

PREMIÈRE ANNÉE DE FORMATION DOCTORALE

Évaluation et caractérisation automatiques de toxicité *in vitro* à partir de données de vidéo-microscopie

<u>Unités</u>	UMR900 CANCER ET GÉNOME : BIOINFORMATIQUE, BIostatISTIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIE D'UN SYSTÈME COMPLEXE UMR-S747 - PHARMACOLOGIE, TOXICOLOGIE ET SIGNALISATION CELLULAIRE
<u>Equipes</u>	APPRENTISSAGE STATISTIQUE ET MODÉLISATION DES SYSTÈMES BIOLOGIQUES SIGNALISATION EN TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT ET DU MÉDICAMENT
<u>Directeurs de thèse</u>	Dr. Jean-Philippe Vert et Pr. Robert Barouki
<u>Encadrants</u>	Dr. Thomas Walter et Dr. Céline Raulet-Tomkiewicz
<u>Ecole doctorale</u>	Science des Métiers de l'Ingénieur, option Bioinformatique

Résumé

Toxicologie environnementale et bioinformatique : évaluation et caractérisation automatiques de toxicité *in vitro* à partir de données de vidéo-microscopie

La microscopie à haut débit est un outil puissant pour étudier, à grande échelle, les réponses phénotypiques à une perturbation chimique. Les techniques d'imagerie en cellules vivantes (*live-cell imaging*), récemment devenues utilisables à grande échelle, permettent maintenant de s'intéresser aux processus biologiques dynamiques. Plusieurs méthodes basées sur l'analyse d'images et l'apprentissage statistique ont déjà été proposées pour exploiter ce type de données de manière quantitative. Les processus impliqués, au nombre desquels la migration ou encore la modification de la morphologie cellulaire, sont en effet des critères de toxicité inexploités, quoique cruciaux dans des événements tels la promotion cancéreuse ou la transition épithélio-mésenchymateuse.

Cette thèse a pour objectif l'évaluation et la caractérisation automatiques de la réponse d'une population de cellules à un stress chimique, à partir de données de vidéo-microscopie. Le but de la thèse est d'étendre des méthodes existantes et de développer de nouvelles méthodes, afin d'analyser la distribution des phénotypes dynamiques et leur hétérogénéité dans la réponse d'une population de cellules à une exposition à un ou plusieurs xénobiotiques. Ces méthodes seront appliquées aux données issues d'un crible du génome humain par la technique de *small interfering RNA* (siRNA), ainsi que des données nouvellement produites dans le domaine de la toxicologie environnementale.

Table des matières

1	Sujet	4
1.1	Contexte	4
1.2	Sujet	4
2	Première étape : septembre 2012 - mai 2013	5
2.1	Bioinformatique	5
2.2	Culture cellulaire	6
3	Compétences développées	7
4	Planning prévisionnel : juin 2013 - août 2015	8
4.1	Etude de l'hétérogénéité cellulaire dans la réponse populationnelle	8
4.2	Le <i>xenobiotic screen</i> : application à la toxicologie environnementale	8
5	Annexes	11
5.1	Figures	11
5.2	Protocoles	16
5.3	Descripteurs de trajectoires	16

1 Sujet

1.1 Contexte

Les techniques d'imagerie cellulaire sur cellules vivantes permettent d'étudier les évolutions temporelles de plusieurs paramètres cellulaires (live-cell microscopy). Les données produites lors de telles expériences sont de plus en plus nombreuses et complexes, comme par exemple celles issues des cribles à haut contenu et haut débit (high throughput/high content screening). Les méthodes informatiques nécessaires pour traiter et analyser ces dernières n'existent que depuis peu [20], [9]. Ces développements méthodologiques ont permis d'énormes progrès dans la prévision de la toxicité d'un xénobiotique [15] et l'indication des voies métaboliques ciblées, sans toutefois être encore des méthodes très communes en toxicologie environnementale.

En effet, dans les cas où la vidéo-microscopie est exploitée dans ce domaine, elle ne l'est pas encore de manière quantitative : les phénotypes sont analysés manuellement (à l'œil nu, par exemple dans cet article des effets du DDT sur les cellules de Sertoli [5], ou cet article sur l'ordre des événements conduisant à la cytotoxicité du méthylmercure [6]). Les méthodes sont toutefois en cours de publication (par exemple [21], [19]), ce qui prouve le développement actuel intense du domaine.

L'exploitation de données de vidéo-microscopie en toxicologie, par des méthodes d'apprentissage statistique permettant l'analyse automatique de la réponse d'une population cellulaire à un stress chimique donné, facilitera :

- **l'observation de phénomènes rapides et transitoires**, tels la division cellulaire,
- **l'étude des critères temporels de toxicité**, capitaux entre autres dans le processus cancéreux : vitesse de prolifération et durée du cycle cellulaire, type de déplacement cellulaire et vitesse de migration, évolution des morphologies nucléaire et cellulaire
- **leur ordonnancement dans le temps** : la caractérisation automatique des phénotypes permettrait de les classer de manière rapide et quantitative en phénotypes primaires et secondaires ([12] - [11] introduit les *Event Order Maps* pour ce faire). Cela fournirait des pistes quant aux événements-clefs (initiateurs, majeurs ou plus aisément observables) d'une cascade à l'origine de la toxicité de certains xénobiotiques.
- **l'amélioration de la puissance statistique des tests *in vitro*** grâce à l'analyse de la réponse d'une population à l'échelle de la cellule, i.e. grâce à l'étude de l'hétérogénéité cellulaire dans la réponse à une exposition donnée [17].

1.2 Sujet

Problématique Le présent projet a donc pour objectif l'évaluation et la caractérisation automatiques de la réponse d'une population de cellules à un stress chimique, à partir de données de vidéo-microscopie. Le but de la thèse est d'étendre des méthodes existantes et de développer de nouvelles méthodes, afin d'analyser la distribution des phénotypes dynamiques et leur hétérogénéité dans la réponse d'une population de cellules à une exposition à un ou plusieurs xénobiotiques.

L'observation en cellules vivantes permet d'enregistrer toute la complexité spatio-temporelle des réponses individuelles des cellules, car elle capture l'histoire phénotypique de chacune. L'or-

donnancement des événements phénotypiques comme l'extraction d'éventuels motifs particuliers de migration cellulaire suite à une exposition donnée, peuvent alors être réalisés. Par ailleurs, chaque cellule réagit différemment à une même exposition. Une fois extraites les distributions de trajectoires phénotypiques en réponse aux expositions étudiées, il s'agira donc de modéliser cette hétérogénéité. L'ensemble du projet est résumé sur la figure 1¹.

Données Les données utilisées seront d'une part les vidéos issus d'un projet de criblage génomique par la technique d'ARN interférence (MitoCheck [11], <http://www.mitocheck.org>), ainsi que des données nouvellement produites dans le champ de la toxicologie environnementale.

Déroulement Le présent projet se déroule en deux étapes : la première consiste à développer des méthodes sur les données du projet MitoCheck parallèlement à la préparation des expériences de vidéo-microscopie, appelées *xenobiotic screens* par analogie aux *drug screens* réalisés en toxicologie pharmacologique. La seconde étape verra la réalisation des expériences, et leur analyse grâce aux modèles développés dans le premier temps.

2 Première étape : septembre 2012 - mai 2013

2.1 Bioinformatique

Du fait de notre intérêt pour les réponses individuelles des cellules, la première étape consistait à suivre les objets présents dans les vidéos, de la première à la dernière image de chacune. Une étude bibliographique des principales méthodes de suivi de cellules (*cell tracking*) a révélé qu'il en existe deux types [2] : d'une part les méthodes réalisant de manière conjointe segmentation et suivi, et celles réalisant segmentation et suivi des objets segmentés en deux temps. Nous nous sommes intéressés au second type de méthodes, afin de privilégier une approche modulaire du travail menant des données brutes aux résultats de leur analyse. En effet, différents types de données nécessitent la plupart du temps différentes méthodes de segmentation, d'où l'importance de séparer segmentation et *tracking* afin que l'ensemble soit robuste et adaptable à tout type de données.

Les cellules étant soumises à un stress chimique dont l'impact sur leurs caractéristiques migratoires est inconnu, un second critère de choix fut l'utilisation du minimum d'*a priori*. Nous ne voulions pas d'un algorithme de tracking s'appuyant sur une modélisation du mouvement cellulaire, quelle qu'elle soit. Un autre type d'information *a priori* généralement utilisée dans les algorithmes de tracking consiste à choisir un ensemble arbitraire réduit de descripteurs des objets suivis (e.g. aire, intensité moyenne de l'objet), dont l'influence est réglée manuellement par l'utilisateur. Ce dernier se retrouve donc souvent face à des paramètres délicats à interpréter précisément et plus encore à régler (cf un exemple figure 3).

Nous avons donc finalement opté pour la méthode présentée dans [8], apprenant les règles reliant descripteurs cellulaires à association des objets correspondants, d'une image à l'autre, à partir d'exemples de déplacements (*training set*). Le principe est décrit sur l'image 4 ; les seules informations *a priori* concernent le type de mouvement permis pour chaque objet d'une image à l'autre : déplacement, disparition, apparition, fusion et division.

1. Les figures sont présentées en annexe 5.1

Je pus récupérer le code de l'article, en C++, et passai sans succès un certain temps à essayer de l'adapter. Je finis donc par le reprogrammer entièrement en Python, avec les principales adaptations suivantes :

- utilisation possible d'un training set réparti sur plusieurs vidéos,
- utilisation des 239 descripteurs d'intensité et de forme du logiciel CellCognition (cf infra),
- prise en compte des événements impliquant trois objets (e.g. division en trois) et optimisation du code en conséquence,
- utilisation d'une fonction d'erreur permettant d'équilibrer le *training set* par rapport aux différents types de mouvements.

Dans le même temps, je créai le training set à l'aide du logiciel libre CellCognition co-développé par Thomas Walter et l'IMBA (Vienne) (<http://cellcognition.org/>). Le training set contient environ 32 000 liens entre objets d'une image à l'autre.

L'ensemble du travail au sujet du cell tracking a suivi l'enchaînement suivant :

1. extension de l'interface de CellCognition pour faciliter les annotations de trajectoires cellulaires (cf image 5)
2. utilisation de l'algorithme de *tracking* de CellCognition² pour produire une première approximation des trajectoires
3. correction des trajectoires via l'interface
4. utilisation de ces trajectoires corrigées pour apprendre un modèle de *cell tracking*
5. prédiction de trajectoires par le modèle appris

Les résultats sont satisfaisants : le modèle produit a 99.28% d'exactitude sur le training set (pourcentage calculé par cross-validation). Si il n'est pas bien meilleur que le modèle de CellCognition sur les simples déplacements, il l'est pour tous les autres mouvements (cf figure 6). Une troisième comparaison est en cours, avec le modèle décrit dans l'article [7] tel qu'il est implémenté dans le logiciel CellProfiler (<http://www.cellprofiler.org/>).

Une autre manière d'évaluer le modèle produit consiste à comparer les valeurs des descripteurs de trajectoires entre le training set et la prédiction du modèle, cf image 7³. Les descripteurs de trajectoire ont été sélectionnés à la suite d'une étude bibliographique ; ils sont présentés table 1. Le résultat est satisfaisant.

2.2 Culture cellulaire

Une autre partie du travail a consisté en l'obtention de clones stables de la lignée cellulaire MCF-7 exprimant les protéines fluorescentes H2B-mCherry et myrPalm-GFP. Les protocoles de culture cellulaire et transfection⁴ sont indiqués en annexe, section 5.2.

Le protocole de transfection utilisé contient une quantité bien moindre de lipofectamine que celle conseillée par le fabricant (Life TechnologiesTM). Cette dernière s'est en effet révélée toxique pour les cellules. La quantité utilisée a permis d'obtenir des cellules avec un bon niveau d'expression des protéines d'intérêt (cf image 9). Toutefois, le premier plasmide utilisé pour

2. L'algorithme de *tracking* de CellCognition est assez basique ; il s'agit d'un *nearest neighbour* avec contraintes.

3. Les points oranges et violets correspondent à des trajectoires issues de vidéos sur lesquelles le modèle n'a pas été entraîné.

4. Le principe de la transfection est indiqué figure 8.

la transfection de la protéine H2B-mCherry contenait le gène de résistance au même antibiotique que celui utilisé pour la transfection de myrPalm-GFP, la néomycine. La sélection par antibiotique n'était donc pas suffisante pour sélectionner les cellules doublement marquées.

Technique de la dilution limite A l'aide d'un microscope Nikon Eclipse TE-2000E, des clones de cellules, doublement marquées ou simplement marquées, furent repérés et sélectionnés. Les cellules furent ensuite comptées et le milieu de récolte dilué de manière à déposer 0.3, 1 ou 3 cellules par puits, dans quatre plaques 96 puits (technique de la dilution limite). Suite à cette manipulation, nous pûmes récupérer plusieurs clones de cellules exprimant MyrPalm-GFP, et un clone exprimant H2B-mCherry. Malheureusement, aucune cellule les deux marqueurs ne survécut à cette expérience. Il est possible qu'elles soient toutes mortes, ou qu'elles aient perdu un des deux marqueurs (préférentiellement H2B-mCherry), ou les deux.

Tri par cytométrie de flux En fonction des protéines fluorescentes exprimées, les cellules furent triées et déposées une par une dans les puits de quatre plaques 96 puits. Une fois ces plaques pleines, le reste des cellules fut déposée en fonction de leurs marqueurs dans trois boîtes de 10cm (GFP, mCherry, deux marqueurs). Aucune cellule déposée seule ne survécut. Le tri par cytométrie de flux est extrêmement éprouvant pour les cellules ; ces résultats prouvent également à quel point les cellules MCF-7 se développent difficilement lorsqu'elles sont en faible concentration. Les cellules déposées dans les trois boîtes survécurent toutefois, ce qui nous permit de disposer d'un pool de cellules doublement marquées.

Le pool se distingue du clone par son hétérogénéité génomique. En effet, les cellules d'un clone sont toutes issues de la même cellule-mère, tandis que ce n'est pas le cas dans un pool où les cellules n'ont donc pas nécessairement incorporé le gène des protéines d'intérêt au même endroit. Etant donné notre intérêt pour l'étude de l'hétérogénéité cellulaire, l'ajout d'une variable relative à l'hétérogénéité génomique des cellules risquerait de compliquer sensiblement le problème, d'où notre volonté de travailler avec des clones. Le pool obtenu permet toutefois de faire de premières expériences de mise au point relativement à l'utilisation du microscope.

Un nouveau plasmide pour la transfection de la protéine H2B-mCherry fut donc commandé, comprenant le gène de résistance à un antibiotique différent (la puromycine) de l'autre plasmide. Nous faisons cette fois face à un nouveau problème, qui est celui de l'extrême sensibilisation des cellules à la puromycine lorsqu'elles ont été transfectées par la lipofectamine.

3 Compétences développées

Sur le plan méthodologique Au cours de cette première partie de ma thèse, j'ai pu acquérir une bonne base de programmation en Python. J'ai en effet dû composer avec les logiciels libres Cell Cognition et Cell Profiler de manière à pouvoir les modifier d'une part, et exploiter leurs sorties d'autre part. J'ai par ailleurs entièrement reprogrammé l'algorithme décrit dans [8].

J'ai également acquis les compétences de base en culture cellulaire (culture dans un laboratoire de culture de type L2), biologie moléculaire (transfections transitoire et stable) et biologie cellulaire (acquisition d'images en microscopie).

Sur le plan théorique J'ai profité de cette première année pour suivre des cours de base en apprentissage statistique : j'ai notamment suivi le cours d'*Introduction aux modèles graphiques probabilistes* de Francis Bach et Guillaume Obozinski (27 heures) ainsi que le cours *Kernel methods* de Jean-Philippe Vert (18 heures).

Cet apprentissage basique sera complété par ma présence cet été à la *Machine Learning Summer School* du *Max Planck Institute for Intelligent Systems* (<http://mlss.tuebingen.mpg.de/>).

4 Planning prévisionnel : juin 2013 - août 2015

Concernant le *cell tracking*, la suite consistera d'une part à comparer les résultats du modèle choisi à celui proposé par [7], et d'autre part à prédire avec le meilleur modèle les trajectoires des cellules dans l'ensemble des films du projet MitoCheck. Le cluster de l'équipe sera utilisé pour cela ; cela devrait durer environ un mois (10min/film, 190 000 films, 200 noeuds). L'idée est ensuite d'identifier les gènes du génome humain dont l'extinction partielle entraîne une modification significative des comportements migratoires des cellules, d'une part, et de lier la perturbation des processus migratoires aux modifications de la morphologie nucléaire observés. Nous espérons publier un premier papier à ce sujet.

L'ajout d'un classifieur phénotypique, tel que cela a déjà été fait dans l'article de référence du projet MitoCheck [11], permettra d'obtenir les trajectoires phénotypiques temporelles de chaque cellule, et de passer à l'étude de l'hétérogénéité cellulaire.

4.1 Etude de l'hétérogénéité cellulaire dans la réponse populationnelle

L'importance de l'hétérogénéité cellulaire dans la réponse à un stress biologique [17] ou chimique [16] a été mise en évidence récemment. Dans le contexte du développement de tests réglementaires *in vitro*, elle prend tout son sens : la question se pose de savoir comment quantifier la toxicité *per se* d'une substance lorsque l'on teste sa toxicité relativement à un critère donné *in vitro*. L'étude des schémas de réponses individuelles permettra de mettre en évidence de manière quantitative l'importance de certains facteurs comme la densité cellulaire locale.

De même, la modélisation de l'expression stochastique des gènes [13] pourra permettre en expliquant une part du bruit observé d'accroître la force prédictive des tests reposant sur une analyse individuelle de la réponse d'une cellule à un stress chimique.

4.2 Le *xenobiotic screen* : application à la toxicologie environnementale

Une condition *sine qua non* de la réalisation de ce screen est l'obtention de clones stables de la lignée cellulaire MCF-7 exprimant les protéines d'intérêt susmentionnées. Idéalement, ce sera le cas avant l'été 2013.

Le protocole expérimental précis sera ensuite déterminé (avant fin 2013) :

- choix des **xénobiotiques** étudiés
- choix des **mélanges** de xénobiotiques étudiés

- choix des **doses** : par rapport aux données MitoCheck, il s'agit d'une variable supplémentaire, extrêmement pertinente dans le débat actuel sur les effets à faible dose en général, et les perturbateurs endocriniens en particulier.

Les données seront produites et récoltées dès que possible, dans l'esprit des premiers tests qui ont été réalisés, dont le protocole est fourni en annexe (section 5.2). Les méthodes développées durant la première partie seront alors utilisées sur les nouvelles données. Parmi les adaptations qui seront nécessaires, il faudra tout d'abord s'intéresser à la segmentation des images obtenues. En effet, le marqueur membranaire myrPalm-GFP, qui permet d'observer la membrane nucléaire, n'existe pas dans les données MitoCheck.

L'aboutissement sera alors de comparer les phénotypes ou répartitions de phénotypes présentés dans les différents cas : pourront être mises en regard substances connues et inconnues, doses d'une même substance ou encore xénobiotiques et siRNA. Suivant les résultats obtenus (et le temps restant), des tests de validation *in vitro* de la fiabilité des résultats obtenus pourront être réalisés.

Références

- [1] J. B. BELTMAN, A. F. MAREE, AND R. J. DE BOER, *Analysing immune cell migration*, Nat. Rev. Immunol., 9 (2009), pp. 789–798.
- [2] Y. Z. BISE R. AND T. KANADE, *Reliable cell tracking by global data association*, in IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2011), 2011.
- [3] E. A. CODLING, M. J. PLANK, AND S. BENHAMOU, *Random walk models in biology*, J R Soc Interface, 5 (2008), pp. 813–834.
- [4] R. FERRARI, A. MANFROI, AND W. YOUNG, *Strongly and weakly self-similar diffusion*, Physica D, 154 (2001), pp. 111–137.
- [5] C. FIORINI, J. GILLERON, D. CARETTE, A. VALETTE, A. TILLOY, S. CHEVALIER, D. SEGRETAIN, AND G. POINTIS, *Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles : an early event of DDT carcinogenicity*, Biochim. Biophys. Acta, 1778 (2008), pp. 56–67.
- [6] R. GATTI, S. BELLETTI, J. UGGERI, M. V. VETTORI, A. MUTTI, R. SCANDROGLIO, AND G. ORLANDINI, *Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation*, Toxicology, 204 (2004), pp. 175–185.
- [7] K. JAQAMAN, D. LOERKE, M. METTLEN, H. KUWATA, S. GRINSTEIN, S. L. SCHMID, AND G. DANUSER, *Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences*, Nat. Methods, 5 (2008), pp. 695–702.
- [8] X. LOU AND F. A. HAMPRECHT, *Structured Learning for Cell Tracking*, in Twenty-Fifth Annual Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS 2011), 2011.
- [9] E. MEIJERING, O. DZYUBACHYK, AND I. SMAL, *Methods for cell and particle tracking*, Meth. Enzymol., 504 (2012), pp. 183–200.
- [10] S. NAFFAR-ABU-AMARA, T. SHAY, M. GALUN, N. COHEN, S. J. ISAKOFF, Z. KAM, AND B. GEIGER, *Identification of novel pro-migratory, cancer-associated genes using quantitative, microscopy-based screening*, PLoS ONE, 3 (2008), p. e1457.
- [11] B. NEUMANN, T. WALTER, J. K. HERICHE, J. BULKESCHER, H. ERFLE, C. CONRAD, P. ROGERS, I. POSER, M. HELD, U. LIEBEL, C. CETIN, F. SIECKMANN, G. PAU, R. KABBE, A. WUNSCH, V. SATAGOPAM, M. H. SCHMITZ, C. CHAPUIS, D. W. GERLICH, R. SCHNEIDER, R. EILS, W. HUBER, J. M. PETERS, A. A. HYMAN, R. DURBIN, R. PEPPERKOK, AND J. ELLENBERG, *Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes*, Nature, 464 (2010), pp. 721–727.
- [12] Z. E. PERLMAN, M. D. SLACK, Y. FENG, T. J. MITCHISON, L. F. WU, AND S. J. ALTSCHULER, *Multidimensional drug profiling by automated microscopy*, Science, 306 (2004), pp. 1194–1198.
- [13] A. RAJ AND A. VAN OUDENAARDEN, *Nature, nurture, or chance : stochastic gene expression and its consequences*, Cell, 135 (2008), pp. 216–226.
- [14] I. F. SBALZARINI AND P. KOUMOUTSAKOS, *Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology*, J. Struct. Biol., 151 (2005), pp. 182–195.

- [15] W. G. SCHOONEN, W. M. WESTERINK, AND G. J. HORBACH, *High-throughput screening for analysis of in vitro toxicity*, EXS, 99 (2009), pp. 401–452.
- [16] D. K. SINGH, C. J. KU, C. WICHAIDIT, R. J. STEININGER, L. F. WU, AND S. J. ALTSCHULER, *Patterns of basal signaling heterogeneity can distinguish cellular populations with different drug sensitivities*, Mol. Syst. Biol., 6 (2010), p. 369.
- [17] B. SNIJDER, R. SACHER, P. RAMO, E. M. DAMM, P. LIBERALI, AND L. PELKMANS, *Population context determines cell-to-cell variability in endocytosis and virus infection*, Nature, 461 (2009), pp. 520–523.
- [18] H. TAKAGI, M. J. SATO, T. YANAGIDA, AND M. UEDA, *Functional analysis of spontaneous cell movement under different physiological conditions*, PLoS ONE, 3 (2008), p. e2648.
- [19] W. VAN ROOSMALEN, S. E. LE DEVEDEC, S. ZOVKO, H. DE BONT, AND B. VAN DE WATER, *Functional screening with a live cell imaging-based random cell migration assay*, Methods Mol. Biol., 769 (2011), pp. 435–448.
- [20] T. WALTER, M. HELD, B. NEUMANN, J. K. HERICHE, C. CONRAD, R. PEPPERKOK, AND J. ELLENBERG, *Automatic identification and clustering of chromosome phenotypes in a genome wide RNAi screen by time-lapse imaging*, J. Struct. Biol., 170 (2010), pp. 1–9.
- [21] D. WLODKOWIC, S. FALEY, Z. DARZYNKIEWICZ, AND J. M. COOPER, *Real-time cytotoxicity assays*, Methods Mol. Biol., 731 (2011), pp. 285–291.

5 Annexes

5.1 Figures

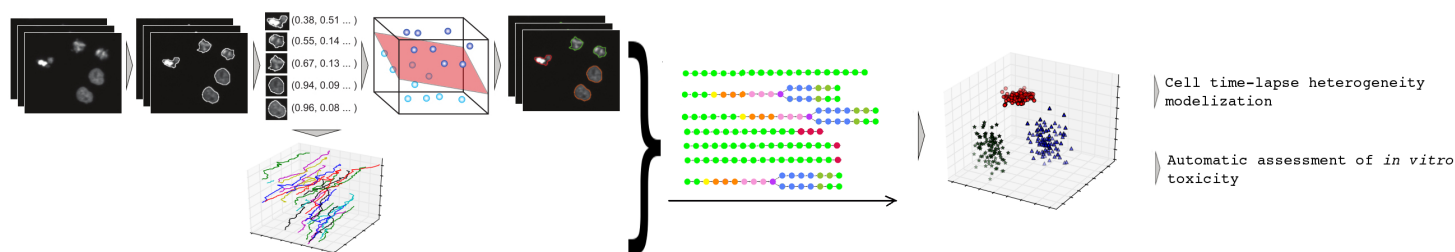


FIGURE 1 – Projet de thèse *xenobiotic screen*

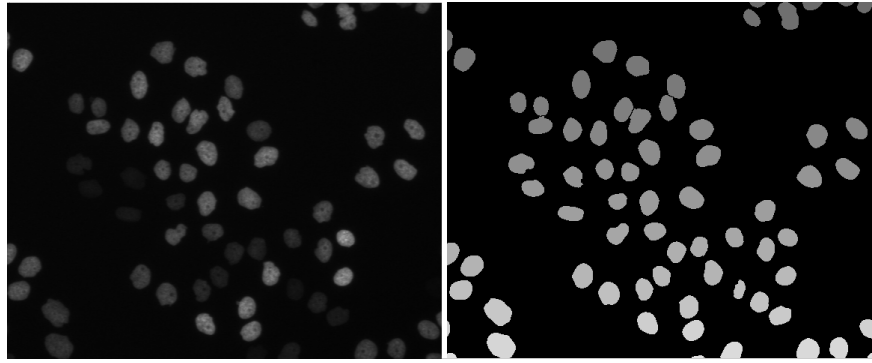


FIGURE 2 – Exemple d'une image issue d'une vidéo du projet MitoCheck et de sa segmentation

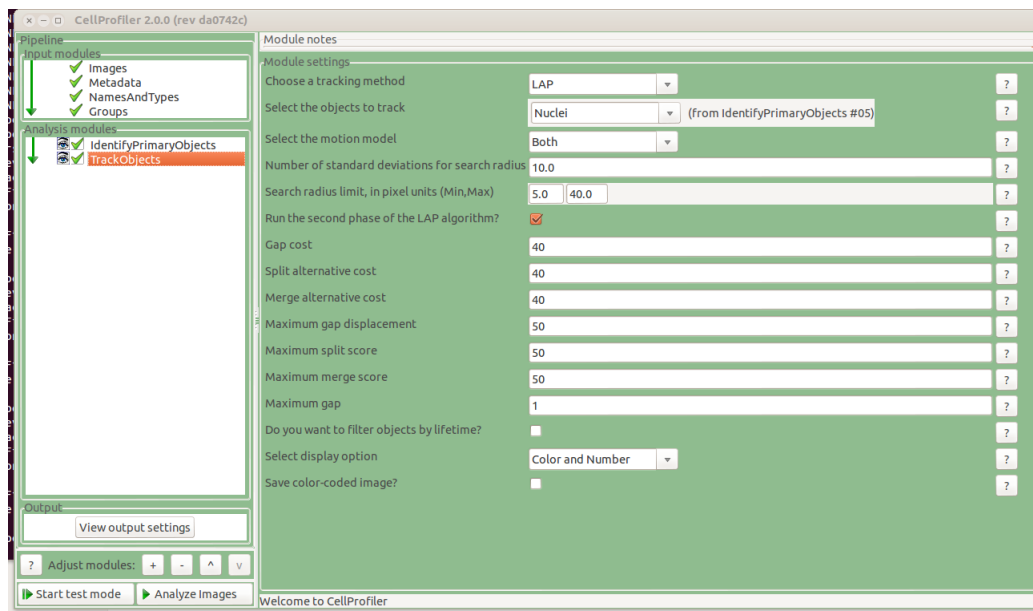
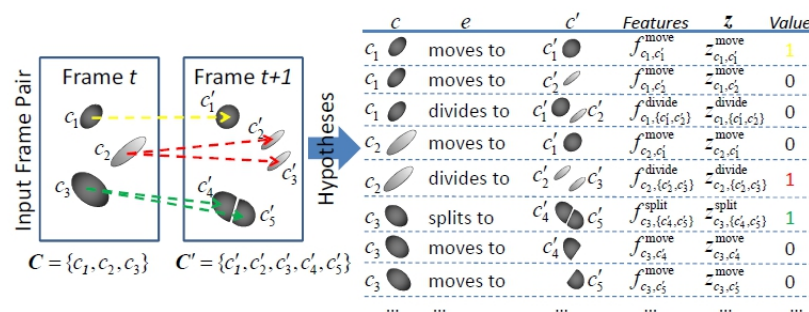
FIGURE 3 – Interface de *tracking* du logiciel Cell Profiler

FIGURE 4 – Principe du suivi de cellules par apprentissage structuré (tiré de [8])

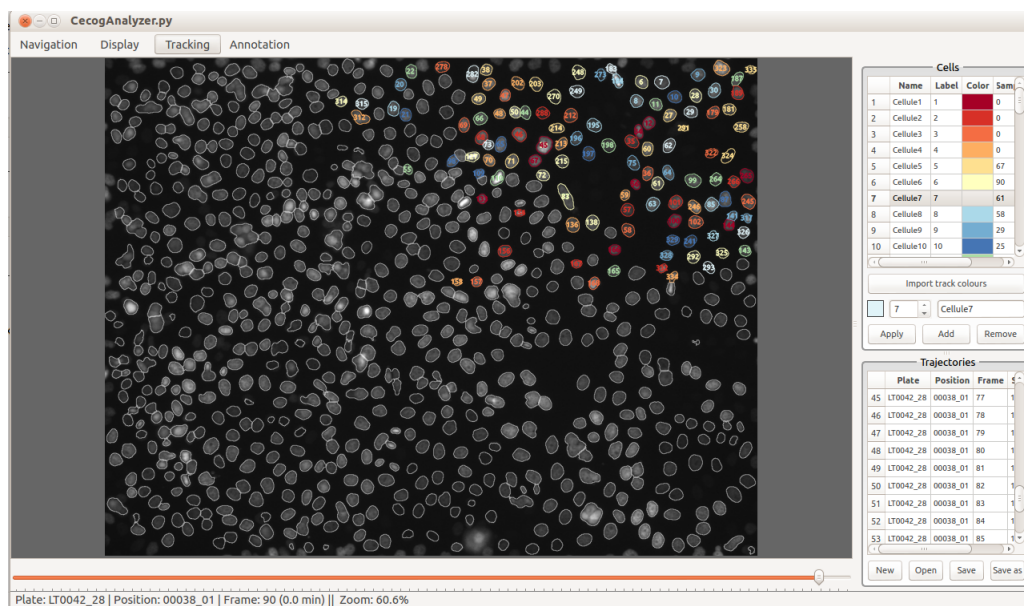


FIGURE 5 – Interface graphique de CellCognition adaptée pour annoter les trajectoires

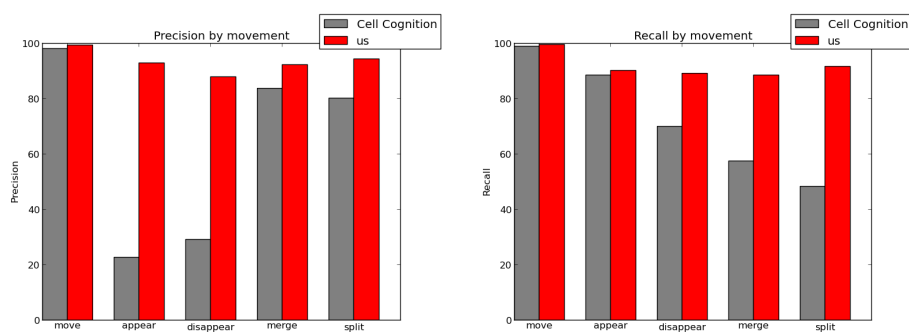


FIGURE 6 – Exactitude et précision du modèle de tracking produit

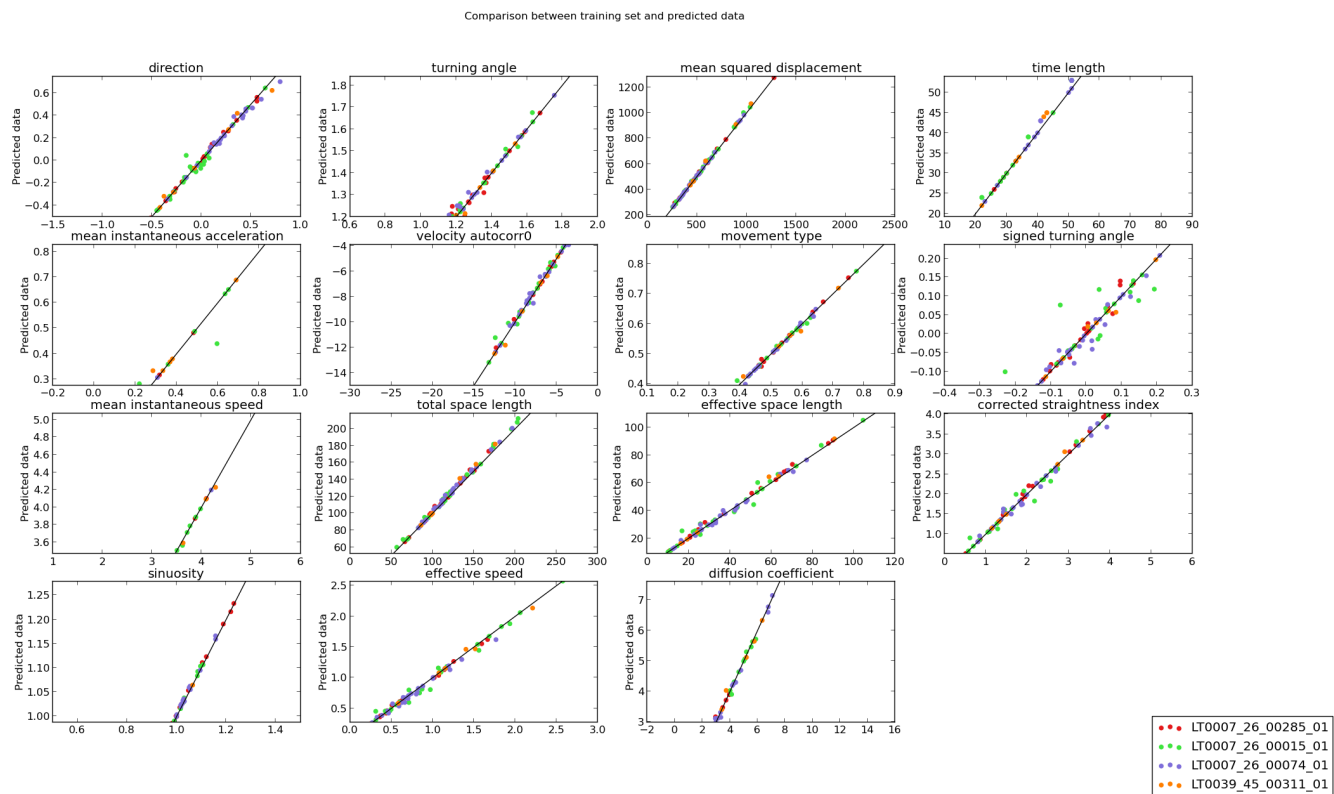


FIGURE 7 – Comparaison entre les valeurs des descripteurs de trajectoires manuellement et automatiquement produites

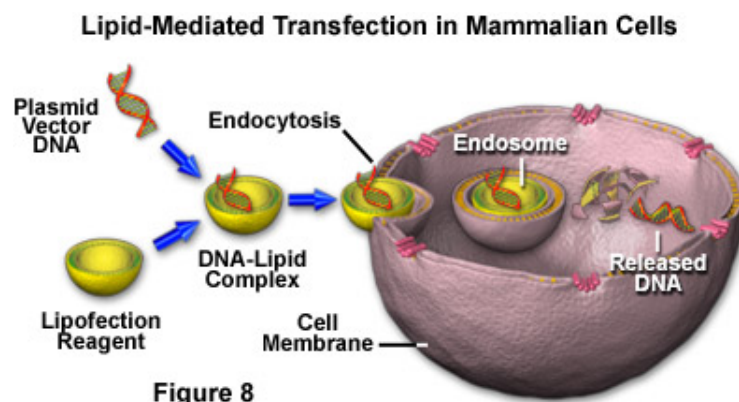


FIGURE 8 – Principe de la lipofection

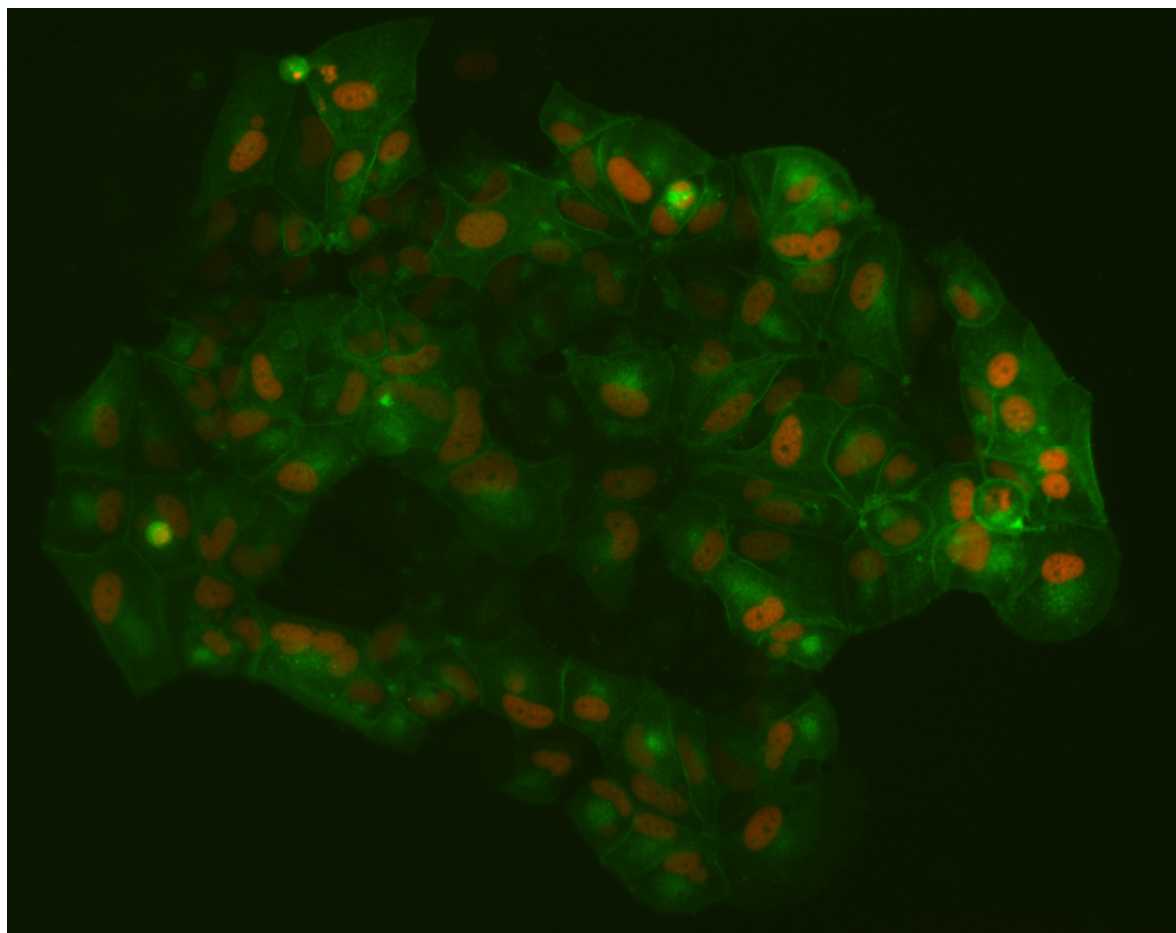


FIGURE 9 – Cellules MCF-7 exprimant H2B-mCherry (rouge) et myrPalm-GFP (vert) (x10)

5.2 Protocoles

Cell culture The human mammary tumor cell line MCF-7 (ATCC® Catalog N°HTB-22™) was maintained in DMEM (Life Technologies) with phenol red and supplemented with 10% FCS, 200 units/ml penicillin, 500 μ g/ml streptomycin, 3g/ml glutamin, 10 μ g/mL insulin and 0.1nmol/mL of non-essential amino acids solution (all from Life Technologies™, Diamant, Puteaux, France), and 0.5 μ g/ml fungizone (Squibb, Princeton, NJ)⁵. Forty-eight h before any experiment, the medium was removed and replaced by DMEM without phenol red (Life Technologies™) with 3% charcoal-treated calf serum (i.e. desteroidized calf serum), and the same concentrations of penicillin, streptomycin, and fungizone as described above⁶.

Cell transfection Cells were transfected with two plasmids : one containing human histone H2B fused to the gene encoding a red fluorescent protein (mCherry), isolated from *Discosoma* species (Addgene, plasmid #21045), one containing human membrane lipid Myr/Palm fused to the gene encoding the green fluorescent protein (GFP) of *Aequorea victoria* (Addgene, plasmid #21037). The aim was to generate a stable line constitutively expressing H2B-mCherry and Myr/Palm-GFP.

On the day before transfection, MCF-7 cells were seeded into 10cm dish with normal medium (2 millions per dish). On the day of transfection, cell medium was replaced with 2mL of normal medium and a mix composed of 72 μ L Lipofectamin® 2000 reagent and 24 μ g of total plasmid DNA (either H2B-GFP alone, Myr/Palm-mCherry alone or both), completed to a volume of 3mL with Optimem (Life technologies™). Cells were then incubated for 5 hours at 37°C, after what 5mL of normal medium was added. Antibiotic selection started 7 days after transfection, with 1mg/mL of neomycin and 1 μ g/mL of puromycin added to normal cell medium ; selection medium was replaced every other day.

Production of 6 well-plate for imaging Two days before imaging, MCF-7 cells were seeded into 6 well-plastic plates, and normal medium replaced with experiment medium. Thirty minutes before imaging, TCDD (LGC Promochem, Mosheim, France) was added to medium for a final concentration of 25 nmol/L.

High-throughput time-lapse imaging Images were acquired every 15 minutes in each well for forty-eight hours, with an automated epifluorescence microscope (Axio Observer Z1 ; Zeiss, Oberkochen, Germany) with motorized objectives in z-axis (resolution 10nm) and using 10x objective (EC Plan-Neofluar ;0.3 M27). A motorized xy-stage allows automatic re-positioning. The microscope is integrated into a microscope incubation chamber to provide constant temperature (+37°C) and CO2 pressure (5%) conditions. Zeiss software ZEN2011 was used for focus and data recording.

5.3 Descripteurs de trajectoires

5. Medium called "normal medium" in the following.

6. Medium called "experiment medium" in the following.

Name	Formula	Reference
Effective path length	$L = \sqrt{(x(t_0) - x(t_f))^2 + (y(t_0) - y(t_f))^2}$	[10]
Total path length P	$P = nE(L) = \sum \sqrt{(x(t) - x(t))^2 + (y(t) - y(t))^2}$	[10]
Corrected straightness index	$\sqrt{f}L/P$	[1]
Sinuosity (for CRW)	$S = 2\sqrt{\frac{P}{MSD}}$	[3]
Velocity autocorrelation	$\frac{1}{f} \sum (\vec{v}_t \bullet \vec{v}_{t+1})$	[18]
Mean turning angle	$\frac{1}{f} \sum \cos^{-1}(\frac{\vec{d}_t \bullet \vec{d}_{t+1}}{ \vec{d}_t \vec{d}_{t+1} })$	[18]
Mean (signed) turning angle	$\frac{1}{f} \sum \text{sgn}(y(t+1) - y(t)) \cos^{-1}(\frac{\vec{d}_t \bullet \vec{d}_{t+1}}{ \vec{d}_t \vec{d}_{t+1} })$	[18]
Mean turning rate	$\frac{1}{f} \sum \cos^{-1}(\frac{\vec{v}_t \bullet \vec{v}_{t+1}}{ \vec{v}_t \vec{v}_{t+1} })$	[18]
Effective speed	$\frac{L}{f\delta t}$	
Mean instantaneous speed	$\frac{P}{f\delta t}$	
Mean instantaneous acceleration		
Mean direction	$\frac{1}{f} \sum \text{sgn}(y(t)) \cos^{-1}(\frac{x(t)}{ \vec{OM}(t) })$	
Mean squared displacement	$MSD = \frac{1}{f-1} \sum (x(t) - x(t))^2 + (y(t) - y(t))^2$	
Moment of order ν , time-shift Δn	$\mu(\nu, \Delta n) = \frac{1}{f - \Delta n} \sum d_{t+\Delta n} - \vec{d}_t ^\nu$	[4], [14]
Type of movement	if $\mu(\nu, \Delta n) \propto \Delta n^{\gamma_\nu}$ then type of movement is given by the slope of $\gamma_\nu = f(\nu)$	[4], [14]
Diffusion coefficient	$D_2 = \frac{e^{g(0)}}{4}$ where $\ln(\mu(2)) = g(\ln(\Delta n))$	[4]

TABLE 1 – Track parameters