



HAL
open science

Le criblage cytomique à haut contenu

Christian D. Muller

► **To cite this version:**

Christian D. Muller. Le criblage cytomique à haut contenu. Jean-François Mayol, Corinne Laplace-Builhé et Christian D. Muller. La cytométrie en flux, Lavoisier, Chapitre 16, 2020. <hal-02991086>

HAL Id: hal-02991086

<https://hal.science/hal-02991086v1>

Submitted on 5 Nov 2020

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.



Copyright - All rights reserved

Le criblage cytomique à haut contenu

Christian D. Muller

1. Introduction
 - 1.1. Criblage
 - 1.2. Cytomique
2. Mise en place d'un criblage fiable
 - 2.1. Vers une mesure objective de l'activité de molécules actives : IC_{50} ou taux de prolifération ?
 - 2.2. Le facteur Z', un incontournable pour la validation du test de criblage
 - 2.3. Exemple de résultats de mesure de l'induction d'apoptose
3. Test de criblages en multitraitements
 - 3.1. Application à un test de trithérapie 3D *in vitro*

1. INTRODUCTION

L'analyse multiparamétrique dans les systèmes cellulaires permet une étude approfondie des complexes mécanismes interconnectés de l'action des médicaments. La capacité à effectuer des mesures à haut contenu a fait de la cytométrie un outil important dans la découverte de médicaments. La cytométrie est ainsi utilisée à toutes les étapes du cycle de découverte des médicaments, tant dans les entreprises pharmaceutiques que dans les biotechnologies, notamment l'identification et la validation des cibles, l'identification des impacts, la sélection des candidats et les études de sécurité. Des méthodes de cytométrie *in vitro* et *ex vivo* sont utilisées de façon routinière dans des études toxicologiques et aident à identifier et à caractériser les effets hors cible au niveau de la cellule unique (Marder et Litwin, 2010).

1.1. Criblage

Le terme « criblage » désigne en pharmacologie une méthode d'investigation permettant d'effectuer un tri, *screening* en anglais, parmi des substances naturelles caractérisées (extractothèque) ou des molécules synthétiques (chimiothèque) dont on ignore les propriétés pharmacologiques hypothétiques, cela dans la perspective de la recherche d'une molécule active (un outil pharmacologique voir un médicament potentiel). Seules sont retenues les molécules qui présentent une activité intéressante, lors d'essais systématiques sur un ou plusieurs tests selon le programme adopté. Cette façon de procéder est particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit de molécules chimiquement originales puisqu'elle permet non seulement de détecter à l'aide d'un maximum de tests une activité parfois imprévue, ou encore d'obtenir le plus de renseignements possible sur le produit concerné.

Lorsqu'on étudie une série de molécules chimiquement homogène ou des molécules agissant par des mécanismes biologiques semblables, on essaiera d'établir des relations entre *structure* et *activité* directement exploitables en *drug design* (recherche de molécules sur des bases rationnelles théoriques et expérimentales). Les tests utilisés dans ces criblages font généralement appel à des techniques *in vivo* sur animal entier, ou plus fréquemment *in vitro* soit sur organe isolé, soit sur cellule organotypique en culture.

Pour les tests cellulaires, les essais de la molécule retenue sont pratiqués à une dose choisie. Cette dose est définie en fonction de la toxicité aiguë de la molécule, exprimée par la DL_{50} (dose létale pour 50 % des cellules). En cas de découverte simultanée de plusieurs molécules ou

extraits actifs, des expériences en concentration croissante se devront d'être effectuées. Les produits retenus à l'issue du *criblage* font alors l'objet d'études pharmacologiques complémentaires. Une sélection plus rigoureuse ensuivra situant, entre autres, le rapport activité/toxicité (qui donne la marge de sécurité) comparativement à celui d'un ou mieux de plusieurs produits de référence. On recueille ainsi la DA_{50} (dose active pour 50 % des cellules) mesurant la propriété pharmacologique recherchée. Cette DA_{50} ou DE_{50} (dose efficace pour 50 % des cellules) est celle qui produit un effet déterminé chez 50 % des cellules traitées ou qui réduit ou augmente un effet déterminé de 50 %.

Cette démarche permet, de faire un choix parmi les molécules disponibles, mais elle impliquera obligatoirement une deuxième phase, c'est-à-dire des études plus approfondies afin de déterminer, éventuellement, les effets secondaires indésirables et les mécanismes d'action. Finalement, les rares molécules qui franchiront avec succès cette étape de recherche devront alors être étudiées sous différents aspects (pharmacocinétique, toxicologique, tératologique...) avant de pouvoir être expérimentées chez l'homme.

Ainsi, malgré un caractère empirique et un rendement modeste, le criblage de *molécules naturelles* continue à être utilisé à côté des méthodes plus rationnelles de *drug design* dont le rendement, à ce jour, s'est révélé nettement plus modeste. En effet, Mère Nature a quelques étapes d'avance, criblant durant les millénaires de l'évolution, des milliards de molécules. Elle n'aura retenu que celles qui présentent des critères originaux. Ces molécules actives naturelles ont permis la survie de l'espèce qui aura su s'adapter à un environnement changeant rapidement ou à gagner une « guerre chimique » inter-espèce pour la conquête d'un biotope particulier, comme dans la lutte territoriale d'un rocher sous-marin entre deux éponges encroûtantes.

Le criblage à haut contenu sur cellules vient de la traduction anglaise du terme *high content screening* (HCS). Dans le criblage à haut contenu, les cellules sont d'abord mises en incubation avec la substance à tester, et après une certaine période de temps, des structures et des composants moléculaires des cellules sont analysés. L'analyse la plus courante consiste à suivre des protéines à étiquetage fluorescent (*green fluorescent protein* par exemple) et, si un changement de phénotype cellulaire a lieu, celui-ci est alors mesuré en cytométrie. Ainsi, par l'utilisation de différents marqueurs fluorescents, il est possible de mesurer en parallèle plusieurs composants cellulaires. Notons que la taille et la complexité interne relative (nommés FCS [*forward scattered*] et SSC [*side scattered*] en cytométrie en flux) sont déjà aptes à détecter des changements au niveau subcellulaire (par exemple, un cytoplasme plus granuleux et/ou une cellule plus petite). En conséquence, un

grand nombre de points de données peuvent être collectés pour chaque cellule suivie. De plus, par un marquage fluorescent, diverses sécrétions cellulaires peuvent également être mesurées dans le surnageant de culture lors d'un criblage à haut contenu en cytométrie (cytokines, hormones, radicaux libres...). Ces sécrétions sont alors capturées par des microbilles de latex hérissées d'anticorps monoclonaux spécifiques de la molécule sécrétée. La lecture et le dosage se font alors par cytométrie en flux. Ainsi les méthodes analytiques faisant appel aux microbilles se sont étendues à ce jour à la détection de protéines, d'acides nucléiques et d'ions. Pour cela, des microbilles de fluorescences différentes sont couplées à des anticorps, des oligonucléotides ou des chélatants. Les applications de ces méthodes multiplexées qui permettent l'identification et la quantification simultanée de plusieurs ions ou macromolécules concernent aussi l'identification d'activités enzymatiques et les analyses de polymorphisme. Avec les microbilles utilisées comme support réactionnel, les domaines d'application de la cytométrie en flux vont ainsi de l'analyse cellulaire à l'analyse moléculaire (Lizard *et al.*, 2003).

1.2. Cytomique

Les cytomes sont les systèmes cellulaires, sous-systèmes et composants fonctionnels du corps. Le cytome est la collection des processus cellulaires complexes et dynamiques (structure et fonction) qui sous-tendent les processus physiologiques. Il décrit l'hétérogénéité structurelle et fonctionnelle de la diversité cellulaire d'un organisme. L'étude des cytomes est appelée la cytomique (Valet et Tarnok 2004 ; Valet, 2005 ; O'Connor *et al.*, 2014). Lors d'un criblage de chimiothèque qu'elle soit de synthèse ou issue d'une extractothèque de substances naturelles, une étude cytomique sera réalisée en suivant les réponses de cellules d'origine phénotypiques différentes (sang, intestin, foie, vessie, derme...) par des expérimentations menées en parallèle ceci avec les mêmes composants soit à concentration fixe soit en dilution en cascade.

2. MISE EN PLACE D'UN CRIBLAGE FIABLE

Sachant que le taux moyen de « touches » sur un criblage est inférieur à 1 %, il est nécessaire d'avoir une collection importante et très diverse pour espérer en trouver des intéressantes (Mahuteau-Betzer, 2015). Par exemple, la Chimiothèque nationale (CN) est une chimiothèque

composée de petites molécules de synthèse ou isolées de produits naturels ; elle offre actuellement plus de 50 000 molécules que les plates-formes de criblage peuvent cribler en totalité. Depuis 2005, le fichier des structures présentes dans la collection est accessible sur internet (<http://chimiotheque-nationale.enscm.fr/>) après un enregistrement préalable de l'utilisateur. Dans le monde académique, le criblage n'a pas la vocation de découvrir de nouveau médicament même s'il peut faciliter dans certains cas la découverte de molécules susceptibles d'avoir des applications thérapeutiques. Le criblage académique vise surtout à l'identification de nouveaux outils pharmacologiques pour étudier le vivant en modulant ou en contrôlant une activité biologique. Lorsque le criblage est phénotypique, ce qui est le cas en cytomique, il peut permettre d'identifier une ou des cibles.

Ainsi pour tester, par exemple, 50 000 molécules, dans le cas de la CN, l'expérience de criblage cytomique se doit d'être simple, reproductible et surtout fiable, même s'il faut accepter d'emblée qu'une molécule intéressante soit susceptible d'en échapper. Avec un taux de succès inférieur à 1 %, cela laisse tout de même présager la mise en évidence d'une petite dizaine de touches qui devront toutes être confirmées, par la répétition de l'expérience bien sûr, mais surtout par une activité reproductible indépendante de l'expérimentateur et peut-être même spécifique du phénotype cellulaire testé (cellule saine *versus* cellule maligne).

2.1. Vers une mesure objective de l'activité de molécules actives : IC₅₀ ou taux de prolifération ?

Comprendre les effets de petites molécules sur le taux de croissance et la viabilité cellulaire reste un point essentiel pour la compréhension de leurs mécanismes d'action, ainsi que pour l'évaluation d'une efficacité thérapeutique potentielle. Les mesures « classiques » d'étude de l'efficacité des médicaments, peuvent être biaisées en fonction de conditions expérimentales données, ce qui les rend difficiles à reproduire, comparer et interpréter. Ces mesures alternatives devraient améliorer la reproductibilité des études de criblage de chimiothèque. Deux études indépendantes présentent des alternatives de mesures objectives afin d'évaluer les effets antiprolifératifs de petites molécules.

Harris *et al.* (2016) ont développé une mesure de l'inhibition du taux de croissance basée sur la comparaison en présence et en absence d'une molécule. Ces mesures restent insensibles à des facteurs tels que la densité d'ensemencement, le temps de doublement cellulaire et la durée

de l'essai, alors que les mesures classiques d'évaluation d'un effet antiprolifératif d'une molécule sont fonction du temps d'incubation, ce qui peut fausser les résultats. Leur taux de prolifération induit par la molécule peut être utilisé comme une mesure alternative de l'IC₅₀ (concentration inhibitrice médiane) pour une évaluation précise et reproductible. Le facteur *drug-induced proliferation* (DIP) *rate* est défini comme le taux d'équilibre permanent de la prolifération d'une population de cellules en présence d'une concentration donnée de molécules actives. C'est une mesure intuitive, biologiquement compréhensible reposant sur la dynamique de la population. Ces auteurs spéculent que la mesure standard de l'effet d'une molécule active dans le cadre, par exemple, d'une courbe dose-réponse, générerait des valeurs erronées de l'activité de la molécule testée, biaisant ainsi l'interprétation des données. En effet, deux sources d'erreur dépendantes du temps faussent ces mesures : (i) la croissance exponentielle et (ii) des retards dans la stabilisation de l'effet de la molécule. La première peut conduire à des conclusions erronées (par exemple, une molécule augmentant son efficacité au fil du temps), tandis que la seconde exige de placer la fenêtre d'évaluation après qu'une stabilisation soit atteinte. Le facteur DIP décrit fidèlement, au sein d'une seule valeur, l'effet à long terme d'une molécule active sur une population de cellules données.

De manière complémentaire, Hafner *et al.* (2016) préconisent d'utiliser un taux d'inhibition de prolifération induit par la présence de la molécule, un taux indépendant du biais de la mesure en fonction du temps d'incubation. Les mesures d'inhibition de la croissance permettent d'estimer avec précision l'efficacité d'une molécule, indépendamment des variables telles que le taux de croissance des cellules, la densité d'ensemencement et le milieu de croissance. Ils sont une alternative pratique à des indicateurs tels que l'IC₅₀ et offre une reproductibilité accrue. Plus exactement, la sensibilité et la résistance aux molécules actives, classiquement quantifiées par l'IC₅₀ ou les valeurs E_{max}, restent des mesures totalement dépendantes du nombre de divisions cellulaires qui ont lieu au cours du test de réponse. Ainsi la dépendance de l'IC₅₀ et de l'E_{max} sur le taux de division crée des corrélations artefactuelles entre le génotype et la sensibilité aux molécules actives. Pour mesurer efficacement une réponse à la molécule testée par une technique insensible aux nombres de divisions cellulaires, il suffit d'estimer l'ampleur de l'inhibition, donc du taux de croissance induit par la molécule testée (GR pour *growth rate*) en utilisant un point de terminaison rapide, c'est-à-dire un temps court d'incubation. Hafner *et al.* démontrent ainsi que GR₅₀ et GR_{max} sont supérieurs aux mesures classiques pour évaluer les effets des petites molécules dans les cellules en division. En outre, l'adop-

tion de la mesure de GR ne nécessite que des changements modestes dans les protocoles expérimentaux. Les mesures de GR amélioreront l'étude de la signalisation cellulaire et de la croissance, due à l'action de petites molécules ou produits biologiques. Elles faciliteront la découverte de biomarqueurs en réponse aux traitements tout comme l'identification de nouveaux médicaments efficaces contre les cellules de tumeurs de patients. Harris *et al.* montraient déjà que pour les mesures de réponse traditionnelles, les IC₅₀ présentent un défaut fondamental quand ils sont estimés à partir du nombre de cellules réalisées à la fin de l'expérience (approche standard) : si les cellules de contrôle subissent différents nombres de divisions au cours d'un essai en raison de différences naturelles dans le taux de prolifération, la variation des conditions de croissance, ou des changements dans la durée d'une expérience, IC₅₀, E_{max} et les valeurs de la surface sous la courbe peuvent varier considérablement, indépendamment de tout changement dans la biologie sous-jacente. Ainsi, les biomarqueurs qui prédisent la sensibilité sous un ensemble de conditions d'essai ne peuvent prédire la sensibilité dans des conditions même légèrement différentes. Ces auteurs proposent que ces mesures remplacent les valeurs IC₅₀ et E_{max} dans l'évaluation de la réponse cellulaire aux molécules actives ou aux RNAi ou encore d'autres perturbations qui contrôlent les cellules se divisant au cours de l'essai.

Les effets du taux de division sur la réponse aux molécules testées pourront être compensés en calculant la valeur GR à l'instant « t », en présence de molécule active à la concentration « c » à l'aide de :

$$GR(c,t) = 2^{k(c,t)/k(0)} - 1$$

où $k(c,t)$ est le taux de cellules traitées avec la molécule et la croissance $k(0)$ est le taux de croissance des cellules témoins non traitées. La valeur GR est tout simplement le rapport entre les taux de croissance dans des conditions normalisées traitées et non traitées avec une division cellulaire unique.

Le signe de la valeur de GR est directement lié à la réponse phénotypique : elle est comprise entre 0 et 1 dans le cas d'inhibition de la croissance partielle ; elle est égale à 0 dans le cas d'une cytostase complète et il est compris entre 0 et -1 dans le cas de la mort cellulaire. Compte tenu des valeurs GR pour une gamme de concentrations de molécule active, GR₅₀ est la concentration à laquelle GR(c) = 0,5, GR_{max} est la valeur maximale mesurée de GR et hGR est la pente de l'ajustement sigmoïde ; GR_{AOC} est calculé en intégrant la courbe GR sur une plage de concentrations.

Vu les applications fréquentes de tests de prolifération cellulaire menées pour un criblage en oncologie, pharma-

cologie et toutes sciences biomédicales (c'est-à-dire l'activité des cytokines, la réponse des récepteurs de surface cellulaire, les voies de signalisation altérées, la surexpression et la répression d'un gène), il semble impératif que la qualité de la mesure pour les essais antiprolifératifs soit améliorée. Les deux méthodes décrites ici sauront aider à obtenir une mesure comparative nettement plus objective de l'activité des molécules actives quel que soit le modèle de lecture utilisé (signal de fluorescence, comptage cellulaire, diamètre du sphéroïde, surface de la colonie...).

2.2 Le facteur Z', un incontournable pour la validation du test de criblage

Lors de l'élaboration puis de l'évaluation d'un test de diverses molécules actives, il faudra quantifier à quel point le test retenu est fiable. Une façon de faire sera le biais du rapport signal sur bruit. Zhang *et al.* (1999) ont mis au point une méthode permettant de quantifier la qualité d'un test et ont défini le facteur Z' qui résulte des calculs suivants (figure 16-1).

Pour interpréter le facteur Z', il faut utiliser les lignes directrices issues directement des travaux de Zhang *et al.* (1999). Le facteur Z' est défini à l'aide de quatre paramètres – les moyennes (μ) et les écarts-types (σ), des deux contrôles positifs (p) et négatifs (n) :

$$Z' = 1 - 3 \frac{\sigma_p + \sigma_n}{|\mu_p - \mu_n|}$$

- si le facteur Z' est égal à 1, c'est l'idéal, même si un essai ne pourra jamais avoir un facteur Z' égal à 1, mais cette valeur sera approchée dans le cas d'une vaste gamme dynamique avec des écarts types minuscules. Dans cette situation, la plage de séparation

est presque aussi longue que la gamme dynamique. Il est à noter que le facteur Z' ne pourra jamais être supérieur à 1 ;

- une valeur du facteur Z' entre 0,5 et 0,999 indique que le test un excellent test ;
- un facteur Z' compris entre 0 et 0,5 montre que le test est non conforme ;
- un facteur Z' inférieur à 0 signifie que les signaux provenant des témoins positifs et négatifs pourraient se chevaucher, ce qui rend invalide le test.

Le facteur Z' est calculé sur la base d'une équation qui pourrait apparaître arbitraire. Pourquoi calculer les seuils de trois fois les écarts-types respectifs plutôt que d'utiliser un facteur de deux ou quatre ou tout autre facteur ? Ce choix, bien que purement arbitraire, a montré que le facteur Z' reste un moyen très utile pour décrire un essai, et il en est devenu la norme (figure 16-2).

Analyse et logiciel *ad hoc* : une fois que le test (multiparamétrique ou non) aura donné une valeur satisfaisante d'un facteur Z' compris entre 0,5 et 0,999, la pierre d'achoppement de tout criblage restera toujours le choix du logiciel d'analyse des données. Ayant eu l'opportunité de participer activement à la réalisation et au bêtatage d'un logiciel, c'est ce dernier avec ses outils intuitifs (dessiner une région, la saisir puis la coller sur un cytochrome ou un histogramme) qui a été retenu ici. Ce logiciel a toujours été rapidement pris en main par les étudiants de passage au laboratoire durant cette décennie. La représentation de la plaque 96 puits permettant la lecture de la réponse cellulaire par une illustration colorée de « camemberts » présentant jusqu'à six portions, plusieurs phénotypes cellulaires peuvent ainsi être rapidement comparés en réponse à une chimiothèque donnée et permettre une rapide lecture cytomique de la chimiothèque testée.

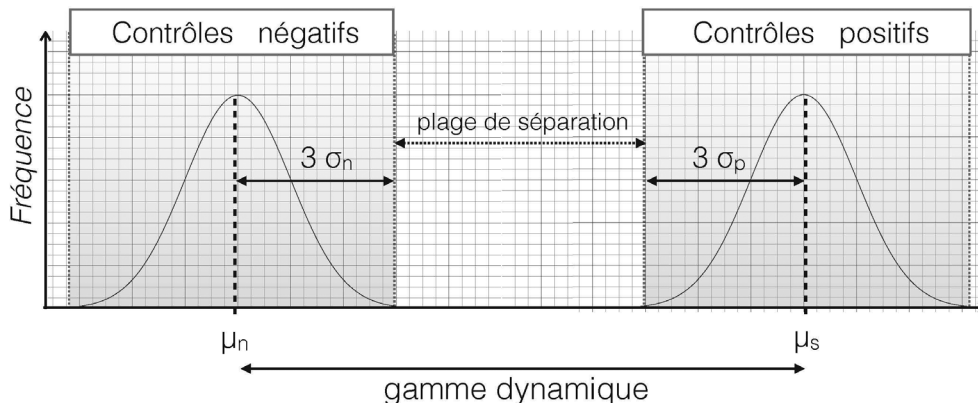
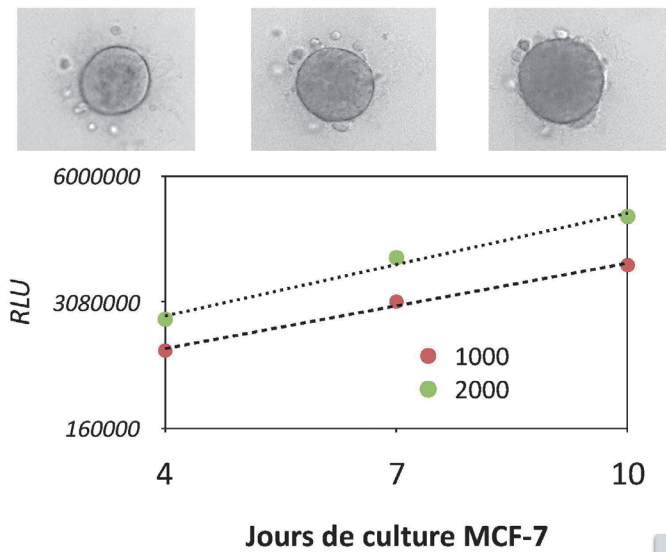
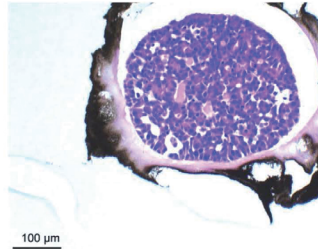


Figure 16-1. Expression mathématique de Z'.



CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability			
paramètre Z' obtenu pour les différentes conditions			
	Cellules ensemencées / puits		
MCF-7	1000	1500	2000
jour 4	0.72	0.60	0.56
jour 7	0.15	0.57	0.47
jour 10	0.22	0.47	0.47
Z' ≥ 0.5; pour un excellent test			
Z' ≥ 0.3; pour un bon test			

section de sphéroïde MCF-7 fixé, inclus dans la paraffine avant coloration hématoxyline-éosine



Le facteur Z' est défini à l'aide de quatre paramètres: les moyennes et les écarts-types des deux contrôles positifs et négatifs.

$$Z\text{-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Figure 16-2. Validation du test de croissance de sphéroïdes de cellules MCF-7. La lignée cellulaire MCF7 (origine humaine, cancer du sein) a été ensemencée dans des boîtes 96 puits en forme de U et à très faible adhésion permettant la formation de sphéroïdes. Z' a été déterminé à partir du nombre de cellules vivantes estimées dans chaque sphéroïde. Le meilleur taux d'ensemencement par puits a ainsi pu être déterminé, 2 000 cellules/puits a été la valeur retenue car la pente de croissance et le Z' étaient optimaux (sphéroïdes de cellules humaines MCF-7 en culture ; pour les conditions de mise en culture, se référer aux travaux de Bozic *et al.*, 2016).

2.3. Exemple de résultats de mesure de l'induction d'apoptose

Afin d'illustrer un résultat de criblage de chimiothèque, nous avons choisi la recherche de molécules pro-apoptotique anticancéreuse et/ou anti-inflammatoire. Le principe du test consiste à mesurer, pour chaque cellule, la translocation membranaire de la phosphatidylsérine en surface cellulaire chez les cellules en apoptose et la perturbation de l'intégrité cellulaire basée sur la différence de perméabilité membranaire des cellules vivantes ou mortes en présence ou en absence de molécules d'une chimiothèque.

L'annexine V est une protéine présentant une forte affinité pour la phosphatidylsérine. Ce phospholipide anionique est séquestré au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique des cellules vivantes. La phase

précoce de l'apoptose s'accompagne d'une rupture de l'asymétrie de la membrane plasmique. Les résidus phosphatidylsérines sont transloqués du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique par des mécanismes complexes. *In vivo*, les résidus phosphatidylsérines ainsi exposés sont reconnus par des récepteurs présents à la surface des macrophages qui éliminent les cellules apoptotiques par phagocytose. *In vitro*, les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées et rentrent dans un processus dit d' « apoptose tardive » où la membrane plasmique devient perméable. L'annexine V conjuguée au fluorochrome FITC (fluorescéine isothiocyanate) se fixe sur les résidus phosphatidylsérines exposés au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique des cellules en apoptose précoce ou tardive et permet ainsi leur détection par émission d'une fluorescence verte après excitation à 488 nm (laser bleu).

L'iodure de propidium (IP) est une sonde fluorescente des acides nucléiques double brin. C'est une sonde dite « d'exclusion », car elle ne peut pas traverser la membrane plasmique intacte des cellules viables. En revanche, la membrane plasmique lésée des cellules en nécrose ou en apoptose tardive laisse diffuser l'iodure de propidium qui se lie alors au niveau des structures polynucléotidiques double brin en s'intercalant entre les paires de bases azotées. Dans cet environnement, après excitation à 488 nm (laser bleu), l'iodure de propidium présente une forte fluorescence rouge associée au noyau des cellules dont l'intégrité de la membrane plasmique est perturbée.

Ce double marquage annexine V-FITC/IP permet ainsi de différencier les cellules viables, les cellules apoptotiques (tardives et précoces) et les cellules nécrotiques selon les différents phénotypes observés : annexine V-FITC-/IP- (cellules viables), annexine V-FITC-/IP+ (cellules en nécrose), annexine V-FITC+/IP- (cellules en apoptose précoce), annexine V-FITC+/IP+ (cellules en apoptose tardive).

Les résultats obtenus pour les différents traitements sont exprimés en pourcentages de cellules viables, apoptotiques (précoces + tardives) ou en nécrose (figure 16-3A et B).

Les différents contrôles sont indispensables à la validation de chaque plaque, c'est-à-dire que, dans chaque plaque, il faudra prévoir des échantillons non traités, mais aussi des échantillons où la mort cellulaire par apoptose a été induite de façon massive (par exemple, par le célastrol un puissant inhibiteur du protéasome).

L'interprétation des résultats de cytométrie n'a été possible que grâce à un logiciel capable de superposer à la fois la réponse inflammatoire et la réponse pro-apoptotique à partir des données brutes de cytométrie. Le logiciel InCyte™ permet de visualiser, comparer et analyser jusqu'à huit ensembles de données simultanément, permettant ainsi d'analyser des plaques entières de données en moins de temps qu'il n'est typiquement nécessaire pour analyser les données d'une seule plaque avec un logiciel classique. Le déchiffrement des résultats bruts de cytométrie n'aurait jamais permis de comparer de manière aussi efficace ces deux réponses cellulaires, dont l'une effectuée sur trois phénotypes cellulaires différents, et il est bien possible que la relation entre structure et activité de ces molécules n'ait jamais pu être révélée parmi les 7 500 molécules testées lors de la campagne de criblage anti-*tumor necrosis factor* α (anti-TNF α) (Hulot *et al.*, 2010).

3. TESTS DE CRIBLAGES EN MULTITRAITEMENTS

L'efficacité anti-tumorale établie dans des modèles de cancer se traduit rarement par des résultats fidèles chez les patients car la découverte de nouvelles molécules actives est le plus souvent effectuée dans des modèles de cellules qui représentent mal les tumeurs malignes. La culture en 3D de différentes lignées cellulaires humaines (testicule, pancréas, sang et foie) est une approche thérapeutique anti-cancéreuse plus objective permettant d'étudier en détail les activités différentielles de nouvelles molécules.

Les cellules souches cancéreuses sont un facteur clés de la formation et de la progression des tumeurs. Une thérapie réussie se doit d'éliminer ces cellules. Compte tenu de leur plasticité, la question se pose de savoir si une stratégie particulière induisant l'apoptose serait suffisante pour éliminer toutes ces cellules tenant compte d'un micro-environnement variable (figure 16-4).

Échapper à l'apoptose est l'une des caractéristiques du cancer, une capacité que possèdent les cellules souches cancéreuses ; ainsi les thérapies futures qui surmonteront la résistance à l'apoptose dans les cellules tumorales se devront d'être dirigées vers les cellules souches cancéreuses pour cibler directement la source de nouvelles métastases. Dans cet esprit, il est fondamental de construire *in vitro* des modèles de tumeur pour tester facilement de nouveaux agents anticancéreux. Ainsi, les différents mécanismes de résistance à l'apoptose qui peuvent être rencontrés dans le contexte de la plasticité des cellules souches cancéreuses se doivent d'être testés en culture 3D. Cette étude peut se faire en mode 96 puits à l'aide d'une

PROTOCOLE 16-1.

Détection de l'apoptose et de la nécrose cellulaire

- Les cellules ensemencées dans une plaque 96 puits, sont incubées 24 heures à 37 °C en atmosphère humide à 5 % CO₂, en présence ou non de molécules à tester.
- On récupère le surnageant de chaque puits et il est mis de côté. Les cellules sont lavées avec du PBS, sans Ca²⁺, sans Mg²⁺ (Lonza) et décollées à 37 °C par ajout de trypsine 1 % (Versene®, Lonza).
- Les cellules de chaque puits sont alors re-suspendues dans le surnageant correspondant puis marquées à l'aide d'annexine V-FITC (ImmunoTools) et à l'iodure de propidium (Miltenyi Biotec) selon les indications données par les fournisseurs.
- La toxicité des différents traitements (apoptose et/ou nécrose) est évaluée par cytométrie en flux sur un appareil Guava® easyCyte™ 12HT (Merck Millipore). Deux mille cellules sont acquises par échantillon.
- Les résultats sont enfin analysés à l'aide du Logiciel InCyte™ 3.1 (Guava®, Merck Millipore).

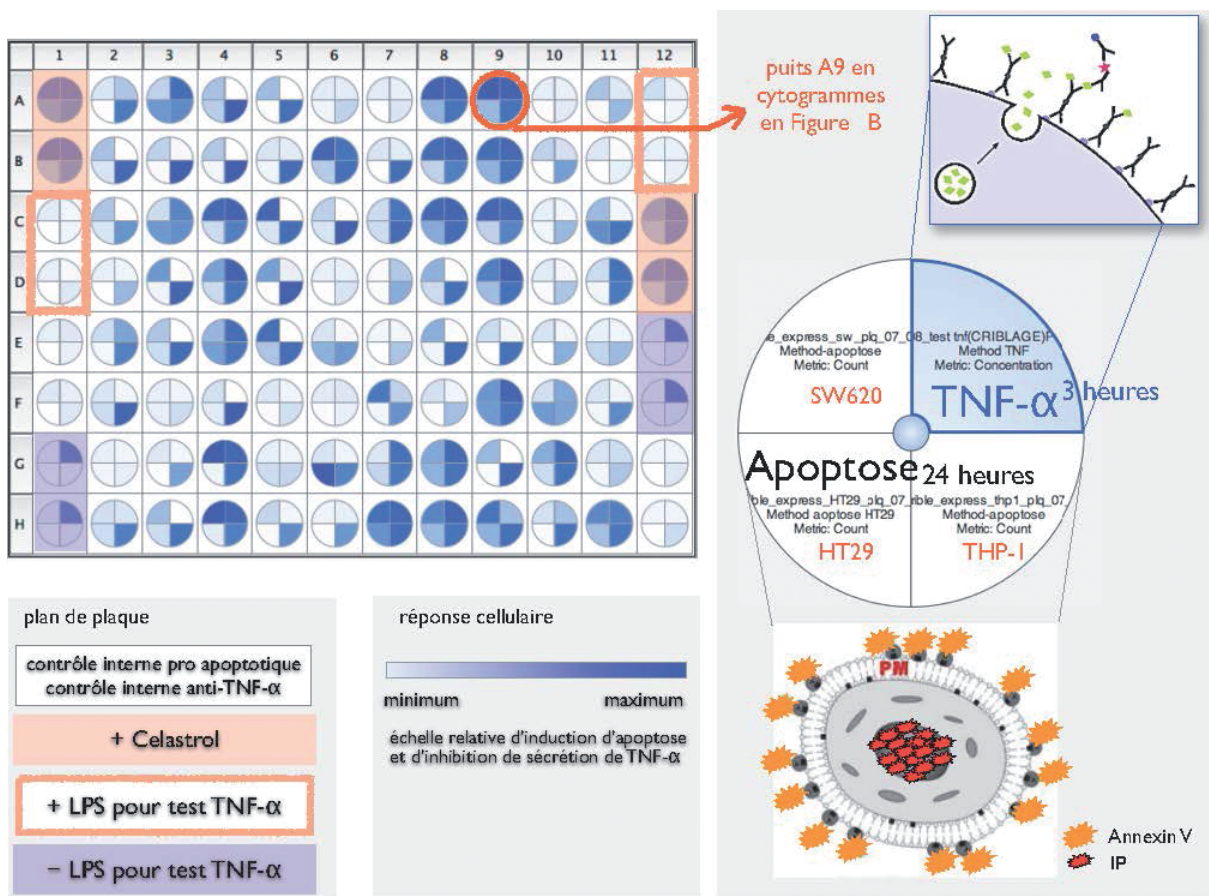


Figure 16-3. (A) Représentation graphique des résultats de criblage obtenus en cytométrie à l'aide du logiciel InCyte™. Quart supérieur droit : sécrétion du TNF α par test ELISA sandwich en surface cellulaire (Miltyeni Biotec) sur cellules THP-1 ; quart inférieur droit : apoptose sur cellules THP-1 ; quart inférieur gauche : apoptose sur cellules HT29 ; quart supérieur gauche : apoptose sur cellules SW620 (cellules TRAIL résistantes). Le célastrol (10 μ M) est utilisé comme validateur d'expérimentation dans chaque plaque (Pinna *et al.*, 2004 ; Nabergoj *et al.*, 2016).

chimiothèque de nouveaux outils pharmacologiques testés ou non en association (multithérapie) avec des médicaments anticancéreux déjà commercialisés.

3.1. Application à un test de trithérapie 3D *in vitro*

Tester simultanément en damier différentes molécules permet de déterminer leurs concentrations efficaces les plus basses à envisager en trithérapie. Des molécules ainsi associées devraient accroître leurs effets par synergie, par interaction sur une ou des cibles multiples, réduisant le risque d'interactions médicamenteuses, et surtout la résistance aux médicaments des cellules souches cancéreuses.

Sous l'égide de l'action européenne COST CM1106 « Approches chimiques pour cibler la résistance aux médicaments dans les cellules souches cancéreuses », une petite chimiothèque a été rassemblée, basé sur le concept de pharmacophores à cible déterminée (Filipović *et al.*, 2015). La bibliothèque se compose de plusieurs classes de composés synthétiques et naturels (figure 16-5 A et B). Le criblage initial de composés sur des cellules souches de cancer pancréatique (AsPC-1) a été effectué selon la disposition en damier. La figure 16-6 décrit comment tester 64 combinaisons de 3 médicaments à 4 concentrations sur une plaque à 96 puits et ainsi obtenir la meilleure combinaison sur les sphéroïdes du cancer 3D. Ces criblages 3D à base de sphéroïdes tumoraux sont conduits dans une cohérence cytométrie en utilisant un ensemble représentatif de lignées cellulaires de cellules souches cancéreuses

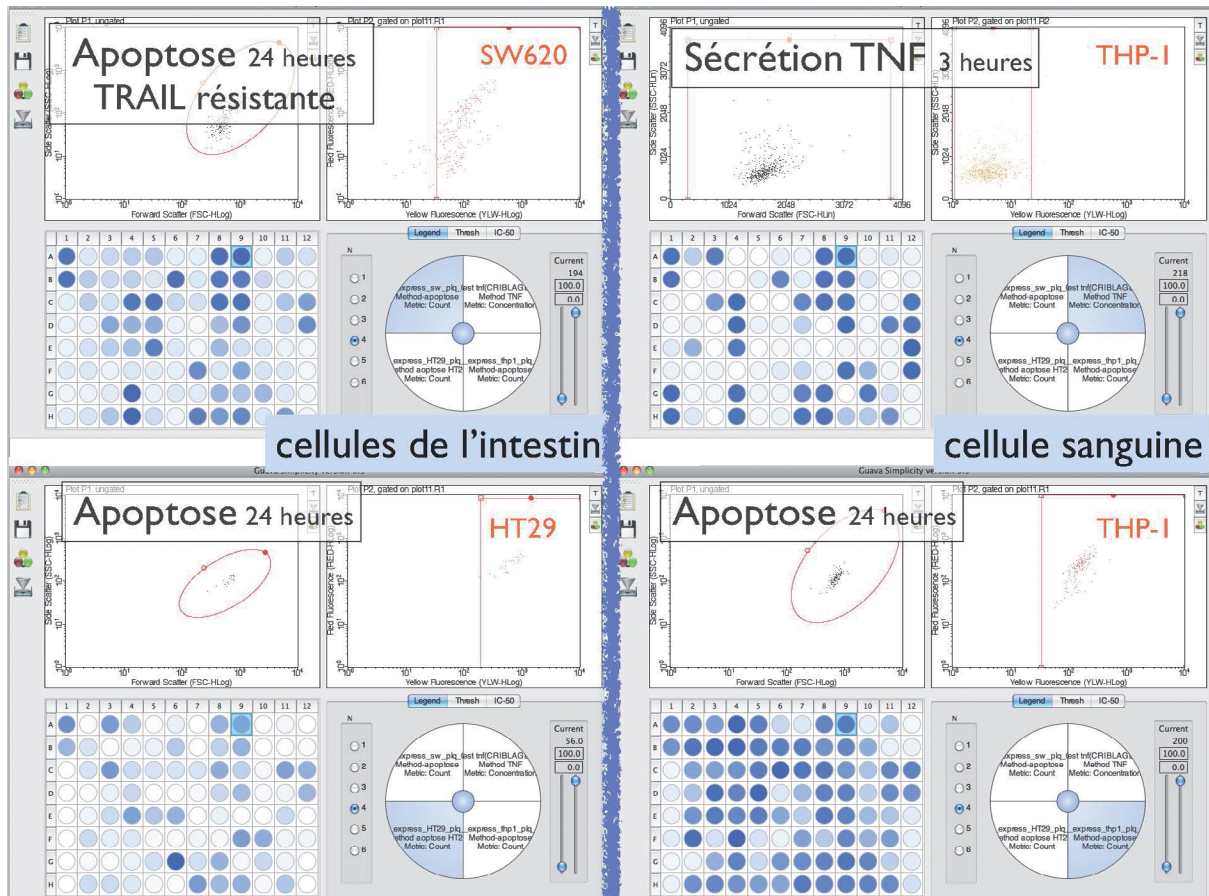


Figure 16-3. (B) Cytogrammes correspondant au puits A9 de la figure 15-3A.

pour élargir le spectre des données engendrées au début de la phase de criblage.

À l'heure actuelle où les chercheurs sont limités dans leurs capacités à prédire la réponse d'un patient à certaines thérapies, la culture de cellules tumorales en 2D pour tester la réponse à une molécule et sa résistance ne permet pas de saisir les effets du micro-environnement tumoral. Le modèle de la souris (xénogreffes murines faites avec la tumeur d'un patient pour évaluer des approches thérapeutiques personnalisées) présente également de nombreuses limitations, y compris, dans la plupart des cas, le temps. Ces modèles prennent simplement trop de temps à être développés pour être cliniquement pertinents.

Dans un premier temps, un ensemble de molécules a été testé sur des lignées cellulaires humaines de cellules souches cancéreuses, mais il est aisément imaginable d'appliquer un tel criblage sur des cultures 3D d'explants de patients afin d'aider à identifier le meilleur traitement individualisé. Des analyses primaires pour l'activité d'une

combinaison de médicaments sur le marché en association avec de nouveaux médicaments putatifs sont montrées à titre d'exemple dans la figure 16-7. Ainsi une association de médicaments anticancéreux déjà sur le marché avec de nouveaux composés devrait permettre d'atteindre différentes cibles de cellules cancéreuses dans l'espoir d'éradiquer définitivement les cellules souches cancéreuses chez le patient.

Remerciements. L'auteur tient à remercier les personnes suivantes qui ont mis au point et/ou participé aux études en cytomique lors de leurs passages au laboratoire durant ces dernières années : le docteur Päivi Jarvinen (Division of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Finland), les docteurs Sanja Vrbeč et Dominik Nabergoj, tous deux PharmD (Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Slovenia), et le docteur Snežana Bjelogrić, MD, PhD (Experimental Pharmacology, Department for Experimental Oncology, National Cancer Research Center, Belgrade, Serbia).

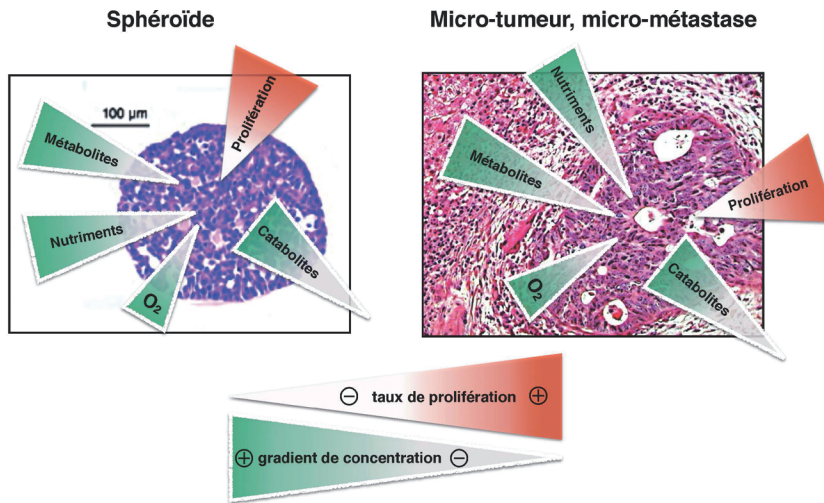


Figure 16-4. Un sphéroïde de cellules cancéreuses généré *in vivo* présente une architecture et un micro-environnement plus proche d’une microtumeur ou d’une micrométastase que les classiques cultures sur fond de plastique. Les cellules situées dans la périphérie du sphéroïde reflètent la situation *in vivo* des cellules tumorales en divisions actives et adjacentes aux capillaires. En revanche, les cellules les plus internes se retrouvent dans un environnement protégeant la survie des cellules souches cancéreuses à prolifération lente. L’agencement concentrique des populations de cellules hétérogènes dans les sphéroïdes et l’établissement de gradients physiopathologiques est comparable à celui des micrométastases, des microrégions tumorales avasculaires ou des régions tumorales inter-capillaires. (Photo d’un sphéroïde de cellules humaines MCF-7 en culture ; pour les conditions de mise en culture 3D, se référer aux travaux de Bozic *et al.*, 2016).

Small library of 33 drugs with defined ≈15 targets to be tested in combination in triple 3D = 455 tests

molecule	mode of action
Ellagic Acid	antioxydant
Caffeic Acid	antioxydant
5 aza	(-) DNA methylation
Transveratrol	antioxydant
Tranlycypromine	(-) histone demethylase
Sodium Butyrate	(-) Histone deacetylase
Anacardic acid	(-) androgen receptor, (+) of p53 signaling.
PB OD4	(-) Histone deacetylase
Retinoic acid	induces differentiation CSC
Epigallocatechin	(-) Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
Withaferin A	(-) both NF-κB and Sp1 Transcription factor
Rutin	antioxydant
Quercetin	(-) Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein
Thioridazine	(-) phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt
Podophyllotoxin	Pro-Apoptotic ER Stress
camptothecin	(-) DNA re-ligation
Brucine	(-) NF-κB subunit (p65) expression
Ermanine	enhanced TRAIL-induced apoptosis

$$\binom{n}{r} \text{ or } {}_n C_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} = \frac{n(n-1)(n-2)\dots(n-r+1)}{r!}$$

molecule	mode of action
Kaempferol	(+) apoptosis
Morin	(-) N-methylpurine DNA glycosylase (DNA repair)
Vismodegib	(-) hedgehog signalization
Ferulic acid	(-) oxidative stress
UKU 10118	(-) SIRT
AW20	(-) Histone acetyl transferases
cyclopamin	(-) hedgehog signalization
chir 99021	(-) GSK3
Thiazovivin	(-) Rho- associated kinase (ROCK)
BIX 01294	(-) histone lysine methyltransferase
LDN-193189	(-) BMP type I receptors ALK2
Wnt C59	(-) Wnt signaling pathway
SB 4315	(-) TGF
Narin	antioxydant polyphenol
Umbelliferon	antioxydant polyphenol

A



Figure 16-5. (A) Une petite chimiothèque a été rassemblée, basée sur un concept de pharmacophore à cible définie.

#	combinations	activity and target
I	5 Aza	DNA methyltransferase inhibition
	Transveratrol	Sirtuin 1 (deacetylase) inhibition
	Anacardic acids	Histone acetyl transferases inhibition
	PB OD4	Histone deacetylase inhibition
II	viniferin	PDE-4 inhibition
	camptothecin	DNA re-ligation inhibition
	Podophyllotoxin	topoisomerase II inhibition
III	Camptothecin	DNA re-ligation inhibition
	Quercetin	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein inhibition
	PB OD4	Histone deacetylase inhibition
IV	Brucine	NF-kB subunit (p65) expression inhibition
	Tranylcypromine	Histone demethylase inhibition
	Sodium Butyrate	histone deacetylase inhibition
V	Chlorpromazine	autophagy inducer
	Ermanine	enhanced TRAIL-induced apoptosis
	Podophyllotoxin	topoisomerase II inhibition
VI	Retinoic acid	Retinoic acid receptors activation
	Rutin	modulates wide ranging intracellular signaling cascades

Figure 16-5. (B) Un exemple de 6 combinaisons de 3 molécules testées dans le format triple 3D, c'est-à-dire 3 médicaments avec 4 concentrations soit 64 tests.

The triple 3D test

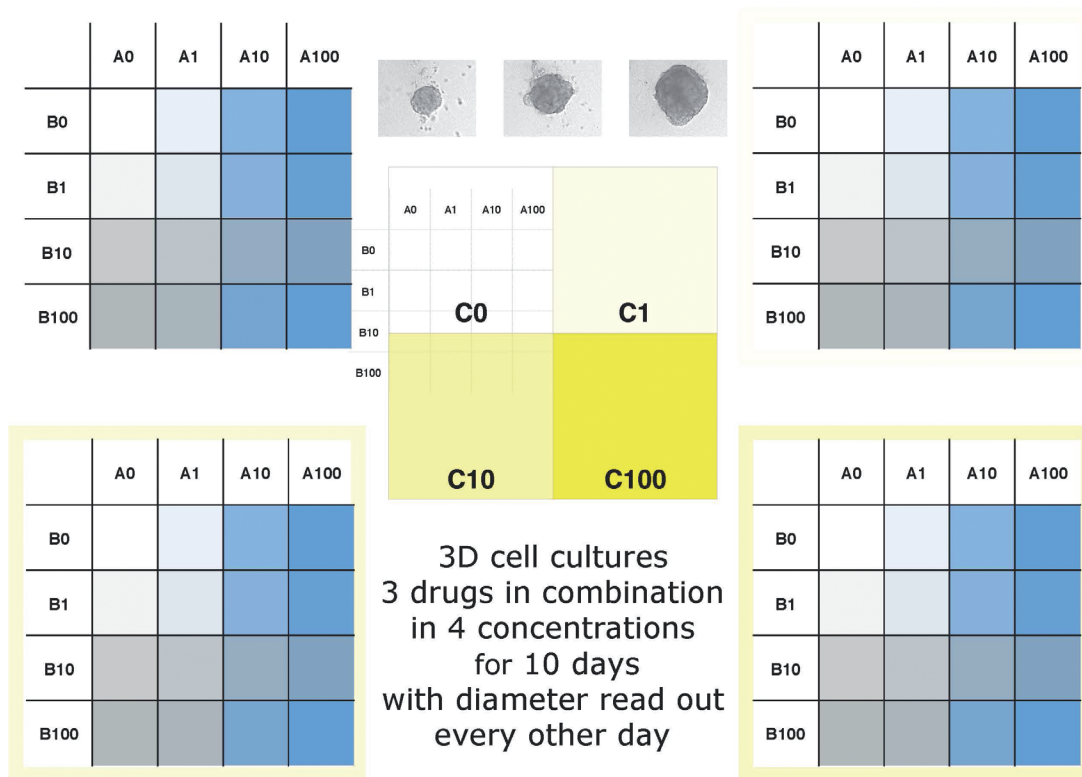


Figure 16-6. Disposition en damier permettant de tester une trithérapie différentielle. Trois molécules avec trois cibles différentes sont testées sur 10 jours en combinaison avec 4 concentrations (0, 1, 10, et 100 µM par exemple) ; les courbes de croissances (diamètre du sphéroïde) permettent de trouver le mélange optimal pour chaque combinaison.

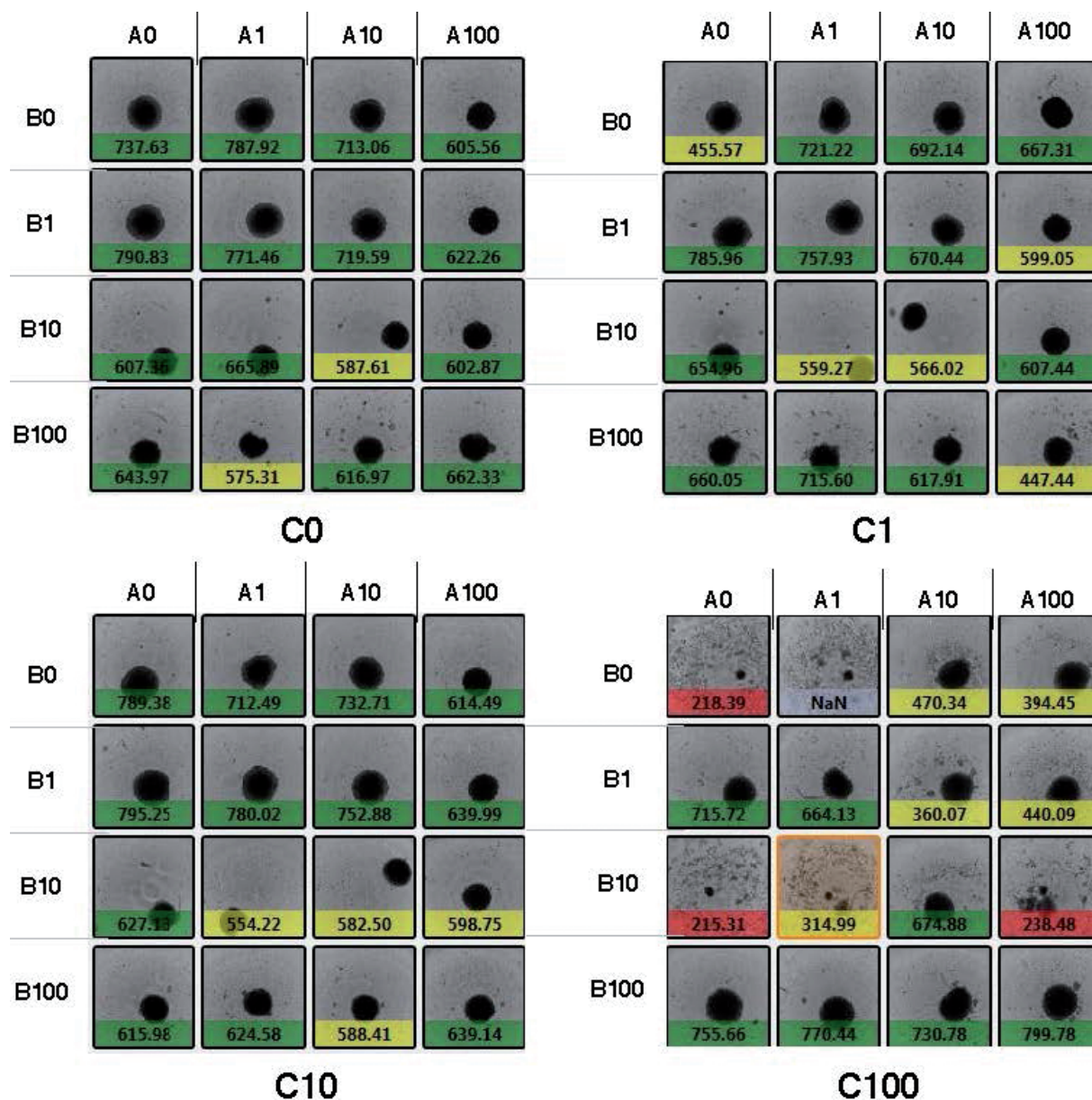


Figure 16-7. Exemple de résultats de criblage triple 3D. Le diamètre en μm de chaque sphéroïde (si il n'est éliminé totalement, NaN) est déterminé automatiquement par le cytomètre en image (Celigo™ Image Cytometry System, Nexcelom Bioscience, MA – États-Unis). On s'aperçoit que l'addition de 3 molécules aux plus fortes concentrations (ligne A de 0 à 100 + B100 + C100) ne résulte pas en un effet combiné, mais induit plutôt une forme de résistance des sphéroïdes. Molécules inhibitrices utilisées : A. ADN méthyltransférase, B. désacétylase et C. histone acétyltransférase.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bozic A, Marinkovic A, Bjelogrić S, Todorovic TR, Cvijetic IN, Novakovic I, *et al.* Quinoline based mono- and bis-(thio) carbohydrazones : synthesis, anticancer activity in 2D and 3D cancer and cancer stem cell models. RSC Adv. 2016 ; 6 : 104763-81.

Filipović NR, Bjelogrić S, Marinković A, Verbić TŽ, Cvijetić IN, Senčanski M, *et al.* Zn(ii) complex with 2-quinolinecarboxaldehyde selenosemicarbazone : synthesis, structure, interaction studies with DNA/HSA, molecular docking and caspase-8 and -9 independent apoptosis induction. RSC Adv. 2015 ; 5 : 95191-211.

- Hafner M, Niepel M, Chung M, Sorger PK. Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nat Methods*. 2016 ; 13 : 521-27.
- Harris LA, Frick PL, Garbett SP, Hardeman KN, Paudel BB, Lopez CF, *et al*. An unbiased metric of antiproliferative drug effect in vitro. *Nat Methods*. 2016 ; 13 : 497-500.
- Hulot C, Peluso J, Blond G, Muller CD, Suffert J. Synthesis of exotic polycycles such as cyclooctatrienes and fenestrenes with differential pro-apoptotic activities on human TRAIL-resistant metastatic cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 ; 20 : 6836-9.
- Lizard G, Duvillard L, Wedemeyer N, Muller CD, Ghiringhelli F, Cesbron A, *et al*. Microbilles, nanobilles et cytométrie : applications à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire. *Pathologie Biologie*. 2003 ; 51 : 418-27.
- Mahuteau-Betzer F. [The French National Compound Library : advances and future prospects]. *Med Sci (Paris)*. 2015 ; 31 : 417-22.
- Marder P, Litwin V. Frontmatter. In : P Marder, V Litwin. *Flow cytometry in drug discovery and développement*. Hoboken – New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. 2010 : i-xviii.
- Nabergoj D, Vrbek S, Zidar N, Tomasic T, Kikelj D, Masic LP, Muller CD. Synthetic analogues of marine alkaloid clathrocin differently induce phosphatidylserine exposure in monocytic cancer cells then in cancer stem cell lines. *MedChemComm*. 2016 ; 7 : 1546-54.
- O'Connor JE, Herrera G, Martinez-Romero A, de Oyanguren FS, Diaz L, Gomes A, *et al*. Systems biology and immune agit. *Immunol Lett*. 2014 ; 162 : 334-45.
- Pinna GF, Fiorucci M, Reimund JM, Taquet N, Arondel Y, Muller CD. Celastrol inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in Crohn's disease biopsies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 ; 322 : 778-86.
- Valet G. Cytomics, the human cytoome project and systems biology : top-down resolution of the molecular biocomplexity of organisms by single cell analysis. *Cell Prolif*. 2005 ; 38 : 171-4.
- Valet G, Tarnok A. Potential and challenges of a human cytoome project. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 ; 18 : 87-91.
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*. 1999 ; 4 : 67-73.

