

ANALYSE MORPHOLOGIQUE COMPARATIVE DES EFFETS DES TRAITEMENTS SUR DES ÉCHANTILLONS *IN VITRO* 3D DE THYROÏDE ET FOIE DE RAT

GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela

Bayer SAS – Crop Science Division

Pathology → Mechanistic Toxicology

355 rue Dostoievski - 06560 Sophia Antipolis – France

Auteur correspondant: marciarafaela.goncalvesmachado@bayer.com

OPEN ACCESS

Received: March 9, 2026

Revised: April 22, 2026

Accepted: April 23, 2026

Published: June, 2026



© Association Française d'Histotechnologie 2026

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non-commercial purposes, provided the original work is properly cited and the authors are credited.

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.47

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF TRAITEMENTS ON 3D *IN VITRO* SAMPLES OF RAT THYROID AND LIVER

ABSTRACT

Paraffin embedding is an essential technique for the in-depth histological analysis of rat thyroid and liver spheroids, allowing for the preservation of sample integrity while facilitating their morphological study. Currently, several paraffin embedding methods are specifically applied to these samples, each equipped with protocols tailored to the unique characteristics of collagen-embedded thyroid spheroids and liver spheroids.

These techniques include key steps such as fixation, dehydration, and embedding, which are crucial for ensuring the quality of histological sections. We will examine the challenges associated with embedding these spheroids, particularly the preservation of their three-dimensional architecture, as well as the implications of these challenges on the interpretation of morphological results.

KEY WORDS

Histological techniques, Liver spheroids, Morphological results, Thyroid spheroids.

RÉSUMÉ

L'enrobage en paraffine constitue une technique essentielle pour l'analyse histologique approfondie des sphéroïdes de thyroïde et de foie de rat, permettant de préserver l'intégrité des échantillons tout en facilitant leur étude morphologique.

Actuellement, plusieurs méthodes d'enrobage en paraffine sont spécifiquement appliquées à ces échantillons, chacune étant dotée de protocoles adaptés aux particularités uniques des sphéroïdes de thyroïde dans le collagène et aux sphéroïdes de foie.

Ces techniques comprennent des étapes clés, telles que la fixation, la déshydratation et l'inclusion, qui sont indispensables pour garantir la qualité des coupes histologiques. Nous examinerons les défis associés à l'enrobage de ces sphéroïdes, notamment la préservation de leur architecture tridimensionnelle, ainsi que les implications de ces défis sur l'interprétation des résultats morphologiques.

MOTS CLÉS

Sphéroïdes de thyroïde, Sphéroïdes de foie, Techniques histologiques, Résultats morphologiques.

INTRODUCTION

Le foie et la thyroïde figurent parmi les principaux organes cibles majeurs des effets des produits phytosanitaires. Leur interaction physiologique est étroitement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire par la sécrétion de la thyroïdostimuline (TSH), l'hormone qui stimule la thyroïde à produire les hormones thyroïdiennes, triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4). Après sa libération dans la circulation sanguine, la T4 est transportée vers le foie, où elle est métabolisée en formes conjuguées ou sulfatées en gT4 ou sT4, lesquelles participent au mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé sur l'hypophyse, modulant ainsi la sécrétion de TSH.

En raison de cette interconnexion fonctionnelle étroite et directe entre ces deux organes, le développement de modèles *in vitro* du foie et de la thyroïde constitue un enjeu majeur pour la recherche en agrochimie. Dans le contexte de l'évaluation des produits phytosanitaires, ces deux organes sont en effet considérés comme des cibles biologiques privilégiées. Les modèles *in vitro*, notamment sous forme de sphéroïdes, permettent de reproduire l'architecture tridimensionnelle et certaines fonctions essentielles des tissus, offrant ainsi des outils pertinents et précieux pour l'étude des mécanismes de toxicité des produits chimiques. Dans cette optique, la préservation de l'intégrité de la morphologie des sphéroïdes apparaît comme un paramètre déterminant pour garantir la fiabilité et la reproductibilité des résultats obtenus.

Le développement de diverses techniques histologiques adaptées est essentiel pour permettre une analyse morphologique fine et approfondie des sphéroïdes. Ces approches offrent la possibilité d'évaluer de manière rigoureuse la performance de chaque méthode en termes de préservation de l'intégrité morphologique. Dans ce cadre, le présent article propose une comparaison de différentes méthodes de préparation des sphéroïdes, en mettant en évidence leurs avantages et leurs limites respectifs.

À cet effet, trois études comparatives distinctes ont été menées. Chacune d'elle a été réalisée selon un protocole de traitement identique, appliqué à un total de trente échantillons comparables. Dans deux des expériences, quinze échantillons ont été utilisés pour la mise en œuvre de la première méthode tandis que les quinze restants ont été traités selon la méthode comparée. Le nombre d'échantillons retenu a été choisi afin d'assurer une répétabilité suffisante et de garantir la validité ainsi que la robustesse des résultats obtenus.

TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Les premières investigations ont porté sur la méthode d'enrobage des sphéroïdes, dans l'objectif de standardiser les conditions expérimentales pour l'ensemble des comparaisons ultérieures. À cette fin, deux approches ont été testées : la coupe en congélation et la coupe après inclusion en paraffine, selon le protocole de fixation au formol et inclusion en paraffine (*Formalin-Fixed Paraffin Embedding*, FFPE).

La coupe en congélation (**Figure 1**) a été réalisée avec une congélation directe des sphéroïdes dans un milieu de congélation pour tissus, du Tissu Freezing Medium (TFM, Leica Biosystems, Réf 140201002). L'examen des lames histologiques, après coloration à l'hématoxyline-éosine (HE), a mis en évidence une altération marquée du tissu, caractérisée notamment par la formation de cristaux. Ces artéfacts ont fortement compromis la qualité morphologique des échantillons, rendant les résultats difficilement exploitables.

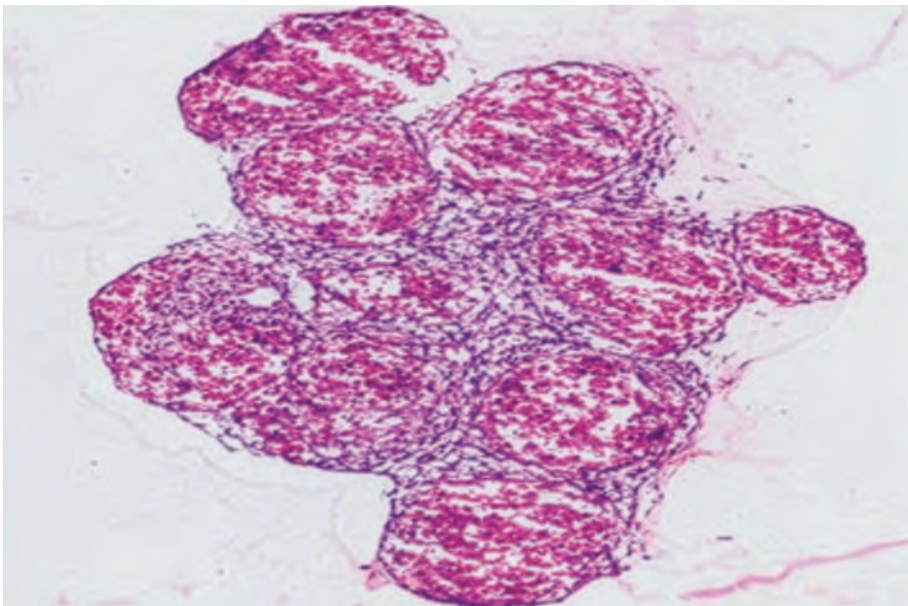


Figure 1 : Coupe congelée de sphéroïde de foie de Rat, HE, capture à l'objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica).

La deuxième méthode d'enrobage évaluée correspondait au protocole de fixation au formol suivi d'une inclusion en paraffine (FFPE) (**Figure 2**). Nous avons commencé par une étape de fixation au formol afin de permettre la préparation des coupes histologiques. L'analyse des lames obtenues a mis en évidence une excellente préservation de l'architecture tissulaire ainsi que l'intégrité cellulaire, attestant de la bonne qualité morphologique des échantillons traités selon cette méthode.

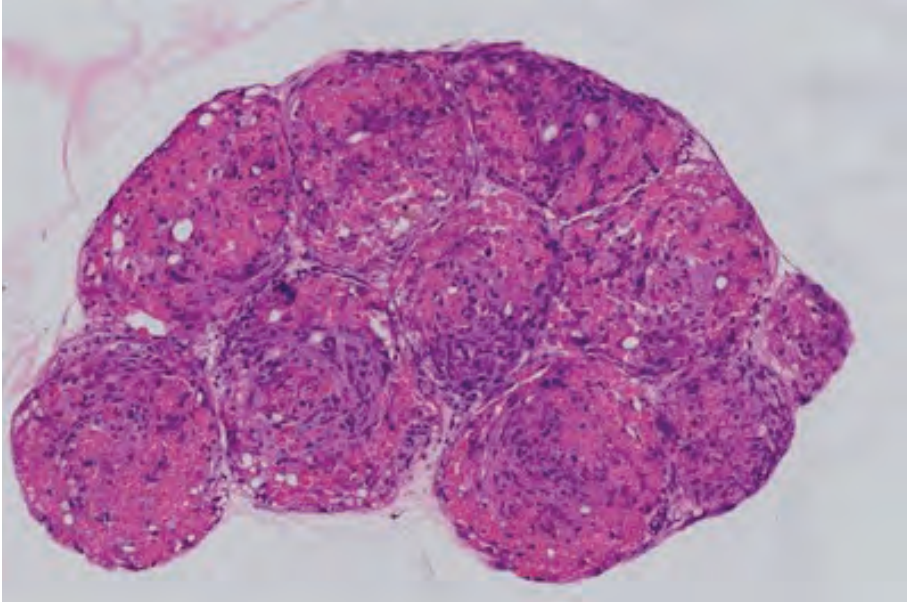


Figure 2 : Coupe en paraffine de sphéroïde de foie de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica).

Par la suite et pour une optimisation des résultats, l'enrobage des sphéroïdes sera réalisé seulement à partir d'échantillon préparé en FFPE.

Un second enjeu méthodologique concernait la diversité des sphéroïdes développés au sein de notre laboratoire. Deux types distincts sont en effet produits : des sphéroïdes de thyroïde qui sont enrobés dans une matrice de collagène et des sphéroïdes de foie qui ne sont pas enrobés dans le collagène.

Cette différence de structure impose une adaptation des stratégies d'inclusion. Dans ce contexte, trois méthodes d'inclusion distinctes ont pu être évaluées et comparées :

- Méthode en HistoGel™: Utilisation d'un gel histologique pour encapsuler les sphéroïdes.
- Méthode sur mousse: Placement des sphéroïdes entre deux mousses pour la déshydratation.
- Méthode à l'aide de CytoPath® Disc: Utilisation de disques spécifiques pour le maintien et la fixation des sphéroïdes.

1.1. Méthodes de Préparation des Sphéroïdes de Thyroïde dans le collagène

Les sphéroïdes de thyroïde sont réalisés à partir de la dissociation des thyroïdes de rats, qui sont ensuite traitées et mises en culture pour permettre aux cellules de s'assembler et de former leur structure tridimensionnelle (3D). Lors de la formation des sphéroïdes, une goutte de collagène est soigneusement déposée autour d'eux, créant ainsi une matrice qui les "emprisonne" à l'intérieur. Cette approche améliore la stabilité des sphéroïdes, facilitant leur coupe lors des préparations histologiques et garantissent la préservation de leurs caractéristiques cellulaires pour une analyse microscopique approfondie [1]. Afin d'évaluer et de comparer la structure de ces sphéroïdes, deux méthodes d'inclusion ont été mises en œuvre : une méthode utilisant l'HistoGel™ et une méthode reposant sur l'utilisation d'une mousse de support. Cette approche comparative permet d'identifier la stratégie d'inclusion la plus adaptée à ce type de sphéroïdes, en termes de préservation morphologique et de qualité d'analyse.

1.1.1. Méthode en HistoGel™

Pour démarrer cette méthode (**Figure 3**), il est nécessaire de procéder à une étape de préparation des consommables. Pour l'HistoGel™ (EpreDia, France, 12006679), un chauffage dans un bain marie à 65°C est nécessaire jusqu'à ce que ce gel devienne totalement liquide. La température doit être adéquate pour assurer une bonne fluidité du gel, facilitant son utilisation. Se munir d'un moule jetable, y déposer le sphéroïde et ensuite verser l'HistoGel™ en veillant à ce que le sphéroïde ne flotte pas.

Après solidification de l'HistoGel™, l'échantillon est prélevé du moule, inséré dans une cassette (9226, SAKURA, Histo-Tek® Standard with Lid Attached Green) et mis dans l'automate de déshydratation (EXCELSIOR AS, EpreDia) pendant 13h 30 avec des bains successifs d'éthanol, de xylène et de paraffine liquide chauffée à 60°C.

L'échantillon est ensuite inclus en bloc à l'aide d'un automate de distribution de paraffine liquide. À partir de ces blocs, des coupes de 5µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome automatique. Les sections obtenues sont ensuite colorées selon la méthode hématoxyline-éosine (HE) puis montées sous lamelles de verre à l'aide d'un automate de coloration.

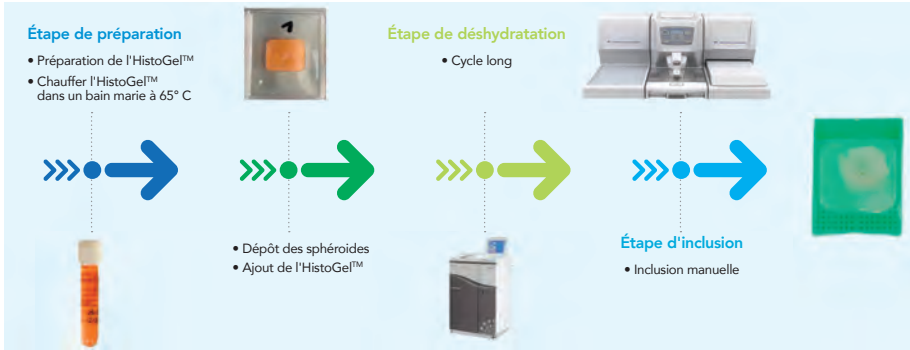


Figure 3 : Illustration des étapes clés de l'HistoGel™.

1.1.2. Méthode sur mousse

Cette méthode (**Figure 4**) ne requiert aucune étape de préparation préalable, contrairement à l'utilisation de l'HistoGel™. La méthode sur mousse consiste à positionner le sphéroïde de thyroïde, inclus dans une goutte de collagène, entre deux mousses de biopsie (tapis en mousse noir, Modèle QPATH, 720-2255) lesquelles sont ensuite placées dans une cassette. L'échantillon est alors soumis à un cycle de déshydratation automatisé pendant une durée de 2 h 30.

L'inclusion se réalise aussi manuellement avec l'automate d'inclusion manuelle. Des coupes de 5µm ont aussi été effectuées avec un microtome automatique. Les coupes ont été colorées de la même façon à l'HE et montées sous lamelle de verre avec l'automate de coloration.

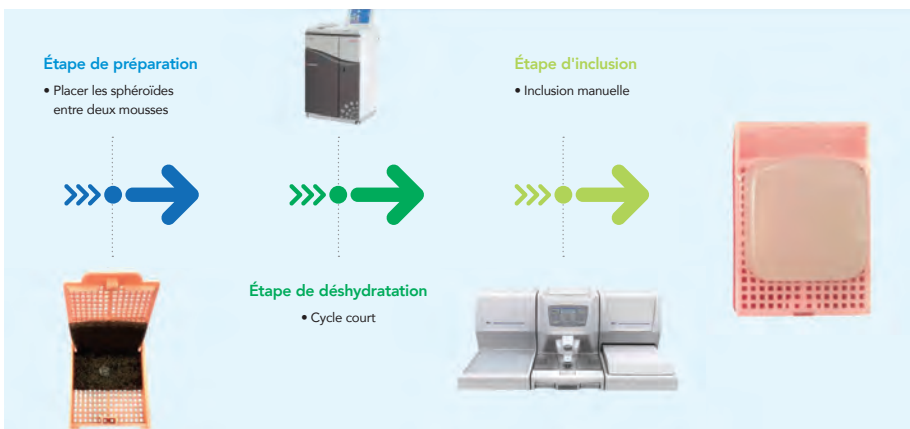


Figure 4 : Illustration des étapes clés de la méthode avec mousse.

1.1.3. Résultats

Pour choisir entre les deux méthodes de préparation des sphéroïdes de thyroïde dans le collagène (**Figures 5 A et B**), deux critères de comparaison ont été établis: la qualité des préparations et les contraintes et avantages.

Qualité morphologique des préparations: une qualité morphologique similaire a été observée entre les deux méthodes, avec une quantité de prélèvements comparable. Cela signifie que les deux techniques peuvent être utilisées avec succès pour la préparation des sphéroïdes.

Contraintes et avantages : En analysant les étapes de préparation, la méthode sur mousse s'avère plus efficace par sa facilité d'utilisation et la simplicité du protocole tandis qu'avec l'HistoGel™ la méthode comprend plus d'étapes avec des temps de préparations plus longs et un temps plus long pour le cycle de déshydratation. Si on prend en compte le coût total des méthodes, la méthode sur mousse est plus économique, ce qui est un facteur important dans le choix de la technique.

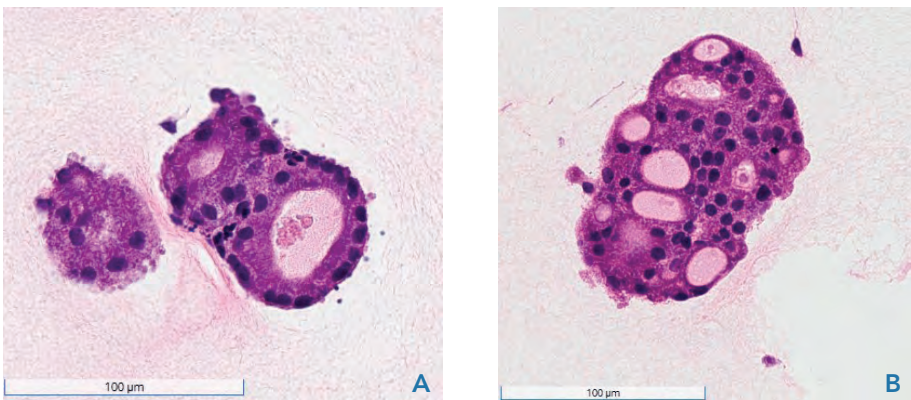


Figure 5 A : Résultat de la méthode avec l'HistoGel™. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica). **B :** Résultat de la méthode avec mousse. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica).

Après une évaluation de tous les critères, la méthode sur mousse se révèle être une meilleure solution pour les sphéroïdes de thyroïde dans le collagène grâce à sa simplicité et son coût moins élevé.

1.2. Méthodes de Préparation des Sphéroïdes de Foie

Pour la réalisation de ce type de sphéroïdes on commence par une perfusion du foie de rats afin de récupérer les cellules primaires (hépatocytes). Une pré-culture est réalisée afin d'obtenir le développement des cellules pour permettre ainsi un ensemencement cellulaire dans une plaque de 96 puits afin de promouvoir le développement 3D des cellules [2].

1.2.1. Méthode en HistoGel™

Pour la préparation des sphéroïdes de foie (**Figure 6**), la méthode en HistoGel™ a également été utilisée. La préparation commence par le chauffage de l'HistoGel™ dans le bain-marie. Pendant ce temps, les sphéroïdes de foie qui ne sont pas enrobés dans le collagène, doivent donc être déposés avec précaution sur une mousse de support. Un bloc carré d'HistoGel™ est ensuite préparé dans des moules jetables et on insère ensuite la mousse contenant les sphéroïdes au centre de l'HistoGel™. Afin d'éviter toute perte d'échantillons lors des étapes ultérieures, la mousse est finalement recouverte d'une fine couche d'HistoGel™ liquide.

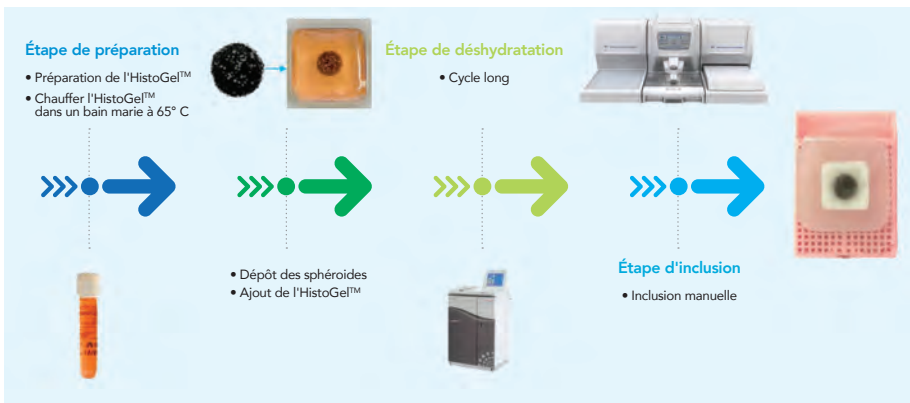


Figure 6 : Illustration des étapes clés de la méthode à l'HistoGel™.

Une fois l'ensemble solidifié, le bloc carré d'HistoGel™ est placé dans une cassette et soumis à un cycle de déshydratation prolongé, suivi d'une étape d'inclusion manuelle. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome automatique et colorées selon la méthode HE puis montées sous lamelles de verre à l'aide d'un automate de coloration selon des procédures standard.

1.2.2. Méthode avec le CytoPath® Disc

La méthode utilisant le CytoPath® Disc (DIAPATH, disque 12 mm, CPD12) (**Figure 7**) nécessite aussi plusieurs étapes de préparation. Les sphéroïdes sont d'abord placés sur les CytoPath® Disc. Pour une absorption optimale on dépose les échantillons sur le disque pendant une période de 10 minutes sans les manipuler. Pour minimiser la perte d'échantillons, le disque est placé dans un sachet filtre. On place les échantillons pendant au moins 4 heures dans le formol, après quoi ils sont soumis à un cycle court de déshydratation. Une fois la déshydratation terminée, une inclusion manuelle est réalisée. Chaque bloc est coupé à une épaisseur de 5 µm et les lames sont colorées et montées avec l'automate de coloration comme décrit pour les autres méthodes.



Figure 7 : Illustration des étapes clés de la méthode à l'aide des CytoPath® Disc.

1.2.3. Résultats

En reprenant les deux critères de comparaison retenus, il ressort que (**Figures 8 A et B**) :

Qualité morphologique: la technique utilisant les CytoPath® Disc se distingue par une qualité morphologique nettement supérieure. Les sphéroïdes présentent une structure mieux préservée et plus homogène. Ils sont également observés en plus grand nombre, ce qui permet d'obtenir une surface d'analyse plus étendue et ainsi envisager des investigations ultérieures plus robustes.

Contraintes et avantages: l'utilisation de CytoPath® Disc a permis une optimisation du temps d'enrobage. Le temps de préparation et d'imprégnation est plus court par rapport à la méthode avec l'HistoGel™, qui nécessite un temps de chauffage du gel et un cycle de déshydratation long.

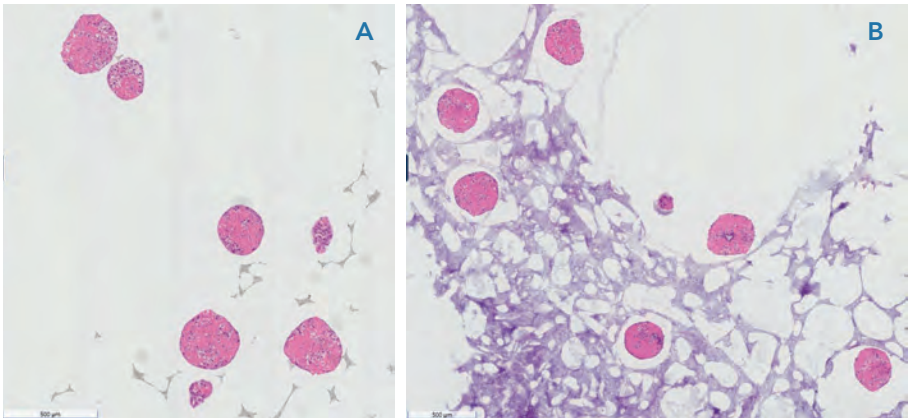


Figure 8 A : Résultat de la méthode avec l'HistoGel™. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica). **B :** Résultat de la méthode avec CytoPath® Disc. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica).

Après une analyse approfondie de l'ensemble des critères évalués, la méthode utilisant le CytoPath® Disc apparaît comme la solution la plus adaptée pour la préparation des sphéroïdes de foie, en raison de sa capacité à assurer une excellente préservation de la qualité morphologique.

CONCLUSION

Avec l'essor des modèles *in vitro* 3D dans les laboratoires, le développement de nouvelles techniques devient indispensable afin d'optimiser les processus existants. Ces évolutions sont nécessaires pour permettre à l'histologie de conserver toute sa pertinence dans l'analyse *in vivo*, tout en s'intégrant pleinement aux approches *in vitro*. Les différentes techniques de préparation évaluées dans cet article apparaissent particulièrement prometteuses pour les recherches futures. Leur performance en termes de préservation morphologique associée à leur facilité de mise en œuvre, permet d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, conditions indispensables à la validation des travaux scientifiques. L'intégration de ces méthodes dans les protocoles d'histotechnologie, offre ainsi la possibilité d'approfondir la compréhension des effets des produits phytosanitaires sur les tissus cibles, contribuant de manière significative aux avancées dans le domaine de la toxicologie. Par ailleurs ces optimisations présentent un potentiel de transposition à d'autres contextes expérimentaux, ouvrant la voie à leur application dans un large éventail d'études.

En conclusion, cette étude souligne l'importance d'une évaluation rigoureuse des techniques histologiques appliquées à l'analyse des sphéroïdes. En privilégiant des méthodes qui assurent à la fois une excellente préservation morphologique et une viabilité économique constitue un levier essentiel pour contribuer de manière significative à l'avancement des connaissances en toxicologie. La complémentarité entre les approches *in vitro* et *in vivo* apparaît déterminante pour l'établissement de normes robustes et fiables, condition indispensable à la production de résultats pertinents et transposables aux problématiques liées à l'exposition aux produits phytosanitaires. Bien que le chemin à parcourir demeure important, les pistes prometteuses identifiées dans ce travail ouvrent des perspectives stimulantes pour les recherches futures dans un champ en pleine complexification.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à toute l'équipe de Bayer pour le soutien et l'aide que j'ai reçus tout au long de ce projet. Votre engagement et votre collaboration ont été essentiels à sa réussite.

Je souhaite également remercier l'association AFH pour leur accueil chaleureux. Votre ouverture et votre disponibilité ont grandement enrichi cette expérience.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] KRAUSE M, HOFFMAN G, HENNING H. Morphological changes in the rat thyroid induced by thyroxine treatment. *Ann. Endocrinol.*, 1976, **37** (2), 173-182.
- [2] HENRY J, GONZALEZ L, GOLDBERG R. Rat liver perfusion for primary hepatocytes isolation: an old procedure revisited. *JoVE*, 2021, (**168**), e66857.