

Compte rendu table ronde 255

Par Laura Clauzier, Catherine Picart et Thomas Walter

TR155- Microscopie Haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale

Introduction: L'objectif était de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au Module 7: Microscopie haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale
Il n'a pas eu de présentation spécifique pour cette table ronde

Durant la table ronde, trois grandes parties discutées :

- 1) l'analyse d'images en HCS (partie logicielle) et
- 2) les problématiques techniques liées à la mise en place du HCS (partie biologique)
- 3) le bilan du contest HCS organisé par Virginie Georget

1) Problématiques liées à l'acquisition, au transfert et à l'analyse d'images en HCS

Problématique n°1 : Difficultés de l'analyse d'images en l'HCS

- Segmentation :
 - Méthodes basées sur pixel learning : souvent ces méthodes ont besoin d'un post-traitement pour séparer les objets (e.g. Ilastik).
 - Méthodes basées sur les réseaux de neurones : extrêmement puissants, souvent quand même un besoin de post-traitement « classique », besoin de beaucoup d'annotations (et donc d'outils d'annotation)
 - Les challenges sont organisés dans la communauté de Computer vision pour la segmentation, qui peuvent nourrir notre communauté en méthodes et en data annotées
 - Les réseaux de neurones restent difficiles à utiliser pour les non-experts.
- Quantification / Classification :
 - Pour la quantification (mesures), nous avons les outils nécessaires aujourd'hui (cellprofiler, logiciels fournis par les vendeurs de microscope)
 - Pour la classification, il est évident que les méthodes d'apprentissage profond sont les meilleurs méthodes aujourd'hui, mais elles ne sont pas encore utilisées énormément dans le criblage en pratique sur les plateformes, car difficiles à mettre en œuvre d'un point de vue pratique.
- Label-free imaging et prédiction de marqueurs fluorescents :
 - HCS peut facilement générer un ground truth experimental.
 - Option pour le GDR : organiser un challenge à partir d'une ground truth expérimentale, acquise en HCS.

Suggestions / conclusions:

- Action : Organiser d'autres challenges sur l'analyse d'images (ex : segmentation de sphéroïdes)
- Action : Former les utilisateurs au deep learning, DLL Fiji/ImageJ
- Constat : un vrai besoin de logiciels permettant d'utiliser des réseaux neuronaux

Problématique n°2 : Format des images

Il y a un problème de standardisation du format des images (e.g. TIFF) et des résultats (e.g. HDF5) dans la communauté. Concernant les images, bio-formats fournit le format OMEtiff qui peut être lu par tous les logiciels, mais parfois les formats propriétaires sont plus faciles à utiliser par les logiciels d'analyses des entreprises de microscopie. En ce qui concerne le format d'analyse, il n'y a beaucoup de formats qui ont été proposés (basés sur HDF5), mais aucun qui s'est imposé.

Conclusion: Les problèmes de format restent d'actualité, surtout en ce qui concerne les résultats d'analyse. Le problème n'est pas de l'ordre technique, mais plutôt de l'ordre d'acceptation de la communauté.

Problématique n°3 : Taille des jeux de données

Le HCS génère une grande quantité d'images. Cette situation s'accroît avec les nouvelles techniques de super-résolution qui sont maintenant utilisables à large échelle. La grande masse de données a pour conséquence une perte de temps (pour la copie, transfert, backup, etc.), de moyens importants pour le stockage et des problèmes concernant l'infrastructure informatique pour la navigation et l'affichage. Comment donc stocker, naviguer et partager les données ?

Conclusions :

- Un sujet qui a été identifié depuis longtemps, mais les problèmes s'accroissent avec les nouvelles techniques.
- Il y a des solutions, mais pour l'instant les utilisateurs n'avaient pas une solution unanime pour ce problème.
- Compression ? (controversé)
- Deep Learning peut aider à réduire les quantités de données acquises (message des présentations à MifoBio).

Problématique n°4 : les tendances dans le domaine

Nous avons également discuté les évolutions dans le domaine, en termes d'applications, techniques utilisées, et surtout des modèles. Nous observons que les techniques deviennent plus complexes pour certaines applications de pointe. Nous observons une grande variabilité en ce qui concerne les modèles (e.g. sphéroïdes, organoïdes), ce qui pose également beaucoup de problèmes en termes d'analyse.

CONCLUSIONS

Nous avons discuté les évolutions dans le domaine HCS. Nous constatons plus de données massives et des modèles plus variés et plus complexes qu'il y a quelques années encore. Aussi, les méthodes d'apprentissage profond ne sont pas encore utilisées beaucoup dans le domaine. Pour ce, il y a un vrai besoin d'un logiciel qui démocratise l'accès à ces méthodes, et des formations « Deep Learning for Biologists » (une action possible pour le GDR ImaBio). Dans le cadre du GDR ImaBio, nous pourrions également envisager un challenge basé sur des données HCS.

2) Problématiques techniques liées à l'implémentation du HCS (aspects techniques et biologiques)

Problématique n°1 : acquisition d'images à haute résolution

La problématique est de savoir si les techniques de hautes résolutions peuvent être compatibles avec le haut débit. En effet, les techniques de haute résolution actuelles sont déjà lourdes et chronophages.

Solutions :

- Développer des outils tels que l'approche SQUIRREL (Ricardo Henriques, *Nature Methods* 2018).
 - Développement d'un microscope intelligent capable de stopper l'acquisition d'un échantillon lorsque, par exemple, le nombre de cellules acquises dépasse un certain seuil. Ceci devrait être possible avec le développement de l'intelligence artificielle
- Il semble envisageable que les développements futurs permettent des acquisitions HCS avec les techniques de light sheet microscopy et super resolution microscopy.

Problématique n°2 : lignée cellulaire

Chaque lignée cellulaire présente des caractéristiques morphologiques spécifiques, ce qui peut nécessiter des méthodes de segmentation spécifiques à chaque type cellulaire.

On peut donc se demander si les techniques de HCS utilisées actuellement permettent de réaliser le même type d'analyse indépendamment de la lignée cellulaire.

De plus, au sein d'une seule lignée cellulaire, on peut avoir une hétérogénéité de forme ou de marquage.

A noter : dans le cas des plateformes de criblages, ce sont généralement les cellules du porteur de projet qui sont utilisées.

Solutions :

- Concours sur la caractérisation d'EC50 sur différents types cellulaires en HCS.
- Habituellement le criblage de molécules est réalisé sur des lignées cellulaires classiques puis les hits sont confirmés avec des criblages secondaires sur des lignées plus physiologiques. Ceci présente un possible inconvénient car il peut y avoir des faux-négatifs sur les lignées classiques qui sont moins physiologiques.

Problématique n°3 : scale-up

Le transfert d'une expérience développée sur lamelle de verre vers un système adapté au HCS passe par des étapes de miniaturisation et d'optimisations du protocole.

Les différents paramètres à optimiser rendent cette étape longue et lourde en manipulations.

Solution:

Utilisation de méthodes statistiques pour optimiser plus rapidement les différents paramètres, tels que les plans d'expériences.

Problématique n°4 : Contrôle de qualité du criblage

Le Z'factor est un indice de l'effet statistique d'un test de criblage, utilisé couramment en HTS. Il permet de déterminer si les caractéristiques sélectionnées peuvent être étudiées en haut débit (il est déterminé par rapport à la fenêtre d'essais entre les contrôles positifs et négatifs).

Solution

Ce Z'factor pourrait être appliqué au HCS.

3) Bilan du challenge HCS

Ce challenge, coordonné par Virginie Georget de Montpellier RIO IMAGING, a permis aux participants de tester leurs expériences ou leurs problématiques sur différents systèmes d'acquisition à haut débit.

Ce challenge a regroupé 5 participants, mais 3 participants sur 5 n'ont pas pu obtenir de résultats probants. La cause de ces échecs est l'utilisation de formats trop exotique (système microfluidique, sphéroïdes) ou une qualité d'échantillon insuffisante (marquage non homogène).

Les 2 projets qui ont été réalisés avec succès sont :

- Détermination du nombre et aires de cellule sur plaques recouvertes d'un film biomimétique.

La segmentation des noyaux et des cellules n'a pas posé de problèmes aux différents systèmes testés. Pas de supériorité du deep-learning pour ce type de segmentation car il n'y avait de difficulté spécifique.

- Recherche de cellules rares dans un échantillon.

Expérience ne nécessitant pas de haute résolution, réalisation d'un pré-scan de l'échantillon puis analyse spécifique des cellules positives.

Liste des participants la TR 155:

Thomas LAURENT

Thèse Cifre – Analyse d'images à haut débit pour le screening chez le zebrafish

Université d'Heidelberg – l.thoma@acquirer.de

Marine CABLLIC

Thèses Cifre (Sanofi) - super-resolution imaging coupled to high content screening Institut Interdisciplinaire des Neurosciences Bordeaux, marine.cabillic@u-bordeaux.fr

Céline LETEUR

Ingénieur Plateforme HCS & Imagerie chez ISTEM ; Drug discovery à partir de cellules souches Utilise différents types de lignées.

I-STEM : cleteur@istem.fr

Amaël MOMBÉREAU

Thèse dans l'équipe de Gaëlle Recher sur la mécanotransduction des cellules souches, tracking et évaluation des forces grâce à des coques en alginates.

LP2N, amael.mombereau@institutoptique.fr

Anatole CHESSEL, Maitres de conférences in bioimage informatics

Intéressé par les big data, gestion de données, partage de données et analyses

Anatole.chessel@polytechnique.edu

Charlotte RIVIERE, Institut lumière matière, Lyon

Travail sur des sphéroïdes reproductibles.

Charlotte.riviere@univ-lyon1.fr

Virginie GEORGET, Ingénieur plateforme d'imagerie, travail sur différents microscopes (Cellomics (ArrayScan),

Criblage de banque de siRNA, banque chimique, bloquée par la segmentation en HCS.

Virginie.georget@mri.cnrs.fr

Adrien MAU, Thèse à Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay

Adrien.mau@u-psud.fr