

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

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^{ème} siècle. Par la suite, dans la première moitié du XX^{ème} 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^{G12D/+} ; Ink4a/Arf^{lox/lox} ; Pdx1-Cre) ont été obtenues par croisement des lignées de souris LSL-Kras^{G12D/+} [6], Pdx1-Cre [7] et Ink4a/Arf^{lox/lox} [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^{G12D/+}; Ink4a/Arf^{lox/lox}; 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-canalaies (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 (α -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- α -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 α -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

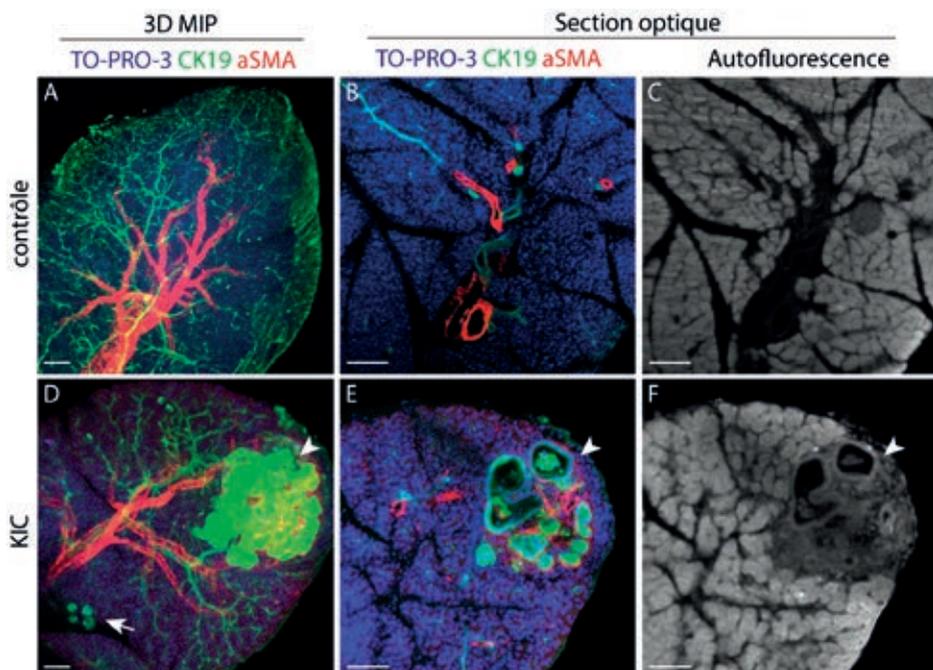


Figure 1 : Détection des lésions épithéliales cancéreuses et précancéreuses dans des pancréas clarifiés.

(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- α -SMA (rouge) et avec le marqueur nucléaire TO-PRO-3 (bleu). Dans un pancréas contrôlé, CK19 est exprimé par les cellules épithéliales des canaux pancréatiques et α -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 contrôlé 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 μ m. Taille des voxels : x = 0,755 μ m y = 0,755 μ m z = 2 μ m (A-C) x = 0,604 μ m y = 0,604 μ m z = 1 μ 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**).

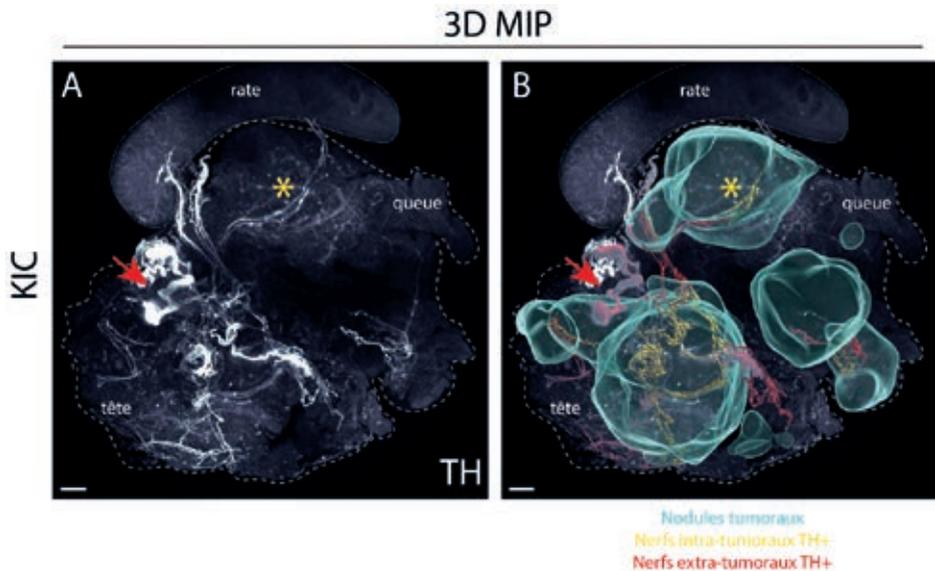


Figure 2 : Reconstruction des nerfs sympathiques intra et extra-tumoraux.

(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⁺ 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 innervier l'organe entier. L'astérisque jaune indique le nerf splénique qui traverse le pancréas pour innervier la rate.

(B) Reconstruction des nodules tumoraux (en cyan), et des nerfs TH⁺ 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 μ m y = 4,79 μ m z = 4 μ 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

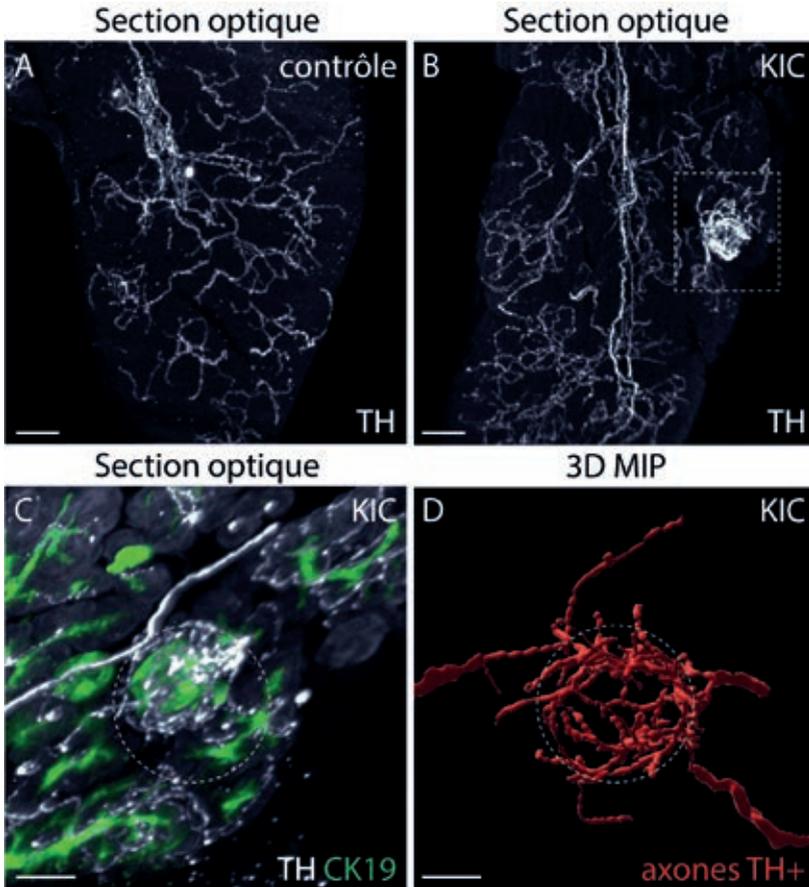


Figure 3 : Identification de régions d'hyper-innervation sympathique dans un pancréas de souris KIC

(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 μm (A-B), 50 μm (C-D). Taille des voxels x : = 1,21 μm y = 1,21 μm z = 2 μm (A-B) x = 0,944 μm y = 0,944 μm z = 4 μm (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.