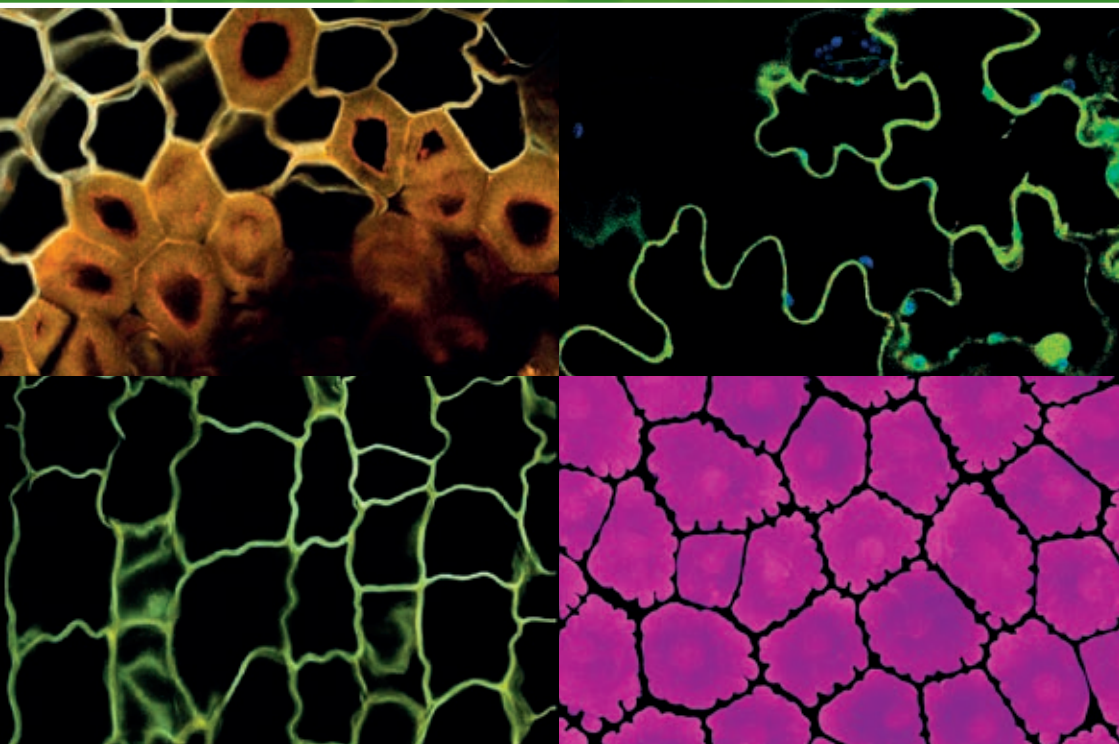


Revue Française

# d'Histo

2023 - Vol. 35 - n°1

Technologie





# *Revue Française d'HistoTechnologie*

[www.afhisto.com](http://www.afhisto.com)



2023 - Vol. 35 - n°1



## ASSOCIATION FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

N° 8397, J.O. du 17 février 1988, n°7

**OBJET** : promouvoir les échanges d'information, la communication dans tous les domaines de la technique histologique, par l'organisation de congrès, de groupes de travail, ainsi que l'édition d'une revue.

### COMPOSITION DU BUREAU :

Nathalie ACCART, Bâle, *Présidente*

Nicolas GADOT, Lyon, *Trésorier*

Sophie LUCCANTONI, Fontenay-Aux-Roses, *Secrétaire & Photographe*

Alain FAUTREL, Rennes, *Vice-Président*

Corinne LESAFFRE, Paris, *Trésorier Adjoint*

Florence LÉZIN, Nantes, *Communication*

Anna BENCSIK, Lyon, *Rédactrice en chef de la Revue*

Maryline FAVIER, Paris, *Relations avec les exposants*

Mireille LEDEVIN, Nantes, *Responsable Site Internet*

Nombre d'adhérents au 31 décembre 2022 : 107

### Siège social :

Association Française d'Histotechnologie

Mairie d'Amboise, BP 247

37402 AMBOISE CEDEX



# GUIDE POUR LES AUTEURS

## INTRODUCTION

La *Revue Française d'HistoTechnologie* est affiliée à l'Association Française d'histotechnologie qui vise à promouvoir, par le biais de publications, les flux d'informations et la communication dans tous les domaines de la technologie histologique, un domaine qui connaît un renouveau. La *Revue Française d'HistoTechnologie* se spécialise dans la publication d'articles de recherche / techniques originaux évalués par des pairs, de revues, de synthèses, d'éditoriaux ainsi que d'actes du congrès annuel de l'AFH.

Nous encourageons l'ensemble de la communauté francophone impliquée dans la pratique de l'histologie, techniciens, ingénieurs, chercheurs, étudiants, passionnés indépendants, à soumettre un article qui doit présenter ou mettre en évidence des aspects histotechnologiques, quel que soit le domaine d'application, micro-organismes, champignons, plantes, insectes, poissons, animaux, hommes, momies, fossiles, tissus sains ou malades, cellules, cultures organoïdes...

La Revue accueille des articles traitant de développements méthodologiques, du principe des nouvelles approches, des études comparatives ou des questions spécifiques liées aux préparations histologiques. Le travail technique doit être décrit de façon la plus complète possible et être original ou utile à nos lecteurs. Il est possible de soumettre un article d'une étude déjà publiée à condition qu'il développe et mette en évidence les aspects méthodologiques des techniques histologiques appliquées, avec des illustrations appropriées.

La *Revue Française d'HistoTechnologie* n'accepte pas les articles de nature commerciale ou publicitaire.

## Types de contenu

La *Revue Française d'HistoTechnologie* publiera, à côté de ses actes éditoriaux et de son congrès annuel, des articles de préférence écrits en Français, contenant des recherches originales, des rapports techniques, de brèves communications ou de courtes notes, des critiques. La Revue Française d'HistoTechnologie n'acceptera pas d'articles ayant un but commercial évident.

Des exemples de chaque type d'articles sont disponibles dans les numéros précédents publiés sur le site Web de l'AFH <https://www.afhisteo.fr/les-revues>.

## Article

Il n'y a pas de restriction dans la longueur d'un article. Cependant, il est recommandé de fournir un manuscrit concis avec le nombre approprié de figures et de tableaux.

Les articles soumis doivent être approuvés par leurs auteurs et ne doivent pas avoir été publiés auparavant. Cependant, il est possible de soumettre un article qui développe et met en évidence les aspects histotechniques généralement peu développés dans une étude publiée.

## I. SOUMISSION

La soumission, ainsi que toute la correspondance concernant la soumission de l'article, y compris la notification de la décision de l'éditeur et les demandes de révisions, est envoyée par courrier électronique au rédacteur en chef.

Anna BENCSIK : [anna.bencsik@anses.fr](mailto:anna.bencsik@anses.fr)

Anses - site de Lyon

31 Avenue Tony Garnier

69364 Lyon cedex 07, FRANCE

## II. PRÉPARATION

Les manuscrits doivent remplir les exigences éditoriales comme rappelé dans le document Word qui sert de trame **modèle** à télécharger depuis le site Web de l'AFH <https://www.afhisto.fr/les-revues>. En bref, ils doivent être soumis sous forme de fichier Microsoft Word et en utilisant la police « Times New Roman » de taille 12.

Un guide complémentaire en Français offrant une aide à la rédaction est également disponible depuis le site Web de l'AFH <https://www.afhisto.fr/les-revues>.

### ***Informations requises sur la page de titre***

La Revue Française d'HistoTechnologie publie préférentiellement des articles en langue française.

**Dans tous les cas, il est nécessaire de fournir le titre, le résumé et les mots-clés en Français ET en anglais**

- **Titre** concis et informatif. Évitez les abréviations dans la mesure du possible.
- **Noms et affiliations des auteurs** Veuillez indiquer clairement le(s) prénom(s) et le(s) nom(s) de famille(s) de chaque auteur et vérifier que tous les noms sont correctement orthographiés.
- **Auteur correspondant** Indiquez clairement qui s'occupera de la correspondance à toutes les étapes de l'arbitrage et de la publication, y compris après la publica-



tion. Cette responsabilité comprend la réponse à toute question future sur la méthodologie et le matériel. Indiquez l'adresse postale complète, y compris le nom du pays, l'adresse e-mail et le numéro ORCID, s'il est disponible.

- **Résumé** Un résumé concis et factuel est requis. Le résumé doit énoncer brièvement le but de la recherche, les principaux résultats et les principales conclusions.
- **Mots-clés** Immédiatement après le résumé, proposer des mots-clés en minimisant l'usage d'abréviations: seules les abréviations solidement établies dans le domaine peuvent être éligibles. Ces mots-clés seront utilisés à des fins d'indexation.

## **Nomenclature, unités, abréviations, numérotation des figures et des tableaux**

Veuillez suivre la nomenclature habituelle applicable à la nomenclature de style.

Les unités seront généralement conformes au Système international (SI) tel qu'adopté par la 11<sup>ème</sup> Conférence générale des poids et mesures. Les 7 unités de base sont : mètre (m), kilogramme (kg), seconde (s), ampère (A), kelvin (K), mole (mol) et candela (cd). Notez que les abréviations d'une unité ne sont jamais suivies d'un point, par exemple 10g/L, 5pmpl, 2mM. N'utilisez pas de points dans les abréviations avec des majuscules, par exemple ADN. Pour les abréviations de cas, utilisez des points, par exemple i.v., s.c.

Tous les autres mots à abrégier doivent être écrits en entier lors de leur première apparition dans le texte et être suivis de l'abréviation entre parenthèses comme ceci : Association Française d'Histotechnologie (AFH).

Les médicaments doivent être mentionnés en fonction de leur nom commun ou de leur nom chimique. Les références commerciales des réactifs (référence et fournisseur) et du matériau (modèle et fabricant) utilisés seront clairement mentionnées, ainsi que les conditions expérimentales des travaux décrits.

Les figures sont numérotées en chiffres arabes et par ordre d'apparition dans le texte : (Figure 1). Les tableaux sont numérotés en chiffres romains par ordre d'apparition dans le texte: (tableau I). Les légendes des figures et des tableaux sont reprises les unes après les autres, à la fin de l'article.

## **Modèle**

Pour faciliter le respect du format respectant le style de La *Revue Française d'HistoTechnologie*, nous invitons les auteurs à utiliser le document Word modèle disponible depuis le site Web de l'AFH <https://www.afhisto.fr/les-revues>. Construit sur un plan d'article de recherche / technique classique avec une structure IMRD: Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusion et Liste de références, il peut être modulé pour adapter le texte au type d'article (Revue, notes courtes, etc.)

## Figures et Tableaux

Veillez fournir uniquement des illustrations électroniques.

### Figures

- Assurez-vous d'utiliser un lettrage et un dimensionnement uniformes de votre illustration/photo originale.
- Polices préférées: Arial (ou Helvetica), Times New Roman (ou Times), Symbol, Courier.
- Numérotez les illustrations en fonction de leur ordre dans le texte.
- Utilisez une convention d'appellation logique pour vos fichiers d'illustration.
- Les images composant les figures doivent être fournies dans le format original (.tif ou .jpeg) dans un dossier nommé « images ». Évitez les fichiers compressés ou autres formats tels que Powerpoint, Paintbrush...
- Les figures en couleurs sont les bienvenues et apparaîtront en couleur en version papier comme en version en ligne sans frais supplémentaires.

### Tableaux

Veillez soumettre les tableaux sous forme de texte modifiable et non d'images. Les tableaux peuvent être placés soit à côté du texte pertinent dans l'article, soit sur une ou plusieurs pages séparées à la fin. Numérotez les tableaux consécutivement en fonction de leur apparence dans le texte et placez les notes de tableau sous le corps du tableau. Soyez économe dans l'utilisation des tableaux et assurez-vous que les données qui y sont présentées ne font pas double emploi avec les résultats décrits ailleurs dans l'article. Veillez éviter d'utiliser des règles verticales et des ombrages dans les cellules du tableau.

- L'illustration et le texte doivent être soumis de préférence sous forme de fichiers séparés, sous forme de documents joints par courrier électronique et comme préconisé ci dessous :
- 1 fichier Word, police préférée : « Times New Roman, taille 12 », avec uniquement le texte et les légendes des photos ainsi qu'un fichier .pdf correspondant montrant le texte avec l'emplacement des figures et des tableaux. Pour les soumissions Word uniquement, vous pouvez toujours fournir des figures et leurs légendes, ainsi que des tableaux dans un seul fichier, mais à l'étape de la révision.
- 1 fichier au format TIFF de préférence (ou JPEG) avec une résolution minimale de 300 dpi pour les illustrations seules, clairement identifiées et nommées dans le texte (Figure 1a, Figure 2...)

## Références bibliographiques

### Citation dans le texte

Dans le texte, le numéro de la référence citée est mentionné entre parenthèses. La liste des références, numérotées en chiffres arabes, classées selon l'ordre d'apparition dans le texte figure à la fin de l'article.

Veillez à vous assurer que chaque référence citée dans le texte est également présente dans la liste de références (et vice versa).

Les résultats non publiés et les communications personnelles ne sont pas recommandés dans la liste de références ou peuvent être mentionnés comme tels dans le texte. Si ces références sont incluses dans la liste de références, elles doivent suivre le style de référence standard de la revue et doivent inclure une substitution de la date de publication par « Résultats non publiés » ou « Communication personnelle ». La citation d'une référence comme « sous presse » implique que l'article a été accepté pour publication.

Le nom de la revue doit correspondre aux abréviations standards définies par le Centre international de l'ISSN, la base BIOSIS et CASSI. Ils sont disponibles par exemple dans la liste des revues indexées dans PubMed ([NCBI-National Center for Biotechnology Information database](#)).

Tous les logiciels bibliographiques (Endnote, Zotero, etc.) contiennent également ces abréviations.

### Références à des liens

Une visibilité accrue de la recherche et un examen de haute qualité par les pairs sont assurés par l'existence de liens d'accès en ligne vers les sources citées. Afin de nous permettre de créer des liens vers des services de résumé et d'indexation, tels que Scopus, CrossRef et PubMed, veillez à vous assurer que les données fournies dans les références sont correctes. Veuillez noter que les noms de famille, les titres de revues / livres, l'année de publication et la pagination incorrects peuvent empêcher la création de ces liens. Lorsque vous copiez des références, soyez prudents car elles peuvent déjà contenir des erreurs. L'utilisation du DOI est fortement encouragée. Un DOI est garanti de ne jamais changer, vous pouvez donc l'utiliser comme lien permanent vers n'importe quel article électronique.

### Références à des sites Web

Au minimum, l'URL complète doit être indiquée avec la date du dernier accès à la référence. Toute autre information, si elle est connue (DOI, noms des auteurs, dates, référence à une publication source, etc.), doit également être fournie. Les références Web peuvent être répertoriées séparément (par exemple, après la liste

de références) sous une rubrique différente si vous le souhaitez, ou peuvent être incluses dans la liste de références.

## **Style de référence standard de la revue**

### **Style à suivre pour la liste des références :**

#### Articles

1. KOLOPP M : Le sujet roux. Rev.fr.histotechnol., 2008, 21 (1), 29-38.

#### Livres

1. TERNYNCK T. & AVRAMEAS S.- Techniques immunoenzymatiques. 2e éd. Inserm, Paris, 1987, 19-22.

#### Chapitre de livre ou actes de congrès

1. PATRICK D., MOGHTADER J., WANG H., DE HAAN K. & RIVENSON Y. Deep Learning-Enabled Virtual H&E and Fluoro-Jade B Tissue Staining for Neuronal Degeneration. En 40e symposium annuel, Baltimore, MD, États-Unis, 2021. <https://websitev0.s3.us-west-1.amazonaws.com/path2021.pdf>-<https://pictorlabs.ai/publications>

#### Site internet

1. I2SL - International Institute for Sustainable Laboratories : <https://smartlabs.i2sl.org/> (consulté le 14 mai 2022)

### **Fichiers de Style**

Les fichiers de style (Endnote et Zotero), ainsi qu'un fichier ris. sont disponibles depuis le site Web de l'AFH <https://www.afhisto.fr/les-revues>.

## **Examen par les pairs**

Cette revue a recours au processus de relecture anonymisé s'appuyant sur l'examen par des pairs. Toutes les contributions seront initialement évaluées par l'éditeur pour déterminer si elles conviennent à la revue. Les articles jugés appropriés sont ensuite généralement envoyés à un minimum de deux examinateurs experts indépendants pour évaluer la qualité scientifique de l'article. L'éditeur est responsable de la décision finale concernant l'acceptation ou le rejet des articles. La décision de l'éditeur est définitive.

L'éditeur, la directrice de publication comme les membres du comité de lecture ne sont pas impliqués dans les décisions concernant les articles qu'ils ont eux-mêmes rédigés. Toute soumission de ce type est soumise à toutes les procédures habituelles de la revue, l'évaluation externe par les pairs étant gérée indépendamment de l'auteur concerné.

### III. APRÈS L'ACCEPTATION

#### Correction d'épreuve

Les auteurs correspondants recevront dans un courriel un fichier PDF de leur article dans une version mise en page pour impression (épreuve d'imprimeur). Pour assurer un processus de publication rapide de l'article, nous demandons aux auteurs de nous fournir leurs corrections d'épreuve, généralement dans les deux jours. Cette épreuve n'est utilisée que pour vérifier la composition, l'édition, l'exhaustivité et l'exactitude du texte, des tableaux et des figures. Des modifications importantes de l'article dans son format tel qu'accepté pour publication, ne seront pas possibles.

Chaque article sera publié dans la revue de l'année et se verra attribuer un identifiant numérique (le Digital Object Identifier ou DOI) qui permettra une visibilité permanente de l'article sur Internet. Chaque adhérent de l'association a accès à la revue dès sa publication en version papier et une version électronique est disponible en ligne pour tous sur le site de l'association ([www.afhisto.fr](http://www.afhisto.fr)).

#### Tirés à part

L'auteur correspondant, sans frais, recevra un fichier PDF de l'article par courriel. Il recevra également une version papier de la *Revue Française d'HistoTechnologie* avec un numéro complet du volume correspondant à son année de publication.

#### Libre accès

Chaque membre de l'association a libre accès au dernier numéro dès sa publication en version papier.

Il est possible d'acheter une version papier de n'importe quel volume de la *Revue Française d'HistoTechnologie* - dans la limite du stock disponible - au prix de 30€ le numéro supplémentaire, en envoyant une demande par mail au trésorier : Nicolas Gadot - [nicolas.gadot@yahoo.fr](mailto:nicolas.gadot@yahoo.fr).

Tous les articles sont disponibles en libre accès sur le site de l'association ([www.afhisto.fr](http://www.afhisto.fr)).



# ANATOMIE DES PLANTES ET INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES EN MICROSCOPIE

Anna BENCSIK et Nathalie ACCART

Notre 36<sup>ème</sup> congrès annuel va nous amener à Dijon, congrès au cours duquel nos organisateurs locaux ainsi que plusieurs de nos conférenciers traiteront de sujets mettant en avant la biologie végétale, un domaine d'application des pratiques histologiques qui comporte ses particularités. Un article du *Journal of Microscopy* [1], version électronique parue en février 2023, a attiré notre attention et a inspiré l'éditorial de la Revue Française d'HistoTechnologie de cette année.

Cet article rend hommage à Katherine Esau, une des pionnières dans le domaine de la biologie des plantes, concevant des atlas d'anatomie des plantes sur lesquels se basent encore aujourd'hui les scientifiques contemporains. Elle a en effet contribué à normaliser le vocabulaire permettant de décrire précisément l'anatomie des plantes. Sa carrière de 64 ans est exceptionnelle et productive : elle a publié plus de 150 livres et articles – elle a poursuivi ses recherches en tant que botaniste spécialisée en anatomie végétale après sa retraite de l'enseignement en 1965, jusque dans les années 90. En 1989, le Président George Bush lui a décerné le prestigieux prix américain - the National Medal of Science, et un prix Katherine Esau a été créé en mémoire de ses contributions ; il est décerné chaque année à l'étudiante diplômée qui présente le meilleur article en biologie structurale et du développement lors de la réunion annuelle de la Société américaine de botanique (Botanical Society of America).

Cet éditorial sera l'occasion de revenir sur ce grand personnage de la biologie des plantes et de mettre en lumière les développements sur le plan de la microscopie pour l'étude des végétaux. Parmi ces développements, une des approches appliquées au tissu végétal, entre complètement dans l'actualité

de notre association. En effet depuis juin 2022, l'AFH héberge en son sein MicroLaserBiotech, réseau composé de nos collègues spécialistes de l'application de la microdissection laser, que ce soit sur du tissu végétal ou animal. L'occasion de diversifier la palette de l'AFH dans ses actions de partage de connaissances, de savoir-faire et de mise en réseau.

## **Katherine Esau (1898-1997), une pionnière de la biologie des plantes**

Katherine Esau (1898-1997) est une passionnée, dédiant ses 99 ans de vie à l'étude des plantes. Née dans l'Empire Russe à Ekaterinoslav, (aujourd'hui Dnipro, Ukraine), sa famille migre aux Etats Unis en 1922. Après des études en agriculture, une succession d'expériences professionnelles reposant sur des connaissances botaniques la conduise à l'Université de Davis où elle soutiendra une thèse de botanique en 1931. Embauchée comme botaniste junior elle a commencé à enseigner la botanique au Collège agricole de Davis. Dans les années 30, elle commence par dessiner les tissus majeurs et les organes des plantes en y joignant des explications sur la fonction de ces différents tissus. Plus tard, elle encourage les étudiants à dessiner leurs préparations, afin de susciter leur intérêt sur leurs observations et à stimuler leur capacité de réflexion sur ces mêmes observations. Mais elle ne fut pas seulement une anatomiste excellente et un maître dans l'art du dessin scientifique mais également une utilisatrice enthousiaste des méthodes de microscopie, toujours prête à utiliser les dernières avancées techniques pour sa recherche. Citons par exemple le système d'illumination développé par son collègue Alden Springer Crafts (1897-1990). Ce dernier, pour résoudre le problème de l'illumination en microscopie qui doit s'intensifier avec l'augmentation du grossissement, inventa un système d'ajustement de l'intensité lumineuse en fonction de chaque type d'objectif en ajoutant un diaphragme dans le condenseur, dont la position était ajustable [2].

Dans les années 60, Katherine Esau fut également une des premières biologistes des plantes à faire un usage intensif de la microscopie électronique à transmission (MET) (**Figure 1**). Elle adopta pour cela la fixation à la glutaraldéhyde qui améliore la qualité des préparations comparée à la méthode utilisée le plus couramment à l'époque qui était basée sur l'utilisation du permanganate de potassium [3].





**Figure 1** : Katherine Esau installée à son microscope électronique. Pour en savoir plus : <https://ccber.ucsb.edu/ucsb-natural-history-collections-library-and-historical-information-katherine-esau/life-katherine>.

Quant à la publication de photomicrographies, Katherine Esau utilisa le laboratoire de développement photographique qu'elle avait construit dans sa propre maison car la chambre noire de l'Université n'était pas pourvue d'air conditionné et ne permettait pas toute l'année d'obtenir des clichés de qualité. Pouvons-nous encore imaginer combien de temps les microscopistes de MET ont passé à changer les négatifs dans les microscopes, à tester les temps d'exposition et le grammage du papier utilisé pour obtenir les photomicrographies de la meilleure qualité possible pour pouvoir être publiées ? D'autres innovations techniques ont changé la vie des microscopistes sur l'acquisition des images de microscopie. Notamment, l'acquisition d'images digitales et la publication des données scientifiques sous format électronique a permis de grandement simplifier cette étape importante de communication d'études scientifiques. Une des conséquences de cette évolution est un important petit détail : l'indication du grossissement d'une image. Précédemment, l'échelle était donnée par un calcul indiquant l'objectif du microscope et des lentilles présentes dans l'équipement alors que dorénavant il est obligatoire d'intégrer une barre d'échelle sur les images pour éviter les variations liées au zoom de l'ordinateur.

Revenons sur les techniques de microscopie et leurs fonctionnalités. Katherine Esau aurait sûrement apprécié l'échantillonnage optique de ses préparations par l'utilisation du microscope confocal. Des sections optiques nettes sont générées en éliminant la lumière hors focus, par un changement automatique du plan focal. Cette méthode a été développée en 1951 par Marvin Minsky (1927-2016), un informaticien et roboticien américain, créateur de l'intelligence artificielle. Le microscope à disque tournant (*spinning disk microscope*) est une invention encore plus ancienne (brevet déposé en 1885 par Paul Gottlieb Nipkow (1860-1940)). Malheureusement les premiers microscopes confocaux n'ont été commercialisés que dans les années 1980 avec seulement des microscopes réalisant des observations à forte résolution spatiale liée à une automatisation, disponibles à partir des années 2000-2010. Ces techniques sont maintenant largement utilisées en biologie des plantes avec plus de 5833 articles publiés (selon PubMed) sur l'utilisation de la microscopie confocale pour l'étude de l'anatomie des plantes, ou de leurs interactions avec d'autres organismes comme des pathogènes ou des microorganismes composant les microbiotes. Nous citerons par exemple ces chapitres 16 et 17 du livre « *Microbial Environmental Genomics* » [4].

Le développement des protéines fluorescentes a été une avancée majeure pour la microscopie mais les plantes contiennent malheureusement une grande variété de composés auto-fluorescents, comme la chlorophylle, qui génèrent un bruit de fond important. Les plantes possèdent également des structures (parois cellulaires, cytosol, espaces aériens) avec des indices de réfraction différents rendant l'utilisation du microscope à feuille de lumière complexe voire impossible. Même le microscope à deux photons est inopérant pour l'utilisation de la fluorescence pour l'étude des plantes. Dernièrement est à noter l'émergence des méthodes de « *clearing* » et des méthodes de marquage qui éliminent l'auto-fluorescence tout en conservant la fluorescence apportée par les marquages. La méthodologie « *ClearSee* », a été revisitée par l'équipe de Tetsuya Higashiyama [5], un biologiste des végétaux de l'Université de Nagoya, le plus reconnu dans son domaine, qui se concentre sur l'identification des molécules clés de la reproduction des plantes. Son équipe a pu ainsi détecter des tubes à pollen dans les tissus complexes contenus dans le pistil des fleurs. Pour obtenir des observations similaires Katherine Esau aurait dû procéder à la coupe des spécimens, soit frais, soit fixés et inclus ! La reconstruction tri-dimensionnelle de l'architecture tissulaire a également pu être obtenue grâce à la microComputed Tomography (microCT), donnant la notion de volume aux structures, et permettant la distinction des phases solides, liquides et gazeuses.

D'autres approches de microscopie ont aussi été utilisées pour l'étude des plantes, comme la spectroscopie de corrélation spatiotemporelle (STICS) ou encore la récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

## **Qu'en est-il de la microdissection laser pour caractériser les expressions de gènes dans les plantes ?**

Cette technique s'articule autour de la microscopie, de la biologie moléculaire et de l'histologie qui doit assurer l'un des enjeux fondamentaux de cette approche, la conservation de l'intégrité des biomolécules lors de la préparation des tissus. Comme dans le cas des cellules animales, les réseaux d'expression de gènes et les processus physiologiques sont étroitement liés à l'environnement spatial et structural des organes dans lesquels ils opèrent. Dans cette complexité, la microdissection laser est une technique permettant d'étudier l'expression des gènes tout en gardant le contexte spatial des tissus. De façon remarquable, une analyse bibliographique indique que près de 256 articles font référence à l'utilisation de la microdissection laser dans le domaine des plantes, dont déjà deux en 2023.

## **Notre rapprochement avec le Réseau de Microdissection Laser *MicroLaser Biotech***

Ainsi la technique de microdissection laser apparaît comme un prolongement naturel des techniques histologiques et l'AFH est heureuse d'accueillir depuis juin 2022 le Réseau Microlaser Biotech (RMLB). Au niveau national, le réseau Microlaser Biotech fédère et structure la communauté des utilisateurs français de la technologie microdissection laser. Ce rapprochement avec nos collègues du RMLB s'est traduit par l'apparition d'un nouvel onglet sur le site web de l'AFH <https://www.afhisto.fr/r%C3%A9seau-microlaser-biotech>, qui relaye les informations et actions de cette branche spécifique des pratiques histotechnologiques. Un des premiers bénéfices de ce rapprochement a été la réussite d'une première journée de rencontres dédiée à la microdissection laser organisée à Paris le 25 novembre 2022. Elle a réuni 50 participants, 10 conférenciers et 4 fournisseurs d'équipements de microdissection. Parmi les travaux présentés, les participants ont découvert comment du mucus intestinal micro-disséqué permet de caractériser les « *invaders* » (procaryotes présents dans le microbiote) ou encore comment isoler les ostéocytes pour étudier leur profil transcriptionnel. Les fournisseurs ont montré les dernières évolutions des instruments mais aussi des logiciels qui facilitent l'étape de microdissection laser. Le prochain événement organisé sera relayé par les canaux habituels de l'AFH.

Avec cette actualité, la Revue Française d'HistoTechnologie accueille dans ce nouveau volume un article dédié à ces approches, qui rapporte entre autres, l'histoire souvent méconnue de la mise en place de ces techniques de microdissection, qui n'ont pas toujours été associées au laser. Nous souhaitons le meilleur de ce rapprochement qui représente une opportunité pour nos adhérents de se tenir informé des nombreux et rapides développements qui s'opèrent à l'heure actuelle autour de ces techniques de hautes exigences.

Cette année au sommaire de notre revue, vous retrouverez les actes du congrès de Marseille ainsi que des articles originaux tout à fait remarquables sur des sujets importants et novateurs montrant une fois encore la diversité des apports des techniques appliquées à l'histologie. Vous trouverez également les photos du concours photo 2022, un millésime riche en couleurs.

Cette édition de la Revue Française d'HistoTechnologie est à l'image de l'AFH, elle reflète les évolutions et le dynamisme de notre association que nous dédions à cette discipline et à nos adhérents qui la pratiquent au quotidien.

Pour notre plus grand plaisir, rejoignons-nous à Dijon.

Anna et Nathalie

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. GEITMANN A. Seeing clearly-Plant anatomy through Katherine Esau's microscopy lens. *J. of Microscopy*, 2023, 1-13.
2. CRAFT A.S. A dual purpose microscope lamp. *Plant Physiology* 1932, 7:533-555.
3. ESAU K., GILL R.H. Tobacco mosaic virus in dividing mesophyll cells of Nicotiana. *Virology* 1969, 38:464-472.
4. MARTIN F., UROZ S. (eds.), Microbial Environmental Genomics (MEG), *Methods in Molecular Biology*, 2023, vol. 2605, Chapters 16 and 17:325-361.
5. KURIHARA, D. et al. ClearSee: A rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* (Cambridge, England) 2015, 142, 4168–4179.
6. ANDO A. et al. Endosperm and Maternal-specific expression of EIN2 in the endosperm affects endosperm cellularization and seed size in Arabidopsis. *Genetics* 2023, 223(2).



# L'ÉPONGE MARINE OSCARELLA LOBULARIS : UN MODÈLE POUR COMPRENDRE L'ORIGINE ET L'ÉVOLUTION DES ÉPITHÉLIUMS

RENARD Emmanuelle<sup>1\*</sup>, SCHENKELAARS Quentin<sup>1\*</sup>, ROCHER Caroline<sup>1</sup>,  
VERNALE Amélie<sup>1,2</sup>, DE PAO MENDONCA Cassandra<sup>1,2</sup>, CAPPELLEN Laura<sup>1</sup>,  
MASSEY-HARROCHE Dominique<sup>2</sup>, LE BIVIC André<sup>2</sup>, BORCHIELLINI Carole<sup>1°</sup>

1. Aix Marseille Univ, Avignon Université, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France

2. Aix Marseille Univ, CNRS, IBDM, Marseille, France

\*Co-premiers auteurs

° Auteur-correspondant : carole.borchiellini@imbe.fr

# MARINE SPONGE *OSCARELLA LOBULARIS* : A MODEL FOR UNDERSTANDING THE ORIGIN AND EVOLUTION OF EPITHELIA

## ABSTRACT

In order to investigate the origin and evolution of epithelia, we are developing a model of sponge belonging to the homoscleromorph class. Sponges are one of the earliest emerged animal lineages and are therefore a key group for understanding the early steps of animal evolution. We aim to characterize the molecular mechanisms involved in the establishment of epithelia in our model in order to decipher, in a comparative approach, the mechanisms that are conserved across animals and thus probably acquired in their last common ancestor from those specific to our model. To address these central issues, we rely on a set of complementary approaches: comparative genomics and transcriptomics, classical histology, electron microscopy, immunofluorescence, biochemistry and proteomics.

## KEY WORDS

**Cell junctions, cell polarity, basement membrane, evo-devo, immunostaining**



## RESUME

Afin d'émettre des hypothèses sur l'origine et l'évolution des épithéliums, nous développons un modèle d'éponge appartenant à la classe des homoscléromorphes. Les éponges sont l'une des lignées ayant émergé le plus précocement au cours de l'évolution des animaux, elles constituent donc un groupe clé pour comprendre les premières étapes de l'évolution animale. Nous cherchons à caractériser les mécanismes moléculaires qui concourent à la mise en place des épithéliums dans notre modèle afin d'en déduire, dans une approche comparative, les mécanismes qui sont conservés à l'échelle des animaux et donc acquis très probablement chez leur dernier ancêtre commun et ceux spécifiques à notre modèle. Afin de répondre à ces questions fondamentales, nous nous appuyons sur un ensemble d'approches complémentaires : génomique et transcriptomique comparées, histologie classique, microscopie électronique, immunofluorescence, biochimie et protéomique.

## MOTS CLÉS

**Jonctions cellulaires, polarité cellulaire, lame basale, évo-dévo, immunomarquage**

## INTRODUCTION

### Qu'est-ce qu'un épithélium ?

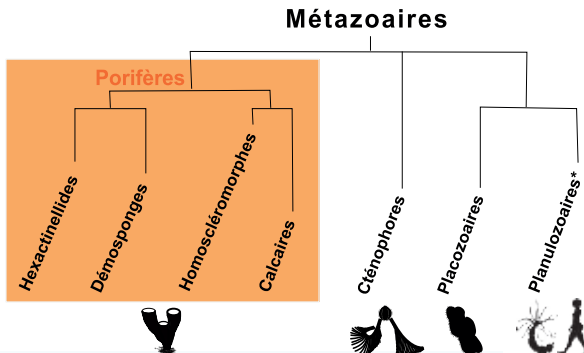
#### La définition des épithéliums chez les bilatériens

Les épithéliums sont des tissus mis en place très tôt au cours de l'embryogenèse, au stade blastula. Ils assurent tout le long de la vie des métazoaires (animaux) des fonctions vitales en assurant le rôle de barrières mécaniques et chimiques vis-à-vis de l'environnement tout en maintenant les échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. De plus, ces tissus complexes permettent l'intégrité et la robustesse des structures et des organes tout en conservant la plasticité nécessaire lors du remodelage des tissus à la fois au cours de l'embryogenèse et de l'organogenèse mais également lors des processus de cicatrisation et de régénération (pour revue voir [1] et littérature citée). De ce fait, toute altération de la morphologie ou de la fonction de ces épithéliums peut se traduire par des pathologies sévères comme des cancers [2–4].

D'un point de vue évolutif, l'invention d'un épithélium est considérée comme l'un des événements clés ayant permis, il y a plus de 700 millions d'années, l'acquisition d'une multicellularité permanente chez l'ancêtre commun des métazoaires [5–7]. Dans le but d'inférer les caractéristiques morphologiques et moléculaires de l'épithélium ancestral, il est nécessaire de développer des approches comparatives au sein des métazoaires.

Ces dernières ont été, dans un premier temps, exclusivement restreintes aux animaux à symétrie bilatérale (bilatériens), qui représentent 99% de la biodiversité animale actuelle et qui incluent la plus grande partie des organismes modèles incontournables en biologie cellulaire et du développement animal (drosophile, souris, xénope, poulet...) (**Figure 1**).

**Figure 1** : Illustration schématique des relations de parenté chez les métazoaires et au sein des éponges et leurs principales caractéristiques épithéliales (*Nota bene* : la longueur des branches ne représente ni le temps de divergence ni la distance génétique entre les taxons) : observations histologiques des structures épithéliales et prédictions de gènes codant pour les principales protéines impliquées dans celles-ci. **P**= présence ; **A**=absence ; **P**= présent mais certains domaines protéiques absents ; **P/A**=dépend des espèces ; **?** = ambiguïté dans la littérature. \*Planulozoaires = ensemble formé par cnidaires+bilatériens. Les silhouettes de cténophore, placozoaire, *Nematostella* et homme sont issues de Phylopic (<http://phylopic.org/>).



**Polarité cellulaire**

<i>Observations histologiques</i>	P	P	P	P	P	P	P
PAR	P	P	P	P	P	P	P
CRUMB	P	P	P	P	A	P	P
SCRIBBLE	P	P	P	P	P/A	P	P

**Jonctions adhérentes**

<i>Observations histologiques</i>	A	A	P	P	P	P	P
E- CADHERINE	P	P	P	P	P	P	P
α- CATENINE	P	P	P	P	P	P	P
β- CATENINE	P	P	P	P	P	P	P
δ- CATENINE	P	P	P	P	P	P	P

**Jonctions communicantes**

<i>Observations histologiques</i>	A	A	A	A	P	A	P
INNEXINE	A	A	A	A	P	A	P

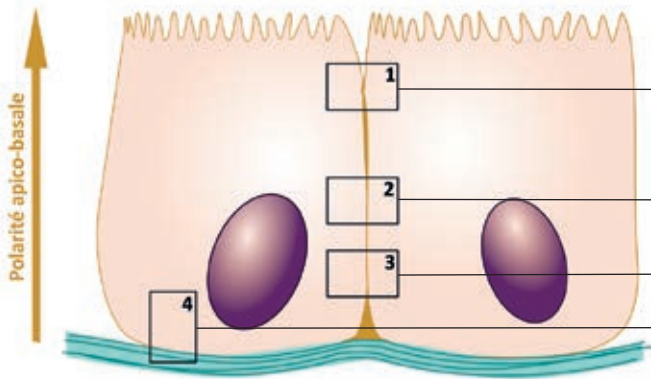
**Jonctions serrées**

<i>Observations histologiques</i>	A	A	A	P	A	?	P
CLAUDINES	P	P	P	P	P	P	P
CONTACTINE	A	A	A	A	A	P	P
NEUREXINE	A	A	A	A	A	P	P
NEUROGLYCANE	A	A	A	A	A	P	P

**Lame basale**

<i>Observations histologiques</i>	A	A	P	P	P/A	A	P
COLLAGENE IV	A	P	P	P	P	P	P
LAMININES	P	P	P	P	P	P	P
PERLECAN	A	A	A	A	A	P	P
NIDOGENE	A	A	A	A	A	P	P

Chez les bilatériens, la comparaison des épithéliums a permis de mettre en évidence des caractéristiques partagées et d'établir des caractéristiques épithéliales « types » (**Figure 2**) (Pour revue voir [1] et références citées). Ces caractéristiques sont également présentes chez les cnidaires, suggérant que l'ancêtre commun de ces taxons présentait déjà un agencement tissulaire comparable (**Figure 2**). Ces épithéliums sont constitués de cellules jointives (une ou plusieurs couches) présentant une polarité apico-basale. Différents types de jonctions intercellulaires y assurent la cohésion, la communication et la perméabilité. Ces épithéliums reposent sur une lame basale contenant du collagène de type IV, protéine architecte majeure de cette structure. La lame basale n'est pas une structure inerte, elle assure grâce à des jonctions cellules-matrice, conjointement avec les jonctions intercellulaires, des fonctions clés dans l'intégrité épithéliale [8].

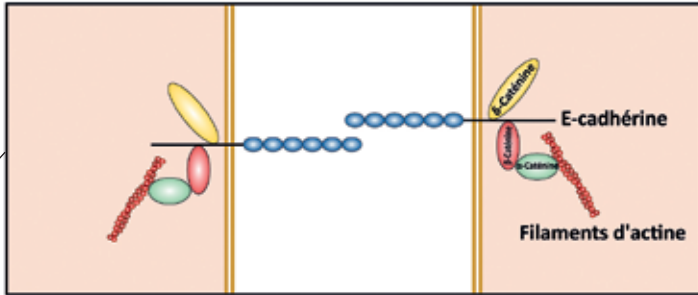


**Figure 2 :** Principales protéines structurales impliquées dans les épithéliums chez les bilatériens et les cnidaires.

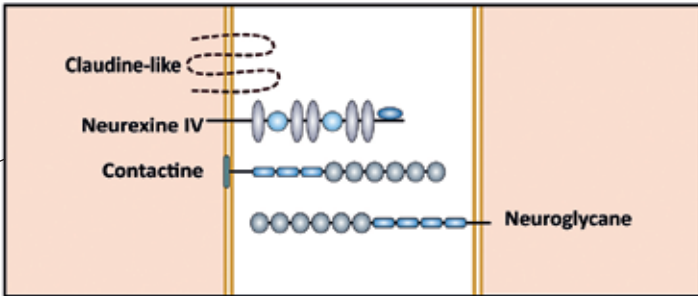
## L'importance d'élargir le cadre comparatif

Lorsque l'on parcourt le peu de données bibliographiques disponible chez les animaux non-bilatériens et référencées dans [1] (cnidaires, placozoaires, cténophores et porifères (i.e. éponges ; **Figure 1**), force est de constater que, à l'exception des cnidaires, les caractéristiques épithéliales précédemment citées (polarité, lame basale et jonctions), ne sont pas toujours présentes et, de surcroît, pas de manière concomitante dans ces taxons ayant émergé précocement (**Figure 1**). Par exemple, la lame basale n'est pas observable chez le placozoaire *Trichoplax adherens*, chez certains cténophores comme *Mnemiopsis leidyi* ou également chez les éponges

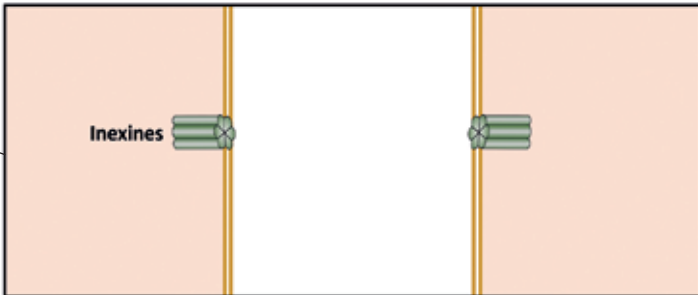
### 1: Jonctions adhérentes



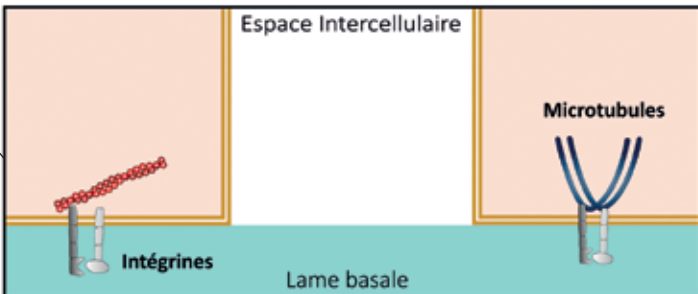
### 2: Jonctions serrées



### 3: Jonctions GAP



### 4: Adhésions focales



n'appartenant pas à la classe des homoscléromorphes. Cette absence de lame basale chez la plupart des éponges a d'ailleurs (et étrangement uniquement chez les éponges !) longtemps exclu les éponges des « vrais métazoaires » (eumétazoaires) supposés présenter de « vrais tissus ».

Au-delà de cet exemple, les caractéristiques épithéliales dans ces taxons sont de manière générale beaucoup plus contrastées et ne rentrent pas dans le schéma classique d'un « épithélium type » tel qu'il a été défini, bien que leur fonctionnalité ne puisse être mise en doute [6,9–11]. Il était donc urgent d'élargir le champ d'investigation aux non-bilatériens pour émettre des hypothèses évolutives pertinentes sur l'origine et l'évolution des épithéliums. La compilation des données bibliographiques, bien que parcellaires et contradictoires, a toutefois permis de dégager des caractéristiques épithéliales conservées à l'échelle des métazoaires et donc supposées héritées d'un ancêtre commun :

- 1) des cellules épithéliales polarisées,
- 2) une lame basale renfermant du collagène de type IV et, probablement,
- 3) des jonctions adhérentes, les autres types de jonctions n'étant pas ou très peu présentes dans les taxons situés basalement dans l'arbre des métazoaires (**Figure 1**).

Ce qui implique que les animaux actuels dépourvus de ces caractéristiques les ont perdues secondairement au cours de l'évolution. Cependant, il est indispensable d'étayer cette hypothèse par la caractérisation des mécanismes moléculaires qui concourent à la mise en place de ces structures dans ces différents taxons. En effet, des structures homologues, c'est-à-dire héritées d'un ancêtre commun, sont généralement mises en place par des mécanismes moléculaires également homologues reposant sur des gènes orthologues<sup>1</sup>.

## L'importance de dépasser l'aire de la génomique

Afin de caractériser les gènes codant pour les protéines clés impliquées dans la polarité, la lame basale et les jonctions adhérentes chez les bilatériens et les cnidaires (groupe nommé planulozoaires), nous étudions, depuis quelques années, les caractéristiques moléculaires épithéliales des éponges, qui constituent l'une des lignées située le plus basalement dans l'arbre des métazoaires (**Figure 1**) [12,13].

1. Gènes orthologues : gènes présents dans deux ou plusieurs espèces issus d'un événement de spéciation.

Nos résultats et les données acquises par d'autres équipes ont montré que tous les gènes codant pour les principales protéines structurales des épithéliums sont présents dans trois des quatre classes d'éponges (le gène codant pour le collagène de type IV est absent du génome des hexactinellides) et ce quelles que soient les caractéristiques histologiques observables dans les espèces étudiées (**Figure 1**) [14,15]. Par exemple, tous les gènes codant pour les protéines impliquées dans la mise en place et le maintien des jonctions adhérentes (cadhérines et caténines) ont été trouvés chez toutes les éponges étudiées bien que les hexactinellides et les démosponges ne présentent pas ce type de jonctions [1,16]. Il en est de même pour le gène codant pour le collagène de type IV qui a été retrouvé chez les éponges calcaires et les démosponges, chez le placozoaire *Trichoplax adherens* et chez certains cténophores comme *Mnemiopsis leidyi* qui ne possèdent pourtant pas de lame basale (**Figure 1**) [1,17]. Ces éléments interrogent donc sur la fonction de ces protéines en absence de la structure histologique correspondante ou sur leur fonctionnalité (capacité à interagir avec les autres protéines d'intérêt *in vivo*). Inversement, chez les cténophores, de nombreuses protéines impliquées dans la mise en place de la polarité cellulaire sont absentes (i.e. protéines du complexe CRUMBS et SCRIBBLE) malgré l'existence d'une polarité cellulaire [16]. Ceci suggère que cette dernière est sous le contrôle de mécanismes moléculaires différents dans ce taxon.

Plus globalement, cette non-congruence entre présence de gènes/protéines et structures morphologiques interpelle sur l'homologie des structures : est-ce que les mêmes mécanismes moléculaires sont impliqués dans la mise en place de structures considérées comme similaires ? Autrement dit est-ce que tout ce qui est appelé « jonction adhérente » ou « lame basale » est équivalent et est apparu une seule fois au cours de l'évolution (homologie) ?

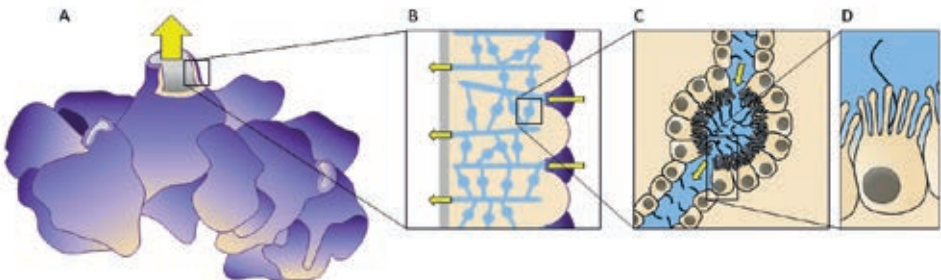
## NOTRE MODELE BIOLOGIQUE

### *Oscarella lobularis* et ses propriétés épithéliales

Afin de répondre à ces questions fondamentales sur l'origine et l'évolution des caractéristiques épithéliales, nous développons depuis plusieurs années le modèle éponge *Oscarella lobularis* (homoscléromorphe) [18–20].

*O. lobularis* est l'espèce type du genre *Oscarella*. Il s'agit d'une espèce endémique de la mer Méditerranée que l'on trouve dans des eaux peu profondes entre 4 et 35 m sur les substrats durs ombragés, y compris à l'entrée des grottes sous-marines semi-obscurées et obscures. Comme la grande majorité des éponges, *O. lobularis* est un animal sessile filtreur. Le flux d'eau à l'intérieur de l'éponge est assuré par le battement des flagelles des choanocytes. Ces derniers s'organisent au sein de structures appelées chambres choanocytaires. L'eau pénètre dans l'éponge par des orifices inhalants (ostia) et chemine via des canaux inhalants vers les chambres choanocytaires où elle est filtrée. Les particules alimentaires sont piégées au niveau de la collerette de microvillosités des choanocytes et sont par la suite phagocytées. Enfin l'eau filtrée est acheminée par des canaux exhalants vers l'orifice de sortie d'eau (oscule) (**Figure 3**). Ce système de filtration est appelé système aquifère. Les choanocytes sont des cellules de forme conique, polarisées, jointives et reposent sur une lame basale. Cet épithélium interne constitue le choanoderme. L'épithélium de surface, le pinacoderme, est quant à lui constitué de cellules ciliées plus aplaties qui tapissent la surface de l'éponge ainsi que les canaux (**Figure 3**). Les cellules qui le constituent sont, comme les cellules du choanoderme, polarisées, jointives et reposent sur une lame basale renfermant du collagène de type IV. Ainsi, contrairement aux éponges des autres classes, *O. lobularis* possède des épithéliums répondant aux trois critères histologiques définis chez les bilatériens.

Cet article a pour objectif de reprendre les dernières avancées tant conceptuelles que techniques sur le modèle *O. lobularis* qui nous permettent maintenant d'avancer progressivement sur la compréhension de l'origine et l'évolution des épithéliums avec une attention plus particulière sur les jonctions adhérentes.



**Figure 3** : A) Schéma simplifié d'un individu *Oscarella lobularis* adulte ; B) Schéma du système aquifère constitué de pores inhalants et exhalants, de canaux et de chambres choanocytaires (en bleu) ; C) Schéma d'une chambre choanocytaire formée de choanocytes présentant une collerette de microvillosités entourant un flagelle (D). Les flèches jaunes indiquent le sens de circulation de l'eau.



## INVENTAIRE DES GENES CARACTERISTIQUES DES EPITHELIUMS ET ANALYSE DES DOMAINES PROTEIQUES CHEZ *O. LOBULARIS*

Chez les bilatériens, quatre protéines sont classiquement considérées comme étant les protéines clés impliquées dans les jonctions adhérentes (**Figure 2**). Brièvement, la protéine transmembranaire E-cadhérine interagit *via* ses deux domaines cytoplasmiques avec les protéines  $\delta$ - et  $\beta$ -caténines. Cette dernière interagit quant à elle avec l' $\alpha$ -caténine afin de faire la liaison avec l'actine filamenteuse du cytosquelette. Ces quatre protéines constituent le complexe CCC (pour Complexe Cadhérine-Caténines) au sein duquel les domaines extracellulaires calcium dépendants de la E-cadhérine permettent l'adhérence entre deux cellules adjacentes [21,22].

Grâce à l'acquisition de divers transcriptomes et d'un draft de génome pour l'espèce *O. lobularis* [16,23,24], nous avons pu entreprendre la recherche, dans cette éponge, des gènes orthologues à ceux impliqués dans la constitution des épithéliums chez les bilatériens. Ainsi, grâce à l'avènement des techniques de séquençage haut débit, nous avons pu caractériser l'ensemble des gènes codant pour les protéines du complexe CCC dans le génome de notre modèle et plus largement chez un représentant de chaque classe d'éponge. Nous avons ensuite effectué une analyse des différents domaines impliqués dans les interactions entre ces protéines afin d'évaluer la potentielle conservation fonctionnelle des protéines identifiées. De manière inattendue, les protéines candidates trouvées chez les éponges étudiées présentent toutes l'intégralité des domaines fonctionnels nécessaires à leurs potentielles interactions bien que les jonctions adhérentes n'aient pas été observées dans les tissus de toutes ces éponges. Cependant, il a été montré que ces domaines sont mieux conservés chez *Oscarella lobularis* comparativement aux autres éponges [16]. Cette conservation peut-elle expliquer la présence de cette structure uniquement dans cette espèce et plus largement chez les homoscléromorphes ? L'analyse de ces protéines a également révélé que la partie extracellulaire de la E-cadhérine présentait une répétition de motifs EGF (epidermal growth factor), absente dans les E-cadhérines des bilatériens. Ceci suggère que d'autres types d'interactions protéine-protéine spécifiques des éponges pourraient exister bien qu'actuellement aucune hypothèse n'ait été avancée sur le rôle éventuel de ces domaines.

Cette approche « top-down » ne permet cependant pas de caractériser des protéines propres aux épithéliums d'*O. lobularis*. Ainsi nous avons également initié une approche « bottom-up » par séquençage en cellule unique qui permet de caractériser des gènes candidats sans aucune hypothèse *a priori*. Il est question ici d'obtenir un profil d'expression génique (transcriptome) spécifique pour chaque population de cellules chez notre modèle d'éponge. La comparaison des données entre populations cellulaires devrait permettre de mettre en avant des signatures moléculaires qui leur sont propres, avec l'idée que chaque signature est probablement reliée à une fonction ou une caractéristique particulière. Ainsi, bien que les types cellulaires aient traditionnellement été définis d'après le partage de caractères morphologiques et d'une fonction identifiée, cette approche nous permet aujourd'hui d'aborder les questions fondamentales de l'identité, l'homologie et l'évolution des types cellulaires en se basant sur le partage d'un ensemble de gènes régulateurs exprimés [25–27].

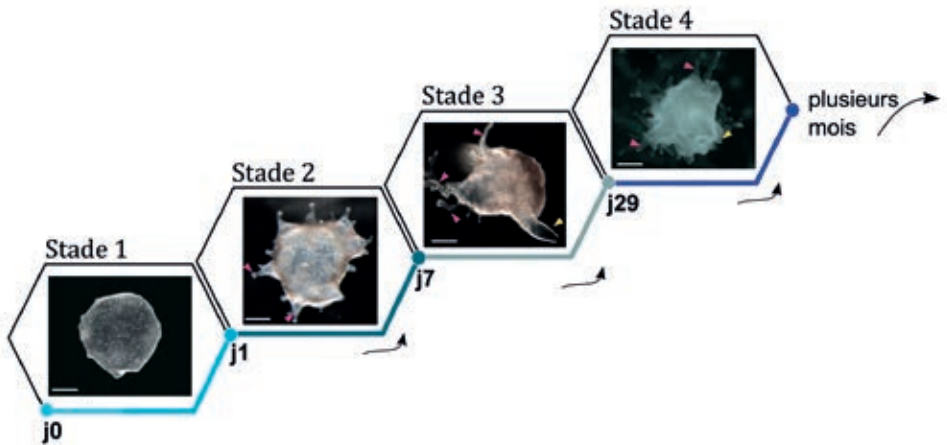
## DIFFERENTS CONTEXTES MORPHOGENETIQUES POUR L'ETUDE DES EPITHELIUMS CHEZ *O. LOBULARIS*

### Le processus de bourgeonnement

Les individus adultes de l'éponge *Oscarella lobularis* alternent entre une reproduction sexuée de juillet à septembre et une reproduction asexuée par bourgeonnement ou fragmentation le reste de l'année. Le bourgeonnement est un processus très intéressant d'un point de vue morphogénétique mais également technique car il permet d'engendrer rapidement (environ deux semaines) plusieurs centaines de clones à partir d'un fragment d'individu adulte. Ce processus naturel est maintenant maîtrisé en laboratoire tout au long de l'année, facilitant ainsi les différentes expérimentations entreprises [18,20,28]. Au cours du processus de bourgeonnement, la surface de l'éponge va drastiquement se modifier pour passer d'une structure très lisse à une structure en doigt de gant jusqu'au détachement de petites sphères que sont les bourgeons. Une fois émis dans le milieu, les bourgeons ont été suivis en conditions standardisées et quatre stades développementaux ont été définis (**Figure 4**). Au stade 1, juste après le détachement, le bourgeon ressemble à une petite sphère lisse. Quelques jours après, au stade 2, il commence à former des excroissances puis un oscule au stade 3. Enfin, quelques semaines

après son détachement, le bourgeon atteint le stade 4 ou juvénile qui correspond à une petite éponge fixée au substrat.

De manière intéressante, au-delà de ce processus morphogénétique plutôt atypique, le bourgeon présente des tissus, une organisation et un fonctionnement (filtration) comparables à ceux de l'adulte, quel que soit le stade de développement considéré. De plus, alors qu'il reste difficile de maintenir en aquarium les individus adultes, les bourgeons présentent l'avantage de pouvoir être maintenus vivants pendant plusieurs semaines, voire des mois en boîtes de Pétri, facilitant ainsi l'ensemble des études. La petite taille et la transparence des tissus facilitent l'observation des tissus fixés ou vivants ce qui constitue un atout non négligeable en microscopie. Il est désormais possible de s'affranchir de la réalisation de coupes histologiques en visualisant les marquages sur bourgeons entiers en microscopie à épifluorescence ou confocale. Dès lors, le bourgeon d'*O. lobularis* est devenu un système très avantageux pour nos études et est maintenant un incontournable au laboratoire pour le développement des divers projets.



**Figure 4 :** Les différents stades du développement du bourgeon en conditions contrôlées. Les flèches roses indiquent les excroissances qui se forment dès le stade 2 et qui, au stade 4, permettent la fixation du juvénile au substrat. Les flèches jaunes indiquent la position de l'oscule, orifice de sortie d'eau. J= jours, la barre échelle correspond à 0.4 mm.

Dans le contexte de notre projet sur les épithéliums, bien que les protéines étudiées puissent *a priori* interagir *via* leurs domaines conservés (d'après les prédictions *in silico*), leur localisation dans les tissus pourrait limiter voire écarter une possible interaction. Afin de savoir où les protéines d'intérêt (e.g. caténines et E-cadhérine) se

localisent dans les tissus, nous réalisons des immunomarquages avec des anticorps spécifiquement dirigés contre les épitopes d'*O. lobularis* [18]. En effet, compte tenu de la divergence des protéines d'éponges par rapport à leurs homologues chez les autres métazoaires, nous avons fait synthétiser des anticorps spécifiques d'*O. lobularis*. La validation de ces anticorps et la localisation des protéines visées est en cours de progression sur les bourgeons.

## **Le processus de dissociation-réagrégation cellulaire**

Les bourgeons d'*Oscarella lobularis*, comme l'adulte, sont dotés d'incroyables capacités de régénération et sont capables de se réagréger après une dissociation cellulaire totale ou partielle de l'individu.

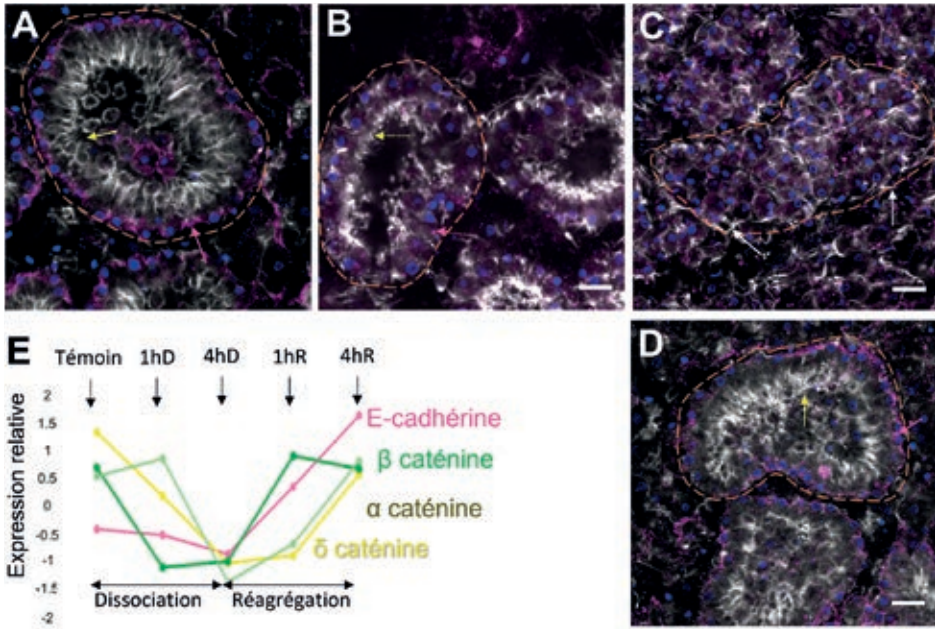
En effet, lorsque les individus sont placés dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium, les cellules constitutives des épithéliums se dissocient spontanément les unes des autres [10,24]. De manière intéressante, ce processus est complètement réversible lors du retour en eau de mer naturelle. Cela fait écho avec ce que l'on connaît chez les mammifères et plus largement chez les bilatériens [24,29,30]. Chez ces derniers, une concentration en calcium extracellulaire faible entraîne une perte des contacts cellule-cellule et cellule-matrice et une déstructuration des épithéliums. En effet, les deux protéines transmembranaires que sont la E-cadhérine, impliquée dans la mise en place des jonctions adhérentes, et les intégrines, impliquées dans les jonctions cellule-matrice, sont calcium-dépendantes. Il a été montré qu'une déplétion en ions divalents dans le milieu entraînait un changement de conformation de ces protéines et une modification de leur interactome [30,31].

Cette propriété de dissociation/réagrégation cellulaire dépendante de la teneur en calcium et magnésium de l'eau de mer d'*O. lobularis* (et en général des éponges) suggère que les protéines impliquées dans les jonctions cellule-cellule et/ou cellule-matrice sont également calcium-dépendantes sans pour autant que ces protéines aient été identifiées.

Nous avons effectué des analyses des gènes différentiellement exprimés au cours de ce processus dynamique de dissociation/réagrégation cellulaire [24]. Dans ce contexte, des bourgeons ont été placés dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium et, avant la dissociation complète des tissus, remis dans de l'eau de mer naturelle. Au cours de ce processus nous avons pu identifier des étapes clés

du processus de déstructuration et restauration de l'épithélium interne (**Figure 5**). A 1h de dissociation nous avons observé un début de perte de la polarité apico-basale des choanocytes, une perte des contacts cellulaires ainsi qu'une désorganisation de la lame basale (**Figure 5B**). A 4h de dissociation, les chambres choanocytaires étaient complètement désorganisées avec notamment une perte de la lame basale comme attestée par la disparition du marquage immunohistochimique du collagène de type IV (**Figure 5C**). Dès 4h d'incubation dans de l'eau de mer naturelle, les chambres choanocytaires commençaient à retrouver leur morphologie initiale, les choanocytes réacquerraient une polarité apico-basale, les jonctions se reformaient ainsi que la lame basale. Toutefois, ce n'est qu'après 24h de réagrégation que les tissus retrouvaient leur aspect initial (**Figure 5D**). L'analyse par RNA-seq de l'expression des gènes codant pour les protéines clés orthologues à celles impliquées dans la mise en place et le maintien des épithéliums chez les planulozoaires au cours de ce processus de dissociation-réagrégation suggèrent une possible implication de ces protéines dans la mise en place et le maintien des épithéliums chez *Oscarella lobularis*. Par exemple, l'expression des gènes codant pour les protéines du complexe CCC diminuait au cours du processus de dissociation et réaugmentait au cours de la réagrégation (**Figure 5E**). Toutefois cette modulation d'expression n'est pas une preuve directe de l'implication des protéines correspondantes dans les jonctions chez *O. lobularis*, il reste à valider leur engagement par des techniques immunohistochimiques.

Les facteurs d'agrégation, protéoglycanes extracellulaires, sont également des candidats potentiels. Ils ont été identifiés comme des acteurs majeurs dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaires chez les éponges et les choanoflagellés (groupe d'unicellulaires le plus proche des métazoaires) via des récepteurs membranaires [24,32,33]. De manière intéressante, les gènes codant pour certains de ces facteurs d'agrégation chez *O. lobularis* présentaient un profil d'expression qui peut laisser envisager un rôle dans la mise en place et le maintien des épithéliums dans notre modèle. Cependant, la part respective de ces mécanismes d'adhérence et leur potentielle interaction au cours du processus de mise en place et de maintien des épithéliums reste à évaluer. Au-delà de ces recherches ciblées sur des gènes dont la fonction est déjà connue dans les épithéliums, les profils d'expression d'autres gènes suggèrent que la mise en place et le maintien des épithéliums dans cette espèce impliquent non seulement des gènes homologues conservés chez tous les animaux mais également des mécanismes spécifiques aux éponges qu'ils restent à définir.



**Figure 5** : Modification de l'expression des gènes codant pour les protéines orthologues à celles connues pour être impliquées dans la mise en place des jonctions adhérentes chez les planulozoaires au cours du processus de dissociation-réagrégation chez *Oscarella lobularis*. **A**) Echantillon témoin. Les chambres choanocytaires, entourées en pointillés orange, ont une structure arrondie, les choanocytes qui constituent ces chambres ont une polarité apico-basale bien marquée avec dans la partie apicale une collerette de microvillosités (flèches jaunes) et dont la partie basale repose sur une lame basale visible grâce au marquage immunohistochimique du collagène de type IV (flèches roses), protéine structurante majeure de ces structures. **B**) Echantillon après 1 heure d'incubation dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium (1hD). Bien que la chambre choanocytaire présente encore une structure arrondie, les caractéristiques épithéliales tendent à être perdues : réduction de la collerette de microvillosités des choanocytes (flèches jaunes pointillées), perte des contacts cellule-cellule et cellule-matrice ; désorganisation de la lame basale visible par une diminution du marquage collagène (flèches roses pointillées). **C**) Echantillon après 4 heures d'incubation dans de l'eau de mer sans calcium ni magnésium (4hD). A ce stade les chambres choanocytaires sont complètement déstructurées avec une perte totale des caractéristiques épithéliales : perte de la collerette de microvillosités, apparition de très nombreuses protrusions basales (flèches blanches), perte de la lame basale. **D**) Le processus de réagrégation cellulaire et de ré-épithétisation commence dès 1 heure d'incubation dans de l'eau naturelle mais ce n'est qu'après 24 heures d'incubation (24hR) que les chambres choanocytaires retrouvent leurs caractéristiques épithéliales. **E**) Expression relative des gènes du complexe CCC au cours du processus de dissociation-réagrégation aux différents temps de dissociation et réagrégation (1 heure de dissociation (1hD) ; 4 heures de dissociation (4hD) ; 1 heure de réagrégation (1hR) ; 4 heures de réagrégation (4hR)). La barre échelle représente 10 µm. Le collagène de type IV est marqué en rose, l'actine en blanc (phalloïdine), les noyaux en bleu (DAPI).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

### Défis techniques à relever pour la compréhension des épithéliums d'*O. lobularis*

A l'heure actuelle, les techniques d'inhibition génique ne sont malheureusement pas encore disponibles sur les éponges marines : c'est l'un des défis que nous essayons de relever. De ce fait, afin de tester la conservation des protéines impliquées dans la formation et le maintien des jonctions adhérentes chez *Oscarella lobularis*, nous devons développer des méthodes indirectes. Parmi celles-ci, nous avons précédemment évoqué le séquençage des ARN en cellules uniques qui devrait nous apporter des réponses concernant l'expression de gènes marqueurs des cellules épithéliales chez notre modèle. De même, nous avons initié la production et la validation d'anticorps dirigés contre les protéines homologues à celles engagées dans les jonctions chez les bilatériens. Les immunolocalisations des protéines correspondantes nous offrent d'ores et déjà des réponses plus qu'informatives sur le potentiel engagement de ces dernières dans les jonctions adhérentes et devraient rapidement faire l'objet d'une publication. L'enjeu est donc maintenant d'utiliser ces mêmes anticorps afin de mettre en évidence l'interactome de chacune des protéines d'intérêt par des techniques de co-immunoprécipitation et de séquençage par spectrométrie de masse. En effet, connaître précisément les protéines réellement capables d'interagir entre elles nous guidera vers une meilleure représentation de ce qui se passe au niveau des jonctions. Entre autres, cela nous permettra de valider l'existence du complexe CCC chez cette éponge ou, le cas échéant, d'émettre des hypothèses alternatives avec la mise en évidence de nouvelles protéines candidates pour ce rôle. Nos résultats préliminaires pourraient remettre en cause l'homologie des jonctions adhérentes d'*Oscarella* par rapport à celles des bilatériens mais nos résultats sont en cours de validation.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les services communs sans qui la collecte des organismes et les expérimentations en cours ne seraient pas possibles : le service plongée de l'OSU Pythéas, les services communs de biologie moléculaire et de morphologie de l'IMBE. Nous remercions les financeurs de nos projets Spongex (fondation

A\*MIDEX (n° ANR-11-IDEX-0001-02), JUNE (foundation A\*MIDEX (ANR-16-CONV-0001), EvolAJ (ANR-21-CE13-0013-02). Nous remercions également nos tutelles, le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et l'Université Aix-Marseille (AMU) dont les crédits récurrents ont soutenu le développement du modèle et financé les contrats doctoraux d'Amélie Vernale et Cassandra de Pao Mendonca.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RENARD E. et al. Origin and Evolution of Epithelial Cell Types, edited by: Leys, S., & Hejnol, A. (Eds.). Origin and Evolution of Metazoan Cell Types (1st ed.). CRC Press., 2021:75–100. <https://doi.org/10.1201/b21831-5> <https://www.taylorfrancis.com/https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b21831-5/origin-evolution-epithelial-cell-types-emmanuelle-renard-andré-le-bivic-carole-borchiellini>
2. AKDIS C.A. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions?, *Nature Reviews Immunology*, 2021, **21**(11): 739–51. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00538-7>
3. SEKIGUCHI R. et al. Chapter Four - Basement Membranes in Development and Disease, In: *Current Topics in Developmental Biology: volume: 130*: Litscher ES et al., eds., volume130, edited by: Academic Press, 2018: **143**–91. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.005> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215318300371>
4. THIERY J.P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease, *Cell*, 2009, **139**(5): 871–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
5. BICH L. et al. Understanding Multicellularity: The Functional Organization of the Intercellular Space, *Frontiers in Physiology*, 2019, **10**:1170. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01170><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6759637/>
6. LEYS S.P. et al. Epithelia, an Evolutionary Novelty of Metazoans, *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2012, **318**(6): 438–47. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21442>
7. TYLER S. Epithelium - The Primary Building Block for Metazoan Complexity1, *Integrative and comparative biology*, 2003, **43**(1): 55–63.
8. BARCELONA-ESTAJE E. et al. You Talking to Me? Cadherin and Integrin Cross-talk in Biomaterial Design, *Advanced Healthcare Materials*, 2021, **10**(6): 2002048. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002048>



9. ADAMS E.D.M. et al. Freshwater Sponges Have Functional, Sealing Epithelia with High Transepithelial Resistance and Negative Transepithelial Potential, *PLoS ONE*, 2010, **5**(11): e15040.(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015040> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993944/>
10. LEYS S.P. et al. The Physiology and Molecular Biology of Sponge Tissues, In: *Advances in Marine Biology: volume: 62*, edited by: Elsevier, 2012: 1–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394283-8.00001-1> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123942838000011>
11. LEYS S.P. et al. Epithelia and integration in sponges, *Integrative and Comparative Biology*, 2009, **49**(2): 167–77. <https://doi.org/10.1093/icb/icp038>
12. REDMOND A.K. et al. Evidence for sponges as sister to all other animals from partitioned phylogenomics with mixture models and recoding, *Nature Communications*, 2021, **12**(1): 1783. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22074-7>
13. SCHULTZ D.T. et al. A chromosome-scale genome assembly and karyotype of the ctenophore *Hormiphora californensis*, *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2021, **11**(11): jkab302. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab302>
14. RENARD E. et al. Understanding Animal Evolution: The Added Value of Sponge Transcriptomics and Genomics, *BioEssays*, 2018, **40**(9):e1700237(9). <https://doi.org/10.1002/bies.201700237> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.201700237>
15. SANTINI S. et al. The compact genome of the sponge *Oopsacas minuta* (Hexactinellida) is lacking key metazoan core genes, 2022, Accessed date September 12, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.07.26.501511> <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03757223>
16. BELAHBIB H. et al. New genomic data and analyses challenge the traditional vision of animal epithelium evolution, *BMC Genomics*, 2018, **19**:393. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4715-9> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5968619/>
17. FIDLER A.L. et al. Collagen IV and basement membrane at the evolutionary dawn of metazoan tissues, *eLife*, 2017, **6**:e24176. <https://doi.org/10.7554/eLife.24176>
18. BORCHIPELLINI C. et al. Staining and Tracking Methods for Studying Sponge Cell Dynamics, In: *Developmental Biology of the Sea Urchin and Other Marine Invertebrates: Methods and Protocols: volume: Carroll DJ et al., eds.*, edited by: Springer US, 2021: 81–97. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0974-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0974-3_5)
19. RENARD E. et al. The Homoscleromorph Sponge, *Oscarella lobularis*, In: *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: volume*, edited by: CRC Press, 2021.

20. ROCHER C. et al. The buds of *Oscarella lobularis* (Porifera): a new convenient model for sponge cell and developmental biology, *bioRxiv*2020 Jun 23; doi 10.1101/2020.06.23.167296. <https://doi.org/10.1101/2020.06.23.167296>
21. ARBORE C. et al.  $\alpha$ -catenin switches between a slip and an asymmetric catch bond with F-actin to cooperatively regulate cell junction fluidity, *Nature Communications*, 2022, **13**(1): 1146. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28779-7>
22. VANSLEMBROUCK B. et al. Microscopic Visualization of Cell-Cell Adhesion Complexes at Micro and Nanoscale, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, **10**: 819534. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.819534>
23. SCHENKELAARS Q. Origine et évolution des voies Wnt chez les métazoaires : étude comparée de diverses espèces d'éponges., edited by: Aix-Marseille, 2015. <http://www.theses.fr/2015AIXM4014>
24. VERNALE A. et al. Evolution of mechanisms controlling epithelial morphogenesis across animals: new insights from dissociation-reaggregation experiments in the sponge *Oscarella lobularis*, *BMC ecology and evolution*, 2021, **21**(1): 160. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01866-x>
25. GRUENHAGEN G.W. et al. Single Cell RNA Sequencing Reveals Deep Homology of Dental Cell Types Across Vertebrates, *Frontiers in Dental Medicine*, 2022, **3**:845449. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fdmed.2022.845449>
26. TARASHANSKY A.J. et al. Mapping single-cell atlases throughout Metazoa unravels cell type evolution, *eLife*, 2021, **10**: e66747. <https://doi.org/10.7554/eLife.66747>
27. VERGARA H.M. et al. Whole-body integration of gene expression and single-cell morphology, *Cell*, 2021, **184**(18): 4819-4837.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.017>
28. FIERRO-CONSTAÍN L. et al. In Situ Hybridization Techniques in the Homoscleromorph Sponge *Oscarella lobularis*, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2021, **2219**: 181–94. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0974-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0974-3_11)
29. BRODSKIY P.A. et al. Calcium as a signal integrator in developing epithelial tissues, *Physical biology*, 2018, **15**(5): 051001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aabb18>
30. D'SOUZA R.S. et al. Calcium-stimulated disassembly of focal adhesions mediated by an ORP3/IQSec1 complex, *bioRxiv*2019 Dec 5; doi 10.1101/866392. <https://doi.org/10.1101/866392>
31. GUO Z. et al. E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics, *Science signaling*, 2014, **7**(354): rs7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005473>

32. GRICE L.F. et al. Origin and Evolution of the Sponge Aggregation Factor Gene Family, *Molecular Biology and Evolution*, 2017, **34**(5): 1083–99. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx058>
33. LEITH A. Role of aggregation factor and cell type in sponge cell adhesion, *The Biological Bulletin*, 1979, **156**(2): 212–23. <https://doi.org/10.2307/1541044>



# TOXICOLOGIE DÉVELOPPEMENTALE SUR LES LARVES DE MOULES : APPORT DES MÉTHODES D'IMMUNOHISTOCHEMIE, D'HYBRIDATION *IN SITU* ET D'IMAGERIE POUR L'ÉTUDE FINE DES TISSUS

DUMOLLARD Rémi et MIGLIOLI Angélica

*Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-Mer (LBDV),  
Institut de la Mer de Villefranche, (IMEV), Sorbonne Université  
CNRS UMR 7009, 181, Chemin du Lazaret, 06230 Villefranche-sur-Mer, France*

remi.dumollard@imev-mer.fr

# DEVELOPMENTAL TOXICOLOGY ON MUSSEL LARVAE: CONTRIBUTION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY, *IN SITU* HYBRIDIZATION AND IMAGING FOR THE DETAILED STUDY OF TISSUES

## ABSTRACT

Larval development of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* is a well-established model to assess the effects of environmental stressors on marine invertebrates. However, the scarce understanding of the processes regulating larval development in bivalve mollusks prevents the comprehension of their modes of action in these organisms. Accordingly, we devised live staining, whole mount *in situ* hybridization (WMISH) and immunostaining protocols to investigate in detail shell biogenesis and neurogenesis. These two major morphogenetic processes characterize *M. galloprovincialis* larval ontogeny and are extremely susceptible to both environmental contaminants and global change. Larval shell biogenesis was studied at close times post fertilization (pf) starting by the early trochophore stage (24 hours pf) until the D-Veliger stage (48 hours pf) with the two live dyes Calcofluor and Calcein which, respectively, stain the organic and calcified portion of the growing shell. During the same developmental window, early neurogenesis was studied with antibodies against the neurotransmitters serotonin (5-HT) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). In addition, WMISH was performed to study the onset of dopaminergic (DOPA) neurons and the global neuronal population. Our results show that shell biogenesis starts at the trochophore stage with the secretion of a saddle-shaped organic matrix providing the scaffold for the following mineral deposition. At this same stage, mussel larvae already present a copious neuronal population which include both 5-HT and GABA positive cells, while DOPA neurons only appear at later stages. In D-Veligers, the shell is D-shaped with the organic and inorganic layers growing at the same rate while neurons, especially 5-HT, are organized in proto-ganglions. These techniques and findings allowed us to demonstrate neurotoxic as well as direct effects on the early stages of shell biogenesis for diverse stressors including Endocrine Disruptors.

## KEY WORDS

**mollusks, bivalves, larval shell morphogenesis, neurogenesis, endocrine disruptors, *in situ* hybridization**

## RESUME

Le développement larvaire de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* est un modèle bien établi pour évaluer les effets des facteurs de stress environnementaux sur les invertébrés marins. Cependant, les processus régulant le développement larvaire chez les mollusques bivalves sont encore très peu connus. Nous avons conçu des protocoles d'hybridation *in situ* (HIS), d'immuno-marquage et de colorations vitales pour étudier la biogénèse de la coquille et la neurogénèse, processus morphogénétiques extrêmement sensibles aux contaminants environnementaux et au changement climatique. La biogénèse de la coquille larvaire qui commence au stade trochophore précoce (24 heures post fécondation (hpf)) jusqu'au stade D-véligère (48 heures pf) est quantifiée par marquage avec les deux colorants vitaux Calcofluor et Calcéine qui, respectivement, colorent la matrice organique et la partie minérale de la coquille en croissance. Au cours de la même fenêtre de développement, la neurogénèse précoce a été étudiée avec des anticorps dirigés contre les neurotransmetteurs sérotonine (5-HT) et acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). En outre, des HIS ont été réalisées pour étudier l'apparition des neurones dopaminergiques (DOPA) et la population neuronale globale. Nos résultats montrent que la biogénèse de la coquille commence dès le stade trochophore et qu'à ce stade larvaire les moules présentent déjà une population neuronale qui comprend à la fois des cellules 5-HT et GABA positives, tandis que les neurones DOPA n'apparaissent qu'au stade pré-véligère. Chez les D-véligères, la coquille est en forme de D tandis que les neurones, en particulier 5-HT, sont organisés en proto-ganglions. Ces techniques et découvertes nous ont permis de démontrer des effets neurotoxiques ainsi que des effets directs sur la biogénèse de la coquille par des perturbateurs endocriniens connus.

## MOTS CLÉS

**Mollusques, moule, morphogénèse de la coquille larvaire, neurogénèse, perturbateur endocrinien, hybridation *in situ***

## INTRODUCTION

Les mollusques constituent une partie importante des invertébrés marins. Parmi les mollusques, les bivalves comme la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) sont étudiés depuis des décennies en raison de leur importance écologique et commerciale [1]. Le cycle de vie de *M. galloprovincialis* est analogue à tous les autres mollusques bivalves et est caractérisé par la succession d'une phase planctonique suivie d'une phase benthique [2, 3]. Le développement embryonnaire des bivalves comprend les stades typiques des métazoaires spiraliens avec des transitions progressives entre les stades morula, blastula et gastrula [2]. Le stade gastrula signe la fin de la phase planctonique embryonnaire et le passage à la phase planctonique larvaire nageant librement. La première forme larvaire nageant librement est appelée trochophore. Au cours de cette étape, la larve commence à former la coquille larvaire ainsi que la neurogénèse et la morphogénèse de l'épithélium cilié servant à nager librement [3, 4].

La biogenèse de la coquille commence par la sécrétion de la matrice organique opérée par un groupe de cellules ectodermiques qui prennent le nom de « shell field » (champ de coquille) (**Figure 1**) [5, 6]. Les cellules composant le tissu du champ de coquille sont déjà présentes à la gastrulation, au cours de laquelle elles subissent une invagination complexe accompagnée d'un épaissement cellulaire (**Figure 1A gastrula**) [10]. L'épaississement des cellules du « shell field » conduit à une évagination progressive apparente du champ de coquille lorsque les embryons atteignent le stade trochophore et est suivie du début de la sécrétion de la matrice organique (**Figure 1A Trochophore**) [5]. Au début du développement, la coquille exclusivement organique prend la forme d'une selle de cheval et l'ensemble du complexe coquille- champ de coquille est nommé « shell field » en forme de selle de cheval (**Figure 2**) [11]. La matrice organique est principalement composée de chitine et de polysaccharides acides, de protéines et de glycoprotéines, qui jouent un rôle essentiel dans différents aspects de la formation de la coquille, tels que la nucléation de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), la croissance et le choix des polymorphes de  $\text{CaCO}_3$  [12]. La couche inorganique commence bientôt à se déposer sur la matrice organique qui fournit un échafaudage pour le dépôt minéral (**Figure 1A**) [13]. Les deux composants commencent à se développer ensemble durant le développement larvaire sous la forme de deux valves symétriques qui recouvrent et enferment progressivement l'ensemble du corps larvaire dans une coquille en forme de D lorsque le stade D-véligère est atteint [13]. À ce stade, le « shell field » se différencie en manteau, le tissu formant la coquille chez les



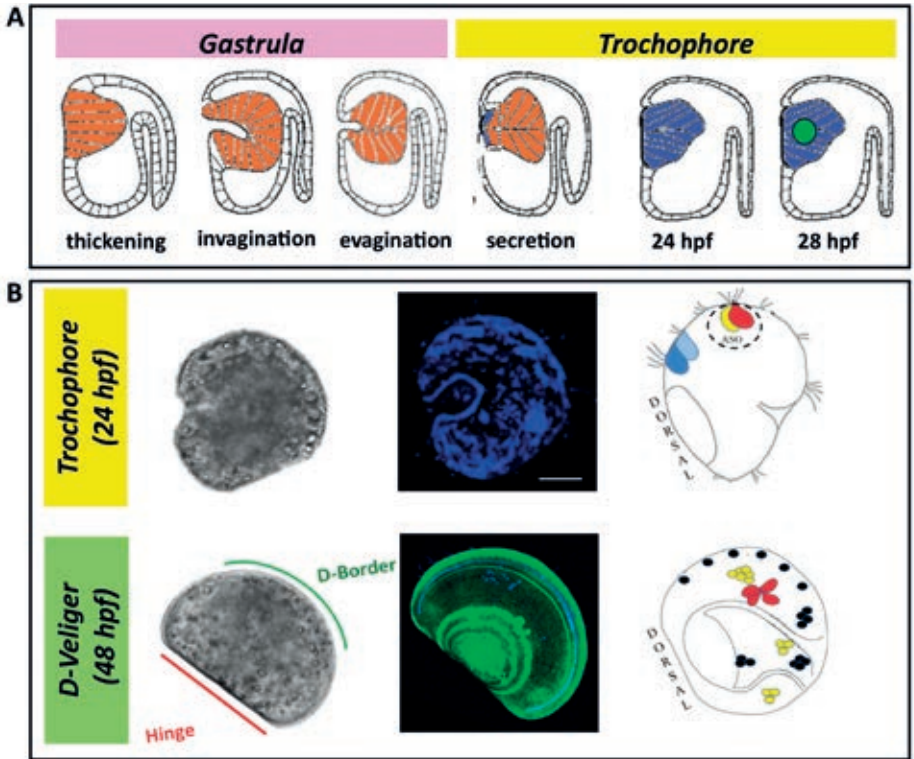


Figure 1 : Le développement larvaire précoce de *Mytilus galloprovincialis* (adapté de (8))

A) Formation du champ de coquille pendant le développement embryonnaire de *Mytilus*: représentations schématiques d'embryons de *Mytilus* aux stades gastrula et trochophore. La gastrula présente un épaissement de l'ectoderme dorsal au niveau du champ de coquille (en orange) suivi d'une invagination et d'une évagination. Au stade trochophore, la sécrétion de la matrice organique (bleu) commence à 24 hpf et la minéralisation (vert) à 28 hpf.

B) Coquille larvaire et développement neural chez *Mytilus*: colonne de gauche: images de trochophores et de larves D-véligères avec la face dorsale à gauche qui devient la charnière ("hinge") du stade D-véligère. La face ventrale de l'embryon devient la bordure D de la D-véligère ("D-border"). Colonne du milieu: embryons colorés au calcofluor (en bleu) et à la calcéine (vert) montrant le "shell field" dorsal au stade trochophore et la coquille entièrement calcifiée au stade D-véligère. Barre d'échelle: 20 µm. Colonne de droite : représentation schématique des populations de cellules neuronales chez *Mytilus* dans des larves au stade trochophore et D-véligère. Le bleu indique les neurones périphériques sensoriels, les neurones sérotoninergiques sont marqués en rouge, le jaune indique les neurones FRM Famidergiques et les cellules contenant des catécholamines sont représentées en noir. La région de l'organe sensoriel apical (ASO) est indiquée par un cercle pointillé.

adultes [11]. La forme nette et caractéristique de la coquille des D-véligères est très sensible au stress venant de facteurs exogènes (comme l'acidification des océans, les polluants émergents, etc) qui se reflétera notamment par des malformations au niveau de la coquille [20, 21, 23]. De telles caractéristiques permettent d'employer efficacement les larves de *Mytilus* pour des tests standards d'embryotoxicité [14, 22].

En revanche, on sait peu de choses sur la neurogénèse larvaire de *M. galloprovincialis* jusqu'à présent. La neurogénèse des larves de mollusques a été étudiée et décrite chez d'autres mollusques bivalves tels que l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* et la moule *Mytilus trossulus* [15, 16]. Le consensus est que les premiers neurones à apparaître dans la larve sont des cellules sensorielles, responsables de la conversion des stimuli externes de l'environnement [15]. Chez *C. gigas*, les premiers neurones périphériques apparaissent sur les faces dorsale et ventrale des larves trochophores, suivis de la formation de l'organe sensoriel apical larvaire (ASO) [15]. L'ASO est un organe sensoriel typique du stade trochophore localisé dans la région de la touffe apicale (**Figure 1B**).

Au début du développement de la trochophore, les premiers neurotransmetteurs à apparaître sont la sérotonine (5-HT) et le FRMFamide (H-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) un neuropeptide présent chez les mollusques, la sérotonine étant exclusivement localisée dans l'ASO et le FRMFamide dans l'ASO et les neurones périphériques [15]. À partir du stade véligère, on trouve également des cellules contenant des catécholamines. Les catécholamines sont un groupe de neurotransmetteurs et de neurohormones qui comprend la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline. Les cellules contenant des catécholamines commencent à être détectées au stade pré-véligère et se localisent principalement dans le velum en extrusion et plus tard dans la bordure D de la coquille D-véligère ainsi que dans un petit groupe de cellules situé du côté dorsal de la larve (**Figure 1B**) [15, 16]. De manière intéressante, les premiers neurones et leurs neurotransmetteurs ont été liés à une série de fonctions régulatrices au cours du développement larvaire, notamment la locomotion, la structuration du système nerveux lui-même ainsi que la fixation et la métamorphose larvaires à des stades ultérieurs [15, 16]. De plus, l'action de la sérotonine et de la dopamine a récemment été liée au processus de biogenèse de la coquille larvaire chez *C. gigas* [17, 18]. Les mécanismes impliqués sont totalement inconnus en raison d'une mauvaise connaissance des processus de développement mis en jeu lors de la biogenèse de la coquille larvaire et de la neurogénèse chez ces invertébrés marins.

Les larves d'invertébrés marins et les premiers stades de leur vie ont longtemps été utilisés comme modèles expérimentaux dans diverses disciplines et non exclusivement liés à des problèmes environnementaux [7, 9]. De nos jours, le développement larvaire d'un certain nombre d'invertébrés marins de phylums distincts est également exploité lors de tests d'embryotoxicité standards conçus par l'Organisation internationale de normalisation - ISO ([www.iso.org](http://www.iso.org)) et ASTM international ([www.astm.org](http://www.astm.org)).

La pollution des eaux marines par des produits chimiques fabriqués par l'homme constitue un grave risque pour la santé des trois milliards de personnes vivant dans les zones côtières (8). De plus, cette pollution représente un grave danger pour les écosystèmes marins. Les animaux filtreurs, par exemple, accumulent des produits chimiques toxiques dans leur corps, mais ce sont les larves planctoniques qui sont les plus sensibles à la pollution et à tout type de stress au cours de leur développement [2]. En effet, de faibles concentrations de polluants peuvent avoir des impacts majeurs sur le développement et la survie des larves [2]. Le développement larvaire des mollusques est donc un modèle de choix pour étudier les impacts délétères de la pollution marine sur la biodiversité marine.

Dans ce contexte, notre étude vise à décrire les techniques et protocoles histologiques utilisés pour visualiser le développement de la coquille et le développement neural de *Mytilus*. Nous pensons que ces outils seront essentiels à la compréhension et à la caractérisation de paramètres (i.e. « endpoints ») distincts et spécifiques de toxicité développementale chez les mollusques bivalves, en utilisant la larve précoce de *Mytilus galloprovincialis* comme modèle.

## MATERIELS ET METHODES

### Moules, collecte de gamètes et fécondation

Toutes les procédures ont été effectuées comme décrit précédemment [19, 20, 21]. Des spécimens sexuellement matures de *M. galloprovincialis* ont été collectés dans la population naturelle de la baie de Villefranche-sur-Mer (43.682°N, 7.319°E - France) pendant la saison de ponte de 2018 à 2020 (décembre-mars). Les animaux ont été maintenus à l'Institut de la Mer de Villefranche (IMEV) par le Centre de Ressources Biologiques Marines de l'institut (CRBM) dans des aquaria à flux continu contenant de l'eau de mer naturelle filtrée Millipore (MFSW) (pH 7,9–8,0, salinité 38 ppt, 15 °C). Les gamètes ont été obtenues par ponte induite par choc

thermique dans MFSW (le protocole complet de ponte peut être téléchargé à partir de : <https://lbdv.imev-mer.fr/wp-content/uploads/Spawning-Protocol-Mytilus-galloprovincialis.pdf>). La fécondation a été effectuée comme décrit précédemment et conformément aux protocoles standardisés d'embryotoxicité (<https://www.iso.org/ics/13.060.70/x/>). Le succès de la fécondation est identifié par observation microscopique de la présence du globule polaire, un globule se formant au pôle animal de l'œuf. Après 30 min, le succès de la fécondation (n. œufs fécondés/n. œufs au total x 100) est calculé (il est habituellement supérieur à 90 %). Des cultures larvaires ont été préparées en MFSW avec une concentration maximale de 200 embryons/mL [22].

## Cultures larvaires en présence de toxiques

Les œufs fécondés ont été exposés (30 minutes après la fécondation) au bisphénol A (BPA, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et au TetraBromoBisphénol A (TBBPA, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dans des plaques à 24 puits. Les solutions mères de BPA et de TBBPA (0,5 M dans du diméthylsulfoxyde/DMSO) ont été diluées dans de la MFSW à 100  $\mu$ M et diluées en série au dixième pour obtenir les concentrations souhaitées (100 nM, 1  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) et préparées en solution 2x en MFSW et ensuite diluées 2 fois dans le milieu de culture. Des échantillons de contrôles sont faits en parallèle dans de la MFSW dans laquelle le véhicule à la concentration finale utilisée (0,01 % de DMSO) a été ajouté.

## Développement larvaire et biogenèse de la coquille

La biogenèse de la coquille a été suivie à différentes heures après la fécondation (hpf) entre le stade trochophore précoce (24 hpf) et le stade D-véligère (48 hpf), en évaluant la croissance des composants organiques et inorganiques de la coquille à l'aide de Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et de Calcéine (Sigma Aldrich, Lyon, France) colorants fluorescents (bleu (Ex/Em: 365/435 nm) et vert (Ex/Em: 495/515 nm) respectivement, comme décrit précédemment [19, 20, 23]. Pour cela, de la calcéine a été ajoutée au milieu de culture (concentration finale 1 mM dans 0,01% de diméthylsulfoxyde; DMSO) avant l'ajout d'œufs fécondés tandis que le Calcofluor blanc a été directement ajouté à la culture de larves vivantes 5 minutes avant chaque temps d'échantillonnage (concentration finale 0,02 mM dans 0,01 % DMSO). Les larves ont été lavées dans MFSW pour éliminer l'excès des deux colorants et fixées avec 4 % de paraformaldéhyde (PFA) dans MFSW avant l'imagerie confocale. Comme décrit précédemment, les images confocales composites ont été rendues en 3D et la surface (en  $\mu$ m<sup>2</sup>) d'une valve dans chaque larve colorée a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ [19, 20, 21, 23].

## Hybridation *in situ*

Les paires d'amorces pour l'HIS des gènes montrés sont rapportées dans les matériaux et méthodes et les matériaux supplémentaires des références 19, 20 et 21. Des paires d'amorces d'HIS ont été utilisées pour amplifier un fragment d'ADNc pour chaque gène. Les produits de PCR (environ 1,5 kilobase-kb) ont été clonés dans un vecteur pGEM-T easy (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Le plasmide recombinant sélectionné a été linéarisé (enzymes de restriction SpeI et NcoI, New England BioLabs, Evry, France) et séquencé pour vérifier l'orientation de l'insert. Des sondes d'ARN sens et antisens marquées à la digoxigénine ont été synthétisées en utilisant le mélange de marquage d'ARN DIG (Roche, Meylan, France) et l'ARN polymérase T7/Sp6 (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les sondes ont été testées sur des larves provenant d'au moins trois paires parentales indépendantes pour un total de 150 individus (N = 50 pour chaque paire parentale) imagés par point de temps. Le protocole d'HIS complet que nous avons conçu peut être téléchargé à partir de <https://lbdv.imev-mer.fr/wp-content/uploads/Mytilus-ISH-protocol.pdf>.

### A) Préparation et fixation des échantillons

Les larves au stade de développement souhaité sont récupérées dans un récipient de culture à l'aide d'un filtre à mailles de 40 µm ; puis les larves sont recueillies délicatement avec une pipette en plastique de 1 mL et transférées dans un tube de collecte de 1,5 mL contenant 50 µL de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X/eau de mer artificielle (EMA) ; le tube (pour les stades trochophores) est centrifugé ou on attend que les larves se culottent au fond du tube (pour les stades véligères). Le surnageant est ensuite ôté et on ajoute 1 mL de PFA 4 % dans du PBS1X/EMA. La fixation se fait pendant une nuit à 4°C ou pendant 1h à température ambiante ; on ôte l'excédent de fixateur avec 3 lavages en PBS-Tween (0,1 %) ; le surnageant est retiré, seules les larves doivent rester dans le tube ; les larves sont alors transférées dans un nouveau tube de prélèvement de 1,5 mL préalablement rempli de méthanol à 100 %. Une fois que les larves ont sédimenté, le surnageant est retiré et remplacé par du méthanol à 100 %. Les larves sont ainsi conservées à -20°C.

### B) Réhydratation et Hybridation

Les larves sont réhydratées en série avec du PBS1X/EMA 25 %, puis 50 %, puis 75 % et enfin 100 % ; après un lavage supplémentaire dans du PBS-Tween (0,1 %), les larves sont incubées pendant 25 minutes à 27°C (trochophores) ou à 37°C

(végigères) dans la protéinase K (10 µg/ml) diluée dans du PBS1X. La protéinase K est retirée à l'aide de deux lavages dans du PBS1X. Afin de rendre les larves trochophores plus transparentes, elles sont lavées dans une solution de glycine 0,1 M dans du PBS1X pendant 5 minutes puis lavées deux fois avec du PBS-Tween (0,1 %). Les larves sont fixées à l'aide d'une solution de PFA 4 % en PBS1X pendant 40 minutes à température ambiante. Le fixateur est retiré par trois lavages avec du PBS-Tween (0,1 %). Le surnageant est retiré et les larves sont transférées dans un nouveau tube de collecte de 1,5 mL préalablement rempli de tampon d'hybridation ; les tubes sont laissés à température ambiante pendant 15 minutes ; les larves sont réparties dans la plaque multi-puits et pré-hybridées à 65 °C pendant au moins 2 heures. Les sondes (diluées dans le tampon d'hybridation) sont ajoutées et on laisse le tout s'hybrider à 65 °C pendant au moins 18 heures.

### C) Lavage des sondes et incubation avec des anticorps anti-digoxigénine (DIG)

Les sondes sont retirées avec le tampon d'hybridation et conservées dans un nouveau tube (les sondes peuvent être utilisées jusqu'à 3 fois) ; puis les séquences se suivent ainsi :

A 65°C : Laver les larves avec 2 lavages de 30 minutes dans la Solution 1 ;

A 65°C : Laver les larves pendant 30 minutes avec la Solution 2 ;

A 65°C : Laver les larves pendant 30 minutes avec la Solution 3 ;

A 65°C : Laver les larves pendant 30 minutes avec la Solution 4 ;

Enfin, laver les larves dans du PBS-Tween (0,1 %) si ce sont des trochophores ou dans du PBS Triton X-100 (1%) si ce sont des végigères à température ambiante ;

Incuber les larves avec le tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante, avant d'incuber les larves avec l'anticorps anti-DIG (1:4000 dans le tampon de blocage) pendant une nuit à 4°C.

L'excès d'anticorps est éliminé avec 5 lavages d'une heure dans du Tris Buffer Saline (TBS)-Tween (0,1 %). Puis les larves sont laissées dans du TBS-Tween (0,1 %) pendant une nuit à 4 °C.

#### **Composition des réactifs utilisés :**

**Tampon d'hybridation :** 50% Formamide (25 mL), 6X Sel de Sodium Citrate (SSC) (15 mL de solution 20X), 5X Denhardt (2,5 mL de solution de Denhardt à 100X), 1 mg/mL d'ARN/tARN de levure (2,5 mL de solution à 20 mg/mL), 0.1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate).

**Solution 1 :** Solution 50% Formamide (25 mL), 5XSSC (12,5 mL de solution 20X), 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (2,5 mL de solution à 20%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Solution 2 :** 50% Formamide (25 mL), 2XSSC (5 mL de solution 20X), 1%SDS (5 mL de solution à 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Solution 3 :** 2XSSC (5 mL de solution 20X), 0,1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Solution 4 :** 0,2XSSC (0,5 mL de solution 20X), 0,1% Tween 20 (250 µL, Tween 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Tampon de blocage pour les trochophores :** 0,1M Tris (5 mL de solution à 1M; pH 7,5); 0,15M NaCl (1,5 mL de solution à 5M); 1% BBR (5 mL de solution Boehringer Blocking Reagent (BBR) à 10%), 0,1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%), ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Tampon de blocage pour les véligères :** 0,1M Tris (5 mL de solution à 1M; pH 7,5); 0,15M NaCl (1,5 mL de solution à 5M); 0,5% BBR (2,5 mL de solution BBR à 10%), 1% Triton-X (500 µL), ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

#### D) Révélation avec NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate)

Laver une dernière fois les larves dans du TBS-Tween (0,1 %) avant de les incubé dans le tampon de révélation NBT/BCIP pendant 10 minutes à température ambiante. Préparer une solution avec le NBT et le BCIP dans leur tampon et l'ajouter aux larves (pour 1 mL de tampon de révélation : 3,5 µL de solution de BCIP à 50 mg/mL, 6,75 µL de solution NBT à 50 µg/mL). Laisser le signal se révéler à une température constante (16-25°C, plus la température est basse, plus le risque d'obtenir un signal non spécifique sur les bords de la coquille est faible), remettre en suspension la solution toutes les 30 minutes ou placer les larves sur un agitateur et protéger de la lumière. Renouveler la solution de NBT/BCIP toutes les 3 heures dans le cas des véligères ; pour finir, bloquer la réaction avec 3 lavages de 5 minutes dans du TBS-Tween (0,1 %) et de l'acide Ethylene Diamine TetraAcétique (EDTA) à 50 mM. Effectuez 5 ou 6 autres lavages dans du TBS-Tween (0,1 %) et laissez une nuit dans du PBS-Tween (0,1 %) à +4°C. Des lavages supplémentaires et un temps d'incubation dans du PBS-Tween aideront à obtenir une bonne qualité de signal en rendant les larves plus transparentes et la coloration plus évidente ; ensuite faire tremper les larves dans du glycérol à 80 % dans du PBS 1X et les laisser une

nuit à 4°C. Le lendemain, laissez les larves pendant 10/20 minutes à température ambiante avant de les monter sur lame et de procéder à l'imagerie.

**Composition des solutions utilisées : Tampon de révélation NBT/BCIP :**  
0,1M Tris (5 mL de solution Tris à 1M, pH 9,5), 50 mM MgCl<sub>2</sub> (2,5 mL de solution MgCl<sub>2</sub> à 1M), 100 mM NaCl (1 mL de solution NaCl à 5M), 0.1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%), ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

## Immunohistochimie

Des anticorps dirigés contre le neurotransmetteur sérotonine (5-HT, Cat #20080, Immunostar, Hudson, WI, USA) et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA, A2052, Sigma Aldrich) ont été utilisés pour visualiser le développement des systèmes sérotoninergique et GABAergique chez les larves de *Mytilus* à différents moments cf, comme décrit précédemment [20, 21], en utilisant une adaptation des protocoles déjà disponibles pour les larves d'autres bivalves [15, 16].

Les échantillons ont été incubés avec des anticorps primaires soit contre 5-HT (1:10000) ou GABA (1:4000) pendant 5 jours à +4°C. Par la suite, les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire anti-Rhodamine Red™-X (RRX) IgG (1:500, Ex/Em : 570/590 nm - Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) pendant 3 jours à 4°C. La liaison non spécifique a été évaluée dans des sous-échantillons incubés uniquement en présence de l'anticorps secondaire (non représenté) comme décrit précédemment [20]. Les larves ont ensuite été colorées avec 1 µg/mL de Hoechst (Ex/Em: 352/461 nm - Hoechst 33342, Invitrogen) dans du PBS et montées avec une solution tamponnée au phosphate de glycérol contenant un agent anti-fading (CitiFluor™ AF1, pH 10, Agar scientifique). Les échantillons ont été imagés avec un microscope Leica SP8 CLSM. Le signal Hoechst, l'immunoréactivité 5-HT et les signaux Brightfield ont été scannés séquentiellement avec un intervalle de pile Z de 0,3 µm. À l'aide du logiciel ImageJ, les canaux ont été fusionnés et les piles Z ultérieures ont été assemblées afin d'évaluer le nombre de cellules 5-HT-ir (immunoréactives) comme décrit dans la figure 5 et précédemment [20, 21]. Les larves colorées avec des anticorps GABA ont été entièrement imagées dans des piles Z de 0, 6 µm pour un total de 100 plans z, avec des projections Z réalisées avec 10 plans z séquentiels (de z10 à z100). Au moins 50 individus ont été analysés pour chaque échantillon et condition expérimentale (N = 5).



## RESULTATS

### Les différentes étapes de la morphogenèse de la coquille larvaire

La coquille larvaire est composée d'une couche ou matrice organique (en bleu sur les **Figure 1 et 2**) et d'une couche inorganique (ou coquille calcifiée en vert sur les **Figure 1 et 2**) qui est constituée par le dépôt de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Il est possible de suivre le dépôt progressif de la matrice organique de la coquille et du  $\text{CaCO}_3$  dans les embryons vivants de *Mytilus galloprovincialis* en utilisant le protocole de double coloration avec le calcofluor et la calcéine (**Figure 2A**, 19). Dès 24 hpf (quand la trochophore commence à sécréter la matrice organique) le signal calcofluor (bleu) est principalement visible dans une zone en forme de selle correspondant au champ de coquille (**Figure 2A**), qui à ce stade est encore partiellement invaginé. À ce moment, aucune coloration de calcéine n'est observée, indiquant l'absence de dépôt stable de  $\text{CaCO}_3$  (**Figure 2A**). À 28 hpf, la zone calcifiée (en vert sur la **Figure 2A**) occupe une grande partie de la coquille en croissance, et la matrice organique peut encore être observée le long des marges externes de la valve (**Figure 2A**). Cependant, aucune calcification n'est encore visible dans la région charnière qui, à ce moment, a terminé son aplatissement. À 32 hpf, l'organisation du corps change radicalement, la larve prenant la forme caractéristique en D du stade véligère (**Figure 2A**) : la valve est largement calcifiée, montrant les premiers anneaux d'accrétion indiquant le dépôt progressif de  $\text{CaCO}_3$ . La coquille calcifiée recouvre la matrice organique, à l'exception d'une fine couche le long des marges de la valve. À 48 hpf, le stade D-véligère est atteint, la coquille calcifiée recouvre maintenant tout le corps de la larve et montre des anneaux d'accrétion concentriques plus évidents (**Figure 2A**). En quantifiant les surfaces occupées par la matrice et la coquille calcifiée dans une seule valve de chaque larve, nous avons montré que les surfaces occupées par chaque composant de la coquille ont une croissance exponentielle similaire, les surfaces de la matrice organique étant significativement plus élevées que celles de la coquille calcifiée en tout temps après la fécondation [19].

### Patrons d'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la matrice organique

Plusieurs gènes participant à la synthèse et au dépôt des protéines de la matrice de la coquille (SMP) chez les mollusques sont connus et ils peuvent également être utilisés pour surveiller la morphogenèse de la coquille larvaire dans des embryons de *Mytilus* grâce à la technique d'hybridation *in situ* (HIS). Nous présentons ici 3 de

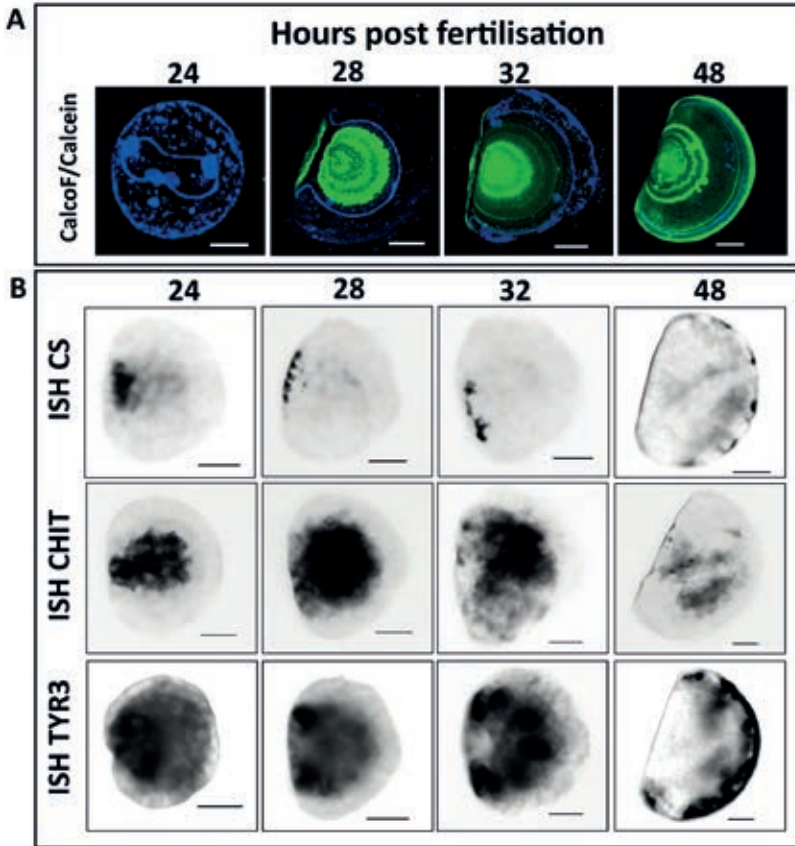


Figure 2 : Observation de la croissance de la coquille avec la double coloration Calcofluor/ Calcéine et l'expression génique par hybridation *in situ* (HIS) dans la même culture larvaire de *M. galloprovincialis*.

A) Images confocales montrant l'évolution dans le temps de la formation de la coquille de *M. galloprovincialis* du stade trochophore (24 hpf) au stade D-véligère (48 hpf). Le signal fluorescent du calcofluor (bleu) correspond à la matrice organique tandis que le signal de fluorescence de la calcéine (vert) correspond au dépôt de carbonate de calcium. La sécrétion de la matrice organique est visible à partir de 24 hpf (bleu). A 28 hpf, les valves calcifiées sont bien développées sur la matrice organique. À 32 hpf, la calcification atteint les marges externes de la matrice organique et s'étend vers la région charnière. A 48 hpf, toute la coquille est calcifiée et enferme complètement le corps larvaire. Barres d'échelle, 20  $\mu$ m.

B) Utilisation de l'hybridation *in situ* (HIS) de gènes de champ de coquille pour surveiller la morphogénèse de la coquille. Images des signaux HIS de la chitine synthase (CS), de la chitinase (CHIT) et de la tyrosinase (TYR) à 24, 28, 32 et 48 hpf. Barres d'échelle : 20  $\mu$ m.

ces gènes qui sont exprimés dans différentes parties de la coquille en croissance.

Les chitine synthases (CS) sont des glycosyltransférases transmembranaires responsables de la synthèse de la chitine, une protéine majeure de la matrice coquillière [24]. Les analyses en qPCR dans les embryons de *Mytilus* ont révélé que la CS a un taux basal d'ARNm élevé dans les œufs qui n'est pas augmenté avant 48 hpf [19]. L'analyse par HIS de ce gène révèle que, à 24 hpf, l'expression est faible et concentrée dans une petite zone à l'intérieur du champ de coquille (**Figure 2B**). Un signal similaire, mais plus fort, est détecté à 28 hpf, dans une zone proche de la région charnière. À 32 hpf, l'expression de la CS se propage le long de l'axe de la charnière alors qu'à 48 hpf, l'expression est plus forte dans la marge D de la D-véligère que dans la région de la charnière (**Figure 2B**).

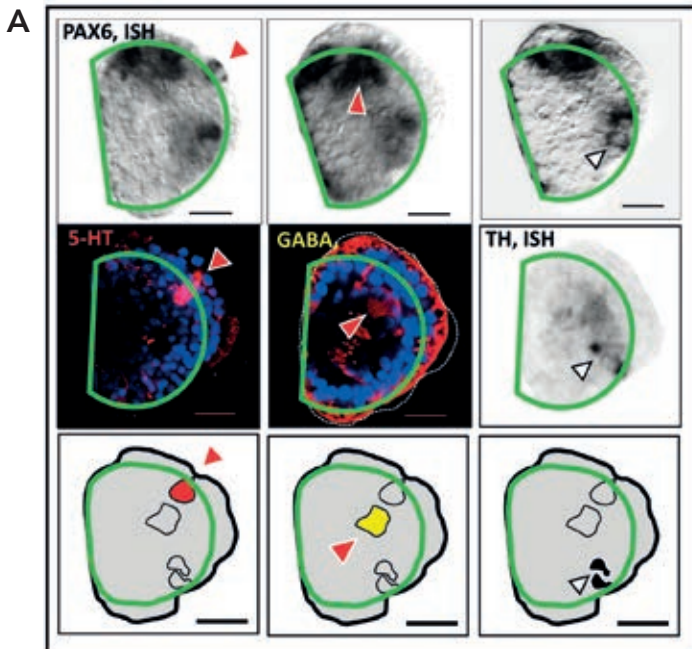
La chitinase (CHIT) est une enzyme de biominéralisation bien connue impliquée dans le métabolisme de la chitine. Le gène CHIT est exprimé dans les trochophores bivalves où il participe au développement de la coquille larvaire [18, 25]. Il est intéressant de constater que CHIT est régulé positivement au stade trochophore dans des larves de *Mytilus* exposées à de l'eau de mer acidifiée (pour imiter l'acidification des océans) [26]. L'analyse HIS montre que la Chi est exprimée dans une grande partie du champ de coquille de 24 à 32 hpf mais pas dans l'ensemble de celui-ci (**Figure 2B**). En revanche, il semble que la CHIT ne soit exprimée que dans les parties internes de la coquille déposée à 48 hpf (**Figure 2B**).

Les tyrosinases peuvent être impliquées dans la formation de la matrice de la coquille en réticulant des protéines fibreuses riches en quinones réactives pour former des polymères insolubles dans l'eau et résistants aux protéases. On pense que des tyrosinases participent à la phase initiale de formation de la coquille chez les huîtres [27, 28] ainsi qu'aux premières larves de moules [19, 29]. L'analyse qPCR a révélé qu'un des gènes codant pour une tyrosinase (TYR3) montre une faible expression dans les œufs fécondés et est fortement augmentée dans les trochophores de *M. galloprovincialis* [19]. L'analyse HIS montre que TYR3 est détectable à 24 hpf dans une large zone du champ de la coquille (**Figure 2B**). À 28 hpf, le signal TYR3 chevauche la coquille en croissance avec une expression plus forte sur les marges du champ de la coquille (**Figure 2B**). À 32 hpf, l'expression de TYR3 est concentrée dans des taches arrondies le long de la marge de croissance de la coquille et absente au centre des zones calcifiées. Au premier stade D-véligère complètement développé, à 48 hpf, l'expression est limitée aux marges de la valve en croissance et aucun signal n'est détectable dans la partie calcifiée de la coquille (**Figure 2B**). Ces analyses en HIS montrent clairement que la régulation à la hausse

du gène TYR3 précède et suit ensuite la croissance de la matrice organique dans la trochophore.

## Neurogénèse larvaire

La neurogénèse larvaire de *M. galloprovincialis* n'a été documentée que très récemment dans notre laboratoire. Deux techniques d'imagerie sont disponibles pour localiser les populations neuronales dans des larves en développement : la plus spatialement résolutive est l'immunohistochimie contre des neurotransmetteurs (lorsque des anticorps sont disponibles) et la plus exhaustive est l'HIS sur les gènes neuronaux (les gènes neuronaux sont soit des facteurs de transcription neurogéniques connus tels que Pax6, Ato1, Acs ou des gènes impliqués dans les fonctions neuronales). Les HIS de marqueurs neuronaux conservés tels que Pax6 sont très utiles pour localiser les différents domaines neuronaux dans la larve de *Mytilus* (**Figure 3A**). Cependant, ces types de gènes pan-neuronaux ne permettent pas de discriminer entre les différents neurones. Afin de discriminer les différentes populations neuronales, il faut utiliser l'immunohistochimie des neurotransmetteurs ou l'HIS de gènes exprimés uniquement dans un seul type de neurone comme les enzymes anaboliques et cataboliques de neurotransmetteurs spécifiques ou les transporteurs et récepteurs de ces neurotransmetteurs.



B

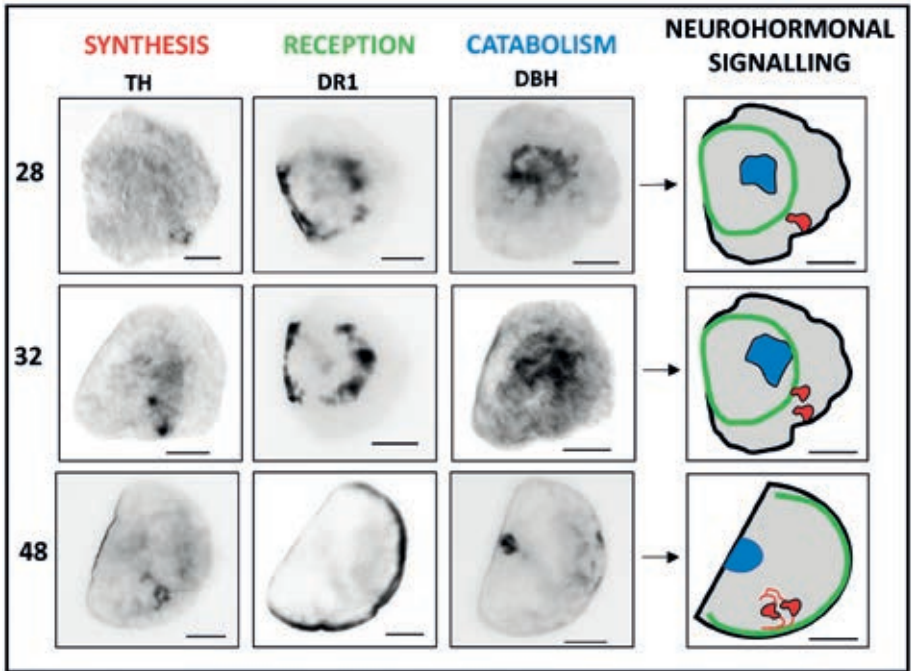


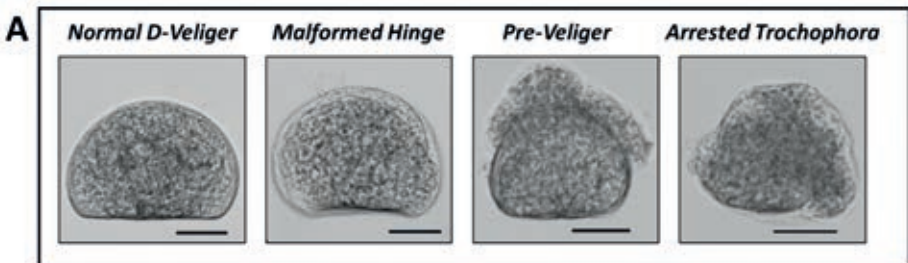
Figure 3 : Neurog nese chez la larve précoce de *M. galloprovincialis*.

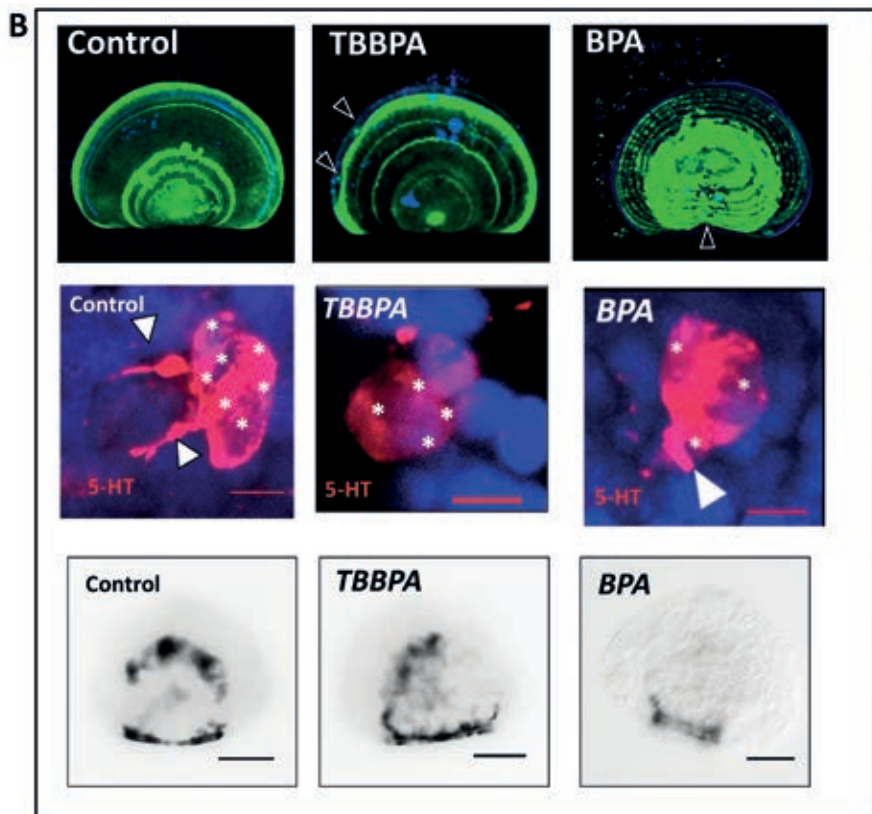
A) Trois populations neuronales dans des trochophores de 32 hpf : signal HIS de première rangée du gène marqueur pan-neuronal PAX6 montrant trois populations neuronales distinctes (têtes de flèches) observées dans une trochophore de 32 hpf. Rangée du milieu : les deux premières images montrent l'immunohistochimie pour 5-HT (cellules sérotoninergiques, tête de flèche) et GABA (cellules GABAergiques, tête de flèche) dans des trochophores à 32hpf. La troisième image montre une ISH pour le gène TH (Tyrosine Hydroxylase) un marqueur des cellules dopaminergiques (tête de flèche). Rangée du bas : représentations schématiques montrant les trois populations neuronales distinctes dans des trochophores à 32hpf avec les cellules sérotoninergiques en rouge, les cellules GABAergiques en jaune et les cellules dopaminergiques en noir. Le contour vert représente les limites du champ de la coquille. Barres d'échelle : 20  m.

B) Développement de la signalisation de la dopamine. Images HIS montrant les patrons d'expression des composants dopaminergiques au cours du développement larvaire (  28, 32 et 48 hpf). TH (Tyrosine Hydroxylase) indique la synthèse de la dopamine, DR1 (Dopamine Receptor 1) indique la réception de la dopamine et D H (Dopamine Beta Hydroxylase) indique le catabolisme de la dopamine. L'emplacement distinct de ces trois composants du métabolisme de la dopamine dans la larve suggère un rôle de la dopamine dans la signalisation neurohormonale au cours du développement de *Mytilus*. Barres d'échelle : 20  m.

Dans l'embryon de *Mytilus galloprovincialis*, les premiers neurones sérotoninergiques sont détectés dans l'ASO à partir de 24 hpf dans la trochophore (**Figure 1B**) [20]. Au cours du développement de la trochophore, le nombre de neurones sérotoninergiques augmente, mais ils restent localisés dans une seule structure semblable à un ganglion qui se situe près de la bordure D de la D-véligère (48 hpf, **Figure 3A**). Le marquage immunohistochimique de la sérotonine offre la possibilité de compter les cellules sérotoninergiques positives par microscopie confocale en utilisant la co-coloration des cellules sérotoninergiques et de tous les noyaux (par le Hoechst) dans le même individu (**Figure 4B, Figure 5**). Dans les larves de *M. galloprovincialis*, l'immunoréactivité de la sérotonine (5-HT) (ir) est détectable à partir de 24 hpf dans quelques cellules situées dans la zone pré-trochale de la larve, près des cils apicaux [20]. Au fur et à mesure que la larve se développe, le nombre de cellules 5-HT-ir passe progressivement à trois à 28 hpf, et à quatre dans la trochophore tardive (32 hpf) et jusqu'à 7 dans la D-véligère (48 hpf) [20] (**Figure 4B, Fig. 5**). Dans les D-véligères, les neurones positifs à la sérotonine sont organisés en une structure pyramidale compacte avec des axones/neurites visibles émergeant vers la charnière de la face dorsale de la larve (**Figure 4B**). En utilisant l'imagerie confocale des cellules 5HT-ir avec Hoechst, nous sommes en mesure de compter plus précisément le nombre de cellules 5HT-ir (**Figure 5**). En comptant le nombre de noyaux cellulaires colocalisés avec la coloration 5-HT, nous pouvons compter avec précision 7 cellules sérotoninergiques dans la D-véligère illustrée dans la **Figure 5** et trouver un nombre plus élevé de neurones sérotoninergiques dans les D-véligères à ce stade que dans d'autres espèces de bivalves [20].

L'apparition de cellules GABA-ir peut également être évaluée par immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-GABA disponibles dans le commerce (**Figure 3A**). Dans les larves de *M. galloprovincialis*, plusieurs cellules GABA-ir sont détectées à 24 et 28 hpf, le long du champ de la coquille et au centre du corps [21]. A partir





**Figure 4 : Phénotypes induits par le stress chimique/environnemental des D-véligères de *M. galloprovincialis*.**

A : Images en champ clair d'embryons de *Mytilus* cultivés pendant 48 heures jusqu'aux stades D-véligères. Par analyse visuelle de la morphologie générale des larves, nous pouvons remarquer trois phénotypes différents de la D-véligère normale (Normal D-Veliger). Il s'agit de la charnière malformée (« Malformed Hinge »), de la pré-véligère (« Pre-Veliger ») et de la trochophore arrêtée (« Arrested Trochophora »). Barres d'échelle : 20  $\mu$ m.

B : phénotypes larvaires induits par le BPA et le TBBPA : première rangée : phénotypes de coquille évalués par coloration avec CalcoF/Calcéine suivie d'une imagerie confocale 3D. Les pointes de flèches blanches indiquent la zone des morphologies affectées de la coquille. Barre d'échelle: 20  $\mu$ m. Rangée du milieu : phénotype neural évalué en comptant le nombre de cellules 5-HT positives (voir la figure 5 pour la méthode de comptage des cellules). Chez la larve témoin on observe 7 cellules sérotoninergiques alors qu'il n'y a que 5 et 3 cellules chez les larves cultivées en présence de TBBPA et de BPA respectivement. Les pointes de flèches blanches indiquent la présence de neurites. Barres d'échelle : 10  $\mu$ m. Rangée du bas : phénotype neuronal évalué par analyse HIS de l'expression du récepteur de la dopamine 1 (DR1) à 32 hpf. Barres d'échelle : 20  $\mu$ m.

de 32 hpf, l'immunoréactivité se concentre le long des marges externes des larves. À 48 hpf, un groupe de cellules GABAergiques peut être observé dans un ganglion différent du ganglion sérotoninergique (**Figure 3A**). Les cellules GABAergiques se trouvent également dans d'autres parties des larves, même dans des régions non neuronales. Cela indique que cet anticorps pourrait également avoir une liaison non spécifique (**Figure 3A**).

Parce que nous n'avons pas pu trouver d'anticorps capables de colorer spécifiquement les catécholamines, nous avons cherché à localiser les neurones à catécholamines dans des larves de *Mytilus* en utilisant l'HIS contre des gènes spécifiques pour chaque type de catécholamines. Nous présentons ici des données relatives à la voie dopaminergique que nous avons pu localiser dans la larve.

Pour localiser spécifiquement le système dopaminergique, nous avons analysé par HIS les profils d'expression des enzymes clés impliquées dans la synthèse de DOPA (Tyrosine Hydroxylase, TH) et le métabolisme (Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase, D $\beta$ H) et du récepteur DOPA (DR1) (**Figure 3B**). Dans les larves de *Mytilus*, le marqueur dopaminergique TH montre une localisation diffuse à 24hpf, [21] suivie d'une concentration progressive dans deux clusters de neurones dopaminergiques à 28 hpf et 32 hpf alors qu'à 48 hpf, une localisation claire de TH dans un seul cluster est observée (**Figure 3B**). L'HIS du gène DR1 montre que ce récepteur de la dopamine est situé à la marge du champ de la coquille à 28 hpf et 32 hpf alors qu'il est exprimé dans la bordure D de la véligère à 48 hpf (**Figure 3B**). L'expression de l'enzyme catabolique dopaminergique D $\beta$ H est assez diffuse dans la partie centrale des trochophores à 28 et 32 hpf mais elle devient très localisée au milieu de la région charnière de la D-véligère (à 48 hpf, **Figure 3B**). L'emplacement dispersé de la synthèse (TH), de la réception (DR1) et de l'anabolisme (D $\beta$ H) de la dopamine dans les larves de *Mytilus* indique que la dopamine agirait comme une neurohormone dans cet organisme plutôt que comme un simple neurotransmetteur.

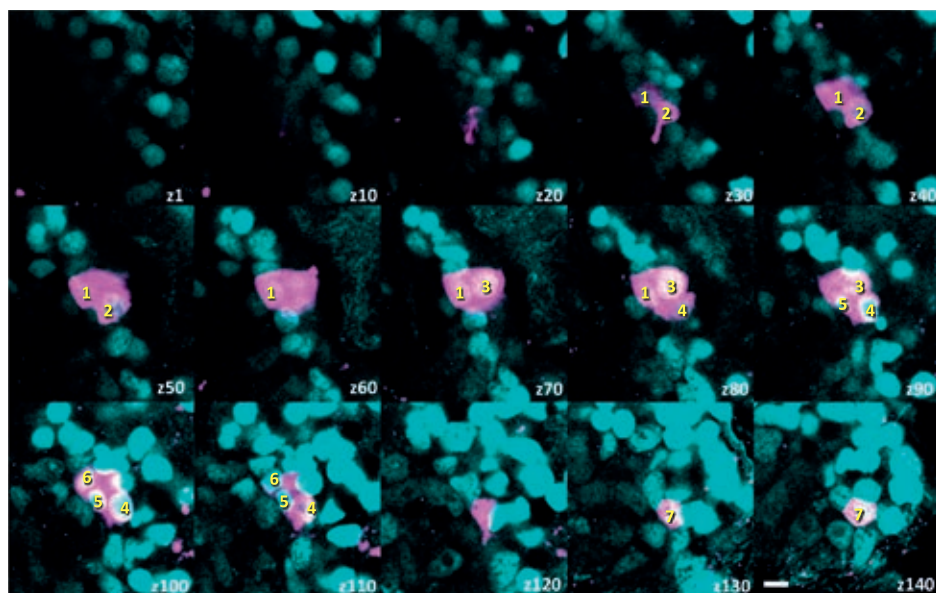
## Effet des polluants sur la coquille et le développement neuronal

La possibilité de cultiver en parallèle des centaines de milliers de larves de *Mytilus* qui atteignent le stade D-véligère en 48 heures permet de cribler l'effet des toxiques et de caractériser l'embryotoxicité (ou la tératogénicité) et la toxicité neurodéveloppementale des composés testés ou d'échantillons marins. Le protocole le plus simple consiste en une analyse de la morphologie des larves après 48 heures de culture. Une telle analyse de la morphologie larvaire peut être complétée par les protocoles de coloration décrits ci-dessus pour évaluer plus



spécifiquement l'altération de la morphogenèse de la coquille et du développement neuronal.

En utilisant les protocoles décrits dans les chapitres précédents, nous avons évalué l'impact de plusieurs perturbateurs endocriniens connus sur le développement de *M. galloprovincialis*. Les phénotypes (ou « endpoints ») notés lors du bio-essai larvaire sont des phénotypes très simples basés sur la morphologie des larves après 48 heures d'exposition au produit chimique testé [20, 21, 22]. À 48 hpf, les larves de *Mytilus galloprovincialis* devraient avoir une forme en D caractéristique en raison de



**Figure 5 : Comptage des neurones sérotoninergiques chez les D-véligères de *M. galloprovincialis* par immunohistochimie.**

Images confocales en série prises à 0,6  $\mu\text{m}$  d'intervalle d'un stade D-véligère (48 hpf) coloré pour la sérotonine (5-HT en magenta) et les noyaux avec du Hoechst (cyan). Les superpositions magenta et cyan ont été choisies pour mieux montrer la présence de noyaux dans l'image de superposition. Des images à 6  $\mu\text{m}$  d'intervalle sont affichées (avec la tranche z indiquée). Le comptage des cellules 5-HT positives se fait en marquant dans chaque image les noyaux entourés par la coloration 5-HT (numéro de cellule indiqué en jaune sur les images). Les noyaux cellulaires englobent plusieurs plans z (par exemple, le noyau de la cellule #1 est visible de z30 à z80 tandis que le noyau de la cellule #7 est visible de z130 à z140). Le ganglion sérotoninergique de cette D-véligère est composé de sept cellules. Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ .

la coquille calcifiée tandis que tout le corps de la larve est contenu dans la coquille (Figure 4A, « normal D-veliger »). Les principaux phénotypes morphologiques observés sont soit une charnière qui est plus droite (**Figure 4A**, « malformed hinge ») ou une véligère plus petite avec une forme en D encore apparente mais où le corps de la larve n'est plus contenu dans la coquille (« Pre-veliger » dans la **figure 4A**, également appelé « protruding mantle » dans de nombreuses études publiées). Le phénotype le plus radical est lorsqu'une forme en D ne peut plus être observée et que ces larves semblent arrêtées au stade trochophore (**Figure 4A**, « arrested trochophora »). Ces phénotypes morphologiques peuvent être facilement imagés et comptés par microscopie à lumière transmise qui permet d'imager les grands nombres de larves nécessaires pour des études toxicologiques et des criblages. En utilisant une telle analyse morphométrique, nous avons constaté qu'un pH acidifié (suivant un scénario d'acidification des océans) augmente la présence de larves avec une charnière affectée et avec un manteau saillant (phénotype pré-véligère) [23]. Les toxiques tels que le bisphénol A (BPA) (à des concentrations environnementales) induisent principalement des pré-véligères [20] tandis qu'une concentration environnementale de tétrabromobisphénol A (TBBPA) induit des pré-véligères et arrête les trochophores [21].

La coloration CalcoFluor/Calcéine peut révéler davantage de différences entre le BPA et le TBBPA. En effet, le TBBPA n'affecte pas les anneaux d'accrétion dans la D-véligère, sauf dans des endroits localisés près de la bordure D de la coquille (pointes de flèche sur la **figure 4B**) ni de la charnière, alors que le BPA affecte la charnière de la coque et semble avoir un impact plus fort que le TBBPA sur le dépôt de  $\text{CaCO}_3$  (**Figure 4B** rangée du haut).

L'immunoréactivité 5-HT et l'HIS du gène DR1 montrent les défauts de développement neurologique provoqués par les traitements TBBPA/BPA et révèlent davantage de différences dans les effets du TBBPA et du BPA. Le TBBPA et le BPA réduisent tous deux le nombre de cellules sérotoninergiques dans le ganglion 5HT-positif [20, 21] et l'apparition de neurites sortant de ce ganglion neural (**Figure 4B** rangée du milieu). En revanche, l'HIS de DR1 révèle des différences frappantes entre le TBBPA et le BPA. Le TBBPA diminue considérablement l'expression de DR1 dans la marge D de la coquille en croissance (à 32 hpf) tandis que l'expression de DR1 dans la charnière de la coquille ne semble pas affectée. En revanche, le BPA n'a aucun effet évident sur l'expression de DR1 à ce stade (**Figure 4B**). Cette observation suggère que le BPA et le TBBPA ont des modes d'action toxiques différents dans les larves de *Mytilus*.

## DISCUSSION/CONCLUSION

Le développement larvaire de *Mytilus* (de différentes espèces) a été exploité par des tests d'embryotoxicité standards conçus par l'Organisation internationale de normalisation - ISO ([www.iso.org](http://www.iso.org)) et ASTM international [14] et utilisés dans de nombreux laboratoires depuis plusieurs décennies. En effet, le développement des embryons et des larves peut être facilement surveillé et échantillonné à l'aide des protocoles de tests biologiques embryo-larvaires utilisant des espèces de moule [22]. De plus, en raison de la petite taille des larves de *Mytilus* (un demi-millimètre), de leur vitesse de développement (larves D-véligères entièrement calcifiées en 48 heures) et du phénotypage morphologique facile et rapide, les tests embryo-larvaires peuvent être miniaturisés et effectués à une vitesse élevée et à haut débit ce qui est important pour un outil de surveillance.

Cependant, le fait de n'avoir que 3 critères d'évaluation morphologiques rend difficile la distinction des différents types de toxicité et ne permet pas de caractériser des phénotypes spécifiques de la coquille ou du développement neurologique. La coloration fluorescente de la croissance de la coquille avec le CalcoFluor/Calcéine ainsi que la coloration immunohistochimique/HIS des cellules neurales peuvent fournir des informations plus approfondies pour permettre de mieux discriminer les différents phénotypes induits par différents toxiques.

Nous avons montré ici deux techniques complémentaires pour analyser la morphogénèse de la coquille embryonnaire (colorants vitaux et HIS). L'imagerie 3D des larves colorées au CalcoFluor/calcéine par microscopie confocale permet une quantification fine de la croissance de la coquille qui est essentielle à la caractérisation des processus de développement impliqués dans la formation de la coquille larvaire de tous les bivalves et pas seulement de *Mytilus galloprovincialis* [30]. Une telle quantification fournit également certains critères de toxicité sublétaux qui peuvent se révéler plus sensibles que l'unique phénotypage morphologique. L'analyse par hybridation *in situ* (HIS) apporte des informations moléculaires liées à l'expression embryonnaire des gènes qui jouent un rôle déterminant dans la construction de réseaux de régulation des gènes (GRN) participant à la formation de la coquille embryonnaire ainsi que des « adverse outcome pathways » (AOP) décrivant les modes d'action des toxiques. En effet, certains toxiques pourraient avoir des impacts similaires sur le développement larvaire et la morphogénèse de la coquille mais avec des cibles et des événements moléculaires différents (et donc affectant différemment les GRN) conduisant aux phénotypes observés. Parce que l'HIS n'est pas quantitative, elle doit être utilisée en parallèle avec la qPCR pour

concevoir des GRN testables qui sous-tendent la biogenèse de la coquille larvaire ou les AOP.

Ensuite, nous avons montré comment l'immunohistochimie du neurotransmetteur suivie d'une imagerie confocale 3D peut documenter l'initiation de la neurogénèse avec une résolution cellulaire et comment certains toxiques peuvent affecter le neurodéveloppement. Là encore, l'analyse HIS complète bien l'immunohistochimie en diversifiant le nombre de voies neuronales à étudier (là où aucun bon anticorps n'est disponible) et en faisant la lumière sur les GRN impliqués dans le développement neuronal et leur dérégulation. En couplant tous ces protocoles avec une approche pharmacologique, nous avons démontré le contrôle neuroendocrinien de la biogenèse de la coquille chez *M. galloprovincialis* [20].

Nous avons d'abord constaté que l'apparition des systèmes sérotoninergique et dopaminergique se produit au cours du développement larvaire précoce de *M. galloprovincialis*, conduisant à la génération de populations neuronales distinctes au début de la croissance de la coquille [20, 21]. De plus, la signalisation dopaminergique régule la biogenèse de la coquille larvaire de *M. galloprovincialis*, car le récepteur de la dopamine 1 (DR1) est localisé dans les tissus responsables de la biogenèse de la coquille. Le contrôle neuroendocrinien de la morphogénèse de la coquille a en outre été suggéré par l'observation du blocage pharmacologique de DR1 qui est capable d'arrêter l'ensemble du processus de biogenèse et de développement de la coquille larvaire [21]. Enfin, les enzymes anaboliques et cataboliques de la dopamine sont constamment exprimées tout au long du développement de la coquille. Ces observations confirment que la dopamine est un agent morphogénétique puissant dans la biogenèse de la coquille larvaire de *M. galloprovincialis* [21].

Si le processus de biogenèse de la coquille larvaire chez les mollusques bivalves est régulé par la signalisation neuroendocrinienne des monoamines sérotonine et dopamine, ces voies devraient être étudiées après exposition aux perturbateurs endocriniens à activité neuroendocrinienne pour prouver le mode d'action de ces classes de toxiques sur les bivalves.

En effet, nos travaux et ceux d'autres personnes suggèrent jusqu'à présent que les effets néfastes de l'exposition au BPA et au TBBPA sur les larves de moules pourraient être dûs à la perturbation des voies de signalisation neuroendocriniennes [20, 21]. Il a déjà été démontré que le BPA affecte le développement larvaire de *M. galloprovincialis* dans le test d'embryotoxicité de 48 h dans une large gamme de concentrations, y compris les concentrations environnementales [22]. De plus, le

BPA a significativement affecté la transcription de plusieurs gènes, dont le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>1</sub> ainsi que ceux impliqués dans la biominéralisation [31]. Le BPA pourrait également induire une localisation ectopique et une diminution du nombre de neurones 5-HT-ir, accompagnée d'un effet significatif sur les niveaux d'expression du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>1</sub> [20]. Le TBBPA a altéré l'ensemble du processus de biogenèse de la coquille larvaire et a affecté le développement des systèmes dopaminergique, sérotoninergique et GABAergique [21]. Ainsi, une voie plausible de résultats indésirables (AOP) de l'action du BPA et du TPBPA sur les premiers stades larvaires de *M. galloprovincialis* implique une interférence avec la synthèse des neurotransmetteurs sérotonine et dopamine en tant qu'événement initiateur moléculaire, ce qui entraîne finalement une morphogenèse de la coquille altérée et un arrêt du développement dans les larves de *Mytilus* [21]. Il est important de noter que la gamme de concentrations utilisées dans nos études est proche de la quantité des deux produits chimiques trouvés dans l'environnement, ce qui suggère que l'AOP identifié pourrait être impliqué dans les conséquences néfastes sur les populations de *Mytilus* et de bivalves [21].

Les exemples du BPA et du TBBPA soutiennent fortement que la signalisation neuroendocrinienne effectuée par le système monoaminergique pourrait être une cible sensible des produits chimiques perturbateurs neuroendocriniens dans le développement des mollusques bivalves, et la première preuve diagnostique d'un tel mécanisme est le développement défavorable de la larve. Une telle perturbation neuroendocrinienne peut aussi se produire dans d'autres invertébrés puisque les neurotransmetteurs et les neurohormones, et en particulier les monoamines, sont les principales molécules de signalisation du système neuroendocrinien de nombreux invertébrés [32, 33]. Cependant, les éléments de diagnostic neuroendocriniens, tels que le développement de la coquille chez les mollusques bivalves, doivent d'abord être découverts et caractérisés pour chaque type d'invertébrés.

Enfin, tous les protocoles décrits ici peuvent être facilement appliqués à d'autres espèces d'invertébrés calcifiants et sont très utiles dans le domaine des études Evo-dévo et de la toxicologie environnementale. Parce que toutes ces techniques utilisent l'imagerie pour collecter les résultats, elles peuvent être appliquées dans des criblages/tests à haut débit par l'automatisation de l'acquisition et de l'analyse d'images et nous sommes convaincus qu'elles joueront un rôle déterminant dans la toxicologie du 21<sup>ème</sup> siècle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. 2022
2. CARRIER TJ., REITZEL, AM. & HEYLAND, A. Evolutionary ecology of marine invertebrate larvae. Oxford University Press, 2018 and references quoted therein
3. GOSLING E.: Marine Bivalve Molluscs. John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
4. GIRIBET, G & EDGECOMBE, GD. 44. Lophotrochozoa: The Invertebrate Tree of Life, Princeton University Press, 2020, pp. 346-350.
5. KNIPRATH E. Ontogeny of the Molluscan Shell Field: a Review. *Zool Scripta* 1981, **10**, 61–79.
6. KNIPRATH E. Larval development of the shell and the shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Wilhelm Roux' Archiv* 1980, **188**, 201–204.
7. WILSON-SANDERS SE. Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education. *ILAR Journal*, 2011, **52**, 126–52.
8. BORETTI A. & ROSA L.: Reassessing the projections of the World Water Development Report. *npj Clean Water*, 2019, **2** (15)
9. ORTEGA A. & OLIVARES-BANUELOS TN.: Neurons and Glia Cells in Marine Invertebrates: An Update. *Front Neurosci.* 2020, **14**, 121
10. KURITA Y, DEGUCHI R, Wada H. Early Development and Cleavage Pattern of the Japanese Purple Mussel, *Septifer virgatus*. *Zoological Science* 2009, **26**, 814–820.
11. MARIN F. The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci* 2012, **S4**, 1099–1125.
12. FALINI G & FERMANI S. Chitin Mineralization. *Tissue Engineering* 2004, **10**, 1–6.
13. RAMESH K, MELZNER F, GRIFFITH AW, GOBLER CJ, ROUGER C, TASDEMIR D, et al. In vivo characterization of bivalve larval shells: a confocal Raman microscopy study. *J R Soc Interface* 2018, **15**, 20170723.
14. ASTM, 1994. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. Annual book of standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Vol 11.05, pp. 223-240.
15. YURCHENKO OV, SAVELIEVA AV, KOLOTUCHINA NK, VORONEZHSKAYA EE, DYACHUK VA. Peripheral sensory neurons govern development of the nervous system in bivalve larvae. *EvoDevo*, 2019, **10**, 22.
16. VORONEZHSKAYA EE, NEZLIN LP, ODINTSOVA NA, PLUMMER JT, CROLL RP. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). *Zoomorphology* 2008, **127**, 97–110.

17. LIU Z, WANG L, YAN Y, ZHENG Y, GE W, LI M, et al. D1 dopamine receptor is involved in shell formation in larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 2018, **84**, 337–342.
18. LIU Z, ZHOU Z, ZHANG Y, WANG L, SONG X, WANG W, et al. Ocean acidification inhibits initial shell formation of oyster larvae by suppressing the biosynthesis of serotonin and dopamine. *Science of The Total Environment* 2020, **735**, 139469.
19. MIGLIOLI A., DUMOLLARD R., BALBI T., BESNARDEAU L. AND CANESI L. Characterization of the main steps in first shell formation in *Mytilus galloprovincialis*: possible role of tyrosinase. *Proc. R. Soc. B.* 2019 **286**, 20192043
20. MIGLIOLI, A., BALBI, T., BESNARDEAU, L., DUMOLLARD, R., & CANESI, L. Bisphenol A interferes with first shell formation and development of the serotonergic system in early larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 2021, **758**, 144003.
21. MIGLIOLI, A., BALBI, T., MONTAGNA, M., DUMOLLARD, R., & CANESI, L. Tetrabromobisphenol A acts a neurodevelopmental disruptor in early larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 2021, **793**, 148596.
22. FABBRI R, MONTAGNA M, BALBI T, RAFFO E, PALUMBO F, CANESI L. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 2014, **99**, 1–8.
23. KAPSENBERG L, MIGLIOLI A, BITTER MC, TAMBUTTÉ E, DUMOLLARD R, GATTUSO J-P. Ocean pH fluctuations affect mussel larvae at key developmental transitions. *Proc. Royal Soc. B: Biological Sciences* 2018, **285**, 20182381.
24. ZHAO, R, TAKEUCHI, Takeshi, LUO, YJ, et al. Dual gene repertoires for larval and adult shells reveal molecules essential for molluscan shell formation. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, **35**(11), 2751-2761.
25. LI H, WANG D, DENG Z, HUANG G, FAN S, ZHOU D, LIU B, ZHANG B, YU D. Molecular characterization and expression analysis of chitinase from the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 2017, **203**, 141-148.
26. KAPSENBERG L., BITTER MC., MIGLIOLI A., PELEJERO C., GATTUSO JP., DUMOLLARD R., Molecular basis of ocean acidification sensitivity and adaptation in *Mytilus galloprovincialis*. *iScience*, 2022, **25**(8), 104677.
27. HUAN P, LIU G, WANG H, LIU B. Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Genes Evol.* 2013, **223**, 389–394.
28. YANG B, PU F, LI L, YOU W, KE C, FENG D. Functional analysis of a tyrosinase gene involved in early larval shell biogenesis in *Crassostrea angulata* and its response to ocean acidification. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2017, **206**, 8–15.

29. REN, G., CHEN, C., JIN, Y., ZHANG, G., HU, Y., SHEN, W. A novel tyrosinase gene plays a potential role in modification the shell organic matrix of the triangle mussel *Hyriopsis cumingii*. *Front. Physiol.* 2020, **11**, 100.
30. MIN Y, LI Q, YU H. Characterization of larval shell formation and CgPOU2F1, Cg-Sox5, and CgPax6 gene expression during shell morphogenesis in *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*; 2022, **263**, 110783.
31. BALBI T, FRANZELLITTI S, FABBRI R, MONTAGNA M, FABBRI E, CANESI L. Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects on gene transcription. *Environmental Pollution* 2016, **218**, 996–1004.
32. JOYCE A, VOGELER S. Molluscan bivalve settlement and metamorphosis: Neuroendocrine inducers and morphogenetic responses. *Aquaculture* 2018, **487**, 64–82.
33. MALAGOLI D, OTTAVIANI E. Cross-talk among immune and neuroendocrine systems in molluscs and other invertebrate models. *Hormones and Behavior* 2017, **88**, 41–4. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.015>

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Laurent Gilletta, Alexandre Jean, Axel Duchene et le Centre de Ressources Biologiques Marines du CRBM-IMEV soutenu par EMBRC-France, dont les fonds publics français sont gérés par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme « Investissement d'Avenir » (ANR-10-INBS-02) ; Lydia Besnardeau et les membres du groupe Ascidian BioCell. R.D. et A.M. ont été soutenus par une bourse de l'Agence Nationale de la Recherche (MusMod4EDC, N° : ANR-21-CE34-0006-01, France), et A.M a également été soutenue par le programme de doctorat en sciences marines, DISTAV de l'Université de Gênes.



# IMAGERIE 3D DE L'INNERVATION TUMORALE

PUGET Angélique, MANN Fanny

*Aix Marseille Univ, CNRS,  
IBDM – Institut de Biologie du Développement de Marseille  
UMR 7288, Parc Scientifique de Luminy - 13288 Marseille Cedex 9 – France*

fanny.mann@univ-amu.fr

[doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.73](https://doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.73)

# 3D IMAGING OF TUMOR INNERVATION

## ABSTRACT

There is no tissue without neural connections and therefore malignant tumors also have a neural interface, regardless of where they emerge and spread. Cancer cells and cells of the nervous system engage in a reciprocal dialogue that often leads to accelerated disease progression. The presence of nerve fibers in the tumor microenvironment has therefore recently emerged as a prognostic biomarker and a potential therapeutic target for cancer treatment. This paper presents a method to analyze the three-dimensional organization of neural networks in intact (non-sectioned) tissue samples. We will illustrate how this approach, applied to a mouse model of pancreatic adenocarcinoma, permits the visualization of the different neural structures present in the tumor microenvironment (from large nerve bundles to individual axonal terminals) and provides information about the mechanisms underlying tumor innervation.

## KEY WORDS

**Light sheet fluorescence microscopy, tissue clarification, nervous system, pancreatic ductal adenocarcinoma, axonogenesis, neural invasion**

## RESUME

Il n'existe pas de tissu sans connexions neuronales et, par conséquent, les tumeurs malignes possèdent également une interface neuronale, indépendamment de l'endroit où elles apparaissent et se propagent. Les cellules cancéreuses et les cellules du système nerveux s'engagent dans un dialogue réciproque qui conduit souvent à une accélération de la progression de la maladie. La présence de fibres nerveuses dans le microenvironnement tumoral est donc apparue récemment comme un biomarqueur pronostique et une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer. Cet article présente une méthode permettant d'analyser l'organisation tridimensionnelle des réseaux neuronaux dans des échantillons de tissus intacts (non sectionnés). Nous illustrerons comment cette approche, appliquée à un modèle murin d'adénocarcinome pancréatique, permet de visualiser les différentes structures neurales présentes dans le microenvironnement tumoral (des grands faisceaux nerveux aux terminaisons axonales individuelles) et fournit des informations sur les mécanismes qui sous-tendent l'innervation tumorale.

## MOTS CLÉS

**Microscopie de fluorescence à feuille de lumière, clarification tissulaire, système nerveux, adénocarcinome canalaire du pancréas, axonogenèse, invasion neurale**

## INTRODUCTION

Les cellules du système nerveux forment un réseau qui s'étend dans tous les tissus et organes du corps, y compris dans les tumeurs malignes. Les premières observations de la présence de nerfs dans les tumeurs remontent à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Par la suite, dans la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, les limitations des méthodes de coloration du tissu nerveux pour la microscopie ont conduit à des résultats ambigus et controversés concluant soit que les tumeurs solides étaient innervées, soit au contraire que les structures nerveuses étaient absentes de la masse tumorale, possiblement en raison de leur dégradation par la tumeur. L'avènement des techniques d'immunohistochimie et de microscopie électronique a ensuite fourni des preuves irréfutables de la présence de fibres nerveuses dans les cancers humains ainsi que dans les modèles animaux expérimentaux, et la notion d'innervation tumorale est désormais largement acceptée [1]. Des travaux récents et de plus en plus nombreux indiquent que les cellules nerveuses présentes dans la tumeur engagent un dialogue réciproque avec les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires infiltrées, avec des conséquences néfastes et, dans de rares cas, bénéfiques sur le développement et la progression de la maladie [2]. L'innervation tumorale est donc apparue comme un biomarqueur pronostique et une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer.

S'il est désormais établi que la croissance des tumeurs se fait en relation avec le système nerveux, les mécanismes d'apparition des nerfs dans les tumeurs sont en revanche moins bien connus. Les recherches ont conclu à l'existence de deux phénomènes principaux, souvent désignés dans la littérature par les termes d'*invasion neurale* et d'*axonogenèse* [1]. Dans le cas de l'invasion neurale, le système nerveux reste largement statique tandis que les tumeurs se développent autour des nerfs existants et les envahissent. Dans le cas de l'axonogenèse, en revanche, les neurones adultes réactivent un programme de croissance axonale et des fibres nerveuses nouvellement formées infiltrent activement les tumeurs et s'y arborescent. Distinguer ces deux phénomènes et comprendre la part active que joue la plasticité neuronale dans l'innervation des tumeurs est crucial pour développer des stratégies visant à réduire l'impact du système nerveux dans les cancers.

À présent, cette question a été principalement abordée par l'examen de la présence et de la taille des nerfs sur des coupes histologiques ou des "microarrays de tissus" (TMA) d'échantillons cancéreux. Cela a conduit à des résultats divergents. Par exemple, une analyse du tissu prostatique humain a montré que les régions cancéreuses ainsi que les lésions préneoplasiques présentent une densité ner-

veuse plus élevée que le tissu sain, ce que les chercheurs ont interprété comme une preuve d'axonogenèse liée au cancer [3]. Une autre étude indique que si la taille des nerfs augmente dans les cancers pancréatiques comparés aux tissus adjacents normaux, leur nombre reste en revanche le même. Les auteurs concluent donc que les modifications nerveuses observées sont dues à une hypertrophie nerveuse, probablement consécutive à l'invasion par les cellules cancéreuses, et non à une innervation *de novo* [4]. La principale limitation de ces études est qu'elles ne présentent qu'un "instantané" de l'innervation des régions examinées et ne rendent pas compte de l'innervation de toute la zone cancéreuse, ni même de l'organe dans lequel la tumeur se développe. Or, distinguer l'invasion neurale de l'axonogenèse nécessite d'identifier et de tracer les nerfs préexistants dans l'organe et les nerfs intra-tumoraux, afin de démontrer formellement s'il existe une expansion globale du nombre de nerfs liée au développement tumoral. D'autre part, ces méthodes classiques d'analyse se concentrent généralement sur de larges faisceaux de fibres nerveuses, qui sont facilement identifiables sur des coupes histologiques de quelques micromètres d'épaisseur, et ignorent les fibres axonales individuelles qui forment un maillage distribué dans tous les tissus mais dont la présence dans les tumeurs a jusqu'à présent été sous-estimée.

Pour remédier à ces problèmes, nous présentons ici une méthode d'imagerie tridimensionnelle (3D) par microscopie de fluorescence à feuille de lumière (LSFM) permettant de visualiser l'architecture des projections neuronales dans des organes entiers. Appliquée à des modèles murins d'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP), cette méthode nous a permis de réaliser une étude quantitative du système nerveux sympathique et de son évolution au cours de la tumorigenèse pancréatique. Nos résultats ont confirmé l'existence de deux mécanismes indépendants mais coexistants : un englobement passif des nerfs sympathiques existants dans les tumeurs, et une croissance active de fibres axonales individuelles dans les lésions préneoplasiques et à la périphérie des tumeurs [5].

## MATERIELS ET METHODES

### Animaux

Toutes les procédures animales ont été menées conformément aux directives du ministère français de l'Agriculture (numéro d'agrément F1305521) et approuvées par le comité d'éthique local (numéro d'agrément CE14 APAFIS#27289-2020091713522725 v4). Les souris sauvages C57BL/6 proviennent

du laboratoire Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) et les souris mutantes KIC (LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> ; Ink4a/Arf<sup>lox/lox</sup> ; Pdx1-Cre) ont été obtenues par croisement des lignées de souris LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> [6], Pdx1-Cre [7] et Ink4a/Arf<sup>lox/lox</sup> [8].

## Procédure d'immunomarquage et de clarification d'organe entier

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de 100 mg/kg de kétamine (Imalgene ; Merial, Lyon, France) et de 10 mg/kg de xylazine (Rompun ; Bayer, Leverkusen, Allemagne) et perfusées par voie intracardiaque avec 20 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) suivis de 30 mL de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du PBS. Les pancréas sont disséqués en gardant attachés le plexus coeliaque et la rate afin de permettre leur orientation, puis post-fixés pendant la nuit à 4 °C dans du PFA à 4 %. Les organes sont immunomarqués et clarifiés selon le protocole iDISCO+ [9]. Les échantillons sont placés dans des tubes de 15 ou 50 mL en fonction de la présence et/ou de taille de la tumeur. Les volumes de solutions sont adaptés afin de recouvrir le tissu et permettre une bonne homogénéisation lors de l'agitation. Lorsqu'indiqué, les solutions sont filtrées avec des filtres à pores de 0,2 µm. Les échantillons sont déshydratés dans une série graduée de méthanol dilué dans du PBS (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % méthanol) pendant 1 h chacune à température ambiante (TA) avec agitation, puis blanchis dans du méthanol/5 % de peroxyde d'hydrogène pendant la nuit à 4 °C. Les échantillons sont réhydratés en utilisant une série graduée de solutions de méthanol (100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % méthanol dans du PBS) pendant 1 h chacune à TA avec agitation. Les tissus sont ensuite incubés dans une solution de perméabilisation filtrée (20% diméthylsulfoxyde (DMSO), 0,16 % Triton X-100, 18,4 g/L de glycine et 0,05 % d'azide dans du PBS) pendant 2 jours à 37 °C avec agitation, puis incubés dans un tampon de blocage filtré (PTwH (0,2 % Tween-20, 10 mg/L d'héparine et 0,05 % d'azide dans du PBS) additionné de 5 % DMSO et 3 % de sérum d'âne) pendant 3 jours à 37 °C avec agitation. Les tissus sont ensuite transférés dans des plaques 12 puits et incubés avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage filtré (2 à 3 mL par puits) à 37 °C avec agitation pendant une semaine, puis lavés dans du PTwH et incubés avec des anticorps secondaires dilués dans le tampon de blocage filtré pendant 2 à 3 jours à 37 °C avec agitation. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau I. Dans certains cas, un marquage nucléaire a été réalisé avec le colorant TO-PROTM-3 (642/661 ; cat. #T3605 ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) dilué dans du DMSO (1:1000) pendant 1 h 30 min à TA après incubation avec l'anticorps secondaire. Les échantillons sont lavés dans du

PTwH, avant d'être de nouveau transférés dans des tubes de 15 ou 50 mL, puis déshydratés dans une série graduée de solutions de méthanol dilué dans du PBS (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % de méthanol) pendant 1 h chacune à TA avec agitation. A partir de cette étape, des tubes en plastique renforcé (TPP™ 91015) de 15 ou 50 mL doivent être utilisés. Les échantillons sont équilibrés dans 66 % de dichlorométhane / 33 % de méthanol pendant une nuit à température ambiante. La délipidation est réalisée par une immersion dans du dichlorométhane à 100 % pendant 20 min. Enfin, les échantillons sont immergés dans de l'éther dibenzyle pour homogénéiser les indices de réfraction entre le tissu et le milieu d'imagerie.

## Acquisition d'images par LSM et analyse

Les échantillons clarifiés ont été imagés avec l'Ultramicroscope II (Miltényi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) équipé d'une caméra sCMOS 5,5 (Andor Neo) et d'un objectif 2x/0,5 (MVPLAPO 2x) muni d'un capuchon de protection avec une distance de travail de 5,7 mm. La version 5.1.328 du logiciel de contrôle du microscope, lmspector, a été utilisée. Les images de volume 3D ont été générées à l'aide du logiciel Imaris x64 (version 9.2.1 et 9.3.0 ; Bitplane, Zurich, Suisse). Les images ont d'abord été converties en fichiers Imaris (.ims) à l'aide d'Imaris File Converter. Les acquisitions de pancréas entiers ont été réalisées en mosaïque avec un pourcentage de recouvrement de 45 % et combinées à l'aide du logiciel Imaris Stitcher. La visualisation 3D des échantillons a ensuite été effectuée en utilisant "3D view" dans Imaris. Dans certains cas, un plan de coupe a été créé à l'aide des outils "Orthoslicer" ou "Obliqueslicer" pour permettre une meilleure visualisation des structures d'intérêt. Les images 3D ont été générées à l'aide des outils "Snapshot" et "Animation". Lorsque cela était nécessaire, les images ont été recadrées et leur luminosité a été ajustée uniformément à l'aide du logiciel Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, CA).

Les fibres nerveuses immunopositives pour le marqueur neuronal TH (tyrosine hydroxylase) ont été reconstruites à l'aide de l'outil "Surface" d'Imaris de manière automatique (option « *absolute intensity* » en gardant les paramètres par défaut) en utilisant le signal TH. Les contours des nodules cancéreux ont été reconstruits manuellement à l'aide de l'outil "Surface" d'Imaris en utilisant le signal d'autofluorescence du tissu. Ces reconstructions ont permis d'extraire le signal des nerfs TH positifs contenu dans ou à l'extérieur des nodules tumoraux segmentés, afin de reconstruire les nerfs intra et extra-tumoraux.

## RESULTATS

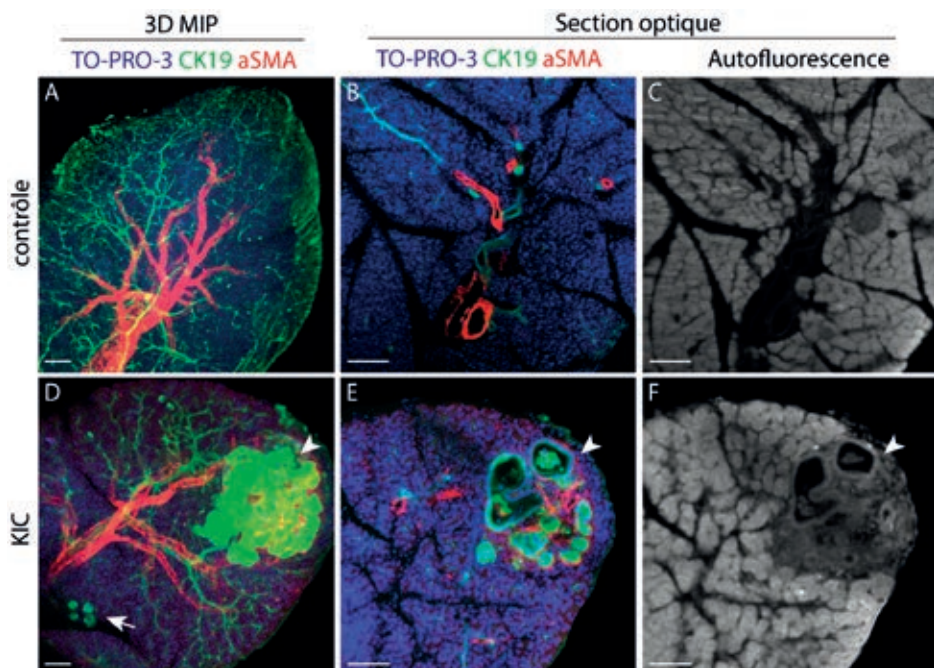
### Analyse histopathologique des tissus clarifiés par auto-fluorescence

Notre objectif est d'étudier comment l'innervation du pancréas évolue au cours du développement de l'ADKP en utilisant le modèle de souris KIC (LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> ; Ink4a/Arf<sup>lox/lox</sup> ; Pdx1-Cre) qui récapitule les étapes de la progression de la pathologie humaine. Afin d'étudier la distribution spatiale des faisceaux nerveux dans le pancréas, nous avons utilisé la méthode iDISCO+ qui permet d'immunomarquer des cellules d'intérêt dans des organes entiers rendus optiquement transparents. Une condition préalable importante pour cette étude est la capacité d'identifier les différentes lésions pancréatiques conduisant à l'ADKP [incluant les métaplasies acino-canalisaires (ADM) et les néoplasies intraépithéliales (PanIN)] ainsi que les nodules cancéreux dans les échantillons transparents. Dans un premier temps, les lésions pancréatiques ont été visualisées par immunomarquage avec les marqueurs Cytokératine 19 (CK19) et alpha-actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA). Dans un pancréas sain, le marquage anti-CK19 permet de visualiser le réseau de canaux transportant le suc pancréatique sécrété par les cellules acineuses jusqu'au duodénum, alors que le marquage anti- $\alpha$ -SMA met en évidence les artères qui alimentent le pancréas (**Figure 1A** et **1B**). Dans un pancréas de souris KIC âgé de 6,5 semaines, le marqueur CK19 révèle des structures épithéliales ayant une morphologie alvéolaire qui les distingue des canaux pancréatiques, et qui correspondent à de petites lésions PanIN de bas grade (**Figure 1D**) ou à des lésions cancéreuses plus grandes et architecturalement plus complexes (**Figure 1D** et **1E**). Le marquage  $\alpha$ -SMA indique une vascularisation et/ou une activation stromale dans ces régions lésionnelles. Il est intéressant de noter que le signal auto-fluorescent du tissu pancréatique imagé dans le canal vert (excitation laser à 488 nm) permet d'apprécier la morphologie générale du tissu ainsi que les changements histopathologiques mentionnés ci-dessus, les lésions épithéliales étant reconnaissables par leur structure et par une plus faible intensité d'auto-fluorescence par rapport au tissu adjacent (**Figure 1C** et **1F**).

### Visualisation 3D des nerfs intra-tumoraux

L'innervation extrinsèque du pancréas est assurée par le système nerveux autonome, constitué de fibres sympathiques et parasymphatiques, qui adapte les sécrétions exocrines et endocrines aux changements constants des conditions environnementales et physiologiques. Dans cette étude, nous nous sommes





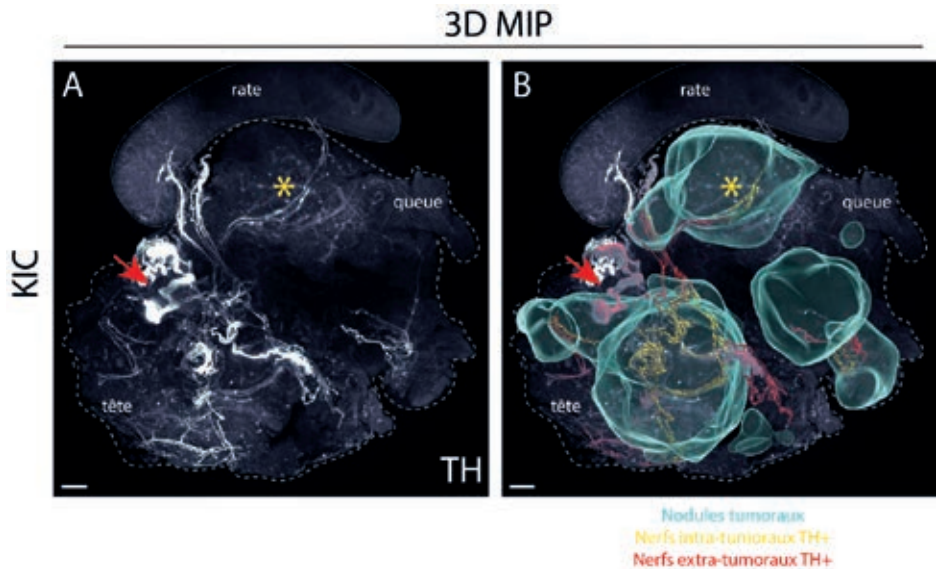
**Figure 1 : Détection des lésions épithéliales cancéreuses et précancéreuses dans des pancréas clarifiés.**

(A, B et D, E) Vue en projection d'intensité maximale 3D (3D MIP) (A, D) et coupes optiques (B, E) de lobules pancréatiques de souris contrôles et KIC marqués avec les anticorps anti-CK19 (vert), anti-  $\alpha$ -SMA (rouge) et avec le marqueur nucléaire TO-PRO-3 (bleu). Dans un pancréas contrôle, CK19 est exprimé par les cellules épithéliales des canaux pancréatiques et  $\alpha$ -SMA est exprimé par les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins. Dans un pancréas de souris KIC, le marquage CK19 identifie de petites lésions épithéliales de type PanIN (flèche en D) et un nodule tumoral (têtes de flèche en D et E). (C, F) Autofluorescence imagée à 488 nm du tissu contrôle et du tissu KIC présentés en B et E, respectivement. Le tissu lésionnel étant moins autofluorescent que le tissu sain, le signal fournit suffisamment d'informations pour identifier les lésions épithéliales cancéreuses (tête de flèche) sans utiliser d'immunomarquage.

Barres d'échelle : 100  $\mu$ m. Taille des voxels : x = 0,755  $\mu$ m y = 0,755  $\mu$ m z = 2  $\mu$ m (A-C) x = 0,604  $\mu$ m y = 0,604  $\mu$ m z = 1  $\mu$ m (D-F).

intéressés à décrire l'innervation sympathique de l'ADKP en réalisant un immunomarquage à l'aide d'anticorps anti-tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme de la voie de biosynthèse de la noradrénaline, sur des pancréas de souris KIC âgée de 8 semaines. Les images 3D des échantillons ont été acquises

en mosaïque puis assemblées pour reconstruire les préparations de pancréas entiers, incluant le plexus coélique et la rate. Les corps cellulaires des neurones sympathiques noradrénergiques innervant le pancréas sont situés dans le complexe ganglionnaire coélique-mésentérique supérieur, situé à l'extérieur mais à proximité du pancréas (**Figure 2A**). Les nerfs sympathiques pénètrent dans le pancréas en un point unique, puis se subdivisent en différents faisceaux qui s'étendent dans la profondeur de l'organe (**Figure 2A**). La **Figure 2B** montre la reconstruction des nodules tumoraux individuels à l'aide du signal auto-fluorescent du tissu (en cyan) et des nerfs sympathiques intra-tumoraux (en jaune) et extra-tumoraux (en rouge). Il est alors possible de tracer l'origine de certains nerfs intra-tumoraux. Il apparaît ainsi qu'une branche du nerf sympathique splénique, qui traverse le parenchyme pancréatique vers la rate, est englobé dans la tumeur (**Figure 2A-B**).



**Figure 2 : Reconstruction des nerfs sympathiques intra et extra-tumoraux.**

(A) Vue en projection d'intensité maximale 3D (3D MIP) d'un pancréas de souris KIC clarifié et immunomarcqué pour TH. Le pancréas est délimité à l'aide de larges pointillés et orienté dans le sens tête-queue. La rate, qui a été maintenue attachée pendant la dissection, est délimitée par des petits pointillés. Les nerfs sympathiques TH<sup>+</sup> provenant du complexe ganglionnaire coélique-mésentérique supérieur (flèche rouge) pénètrent dans le pancréas en un point unique de la tête du pancréas d'où ils divergent pour innervent l'organe entier. L'astérisque jaune indique le nerf splénique qui traverse le pancréas pour innervent la rate.

(B) Reconstruction des nodules tumoraux (en cyan), et des nerfs TH<sup>+</sup> intra-tumoraux (en jaune) et extra-tumoraux (en rouge). Cette reconstruction permet de voir que certaines portions de nerfs sont englobés par la tumeur, c'est le cas notamment du nerf splénique (astérisque jaune).

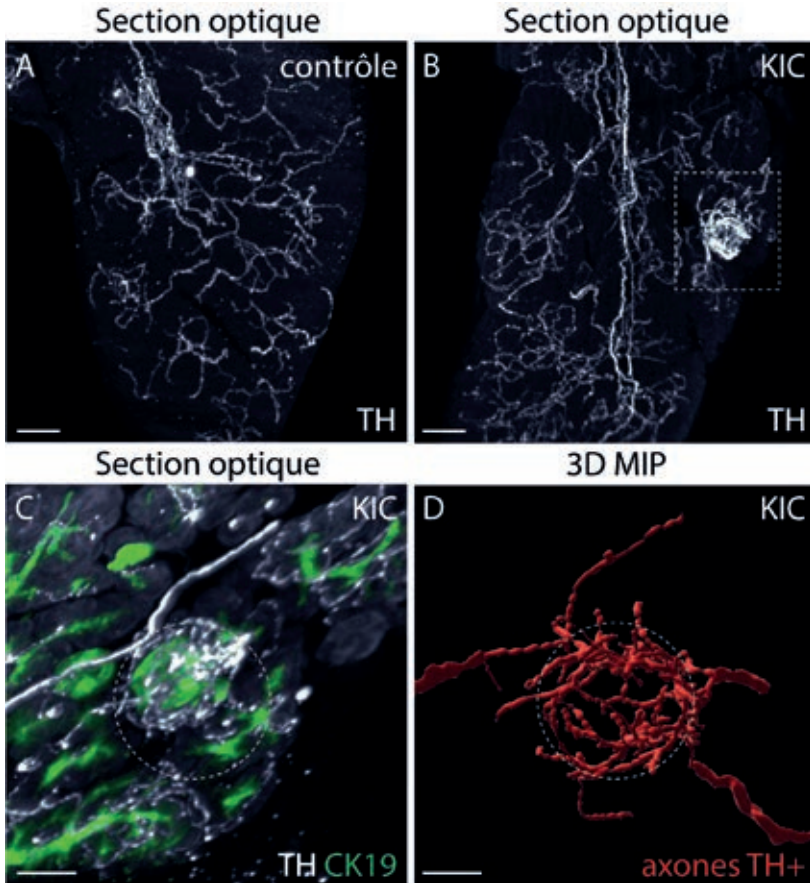
Barres d'échelle : 1 mm. Taille des voxels : x = 4,79  $\mu$ m y = 4,79  $\mu$ m z = 4  $\mu$ m.

## Visualisation 3D des réseaux de terminaisons axonales

Les terminaisons distales des nerfs sympathiques forment un réseau fin et régulier de fibres axonales qui parcourent l'ensemble du parenchyme acinaire du pancréas. Non visibles sur les images de pancréas entiers, les fibres axonales individuelles s'observent sur des images acquises à fort grossissement des lobules pancréatiques (**Figure 3A**). Il est alors possible de reconstruire précisément les réseaux axonaux sur une région définie afin d'en extraire des données morphologiques (ex : longueur, densité, nombres de points de branchement). Dans le pancréas de souris KIC âgées de 6,5 semaines, le schéma stéréotypé du réseau sympathique est altéré autour des lésions épithéliales de type PanIN (**Figure 3B-D**) et à la périphérie des lésions cancéreuses (non montré). Les PanIN apparaissent notamment comme des structures hyper-innervées par de fines branches d'axones sympathiques.

## DISCUSSION

Nos résultats montrent qu'il est possible d'analyser la structure des tissus pancréatiques et la progression de l'ADKP chez la souris en se basant uniquement sur l'auto-fluorescence des tissus, ce qui réduit les difficultés liées à la combinaison de plusieurs anticorps et marqueurs fluorescents et diminue le coût de l'expérience. La visualisation en 3D des nerfs sympathiques dans le pancréas des souris KIC confirme les observations précédentes de la présence de faisceaux nerveux dans les masses tumorales. La possibilité de tracer le parcours de ces nerfs indique clairement que certains nerfs intra tumoraux résultent de l'invasion par la tumeur de portions de nerfs préexistants. Dans une étude récente, la quantification du volume total occupé par les nerfs sympathiques dans les pancréas de souris sauvages ou KIC a confirmé l'absence de formation *de novo* de nerfs sympathiques pendant le développement de l'ADKP [5]. La méthode présentée ici permet également de visualiser les réseaux de terminaisons axonales et de reconstruire leur structure 3D. L'observation d'une augmentation de la densité des branches axonales autour



**Figure 3 : Identification de régions d'hyper-innervation sympathique dans un pancréas de souris KIC**

(A) Coupe optique d'un lobule pancréatique d'une souris contrôle montrant l'innervation terminale des nerfs sympathiques dans le parenchyme acinaire, révélée avec un anticorps anti-TH.

(B) Coupe optique d'un lobule pancréatique d'une souris KIC montrant une région d'hyper-innervation sympathique (encadrée en pointillés).

(C) Coupe optique d'une région d'hyper-innervation immunomarquée pour TH (blanc) et CK19 (vert). Le marquage CK19 a permis d'identifier la région comme une lésion de type PanIN (entourée en pointillés).

(D) Vue en projection d'intensité maximale 3D (3D MIP) de la reconstruction du réseau d'axones sympathiques autour de la lésion de type PanIN présentée en C.

Barres d'échelle : 100  $\mu\text{m}$  (A-B), 50  $\mu\text{m}$  (C-D). Taille des voxels x : = 1,21  $\mu\text{m}$  y = 1,21  $\mu\text{m}$  z = 2  $\mu\text{m}$  (A-B) x = 0,944  $\mu\text{m}$  y = 0,944  $\mu\text{m}$  z = 4  $\mu\text{m}$  (C-D).

des PanIN démontre l'existence d'une axonogenèse locale et précoce au cours du développement de l'ADKP.

## CONCLUSION

L'imagerie LSFM d'organes clarifiés fournit des informations 3D pour tracer et quantifier la structure des réseaux neuronaux dans les organes atteints de cancer. Les résultats obtenus sur des modèles murins d'ADKP apportent un éclairage nouveau au débat sur l'importance de l'invasion neurale par rapport à l'axonogenèse dans l'apparition de nerfs dans les tumeurs malignes. Enfin, l'imagerie moléculaire 3D a commencé à être appliquée au tissu pancréatique humain [10] et pourra être mise en œuvre pour valider les données des modèles murins dans les cancers humains et aider à la stratification des adénocarcinomes pancréatiques basée sur les caractéristiques de leur environnement neuronal.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARALDI JH, MARTYN G, SHURIN G, SHURIN MR : Tumor Innervation: History, Methodologies, and Significance. *Cancers*, 2022, **14** (8), 1979.
2. ZAHALKA AH, FRENETTE PS : Nerves in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2020, **20** (3), 143–157.
3. AYALA GE, DAI H, POWELL M, LI R, DING Y, WHEELER TM, et al. : Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14** (23), 7593-603.
4. FERDOUSHI A, GRIFFIN N, MARSLAND M, XU X, FAULKNER S, GAO F, et al. : Tumor innervation and clinical outcome in pancreatic cancer. *Sci. Rep.*, 2021, **11** (1), 7390.
5. GUILLOT J, DOMINICI C, LUCCHESI A, NGUYEN HTT, PUGET A, HOCINE M, et al. : Sympathetic axonal sprouting induces changes in macrophage populations and protects against pancreatic cancer. *Nat. Commun.*, 2022, **13** (1), 1985.
6. JACKSON EL, WILLIS N, MERCER K, BRONSON RT, CROWLEY D, MONTOYA R, et al. : Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.*, 2001, **15** (24), 3243–8.
7. GU G, DUBAUSKAITE J, MELTON DA : Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.*, 2002, **129** (10), 2447–57.

8. AGUIRRE AJ, BARDEESY N, SINHA M, LOPEZ L, TUVESON DA, Horner J, et al. : Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.*, 2003, **17** (24), 3112-26.
9. RENIER N, ADAMS EL, KIRST C, WU Z, AZEVEDO R, KOHL J, et al. : Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell*, 2016, **165** (7), 1789–1802.
10. HAHN M, NORD C, ERIKSSON M, MORINI F, ALANENTALO T, KORSGREN O, et al. : 3D imaging of human organs with micrometer resolution - applied to the endocrine pancreas. *Commun. Biol.*, 2021, **4** (1), 1063.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Chloé Dominici (IBDM, Marseille) et Serge van de Pavert (CIML, Marseille) pour leur aide pour l'imagerie LSFM. Ce travail a été soutenu par le Centre National de la Recherche Scientifique, Aix Marseille Université, et une subvention conjointe de l'Institut National du Cancer, la Ligue contre le cancer et la Fondation ARC (PAIR Pancreas 186738) attribuée à F.M.

# DEVELOPPEMENT D'UN ANTICORPS THERAPEUTIQUE ANTI-NECTINE-4 DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF

CABAUD Olivier <sup>1</sup>, BERGER Ludovic <sup>1</sup>, CROMPOT Emerence <sup>1</sup>,  
ADÉLAÏDE José <sup>1</sup>, FINETTI Pascal <sup>1</sup>, GUILLE Arnaud <sup>1</sup>, FARINA Anne <sup>2</sup>,  
CHARAFE-JAUFFRET Emmanuelle <sup>2</sup>, CASTELLANO Rémy <sup>3</sup>, COLLETTE Yves <sup>3</sup>,  
OLIVE Daniel <sup>4</sup>, MAMESSIER Emilie <sup>1</sup>, BIRNBAUM Daniel <sup>1</sup>,  
BERTUCCI François <sup>1,5</sup>, LOPEZ Marc <sup>1</sup>

1. *Laboratoire d'Oncologie Prédictive, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
2. *ICEP Platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
3. *TrGET platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
4. *Laboratoire d'Immunologie des tumeurs. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
5. *Département d'Oncologie Médicale, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France*

auteur correspondant : marc.lopez@inserm.fr

[doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.87](https://doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.87)

# DEVELOPMENT OF AN ANTI-NECTIN-4 THERAPEUTIC ANTIBODY FOR BREAST CANCER TREATMENT

## ABSTRACT

We identified nectin-4 as a new prognostic cell surface biomarker expressed in the poor prognosis triple negative breast cancer (TNBC) subtype. Immunohistochemistry data showed high expression in 62% of TNBC and reduced expression in healthy tissues. A nectin-4 directed Antibody-Drug Conjugate (ADC) has been developed and showed marked efficacy in preclinical primary and metastatic TNBC models. We have studied the consequences of long-term treatment with our ADC *in vivo* and identified a resistance mechanism involving the multidrug resistance protein MDR-1/P-glycoprotein (P-gp). Combination treatment with a P-gp inhibitor allows recovery of ADC sensitivity without toxicity. A new generation of ADC targeting nectin-4 is under development for clinics.

## KEY WORDS

**Immunotherapy, ADC targeting, biomarker, breast cancer, immunohistochemistry, nectin-4, resistance**



## RESUME

Nous avons identifié au laboratoire un nouveau biomarqueur pronostic de surface appelé nectine-4 exprimé dans le sous-type de cancer du sein triple négatif (TNBC) de mauvais pronostic. Les données d'immunohistochimie montrent une forte expression dans 62% des TNBC et une expression réduite dans les tissus sains. Un conjugué anticorps-médicament anti-nectine-4 (ADC) a été développé et montre une efficacité marquée dans des modèles précliniques TNBC primaires et métastatiques. Nous avons étudié *in vivo* les conséquences d'un traitement à long-terme avec notre ADC et identifié un mécanisme de résistance impliquant la protéine de multirésistance MDR-1/P-glycoprotéine (P-gp). Le traitement combiné avec un inhibiteur de P-gp permet de retrouver la sensibilité à l'ADC. Un médicament de type ADC de nouvelle génération ciblant nectine-4 est en cours de développement clinique.

## MOTS CLES

**Immunothérapie, ciblage par ADC, biomarqueur, cancer du sein, immunohistochimie, nectine-4, résistance**

## INTRODUCTION

Le cancer du sein triple négatif (TNBC) représente environ 15 à 20 % des cancers du sein et se caractérise par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et l'absence de surexpression ou d'amplification du gène HER2. Les patientes atteintes de TNBC ont un risque plus élevé de rechute précoce que les patientes atteintes d'un cancer du sein non TNBC [1]. Cependant, malgré les efforts récents pour trouver des traitements alternatifs tels que l'hormonothérapie et les médicaments anti-HER2 pour les cancers du sein respectivement hormono-positifs et HER2-positifs, il n'existe pas de thérapies ciblées efficaces dans le traitement du TNBC. A ce jour, la chimiothérapie reste le seul traitement systémique disponible [2]. Ainsi, une protéine de surface cellulaire spécifiquement exprimée par les cellules tumorales de TNBC représenterait un biomarqueur de surface moléculaire idéal ainsi qu'une cible thérapeutique potentielle pour les conjugués anticorps-médicament appelés ADC (Antibody-Drug Conjugate). Les ADC sont des anticorps monoclonaux conjugués à des agents cytotoxiques via un agent de liaison chimique. L'anticorps, en reconnaissant un biomarqueur tumoral de surface, s'internalise dans la cellule pour induire la mort des cellules tumorales [3]. Ce type de médicament permet d'améliorer l'efficacité et de réduire la toxicité classiquement observée avec la chimiothérapie. La conception d'un ADC efficace pour le traitement du cancer nécessite l'identification d'une cible appropriée. Quatorze ADC sont actuellement approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), dont historiquement le KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansine (T-DM1)) dans le cancer du sein métastatique HER2+ réfractaire (BC), et maintenant le ENHERTU® dans les cancers HER2<sup>low</sup>. Le PADCEV® (enfortumab vedotin) est indiqué dans le cancer urothélial métastatique nectine-4+.

La nectine-4, produit du gène *PVRL4*, est impliquée dans la formation et le maintien des jonctions adhérentes en coopération avec les cadhérines. La nectine-4 est une molécule d'adhésion cellulaire transmembranaire de type I composée de trois domaines de type Ig (type V-C-C) dans sa région extracellulaire [4, 5]. C'est également un récepteur du virus de la rougeole, qui permet l'endocytose [6]. La nectine-4 est exprimée au cours du développement fœtal, son expression diminuant à l'âge adulte, contrairement aux autres nectines. Nous avons montré, avec d'autres, que la nectine-4 est un antigène exprimé dans différents cancers, et qu'elle présente des propriétés pro-oncogéniques [7-9]. Ces caractéristiques, associées à son expression limitée dans les tissus normaux respectifs, suggèrent que la nectine-4 pourrait être une cible ADC pour ces cancers.

Nous avons analysé l'expression transcriptionnelle et protéique de la nectine-4 et montré que la nectine-4 était un biomarqueur de surface cellulaire plus fréquemment surexprimé dans les TNBC et les cancers du sein de sous-type basal par rapport aux autres sous-types. Nous avons montré qu'une expression élevée de l'ARNm était un facteur indépendant de mauvais pronostic. Ensuite, nous avons développé un ADC anti-nectine-4 et montré son efficacité thérapeutique sur les TNBC localisés et métastatiques à la fois *in vitro* et *in vivo*, induisant une réponse avec une régression rapide, complète et durable. Afin d'étudier les conséquences d'un traitement à long terme avec cet ADC, nous avons développé un modèle préclinique de cancer du sein chez la souris, et mis en évidence un mécanisme de résistance après 9 mois de traitement puis montrer sa réversibilité. Fort de ces expériences, nous développons un ADC thérapeutique de nouvelle génération dont l'objectif est d'être moins toxique et plus efficace que l'ADC anti-nectine-4 appelé enfortumab vedotin utilisé dans le traitement du cancer urothélial métastatique.

## MATERIELS ET METHODES

### Patients et échantillons

Les échantillons cliniques ont été profilés à l'aide de puces à ADN pour l'analyse d'expression génique. Notre collection de tumeurs est de 353 cas représentant des carcinomes invasifs avant traitement chez des patients non métastatiques au moment du diagnostic. L'étude a été approuvée par notre comité d'examen institutionnel (accord IRB n° 15-002). Chaque patient a donné un consentement éclairé écrit pour l'utilisation de la recherche. Pour l'expression de la protéine, nous avons analysé une série consécutive de 61 échantillons de TNBC au diagnostic de notre Institut. Le profil moléculaire sur puces à ADN a été réalisé sur 12 de ces échantillons. Le consentement éclairé a été obtenu pour chaque patient et l'étude a été approuvée par notre IRB.

### Analyse des données d'expression génique

Nos données d'expression génique ont été générées à l'aide de puces spécifiques de l'ADN humain Affymetrix U133 Plus 2.0 (Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA). L'expression de *PVRL4* a été mesurée en analysant différents jeux de sondes dont l'identité et la spécificité ont été vérifiées à l'aide du programme BLASTN 2.2.31+ du NCBI.

## Production d'anticorps, immunohistochimie (IHC)

Différents anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine distal de type IgV de la nectine-4 ont été produits et analysés. La protéine V-Fc chimérique soluble recombinante de la nectine-4 a été utilisée pour immuniser des souris. La sélection des anticorps dérivés d'hybridomes contre la nectine-4 a été effectuée par cytométrie de flux en utilisant des cellules MDA-MB-231 transfectées.

L'IHC a été réalisée sur des sections de 5  $\mu\text{m}$  de tissu congelé. Les sections ont été fixées dans de l'acétone pendant 10 minutes, séchées à l'air pendant 10 minutes et réhydratées dans du TBST. La coloration a été faite avec 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de N41mab pendant 3h à 37°C. L'anticorps secondaire OmnipMap anti-Ms HRP (Multimer HRP, Roche) a été incubé pendant 15 minutes. Une contre-coloration a ensuite été réalisée avec l'hématoxyline II et le réactif de bleuissement (Roche). Les résultats ont été quantifiés par Quick score (QS) en multipliant le pourcentage de cellules positives (P (de 0% à 100%)) par l'intensité (I (de 0 à 3)). Formule :  $QS = P \times I$ . Le score maximum étant de 300.

## Production de l'ADC

L'ADC a été produit par Concartis (San Diego, CA, USA). Les conjugués ont été produits à partir de l'anticorps monoclonal N41mab purifié. Le linker utilisé est le MC-Val-Cit-PAB-PNP (Maleimidocaproyl-L-valine-L-citrulline-p-aminobenzyl alcohol p-nitrophenyl carbonate) conjugué de manière covalente à la monométhyl auristatine-E (MMAE). Le Drug to Antibody Ratio (DAR) est de 4,73.

## Modèles animaux

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la législation française pour la manipulation des animaux et approuvées par le comité d'éthique local (Accord n° 01152-01). Les souris NOD/SCID/ $\gamma\text{c}$  null (NSG) ont été obtenues auprès de Charles River. Les souris sont hébergées dans des conditions stériles avec de la nourriture et de l'eau stérilisées fournies *ad libitum* et maintenues sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les cellules ont été inoculées sur les deux flancs dans la glande mammaire avec  $0,5 \times 10^6$  cellules en suspension dans du Matrigel à 50 % sans rouge de phénol (Becton-Dickinson Bioscience). Les souris ont été traitées comme indiqué sur les figures. La croissance tumorale a été mesurée avec un pied à coulisse numérique en calculant le volume tumoral (longueur  $\times$

largeur  $2 \times \pi/6$ ). Tous les animaux ont été répartis au hasard dans les groupes de traitement, de telle sorte que le volume tumoral moyen de chaque groupe soit de 100 à 200 mm<sup>3</sup>. La douleur et la détresse ont été évaluées pour chaque animal. Le poids des animaux a été contrôlé tous les 3 jours afin d'évaluer la toxicité des différents traitements.

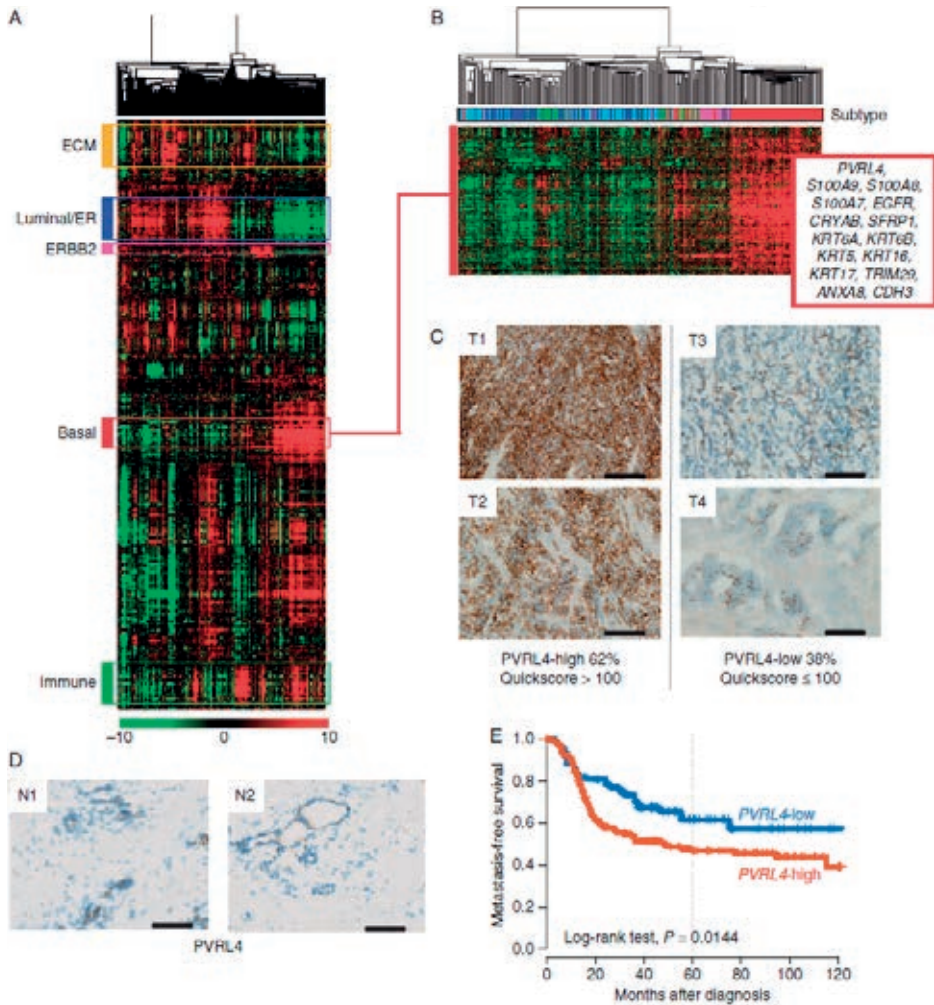
## RESULTATS

### **Nectine-4 est exprimée dans le TNBC avec une expression associée à un mauvais pronostic**

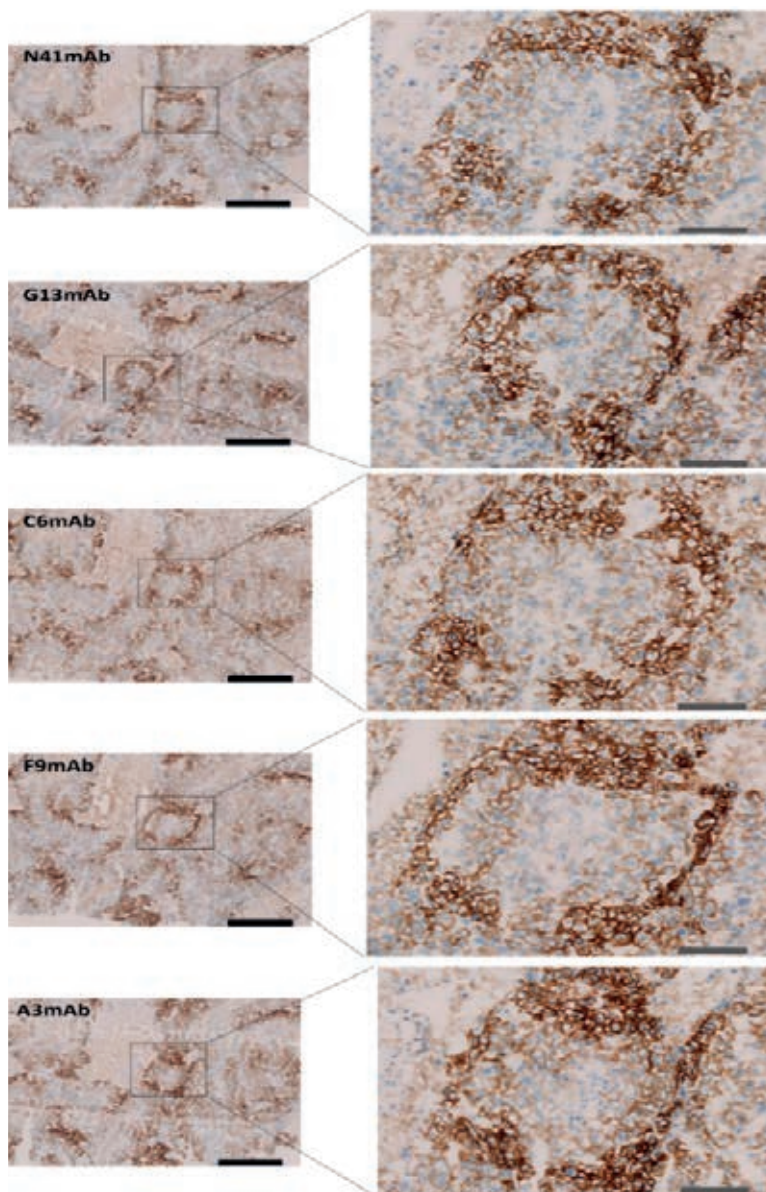
Nous avons examiné l'expression de nectine-4 dans le cancer du sein. L'analyse de 353 échantillons de cancer du sein a montré que l'expression ARNm de nectine-4 se trouvait dans le groupe de gènes "basal" (**Figure 1A,B**). Nous avons analysé l'expression de la protéine nectine-4 par immunohistochimie dans 61 TNBCs. L'anticorps monoclonal sélectionné pour cette analyse (N41mab) reconnaît le domaine distal de type IgV de la nectine-4 humaine. Plusieurs anticorps développés au laboratoire ont été comparés et montrent des marquages similaires en immunohistochimie permettant de valider le choix de cet anticorps (**Figure 2**). L'expression de la nectine-4 est détectée au niveau de la membrane plasmique. Sur la base de l'évaluation semi-quantitative QuickScore (QS), nous avons distingué un " groupe nectine-4-high " (QS>100) et un " groupe nectine-4-low " (QS<100), représentant respectivement 62% et 38% des TNBC (**Figure 1C**). La nectine-4 n'est pas détectée dans l'épithélium normal de la glande mammaire (**Figure 1D**), ni dans 30 tissus normaux adultes différents, à l'exception de la peau où elle est retrouvée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme (**Figure 3**). L'analyse pronostique univariée a montré que l'expression élevée de *PVRL4* était associée à la survie sans événement métastatique dans les TNBC (**Figure 1E**). L'ensemble de ces données montrent l'intérêt de nectine-4 comme nouveau marqueur pronostic et comme cible thérapeutique potentielle dans le TNBC.

### **Ciblage de la nectine-4 par un ADC anti-nectine-4 dans le TNBC**

Nous avons ensuite orienté notre étude pour montrer que la nectine-4 pouvait être une cible thérapeutique dans le TNBC. Après sélection d'un anticorps monoclonal présentant une affinité apparente élevée et une capacité à internaliser

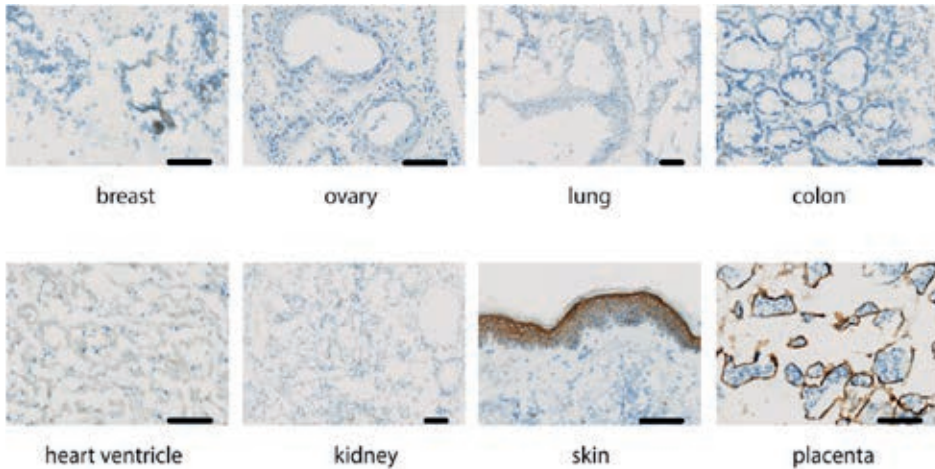


**Figure 1** : Expression de PVRL4/nectine-4 dans les échantillons cliniques de cancer du sein. (A) Clustering hiérarchique de 353 échantillons de cancer du sein primaire et de 12304 gènes sur la base des niveaux d'expression de l'ARNm. (B) Vue élargie du groupe de gènes "basal", qui comprend le gène PVRL4. (C) Expression de nectine-4 dans les TNBCs par IHC sur coupes congelées en utilisant 0,5 mg/ml de N41mab. Le marquage est de type membranaire. T1 et T2 sont deux TNBCs avec QS>100. T3 et T4 sont deux TNBCs avec QS<100. Echelle : 100 µm. (D) Absence d'expression dans le tissu épithélial normal de la glande mammaire humaine. Echelle : 100 µm. (E) Courbes de survie en fonction de l'expression de l'ARNm PVRL4 dans les TNBC (N=290).



**Figure 2 : Validation de l'anticorps N41mab par IHC.**

La validation est réalisée à la concentration de 0,5 µg/µl sur coupe congelée d'un échantillon TNBC. Cinq anticorps monoclonaux produits au laboratoire sont testés et présentent des profils IHC similaires. Barre d'échelle = 100µm.



**Figure 3** : Analyse de l'expression de nectine-4 sur tissus sains. Cette expérience est réalisée par IHC avec l'anticorps N41mab à 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , sur un « Tissue MicroArray » congelé comprenant 30 tissus sains en triplicate (Biochain, CA, USA). Barre d'échelle = 100 $\mu\text{m}$ .

importante, nous avons développé un ADC avec l'anticorps N41mab couplé à la monométhyl auristatine-E (MMAE) via un linker chimique clivable de type Citrulline-Valine (**Figure 4**). L'auristatine-E est un puissant inhibiteur de la polymérisation des microtubules et bloque les cellules tumorales en phase M du cycle cellulaire. L'activité de notre ADC a été testée *in vitro* et *in vivo* sur la lignée de cancer du sein SUM190 (exprimant nectine-4) puis sur quatre modèles PDX (Patient Derived Xenograft) de TNBC primaires de sous-type basal, xénotransplantés dans la glande mammaire de souris NOD/SCID/ $\gamma\text{c}$  null (NSG) immunodéficientes. Ces modèles précliniques reproduisent la physiopathologie de ce type de cancer. Ces modèles ont été sélectionnés par IHC, à partir de notre collection, pour avoir une expression (Quickscore (QS)) forte, intermédiaire, faible et négative sur la base de l'expression de nectine-4 (**Figure 5**). Ces souris ont été traitées par voie intra-veineuse (i.v.) avec deux doses successives d'ADC à 10mg/kg. Le niveau de réponse clinique corrèle bien avec le niveau d'expression de la nectine-4 : une régression rapide et complète de la masse tumorale est observée pour la PDX400 (QS=300) et la PDX 317 (QS=140) (**Figure 6A et B**), et dans une moindre mesure pour la PDX348 (QS=100) (**Figure 6C**), et pas pour la PDX434 (QS=10) (**Figure 6D**). En revanche, la PDX 348 reste insensible au docétaxel (3 fois 10 mg/kg i.p.) (**Figure 6E**). Dans tous les cas, la réponse est transitoire suggérant qu'un seul traitement n'est pas suffisant pour obtenir une rémission. Pour évaluer l'efficacité du traitement par



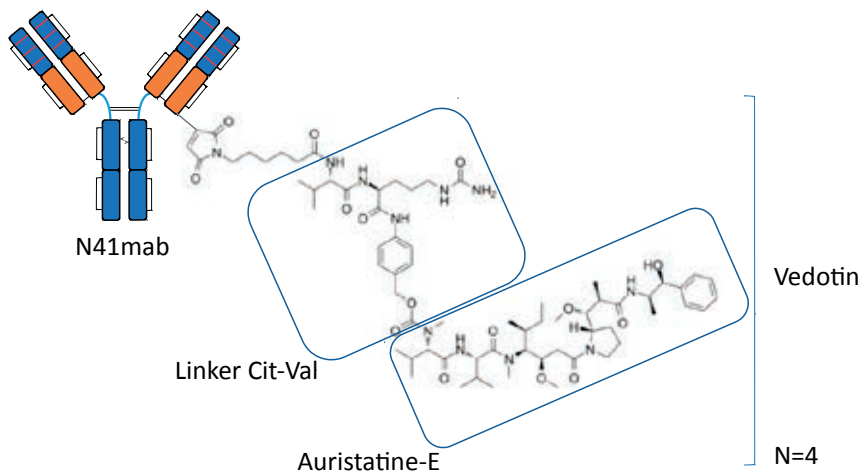


Figure 4 : Production de l'ADC anti-nectine-4.

L'ADC anti-nectine-4 est couplé à l'auristatine-E (N41mab-vcMMAE) via un peptide clivable par les cathépsines lysosomales. Le Drug to Antibody Ratio (DAR) est de 4, soit 4 molécules d'auristatine-E par anticorps.

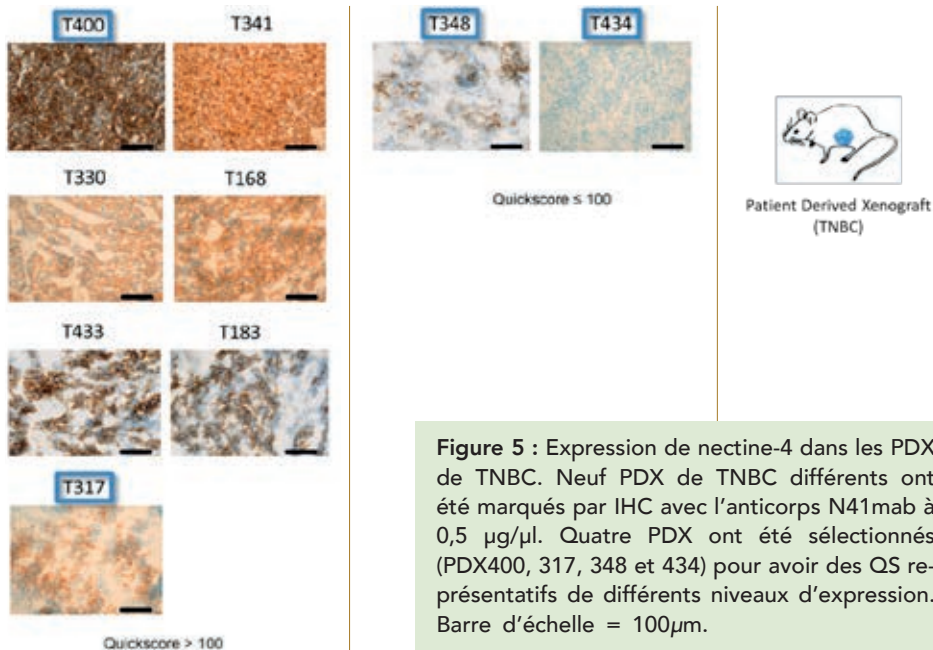
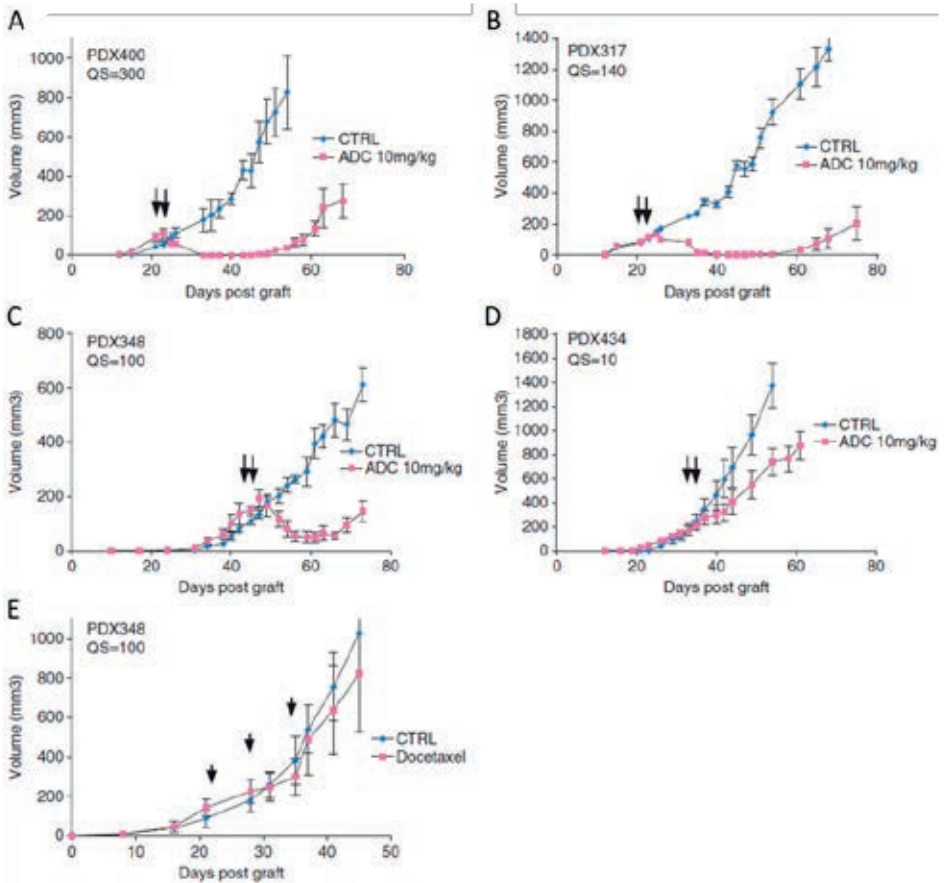


Figure 5 : Expression de nectine-4 dans les PDX de TNBC. Neuf PDX de TNBC différents ont été marqués par IHC avec l'anticorps N41mab à 0,5 µg/µl. Quatre PDX ont été sélectionnés (PDX400, 317, 348 et 434) pour avoir des QS représentatifs de différents niveaux d'expression. Barre d'échelle = 100µm.



**Figure 6 :** Efficacité de l'ADC anti-nectine-4 *in vivo*.

Les 4 modèles de PDX TNBC sont traités par 2 injections i.v. caudale de l'ADC N41mab-vc-MMAE à 10 mg/kg (Flèche noir). A : PDX400, B : PDX317, C : PDX348, D : PDX 434, E : PDX 348 traitées par le docétaxel.

ADC dans la maladie métastatique, nous avons ensuite traité la PDX317 développant des lésions métastatiques spontanées à partir de tumeurs primaires. Le traitement avec deux doses i.v. successives d'ADC entraîne une réduction rapide et une disparition de toutes les lésions métastatiques observées par analyse de luminescence (**Figure 7**). Ces résultats ont montré que N41mab-vcMMAE a une activité antitumorale marquée dans les TNBCs primaires et métastatiques exprimant la nectine-4 [10].

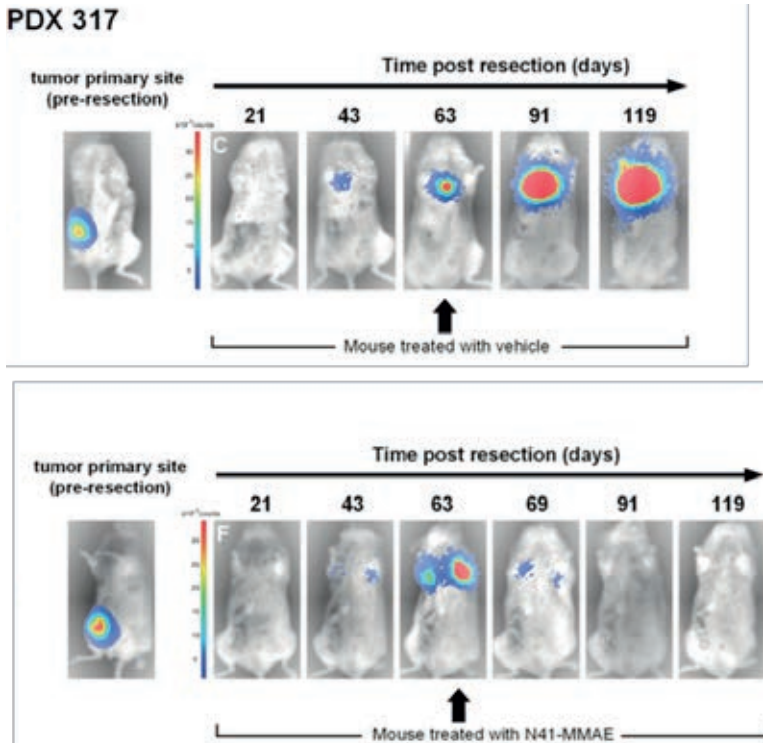
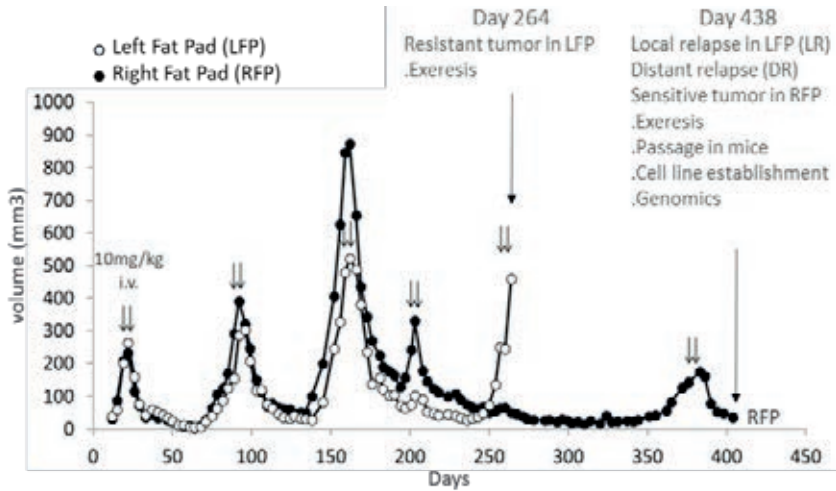


Figure 7 : Efficacité de l'ADC anti-nectine-4 sur les métastases.

Après résection chirurgicale des tumeurs mammaires primaires, l'apparition spontanée de métastases a été suivie par imagerie par bioluminescence. Les souris métastatiques issues de la PDX317 ont été traitées par le diluant (haut) ou par l'ADC N41mab-vcMMAE (bas) par injection i.v. caudale.

## Traitement à long terme avec l'ADC anti-nectine-4 et induction de résistance

Pour étudier les conséquences d'un traitement à long terme avec cet ADC, nous avons utilisé le modèle SUM190 et nous avons mis en évidence un mécanisme de résistance au N41mab-vcMMAE après un traitement de 9 mois (**Figure 8**). Après récurrences, les tumeurs droite et gauche restent sensibles aux nouvelles injections. Au jour 438, une rechute locale (LR) et une métastase dans un ganglion lymphatique inguinal (rechute à distance (DR)) ont été observées. Nous avons caractérisé ce modèle de résistance et mis en évidence une augmentation, dans les tumeurs résistantes, de l'expression du gène ABCB1, codant pour la protéine de



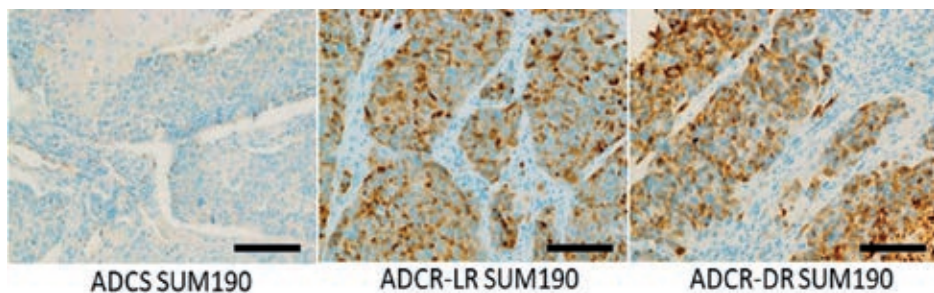
**Figure 8** : Résistance au traitement ADC.

Des souris NSG ont été xéno greffées dans la glande mammaire (côtés droit et gauche) avec des cellules SUM190 exprimant nectine-4. Des traitements répétés avec deux injections i.v. de 10 mg/kg de N41mab-MMAE (flèches) ont été effectués au moment des reprises tumorales. La mesure du volume tumoral a été effectuée dans le coussinet adipeux gauche (point blanc) et droit (point noir). Des rechutes locales et à distance (LR et DR) ont été observées sous traitement

multirésistance MDR-1/P-glycoprotéine (P-gp) associée à une amplification focale et à une expression protéique élevée. Les deux tumeurs résistantes (ADCR-LR et ADCR-DR) expriment des niveaux élevés de P-gp, comparées à la lignée sensible (ADCS) (**Figure 9**).

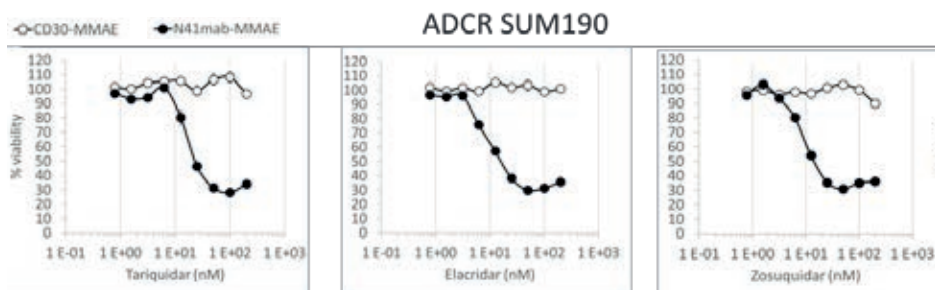
## Réversion de la résistance

L'efflux d'agents cytotoxiques comme la chimiothérapie par les transporteurs ABC est un mécanisme bien connu de résistance en clinique [11]. Des inhibiteurs pharmacologiques des transporteurs ABC ont montré une activité dans les études précliniques mais se sont révélés toxiques et peu efficaces en clinique [12]. P-gp est exprimé dans de nombreux tissus sains de l'organisme, assurant un rôle de détoxifiant notamment des xénobiotiques. Dans le cadre d'essais cliniques combinant la chimiothérapie et les inhibiteurs P-gp, de fortes toxicités ont été décrites, liées à la séquestration de la chimiothérapie dans les tissus sains. Nous avons postulé que la combinaison ADC et inhibiteurs de P-gp pouvait être efficace et

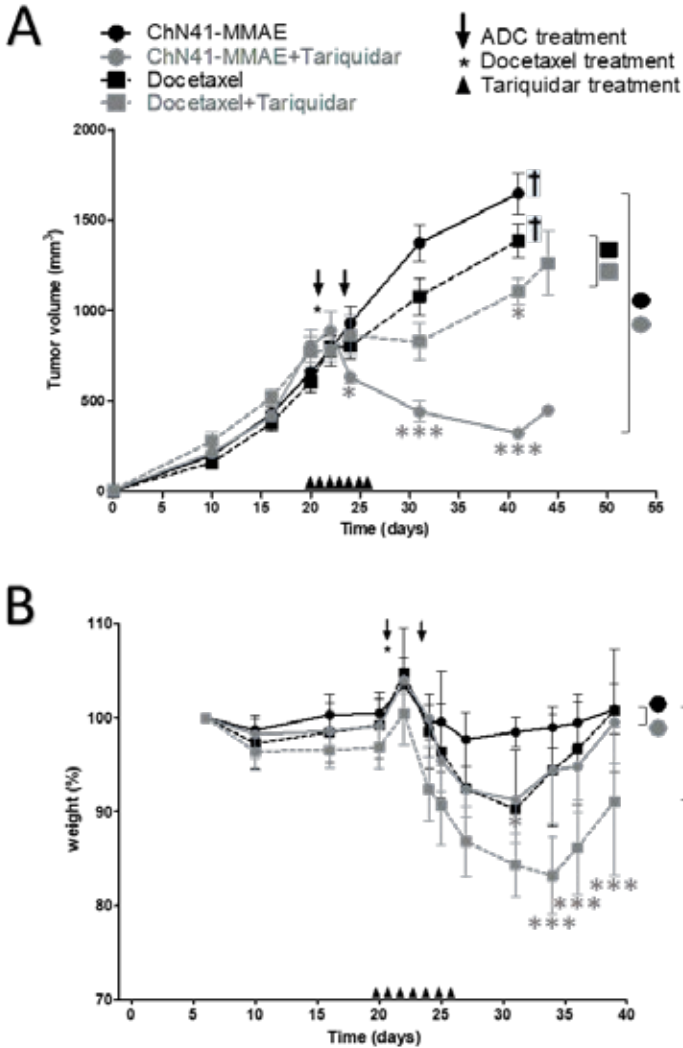


**Figure 9** : Expression de P-gp dans les tumeurs sensibles et résistantes. L'expression mesurée par IHC dans les tumeurs sensibles ADCS vs résistantes (ADCR-LR et ADCR-DR) en utilisant l'anticorps JSB-1 anti P-gp au 1/40 (Biolegend Inc., CA, USA). Barre d'échelle = 100µm.

peu toxique puisque dans ce cas l'agent cytotoxique est délivré spécifiquement à la tumeur. Nous avons d'abord testé si l'inhibition pharmacologique de P-gp pouvait rétablir la sensibilité à notre ADC. Les cellules ADCR ont été traitées avec des inhibiteurs de troisième génération (tariquidar, elacridar, zosuquidar) combinés avec soit du brentuximab vedotin (BV) (ADC CD30-MMAE comme contrôle négatif) soit du N41mab-vcMMAE. Les trois inhibiteurs de P-gp utilisés jusqu'à 200 nM ne sont pas toxiques comme le montrent les courbes CD30-MMAE. Ils restaurent la sensibilité des cellules ADCR à N41mab-vcMMAE, avec une IC50 similaire pour les trois inhibiteurs (20, 10 et 10 nM respectivement) (**Figure 10**). Les cellules ADCR ont été xéno greffées dans des souris NSG. Le tariquidar est connu pour



**Figure 10** : Réversion de la résistance à l'ADC *in vitro* à l'aide d'inhibiteurs de P-gp. La lignée SUM190 ADCR a été traitée avec 1µg/mL de N41mab-vcMMAE (cercle noir) ou de contrôle négatif CD30-MMAE (cercle blanc) en présence des concentrations indiquées de tariquidar, elacridar ou zosuquidar. Les trois inhibiteurs de P-gp ne sont pas toxiques (courbes CD30-MMAE), et rétablissent la sensibilité au N41mab-vcMMAE.



**Figure 11** : Réversion de la résistance à l'ADC *in vivo* à l'aide d'inhibiteurs de P-gp.

(A) Les cellules SUM190 ADCR-DR ont été xéno greffées de façon orthotopique dans des souris NSG. Les souris ont été traitées lorsque la tumeur a atteint un volume moyen de 700 mm<sup>3</sup>. Les souris ont été traitées soit par N41mab-MMAE (cercles noirs), soit par docétaxel (carrés noirs), soit en association avec tariquidar (gris). Les "groupes tariquidar" ont été traités une fois par jour pendant 7 jours avec du tariquidar (15 mg/kg i.v.). Les traitements par ADC (2 x 10 mg/kg i.v.) et docétaxel (10 mg/kg i.v.) ont débuté après le premier traitement par tariquidar. (B) La mesure du poids des souris a été effectuée dans les différents groupes. La légende est similaire à celle de A.

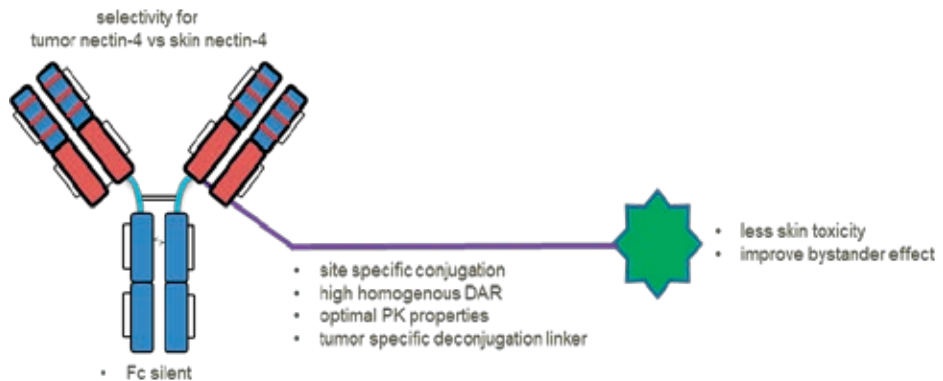
inhiber la P-gp murine *in vitro* et *in vivo*. Nous avons comparé l'efficacité et la toxicité du traitement par docétaxel versus ADC anti-nectine-4 en association ou non avec des doses répétitives de tariquidar dans ce modèle résistant (**Figure 11**). Comme attendu, le N41mab-MMAE seul n'a eu aucun effet sur la croissance tumorale. Le docétaxel seul a entraîné une légère réduction de la croissance tumorale. L'association de tariquidar avec le docétaxel a entraîné une réduction de la croissance légèrement plus durable que le docétaxel seul, probablement attribuable à tariquidar. En revanche, l'association de tariquidar avec le N41mab-MMAE entraîne une réduction beaucoup plus marquée de la croissance tumorale que N41mab-MMAE seul, ce qui indique que le tariquidar a re-sensibilisé la tumeur résistante à l'ADC *in vivo* (**Figure 11A**). La toxicité des différents traitements a été évaluée par mesure du poids des animaux au cours du temps. L'association de tariquidar avec le docétaxel a induit une diminution de poids marquée par rapport au docétaxel seul, proche du point limite éthique (20%), suggérant une toxicité élevée (**Figure 11B**). En revanche, l'association de tariquidar avec N41mab-MMAE n'induit qu'une légère diminution de poids par rapport à N41mab-MMAE seul (**Figure 11B**). Ces données précliniques démontrent que l'inhibiteur de P-gp associé à notre ADC est efficace tout en étant sûr et beaucoup moins toxique que lorsqu'il est associé à la chimiothérapie [13].

## DISCUSSION

Nous montrons que la nectine-4 est une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du TNBC. Il s'agit d'un biomarqueur de surface fréquemment exprimé dans les TNBC, avec une valeur pronostique négative indépendante, et une absence d'expression dans le tissu mammaire normal. L'ADC anti-nectine-4 que nous avons développé (N41mab-vcMMAE) induit des réponses complètes et durables *in vitro* et *in vivo* sur des échantillons positifs pour la nectine-4, y compris des tumeurs primaires, des lésions métastatiques et des rechutes locales ; l'efficacité est dose-dépendante et expression-dépendante. L'enfortumab vedotin (Seattle Genetics) a été développé en clinique dans le traitement du cancer urothélial métastatique. Le taux de réponse global (ORR) chez les patients atteints de cancer urothélial réfractaire aux traitements est de 44% [14]. Cet ADC anti-nectine-4 est du même type que celui développé au laboratoire puisque composé du même linker et de la même toxine (MMAE). Ces résultats restent prometteurs mais limités par l'induction d'une toxicité cutanée et une neuropathie périphérique. Ces effets indésirables sont liés à des effets « on-target » sur la peau, la nectine-4 y étant exprimée (Cf **Figure 3**).

D'autre part l'échappement des patients à l'enfortumab vedotin est fréquent et potentiellement lié à des mécanismes impliquant les pompes d'efflux tels que nous les avons décrits. L'utilisation d'inhibiteurs de P-gp en association avec l'enfortumab vedotin est d'ailleurs maintenant proposé dans le cas de récurrence. L'ensemble de ces données nous ont amenés à développer un ADC de nouvelle génération permettant d'améliorer l'index thérapeutique. Cet ADC présente de nombreuses caractéristiques résumées dans la **Figure 12** et les données précliniques restent très encourageantes pour aborder la phase clinique.

La nectine-4 est exprimée dans différents carcinomes. Elle est en passe de devenir un biomarqueur théranostique, permettant d'associer sa détection à l'éligibilité du patient au traitement.



**Figure 12 :** Développement d'un ADC anti-nectine-4 de nouvelle génération.

Le design moléculaire de cet ADC prend en compte l'ensemble des données connues sur la cible, les données *in vivo* ainsi que les données cliniques de l'essai avec l'enfortumab vedotin. L'anticorps sélectionné présente une reconnaissance différentielle entre la nectine-4 tumorale et la nectine-4 exprimée dans la peau afin de minimiser l'effet de toxicité on-target observé dans les essais cliniques. La libération de la drogue est ici tumeur spécifique. La drogue sélectionnée n'est pas un substrat de P-gp et cet ADC reste actif dans le cas de résistance liée à P-gp (Brevets déposés).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SORLIE T., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,**98** (19): 10869-10874 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815>
2. BERTUCCI F., FINETTI P. & BIRNBAUM D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med*, 2012,**12** (1): 96-110 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082486>
3. JOUBERT N., et al. Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020,**13** (9): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32937862>
4. FABRE S., et al. Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C"-D beta-strands of the nectin1 V domain. *J Biol Chem*, 2002,**277** (30): 27006-27013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011057>
5. REYMOND N., et al. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem*, 2001,**276** (46): 43205-43215 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544254>
6. MUHLEBACH M.D., et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 2011,**480** (7378): 530-533 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048310>
7. DERYCKE M.S., et al. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol*, 2010,**134** (5): 835-845 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959669>
8. FABRE-LAFAY S., et al. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer*, 2007,**7** 73 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17474988>
9. PAVLOVA N.N., et al. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. *Elife*, 2013,**2** e00358 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23682311>
10. M-RABET M., et al. Nectin-4: a new prognostic biomarker for efficient therapeutic targeting of primary and metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 2017,**28** (4): 769-776 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27998973>
11. BUKOWSKI K., KCIUK M. & KONTEK R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 2020,**21** (9): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32370233>

12. BINKHATHLAN Z. & LAVASANIFAR A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013,**13** (3): 326-346 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369096>
13. CABAUD O., et al. Overcoming Resistance to Anti-Nectin-4 Antibody-Drug Conjugate. *Mol Cancer Ther*, 2022,**21** (7): 1227-1235 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35534238>
14. ROSENBERG J.E., et al. Pivotal Trial of Enfortumab Vedotin in Urothelial Carcinoma After Platinum and Anti-Programmed Death 1/Programmed Death Ligand 1 Therapy. *J Clin Oncol*, 2019,JCO1901140 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31356140>

# ICOS EST FORTEMENT EXPRIMÉ DANS LES LYMPHOMES T CUTANÉS ET SON CIBLAGE PERMET L'INHIBITION DES CELLULES TUMORALES

AMATORE Florent<sup>1,2,3</sup>, ORTONNE Nicolas<sup>4</sup>, LOPEZ Marc<sup>1</sup>,  
ORLANDUCCI Florence<sup>1</sup>, CASTELLANO Rémy<sup>1</sup>, DE CROOS Amandine<sup>4</sup>,  
GORVEL Laurent<sup>1</sup>, GOUBARD Armelle<sup>1</sup>, BOUABDALLAH Réda<sup>5</sup>,  
BONNET Nathalie<sup>2</sup>, GROB Jean-Jacques<sup>3</sup>, GAULARD Philippe<sup>4</sup>,  
BAGOT Martine<sup>6</sup>, BENSUSSAN Armand<sup>7</sup>, BERBIS Philippe<sup>2</sup>, et OLIVE Daniel<sup>1</sup>

1. *Centre de recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM U1068, CNRS U7258, Aix Marseille Université, Institut Paoli - Calmettes, Marseille, France*
2. *Service de Dermatologie, Aix Marseille Université, APHM, Hôpital Nord, Marseille, France*
3. *Service de dermatologie et oncodermatologie, Hôpital de la Timone, Aix-Marseille Université, Marseille, France*
4. *Service d'anatomie et cytologie pathologique, INSERM U955 9, AP-HP, Hôpital Henri-Mondor, 94220 Créteil, France*
5. *Département d'hématologie, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France*
6. *Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, Inserm, U976*
7. *Université de Paris, INSERM, UMR-976, Institut de Recherche Saint-Louis, Paris, France*

auteur correspondant : florent.amatore@ap-hm.fr

[doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.107](https://doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.107)

# ICOS IS WIDELY EXPRESSED IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA, AND ITS TARGETING PROMOTES POTENT KILLING OF MALIGNANT CELLS

## ABSTRACT

**Background:** Advanced stage cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs) remain an unmet medical need. Mogamulizumab, anti-KIR3DL2 and brentuximab vedotin (BV), an anti-CD30 antibody–drug conjugate (ADC) coupled to monomethylauristatin-E (MMAE), provided encouraging results but new targeted therapies are needed. Inducible Co-Stimulator (ICOS), a T-cell costimulatory receptor involved in the development of CTCLs, arouses interest.

**Methods:** We used immunohistochemistry to study ICOS expression in skin biopsies of 23 patients with early-stage mycosis fungoides (MF), 12 with transformed MF (TMF) and 17 with Sézary Syndrome (SS), at diagnosis or in relapse. ICOS expression by circulating Sézary cells and regulatory T cells (Tregs) in patients with SS was evaluated using flow cytometry and compared to healthy donors (HD) lymphocytes. In 5 patients with SS, we also analyzed concomitant biopsies from involved nodes. Then, we investigated the efficacy of anti-ICOS ADCs generated by coupling murine anti-ICOS monoclonal antibodies with MMAE, in comparison to BV. We used ICOS<sup>+</sup> CTCL cell lines (MyLa and MJ), murine xenograft models with MyLa and ICOS<sup>+</sup> Patient Derived Xenografts (PDXs) from patients with SS and angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL).

**Results:** ICOS was highly expressed by the cutaneous atypical lymphocytic infiltrates in respectively 61%, 75% and 88% of patients with early-stage MF, TMF and SS, such as in all the involved nodes. ICOS expression by circulating Sézary cells was strong:  $69 \pm 7.3\%$  versus  $38.8 \pm 7.1\%$  of non-tumoral CD4<sup>+</sup> cells ( $p < 0.009$ ; CI95%: 8.7-51.6); and  $31 \pm 3.2\%$  of CD4<sup>+</sup> cells in HD ( $p < 0.0001$ ; CI95%: 20.3-46.3). Percentages of ICOS<sup>+</sup> Tregs were significantly higher in patients with SS than in HD. In CTCL cell lines, we observed a significant dose-dependent decrease in cell viability in the presence of anti-ICOS ADCs. In a mouse xenograft model (MyLa), anti-ICOS ADCs provided a longer overall survival (OS) than BV (HR=15.2; CI95%: 3.2-71.1;  $p < 0.0006$ ). Finally, in ICOS<sup>+</sup> PDXs anti-ICOS ADCs significantly improved OS, and reduced the number of tumor cells in the blood and bone marrow. No evidence of ADC toxicity was observed in treated mice.

Conclusion: ICOS is a therapeutic target of interest in CTCLs. Our results provide the preliminary basis for a therapeutic trial.

## KEY POINTS

**ICOS is widely expressed by malignant cells in the skin and blood of patients with CTCL.**

**Anti-ICOS ADCs have anti-tumor potential against CTCL cell lines and patient derived xenografts.**

## RESUME

Introduction : Il existe un besoin thérapeutique important pour les formes sévères de lymphomes T cutanés (LTC). Le Mogamulizumab, anti-KIR3DL2 et la brentuximab vedotin (BV), un anticorps anti-CD30 de type *antibody-drug conjugate* (ADC) couplé à la monométhyl auristatine E (MMAE), ne permet que des réponses de courte durée. Inducible Co-Stimulator (ICOS) est un récepteur de costimulation lymphocytaire T impliqué dans le développement des LTC. Notre étude évalue son potentiel en tant que cible thérapeutique.

Matériel et Méthodes : L'expression d'ICOS était évaluée en immunohistochimie dans des biopsies cutanées de 23 patients atteints de mycosis fongoïde (MF) à un stade précoce, 12 de MF transformé (MFT) et 17 de syndrome de Sézary (SS). Les ganglions envahis de 5 patients ayant un SS étaient également analysés.

L'expression d'ICOS par les cellules de Sézary circulantes et les lymphocytes T régulateurs (Tregs) des patients atteints de SS était évaluée par cytométrie en flux et comparée à des lymphocytes de donneurs sains (DS).

Nous avons ensuite étudié l'efficacité d'ADC anti-ICOS générés par le couplage d'anticorps monoclonaux anti-ICOS avec la MMAE et la pyrrolobenzodiazépine (PBD), et nous les avons comparés au BV. Pour cela, nous avons utilisé des lignées cellulaires de LTC ICOS<sup>+</sup> (MyLa, MJ et HUT78), une xénogreffe murine (XM) avec la lignée MyLa, et une XM avec des cellules de Sézary issues d'un patient.

Résultats : ICOS était fortement exprimé dans l'infiltrat lymphocytaire tumoral chez respectivement 61%, 75% et 88% des patients atteints de MF, TMF et SS, ainsi que dans les 5 ganglions envahis. Le double marquage révélait que l'expression

d'ICOS était limitée aux lymphocytes T tumoraux. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> du micro-environnement tumoral étaient rares. L'expression d'ICOS par les cellules de Sézary circulantes était forte :  $69 \pm 7,3$  % contre  $38,8 \pm 7,1$  % des LT CD4<sup>+</sup> non tumoraux ( $p < 0,009$ ; IC95%:8,7-51,6) ; et  $31 \pm 3,2$ % des LT CD4<sup>+</sup> de DS ( $p < 0,0001$ ; CI95%:20,3-46,3). Les patients atteints de SS avaient significativement plus de Treg ICOS<sup>+</sup> que les DS.

Sur les lignées de LTC, les ADC anti-ICOS-MMAE et anti-ICOS-PBD permettaient une diminution significative de la viabilité cellulaire. Dans le modèle de XM avec MyLa, la survie globale (SG) était plus longue dans le groupe ADC anti-ICOS-MMAE que dans le groupe BV (HR=15,2; IC95%:3,2-71,1;  $p < 0,0006$ ). Enfin, dans la XM dérivée de patient, l'ADC anti-ICOS-MMAE améliorait significativement la SG et réduisait le nombre de cellules tumorales sanguines et médullaires. Aucune toxicité des ADC n'a été observée chez les souris traitées.

Discussion : ICOS est une cible prometteuse car elle est exprimée à la fois par les lymphocytes tumoraux et les Treg. Nous rapportons pour la première fois l'expression forte d'ICOS dans les LTC, ainsi que l'efficacité préclinique d'ADC anti-ICOS dans différentes conditions expérimentales. Ces résultats constituent la base préliminaire d'un essai thérapeutique.

## POINTS CLÉS

**ICOS est fortement exprimé par les cellules tumorales dans la peau et dans le sang des patients atteints de LTCE.**

**Les ADC anti-ICOS ont une efficacité anti-tumorale puissante dans des lignées de LTCE et de xénogreffes dérivées de patients.**

## INTRODUCTION

Les lymphomes T cutanés épidermotropes (LTCE) représentent environ deux tiers de tous les lymphomes cutanés primitifs [1]. Parmi eux, le mycosis fongoïde (MF) et sa forme leucémique, le syndrome de Sézary (SS), sont les plus fréquents [1]. Au stade précoce de la maladie (plaques érythémateuses plus ou moins infiltrées), les patients ont un pronostic favorable malgré une importante altération de leur qualité de vie [2]. En revanche, au stade tumoral (nodules parfois ulcérés et douloureux) et ganglionnaire, la survie spécifique à 10 ans n'est que d'environ 40% [2,3]. Enfin, dans les formes les plus avancées, c'est-à-dire le MF érythrodermique (toute la peau est érythémateuse) ou de SS (les cellules tumorales circulent dans le sang), le taux de survie à 5 ans tombe aux alentours de 25% [3].

Le MF et le SS sont tous deux caractérisés par une prolifération monoclonale de lymphocytes T-helper matures dans la peau. Les cellules tumorales du MF sont classiquement CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, avec une perte fréquente de CD7 [4]. Les cellules de Sézary (lymphocytes malins circulants) sont CD4<sup>+</sup> CD7<sup>-</sup>, et/ou CD4<sup>+</sup> CD26<sup>-</sup>, et expriment fréquemment CD158k (KIR3DL2) [5]. Le CD158k est le marqueur le plus sensible pour la détection des cellules de Sézary dans le sang et la peau [6 – 8]. Programmed Death-1 (PD-1) est également exprimé par les cellules T tumorales dans la peau et le sang [9,10], et représente un marqueur utile pour le diagnostic histologique de SS [11]. Cependant, le phénotype des cellules de Sézary varie fortement d'un patient à l'autre [7,12].

Il existe un réel besoin thérapeutique dans les LTCE. Le brentuximab vedotin (BV) [13], un *Antibody-Drug Conjugate* (ADC) anti-CD30 lié à la monométhyl auristatine E (MMAE), n'apporte pas d'amélioration significative du pronostic sur le long terme. Plus récemment, le mogamulizumab [14] (anti-CCR4) et les anti-KIR3DL2 [15] ont donné des résultats encourageants, mais de nouvelles thérapies ciblées sont nécessaires.

Dans la lymphomagenèse, les cellules T tumorales peuvent surexprimer à la fois des récepteurs co-stimulateurs qui leur permettent de survivre, de proliférer et de résister à l'apoptose, et des récepteurs co-inhibiteurs qui sont associés à leur capacité d'échappement à l'immunité anti-tumorale [16,17]. Dans les LTCE, cette double expression de récepteurs inhibiteurs et stimulateurs permet la croissance tumorale [18]. En effet, dans l'épiderme d'une plaque de MF, les cellules T CD4 tumorales et non tumorales expriment un large éventail de récepteurs co-inhibiteurs, tels que PD-1 [18]. Notons d'ailleurs que l'expression de PD-1 à la surface des

cellules tumorales augmente avec la progression de la maladie [19]. De plus, dans une petite cohorte de patients atteints de MF, il a été montré que l'expression d'*Inducible CO-Stimulator* (ICOS) pouvait être retrouvée à différents stades de la maladie [20]. Plus récemment, l'analyse de cultures d'explants épidermiques et dermiques de biopsies cutanées de patients atteints de LTCE a révélé qu'il y avait plus de lymphocytes T ICOS<sup>+</sup> chez des patients atteints de LTCE que chez des donneurs sains, sans toutefois préciser la nature tumorale ou réactive de ces lymphocytes [18].

ICOS (CD278, AILIM, H4) est un récepteur de co-stimulation lymphocytaire T membre de la superfamille des récepteurs B7/CD28 [21]. Il est positivement régulé sur les lymphocytes T activés (CD4 et CD8 effecteurs, T folliculaires auxiliaires [T<sub>FH</sub>], lymphocytes T régulateurs [Tregs]). Les cellules T naïves expriment faiblement ICOS mais son expression est rapidement induite après l'engagement du T-Cell Receptor (TCR). Son ligand unique, ICOSL, est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B), et de nombreuses cellules non hématopoïétiques [22]. L'engagement d'ICOS par son ligand induit la prolifération, la survie, la différenciation et la production de cytokines afin de potentialiser la réponse immunitaire spécifique de l'antigène.

L'expression d'ICOS par les cellules tumorales dérivées de lymphocytes T<sub>FH</sub> est connue depuis une vingtaine d'années [23,24]. Par exemple, les cellules malignes dans le lymphome angio-immunoblastique (AITL) et le syndrome lympho-prolifératif cutané primaire à cellules T CD4<sup>+</sup> petites à moyennes (PCSM<sub>TLPD</sub>) expriment fortement ICOS. De plus, les Tregs activés expriment fréquemment ICOS [22], et les Tregs ICOS<sup>+</sup> ont une plus grande capacité immunosuppressive que les Tregs ICOS<sup>-</sup> [25]. Récemment, Geskin et al [26] ont mis en évidence que le taux de Tregs était anormalement élevé dans le sang des patients atteints de SS. Enfin, la capacité inhibitrice du mogamulizumab sur les Tregs explique en grande partie son efficacité dans le SS [27].

Ainsi, ICOS est une cible thérapeutique prometteuse du fait de son expression dans plusieurs types de lymphomes T périphériques primitifs (PTCL) agressifs, au premier rang desquels LTCE et AITL. Notre premier objectif était de déterminer l'expression d'ICOS dans la peau de patients atteints de MF et de SS à différents stades de la maladie, et dans le sang de patients atteints de SS. Notre deuxième objectif était d'évaluer l'efficacité d'ADC anti-ICOS sur des lignées cellulaires de LTCE et des modèles de xénogreffes murins.



## MATERIELS ET METHODES

### Conception de l'étude et population

Nous avons mené une étude prospective multicentrique entre novembre 2017 et octobre 2019. Les patients étaient âgés de plus de 18 ans et ont signé un formulaire de consentement éclairé avant le début de toute procédure liée à l'étude. Le diagnostic de LTCE était réalisé par un clinicien et un pathologiste, tous deux membres du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés (GFELC), selon les critères de la classification 2018 de l'OMS-EORTC [28,29]. Pour que le diagnostic de SS soit confirmé, le patient devait répondre aux critères du groupe B2 de la classification TNMB [29]. Pour les tests fonctionnels, les patients atteints de SS ont été inclus soit lors du diagnostic initial, soit lors d'une rechute clinique et biologique (critères B2). Nous avons exclu les patients sous traitement par immunothérapie ou participant à un essai thérapeutique.

Les échantillons de peau de 52 patients atteints de LTCE au moment du diagnostic (38 patients) ou en rechute (14 patients) ont été obtenus par punch-biopsie de 4 mm sous anesthésie locale, puis fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine. Des échantillons de peau provenant de 12 patients atteints de lymphome B, 14 de syndrome lymphoprolifératif CD30<sup>+</sup> (lymphome cutané primitif anaplasique à grandes cellules et papulose lymphomatoïde), 12 de PCSMLPD et 13 d'AITL ont servi de contrôle. Les volontaires sains étaient des donneurs de sang de l'Etablissement Français du Sang (EFS).

Tous les prélèvements de tissus de patients et l'utilisation à des fins de recherche ont respecté les protocoles approuvés par les comités d'examen et de confidentialité institutionnels de l'Institut Paoli-Calmettes (ICOS-LYMPH-IPC2018003), de l'hôpital Saint-Louis et de l'hôpital Henri-Mondor, conformément à la Déclaration d'Helsinki.

### Génération des anticorps monoclonaux

Pour la génération des ADC anti-ICOS, un anticorps murin anti-ICOS IgG1 clone 314.8 purifié généré dans notre laboratoire [30] a été transmis à Levena Biopharma et Concortis Biotherapeutics (San Diego, CA, USA) pour être couplé au MMAE et à la pyrrolobenzodiazépine (PBD). Il s'agit d'un anticorps neutralisant. Le Drug Antibody Ratio (DAR) était de 3,25.

Le BV (anti-CD30-MMAE) et le trastuzumab emtansine (anti-HER2-MMAE) ont été fournis par la pharmacie de notre hôpital.

## Culture cellulaire

Nous avons utilisé trois lignées cellulaires de LTCE : MyLa (Pr N. Ortonne, Département de pathologie, Hôpital Henri-Mondor, Créteil, France), MJ (American Type Culture Collection [ATCC], VA, USA) et HUT78 (ATCC). MyLa et MJ sont des lignées cellulaires MF, tandis que HUT78 est une lignée cellulaire SS. Les cellules MyLa et HUT78 ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Life Technologies) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (FCS), 2 % de L-glutamine, 1 % de pyruvate ; les cellules MJ dans le milieu Iscove modifié Dulbecco (IMDM) (Life Technologies) complété par 20 % de FCS. Les lignées cellulaires de lymphome diffus à grandes cellules B (Daudi, ATCC CCL-213) et de leucémie à cellules T (Jurkat, ATCC TIB-152) ont également été achetées auprès de l'ATCC et ont été cultivées de la même manière que les cellules MyLa et HUT78. La lignée cellulaire Jurkat qui a été transfectée pour exprimer le récepteur ICOS a été nommée Jurkat-ICOS. La lignée cellulaire MyLa transfectée pour exprimer la luciférase (infection avec un vecteur lentivirus exprimant *LUC2*) a été nommée MyLa-Luciférase.

Les xénogreffes dérivées de patients (PDX) de AITL (DFTL 78024V1) et de SS (DFTL 90501V3) ont été obtenues auprès du Dana-Farber Cancer Institute, Boston (MA, USA) [31].

## Cytométrie en flux et immunohistochimie

Nous avons utilisé des anticorps anti-ICOS de lapin (anticorps polyclonal de lapin de Spring Biosciences [Abcam, Cambridge, Royaume-Uni] pour l'immunohistochimie, et l'anticorps monoclonal de lapin SP98, Spring Biosciences, avec des anticorps secondaires anti-lapin Alexa488), ainsi que des anticorps de souris contre PD-1 (NAT105, Abcam), CD4 (4B12, Novocastra) (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne), CD8 (C8/144B, Dako) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), et FoxP3 (236A/E7, Abcam) pour les colorations multiplexes, à l'aide d'anticorps secondaires rouge Texas anti-souris, et DAPI pour les colorations nucléaires. Les anticorps étaient utilisés en dilution 1:100. Toutes les expériences de coloration ont été réalisées sur des sections de 3µm d'épaisseur provenant de biopsies de peau et de ganglions fixées au formol et incluses en paraffine, soit manuellement, soit à l'aide du dispositif Bond Max (Leica Microsystems). L'expression d'ICOS et de tous

les autres marqueurs a été notée de manière semi-quantitative et divisée en quatre catégories, en fonction de la proportion de cellules positives au sein de l'infiltrat de cellules T tumorales, sur 10 champs à l'objectif 40, par 2 lecteurs (0 : aucune coloration, faible expression : < 5 %, expression modérée : 5-50 %, forte expression : > 50 %). L'intensité de marquage était équivalente sur toutes les lames de MF et de SS et n'était pas prise en compte pour l'analyse statistique.

Pour la cytométrie en flux et les tests fonctionnels, nous avons utilisé des anticorps anti-ICOS 314.8 générés dans notre laboratoire (pour plus de détails, voir Le *et al* [30]). Les autres anticorps ont été achetés auprès de Beckman Coulter (BC) (Brea, CA, USA), Becton-Dickinson (BD) (Franklin Lakes, NJ, USA), Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Allemagne), et eBioscience (San Diego, CA, USA) : CD45 KO (BC), CD3 percpCy5.5 (BD), CD4 Pacblue (BD), CD7 FITC (BD), CD26 APC (Miltenyi), CD14 APCH7 (BD), CD158e/k PE Vio770 (Miltenyi), CD52 PE (Miltenyi), CD56 APC-Vio770 (Miltenyi), CD19 APC (BD), CD20 PE (BC), CD25 PE-Cf 594 (BD) et FoxP3 FITC (eBioscience).

Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées sur un cytomètre FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Les données brutes générées ont été analysées avec le logiciel DIVA FACS Canto II version 8.0.1.

## Essais cytotoxiques fonctionnels

**Mesure de la viabilité cellulaire avec alamarBlue™.** La viabilité des cellules en présence d'ADC a été mesurée avec de l'amarBlue™ (Biosource, Carlsbad, CA, USA). Après 4 à 5 jours d'exposition des cellules aux ADC, l'amarBlue™ était ajouté. Après 4 heures d'incubation à 37°C, la fluorescence était mesurée par un luminomètre (OPTIMA, BMG Labtech) à une longueur d'onde de 560 nm, comme recommandé par le fabricant.

**Mesure de l'internalisation des anticorps avec pHAb Reactive Dyes.** Nous avons utilisé un test de colorants réactifs pHAb (Promega) pour évaluer l'internalisation des anticorps anti-ICOS et anti-CD30 dans les lignées cellulaires MyLa, MJ et HUT78. Les colorants pHAb sont non fluorescents à un pH neutre et deviennent hautement fluorescents à un pH acide. Les anticorps ont été liés à des billes magnétiques de protéine G, puis marqués avec le colorant réactif aux amines pHAb. Les anticorps conjugués au pHAb ont ensuite été co-incubés avec les lignées cellulaires pendant 20 heures à 37°C. La fluorescence des anticorps internalisés a été détectée par cytométrie en flux (532 nM, détecteur PE).

## Animaux et modèle de xénogreffes

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives françaises pour la manipulation des animaux, les directives ARRIVE et approuvées par le comité d'éthique local (accord n° APAFIS#6069-2016071216263470 v3).

Des souris mâles non obèses diabétiques présentant un déficit immunitaire combiné sévère gamma (NSG/NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rgtm1Wjl/SzJ) âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées pour les études sur les souris et ont été obtenues auprès de Charles Rivers (l'Arbresle, France). Les souris ont été hébergées dans des conditions stériles avec de la nourriture et de l'eau stérilisées fournies *ad libitum* et ont été maintenues sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité et sous contrôle de la température et de l'humidité.

Les souris ont reçu des injections sous-cutanées de 8 millions de cellules Myla ou MylaLuc dans du PBS. La croissance tumorale a été suivie en mesurant avec un pied à coulisse numérique et en calculant le volume de la tumeur (longueur  $\times$  largeur $^2 \times \pi/6$ ). Lorsque les tumeurs ont atteint une taille moyenne proche de 100 mm<sup>3</sup>, les souris ont été randomisées (n=7 par groupe) et utilisées pour déterminer la réponse au traitement. Les traitements par ADC ont été injectés par voie intraveineuse dans la veine caudale. Les ADC BV et anti-ICOS ont été administrés à la même dose (3 mg/kg) et le trastuzumab emtansine à 10 mg/kg. L'analyse de la bioluminescence a été réalisée à l'aide d'un PhotonIMAGER (Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France) après ajout de luciférine sans endotoxine (30 mg/kg). Une fois l'analyse terminée, les souris ont été autopsiées et la luminescence des organes a été évaluée. La surveillance quotidienne des souris à la recherche de symptômes de la maladie (volume tumoral >1500 mm<sup>3</sup>, perte de poids significative, pelage ébouriffé, dos voûté, faiblesse et mobilité réduite) a permis de déterminer le moment où une euthanasie était nécessaire. Les courbes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées à l'aide du test log-rank.

Pour explorer l'efficacité des traitements ADC sur la progression des lymphomes, nous avons utilisé des PDX d'AITL (DFTL 78024V1) et de SS (DFTL 90501V3). Pour chaque PDX, 100 000 à 500 000 cellules provenant des PDX ont été injectées par voie intraveineuse dans la veine caudale de souris NSG sans culture *in vitro* préalable. Lorsque la prise de greffe était authentifiée (cellules hCD45<sup>+</sup> détectées dans le sang périphérique par cytométrie en flux), les souris étaient traitées de la même manière que celle décrite précédemment.

## Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées avec le programme GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un test t non paramétrique non apparié de Student avec un niveau de signification fixé à  $p < 0,05$  a été utilisé pour comparer l'efficacité *in vitro* de l'anticorps d'intérêt et de son contrôle. Les analyses d'efficacité groupées ont été réalisées avec un test d'analyse de variance (two-way ANOVA). La CI50 (dose inhibitrice médiane) a été calculée par régression non linéaire. Les courbes de survie *in vivo* ont été comparées à l'aide du test log-rank (Kaplan-Meier).

## Déclaration de partage des données

Pour les données originales, veuillez contacter [florent.amatore@ap-hm.fr](mailto:florent.amatore@ap-hm.fr) et [daniel.olive@inserm.fr](mailto:daniel.olive@inserm.fr).

## RESULTATS

### ICOS est fortement exprimé par les cellules malignes de la peau des patients atteints de MF et de SS.

L'expression d'ICOS dans les biopsies cutanées de 52 patients atteints de LTCE au moment du diagnostic (38 patients) ou en rechute (14 patients) était évaluée par IHC. Chez 5 patients atteints de SS, nous avons également analysé des biopsies de ganglions envahis (pN3). Nous avons mesuré l'expression de l'ICOS au sein de la population de cellules T tumorales CD3<sup>+</sup>, caractérisée morphologiquement (atypies nucléaires) et phénotypiquement (perte de CD2, CD5, CD7 ; expression de PD-1 pour le SS ; expression de CD30 pour les syndromes lymphoprolifératifs cutanés primitifs CD30<sup>+</sup>).

L'expression d'ICOS était modérée à forte dans l'infiltrat lymphocytaire tumoral chez respectivement 61%, 75% et 88% des patients atteints de MF, MF avancé et SS (**Figure 1A-B**). Comme attendu, ICOS était faiblement exprimé dans les lymphomes B et fortement exprimé dans les PCSMLPD et AITL. De plus, ICOS était exprimé par des lymphocytes atypiques (définis par les caractéristiques nucléaires et phénotypiques classiques) dans les cinq ganglions envahis chez les patients atteints de SS. Ainsi, l'expression d'ICOS augmente avec la progression de la maladie et devient forte et constante dans le SS, tant dans la peau que dans les ganglions.

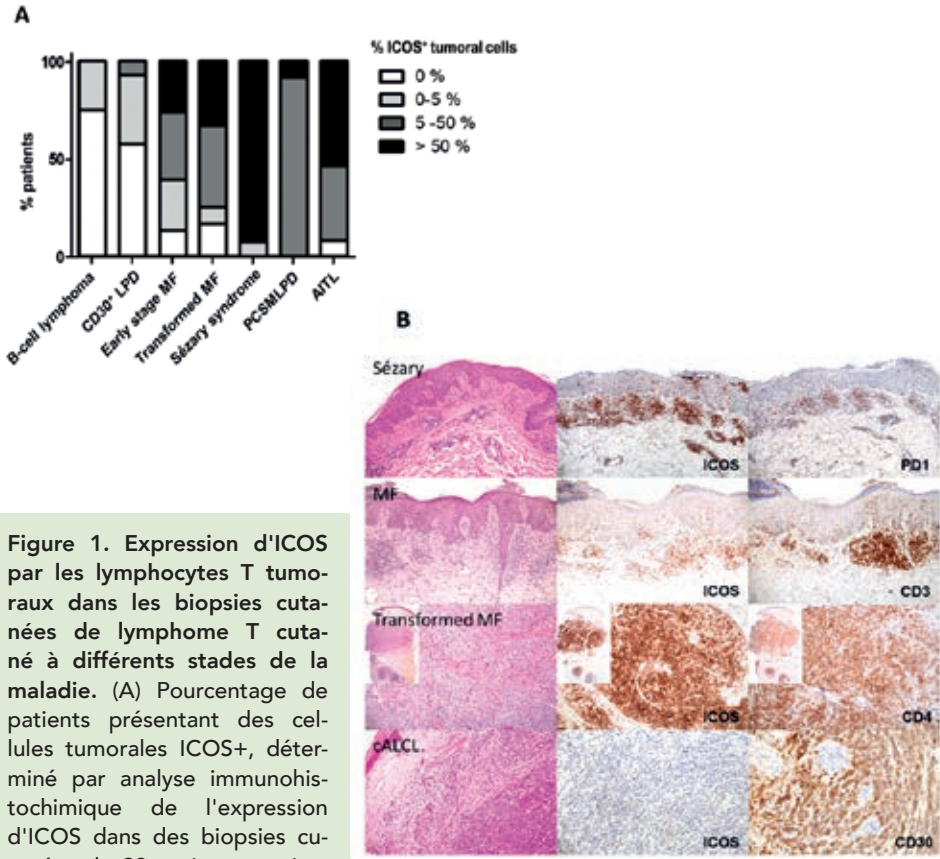
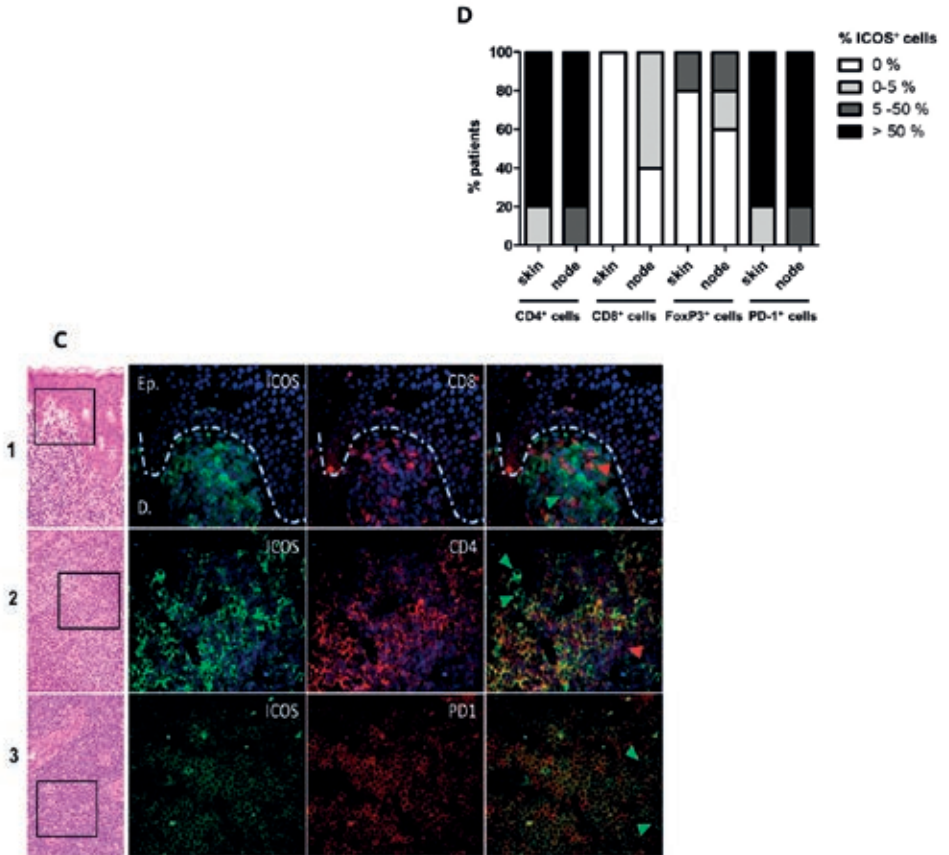


Figure 1. Expression d'ICOS par les lymphocytes T tumoraux dans les biopsies cutanées de lymphome T cutané à différents stades de la maladie. (A) Pourcentage de patients présentant des cellules tumorales ICOS+, déterminé par analyse immunohistochimique de l'expression d'ICOS dans des biopsies cutanées de 23 patients atteints de MF au stade précoce, 12 de MF transformé, 17 de SS, 12 de lymphome B, 14 de LPD CD30+ (lymphome cutané anaplasique à grandes cellules et papulose lymphomatoïde), 12 de PCSM/LPD et 13 d'AITL. Les biopsies de lymphome B ont été utilisées comme témoins négatifs, tandis que les PCSM/LPD et AITL ont été utilisés comme contrôles positifs. (B) Analyse immunohistochimique de l'expression d'ICOS dans les lymphocytes CD3+CD4+ infiltrant l'épiderme ou le derme. (C) Immunofluorescence avec double coloration : anti-souris Texas red et anti-lapin Alexa Fluor 488 comme anticorps secondaires et le 49,6-diamidino-2 phénylindole pour la coloration nucléaire dans les biopsies cutanées (ligne 1) et les ganglions (lignes 2 et 3) de 3 patients différents atteints de SS. Les flèches identifient les cellules exprimant un seul marqueur ; les flèches vertes indiquent les cellules ICOS+, et les flèches rouges indiquent les cellules CD8+ (ligne 2) et les cellules CD4+ (ligne 3). (D) Analyse immunohistochimique en double coloration de biopsies cutanées et de ganglions de 5 patients atteints de SS. Le pourcentage de patients présentant des cellules ICOS+/CD4+, ICOS+/CD8+, ICOS+/FoxP3+ et ICOS+/PD-1+ dans l'infiltrat tumoral cutané et ganglionnaire est représenté. cALCL, « cutaneous anaplastic large cell lymphoma » (lymphome cutané anaplasique à grandes cellules).

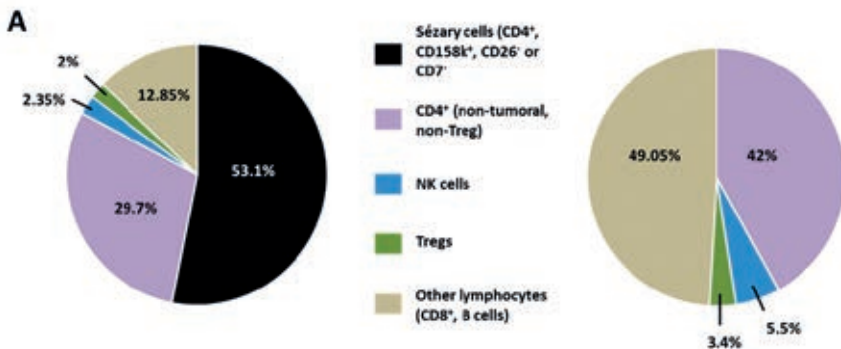


Des expériences de doubles marquages ont été réalisées dans des échantillons de peau et de ganglions lymphatiques des cinq patients afin de caractériser davantage l'expression d'ICOS par les cellules T néoplasiques et par le microenvironnement (**Figure 1C**). Nous avons observé que la plupart des cellules T CD4<sup>+</sup> atypiques (>50 %) exprimaient ICOS, ainsi que la plupart des cellules atypiques PD-1<sup>+</sup>, à l'exception d'un patient dont l'expression d'ICOS était faible à modérée. Chez ce dernier, tous les lymphocytes ICOS<sup>+</sup> co-exprimaient PD-1. Une forte expression de PD-1 a été retrouvée dans tous les échantillons de peau et de ganglions, et les lymphocytes ICOS<sup>+</sup> PD-1<sup>-</sup> semblaient être absents ou très rares (<5%). Seuls très peu (<5%) de lymphocytes T ICOS<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> ont pu être identifiés dans le microenvironnement tumoral dans 3 échantillons de ganglions. Peu de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>-</sup> et de lymphocytes Tregs FoxP3<sup>+</sup> étaient présents dans la peau et les ganglions. Ces Tregs exprimaient faiblement à modérément ICOS (**Figure 1D**). Ainsi, l'expression

d'ICOS semble principalement limitée aux cellules T CD4<sup>+</sup> néoplasiques, avec de rares cellules T CD8<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> ou Tregs FoxP3<sup>+</sup> dans le micro-environnement tumoral.

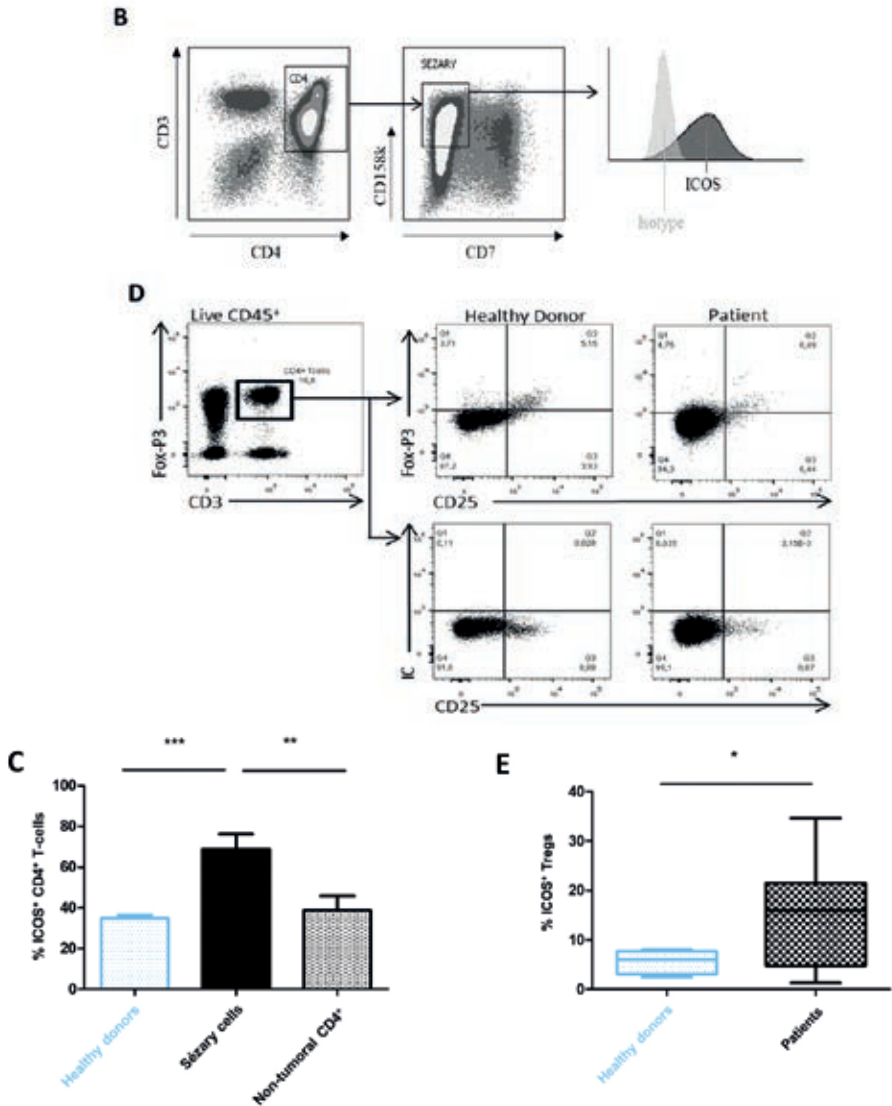
## ICOS est fortement exprimé par les cellules malignes dans le sang des patients atteints de SS.

L'expression d'ICOS par les cellules malignes circulantes a ensuite été évaluée par cytométrie de flux. L'expression de KIR3DL2 est rapportée comme étant plus fiable que la perte d'expression de CD7 et CD26 dans le diagnostic et l'évaluation de la charge tumorale sanguine dans le SS [6]. Pour assurer la sélection la plus spécifique des cellules de Sézary, nous avons considéré que les cellules T CD4<sup>+</sup> KIR3DL2<sup>+</sup> avec perte de CD7 et/ou CD26 étaient des cellules malignes. La **figure 2A** montre la distribution des populations lymphocytaires chez 13 patients et 12 volontaires sains. Chez les patients, le pourcentage médian de cellules T CD4<sup>+</sup> malignes (cellules de Sézary) parmi toutes les cellules lymphoïdes était de 53,1 % (35,9-71), ce qui signifie que 64 % de toutes les cellules T CD4<sup>+</sup> des patients étaient des cellules malignes. Les Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) représentaient 2 % de l'ensemble des lymphocytes, soit 4,3 % des lymphocytes non tumoraux ; cette proportion était de 3,4 % chez les donneurs sains. En outre, les lymphocytes NK représentaient 2,4 % de tous les lymphocytes chez les patients (5 % des lymphocytes non tumoraux), contre 5,5 % chez les donneurs sains.



**Figure 2. Expression d'ICOS dans les cellules malignes circulantes des patients atteints de SS.** (A) Pourcentage des populations de cellules lymphoïdes dans le sang périphérique de 13 patients atteints de SS et de 12 donneurs sains par cytométrie de flux. NK, natural killer. (B) Stratégie de *gating* des cellules de Sézary (CD4+CD158k+CD7-) par cytométrie en flux. (C) Évaluation par cytométrie en flux de l'expression d'ICOS chez des patients atteints de SS et des donneurs sains. Pourcentage de cellules ICOS<sup>+</sup> parmi les cellules T CD4<sup>+</sup> de Sézary et les cellules T CD4<sup>+</sup> non tumorales. Les cellules de Sézary ont été définies comme CD4<sup>+</sup>, KIR3DL2<sup>+</sup>, CD7<sup>-</sup>, ou CD4<sup>+</sup>, KIR3DL2<sup>+</sup>, CD26<sup>-</sup>. Les cellules T CD4<sup>+</sup>





non tumorales sont KIR3DL2-. Environ 70 % des cellules de Sézary expriment l'ICOS, contre 40 % des cellules CD4+ non tumorales des patients et des cellules CD4+ des donneurs sains. Il n'y avait pas de différence significative d'intensité d'expression entre les cellules tumorales et les CD4 sains des patients (données non présentées). (D) Stratégie de sélection des cellules Treg (CD4+FoxP3+CD25+) par cytométrie de flux pour un donneur sain et un patient représentatif. (E) Pourcentage de cellules Treg ICOS+ chez les patients atteints de SS et les donneurs sains. \*\*\*P, .001 ; \*\*P, 5.001-.01 ; \*P, 5 .01-.05. IC, contrôle isotypique.

L'expression d'ICOS par les cellules tumorales circulantes a été retrouvée chez tous les patients. Cette expression était forte :  $69\pm 7,3$  % des cellules tumorales exprimaient ICOS contre  $38,8\pm 7,1$  % des cellules CD4<sup>+</sup> non tumorales chez les patients ( $p < 0,009$  ; intervalle de confiance à 95 % [IC95 %] : 8,654-51,55) ; et  $31\pm 3,2$  % des cellules CD4<sup>+</sup> chez les volontaires sains ( $p < 0,0001$  ; IC95 % : 20,29-46,34) (**Figure 2B**). Chez les patients,  $14,4\pm 2,7$ % des Tregs Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> exprimaient ICOS, contre  $5,6\pm 1,2$ % chez les volontaires sains ( $p=0,04$ ) (**Figure 2C**).

## Les ADC anti-ICOS inhibent les lignées cellulaires MyLa, MJ et HUT78

Nous avons d'abord testé les ADC anti-ICOS sur des lignées cellulaires MF (MyLa et MJ) et SS (HUT78) pour nous assurer de leur fonctionnalité. L'expression d'ICOS était forte sur MyLa (rapport MFI = 143,9) et MJ (rapport MFI = 96) mais faible sur HUT78 (rapport MFI = 4,5). CD30 était fortement exprimé sur les 3 lignées cellulaires (**Figure 3A**).

Nous avons observé une diminution significative et dose-dépendante de la viabilité cellulaire en présence des ADC anti-ICOS-MMAE dans les lignées cellulaires MyLa et MJ (**Figures 3B-C**). Pour la lignée cellulaire MyLa, les ADC anti-ICOS-MMAE avaient une IC50 meilleure mais pas statistiquement différente que celle obtenue avec le BV (respectivement 8,2 ng/ml et 30,6 ng/ml). Pour la lignée MJ, les ADC anti-ICOS-MMAE étaient légèrement moins efficaces que le BV. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les anticorps monoclonaux anti-ICOS s'internalisent mieux dans les cellules MyLa, contrairement aux anti-CD30 qui s'internalisent mieux dans les cellules MJ (données non montrées).

Dans les cellules HUT78, BV est moins efficace que dans MyLa et MJ (IC50=251,9 ng/ml) et les ADC anti-ICOS-MMAE ne présentent aucune activité (**Figure 3D**). En effet, la lignée cellulaire HUT78 présente une résistance au MMAE, puisque la CI50 du MMAE libre est respectivement de  $8,2e-007$   $\mu$ M et  $0,001$   $\mu$ M dans MyLa et HUT78 (données non montrées). Cependant, les ADC anti-ICOS-PBD ont une forte action inhibitrice, ce qui suggère que les ADC anti-ICOS couplés à une drogue adaptée pourraient être efficaces même avec de faibles niveaux d'expression d'ICOS.

Enfin, nous avons évalué la spécificité des ADC en testant les ADC anti-ICOS sur les cellules Jurkat et Jurkat-ICOS (**Figures 3E-F**). Les valeurs IC50 de tous les ADC sont résumées dans la **Figure 3G**.

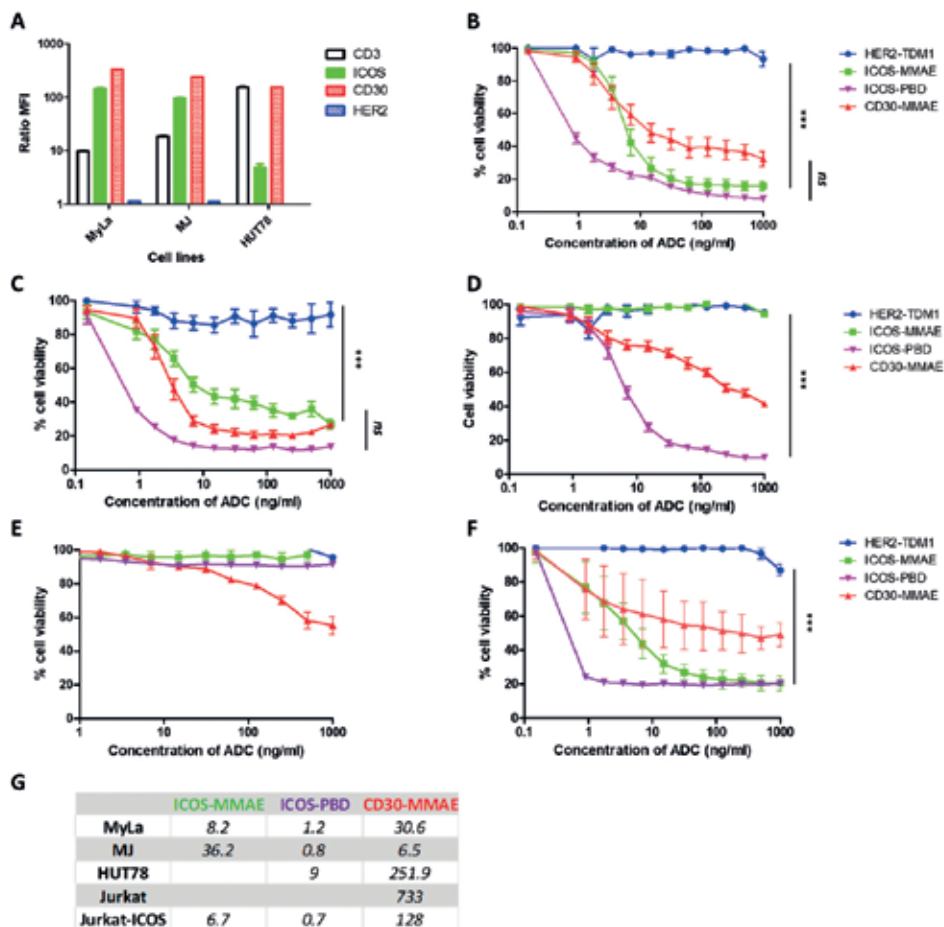
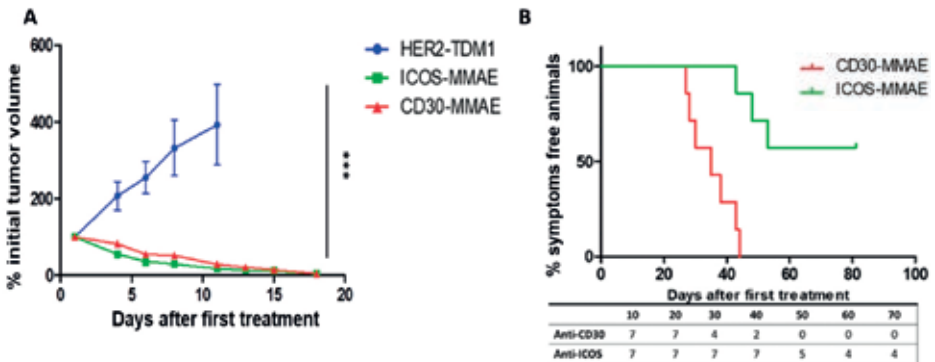


Figure 3. Les ADC anti-ICOS ont une efficacité *in vitro* spécifique sur les lignées cellulaires exprimant ICOS. (A) Immunophénotypage des lignées cellulaires de lymphome T cutané par cytométrie de flux. A noter que l'expression d'ICOS était plus élevée dans les cellules MyLa et MJ que dans les cellules HUT78. (B-F) Pourcentage de viabilité cellulaire dans des concentrations croissantes d'ADC, évaluées avec l'alarmarBlue (moyenne de 16 replicates), sur MyLa (B), MJ (C), HUT78 (D), Jurkat (E), et Jurkat-ICOS (F). Les ADC anti-HER2 ont été utilisés comme contrôle négatif, tandis que les ADC anti-CD30 (BV) ont servi de contrôle positif. (G) Tableau récapitulatif des valeurs IC50 exprimées en ng/ml pour tous les ADC. \*\*\*P, .001. ns, non significatif. PBD, pyrrolobenzodiazépine.

## In vivo, les ADC anti-ICOS-MMAE sont supérieurs au BV en terme de survie globale et empêchent le développement de métastases

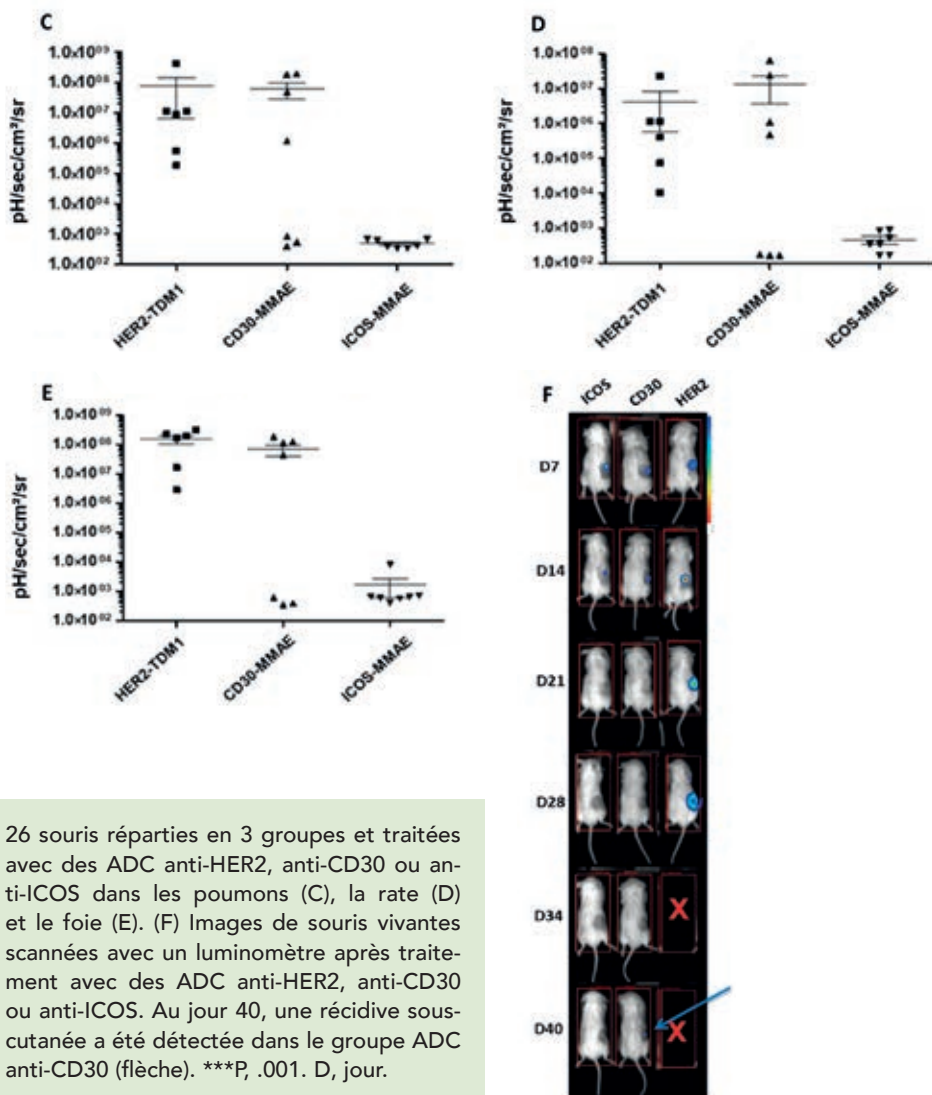
Les souris greffées par voie sous-cutanée avec  $8.10^6$  cellules MyLa ont été réparties aléatoirement en trois groupes : un groupe ADC anti-ICOS-MMAE, un groupe BV, un groupe ADC anti-HER2 (trastuzumab-emtansine).

Les souris traitées avec les ADC anti-HER2 sont décédées entre le jour J10 et J12. Une diminution rapide du volume tumoral était observée après traitement par ADC anti-ICOS-MMAE ou BV (**Figure 4A**). Les tumeurs sous-cutanées n'étaient plus perceptibles à partir du quinzième jour après la première injection, sans différence significative entre les deux traitements. La tolérance a été excellente, sans aucun signe de toxicité des ADC chez les souris traitées. Fait intéressant, les ADC anti-ICOS-MMAE ont montré une supériorité significative par rapport à la BV en terme de survie globale (**Figure 4B**). La différence entre les deux courbes de survie globale (test de Mantel-Cox log-rank) était significative ( $p=0,0006$ ) avec un hazard ratio de 15,16 (IC95% : 3,2-71,1). La survie médiane dans le groupe BV était de 35 jours et n'a pas été atteinte dans le groupe ADC anti-ICOS.



**Figure 4.** Évaluation de l'efficacité *in vivo* des ADC anti-ICOS-MMAE dans un modèle de xélogreffe murine avec la lignée MyLa. (A) Vingt-et-une souris ont été greffées avec  $8 \times 10^6$  cellules MyLa chacune, qui ont été injectées par voie sous-cutanée avec 200  $\mu$ L de solution saline tamponnée au phosphate et sans matrice de membrane basale. Les souris ont ensuite été réparties aléatoirement en 3 groupes et suivies pour le volume tumoral après 2 traitements d'ADC anti-HER-2, anti-CD30 ou anti-ICOS administrés à 4 jours d'intervalle (jours 10 et 14 après la prise de greffe). (B) Courbes de survie globale (Kaplan-Meier) comparant l'effet des ADCs anti-ICOS et anti-CD30. La différence entre les 2 courbes est significative ( $P= 0.0006$ ). (C-E) Détection des métastases chez

Au cours d'une deuxième expérience, nous avons cherché à suivre le développement des métastases en utilisant des cellules MyLa-Luciférase. Vingt-sept souris ont été greffées et traitées dans les mêmes conditions que lors de la première expérience. A J25, 7 souris de chaque groupe ont été sacrifiées et leurs organes ont été scannés avec le luminomètre pour détecter la présence de métastases. Les



26 souris réparties en 3 groupes et traitées avec des ADC anti-HER2, anti-CD30 ou anti-ICOS dans les poumons (C), la rate (D) et le foie (E). (F) Images de souris vivantes scannées avec un luminomètre après traitement avec des ADC anti-HER2, anti-CD30 ou anti-ICOS. Au jour 40, une récurrence sous-cutanée a été détectée dans le groupe ADC anti-CD30 (flèche). \*\*\*P, .001. D, jour.

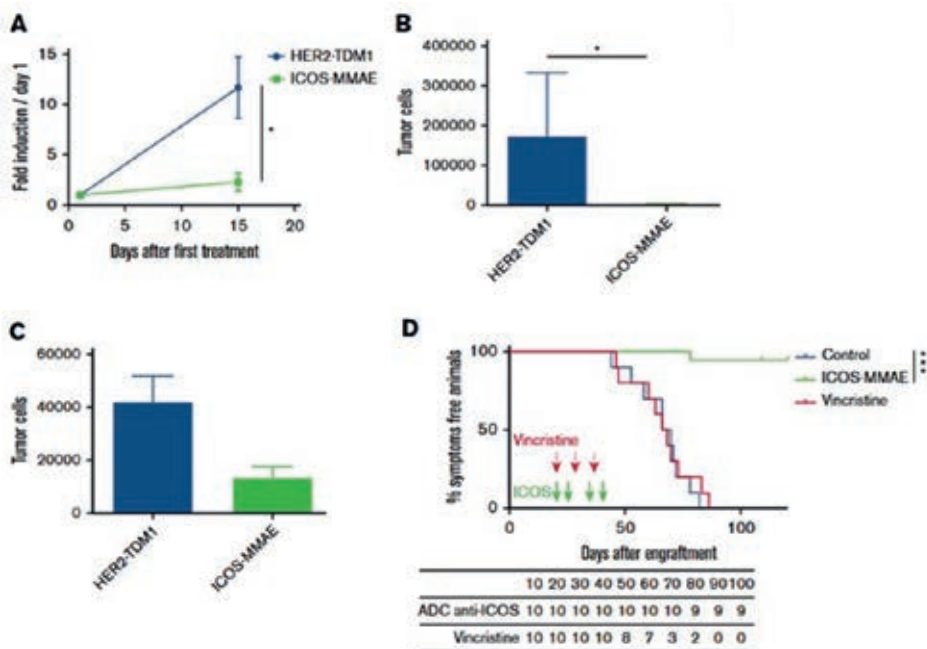
autres souris ont été maintenues jusqu'à J40 pour détecter *in vivo* le début de la récurrence sous-cutanée. A J25, toutes les souris du groupe anti-HER2 présentaient des métastases dans les poumons, le foie et la rate. Dans le groupe BV, environ 50% des souris avaient au moins une métastase dans l'un de ces trois organes. Dans le groupe anti-ICOS-MMAE, les organes ne présentaient pas de bioluminescence significative (**Figures 4C-E**). A J40, une récurrence sous-cutanée était perçue *in vivo* chez les souris du groupe BV, alors que les souris du groupe anti-ICOS étaient toujours en rémission (**Figures 4F**).

## **Les ADC anti-ICOS-MMAE ont une puissante efficacité *in vivo* dans les PDX de lymphomes ICOS<sup>+</sup>.**

Pour améliorer la valeur prédictive de notre modèle préclinique, nous avons évalué l'efficacité des ADC anti-ICOS-MMAE dans des PDX ICOS<sup>+</sup> provenant de patients atteints de SS et d'AITL.

Des cellules de PDX exprimant ICOS provenant de patients atteints de SS ont été injectées par voie intraveineuse à quatorze souris NSG. À J40 après la greffe, nous avons observé une augmentation brutale et rapide du nombre de cellules de Sézary. Nous avons prélevé des échantillons de sang de chaque souris et quantifié le nombre de cellules tumorales circulantes pour répartir uniformément les souris vivantes en deux groupes de 7 souris : le groupe ADC anti-ICOS et le groupe témoin ADC anti-HER2. Quinze jours après le traitement, les souris ont été sacrifiées, et nous avons quantifié le nombre de cellules malignes dans le sang et les organes par cytométrie de flux. Nous avons observé une réduction du nombre de cellules tumorales dans le sang, la moelle osseuse et la rate du groupe ADC anti-ICOS (**Figure 5A-C**). Les ADC anti-ICOS montrent ici une efficacité rapide et significative, ce qui suggère que cette stratégie thérapeutique pourrait être utilisée chez des patients atteints de SS avancé.

Dans une deuxième expérience, des PDX ICOS<sup>+</sup> provenant de patients atteints d'AITL ont été injectés par voie intraveineuse à des souris NSG. Nous avons ensuite prélevé des échantillons de sang pour détecter les cellules tumorales par cytométrie de flux. Les premières cellules tumorales ont été détectées à J21 après la transplantation, les traitements ont donc commencé à J22. Les souris ont été traitées avec des ADC anti-ICOS, de la vincristine (contrôle positif, avec le même mode d'action que le MMAE), ou une solution saline (NaCl à 0,9 %). La survie médiane dans le groupe contrôle négatif et vincristine était de J67 et J68,



**Figure 5. Efficacité *in vivo* des ADC anti-ICOS-MMAE sur des PDX ICOS+.** (A-C) Quatorze souris ont été greffées avec  $5 \times 10^5$  cellules de PDXs provenant d'un patient atteint de SS et divisées en 2 groupes (ADC anti-ICOS-MMAE et ADC anti-HER2 contrôle). Les deux traitements ont été injectés par voie IV aux jours 55, 58, 62 et 65 à une dose de 3 mg/kg. Les souris ont ensuite été euthanasiées au jour 69, et les organes ont été prélevés, dissociés et analysés par cytométrie en flux (dans le sang [A], la moelle osseuse [B] et la rate [C]). (D) Trente souris ont été greffées avec  $5 \times 10^5$  cellules de PDXs provenant de patients atteints d'AITL et divisées en 3 groupes de 10 souris. Le traitement a commencé le 22<sup>e</sup> jour, lorsque les premiers blastes ont été détectés dans le sang (environ 0,2 blaste/mL). L'ADC anti-ICOS et le sérum salin (NaCl 0,9 %) ont été injectés par voie IV aux jours 22, 25, 38 et 43 à une dose de 3 mg/kg. La vincristine a été administrée par voie intrapéritonéale aux jours 22, 29 et 38 à raison de 0,25 mg/kg. \*P, 5.01-.05 ; \*\*\*P, .001.

respectivement. La survie médiane dans le groupe anti-ICOS n'a pas été atteinte. La survie prolongée des souris traitées par l'ADC anti-ICOS par rapport à celles recevant une solution saline était significative ( $p < 0,0001$ ) (**Figure 5D**). Aucun signe de toxicité de l'ADC n'a été observé chez les souris traitées. À J120, les souris traitées avec les ADC anti-ICOS étaient en rémission complète puisqu'aucun blaste n'était plus détectable (données non présentées).

## DISCUSSION

Cette étude présente les résultats de l'efficacité préclinique des ADC anti-ICOS et démontre leur excellent potentiel anti-tumoral dans plusieurs conditions expérimentales complémentaires, dans des PTCL agressifs tels que LTCE et AITL.

Nous rapportons pour la première fois l'expression forte et constante d'ICOS par les cellules de Sézary circulantes, la forme la plus sévère de LTCE. Dans les biopsies cutanées de MF, l'expression d'ICOS semble augmenter avec l'évolution de la maladie. Il est à noter que dans les formes précoces de MF, l'infiltration tumorale est principalement composée de lymphocytes du TME, et que cet équilibre s'inverse dans les formes tardives de la maladie [32].

Le profil d'expression d'ICOS dans le MF et le SS met en évidence son potentiel en tant que marqueur diagnostique supplémentaire pour le LTCE. En effet, certains résultats histologiques nécessaires au diagnostic sont parfois trompeurs dans les premiers stades de la maladie. Les patients atteints de MF ont un risque accru de développer un syndrome lymphoprolifératif cutané CD30<sup>+</sup> [33], dont l'histologie est proche du MF transformé. ICOS est rarement exprimé par les cellules néoplasiques des lymphomes cutanés anaplasiques à grandes cellules, ce qui pourrait aider à distinguer les c-ALCL des MF transformés.

D'autres études sont nécessaires pour évaluer le potentiel prédictif de l'expression d'ICOS sur l'évolution et le pronostic du LTCE. Dans de nombreux cancers solides, tels que le mélanome [34], le cancer du sein [35] le cancer gastrique [36] et le carcinome rénal à cellules claires [37], l'expression d'ICOS par les Tregs du micro-environnement est associée à un mauvais pronostic. L'impact pronostique d'ICOS n'a pas été évalué dans les hémopathies malignes.

Nous avons montré que les ADC anti-ICOS sont efficaces dans les lignées cellulaires et les PDX de lymphomes exprimant ICOS. On peut s'attendre à ce qu'ils induisent une déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> malignes et des Tregs, mais aussi des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> non malignes exprimant ICOS. Nous montrons ici que les cellules T CD4<sup>+</sup> non malignes des patients atteints de SS ne représentent qu'environ 30% de tous les lymphocytes, dont 30-40% expriment ICOS. De plus, les cellules T CD8<sup>+</sup> représentent moins de 10% des lymphocytes (le rapport CD4:CD8 est classiquement > 10:1 dans le SS). Dans le LTCE, les cellules T CD8<sup>+</sup> infiltrant la TME sont connues pour être peu cytotoxiques [38]. Ainsi, les mAbs anti-ICOS n'inhiberaient qu'une partie du pool de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et ces derniers ne sont pas des acteurs efficaces de l'immunité anti-tumorale dans les



LTCE. En outre, nous n'avons identifié que très peu de cellules T ICOS<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> dans la TME des échantillons de SS, tant dans la peau que dans les ganglions. Enfin, contrairement à l'alemtuzumab [39] et d'autres thérapies immunosuppressives, les anti-ICOS n'auraient aucun effet toxique sur les lymphocytes NK, qui sont des effecteurs importants de l'immunité anti-tumorale. Il est admis que l'élimination des cellules tumorales associée à la préservation d'un système immunitaire efficace est la clé d'une stratégie thérapeutique efficace [39].

Les Tregs sont une sous-population de cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> qui empêchent les réponses immunitaires aux auto-antigènes, assurent une immunosuppression et participent ainsi à l'échappement immunitaire des tumeurs. Parmi eux, les Tregs intra-tumoraux ICOS<sup>+</sup> ont une capacité de suppression plus forte que leurs homologues ICOS<sup>-</sup> [40]. En sécrétant de l'IL-10 et du TGF-β, les Tregs ICOS<sup>+</sup> inhibent la plupart des cellules immunitaires innées et adaptatives [41]. Des études portant sur différents types histologiques de cancer ont mis en évidence le nombre important de Tregs dans le sang périphérique et dans la TME des patients [42]. De plus, Le et al [30] ont démontré que les lymphomes B folliculaires génèrent des Tregs *via* la voie ICOS/ICOSL. Ici, un pourcentage significativement plus élevé de Tregs exprimait ICOS chez les patients atteints de LTCE que chez les donneurs sains. Le ciblage d'ICOS induirait une déplétion des Tregs, ce qui pourrait améliorer les profils immunitaires. Dans le LTCE, cette stratégie a été utilisée *via* l'inhibition de CCR4 avec le mogamulizumab, qui induit une cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) et une phagocytose (ADCP) des cellules T malignes CCR4<sup>+</sup> et les Tregs [27].

Contrairement aux anticorps induisant un effet ADCC/ADCP, les ADC agissent directement sur les cellules tumorales ; l'avantage est la rapidité d'action, mais l'inconvénient est une toxicité cumulative liée à la drogue couplée. Les ADC anti-ICOS pourraient être utilisés pour obtenir une rémission complète avant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, ou dans les cas où une manifestation clinique sévère de la maladie nécessite une efficacité rapide. L'optimisation des ADC pour réduire leur toxicité et améliorer leur efficacité est actuellement à l'étude [43,44].

Nos résultats peuvent être étendus au spectre de la variante folliculaire des PTCL et aux AITL. Ceux-ci ont un mauvais pronostic avec une survie globale à 5 ans d'environ 30%, les chimiothérapies actuelles étant inefficaces chez la plupart des patients [45,46]. Ainsi, un essai de phase I évaluant la tolérance d'un anticorps antagoniste anti-ICOS, MEDI-570, chez des patients atteints de PTCL ou d'AITL de variante folliculaire récidivant ou réfractaire a été récemment initié (NCT02520791).

Il existe un réel besoin thérapeutique dans les LTCE et les PTCL T<sub>FH</sub>. ICOS est une cible thérapeutique prometteuse car elle est exprimée à la fois par les cellules T tumorales et les Tregs. Nos résultats, qui démontrent l'expression forte et fréquente d'ICOS dans les LTCE, ainsi que l'efficacité préclinique des ADC anti-ICOS, sont une base préliminaire pour un essai thérapeutique.

## REMERCIEMENTS

L'équipe D.O. est affiliée "Equipe Fondation Recherche Médicale" DEQ20180339209. D.O. est Senior Scholar de l'"Institut Universitaire de France". Les auteurs remercient toute l'équipe "Immunité et Cancer" (CRCM, Marseille) et la plateforme "TrGet" (CRCM, Marseille) pour leur aide technique. Les auteurs remercient « INSERM », « Institut Paoli-Calmettes », « Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer » et « Aix-Marseille Université » pour leur aide financière. Les auteurs remercient les patients et leurs familles.

## CONFLITS D'INTERETS :

D.O. est co-fondateur d'ImCheck Therapeutics, Emergence Therapeutics et Alderaan.

M.B. est membre du board scientifique de Takeda.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SWERDLOW SH : The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 2016, **127**(20),2375-90.
2. HWANG ST. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet Lond Engl*, 2008, **371**(9616),945-57.
3. FINK-PUCHES R : Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood*, 2002, **99**(3),800-5.
4. JAWD SI : Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*, 2014, **70**(2),205.e1-16; quiz 221-2.

5. SCARISBRICK JJ : Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990, 2018, **93**,47-56.
6. ROELENS M : Revisiting the initial diagnosis and blood staging of mycosis fungoides and Sézary syndrome with the KIR3DL2 marker. *Br J Dermatol*, 2020, **182**(6),1415-22
7. BAHLER DW : CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sézary syndrome by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, **74**(3),156-62.
8. ORTONNE N : CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*, 2008, **128**(2),465-72.
9. SAMIMI S : Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Arch Dermatol*, 2010, **146**(12),1382-88.
10. WADA DA : Programmed death 1 is expressed in cutaneous infiltrates of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Am J Hematol*, 2011, **86**(3),325-27.
11. KLEMKE CD : Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br J Dermatol*, 2015, **173**(1),93-105.
12. MOINS-TEISSERENC H : CD158k is a reliable marker for diagnosis of Sézary syndrome and reveals an unprecedented heterogeneity of circulating malignant cells. *J Invest Dermatol*, 2015,**135**(1),247-57.
13. PRINCE HM : Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. *Lancet Lond Engl*, 2017, **390**(10094):555-66.
14. KIM YH : Mogamulizumab versus vorinostat in previously treated cutaneous T-cell lymphoma (MAVORIC): an international, open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2018, **19**(9),1192-204.
15. BAGOT M : IPH4102, a first-in-class anti-KIR3DL2 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma: an international, first-in-human, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol*, 2019, **20**(8),1160-70.
16. UPADHYAY R : Lymphoma: immune evasion strategies. *Cancers*, 2015, **7**(2),736-62.
17. SCHIETINGER A : Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*, 2014, **35**(2),51-60.

18. QUERFELD C : Primary T Cells from Cutaneous T-cell Lymphoma Skin Explants Display an Exhausted Immune Checkpoint Profile. *Cancer Immunol Res*, 2018, **6**(8):900-9.
19. NGUYEN GH : Upregulation of inhibitory signaling receptor programmed death marker-1 (PD-1) in disease evolution from cutaneous lymphoid dyscrasias to mycosis fungoides and Sezary's syndrome. *Ann Diagn Pathol*, 2017, **28**,54-9.
20. BOSISIO FM : Expression of T-follicular helper markers in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides and other primary cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Dermatopathol*, 2015, **37**(2),115-21.
21. AMATORE F : Inducible Co-Stimulator (ICOS) as a potential therapeutic target for anti-cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, **22**(4),343-51.
22. AMATORE F : Role of Inducible Co-Stimulator (ICOS) in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, **20**(2),141-50
23. MARAFIOTI T, PATERSON JC, BALLABIO E, et al. The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation. *Haematologica*, 2010, **95**(3),432-39.
24. BUONFIGLIO D : Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eur J Immunol*, 1999, **29**(9),2863-74.
25. DOWNS-CANNER S : Suppressive IL-17A+Foxp3+ and ex-Th17 IL-17AnegFoxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nat Commun*, 2017, **8**,14649.
26. GESKIN LJ : Therapeutic reduction of cell-mediated immunosuppression in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Cancer Immunol Immunother Cll*, 2018, **67**(3),423-34.
27. NI X : Reduction of regulatory T cells by Mogamulizumab, a defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 antibody, in patients with aggressive/refractory mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2015, **21**(2),274-85.
28. WILLEMZE R : The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*, 2019, **133**(16),1703-14.
29. OLSEN EA : Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 2011, **29**(18),2598-607. doi:10.1200/JCO.2010.32.0630

30. LE K-S : Follicular B Lymphomas Generate Regulatory T Cells via the ICOS/ICOSL Pathway and Are Susceptible to Treatment by Anti-ICOS/ICOSL Therapy. *Cancer Res*, 2016, **76**(16),4648-60.
31. TOWNSEND EC : The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell*, 2016, **29**(4),574-86.
32. RUBIO GONZALEZ B : Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Curr Opin Oncol*, 2016, **28**(1),88-96.
33. VERGIER B : Statistical evaluation of diagnostic and prognostic features of CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 65 cases. *Am J Surg Pathol*. 1998, **22**(10),1192-202.
34. NELSON MH, : The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. *J Immunol Baltim Md 1950*, 2015, **194**(4),1737-47.
35. FAGET J : ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res*, 2012,**72**(23),6130-41.
36. NAGASE H : ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with Helicobacter pylori. *Int J Cancer*, 2017, **140**(3),686-95.
37. GIRALDO NA :Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2017, **23**(15):4416-28.
38. ILIADIS A : The cellular microenvironment and neoplastic population in mycosis fungoides skin lesions: a clinicopathological correlation. *Eur J Dermatol EJD*, 2016, **26**(6):566-71.
39. MARIE-CARDINE A : IPH4102, a humanized KIR3DL2 antibody with potent activity against cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res*, 2014, **74**,6060-70.
40. WALLIN JJ : Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J Immunol Baltim Md 1950*, 2001, **167**(1),132-39.
41. KLINGENBERG R : Endothelial inducible costimulator ligand expression is increased during human cardiac allograft rejection and regulates endothelial cell-dependent allo-activation of CD8+ T cells *in vitro*. *Eur J Immunol*, 2005, **35**(6):1712-21.
42. SCHENK AD : Effector functions of donor-reactive CD8 memory T cells are dependent on ICOS induced during division in cardiac grafts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*, 2009, **9**(1),64-73.
43. DAN N : Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Chemistry to Clinical Implications. *Pharm Basel Switz*, 2018, **11**(2).

44. KHERA E : Pharmacokinetic and Immunological Considerations for Expanding the Therapeutic Window of Next-Generation Antibody-Drug Conjugates. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*, 2018, **32**(5):465-80
45. LEMONNIER F : Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood*, 2012, **120**(7):1466-69.
46. MOURAD N : Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood*, 2008, **111**(9):4463-70.

# LES ORGANOÏDES : UN MODÈLE DE CHOIX POUR REPRODUIRE LES CARACTÉRISTIQUES HISTOLOGIQUES DU TISSU D'ORIGINE

TRAVERSARI Eddy<sup>3</sup>, BONNET Julien<sup>3</sup>, SAUBIN Manon<sup>1,2</sup>, TRIAIRE Simon<sup>1,2</sup>, POIZAT Flora<sup>4</sup>, RATONE Jean-Philippe<sup>5</sup>, DAHEL Yanis<sup>5</sup>, CAILLOL Fabrice<sup>5</sup>, PESENTI Christian<sup>5</sup>, COMITI Olivier<sup>5</sup>, HOIBIAN Solène<sup>5</sup>, GIOVANNINI Marc<sup>5</sup>, DE CHAISEMARTIN Cecile<sup>3</sup>, TURRINI Olivier<sup>3</sup>, GINESTIER Christophe<sup>1,2</sup>, CHARAFE-JAUFFRET Emmanuelle<sup>1,2</sup>, GUASCH Géraldine<sup>1,2</sup>, CHEVRIER Véronique<sup>1,2\*</sup>

\*veronique.chevrier@inserm.fr

1. Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, Platform 3D-Hub-O, 27 BVD Lei Roure, 13273, Marseille Cedex09, France
2. Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, équipe cellules souches et cancer, 27 BVD Lei Roure, 13273, Marseille Cedex09, France
3. Department of surgical oncology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France
4. Department of Biopathology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France
5. Department of Gastro-enterology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France

# ORGANOIDS: RELEVANT MODEL TO REPRODUCE THE HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TISSUE

## ABSTRACT

Organoids are three-dimensional (3D) multicellular structures that reproduce *in vitro* the micro-anatomy and at least one organ function. This organ model is obtained from one or more stem cells which in our studies are adult stem cells. These organoids are 3D structures that develop when stem cells are in appropriate environmental conditions that will allow them to organize and differentiate with morphological properties similar to their tissues or organs of origin.

Organoids derived from patient carcinomas (also known as tumoroids) are phenotypically and genotypically similar to their cognate tumor from which they are derived. They reproduce the cell tumor heterogeneity found in tumors.

In this paper, organoids are produced using two different techniques such as air-liquid interface culture or droplet culture and then analyzed by histology or immunofluorescence techniques. We have shown that organoids developed from various parts of murine stomach transition zone or human mammary gland, are histologically similar to their tissues of origin and retain the molecular characteristics.

Tumoroids derived from biopsies of patients with rectum cancer reproduce the stage of differentiation of the original tumor ranging from high-grade dysplasia to low-differentiated adenocarcinoma.

Thus, organoids derived from healthy or diseased tissues are new tools to model diseases from patient samples or mouse models. Organoids will be a key player in the development of pre-clinical assay with the possibility to test new therapies before proposing clinical trials.

## KEY WORDS

**Organoids, tumoroids, histology, microscopy**



## RESUME

Les organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles (3D) qui reproduisent *in vitro* la micro-anatomie et au moins une fonction d'organe. Ce modèle d'organe est obtenu à partir d'une ou plusieurs cellules souches qui dans nos études sont des cellules souches adultes. Ces organoïdes se développent quand les cellules souches sont dans des conditions environnementales appropriées qui vont leur permettre de s'organiser et de se différencier avec une morphologie semblable aux tissus ou aux organes dont elles proviennent. Les organoïdes dérivés de tumeurs de patients (aussi appelés tumoroïdes) sont similaires phénotypiquement et génotypiquement aux épithéliums tumoraux dont ils sont issus. Ils reproduisent l'hétérogénéité tumorale retrouvée au sein des tumeurs.

Dans cet article, des organoïdes sont produits à l'aide de deux techniques différentes que sont la culture à l'interface Air-Liquide et la technique de la goutte immergée, puis analysés par des techniques d'histologie ou d'immunofluorescence. Nous montrons que les organoïdes développés à partir de diverses parties de la zone transitionnelle de l'estomac de souris ou de glande mammaire humaine ressemblent histologiquement à leurs tissus d'origine.

Des tumoroïdes dérivés à partir de biopsies de patients atteints de cancer du rectum vont reproduire le stade de différenciation de la tumeur d'origine allant de la dysplasie de haut grade à l'adénocarcinome peu différencié.

Ainsi les organoïdes dérivés de tissus sains ou pathologiques sont de nouveaux modèles d'étude qui permettent de modéliser des maladies pour les étudier dans un environnement humain ou murin tridimensionnel et fonctionnel, et ce, avec des cellules spécifiques d'un patient ou avec des cellules de modèles murins. Les organoïdes seront un atout majeur dans le développement d'essai préclinique permettant de tester de nouvelles thérapies sur des organoïdes pathologiques humains avant de proposer des essais cliniques chez l'homme.

## MOTS CLÉS

**Organoïdes, tumoroïdes, histologie, microscopie**

## INTRODUCTION

Ces dernières années ont permis de voir l'émergence de nouveaux modèles de culture en 3 dimensions : les organoïdes. Ces organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles qui reproduisent *in vitro* la micro-anatomie d'un organe. L'organoïde doit mimer les fonctions de base des organes correspondants. Ces mini-organes sont obtenus à partir d'une ou plusieurs cellules souches qui proviennent soit de cellules souches embryonnaires, soit de cellules souches pluripotentes induites ou de cellules souches adultes. Ces cellules vont s'auto-organiser en 3 dimensions grâce à leurs propriétés d'adhésion, puis proliférer et se différencier lorsqu'elles sont dans des conditions environnementales appropriées [1]. Les capacités d'auto-renouvellement des cellules souches assurent la pérennité de la culture.

Les organoïdes développés à partir de cellules souches adultes sont spécifiques du tissu dont ils sont issus. Les caractéristiques physiques et biochimiques de l'environnement de culture sont importantes pour le développement des organoïdes car il tend à reproduire la niche où les cellules souches résident normalement *in vivo*. Les organoïdes sont principalement produits à partir de deux techniques : la technique à l'interface Air-Liquide (ALI) sur filtre ou la technique de la goutte immergée [2]. Dans la technique ALI, le tissu est émincé puis enrobé dans du collagène avant d'être déposé sur un filtre alors que dans la technique en goutte immergée, les cellules souches sont obtenues après dissociation enzymatique du tissu, elles peuvent être isolées par la technique du FACS, puis enrobées dans des matrices 3D [3]. Ainsi dans la première technique, les organoïdes sont composés non seulement de cellules épithéliales mais aussi de cellules du microenvironnement. Ce système permet la préservation du microenvironnement pour au moins 1 mois. Dans la technique de la goutte immergée, seules les cellules souches vont permettre le développement d'organoïdes alors que les cellules du microenvironnement disparaissent au fur et à mesure des passages [4]. Ces cellules souches doivent être cultivées dans un milieu de culture complexe enrichi en facteurs de croissance spécifiques pour chaque organe. Ce milieu a pour but de reproduire les facteurs de la niche du tissu initial.

Nous avons précédemment développé des organoïdes à partir de diverses parties de la zone ano-rectale (épithélium glandulaire du rectum, épithéliums stratifiés des zones de transition épithéliales (ZT) ainsi que du canal anal) [5]. Les zones de transition représentent une transition abrupte entre deux types d'épithélium. Ces zones de transition sont déterminantes pour l'étude de l'initiation des cancers car

ces régions développent fréquemment des cancers de très mauvais pronostic à tendance métastatique. La transition d'un épithélium à l'autre peut être facilement détectée histologiquement et moléculairement car les épithéliums expriment des protéines spécifiques telles que la cytokératine 17 (cellules de la ZT), la cytokératine 14 pour l'épithélium stratifié du canal anal et la cytokératine 8 pour l'épithélium rectal glandulaire. Nous avons précédemment montré que ces organoïdes ressemblaient à leurs tissus d'origine [1].

Les organoïdes dérivés de tumeurs de patients (aussi appelés tumoroïdes) sont similaires phénotypiquement et génotypiquement aux épithéliums tumoraux dont ils sont issus. Ils reproduisent l'hétérogénéité tumorale retrouvée au sein des tumeurs [6].

Dans cette étude, nous montrons que des organoïdes dérivés de différents tissus sains ou tumoraux tels que la glande mammaire, la zone de transition œsogastrique ainsi que le rectum, miment leur tissu d'origine.

## MATERIELS ET METHODES

### Echantillons humains

Les tissus de rectum sont obtenus de patients subissant des biopsies sous endoscopie lors d'examen diagnostique à l'Institut Paoli-Calmettes (IPC, Marseille, France). Les patients sont informés et donnent leur consentement pour participer à une étude de recherche qui a été préalablement soumise à l'autorisation du Comité de Protection de Personnes Ouest II et diffusé auprès de l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ANSM) pour information (protocole RBC#2015-021TZ).

Des échantillons de mammoplastie de trois femmes âgées de 20 à 43 ans proviennent de l'Hôpital de la Conception selon les protocoles IRB approuvés de l'Institut Paoli-Calmettes (Marseille, France) pour la recherche sur des sujets humains [8].

### Modèle murin

Les souris sont hébergées dans une animalerie de statut SPF. Toutes les expériences ont été approuvées par la réglementation européenne et nationale (Protocoles N° 4572, 8287 et 2244).

### Culture organoïde à l'interface Air-Liquide

Les filtres (PICM03050, Millicell-CM, Millipore) sont insérés dans des boîtes de Pétri

(35X10mm, 353001, Falcon) [7]. Des matrices de gel de collagène sont préparées et déposées sur le filtre en mélangeant la matrice de collagène (Cellmatrix de type I-A, W1W637-00653, Sobioda) avec un milieu de culture stérile concentré 10 X (DMEM / F-12, 12500096, Life Technologies) et un tampon de reconstitution stérile (2,2 g de NaHCO<sub>3</sub>, 478537, Carlo-Erba dans 100 mL de NaOH 0,05 N, 1310-73-2, Carlo-Erba et HEPES 200 mM, 15630056, Life Technologies) à un ratio de 8:1:1. Ce collagène reconstitué avec la solution est conservé sur de la glace (4°C) pour empêcher la solidification du gel jusqu'à ce qu'il soit déposé sur le filtre. Un mL de solution de collagène reconstitué est ajouté au filtre dans des conditions stériles, servant de couche inférieure sans tissu. Cette couche inférieure solidifie pendant 30 min à 37°C. Le tissu provenant de biopsies humaines est émincé, mélangé à 1 mL de solution de collagène reconstitué puis déposé sur le filtre et l'ensemble est incubé 30 min à 37°C puis le milieu de culture décrit précédemment [5] est ajouté autour du filtre préalablement disposé dans la boîte de Pétri.

### **Culture organoïde en goutte immergée à partir de biopsies**

Le tissu provenant de biopsies humaines est émincé, lavé 2 fois en PBS 1X (14190094, Life Technologies) puis dissocié 20 min à 37°C sous agitation dans le tampon de digestion (1mL DMEM, 41965062, Life Technologies+ 2,5% sérum de veau fœtal (SVF), F7524 Life Technologies + 150 µL Collagénase 20%, C2674, Sigma + 1 mL Dispase, 17105-041 ThermoFischer). Un volume de 12,5 µL de DNase (89836, ThermoFischer) est ajouté pendant 10 min à 37°C sous agitation. L'échantillon est resuspendu dans 50 mL de PBS froid, centrifugé 5 min à 4°C à 200g. Les culots sont repris dans 20 mL de PBS puis passés sur filtre de 70 µm (352350, Falcon). Sont ajoutés au filtrat 200 µL de SVF. Les tissus ou amas de cellules restés sur le filtre sont dissociés avec 2 mL de TrypLE Express (12605010, Life Technologies) et incubés à 37°C pendant 5 min. L'action de l'enzyme est arrêtée par ajout de 9 mL de milieu *Complete AdDF Medium* [Advanced DMEM/ F12 (12634010, Life Technologies) Glutamax 1X (35050061, Life Technologies) HEPES 10 mM (15630080, Life Technologies) Pénicilline-streptomycine 100 U/ml (15140122, Life Technologies)] + 2,5% SVF (A5209401, Life Technologies). L'ensemble est ensuite passé sur un filtre de 40 µm puis centrifugé à 200g pendant 5 min à 4°C, le culot étant resuspendu dans 1 mL *Complete AdDF Medium* et les cellules sont comptées. Pour la réa-lisation d'organoïdes tumoraux et sains, le culot cellulaire est re-suspendu dans du Matrigel (356231, Corning) afin d'obtenir un ratio de 1000 à 50000 cellules par goutte de 25 µL de Matrigel. Ces gouttes sont placées au centre des puits d'une plaque de culture de 48 puits préalablement chauffée à 37°C. Après une période de solidification du Matrigel pendant 10 min

dans un incubateur à 37°C 5% CO<sub>2</sub>, la goutte est recouverte par 300 µL de milieu de culture supplémenté par 10 µM de Y-27632 (durant les 5 premiers jours). Les milieux de culture pour les organoïdes de glande mammaire [8] et les organoïdes de rectum [5] ont été antérieurement décrits.

## Histologie

Les organoïdes sont prélevés puis fixés 1 h à 4°C en PBS (14190094, Life Technologies) 4% PFA (28908, Life Technologies). Après 2 lavages en PBS, ils sont inclus en gélatine-sucrose (DPBS 1 X, Gélatine 7,5% (G7765-1L, Sigma), Sucre 15% (S7903-1KG, Sigma)) et coupés au cryostat (Cryostar NX70, Leica).

Les organoïdes peuvent aussi être inclus en PBS 2% Agarose (R0801, Thermo Scientific) 20 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite déposés dans une cassette, incubés 24h en formol (252549, Sigma), déshydratés et imprégnés avec le processeur de tissu (ASP300S, Leica) puis inclus en paraffine (EG1150H, Leica).

La plateforme ICEP (Ipc Crcm Experimental Pathology) réalise les inclusions en paraffine, les coupes au microtome Leica de 4 µm ainsi que les colorations HES à partir des échantillons inclus en paraffine ou en gélatine-sucrose. La coloration HES est composée d'hématoxyline colorant les noyaux en violet, d'éosine colorant le cytoplasme en rose et de Safran colorant le collagène en jaune.

## Immunofluorescence

Après un déparaffinage suivi d'un démasquage antigénique à pH6 pour les organoïdes inclus en paraffine, ou décongélation pour les organoïdes inclus en gélatine-sucrose, les coupes sont lavées 3 fois dans du PBS 1X et perméabilisées dans du PBS 1X, 0,1% Triton X-100 (9036-19-5, Merck) pendant 10 min. Une solution de saturation des sites non spécifiques est alors appliquée pendant 30 min à température ambiante (Gélatine Block : 40% Gélatine (G7765, Merck) 1% BSA (04-110-812-F, Euromedex) 0,1% Triton X-100, 1,5% Sérum normal de chèvre (005-000-121, Jackson Immuno Research) et 1,5% Sérum normal d'âne (017-000-121, Jackson Immuno Research) afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps. Les anticorps primaires (**Tableau I**) dilués dans le tampon Gélatine Block sont déposés sur les coupes et incubés la nuit à 4°C. Les coupes sont lavées 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS 0,1% Triton X-100 avant ajout des anticorps secondaires (**Tableau II**) et du DAPI (D9542, Merck) dilués dans le tampon Gélatine Block pendant 30 minutes à température ambiante. Trois nouveaux lavages de 5 minutes dans du PBS 0,1% Triton X-100 sont alors réalisés avant le montage des lames avec du Prolong

Antifade (P36934, Life Technologies). Les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Les images fluorescentes sont acquises à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 880. Toutes les images sont analysées à l'aide du logiciel ZEN.

Anticorps primaire	Référence	Hôte	Réactivité	Fournisseur	Dilution
Anti - alpha Smooth Muscle Actin aSMA	MA5-11547	Souris	Humain	ThermoFisher	1/200e
Anti - CD3	130-113-138	Humain	Humain	Miltenyi	1/200e
Anti - CD44v6	BBA13	Souris	Humain	R&D	1/50e
Anti - Cytokératine 8 (CK8)	TROMA-I	Rat	Humain/ Souris	DHSB	1/200e
Anti - Cytokératine 14 (CK14)	MAB3232	Souris	Humain	Millipore	1/200e
Anti - Cytokératine 17 (CK17)	Ab-53707	Lapin	Humain/ Souris	Abcam	1/20000e
Anti - OLFM4	D1E4M	Lapin	Humain	Cell Signaling	1/100e

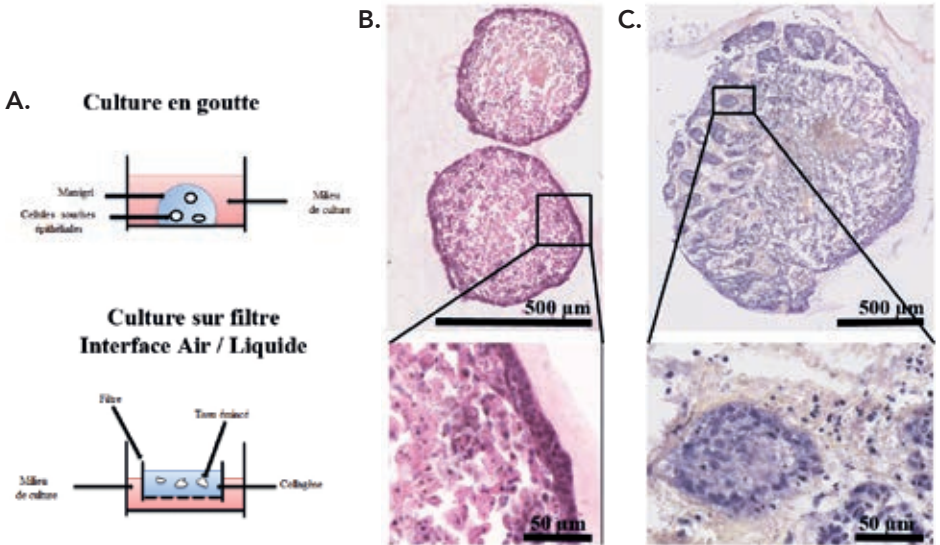
**Tableau I :** Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

Anticorps secondaires	Couplé à	Référence	Fournisseur	Dilution
Anti - lapin	Alexa 488	711-546-152	Jackson Immuno Research	1/1000e
Anti - souris	Alexa 488	715-546-151	Jackson Immuno Research	1/1000e
Anti - humain	Alexa 488	709-546-149	Jackson Immuno Research	1/1000e
Anti - rat	Cyanine 3	712-166-153	Jackson Immuno Research	1/1000e
Anti - souris	Cyanine 3	715-166-151	Jackson Immuno Research	1/1000e
Anti - lapin	Alexa 647	711-606-152	Jackson Immuno Research	1/1000e
Anti - rat	Alexa 647	712-606-153	Jackson Immuno Research	1/1000e

**Tableau II :** Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

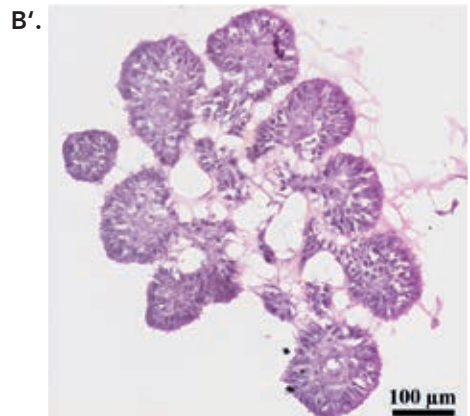
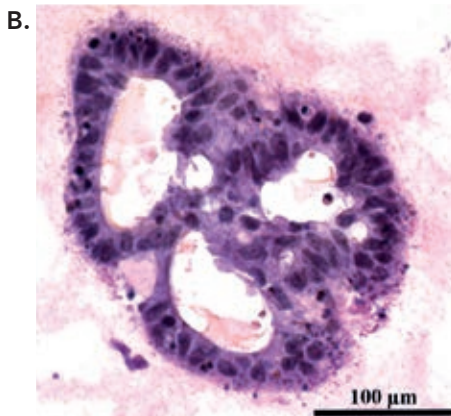
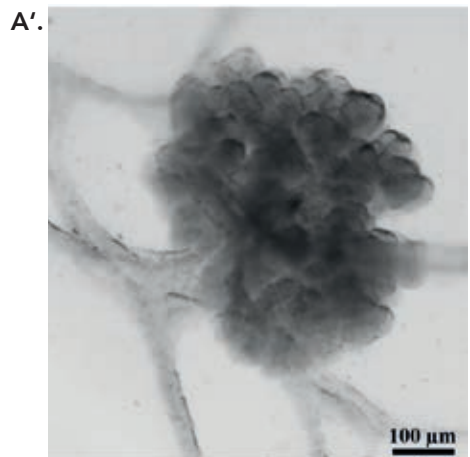
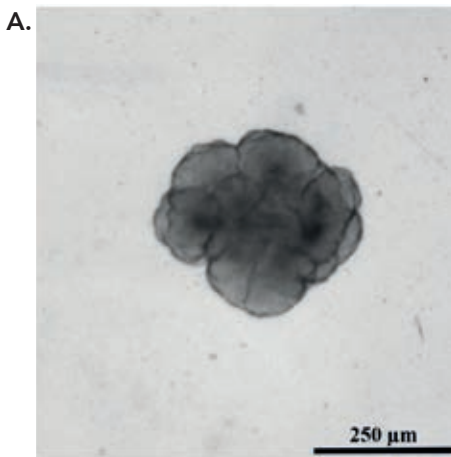
## RESULTATS

Différentes techniques de culture en 3 dimensions pour produire des organoïdes ont été développées ces dernières années. Les deux principales que nous utilisons sont d'une part la technique de la goutte immergée et d'autre part la technique à l'interface Air-Liquide sur filtre. Ces cultures reflètent l'identité de l'organe correspondant (**Figure 1A**). La technique en goutte où seules les cellules épithéliales sont présentes (**Figure 1B**), possède l'avantage d'une culture sur le long terme. Les organoïdes peuvent de plus être cryo-préservés et manipulés génétiquement. L'intérêt de la technique à l'interface Air-Liquide sur filtre est que ce modèle d'organoïde contient non seulement les cellules épithéliales mais aussi des cellules du microenvironnement (comme des fibroblastes, des cellules immunes) reflétant la structure native du tissu d'origine (**Figure 1C**).

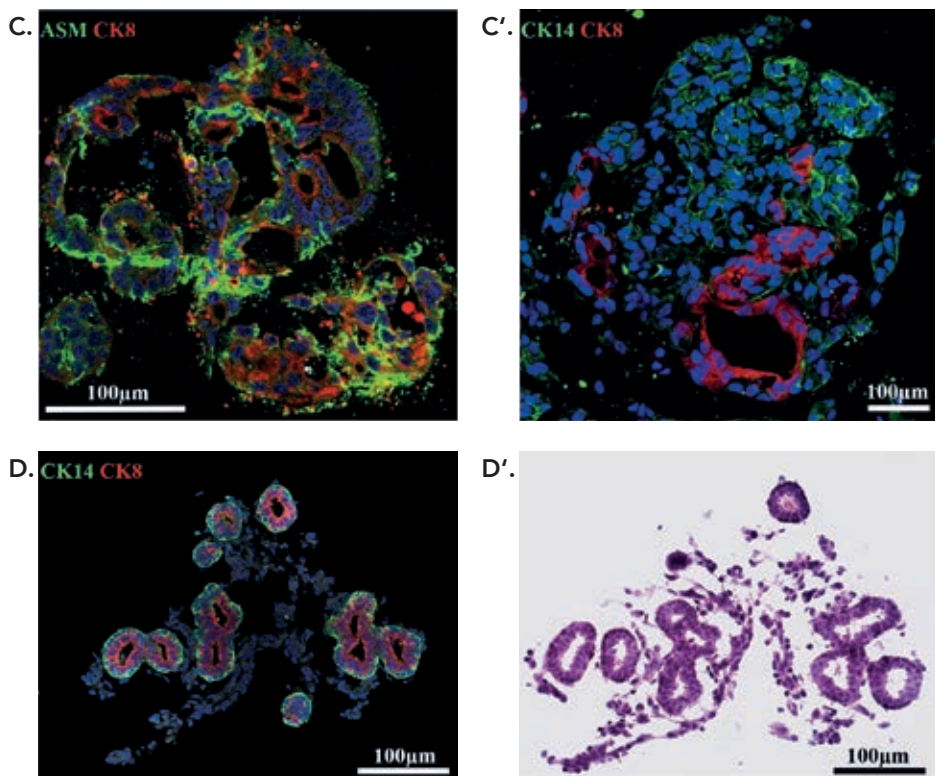


**Figure 1 :** A. Représentation schématique des 2 principales techniques de culture d'organoïdes : soit la technique de la goutte immergée qui contient uniquement les cellules épithéliales enrobées dans du Matrigel, soit la culture à l'interface Air-Liquide (ALI) qui est une technique plus organotypique contenant non seulement les cellules épithéliales mais aussi les cellules du microenvironnement (stroma et cellules immunitaires). L'analyse des organoïdes de zones de transition anorectales de souris [4] après coloration HES (Hémaroxyline-Eosine-Safran) montre la présence unique de cellules épithéliales dans la technique de la goutte immergée (B) alors que la technique du filtre permet de préserver le microenvironnement des cellules avec la présence du stroma et des cellules immunitaires (C).

Dans le laboratoire, nous avons expérimenté la culture d'organoïdes de différentes origines tissulaires. Les organoïdes issus de cellules souches isolées à partir de glande mammaire provenant d'une patiente saine montrent une structure lobulaire très branchée avec des canaux intra-lobulaires (**Figures 2A et 2B**). L'analyse en immunofluorescence révèle la présence d'acinis composés de cellules épithéliales glandulaires (cytokératine 8) entourées de cellules myoépithéliales (cytokératine 14 et Smooth Muscle Actin) (**Figure 2C**). Bien qu'ayant des structures moins organisées que le tissu initial (**Figure 2D**), les organoïdes reproduisent les caractéristiques moléculaires du tissu d'origine.



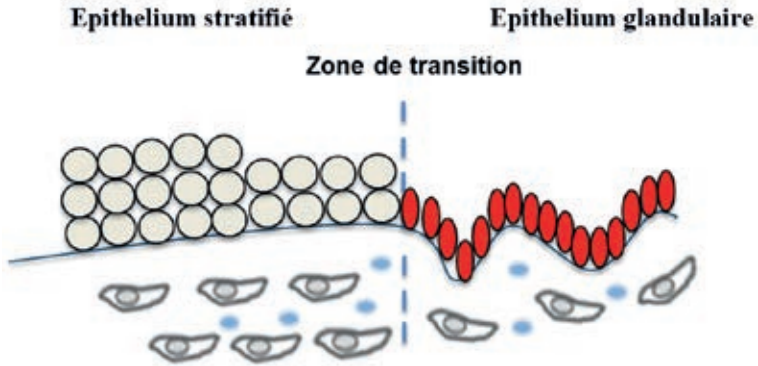




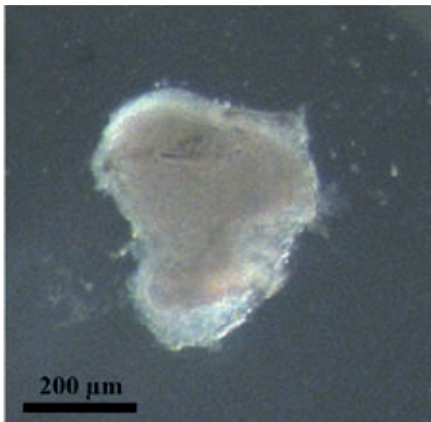
**Figure 2** : Organoïdes de seins humains (A, B, C, C') ou de la lignée cellulaire épithéliale mammaire HME (A', B') par comparaison avec le tissu original (D et D'). A et A' sont des images prises en champ clair. Histologie représentant des coupes d'organoïdes (B, B') ou de tissu (D') après colorations H.E.S (Hématoxyline-Eosine-Safran). Les organoïdes en C et C' expriment la cytokératine 8 (CK8) ainsi que l'actine du muscle lisse (aSMA) ou la cytokératine 14 (CK14) révélant la présence des cellules matures luminales (CK8) ainsi que les cellules myoépithéliales (CK14, ASM). Ces cellules sont présentes dans le tissu original en D.

La transition d'un épithélium stratifié à un épithélium glandulaire peut être facilement détectée histologiquement. Les organoïdes de la zone de transition œsogastrique montrent d'une part un épithélium malpighien stratifié et d'autre part un épithélium en simple couche de cellules mucipares (**Figures 3A-3C et 3E**). Ces organoïdes conservent aussi les caractéristiques moléculaires car les épithéliums expriment des protéines spécifiques telles que la cytokératine 17 pour les cellules de la zone de transition et la cytokératine 8 pour l'épithélium glandulaire (**Figure 3D**). Ces organoïdes possèdent une zone de transition bien organisée.

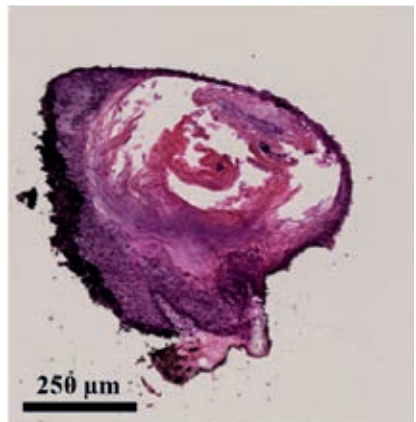
A.



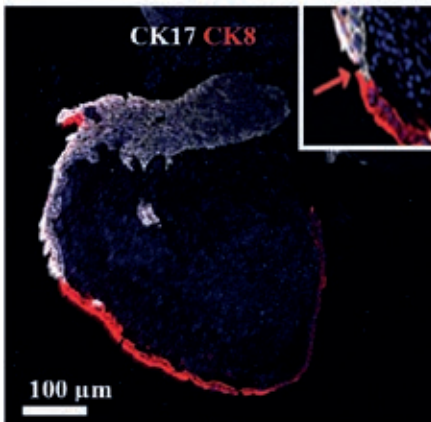
B.



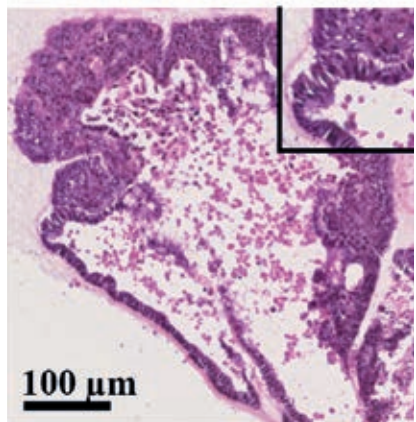
C.



D.



E.



**Figure 3** : Caractérisation d'organoïdes de la zone de transition d'estomac de souris.

(A) Représentation schématique de la zone de transition entre un épithélium stratifié et un épithélium glandulaire. (B) Images en champ clair d'un organoïde de zone de transition poussant en culture ALI ainsi que la coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) de ce même organoïde après fixation et inclusion en gélatine-sucrose (C). Images comparatives en immunofluorescence (D) et en HES (E) montrant la zone de transition avec les cellules épithéliales stratifiées marquées par un anticorps anti-cytokératine 17 (CK17) et les cellules glandulaires marquées par un anticorps anti-cytokératine 8 (CK8).

Dans le but d'étudier les différentes phases de l'oncogenèse, nous avons établi une bio-banque d'organoïdes de rectum, issue de biopsies saines ou tumorales de patients. Les organoïdes cultivés selon la technique de la goutte immergée, présentent les mêmes caractéristiques histologiques que les biopsies initiales avec un panel allant du normal, passant par des dysplasies de haut grade jusqu'à des adénocarcinomes pouvant être bien, moyennement ou peu différenciés (**Figure 4**). Les tumoroides non seulement reproduisent le grade histologique mais ils conservent aussi le caractère de différenciation observés dans les tumeurs initiales. Ainsi, l'hétérogénéité des cancers du rectum peut être analysée grâce aux cultures d'organoïdes. Dans cette étude, deux marqueurs de cellules souches cancéreuses (OLFM4 et CD44v6) présents dans les biopsies tumorales de rectum (**Figure 5A**) sont retrouvés dans les organoïdes issus de ces biopsies (**Figure 5B**).

La technique de production d'organoïdes à l'interface Air-Liquide permet de garder le microenvironnement tumoral. Les tissus présentent un épithélium tumoral et des cellules inflammatoires (**Figure 5C'**). Ainsi sur des tumoroides de rectum, les cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T (marqués par un anticorps anti-CD3) sont retrouvées dans les organoïdes (**Figure 5C**).

## DISCUSSION

Nous avons démontré la faisabilité de générer des organoïdes de différents tissus incluant différents sous-types moléculaires et différents stades de progression de la maladie. Les organoïdes conservent le phénotype initialement trouvé dans le tissu d'origine.

Quelques bio-banques de culture d'organoïdes ont été précédemment établies à partir de cancers variés [4, 9]. Ces cultures d'organoïdes peuvent potentiellement

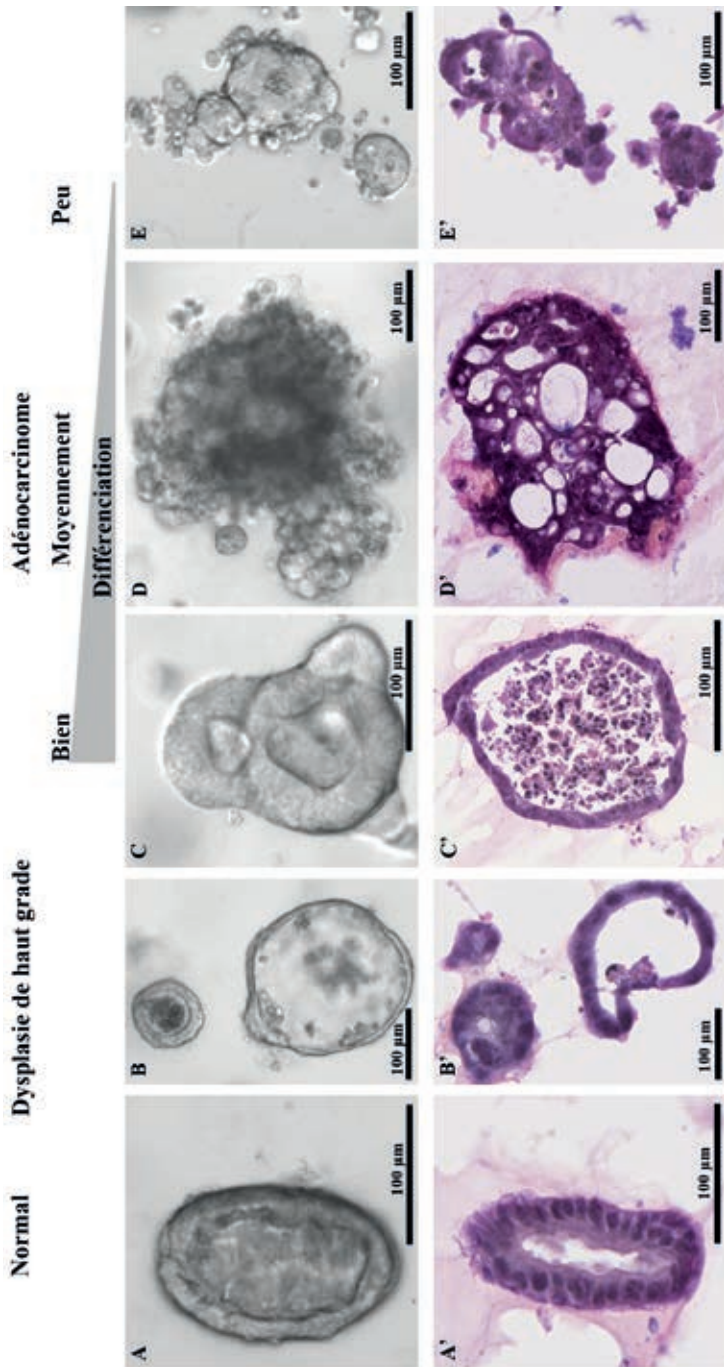
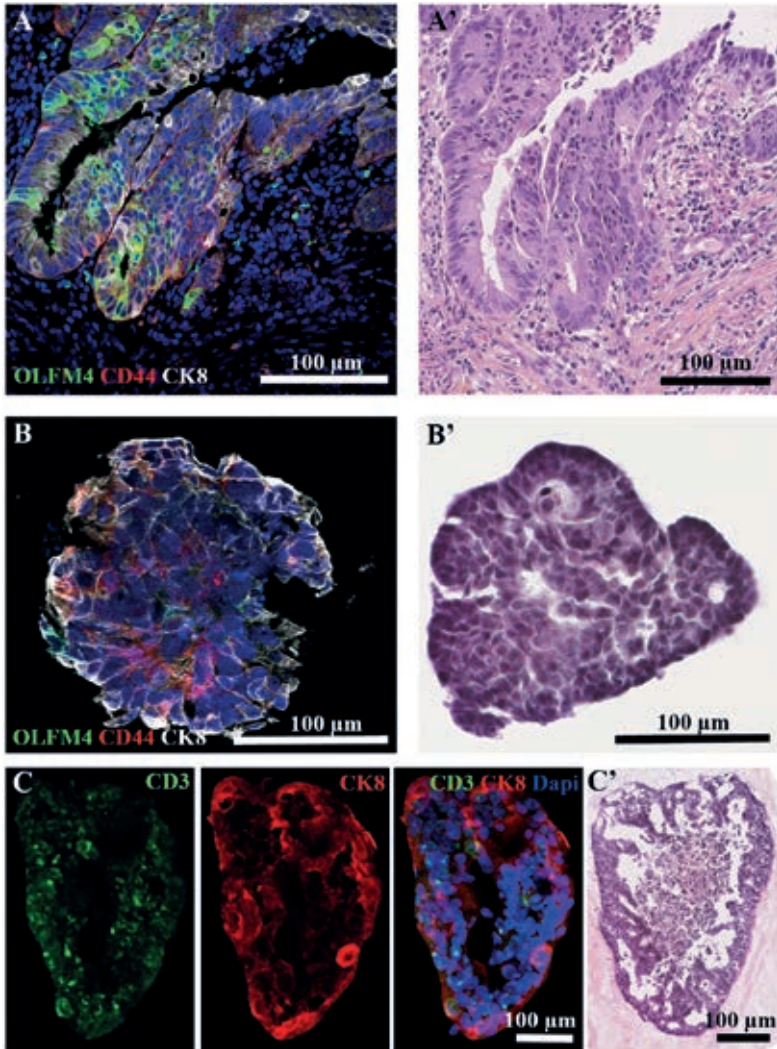


Figure 4 : Etablissement d'une biobanque d'organoïdes de rectum dérivés de patients. A, B, C, D, E. Organoïdes observés en microscopie à champ clair à partir de biopsie de patients. L'analyse des biopsies après coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) montre différents stades de différenciation allant du tissu normal (A) passant par la dysplasie de haut grade (B') jusqu'aux adénocarcinomes bien (C'), moyennement (D') ou peu différenciés (E').



**Figure 5 :** Caractérisation des tumoroïdes de rectum humain par immunofluorescence. L'analyse de marqueurs de cellules souches cancéreuses tels que OLFM4 et CD44v6 présents dans la biopsie initiale (A) montre la conservation de ces marqueurs dans ces tumoroïdes obtenus par la technique de la goutte immergée (B). Grâce à la technique de culture à l'interface Air-Liquide qui maintient le microenvironnement, la présence de lymphocytes au sein du tumoroïde est révélée par un anticorps anti-CD3 spécifique des lymphocytes T (C). La cytokératine 8 (CK8) marque les cellules épithéliales.

servir d'outils précieux pour étudier les rôles fonctionnels des gènes-clés et leurs conséquences sur le développement tumoral.

Notre bio-banque d'organoïdes de rectum va permettre à l'avenir d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse des cancers du rectum au traitement néoadjuvant car actuellement il n'existe pas de biomarqueurs pertinents pour analyser l'efficacité des chimiothérapies. Ces organoïdes, issus de biopsies, vont permettre de réaliser des tests prédictifs au traitement afin de proposer une stratégie de traitement personnalisée et d'accélérer le développement de drogues anti-cancéreuses. Le développement de nouvelles thérapies pour les cancers a été limité par la difficulté de mener des essais cliniques. Les tests de chimiothérapie sur les organoïdes tumoraux pourraient contribuer au développement d'essais précliniques facilitant la sélection des nouveaux traitements à tester lors d'essais cliniques. La technologie des organoïdes va permettre le développement de stratégies de médecine personnalisée afin d'adapter le traitement à la biologie d'une tumeur donnée.

La technologie de production d'organoïdes à l'interface Air-Liquide qui contient l'épithélium tumoral ainsi que le système immunitaire endogène va permettre de développer de nouvelles études d'immuno-oncologie et ouvrir les portes à des tests d'immunothérapie personnalisée indispensables pour orienter le traitement.

## CONCLUSION

Une fois établis, les organoïdes peuvent être cultivés à long terme, cryo-conservés et manipulés génétiquement comme les lignées cellulaires 2D traditionnelles mais avec l'avantage de présenter une complexité tissulaire les rapprochant de l'organisation du tissu d'origine. À ce titre, ces organoïdes combinent la traçabilité des systèmes *in vitro* avec l'architecture 3D et la différenciation des organismes modèles *in vivo*. Ils se présentent comme un atout majeur dans le développement des protocoles de médecine personnalisée de demain.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FUJII M. and SATO T. Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nature Mater.* 2021, Feb; **20**(2), 156-169.
2. LI X., OOTANI A. & KUO C. An Air-Liquid interface culture system for 3D organoid culture of diverse primary gastrointestinal tissues. *Methods Mol Biol.* 2016, 1422-33.

3. SATO T., STANGE D., FERRANTE M., VRIES R., VAN ES J., VAN DEN BRINK S., VAN HOUTD W., PRONK A., VAN GORP J., SIERSEMA P. & CLEVERS H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011, **141**, 1762-1772.
4. LO Y.H., KARLSSON K. & KUO C.J. Applications of Organoids for Cancer Biology and Precision Medicine. *Nat Cancer*. 2020,**1**(8) 761-773.
5. MITOYAN L., CHEVRIER V., HERNANDEZ-VARGAS H., OLLIVIER A., HOMAYED Z., PANNEQUIN J., POIZAT F., DE BIASIS-CADOR C., CHARAFE-JAUFFRET E., GINESTIER C. & GUASCH G. A stem cell population at the anorectal junction maintains homeostasis and participates in tissue regeneration. *Nature Com*. 2021, May12. **12**(1)2761.
6. LESAVAGE B.L., SUHAR R.A., BROGUIERE N., LUTOF M.P.&HEILSHORN S.C. Next-generation cancer organoids. *Nature Mater*. 2022, **21**(2) 143-159.
7. LI X., NADAULD L., OOTANI A., CORNEY D.C., PAI R.K., GEVAERT O., CANTRELL M.A., RACK P.G., NEAL J.T., CHAN C.W., YEUNG T., GONG X., UAN J., WILHELMY J., ROBINE S., ATTARDI L., PLEVITIS S., HUNG K., CHEN C.Z., JI H.&KUO C.J. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat. Med*. 2014,**20** 769-777.
8. RICHART L., PICOD-CHEDOTEL M.-L., WASSEF M., MACARIO M., AFLAKI S., SALVADOR M.A., HERY T., DAUPHIN A., WICINSKI J., CHEVRIER V., PASTOR S., GUITTARD G., LE CAM S., KAMHAWI H., CASTELLANO R., GUASCH G., CHARAFE-JAUFFRET E., HEARD E., MARGUERON R. & GINESTIER C. XIST loss impairs mammary stem cell differentiation and increases tumorigenicity through Mediator hyperactivation. *Cell*.2022, **185**, 1-20.
9. DROST J. & CLEVERS H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer*. 2018, **18**(7) 407-418

## REMERCIEMENTS

Nous remercions la plateforme d'histopathologie ICEP pour avoir réalisé toutes les colorations HES ainsi que la plateforme imagerie MISC du CRCM. Toutes les cultures d'organoides ont été réalisées sur la plateforme organoïde 3D-Hub-O du CRCM, labélisée par le GIS IBIISA. Ces études ont été financées par l'INSERM, la fondation A\*Midex investissement d'avenir CapoStromEX, l'ANR 20-CE13-0009-01 et l'INCA N°2019-188. Remerciements au Canceropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur, à l'Institut National du Cancer et à la Région Sud pour le soutien financier apporté dans la réalisation de ce projet de recherche.





# PHÉNOTYPAGE D'ORGANOÏDES : APPORT D'UNE PLATEFORME INTÉGRÉE POUR LEUR CARACTÉRISATION

RIVIÈRE Julie\*, VILOTTE Marthe, BEVILACQUA Claudia, GIUFFRA Elisabetta,  
EGIDY-MASKOS Giorgia, BLANC Fany

*Plateforme @BRIDGe, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative  
(GABI), Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France*

\* auteur correspondant [julie.riviere@inrae.fr](mailto:julie.riviere@inrae.fr)

# PHENOTYPING OF ORGANOID: CONTRIBUTION OF AN INTEGRATED PLATFORM FOR THEIR CHARACTERIZATION

## ABSTRACT

Classical 2D *in vitro* cell cultures have shown their limits, and the development of "organotypic" cell cultures of epithelial tissues seems a good way to replace animal biopsies. Organoids are 3D organotypic cell cultures derived from animal tissue stem cells. Development of protocols for obtaining organoids from different organs is underway at INRAE in Jouy-en-Josas. Their characterization is an important step to verify cell differentiation.

At the Animal Genetics and Integrative Biology unit (INRAE UMR1313 GABI), the Genetics, Microbiota, Health (GeMS) team has developed the production of pig intestinal organoids. The @BRIDGe (Animal Biological Resources for Integrated and Digital Genomics) platform of the GABI unit brings its expertise in histology and molecular biology for the characterization of the organoids obtained by those production protocols.

## KEY WORDS

**Organoids, characterization, histology, molecular biology**

## RESUME

Les cultures cellulaires 2D *in vitro* classiques ont montré leurs limites, aussi, le développement de cultures cellulaires "organotypiques" de tissus épithéliaux trouvent toute leur place pour se substituer aux biopsies animales. Les organoïdes sont des cultures cellulaires organotypiques 3D dérivant de cellules souches de tissus animaux. Des mises au point de protocoles d'obtention d'organoïdes issus de différents organes sont en cours à INRAE (Jouy-en-Josas). Leur caractérisation est une étape importante pour vérifier la différenciation des cellules.

Dans l'unité de Génétique Animale et de Biologie Intégrative (INRAE UMR1313 GABI), l'équipe de Génétique, Microbiote, Santé (GeMS) a mis au point la production d'organoïdes intestinaux de porc. La plateforme @BRIDGe (Animal Biological Resources for Integrated and Digital Genomics) de l'unité GABI apporte son expertise en histologie et biologie moléculaire pour la caractérisation des organoïdes obtenus par ces protocoles de production.

## MOTS CLES

**Organoïdes, caractérisation, histologie, biologie moléculaire**

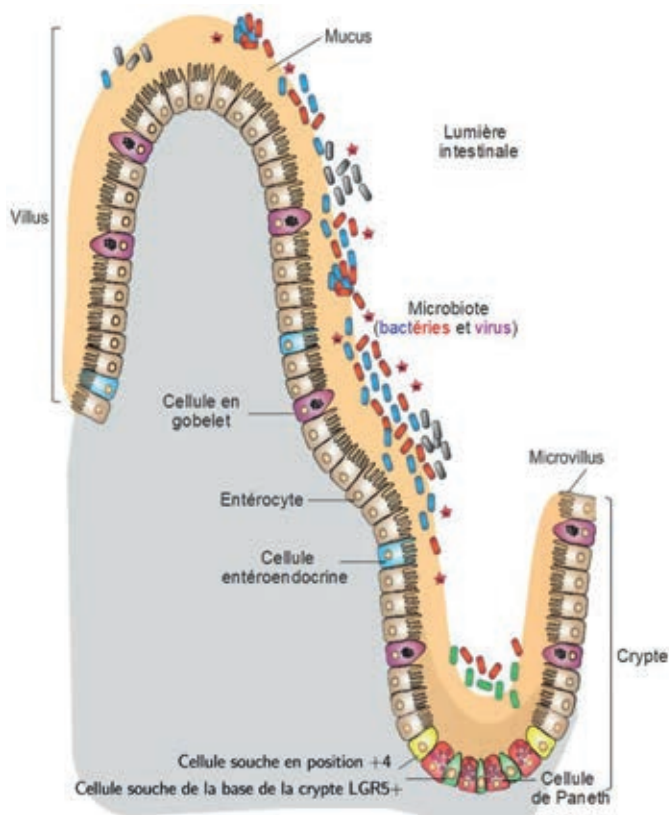
## INTRODUCTION

A l'INRAE de Jouy-en-Josas, la plateforme @BRIDGe de l'UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI) propose une offre intégrée de services de la conservation de l'échantillon biologique à son analyse au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire. Dédiée à la génomique des animaux domestiques, ses compétences et ses équipements lui permettent également de participer à des projets concernant la biologie humaine ou des modèles biomédicaux. Elle est certifiée ISO 9001:2015 depuis 2018 pour toutes ses activités ([www.abridge.inrae.fr](http://www.abridge.inrae.fr)).

L'équipe GeMS de l'unité GABI travaille entre autres sur le contrôle génétique de l'immunité et de l'immunocompétence. Une des thématiques de recherche est l'étude de l'architecture génétique des caractères de santé et de bien-être du porc et de la poule, en évaluant la capacité des animaux à effectuer une réponse immune efficace après infection par des pathogènes, vaccination ou bien lors du sevrage chez le porcelet. L'équipe GeMS mène des approches de génétique et de génomique fonctionnelle sur de grands dispositifs expérimentaux et développe également des méthodes de phénotypage *in vitro* (organoïdes, lignées cellulaires) (<https://www6.jouy.inrae.fr/gabi/Les-Recherches/Equipes-de-recherche/GeMS>).

Il apparaît important aujourd'hui de diminuer le nombre d'animaux sacrifiés pour des études biologiques. Les modèles de culture cellulaire *in vitro* en 2D ont trouvé leurs limites, aussi le développement de cultures cellulaires « organotypiques » en 3D de tissus épithéliaux (intestin, glande mammaire...) trouvent toute leur place pour se substituer aux biopsies animales. En effet, basée sur les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches du tissu, la culture d'organoïdes présente des possibilités de maintenance au long cours et de stockage par congélation. C'est pour cela que l'équipe GeMS a mis au point des protocoles de production d'organoïdes intestinaux de porc [1, 2].

L'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de différents types cellulaires qui assurent chacun un rôle spécifique dans l'homéostasie de l'organe (**Figure 1**).



**Figure 1 :**  
Schéma simplifié de l'épithélium intestinal.  
Œuvre dérivée de Wong et al. [3]

L'intestin grêle est composé de 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Son rôle principal est l'absorption des acides aminés, des lipides et des glucides. Afin d'amplifier ses capacités d'absorption, l'intestin grêle est structuré en villosités intestinales, elles-mêmes composées de différents types cellulaires : entérocytes, cellules caliciformes dites « en gobelet » productrices de mucus, cellules endocrines, cellules souches et cellules de Paneth, productrices de lysozymes.

Le côlon a quant à lui un rôle dans l'absorption d'eau et d'ions, d'acides gras et de vitamines synthétisés par les bactéries et un rôle dans la formation des matières fécales. Il n'a pas une structure d'amplification de l'absorption comme l'intestin grêle (absence de villi). Les cellules épithéliales du côlon, appelées colonocytes, ont pour principale source d'énergie le butyrate. On n'y trouve pas de cellules de Paneth, mais beaucoup de cellules caliciformes productrices de mucus.

Chaque type cellulaire ayant des caractéristiques particulières et un rôle qui lui est propre, les organoïdes produits doivent posséder les mêmes caractéristiques que l'organe d'origine. C'est pourquoi la caractérisation des organoïdes est une étape importante pour contrôler la différenciation des cellules.

Pour cela, la plateforme @BRIDGE apporte son expertise technique pour le contrôle de la nature de ces échantillons, d'une part par la caractérisation moléculaire de ces nouveaux échantillons, et d'autre part, par la caractérisation morphologique en histologie et immunofluorescence.

L'objectif de cet article est de présenter en détail la méthodologie appliquée dans le cadre d'un projet collaboratif avec une équipe de recherche de l'unité GABI visant à vérifier que les protocoles utilisés « en routine » sur la plateforme pouvaient être utilisés ou adaptés à ces petits échantillons particuliers.

## MATERIELS ET METHODES

### 1- Production des organoïdes

Les organoïdes ont été produits à partir de 3 sections d'intestin grêle : duodénum, jéjunum et iléon, ainsi qu'à partir de côlon de porcs de race Melanoma-Bearing Libechov Minipig (MeLiM) hébergés à proximité du laboratoire à Jouy-en-Josas.

Les conditions d'obtention et de culture des organoïdes ont été mises au point par l'équipe GeMS, d'après le protocole de van der Hee *et al.* [4]. Brièvement, pour chaque section intestinale, les biopsies d'intestin ont été identifiées, isolées et nettoyées au Phosphate Buffer Saline 1X (PBS 1X). Après dissociation du tissu pour obtenir les cellules souches pluripotentes, celles-ci ont été mises en culture dans du Matrigel pour l'obtention de structures 3D, et mises en présence de facteurs favorisant leur prolifération puis leur différenciation.

A l'issue de cette étape de culture par l'équipe de recherche, les échantillons ont été pris en charge par la plateforme @BRIDGE.

## 2- Préparation des échantillons pour leur analyse moléculaire

Les organoïdes cultivés en plaque 24 puits ont été isolés du Matrigel par pipettage en présence de PBS 1X froid, puis centrifugés afin d'obtenir un culot cellulaire. Le culot a été repris dans du Trizol puis l'extraction a été effectuée grâce au kit PicoPure d'Arcturus. La qualité et la quantité des ARN ont été ensuite vérifiées au nanodrop puis au Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies).

Afin d'optimiser les conditions de culture, la différenciation cellulaire des organoïdes a été étudiée à travers l'expression de certains gènes de différenciation. Les ARN des organoïdes ont été extraits à différents temps de culture : 3 jours (J3), 5 jours (J5) et 7 jours (J7) puis ces marqueurs de différenciation ont été analysés par PCR quantitative sur la plateforme. Les marqueurs choisis sont les suivants : *PCNA* (prolifération), *LGR5* (cellules souches), *MUC2* (cellules caliciformes), *VILLINE 1* (entérocytes), *LYZOZYME* (cellules de Paneth), *CHROMOGRANINE A* (cellules entéro-endocrines).

## 3- Préparation des échantillons pour les analyses histologiques

Les organoïdes cultivés en gouttes de Matrigel ont été rincés avec 1 mL de PBS 1X puis fixés 1h30 avec 900 µL de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) sur de la glace. Après fixation, les organoïdes ont été délicatement décollés du fond de la plaque à l'aide d'une pipette P1000 avec un cône à la pointe coupée. Ils ont ensuite été mis dans un tube de 2mL puis centrifugés 1 min à 2000 x g pour les culotter au fond du tube. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris avec 100 µL d'agarose 2% avec des mouvements de va-et-vient délicats à l'aide d'une pipette P200 à l'embout de cône coupé. La solution d'agarose a été conservée au bain marie à une température le gardant liquide (environ 70°C). Les tubes ont ensuite été placés dans la glace pour figer l'agarose, puis conservés au minimum 24h en éthanol 70% avec ajout d'éosine Y en poudre pour colorer les organoïdes et ainsi les rendre plus visibles dans la paraffine au moment de la coupe.

Les organoïdes pris en bloc d'agarose ont été mis en cassette puis déshydratés et enrobés en paraffine selon le protocole classique utilisé sur la plateforme @BRIDGE (Ethanol 80°, 2h ; Ethanol 95°, 2h ; Ethanol 100, 2h ; Xylène 2 x 2h, Paraffine 3 x 2h).

Des biopsies des 4 sections d'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, côlon) ont été fixées en PFA 4% pendant 48h, puis selon le protocole ci-dessus inclus en paraffine

pour les analyses histologiques. Parfois fixés en liquide de Carnoy pendant 3 semaines, les échantillons ont suivi le protocole suivant pour inclusion en paraffine : Méthanol, 2 x 30 min ; Ethanol 100, 2 x 20 min ; Xylène 2 x 15min ; Paraffine, 3 x 2h. Le liquide de Carnoy est composé de méthanol (60%), chloroforme (30%) et d'acide acétique (10%). Le mucus est riche en eau. Ce fixateur ne contenant pas d'eau va permettre une meilleure conservation de la couche de mucus. Tous les échantillons ont ensuite été coupés au microtome à une épaisseur de 5µm.

## 4- Analyses histologiques

### 3.1 Colorations

Tous les échantillons d'organes et d'organoïdes ont été colorés en Hématoxyline-Eosine-Safranine (HES) et en Bleu Alcian + PAS (acide périodique Schiff) (BA + PAS). La coloration Hématoxyline-Eosine-Safranine permet d'étudier la morphologie des organoïdes produits. La coloration Bleu Alcian + PAS permet de mettre en évidence les cellules caliciformes productrices de mucus. Puis les lames colorées ont été numérisées avec le scanner de lames Panoramic Scan 150, 3D Histech.

### 3.2 Immunofluorescence

La différenciation cellulaire des organoïdes a été également vérifiée par immunofluorescence. Le marquage par les anticorps a été mis au point sur les biopsies des portions d'iléon de porc.

Des anticorps spécifiques de différents types cellulaires ont été utilisés (**Tableau I**). Les immunofluorescences ont été effectuées sur automate BOND RXm (Leica), avec le BOND Research kit Leica (DS9455) selon le protocole suivant: les coupes ont été déparaffinées et réhydratées suivant le protocole classique du BOND RXm. Une étape de démasquage antigénique a ensuite été faite pendant 20 minutes à pH 6 (tampon Leica ER1, référence AR9961) ou à pH 9 (tampon Leica ER2, référence AR9640) selon l'anticorps primaire (voir **Tableau I**). Les coupes ont été incubées 10 min avec une solution de blocage (2% Bovine Serum Albumine, 5% Normal Goat Serum) puis incubées 1h avec l'anticorps primaire dilué au 1/500<sup>ème</sup> (**Tableau I**) et enfin une dernière incubation de 30 min avec une solution d'anticorps secondaire dilué au 1/2000 et du 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) dilué au 1/500. Elles ont ensuite été montées avec le milieu de montage aqueux FluoroMount® et numérisées avec le scanner de lames Panoramic Scan 150, 3D Histech.



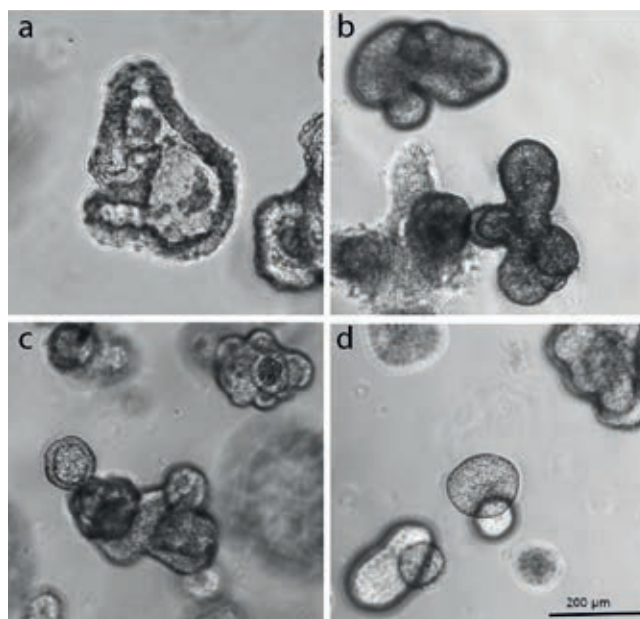
Types cellulaires	Anticorps Primaires	Référence Fournisseur	pH de Démasquage	Anticorps Secondaires
Entérocytes matures	anticorps polyclonal (lapin) anti- <b>villine 1</b>	NBP1-85335, Novus Biological	pH 6	anti rabbit IgG Alexa Fluor® 647
Cellules caliciformes	anticorps polyclonal (lapin) anti- <b>MUC2</b>	NBP1-31231, Novus Biological	pH 9	anti rabbit IgG Alexa Fluor® 647
Cellules entéro-endocrines	anticorps monoclonal (souris) anti- <b>chromogranine A</b>	NBP2-34240, Novus Biological	pH 9	anti mouse IgG Alexa Fluor® 660

**Tableau I :** Anticorps utilisés et conditions d'utilisation

## RESULTATS

### 1- Observation des organoïdes en culture

Le suivi de la croissance des organoïdes a permis d'évaluer leur croissance pour chaque portion d'intestin étudiée. Les organoïdes sont apportés sur la plateforme aux stades J3, J5 et J7. On peut voir sur la **figure 2** qu'au stade J7, les organoïdes sont composés d'une monocouche épithéliale bordant une lumière centrale.

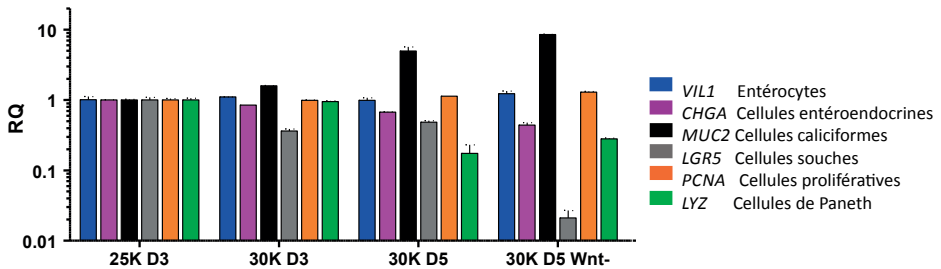


**Figure 2 :** Observation des organoïdes au microscope inversé après 7 jours de culture.  
 A. duodénum  
 B. jéjunum  
 C. iléon  
 D. côlon

## 2- Analyses moléculaires

L'extraction d'ARN à partir des organoïdes intestinaux de porc est faite à partir d'un puits d'une plaque 24 puits. La quantité d'organoïdes de départ est variable d'un puits à l'autre. La quantité d'ARN extraite est comprise entre 20 ng/ $\mu$ L et 100 ng/ $\mu$ L. Le contrôle au Bioanalyzer des ARN extraits montre que nous obtenons des ARN de bonne qualité : RNA Integrity Number (RIN) entre 8 et 9.

Parmi les paramètres étudiés en PCR quantitative, il y a le nombre de cellules dissociées nécessaires ainsi que la présence ou non du facteur de croissance Wnt pour le déclenchement de la différenciation cellulaire. Pour les organoïdes issus d'iléons, la **figure 3** montre qu'à partir de 3 jours de culture, l'expression de *MUC2* augmente lorsque l'on met 30000 cellules au départ. Le retrait du facteur de croissance Wnt après 3 jours de culture entraîne une forte diminution de l'expression du gène *LGR5* et une augmentation de l'expression du gène *MUC2* et donc une initiation de la différenciation cellulaire.



**Figure 3** : Analyse par qPCR de gènes représentatifs de l'état cellules-souches (*LGR5*) ou prolifératif (*PCNA*) et des gènes de différenciations cellulaires (*VIL1*, *CHGA*, *MUC2* et *LYZ*)

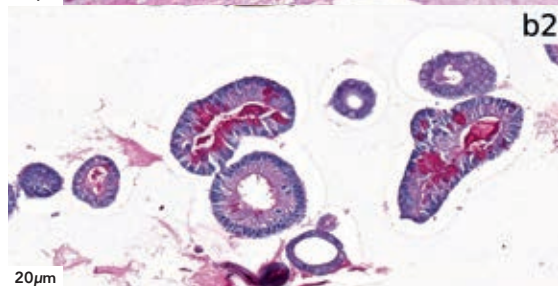
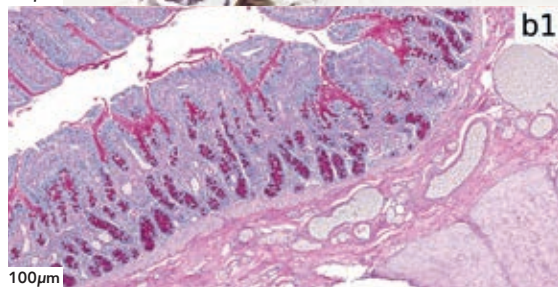
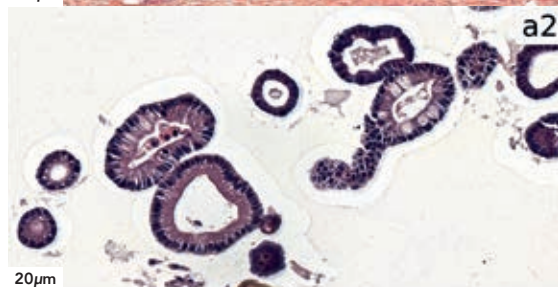
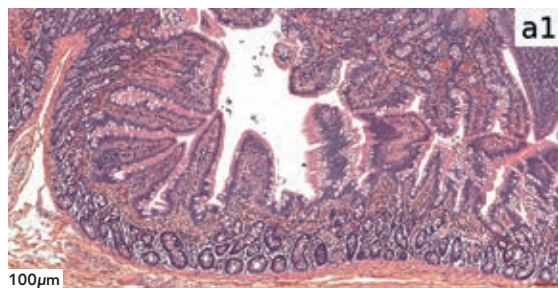
Les analyses par qPCR des différents marqueurs de prolifération ont permis d'optimiser les conditions de cultures des organoïdes.

## 3- Analyses histologiques - colorations

La coloration morphologique Hématoxyline-Eosine-Safranine de la coupe d'iléon de porc montre que les cellules composant les villosités intestinales sont en majorité longues, étroites et polarisées (**Fig. 4a1**). Entre les entérocytes, on trouve

des cellules caliciformes produisant le mucus intestinal (**Fig. 4b1**). La coloration HES des coupes d'organoïdes montre également qu'on retrouve cette structure épithéliale composée de cellules polarisées longues et étroites (**Fig. 4a2**).

La coloration Bleu Alcian + PAS des coupes d'organoïdes permet d'identifier clairement la présence de cellules caliciformes, productrices de mucus (**Fig. 4b2**).



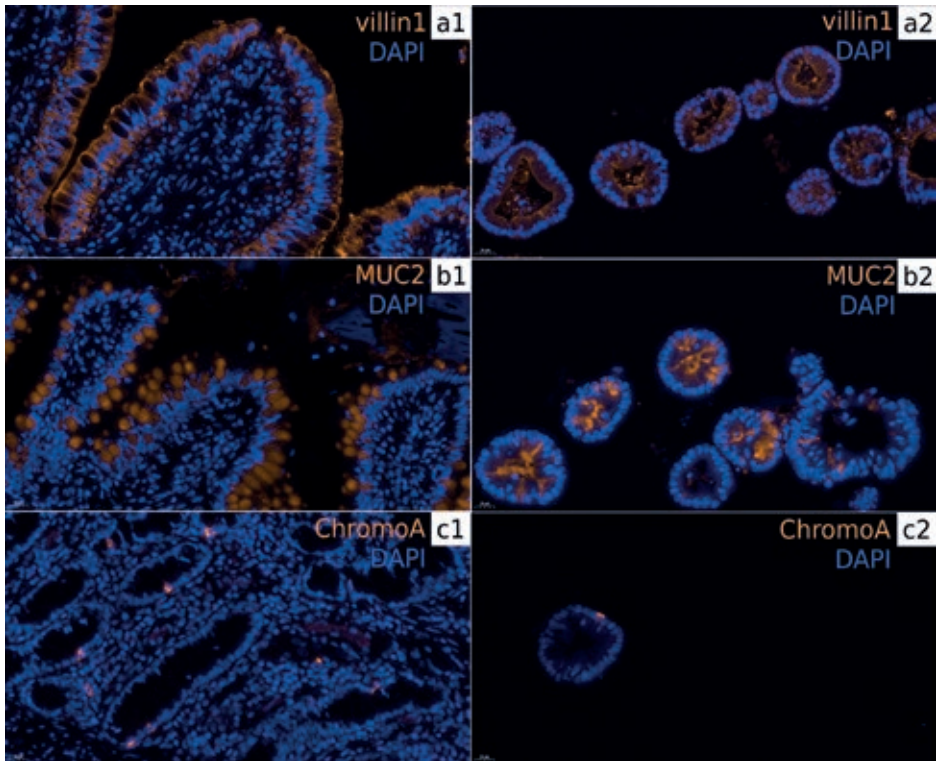
Les mêmes résultats ont été obtenus sur les portions de duodénum, jéjunum et côlon.

**Figure 4 :** Coupes d'iléon de porc (a1, b1) et d'organoïdes (a2, b2) colorées en HES (a1, a2) et au Bleu Alcian + PAS (b1, b2)

#### 4- Analyses histologiques – Immunofluorescence

On peut voir sur la **figure 5 a1**, que les villosités intestinales sont composées d'entérocytes matures, cellules marquées par l'anticorps anti-villine1. Parmi ces entérocytes matures, on détecte la présence de cellules entéro-endocrines qui sont mises en évidence par l'anticorps anti-chromogranine A (**Figure 5 c1**) et des cellules caliciformes mises en évidence par l'anticorps anti-MUC2 (**Figure 5 b1**). Ces anticorps permettent d'identifier ces mêmes cellules différenciées dans les organoïdes d'iléons (**Fig. 5a2, b2, c2**).

Les mêmes résultats ont été obtenus sur les portions de duodénum, jéjunum et côlon.



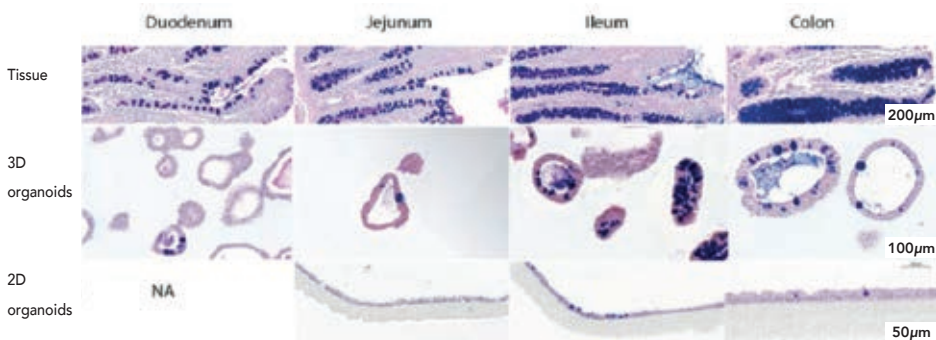
**Figure 5** : Immunofluorescence sur coupes d'iléon de porc et d'organoïdes d'iléon.  
Barre d'échelle : 20µm

## CONCLUSION

Les premiers tests en biologie moléculaire ont permis d'obtenir des échantillons en quantité suffisante et de bonne qualité grâce au savoir-faire de la plateforme @BRIDGe dans l'analyse d'échantillons de taille réduite. Cela a permis à l'équipe GeMS de déterminer les conditions optimales de culture en étudiant l'expression de certains gènes marqueurs de prolifération, de différenciation ou de cellules souches pluripotentes.

Les résultats obtenus en histologie ont montré que les protocoles « de routine » utilisés sur la plateforme @BRIDGe pour les tissus animaux pouvaient être appliqués sur d'autres types d'échantillons moins conventionnels tels que les organoïdes.

Ces premiers tests de faisabilité sur la plateforme ont permis à l'équipe GeMS de développer leur activité de production d'organoïdes à des fins de recherche en augmentant le nombre d'échantillons analysés. Dans un premier temps, ils ont pu optimiser les conditions de cultures en 3D, puis en 2D sur membranes Transwell. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons apportés sur la plateforme leur a permis de mettre en évidence des différences entre les organoïdes issus des différentes portions d'intestin, à l'image des différences conservées dans les tissus d'origine avec notamment des organoïdes de côlons plus gros et des organoïdes de duodénum moins circulaires ou l'observation de plus de cellules calciformes dans le côlon et les organoïdes de côlon [2].



**Figure 6 :** Coloration Bleu Alcian + PAS des tissus, organoïdes 3D et 2D issus de duodénum, jéjunum, iléon et côlon, courtoisie de Blanc et *al.* Phenotypic Characterization of Organoids Derived from Pig Intestine Segments [2].

Dans un second temps, ils ont pu approfondir la caractérisation moléculaire des organoïdes en comparant le transcriptome des tissus d'origine et des organoïdes correspondant par analyses RNAseq. Ces résultats sont en cours d'analyse.

La complémentarité des services de la plateforme @BRIDGe a ainsi permis à l'équipe de recherche GeMS de développer un nouvel outil expérimental. Ceci ouvre de réelles perspectives d'utilisation des organoïdes comme modèle d'étude des tissus quand les problématiques de recherche le permettent.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BEAUMONT, M. et al., Intestinal organoids in farm animals, *Vet. Res.*, vol. 52, no 1, p. **33**, 2021, doi: 10.1186/s13567-021-00909-x.
2. BLANC, F. et al., Phenotypic Characterization of Organoids Derived from Pig Intestine Segments, 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Rotterdam, The Netherlands, 2022. [https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/978-90-8686-940-4\\_505](https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/978-90-8686-940-4_505)
3. WONG, A. C. N., VANHOVE, A. S. AND WATNICK, P. I. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*, *Dis. Model. Mech.*, vol. **9**, no 3, p. 271-281, 2016, doi: 10.1242/dmm.023408.
4. VAN DER HEE, B. LOONEN, L. M. P. TAVERNE, N. TAVERNE-THIELE, J. J. SMIDT, H. AND WELLS, J. M. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids, *Stem Cell Res.*, vol. **28**, p. 165-171, 2018, doi: 10.1016/j.scr.2018.02.013.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le département de Génétique Animale d'INRAE pour le financement de ce projet.

# HISTOLOGIE RAMAN STIMULEE : QUAND L'OPTIQUE NON LINEAIRE PERMET D'OBTENIR SANS MARQUAGE ET QUASI INSTANTANEMENT UNE IMAGE HISTOLOGIQUE VIRTUELLE

SARRI Barbara<sup>1,2</sup>, APPAY Romain<sup>3,4</sup>, POIZAT Flora<sup>5</sup> et RIGNEAULT Hervé<sup>1,2</sup>

barbara.sarri@lightcore.tech, herve.rigneault@fresnel.fr

1. Aix-Marseille université, CNRS, Centrale Marseille,  
Institut Fresnel, Marseille, France

2. Lightcore Technologies, Marseille, France

3. APHM, CHU Timone, Service d'Anatomie Pathologique  
et de Neuropathologie, Marseille, France

4. Aix-Marseille Université, CNRS, INP, Inst. Neurophysiopathol,  
Marseille, France.

5. Institut Paoli Calmettes, Département d'endoscopie  
et de gastroentérologie, Marseille, France

## ABSTRACT

In this article we propose to revisit the emergence of an innovative imaging technique: Stimulated Raman Histology (SRH). First, we will recall the principle of Raman spectroscopy and the limits of this technology before introducing the basics of nonlinear optics. We will then present the intrinsic advantages relating to nonlinear imaging techniques, in particular those derived from coherent Raman, which make it possible to obtain multimodal images providing information on the morphology of tissues and their chemical composition. We will explain how it is then possible to obtain virtual histological images without any labeling using stimulated Raman scattering (SRS) and second harmonic generation (SHG) microscopy images. We will trace the technological developments that have allowed this field to evolve rapidly and we will describe the elements necessary for the implementation of such imaging techniques; non-invasive and without any marker. We will relate the first studies in the field applied to tumors of the central nervous system and then in the gastric field. We will follow a step-by-step approach to demonstrate the potential of this innovative imaging technique which has the potential to become a tool of choice in the endoscopy, surgery and histopathology departments of hospitals.

## KEY WORDS

**Non-linear optics, Coherent Raman Imaging, Stimulated Raman Scattering, Second Harmonic Generation, Virtual Histology, Stimulated Raman Histology, Pathology workflow**



## RESUME

Dans cet article nous proposons de revisiter l'émergence d'une technique d'imagerie innovante : l'histologie Raman stimulée (SRH). Dans un premier temps nous rappellerons le principe de la spectroscopie Raman et les limites de cette technologie avant d'introduire les bases de l'optique non-linéaire. Nous présenterons alors les avantages intrinsèques relatifs aux techniques d'imagerie non-linéaires, notamment celles issues du Raman cohérent, qui permettent d'obtenir des images multimodales renseignant sur la morphologie des tissus et leur composition chimique. Nous expliquerons comment il est alors possible d'obtenir, sans aucun marquage, des images histologiques virtuelles en utilisant des images de microscopie par diffusion Raman stimulée (SRS) et de génération de la seconde harmonique (SHG). Nous retracerons les évolutions technologiques qui ont permis à ce domaine d'évoluer rapidement et nous décrirons les éléments nécessaires à l'implémentation de telles techniques d'imagerie, non invasives et sans marquage. Nous relaterons les premières études du domaine d'abord appliquées aux tumeurs du système nerveux centrale puis dans le domaine gastrique. Nous suivrons une démarche pas à pas pour démontrer le potentiel de cette technique d'imagerie novatrice qui présente des qualités nécessaires pour devenir un outil de choix dans les services hospitaliers notamment de chirurgie et d'histopathologie.

## MOTS CLES

**Optique Non linéaire, Imagerie Raman Cohérent, Diffusion Raman Cohérent, Génération de Seconde Harmonique, Histologie Virtuelle, Examen anatomopathologique**

## INTRODUCTION

L'examen anatomopathologique ou histopathologique consiste à analyser au microscope des prélèvements tissulaires d'organes afin d'établir un diagnostic. Cet examen peut être réalisé au cours d'une opération chirurgicale, il s'agit de l'examen extemporané dont les résultats permettent d'adapter immédiatement le geste chirurgical au cours de l'intervention. Dans cet article nous revisitons l'émergence d'une technique d'imagerie innovante : l'histologie Raman stimulée (SRH). Après avoir rappelé le principe de la spectroscopie Raman, nous présenterons les avantages intrinsèques relatifs aux techniques d'imagerie non-linéaires, notamment celles issues du Raman cohérent, qui permettent d'obtenir des images multimodales renseignant sur la morphologie des tissus et ainsi que sur leur composition chimique. En combinant des images de microscopie par diffusion Raman stimulée (SRS) et de génération de la seconde harmonique (SHG) il est possible de créer, sans aucun marquage, des images histologiques virtuelles : c'est l'histologie Raman Stimulée. Nous présenterons les premières études du domaine appliquées aux tumeurs du système nerveux central et du système digestif.

### Spectroscopie Raman

C'est en 1928 que Sir C. V. Raman découvrit l'effet qui portera son nom : il démontra que lorsqu'on éclaire un échantillon avec une source de lumière monochromatique, une petite portion de la lumière – environ un photon sur un million – est diffractée inélastiquement : il y a alors échange d'énergie entre la lumière incidente et l'échantillon. Il mit en évidence que la quantité d'énergie échangée (prise ou donnée à la lumière incidente par l'échantillon) induisait un décalage en longueur d'onde qui était caractéristique des liaisons chimiques covalentes présentes dans l'échantillon.

Lorsque l'on s'intéresse au phénomène de diffusion Raman spontanée, il faut réfléchir en termes de polarisabilité : la polarisabilité d'une molécule est sa capacité - ou plutôt celle de son nuage électronique - à se déformer lorsqu'elle est soumise à un champ électromagnétique.

Pour appréhender ce phénomène on peut visualiser les molécules comme un système de masses et de ressorts : les atomes étant représentés par des masses et les liaisons covalentes par des ressorts. On peut alors démontrer que le comportement vibrationnel d'une molécule se décrit grâce au modèle de l'oscillateur harmonique.

La distance entre les atomes étant sujette à des oscillations  $r(t)$  lorsqu'un champ électromagnétique de pulsation  $\omega_0$  est appliqué avec  $r(t) = r \cos(\Omega_R t)$  où  $r$  représente l'amplitude des oscillations et  $\Omega_R$  la pulsation de vibration moléculaire de la liaison chimique. Cette pulsation de vibration moléculaire  $\Omega_R$  dépend de la masse des atomes ainsi que de la force de la liaison covalente. Chaque mode de vibration d'une liaison covalente aura une pulsation de vibration unique qu'on appelle sa signature vibrationnelle.

Lorsque la molécule est illuminée par une onde électromagnétique de pulsation  $\omega_0$ , la très grande majorité des photons va être diffusée élastiquement : c'est la diffusion Rayleigh, il n'y a pas d'échange d'énergie et  $\omega_{\text{Rayleigh}} = \omega_0$ . On distingue ensuite deux rayonnements distincts en fonction du sens du transfert d'énergie entre la molécule d'intérêt et la lumière incidente. Si la molécule est dans un état fondamental (cas le plus probable) il va y avoir absorption d'énergie par la molécule. Il y aura perte d'énergie du photon diffusé par rapport au photon incident et la lumière émise sera décalée vers le rouge : c'est le rayonnement Stokes de pulsation  $\omega_{\text{Stokes}} = \omega_0 - \Omega_R$ . Si la molécule est dans un état vibratoire excité, il va y avoir émission d'énergie lors de la désexcitation et il y aura un gain d'énergie du photon diffusé par rapport au photon incident : la lumière émise sera décalée vers le bleu : c'est le rayonnement anti-Stokes de pulsation  $\omega_{\text{Anti-Stokes}} = \omega_0 + \Omega_R$ . (voir diagrammes de Jablonski **Figure 1a**). Le lecteur pourra se référer à [1] pour de plus amples informations et voir une démonstration complète de ce processus.

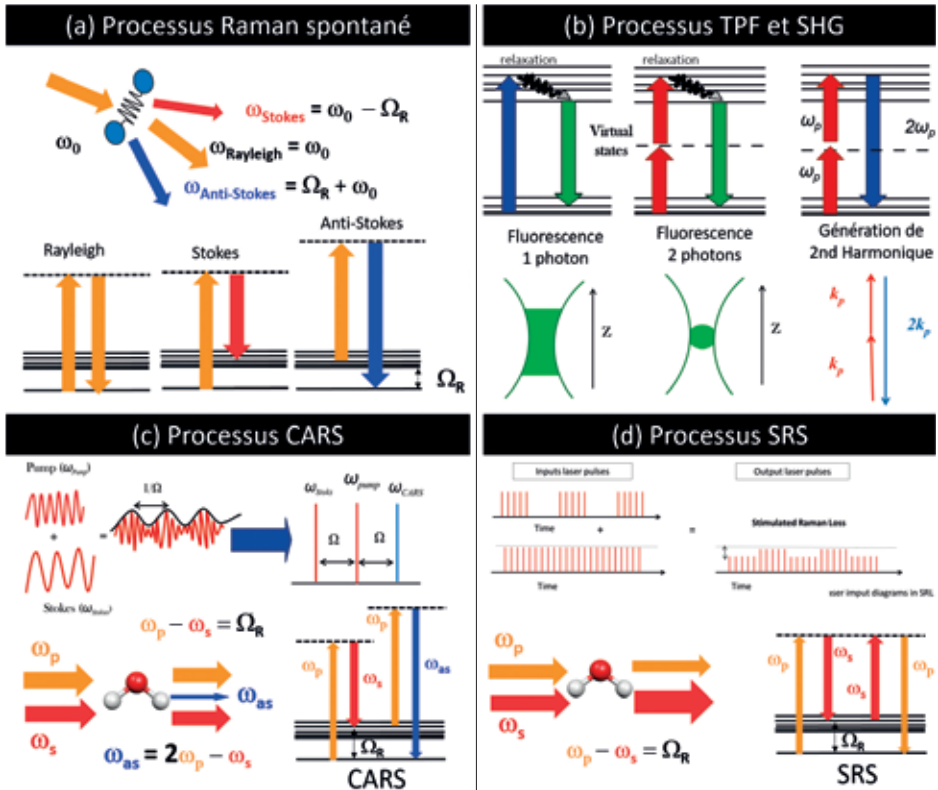
En pratique il est possible de sonder la matière grâce à la spectroscopie Raman. L'utilisateur aura alors accès à la "carte d'identité chimique" de l'échantillon sondé : on parle de spectroscopie vibrationnelle. On s'intéresse alors à l'intensité des raies en fonction du nombre d'onde  $\sigma$  défini comme suit et mesuré en  $\text{cm}^{-1}$  :

$$\sigma = 1/\lambda_{\text{incidente}} - 1/\lambda_{\text{diffusée}}$$

Il existe des tables répertoriant les raies Raman dans une multitude de domaines. La **figure 2a** présente un exemple typique de spectre Raman d'échantillons biologiques : on y distingue trois grandes régions spectrales :

La région des CH entre  $2700$  et  $3200 \text{ cm}^{-1}$  avec un large pic présent autour de  $2820\text{-}2980 \text{ cm}^{-1}$

La région silence entre  $1800$  et  $2700 \text{ cm}^{-1}$  où le vivant ne signe pas. Cette région peut notamment être utilisée pour détecter des espèces deutérées auxquelles on a substitué des atomes de carbones par des atomes de deutérium pour les rendre plus lourds (voir spectre rouge d'une espèce lipidique deutérée en **Figure 2a**).



**Figure 1:** Récapitulatif des différents processus en jeu entre la diffusion Raman spontanée et les processus basés sur l'optique non-linéaire. Les diagrammes de Jablonski sont notamment présentés pour chaque processus. (a) Processus de diffusion Raman spontanée : les atomes peuvent être modélisés par des masses reliées par des ressorts. Diagrammes de Jablonski de la diffusion Rayleigh (diffusion élastique), de la diffusion Stokes (la molécule s'excite en absorbant de l'énergie du faisceau incident), de la diffusion Anti-Stokes (la molécule se désexcite en donnant de l'énergie au faisceau incident) ; (b) Diagramme de Jablonski de la fluorescence à 1 photon, 2 photons et de la génération de seconde harmonique. Inhérent à l'optique non-linéaire le sectionnement axial est nettement meilleur en fluorescence à deux photons. En SHG, 2 photons strictement identiques sont combinés en un photon de même phase mais de fréquence doublée. (c) En CARS deux faisceaux incidents Pompe et Stokes interagissent avec l'échantillon : lorsque la différence de leur pulsation,  $\omega_p - \omega_s$  est égale à une fréquence de vibration moléculaire  $\Omega_R$ , les atomes entrent en résonance et une forte réponse est observable à  $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$ . (d) En SRS, un des deux faisceaux incidents est modulé et l'on observe le transfert de modulation d'un faisceau à l'autre lorsque  $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$ .

La région des empreintes ("fingerprint" en anglais) aux plus bas nombres d'ondes entre 400 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  dans laquelle on retrouve une multitude de fines raies.

Il est ici important de noter que c'est le mode de vibration d'une liaison covalente qui a une fréquence de vibration propre (et donc une raie caractéristique sur les spectres Raman) et non la liaison covalente elle-même. Un groupement d'atomes  $\text{CH}_3$  ou  $\text{CH}_2$  pourra avoir plusieurs fréquences de vibration selon le mode de vibration (par exemple mode symétrique, antisymétrique, liaison carbone-carbone *cis* ou *trans* qui auront des fréquences de vibration différentes) et l'environnement atomique (seconds voisins). On remarquera également qu'il est équivalent de parler de fréquence de vibration et de pulsation, la fréquence  $\nu$  étant reliée à la pulsation  $\omega$  par  $\omega = 2\pi\nu$ . Une des forces de la spectroscopie Raman est sa facilité d'utilisation : l'échantillon ne nécessite en général pas de préparation spécifique. Cette technique est également non-destructive et ne nécessite pas de marquage. Cependant le processus Raman souffre de son inefficacité. On quantifie généralement l'efficacité d'un processus par sa section efficace. Celle-ci est définie comme la probabilité qu'a la lumière d'interagir avec des atomes dans l'espace les entourant. La section efficace du Raman spontané n'est que de  $10^{-33}\text{cm}^2$  ! Ceci implique de faibles signaux et de longs temps d'intégration. Il faut typiquement compter quelques minutes pour obtenir un spectre lisible. Dans la pratique, imager par Raman spontané un plan de 250x250 pixels (cartographie Raman) va demander plusieurs heures. Si la spectroscopie Raman reste largement utilisée dans les laboratoires et dans l'industrie, on lui préfère parfois depuis quelques années des techniques de diffusion Raman cohérentes pour faire de l'imagerie. Ces techniques sont développées dans la section suivante.

## Optique non linéaire, excitation multiphotonique et génération d'harmoniques

On parle d'optique non-linéaire lorsque la polarisation (i.e. la réponse d'un milieu suite à l'application d'un ou des champs électriques) est régie par l'équation suivante :

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 (\chi\mathbf{E} + \chi^2 \mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^3 \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots),$$

où  $\epsilon_0$  est la perméabilité du vide et  $\chi^n$  le tenseur de susceptibilité d'ordre  $n$ .

Dans la plupart des cas le premier terme est largement prépondérant par rapport aux autres et l'on considère que la polarisation est proportionnelle au champ

appliqué : c'est l'optique linéaire. Cependant dans certaines conditions, les autres termes doivent être pris en compte et nous permettent de voir des effets/réponses non-linéaires dans certains matériaux : c'est le cas lorsque les champs électriques appliqués ne sont plus négligeables devant le champ électrique atomique auquel est soumis l'électron dans un atome (champ inter-atomique). En pratique pour atteindre de tels niveaux de champs qui doivent être supérieurs à  $E_{\text{atome}} = 10^{11} \text{ V.m}^{-1}$ , il faut des faisceaux de très forte intensité et ce n'est qu'avec l'arrivée des lasers pulsés dans les années 1960 que l'optique non-linéaire a véritablement pris son essor. Les techniques d'imagerie basées sur l'optique non-linéaire ont quant à elles vu le jour dans les années 1980.

Il existe plusieurs familles de processus non-linéaires : on distingue l'excitation multiphotonique, la génération d'harmoniques et le mélange d'ondes. Cependant toutes les techniques d'imagerie basées sur ces processus bénéficient des avantages inhérents à l'optique non-linéaire décrits plus bas.

On parle d'excitation multiphotonique lorsque plusieurs photons sont impliqués dans le processus d'excitation d'une molécule ou d'un fluorophore. Comparé à la fluorescence à un photon où un seul photon est absorbé, deux photons (trois photons dans le cas de la fluorescence à 3 photons) de plus basses énergies, seront absorbés quasi-instantanément en passant par des états d'énergie dits virtuels lors de la fluorescence à 2 photons (voir **Figure 1b**). La molécule sera excitée au même niveau et générera de la fluorescence dans toutes les directions de l'espace à la même fréquence qu'avec de la fluorescence un photon.

Comme les autres techniques d'imagerie basées sur l'optique non linéaire décrites plus bas, la fluorescence à deux photons présente plusieurs avantages comparativement à la microscopie traditionnelle à un photon :

- En premier lieu, les longueurs d'ondes généralement utilisées se situent dans le proche infrarouge : cela permet une plus grande pénétration dans les tissus biologiques. Les radiations de l'infrarouge sont moins diffusées dans les tissus que les radiations du visible.
- De plus, la résolution axiale de la microscopie est nettement améliorée comparée à la microscopie à un photon et similaire à celle de la microscopie confocale. Si l'on balaye un faisceau focalisé sur l'échantillon on pourra alors obtenir des cartographies 3D de cet échantillon. Ceci est dû à la nature non-linéaire du processus d'absorption à 2 photons : celui-ci ne se produit qu'au point de focalisation du faisceau incident, là où l'intensité est maximale, cela permet un sectionnement optique suivant l'axe z orienté dans la profondeur de

l'échantillon. Comme en microscopie confocale on peut alors acquérir des coupes (sections) d'un échantillon de type biopsie et en effectuer des reconstructions tridimensionnelles.

- Enfin, l'échantillon est mieux protégé contre les risques de photo-blanchiment et de photo-endommagement parce que les milieux absorbent généralement moins dans l'infrarouge.

Certains échantillons biologiques présentent un signal d'autofluorescence, ce qui rend la fluorescence à deux photons assez attrayante. Aucun fluorophore ou autre marqueur exogène n'a besoin d'être ajouté, le signal d'autofluorescence provenant de composants moléculaires endogènes au système. On peut citer l'élastine dans la peau, les flavines ou les enzymes NADPH. Cette auto-fluorescence permet alors d'avoir accès à la morphologie en 3D de l'échantillon sans marquage.

La génération d'harmoniques est légèrement différente. Dans le cas de la génération de seconde harmonique (SHG), deux photons (trois pour la génération de troisième harmonique THG) strictement identiques (*i.e.* de même phase et de même pulsation) sont combinés en un photon de même phase mais dont la pulsation sera doublée. Par exemple si l'on éclaire un échantillon avec un laser à 900nm le signal SHG sera émis à exactement 450nm et celui de THG à exactement 300nm. Une des conditions *sine qua non* pour pouvoir détecter un signal SHG est la non-centrosymétrie de l'échantillon au niveau moléculaire. Le collagène étant un des seuls composants non-centrosymétriques du vivant, le SHG est une technique de choix pour le discriminer des autres composants dans les échantillons biologiques.

Si les techniques d'imagerie TPF et SHG permettent de cartographier en 3D et sans marquage les échantillons biologiques, elles ne présentent pas de sélectivité chimique contrairement à la microscopie Raman stimulée décrite ci-après.

## **Diffusion Raman Cohérente et sélectivité chimique : imagerie vibrationnelle**

*A contrario* de l'émission spontanée, lors de l'émission stimulée, un photon incident force un photon à se désexciter à travers l'interaction avec un échantillon en émettant un photon rigoureusement identique à lui-même (*i.e.* de même phase et de même fréquence) : on parle de processus cohérent.

Le processus CARS (pour Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) ou diffusion Raman cohérente anti-Stokes en français, est un mélange non-linéaire à 4 ondes.

En optique non-linéaire on parle de mélange à  $n$  ondes lorsque  $n$  photons (photons émis inclus) sont impliqués dans le processus. En CARS, trois champs électromagnétiques incidents : Pompe, Stokes et Probe, interagissent avec un échantillon, pour engendrer un quatrième champ : le champ Anti-Stokes. En pratique les champs Pompe et Probe sont identiques et deux champs électromagnétiques incidents  $E_{\text{Pompe}}$  et  $E_{\text{Stokes}}$  seulement seront nécessaires à l'implémentation du processus CARS.

Le principe est le suivant (voir diagramme de Jablonski **Figure 1c**) : les champs  $E_{\text{Pompe}}$  de pulsation  $\omega_p$  et  $E_{\text{Stokes}}$  de pulsation  $\omega_s$  peuvent se combiner si leur intensité est assez forte (phénomène d'optique non-linéaire). Lorsque la différence de pulsation entre le champ Pompe et le champ Stokes,  $\Omega = \omega_p - \omega_s$ , coïncide avec une fréquence moléculaire vibrationnelle Raman  $\Omega_R$  présente dans l'échantillon, le processus devient résonant et toutes les liaisons covalentes de fréquence de vibration  $\Omega = \Omega_R$  vont osciller en phase (i.e. de manière cohérente) pour générer un fort signal Anti-Stokes décalé vers le bleu, c'est le signal CARS. Cette forte réponse collective sera détectable à la pulsation Anti-Stokes  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$ . En pratique ce signal sera  $10^6$  plus fort que le signal Raman spontané rendant l'imagerie (vibrationnelle) possible.

Si la microscopie CARS fut la première technologie d'imagerie vibrationnelle appliquée aux cellules, notamment pour la détection de gouttes lipidiques [2], cette technologie souffre de la présence d'un fond non-résonant qui bruite le signal et distord ses spectres. Aussi depuis sa mise en œuvre en microscopie en 2008 [3], on lui préfère le processus de diffusion Raman Stimulée (SRS) qui donne une réponse strictement égale au signal Raman spontané (sans distorsion spectrale). Nous décrivons ce processus ci-après. Pour de plus amples informations sur les principes physiques sous-jacents et une revue des diverses applications du CARS le lecteur pourra se référer à [1] et [4, 5] respectivement.

En diffusion Raman stimulée (SRS pour Stimulated Raman Scattering en anglais) le principe est légèrement différent et l'implémentation technologique plus contraignante. Comme en CARS, on applique toujours deux champs Pompe et Stokes,  $E_{\text{Pompe}}$  et  $E_{\text{Stokes}}$ , qui vont interagir avec un échantillon par différence de fréquence. Lorsque la différence de pulsation entre le champ Pompe et le champ Stokes ( $\Omega = \omega_p - \omega_s$ ) coïncide avec une fréquence moléculaire vibrationnelle Raman  $\Omega_R$  présente dans l'échantillon (i.e. quand  $\Omega = \Omega_R$ ), on observe un changement d'intensité dans les faisceaux Pompe et Stokes. Le faisceau Pompe est atténué et le faisceau Stokes est amplifié. Néanmoins cette atténuation ou amplification est faible (de l'ordre de  $\Delta I = 10^{-3}$  à  $10^{-6}$ ) et on utilise une technique de modulation pour les détecter. Il s'agit de moduler en intensité un des faisceaux et de regarder



le transfert de modulation dans le faisceau non modulé avec un amplificateur à détection synchrone. Tout se passe alors comme si les liaisons covalentes de fréquence de vibration  $\Omega = \Omega_R$ , en oscillant en phase, engendraient un transfert de modulation du faisceau modulé vers faisceau non-modulé. Ici, on ne s'intéresse donc pas à un nouveau rayonnement produit, comme le rayonnement Anti-Stokes en CARS, mais à une variation d'intensité d'un des deux faisceaux incidents (**Figure 2b**).

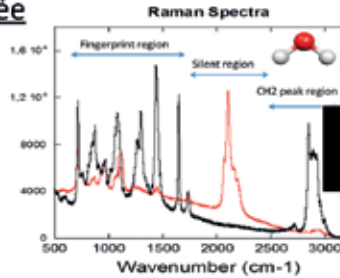
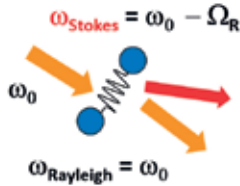
Cette petite variation d'intensité  $\Delta I$  constitue le signal SRS. Tout comme pour le signal CARS, le signal SRS sera  $10^6$  plus efficace que le signal Raman spontané ce qui rend l'acquisition d'images SRS à cadence vidéo possible. Suivant si la modulation est réalisée sur le faisceau Stokes ou Pompe on parle de SRG (Stimulated Raman Gain) ou SRL (Stimulated Ramang Loss) (voir diagrammes de Jablonski **Figure 1d**). Dans les deux cas SRG et SRL sondent les liaisons chimiques et leur spectre est identique au signal Raman spontané. D'autre part les signaux SRG ou SRL sont linéaires avec la concentration des échantillons, ce qui en fait un outil de choix en imagerie chimique. Pour de plus amples informations sur les principes physiques sous-jacents au SRS le lecteur peut se référer à [1]. Enfin, en faisant varier la fréquence (ou la longueur d'onde) d'un des deux faisceaux incidents, il est possible de changer  $\omega_p - \omega_s$  et donc la liaison moléculaire  $\Omega_R$  sondée. Il est ainsi possible d'acquérir des spectres SRS. On acquière une image pour chaque  $\Omega_R$ . On parle alors d'image hyperspectrale.

## De la diffusion Raman Stimulée à l'histologie Raman Stimulée

Ce n'est que très récemment que le terme d'histologie Raman Stimulée est apparu (2017) (SRH pour Stimulated Raman Histology en anglais) [7]. On parle d'histologie Raman Stimulée lorsque l'on produit à partir de signaux d'optiques non linéaires, notamment des signaux SRS, des images chimiques qui par traitement numérique ressemblent aux colorations standards d'histopathologie : la coloration hématoxyline et éosine (HE) ou la coloration hématoxyline, éosine, safran (HES).

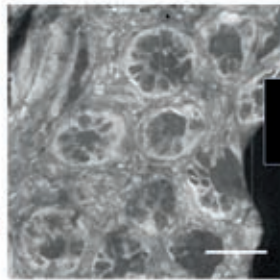
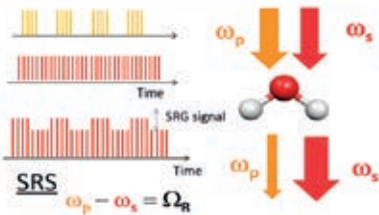
Pour construire des images SRH, on s'intéresse en particulier à deux raies Raman, aux nombres d'ondes suivants :  $\Omega_1 = 2845\text{cm}^{-1}$  et  $\Omega_2 = 2930\text{cm}^{-1}$ . La première raie, correspond à la signature vibrationnelle de la liaison chimique  $\text{CH}_2$  que l'on retrouve en abondance dans les lipides tandis que la seconde raie est la signature de la liaison chimique du  $\text{CH}_3$  très présente dans les protéines et dans l'ADN. Ces

## Diffusion Raman spontanée



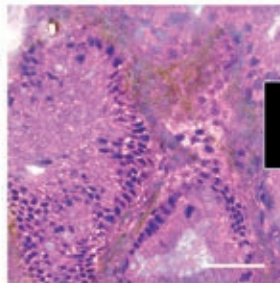
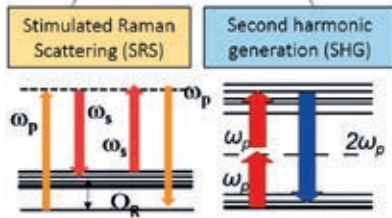
(a) Spectroscopie vibrationnelle

## Diffusion Raman stimulée



(b) Imagerie vibrationnelle

## Histologie Raman Stimulée



(c) Histologie virtuelle

**Figure 2** : Du Raman spontané à l'histologie virtuelle. (a) La diffusion Raman spontanée est un phénomène de diffusion inélastique, on peut obtenir une information spectrale sur la nature des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon : on parle de spectroscopie vibrationnelle. (b) Dans la diffusion Raman stimulée, on détecte le transfert de modulation d'un faisceau appelé Pompe sur un faisceau appelé Stokes. Ce phénomène est  $10^6$  fois plus efficace que le Raman spontané et permet de faire de l'imagerie vibrationnelle sans marquage. (c) Lorsque l'on combine les signatures de diffusion Raman Stimulée (SRS) de deux liaisons judicieusement choisies ( $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ ) à de la génération de seconde harmonique (SHG) on peut générer en temps réel des images de qualité histologique : on parle d'histologie virtuelle. Barre d'échelle :  $100\mu\text{m}$ .

éléments étant souvent concentrés spatialement dans les cellules et dans les tissus, les images brutes chimiques SRS  $\text{CH}_2$  et SRS  $\text{CH}_3$  renseignent alors sur la morphologie et l'architecture générale de l'échantillon en même temps que sur leur composition chimique (voir **Figure 2b** et **Figure 3**). Remarquablement, il a été montré que la différence entre les signaux SRS  $\text{CH}_3$  et SRS  $\text{CH}_2$ , SRS ( $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ ), permettait de mettre en exergue la distribution des noyaux cellulaires [6, 7, 8] (**Figure 3b**). Lorsqu'elle est acquise en parallèle, la génération de seconde harmonique révèle quant à elle la distribution et l'agencement des fibres de collagène, un autre élément caractéristique de la structure d'une tumeur et dont l'analyse est indispensable en anatomopathologie (**Figures 2 et 3**). Les trois signaux, SRS  $\text{CH}_2$ , SRS ( $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ ) et SHG acquis sans marquage, sont les trois images constitutives nécessaires à la construction des images d'histologie virtuelle HES. Le principe de la coloration SRH est illustré en **figure 3b** : il s'agit d'imiter de manière fictive la coloration HE/HES de manière à obtenir des images interprétables par des anatomopathologistes. Des tables de couleurs (LUT pour look up table en anglais) sont virtuellement assignées aux images morpho-chimiques d'intérêts :

- L'image SRS  $\text{CH}_2$  renseignant sur la distribution des corps cellulaires et les structures riches en lipide se verra attribuée une table de couleur dans les teintes roses pour imiter la coloration cytoplasmique obtenue avec l'éosine.
- L'image SRS ( $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ ) informant sur la distribution des noyaux se verra assignée une table de couleur dans les tons de violet pour imiter la coloration nucléaire obtenue avec l'hématoxyline.
- Enfin lorsque le SHG est également acquis, l'image SHG sera teinte en tons orangés pour reproduire la coloration du collagène par le safran.

Ces 3 images colorées sont finalement combinées pour un rendu final proche de celui observé à partir d'une coloration standard HE/HES d'une section tissulaire ; image pouvant alors être interprétée par un anatomopathologiste. Nous décrivons dans la section suivante comment implémenter un tel système capable d'acquérir des images SRH et les avancées technologiques récentes dans le domaine.

## METHODE

### Mise en œuvre expérimentale du SRH : Eléments indispensables à l'implémentation de la microscopie Raman Stimulée

La mise en œuvre d'une expérience de microscopie Raman cohérente ou de microscopie Raman stimulée nécessite d'avoir accès à deux sources d'excitation pulsées en régime picosecondes ( $10^{-12}$ s) ou femtosecondes ( $10^{-15}$ s). Ces sources, les champs Pompe et Stokes,  $E_{\text{Pompe}}$  et  $E_{\text{Stokes}}$ , de pulsation respective  $\omega_p$  et  $\omega_s$ , doivent délivrer des trains d'impulsions à un taux de répétition rigoureusement identique. Ceci pour que les impulsions arrivent strictement au même moment pour interagir avec l'échantillon : on parle de recouvrement temporel. Les faisceaux doivent également être focalisés au même endroit sur l'échantillon (recouvrement spatial). Ce recouvrement spatio-temporel est indispensable pour que le mélange à 4 ondes puisse se produire et activer le processus SRS. Comme décrit précédemment, lorsque  $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$ , les processus CARS et SRS sont résonants avec le mode vibratoire moléculaire. *A contrario*, lorsque  $\Omega_R \neq \omega_p - \omega_s$  les signaux sont faibles (cas du CARS) ou quasi nuls (cas du SRS) : la force de ces processus réside dans leur sélectivité chimique. Si l'expérimentateur désire mener des études spectroscopiques, ou sonder différents modes vibrationnels au sein d'un échantillon, il est nécessaire de pouvoir modifier la longueur d'onde d'une au moins des deux sources d'excitation (*i.e.* faire varier  $\omega_p - \omega_s$ ). Pour ce faire, il est assez courant d'avoir recours à des oscillateurs paramétriques optiques (OPO). Un OPO est un dispositif qui possède un cristal non -linéaire dont les propriétés dépendent de la température et qui a la capacité de générer des nouvelles fréquences lorsqu'il est pompé par un faisceau laser. En modifiant la température du cristal, l'expérimentateur pourra contrôler la longueur d'ondes des faisceaux de sortie. En pratique lorsqu'un OPO est pompé par un laser vert à 515nm, le faisceau en sortie d'OPO peut être accordé entre 740nm et 980nm, ce qui permet d'accéder à toute la région spectrale 400-4000 $\text{cm}^{-1}$  ce qui couvre l'ensemble de la gamme généralement scrutée en Raman spontané. Pour des études spectrales, on préfère généralement utiliser des impulsions picosecondes qui donnent une meilleure résolution spectrale (de l'ordre de quelques  $\text{cm}^{-1}$ ) comparé aux impulsions femtosecondes.

Plusieurs montages sont possibles pour acquérir des images SRH. La **figure 3a** présente un des modèles courants. Ce montage permet d'acquérir le signal SHG et en parallèle d'adresser simultanément les deux liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ . Un laser de pompe, typiquement un laser ytterbium fibré (Yb), délivre des pulses picosecondes

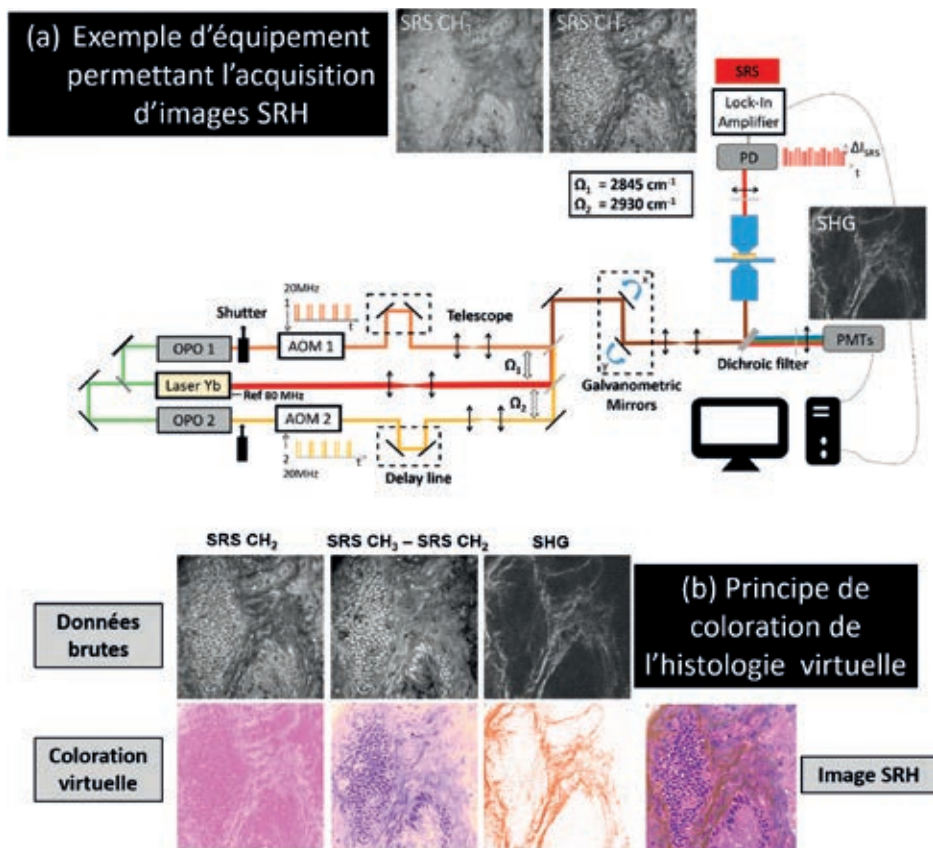


Figure 3 : (a) Exemple de montage utilisé pour l'acquisition d'images SRH : AMO : acousto-optique modulateur, OPO : oscillateur paramétrique optique, delay line : ligne à retard, PD : photodiode, PMT : tube photomultiplicateur. Les lignes sortant des OPO sont modulées en fréquence grâce aux AOM. Les lignes à délais assurent le recouvrement temporel. L'unité de miroirs galvanométriques permet de scanner pixel par pixel l'échantillon. Le signal de seconde harmonique (SHG) est détecté en réflexion (épi détection) par le PMT tandis que les signaux Raman (SRS) sont détectés en transmission sur la photodiode. La détection synchrone (lock-in amplifier) permet d'extraire par démodulation ces signatures Raman. (b) Principe de coloration de l'histologie virtuelle : trois images acquises grâce à des contrastes d'optique non-linéaire sont nécessaires : la distribution du signal SRS CH<sub>2</sub>, l'image soustraite entre la distribution de signal SRS CH<sub>3</sub> et la distribution de signal SRS CH<sub>2</sub> et l'image SHG. L'image SRS CH<sub>2</sub> donne la distribution des corps cellulaires riches en lipides tandis que l'image 'soustraite' donne la distribution des noyaux ainsi que des protéines. L'image SHG révèle quant à elle l'agencement des fibres de collagène. Des tables de couleurs sont attribuées à ces trois images pour imiter la coloration HES et obtenir l'image SRH d'histologie virtuelle.

à 1031 nm avec un taux de répétition élevé (80MHz). Ce laser est utilisé d'une part pour créer le champ Stokes  $E_{\text{Stokes}}$  et d'autre part pour pomper deux oscillateurs paramétriques optiques (OPO) après passage dans une unité de doublement de fréquence (515nm). Les longueurs d'ondes en sortie des deux OPOs (OPO1 et OPO2) constituent les champs Pompes  $E_{\text{Pompe 1}}$  et  $E_{\text{Pompe 2}}$  et sont fixées de manière à adresser simultanément les deux raies spectrales qui nous intéressent  $\Omega_1 = 2845\text{cm}^{-1}$  et  $\Omega_2 = 2930\text{cm}^{-1}$  (i.e. ici  $\lambda_{\text{Pompe 1}} = 797.3\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{Pompe 2}} = 792.2\text{nm}$ ). Ces faisceaux Pompes passent ensuite à travers des modulateurs acousto-optiques (AOMs) qui assurent leur modulation. Des lignes à retard sont placées sur le chemin optique des faisceaux Pompes pour pouvoir ajuster, grâce à un couple de miroirs, la longueur de leurs trajets optiques et ainsi garantir le recouvrement temporel. Des systèmes de lentilles (télescopes) garantissent la collimation des faisceaux nécessaires au recouvrement spatial. Un miroir dichroïque combine les trois faisceaux avant l'entrée du microscope. Un couple de miroirs galvanométriques permet de balayer le point de focalisation dans les directions latérales  $x$  et  $y$  tandis que de fins déplacements axiaux (en  $z$ ) de l'objectif s'effectuent grâce à un piézo-électrique. Ceci rend possible l'acquisition d'images tridimensionnelles avec une résolution en dessous du micromètre. Les faisceaux d'excitations sont focalisés sur l'échantillon par un objectif de grande ouverture numérique ( $\text{NA} > 1$ ) tandis qu'un condenseur transmet le signal vers les détecteurs de SRS. Des filtres de forte densité optique permettent de sélectionner les longueurs d'ondes d'intérêt devant les différents détecteurs. Le signal de SHG est collecté en Epi (réflexion) grâce à un photomultiplicateur tandis que les signaux SRS sont collectés en transmissions grâce à une photodiode reliée à une détection synchrone (**Figure 3a**). Les puissances généralement utilisées sont de l'ordre de quelques dizaines de milliwatts sur l'échantillon.

## Innovations récentes

Les montages décrits ci-dessus, avec notamment l'utilisation d'OPO sont très performants :

- Ils donnent accès à des centaines de mW sur l'échantillon
- Ils fournissent une grande flexibilité d'investigation spectrale idéale pour la recherche
- Ils génèrent des images de bonne qualité (peu bruitées)

Cependant leur prix, on parle ici de plusieurs centaines de milliers d'euros, et leur encombrement (plusieurs  $\text{m}^2$ ) limitent leur utilisation routinière dans un environnement hospitalier.

La communauté scientifique ainsi que les industriels ont activement œuvré ces dernières années (parfois en collaboration), pour apporter des solutions technologiques susceptibles d'être compatibles avec les exigences du milieu médical. Ainsi, des solutions compactes commencent à voir le jour (voir **Figure 6d**). Certains développent un microscope deux couleurs Raman Cohérent et se sont orientés vers une miniaturisation des optiques en utilisant un système de filtrage optique astucieux [9] (BondXplorer, Lightcore Technologies). D'autres se sont tournés vers des solutions lasers fibrées [10] [11], moins onéreuses mais plus bruitées, qui permettent de délivrer des trains d'impulsion Pompe et Stokes synchronisés (Invenio Imaging, Refine laser system) [7]. Nous y reviendrons dans la partie discussion.

## RESULTATS

### **Avènement du SRH : application aux tumeurs du système nerveux central**

C'est en 2017 que le terme d'histologie Raman Stimulée a vu le jour, lors de la parution d'une vaste étude américaine [7]. Dans cette étude très complète, l'équipe s'est efforcée d'aborder plusieurs aspects : technologique, quantitatif et digital pour apporter la technologie SRS au cœur de l'hôpital, au plus près des patients où son potentiel pouvait être exploité. L'équipe présente un système SRS compact compatible avec le milieu hospitalier et placé près du bloc opératoire. Elle propose pour la première fois, une méthode de coloration pour imiter l'histologie standard et fournir des images d'histologie virtuelle à partir des images SRS. Elle présente une étude menée en aveugle sur un large échantillonnage (>100 échantillons) d'échantillons frais et propose une première version d'aide au diagnostic grâce à de l'intelligence artificielle (IA) à partir des données SRH.

L'équipe s'intéresse aux tumeurs du système nerveux central (SNC). En neurochirurgie, il est courant que le chirurgien ait recours à un examen histopathologique per-opératoire, afin de guider son geste au cours de l'intervention. Une biopsie est alors envoyée au service d'anatomopathologie qui procédera à un examen rapide, dit examen extemporané (coloration HE de lames d'étalement ou de sections de tissus cryogénisés). Le protocole expérimental est le suivant : des images SRH (virtuellement teintées) ou résultant de coloration HE standard sont envoyées à un panel de 3 anatomopathologistes, issus d'institutions différentes. Pour simuler les

situations réelles, un bref historique clinique du patient est également fourni. Les praticiens devaient comme ils le feraient dans leur routine anatomopathologique :

- Identifier la présence ou non de lésions
- Définir l'origine gliale ou non-gliale de ces lésions (dans le cas de lésions présentes)
- Préciser le statut, le grade ou le sous type histologique d'une pathologie.

Pour une trentaine de cas (lorsque les tailles des biopsies excisées le permettaient) des sections cryogéniques étaient pour moitié imagées par SRH et pour moitié imagées en HE extemporané en parallèle. Ils devaient alors également évaluer, en comparant les images SRH et HE issus du même patient, s'ils pouvaient retrouver le même niveau d'informations cytologiques sur les images SRH que sur l'examen clinique de diagnostic intra opératoire classique de HE. Les diagnostics anatomopathologiques posés à partir des images SRH puis ceux prédits par l'IA (à partir des images SRH) étaient ensuite confrontés aux diagnostics extemporanés HE classiques. L'étude utilise le coefficient de Kappa (coefficient qui mesure le degré de concordance entre deux évaluateurs, par rapport au hasard) pour mesurer l'efficacité du SRH. Ils rapportent une excellente concordance dans les diagnostics SRH et HE pour un large panel de type de tumeur du SNC étudiée (gliome de bas et haut grade, méningiome, lymphome, adénome hypophysaire, adénocarcinome...). Dans 98% des cas l'identification de la présence ou non de lésions put se faire grâce au SRH. Les tumeurs gliales ont pu être distinguées des tumeurs non-gliales avec 100% de réussite tandis que le diagnostic final fut prédit correctement à plus de 92% avec le SRH. Les auteurs expliquent ensuite d'où peuvent provenir les rares erreurs de diagnostic basées sur les images SRH, au cas par cas. Ils rapportent également des résultats très prometteurs de l'IA. Si les diagnostics des anatomopathologistes entre eux étaient généralement concordants, ce domaine reste dépendant du praticien. Implémentée correctement, une aide au diagnostic informatique robuste pourrait pallier à ce problème et diminuer les risques de mauvaise lecture de lame qui peuvent être parfois lourdes de conséquences pour le patient.

L'équipe met également en avant le bénéfice d'obtenir en quelques minutes des images histologiques virtuelles digitalisées. Dans un monde de plus en plus connecté, pouvoir interagir en direct avec un spécialiste à distance (à l'autre bout de la ville ou à des milliers de kilomètres) pourrait s'avérer très avantageux pour le chirurgien et pour le patient. Cette étude conséquente a dévoilé le potentiel du SRS pour le milieu hospitalier et ouvre la voie à une toute nouvelle discipline : l'histologie virtuelle. Pour de plus amples informations le lecteur pourra se référer à [7].

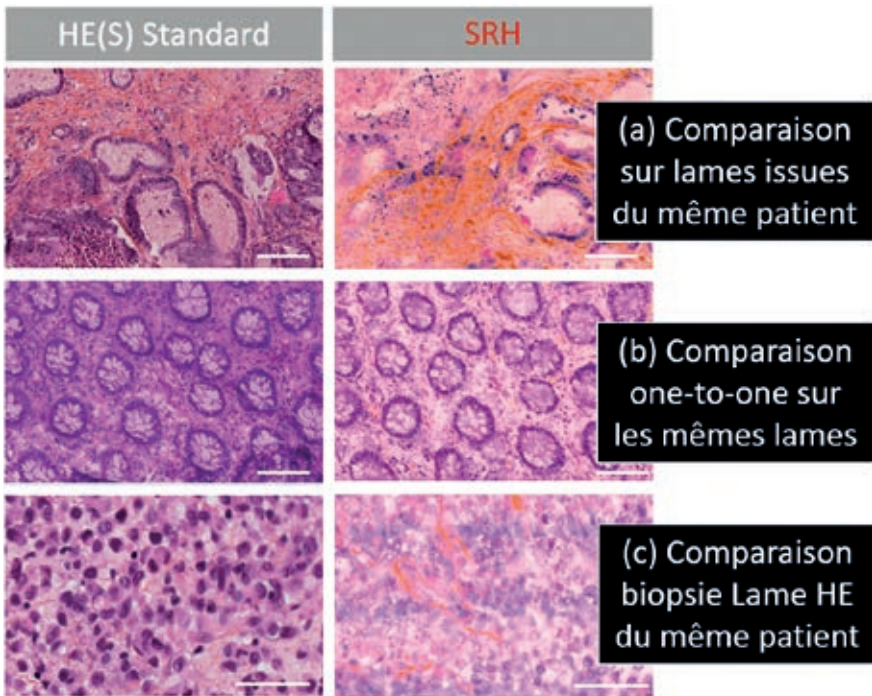


## Le SRH appliqué au système gastrique

Par la suite, le SRH fut appliqué au système gastrique [8]. Dans une étude à plus petite échelle, les auteurs démontrent qu'il est possible de combiner des images de SRS avec des images de SHG pour imiter la coloration hématoxyline, éosine, safran (HES). Pour les pathologies du système gastrique l'étude de l'agencement des fibres de collagène est importante : elle permet de visualiser la trame et l'architecture d'une muqueuse. Le développement d'une prolifération tumorale est associé à une désorganisation architecturale : le stade de développement de la fibrose joue un rôle prépondérant dans l'évolution de la tumeur et participe au diagnostic final. Dans cette étude, des pièces issues de chirurgies sont divisées. Une petite partie est extraite pour imiter une biopsie et montée pour obtenir des coupes de tissu cryo-sectionnées. Cette cryosection est imagée en SRH tandis que le reste de la pièce suit la routine histopathologique normale. Ce protocole permet d'avoir accès aux images d'histologie virtuelle SRH et d'HES conventionnelle du même patient et ainsi de valider les diagnostics SRH obtenus. En accord avec les travaux de 2017 [7], la concordance rapportée entre SRH et HES est très bonne. Dans chacun des cas étudiés (colon sain, dysplasie de bas grade, adénocarcinome du colon, pancréas sain, adénocarcinome du pancréas) l'anatomopathologiste, en prenant en compte l'architecture générale du tissu et les informations cytologiques et nucléiques, a été en mesure de retrouver les éléments indispensables pour poser le bon diagnostic. Ainsi, l'aspect des glandes de Lieberkühn allongées et dénuées de vacuoles associé à la pseudo stratification des noyaux cellulaires ont permis d'identifier une dysplasie de bas grade (stade pré-cancéreux). L'identification d'un important stroma, caractérisé par la présence importante de fibres de collagène témoignait d'une désorganisation architecturale ; cette réaction stromale était développée autour de glandes dénuées de lumière, de tailles variables, orientant le diagnostic vers une tumeur infiltrante dans le cas de l'adénocarcinome (voir **Figure 4a**). La présence de cellules nécrotiques et de nucléoles sur l'image SRH renforçaient ce diagnostic.

L'évaluation de l'adénocarcinome du pancréas est assez démonstrative pour illustrer la similarité de recherche d'indices sur les deux images SRH et HE. Il est assez délicat de distinguer une inflammation du pancréas (pancréatite), d'une tumeur.

Pour discriminer une tumeur, le praticien recherche des anomalies cyto-nucléaires tel un noyau plus volumineux, un rapport nucléocytoplasmique augmenté, un hyperchromatisme, un polymorphisme nucléaire ou une anisocaryose (variation de la taille des noyaux). Dans le cas de l'image SRH il put trouver au sein d'une même



**Figure 4** : Comparaison HES (colonne de gauche) /SRH (colonne de droite): (a) Comparaison lame à lame (lames différentes même patient), (b) comparaison SRH/HES sur les mêmes lames (comparaison dite "one-to-one"), (c) Comparaison SRH sur biopsie et HES sur lame issues du même patient. Images tirées et adaptées de [8], pour (a), et de [12] pour (b) et (c). Barre d'échelle : 100µm.

petite glande une cellule contenant un nucléole et une cellule hyperchromatique. Dans le cas de l'image HE standard, il s'agissait d'un nerf encapsulant deux glandes de petite taille. Cette recherche d'anomalies démontre l'intérêt de développer une technologie qui permettrait en direct d'explorer l'échantillon à la recherche de tels indices.

### Comparaison "one-to-one" : une preuve de concept

Après la publication des premières études SRH, une problématique est apparue : dans quelle mesure les images d'histologie virtuelle sont équivalentes à l'histologie standard ? Voit-on réellement les mêmes informations sur une image SRH et sur une lame histologique HE classique ? Pour répondre à ces questions un nouveau

protocole fut élaboré [12] : dans cette étude, des cryo-sections sont imagées d'abord en SRH (sans marquage) puis colorées en HE rapide. Ce protocole permet d'avoir accès aux images histologiques virtuelles SRH et HE standard des mêmes tissus et de comparer les images aux mêmes endroits. On s'intéresse prioritairement à l'aspect des noyaux qui regorgent d'informations essentielles à un bon diagnostic : en effet leur concentration, leur contenu, taille et forme sont à analyser précautionneusement pour délivrer un diagnostic précis. Aussi, un premier cas étudié est une inflammation de muqueuse d'estomac, qui possède une distribution de noyaux de forme et taille variées, plus concentrée qu'une muqueuse d'estomac sain. Une LUT dans les tons roses ou oranges pouvait être appliquée à l'image de SHG (distribution de collagène) pour obtenir au choix, une image virtuelle HES ou HE. Le second cas permettant de calculer la correspondance SRH/HE exacte. La confrontation des résultats révéla pour chaque cas une correspondance quasi parfaite entre les images SRH et HE avec un coefficient de corrélation de 0.80. Pour les autres cas présentés, muqueuse de colon sain et adénocarcinome de colon, la zone imagée en SRH s'intègre parfaitement dans la lame HE, celle-ci étant délimitée et détectable grâce à la coloration safran des fibres de collagène.

A ce stade, il est légitime de se demander l'intérêt du SRH pour le domaine gastrique : si l'on comprend aisément l'intérêt de limiter la quantité de tissu prélevé pour les tumeurs du système nerveux central [13] (prélèvements stéréotaxiques et recherche de marge), ce problème est moins vrai dans le domaine gastrique. En revanche, la technique SRH trouve sa place dans le domaine chirurgical, lors de l'exploration per opératoire d'une chirurgie carcinologique. En effet, avant toute résection tumorale, le premier temps opératoire consiste en une exploration de la cavité péritonéale et du foie pour rechercher une localisation métastatique qui contre-indiquerait la chirurgie. Appliqué à des pathologies du système nerveux central, le "one-to-one" révéla aussi une bonne correspondance SRH/HE et de nouvelles études continuent d'être publiées dans le domaine de la neurologie [14]. Ces études sont encourageantes pour convaincre la communauté médicale de l'intérêt de la technologie SRH comme outil de diagnostic rapide.

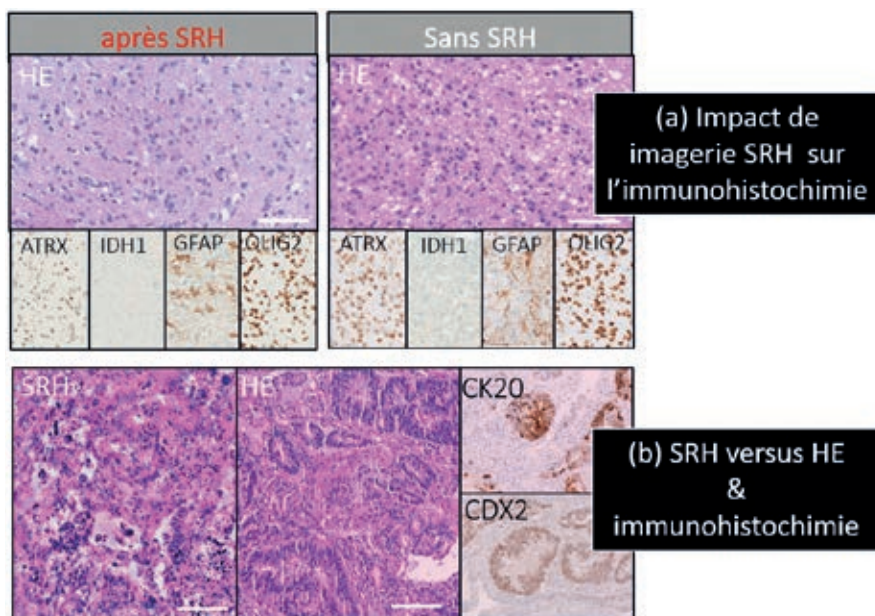
## **Compatibilité du SRH avec les examens d'immunohistochimie et de profil génomique**

L'étude précédente [12] pointe aussi les effets de déformations secondaires dues au processus de cryogénéisation et de coupes qui peuvent altérer le tissu et modifier l'aspect morphologique (voir l'aspect des vacuoles du colon sain déformées en

**Figure 4b)** entravant parfois le diagnostic. Cela souligne la nécessité de s'affranchir de cette étape chronophage de congélation et de coupe, altérant le tissu pour travailler sur tissu frais ou directement sur le patient (en parallèle des équipes travaillent activement au développement de microscopes intra opératoires [15] ou de sondes endoscopiques flexibles [16] qui permettraient de tels examens). Lors des études exposées précédemment, le tissu imagé en SRH était 'sacrifié' (écrasé entre lame et lamelle lors des études « smear » ou en cryo-section). On se demande ici si l'on ne pourrait pas réutiliser l'échantillon imagé en SRH en travaillant sur biopsies peu écrasées ? La microscopie SRH ne nécessitant aucune préparation particulière de l'échantillon, les contrastes SHG et SRS résultant uniquement de l'interaction des impulsions des champs incidents avec les tissus biologiques (sans marquage), les échantillons peuvent être montés entre lamelles de verre et démontés post imagerie SRH. Dans ce cas, dans quelles mesures peut-on réutiliser l'échantillon pour réaliser un examen anatomopathologique conventionnel ? Si aucune altération ne semble présente aux niveaux macro et microscopiques, se peut-il que l'échantillon soit altéré au niveau moléculaire dû à l'interaction lasers/échantillon ?

Dans une publication récente notre équipe s'est intéressée à ce problème [12]. Dans cet article une biopsie fraîche « épaisse » (5x5mm<sup>2</sup>) est imagée en SRH juste après excision et le diagnostic SRH confronté au diagnostic HE normal.

Dans les deux cas, le nombre de nucléoles présents, l'identification du ratio cytosol/noyau, ainsi que la grande diversité dans la taille et la forme des noyaux permirent de conclure à un adénocarcinome peu différencié (**Figure 4c**). Dans une autre étude [13], on propose de réutiliser les biopsies imagées en SRH pour mener des études d'immunohistochimie et de profil génomique post-imagerie SRH dans le cadre d'un examen de routine histopathologique conventionnel (échantillon témoin fixé qui n'avait pas subi d'imagerie SRH) menée en parallèle. La **figure 5** illustre les résultats obtenus. Les échantillons imagés en SRH, des biopsies fraîches de quelques mm<sup>3</sup>, étaient montés entre deux lamelles de verre séparés par un « spacer » de 500µm d'épaisseur, qui permet de limiter la déformation des échantillons et leur récupération post imagerie. Sur la **figure 5a**, on peut voir que l'imagerie SRH n'impacte pas l'aspect morphologique du tissu (HE), et n'altère pas non plus l'échantillon au niveau moléculaire. Dans les deux cas (avec et sans imagerie SRH), une prolifération diffuse de cellules gliales pléomorphes associée à la présence de noyaux atypiques permet de retenir le diagnostic de gliome de haut grade. La nature gliale de la tumeur put dans les deux cas être confirmée par les tests d'immunohistochimie (expression de la protéine acide fibrillaire gliale GFAP



**Figure 5** : SRH versus HE : impact de l'imagerie SRH sur l'échantillon. (a) Comparaison de lames HE et lames d'immunohistochimie après imagerie SRH (à gauche) avec un échantillon témoin issu du même patient, non imagé en SRH (à droite). (b) Images SRH et immunohistochimie d'un échantillon tumoral du CNS (adénocarcinome du colon) comparés à l'histologie HE et immunohistochimie d'un échantillon témoin issu du même patient. Image tirée et adaptée de [13] pour (a) et de [17] pour (b). Barre d'échelle : 100µm.

et du facteur de transcription oligodendrogliale OLIG2) tandis que la mutation IDH1 était absente dans les deux cas (absence d'immunomarquage avec l'anticorps ciblant la protéine mutante IDH1 R132H). Enfin dans les deux cas l'expression nucléaire de la protéine ATRX était conservée confirmant une absence d'altération du gène ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked). Le séquençage du génome révéla également des résultats similaires avec dans les deux cas (avec et sans imagerie SRH), une mutation du promoteur de TERT (NM\_198253:2:c.1-146C>T) sans altération des autres séquences génomiques analysées. Ainsi l'imagerie SRH ne semble pas impacter l'échantillon ni au niveau moléculaire ni au niveau génomique (pas d'ajout de mutations). Ce premier résultat est une preuve de concept qui exige des études de plus grande envergure pour le confirmer. Une étude à plus large échelle sur différentes pathologies du système nerveux central vient d'être publiée et renforce ces conclusions [17].

## DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cet article nous avons posé les bases de la spectroscopie Raman spontanée, introduit des techniques d'optique non linéaires et présenté leurs avantages, pour en arriver à la présentation d'une technique novatrice basée sur la diffusion Raman Stimulée : l'Histologie Raman Stimulée (SRH). Rapide, sans marquage et ne nécessitant aucune préparation préalable, le SRH produit en quelques minutes des images histologiques de qualité colorées digitalement. Nous nous sommes appuyés sur des résultats publiés par différents groupes (dont le nôtre) pour démontrer le potentiel de l'imagerie SRH et montrer comment cette technologie pourrait apporter un changement méthodologique à l'hôpital en permettant de réaliser une image de qualité histologique en quelques minutes. Par ailleurs, la technique SRH tire partie des progrès récents en intelligence artificielle avec notamment une aide instantanée au diagnostic et des images numérisées. La correspondance quasi-parfaite entre l'imagerie SRH et l'histologie HES (hematoxylin eosin safran) sur les premiers échantillons d'abord imagés en SRH puis colorés en HES est une démonstration forte que le SRH pourrait *in fine* se substituer à l'examen HE lors des consultations intra-opératoires. Nous avons par ailleurs montré que l'imagerie SRH est non destructrice et peut s'appliquer directement sur des biopsies fraîchement excisées, ce qui permet de s'affranchir des artéfacts secondaires dûs à la congélation et à la coupe, susceptibles de modifier l'aspect morphologique des échantillons congelés. Nous avons également démontré que l'imagerie SRH n'altère pas l'échantillon ni au niveau microscopique, ni aux niveaux protéique et génomique. Ceci fait du SRH une technologie *a priori* compatible avec l'examen anatomopathologique complet (**Figure 6**). Des études à plus grande échelle sont néanmoins nécessaires pour valider ces résultats encourageants sur un plus grand nombre d'échantillons.

Avec l'apparition de solutions compactes développées ces dernières années (**Figure 6d**), les études SRH se font plus nombreuses. Avoir la possibilité de réaliser un suivi "histologique virtuel", en se déplaçant en direct sur un échantillon biologique sans le perturber, pourrait s'avérer très bénéfique pour le suivi de croissance cellulaire : on pense notamment ici au suivi de croissance d'organoïdes ou de sphéroïdes, sujet d'intérêt grandissant dans les hôpitaux, qui vise à implémenter une médecine plus personnalisée. Enfin l'imagerie SRH étant une imagerie chimique il serait passionnant d'aller explorer l'imagerie SRH dans la région spectrale des empreintes ("fingerprint" en dessous de  $1800\text{cm}^{-1}$ ) qui foisonne de raies Raman. Ceci est en particulier possible avec le système BondExplorer

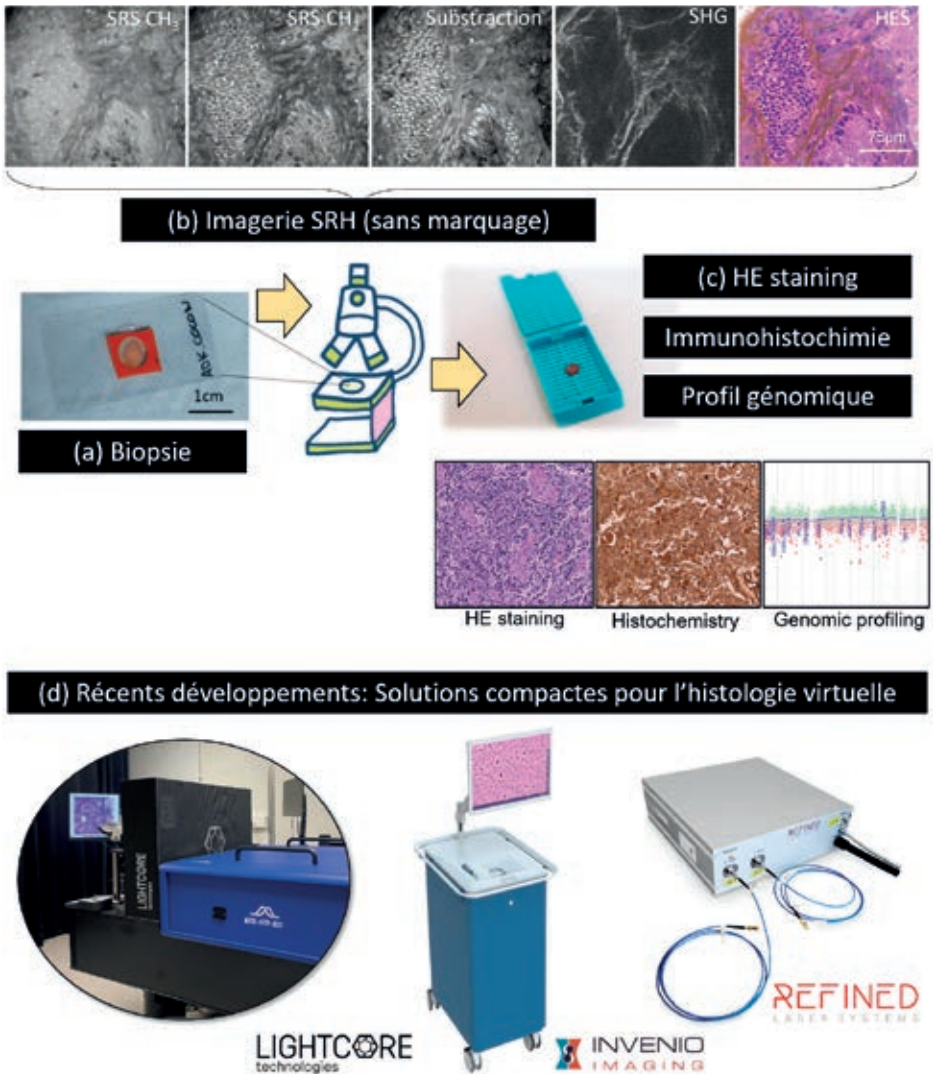


Figure 6 : (a) Un tissu frais (biopsie) issue de chirurgie est monté entre deux lamelles de verres et placée sur le microscope SRH. (b) Les contrastes d'optique non-linéaire permettent d'obtenir en temps réel une image histologique et de faire une investigation dans les trois directions de l'espace, (c) L'échantillon réintègre le 'flux' d'histopathologie et peut être réutilisé pour des tests complémentaires- tests d'immunohistochimie et de profil génomique. (d) Quelques exemples de solutions commerciales compactes développées ces dernières années pour l'histologie virtuelle. Image tirée et adaptée de [17] pour (c).

développé par la société Lightcore technologies. La **figure 6d** présente quelques solutions compactes commercialement disponibles permettant de telles études. On notera en particulier le système BondExplorer de Lightcore Technologies déjà cité et le dispositif portable de Invenio Imaging qui a déjà fait ses premières entrées à l'hôpital. Par ailleurs il y a fort à parier que de nouveaux lasers fibrés seront en mesure de s'intégrer dans la technologie SRH, les sociétés Invenio Imaging et Refined Laser Systems commercialisent déjà de tels systèmes. La technologie ne cessant de s'améliorer, ces exemples on l'espère ne sont que les précurseurs de ce que seront demain les outils utilisés à l'hôpital dans les domaines de la chirurgie et de l'oncologie.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RIGNEAUTL H & BERTO P. Tutorial : Coherent Raman light matter interaction processes, *APL Photonics*, 2018, **3**, 091101.
2. NAN X, YANG W Y & XIE X S. CARS microscopy lights up lipids in living cells., *Biophotonics Int.*, 2004, **11** (8), 44-47.
3. FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, LU S, HOLTOM G R, HE C, TSAI J C, KANG J X & XIE X S. Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy, *Science*, 2008, **322** (5909), 1857–1861.
4. EVANS C L & XIE X S. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2008, **1** (1), 883–909.
5. WINTERTHALDER M J & ZUMBUSCH A. Beyond the borders - Biomedical applications of non-linear Raman microscopy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, **89**, 135–144.
6. JI M, ORRINGER D A, FREUDIGER C W, RAMKISSOON S, LIU X, LAU D, GOLBY A J, NORTHON I, HAYASHI M, AGAR N Y R, YOUNG GS, SPINO C, SANTAGATA S, CAMELO-PIRAGUA S, LIGON K L, SAGHER O & XIE X S. Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy, *Sci. Transl. Med.*, 2013, **5** (201), pp. 201ra119-201ra119.
7. ORRINGER D A, PANDIAN B, NIKNAFS Y S, HOLLON T C, BOYLE J, LEWIS S, GARRARD M, HERVEY-JUMPER S L, GARTON H J L, MAHER C O, HETH J A, SAGHER O, WILKINSON D A, SNUDERL M, VENNETI S, RAMKISSOON S H, MC-FADDEN K A, FISHER-HUBBARD A, LIEBERMAN A P, JOHNSON T D, XIE X S, TRAUTMAN J K, FREUDIGER C W & CAMELO-PIRAGUA S. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy, *Nat. Biomed. Eng.*, 2017, **1** (27).



8. SARRI B, CANONGE R, AUDIER X, SIMON E, WOJAK J, CAILLOL F, CADOR C, MARGUET D, POIZAT F, GIOVANNINI M & RIGNEAULT H. Fast stimulated Raman and second harmonic generation imaging for intraoperative gastro-intestinal cancer detection, *Sci. Rep.*, 2019, **9** (7), 10052.
9. HEUKE S, RIMKE I, SARRI B, GASECKA P, APPAY R, LEGOFF L, VOLZ P, BÜTTNER E & RIGNEAULT H. Shot-noise limited tunable dual-vibrational frequency stimulated Raman scattering microscopy, *Biomed. Opt. Express*, 2021, **12** (12), 7780–7789.
10. FREUDIGER C W, YANG W, HOLTOM G R, PEYGHAMBARIAN N, XIE X S & KIEU K Q. Stimulated Raman scattering microscopy with a robust fibre laser source, *Nat. Photonics*, 2014, **8** (2), 153–159.
11. XU C & WISE F. Recent advances in fibre lasers for nonlinear microscopy, *Nat. Photonics*, 2013, **7**, 875–882.
12. SARRI B, POIZAT F, HEUKE S, WOJAK J, FRANCHI F, CAILLOL F, GIOVANNINI M & RIGNEAULT H. Stimulated Raman histology : one to one comparison with standard hematoxylin and eosin staining, *Biomed. Opt. Express*, 2019, **10** (10), 5378–5384.
13. SARRI B, APPAY R, HEUKE S, POIZAT F, FRANCHI F, BOISSONNEAU S, CAILLOL F, DUFOUR H, FIGARELLA-BRANGER D, GIOVANNINI M & RIGNEAULT H. Observation of the compatibility of stimulated Raman histology with pathology workflow and genome sequencing, *Transl. Biophotonics*, 2021, **3** (3), e202000020.
14. EINSTEIN E H, ABLYAZOVA F, ROSENGERG A, HARSHAN M, WAHL S, HAR-EL G, CONSTANTINO P D, ELLIS J A, BOOCKVAR J A, LANGER D J, D'AMICO R S. Stimulated Raman histology facilitates accurate diagnosis in neurosurgical patients: a one-to-one noninferiority study, *J. Neuro-Oncology*, 2022, **159** (2), 369–375.
15. KILLORY B D, NAKAJI P, GONZALES L F, PONCE F A, WAIT S D & SPETZLER R F. Prospective evaluation of surgical microscope-integrated intraoperative near-infrared indocyanine green angiography during cerebral arteriovenous malformation surgery, *Neurosurgery*, 2009, **65** (3), 456–62.
16. LOMBARDINI A, MYTSKANIUK V, SIVANKUTTY S, ANDRESON E R, CHEN X, WENGER J, FABERT M, JOLY N, LOURADOUR F, KUDLINSKI A & RIGNEAULT H. High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope, *Light Sci. Appl.*, 2018, **7** (10).
17. APPAY R, SARRI B, HEUKE S, BOISSONNEAU S, LIU C, DOUGY E, DANIEL L, SCAVARDA D, DUFOUR H, FIGARELLA-BRANGER D & RIGNEAULT H. Live Stimulated Raman Histology for the Near-Instant Assessment of Central Nervous System Samples, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2023, **127** (16), 3624-3631.



# MICRODISSECTION LASER DE COUPES HISTOLOGIQUES : PASSÉ, PRÉSENT ET FUTUR

MAITRE Marlène<sup>1</sup> et FAVIER Maryline<sup>2</sup>

1. INSERM, Université de Bordeaux, Plateforme de microdissection laser  
et d'histologie, Neurocentre Magendie, 146 rue Léo Saigant,  
33 077 Bordeaux, France  
[marlene.maitre@inserm.fr](mailto:marlene.maitre@inserm.fr)

2. Université Paris Cité, INSERM, CNRS, Plateforme « Histologie,  
Immunomarquage, Microdissection laser », Institut Cochin, 22 rue Méchain,  
75 014 Paris, France  
[maryline.favier@inserm.fr](mailto:maryline.favier@inserm.fr)

[doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.195](https://doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.195)

# LASER MICRODISSECTION APPLIED ON HISTOLOGICAL SECTIONS: PAST, PRESENT AND FUTURE

## ABSTRACT

Laser microdissection techniques aim to isolate cells or groups of cells from a histological section, under a microscope to ensure morphological control, in order to perform molecular biology studies. These techniques, which are constantly evolving, offer a useful approach in several fields of application (animal and vegetal) and require specific know-how. These applications and technological evolutions are at the heart of the activity of the Microlaser Biotech network – a branch of the French Association of Histotechnology (AFH) - which gathers a group of histologists and molecular biologists whose authors belong.

The authors present here the often unknown history of the implementation of these microdissection-related techniques, which have not always been associated with laser. They review the principle of this approach, and since this technique can be performed on a variety of tissue samples, they give examples of applications in various fields such as oncology, neurology or vegetal biology.

The key steps, from sample preparation through staining to the laser microdissection itself are described in detail. The different commercial devices available today are given, to finish by mentioning the evolutions to come. Indeed, this method, useful to study DNA (Deoxyribonucleic Acid) or RNA (Ribonucleic Acid) of target cells, is likely to undergo new developments, such as coupling with proteomic analysis in order to identify specific proteins.

## KEY WORDS

**Laser microdissection, history, principle, molecular biology, development, multi-omics studies**

## RESUME

Les techniques de microdissection laser ont pour but d'isoler des cellules ou des groupes de cellules grâce à un contrôle morphologique effectué sous un microscope, afin d'effectuer des études à l'échelle moléculaire. Ces techniques, qui évoluent constamment, offrent une approche utile dans plusieurs domaines d'application (animale et végétale) et nécessitent un savoir-faire particulier. Ces applications et évolutions technologiques sont au cœur de l'activité du réseau Microlaser Biotech, une branche de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), qui rassemble un groupe d'histologistes et de biologistes moléculaires auquel les auteurs du présent article appartiennent.

Les auteurs présentent ici l'histoire souvent méconnue de la mise en place de ces techniques de microdissection, qui n'ont pas toujours été associées au laser. Ils reviennent sur le principe de cette approche pouvant être exécutée sur une variété d'échantillons tissulaires, donnent des exemples d'applications dans des domaines variés tels que l'oncologie, la neurologie ou encore la biologie végétale.

Les étapes clés, de la préparation des échantillons à la microdissection en passant par les colorations sont décrites en détail. Les différents dispositifs commerciaux disponibles aujourd'hui sont présentés, en évoquant les évolutions futures. En effet cette méthode utile pour étudier l'ADN (Acide désoxyribonucléique) ou l'ARN (Acide ribonucléique) contenu dans des cellules cibles est amenée à connaître de nouveaux développements, comme par exemple, le couplage avec une analyse protéomique dans le but d'identifier certaines protéines spécifiques.

## MOTS CLES

**Microdissection laser, histoire, principe, biologie moléculaire, développement, études multiomiques**

## INTRODUCTION

L'histologie est la science qui s'intéresse à la structure microscopique des tissus qu'ils soient humains, animaux ou végétaux. Ces cellules expriment souvent de manière différentielle leurs biomolécules : ADN, ARN, protéines. Afin de les étudier, la microdissection laser (ML) peut être un outil de choix. C'est le chaînon manquant entre l'observation histologique du tissu et les mécanismes de biologie moléculaire observés dans les tissus biologiques.

En effet la ML permet d'isoler des cellules, phénotypiquement identiques, à partir d'une lame de microscope portant un tissu biologique, dans l'optique de réaliser des analyses moléculaires différentielles, spécifiques de ces populations isolées.

Dans cet article, nous proposons un panorama de l'histoire de la ML : de la naissance de la ML à son utilisation aujourd'hui et comment l'outil peut se développer dans le futur.

La ML est une technique spécifique mais c'est aussi un outil puissant et utile pour certaines applications. Le Réseau Microlaser Biotech (**Figure 1**) (branche de l'AFH) promeut cette technologie et aide tous les utilisateurs qui souhaitent faire de la ML.



**Figure 1** : Nouveau logo du Réseau Microlaser Biotech (RMLB). Le RMLB est né en 1999 sous l'impulsion de M. Luc Legrès. En 2022 ce réseau se rapproche de l'AFH pour en devenir une branche de travail.

Le réseau est composé d'histologistes et de biologistes moléculaires ; l'histologie et la biologie moléculaire étant les deux domaines d'expertise nécessaires à la réussite des expérimentations en microdissection laser (**Figure 2**).



**Figure 2** : Le processus complet de la microdissection laser repose sur 3 étapes clés.

# 1. Histoire et Origine de la microdissection laser

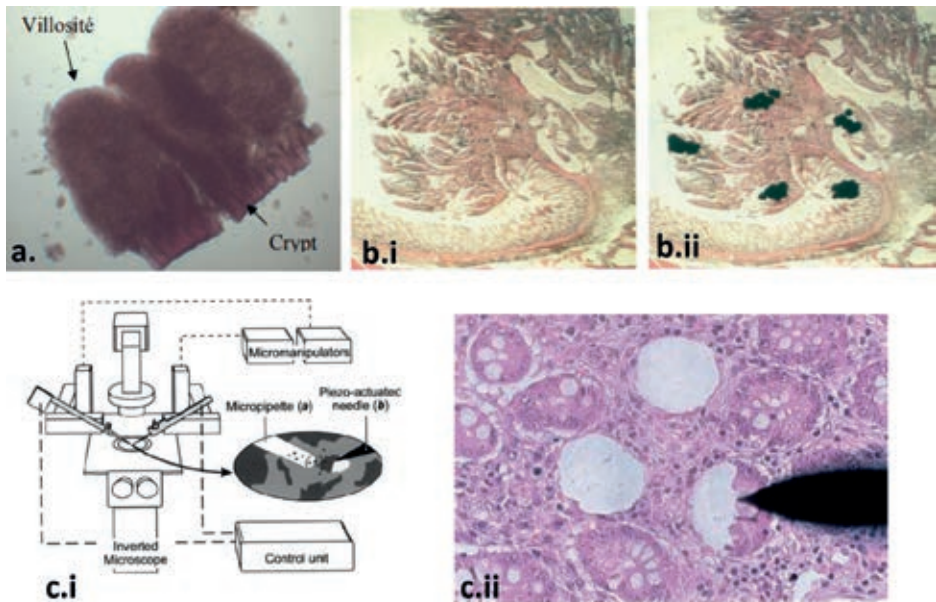
## 1.1 Avant, c'était comment?

Les tissus biologiques sont organisés et composés de différentes populations cellulaires entraînant une forte hétérogénéité de chaque tissu. Les profils génomiques, transcriptomiques ou protéomiques obtenus à partir d'un tissu entier reflètent cette hétérogénéité et ne permettent pas de déterminer des profils associés à des types cellulaires particuliers. Lorsque l'on souhaite étudier spécifiquement une région tissulaire ou une population cellulaire homogène, il devient nécessaire de s'affranchir de cette hétérogénéité. En particulier, lorsque les régions ou cellules d'intérêt sont rares et les gènes d'intérêt peu exprimés et qui seraient ainsi masqués par une étude simple sur tissu entier.

Afin de s'affranchir de l'hétérogénéité des tissus, une variété de techniques se sont développées. Plusieurs articles décrivent différentes techniques reposant sur la dissection manuelle sous contrôle d'un microscope à l'aide de lames de rasoir, d'aiguilles ou de fines pipettes en verre pour isoler les tissus d'intérêt [1,2]. Dans les années 1970, Lowry et Passonneau ont mis au point une procédure de micro-analyse biochimique qui utilisait la microdissection "à main levée" de types cellulaires spécifiques sous un microscope [2,3] (**Figure 3.a**). Un inconvénient évident est que la microdissection manuelle prend du temps, est fastidieuse et ne permet pas un contrôle précis et reproductible du matériel sélectionné [2,3]. De plus cette méthode n'est réalisable que s'il existe une démarcation claire, visible à l'œil nu, entre le tissu considéré et son environnement et de plus, elle ne permet qu'une séparation approximative des tissus.

Une avancée technologique significative a été proposée par Shibata en 1993, qui a suggéré le fractionnement sélectif par rayonnement ultraviolet (SURF). Cette méthode implique la destruction sélective de l'ADN sur la lame par exposition aux rayonnements ultraviolets tandis que les cellules d'intérêt sont protégées par un point d'encre (**Figure 3.b**). Les groupes spécifiques de cellules d'intérêt sont identifiés au microscope et des points d'encre sont placés directement sur eux. Puis, une procédure qui utilise un faisceau laser ultraviolet (UV) détruit l'ADN de tous les composants indésirables du tissu, tandis que les cellules d'intérêt sont protégées par l'encre [4,5]. Malheureusement, cette technique n'est utile que pour les biomolécules qui sont susceptibles d'être dégradées par la lumière UV, comme l'ADN. De plus, les ADN détruits peuvent potentiellement contaminer les ADN d'intérêt.

Une autre technologie permettant la microdissection techniquement assistée est arrivée sur le marché dans les années 2000 : le système de microdissection piézoélectrique (PPMD piezo-power microdissection) [6] (**Figure 3.c**). Harsch et al. décrivent un système de microdissection piézoélectrique qui utilise une aiguille en tungstène (MicroChisel) oscillant en mode avant-arrière pour « gratter » les cellules du tissu environnant et d'une micropipette aspirante à commande piézoélectrique. Cette technique de microdissection rapide en une seule étape a été appliquée pour l'obtention sélective de zones de tissus avec 10 types cellulaires. La validité de cette technique est démontrée dans le carcinome pulmonaire humain à grandes cellules par des analyses en PCR quantitative en temps réel [6]. Des améliorations de cette technique ont permis de proposer un système commercial vendu par Eppendorf [7] et une évolution récente basée sur un nouveau mécanisme de flexion permet de supprimer les vibrations [8].



**Figure 3** : Différentes méthodes permettant la microdissection de tissus. a. Microdissection manuelle de villosités de jéjunum de dinde. b. Technique du SURF. Image d'un colon avant (i) et après (ii) le positionnement des points d'encre (x20). c. Technique PPMD (i) représentation schématique de l'instrument (ii) muqueuse de côlon après microdissection par PPMD (x20).

Ces images sont issues des articles 3,5,6.



## 1.2 L'arrivée de la microdissection laser : les premiers pas

Les lasers (pour l'acronyme issu de l'anglais "*light amplification by stimulated emission of radiation*" qui signifie « amplification de la lumière par émission stimulée de radiation ») sont apparus dans les années 60. Le laser trouve rapidement des débouchés et s'impose comme un outil de production industrielle dans le micro-usinage. Ses principaux avantages sont sa grande vitesse, sa précision, l'absence de contact avec le matériel et sa faible usure.

Il devient ainsi particulièrement utilisé dans les applications médicales comme dans la chirurgie ophtalmique, l'urologie pour la destruction de calculs urinaires, la dermatologie...

Grâce en particulier aux lasers UV, l'énergie développée par le laser est suffisante pour permettre de casser une liaison covalente. Ce processus, dit de photoablation, est mis à profit pour des applications phares telles que la chirurgie de la cornée en ophtalmologie (LASIK).

Ce qui est particulièrement intéressant sur les lasers UV utilisés en biologie est que cette photoablation est réalisée à froid, c'est-à-dire que la découpe, la pulvérisation de la matière sont réalisées sans entraîner de chauffe du matériel environnant. La photoablation à froid est possible grâce aux propriétés du laser avec des impulsions courtes voire ultra courtes qui permettent d'expulser la matière avant que la chaleur ne diffuse en dehors du volume irradié. La matière ablatée emporte donc avec elle l'excès de chaleur et les effets thermiques résiduels sur la cible sont considérablement réduits par rapport à des impulsions longues.

C'est en 1986 que le laser est décrit pour la première fois comme des ciseaux permettant la découpe de matériel biologique. Monajembashi *et al.* décrivent la première microdissection laser de chromosomes [9]. Cet article décrit l'utilisation d'un laser à colorant pompé de 20 nanosecondes (ns) pour découper des chromosomes de lymphocytes humains en tranches de moins de 0,5 micromètres ( $\mu\text{m}$ ) (correspondant à environ 30 mégabases (Mb) d'ADN).

Mais c'est au milieu des années 1990 que le système de microdissection par capture laser (LCM-Laser Capture Microdissection) a été mis au point par le Dr Emmert-Buck et ses collègues des National Institutes of Health (NIH), à Bethesda, Maryland, aux États-Unis [10]. Le système a été initialement développé pour l'analyse des tumeurs solides, et a ensuite été commercialisé par Arcturus Engineering (Sunnyvale, CA, USA) sous le nom de système PixCell. La série Pixcell est le système de microdissection laser utilisé dans le "*cancer genome anatomy project*" (CGAP) parrainé par le National Cancer Institute (NCI) [9].

### 1.3 Aujourd'hui 4 systèmes commerciaux disponibles

Les fournisseurs de microscopie se sont rapidement impliqués dans la production de plateformes robotisées de microdissection laser permettant une ergonomie beaucoup plus conviviale pour l'utilisation des systèmes. Les lasers sont conditionnés dans des boîtiers permettant d'utiliser facilement les systèmes sans formation laser et sans risque. Ces boîtiers sont couplés à des microscopes motorisés droits ou inversés qui possèdent en général une platine pour la récupération des échantillons.

Le principe est relativement simple, il s'agit d'abord d'observer l'échantillon via le microscope, d'identifier les cellules ou les régions/structures tissulaires à collecter, de dessiner en détournant les cellules via le stylet d'une tablette graphique et d'actionner le laser. Le laser peut et doit être réglé par le manipulateur car la qualité de découpe dépend de différents facteurs (nature du tissu, épaisseur du tissu, type de coloration). Une fois les bons paramètres identifiés, il est possible de les enregistrer afin de les réutiliser lors d'une prochaine expérience.

Actuellement on trouve sur le marché 4 systèmes de microdissecteurs laser : MMI cell Cut de Nikon, le PALM Microbeam de Zeiss, le LMD6 et 7 de Leica et l'Acculift (anciennement Pixcell et Veritas) commercialisé en France par Excilone. Quelques caractéristiques de ces systèmes sont présentées dans la **Figure 4**.

Tous sont associés à un microscope qui permet la visualisation de l'échantillon et sont couplés à un laser UV (335 nanomètres (nm) à 355 nm suivant les systèmes) qui permet une découpe précise de l'échantillon. Le système Acculift associe également un laser Infrarouge (IR) pour permettre l'encollage des tissus, en plus, ou à la place, de son découpage. La principale différence réside dans le système de récupération de l'échantillon. Le système Zeiss permet de récupérer l'échantillon par catapultage, un impact laser défocalisé va venir propulser (catapulter) les cellules précédemment découpées (**Figure 4.a**). Ce système évite le contact entre l'échantillon et le tube collecteur. Ce système est nommé LPC pour Laser Pressure Catalpulting. Le système LMD (Laser MicroDissection) de Leica fonctionne par gravité (**Figure 4.b**). Contrairement au système Zeiss, le statif est un microscope droit. Les cellules découpées par le laser UV tombent dans un tube situé sous la lame. Dans ce cas il n'y a également pas de contact entre l'échantillon et le collecteur. Le système LCM (Laser Capture Microdissection) Acculift (anciennement Acturus et Pixcell) permet une récupération grâce à un collecteur, appelé une capsule, qui possède un film thermosensible sur lequel va adhérer le tissu microdisséqué. Une fois les régions tissulaires découpées par laser UV, le laser IR fait fondre le film thermosensible de la capsule au dessus du tissu, qui s'encolle alors sur le tissu et



Figure 4 : Principe et caractéristiques des différents systèmes de microdissection laser vendus en France.

emmène avec lui les régions découpées (**Figure 4.c**) lors du soulèvement de la capsule. Le laser IR est impulsé sous forme de spots, ce qui a pour avantage, dans le cas d'isolement de cellule unique, de pouvoir impacter une cellule au laser IR et de la faire coller au film sans avoir à la découper à l'UV. Le travail est alors plus rapide et moins invasif pour la cellule. Enfin, le système MMI cell cut (**Figure 4.d**) fonctionne aussi par contact grâce à l'utilisation de bouchon adhésif. Après découpe sur lame spéciale, le bouchon s'abaisse et grâce au capuchon adhésif, récolte les cellules découpées. Certaines méthodes comme la méthode de catapultage de PALM ou du couplage UV/IR sont protégées par un brevet. Notre propos n'est pas de plébisciter un système ou un autre, ils permettent tous une microdissection de qualité. Ils sont tous ergonomiques avec des logiciels faciles à exploiter. A noter toutefois que suivant son application, certains systèmes sont plus adaptés que d'autres et que donc il peut être intéressant de les comparer.

Les systèmes ont finalement peu évolué depuis les années 90. Les équipements sont robustes et en relation avec les sociétés de microscopie, il est possible d'améliorer son système en l'équipant d'un nouvel objectif, de lumière fluorescente ou d'une nouvelle caméra.

La microdissection laser a connu une véritable expansion entre le début des années 2000 jusqu'à aujourd'hui en multipliant par 4 le nombre de citations dans PubMed [11].

## 2. La microdissection laser aujourd'hui : quelles applications ?

### 2.1 Un large choix d'applications post-ML

Toutes les technologies de biologie moléculaire sont aujourd'hui applicables à partir d'échantillons issus de ML. Le principal obstacle est la quantité de matériel récupérée après ML. Cependant, les techniques de pré-amplification et d'amplification des ADN et ARN permettent de lever aujourd'hui ces freins. De plus, les techniques actuelles de biologie moléculaire nécessitent moins de matériel. Ainsi, la protéomique décrite comme plus « gourmande » en matériel lève, elle aussi, ce verrou grâce aux technologies d'analyse plus sensibles comme la spectrométrie de masse en particulier la LS-MS/MS (Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem) [12].

Les quantités de matériel obtenues après ML, même extrêmement réduites, permettent d'envisager un très large panel d'applications en biologie moléculaire (Figure 5).

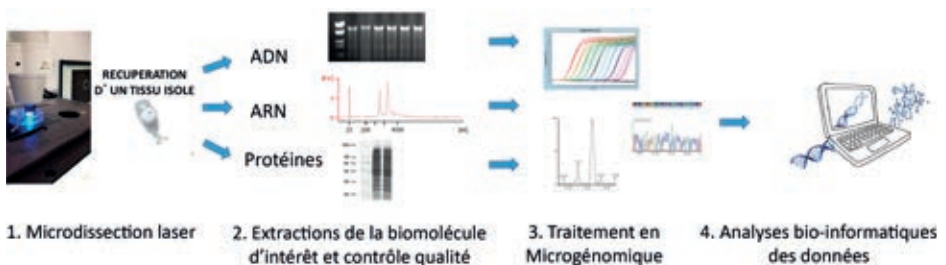


Figure 5 : Flux de travail - applications possibles post microdissection laser.

Pour l'étude du transcriptome, il est possible de réaliser de la qRT-PCR (reverse transcriptase, suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative), HT-qPCR (High-Throughput qPCR), dPCR (PCR (Polymerase Chain reaction) digitale), du RNASeq (séquençage de l'ARN) et du NGS (Next Generation Sequencing).

La PCR quantitative en temps réel reste une méthode rapide, facile à mettre en place et peu onéreuse s'il y a peu de gènes à étudier [11]. En revanche quand le nombre de cellules récoltées par ML est faible et que le nombre de gènes augmente, il est alors utile de travailler avec des méthodes de pré-amplification du matériel. Il existe différentes méthodes de pré-amplification globale (Whole transcriptome amplification) ou ciblée (pool d'amorces spécifiques des gènes cibles sur le principe de la PCR nichée). Il est important de bien vérifier la linéarité de l'amplification, ce qui demande la réalisation de contrôles spécifiques [13].

On trouve dans la littérature différents articles qui décrivent l'utilisation de la ML et de la d-PCR ou le couplage ML et NGS [11] en utilisant ces techniques de pré-amplification.

La ML permet également une large gamme d'analyses basées sur l'ADN comme l'analyse de microsatellites, la perte d'hétérozygotie, l'analyse de mutations génétiques [14, 15, 16].

Par exemple, la ML a été appliquée à des analyses génomiques telles que l'étude des schémas d'inactivation du chromosome X pour évaluer la clonalité, l'hyperméthylation des promoteurs, les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP) et l'analyse du polymorphisme de conformation à brin unique (SSCP) pour évaluer les mutations dans des gènes critiques [17].

Enfin, la ML permet aujourd'hui d'obtenir de larges profils protéomiques sur tissus congelés ou fixés. La ML s'appliquera aussi bien en western blot [18] à partir de microdissection de tissus qu'à la spectrométrie de masse à partir de quelques centaines de cellules [19].

## 2.2 Différentes disciplines

Comme nous l'avons décrit précédemment, la ML est très polyvalente, ainsi on la retrouve dans de nombreux domaines de recherche. Il serait compliqué de faire ici une liste exhaustive de tous les champs d'investigation de la ML tant elle s'applique à tous les domaines : animal (tissus mou et dur), végétal, microorganisme, et même dans certains cas en géologie. Nous avons choisi arbitrairement des méthodologies qui utilisent la ML de façon originale.

En clinique, elle est principalement illustrée en cancérologie et en neurosciences. Ces 2 domaines représentent à eux deux 74% des publications utilisant la ML (source Pubmed sur +7000 publications – 44% cancérologie et 30% neurosciences).

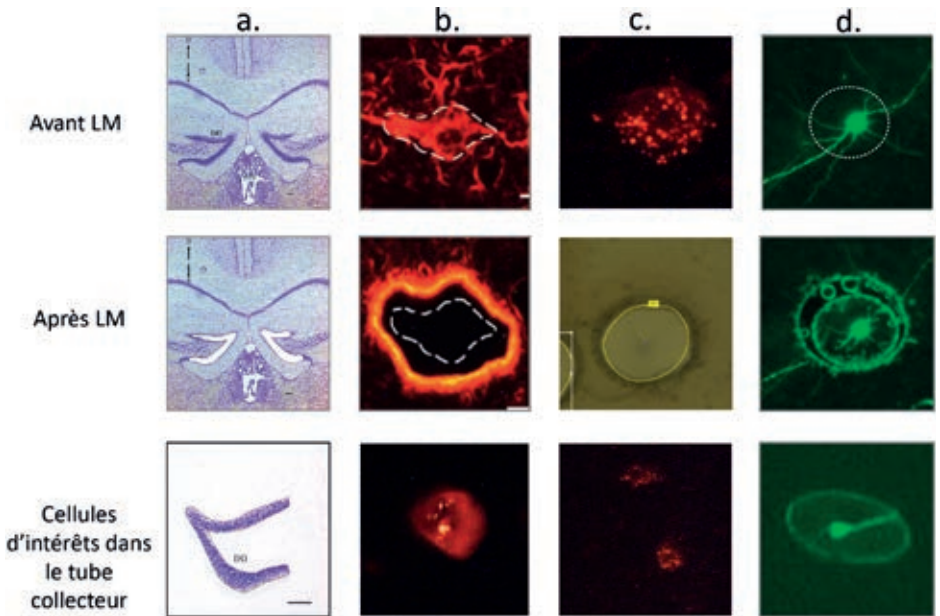
La ML est par exemple utilisée dans le cadre du programme d'anatomie du génome du cancer (CGAP : Cancer Genome Anatomy Project) et illustre les avancées moléculaires qu'offre la ML. Elle permet aux chercheurs de cataloguer les gènes qui sont exprimés dans les tissus, lorsque des cellules normales subissent des modifications pré-malignes et se transforment en cancer invasif et métastatique. Les changements dans les gènes exprimés, ou les altérations de l'ADN cellulaire correspondant à un état pathologique spécifique, peuvent être comparés au sein d'un même patient ou entre des patients individuels, car un grand nombre de bibliothèques d'ADNc microdisséqués (produites à partir d'ARN de tissus normaux et pré-malins microdisséqués) ont été produites et publiées sur la page Web du CGAP. Ce catalogue de modèles d'expression génique a le potentiel de fournir des indices sur l'étiologie et, espérons-le, de contribuer à une détection précoce et à un diagnostic plus précis de la maladie, suivis de thérapies adaptées à chaque patient [20, 21].

Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des cellules cancéreuses issues d'une tumeur primaire ou d'un site métastatique. Elles circulent dans le sang en tant qu'origine cellulaire potentielle des métastases. Les tests NanoVelcro CTC représentent une méthode unique de tri des cellules rares qui permettent la détection et la caractérisation des CTC dans le sang périphérique, offrant la possibilité de surveiller de manière non invasive la progression de la maladie chez les patients atteints de cancer. Ce test est basé sur le concept de substrats NanoVelcro, pour lesquels des nanofils de silicium recouverts d'anticorps anti-EpCAM ont été agencés pour immobiliser les CTC [22, 23]. Grâce au couplage avec la ML, aujourd'hui, il est possible d'isoler une seule CTC [22]. La ML va venir capturer spécifiquement la CTC isolée sur le Nano Velcro. Ces tests NanoVelcro-LCM de 2e génération peuvent isoler une CTC contrairement aux tests NanoVelcro de première génération qui permettent uniquement l'énumération des CTC.

Ce principe a également été développé sur filtre ISET. Le test ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells) est un examen médical permettant la détection précoce des cancers par l'isolation de CTC dans le sang. La technologie ISET est basée sur le principe de la filtration car les cellules tumorales provenant de cancers solides sont de dimensions plus grandes que les cellules sanguines classiques. Le test ISET utilise un appareil ainsi que des filtres spécialement conçus pour éliminer tous les

érythrocytes et pratiquement tous les leucocytes de l'échantillon. La ML permet de couper les filtres et ainsi de prélever des CTC pour analyse moléculaire. Ainsi, il a été démontré la suppression homozygote de p53 dans des cellules Hep3B uniques après filtration et ML [24].

Le système nerveux se prête également parfaitement à la ML de par son hétérogénéité tissulaire et cellulaire (**Figure 6**).



**Figure 6** : Exemple de ML appliqué en neurosciences **a.** ML sur coupe congelée de gyrus denté après coloration au crésyl violet 1% (5X), **b.** ML d'astrocytes sur coupe de tissu fixé après marquage en immunofluorescence (63X), **c.** ML d'astrocytes sur coupe de tissu fixé après injection de bille fluorescente (63X), **d.** ML de neurone GFP en culture cellulaire (63X) – Images des auteurs.

Les grandes structures et sous structures fonctionnelles du cerveau sont facilement identifiables sous microscope après une simple coloration. Les différents types cellulaires tels que les astrocytes sont également facilement identifiables par immunomarquage. Les technologies de ML spécifiques à un type de cellule, combinées avec des techniques moléculaires pour déterminer les profils d'expression, sont devenues des outils puissants pour mieux comprendre la base

neurobiologique des perturbations des circuits neuronaux dans diverses maladies neurologiques ou psychiatriques [25]. Dans cette publication, les auteurs proposent des protocoles pour identifier des populations cellulaires spécifiques dans le tissu cérébral *post-mortem* avec 2 systèmes de ML (LCM, Acturus XT ou LMD, Leica), en particulier pour isoler différentes populations neuronales (neurones GABAergiques et dopaminergiques) et des oligodendrocytes après une combinaison d'IHC rapide ou par coloration de Nissl.

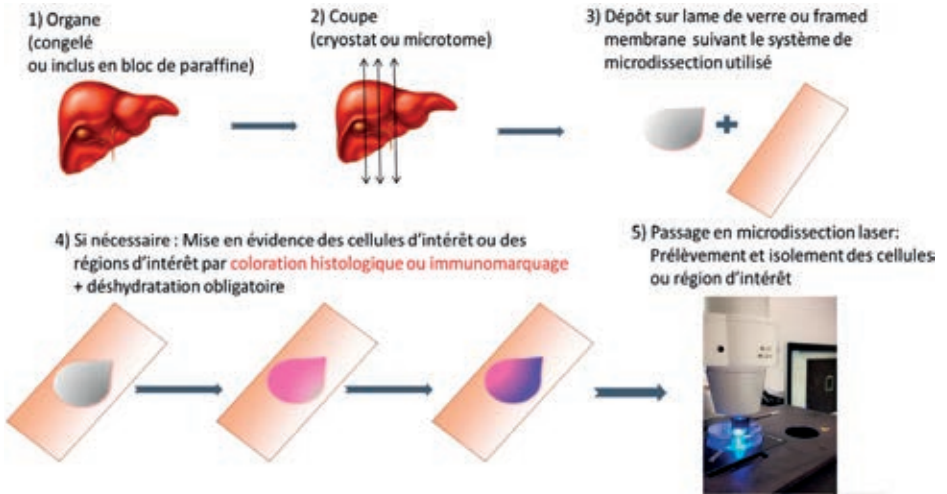
Les plantes sont également particulièrement adaptées aux applications de ML. L'organisation tissulaire très régulière et les parois cellulaires stables des plantes facilitent l'identification visuelle de la plupart des types de cellules, même dans des coupes de tissus non colorées. Les cellules végétales isolées par ML ont été le point de départ de diverses études génomiques et métaboliques de types cellulaires spécifiques. Cependant la ML de tissus végétaux peut être complexe et les protocoles de préparation des tissus végétaux doivent être optimisés au cas par cas [26]. On trouve tout de même dans la littérature quelques protocoles « prêt-à-l'emploi » pour réaliser la ML de végétaux comme par exemple la réalisation de coupes transversales (100µm) de tiges à l'aide d'un vibratome. Les sections coupées sont collectées immédiatement et stockées sur de la glace dans des tubes avec de l'eau additionnée d'un inhibiteur de RNase avant d'être transférées sur des lames. Après élimination de l'excès de liquide, les lames sont séchées dans un dessiccateur à + 4°C avant de récolter des régions tissulaires spécifiques par ML [27].

Ainsi, les avancées sur les outils post microdissection ont permis d'étendre les applications. L'enjeu principal d'une ML de qualité est la préparation histologique de l'échantillon. Preuve en est, un grand nombre d'articles compare et valide différents protocoles histologiques de préparation suivant le type d'échantillons. Cette première étape est la plus importante, elle détermine à la fois la qualité de la découpe par ML et les résultats des analytes.



### 3. La préparation des échantillons à la microdissection laser

Les étapes de la préparation des lames à la ML sont décrites **Figure 7**.



**Figure 7** : Le traitement histologique de l'échantillon pré-microdissection.

#### 3.1 Le prélèvement et la coupe

Une large gamme d'échantillons peut être utilisée pour faire de la ML. Les échantillons pouvant être traités en ML sont soit congelés, soit fixés et congelés, soit fixés en paraformaldéhyde (PFA) et inclus en bloc de paraffine appelés tissu FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded).

La congélation d'un tissu pour la ML est identique à celle utilisée pour l'histologie classique, c'est-à-dire congélation après enrobage en OCT (ou non), en cryomold plongé dans l'isopentane refroidi à l'azote. Dans certains cas, en particulier lorsque l'on travaille avec de la fluorescence, la fixation est indispensable. Le tissu peut alors être préalablement fixé en PFA classiquement 4% et, ou non, incubé dans une solution de sucrose à 30%. Les échantillons sont ensuite congelés et conservés à -80°C.

De même, la préparation de tissu FFPE pour la ML est identique à celle utilisée en histologie classique. Les blocs FFPE sont gardés à température ambiante. Il est

donc parfois possible de travailler avec des échantillons archivés depuis plusieurs années.

La congélation, sans fixation, du tissu est la méthode à privilégier pour la ML, en particulier pour l'analyse des transcrits d'ARN messagers (ARNm). En effet, le paraformaldéhyde, classiquement utilisé pour la fixation des tissus, induit des liaisons covalentes qui nécessitent ensuite des extractions agressives des biomolécules, risquant de fragmenter la molécule d'intérêt. Cependant, il existe aujourd'hui sur le marché une variété de kits d'extraction d'ADN et d'ARN qui permettent d'obtenir des résultats satisfaisants sur tissus fixés [28]. Pour l'extraction des protéines, il existe aussi maintenant des tampons de lyse commerciaux qui permettent de « reverter » la fixation en douceur. De même, les méthodes de dosage et de qualification des ARN sont aujourd'hui adaptées et les méthodes d'analyse actuelles, comme le séquençage ou l'utilisation de sondes d'ADN complémentaires (ADNc) d'une longueur réduite en nucléotides, permettent de travailler sur ARN plus ou moins fragmenté.

Ces propos doivent tout de même être nuancés et des échantillons fixés devront avoir des contrôles qualité plus importants (DV200/RNA Integrity Number-RIN) que les ARN issus de tissus congelés.

Les tissus congelés ou FFPE utilisables pour la ML n'ont pas besoin d'avoir été récemment préparés. Par contre, il est nécessaire de travailler sur des lames fraîchement coupées.

L'étape de coupe demande également quelques précautions pour les tissus destinés à la ML. En effet, il faut nettoyer les cryostats/microtomes à l'éthanol 70% et avec une solution décontaminante type RNase away. Il faut également nettoyer les lames à l'éthanol 70% si celles-ci ne sont pas stériles, afin de limiter la présence de RNases, et porter des gants. Un 1<sup>er</sup> point stop après la coupe est possible avec conservation des lames à -80°C, pas plus d'une semaine, pour les tissus congelés, en conditions propre et hermétique. Les lames peuvent être placées dos à dos dans un tube Falcon 50mL (millilitres) avec des graines de silice au fond et du film de scellage type parafilm autour du bouchon.

Même si pour certains systèmes il est possible de réaliser la ML sur lame de verre, les coupes sont le plus souvent déposées sur des lames spécifiques pour la ML. Ces lames peuvent être légèrement différentes suivant les systèmes utilisés. Pour simplifier le propos, il existe 2 types de lames : les lames PEN recouvertes d'un film de polyéthylène naphthalate et les lames PET recouvertes d'un film de

polytéréphtalate d'éthylène. Ce film a un double rôle : 1/ il aide à la découpe car le polymère va concentrer l'énergie du laser et 2/, suivant les systèmes, il facilite la récupération par gravité (film plus lourd) ou par catapultage (film plus fin mais qui permet un support pour l'échantillon lors du catapultage). Les lames PEN sont classiquement utilisées pour les colorations histologiques alors que les lames PET sont utilisées pour les immunomarquages. Notons qu'il existe également les « frame-slides », qui sont faites d'un cadre métallique où est étiré un film PEN ou PET, et donc pas de verre dans ce cas. Les frame-slides doivent être utilisées pour le système MMI Cell Cut.

## 3.2 Coloration histologique et immunomarquage

Cette étape avant la ML dépend de ce que le manipulateur cherche à prélever.

Dans tous les cas, on distingue les étapes suivantes : 1/ pour les lames FFPE, pré-traitement avec déparaffinage et réhydratation de façon classique, par immersion dans plusieurs bains de xylène ou substitut, et bains d'éthanol décroissant, 2/ coloration ou immunomarquage et enfin 3/ déshydratation par des bains d'éthanol croissants, voire une étape de xylène (recommandée pour les systèmes couplés à l'IR).

Concernant la coloration, différents colorants classiquement utilisés en histologie fonctionnent. On retrouve 2 colorations très utilisées : le crésyl violet 1% et l'hématoxyline éosine (HE) pour l'étude des ADN et ARN. Attention à certaines éosines qui ne sont pas recommandées pour les applications en protéomique.

On recommandera donc des protocoles classiques de coloration, une vigilance sera apportée avec des solutions Rnase free, des incubations plus rapides et à froid pour maximiser la qualité de la biomolécule d'intérêt.

Les immunomarquages sont également possibles, ils demandent toutefois des mises au point spécifiques pour chaque anticorps (Ac) [29]. Il est préférable de choisir un Ac primaire couplé au fluorochrome pour limiter le temps d'incubation. Ensuite, il s'agit de trouver les conditions d'immunomarquage les plus rapides tout en conservant un fort signal. Les paramètres qui pourront être ajustés sont la concentration d'Ac, le temps d'incubation et la température. Il est également possible d'ajouter des inhibiteurs de RNase pendant les incubations pour ralentir la dégradation des ARN. En cas de tissu fixé ou FFPE, une étape de démasquage est nécessaire pour rendre l'épitope d'intérêt accessible à l'Ac. Il est préférable en

ML d'utiliser des démasquages enzymatiques comme par exemple la protéinase K qui ne nécessite pas de température d'incubation importante qui risquerait de dégrader les biomolécules d'intérêt.

Idéalement, les étapes de traitement de la lame : sa coupe, sa coloration ou immunomarquage, sa déshydratation et sa microdissection laser doivent être faites dans la foulée, afin de préserver au mieux la qualité des biomolécules du tissu, en particulier l'ARN.

### **3.3 La microdissection laser**

Après coloration ou immunomarquage, les lames sont immédiatement placées sous le microdissecteur. La ML est réalisée (sauf cas de chambre d'incubation) à température et hygrométrie ambiantes. Bien que les lames soient déshydratées et l'activité des enzymes ralentie, ces dernières vont peu à peu se réactiver et entraîner une dégradation des biomolécules. La durée du traitement des lames sous le microdissecteur est donc définie et elle est directement dépendante de l'organe étudié. Certains organes, comme le cerveau et le cœur, ont une activité RNAsique relativement faible qui permet de travailler 1h30 sans observer de dégradation. D'autres organes, comme le pancréas, doivent être microdisséqués très rapidement, en 20 minutes maximum. Ce « temps de microdissection » est à mettre en relation directe avec l'activité enzymatique de l'organe.

Une fois les « microdissécats » récupérés dans les tubes (de différents types selon le modèle de microdissecteur utilisé), ils sont incubés et lysés dans un tampon d'extraction adéquat pour ADN, ARN ou protéines.

Ici, peut intervenir alors un 2<sup>ème</sup> point stop ; les lysats peuvent être congelés à -80°C, avant extraction des biomolécules d'intérêt et leurs analyses.

## 4. La microdissection laser de demain

### 4.1 La microdissection laser comme technique de spatial omique

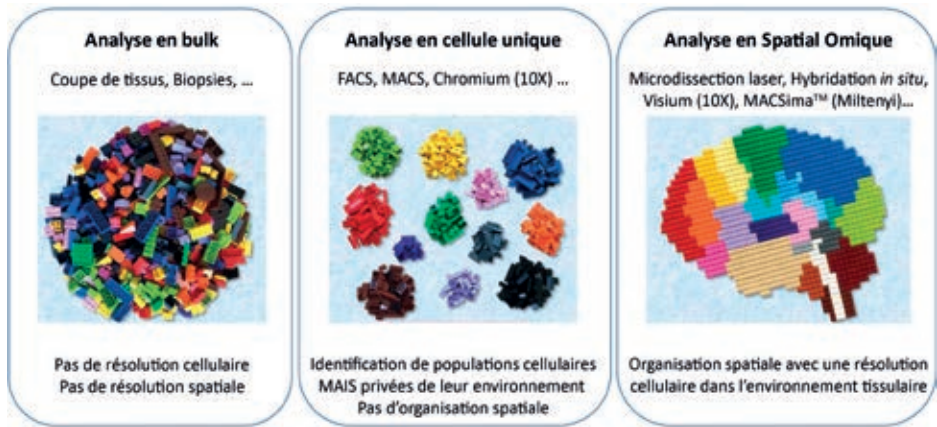
#### 4.1.a Qu'est-ce que les -omiques ?

Les études « omiques » visent à caractériser, de manière fine et complète, la totalité des biomolécules en présence, dans son ensemble et sans *a priori*, au niveau de la cellule, d'un groupe de cellules, d'un organe, d'un organisme. On parle de Génomique pour l'analyse de l'ADN ; de Transcriptomique pour l'analyse de l'expression des gènes ; de Protéomique pour l'ensemble des protéines ; de Métabolomique pour l'étude des métabolites cellulaires (acides organiques, sucres, acides gras, acides aminés mais aussi certains peptides et vitamines) ; et de Lipidomique pour les lipides. Ces études se font à grande échelle ; dans les cellules humaines, protéome et transcriptome sont maintenant analysés à partir des milliards de copies traduites (protéome) de tout ou partie des environ 20 000 protéines identifiées et des copies d'ARN transcrits (transcriptome) représentant des centaines de millions de molécules.

S'appuyant largement sur les avancées des technologies de pointe, les analyses « omiques » sont possibles. Depuis l'apparition des puces à ADN/ARN, du RNASeq, et enfin du NGS (Next Generation Sequencing), il est en effet possible à partir de cellules ou d'un organe broyé et lysé, d'obtenir le séquençage des ADNc issus de la transcription inverse des ARNm extraits et donc de connaître l'expression du génome à un temps T de la vie d'un organisme ou d'un individu et de comparer différentes conditions. De même, grâce à la spectrométrie de masse, il est possible de connaître, à partir d'une suspension cellulaire ou d'un tissu lysé, l'ensemble des protéines et métabolites présents à un temps T dans une cellule/un tissu/ un organe/ un organisme. Comme le protéome, le métabolome est dépendant du contexte, c'est-à-dire que les taux de protéines ou de métabolites sont modifiés en fonction de l'état physiologique, développemental ou pathologique d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme.

Dans ces approches "en bulk" (**Figure 8**), la dimension spatiale est perdue.

Pourtant, elle se révèle aujourd'hui nécessaire à la compréhension des mécanismes biologiques en jeu. On sait aujourd'hui qu'une cellule ou un micro-organisme évolue en fonction de son environnement. Il est donc indispensable de pouvoir visualiser la position d'une cellule/d'un micro-organisme dans un territoire tissulaire, d'identifier les interactions cellule/cellule, de caractériser un micro-environnement tumoral ou



**Figure 8** : Comparaison des différents types d'analyse des tissus et de leur niveau de résolution cellulaire et spatiale.

Images libres de droit issues de <https://boxia2018.wixsite.com/boxia/moments>.

infectieux indispensable à la compréhension de l'évolution d'une tumeur dans son environnement ou l'évolution d'un micro-organisme (bactérie, virus, parasite) dans sa relation hôte/pathogène. La dimension spatiale est donc un complément essentiel aux études omiques.

#### **4.1.b Utilisation de la ML pour les études génomique et transcriptomique**

La ML a été la première technique disponible pour concilier -omique et dimension spatiale et unicellulaire. En effet, comme dit précédemment, sur un tissu microdisséqué, il est possible de réaliser toutes les études de biologie moléculaire en ayant une information spatiale puisque le microdissécat est issu d'une coupe observée sous microscope. Un profil peut être issu d'un type cellulaire unique [30] d'un territoire tissulaire identifié spécifique [31] mais dont on connaît à chaque fois la dimension spatiale et l'environnement.

#### **4.1.c Utilisation de la microdissection laser dans les autres -omiques**

Les analyses de protéomique, métabolomique et lipidomique sont réalisées grâce à la spectrométrie de masse (MS). Concernant les protéines, elles sont découpées en peptides qui sont analysés par MS/MS. Les séquences en acides aminés étant connues, il est alors possible de connaître toutes les protéines en présence au sein d'un microdissécat. Tout comme pour les protéines, les métabolites et lipides

présents au sein d'un tissu sont identifiables par spectrométrie de masse, plus précisément par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC-High Performance Liquid Chromatography). Le frein majeur à ce type d'études est l'accès à une grande quantité de matériels. En effet, à l'inverse des ARN et ADN, les protéines, métabolites et lipides ne peuvent être amplifiés, il faut donc dès le départ prélever, par ML, un nombre de cellules ou une surface de tissu suffisant pour pouvoir travailler sur des quantités suffisantes de matériels. Un deuxième frein est l'extraction des molécules. En effet, pour les ADN ou ARN, il existe des tampons et kits d'extraction « prêt-à-l'emploi » et standardisés, ce qui n'est pas du tout le cas pour les protéines, métabolites et lipides.

Bien que les études en métabolomique et lipidomique soient encore peu réalisées aujourd'hui en ML, il semble toutefois qu'elles soient techniquement possibles, à condition de traiter suffisamment de matériels biologiques pour dépasser les seuils de détection des spectromètres de masse. L'étude des métabolites couplée à la microdissection laser se pratique aujourd'hui essentiellement dans le modèle végétal [32].

Aujourd'hui, la protéomique est donc le 3<sup>ème</sup> omique à se développer en microdissection laser. Malgré l'absence de standardisation dans l'extraction des protéines, plusieurs protocoles sont récurrents pour obtenir du matériel suffisamment abondant et qualitatif, et réaliser des études de protéomique [33]. Pour mieux illustrer l'apport du développement entre microdissection laser et protéomique, nous avons choisi de décrire ici l'utilisation de la ML dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer (MA) [34]. Plusieurs études confirment que la présence de plaques amyloïdes permet de diagnostiquer les personnes qui souffrent de la MA, voire de prédire le développement de la maladie chez certains patients. En effet la dégénérescence des neurones qui survient dans la MA est en partie due à l'accumulation anormale d'une protéine appelée peptide bêta-amyloïde (peptide A $\beta$ ) à l'extérieur des cellules nerveuses. C'est cette accumulation de protéines qui conduit à la formation de « plaques amyloïdes », également appelées « plaques séniles ». Des études antérieures examinant les protéines associées aux plaques ont montré que ces plaques contiennent de nombreuses protéines en plus de la bêta-amyloïde. Une étude utilisant la ML et l'analyse LC-MS a permis d'identifier les protéines impliquées. A partir de coupe FFPE, les plaques amyloïdes ont été visualisées par immunohistochimie fluorescente en utilisant une combinaison d'anticorps puis collectées par microdissection laser (2mm<sup>2</sup> cumulés) et analysées

en LC-MS. Cette étude a permis de mettre en évidence l'enrichissement significatif de 48 protéines dans les plaques amyloïdes, dont beaucoup peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles et/ou des biomarqueurs de la MA.

#### **4.1.d La Microdissection laser versus les techniques récentes d'études -omiques**

Les technologies récentes de spatiales -omiques développées par diverses sociétés (10x Genomics, Nanostring, Vizgen, etc...) allient études -omiques et dimension spatiale. Cependant, la ML reste une technique pertinente pour diverses raisons :

- La ML est une alternative moins onéreuse, en particulier comparée aux autres techniques de transcriptomique spatiale (ST) actuelles. En effet, elle ne nécessite pas l'achat d'un nouvel équipement, des microdissecteurs laser étant déjà disponibles sur de nombreuses plateformes en France. Le coût consommable est très bas comparé aux autres techniques de ST. La ML permet de traiter un grand nombre d'échantillons et de régions microdisséqués à faible coût même si le temps technique peut être long.
- Les résultats sont immédiats. En effet, les analyses bioinformatiques qui suivent le traitement d'une lame en ST sont longues, chères et nécessitent des personnes compétentes en bioinformatique.
- La ML est la seule approche à pouvoir fournir, en plus des études en génomique et transcriptomique, des données de protéomique (métabolomique et lipidomique) en relation avec un groupe de cellules, un type cellulaire, un territoire tissulaire. Il est possible avec un même échantillon de réaliser en parallèle une analyse transcriptomique et protéomique.
- La ML est aussi capable de travailler sur cellule unique contrairement aux techniques disponibles actuelles qui n'ont pas encore une résolution cellule unique. En effet, grâce au laser, il est possible de ne prélever qu'une seule cellule et d'obtenir des données à l'échelle de la cellule unique voire subcellulaire. Ce qui est difficile à obtenir aujourd'hui avec les techniques de ST récentes.
- La ML reste plus sensible en terme de nombre de gènes détectés. Là où les techniques de ST actuelles vont pouvoir détecter environ 3 000 gènes pour une dizaine de cellules, les techniques de séquençage appliquées à la ML vont pouvoir en détecter 10 000 pour un même nombre de cellules. Il est vrai aussi que sont visibles les gènes les plus fortement exprimés.
- La ML permet de détecter des gènes même faiblement exprimés, au contraire des techniques de ST actuelles qui ne permettent de voir l'expression que des



gènes les plus exprimés. En effet, la ML permet d'obtenir un microdissécat très spécifique, enrichi en un type cellulaire d'intérêt ou en un groupe de cellules ou en un territoire tissulaire particulier, par pool de plusieurs coupes de tissus, et donc d'augmenter la quantité de matériau spécifiquement d'intérêt et d'obtenir pour objet d'étude, un microdissécat très spécifique. Ainsi il devient possible de révéler les gènes les moins exprimés dont le signal serait camouflé par les gènes les plus fortement exprimés, comme les miRNA (micro RNA) [35].

## 4.2 Les futures évolutions de la microdissection laser

Pour la découpe de structures/régions tissulaires, les fournisseurs ont développé des logiciels qui permettent de réaliser la ML rapidement. A partir de coupes en série, il est possible d'identifier les régions d'intérêt sur une lame traitée (coloration, DAB). En reportant des marqueurs sur la lame marquée, le logiciel va dessiner automatiquement les régions sur toutes les coupes de la lame. Ce protocole évite de dessiner manuellement toutes les régions à prélever et de ne réaliser le traitement que sur la première lame. L'inconvénient est que les coupes doivent être parfaitement bien réalisées en série et que les régions d'intérêt doivent être « stables » dans l'échantillon.

Pour les analyses en cellule unique, afin d'obtenir un profil d'expression représentatif, il peut être nécessaire de prélever un nombre important de cellules. Parfois l'expression du gène ou de la protéine est si faible qu'il peut être là encore intéressant de pooler plusieurs cellules. Dans ce cas la ML est un outil long et fastidieux car il nécessite un grand nombre de découpes. En moyenne, suivant comment sont organisées les cellules cibles, pour une découpe individuelle, il est possible de découper entre 150 à 250 cellules par heure. L'automatisation peut alors dans certains cas être très utile comme cela a été décrit dans l'article d'Ezzoukhry dans *Nat Commun* 2018 [36] qui travaille sur l'agressivité invasive des cellules cancéreuses corrélée à la présence d'invadosomes.

Les invadosomes sont des structures à base d'actine F impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, l'invasion cellulaire et la formation de métastases. Il est particulièrement crucial de déterminer leur composition moléculaire car leur présence dans les cellules cancéreuses est corrélée au caractère invasif de celles-ci. L'analyse de leur protéome est donc capitale pour décrypter leur composition moléculaire, comprendre leurs mécanismes et trouver des éléments spécifiques pour les cibler. Cependant, l'analyse spécifique des invadosomes est complexe, car il est difficile de maintenir leur intégrité pendant l'isolement. Pour assurer l'identification

spécifique des composants de l'invadosome, une méthode qui combine la ML et la spectrométrie de masse permet l'analyse des structures subcellulaires dans leur état natif sur la base de faibles quantités de matériau d'entrée. La collecte d'une centaine d'invadosomes par ML a permis d'identifier cinq peptides. Une nouvelle collecte manuelle de 10 000 invadosomes a permis d'identifier 250 peptides. Cependant, aller plus loin manuellement est trop chronophage. Pour accélérer le processus, l'équipe a développé une stratégie de découpe automatisée. Dans un premier temps, ici sous le logiciel Zeiss PALM, l'utilisateur localise un champ d'intérêt, une image est prise et elle est automatiquement importée sous le logiciel ImageJ. À l'aide d'un « plugin » maison, les métadonnées sont extraites et permettent d'accéder à l'emplacement précis de l'étape d'acquisition, exprimé sous la forme d'un jeu de coordonnées. Ces coordonnées sont utilisées pour calculer une matrice de points placés au centre du champ adjacent. À l'aide du plugin, cette matrice est exportée sous un format de fichier qui peut être traduit en élément dans le fichier du microdissecteur laser. Les éléments (ici les invadosomes) sont automatiquement dessinés. Cette automatisation permet de microdisséquer 900 éléments à l'heure, ce qui est 4 fois plus rapide qu'une ML réalisée manuellement. Ainsi, le système d'automatisation a permis de collecter 40 000 invadosomes et ainsi d'identifier 2 286 peptides correspondant à 570 protéines.

D'autres évolutions prometteuses sont en cours. En particulier en pathologie numérique (digital pathology) qui se concentre sur la gestion des données basées sur les informations générées à partir de lames d'échantillons numérisées. Les lames de verre sont converties en lames numériques qui peuvent être visualisées, gérées, partagées et analysées sur un écran d'ordinateur. En incluant la ML dans les techniques de pathologie numérique, il sera possible d'isoler à distance à partir de banque d'échantillons une région d'un tissu d'intérêt. Cette voie ouvre de larges perspectives de collaborations multisites vers l'utilisation de la ML comme un outil de diagnostic.

## CONCLUSION

Comme nous venons de le décrire, la ML a permis une avancée importante par rapport à la microdissection manuelle de tissus. C'est une technique très polyvalente car elle s'applique à tous les domaines de la science [37]. Par cet article nous voulions aussi sensibiliser le lecteur sur les points critiques de la ML qui ne sont pas la ML proprement dite mais la préparation des échantillons et les applications post-microdissection.

La ML dans les dissections de structures ou de régions après coloration est un outil très accessible, qui demande très peu d'investissement en temps et matériel. Dans ce cas, la technique est facile et rapide à mettre en application.

Dans les projets à l'échelle cellulaire ou subcellulaire nécessitant des marquages, la démarche demande des ajustements qui peuvent prendre plus de temps.

La ML contrairement aux techniques d'isolement cellulaire type FACS (Fluorescence activated cell sorting), cell sorter, MACS (Magnetic-activated cell sorting), a l'avantage de se réaliser dans l'environnement natif, sans perturber les tissus. Ce point est particulièrement important quand on sait que les cellules interagissent de façon très étroite. De plus, comme nous venons de le montrer, la ML est une technique qui inclut la dimension spatiale. Elle permet de mesurer l'expression des gènes dans un tissu et d'en cartographier la position au sein du tissu.

Son autre atout est d'être applicable à tous les -omiques : génomique, transcriptomique, protéomique, lipidomique, métabolomique, ce que ne propose pas encore les techniques récentes d'étude spatiale. De plus la ML a encore l'avantage d'être résolutive à l'échelle cellulaire/subcellulaire et d'être moins coûteuse comparée à certaines techniques.

Il ne s'agit pas de confronter les techniques entre elles mais simplement d'être conscient que la ML, pour certaines questions, est l'outil le mieux adapté.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ESPOSITO G: Complementary techniques: Laser capture microdissection increasing specificity of gene expression profiling of cancer specimens. *Adv Exp Med Biol*, 2007, **593**:54-65.
2. ELTOUM IA: Microdissection of histologic sections: Past, present, and future. *Adv Anat Pathol*, 2002, **9**:316-322.
3. GABRIEL I: Caractérisation des troubles digestifs non spécifiques chez le dindon-neau par morphométrie de l'intestin grêle. Septièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 2007.
4. SHIBATA D: Specific Genetic Analysis of Microscopic Tissue After Selective Ultraviolet Radiation Fractionation and the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Pathology*, 1992, **141**(3): 539-543.

5. SHIBATA D: Selective ultraviolet radiation fractionation and polymerase chain reaction analysis of genetic alterations. *American Journal of Pathology*, 1993, **143**:1523-1526.
6. HARSCH M: A New Method for Histological Microdissection Utilizing an Ultrasonically Oscillating Needle. *American Journal of Pathology*, 2001, **158**(6): 1985–1990.
7. TERPITZ U: Isolation of guard cells from fresh epidermis using a piezo-power microdissection system with vibration attenuated needles. *Bio Techniques*, 2010, **48**:68-70.
8. HUANG H: Piezoelectric Ultrasonic Biological Microdissection Device Based on a Novel Flexure Mechanism for Suppressing Vibration. *Micromachines*. 2021;**12**(2):196. doi: 10.3390/mi12020196.
9. MONAJEMBASHI S: Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Exp Cell Res*, 1986, **167**:262-265.
10. MURRAY GI: An overview of laser capture microdissection technologies. *Acta Histochem*, 2007, **109**:171-176.
11. BEVILACQUA C: Laser microdissection: A powerful tool for genomics at cell level. *Molecular Aspects of Medecine*, 2018, **59**: 5-27.
12. WULF M: Laser Microdissection-Based Protocol for the LC-MS/MS Analysis of the proteomic Profile of Neuromelanin Granules. *J Vis Exp*. 2021 Dec 16;(178). doi: 10.3791/63289.
13. KRONEIS T: Global preamplification simplifies targeted mRNA quantification. *Scientific Reports*, 2017, **7**:45219. doi: 10.1038/srep45219.
14. DILLON D: Detection of Ki-ras and p53 mutations by laser capture microdissection/PCR/SSCP. *Methods Mol. Biol.*, 2005, **293**:57–67 doi: 10.1385/1-59259-853-6:057.
15. JENSEN LH: Laser microdissection and microsatellite analysis of colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res.*, 2006, **26**, 2069–2074.16.
16. WILD PJ: Laser microdissection for microsatellite analysis in colon and breast cancer. *Methods Mol. Biol.* 2005, **293**:93–101. <https://doi.org/10.1385/1-59259-853-6:093>.
17. CHENG L: Laser-assisted microdissection in translational research. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2013, Jan;**21**(1):31-47. doi: 10.1097/PAI.0b013e31824d0519.
18. MAITRE M: Western blot detection of brain phosphoproteins after performing Laser Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC). *J Neurosci Methods*, 2011, **198**(2)/204-12.

19. MUSTAFA D: Combining laser capture microdissection and proteomics techniques. *Methods Mol Biol*, 2008, **428**:159-78.
20. VONA G: Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 2000, **156** (1):57-63.
21. MAUNEY SA: Cell Type-Specific Laser Capture Microdissection for Gene Expression Profiling in the Human Brain, *Methods Mol Biol*, 2018, **1723**:203-221.
22. CHEN J-F: Clinical Applications of NanoVelcro Rare –Cell Assays for detection and characterization of circulating tumor cells. *Theranostics*, 2016, **6**(9)/1425-1439.
23. BONNER RF: Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science*, 1997, **278**:1481-1483.
24. VONA G: Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 2000, **156** (1):57-63.
25. MAUNEY SA: Cell Type-Specific Laser Capture Microdissection for Gene Expression Profiling in the Human Brain, *Methods Mol Biol*, 2018, **1723**:203-221.
26. DAY R: Transcript analysis of laser microdissected plant cells. *Physiologia Plantarum*, 2007, **129**:267-282.
27. OLSEN S: A rapid preparation procedure for laser microdissection-mediated harvest of plant tissues for gene expression analysis. *Plant Methods*, 2019, **15**:88.
28. AMINI P: An optimized protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissues amenable for next-generation sequencing. *BMC Molecular Biol*, 2017, **18**:22.
29. MURAKAMI H: IF-LCM: Laser capture microdissection of immunofluorescently defined cells for mRNA analysis. *Kidney Int.*, 2000, **58**(3):1346-53.
30. DONALD J : Microdissection Methods Utilizing Single-Cell Subtype Analysis and the Impact on Precision Medicine, *Methods Mol Biol*. 2022;**2394**:93-107.
31. CHASSAING B : Identification of Inner Mucus-Associated Bacteria by Laser Capture Microdissection, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019; **7**(1): 157–160.
32. XU R : Comparative analysis in different organs and tissue-specific metabolite profiling of *Atractylodes lancea* from four regions by GC-MS and laser microdissection, *J Sep Sci*, 2021 : **45**/5 : 1067-1079.
33. ROUDNICKÝ P : Laser capture microdissection in combination with mass spectrometry: Approach to characterization of tissue-specific proteomes of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea, Polyopisthocotylea). *PLOS ONE*. 17 june 2020;**15**(6):e0231681.

34. DRUMMOND E: The amyloid plaque proteome in early onset Alzheimer's disease and down syndrome. *Acta Neuropathologica Communications*, 2022, Apr 13; **10**(1):53. doi: 10.1186/s40478-022-01356-1.
35. VIBHAV G : An Efficient LCM-Based Method for Tissue Specific Expression Analysis of Genes and miRNAs, *Sci Rep* 2016 Feb 10; **6**:21577.
36. EZZOUKHRY Z: Combining laser capture microdissection and proteomics reveals an active translation machinery controlling invadosome formation. *Nature communications*, 2018, **10**.1038.
37. LEGRÈS L: Principe et applications de la microdissection laser en histopathologie. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010, **418**:57-66. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70347-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70347-6).



**Jeudi 16 juin 2022**

Invitation à l'Histologie en Provence

## **XXXV<sup>ème</sup> Congrès AFH 2022 - Marseille**

**08h00 : Accueil des congressistes**

**09h00-09h30 : Ouverture du congrès**

Nathalie Accart, présidente de l'AFH et Jean-Paul Borg, directeur du CRCM

**09h30-10h00 : Oscarella lobularis : une éponge pour mieux comprendre l'origine et l'évolution des épithéliums** - Carole Borchiellini

### **Session 1 : « Bench to Bedside » - Apport de l'Histologie dans le développement clinique**

*Modérateur : Jean-Paul Borg*

- **10h00-10h30 : Développement d'un anticorps thérapeutique dans le traitement du cancer du sein** - Marc Lopez
- **10h30-11h : ICOS est fortement exprimé dans les lymphomes T cutanés et son ciblage permet l'inhibition des cellules tumorales** - Florent Amatore

**11h00-11h20 : Pause café et visite de l'exposition - Session posters**

**11h20-12h20 : Ateliers des exposants**

### **Session 2 : Hétérogénéité Tumorale**

*Modérateur : Emmanuelle Charafe*

- **12h20-12h40 : Multiplex Spatial : retour d'expérience avec le MACSima** - Anne Farina
- **12h40-13h00 : Rhéologie tumorale : une dimension encore inexploitée de l'histologie**  
Michael Sebbagh
- **13h00-13h20 : Quantification de l'expression de Ki67 dans le cancer du sein par analyse d'images** - Marion Rubis

**13h20-14h20 : Déjeuner - Visite de l'exposition**

### **Session 3 : Histologie Marine**

*Modérateur : Alain Fautrel*

- **14h20-14h40 : Le concombre de Mer se démasque** - Patrick Le Chevalier/Mireille Ledevin

**14h40-15h40 : Atelier des exposants**

**15h40-16h00 : Pause café et visite de l'exposition - Session posters**

- **16h00-16h20 : Toxicologie développementale sur les larves de moules : apport de l'imagerie pour l'étude fine des tissus** - Rémi Dumollard
- **16h20-16h40 : Assemblée Générale**

**16h40 - Clôture de la première journée**

**Départ pour une visite de la réplique de la grotte Cosquer**

**20h00 - Dîner de gala**



**Vendredi 17 juin 2022** Invitation à l'Histologie en Provence

## XXXV<sup>ème</sup> Congrès AFH 2022 - Marseille

### **Session 4 : Histologie des Organoïdes**

*Modérateur : Géraldine Guasch-Grangeon*

- **09h00-09h20 : Les organoïdes : un modèle de choix pour reproduire les caractéristiques histologiques du tissu d'origine** - Véronique Chevrier
- **09h20-09h40 : Les organoïdes tumoraux : modèle d'hétérogénéité tumorale** - Audrey Vincent
- **09h40 -10h00 : Organoïde et transpiration** - Nicolas Mouchet

**10h00-10h20 : Pause café et visite de l'exposition - Session posters**

**10h20-11h20 : Ateliers des exposants**

### **Session 5 : Méthodes d'imagerie novatrices**

*Modérateur : Nathalie Accart*

- **11h20-11h50 : Imagerie 3D de l'innervation tumorale dans des organes transparents**  
Fanny Mann
- **11h50-12h20 : Compatibilité de l'Histologie Raman Stimulée avec l'examen anatomopathologique et le séquençage du génome** - Barbara Sarri
- **12h20-12h50 : Transcriptomique spatiale par capture in situ et séquençage à haut-débit des ARNm** - Pierre Milpied

**12h50-13h50 : Déjeuner - Visite de l'exposition - Session posters**

### **Session 6 : Histologie de l'Os**

*Modérateur : Michel Aurrand-Lions*

- **13h50-14h10 : Identification des cellules du tissu osseux par histochimie enzymatique et immunohistochimie** - Dominique Heymann
- **14h10- 14h30 : Imagerie de la niche hématopoïétique chez la souris à l'aide de la technique de Kawamoto** - Tony Marchand
- **14h30-14h50 : Recherche histologique de particules exogènes en Anthropologie médico-légale** - Catherine Cannet

**15h00 : Clôture du congrès**





# CONFERENCE INAUGURALE

## ***Oscarella lobularis* :** **une éponge pour mieux comprendre l'origine et l'évolution des épithéliums**

Carole BORCHIELLINI

Maître de conférences à Aix-Marseille Université

*Institut de Biodiversité et d'écologie marine et continentale,  
Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille*

carole.borchiellini@imbe.fr

L'apparition des épithéliums est considéré comme un élément crucial dans l'acquisition de la multicellularité permanente chez l'ancêtre commun des animaux. Aujourd'hui les caractéristiques des épithéliums sont définies par rapport à ce que l'on connaît chez les bilatériens. Afin d'émettre des hypothèses sur les caractéristiques ancestrales de ces épithéliums et leur évolution il est indispensable de développer des approches comparatives et d'étudier l'organisation de ces tissus dans les lignées non-bilatériennes. Nous avons choisi de développer un modèle éponge car elles constituent l'une des lignées ayant émergé le plus précocement au cours de l'évolution des animaux en nous focalisant sur l'espèce *Oscarella lobularis* de la famille des homoscléromorphes qui présentent histologiquement des tissus similaires aux épithéliums des bilatériens.

## Session 1 : «Bench to Bedside» Apport de l'Histologie dans le développement clinique

# Développement d'un anticorps thérapeutique dans le traitement du cancer du sein

Marc LOPEZ

*Laboratoire d'Oncologie Prédictive, Centre de Recherche en  
Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068,  
CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes,  
27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*

marc.lopez@inserm.fr

Le cancer du sein Triple Négatif (TNBC) est un sous-type de cancer du sein de mauvais de pronostic. La chimiothérapie reste le traitement de référence, mais la probabilité de développer des métastases reste très élevée, avec une survie globale médiane d'environ 15 mois. Contrairement aux autres sous-types de bons pronostics, il n'existe que peu de traitement de thérapies ciblées permettant un traitement de la maladie métastatique. Nous avons identifié au laboratoire un biomarqueur pronostic de surface appelé Nectine-4 exprimé dans le sous-type TNBC. Les données d'immunohistochimie montrent une forte expression dans 62% des TNBC et peu d'expression dans les tissus sains. Un anticorps monoclonal anti-nectine-4 conjugué à une drogue (ADC) a été développé et montre une efficacité marquée dans des modèles précliniques TNBC primaires et métastatiques. Le développement d'un médicament de type ADC ciblant la nectine-4 est en cours.

## Session 1 : «Bench to Bedside» Apport de l'Histologie dans le développement clinique

# ICOS est fortement exprimé dans les lymphomes T cutanés et son ciblage permet l'inhibition des cellules tumorales

Florent AMATORE

1. *Centre de recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM U1068, CNRS U7258, Aix Marseille Université, Institut Paoli - Calmettes, Marseille, France*
2. *Service de Dermatologie, Aix Marseille Université, APHM, Hôpital Nord, Marseille, France*
3. *Service de dermatologie et oncodermatologie, Hôpital de la Timone, Aix-Marseille Université, Marseille, France*

florent.amatore@ap-hm.fr

Il existe un besoin thérapeutique important pour les formes sévères de lymphomes T cutanés (LTC). La brentuximab vedotin (BV), un anticorps anti-CD30 de type antibody-drug conjugate (ADC) couplé à la monométhyl auristatine E (MMAE), ne permet que des réponses de courte durée. Inducible Co-Stimulator (ICOS) est un récepteur de costimulation lymphocytaire T impliqué dans le développement des LTC. Notre étude évalue son potentiel en tant que cible thérapeutique.

## Session 2 : Hétérogénéité Tumorale

# Multiplex Spatial : retour d'expérience avec le MACSima

Anne FARINA

*ICEP Platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille,  
CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258,  
Aix Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes,  
27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*

*Cellules souches épithéliales et cancer, Centre de Recherche en Cancérologie  
de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258,  
Aix-Marseille Université U105, Institut Paoli Calmettes,  
27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*

farinaa@ipc.unicancer.fr

Les cancers épithéliaux sont connus pour présenter une importante hétérogénéité intratumorale qui contribue à la progression de la maladie et à la résistance thérapeutique. L'origine de cette hétérogénéité cellulaire est principalement expliquée par la présence de sous-populations qui diffèrent sur le plan phénotypique et fonctionnel et qui dérivent de cellules souches cancéreuses (CSCs). Ainsi, les CSCs alimentent la croissance tumorale et contribuent à la résistance aux thérapies conventionnelles et au développement métastatique. Le développement de nouvelles thérapies ciblant les CSCs nécessite une meilleure compréhension de leur rôle à l'origine de l'hétérogénéité tumorale. Pour répondre à la problématique de la compréhension de l'hétérogénéité tumorale et de son microenvironnement, le Multiplex Spatial est une nouvelle technologie adaptée. L'analyse de plusieurs dizaines de marqueurs permettant de cartographier précisément les sous-populations cellulaires tumorales, l'infiltrat lymphocytaire et les cellules du microenvironnement promet de donner une compréhension plus fine des mécanismes à l'origine de la progression tumorale. Ici, nous vous exposerons le retour d'une expérience Multiplex Spatial avec le MACSima Imaging System de chez Miltenyi.

## Session 2 : Hétérogénéité Tumorale

# Rhéologie tumorale : une dimension encore inexploitée de l'histologie

Michael SEBBAGH

*Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Aix Marseille Université  
UM105, Institut Paoli-Calmettes, UMR7258 CNRS, U1068 INSERM, France*

michael.sebbagh@inserm.fr

L'observation et la caractérisation des désordres et altérations tissulaires associées aux pathologies est au fondement du développement de l'histologie et du diagnostic étiologique. En cancérologie cela reste l'une des étapes majeures de stratification des patients participant à l'élaboration de traitements leur étant le plus adaptés. Cela s'effectue principalement, par l'analyse et la quantification de marquages et colorations caractérisant des altérations fonctionnelles et organisationnelles du tissu. Admises sans être formalisées en anatomopathologie, ces analyses mettent en lumière des domaines nécrotiques ou fibrotiques aux propriétés viscoélastiques très différentes. D'ailleurs, ces altérations des propriétés mécaniques, ou rhéologie, au cours de la progression tumorale sont évidentes et, restent au travers de la palpation pour les parties accessibles, l'un des premiers signes d'alerte. Bien qu'encore peu documentée, la rhéologie intra-tumorale révèle une hétérogénéité topographique. Nos résultats suggèrent qu'au sein de la tumeur, ces domaines de rhéologies variables contribueraient à la progression tumorale. Ainsi, leurs caractérisations pourraient avoir un intérêt tout autant diagnostic que contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'œuvre.

Ces travaux bénéficient du Programme Investissement d'Avenir, Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université – A\*Midex.

## Session 2 : Hétérogénéité Tumorale

# Quantification de l'expression de Ki67 dans le cancer du sein par analyse d'images

Marion RUBIS

*ICEP Platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille,  
CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258,  
Aix Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes,  
27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*

marion.rubis@inserm.fr

La prolifération cellulaire non contrôlée est l'une des caractéristiques majeures de la malignité et de l'agressivité du cancer du sein. La mesure la plus communément pratiquée de cette prolifération est l'évaluation immunohistochimique (IHC) de l'expression de l'antigène Ki67, un marqueur nucléaire exprimé dans toutes les phases du cycle cellulaire autres que G0. De nombreuses études ont démontré son utilité pronostique et prédictive dans le cadre de traitement adjuvant comme néoadjuvant. Cependant, la variabilité inter et intra observateurs de sa mesure ainsi que la difficulté à établir un seuil permettant de distinguer un « Ki67 élevé » d'un « Ki67 faible » limitent fortement son utilité clinique. C'est pourquoi, d'autres techniques plus standardisées ont émergé ces dernières années comme les tests d'expression multigénique. Ces tests s'avèrent être très robustes et reproductibles mais leurs coûts restent très élevés en comparaison de celui d'une immunohistochimie comme celle du Ki67 (jusqu'à 100 fois plus). Il est donc tout à fait logique de vouloir trouver des alternatives à ces tests coûteux en améliorant l'utilisation de tests existants grâce à une technique en plein essor en pathologie : l'Intelligence Artificielle. En effet, la numérisation en histo-pathologie ouvre la porte à des solutions d'analyse d'images qui pourront améliorer l'analyse et la quantification des signaux produits en histologie de façon plus objective et standardisée. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'apport de l'analyse d'images automatisée du Ki67 dans les cancers du sein hormono-dépendants. Pour cela, nous le comparerons à la quantification « manuelle » par le pathologiste, et évaluerons son intérêt pronostique en comparaison d'un test multigénique de deuxième génération (Prosigna®).



## Session 3 : Histologie Marine

# ***Crassostrea gigas*, une huître au service de la recherche sur le Cancer**

Charlotte CORPOREAU

*Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UBO-CNRS-IRD-IFREMER-IUEM – Plouzané.*

*Ifremer- Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins*

*Laboratoire Physiologie des Invertébrés Marins, Centre Bretagne -Z.I Pointe du Diable, CS 10070,F-29280 Plouzané, France*

Charlotte.Corporeau@ifremer.fr

De par son mode de vie, l'huître *Crassostrea gigas* possède des capacités particulières afin d'adapter son métabolisme aux changements extrêmes du milieu dans lequel elle se trouve. Elle est naturellement capable de reprogrammer son métabolisme vers l'effet Warburg qu'elle contrôle. Or, l'effet Warburg est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses chez l'être humain, permettant aux cellules cancéreuses de satisfaire leurs besoins énergétiques en fonction du microenvironnement qu'elles rencontrent au sein de la tumeur. *Crassostrea gigas* représente ainsi un modèle d'intérêt pour mieux comprendre l'effet Warburg de la cellule cancéreuse et ainsi découvrir de nouvelles voies d'attaque contre la cellule cancéreuse.

## Session 3 : Histologie Marine

# Le concombre de Mer se démasque : Qu'est-ce qui baigne dans le liquide cœlomique de l'holothurie ?

Mireille LEDEVIN <sup>1</sup>, Thibaut LARCHER<sup>1</sup>, Fanny GAILLARD <sup>2</sup>,  
Hélène LAGUERRE <sup>2</sup> & Patrick LE CHEVALIER<sup>2</sup>

1. INRAE, Oniris, UMR0703 PAnTher, APEX, 44000 Nantes

2. Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (EA 3884),  
Université de Bretagne Occidentale 29000 Quimper

[mireille.ledevin@oniris-nantes.fr](mailto:mireille.ledevin@oniris-nantes.fr), [thibaut.larcher@inrae.fr](mailto:thibaut.larcher@inrae.fr), [fanny.gaillard@upmc.fr](mailto:fanny.gaillard@upmc.fr),  
[helene.laguerre@univ-brest.fr](mailto:helene.laguerre@univ-brest.fr), [patrick.lechevalier@univ-brest.fr](mailto:patrick.lechevalier@univ-brest.fr)

Les holothuries ou concombres de mer habitent les fonds marins du monde entier (Brusca, 2005). Outre leur rôle environnemental et leur importance économique en tant qu'aliment, les holothuries suscitent l'intérêt des scientifiques en raison de leur biologie encore peu caractérisée.

Après avoir étudié l'organisation histologique d'*Holothuria forskali*, nous nous sommes intéressés aux cellules circulantes nommées cœlomocytes afin de les identifier, de les localiser au sein des tissus de l'holothurie et de mieux comprendre leurs fonctions immunes supposées. Ces résultats sont ensuite confrontés aux données obtenues en parallèle par des analyses de métagénomique ciblée (métabarcoding 16S) qui montrent l'existence de core-microbiotes spécifiques à certains tissus.

Cet ensemble de résultats illustre la théorie de l'hologénome qui considère l'hôte et les micro-organismes associés (le microbiote) comme un super-organisme appelé holobionte au sein duquel les relations symbiotiques mutuelles assurent une résilience accrue aux fluctuations environnementales. L'ensemble de ce « bactériote » résidentiel composé de genres bactériens marins ubiquistes doit vraisemblablement jouer un rôle essentiel dans l'homéostasie de cet holobionte marin.

## Session 3 : Histologie Marine

# Toxicologie développementale sur les larves de moules : apport de l'imagerie pour l'étude fine des tissus

Rémi DUMOLLARD et Angélica MIGLIOLI

*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR7009 Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-mer (LBDV), Institut de la Mer à Villefranche (IMEV), Villefranche sur-mer, France*

remi.dumollard@imev-mer.fr

Le développement larvaire de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* est un système modèle bien établi pour évaluer les effets des facteurs de stress environnementaux sur les invertébrés marins. Cependant, les processus régulant le développement larvaire chez les mollusques bivalves sont encore très peu connus. Nous avons conçu des protocoles d'hybridation in situ (ISH), d'immunomarquage et de colorations vitales pour étudier la biogenèse de la coquille et la neurogenèse: processus morphogénétiques extrêmement sensibles aux contaminants environnementaux et au changement climatique. La biogenèse de la coquille larvaire qui commence au stade trochophore précoce (24 heures post fécondation (pf)) jusqu'au stade D-Véliger (48 heures pf) est quantifiée par marquage avec les deux colorants vitaux Calcofluor et Calcein qui, respectivement, colorent la matière organique et partie calcifiée de la coquille en croissance. Au cours de la même fenêtre de développement, la neurogenèse précoce a été étudiée avec des anticorps dirigés contre les neurotransmetteurs sérotonine (5-HT) et acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). En outre, des ISH ont été réalisées pour étudier l'apparition des neurones dopaminergiques (DOPA) et la population neuronale globale. Nos résultats montrent que la biogenèse de la coquille commence au stade trochophore à un stade où les larves de moules présentent déjà une population neuronale abondante qui comprend à la fois des cellules 5-HT et GABA positives, tandis que les neurones DOPA n'apparaissent qu'à des stades plus avancés. Chez les D-Véligers, la coquille est en forme de D tandis que les neurones, en particulier 5-HT, sont organisés en proto-ganglions. Ces techniques et découvertes nous ont permis de démontrer des effets neurotoxiques ainsi que des effets directs sur les premiers stades de la biogenèse des coquilles pour divers facteurs de stress, notamment les perturbateurs endocriniens et l'acidification des océans.

## Session 4 : Histologie des Organoïdes

# Les organoïdes : un modèle de choix pour reproduire les caractéristiques histologiques du tissu d'origine

Véronique CHEVRIER, Eddy TRAVERSARI, Julien BONNET, Manon SAUBIN,  
Louciné MITOYAN, Flora POIZAT, Cécile DECHAISEMARTIN,  
Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET, Géraldine GUASCH

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille INSERM 1068- IPC - CNRS  
7258 - AMU U105 Equipe Cellules Souches Epithéliales et Cancer,  
MARSEILLE, France

veronique.chevrier@inserm.fr

Les organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles (3D) qui reproduisent *in vitro* la micro-anatomie et au moins une fonction d'un organe. Ce modèle d'organe est obtenu à partir d'une ou plusieurs cellules souches qui dans nos études sont des cellules souches adultes. Ces organoïdes sont des structures 3D qui se développent quand les cellules souches sont dans des conditions environnementales appropriées qui vont leur permettre de se différencier et s'organiser avec des formes et des propriétés semblables aux tissus ou organes. Nous avons montré que les organoïdes développés à partir de diverses parties de la zone anorectale (épithéliums glandulaires du rectum, épithéliums stratifiés des zones de transitions épithéliales ainsi que du canal anal) (Mitoyan et al, Nat. Com., 2021 May12, doi: 10.1038/s41467-021-23034-x), de l'estomac ou de la glande mammaire ressemblaient histologiquement à leurs tissus d'origine et que ces organoïdes conservent les caractéristiques moléculaires du tissu initial.

Les organoïdes dérivés de tumeurs de patients (aussi appelés tumoroides) sont similaires phénotypiquement et génotypiquement aux épithéliums tumoraux dont ils sont issus. Ils reproduisent l'hétérogénéité tumorale retrouvée au sein des tumeurs. Des tumoroides dérivés de patients atteints de cancer du rectum vont reproduire le stade de différenciation de la tumeur d'origine allant de tissus bien différenciés aux tissus les plus indifférenciés.

Ainsi les organoïdes dérivés de tissus sains ou tumoraux sont de nouveaux modèles d'étude des tissus qui permettent de modéliser des maladies.

## Session 4 : Histologie des Organoïdes

# Organoïde et transparence

Nicolas MOUCHET

Plateforme H2P2,

2 avenue du Professeur Léon Bernard - 35043 RENNES cedex

nicolas.mouchet@univ-rennes1.fr

Les organoïdes sont des systèmes modèles d'organes miniaturisés et simplifiés *in vitro* qui ont révolutionné la recherche biomédicale. Ces structures 3D sont dérivées de cellules souches adultes. Les relations spatiales peuvent ainsi être étudiées. La restitution d'images 3D à partir d'échantillons devient un enjeu majeur pour visualiser, explorer, analyser et quantifier. Le problème majeur des échantillons est leur composition intrinsèque qui empêche une observation correcte et ce, malgré les avancées dans les méthodes d'observation optiques et les sondes. Une des alternatives est de rendre les échantillons plus transparents de sorte que la lumière puisse passer et permettre l'acquisition d'images en profondeur dans les tissus. Arriver à homogénéiser les indices de réfraction et à enlever les constituants à haut indice de réfraction est l'enjeu principal. Nous utilisons différentes méthodes de clarification sur la plateforme (CUBIC, FOCM, fructose-glycerol, ...) ce qui nous permet de travailler sur des organes, des organoïdes et aussi des os. Afin de visualiser, nous utilisons principalement des microscopes confocaux qui sont disponibles localement. Nous reconstruisons les images 3D avec les logiciels Fiji et AMIRA afin de quantifier les différents marqueurs.

## Session 5 : Méthodes d'imagerie novatrices

# Imagerie 3D de l'innervation tumorale dans des organes transparents

Fanny MANN

*Aix Marseille Univ, CNRS, IBDM UMR 7288, Marseille, France*

[fanny.MANN@univ-amu.fr](mailto:fanny.MANN@univ-amu.fr)

Il n'existe aucun tissu exempt de connexions nerveuses et, par conséquent, les tumeurs malignes sont elles aussi pourvues d'une interface neuronale, quel que soit leur site d'émergence et de propagation. De plus en plus de travaux indiquent que les cellules cancéreuses et les cellules du système nerveux s'engagent dans un dialogue réciproque dont les conséquences sont bénéfiques, mais parfois au contraire néfastes, pour la progression de la maladie. L'infiltration nerveuse dans le microenvironnement tumoral a donc récemment émergé comme un biomarqueur pronostique et une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers.

Cette présentation portera sur une méthode d'imagerie tridimensionnelle permettant d'analyser l'organisation des réseaux neuronaux dans des échantillons tumoraux transparisés. Nous illustrerons comment cette approche, appliquée à un modèle murin d'adénocarcinome canalaire du pancréas, a permis de mettre en évidence des remodelages propres à chaque sous-type de neurones lors du développement de la maladie.

## Session 5 : Méthodes d'imagerie novatrices

# Compatibilité de l'Histologie Raman Stimulée avec l'examen anatomopathologique et le séquençage du génome

Barbara SARRI

*Institut Fresnel , Faculté des Sciences-Av. Escadrille Normandie-Niémén  
13013 Marseille**Lightcore Technologies, 35-39 rue d'Antibes 06400 Cannes*

barbara.sarri@fresnel.fr ; barbara.sarri@lightcore.tech

## Résumé :

Basée sur l'imagerie vibrationnelle, la microscopie Raman Stimulée est ici combinée à de l'imagerie de seconde harmonique pour obtenir des images virtuellement colorées, dites d'Histologie Raman Stimulée (SRH). Deux liaisons chimiques,  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ , sont adressées simultanément grâce à l'utilisation d'un microscope deux couleurs Raman cohérent (DC-microscope, Lightcore Technologies) et nous permettent d'accéder à la morphologie de l'échantillon ; tandis qu'une simple soustraction ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ) permet de mettre en exergue la distribution des noyaux cellulaires. La génération de seconde harmonique, acquise en parallèle, révèle la distribution du collagène, un autre élément primordial dans le développement des tumeurs (fibrose) et sera virtuellement teint en tons orangés pour reproduire le safran. Deux types d'échantillons sont analysés : des lames cryogénées et des biopsies. On établit ici une correspondance quasi-parfaite entre l'imagerie SRH et l'histologie Hématoxyline Eosine Safran (HES) standard sur les premiers échantillons d'abord imagés en SRH puis teints en HES. Rapide, sans marquage et ne nécessitant aucune préparation préalable, on démontre pour la première fois que l'imagerie SRH n'altère pas l'échantillon (biopsie) et est compatible avec l'examen anatomopathologique et le séquençage du génome. Ceci est particulièrement important dans le cadre des consultations intra-opératoires où temps et matériel sont limités.

## Session 5 : Méthodes d'imagerie novatrices

# Transcriptomique spatiale par capture *in situ* et séquençage à haut-débit des ARNm

Pierre MILPIED

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), Inserm, CNRS, Aix Marseille Université, Parc Scientifique de Luminy – case 906, 13288 Marseille cedex 09

[milpied@ciml.univ-mrs.fr](mailto:milpied@ciml.univ-mrs.fr)

Le séquençage de l'ARNm sur cellules uniques a révolutionné l'analyse des systèmes biologiques complexes dans la dernière décennie. Ces analyses « single-cell » permettent de caractériser finement les différents types cellulaires et leurs états fonctionnels présents dans un tissu d'intérêt, mais requièrent de procéder à la dissociation du tissu analysé ; elles négligent ainsi un élément fondamental de l'organisation des tissus : la localisation des cellules dans leur environnement. Depuis quelques années, plusieurs méthodes innovantes ont été développées pour analyser l'expression de plusieurs milliers de gènes directement dans les tissus, permettant ainsi de faire le lien entre les analyses transcriptomiques et l'histologie. Une des méthodes de transcriptomique spatiale repose sur l'utilisation de lames recouvertes d'oligonucléotides permettant la capture localisée des ARNm du tissu apposé sur cette lame, et l'assignation de code-barres spatiaux à ces molécules d'ARNm. Après préparation de librairie RNA-seq, séquençage, et déconvolution des code-barres spatiaux, l'analyse bioinformatique permet de quantifier l'expression localisée de gènes d'intérêt avec une résolution d'environ 50 µm. Dans mon laboratoire, en collaboration avec la plateforme d'histologie du CIML, nous utilisons cette méthode pour localiser certains sous-types cellulaires et états fonctionnels dans des échantillons de tumeurs humaines (lymphomes, cancer du poumon). Je présenterai les aspects pratiques et les résultats de ces analyses, et mettrai l'accent sur les points forts, les points faibles, et les défis qui restent à relever dans le domaine de la transcriptomique spatiale.



## Session 6 : Histologie de l'Os

# Identification des cellules du tissu osseux par histochimie enzymatique et immunohistochimie

Dominique HEYMANN

*1. Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine, Nantes**2. CNRS, UMR6286, US2B, Institut de Cancérologie de l'Ouest  
Bd Jacques Monod, Saint-Herblain*

dominique.heyman@univ-nantes.fr

Le tissu osseux est un dérivé du tissu conjonctif composé d'une matrice extracellulaire associée à différentes sous populations cellulaires. La spécificité de la matrice extracellulaire osseuse est sa forte composante minérale sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite en lien étroit avec la trame collagénique. Une étape de décalcification va donc être nécessaire pour éliminer cette composante minérale et permettre son enrobage en paraffine (non indispensable pour une inclusion en résine). La nature de la solution décalcifiante dépendra de la taille de la pièce à analyser et de l'utilisation ultérieure de l'échantillon. Le remodelage osseux est assuré par deux catégories cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont des cellules mésenchymateuses mononucléées responsables du processus de minéralisation et peuvent être mises en évidence par des approches histoenzymologiques (ex. phosphatase alcaline osseuse) ou immunohistochimiques (ex : osterix, Runx2). Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique et responsables du processus de résorption osseuse. Des approches d'identification histoenzymologiques (ex : TRAP) ou immunohistochimiques (ex : Cathepsine K) permettent de les quantifier et d'évaluer leur activité de résorption. A ces cellules osseuses, les cellules de l'arbre vasculaire sont également, très fortement impliquées dans la croissance osseuse et des sous populations des cellules endothéliales peuvent être identifiées par des approches immohistochimiques (ex : NG2, endomucine). Le tissu osseux étant en perpétuel remaniement tout au long de la vie, la balance entre le nombre et activité des ostéoblastes et des ostéoclastes varie au cours du temps, ce paramètre doit être intégré à toute interprétation des marquages tissulaires.

## Session 6 : Histologie de l'Os

# Imagerie de la niche hématopoïétique chez la souris à l'aide de la technique de Kawamoto

Tony MARCHAND<sup>1,2,3,4</sup>

1. Service d'hématologie Clinique, CHU de Rennes, Rennes, France

2. Université Rennes 1, Rennes, France

3. INSERM U1236, Rennes, France

4. Paul Frenette Lab, Einstein College of Medicine, New York, NY, Etats-Unis

tony.marchand@chu-rennes.fr

La moelle osseuse assure le renouvellement quotidien des cellules sanguines. Situées au sommet de la hiérarchie, les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules pluripotentes douées de propriétés d'autorenouveau et de différenciation. Ces propriétés sont très finement régulées au sein d'un microenvironnement complexe, appelé niche, constitué notamment de vaisseaux sanguins, nerfs et cellules stromales.

Les cellules stromales mésenchymateuses constituent une population hétérogène de cellules non hématopoïétiques. Initialement considérées comme de simples cellules de soutien assurant l'architecture de la moelle osseuse, les cellules stromales mésenchymateuses suscitent un intérêt croissant compte tenu de leur rôle dans le contrôle de l'hématopoïèse et leurs propriétés immunomodulatrices et régénératives. En dehors de la moelle osseuse, des populations stromales ont été décrites dans de nombreux tissus comme le périoste. L'existence d'une éventuelle hiérarchie entre les populations stromales est à ce jour inconnue.

L'étude de la niche hématopoïétique par des techniques d'imagerie est complexe notamment du fait de la différence de consistance entre le tissu osseux et la moelle osseuse. Cette différence est fréquemment responsable d'une rétraction de la moelle ou d'une altération du tissu osseux lors des techniques de fixation ou de coupe rendant difficile l'analyse de la niche endostéale, zone de contact entre le tissu hématopoïétique et le tissu osseux.

En utilisant une technique développée par le Dr Tadafumi Kawamoto, nous avons étudié le microenvironnement médullaire et les interactions entre les cellules stromales mésenchymateuses situées au sein du périoste et le stroma médullaire. Cette technique permet de préserver l'intégrité de la niche endostéale lors de la coupe de fémurs de souris non décalcifiés. En préservant l'architecture du tissu médullaire, cette technologie permet l'analyse précise des différents constituants de la niche hématopoïétique sur coupes fines. Nos travaux suggèrent l'implication des cellules stromales du périoste dans la régénération médullaire après agression.

## Session 6 : Histologie de l'Os

# Recherche histologique de particules exogènes en Anthropologie médico-légale

Catherine CANNET

*Institut de Médecine Légale de Strasbourg, laboratoire d'histomorphométrie,  
11 rue Humann, 67085, Strasbourg, France*

catherine.cannet@wanadoo.fr

En anthropologie médico-légale, lorsque les corps sont squelettisés, putréfiés ou momifiés, la présence de particules exogènes peut fournir des indices déterminants quant au déroulement de l'action criminelle.

La recherche histologique de telles particules ainsi que leur mise en évidence permettent d'apporter des preuves scientifiques objectives pour servir les intérêts de la justice.

A travers trois exemples de cas, cette présentation s'attachera à démontrer que l'analyse histologique offre un moyen fiable pour détecter les particules exogènes en relation avec l'agent vulnérant et / ou l'environnement dans lequel se trouvait la victime.



# CONCOURS PHOTOS

En 2020, l'Association Française d'Histotechnologie a organisé son 1<sup>er</sup> **Concours des plus belles photos « histo-artistico-scientifiques »** qui a remporté un franc succès. Plébiscité par tous, il est dorénavant reconduit chaque année et toutes les photos soumises par nos adhérents sont reproduites dans l'édition de la Revue Française d'HistoTechnologie de l'année suivant son organisation, mettant en valeur les lauréats.

Pour rappel, ce concours, qui se veut ludique, s'adresse aux travaux originaux de ses adhérents dans leurs domaines d'application professionnelle quels qu'ils soient : biologie et sciences de la vie, microorganismes, champignons, végétaux, animaux, et autres fossiles ! Tissus sains ou malades, animaux ou humains, cellules et autres organoïdes en culture ... Ces photos, issues d'observations dans les laboratoires pratiquant les techniques propres à l'histologie, peuvent être par exemple un cliché de macroscopie, de tissu en bloc, congelé, en tube, ou un cliché en microscopie quelle qu'elle soit, optique, confocale, électronique, à balayage etc., elles sont toutes éligibles. Pour être retenues par les organisateurs, les photos issues des travaux scientifiques des participants devaient être esthétiques et présenter un caractère original (voir les détails dans le règlement ci-après). Partant du constat que par nature, l'histologie n'est pas seulement un domaine d'études professionnel, mais aussi une forme d'art, celle de révéler la beauté et la diversité des structures tissulaires en s'appuyant sur une variété de techniques de visualisation passant par des colorations ou non, nous souhaitons mettre en avant cette dimension artistique mais aussi son côté surprenant, captivant, émouvant, parfois drôle.... Tous ceux qui ont la chance de pratiquer cette discipline, qu'il soit talents des praticiens de l'histologie, débutant, ou véritable passionné de longue date d'histologie, ils ont tous à coup sûr eu des coups de cœur ou des émotions en observant de belles choses, d'autres inattendues, ou bien encore des rigolotes....

Par ce concours annuel, nous sommes heureux de constater la diversité des talents des praticiens de l'histologie et nous vous invitons à revoir les plus belles photos histo-artistico-scientifiques soumises au concours 2022.

Toutes les photos respectant le règlement, ont été mises en ligne sur le site internet de l'AFH puis à l'issue d'une période de vote, 3 lauréats ont été sélectionnés sur la base du plus grand nombre de votes récoltés. Nous avons recueilli en tout 34 très belles propositions et nous avons le plaisir de publier dans ce numéro de notre revue, cette belle galerie d'images, qui débute donc avec les photos des 3 lauréats, prolongeant ainsi l'opportunité de partager les émotions révélées par nos adhérents.

Peut-être serez-vous inspirés pour participer à votre tour, aussi nous vous invitons à mettre de côté dès à présent vos prochains clichés afin de participer plus nombreux encore au prochain concours.

*Montrez vos talents !*

1<sup>er</sup> PRIX

## **STRANGER THINGS**

La créature qui me hante toutes les nuits.

Triple marquage immuno-fluo zebrafish, objectif x10, scanné sur scanner de lames HAMAMATSU.

Gevorg GHUKASYAN - Plateforme H2P2 - Rennes  
lucasgev89@gmail.com



## 2<sup>ème</sup> PRIX

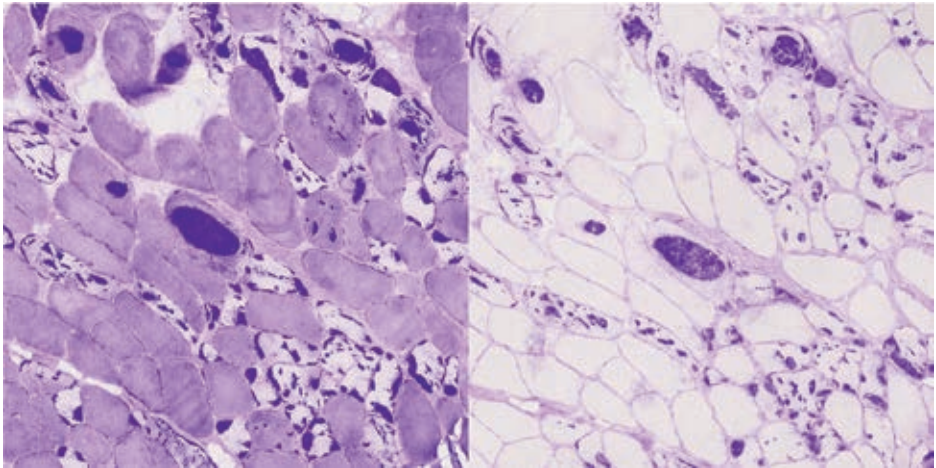
### **TU M'VOIS TU M'VOIS PLUS !**

« Tu m'vois tu m'vois plus » extrait d'Astérix et Obélix : Mission Cléopâtre »

Image acquise à l'objectif x10 au scanner de lame Axio Scan 21 (Zeiss) sur la plateforme APEX UMR703 PAnTher INRAe/Oniris de Nantes.

Coloration Acide Périodique de Schiff (à gauche) et après digestion enzymatique (à droite) sur biopsie musculaire de patient atteint de myopathie Polyglucosans. Image de 1000µm de côté

*Johan DENIAUD - UMR703 PAnTher INRAe/Oniris  
johan.deniaud@oniris-nantes.fr*



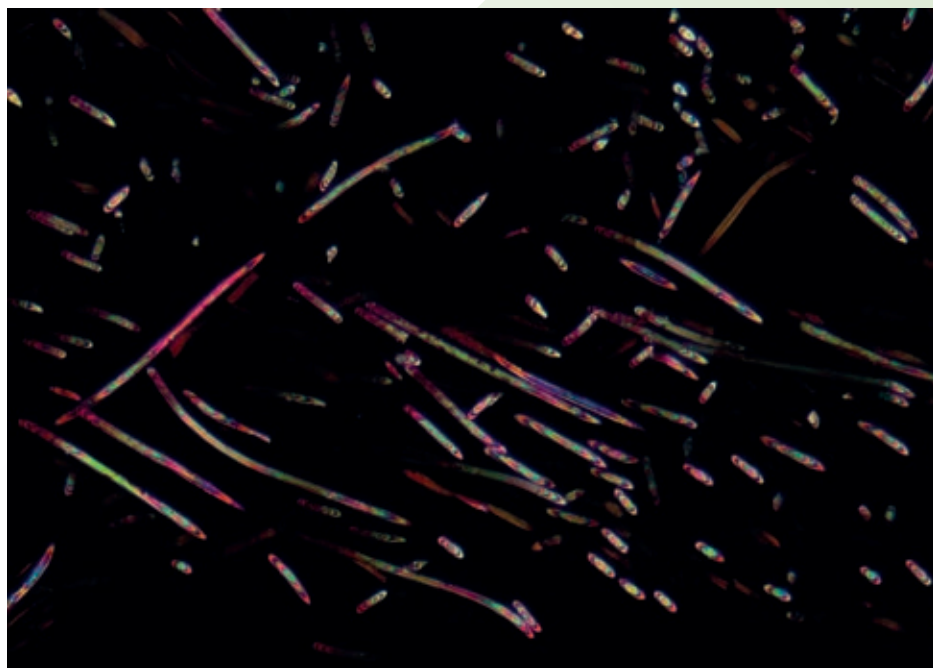


3<sup>ème</sup> PRIX

## UN BEL OUBLI 1

Fibres de compresses « oubliées » lors de l'opération

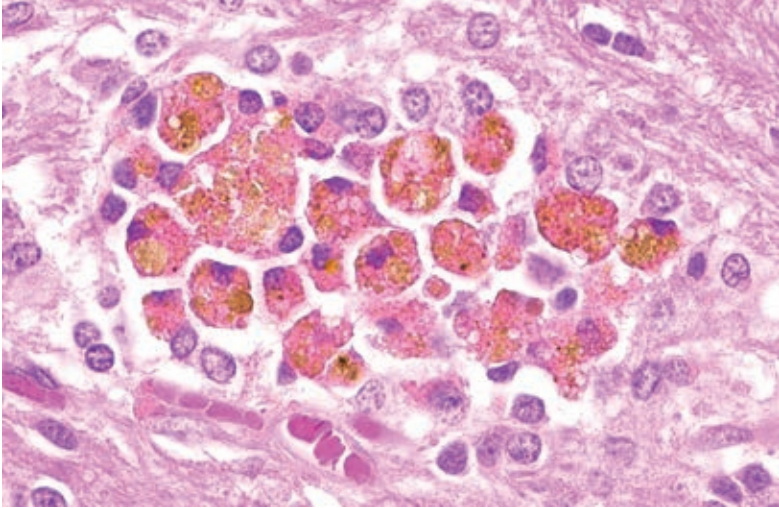
Guillaume GAUTIER - Laboniris  
guillaume.gautier@oniris-nantes.fr



## **PIGMENTS**

Cellules microgliales au cytoplasme empli de divers pigments. Cerveau de rat. HE (x400).

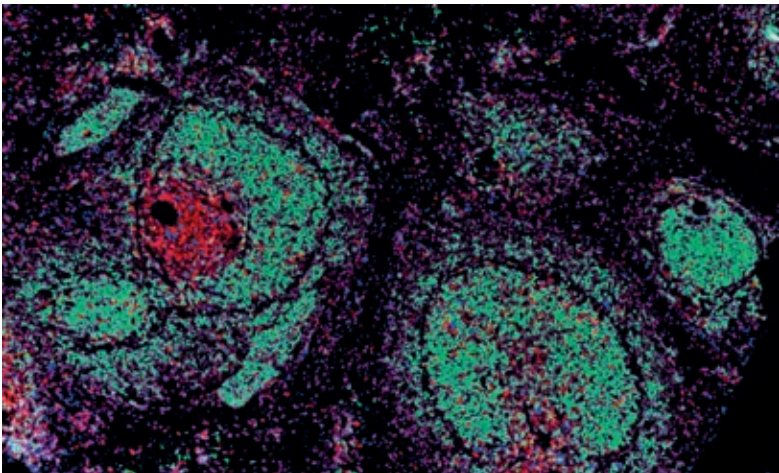
Mireille LEDEVIN - UMR703 PAnTher - mireille.ledevin@oniris-nantes.fr

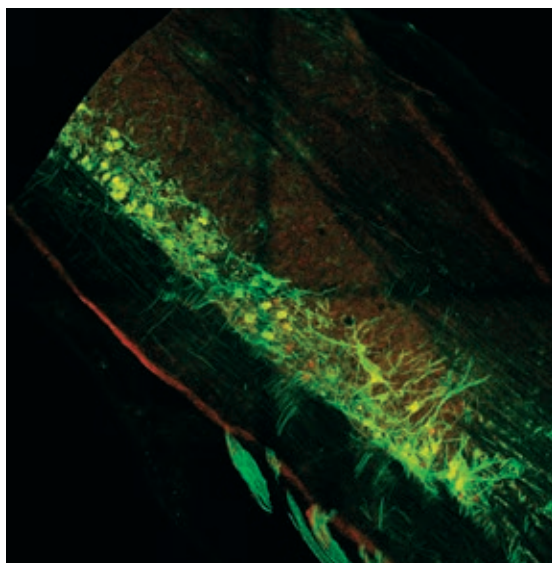


## **LE MONSTRE OBSERVE DANS LA NUIT**

Rate de souris multiplexe. CD45RC (vert), Pax5 (violet) CD68 (bleu), CD3 (rouge).

Mireille LEDEVIN - UMR703 PAnTher - mireille.ledevin@oniris-nantes.fr





## STARLINK 2030

Immunofluorescence GFP (vert) et ChAT (rouge) sur section longitudinale de moelle épinière lombaire de primate non humain. Image acquise à l'objectif x5 au confocal LSM780 (Zeiss) sur la plateforme APEX UMR703 PAnTher INRAe/Oniris de Nantes.

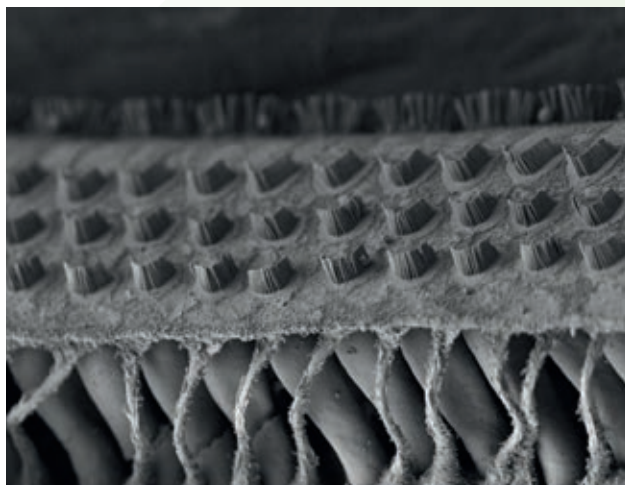
Johan DENIAUD

UMR703 PAnTher INRAe/Oniris

[johan.deniaud@oniris-nantes.fr](mailto:johan.deniaud@oniris-nantes.fr)

## LES PILIERS DE L'AUDITION

Exploration de la cochlée, le récepteur périphérique de l'audition. Visualisation de l'organe de Corti : au 1<sup>er</sup> plan, 3 couches de cellules ciliées externes sont présentes. On entrevoit la couche de cellules ciliées internes au 2<sup>nd</sup> plan. Les stéréocils en surface sont le siège de la transduction mécano-électrique. Cochlée fixée à la glutaraldéhyde puis au tétroxyde d'osmium. Les échantillons sont ensuite déshydratés et métallisés avant observation en microscopie électronique à balayage (Jeol JSM7400F).



Stéphane BOUCARD

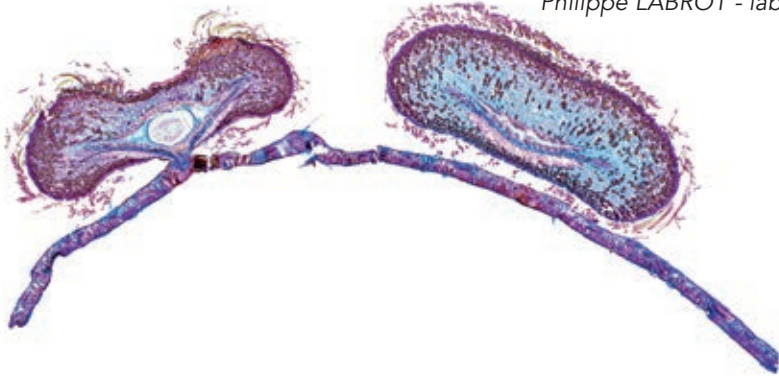
Laboratoire ONE

[stephane.boucard@inrs.fr](mailto:stephane.boucard@inrs.fr)

## UN HÔTEL SUR MESURE EN PENSION COMPLÈTE

*Neuroterus numismalis* est une petite guêpe qui, pour se reproduire, pond ses œufs sur des feuilles de chêne. Par des mécanismes encore mal connus, qui mettent en lumière l'incroyable complexité des interactions du monde animal avec le monde végétal, la feuille se retrouve forcée de développer autour des œufs des excroissances de grandes tailles très structurées (appelées galles ou cécidies), qui, par l'intermédiaire de différents tissus spécialisés protecteurs et nourriciers, offrent le gîte et le couvert à un hôte indésirable (microscopie optique en transmission, Etzold FCA, photo-mosaïque de 9 images, objectif x4).

Philippe LABROT - labrot@nirgal.net



## MIEUX QUE LE JAMES WEBB SPACE TELESCOPE (JWST) DE LA NASA ?

Cette coupe transversale du manteau d'une coquille Saint-Jacques (*Pecten Maximus*) passe par l'un des 200 yeux que possède l'animal pour observer et scruter son environnement. Bien que mesurant chacun environ 1 millimètre de diamètre, ces derniers comptent parmi les plus sophistiqués du monde vivant. Fonctionnant par réflexion, chaque œil met en effet en œuvre un miroir composé de cubes cristallins microscopiques, un système qui rappelle de manière frappante les miroirs segmentés des plus grands télescopes terrestres et spatiaux (microscopie optique en transmission, trichrome d'Azan, photo-mosaïque de 12 images, objectif x4).

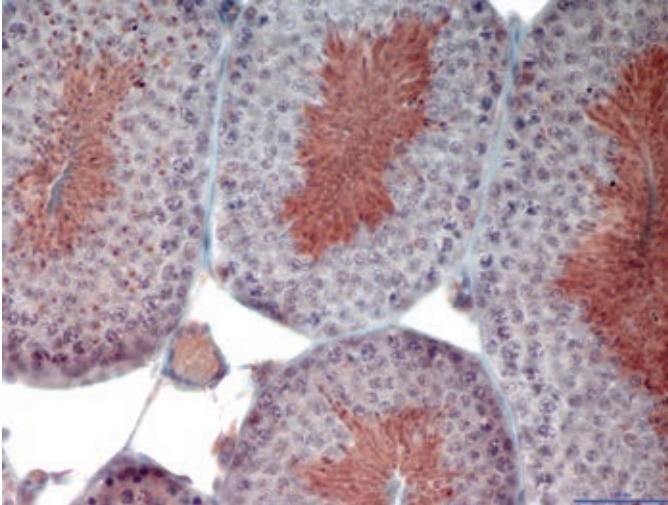
Philippe LABROT - labrot@nirgal.net



## **COUPE TRANSVERSALE DE TESTICULE 1**

Observation au microscope photonique après un marquage (étude immunohistochimique).

Adel GHOUL - LBCM / FSB / USTHB - ghoul.adel@yahoo.fr



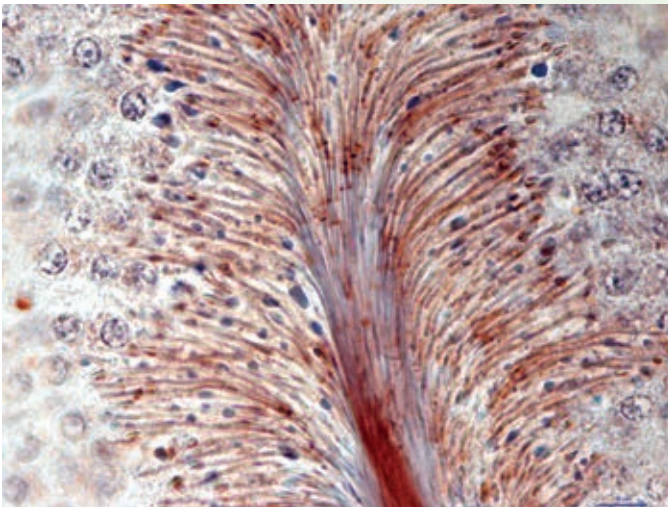
## **COUPE TRANSVERSALE DE TESTICULE 2**

Observation au microscope photonique après un marquage (étude immunohistochimique).

Adel GHOUL

LBCM / FSB / USTHB

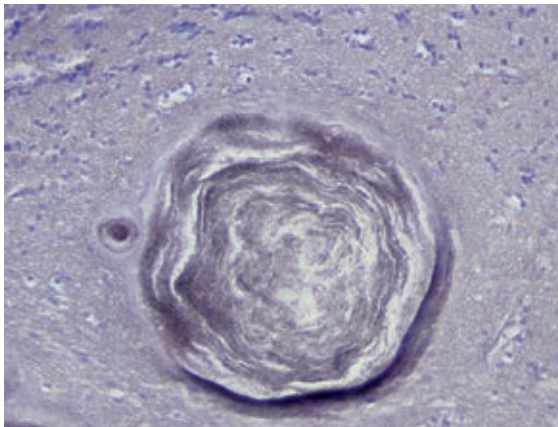
ghoul.adel@yahoo.fr



## 2022 ANNÉE DU TIGRE

Coupe frontale de cerveau de souris passant par les ventricules latéraux – marquage des neurones exprimant l'alpha-synucléine identifiée par immunohistochimie – Révélation DAB, sans coloration additionnelle. Image prise à l'objectif x4 à l'aide de la fonction « mosaïque » du logiciel de capture d'images.

Anna BENCSIK - ANSES - [anna.bencsik@anses.fr](mailto:anna.bencsik@anses.fr)



### **TROP CHOU LA TRANCHE !**

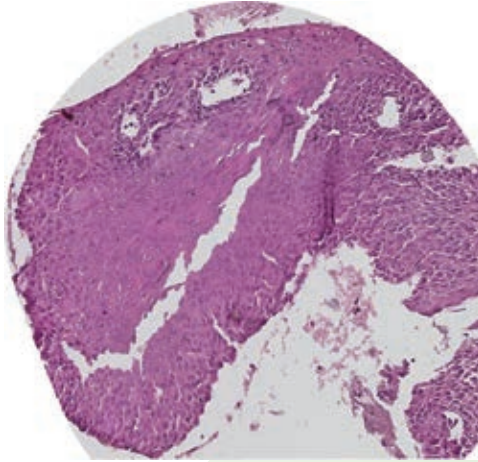
Hématoxyline sur coupe de cerveau de souris présentant dans le cortex des figures lésionnelles en spirales évoquant le motif d'une tranche de chou rouge. Lésions qui nous ont donné bien du fil à retordre, à la coupe, à l'interprétation... Bref de quoi se prendre le chou !

Anna BENCSIK - ANSES  
[anna.bencsik@anses.fr](mailto:anna.bencsik@anses.fr)

## **T-REX**

Human cervical biopsy CIN3.

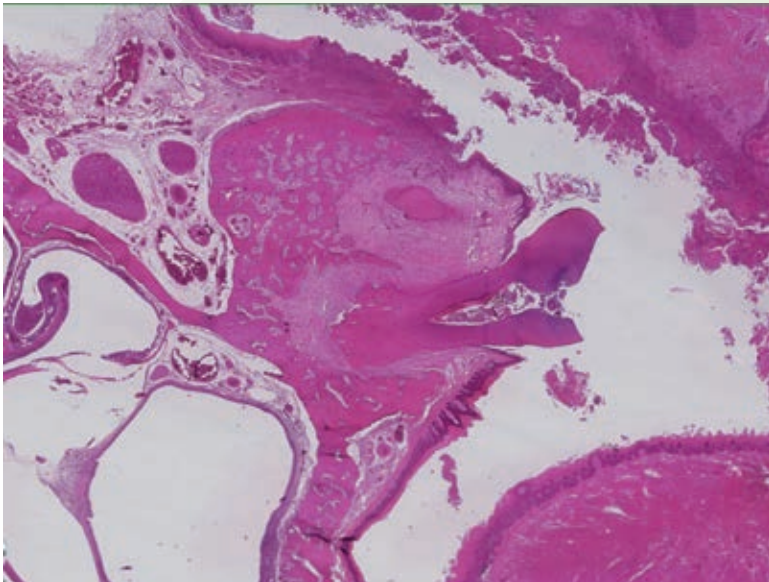
Christine CARREIRA - Histopathologie Lab CIRC/OMS - carreirac@iarc.fr



## **PHOENIX**

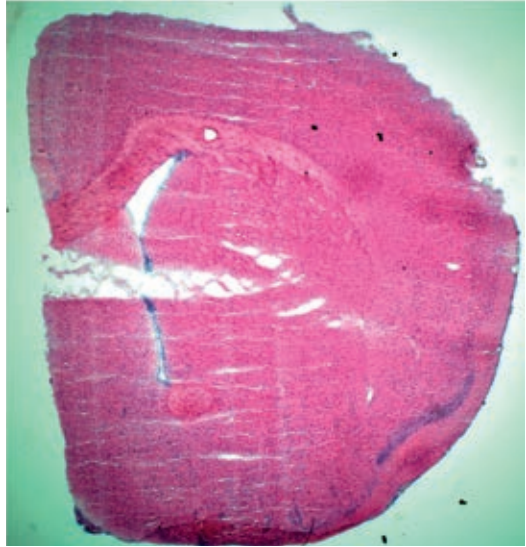
Rat Gral cancer.

Christine CARREIRA - Histopathologie Lab CIRC/OMS - carreirac@iarc.fr



## **GODZILL'ALZHEIMER**

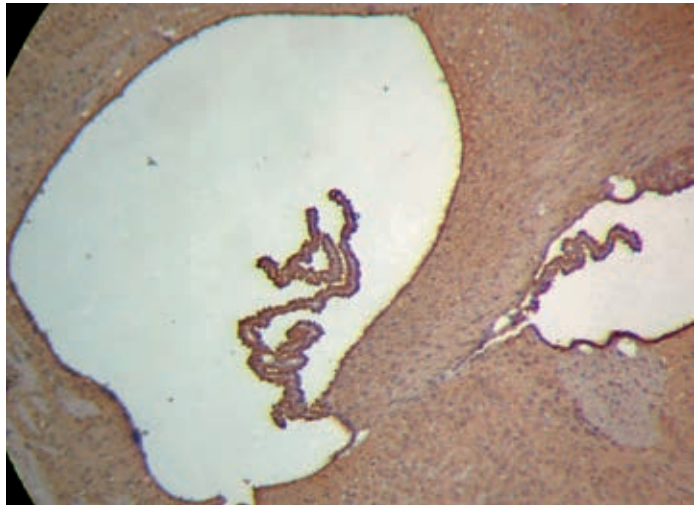
Certaines pathologies peuvent sembler agressives, en voici la preuve. Coloration HE sur une moitié de cerveau, un peu abîmée. Microscope optique x4.



Marlène DEBIOSSAT  
Laboratoire Radiopharmaceutiques  
Biocliniques - INSERM U1039  
marlene.debiossat@univ-grenoble-alpes.fr

## **UN HIPPOCAMPE DANS LE STRIATUM**

Un invité s'est glissé dans le cerveau de notre souris. Laissez place à votre imagination ! Immunohistochimie avec contre coloration des noyaux (Hématoxyline). Microscope optique x8.



Marlène DEBIOSSAT  
Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques - INSERM U1039  
marlene.debiossat@univ-grenoble-alpes.fr





## MONSTRE À LA ANDY WARHOL

Un monstre dégoulinant et décoloré. Coupe longitudinale de cochlée de rat colorée Hématoxyline/Eosine. Lame scannée au Lamina Slide Scanner et photo réalisée sur Case Viewer.

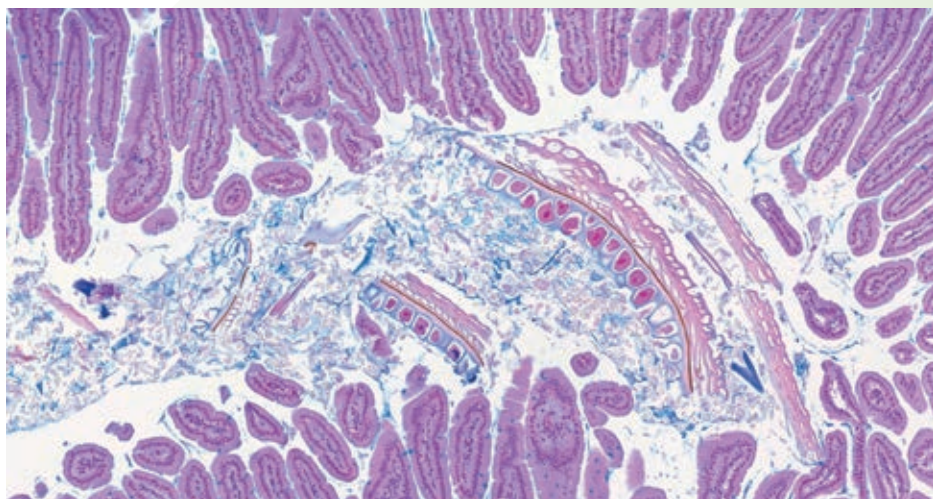
Maryline FAVIER - Institut Cochin - maryline.favier@inserm.fr



## CE QUE MANGENT LES SOURIS

Quand les cellules végétales rencontrent les cellules animales. Coupe longitudinale d'intestin de souris avec son bol alimentaire. Coloration au Bleu Alcian. Lame scannée au Lamina Slide Scanner et photo réalisée sur Case Viewer."

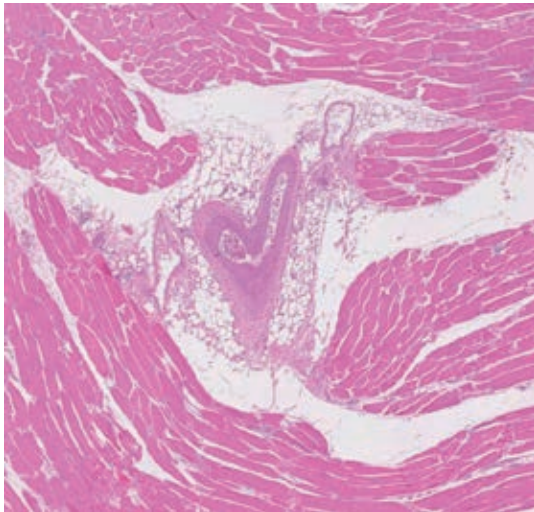
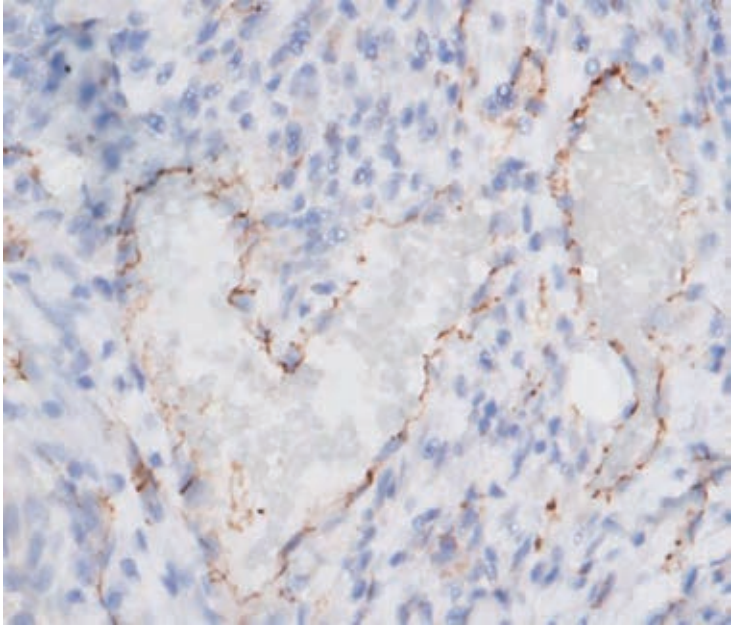
Maryline FAVIER - Institut Cochin - maryline.favier@inserm.fr



## **AU CŒUR DE LA SCIENCE**

Marquage vasculaire sur tissu FFPE.

Isabelle SOLNON - BRACCO Suisse SA - [Isabelle.solnon@bracco.com](mailto:Isabelle.solnon@bracco.com)



## **AU CŒUR DU MAÎTRE DE LA BASSE COUR**

HE sur tissu FFPE.

Isabelle SOLNON

BRACCO Suisse SA

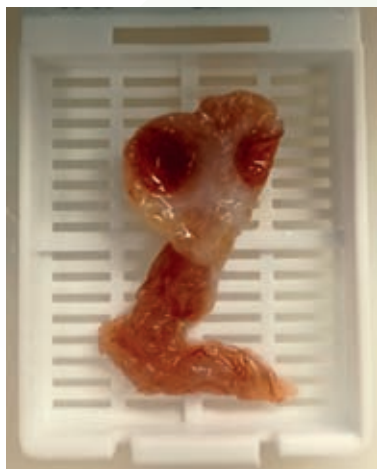
[Isabelle.solnon@bracco.com](mailto:Isabelle.solnon@bracco.com)

## **HISTOLOGIE D'UN SMILEY, OBJECTIF X20**

Triple marquage en immunofluorescence d'une amygdale humaine (CCL21 rouge, Col IV orange, CD21 vert).

Numérisation scanner Hamamatsu x20.

Marine SEFFALS - Excilone - [marine.seffals@excilone.com](mailto:marine.seffals@excilone.com)



## **E.T. VEUT RETROUVER SA MAISON**

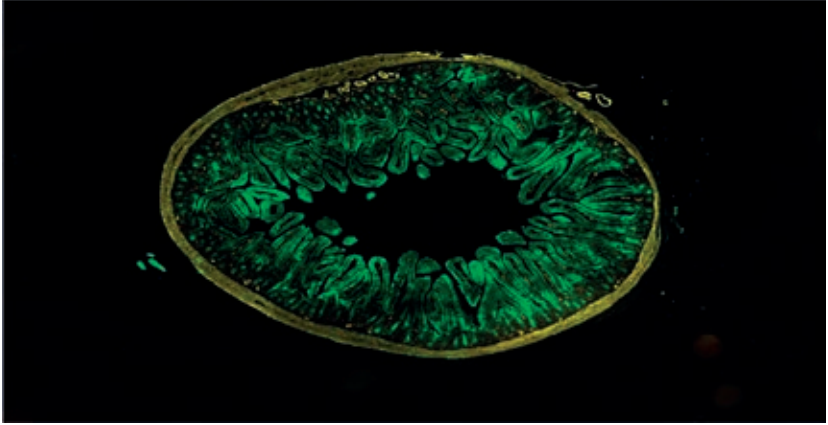
Image macroscopique d'un ovaire de cochon avec follicules.

Marine SEFFALS - Excilone  
[marine.seffals@excilone.com](mailto:marine.seffals@excilone.com)

## L'OEIL DE CROCODILE

Intestin de souris. Multiplex en immunofluorescence : a-SMA en jaune, PCK en vert, Ki67 en rouge et CD31 en orange. Lamme scannée au grossissement x40.

Aurélie COVINHES - Plateforme RHEM - aurelie.covinhes@inserm.fr



## JE SUIS TON PÈRE "DARK VADOR"

Immuno-fluorescence sur  
embryon de zébrafish.

Pascale BELLAUD

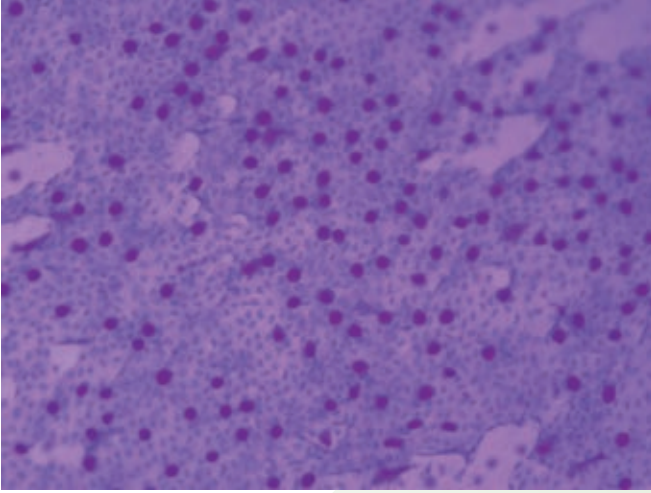
plateforme H2P2

pascale.bellaud@univ-rennes1.fr

## **GOBLETCONDE**

Goblet cells (cellules à mucus) de la conjonctive bulbaire prélevée sur un filtre de nitrocellulose et colorée au PAS. Le tapis cellulaire représente les cellules épithéliales de l'épithélium conjonctival.

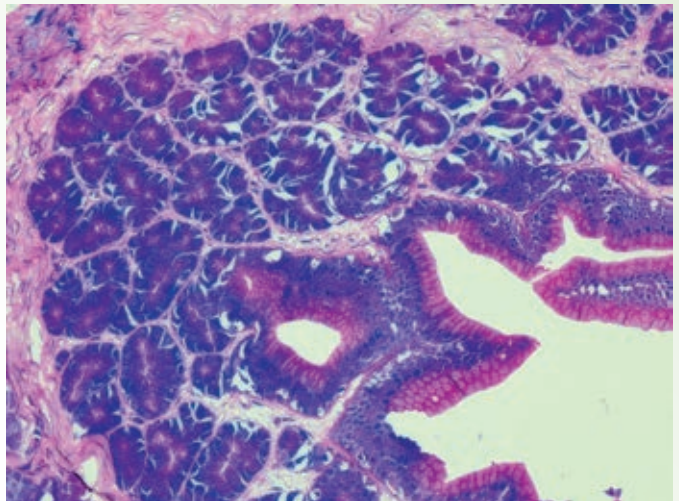
Mahmoud KECHAD - Iris Pharma - m.kechad@iris-pharma.com

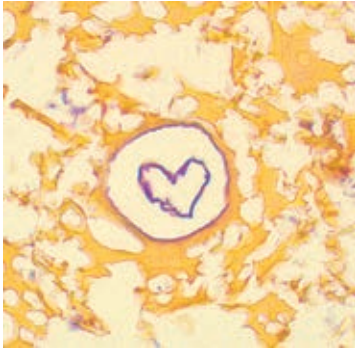


## **INTESTIN DE TRUITE**

Histophysiologie de l'intestin, mise en évidence des glycosaminoglycanes.

Chakib DJEDIAT - Ptme, MNHN - djediat@mnhn.fr





## **UN COEUR PLEIN D'ESPOIR**

HES d'une coupe d'os issu de fouille archéologique (test de décalcification) x20, microscope optique.

Maëlle GUYOT

Plateau technique d'Histologie

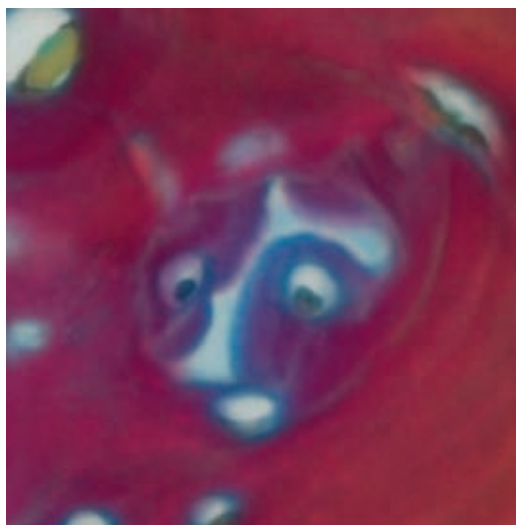
maelle.coquemont@unicaen.fr

## **UN INSTANT MAGIQUE**

Quand une bourse de Fabricius rencontre une trachée, la température monte... Laissez votre imagination s'exprimer... Coloration en HES.

Delphine GUINEBERTEAU  
Oniris-LabOniris-Secteur LHA  
delphine.guineberteau@oniris-nantes.fr





## QUAND LES OSTÉOBLASTES S'ORGANISENT EN FACE DE CHIEN

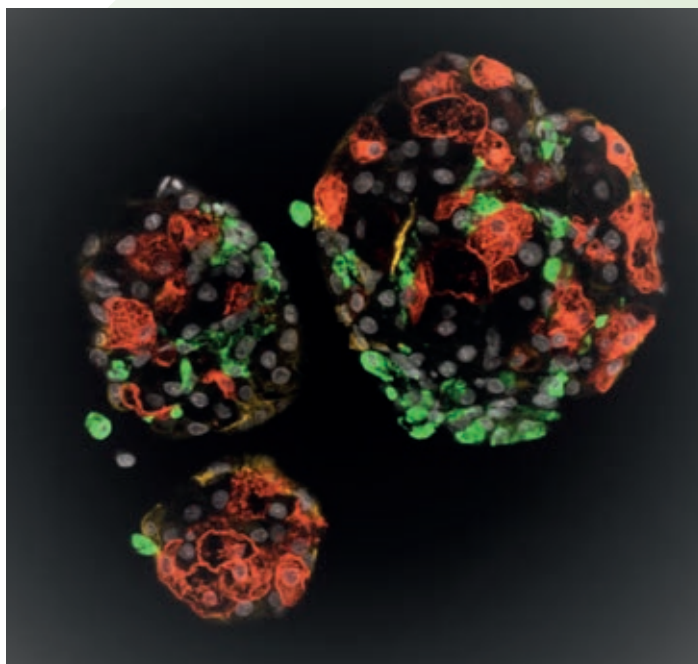
Coupes de genou de rat, coloration  
Russell-Movat Pentachrome.  
Image acquise sur la partie  
osseuse au scanner Leica 40x.

Nathalie ACCART  
Novartis Pharma  
nathalie.accart\_gris@novartis.com

## MÉTÉORITES CELLULAIRES

Sphéroïdes de cellules HepaRG. Marquages IF Cyp 3A4, CK19, CD68.

Roselyne VIEL - plateforme H2P3 - roselyne.viel@univ-rennes1.fr



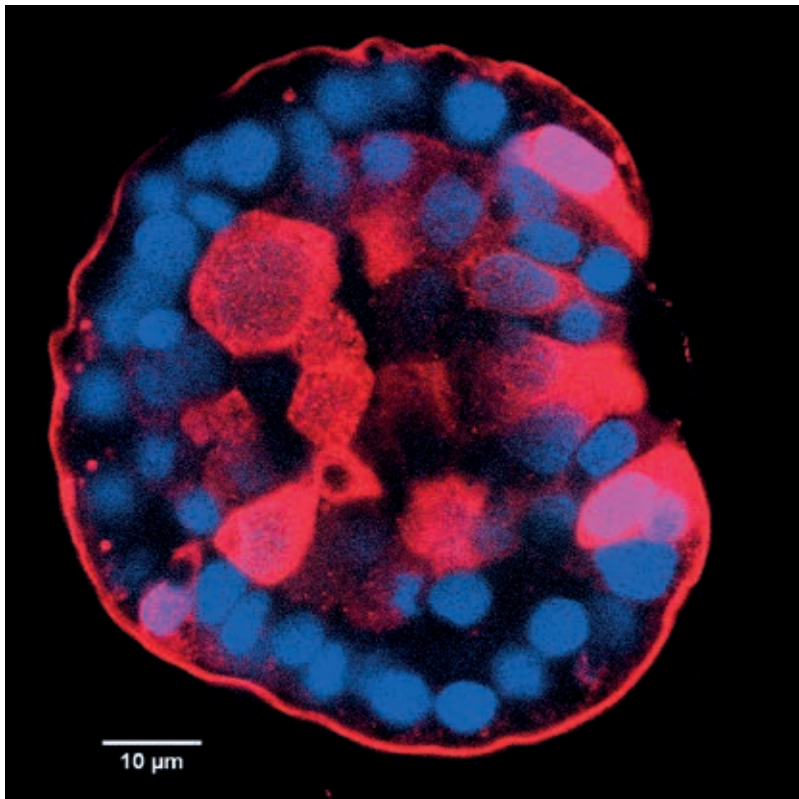
## **THE BRAIN IN A (NUT)SHELL**

$\gamma$ -aminobutyric acid immunoreactive cells (GABA-ir) in *Mytilus galloprovincialis* early trochophore stage. GABA-ir cells are shown in red and Hoechst stained nuclei are shown in blue. GABA-ir pattern follows the outline of the saddle-shaped shell field, the group of ectodermic cells responsible for early shell biogenesis in molluscs. Such pattern hints to a possible relationship between neurogenesis and larval shell formation in these organisms.

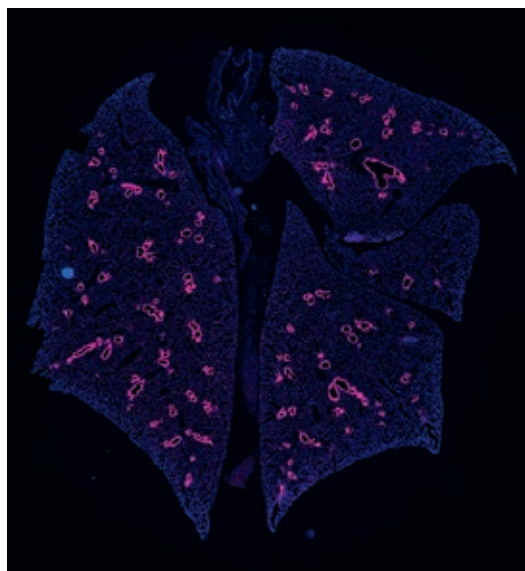
Angelica MIGLIOLI

Institut de la mer de Villefranche, LBDV

angelica.miglioli@imev-mer.fr







### **PAPILLON DE NUIT**

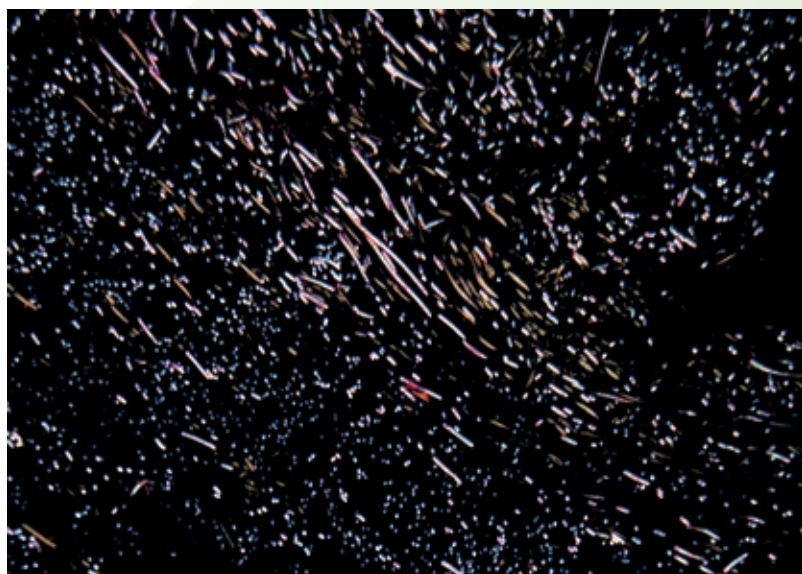
Poumon de souris en coupe longitudinale. Immunomarquage Cytokératine 8 en rose et contre-coloration des noyaux au DAPI. Scan au Lamina Slide Scanner. Photo issue de Case Viewer.

*Rachel ONIFARASOANIAINA  
Institut Cochin  
rachel.onifarasoaniaina@inserm.fr*

### **UN BEL OUBLI 2**

Fibres de compresses « oubliées » lors de l'opération.

*Guillaume GAUTIER - Laboniris - guillaume.gautier@oniris-nantes.fr*



## REGLEMENT DU CONCOURS

### ARTICLE 1 – ORGANISATEUR

L'Association Française d'Histotechnologie dont le siège social est situé à la Mairie d'Amboise, BP247 37402 AMBOISE Cedex.

Organise du 07 février 2022 au 9 avril 2022, un concours photo, selon les modalités décrites dans le présent règlement.

### ARTICLE 2 – CONDITIONS DE PARTICIPATION

Ce concours gratuit est ouvert à tous les adhérents de l'AFH, disposant d'un accès à internet ainsi que d'une adresse électronique valide.

Le concours est soumis à la réglementation de la loi française applicable aux jeux et concours (<https://www.reglementdejeu.com/jeux-concours/legislation.html>).

Le seul fait de participer à ce concours implique l'acceptation pure et simple, sans réserve, du présent règlement.

### ARTICLE 3 – MODALITÉS DE PARTICIPATION

Ce concours se déroule exclusivement sur le site de l'association aux dates indiquées dans l'article 1.

Les participants devront envoyer leur oeuvre par mail à l'adresse suivante : [afhisto@outlook.fr](mailto:afhisto@outlook.fr) avant la date limite du 21/03/2022 minuit, l'heure de réception du courriel faisant foi.

Les participants devront indiquer :

- En objet du mail : « Concours photo AFH 2022 »,
- Dans le corps du message : leur prénom, nom, laboratoire, code postal (commune). *À tout moment, le participant est responsable de l'exactitude des informations qu'il a communiquées*
- Un titre pour la photographie
- Un commentaire scientifique et/ou humoristique de quelques lignes est bienvenu et devra indiquer la nature du tissu, la coloration, le grossissement, le type de microscopie, etc...

Une à deux photos peuvent être proposées par chaque participant, le participant étant défini par un même nom, un même prénom et une même adresse électronique.

Les photographies seront exposées pour voter sur le site de l'association : <https://www.afhiste.fr/concours-photo> du 28 mars 2022 au 09 avril 2022, date de clôture des votes.

### ARTICLE 4 – SPECIFICITE DES PHOTOGRAPHIES

Les participants devront s'assurer lors de l'envoi de leur photographie que les conditions suivantes sont respectées :

- Les photographies devront être au format tiff ou jpeg de préférence avec la meilleure résolution possible (*a minima* 300 dpi) ;
- Les photographies envoyées devront être libres de droit ;
- Les photographies feront l'objet d'une modération et sélection si nécessaire au préalable par l'organisateur ;

- En s'inscrivant au concours, les participants cèdent, à titre gracieux, à l'AFH le droit de reproduire, de représenter, d'adapter et de communiquer au public cette photographie, sur tous supports et par tous procédés existants ou à venir pour tous usages.

#### **ARTICLE 5 - DESIGNATION DES GAGNANTS ET DOTATION**

Les adhérents de l'AFH pourront voter sur <https://www.afhisto.fr/concours-photo> pour leur photo préférée (un choix par adhérent).

Les votes sont ouverts du 28 mars 2022 au 09 avril 2022. La photo ayant reçu le plus grand nombre de votes sera primée. En cas d'ex-aequo, l'organisateur procédera à un tirage au sort pour désigner le gagnant.

Le gagnant (adhérent à jour de sa cotisation au moment du congrès) sera annoncé lors du congrès annuel et le résultat mis en ligne sur le site de l'AFH après le congrès.

Le titulaire du 1<sup>er</sup> prix se verra offrir un prix surprise. La photographie gagnante sera mise en ligne sur le site internet de l'AFH et sera publiée dans la Revue annuelle de l'AFH.

#### **ARTICLE 6 – DOTATION**

La responsabilité de l'organisateur ne pourra en aucun cas être engagée en cas d'éventuel dysfonctionnement du mode de participation au présent concours, lié aux caractéristiques même d'internet ; dans ce cas, les participants ne pourront prétendre à aucune contrepartie de quelque nature que ce soit.

#### **ARTICLE 7 – INFORMATIQUE ET LIBERTES**

Conformément aux dispositions de la Loi Informatique et Libertés du 6 janvier 1978 modifiée par la Loi du 6 août 2004, les informations collectées pour participer au concours sont destinées exclusivement à l'organisateur. Les données collectées à cette fin sont obligatoires pour participer au concours. Par conséquent, les personnes qui souhaiteraient supprimer ces données avant la fin du concours ne pourront pas participer au concours.

Les gagnants autorisent expressément l'organisateur à reproduire et à publier gracieusement sur les documents d'information liés au présent concours l'identité des gagnants, à savoir leur nom, leur prénom ainsi que le laboratoire.

Tout participant au concours dispose par ailleurs d'un droit d'accès, de rectification et de suppression des données le concernant sur simple demande par mail à [afhisto@outlook.fr](mailto:afhisto@outlook.fr)

#### **ARTICLE 8 – ACCEPTATION DU REGLEMENT**

La participation à ce concours implique l'acceptation totale du présent règlement. Tout défaut de renseignement ou fausse déclaration d'identité ou adresse entraînera automatiquement l'élimination du participant. L'organisateur se réserve le droit de contrôler l'exactitude des renseignements fournis par les participants.

#### **ARTICLE 9 – DEPÔT DU REGLEMENT**

Ce règlement peut être consulté sur le site de l'association <https://www.afhisto.fr/>.



- NOTES -

- NOTES -

- NOTES -

- NOTES -



# TABLE OF CONTENTS

## Revue Française d'HistoTechnologie

Rev. Fr. Histotechnol., 2023, 35, 1

doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35

### • EDITORIAL 2023

#### PLANT ANATOMY AND TECHNOLOGICAL INNOVATIONS IN MICROSCOPY

BENCsik Anna & ACCART Nathalie ..... p. 15

### • ARTICLES 2023

#### MARINE SPONGE OSCARELLA LOBULARIS : A MODEL FOR UNDERSTANDING THE ORIGIN AND EVOLUTION OF EPITHELIA

RENARD Emmanuelle et al. .... p. 23

#### DEVELOPMENTAL TOXICOLOGY ON MUSSEL LARVAE: CONTRIBUTION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY, *IN SITU* HYBRIDIZATION AND IMAGING FOR THE DETAILED STUDY OF TISSUES

DUMOLLARD Rémy & MIGLIORI Angelica ..... p. 45

#### 3D IMAGING OF TUMOR INNERVATION

PUGET Angélique & MANN Fanny ..... p. 73

#### DEVELOPMENT OF AN ANTI-NECTIN-4 THERAPEUTIC ANTIBODY FOR BREAST CANCER TREATMENT

CABAUD Olivier et al. .... p. 87

#### ICOS IS WIDELY EXPRESSED IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA, AND ITS TARGETING PROMOTES POTENT KILLING OF MALIGNANT CELLS

AMATORE Florent et al. .... p. 107

#### ORGANOIDS: RELEVANT MODEL TO REPRODUCE THE HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TISSUE

TRAVERSARI Eddy et al. .... p. 135

#### PHENOTYPING OF ORGANOIDS: CONTRIBUTION OF AN INTEGRATED PLATFORM FOR THEIR CHARACTERIZATION

RIVIERE Julie et al. .... p. 153

#### COMPATIBILITY OF STIMULATED RAMAN HISTOLOGY WITH HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION AND GENOME SEQUENCING

SARRI Barbara et al. .... p. 167

#### LASER MICRODISSECTION APPLIED ON HISTOLOGICAL SECTIONS: PASS, PRESENT AND FUTURE

MAITRE Marlène & FAVIER Maryline ..... p. 195

### • Proceedings : 35<sup>th</sup> AFH Congress Invitation à l'Histologie en Provence MARSEILLE 2023

Programme ..... p. 224 - 225

INAUGURAL CONFERENCE ..... p. 227

SESSION 1 «BENCH TO BEDSIDE» - CONTRIBUTION OF HISTOLOGY IN CLINICAL DEVELOPMENT..... p. 228

SESSION 2 : TUMOR'S HETEROGENEITY ..... p. 230

SESSION 3 : MARINE HISTOLOGY ..... p. 233

SESSION 4 : ORGANOID HISTOLOGY p. 236

SESSION 5 : INNOVATIVE IMAGING

METHODS ..... p. 238

SESSION 6 : BONE HISTOLOGY ..... p. 241

### • PHOTO CONTEST 2022

2nd photo contest for the most beautiful « histo-artistico-scientific » pictures ..... p. 245

Contest rules..... p. 266

### • FRONT PAGE ILLUSTRATION

Left, Cork cells observed in two-photon microscopy. Sample UMR PAM. Top radial cut, bottom tangential cut. Top right, Nicotiana tabacum plant cells observed in FLIM fluorescence lifetime microscopy. Multiphoton excitation. Sample UMR Agroécologie. Bottom right: petal of small periwinkle - confocal microscopy. Courtesy of Pascale Winckler & Elodie Noirot, Plateforme DImaCell.

## SOMMAIRE

### • EDITORIAL 2023

#### ANATOMIE DES PLANTES ET INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES EN MICROSCOPIE

BENCSIK Anna et ACCART Nathalie ..... p. 15

### • ARTICLES 2023

#### L'EPONGE MARINE OSCARELLA LOBULARIS UN MODELE POUR COMPRENDRE L'ORIGINE ET L'EVOLUTION DES EPITHELIUMS

RENARD Emmanuelle et al. .... p. 23

#### TOXICOLOGIE DEVELOPPEMENTALE SUR LES LARVES DE MOULES : APPORT DES METHODES D'IMMUNOHISTOCHIMIE, D'HYBRIDATION *IN SITU* ET D'IMAGERIE POUR L'ETUDE FINE DES TISSUS

DUMOLLARD Rémy et MIGLIORI Angelica ..... p. 45

#### IMAGERIE 3D DE L'INNERVATION

PUGET Angélique et MANN Fanny ..... p. 73

#### DEVELOPPEMENT D'UN ANTICORPS THERAPEUTIQUE ANTI-NECTINE-4 DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DU SEIN

CABAUD Olivier et al. .... p. 87

#### ICOS EST FORTEMENT EXPRIME DANS LES LYMPHOMES T CUTANES ET SON CIBLAGE PERMET L'INHIBITION DES CELLULES TUMORALES

AMATORE Florent et al. .... p. 107

#### LES ORGANOÏDES : UN MODELE DE CHOIX POUR REPRODUIRE LES CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES DU TISSU D'ORIGINE

TRAVERSARI Eddy et al. .... p. 135

#### PHENOTYPAGES D'ORGANOÏDES : APPORT D'UNE PLATEFORME INTEGREE POUR LEUR CARACTERISATION

RIVIERE Julie et al. .... p. 153

#### COMPATIBILITE DE L'HISTOLOGIE RAMAN STIMULEE AVEC L'EXAMEN ANATOMOPATHOLOGIQUE ET LE SEQUENÇAGE DU GENOME

SARRI Barbara et al. .... p. 167

#### MICRODISSECTION LASER DE COUPES HISTOLOGIQUES : PASSE, PRESENT ET FUTUR

MAITRE Marlène et FAVIER Maryline ..... p. 195

### • ACTES 35<sup>ème</sup> Congrès AFH Invitation à l'Histologie en Provence MARSEILLE 2023

Programme ..... p. 224 - 225

CONFERENCE INAUGURALE ..... p. 227

SESSION 1 «BENCH TO BEDSIDE» -  
APPORT DE L'HISTOLOGIE DANS LE  
DEVELOPPEMENT CLINIQUE..... p. 228

SESSION 2 : HETEROGENEITE TUMORALE  
..... p. 230

SESSION 3 : HISTOLOGIE MARINE ..... p. 233

SESSION 4 : HISTOLOGIE DES  
ORGANOIDES ..... p. 236

SESSION 5 : METHODES D'IMAGERIE  
NOVATRICES ..... p. 238

SESSION 6 : HISTOLOGIE DE L'OS ..... p. 241

### • CONCOURS PHOTOS 2022

2<sup>ème</sup> Concours des plus belles photos

« histo-artistico-scientifiques » ..... p. 245

Règlement du Concours ..... p. 266

### • ILLUSTRATION DE LA PREMIERE PAGE

A gauche, cellules de liège - microscopie biphotonique. Echantillon UMR PAM. En haut coupe radiale, en bas coupe tangentielle. A droite en haut, cellules végétales de *Nicotiana tabacum* - microscopie de durée de vie de fluorescence FLIM. Excitation multiphotonique. Echantillon UMR Agroécologie. A droite en bas, pétale de petite pervenche - microscope confocal. Courtoisie de Pascale Winckler & Elodie Noirot, Plateforme DImaCell.