Université de Montréal

Sélection visuelle basée sur un phénotype migratoire, isolation et caractérisation de cellules uniques métastatiques

par

Nicolas Desjardins-Lecavalier

Institut de Génie biomédical

Département de pharmacologie et physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences appliquées (M. Sc. A.) en génie biomédical

Novembre 2020

Université de Montréal

Études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Sélection visuelle basée sur un phénotype migratoire, isolation et caractérisation de cellules uniques métastatiques

présenté par

Nicolas Desjardins-Lecavalier

Mémoire accepté le : 12 janvier 2021

Matthieu Vanni	
(président-rapporteur)	
Santiago Costantino	
(directeur de recherche)	
Laura Hulea	
(membre du jury)	

Sommaire

La caractérisation d'échantillons biologiques s'effectue très souvent au microscope optique. Or, il est techniquement difficile d'isoler quelques cellules rares parmi une culture hétérogène en se basant strictement sur des caractéristiques observables au microscope, comme la localisation, la morphologie ou le déplacement, car il n'existe pas nécessairement de marqueur moléculaire unique qui leur sont associés. Afin de répondre à cet enjeux, le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage de maîtrise a récemment développé la Single Cell Magneto Optical Capture (scMOCa), qui utilise des réactifs communs et un laser de faible puissance pour attacher des billes ferromagnétiques à la membrane plasmique cellulaire et permet d'isoler magnétiquement les cellules d'intérêt.

Le présent ouvrage rapporte l'application de la scMOCa à la migration de cellules métastatiques ainsi que les adaptations apportées à la technique nécessaires à la réalisation du projet. Notamment, le volume de cellules uniques capturé a été augmenté d'un facteur d'environ 250 grâce à l'automatisation de la technique et à l'étude du photoblanchiement de la fluorescéine, phénomène à la base de la scMOCa. Brièvement, l'expérience consiste à capturer les cellules uniques présentant les phénotypes migratoires les plus importants, définis par l'analyse de leur trajectoire, parmi une culture hétérogène de cellules métastatique. Les résultats de l'expérience démontrent une conservation des phénotypes migratoires après plusieurs mitoses. Aussi, l'expression génétique relative fait ressortir des gènes et groupes de gènes propres à la migration cellulaire.

Mots-clés : Cellule unique, isolation cellulaire, métastase, cancer, migration cellulaire, séquençage, photoblanchiment

Summary

The characterization of biological samples depends heavily on the optical microscope. However, it is technically challenging to isolate rare cells among a heterogeneous culture solely based on visual inspection at the microscope. Indeed, characteristics like location, morphology or displacement do not necessairly have specific related molecular markers. In order to solve this issue, the laboratory where I accomplished my master internship developed the Single Cell Magneto Optical Capture (scMOCa) wich uses commun reagents and a low powered laser to attach ferromagnetic beads on the cell plasma membrane and isolate the cells of interest with magnetic tools.

The present work reports the application of scMOCa to the metastatic cell migration and the implemented adaptations to the technique in order to carry out the project, especially by increasing the number of single cells being isolated by a factor of 250. This adaptation requiered the study of photobleaching, phenomenon at the foundation of scMOCa. Briefly, the experiment consists to capture the cells presenting the most important migratory phenotypes, defined by their track analysis, among a heterogeneous metastatic cell culture. The experimental results show that the migratory phenotypes are preserved after several cell divisions. Also, the relative gene expression highlights some genes and gene groups owned to cellular migration.

Keywords: Single-cell, cellular isolation, metastasis, cancer, cellular migration, sequencing, photobleaching

Table des matières

Sommaire	V
Summary	vii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	XV
Liste des sigles et abréviationsxx	xiii
Remerciementsx	ΣΧV
Chapitre 1. Introduction	1
1.0.1. Isolation cellulaire basée sur des caractéristiques visuelles	1
1.0.2. Migration cellulaire dans le développement de métastases	2
1.0.3. Objectifs de recherche	4
1.0.4. Contenu du mémoire	4
Chapitre 2. Migration cellulaire	7
2.1. Introduction	7
2.2. Dynamique de l'actine en deux dimensions	7
2.2.1. Lamellipode	8
2.2.2. Le filopode	9
2.2.3. Les fibres de stress	9
2.2.4. Points d'ancrage à la matrice extracellulaire	10
2.3. Migration cellulaire en 3D	12
2.4. Paramétrisation du mouvement d'une cellule unique	13

Chapitre 3. Imagerie, segmentation cellulaire et programme de suivi des	
cellules	23
3.1. Introduction	23
3.2. Microscopie en champ sombre	24
3.2.1. Méthodes	25
3.2.1.1. Modèle de diffusion	25
3.2.1.2. Éclairage et détection	28
3.2.1.3. Modèle cellulaire	33
3.2.1.4. Organigramme de programmation	35
3.2.2. Résultats et discussion	36
3.3. Logiciel de suivi des cellules	40
3.3.1. Segmentation des images en champ sombre	41
3.4. Segmentation par réseau neuronal convolutif	42
3.5. Conclusion	47
Chapitre 4. Isolation cellulaire par scMOCa	49
4.1. Introduction	49
4.2. Description de la méthode et protocole	51
4.2.1. Matériel requis pour la $scMOCa$	51
4.2.2. Protocole d'illumination et d'isolation magnétique	52
4.3. Augmentation du volume de tri	54
4.3.1. Photoblanchiment de la fluorescéine	55
4.3.2. Réduction du temps d'illumination	58
Chapitre 5. Résultats et discussion	63
	63

5.1. Démonstration de la conservation du phénotype migratoire par la	
caractérisation des trajectoires	63
5.1.1. Définition de l'expérience	64
5.1.2.~ Résultats de la sélection des cellules les $20%$ plus motiles	65
5.1.3. Résultats de la sélection des cellules les 5% plus motiles	67
5.2. Analyse du séquençage ARN et groupement des gènes	68
5.2.1. Extraction, séquençage et analyse de l'ARN	68
5.2.2. Disparité des résultats	69
5.2.3. Groupement des gènes avec DAVID	71
5.2.4. Groupement des gènes avec g:Profiler et Cytoscape	75
Chapitre 6. Conclusion	79
	79
Bibliographie	83
Anneye A Expression génétique de quelques termes importants	Δ_

Liste des tableaux

2.1	Paramètres décrivant la trajectoire d'une cellule et leur définition	15
3.1	Variables utilisées dans la simulation. Les variables ne possédant pas d'unité de mesure sont adimensionnelles	28
3.2	Spécifications d'objectifs commerciaux	30
3.3	Différence d'intensité moyenne normalisée par le maximum d'intensité en fonction du nombre d'angles polaire θ pour 4 angles azimutaux, une O.N. de détection de 0.5 et une illumination de 0.55 d'O.N	32
3.4	Différence d'intensité moyenne normalisée par le maximum d'intensité en fonction du nombre d'angles azimutaux ϕ pour 4 angles polaires, une O.N. de détection de 0.5 et une illumination de 0.55 d'O.N.	32
4.1	Liste des réactifs	52
4.2	Liste du matériel	52
4.3	Variables utilisées dans les équations différentielles couplées décrivant le photoblanchiment de la fluorescéine 4.3.3	58
5.1	Paramètres décrivant la trajectoire d'une cellule et leur définition	65
5.2	Quantité et qualité des échantillons d'ARN extraits	70
5.3	Mots clés cherchés dans les différentes bases de données pour générer la liste de gènes régulés à la baisse du cluster 1	72
5.4	Cluster 1 des gènes régulés à la baisse selon DAVID : domaine de la fibronectine de type III	72

5.5	Mots clés cherchés dans les différentes bases de données pour générer la liste de	
	gènes régulés à la hausse du cluster 1	73
5.6	Cluster 1 des gènes régulés à la hausse selon DAVID : Cadherin et liaison d'ions	
	calcium	74

Liste des figures

1.1	Schématisation simplifiée des étapes menant à une métastase
2.1	Organisation et assemblage du réseau d'actine du lamellipode [26]. A) Le
	lamellipode à l'avant d'une cellule comprend un réseau ramifié de filaments
	d'actine, qui sont nucléés par le complexe Arp2/3. La croissance rapide
	des filaments génère une force contre la membrane cellulaire qui la pousse
	vers l'avant. En plus du complexe Arp2/3, certaines formines contribuent
	à la nucléation de filaments d'actine. L'assemblage et le désassemblage des
	filaments d'actine, ainsi que le recyclage des monomères d'actine, sont contrôlés
	par plusieurs protéines incluant les protéines de coiffe, la cofiline, la profiline
	et les CAP. B) Rac1 active la ramification et l'assemblage des filaments
	d'actine via le complexe WAVE et elle prévient le désassemblage des filaments
	près de la membrane cellulaire en inhibant la cofiline via PAK et LIMK.
	Reprinted/adapted by permission from Springer Nature Customer Service
	Centre GmbH : Springer, Cham, Actin Filament Structures in Migrating
	Cells by Jaakko Lehtimäki, Markku Hakala, Pekka Lappalainen ©
	SpringerInternationalPublishingSwitzerland (2016)
2.2	Organisation et architecture de la matrice de filaments d'actine dans le filopode.
	[26] A) Le filopode contient un seul paquet unipolaire de filaments d'actine dont
	le côté barbelé à croissance rapide pointe vers l'extrémité du filopode. B) $\mathrm{Cdc42}$
	active la formine Dia2 pour promouvoir l'assemblage des filaments d'actine. Il
	inactive la cofiline via LIMK et PAK, et inhibe ainsi le désassemblage des filaments
	d'actine, et intéragit avec IRSp53, qui génère la courbure de la membrane et
	fonctionne comme une protéine d'échaffaudage pour d'autres régulateurs de la

	dynamique de l'actine. Reprinted/adapted by permission from Springer Nature
	Customer Service Centre GmbH : Springer, Cham, Actin Filament
	Structures in Migrating Cells by Jaakko Lehtimäki, Markku Hakala,
	Pekka Lappalainen © SpringerInternationalPublishingSwitzerland
	(2016))
2.3	Assemblage et organisation des fibres de stress d'actine [26]. A) Les fibre
	de stress dorsales sont des paquets de filaments d'actine non-contractiles qui
	s'associent aux points d'adhésion et s'allongent dans leur direction. Les arcs
	transverses sont contractiles et s'associent aux fibres de stress dorsales. Les
	fibres de stress ventrales sont contractiles et communiquent avec la matrice
	extracellulaire à travers des points d'adhésion situés à leurs deux extrémités.
	B) RhoA promouvoit l'assemblage des filaments d'actine via la formine Dia1 et
	inhibe le désassemblage des filaments d'actine par l'inhibition de la cofiline via
	ROCK et LIMK. De plus, RhoA promouvoit l'activation de la myosine II via
	ROCK. Reprinted/adapted by permission from Springer Nature Customer
	Service Centre GmbH : Springer, Cham, Actin Filament Structures in
	Migrating Cells by Jaakko LehtimäkiMarkku HakalaPekka Lappalainen
	© SpringerInternationalPublishingSwitzerland (2016)
2.4	Représentation tridimensionnelle d'un point d'ancrage [10] Reprinted by
	permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH:
	Nature, Nature Cell Biology, Integration of actin dynamics and cell adhesion
	by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch, Lindsay B. Case
	& Clare M. Waterman, Copyright © Nature Publishing Group, a division of
	Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. (2015)
2.5	Modes de migration mésenchymal vs amoeboid. a) La cellule mésenchymale
	s'aligne dans le sens des lignes de tension des fibres de la matrice extracellulaire
	et crée son propre chemin en digérant la matrice extracellulaire. La cellule
	amoeboide ne s'aligne pas avec la matrice extracellulaire et se déplace à travers

des pores préexistants. Le centre d'organisation des microtubules est situé devant
le noyau des cellules mésenchymales, alors qu'il est situé derrière le noyau des
cellules amoeboides. b) Présentation de trois modes de migration et de leur
dépendance à l'adhésion au milieu extracellulaire. c) Dépendemment du contexte,
les cellules peuvent changer de mode de migration. Reprinted by permission from
Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Nature, Nature Cell
Biology, Mechanisms of 3D cell migration, Kenneth M. Yamada and Michael
Sixt, Copyright © Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers
Limited. All Rights Reserved. (2019)
The instainer simuláis nen Common et al [F2] I es torientainer and alternas à

3.1	Représentation du système d'illumination en champ sombre utilisé. a) Masque de phase IX-Ph3 d'Olympus b) système d'illumination	24
3.2	Représentation d'une surface rugueuse et sa paramétrisation. L'écart-type de la distribution de hauteur est σ et la longueur de corrélation des hauteurs τ	26
3.3	Transmission à une interface rugueuse. Les vecteurs d'onde normalisés incident (\hat{k}_i) , réfracté (\hat{k}_2) et diffusé (\hat{k}'_2) sont illustrés. La surface rugueuse S sépare deux milieux d'indice de réfraction n_1 et n_2 . Figure inspirée du chapitre 10 du livre de Braat et Török [8]	26
3.4	Diffusion angulaire en transmission à travers une surface rugueuse de longueur de corrélation de 10 μ m. Le faisceau incident est normal à la surface. Les indices de réfraction sont $n_1=1$ et $n_2=2,\ \lambda_0=500nm,\ \rho_0=0.3$. La rms de rugosité de surface σ est de a) 10 nm b) 30 nm. La ligne bleue représente la transmission diffuse et la ligne orange, la transmission spéculaire avec de la diffraction	29
3.5	Intensité diffuse transmise intégrée sur les angles de diffusion par rapport à l'angle d'incidence du faisceau	29
3.6	Set-ups d'imagerie où t_1 et t_2 sont les angles d'illumination et de détection respectivement. a) disposition conventionnelle b) disposition avec $Side-Illumination$	31
3.7	Section du modèle de la cellule à mi-hauteur et vecteurs normalisés utilisés pour la détection projetés sur les plans XY et YZ pour a) 20 valeurs de θ et 8 de ϕ b) 4 valeurs de θ et 24 de ϕ c) 20 valeurs de θ et 24 de ϕ	33
3.8	Surface d'un quart de sphère. Les axes sont en pixels	34
3.9	Organigramme de la simulation	35
3.10	Résultats pour une illumination faite à l'aide d'un condensateur de 0.55 d'O.N. Intensité diffusé avant convolution, simulation d'un volume imagé et intensité diffusée en fonctions des angles d'incidence et de diffusion pour des objectifs de microscope d'ouverture numérique de a) 0.25 b) 0.3 c) 0.50.	37
	microscope a ouveraire numerique de a u 0.25 D1 0. 5 C1 0.50.	.) [

3.11	Résultats pour une illumination faite à l'aide d'un condensateur de 0.95 d'O.N. Intensité diffusé avant convolution, simulation d'un volume imagé et intensité diffusée en fonctions des angles d'incidence et de diffusion pour des objectifs de microscope d'ouverture numérique de a) 0.75 b) 0.95	38
3.12	Résultats pour une illumination perpendiculaire à l'axe optique de détection. Intensité diffusé avant convolution, simulation d'un volume imagé et intensité diffusée en fonctions des angles d'incidence et de diffusion pour des objectifs de microscope d'ouverture numérique de a) 0.3 b) 0.5 c) 0.75 d) 0.95	39
3.13	Exemple d'image acquise a) en illumination en champ sombre avec un objectif de 0.25 d'O.N. et un condenseur de 0.55 d'O.N. b) et c) au confocal avec de la phalloidine	40
3.14	Exemple d'une image segmentée et résultat du programme de suivi. Les trajectoires rapides sont en vert et les lentes en rouge	42
3.15	U-Net : Architecture du réseau neuronal convolutif	43
3.16	Comparaison entre A) une image en DAPI (<i>ground truth</i>), B) la prédiction du DAPI, C) l'image en transmission et D) la fusion des trois images. En vert, la <i>ground truth</i> et en rouge la prédiction. Des erreurs typiques sont encadrées en	
		44
3.17	Distribution des coefficients de corrélation r par image	45
3.18	Nombre de noyaux segmentés une image prédite par rapport aux noyaux segmentés sur sa ground truth. Chaque point représente un couple d'images prédiction-ground truth.	46
3.19	Masques des noyaux de l'image DAPI en vert et de la prédiction en rouge. En jaune, la superposition des deux masques	
3.20	Distance entre les centroïdes des segmentations de noyaux correspondants en fonction de l'indice de Jaccard (J). Chaque point représente un couple de noyaux prédiction-ground truth	47
	DECHUMOH-01076166 EFTBB	41

3.21	Proportion de distances entre les centroïdes des noyaux homologues considérées petites en fonction d'un seuil de distances.	48
3.22	Nombre de segmentations de noyaux de la prédiction jugées acceptables par rapport aux nombre total de noyaux segmentés dans la prédiction. Les segmentations jugées acceptables se trouvent à une distance inférieure à 2 microns de leur homologue ground truth. Chaque point représente une image	48
4.1	Aperçu de la méthode. Figure adaptée de [5] avec permission de l'auteur. A) La B4F est liée à la membrane cellulaire avec un laser. Les cellules aux membranes biotinilées sont marquées de billes ferromagnétiques fonctionnalisées à la streptavidine et capturées à l'aide de moyens magnétiques. B) Exemple de MDA-MB-231 identifiées de billes magnétiques. C) Schéma du montage utilisé pour isoler les cellules	53
4.2	Diagramme de Jablonski simplifié du photoblanchiment de la fluorescéine. Tiré de l'article de Song et al. [48]	56
4.3	Mesures de la largeur du faisceau laser au focus à l'aide d'une lame de rasoir pour les installations sur a) le microscope Olympus b) le microscope Nikon	59
4.4	Population de fluorescéine photoblanchie, semi-réduite (N_R) et semi-oxydée (N_X) , en fonction de la puissance d'illumination laser pour deux temps d'illumination différents	60
4.5	Population de fluorescéine photoblanchie, semi-réduite (N_R) et semi-oxydée (N_X) , en fonction du temps d'illumination laser pour cinq puissances d'illumination différentes. Les carrés sont placés à $0.1s$ et les losanges à $2s$	61
4.6	Test de puissance à 0,1 seconde d'illumination laser et couverture de billes le lendemain de l'illumination a) 24 mW b) 18 mW c) 12 mW d) 6 mW. Les cellules brulées ou mortes sont encerclées en rouge et les cellules saines, en vert. Les cellules jugées en mauvaise conditions étaient faiblement attachés au substrat ou apoptotiques	62

5.1	Schéma représentant la sélection des périodes de 2h parmi une acquisition de 12h	64
5.2	Proportion de trajectoires identifiées autant dans les 10% supérieurs du vidéo de 12h que dans les 20% supérieurs du vidéo de 2h	65
5.3	Schématisation du paramètre d_{max} sur une trajectoire cellulaire	65
5.4	Comparaison de la motilité de cultures parentale et isolées sur un critère de distance maximale parcourue (d_{max}) et résultas d'une one way ANOVA avec analyse post-hoc de Tuckey-Kramer sur $log10(d_{max})$. À gauche, comparaison entre la culture parentale et la culture isolée selon la motilité à deux moments différents. À droite, culture parentale et culture isolée aléatoirement à deux moments différents.	66
5.5	Comparaison cinétique entre la population parentale et la population isolée à trois moments après l'isolation. Les probabilités p que les populations soient semblables sont obtenus après une $one\text{-}way\ ANOVA$ avec test post-hoc $Tukey\text{-}Kramer$	67
5.6	Comparaison des mesures cinétiques à différents moments par population. Les probabilités p que les populations soient semblables sont obtenus après une $one-way\ ANOVA$ avec test post-hoc $Tukey\text{-}Kramer$.	68
5.7	Moyenne de l'indice de méandre. Les moyennes sont encadrées de l'erreur type, ou intervalle de confiance, $I_c = \left[\bar{x} - \frac{\sigma}{\sqrt{n}}; \bar{x} - \frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right]$, où la \bar{x} est la moyenne calculée de l'échantillon, σ son équart-type observé et n sa taille	69
5.8	Analyse en composante principale sur l'expression normalisée. La composante principale explique 99% de la variation entre les échantillons et sépare distinctement les échantillons parentaux (bleus) et rapides (rouges) en deux groupes	70
5.9	Heat map de l'expression normalisée des 1000 gènes expliquant la plus grande variation entre les échantillons parentaux et rapides pour les 6 échantillons	71
5.10	Liste des termes de <i>Gene Ontology</i> regroupant le gènes significatifs après enrichissement fonctionnel.	77

5.11	Regroupement et annotations des termes par le programme <i>CytoScape</i> [51]. La
	taille du cercle représente le nombre de gènes inclus dans un terme et l'échelle de
	couleur représente la <i>p-value</i> . Orange équivaut à 0.4 et blanc 0
A.1	Expression relative des gènes significatifs du terme Cell migration de la Gene
	OntologyA-ii
A.2	Expression relative des gènes significatifs du terme biological adhesion de la Gene
	OntologyA-iii
A.3	Expression relative des gènes significatifs du terme extracellular matrix
	organization de la Gene Ontology
A.4	Expression relative des gènes significatifs du terme Ameboidal-type Cell Migration
	de la Gene Ontology
A.5	Expression relative des gènes significatifs du terme Cell Adhesion Mediated by
	Integrin de la Gene Ontology
A.6	Expression relative des gènes significatifs du terme Regulation of Cell Migration
	de la <i>Gene Ontology</i>
A.7	Expression relative des gènes significatifs du terme Regulation of Actin Filament-
	based Process de la Gene Ontology

Liste des sigles et abréviations

B4F Biotine-4-fluorescéine

FACS Fluorescence Activated Cell Sorting

 ${\rm FAK} \qquad \textit{focal adhesion kinases}$

GO Gene Ontology

IACS Intelligent Image-Activated Cell Sorting

MACS Magnetic activated cell sorting

nm nanomètre(s)

ORA over-representation analysis

PDMS polydiméthylsiloxane

Pdots photoswitchable semiconducting polymer dots

PE point d'encrage au milieu extracellulaire

RIN numéro d'intégrité

RNC Réseau neuronal convolutif

scMOCa Single-Cell Magneto-Optical Capture

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier Santiago Costantino, mon directeur de recherche, pour sa disponibilité et son support autant scientifiquement que humainement.

Ensuite, j'aimerais remercier les membres du laboratoire qui ont été des collègues et des amis, particulièrement Loïc Binan pour son temps à répondre à mes multiples questions et Joannie Roy pour mon introduction à la biologie cellulaire.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents qui m'ont soutenu et guidé jusqu'à présent.

Chapitre 1

Introduction

1.0.1. Isolation cellulaire basée sur des caractéristiques visuelles

La microscopie optique est abondement utilisé dans la caractérisation d'échantillons biologiques, qu'il s'agisse de tissus ou de culture cellulaire. À la suite d'une inspection visuelle à l'oculaire du microscope ou d'une analyse d'image automatisée, cette technique permet d'obtenir des informations visuelles comme l'organisation spatiale des cellules, leur forme ou leur mouvement. Par exemple, la localisation d'une cellule peut donner des indices sur les signaux qu'elle reçoit notemment par le contact cellulaire et la distance de la cellule aux sources de signaux chimiques. Ainsi la localisation d'une cellule joue un rôle dans la chimiokinèse, la différenciation cellulaire, la fonction neuronale, la réponse immunitaire [19], etc. Aussi, la morphologie cellulaire constitue un biomarqueur pour la croissance cellulaire, la division, la mort, la différentiation, etc [40]. Enfin, la migration cellulaire est déterminante dans le développement embryonnaire, la guérison de plaies, la réponse immunitaire, la progression tumorale, les maladies vasculaires, etc [25]. Malheureusement, il est techniquement difficile d'isoler des cellules sur un critère visuel pour lequel il n'existe pas nécessairement de marqueur moléculaire. Il est donc impossible d'utiliser des techniques conventionnelles comme le FACS ou le MACS qui utilisent l'immunofluorescence et l'immunomagnétisme respectivement pour isoler des cellules.

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage de maîtrise a récemment développé une technique répondant à cet enjeu, la Single-Cell Magneto Optical Capture (scMOCa) [5]. Brièvement, la scMOCa permet d'isoler un petit nombre de cellules parmi une culture hétérogène avec une grande pureté et sensibilité à l'aide d'outils magnétiques. Les cellules

d'intérêt sont sélectionnées en se basant uniquement sur des caractéristiques visuelles observées au microscope. Une plus ample description de la technique est disponible à la section 4. Le travail de maîtrise que j'ai accompli est une application de la scMOCa à la migration de cellules métastatiques. Ce problème est très adapté à la technique, car la scMOCa permet d'isoler quelques cellules rares parmi un échantillon hétérogène et permettra peut-être de disséquer l'hétérogénéité phénotypique présente dans une culture de cellules cancéreuses et ainsi définir ou consolider une liste de biomarqueurs liés à l'agressivité métastatique.

1.0.2. Migration cellulaire dans le développement de métastases

La migration cellulaire joue un rôle primordial dans le développement des métastases, responsable d'environ 90% des décès causés par le cancer [46]. Par contre, il est très difficile de trouver les cibles moléculaires d'un traitement contre le développement des métastases à cause de la grande hétérogénéité intratumorale. En effet, il existe une très grande variété phénotypique et génotypique au sein d'une tumeur à cause des fréquentes mutations génétiques et de la grande variété dans l'expression des gènes. Ainsi, seulement une très petite proportion des cellules d'une tumeur primaire arrive à former une métastase, car peu de cellules possèdent toutes les caractéristiques biomécaniques et biochimiques nécessaires aux différentes étapes du développement d'une métastase. Très brièvement, comme illustré à la figure 1.1, le développement d'une méta-

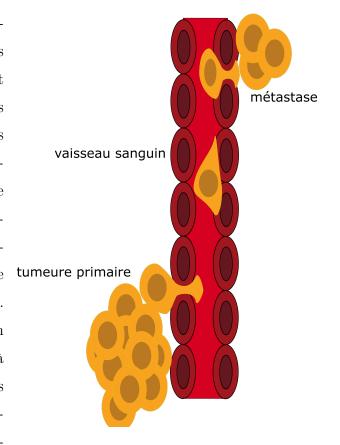


Fig. 1.1. Schématisation simplifiée des étapes menant à une métastase.

stase va comme suit. Après s'être détachées de leur tumeur primaire, les cellules tumorales circulantes migrent à travers la matrice extracellulaire entourant la tumeur, traversent la

membrane basale des vaisseaux lymphatiques ou sanguins et circulent dans le système vasculaire périphérique avant de se localiser à un nouveau foyer où elles forment une métastase [16].

Comme mentionné plus haut, seulement certaines cellules tumorales rassemblent un ensemble de propriétés leur permettant d'interagir avec le microenvironnement métastatique. Ainsi, comparer les différences entre les cellules formant la métastase et la tumeur primaire à l'aide de méthodes biochimiques conventionnelles a permis de découvrir plusieurs voies de signalisation liées à la dissémination [49]. Par contre, ces découvertes n'ont pas permis de découvrir un marqueur biochimique unique pour déterminer le potentiel métastatique et cibler un traitement unique. En effet, même à travers les cellules d'une métastase de provenance unicellulaire, on observe une grande variété phénotypique des cellules [52]. Cette hétérogénéité rend les méthodes d'analyse et d'isolation classiques inaptes à découvrir les subtilités du développement de métastases [39] [52]. L'étude biophysique des cellules en migration, quant à elle, est une approche prometteuse qui a récemment émergé afin de trouver des biomarqueurs caractérisant l'agressivité des cellules circulantes.

L'étude des traits biophysiques des cellules cancéreuses circulantes est une voie qui semble émerger pour caractériser l'invasivité du cancer. Pour se déplacer, la cellule doit être en mesure de générer et de transmettre des forces de contractions [31]. Ceci s'effectue via son adhésion à la matrice extracellulaire et son habileté à déformer son cytosquelette pour se contracter. Plusieurs tentatives ont d'ailleurs été effectuées pour corréler différents paramètres mécaniques à la motilité des cellules, tels que la taille des foyers d'adhésion [24], la force d'adhésion [4] [21], la rigidité de la cellule [61], etc. Par exemple, Beri et. al. se sont intéressés à étudier l'adhérence des cellules comme marqueur en isolant des cellules provenant de lignées métastatiques selon leur adhérence [4] [39]. Par contre, ces études ne semblent pas considérer toutes les caractéristiques biophysiques liées à la migration simultanément à cause de la méthode d'isolation des cellules utilisée. En effet, l'isolation de cellules métastatiques sélectionnées selon un ensemble de caractéristiques migratoires pour leur étude approfondie est un défi technique et n'a pas été accompli selon mes connaissances. Simplement capturer des cellules en migration après l'analyse de leur trajectoire est une façon élégante de considérer plusieurs caractéristiques biophysiques simultanément. Cette expérience est possible grâce à l'adaptation de la scMOCa au problème.

1.0.3. Objectifs de recherche

Objectifs globaux Nous exploiterons l'unique pouvoir de la scMOCa pour identifier, isoler et développer des clones de cellules uniques à partir d'une population de cellules hétérogène qui diffèrent selon leurs caractéristiques migratoires. Ceci mettra en place le décor pour le profilage du génome entier et des analyses fonctionnelles sur la population de cellules clones selon leur caractéristiques cinétiques [53]. Notre but ultime est d'identifier de nouveaux facteurs et voies de signalisation, ainsi que des signatures d'expression génétique, qui influencent la migration cellulaire et leur capacité à former des métastases.

Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Isoler, développer et caractériser des nouvelles populations cellulaires avec caractéristiques migratoires accrues, à partir d'une population hétérogène.

À l'aide de l'imagerie de cellules vivantes, nous identifierons les cellules et suivrons leurs trajectoires. Nous définirons des paramètres pour quantifier le mouvement des cellules et capturer celles présentant des propriétés cinétiques particulières. Les cellules capturées seront amplifiées et cultivées pour plusieurs générations et comparées à leur lignée parentale pour sélectionner des lignées présentant une grande motilité de façon stable. Nous utiliserons la lignée cellulaire MDA-MB-231 (lignée de cellule cancéreuse du sein).

Objectif 2: Accomplir une recherche non-biaisée pour trouver des nouveaux facteurs qui influencent la migration cellulaire. Le séquençage ARN sera utilisé pour profiler l'expression génétique.

1.0.4. Contenu du mémoire

L'automatisation ainsi que l'augmentation du volume de capture de la scMOCa, nécessaires à l'expérience, ont apporté quelques défis techniques à surmonter, qui sont le coeur de ce mémoire. Le chapitre 2 introduit quelques concepts généraux sur la régulation de la migration cellulaire. Ainsi les bases de la dynamique de l'actine et de l'adhésion dans différentes organelles nécessaire au mouvement cellulaire sont discutées. Le chapitre 3 précise sur les méthodes d'imagerie employées et leur développement. Notamment, il discute premièrement de la technique d'imagerie utilisée pour obtenir un bon contraste et éviter la phototoxicité, puis des techniques d'analyse et de segmentation d'image autant pour le suivi des cellules que pour la caractérisation des résultats. Le chapitre 4 présente la méthode de capture des

cellules utilisée, la *scMOCa*, et de son adaptation au présents enjeux. Le chapitre 5 développe sur les résultats des isolations et la caractérisation des populations obtenues tant au niveau cinétique que de l'analyse de séquençage ARN.

Chapitre 2

Migration cellulaire

2.1. Introduction

La migration cellulaire joue un rôle critique dans plusieurs phénomènes biologiques, et cela dès le début de vie d'un organisme. En effet, la migration cellulaire orchestre la morphogénèse lors du développement embryonnaire. Par exemple, pendant la gastrulation, un grand nombre de cellules se déplacent en feuillets d'où nait un embryon [23]. Un second phénomène mettant en scène la migration cellulaire est la surveillance immunitaire, pendant laquelle les leucocytes circulent afin de détruire des cellules infectées ou des microorganismes étrangers [17]. La réparation tissulaire consiste en un troisième exemple de migration cellulaire met en scène les cellules souches mésenchymales [18]. Un dernier exemple serait le développement de métastases, où quelques cellules de la tumeur primaire se délocalisent en suivant un signal chimique [33].

Bien que les cellules puissent migrer seules ou en groupes, [45] et suivre différents signaux chimiques, des gradients de rigidité du substrat ou des géométries particulières, le présent chapitre s'intéresse aux mécanismes de migration de la cellule isolée sans stimulation. D'abord, une description des différentes structures servant à la migration bidimensionnelle est élaborée, puis une comparaison à la migration cellulaire en 3D et finalement, des paramètres visant à quantifier le déplacement sont présentés.

2.2. Dynamique de l'actine en deux dimensions

Les cellules migrant en deux dimensions suivent en général le même patron. D'abord, le réseau d'actine pousse une protrusion, lamellipode ou filopode, dans une direction. Puis, des

points d'ancrage liant le cytosquelette au milieu extracellulaire sont formés à l'extrémité de la protrusion et maturent en se dirigeant vers le centre de la cellule sous l'effet de la tension exercée entre le réseau d'actine et la matrice extracellulaire. Il s'en suit une contraction de la myosine II qui a pour effet de contracter le derrière de la cellule et d'effectuer une traction contre le milieu extracellulaire. Les points d'ancrage se détachent à l'arrière de la cellule et le cycle recommence. On assiste alors à une polarisation de la cellule, c'est-à-dire qu'on retrouve des mécanismes biomoléculaires distincts à l'avant et à l'arrière de la cellule [43].

2.2.1. Lamellipode

Le lamellipode est une protrusion d'environ 100 à 160 nanomètres d'épaisseur qui se trouve à l'avant de la cellule. Il est principalement constitué d'un réseau dense de branchements en Y d'actine, formés par le complexe Arp2/3, qui pousse contre la membrane cellulaire. En 3D, il sert d'ancrage à la cellule lors de son déplacement à travers des interstices. Bien qu'il existe des modes de migration ne nécessitant pas de lamellipode, celui-ci est crucial dans la migration directionnelle persistante. [26]

Le lamellipode, présenté à la figure 2.1, est une structure dynamique dont le réseau d'actine est constamment modifié par l'ajout de nouveaux monomères d'actine aux filaments existant autant dans le but de les allonger que de les ramifier. Ce développement du réseau crée une force contre la membrane cellulaire et la pousse. Or, la quantité de monomères d'actine n'étant pas infinie à l'intérieur d'une cellule, les monomères d'actine sont dissociés du côté pointu des filaments afin d'être recyclés et ajoutés à l'extrémité barbelée des filaments. Toute cette machinerie moléculaire est contrôlée par différentes protéines qui ramifient et arrêtent la polymérisation des filaments d'actine, et désassemblent et recyclent les monomères d'actine. La ramification des filaments préexistants est assurée par le complexe Arp2/3 qui s'associe à une branche mère et sert de site de nucléation pour un nouveau filament fille à un angle caractéristique de $70 \pm 3^{\circ}$. Le complexe est donc critique pour le développement dendritique du réseau d'actine. La polymérisation des brins d'actine, ainsi que leur dissociation, est empêchée par l'association de protéines de coiffage à l'extrémité barbelée des filaments. Or, des protéines de la famille ENA/VASP ou des formines empêchent la coiffe des filaments d'actine et augmentent le taux d'élongation des filaments d'actine. Le désassemblage des monomères d'actine au bout pointu des filaments et leur recyclage est assuré par la famille ADF/cofiline et la twinfiline. Lors de leur dissociation, les monomères sont liés à de l'ATP alors qu'ils doivent être liés à l'ADP pour la polymérisation. C'est surtout les protéines associées à la cyclase et la profiline qui promeuvent les échanges de nucléotides. Toute cette machinerie biochimique formant les lamellipodes est principalement régulée par un membre de la famille des Rho GTPases, Rac1, qui assure un branchement approprié du réseau de filaments d'actine aux abords du lamellipode. En effet, il assure la ramification des branches d'atine en activant le complexe Arp2/3 à travers l'activation des protéines WAVE et réduit aussi le désassemblage des fibres d'actine en inhibant la cofiline, par l'activation des PAK et LIMK.

2.2.2. Le filopode

Le filopode, représenté à la figure 2.2, est une protrusion instable fine qui semble servir de senseur pour aider la cellule en migration à trouver son chemin. Son élongation et sa rétraction sont contrôlées par la polymérisation et le désassemblage des filaments d'actine. Deux mécanismes peuvent être à la source d'un filopode : l'élongation à partir d'un lamellipode et la nucléation à la pointe. Dans le premier cas, ce serait le complexe $\rm Arp2/3$ qui serait un site de nucléation et $\rm Ena/VASP$ protège de la coiffe , alors que dans le deuxième, ce serait la formine qui serait le point de nucléation et qui protégerait l'assemblage des filaments. Afin de repousser la membrane plasmique, 10 filaments seraient suffisants et 30, optimal. Les différents filaments sont retenus en paquet par la fascine, la fimbrine, l' α -actine et la filamine.

2.2.3. Les fibres de stress

Les fibres de stress sont des assemblages dynamiques de fibres d'actine et de myosine, protéine motrice, qui s'alignent avec les tensions de la matrice extracellulaire par des points d'ancrage. Bien que le rôle de ces structures puisse varier d'un type cellulaire à l'autre et d'une matrice à l'autre, la formation et la stabilisation des fibres de stress est contrôlée par la famille de petites protéines GTPase RhoA par un grand éventail de protéines se liant à l'actine ou la myosine. Leur assemblage est complexe par rapport aux réseaux d'actine retrouvés aux lamellipodes et filipodes et implique plusieurs mécanismes de nucléation de l'actine. Il existe trois types de fibres de stress, représentées à la figure 2.3 : les fibres dorsales, les arcs transversaux et les fibres ventrales.

Les fibres de stress dorsales sont situées dans la région du lamellipode et sont associées à des points d'ancrage à leur extrémité distale et ventrale. Elles ne contiennent pas de myosine et ne sont donc pas contractiles. Par contre, elles peuvent relier d'autres fibres de stress contractiles aux points d'ancrage. Leur nucléation et leur élongation sont assurées par les formines et la famille Ena/VASP à partir des points d'ancrage.

Les arcs transversaux sont formés de brins d'actine provenant du lamellipode. Leur nucléation et leur élongation provient des complexes Arp2/3 ou des formines. Malgré qu'ils ne soient pas directement rattachés à des points d'ancrage, ils contiennent de la myosine et sont donc contractiles. Ils ne sont pas directement liés à la migration cellulaire, mais ils sont importants pour la formation du lamellipode.

Les fibres de stress ventrales sont généralement formées perpendiculairement à la direction de migration en réponse aux forces transmises par la matrice extracellulaire à partir des fibres dorsales et des arcs transversaux. Ces fibres sont importantes pour la migration, à la morphogénèse et à la mécano détection, car elles sont contractiles et leurs deux extrémités sont associées à des points d'ancrage à la matrice extracellulaire.

Comme mentionné précédemment, c'est grâce à la myosine II que les faisceaux contractiles peuvent se contracter. Les cellules mammifères utilisent trois types de myosine II non musculaire, la myosine II A, la myosine II B et la myosine II C. Dans les cellules polarisées, la myosine II A et B sont des composantes centrales des fibres de stress et sont enrichies en périphérie du lamellipode et dans la région postérieure de la cellule. La myosine II B est capable de tenir la tension longtemps et est utile dans les parties corticales et et postérieures de la cellule, alors que la myosine II A exerce la tension plus rapidement et est utile dans la partie frontale de la cellule progressant rapidement. Les tropomyosines, quant à elles, sont importantes pour l'assemblage ou la stabilité des faisceaux.

2.2.4. Points d'ancrage à la matrice extracellulaire

Afin de générer une force sur la matrice extracellulaire et permettre le mouvement, la tension de la contraction des fibres d'actine par la myosine II est relayée aux intégrines par des organelles macromoléculaires comportant des centaines de molécules. Si ces organelles hautement dynamiques formant un lien indirect entre le réseau d'actine et les intégrines s'engagent, on observe un ralentissement de la vitesse de rétraction du réseau d'actine et une

force est générée au substrat. Ces organelles, qu'on nommera ici points d'ancrage (PA), sont régulées par la tension générée à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule par la contraction de la myosine et la rigidité du substrat. Les PAs se forment d'abord dans la protrusion du lamellipode sous la forme de petits points contenant des intégrines, des focal adhesion kinases (FAK) et des paxillines, dont la durée de vie est d'approximativement 1 minute. S'ils sont actifs, ils migrent vers le lamellum, structure proximale par rapport au lamellipode, où ils maturent et se stabilisent. Leur maturation requiert l'assemblage d'une fibre de stress et l'activation de la myosine II, c'est alors qu'ils s'allongent dans la direction du mouvement rétrograde de l'actine, soit dans la direction du mouvement de la cellule. Les PAs sont des structures hautement dynamiques dont les protéines s'échangent rapidement avec celles du réservoir cytoplasmique, ce qui notamment est le cas des paxillines, vinculines, α -actinines, talines, kindlines, FAKs, zynines, VASP, ILK, etc. Les intégrines diffusent rapidement sur la membrane cellulaire et sont immobilisés lors de leur activation.

Les PAs sont des structures dynamiques qui contiennent des centaines de molécules, incluant notamment des protéines d'échafaudage et des protéines structurelles, dont la composition évolue en fonction des stimuli. Le PA mature est stratifié verticalement, représenté à la figure 2.4, soit dans la direction perpendiculaire à la membrane ventrale de la cellule, en trois couches. La couche de signalisation des intégrines est la plus proche de la membrane plasmique (environ 30 nm) et comprend les queues cytoplasmiques des intégrines, les paxillines et les FAKs. La couche de signalisation de l'actine est la plus haute (plus de 50 nm au dessus de la membrane plasmique) et comprend l'actine et les protéines se liant à l'actine, comme les zynines, les VASP, les α -actinines, etc. La couche de transduction de la force est celle qui lie les deux autres couches et est composée du corps des talines et des vinculines. Les talines sont de grandes protéines dont la tête intéragit directement avec les queues des intégrines et la queue, avec l'actine. Le PA mature est aussi organisé horizontalement, soit parallèlement à la membrane plasmique ventrale, dans la direction de la contraction de l'actine. Son long axe est d'ailleurs selon cette direction. De manière générale, on retrouve les protéines de signalisation des intégrines plus près du bord de la cellule et les protéines de signalisation de l'actine plus près du corps de la cellule. Les talines sont inclinées, c'est-à-dire que leur tête est plus loin du centre de la cellule que leur queue. Ceci suggère que les PAs s'alignent avec la force qu'ils subissent. Ainsi, les PAs sont composés de multiples protéines qui sont stratifiées en trois couches horizontales selon leurs fonctions et interactions. [10]

La tension exercée par le cytosquelette d'une cellule en migration est transmise à la matrice extracellulaire via les PAs. La tension est aussi un régulateur de la maturation des PE, autant dans le lamellipode que dans le lamellum. En effet, le taux de croissance des PAs est directement proportionnel au flux d'actine et à la tension, qu'elle provienne de la rigidité de la matrice extracellulaire ou de la contraction de la myosine II.

2.3. Migration cellulaire en 3D

Cette section élabore sur la migration cellulaire en trois dimensions afin de comprendre si les expériences en deux dimensions peuvent être représentatives des mécanismes migratoires qu'on retrouve en trois dimensions. Elle résume les propos tenus dans l'article de Kenneth M. Yamada et Michael Sixt [59]. Les propos tenu dans cette sous-section est sont illustré à la figure 2.5

Presque tous les phénomènes de migration cellulaire s'effectuent en trois dimensions, c'est-à-dire qu'ils sont intégrés dans un contexte d'assemblage cellulaire ou d'une matrice extracellulaire. Bien que le principe de base de locomotion soit semblable dans toutes les dimensions, i.e. que la cellule exerce une force sur son milieu grâce à la contraction de son cytosquelette d'actomyosine, le confinement tridimensionnel permet de diminuer la dépendance du déplacement à l'adhérence à une surface. En effet, on observe une variété de modes de migrations en trois dimensions qui ne possèdent pas de parallèles dans des dimensionnalités inférieures. Les modes de migration majeurs en 3D sont mésenchymal, amoeboid et lobopodial, qui sont des modes distincts du mode cyclique retrouvé en 2D décrit plus haut.

La migration de cellules en 3D oscille entre trois modes qui sont déterminés par l'adhésion au substrat, la protrusion d'actine vers l'avant et la contraction du réseau d'actomyosine. Ces trois paramètres adoptent différentes dynamiques spatiotemporelles en fonction de facteurs intrinsèques (expression génétique) et extrinsèques à la cellule (chemoatractants, dégradabilité du substrat, élasticité et viscosité de la matrice extracellulaire, la topologie et la taille des pores de la matrice extra cellulaire, etc.). Le mode mésenchimal est celui qui peut s'apparenter le plus avec celui observé en 2D à cause d'éléments communs comme : la polymérisation de l'actine pousse le bord d'attaque créant un lamellipode, les grandes forces

d'adhésion, et une machinerie moléculaire semblable utilisant les intégrines et le PAs pour transmettre la tension. Ainsi le mode mésenchymal se charactérise par une forme allongée d'une grande plasticité, une organisation du cytosquelette d'actine qui reflète l'arrangement des fibres de la matrice extracellulaire et le remodelage de la matrice avec des protéases. Les modes amoeboide et lobopoidal sont très différents du modèle de cycle retrouvé en 2D. Les cellules migrant en mode amoeboid sont arrondies et se déforment facilement. Contrairement au mode mésenchymal où la cellule exerce une force de traction pour avancer, le mode amoeboide, beaucoup plus véloce, utilise le minimum d'adhésion et se déforme pour se déplacer à travers la topologie du milieu. Ses intégrines sont orientés généralement parallèlement à la surface afin de générer de la friction. Le nombre réduit de molécules servant à l'adhérence lui permet de réduire le temps consacré à détacher les molécules à l'arrière de la cellule et lui permet d'avancer nettement plus rapidement et d'être indépendant de la composition chimique de l'environnement. Pour se déplacer, elle utilise un bleb résultant de la déformation de la membrane plasmique sous une pression hydrostatique provoquée par la contraction du cortex d'actomyosine.

Comme mentionné précédemment, les cellules en migration peuvent instantanément changer de mode de migration. Par exemple, une cellule en mode mésenchymal lorsqu'elle se retrouve très confinée peut changer pour le mode amoeboide. La commutation dépend énormément de la modulation de la voie Rho-ROCK afin de contracter davantage l'arrière de la cellule.

2.4. Paramétrisation du mouvement d'une cellule unique

Les expériences de migration cellulaire sont très souvent effectuées sur un substrat bidimensionnel recouvert d'un polymère organique comme du collagène, de la fibronectine, de la polylysine, etc. Puis les cellules sont imagées au microscope pour quelques heures à un intervalle constant, permettant le suivi des cellules manuellement ou par des moyens informatiques. Les trajectoires obtenues relient les points spacio-temporels occupés par les cellules et résultent en une séquence temporelle de points $\vec{x} = [x_1, x_2, x_3, ..., x_N]$ où N est le nombre de moments. Afin de minimiser les erreurs de suivi, il est suggéré d'accomplir l'acquisition à une fréquence telle que la cellule se déplace de moins d'une largeur cellulaire entre chaque frame [29]. Analyser les différences migratoires entre deux populations de cellules, qui diffèrent par leur stimulation, leur type cellulaire, leur substrat, etc. nécessite des outils de mesure propres aux trajectoires. Pour ce faire, deux approches sont disponibles : l'utilisation d'un modèle mathématique de migration cellulaire et la paramétrisation de la trajectoire par la mesure de descripteurs.

Les modèles de migration cellulaire tirent leur origine de la marche aléatoire, ou mouvement brownien, décrite pour la première fois par nul autre que Einstein en 1905 [15]. Or, ce modèle ne décrit pas la persistance directionnelle retrouvée dans les trajectoires cellulaires. Pour répondre à ce problème, il a été proposé d'utiliser l'équation de Langevin à laquelle on ajoute un biais directionnel dans le cas de migration suivant un gradient chimique ou physique [34] [9]. La version adimensionnelle est présentée à l'équation (2.4.1)

$$\frac{\mathrm{d}\vec{v}(t)}{\mathrm{d}t} = -\frac{1}{\tau}\vec{v}(t) + \frac{\sqrt{2D}}{\tau}(\vec{n}(t) + \vec{u}) \tag{2.4.1}$$

où $\vec{v}(t)$ est la vitesse en fonction du temps, t le temps, τ la durée de persistance, D la constante de diffusion, $\vec{n}(t)$ le bruit gaussien et \vec{u} le biais directionnel. Des trajectoires simulées par Svensson et al. [53] sont représentées à la figure 2.6, où $D = \tau^2$.

Parmi les avantages de tels modèles figurent l'aisance à analyser et interpréter les résultats et le faible nombre de paramètres à ajuster. En effet, afin de déterminer le biais $\vec{u}(t)$ et le coefficient de diffusion D, il suffit d'effectuer.

$$E[d_{tot}](t) = \vec{u}(t)$$
 (2.4.2)

et

$$E[MSD](t) = |\vec{u}|^2 t^2 + 4Dt \tag{2.4.3}$$

où E[x] est l'espérance de x, d_{tot} est la distance totale parcourue et MSD le carré du déplacement moyen. Par contre, toutes les situations ne répondent pas au même modèle. Par exemple, dans plusieurs cas, le bruit \vec{u} n'est pas gaussien. Dans de tels cas, il faut développer un modèle propre à l'expérience.

Pour éviter de développer un modèle, on peut mesurer des paramètres directement à partir de la trajectoire. Une liste de paramètres récurrents dans la littérature et leur définition est présentée à la table 2.1. Ceux-ci ne dépendent pas de la qualité de l'ajustement à un modèle ni de la validité du modèle et sont facilement calculables. Par contre, le nom des

paramètres ne fait pas l'unanimité à travers la littérature et un même paramètre peut porter plusieurs noms. Aussi, afin d'interpréter convenablement les résultats, un paramètre n'est pas suffisant pour décrire la dynamique d'un échantillon. Svensson et al. [53] l'illustre bien à la figure 2.7 en analysant les trajectoires présentées à al figure 2.6. On y observe que d_{tot} et d_{max} sont plus grands pour les trajectoires biaisées que non biaisés de mêmes persistances. En effet, pour déduire le biais et la persistance, les quatre paramètres représentés sont nécessaires.

Tab. 2.1. Paramètres décrivant la trajectoire d'une cellule et leur définition

Paramètre	Définition
Distance entre les points de la trajectoire	$d(\vec{x}_i \vec{x}_j) = \sqrt{\sum_{d=1}^{D} (x_{i,d} - x_{j,d})^2}$
	où $D = 2or3$
Vitesse moyenne	$\langle speed \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{d(\vec{x}_i \vec{x}_j)}{dt}$
Distance totale	$d_{tot} = \sum_{i=1}^{N} d(\vec{x}_i \vec{x}_j)$
Distance nette	$d_{net} = d(\vec{x}_1 \vec{x}_N)$
Distance maximale	$d_{max} = \max_{i,j} d(\vec{x}_i \vec{x}_j)$
Moyenne du déplacement quadratique	$MSD = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} d(\vec{x}_i \vec{x}_{i+1})^2$
Indice de méandre	$MI = \frac{d_{net}}{d_{tot}}$
Ratio de rayonnement	$OR = \frac{d_{max}}{d_{tot}}$
Vitesse instantanée	$\vec{v}_i = \frac{x_i - x_{i+1}}{\Delta t}$
Vitesse instantanée scalaire	$v_i = ec{v}_i $
Autocorrélation de la vitesse	$v_{i,j}^{ac} = \vec{v}_i \vec{v}_j, i > j$
Angle de braquage global	$\alpha_i = atan\left(\frac{x_{i,2} - x_{i+1,2}}{x_{i,1} - x_{i+1,1}}\right)$
Angle de braquage relatif	$\alpha_i = atan\left(\frac{x_{i,2} - x_{i+1,2}}{x_{i,1} - x_{i+1,1}}\right)$ $\phi_i = acos\left(\frac{\vec{v}_i \cdot \vec{v}_{i+1}}{ \vec{v}_i \cdot \vec{v}_{i+1} }\right)$
Autocorrélation de la direction	$DA = cos(\alpha_{i+1} - \alpha_i)$

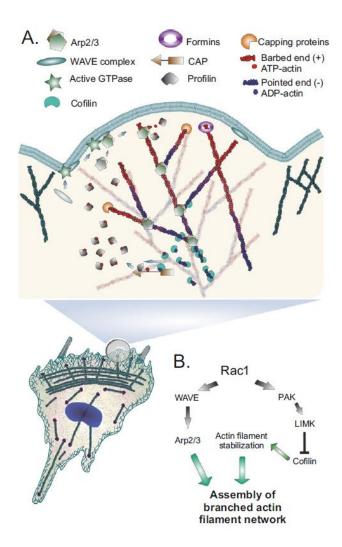


Fig. 2.1. Organisation et assemblage du réseau d'actine du lamellipode [26]. A) Le lamellipode à l'avant d'une cellule comprend un réseau ramifié de filaments d'actine, qui sont nucléés par le complexe Arp2/3. La croissance rapide des filaments génère une force contre la membrane cellulaire qui la pousse vers l'avant. En plus du complexe Arp2/3, certaines formines contribuent à la nucléation de filaments d'actine. L'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine, ainsi que le recyclage des monomères d'actine, sont contrôlés par plusieurs protéines incluant les protéines de coiffe, la cofiline, la profiline et les CAP. B) Rac1 active la ramification et l'assemblage des filaments d'actine via le complexe WAVE et elle prévient le désassemblage des filaments près de la membrane cellulaire en inhibant la cofiline via PAK et LIMK.

Reprinted/adapted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Cham, Actin Filament Structures in Migrating Cells by Jaakko Lehtimäki, Markku Hakala, Pekka Lappalainen © SpringerInternationalPublishingSwitzerland (2016)

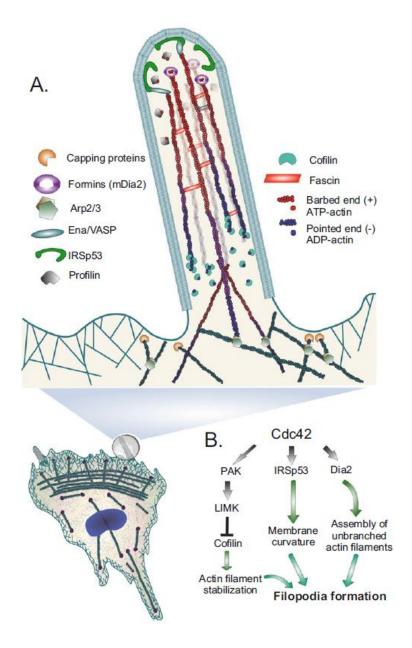


Fig. 2.2. Organisation et architecture de la matrice de filaments d'actine dans le filopode. [26] A) Le filopode contient un seul paquet unipolaire de filaments d'actine dont le côté barbelé à croissance rapide pointe vers l'extrémité du filopode. B) Cdc42 active la formine Dia2 pour promouvoir l'assemblage des filaments d'actine. Il inactive la cofiline via LIMK et PAK, et inhibe ainsi le désassemblage des filaments d'actine, et intéragit avec IRSp53, qui génère la courbure de la membrane et fonctionne comme une protéine d'échaffaudage pour d'autres régulateurs de la dynamique de l'actine.

Reprinted/adapted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Cham, Actin Filament Structures in Migrating Cells by Jaakko Lehtimäki, Markku Hakala, Pekka Lappalainen © SpringerInternationalPublishingSwitzerland (2016))

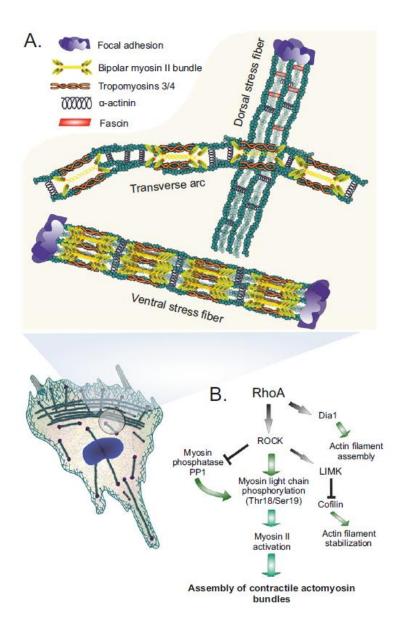


Fig. 2.3. Assemblage et organisation des fibres de stress d'actine [26]. A) Les fibre de stress dorsales sont des paquets de filaments d'actine non-contractiles qui s'associent aux points d'adhésion et s'allongent dans leur direction. Les arcs transverses sont contractiles et s'associent aux fibres de stress dorsales. Les fibres de stress ventrales sont contractiles et communiquent avec la matrice extracellulaire à travers des points d'adhésion situés à leurs deux extrémités. B) RhoA promouvoit l'assemblage des filaments d'actine via la formine Dia1 et inhibe le désassemblage des filaments d'actine par l'inhibition de la cofiline via ROCK et LIMK. De plus, RhoA promouvoit l'activation de la myosine II via ROCK.

Reprinted/adapted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Cham, Actin Filament Structures in Migrating Cells by Jaakko LehtimäkiMarkku HakalaPekka Lappalainen © SpringerInternationalPublishing-Switzerland (2016)

18

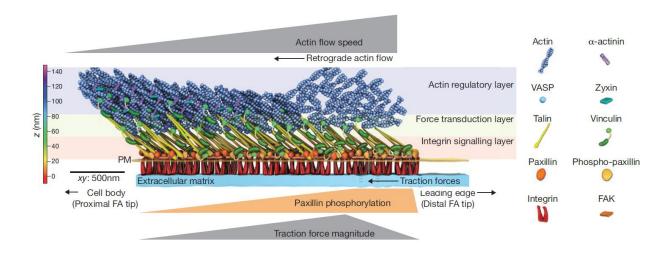


Fig. 2.4. Représentation tridimensionnelle d'un point d'ancrage [10]
Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH:
Nature, Nature Cell Biology, Integration of actin dynamics and cell adhesion by a threedimensional, mechanosensitive molecular clutch, Lindsay B. Case & Clare M. Waterman,
Copyright © Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All
Rights Reserved. (2015)

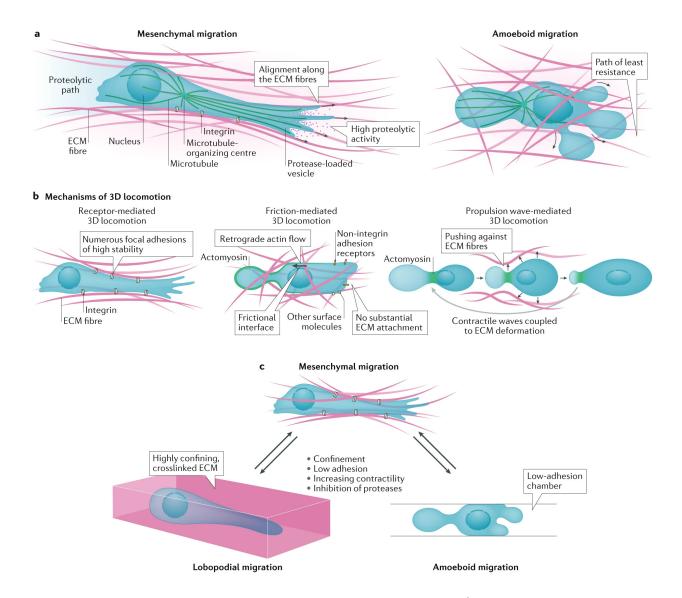


Fig. 2.5. Modes de migration mésenchymal vs amoeboid. a) La cellule mésenchymale s'aligne dans le sens des lignes de tension des fibres de la matrice extracellulaire et crée son propre chemin en digérant la matrice extracellulaire. La cellule amoeboide ne s'aligne pas avec la matrice extracellulaire et se déplace à travers des pores préexistants. Le centre d'organisation des microtubules est situé devant le noyau des cellules mésenchymales, alors qu'il est situé derrière le noyau des cellules amoeboides. b) Présentation de trois modes de migration et de leur dépendance à l'adhésion au milieu extracellulaire. c) Dépendemment du contexte, les cellules peuvent changer de mode de migration.

Reprinted by permission from **Springer Nature Customer Service Centre GmbH**: **Nature**, **Nature Cell Biology**, Mechanisms of 3D cell migration, Kenneth M. Yamada and Michael Sixt, Copyright © Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. (2019)

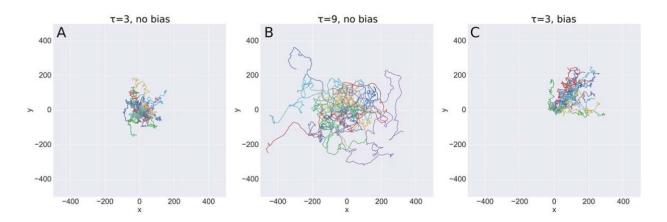


Fig. 2.6. Trajectoires simulées par Svensson et al. [53]. Les trajectoires sont obtenues à l'aide du modèle de marche aléatoire persistante présenté à l'équation (2.4.1) avec A) une faible persistance sans biais B) une grande persistance sans biais C) faible persistance avec biais directionnel vers le coin haut droit.

Permission de réutiliser ou de reproduire par John Wiley & Sons, Inc.: Wiley, Journal of Quantitativfe Cell Science, Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis, Carl-Magnus Svensson, Anna Medyukhina, Ivan Belyaev, Naim Al-Zaben, Marc Thilo Figge © International Society for Advancement of Cytometry (2017)

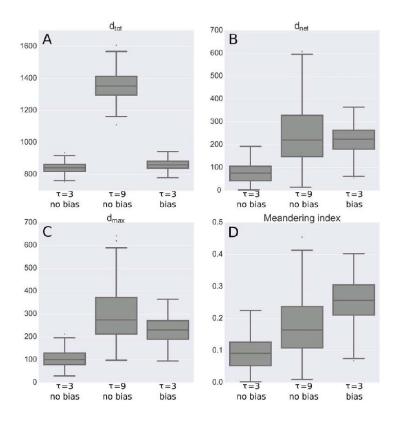


Fig. 2.7. Distribution de quatre paramètres migratoires sur les trajectoires illustrées à la figure (2.6). d_{max} est la distance maximale retrouvée entre deux points d'une trajectoire, d_{tot} est la distance totale parcourue, d_{net} est la distance entre le point initial et le point final d'une trajectoire et l'indice de méandre est le ratio de d_{net} sur d_{tot} .

Permission de réutiliser ou de reproduire par John Wiley & Sons, Inc. : Wiley, Journal of Quantitativfe Cell Science, Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis, Carl-Magnus Svensson, Anna Medyukhina, Ivan Belyaev, Naim Al-Zaben, Marc Thilo Figge © International Society for Advancement of Cytometry (2017)

Chapitre 3

Imagerie, segmentation cellulaire et programme de suivi des cellules

3.1. Introduction

Une segmentation robuste des cellules permet une quantification précise du mouvement cellulaire. Or, il est techniquement difficile d'acquérir des images microscopiques suffisamment contrastées pour être segmentées à un rythme rapide, sur une longue période et sans altérer la viabilité des cellules.

En biologie cellulaire et moléculaire, la microscopie par fluorescence est très appréciée, car elle permet d'identifier précisément des structures intracellulaires et offre un contraste marqué. Le DAPI, par exemple, est un marqueur fluorescent qui s'attache à l'ADN et qui permet d'identifier le noyau cellulaire. Il est couramment utilisé pour distinguer les cellules et identifier la phase cellulaire dans laquelle elles se trouvent. [62] Des algorithmes utilisant des techniques de seuillage d'intensité suivi de watershed sont très efficaces pour séparer les noyaux collés [27]. Par contre, plusieurs marqueurs fluorescents sont toxiques et ne permettent pas l'imagerie de cellules vivantes. Pour ceux qui ne le sont pas, il existe tout de même un compromis entre l'énergie lumineuse totale irradiée sur les cellules et leur viabilité. Plus un fluorophore est illuminé, plus il est probable qu'il photoblanchisse, processus toxique pour les cellules. Celles-ci peuvent mourir pendant l'acquisition ou changer de comportement [14] [56]. La microscopie en fluorescence est donc à éviter lors de longues séances de captures d'images [60].

La technique de microscopie en transmission standard, bien qu'elle soit facile d'approche et permette une haute fréquence d'acquisition sur une longue période sans affecter le comportement des cellules, offre un piètre contraste. La différence d'indice de réfraction entre le milieu de culture aqueux et la cellule, principalement formée d'eau, est trop faible pour obtenir une image contrastée. Des techniques intégrant la phase de la lumière, tel que la microscopie à contraste interférentiel et la microscopie à contraste de phase améliorent le contraste en ajoutant des pièces optiques simples dans le chemin lumineux. Or, segmenter deux cellules rapprochées ou mitotiques reste tout de même un défi [30]. Plusieurs approches ont vu le jour mettant en scène le seuillage en intensité, la détection de motifs, le filtre par des opérations morphologiques [1][22], l'ajustement d'un modèle déformable [55], etc. La technique qui semble toutes les surpasser utilise un réseau de neurones convolutif [44]. Or, l'entraînement du réseau requiert une grande sélection d'images segmentées à la main. La méthode d'imagerie choisie dans ce travail, la microscopie en champ sombre, permet d'utiliser des méthodes classiques de segmentation d'image grâce au bon contraste qu'elle offre sans toutefois intervenir dans le comportement de la cellule. Étonnement, la microscopie en champ sombre n'est pas couramment utilisée dans le suivi cellulaire, probablement car il est difficile d'analyser la morphologie de la cellule à l'aide de cette technique.

3.2. Microscopie en champ sombre

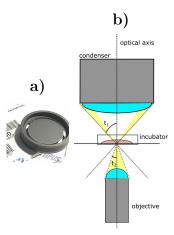


Fig. 3.1. Représentation du système d'illumination en champ sombre utilisé. a) Masque de phase IX-Ph3 d'Olympus b) système d'illumination

La microscopie en champ sombre est la technique d'imagerie choisie pour suivre la migration des cellules dans ce projet. Elle possède les avantages de la microscopie en transmission tout en offrant un contraste semblable à la microscopie en fluorescence. Elle tire son contraste de la lumière qui est diffusée par l'échantillon illuminé par un cône de lumière creux. Pour créer cette illumination particulière, les condenseurs commerciaux sont composés de miroirs réfléchissant la lumière à un angle très grand, ils possèdent donc une grande ouverture numérique, entre 0,85 et 0,95, et sont conçus pour être utilisés avec une vaste gamme d'ouverture numérique d'objectifs de microscope. Or, cette grande ouverture numérique implique une faible distance de travail, ne laissant pas de place pour un incubateur et rendant les condenseurs commerciaux inutilisables pour ce projet. Afin de contourner cet obstacle, j'ai composé un condenseur de champ sombre en ajoutant un disque de phase dans un condenseur de 0,55 d'ouverture numérique, comme suggéré précédemment [2] et illustré à la figure 3.1. Cette disposition limite l'illumination en champ sombre aux objectifs de 10x.

Afin de bien comprendre ce qui est observé lors de l'imagerie par microscopie en champ sombre, ainsi que d'évaluer son potentiel à imager en trois dimensions, j'ai effectué une simulation qui sera discutée dans les sections 3.2.1 et 3.2.2.

3.2.1. Méthodes

3.2.1.1. Modèle de diffusion

La diffusion est le phénomène par lequel la lumière est déviée dans diverses directions lorsque l'onde lumineuse interagit avec des objets irréguliers. Par exemple, lorsque la lumière traverse un tissu organique, l'hétérogénéité du milieu fait dévier la lumière par de multiples réfractions. Encore, lorsque la lumière interagit avec une surface rugueuse, elle subit des réfractions et réflexions à différents angles et est redirigée de façon aléatoire. Dans ce modèle, je ne m'intéresserai qu'à la diffusion à travers une surface rugueuse. Cette surface, schématisée à la figure 3.2, sera modélisée par une variation stochastique de hauteur qui a une distribution de probabilité p(z) gaussienne de moyenne à z=0 et d'écart-type σ . La longueur de corrélation de hauteur est paramétrisée par τ .

$$p(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma^2}\right) \tag{3.2.1}$$

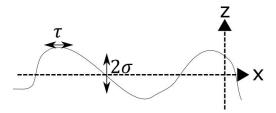


Fig. 3.2. Représentation d'une surface rugueuse et sa paramétrisation. L'écart-type de la distribution de hauteur est σ et la longueur de corrélation des hauteurs τ .

Aussi, bien que la diffusion affecte la lumière transmise et réfléchie, nous ne nous intéresserons ici qu'à la lumière transmise, car c'est elle qui est capturée en microscopie en champ sombre.

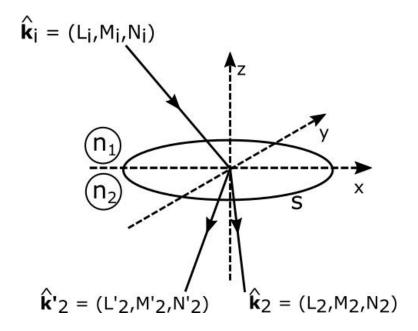


Fig. 3.3. Transmission à une interface rugueuse. Les vecteurs d'onde normalisés incident (\hat{k}_i) , réfracté (\hat{k}_2) et diffusé (\hat{k}'_2) sont illustrés. La surface rugueuse S sépare deux milieux d'indice de réfraction n_1 et n_2 . Figure inspirée du chapitre 10 du livre de Braat et Török [8].

Comme illustré à la figure 3.3, la transmission de la lumière à une interface rugueuse comporte la transmission spéculaire, celle qui est régie par la loi de Snell-Descartes $n1\sin\theta_1=n2\sin\theta_2$ où les n_x sont les indices de réfraction des milieux x et θ_x les angles à la normale de la surface, et de la transmission diffuse. Les deux types de transmissions ont une importance relative qui dépend de la taille de la rugosité par rapport à la longueur d'onde. En effet, si $[k_0\sigma(n_1N_i-n_2N_2)] >> 1$, c'est-à-dire que la rugosité σ est beaucoup plus grande

que la longueur d'onde λ_0 , l'amplitude de l'onde transmise de façon spéculaire, présentée à l'équation (3.2.2), est presque nulle. En effet, ceci affecte le terme de transmission spéculaire $T_d = \exp\{-[k_0\sigma(n_1N_i - n_2N_2)]^2\}$ trouvé dans l'équation (3.2.2). Le phénomène de diffraction est inclus dans cette équation sous la forme du polynôme de Bessel $\frac{2J_1(x)}{x}$.

$$\langle U(L'_{2}, M'_{2}) \rangle = -i\pi \rho_{0}^{2} U_{0} \frac{n_{2} k_{0} \exp(in_{2} k_{0} R)}{2\pi R} \left(\frac{N_{2} + N'_{2}}{2} \right) \exp \left\{ -\frac{\left[k_{0} \sigma(n_{1} N_{i} - n_{2} N'_{2})\right]^{2}}{2} \right\}$$

$$\times \frac{2J_{1} \left(n_{2} k_{0} \rho_{0} \sqrt{(L'_{2} - L_{2})^{2} + (M'_{2} - M_{2})^{2}}\right)}{\left(n_{2} k_{0} \rho_{0} \sqrt{(L'_{2} - L_{2})^{2} + (M'_{2} - M_{2})^{2}}\right)}$$

$$(3.2.2)$$

Ainsi, si $[k_0\sigma(n_1N_i-n_2N_2)] << 1$, on se trouve alors en présence de diffusion faible, où l'intensité transmise par diffusion est décrite par l'équation (3.2.3).

$$\langle I(L'_{2}, M'_{2}) \rangle = I_{0} \frac{\pi^{4} \tau^{2} \sigma^{2} n_{2}^{2} \rho_{0}^{2} (N_{2} + N'_{2})^{2} (n_{1} N_{i} - n_{2} N'_{2})^{2}}{R^{2} \lambda_{0}^{4}}$$

$$\times \exp \left\{ -\frac{\pi^{2} \tau^{2} n_{2}^{2}}{\lambda_{0}^{2}} \left[(L'_{2} - L_{2})^{2} + (M'_{2} - M_{2})^{2} \right] \right\}$$
 (3.2.3)

Sinon, on se trouve en présence de diffusion forte, dont l'intensité transmise est présentée à l'équation (3.2.4).

$$\langle I(L'_2, M'_2) \rangle = I_0 \frac{n_2^2 \rho_0^2 (N_2 + N'_2)^2}{8R^2 (n_1 N_i - n_2 N'_2)^2 \sigma_B^2}$$

$$\times \exp \left\{ -\frac{n_2^2}{2(n_1 N_i - n_2 N'_2)^2 \sigma_B^2} \left[(L'_2 - L_2)^2 + (M'_2 - M_2)^2 \right] \right\}$$
 (3.2.4)

Pour les deux équations décrivant la transmission diffuse, deux termes se distinguent. Le premier, celui qui multiplie I_0 , concerne l'intensité maximale diffusée en fonction de l'angle d'incidence, ou de réfraction spéculaire, et de la rugosité de surface. Le second terme, celui dans l'exponentielle, concerne la distribution angulaire de la diffusion et est en fonction de l'écart angulaire entre le faisceau réfracté spéculaire et les faisceaux diffusés. La dérivation des équations ci-dessus se trouve dans le chapitre 10 du livre $Imaging\ Optics$ de Joseph Braat et Peter Török [8]. Toutes les définitions des variables présentées sont fournies dans la table 3.1.

Tab. 3.1. Variables utilisées dans la simulation. Les variables ne possédant pas d'unité de mesure sont adimensionnelles.

Variable	Définition
\overline{I}	intensité lumineuse diffusée (u.a.)
I_0	intensité lumineuse du faisceau incident (u.a.)
n_1	indice de réfraction du premier milieu (eau)
n_2	indice de réfraction du second milieu
λ_0	longueur d'onde de la lumière (nm)
$k_0 = 2\pi/\lambda_0$	nombre d'onde du faisceau incident dans le vide (nm^{-1})
$\vec{k_i} = (L_i, M_i, N_i)$	vecteur d'onde normalisé incident
$\vec{k}_2 = (L_2, M_2, N_2)$	vecteur d'onde normalisé réfracté
$\vec{k}_2' = (L_2', M_2', N_2')$	vecteur d'onde normalisé diffusé
σ	rugosité de la surface (nm)
au	longueur de corrélation latérale de la surface rugueuse (nm)
σ_B	valeur RMS de la pente des facettes de surface projetée sur le plan y=0
$ ho_0$	rayon du faisceau incident
R	distance à la surface à laquelle on mesure l'intensité diffusée

L'intensité lumineuse diffusée dépend de l'angle du faisceau incident par rapport à la surface, de l'angle du faisceau diffusé, de la rugosité de la surface, de la longueur d'onde et de la différence d'indice de réfraction. Par exemple, la figure 3.4 montre l'intensité de lumière transmise en fonction de la première composante du vecteur transmis, soit $sin(\theta_2)$, pour deux valeurs de rugosité. On constate que la partie diffuse de la transmission occupe une plus grande proportion de la lumière transmise quand σ est plus grand. Une fois l'intensité intégrée sur les angles diffusés, on observe aussi que l'angle du faisceau incident influence la quantité de lumière transmise, comme illustré à la figure 3.5.

3.2.1.2. Éclairage et détection

Pour ne collecter que la lumière qui est diffusée par l'échantillon, et ainsi obtenir un bon contraste dans l'image, l'illumination de l'échantillon doit se faire à un angle à l'axe

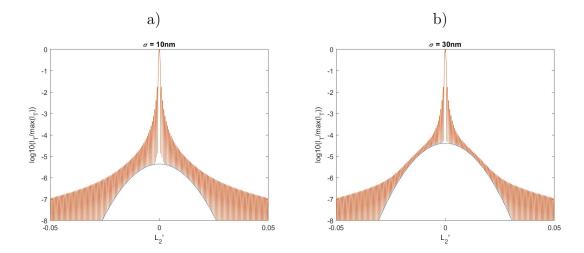


Fig. 3.4. Diffusion angulaire en transmission à travers une surface rugueuse de longueur de corrélation de 10 μ m. Le faisceau incident est normal à la surface. Les indices de réfraction sont $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$, $\lambda_0 = 500nm$, $\rho_0 = 0.3$. La rms de rugosité de surface σ est de a) 10 nm b) 30 nm. La ligne bleue représente la transmission diffuse et la ligne orange, la transmission spéculaire avec de la diffraction.

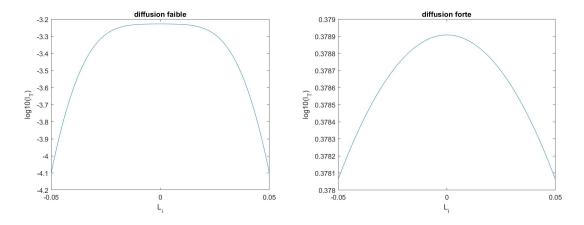


Fig. 3.5. Intensité diffuse transmise intégrée sur les angles de diffusion par rapport à l'angle d'incidence du faisceau

optique plus grand que l'angle d'ouverture de collection de l'objectif de microscope. Ceci se traduit par l'utilisation d'une ouverture numérique d'illumination plus grande que celle de la détection. L'ouverture numérique (O.N.) est définie par l'équation. (3.2.5)

$$O.N. = n\sin(\theta) \tag{3.2.5}$$

où n est l'indice de réfraction et θ , l'angle à l'axe optique du faisceau lumineux le plus incliné. Les microscopes en champ sombre commerciaux utilise un condenseur de 0.95 d'ouverture numérique projetant un cône de lumière creux. L'objectif de microscope utilisé doit alors posséder une O.N. plus petite, ou égale, à la limite. La table 3.2 présente différentes spécifications d'objectifs commerciaux de base des compagnies Nikon et Olympus. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'utilise comme source d'illumination un condenseur de microscope d'O.N. de 0.55 auquel j'ajoute un masque de phase. La forme d'illumination s'approche alors de celle d'un condenseur de microscopie en champ sombre commercial, avec une O.N. plus faible. Tous les objectifs de microscopes présentés à la table 3.2 sont compatibles avec le condenseur de 0.95 d'O.N., mais seuls les objectifs de 10x et 20x de grandissement sont compatibles avec le condensateur de 0.55 d'O.N.

Tab. 3.2. Spécifications d'objectifs commerciaux

Grandissement	Ouverture numérique	distance de travail (mm)
10x	0.25	16
10x	0.3	16
20x	0.5	2.10
40x	0.95	0.23
40x	0.75	0.66

Plusieurs enjeux sont à considérer dans l'utilisation de matériel optique, telle que les limites de résolution axiale et latérale des objectifs, la distance de travail des objectifs et des condenseurs, imager des cellules vivantes sur une longue période et imager en trois dimensions. En effet, l'utilisation d'un incubateur limite la distance de travail du condensateur à de grandes valeurs, accessibles seulement avec des condenseurs de basse O.N. comme illustrés à la figure 3.6 a). Or, les résolutions axiales et latérales définies par les limites d' Abbe [47], exprimées par les équations (3.2.6) et (3.2.7) respectivement, sont faibles pour des objectifs de petite O.N. Les objectifs de haute O.N. sont alors nécessaires pour l'imagerie en trois dimensions, mais ne sont pas compatibles avec les condensateurs de basse O.N.

$$\Delta z = \frac{2\lambda_0}{O.N.^2} \tag{3.2.6}$$

$$\Delta xy = \frac{\lambda_0}{2O.N.} \tag{3.2.7}$$

Une solution est à considérer : illuminer l'échantillon à l'extrême de l'ouverture numérique, soit perpendiculairement à la détection. Ceci est possible en utilisant un ruban de LED, compatible avec l'incubateur et tous les objectifs de microscope, ou d'utiliser un adaptateur de Side-Illumination microscopy produit commercialement par la compagnie montréalaise Vegaphoton (https://vegaphoton.com/) comme illustrée à la figure 3.6 b). Plusieurs combinaisons illumination-détection ont été effectuées dans la simulation.

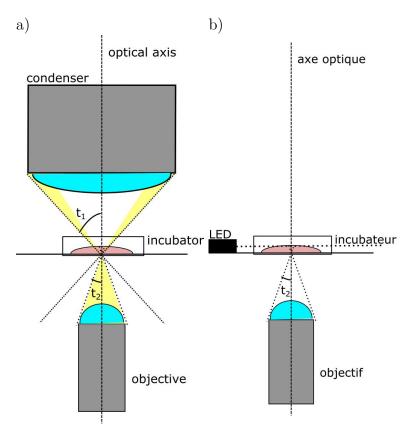


Fig. 3.6. Set-ups d'imagerie où t_1 et t_2 sont les angles d'illumination et de détection respectivement. a) disposition conventionnelle b) disposition avec Side-Illumination

Pour simuler l'O.N. de détection, j'ai intégré numériquement à l'aide de la méthode des trapèzes les équations (3.2.3) et (3.2.4) sur l'angle d'ouverture de détection en coordonnées sphériques. Le nombre d'angles azimutaux et polaires nécessaires à la simulation, de 24 et 20 respectivement, ont été déterminés avec la variation de l'intensité moyenne diffusée par rapport au nombre d'angles considérés. Le choix s'est arrêté lorsque la différence d'intensité

moyenne pour deux nombres d'angles était inférieure à 1% de la valeur maximale d'intensité. L'effet du nombre d'angles considéré sur l'image obtenue est illustré à la figure 3.7. Les détails sont présentés aux tables 3.3 et 3.4.

Pour simuler la résolution, le volume d'intensité diffusé est convolué avec une approximation de la fonction d'étalement d'un point (PSF) des objectifs. L'approximation est une gaussienne tridimensionnelle dont les écarts-types sont les limites de résolution axiales et latérales présentées précédemment aux équations (3.2.6) et (3.2.7).

Tab. 3.3. Différence d'intensité moyenne normalisée par le maximum d'intensité en fonction du nombre d'angles polaire θ pour 4 angles azimutaux, une O.N. de détection de 0.5 et une illumination de 0.55 d'O.N.

Nombre d'angles 1	Nombre d'angles 2	Différence d'intensité normalisée (%)
24	20	1
20	16	1
16	12	1,3
12	8	2
8	4	8,3

Tab. 3.4. Différence d'intensité moyenne normalisée par le maximum d'intensité en fonction du nombre d'angles azimutaux ϕ pour 4 angles polaires, une O.N. de détection de 0.5 et une illumination de 0.55 d'O.N.

Nombre d'angles 1	Nombre d'angles 2	Différence d'intensité normalisée (%)
32	28	0,9
24	28	0,9
24	20	1
20	16	1,3
16	12	1,4
12	8	3,3
8	4	10

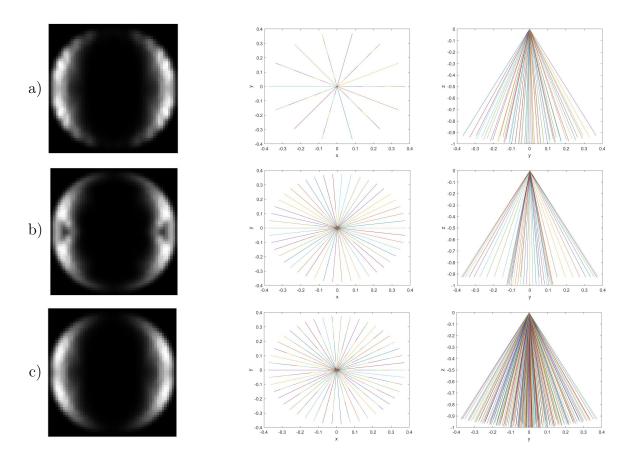


Fig. 3.7. Section du modèle de la cellule à mi-hauteur et vecteurs normalisés utilisés pour la détection projetés sur les plans XY et YZ pour a) 20 valeurs de θ et 8 de ϕ b) 4 valeurs de θ et 24 de ϕ c) 20 valeurs de θ et 24 de ϕ

3.2.1.3. Modèle cellulaire

La cellule est modélisée par un hémisphère de 40 microns de diamètre de silicone rugueuse, dont l'indice de réfraction est semblable à celui de la membrane cellulaire. La rugosité de la sphère est de $\sigma=150$ nm et la longueur de corrélation latérale est de $\tau=2000$ nm pour simuler la surface d'un lamellipode (partie de la cellule servant au déplacement) [11]. Pour des raisons de symétrie et de temps de calcul, la simulation s'est effectuée sur un quart de sphère, illustré à la figure 3.8.

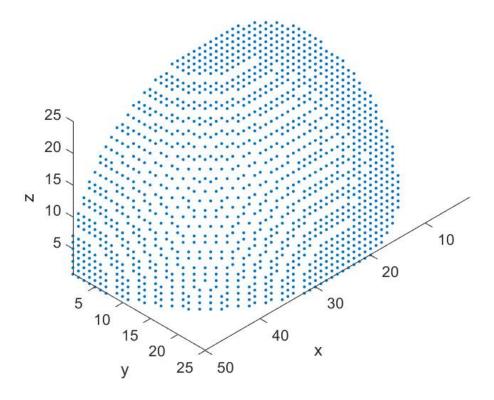


Fig. 3.8. Surface d'un quart de sphère. Les axes sont en pixels.

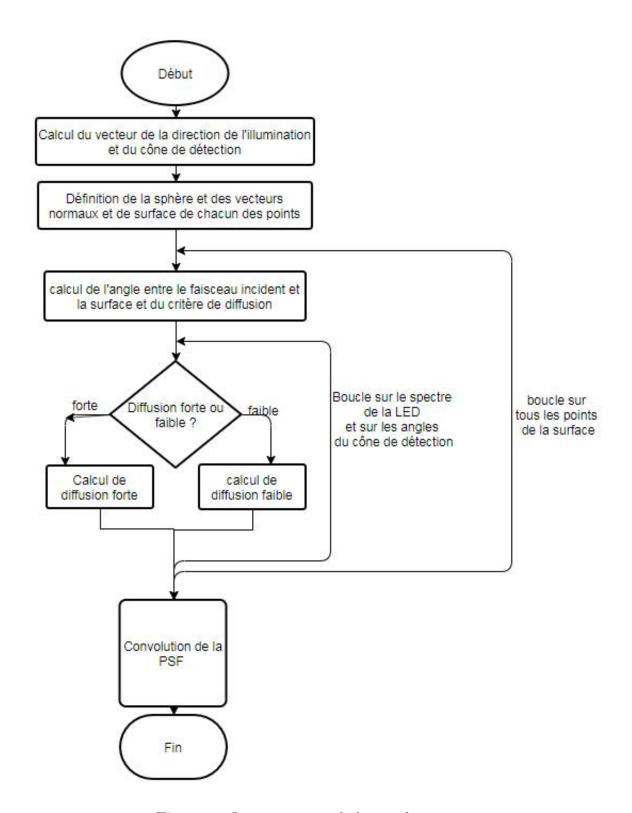


Fig. 3.9. Organigramme de la simulation

3.2.2. Résultats et discussion

Les résultats de simulation sont montrés aux figures 3.10, 3.11 et 3.12 pour des illuminations à l'aide d'un condensateur de 0.55 d'O.N., de 0.95 d'O.N. et de *Side-Illumination* respectivement.

Par illumination, les valeurs d'intensité montent d'ordres de grandeur avec l'O.N. des objectifs de microscope. Ceci est dû à la plus grande quantité de lumière collectée par les cônes de détections. Aussi, l'angle polaire des maximums d'intensité diffusée diminue avec l'ouverture du cône d'illumination.

On observe que la PSF des objectifs de 0.25 et 0.3 d'O.N. dépasse largement la hauteur de la cellule. La hauteur de leur PSF est d'environ 34 et 22 microns respectivement, alors que l'hémi sphère possède un rayon de 20 microns. Seuls les objectifs de 0.75 et de 0.95 d'O.N. offrent une résolution axiale satisfaisante pour mesurer la hauteur d'une cellule. Ainsi, le condensateur de 0.55 d'O.N. est à rejeter pour l'imagerie tridimensionnelle, car il n'est pas compatible avec ces objectifs.

Comme mentionné plus tôt, le condenseur de 0.95 d'O.N. est aussi à rejeter, car il ne permet pas d'utiliser un incubateur et d'imager des cellules vivantes sur une période prolongée, malgré la qualité des volumes d'images obtenus.

Ainsi, seule la Side-Illumination peut être utilisée. Par contre, l'intensité maximale détectée provient de points dont l'angle d'incidence à la surface est d'environ 60 degrés. Sur une cellule, cet angle correspond au corps cellulaire qui diffuse très peu la lumière. Comme mentionné précédemment, la surface qui diffuse le plus est le lamellipode, dont sa surface est parallèle au substrat et à la Side-Illumination. Pour un maximum de diffusion au lamellipode, il faudrait incliner l'échantillon de 30 degrés. Le focus serait alors une tâche ardue lors du suivi des cellules.

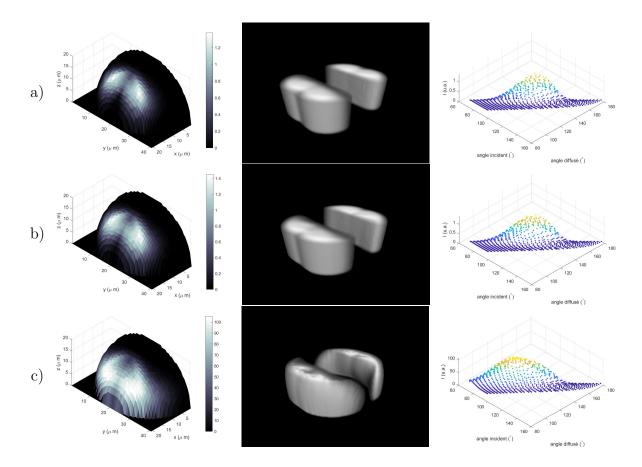


Fig. 3.10. Résultats pour une illumination faite à l'aide d'un condensateur de 0.55 d'O.N. Intensité diffusé avant convolution, simulation d'un volume imagé et intensité diffusée en fonctions des angles d'incidence et de diffusion pour des objectifs de microscope d'ouverture numérique de **a)** 0.25 **b)** 0.3 **c)** 0.50

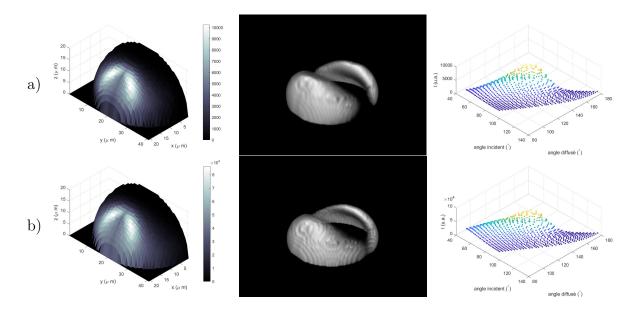


Fig. 3.11. Résultats pour une illumination faite à l'aide d'un condensateur de 0.95 d'O.N. Intensité diffusé avant convolution, simulation d'un volume imagé et intensité diffusée en fonctions des angles d'incidence et de diffusion pour des objectifs de microscope d'ouverture numérique de **a**) 0.75 **b**) 0.95

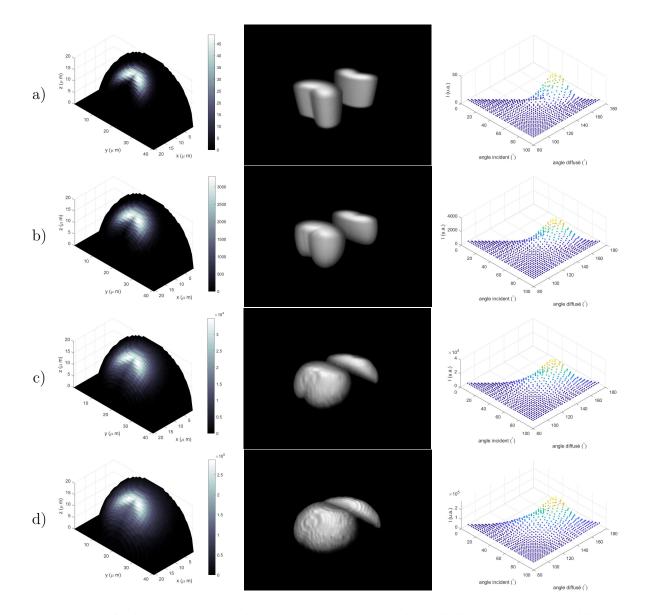


Fig. 3.12. Résultats pour une illumination perpendiculaire à l'axe optique de détection. Intensité diffusé avant convolution, simulation d'un volume imagé et intensité diffusée en fonctions des angles d'incidence et de diffusion pour des objectifs de microscope d'ouverture numérique de **a**) 0.3 **b**) 0.5 **c**) 0.75 **d**) 0.95

Bien que la simulation se soit effectuée en modélisant la membrane cellulaire, ce n'est pas ce que l'on observe au microscope, comme démontré à la figure 3.13. En effet, on semble plutôt observer des organelles de part et d'autre du noyau, qui sont visibles par de petites taches. Il se peut aussi que l'on puisse observer le cytosquelette, soit des *microspikes* d'actine à l'extrémité du lamellipode ou l'actine corticale qui encadre le corps cellulaire.

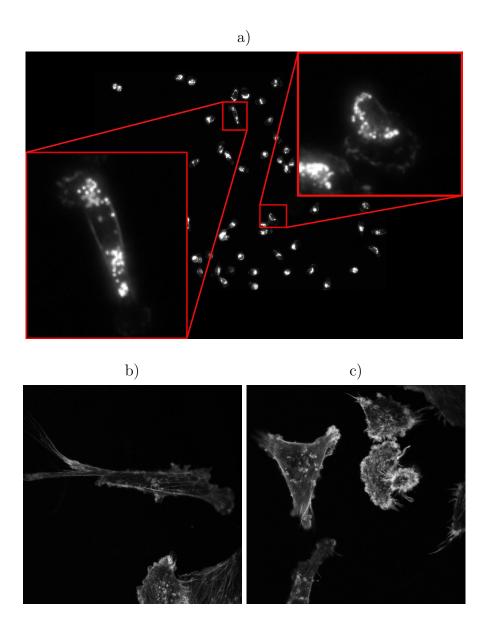


Fig. 3.13. Exemple d'image acquise a) en illumination en champ sombre avec un objectif de 0.25 d'O.N. et un condenseur de 0.55 d'O.N. b) et c) au confocal avec de la phalloidine

3.3. Logiciel de suivi des cellules

La première étape du logiciel de suivi consiste à segmenter les images acquises en temps réel et à définir le centre des cellules. Les images sont acquises toutes les 2 minutes pour 10 positions dans le cas des résultats préliminaires et 121 pour les résultats finaux. Comme mentionné à la section 3.2, l'illumination en champ sombre offre un bon contraste et permet une segmentation aisée des cellules. Une fois l'acquisition terminée, tous les centres de cellules

de tous les instants sont analysés pour former des trajectoires à partir d'un algorithme de Nearest Neighbor décrit dans l'article [28]. Une fois les trajectoires obtenues, celles-ci sont filtrées selon la longueur, celles plus longues que 1h30 sont conservées, et analysées selon différents paramètres décrits à la section 5.1.1, puis elles sont classées. Pour les résultats préliminaires, les 20% les plus mobiles sont classées rapides, alors que pour les résultats finaux, seulement les 5% sont considérées rapides. Les positions finales des cellules rapides sont par la suite enregistrées et un masque binaire est utilisé pour illuminer les cellules d'intérêt.

3.3.1. Segmentation des images en champ sombre

Comme mentionné précédemment la segmentation des images s'effectue en même temps que l'acquisition. L'acquisition des images se fait à un rythme d'une image par 2 minutes pour 10 et 121 positions lors des expériences de capture des cellules les 20% et 5% plus motiles respectivement. Ceci implique que l'analyse d'une image ne doit pas dépasser la seconde pour l'expérience de capture des 5% plus rapides. Ainsi, j'ai développé un algorithme simple et robuste pour segmenter les images obtenues par microscopie en champ sombre.

D'abord, une série de filtres sont appliqués pour retirer le bruit et retirer le fond de l'image. Un filtre médian est suivi d'une flat-field correction et d'un filtre gaussien. Le paramètre de taille entré dans la flat-field est de l'ordre de grandeur d'une cellule. La taille du filtre gaussien est de 2 pixels pour enlever le bruit de haute fréquence laissé par la flat-field. Ensuite, un ajustement en intensité est effectué pour ne conserver que les pixels les plus intenses. Les pixels en bas du percentile 90 d'intensité sont annulés. Puis une correction gamma est effectuée avec un paramètre alpha de 0.5 pour mettre l'accent sur les pixels intenses. Ceci permet de diminuer la taille des objets après le seuillage en intensité et éviter que deux cellules voisines ne soient considérées comme un objet unique. La dernière étape vise à générer un masque identifiant les cellules et à trouver leur centre. Pour ce faire, la méthode de seuillage d'intensité d'Otsu [35] est utilisée pour générer le premier masque. Puis les objets de moins de 250 pixels, soit la moitié de la taille d'une petite cellule, sont retirés du masque, et les objets restants présentant des trous sont remplis. Les centres des cellules sont obtenus à partir des centroïdes pondérés par l'intensité.

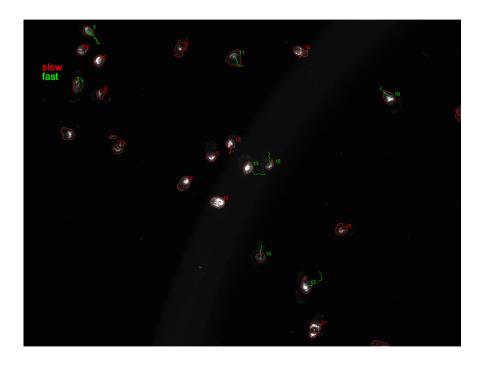


Fig. 3.14. Exemple d'une image segmentée et résultat du programme de suivi. Les trajectoires rapides sont en vert et les lentes en rouge

3.4. Segmentation par réseau neuronal convolutif

Malgré les efforts déployés dans ce projets à tenter de trouver une méthode d'illumination et de segmentation permettant le suivi efficace des cellules, près de 5% des segmentations des cellules se joignent lorsque deux cellules voisines se rapprochent trop. Plusieurs exemples de segmentation d'image par réseau neuronal convolutif (RNC) ont surpassé des méthodes classiques, tels que la watershed, lorsqu'il s'agit de distinguer le contour de cellules avoisinantes. Par contre, la préparation des données servant à l'entraînement du RNC est une tâche laborieuse et répétitive si elle n'est pas automatisée. Comme mentionné précédemment, la microscopie en fluorescence permet d'identifier précisément des structures intracellulaires. Il est routinier d'utiliser le DAPI, étiquetant l'ADN du noyau, pour différencier des cellules. D'ailleurs, il a été démontré dans l'article de 2018 de Ounkomol et al. [36] qu'il est possible de prédire un étiquetage fluorescent sur une image en transmission à partir d'outils d'intelligence artificielle. L'utilisation d'une telle technique peut nous permettre de segmenter des noyaux cellulaires aisément, sans utiliser de marqueur fluorescent, et ainsi d'améliorer le suivi des cellules. Les résultats de mon essai sont présentés ici.

Comme présenté dans l'article [36], j'ai utilisé une architecture de réseau convolutif U-Net [44], dont l'architecture précise est présentée à la figure 3.15. Par contre, j'ai utilisé des images acquises en champ large plutôt qu'au microscope confocal et avec un grandissement de 20x plutôt que 60x.

La première approche consiste à prédire des images DAPI à partir d'images en transmission et de segmenter les noyaux par la suite à l'aide de méthodes classiques. La taille d'entraînement est de 1146 couples d'images, la taille de validation est de 193 couples et la taille de l'échantillon test est de 36 couples. J'ai entraîné le réseau sans augmentation de données, pour 50 époques avec 50 itérations par époques. La minibatchsize est de 50, et les images ont été coupées en parties de 256x256 pixels. J'ai utilisé un $Adam\ optimizer$ pour la descente en gradient avec un taux d'apprentissage de 0.001. La fonction de coût L disponible sur Matlab, langage que j'ai utilisé, est l'erreur quadratique moyenne définie à l'équation. 3.4.1

$$L = \frac{1}{N} \sum_{N} \sum_{pixels} (y - \hat{y})^2$$
 (3.4.1)

où N est le nombre d'exemples, y la ground truth, et \hat{y} la prédiction.

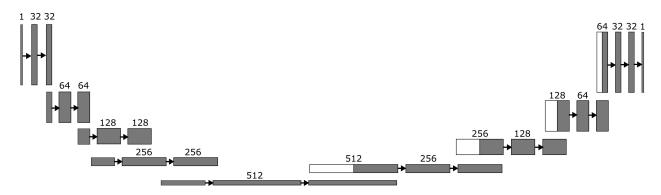


Fig. 3.15. U-Net: Architecture du réseau neuronal convolutif

Afin de prédire une image, celle-ci est d'abord coupée en morceaux de 256 par 256 pixels. J'ai considéré une marge de 80 pixels autour des morceaux afin d'éviter les effets de bords dus aux multiples convolutions lors de la reconstitution de l'image. Au total, on compte 81 morceaux par image de 1608 par 1608 pixels. Ainsi, sur mon ordinateur personnel, un temps de 36,6 secondes est nécessaire en moyenne pour accomplir une prédiction, soit environ 0,45 seconde par morceau. Ce temps de reconstitution est beaucoup trop grand pour accomplir un suivi de cellules en temps réel.

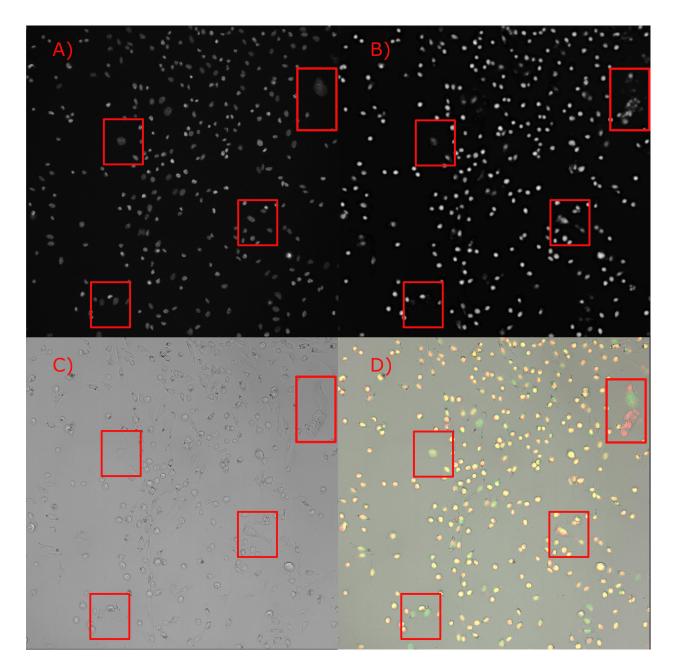


Fig. 3.16. Comparaison entre **A)** une image en DAPI (*ground truth*), **B)** la prédiction du DAPI, **C)** l'image en transmission et **D)** la fusion des trois images. En vert, la *ground truth* et en rouge la prédiction. Des erreurs typiques sont encadrées en rouge.

Un exemple de résultat est présenté à la figure 3.16. La corrélation entre les images est plutôt bonne, comme illustrée à la figure 3.17. La corrélation a été calculée comme présenté à l'équation. 3.4.2

$$r = \frac{\sum_{i} (x_{i} - \bar{x})(y_{i} - \bar{y})}{\sqrt{(\sum_{i} (x_{i} - \bar{x})^{2} \sum_{i} (y_{i} - \bar{y})^{2})}}$$
(3.4.2)

où i sont les pixels d'une image, x_i est l'intensité d'un pixel d'une ground truth et y_i est l'intensité d'un pixel de la prédiction.

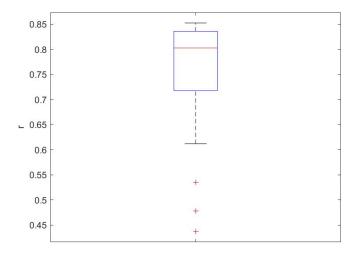


Fig. 3.17. Distribution des coefficients de corrélation r par image

Malgré une bonne corrélation entre les images, on peut voir à la figure 3.18 que la proportion de noyaux segmentés dans les prédictions est environ 63% que ceux qui ont été segmentés dans les *ground truth*.

Afin de quantifier la qualité de la segmentation, dont un exemple est présenté à la figure 3.19, l'indice de Jaccard J a été calculé pour toutes les segmentations de noyaux dont la description est présentée à l'équation 3.4.3:

$$J = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \tag{3.4.3}$$

où A est le masque d'un noyau prédit et B le masque du noyau homologue ground truth. Par contre, l'indice de Jaccard n'est pas l'indicateur de segmentation le plus adapté au suivi des cellules, c'est pourquoi j'ai aussi calculé la distance entre les centres des masques de noyaux homologues. En effet, on voit à la figure 3.20 qu'il est possible d'obtenir une distance faible malgré un faible indice de Jaccard.

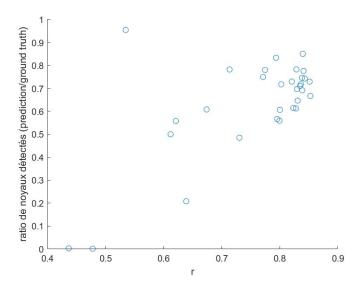


Fig. 3.18. Nombre de noyaux segmentés une image prédite par rapport aux noyaux segmentés sur sa *ground truth*. Chaque point représente un couple d'images prédiction-*ground truth*.

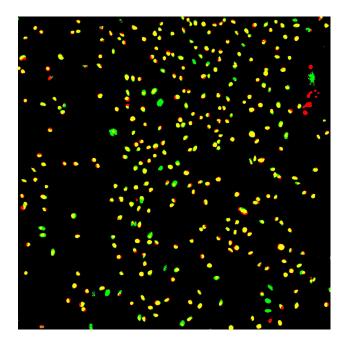


Fig. 3.19. Masques des noyaux de l'image DAPI en vert et de la prédiction en rouge. En jaune, la superposition des deux masques.

Afin de déterminer si le modèle de prédiction peut être utilisé dans le suivi des cellules, un seuil sur la distance entre les noyaux homologues doit être déterminé. La figure 3.21 montre la proportion de distances sous différents seuils. Sous 2 microns, seuil généreux

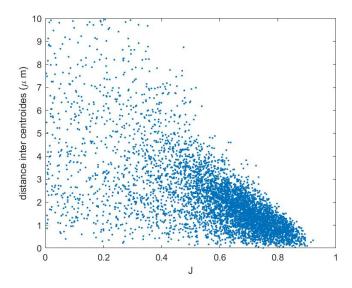


Fig. 3.20. Distance entre les centroïdes des segmentations de noyaux correspondants en fonction de l'indice de Jaccard (J). Chaque point représente un couple de noyaux prédictionground truth

considérant qu'une cellule se déplace à une vitesse sous le micron par minute, on conserve 60% des noyaux. On voit aussi à la figure 3.22 que la qualité de localisation de la cellule dépend de la qualité de la prédiction. En multipliant la proportion de noyaux segmentés sur la prédiction par rapport à ceux segmentés sur la ground truth et la proportion de noyaux prédits bien localisés, on obtient que moins de la moitié des noyaux soient bien localisés à l'aide de la méthode présentée.

Bref, l'outil de localisation des noyaux par RNC, tel que présenté ici, n'est pas applicable au suivi des cellules, car il est trop lent et moins de la moitié des cellules sont localisées précisément. Afin d'améliorer la prédiction, plusieurs avenues sont possibles, dont designer une fonction de coût adaptée au problème. Or ceci est difficilement applicable avec le langage de programmation *Matlab*, *Python* serait un meilleur outil.

3.5. Conclusion

Dans cette section, j'ai étudié la microscopie en champ sombre pour comprendre ses limites en terme de contraste et d'imagerie tridimensionnelle. J'ai choisi cette technique, car elle offre un bon contraste sans utiliser de marqueur fluorescent. Puis, j'ai élaboré sur la méthode de segmentation développée basée sur un seuillage en intensité. Je me suis aussi

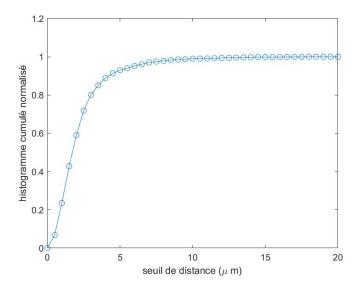


Fig. 3.21. Proportion de distances entre les centroïdes des noyaux homologues considérées petites en fonction d'un seuil de distances.

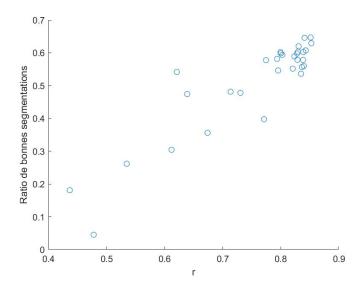


Fig. 3.22. Nombre de segmentations de noyaux de la prédiction jugées acceptables par rapport aux nombre total de noyaux segmentés dans la prédiction. Les segmentations jugées acceptables se trouvent à une distance inférieure à 2 microns de leur homologue ground truth. Chaque point représente une image.

intéressé à la segmentation d'image à l'aide d'intelligence artificielle, sans obtenir de résultats utilisable pour mon application de suivi cellulaire.

Chapitre 4

Isolation cellulaire par scMOCa

4.1. Introduction

La scMOCa est le plus récent développement d'une lignée de techniques exploitant le photoblanchiment de la fluorescéine pour fonctionnaliser des surfaces, qu'elles soient vivantes ou non. Le photoblanchiment, décrit plus en détail à la section 4.3.1, est la perte de luminescence d'un fluorophore après une excitation lumineuse, entrainant des espèces semi-réduites et semi-oxydées [48]. Une technique développée au laboratoire en 2008, le Laser-assisted adsorption by photobleaching (LAPAP), consiste à fonctionnaliser des substrats biologiques de gradients de protéines adsorbées par le photoblanchiment de la fluorescéine au balayage d'un laser. Jonathan M. Bélisle et ses collègues ont utilisé la technique qu'ils ont développée pour guider la croissance d'axones neuronaux [3]. Le même phénomène a été utilisé en 2016 pour identifier des cellules pointées d'un laser de marqueurs fluorescents par le Cell labeling via photobleaching (CLaP). Loïc Binan et ses collègues ont pu isoler des cellules sur le critère morphologique seul à l'aide du CLaP et du FACS [6]. Puisque le tri par fluorescence n'est pas assez sensible pour isoler des cellules uniques avec le CLaP, le même auteur a développé en 2019 la single-cell magneto-optical Capture (scMOCa) qui permet de lier des billes ferromagnétiques aux membranes cellulaires plutôt que des marqueurs fluorescents et d'isoler les cellules avec des moyens magnétiques. Ceci a permis d'isoler des cellules réparant rapidement des dommages faits à l'ADN [5].

Ce développement technologique basé sur le photoblanchiment de la fluorescéine s'intègre dans une nouvelle lignée d'isolation cellulaire, celle basée sur des caractéristiques visuelles. Communément, on utilise en biologie des techniques d'isolation basées sur l'immunochimie,

tant avec l'immunofluorescence que l'immunomagnétisme, ce qui nécessite une connaissance préalable de cibles moléculaires. Ainsi, il est techniquement difficile d'isoler des cellules présentant des caractéristiques observables au microscope pour lesquelles on ne connait pas les mécanismes physiologiques sous-jacents. Pour répondre à cet enjeu, diverses solutions technologiques ont été suggérées. Un premier exemple, l'Intelligent Image-Activated Cell Sorting (IACS) consiste en un système de cytométrie en flux qui classe les cellules selon une analyse d'image faite par un logiciel d'intelligence artificielle [32]. Cette technologie très prometteuse permet de classer environ 100 cellules par seconde à partir d'images microscopiques à grand contenu avec une grande pureté et une grande sensibilité. Son impressionnante performance vient avec un prix, car cette technologie ne peut être utilisée que par un personnel hautement qualifié et l'investissement monétaire est majeur pour un centre de recherche, ce qui la rend inatteignable. De plus, on ne peut qu'isoler des cellules en suspensions, comme des cellules sanguines, ou des cellules détachées de leur tissu ou culture d'origine. Le IACS est alors mal adapté pour les tâches dans lesquelles la scMOCa excelle. Un second exemple est le Visual Cell Sorting [20] qui consiste à isoler les cellules modifiées pour exprimer Dendra2, une protéine qui change de conformation et de spectre d'émission du vert au rouge lorsqu'elle est illuminée. Leur niveau de fluorescence est fonction de la durée d'illumination, ce qui a permis l'isolation au FACS de 4 phénotypes différents présents dans une culture hétérogène. La technique a été automatisée pour permettre l'isolation de plusieurs milliers de cellules. Celle-ci n'est alors pas appropriée pour étudier des cellules provenant de biopsie ou des cellules qu'on ne souhaite pas modifier génétiquement. Un troisième exemple est le *Photostick*, qui consiste à immobiliser les cellules visées d'un laser sur leur surface de culture de façon photochimique. Après un rinçage, il reste les cellules d'intérêt visées par un laser à 407 nm [12]. Cette technique repose sur le rinçage du pétri et est donc fortement dépendante de l'habileté de l'expérimentateur. Le quatrième et dernier exemple met en oeuvre des points de polymère semiconducteurs optiquement commutables (Pdots) qui commutent entre un état fluorescent (ON) et un état non fluorescent (OFF) lors de l'excitation au laser rouge et UV respectivement. Une fois les Pdots attachés aux membranes cellulaires par des anticorps biotinilés, les cellules d'intérêt sont ciblées par un laser et triées au FACS. La scMOCa trouve sa niche particulière grâce à son utilisation du magnétisme pour l'isolation cellulaire, son utilisation du photoblanchiment comme réticulant et son intégration facile dans un laboratoire de biologie cellulaire.

Comme mentionné, la scMOCa se distingue des autres techniques d'isolation basée sur les caractéristiques visuelles par l'utilisation du magnétisme plutôt que de la fluorescence pour identifier et trier les cellules. En effet, les techniques d'isolation par fluorescence sont sujettes aux contraintes techniques du FACS, comme un grand volume de cellules triées [58] au détriment de l'efficacité et de la spécificité [38]. Ainsi il est très difficile de trier des cellules rares et de disséquer l'hétérogénéité d'une culture à l'aide de marqueurs fluorescents. L'utilisation du magnétisme pour marquer les cellules évite ce problème de taille et permet une capture très efficace et pure à 100% de cellules rares [5]. En effet, la scMOCa permet d'isoler une cellule unique à partir d'une culture hétérogène, comme démontré par Loic Binan en 2019 [5]. Depuis peu, j'ai automatisé le processus de sélection et d'illumination et réduit drastiquement le temps d'illumination par cellule, ce qui a augmenté d'un facteur d'environ 250 le volume de cellules pouvant être triées pour une période de temps définie. Aussi, la scMOCa utilise des réactifs communs et peu coûteux, comme de la fluorescéine, de la biotine et de la streptavidine, ce qui la rend très accessible. Le matériel nécessaire pour la technique est communément disponible dans les centres de recherche de biologie, car elle nécessite un laser de faible puissance, comme celui que l'on retrouve dans un microscope confocal, et un microscope.

4.2. Description de la méthode et protocole

4.2.1. Matériel requis pour la scMOCa

La scMOca est une technique qui peut s'intégrer aisément à un laboratoire de biologie possédant un microscope. La méthode requiert du matériel et des réactifs communs et peu coûteux et ne requiert pas de personnel qualifié lors de l'étape d'isolation. La liste des réactifs est disponible à la table 4.1, et celle du matériel à la table 4.2. Les résultats préliminaires ont été obtenus avec un microscope IX71 d'Olympus avec un objectif 10x et 0,25 d'ouverture numérique d'Olympus alors que les résultats finaux sont obtenus avec un microscope Eclipse Ti2 de Nikon et un objectif 10x de 0,3 d'ouverture numérique de Nikon. Pour le microscope d'Olympus, le laser servant à photoblanchir la fluorescéine est

acheminé par un port latéral et parcourt l'échantillon avec la plateforme motorisée MLS 203 de Thorlabs. Pour le microscope de Nikon, le laser passe d'abord par un système de miroirs galvanométriques Prairie de Brucker avant de pénétrer le microscope par son port arrière. Un système de lentilles optiques a été désigné pour corriger l'effet des lentilles dans le microscope.

Tab. 4.1. Liste des réactifs

Réactif	Source	Identifiant
Billes ferromagnétiques	Thermofischer	cat # : 65305
B4F	Sigma-Aldrich	cat #:B9431-5MG
PBS	_	-

Tab. 4.2. Liste du matériel

- Polydiméthylsiloxane (PDMS)
- Laser à 473nm. Le laser doit pouvoir illuminer à une puissance allant jusqu'à 10 mW après l'objectif de microscope.
- Microscope
- Objectif 10x d'ouverture numérique basse (environ 0.3)
- Lamelle de microscope en verre ou en plastique
- Aimants N35 de 1,2 Tesla (10)
- Blocs Lego

4.2.2. Protocole d'illumination et d'isolation magnétique

Un protocole détaillé de la technique est déjà publié [7]. La présente section résumera le protocole et les changements faits par rapport à la publication. Un aperçu de la méthode est illustré à la figure 4.1.

- (1) Identifier les cellules à isoler, soit par inspection visuelle ou par de l'analyse d'image automatisée.
- (2) Après avoir ajouté au milieu cellulaire une grande concentration de B4F (1:50), illuminer la cellule d'intérêt à 473nm avec $100\mu W$ pour 2 secondes (ou 6 mW pour

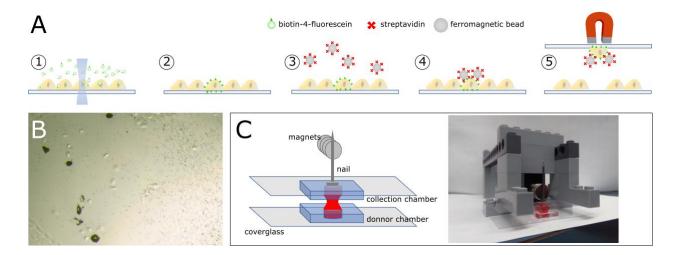


Fig. 4.1. Aperçu de la méthode. Figure adaptée de [5] avec permission de l'auteur. A) La B4F est liée à la membrane cellulaire avec un laser. Les cellules aux membranes biotinilées sont marquées de billes ferromagnétiques fonctionnalisées à la streptavidine et capturées à l'aide de moyens magnétiques. B) Exemple de MDA-MB-231 identifiées de billes magnétiques. C) Schéma du montage utilisé pour isoler les cellules

- 0.1 seconde). La fluorescéine est alors photoblanchie et la membrane cellulaire est fonctionnalisée avec de la biotine.
- (3) Après avoir fonctionnalisé les membranes de plusieurs cellules, rincer le milieu délicatement. Cette étape est cruciale, car s'il reste une quantité minimale de B4F l'étape suivante ne fonctionnera pas.
- (4) Ajouter au milieu cellulaire les billes ferromagnétiques fonctionnalisées à la streptavidine. À l'aide d'un aimant, attirer les billes au fond de la chambre de culture et les déplacer lentement afin qu'elles parcourent l'entièreté de la surface de culture. La streptavidine et la biotine forment un lien covalent très fort $(K_d = 10^{-15}M)$ et les cellules d'intérêt sont maintenant identifiées de billes ferromagnétiques.
- (5) Rincer le surplus de billes en l'attirant premièrement vers le haut à l'aide d'aimants, puis l'aspirer. Au besoin, à l'aide d'un jet de pipette, pousser délicatement les billes se trouvant sur les bords de la chambre et répéter l'aspiration.
- (6) Remplacer le milieu cellulaire par de la trypsine 0.23% et attendre 5 minutes. Remplir la chambre de collection de 80 μ L de trypsine.
- (7) Superposer la chambre de collection 6mm au-dessus de la chambre donneuse et y apposer un clou fixé magnétiquement à 10 aimants de 1.2 Gauss. Attendre 4 minutes

pour que les cellules négatives descendent par gravité. Si la chambre donneuse est plus grande que la chambre de collection, déplacer lentement la chambre donneuse afin que la chambre de collection parcoure toute la surface de la chambre donneuse. Répéter au besoin pour plus de pureté. Lors de la dernière itération, la chambre de collection devrait être remplie de milieu de culture.

Les chambres de collection de 6mm de diamètre sont constituées d'un anneau de PDMS apposé sur une lamelle de verre ou de plastique traitée au plasma. Les anneaux de 6mm de diamètre intérieur et de 8 mm de diamètre extérieur sont taillés à l'aide de punchs chirurgicaux métalliques circulaires dans du PDMS de 2 mm d'épaisseur. La surface de culture initiale de laquelle sont isolées les cellules d'intérêt mesure 6 mm de diamètre pour les résultats préliminaires et 21 mm de diamètre pour les résultats finaux. Les chambres utilisées sont les mêmes que pour les chambres de collection dans le cas des résultats préliminaires. Pour les résultats finaux, les pétris μ -Dish de IBIDI sont utilisés.

4.3. Augmentation du volume de tri

Comme discuté dans la section des résultats de l'isolation de cellules les 20% plus motiles 5.1.2, pour obtenir une différence marquée entre la population parentale et la population présentant des phénotypes migratoires importants, une stratégie est d'isoler un grand nombre de cellules représentant un faible pourcentage de la population analysée. Pour ce faire, j'ai augmenté d'un facteur 12 la taille de la chambre d'analyse en passant d'une chambre de 6mm de diamètre à un pétri de 21mm de diamètre. Ainsi, en isolant les 5%, plutôt que 20%, cellules les plus mobiles, j'ai triplé le nombre de cellules capturées, laissant plus de marge de manoeuvre en cas d'erreur de manipulation.

En augmentant l'échelle de grandeur de l'expérience, le délai entre l'acquisition et l'illumination au laser devient critique. En effet, multiplier par 12 le nombre de positions d'acquisition au microscope augmente du même facteur le temps requis pour le suivi des cellules. Aussi, puisqu'il y a 4 fois plus de cellules à illuminer, le délai entre la première et la dernière cellule illuminée s'élève à environ 5 minutes, ce qui laisse le temps aux cellules les plus rapides de parcourir au moins 6 microns, distance plus grande que la demie-taille du faisceau laser. Ainsi, il est possible que le laser cible un endroit dépourvu de cellules au moment

d'illuminer les dernières cellules d'intérêt. Afin d'éviter cette situation, j'ai diminué le temps d'illumination de 2 secondes, comme décrit dans l'article [5], à 0,1 seconde.

4.3.1. Photoblanchiment de la fluorescéine

J'ai effectué une simulation de photoblanchiment de la fluorescéine afin d'obtenir une estimation du temps d'illumination et de la puissance lumineuse nécessaire à l'augmentation de la fréquence d'illumination. Pour ce faire, une compréhension du phénomène est requise. Cette sous-section présente les concepts reliés au photoblanchiment de la fluorescéine ainsi que leur quantification sous forme d'équations couplées.

Le photoblanchiment de la fluorescéine est un phénomène complexe faisant intervenir de multiples réactions photochimiques menant à la perte de fluorescence du fluorophore. Bien qu'il soit généralement perçu comme un effet nuisible en imagerie et en immunofluorescence, causant la perte du signal lumineux ou l'intoxication de cellules vivantes, il est à la base de la scMOCa. Comme mentionné plus tôt, la molécule photoblanchie est ce qui permet de lier fluorophores et billes ferromagnétiques à la membrane cellulaire.

Le photoblanchiment de la fluorescéine est très bien décrit dans l'article de Song et al. de 1995 [48]. Comme illustré à la figure 4.2, lors de l'illumination, la fluorescéine passe de l'état fondamental S à l'état excité S^* avec un taux k_a , décrit par l'équation 4.3.1, par l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ_{ex} d'énergie $\lambda_{ex}/(hc)$, où h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière.

$$k_a = \sigma_a [H \cdot \lambda_{ex}/(hc)] \tag{4.3.1}$$

Dans l'équation précédente, H est l'irradiance de la lumière (W cm⁻²) et σ_a la section efficace d'absorption (cm² molecule⁻¹) qui est évaluée à 3.06×10^{-16} cm² molécule⁻¹ pour la fluorescéine à 488nm pour un pH plus grand que 7 [54]. On peut passer de l'état excité à l'état fondamental par deux chemins, d'abord par la transition radiative de $S^* \to S$ qui s'effectue avec un taux k_d , ou par la transition interdite $S^* \to T^*$ suivie de la transition $T^* \to S$ avec des taux k_{isc} et k_1 , le second étant très petit. On peut alors écrire la cinétique des populations sans tenir compte du photoblanchiement :

$$\frac{d}{dt}[N_S(t)] = -k_a N_S(t) + k_d N_{S*}(t) + k_1 N_{T*}(t)$$

$$\frac{d}{dt}[N_{S*}(t)] = k_a N_S(t) - (k_d + k_{isc}) N_{S*}(t)$$

$$\frac{d}{dt}[N_{T*}(t)] = k_{isc} N_{S*}(t) - k_1 N_{T*}(t)$$
(4.3.2)

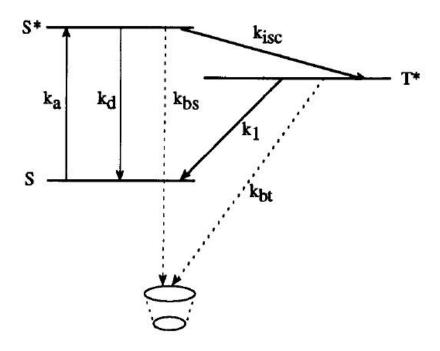


Fig. 4.2. Diagramme de Jablonski simplifié du photoblanchiment de la fluorescéine. Tiré de l'article de Song et al. [48].

Le photoblanchiment peut s'effectuer à partir des états S^* et T^* avec des taux k_{bs} et k_{bt} respectivement, comme illustré à la figure 4.2. Les molécules photoblanchies ne peuvent alors plus participer au cycle excitation-émission et sont semi-oxydées (X) ou semi-réduites (R). Malgré la possibilité de photoblanchiment à partir de l'état singulet excité, aucune évidence n'a montré l'existence d'une telle réaction. En effet, le photoblanchiment provient de deux mécanismes différents impliquant l'état triplet excité, soient les mécanismes dye-to-dye entre les molécules de fluorophores à l'état triplet excité et à l'état fondamental, et dye-to-oxygen entre les molécules à l'état triplet et l'oxygène. Les réactions majeures décrites par Song et al. [48] sont :

•
$$T^* + T^* \rightarrow R + X$$

•
$$T^* + T^* \rightarrow T + S$$

•
$$T^* + S \rightarrow S + S$$

•
$$T^* + S \rightarrow R + X$$

•
$$T^* + X \rightarrow S + X$$

$$\bullet$$
 $T+R \rightarrow S+R$

$$\bullet \ T^* + O_2 \to S + O_2$$

$$\bullet \ T^* + O_2 \to X + HO_2$$

Ainsi, la cinétique du photoblanchiment de la fluorescéine est décrit par les équations différentielles couplées suivantes, sous forme de taux de variation :

$$\frac{d}{dt}[N_{S}(t)] = [k_{d}N_{S^{*}}(t) + k_{1}N_{T^{*}}(t) + k_{2}N_{T^{*}}^{2}(t) + k_{3}N_{T^{*}}(t)N_{S}(t) + k_{6}N_{T^{*}}(t)N_{X}(t) + k_{7}N_{T^{*}}(t)N_{R}(t) + k_{8}N_{T^{*}}(t)N_{O_{2}}(t)] - [k_{a}N_{S}(t) + k_{5}N_{T^{*}}(t)N_{S}(t)]$$

$$\frac{d}{dt}[N_{S^{*}}(t)] = k_{a}N_{S}(t) - [k_{d}N_{S^{*}}(t) + k_{isc}N_{S^{*}}(t)]$$

$$\frac{d}{dt}[N_{T^{*}}(t)] = k_{isc}N_{S^{*}}(t) - [k_{1}N_{T^{*}}(t) + k_{2}N_{T^{*}}^{2}(t) + k_{3}N_{T^{*}}(t)N_{S}(t) + 2k_{4}N_{T^{*}}^{2} + k_{5}N_{T^{*}}(t)N_{S}(t) + k_{6}N_{T^{*}}(t)N_{X}(t) + k_{7}N_{T^{*}}(t)N_{R}(t) + k_{8}N_{T^{*}}(t)N_{O_{2}}(t) + k_{9}N_{T^{*}}(t)N_{O_{2}}(t)]$$

$$\frac{d}{dt}[N_{X}(t)] = k_{4}N_{T^{*}}^{2} + k_{5}N_{T^{*}}(t)N_{S}(t) + k_{9}N_{T^{*}}(t)N_{O_{2}}(t)$$

$$\frac{d}{dt}[N_{R}(t)] = k_{4}N_{T^{*}}^{2} + k_{5}N_{T^{*}}(t)N_{S}(t)$$

$$\frac{d}{dt}[N_{O_{2}}(t)] = -k_{9}N_{T^{*}}(t)N_{O_{2}}(t)$$

Comme expliqué précédemment, on y observe que la variation d'espèce photoblanchie semi-oxydée $(\frac{d}{dt}[N_X(t)])$ est proportionnelle au carré de la concentration de l'état triplet excité N_{T*}^2 , au produit de concentration de l'état triplet excité et fondamental $N_{T*}N_S$ et au produit de concentration d'espèce triplet excité et d'oxygène $N_{T*}N_{O_2}$ à cause des trois intéractions $T^* + T^* \to R + X$, $T^* + S \to R + X$ et $T^* + O_2 \to X + HO_2$ respectivement.

Tab. 4.3. Variables utilisées dans les équations différentielles couplées décrivant le photoblanchiment de la fluorescéine 4.3.3

Variable	définition
S	État singulet fondamental
S^*	État singulet excité
T^*	État triplet excité
$N_X(t)$	Population moléculaire au niveau d'énergie X en fonction du temps
k_a	taux d'absorption de photons (s ⁻ 1)

La variation de concentration de l'espèce photoblanchie semi-réduite $\frac{d}{dt}[N_R(t)]$ est proportionelle à $N_{T^*}^2$ et $N_{T^*}N_S$ à cause des intéractions $T^* + T^* \to R + X$ et $T^* + S \to R + X$ respectivement. La liste des variables est détaillée à la table 4.3. Les équations (4.3.3) ont été numériquement intégrées à partir des valeurs de concentration de fluorescéine utilisée et des constantes cinétiques présentées dans l'article de Song et al. [48].

4.3.2. Réduction du temps d'illumination

J'ai diminué le temps d'illumination de 2 à 0,1 seconde. Pour ce faire, il a fallu augmenter la puissance du laser d'environ $100~\mu\mathrm{W}$ à 6 mW. Ces valeurs furent trouvées expérimentalement, à partir d'une estimation fournie par l'intégration numérique des équations (4.3.3), sous le critère d'attacher un minimum de billes pour 0,1s d'illumination. Pour un temps d'illumination 20 fois plus petit, une puissance lumineuse 60 fois plus grande est nécessaire. Pour trouver ces valeurs, l'enjeu était de ne pas altérer le comportement des cellules après illumination à cause d'une trop grande puissance lumineuse, qui aurait pu brûler les cellules, ou d'un trop grand photoblanchiment de la fluorescéine, qui pourrait être toxique. Pour garantir un assez grand nombre de molécules de fluorescéines adsorbées à la surface en évitant la phototoxicité, il fallait trouver un temps d'illumination couplé à une puissance lumineuse qui engendre la même concentration de molécules photoblanchies que dans les expériences précédentes. Pour ce faire, j'ai intégré numériquement les équations différentielles couplées décrivant le photoblanchiment de la fluorescéine par rapport au temps, numérotées 4.3.3

[48], pour différentes valeurs de puissance lumineuses. Dans l'idée de fixer un ordre de grandeur, aucune diffusion n'a été considérée, la simulation s'est effectuée en deux dimensions au point focal et la puissance du laser a été considérée comme constante transversalement sur l'étendue de la fonction d'étalement du laser.

Le rayon au focus du faisceau laser utilisé lors de la simulation est de 4,5 microns pour correspondre aux mesures faites sur les deux microscopes. Les mesures sont présentées à la figure 4.3. La mesure consiste à déplacer une lame de rasoir bloquant partiellement le laser et à mesurer la puissance transmise. La forme du faisceau au focus est obtenue en dérivant la puissance totale transmise par rapport à la distance, puis est paramétrisée en y ajustant une fonction gaussienne. Le rayon du faisceau est obtenu à $\frac{1}{e^2}$ de l'intensité maximale, soit à 2σ du sommet. Le faisceau au focus est large, car il arrive avec une petite taille derrière l'objectif de microscope affectant l'ouverture numérique effective à la baisse. Ceci permet des erreurs de focus, car la taille du laser est cintrée sur une plus grande distance que dans un cas où on utiliserait les objectifs à leur ouverture numérique maximale. De plus, la taille de faisceau est plus petite qu'une cellule.

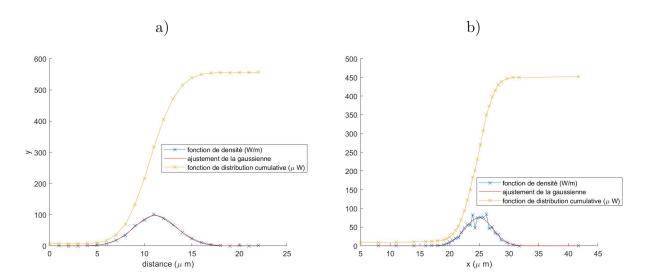


Fig. 4.3. Mesures de la largeur du faisceau laser au focus à l'aide d'une lame de rasoir pour les installations sur a) le microscope Olympus b) le microscope Nikon

On voit que le nombre d'espèces photoblanchies évolue linéairement avec la puissance du laser, alors qu'il évolue exponentiellement avec le temps d'exposition, grâce aux figures 4.4 et 4.5 respectivement. Les ratios de puissance entre 2s et 0,1s donnent entre 346 et

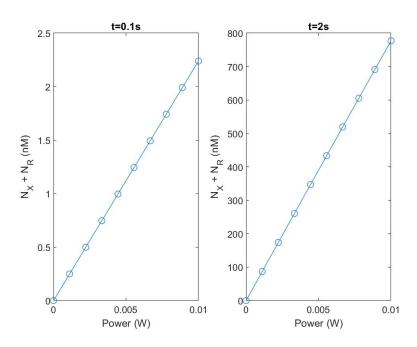


Fig. 4.4. Population de fluorescéine photoblanchie, semi-réduite (N_R) et semi-oxydée (N_X) , en fonction de la puissance d'illumination laser pour deux temps d'illumination différents

350 sur les courbes temporelles. J'ai fixé à 240 fois la puissance lumineuse à 2 secondes d'illumination (24 mW) comme le maximum de puissance pour une expérience, car c'est le maximum de puissance qui peut être généré par le laser à la sortie de l'objectif de microscope. Je me suis arrêté à 6 mW. On voit à la figure 4.6 qu'une illumination de 6 mW permet de couvrir les cellules de billes et de les garder en bonne forme le lendemain de l'expérience. Comme expliqué dans l'article de Song et al. [48], le photoblanchiment dépend énormément des molécules présentes autour du fluorophore. La simulation s'est effectuée dans l'eau, alors que la scmOca s'effectue à la surface cellulaire, ce qui explique l'écart entre le résultat simulé et expérimental.

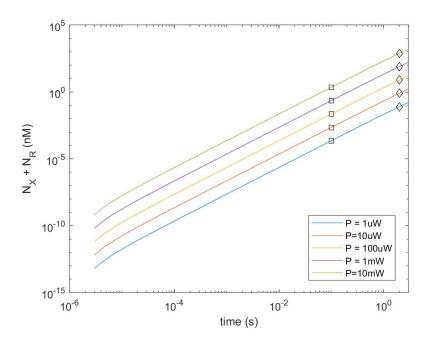


Fig. 4.5. Population de fluorescéine photoblanchie, semi-réduite (N_R) et semi-oxydée (N_X) , en fonction du temps d'illumination laser pour cinq puissances d'illumination différentes. Les carrés sont placés à 0.1s et les losanges à 2s

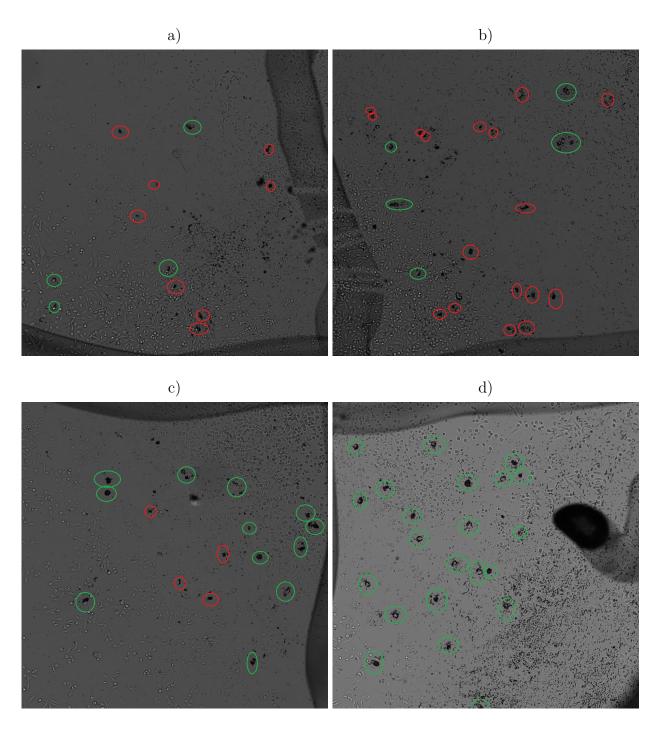


Fig. 4.6. Test de puissance à 0,1 seconde d'illumination laser et couverture de billes le lendemain de l'illumination a) 24 mW b) 18 mW c) 12 mW d) 6 mW. Les cellules brulées ou mortes sont encerclées en rouge et les cellules saines, en vert. Les cellules jugées en mauvaise conditions étaient faiblement attachés au substrat ou apoptotiques.

Chapitre 5

Résultats et discussion

Le présent chapitre rapporte les résultats de la sélection des cellules métastatiques. Dans un premier temps, la section 5.1 présente la caractérisation des trajectoires des populations isolées et parentales et démontre la conservation des phénotypes migratoires dans le temps. Puis, les résultats du séquençage ARN et les regroupements des gènes significatifs sont présentés à la section 5.2. Ces résultats sont obtenus à partir de la sélection des cellules les 5% plus motiles.

5.1. Démonstration de la conservation du phénotype migratoire par la caractérisation des trajectoires

Après la section 5.1.1 qui justifie les choix de durée de l'expérience et du paramètre de sélection des cellules, les résultats sont présentés en deux grandes sections : la section 5.1.2 contient les résultats de l'isolation de cellules démontrant un d_{max} dans les 20% les plus grands et la section 5.1.3, les résultats de l'isolation de cellules démontrant un d_{max} dans les 5% les plus grands. Des ajustements de méthode ont été accomplis entre les deux sélections afin d'augmenter la taille de l'expérience et de réduire la proportion de cellules isolées. Pour ce faire, le diamètre de la surface de culture est passée de 6mm à 21mm entre les deux expériences. Ceci a permis l'acquisition d'environ 12 fois plus de trajectoires, l'isolation d'un plus grand nombre de cellules, une plus grande séparation entre les médianes de d_{max} des populations parentales et isolées, et une amélioration des statistiques.

Pour toutes les expériences, j'ai utilisé une lignée de cellule métastatique du sein, les MDA-MB-231. Lors du suivi des cellules au microscope, pour les résultats de la sélection des cellules les 20% plus motiles, les cellules étaient en culture sur du plastique traité au plasma dans une chambre de 6 mm de diamètre taillée dans du PDMS. Pour les résultats de la sélection des cellules les 5% plus motiles, les cellules étaient en culture dans un $\mu Dish$ de IBIDI de 35 mm de diamètre et 21 mm de surface de culture sur une surface de plastique traitée au plasma et recouverte de 5 μ g/cm² de fibronectine. Le milieu de culture utilisé pour toutes les parties de l'expérience est le DMEM-F12 avec 1% de Glutamax, 1% de Penicilline-Streptomycine-Neomycine et 10% de sérum de veau foetal.

5.1.1. Définition de l'expérience

Bien qu'une accquisition de 12h soit biologiquement plus juste pour caractériser le mouvement cellulaire, elle est sujette à des défis expérimentaux comme la stabilité de l'équipement. Pour répondre à ce problème, j'ai réduis le temps d'acquisition de 12h à 2h, ce qui offre un meilleur flux de travail et une plus grande tolérance aux variations de l'environnement, mais est plus sensible à la variabilité phénotypique dû au cycle cellulaire. Pour m'assurer de la validité du racourcissement de période d'acquisition, je me suis assuré de sélectionner les mêmes cellules dans un vidéo de 2h que dans un vidéo de 12h, selon différents paramètres caractérisant le mouvement. L'expérience, comme schématisée à la figure 5.1, fut d'identifier les trajectoires cellulaires faisant partie des 10% plus motiles selon chacun des paramètres listés à la table 5.1 d'une acquisition de 12h et de comparer le classement aux trajectoires de vidéos de toutes les périodes de 2h parmi la longue acquisition. Les trajectoires furent classées selon les paramètres décrits à la table 2.1. Les résultats présentés à la figure 5.2 montrent quelles proportion des trajectoires classées au dessus du percentile 90 de la longue acquisitions correspond aux trajectoires classées au dessus du percentile 80 pour les périodes de 2h.

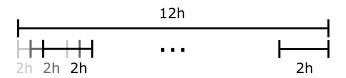
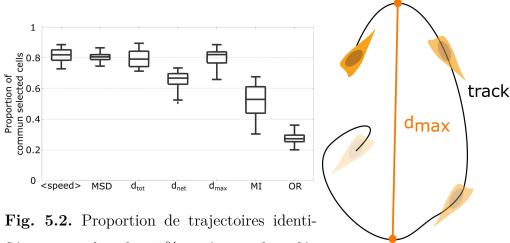


Fig. 5.1. Schéma représentant la sélection des périodes de 2h parmi une acquisition de 12h

Tab. 5.1. Paramètres décrivant la trajectoire d'une cellule et leur définition

Measure	Definition
Distance between track points	$d(\vec{x}_i \vec{x}_j) = \sqrt{\sum_{d=1}^{D} (x_{i,d} - x_{j,d})^2}$
	where $D = 2or3$
Average speed	$< speed > = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{d(\vec{x}_i \vec{x}_j)}{dt}$
Total distance	$d_{tot} = \sum_{i=1}^{N} d(\vec{x}_i \vec{x}_j)$
Net distance	$d_{net} = d(\vec{x}_1 \vec{x}_N)$
Max distance	$d_{max} = \max_{i,j} d(\vec{x}_i \vec{x}_j)$
Mean-square displacement	$MSD = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} d(\vec{x}_i \vec{x}_{i+1})^2$
Meandering index	$MI = \frac{d_{net}}{d_{tot}}$
Outreach ratio	$OR = \frac{d_{max}}{d_{tot}}$

À la suite du test, j'ai choisi d'utiliser le paramètre d_{max} comme critère de sélection, car c'est pour ce paramètre qu'il y a le moins grand biais de sélection basé sur le temps. Le paramètre d_{max} est illustré à la figure 5.3.



fiées autant dans les 10% supérieurs du vidéo de 12h que dans les 20% supérieurs du vidéo **Fig.** de 2h.

Fig. 5.3. Schématisation du paramètre d_{max} sur une trajectoire cellulaire

5.1.2. Résultats de la sélection des cellules les 20% plus motiles

J'ai obtenu mes premiers résultats à l'aide de la méthode décrite dans l'article [5], avec illumination manuelle des cellules d'intérêt à partir d'un puit de 6mm de diamètre. Environ

15 cellules ont été capturées parmi les 20% plus motiles des 150 cellules de la culture parentale. La caractérisation de la vitesse menant à la figure 5.4 on été fait dans des pétris de 21 mm de diamètre, après expansion des cellules capturées.

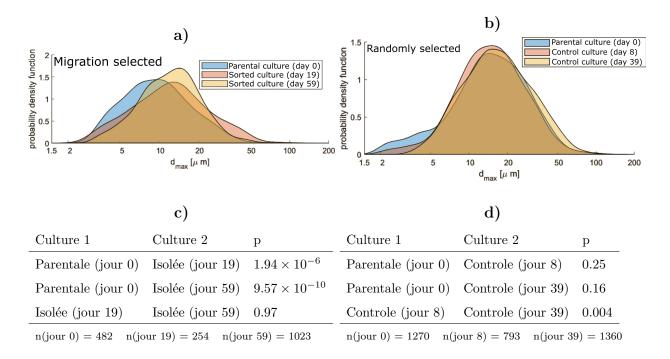


Fig. 5.4. Comparaison de la motilité de cultures parentale et isolées sur un critère de distance maximale parcourue (d_{max}) et résultas d'une one way ANOVA avec analyse post-hoc de Tuckey-Kramer sur $log10(d_{max})$. À gauche, comparaison entre la culture parentale et la culture isolée selon la motilité à deux moments différents. À droite, culture parentale et culture isolée aléatoirement à deux moments différents.

La figure 5.4 a) montre que les cellules triées selon leur déplacement conservent un déplacement significativement plus grand que celui de la culture prentale dont elles proviennent. Aussi, le processus de sélection n'affecte pas le mouvement des cellules, tel que montré à la figure 5.4 b) où est comparé le mouvement de cellules sélectionnées aléatoirement et celui de leur culture parentale. Par contre, l'écart de vitesse entre la population motile et parentale n'est pas assez grand pour entreprendre un test de potentiel métastatique in vivo selon nos collaborateurs. Pour augmenter la différence de vitesse, j'ai choisi de rendre le seuil de sélection plus sévère en isolant les 5% plutôt que les 20% cellules les plus motiles. Pour ce faire, j'ai augmenté l'échelle de grandeur de l'expérience et je l'ai automatisée.

5.1.3. Résultats de la sélection des cellules les 5% plus motiles

J'ai obtenu les résultats présentés dans cette sous-section après illumination automatisée des cellules. Le temps d'illumination par cellule était de 0,1s à 6mW, comme décrit à la section 4.3. Après le suivi des cellules, la position des individus faisant partie des 5% plus motiles étaient evoyées au microscope pour l'illumination.

Comme illustré à la figure 5.5, j'ai mesuré à répétition, sur une période de 36 jours après le tri, des différences significatives de d_{max} et de vitesse moyenne de migration entre les populations parentales et isolées.

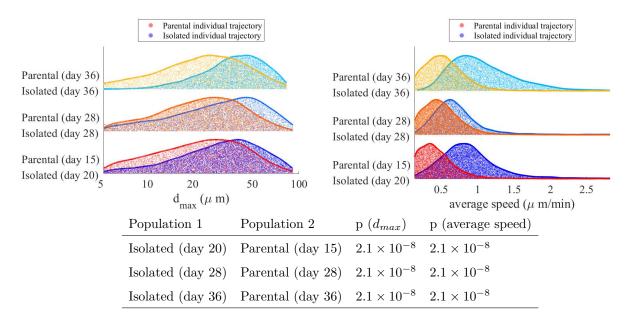


Fig. 5.5. Comparaison cinétique entre la population parentale et la population isolée à trois moments après l'isolation. Les probabilités p que les populations soient semblables sont obtenus après une one-way ANOVA avec test post-hoc Tukey-Kramer.

Aussi, on peut voir que les caractéristiques cinétiques sont concervées dans le temps, car la différence de vitesse moyenne n'est pas significative entre les différents moments pour une population, comme illustré à la figure 5.6. Ceci suggère que les caractéristiques cinétiques sont transmises après plusieurs divisions cellulaire et sont héréditaires. Par contre, on y observe aussi que la mesure de d_{max} de la population isolée 36 jours après l'isolation est significativement plus grande que les deux mesures précédentes. Une tentative d'explication serait qu'on mesure le plus grand indice de méandre moyen pour la population isolée au jour 36, comme montré à la figure 5.7. Ce paramètre est défini à la table 5.1 comme le ratio entre

la distance nette et la distance totale parcourue. Ainsi, les trajectoires de la population isolé à 36 jours après l'isolation sont en moyennes moins tortueuses et seraient donc plus longues pour une vitesse semblable.

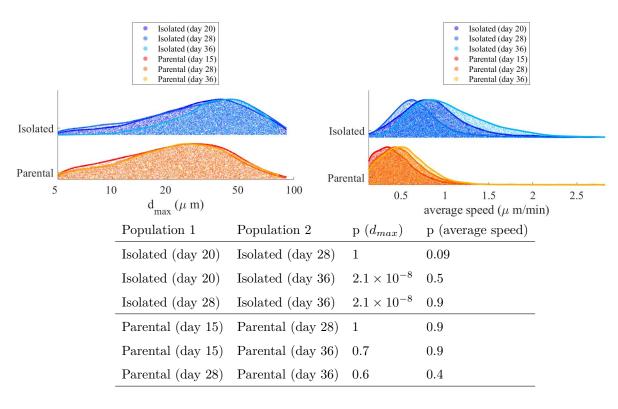


Fig. 5.6. Comparaison des mesures cinétiques à différents moments par population. Les probabilités p que les populations soient semblables sont obtenus après une one-way ANOVA avec test post-hoc Tukey-Kramer.

5.2. Analyse du séquençage ARN et groupement des gènes

5.2.1. Extraction, séquençage et analyse de l'ARN

Un jour avant d'extraire l'ARN, j'ai mis en culture toutes les populations dans des pétris recouverts de 5mg/cm² de fibronectine. J'ai extrait l'ARN à l'aide du kit *RNeasy Micro Kit* de *Qiagen*. J'ai extrait l'ARN de 4 cultures par population afin de conserver les 3 échantillons d'ARN présentant les nombre d'intégrité (RIN) les plus grands par population. À l'aide de Manuel Buscarlet, responsable de la plateforme de séquençage au centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, la qualité et la quantité d'ARN ont été évaluées avec le 2100 Bioanalyser Instrument de Agilent. Le numéro d'intégrité de l'ARN (RIN), mesure de

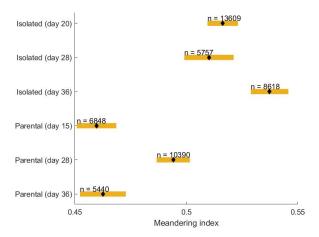


Fig. 5.7. Moyenne de l'indice de méandre. Les moyennes sont encadrées de l'erreur type, ou intervalle de confiance, $I_c = \left[\bar{x} - \frac{\sigma}{\sqrt{n}}; \bar{x} - \frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right]$, où la \bar{x} est la moyenne calculée de l'échantillon, σ son équart-type observé et n sa taille.

la qualité de l'ARN, s'élève entre 8.7 et 10 sur 10 pour les différents échantillons, alors qu'il doit être minimalement de 6 pour être séquencé à *Génome Québec*, et les concentrations varient entre 430 et 2400 ng/ml. Les valeurs précises sont inscrites à la table 5.2. Les échantillons F1, F2, F4, P1, P3 et P4 ont été séquencés par *Génome Québec* sur NovaSeq 6000 de *Illumina* à partir d'une librairie préparée avec le kit *NEBNext Ultra* de *New England BioLabs*.

La liste des gènes accompagnés de leur expression relative et de leur valeur p ajustée a été obtenue par Steven Hébert sur R avec le paquet DESeq2. Les gènes significatifs ont des valeurs de p ajustées plus petites que 0.05 et des valeurs absolues de logarithmes binaires de ratio d'expression plus grandes que 1.

5.2.2. Disparité des résultats

Comme mentionné précédemment, la liste des gènes significatifs a été générée sur DESeq2 de R. Comme on peut le constater par l'analyse en composante principale faite sur l'expression génétique normalisée entre les échantillons des populations parentale et isolée présentées à la figure 5.8, la différence d'expression est très marquée entre les deux populations. En effet, la composante principale explique 99% de la variation retrouvée dans l'expression des différents échantillons et polarise les deux populations. Cette différence marquée se retrouve

Tab. 5.2. Quantité et qualité des échantillons d'ARN extraits

Échantillon	Concentration (ng/ml)	RIN
F1	434	10
F2	542	9.4
F3	743	8.7
F4	563	9
P1	987	9.9
P2	1303	9.1
P3	1037	10
P4	2364	10

aussi dans la *heat map* présentée à la figure 5.9 qui montre les gènes significativement différents entre les deux populations. Nous pensons que l'hétérogénéité d'expression est la cause différence d'expression, car la population isolée contient moins de 5% de la variété trouvée dans la population parentale.

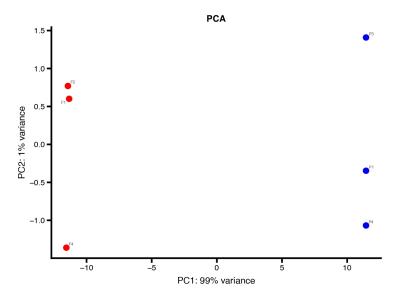


Fig. 5.8. Analyse en composante principale sur l'expression normalisée. La composante principale explique 99% de la variation entre les échantillons et sépare distinctement les échantillons parentaux (bleus) et rapides (rouges) en deux groupes.

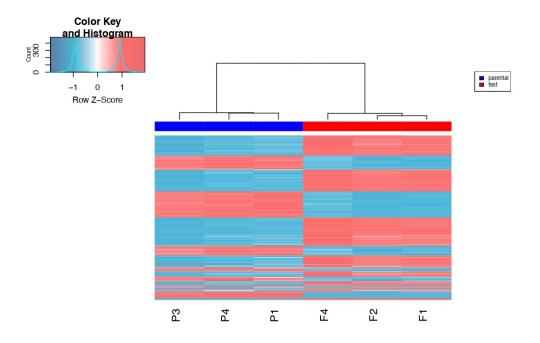


Fig. 5.9. Heat map de l'expression normalisée des 1000 gènes expliquant la plus grande variation entre les échantillons parentaux et rapides pour les 6 échantillons.

5.2.3. Groupement des gènes avec DAVID

À travers les 932 gènes significativement différents entre les deux populations, 412 sont exprimés à la baisse dans la population isolée et 520 à la hausse. À l'aide de l'outil bioinformatique d'annotation fonctionnelle des gènes DAVID, disponible en ligne, j'ai séparé les deux classes de gènes en *clusters*.

Le premier cluster de gènes moins exprimés chez les cellules isolées réunis des gènes propres à l'adhésion cellulaire et l'organisation de la matrice extracellulaire, listés à la table 5.4, dont l'expression se concentre sur la membrane cellulaire et dans des sécrétions vers la région extra cellulaire. Par exemple, FN1 contribue à la formation de superfibronectine qui démontre d'importantes propriétés adhésives. La superfibronectine est aussi reconnue pour inhiber la croissance tumorale, l'angiogénèse et les métastases. Aussi, on retrouve des gènes comme COL6A3 et ABI3BP qui produisent et organisent le collagène. D'autres gènes sont liés à des récepteurs de surface régulant l'adhésion cellulaire, comme NEO1, PTPRU et EPHA5. Encore, il y a des gènes produisant des molécules d'adhésion cellulaire, comme DSCAM, NCAM2 et CDON.

Tab. 5.3. Mots clés cherchés dans les différentes bases de données pour générer la liste de gènes régulés à la baisse du cluster 1

Base de donnée	Mot clés
INTERPRO	IPR003961:Fibronectin, type III
UP_SEQ_FEATURE	domain: Fibronectin type-III 2
UP_SEQ_FEATURE	domain: Fibronectin type-III 1
${\tt UP_SEQ_FEATURE}$	domain: Fibronect in type-III ${\bf 3}$
SMART	SM00060:FN3
UP_SEQ_FEATURE	domain: Fibronectin type-III 4
UP_SEQ_FEATURE	domain: Fibronectin type-III 6
UP_SEQ_FEATURE	domain:Fibronectin type-III 5

Tab. 5.4. Cluster 1 des gènes régulés à la baisse selon DAVID : domaine de la fibronectine de type III

Symbole	-log10(p)	$\log 2$ (Fold Change)
FN1	Inf	-1.28
COL6A3	Inf	-1.82
NEO1	256.56	-5.42
F3	256.19	-1.40
CNTN5	120.65	-4.26
PTPRU	113.45	-1.69
SORL1	104.39	-5.54
KAL1	84.69	-1.28
IGF1R	79.33	-1.01
NCAM2	57.92	-2.29
ABI3BP	53.48	-2.61
DSCAM	45.50	-3.32
CDON	42.90	-2.02
POMGNT2	34.74	-1.01
LRRN1	24.45	-10.87
BZRAP1	17.46	-1.17
TIE1	11.72	-1.01
EPHA5	6.99	-1.06

Les gènes contituant le premier cluster d'expression rehaussée chez les cellules isolées, listés dans la table 5.6, contribuent à l'inhibition de l'adhésion, la dynamique de l'adhésion et la déformation du cytosquelette. Une grande partie du cluster implique la modulation de l'adhésion déclenchée par le calcium. Ainsi, on retrouve 23 protocadhérines (PCDH) qui sont des protéines transmembranaires d'adhésion homophilique. Ces protéines de la famille de

cadherines sont encore le sujet de plusieurs études, mais on sait que la dérégulation de leur expression joue un rôle dans le cancer [37]. De plus, on retrouve des gènes servant à la modulation de l'adhésion, par exemple, ITGB3 est un récepteur qui régule l'adhésion et RELN, dont l'activité enzymatique joue un rôle crucial dans la modulation de l'adhésion. Aussi, plusieurs gènes régulent l'actine ou la myosine, comme GSN qui produit des protéines qui modulent l'actine, AIF1L qui regroupe l'actine, et MYLK et MYL12A qui produit et régule la myosine respectivement. On retrouve plusieurs intégrines, dont ITGB4, ITGA2, ITGB2 et ITGB3. Finalement, on a des gènes dont l'expression réorganise la matrice extracellulaire, comme FBLIM1, HSPG2, MMP16, RELN et TNXB.

Tab. 5.5. Mots clés cherchés dans les différentes bases de données pour générer la liste de gènes régulés à la hausse du cluster 1

Base de donnée	Mot clés
INTERPRO	IPR013164:Cadherin, N-terminal
${\rm UP_SEQ_FEATURE}$	domain:Cadherin 6
${\rm UP_SEQ_FEATURE}$	domain:Cadherin 5
${\rm UP_SEQ_FEATURE}$	domain:Cadherin 3
${\rm UP_SEQ_FEATURE}$	domain:Cadherin 4
INTERPRO	IPR020894:Cadherin conserved site
UP_SEQ_FEATURE	domain:Cadherin 1
UP_SEQ_FEATURE	domain:Cadherin 2
UP_KEYWORDS	Cell adhesion
INTERPRO	IPR002126:Cadherin
INTERPRO	IPR015919:Cadherin-like
$GOTERM_BP_DIRECT$	GO:0007156 homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules
SMART	SM00112:CA
UP_KEYWORDS	Calcium
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005509 calcium ion binding

Bref, les résultats de séquençage ARN, bien qu'ils soient très marqués, sont cohérents avec le reste de l'expérience. En effet, pour le premier cluster de gènes exprimés à la hausse, on retrouve des gènes qui dégradent la matrice extracellulaire, qui régulent le cytosquelette et modulent l'adhésion, donc qui favorisent la migration. Pour le premier cluster de gènes exprimés à la baisse, on retrouve des gènes contribuant à la formation de la matrice extracellulaire et à l'adhésion, des gènes qui défavorisent la migration. Afin de valider ces résultats,

Tab. 5.6. Cluster 1 des gènes régulés à la hausse selon DAVID : Cadherin et liaison d'ions calcium

Symbole	-log10(p)	log2(Fold Change)	Symbole	-log10(p)	$\log 2(F.C.)$			
DYSF	Inf	1.27	PCDHGA10	75.33	1.27			
ENG	Inf	1.46	PCDHGA5	74.07	1.25			
CALB2	Inf	2.54	PCDHGB7	73.47	1.27	Symbole	-log10(p)	log2(F.C.)
ITGB4	Inf	1.53	PCDHGA9	73.06	1.26	CDH18	42.65	2.02
GPR56	289.41	1.57	PCDHGC4	72.39	1.26	RELN	32.92	2.62
MYL12A	280.35	1.13	PCDHGA12	72.29	1.26	TNXB	28.71	2.02
FBLIM1	271.09	2.15	PCDHGA8	72.08	1.26	SYTL3	28.63	1.46
ITGA2	269.61	1.15	PCDHGA3	71.35	1.25	PCDHB2	26.22	1.46
MYLK	247.60	1.49	PCDHGA2	71.31	1.26	CACNB4		
TGFBI	245.08	1.18	PCDHGB4	71.08	1.25	SYT1	22.17 22.00	1.32
ITGB2	240.92	1.88	PCDHGA1	70.95	1.23			1.34
LAMC2	238.94	1.01	PCDHGA4	70.90	1.24	HMCN1 FIBCD1	16.67	1.05
ESAM	213.92	1.00	PCDHGA6	70.54	1.24		16.41	1.45
SLC8B1	162.27	1.13	PCDHGB3	70.52	1.22	CADM4	14.20	1.47
PLCD3	160.57	1.12	PCDHGA7	70.32	1.24	SLC24A5	12.46	1.01
NCS1	139.29	1.25	PCDHGC5	70.23	1.25	EFHD1	11.29	1.26
L1CAM	129.86	1.07	PCDHGB6	69.76	1.24	VWDE	9.62	1.10
CD96	117.44	1.82	PCDHGA11	67.02	1.29	F13A1	8.84	1.41
HSPG2	113.34	1.08	ITGB3	61.28	2.11	RASGRP3	8.25	1.31
GALNT3	113.15	1.33	PCDHGC3	59.91	1.09	JAG2	7.73	1.30
PCDHGB1	107.61	1.28	AIF1L	59.05	1.42	ADAM12	6.83	1.08
MSLN	98.95	1.38	PLCB4	51.51	1.20	PCDHB11	6.02	1.26
PCDHGB2	98.33	1.31	NPTXR	50.41	1.16	MMP3	5.25	1.06
ITGB3	97.29	2.15	EGFL7	45.88	1.43			
GSN	77.45	1.15	MEGF6	44.56	1.84			
MMP16	75.35	2.03	SUSD1	43.25	1.06			

j'accomplirai au moins deux isolations supplémentaires à partir de culture parentales disctinctes. Il serait aussi intéressant de comparer les résultats avec des isolations provenant d'autres lignées cellulaires métastatiques, comme les MEL201 qui provient de mélanomes de la choroïde. Il reste aussi à trouver des voies de signalisation connues ou non qui sont favorisées ou défavorisées dans la population rapide qui pourraient être des cibles potentielles pour des traîtements prévenant le développement de métastases.

5.2.4. Groupement des gènes avec g:Profiler et Cytoscape

Dans cette section, j'ai analysé les résultats de séquençage afin de trouver un enrichissement d'une voix de signalisation en suivant la méthodologie proposée par Jüri Reimand et al. [42]. D'abord, j'ai effectué une analyse d'enrichissement fonctionnelle à l'aide de l'outil g:Profiler disponible en ligne [41]. Après y avoir inséré la liste ordonnée par importance de gène exprimés significativement différemment entre les deux populations, j'ai lancé l'algorythme d'over-representation analysis (ORA) en n'utilisant que la base de donnée Gene Ontology biological process, comme suggéré dans l'article [42]. Les résultats sont présentés à la figure 5.10.

La liste ressort 191 annotations classées par significativité, dont les 100 premiers sont présentés à la figure 5.10. La grande difficulté dans l'analyse de ces données est la quantité d'information. Afin de classer les termes et de visualiser des voies de signalisation, les résultats ont été importés dans le logiciel open source Cytoscape et des annotaions on été générées automatiquement pour regrouper des termes, comme on peut le voir à la figure 5.11. Les regroupements de termes pertinents sont ouverts, en jaune, et ceux qui le sont moins sont fermés en gris. La plus grande annotaion ouverte, Localization, locomotion, migration, comporte 14 termes regroupant des termes qui consernent le mouvement cellulaire et la régulation du mouvement. La seconde annotation Homophilic adhesion mediated, comporte les termes les plus significatifs, comme Biological adhesion, et des termes qui concernent autant l'adhésion cellule-cellule que l'adhésion à un substrat. L'annotation Extracellular interactions matrix comporte des termes sur l'organisation de la matrice extracellulaire et son adhésion, autant par des intégrines que sans intégrines, on sait que l'adhésion sans intégrines peut être retrouvé dans le mode de migration amoeboidal. De façon intéressante, une annotation est réservée à la migration en mode amoeboidal, mode de migration très rapide. Finalement, une annotaion est réservée à la régulation de l'actine, très impliquée dans la migration cellulaire. Quelques listes d'expression relative des gènes significatifs pour des termes importants sont présentées dans l'appendice A.

De plus amples caractérisations seront à effectuer afin d'identifier des protéines à imager par immunofluorescence. Ceci permettra de mieux comprendre la différence entre les populations isolée et parentale et peut-être identifier des voies de signalisations nouvelles.

D'ailleurs, il serait intéressant d'explorer le mode de migration amoeboidal, puisque les protéines d'adhésion qui permettent le déplacement sont encore peu explorées [59]. D'abord, il faudra effectuer des tests pour s'assurer que les cellules isolées se déplacent bien par mode amoeboidal. La migration de cellules à travers des canaux étroits peut être une analyse efficace [57].



Fig. 5.10. Liste des termes de *Gene Ontology* regroupant le gènes significatifs après enrichissement fonctionnel.

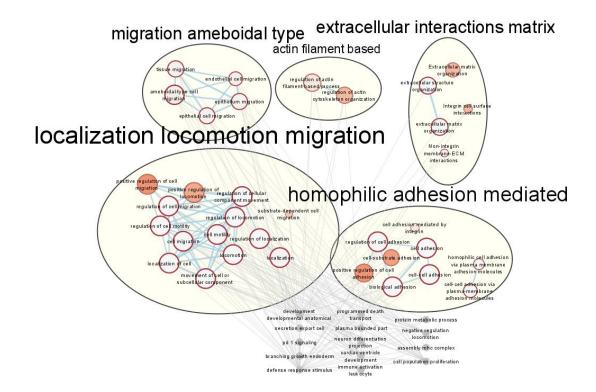


Fig. 5.11. Regroupement et annotations des termes par le programme *CytoScape* [51]. La taille du cercle représente le nombre de gènes inclus dans un terme et l'échelle de couleur représente la *p-value*. Orange équivaut à 0.4 et blanc 0.

Chapitre 6

Conclusion

La microscopie optique est abondement utilisée dans la caractérisation d'échantillons biologiques. Or , il est techniquement difficile d'isoler quelques cellules rares parmi une culture hétérogène en se fiant uniquement à des phénotypes observables au microscope. Plusieurs techniques tentent de répondre à cet enjeu, comme le *IACS*, le *Visual Cell Sorting*, le *Photostick* ou l'utilisation de *Pdots* commutables. La *scMOca*, technique développée au laboratoire, trouve sa niche particulière, car elle peut s'utiliser directement sous le microscope, elle possède une grande sensibilité et spécificité grâce à l'isolation magnétique, ne requiert aucune modification génétique des cellules, utilise des réactifs et de l'équipement communs, etc.

Dans le cadre de ce projet, je me suis concentré à appliquer et à adapter la scMOca à la migration de cellules métastatiques, notemment en augmentant d'un facteur d'environ 250 le volume de cellules pouvant être triées. Le but était de démontrer que cette méthode peut être appliquée à l'isolation de cellules présentant un phénotype migratoire important parmi une culture hétérogène. L'utilisation de cette technique pourrait aider à définir des cibles potentielles à un traitement contre le développement de métastases en dressant un portrait génétique associé à différents phénotypes migratoires. Par exemple, une expérience pourrait être de sélectionner des cellules selon la force qu'elles exercent sur le substrat. Cette force pourrait être mesurée par traction force microscopy [50]. Ainsi, la scMOCa pourrait être adaptée pour sélectionner différents phénotypes visuels liés à la migration cellulaire

afin de disséquer l'hétérogénéité d'une population et mesurer l'importance de ces différents phénotypes vis-à-vis l'agressivité des cellules métastatiques.

Les résultats du séquençage ARN démontrent bien la richesse que cette technique peut apporter à la biologie cellulaire, tant la quantité des pistes de recherche est élevée. En effet, l'analyse a fait ressortir plusieurs gènes et groupes de gènes liés à la migration cellulaire. Ainsi, un grand travail de recherche reste à accomplir afin de bien comprendre les résultats de cette expérience, tant les gènes significatifs sont nombreux. Définir des protéines à imager par immunofluorescence pourrait aider à étudier la localisation de certains phénomènes biochimiques à l'intérieur de la cellule par exemple. Cette recherche sera accomplie par des collaborateurs mieux outillés dans le domaine de la biochimie. D'ailleurs, des collaborateurs mènent présentement une expérience in vivo afin de comparer le potentiel métastatique des populations parentale et isolée. Enfin, afin de démontrer la répétabilité de l'expérience et valider les résultats, l'expérience est à réitérer.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette maîtrise contrastent ceux d'une étude de Beri et al. publiée récemment [4]. Le travail présenté dans cette étude ressemble au mien. En effet, les auteurs ont isolé des cellules métastatiques de lignée MDA-MB-231 sur un critère d'adhésion avant de séquencer les cellules très adhérentes et moins adhérentes. Ils ont observé que les cellules peu adhérentes possédaient des aptitudes migratoires plus importantes que les cellules très adhérentes. Par contre, ils ont observé que le phénotype migratoire revenait à la normale après deux semaines et ne voyaient plus de différence entre les deux populations alors que l'analyse de mes trajectoires cellulaires des populations parentale et isolée démontrent que le phénotype migratoire est conservé après plusieurs mitoses, autant pour les cellules rapides que les parentales. De plus, les gènes qui ont attiré leur attention parmi les gènes qui possédaient une grande différence d'expression entre les deux populations étaient des gènes liés à des protéines motrices, particulièrement celles impliquées dans le transport de vésicules sur les microtubules. Les termes de la Gene Ontology qui sont sortis avec la plus grande signifiance étaient Tubulin Binding, Microtubule binding et Microtubule motor activity. Dans mon cas, ce sont des termes reliés à l'adhésion qui ont obtenu le top du palmarès des termes de la GO. Je n'ai vu aucun terme lié aux microtubules.

Aussi, nous avons mesuré une très forte différence d'expression entre les deux populations, beaucoup plus grande que celle observée dans l'article de Beri et al. En effet, la plus grande valeur absolue de logarithme binaire du ratio d'expression $(log_2(FoldChange))$ qu'ils ont observé s'élève à 1, alors que dans notre cas, c'était le seuil pour considérer un gène significatif. Ainsi les résultats des deux expériences, bien qu'elles tentent toutes deux de trouver des marqueurs pour le potentiel métastatique, diffèrent grandement. Je pense que l'expérience que j'ai menée pourrait mener à la découverte d'un marqueur biophysique du potentiel métastatique, car lors de la sélection des cellules à isoler, j'ai considéré des critères migratoires. Ainsi, j'ai considéré plusieurs caractéristiques biomécaniques simultanément, plutôt que d'en avoir isolé une seule, comme l'adhésion.

Les résultats excitants obtenus ici sont possibles grâce à la scMOCa. Comme mentionné précédemment, elle s'intègre à une nouvelle vague de techniques d'isolation cellulaire, celles basées sur les caractéristiques visuelles. Cette vague est à même de créer une mini-révolution dans la recherche en biologie cellulaire et moléculaire, car elle ouvre la possibilité de poser des questions de recherche en biologie à l'inverse de la tradition, soit de trouver les mécanismes moléculaires sous-jacents à un phénotype observable, plutôt que d'établir l'effet d'un mécanisme moléculaire sur les comportements cellulaires. Bien entendu, beaucoup de développement technologique reste à effectuer afin d'adapter les techniques actuelles à un maximum de questions biologiques. Dans ce sens, développer un système d'isolation pour une culture tridimensionnelle ou un tissu biologique est un défi technologique de taille. Celuici implique l'utilisation de l'excitation à de multiples photons afin de localiser les cellules d'intérêt dans la direction axiale. Ceci permettrait d'étudier davantage la formation des organoïdes, la différenciation des cellules souches en trois dimensions ou la migration tridimensionnelle cellulaire. En effet, les phénomènes biologiques observés en trois dimensions sont souvent différents de ceux en deux dimensions et semblent mieux représenter la physiologie. Ce projet prometteur de développement technologique m'intéresse grandement, car il fait intervenir des concepts d'ingénierie optique et biophotonique et ferait participer plusieurs collaborateurs provenant du domaine du génie et de la biologie. Peut-être aurais-je la chance d'en faire mon sujet de doctorat.

Bibliographie

- Dwi Anoraganingrum: Cell segmentation with median filter and mathematical morphology operation. In Proceedings 10th International Conference on Image Analysis and Processing, pages 1043–1046. IEEE, 1999.
- [2] Vlatka Antolović, Maja Marinović, Vedrana Filić et Igor Weber: A simple optical configuration for cell tracking by dark-field microscopy. *Journal of microbiological methods*, 104:9–11, 2014.
- [3] Jonathan M BÉLISLE, James P CORREIA, Paul W WISEMAN, Timothy E KENNEDY et Santiago Cos-TANTINO: Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, lapap. *Lab on a Chip*, 8(12):2164–2167, 2008.
- [4] Pranjali Beri, Anna Popravko, Benjamin Yeoman, Aditya Kumar, Kevin Chen, Enio Hodzic, Alyssa Chiang, Afsheen Banisadr, Jesse K Placone, Hannah Carter et al.: Cell adhesiveness serves as a biophysical marker for metastatic potential. Cancer Research, 80(4):901–911, 2020.
- [5] Loïc Binan, François Bélanger, Maxime Uriarte, Jean-François Lemay, Jean-Christophe Pelletier De Kininck, Joannie Roy, El Bachir Affar, Elliot Drobetsky, Hugo Wurtele et Santiago Costantino: Opto-magnetic capture of individual cells based on visual phenotypes. eLIFE, pages 1–21, 2019.
- [6] Loïc Binan, Javier Mazzaferri, Karine Choquet, Louis-Etienne Lorenzo, Yu Chang Wang, El Bachir Affar, Yves De Koninck, Jiannis Ragoussis, Claudia L Kleinman et Santiago Costantino: Live single-cell laser tag. *Nature communications*, 7(1):1–8, 2016.
- [7] Loïc Binan, Joannie Roy et Santiago Costantino: Opto-magnetic selection and isolation of single cells. 2019.
- [8] Joseph Braat et Peter Török: Frequency Analysis of Optical Imaging, pages 657–781. Cambridge University Press, 2019.
- [9] Daniel Campos, Vicenç Méndez et Isaac Llopis: Persistent random motion: Uncovering cell migration dynamics. *Journal of theoretical biology*, 267(4):526–534, 2010.
- [10] Lindsay B CASE et Clare M WATERMAN: Integration of actin dynamics and cell adhesion by a threedimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature cell biology*, 17(8):955–963, 2015.
- [11] Chao-Hung Chang, Hsiao-Hui Lee et Chau-Hwang Lee: Substrate properties modulate cell membrane roughness by way of actin filaments. *Scientific reports*, 7(1):9068, 2017.

- [12] Miao-Ping Chien, Christopher A Werley, Samouil L Farhi et Adam E Cohen: Photostick: a method for selective isolation of target cells from culture. *Chemical science*, 6(3):1701–1705, 2015.
- [13] Gene Ontology Consortium: The gene ontology (go) database and informatics resource. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1):D258–D261, 2004.
- [14] Alberto Diaspro, Giuseppe Chirico, Cesare Usai, Paola Ramoino et Jurek Dobrucki: Photobleaching. In Handbook of biological confocal microscopy, pages 690–702. Springer, 2006.
- [15] A. EINSTEIN: Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8):549–560, 1905.
- [16] Isaiah J FIDLER: The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nature reviews cancer*, 3(6):453–458, 2003.
- [17] Peter Friedl et Bettina Weigelin: Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature immunology*, 9(9):960, 2008.
- [18] Xiaorong Fu, Ge Liu, Alexander Halim, Yang Ju, Qing Luo et Guanbin Song: Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 8(8):784, 2019.
- [19] Miguel A Garcia, W James Nelson et Natalie Chavez: Cell-cell junctions organize structural and signaling networks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4):a029181, 2018.
- [20] Nicholas Hasle, Anthony Cooke, Sanjay Srivatsan, Heather Huang, Jason J Stephany, Zachary Krieger, Dana Jackson, Weiliang Tang, Sriram Pendyala, Raymond J Monnat Jr et al.: High-throughput, microscope-based sorting to dissect cellular heterogeneity. Molecular Systems Biology, 16(6): e9442, 2020.
- [21] Indrajyoti Indra, Vishnu Undyala, Casey Kandow, Umadevi Thirumurthi, Micah Dembo et Karen A Beningo: An in vitro correlation of mechanical forces and metastatic capacity. *Physical biology*, 8(1):015015, 2011.
- [22] Nezamoddin N KACHOUIE, Paul FIEGUTH et Eric JERVIS: Watershed deconvolution for cell segmentation. In 2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, pages 375–378. IEEE, 2008.
- [23] Ray Keller: Cell migration during gastrulation. Current opinion in cell biology, 17(5):533-541, 2005.
- [24] Dong-Hwee Kim et Denis Wirtz: Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *The FASEB Journal*, 27(4):1351–1361, 2013.
- [25] Satoshi Kurosaka et Anna Kashina: Cell biology of embryonic migration. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 84(2):102–122, 2008.
- [26] Jaakko Lehtimäki, Markku Hakala et Pekka Lappalainen: Actin filament structures in migrating cells. *In The Actin Cytoskeleton*, pages 123–152. Springer, 2016.
- [27] Norberto Malpica, Carlos Ortiz De Solórzano, Juan José Vaquero, Andrés Santos, Isabel Vallcorba, José Miguel García-Sagredo et Francisco Del Pozo: Applying watershed algorithms to

- the segmentation of clustered nuclei. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 28(4):289–297, 1997.
- [28] Javier Mazzaferri, Joannie Roy, Stephane Lefrancois et Santiago Costantino: Adaptive settings for the nearest-neighbor particle tracking algorithm. *Bioinformatics*, 31(8):1279–1285, 2014.
- [29] E Meijering, O Dzyubachyk et I Smal: Chapter nine-methods for cell and particle tracking. in conn, pm, editor, imaging and spectroscopic analysis of living cells optical and spectroscopic techniques, volume 504 of methods in enzymology, 2012.
- [30] Erik Meijering: Cell segmentation: 50 years down the road [life sciences]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 29(5):140–145, 2012.
- [31] Claudia Tanja MIERKE, Daniel RÖSEL, Ben FABRY et Jan BRÁBEK: Contractile forces in tumor cell migration. European journal of cell biology, 87(8-9):669-676, 2008.
- [32] Nao Nitta, Takeaki Sugimura, Akihiro Isozaki, Hideharu Mikami, Kei Hiraki, Shinya Sakuma, Takanori Iino, Fumihito Arai, Taichiro Endo, Yasuhiro Fujiwaki et al.: Intelligent image-activated cell sorting. Cell, 175(1):266–276, 2018.
- [33] Morgan O'HAYRE, Catherina L SALANGA, Tracy M HANDEL et Samantha J ALLEN: Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. Biochemical Journal, 409(3):635–649, 2008.
- [34] Leonard Salomon Ornstein: On the theory of the brownian motion. *Physical review*, 36:823–841, 1930.
- [35] Nobuyuki Otsu: A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, 9(1):62–66, 1979.
- [36] Chawin Ounkomol, Sharmishtaa Seshamani, Mary M Maleckar, Forrest Collman et Gregory R Johnson: Label-free prediction of three-dimensional fluorescence images from transmitted-light microscopy. *Nature methods*, 15(11):917, 2018.
- [37] Anna Pancho, Tania Aerts, Manuela D Mitsogiannis et Eve Seuntjens: Protocadherins at the crossroad of signaling pathways. Frontiers in Molecular Neuroscience, 13, 2020.
- [38] Dimitri Pappas et Kelong Wang: Cellular separations: a review of new challenges in analytical chemistry. analytica chimica acta, 601(1):26–35, 2007.
- [39] Kornelia Polyak: Heterogeneity in breast cancer. The Journal of clinical investigation, 121(10):3786–3788, 2011.
- [40] Ashok Prasad et Elaheh Alizadeh: Cell form and function: interpreting and controlling the shape of adherent cells. *Trends in biotechnology*, 37(4):347–357, 2019.
- [41] Uku RAUDVERE, Liis KOLBERG, Ivan KUZMIN, Tambet ARAK, Priit ADLER, Hedi PETERSON et Jaak VILO: g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic acids research*, 47(W1):W191–W198, 2019.

- [42] Jüri Reimand, Ruth Isserlin, Veronique Voisin, Mike Kucera, Christian Tannus-Lopes, Asha Rostamianfar, Lina Wadi, Mona Meyer, Jeff Wong, Changjiang Xu et al.: Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g: Profiler, gsea, cytoscape and enrichmentmap. Nature protocols, 14(2):482–517, 2019.
- [43] Anne J Ridley, Martin A Schwartz, Keith Burridge, Richard A Firtel, Mark H Ginsberg, Gary Borisy, J Thomas Parsons et Alan Rick Horwitz: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651):1704–1709, 2003.
- [44] Olaf Ronneberger, Philipp Fischer et Thomas Brox: U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention, pages 234–241. Springer, 2015.
- [45] Pernille Rørth: Collective cell migration. Annual Review of Cell and Developmental, 25:407–429, 2009.
- [46] Thomas N SEYFRIED et Leanne C HUYSENTRUYT: On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*, 18(1-2):43, 2013.
- [47] CJR SHEPPARD et XQ MAO: Three-dimensional imaging in a microscope. JOSA A, 6(9):1260–1269, 1989.
- [48] Loling Song, EJ Hennink, I Ted Young et Hans J Tanke: Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 68(6):2588–2600, 1995.
- [49] Patricia S STEEG: Targeting metastasis. Nature reviews cancer, 16(4):201, 2016.
- [50] Robert W Style, Rostislav Boltyanskiy, Guy K German, Callen Hyland, Christopher W Mac-Minn, Aaron F Mertz, Larry A Wilen, Ye Xu et Eric R Dufresne: Traction force microscopy in physics and biology. Soft matter, 10(23):4047–4055, 2014.
- [51] Gang Su, John H Morris, Barry Demchak et Gary D Bader: Biological network exploration with cytoscape 3. *Current protocols in bioinformatics*, 47(1):8–13, 2014.
- [52] Xiao-xiao Sun et Qiang Yu: Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(10):1219–1227, 2015.
- [53] Carl-Magnus Svensson, Anna Medyukhina, Ivan Belyaev, Naim Al-Zaben et Marc Thilo Figge
 : Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis. Cytometry Part A, 93(3):357–370, 2018.
- [54] Roger Y Tsien: Fluorescent probes of cell signaling. Annual review of neuroscience, 12(1):227–253, 1989.
- [55] Xiaoxu Wang, Weijun He, Dimitris Metaxas, Robin Mathew et Eileen White: Cell segmentation and tracking using texture-adaptive snakes. *In 2007 4th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, pages 101–104. IEEE, 2007.
- [56] Pei-Hsun Wu, Daniele M GILKES et Denis WIRTZ: The biophysics of 3d cell migration. Annual Review of Biophysics, 47:549–567, 2018.

- [57] Meghan M Wyse, Silvia Goicoechea, Rafael Garcia-Mata, Andrea L Nestor-Kalinoski et Kathryn M Eisenmann: mdia2 and cxcl12/cxcr4 chemokine signaling intersect to drive tumor cell amoeboid morphological transitions. *Biochemical and biophysical research communications*, 484(2):255–261, 2017.
- [58] Wei Xu, Christopher E Sims et Nancy L Allbriton: Microcup arrays for the efficient isolation and cloning of cells. *Analytical chemistry*, 82(8):3161–3167, 2010.
- [59] Kenneth M Yamada et Michael Sixt: Mechanisms of 3d cell migration. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20(12):738–752, 2019.
- [60] Xiaodong Yang, Houqiang Li et Xiaobo Zhou: Nuclei segmentation using marker-controlled watershed, tracking using mean-shift, and kalman filter in time-lapse microscopy. IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers, 53(11):2405–2414, 2006.
- [61] Katherine M Young, Congmin Xu, Kelly Ahkee, Roman Mezencev, Peng Qiu et Todd Sulchek : Correlating mechanical and gene expression data on the single cell level to investigate metastasis. Biophysical Journal, 118(3):189a, 2020.
- [62] Xiaobo Zhou, Fuhai Li, Jun Yan et Stephen TC Wong: A novel cell segmentation method and cell phase identification using markov model. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 13(2):152–157, 2008.

Annexe A

Expression génétique de quelques termes importants

La présente section partage quelques listes d'expression génétique relative obtenues après le séquençage ARN des 3 échantillons par population. Le listes sont regroupées selon certain termes de la *Gene Ontology* [13] trouvés par l'analyse de sur-représentation (ORA) de l'outil bioinformatique en ligne g:Profiler [41]. Les termes choisis sont représentatifs des annotations faites par le logiciel *Cytoscape* [51].

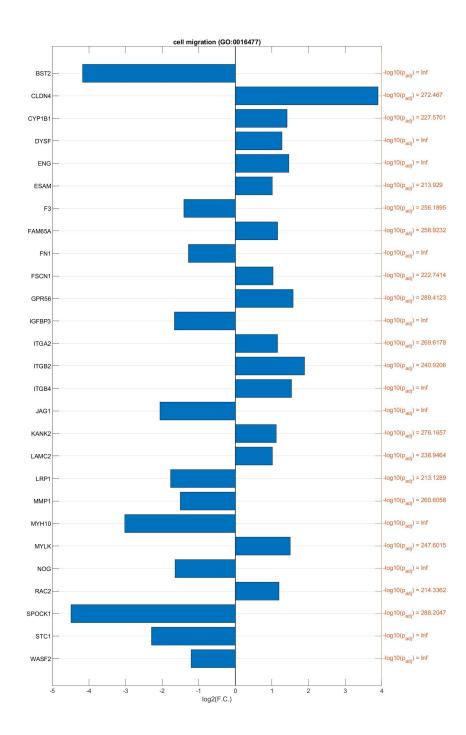


Fig. A.1. Expression relative des gènes significatifs du terme *Cell migration* de la *Gene Ontology*

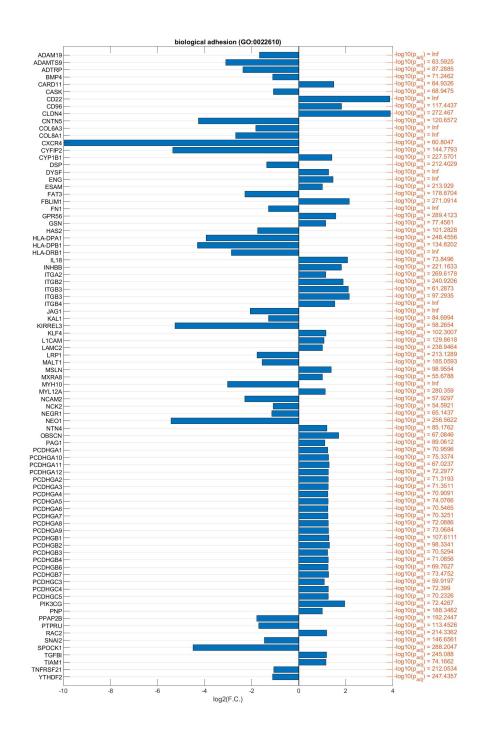


Fig. A.2. Expression relative des gènes significatifs du terme biological adhesion de la Gene Ontology

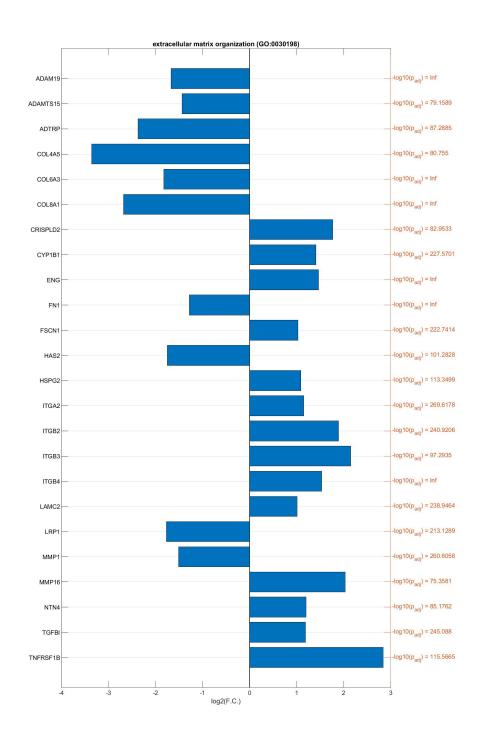


Fig. A.3. Expression relative des gènes significatifs du terme extracellular matrix organization de la Gene Ontology

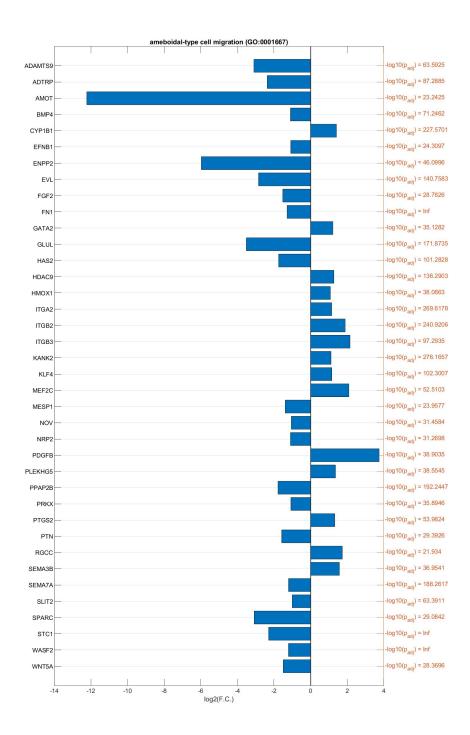


Fig. A.4. Expression relative des gènes significatifs du terme *Ameboidal-type Cell Migration* de la *Gene Ontology*

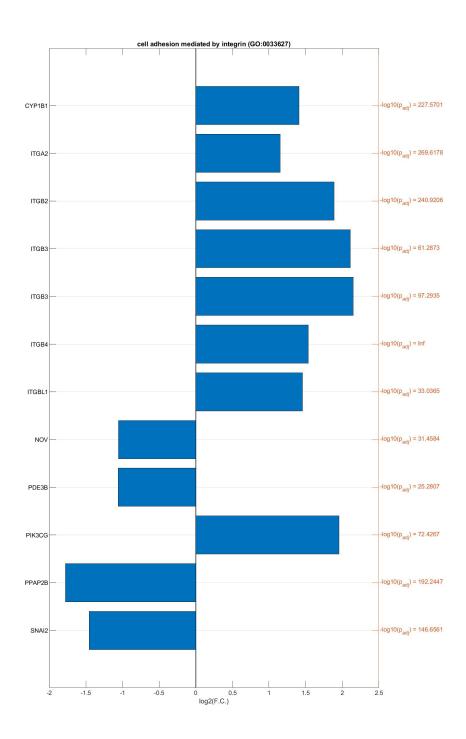


Fig. A.5. Expression relative des gènes significatifs du terme *Cell Adhesion Mediated by Integrin* de la *Gene Ontology*

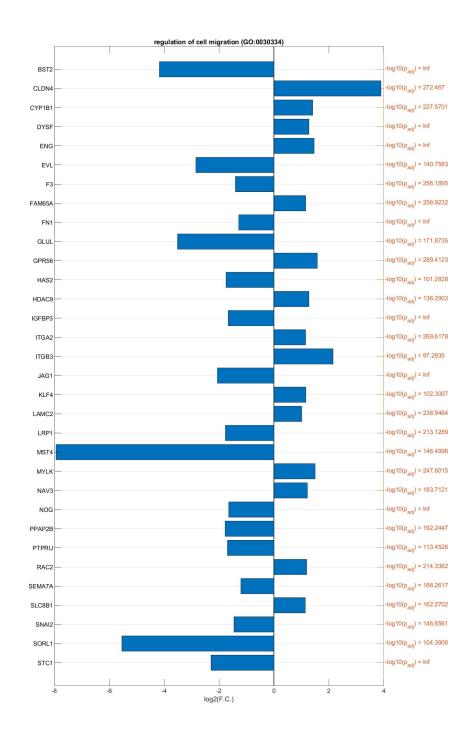


Fig. A.6. Expression relative des gènes significatifs du terme *Regulation of Cell Migration* de la *Gene Ontology*

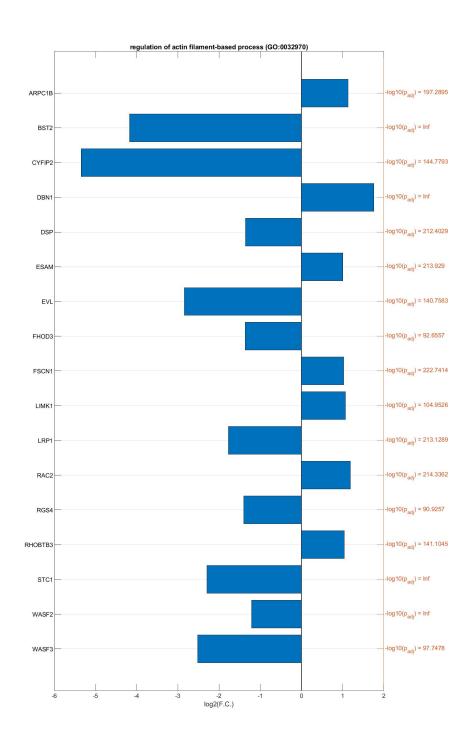


Fig. A.7. Expression relative des gènes significatifs du terme Regulation of Actin Filament-based Process de la Gene Ontology