



École thématique CNRS 2024 : RoscoScreen

Station Biologique de Roscoff – 24 au 27 Septembre 2024



Criblage Moléculaire : à la recherche de sondes chimiques d'intérêt en thérapie humaine

Module 2. Développement de tests de criblage

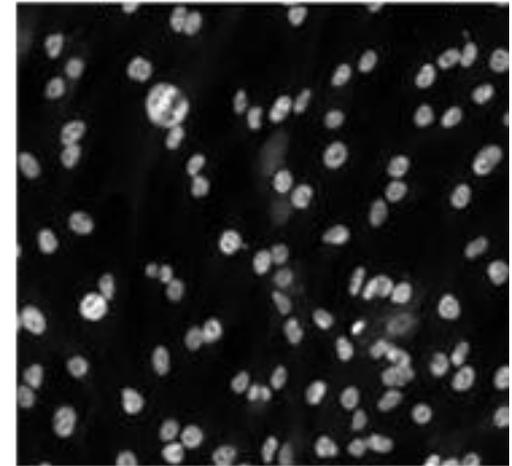
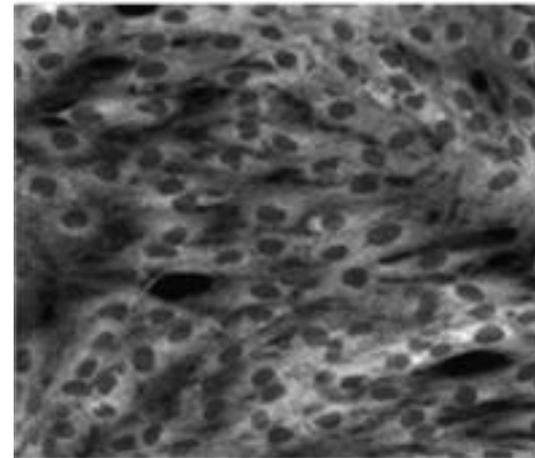
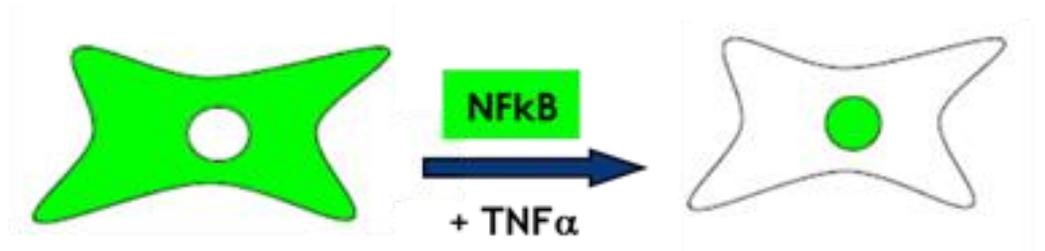
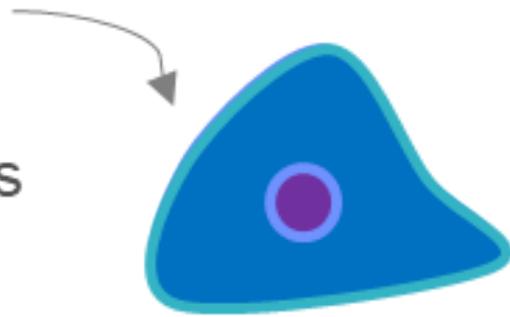
L'analyse phénotypique de la paillasse à la robotique :

Comment mettre en place et explorer les phénotypes cellulaires complexes.

Elaine Del Nery
Institut Curie – Plateforme BioPhenics

Criblage phénotypique

siRNAs
compounds
approved-drugs
off-patent drugs



1. Phénotype

CNRTL Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales

Ortolang Outils et Ressources pour un Traitement Optimisé de la LANGue

Accueil Portail lexical Corpus Lexiques Dictionnaires Métalexicographie Outils Contact

Morphologie **Lexicographie** Etymologie Synonymie Antonymie Proxémie Concordance Aide

Entrez une forme Chercher

options d'affichage catégorie : toutes

PHÉNOTYPE, subst. masc.

BIOL. Ensemble des caractères observables, apparents, d'un individu, d'un organisme dus aux facteurs héréditaires (génotype) et aux modifications apportées par le milieu environnant. La relation entre le génotype et le phénotype est souvent si complexe que même si nous sommes d'accord sur la valeur délétère d'un phénotype, les gènes déterminants ne sont pas forcément mauvais pour l'espèce (Tiers Monde, 1956, p.112). Des faits jusque-là obscurs ou mal interprétés (...) ont trouvé leur explication grâce à l'étude des phénotypes et des altérations de la chromatine sexuelle (BARIÉTY, COURY, Hist. méd., 1963, p.760).

REM.
Phénotypique, adj. Relatif au phénotype. Caractère, particularité phénotypique. La taille présente une variation continue. Ce fait, évident pour la taille, a été observé au niveau de nombreuses caractéristiques phénotypiques. Ce phénomène de variation continue, qui nous apparaît comme très répandu dans l'espèce humaine, s'explique par le fait que les caractères, ou les ensembles de caractères, qui s'héritent de cette manière, sont sous le contrôle d'un grand nombre de gènes (Tiers Monde, 1956, p.101). Une adaptabilité au milieu qu'assurent non seulement une grande variabilité phénotypique non héréditaire mais une mutabilité qui intéresse le génome (LEVADOUX, Vigne, 1961, p.23).

Prononc. et Orth.: [fenotip]. **Étymol. et Hist.** 1911 (L. CUÉNOT, Genèse des espèces animales, Paris, Alcan, p.116). Empr. à l'all. *Phänotypus*, mot créé en 1909 par le biologiste danois W. Johannsen [1857-1927], à partir du gr. φαίνω -, φαίνω «paraître» (v. *phénomène*) et de *Typus*, fr. *type**, sur le calque de l'all. *Erscheinungstypus*, lui-même comp. de *Erscheinung* «apparition» et de *Typus* (*Elemente der exakten Erblichkeitslehre*, p.123).

TLFi

Académie 9^e édition

Académie 8^e édition

Académie 4^e édition

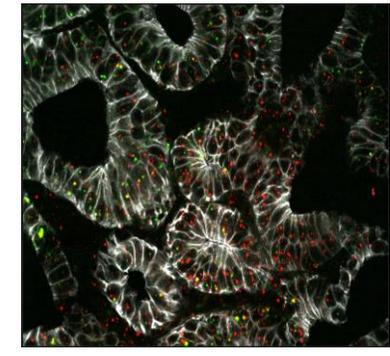
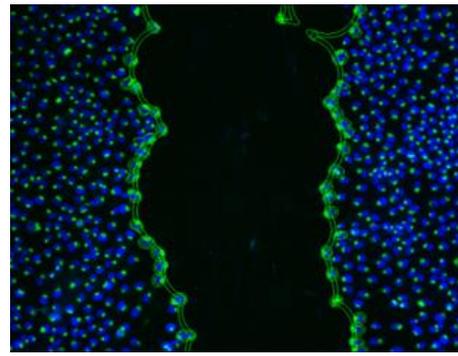
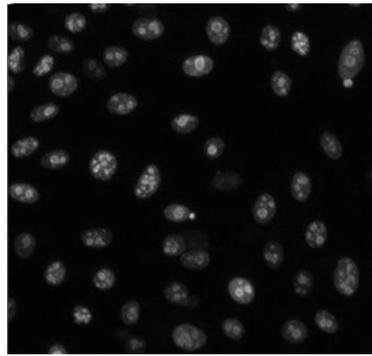
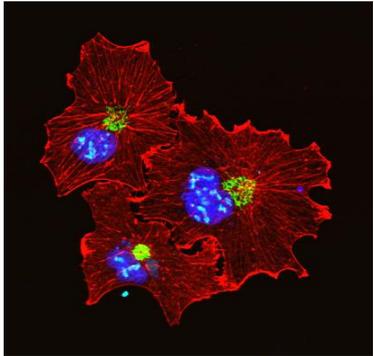
BDLP Francophonie

BHVF attestations

DMF (1330 - 1500)

Qu'est-ce qu'un phénotype ?

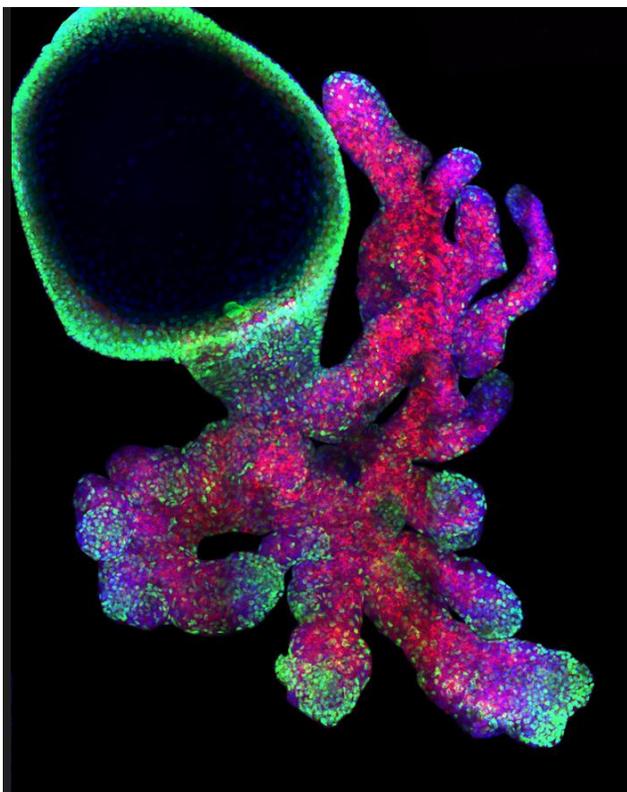
- **Définition simple** : L'ensemble des caractéristiques observables/quantifiables « d'une cellule ou d'un organisme », résultant de l'interaction entre son génotype et l'environnement.



*

Qu'entend-on par "phénotype complexe" ?

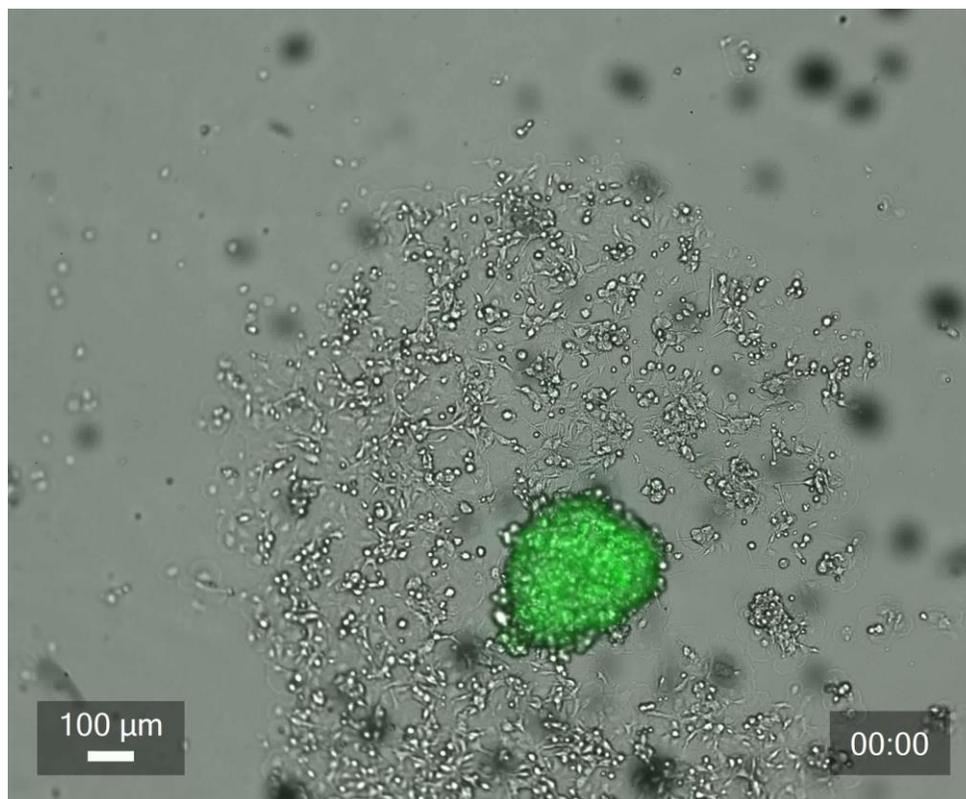
Stages du développement



Silvia Frei/IC

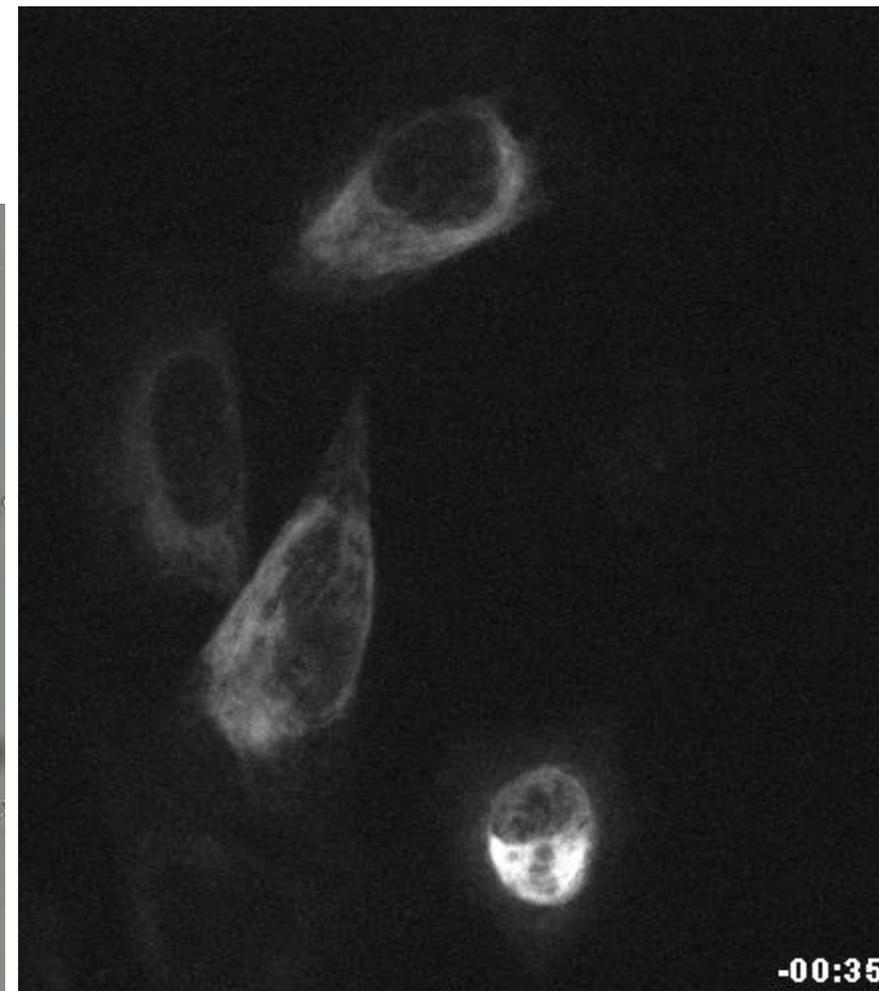
Team of Silvia Frei, Inst Curie

Co-cultures / 3D



Team of P. Benaroch, Inst Curie

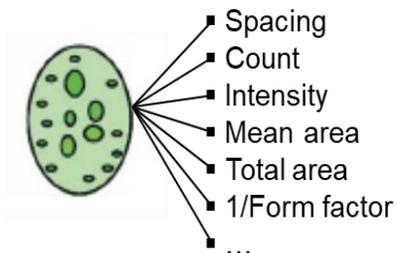
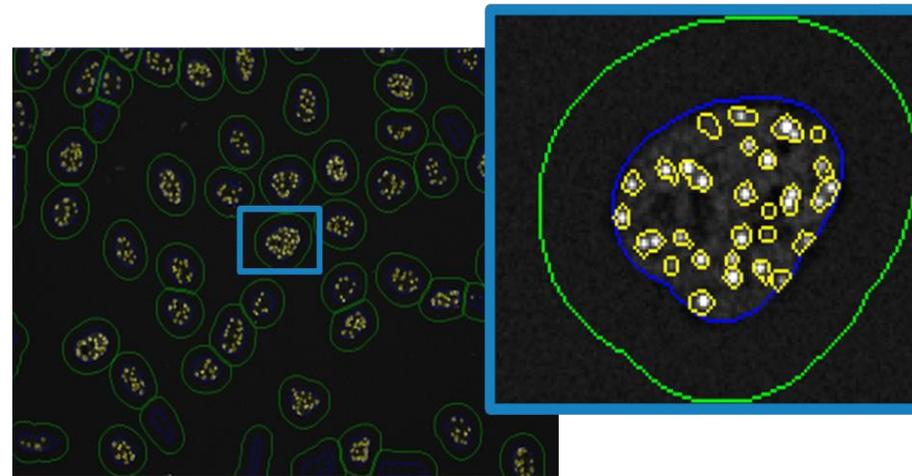
Transport cellulaire



Team of F. Perez, Inst Curie

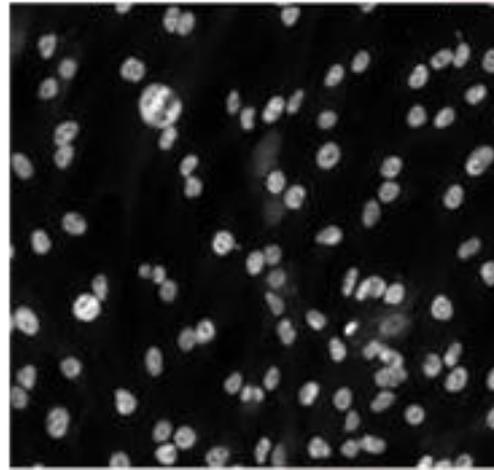
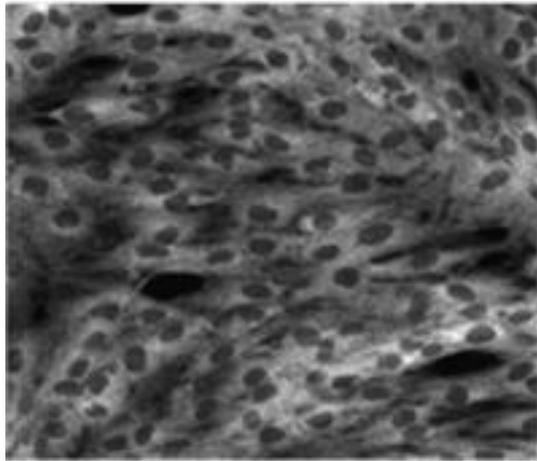
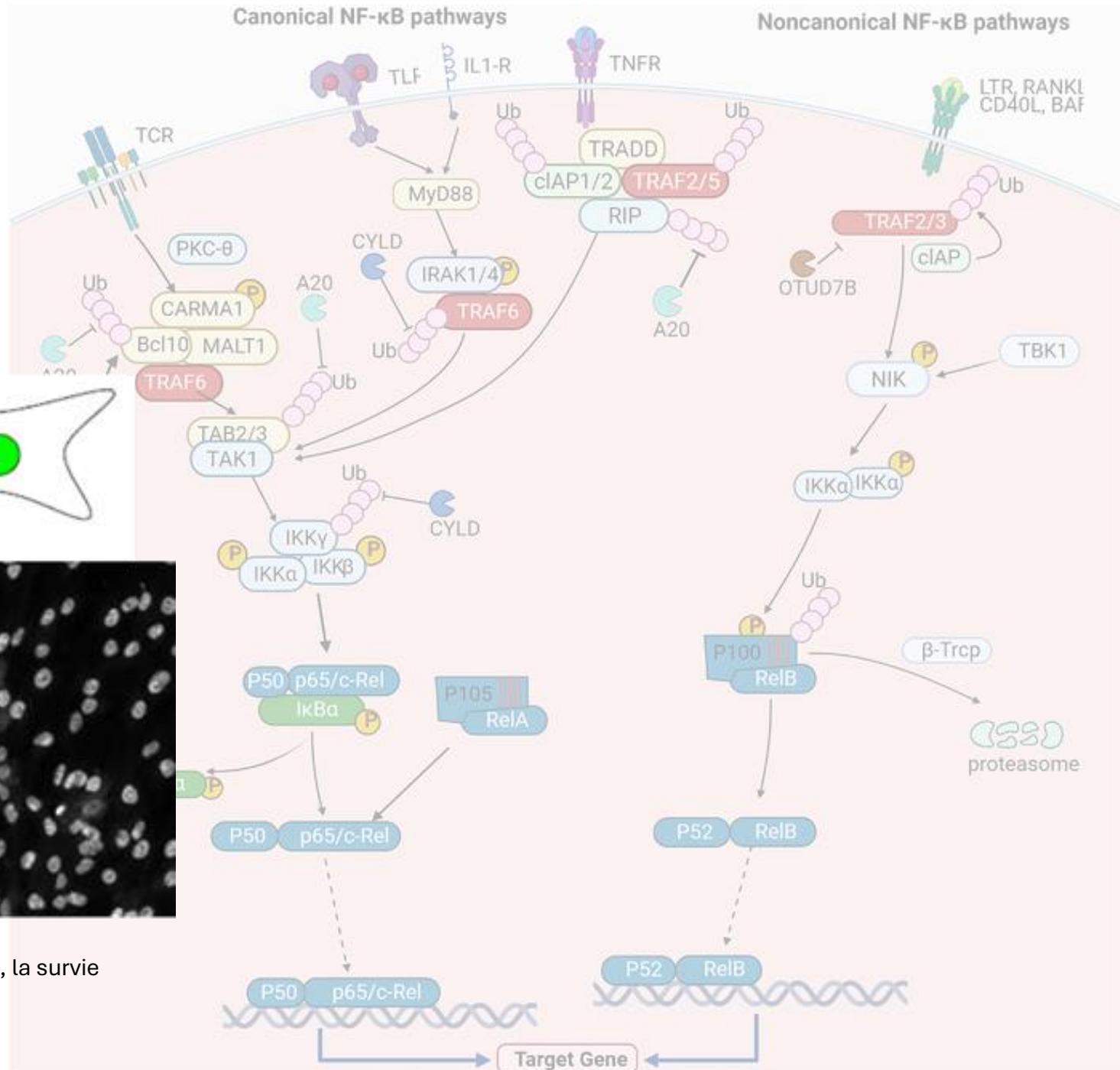
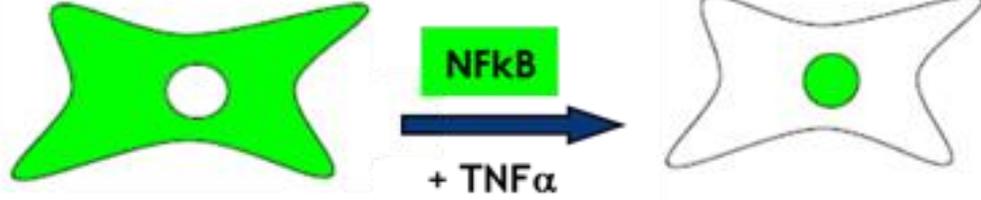
Qu'entend-on par "phénotype complexe" ?

- Parfois difficiles à voir directement à l'œil nu, mais des outils automatisés permettent de détecter ces "patterns" subtils dans les cellules, tout comme des motifs cachés dans des images plus familières.



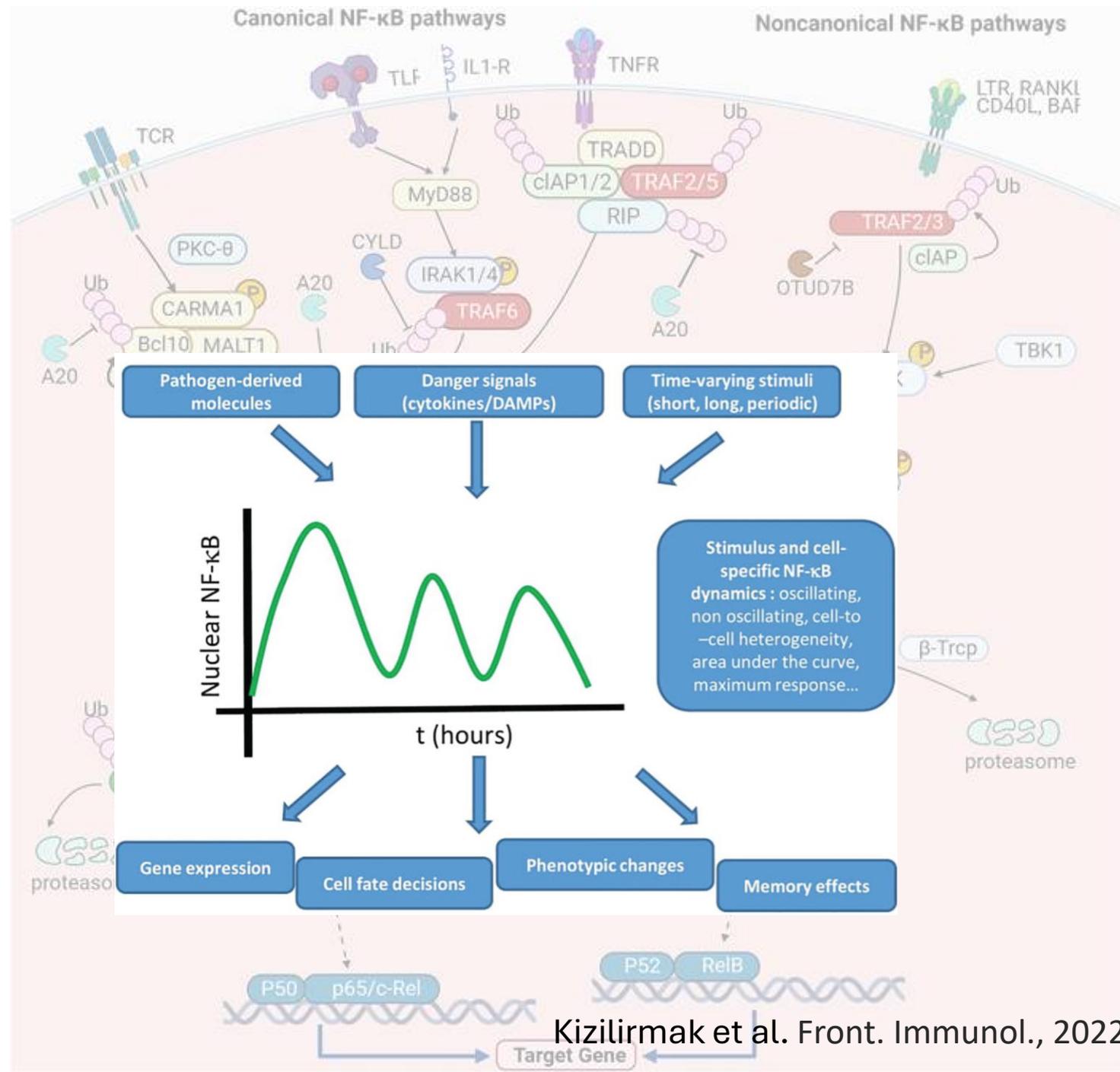
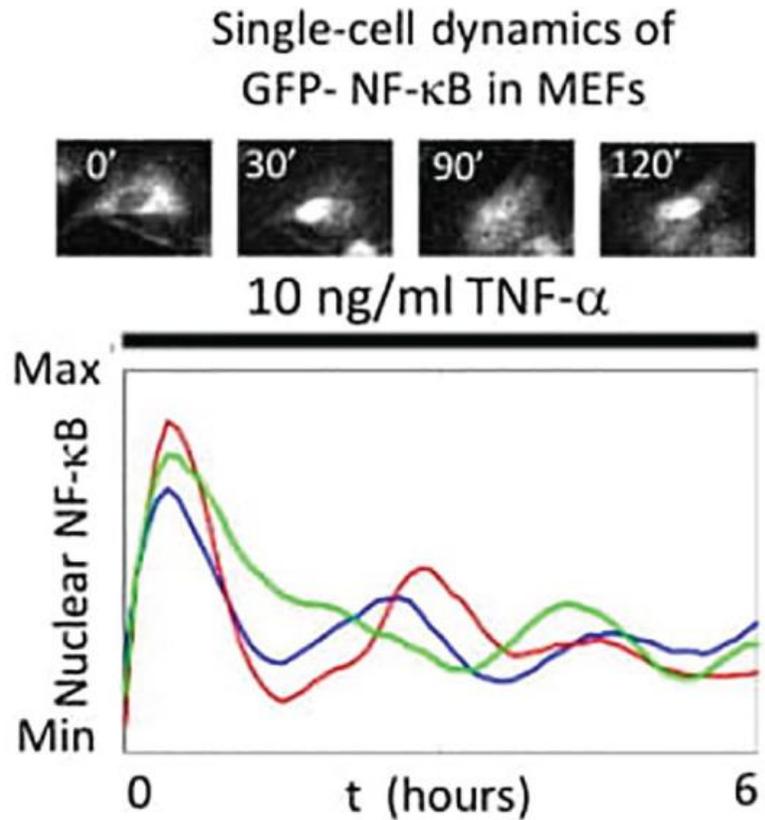
Automated Promyelocytic leukaemia
nuclear body quantification

Voie de signalisation de NF- κ B



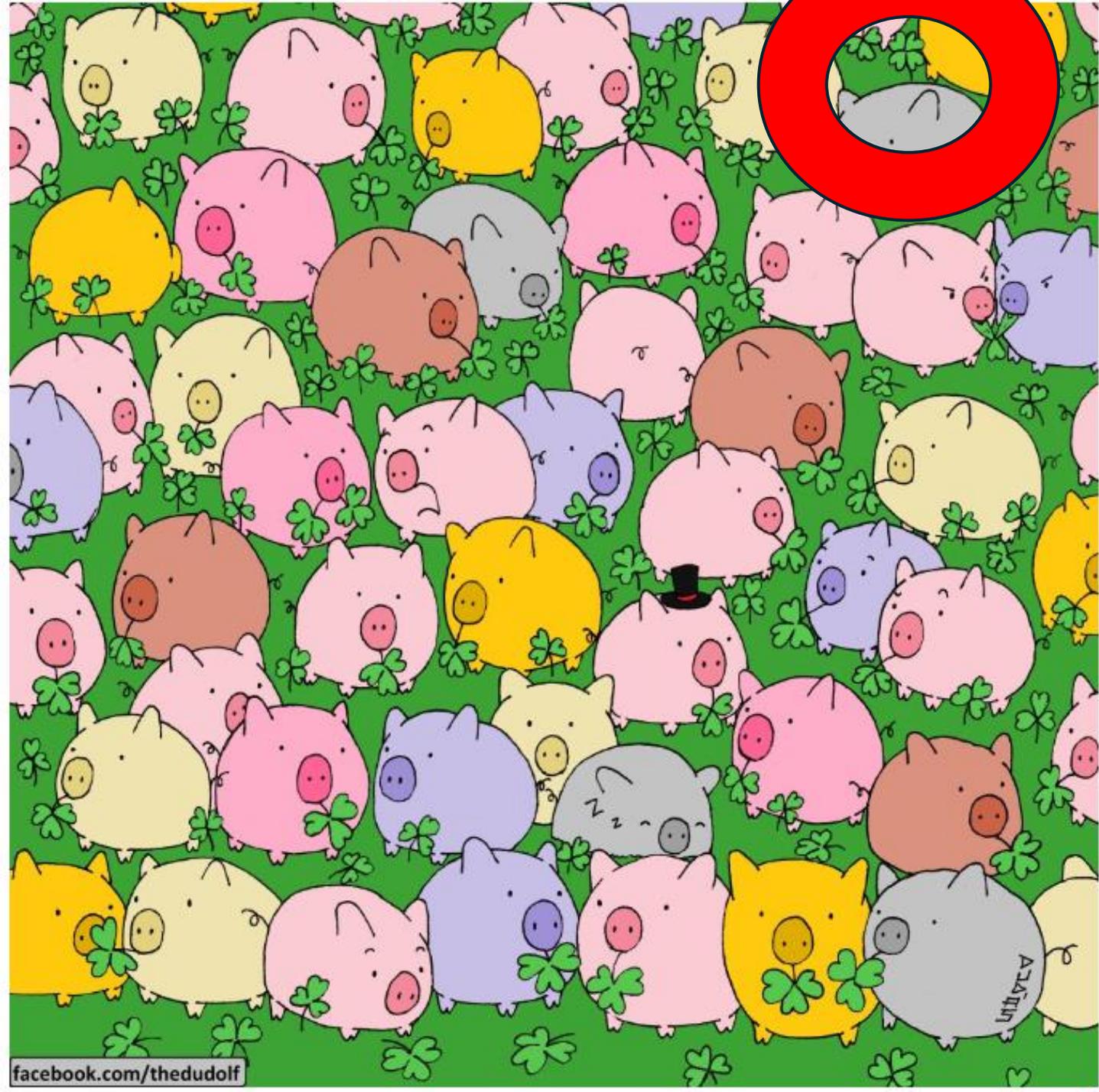
Rôle clé dans l'inflammation, l'immunité, la survie et la prolifération cellulaire

Voie de signalisation de NF- κ B



Quel phénotype ?

Trouvez le trèfle à 4 feuilles parmi les cochons

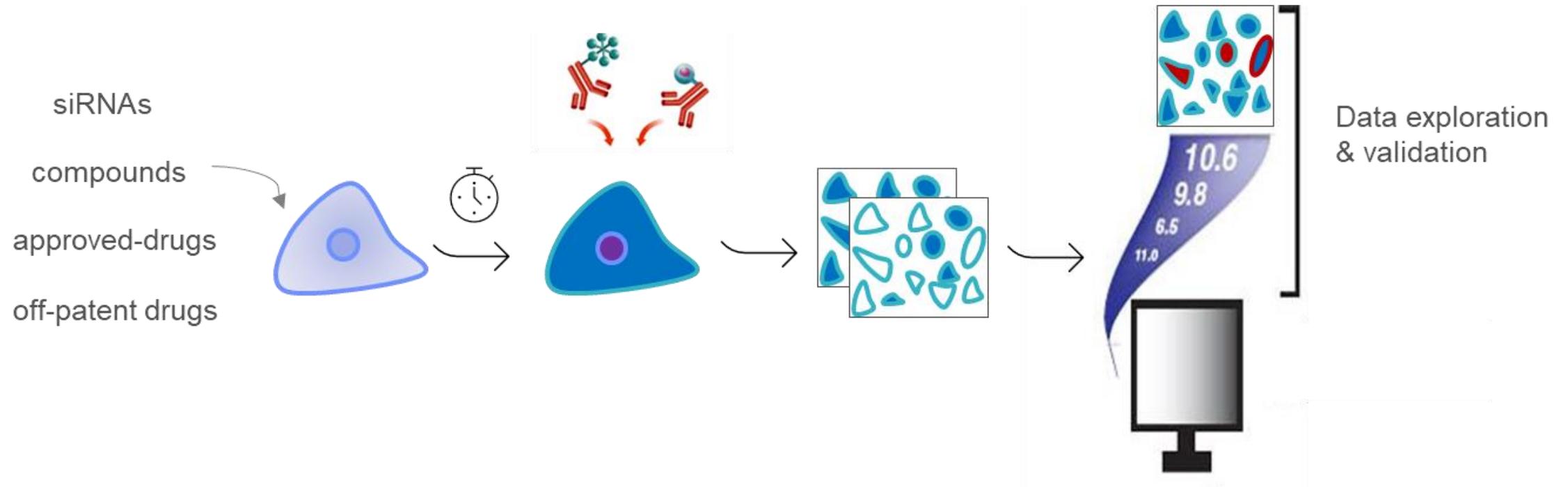


Les phénotypes sont complexes

- **Résumé des idées clés :**

- Que ce soit dans les galaxies, dans les logos, ou dans les visages, des motifs cachés existent partout autour de nous.
- En biologie cellulaire, les phénotypes complexes sont comme ces motifs cachés : il faut des outils spécialisés pour les révéler.
- Le criblage, l'imagerie automatisée et les algorithmes d'analyse jouent un rôle essentiel pour dévoiler ces phénotypes cellulaires complexes, tout comme dans d'autres domaines scientifiques.

Criblage phénotypique



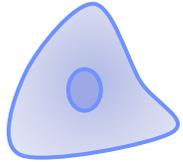
Applications

- Identifier des « perturbateurs » ayant un effet sur des phénotypes cellulaires (visée thérapeutique, cosmétique, recherche ...)
- Compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents (ex. cancer, maladies inflammatoires, neurodégénératives).

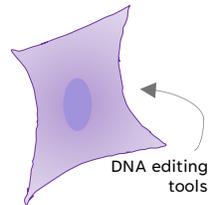
Le criblage cellulaire

- **Choix du modèle cellulaire (primaires, iPSCs etc.)**

« Normal » Cells



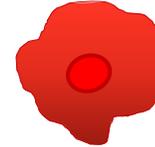
Engineered Cells



Cancer cells

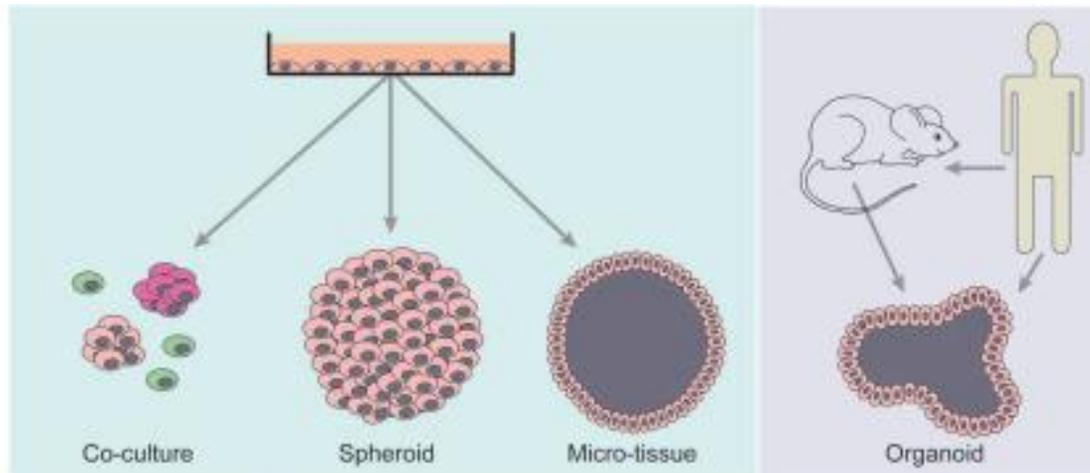


Resistant cells



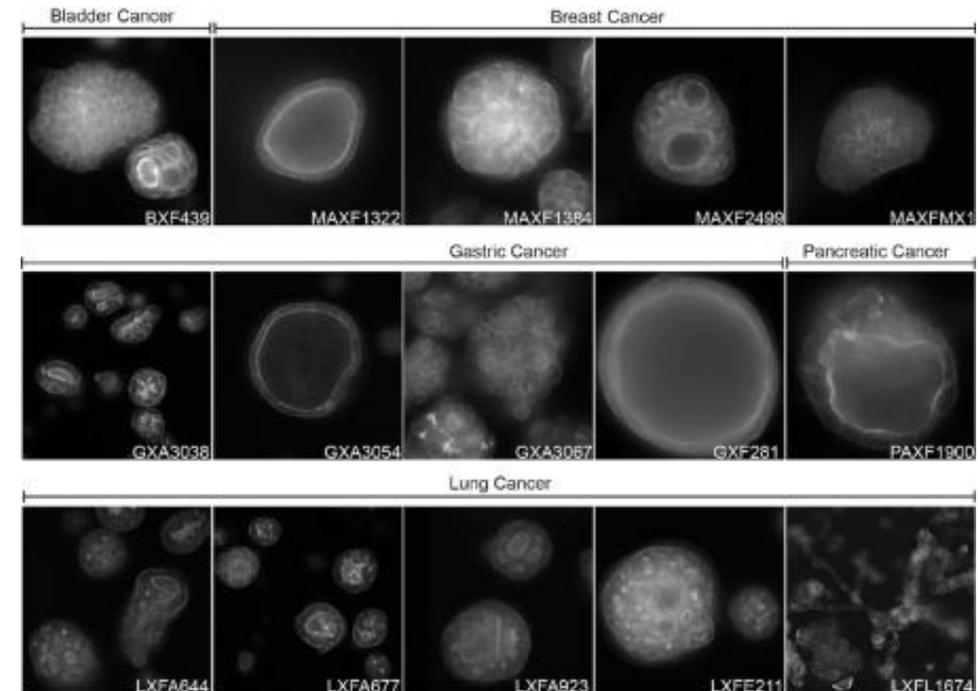
Le criblage cellulaire

- **Méthodes de culture (2D, 3D)**



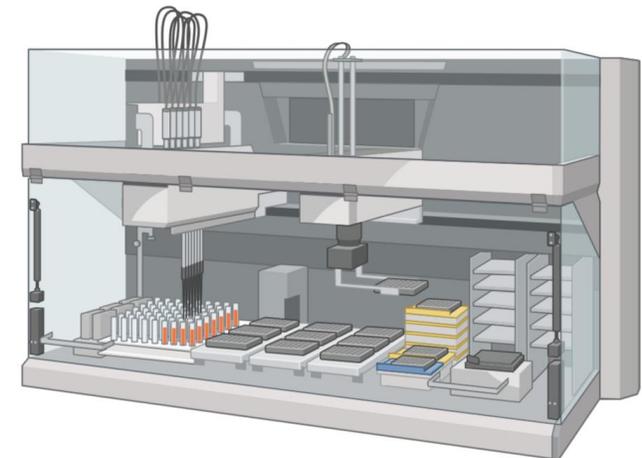
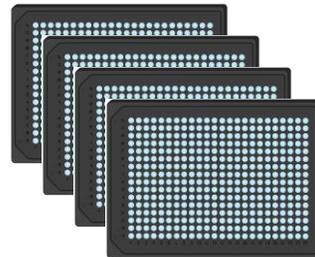
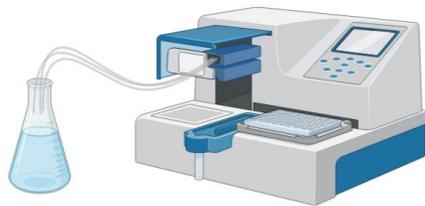
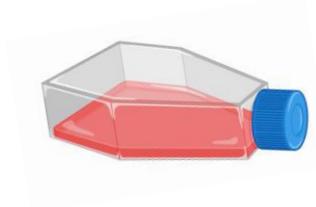
- **Choix du support, protocoles de culture**
- **Automatisation des manipulations complexes**
Marqueurs, robotique, acquisition d'images

Cultures 3D de matériel PDX
(xénogreffes dérivées de patients)



Le processus De la paillasse à la robotique

- Les étapes du processus d'analyse phénotypique, en allant des expérimentations manuelles à l'automatisation et la robotique.



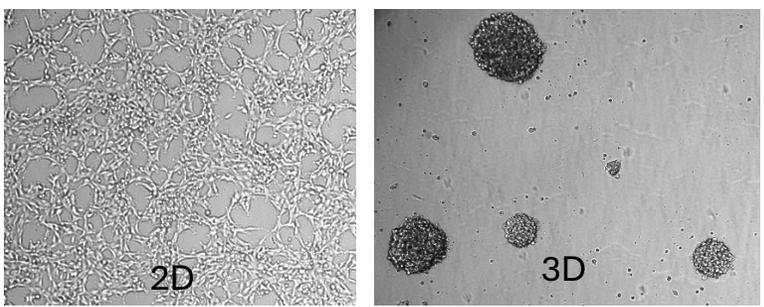
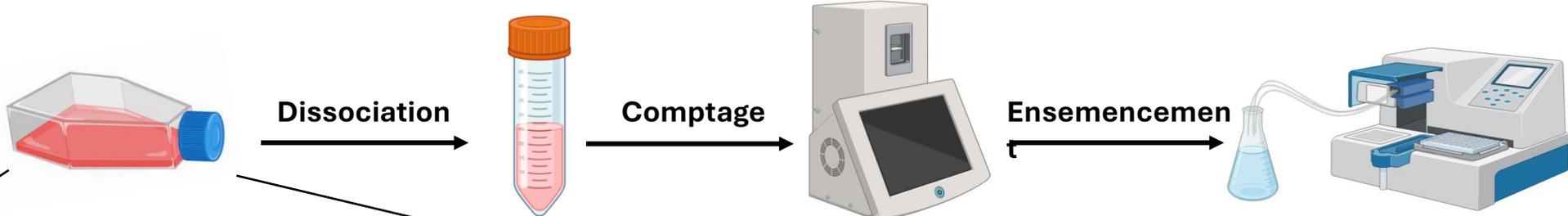
Le processus de criblage phénotypique

De la paillasse à la robotique

- Voici quelques points importants à contrôler :

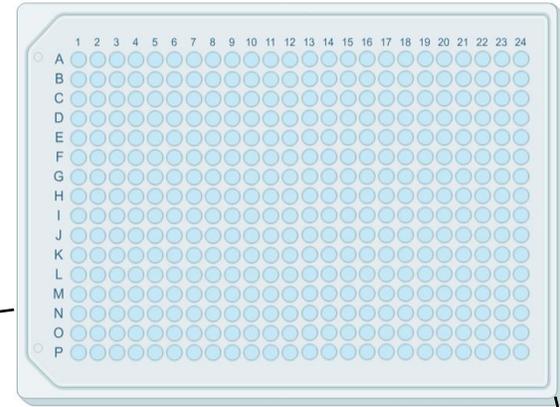
1. Contrôle de l'ensemencement : Assurer une répartition homogène des cellules dans chaque puits pour éviter des variations entre les réplicats.

Contrôle de l'ensemencement

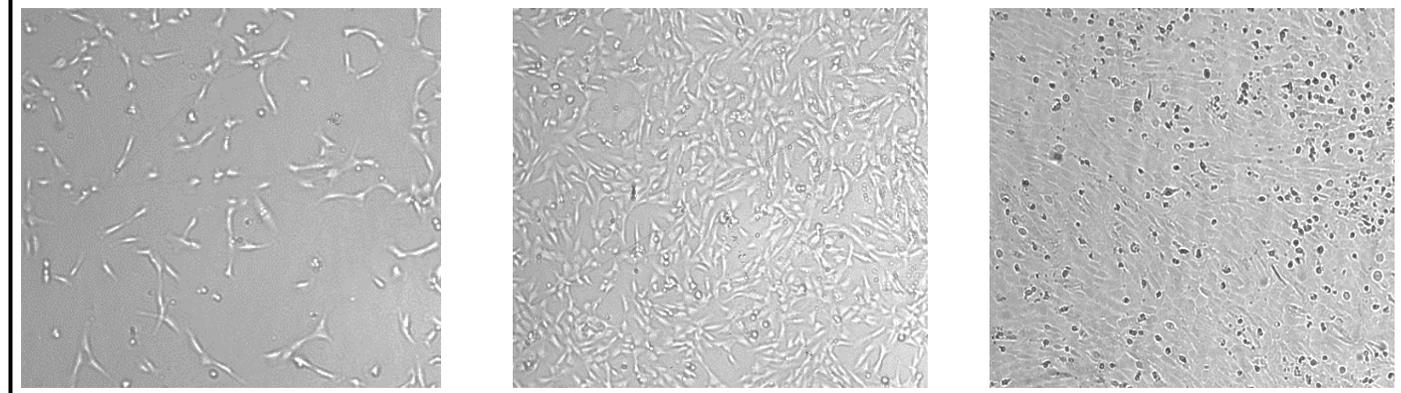


Valider la morphologie

Contrôle de la densité cellulaire dans une plaque 384-puits



J6
Post-ensemencement



Le processus de criblage phénotypique

De la paillasse à la robotique

- Voici d'autres points importants :

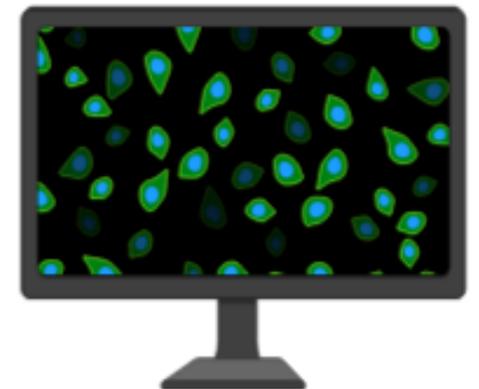
1. Contrôle de l'ensemencement : Assurer une répartition homogène des cellules dans chaque puits pour éviter des variations entre les réplicats.

- **Gestion de l'évaporation**
- **Homogénéité du milieu**
- **Protocoles de culture et de criblage**

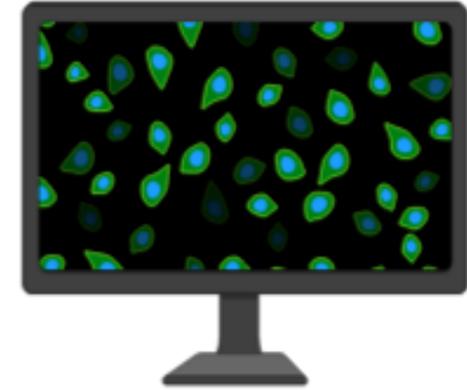
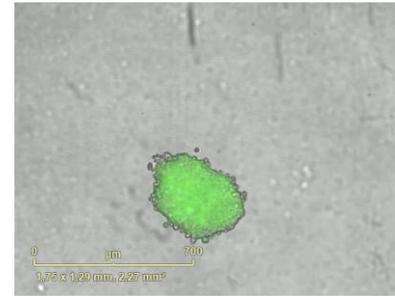
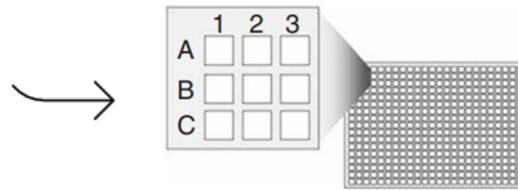
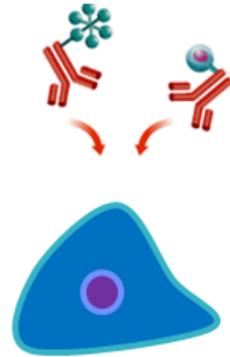
Le processus de criblage phénotypique

De la paillasse à la robotique

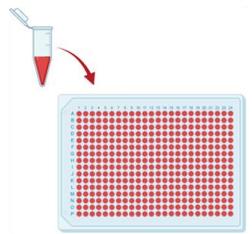
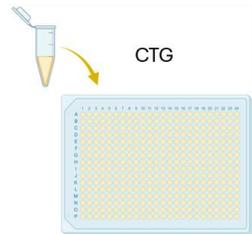
2. Choix du test cellulaire : Sélectionner un test adapté au type de cellules et aux objectifs expérimentaux (viabilité, prolifération, toxicité), en tenant compte des spécificités des modèles 2/3D.



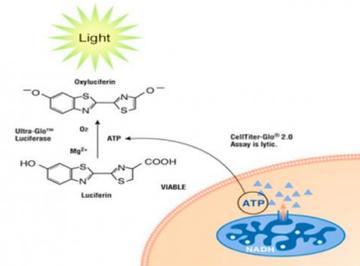
Anticorps/marqueurs, contrôles, fixation etc



Phases d'optimisation et faisabilité

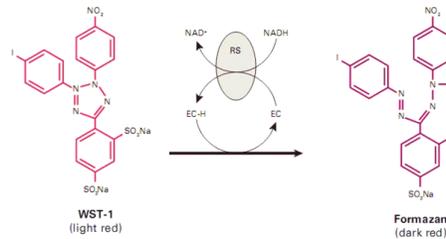


MTT/WST-1



Luminescence
Champ de lecture plus grand ☺

≠ ne regarde pas la même chose



Absorbance
Arrive vite à saturation ☹



3. Le processus de criblage phénotypique

De la paillasse à la robotique

- Voici quelques points importants à contrôler :

1. Contrôle de l'ensemencement : Assurer une répartition homogène des cellules dans chaque puits pour éviter des variations entre les réplicats.

2. Choix du test cellulaire : Sélectionner un test adapté au type de cellules et aux objectifs expérimentaux (viabilité, prolifération, toxicité), en tenant compte des spécificités des modèles 2/3D.

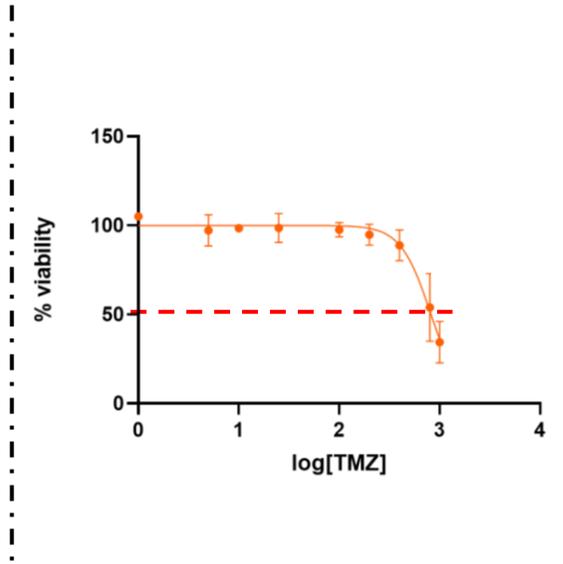
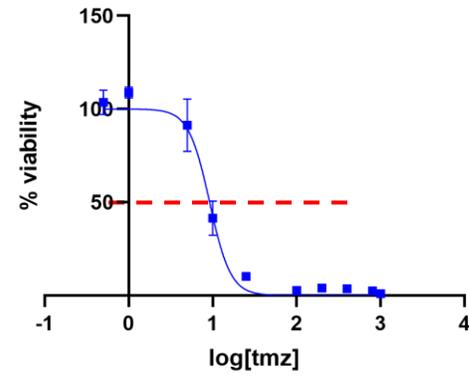
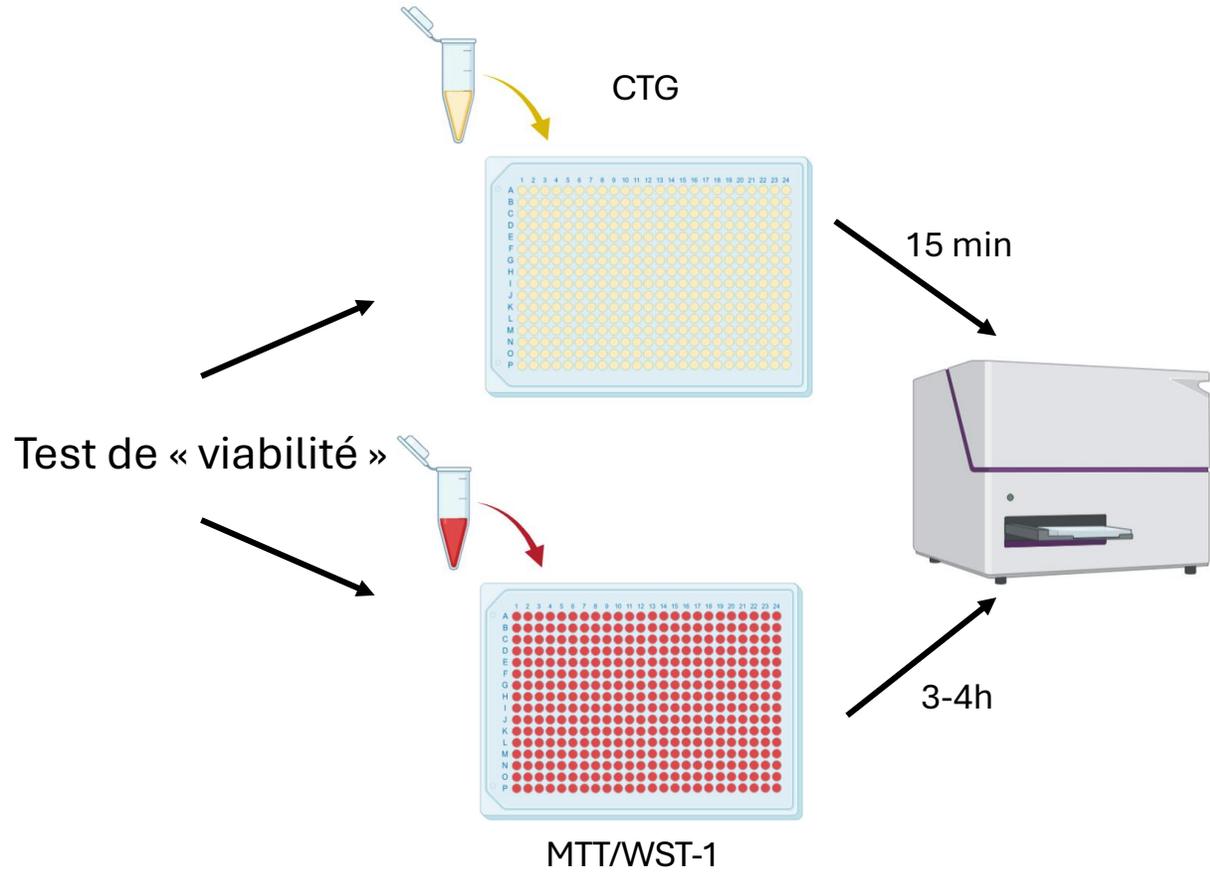
3. Réactifs biochimiques adaptés : Choisir des réactifs et des méthodes biochimiques compatibles avec la matrice utilisée (hydrogels, ECM) pour éviter les interférences avec les résultats d'analyse.

Ensemencement

Traitement

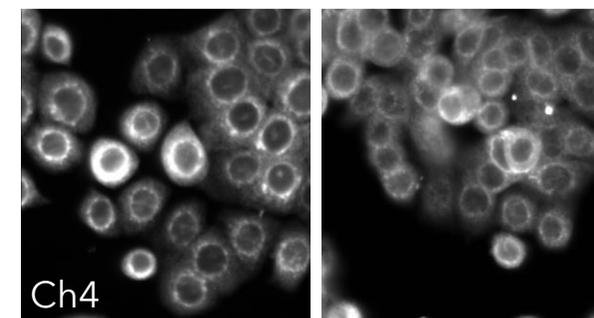
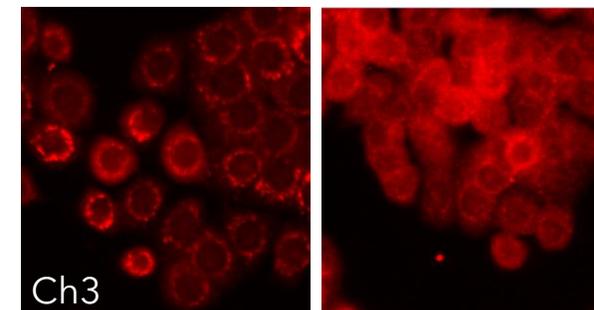
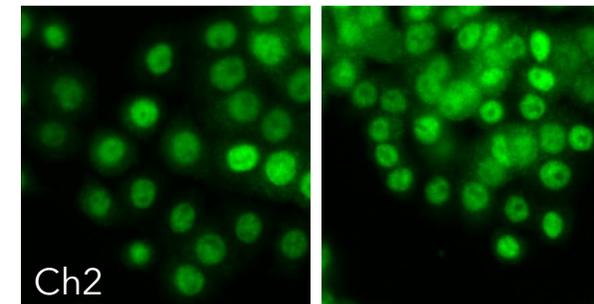
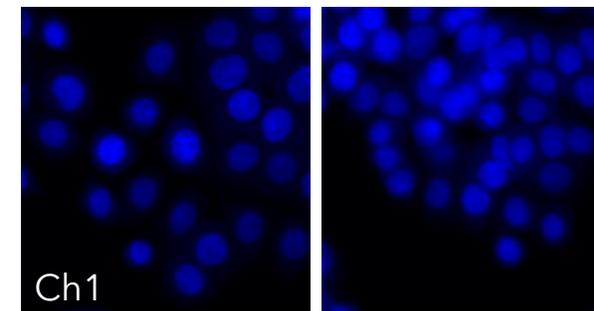
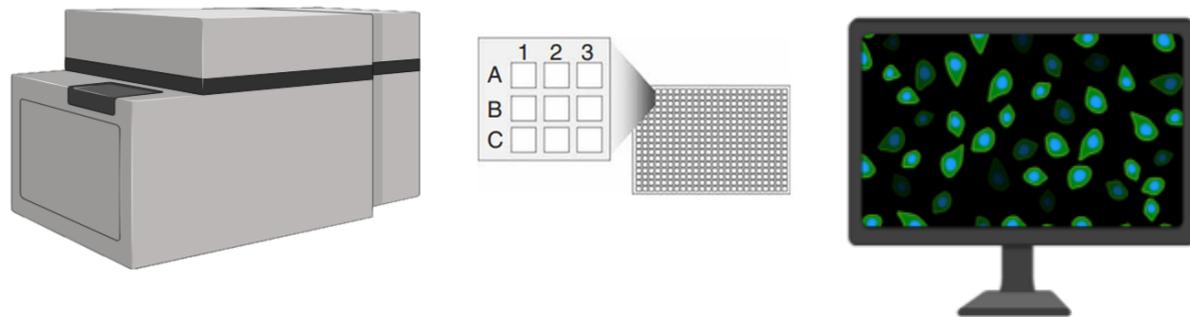
Révélation

Analyse



Méthode d'évaluation du potentiel antioxydant de molécules

Plusieurs anticorps et méthodes testées

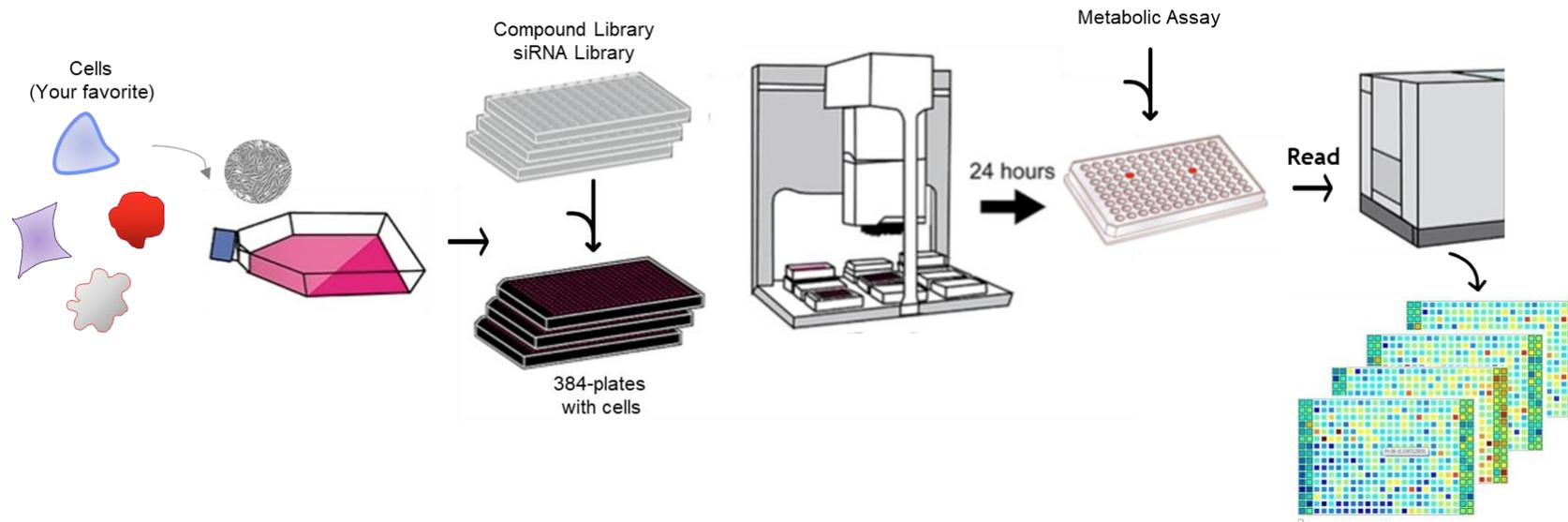


PROJECT CATMAN: Catalytic Manganese-based anti-oxidants: an integrated approach from chemical design to bio-activity in cells.

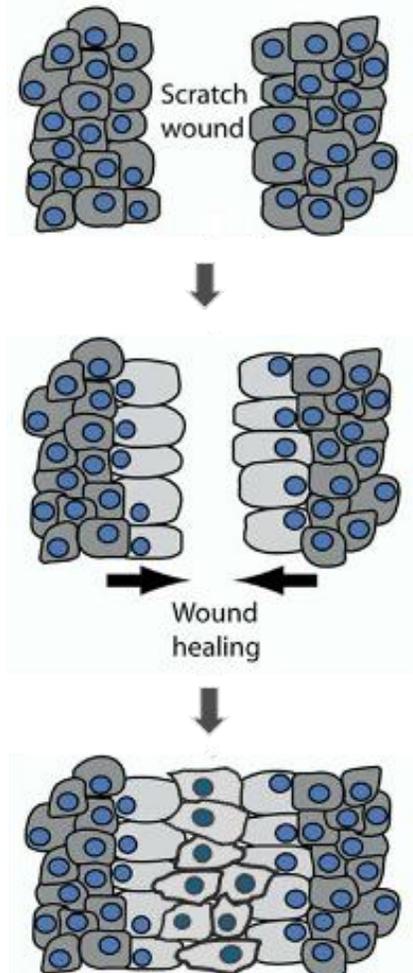
Clotilde Policar (Laboratoire des biomolécules ENS)

Passage à l'automatisation et à la robotique

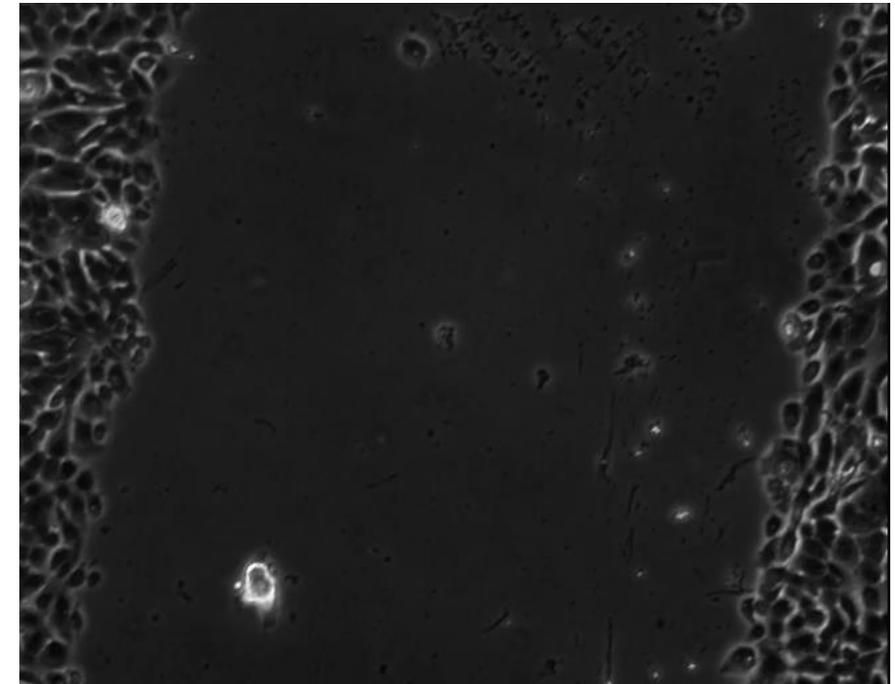
Pourquoi l'automatisation ? Accélérer les expériences, réduire les biais humains, traiter de grandes quantités de données simultanément.



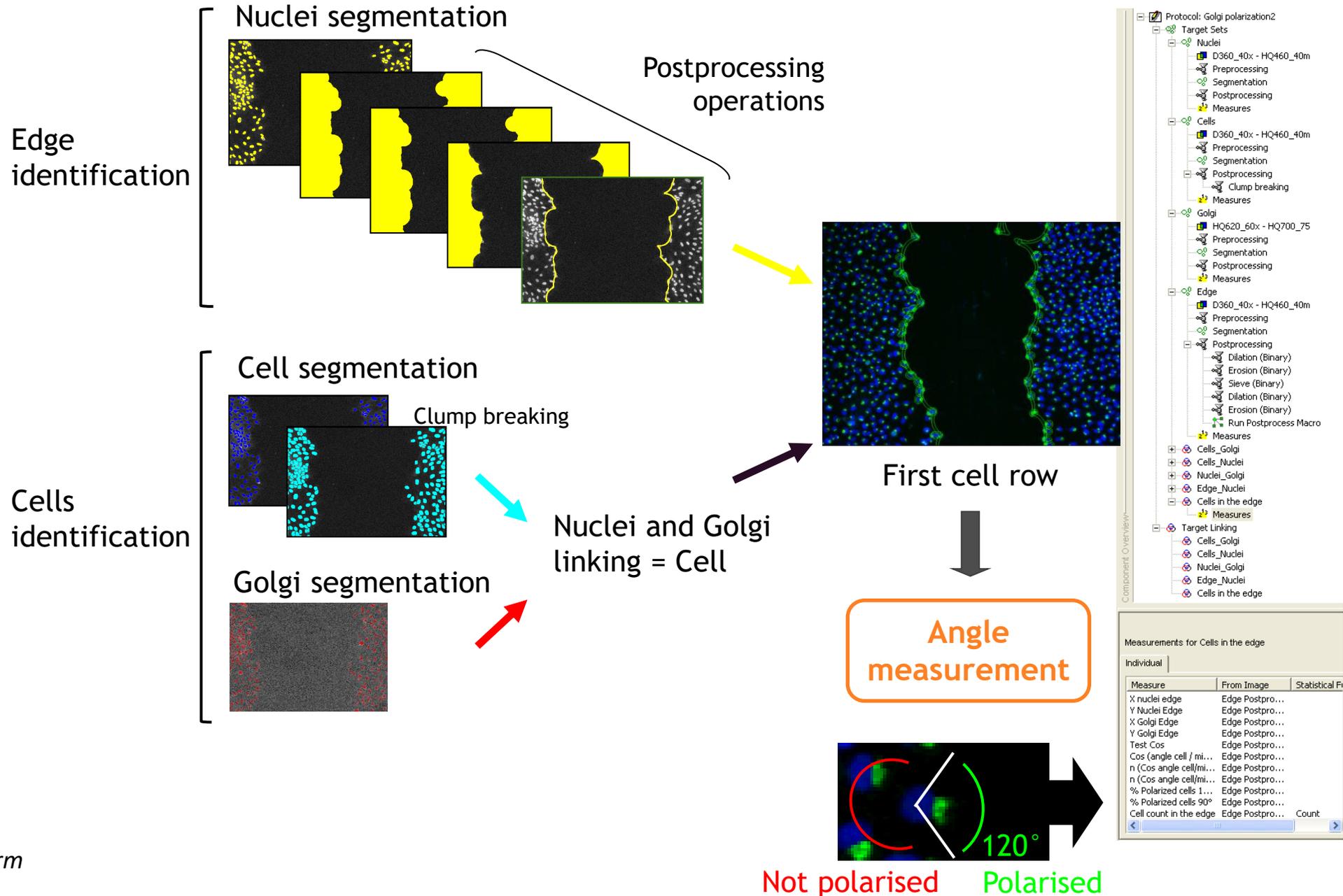
Passage à l'automatisation et à la robotique



Test de cicatrisation (scratch wound-healing assay)

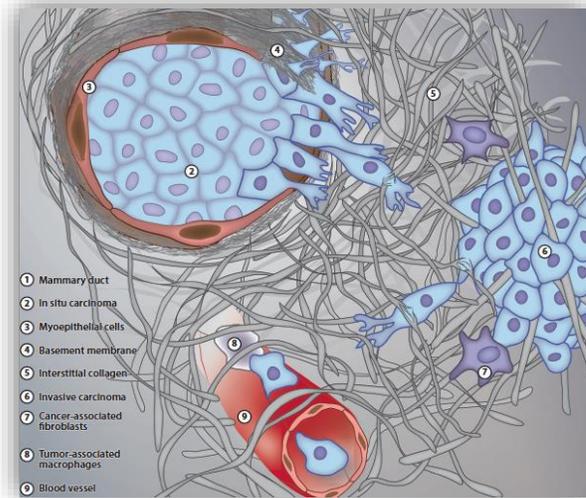


Test de cicatrissage (fermeture de la cicatrice et polarisation)



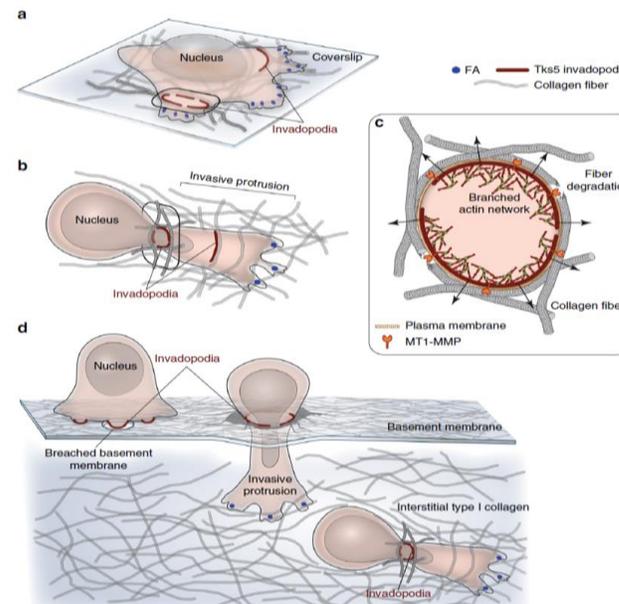
Passage à l'automatisation et à la robotique

Stratégies thérapeutiques contre l'invasion tumorale et la métastase



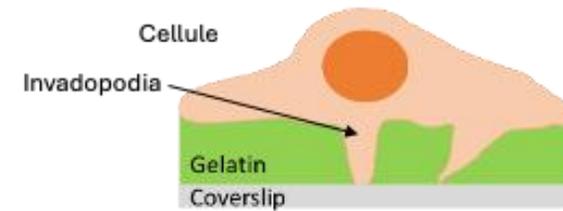
Castro et al., *Ann Review Cell. Dev. Biol.* (2016)

Test d'invasion et dégradation enzymatique

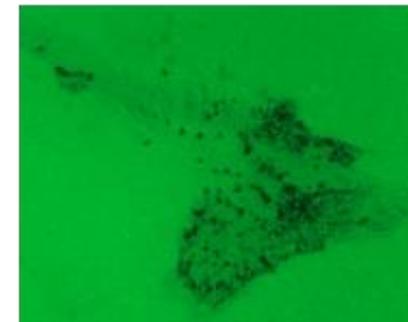


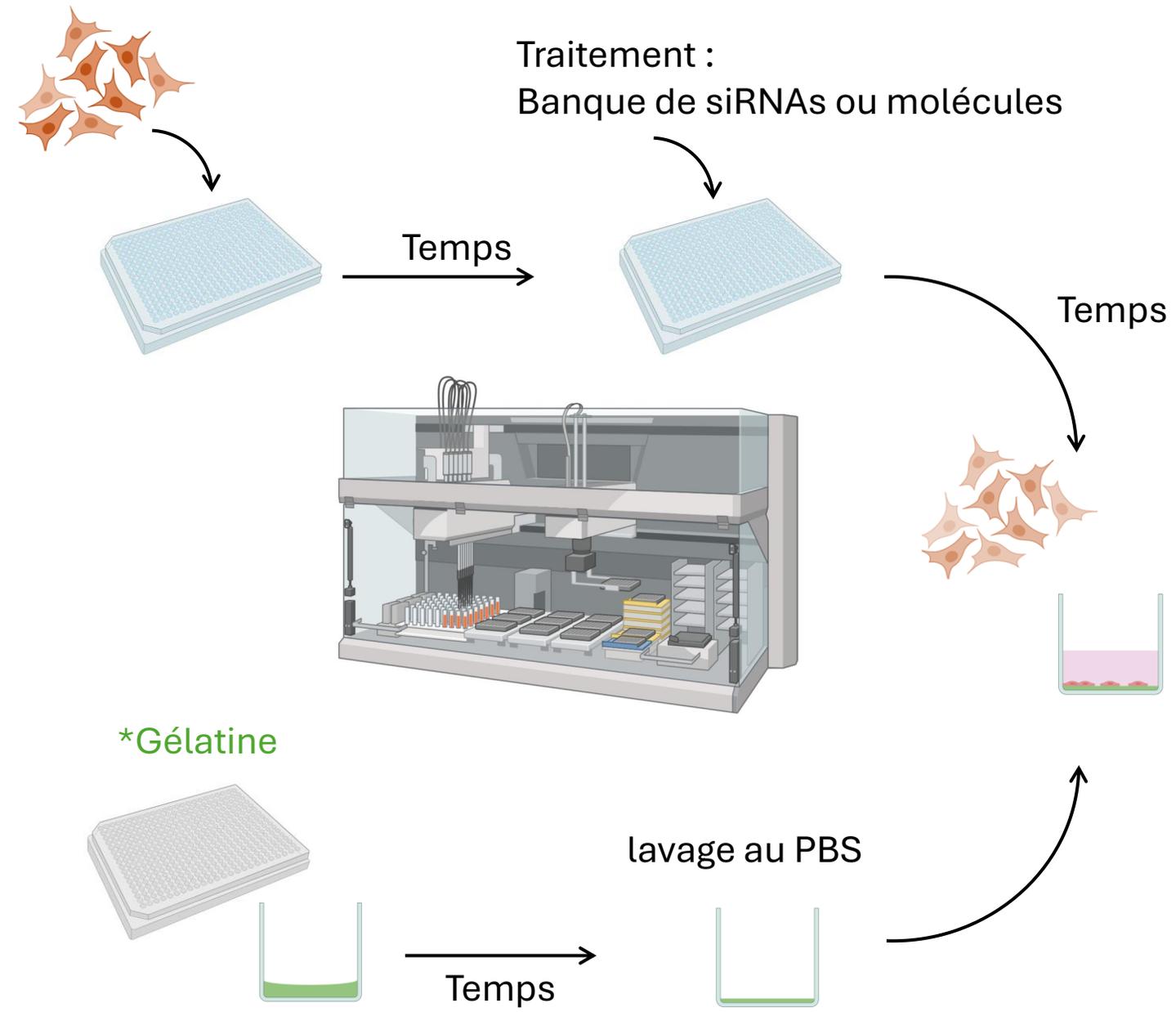
Ferrari & al, *Nat. Comm*, (2019)

Matrix degradation assay to measure invadopodia activity

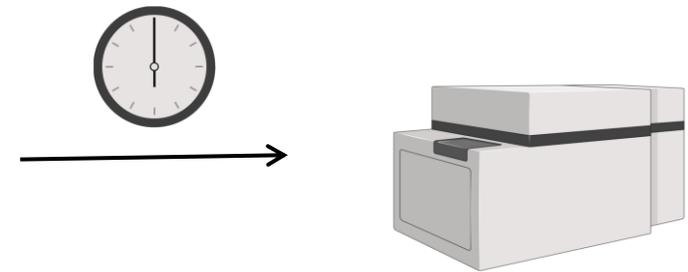
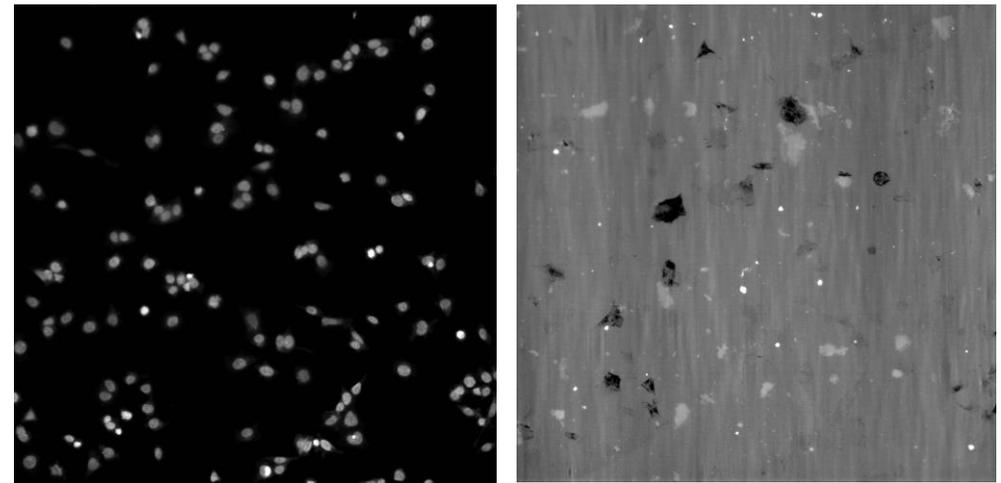


Visualization of matrix degradation through the loss of gelatin fluorescence





Test de dégradation



Les plateformes robotiques pour l'analyse phénotypique

- **Technologies utilisées :**
 - **Systèmes robotiques :** Culture, mise en contact molécules, tests
 - **Imagerie automatisée :** Observer des centaines de cellules dans différents puits.
 - **Traitement automatisé des données :** Afin d'identifier les phénotypes spécifiques.

Méthodes pour analyser les phénotypes complexes

- **Multicanaux de détection** : Utilisation de plusieurs marqueurs (immunofluorescence) pour observer des paramètres multiples en parallèle.
- **Algorithmes de traitement d'images** : Logiciels capables de détecter les changements morphologiques, d'analyser la dynamique cellulaire, etc.
- **Utilisation de méthodes IA** pour identifier des phénotypes complexes (ex. reconnaissance de motifs spécifiques dans des ensembles de données complexes).

Les principaux défis dans l'exploration des phénotypes complexes

- **Volume de données** : Gérer et traiter des milliers d'images en haute résolution.
- **Bruit et variabilité** : Distinguer les vrais signaux des artefacts expérimentaux.
- **Interprétation des résultats** : S'assurer que les phénotypes observés sont significatifs et reproductibles.
- **Intégration et analyse croisée** facilitant ainsi l'identification de relations entre gènes et phénotypes.

Conclusion

- **Étapes importantes:**



- Culture cellulaire
 - Manipulations expérimentales (traitement des cellules avec des composés ou des conditions spécifiques, contrôles).
 - Test phénotype (microscopie, coloration, etc.).
 - Mesures (ex. comptage de cellules, mesure de l'apoptose etc).
-
- **Limites** : Protocoles parfois laborieux, mise en place longue

Remerciements



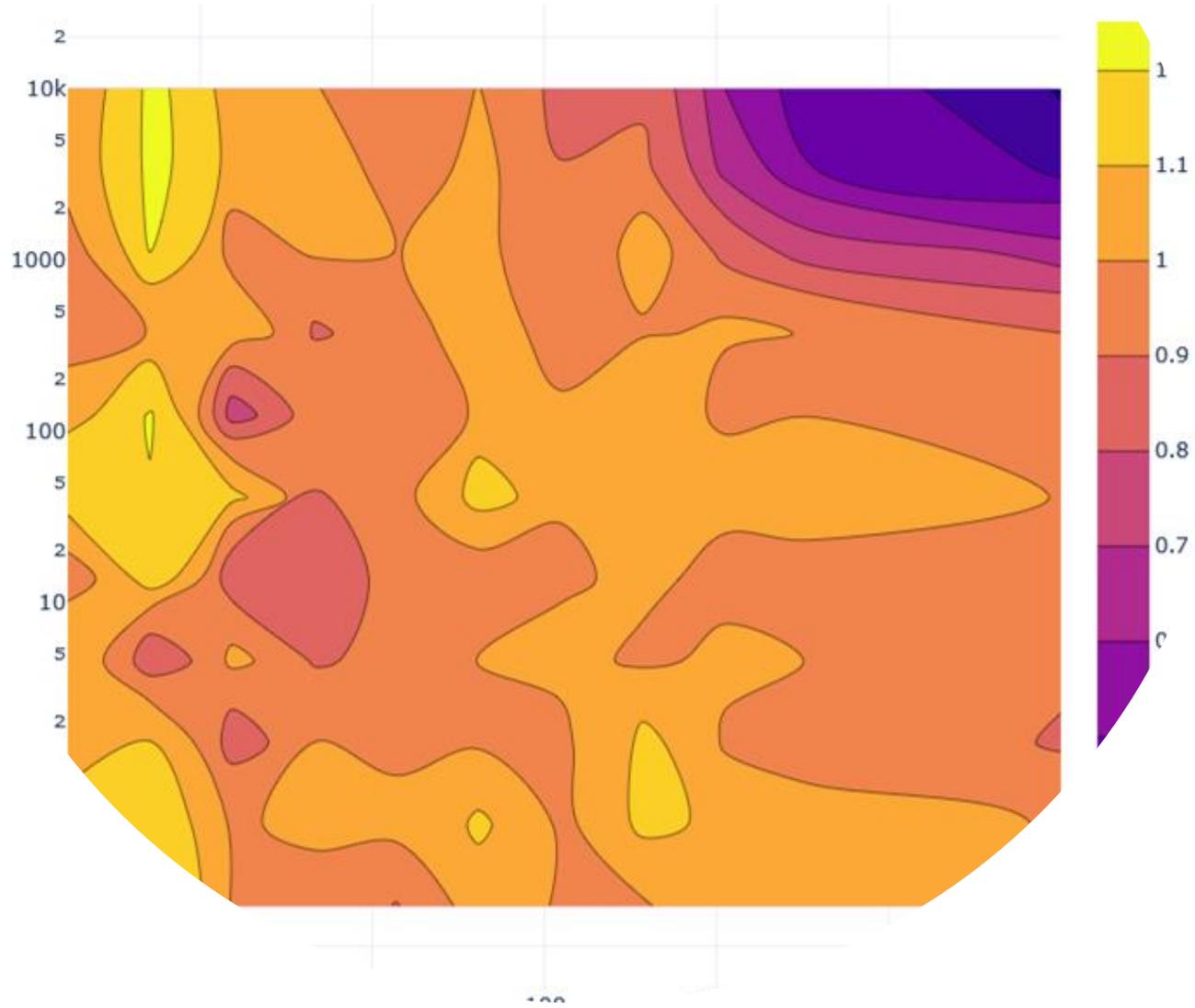
École thématique CNRS 2024 : RoscoScreen
Station Biologique de Roscoff – 24 au 27 Septembre 2024



Equipe de la plateforme BioPhenics



Un grand merci aux collaborateurs et partenaires
scientifiques de notre équipe



Elaine Del Nery
elaine.del.nery@curie.fr