

Projet de plate-forme commune d'imagerie  
quantitative appliquée à la microscopie

Projet présenté par Jean-Patrick Pommier

**CONCOURS INGENIEUR**

Janvier 2002

<b>PROFIL .....</b>	<b>3</b>
DOMAINES DE COMPÉTENCE.....	3
<i>Biologie Moléculaire</i> .....	3
<i>Bio-Informatique</i> .....	3
<i>Cytogénétique</i> .....	3
<i>Traitement et Analyse d'images 2D (3D) en microscopie à fluorescence</i> .....	3
<i>Modélisation</i> .....	3
PUBLICATIONS .....	4
COMMUNICATIONS.....	5
FORMATION.....	5
DIVERS.....	5
<b>RÉSUMÉ DE THÈSE .....</b>	<b>6</b>
INTRODUCTION.....	6
ANALYSE QUANTITATIVE DES SOUTHERN BLOTS DE TÉLOMÈRES, MODÉLISATION MATHÉMATIQUE D'UN SIGNAL ÉLECTROPHORÉTIQUE.....	7
FISH QUANTITATIF.....	9
<i>Méthodes de mesure des signaux FISH télomérique sur chromosomes.</i> .....	9
<i>Analyse statistique des signaux télomériques dans des fibroblastes primaires, relation avec la stabilité des chromosomes.</i> .....	11
<i>Hypothèse de la compétition entre lignée somatique et germinale pour le gain et la perte d'hétéromorphismes télomériques.</i> .....	13
<b>ACTIVITÉS POST-DOCTORALES.....</b>	<b>15</b>
PROJET TRACES (RADIOBIOLOGIE) .....	15
PROJET CGA (CYTOGÉNÉTIQUE QUANTITATIVE).....	16
<i>Nouveaux modules.</i> .....	16
<i>Segmentation</i> .....	18
<i>Indépendance du signal mesuré par rapport au matériel.</i> .....	20
<i>Travaux en cours avec le logiciel CGA</i> .....	22
AUTRES PROJETS EN ANALYSE D'IMAGES .....	22
<i>Analyse quantitative du signaux fluorescents sur noyaux par microscopie 2D/3D</i> .....	22
TEST DE DÉTECTION DE FUSIONS TÉLOMÉRIQUES PAR DÉTECTION DE TANDEMS INVERSES : <u>TFT-PCR</u> .....	23
<b>PROJET DE PLATEFORME COMMUNE D'IMAGERIE QUANTITATIVE POUR LA DRR .....</b>	<b>26</b>
BUTS.....	26
-les chercheurs des différents groupes: .....	26
-les services informatiques du CEA:.....	27
-les sociétés commerciales : .....	27
-le monde des logiciels libres.....	27
CHAMP D'APPLICATION ET RESSOURCES DE LA PLATE-FORME COMMUNE D'IMAGERIE QUANTITATIVE .....	28
<i>Topographie des protéines dans la cellule fixée ou vivante</i> .....	28
<i>Topographie du génome dans la cellule</i> .....	28
<i>Ressources</i> .....	29

## PROFIL

Jean-Patrick Pommier  
Né le 22/02/1967 à Paris  
Nationalité française  
Marié, un enfant  
80 Rue de Bagnolet 75020 Paris  
01 43 70 02 12

06 19 70 99 96  
jpommier@armoise.saclay.cea.fr  
pommier001@netscape.net

### **Docteur en biologie**

#### ***Domaines de compétence***

##### **Biologie Moléculaire**

Culture cellulaire.  
Extraction d'ADN génomique.  
Southern-blots.  
Isolation de séquences d'ADN par capture par affinité.

##### **Bio-Informatique**

Design de séquences oligonucleotidique pour la PCR.  
Analyse de séquences (Blast, Clustal, Tandem Repeat Finder).

##### **Cytogénétique**

Préparations chromosomiques (méthanol-acide acétique).  
Techniques conventionnelles : Giemsa, Bandes R  
Techniques en fluorescence: Préparation de sondes par PCR pour la cytogénétique (Alu, DOP), marquages *in-situ* (SPRINS), FISH (peintures, sondes oligonucléotidiques).  
Purification et marquage de cosmides subtélomériques (don du Dr Lindal Kerney)

##### **Traitement et Analyse d'images 2D (3D) en microscopie à fluorescence**

###### Mise en place d'un poste d'analyse d'images

Choix du set de filtres pour un microscope en fluorescence, choix d'une caméra CCD.

###### Analyse d'images MFISH

(avec NIH-Image, Aphelion).

###### Conception du cahier des charges du logiciel *CytoGenetic Assistant* (www.adcis.net),

CGA est un logiciel dédié à la quantification des signaux FISH sur chromosomes à partir d'un protocole développé sur NIH-Image.

### Developpement:

Projet “Traces”: dénombrement automatique d’impacts d’ions lourds (CIRIL).

Macros pour NIH-image :étiquetage en composantes connexes de particules binaires convexes

Programme de calcul de la longueur moyenne des télomeres en Southern-Blot avec modèle logistique de la migration de l’ADN.

Macros VBA pour le traitement d’images 2D sous le logiciel Aphélon:Correction FlatField, Compensation spectrale, Segmentation, Analyse de forme de chromosomes

### Veille technologique:

Recherche de logiciels du domaine public pour l’analyse d’images (TINA, XITE, IUE, XCosm, GSnake, TNImage, Image-J)

Recherche de logiciels du domaine public pour l’analyse statistique et numérique (ADE-4, R, SCILAB).

Reflexion sur une approche *Top-Down* (ou *model-driven*) pour la segmentation automatique des objets “cytogénétiques” (chromosomes, noyaux) à l’aide du programme GSnake (bibliothèque+utilitaires), tentative de compilation sur une plateforme LinuxPPC de la bibliothèque GSnake.

### Analyse statistique:

Analyse multivariée de la distribution de la longueur des télomères en FISH (Classification hiérarchique des variables (télomères) ou des observations (les cellules) par la méthode de ward avec coupure itérative du dendrogramme dans le but d’identifier des mélanges)

### Modélisation

Modélisation de la migration/diffusion électrophorétique, simulation numérique de l’électrophorèse.

Modélisation de l’effet des divisions cellulaires sur la distribution de la longueur des télomères: covariations et selection cellulaire.

### ***Publications dans des revues internationales (comité de lecture)***

Ancelin K., Bauwens S., Brun C., Ricoul M., Pommier J.P., Sabatier L., Gilson E.

A targeting Assay to study the cis function of human telomeric proteins :evidences for an inhibition of telomerase by TRF1 and for an activation of telomere degradation by TRF2. (Soumis)

Pommier, J.P., Martins, L., Ricoul, M. and Sabatier L.

Telomeric Heteromorphisms in normal human diploid fibroblasts

Manuscrit en préparation.

Pommier, J.P. and Sabatier L.

Analysis of the Telomere Length Distribution :Digital Image Processing and Statistical Analysis

Methods in Molecular Medicine, Humana Press (sous presse)

Ducray, C., Pommier, J. P., Martins, L., Boussin, F. D., Sabatier, L.

*Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process.*

Oncogene (1999) 18, 29, 4211-4223

Pommier, J. P., Gauthier, L., Livartowski, J., Galanaud, P., Boue, F., Dulioust, A., Marce, D., Ducray, C., Sabatier, L., Lebeau, J., Boussin, F. D.

Immunosenescence in HIV pathogenesis.

Virology (1997) 231 1, 148-154

JP Pommier, J Lebeau, C Ducray, L Sabatier

Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequences.

Biochimie (1995) 77, 817-825

### ***Publications dans revues françaises***

Gauthier L., Boussin F.D., Pommier J.P., Livartowski J., Galanaud P., Boué F., Dulioust A., Marcé D., Ducray C., Sabatier L., Lebeau J., Dormont D. Implication de la sénescence cellulaire dans l'immunodéficience induit par l'infection à VIH (1998) ; L'année gérontologique :12 :234-235

Gauthier L., Boussin F.D., Pommier J.P., Livartowski J., Galanaud P., Boué F., Dulioust A., Marcé D., Ducray C., Sabatier L., Lebeau J., Dormont D. Implication de la sénescence cellulaire dans l'immunodéficience induit par l'infection à VIH (1997). S.S.A Travaux scientifiques :18 :59-60.

## **Communications**

### **Cold Spring Harbor, New York 2001 Telomere Telomerase**

Pommier, J.P., Pothier G., Sabatier L.

Heterogeneity of telomere length distribution, specific chromosome instability and chromosomes imbalances occurrence during immortalization of human cells.

### **Cold Spring Harbor, New York 1999 Telomere Telomerase**

Pommier, J.P., Pothier G., Martins L., Sabatier L.

Heterogeneity of telomere length distribution and specific chromosome instability during senescence

### **Congress SBCF, Lyon 27-29 October 1999**

Jean-Patrick Pommier, Caroline Ducray, Luis Martins, Géraldine Pottier and Laure Sabatier

*Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during senescence and immortalization process of human fibroblasts.*

Biology of the Cell (1999) volume 91(7)-september 1999, 536-537

### **Athènes 1997 First European Congress of Cytogenetic**

JP Pommier, J Lebeau, C Ducray, Martins, L, Ricoul M, Sabatier L.

*Telomeric length could predict specific chromosomal instability.*

### **Villejuif 1995 Congrès des 3R**

C. Ducray, J. Lebeau, J.P. Pommier, B. Dutrillaux and L. Sabatier

*Evolution de la taille des télomères et de l'activité télomérase au cours de l'immortalisation cellulaire.*

### **Wursburg 1995 10th International congress of Radiation Research about 1995.**

Laure Sabatier, J. Lebeau, J.P. Pommier and B. Dutrillaux

*Chromosome instability and telomeric alteration detected in irradiated human fibroblasts.*

### **St Andrews 1995**

Laure Sabatier, J. Lebeau, J.P. Pommier and B. Dutrillaux

*Chromosome instability in human fibroblasts after heavy ions.*

## **Formation**

**1999** : Doctorat de l'université de Paris VI, Paris, France, spécialité : Biologie du vieillissement. Directrice de thèse : Dr Laure Sabatier, Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, Fontenay-aux-Roses, France. Titre de la thèse : « *Dynamique de la longueur des télomères au cours de la sénescence et de l'immortalisation de cellules humaines.* ». Mention très honorable avec félicitations du jury.

**1994** : DESS de Biologie et de pharmacologie du vieillissement de l'université de Marne-la-vallée. Mention AB.

## **Divers**

**Enseignement, 1994-1995** : enseignant en mathématique (1ere littéraire), répétiteur CNED en sciences de la nature et de la vie (jeunes sportifs de haut niveau, collège et terminale S).

## Résumé de thèse

### *Introduction*

La principale question posée dans ma thèse était de savoir si il existait une relation entre la quantité de motifs TTAGGG localisée à un télomère et la stabilité du chromosome qui le porte (*i.e.* la fréquence d'implication du chromosome dans une fusion terminale) dans un modèle fibroblastique humain. Ce travail se situait dans le prolongement des études effectuées au laboratoire de cytogénétique et génétique, puis au laboratoire de radiobiologie et oncologie, sur l'instabilité chromosomique des fibroblastes d'un donneur particulier (TP), cultivés jusqu'à la sénescence et de l'étude des effets à long terme d'une irradiation aux ions lourds sur l'instabilité chromosomique. Dans ces fibroblastes, les mêmes chromosomes se mettent à fusionner par les télomères (dicentriques terminaux) lorsque les cellules sont poussées à se diviser. Les résultats des études sur les cellules sénescents et irradiées, indiquaient que les télomères 1p, 16p, 13p étaient sur-impliqués. De plus, dans le cas de la paire de chromosomes 13, un hétéromorphisme indiquait qu'un des deux homologues était plus impliqué dans les fusions que l'autre. Ces résultats suggéraient donc fortement que si les télomères avaient un rapport direct avec l'instabilité chromosomique, les chromosomes les plus instables devraient avoir les télomères les plus courts. De plus, les profils d'instabilité chromosomique variant d'un individu à l'autre, les profils télomériques (la quantité de séquences TTAGGG pour un télomère particulier (chromosome/homologue/bras)) devaient être propres à chaque individu au moins dans les fibroblastes. La stratégie la plus directe pour résoudre cette question de la relation entre la stabilité chromosomique et la longueur des télomères, consistait donc à observer directement la longueur d'un télomère en microscopie à épifluorescence après hybridation d'une sonde télomérique et à mesurer le signal fluorescent. Les résultats sur l'instabilité chromosomique et les télomères dans les fibroblastes primaires sénescents montrent un hétéromorphisme télomérique (différence de longueur entre les homologues), l'existence de sous-classes de télomères, une instabilité spécifique des chromosomes homologues dirigée par les télomères (ces résultats ont été présentés au congrès du *Cold Spring Harbor telomeres/telomerase* en 1999).

Le modèle de fibroblastes transformés par SV40 mime les tumeurs solides par l'évolution du caryotypique. Une autre partie de mon travail aura été de travailler sur les aspects de l'instabilité chromosomique (giemsa, bandes R, peintures chromosomiques) et de l'évolution de la longueur des télomères (par Southern-blot et par FISH) d'un clone (clone TP15.5). Dans cette optique, j'ai alors mis en place et amélioré des méthodes numériques pour calculer la longueur moyenne des télomères des cellules transformées par SV40. Le modèle de fibroblastes transformés par SV40 nous a permis de mettre en évidence :

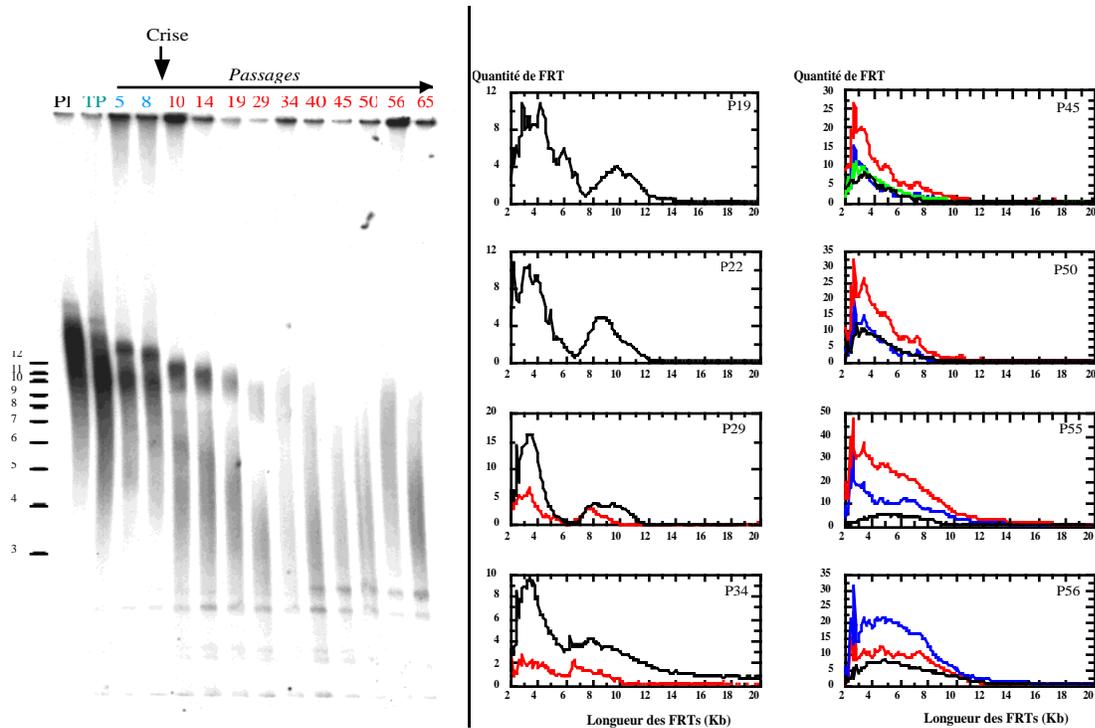
- L'existence de sous-populations de télomères à l'échelle d'une cellule.
- Un phénomène d'homogénéisation des télomères qui s'explique par un phénomène d'accessibilité différentiel de la télomérase sur les petits et les grands télomères. Cette cinétique est intéressante car elle sous-tend un modèle moléculaire où la chromatine télomérique en 3' peut exister sous deux états (ouvert/fermé) qui pourraient correspondre à des entités moléculaires identifiées (*T-loop* et/ou *G-quartet*).
- Une relation inverse entre la longueur des télomères et l'instabilité chromosomique autour de la crise.

### ***Analyse Quantitative des Southern Blots de télomères, modélisation mathématique d'un signal électrophorétique.***

La longueur moyenne des télomères d'une population cellulaire est égale au centre de masse d'un profil densitométrique. La position et la forme de ce profil densitométrique dépendent de la longueur de plusieurs millions de molécules d'ADN correspondant chacune à un télomère (après séparation électrophorétique, transfert, hybridation d'une sonde et autoradiographie). Dans le cas des cellules transformées par SV40, la forme de ces profils s'est révélée être particulièrement complexe et très clairement multimodale dans les premiers stades de la transformation cellulaire. Le simple calcul du *mean TRF* n'exploitait pas toute l'information contenue dans les profils de ces cellules. Nous avons considéré qu'il était intéressant d'ajuster ce type de signal par une somme de fonctions gaussiennes, correspondant à des sous-populations de télomères d'origine intracellulaire ou bien intercellulaire. Une difficulté supplémentaire est apparue empêchant d'ajuster directement un modèle multigaussien à un densitogramme

télomérique. Pour contourner cette difficulté, il a été nécessaire de développer un modèle mathématique du signal densitométrique des télomères.

La migration de fragments d'ADN au cours d'une électrophorèse est non linéaire ; la diffusion des fragments est également non linéaire et croît le long du gel. Le signal observé résulte de la transformation d'un signal idéal par un processus de déformation. Connaissant la manière dont le signal est déformé, il est possible de reconstruire une approximation d'un signal idéal, cependant la déformation variant selon la position du signal, il n'est pas possible de mettre en œuvre des techniques de super-résolution faisant appel à la déconvolution. Parce que nous n'avons pas de méthode numérique incorporant les contraintes du modèle, nous n'avons pas appliqué ce modèle pour éliminer les déformations électrophorétiques des densitogrammes télomériques. Cependant, la modélisation de la migration permet de définir un nouveau système d'axes (densité x kilobases) permettant de comparer des densitogrammes télomériques de différentes expériences (Figure 1).



**Figure 1 Densitogrammes télomériques (droite) extraits d'un autoradiogramme (gauche):** Comparaison de la distribution de la longueur des télomères dans des cellules immortalisées par SV40 au cours des divisions cellulaires (A nombre de passages croissants: P19<....<P56), pour différentes expériences (courbes noires, bleues, verte, rouges).

## ***FISH Quantitatif***

### Méthodes de mesure des signaux FISH télomérique sur chromosomes.

La question de la relation directe entre la longueur d'un télomère donné d'un chromosome homologue donné et la stabilité de ce télomère, *i.e.* sa capacité à ne pas fusionner pour donner des chromosomes dicentriques, restait posée. L'analyse *in-situ* à l'échelle d'un télomère unique reste incontournable et passe par la microscopie à épifluorescence et l'analyse d'image.

Avec le recul, l'obtention d'images de signaux télomériques de bonne qualité, même si cette étape est critique, n'est pas l'étape la plus complexe. La complexité réside dans le volume de données à traiter (92 paires de signaux pour chaque cellule humaine normale en métaphase) et les différentes étapes pour parvenir à un codage qui permette d'exploiter ces mesures. Le laboratoire disposait d'une machine cytovision™ commercialisée par la société Applied Imaging™. Avec cette machine comme poste de capture, nous avons analysé les images brutes avec un logiciel libre et gratuit, NIH-Image (développé par Wayne Rasband au NIH), puis développé une méthode semi-automatique pour l'extraction et l'assemblage des mesures (Figures 2A, 2B), les premiers résultats sur la distribution de la longueur des télomères ont été présentés au premier congrès européen de cytogénétique à Athènes en 1997. La méthode de codage des mesures a été améliorée. Elle permet de construire automatiquement des tableaux de mesures qui peuvent être interrogés comme une base de données, grâce à un système d'étiquetage symbolique (toujours avec NIH-image) faisant intervenir des opérations à la fois de bas niveaux (par exemple l'étiquetage en composantes connexes de particules binaires) et de haut niveaux impliquant de la reconnaissance de formes (résolution de chevauchement chromosomique et caryotypage).

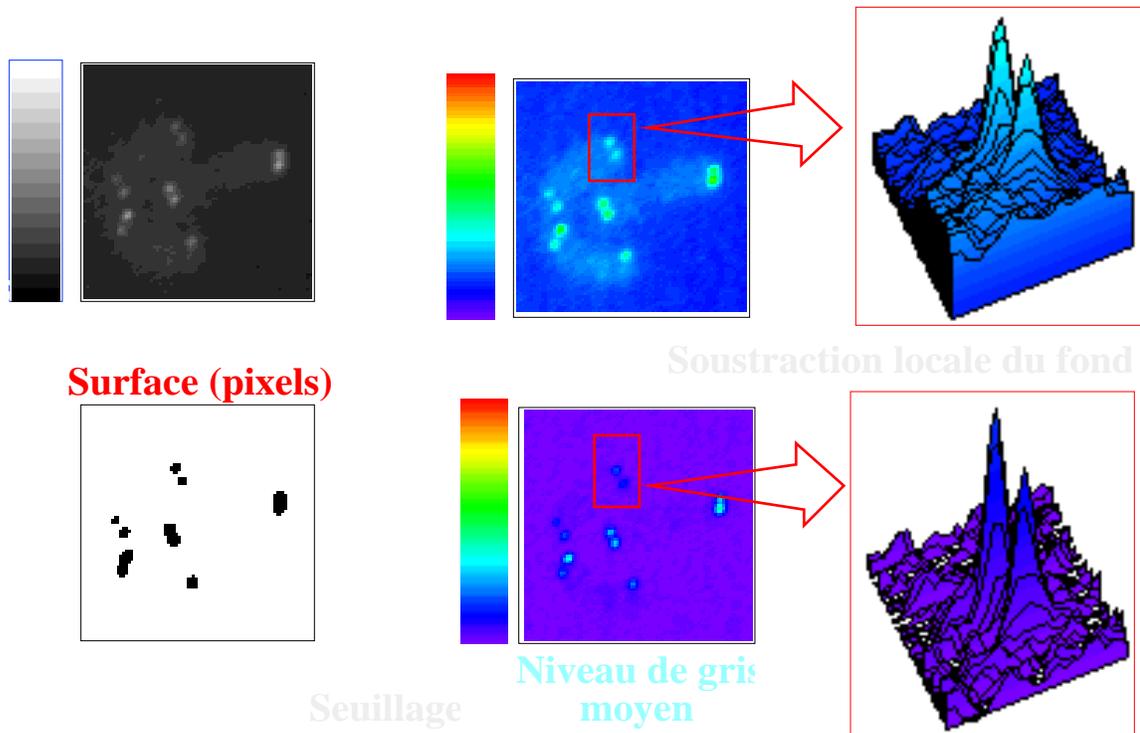


Figure 2A Mesure de l'intensité des signaux fluorescents télomériques en 3 étapes

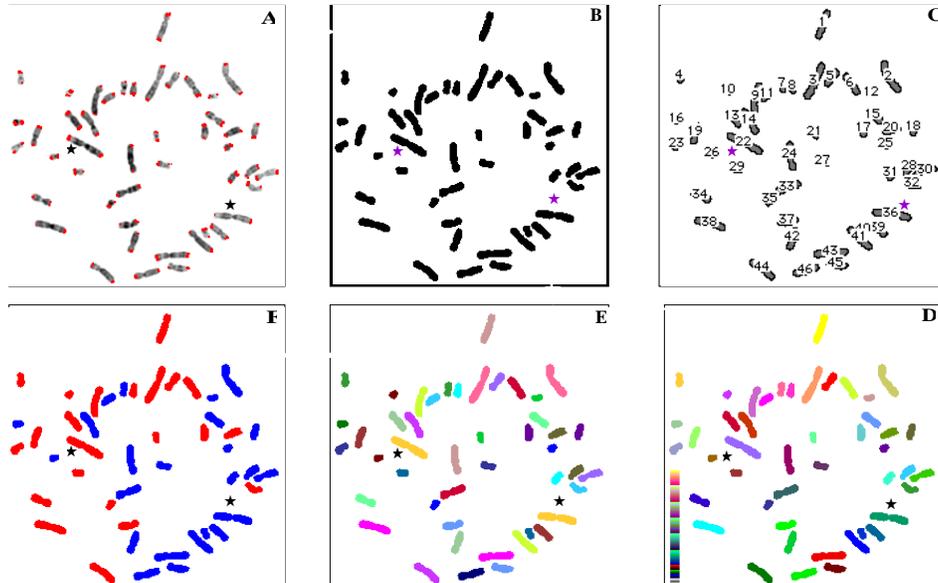
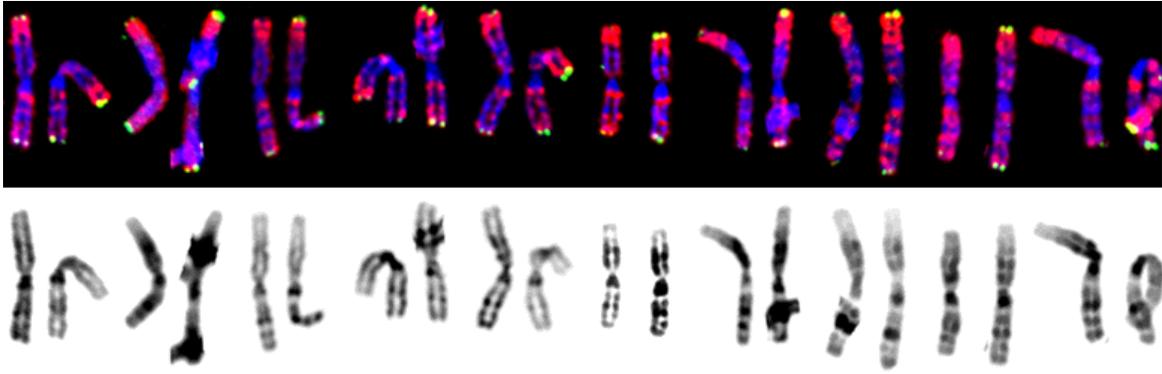


Figure 2B Etiquetage symbolique généré à partir d'une image des chromosomes : A-coloration DAPI. B-Image binaire. D-Composantes connexes (46). E-Labels en caryotype (24) ; F-Labels en homologue (2)

## Analyse statistique des signaux télomériques dans des fibroblastes primaires, relation avec la stabilité des chromosomes.

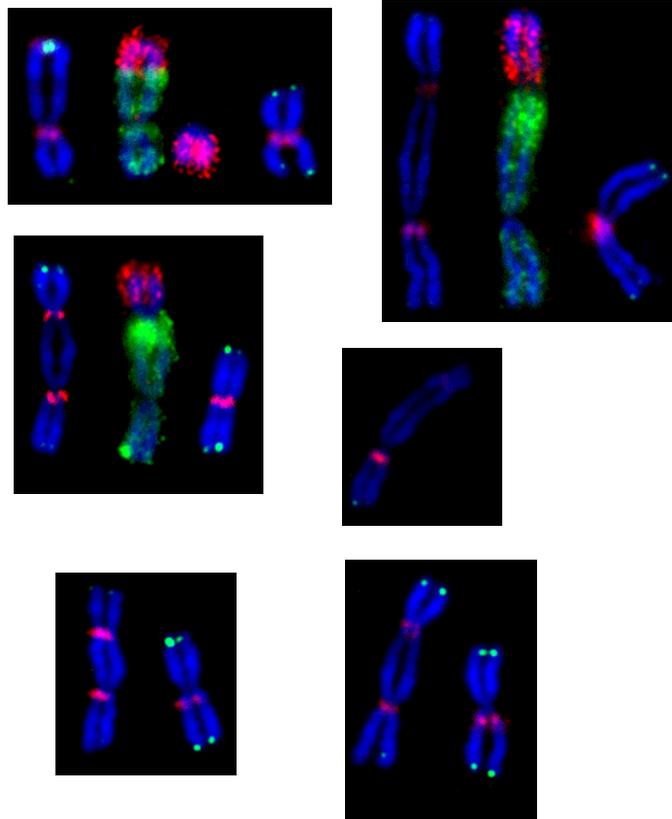
Les tableaux de mesures des télomères à l'échelle chromosomique peuvent rapidement devenir très vastes, pour contenir plusieurs milliers de valeurs ; de plus, chaque cellule peut être vue comme un point dans un espace à 92 dimensions (1 par télomère). Il est rapidement apparu que l'analyse de ces tableaux serait grandement facilitée en employant des techniques d'analyse multivariée (classification hiérarchique). Par un changement des unités de mesures (sans dimension), il devient possible de comparer de manière robuste la longueur d'un même télomère d'une cellule à l'autre et de mettre en évidence des différences de la longueur des télomères des chromosomes homologues, et l'existence d'au moins deux classes de télomères (les courts et les longs). Pour arriver à ces conclusions, il faut être capable de séparer les mesures correspondant à chaque chromosome homologue (A ou B, nous ne pouvons pas encore attribuer de manière absolue un télomère à un chromosome paternel ou maternel). Dans ce but, nous avons développé deux tests statistiques permettant de détecter des paires d'homologues hétéromorphes par les deux télomères ou par un seul, ainsi qu'une représentation (diagrammes *pter-qter*) qui permet de visualiser pour chaque chromosome la présence de deux groupes de points correspondant à chaque homologue.

Nous avons pu mettre en évidence un hétéromorphisme télomérique notamment pour les paires de chromosomes 1, 9,13, 16. L'hétéromorphisme des chromosomes 1 est visible à différent passage de la culture cellulaire (Figure 3A). Dans les cellules des passages précédant la sénescence in vitro, on a pu observer un nombre suffisant de chromosomes dicentriques pour tester si leur formation n'importe lequel des deux homologues. Dans le cas des chromosomes dicentriques impliquant un chromosome 1, le télomère impliqué dans la fusion est le télomère *1pA* (Figure 3B). Lorsque le télomère *1pA* n'est pas fusionné dans un dicentrique, il s'agit du télomère le plus court dans chaque cellule (ayant le moins de motifs TTAGGG). Cependant, la relation entre la quantité de motifs TTAGGG et la stabilité d'un télomère est plus complexe que l'hypothèse initiale (télomère court=instable, télomère long=stable). Dans le cas de la stabilité du chromosome 1A, si le télomère *1pA* est fréquemment fusionné, le télomère *1qA* ne fusionne pas alors qu'il est aussi "court " que le télomère *1pA* (c'est à dire que statistiquement le télomère



**Figure 3A Hétéromorphisme des télomères du chromosome 1 dans les fibroblastes TP “jeunes“.** Signal FISH télomérique (jaune), Signal Alu (rouge), DAPI (bleu).

Dicentriques impliquant le télomère p du chromosome 1 (homologue A)



**Figure 3B Instabilité spécifique du télomère 1pA:** dans le cas des chromosomes 1 de fibroblastes TP primaires présénescents, seul le télomère 1pA fusionne avec d’autres télomères pour former des chromosomes dicentriques, les chromosomes peuvent être identifiés par peinture chromosomique (trois premiers clichés. HSA1 :vert ;HSA13 :rouge).

1qA a autant de motifs TTAGGG). La relation longueur vs stabilité pour le télomère 1pA, pourrait être fortuite, mais pour d'autres chromosomes, également instables, ce sont encore les petits télomères qui fusionnent. Le mécanisme expliquant comment un couple de télomères fusionne pour générer spécifiquement certains chromosomes dicentriques (par exemple 1pA-13pA, mais pas 1qA-13pA) reste à élucider (Cf Champ d'application).

### Hypothèse de la compétition entre lignée somatique et germinale pour le gain et la perte d'hétéromorphismes télomériques.

Comme la réplication de l'ADN et la télomérase font disparaître progressivement les différences de longueur entre les télomères, d'où vient la différence de longueur des télomères vue pour certains homologues, et l'existence de sous-populations de télomères au sein de chaque cellule ? Cette diversité du répertoire (sous-populations) télomérique pourrait naître des mécanismes de recombinaisons méiotiques. Une des fonctions première de la télomérase pourrait être de rallonger des télomères trop courts, nés d'un échange conservatifs de motifs TTAGGG. Ainsi la lignée germinale et la lignée somatique seraient en compétition pour maintenir ou faire disparaître la diversité du répertoire télomérique. Ce modèle prévoit que la diversité télomérique devrait être maximale après la méiose dans les gamètes et dans les cellules embryonnaires pour diminuer dans les cellules somatiques d'autant plus que les cellules se divisent et expriment la télomérase (lymphocytes, cellules épithéliales). Ce modèle prévoit également que des animaux nés par transfert d'un noyau somatique adulte dans un ovocyte devraient présenter une diminution de la diversité du répertoire télomériques, indépendamment des variations de longueur absolue des télomères qui peuvent être positives (murin) ou négatives (ovin, ex Dolly) ... ou sujettes à débat (bovin).

### Le projet CGA (CEA Technologie n°44/mai-juin 1999. Concours d'idées, 50 idées pour innover)

Le logiciel NIH-Image ne se prête pas très bien à une analyse en routine des signaux télomériques sur chromosomes, notamment par ce que l'on ne peut disposer d'une interface graphique avec des commandes spécialisées pour manipuler les chromosomes et puis surtout il s'agit surtout d'un logiciel fait pour manipuler des images ayant une profondeur de 256 niveaux

de gris (8bits), alors qu'une plus grande dynamique (12 ou 16 bits) est nécessaire pour atteindre une discrimination élevée. De plus, l'analyse des données nécessitait de "jongler" avec différents logiciels. Une solution intégrant toutes les étapes, de l'acquisition des images à la création des graphiques, devenait critique. Le protocole mis au point avec le logiciel NIH-Image, est à la base du cahier des charges du logiciel *CGA (CytoGeneticAssistant)* que le laboratoire a décidé de faire développer en externe par la société ADCIS ([www.Adcis.net](http://www.Adcis.net)) qui commercialise par ailleurs le logiciel Aphelion™ spécialisé dans le traitement et l'interprétation d'images (*Image Understanding*).

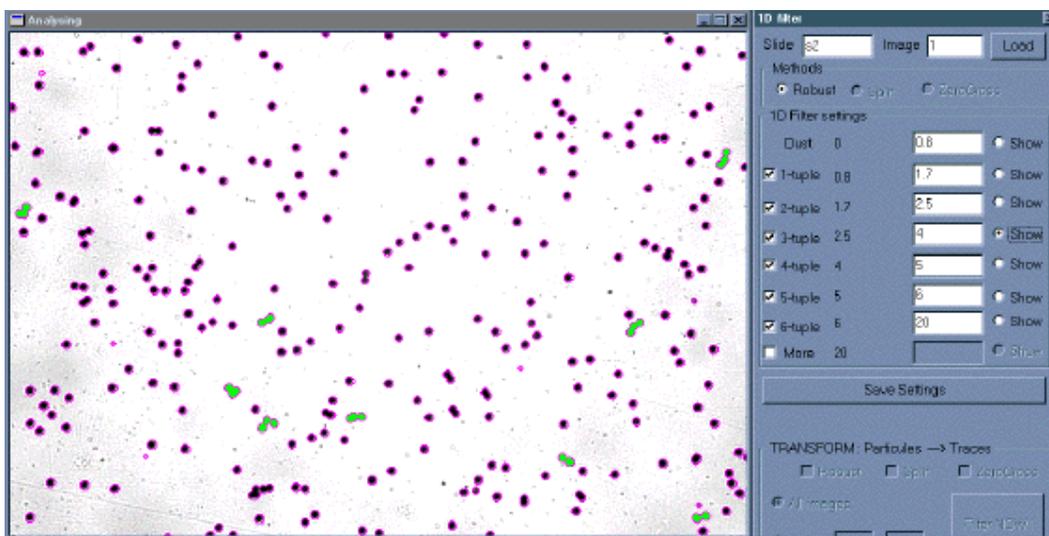
*CGA* est un système intégré, comprenant le pilotage d'une caméra haute résolution refroidie, la gestion d'une banque d'images, des modules de détection des chromosomes et de mesure des signaux FISH télomériques, un module de génération d'image en couleur compatible avec un système MFISH. *CGA* est conçu pour être modulaire de manière à accueillir des modules supplémentaires (voir plus bas).

## Activités Post-Doctorales

### *Projet Traces (Radiobiologie)*

Dans la recherche des effets des rayonnements ionisants sur les cellules, il est primordial de pouvoir déterminer la fluence (particules/cm<sup>2</sup>) du faisceau de particules. Des détecteurs couplés à l'accélérateur de particules du GANIL permettent d'estimer cette fluence. Cependant, au cours de ses travaux, Mme Isabelle Testard (CEA CIRIL) et d'autres radiobiologistes ont mis en évidence la nécessité de matérialiser l'impact des ions dans la zone d'irradiation des cellules, de manière à estimer plus directement la fluence du faisceau, voire sa qualité (gradient de fluence ?), mais également pour déterminer le nombre d'impacts par cellule.

Au Centre Interdisciplinaire de Recherche sur les Ions Lourds, dirigé par M. Jean-Pierre Grandin, en collaboration avec Mme Isabelle Testard et avec l'aide du support technique de la société ADCIS, j'ai développé une application de dénombrement d'impacts pour calculer la fluence des particules (le nombre d'impacts par cm<sup>2</sup>). Ce logiciel développé en langage VBA dans l'environnement Aphelion, pilote une caméra, gère la banque d'images, détecte automatiquement les impacts, et distingue les particules qui correspondent à 1, 2, 3 ou plus d'impacts et calcule le nombre d'impacts par cm<sup>2</sup> (Figure 4)



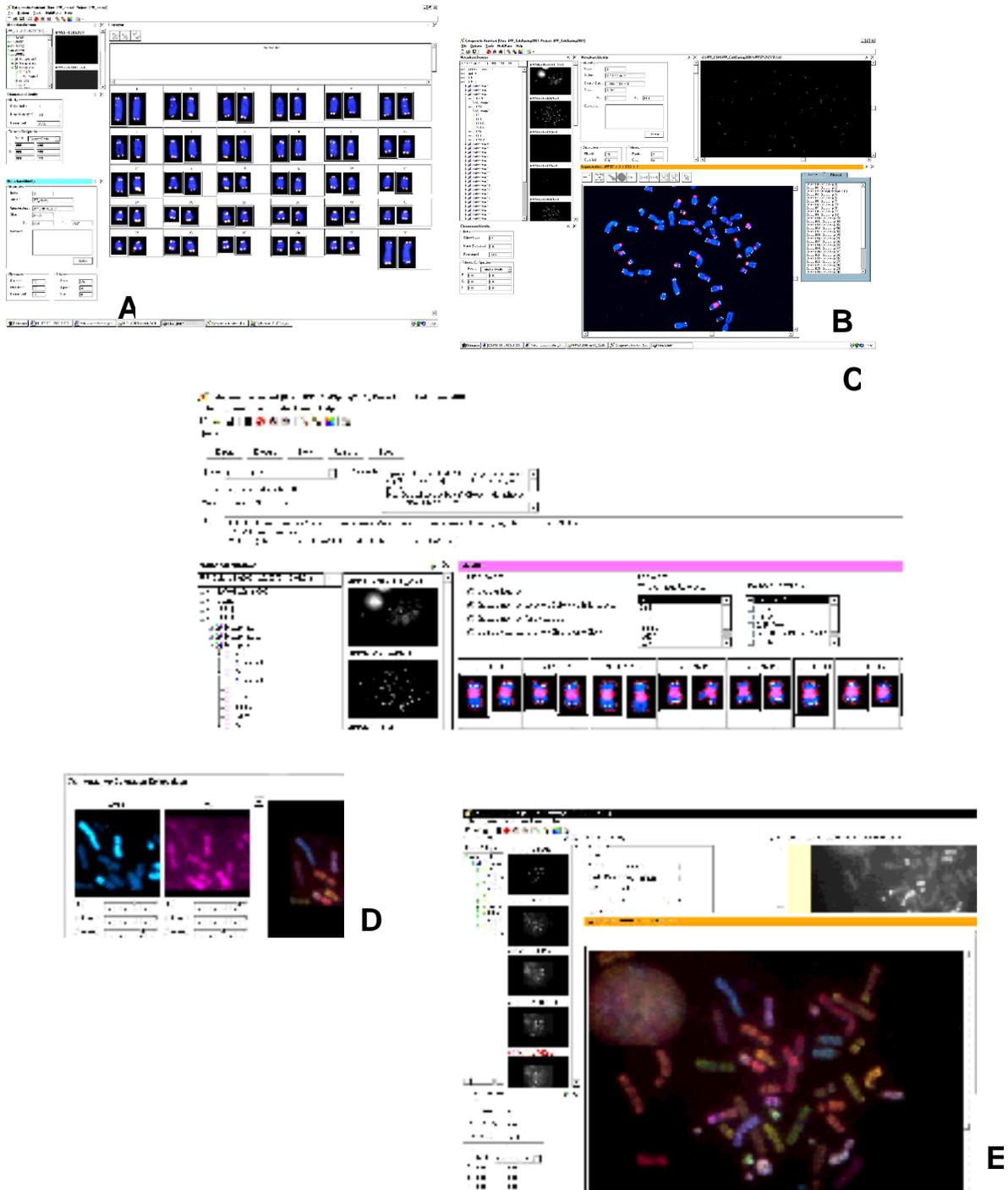
**Figure 4** *Projet Traces*: les traces des ions sont détectées (violet). Certaines traces résultent de plusieurs impacts (en vert des traces résultant de impacts proches).

## ***Projet CGA (Cytogénétique quantitative)***

### **Nouveaux modules**

Le logiciel CytoGenetic Assistant, en est à sa version 3.1.1 après une quatrième phase de développement par la société ADCIS. Les fonctionnalités du logiciel sont impressionnantes et en font un système d'analyse cytogénétique plus puissant, sur certains plans, que bien des systèmes commerciaux. *CGA* intègre maintenant une interface graphique complètement configurable et de nouveaux modules comme :

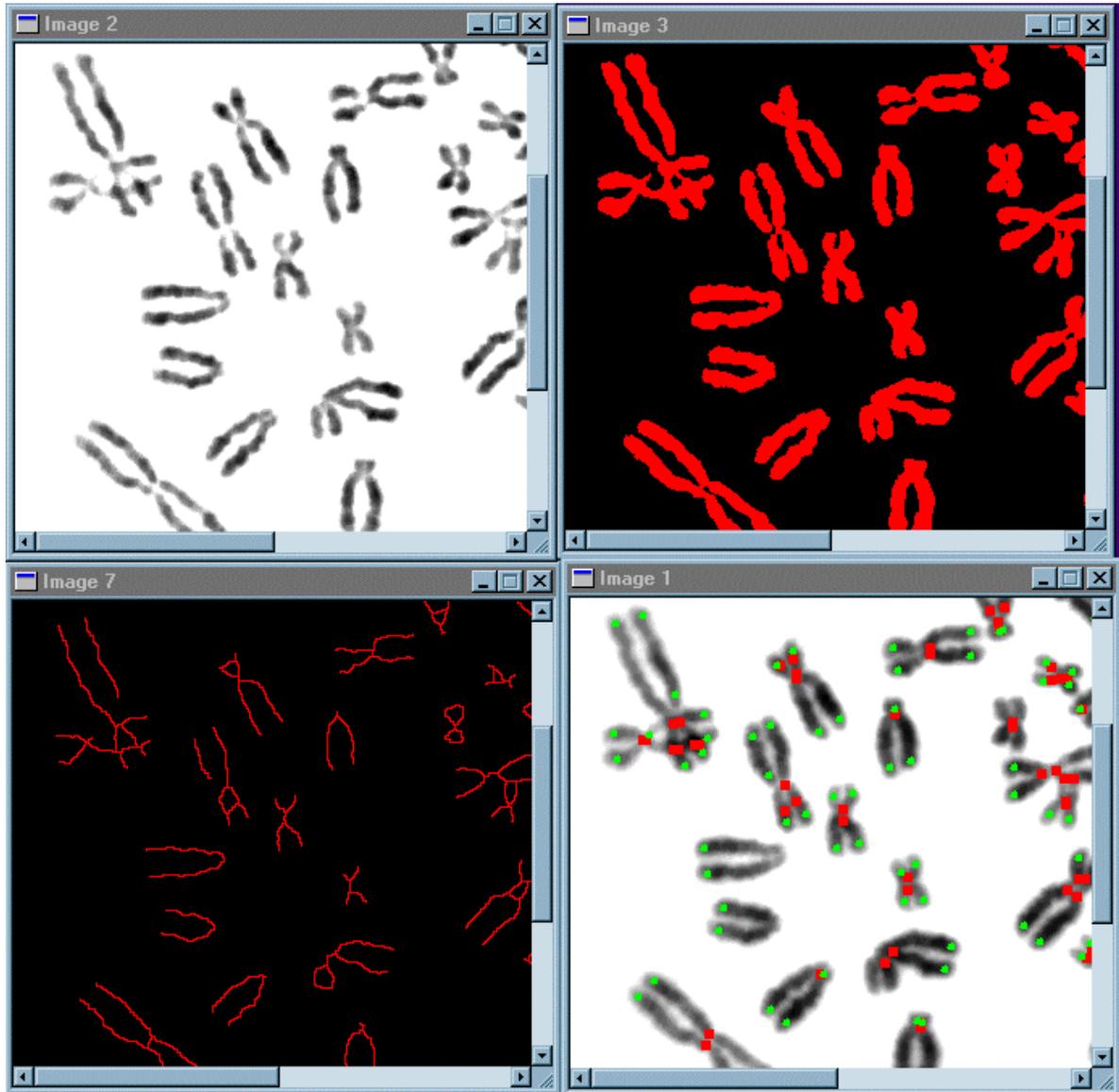
- le traitement par lot de tous les processus de segmentation et de mesure
- les graphiques intégrés (histogrammes et scatterplots)
- un système de requête (SQL) pour construire automatiquement des galeries de chromosomes (il s'agit d'une fonction qui n'existe sur aucune plateforme commerciale à ce jour !)
- un système d'extraction des mesures qui propose différents systèmes d'unité.
- des liens dynamiques encore améliorés entre les différents modules.
- un système de construction d'images en couleurs gérant un nombre quelconque de composantes spectrales avec une gestion de différentes configurations de coloration.
- un caryotypeur qui permet d'étudier le caryotype de n'importe quelle espèce (fonction présente depuis le début, mais ce module a été encore amélioré).



**Figure 5** Copies d'écran présentant quelques fonctions du logiciel CGA : **A**-Caryotype (couleurs, inverse DAPI) avec un nombre paramétrable de paires de chromosomes (ex :N=30, bovin). **B**-Détection de signaux fluorescents (ex :télomères humains). **C**-Construction d'une galerie d'images du chromosome 9 avec des requêtes programmables en langage SQL. **D**, **E**-Nombre illimité de composantes pour la construction d'image MFISH (banque d'images MFISH [www.adires.com](http://www.adires.com)).

## Segmentation

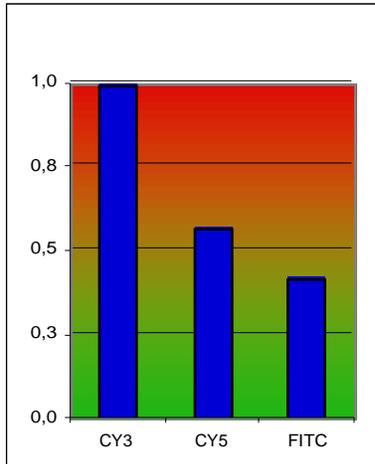
Personnellement, j'ai écrit des macros dans le langage de programmation du logiciel Aphelion, pour disposer de fonctions qui ont été intégrées par la suite dans CGA (correction de défaut d'illumination des images, amélioration des images pour faciliter la détection des chromosomes et des signaux fluorescents). Je me suis également intéressé aux stratégies utilisées en reconnaissance de forme dans le but de résoudre de manière totalement automatique la résolution des chevauchements de chromosomes au sein de l'image d'une métaphase, étape qui représente le goulot d'étranglement majeur dans toute analyse cytogénétique. Par exemple, dans une approche consistant à analyser la forme des chromosomes à partir d'une image DAPI : on isolera les extrémités des chromatides et les régions centromériques ou correspondant à des chevauchements. Pour cela, on recherche les points simples et les points multiples (par transformation *Hit and Miss*) du squelette des chromosomes (Après un seuillage par entropie d'une image soumise à un filtrage passe-haut suivi d'une compression de son histogramme des niveaux de gris). Ce type d'approche devrait permettre de trouver des critères de décision pour résoudre automatiquement les superpositions de chromosomes (Figure 5). Une combinaison des méthodes de segmentation précédentes et de segmentation par déformation sous contraintes d'un modèle géométrique de chromosomes (qui pourrait inclure de composantes multispectrales) pourrait être suffisamment robuste pour être complètement automatisable. La librairie GSnake (SunOS) et la librairie implémentant la segmentation par *modèle d'apparence actif* (AAM-API pour windows) sont disponibles librement.



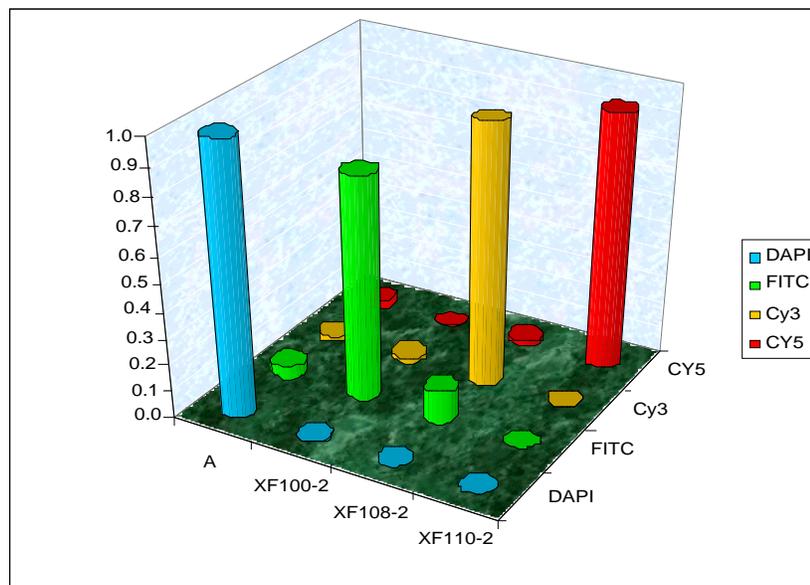
**Figure 6** Analyse de la forme des chromosomes colorés au DAPI : Filtrage passe-haut du DAPI pour isoler les chromatides (image sup. gauche). Seuillage automatique (image sup. droite). Squelette des chromosomes détectés (image inf gauche). Superposition sur l'image DAPI originale, des points simples (verts) et multiples (rouges) détectés par un opérateur morphologique à partir du squelette des chromosomes (image inf. droite).

## Indépendance du signal mesuré par rapport au matériel

La comparaison de l'intensité de signaux FISH correspondant à différents fluorochromes est délicate, de nombreux biais peuvent fausser les mesures. En premier lieu, la sensibilité spectrale varie d'un fluorochrome à l'autre. Pour une même sonde un signal fluorescent sera plus fort en cyanine 3 puis en cyanine 5, et sera plus faible en FITC (Figure 7A). En deuxième lieu, la spécificité spectrale des filtres n'est pas idéale du fait des recouvrements inévitables des spectres d'émission et d'excitation des fluorochromes. Ce défaut spectral dit de *cross-talk*, peut être compensé à condition d'avoir été modélisé (Figure 7B). Pour cela, on utilise une lame de microscope sur laquelle on a déposé des microgouttes de solution de fluorochrome (FITC, Cy3, Cy5) de concentration connue, puis on mesure les capacités discriminatoires de chaque combinaison de filtres (nous avons utilisé des sets de filtres passe-bandes de type *alpha-vivid* commercialisés par *Omegafilters* : XF100-2, XF108-2, XF110-2), pour obtenir une matrice 4x4 (avec le DAPI comme quatrième fluorochrome) décrivant comment d'une image multispectrale idéale, on observe une image dégradée. L'inversion de cette matrice permet de reconstruire une image proche de ce qui devrait être idéalement observé. Enfin, pour toute tentative de mesure d'un signal, il est prudent de disposer d'une référence interne (une deuxième sonde fluorescente qui se distingue de la cible d'intérêt, soit par sa position soit par un autre fluorochrome). Connaissant les sensibilités relatives des fluorochromes (par exemple Cy3=1, Cy5=0.57, FITC=0.42), le nombre de fluorochrome par sonde (1 pour une sonde oligonucléotidique), connaissant le nombre de copies d'une cible de référence, il devient possible de mesurer de manière robuste et absolue (en kilobases) un deuxième signal qui pourra être détecté avec un deuxième fluorochrome.



**Figure 7A Détermination de la sensibilité relative de fluorochromes avec des solutions de référence en microscopie.**



**Figure 7B Détermination de la spécificité spectrale des combinaisons de filtres d'un microscope**

## Travaux en cours avec le logiciel CGA

Analyse de l'instabilité chromosomique dans des fibroblastes primaires sénescents et transformés par SV40.

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

Profils télomériques lymphocytaires chez des individus Rb ayant développé une tumeur radio-induite.

-Institut Curie

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

Effet de la modulation de l'expression de protéines télomériques sur la longueur d'un télomère ciblé.

-ENS Lyon

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR.

Profil télomériques, pentamériques de cellules musculaires satellites primaires normales. Profils télomériques, trinuécléotidiques et pentamériques de cellules musculaires satellites primaires DMD.

-Laboratoire Cytosquelette et développement, Hopital de la Pitié-Salpêtrière.

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR.

Effet du transfert de noyaux de fibroblastes bovins sur la longueur et l'hétéromorphisme des télomères.

-INRA, Jouy-en-Josas

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

## *Autres projets en analyse d'images*

### Analyse quantitative du signaux fluorescents sur noyaux par microscopie 2D/3D

Mesure des signaux télomériques sur noyaux, identification de cellules humaines dans un mélange de cellules humaines et murines.

-Institut Curie

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

Dénombrement de signaux FISH sur champs de noyaux, application au satellite du chromosome .

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

Développement de l'analyse de l'intensité des signaux télomériques sur coupe de tissus.

-IGR

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

Développement de l'analyse automatique de la distribution spatiale de Ku80 dans le noyau de cellules LLC radiosensibles ou radioresistantes après immunohistochimie en fluorescence.

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

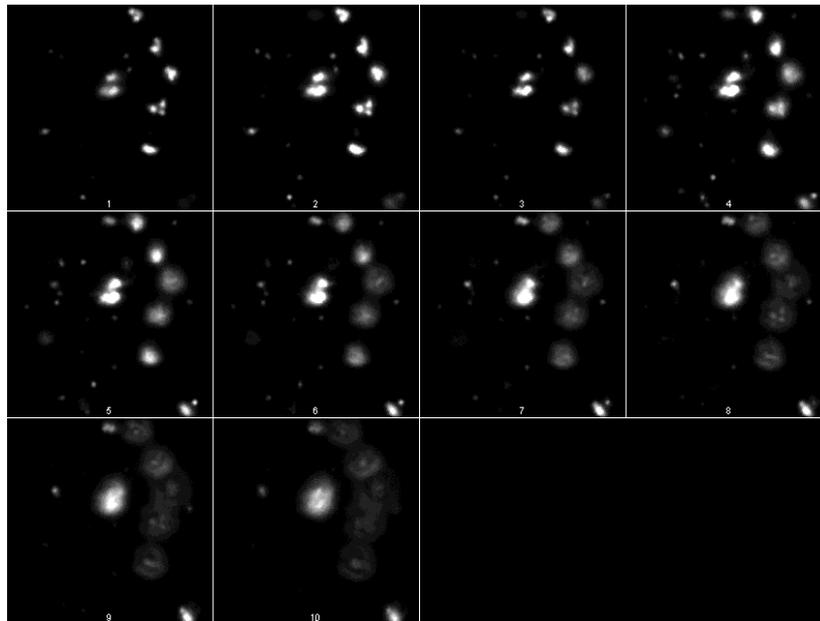
Méthodes de rendu 3D (Figure 8A, B, C)

-Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR

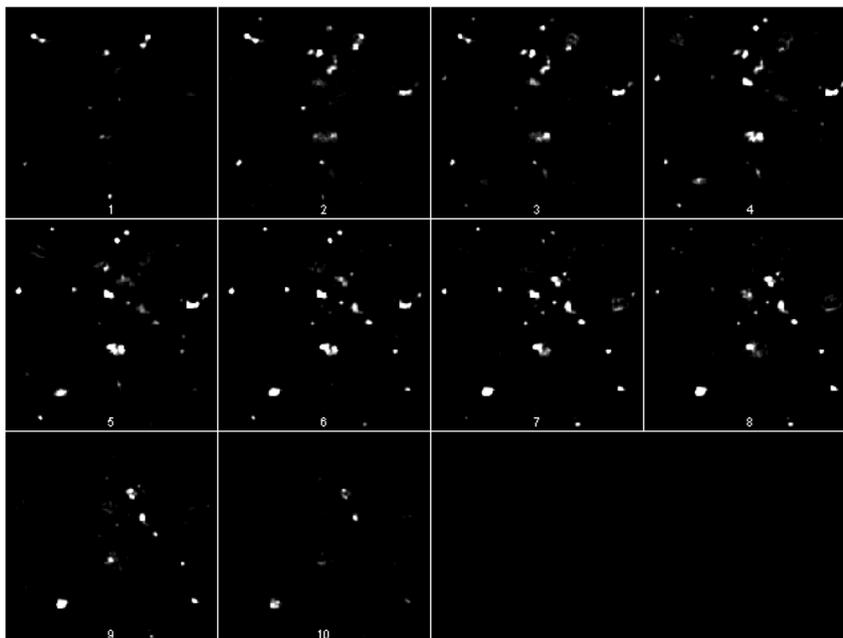
**Test de détection de Fusions Télomériques par détection de tandems inverses : TFT-PCR**

Développement en cours d'un test de détection de séquences télomériques en tandem inverse par PCR, application éventuelle au FISH pour l'obtention de sondes pan-subtélomériques.

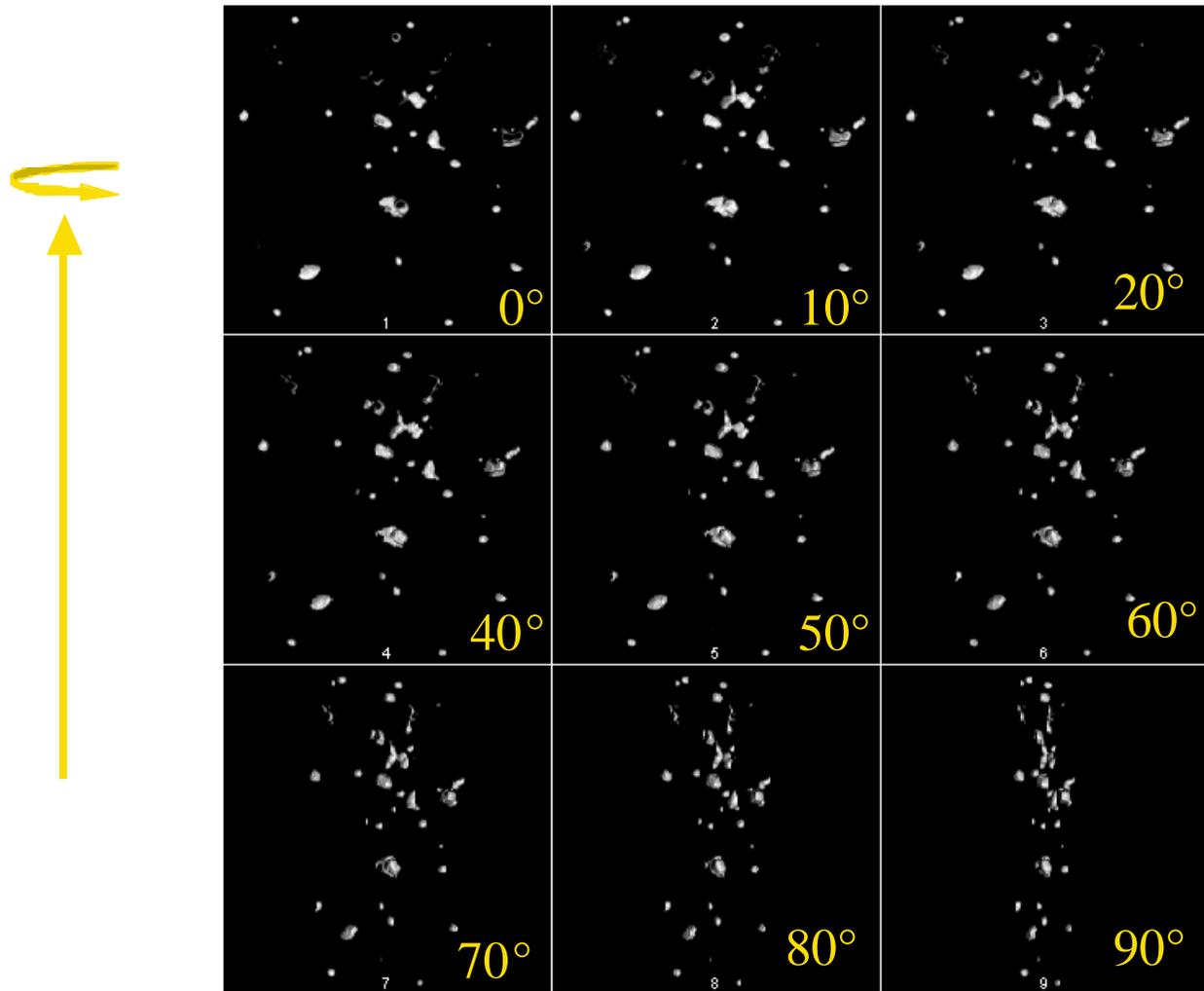
Laboratoire de Radiobiologie et d'Oncologie, CEA FAR



**Figure 8A** Serie de sections optiques d'un noyau de cellule de hamster ( signal télomérique)



**Figure 8B** Séries de sections optiques après déconvolutions (élimination des signaux hors focus)



**Figure 8C Rendu 3D des signaux fluorescents (intensité est proportionnelle à la distance à l'observateur) avec rotation des signaux autour de l'axe Y de la cellule.**

## Projet de plateforme commune d'imagerie quantitative pour la DRR

La microscopie à la DRR fait partie des techniques couramment utilisées. Le couplage de la microscopie et des techniques d'analyse numérique peut apporter des informations sur les systèmes biologiques à l'échelle cellulaire, qui seraient plus difficilement accessibles par les techniques biochimiques (localisation cellulaire) voire impossible à obtenir autrement (ratio d'images multispectrales) ; ou bien encore accélérer la collecte de ces informations par rapport à une méthode manuelle (dénombrement). L'exploitation des méthodes numériques en imagerie (corrections, filtrage, seuillage, cooccurrence, ...) est parfois intégrée dans des logiciels spécialisés. Lorsque le problème est mal abordé par ces logiciels, il faut alors se tourner vers des logiciels généralistes ou bien encore écrire soit même une application pour résoudre un problème, ce que peu de biologiste accepte de faire. Avec l'arrivée prochaine de nouvelles équipes INSERM au sein de la DRR, les travaux d'imagerie vont augmenter et l'imagerie 3D va être tout particulièrement développée.

### ***Buts***

Le but d'une plateforme commune d'imagerie quantitative est de fournir à n'importe quel laboratoire toute l'assistance nécessaire à leur sujet d'étude en microscopie, en analyse d'image et pour les systèmes informatiques qui les sous-tendent. Je propose de mettre mes compétences en biologie, en microscopie, en imagerie, à la disposition des autres équipes de la DRR pour toute étude faisant intervenir des techniques d'imagerie multispectrale et *time-lapse*.

Ma fonction serait de développer et de maintenir cette plate-forme de manière à ce qu'elle remplisse les besoins des utilisateurs. Cette fonction demande d'être à l'interface entre :

#### **-les chercheurs des différents groupes:**

-Pour identifier leurs besoins en microscopie et proposer des solutions (microscope confocal ou conventionnel ; set de filtres pour le MFISH, le FRET ; camera video CCD, intensifiée ; ...)

-Pour développer des solutions logicielles dédiées à leur problème ou bien identifier les logiciels de commerce ou du monde des logiciels libres apportant une solution.

-Pour proposer de nouvelles approches relatives aux projets des différents laboratoires (approches multispectrales en immunohistochimie ; sondes ; protéines fluorescentes BFP, GFP, YFP multiFRET)

-les services informatiques du CEA:

**-Pour conserver un parc informatique optimal (CEA DRR)**

-Au niveau des systèmes de base (réseau, imprimantes)

-Au niveau des machines : Les applications en imagerie sont extrêmement gourmandes en ressources (puissance/mémoire/stockage), un renouvellement des machines pour des machines toujours plus puissantes pour les applications critiques est souhaitable en conservant une compatibilité ascendante.

-Au niveau des données : Les systèmes d'imagerie génèrent un volume de données très important que chaque utilisateur gère de son mieux (*i.e.* en empilant les CDROM le plus souvent), et il peut être parfois difficile de rechercher des données anciennes. Une réflexion sur un système de *datathèque* est-elle nécessaire ? Une *datathèque* gérée en intranet (pour une question de sécurité et de confidentialité, avec une indexation des images par laboratoire/thème/...) pourrait décharger en partie les utilisateurs de la gestion des images.

**-Pour proposer de nouvelles solutions matérielles/logicielles**

Ces solutions pourraient passer par l'utilisation des ressources matérielles informatiques du CEA (supercalculateurs, clusters de machines sous linux) qui ne sont pas habituellement utilisées en radiobiologie, en biologie cellulaire ou en cytogénétique, dans le but de gagner plusieurs ordres de grandeurs dans le temps d'analyse.

-les sociétés commerciales :

-Pour évaluer les meilleures solutions qui combinent :intégration du matériel (Caméra/Carte d'acquisition/Pilotage du microscope) - puissance d'analyse/facilité de mise en œuvre des logiciels- coûts et pérennités des investissements financiers et intellectuels.

-le monde des logiciels libres

-Pour trouver des logiciels pour faire ce que l'on ne trouve pas dans les logiciels propriétaires ou faire la même chose gratuitement (déconvolution de sections optiques avec XCOSM, segmentation avec Gsnake ou la technique AAM).

-Pour mener une réflexion sur une migration vers les logiciels et les systèmes d'exploitation libres (GNU/Linux,...) plutôt que propriétaires (Windows). Pourquoi un système libre comme Linux plutôt que Windows ? Linux est quasiment gratuit, évolue plus vite que Windows et est disponible sur un nombre de plates-formes plus grand (Intel, PowerPC, Alpha,...) et notamment pour des *clusters* d'ordinateurs simulant un super ordinateur. Donc, à condition de disposer de logiciels d'imagerie fonctionnant sous un *cluster* linux, pour gagner en vitesse de traitement, il suffit de rajouter des ordinateurs dans le cluster. Outre une puissance de calcul potentiellement énorme s'il est optimisé pour fonctionner sur un *cluster*, un logiciel libre (dont le code source est accessible par définition) assure une pérennité de l'investissement en recherche-développement, ce qui n'est pas le cas avec une solution logicielle propriétaire.

### ***Champ d'application et ressources de la plate-forme commune d'imagerie quantitative***

Les thèmes d'étude concernent immédiatement la topographie protéique et génomique, mais toutes les problématiques sont les bienvenues (traceurs fluorescents pour le métabolisme cellulaire, ...).

### **Topographie des protéines dans la cellule fixée ou vivante**

Au sujet de la topographie protéique (transport du cytoplasme vers le noyau ; la distribution dans le noyau : foci vs distribution diffuse ; cinétique des interactions protéines-protéines) dans la cellule fixée ou vivante, les thèmes d'étude concernent :

les systèmes de réponse au stress radioinduit (protéine Kin17, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité).

les systèmes de réparation de l'ADN (voie BER, laboratoire de radiobiologie de l'ADN).

### **Topographie du génome dans la cellule**

L'effet du type cellulaire sur la topographie du génome sera étudié avec comme application l'analyse de la position relative des gènes RET/PTC1/PTC2. L'étude des relations entre les télomères, leur régulation par un ensemble de protéines (TRF1, TRF2, TIN2, hTERT, PARP, Ku, WRN, ...), la stabilité chromosomique, propose un challenge aux techniques d'imagerie quantitatives. Il serait intéressant de savoir si les petits télomères qui fusionnent dans les cellules primaires ont tendance à être spatialement proches en interphase. Cette approche nécessite de mesurer des signaux télomériques dans un noyau donc d'avoir une bonne résolution spatiale

dans les trois dimensions, et de les identifier simultanément avec des sondes subtélomériques discriminées par un marquage MFISH ; ce qui requiert une excellente résolution spectrale à cause de la proximité de l'ensemble de ces signaux. De nouveaux systèmes d'imagerie confocale associant à chaque section optique (x-y) une pile multispectrale ( $\lambda$  *stack*) devraient permettre l'analyse de telles préparations interphasiques.

## Ressources

De nombreuses ressources en matériel et en logiciels permettent déjà d'aborder les méthodes d'analyse d'images en deux dimensions (microscopes à fluorescence droits et inversés ; microscope à balayage laser (ACAS) ; sets de filtres ; caméras CCD ; logiciels généralistes et dédiés) ; néanmoins, d'autres ressources mériteraient éventuellement d'être mieux exploitées (réparation du microscope confocal) ou voir leurs fonctions étendues (platine motorisée en Z, achat du module d'analyse 3D pour le logiciel Aphelion). L'extension à la troisième dimension, outre des traitements supplémentaires des images (déconvolution, résolution des recouvrements spectraux) nécessaires avant toute phase de détection des signaux, demande un système d'acquisition 3D/*time-lapse* multispectral (confocal ou par épifluorescence). Pour opérer de réelles cinétiques sur des cellules vivantes (microscopie en temps réel), un microscope embarquant un système d'étuve est requis (DeltaVision et Zeiss proposent de tels systèmes). Une demande conjointe est déposée à l'ARC pour le financement de ce type d'équipement). Selon les contraintes biologiques, on pourra accéder aux distributions 3D par immunohistochimie en fluorescence sur des préparations fixées ou si les protéines d'intérêts restent fonctionnelles par fusion avec des protéines fluorescentes (BFP, GFP, YFP) qui permettent d'étudier dans le temps (4D) des interactions par la technique FRET dans des cellules vivantes.