

Développement d'une méthode de tri cellulaire dynamique couplée au séquençage de cellule unique pour étudier l'hétérogénéité neuronale dans un modèle murin du syndrome du X-Fragile.

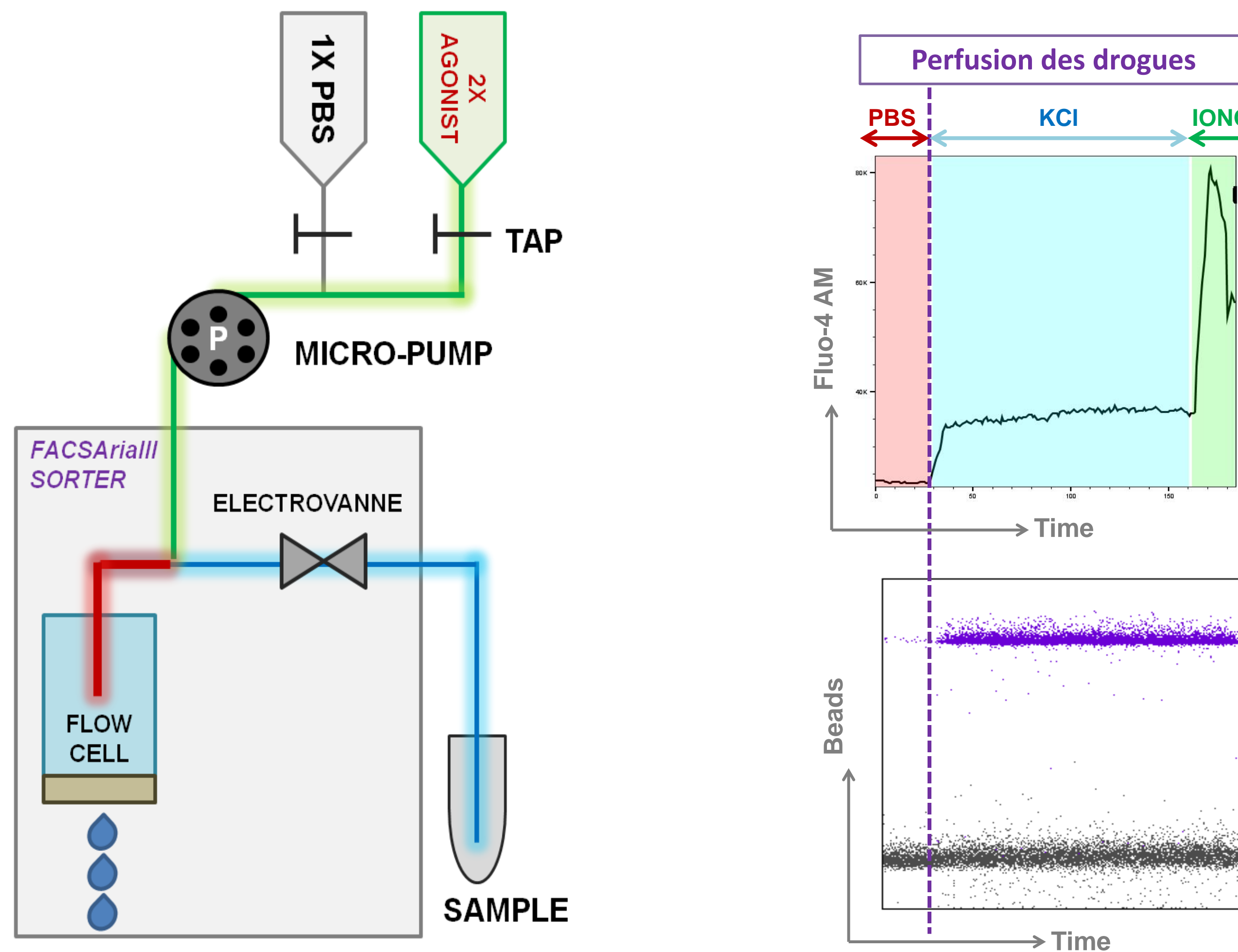


Julie Cazareth, Thomas Maurin, Sara Castagnola, Kevin LeBrigand, Frédéric Brau, Barbara Bardoni
Université Côte D'Azur, CNRS IPMC UMR7275, Valbonne, France

Quiconque a déjà regardé une cellule ou un tissu se demande ce qui fait qu'une cellule se comporte différemment de ses voisines. De nos jours, la transcriptomique sur cellule unique permet d'élargir considérablement nos connaissances sur la diversité des types cellulaires, diversité d'autant plus évidente dans le cerveau. Toutefois, à ce jour, ces technologies n'ont été appliquées qu'à des cellules à l'état d'équilibre et il reste encore beaucoup à apprendre sur la façon dont une cellule interagit avec son environnement.

Nous avons développé une méthode de tri dynamique afin d'être capable de simultanément: stimuler, enregistrer et trier les neurones en fonction de leur réponse, en temps réel, à une stimulation pharmacologique. Nous avons couplé cette technique à du séquençage sur cellule unique. Cette nouvelle approche nous permet d'analyser, plus particulièrement, les troubles du fonctionnement cérébral qui se produisent dans le syndrome du X-Fragile. Nous étudions les dérégulations des flux de calcium dans les neurones de souris atteintes par ce syndrome. En triant les neurones selon leur réponse à un agoniste pharmacologique, puis en réalisant l'analyse de leur transcriptome, nous sommes capables de comprendre les conséquences développementales de l'absence de la protéine FMRP ainsi que leur impact sur l'homéostasie calcique.

Développement d'une technique de tri dynamique



Stratégie instrumentale

La fluidique du trieur (BD FACSAria III) est modifiée pour permettre l'injection de drogues dans la ligne échantillon.

• Le débit d'injection des solutions est ajusté en fonction du débit de l'échantillon.

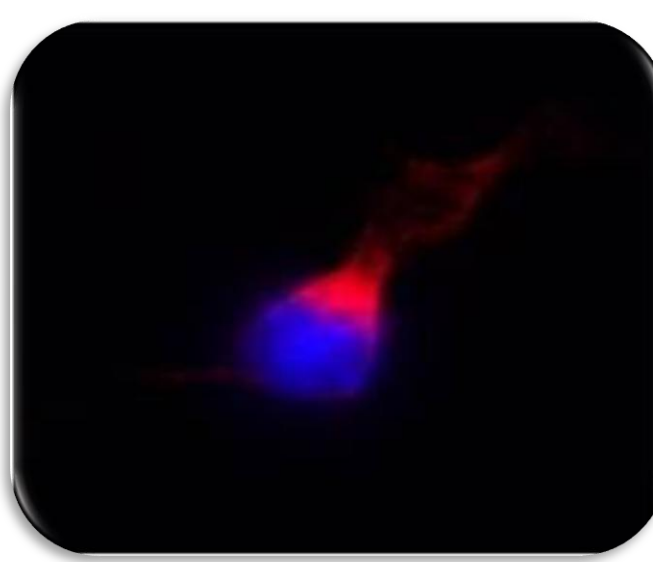
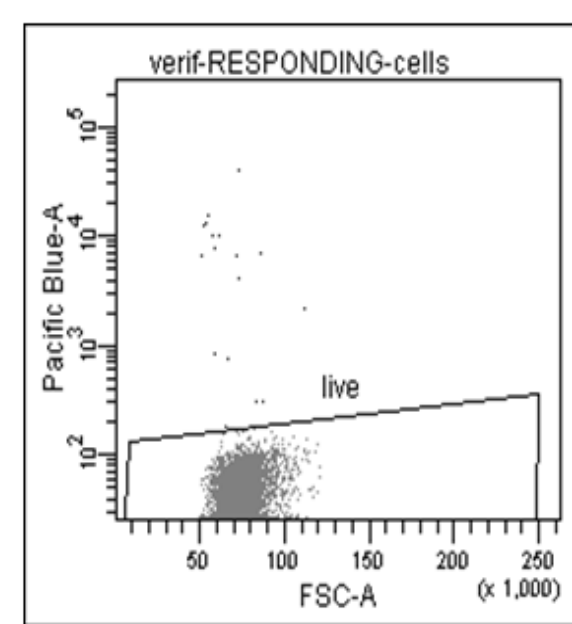
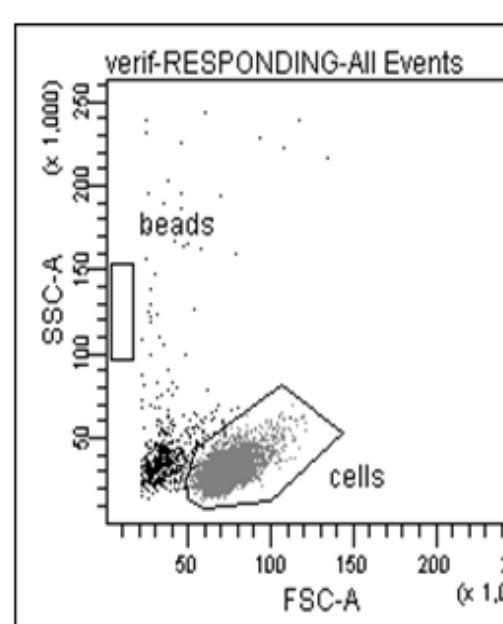
• Grâce à ce montage le temps d'incubation avec la drogue est identique pour chaque cellule et dépend de la longueur de tubulure avant la buse (segment rouge).

⇒ Tri pharmacologique dynamique des cellules

Validation de la méthode

Un échantillon cerveau de souris a été analysé. Les cellules, marquées au Fluor-4 AM, sont stimulées avec du KCl auquel ont été ajoutées des billes fluorescentes. La ionomyicine est utilisée comme contrôle positif de stimulation.

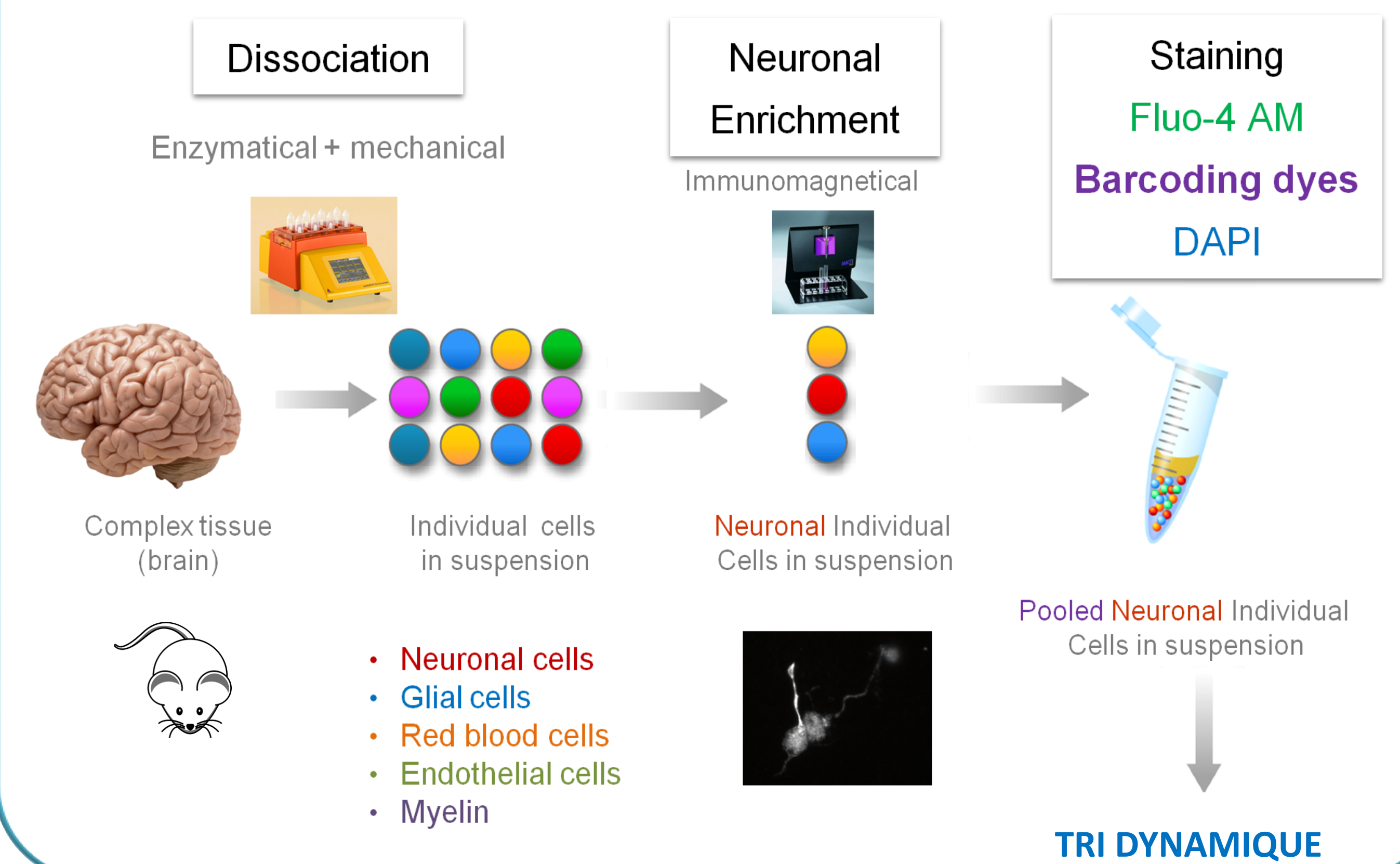
Population	%Parent	%Total
All Events	###	100.0
beads	0.0	0.0
cells	99.9	99.9
live	99.7	99.8



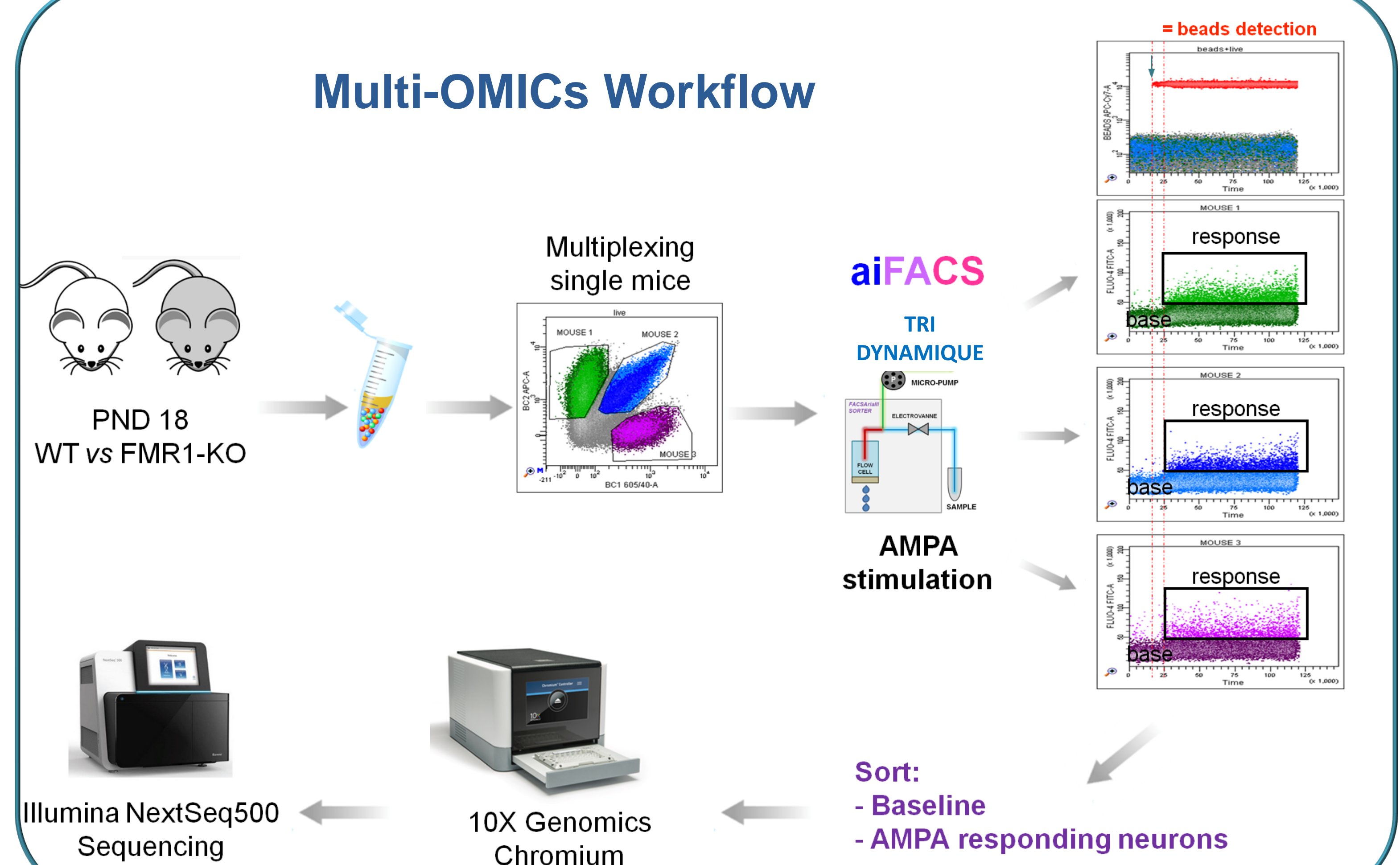
Viabilité cellulaire

Suite au tri dynamique les cellules sont viables. Une fois mis en culture, les neurones présentent, après 6 jours, le même phénotype que des neurones non triés.

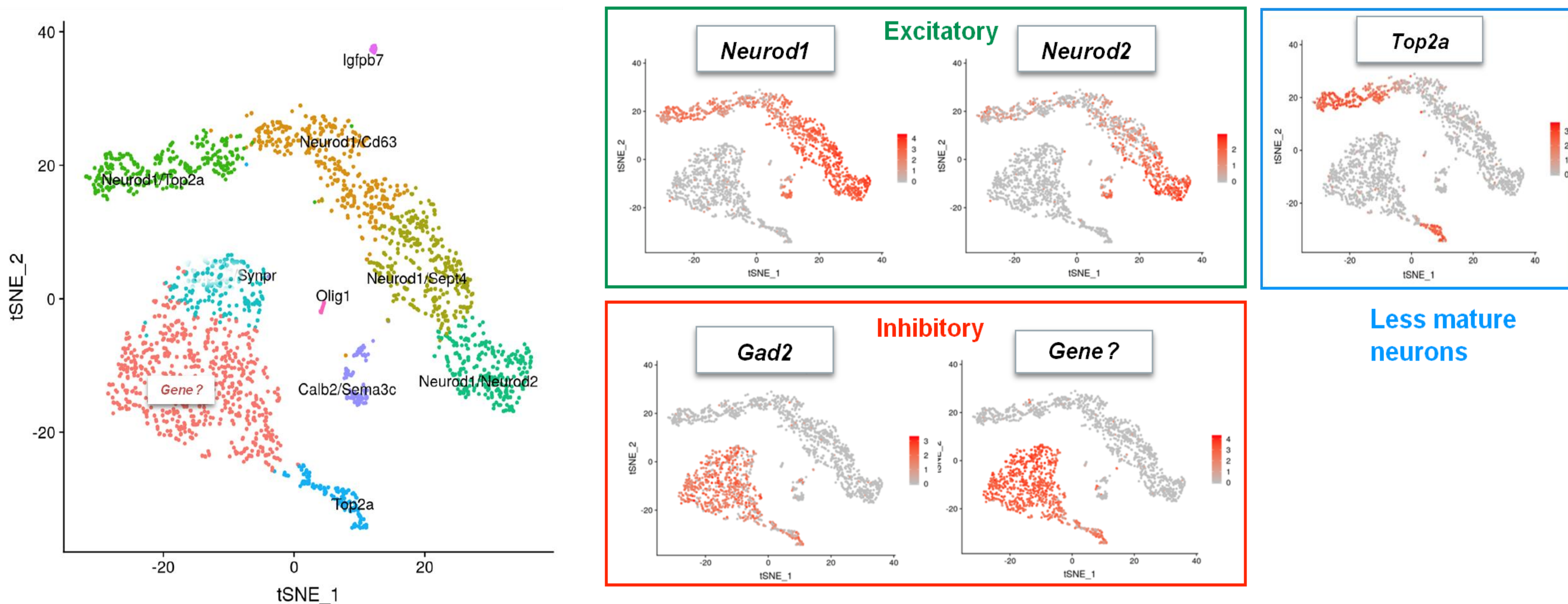
Préparation de l'échantillon



Multi-OMICs Workflow

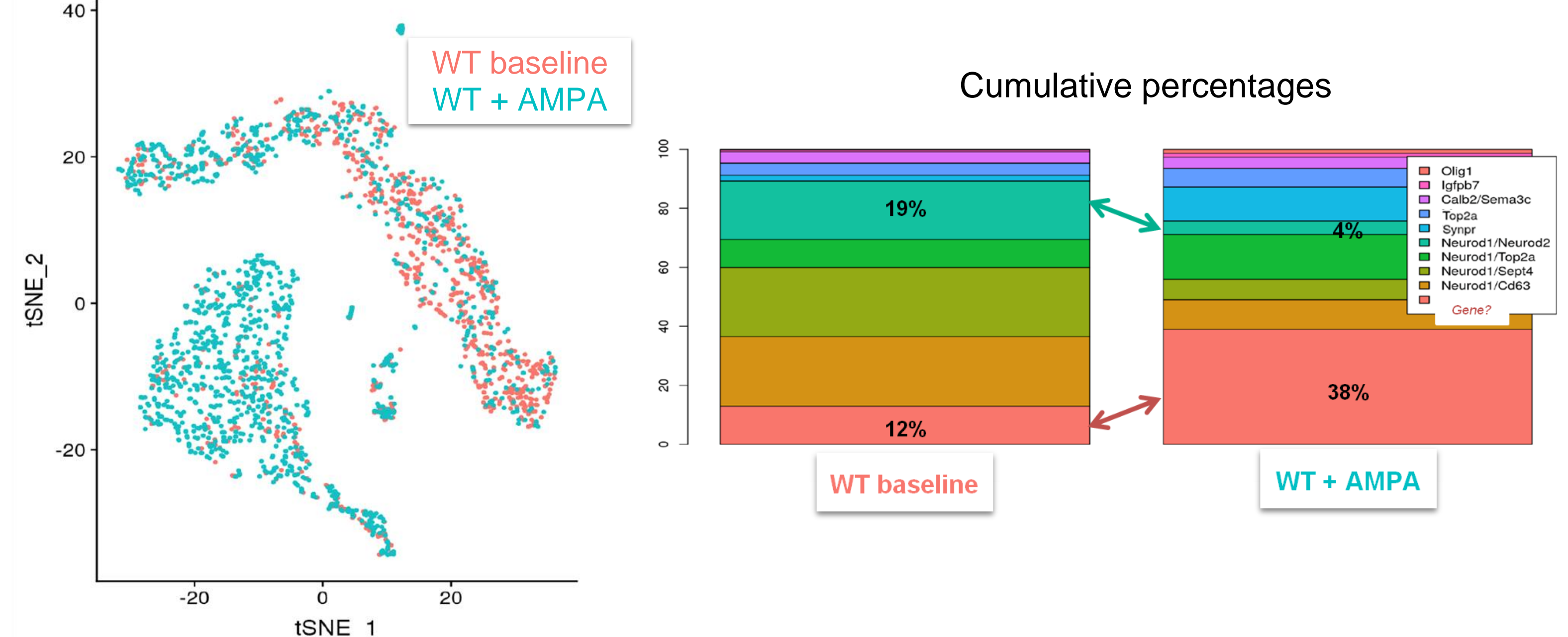


Réponse et sélection de neurones inhibiteurs suite à une stimulation AMPA



Profils transcriptomiques des neurones.

Les données obtenues à partir du séquençage des neurones de souris WT sans stimulation (« baseline »), et des neurones de souris WT et KO ayant répondu à la stimulation AMPA ont été agrégées. Dix clusters sont identifiés suivant leurs profils d'expression génique. Trois phénotypes majoritaires sont identifiés: neurones excitateurs, inhibiteurs ou immatures.



Sélection des neurones inhibiteurs suite à une stimulation par l'AMPA

Suite à une stimulation AMPA, les neurones triés expriment sélectivement des gènes spécifiques d'un phénotype inhibiteur (12% à l'état basal et 38% en réponse à la stimulation). Les gènes, dit « excitateurs », sont réprimés.

