



**HAL**  
open science

# Développement d'une plateforme pour le phénotypage à haut-débit des cellules souches cancéreuses par intelligence artificielle

Alexis Chambost

► **To cite this version:**

Alexis Chambost. Développement d'une plateforme pour le phénotypage à haut-débit des cellules souches cancéreuses par intelligence artificielle. Intelligence artificielle [cs.AI]. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1115 . tel-04649058

**HAL Id: tel-04649058**

**<https://theses.hal.science/tel-04649058>**

Submitted on 16 Jul 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT :

2022LYSE1115

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**Biologie moléculaire et intégrative de la cellule**

**Spécialité de doctorat** : Biologie des systèmes  
**Discipline** : Intelligence artificielle

Soutenue publiquement le 29/06/2022, par :  
**Alexis CHAMBOST**

---

# **Développement d'une plateforme pour le phénotypage à haut-débit des cellules souches cancéreuses par intelligence artificielle**

---

Devant le jury composé de :

Laurent SCHAEFFER	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université Lyon 1	Président
Dominique BAGNARD	Maître de Conférences - HDR, Université de Strasbourg	Rapporteur
Stéphanie DESCROIX Annabelle BALLESTA	Directrice de Recherche, CNRS Paris Chercheure, Inserm Paris	Rapporteuse Examinatrice
David MEYRONET	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université Lyon 1	Directeur de thèse
Sylvain MONNIER	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Co-Directeur de thèse



# Remerciements

Les relations interpersonnelles permettent aux *Homo sapiens* de maintenir la cohésion au sein des groupes sociaux. Elles permettent aux individus appartenant à ces groupes de se souder les uns aux autres, de se lier d'amitié, de se soutenir, se réconforter, d'aller à la chasse ou bien de se reproduire. Cette thèse, comme toute autre activité humaine, est contingente à une série de rencontres, de collaborations et de transmissions de savoirs. Aussi, la liste de personnes à remercier serait bien trop longue pour le présent paragraphe et je m'excuse sincèrement auprès des personnes que j'offenserais en oubliant de les citer.

Je remercie tout d'abord Sylvain et David pour m'avoir encadré au cours de ces 3 — presque 4 — années. Merci Sylvain pour m'avoir fait confiance 5 ans après notre première rencontre à l'Institut Curie. Et merci David pour m'avoir parlé de ce projet pour la première fois autour d'un plateau repas de la cantine de l'hôpital. Merci pour votre temps, votre énergie, votre intelligence et votre gentillesse !

Ensuite, viennent les nombreuses personnes rencontrées dans les deux équipes de recherche et qui ont contribué de près ou de loin à ce projet de recherche. Merci Jean-Paul et merci Mathieu pour m'avoir intégré respectivement à l'équipe Biophysique et à l'équipe Diversité du transcriptome des cellules souches. Merci à tou.te.s les membres des deux équipes (+ l'équipe Liquides et Interfaces) pour ces discussions, ces group meetings, le soutien au cours de ces 3 années de labos.

Je tiens également à remercier les chercheur.euse.s qui ont évalué ce travail. Merci à Corinne LORENZO et Olivier GANDRILLON pour avoir suivi l'évolution du projet. Et merci aux membres du jury pour avoir relu, corrigé, discuté et challengé mes résultats.

Comme je parlais plus haut de contingence, c'est important pour moi de remercier succinctement et chronologiquement les personnes qui ont participé directement ou indirectement à ma formation scientifique. Donc je remercie : les équipes de Il était une fois la vie, les équipes de C'est pas sorcier, les équipes de Sciences et vie junior, le Docteur Raoul PERROT pour son accueil dans son laboratoire d'anthropologie en 3<sup>ème</sup>, Mme Sandrine LAURENT pour l'apprentissage de la rigueur méthodologique, au Docteur Pierre-Paul BRINGUIER pour la découverte de l'anatomie pathologique, le Professeur Jean-Jacques MADJAR pour l'enseignement du raisonnement scientifique, l'équipe de l'École de l'INSERM Liliane Bettencourt pour avoir créé ce merveilleux parcours, le Professeur François AMBLARD pour la découverte de l'interface physique-biologie, le Docteur Morgan DELARUE et la Docteure Hélène AYARI-DELANOË pour m'avoir encadré en master 2.

Enfin, je remercie ma famille, mes parents Marc et Evelyne, mon frère Étienne et ma soeur Solène, pour leur soutien et leur amour pendant toutes ces longues mais formidables années d'études (gardez-en car il m'en reste encore un certain nombre). Une pensée également chargée d'émotion pour mes grands-parents qui n'auront pas eu la chance de voir la fin de mes études. Et bien sûr je remercie Marie, que j'aime et dont je partage la vie depuis maintenant 5 ans. Merci pour ton amour, pour ta passion, pour ta joie, pour ta tendresse. Merci de m'avoir soutenu, de nous avoir soutenu.e.s, dans les moments de tension. Il est clair que cette thèse n'aurait pas été la même sans toi !



# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>ix</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Les cellules couches cancéreuses . . . . .	3
1.2 Le glioblastome . . . . .	5
1.3 Les cellules souches de glioblastome . . . . .	8
1.4 Microfluidique . . . . .	16
1.5 Analyse d'images par intelligence artificielle . . . . .	19
1.6 Problématique . . . . .	28
1.7 Références . . . . .	29
<b>2 Matériel et méthodes</b>	<b>47</b>
2.1 Fabrication du microsystème . . . . .	48
2.2 Microscope . . . . .	52
2.3 Matériel informatique et logiciels . . . . .	55
2.4 Lignées cellulaires . . . . .	55
2.5 Le micropipetteur cellulaire . . . . .	57
2.6 Références . . . . .	59
<b>3 Résultats</b>	<b>63</b>
3.1 Déterminer le destin cellulaire avec l'intelligence artificielle . . . . .	65
3.2 Optimisation de l'utilisation du système microfabriqué . . . . .	91
3.3 Détection des cellules souches cancéreuses avec notre plateforme et évaluation quantitative de leur devenir . . . . .	92
3.4 Sélection spécifique des cellules selon leur phénotype . . . . .	125
3.5 Application de notre plateforme dans le contexte du cancer colo-rectal . . . . .	128
3.6 Références . . . . .	130
<b>4 Discussion</b>	<b>135</b>
4.1 Une plateforme fiable pour l'étude des cellules souches cancéreuses . . . . .	136
4.2 Perspectives et améliorations possibles de la plateforme . . . . .	138
4.3 Références . . . . .	142
<b>5 Conclusion</b>	<b>145</b>



# Liste des figures

1.1	Modèle des cellules souches cancéreuses . . . . .	4
1.2	Caractéristiques des cellules souches de glioblastome . . . . .	11
1.3	Hétérogénéité et plasticité des cellules souches de glioblastome . . . . .	12
1.4	Photolithographie . . . . .	17
1.5	Représentation schématique de l'intelligence artificielle . . . . .	20
1.6	Analogie entre le neurone biologique et le neurone artificiel . . . . .	21
1.7	Réseau de neurones et rétropropagation . . . . .	22
1.8	Problèmes linéaires et non linéaires . . . . .	22
1.9	Fonctions sigmoïde et ReLU . . . . .	23
1.10	Fonction de perte et descente de gradient . . . . .	24
1.11	Convolution . . . . .	25
1.12	Noyau de convolution . . . . .	26
1.13	Maxpooling . . . . .	26
1.14	Un réseau de neurones convolutifs que nous avons développé . . . . .	27
2.1	Modèles de puces . . . . .	48
2.2	Représentation schématique des étapes de fabrication de la puce . . . . .	50
2.3	Représentation schématique de l'ensemencement de la puce . . . . .	51
2.4	Correction de l'inclinaison du gel . . . . .	52
2.5	Imagerie des micro-puits . . . . .	54
2.6	Molécules pharmacologiques . . . . .	57
2.7	Représentation tridimensionnelle du micropipetteur . . . . .	58
2.8	Représentation schématique du micro-système de prélèvement . . . . .	59
3.1	Représentation schématique de notre problème d'analyse d'images . . . . .	65
3.2	Effet de l'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH sur le phénotype des CSG . . . . .	120
3.3	Principe de la détection des cellules quiescentes . . . . .	123
3.4	Cellules quiescentes au sein des cellules de glioblastome . . . . .	123
3.5	Schéma expérimental du micropipettage dans la puce . . . . .	126
3.6	Variations du débit et de la pression au cours de la phase d'aspiration et de restitution des cellules . . . . .	127
3.7	Radio-sensibilisation induite par AGuIX® . . . . .	129



# Liste des tableaux

1.1	Table résumée des méthodes d'identification des GSC . . . . .	14
3.1	Tableau récapitulatif des modèles de puces développées au cours de notre travail . .	91
3.2	Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i> . . . . .	93
3.3	Effet de l'inhibition de la voie NOTCH sur le phénotype des CSG . . . . .	121
3.4	Corrélation entre division pendant la vidéo-microscopie et la formation de NS . . .	121
3.5	Cellules quiescentes au sein des cellules de glioblastome . . . . .	124
3.6	Détection par notre algorithme des cellules uniques de la lignée HTC166 . . . . .	129
3.7	Radio-sensibilisation induite par AGuIX® . . . . .	130



# Chapitre 1

## Introduction

*« Puisqu'on ne peut être universel et savoir tout ce qui se peut savoir sur tout, il faut savoir peu de tout. Car il est bien plus beau de savoir quelque chose de tout que de savoir tout d'une chose; cette universalité est la plus belle. Si on pouvait avoir les deux, encore mieux, mais s'il faut choisir, il faut choisir celle-là, et le monde le sent et le fait, car le monde est un bon juge souvent. »*

Blaise PASCAL, **Pensées**

### Sommaire

<b>1.1 Les cellules souches cancéreuses</b> . . . . .	<b>3</b>
1.1.1 Origine du concept . . . . .	3
1.1.2 Un concept controversé . . . . .	4
<b>1.2 Le glioblastome</b> . . . . .	<b>5</b>
1.2.1 Épidémiologie et définition . . . . .	5
1.2.2 Facteurs de risque . . . . .	6
1.2.3 Clinique . . . . .	7
1.2.4 Paraclinique . . . . .	7
1.2.5 Traitement . . . . .	8
<b>1.3 Les cellules souches de glioblastome</b> . . . . .	<b>8</b>
1.3.1 Découverte et propriétés des cellules souches de glioblastome . . . . .	8
1.3.2 Pertinence biologique, clinique et thérapeutique des cellules souches de glioblastome . . . . .	10
1.3.3 Méthodes d'identification des cellules souches de glioblastome . . . . .	13
1.3.4 Le test de formation de neurosphères . . . . .	15
<b>1.4 Microfluidique</b> . . . . .	<b>16</b>
1.4.1 Bref historique de la microfluidique . . . . .	16
1.4.2 De la recherche fondamentale... . . . . .	16
1.4.3 ...aux applications cliniques . . . . .	17
1.4.4 Systèmes micro-fabriqués pour l'identification et l'analyse des cellules souches de glioblastome . . . . .	18
<b>1.5 Analyse d'images par intelligence artificielle</b> . . . . .	<b>19</b>
1.5.1 Historique et définitions . . . . .	19
1.5.2 Le deep learning expliqué au profane . . . . .	19
1.5.3 Les réseaux de neurones convolutifs . . . . .	24

1.5.4 Exemples d'applications de l'intelligence artificielle aux problématiques bio-  
logiques . . . . . 27

**1.6 Problématique** . . . . . **28**

**1.7 Références** . . . . . **29**

---

À l'image de la citation de Blaise PASCAL qui ouvre ce premier chapitre, nous avons voulu aborder les concepts clefs pour pouvoir appréhender notre travail. La revue de la littérature se veut ici moins exhaustive qu'explicative. Notre but est d'apporter des définitions et des explications claires aux lecteurs profanes afin que ceux-ci puissent suivre notre exposé sans difficulté.

## 1.1 Les cellules couches cancéreuses

### 1.1.1 Origine du concept

En s'inspirant de l'évolution naturelle développée par Charles Darwin au XIX<sup>e</sup> siècle DARWIN [1859], Peter Nowell proposa en 1976 le modèle de l'évolution clonale des cellules cancéreuses, qui explique de façon linéaire et hiérarchique l'initiation et la progression tumorale NOWELL [1976] (Figure 1.1a). Découverte dans les années 70, la survenue des mutations pilotes – l'activation d'oncogènes et la perte de gènes suppresseurs de tumeurs – dans une cellule entraîne l'initiation tumorale CLEVERS [2011]. Des mutations vont ensuite s'accumuler dans les cellules filles. Parallèlement à la déstabilisation du génome, le grade pathologique des lésions va augmenter. Autrement dit, la lésion initialement pré-cancéreuse devient petit à petit cancéreuse, jusqu'à potentiellement métastaser. Cependant, au cours des divisions cellulaires, les mutations apparaissent de façon stochastique. Cet aléa est à l'origine d'une hétérogénéité intra-tumorale. Ainsi, soumis à différentes pressions de sélection (notamment thérapeutiques), certains clones cancéreux sont plus adaptés que d'autres et vont pouvoir survivre, proliférer et être responsables de rechutes GREAVES et MALEY [2012]. Cependant, cette organisation hiérarchique entre les clones n'est pas retrouvée dans tous les types de tumeurs. Ainsi, il a été montré que certaines sous-populations de cellules cancéreuses sont d'une part retrouvées tout au long de la croissance tumorale, d'autre part leur présence permet de maintenir l'hétérogénéité tumorale. En d'autres termes, ces cellules cancéreuses possèdent les capacités de multipotence et d'auto-renouvellement NASSAR et BLANPAIN [2016].

L'association entre cancer et embryon n'est pas neuve. Dès la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, les pionniers de l'anatomie pathologique avaient constaté des similitudes morphologiques entre les tissus embryonnaires et les tumeurs CAPP [2019]. Ce n'est qu'environ un siècle plus tard que les cellules souches embryonnaires (CSE) sont pour la première fois identifiées. Cette identification est en fait plutôt une caractérisation fonctionnelle. En effet, les CSE ont été montrées comme capables de prolifération et de différenciation, tout en maintenant un pool de cellules indifférenciées AFIFY et SENO [2019]. Il est intéressant de noter que les CSE ne constituent pas le premier type cellulaire à avoir été qualifié de "souche". Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) avaient été identifiées dès les années 1960, là encore grâce à leurs propriétés fonctionnelles d'auto-renouvellement et de multi-potence BATLLE et CLEVERS [2017]. Les cellules souches adultes (CSA), elles aussi définies selon l'acquisition des mêmes propriétés fonctionnelles d'auto-renouvellement et de multi-potence, ont été décrites dans de nombreux organes et systèmes adultes comme le tube digestif UMAR [2010], la peau BLANPAIN et FUCHS [2006] ou le système nerveux TAKAGI [2016]. C'est donc dans ce même esprit que, en 1994, l'équipe de John E. DICK rapporte que la transplantation de cellules humaines de leucémie aigüe myéloïde CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> est capable d'initier la même hémopathie chez la souris hôte porteuse d'un déficit combiné immun sévère LAPIDOT et collab. [1994]. Trois ans plus tard, la même équipe démontre que ces cellules CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> possèdent des propriétés d'auto-renouvellement (par greffes itératives dans des souris) et de multipotence (les aspects histologiques et moléculaires des greffons sont similaires à ceux de la leucémie initiale) BONNET et DICK [1997] (Figure 1.1b). Ces articles servent de pierre angulaire à la recherche sur les CSC. Au cours de la décennie suivante, les CSC sont retrouvées dans beaucoup d'autres cancers (liste non exhaustive) : carcinome mammaire AL-HAJJ et collab. [2003], glioblastome (les cellules souches de glioblastome seront décrites en détail dans le paragraphe 1.3) SINGH et collab. [2003], cancer de la prostate COLLINS et collab. [2005], mélanome FANG et collab. [2005], adénocarcinome pulmonaire KIM et collab. [2005], adénocarcinome pan-

créatique HERMANN et collab. [2007].

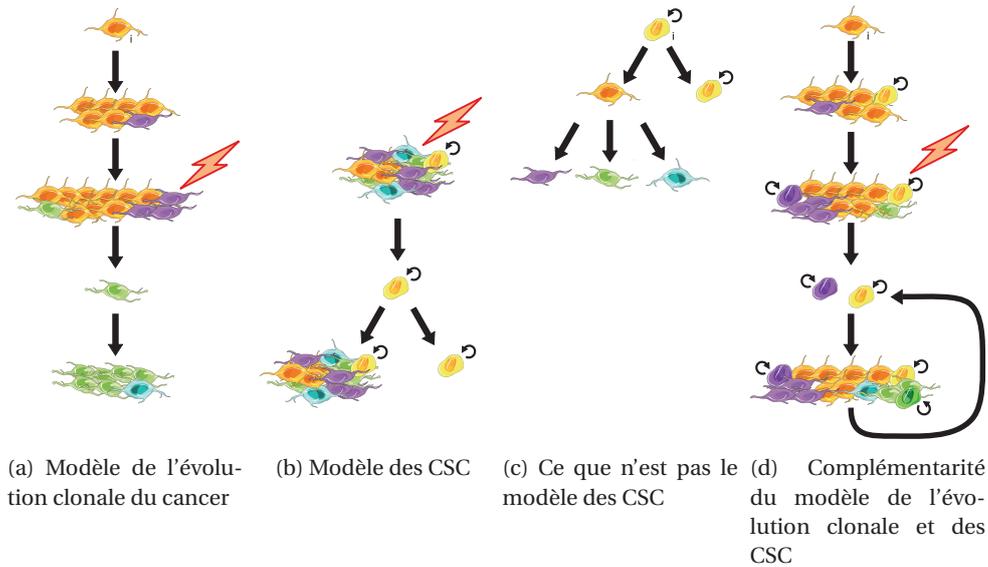


FIGURE 1.1 – **Modèles des cellules souches cancéreuses.** Schémas explicatifs du modèle de l'évolution clonale du cancer (a), du modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) (b), du modèle des CSC tel qu'il est régulièrement mal interprété (c) et complémentarité des modèles de l'évolution clonale et du modèle des CSC, notamment par l'acquisition du phénotype souche par des cellules différenciées (d). i : cellule initiale du cancer; éclair : pression de sélection.

### 1.1.2 Un concept controversé

Malgré l'accumulation des découvertes et l'engouement qu'elles suscitent (729 références sur pubmed.gov en 1994, contre 4031 en 2010 et 10557 en 2020), le concept de CSC s'est aussi attiré l'ire d'une partie de la communauté des chercheur.euse.s en cancérologie. Il est ainsi rapporté que de nombreuses cellules cancéreuses au sein de la même tumeur sont capables à elles seules d'initier la croissance tumorale chez un hôte transplanté [KELLY et collab. \[2007\]](#); [QUINTANA et collab. \[2008\]](#); [WILLIAMS et collab. \[2007\]](#). De plus, les marqueurs moléculaires présentés comme spécifiques des CSC sont régulièrement démontrés comme ni nécessaires ni suffisants pour identifier les cellules souches cancéreuses (on reviendra plus en détail sur ce point dans la partie dédiée aux cellules souches de glioblastome) [BEIER et collab. \[2007\]](#); [SINGH et collab. \[2004\]](#). Enfin, le modèle des CSC a bien souvent été – malheureusement – présenté comme concurrent du modèle d'évolution clonale du cancer. Il a trop facilement – et vraisemblablement pour raisons pédagogiques – été résumé que le modèle des CSC plaçait comme cellule initiatrice du cancer une cellule souche adulte devenue cancéreuse et qui transmettrait ses altérations génétiques à sa descendance [KARVELA; ROWAN \[2009\]](#) (Figure 1.1c). Il s'agit en vérité d'un malheureux imbroglio sur ce que propose le modèle des cellules souches cancéreuses (accentué par la profusion de termes désignant les CSC comme cellules initiatrices de tumeurs par exemple). En effet, le modèle des CSC n'a jamais considéré les cellules souches adultes comme les cellules d'origine des cancers. Il n'a fait qu'apporter les preuves que, au sein d'une population de cellules tumorales, il existe une sous-population de cellules capables d'auto-renouvellement et de multipotence. Or ce sont là les deux critères qui permettent de définir une cellule souche [WEINER \[2008\]](#). L'adjectif « souche » utilisé pour décrire ces cellules permet très justement de décrire ces propriétés fonctionnelles. Dans sa revue, le chercheur Craig T. Jordan est limpide sur ce point : « Toute cellule, cancéreuse ou non, possédant les propriétés fonctionnelles [d'auto-renouvellement et de multipotence], doit être considérée comme une vraie cellule souche. Dans le cas de la cancérologie, les conséquences de cette règle sont claires et sans équivoque : les [cellules souches cancéreuses] sont présentes

dans de nombreux cancers. » [JORDAN \[2009\]](#). Pour valider la pertinence du modèle des cellules souches cancéreuses et sa présentation contrapuntique au modèle d'évolution clonale, plusieurs études semblent indiquer que ces deux modèles se complètent plus qu'ils ne s'opposent. Des analyses transcriptomiques révèlent que des sous-populations de cellules tumorales transcrivent des gènes classiquement associés aux CSE [VAN NIEKERK et collab. \[2017\]](#). L'hypothèse de l'apparition de multiples cellules souches cancéreuses, partageant toutes le même ancêtre commun, au cours de l'évolution clonale d'un cancer permettrait de synthétiser ces deux modèles (Figure 1.1d).

Parmi les CSC identifiées, le cas des cellules souches de glioblastome symbolise justement cette tension qui existe entre, d'un côté ce nouveau modèle qui permet de mieux expliquer la biologie des cancers, et de l'autre, les lacunes de ce modèle qui remettent en cause sa pertinence. Avant de décrire plus en détail les cellules souches de glioblastome, nous devons aborder le glioblastome d'un point de vue clinique. Ce détour est essentiel pour comprendre pourquoi le modèle des cellules souches cancéreuses suscite beaucoup d'enthousiasme dans la physiopathologie de ce cancer. La prochaine partie 1.2 sera donc consacrée au glioblastome via les prismes de l'épidémiologie, la clinique et la thérapeutique. Puis dans la partie suivante 1.3, nous reviendrons sur les cellules souches de glioblastome. Nous verrons leurs caractéristiques et les méthodes mises au point pour les identifier.

## 1.2 Le glioblastome

### 1.2.1 Épidémiologie et définition

Selon la classification nosologique actuellement en vigueur, le glioblastome (GBM) est une tumeur astrocytaire diffuse qui a un ou plusieurs des critères morphologiques ou génétiques suivants : prolifération micro-vasculaire, nécrose, promoteur de *TERT* muté, amplification du gène de l'EGFR ou une variabilité du nombre de copies des chromosomes +7/-10 [WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL \[2021\]](#). A noter que l'absence de mutation des gènes de l'isocitrate deshydrogénase et de l'histone H3 est nécessaire pour rentrer dans cette nouvelle définition.

L'histoire de la caractérisation scientifiques et médicale du GBM est reprise dans la très intéressante revue publiée en 2018 par [STOYANOV et DZHENKOV \[2018\]](#). C'est le père fondateur de l'anatomie pathologique, Rudolf VIRCHOW, qui décrit pour la première fois les gliomes en 1865. L'homme raisonne juste et répartit en deux classes les tumeurs gliales selon la prolifération cellulaire : les tumeurs peu proliférantes constitueront les gliomes de bas grade, tandis que les tumeurs avec une prolifération cellulaire plus importante regroupent les gliomes de haut grade de nos classifications modernes.

Le GBM étant connu dès le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, les épidémiologistes, plus particulièrement ceux de l'époque moderne, ont pu s'intéresser à ce cancer depuis longtemps. Bien que le calcul de l'incidence du GBM varie quelque peu selon les études, un consensus se dégage pour estimer son taux d'incidence aux alentours de 3,69 pour 100000 personnes (dans les pays développés) [TAMIMI et JUWEID \[2017\]](#). En France plus particulièrement, le taux d'incidence est similaire, 3,337 pour 100000 personnes soit entre 2000 et 2500 cas par an [DARLIX et collab. \[2017\]](#). Dans sa synthèse quinquennale sur l'incidence et la mortalité des cancers en France, l'INCA rapporte l'évolution du taux d'incidence et la mortalité des tumeurs du système nerveux central (dont le GBM représente 33.1% des cas depuis 1990 en France [REGISTRE DES TUMEURS PRIMITIVES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DE LA GIRONDE \[2015\]](#)). Il est intéressant de constater que ni l'incidence des tumeurs du système nerveux central, ni leur mortalité, n'ont significativement évolué depuis 1990 [DEFOSSEZ et collab. \[2019\]](#) : respectivement 6,7 et 4,3 pour 100000 individus masculins et 4,5 et 2.7 pour 100000 individus de sexe féminin.

Ces constats épidémiologiques amènent donc deux interrogations essentielles :

- 1) Si l'incidence du GBM est similaire depuis 30 ans, existe-t-il des prédispositions génétiques ou environnementales à cette maladie?
- 2) Malgré les progrès thérapeutiques réalisés ces dernières décennies, pourquoi le pronostic du GBM reste-t-il si mauvais?

Quelques réponses à la première question seront avancées dans le prochain paragraphe, tandis que la deuxième question sera approfondie plus loin dans ce manuscrit.

### 1.2.2 Facteurs de risque

Avant tout chose, il convient de rappeler que le GBM reste une tumeur rare. La pertinence des résultats issus d'études observationnelles avec peu de patient.e.s est donc souvent remise en question. Ceci étant dit, plusieurs facteurs de risques du GBM semblent désormais bien établis. Le facteur de risque le plus évident est l'âge du patient.e [THAKKAR et collab. \[2014\]](#). L'âge médian au moment du diagnostic est de 64 ans et les courbes d'incidence augmentent largement à partir de 50 ans. Il est intéressant de noter qu'un maximum d'incidence est atteint pendant la tranche d'âge 70-80 ans (jusqu'à environ 20 cas pour 100000 individus masculins), puis les courbes d'incidence s'infléchissent. L'immunosuppression liée à l'âge et donc favorisant la prolifération néoplasique pourrait expliquer le lien entre vieillissement et GBM (et des cancers en général) [LADOMERSKY et collab. \[2019\]](#). Le deuxième facteur de risque bien identifié est le sexe. En effet, dès l'enfance, les individus de sexe masculin présentent un taux d'incidence plus important que les individus de sexe féminin (le ratio masculin-féminin s'établissant à 1 :0,33 pour les GBMs primitifs, contre 0.65 :1 pour les GBMs secondaires – cette notion sera abordée plus tard dans le manuscrit). Les pistes expliquant le lien entre sexe et GBM sont encore plus vagues que dans le cas du vieillissement, car ne reposant que sur des études in vitro ou in vivo chez l'animal [COSTA et collab. \[2020\]](#). Ces études suggèrent l'implication des récepteurs aux hormones sexuelles (et plus particulièrement la progestérone). Enfin, l'origine ethnique semble fortement corrélée à la survenue de la maladie, ainsi qu'à son pronostic [PATEL et collab. \[2019\]](#). Les populations d'origine caucasienne présentent ainsi une incidence du GBM plus importante que les populations d'Amérique latine, afro-américaines ou asiatiques [OSTROM et collab. \[2018\]](#). Là encore, les raisons biologiques et moléculaires restent peu nombreuses et sujettes à caution, les tumeurs des patient.e.s caucasien.ne.s présenteraient plus de mutations de p53 [CHEN et collab. \[2001\]](#), tandis que l'enrichissement de gènes impliqués dans le métabolisme de l'acide rétinolique diminuerait l'apparition de GBMs chez les populations afro-américaines [WU et collab. \[2019\]](#).

D'autres facteurs de risques intrinsèques ont également été décrits. Tout d'abord au niveau génétique, la survenue de GBMs dans le cadre d'entités syndromiques comme le syndrome de Lynch, le syndrome de Li-Fraumeni ou encore le syndrome de Turcot [OSTROM et collab. \[2019\]](#). De plus, les études d'association pangénomique permettent régulièrement de découvrir des nouveaux allèles de prédisposition au GBM [MELIN et collab. \[2017\]](#). Les facteurs anthropométriques (taille et indice de masse corporelle) ont également été décrits comme associés à la survenue de GBMs [SIMIŃSKA et collab. \[2021\]](#). Cependant, d'une part à cause du faible nombre de patients inclus dans les études portant sur cette question et d'autre part les résultats incohérents d'une publication à l'autre, l'association entre les facteurs anthropométriques et l'apparition d'un GBM doit être au mieux mise en doute, sinon abandonnée. Enfin, de façon surprenante, un terrain immunoallergique a été décrit comme facteur protecteur de la survenue du GBM [LINOS et collab. \[2007\]](#). Cependant là encore, ces observations sont contredites dans la littérature [DISNEY-HOGG et collab. \[2018\]](#) et pourraient refléter des biais non pris en compte dans les analyses statistiques [PORTER et collab. \[2015\]](#).

Les facteurs de risques extrinsèques ont aussi été étudiés. Il est à ce jour bien établi que l'exposition aux rayons ionisants (bombes nucléaires, essais atomiques ou radiothérapie) est un

facteur directement lié à la survenue de GBM [BONDY et collab. \[2008\]](#). Plus polémique, l'exposition aux ondes, notamment du téléphone portable, fait couler beaucoup d'encre, tant dans la presse spécialisée que grand public. Publiée en 2010, l'étude Interphone rapporte une augmentation de l'odds-ratio de la survenue de GBM chez les individus ayant passé plus de 1640 heures au téléphone portable [INTERPHONE STUDY GROUP \[2010\]](#). Cette étude a justifié l'inscription de l'exposition au téléphone portable par l'Agence internationale de recherche contre le cancer sur la monographie des agents carcinogéniques. Depuis, cette étude a d'une part été critiquée d'un point de vue méthodologique (il s'agit d'une revue de cas publiés dans littérature) et d'autre part des cohortes beaucoup plus larges ont été étudiées et n'ont pas démontré d'association entre exposition au téléphone portable et survenue de gliome [KARIPIDIS et collab. \[2018\]](#); [LITTLE et collab. \[2012\]](#). Enfin, l'association entre conditions de vie et survenue de GBMs a fait l'objet d'études dont le niveau de preuves reste relativement bas. Il est donc difficile d'interpréter leurs résultats.

### 1.2.3 Clinique

La présentation clinique des GBMs dépend largement de leur localisation cérébrale. L'HAS décrit les symptômes comme pouvant s'aggraver progressivement "en tâche d'huile" ou bien d'apparition brutale [HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ \[2010\]](#). Le Collège de neurologie dresse une liste non exhaustive de ces signes cliniques [COLLÈGE DE NEUROLOGIE 5ÈME ÉDITION \[2020\]](#) :

- Syndrome d'hypertension intra-crânienne : tétrade syndromique associant céphalées typiquement matinales (en lien avec le décubitus nocturne), vomissements, œdème papillaire au fond d'œil, diplopie par compression du nerf abducens (bien que la longueur de ce nerf prive ce symptôme d'une valeur localisatrice).
- Crise d'épilepsie, partielle ou généralisée.
- Déficit focaux, selon la localisation tumorale. Il est lié à la compression directe de la tumeur mais est aggravé par l'œdème vasogénique tumoral associé.
- Troubles cognitifs (il s'agit d'une des cause classique de démence curable).
- Ataxie cérébelleuse si le cervelet est atteint
- Atteinte multiple des paires crâniennes en cas de tumeur du tronc cérébral. L'interrogatoire devra préciser l'anamnèse, les antécédents personnels et familiaux, ainsi qu'une évaluation fonctionnelle du patient (indice de Kanorfsky et Performance Status).

### 1.2.4 Paraclinique

Toute suspicion d'une tumeur du système nerveux central soit faire réaliser une imagerie [HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ \[2010\]](#). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) sans et avec injection de produit de contraste est l'examen de référence dans la prise en charge du GBM. La tomodensitométrie (TDM) constitue l'alternative en cas de contre-indication à l'IRM. A l'imagerie, les GBMs se présentent fréquemment comme des lésions hétérogènes, parfois massivement invasives, avec un centre nécrotique et accompagnées d'œdème en périphérie. L'injection de produit de contraste entraîne classiquement un rehaussement en cocarde [WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL \[2021\]](#).

Les examens biologiques de 1<sup>re</sup> intention visent surtout à établir le bilan pré-opératoire : numération formule sanguine, ionogramme, hémostase, glycémie, bilan rénal et hépatique. L'HAS précise qu'il n'existe pas de marqueur tumoral plasmatique.

La prise en charge se poursuit dans le cadre de réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) au sein d'un service spécialisé. Le diagnostic positif est anatomo-pathologique. La RCP va ainsi statuer sur la meilleure façon d'obtenir du tissu tumoral : biopsie stéréotaxique ou résection partielle ou totale.

A l'examen microscopique, le GBM consiste en une prolifération très dense de cellules astrocytaires peu différenciées, pléomorphiques et atypiques. L'activité mitotique est souvent importante. Comme on l'a vu, la présence de nécrose et/ou de prolifération microvasculaire est un élément nécessaire au diagnostic du GBM. Sur le plan moléculaire les principales voies de signalisation altérées sont les voies RTK/RAS/PI3K, p53 et RB1 (respectivement 88, 87 et 87% des GBM) [BERABEZ \[2018\]](#).

### 1.2.5 Traitement

Discutée dans le cadre des réunions de concertation pluridisciplinaire, la prise en charge des GBM associe traitements curatifs, symptomatiques, palliatifs et d'éducation thérapeutique. Le traitement curatif conjugue une résection chirurgicale large si possible, à une radiothérapie et d'une chimiothérapie d'abord concomitante puis adjuvante [ANOCEF \[2018\]](#). La molécule la plus utilisée en pratique clinique est le témozolomide (ou TMZ). Brièvement, le TMZ est un agent alkylant qui induit une méthylation des adénines et des guanosines, ce qui entraîne un mésappariement et conduit à l'apoptose. L'enzyme 6-O-guanine-ADN-méthyltransférase (ou MGMT) enlève justement le groupement méthyle des bases et inhibe donc l'effet cytotoxique du TMZ. Or, la méthylation de son promoteur inhibe la transcription de *MGMT* et rétablit donc la sensibilité au TMZ [BUTLER et collab. \[2020\]](#). Dans les essais cliniques, cela se traduit par une meilleure survie des patient.e.s dont le promoteur du gène de *MGMT* est méthylé [THOMAS et collab. \[2012\]](#). Ainsi, le TMZ peut être utilisé seul si le promoteur du gène *MGMT* est méthylé [ANOCEF \[2018\]](#).

Le traitement symptomatique va dépendre des signes physiques et fonctionnels des patient.e.s. Il associera en général une corticothérapie afin de limiter l'œdème péri-lésionnel et post-opératoire, anti-épileptiques et anti-coagulants afin de prévenir les thromboses veineuses cérébrales. L'éducation thérapeutique aura pour but d'évaluer le retentissement fonctionnel de la maladie, de proposer des soins de rééducation, d'obtenir une bonne compréhension de la maladie pour favoriser l'adhérence thérapeutique et une meilleure surveillance des événements indésirables liés aux soins. Enfin, le traitement palliatif doit se faire en accord des directives anticipées formulées directement par le.la patient.e ou après leur recueil auprès de la personne de confiance si le patient n'est plus conscient. Les soins palliatifs ont pour but de soulager les symptômes physiques et la prise en charge des souffrances psychologiques des patient.e.s et des proches.

Arrivés sur le marché il y a une dizaine d'années, les thérapies ciblées ont permis d'obtenir une amélioration du pronostic de nombreux cancers. Cependant la prise en charge du GBM n'a pas bénéficié de ces nouvelles molécules. De nombreux essais cliniques ont démontré l'absence de supériorité des anti-EGFR, des anti-angiogéniques et des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire sur la survie des patient.e.s atteint.e.s de GBM [TOUAT et collab. \[2017\]](#).

Malgré les avancées techniques et thérapeutiques, le pronostic des patient.e.s ne s'améliore pas. Ce constat est à mettre en corrélation avec la récurrence quasi-systématique des GBMs [STUPP et collab. \[2009\]](#). Or, il y a une vingtaine d'années, des chercheur.euse.s ont découvert un nouveau type de cellules cancéreuses au sein de l'écosystème tumoral : les cellules souches cancéreuses. L'étude de ces cellules souches cancéreuses, qui possèdent notamment la propriété d'auto-renouvellement, pourrait permettre de mieux caractériser les phénomènes de rechutes du GBM.

## 1.3 Les cellules souches de glioblastome

### 1.3.1 Découverte et propriétés des cellules souches de glioblastome

La première description des cellules souches de GBM (CSG) date de 2003 [SINGH et collab. \[2003\]](#), soit quelques années après la découverte des cellules souches leucémiques [LAPIDOT et col-](#)

lab. [1994]. En dérivant le test de formation de neurosphères, initialement développé pour étudier l'auto-renouvellement des cellules souches neurales REYNOLDS et WEISS [1992], l'équipe de Peter B. DIRKS a montré qu'une partie des cellules cancéreuses au sein des tumeurs gliales sont capables d'auto-renouvellement. La preuve que ces cellules sont également capables de multipotence (en étant précurseurs des types cellulaires retrouvés dans la tumeur initiale) est rapidement apportée GALLI et collab. [2004]. L'existence de cellules souches cancéreuses au sein des GBMs est dès lors établie.

Dans une revue très complète, les auteur.e.s détaillent les caractéristiques des CSG LATHIA et collab. [2015] (Figure 1.2) :

— Caractéristiques génétiques : les altérations génétiques les plus fréquemment retrouvées dans les GBMs sont également décrites dans les CSG. Les méthodes de cytogénétique classiques ont ainsi retrouvé les aberrations chromosomiques suivantes BARONCHELLI et collab. [2013] : gain partiel ou total du chromosome 7 (contenant le gène *EGFR*), la perte du chromosome 13 (entraînant une perte du gène *RBI*), nullosomie du locus 9p21 (contient les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*, inhibiteurs du cycle cellulaire), perte du chromosome 10 (et du gène *PTEN*). Néanmoins, les analyses d'hybridation génomique comparative (plus connues sous le nom de CGH-array) montrent une corrélation des altérations cytogénétiques plus forte entre le GBM initial et les cellules souches qui en dérivent qu'entre les cellules souches issues de GBMs différents PESENTI et collab. [2019]. Enfin, il a été montré que les différentes sous-populations de cellules souches cancéreuses, provenant d'un même GBM, ne partagent pas nécessairement les mêmes aberrations caryotypiques entre elles WALLENBORN et collab. [7 juil. 2020]. Ces observations sont très intéressantes car elles suggèrent moins une opposition qu'une complémentarité entre le modèle d'évolution clonale et le modèle des CSC (comme illustré sur la figure 1.1d).

— Caractéristiques épigénétiques : beaucoup de protéines ont été décrites comme intervenant dans le remodelage de la chromatine des CSG (*MYC*, *SOX2*, *NANOG*, *STAT3*, etc.). Plus spécifiquement, la surexpression combinée de *POU3F2*, *SOX2*, *SALL2* et *OLIG2* dans des cellules de GBMs différenciées conduit ces cellules à acquérir un phénotype souche via un remodelage chromatien par acétylation de H3K27 SUVÀ et collab. [2014]. La dédifférenciation initiée par ces facteurs de transcription ne semble en revanche pas se dérouler selon un mode "on/off", mais plutôt de façon graduelle. En effet, les analyses en cellules uniques trouvent un continuum entre les signatures transcriptomiques des cellules cancéreuses différenciées et les CSG PATEL et collab. [2014]. Ce constat témoigne de changements épigénétiques finement régulés, à l'origine d'une hétérogénéité cellulaire intra-tumorale. Des études de transcriptomiques en cellules uniques révèlent également que, au sein d'une même tumeur, le statut épigénétique est différent entre les sous-populations de cellules de GBMs NEFTEL et collab. [2019].

— Caractéristiques métaboliques : les principales études sur le métabolisme des CSG portent principalement sur le métabolisme du glucose. L'effet Warburg, classiquement décrit dans les tumeurs, est également retrouvé dans les populations de CSG WARBURG et collab. [1924]. Pour rappel, les cellules normales tirent leur énergie principalement par phosphorylation oxydative du glucose, via la chaîne respiratoire mitochondriale. A l'inverse, dans de nombreuses cellules cancéreuses, l'effet Warburg désigne la production d'énergie essentiellement à partir de la glycolyse par la lactate-deshydrogénase (LDH), même en présence d'oxygène. Or, le rendement énergétique de la glycolyse anaérobie est théoriquement plus faible que celui de la phosphorylation oxydative. Bien que le mécanisme soit encore mal connu, les CSG pourraient adapter leur métabolisme glucidique aux conditions environnantes et basculer du côté de la phosphorylation oxydative ou de la glycolyse anaérobie THOMAS et YU [2017]. Enfin, il a été montré que les différentes sous-populations de CSG au sein d'une même tumeur ont des voies métaboliques différentes GARNIER et collab. [2019]. Ces nouvelles données expliquent pourquoi de nombreuses études ont tantôt montré que le métabolisme des CSG relevait de la phosphorylation oxydative, tantôt de la glycolyse anaérobie.

— Les facteurs de niche : la notion de niche recouvre l'ensemble des stimuli extérieurs aux cel-

lules souches (signaux paracrines, contact cellule-cellules) et qui détermine leur devenir [FERRARO et collab. \[2010\]](#). De nombreuses voies de signalisation régulées au sein des niches de cellules souches neurales ont été étudiées dans le contexte des CSG [LATHIA et collab. \[2015\]](#) : les voies de signalisation de l'EGFR et du FGFR, la famille des Bone marrow proteins (BMP)... Détaillons un peu plus précisément l'étude du rôle de la voie de signalisation NOTCH dans les CSG. Les récepteurs de la famille NOTCH et leurs ligands DELTA et JAGGED sont tous des protéines transmembranaires. C'est l'interaction directe entre deux cellules proches qui induit une activation de la voie de signalisation NOTCH. L'intensité de l'activation de cette voie a initialement été retrouvée plus élevée au sein des GBM que des tumeurs gliales moins agressives [BAZZONI et BENTIVEGNA \[2019\]](#). Il a également été montré que les CSG ont un niveau d'activation de la voie de signalisation NOTCH plus important que les cellules cancéreuses plus avancées dans la différenciation [JIANG et collab. \[2012\]](#). De façon réciproque, l'inhibition de cette voie de signalisation dans les CSG s'accompagne une perte des propriétés souches [MA et collab. \[2017\]](#). Nous avons également démontré que la voie de signalisation de NOTCH est stimulée de façon post-traductionnelle par la protéine CRMP5, CRMP5 dont les niveaux d'expression élevés sont généralement retrouvés dans des GBM de plus mauvais pronostic [MOUTAL et collab. \[2015\]](#). Un autre exemple est celui de la voie de signalisation MET. La fixation du facteur de croissance hépatocytaire (ou HGF) sur le récepteur MET induit une cascade de phosphorylation dont le niveau d'activité est augmenté dans les CSG [LI et collab. \[2011\]](#). De la même façon que pour la voie de signalisation NOTCH, nous avons montré que l'inhibition de la voie de signalisation MET diminuait la prolifération cellulaire, tandis que son activation dans des lignées cellulaires différenciées induisait l'acquisition des propriétés souches [LU et collab. \[2012\]](#).

— Immuno-suppression : s'il est désormais bien établi que les GBMs sont des cancers induisant une immuno-suppression locale, peu d'études se sont intéressées spécifiquement aux interactions entre le système immunitaire et les CSG. Les CSG sont capables d'induire un phénotype immuno-suppresseur chez les macrophages associés aux tumeurs, via la stimulation de la voie de STAT3 [WU et collab. \[2010\]](#) et la sécrétion de WISP1 [TAO et collab. \[2020\]](#). De même, les CSG secrètent de la cathepsine K dont le rôle immuno-suppresseur dans certains cancers est connu [HIRA et collab. \[2017\]](#). Enfin, les interactions entre CSG et lymphocytes T, notamment en ce qui concerne le point de contrôle immunitaire, semblent différer selon les sous-populations de CSG [ZHAI et collab. \[2020\]](#).

— Micro-environnement : les CSG sont classiquement retrouvées dans les régions tumorales péri-vasculaires et péri-nécrotiques. Cette observation suggère un rôle important tenu par l'hypoxie dans le phénotype des CSG [SCHIFFER et collab. \[2014\]](#). Il a en effet été montré que le statut souche des CSG est maintenu par des conditions environnementales hypoxiques, via l'expression de HIF-1 $\alpha$  (membre de la famille des facteurs induits par l'hypoxie). HIF-1 $\alpha$  est également impliqué dans la néoangiogénèse en stimulant la sécrétion de VEGF par les CSG [COLWELL et collab. \[2017\]](#). Il se met en place une boucle de rétrocontrôle positive car les cellules endothéliales, par l'activation des voies du monoxyde d'azote (NO), de la guanosine monophosphate cyclique (GMPC) et de NOTCH, participent en retour à la régulation des CSG [SCHIFFER et collab. \[2018\]](#). Enfin, il n'est encore pas très clair si la rigidité du micro-environnement a un effet favorisant le maintien des CSG [CHEN et collab. \[2018\]](#), ou bien limite leur capacité d'auto-renouvellement [MOTEGI et collab. \[2014\]](#) ou encore n'a aucun effet sur celles-ci [WONG et collab. \[2015\]](#). Néanmoins, le micro-environnement pris dans son ensemble (facteurs humoraux, cellulaires, physiques et chimiques) semble bien être un élément clef des mécanismes régulateurs de l'hétérogénéité et de la plasticité des CSG [JUNG et collab. \[2021\]](#); [ZHENG et collab. \[2021\]](#).

### 1.3.2 Pertinence biologique, clinique et thérapeutique des cellules souches de glioblastome

Si l'existence des CSG et plus généralement celle des cellules souches cancéreuses ne fait plus de doute, leur pertinence biologique et leur implications cliniques restent discutées.

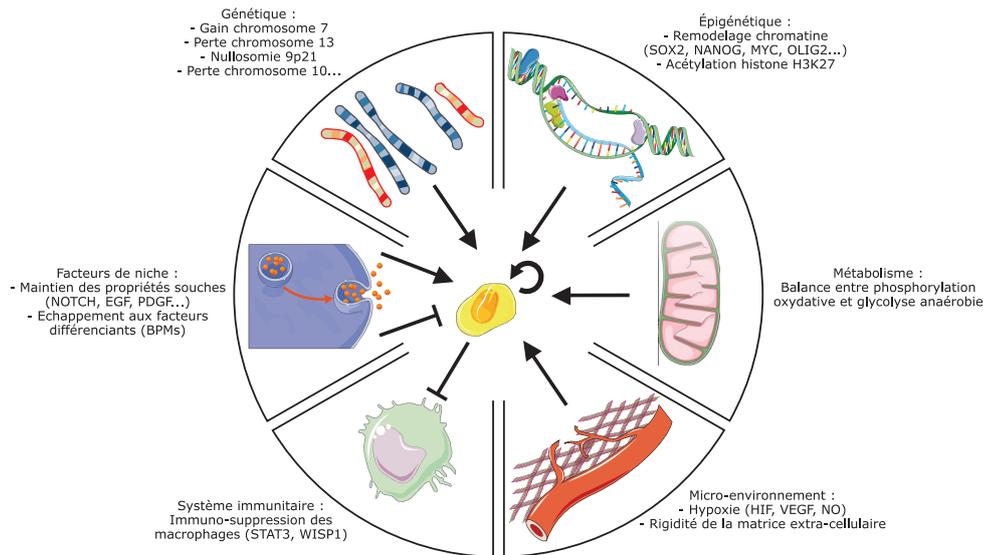


FIGURE 1.2 – **Caractéristiques des cellules souches de glioblastome.** De nombreux facteurs génétiques, épigénétiques, métaboliques et micro-environnementaux semblent impliqués dans la promotion et le maintien des propriétés souches dans les cellules de glioblastome. Les CSG sont également capables d'induire une immuno-suppression locale.

Le concept-clef qui émane du paragraphe précédent est celui d'hétérogénéité. Tout d'abord, l'hétérogénéité inter-tumorale désigne la variation des paramètres clinico-biologiques entre les différentes tumeurs de patient.e.s. Cette hétérogénéité inter-tumorale va se retrouver au niveau anatomique (localisation de la tumeur), radiologique (taille, nécrose, vascularisation), histologique (atypies cyto-nucléaires) et moléculaire [COUTURIER et collab. \[2020\]](#).

L'hétérogénéité intra-tumorale des GBM est également bien décrite et correspond aux différentes sous-populations de cellules au sein d'une même tumeur. La classification de ces sous-populations peut se faire selon plusieurs axes : un axe vertical ou hiérarchique et un axe horizontal ou clonal (Figure 1.3). L'axe vertical correspond à la hiérarchie proliférative au sein de la tumeur, de la cellule souche cancéreuse jusqu'à la cellule différenciée en passant par les stades progéniteurs [LAN et collab. \[2017\]](#). L'hétérogénéité horizontale rend compte des sous-populations clonalement différentes mais fonctionnellement identiques. Une multitude de sous-populations de CSG peut ainsi être identifiée selon leur profil génétique [WALLENBORN et collab. \[7 juil. 2020\]](#), leur signature transcriptomique [NEFTEL et collab. \[2019\]](#) ou les protéines exprimées [DIRKSE et collab. \[2019\]](#). Le cas de l'expression des protéines est particulièrement frappant car dès 2003, la spécificité revendiquée pour l'identification des CSG par chacune de ces protéines s'est vue remise en cause dans les années suivantes. Par exemple CD133, ou prominine 1, a été le premier marqueur protéique déclaré comme spécifique des CSG [SINGH et collab. \[2004\]](#). Seules les cellules exprimant le CD133 ont été montrées comme capables d'initier la croissance tumorale après transplantation dans des souris immuno-déprimées. Cependant, en 2007, un étude démontre qu'une fraction non négligeable des cellules de GBMs n'exprimant pas le CD133 possèdent tout de même les propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence [BEIER et collab. \[2007\]](#). De même, des résultats publiés en 2009 montrent que l'expression de SSEA1 serait spécifique des CSG [SON et collab. \[2009\]](#), résultats qui seront remis en question l'année suivante avec la description d'une population de cellules de GBMs n'exprimant pas SSEA1 [PATRU et collab. \[2010\]](#). Pour citer un dernier exemple, l'expression de A2B5 par les CSG a été rapportée en 2008 [OGDEN et collab. \[2008\]](#) mais expression non retrouvée en 2015 dans une population de cellules de GBM possédant pourtant les propriétés souches [HAN et collab. \[2015\]](#).

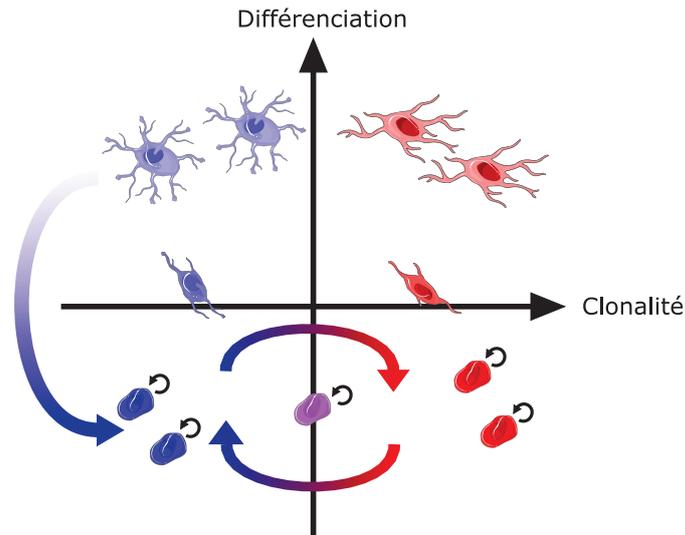


FIGURE 1.3 – **Hétérogénéité et plasticité des cellules souches de glioblastome.** Représentation schématique de l'hétérogénéité verticale ou hiérarchique entre les CSG et les cellules plus avancées dans la différenciation et de l'hétérogénéité horizontale ou clonale entre les différentes sous-populations clonalement hétérogènes. La plasticité est représentée par la transition d'une sous-population de GSC à une autre, ou bien par la réacquisition des propriétés souches par dédifférenciation.

En sus de l'hétérogénéité, une autre couche de complexité permet d'expliquer les résultats discordants entre ces études : la plasticité. La plasticité se définit comme la capacité pour une cellule à changer son phénotype en réponse aux stimuli de son micro-environnement mais en l'absence de mutation génétique [SHEN et CLAIRAMBAULT \[2020\]](#). Il a ainsi été montré que les cellules de GBMs différenciées sont capables d'acquérir des propriétés souches en réponse à la chimiothérapie [LIAU et collab. \[2017\]](#), aux radiations ionisantes [DAHAN et collab. \[2014\]](#), à l'hypoxie [LEE et collab. \[2016\]](#) ou encore aux interactions mécaniques avec la matrice extra-cellulaire [SUZUKA et collab. \[2021\]](#). Mais la dédifférenciation n'est pas la seule modalité de plasticité des cellules de GBMs. Il existe ainsi une plasticité entre les sous-populations de cellules de GBMs elles-mêmes. Dans une très belle étude de 2019, [DIRKSE et collab. \[2019\]](#) identifient 16 sous-populations de CSG dans leurs lignées grâce à une combinaison de marqueurs. Isolées dans des puits de plaques 96 puits, les cellules uniques, pourtant issues d'une de ces 16 sous-populations, sont capables de proliférer et de reconstituer l'ensemble de ces 16 sous-populations. La démonstration est faite que les CSG, bien que toujours souches, sont capables de perdre et d'acquérir des marqueurs que les scientifiques tentent vainement d'établir comme spécifiques depuis vingt ans. Ce constat pousse certain.e.s chercheur.euse.s à vouloir s'affranchir des marqueurs pour étudier les CSG [SUVÀ et TIROSH \[2020\]](#). Non contente d'avoir permis de prêter le flanc aux critiques des détracteurs du modèle des cellules souches cancéreuses, cette quête du marqueur universel des CSG a fait s'éloigner de ce qui forge le concept même des cellules souches : la validation fonctionnelle de l'auto-renouvellement et de la multipotence [LATHIA et collab. \[2015\]](#).

Enfin, malgré une littérature sémillante sur les CSG, les résultats des études cliniques ciblant ces cellules restent décevants. Dans une revue de 2019, [TARASOV et collab. \[2019\]](#) résument les principaux essais cliniques ciblant les voies de signalisations impliquées dans la biologie des CSG. Ainsi, les tentatives d'inhibition des voies de signalisation NOTCH, Wnt, Sonic hedgehog, JAK/STAT ou mTOR ne parviennent pas à améliorer le pronostic des patient.e.s atteint.e.s de GBM. Deux autres études avancent néanmoins des résultats intéressants. Celles-ci utilisent un vaccin dirigé contre la protéine survivine. La survivine est une protéine de la famille des inhibiteurs de l'apoptose. Plusieurs études ont démontré son implication dans la dédifférenciation des cellules de GBMs [DAHAN et collab. \[2014\]](#), l'auto-renouvellement et la survie des CSG [GUVENC et collab. \[2013\]](#). Alors que les thérapies ciblées de la survivine par inhibiteur pharmacologique n'améliore

pas le pronostic des patient.e.s atteint.e.s de GBMs, les essais cliniques utilisant des vaccins contre la survivine semblent bel et bien augmenter la survie sans progression de la maladie ainsi que la survie globale FENSTERMAKER et collab. [2016]; ROSWELL PARK CANCER INSTITUTE [2021]; VIK-MO et collab. [2013].

Pris dans leur ensemble, ces résultats amènent aux réflexions suivantes : 1) le modèle des cellules souches cancéreuses apporte un éclairage nouveau sur la biologie des cancers, 2) l'hétérogénéité et la plasticité des cellules souches cancéreuses complexifie la vision unidirectionnelle du modèle de l'évolution clonale, 3) cette complexité peut expliquer l'échec des essais cliniques ciblant les potentiels leviers thérapeutiques importants dans le métabolisme des cellules souches cancéreuses 4) mais le domaine de la recherche sur les cellules souches cancéreuses reste foisonnant et pourrait aboutir à une description plus fine des voies de signalisation en jeu, offrant par la même occasion de nouvelles pistes thérapeutiques à étudier. Mais pour bien étudier les CSG, il faudra avant tout bien les identifier. C'est pourquoi nous aborderons les méthodes d'identification des CSG dans le paragraphe suivant.

### 1.3.3 Méthodes d'identification des cellules souches de glioblastome

Depuis 2003 et l'article de SINGH et collab. [2003], force est de constater que beaucoup de méthodes ont été utilisées pour identifier les CSG. La plus ancienne et encore la plus fréquemment pratiquée est l'immunomarquage, que ce soit par immunofluorescence sur lame ou par cytométrie en flux DUNDAR et collab. [2019]. Or, on l'a vu dans le précédent paragraphe, il n'existe pas de protéine exprimée de façon universelle par les CSG. C'est notamment pour cela que bien d'autres marqueurs moléculaires ont été mis au point pour identifier les CSG. Ainsi, certaines caractéristiques des CSG listées dans le paragraphe 1.3.1 ont constitué le rationnel de méthodes d'identification moléculaire des CSG. Cependant, au risque de paraître redondant, si ces techniques peuvent être facilement réalisées, elles ne permettent pas de caractériser les propriétés fonctionnelles définissant les cellules souches : l'auto-renouvellement et la multipotence JORDAN [2009].

Justement, il existe de nombreuses façons pour identifier fonctionnellement les CSG (Table 1.1) GIMPLE et collab. [2019].

— La recherche des marqueurs moléculaires d'auto-renouvellement et de multipotence est très utilisée comme succédané aux tests fonctionnels à proprement dit BAYIN et collab. [2014]; INNES et collab. [2021]. Cependant, la présence de ces marqueurs n'est ni suffisante ni spécifique aux CSG SUVÀ et TIROSH [2020]. De plus, la recherche de ces marqueurs se fait généralement en point final alors que leur présence est souvent transitoire et que les CSG constituent une population cellulaire dynamique au cours du temps DIRKSE et collab. [2019]; ENDERLING [2015].

— Les tests fonctionnels *in vitro* sont également beaucoup utilisés en pratique. Si le test de formation de neurosphères est le plus ancien (il sera développé en détail dans le paragraphe suivant 1.3.4), d'autres tests existent comme la formation de colonies sur substrat ou bien la culture des CSG dans des organoïdes. Ces deux derniers tests ont été développés successivement pour tenter de rendre le test de formation de neurosphère plus proche des conditions *in vivo* AZZARELLI [2020]; REYNOLDS et VESCOVI [2009]. Cependant, pour ce qui est de la culture de colonies sur substrat, il a été montré que les conditions de culture bidimensionnelles induisaient la différenciation des CSG FERNANDEZ-FUENTE et collab. [2014]; YU et collab. [2018]. Dans le cas de la formation d'organoïdes, cette méthode est relativement récente et il existe de nombreux protocoles : substrat d'hydrogel, co-culture avec des cellules micro-gliales... AZZARELLI [2020]. De plus, il a été montré que les différentes sous-populations de CSG peuvent avoir des comportements très différents au sein des organoïdes INNES et collab. [2021]. En finalité, la formation de colonies sur substrat et la culture dans les organoïdes ne sont elles non plus pas exemptes de biais méthodologiques.

— Les xénogreffes de tumeurs dérivées de patient.e.s (XDP) ont dès le début été utilisées pour l'identification des CSC LAPIDOT et collab. [1994]. Cette méthode consiste en des injections de cellules cancéreuses dans modèles murins. La rationnel de l'expérience est que si les cellules injectées sont souches, elles vont être capables d'initier la croissance tumorale. Les XDP sont ainsi

souvent réalisées après isolement d’une sous-population de CSC avec un marqueur moléculaire et il s’agit de montrer que cette sous-population initie plus facilement la croissance tumorale que la sous-population dépourvue dudit marqueur. Bien que considérée comme le mètre étalon du test fonctionnel d’identification des CSC, la XDP est une méthode aussi régulièrement critiquée WILLIAMS et collab. [2013]. Par exemple dans le cas des CSG, les XDP ont établi que le marqueur CD133 était spécifique des CSG, car les cellules n’exprimant pas de marqueur étaient incapables d’initier une croissance tumorale SINGH et collab. [2004]. Cependant, une autre équipe a rapidement démontré que même les cellules CD133<sup>-</sup> sont pourtant capables d’initier la croissance tumorale après une XDP BEIER et collab. [2007]. Les différences de protocoles peuvent là encore expliquer les différences entre les résultats observés : méthode d’injection (intra-cérébrale, sous-cutanée, intra-péritonéale...), modèle murin (souris SCID, nude...) OKADA et collab. [2019]. De plus, il a récemment été montré que, dans les modèles murins, les cellules cancéreuses avaient une évolution souvent très différente de celle observé chez les patient.e.s initiaux BEN-DAVID et collab. [2017]; PINE et collab. [2020].

— L’initiation tumorale a enfin été étudiée par modification génétique de modèles murins. Les principales voies de signalisation ciblées par génie génétique sont celles du facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor ou PDGF), du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor ou EGF) et la neurofibromine 1 (ou NF1) HAMBARDZUMYAN et collab. [2011]. Si la surexpression du récepteur du PDGF, la délétion de NF1 et la mutation dirigée du récepteur de l’EGF ont toutes réussi à initier la croissance de glioblastomes, chacune de ces méthodes a également permis de générer des populations de cellules cancéreuses BLEAU et collab. [2009]; HARRIS et collab. [2008]; MARQUES et collab. [2021]. Cependant, le génie génétique sur modèle murin n’échappe pas non plus aux biais méthodologiques. Premièrement, les altérations génétiques nécessaires pour initier la croissance tumorale peuvent être différentes dans les modèles murins par rapport à la tumorigenèse humaine HUSZTHY et collab. [2012]. De plus, le génie génétique implique que l’ensemble des cellules à l’origine de la tumeur soient génétiquement homogènes, or on l’a vu dans le paragraphe 1.3.2, l’hétérogénéité intra-tumorale est très importante dans le GBM LENTING et collab. [2017].

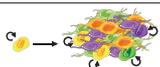
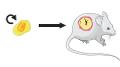
	Méthodes	Avantages	Limites
<i>In vitro</i>	Marqueurs moléculaires 	-Simple	-Pas un test fonctionnel -Pas de marqueur universel
	Tests fonctionnels 	-Test fonctionnel -Simple	-Extrapolation
<i>In vivo</i>	XDP 	-Test fonctionnel -Micro-environnement	-Extrapolation -Complexe
	Génie génétique 	-Micro-environnement -Teste l’initiation tumorale	-Extrapolation -Complexe

TABLEAU 1.1 – Table résumée des méthodes d’identification des GSC. Les méthodes *in vitro* consistent en l’identification de marqueurs moléculaires ou les tests fonctionnels des propriétés d’auto-renouvellement et de multipotence. Les modèles murins de xénogreffes dérivées de tumeurs de patient.e.s (XDP) et de génie génétique illustrent les moyens d’identification *in vivo* des CSG.

Pour conclure, chacune de ces techniques, *in vitro* ou *in vivo* présente des avantages et des inconvénients. De façon générale, les méthodes *in vitro* permettent de réaliser un grand nombre d’expériences et de réplicats aux dépends de l’extrapolation clinico-biologique originale (l’exemple du test de formation de neurosphères sera développé dans le paragraphe 1.3.4). A l’inverse, les méthodes *in vivo* veulent se rapprocher des conditions physio-pathologiques humaines mais nécessitent un investissement financier et humain qui est loin d’être négligeable pour un résultat aussi soumis à l’acceptation de biais méthodologiques. Ainsi, la standardisation, la parallélisation

et l'automatisation des moyens d'études des cellules souches cancéreuses constituent un enjeu essentiel pour éviter les errements et les critiques qu'a connu le modèle des cellules souches cancéreuses ces vingt dernières années.

### 1.3.4 Le test de formation de neurosphères

Parmi les méthodes investiguant l'auto-renouvellement des CSG, les méthodes d'identification *in vitro* des CSG semblent particulièrement adaptées aux systèmes standardisés et à haut-débit (Table 1.1). Initialement proposé en 1992 par REYNOLDS et WEISS [1992], le test de formation de neurosphères (NS) permet de tester *in vitro* l'auto-renouvellement des cellules souches neurales. Cultivées en condition non adhérentes et en présence de facteur de croissance épidermique (ou EGF pour epidermal growth factor), certaines cellules neurales sont capables de proliférer sous la forme de sphéroïdes (d'où le terme de NS). Après dissociation des sphères en cellules uniques, un contingent de cellules est de nouveau capable d'aboutir à une NS. Dans un premier temps adopté par la communauté scientifique travaillant sur les cellules souches neurales, le test a ensuite été utilisé pour découvrir les CSG SINGH et collab. [2003]. La preuve de la multipotence des CSG cultivées en NS a été apportée quelques années plus tard LEE et collab. [2006]. En effet, les CSG issues de NS sont capables de former des tumeurs similaires aux tumeurs originales et leur signatures transcriptomiques sont très proches. Quant aux applications cliniques du test de formation de NS, de plus en plus d'études montrent une corrélation entre pronostic des patient.e.s atteint.e.s de GBMs et propension des cellules issues de ces GBMs à former des NS D'ALESSANDRIS et collab. [2017]; KONG et collab. [2014]; LAKS et collab. [2016, 2009]; PANOSYAN et collab. [2010]; THIRANT et collab. [2011]. De plus, ce test est aussi utilisé pour dépister des drogues potentiellement efficaces sur l'auto-renouvellement des CSG GANGULI et collab. [2021]; HU et collab. [2021]; PANG et collab. [2019]; QUARTARARO et collab. [2015]; QUEREDA et collab. [2018a].

Bien que satisfaisant aux critères d'auto-renouvellement et de multipotence, le test de formation de NS est cependant régulièrement critiqué PASTRANA et collab. [2011]; WAN et collab. [2010] pour les raisons suivantes :

- L'homogénéité clonale non contrôlée : il s'agit là de la première critique du test de formation de NS. À juste titre d'ailleurs car quiconque a déjà manipulé des cellules en conditions non adhérentes sait que le moindre mouvement va entraîner l'agrégation de cellules entre elles. Or, rares sont les articles qui s'assurent que les NS proviennent bien de cellules souches restées isolées et ne sont pas la résultante d'une agglomération de cellules et de NS.

- Le test de formation de NS n'est pas standardisé : en effet les protocoles varient d'une étude à l'autre, que ce soit au niveau des conditions de culture ou de la définition même d'une NS. La diversité des milieux de culture utilisés (DMEM sans ou avec F12, milieu neurobasal, facteurs de croissance, insuline, antibiotiques, BMP, sérum...) rend difficilement comparable les études, explique les résultats divergents et attise les critiques vis-à-vis du modèle des cellules souches cancéreuses. De même, il n'existe pas de seuil de taille au delà duquel un agrégat cellulaire peut être considéré comme une NS. La taille et la vitesse de croissance des NS semblent ainsi varier selon les lignées utilisées.

- La fréquence des cellules souches détectées avec le test de formation de NS n'est pas représentative du taux de cellules souches *in vivo* : étant réalisé *in vitro*, il est normal que le test de formation de NS s'affranchisse de la complexité du micro-environnement tumoral. Il est à noter tout de même que 1) certaines études parviennent à mimer le micro-environnement en cultivant des NS dans des gels LI et collab. [2018]; NAKOD et collab. [2020] et 2) bien que la référence des tests fonctionnels des CSG soit celle des xenogreffes de tumeurs de patient.e.s dans des souris, il a été montré que les xenogreffes dérivent autant, au niveau génétique et épigénétique, que les NS par rapport aux tumeurs originales BEN-DAVID et collab. [2017]; PINE et collab. [2020].

- Les cellules souches quiescentes ne sont pas détectées par le test de formation de NS : s'il est juste de dire que le test de formation de NS ne permet pas de détecter les cellules quiescentes,

il convient de rappeler qu'il n'existe pas non plus de test de référence pour identifier les cellules quiescentes [CHEUNG et RANDO \[2013\]](#). D'autre part, plusieurs études suggèrent que les CSG quiescentes sont tout autant capables de former des NS que CSG non quiescentes. [SACHDEVA et collab. \[2019\]](#); [TEJERO et collab. \[2019\]](#).

Malgré ces critiques, le test de formation de NS permettrait de tester l'auto-renouvellement des CSG de façon rapide, économique, parallélisable et tout en nécessitant peu de matériel biologique (notamment dans le cadre des prélèvements neurochirurgicaux [SUNG et collab. \[2016\]](#)). Pour ces raisons, il semble parfaitement adapté aux systèmes microfabriqués.

## 1.4 Microfluidique

Depuis une trentaine d'années, l'essor des systèmes microfabriqués a permis une standardisation et un déploiement à large échelle de nombreux procédés de fabrication et d'analyse, notamment en biologie. Après un bref historique du développement des systèmes microfabriqués, nous évoquerons l'application de cette technologie au GBM et aux CSG.

### 1.4.1 Bref historique de la microfluidique

Deux innovations sont à l'origine de la microfluidique [CONVERY et GADEGAARD \[2019\]](#). La première date de 1947 et correspond à l'invention du transistor. Les applications des composants semi-conducteurs se développent et la fabrication par photolithographie de circuits imprimés devient la base de la micro-électronique dans les années 60 (Figure 1.4). La photolithographie se fonde sur l'exposition aux rayons UV d'une résine photosensible à travers un masque. Ainsi, seules les zones de résine exposées aux rayons UV se détachent tandis que les zones protégées permettront de reproduire le motif d'intérêt. Un peu plus tard, en 1965, la première imprimante à jet d'encre est inventée par Richard SWEET. L'encre coule dans des buses où se trouve une électrode. Le courant électrique généré par l'électrode polarise l'encre qui forme des gouttes à une fréquence donnée. Ces gouttes tombent ensuite sur le papier où elles sèchent en le teintant. L'imprimante à jet d'encre de Richard SWEET est considéré comme le premier système microfluidique. En 1977 les buses deviennent imprimées en série par photolithographie rendant l'impression par jet d'encre plus efficace et moins chère. Dans les années 90, le poly(diméthylsiloxane) (PDMS) devient le matériel principal dans la fabrication des puces de microfluidique. Plus facilement manipulable que le verre ou le silicium (qui étaient les matériaux utilisés jusqu'alors), le PDMS permet une nouvelle accélération dans le développement de la microfluidique. Ainsi, la seconde moitié des années 90 voient fleurir les travaux biologiques tirant profit des systèmes miniaturisés [WHITESIDES et collab. \[2001\]](#), notamment the human genome project (1995) et le tri cellulaire. De nos jours, l'usage de la microfluidique s'est démocratisé : des bandelettes urinaires aux séquenceurs de nouvelle génération en passant par la production de médicaments [BATTAT et collab. \[2022\]](#). Quant aux applications dans le cadre de la recherche, nous allons voir dans les deux prochains paragraphes 1.4.2 et 1.4.3 que la microfluidique a permis de développer de nouveaux outils d'étude du micro-environnement tumoral, des méthodes d'analyses omiques à haut débit, ainsi que de criblage de drogues à grande échelle [ZHANG et NAGRATH \[2013\]](#).

### 1.4.2 De la recherche fondamentale...

Dans le contexte de la recherche sur le GBM, les applications de la microfluidique s'articulent autour de plusieurs axes [LOGUN et collab. \[2018\]](#). Nous avons vu dans le paragraphe 1.3.1 que les acteurs du micro-environnement semblent particulièrement impliqués dans la biologie

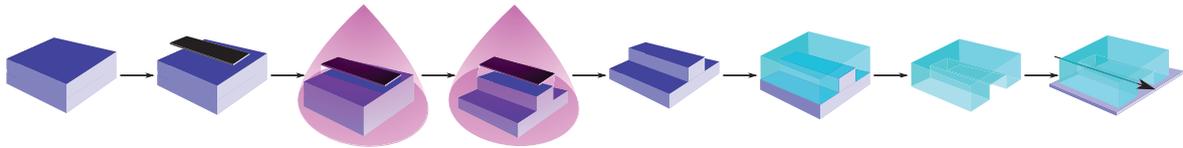


FIGURE 1.4 – **Photolithographie.** Représentation schématique du processus de photolithographie. La résine photosensible (bleu foncé) est protégée par endroit par un masque (noir). Après exposition aux rayons UV (violet), la résine photosensible constitue un contre-moule qui permet de donner sa forme à la puce de micro-fluidique (bleu clair). La puce de microfluidique peut ensuite être fixée sur un substrat afin de former un canal circulant (flèche noire).

des CSG. Ainsi, la rigidité de la matrice extra-cellulaire peut être reproduite en modifiant la polymérisation d'une puce de polyacrilamide [PATHAK et KUMAR \[2012\]](#). Dans cet article, les auteurs montrent que non seulement l'augmentation de la rigidité du substrat augmente la vitesse de migration des cellules, mais que le confinement des cellules augmente également leur vitesse. Concernant les interactions cellulaires, [WANG et collab. \[2012\]](#) présentent une puce de microfluidique capable de suivre l'activité de voies de signalisations lorsque deux cellules cancéreuses entrent en contact. Leurs résultats indiquent d'une part que la voie de signalisation p13K est globalement inhibée lorsque les cellules sont trop proches (distance inférieure à  $90\mu\text{m}$ ) et d'autre part que les voies activées dépendent de la distance entre les cellules (plus la distance est grande et plus l'interleukine 6 est exprimée, à l'inverse la phospho-kinase S6 semble exprimée lorsque la distance inter-cellulaire est dans l'intervalle  $60\text{-}90\mu\text{m}$ ). Les interactions entre cellules de GBMs et lymphocytes ont également été étudiées dans les systèmes microfluidiques. L'extravasation et la vitesse des lymphocytes sont ainsi différentes selon la sous-population de cellules de GBMs prise pour cible [CUI et collab. \[2020\]](#). De plus, ces paramètres sont chacun augmentés en l'absence de macrophages associés aux tumeurs (régulièrement suspectés d'entraîner une immunosuppression). Enfin, [TRUONG et collab. \[2019\]](#) parviennent à reproduire l'interaction entre cellules de GBMs et cellules endothéliales dans leur puce. La migration vers les zones vascularisées et les protéines exprimées lors de celle-ci par les cellules de GBMs sont similaires aux observations in vivo.

### 1.4.3 ...aux applications cliniques

La microfluidique est aussi utilisée dans le diagnostic des GBMs. Tirant parti des technologies microfluidiques, le séquençage à haut débit a permis [VERHAAK et collab. \[2010\]](#) d'analyser le transcriptome d'un très grand nombre de tumeurs. Les chercheurs ont ainsi pu classer les profils transcriptomiques des GBMs en quatre sous-types : classique, neural, proneural et mésoenchymateux. [SUN et collab. \[2010\]](#) ont également proposé une classification des GBM selon l'expression de 4 protéines : EGFR, PTEN, phospho-AKT et phospho-kinase S6. Grâce à leur puce microfluidique permettant de réaliser des immunohistochimies, les auteurs peuvent quantifier l'expression de ces quatre protéines et classer les tumeurs selon leur pronostic. La miniaturisation des systèmes permet également de combiner différents outils diagnostiques. Ainsi, en couplant des techniques d'immunomarquages et un système de résonance magnétique nucléaire miniaturisé, [SHAO et collab. \[2012\]](#) sont parvenus à filtrer des micro-vésicules sécrétées par les cellules de GBMs. Or la signature moléculaire de ces micro-vésicules est superposable à celle de la tumeur initiale, notamment après traitement par chimiothérapie. Ce système microfluidique peut donc servir d'aide au diagnostic mais aussi à l'évaluation de la réponse thérapeutique. Enfin, la microfluidique permet de multiplier les tests thérapeutiques. Pour comparaison, l'étude de [QUEREDA et collab. \[2018b\]](#) utilise des boîtes de culture de taille standard mais comportant 1536 micro-puits. Les auteurs ont réalisé un criblage avec plus de 3000 drogues (une par micro-puits) en trois réplicats. [LEE et collab. \[2017\]](#) utilisent quant à eux un système de microfluidique de la taille d'une pièce de monnaie permettant de tester 72 drogues en 7 réplicats à la fois. Tous ces

exemples montrent que la microfluidique permet non seulement de développer des dispositifs expérimentaux innovants, mais aussi d'augmenter la production de données, tout en requérant une très faible quantité de matériel biologique.

#### 1.4.4 Systèmes micro-fabriqués pour l'identification et l'analyse des cellules souches de glioblastome

On l'a vu dans le paragraphe 1.3.4, bien que le test de formation de NS constitue une façon simple d'identifier les CSG, la méthodologie de ce test est aussi critiquée. Si certains biais sont intrinsèquement liés au caractère *in vitro* du test, d'autres paramètres de réalisation du test peuvent néanmoins être contrôlés, comme la standardisation des conditions de culture ou le contrôle de l'homogénéité clonale des NS formées. Pour répondre à ces critères de standardisation, les micro-puits constituent le principal type de puce développé pour l'étude de la formation de NS. Dès 2007, l'auto-renouvellement des cellules souches neurales a été testé dans des micro-puits formés de polyéthylène glycol (PEG) [CORDEY et collab. \[2008\]](#). D'autres puces contenant des micro-puits ont ensuite été développées pour les CSG, notamment avec des applications de tests pharmacologiques. [PANG et collab. \[2019\]](#) isolent des cellules de GBM dans des micro-puits en PDMS de tailles différentes. Leur système permet ainsi d'étudier l'impact du confinement sur l'auto-renouvellement des CSG, ainsi que leur réponse à la vincristine. La puce de silice de [GANGULI et collab. \[2021\]](#) reprend l'idée des micro-puits de tailles et de formes différentes. Cependant, cette puce est à "ciel ouvert" et permet de récupérer les NS formées. Les auteurs réalisent ainsi un séquençage d'ARN en cellules uniques, montrant que la signature transcriptomique des cellules dans la puce est similaire à celle des xéno greffes de tumeurs de patients dans des souris. Cette étude suggère également que, si la taille et la forme des micro-puits ont un impact sur la prolifération cellulaire, la mortalité cellulaire ne semble en revanche pas modifiée. Enfin les auteurs ont utilisé leur puce pour tester l'effet du dasatinib sur la mortalité cellulaire. D'autres systèmes microfluidiques ont également été développés pour l'étude des GSC. Selon leur contenu, les cellules ont une polarité – au sens électrique – différente. La puce microfluidique de [ALINEZHADBALALAMI et collab. \[2019\]](#) tire parti de cette différence de polarité entre les cellules souches et les cellules différenciées de GBM afin de les séparer par diélectrophorèse. Il s'avère que les cellules isolées par un champ électrique plus important forment plus de NS et expriment plus de marqueurs associés aux CSG. Enfin, citons l'étude originale de [STEVENS et collab. \[2016\]](#), qui utilise l'accumulation de masse flottante pour séparer les cellules souches des cellules différenciées de GBM. La masse flottante est le produit du volume de la cellule par la différence en la densité de la cellule et la densité de l'eau ( $m_{flottante} = V_{cellule}(\rho_{cellule} - \rho_{eau})$ ) et est directement reliée à la masse sèche des cellules (c'est-à-dire leur contenu non-hydrique) [GODIN et collab. \[2010\]](#). Le passage de cellules dans des port-à-faux microfabriqués fait vibrer le système à une certaine fréquence. Or l'accumulation de masse flottante est inversement corrélée à la fréquence. Selon les variations de fréquence, les auteurs peuvent donc déterminer l'accumulation de masse flottante de la cellule. Aussi élégant et ingénieux que puisse être ce système microfluidique, il s'avère malheureusement que l'accumulation de masse ne permet pas de différencier les cellules souches des cellules différenciées de GBM.

La microfluidique apporte donc des méthodes innovantes, économiques et reproductibles à grande échelle pour l'étude des CSG. Mais l'augmentation de la quantité de données générées implique une adaptation des systèmes d'analyse. Les récents développements en intelligence artificielle apportent justement de nouvelles méthodes d'analyse d'images dont la fiabilité et la performance reposent notamment sur la quantité de données fournies aux algorithmes.

## 1.5 Analyse d'images par intelligence artificielle

### 1.5.1 Historique et définitions

Afin de bien définir ce que l'expression "intelligence artificielle" recouvre, il convient de la replacer dans son contexte historique. Désormais bien connu dans la culture populaire, Alan TURING propose en 1950 son célèbre test d'imitation dans un article intitulé *Computing machine and intelligence* [TURING \[1950\]](#). Si le propos de l'article est d'expliquer pédagogiquement les notions de machine et d'ordinateur, Alan TURING y détaille aussi des méthodes d'apprentissage par les machines. Mais c'est en 1955 que le terme d'intelligence artificielle est utilisé pour la première fois, lors de la Conférence de Dartmouth sur l'intelligence artificielle [MCCARTHY et collab. \[1955\]](#). La note d'intention de la conférence précise que l'expression d'intelligence artificielle consiste en "le fait qu'une machine se comporte d'une façon qu'on aurait qualifiée d'intelligente si une personne humaine l'avait effectuée". Peu de temps après, en 1958, Franck ROSENBLATT propose le modèle théorique du perceptron : le premier neurone artificiel (nous décrivons en détails le neurone artificiel dans le paragraphe 1.5.2). Si les recherches sur l'intelligence artificielle se sont poursuivies, le domaine a connu de longues périodes d'hibernation en raison des capacités calculatoires limitées des ordinateurs de l'époque. Il faudra attendre les progrès des cartes graphiques dans les années 2000 pour pouvoir fournir assez de puissance de calcul aux algorithmes d'intelligence artificielle, notamment ceux utilisant les réseaux de neurones. L'année 2016 fera ainsi date car pour la première fois, une intelligence artificielle, AlphaGo, bat le champion européen de Go Fan HUI [SILVER et collab. \[2016\]](#). AlphaGo a été entraîné sur une base de données regroupant des coups de joueur.se.s expérimenté.e.s, puis en analysant la position des pièces, il va prédire le meilleur coup à jouer.

Maintenant que les jalons historiques sont posés, nous pouvons éclaircir ce que nous voulons dire par intelligence artificielle pour le reste de notre manuscrit. Nous utilisons pour cela la définition proposée par Marvin MINSKY (l'un des participants de la conférence de Dartmouth [MCCARTHY et collab. \[1955\]](#) et par ailleurs à l'origine de la microscopie confocale) dans son ouvrage publié en 1969 : l'intelligence artificielle est "la science du développement de machines qui réalisent des choses que les humains font en utilisant leur intelligence" [MINSKY \[1969\]](#). Cette définition est donc très large et englobe beaucoup de processus informatiques. L'apprentissage intelligent, que nous appellerons machine learning dans le reste de l'ouvrage, est une branche de l'intelligence artificielle. Issu d'un concept développé au début des années 1980, le machine learning désigne les algorithmes entraînés à partir de statistiques issues de bases de données empiriques [LANGLEY \[2011\]](#). L'apprentissage profond, ou deep learning – terme que nous privilégierons dans ce manuscrit, provient lui-même de la recherche sur le machine learning dans le milieu des années 1980. Les algorithmes de deep learning reposent sur des couches de neurones artificiels (plus il y a de couches de neurones et plus l'algorithme est dit "profond"). Les algorithmes de machine learning n'utilisant pas des réseaux de neurones sont qualifiés d'apprentissage superficiel (ou shallow learning) (Figure 1.5) [DETCHEK \[1986\]](#). Enfin, évoquons l'apprentissage par transfert, traduction de transfer learning – terme que nous préférons pour le reste de l'ouvrage, qui consiste à faire apprendre une nouvelle tâche à des algorithmes de machine learning déjà entraînés à d'autres problèmes. Le transfer learning permet ainsi de diminuer le temps d'apprentissage de la nouvelle tâche tout en augmentant ses performances [PRATT et THRUN \[1997\]](#).

### 1.5.2 Le deep learning expliqué au profane

Ce paragraphe a été écrit pour expliquer plus en profondeur le deep learning aux personnes sans aucune formation dans le domaine, mais avec un niveau de mathématique au moins équivalent à celui collège.

Définition des termes techniques :

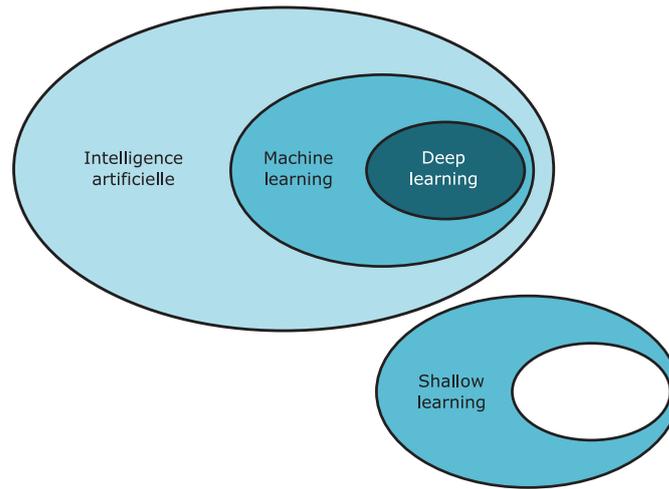


FIGURE 1.5 – **Représentation schématique de l'intelligence artificielle.** Le terme "intelligence artificielle" recouvre les notions d'apprentissage intelligent (ou machine learning), du deep learning (ou apprentissage profond) et de l'apprentissage superficiel (ou shallow learning).

— Le neurone artificiel. Avant d'aborder la définition brute du neurone artificiel, arrêtons-nous quelques instants sur le neurone biologique. Un neurone biologique est connecté en amont à des neurones afférents et en aval à des neurones efférents. L'influx nerveux des neurones afférents libère de l'acétylcholine dans la synapse. Cette molécule, si elle libérée en quantité suffisante va induire une dépolarisation dans le soma du neurone. Si la dépolarisation dépasse le seuil de  $-55\text{mV}$ , elle génère un potentiel d'action qui est transmis le long de l'axone jusqu'à la synapse avec le neurone efférent. Le fonctionnement des neurones artificiels n'est pas si différent (Figure 1.6). Les influx nerveux afférents sont appelés valeurs d'entrée et la pondération de ces valeurs mime la quantité d'acétylcholine libérée. La dépolarisation induite par l'acétylcholine est représentée par l'application d'une fonction d'activation sur les valeurs d'entrée dans le neurone artificiel. Enfin, le neurone efférent sur lequel se projette l'axone est appelé sortie. La nature silicée du neurone artificiel n'est cependant pas l'unique différence avec la structure carbonée du neurone biologique. Les valeurs d'entrée sont ici numériques et non biochimiques. Ce qu'on nomme "Entrée" du neurone artificiel est ainsi un modèle linéaire constitué de la somme des valeurs d'entrée pondérées et du biais (voir plus loin). Les analogies et différences étant expliquées, nous pouvons désormais donner la définition du neurone artificiel : le neurone artificiel est un classificateur d'un modèle linéaire avec un modèle entrée-sortie [PATTERSON et GIBSON \[2017\]](#). La formalisation mathématique du *neurone<sub>i</sub>* est la suivante :

$$\text{Entrée}_i = W_i \cdot A_i + b \quad (1.1)$$

et

$$\text{Sortie}_i = g(\text{Entrée}_i) \quad (1.2)$$

$A_i$  représente la somme des valeurs afférentes au *neurone<sub>i</sub>* ;  $W_i$  est le poids appliqué à chacune de ces valeurs ;  $b$  est le biais qui s'applique à l'ensemble de la couche du *neurone<sub>i</sub>* afin de forcer l'activation de certains neurones de la couche (améliore l'apprentissage) ;  $g$  constitue la fonction d'activation du *neurone<sub>i</sub>*, elle détermine l'activation du *neurone<sub>i</sub>* en fonction de l'entrée et produit le résultat de l'activation du *neurone<sub>i</sub>*. Pour le reste de l'ouvrage, lorsque nous parlerons de neurone artificiel, nous utiliserons simplement le terme neurone.

— Les couches de neurones [PATTERSON et GIBSON \[2017\]](#) ; [VANNIEUWENHUYZE \[2019\]](#). On l'a vu dans le paragraphe précédent 1.5.1, le deep learning implique la présence de couches de neurones. Pour simplifier les explications, nous allons considérer un réseau de neurones à seulement trois couches : la couche d'entrée, la couche cachée et la couche de sortie. La couche d'entrée

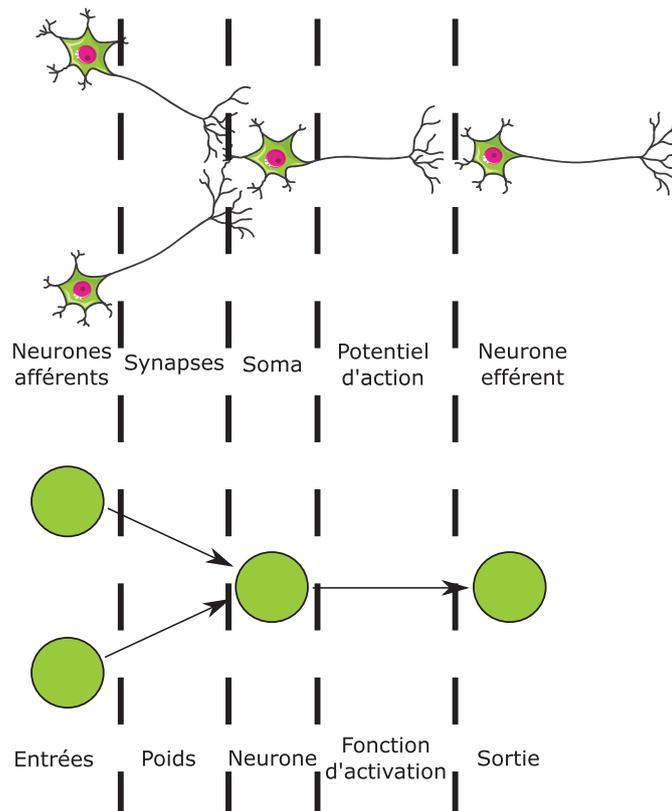


FIGURE 1.6 – **Analogie entre le neurone biologique et le neurone artificiel.** Le neurone artificiel est inspiré du neurone biologique. De même que la propagation de l’influx se fait des neurones afférents jusqu’au neurone efférent, les données numériques proviennent des neurones d’entrées et se projettent sur les neurones de sortie. La fonction d’activation du neurone mime le potentiel d’action.

correspond aux neurones qui vont produire les valeurs d’entrée, c’est-à-dire l’information à analyser. La couche cachée correspond aux neurones qui vont apprendre en s’entraînant sur les données issues des neurones de la couche d’entrée. Enfin les neurones de la couche de sortie sont les neurones qui vont faire des prédictions statistiques à partir de l’apprentissage des neurones de la couche cachée. Le réseau ainsi décrit est similaire au réseau de neurones biologiques comprenant les neurones afférents et efférents (Figures 1.6 et 1.7).

A ce moment de l’exposé, plusieurs questions légitimes peuvent être posées. Tout d’abord, pourquoi avoir besoin de plusieurs neurones? Un neurone simple ne suffirait-il pas à faire des prédictions statistiques? En effet, un neurone simple permet la résolution de problèmes linéaires. Pour illustrer ce propos, considérons un système à deux paramètres A et B, qui peuvent chacun être dans deux états (0 et 1). Tel que représenté sur la figure 1.8, on va donc avoir quatre configurations possibles : A-Non/B-Non, A-Oui/B-Non, A-Non/B-Oui et enfin A-Oui/B-Oui. Un problème linéaire consiste à tracer une droite séparant deux catégories de points. On peut par exemple résoudre le problème de séparation du point A-Oui/B-Oui (Figure 1.8a), ou bien le problème de séparations des points A-Oui/B-Oui OU A-Oui/B-Non OU A-Non/B-Oui (Figure 1.8b) (on parle de OU inclusif, c’est-à-dire peu importe si un paramètre est Non tant que l’autre est Oui). En revanche, on réalise qu’il est impossible avec une seule droite de séparer les points A-Oui/B-Non ET A-Non/B-Oui (Figure 1.8c) (s’il faut que strictement un seul paramètre soit Oui, on parle de OU exclusif). Ainsi, un neurone simple ne permet pas la résolution de problèmes non-linéaires. Nous n’irons pas plus loin dans le formalisme mathématique mais pour dessiner une seconde droite sur ce graphique, il convient de rajouter une seconde couche au modèle constitué d’un seul neurone (le lecteur.rice intéressé.e par les démonstrations mathématiques trouvera sans problème en ligne une documentation foisonnante sur le sujet).

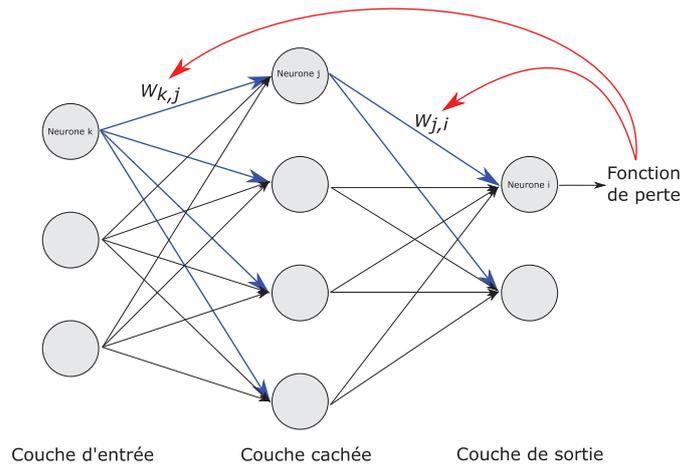
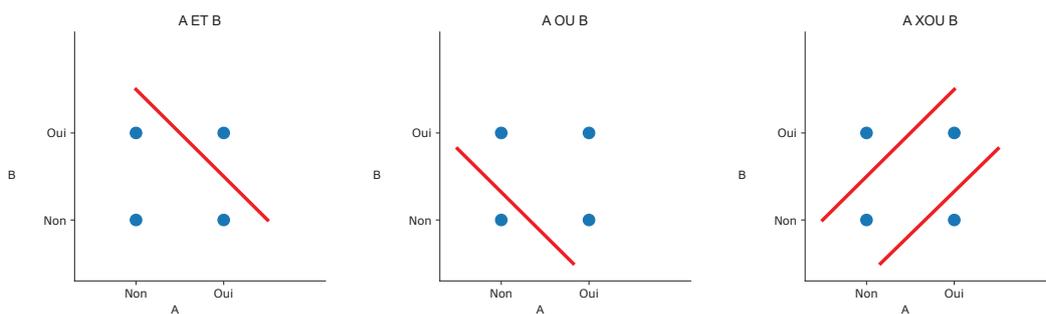


FIGURE 1.7 – **Réseau de neurones et rétropropagation.** Le neurone k fait partie de la couche d'entrée. Il envoie son information sur le neurone j de la couche cachée. Si le neurone j est activé, il va à son tour projeter le résultat de son activation sur le neurone i de la couche de sortie. Enfin, selon les données transmises, le neurone i fait une prédiction statistique. La fonction de perte calcule l'erreur entre la prédiction et la réalité. Grâce à la rétropropagation du gradient, les poids  $W_{k,j}$  et  $W_{j,i}$  entre respectivement le neurone k et le neurone j et entre le neurone j et le neurone i sont ajustés.

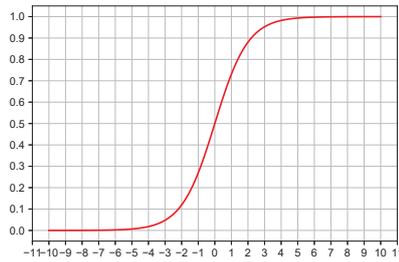


(a) Problème linéaire ET : A-Oui/B-Oui. (b) Problème linéaire OU inclusif : A-Oui/B-Oui OU A-Oui/B-Non OU A-Non/B-Oui. (c) Problème non linéaire OU exclusif (XOR) : A-Oui/B-Non ET A-Non/B-Oui.

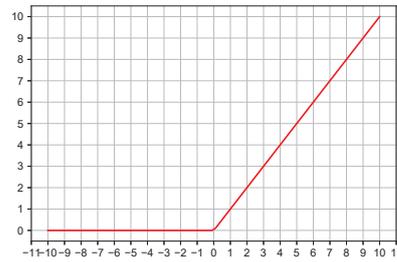
FIGURE 1.8 – **Problèmes linéaires et non linéaires.** Détecter un point qui satisfait la condition A-Oui ET B-Oui est un problème linéaire car il ne nécessite de dessiner qu'une seule droite (a). De même, le problème du OU inclusif pour détecter les points où A OU B est Oui est un problème linéaire (b). En revanche, détecter les points où seulement A OU B est Oui à l'EXCLUSION du point où A ET B sont Oui est un problème non linéaire car il nécessite deux droites (c).

— La fonction d'activation **PATTERSON et GIBSON [2017]**. La fonction d'activation est la fonction qui va permettre au neurone de passer l'information qu'il a reçu de la couche d'entrée vers la couche de sortie. Le but de cette fonction d'activation est d'apporter une non-linéarité au réseau de neurones, c'est-à-dire qu'elle va permettre au réseau de mieux traiter les problèmes non-linéaires. Les fonctions d'activation appartiennent généralement à la famille des fonctions sigmoïdes : cela permet de réduire les valeurs extrêmes et de donner un résultat compris entre 0 et 1 (Figure 1.9a). Détaillons plus précisément deux fonctions d'activation. Tout d'abord la fonction Softmax qui est utilisée pour résoudre des problèmes multi-classes. Ainsi, chaque classe se voit attribuer une probabilité entre 0 et 1. La fonction de rectification linéaire (ou ReLU) est une fonction linéaire lorsque la valeur d'entrée dépasse 0, sinon son résultat est nul (Figure 1.9b). Ce n'est pas une fonction linéaire car son gradient est nul ou constant. Il n'y a donc pas de risque de disparition de gradient comme avec la fonction sigmoïde (voir plus loin pour l'explication de la descente de gradient). En outre, elle permet un meilleur apprentissage que la fonction sigmoïde dans les

couches de neurones.



(a) Fonction sigmoïde.



(b) Fonction ReLU.

FIGURE 1.9 – **Fonctions sigmoïde et ReLU.** La fonction sigmoïde (a) est une fonction logistique utilisée dans les problèmes de prédiction de classes. La fonction ReLU n'est pas une fonction linéaire et permet un meilleur apprentissage (b).

— L'entraînement [PATTERSON et GIBSON \[2017\]](#). On l'a vu, le deep learning consiste en l'application de fonctions mathématiques sur des données afin de générer des prédictions statistiques. Mais pour arriver aux prédictions les plus justes possible, il faut que les fonctions mathématiques soient le plus optimisées possible. C'est pour cela que les réseaux de neurones doivent être entraînés sur une base de données d'apprentissage. A la fin de l'apprentissage, les erreurs de prédictions par rapport à la réalité doivent être identifiées et les poids et biais du réseaux modifiés en conséquences. La rétropropagation du gradient permet justement une automatisation itérative de cette étape (Figure 1.7). Pour clarifier ce processus, écrivons le en code formel :

La base de données d'entraînement est divisée en plusieurs échantillons  
Jusqu'à une erreur acceptable entre prédiction et réalité :

- Pour chaque échantillon :
- - Apprentissage du réseau de neurones
- - À la fin de l'apprentissage, calcul de l'erreur entre prédictions et réalité
- - Ajustement des poids et des biais

La rétropropagation du gradient étant expliquée avec les mains, nous pouvons passer au formalisme mathématique [HUGEGENE \[2019\]](#) :

$$W_{j,i} = W_{j,i} + \alpha \cdot \frac{\delta L}{\delta W_{j,i}} \quad (1.3)$$

Pour mieux comprendre le lien entre la fonction de perte et la rétropropagation, on va projeter la fonction de perte en fonction des poids ajustés au cours des apprentissages. Pour un poids donné  $W_{j,i}$  entre un neurone de la couche  $j$  et un neurone de la couche  $i$ , on va calculer la dérivée de la fonction de perte  $L$  en ce point. On appelle cette dérivée le gradient et le but est de "descendre" ce gradient, c'est-à-dire qu'il soit le plus petit possible. La rétropropagation consiste justement à modifier le poids  $W_{j,i}$  de telle sorte qu'au prochain apprentissage le gradient de  $L$  soit réduit.  $\alpha$  est appelé taux d'apprentissage et sert à moduler l'ajustement afin d'éviter que l'ajustement soit ou trop important ou insignifiant (c'est la disparition de gradient évoquée lorsque nous parlions des fonctions d'activation). La fonction de perte, ou fonction de coût, est la fonction qui quantifie la différence entre la réalité et la prédiction du réseau de neurones. Plusieurs fonctions peuvent être utilisées selon le cas de figure. L'erreur quadratique moyenne est le plus souvent utilisée quand il s'agit d'un problème de régression, tandis que les prédictions de classification seront plutôt évaluées par des pertes logistiques (voir plus loin).

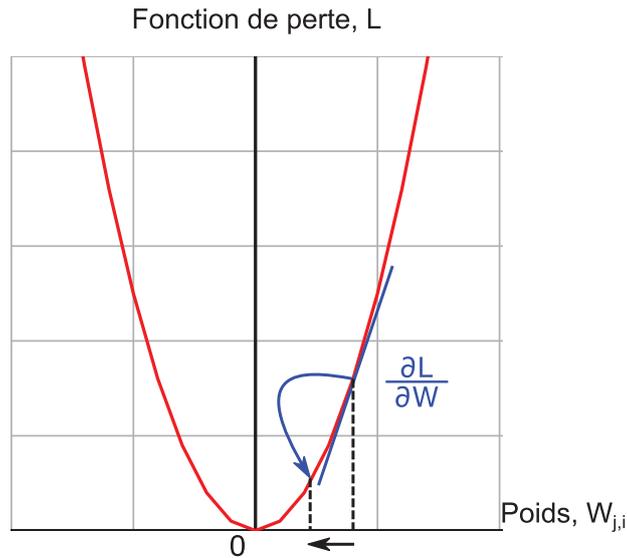


FIGURE 1.10 – **Fonction de perte et descente de gradient.** Le graphique représente la fonction de perte  $L$  (en l'occurrence l'erreur quadratique moyenne) en fonction du poids  $W_{j,i}$  entre le neurone  $j$  et le neurone  $i$  de la figure 1.7. A la fin d'une phase d'apprentissage, le gradient de  $L$  est calculé (droite bleue). La descente de gradient (flèche bleue) consiste à ajuster le poids  $W_{j,i}$  afin que le gradient soit le plus petit possible (flèche noire). Exemple adapté de HUGEGENE [2019].

— Apprentissage supervisé et non supervisé AZENCOTT [2018]. L'apprentissage supervisé consiste à faire apprendre des prédictions à partir d'exemples étiquetés. L'apprentissage supervisé explore donc les problèmes de classification, où l'espace des étiquettes à prédire est discret et fini (après avoir soumis des sphéroïdes de cellules cancéreuses à diverses chimiothérapies, BENNING et collab. [2020] classent ces sphéroïdes entre chimio-sensibles, peu chimio-sensibles et chimio-résistants); et les problèmes de régression, dans ce cas les étiquettes à prédire appartiennent à l'ensemble  $\mathbb{R}$  (l'algorithme développé par COURTIOL et collab. [2019] prédit la survie d'un.e patient.e en fonction de ses données clinico-biologiques). Le but de l'apprentissage non supervisé est d'apprendre une fonction sur l'ensemble  $X$  qui vérifie les propriétés de cet ensemble. On va ainsi trouver les problèmes de partitionnement (ou clustering) qui consistent à créer des partitions dans l'ensemble  $X$  (par exemple étudier l'hétérogénéité cellulaire à partir de données transcriptomiques RICHARD et collab. [2016]); les problèmes de réduction de dimension, c'est-à-dire trouver un ensemble  $Z$  avec moins de dimensions que l'ensemble  $X$  (toujours dans le même article, RICHARD et collab. [2016] représentent les données transcriptomiques dans un espace bidimensionnel); et les problèmes d'estimations de densité de l'ensemble  $X$  (GONÇALVES et collab. [2020] développent un algorithme qui identifie la distribution des données expérimentales pour que leur analyse soit adéquate).

### 1.5.3 Les réseaux de neurones convolutifs

Depuis les premières études sur le cortex visuel débutées dans les années 1960, nous savons que les neurones des aires visuelles s'organisent de façon hiérarchique. Si les premières couches de neurones identifient des motifs simples, plus les couches sont profondes et plus les neurones peuvent reconnaître des formes complexes. Cette organisation neuronale a inspiré le chercheur.euse.s en analyse d'images dès les années 1980. Il faut attendre les années 2000 et l'amélioration des processeurs pour que les premiers réseaux de neurones dits convolutifs deviennent performants LINDSAY [2020]. Ces réseaux de neurones convolutifs (RNC) sont depuis largement utilisés dans le domaine de l'analyse d'images par rapport aux autres algorithmes de deep lear-

ning car ils demandent moins de ressources calculatoires, ils peuvent analyser une grande variété de paramètres contenus dans les images et ils sont facilement modifiables selon les problématiques ALZUBAIDI et collab. [2021].

Un RNC est un réseau de neurones où les couches cachées sont constituées d'une séquence d'une couche de convolution et d'une couche de mise en commun (ou pooling) PATTERSON et GIBSON [2017]. Une convolution est une opération mathématique qui fait glisser une fonction par-dessus une autre et mesure l'intégrale de leur multiplication ponctuelle (Figure 1.11) GÉRON [2020].

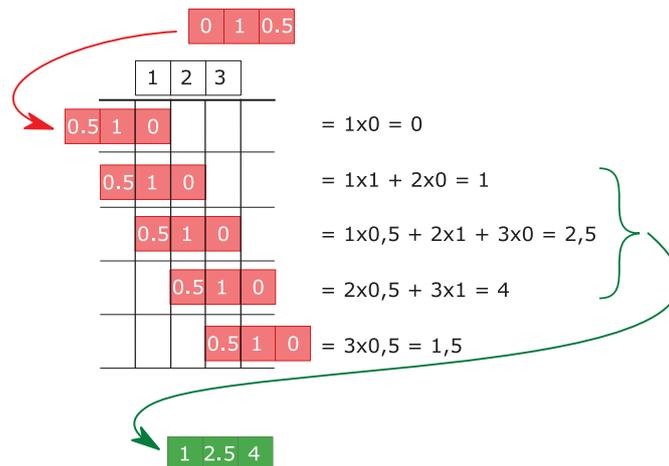


FIGURE 1.11 – **Convolution.** Explication de la convolution de la matrice d'entrée [1 ; 2 ; 3] par la matrice filtre [0 ; 1 ; 0,5]. La matrice filtre est "retournée" et son premier élément (0) est multiplié au premier élément de la matrice d'entrée (1). Le premier élément de la matrice de sortie qui résulte de cette convolution est donc  $0 \times 1 = 0$ . La matrice filtre est ensuite décalée d'un cran vers la droite. Le deuxième élément de la matrice de sortie est donc la somme du produit du premier élément de la matrice filtre avec le deuxième élément de la matrice d'entrée ( $0 \times 2 = 0$ ) et du produit du deuxième élément de la matrice filtre avec le premier élément de la matrice d'entrée ( $1 \times 1 = 1$ ), soit  $0 + 1 = 1$ . On procède ainsi de suite jusqu'à ce que tous les éléments de la matrice filtre aient multiplié tous les éléments de la matrice d'entrée. À la fin, on obtient la matrice de sortie [0 ; 1 ; 2,5 ; 4 ; 1,5]. Habituellement en analyse d'images, on supprime les éléments des bords pour ne garder qu'une matrice de sortie qui a les mêmes dimensions que la matrice d'entrée (en l'occurrence trois valeurs, donc la matrice de sortie est égale à [1 ; 2,5 ; 4]). Exemple adapté de NUMPY.

Un noyau de convolution (ou kernel) est, en analyse d'images, un filtre utilisé lors de la convolution pour faire ressortir de l'image les caractéristiques se rapprochant du filtre (Figure 1.12) GÉRON [2020].

La mise en commun (ou pooling) est le sous-échantillonnage (rétrécissement) de l'image d'entrée afin de réduire la charge de calcul. La mise en commun maximum (ou maxpooling) est la méthode la plus utilisée car elle permet de diminuer les invariances des images liées aux rotations ou aux échelles différentes (Figure 1.13) GÉRON [2020].

La sortie de la dernière séquence de convolution-pooling est une couche de neurones classique, dite couche entièrement connectée (CEC). Une CEC est une couche de neurones qui ont des connexions avec toutes les sorties de la couche précédente. Dans le cas de la première CEC, les entrées sont constituées de l'ensemble des pixels issus de la dernière couche de convolution PATTERSON et GIBSON [2017]. Le RNC peut contenir une ou plusieurs CEC. L'abandon (ou dropout) est la désactivation des neurones de manière aléatoire dans la CEC afin qu'ils ne participent pas à l'apprentissage ni à la rétropropagation. Le dropout améliore l'apprentissage PATTERSON et GIBSON [2017]. La couche de sortie du RNC est la couche qui produit la prédiction. Elle est composée de N neurones, N étant le nombre de classes à prédire (Figure 1.14) GÉRON [2020]; PATTERSON et GIBSON [2017].

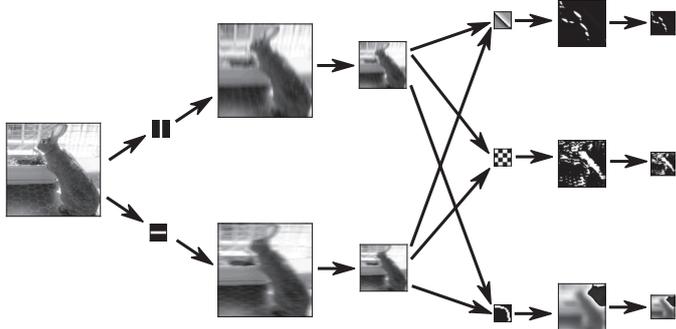


FIGURE 1.12 – **Noyau de convolution.** Les caractéristiques de l’image initiale sont mise en évidence par les noyaux de convolution, ou filtres. Les barreaux verticaux du grillage ressortent après la convolution de l’image initiale par le filtre constitué d’une barre verticale centrale (le produit des pixels sera nul à l’exception de ceux se trouvant dans la bande blanche). De même, le filtre constitué d’une barre horizontale met en valeur les barreaux horizontaux du grillage, les détails du bac de fleurs ainsi que les bords horizontaux des tomates du carrelage. La couche de mise en commun, ou pooling reçoit ensuite les produits de convolution (dans de cas une fonction de maxpooling (Figure 1.13)). Une nouvelle couche de convolution est appliquée aux images résultantes. Les bords obliques en bas et à droite sont soulignés par le premier filtre. Les textures du pelage et des fleurs sont mises en valeur par le deuxième filtre. Enfin le troisième filtre fait ressortir les courbes. Une couche de maxpooling est à nouveau appliquée aux images de sortie.

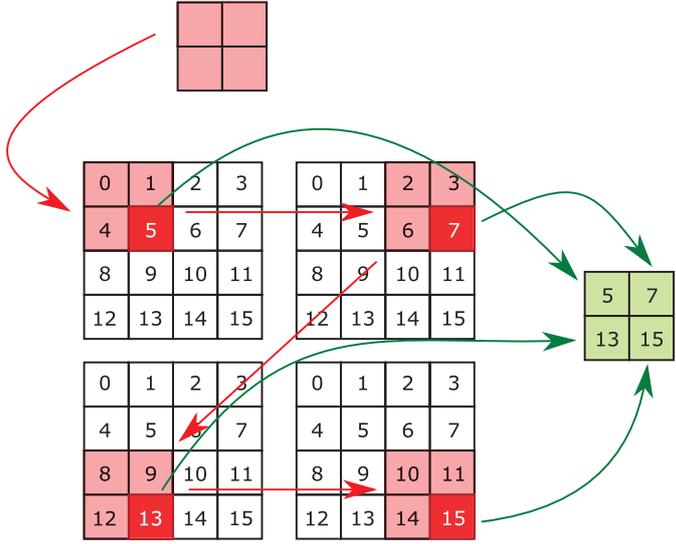


FIGURE 1.13 – **Maxpooling.** Le noyau de la couche de maxpooling mesure 2 pixels par 2 pixels. Il se déplace avec un pas de 2 pixels sur l’image d’entrée. A chaque étape, seul le pixel dont la valeur est la plus grande est conservé. On aboutit donc à une image de sortie dont les dimensions ont été réduites de moitié. On constate que si on effectue une rotation de l’image initiale, ou bien si sa taille est changée (en conservant le nombre de pixels), le maxpooling donne le même résultat. Adapté de [SCIKIT-IMAGE](#).

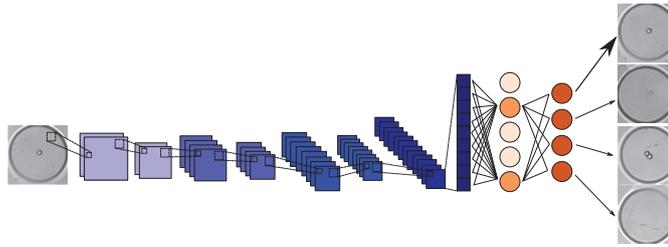


FIGURE 1.14 – **Un réseau de neurones convolutifs que nous avons développé.** Ce réseau de neurones convolutifs que nous avons développé possède quatre couches de convolution qui comportent respectivement 8, 16, 32 et 64 filtres de 15x15 pixels. Les trois premières couches de convolutions sont suivies par une couche de maxpooling. Les données sont ensuite linéarisées et injectées dans la première couche de neurones entièrement connectée (1024 neurones avec un dropout de 80%). La seconde couche de neurones entièrement connectée prédit l'appartenance de l'image d'entrée entre quatre classes : 0 cellule, 1 cellule, 2 cellules ou plus ou 1 cellule morte.

Voyons maintenant plus en détail quelques applications biologiques du deep learning.

#### 1.5.4 Exemples d'applications de l'intelligence artificielle aux problématiques biologiques

Dans le contexte de la recherche sur le GBM, les réseaux de neurones sont régulièrement utilisés depuis quelques années. À partir de la base de données de l'Atlas génomique du cancer (connu sous le nom de The Cancer Genome Atlas), [WONG et collab. \[2019\]](#) ont développé un modèle qui compare les mutations séquencées au pronostic des patients. Il s'agit donc d'un problème de régression où la survie du malade est prédite à partir du profil génétique du GBM. Le réseau de neurones de [BAE et collab. \[2020\]](#) aborde quant à lui le problème de la classification des images radiologiques cérébrales. Le but de ce modèle est de distinguer les images de GBM des images de métastases cérébrales. Pour cela, les chercheurs extraient des paramètres des images avant de les injecter dans le réseau de neurones. Celui-ci va apprendre les paramètres correspondants aux images de GBM et ceux décrivant les images de métastases. Enfin, on l'a vu dans le paragraphe précédent [1.5.3](#), les RNC sont particulièrement adaptés à l'analyse d'images. Le modèle développé par [ERTOSUN et RUBIN \[2015\]](#) pose le problème de la classification multi-classes. La base de données d'apprentissage comporte des coupes anatomo-pathologiques de gliomes de grade II, III et de GBM. Dans un premier temps, le but est de différencier les images de GBM des gliomes de bas grades (II et III). Pour cela, un RNC de 4 couches de convolution est suffisant. En revanche, pour distinguer les images de gliomes de grade II et de grade III, 6 couches de convolution sont nécessaires. La complexité du calcul souligne la différence subtile entre la classification des gliomes de grade II et III.

Le deep learning est également largement utilisé pour la recherche sur les cellules souches cancéreuses. [ANAGNOSTIDIS et collab. \[2020\]](#) couplent ainsi un système microfluidique à un RNC pour sélectionner des gouttelettes contenant une seule cellule. Si la cellule possède la propriété d'auto-renouvellement, un sphéroïde sera ensuite détecté dans la gouttelette. Malgré l'ingéniosité de ce système, le RNC a été entraîné sur des billes de polyacrylamide, de tailles et de formes beaucoup plus homogènes que des vraies cellules. L'enrichissement en cellules capables d'auto-renouvellement est également le but du RNC développé par [RIBA et collab. \[2020\]](#). Toujours à partir d'images de cellules isolées dans un dispositif de tri cellulaire, le but de l'étude est de différencier en temps réel les cellules mortes des cellules vivantes. Ce procédé permet d'augmenter la proportion de cellules capables de former des colonies, c'est-à-dire qui possèdent la propriété d'auto-renouvellement. Enfin, [CHEN et collab. \[2020\]](#) abordent un problème de régression. À partir d'images de CSC fluorescentes, leur but est de prédire la taille de la sphère formée au bout de deux semaines à partir de la taille des cellules uniques au début de l'expérience. Si la probléma-

tique est intéressante, leur algorithme ne parvient à prédire la taille des sphères qu'à partir du quatrième jour de l'expérience, c'est-à-dire que les cellules ont déjà commencé à faire des petites sphères.

Stoppons ici notre revue de la littérature. Cette partie a été écrite de telle sorte que le lecteur puisse comprendre toutes les notions abordées dans la suite de l'ouvrage. Nous avons pris le parti d'une introduction didactique et pragmatique plutôt que de perdre le lecteur dans une bibliographie exhaustive et fastidieuse. Terminons ce chapitre en synthétisant les questions soulevées aux cours des précédents paragraphes afin de faire émerger une problématique générale et les questions qui en découlent.

## 1.6 Problématique

On l'a vu dans le paragraphe 1.3.2, à cause de leur hétérogénéité et de leur plasticité, il n'existe pas de marqueur moléculaire capable d'identifier spécifiquement les CSC. La quête inachevée du marqueur universel amène alors des questions sur la réalité fonctionnelle des CSC d'une part et sur la définition d'une CSC d'autre part. Or, comme on l'a rappelé dans le tout premier paragraphe 1.1.1, une cellule qui possède les propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence est souche. Tenter d'identifier une cellule souche en omettant de caractériser ces propriétés est donc critiquable. D'autre part, nous avons expliqué dans le paragraphe 1.3.4 que le test de formation de NS est justement une méthode simple et fiable pour identifier fonctionnellement les CSC. Mais ici aussi, l'absence de standardisation et l'absence de contrôle de l'homogénéité clonale des NS formées font que la crédibilité de ce test est régulièrement remise en cause.

Nous nous trouvons donc à la croisée de deux problèmes : 1) Les méthodes moléculaires traditionnelles ne permettent pas d'identifier fonctionnellement les CSC et 2) une des méthodes les plus pratiques pour identifier de façon fonctionnelle les CSC souffre de son manque de standardisation. Dès lors, serait-il envisageable d'adapter le test de formation de NS afin de concevoir une méthode pertinente et rigoureuse pour identifier fonctionnellement les CSC? Pour répondre à cette problématique, nous avons combiné un système microfabriqué compatible avec la culture cellulaire avec des algorithmes d'analyses d'images par intelligence artificielle. Ce travail a comme premier objectif de développer une plateforme pour identifier de façon fiable, reproductible, automatique et à haut débit les CSC. Le second but de notre étude est d'apporter la preuve de concept que notre plateforme permet d'explorer les propriétés dynamiques des cellules, souches ou non souches, afin de déterminer lesquelles de ces propriétés sont prédictives du phénotype souche.

Pour parvenir à réaliser ces deux objectifs, il nous a fallu faire face à plusieurs défis technologiques. Le premier problème est celui de l'optimisation de la puce microfabriquée. Le contrôle des paramètres de fabrication et d'utilisation de la puce est nécessaire pour garantir la reproductibilité et la standardisation de son utilisation. Au niveau de la culture cellulaire, nous avons optimisé l'ensemencement de la puce, mais également les conditions de culture cellulaire au long cours dans la puce microfabriquée. La standardisation des processus de fabrication et d'optimisation de la culture cellulaire a été contrôlée statistiquement.

Le traitement de données a également demandé beaucoup de travail. D'une part, il a fallu faire face à l'énorme quantité d'images produite par notre plateforme. De plus, l'identification automatique des CSC à partir de ces images s'est avérée être une question très complexe. Nous avons démontré que la puissance calculatoire de l'analyse d'images par deep learning est nécessaire pour identifier de façon précise et rapide les CSC. Notre algorithme fondé sur l'intelligence artificielle nous permet de suivre le destin des cellules à court terme (division ou mort cellulaire) et à long terme (formation d'une NS ou mort ou quiescence).

Après avoir établi les processus pré- et post-analytiques, nous avons abordé le versant biologique de la problématique. Les expériences de vidéomicroscopie que nous avons réalisées avec notre plateforme nous permettent de suivre sur plusieurs jours les propriétés précoces des cellules (division ou mort ou aucun des deux) ainsi que leurs propriétés tardives (formation d'une NS ou mort ou quiescence). Ainsi, avec ces deux informations dynamiques, nous pouvons non seulement identifier rétrospectivement les CSC, mais également corrélérer leurs propriétés précoces avec leurs propriétés souches. Dit autrement, nous avons démontré une corrélation entre la précocité de la 1<sup>ère</sup> division cellulaire et la possession des propriétés souches. Nous avons également testé la force de cette corrélation en soumettant les cellules à des stress pharmacologiques. Enfin, notre travail s'ouvre sur la possibilité de micro-pipetter spécifiquement des cellules partageant un phénotype commun, afin de pouvoir réaliser des analyses sur des sous-populations de cellules dont l'hétérogénéité phénotypique est réduite.

## 1.7 Références

- AFIFY, S. M. et M. SENO. 2019, «Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells : Undercurrent of Cancer Initiation», *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 3, doi :10.3390/cancers11030345, p. E345, ISSN 2072-6694. [3](#)
- AL-HAJJ, M., M. S. WICHA, A. BENITO-HERNANDEZ, S. J. MORRISON et M. F. CLARKE. 2003, «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, n° 7, doi :10.1073/pnas.0530291100, p. 3983–3988, ISSN 0027-8424. [3](#)
- ALINEZHADBALALAMI, N., T. A. DOUGLAS, N. BALANI, S. S. VERBRIDGE et R. V. DAVALOS. 2019, «The feasibility of using dielectrophoresis for isolation of glioblastoma subpopulations with increased stemness», *Electrophoresis*, vol. 40, n° 18-19, doi:10.1002/elps.201900026, p. 2592–2600, ISSN 1522-2683. [18](#)
- ALZUBAIDI, L., J. ZHANG, A. J. HUMAIDI, A. AL-DUJAILI, Y. DUAN, O. AL-SHAMMA, J. SANTAMARÍA, M. A. FADHEL, M. AL-AMIDIE et L. FARHAN. 2021, «Review of deep learning : Concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions», *Journal of Big Data*, vol. 8, n° 1, doi : 10.1186/s40537-021-00444-8, p. 53, ISSN 2196-1115. [25](#)
- ANAGNOSTIDIS, V., B. SHERLOCK, J. METZ, P. MAIR, F. HOLLFELDER et F. GIELEN. 2020, «Deep learning guided image-based droplet sorting for on-demand selection and analysis of single cells and 3D cell cultures», *Lab Chip*, vol. 20, n° 5, doi :10.1039/D0LC00055H, p. 889–900, ISSN 1473-0189. [27](#)
- ANOCEF. 2018, «Traitement des Gliomes malins Grade III et IV OMS», cahier de recherche. [8](#)
- AZENCOTT, C.-A. 2018, *Introduction au Machine Learning*, InfoSup, Dunod, Dunod, Malakoff, ISBN 978-2-10-080153-4. [24](#)
- AZZARELLI, R. 2020, «Organoid Models of Glioblastoma to Study Brain Tumor Stem Cells», *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, doi :10.3389/fcell.2020.00220, p. 220, ISSN 2296-634X. [13](#)
- BAE, S., C. AN, S. S. AHN, H. KIM, K. HAN, S. W. KIM, J. E. PARK, H. S. KIM et S.-K. LEE. 2020, «Robust performance of deep learning for distinguishing glioblastoma from single brain metastasis using radiomic features : Model development and validation», *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41598-020-68980-6, p. 12 110, ISSN 2045-2322. [27](#)
- BARONCHELLI, S., A. BENTIVEGNA, S. REDAELLI, G. RIVA, V. BUTTA, L. PAOLETTA, G. ISIMBALDI, M. MIOZZO, S. TABANO, A. DAGA, D. MARUBBI, M. CATTANEO, I. BIUNNO et L. DALPRÀ. 2013,

- «Delineating the Cytogenomic and Epigenomic Landscapes of Glioma Stem Cell Lines», *PLOS ONE*, vol. 8, n° 2, doi :10.1371/journal.pone.0057462, p. e57 462, ISSN 1932-6203. 9
- BATLLE, E. et H. CLEVERS. 2017, «Cancer stem cells revisited», *Nat Med*, vol. 23, n° 10, doi :10.1038/nm.4409, p. 1124–1134, ISSN 1078-8956, 1546-170X. 3
- BATTAT, S., D. A. WEITZ et G. M. WHITESIDES. 2022, «An outlook on microfluidics : The promise and the challenge», *Lab Chip*, vol. 22, n° 3, doi :10.1039/D1LC00731A, p. 530–536, ISSN 1473-0189. 16
- BAYIN, N. S., A. S. MODREK et D. G. PLACANTONAKIS. 2014, «Glioblastoma stem cells : Molecular characteristics and therapeutic implications», *World J Stem Cells*, vol. 6, n° 2, doi :10.4252/wjsc.v6.i2.230, p. 230–238, ISSN 1948-0210. 13
- BAZZONI, R. et A. BENTIVEGNA. 2019, «Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis», *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 3, doi :10.3390/cancers11030292, p. 292, ISSN 2072-6694. 10
- BEIER, D., P. HAU, M. PROESCHOLDT, A. LOHMEIER, J. WISCHHUSEN, P. J. OEFNER, L. AIGNER, A. BRAWANSKI, U. BOGDahn et C. P. BEIER. 2007, «CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles», *Cancer Res*, vol. 67, n° 9, doi :10.1158/0008-5472.CAN-06-4180, p. 4010–4015, ISSN 0008-5472. 4, 11, 14
- BEN-DAVID, U., G. HA, Y.-Y. TSENG, N. F. GREENWALD, C. OH, J. SHIH, J. M. MCFARLAND, B. WONG, J. S. BOEHM, R. BEROUKHIM et T. R. GOLUB. 2017, «Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution», *Nat. Genet.*, vol. 49, n° 11, doi :10.1038/ng.3967, p. 1567–1575, ISSN 1546-1718. 14, 15
- BENNING, L., A. PEINTNER, G. FINKENZELLER et L. PEINTNER. 2020, «Automated spheroid generation, drug application and efficacy screening using a deep learning classification : A feasibility study», *Scientific Reports*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41598-020-67960-0, p. 11 071, ISSN 2045-2322. 24
- BERABEZ, N. 2018, *Caractérisation Des Cellules Souches Du Glioblastome : Identification de Nouveaux Facteurs Impliqués Dans La Régulation de Leur Transcriptome*, These de doctorat, Lyon. 8
- BLANPAIN, C. et E. FUCHS. 2006, «Epidermal stem cells of the skin», *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 22, doi :10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357, p. 339–373, ISSN 1081-0706. 3
- BLEAU, A.-M., D. HAMBARDZUMYAN, T. OZAWA, E. I. FOMCHENKO, J. T. HUSE, C. W. BRENNAN et E. C. HOLLAND. 2009, «PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells», *Cell Stem Cell*, vol. 4, n° 3, doi :10.1016/j.stem.2009.01.007, p. 226–235, ISSN 1875-9777. 14
- BONDY, M. L., M. E. SCHEURER, B. MALMER, J. S. BARNHOLTZ-SLOAN, F. G. DAVIS, D. IL'YASOVA, C. KRUCHKO, B. J. MCCARTHY, P. RAJARAMAN, J. A. SCHWARTZBAUM, S. SADETZKI, B. SCHLEHOFER, T. TIHAN, J. L. WIEMELS, M. WRENSCH, P. A. BUFFLER et BRAIN TUMOR EPIDEMIOLOGY CONSORTIUM. 2008, «Brain tumor epidemiology : Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium», *Cancer*, vol. 113, n° 7 Suppl, doi :10.1002/cncr.23741, p. 1953–1968, ISSN 0008-543X. 7
- BONNET, D. et J. E. DICK. 1997, «Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell», *Nature Medicine*, vol. 3, n° 7, doi : 10.1038/nm0797-730, p. 730–737, ISSN 1546-170X. 3

- BUTLER, M., L. PONGOR, Y.-T. SU, L. XI, M. RAFFELD, M. QUEZADO, J. TREPPEL, K. ALDAPE, Y. POMMIER et J. WU. 2020, «MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma», *Trends Cancer*, vol. 6, n° 5, doi :10.1016/j.trecan.2020.02.010, p. 380–391, ISSN 2405-8025. 8
- CAPP, J.-P. 2019, «Cancer Stem Cells : From Historical Roots to a New Perspective», *Journal of Oncology*, vol. 2019, doi :10.1155/2019/5189232, p. e5189 232, ISSN 1687-8450. 3
- CHEN, P., K. ALDAPE, J. K. WIENCKE, K. T. KELSEY, R. MIIKE, R. L. DAVIS, J. LIU, A. KESLER-DIAZ, M. TAKAHASHI et M. WRENSCH. 2001, «Ethnicity delineates different genetic pathways in malignant glioma», *Cancer Res*, vol. 61, n° 10, p. 3949–3954, ISSN 0008-5472. 6
- CHEN, X., S. WANGGOU, A. BODALIA, M. ZHU, W. DONG, J. J. FAN, W. C. YIN, H.-K. MIN, M. HU, D. DRAGHICI, W. DOU, F. LI, F. J. COUTINHO, H. WHETSTONE, M. M. KUSHIDA, P. B. DIRKS, Y. SONG, C.-C. HUI, Y. SUN, L.-Y. WANG, X. LI et X. HUANG. 2018, «A Feedforward Mechanism Mediated by Mechanosensitive Ion Channel PIEZO1 and Tissue Mechanics Promotes Glioma Aggression», *Neuron*, vol. 100, n° 4, doi :10.1016/j.neuron.2018.09.046, p. 799–815.e7, ISSN 08966273. 10
- CHEN, Y.-C., Z. ZHANG et E. YOON. 2020, «Early Prediction of Single-Cell Derived Sphere Formation Rate Using Convolutional Neural Network Image Analysis», *Anal Chem*, vol. 92, n° 11, doi :10.1021/acs.analchem.0c00710, p. 7717–7724, ISSN 1520-6882. 27
- CHEUNG, T. H. et T. A. RANDO. 2013, «Molecular regulation of stem cell quiescence», *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 14, n° 6, doi :10.1038/nrm3591, ISSN 1471-0072. 16
- CLEVERS, H. 2011, «The cancer stem cell : Premises, promises and challenges», *Nat Med*, vol. 17, n° 3, doi :10.1038/nm.2304, p. 313–319, ISSN 1546-170X. 3
- COLLÈGE DE NEUROLOGIE 5ÈME ÉDITION. 2020, *Collège de Neurologie 5ème édition*, Elsevier Masson. 7
- COLLINS, A. T., P. A. BERRY, C. HYDE, M. J. STOWER et N. J. MAITLAND. 2005, «Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells», *Cancer Res*, vol. 65, n° 23, doi :10.1158/0008-5472.CAN-05-2018, p. 10946–10951, ISSN 0008-5472. 3
- COLWELL, N., M. LARION, A. J. GILES, A. N. SELDOMRIDGE, S. SIZDAHKHANI, M. R. GILBERT et D. M. PARK. 2017, «Hypoxia in the glioblastoma microenvironment : Shaping the phenotype of cancer stem-like cells», *Neuro Oncol*, vol. 19, n° 7, doi :10.1093/neuonc/now258, p. 887–896, ISSN 1522-8517. 10
- CONVERY, N. et N. GADEGAARD. 2019, «30 years of microfluidics», *Micro and Nano Engineering*, vol. 2, doi :10.1016/j.mne.2019.01.003, p. 76–91, ISSN 2590-0072. 16
- CORDEY, M., M. LIMACHER, S. KOBEL, V. TAYLOR et M. P. LUTOLF. 2008, «Enhancing the Reliability and Throughput of Neurosphere Culture on Hydrogel Microwell Arrays : ENHANCING THE RELIABILITY AND THROUGHPUT OF NEUROSPHERE CULTURE ON HYDROGEL MICROWELL ARRAYS», *STEM CELLS*, vol. 26, n° 10, doi :10.1634/stemcells.2008-0498, p. 2586–2594, ISSN 10665099. 18
- COSTA, A. R., M. LANÇA DE OLIVEIRA, I. CRUZ, I. GONÇALVES, J. F. CASCALHEIRA et C. R. A. SANTOS. 2020, «The Sex Bias of Cancer», *Trends Endocrinol Metab*, vol. 31, n° 10, doi :10.1016/j.tem.2020.07.002, p. 785–799, ISSN 1879-3061. 6
- COURTIOL, P., C. MAUSSION, M. MOARII, E. PRONIER, S. PILCER, M. SEFTA, P. MANCERON, S. TOLDO, M. ZASLAVSKIY, N. LE STANG, N. GIRARD, O. ELEMENTO, A. G. NICHOLSON, J.-Y. BLAY, F. GALATEAU-SALLÉ, G. WAINRIB et T. CLOZEL. 2019, «Deep learning-based classification of mesothelioma improves prediction of patient outcome», *Nature Medicine*, vol. 25, n° 10, doi :10.1038/s41591-019-0583-3, p. 1519–1525, ISSN 1546-170X. 24

- COUTURIER, C. P., S. AYYADHURY, P. U. LE, J. NADAF, J. MONLONG, G. RIVA, R. ALLACHE, S. BAIG, X. YAN, M. BOURGEY, C. LEE, Y. C. D. WANG, V. WEE YONG, M.-C. GUIOT, H. NAJAFABADI, B. MISIC, J. ANTEL, G. BOURQUE, J. RAGOUSIS et K. PETRECCA. 2020, «Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy», *Nature Communications*, vol. 11, n° 1, doi :10.1038/s41467-020-17186-5, p. 3406, ISSN 2041-1723. 11
- CUI, X., C. MA, V. VASUDEVARAJA, J. SERRANO, J. TONG, Y. PENG, M. DELORENZO, G. SHEN, J. FRENSTER, R.-T. T. MORALES, W. QIAN, A. TSIRIGOS, A. S. CHI, R. JAIN, S. C. KURZ, E. P. SULMAN, D. G. PLACANTONAKIS, M. SNUDERL et W. CHEN. 2020, «Dissecting the immunosuppressive tumor microenvironments in Glioblastoma-on-a-Chip for optimized PD-1 immunotherapy», *Elife*, vol. 9, doi :10.7554/eLife.52253, ISSN 2050-084X. 17
- DAHAN, P., J. MARTINEZ GALA, C. DELMAS, S. MONFERRAN, L. MALRIC, D. ZENTKOWSKI, V. LUBRANO, C. TOULAS, E. COHEN-JONATHAN MOYAL et A. LEMARIE. 2014, «Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin : Possible involvement in radioresistance», *Cell Death & Disease*, vol. 5, n° 11, doi :10.1038/cddis.2014.509, p. e1543–e1543, ISSN 2041-4889. 12
- D’ALESSANDRIS, Q. G., M. BIFFONI, M. MARTINI, D. RUNCII, M. BUCCARELLI, T. CENCI, M. SIGNORE, L. STANCATO, A. OLIVI, R. DE MARIA, L. M. LAROCCA, L. RICCI-VITIANI et R. PALLINI. 2017, «The clinical value of patient-derived glioblastoma tumorspheres in predicting treatment response», *Neuro-Oncology*, vol. 19, n° 8, doi :10.1093/neuonc/now304, p. 1097–1108, ISSN 1522-8517, 1523-5866. 15
- DARLIX, A., S. ZOUAOU, V. RIGAU, F. BESSAOUD, D. FIGARELLA-BRANGER, H. MATHIEU-DAUDÉ, B. TRÉTARRE, F. BAUCHET, H. DUFFAU, L. TAILLANDIER et L. BAUCHET. 2017, «Epidemiology for primary brain tumors : A nationwide population-based study», *J Neurooncol*, vol. 131, n° 3, doi :10.1007/s11060-016-2318-3, p. 525–546, ISSN 1573-7373. 5
- DARWIN, C. 1859, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.*, J. Murray, London, England. 3
- DEFOSSÉ, G., S. LE GUYADER-PEYROU, Z. UHRY, P. GROSCLAUDE, M. COLONNA, E. DANTONY, P. DELAFOSSE, F. MOLINIÉ, WORONOFF, A.-M. BOUVIER, N. BOSSARD, L. REMONTET et A. MONNEREAU. 2019, «Estimations nationales de l’incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse.», . 5
- DETCHE, R. 1986, «Learning while searching in constraint-satisfaction problems.», dans *Proceedings of the 5th National Conference on Artificial Intelligence.*, Philadelphia, PA. 19
- DIRKSE, A., A. GOLEBIEWSKA, T. BUDER, P. V. NAZAROV, A. MULLER, S. POOVATHINGAL, N. H. C. BRONS, S. LEITE, N. SAUVAGEOT, D. SARKISJAN, M. SEYFRID, S. FRITAH, D. STIEBER, A. MICHELUCCI, F. HERTEL, C. HEROLD-MENDE, F. AZUAJE, A. SKUPIN, R. BJERKVIG, A. DEUTSCH, A. VOSS-BÖHME et S. P. NICLOU. 2019, «Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment», *Nat Commun*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41467-019-09853-z, p. 1787, ISSN 2041-1723. 11, 12, 13
- DISNEY-HOGG, L., A. J. CORNISH, A. SUD, P. J. LAW, B. KINNERSLEY, D. I. JACOBS, Q. T. OSTROM, K. LABRECHE, J. E. ECKEL-PASSOW, G. N. ARMSTRONG, E. B. CLAUS, D. IL’YASOVA, J. SCHILDKRAUT, J. S. BARNHOLTZ-SLOAN, S. H. OLSON, J. L. BERNSTEIN, R. K. LAI, M. J. SCHOEMAKER, M. SIMON, P. HOFFMANN, M. M. NÖTHEN, K.-H. JÖCKEL, S. CHANOCK, P. RAJARAMAN, C. JOHANSEN, R. B. JENKINS, B. S. MELIN, M. R. WRENSCH, M. SANSON, M. L. BONDY et R. S. HOULSTON. 2018, «Impact of atopy on risk of glioma : A Mendelian randomisation study», *BMC Med*, vol. 16, n° 1, doi :10.1186/s12916-018-1027-5, p. 42, ISSN 1741-7015. 6

- DUNDAR, T. T., M. A. HATIBOGLU, Z. ERGUL, M. H. SEYITHANOGLU, E. SOZEN, S. TUZGEN, M. Y. KAYNAR et E. KARAOZ. 2019, «Glioblastoma Stem Cells and Comparison of Isolation Methods», *J Clin Med Res*, vol. 11, n° 6, doi :10.14740/jocmr3781, p. 415–421, ISSN 1918-3003. [13](#)
- ENDERLING, H. 2015, «Cancer stem cells : Small subpopulation or evolving fraction?», *Integr. Biol.*, vol. 7, n° 1, doi :10.1039/C4IB00191E, p. 14–23, ISSN 1757-9694, 1757-9708. [13](#)
- ERTOSUN, M. G. et D. L. RUBIN. 2015, «Automated Grading of Gliomas using Deep Learning in Digital Pathology Images : A modular approach with ensemble of convolutional neural networks», *AMIA Annu Symp Proc*, vol. 2015, p. 1899–1908, ISSN 1942-597X. [27](#)
- FANG, D., T. K. NGUYEN, K. LEISHEAR, R. FINKO, A. N. KULP, S. HOTZ, P. A. VAN BELLE, X. XU, D. E. ELDER et M. HERLYN. 2005, «A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas», *Cancer Res*, vol. 65, n° 20, doi :10.1158/0008-5472.CAN-05-1343, p. 9328–9337, ISSN 0008-5472. [3](#)
- FENSTERMAKER, R. A., M. J. CIESIELSKI, J. QIU, N. YANG, C. L. FRANK, K. P. LEE, L. R. MECHTLER, A. BELAL, M. S. AHLUWALIA et A. D. HUTSON. 2016, «Clinical study of a survivin long peptide vaccine (SurVaxM) in patients with recurrent malignant glioma», *Cancer Immunol Immunother*, vol. 65, n° 11, doi :10.1007/s00262-016-1890-x, p. 1339–1352, ISSN 1432-0851. [13](#)
- FERNANDEZ-FUENTE, G., P. MOLLINEDO, L. GRANDE, A. VAZQUEZ-BARQUERO et J. L. FERNANDEZ-LUNA. 2014, «Culture Dimensionality Influences the Resistance of Glioblastoma Stem-like Cells to Multikinase Inhibitors», *Mol Cancer Ther*, vol. 13, n° 6, doi :10.1158/1535-7163.MCT-13-0854, p. 1664–1672, ISSN 1535-7163, 1538-8514. [13](#)
- FERRARO, F., C. L. CELSO et D. SCADDEN. 2010, «ADULT STEM CELLS AND THEIR NICHEs», *Adv Exp Med Biol*, vol. 695, doi :10.1007/978-1-4419-7037-4\_11, p. 155–168, ISSN 0065-2598. [10](#)
- GALLI, R., E. BINDA, U. ORFANELLI, B. CIPELLETTI, A. GRITTI, S. D. VITIS, R. FIOCCO, C. FORONI, F. DIMECO et A. VESCOVI. 2004, «Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma», *Cancer Res*, vol. 64, n° 19, doi :10.1158/0008-5472.CAN-04-1364, p. 7011–7021, ISSN 0008-5472, 1538-7445. [9](#)
- GANGULI, A., A. MOSTAFA, C. SAAVEDRA, Y. KIM, P. LE, V. FARAMARZI, R. W. FEATHERS, J. BERGER, K. P. RAMOS-CRUZ, O. ADENIBA, G. J. P. DIAZ, J. DRNEVICH, C. L. WRIGHT, A. G. HERNANDEZ, W. LIN, A. M. SMITH, F. KOSARI, G. VASMATZIS, P. Z. ANASTASIADIS et R. BASHIR. 2021, «Three-dimensional microscale hanging drop arrays with geometric control for drug screening and live tissue imaging», *Sci Adv*, vol. 7, n° 17, doi :10.1126/sciadv.abc1323, ISSN 2375-2548. [15](#), [18](#)
- GARNIER, D., O. RENOULT, M.-C. ALVES-GUERRA, F. PARIS et C. PECQUEUR. 2019, «Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target», *Front. Oncol.*, vol. 9, doi :10.3389/fonc.2019.00118, ISSN 2234-943X. [9](#)
- GÉRON, A. 2020, *Deep Learning avec Keras et TensorFlow*, Hors collection, Dunod, Dunod, ISBN 978-2-10-079066-1. [25](#)
- GIMPLE, R. C., S. BHARGAVA, D. DIXIT et J. N. RICH. 2019, «Glioblastoma stem cells : Lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer», *Genes Dev.*, vol. 33, n° 11-12, doi :10.1101/gad.324301.119, p. 591–609, ISSN 0890-9369, 1549-5477. [13](#)
- GODIN, M., F. F. DELGADO, S. SON, W. H. GROVER, A. K. BRYAN, A. TZUR, P. JORGENSEN, K. PAYER, A. D. GROSSMAN, M. W. KIRSCHNER et S. R. MANALIS. 2010, «Using buoyant mass to measure the growth of single cells», *Nat Methods*, vol. 7, n° 5, doi :10.1038/nmeth.1452, p. 387–390, ISSN 1548-7091. [18](#)

- GONÇALVES, P. J., J.-M. LUECKMANN, M. DEISTLER, M. NONNENMACHER, K. ÖCAL, G. BASSETTO, C. CHINTALURI, W. F. PODLASKI, S. A. HADDAD, T. P. VOGELS, D. S. GREENBERG et J. H. MACKE. 2020, «Training deep neural density estimators to identify mechanistic models of neural dynamics», *eLife*, vol. 9, doi :10.7554/eLife.56261, p. e56 261, ISSN 2050-084X. 24
- GREAVES, M. et C. C. MALEY. 2012, «CLONAL EVOLUTION IN CANCER», *Nature*, vol. 481, n° 7381, doi :10.1038/nature10762, p. 306–313, ISSN 0028-0836. 3
- GUVENÇ, H., M. S. PAVLYUKOV, K. JOSHI, H. KURT, Y. K. BANASAVADI-SIDDEGOWDA, P. MAO, C. HONG, R. YAMADA, C.-H. KWON, D. BHASIN, S. CHETTIAR, G. KITANGE, I.-H. PARK, J. N. SARKARIA, C. LI, M. I. SHAKHPARONOV et I. NAKANO. 2013, «Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin-Ran protein complex», *Clin Cancer Res*, vol. 19, n° 3, doi :10.1158/1078-0432.CCR-12-0647, p. 631–642, ISSN 1557-3265. 12
- HAMBARDZUMYAN, D., L. F. PARADA, E. C. HOLLAND et A. CHAREST. 2011, «Genetic modeling of gliomas in mice : New tools to tackle old problems», *Glia*, vol. 59, n° 8, doi :10.1002/glia.21142, p. 1155–1168, ISSN 1098-1136. 14
- HAN, Y., H. WANG, Y. HUANG, Z. CHENG, T. SUN, G. CHEN, X. XIE, Y. ZHOU et Z. DU. 2015, «Isolation and characteristics of CD133-/A2B5+ and CD133-/A2B5- cells from the SHG139s cell line», *Molecular Medicine Reports*, vol. 12, n° 6, doi :10.3892/mmr.2015.4446, p. 7949–7956, ISSN 1791-2997, 1791-3004. 11
- HARRIS, M. A., H. YANG, B. E. LOW, J. MUKHERJE, A. GUHA, R. T. BRONSON, L. D. SHULTZ, M. A. ISRAEL et K. YUN. 2008, «Cancer stem cells are enriched in the side-population cells in a mouse model of glioma», *Cancer Res*, vol. 68, n° 24, doi :10.1158/0008-5472.CAN-08-0786, p. 10 051–10 059, ISSN 0008-5472. 14
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ. 2010, «ALD n° 30 - Cancer primitif du système nerveux central», . 7
- HERMANN, P. C., S. L. HUBER, T. HERRLER, A. AICHER, J. W. ELLWART, M. GUBA, C. J. BRUNS et C. HEESCHEN. 2007, «Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer», *Cell Stem Cell*, vol. 1, n° 3, doi :10.1016/j.stem.2007.06.002, p. 313–323, ISSN 1875-9777. 4
- HIRA, V. V. V., U. VERBOVŠEK, B. BREZNIK, M. SRDIČ, M. NOVINEC, H. KAKAR, J. WORMER, B. V. DER SWAAN, B. LENARČIČ, L. JULIANO, S. MEHTA, C. J. F. VAN NOORDEN et T. T. LAH. 2017, «Cathepsin K cleavage of SDF-1 $\alpha$  inhibits its chemotactic activity towards glioblastoma stem-like cells», *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, vol. 1864, n° 3, doi :10.1016/j.bbamcr.2016.12.021, p. 594–603, ISSN 0167-4889. 10
- HU, Z., T. ZHOU, F. WU et F. LIN. 2021, «A Rapid Screening Workflow to Identify Potential Combination Therapy for GBM using Patient-Derived Glioma Stem Cells», *J Vis Exp*, , n° 169, doi : 10.3791/62312, ISSN 1940-087X. 15
- HUGEGENE. 2019, «Visualizing Relationships between Loss Functions and Gradient Descent», <https://towardsdatascience.com/visualising-relationships-between-loss-activation-functions-and-gradient-descent-312a3963c9a5>. 23, 24
- HUSZTHY, P. C., I. DAPHU, S. P. NICLOU, D. STIEBER, J. M. NIGRO, P. Ø. SAKARIASSEN, H. MILETIC, F. THORSEN et R. BJERKVIG. 2012, «In vivo models of primary brain tumors : Pitfalls and perspectives», *Neuro Oncol*, vol. 14, n° 8, doi :10.1093/neuonc/nos135, p. 979–993, ISSN 1523-5866. 14
- INNES, J. A., A. S. LOWE, R. FONSECA, N. ALEY, T. EL-HASSAN, M. CONSTANTINOU, J. LAU, A. EDDAOUDI, S. MARINO et S. BRANDNER. 2021, «Phenotyping clonal populations of glioma stem cell reveals a high degree of plasticity in response to changes of microenvironment», *Lab Invest*, doi :10.1038/s41374-021-00695-2, p. 1–13, ISSN 1530-0307. 13

- INTERPHONE STUDY GROUP. 2010, «Brain tumour risk in relation to mobile telephone use : Results of the INTERPHONE international case-control study», *Int J Epidemiol*, vol. 39, n° 3, doi : 10.1093/ije/dyq079, p. 675–694, ISSN 1464-3685. 7
- JIANG, X., H. XING, T.-M. KIM, Y. JUNG, W. HUANG, H. W. YANG, S. SONG, P. J. PARK, R. S. CARROLL et M. D. JOHNSON. 2012, «Numb Regulates Glioma Stem Cell Fate and Growth by Altering Epidermal Growth Factor Receptor and Skp1-Cullin-F-Box Ubiquitin Ligase Activity», *Stem Cells*, vol. 30, n° 7, doi :10.1002/stem.1120, p. 1313–1326, ISSN 1066-5099. 10
- JORDAN, C. T. 2009, «Cancer Stem Cells : Controversial or Just Misunderstood?», *Cell Stem Cell*, vol. 4, n° 3, doi :10.1016/j.stem.2009.02.003, p. 203–205, ISSN 1934-5909. 5, 13
- JUNG, E., M. OSSWALD, M. RATLIFF, H. DOGAN, R. XIE, S. WEIL, D. C. HOFFMANN, F. T. KURZ, T. KESSLER, S. HEILAND, A. VON DEIMLING, F. SAHM, W. WICK et F. WINKLER. 2021, «Tumor cell plasticity, heterogeneity, and resistance in crucial microenvironmental niches in glioma», *Nat Commun*, vol. 12, n° 1, doi :10.1038/s41467-021-21117-3, p. 1014, ISSN 2041-1723. 10
- KARIPIDIS, K., M. ELWOOD, G. BENKE, M. SANAGOU, L. TJONG et R. J. CROFT. 2018, «Mobile phone use and incidence of brain tumour histological types, grading or anatomical location : A population-based ecological study», *BMJ Open*, vol. 8, n° 12, doi :10.1136/bmjopen-2018-024489, p. e024 489, ISSN 2044-6055. 7
- KARVELA, M. «The cancer stem cell hypothesis and the clonal evolution model», /info/blog. 4
- KELLY, P. N., A. DAKIC, J. M. ADAMS, S. L. NUTT et A. STRASSER. 2007, «Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells», *Science*, vol. 317, n° 5836, doi :10.1126/science.1142596, p. 337, ISSN 1095-9203. 4
- KIM, C. F. B., E. L. JACKSON, A. E. WOOLFENDEN, S. LAWRENCE, I. BABAR, S. VOGEL, D. CROWLEY, R. T. BRONSON et T. JACKS. 2005, «Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer», *Cell*, vol. 121, n° 6, doi :10.1016/j.cell.2005.03.032, p. 823–835, ISSN 0092-8674. 3
- KONG, B. H., J. H. MOON, Y.-M. HUH, J.-K. SHIM, J.-H. LEE, E.-H. KIM, J. H. CHANG, D.-S. KIM, Y.-K. HONG, S. H. KIM, S.-J. LEE et S.-G. KANG. 2014, «Prognostic Value of Glioma Cancer Stem Cell Isolation in Survival of Primary Glioblastoma Patients», *Stem Cells International*, vol. 2014, doi :10.1155/2014/838950, p. e838 950, ISSN 1687-966X. 15
- LADOMERSKY, E., D. M. SCHOLTENS, M. KOCHERGINSKY, E. A. HIBLER, E. T. BARTOM, S. OTTOMEYER, L. ZHAI, K. L. LAUING, J. CHOI, J. A. SOSMAN, J. D. WU, B. ZHANG, R. V. LUKAS et D. A. WAINWRIGHT. 2019, «The Coincidence Between Increasing Age, Immunosuppression, and the Incidence of Patients With Glioblastoma», *Front Pharmacol*, vol. 10, doi :10.3389/fphar.2019.00200, ISSN 1663-9812. 6
- LAKS, D. R., T. J. CRISMAN, M. Y. S. SHIH, J. MOTTAHEDEH, F. GAO, J. SPERRY, M. C. GARRETT, W. H. YONG, T. F. CLOUGHESY, L. M. LIAU, A. LAI, G. COPPOLA et H. I. KORNBLUM. 2016, «Large-scale assessment of the gliomasphere model system», *NEUONC*, vol. 18, n° 10, doi :10.1093/neuonc/nov045, p. 1367–1378, ISSN 1522-8517, 1523-5866. 15
- LAKS, D. R., M. MASTERMAN-SMITH, K. VISNYEI, B. ANGENIEUX, N. M. OROZCO, I. FORAN, W. H. YONG, H. V. VINTERS, L. M. LIAU, J. A. LAZAREFF, P. S. MISCHER, T. F. CLOUGHESY, S. HORVATH et H. I. KORNBLUM. 2009, «Neurosphere Formation Is an Independent Predictor of Clinical Outcome in Malignant Glioma», *Stem Cells*, vol. 27, n° 4, doi :10.1002/stem.15, p. 980–987, ISSN 10665099, 15494918. 15
- LAN, X., D. J. JÖRG, F. M. G. CAVALLI, L. M. RICHARDS, L. V. NGUYEN, R. J. VANNER, P. GUILHAMON, L. LEE, M. M. KUSHIDA, D. PELLACANI, N. I. PARK, F. J. COUTINHO, H. WHETSTONE,

- H. J. SELVADURAI, C. CHE, B. LUU, A. CARLES, M. MOKSA, N. RASTEGAR, R. HEAD, S. DOLMA, P. PRINOS, M. D. CUSIMANO, S. DAS, M. BERNSTEIN, C. H. ARROWSMITH, A. J. MUNGALL, R. A. MOORE, Y. MA, M. GALLO, M. LUPIEN, T. J. PUGH, M. D. TAYLOR, M. HIRST, C. J. EAVES, B. D. SIMONS et P. B. DIRKS. 2017, «Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy», *Nature*, vol. 549, n° 7671, doi :10.1038/nature23666, p. 227–232, ISSN 0028-0836, 1476-4687. [11](#)
- LANGLEY, P. 2011, «The changing science of machine learning», *Mach Learn*, vol. 82, n° 3, doi : 10.1007/s10994-011-5242-y, p. 275–279, ISSN 1573-0565. [19](#)
- LAPIDOT, T., C. SIRARD, J. VORMOOR, B. MURDOCH, T. HOANG, J. CACERES-CORTES, M. MINDEN, B. PATERSON, M. A. CALIGIURI et J. E. DICK. 1994, «A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice», *Nature*, vol. 367, n° 6464, doi :10.1038/367645a0, p. 645–648, ISSN 1476-4687. [3](#), [8](#), [13](#)
- LATHIA, J. D., S. C. MACK, E. E. MULKEARNS-HUBERT, C. L. L. VALENTIM et J. N. RICH. 2015, «Cancer stem cells in glioblastoma», *Genes Dev*, vol. 29, n° 12, doi :10.1101/gad.261982.115, p. 1203–1217, ISSN 1549-5477. [9](#), [10](#), [12](#)
- LEE, D. W., S.-Y. LEE, I. DOH, G. H. RYU et D.-H. NAM. 2017, «High-Dose Compound Heat Map for 3D-Cultured Glioblastoma Multiforme Cells in a Micropillar and Microwell Chip Platform», *Biomed Res Int*, vol. 2017, doi :10.1155/2017/7218707, ISSN 2314-6133. [17](#)
- LEE, G., B. AUFFINGER, D. GUO, T. HASAN, M. DEHEEGER, A. L. TOBIAS, J. Y. KIM, F. ATASHI, L. ZHANG, M. S. LESNIAK, J. C. DAVID et A. U. AHMED. 2016, «De-differentiation of glioma cells to glioma stem-like cells by therapeutic stress-induced HIF signaling in the recurrent GBM model», *Mol Cancer Ther*, vol. 15, n° 12, doi :10.1158/1535-7163.MCT-15-0675, p. 3064–3076, ISSN 1535-7163. [12](#)
- LEE, J., S. KOTLIAROVA, Y. KOTLIAROV, A. LI, Q. SU, N. M. DONIN, S. PASTORINO, B. W. PUROW, N. CHRISTOPHER, W. ZHANG, J. K. PARK et H. A. FINE. 2006, «Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines», *Cancer Cell*, vol. 9, n° 5, doi :10.1016/j.ccr.2006.03.030, p. 391–403, ISSN 15356108. [15](#)
- LENTING, K., R. VERHAAK, M. TER LAAN, P. WESSELING et W. LEENDERS. 2017, «Glioma : Experimental models and reality», *Acta Neuropathol*, vol. 133, n° 2, doi :10.1007/s00401-017-1671-4, p. 263–282, ISSN 1432-0533. [14](#)
- LI, Q., H. LIN, J. RAUCH, L. P. DELEYROLLE, B. A. REYNOLDS, H. J. VILJOEN, C. ZHANG, C. ZHANG, L. GU, E. VAN WYK et Y. LEI. 2018, «Scalable Culturing of Primary Human Glioblastoma Tumor-Initiating Cells with a Cell-Friendly Culture System», *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, doi :10.1038/s41598-018-21927-4, p. 3531, ISSN 2045-2322. [15](#)
- LI, Y., A. LI, M. GLAS, B. LAL, M. YING, Y. SANG, S. XIA, D. TRAGESER, H. GUERRERO-CÁZARES, C. G. EBERHART, A. QUIÑONES-HINOJOSA, B. SCHEFFLER et J. LATERRA. 2011, «C-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, n° 24, doi :10.1073/pnas.1016912108, p. 9951–9956, ISSN 0027-8424. [10](#)
- LIAU, B. B., C. SIEVERS, L. K. DONOHUE, S. M. GILLESPIE, W. A. FLAVAHAN, T. E. MILLER, A. S. VENTEICHER, C. H. HEBERT, C. D. CAREY, S. J. RODIG, S. J. SHAREEF, F. J. NAJM, P. VAN GALEN, H. WAKIMOTO, D. P. CAHILL, J. N. RICH, J. C. ASTER, M. L. SUVÀ, A. P. PATEL et B. E. BERNSTEIN. 2017, «Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance», *Cell Stem Cell*, vol. 20, n° 2, doi :10.1016/j.stem.2016.11.003, p. 233–246.e7, ISSN 19345909. [12](#)

- LINDSAY, G. W. 2020, «Convolutional Neural Networks as a Model of the Visual System : Past, Present, and Future», *J Cogn Neurosci*, doi :10.1162/jocn\_a\_01544, p. 1–15, ISSN 1530-8898. [24](#)
- LINOS, E., T. RAINE, A. ALONSO et D. MICHAUD. 2007, «Atopy and risk of brain tumors : A meta-analysis», *J Natl Cancer Inst*, vol. 99, n° 20, doi :10.1093/jnci/djm170, p. 1544–1550, ISSN 1460-2105. [6](#)
- LITTLE, M. P., P. RAJARAMAN, R. E. CURTIS, S. S. DEVESA, P. D. INSKIP, D. P. CHECK et M. S. LINET. 2012, «Mobile phone use and glioma risk : Comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States», *BMJ*, vol. 344, doi :10.1136/bmj.e1147, p. e1147, ISSN 0959-8138, 1468-5833. [7](#)
- LOGUN, M., W. ZHAO, L. MAO et L. KARUMBIAIAH. 2018, «Microfluidics in Malignant Glioma Research and Precision Medicine», *Adv Biosyst*, vol. 2, n° 5, doi :10.1002/adbi.201700221, ISSN 2366-7478. [16](#)
- LU, K. V., J. P. CHANG, C. A. PARACHONIAK, M. M. PANDIKA, M. K. AGHI, D. MEYRONET, N. ISACHENKO, S. D. FOUSE, J. J. PHILLIPS, D. A. CHERESH, M. PARK et G. BERGERS. 2012, «VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition Through a MET/VEGFR2 Complex», *Cancer Cell*, vol. 22, n° 1, doi :10.1016/j.ccr.2012.05.037, p. 21–35, ISSN 1535-6108. [10](#)
- MA, Y., Z. CHENG, J. LIU, L. TORRE-HEALY, J. D. LATHIA, I. NAKANO, Y. GUO, R. C. THOMPSON, M. L. FREEMAN et J. WANG. 2017, «Inhibition of Farnesyltransferase Potentiates NOTCH-Targeted Therapy against Glioblastoma Stem Cells», *Stem Cell Reports*, vol. 9, n° 6, doi :10.1016/j.stemcr.2017.10.028, p. 1948–1960, ISSN 22136711. [10](#)
- MARQUES, C., T. UNTERKIRCHER, P. KROON, B. OLDRINI, A. IZZO, Y. DRAMARETSKA, R. FERRARESE, E. KLING, O. SCHNELL, S. NELANDER, E. F. WAGNER, L. BAKIRI, G. GARGIULO, M. S. CARRO et M. SQUATRITO. 2021, «NF1 regulates mesenchymal glioblastoma plasticity and aggressiveness through the AP-1 transcription factor FOSL1», *Elife*, vol. 10, doi :10.7554/eLife.64846, p. e64 846, ISSN 2050-084X. [14](#)
- MCCARTHY, J., M. MINSKY, N. ROCHESTER et C. SHANNON. 1955, «A Proposal for the Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence», Hanover, New Hampshire. [19](#)
- MELIN, B. S., J. S. BARNHOLTZ-SLOAN, M. R. WRENSCH, C. JOHANSEN, D. IL'YASOVA, B. KINNERSLEY, Q. T. OSTROM, K. LABRECHE, Y. CHEN, G. ARMSTRONG, Y. LIU, J. E. ECKEL-PASSOW, P. A. DECKER, M. LABUSSIÈRE, A. IDBAIH, K. HOANG-XUAN, A.-L. DI STEFANO, K. MOKHTARI, J.-Y. DELATTRE, P. BRODERICK, P. GALAN, K. GOUSIAS, J. SCHRAMM, M. J. SCHOEMAKER, S. J. FLEMING, S. HERMS, S. HEILMANN, M. M. NÖTHEN, H.-E. WICHMANN, S. SCHREIBER, A. SWERDLOW, M. LATHROP, M. SIMON, M. SANSON, U. ANDERSSON, P. RAJARAMAN, S. CHANOCK, M. LINET, Z. WANG, M. YEAGER, J. K. WIENCKE, H. HANSEN, L. MCCOY, T. RICE, M. L. KOSEL, H. SICOTTE, C. I. AMOS, J. L. BERNSTEIN, F. DAVIS, D. LACHANCE, C. LAU, R. T. MERRELL, J. SHILDKRAUT, F. ALI-OSMAN, S. SADETZKI, M. SCHEURER, S. SHETE, R. K. LAI, E. B. CLAUS, S. H. OLSON, R. B. JENKINS, R. S. HOULSTON et M. L. BONDY. 2017, «Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors», *Nature Genetics*, vol. 49, n° 5, doi :10.1038/ng.3823, p. 789–794, ISSN 1546-1718. [6](#)
- MINSKY, M., éd.. 1969, *Semantic Information Processing*, MIT Press, Cambridge, MA, USA, ISBN 978-0-262-13044-8. [19](#)
- MOTEGI, H., Y. KAMOSHIMA, S. TERASAKA, H. KOBAYASHI et K. HOUKIN. 2014, «Type 1 collagen as a potential niche component for CD133-positive glioblastoma cells», *Neuropathology*, vol. 34, n° 4, doi :10.1111/neup.12117, p. 378–385, ISSN 1440-1789. [10](#)

- MOUTAL, A., J. HONNORAT, P. MASSOMA, P. DESORMEAUX, C. BERTRAND, C. MALLEVAL, C. WATRIN, N. CHOUNLAMOUNTRI, M.-E. MAYEUR, R. BESANCON, N. NAUDET, L. MAGADOUX, R. KHANNA, F. DUCRAY, D. MEYRONET et N. THOMASSET. 2015, «CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling», *Cancer Research*, vol. 75, n° 17, doi :10.1158/0008-5472.CAN-14-0631, p. 3519–3528, ISSN 0008-5472, 1538-7445. 10
- NAKOD, P. S., Y. KIM et S. S. RAO. 2020, «Three-dimensional biomimetic hyaluronic acid hydrogels to investigate glioblastoma stem cell behaviors», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, n° 2, doi :10.1002/bit.27219, p. 511–522, ISSN 1097-0290. 15
- NASSAR, D. et C. BLANPAIN. 2016, «Cancer Stem Cells : Basic Concepts and Therapeutic Implications», *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 11, n° 1, doi :10.1146/annurev-pathol-012615-044438, p. 47–76, ISSN 1553-4006. 3
- NEFTEL, C., J. LAFFY, M. G. FILBIN, T. HARA, M. E. SHORE, G. J. RAHME, A. R. RICHMAN, D. SILVERBUSH, M. L. SHAW, C. M. HEBERT, J. DEWITT, S. GRITSCH, E. M. PEREZ, L. N. GONZALEZ CASTRO, X. LAN, N. DRUCK, C. RODMAN, D. DIONNE, A. KAPLAN, M. S. BERTALAN, J. SMALL, K. PELTON, S. BECKER, D. BONAL, Q.-D. NGUYEN, R. L. SERVIS, J. M. FUNG, R. MYLVAGANAM, L. MAYR, J. GOJO, C. HABERLER, R. GEYEREGGER, T. CZECH, I. SLAVC, B. V. NAHED, W. T. CURRY, B. S. CARTER, H. WAKIMOTO, P. K. BRASTIANOS, T. T. BATCHELOR, A. STEMMER-RACHAMIMOV, M. MARTINEZ-LAGE, M. P. FROSCHE, I. STAMENKOVIC, N. RIGGI, E. RHEINBAY, M. MONJE, O. ROZENBLATT-ROSEN, D. P. CAHILL, A. P. PATEL, T. HUNTER, I. M. VERMA, K. L. LIGON, D. N. LOUIS, A. REGEV, B. E. BERNSTEIN, I. TIROSH et M. L. SUVÀ. 2019, «An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma», *Cell*, doi :10.1016/j.cell.2019.06.024, p. S0092867419306877, ISSN 00928674. 9, 11
- VAN NIEKERK, G., L. M. DAVIDS, S. M. HATTINGH et A.-M. ENGELBRECHT. 2017, «Cancer stem cells : A product of clonal evolution?», *International Journal of Cancer*, vol. 140, n° 5, doi :10.1002/ijc.30448, p. 993–999, ISSN 1097-0215. 5
- NOWELL, P. C. 1976, «The clonal evolution of tumor cell populations», *Science*, vol. 194, n° 4260, doi :10.1126/science.959840, p. 23–28, ISSN 0036-8075, 1095-9203. 3
- NUMPY. «Numpy.convolve — NumPy v1.21 Manual», <https://numpy.org/doc/stable/reference/generated/numpy.convolve.html>. 25
- OGDEN, A. T., A. E. WAZIRI, R. A. LOCHHEAD, D. FUSCO, K. LOPEZ, J. A. ELLIS, J. KANG, M. ASSANAH, G. M. MCKHANN, M. B. SISTI, P. C. MCCORMICK, P. CANOLL et J. N. BRUCE. 2008, «IDENTIFICATION OF A2B5+CD133- TUMOR-INITIATING CELLS IN ADULT HUMAN GLIOMAS», *Neurosurgery*, vol. 62, n° 2, doi :10.1227/01.neu.0000316019.28421.95, p. 505–515, ISSN 0148-396X, 1524-4040. 11
- OKADA, S., K. VAETEEWOOTTACHARN et R. KARIYA. 2019, «Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models», *Cells*, vol. 8, n° 8, doi :10.3390/cells8080889, p. 889, ISSN 2073-4409. 14
- OSTROM, Q. T., M. ADEL FAHMIDEH, D. J. COTE, I. S. MUSKENS, J. M. SCHRAW, M. E. SCHEURER et M. L. BONDY. 2019, «Risk factors for childhood and adult primary brain tumors», *Neuro Oncol*, vol. 21, n° 11, doi :10.1093/neuonc/noz123, p. 1357–1375, ISSN 1523-5866. 6
- OSTROM, Q. T., D. J. COTE, M. ASCHA, C. KRUCHKO et J. S. BARNHOLTZ-SLOAN. 2018, «Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to 2014», *JAMA Oncol*, vol. 4, n° 9, doi :10.1001/jamaoncol.2018.1789, p. 1254–1262, ISSN 2374-2445. 6
- PANG, L., J. DING, Y. GE, J. FAN et S.-K. FAN. 2019, «Single-Cell-Derived Tumor-Sphere Formation and Drug-Resistance Assay Using an Integrated Microfluidics», *Anal Chem*, vol. 91, n° 13, doi :10.1021/acs.analchem.9b01084, p. 8318–8325, ISSN 1520-6882. 15, 18

- PANOSYAN, E. H., D. R. LAKS, M. MASTERMAN-SMITH, J. MOTTAHEDEH, W. H. YONG, T. F. CLOUGHESY, J. A. LAZAREFF, P. S. MISCHER, T. B. MOORE et H. I. KORNBLUM. 2010, «Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation», *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 55, n° 4, doi :10.1002/pbc.22627, p. 644–651, ISSN 15455009. [15](#)
- PASTRANA, E., V. SILVA-VARGAS et F. DOETSCH. 2011, «Eyes Wide Open : A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells», *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 5, doi :10.1016/j.stem.2011.04.007, p. 486–498, ISSN 19345909. [15](#)
- PATEL, A. P., I. TIROSH, J. J. TROMBETTA, A. K. SHALEK, S. M. GILLESPIE, H. WAKIMOTO, D. P. CAHILL, B. V. NAHED, W. T. CURRY, R. L. MARTUZA, D. N. LOUIS, O. ROZENBLATT-ROSEN, M. L. SUVA, A. REGEV et B. E. BERNSTEIN. 2014, «Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma», *Science*, vol. 344, n° 6190, doi :10.1126/science.1254257, p. 1396–1401, ISSN 0036-8075, 1095-9203. [9](#)
- PATEL, N. P., K. A. LYON et J. H. HUANG. 2019, «The Effect of Race on the Prognosis of the Glioblastoma Patient : A Brief Review», *Neurol Res*, vol. 41, n° 11, doi :10.1080/01616412.2019.1638018, p. 967–971, ISSN 0161-6412. [6](#)
- PATHAK, A. et S. KUMAR. 2012, «Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, n° 26, doi :10.1073/pnas.1118073109, p. 10334–10339, ISSN 1091-6490. [17](#)
- PATRU, C., L. ROMAO, P. VARLET, L. COULOMBEL, E. RAPONI, J. CADUSSEAU, F. RENAULT-MIHARA, C. THIRANT, N. LEONARD, A. BERHNEIM, M. MIHALESCU-MAINGOT, J. HAIECH, I. BIÈCHE, V. MOURA-NETO, C. DAUMAS-DUPOUR, M.-P. JUNIER et H. CHNEIWEISS. 2010, «CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors», *BMC Cancer*, vol. 10, n° 1, doi :10.1186/1471-2407-10-66, p. 66, ISSN 1471-2407. [11](#)
- PATTERSON, J. et A. GIBSON. 2017, *Deep learning en action*, O'Reilly, ISBN 978-2-412-03744-7. [20](#), [22](#), [23](#), [25](#)
- PESENTI, C., S. E. NAVONE, L. GUARNACCIA, A. TERRASI, J. COSTANZA, R. SILIPIGNI, S. GUARNERI, N. FUSCO, L. FONTANA, M. LOCATELLI, P. RAMPINI, R. CAMPANELLA, S. TABANO, M. MIOZZO et G. MARFIA. 2019, «The Genetic Landscape of Human Glioblastoma and Matched Primary Cancer Stem Cells Reveals Intratumour Similarity and Intertumour Heterogeneity», *Stem Cells International*, vol. 2019, doi :10.1155/2019/2617030, p. e2617030, ISSN 1687-966X. [9](#)
- PINE, A. R., S. M. CIRIGLIANO, J. G. NICHOLSON, Y. HU, A. LINKOUS, K. MIYAGUCHI, L. EDWARDS, R. SINGHANIA, T. H. SCHWARTZ, R. RAMAKRISHNA, D. J. PISAPIA, M. SNUDERL, O. ELEMENTO et H. A. FINE. 2020, «Tumor microenvironment is critical for the maintenance of cellular states found in primary glioblastomas.», *Cancer Discov*, doi :10.1158/2159-8290.CD-20-0057, ISSN 2159-8274, 2159-8290. [14](#), [15](#)
- PORTER, A. B., D. H. LACHANCE et D. R. JOHNSON. 2015, «Socioeconomic status and glioblastoma risk : A population-based analysis», *Cancer Causes Control*, vol. 26, n° 2, doi :10.1007/s10552-014-0496-x, p. 179–185, ISSN 1573-7225. [6](#)
- PRATT, L. et S. THRUN. 1997, «Guest Editors' Introduction», *Machine Learning*, vol. 28, n° 1, doi :10.1023/A:1007322005825, p. 5–5, ISSN 1573-0565. [19](#)
- QUARTARARO, C. E., E. REZNIK, A. C. DECARVALHO, T. MIKKELSEN et B. R. STOCKWELL. 2015, «High-Throughput Screening of Patient-Derived Cultures Reveals Potential for Precision Medicine in Glioblastoma», *ACS Med Chem Lett*, vol. 6, n° 8, doi :10.1021/acsmchemlett.5b00128, p. 948–952, ISSN 1948-5875. [15](#)

- QUEREDA, V., S. HOU, F. MADOUX, L. SCAMPAVIA, T. P. SPICER et D. DUCKETT. 2018a, «A Cytotoxic Three-Dimensional-Spheroid, High-Throughput Assay Using Patient-Derived Glioma Stem Cells», *SLAS DISCOVERY : Advancing Life Sciences R&D*, vol. 23, n° 8, doi :10.1177/2472555218775055, p. 842–849, ISSN 2472-5552, 2472-5560. 15
- QUEREDA, V., S. HOU, F. MADOUX, L. SCAMPAVIA, T. P. SPICER et D. DUCKETT. 2018b, «A Cytotoxic Three-Dimensional-Spheroid, High-Throughput Assay using Patient Derived Glioma Stem Cells», *SLAS Discov*, vol. 23, n° 8, doi :10.1177/2472555218775055, p. 842–849, ISSN 2472-5552. 17
- QUINTANA, E., M. SHACKLETON, M. S. SABEL, D. R. FULLEN, T. M. JOHNSON et S. J. MORRISON. 2008, «Efficient tumour formation by single human melanoma cells», *Nature*, vol. 456, n° 7222, doi :10.1038/nature07567, p. 593–598, ISSN 1476-4687. 4
- REGISTRE DES TUMEURS PRIMITIVES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DE LA GIRONDE. 2015, «Registre des cancers en Aquitaine», [http://etudes.isped.u-bordeaux2.fr/REGISTRES-CANCERS-AQUITAINE/Snc/S\\_Accueil.aspx](http://etudes.isped.u-bordeaux2.fr/REGISTRES-CANCERS-AQUITAINE/Snc/S_Accueil.aspx). 5
- REYNOLDS, B. et S. WEISS. 1992, «Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system», *Science*, vol. 255, n° 5052, doi :10.1126/science.1553558, p. 1707–1710, ISSN 0036-8075, 1095-9203. 9, 15
- REYNOLDS, B. A. et A. L. VESCOVI. 2009, «Brain Cancer Stem Cells : Think Twice before Going Flat», *Cell Stem Cell*, vol. 5, n° 5, doi :10.1016/j.stem.2009.10.017, p. 466–467, ISSN 19345909. 13
- RIBA, J., J. SCHOENDUBE, S. ZIMMERMANN, P. KOLTAY et R. ZENGERLE. 2020, «Single-cell dispensing and ‘real-time’ cell classification using convolutional neural networks for higher efficiency in single-cell cloning», *Scientific Reports*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41598-020-57900-3, p. 1193, ISSN 2045-2322. 27
- RICHARD, A., L. BOULLU, U. HERBACH, A. BONNAFOUX, V. MORIN, E. VALLIN, A. GUILLEMIN, N. P. GAO, R. GUNAWAN, J. COSETTE, O. ARNAUD, J.-J. KUPIEC, T. ESPINASSE, S. GONIN-GIRAUD et O. GANDRILLON. 2016, «Single-Cell-Based Analysis Highlights a Surge in Cell-to-Cell Molecular Variability Preceding Irreversible Commitment in a Differentiation Process», *PLOS Biology*, vol. 14, n° 12, doi :10.1371/journal.pbio.1002585, p. e1002585, ISSN 1545-7885. 24
- ROSWELL PARK CANCER INSTITUTE. 2021, «A Phase II Study of the Safety and Efficacy of SVN53-67/M57-KLH (SurVaxM) in Survivin-Positive Newly Diagnosed Glioblastoma», Clinical Trial Registration study/NCT02455557, [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). 13
- ROWAN, K. 2009, «Are Cancer Stem Cells Real? After Four Decades, Debate Still Simmers», *JNCI : Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, n° 8, doi :10.1093/jnci/djp083, p. 546–547, ISSN 0027-8874. 4
- SACHDEVA, R., M. WU, K. JOHNSON, H. KIM, A. CELEBRE, U. SHAHZAD, M. S. GRAHAM, J. A. KESSLER, J. H. CHUANG, J. KARAMCHANDANI, M. BREDEL, R. VERHAAK et S. DAS. 2019, «BMP signaling mediates glioma stem cell quiescence and confers treatment resistance in glioblastoma», *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, doi :10.1038/s41598-019-51270-1, p. 14569, ISSN 2045-2322. 16
- SCHIFFER, D., L. ANNOVAZZI, C. CASALONE, C. CORONA et M. MELLAI. 2018, «Glioblastoma : Microenvironment and Niche Concept», *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 1, doi :10.3390/cancers11010005, ISSN 2072-6694. 10
- SCHIFFER, D., M. MELLAI, L. ANNOVAZZI, V. CALDERA, A. PIAZZI, T. DENYSENKO et A. MELCARNE. 2014, «Stem Cell Niches in Glioblastoma : A Neuropathological View», *BioMed Research International*, vol. 2014, doi :10.1155/2014/725921, p. e725921, ISSN 2314-6133. 10

SCIKIT-IMAGE. «Module : Measure», <https://scikit-image.org/docs/dev/api/skimage.measure.html>.  
26

SHAO, H., J. CHUNG, L. BALAJ, A. CHAREST, D. D. BIGNER, B. S. CARTER, F. H. HOCHBERG, X. O. BREAKFIELD, R. WEISSLEDER et H. LEE. 2012, «Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy», *Nat Med*, vol. 18, n° 12, doi : 10.1038/nm.2994, p. 1835–1840, ISSN 1546-170X. 17

SHEN, S. et J. CLAIRAMBAULT. 2020, «Cell plasticity in cancer cell populations», *F1000Res*, vol. 9, doi :10.12688/f1000research.24803.1, ISSN 2046-1402. 12

SILVER, D., A. HUANG, C. J. MADDISON, A. GUEZ, L. SIFRE, G. VAN DEN DRIESSCHE, J. SCHRITTWIESER, I. ANTONOGLU, V. PANNEERSHELVAM, M. LANCTOT, S. DIELEMAN, D. GREWE, J. NHAM, N. KALCHBRENNER, I. SUTSKEVER, T. LILLICRAP, M. LEACH, K. KAVUKCUOGLU, T. GRAEPEL et D. HASSABIS. 2016, «Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search», *Nature*, vol. 529, n° 7587, doi :10.1038/nature16961, p. 484–489, ISSN 1476-4687. 19

SIMIŃSKA, D., J. KORBECKI, K. KOJDER, P. KAPCZUK, M. FABIAŃSKA, I. GUTOWSKA, A. MACHOY-MOKRZYŃSKA, D. CHLUBEK et I. BARANOWSKA-BOSIACKA. 2021, «Epidemiology of Anthropometric Factors in Glioblastoma Multiforme—Literature Review», *Brain Sci*, vol. 11, n° 1, doi : 10.3390/brainsci11010116, ISSN 2076-3425. 6

SINGH, S. K., I. D. CLARKE, M. TERASAKI, V. E. BONN, C. HAWKINS, J. SQUIRE et P. B. DIRKS. 2003, «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors», *Cancer Res*, vol. 63, n° 18, p. 5821–5828, ISSN 0008-5472. 3, 8, 13, 15

SINGH, S. K., C. HAWKINS, I. D. CLARKE, J. A. SQUIRE, J. BAYANI, T. HIDE, R. M. HENKELMAN, M. D. CUSIMANO et P. B. DIRKS. 2004, «Identification of human brain tumour initiating cells», *Nature*, vol. 432, n° 7015, doi :10.1038/nature03128, p. 396–401, ISSN 0028-0836, 1476-4687. 4, 11, 14

SON, M. J., K. WOOLARD, D.-H. NAM, J. LEE et H. A. FINE. 2009, «SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma», *Cell Stem Cell*, vol. 4, n° 5, doi :10.1016/j.stem.2009.03.003, p. 440–452, ISSN 19345909. 11

STEVENS, M. M., C. L. MAIRE, N. CHOU, M. A. MURAKAMI, D. KNOFF, Y. KIKUCHI, R. J. KIMMERLING, H. LIU, S. HAIDAR, N. L. CALISTRI, N. CERMAK, S. OLCUM, N. CORDERO, A. IDBAIH, P. Y. WEN, D. M. WEINSTOCK, K. L. LIGON et S. R. MANALIS. 2016, «Drug sensitivity of single cancer cells is predicted by changes in mass accumulation rate», *Nat Biotechnol*, vol. 34, n° 11, doi :10.1038/nbt.3697, p. 1161–1167, ISSN 1087-0156. 18

STOYANOV, G. S. et D. L. DZHENKOV. 2018, «On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics», *Folia Med (Plovdiv)*, vol. 60, n° 1, doi : 10.1515/folmed-2017-0069, p. 48–66, ISSN 0204-8043. 5

STUPP, R., M. E. HEGI, W. P. MASON, M. J. VAN DEN BENT, M. J. B. TAPHOORN, R. C. JANZER, S. K. LUDWIN, A. ALLGEIER, B. FISHER, K. BELANGER, P. HAU, A. A. BRANDES, J. GIJTENBEEK, C. MAROSI, C. J. VECHT, K. MOKHTARI, P. WESSELING, S. VILLA, E. EISENHAUER, T. GORLIA, M. WELLER, D. LACOMBE, J. G. CAIRNCROSS, R.-O. MIRIMANOFF, EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOUR AND RADIATION ONCOLOGY GROUPS et NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP. 2009, «Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial», *Lancet Oncol*, vol. 10, n° 5, doi :10.1016/S1470-2045(09)70025-7, p. 459–466, ISSN 1474-5488. 8

- SUN, J., M. D. MASTERMAN-SMITH, N. A. GRAHAM, J. JIAO, J. MOTTAHEDEH, D. R. LAKS, M. OHASHI, J. DEJESUS, K.-I. KAMEI, K.-B. LEE, H. WANG, Z. T. F. YU, Y.-T. LU, S. HOU, K. LI, M. LIU, N. ZHANG, S. WANG, B. ANGENIEUX, E. PANOSYAN, E. R. SAMUELS, J. PARK, D. WILLIAMS, V. KONKANKIT, D. NATHANSON, R. M. VAN DAM, M. E. PHELPS, H. WU, L. M. LIAU, P. S. MISCHER, J. A. LAZAREFF, H. I. KORNBLUM, W. H. YONG, T. G. GRAEBER et H.-R. TSENG. 2010, «A microfluidic platform for systems pathology : Multiparameter single-cell signaling measurements of clinical brain tumor specimens», *Cancer Res*, vol. 70, n° 15, doi :10.1158/0008-5472.CAN-10-0076, p. 6128–6138, ISSN 1538-7445. 17
- SUNG, K. S., J.-K. SHIM, J.-H. LEE, S. H. KIM, S. PARK, T.-H. ROH, J. H. MOON, E.-H. KIM, S. H. KIM, S. J. LEE, Y. M. HUH, S.-G. KANG et J. H. CHANG. 2016, «Success of tumorsphere isolation from WHO grade IV gliomas does not correlate with the weight of fresh tumor specimens : An immunohistochemical characterization of tumorsphere differentiation», *Cancer Cell International*, vol. 16, n° 1, doi :10.1186/s12935-016-0350-1, p. 75, ISSN 1475-2867. 16
- SUVÀ, M. L., E. RHEINBAY, S. M. GILLESPIE, A. P. PATEL, H. WAKIMOTO, S. D. RABKIN, N. RIGGI, A. S. CHI, D. P. CAHILL, B. V. NAHED, W. T. CURRY, R. L. MARTUZA, M. N. RIVERA, N. ROSSETTI, S. KASIF, S. BEIK, S. KADRI, I. TIROSH, I. WORTMAN, A. K. SHALEK, O. ROZENBLATT-ROSEN, A. REGEV, D. N. LOUIS et B. E. BERNSTEIN. 2014, «Reconstructing and Reprogramming the Tumor-Propagating Potential of Glioblastoma Stem-like Cells», *Cell*, vol. 157, n° 3, doi :10.1016/j.cell.2014.02.030, p. 580–594, ISSN 00928674. 9
- SUVÀ, M. L. et I. TIROSH. 2020, «The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics», *Cancer Cell*, vol. 37, n° 5, doi :10.1016/j.ccell.2020.04.001, p. 630–636, ISSN 1535-6108. 12, 13
- SUZUKA, J., M. TSUDA, L. WANG, S. KOHSAKA, K. KISHIDA, S. SEMBA, H. SUGINO, S. ABURATANI, M. FRAUENLOB, T. KUROKAWA, S. KOJIMA, T. UENO, Y. OHMIYA, H. MANO, K. YASUDA, J. P. GONG et S. TANAKA. 2021, «Rapid reprogramming of tumour cells into cancer stem cells on double-network hydrogels», *Nature Biomedical Engineering*, doi :10.1038/s41551-021-00692-2, p. 1–12, ISSN 2157-846X. 12
- TAKAGI, Y. 2016, «History of Neural Stem Cell Research and Its Clinical Application», *Neurol Med Chir (Tokyo)*, vol. 56, n° 3, doi :10.2176/nmc.ra.2015-0340, p. 110–124, ISSN 0470-8105. 3
- TAMIMI, A. F. et M. JUWEID. 2017, «Epidemiology and Outcome of Glioblastoma», dans *Glioblastoma*, édité par S. De Vleeschouwer, Codon Publications, Brisbane (AU), ISBN 978-0-9944381-2-6, p. 452. 5
- TAO, W., C. CHU, W. ZHOU, Z. HUANG, K. ZHAI, X. FANG, Q. HUANG, A. ZHANG, X. WANG, X. YU, H. HUANG, Q. WU, A. E. SLOAN, J. S. YU, X. LI, G. R. STARK, J. N. RICH et S. BAO. 2020, «Dual Role of WISP1 in maintaining glioma stem cells and tumor-supportive macrophages in glioblastoma», *Nature Communications*, vol. 11, n° 1, doi :10.1038/s41467-020-16827-z, p. 3015, ISSN 2041-1723. 10
- TARASOV, V. V., A. A. SVISTUNOV, V. N. CHUBAREV, T. A. ZATSEPILOVA, N. G. PREFERANSKAYA, O. I. STEPANOVA, A. V. SOKOLOV, S. A. DOSTDAR, N. N. MINYAEVA, M. E. NEGANOVA, S. G. KLOCHKOV, L. M. MIKHALEVA, S. G. SOMASUNDARAM, C. E. KIRKLAND et G. ALIEV. 2019, «Feasibility of Targeting Glioblastoma Stem Cells : From Concept to Clinical Trials», *Curr Top Med Chem*, vol. 19, n° 32, doi :10.2174/1568026619666191112140939, p. 2974–2984, ISSN 1873-4294. 12
- TEJERO, R., Y. HUANG, I. KATSYV, M. KLUGE, J.-Y. LIN, J. TOME-GARCIA, N. DAVIAUD, Y. WANG, B. ZHANG, N. M. TSANKOVA, C. C. FRIEDEL, H. ZOU et R. H. FRIEDEL. 2019, «Gene signatures of quiescent glioblastoma cells reveal mesenchymal shift and interactions with niche microenvironment», *EBioMedicine*, vol. 42, doi :10.1016/j.ebiom.2019.03.064, p. 252–269, ISSN 2352-3964. 16

- THAKKAR, J. P., T. A. DOLECEK, C. HORBINSKI, Q. T. OSTROM, D. D. LIGHTNER, J. S. BARNHOLTZ-SLOAN et J. L. VILLANO. 2014, «Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma», *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 23, n° 10, doi :10.1158/1055-9965.EPI-14-0275, p. 1985–1996, ISSN 1538-7755. 6
- THIRANT, C., B. BESSETTE, P. VARLET, S. PUGET, J. CADUSSEAU, S. D. R. TAVARES, J.-M. STUDLER, D. C. SILVESTRE, A. SUSINI, C. VILLA, C. MIQUEL, A. BOGEAS, A.-L. SURENA, A. DIAS-MORAIS, N. LÉONARD, F. PFLUMIO, I. BIÈCHE, F. D. BOUSSIN, C. SAINTE-ROSE, J. GRILL, C. DAUMAS-DUPORT, H. CHNEIWEISS et M.-P. JUNIER. 2011, «Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors», *PLOS ONE*, vol. 6, n° 1, doi :10.1371/journal.pone.0016375, p. e16375, ISSN 1932-6203. 15
- THOMAS, R. P., L. RECHT et S. NAGPAL. 2012, «Advances in the management of glioblastoma : The role of temozolomide and MGMT testing», *Clin Pharmacol*, vol. 5, doi :10.2147/CPAA.S26586, p. 1–9, ISSN 1179-1438. 8
- THOMAS, T. M. et J. S. YU. 2017, «Metabolic regulation of glioma stem-like cells in the tumor micro-environment», *Cancer Letters*, vol. 408, doi :10.1016/j.canlet.2017.07.014, p. 174–181, ISSN 03043835. 9
- TOUAT, M., A. IDBAIH, M. SANSON et K. L. LIGON. 2017, «Glioblastoma targeted therapy : Updated approaches from recent biological insights», *Ann Oncol*, vol. 28, n° 7, doi :10.1093/annonc/mdx106, p. 1457–1472, ISSN 1569-8041. 8
- TRUONG, D., R. FIORELLI, E. S. BARRIENTOS, E. L. MELENDEZ, N. SANAI, S. MEHTA et M. NIKKHAH. 2019, «A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells – Vascular interactions», *Biomaterials*, vol. 198, doi :10.1016/j.biomaterials.2018.07.048, p. 63–77, ISSN 0142-9612. 17
- TURING, A. M. 1950, «I.—COMPUTING MACHINERY AND INTELLIGENCE», *Mind*, vol. LIX, n° 236, doi :10.1093/mind/LIX.236.433, p. 433–460, ISSN 0026-4423. 19
- UMAR, S. 2010, «Intestinal Stem Cells», *Curr Gastroenterol Rep*, vol. 12, n° 5, doi :10.1007/s11894-010-0130-3, p. 340–348, ISSN 1522-8037. 3
- VANNIEUWENHUYZE, A. 2019, *Intelligence artificielle vulgarisée*, Editions ENI, St Herblain, ISBN 978-2-409-02073-5. 20
- VERHAAK, R. G., K. A. HOADLEY, E. PURDOM, V. WANG, Y. QI, M. D. WILKERSON, C. R. MILLER, L. DING, T. GOLUB, J. P. MESIROV, G. ALEXE, M. LAWRENCE, M. O’KELLY, P. TAMAYO, B. A. WEIR, S. GABRIEL, W. WINCKLER, S. GUPTA, L. JAKKULA, H. S. FEILER, J. G. HODGSON, C. D. JAMES, J. N. SARKARIA, C. BRENNAN, A. KAHN, P. T. SPELLMAN, R. K. WILSON, T. P. SPEED, J. W. GRAY, M. MEYERSON, G. GETZ, C. M. PEROU et D. N. HAYES. 2010, «Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1», *Cancer Cell*, vol. 17, n° 1, doi :10.1016/j.ccr.2009.12.020, p. 98–110, ISSN 15356108. 17
- VIK-MO, E. O., M. NYAKAS, B. V. MIKKELSEN, M. C. MOE, P. DUE-TØNNESEN, E. M. I. SUSO, S. SÆBØE-LARSSSEN, C. SANDBERG, J. E. BRINCHMANN, E. HELSETH, A.-M. RASMUSSEN, K. LOTE, S. AAMDAL, G. GAUDERNACK, G. KVALHEIM et I. A. LANGMOEN. 2013, «Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma», *Cancer Immunol Immunother*, vol. 62, n° 9, doi :10.1007/s00262-013-1453-3, p. 1499–1509, ISSN 1432-0851. 13
- WALLENBORN, M., L.-X. XU, H. KIRSTEN, L. ROHANI, D. RUDOLF, P. AHNERT, C. SCHMIDT, R. M. SCHULZ, M. RICHTER, W. KRUPP, W. MUELLER, A. A. JOHNSON, J. MEIXENSBERGER et H. HOLLAND. 7 juil. 2020, «Molecular analyses of glioblastoma stem-like cells and glioblastoma tissue», *PLOS ONE*, vol. 15, n° 7, doi :10.1371/journal.pone.0234986, p. e0234986, ISSN 1932-6203. 9, 11

- WAN, F., S. ZHANG, R. XIE, B. GAO, B. CAMPOS, C. HEROLD-MENDE et T. LEI. 2010, «The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research», *Brain Pathol*, vol. 20, n° 5, doi :10.1111/j.1750-3639.2010.00379.x, p. 877–889, ISSN 1750-3639. 15
- WANG, J., D. THAM, W. WEI, Y. S. SHIN, C. MA, H. AHMAD, Q. SHI, J. YU, R. D. LEVINE et J. R. HEATH. 2012, «Quantitating cell-cell interaction functions with applications to glioblastoma multiforme cancer cells», *Nano Lett*, vol. 12, n° 12, doi :10.1021/nl302748q, p. 6101–6106, ISSN 1530-6992. 17
- WARBURG, O., K. POSENER et E. NEGELEIN. 1924, «Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle», *Biochem Z*, vol. 152, p. 309–344. 9
- WEINER, L. P. 2008, «Definitions and Criteria for Stem Cells», dans *Neural Stem Cells : Methods and Protocols*, édité par L. P. Weiner, *Methods in Molecular Biology™*, Humana Press, Totowa, NJ, ISBN 978-1-59745-133-8, p. 3–8, doi :10.1007/978-1-59745-133-8\_1. 4
- WHITESIDES, G. M., E. OSTUNI, S. TAKAYAMA, X. JIANG et D. E. INGBER. 2001, «Soft lithography in biology and biochemistry», *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 3, doi :10.1146/annurev.bioeng.3.1.335, p. 335–373, ISSN 1523-9829. 16
- WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL, B. 2021, *Central Nervous System Tumours*, ISBN 978-92-832-4508-7. 5, 7
- WILLIAMS, R. T., W. DEN BESTEN et C. J. SHERR. 2007, «Cytokine-dependent imatinib resistance in mouse BCR-ABL+, Arf-null lymphoblastic leukemia», *Genes Dev*, vol. 21, n° 18, doi :10.1101/gad.1588607, p. 2283–2287, ISSN 0890-9369. 4
- WILLIAMS, S. A., W. C. ANDERSON, M. T. SANTAGUIDA et S. J. DYLLA. 2013, «Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century», *Lab Invest*, vol. 93, n° 9, doi :10.1038/labinvest.2013.92, p. 970–982, ISSN 1530-0307. 14
- WONG, K. K., R. ROSTOMILY et S. T. C. WONG. 2019, «Prognostic Gene Discovery in Glioblastoma Patients using Deep Learning», *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 1, doi :10.3390/cancers11010053, p. E53, ISSN 2072-6694. 27
- WONG, S. Y., T. A. ULRICH, L. P. DELEYROLLE, J. L. MACKAY, J.-M. G. LIN, R. T. MARTUSCELLO, M. A. JUNDI, B. A. REYNOLDS et S. KUMAR. 2015, «Constitutive Activation of Myosin-Dependent Contractility Sensitizes Glioma Tumor-Initiating Cells to Mechanical Inputs and Reduces Tissue Invasion», *Cancer Research*, vol. 75, n° 6, doi :10.1158/0008-5472.CAN-13-3426, p. 1113–1122, ISSN 0008-5472, 1538-7445. 10
- WU, A., J. WEI, L.-Y. KONG, Y. WANG, W. PRIEBE, W. QIAO, R. SAWAYA et A. B. HEIMBERGER. 2010, «Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia», *Neuro Oncol*, vol. 12, n° 11, doi :10.1093/neuonc/noq082, p. 1113–1125, ISSN 1523-5866. 10
- WU, M., J. MISKA, T. XIAO, P. ZHANG, J. R. KANE, I. V. BALYASNIKOVA, J. P. CHANDLER, C. M. HORBINSKI et M. S. LESNIAK. 2019, «Race influences survival in glioblastoma patients with KPS  $\geq$  80 and associates with genetic markers of retinoic acid metabolism», *J Neurooncol*, vol. 142, n° 2, doi :10.1007/s11060-019-03110-5, p. 375–384, ISSN 1573-7373. 6
- YU, Q., Y. XUE, J. LIU, Z. XI, Z. LI et Y. LIU. 2018, «Fibronectin Promotes the Malignancy of Glioma Stem-Like Cells Via Modulation of Cell Adhesion, Differentiation, Proliferation and Chemoresistance», *Front Mol Neurosci*, vol. 11, doi :10.3389/fnmol.2018.00130, p. 130, ISSN 1662-5099. 13

ZHAI, Y., G. LI, R. LI, Y. CHANG, Y. FENG, D. WANG, F. WU et W. ZHANG. 2020, «Single-Cell RNA-Sequencing Shift in the Interaction Pattern Between Glioma Stem Cells and Immune Cells During Tumorigenesis», *Front. Immunol.*, vol. 11, doi :10.3389/fimmu.2020.581209, ISSN 1664-3224. [10](#)

ZHANG, J. Z. et S. NAGRATH. 2013, «Microfluidics and Cancer : Are we there yet?», *Biomed Micro-devices*, vol. 15, n° 4, doi :10.1007/s10544-012-9734-8, p. 595–609, ISSN 1387-2176. [16](#)

ZHENG, X., C. YU et M. XU. 2021, «Linking Tumor Microenvironment to Plasticity of Cancer Stem Cells : Mechanisms and Application in Cancer Therapy», *Frontiers in Oncology*, vol. 11, ISSN 2234-943X. [10](#)

Toutes les figures de ce documents sont originales. Les figures utilisées dans les deux articles [3.1.5](#) et [3.3.3](#) ont été ou vont être publiées. Je remercie Gilles SIMON (Institut lumière matière) pour les représentations tridimensionnelles du micro-pipetteur. Les illustrations biologiques proviennent de Servier medical art. Les autres illustrations sont des images libres de droit. Je remercie Marie pour m'avoir laissé utiliser la photographie d'Ostara pour la figure [1.12](#).



# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

*« Pourquoi faire simple quand on peut faire compliqué? »*

Proverbe Shadok

### Sommaire

---

<b>2.1 Fabrication du microsysteme</b> . . . . .	<b>48</b>
2.1.1 Conception de la puce et usinage . . . . .	48
2.1.2 Fonctionnalisation des lamelles de verre . . . . .	49
2.1.3 Fabrication des puces d'agarose . . . . .	49
<b>2.2 Microscope</b> . . . . .	<b>52</b>
2.2.1 Matériels . . . . .	52
2.2.2 Logiciels . . . . .	52
<b>2.3 Matériel informatique et logiciels</b> . . . . .	<b>55</b>
<b>2.4 Lignées cellulaires</b> . . . . .	<b>55</b>
2.4.1 Origine et données moléculaires . . . . .	55
2.4.2 Culture cellulaire . . . . .	55
2.4.3 Tests pharmacologiques . . . . .	56
<b>2.5 Le micropipetteur cellulaire</b> . . . . .	<b>57</b>
2.5.1 La conception du bras et son contrôle . . . . .	57
2.5.2 Fabrication des capillaires . . . . .	57
2.5.3 Micro-système de prélèvement par aspiration . . . . .	58
<b>2.6 Références</b> . . . . .	<b>59</b>

---

Afin de développer la plateforme de phénotypage, il a fallu maîtriser l'ensemble des processus de la chaîne de conception, de fabrication et d'utilisation du système microfabriqué. Les étapes de la fabrication de la puce seront décrites dans la première section (2.1) de ce chapitre. Les méthodes d'imagerie de la puce et le matériel informatique nécessaire seront détaillées respectivement dans la seconde 2.2 et la troisième 2.3 section. Les données sur le modèle biologique seront ensuite présentées dans la 2.4. Enfin, nous détaillerons dans la dernière section 2.5 la conception et le contrôle du micropipetteur.

## 2.1 Fabrication du microsysteme

### 2.1.1 Conception de la puce et usinage

Plusieurs puces ont été développées au cours de ce travail.

— La puce "wall-less" (Figure 2.1a). Il s'agit du premier modèle de puce utilisé. Elle mesure 1cm de long et 1cm de large. La puce "wall-less" contient 1200 micro-puits de 100 $\mu$ m de diamètre et de 100 $\mu$ m de profondeur.

— La puce "quadrants" (Figure 2.1b). Elle mesure 1cm de long et 1cm de large. Ses 1200 micro-puits de 100 $\mu$ m de diamètre et de 100 $\mu$ m de profondeur sont également répartis dans les quatre quadrants carrés de 0.4cm qui la composent. Chacun des quadrants est délimité par un mur de 0.2cm de hauteur et de 0.2cm d'épaisseur. Les murs permettent d'éviter que les flux de milieu emportent les cellules hors des micropuits.

— La puce "2K" (Figure 2.1c). Cette puce est de forme circulaire de 1.2cm de diamètre. Elle contient 2000 micro-puits de 200 $\mu$ m de diamètre et de 220 $\mu$ m de profondeur. Une enceinte elliptique de 0.2cm de hauteur et de 0.2 à 0.3 cm d'épaisseur délimite la puce "2K". Une croix gravée en son centre permet de s'orienter sous le microscope. La puce "2K" a été développée afin d'être recouverte par un bouchon d'agarose de même diamètre et de 0.2cm d'épaisseur. Tout en restant perméable aux nutriments présents dans le milieu de culture, le bouchon permet 1) de limiter la sortie des cellules hors des micro-puits et 2) d'éviter la sédimentation tardive de cellules dans les micro-puits (Figure 2.3).

Les trois modèles de puces ont tous été conçus de la même façon. Les plans ont été conçus sur le logiciel de dessin industriel Autodesk Inventor Pro [AUTODESK \[2018\]](#). Puis des pièces de laiton ont été usinées à la microfraiseuse Mini-Mill (Minitex) selon ces plans. Du PDMS (Sylgard 184) composé à 10% d'agent réticulant est coulé sur le moule en laiton. Le PDMS est ensuite placé dans une étuve à 70°C pendant au moins 4 heures afin de se rigidifier. A l'aide d'isopropanol, le contre-moule de PDMS est décollé avec précaution du moule en laiton. Le contre-moule de PDMS peut être utilisé plusieurs fois à condition d'être stocké dans un endroit sec et protégé

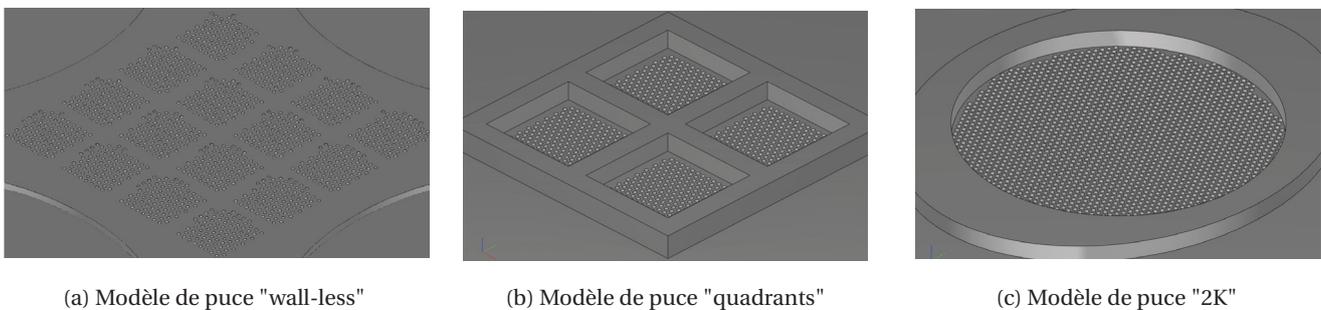


FIGURE 2.1 – **Modèles de puces.** Représentation tridimensionnelle des modèles de puces que nous avons conçus. Les micro-puits du modèle "wall-less" ne sont pas ceints d'un mur (a), contrairement aux micro-puits de la puce "quadrants" (b). La puce "2K" contient 2000 micro-puits protégés par un mur et est compatible avec le bouchon d'agarose (c) (Figure 2.3).

pendant plusieurs mois.

### 2.1.2 Fonctionnalisation des lamelles de verre

Les puces d'agarose sont collées sur des lamelles de verre fonctionnalisées grâce au greffage de silane. Le protocole de préparation de cette solution est le suivant [RIVIÈRE et collab. \[2018\]](#) (Figure 2.2) :

- Nettoyer les lamelles de verre à l'éthanol 70% et les sécher à l'air comprimé.
- Sous hotte aspirante, diluer 12.5µL d'acide acétique (ACS REAG. 2010429) dans 43.5mL d'eau pure stérile (soit 0.028%), puis mélanger.
- Toujours sous la hotte, ajouter 435µL (soit 1%) de 3-aminopropyltriéthoxysilane (Acros Organics 430941000), puis mélanger.
- Mettre les lamelles dans la solution de silane et laisser 20 minutes sous agitation à température ambiante.
- Rincer les lamelles à l'éthanol 70% (au moins 3 secondes par face) et les sécher à l'air comprimé.
- Placer les lamelles sur une plaque chauffante (préalablement stérilisée à l'éthanol) sous la hotte de culture. Cuire 15 minutes à 100°C les lamelles.
- Placer les lamelles dans un endroit sec. Elles peuvent être conservées 1 semaine.

### 2.1.3 Fabrication des puces d'agarose

La fabrication des puces d'agarose se fait en conditions stériles sous la hotte de culture. L'agarose a l'avantage d'être un matériel peu coûteux, biocompatible et perméable aux nutriments et autres macromolécules [PLUEN et collab. \[1999\]](#).

- Avant toute chose, stériliser sous les rayons UV et dans la hotte de culture la boîte de culture cellulaire trouée ainsi que les contre-moules de PDMS. Placer également sous la hotte de culture une plaque chauffante nettoyée à l'éthanol 70% et la faire chauffer à 100°C.
- Stériliser une solution d'agarose standard (Roth, 3810.2) à l'autoclave (20 minutes à 121°C).
- Mettre sur la plaque chauffante les contre-moules de PDMS stérilisés ainsi que les lamelles de verre fonctionnalisées.
- Une fois la solution d'agarose stérilisée, la placer sur la plaque chauffante.
- Mouiller le contre-moule de PDMS avec une goutte d'éthanol 70%.
- Prélever 200µL d'agarose et les déposer sur le contre-moule.
- À l'aide d'une pince, placer délicatement une lamelle de verre sur l'agarose encore liquide. Laisser refroidir 10 minutes.
- Séparer délicatement l'agarose du contre-moule. La puce d'agarose doit rester attachée à la lamelle de verre.
- Coller la lamelle de verre au fond de la boîte de culture avec la colle NOA81 (36-428). La polymérisation de la colle nécessite une exposition aux rayons UV (365 nm) pendant 1 minute.
- Une fois la colle polymérisée, verser du milieu de culture avec antibiotiques, puis stérilisation sous les rayons UV pendant 2 heures au minimum.
- Enfin la boîte de culture doit être scellée avec du parafilm. Elle peut être conservée à 4°C pendant 1 semaine.

La figure 2.2 schématise l'ensemble du processus de fabrication de la puce.

La fabrication des bouchons d'agarose est similaire. Il n'est cependant pas nécessaire que les lamelles de verre soient silanisées. De plus, après refroidissement de l'agarose, les bouchons sont déposés dans une boîte de Pétri stérile. Une fois que tous les bouchons sont fabriqués, le milieu de culture avec antibiotiques peut être ajouté et la boîte de Pétri stérilisée sous les rayons UV. Après 2 heures de stérilisation des bouchons et de la puce, il est possible d'ensemencer la puce avec une solution de cellules en suspension. Après sédimentation des cellules dans les micro-puits, le

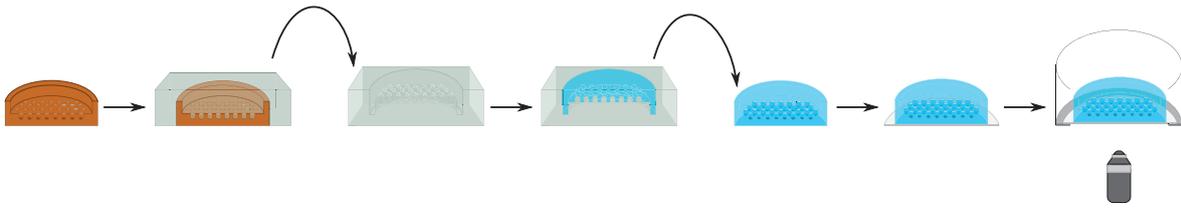


FIGURE 2.2 – **Représentation schématique des étapes de fabrication de la puce.** Le moule en laiton (mar-ron) est usiné avec la micro-fraiseuse. Le contre-moule de PDMS (gris) constitue le négatif du moule de laiton. Puis la puce d'agarose (bleu clair) est coulée sur le contre-moule de PDMS. Après fixation sur la lamelle silanisée, la puce est collée au fond d'une boîte de culture pour être imagée.

bouchon d'agarose est placé au-dessus du système afin de limiter la sédimentation tardive dans les micro-puits (Figure 2.3).

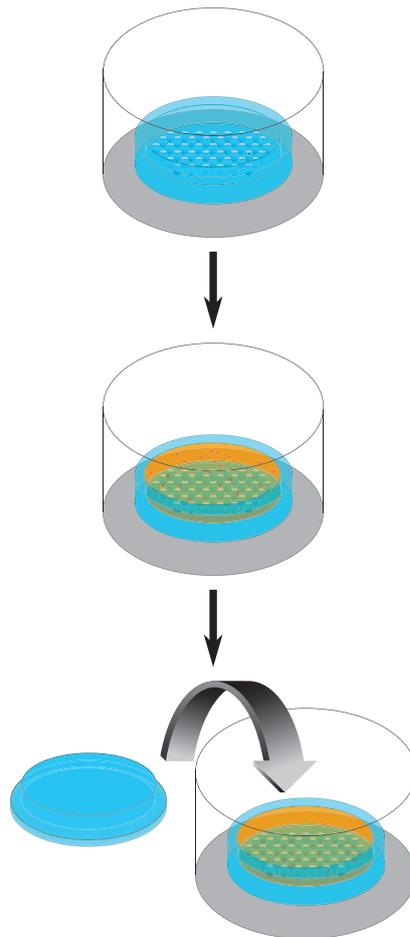


FIGURE 2.3 – **Représentation schématique de l'ensemencement de la puce.** La puce (bleu clair) est collée au fond d'une boîte de culture cellulaire (gris). La solution de milieu contenant les cellules dissociées (orange) est versée au-dessus de la puce. Par gravité, les cellules sédimentent au fond des micro-puits. Après avoir retiré le surnageant, on place le bouchon d'agarose (bleu clair) au-dessus de la puce afin d'empêcher la sédimentation tardive.

## 2.2 Microscope

### 2.2.1 Matériels

Le modèle de microscope utilisé est un microscope inversé Leica DMIRB. L'illumination par lumière blanche est assurée par une LED Thorlab MWWHL4 et la lumière fluorescente est produite par une source pE-300 (CooLED). La caméra utilisée pour la prise d'images est une Andor Neo 5.5 SCMOS. L'obturateur Vincent associated D1 permet de contrôler l'illumination. Les objectifs de 10X et 20X sont fabriqués par Leica. Le contrôleur Prior proscan II permet de déplacer la platine du microscope. La température du système est maintenue à 37°C (Life Imaging Services Cube). La pression partielle en CO<sub>2</sub> est assurée par le mélangeur Brick (Life Imaging Services Brick) : de l'air comprimé et du CO<sub>2</sub> sont injectés dans le mélangeur puis celui-ci permet de rejeter un mélange dont la pression partielle de CO<sub>2</sub> est maintenue à 7% (nous avons empiriquement déterminé qu'à cause des pertes, une pression partielle de 7% dans le microscope équivaut à une pression partielle de 5% dans l'incubateur). Le gaz produit par le mélangeur est ensuite filtré avant de passer dans un humidificateur. L'humidificateur est rempli avant chaque expérience par de l'eau stérile à laquelle on rajoute une goutte de Bactinyl. Le gaz humidifié est ensuite envoyé jusqu'à l'échantillon qui se trouve dans une chambre d'incubation. Celle-ci est également nettoyée avant chaque expérience. En finalité, ce montage expérimental permet de maintenir l'échantillon dans des conditions de température, d'humidité et de pression partielle en CO<sub>2</sub> similaires à celles de l'incubateur.

### 2.2.2 Logiciels

La platine, l'obturateur et la lampe de fluorescence sont contrôlés par le logiciel micro-manager [EDELSTEIN et collab. \[2014\]](#). Micro-manager permet de contrôler les paramètres de la vidéomicroscopie : la durée de l'expérience, la cadence d'imagerie, les coordonnées des positions.

La liste des positions et de leurs coordonnées est produite automatiquement par un script Python que nous avons développé. En renseignant les coordonnées x et y de cinq points sur la puce, ainsi que la profondeur de champ optimale en ces cinq points, le script calcule la liste des coordonnées tridimensionnelles des positions afin que l'ensemble de la surface de la puce soit imagé. Ce fichier est ensuite chargé dans micro-manager (Figure 2.4).

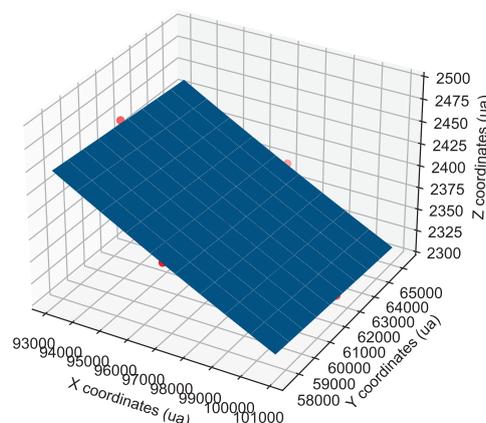


FIGURE 2.4 – **Correction de l'inclinaison du gel.** Les cinq points rouges représentent les points dont les coordonnées tridimensionnelles ont été enregistrées à la main. A l'aide d'un algorithme, nous produisons automatiquement la liste des 100 positions nécessaires pour imager l'ensemble de la puce et corriger l'éventuelle inclinaison de celle-ci. Les valeurs sont données en unité arbitraire (ua) qui dépendent de la platine.

En scannant l'ensemble de la puce, il arrive que certains micro-puits soient imagés plusieurs fois. Nous avons donc développé un script Python qui détecte la position des micro-puits et calcule ses coordonnées absolues (c'est-à-dire par rapport à la position d'origine de la boîte de culture, en l'occurrence son coin inférieur droit). Grâce à la fonction de détection de cercles du package OpenCV BRADSKI [2000], les micro-puits sont détectés et numérotés sur chacune des images. Les coordonnées des micro-puits sont conservées sur une base de données pandas MCKINNEY [2010]. En comparant les coordonnées de chacun des micro-puits pour chacune des positions, on peut déterminer si un micro-puits a été imagé plusieurs fois. Si tel est le cas, seul le premier indexage du micro-puits est conservé. On aboutit ainsi à la liste de tous les micro-puits imagés sur la puce.

Une fois la liste des micro-puits établie, une région d'intérêt est définie autour du micro-puits. Cette zone est sauvegardée dans un dossier au nom du micro-puits. La détection et le découpage de cette zone d'intérêt vont être appliqués sur chaque image acquise au cours de la vidéomicroscopie. Cette étape est importante car les images initiales sont supprimées au fur et à mesure afin de réduire par 100 la taille des données. En finalité, on obtient avec un dossier par micro-puits et chaque dossier contient les images de ce micro-puits au cours de la vidéomicroscopie (Figure 2.5).

Lorsque la boîte de culture doit être imagée après avoir été sortie du microscope, il est possible que les coordonnées soient légèrement décalées. En effet, la liste des positions des micro-puits est calculée à partir de la position initiale de la platine du microscope. Or celle-ci peut légèrement dériver avec le temps. Il faut donc réaligner la position initiale actuelle de la platine avec la position initiale du jour où la liste des coordonnées des micro-puits a été établie. Ceux-ci étant fixes par rapport à la boîte de culture, il suffit de prendre un point de repère sur la boîte de culture, de le faire coïncider avec sa position initiale. La différence de distance peut alors être appliquée à l'ensemble des coordonnées des micro-puits (qui seront recalculées). En pratique, l'alignement n'est jamais parfait, mais s'il est raisonnable, il ne gêne pas l'analyse d'images.

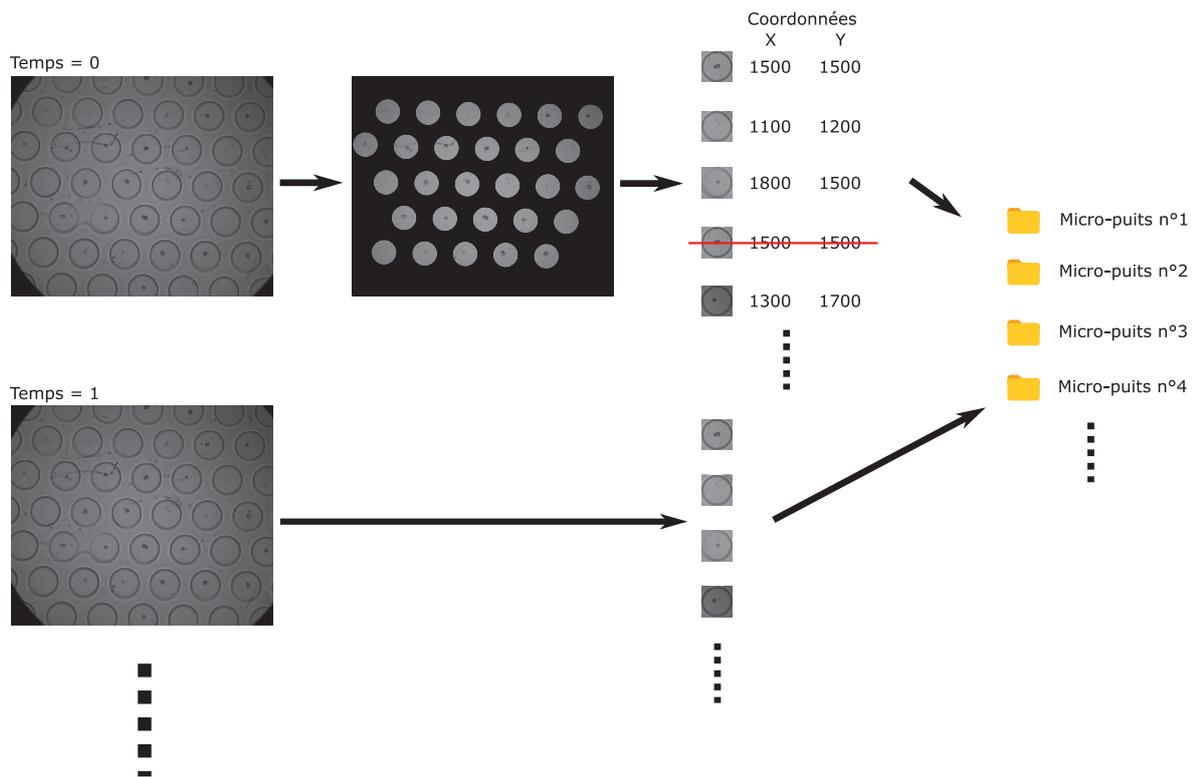


FIGURE 2.5 – **Imagerie des micro-puits.** La première image de la vidéomicroscopie est analysée de sorte à identifier les micro-puits. Les coordonnées sont calculées afin 1) d'établir la liste de tous les puits et de leurs coordonnées et 2) de ne pas conserver les puits qui ont été imagés plusieurs fois. Les micro-puits sont ensuite sauvegardés individuellement dans des dossiers correspondants. La liste des coordonnées des micro-puits est ensuite appliquée sur les images suivantes de la vidéomicroscopie afin de sauvegarder spécifiquement les images des micro-puits et de les placer dans les dossiers correspondants.

## 2.3 Matériel informatique et logiciels

L'analyse d'images a été réalisée sur un ordinateur avec le système d'exploitation Windows 10, 64 bits et un processeur Intel(R) Core i7-7000 3,60Hz. La référence de la carte graphique utilisée est NVIDIA quadro p600. La programmation a été rédigée en langage Python, avec les packages Mahotas [COELHO \[2013\]](#), OpenCV [BRADSKI \[2000\]](#), seaborn [WASKOM \[2021\]](#), numpy [HARRIS et collab. \[2020\]](#), SciPy [VIRTANEN et collab. \[2020\]](#), pandas [MCKINNEY \[2010\]](#), matplotlib [HUNTER \[2007\]](#) et Tensorflow [ABADI et collab. \[2016\]](#). La version d'Ilstik utilisée est 1.3.2post [BERG et collab. \[2019\]](#).

## 2.4 Lignées cellulaires

### 2.4.1 Origine et données moléculaires

Deux lignées cellulaires ont principalement été utilisées au cours de la thèse : la lignée N14-0510 et la lignée N15-1525. Chaque lignée provient d'une tumeur prélevée après recueil du consentement du patient à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière – équipe Neurooncologie expérimentale (Dr Ahmed IDBAIH). Une analyse anatomo-pathologique de la lésion a confirmé le diagnostic de glioblastome. Les cellules de la tumeur sont ensuite dissociées avant d'être greffées en sous-cutanées dans des souris. Cette étape a pour but d'amplifier les populations de cellules cancéreuses *in vivo*. Les cellules sont enfin prélevées pour être étudiées *in vitro* [BERABEZ \[2018\]](#). Afin d'alléger le texte, les lignées N14-0510 et N15-1525 seront appelées respectivement N14 et N15 pour la suite.

Nous disposons de peu d'informations sur les données moléculaires des N14 et des N15. Pour les N14, les gènes *IDH1* et *IDH2* ne sont pas mutés [BERABEZ \[2018\]](#). Les N14 et les N15 présentent un autre un niveau d'expression modéré de la protéine anti-apoptotique BCL-xL [FANFONE et collab. \[2020\]](#).

Nous avons également utilisé la lignée de cellules de cancer colo-rectales humaines HCT116.

### 2.4.2 Culture cellulaire

Le milieu de culture des CSG est composé à partir de DMEM-F12 (Life, 31330-095) supplémenté avec du B-27 (Life, 17504-001) et du N-2 (Life, 17502-048) chacun à la concentration 1X. Les antibiotiques (Pénicilline/Streptavidine, Life, 15140-122) sont également ajoutés à ce moment là, à la concentration 1X. Ce mélange initial est appelé milieu incomplet, il peut être gardé 1 mois à 4°C. Avant que le milieu incomplet soit utilisé au contact des cellules, il faut rajouter à la concentration 1 :1000 du hEGF (Miltenyi Biotec, 130-093-825), du hFGF (Miltenyi Biotec, 130-104-922) et de l'héparine (Sigma, H3149), on parle alors de milieu complet. Le passage des cellules est réalisé une fois par semaine, de même que le changement de milieu qui est intercalé entre-temps. L'apport de milieu frais 2 fois par semaine a été une contrainte qu'il a fallu prendre en considération pour nos expériences.

Les HCT116 sont cultivées dans du DMEM-Glutamax (Gibco), avec 10% de sérum de veau fœtal (PAN Biotech, P30-1985), et 100 unités/100 microgrammes de pénicilline et de streptavidine (Life, 15140-122).

Afin de les maintenir dans leur état souche, les CSG sont cultivées en conditions non adhérentes dans des boîtes Corning Ultra-low attachment surface. Lors du passage des cellules, la première étape est donc de pipeter les cellules de la boîte de culture dans un flacon. Celui-ci est cen-

trifugé à environ 300g. Après centrifugation, le milieu est aspiré avec précaution afin de ne pas perdre le culot cellulaire. Les cellules sont ensuite suspendues dans de l'Accumax (Sigma, A7089), puis placées à 37°C pendant 10 minutes pour être isolées. Après action de l'Accumax, les cellules sont filtrées au travers d'un tamis dont les mailles mesurent 40µm. La concentration de cellules dans la solution peut ensuite être calculée. Il est recommandé de garder environ 600 000 d'un passage à l'autre dans une T75. Si elles sont rincées avec du PBS entre chaque passage, les flasques peuvent être réutilisées pour le même lot de cellules pendant plusieurs passages. Les flasques avec les cellules sont ensuite replacées dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Lorsque les cellules doivent être utilisées pour une expérience dans les micro-puits, il faut réserver des cellules de sorte à avoir une densité finale de cellules de 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le volume de milieu nécessaire pour diluer ces cellules doit être équivalent à 100µL par puce "2K". En effet, la forme de la puce "2K" permet de déposer du milieu uniquement à l'intérieur des murs de la puce. Par gravité, les cellules vont sédimenter dans les micro-puits. La durée de la sédimentation ne change pas la distribution des cellules dans les micro-puits. Le milieu qui a servi à la sédimentation est ensuite retiré délicatement. L'étape suivante est celle de la dépose du bouchon d'agarose sur la puce. Avec une pince stérile, le bouchon d'agarose doit être placé avec précaution sur la puce. Une fois le bouchon en place, avec une pipette p1000, 2mL de milieu peuvent être ajoutés. Les éventuelles bulles entre le bouchon et la puce vont partir à ce moment-là et le bouchon va rester accroché à la puce comme une ventouse (Figure 2.3). La dernière étape est de rajouter du PBS stérile entre les puits afin de limiter l'évaporation. Le milieu de culture peut être changé dans les puits sans risque de perdre les cellules à cause des flux de liquide. Les cellules peuvent ainsi être gardées pendant au moins trois semaines dans les puces.

### 2.4.3 Tests pharmacologiques

Deux molécules ont été utilisées dans ce travail. Le témozolomide (TMZ) est la molécule donnée en première intention dans le traitement du glioblastome par chimiothérapie **HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ [2010]** (Figure 2.6a). Le TMZ a été acheté chez Selleckchem (Catalog No.S1237). Après réception sous forme de poudre, il a été resuspendu dans du DMSO afin de parvenir à une solution mère de 50mM. Pour raison de sécurité, la dilution a été effectuée sous une hotte aspirante dans les conditions les plus aseptiques possibles. Une fois diluée, la solution de TMZ a été filtrée afin d'éviter au maximum toute contamination microbienne puis stockée à 4°C.

Le RO4929097 (RO49 ou RG-4733) est un inhibiteur des gamma sécrétases (Figure 2.6b), initialement développé dans le cadre de la recherche sur la maladie d'Alzheimer **RAHMAN et collab. [2021]**. En ciblant directement la protéine transmembranaire NOTCH1, les inhibiteurs des gamma sécrétases permettent d'inhiber la voie NOTCH **GROSVELD [2009]**. Les inhibiteurs des gamma sécrétases, et plus particulièrement le RO49, sont capables d'inhiber l'auto-renouvellement de CSG **ZHANG et collab. [2019]**. Nous avons acheté le RO49 chez Apexbio (Référence A4005). Après réception sous forme de poudre, il a été resuspendu dans du DMSO afin de parvenir à une solution mère de 50mM. Pour raison de sécurité, la dilution a été effectuée sous une hotte aspirante dans les conditions les plus aseptiques possibles. Une fois diluée, la solution de RO49 a été filtrée afin d'éviter au maximum toute contamination microbienne puis stockée à -20°C.

AGuIX<sup>®</sup> sont des nanoparticules dont le noyau est composé de particules de polysiloxane recouvertes d'aminopropyle-triéthoxysilane (APTES). Le noyau est rendu fonctionnel par l'ajout de ligands de 1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-acide tétraacétique (DOTA). Ces ligands permettent ensuite de chélater les ions gadolinium **LUX et collab. [2011]**; **TRAN [2018]** (Figure 2.6c). Les nanoparticules AGuIX<sup>®</sup> sont internalisées par diffusion passive et macro-pinocytose avant d'être incorporées dans les lysosomes **GOODARZI et collab. [2021]**; **RIMA et collab. [2013]**. Il a été montré que les nanoparticules AGuIX<sup>®</sup> ont un effet radio-sensibilisant *in vitro* **MOWAT et collab.**

[2011] et *in vivo* BORT et collab. [2020].

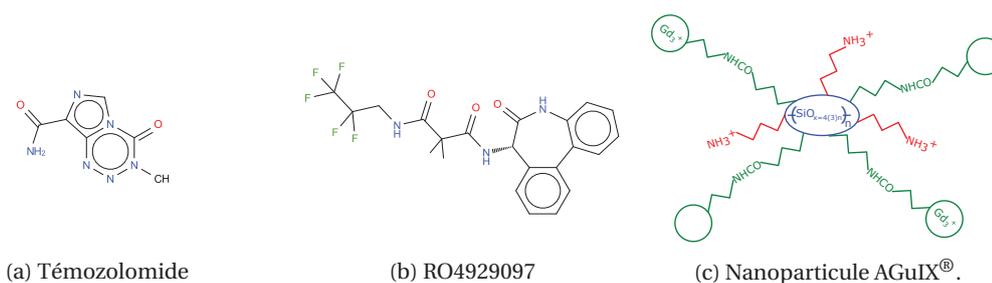


FIGURE 2.6 – **Molécules pharmacologiques.** Structures de Lewis du Témzolomide (a), du RO4929097 (b). La représentation d'une nanoparticule AGuIX® est adapté de TRAN [2018] (c) : le noyau de polysiloxane est représenté par le cercle bleu, les particules d'APTES sont en rouge, et les ligands DOTA libres ou chélatant les ions gadolinium sont en vert.

## 2.5 Le micropipetteur cellulaire

### 2.5.1 La conception du bras et son contrôle

Nous avons pour cela développé un bras sur lequel vient se fixer un capillaire (Sutter Instrument BF150-110-10HP). Ce bras est monté sur une vis sans fin et un moteur (12V) le fait translater verticalement. Le sens et le pas du moteur est contrôlé par un système Arduino. L'arduino est interfacé à l'ordinateur par le package pyserial LIECHTI [2021] programmé en langage Python. Le bras est immobile dans le plan transversal donc les déplacements horizontaux et longitudinaux sont assurés par la platine du microscope, elle-même interfacée à l'ordinateur via le logiciel micromanager EDELSTEIN et collab. [2014]. Une fois que le micro-pipetteur est en surplomb du micro-puits, il faut à présent descendre le capillaire dans le micro-puits pour aspirer la cellule qui s'y trouve.

### 2.5.2 Fabrication des capillaires

Les capillaires sont étirés à partir de tubes de verre de diamètre externe de 1,5 mm et de diamètre interne de 1,1 mm (référence : BF150-110-10). Afin de former les capillaires, les tubes sont fixés à leurs deux extrémités dans l'étireuse Sutter Instrument P-1000. Ces deux extrémités sont tirées dans des directions opposées par un ressort, alors qu'un filament chauffant augmente la température de verre localement. Le capillaire est ainsi formé par étirement du tube de verre à l'endroit où il est chauffé. Selon le diamètre du capillaire souhaité, les paramètres d'étirement sont différents. Étant donné que nos micro-puits mesurent 200µm de diamètre, nous avons opté pour un diamètre des capillaires de 100µm. Pour cela, nous avons choisi les paramètres d'étirement suivants (les unités sont arbitraires) INSTRUMENT [2018] :

- Heat : courant électrique qui va passer dans le filament qui chauffe le tube de verre. Nous avons choisi le paramètre Heat égal à la valeur de RAMP (dépend de chaque capillaire et est donné directement par l'étireuse) + 25.
- Pull : traction exercée sur le tube de verre après qu'il a été chauffé. La valeur de Pull choisi est 0.
- Velocity : vitesse avec laquelle les extrémités du tube de verre sont étirées. Ce paramètre est de 150.
- Air : durée du refroidissement par injection d'air après l'étirement. Le paramètre Air choisi est égal à 100.
- Pressure : la pression avec laquelle l'air de refroidissement est appliqué. Nous avons choisi un paramètre de Pressure à 200.

A noter que l'étirement s'est réalisé dans une atmosphère relativement humide (dont la coloration violette des cristaux de drierite témoigne). Cette humidité entraîne une hydroxylation du verre

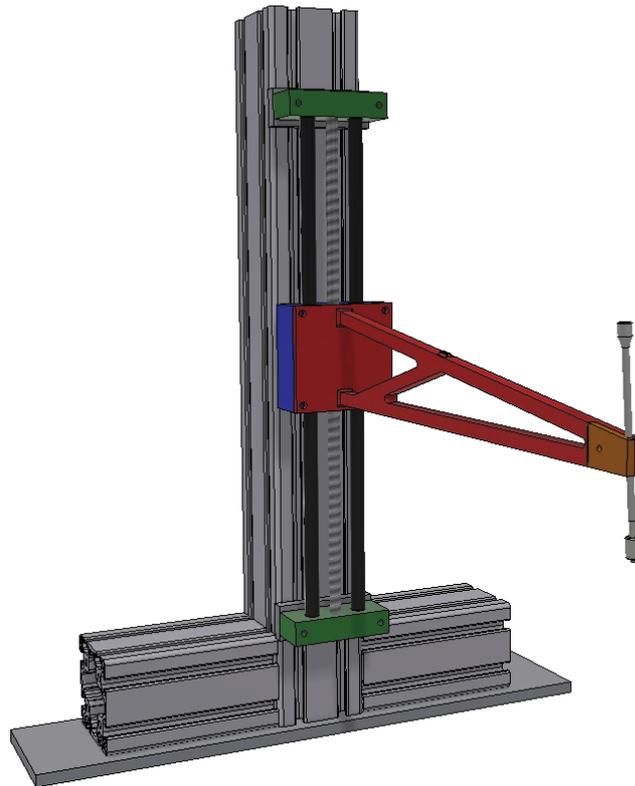


FIGURE 2.7 – **Représentation tridimensionnelle du micropipetteur.** Le moteur (non représenté ici) est interfacé à l'ordinateur pour piloter les déplacements verticaux du bras.

rendant sa surface plus adhérente.

### 2.5.3 Micro-système de prélèvement par aspiration

Le capillaire est ensuite fixé sur le bras puis relié à un système microfluidique composé de (Figure 2.8) :

- Un générateur de pression (Fluidigent, FLPG plus), interfacé avec un programme en langage Python pour pouvoir moduler automatiquement la pression au cours de l'expérience,
- Un réservoir contenant du milieu, situé environ 50cm en dessous de la puce, afin d'éviter la formation de bulle dans le système microfluidique,
- Un contrôleur de débit (Fluidigent, Flowboard), également interfacé au programme codé en langage Python, il permet de suivre en temps réel le débit au sein du système microfluidique,
- Un système de valves (Fluidigent, L-Switch), aussi interfacé au programme codé en langage Python, il permet d'isoler le système microfluidique lorsque le capillaire est en dehors du milieu de culture.

Ainsi, on crée un système de colonne d'eau où, en exerçant une pression de 50 mbar, on parvient à équilibrer le flux au niveau du capillaire. Lorsque celui-ci plonge dans le micro-puits, nous coupons la pression produite par le générateur. Il en résulte ainsi une dépression dans le capillaire qui va aspirer la cellule. Pour relarguer la cellule dans un autre contenant, nous rétablissons un flux nul, puis avec le système de valves, nous bloquons le système. Le micro-pipetteur est déplacé au dessus du contenant destiné à recevoir la cellule préalablement rempli de milieu. Le capillaire est immergé dans le milieu puis on demande au générateur d'exercer une pression suffisamment forte pour faire sortir la cellule du capillaire.

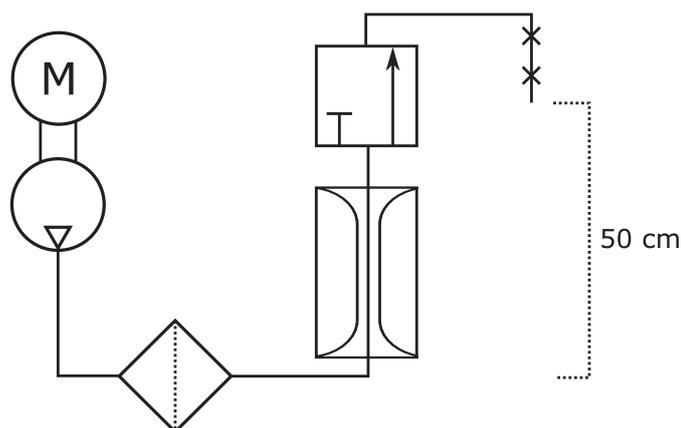


FIGURE 2.8 – **Représentation schématique du micro-système de prélèvement.** Le générateur  injecte de la pression dans un réservoir  contenant du milieu de culture jusque dans le capillaire . Le contrôleur de flux  permet de suivre et de réguler le débit en direct. La valve  permet d'éviter le reflux et l'entrée d'air dans le système. La déclivité de 50 cm du réservoir d'eau par rapport au capillaire permet de générer une colonne d'eau.

## 2.6 Références

- ABADI, M., P. BARHAM, J. CHEN, Z. CHEN, A. DAVIS, J. DEAN, M. DEVIN, S. GHEMAWAT, G. IRVING, M. ISARD, M. KUDLUR, J. LEVENBERG, R. MONGA, S. MOORE, D. G. MURRAY, B. STEINER, P. TUCKER, V. VASUDEVAN, P. WARDEN, M. WICKE, Y. YU et X. ZHENG. 2016, «TensorFlow : A system for large-scale machine learning», *arXiv :1605.08695 [cs]*. 55
- AUTODESK. 2018, «Autodesk Inventor», Autodesk. 48
- BERABEZ, N. 2018, *Caractérisation Des Cellules Souches Du Glioblastome : Identification de Nouveaux Facteurs Impliqués Dans La Régulation de Leur Transcriptome*, These de doctorat, Lyon. 55
- BERG, S., D. KUTRA, T. KROEGER, C. N. STRAEHLE, B. X. KAUSLER, C. HAUBOLD, M. SCHIEGG, J. ALES, T. BEIER, M. RUDY, K. EREN, J. I. CERVANTES, B. XU, F. BEUTTENMUELLER, A. WOLNY, C. ZHANG, U. KOETHE, F. A. HAMPRECHT et A. KRESHUK. 2019, «Ilastik : Interactive machine learning for (bio)image analysis», *Nat Methods*, vol. 16, n° 12, doi :10.1038/s41592-019-0582-9, p. 1226–1232, ISSN 1548-7105. 55
- BORT, G., F. LUX, S. DUFORT, Y. CRÉMILLIEUX, C. VERRY et O. TILLEMENT. 2020, «EPR-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles : From animal to human with theranostic AGuIX nanoparticles», *Theranostics*, vol. 10, n° 3, doi :10.7150/thno.37543, p. 1319–1331, ISSN 1838-7640. 57
- BRADSKI, G. 2000, «The OpenCV Library», *Dr Dobb's J. Software Tools*, vol. 25, p. 120–125. 53, 55
- COELHO, L. P. 2013, «Mahotas : Open source software for scriptable computer vision», *Journal of Open Research Software*, vol. 1, n° 1, p. e3, ISSN 2049-9647. 55
- EDELSTEIN, A. D., M. A. TSUCHIDA, N. AMODAJ, H. PINKARD, R. D. VALE et N. STUURMAN. 2014, «Advanced methods of microscope control using microManager software», *J Biol Methods*, vol. 1, n° 2, doi :10.14440/jbm.2014.36, ISSN 2326-9901. 52, 57
- FANFONE, D., A. IDBAIH, J. MAMMI, M. GABUT et G. ICHIM. 2020, «Profiling Anti-Apoptotic BCL-xL Protein Expression in Glioblastoma Tumorspheres», *Cancers (Basel)*, vol. 12, n° 10, doi :10.3390/cancers12102853, p. E2853, ISSN 2072-6694. 55

- GOODARZI, S., A. PRUNET, F. ROSSETTI, G. BORT, O. TILLEMENT, E. PORCEL, S. LACOMBE, T.-D. WU, J.-L. GUERQUIN-KERN, H. DELANOË-AYARI, F. LUX et C. RIVIÈRE. 2021, «Quantifying nanotherapeutic penetration using a hydrogel-based microsystem as a new 3D in vitro platform», *Lab Chip*, vol. 21, n° 13, doi :10.1039/D1LC00192B, p. 2495–2510, ISSN 1473-0189. 56
- GROSVELD, G. C. 2009, « $\gamma$ -secretase inhibitors : Notch so bad», *Nat Med*, vol. 15, n° 1, doi :10.1038/nm0109-20, p. 20–21, ISSN 1546-170X. 56
- HARRIS, C. R., K. J. MILLMAN, S. J. VAN DER WALT, R. GOMMERS, P. VIRTANEN, D. COURNAPEAU, E. WIESER, J. TAYLOR, S. BERG, N. J. SMITH, R. KERN, M. PICUS, S. HOYER, M. H. VAN KERKWIJK, M. BRETT, A. HALDANE, J. F. DEL RÍO, M. WIEBE, P. PETERSON, P. GÉRARD-MARCHANT, K. SHEPPARD, T. REDDY, W. WECKESSER, H. ABBASI, C. GOHLKE et T. E. OLIPHANT. 2020, «Array programming with NumPy», *Nature*, vol. 585, n° 7825, doi :10.1038/s41586-020-2649-2, p. 357–362, ISSN 1476-4687. 55
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ. 2010, «ALD n° 30 - Cancer primitif du système nerveux central», . 56
- HUNTER, J. D. 2007, «Matplotlib : A 2D Graphics Environment», *Computing in Science Engineering*, vol. 9, n° 3, doi :10.1109/MCSE.2007.55, p. 90–95, ISSN 1558-366X. 55
- INSTRUMENT, S. 2018, *Pipette Cookbook 2018*. 57
- LIECHTI, C. 2021, «pySerial», pySerial. 57
- LUX, F., A. MIGNOT, P. MOWAT, C. LOUIS, S. DUFORT, C. BERNHARD, F. DENAT, F. BOSCHETTI, C. BRUNET, R. ANTOINE, P. DUGOURD, S. LAURENT, L. V. ELST, R. MULLER, L. SANCEY, V. JOSSE-RAND, J.-L. COLL, V. STUPAR, E. BARBIER, C. RÉMY, A. BROISAT, C. GHEZZI, G. LE DUC, S. ROUX, P. PERRIAT et O. TILLEMENT. 2011, «Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n° 51, doi :10.1002/anie.201104104, p. 12 299–12 303, ISSN 1521-3773. 56
- MCKINNEY, W. 2010, «Data Structures for Statistical Computing in Python», *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, doi :10.25080/Majora-92bf1922-00a, p. 56–61. 53, 55
- MOWAT, P., A. MIGNOT, W. RIMA, F. LUX, O. TILLEMENT, C. ROULIN, M. DUTREIX, D. BECHET, S. HUGER, L. HUMBERT, M. BARBERI-HEYOB, M. T. ALOY, E. ARMANDY, C. RODRIGUEZ-LAFRASSE, G. LE DUC, S. ROUX et P. PERRIAT. 2011, «In vitro radiosensitizing effects of ultras-small gadolinium based particles on tumour cells», *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 11, n° 9, doi : 10.1166/jnn.2011.4725, p. 7833–7839, ISSN 1533-4880. 56
- PLUEN, A., P. A. NETTI, R. K. JAIN et D. A. BERK. 1999, «Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels : Comparison of Linear and Globular Configurations», *Biophysical Journal*, vol. 77, n° 1, doi :10.1016/S0006-3495(99)76911-0, p. 542–552, ISSN 00063495. 49
- RAHMAN, A., I. D. LOZADA-MARTINEZ, S. RAHMAN, A. H. M. ATAULLAH, K. MUÑOZ-BAEZ, L. R. MOSCOTE-SALAZAR, A. AGRAWAL et M. M. RAHMAN. 2021, «Letter : A Phase II and Pharmacodynamic Trial of RO4929097 for Patients With Recurrent/Progressive Glioblastoma», *Neurosurgery*, vol. 89, n° 1, doi :10.1093/neuros/nyab097, p. E78–E79, ISSN 0148-396X. 56
- RIMA, W., L. SANCEY, M.-T. ALOY, E. ARMANDY, G. B. ALCANTARA, T. EPICIER, A. MALCHÈRE, L. JOLY-POTTUZ, P. MOWAT, F. LUX, O. TILLEMENT, B. BURDIN, A. RIVOIRE, C. BOULÉ, I. ANSELME-BERTRAND, J. POURCHEZ, M. COTTIER, S. ROUX, C. RODRIGUEZ-LAFRASSE et P. PERRIAT. 2013, «Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles», *Biomaterials*, vol. 34, n° 1, doi :10.1016/j.biomaterials.2012.09.029, p. 181–195, ISSN 1878-5905. 56
- RIVIÈRE, C., A. PRUNET, L. FUOCO et H. AYARI. 2018, «Plaques de micropuits en hydrogel biocompatible», . 49

- TRAN, V. L. 2018, *Synthesis, Functionalization and Characterization of Ultrasmall Hybrid Silica Nanoparticles for Theranostic Applications*, thèse de doctorat, Université de Lyon. 56, 57
- VIRTANEN, P., R. GOMMERS, T. E. OLIPHANT, M. HABERLAND, T. REDDY, D. COURNAPEAU, E. BUROVSKI, P. PETERSON, W. WECKESSER, J. BRIGHT, S. J. VAN DER WALT, M. BRETT, J. WILSON, K. J. MILLMAN, N. MAYOROV, A. R. J. NELSON, E. JONES, R. KERN, E. LARSON, C. J. CAREY, Í. POLAT, Y. FENG, E. W. MOORE, J. VANDERPLAS, D. LAXALDE, J. PERKTOLD, R. CIMRMAN, I. HENRIKSEN, E. A. QUINTERO, C. R. HARRIS, A. M. ARCHIBALD, A. H. RIBEIRO, F. PEDREGOSA et P. VAN MULBREGT. 2020, «SciPy 1.0 : Fundamental algorithms for scientific computing in Python», *Nat Methods*, vol. 17, n° 3, doi :10.1038/s41592-019-0686-2, p. 261–272, ISSN 1548-7105. 55
- WASKOM, M. L. 2021, «Seaborn : Statistical data visualization», *Journal of Open Source Software*, vol. 6, n° 60, doi :10.21105/joss.03021, p. 3021, ISSN 2475-9066. 55
- ZHANG, C., E. MARTINEZ-LEDESMA, F. GAO, W. ZHANG, J. DING, S. WU, X. LI, J. WU, Y. YUAN, D. KOUL et W. K. ALFRED YUNG. 2019, «Wild-type TP53 defined gamma-secretase inhibitor sensitivity and synergistic activity with doxorubicin in GSCs», *Am J Cancer Res*, vol. 9, n° 8, p. 1734–1745, ISSN 2156-6976. 56



# Chapitre 3

## Résultats

*« Ce n'est qu'en essayant  
continuellement que l'on finit par  
réussir... En d'autres termes... Plus  
ça rate et plus on a de chances que  
ça marche... »*

Proverbe Shadok

### Sommaire

<b>3.1 Déterminer le destin cellulaire avec l'intelligence artificielle</b>	<b>65</b>
3.1.1 Définition du problème	65
3.1.2 Constitution des bases de données	67
3.1.3 Déterminer le phénotype précoce des cellules à partir de films est un problème complexe	67
3.1.3.1 Algorithme d'analyse d'images classique	67
3.1.3.2 Algorithme de shallow learning	68
3.1.3.3 Algorithme de deep learning	68
3.1.4 Un second réseau de neurones profonds pour détecter les neurosphères	69
3.1.5 Machine learning-based detection of label-free glioblastoma stem cell fate	70
<b>3.2 Optimisation de l'utilisation du système microfabriqué</b>	<b>91</b>
<b>3.3 Détection des cellules souches cancéreuses avec notre plateforme et évaluation quantitative de leur devenir</b>	<b>92</b>
3.3.1 Corrélation entre division précoce et formation d'une neurosphère	92
3.3.2 La corrélation entre division précoce et propriétés souches est forte	92
3.3.3 High throughput phenotypical identification of glioblastoma stem cells with deep learning algorithm	93
3.3.4 L'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH altère l'auto-renouvellement des CSG	119
3.3.5 Étude de la quiescence au sein des cellules de glioblastome	122
<b>3.4 Sélection spécifique des cellules selon leur phénotype</b>	<b>125</b>
3.4.1 Rationnel	125
3.4.2 Preuve de concept de l'aspiration et la restitution des cellules par micropipettage automatisé	125
<b>3.5 Application de notre plateforme dans le contexte du cancer colo-rectal</b>	<b>128</b>
3.5.1 Le cancer colo-rectal et les cellules souches cancéreuses associées	128
3.5.2 Effet de l'association des nano-particules AGuIX <sup>®</sup> avec la radiothérapie sur l'auto-renouvellement des cellules du cancer colique	128
3.5.2.1 Rationnel et schéma expérimental	128
3.5.2.2 Les nanoparticules AGuIX <sup>®</sup> sensibilisent les cellules souches du cancer colo-rectal à la radiothérapie	129

**3.6 Références** ..... **130**

---

Les deux premières sections de ce chapitre reprennent les résultats principaux que nous présentons dans nos deux articles. Ainsi la première section 3.1 et le premier article 3.1.5 décrivent notre problématique d’analyses d’image et les algorithmes que nous avons développés pour y répondre. La seconde 3.2 et la troisième section 3.3 détaillent respectivement les étapes d’optimisation de la puce et les résultats du phénotypage des CSG, chacun publiés dans l’article 3.3.3. Nous avons repris le cadre des publications courtes pour présenter nos travaux sur l’inhibition de la voie de signalisation de NOTCH 3.3.4 et la détection des cellules quiescentes 3.3.5 dans leur sous-section correspondante. Enfin les sections 3.4 et 3.5 apportent des preuves de concept pour ouvrir sur une utilisation plus large de notre plateforme.

### 3.1 Déterminer le destin cellulaire avec l’intelligence artificielle

#### 3.1.1 Définition du problème

Notre objectif est de déterminer quels comportements cellulaires à court terme sont associés aux propriétés souches. Pour cela, nous avons conçu un micro-système qui nous permet d’imager plusieurs centaines de cellules, très fréquemment et sur des laps de temps de plusieurs semaines. Ainsi, notre problème se découpe en trois étapes (Figure 3.1)

— Tout d’abord détecter à partir de données vidéomicroscopiques les phénotypes des cellules dans les 4 premiers jours qui suivent leur isolement dans la puce de microfluidique.

— Ensuite déterminer rétrospectivement quelles cellules sont souches en vérifiant leur capacité à former une NS au bout de 14 jours.

— Enfin, tenter de corrélérer les phénotypes observés lors de la vidéomicroscopie au statut souche des cellules.

La quantité d’images produites par notre expérience va donc être très importante et leur analyse à la main fastidieuse. Nous avons donc développé deux algorithmes automatisés pour l’analyse de ces images : le premier pour analyser les phénotypes présentés par les cellules dans les premiers jours de l’expérience et le second pour détecter les NS.

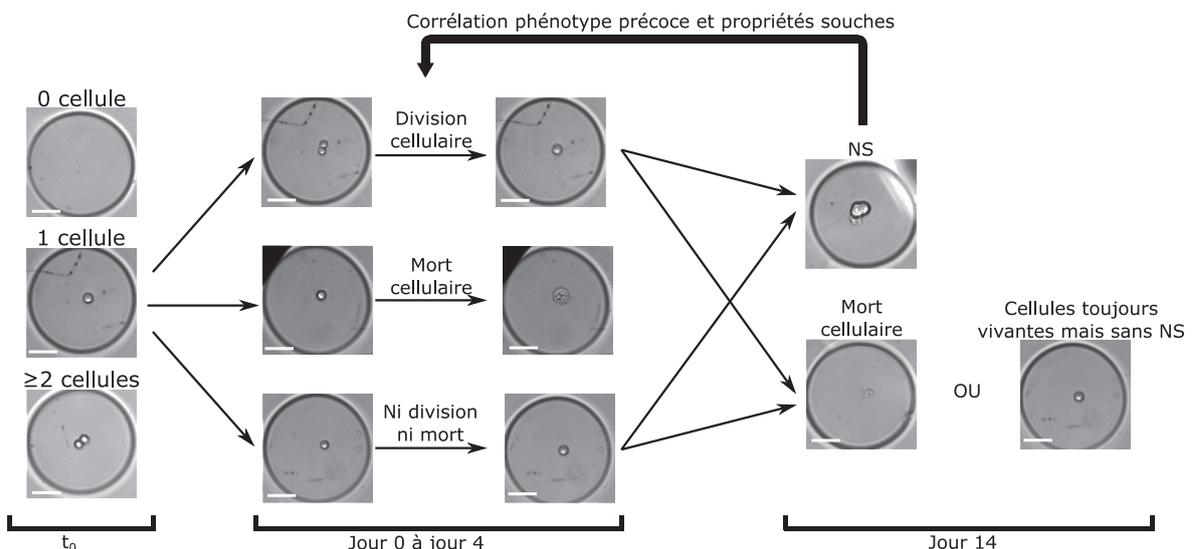


FIGURE 3.1 – **Représentation schématique de notre problème d’analyse d’images.** La première étape est de détecter les micro-puits qui contiennent exactement une cellule unique au début de l’expérience ( $t_0$ ). Ensuite, les films issus de l’expérience de vidéomicroscopie pendant 4 jours sont analysés pour détecter le phénotype précoce des cellules uniques. Enfin, nous devons détecter les micro-puits avec une neurosphère (NS) après 14 jours de culture dans la puce de micro-fluidique. L’objectif final est de corrélérer le phénotype précoce observé pendant la vidéomicroscopie avec la capacité à former une NS.

Le problème du phénotypage précoce correspond à l’analyse des images des cellules pen-

nant la vidéomicroscopie. Pendant 4 jours, les cellules sont isolées dans des micro-puits, selon une distribution probabiliste, et elles sont imagées toutes les 30 minutes. Cette limite de 4 jours est posée par la nécessité du modèle cellulaire à recevoir du milieu frais 2 fois par semaine, comme expliqué dans le paragraphe 2.4.2. Avant tout, il faut détecter les micro-puits contenant une seule cellule, sachant que les micro-puits peuvent aussi contenir 2 cellules ou plus ou aucune cellule. Dans un second temps, les images des micro-puits contenant une seule cellule sont analysées afin de procéder au phénotypage proprement dit. Nous avons défini trois classes de phénotypes : les divisions cellulaires, les morts cellulaires et les cellules toujours vivantes mais qui ne se sont pas divisées. Deux problèmes de classification peuvent être posés :

- Classifier les images de micro-puits contenant une seule cellule, les images de micro-puits contenant deux cellules ou plus et enfin les images de micro-puits ne contenant aucune cellule.
- Classifier les images de micro-puits contenant une seule cellule qui se divise (c'est-à-dire que le micro-puits ne contient non plus une, mais deux cellules), les images de micro-puits contenant une cellule qui meurt et les images de micro-puits contenant une cellule qui ne meurt pas et ne se divise pas.

Pour couvrir l'ensemble de ces possibilités, nous avons envisagé un problème de classification à quatre classes :

- La classe "Uniques" des micro-puits contenant une seule cellule pour détecter les cellules uniques au début de l'expérience.
- La classe "Multiples" des micro-puits contenant deux cellules ou plus pour détecter les micro-puits avec plusieurs cellules au début de l'expérience et les cellules uniques qui se divisent au cours de la vidéomicroscopie.
- La classe "Morts" des micro-puits contenant une cellule morte pour détecter les cellules uniques qui meurent au cours de l'expérience.
- La classe "Vides" des micro-puits vides pour détecter les micro-puits vides au début de l'expérience.

Concrètement, notre algorithme analyse dans un premier temps les trois premières images de la vidéomicroscopie. Si les trois premières images sont classifiées comme "Uniques", le reste des images est analysé. Si une de ces images est classifiée comme "Multiples", on considère que la cellule s'est divisée. Si une de ces images est classifiée comme "Morts", on considère que la cellule est morte pendant l'expérience. Si aucune de ces images n'est classifiée comme "Multiples" ou "Morts", on considère que la cellule est toujours seule et vivante dans le micropuits. Si une des trois premières images des micro-puits est classifiée comme "Multiples", "Mortes" ou "Vide", l'analyse s'interrompt. On aboutit donc à un algorithme capable de détecter les cellules uniques, puis de détecter quelles cellules se sont divisées ou sont mortes.

La question de la détection des NS peut également être abordée par un problème de classification. Nous aurions pu définir deux classes d'images : micro-puits contenant une NS et micropuits ne contenant pas de NS. Cependant, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.3.4, il n'existe pas de définition consensuelle de la NS, notamment de taille minimale. En se fondant sur les seuils de taille et les durées de culture classiquement utilisés dans la littérature [DIRKSE et collab. \[2019\]](#), nous avons défini une NS comme un sphéroïde multi-cellulaire, issu d'une seule cellule et d'au-moins 15 $\mu$ m de rayon. D'autre part, si différencier les images contenant une NS des images contenant un sphéroïde multi-cellulaire de rayon strictement inférieur à 15 $\mu$ m est relativement complexe, différencier les images d'un micro-puits vide avec des images de micro-puits contenant quelque chose est plus aisé. Dans un souci de réduction de complexité, nous avons donc pris le parti d'aborder le problème de classification avec trois classes : "Vide" pour les micro-puits vides, "NS" pour les micro-puits contenant un sphéroïde de rayon supérieur à 15 $\mu$ m (peu importe s'il contient également des cellules mortes) et "Autres" pour les micro-puits n'étant ni vides ne contenant de sphéroïde multi-cellulaire de rayon supérieur ou égal à 15 $\mu$ m (c'est-à-dire les micro-puits avec uniquement des cellules mortes, ou avec un mélange de cellules vivantes et de cellules mortes, ou avec un sphéroïde multi-cellulaire de rayon inférieur à 15 $\mu$ m avec ou

sans des cellules mortes).

Nous avons donc bien défini notre problème avec deux algorithmes d'analyse d'images. Le premier sert à détecter les cellules uniques ainsi qu'au phénotypage précoce (division ou mort cellulaire ou aucun des deux). Le second permet de détecter les sphéroïdes multi-cellulaires de rayon supérieur ou égal à 15 $\mu$ m. La corrélation entre phénotype précoce et propriétés souche permettrait ainsi d'identifier les CSG de façon fonctionnelle sans utiliser de marqueur moléculaire.

### 3.1.2 Constitution des bases de données

Nous avons créé une première base de données pour aborder le problème du phénotypage pendant la vidéomicroscopie avec des algorithmes d'analyse d'images. Nous avons manuellement annoté 2871 images "Uniques", 4615 images "Multiples", 803 images "Morts" et 9089 images "Vides". 10% des images de la base de données ont été aléatoirement sélectionnées pour constituer la base de données de test (celle qui ne sera jamais vue par l'algorithme sauf au dernier moment pour en calculer les performances). 10% des images ont également été aléatoirement sélectionnées pour former la base de données de validation (celle qui servira à ajuster les poids au cours de l'apprentissage). Sur les images restantes, nous réalisons de l'augmentation de données afin d'équilibrer le nombre d'images entre les classes. Ainsi nous réalisons des opérations de rotations horaires de 90°, rotations horaires de -90°, rotations de 180°, miroir horizontal et miroir vertical. On arrive ainsi à environ 7000 images par classes (sauf la classe "Morts" qui n'en contient que 3900).

Nous avons annoté une seconde base de données afin de détecter les NS : 1071 images pour la classe "NS", 1857 images pour la classe "Vide" et 3072 images pour la classe "Autres". Comme pour la première base de données, 10% des images servent à la base de données de test, 10% à la base de données de validation et le reste, après augmentation de données, sert à la base de données d'entraînement. Dans le cas de cette base de données, nous avons pu utiliser l'augmentation de données non seulement pour équilibrer le nombre d'images entre les classes, mais également pour augmenter artificiellement le nombre d'images jusqu'à environ 4500 par classe.

### 3.1.3 Déterminer le phénotype précoce des cellules à partir de films est un problème complexe

Dans l'article 3.1.5, notre objectif est d'explorer la complexité du problème posé par le phénotypage des cellules à partir des films obtenus par vidéomicroscopie. Nous avons développé plusieurs algorithmes d'analyse d'images afin de répondre aux deux questions suivantes :

- Quels micro-puits contiennent une cellule unique?
- Quel est le phénotype précoce des cellules uniques?

Nous montrons que malgré une apparente simplicité, ce problème est très complexe et nécessite le recours aux réseaux de neurones profonds pour pouvoir être adressé de façon suffisamment fiable.

#### 3.1.3.1 Algorithme d'analyse d'images classique

Nous avons développé un premier programme très simple pour aborder la question du phénotypage des cellules à partir d'images bidimensionnelles. Le pseudocode est le suivant :

Chaque image est analysée l'une à la suite de l'autre :

- Segmentation d'objets par seuillage d'intensité avec la méthode d'Otsu **Otsu**

[1979]

- Filtrage selon la taille et la position des objets segmentés avec le package Mahotas [COELHO \[2013\]](#)
- Approximation de l'objet par une ellipse avec le package OpenCV [BRADSKI \[2000\]](#)
- Calcul de la surface projetée de l'ellipse et de sa rondeur (rapport du diamètre mineur par le diamètre majeur) :
  - - Si les deux valeurs ne sont pas des nombres : le micro-puits est classé dans "Vide".
  - - Si la surface projetée est inférieure à 130  $\mu\text{m}$  et que la rondeur est entre 0.5 et 0.8 : le micro-puits est classé dans "Uniques"
  - - Si la surface projetée est inférieure à 130  $\mu\text{m}$  et que la rondeur est inférieure à 0.5 : le micro-puits est classé dans "Morts"
  - - Dans les autres cas, le micro-puits est classé dans "Multiples"

Cet algorithme analyse donc 5 paramètres : intensité, taille, position, rondeur et surface. La précision de cet algorithme pour détecter les images avec une cellule unique est de 62%. Nous avons ensuite voulu savoir si l'utilisation d'algorithmes d'intelligence artificielle permettrait d'améliorer cette valeur.

### 3.1.3.2 Algorithme de shallow learning

L'apprentissage superficiel, ou shallow learning, a été réalisé à l'aide du logiciel ilastik [BERG et collab. \[2019\]](#). Ce logiciel utilise un classificateur Random Forest. Brièvement, en se fondant sur l'analyse de  $M$  paramètres,  $N$  arbres vont voter l'appartenance de l'entrée à une catégorie. La prédiction est faite selon la catégorie qui a eu le plus de votes [BREIMAN \[2001\]](#). Concrètement, dans notre cas, nous avons choisi 5 paramètres pour entraîner l'algorithme à segmenter les cellules du fond du micro-puits. L'entraînement a porté sur 40 images. Ensuite, à partir des images segmentées, l'algorithme classe les images entre "Uniques", "Multiples", "Morts" et "Vides". Cette seconde étape de classification utilise 3 paramètres. Ainsi, notre algorithme explore au total 8 paramètres pour répondre au problème du phénotypage à partir d'images de cellules. La précision obtenue avec cet algorithme d'apprentissage superficiel est donc de 71.1%. Sachant que le deep learning permet d'analyser un nombre beaucoup plus importants de paramètres, nous avons soumis ce problème de classification à un réseau de neurones convolutifs que nous avons développé.

### 3.1.3.3 Algorithme de deep learning

Nous avons développé un premier réseau de neurones convolutifs pour le phénotypage des données de vidéomicroscopie. Les données concernant l'optimisation du réseau de neurones sont disponibles dans l'article [3.1.5](#). Brièvement, nous avons utilisé le package TensorFlow afin de programmer en langage Python un réseau de neurones convolutifs [ABADI et collab. \[2016\]](#); [VAN ROS-SUM et DRAKE \[2009\]](#). Ce réseau de neurones convolutifs se compose de quatre couches de convolutions de 8, 16, 32 et 64 filtres respectivement. Le kernel mesure 15 pixels par 15 pixels. La première couche entièrement connectée comporte 1052 neurones avec un dropout de 80%. Enfin, la seconde couche de neurones entièrement connectée contient 4 neurones qui classifient l'image d'entrée entre les classes "Uniques", "Multiple", "Morts" ou "Vides" (Figure [1.14](#)). Ce réseau de neurones analyse 8 541 700 paramètres pour répondre à notre problème de classification d'images bidimensionnelles et il atteint une précision de 91.2%.

Afin de prendre en compte la dimension temporelle des données acquises en vidéomicroscopie, nous avons opté pour un arbre décisionnel en aval de la classification par le réseau de neurones. Le pseudo-code est le suivant :

Classification des trois premières images du micropuits par deep learning :

- Les trois images sont classifiées comme "Vide" : le micro-puits est considéré comme vide. L'analyse s'arrête.
- Les trois images sont classifiées comme "Uniques" :
  - - Le micro-puits est considéré comme contenant une cellule unique.
  - - Analyse du reste de la vidéomicroscopie pour ce micro-puits:
    - - - Si deux images sont classifiées comme "Multiples" avec une probabilité supérieure à 90% dont une supérieure à 99% : le micro-puits est considéré comme contenant une division cellulaire.
    - - - Puis, si une image est classifiée comme "Morts" avec une probabilité supérieure à 50% : le micro-puits est considéré comme contenant une cellule morte.
    - - - Dans les autres conditions : le micro-puits est considéré comme contenant une cellule unique toujours vivante.
    - - - L'analyse s'arrête.
- Dans les autres conditions : le micro-puits est considéré comme contenant plusieurs cellules. L'analyse s'arrête.

Nous avons jugé satisfaisante l'analyse des films par cet arbre décisionnel. La sensibilité de notre algorithme pour détecter les micro-puits avec une cellule unique est de 93% et la valeur prédictive positive (VPP) est de 96%. La sensibilité et la VPP pour la détection des divisions sont respectivement de 67% et 94%. Enfin, la sensibilité pour la détection des morts cellulaires est de 82% et la VPP est de 90%. Nous montrons que notre algorithme est aussi assez robuste pour pouvoir être utilisé sur des images prises à différents grossissements, avec des images de la lignée de CSG N15 (3.1.5), ainsi que des images de cellules du cancer du colon (3.5).

Alors que la question de la détection du phénotype précoce à partir d'images semble trivial de prime abord, nous montrons au contraire qu'il s'agit d'un problème complexe. Cette complexité se révèle par la nécessité d'explorer un grand nombre de paramètres. Or, nous montrons que, parmi les algorithmes testés, seul le deep learning offre les ressources calculatoires suffisantes pour adresser ce problème de façon satisfaisante.

### 3.1.4 Un second réseau de neurones profonds pour détecter les neurosphères

Devant l'efficacité du premier réseau de neurones, nous avons développé un second réseau de neurones semblable pour détecter les NS dans l'article 3.3.3. Son architecture est la même que celle du réseau de neurones convolutifs du paragraphe précédent 3.1.3.3, à la seule différence qu'il n'y a que 3 neurones dans la seconde couche de neurones entièrement connectée. En effet, ce second réseau de neurones convolutifs a été entraîné pour reconnaître trois classes d'images : les micro-puits avec un sphéroïde multi-cellulaire dont le rayon est supérieur ou égal à 15 $\mu$ m, les micro-puits vides et enfin les micro-puits soit avec des cellules mortes OU avec des cellules vivantes mais sans sphéroïde multi-cellulaire de rayon supérieur ou égal à 15 $\mu$ m. Nous montrons que la précision de cet algorithme de deep learning pour répondre à ce problème de classification atteint 94%. Plus précisément, la sensibilité et la VPP pour la détection des sphéroïdes dont le rayon est supérieur ou égal à 15 $\mu$ m sont respectivement de 70% et 90%.

Pris dans leur ensemble, les performances obtenues avec les réseaux de neurones convolutifs décrits dans les paragraphes 3.1.3.3 et 3.1.4 justifient ainsi leur utilisation post-analytique afin de phénotyper les CSC.

### **3.1.5 Machine learning-based detection of label-free glioblastoma stem cell fate**

# Machine learning-based detection of label-free cancer stem-like cell fate

Alexis J. Chambost<sup>1,2,5</sup>, Nabila Berabez<sup>1</sup>, Olivier Cochet-Escartin<sup>2</sup>, François Ducray<sup>1,6</sup>, Mathieu Gabut<sup>1</sup>, Caroline Isaac<sup>1</sup>, Sylvie Martel<sup>1</sup>, Ahmed Idbah<sup>3</sup>, David Rousseau<sup>4,\*,+</sup>, David Meyronet<sup>1,5,+</sup>, and Sylvain Monnier<sup>2,\*,+</sup>

<sup>1</sup>Cancer Initiation and Tumor Cell Identity Department. Cancer Research Centre of Lyon (CRCL) INSERM 1052, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne FR

<sup>2</sup>Univ Lyon, Univ Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut Lumière Matière, F-69622, VILLEURBANNE, France

<sup>3</sup>Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, AP-HP, Hôpital Universitaire La Pitié Salpêtrière, DMU Neurosciences, Paris, France

<sup>4</sup>Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes (LARIS), UMR Inrae IRHS, Université d'Angers, Angers, 49000, France

<sup>5</sup>Pathology Institute, Hospices Civils de Lyon, Lyon, FR

<sup>6</sup>Neuro-oncology department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, FR

\*sylvain.monnier@univ-lyon1.fr; david.rousseau@univ-angers.fr

+these authors contributed equally to this work

## ABSTRACT

The detection of cancer stem-like cells (CSCs) is mainly based on molecular markers or functional tests giving *a posteriori* results. Therefore label-free and real-time detection of single CSCs remains a difficult challenge. The recent development of microfluidics has made it possible to perform high-throughput single cell imaging under controlled conditions and geometries. Such a throughput requires adapted image analysis pipelines while providing the necessary amount of data for the development of machine-learning algorithms. In this paper, we provide a data-driven study to assess the complexity of brightfield time-lapses to monitor the fate of isolated cancer stem-like cells in non-adherent conditions. We combined for the first time individual cell fate and cell state temporality analysis in a unique algorithm. We show that with our experimental system and on two different primary cell lines our optimized deep learning based algorithm outperforms classical computer vision and shallow learning-based algorithms in terms of accuracy while being faster than cutting-edge convolutional neural network (CNNs). With this study, we show that tailoring our deep learning-based algorithm to the image analysis problem yields better results than pre-trained models. As a result, such a rapid and accurate CNN is compatible with the rise of high-throughput data generation and opens the door to on-the-fly CSC fate analysis.

## Introduction

The precise identification of cancer stem cell (CSC) phenotypes is a prerequisite to improve our understanding of their biology, patient diagnosis as well as future treatments. Until now, the specific identification of cell types was performed *a posteriori* by detecting a combination of markers<sup>1</sup> and could not be easily implemented in living cells, especially in patient-derived samples. The tumorsphere formation assay is an alternative and complementary functional test based on CSC self-renewing capacity<sup>2</sup>. Indeed, in non-adherent culture conditions, CSCs are characterized by their ability to divide in suspension while maintaining cell-cell interactions to form structures of hundreds to thousands of cells called tumorspheres, similar to neural stem cell derived neurospheres<sup>3</sup>. The proportion of CSCs within a given cell population derived from either tumor samples or *in vitro* cell cultures can therefore be evaluated based on their capacity to survive as single cells and/or to reconstitute a hierarchical population of cancer cells *in vitro*<sup>4</sup>. Studying the dynamics of the earliest steps of the formation of tumorspheres at the single-cell level to determine cell fate can therefore bring new insights into the biology of CSCs while also shortening the evaluation of CSC proportions and their contribution to tumor resistance within patient-derived samples.

Labeling living biological samples is not systematically possible and, in addition, it might result in biochemical artefacts or phototoxicity, which can alter cell behavior<sup>5</sup> and metabolism<sup>6</sup>. Brightfield microscopy is a widely available imaging technique to assess cell morphological characteristics, but its lack of specificity and contrast requires the development of dedicated image

analysis tools to quantify different cellular phenotypes. Several studies have made use of image analysis algorithms to provide quantified data from brightfield images. For example, many classical computer vision algorithms (CCVA), *i.e.* based on a few sets of expert selected features, have been developed so far, such as thresholding methods for cell and vesicle segmentation<sup>7</sup>, or intensity projection from z-stacks for macrophages segmentation<sup>8</sup>. Brightfield images generally display high sample-to-sample variability and classical handcrafted methods based on few features and fixed decision rules require advanced programming skills and long development<sup>9,10</sup>.

Microfluidics can produce the high-throughput data needed for physiologically relevant single-cell analysis. Thanks to this approach, machine learning-based techniques can now be used for image analysis<sup>11</sup>. With shallow learning based algorithms (SLBA), the decision rules can be data driven instead of handcrafted by experts<sup>12,13</sup>. Deep learning-based algorithms (DLBAs) are revolutionary since they considerably reduce the time of algorithm development. The power of DLBAs in deciphering the complexity of image analysis problems has already been demonstrated on similar topics<sup>14–16</sup>. DLBAs have proven to be more efficient than CCVAs for white blood cell classification<sup>17</sup>, and in a classification problem of multi-cellular spheroids, while convolutional neural networks (CNNs) have outperformed SLBAs when trained on a large data set<sup>18</sup>. Along the same line, improving feature extraction thanks to transfer learning from pre-trained CNNs can also enhance histopathological biopsy classification<sup>19</sup>. Pre-trained CNNs have already provided excellent results to detect cell death or differentiation from cells grown in adherent conditions, however these cell features and geometry are very different from the problem faced in our study with cells expanding in non-adherent conditions and therefore cannot be applied straightforwardly<sup>20–22</sup>.

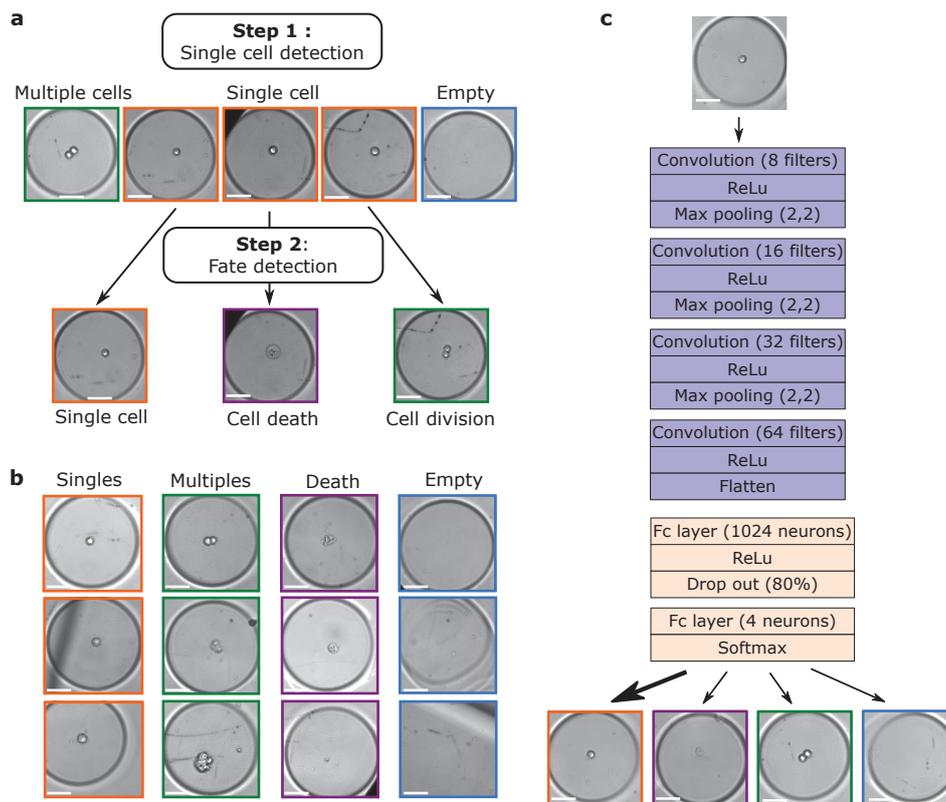
Here, we provide a data driven study to automatically process brightfield images of cells growing in suspension isolated in microwells of a microfabricated chip (Figure 1a and b)<sup>23,24</sup>. Despite a trivia appearance, the detection of different cell fates in these conditions is challenging as i) cells can exhibit a large variety of shapes, ii) the cell morphology is a lot more compact when grown in suspension compared to adherent conditions, iii) cells can be out-of-focus since they are cultured in non-adherent conditions, iv) images of these cells are very different from classical computer vision data base such as ImageNet<sup>25</sup>. To detect single cells and dynamically track their fate, we have developed a full DLBA pipeline for the high-throughput prediction of cancer cells status (division, death or quiescence) from large amount of label-free brightfield microscopy images. In this article, we describe how we tailored a DLBA to microfabricated wells to track cell-fate from two primary CSC lines. We compare our solution with a classical computer vision algorithm (CCVA), a shallow learning-based algorithm (SLBA) and several standard DLBAs. We also assayed the robustness of our DLBA on a CSC model different from the one used for the training. Taken together, we demonstrate that for this problem (defining the fate of non-adherent cells) our algorithm is more efficient than all CCVA, SLBA and pretrained large models tested as it provides equivalent or better results while allowing on-the-fly analysis of high-throughput acquisitions by saving processing time and power.

## Results

In this study, we primarily focused on addressing a problem of CSC fate prediction after being individually isolated in microwells. Our approach was divided into two phases: first, classify each microwells based on its content at the beginning of the assay: empty, alive single cell, dead single cell or more than one cell. Second, the results of the classification were linked to a 96-hour time lapse analysis using a decision tree to assess the fate of the single CSCs in the microwells.

### Deep learning-based algorithm.

In informational terms, we formulate the problem as an invariant to translation classification. We therefore developed a CNN adapted to our classification problem, referred to as "our DLBA" in the rest of the text. We trained our CNN on a data set which contains 17378 annotated images of glioblastoma-derived N14-0510 CSCs imaged with a 20x magnification every 30 minutes, a temporal resolution selected according to the proliferation characteristics of N14-0510 cells in this culture condition. This model was based on successive layers of convolution and max pooling upstream of a first fully connected layer together with a second fully connected layer that classified images as "Singles", "Multiples", "Death" or "Empty" (Figure 1c, the data sets are described in the Methods section and in the Supplemental Figures S1a and b). Wells classified as "Multiples" can either contain two cells, sparse single cells or aggregates of cells. Classification based on brightfield images was controlled using fluorescent markers for cell numbers and cell death (Supplemental Figures S2a and b).



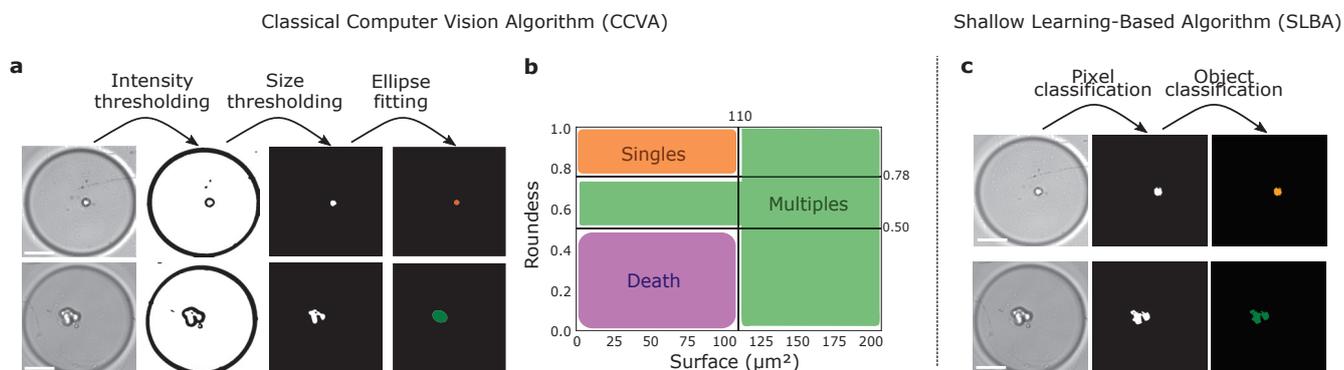
**Figure 1.** Description of our Deep-Learning Based Algorithm (DLBA). (a) Visual abstract of the image analysis problem. First step: detection of isolated single cells from 2D brightfield images. Second step: when a single cell was detected, the 96-hour time-lapse of the corresponding well was analysed in order to detect cell division or cell death. (b) Examples of the different classes defined for our DLBA: single cells, multiple cells, dead cells or empty well. (c) Model of our optimized DLBA : 4 convolution layers before classification of images between “Singles”, “Multiples”, “Death” and “Empty”. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

We have optimized the number of layers, the number of filters per convolution layer and the kernel size: four convolution layers of 8, 16, 32 and 64 filters respectively, and a kernel size of  $15 \times 15$  pixels gave the best accuracy (Supplemental Figure S1c). Secondly, we have determined the optimal number of neurons in the first fully connected layer: 1024. Because of the high number of neurons in the first fully connected layer, a 80% drop out rate provided the best accuracy (Supplemental figures S1d-e). Finally, computing *circa* 8 million features (Supplemental Table S1), our DLBA reached an accuracy of 91.2% ( $\pm 0.17\%$ ) (Figure 3a). More precisely, the detection precision for “Singles”, “Multiples” and “Empty” classes reached 81.7%, 93.2% and 97.6%, respectively. Nevertheless, some images were misclassified, notably for “Singles” and “Death” classes (Supplemental Figures S1f).

### Classical computer vision and shallow learning-based algorithms

To offer a baseline comparison with our optimized DLBA, we also investigated our classification problem with a classical computer vision algorithm (CCVA). We developed a CCVA that pre-processed images in a few steps (Figure 2a and b): i) first, objects were segmented according to intensity thresholds, ii) the largest and smallest segmented objects were filtered depending on their size in pixels, iii) the remaining objects were fitted to an ellipse, iv) according to the area and the roundness of the ellipse, the objects were classified as “Singles”, “Multiples”, “Death” or “Empty” if no object was segmented. Five features were analysed by the CCVA: i) Intensity thresholding was based on the Otsu method<sup>26</sup>, ii) size filtering has been empirically optimized based on 175 images of validation data set (Supplemental Table S3), iii) position, as bordering objects were removed, iv) finally, roundness and v) area thresholds were optimized among a wide range of values to provide the best accuracy (Supplemental Figure S4a). When applied to a test data set (Supplemental Figures S1a-b), the CCVA only provided an accuracy of 65% (Figure 3b). More precisely, it appeared that a lot of images with single or multiple cells were classified as “Empty” (*circa* 57%), either because they were not segmented properly by intensity thresholding, or their size did not match the size filter. The image-to-image variability is large, more likely due to variations in illumination, cell morphologies, microwell

shape and depth of field (Supplemental Figure S4b) and explains why a CCVA with few features (5) provided a low detection accuracy.

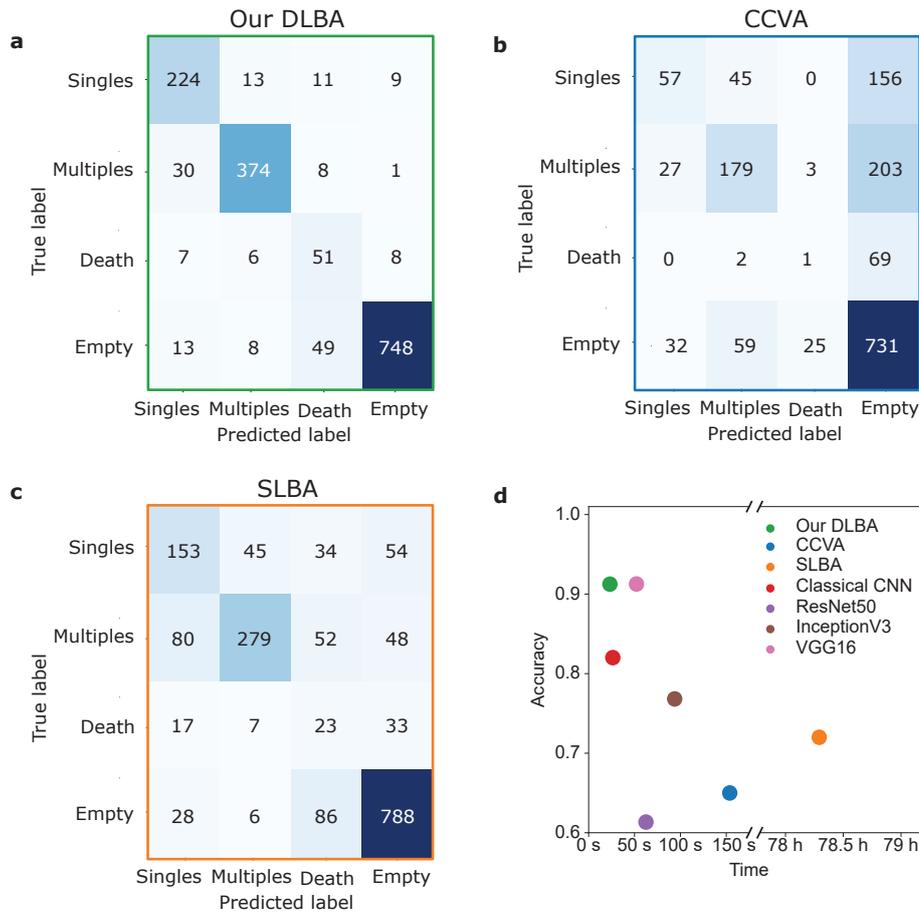


**Figure 2.** Working principles of the CCVA and SLBA tested in this study. (a) For the CCVA, images were processed through an intensity threshold before a size filtering. Remaining objects were fit to an ellipse. First row: processing of a well containing a single cell, second row: processing of a well containing multiple cells. (b) According to the area and roundness of the ellipse, images were classified as “Singles”, “Multiples”, “Death” or “Empty”. (c) For the SLBA, the first step of pixel classification segments cells from the background. Then, thanks to an object classification tool (Ilastik<sup>27</sup>), images were classified between “Singles”, “Multiples”, “Death” and “Empty” categories. The first row shows the processing of an image classified as "Single", second row image of well classified as "Multiple". Colour code corresponds to Figure 1. Scale bars show 50 µm.

As an additional comparison with our optimized DLBA, a similar analysis was undertaken with a SLBA. Random forest has been shown to be one of the most accurate SLBA<sup>28</sup>. We therefore used a random forest classifier implemented under Ilastik software<sup>27</sup>. Thanks to its pixel classification combined with object classification methods, several studies used this software for image analysis<sup>13</sup>. Based on these studies, we performed a pixel classification step by training the software to segment cells from the background on 40 images from the validation data set (Supplemental Figures S1a and b and Supplemental Table S3). Then, using an object classification method, segmented objects were classified between “Singles”, “Multiples”, “Death” or “Empty” (Figure 2c). The SLBA processed respectively 5 and 3 features for pixel classification and object classification steps (Supplemental Table S4). Applied to the test data set (Supplemental Figures S1a-b), the SLBA performed a better classification than the CCVA: its accuracy reached 72% (Figure 3b and c). While many images with cells were still classified as “Empty” (circa 13%), there were also a lot of misclassifications between “Singles” and “Multiples” classes (circa 16%), see Figure 3c.

### Comparison of our DLBA with CCVA, SLBA and other CNNs.

Our optimized DLBA proved to be a more accurate and a much faster (computation time circa 20 ms per image) classifier than the CCVA and SLBA previously described (Table 1 and Supplemental Figure S5).



**Figure 3.** Global accuracy comparison between the different methods tested. (a) For our optimized DLBA: Double entry table analysing differences between the ground truth ("True label", vertical axis) and the prediction ("Predicted label", horizontal axis). Our optimized DLBA provided an accuracy of  $91.2 \pm 0.17\%$ . Recall and precision were respectively 87% and 81% for "Singles", 90% and 93% for "Multiple", 70% and 42% for "Death", and 91% and 97% for "Empty". (b) The CCVA provided an accuracy of 65%. Recall and precision were respectively 22% and 66% for "Singles", 42% and 62% for "Multiple", 1% and 3% for "Death", and 89% and 63% for "Empty". (c) The SLBA provided an accuracy of 72%. Recall and precision were respectively 51% and 55% for "Singles", 64% and 81% for "Multiple", 22% and 10% for "Death", and 88% and 85% for "Empty". The color range stands for the amount of images in each category: the darker, the more images are associated. (d) Accuracy versus computation times for the 7 methods tested, for 1000 images See Table 1.

Our optimized DLBA has also been compared to other cutting edge CNNs (Table 1). For a similar purpose, Anagnostidis et al<sup>15</sup> developed a simple similar CNN which provided a lower accuracy when applied to the test data set: 82% ( $\pm 0.26\%$ ). We have also trained pre-trained CNNs (VGG16, InceptionV3, classical CNN and ResNet50) on our training data set. Although transfer learning-based algorithms were computing more features and required more computation time, they did not show better accuracy than our optimized DLBA when applied on our test data set (although VGG16 gives close results 91.2% ( $\pm 0.13\%$ )) but for larger computation times (Figure 3d).

Algorithm	Machine learning	Deep learning	Transfer learning	Number of features	Accuracy	Computation time per image (s)
CCVA	–	–	–	5	65%	0.15 ± 0.1
SLBA	+	–	–	8	72%	281 ± 36
Classical CNN <sup>15</sup>	+	+	–	162,900	82 ± 0.26%	0.02 ± 0.03
ResNet50 <sup>20,22</sup>	+	+	+	23,587,712	61.3 ± 1.53%	0.06 ± 0.07
InceptionV3 <sup>29</sup>	+	+	+	21,810,980	78.6 ± 0.06%	0.09 ± 0.13
VGG16 <sup>21</sup>	+	+	+	17,943,108	91.2 ± 0.13%	0.05 ± 0.04
our DLBA	+	+	–	8,541,700	91.2 ± 0.17%	0.02 ± 0.03

**Table 1.** Comparison of CCVA, SLBA, our optimized DLBA and other publicly available CNNs. For the CNNs, we show the mean accuracy ± standard deviation after three model trainings. The mean of computation time per image is given in seconds ± standard deviation.

### Encoding of Temporal information.

So far, our DLBA analysed only separated 2D images, but to assess the dynamics of single cell fate, temporal information of time-lapses need to be integrated. In addition, we considered that the temporal encoding could rescue some of our DLBA's misclassification events. Indeed, two cells can adhere tightly to each other in suspension, while having the morphology of a single cell, but detecting events such as cytokinesis can demonstrate that two cells were actually present in the microwell instead of a single fortuitously assumed single cell. We have thus developed a post-analytical decision tree (Figure 4a). The detection of single cells, cell divisions and cell death with this decision tree was evaluated by computation of recall and precision on fully annotated bright field time-lapses. It appeared that this method very efficiently detected single cells (recall: 93%; precision: 96%), cell divisions (recall: 67%; precision: 94%) and cell death (recall: 82%; precision: 90%) (Time-lapse data set 1, Supplemental Tables S2 and S5). The impact of the frame-rate on the detection of divisions of our DLBA has also been investigated with the time-lapse data set 1. Increasing the interval between two frames induced a lower recall while the precision was not modified (Supplemental Table S6). The probability thresholds and the majority voting can be considered as hyper-parameters that have been empirically tuned. Besides, we have not seen any single cell escaping from its microwell during time-lapses annotation. Hence, we have not considered classification of image as “Empty” during the time-lapse of a microwell if a single cell was detected at the beginning of the acquisition.

In addition, the impact of imaging magnification was also investigated (Time-lapse data set 2, Supplemental Figure S3 and Table S2). Recall and Precision were computed for two cell lines and showed similar results, although it appeared that the detection of cell death with higher (20x) magnification images was more sensitive while lower magnification (10x) led to a more sensitive detection of cell divisions (See Supplemental Table S2).

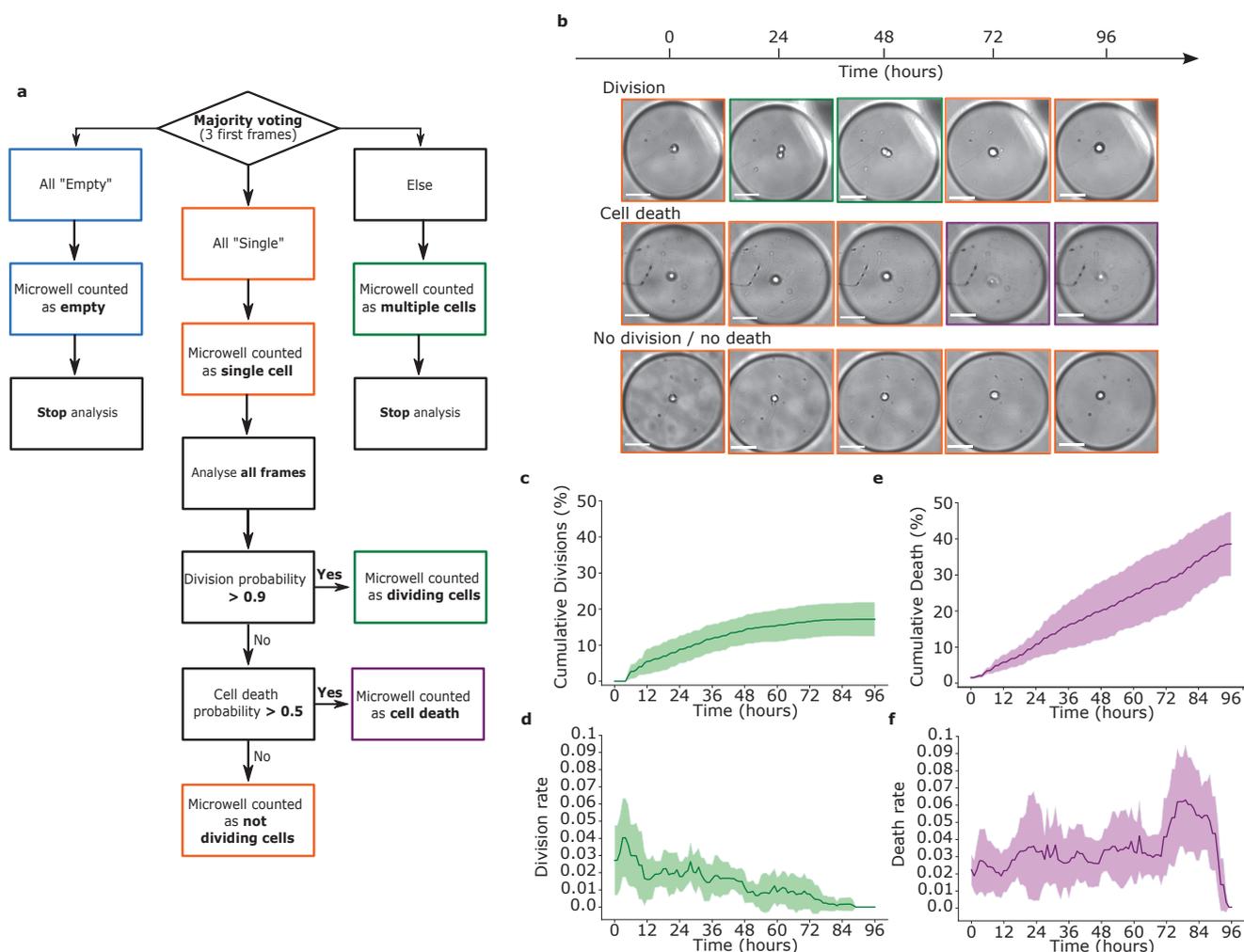
### Testing our DLBA on an independant model of CSCs.

Although our DLBA was trained on N14-0510 CSCs, we challenged it on the Time-lapse data sets 3 and 4, which were respectively composed of images of N14-1525 cells with 20x and 10x magnifications (Supplemental Tables S5). N14-1525 cells are CSCs derived from another independent glioblastoma tumor and cultured as tumorspheres in the same non-adherent conditions as previously described for the N14-0510 cells. Recalls for the N14-1525 cells were overall slightly decreased compared to N14-0510 cells, but the precision of detection remained similar (Supplemental Table S2). N14-1525 cells are larger than N14-0510 cells (Supplemental Figure S3 and Supplemental Table S7) which may explain the lower recalls. Altogether, we can consider that the global performance remains excellent which suggests that our DLBA can be used on different CSC models.

### Dynamics of cell divisions and cell death using our DLBA.

As we compared the accuracy of our DLBA to other CNNs and assessed its robustness to different magnifications and brain CSC models, we next tested its ability to extract relevant biological features of these cells, such as time-resolved division and death rates. We performed 4 experiments with N14-0510 cells (3 replicates each). Brightfield time-lapses were acquired over 96 hours, with a 20x magnification objective, using 80-minute imaging intervals. Upon completion, all time-lapses were analysed with our DLBA. The analysis of each experiment took less than 1 hour. In total, 2780 single cells were detected and 17% (±5%) underwent cell division within 96 hours (Figure 4b and c). When looking at the dynamic curve of cell divisions, we saw that most divisions occurred during the first 48 hours, with a curve flattening after 60 hours. Because the low number of

late divisions (after 60 hours) was overwhelmed by the initial numbers of single cells, computing dynamics did not allow a clear view of the latest divisions. In order to emancipate from the initial number of single cells, we have plotted the instantaneous division rate (Figure 4b and d). The initial division rate was *circa* 0.03 division/hour, but interestingly, it was decreasing over time. Regarding cell death, 38% ( $\pm 9\%$ ) of single cells died during the 96-hour time-lapse (Figure 4b and e). Compared to cell proliferation rates, the dynamics of cell death rather seemed linear, suggesting that instantaneous death rates should be relatively stable over time. Indeed, the instant death rate was constant *circa* 0.03 death/hour, but it seemed to transiently increase after 72 hours (up to 0.07 death/hour) (Figure 4b and f). Taken together, these results show that for the cell line tested, our DLBA can track automatically single cell fate and follow dynamics of cell phenotypes over time at high throughput rate using brightfield microscopy.



**Figure 4.** Dynamic analysis with our DLBA. (a) Downstream of the CNN, a decision tree considers the temporal information of cell time-lapses in order to detect single cells, cell divisions and cell death. First, we performed a majority voting on the first three frames for each microwell. If all these three frames were classified as “Empty”, the microwell was considered as containing no cell and its time-lapse was not further analysed. Then, if any of these three first frames was classified as “Multiple” or “Death”, the microwell was respectively considered as containing multiple cells or dead cells and was discarded from further analysis too. Finally, if all the three first frames were classified as “Single”, the microwell was considered as containing a single cell and the analysis kept on going. Among each time-lapse with an initial single cell, if two frames were classified as “Multiple” with a probability  $> 0.9$  (of which one  $> 0.99$ ), we considered that a cell division occurred in the microwell. Else, if any frame was classified as “Death” with a  $> 0.5$  probability, we considered that a cell death occurred in the microwell. In any other case, we considered that there were still a living yet non-dividing cell in the microwell. (b) Examples of Time-Lapse images displaying cell division, death or neither of the two. Scale bars:  $50 \mu\text{M}$ . Cumulative dynamics of N14-0510 cells divisions (c) and cell death (e) were computed over time. Relative division rate (d) and death rate (f) were computed, over sliding 6-hour temporal windows. Plots show means and standard deviations, over 4 experiments with three replicates each (2780 time-lapses analyzed in total).

## Discussion

Deep learning-based strategies have been developed to detect or predict cell differentiation. They either rely on morphological transformations of cell populations<sup>22,30,31</sup>, or on the detection of gained or lost expression of biomarkers<sup>32,33</sup>. In this study we propose an original approach, taking advantage of hydrogel microwells to isolate cells in suspension and to recapitulate the initial steps of the tumorsphere formation assay. These growth conditions allow the maintenance of the CSC population from a brain tumor which can be demonstrated by the capacity of tumorspheres-derived CSCs to recapitulate tumor growth when

injected in the brain of mouse models<sup>34</sup>. In such microfabricated device, identifying whether or not the cells divide provides us with key features about their stemness potential. In this study, we propose a deep-learning based approach to evaluate the fate (division, death, quiescence) of individual CSCs isolated in microwells, including temporal information encoding for cell dynamics. The complexity of our image data sets can be compared to other similar already published image analysis studies. Chen et al recently used a CNN to predict the formation of spheroids from single breast cancer cells, yet their approach strictly relied on the constitutive expression of the fluorescent mCherry protein in cells<sup>16</sup>. Correlating DNA content and label-free morphological features, Blasi et al developed a SLBA in order to classify cell images at different steps during the cell cycle, but the precision for mitosis detection remained low (*circa* 45%)<sup>35</sup>. More recently, with the same purpose, this team combined bright field images and fluorescent stains and extracted additional features allowing their DLBA to provide improved precisions for mitosis detection (*circa* 70%)<sup>29</sup>. As for cell counting approaches, Anagnostidis et al developed a CNN that was very accurate for counting polyacrylamide beads but which had degraded capacities for cell counting (*circa* 85%)<sup>15</sup> probably due to complex cell morphological features compare to homogeneous polyacrylamide beads. Concerning the detection of dead cells, Riba et al developed a DLBA in order to distinguish viable cells from dead cells. Interestingly, as we do, they showed that their optimised CNN was more accurate (*circa* 80%) than more complex networks<sup>36</sup>. Here, our DLBA cannot only detect images of microwells containing single cells with high recall and precision (93% and 96% respectively), but it can also detect dividing and dead cells with high reliability all at once, while integrating a time dimension to the analysis. Therefore constituting an innovative and more comprehensive approach to systematic cell phenotyping.

Pre-trained CNNs have already provided excellent results to detect cell death or differentiation for adherent cells on a 2D surface<sup>20-22</sup>. Interestingly, such CNNs did not provide a better accuracy than ours while requiring longer computing times (see Table 1). Transfer learning CNNs have been pre-trained on the publicly available ImageNet database<sup>25</sup>. While it has already been reported that transfer learning did not always improve deep learning performances<sup>37</sup>, other results suggested that CNNs pre-trained on images dedicated to a similar purpose enhance network accuracy<sup>19</sup>. Statistics of natural images are known to produce in the Fourier domain power law spectrum in log-log scales<sup>38</sup>. This means that there are no specific size of objects, but rather objects of all sizes. In our images instead, we have a single object with a given size range, typically a blob which will produce a spectrum with holes (zeros) in the Fourier spectrum. This may explain the relative inefficiency of the pre-trained models applied to our problem. Therefore, in comparison with this most related literature, the imaging and the image analysis have been optimized in order to deliver biologically relevant results with large statistics and high-throughput. Indeed each microwell contains a low number of cells or no cells at the beginning of the experiment. Consequently, the complexity of the informational task is reduced and this accounts for the much simpler and smaller neural network that we obtained as the best solution. Therefore, the use of the microwell systems not only increases the experimental throughput but also reduces the computational complexity of the neural network. From a methodological point of view, our CNN architecture has demonstrated to provide better results than standard architectures with a low number of hyperparameters to be tuned. Our approach enables easy time dependent processing and is more compatible with on-the-fly analysis. This is obtained thanks to the joint optimization of hardware (microwell approach) and software (small CNN) which results in a globally more efficient solution.

Although our DLBA provided good predictions for a given cell line while trained on a different one. However, a thorough examination to additional cell lines is still necessary to generalize the improved capacities of our method, yet when suspended in microwells, cells typically take on a spherical form and don't display much variability in shape compared to adherent cells. Indeed, misclassification seems to results from differences in the mean size of each cell line (Supplemental Figure S3 and Supplemental Table S7). An efficient way to improve performances of the CNN could be adding to our image data sets more images from different cell lines with various sizes or textures, i.e. cell models derived from other patients or tissues. Although this annotating step require some more work, it would be still less demanding than programming a new CCVA optimised to each new cell line. Another very interesting perspective would be to implement temporal convolution to our CNN in order to better take into account the temporal dimension of time-lapses. Despite implying the re-annotation of the training datasets used so far, the analysis of time series by CNNs should allow to significantly improve the prediction of cell fate<sup>39</sup>, for example by predicting cell divisions before it happens based on cell morphological characteristics.

We have also investigated the dynamics of cell division and death of CSCs originated from glioblastoma. These glioblastoma CSCs are at the centre of controversies because of the lack of reliable molecular markers to specifically identify them<sup>4</sup>. Moreover, recent single cell transcriptomic data suggest that glioblastoma tumor-forming cells are rather defined by a continuum of cellular states, including different CSC phenotypes and cells engaged towards more differentiated cancer cells populations<sup>40-42</sup>. Similarly, although Patel et al suggested that CSCs express cell cycle related genes at low level, suggesting that these cells likely have low division rates, other recent single RNA-seq studies conversely suggest that glioblastoma stem or progenitor-like cells are enriched in cycling cells<sup>43</sup>. These conflicting results further support the need to develop approaches, such as the one proposed in this study, to further describe or experimentally assess hypotheses regarding the behavior of CSCs. Accordingly,

this heterogeneity between slow and fast dividing cells could be recapitulated in Fig. 4c and might arise from cells unequally positioned on the continuum of differentiation phenotypes. Besides, CSCs have been shown to escape anoikis<sup>44</sup>, and more specifically, N14-0510 cells have been reported to display an increased expression of anti-apoptotic factors under non-adherent culture conditions<sup>45</sup>. Our microwells prevent cell-substrate adhesion as well as cell-cell adhesion, therefore suggesting that cells remaining alive at the end of the time-lapse might recapitulate several CSC properties, including survival of isolated cells and tumorigenic capacities highlighted by the formation of tumorspheres. To further prove the correlation between cell state, early division and fate, it would be interesting to monitor stemness or differentiation molecular markers i.e. OLIG2, SOX2 or GFAP in our microwells and correlate their expression with late events such as tumorsphere formation. This would provide unique information on the dynamics of CSCs linked to biological functions. Finally, coupling our DLBA to a micro-fabricated device dedicated to drug screening would provide a relevant image analysis pipeline in order to assess, on-the-fly and at high throughput rate, drug effects on cell divisions, cell death and CSCs fate modifications for patient-derived dissociated tumor samples.

## Methods

### Microfabricated device.

Manufacturing process has already been detailed in Goodarzi et al<sup>23,24</sup>. Briefly, 200 µm diameter microwells were molded with 2% agarose solution over PDMS counter-moulds. Agarose was then immobilized on (3-Aminopropyl)triethoxysilane coated glass cover-slips. Eventually, GSCs were seeded in the agarose microwells.

### Cell lines and culture.

N14-0510 and N14-1525 cell lines were kindly provided by A.I. and M.G. labs and were derived from diagnosed WHO grade IV glioblastoma before established as cellular models maintain in non-adherent conditions. They were maintained under normoxia at 37°C in incubator, in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F12 (Life, 31330-095) complemented with N2 (Life, 17502-048) at 1X, B27 (Life, 17504-001) at 1X, 100 U/ml penicillin-streptomycin (Life, 15140-122) and FGF2 (Miltenyi Biotec, 130-104-922), EGF (Miltenyi Biotec, 130-093-825) (20ng/mL both) and heparin 0.00002% (Sigma, H3149). Unless otherwise specified, cells were cultured in Ultra low attachment T75 flasks (ThermoFisher, Ultra Low Adherent, 10491623). Cells were passaged weekly with Accumax (Sigma, A7089) at a density of 600 000 cells in 20 ml of complete media. The medium was renewed twice a week and mycoplasma tests were regularly performed. Hoechst staining (Sigma, H6024) was used to control cell number (10 and 100 ng/mL) and TO-PRO-1 iodide (ThermoFisher, T3602) was used to control cell viability (1:50). Cell size measurements were performed after enzymatic dissociation of tumorsphere as previously detailed, the cell suspensions were quantified using the automatic LUNA FL cell counter (Logos biosystems) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were stained with acridine orange and propidium iodide stain solution and were immediately imaged with both brightfield and dual fluorescence optics to discriminate dead from living cells, and to estimate the size of living cells.

### Image setup.

Samples were imaged with a Leica DMIRB microscope. Microscope was located in a impervious box with 37°C controlled temperature (LIS Cube) and 5% CO<sub>2</sub> air (LIS Brick gaz mixer). The camera (Andor Neo 5.5 SCMOS), shutter (Vincent associated D1) and stage (Prior proscan II) were controlled with micromanager 1.4.22<sup>46</sup>. The light source was provided by a LED (Thorlabs MWWHL4). 20x and 10x numerical aperture objectives were both from Leica.

### Hardwares and softwares

Computing was performed with Windows 10, 64 bit operating system, Intel(R) Core(TM) i7-7700 3.60GHz processor. GPU used was NVIDIA quadro p600. All scripts were written in Python 3.7<sup>47</sup>. Libraries used were Mahotas 1.4.11<sup>48</sup>, OpenCV 4.2.0<sup>49</sup>, Seaborn<sup>50</sup>, numpy<sup>51</sup>, SciPy<sup>52</sup>, pandas<sup>53</sup>, matplotlib<sup>54</sup> and Tensorflow 2.3.0<sup>55</sup>. Version of Ilastik used was 1.3.2post1<sup>27</sup>. Pre-trained CNN were found at [https://www.tensorflow.org/api\\_docs/python/tf/keras/applications](https://www.tensorflow.org/api_docs/python/tf/keras/applications).

### Data sets and code availability.

Annotated data set was composed of 17378 bright field acquired images. Images have been manually annotated. All cells from this data set were N14-0510 cells imaged with a 20x magnification. Amount of images per class was: 2871 "Singles" images, 4615 "Multiples" images, 803 "Death" images and 9089 "Empty" images (Figure 1b and Supplemental Figure S1a). The number and viability of cells seen in brightfield has been controlled by fluorescent microscopy (Supplemental Figure S2). 10% of these images were randomly selected in order to generate a validation data set, and another 10% was also randomly selected for the test data set. Remaining images constitute the training data set, on which we performed data augmentation in order to balance number of images between the four classes (Supplemental Figure S1b). Parameters of SLBA and CCVA were optimized respectively with 40 and 175 images manually selected from validation data set (Supplemental Table S3).

Performance of DLBA, SLBA and CCVA were all compared on test data set. Computation times were compared on 1, 10, 100 and 1000 images randomly selected from test data set. Time-lapses were performed with a time interval of 40 minutes (Supplemental Table S6), except for the dynamics of cell division and death (Figure 4) where a 30 minutes interval was used. Time-lapse data set 1 was composed of 1091 annotated time-lapses of N14-0510 cells imaged with 20x magnification. There were 356 empty microwells, 434 microwells with 2 cells or more, 301 microwells with single cells which 81 divided and 117 died. Time-lapse data set 2 was composed of 1179 annotated time-lapses of N14-0510 cells imaged with 10x magnification. There were 363 empty microwells, 482 microwells with 2 cells or more, 334 microwells with single cells which 71 divided and 85 died. Time-lapse data set 3 was composed of 717 annotated time-lapses of N14-1525 cells imaged with 20x magnification. There were 231 empty microwells, 310 microwells with 2 cells or more, 176 microwells with single cells which 26 divided and 34 died. Time-lapse data set 4 was composed of 596 annotated time-lapses of N14-1525 cells imaged with 10x magnification. There were 222 empty microwells, 214 microwells with 2 cells or more, 160 microwells with single cells which 31 divided and 55 died. Image databases and codes can be found at <https://github.com/chalbiophysics/XXX>.

### Statistics.

Classical efficiency scores were performed to evaluate and compare algorithms. Those scores involve true positives (positive images correctly classified, or TP), true negatives (negative images correctly classified, or TN), false positives (negative images misclassified, or FP) and false negatives (positive images misclassified, or FN). Accuracy was computed when CCVA, SLBA and the various CNNs:

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}. \quad (1)$$

When assessing time-lapse classification and comparison between cell lines and magnifications by DLBA, recall and precision were computed:

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (2)$$

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}. \quad (3)$$

Numpy library<sup>51</sup> was used to compute means and standard deviations. Percentages of cell divisions and cell death through time were computed as follows:

$$\%events_{time} = 100 * \frac{N\ cell\ events_{time}}{N\ single\ cells}, \quad (4)$$

$\%events_{time}$  is the percentage of cell division or death at given time point;  $N\ cell\ events_{time}$  are number of cell divisions or death at given time;  $N\ single\ cells$  is the initial number of single cells at beginning of time-lapse. Division rate and death rate through time were computed upon a 6-hour temporal window:

$$Event\ rate_{time} = \frac{N\ cell\ events_{time} - N\ cell\ events_{time-6hours}}{N\ living\ single\ cells_{time}}, \quad (5)$$

$Event\ rate_{time}$  is the division or death rate at given time,  $N\ cell\ events_{time}$  are the number of cell divisions or death at given time,  $N\ living\ single\ cells_{time}$  is the remaining number of single cells that are still alive and have not divided yet at given time.

### References

1. Dirkse, A. *et al.* Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun* **10**, 1787, DOI: [10.1038/s41467-019-09853-z](https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z) (2019).
2. Nassar, D. & Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 47–76, DOI: [10.1146/annurev-pathol-012615-044438](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438) (2016).
3. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell* **8**, 486–498, DOI: [10.1016/j.stem.2011.04.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007) (2011).
4. Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* **29**, 1203–1217, DOI: [10.1101/gad.261982.115](https://doi.org/10.1101/gad.261982.115) (2015).

5. Icha, J., Weber, M., Waters, J. C. & Norden, C. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *Bioessays* **39**, DOI: [10.1002/bies.201700003](https://doi.org/10.1002/bies.201700003) (2017).
6. Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. A. & Giepmans, B. N. G. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat Methods* **9**, 152–158, DOI: [10.1038/nmeth.1855](https://doi.org/10.1038/nmeth.1855) (2012).
7. Chiang, P.-J., Wu, S.-M., Tseng, M.-J. & Huang, P.-J. Automated Bright Field Segmentation of Cells and Vacuoles Using Image Processing Technique. *Cytom. Part A* **93**, 1004–1018, DOI: [10.1002/cyto.a.23595](https://doi.org/10.1002/cyto.a.23595) (2018).
8. Selinummi, J. *et al.* Bright Field Microscopy as an Alternative to Whole Cell Fluorescence in Automated Analysis of Macrophage Images. *PLOS ONE* **4**, e7497, DOI: [10.1371/journal.pone.0007497](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007497) (2009).
9. D'Argenio, V. The High-Throughput Analyses Era: Are We Ready for the Data Struggle? *High Throughput* **7**, 8, DOI: [10.3390/ht7010008](https://doi.org/10.3390/ht7010008) (2018).
10. Edlund, C. *et al.* LIVECell—A large-scale dataset for label-free live cell segmentation. *Nat Methods* **18**, 1–8, DOI: [10.1038/s41592-021-01249-6](https://doi.org/10.1038/s41592-021-01249-6) (2021).
11. Riordon, J., Sovilj, D., Sanner, S., Sinton, D. & Young, E. W. K. Deep Learning with Microfluidics for Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **37**, 310–324, DOI: [10.1016/j.tibtech.2018.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.005) (2019).
12. Lugagne, J.-B. *et al.* Identification of individual cells from z-stacks of bright-field microscopy images. *Sci Rep* **8**, 11455, DOI: [10.1038/s41598-018-29647-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-29647-5) (2018).
13. Ossinger, A. *et al.* A rapid and accurate method to quantify neurite outgrowth from cell and tissue cultures: Two image analytic approaches using adaptive thresholds or machine learning. *J. Neurosci. Methods* **331**, 108522, DOI: [10.1016/j.jneumeth.2019.108522](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108522) (2020).
14. Wei, L. & Roberts, E. Neural network control of focal position during time-lapse microscopy of cells. *Sci Rep* **8**, 7313, DOI: [10.1038/s41598-018-25458-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25458-w) (2018).
15. Anagnostidis, V. *et al.* Deep learning guided image-based droplet sorting for on-demand selection and analysis of single cells and 3D cell cultures. *Lab Chip* **20**, 889–900, DOI: [10.1039/D0LC00055H](https://doi.org/10.1039/D0LC00055H) (2020).
16. Chen, Y.-C., Zhang, Z. & Yoon, E. Early Prediction of Single-Cell Derived Sphere Formation Rate Using Convolutional Neural Network Image Analysis. *Anal Chem* **92**, 7717–7724, DOI: [10.1021/acs.analchem.0c00710](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00710) (2020).
17. Hegde, R. B., Prasad, K., Hebbar, H. & Singh, B. M. K. Comparison of traditional image processing and deep learning approaches for classification of white blood cells in peripheral blood smear images. *Biocybern. Biomed. Eng.* **39**, 382–392, DOI: [10.1016/j.bbe.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bbe.2019.01.005) (2019).
18. Soetje, B., Fuehlekrug, J., Haffner, D. & Ziegler, W. H. Application and Comparison of Supervised Learning Strategies to Classify Polarity of Epithelial Cell Spheroids in 3D Culture. *Front. Genet.* **11**, 248, DOI: [10.3389/fgene.2020.00248](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00248) (2020).
19. Kim, Y.-G. *et al.* Effectiveness of transfer learning for enhancing tumor classification with a convolutional neural network on frozen sections. *Sci Rep* **10**, 21899, DOI: [10.1038/s41598-020-78129-0](https://doi.org/10.1038/s41598-020-78129-0) (2020).
20. Greca, A. D. L. *et al.* Celldeath: A tool for detection of cell death in transmitted light microscopy images by deep learning-based visual recognition. *PLOS ONE* **16**, e0253666, DOI: [10.1371/journal.pone.0253666](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253666) (2021).
21. Verduijn, J., Van der Meeren, L., Krysko, D. V. & Skirtach, A. G. Deep learning with digital holographic microscopy discriminates apoptosis and necroptosis. *Cell Death Discov.* **7**, 1–10, DOI: [10.1038/s41420-021-00616-8](https://doi.org/10.1038/s41420-021-00616-8) (2021).
22. Waisman, A. *et al.* Deep Learning Neural Networks Highly Predict Very Early Onset of Pluripotent Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Reports* **12**, 845–859, DOI: [10.1016/j.stemcr.2019.02.004](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.02.004) (2019).
23. Goodarzi, S. *et al.* Quantifying nanotherapeutic penetration using a hydrogel-based microsystem as a new 3D in vitro platform. *Lab Chip* **21**, 2495–2510, DOI: [10.1039/D1LC00192B](https://doi.org/10.1039/D1LC00192B) (2021).
24. Rivière, C., Prunet, A., Fuoco, L. & Ayari, H. Plaques de micropuits en hydrogel biocompatible (2018).
25. Deng, J. *et al.* ImageNet: A large-scale hierarchical image database. In *2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 248–255, DOI: [10.1109/CVPR.2009.5206848](https://doi.org/10.1109/CVPR.2009.5206848) (2009).

26. Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Syst. Man, Cybern.* **9**, 62–66, DOI: [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076) (1979).
27. Berg, S. *et al.* Ilastik: Interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* **16**, 1226–1232, DOI: [10.1038/s41592-019-0582-9](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9) (2019).
28. Chen, X. & Ishwaran, H. Random forests for genomic data analysis. *Genomics* **99**, 323–329, DOI: [10.1016/j.ygeno.2012.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.04.003) (2012).
29. Eulenberg, P. *et al.* Reconstructing cell cycle and disease progression using deep learning. *Nat. Commun.* **8**, 463, DOI: [10.1038/s41467-017-00623-3](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00623-3) (2017).
30. Kegeles, E., Naumov, A., Karpulevich, E. A., Volchkov, P. & Baranov, P. Convolutional Neural Networks Can Predict Retinal Differentiation in Retinal Organoids. *Front. Cell. Neurosci.* **14** (2020).
31. Joy, D. A., Libby, A. R. G. & McDevitt, T. C. Deep neural net tracking of human pluripotent stem cells reveals intrinsic behaviors directing morphogenesis. *Stem Cell Reports* **16**, 1317–1330, DOI: [10.1016/j.stemcr.2021.04.008](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.04.008) (2021).
32. Maslova, A. *et al.* Deep learning of immune cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 25655–25666, DOI: [10.1073/pnas.2011795117](https://doi.org/10.1073/pnas.2011795117) (2020).
33. Ahmad, S. M. *et al.* Machine learning classification of cell-specific cardiac enhancers uncovers developmental subnetworks regulating progenitor cell division and cell fate specification. *Development* **141**, 878–888, DOI: [10.1242/dev.101709](https://doi.org/10.1242/dev.101709) (2014).
34. Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821–5828 (2003).
35. Blasi, T. *et al.* Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry. *Nat Commun* **7**, 10256, DOI: [10.1038/ncomms10256](https://doi.org/10.1038/ncomms10256) (2016).
36. Riba, J., Schoendube, J., Zimmermann, S., Koltay, P. & Zengerle, R. Single-cell dispensing and ‘real-time’ cell classification using convolutional neural networks for higher efficiency in single-cell cloning. *Sci. Reports* **10**, 1193, DOI: [10.1038/s41598-020-57900-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-57900-3) (2020).
37. Rasti, P. *et al.* Machine Learning-Based Classification of the Health State of Mice Colon in Cancer Study from Confocal Laser Endomicroscopy. *Sci. Reports* **9**, 20010, DOI: [10.1038/s41598-019-56583-9](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56583-9) (2019).
38. Ruderman, D. L. The statistics of natural images. *Network: Comput. Neural Syst.* **5**, 517–548, DOI: [10.1088/0954-898X\\_5\\_4\\_006](https://doi.org/10.1088/0954-898X_5_4_006) (1994).
39. Liao, Q. *et al.* Development of deep learning algorithms for predicting blastocyst formation and quality by time-lapse monitoring. *Commun Biol* **4**, 1–9, DOI: [10.1038/s42003-021-01937-1](https://doi.org/10.1038/s42003-021-01937-1) (2021).
40. Patel, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**, 1396–1401, DOI: [10.1126/science.1254257](https://doi.org/10.1126/science.1254257) (2014).
41. Neftel, C. *et al.* An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* S0092867419306877, DOI: [10.1016/j.cell.2019.06.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024) (2019).
42. Couturier, C. P. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat. Commun.* **11**, 3406, DOI: [10.1038/s41467-020-17186-5](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17186-5) (2020).
43. Couturier, C. P. *et al.* Single-cell rna-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat. communications* **11**, 1–19 (2020).
44. Talukdar, S. *et al.* MDA-9/Syntenin regulates protective autophagy in anoikis-resistant glioma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 5768–5773, DOI: [10.1073/pnas.1721650115](https://doi.org/10.1073/pnas.1721650115) (2018).
45. Fanfone, D., Idbah, A., Mammi, J., Gabut, M. & Ichim, G. Profiling Anti-Apoptotic BCL-xL Protein Expression in Glioblastoma Tumorspheres. *Cancers (Basel)* **12**, E2853, DOI: [10.3390/cancers12102853](https://doi.org/10.3390/cancers12102853) (2020).
46. Edelstein, A. D. *et al.* Advanced methods of microscope control using microManager software. *J Biol Methods* **1**, DOI: [10.14440/jbm.2014.36](https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36) (2014).
47. Van Rossum, G. & Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual*. (CreateSpace, Scotts Valley, CA, 2009).

48. Coelho, L. P. Mahotas: Open source software for scriptable computer vision. *J. Open Res. Softw.* **1**, e3 (2013).
49. Bradski, G. The OpenCV Library. <http://www.drdobbs.com/open-source/the-opencv-library/184404319>.
50. Waskom, M. L. Seaborn: Statistical data visualization. *J. Open Source Softw.* **6**, 3021, DOI: [10.21105/joss.03021](https://doi.org/10.21105/joss.03021) (2021).
51. Harris, C. R. *et al.* Array programming with NumPy. *Nature* **585**, 357–362, DOI: [10.1038/s41586-020-2649-2](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2) (2020).
52. Virtanen, P. *et al.* SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods* **17**, 261–272, DOI: [10.1038/s41592-019-0686-2](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2) (2020).
53. McKinney, W. Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proc. 9th Python Sci. Conf.* 56–61, DOI: [10.25080/Majora-92bf1922-00a](https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-00a) (2010).
54. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 90–95, DOI: [10.1109/MCSE.2007.55](https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55) (2007).
55. Abadi, M. *et al.* TensorFlow: A system for large-scale machine learning. *arXiv:1605.08695 [cs]* (2016). [1605.08695](https://arxiv.org/abs/1605.08695).

## Acknowledgements

GDR Imabio founded Hackathon Anger 2019 where AJC, SM and DR conceived study. AJC was funded by Hospices civils de Lyon and ITMO Cancer Soutien pour la formation à la recherche fondamentale et translationnelle en Cancérologie. The experiments were funded by a grant from the Ligue Nationale contre le Cancer, comité Auvergne-Rhône-Alpes (MG and SM) and by a grant from Institut Convergence PLAsCAN, ANR-17-CONV-0002 (MG and SM). Charlotte RIVIÈRE kindly provided micro-fabricated chip and has to disclose the patent FR3079524A1. We thank Mrs Clarisse Hyron for english reviewing of the manuscript

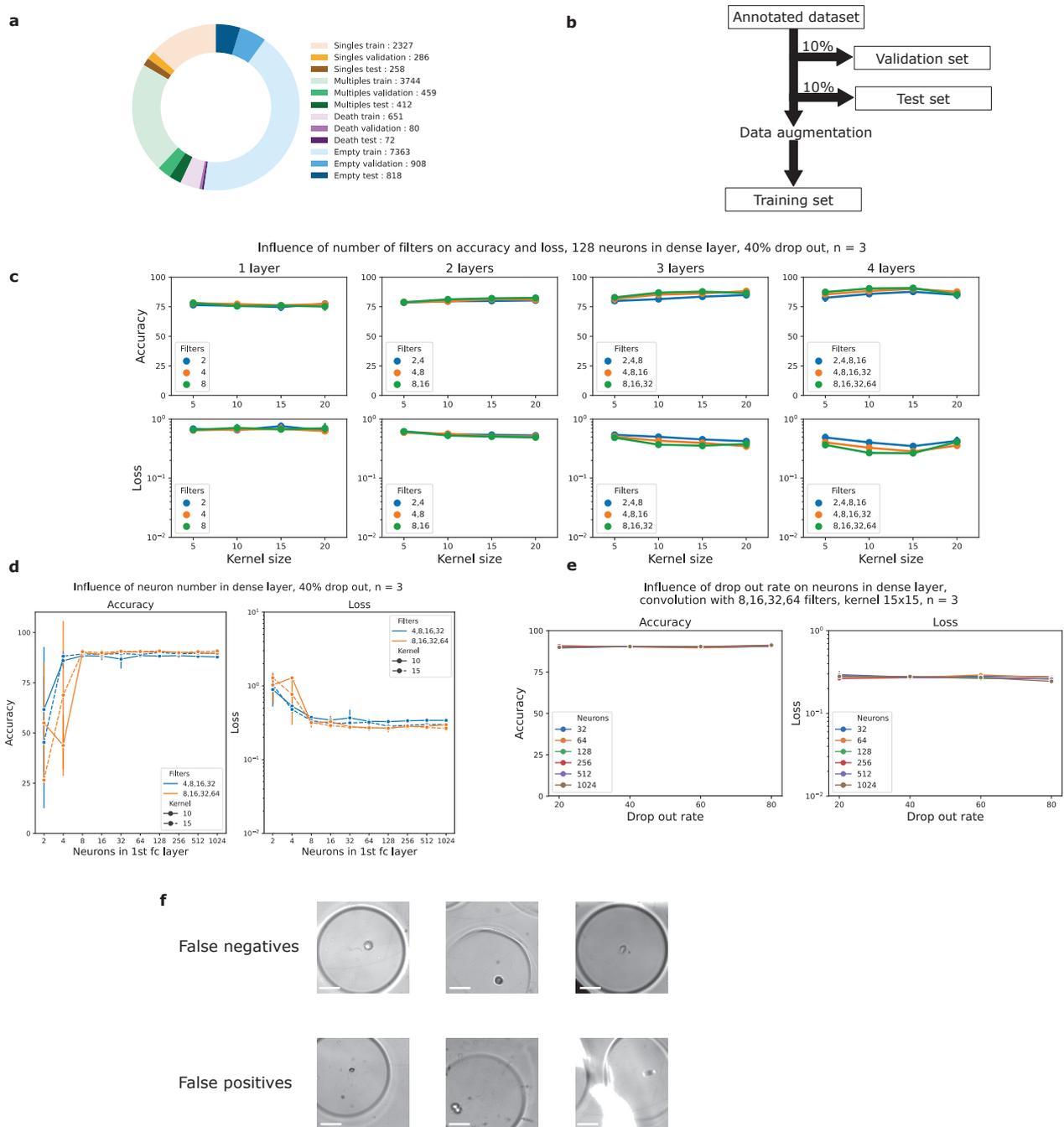
## Author contributions statement

AJC, DR and SM conceived experiments. MG, OCE, DM and SM contributed to the study design. AJC conducted experiment, developed algorithms, annotated databases, is the main writer and made figures. AJC, DR and SM analysed data. AI and MG provided biological samples. AJC, NB, MG and CI cultured cells. All authors contributed to write and/or reviewed the manuscript and agreed to the published version.

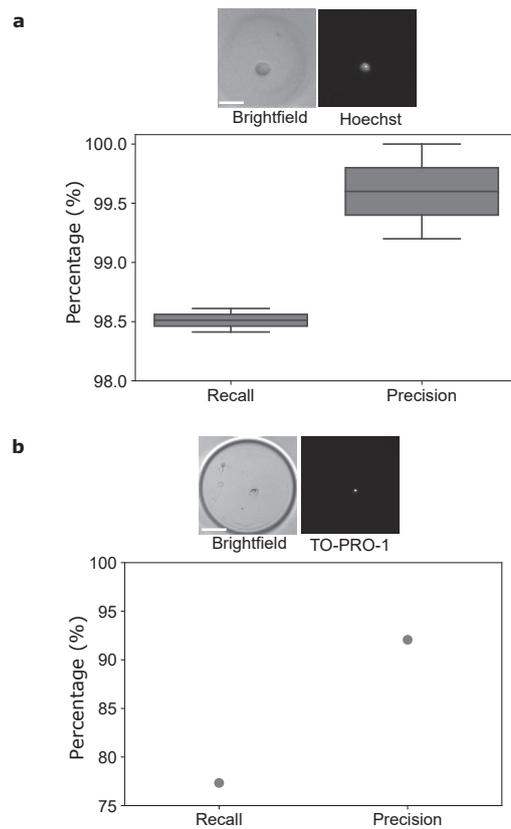
## Additional information

AI reports research grants and travel funding from Carthera, research grants from Transgene, research grants from Sanofi, research grants from Air Liquide, travel funding from Leo Pharma, research grants from Nutritheragene, outside the submitted work.

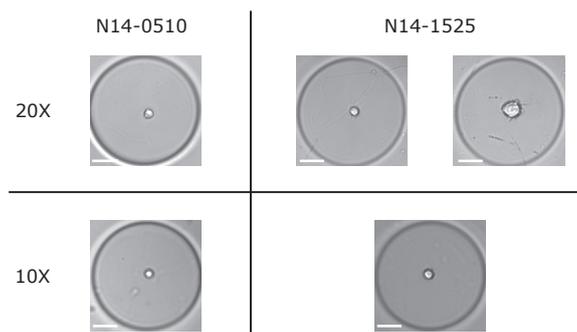
## Supplementary information



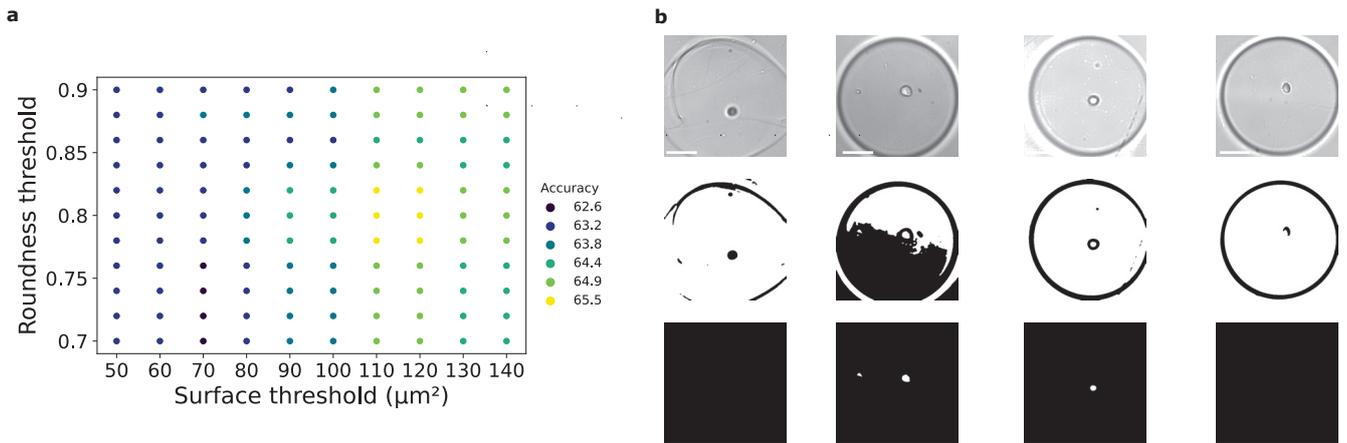
**Figure S1.** DLBA databases and optimization. (a) 17378 images were manually annotated between “Singles”, “Multiples”, “Death” and “Empty” classes. (b) 10% of the image data set constituted the validation set and another 10% was used as a test set. We performed data augmentation (clockwise 90° rotation, clockwise -90° rotation, 180° rotation, horizontal flip and vertical flip) in order to balance the classes. We optimized the kernel size, number of layers and number of filters per layer (c), number of neurons in first fully connected layer (d) and dropout rate (e). Plots show means and standard deviations of three model trainings. (f) Examples of images from “Singles” class misclassified. Scale bars show 50  $\mu\text{m}$ .



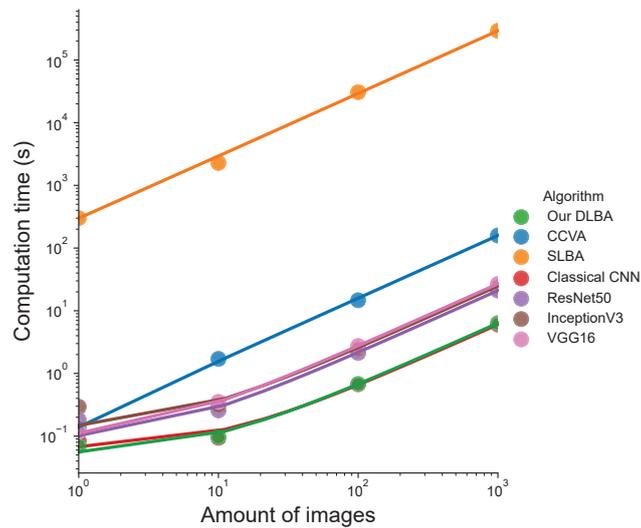
**Figure S2.** Fluorescence labeling validation of the database of brightfield images. (a) Single cell counting was controlled with Hoechst staining and fluorescence imaging (100 ng/mL). For box plot  $n=777$  analysed images (b) Cell viability was assessed by TO-PRO-1 iodide staining, fluorescence imaging and analysis of 1069 images. Scale bars show 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure S3.** Examples of N14-0510 and N14-1525 cells imaged with 20x and 10x magnification, mean diameters are respectively  $14.8 \pm 0.5 \mu\text{m}^3$  and  $17 \pm 0.6 \mu\text{m}^3$  (see Supplemental Table S7). Scale bars show 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure S4.** CCVA optimization and misclassifications. (a) Roundness and area thresholds were selected in order to optimize accuracy of the classification problem. (b) First row illustrates variability of images taken with brightfield microscopy. Second row: Intensity thresholding of corresponding images and third row: results of ellipse fitting. Scale bars show 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure S5.** Comparison of the different algorithms computation times. We compared the computation time needed to analyse 1, 10, 100 and 1000 images with CCVA, SLBA, DLBA, an already published classical CNN<sup>1</sup>, ResNet50, InceptionV3<sup>2</sup> and VGG16<sup>3</sup>.

Layer (type)	Output Shape	Number of features
conv2d (Conv2D)	(None, 285, 285, 8)	1808
max_pooling2d (MaxPooling2D)	(None, 142, 142, 8)	0
conv2d_1 (Conv2D)	(None, 128, 128, 16)	28816
max_pooling2d_1 (MaxPooling2D)	(None, 64, 64, 16)	0
conv2d_2 (Conv2D)	(None, 50, 50, 32)	115232
max_pooling2d_2 (MaxPooling2D)	(None, 25, 25, 32)	0
conv2d_2 (Conv2D)	(None, 11, 11, 64)	460864
fatten (Flatten)	(None, 7744)	0
dense (Dense)	(None, 1024)	7930880
activation (Activation)	(None, 1024)	0
dropout (Dropout)	(None, 1024)	0
dense_1 (Dense)	(None, 3)	3075
activation_1 (Activation)	(None, 3)	0

**Table S1.** Features computed by our optimized DLBA.

	Magnification	N14-0510		N14-1525	
		Recall	Precision	Recall	Precision
<b>Single cell</b>	20x	93% (281/301)	96% (281/292)	80% (142/176)	92% (142/153)
	10x	93% (312/334)	99% (312/314)	86% (138/160)	97% (138/142)
<b>Division</b>	20x	67% (55/81)	94% (55/58)	79% (23/28)	88% (23/26)
	10x	80% (57/71)	93% (57/61)	93% (29/31)	87% (29/33)
<b>Cell death</b>	20x	82% (96/117)	90% (96/106)	54% (27/50)	79% (27/34)
	10x	70% (60/85)	89% (60/67)	65% (36/55)	92% (36/39)

**Table S2.** Recall and precision for the detection of time-lapses with one single cell, of cell divisions and of cell death. The table shows results in percentage and absolute numbers for N14-0510 cells at 20x and 10x magnifications, and for N14-1525 cells at 20x and 10x magnifications (respectively 1091, 1179, 717 and 596 time-lapses analysed).

Algorithm	Data sets used for parameters optimization
DLBA	Training set & Validation set
SLBA	40 images from Validation set
CCVA	175 images from Validation set

**Table S3.** Our DLBA was trained on Training set and weights were optimized based on Validation set. SLBA was trained on 40 imaged manually selected from "Singles", "Multiples" and "Death" classes from Validation set. CCVA was trained on 10% of images from each classes of Validation set. All algorithms were tested with the Test set.

<b>Pixel classification</b>
Gaussian smoothing ( $\sigma$ 10)
Gaussian gradient magnitude ( $\sigma$ 5)
Difference of gaussians ( $\sigma$ 0.7)
Structure tensor eigenvalues ( $\sigma$ 1.6 and 10)
Hessian gaussian eigenvalues ( $\sigma$ 3 and 10)
<b>Object classification</b>
Sizing in pixels
Convexity
Average Branch length

**Table S4.** Features computed by ilastik for pixel classification and object classification steps.

Time lapse data set #	Cell line	Magnification	Amount of time-lapses annotated	Micro-wells with a single cell	Micro-wells with a cell division	Micro-wells with a cell death
1	N14-0510	20x	1091	301	81	117
2	N14-0510	10x	1179	334	71	85
3	N14-1525	20x	717	176	26	34
4	N14-1525	10x	596	160	31	55

**Table S5.** Four time-lapse data sets were manually annotated between empty micro-wells, micro-wells with multiple cells at beginning of experiment, micro-wells with a single cell at beginning of experiment, micro-wells with a cell division and micro-wells with a cell death event. Both N14-0510 and N14-1525 cell lines were imaged with 10x and 20x magnification.

	<b>Time interval (min)</b>		
	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>120</b>
Recall	84%	56%	41%
Precision	94%	97%	100%

**Table S6.** Impact of the time interval between two frames on the performances of our DLBA. All results were computed with the time-lapse data set 1 from which 1 frame out of 2 was removed for 80 min time intervals and 2 frames out of 3 were removed for 120 min intervals.

	<b>Mean diameter (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	
	N14-0510	14,86 $\pm$ 0,5
N14-1525	17,06 $\pm$ 0,53	(n= 2246)

**Table S7.** Mean diameter for N14-0510 and N14-1525 cell lines. Measurements were performed with a commercial automated cell counter (See Methods)

## References

1. Anagnostidis, V. *et al.* Deep learning guided image-based droplet sorting for on-demand selection and analysis of single cells and 3D cell cultures. *Lab on a Chip* **20**, 889–900, DOI: [10.1039/D0LC00055H](https://doi.org/10.1039/D0LC00055H) (2020). Publisher: The Royal Society of Chemistry.
2. Eulenberg, P. *et al.* Reconstructing cell cycle and disease progression using deep learning. *Nat. Commun.* **8**, 463, DOI: [10.1038/s41467-017-00623-3](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00623-3) (2017). Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.

3. Verduijn, J., Van der Meeren, L., Krysko, D. V. & Skirtach, A. G. Deep learning with digital holographic microscopy discriminates apoptosis and necroptosis. *Cell Death Discov.* **7**, 1–10, DOI: [10.1038/s41420-021-00616-8](https://doi.org/10.1038/s41420-021-00616-8) (2021). Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.

### 3.2 Optimisation de l'utilisation du système microfabriqué

Les processus d'analyses d'images étant maîtrisés, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des étapes pré-analytiques de notre plateforme. Les détails de chacune des étapes d'optimisation sont expliqués dans la première partie de l'article 3.3.3, mais nous présenterons ici un résumé de ces résultats.

Les premières étapes pour optimiser l'utilisation de la puce de microfluidique ont été d'obtenir le meilleur rendement possible, c'est-à-dire le nombre le plus important de micro-puits avec une cellule unique à l'intérieur. Nous avons montré que la densité d'ensemencement à 4000 cellules/cm<sup>2</sup> garantissant le meilleur taux de micro-puits avec une seule cellule : en moyenne 334 micro-puits avec une seule cellule (soit 29.3% des micro-puits de la puce). Cependant, afin d'être le plus fidèle possible aux conditions de culture *in vitro*, il a fallu que nous puissions changer le milieu de culture sans que les cellules soient emportées par les flux de liquide. Nous sommes donc passé du modèle de puce plane (Figure 2.1a) à une puce entourée par des murs (Figure 2.1b). Puis, en raison de la découverte de la sédimentation tardive de cellules et de NS dans les micro-puits au cours du temps, nous avons développé un nouveau modèle de puce qui est recouverte par un bouchon d'agarose (Figures 2.1c et 2.3). Ainsi, nous avons développé une puce qui isole les cellules dans des micro-puits, tout en restant perméable aux nutriments contenus dans le milieu de culture. De plus, le renouvellement de milieu 2 fois par semaine est possible avec notre plateforme. Cette contingence biologique nécessite néanmoins de limiter l'étape de vidéomicroscopie à 4 jours.

Nous avons également déterminé la durée nécessaire pour optimiser le nombre de NS formées dans notre puce. En acquérant des images 7 jours, 10 jours, 14 jours et 21 jours après le début de l'expérience, nous montrons que quasiment la totalité des NS détectées au 21<sup>ème</sup> jour le sont déjà au 14<sup>ème</sup> jour (la figure de référence se trouve dans l'article 3.3.3). Nous avons donc fixé la durée de notre expérience à 14 jours.

Modèle de puce	Problème	Solution
"Wall less" (Figure 2.1a)	Perte de cellules lors changements de milieu	Conception d'un mur d'enceinte autour de la puce pour limiter les flux de liquide
"Quadrants" (Figure 2.1b)	Sédimentation tardive dans les micro-puits au cours du temps	Conception d'un bouchon d'agarose pour limiter la sédimentation et rester perméables aux
"2K" (Figure 2.1b)	Manipulation délicate de la puce et du bouchon avec risque de contamination	Puce directement moulée au fond de la boîte de culture et bouchon en agarose à point de fusion bas?

TABLEAU 3.1 – **Tableau récapitulatif des modèles de puces développées au cours de notre travail.** Présentation des modèles de puce et leurs limites d'utilisation. Actuellement notre plateforme utilise le modèle de puce "2K" mais des améliorations sont prévues à l'avenir.

Enfin, nous nous sommes assurés de la reproductibilité des expériences menées avec la puce. Pour ce faire, nous avons analysé plusieurs expériences en conditions de culture standard pour les deux lignées N14 et N15. Nous montrons que les taux de divisions, les taux de mort cellulaire ainsi que les taux de formation de NS sont reproductibles d'une expérience à l'autre (p corrigé > 0.05) – même si bien sûr les valeurs restent dépendantes des modèles cellulaires. Nous avons analysé plusieurs facteurs confondants (taux d'occupation des micro-puits, position de la puce dans la boîte de culture et effet expérience-dépendant) sur les taux de divisions, les taux de morts cellulaires et les taux de formation de NS. Aucun biais n'a été mis en évidence, donc nous

avons conclu que les résultats obtenus avec notre plateforme sont reproductibles.

Nous sommes donc parvenus à maîtriser les processus pré et post-analytiques de notre plateforme. Les conditions d'ensemencement nous permettent d'optimiser le nombre absolu de cellules uniques, tandis que les conditions de culture nous permettent de comparer notre expérience à celles classiquement réalisées en flasques. D'autre part, nos algorithmes d'analyses d'images nous assurent une analyse performante et fiable des données issues de notre expérience. Le contrôle de tous ces paramètres est essentiel pour pouvoir adresser notre problématique biologique : la détection fonctionnelle des CSC.

### 3.3 Détection des cellules souches cancéreuses avec notre plateforme et évaluation quantitative de leur devenir

#### 3.3.1 Corrélation entre division précoce et formation d'une neurosphère

Notre plateforme nous permet d'explorer le phénotype précoce et le phénotype tardif des cellules de GBM. Pour ce paragraphe, nous nous concentrerons sur la lignée N14. Premièrement, en considérant que seules les CSG sont capables de donner une NS, le pourcentage de CSG au sein de la lignée N14 est de 28.8%. D'autre part, nous montrons que 28.2% des cellules se divisent au cours des 4 premiers jours de notre expérience. Or, notre plateforme nous permet 1) de suivre le devenir de chaque cellule prise individuellement, nous pouvons savoir si la survenue d'une division pendant les 96 premières heures (phénotype précoce) est associée à la formation d'une NS au bout de 14 jours (phénotype tardif) et 2) de générer ces données à haut-débit afin d'avoir des statistiques robustes. Ainsi, si on s'intéresse aux cellules qui se sont divisées entre J0 et J4, 46.9% d'entre elles ont données une NS, contre 28.8% des cellules de la lignée prise dans son ensemble. Cette observation est confirmée par un test du khi carré ( $p < 0.05$ ). Nous montrons donc que la survenue d'une division cellulaire précoce (entre 0 et 96 heures) est significativement corrélée à la possession des propriétés souches. Cette corrélation est également statistiquement significative dans la lignée N15.

#### 3.3.2 La corrélation entre division précoce et propriétés souches est forte

Nous avons montré dans le paragraphe précédent 3.3.1 une corrélation entre la précocité de la 1<sup>ère</sup> division cellulaire et les propriétés souches. Nous avons voulu tester la robustesse de cette corrélation en condition de stress pharmacologique. Comme on l'a vu dans le paragraphe consacré au GBM 1.2, le témozolomide (TMZ) est la molécule utilisée en 1<sup>ère</sup> intention dans le traitement de ce cancer. De façon intéressante, nous montrons que la corrélation entre division précoce et formation de NS est toujours statistiquement significative pour une concentration de TMZ de 10 $\mu$ M (test khi carré,  $p < 0.05$ ). À l'inverse, la division précoce et la formation de NS ne sont plus corrélées lorsque le TMZ est utilisé aux concentrations de 100 $\mu$ M et 1000 $\mu$ M (test khi carré,  $p > 0.05$ ).

Or la réponse thérapeutique au TMZ est – pour partie – dépendante de l'expression de l'enzyme MGMT. Il a été montré que plus les îlots CpG du promoteur de *MGMT* sont méthylés et meilleure est la réponse thérapeutique au TMZ [QUILLIEN et collab. \[2016\]](#); [THOMAS et collab. \[2012\]](#). Quand on regarde les profils de méthylation du promoteur de *MGMT* entre les lignées cellulaires dont nous disposons, il s'avère que la lignée N15 présente un pourcentage de méthylation beaucoup plus élevé que celui de la lignée N14 : respectivement 58% contre 17% (Table 3.2). Ainsi, les cellules de la lignée N15 sont – théoriquement – plus sensibles au TMZ que les cellules de la lignée N14. Surprenamment dans la lignée N15, seules les fortes doses de TMZ (1000  $\mu$ M) inhibent la formation de NS (test de Wilcoxon-Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) et décorèlent la division précoce

de la formation de NS (test khi carré,  $p > 0.05$ ). De façon intéressante, ces résultats suggèrent deux choses : 1) la corrélation entre division précoce et propriétés souches semble assez robuste car elle est partagée par plusieurs lignées cellulaires et persiste malgré la pression pharmacologique et 2) la capacité à former une NS se semble pas associée au profil de méthylation du promoteur de *MGMT*.

Lignée cellulaire	Concentration d'ADN d'ADN (ng/ $\mu$ L)	Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i>
N14	271	17%
N15	234	58%

TABLEAU 3.2 – **Méthylation du promoteur de *MGMT***. Le pyroséquençage montre que le pourcentage des îlots CpG méthylés dans le promoteur de *MGMT* est respectivement de 17% et 56% pour les lignées N14 et N15 (résultats de Marc BARRITAUULT (Centre de recherche en cancérologie de Lyon)).

### 3.3.3 High throughput phenotypical identification of glioblastoma stem cells with deep learning algorithm

# High throughput phenotypical identification of glioblastoma stem cells with deep learning algorithm

Authors: Alexis J. Chambost<sup>1,2,3</sup>, Marc Barritault<sup>2,3</sup>, Nabila Berabez<sup>2,3</sup>, Marion Carcel<sup>1</sup>, Mathieu Gabut<sup>2,3</sup>, Ahmed Idbaih<sup>4</sup>, Caroline Isaac<sup>2,3</sup>, Audrey Prunet<sup>1</sup>, Charlotte Rivière<sup>1</sup>, David Meyronet<sup>2,3\*</sup>, Sylvain Monnier<sup>1\*</sup>

1 - Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut Lumière Matière, VILLEURBANNE, France.

2 - Equipe 'Transcriptome Diversity in Stem Cells', Cancer Cell Plasticity Department, INSERM 1052, CNRS 5286, Cancer Research Center of Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.

3 - Université Claude Bernard Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France.

4 – Sorbonne Université, INSERM, CNRS, UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, 75013 Paris, France

## Introduction

### Limits of molecular markers for stem-cell like characterization

Glioblastoma multiform (GBM) is the most frequent primary cancer in adult central nervous system<sup>1</sup>. Despite currently available multimodal therapy, relapse is almost unavoidable, thus median survival of patients approximates 15 months<sup>2</sup>. Cancer stem cells (CSCs), a very scarce proportion of cancer cells, have been hold responsible for cancer relapses and the poor patient prognosis<sup>3</sup>. A lot of efforts have been spent in order to characterize GBM stem cells (GSCs) and target them in preliminary clinical trials. However, many of these studies either provided contradictory results, or were disappointing<sup>4,5</sup>, and thus raised concerns about GSC model consistency<sup>6</sup>. These doubts also rely on another pitfall of GSC model, which is the lack of universal reliable marker. Absence of specific molecular maker for GSC identification is explained by the very high heterogeneity among GSC subpopulations. GSC subpopulations express different combinations of molecular markers<sup>7</sup> and can be fuelled by dedifferentiated cancer cells<sup>8</sup>. That's why for the last two decades, several molecular markers have been proposed to be specific of GSCs: CD133<sup>9</sup>, A2B5<sup>10</sup>, SSEA1<sup>11</sup>... However, further studies confirmed that their lack of expression does not impair stem cell properties<sup>12-14</sup>.

### NS formation is a relevant and predictive functional test:

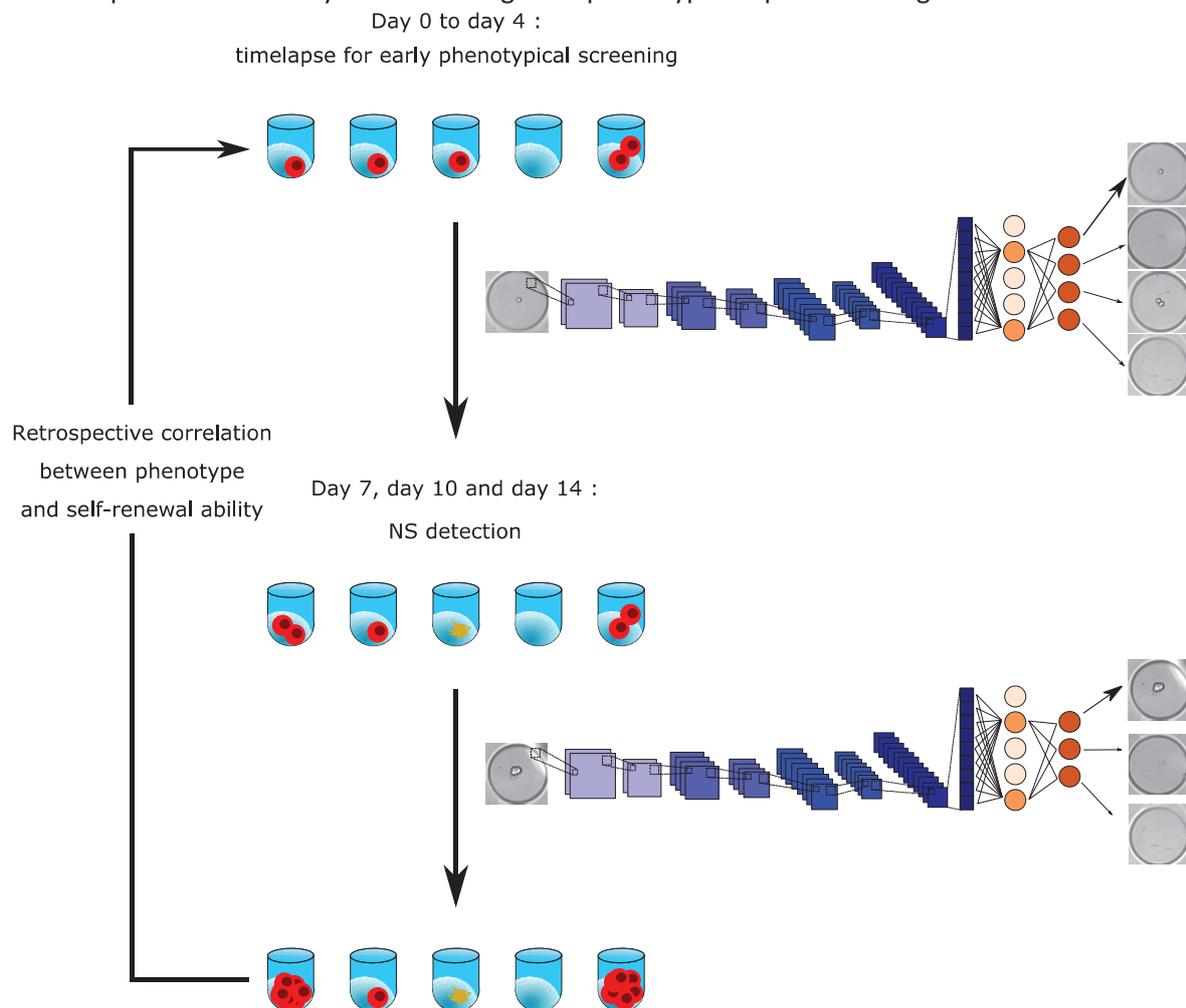
A misconception of CSC model might also explain all these contradictory results and controversies. Designation of a cell as “stem cell” should be reserved for cells that fulfil two functional properties: multipotency and self-renewal<sup>15</sup>. In the context of GSCs, it has been shown that GSCs fulfil these functional criteria: 1) GSCs are very plastic and can recapitulate heterogeneity of original tumour<sup>7,16,17</sup>; 2) Self-renewal ability of GSCs have been widely studied both in vivo through tumour initiation after cell injection in mice models, or in vitro with the neurosphere (NS) formation assay<sup>3,15</sup>. NSs are three-dimensional aggregates of clonally homogeneous cells that originate from a single stem cell. In addition to be a functional test for GSC identification, several studies showed that ability to form NS from patient derived cells is correlated with patient prognosis<sup>18-22</sup>.

### Technical limitations of the NS assay:

Despite NS formation assay has been used for decades, it raised a lot of concerns about its feasibility and pertinence<sup>23</sup>. Indeed, there is still no consensus on the way of performing NS formation assay. Cell and/or sphere aggregation that breaks clonal homogeneity is not always ensured and there is no size criterion that defines which aggregate is a NS and which one is not. In the past, several studies provided tools in order to cope standardization issue. Colony formation assays in 96 well plates<sup>17</sup> or microfabricated chip<sup>24</sup> allow a better control of clonal homogeneity, increase amount of data

generated<sup>25</sup>, are cheaper<sup>26</sup> and more ethical than tumour initiation in animal models<sup>27</sup>. Fortunately, this high throughput data generation gives access to data analysis with machine learning-based algorithm<sup>28</sup>. Many deep learning-based algorithms (DLBAs) have been trained in order to detect single cell phenotype (Chambost et al) or assessing multicellular spheroids (MCS) drug-response<sup>29</sup>. Applying automated DLBA algorithm on micro-fabricated chip where NS harvesting conditions are standardized would tackle NS formation test criticisms and control heterogeneity among GSC sub-populations.

Precisely, the purpose of this paper is to provide a phenotyping platform in order to reduce heterogeneity among GSC sub-populations. Our platform combines micro fabricated chip, timeslapse acquisition and automated image analysis with DLBA in order to detect GSCs based on a standardized NS formation test at high throughput rate. We designed a micro-fabricated chip composed of hundreds of micro-wells. Singles cells are trapped in this micro-wells and can be time-lapse imaged over days. Cell death and cell divisions are label-free detected with a DLBA that we previously developed (Chambost et al). Here, we have developed a new DLBA in order to detect NSs. Cross-reference between phenotype exhibited during timelapse and NS formation ability allows to reduce heterogeneity among GSC sub-populations based of functional properties (Figure 1). We also show that this platform can study short and long term phenotypic response to drugs.



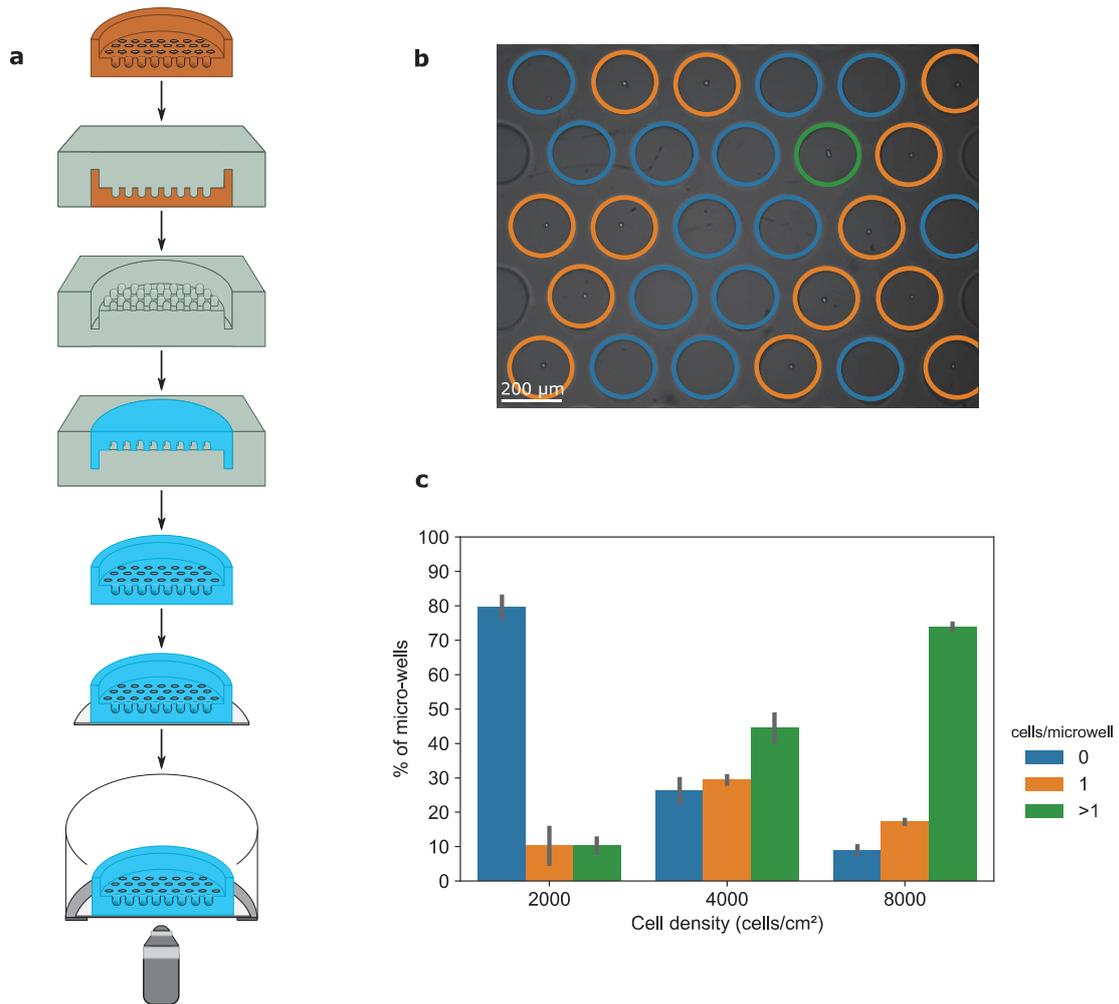
*Figure 1 : Experiment overview. Single cells are trapped in micro-wells and are timelapse imaged over 4 days. Their phenotype is analysed with DLBA (Chambost et al). At days 7, 10 and 14, chip is imaged again in order to detect NS with another DLBA. Hence, we can retrospectively correlate NS formation with phenotype exhibited during timelapse. Scale bars show 50 $\mu$ m*

## Results

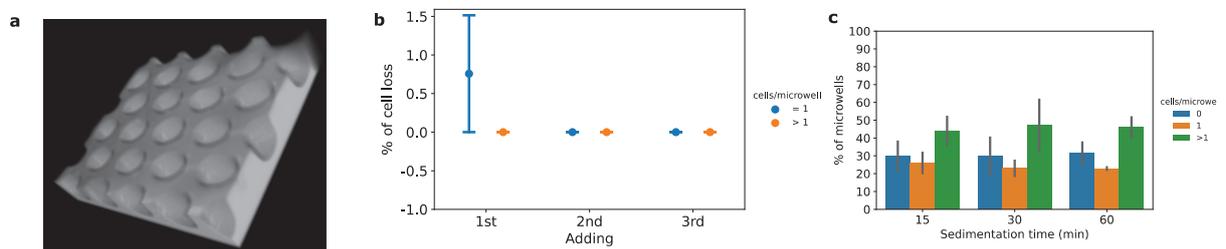
### Chip manufacturing

In order to follow large numbers of single cells and generate high throughput data while ensuring clonal homogeneity during NS formation, we have designed a micro-fabricated chip containing 2000 non-adherent microwells with a radius of 200 $\mu$ m (Figure 2a and Supplemental Figure S1a). The chip is made in agarose, a biocompatible polymer that provides several interesting properties. Agarose is a naturally non-adhesive polymer providing non-adherent culture conditions that positively select stem cells without requiring complex surface treatment<sup>30,31</sup>. Agarose hydrogels allow diffusion of gas, macromolecules and nutrients<sup>32</sup> and does not deplete hydrophobic molecules like Poly(dimethylsulfoxan) (PDMS) classically used for biocompatible microfabricated systems<sup>33</sup> thus providing ideal conditions for drug testing. The chip has been design to fit in 12-well plates currently to facilitate the technological transfer in biological labs and standardized procedures.

Low amount of cells is seeded exclusively on top of the microwells thanks to large walls also enabling easy manipulation (Figure 2b). Cell amount has been optimized in order to obtain the largest amount of single cells (Figure 2c and Supplemental Figure S1c), thus only 5300 cells are required to populate 331 ( $\pm$ 4) micro-wells with single cells (29.3% ( $\pm$  1.3%) of analysable micro-wells). To keep culture conditions in the chip as close as possible the one in flasks, medium has to be renewed, this generates flows that can remove cells from their microwells (Supplemental Figure S1b) or stress the cells and induce differentiation<sup>34</sup>. We thus design an agarose lid; placed on top of the chip it reduces flows while still allowing biomolecules diffusion on the long term (Supplemental Figures S2 and S7a). By reducing the amount of biological material and the mechanical shear stress both during seeding and medium renewal, our systems copes with pitfalls of flow cytometer classically used to plate CSCs in a limiting dilution assay (LDA)<sup>35</sup>.



**Figure 2 :** Manufacturing and optimization of the chip. **a** PDMS counter-mould is cured from brass mould. Then agarose chip is cured from PDMS counter-mould. Finally, the chip is stuck at bottom of 96 well-plate. **b** Detection of micro-wells with single cell, micro-wells with multiple cells and empty micro-wells with DLBA that we previously developed (Chambost et al). Scale bar show 200 $\mu$ m. **c** Mean percentage of micro-well cell content depending on seeding density. Density of 4000 cells/cm<sup>2</sup> provide best yield of micro-wells with single cell (2000 cells/cm<sup>2</sup>: 78 $\pm$ 5; 4000 cells/cm<sup>2</sup>: 33 $\pm$ 4; 8000 cells/cm<sup>2</sup>: 201 $\pm$ 19). Error bars show standard deviations. Full data available in Supplemental Table S1.



**Figure S 1 :** **a** Tri-dimensionnal reconstruction of micro-wells from confocal imaging. **b** Effect of walls on cell loss after 3 iterative additions of 500 $\mu$ L of PBS (N = 2). 1 micro-well with single cell could not be analysed over 211. All 27 micro-wells with multiple cells have been analysed. Points show mean and error bars show standard deviation. **c** Sedimentation time has no effect on amount of micro-wells with single cells (15 min: 286 $\pm$ 73; 30 min: 227 $\pm$ 34; 60 min: 253 $\pm$ 3; N = 3 each, see Supplemental Table S5 for full dataframe). Plots show means and error bars show standard deviation

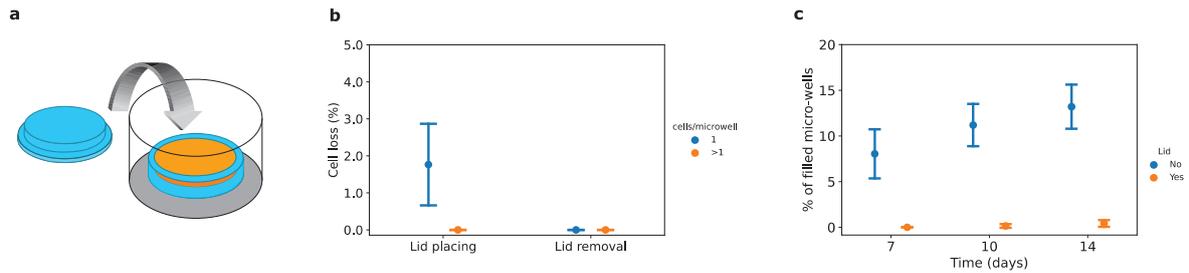


Figure S2 : a Schematic view of the lid over the chip. b 13 micro-wells with single cells out of 682 were lost when placing agarose lid. None of 1453 micro-wells with multiple cells were lost after lid placing. Micro-wells are not lost when lid is removed.  $N = 2$  both. Points show mean and error bars show standard deviation. c Without agarose lid, over 600 empty micro-wells, 48 are filled at day 7, 67 are filled at day 10 and 79 are filled at day 14. With agarose lid, over 756 empty micro-wells, none are filled at day 7, 1 is filled at day 10 and 3 are filled at day 14.  $N = 3$  each. Points show mean and error bars show standard deviation.

Density (cells/cm <sup>2</sup> )	Gel	Empty	Singles	Multiples
2000	1	608	132	60
2000	2	586	77	81
2000	3	598	27	89
4000	1	328	329	500
4000	2	307	328	427
4000	3	250	337	583
8000	1	114	219	900
8000	2	86	205	883
8000	3	112	180	809

Supplemental Table S1: Cell distribution in micro-wells according to cell seeding density.

Sedimentation time	0 cells	1 cell	>1 cells
15 min	968	860	1449
30 min	869	682	1453
60 min	1047	759	1528

Supplemental Table S5: Cell distribution in micro-wells according to sedimentation time.

### NS detection by convolutional neural network

Thanks to high throughput generated data, we first aimed to develop an automated image analysis algorithm in order to detect NS. Similar to convolutional neural networks (CNNs) that we developed here (Chambost et al), we trained a CNN on Image data set 1 which is constituted of 3 classes: "NS", "Empty micro-wells", "Dead cells or smaller aggregates" (Supplemental Figure S3a-b). We programmed a simple CNN composed of four convolution layers with 8, 16, 32 and 64 filters respectively. Then the first fully connected layer contains 1024 neurons with a 80% dropout rate and the three neurons of second fully connected layer classify images between the three classes (Supplemental Table S2). Applied on validation data set, accuracy of this CNN reaches 94% ( $\pm 0.3\%$ ) (Supplemental Figure S3c). More precisely, we computed recall and precision scores for classification of "NS" images on four other independent data sets. Image data set 2 and 3 were data sets of images of N14 NSs taken with 20X and 10X magnifications respectively. Recall and precision were 70% and 90% for Image data set 2 and 91% and 92% for Image data set 3 (Supplemental Table S3). However, our CNN was trained on NS grown from single N14 cells. We tested our CNN robustness on images of NS grown from another cell line, N15-1525 cell line (N15), imaged with 20X and 10X magnifications. Images from both conditions were manually annotated in Image data sets 4 and 5 respectively. Although our CNN was trained on NS grown from N14 cell line, recall and precision were 82% and

98% for Image data set 4 and 79% and 97% for Image data set 5 (Supplemental Table S3). Images misclassified as false positives were images of small aggregates which projected area can be similar to real NS but they did not have a spherical shape. On the contrary, false negatives were images where NS were imaged at low depth of field and appeared darker than most of NS images in the dataset (Supplemental Figure S3d). Taken together, these results allowed us to apply our CNN in order to detect NS in our chip.

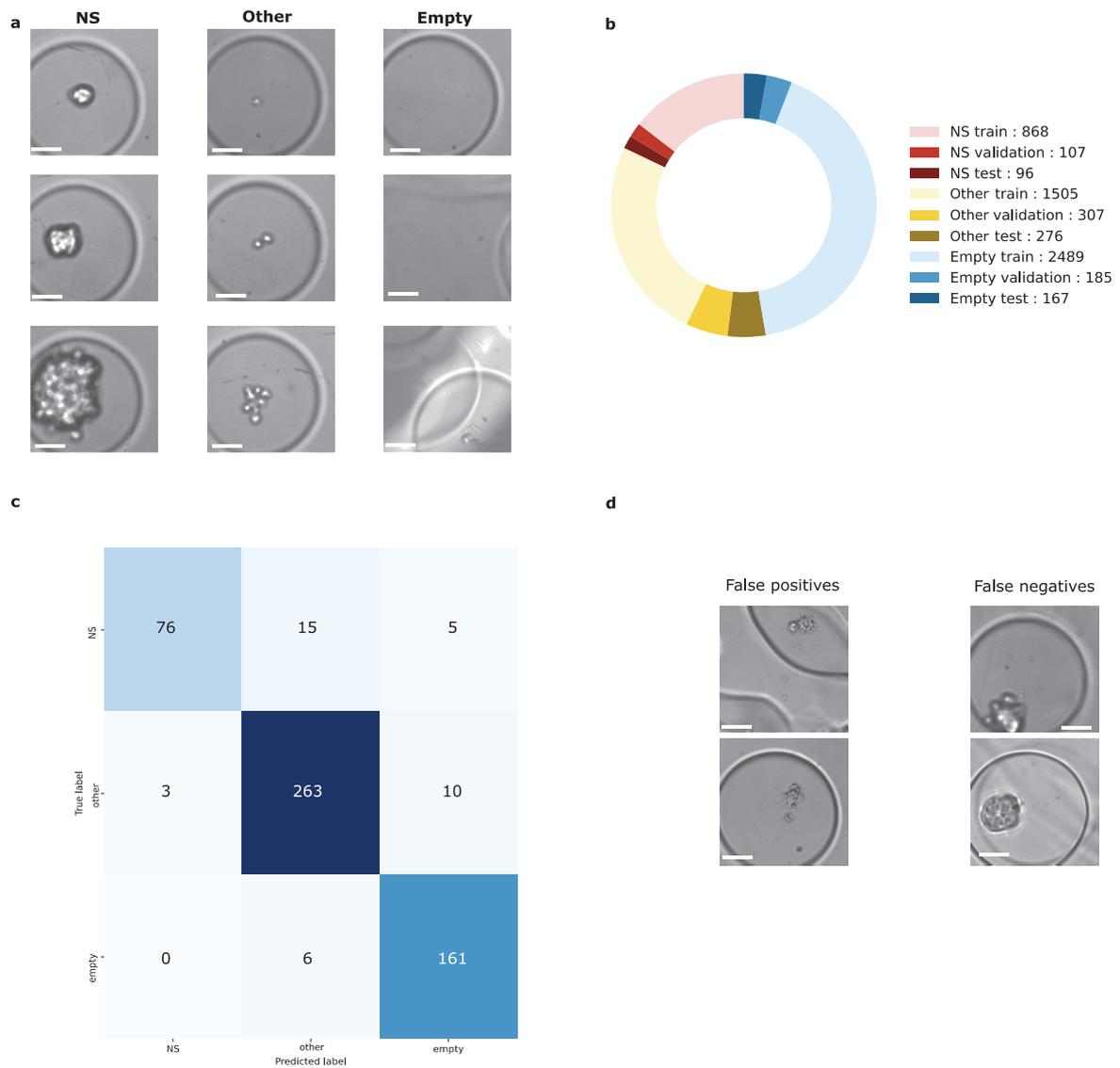


Figure S3 : a Example of images from the data set annotated as “NS”, “Empty” and “Other”. b 6000 images were manually annotated and split between train, validation and test sets. c Test set was used to compute confusion matrix. Accuracy reaches 94%. Recall and precision for “NS” classification are 79% and 96%; recall and precision for “Other” classification are 95% and 92%; recall and precision for “Empty” classification are 96% and 91%. d Examples of images wrongly classified as “NS” and missed images of “NS”. Scale bars show 50µm.

Layer (type)	Output Shape	Parameters
conv2d (Conv2D)	(None, 285, 285, 8)	1808
max_pooling2d (MaxPooling2D)	(None, 142, 142, 8)	0
conv2d_1 (Conv2D)	(None, 128, 128, 16)	28816
max_pooling2d_1 (MaxPooling2D)	(None, 64, 64, 16)	0
conv2d_2 (Conv2D)	(None, 50, 50, 32)	115232
max_pooling2d_2 (MaxPooling2D)	(None, 25, 25, 32)	0
conv2d_3 (Conv2D)	(None, 11, 11, 64)	460864
flatten (Flatten)	(None, 7744)	0
dense (Dense)	(None, 1024)	7930880
activation (Activation)	(None, 1024)	0
dropout (Dropout)	(None, 1024)	0
dense_1 (Dense)	(None, 3)	3075
activation_1 (Activation)	(None, 3)	0

Supplemental Table S2: features computed by CNN that detects NSs.

Cell line	Magnification	Recall	Accuracy
N14	20X	70% (449/635)	90% (449/498)
	10X	91% (244/266)	92% (244/264)
N15	20X	82% (261/318)	98% (261/264)
	10X	79% (87/109)	97% (87/89)

Supplemental Table S3: Recall and Accuracy for detection of N14 and N15 NSs with 20X and 10X magnification.

### NS formation in our chip

As we were able to detect NSs with high recall and precision, we wanted to know if NS harvested in our chip recapitulated heterogeneity that is currently described in literature<sup>7,16,17</sup>. Although heterogeneously expressed, Sox2 expression has been associated with GSCs<sup>36</sup>. We showed by immunofluorescence assay that NSs grown in our chip recapitulated Sox2 heterogeneous expression (Supplemental Figure S4). Secondly, we wondered how long we should wait for NS growth. We showed that almost all NSs (from 90% to 100%) that are detected 21 days after beginning of experiment can already be detected 14 days after beginning of experiment (Supplemental Figure S5). Hence, we decided to detect NSs after two weeks of culture in our chip. We showed that 28.8% ( $\pm 7.7\%$ ) and 39.2% ( $\pm 15.6\%$ ) of single cells, from respectively N14 and N15 cell lines, were able to give rise to NS after 14 days in culture (Figure 3). Finally, we have not identified any confounding parameters that could bias NS formation (Supplemental Table S4). Although NS formation assay performed in our chip ensured clonal homogeneity, it remained an endpoint measure. With our platform we are able to detect early cell phenotype during timelapse.

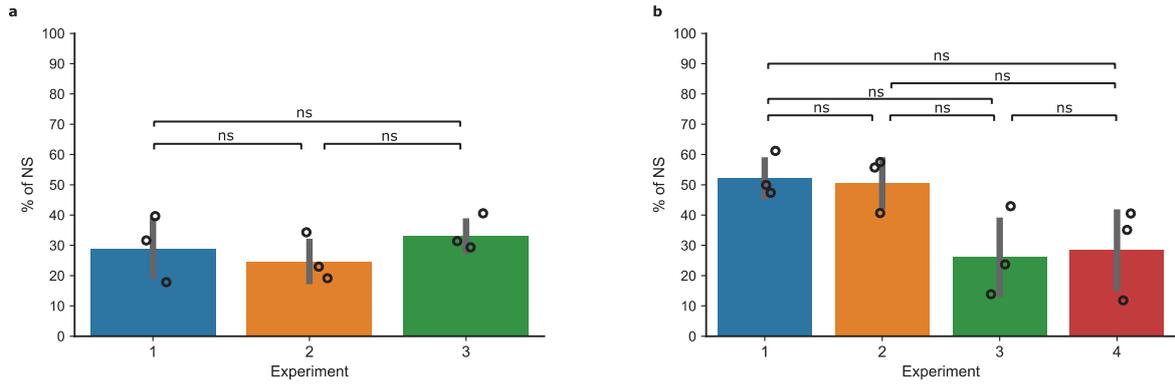


Figure 3: NS formation from single cells in N14 (A) and N15 (B) cell lines. ns: not significant. *p* values were computed with Mann-Whitney-U test and corrected with false discovery rate.

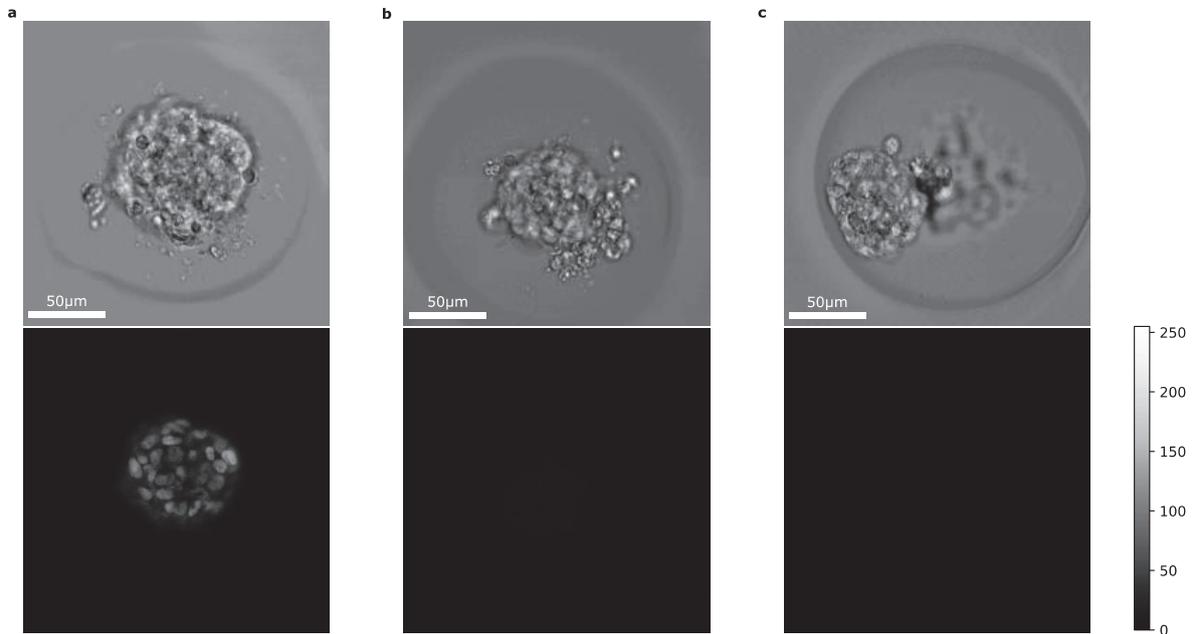


Figure S4: Example of NSs acquired with confocal microscopy with 25X magnification. Upper panels are brightfield microscopy images and lower panels are fluorescence images (633nm). Scale bars show 50µm. Intensity bar is given in arbitrary units and is the same for all images. a Sox2 staining with secondary antibody (633nm). b Secondary antibody only (633nm) without primary antibody (Sox2). c Without primary (Sox2) and secondary antibody (633nm).

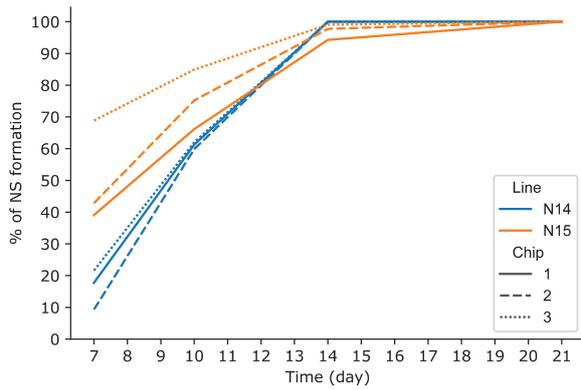


Figure S5: Percentage of NSs detected through time for N14 and N15 (N = 3 chips both). Percentage of NSs detected at day 21 is 100%. For N14, 72 NS were detected at day 7, 276 at day 10, 452 at day 14 and 452 at day 21. For N15, 205 NS were detected at day 7, 317 at day 10, 416 at day 14 and 431 at day 21.

Data	Target	pvalue	pvalue_corr	Significant
Empty	NS7	0,84953128	1	FAUX
Empty	NS10	0,01680502	0,35020531	FAUX
Empty	NS14	0,01129034	0,33935184	FAUX
Singles	NS7	0,73071148	1	FAUX
Singles	NS10	0,14323187	1	FAUX
Singles	NS14	0,15726889	1	FAUX
Multiples	NS7	0,78169863	1	FAUX
Multiples	NS10	0,0186423	0,35020531	FAUX
Multiples	NS14	0,01509757	0,35020531	FAUX
Experiment	NS7	0,46982861	1	FAUX
Position_well	NS7	0,14271574	1	FAUX
Label_well	NS7	0,28719692	1	FAUX
Experiment	NS10	0,06626024	0,99578627	FAUX
Position_well	NS10	0,00073735	0,11081128	FAUX
Label_well	NS10	0,00304944	0,15276094	FAUX
Experiment	NS14	0,09229745	1	FAUX
Position_well	NS14	0,00665891	0,25018211	FAUX
Label_well	NS14	0,02155922	0,36000102	FAUX
Empty	Division	0,30275221	1	FAUX
Singles	Division	0,60221191	1	FAUX
Multiples	Division	0,59964354	1	FAUX
Experiment	Division	0,26211858	1	FAUX
Position_well	Division	0,84164632	1	FAUX
Label_well	Division	0,87313526	1	FAUX
Empty	Death	0,47415782	1	FAUX
Singles	Death	0,28606193	1	FAUX
Multiples	Death	0,3405557	1	FAUX
Experiment	Death	0,10762546	1	FAUX
Position_well	Death	0,98480159	1	FAUX

Supplemental Table S4: Control of confounding parameters that could bias NS formation at days 7, 10 and 14, divisions and death. Correlation between percentage of micro-wells with one cell, multiple cells and empty micro-wells were performed with Pearson's correlation test. Correlation between experiment-effect, position of the chip on the plate ("corner", "edge" or "middle") and label of the chip ("A1", "B1", "C1", "A2", "B2"...) were performed with ANOVA. p-values were corrected with false discovery rate. NS7, NS10 and NS14 are percentages of NS formation at day 7, 10 and 14 respectively. N = 3 chips x 6 independent experiments, with N14 cell line in control medium.

### **Dynamic phenotyping during timelapse**

Detection of cell divisions and cell death was performed with a deep learning-based algorithm that we previously described (Chambost et al). In control conditions, division dynamics of N14 reached a plateau 60 hours after beginning of timelapse. After 4 days, 28.2% ( $\pm 6.3\%$ ) of single N14 cells have divided (Figure 4a). We hypothesized that this dynamic can be fit with an asymptotic regression (Equation 1). We fit 27 curves with eq. 1 and computed the  $R^2$  score. As the mean  $R^2$  score for the fit of these curves was 0.98, we concluded that division dynamics can be approximated with an asymptotic regression (Supplemental Figure S6). Hence, initial rate of these exponentials can be computed. In control conditions, initial rate equals 0.046 division/hour ( $\pm 0.015$ ). On the contrary, cell death dynamics followed linear growth (Figure 4c). We assess a linear fit on 27 death dynamic curves (Equation 2) and computed  $R^2$  score that was statistically significant: 0.98 (Supplemental Figure S6). In control conditions, mean percentage of single cell death reached 32.7% ( $\pm 6.2\%$ ) and the fit slope was 0.34 death/hour ( $\pm 0.07$ ). We did not find any parameters that could bias cell division and cell death (Supplemental Table S2). Regarding N15 cell line, 16.2% ( $\pm 6.8\%$ ) and 26.2% ( $\pm 6.3\%$ ) of single cells divided or died during 4 day time-lapse acquisition (Figures 4b and 4e).  $R^2$  scores for fitting the division and death curves were both statistically significant, respectively by an asymptotic regression (0.96) and a slope (0.97). Hence division initial rate computed from N15 division dynamic curves was 0.04 division/hour ( $\pm 0.01$ ) and death speed was 0.26 death/hour ( $\pm 0.06$ ). Hence, with our platform, on one hand we can follow dynamics of cell phenotypes and we are able to extract intrinsic parameters of these dynamics, and on the other hand we know if cells are able to grow as NS. So next we investigated relationship between early phenotype and stem properties.

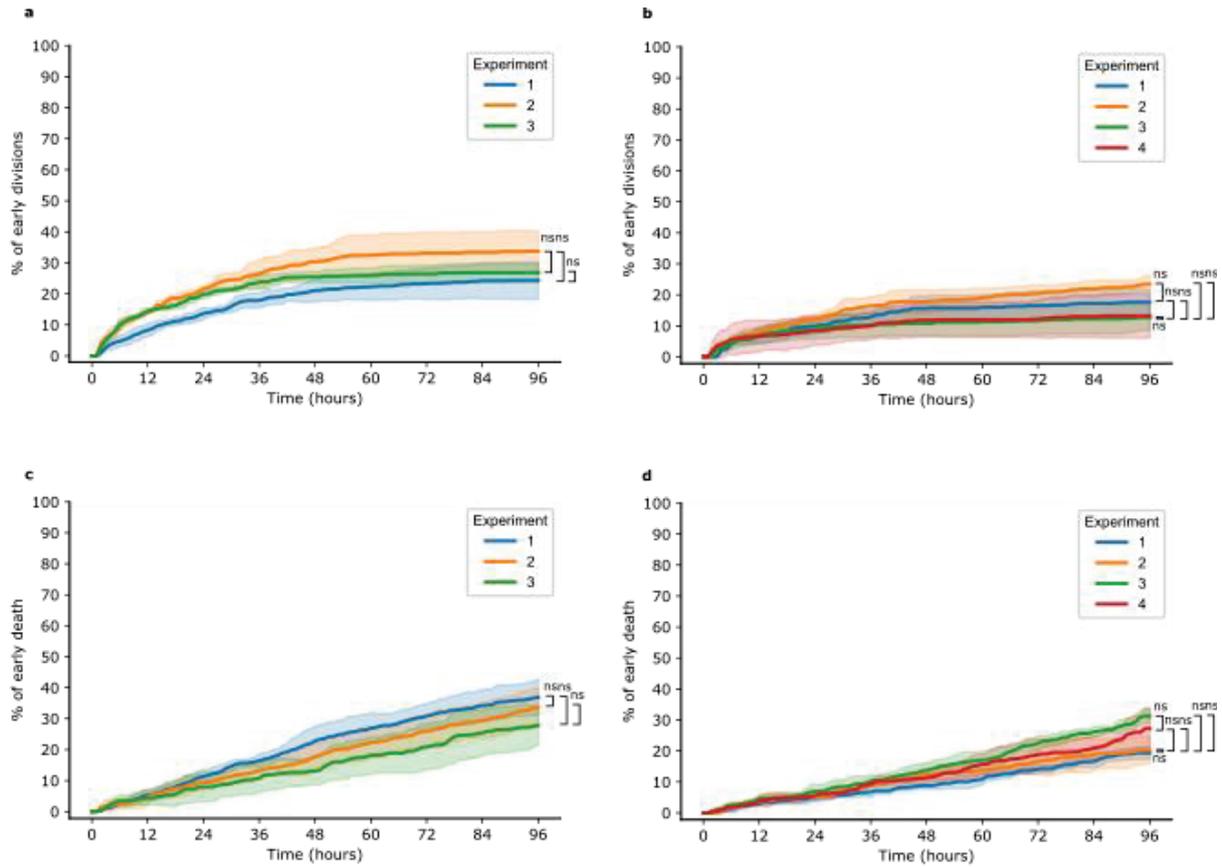


Figure 4 : Early divisions and early death dynamics for N14 (respectively A and C) and N15 cells (respectively B and D). ns : not significant. Full lines show mean percentage of divisions (A and B) and death (C and D) and confidence interval show standard deviation. p values were computed with Mann-Whitney-U test and corrected with false discovery rate.

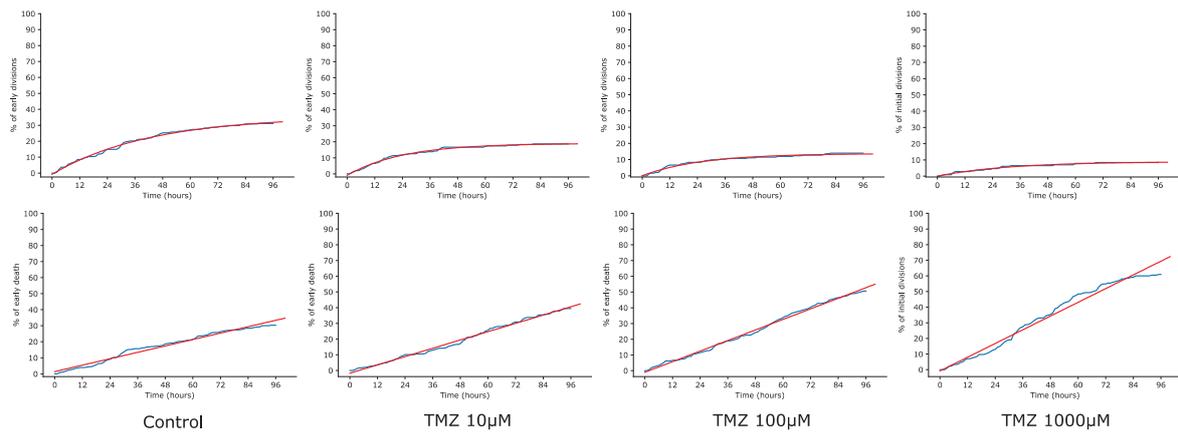


Figure S6 : Examples of curve fitting for N14 divisions and death in control condition, TMZ 10µM, TMZ 100µM and TMZ 1000µM.

$$Y_M - (Y_M - Y_0) * e^{-k*x}, \text{ (equation 1)}$$

$$a * x + b, \text{ (equation 2)}$$

**Early division correlates with NS formation**

Sankey plot of Fig. 5 allowed a temporal representation of cell fate. Hence, as we showed previously (Figure 3), 28.8% of single N14 cells at beginning of experiment were able to grow as a NS. However, we analysed ability of cells that were not dead after 96 hours (regardless of whether they divided or not), 38.8% ( $\pm 8.23\%$ ) were able to grow as NS. Moreover, when considering cells that divided during timelapse, up to 46.9% ( $\pm 11.9\%$ ) of them grew as NS (Figure 5a). This trend is similar for N15 cell line: 48.9% ( $\pm 17\%$ ) of cells that did not die and 44.9% ( $\pm 21.3\%$ ) of cells that divided are able to grow as a NS (Figure 5b). We demonstrated a statistically significant correlation between early division and NS formation for both N14 and N15 cell lines (Tables 1 and 2). The, we wondered how robust is this correlation so we exposed cells in our chip to drugs and assessed the relationship between early division and NS formation.

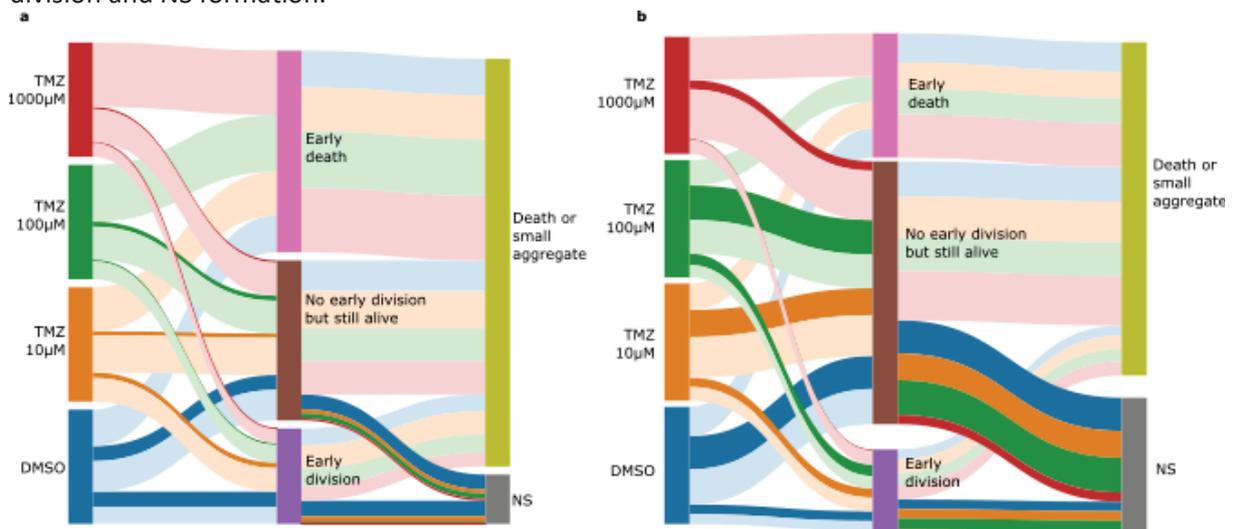


Figure 5 : N14 and N15 cell fate. Sankey plotting of N14 (A) and N15 (B) fate with TMZ. All conditions are normalized for visual comparison. Darker links represent cell able to grow as NS. Early division and early death stand respectively for division and death that occurred during timelapse. N=3 for N14 and N=4 for N15; NS: neurosphere.

		NS formation	No NS formation
Control	Division	272	294
	No division	307	1136
TMZ 10µM	Division	59	259
	No division	53	881
TMZ 100µM	Division	21	198
	No division	64	995
TMZ 1000µM	Division	6	203
	No division	40	1393

Table 1: Confusion matrix showing correlation between division during time-lapse and NS formation in control condition, TMZ 10µM, TMZ 100µM and TMZ 1000µM, with N14 cell line. Except for TMZ 100µM and 1000µM, chi-square test showed correlation between division during timelapse and NS formation ( $p$ -value corrected with false discovery rate<sup>37</sup> < 0.05).

		NS formation	No NS formation
Control	Division	127	147
	No division	431	975
TMZ 10µM	Division	97	161
	No division	263	772
TMZ 100µM	Division	159	182
	No division	398	824
TMZ 1000µM	Division	10	177

	No division	82	1177
--	-------------	----	------

Table 2: Confusion matrix showing correlation between division during time-lapse and NS formation in control, TMZ 10 $\mu$ M, TMZ 100 $\mu$ M and TMZ 1000 $\mu$ M, conditions with N15 cell line. Except for TMZ 1000 $\mu$ M, chi-square test showed correlation between division during time-lapse and NS formation (p-value corrected with false discovery rate<sup>37</sup> < 0.05).

### NS formation is not correlated to *MGMT* promoter methylation status.

TMZ is an alkylating agent which is responsible of guanine and adenine methylation. Methylation induces an inaccurate pairing during DNA replication and leads to apoptosis. O6-alkylguanine DNA alkyltransferase or *MGMT* is an enzyme that remove methyl group that is on nucleotides and thus is responsible for TMZ resistance<sup>38</sup>. However, increased *MGMT* promoter methylation induces low *MGMT* expression that can rescue TMZ sensitivity and improve survival of patients with GBM<sup>39</sup>. We assessed methylation status of *MGMT* promoter in N14 and N15 cell lines by pyrosequencing methods<sup>40</sup>. This analysis showed that methylation percentage of *MGMT* promoter is higher in N15 cell line (58%) compared to N14 cell line (17%) (Supplemental Table S5), meaning that N15 are theoretically more sensitive to TMZ than N14. In order to prevent the saturation of *MGMT* demethylation ability, we performed a dilution range of temozolomide (TMZ) concentrations. We compared first the percentage of NS forming cells in N14 cell line with concentrations of TMZ 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M (respectively 8.7% ( $\pm$ 7.4%), 6.7% ( $\pm$ 2.8%) and 3.2% (2.5%)) to control conditions (Figure 6a). Mann-Whitney U test showed that with TMZ 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M concentrations, the percentage of self-renewing cells was decreasing (respectively p < 0.01, p < 0.001 and p < 0.001). Surprisingly, in N15 cell line, TMZ at 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M concentrations did not impact NS formation compared to control conditions (33.1% ( $\pm$ 11.1%) and 41.7% ( $\pm$ 11.3%) respectively versus 39.2% ( $\pm$ 15.6%) respectively, p > 0.05), TMZ at 1000 $\mu$ M concentrations decreased NS formation (10% ( $\pm$ 8.7%) p < 0.001) (Figure 6B). Hence, we showed here that, in N14 and N15 cell lines, methylation percentage of *MGMT* promoter is not predictive of NS formation under TMZ exposure. Then, we investigated effects of TMZ on cell dynamic properties.

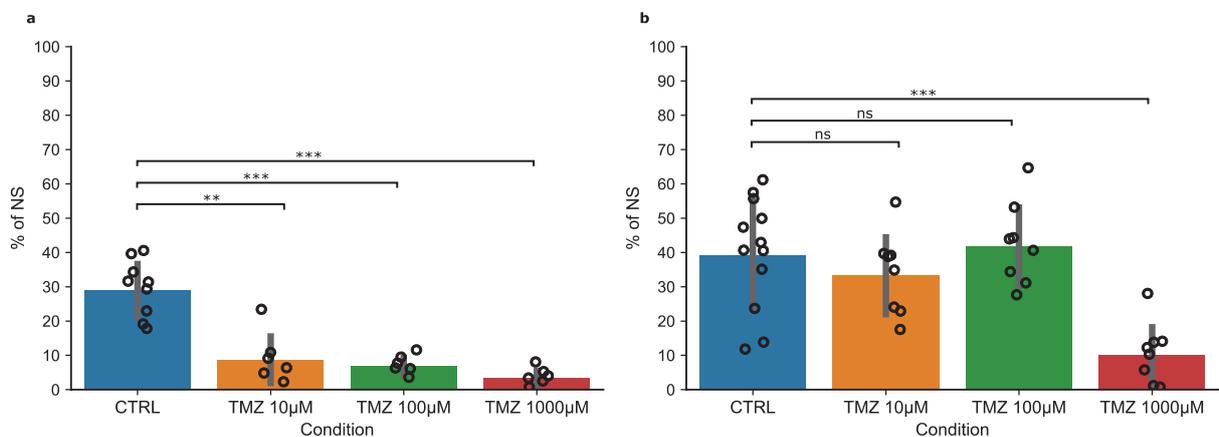


Figure 6: Effect of TMZ on NS formation in N14 (A) and N15 (B) cell lines. N = 3 for N14 and N = 4 for N15. ns: not significant; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001.

Cell line	cDNA ( $\mu$ g/ $\mu$ L)	% methylation of <i>MGMT</i> promoter
N14	0.271	17%
N15	0.234	58%

Our platform can follow division and death dynamic changes induced by TMZ

We first compared the mean percentage of single cells that divided 4 days after beginning of timelapse in N14 cell line. Mean division percentages in conditions TMZ 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M were respectively 25.6% ( $\pm$ 8.4%), 18.6% ( $\pm$ 5.9%) and 13.8% ( $\pm$ 5.3%) (Figure 7a and Table 1). As these values were not normally distributed, we performed a Mann-Whitney U test which showed that at TMZ 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M concentrations, proportion of single N14 able to divide was significantly decreased ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively). We also wanted to see if TMZ had an impact on division initial rate. We extracted initial rate thanks to asymptotic regression fits and compared these values under TMZ concentrations to control conditions (Figure 7a and Supplemental Figure S6). Interestingly, TMZ did not affect the division initial rate, respectively 0.051 ( $\pm$ 0.02), 0.058 ( $\pm$ 0.02) and 0.059 ( $\pm$ 0.02) division/hour for TMZ 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M conditions vs 0.046 ( $\pm$ 0.01) division/hour for control condition (Mann-Whitney U test,  $p > 0.05$ ). Otherworldly, TMZ was decreasing the amount of N14 cells able to divide but it was not changing the division speed. However, TMZ was changing death dynamics (Figure 7c). After 96 hours, TMZ at 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M concentrations statistically increased percentage of cell death (48.4% ( $\pm$ 5.1%) and 59.1% ( $\pm$ 8.6%),  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively) but not at 10 $\mu$ M concentration (38.5% ( $\pm$ 7.9%),  $p > 0.5$ ), compared to control condition (32.7% ( $\pm$ 6.6%)). Slopes computed from linear fits of death dynamics of TMZ 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M were respectively 0.42 ( $\pm$ 0.1), 0.53 ( $\pm$ 0.07) and 0.68 ( $\pm$ 0.09) death/hour (Supplemental Figure S6). Compared to 0.34 death/hour ( $\pm$ 0.07) for control condition, Mann-Whitney U test showed that TMZ 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M concentrations were increasing death speed ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively).

Then, we investigated TMZ effect on N15 cell dynamics during 96-hour timelapse. Respectively 19.7% ( $\pm$ 4.1%), 22.1% ( $\pm$ 4.7%) and 12.4% ( $\pm$ 4.1%) of N15 single cells were able to divide under TMZ 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M conditions, *versus* 16.2% ( $\pm$ 6.8%) in control conditions (Figure 7b). Performing Mann-Whitney U test on these data showed that TMZ was not modifying this proportion  $p > 0.05$ ). Comparisons of division initial rate computed from division dynamic curves fit also did not show any difference between control (0.04 division/hour ( $\pm$ 0.01)) and TMZ 10 $\mu$ M (0.04 division/hour ( $\pm$ 0.01),  $p > 0.05$ ), 100 $\mu$ M (0.37 division/hour ( $\pm$ 0.02),  $p > 0.05$ ) and 1000 $\mu$ M (0.05 division/hour,  $p > 0.05$ ) conditions. Nevertheless, TMZ at 1000 $\mu$ M concentration was increasing amount of cell death (40.5% ( $\pm$ 6.4%),  $p < 0.001$ ) but not TMZ at concentration 10 $\mu$ M (23.1% ( $\pm$ 4.8%),  $p > 0.05$ ) and 100 $\mu$ M (21.2% ( $\pm$ 4.1%),  $p > 0.05$ ) compared to control condition (26.2% ( $\pm$ 6.3%)) (Figure 7d). Similarly, slopes computed for death dynamic curves showed that TMZ 1000 $\mu$ M concentration increased death speed (0.43 death/hour ( $\pm$ 0.07),  $p < 0.001$ ) compared to control condition (0.26 death/hour ( $\pm$ 0.06)), but it was not the case for TMZ 10 $\mu$ M (0.24 death/hour ( $\pm$ 0.04),  $p > 0.05$ ) and 100 $\mu$ M (0.22 death/hour ( $\pm$ 0.04),  $p > 0.05$ ).

With those results, we can finally investigate the effect of TMZ on the correlation between early division and NS formation.

### **Correlation between early division and NS formation persists under low concentrations of TMZ**

We first assessed correlation between early division and NS formation under TMZ exposure in N14 cell lines (Table 1). Although culture condition with TMZ 10 $\mu$ M showed correlation between early division and NS formation ( $p < 0.001$ ), this correlation was no longer statistically significant for culture conditions with TMZ 100 $\mu$ M and TMZ 1000 $\mu$ M ( $p > 0.05$  both). Similarly, for N15 cell line, chi-square test showed that early division was correlated to NS formation in control condition, TMZ 10 $\mu$ M and TMZ 100  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ). However, early division and NS formation are no longer correlated in TMZ 1000 $\mu$ M condition ( $p > 0.05$ ) (Table 2).

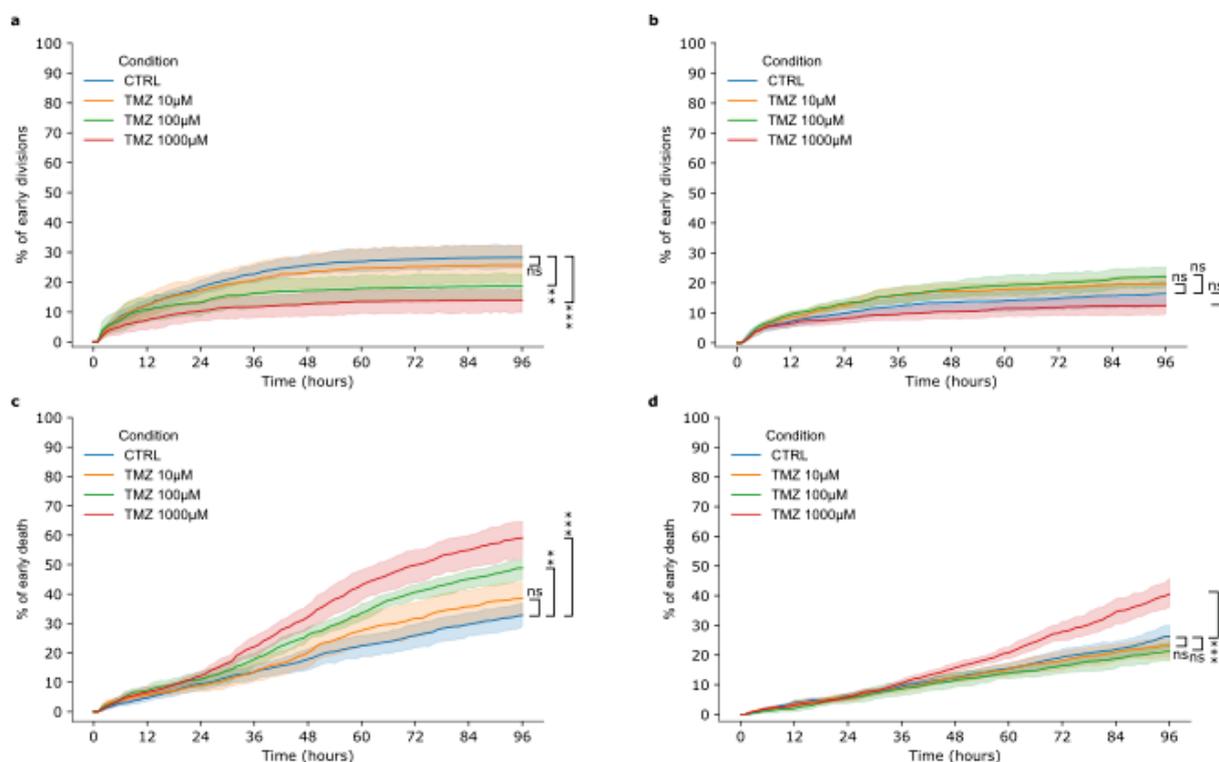


Figure 7: Effect of TMZ on early divisions and early death with N14 (respectively A and C) and N15 cell lines (respectively B and D).  $N = 3$  for N14 and  $N = 4$  for N15. ns: not significant; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## Discussion

We have developed a platform that combines micro-fabricated chip, timelapse microscopy and image analysis with DLBAs. Chip manufacturing and cell culture have been optimized in order to mimic as close as possible cell culture in classical flasks. But contrary to traditional NS formation from cell batch, our system ensures NS growth from single cells. Although all micro-wells of the chip may not be analysable (they can be undetected because they are too folded or they are above a interface), we are able to isolate *circa* 300 single cells per chip, which yield is still bigger than traditional LDA<sup>41</sup>. Besides, the NS formation rate that we observed here is similar to what can be find in controlled NS formation assays<sup>17,42</sup>. Hence, this high throughput data generation provides a deeper insight on the proportion of cells able to self-renew, in culture conditions that are close to traditional ones.

This high throughput data generation gives access to machine learning-based algorithms. Similarly to what we published (Chambost et al), our platform provides a lot of timelapses and a lot of snapshots. We have developed a DLBA that can detect NS with a good recall and precision. These performances are kept for different cell lines and different magnifications. Similar DLBA have been published recently. In classification problem, Benning et al screened drug effect on MCSs<sup>29</sup>. They met same issues than us because their class called “Midly affected” MCSs is a grey zone between “Unaffected” and “Affected” MCSs, like our class “Dead cells and/or small aggregates”. Nevertheless, their CNN reached accuracy  $> 90\%$  like us. Grexa et al have addressed the problem of MCS detection through segmentation algorithm<sup>43</sup>. Although their MCSs are bigger than our NSs, their U-net network can detect MCSs with recall and accuracy  $> 90\%$ . We showed that recall for NS detection by our DLBA is a

bit lower because of NSs imaged at lower depth of field. A quick way to improve it would be to add more images of “darker” NSs in training data set. Besides, another way would be to add NSs grown from different cell lines in the training data set. Finally, we considered an aggregate as a NS if radius was superior or equals 15 $\mu$ m. This threshold was chosen because we empirically determined that an aggregate with 4 cells or more would be that big. Nevertheless, we showed that given this size threshold, we did not detect any more NSs after 14 days in N14 cell line.

Our platform allows to follow dynamics of cell phenotype. We showed that cell divisions and cell death can be tracked through time. Interestingly, cell division dynamics fit asymptotic exponential and cell death dynamics is linear. Thanks to mathematical modelling, we have been able to fit these dynamics and extract intrinsic properties of the cells. Hence, we are able to assess initial division rate and death slope changes under TMZ treatment. Interestingly, TMZ was not modifying initial division rate but it was decreasing total amount of cell able to divide. As TMZ is inducing cell death during DNA replication, our results suggest that cell which are dividing at beginning of experiment have not integrated TMZ yet. However, as time goes on, cells that were supposed to replicate their DNA before division have died. Hence, amount of cells that proliferate is decreased through time. This assumption is strengthened by the fact that death slope is increased with TMZ. Otherwordly, cells that divide are not slowed down by TMZ, but TMZ is increasing death speed, so less cells are able to divide in the end.

As TMZ is an alkylating agent, it is not directly targeting self-renewal ability of GSCs. Nevertheless, several studies reported that NS formation ability depends on MGMT expression under TMZ exposure<sup>44-46</sup>. In presence of TMZ, cells that do not express MGMT are less prone to grow as NS contrary to cells that have higher level of MGMT expression. However, NS formation assay in those studies were performed in batch culture conditions. Here, we showed that at single cell level, *MGMT* promotor methylation status is not associated with NS formation. In addition to that, N14 cell line that is supposed to be more resistant to TMZ died faster than N15 cells. Besides, prognostic value of MGMT expression and methylation status of *MGMT* promotor remains not that clear in literature<sup>47,48</sup>. Taken together, these results suggest that GSC may not be directly concerned by MGMT pathway.

Finally, we have assessed correlation between phenotype detected during time-lapse and stem properties. We showed in this paper that division that occurred during the first 96 hours after passage is statistically associated with NS formation. Although this association has already been reported for breast cancer stem cells<sup>49,50</sup>, it seems that prediction NS formation from GSCs cannot only be based on the early division detection. Indeed, in both N14 and N15 cell lines, majority of NSs did not originate from a single cell that divided during time-lapse. Interestingly, correlation between division during time-lapse and NS formation remained under low TMZ expositions, which may suggest its importance in stemness maintenance. Several perspectives would constitute great implement for predicting NS formation. Developing a new CNN trained on time-lapse movies rather than 2D images would allow to take into account shape and size changes through time<sup>51</sup>. Then, it would be possible to detect GSCs after short period of time without the need to wait for several weeks for NS growth. Inasmuch one could combine cell fate prediction, single cell RNA sequencing and single cell pipetting<sup>52</sup>, it would be possible to establish specific transcriptomic signature of GSCs getting rid of more differentiated cancer cells. As a whole, we developed an automated phenotyping platform in order to track on-the-fly single cell fate at high throughput rate. It has been designed to be biology-friendly, affordable and it is compatible with any cell type or culture condition (notably for drug screening).

## Materials and methods

**Chip design and manufacturing.** Chip was designed on Autodesk Inventor software<sup>53</sup>. Brass moulds were micro-drilled with Mini-Mill (Minitech) device. PDMS from Sylgard 184 was used for counter-moulds. Agarose from Roth (3810.2) was cured for chip and lid. Functionalization of glass coverslip is object of patent<sup>54</sup>. Glass coverslips are cleaned with ethanol before functionalized with silane solution. Silane solution is composed of 43.5mL of pure water, 12.5 $\mu$ L of glacial acetic acid (ACS REAG. 2010429) and 435 $\mu$ L of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (silane). Functionalization takes 20 minutes at room temperature under agitation. Then excess of solution is removed with ethanol and silane is cooked for 15 minutes at 100°C. Glass coverslips can be kept in clean and dry place for 1 week. Chips and lids are cured from 2% agarose solution. When poured on PDMS counter-moulds, agarose curing takes 10 minutes. Peeling chip from counter-moulds should be gentle so agarose remains stuck on the glass coverslip. Lid doesn't need to adhere on functionalized coverslip. NOA 81 glue (Edmund Optics) is applied on glass coverslip which is put at bottom on culture plate. Polymerization of NOA 81 requires 365nm UV irradiation for 1 minute. Then, pour medium with antibiotics above chip and place it under UV sterilization for at least 2 hours. Similarly, add medium with antibiotics on lids and sterilize them same way.

**Cell lines and culture.** N14-0510 and N15-1525, cell lines were kindly provided by M.G. lab and are derived from diagnosed WHO grade IV glioblastoma before established as stable lines. They are maintained under normoxia at 37°C in incubator, in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F12 (Life, 31330-095), N2 (Life, 17502-048) at 1X, B27 (Life, 17504-001) at 1X, 100 U/ml penicillin-streptomycin (Life, 15140-122) and bi-weekly pulsing of FGF (Miltenyi Biotec, 130-104-922), EGF (Miltenyi Biotec, 130-093-825) (20ng/mL both) and heparin 0.00002% (Sigma, H3149). Passage is weekly with Accumax (Sigma, A7089), medium renewed twice a week and mycoplasma test regularly performed. Cells are cultured in Ultra low attachment T75 flasks (ThermoFisher, Ultra Low Adherent, 10491623) and passaged at density of 600 000 cells. RO4929097 was bought from APEXBIO (A4005) and diluted in Dimethylsulfoxide (DMSO). Temozolomide was bought from Selleckchem (S1237) and also diluted in DMSO. DMSO concentration was 2% in all controlled and drug conditions. Comparison of NS formation between our chip and 96 well-plated was performed without DMSO

**Immunofluorescence.** Sox2 antibody came from Millipore (AB5603) and used at 1:400 concentration. NucGreen 488 came from ThermoFisher (R37109) and used as 1 drop/2mL. Secondary anti-rabbit antibody came from ThermoFisher (A21244) and used at 1:500 concentration. Confocal acquisitions were performed with Leica TCS Sp5 microscope. Images were treated with Fiji software<sup>55</sup>.

**Cell seeding in chip.** Dissociated cells should be diluted to 5300 cells in 100 $\mu$ L. This volume is dropped on chip. One should not wait more than 15 minutes for cell sedimentation in micro-wells. Then remove medium carefully, cells should remain in micro-wells. Place agarose lid on top of chip. Finally add medium (2mL for 12 well-plate). For NS formation experiment, 500 $\mu$ L of medium was added twice a week. LDA was performed in 96 well-plate. We diluted cells in order to have virtually 3 cells/well in 200 $\mu$ L. Wells with single cells were detected by eyes after 15 minutes. NS were detected by eyes 14 days after sedimentation.

**Imaging setup.** Samples were imaged with Leica DMIRB microscope. Microscope is in a box with controlled temperature and air composition (5% CO<sub>2</sub>). Camera (Andor Neo 5.5 SCMOS), shutter (Vincent associated D1) and stage (Prior proscan II) are controlled with micromanager 1.4.22<sup>56</sup>. Light source is provided by a LED (Thorlabs MWWHL4). 20X and 10X magnification lenses have been both manufactured by Leica.

**Computing.** Computing was performed with Windows 10, 64 bit operating system, Intel(R) Core(TM) i7-7700 3.60GHz processor. GPU used is NVIDIA quadro p600. All scripts are written in Python 3.7<sup>57</sup>. Libraries used are Mahotas 1.4.11<sup>58</sup>, OpenCV 4.2.0<sup>59</sup>, Seaborn<sup>60</sup>, numpy<sup>61</sup>, pandas<sup>62</sup>, matplotlib<sup>63</sup>, SciPy<sup>64</sup>, Plotly<sup>65</sup> and Tensorflow 2.3.0<sup>66</sup>. Version of Ilastik used is 1.3.2post1<sup>67</sup>. Pre-trained CNN were found at [https://www.tensorflow.org/api\\_docs/python/tf/keras/applications](https://www.tensorflow.org/api_docs/python/tf/keras/applications)

### NS image data set

Data set was constituted of images from independent experiment with N14 cell line, imaged with 20X magnification. This data set was manually annotated between three classes: “NS” for images of micro-wells with a cell aggregate with radius superior or equal to 15µm (1071 images), “Empty” for images of empty micro-wells (1857 images) and “Other” for images of micro-wells that contain dead cells of cell aggregate with radius inferior to 15µm (3072 images) (Supplemental Figure S6a). We took images acquired with 20X magnification, of NS grown from N14, from independent experiments in order to constitute this data set. 10% of these images were randomly selected in order to generate a validation dataset, and another 10% was also randomly selected for the test dataset. Validation data set was used for backpropagation during learning and confusion matrix was computed from test data set. Remaining images constitute the training dataset, on which we performed data augmentation in order to balance number of images between the three classes (Supplemental Figure S6b). Recall and precision were performed on test sets each from one different chip: N14 20X (653 images of “NS”, 120 images of “Empty” and 478 images of “Other”), N14 10X (109 images of “NS”, 441 images of “Empty” and 291 images of “Other”), N15 20X (318 images of “NS”, 284 images of “Empty” and 375 images of “Other”) and N15 10X (266 images of “NS”, 293 images of “Empty” and 331 images of “Death”).

Digital images and code availability. Image database and code can be found at <https://github.com/chalbiophysics/XXX>

### Statistics

Division dynamic curves were fit with asymptotic exponential equation:

$$Y_M - (Y_M - Y_0) * e^{-k*x}, \text{ (equation 1)}$$

where  $Y_M$  is the maximum of the curve,  $Y_0$  the minimum and  $k$  is the initial rate.

Death dynamic curves were fit with linear equation:

$$a * x + b, \text{ (equation 2)}$$

where  $a$  is the slope and  $b$  is the intercept.

Curves were fit with `curve_fit` function of SciPy package<sup>64</sup> like Mann-Whitney U tests, chi-square test and Shapiro tests.  $R^2$  score, means and standard deviations were computed with Numpy package<sup>61</sup>. Confounding analysis was lead with SciPy package<sup>64</sup>. Briefly, we assessed correlations with Pearson correlation test for quantitative values and performed ANOVA for qualitative values. p-values were corrected with false discovery rate<sup>37</sup>. Plots were drawn with Seaborn<sup>60</sup> and Matplotlib<sup>63</sup> packages. Sankey plots were drawn with Plotly package<sup>65</sup>. Classical efficiency scores were performed to evaluate and compare algorithms. Those scores involve true positives (positive images correctly classified, or TP), true negatives (negative images correctly classified, or TN), false positives (negative images misclassified, or FP) and false negatives (positive images misclassified, or FN). Accuracy was computed for global evaluation of the CNN developed here:

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

For the specific evaluation of “NS” classification, recall and precision were computed:

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}$$

Acknowledgments

#### Author contribution

AJC, MG, DM and SM conceived experiments. MC, AP, MG, CR, DM and SM contributed to the study design. SM and CR designed chip. AJC conducted experiment, developed algorithms, annotated databases, is the main writer and made figures. AJC, MG, DM and SM analysed data. AI and MG provided biological samples. AJC, NB, MC, MG and CI cultured cells. All authors contributed to write and/or review

the manuscript and agreed to the published version.

#### Additional information

1. Wen, P. Y. Malignant Gliomas in Adults. *n engl j med* **16** (2008).
2. Nørøxe, D. S., Poulsen, H. S. & Lassen, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* **1**, e000144 (2016).
3. Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. **15**.
4. Tarasov, V. V. *et al.* Feasibility of Targeting Glioblastoma Stem Cells: From Concept to Clinical Trials. *Curr Top Med Chem* **19**, 2974–2984 (2019).
5. Saygin, C., Matei, D., Majeti, R., Reizes, O. & Lathia, J. D. Targeting Cancer Stemness in the Clinic: From Hype to Hope. *Cell Stem Cell* **24**, 25–40 (2019).
6. Jordan, C. T. Cancer Stem Cells: Controversial or Just Misunderstood? *Cell Stem Cell* **4**, 203–205 (2009).
7. Neftel, C. *et al.* An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* S0092867419306877 (2019) doi:10.1016/j.cell.2019.06.024.
8. Lan, X. *et al.* Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature* **549**, 227–232 (2017).
9. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
10. Ogden, A. T. *et al.* IDENTIFICATION OF A2B5+CD133– TUMOR-INITIATING CELLS IN ADULT HUMAN GLIOMAS. *Neurosurgery* **62**, 505–515 (2008).

11. Son, M. J., Woolard, K., Nam, D.-H., Lee, J. & Fine, H. A. SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma. *Cell Stem Cell* **4**, 440–452 (2009).
12. Dagmar, B. CD133 + and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles.  
<http://cancerres.aacrjournals.org/sites/all/libraries/pdfjs/web/viewer.html?file=/content/cancerres/67/9/4010.full.pdf#page=1&zoom=auto,-20,783>.
13. Han, Y. *et al.* Isolation and characteristics of CD133<sup>-</sup>/A2B5<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup>/A2B5<sup>-</sup> cells from the SHG139s cell line. *Molecular Medicine Reports* **12**, 7949–7956 (2015).
14. Patru, C. *et al.* CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioneuronal tumors. *BMC Cancer* **10**, 66 (2010).
15. Gimple, R. C., Bhargava, S., Dixit, D. & Rich, J. N. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev.* **33**, 591–609 (2019).
16. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391–403 (2006).
17. Dirkse, A. *et al.* Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun* **10**, 1787 (2019).
18. Laks, D. R. *et al.* Neurosphere Formation Is an Independent Predictor of Clinical Outcome in Malignant Glioma. *Stem Cells* **27**, 980–987 (2009).
19. Panosyan, E. H. *et al.* Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr. Blood Cancer* **55**, 644–651 (2010).

20. Thirant, C. *et al.* Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors. *PLOS ONE* **6**, e16375 (2011).
21. Kong, B. H. *et al.* Prognostic Value of Glioma Cancer Stem Cell Isolation in Survival of Primary Glioblastoma Patients. *Stem Cells International* vol. 2014 e838950 <https://www.hindawi.com/journals/sci/2014/838950/> (2014).
22. D'Alessandris, Q. G. *et al.* The clinical value of patient-derived glioblastoma tumorspheres in predicting treatment response. *Neuro-Oncology* **19**, 1097–1108 (2017).
23. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell* **8**, 486–498 (2011).
24. Cordey, M., Limacher, M., Kobel, S., Taylor, V. & Lutolf, M. P. Enhancing the Reliability and Throughput of Neurosphere Culture on Hydrogel Microwell Arrays: ENHANCING THE RELIABILITY AND THROUGHPUT OF NEUROSPHERE CULTURE ON HYDROGEL MICROWELL ARRAYS. *STEM CELLS* **26**, 2586–2594 (2008).
25. Brandenburg, N. *et al.* High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays. *Nature Biomedical Engineering* **4**, 863–874 (2020).
26. Faustino, V., Catarino, S. O., Lima, R. & Minas, G. Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review. *J Biomech* **49**, 2280–2292 (2016).
27. Loizou, G. D. Animal-Free Chemical Safety Assessment. *Front Pharmacol* **7**, 218 (2016).
28. Riordon, J., Sovilj, D., Sanner, S., Sinton, D. & Young, E. W. K. Deep Learning with Microfluidics for Biotechnology. *Trends in Biotechnology* **37**, 310–324 (2019).
29. Benning, L., Peintner, A., Finkenzeller, G. & Peintner, L. Automated spheroid generation, drug application and efficacy screening using a deep learning classification: a feasibility study. *Scientific Reports* **10**, 11071 (2020).

30. Reynolds, B. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707–1710 (1992).
31. Cambria, E. *et al.* Cell-Laden Agarose-Collagen Composite Hydrogels for Mechanotransduction Studies. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 346 (2020).
32. Pluen, A., Netti, P. A., Jain, R. K. & Berk, D. A. Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels: Comparison of Linear and Globular Configurations. *Biophysical Journal* **77**, 542–552 (1999).
33. Berthier, E., Young, E. W. K. & Beebe, D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab Chip* **12**, 1224–1237 (2012).
34. Montel, F. *et al.* Isotropic stress reduces cell proliferation in tumor spheroids. *New J. Phys.* **14**, 055008 (2012).
35. Nassar, D. & Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 47–76 (2016).
36. Song, W.-S. *et al.* Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *Journal of the Chinese Medical Association* **79**, 538–545 (2016).
37. Benjamini, Y. & Yekutieli, D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Statist.* **29**, 1165–1188 (2001).
38. Butler, M. *et al.* MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma. *Trends Cancer* **6**, 380–391 (2020).
39. Thomas, R. P., Recht, L. & Nagpal, S. Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. *Clin Pharmacol* **5**, 1–9 (2012).
40. Quillien, V. *et al.* Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients. *J Neurooncol* **116**, 487–496 (2014).

41. Underwood, P. A. & Bean, P. A. Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas. *J Immunol Methods* **107**, 119–128 (1988).
42. Pang, L., Ding, J., Ge, Y., Fan, J. & Fan, S.-K. Single-Cell-Derived Tumor-Sphere Formation and Drug-Resistance Assay Using an Integrated Microfluidics. *Anal Chem* **91**, 8318–8325 (2019).
43. Grexa, I. *et al.* SpheroidPicker for automated 3D cell culture manipulation using deep learning. *Sci Rep* **11**, 14813 (2021).
44. Clark, P. A. *et al.* The Effects of Tumor Treating Fields and Temozolomide in MGMT Expressing and Non-Expressing Patient-Derived Glioblastoma Cells. *J Clin Neurosci* **36**, 120–124 (2017).
45. Boyd, N. H. *et al.* Addition of carbonic anhydrase 9 inhibitor SLC-0111 to temozolomide treatment delays glioblastoma growth in vivo. *JCI Insight* **2**, e92928.
46. Wu, S. *et al.* PARP-mediated PARylation of MGMT is critical to promote repair of temozolomide-induced O6-methylguanine DNA damage in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **23**, 920–931 (2021).
47. Yu, W., Zhang, L., Wei, Q. & Shao, A. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Frontiers in Oncology* **9**, 1547 (2020).
48. Quillien, V. *et al.* Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* **118**, 4201–4211 (2012).
49. Chen, Y.-C., Zhang, Z. & Yoon, E. Early Prediction of Single-Cell Derived Sphere Formation Rate Using Convolutional Neural Network Image Analysis. *Anal Chem* **92**, 7717–7724 (2020).

50. Bailey, P. C. *et al.* Single-Cell Tracking of Breast Cancer Cells Enables Prediction of Sphere Formation from Early Cell Divisions. *iScience* **8**, 29–39 (2018).
51. Liao, Q. *et al.* Development of deep learning algorithms for predicting blastocyst formation and quality by time-lapse monitoring. *Commun Biol* **4**, 1–9 (2021).
52. Haftbaradaran Esfahani, P. *et al.* Cell shape determines gene expression: cardiomyocyte morphotypic transcriptomes. *Basic Res Cardiol* **115**, 7 (2019).
53. Autodesk. *Autodesk Inventor*. (Autodesk, 2018).
54. Rivière, C., Prunet, A., Fuoco, L. & Ayari, H. Plaques de micropuits en hydrogel biocompatible. 16 (2018).
55. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).
56. Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. & Stuurman, N. Computer control of microscopes using  $\mu$ Manager. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 14**, Unit14.20 (2010).
57. Van Rossum, G. & Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual*. (CreateSpace, 2009).
58. Coelho, L. P. Mahotas: Open source software for scriptable computer vision. *Journal of Open Research Software* **1**, e3 (2013).
59. Bradski, G. The OpenCV Library. *Dr Dobb's J. Software Tools* **25**, 120–125 (2000).
60. Waskom, M. L. seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software* **6**, 3021 (2021).
61. Harris, C. R. *et al.* Array programming with NumPy. *Nature* **585**, 357–362 (2020).
62. McKinney, W. Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* 56–61 (2010) doi:10.25080/Majora-92bf1922-00a.
63. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science Engineering* **9**, 90–95 (2007).

64. Virtanen, P. *et al.* SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods* **17**, 261–272 (2020).
65. Plotly Technologies Inc. *Plotly*. (Plotly Technologies Inc., 2015).
66. Abadi, M. *et al.* TensorFlow: A system for large-scale machine learning. *arXiv:1605.08695 [cs]* (2016).
67. Berg, S. *et al.* ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* **16**, 1226–1232 (2019).

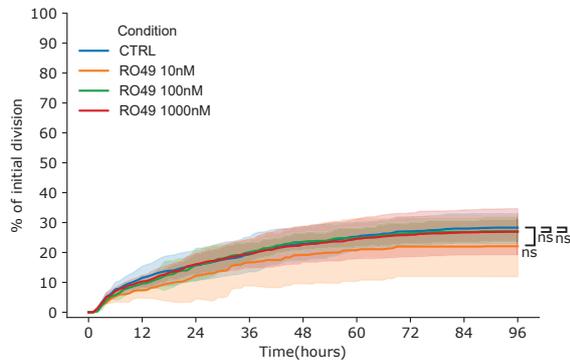
Supplementals

### 3.3.4 L'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH altère l'auto-renouvellement des CSG

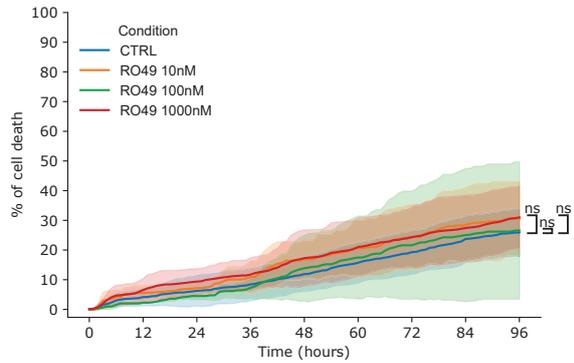
Nous avons montré que la corrélation entre la division précoce et les propriétés souches résiste au stress pharmacologique induit par le TMZ. Or, le TMZ est un agent alkylant. Il cible donc l'ADN des cellules, qu'elles soient souches ou non. Nous nous sommes donc intéressés à l'inhibition spécifique des voies impliquées dans les propriétés souches, en l'occurrence la voie de signalisation de NOTCH. En effet, d'une part notre laboratoire avait déjà développé des méthodes d'étude de la voie de signalisation de NOTCH [MOUTAL et collab. \[2015\]](#) et d'autre part les données de la littérature suggèrent l'importance de cette voie de signalisation dans les CSG (paragraphe 1.3.1). Pour l'étude de la voie de signalisation de NOTCH, nous avons utilisé l'inhibiteur pharmacologique des gamma secrétases RO49 (Figure 2.6b). Le RO49 a été montré comme ayant un pouvoir cytotoxique sur les CSG [DANTAS-BARBOSA et collab. \[2015\]](#) et semble inhiber leur auto-renouvellement [MA et collab. \[2017\]](#); [YAHYANEJAD et collab. \[2016\]](#), probablement via la voie de signalisation de p53 [ZHANG et collab. \[2019\]](#). Ainsi, nous avons voulu voir si l'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH avait un effet sur le phénotype des N14 à court terme et à long terme, pour pouvoir étudier la corrélation entre division précoce et propriétés souches.

Sur la figure 3.2a et la table 3.3, on voit que le RO49 aux concentrations de 10nM, 100nM et 1000nM n'a aucun effet sur le pourcentage de cellules capables de se diviser (respectivement 22% ( $\pm 10.1\%$ ), 27% ( $\pm 4.1\%$ ) et 26.9% ( $\pm 7.6\%$ ) contre 28.3% ( $\pm 4.6\%$ ) en condition contrôle,  $p > 0.05$ ). De même, les taux initiaux de divisions ne sont pas affectés par le RO49 aux concentrations de 10nM, 100nM et 1000nM (respectivement 0.03 ( $\pm 0.01$ ) divisions/heure, 0.03 ( $\pm 0.02$ ) divisions/heure et 0.04 ( $\pm 0.01$ ) divisions/heure contre 0.03 ( $\pm 0.01$ ) divisions/heure pour la condition contrôle,  $p > 0.05$ ). Enfin, le RO49 n'a pas d'effet sur la mort cellulaire au cours des 96 premières heures, aussi bien en terme de pourcentage de cellules mortes (respectivement 30.5% ( $\pm 12.4\%$ ), 26.5% ( $\pm 23\%$ ) et 30.9% ( $\pm 10.5\%$ ) pour les concentrations 10nM, 100nM et 1000nM contre 25.8% ( $\pm 7.9\%$ ) pour la condition contrôle,  $p > 0.05$ ) que pour la pente de morts cellulaires (respectivement 0.32 ( $\pm 0.14$ ) morts/heure, 0.31 ( $\pm 0.3$ ) morts/heure and 0.32 ( $\pm 0.14$ ) morts/heure pour les concentrations 10nM, 100nM et 1000nM contre 0.27 ( $\pm 0.09$ ) morts/heure, pour la condition contrôle,  $p > 0.05$ ) (Figure 3.2b et table 3.3).

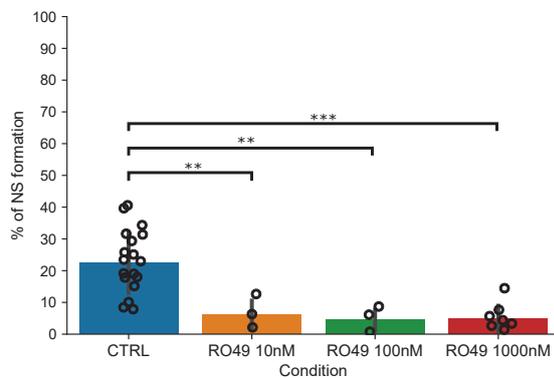
Cependant, le RO49 a bel et bien un effet sur la formation de NS au bout de 14 jours. En condition contrôle, 22.5% des cellules sont capables de former une NS, contre 6.2% ( $\pm 5.2\%$ ,  $p < 0.01$ ), 4.4% ( $\pm 4\%$ ,  $p < 0.01$ ) et 4.8% ( $\pm 4.3\%$ ,  $p < 0.001$ ) respectivement pour les concentrations de RO49 à 10nM, 100nM et 1000nM (Figure 3.2c et table 3.3). De la même façon que dans l'article 3.3.3, nous avons testé la corrélation entre division au cours de la vidéomicroscopie et formation de NS. Il s'avère que la corrélation entre division au cours de la vidéomicroscopie et formation de NS reste statistiquement significative (test khi carré,  $p < 0.05$ ) quelque soit la concentration de RO49 dans le milieu de culture (Table 3.4). Autrement dit, malgré l'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH, la survenue de la 1<sup>ère</sup> division au cours de la vidéomicroscopie reste corrélée à la formation d'une NS.



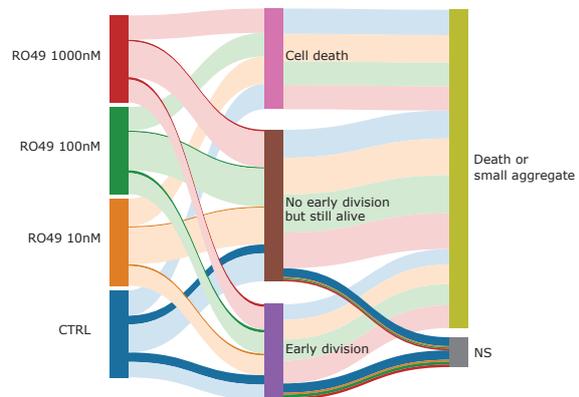
(a) Pourcentage de divisions au cours du temps. Le trait plein montre la moyenne et l'intervalle de confiance représente l'écart-type.



(b) Pourcentage de mort cellulaire au cours du temps. Le trait plein montre la moyenne et l'intervalle de confiance représente l'écart-type.



(c) Pourcentage de formation de NS après 14 jours en culture. Le diagramme en bâtons représente la moyenne et les barres d'erreurs montrent l'écart-type.



(d) Représentation schématique du destin cellulaire des N14. Les bandes foncées permettent de suivre les cellules capables de former une NS.

FIGURE 3.2 – Effet de l'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH sur le phénotype des CSG. Le RO49 n'a aucun effet sur la première division cellulaire (a), ni sur la mort cellulaire (b). Cependant, il diminue de façon significative la formation de NS au bout de 14 jours. Le diagramme de Sankey permet de visualiser l'association entre division initiale et formation de NS en fonction de la concentration de RO49 utilisée. N = 3; CTRL : condition contrôle; ns : non significatif; NS : neurosphère; \*\* :  $p < 0.01$ ; \*\*\* :  $p < 0.001$ .

Lignée cellulaire	Condition	Cellules uniques	Divisions	Mort cellulaire	NS
N14	Contrôle	2050	596	533	318
N14	RO49 10nM	874	217	277	31
N14	RO49 100nM	913	251	248	44
N14	RO49 1000nM	1643	479	458	81

TABLEAU 3.3 – Effet de l’inhibition de la voie NOTCH sur le phénotype des CSG. Nombre total de cellules uniques, de divisions, de mort cellulaire et de NS dans la lignée N14 en fonction de la concentration de RO49 (N = 3).

Condition		Formation de NS		Test khi carré
		Oui	Non	
DMSO	Division	166	430	p < 0.001
	Pas de division	152	1288	
RO49 10nM	Division	16	128	p < 0.01
	Pas de division	12	393	
RO49 100nM	Division	17	136	p < 0.001
	Pas de division	9	417	
RO49 1000nM	Division	49	430	p < 0.001
	Pas de division	37	1127	

TABLEAU 3.4 – Corrélation entre division pendant la vidéo-microscopie et la formation de NS. Matrice de confusion montrant l’association entre la division pendant la vidéo-microscopie des 96 premières heures et la formation de NS à 14 jours (N = 3). Pour toutes les conditions, ces deux variables sont corrélées (test khi carré, p < 0.05 après correction).

Le premier commentaire que l’on peut faire sur cette étude est que les taux de divisions et de morts cellulaires obtenus après ajout de RO49 dans le milieu de culture – à savoir pas d’effet – étaient attendus. En effet, le RO49 est un inhibiteur des gamma sécrétases. Or l’activation de ces enzymes est dépendante de l’interaction inter-cellulaire entre NOTCH et son ligand **SIEBEL et LENDAHL [2017]**. Au début de notre expérience, les cellules sont isolées dans les micro-puits et n’ont pas d’interaction directe avec d’autres cellules. La voie de signalisation de NOTCH n’est alors pas activée et le RO49 n’a donc théoriquement aucun effet. Notre expérience vient ainsi corroborer ce raisonnement.

Néanmoins, la voie de signalisation de NOTCH semble bel et bien inhibée par le RO49 car on observe une diminution significative du taux de formation de NS. Si ce résultat est cohérent avec les données de la littérature **MA et collab. [2017]**, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence un effet dose-dépendant. Il est possible que les concentrations utilisées pour notre étude soient trop importantes pour pouvoir mettre en évidence un effet dose-dépendant car nous suivons ici des cellules uniques. En conditions classique de formation de NS (c’est-à-dire où l’agrégation des cellules n’est pas contrôlée) il se peut que le seuil de concentration tolérée au RO49 soit également augmenté (jusqu’à 10µM dans l’étude de **YAHYANEJAD et collab. [2016]**).

Malgré ces résultats cohérents et potentiellement intéressants d’un point de vue thérapeutique, l’efficacité de l’usage clinique du RO49 n’est pas encore clair – tout du moins dans le cadre du GBM. Si un essai clinique ne montre aucun effet du RO49 sur la survie sans progression **PEEREBOOM et collab. [2021]**, deux autres laissent supposer que le RO49 pourrait avoir une place dans la prise en charge du GBM notamment en association d’autres modalités thérapeutiques **PAN et col-**

lab. [2016]; XU et collab. [2016].

En finalité, même si les inhibiteurs des gamma sécrétases se révèlent finalement inadaptés pour le traitement du GBM, leur utilisation pourrait tout de même permettre de mieux préciser le rôle de la voie de signalisation de NOTCH dans la biologie des CSG. Enfin, il a été montré que le statut muté ou sauvage du gène *p53* influe sur la réponse au RO49 ZHANG et collab. [2019]. De la même façon que nous nous sommes intéressés dans l'article 3.3.3 au lien entre méthylation du promoteur du gène *MGMT* et effet du TMZ sur la formation de NS, nous pourrions tester la formation de NS en présence de RO49 selon le statut mutationnel du gène *p53*.

### 3.3.5 Étude de la quiescence au sein des cellules de glioblastome

La recherche des cellules de GBM quiescentes n'est pas dénuée d'intérêt car il est possible qu'une partie des CSG sont quiescentes *in vivo* ou *in vitro*. Premièrement, il existe des similitudes entre le profil transcriptomique MUKHERJEE [2020] et le métabolisme SPEHALSKI et collab. [2019] des cellules quiescentes et des CSG. De plus, plusieurs études ont montré que les cellules de GBM quiescentes peuvent initier la prolifération tumorale *in vitro* KIMURA et collab. [2019] et *in vivo* ATKINS et collab. [2019]; XIE et collab. [2022] ainsi que former des NS ADAMSKI et collab. [2017]; SACHDEVA et collab. [2019]. Enfin, il a été mis en évidence un lien entre les cellules de GBM quiescentes et la résistance aux agents cytotoxiques *in vivo* ATKINS et collab. [2019]; SACHDEVA et collab. [2019]; XIE et collab. [2022]. Ainsi, ces données nous ont poussé à rechercher les cellules quiescentes dans nos lignées cellulaires avec notre plateforme.

Comme nous l'avons présenté dans le paragraphe 3.1.4, notre plateforme est capable de détecter les CSG capables de former des NS. De plus, grâce à l'algorithme développé dans l'article 3.1.5, nous pouvons détecter les cellules qui se sont divisées, les cellules qui sont mortes et les autres, c'est-à-dire les cellules qui sont toujours vivantes mais qui ne se sont pas divisées. En appliquant cet algorithme au bout de 14 jours à la fin de notre expérience, nous pouvons ainsi détecter les cellules qui 1) sont toujours vivantes et 2) qui sont restées seules dans leur micro-puits 3) pendant deux semaines (Figure 3.3). Nous appellerons "quiescentes" ces cellules, bien que cette étiquette puisse porter le flanc aux critiques car nous n'avons pas testé moléculairement la quiescence de ces cellules. Notre utilisation du terme "quiescent" repose ici sur une observation fonctionnelle et non pas sur l'utilisation de marqueurs moléculaires théoriquement spécifiques de la quiescence – car aucun marqueur n'a jamais été montré comme spécifique de la quiescence CHEUNG et RANDO [2013].

Il s'avère que le pourcentage de cellules quiescentes dans la lignée N14 n'est ni modifiée par le TMZ (respectivement 5,3% ( $\pm 5,3\%$ ), 3,8% ( $\pm 4,7\%$ ) et 1,4% ( $\pm 1,4\%$ ) pour les concentrations 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M et 1000 $\mu$ M,  $p > 0.05$  dans tous les cas), ni par le RO49 (respectivement 8,7% ( $\pm 4,8\%$ ), 10,7% ( $\pm 4,5\%$ ) et 11,6% ( $\pm 12,1\%$ ) pour les concentrations 10nM, 100nM et 1000nM,  $p > 0.05$  dans tous les cas) par rapport à la condition contrôle (5.8%  $\pm 7.9\%$ ). De même, le pourcentage de cellules quiescentes dans la lignée N15 n'est pas modifié par le TMZ (respectivement 7,1% ( $\pm 7,3\%$ ), 8,1% ( $\pm 7,4\%$ ) et 7,6% ( $\pm 8,7\%$ ) pour les concentrations 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M and 1000 $\mu$ M,  $p > 0.05$  dans tous les cas). La figure 3.4 et la table 3.5 reprennent ces résultats.

Concernant la voie de signalisation de NOTCH, nos observations sont cohérentes avec les données issues de la littérature : l'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH n'augmente pas la proportion de cellules quiescentes. En effet, plusieurs études montrent que la voie de signalisation de NOTCH promeut la quiescence dans les cellules de GBM et que son inhibition stimule la prolifération cellulaire GIACHINO et collab. [2015]; LAWLOR et collab. [2020]; O'CONNOR et collab. [2021]. Au total, nous montrons donc que l'inhibition de la voie de signalisation de NOCTH 1) diminue la proportion de cellules capables de former une NS (Figure 3.2c) et 2) sans pour autant

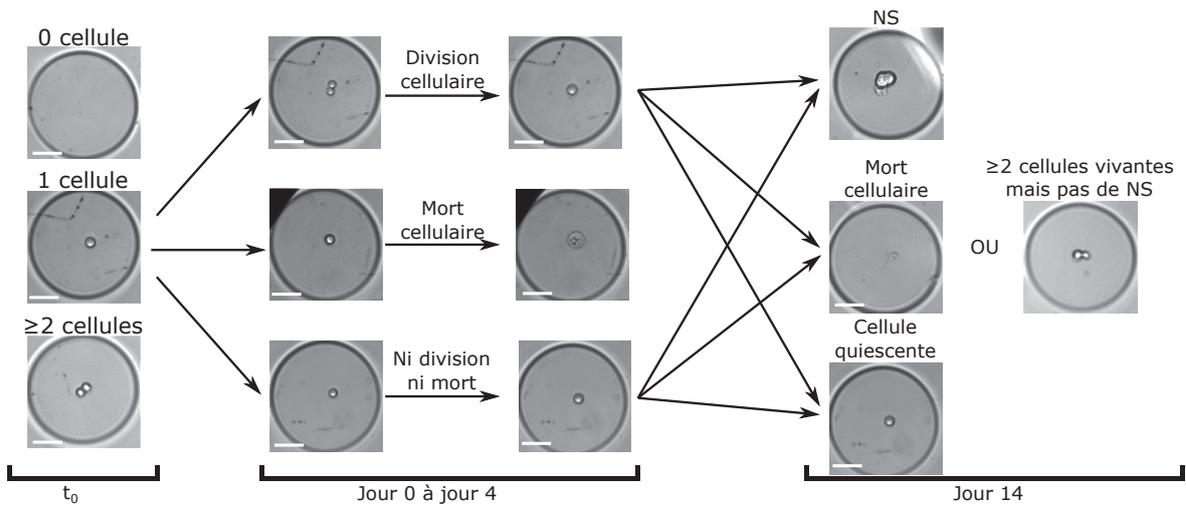


FIGURE 3.3 – **Principe de la détection des cellules quiescentes.** Par rapport à la figure 3.1, nous détectons les cellules seules ET toujours vivantes dans notre puce au bout de 14 jours. Nous considérons que ces cellules sont quiescentes.

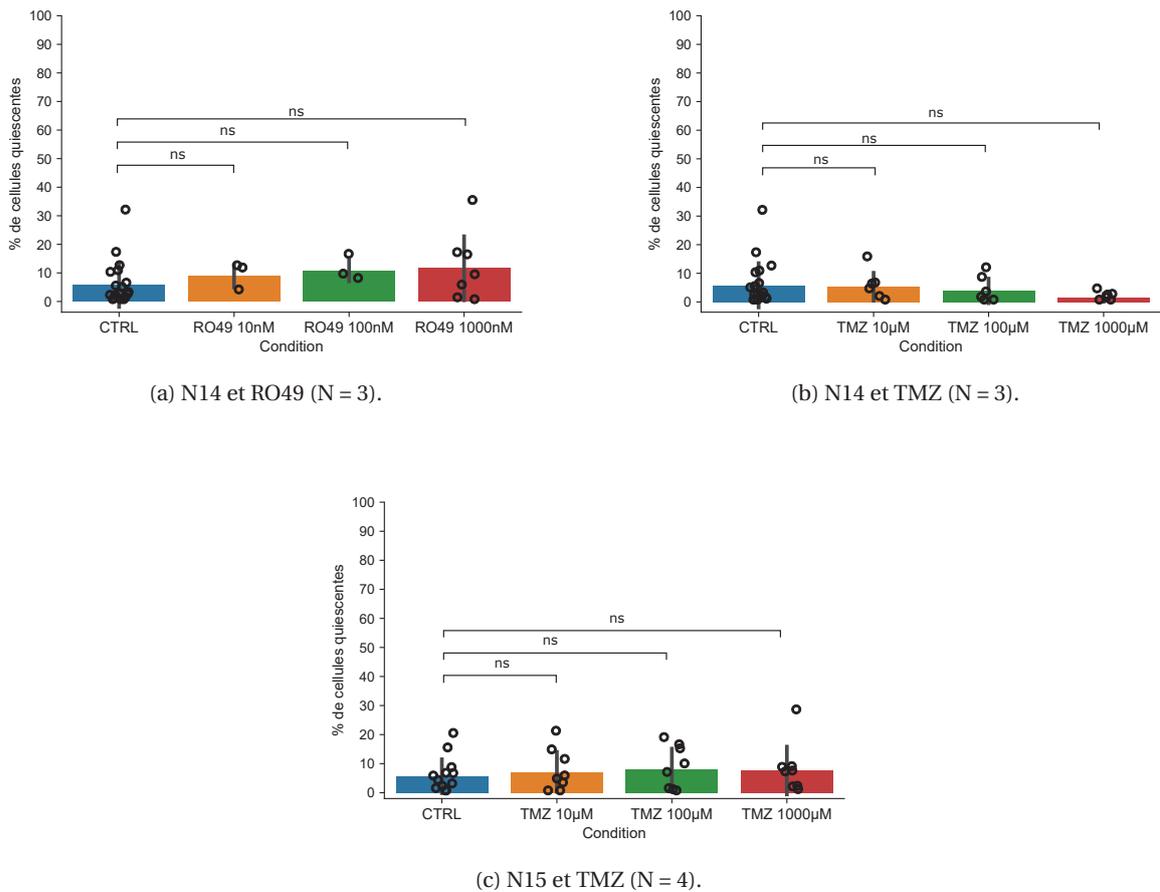


FIGURE 3.4 – **Cellules quiescentes au sein des cellules de glioblastome.** Pourcentage de cellules quiescentes au sein des N14, en présence de TMZ (a) ou de RO49 (b), ainsi qu'au sein des N15 en présence de TMZ (c). Les drogues ne modifient pas le pourcentage de cellules quiescentes (test de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ). ns : non significatif; CTRL : condition contrôle.

Lignée cellulaire	Condition	Cellules uniques	Cellules quiescentes
N14	Contrôle	4059	234
N14	RO49 10nM	874	50
N14	RO49 100nM	913	61
N14	RO49 1000nM	1643	230
N14	TMZ 10 $\mu$ M	1252	54
N14	TMZ 100 $\mu$ M	1278	30
N14	TMZ 1000 $\mu$ M	1642	17
N15	Contrôle	2227	137
N15	TMZ 10 $\mu$ M	1722	109
N15	TMZ 100 $\mu$ M	2014	163
N15	TMZ 1000 $\mu$ M	1825	146

TABLEAU 3.5 – **Cellules quiescentes au sein des cellules de glioblastome.** Nombre de cellules quiescentes en fonction des lignées cellulaires et des conditions de culture. Nous avons regroupé les conditions contrôles pour l'analyse des cellules N14 quiescentes.

augmenter la proportion de cellules quiescentes (Figure 3.4a). Or, il a été observé que l'inhibition de la voie de signalisation de NOTCH induit la différenciation dans les cellules souches neurales du poisson zèbre [CONNER et collab. \[2014\]](#). Nous pouvons alors faire l'hypothèse que le RO49, par inhibition de la voie de signalisation de NOTCH, induit également la différenciation des CSG. Ces considérations renforcent l'intérêt de l'étude de la voie de signalisation de NOTCH dans les CSG afin de pouvoir trouver de nouveaux leviers thérapeutiques.

Intéressons-nous maintenant aux résultats sur le TMZ (Figures 3.4b et 3.4c). Les études qui se sont intéressées au lien entre TMZ et quiescence sont assez cohérentes entre elles : le TMZ semble arrêter le cycle cellulaire et faire entrer les cellules en quiescence [ADAMSKI et collab. \[2017\]](#); [MUNOZ et collab. \[2019\]](#); [XIE et collab. \[2022\]](#); [YANG et collab. \[2020\]](#). Or nos résultats montrent que, pour les deux lignées N14 et N15, le TMZ n'a pas d'effet sur la proportion de cellules quiescentes. Premièrement, la gamme de concentrations de TMZ utilisée dans notre étude n'est pas différente de celles utilisées dans les articles cités plus haut (entre 10 $\mu$ M à 500 $\mu$ M). Deuxièmement, les différences peuvent être simplement expliquées par les modèles biologiques. En effet, on connaît désormais bien l'hétérogénéité qui existe entre les lignées cellulaires de GBM. La discordance entre nos résultats et les autres études pourraient donc être liée au biais entre les modèles biologiques étudiés (d'autant que les lignées utilisées dans la littérature sont plutôt des cellules cancéreuses différenciées et non des lignées de CSG). La dernière considération est également d'ordre méthodologique mais concerne la façon dont est suivie la quiescence. Les articles [ADAMSKI et collab. \[2017\]](#); [MUNOZ et collab. \[2019\]](#); [YANG et collab. \[2020\]](#) étudient chacun la quiescence avec des marqueurs moléculaires. Or, notre critère de quiescence est phénotypique : le fait pour une cellule unique de rester vivante et de ne pas s'être divisée pendant 15 jours. Il serait donc très intéressant de pouvoir récupérer les cellules que notre plateforme identifie comme quiescentes pour ensuite rechercher les marqueurs moléculaires associés à la quiescence.

## 3.4 Sélection spécifique des cellules selon leur phénotype

### 3.4.1 Rationnel

Dans notre article 3.3.3 et dans le paragraphe précédent 3.3.5, nous discutons de l'utilisation du micropipettage pour aller chercher des cellules spécifiquement selon leur phénotype. Or, comme on l'a déjà largement commenté, les cellules de GBM sont très hétérogènes. Isoler des cellules phénotypiquement homogènes constitue donc un moyen de s'affranchir de cette hétérogénéité. De part la conception de notre plateforme, il est possible à l'aide d'un micro-manipulateur de descendre dans les micro-puits pour pipetter les cellules qui s'y trouvent. En combinant ce micropipettage aux technologies de séquençage d'ARN en cellule unique, il serait possible d'établir des signatures transcriptomiques spécifiques de sous-populations phénotypiquement homogènes afin de réduire l'hétérogénéité.

### 3.4.2 Preuve de concept de l'aspiration et la restitution des cellules par micropipettage automatisé

Nous avons réussi à interfacer le bras du micromanipulateur ainsi que système capillaire (Figures 3.5). Ce système nous permet de descendre dans les micro-puits pour aspirer les cellules qui s'y trouvent. Nous pouvons suivre les cycles d'aspiration et de restitution des cellules grâce au contrôle de débit (Figure 3.6). Ainsi, lorsque la pression est équilibrée, le flux est nul. Lors des phases d'aspiration on va avoir un débit négatif. A l'inverse, lorsqu'il va s'agir d'éjecter la cellule, le flux va devenir positif.

Nos résultats apportent la preuve de concept qu'il est possible de micro-pipetter des cellules qui se trouvent dans les micro-puits de notre puce. La prochaine étape consiste à combiner le micro-pipetteur avec les données issues des algorithmes d'analyse d'images. En effet, nous savons le phénotype possédé par les cellules, ainsi que la position de ces cellules dans la puce (Figure 2.5). Ainsi notre objectif à moyen terme serait de micropipetter les cellules dans les micro-puits directement après l'étape de vidéo-microscopie. De cette façon, nous pourrions sélectionner des cellules selon un phénotype commun pour explorer les caractéristiques moléculaires associées à ce phénotype partagé.

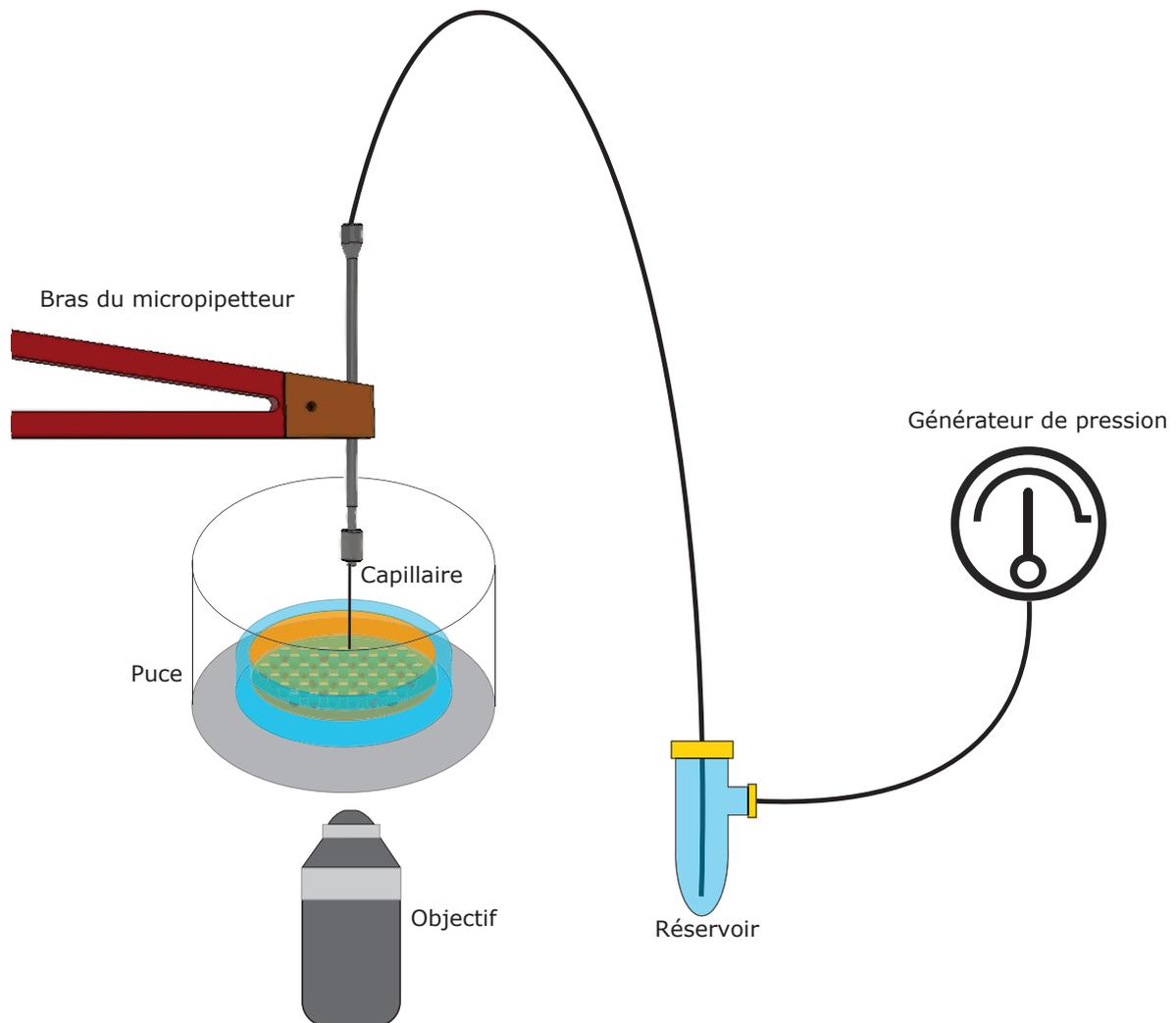


FIGURE 3.5 – **Schéma expérimental du micropipettage dans la puce.** Un capillaire est attaché au bout du bras mécanisé. Il est immergé dans le milieu de culture pour aller dans les micro-puits de la puce. L'aspiration du contenu du micro-puits et la restitution sont contrôlées par un générateur de pression. L'ensemble du montage expérimental est interfacé.

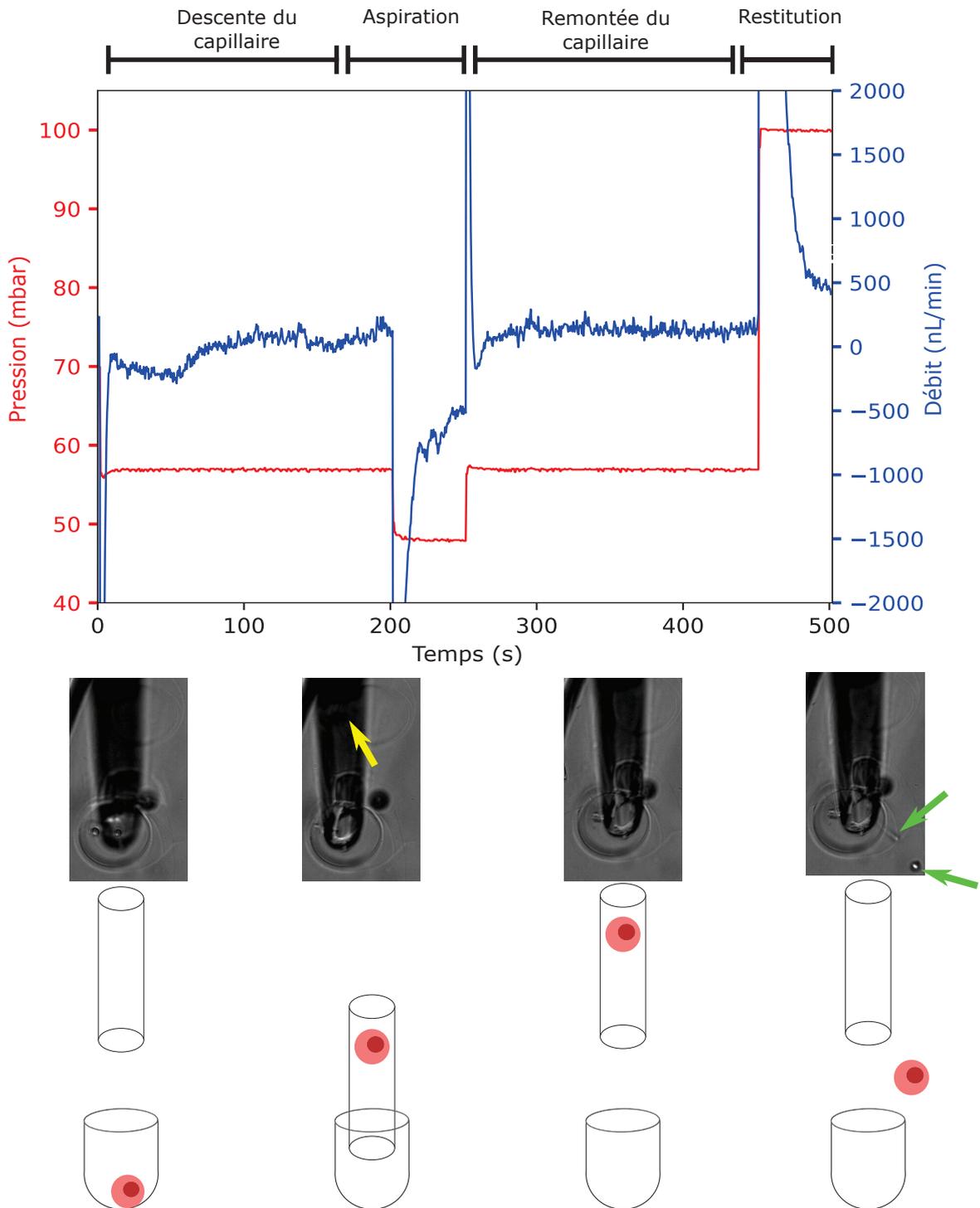


FIGURE 3.6 – **Variations du débit et de la pression au cours de la phase d’aspiration et de restitution des cellules.** Variation de la pression et du débit lors des phase d’aspiration et de restitution des cellules. Dans cet exemple, deux cellules sont micro-pipetées. On peut apercevoir leur ombre dans le capillaire lorsqu’elles sont aspirées (flèche jaune). Les cellules peuvent ensuite être restituées en augmentant la pression dans le capillaire (flèches vertes).

### 3.5 Application de notre plateforme dans le contexte du cancer colo-rectal

#### 3.5.1 Le cancer colo-rectal et les cellules souches cancéreuses associées

L'historique des cellules souches du cancer colo-rectales (CSCR) suit de près celui des CSG. Découvertes en 2007 via l'expression du CD133, les CSCR ont été montrées comme capables de former des tumoro-sphères (TS) ainsi que d'initiation tumorale dans des modèles murins [RICCI-VITIANI et collab. \[2007\]](#). Mais comme pour les CSG, les marqueurs moléculaires utilisés pour identifier les CSCR ont rapidement été démontrés comme non spécifiques. Ainsi, l'étude de [SHMELKOV et collab. \[2008\]](#) a montré dès 2008 que certaines cellules n'exprimant pas le CD133 possèdent tout de même les propriétés souches. L'autre exemple, plus emblématique des CSCR, est celui du gène *LGR5*. Initialement décrit comme spécifique des cellules souches intestinales adultes [BARKER et collab. \[2007\]](#), la protéine LGR5 a rapidement été retrouvée exprimée dans les CSCR [BARKER et collab. \[2009\]](#) L'expression de LGR5 est depuis largement recherchée pour identifier les CSCR [XU et collab. \[2019\]](#) bien que de nombreuses études ont confirmé l'existence de CSCR LGR5<sup>-</sup> [FUMAGALLI et collab. \[2020\]](#); [SHIMOKAWA et collab. \[2017\]](#). Enfin, de même que pour les CSG, l'identification fonctionnelle des CSCR suscite encore de vives discussions. Les comparaisons critiques entre les méthodes *in vitro* versus celles *in vivo* [WU et collab. \[2014\]](#) ou bien entre des méthodes *in vitro* elles-mêmes [ZHAO et collab. \[2019\]](#) révèlent la grande variété des méthodes d'identification fonctionnelle utilisées. Là encore, l'absence de standardisation de ces méthodes permet d'expliquer les résultats parfois contradictoires que celles-ci génèrent. C'est donc dans ce contexte d'absence, à la fois de marqueur moléculaire et de test fonctionnel standardisé, que nous avons utilisé notre plateforme pour étudier l'effet radio-sensibilisant des nanoparticules AGUIX sur les CSCR.

#### 3.5.2 Effet de l'association des nano-particules AGuIX<sup>®</sup> avec la radiothérapie sur l'auto-renouvellement des cellules du cancer colique

##### 3.5.2.1 Rationnel et schéma expérimental

Le test de formation de NS est similaire au test de formation de colonies utilisé dans les études de radio-sensibilisation *in vitro* [FRANKEN et collab. \[2006\]](#). Le test de formation de colonies consiste à diluer des cellules avant de les répartir dans des boîtes de culture puis à attendre que les cellules prolifèrent et forment des colonies. Cette méthode souffre des mêmes biais et donc des mêmes critiques que le test de formation de NS [BRIX et collab. \[2021\]](#). Ainsi, en collaboration avec Saba GOODARZI (Institut lumière matière), nous avons voulu tester l'effet radio-sensibilisant des nanoparticules AGuIX<sup>®</sup> dans des cellules du cancer colique (lignée HCT 116) avec notre plateforme de phénotypage. Pour ce faire, deux pools de cellules (l'un incubé avec 1,5mM de AGuIX<sup>®</sup> et l'autre non) ont été irradiés aux doses de 0, 1, 2, 3 et 4 grays. Deux puces par condition ont ensuite étéensemencées (soit 20 puces au total) dans les mêmes conditions standardisées que décrites précédemment 3.2, soit 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules uniques ont été détectées dans un premier temps, puis 7 jours plus tard, nous avons de nouveau imagé les puces afin de détecter quelles cellules uniques avaient été capables de former une TS. L'effet radio-sensibilisant est estimé à partir du taux de survie, calculé par :

$$\text{taux de survie} = \frac{N_{\text{colonies}_{\text{condition test}}}}{N_{\text{cellules uniques}_{\text{condition test}}}} * \frac{N_{\text{cellules uniques}_{\text{condition contrôle}}}}{N_{\text{colonies}_{\text{condition contrôle}}}}. \quad (3.1)$$

En pratique, les colonies sont détectées manuellement au microscope, et tout sphéroïde multi-cellulaire est généralement compté comme une colonie. C'est pour ces raisons que nous n'avons pas changé le seuil de taille que nous avons choisi pour détecter les NS (rayon supérieur ou égal à 15µm). En revanche, nous avons testé la capacité de notre algorithme de deep learning à détecter les cellules uniques de la lignée HCT166 imagées avec l'objectif 10X, alors que notre algorithme avait été entraîné avec des images de la lignée N14 imagées à l'objectif 20X (3.1.3.3). Il

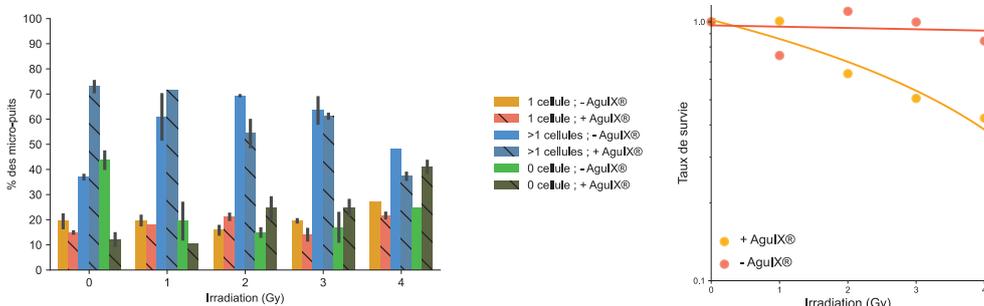
s'avère que les performances de notre algorithme pour adresser ce problème restent très satisfaisantes : la sensibilité et la VPP sont respectivement de 93.7% et 89.3% (Table 3.6).

Algorithme	Détection visuelle		
		Cellules uniques	Autres
	Cellules uniques	134	16
Autres	9	733	

TABLEAU 3.6 – **Détection par notre algorithme des cellules uniques de la lignée HTC166.** La sensibilité et la VPP de notre algorithme de deep learning (3.1.3.3) sont respectivement de 93.7% et 89.3% pour la détection des images de micro-puits contenant une unique cellule de la lignée HCT116.

### 3.5.2.2 Les nanoparticules AGuIX® sensibilisent les cellules souches du cancer colo-rectal à la radiothérapie

Nous montrons que le taux de survie des HCT116 n'est pas diminué par l'irradiation jusqu'à 4 grays en l'absence de nanoparticules AGuIX®. En revanche, la présence des nanoparticules suffit à faire baisser le taux de survie à partir de 2 grays (Figure 3.7).



(a) Distribution des cellules dans les micro-puits selon les conditions de culture et d'irradiation. (b) Taux de survie selon l'irradiation et la présence de nanoparticules

FIGURE 3.7 – **Radio-sensibilisation induite par AGuIX®.** Le pourcentage de micro-puits contenant une seule cellule est similaire entre les différentes conditions, soit environ 200 cellules par puce (a) et table 3.7. Le taux de survie est diminué lorsque les cellules irradiées ont été exposées aux nanoparticules AGuIX®. N = 2 pour toutes les conditions sauf pour les conditions + AGuIX® / 1 gray et - AGuIX® / 4 grays (où N = 1); Gy : gray.

	Irradiation (gray)	Cellules uniques	TS	Taux de survie
+ AGuIX <sup>®</sup>	0	347	243	1
+ AGuIX <sup>®</sup>	1	207	146	1
+ AGuIX <sup>®</sup>	2	465	205	0.63
+ AGuIX <sup>®</sup>	3	253	90	0.5
+ AGuIX <sup>®</sup>	4	495	149	0.42
- AGuIX <sup>®</sup>	0	327	178	1
- AGuIX <sup>®</sup>	1	312	125	0.74
- AGuIX <sup>®</sup>	2	327	194	1.09
- AGuIX <sup>®</sup>	3	410	227	0.99
- AGuIX <sup>®</sup>	4	182	84	0.84

TABLEAU 3.7 – **Radio-sensibilisation induite par AGuIX<sup>®</sup>**. Nombre de cellules uniques détectées initialement, nombre de tumorosphères (TS) détectées après 1 semaine de culture dans la puce et taux de survie (Équation 3.1) selon la présence de AGuIX<sup>®</sup> et de la dose d’irradiation.

Nous présentons dans ce paragraphe une nouvelle utilisation de notre plateforme. Celle-ci peut être utilisée pour réaliser les tests de radio-sensibilisation de façon standardisée. Bien que ces résultats nécessitent d’être reproduits, ils confirment l’effet radio-sensibilisant des nanoparticules AGuIX<sup>®</sup>.

Pris dans leur ensemble, les études que nous avons réalisées, aussi bien sur la caractérisation des CSG et des CSCR, ainsi que les différentes applications pharmacologiques réalisées à grande échelle, montrent la robustesse et l’adaptabilité de notre plateforme. Les algorithmes d’analyse d’images que nous avons développés permettent un phénotypage fiable et performant des cellules. Enfin, les projets en cours visent 1) d’une part à combiner notre plateforme à un système de micro-pipettage afin de pouvoir corrélérer le phénotypage aux analyses moléculaires et 2) étendre l’utilisation de notre plateforme à d’autres applications biologiques.

### 3.6 Références

- ABADI, M., P. BARHAM, J. CHEN, Z. CHEN, A. DAVIS, J. DEAN, M. DEVIN, S. GHEMAWAT, G. IRVING, M. ISARD, M. KUDLUR, J. LEVENBERG, R. MONGA, S. MOORE, D. G. MURRAY, B. STEINER, P. TUCKER, V. VASUDEVAN, P. WARDEN, M. WICKE, Y. YU et X. ZHENG. 2016, «TensorFlow : A system for large-scale machine learning», *arXiv :1605.08695 [cs]*. 68
- ADAMSKI, V., A. HEMPELMANN, C. FLÜH, R. LUCIUS, M. SYNOWITZ, K. HATTERMANN et J. HELDFEINDT. 2017, «Dormant glioblastoma cells acquire stem cell characteristics and are differentially affected by Temozolomide and AT101 treatment», *Oncotarget*, vol. 8, n° 64, doi : 10.18632/oncotarget.22514, p. 108 064–108 078, ISSN 1949-2553. 122, 124
- ATKINS, R. J., S. S. STYLLI, N. KURGANOV, S. MANGIOLA, C. J. NOWELL, T. M. WARE, N. M. CORCORAN, D. V. BROWN, A. H. KAYE, A. MOROKOFF, R. B. LUWOR, C. M. HOVENS et T. MANTAMADIOTIS. 2019, «Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance», *Experimental Cell Research*, vol. 374, n° 2, doi :10.1016/j.yexcr.2018.12.010, p. 353–364, ISSN 0014-4827. 122
- BARKER, N., R. A. RIDGWAY, J. H. VAN ES, M. VAN DE WETERING, H. BEGTHEL, M. VAN DEN BORN,

- E. DANENBERG, A. R. CLARKE, O. J. SANSOM et H. CLEVERS. 2009, «Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer», *Nature*, vol. 457, n° 7229, doi :10.1038/nature07602, p. 608–611, ISSN 1476-4687. 128
- BARKER, N., J. H. VAN ES, J. KUIPERS, P. KUJALA, M. VAN DEN BORN, M. COZIJNSEN, A. HAEGEBARTH, J. KORVING, H. BEGTHEL, P. J. PETERS et H. CLEVERS. 2007, «Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*», *Nature*, vol. 449, n° 7165, doi :10.1038/nature06196, p. 1003–1007, ISSN 1476-4687. 128
- BERG, S., D. KUTRA, T. KROEGER, C. N. STRAEHLE, B. X. KAUSLER, C. HAUBOLD, M. SCHIEGG, J. ALES, T. BEIER, M. RUDY, K. EREN, J. I. CERVANTES, B. XU, F. BEUTTENMUELLER, A. WOLNY, C. ZHANG, U. KOETHE, F. A. HAMPRECHT et A. KRESHUK. 2019, «Ilastik : Interactive machine learning for (bio)image analysis», *Nat Methods*, vol. 16, n° 12, doi :10.1038/s41592-019-0582-9, p. 1226–1232, ISSN 1548-7105. 68
- BRADSKI, G. 2000, «The OpenCV Library», *Dr Dobb's J. Software Tools*, vol. 25, p. 120–125. 68
- BREIMAN, L. 2001, «Random Forests», *Machine Learning*, vol. 45, n° 1, doi :10.1023/A:1010933404324, p. 5–32, ISSN 1573-0565. 68
- BRIX, N., D. SAMAGA, C. BELKA, H. ZITZELSBERGER et K. LAUBER. 2021, «Analysis of clonogenic growth in vitro», *Nat Protoc*, vol. 16, n° 11, doi:10.1038/s41596-021-00615-0, p. 4963–4991, ISSN 1750-2799. 128
- CHEUNG, T. H. et T. A. RANDO. 2013, «Molecular regulation of stem cell quiescence», *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 14, n° 6, doi:10.1038/nrm3591, ISSN 1471-0072. 122
- COELHO, L. P. 2013, «Mahotas : Open source software for scriptable computer vision», *Journal of Open Research Software*, vol. 1, n° 1, p. e3, ISSN 2049-9647. 68
- CONNER, C., K. M. ACKERMAN, M. LAHNE, J. S. HOBGOOD et D. R. HYDE. 2014, «Repressing notch signaling and expressing TNF $\alpha$  are sufficient to mimic retinal regeneration by inducing Müller glial proliferation to generate committed progenitor cells», *J Neurosci*, vol. 34, n° 43, doi :10.1523/JNEUROSCI.0498-14.2014, p. 14 403–14 419, ISSN 1529-2401. 124
- DANTAS-BARBOSA, C., G. BERGTHOLD, E. DAUDIGEOS-DUBUS, H. BLOCKUS, J. F. BOYLAN, C. FERREIRA, S. PUGET, M. ABELY, G. VASSAL, J. GRILL et B. GEOERGER. 2015, «Inhibition of the NOTCH pathway using  $\gamma$ -secretase inhibitor RO4929097 has limited antitumor activity in established glial tumors», *Anticancer Drugs*, vol. 26, n° 3, doi :10.1097/CAD.000000000000190, p. 272–283, ISSN 1473-5741. 119
- DIRKSE, A., A. GOLEBIEWSKA, T. BUDER, P. V. NAZAROV, A. MULLER, S. POOVATHINGAL, N. H. C. BRONS, S. LEITE, N. SAUVAGEOT, D. SARKISJAN, M. SEYFRID, S. FRITAH, D. STIEBER, A. MICHELUCCI, F. HERTEL, C. HEROLD-MENDE, F. AZUAJE, A. SKUPIN, R. BJERKVIG, A. DEUTSCH, A. VOSS-BÖHME et S. P. NICLOU. 2019, «Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment», *Nat Commun*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41467-019-09853-z, p. 1787, ISSN 2041-1723. 66
- FRANKEN, N. A. P., H. M. RODERMOND, J. STAP, J. HAVEMAN et C. VAN BREE. 2006, «Clonogenic assay of cells in vitro», *Nat Protoc*, vol. 1, n° 5, doi :10.1038/nprot.2006.339, p. 2315–2319, ISSN 1750-2799. 128
- FUMAGALLI, A., K. C. OOST, L. KESTER, J. MORGNER, L. BORNES, L. BRUENS, L. SPAARGAREN, M. AZKANAZ, T. SCHELFHORST, E. BEERLING, M. C. HEINZ, D. POSTRACH, D. SEINSTRAS, A. M. SIEUWERTS, J. W. M. MARTENS, S. VAN DER ELST, M. VAN BAALEN, D. BHOWMICK, N. VRISEKOOP, S. I. J. ELLENBROEK, S. J. E. SUIJKERBUIJK, H. J. SNIPPERT et J. VAN RHEENEN. 2020, «Plasticity of *Lgr5*-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer», *Cell Stem Cell*, vol. 26, n° 4, doi :10.1016/j.stem.2020.02.008, p. 569–578.e7, ISSN 1875-9777. 128

- GIACHINO, C., J.-L. BOULAY, R. IVANEK, A. ALVARADO, C. TOSTADO, S. LUGERT, J. TCHORZ, M. COBAN, L. MARIANI, B. BETTLER, J. LATHIA, S. FRANK, S. PFISTER, M. KOOL et V. TAYLOR. 2015, «A Tumor Suppressor Function for Notch Signaling in Forebrain Tumor Subtypes», *Cancer Cell*, vol. 28, n° 6, doi :10.1016/j.ccell.2015.10.008, p. 730–742, ISSN 1535-6108. [122](#)
- KIMURA, T., D. CUI, H. KAWANO, C. YOSHITOMI-SAKAMOTO, N. TAKAKURA et E. IKEDA. 2019, «Induced expression of GINS complex is an essential step for reactivation of quiescent stem-like tumor cells within the peri-necrotic niche in human glioblastoma», *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 145, n° 2, doi :10.1007/s00432-018-2797-z, p. 363–371, ISSN 1432-1335. [122](#)
- LAWLOR, K., M. A. MARQUES-TORREJON, G. DHARMALINGHAM, Y. EL-AZHAR, M. D. SCHNEIDER, S. M. POLLARD et T. A. RODRÍGUEZ. 2020, «Glioblastoma stem cells induce quiescence in surrounding neural stem cells via Notch signaling», *Genes Dev*, vol. 34, n° 23-24, doi : 10.1101/gad.336917.120, p. 1599–1604, ISSN 1549-5477. [122](#)
- MA, Y., Z. CHENG, J. LIU, L. TORRE-HEALY, J. D. LATHIA, I. NAKANO, Y. GUO, R. C. THOMPSON, M. L. FREEMAN et J. WANG. 2017, «Inhibition of Farnesyltransferase Potentiates NOTCH-Targeted Therapy against Glioblastoma Stem Cells», *Stem Cell Reports*, vol. 9, n° 6, doi :10.1016/j.stemcr.2017.10.028, p. 1948–1960, ISSN 22136711. [119](#), [121](#)
- MOUTAL, A., J. HONNORAT, P. MASSOMA, P. DESORMEAUX, C. BERTRAND, C. MALLEVAL, C. WATRIN, N. CHOUNLAMOUNTRI, M.-E. MAYEUR, R. BESANCON, N. NAUDET, L. MAGADOUX, R. KHANNA, F. DUCRAY, D. MEYRONET et N. THOMASSET. 2015, «CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling», *Cancer Research*, vol. 75, n° 17, doi :10.1158/0008-5472.CAN-14-0631, p. 3519–3528, ISSN 0008-5472, 1538-7445. [119](#)
- MUKHERJEE, S. 2020, «Quiescent stem cell marker genes in glioma gene networks are sufficient to distinguish between normal and glioblastoma (GBM) samples», *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, doi : 10.1038/s41598-020-67753-5, p. 10937, ISSN 2045-2322. [122](#)
- MUNOZ, J. L., N. D. WALKER, S. MAREEDU, S. H. PAMARTHI, G. SINHA, S. J. GRECO et P. RAMESHWAR. 2019, «Cycling Quiescence in Temozolomide Resistant Glioblastoma Cells Is Partly Explained by microRNA-93 and -193-Mediated Decrease of Cyclin D», *Front Pharmacol*, vol. 10, doi :10.3389/fphar.2019.00134, p. 134, ISSN 1663-9812. [124](#)
- O’CONNOR, S. A., H. M. FELDMAN, S. ARORA, P. HOELLERBAUER, C. M. TOLEDO, P. CORRIN, L. CARTER, M. KUFELD, H. BOLOURI, R. BASOM, J. DELROW, J. L. MCFALINE-FIGUEROA, C. TRAPNELL, S. M. POLLARD, A. PATEL, P. J. PADDISON et C. L. PLAISIER. 2021, «Neural G0 : A quiescent-like state found in neuroepithelial-derived cells and glioma», *Mol Syst Biol*, vol. 17, n° 6, doi :10.15252/msb.20209522, p. e9522, ISSN 1744-4292. [122](#)
- OTSU, N. 1979, «A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms», *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, n° 1, doi :10.1109/TSMC.1979.4310076, p. 62–66, ISSN 2168-2909. [67](#)
- PAN, E., J. G. SUPKO, T. J. KALEY, N. A. BUTOWSKI, T. CLOUGHESY, J. JUNG, S. DESIDERI, S. GROSSMAN, X. YE et D. M. PARK. 2016, «Phase I study of RO4929097 with bevacizumab in patients with recurrent malignant glioma», *J Neurooncol*, vol. 130, n° 3, doi :10.1007/s11060-016-2263-1, p. 571–579, ISSN 1573-7373. [121](#)
- PEEREBOOM, D. M., X. YE, T. MIKKELSEN, G. J. LESSER, F. S. LIEBERMAN, H. I. ROBINS, M. S. AHLUWALIA, A. E. SLOAN et S. A. GROSSMAN. 2021, «A Phase II and Pharmacodynamic Trial of RO4929097 for Patients With Recurrent/Progressive Glioblastoma», *Neurosurgery*, vol. 88, n° 2, doi :10.1093/neuros/nyaa412, p. 246–251, ISSN 1524-4040. [121](#)

- QUILLIEN, V., A. LAVENU, F. DUCRAY, M.-O. JOLY, O. CHINOT, F. FINA, M. SANSON, C. CARPENTIER, L. KARAYAN-TAPON, P. RIVET, N. ENTZ-WERLE, M. LEGRAIN, E. L. ZALCMAN, G. LEVALLET, F. ESCANDE, C. RAMIREZ, D. CHIFOREANU, E. VAULEON et D. FIGARELLA-BRANGER. 2016, «Validation of the high-performance of pyrosequencing for clinical MGMT testing on a cohort of glioblastoma patients from a prospective dedicated multicentric trial», *Oncotarget*, vol. 7, n° 38, doi :10.18632/oncotarget.11322, p. 61 916–61 929, ISSN 1949-2553. [92](#)
- RICCI-VITIANI, L., D. G. LOMBARDI, E. PILOZZI, M. BIFFONI, M. TODARO, C. PESCHLE et R. DE MARIA. 2007, «Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells», *Nature*, vol. 445, n° 7123, doi :10.1038/nature05384, p. 111–115, ISSN 1476-4687. [128](#)
- SACHDEVA, R., M. WU, K. JOHNSON, H. KIM, A. CELEBRE, U. SHAHZAD, M. S. GRAHAM, J. A. KESSLER, J. H. CHUANG, J. KARAMCHANDANI, M. BREDEL, R. VERHAAK et S. DAS. 2019, «BMP signaling mediates glioma stem cell quiescence and confers treatment resistance in glioblastoma», *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, doi :10.1038/s41598-019-51270-1, p. 14 569, ISSN 2045-2322. [122](#)
- SHIMOKAWA, M., Y. OHTA, S. NISHIKORI, M. MATANO, A. TAKANO, M. FUJII, S. DATE, S. SUGIMOTO, T. KANAI et T. SATO. 2017, «Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells», *Nature*, vol. 545, n° 7653, doi :10.1038/nature22081, p. 187–192, ISSN 1476-4687. [128](#)
- SHMELKOV, S. V., J. M. BUTLER, A. T. HOOPER, A. HORMIGO, J. KUSHNER, T. MILDE, R. ST CLAIR, M. BALJEVIC, I. WHITE, D. K. JIN, A. CHADBURN, A. J. MURPHY, D. M. VALENZUELA, N. W. GALE, G. THURSTON, G. D. YANCOPOULOS, M. D'ANGELICA, N. KEMENY, D. LYDEN et S. RAFII. 2008, «CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors», *J Clin Invest*, vol. 118, n° 6, doi :10.1172/JCI34401, p. 2111–2120, ISSN 0021-9738. [128](#)
- SIEBEL, C. et U. LENDAHL. 2017, «Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease», *Physiological Reviews*, vol. 97, n° 4, doi :10.1152/physrev.00005.2017, p. 1235–1294, ISSN 0031-9333, 1522-1210. [121](#)
- SPEHALSKI, E. I., J. A. LEE, C. PETERS, P. TOFILON et K. CAMPHAUSEN. 2019, «The Quiescent Metabolic Phenotype of Glioma Stem Cells», *J Proteomics Bioinform*, vol. 12, n° 6, doi :10.35248/0974-276x.19.12.502, p. 96–103, ISSN 0974-276X. [122](#)
- THOMAS, R. P., L. RECHT et S. NAGPAL. 2012, «Advances in the management of glioblastoma : The role of temozolomide and MGMT testing», *Clin Pharmacol*, vol. 5, doi :10.2147/CPAA.S26586, p. 1–9, ISSN 1179-1438. [92](#)
- VAN ROSSUM, G. et F. L. DRAKE. 2009, *Python 3 Reference Manual.*, CreateSpace, Scotts Valley, CA, ISBN 1-4414-1269-7. [68](#)
- WU, H., H. ZHANG, Y. HU, Q. XIA, C. LIU, Y. LI, B. YU, T. GU, X. ZHANG, X. YU et W. KONG. 2014, «Sphere formation assay is not an effective method for cancer stem cell derivation and characterization from the Caco-2 colorectal cell line», *Curr Stem Cell Res Ther*, vol. 9, n° 2, doi : 10.2174/1574888x09666131217114927, p. 82–88, ISSN 2212-3946. [128](#)
- XIE, X. P., D. R. LAKS, D. SUN, M. GANBOLD, Z. WANG, A. M. PEDRAZA, T. BALE, V. TABAR, C. BRENNAN, X. ZHOU et L. F. PARADA. 2022, «Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy», *Developmental Cell*, vol. 57, n° 1, doi :10.1016/j.devcel.2021.12.007, p. 32–46.e8, ISSN 1534-5807. [122](#), [124](#)
- XU, L., W. LIN, L. WEN et G. LI. 2019, «Lgr5 in cancer biology : Functional identification of Lgr5 in cancer progression and potential opportunities for novel therapy», *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 10, n° 1, doi :10.1186/s13287-019-1288-8, p. 219, ISSN 1757-6512. [128](#)

- XU, R., F. SHIMIZU, K. HOVINGA, K. BEAL, S. KARIMI, L. DROMS, K. K. PECK, P. GUTIN, J. B. IORGULESCU, T. KALEY, L. DEANGELIS, E. PENTSOVA, C. NOLAN, C. GROMMES, T. CHAN, D. BOBROW, A. HORMIGO, J. R. CROSS, N. WU, N. TAKEBE, K. PANAGEAS, P. IVY, J. G. SUPKO, V. TABAR et A. OMURO. 2016, «Molecular and Clinical Effects of Notch Inhibition in Glioma Patients : A Phase 0/I Trial», *Clin Cancer Res*, vol. 22, n° 19, doi :10.1158/1078-0432.CCR-16-0048, p. 4786–4796, ISSN 1557-3265. [122](#)
- YAHYANEJAD, S., H. KING, V. S. IGLESIAS, P. V. GRANTON, L. M. O. BARBEAU, S. J. VAN HOOFF, A. J. GROOT, R. HABETS, J. PRICKAERTS, A. J. CHALMERS, D. B. P. EEKERS, J. THEYS, S. C. SHORT, F. VERHAEGEN et M. VOOIJS. 2016, «NOTCH blockade combined with radiation therapy and temozolomide prolongs survival of orthotopic glioblastoma», *Oncotarget*, vol. 7, n° 27, doi : 10.18632/oncotarget.9275, p. 41 251–41 264, ISSN 1949-2553. [119](#), [121](#)
- YANG, W.-B., C.-C. HSU, T.-I. HSU, J.-P. LIOU, K.-Y. CHANG, P.-Y. CHEN, J.-J. LIU, S.-T. YANG, J.-Y. WANG, S.-H. YEH, R.-M. CHEN, W.-C. CHANG et J.-Y. CHUANG. 2020, «Increased activation of HDAC1/2/6 and Sp1 underlies therapeutic resistance and tumor growth in glioblastoma», *Neuro Oncol*, vol. 22, n° 10, doi :10.1093/neuonc/noaa103, p. 1439–1451, ISSN 1523-5866. [124](#)
- ZHANG, C., E. MARTINEZ-LEDESMA, F. GAO, W. ZHANG, J. DING, S. WU, X. LI, J. WU, Y. YUAN, D. KOUL et W. K. ALFRED YUNG. 2019, «Wild-type TP53 defined gamma-secretase inhibitor sensitivity and synergistic activity with doxorubicin in GSCs», *Am J Cancer Res*, vol. 9, n° 8, p. 1734–1745, ISSN 2156-6976. [119](#), [122](#)
- ZHAO, H., C. YAN, Y. HU, L. MU, K. HUANG, Q. LI, X. LI, D. TAO et J. QIN. 2019, «Sphere-forming assay vs. organoid culture : Determining long-term stemness and the chemoresistant capacity of primary colorectal cancer cells», *Int J Oncol*, vol. 54, n° 3, doi :10.3892/ijo.2019.4683, p. 893–904, ISSN 1019-6439. [128](#)

# Chapitre 4

## Discussion

*« Hâtez-vous lentement; et, sans  
perdre courage,  
Vingt fois sur le métier remettez  
votre ouvrage :  
Polissez-le sans cesse et le  
repolissez;  
Ajoutez quelquefois, et souvent  
effacez. »*

---

Nicolas BOILEAU, *L'art poétique*

### Sommaire

---

<b>4.1 Une plateforme fiable pour l'étude des cellules souches cancéreuses</b>	<b>136</b>
4.1.1 Identification fonctionnelle des cellules souches de glioblastome	136
4.1.1.1 De la standardisation du test de formation de neurosphères...	136
4.1.1.2 ... à la prédiction de statut souche	136
4.1.2 Étude de la variabilité intrinsèque du modèle biologique	137
4.1.2.1 L'hétérogénéité révélée par les conditions de culture cellulaire	137
4.1.2.2 La dédifférenciation plutôt que la prolifération?	137
<b>4.2 Perspectives et améliorations possibles de la plateforme</b>	<b>138</b>
4.2.1 Simplifier notre plateforme pour en faciliter l'usage	138
4.2.1.1 Une plateforme encore compliquée à utiliser	138
4.2.1.2 Le potentiel théranostique de notre plateforme	139
4.2.2 Établir la signature transcriptomique des cellules de glioblastomes	139
4.2.2.1 Combiner le micro-pipetteur à la plateforme	139
4.2.2.2 Séquençage après réduction de l'hétérogénéité	140
4.2.3 Puissance et limites de l'intelligence artificielle	141
4.2.3.1 La complexité du phénotypage automatisé	141
4.2.3.2 Les limites de l'intelligence artificielle	141
4.2.3.3 La convolution temporelle : une piste pour détecter au plus tôt les cellules souches?	142
<b>4.3 Références</b>	<b>142</b>

---

## 4.1 Une plateforme fiable pour l'étude des cellules souches cancéreuses

### 4.1.1 Identification fonctionnelle des cellules souches de glioblastome

#### 4.1.1.1 De la standardisation du test de formation de neurosphères...

Le test de formation de NS est un moyen rapide et facile à mettre en œuvre pour tester les propriétés souches des cellules. Cependant, l'homogénéité clonale des NS formées doit être garantie pour affirmer le statut de cellule souche JORDAN [2009]. Malheureusement, le test de formation de NS a été pendant longtemps réalisé sans contrôler l'agrégation des cellules entre elles PASTRANA et collab. [2011]. De nombreuses étapes ont été nécessaires pour que l'homogénéité clonale soit assurée par notre puce microfluidique. La conception d'un mur autour de la puce pour diminuer les flux de milieu et protéger les cellules dans leurs micro-puits, puis la fabrication du bouchon d'agarose pour limiter la sédimentation tardive ont constitué des étapes importantes du développement de la puce. Ces améliorations itératives assurent l'isolement des cellules dans leurs micro-puits tout en permettant des conditions de culture semblables à celles en boîtes classiques. L'ensemencement des micro-puits a également nécessité de réaliser des gammes de densités d'ensemencement et de temps de sédimentation. Nous avons mis en évidence dans notre système que la densité de 4000 cellules/cm<sup>2</sup> permet de maximiser le nombre de micro-puits contenant une seule cellule. Enfin, nous avons déterminé le temps optimal de culture pour former des NS au sein de la puce. Ce travail de conception, d'optimisation et de validation nous a permis d'aboutir à un processus pré-analytique standardisé et reproductible.

Depuis plusieurs années, on constate tout de même que des études ont proposé des moyens innovants pour tester la formation de NS. On pourra citer notamment la puce de micro-fluidique de PANG et collab. [2019b] dans laquelle les auteurs piègent les CSG dans des chambres et les laissent former des NS. De façon cohérente avec leurs résultats nous observons qu'une densité de cellule moyenne permet un meilleur taux d'occupation des micro-puits par une cellule unique par rapport à des densités plus importantes. D'autre part, la durée de 10 jours au bout de laquelle les NS sont détectées est similaire à la durée de notre étude (14 jours). De plus, lorsque les NS ont suffisamment de place pour grossir, le taux de formation de NS dans leur puce avoisine celui obtenu avec notre puce (entre 10 et 20%). Notre puce présente néanmoins deux avantages sur la leur : 1) le PDMS dont est constituée la puce de PANG et collab. [2019b] a été montré comme absorbant les drogues diluées dans les milieux de culture VAN MEER et collab. [2017] ce qui limite son utilisation pour le criblage de drogues et 2) notre modèle de puce rend possible le micro-pipettage des cellules dans leur micro-puits.

#### 4.1.1.2 ... à la prédiction de statut souche

Nous sommes parvenus à déterminer *a posteriori* la proportion de CSG au sein de nos lignées cellulaires. Grâce à notre plateforme, il nous a également été possible de connaître le phénotype précoce des cellules, puis de corrélérer ce phénotype précoce au phénotype tardif. Autrement dit, est-il possible de prédire si une cellule est souche à partir de son comportement après quelques heures d'expérience seulement et sans à avoir à attendre deux semaines? Nous montrons qu'il existe une corrélation statistiquement significative entre la division survenant au cours des quatre-vingt-seize premières heures et la formation de NS (test du khi carré,  $p < 0,05$ ). Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude de CHEN et collab. [2020]. Les auteurs ont un système de micro-fabriqué dans lequel ils enferment des cellules souches fluorescentes. Leur objectif est de corrélérer la taille des cellules au cours des premiers jours de l'expérience avec la formation de TS après 2 semaines de culture. CHEN et collab. [2020] montrent que plus les cellules se sont divisées au cours des 4 premiers jours et plus la probabilité de former une TS est importante. Ainsi, comme pour notre étude, la division précoce et les propriétés souches semblent associées.

Nos résultats suggèrent aussi que la corrélation entre division précoce et formation de NS est forte. Ainsi, en présence de drogues ciblant soit la réplication de l'ADN, soit plus particulièrement les voies de signalisation impliquées dans les propriétés souches, la corrélation entre division précoce et formation de NS persiste – au moins jusqu'à une certaine dose. Si le constat de cette corrélation semble trivial (pour former une NS il faut bien proliférer), il nous permet d'envisager la détection des CSG au bout de quelques jours en se fondant sur une approche fonctionnelle et sans utiliser des marqueurs moléculaires. Il serait également intéressant d'étudier la variation de cette corrélation si le seuil de taille de détection des NS était relevé. En effet, il semble logique de penser que plus une cellule s'est divisée tôt et plus elle a le temps de proliférer pour donner une NS. Sauf que cette hypothèse omet le caractère hétérogène et plastique des CSG. Grâce aux informations dynamiques et quantitatives que nous avons pu obtenir avec notre plateforme, nous avons justement été en mesure de mieux caractériser ces propriétés biologiques du modèle des CSG.

#### 4.1.2 Étude de la variabilité intrinsèque du modèle biologique

##### 4.1.2.1 L'hétérogénéité révélée par les conditions de culture cellulaire

Comme nous l'avons déjà évoqué en introduction 1.3, les CSG constituent un modèle biologique très hétérogène. Nous en avons eu la confirmation de part l'hétérogénéité morphologique intra-lignée et inter-lignée qui s'est traduit par la nécessité de développer des algorithmes d'analyse d'images complexes 3.1.5. L'hétérogénéité clonale entre les sous-populations de CSG quant à elle est probablement illustrée par les écart-types qui peuvent parfois être importants entre nos expériences reproduites. Ces différences peuvent être expliquées par l'utilisation d'un lot de cellules différent, qui ont ensuite dérivées au cours des passages successifs, mais également par les conditions de culture légèrement différentes (milieux et suppléments issus de plusieurs lots).

L'effet du TMZ sur les CSG n'est pas tranché lui non plus. On rappelle que le TMZ est un agent alkylant qui agit sur lors de la réplication de l'ADN. Il va donc avoir un effet indifféremment sur les cellules cancéreuses différenciées et souches. Si nos résultats montrant que le TMZ diminue le taux de formation de NS sont cohérents avec des études déjà publiées [BEIER et collab. \[2008\]](#), d'autres articles montrent l'inverse [GAO et collab. \[2021\]](#). Il est possible que ces différences de résultats soient liées à l'hétérogénéité hiérarchique entre les cellules de GBM. En effet, plusieurs études montrent que les CSG résistent mieux au TMZ que les cellules déjà engagées dans la différenciation [BAO et collab. \[2006\]](#). Dans notre cas, il est possible que le TMZ induise la mort cellulaire de cellules différenciées, mais qui en condition contrôle auraient eu la possibilité de se dédifférencier et donc de former une NS. On peut donc faire l'hypothèse que les cellules qui ont formé des NS en présence de TMZ sont les cellules qui possédaient déjà les propriétés souches au début de l'expérience.

##### 4.1.2.2 La dédifférenciation plutôt que la prolifération?

La notion de dédifférenciation amène le problème de la plasticité. De façon surprenante, nous montrons dans l'article 3.3.3 qu'environ la moitié des NS provient de cellules ne s'étant pas divisées au cours de la vidéo-microscopie. Avant toute chose, il convient de discuter de la détection, aussi bien des divisions que des NS, n'est pas parfaite. Il est donc possible que nous manquions quelques divisions (environ 20%) et que nous détectons comme NS des agrégats trop petits (environ 10%). Malgré cela, il reste un nombre conséquent de cellules qui ne se sont pas divisées mais qui sont capables de former une NS. Une première hypothèse serait que certaines de ces cellules se divisent après la phase de vidéo-microscopie, notamment suite à l'ajout de milieu frais. Pour compléter cette hypothèse, on peut également supposer que ces cellules se dédifférencient au cours de l'expérience et donc aboutissent à la formation d'une NS au bout de 14 jours. Le taux

de formation de NS au cours du temps pourrait servir de point de départ pour étayer cette hypothèse car on voit bien qu'après 7 jours, seulement 20% des NS détectables à 2 semaines sont déjà formées. Un moyen de tester cette hypothèse serait d'extraire la taille des NS formées au cours du temps. Ainsi, peut-être que les NS issues de cellules qui se sont divisées lors des 4 premiers jours forment des NS plus grosses, tandis que les cellules qui se sont divisées après la vidéomicroscopie donnent des NS plus petites.

Cependant, la prolifération cellulaire n'est pas l'unique témoin des propriétés souches et de l'agressivité du GBM. [STOCKSLAGER et collab. \[2021\]](#) montrent dans leur article que l'augmentation du volume cellulaire, lorsque les cellules de GBM sont exposées à du TMZ, est en faveur d'une sensibilité accrue au TMZ et à une meilleure survie. Or on sait que l'augmentation du volume cellulaire est associée à l'avancée dans le cycle cellulaire [CADART et collab. \[2017\]](#). On peut donc faire l'hypothèse que ce n'est pas directement la prolifération des cellules cancéreuses différenciées qui est responsable de l'agressivité du GBM, mais bien l'existence d'un contingent tumoral souche qui alimente des sous-populations tumorales plus différenciées. Cette décorellation entre prolifération et propriétés souches est justement illustrée par nos résultats avec le RO49 3.3.4. De part le fonctionnement de la voie de signalisation de NOTCH, le RO49 n'a aucune action du moment que les cellules restent seules. Notre expérience montre en effet que le RO49 n'a pas d'effet sur le taux de divisions et de morts des cellules uniques. En revanche, la voie de signalisation de NOTCH semble bien inhibée car nos résultats montrent une diminution de la capacité à former des NS. Ainsi, la corrélation que nous montrons entre survenue d'une division précoce et formation de NS pourrait témoigner de cette capacité des CSG à produire des sous-populations de cellules cancéreuses plus différenciées.

Au total, nos résultats permettent de rendre compte de l'hétérogénéité et de la plasticité du modèle des CSG. Beaucoup de travail reste encore à prévoir pour pouvoir disséquer plus finement les mécanismes biologiques impliqués dans le maintien ou la perte des propriétés souches. Néanmoins, notre puce permet d'identifier fonctionnellement les CSC de façon standardisée, automatique et reproductible. De plus, elle permet d'avoir accès à des informations dynamiques et non en point final. Ces données nous ont permis d'établir une corrélation entre la survenue d'une division précoce et la possession des propriétés souches. Ces résultats permettent de nous projeter vers d'autres développements et applications de la plateforme.

## 4.2 Perspectives et améliorations possibles de la plateforme

### 4.2.1 Simplifier notre plateforme pour en faciliter l'usage

#### 4.2.1.1 Une plateforme encore compliquée à utiliser

Si utiliser notre plateforme pour la formation de NS présente des avantages par rapport aux méthodes déjà existantes, notre système expérimental nécessite encore des améliorations matérielles. La fabrication des puces requiert un important nombre de manipulations, chacune avec son lot d'aléas (lamelles de verre brisées, oxydation du silane, contamination...) et prenant beaucoup de temps. Nous sommes actuellement en train de développer un modèle de puce qui se place directement au fond de la boîte de culture, de façon à pouvoir se passer de la lamelle de verre silanisée [BRANDENBERG et collab. \[2020\]](#). On peut également envisager de remplacer l'étape de manipulation du bouchon d'agarose en versant de l'agarose à point de fusion bas au dessus des puces. Enfin, l'ensemencement de la puce est également une étape délicate car il faut s'assurer que les cellules sont bien dissociées. Un simple contrôle microscopique avant l'ensemencement est rapide mais nécessaire afin d'optimiser le nombre de micro-puits avec une seule cellule.

La phase de vidéo-microscopie demande ensuite une grande rigueur. Tous les éléments garantissant des conditions de culture adaptées doivent fonctionner (température, humidité et

pression partielle en dioxyde de carbone). La phase d'acquisition des images dépend de plusieurs logiciels (micro-manager et les programmes codés en langage Python) et nécessite un interfaçage adapté entre eux. Malgré ces précautions, les bogues restent fréquents et impliquent une surveillance très régulière du microscope au cas où l'acquisition soit stoppée. Enfin, la cadence d'acquisition est limitée par la vitesse de déplacement de la platine. Même si la cadence optimale pour le phénotypage précoce est encore à déterminer, une augmentation du nombre d'échantillons risque d'entraîner un délai plus important entre les acquisitions et donc de ralentir la cadence de la vidéo-microscopie.

Surmonter ces problèmes techniques et logistiques s'avèrera vraisemblablement rentable car nous avons montré que notre plateforme peut servir pour de nombreuses applications. Nous avons montré dans le paragraphe 3.5.2.2 que la plateforme pouvait être utilisée pour étudier les propriétés souches de lignées cellulaires autre que les CSG. Dans notre article 3.3.3 ainsi que le paragraphe 3.5.2.2, nous montrons que notre plateforme peut servir au criblage de drogues. Cependant, la programmation de la plateforme a été effectuée en langage Python. Il faudra donc rendre l'interfaçage plus pratique si son utilisation se démocratise aux chercheur.euse.s moins habitué.e.s au code.

#### 4.2.1.2 Le potentiel théranostique de notre plateforme

La standardisation, l'accessibilité économique et la parallélisation de notre plateforme permet d'envisager une application clinique de notre plateforme. Par exemple, nous avons interrogé le statut méthylé du promoteur du gène *MGMT* sur l'auto-renouvellement des CSG, notamment en présence de TMZ. Les méthodes de pyroséquençage utilisés en routine clinique montrent que la lignée N15 est théoriquement plus sensible au TMZ que la lignée N14. Or, nous montrons que le taux de formation de NS dans la lignée N14 est plus impacté par le TMZ que dans la lignée N15. Ces résultats sont d'apparence paradoxale et suggèrent plusieurs choses. Il est possible que le statut méthylé du promoteur du gène de *MGMT* n'ait pas les mêmes conséquences selon que la cellule cancéreuse est souche ou différenciée. D'autre part, ces résultats corroborent certaines études qui remettent en cause le caractère prédictif du statut méthylé du promoteur de *MGMT* sur la réponse au TMZ [EGAÑA et collab. \[2020\]](#). Il est également envisageable de concevoir la plateforme comme un test fonctionnel thérapeutique complémentaire à la recherche de la méthylation du promoteur du gène *MGMT* [STOCKSLAGER et collab. \[2021\]](#).

Notre plateforme arrive également au moment de l'ère post-génomique [HUNTSMAN et LADANYI \[2018\]](#). Ce terme regroupe l'ensemble des travaux qui étudient les corrélations génotype-phénotype. En effet, les dernières méthodes de séquençage toujours plus précises mettent au jour de plus en plus de mutations dont la traduction clinique n'est pas toujours évidente [JANIN et collab. \[2021\]](#). Notre plateforme pourrait donc être utilisée en pratique clinique pour étudier les conséquences phénotypiques d'une mutation ou d'un allèle, notamment en condition de criblage de drogues.

### 4.2.2 Établir la signature transcriptomique des cellules de glioblastomes

#### 4.2.2.1 Combiner le micro-pipetteur à la plateforme

L'objectif à long terme de notre étude est de pouvoir spécifiquement prélever les cellules qui ont une probabilité accrue de former une NS afin d'en établir la signature transcriptomique par séquençage d'ARN en cellules uniques. Pour ce faire, nous avons montré dans l'article 3.3.3 que les cellules qui se divisent lors des 4 premiers jours de l'expérience ont une probabilité plus grande de former une NS au bout de 14 jours que les cellules qui ne se divisent pas. D'autre part, nous avons développé un micro-pipetteur pour prélever des cellules dans les micro-puits. La prochaine étape

de notre travail est donc de micro-pipetter les cellules qui se sont divisées au bout des 4 jours de vidéo-microscopie. Plusieurs défis technologiques ont déjà été identifiés :

- Analyse d’image en temps réel : l’analyse d’images de la vidéo-microscopie telle qu’elle est actuellement réalisée ne prend qu’entre 1 et 2 heures. Elle est néanmoins réalisée après la fin de l’expérience de vidéo-microscopie. La prochaine étape serait donc de pouvoir réaliser l’analyse d’image de la vidéo-microscopie en temps réel. S’il n’y a pas besoin d’entraîner un nouveau réseau de neurones convolutifs pour l’analyse en temps réel (les neurones continueront à classifier des images), il faudra revoir la façon dont sont importées les images dans le réseau de neurones convolutifs après chaque intervalle d’acquisition.
- Coordonner le micro-pipetteur et la platine du microscope : les déplacements planaires peuvent être effectués par la platine du microscope, tandis que le déplacement vertical du micro-pipetteur est assuré par son propre système motorisé. L’étalonnage du système sera donc nécessaire pour que le capillaire soit positionné au dessus du bon micro-puits et qu’il descende à la bonne profondeur pour aspirer la cellule et ne pas se briser sur le fond de la boîte de culture. Là encore, cette étape demandera de la programmation mais ne devrait pas poser de problème insurmontable.
- S’assurer de la restitution et de la viabilité des cellules micro-pipetées : les étapes d’aspiration et de restitution des cellules risquent d’être relativement compliquées. Le stress mécanique auquel seront soumises les cellules risque d’altérer la viabilité et le contenu en ARN des cellules. Heureusement, des dispositifs commerciaux similaires à notre plateforme montrent que le séquençage d’ARN en cellules uniques est possible après micro-pipettage [NGARA et collab. \[2018\]](#).

#### 4.2.2.2 Séquençage après réduction de l’hétérogénéité

Une fois les cellules d’intérêt micro-pipetées, notre objectif est d’en établir la signature transcriptomique. Nos collaborateurs de l’équipe du Dr Olivier GANDRILLON (ENS Lyon) ont développé la méthode de séquençage d’ARN en cellules uniques MARSeq. Cette méthode a été optimisée pour séquencer l’ARN des cellules isolées après tri cellulaire. Brièvement, les amorces sont constituées par 20 thymines (afin de se lier aux queues poly-adénines des ARN messagers), d’un code barre spécifique de la cellule et d’une séquence aléatoire de 8 paires de base (générant ainsi plus de 65000 combinaisons différentes afin de statistiquement pouvoir lier l’ensemble des ARN messagers présents dans la cellule). Les échantillons sont ensuite regroupés, rétro-transcrits, amplifiés et enfin séquencés. Ainsi, pour chaque cellule on peut savoir quel ARN messenger est présent et quelle est sa quantité. L’une des principales limitations de cette méthode est qu’elle ne permet que le séquençage de l’extrémité 3’UTR des ARN messagers et donc limite le séquençage des variants d’épissages [HRDLICKOVA et collab. \[2017\]](#). Comme le MARSeq a été optimisé pour séquencer des cellules triées par cytométrie en flux dans des plaques 96 puits, nous pourrions envisager de restituer les cellules micro-pipetées dans des puits d’une plaque 96 puits. Chaque puits contiendrait du tempon de lyse ainsi qu’un code barre spécifique du puits et donc de la cellule. Il nous serait ainsi possible de comparer la signature transcriptomique des cellules selon leur phénotypes, notamment les cellules prédites comme souches *versus* les cellules prédites comme non-souches.

Outre le défi technologique, il n’est pas encore très clair si la signature transcriptomique des CSG sera homogène ou hétérogène. Si les quelques études déjà publiées s’accordent sur le fait que les signatures transcriptomiques des CSG issues d’une même lignée semblent similaires, les signatures transcriptomiques entre les CSG provenant de différentes lignées ont été décrites comme homogènes [DIRKSE et collab. \[2019\]](#); [PANG et collab. \[2019a\]](#) ou hétérogènes [ZHAO et collab. \[2019\]](#). Outre que ces résultats sont encore récents et doivent être reproduits, ils se fondent sur l’identification des CSG avec des marqueurs moléculaires et non pas avec un test fonctionnel. Notre étude pourrait donc permettre à moyen terme d’établir la signature des cellules fonctionnellement identifiées comme souches.

### 4.2.3 Puissance et limites de l'intelligence artificielle

#### 4.2.3.1 La complexité du phénotypage automatisé

L'analyse d'images issues de notre plateforme s'est avérée être un important défi technologique. La quantité de données générées empêche tout d'abord une analyse humaine et nécessite donc le développement d'algorithmes d'analyse d'images automatisés. Deuxièmement, ces images sont le siège d'une grande variabilité 1) de contrastes, liés aux conditions d'imagerie et de fabrication de la puce, et 2) de formes, liées à la variabilité intrinsèque du modèle biologique. Or notre problème de classification repose sur la distinction de paramètres qui varient assez peu entre les différentes classes (forme, taille, intensité...). On se retrouve donc avec un problème complexe où la variabilité des images est importante et la distinction entre les classes est difficile. Cette complexité est démontrée dans notre article 3.1.5 car il a nécessité le développement d'un algorithme de deep learning (précision de 91,2%). Nous montrons que des algorithmes plus simples et des réseaux de neurones pré-entraînés sur des images comportant plus de paramètres ne permettent pas une meilleure classification. Ensuite, il nous a fallu trouver un moyen pour analyser les films de micro-puits générés par la vidéo-microscopie. L'analyse des films est nécessaire pour détecter le phénotype précoce des cellules : division, mort cellulaire ou aucun des deux. Nous avons opté pour un arbre décisionnel en aval de la classification par le réseau de neurones. Ce processus d'analyse d'images s'est avéré robuste car nous l'avons testé pour différentes lignées cellulaires et pour plusieurs grossissements. Enfin, nous montrons qu'un réseau de neurones convolutifs optimisé permet d'arriver à une classification au moins aussi précise que des réseaux de neurones pré-entraînés et pour un temps de calcul plus faible. De plus, l'analyse temporelle et au niveau de la cellule unique constitue une innovation par rapports aux algorithmes déjà publiés et destinés aux phénotypage des cellules [GRECA et collab. \[2021\]](#); [VERDUIJN et collab. \[2021\]](#); [WAISMAN et collab. \[2019\]](#).

#### 4.2.3.2 Les limites de l'intelligence artificielle

Bien que déjà discutées dans notre premier article 3.1.5, revenons sur les limites du premier réseau de neurones convolutifs. Ayant été le seul à concevoir les bases de données, celles-ci souffrent de l'appréciation subjective des images par un seul individu. L'entraînement des réseaux de neurones se fait vraisemblablement à partir d'une base d'images biaisée. La performance égale du réseau de transfer learning VGG16 par rapport à notre propre réseau de neurones convolutifs peut rendre compte de ce biais. Une façon simple, bien que chronophage, serait que d'autres personnes corrigent ou complètent ces bases de données avec de nouvelles images. Le contrôle des bases de données et des paramètres analysés par le réseau de neurones convolutifs sera également très important pour s'assurer de la fiabilité des prédictions [ANAYA-ISAZA et collab. \[2021\]](#). Cette précaution sera d'autant plus importante si des cellules de types très différents des CSG devaient être analysées, notamment en pratique clinique. Un autre biais lié à l'annotation est plus spécifique au second réseau de neurones que nous avons développé (celui chargé de détecter les NS). Nous avons considéré qu'une NS devait mesurer au moins 15 micromètres de rayon. Ce seuil de taille est arbitraire et correspond à la taille d'un agglomérat de 4 cellules de la lignée N14. L'algorithme classe donc comme "NS" un agrégat dont le rayon est supérieur à 15 micromètres. Il est donc possible que nous sous-estimions le taux de CSG (peut-être que des CSG ont formé des agrégats plus petits) ou bien que nous le sur-estimions (si on considère les NS à partir d'une taille plus importante). Cette donnée est importante à prendre en compte pour l'analyse des résultats car elle pourrait modifier les conclusions que nous avons tirées de notre article 3.3.3 comme nous le discutons dans le paragraphe 4.1.2.

### 4.2.3.3 La convolution temporelle : une piste pour détecter au plus tôt les cellules souches ?

Le réseau de neurones convolutifs que nous avons développé dans l'article 3.1.5 analyse des images bidimensionnelles. Le réseau de neurones n'analyse donc pas la dimension temporelle des vidéos. Afin d'inclure la notion de temporalité, nous avons développé un arbre décisionnel en aval de l'analyse des images. La prise en compte du temps se fait donc dans l'évolution de la classification de chacune des images de la vidéo, les événements d'intérêt n'étant détectés qu'avec des boucles *if*. Mais en finalité, notre réseau de neurones convolutifs n'a pas de paramètre temporel pour analyser les vidéos. Une façon élégante et intéressante d'analyser les vidéos serait de développer un algorithme de réseau de neurones pour classifier non pas des images, mais des vidéos [LIAO et collab. \[2021\]](#); [MA et collab. \[2020\]](#). Le réseau de neurones convolutifs n'explorerait plus seulement les paramètres bidimensionnels des images, mais également ses paramètres temporels. Enfin, la convolution tridimensionnelle permettrait d'aborder le problème de classification des vidéos non plus seulement pour trouver les cellules qui se divisent ou meurent, mais de classifier les vidéos entre les cellules uniques qui donnent une NS et les autres. Il serait ainsi possible de prédire quelles cellules sont souches après quelques jours de vidéo-microscopie sans avoir besoin d'attendre 2 semaines que les NS se soient formées. Bien que stimulant, ce projet se heurte à des écueils plus ou moins importants. Tout d'abord, la programmation d'un réseau de neurones prenant en compte la convolution temporelle est plus compliquée que la convolution bidimensionnelle. De plus, un réseau de neurones convolutifs analysant des vidéos implique de constituer un jeu d'entraînement composé de vidéos... Il nous serait donc nécessaire d'annoter des centaines (milliers ?) de vidéos. Enfin, la capacité calculatoire requise pour analyser les vidéos serait probablement beaucoup plus importante que pour analyser seulement des images. Une durée d'analyse trop longue nuirait à l'analyse réalisée actuellement à la volée, voire à notre objectif d'analyse en temps réel afin de micro-pipetter les cellules d'intérêt directement à la fin des quatre jours de vidéo-microscopie.

Aussi complexes que soient ces défis au carrefour de l'ingénierie, de l'informatique, de la physique et de la biologie, les relever permettrait à notre plateforme d'être utilisée en routine afin de produire des résultats quantitatifs, reproductibles et à haut-débit, pour faire face aussi bien à des problématiques de recherche fondamentale qu'à celles posées par la pratique clinique.

## 4.3 Références

- ANAYA-ISAZA, A., L. MERA-JIMÉNEZ et M. ZEQUERA-DIAZ. 2021, «An overview of deep learning in medical imaging», *Informatics in Medicine Unlocked*, vol. 26, doi :10.1016/j.imu.2021.100723, p. 100 723, ISSN 2352-9148. [141](#)
- BAO, S., Q. WU, R. E. MCLENDON, Y. HAO, Q. SHI, A. B. HJELMELAND, M. W. DEWHIRST, D. D. BIGNER et J. N. RICH. 2006, «Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response», *Nature*, vol. 444, n° 7120, doi :10.1038/nature05236, p. 756–760, ISSN 0028-0836, 1476-4687. [137](#)
- BEIER, D., S. RÖHRL, D. R. PILLAI, S. SCHWARZ, L. A. KUNZ-SCHUGHART, P. LEUKEL, M. PROESCHOLDT, A. BRAWANSKI, U. BOGDAHN, A. TRAMPE-KIESLICH, B. GIEBEL, J. WISCHHUSEN, G. REIFENBERGER, P. HAU et C. P. BEIER. 2008, «Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma», *Cancer Res*, vol. 68, n° 14, doi :10.1158/0008-5472.CAN-07-6878, p. 5706–5715, ISSN 0008-5472, 1538-7445. [137](#)
- BRANDENBERG, N., S. HOEHNEL, F. KUTTLER, K. HOMICKO, C. CERONI, T. RINGEL, N. GJOREVSKI, G. SCHWANK, G. COUKOS, G. TURCATTI et M. P. LUTOLF. 2020, «High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays», *Nature Biomedical Engineering*, vol. 4, n° 9, doi :10.1038/s41551-020-0565-2, p. 863–874, ISSN 2157-846X. [138](#)

- CADART, C., E. ZLOTEK-ZLOTKIEWICZ, L. VENKOVA, O. THOUVENIN, V. RACINE, M. LE BERRE, S. MONNIER et M. PIEL. 2017, «Chapter 6 - Fluorescence eXclusion Measurement of volume in live cells», dans *Methods in Cell Biology, Cell Polarity and Morphogenesis*, vol. 139, édité par T. Lecuit, Academic Press, p. 103–120, doi :10.1016/bs.mcb.2016.11.009. [138](#)
- CHEN, Y.-C., Z. ZHANG et E. YOON. 2020, «Early Prediction of Single-Cell Derived Sphere Formation Rate Using Convolutional Neural Network Image Analysis», *Anal Chem*, vol. 92, n° 11, doi :10.1021/acs.analchem.0c00710, p. 7717–7724, ISSN 1520-6882. [136](#)
- DIRKSE, A., A. GOLEBIEWSKA, T. BUDER, P. V. NAZAROV, A. MULLER, S. POOVATHINGAL, N. H. C. BRONS, S. LEITE, N. SAUVAGEOT, D. SARKISJAN, M. SEYFRID, S. FRITAH, D. STIEBER, A. MICHELUCCI, F. HERTEL, C. HEROLD-MENDE, F. AZUAJE, A. SKUPIN, R. BJERKVIG, A. DEUTSCH, A. VOSS-BÖHME et S. P. NICLOU. 2019, «Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment», *Nat Commun*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41467-019-09853-z, p. 1787, ISSN 2041-1723. [140](#)
- EGAÑA, L., J. AUZMENDI-IRIARTE, J. ANDERMATTEN, J. VILLANUA, I. RUIZ, A. ELUA-PININ, P. ALDAZ, A. QUEREJETA, C. SARASQUETA, F. ZUBIA, A. MATHEU et N. SAMPRÓN. 2020, «Methylation of MGMT promoter does not predict response to temozolomide in patients with glioblastoma in Donostia Hospital», *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, doi :10.1038/s41598-020-75477-9, p. 18 445, ISSN 2045-2322. [139](#)
- GAO, X.-Y., J. ZANG, M.-H. ZHENG, Y.-F. ZHANG, K.-Y. YUE, X.-L. CAO, Y. CAO, X.-X. LI, H. HAN, X.-F. JIANG et L. LIANG. 2021, «Temozolomide Treatment Induces HMGB1 to Promote the Formation of Glioma Stem Cells via the TLR2/NEAT1/Wnt Pathway in Glioblastoma», *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, doi :10.3389/fcell.2021.620883, p. 620 883, ISSN 2296-634X. [137](#)
- GRECA, A. D. L., N. PÉREZ, S. CASTAÑEDA, P. M. MILONE, M. A. SCARAFÍA, A. M. MÖBBS, A. WAISMAN, L. N. MORO, G. E. SEVLEVER, C. D. LUZZANI et S. G. MIRIUKA. 2021, «Celldeath : A tool for detection of cell death in transmitted light microscopy images by deep learning-based visual recognition», *PLOS ONE*, vol. 16, n° 6, doi :10.1371/journal.pone.0253666, p. e0253 666, ISSN 1932-6203. [141](#)
- HRDLICKOVA, R., M. TOLOUE et B. TIAN. 2017, «RNA-Seq methods for transcriptome analysis», *Wiley Interdiscip Rev RNA*, vol. 8, n° 1, doi :10.1002/wrna.1364, ISSN 1757-7012. [140](#)
- HUNTSMAN, D. G. et M. LADANYI. 2018, «The molecular pathology of cancer : From pan-genomics to post-genomics», *The Journal of Pathology*, vol. 244, n° 5, doi :10.1002/path.5057, p. 509–511, ISSN 1096-9896. [139](#)
- JANIN, A., L. JANUEL, C. CAZENEUVE, A. DELINIÈRE, P. CHEVALIER et G. MILLAT. 2021, «Molecular Diagnosis of Inherited Cardiac Diseases in the Era of Next-Generation Sequencing : A Single Center's Experience Over 5 Years», *Mol Diagn Ther*, vol. 25, n° 3, doi :10.1007/s40291-021-00530-w, p. 373–385, ISSN 1179-2000. [139](#)
- JORDAN, C. T. 2009, «Cancer Stem Cells : Controversial or Just Misunderstood?», *Cell Stem Cell*, vol. 4, n° 3, doi :10.1016/j.stem.2009.02.003, p. 203–205, ISSN 1934-5909. [136](#)
- LIAO, Q., Q. ZHANG, X. FENG, H. HUANG, H. XU, B. TIAN, J. LIU, Q. YU, N. GUO, Q. LIU, B. HUANG, D. MA, J. AI, S. XU et K. LI. 2021, «Development of deep learning algorithms for predicting blastocyst formation and quality by time-lapse monitoring», *Commun Biol*, vol. 4, n° 1, doi : 10.1038/s42003-021-01937-1, p. 1–9, ISSN 2399-3642. [142](#)
- MA, S., X. ZHANG, C. JIA, Z. ZHAO, S. WANG et S. WANG. 2020, «Image and Video Compression with Neural Networks : A Review», *IEEE Trans. Circuits Syst. Video Technol.*, vol. 30, n° 6, doi : 10.1109/TCSVT.2019.2910119, p. 1683–1698, ISSN 1051-8215, 1558-2205. [142](#)

- NGARA, M., M. PALMKVIST, S. SAGASSER, D. HJELMQVIST, Å. K. BJÖRKLUND, M. WAHLGREN, J. ANKARKLEV et R. SANDBERG. 2018, «Exploring parasite heterogeneity using single-cell RNA-seq reveals a gene signature among sexual stage *Plasmodium falciparum* parasites», *Experimental Cell Research*, vol. 371, n° 1, doi :10.1016/j.yexcr.2018.08.003, p. 130–138, ISSN 0014-4827. 140
- PANG, B., J. XU, J. HU, F. GUO, L. WAN, M. CHENG et L. PANG. 2019a, «Single-cell RNA-seq reveals the invasive trajectory and molecular cascades underlying glioblastoma progression», *Mol Oncol*, vol. 13, n° 12, doi :10.1002/1878-0261.12569, p. 2588–2603, ISSN 1878-0261. 140
- PANG, L., J. DING, Y. GE, J. FAN et S.-K. FAN. 2019b, «Single-Cell-Derived Tumor-Sphere Formation and Drug-Resistance Assay Using an Integrated Microfluidics», *Anal Chem*, vol. 91, n° 13, doi :10.1021/acs.analchem.9b01084, p. 8318–8325, ISSN 1520-6882. 136
- PASTRANA, E., V. SILVA-VARGAS et F. DOETSCH. 2011, «Eyes Wide Open : A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells», *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 5, doi :10.1016/j.stem.2011.04.007, p. 486–498, ISSN 19345909. 136
- STOCKSLAGER, M. A., S. MALINOWSKI, M. TOUAT, J. C. YOON, J. GEDULDIG, M. MIRZA, A. S. KIM, P. Y. WEN, K.-H. CHOW, K. L. LIGON et S. R. MANALIS. 2021, «Functional drug susceptibility testing using single-cell mass predicts treatment outcome in patient-derived cancer neurosphere models», *Cell Rep*, vol. 37, n° 1, doi :10.1016/j.celrep.2021.109788, p. 109 788, ISSN 2211-1247. 138, 139
- VAN MEER, B. J., H. DE VRIES, K. S. A. FIRTH, J. VAN WEERD, L. G. J. TERTOOLEN, H. B. J. KARPENIEN, P. JONKHEIJM, C. DENNING, A. P. IJZERMAN et C. L. MUMMERY. 2017, «Small molecule absorption by PDMS in the context of drug response bioassays», *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 482, n° 2, doi :10.1016/j.bbrc.2016.11.062, p. 323–328, ISSN 1090-2104. 136
- VERDUIJN, J., L. VAN DER MEEREN, D. V. KRYSKO et A. G. SKIRTACH. 2021, «Deep learning with digital holographic microscopy discriminates apoptosis and necroptosis», *Cell Death Discov*, vol. 7, n° 1, doi :10.1038/s41420-021-00616-8, p. 1–10, ISSN 2058-7716. 141
- WAISMAN, A., A. LA GRECA, A. M. MÖBBS, M. A. SCARAFÍA, N. L. SANTÍN VELAZQUE, G. NEIMAN, L. N. MORO, C. LUZZANI, G. E. SEVLEVER, A. S. GUBERMAN et S. G. MIRIUKA. 2019, «Deep Learning Neural Networks Highly Predict Very Early Onset of Pluripotent Stem Cell Differentiation», *Stem Cell Reports*, vol. 12, n° 4, doi :10.1016/j.stemcr.2019.02.004, p. 845–859, ISSN 2213-6711. 141
- ZHAO, Y., R. CARTER, S. NATARAJAN, F. S. VARN, D. A. COMPTON, C. GAWAD, C. CHENG et K. M. GODEK. 2019, «Single-cell RNA sequencing reveals the impact of chromosomal instability on glioblastoma cancer stem cells», *BMC Med Genomics*, vol. 12, n° 1, doi :10.1186/s12920-019-0532-5, p. 79, ISSN 1755-8794. 140

## Chapitre 5

# Conclusion

*« Ça s'est mis à péter du feu de Dieu dans l'équipe « NeuroSphère », avec cet ajout d'intellectuels pâles, et aux costumes complètement hors course, mais dotés d'une intelligence sévèrement aiguisée par l'histoire. »*

---

Maurice DANTEC, **Les racines du mal**

Au cours de notre travail, nous avons développé une plateforme permettant de détecter les CSC. En combinant la micro-fabrication, la vidéo-microscopie et l'analyse d'images par intelligence artificielle, nous pouvons identifier les CSC de façon automatisée, standardisée, économique et à haut débit. Si les systèmes micro-fabriqués permettent de produire beaucoup de données, il est nécessaire que le processus d'analyse de ces données soit rapide, fiable et automatisé. Grâce à l'images par intelligence artificielle, nous pouvons analyser les données complexes produites en très grande quantité par notre plateforme 3.1.5. Nous avons également standardisé les conditions de culture cellulaire dans la puce et les paramètres d'imagerie pour pouvoir obtenir des résultats reproductibles et à grande échelle. Nous montrons dans l'article 3.3.3 que nous pouvons détecter fonctionnellement les CSG. Nous démontrons également une corrélation statistique entre la division au cours des 4 premiers jours et la formation de NS au bout de 2 semaines dans la puce micro-fabriquée. Ces résultats suggèrent qu'il serait possible de détecter les CSG précocement en analysant leur phénotype après seulement quelques jours de culture dans notre puce. C'est pour l'analyse de telles sous-populations cellulaires phénotypiquement homogènes que nous développons le micropipetteur 3.4. Ainsi, le séquençage d'ARN en cellules uniques sur les cellules ainsi micropipettées permettrait d'établir la signature transcriptomique des cellules fonctionnellement identifiées comme souches. Enfin, dans le paragraphe 3.5, nous montrons que notre plateforme peut être adaptée à d'autres types cellulaires et qu'elle peut être utilisée pour le criblage de drogues.

Cependant, nous souhaitons également poursuivre le développement de la puce. Le couplage de la plateforme avec le micropipetteur représente un défi technologique, mais y parvenir permettrait d'étudier des populations cellulaires phénotypiquement homogènes. L'amélioration des réseaux de neurones pourrait également détecter plus de phénotypes, voire de prédire la formation de sphères à partir de vidéos. Enfin, une utilisation plus large de notre plateforme suppose une fabrication et un montage expérimental simplifiés. En concevant de nouveaux modèles de puces et en développant des interfaces graphiques pratiques pour l'imagerie, l'utilisation de notre plateforme pourrait se diffuser à de nombreux domaines de recherches.

Ainsi, par rapport aux montages expérimentaux déjà publiés, notre plateforme permet un suivi dynamique des cellules au cours du temps, de façon automatisée, standardisée et à haut débit. Ces qualités nous permettent d'adresser des problématiques à l'échelle de la cellule unique et de façon quantitative. Ce niveau de précision peut justement permettre de mieux caractériser des phénotypes cellulaires encore restés inaperçus ou mal compris avec les méthodes traditionnelles de biologie moléculaire. À l'heure de la post-génomique, notre plateforme semble ainsi parfaitement adaptée pour caractériser le phénotype induits par les modifications géniques.

La fiabilité et de la standardisation de notre plateforme permettent également d'envisager une application clinique. Nous montrons d'une part que notre plateforme peut être utilisée pour tester la réponse de cellules cancéreuses à des pressions thérapeutiques. D'autre part, en testant les propriétés souches des cellules cancéreuses, notre plateforme pourrait constituer un nouvel outils diagnostique et pronostique complémentaire des techniques déjà existantes.

Pour conclure, ce manuscrit synthétise le travail qu'il a fallu fournir pour développer notre plateforme de phénotypage. Cette plateforme permet de détecter les CSC de façon standardisée, automatisée, économique et à haut-débit. Elle se trouve au point de jonction de l'intelligence artificielle, de la biologie moléculaire et de la micro-fluidique et a nécessité l'acquisition de compétences dans chacun de ces domaines. Son développement futur pourrait permettre son utilisation à plus large échelle, tant dans la recherche fondamentale que pour des applications cliniques.

# Résumé

Le glioblastome (GBM) est la tumeur du système nerveux central la plus fréquente chez l'adulte. Malgré les moyens thérapeutiques disponibles de nos jours, le pronostic des patient.e.s atteint.e.s de ce cancer reste très sombre en raison des rechutes quasi-systématiques. Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) permet d'expliquer l'origine de ces rechutes. Les CSC sont des cellules cancéreuses qui possèdent les propriétés essentielles d'une cellule souche : l'auto-renouvellement et la multi-potence. Or, il a été montré que les cellules souches de GBM (CSG) existent et qu'elles sont capables d'initier la croissance tumorale. Néanmoins, l'étude des CSG est complexe car il existe une très grande hétérogénéité au sein des CSG. Il existe une hétérogénéité clonale, c'est-à-dire que différentes sous-populations de CSG coexistent au sein de la tumeur mais expriment des marqueurs différents. D'autre part, l'hétérogénéité est également hiérarchique, c'est-à-dire qu'il existe moins une dichotomie franche entre les CSG et les cellules cancéreuses différenciées, qu'un continuum entre ces deux extrêmes, qui passe par des stades progéniteurs. Enfin, les CSG sont capables de plasticité. Non seulement les CSG peuvent passer d'une sous-population à l'autre en modifiant l'expression de leurs marqueurs, mais des cellules avancées dans la différenciation peuvent également réacquérir les propriétés souches. Cette complexité explique notamment pourquoi aucun marqueur moléculaire spécifique des CSG n'a encore été découvert. Pour notre étude, nous avons développé une plateforme pour étudier les CSG non pas en les identifiant moléculairement, mais en les caractérisant fonctionnellement. En effet, le statu " souche " d'une cellule dépend de ses capacités fonctionnelles d'auto-renouvellement et de multi-potence. Or il existe un test fonctionnel des propriétés souches et qui est facilement réalisable : le test de formation de neurosphère (NS). Une NS est un agrégat de cellules provenant d'un clone unique de CSG. Ce test permet donc d'identifier *a posteriori* les CSG. Cependant, le test de formation de NS n'est pas standardisé : il n'existe par exemple pas de seuil de taille pour définir une NS. D'autre part, l'homogénéité clonale des NS n'est souvent pas contrôlée. En effet, les cellules sont généralement cultivées en flasque et ces conditions ne permettent pas de contrôler l'agrégation des cellules entre elles. Il est donc impossible de savoir si un agrégat est bien un NS ou bien un agglomérat de cellules clonalement hétérogènes. Pour pallier ces écueils, nous avons développé une plateforme permettant 1) de s'assurer de l'homogénéité clonale des NS, 2) dans des conditions standardisées et reproductibles, 3) à haut-débit et 4) avec une analyse automatique utilisant des algorithmes d'intelligence artificielle. Nous avons conçu une puce de micro-fluidique composée de plusieurs centaines de micro-puits. Cette puce est constituée d'agarose, elle est donc bio-compatible, adaptée aux systèmes de culture cellulaire classiques et à la microscopie. Les cellules sont isolées dans les micro-puits et conservées en culture pendant plusieurs semaines pour que les NS soient formées. Ainsi, la capacité des cellules à former une NS est évaluée à la fin de l'expérience. Nous avons également étudié la probabilité des cellules à former une NS selon leur phénotype précoce. En réalisant de la vidéo-microscopie sur plusieurs jours après isolement des cellules, nous analysons le phénotype précoce de celles-ci (division, mort ou aucun de ces deux événements). La corrélation du phénotype précoce et la formation de NS nous permet de réduire l'hétérogénéité au sein des sous-populations de CSG. Enfin, pour toutes ces analyses, nous avons annoté une base de plus de 17000 images afin d'entraîner des réseaux de neurones convolutifs. Nous sommes donc parvenus à développer une plateforme permettant le phénotypage à haut-débit et automatisé des CSC.