

Single-cell :

Intégration de données moléculaires des populations plasmocytaires de Myélome Multiple

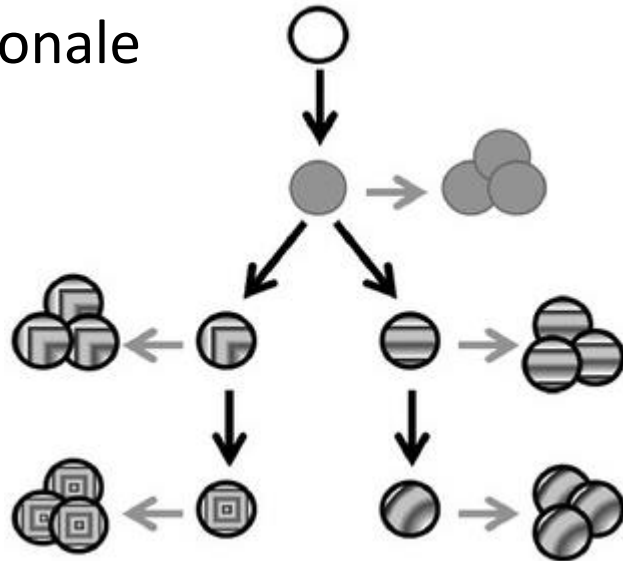
Céline Mazzotti, Antoine Graffeuil, Corentin Pignon, Romain Lannes, Delphine Labourdette (INSA Toulouse), Alice Cleyden (Univ. Montpellier), Jill Corre, Hervé Avet-Loiseau

Objectifs

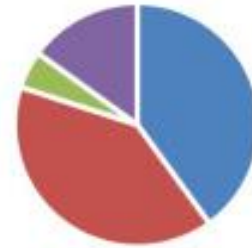
1. Caractériser les plasmocytes de diagnostics

2. Evolution clonale en cours de traitement

3. Phylogénie clonale



4. Quels (sous)-clones plasmocytaires « résistent » ?



Evolution linéaire ou différentielle



Evolution branchée



Stratégie

- 50 patients appariés
 - Diagnostic : « état des lieux » hétérogénéité
 - Post-induction : évaluation plasmocytes résiduels
 - Rechute : clones résistants + confirmation facteur pronostique
- Même suspension cellulaire
 - 4 applications « single-cell »
- Intégration des données = challenge bioinfo
Rodriguez-Meira et al. (2019) *Molecular Cell* :
Analyses mutationnelles et RNAseq en parallèle

Techniques

1. Transcriptomique (3'-RNA) :



2. Epigénétique (ATAC-seq) :



3. Aberrations chromosomiques (CNV) :



4. Profil mutationnel :



Profils clonaux/
patient

→ Hétérogénéités
inter ET intra-
individuelle

*ATAC = Assay for transposase accessible chromatin

*CNV = Variation de Nombre de copies

Coûts

Sans estimations réactifs et consommables autres

	Prix € HT/patient		Notes	Prix total € HT/patient
	Prépa librairie	Séquençage		
3' mRNA	1685,76	619,65	Multiplex 4/FC	2305,41
ATAC-Seq	1437,96	619,65	Multiplex 4/FC	2057,61
CNV	1307,57	2979,25	4/lane Novaseq	4286,82
panel mutations	1407,13	2979,25	4/lane Novaseq	4386,38
			Somme Diag	13 036,21 €
			Post-induction (P-I), CNV seul	2797,19
			Somme Diag + P-I :	15 833,40 €

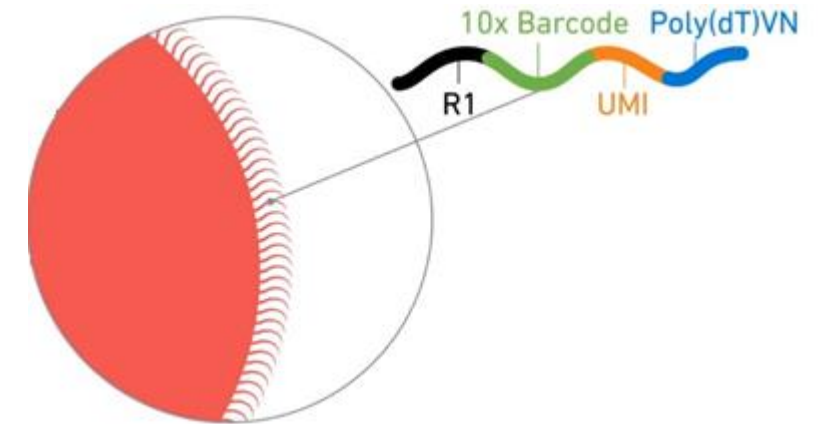
*CNV = Variation de Nombre de Copies

* FC = FlowCell

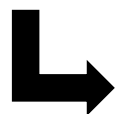
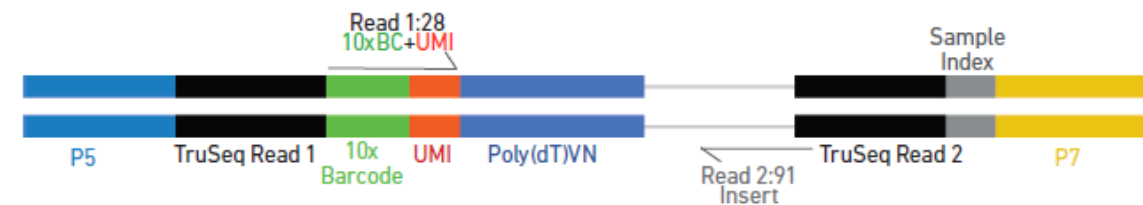
* P-I = Post-Induction

3'-RNA_10X

- 10000-12000 cellules fraîches ; ARN Capture : 34%
- Capture ARNm via billes de gel
- Transcription inverse et amplification
- Préparation librairie et indexage
- Séquençage 40 000 reads/cell → NextSeq



Chromium Single Cell 3' Gene Expression Library

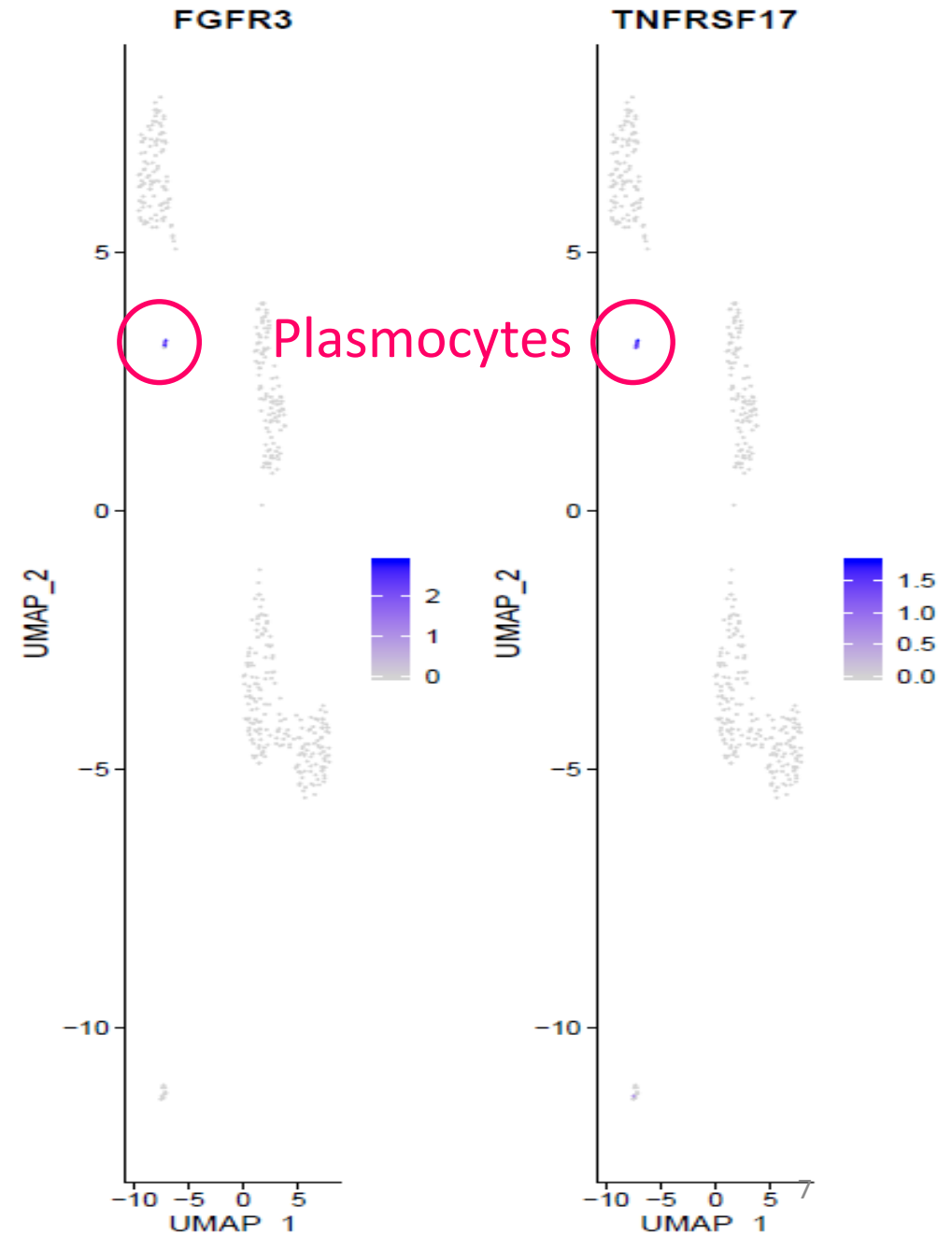


Profils transcriptomiques, voies de signalisations et métaboliques

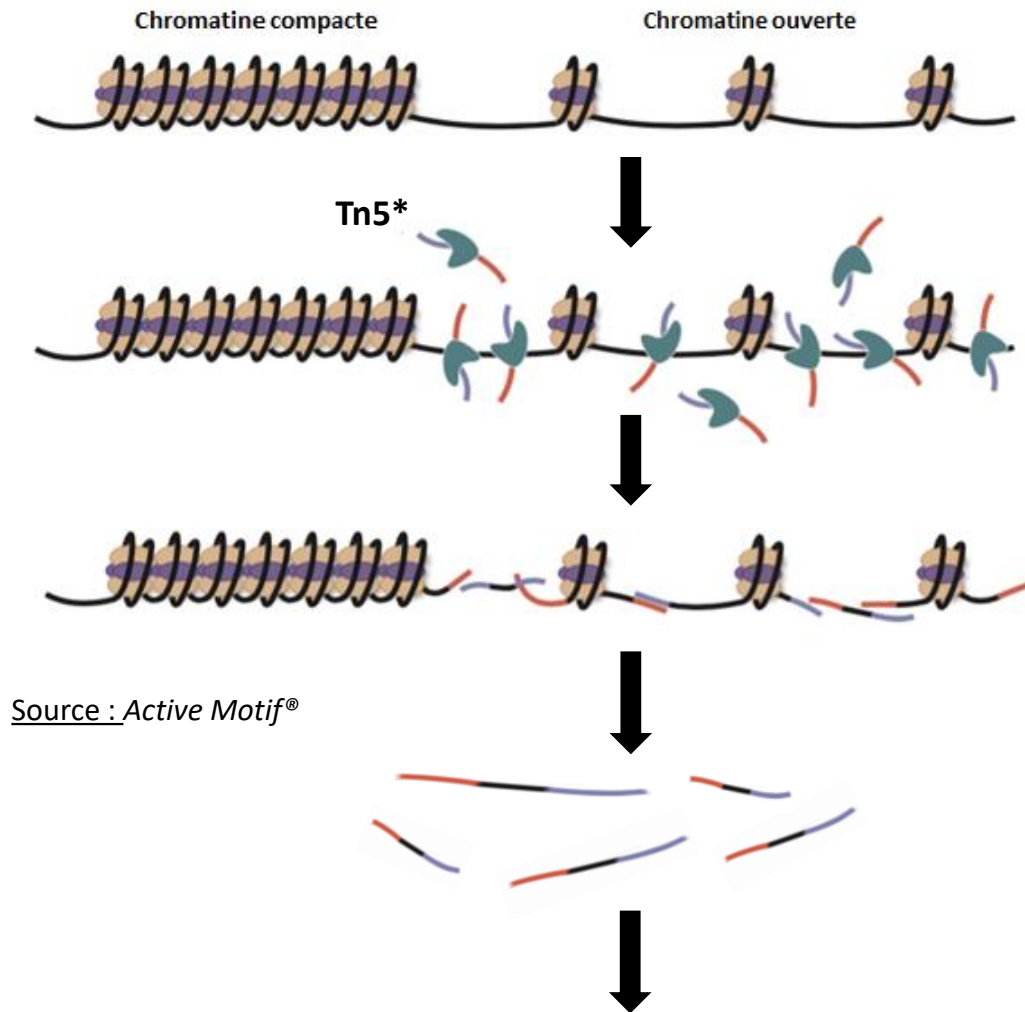
3'-RNA_10X

Expressions géniques #T19270, MO totale :

- Population plasmocytaire : 60 parmi 416 → Sensibilité ↗ avec gènes connus = 0,05%
- Séparation « forcée » et expressions diff :
 - FGFR3++
 - TNFRSF17 (=BCMA)++
- t(4;14) POS en bulk = lien CNV-3'



ATAC-seq_10X



Source : Active Motif®

- 1500-10000 noyaux frais ou décongelés ; Chromatine Capture 47%
- Transposase Tn5 modifiée → hyperactive
- Préparation librairie et séquençage 50000 reads/cell → NextSeq

↳ Accessibilité chromatinienne.
Explication expression génique associée (activée ou « réprimée »).

Purification de l'ADN fragmenté et tagué

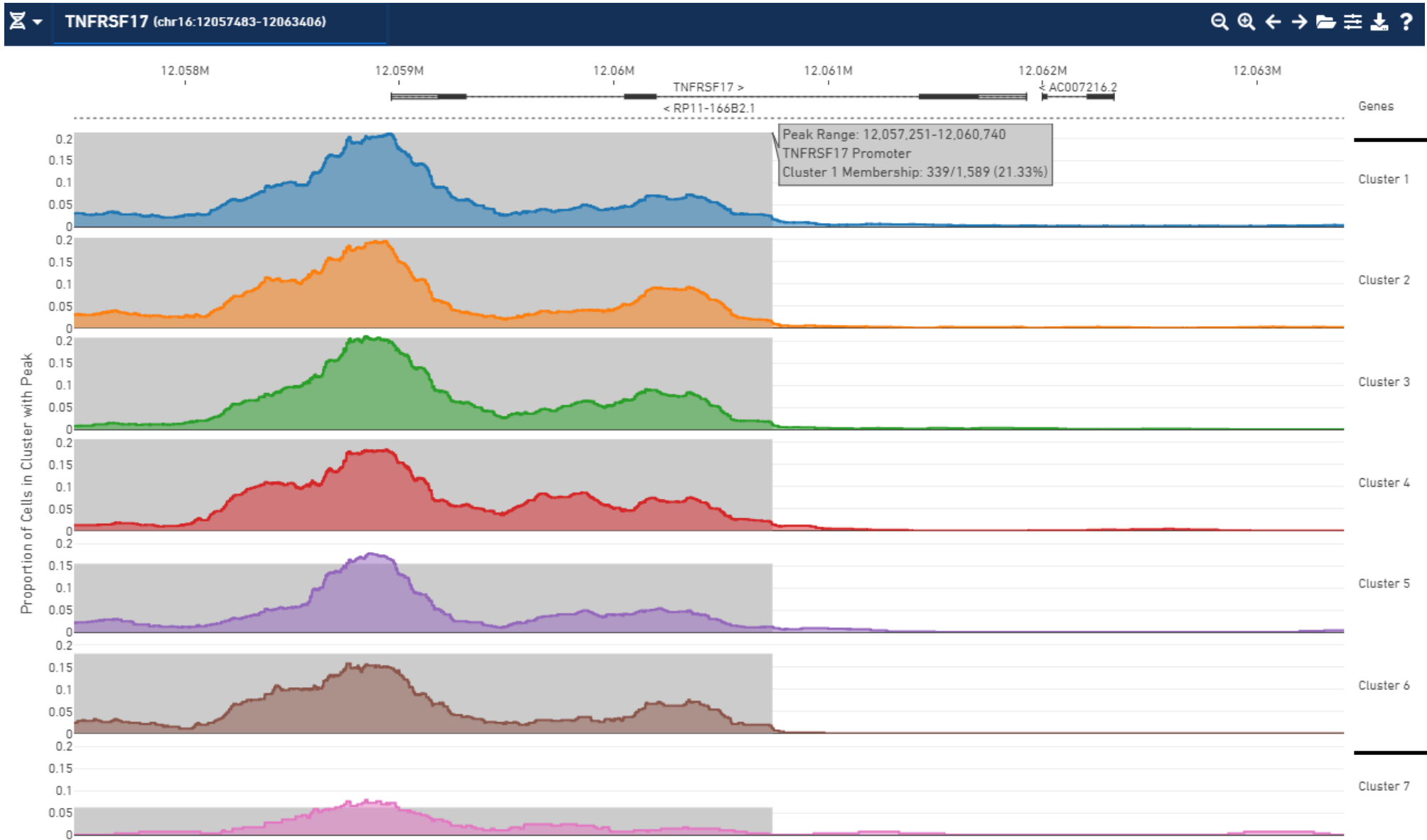


Amplification et purification



Séquençage de la librairie

Exemple d'accessibilité : promoteur de TNFRSF17 (BCMA), #T18948

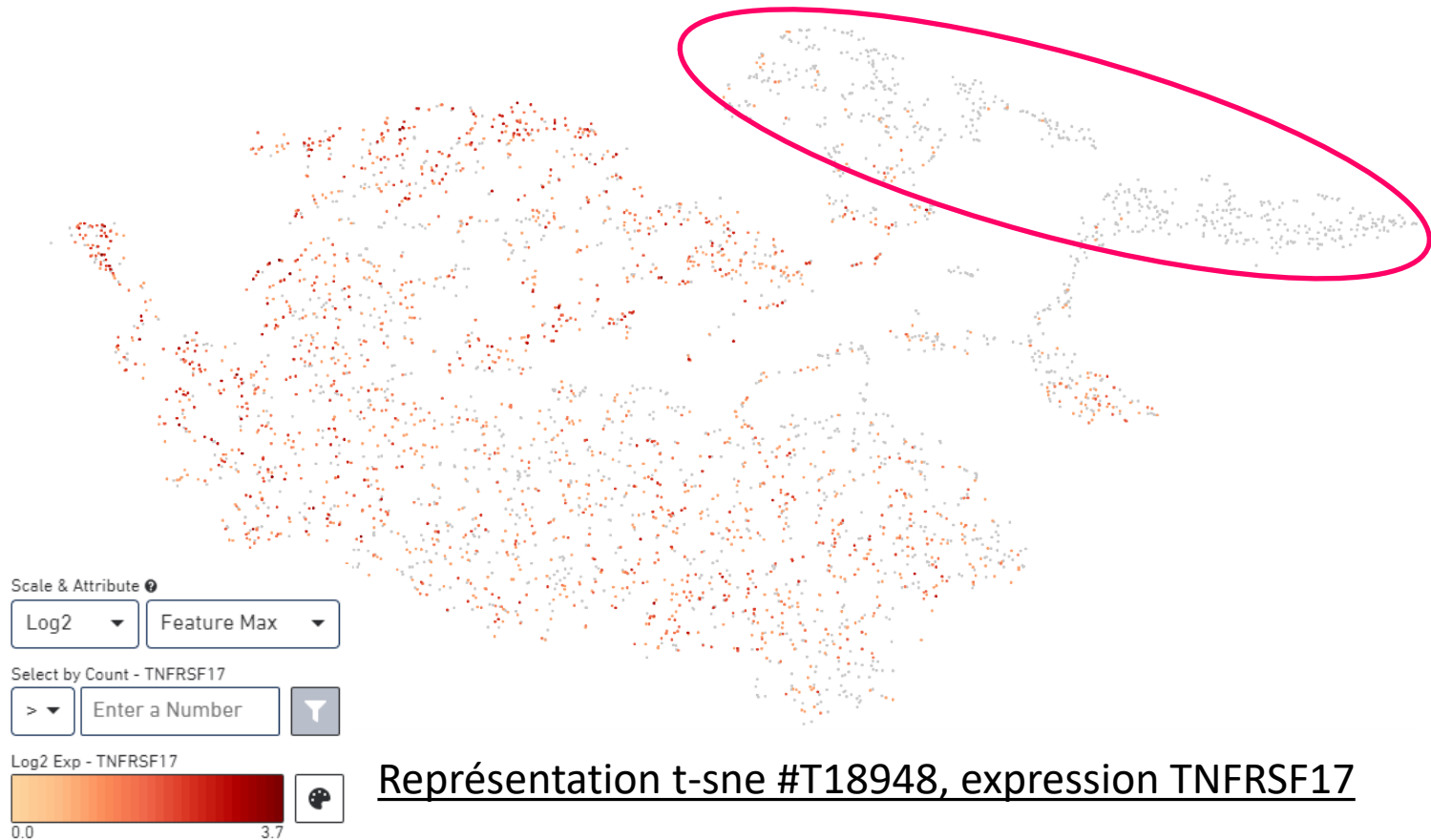


Accessible dans
21% des \mathcal{C} (+)

Accessible dans
7% des $\mathcal{C}_9(-)$

➔ Lien ATAC-seq et expression génique :

Expression TNFRSF17 nulle <--> cluster accessibilité promoteur 7% ?



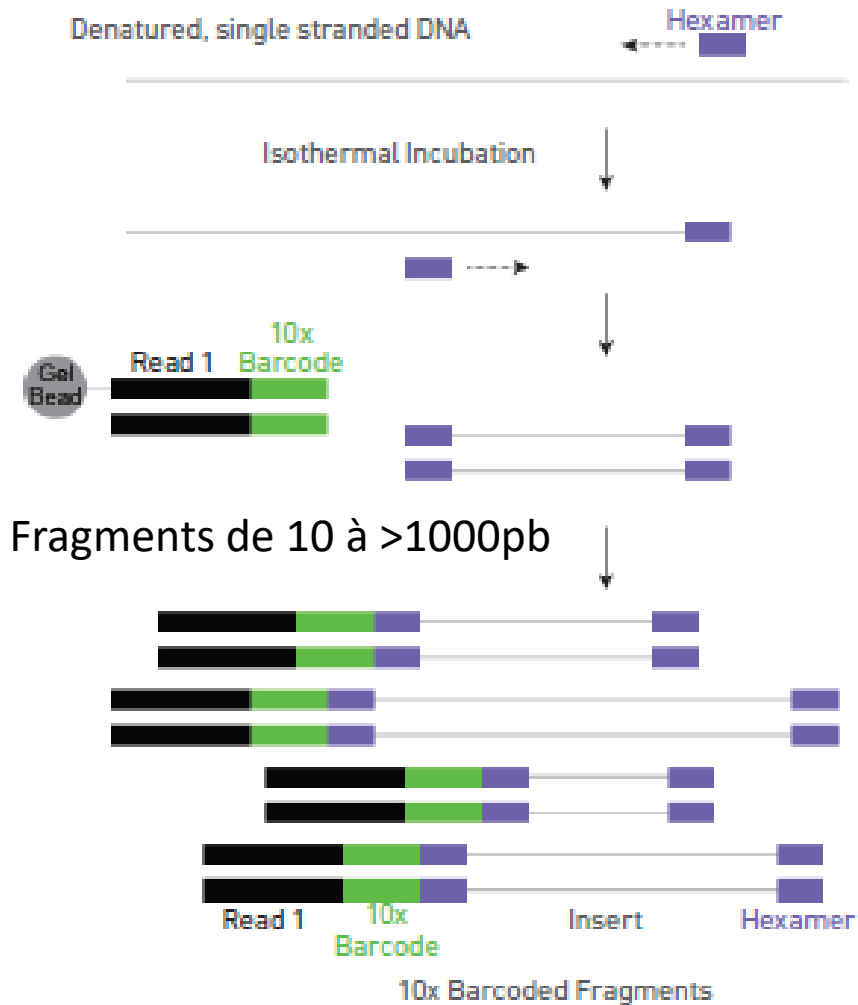
Représentation t-sne #T18948, expression TNFRSF17

➔ Apport VS bulk :

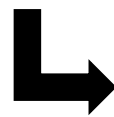
- Promoteur BCMA peu accessible dans 1 cluster → Impact expression BCMA et traduction protéique ?
- TTT anti-BCMA moins efficace (CAR-T cells*)
- Expansion clonale adaptative ?

*CAR-T cells = Cellules T à récepteur antigénique chimérique

CNV_10X



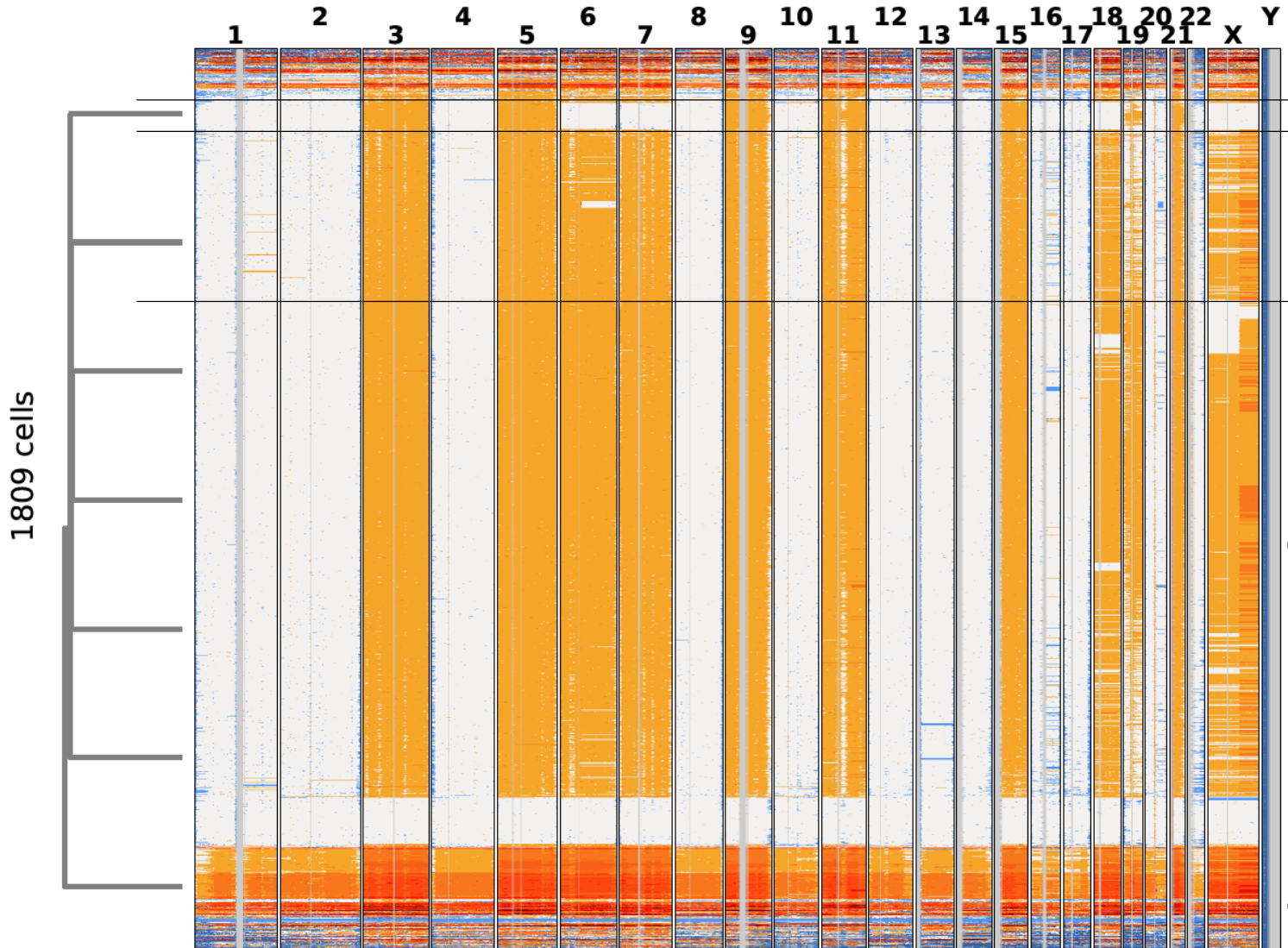
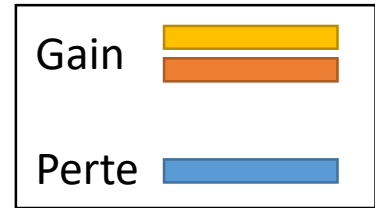
- 4000-6000 cellules ou noyaux
ADN génomique
Couverture : 0,02% du génome (600kb)
Résolution : 1Mb
Capture 13%
- Polymérisation, apport d'hexamères et barcoding
- Lyse cellulaire et préparation librairie pour séquençage
1,5M reads/cell → Novaseq 6000



Etude de l'hétérogénéité génétique
Populations « à risque » minoritaires ?
Facteur pronostique ?

CNV_10X

Exemples d'hétérogénéité clonale : #T21102, F



→ Bruit de fond
→ Clone ~51% :
Alternance gain et 2 copies

↘ Clone ~33% :
- Hyperdiploïde
- Gain (X)

➔ Apport VS bulk :
- Hyperdiploïdie ~homogène
- 1 sous-clone sans CNV → normal ? Evolution clonale en rémission

Panel mutations_MissionBio

- 100 000 cellules fraîches ou décongelées ;
ADN génomique
Couverture : 0,004% du génome
Capture 5%
- Encapsulation, lyse cellulaire et barcoding
- Préparation de librairie pour séquençage
100 reads/cell/amplicons → NovaSeq 6000

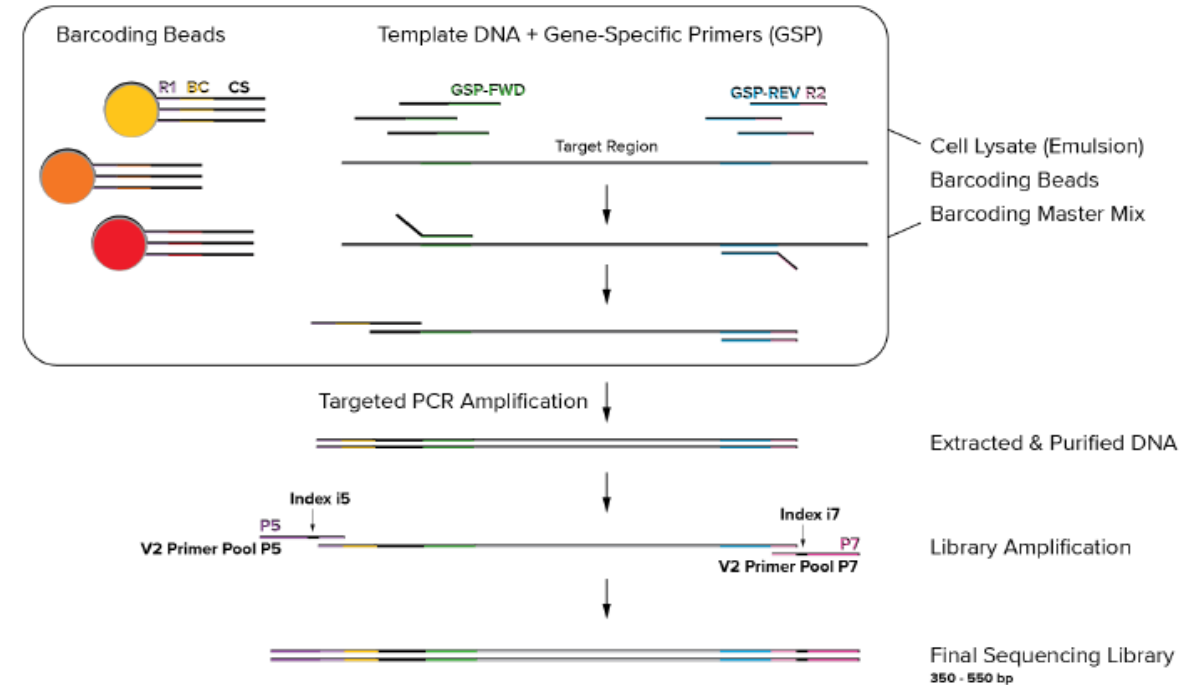
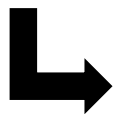


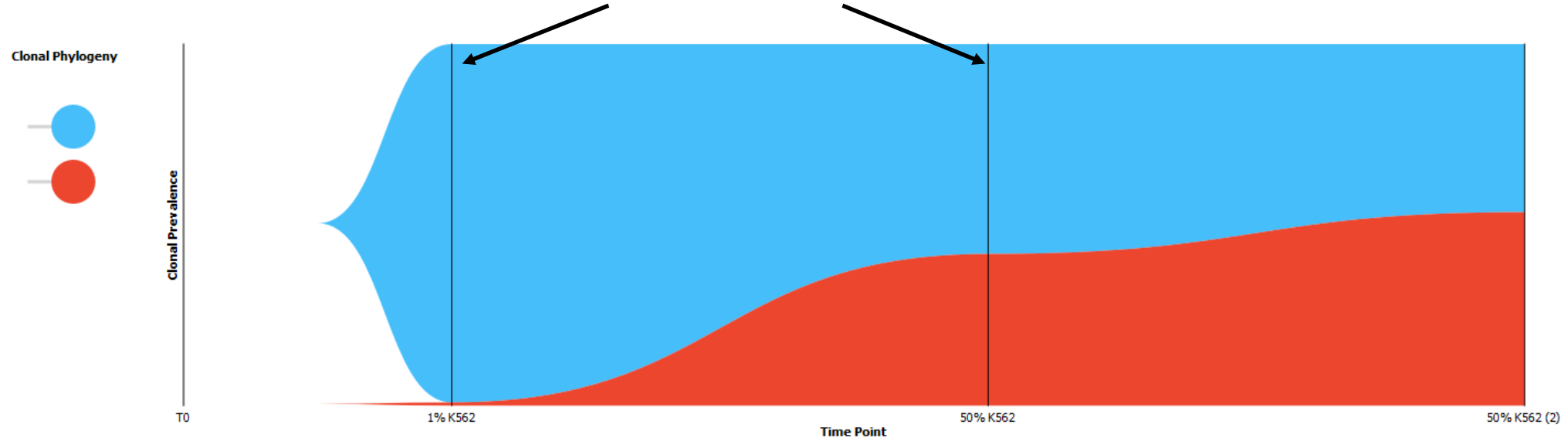
Figure 2. Overview of library construction. R1: Read 1, BC: barcode, CS: common sequence GSP-FWD: gene-specific forward primer, GSP-REV = gene-specific reverse primer, P5: P5 Illumina adapter, P7: P7 Illumina adapter.



Etude de l'hétérogénéité génétique
Evolution clonale

Panel mutations_MissionBio

Objectifs : Mutations « bon/mauvais pronostic » minoritaires
Evolution clonale Diagnostic/Rechute



Subclones

	RAJI	K562
EZH2:chr7:148504854:A/AGACTT	Het	Hom
TP53:chr17:7577581:A/G	Het	WT
TP53:chr17:7578211:C/T	Het	WT
Total	13613 (67.57%)	6535 (32.43%)
1% K562	6467 (99.11%)	58 (0.89%)
50% K562	4090 (58.04%)	2957 (41.96%)
50% K562 (2)	3056 (46.47%)	3520 (53.53%)

Ex : 2 lignées cellulaires « AML* » dans même pool → prévalence clonale de TP53 selon pourcentage de chacune des lignées (1% ou 50% de K562), pour mimer des time points différents

AML* = Leucémie Aigüe Myéloïde

Panel mutations_MissionBio

#T21203, répartition des cellules portant la mutation:

Subclones

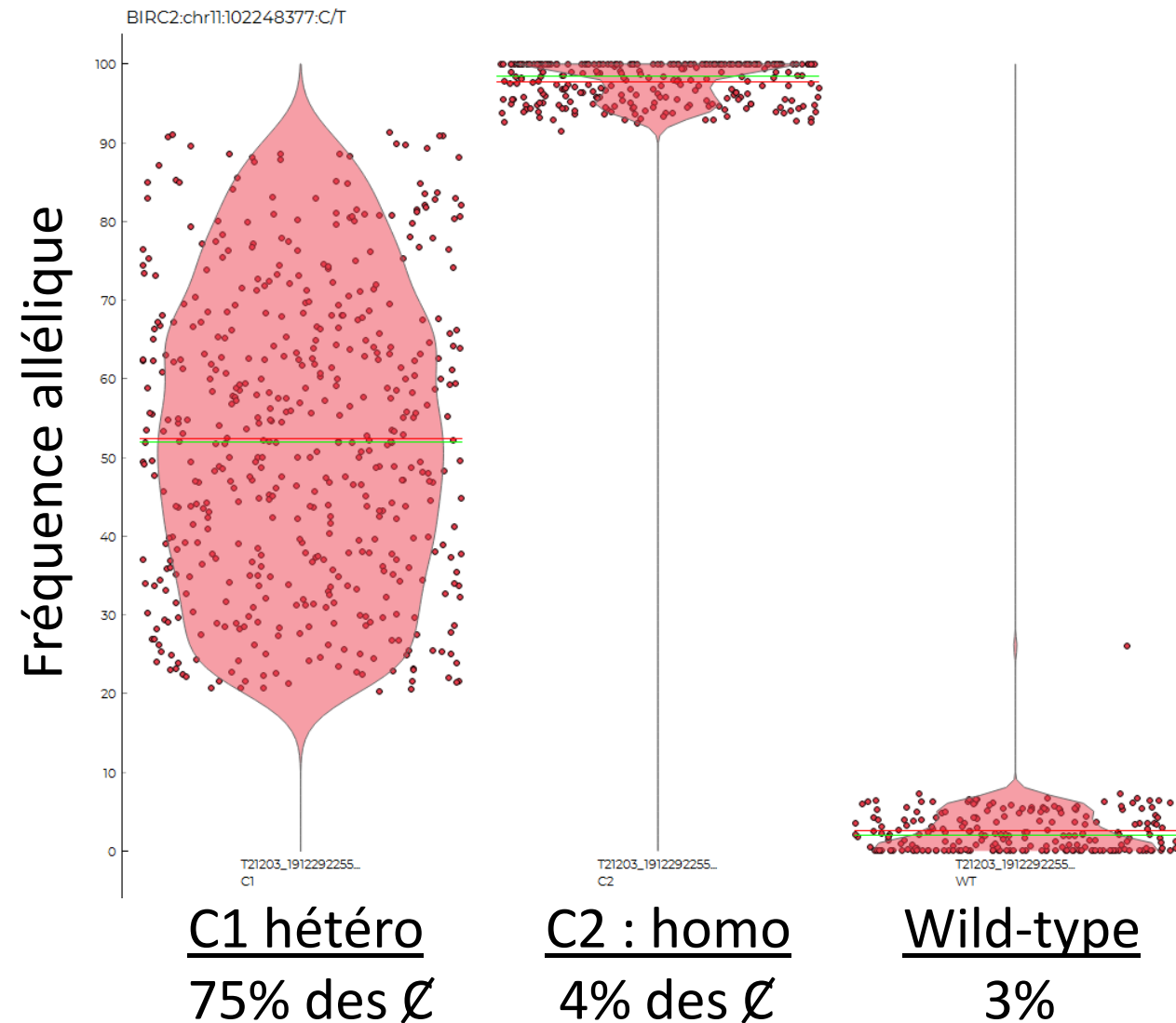
Variant	C1	C2	WT	Missing GT Subclones (1)
BIRC2:chr11:102248377:C/T	Het (53%)	Hom (98%)	WT (3%)	Missing in 17.86% of clones
Total	5105 (75.00%)	270 (3.97%)	216 (3.17%)	1216 (17.86%)
T21203_191229225539.cells	5105 (75.00%)	270 (3.97%)	216 (3.17%)	1216 (17.86%)

→ Impact sur réponse au TTT ?



Apport VS bulk :

- Proportion \varnothing portant la mutation
- Répartition homo-hétérozygote
- Génétique des populations



Analyses Bio-informatiques

1. Apprentissage et améliorations

- RNAseq et ATAC-seq « Bulk » → marqueurs d'intérêts
- Comparaison bulk systématique ?
- Automatisation pipelines ?

2. Intégration des données

<https://www.10xgenomics.com/videos/seminars/#> :

Integration of Multiple Types of Single-Cell Data With Seurat v3, **Rahul Satija**, PhD

Single cell et bioinformatique

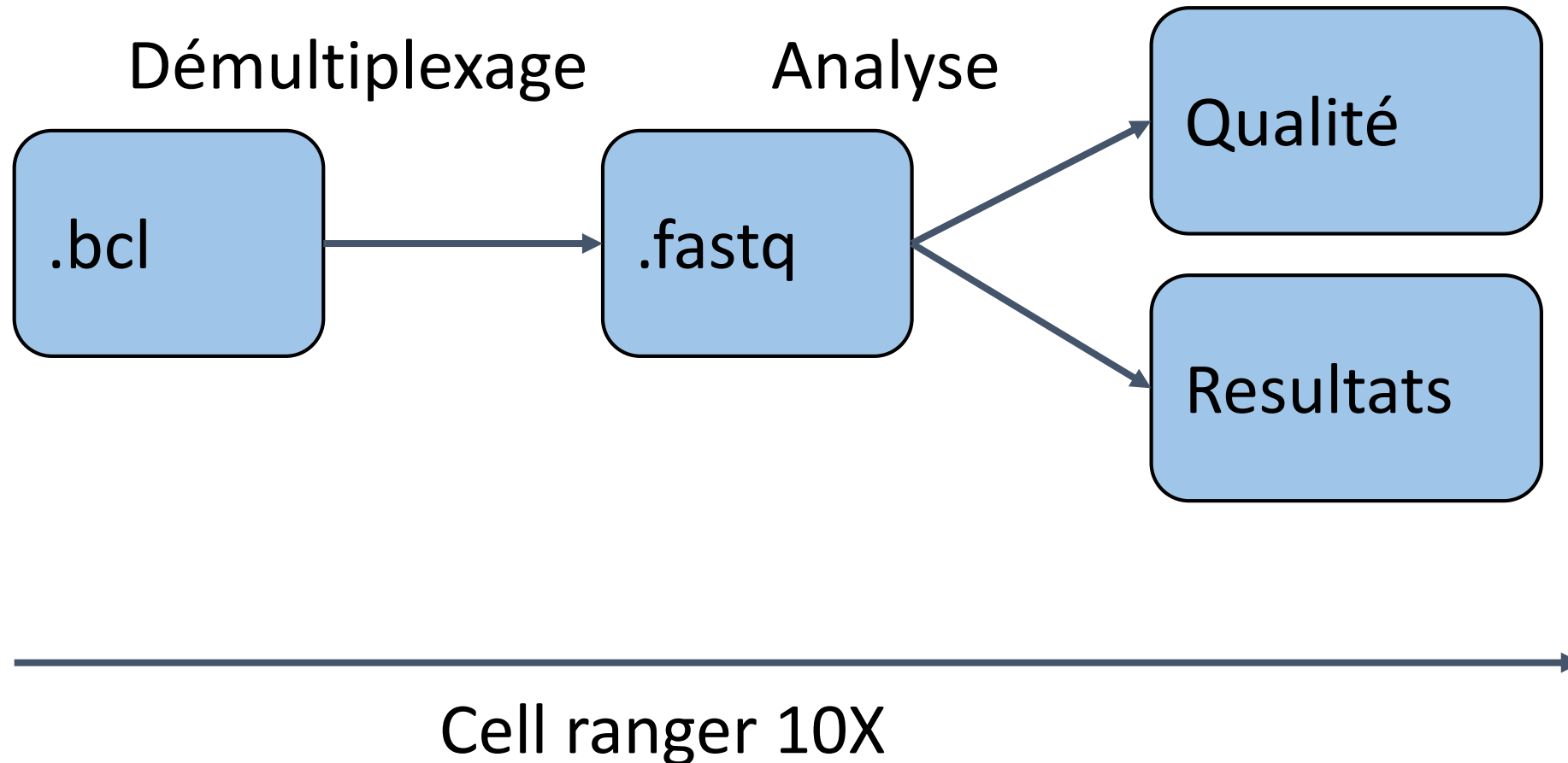
Romain Lannes, post-doctorant

Unité génomique du myélome (Pr Avet-Loiseau)

Single cell et bioinformatique

- Taille des jeux de données
- Relativement intensif en ressource de Calculs
- “Nouveau” champ de recherche en constante évolution
- Absence de signal => vrai ou biais technique ?

Single cell et bioinformatique



Single cell et bioinformatique

ATAC & 3' RNA

Reads count

CNV

Nombre de copies

Panel Mutation

Présence absence

Resultats

```
graph LR; A[Resultats] --> B[Reads count]; A --> C[Nombre de copies]; A --> D[Présence absence];
```

Single cell et bioinformatique

ATAC & 3' RNA

Reads count

CNV

Nombre de copies

Panel Mutation

Présence absence

Resultats



Caractériser la population clonale dans le Myélome Multiple

Caractériser la population clonale dans le Myélome Multiple

- Pronostique.
- Prédire l'évolution de la population clonale.
- Réponse au traitement.
- Piste pour de nouvelles approches thérapeutiques.

Caractériser la population clonale dans le Myélome Multiple

Une image moléculaire “complète” de la population clonale

Caractériser la population clonale dans le Myélome

Multiple

Une image moléculaire “complète” de la population clonale

Prélèvement

3' RNA-seq

ATAC-seq

CNV

Mutation

Caractériser la population clonale dans le Myélome

Multiple

Une image moléculaire “complète” de la population clonale

Prélèvement

3' RNA-seq

ATAC-seq

CNV

Mutation

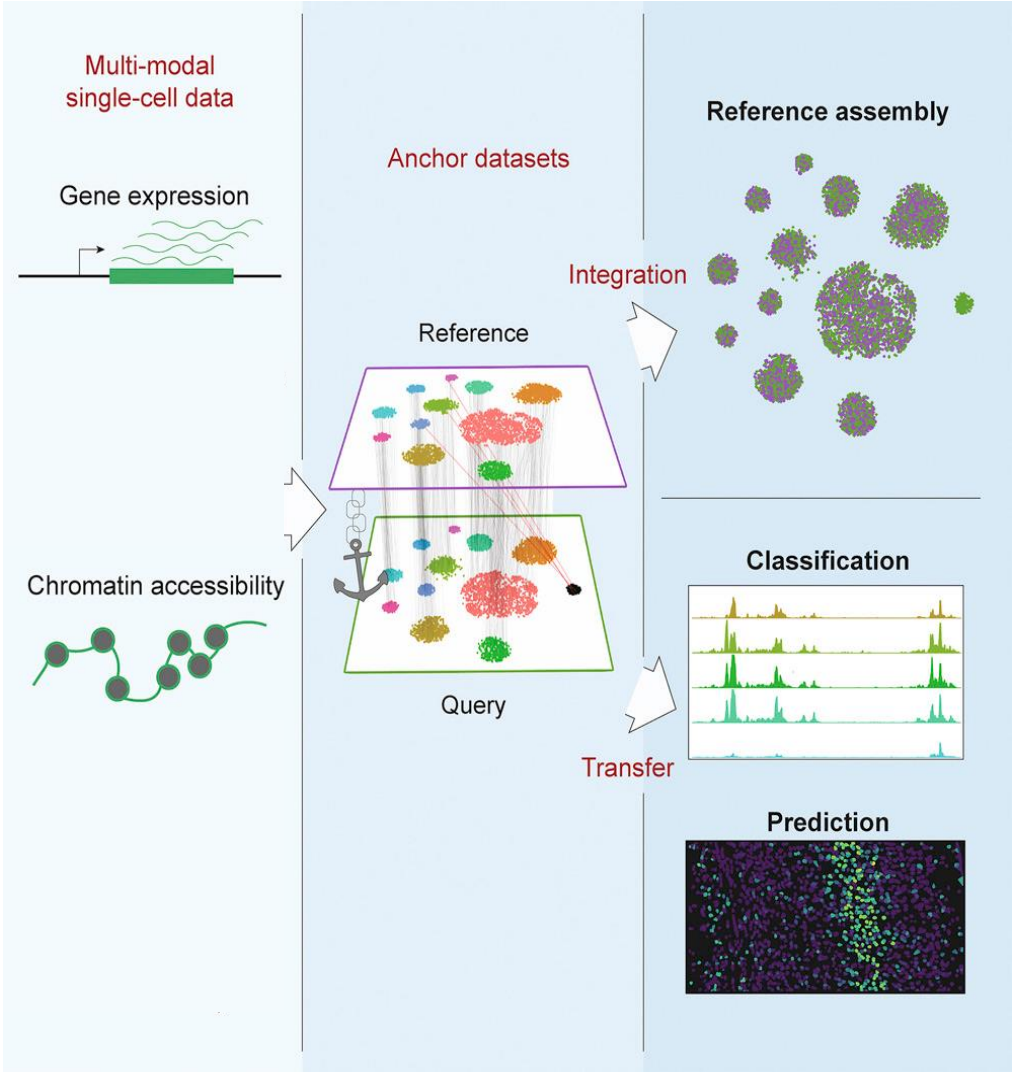


Intégration



1 image

Intégration de données de séquençage de cellule unique

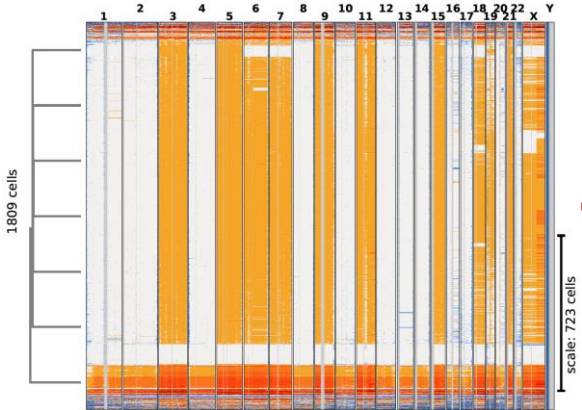


Comprehensive Integration of Single-Cell Data (T.Stuart 2019 Cell)

Intégration de données de séquençage de cellule unique

CNV

Nombre de copies



3' RNA-Seq

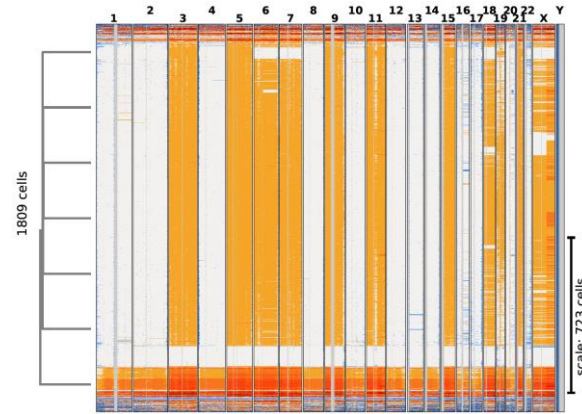
Reads count



Intégration de données de séquençage de cellule unique

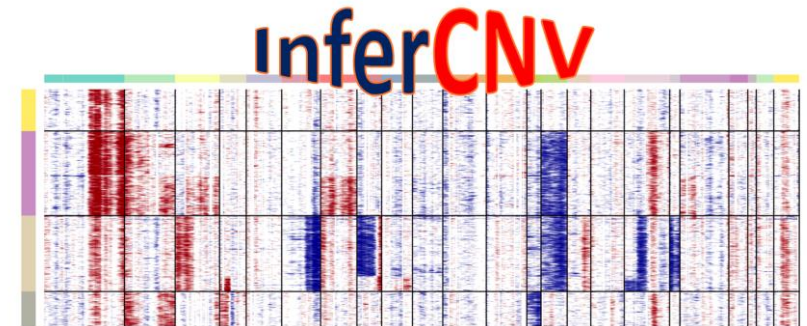
CNV

Nombre de copies



3' RNA-Seq

Reads count



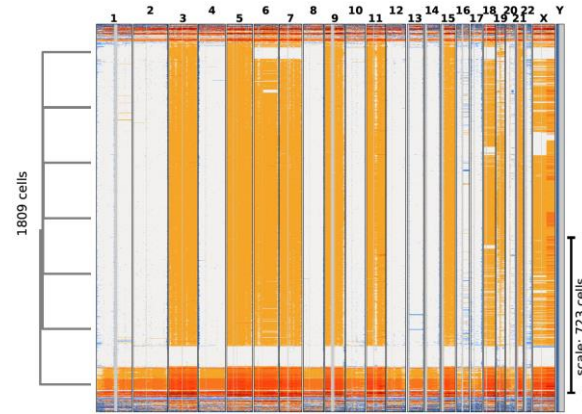
inferCNV of the Trinity CTAT Project.

<https://github.com/broadinstitute/inferCNV>

Intégration de données de séquençage de cellule unique

CNV

Nombre de copies



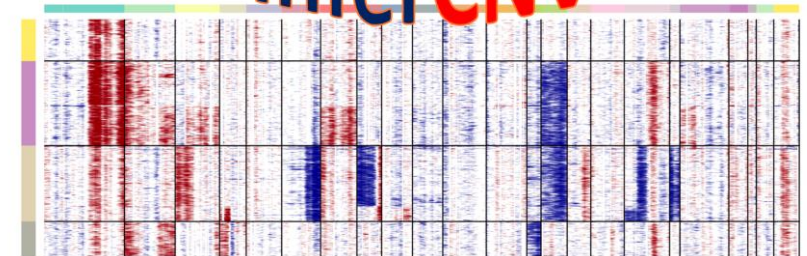
Ancre

3' RNA-Seq

Reads count



inferCNV



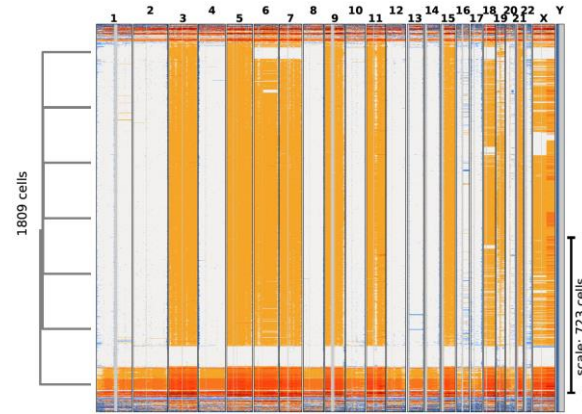
inferCNV of the Trinity CTAT Project.

<https://github.com/broadinstitute/inferCNV>

Intégration de données de séquençage de cellule unique

CNV

Nombre de copies



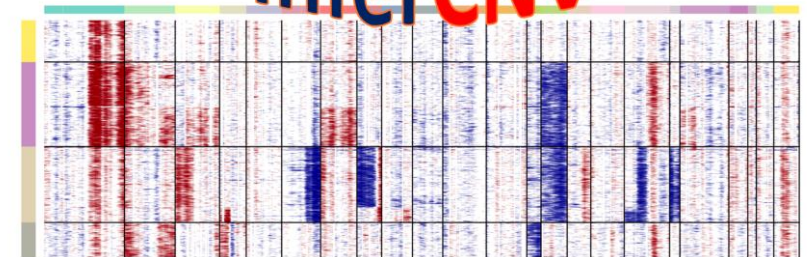
Ancre

3' RNA-Seq

Reads count



inferCNV



inferCNV of the Trinity CTAT Project.

<https://github.com/broadinstitute/inferCNV>

Intégration de données de séquençage de cellule unique

Mutation ?

Intégration de données de séquençage de cellule unique

- Intégration de 4 techniques pour un échantillon.
- Intégration d'une ou plusieurs techniques pour plusieurs échantillons.
- Intégration à différents points temporel -> Evolution de la population clonale.
- Clone présent après traitement ? À la rechute ?
- Pronostic associé à la présence d'un clone ou d'une population clonale ?