GenomEast Platform
thibault@igbmc.fr
keime@igbmc.fr
genomeast.igbmc.fr
+33 3 88 65 34 26

EXCELLENCE IN MOUSE PHENOGENOMICS
Histopathology and Embryology Facility
olivia@igbmc.fr
ics-mci.fr
+33 3 88 65 56 35

FICHE PRODUIT : TRANSCRIPTOMIQUE SPATIALE SUR COUPES DE TISSUS FFPE AVEC LA TECHNOLOGIE VISIUM CYTASSIST

La plateforme GenomEast, en collaboration avec le Service d'histopathologie et d'embryologie de la Clinique de la Souris (ICS) à l'IGBMC, propose une prestation d'analyse transcriptomique sur coupes de tissus humains ou murins fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE), avec la solution « Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE » de 10X Genomics. Cette dernière permet de quantifier spatialement l'expression d'environ 18 000 gènes, à l'aide de paires de sondes spécifiques à chaque gène ciblé.

Pour cette prestation, le porteur de projet fournit préférentiellement des coupes non colorées fraichement préparées à partir de blocs de tissus FFPE. Nous pouvons néanmoins également travailler directement à partir des blocs de tissus, ou à partir de lames archivées colorées à l'hématoxyline et éosine (H&E).

1 La technologie Visium FFPE CytAssist de 10X Genomics

Cette technologie repose sur l'utilisation de :

- une lame Visium comprenant deux zones de capture recouverte d'un réseau ordonné d'oligonucléotides et portant un code-barres spatial unique par spot ou carré (**Fig.1**) ;
- un panel de sondes polyadénylées interrogeant les gènes codants humains ou murins[1] (**Fig.2**) ;
- un équipement CytAssist qui assure le transfert des sondes hybridées sur les sections de la lame de départ vers la lame Visium (**Fig.2**).

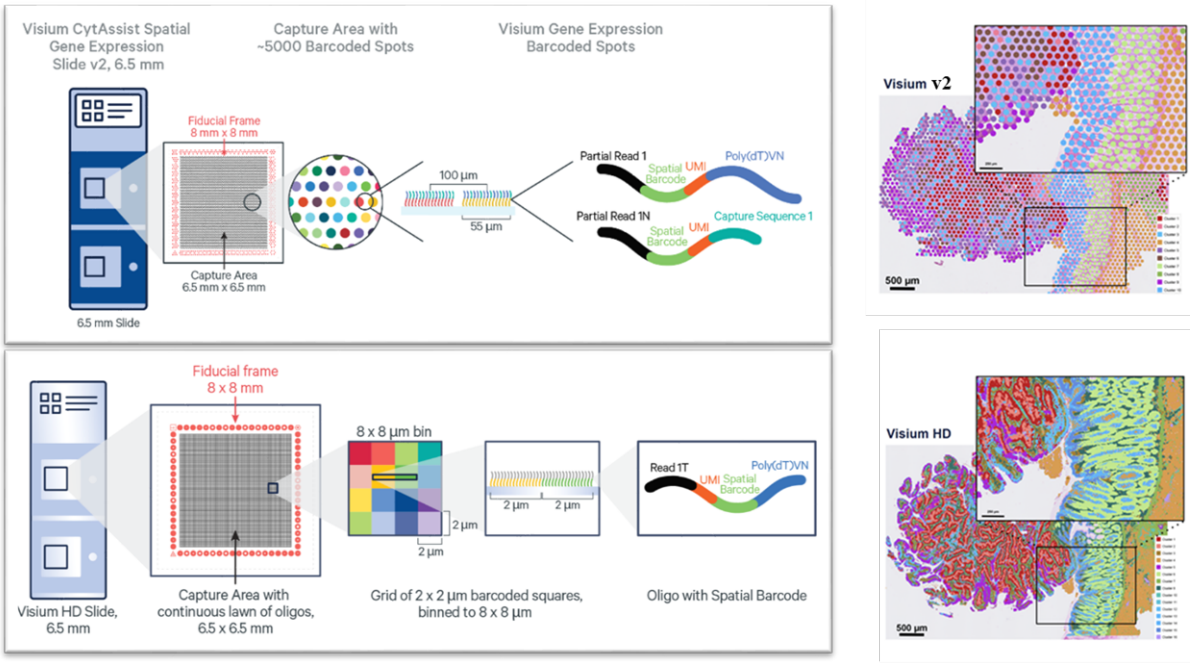

Fig.1 Structure des lames Visium v2 et Visium HD (6,5 x 6,5 mm).

[1] Une description des sondes est disponible sur cette page : https://www.10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/probe-sets/visium-ffpe-probe-sets-overview

La Société 10X propose aujourd'hui différentes versions de lames Visium avec des surfaces de capture et des résolutions variables. La plateforme GenomEast propose en routine des prestations sur les lames Visium CytAssist v2 et les lames Visium HD (Fig.1).
Les spots de la lame Visium v2 de 55 µm de diamètre sont recouverts de deux types d'oligonucléotides de capture, le premier pour capturer les sondes polyadénylées spécifiques des gènes cibles (poly(dT)VN), et le deuxième pour capturer des cibles ou analytes additionnels d'intérêt (capture sequence 1 ; voir **paragraphe 6**).
Les carrés de la lame Visium HD d'une taille de 2x2 µm sont quant à eux recouverts d'un seul type d'oligonucléotides pour la capture des sondes (poly(dT)VN).

Les oligonucléotides de capture sont constitués de :

- une amorce PCR (Truseq Read 1 ou 1N) ;
- un code-barres spatial commun à tous les oligonucléotides d'un même spot ou carré ;
- un identifiant moléculaire unique (UMI) : une séquence aléatoire unique à chaque oligonucléotide d'un spot ou carré ;
- une séquence de capture (poly(dT)VN ou capture sequence 1).

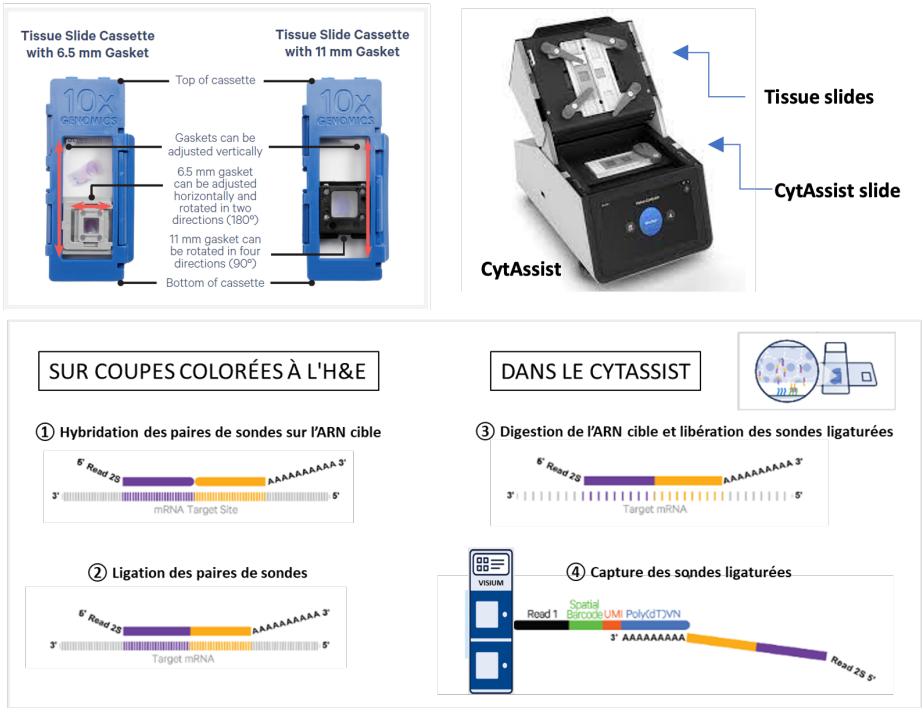

Fig.2 Hybridation et capture des sondes polyadénylées.

Les panels de sondes sont constitués de paires d'oligonucléotides qui s'hybrident de manière contiguë sur les ARNm cibles du tissu de départ. La sonde représentée en violet sur la figure 2 introduit une séquence partielle Read 2S qui servira d'amorce pour l'amplification PCR des sondes ligaturées, tandis que la sonde représentée en jaune sur la figure 2 introduit un polyA synthétique pour la capture des sondes sur les lames Visium.

Après hybridation des sondes sur les coupes colorées, les lames de tissus sont mises en contact avec la lame Visium au sein du CytAssist. La matrice d'ARN est digérée et les tissus perméabilisés pour libérer les sondes

qui seront alors capturées sur la lame Visium. Après extension des sondes et addition du code-barres spatial, ces dernières sont libérées de la lame CytAssist pour construire la librairie de séquençage.

Les librairies Visium finales (**Fig.3**) contiennent les adaptateurs Illumina P5 et P7 pour un séquençage en lecture par paire (28 + 50 bases pour la version Visium v2 et 43 + 50 bases pour la version Visium HD). Le read 1 contient le code-barres spatial ainsi que l'UMI permettant de quantifier l'expression des gènes cibles. Le read 2 contient la séquence des sondes permettant d'identifier le transcrit.

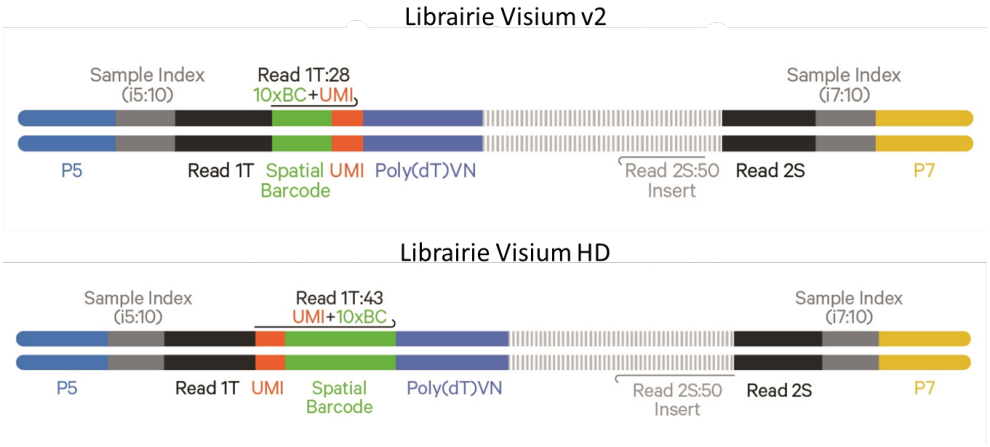

Fig.3 Structure des librairies d'expression génique Visium CytAssist.

L'ensemble des notes techniques et protocoles 10X Genomics, de la préparation des tissus jusqu'au séquençage des librairies Visium CytAssist sont référencés dans les documents suivants :

- Visium v2 CytAssist Spatial Gene Expression: https://www.10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression
- Visium HD Spatial Gene Expression Protocol Planner (CG000698) : https://cdn.10xgenomics.com/raw/upload/v1726071998/support-documents/CG000698_VisiumHDSpatialGeneExpressionProtocolPlanner_RevB.xlsx

2 Services proposés

1. Aide au montage du projet avec un biologiste, un histologiste et un bioinformaticien :
   - Aide à la planification expérimentale ;
   - Rappel des exigences de départ et planification des étapes expérimentales impliquant le porteur de projet.
2. Sectionnement des coupes à partir des blocs de tissu FFPE (optionnel) :
   - Découpage et marquage du bloc ;
   - Réalisation de pré-coupes de 5 µm d'épaisseur pour l'évaluation de la qualité des ARN totaux ;
   - Pré-sectionnement du bloc jusqu'à identification de la zone d'intérêt ;
   - Collecte des coupes d'intérêt de 5 µm d'épaisseur sur des lames standard ;
   - **Préférentiellement, les sections de tissus proviennent de lames blanches fraichement préparées par le porteur de projet et transmises au service d'histologie pour coloration.**
3. Qualification des échantillons de départ :
   - Mesure de l'intégrité des ARN totaux extraits à partir de pré-coupes sur le bloc de tissu FFPE ou de la section d'intérêt sur lame archivée (Bioanalyser, Agilent).

4. Coloration H&E et imagerie des lames :
   - Séchage et déparaffinage des coupes de tissu ;
   - Coloration H&E et montage des lamelles ;
   - **Alternativement, les sections de tissus peuvent provenir de lames archivées et colorées H&E et transmises au service d'histologie pour imagerie ;**
   - Imagerie des sections de tissus à l'aide d'un scanner numérique de lame.
5. Dé-réticulation des coupes colorées à l'H&E.
6. Hybridation et ligation des sondes sur coupes sur lame standard.
7. Transfert des sondes ligaturées des coupes de la lame standard vers la lame Visium CytAssist et addition du code-barres spatial.
8. Génération des librairies de séquençage.
9. Quantification et vérification de la qualité des librairies finales par électrophorèse capillaire (Bioanalyzer).
10. Séquençage avec le système NextSeq 2000 d'Illumina.
11. Démultiplexage par échantillon, création des fichiers FASTQ, contrôle de la qualité des séquences et création d'un rapport synthétisant les méthodes utilisées pour ces étapes et les résultats obtenus, en utilisant le pipeline d'analyse primaire de la plateforme.
12. Sur demande : analyse des séquences en utilisant Space Ranger count[2].

3 Échantillons et données à fournir par le porteur de projet

Avant chaque envoi d'échantillons, le porteur de projet soumet sa demande en créant une requête sur notre interface web à l'adresse suivante : http://ngs-lims.igbmc.fr. Il pourra ensuite suivre l'évolution de son projet en utilisant cette même interface. Sur cette interface, son projet est également visible par les membres de la plateforme GenomEast et du Service d'histopathologie et d'embryologie de la Clinique de la Souris, ainsi que par les personnes indiquées par le porteur de projet en tant que collaborateurs.

Lorsqu'il soumet sa demande, le porteur de projet doit spécifier l'espèce étudiée (souris ou homme), la nature des échantillons de départ (blocs de tissu FFPE, lames blanches ou colorées H&E) et le nombre total de coupes à déposer sur la lame Visium CytAssist. **Chaque lame Visium accueille deux sections provenant impérativement de deux lames distinctes.** Le nombre final d'échantillons et donc de librairies préparées est déterminé par le nombre total de sections. **La plateforme procédera au lancement des manipulations uniquement si les 2 zones de capture des lames Visium CytAssist sont utilisées.**

Le porteur de projet doit se référer à la **Table 1** ci-dessous pour le type de lame standard compatible avec le protocole Visium CytAssist et à la **Fig. 4** pour le positionnement correct des sections sur ces lames. La taille minimale des lames doit être de 24,8 x 74,4 mm, leur taille maximale de 25,3 x 76,2 mm.

Nom du produit	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Epaisseur (mm)
Epredia Shandon ColorFrost Plus Slides	75,0	25,0	1,0
Fisherbrand SuperFrost Plus Microscope Slides	75,0	25,0	1,0
Sigma-Aldrich Poly Prep Slides	75,0	25,0	1,0
VWR SuperFrost Plus Micro Slide, Premium	75,0	25,0	1,0

[2] https://support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression/software/pipelines/latest/using/count
Les fichiers de résultats sont décrits sur la page : https://support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression/software/pipelines/latest/output/overview

Table 1 : Lames standard compatibles avec le protocole Visium CytAssist.

L'épaisseur optimale des sections est de 5 µm. Cependant, 10X Genomics a validé l'essai sur des sections allant de 3 à 10 µm d'épaisseur. Si la surface de la section dépasse la surface de la zone de capture (6,5 x 6,5 mm ou 11 x 11 mm), le porteur de projet devra spécifier la zone d'intérêt à la plateforme soit par marquage au feutre sous la lame de départ, soit à partir des images réalisées par le service d'histologie et d'embryologie. **Dans la mesure du possible, le porteur de projet fournira deux sections par tissu d'intérêt, préférentiellement sur des lames différentes.**

Afin de déterminer si les blocs de tissu FFPE dont sont issues les coupes à analyser sont compatibles avec le protocole Visium CytAssist, il est nécessaire d'évaluer la qualité des ARNs extraits à partir de ces blocs. Le porteur de projet extrait les ARN totaux à partir de 2 à 3 pré-coupes de 5 µm à l'aide d'un kit qui utilise des conditions de lyse spécialement optimisées pour une purification efficace de l'ARN total à partir de coupes de tissu FFPE (par exemple : RNeasy FFPE Kit de Qiagen). L'extraction est à la charge du porteur de projet qui devra fournir un aliquot d'ARN totaux en même temps que ses lames (Quantité minimale : 0,5 ng, volume minimal : 5 µl).

La qualité des ARNs sur les lames archivées peut être évaluée à partir d'une deuxième lame archivée provenant du même bloc de tissus FFPE. Si aucune lame n'est disponible, la plateforme grattera une zone sans importance de la section d'intérêt pour évaluer la qualité de l'ARN de départ.

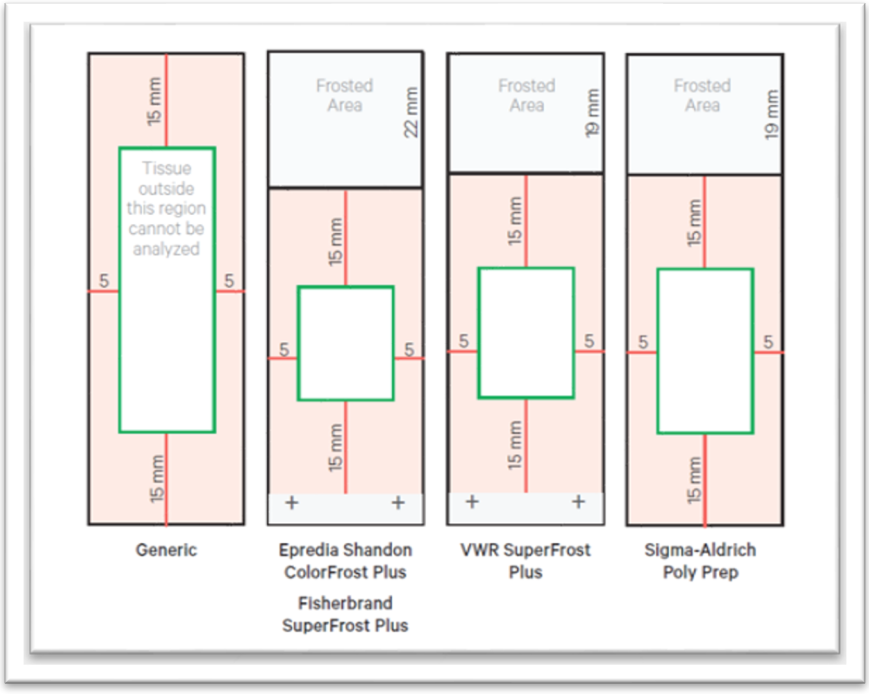

Fig.4 Positionnement des sections de tissu sur lame standard.

4 Contrôles qualité réalisés par la plateforme

Des contrôles qualité sont réalisés lors de la préparation des lames, la génération des banques et après séquençage. Les résultats sont accessibles sur le LIMS de la plateforme (http://ngs-lims.igbmc.fr) à l'issue de chacune des étapes. Le tableau ci-dessous liste ces contrôles ainsi que les seuils attendus :

1) Qualification des blocs de tissu FFPE	
Intégrité des ARN totaux extraits à partir des pré-coupes de 5 µm ou des lames archivées (électrophorèse capillaire).	Pourcentage des fragments d'ARN > 200 nucléotides (DV200) : - Seuil Minimum : > 30% ; - Seuil Optimal : > 70%.
2) Qualification des coupes sur lame standard	
Positionnement et adhésion des coupes sur les lames (inspection visuelle après déparaffinage et coloration H&E).	Positionnement des coupes selon les recommandations de 10X Genomics (**Fig.4**). Absence de bulle, de décollement ou de repliement du tissu. Absence de chevauchement de sections. Coloration H&E couvrant l'ensemble de la coupe.
3) Préparation des librairies	
Profil des librairies (électrophorèse capillaire).	Pic de ~240 pb.
Concentration des librairies (électrophorèse capillaire).	≥ 3 nM.
4) Séquençage et analyse primaire des données	
Nombre total de clusters* par projet (incluant le PhiX).	≥ Nombre total de clusters indiqué dans le paragraphe « Requested services » de la fiche de soumission (fichier pdf téléchargeable dans l'onglet « Document » du LIMS http://ngs-lims.igbmc.fr, pour chaque projet).
Scores de qualité (Phred score) > 30.	≥ 85% des bases.

* Nombre de reads ÷ 2 en séquençage par paires (« paired-end »).

5 Livraison de données

Un e-mail sera envoyé au porteur de projet pour l'informer qu'il peut télécharger ses données sur le serveur sftp/https de la plateforme[3], en utilisant le login et le mot de passe dédiés à son projet, indiqués sur l'interface web de la plateforme (https://ngs-lims.igbmc.fr). Si le porteur de projet a ajouté des collaborateurs pour son projet, ce mail sera également envoyé à ces collaborateurs, qui auront également accès à ces login et mot de passe pour ce projet.

Les fichiers suivants seront mis à disposition :

- Les fichiers de séquences au format FASTQ ;
- Un rapport présentant les méthodes utilisées par le pipeline d'analyse primaire de la plateforme et les résultats obtenus ;
- Un fichier texte fournissant l'empreinte numérique MD5 associée à chaque fichier FASTQ à télécharger. Le porteur de projet devra utiliser ces empreintes pour vérifier l'intégrité des fichiers après leur téléchargement[4].

Conformément aux « Conditions Générales de la Plateforme GenomEast », il est rappelé qu'après la livraison de ses données, le porteur du projet est responsable de leur sauvegarde et de leur archivage. L'accès au serveur sftp/https n'est valable que durant six mois à partir de la date de livraison des données.

[3] Une documentation est disponible sur la page suivante :
http://genomeast.igbmc.fr/wiki/doku.php?id=help:downloading
[4] Une documentation est disponible sur la page suivante :
http://genomeast.igbmc.fr/wiki/doku.php?id=help:md5

GenomEast Platform
thibault@igbmc.fr
keime@igbmc.fr
genomeast.igbmc.fr
+33 3 88 65 34 26

EXCELLENCE IN MOUSE PHENOGENOMICS
Histopathology and Embryology Facility
olivia@igbmc.fr
ics-mci.fr
+33 3 88 65 56 35

Les reliquats d'échantillons et de librairies seront détruits 6 mois après livraison des données brutes si non réclamés par le porteur de projet.

6 Prestations alternatives disponibles

6.1 Analyse spatiale du transcriptome et de protéines sur coupes de tissu FFPE

La Société 10X Genomics met à disposition des kits et protocoles pour l'analyse simultanée de l'expression des gènes et de la détection d'un panel de 35 protéines sur des sections de tissus FFPE humains grâce à l'utilisation conjointe de paires de sondes pour la détection des ARNs et d'anticorps tagués avec un oligonucléotide portant un code-barres pour la détection des protéines (https://www.10xgenomics.com/support/spatial-gene-and-protein-expression). Cet essai est compatible avec la version 2 des lames Visium CytAssist humaines qui contiennent deux types d'oligonucléotides de capture par spot, l'un spécifique des sondes ARN et l'autre du tag des anticorps (capture sequence 1, **Fig.1**). Le panel de protéines interrogées par le « Visium Human Immune Cell Profiling Panel » est détaillé dans le tableau ci-dessous (**Table 2**). Pour plus de détails, veuillez prendre contact avec la plateforme.

Target	Cell Type or Marker	Clone ID	Vendor
alphaSMA	Structural marker	EPR5368	Abcam
CD3E	T cells	SP162	
CD4	T cells	EPR6855	
CD11b	Myeloid cells	EP1345Y	
CD11c	Dendritic cells	EP1347Y	
CD14	Myeloid cells	EPR3652	
CD16	Granulocytes/NK cells	EPR16784	
CD20	B cells	EP459Y	
CD27	Functional B cells	EPR8569	
CD31	Endothelial cells	EPR3094	
CD40	T and B lymphocytes	EPR20735	
CCR7/CD197	Functional B cells	EPR23192-57	
CXCR5	T cells	EPR23463-30	
EPCAM	Epithelial cells	EPR20532-222	
PD1	Checkpoint marker	NAT105	
PDL1	Checkpoint marker	73-10	

Target	Cell Type or Marker	Clone ID	Vendor
BCL2	Apoptotic marker	100	BioLegend
CD8A	T cells	C8/144B	
CD19	B cells	R109	
CD21	Dendritic and B cells	Bu32	
CD45RA	Functional T cells	HI100	
CD45RO	Functional T cells	UCHL1	
CD66b	Neutrophils	6/40c	
CD68	Macrophages	BL13756	
CD163	Macrophage marker	QA19A16	
CD138	Plasma cells	DL-101	
HLA-DR	Myeloid cells	LN3	
PanCK	Structural marker	AE-1/AE-3	
PAX5	B cells	1H9	
PCNA	Cell proliferation marker	PC10	
Vimentin	Mesenchymal cells	O91D3	
IgG2a	Isotype controls	MG2a-53	BioLegend
IgG1 k		MOPC-21	
IgG2b k		MPC-11	
IgG2a		RTK2758	

Table 2 : Visium Human Immune Cell Profiling Panel.

6.2 Transcriptomique spatiale sur coupes congelées de tissus frais ou fixés

La technologie Visium CytAssist est applicable non seulement sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine mais également sur des coupes congelées de tissus frais (FF) ou fixés en paraformaldéhyde (FxF) et enrobés dans l'OCT (Optimal Cutting Compound). Des protocoles dédiés sont disponibles sur le site de 10X Genomics pour le traitement des coupes congelées (voir documents 10X Genomics **page 3**). Pour plus de détails, veuillez prendre contact avec la plateforme.