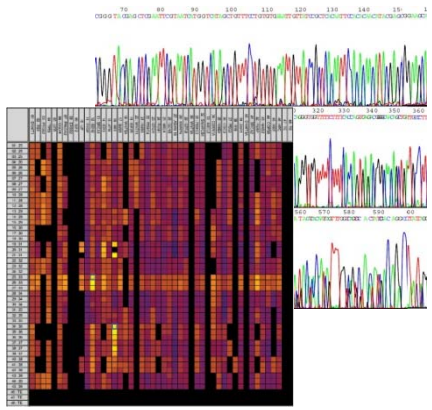
Conseils
Devis

ADN ou ARN

outils biologiques

robots

AGTCGGTACGTGTCA
GTGATGCAGGTGACA
GTCGGTACGTGTCAG



Analyse

outils bio-informatiques

AGTCGGTACGTGTCAGTGATGCAGGTGACAG
TCGGTACGTGTCAGTGATGCAGGTGACAGTC
GGTACGTGTCAGTGATGCAGGTGACATGCTC

Que développe t –on comme protocoles ?

Analyse du **génome**:
- Analyse de génotypage par NGS
- Réalisation de Génome de novo

Analyse du **méthylome** par NGS

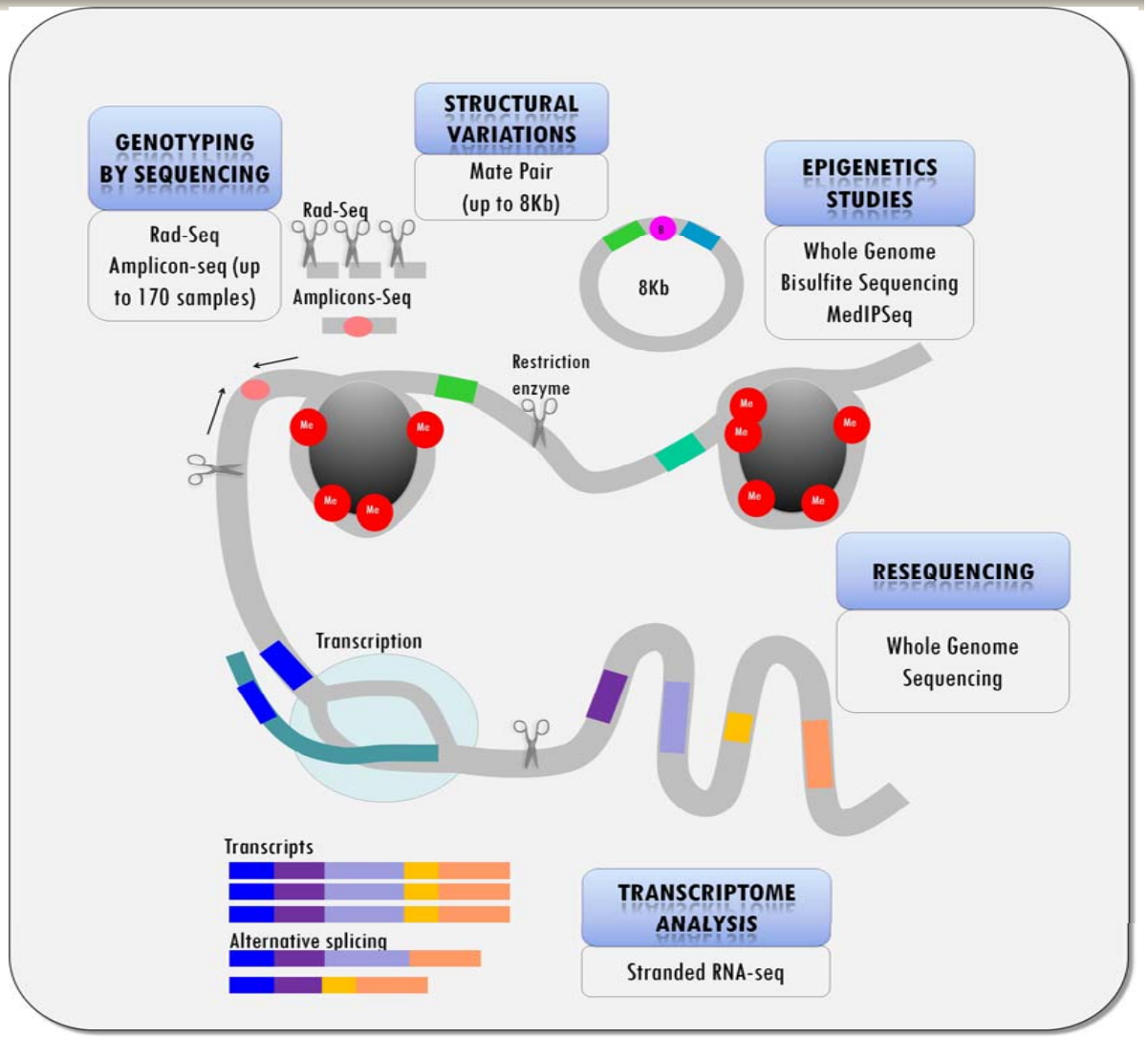
Analyse du **régulome** (ChIP-Seq)

Analyse de **Métagénome** par séquençage de l'ARN 16S (Meta 16S-Seq)
ou par séquençage complet

Analyse **génomique sur cellule unique**

Analyse de **transcriptome**
- RNA-Seq ou qRT-PCR

Analyse de **Méta-transcriptome**



GeT Génome et Transcriptome

Le Single-Cell RNAseq

CONTEXTE

Une équipe s'intéresse au microenvironnement tumoral et travaille sur des cellules A spécialisées dans le recrutement des lymphocytes et présentes dans les tumeurs. Une forte densité de cellules A est associé à un pronostic favorable.

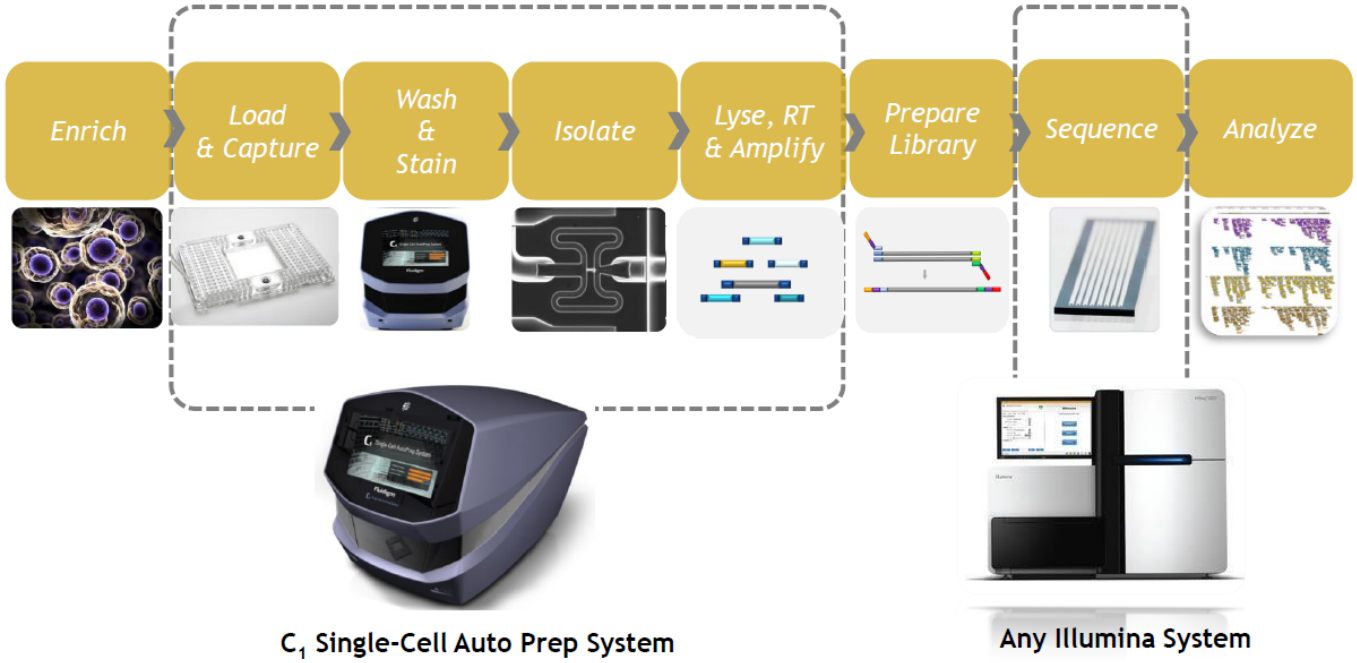
PROBLEME

Faible quantité de cellules A dans les tissus et l'impossibilité de les cultiver in vivo pour du RNAseq « classique » donc passage par le C1

OBJECTIF DE L'ETUDE

Analyser le transcriptome des cellules A par RNA-seq et les comparer à d'autres types cellulaires de la paroi vasculaire (cellules C contrôles) à l'échelle de la cellule unique

DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE SUR LA PLATEFORME



GeT Génome et Transcriptome

Projet SingleCell

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

↓

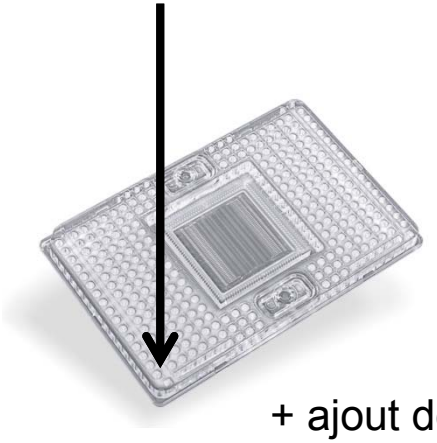
Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données

- 5 souris
- 6 ganglions/souris
- traitement collagenase/Dnase
- marquage Meca79/CD45/GP38
- tri cellulaire au CHU de Rangueil

Suspension cellulaire =
mélange artificiel 80% de A et 20% de C



+ ajout de 3 spikes RNA

GeT Génome et Transcriptome

Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

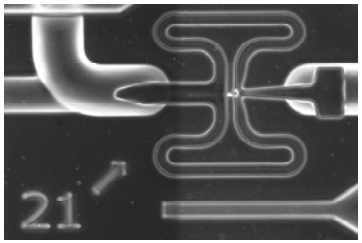
↓

Séquençage Hiseq2500

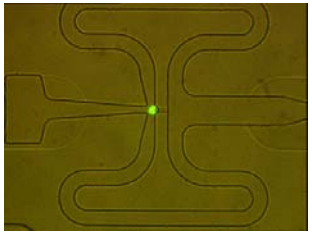
↓

Analyse des données

Capture d'au maximum 96 cellules uniques
- **44 cellules uniques**
- 29 sites remplis mais non exploitables (débris, cellules doubles, amas…)
- 23 sites vides



Discrimination entre A et C sur la base de la microscopie:
- 28 cellules supposées A(63%)
- 16 cellules supposées C(36%)



Conversion des ARN en cDNA grâce à la chimie SMARTer® de Clontech

Quantité de matériel initiale
→ A ~ 0,3 ng/µl
→ C ~ 0,1 ng/µl

Choix de 12 cellules A et 10 cellules B pour la préparation des librairies + 2 bulks artificiels

Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

↓

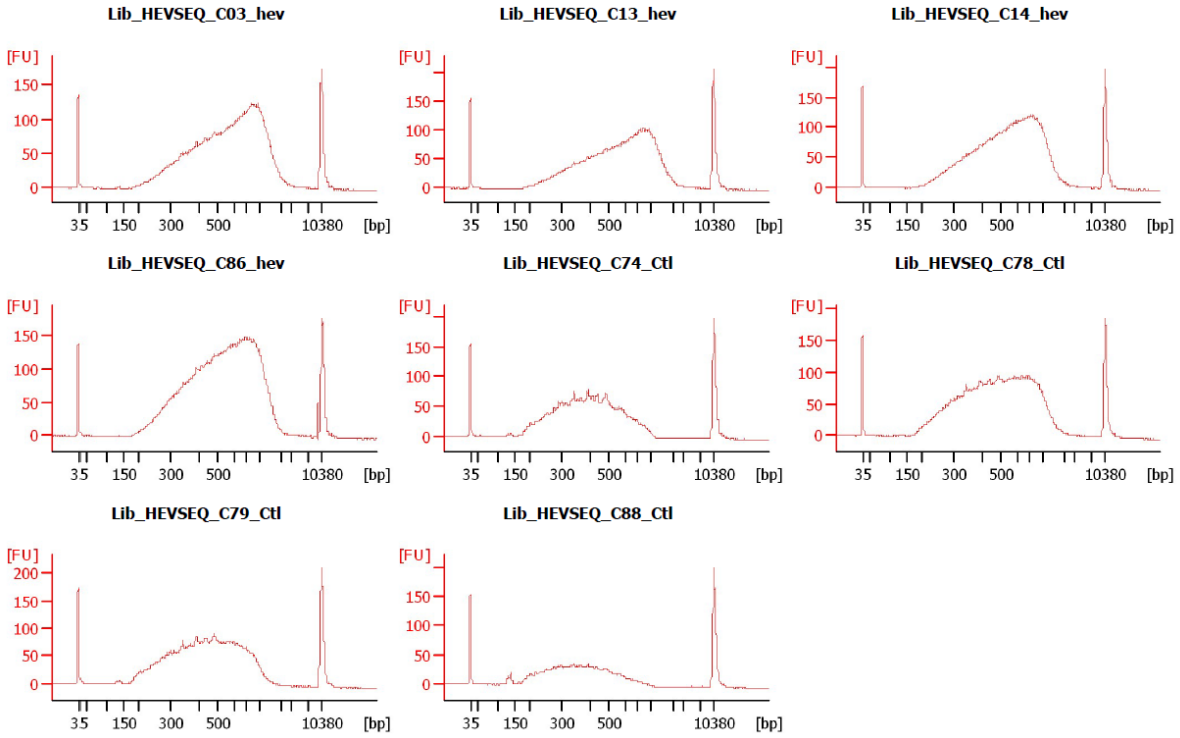
Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données

<u>Préparation des librairies avec le kit Nextera XT d'Illumina basé sur une transposase</u>

Profils BioAnalyzer de quelques librairies :



→ Forte hétérogénéité

Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

↓

Séquençage Hiseq2500

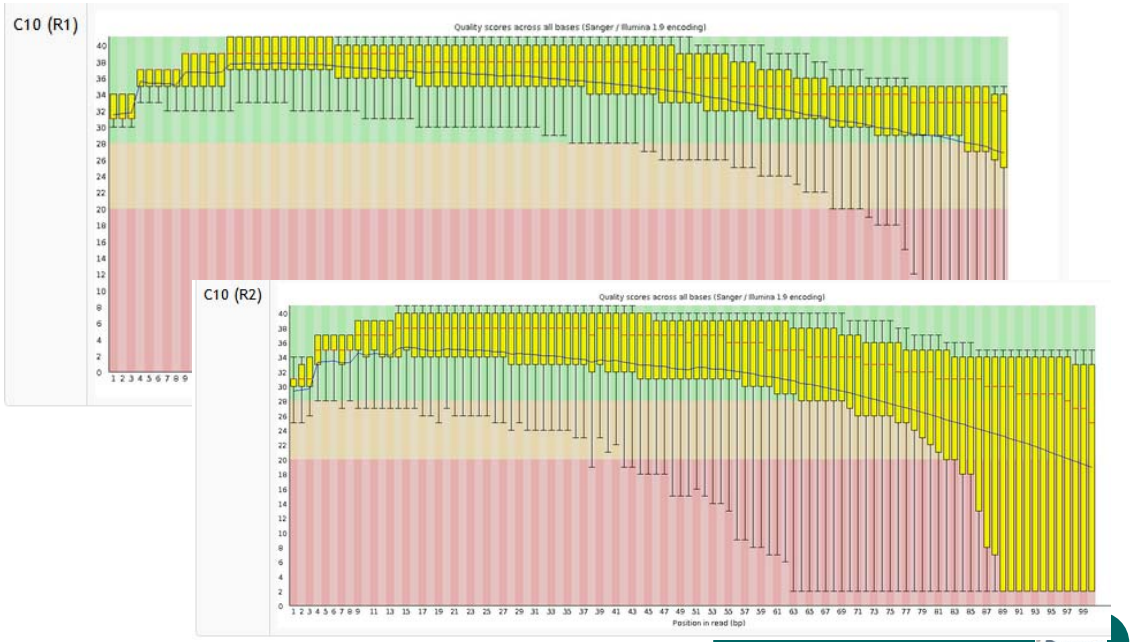
↓

Analyse des données

- Multiplexage des 24 librairies
- Séquençage en 2x100 pb en mode Rapid sur 2 lanes

RESULTATS

- Entre 2 000 000 et 4 000 000 de reads/lane.
- Qualité des reads globalement correcte



GeT Génome et Transcriptome

Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

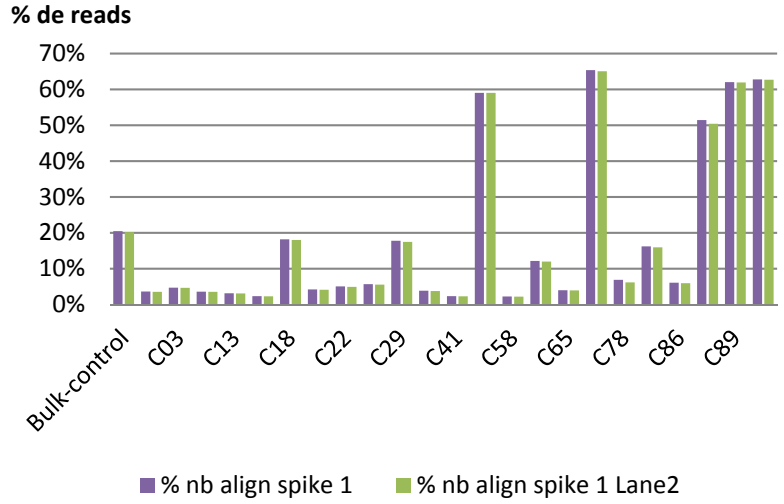
↓

Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données

- Reproductibilité des manipulations Lane1 – Lane2



- Recherche des spikes dans les échantillons – vérification de la proportion

	Lane1		Lane2	
	Bulk-control C	**Bulk-Cellules A**	**Bulk-control C**	**Bulk-Cellules A**
nb reads flowcell	171 911 756	171 911 756	162 668 032	162 668 032
nb reads echantillons	8 564 120	7 310 220	8 076 818	6 868 386
nb align spike 1	1 751 488	264 816	1 631 185	243 442
nb align spike 4	149 690	25 994	137 590	23 977
nb align spike 7	11 940	3 707	10 900	1 539

GeT Génome et Transcriptome

Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

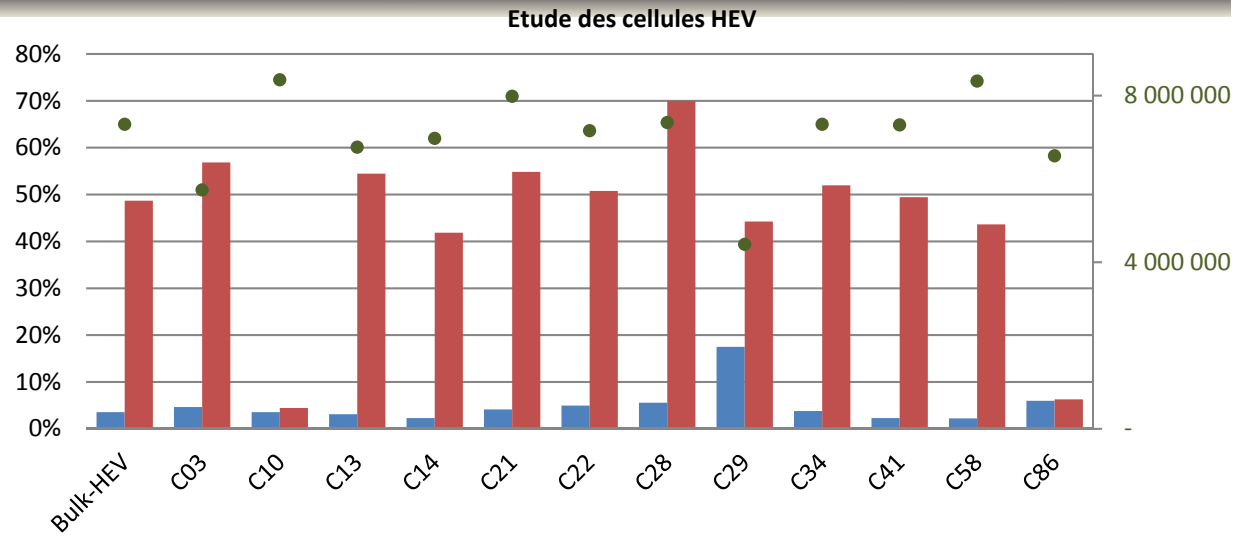
Préparation des Librairies

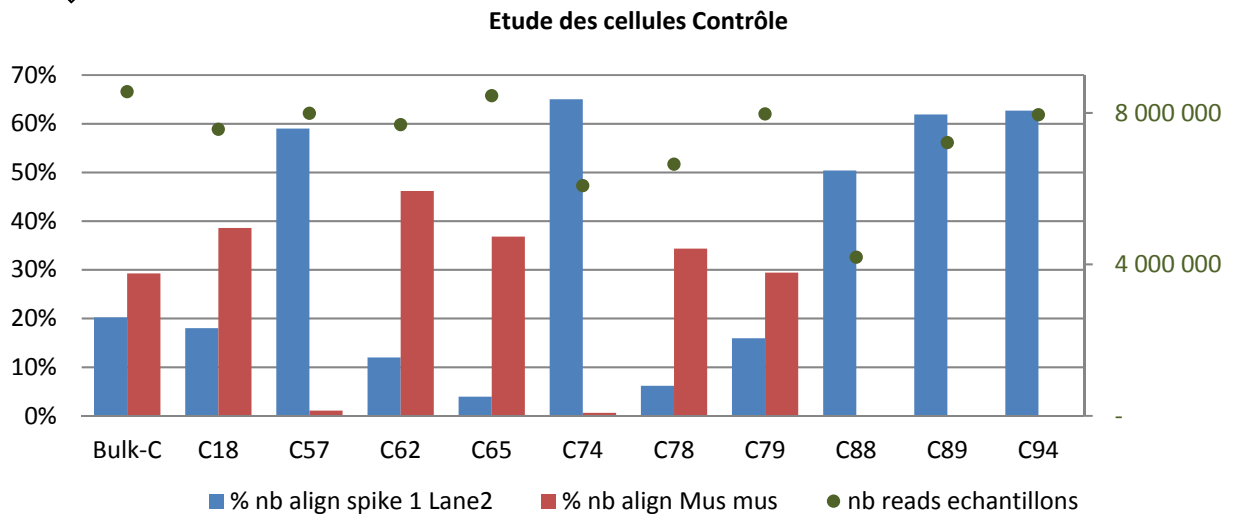
↓

Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données





Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

↓

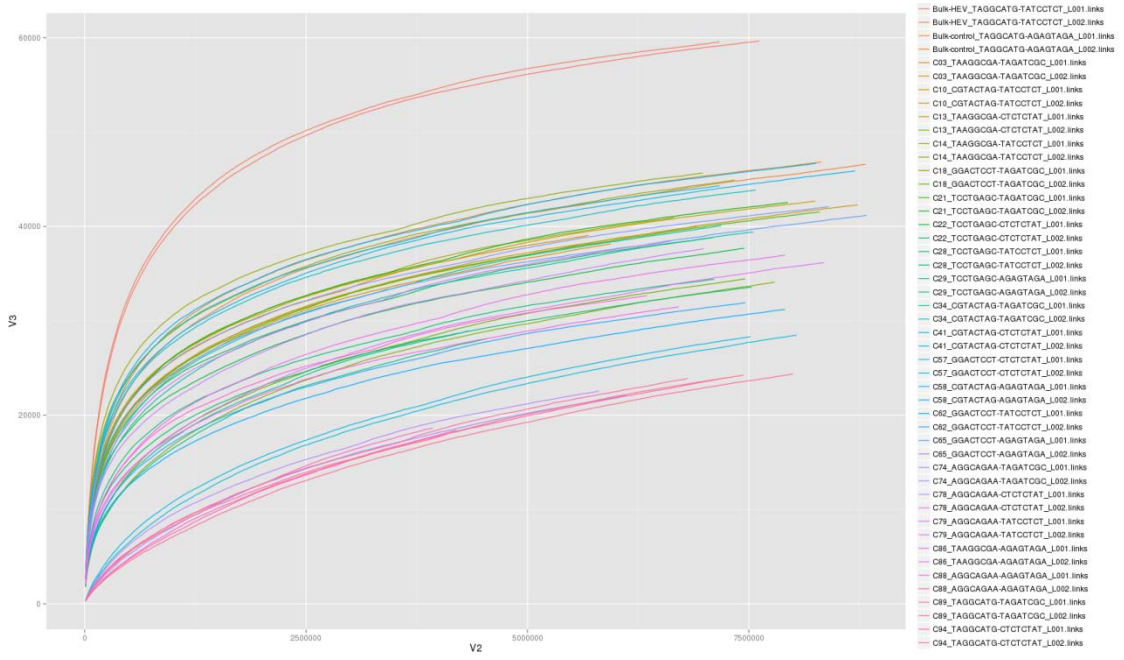
Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données

Analyses par C. Klopp

- Courbe de raréfaction



→ On n'atteint pas de plateau mais on s'y approche

GeT Génome et Transcriptome

Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

↓

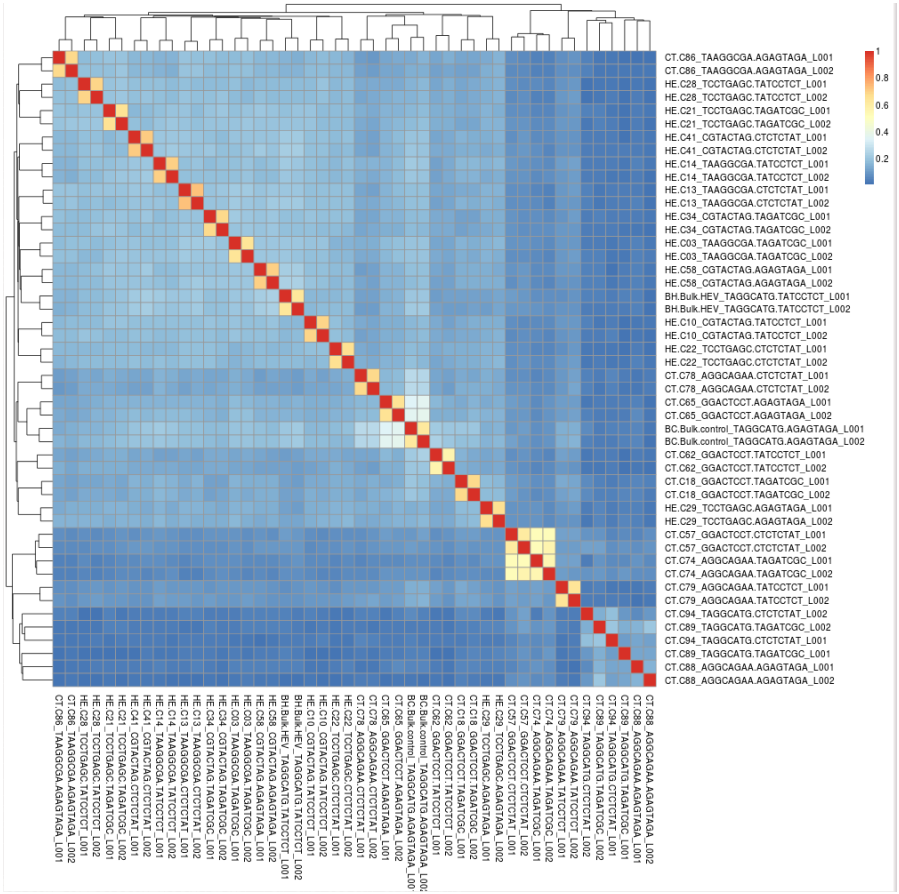
Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données

Analyses par C. Klopp

- Corrélations entre échantillons



Exemple de projet

Suspension cellulaire

↓

Processus du C1
- Capture des cellules
- Microscopie
- Lyse
- Retro-transcription
- PCR

↓

Préparation des Librairies

↓

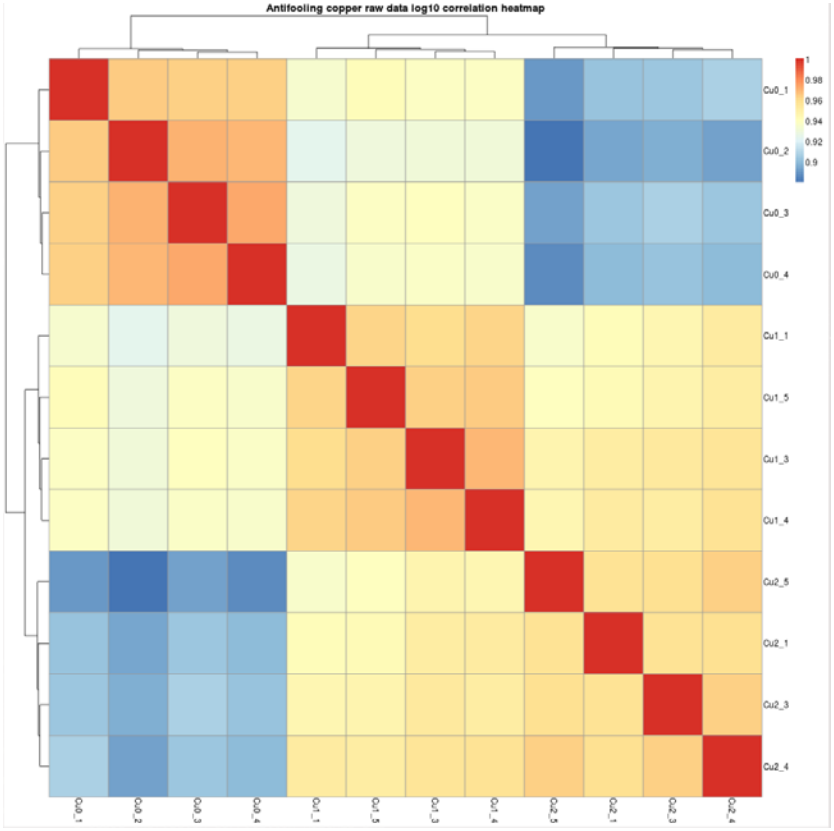
Séquençage Hiseq2500

↓

Analyse des données

Analyses par C. Klopp

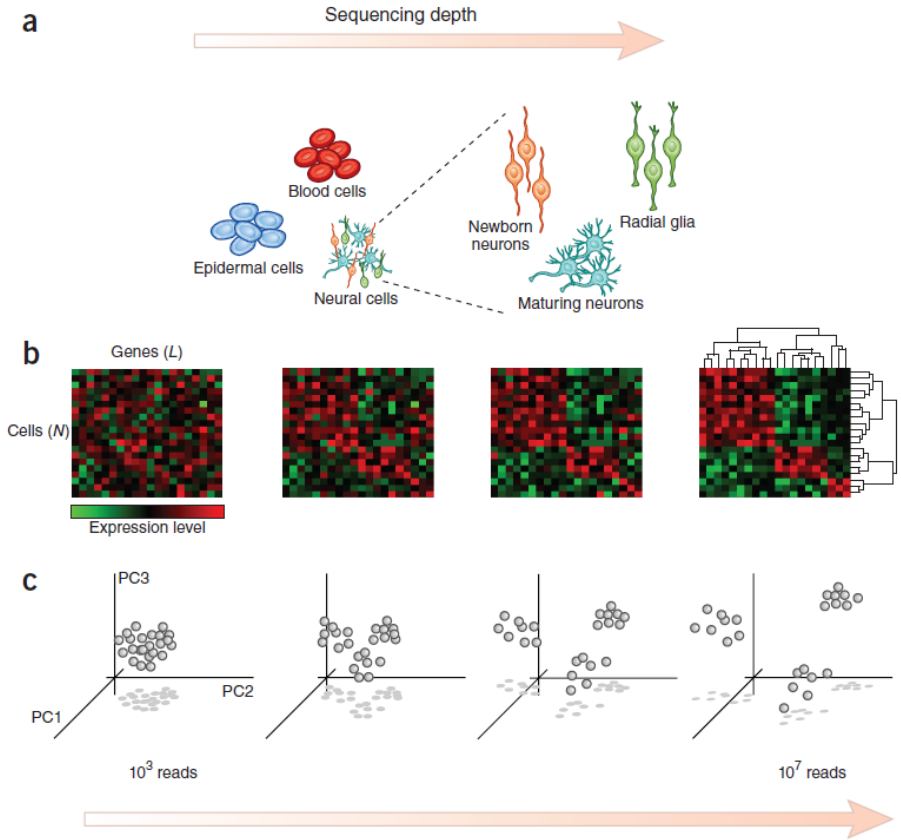
- Exemple de ce qui est obtenu habituellement en RNAseq



How deep is enough in single-cell RNA-seq?

Aaron M Streets & Yanyi Huang

Guidelines for determining sequencing depth facilitate transcriptome profiling of single cells in heterogeneous populations.



Conclusion

- Si cellules avec variations d'expession de gènes importantes alors ultra low sequencing (<10 000 reads) suffisant

- Cellules neuronales à différents stades de développement : 50 000 reads