

Objet de la demande (à renseigner par tous les porteurs de projets)

Intitulé de l'opération : Technologies de rupture pour l'analyse et le suivi d'acides nucléiques et de protéines en cellules uniques

Descriptif de l'opération : L'étude des processus biologiques complexes et leurs dérèglements dans différentes pathologies fait appel à un ensemble de techniques dont l'intégration permet de caractériser les acteurs moléculaires du vivant (gènes/ADN, ARN et protéines exprimées) ainsi que leur dynamique spatio-temporelle dans les cellules à très haute résolution. L'intégration de ces techniques permet ainsi l'étude de processus biologiques allant du gène à son expression en ARN et sa traduction en protéines incluant leurs modifications post-traductionnelles. Cette intégration permet également d'investiguer l'organisation de ces acteurs moléculaires en complexes, leur structure, leur localisation et leur dynamique au sein des cellules. **La spectrométrie de masse associée à l'analyse protéomique ainsi que l'imagerie cellulaire** sont des technologies de pointe qui permettent de relever de manière synergique et complémentaires ces défis majeurs **en santé publique**, l'une permettant l'identification de cibles ou biomarqueurs protéiques, l'autre leur localisation cellulaire. Dans ce contexte, la présente demande porte sur l'acquisition et le développement de deux techniques de pointe **uniques et complémentaires dans le Grand Est**, permettant de caractériser et suivre deux acteurs clés des mécanismes moléculaires dans la cellule, à savoir les acides nucléiques et les protéines. Ces techniques seront implantées et développées au sein de plateformes associées à des laboratoires ayant une visibilité internationale dans les domaines de la spectrométrie de masse (LSMBO/ProFI – Infrastructure Biologie et Santé) et la microscopie de fluorescence (LBP).

1) Trieur de cellules microfluidique pour la protéomique de la cellule unique

Verrous techniques/scientifiques à lever : Les développements en spectrométrie de masse (MS) permettent à l'heure actuelle d'identifier des milliers de protéines au sein d'un mélange protéique complexe sur des quantités de matériel de plus en plus réduites ($> 5 \mu\text{g}$). Pourtant, l'analyse protéomique en cellule unique (SCP) n'en est qu'à ses balbutiements. La plupart des approches d'analyse SCP font appel à des technologies basées sur des anticorps (Western blot, cytométrie de flux ou de masse) qui restent ciblées, offrent un multiplexage limité et des possibilités contraintes par la disponibilité d'anticorps. Les progrès technologiques en MS en termes de sensibilité et de vitesse d'acquisition permettent maintenant d'aborder l'analyse SCP sans a priori et sont disponibles au LSMBO/ProFI. **Le principal verrou technologique reste l'étape pré-analytique** de préparation des échantillons pour isoler des cellules uniques et réaliser une digestion enzymatique fiable et répétable sur de très faibles quantités de matériel (300 picogrammes) et dans de très faibles volumes (quelques nanolitres).

Objectif : Notre objectif est de relever le défi de la protéomique de la cellule unique en implémentant une instrumentation de pointe pour le tri des cellules uniques, une automatisation des étapes pré-analytiques, un multiplexage et l'interfaçage avec l'analyse à haut débit/haute sensibilité par MS. Ces objectifs pourront être atteints par l'acquisition **d'un trieur de cellules (cellenONE®) et d'un module microfluidique (proteoCHIP®) pour l'automatisation des étapes pré-analytiques de protéomique (Cellenion – 241.7 k€ HT).**

Programme scientifique : Travailler sur des quantités de matériel très inférieures au microgramme est un défi à plusieurs niveaux. Afin de trier et collecter des cellules uniques, nous souhaitons acquérir un trieur de cellules de type cellenONE® (Cellenion). Ce dispositif permet d'isoler des cellules uniques et délivrer de très faibles volumes (picolitres, 10^{-12} L) de réactifs de manière très précise pour la préparation d'échantillons. Le trieur présente l'avantage de maintenir l'intégrité des cellules, même fragiles, de par la technologie innovante de génération piézo-acoustique douce des gouttes et un contrôle de température précis. Par ailleurs, le tri cellulaire est suivi par imagerie, ce qui permet d'enregistrer l'ensemble du tri et réaliser des contrôles morphologiques ou par des marqueurs de fluorescence de la qualité des cellules. Le système proteoCHIP intégré au trieur de cellules cellenONE® permet de préparer jusqu'à 192 échantillons simultanément au sein d'une même plateforme. Cette combinaison offre de nombreux avantages : la réduction des manipulations extérieures extrêmement délicates du fait des très faibles volumes/quantités de matériel impliquées, l'automatisation des étapes de lyse cellulaire, la réduction/alkylation et la digestion trypsique et enfin le marquage isobarique nécessaire au multiplexage.

Coût du projet et co-financements : le coût total du trieur de cellule et de la puce microfluidique de miniaturisation du pré-analytique protéomique est de 241.7k€. Un cofinancement IBSA de 100 k€ est acquis (engagement avant 12/2023). **Le complément de 141.7k€ (58%) est demandé dans le cadre du programme triennal.**

2) Microscope de fluorescence résolue en temps avec excitation UltraViolette (UV FLIM)

Verrous techniques/scientifiques à lever : Contrairement aux protéines qui peuvent être exprimées sous forme de protéines chimériques avec des protéines fluorescentes, les acides nucléiques sont difficiles à marquer et donc à imager dans les cellules vivantes. L'inclusion d'aptamères fluorescents ou de sondes externes peut altérer leurs structures et fonctions et ainsi générer des artefacts. Des limitations similaires ont également été observées avec des analogues de nucléosides fluorescents, qui en outre sont généralement fortement éteints lorsqu'ils sont incorporés dans des acides nucléiques. **Une percée majeure dans le domaine a été réalisée par le développement de deux analogues fluorescents de la guanosine, la thiénoguanosine (thG) et l'iso-thizologuanosine (tzG), capables de remplacer presque parfaitement les guanines dans l'ADN et l'ARN.** Les deux composés sont reconnus par les polymérases et conservent une bonne brillance ainsi que des propriétés solvatochromiques sensibles lorsqu'ils sont incorporés dans des acides nucléiques. Une propriété particulièrement attrayante de ces sondes est leur longue durée de vie de fluorescence (10-30 ns), qui permet de les discriminer aisément des autres molécules fluorescentes dans la cellule par imagerie résolue en temps.

Objectif : Notre objectif est d'ouvrir **une nouvelle ère en imagerie** où des acides nucléiques fluorescents pleinement fonctionnels seront imagés dans des cellules vivantes par **microscopie d'imagerie de fluorescence résolue en temps avec excitation UV** (microscopie UV FLIM).

Programme scientifique : Nous proposons de développer un montage basé sur un microscope UV associé à une tête de balayage et une détection par comptage de photons assurée par une caméra à portails temporels et une carte électronique haute performance. L'excitation UV à 350 nm sera fournie par un laser pulsé picoseconde associé à un sélecteur d'impulsions. Parallèlement à l'excitation UV, une excitation pulsée dans le visible sera fournie par un laser supercontinuum. Avec ces sources laser, l'installation offrira la possibilité d'obtenir des images

FLIM confocales multicolores, de suivre les acides nucléiques marqués au thG ou au tzG dans les cellules vivantes et de les localiser par rapport à des protéines fluorescentes émettant dans le visible. De plus, en synchronisant les deux lasers, la configuration permettra une excitation laser alternée (ALEX) pour PIE-FCCS (Pulsed Interleaved Excitation-Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy) et FLCS (Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy). Ces deux approches quantitatives seront utilisées pour étudier les interactions entre acides nucléiques et protéines, avec une réduction drastique des artefacts d'excitation croisée ou/et de bruit de fond. Le développement du microscope UV FLIM sera assuré par un IR CNRS et deux enseignants-chercheurs physiciens du LBP, qui ont une grande expérience dans ce domaine. Le microscope devrait être finalisé et validé avant fin 2023.

Coût du projet et co-financements : Le coût total de ce projet est de 383.65 k€. Pour ce projet, plusieurs éléments ont déjà été acquis (le système de balayage (scanner XY et l'optomécanique du scanner) et le laser supercontinuum, (77.3 k€)) ainsi que l'électronique de comptage (25.5 k€) ont déjà été acquis. Pour compléter le développement, il sera nécessaire d'acquérir un microscope UV (48.2k€), une caméra à portails temporels (106.4 k€), l'opto-mécanique associé (miroir, objectif, filtre, 5.5 k€). Pour la source laser UV sub-nanoseconde pulsée à 350 nm avec un contrôle impulsif (120.75 k€), une demande de co-financement IBISA est également en cours (50 k€ seront nécessaires pour compléter le financement). **Nous demandons donc 230.85 k€ (60%) dans le cadre de ce plan triennal.**

Objectifs poursuivis en lien avec les ambitions du contrat triennal :

Le projet présenté ici propose des technologies de rupture complémentaires pour l'imagerie des acides nucléiques ainsi que pour la cartographie de leurs produits finaux, les protéines, en cellule unique. En effet, les marqueurs biologiques identifiés en protéomique au niveau de la cellule unique seront ensuite imagés soit au niveau protéique ou de manière plus innovante via leurs précurseurs acides nucléiques. Le projet présenté ici a pour objectif de participer à une politique ambitieuse de développement et d'acquisition d'instrumentations de pointe, disponibles pour les chercheurs du site Strasbourgeois ainsi que pour les partenaires industriels et collaborateurs régionaux, nationaux et internationaux. L'acquisition du trieur de cellules et le développement du microscope FLIM UV devraient renforcer le positionnement du Grand Est comme région d'excellence de rayonnement européen. Ces outils de pointe devant donner des informations complémentaires sur les protéines et les acides nucléiques sont essentiels pour avancer les connaissances sur le vivant et relever des défis sociétaux majeurs en santé publique, en phase avec les priorités des stratégies d'établissement (Université de Strasbourg – recherche interdisciplinaire, intensification du réseau des plateformes etc.) et de Région 2020-2030 pour l'enseignement supérieur, la recherche et l'innovation sur la Santé et la Bio-économie. Le coût total du projet est de 500 k€. Nous demandons un soutien à hauteur de 74% (370 k€) par le plan triennal.

Le couplage (acquisition d'un trieur de cellules (cellenONE®) avec un module microfluidique (proteoCHIP®) pour l'automatisation des étapes pré-analytiques de protéomique) ainsi que le développement d'un microscope UV FLIM seraient uniques sur le Grand Est et confèreraient un atout majeur pour l'ensemble de la communauté des biologistes et cliniciens. A notre connaissance, aucune plateforme protéomique en France ne réalise encore de manière routinière des analyses protéomiques SCP, accusant ainsi un retard important par rapport à certains compétiteurs européens (Allemagne). La technologie SCP est une technologie de rupture, avec un énorme potentiel pour ouvrir de nouvelles pistes de connaissance en santé humaine (cancérologie, maladies neurodégénératives, maladies infectieuses virales et

bactériennes). Le typage des cellules uniques permettrait notamment un choix optimal du traitement à administrer et constituerait un pas vers la médecine de précision/personnalisée. De même, la possibilité d'imager et de suivre des acides nucléiques fonctionnels par microscopie de fluorescence dans des cellules vivantes constituera un nouveau paradigme, conférant un avantage distinctif de la communauté scientifique du grand Est dans la compétition internationale. Les applications de ce nouveau paradigme sont extrêmement vastes, couvrant un large spectre de questions fondamentales et appliquées portant sur les acides nucléiques et leurs interactions avec des protéines. Par l'analyse du contenu protéique des cellules et par le suivi d'ARN spécifiques dans la cellule, ces technologies permettront d'aborder de nouvelles questions avec une finesse et résolution jusqu'ici inégalées, qui apporteront des connaissances fondamentales originales et ouvriront de nouvelles portes vers la connaissance des pathologies et le développement de thérapies innovantes (notamment en cancérologie).

Ces technologies seront ouvertes à la communauté via les plateformes d'envergure nationales de protéomique du LSMBO/ProFI-Strasbourg (PIA, IBiSA certifiée ISO9001, Infrastructure Nationale de Protéomique, www.profi-proteomics.fr) et la plateforme d'imagerie QUEST (IBISA). Ces deux sites strasbourgeois possèdent déjà une visibilité nationale et européenne (20% des collaborations se font déjà au niveau européen). L'acquisition de ces nouvelles instrumentations uniques sur Strasbourg constituera un atout important pour accroître le rayonnement européen de la communauté scientifique strasbourgeoise via l'établissement de nouvelles collaborations. Plusieurs équipes européennes académiques (KIT Karlsruhe, Institute for Molecular Medicine and Cell Research Freiburg, Universitätsklinikum Heidelberg, German Cancer Research Center DKFZ, University of Siena, CNR Naples, University of Basel) ou industrielles (Alithéa Freiburg Allemagne, UCB Belgique, Merck Rome Italie) ont déjà exprimées leur intérêt pour ces technologies soit dans le cadre de collaborations via le dépôt de projets communs (ANR Franco-allemande, projet EliXIR Infrastructure européenne de Bioinformatique) soit via des prestations de service ou des financements de thèse (Merck Italie). Des projets européens majeurs sont en cours d'évaluation (ERC Consolidator co-porteurs LSMBO/IRIM Montpellier, Doctoral Network ITN-TACT impliquant des équipes allemandes, hollandaises, autrichiennes, etc.). Le développement en microscopie est mis en avant dans le dossier déposé par la communauté des plateformes alsaciennes en imagerie (RISEst) pour constituer un nouveau nœud de France Bioimaging (FBI, <https://france-bioimaging.org/>), l'Infrastructure Nationale de Recherche en Imagerie Biologique. Cette adhésion à FBI renforcerait de fait la dimension européenne du réseau alsacien, déjà initiée par sa participation au MIAP (Microscopy and Image Analysis Platform) avec les Universités de Freiburg, Bâle et Mulhouse, en connexion avec des réseaux européens majeurs comme EuroBioimaging, German Bioimaging and NEUBIAS. Ces technologies permettront aussi de renforcer la structuration de l'espace de recherche transfrontalier, notamment au niveau d'Eucor, regroupant les universités du Rhin supérieur (Karlsruhe, Bâle, Freiburg, Strasbourg et Mulhouse). De nombreuses collaborations existent déjà et seront renforcées tant au niveau des développements technologiques en spectrométrie de masse et imagerie optique qu'au niveau des applications en protéomique et en acides nucléiques. Par les nouvelles applications permises, mais également par le renforcement des échanges transfrontaliers qui seront induits, ces nouvelles technologies permettront de renforcer la compétitivité des équipes strasbourgeoises en biologie (ICANS, IBMC, IGBMC, IBMP, LBP, CRBS).

Enfin, ces technologies permettront de renforcer les liens avec le monde socio-économique. Un certain nombre d'industriels locaux (Inoviem Scientific, Novalix) ou internationaux/transfrontaliers (Alithéa, Freiburg, Novartis Bâle, Merck Rome) ont déjà manifesté leur intérêt pour analyser le contenu protéique de cellules cancéreuses. Une

collaboration est aussi en cours avec Sanofi-Pasteur sur les vaccins à ARNm, afin de suivre les ARN messagers au sein de la cellule depuis leur entrée dans la cellule jusqu'à leur expression en protéines. Par ailleurs, la technique de microscopie UV FLIM pourra elle-même fait l'objet de valorisation, en partenariat avec des industriels dans le domaine de la microscopie

- Date prévisionnelle du début de l'opération : **01/09/2022**
- Date prévisionnelle de fin de l'opération : **31/12/2023**
- Coût de l'opération : **625.35 k€**
- Montant global de subvention sollicitée : **372.55 k€**