



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **29 juin 2022**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur CHAMBOST Alexis**

Titre de la thèse : « *Développement d'une plateforme pour le phénotypage à haut-débit des cellules souches cancéreuses par intelligence artificielle* »



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 statut « 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 évènements). 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.