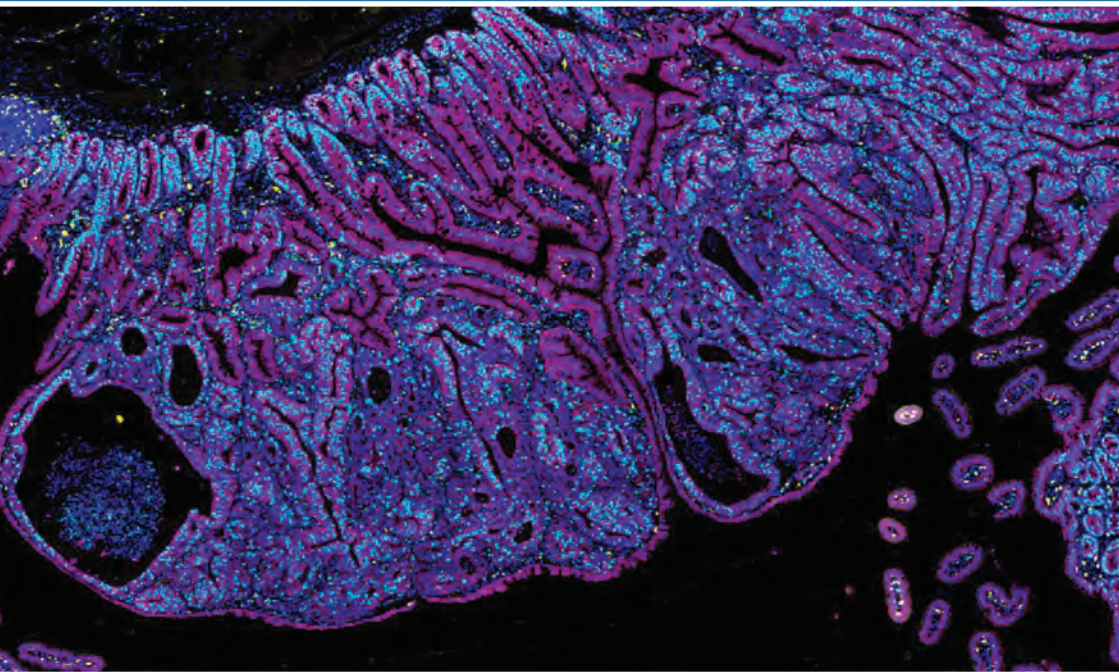


Revue Française
d'**Histo**
Technologie



2026 - Vol. 38 - n°1

Revue Française d'HistoTechnologie

www.afhisto.fr



2026 - Vol. 38 - 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, *Responsable des Communications*

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

Sandrine COCHIN, Illkirch Graffenstaden, *Relations avec les Exposants*

Mireille LEDEVIN, Nantes, *Responsable du site Internet*

Marlène MAITRE, Bordeaux, *Relations Réseau Microlaser Biotech (RMLB)
& co-responsable des Relations avec les Exposants*

Nombre d'adhérents au 30 septembre 2025: 138

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, 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 www.afhisto.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

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 en ligne sur notre site dans la rubrique Revue. En bref, ils doivent être soumis sous forme de fichier Microsoft Word et en utilisant la taille de police « Times New Roman » 12.

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

Charte d'usage de l'intelligence artificielle

Dans un souci de transparence scientifique et d'intégrité éditoriale, les auteurs sont tenus de déclarer explicitement tout recours à des outils d'intelligence artificielle générative au cours de la préparation de leur manuscrit. Cette mention en fin d'article, doit préciser la nature des tâches effectuées (reformulation, aide à la rédaction, analyse linguistique, génération d'images ou de données synthétiques, etc.), le nom des outils utilisés (par exemple : M365 Copilot, ChatGPT, DeepL Write, Midjourney, DALL·E, etc.) ainsi que leur version ou date d'utilisation lorsque cela est possible. Les auteurs demeurent pleinement responsables du contenu produit, notamment en ce qui concerne l'exactitude scientifique, la conformité éthique, la protection des données sensibles et le respect du droit d'auteur. Aucun passage généré automatiquement par un outil d'intelligence artificielle ne doit être présenté comme une production humaine et dans tous les cas il ne peut être présenté sans avoir fait l'objet d'une vérification rigoureuse par les auteurs.

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 publication. 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^e 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 10 g/L, 5 ppm, 2 mM. 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 www.afhisto.fr/les-revues. Construit selon un plan classique d'article de recherche ou de communication technique, articulé autour de la structure IMRD - *Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion*, suivie d'une *Conclusion* et d'une *Liste de références* - le manuscrit peut être modulé afin de s'adapter aux différents formats éditoriaux (revue de littérature, note courte, communication rapide, etc.). En fin de texte, il intègre également les *Remerciements* ainsi que, le cas échéant, la *Déclaration relative à l'usage de l'intelligence artificielle*, conformément aux bonnes pratiques de transparence scientifique.

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-après :

- 1 fichier (Word, polices préférées: « 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 crochets. 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 référence 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

• **Liste de références.** Il doit suivre le style suivant:

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. In-
serm, 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 en ligne : 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).

• 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

Licence:  **CC BY-NC 4.0** Chaque article de la *Revue Française d'HistoTechnologie* est publié sous licence Creative Commons **CC BY NC 4.0** (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Vous êtes libre de partager et d'adapter ce contenu, à condition de créditer les auteurs et pour un usage non commercial.

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. Merci de nous indiquer les volumes qui vous intéressent en envoyant une demande par mail au comité de rédaction (NA-AB). Après confirmation de leur disponibilité dans cette même rubrique, remplir le bon de commande téléchargeable sur notre site et le retourner dûment rempli par courriel au trésorier: Nicolas Gadot - nicolas.gadot@yahoo.fr Les frais de port sont offerts aux adhérents de l'AFH.

Tous les articles sont sous Licence CC BY NC 4.0 et disponibles en libre accès sur le site de l'association (www.afhisto.fr).

ÉDITORIAL

L'HISTOLOGIE OU LA VIE EN ROSE ET BLEU

Anna BENCSIK & Nathalie ACCART

Le 39^e congrès de l'Association Française d'Histotechnologie est accueilli pour la première fois à Nîmes, sous le thème de « *l'histologie entre dans l'arène* ». Célèbre cité romaine au patrimoine architectural exceptionnel, la ville de Nîmes n'en est pas moins célèbre pour son savoir-faire artisanal, notamment la création d'un tissu teinté de bleu qui connaîtra un essor mondial, le jean ! Nous vous proposons une petite plongée dans ses origines, l'occasion pour nous, spécialistes de l'étude des tissus biologiques, d'évoquer les colorations d'anatomo-pathologie qui nous font littéralement voir la vie en rose et en bleu grâce à l'hématoxyline-éosine...

L'histoire du célèbre tissu indigo de Nîmes

Le denim, dont le nom dérive de l'expression « sergé¹ de Nîmes », voit le jour au XVII^e siècle dans la ville éponyme. À l'origine, les tisserands nîmois cherchaient à imiter un tissu génois très apprécié ; leurs expérimentations aboutirent cependant à bien plus qu'une simple copie. Ils donnèrent naissance à une étoffe robuste, tissée en sergé, appelée à marquer durablement l'histoire du textile. Ce tissu se distinguait par un fil de chaîne teint à l'indigo et un fil de trame écru, créant un contraste bleu et blanc devenu emblématique. Diffusée grâce à la foire de Beaucaire et aux réseaux commerciaux méditerranéens, la toile connut rapidement un rayonnement international, notamment par l'intermédiaire des réfugiés protestants qui exportèrent ce savoir-faire hors de France. Au XIX^e siècle, elle traversa l'Atlantique et fut adoptée par Levi Strauss pour la confection des premiers jeans destinés aux mineurs américains, consacrant ainsi le denim comme un tissu universel. [fr.wikipedia.org].

¹ Le sergé (twill en anglais) désigne un type d'armure textile, c'est à dire la structure du tissu, définie par la manière dont les fils de chaîne et de trame s'entrecroisent lors du tissage. Dans une armure sergée, le fil de trame passe au dessus de plusieurs fils de chaîne, puis en dessous d'un seul, créant un décalage régulier à l'origine de côtes diagonales visibles. Il en résulte un tissu plus souple mais aussi plus résistant à l'usure que la toile. Des exemples de tissu sergé sont le denim, la gabardine, ou le tweed.

Lien avec l'histologie et la coloration à l'indigo

En histologie, la coloration est essentielle pour révéler la structure des tissus biologiques, tout comme l'indigo donnait au denim son identité visuelle. Saviez-vous qu'il existe effectivement une coloration à base d'indigo, appelée indigo carmin (ou carmin d'indigo), utilisée en endoscopie et parfois en histologie pour améliorer le contraste des muqueuses. Ce colorant, dérivé de l'indigo naturel par sulfonation, appartient à la famille des colorants indigoïdes et est référencé sous le nom « C.I. Acid Blue 74 » ou « C.I. Natural Blue 2 ». Bien qu'il ne réagisse pas spécifiquement avec les structures cellulaires, il permet de mieux visualiser les reliefs et anomalies, illustrant la même logique que dans le textile : la couleur comme outil de lecture et de différenciation.

Les bleus en histologie

Les colorations histologiques faisant appel aux teintes de bleu sont nombreuses en histologie comme l'illustre la **Figure 1**.

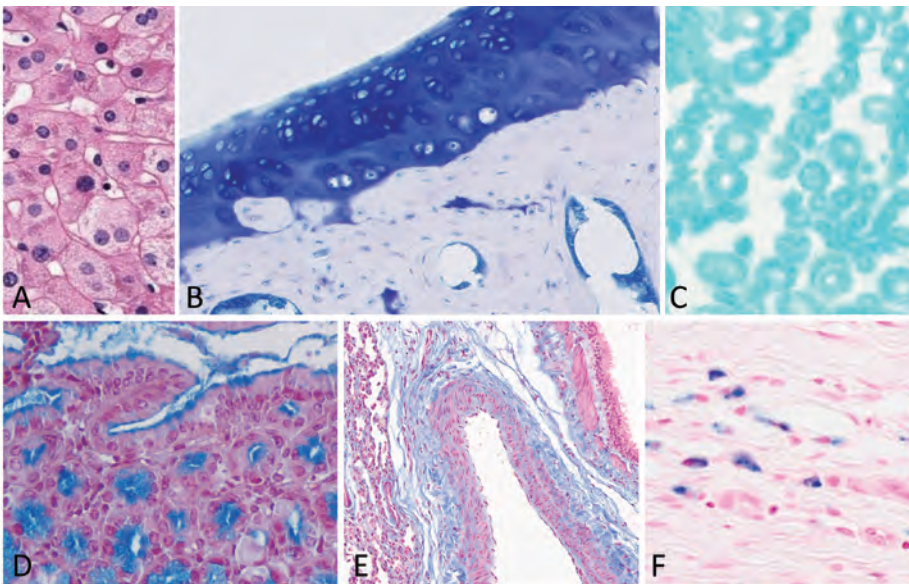


Figure 1 : Exemples de colorations histologiques aux teintes bleues.

A. Hematoxyline et éosine qui colorent les noyaux en bleu et le cytoplasme des cellules en rose.
B. Bleu de toluidine révélant le cartilage hyalin de l'articulation du genou de souris.
C. Luxol fast blue sur un nerf sciatique de souris. D. Bleu Alcian sur intestins de souris (courtoisie Nathalie Senant). E. Trichrome de Masson sur coupe de poumon de rat traité à la bléomycine, montrant une fibrose dans le parenchyme pulmonaire. F. Bleu de Prusse (coloration de Perls) appliqué au muscle cardiaque, il révèle la présence des ions ferriques (Fe^{3+}) formant, en milieu acide, avec le ferrocyanure de potassium, un précipité bleu de ferrocyanure ferrique (courtoisie Catherine Cannet).

Le **tableau 1** ci-dessous en propose une brève synthèse, leur nature, les structures mises en évidence, leur usage principal ainsi que la teinte obtenue. Parmi elles, on citera le bleu de toluidine, le bleu de luxol, le bleu Alcian, le bleu de Prusse,... mais la plus emblématique, et sans doute la plus largement utilisée est la coloration à l'hématoxyline. Ce colorant naturel, originaire du Mexique, constitua longtemps un précieux trésor particulièrement convoité, y compris par les pirates, tant ses propriétés tinctoriales étaient recherchées [1].

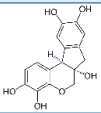
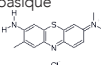
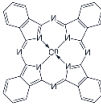
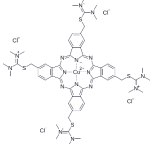
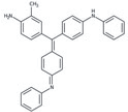
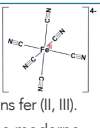
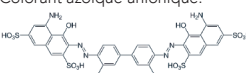
Colorant bleu	Nature / Type	Structures mises en évidence	Usages principaux	Teinte obtenue
Hématoxyline (H&E / HES)	« Laque d'hématoxyline » Principe colorant extrait du bois de Campêche. 	Noyaux (ADN)	Coloration standard en histologie	Noyaux bleu foncé / bleu violet , cytoplasme rosé (éosine), fibre de collagène jaune (safran)
Bleu de toluidine	Colorant thiazinique basique métachromatique chlorhydrate de triméthylthionine 	Mastocytes, cartilage, acides nucléiques	Coupes semi fines, résines	Bleu pour noyaux, métachromasie violet rose pour glycosaminoglycanes (GAG) et mastocytes
Bleu de luxol	Dérivé de la tétrabenzotétrazoporphyrine, famille des phthalocyanines de cuivre 	Myéline	Forte affinité pour les phospholipides de la myéline, colorant pour le système nerveux central	Bleu intense à bleu turquoise Peut évoluer vers un bleu-vert selon le protocole
Bleu Alcian (pH 1ou 2,5)	Colorant acide (anionique), aussi appelé bleu alcian 8GX. Famille des phthalocyanines. 	Mucines acides, glycosaminoglycanes (GAG)	Adhère aux macromolécules chargées négativement (glucidiques). Histopathologie digestive, respiratoire, ORL	Mucosubstances : bleu clair à turquoise , intensité variable selon pH
Bleus trichromiques (Masson, Gomori...)	Mélange de bleus selon protocole Hématoxyline, chlorure ferrique et acide chlorhydrique, ou bleu d'aniline 	Fibres de collagène	Analyse du tissu conjonctif	Collagène bleu vif / bleu profond , muscle et cytoplasme rouges ou roses
Bleu de Prusse (coloration de Perls)	Cyanoferrate ferrique (II), polymère tridimensionnel, les ions cyanures pontant les différents ions fer (II, III). 1 ^{er} colorant synthétique moderne, obtenu au début du XVIII ^e siècle. Pigment bleu foncé. 	Fer ferrique (Fe ³⁺), hémossidérine	Réaction histochimique faisant précipiter le fer grâce à du ferrocyanure de potassium. Dépôts de fer	Granules bleu acier / bleu intense au niveau des dépôts
Bleu trypan	Colorant azoïque anionique. 	Cellules mortes (perméables). trypan est ainsi nommé parce qu'il tue les trypanosomes	Viabilité cellulaire, culture cellulaire	Cellules mortes : bleu foncé cellules vivantes : incolores

Tableau 1 : Synthèse des principaux colorants histologiques caractérisés par des nuances de bleu, précisant leur nature ou leur type, les structures histologiques et cytologiques mises en évidence, leurs usages principaux ainsi que la teinte obtenue. En immunohistochimie, lorsqu'elle est observée en immunofluorescence, on peut également citer le fluorochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), qui se lie spécifiquement à l'ADN par des interactions fortes avec les bases adénine et thymidine, permettant ainsi la visualisation des noyaux cellulaires. Excité par une lumière ultraviolette ($\lambda_{max} \approx 372 \text{ nm}$), le DAPI émet une fluorescence bleue intense ($\lambda_{max} \approx 456 \text{ nm}$).

L'hématoxyline, des origines à son usage courant en histologie

L'hématoxyline utilisée en histologie est extraite du duramen (ou bois de cœur), de *Haematoxylum campechianum*, communément appelé bois de Campêche ou logwood.

C'est un arbre tropical de la famille des Fabaceae, originaire du Mexique, de l'Amérique centrale et des Antilles, où il croît naturellement (Figure 2).



Figure 2: Reproduction de la planche botanique n° 69 représentant *Haematoxylum campechianum*, le bois de Campêche, espèce tropicale utilisée historiquement pour la production de colorants, notamment l'hématoxyline.

Illustration extraite d'un ouvrage sur les plantes médicinales publié en 1813 par Adolphus Ypey (1749 1822), médecin et botaniste néerlandais [2]. De taille modeste, il peut tout de même atteindre une quinzaine de mètres de hauteur et se caractérise par un bois particulièrement dense et sombre, dont la teinte est à l'origine de son nom scientifique, *Haematoxylum*, qui signifie littéralement « bois de sang », en référence à la coloration rouge foncé de sa sève.

L'hématoxyline constitue environ 10% du bois de cœur du *Haematoxylum campechianum*. Il s'agit d'un composé phénolique initialement incolore, qui n'acquiert pas de propriétés tinctoriales tant qu'il n'a pas subi une transformation chimique essentielle. Par oxydation, spontanée à l'air ou activée par des milieux alcalins, l'hématoxyline est convertie en hématéine, une molécule chromogène capable de former des complexes colorés stables en présence de cations métalliques (Al^{3+} , Fe^{3+} , etc.). Cette étape d'oxydation explique le passage progressif d'un produit incolore à des teintes allant du rouge vif au violet foncé selon les conditions de réaction.

Historiquement, l'hématéine a été largement utilisée comme colorant naturel pour les textiles, en particulier à partir du XVII^e siècle, lorsque le bois était exporté depuis le port de Campeche, au Mexique - origine du nom « bois de Campêche » [1, 3]. Associée à différents mordants, elle permettait d'obtenir un spectre très large de nuances, du bleu au rouge, en passant par de nombreux violets, mauves, gris et même des noirs profonds. Cette polyvalence a fait du campêche une ressource tinctoriale majeure : on le retrouve notamment dans la teinture traditionnelle des soutanes, réputées pour leur noir intense.

L'extrait de campêche avait également des usages plus anecdotiques : au début du XX^e siècle, des décoctions de bois étaient employées comme encre sympathique. Les messages écrits étaient presque invisibles à l'œil nu, mais devenaient lisibles lorsqu'ils étaient chauffés, par exemple au fer à repasser.

Avec le développement des sciences biomédicales, l'hématoxyline s'est progressivement imposée comme le colorant naturel de référence en histologie. D'abord utilisé sans mordant et donc avec un succès limité, sur des tissus végétaux dès le milieu du XVIII^e siècle, ses premières applications en histologie animale apparaissent au milieu du XIX^e siècle. En 1863, Heinrich Wilhelm Gottfried Waldeyer-Hartz (1836-1921), anatomiste allemand majeur, l'emploie sur des tissus animaux. Ses travaux sur les techniques de coloration ont indéniablement contribué à l'émergence de ses apports majeurs à l'anatomie et à l'histologie, notamment à la formalisation de la théorie neuronale de l'organisation du système nerveux. Waldeyer-Hartz est par ailleurs reconnu pour avoir introduit les termes de « neurone » et de « chromosome ». Ce dernier, issu du grec ancien χρῶμα (khrôma, « couleur ») et σῶμα (sôma, « corps »), fait très probablement référence à l'affinité de l'hématoxyline pour l'ADN et les noyaux cellulaires, qu'elle colore d'un bleu violacé caractéristique [4].

Une avancée déterminante est toutefois réalisée en 1865, dans le contexte de l'anatomie pathologique et d'une épidémie de méningite cérébro-médullaire, avec l'introduction de l'alun comme mordant par l'histologiste allemand Franz Böhmer (1834-1917).

Cette innovation constitue une étape fondatrice de la coloration nucléaire moderne, en améliorant remarquablement la fixation et la stabilité du marquage. En présence d'un mordant (généralement à base d'aluminium ou de fer), l'hématéine, forme oxydée active de l'hématoxyline, crée un complexe bleu-violacé, à forte affinité pour les acides nucléiques. Cette propriété permet une coloration sélective et intense des noyaux, étape indispensable à l'analyse morphologique des tissus en microscopie optique. Cette coloration nucléaire autorise notamment une visualisation fine des nucléoles, de la chromatine dense et des chromosomes, facilitant l'identification des noyaux en mitose présents au sein de coupes histologiques.

En 1891, Paul Mayer (1848-1923), zoologiste allemand et spécialiste des techniques microscopiques, joue à son tour un rôle déterminant dans l'évolution de la coloration à l'hématoxyline. Il perfectionne la méthode en proposant une oxydation contrôlée de l'hématoxyline en hématéine, sa forme colorante active. Cette avancée améliore considérablement la reproductibilité et la fiabilité de la coloration nucléaire, ouvrant la voie aux formulations modernes dites « hématoxyline de Mayer », encore largement utilisées aujourd'hui. L'association de l'hématoxyline à l'éosine comme contre-coloration, suggérée dès les années 1870, constitue une autre étape décisive : elle jette les bases de la coloration H&E moderne, qui s'impose comme un standard de l'histologie au début du XX^e siècle.

Après oxydation en hématéine, l'hématoxyline est ainsi intégrée à de nombreux protocoles de coloration de routine, sous forme de complexes avec divers mordants métalliques. Elle est employée seule ou associée à d'autres colorants, en particulier les colorations Hématoxyline-Éosine (HE), Hématoxyline-Éosine-Safran (HES), Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS), ainsi que la coloration de Papanicolaou (PAP) qui combine hématoxyline, orange G et éosine.

Une année en couleurs pour l'AFH, deux rendez-vous majeurs, et une communauté plus dynamique que jamais. De quoi voir la vie en rose et en bleu !

De Grasse, capitale du parfum, où s'est tenu avec succès notre 38^e congrès annuel, à Paris avec les 3^e et toute récente 4^e éditions particulièrement réussies du rendez-vous du Réseau MicroLaser Biotech (RMLB), l'année écoulée a été placée sous le signe des échanges scientifiques et de l'excellence. Présentations pointues, tables rondes stimulantes et communications affichées ont rythmé ces événements fédérateurs, qui réunissent et font vivre notre communauté francophone d'experts des pratiques histologiques.

Idées nouvelles, innovations, science de qualité et esprit de partage : le dynamisme de notre association s'est une nouvelle fois pleinement exprimé. Plusieurs contributions issues de ces temps forts trouvent aujourd'hui un prolongement naturel dans les articles publiés dans ce numéro. Nous adressons à ce titre nos plus vifs remerciements à l'ensemble des auteurs et contributeurs, qui offrent à nos lecteurs un panorama riche et diversifié de thématiques actuelles en histotechnologie. Parmi celles-ci figurent notamment les bonnes pratiques de laboratoire, les enjeux liés à la gestion des données électroniques en histopathologie à l'ère de l'intelligence artificielle, des guides méthodologiques pour l'échantillonnage et la recoupe d'organes chez le rongeur, ainsi qu'une analyse des apports et des limites des modèles organoïdes. S'y ajoutent des travaux dédiés à l'optimisation des préparations histologiques d'organoïdes, à la validation de combinaisons de pré-traitements de démasquage antigénique dans le cadre de détections multiplex utilisant des anticorps issus d'une même espèce, ou encore l'utilisation de la microdissection laser à l'étude moléculaire de la niche des cellules souches hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire.

Nous avons également le plaisir d'accueillir un article issu du partenariat entre l'AFH et le Centre Français pour les 3R (FC3R), mettant en lumière une démarche de sensibilisation et d'accompagnement de la communauté scientifique, fondée sur l'utilisation d'anticorps recombinants. Cette approche permet de s'affranchir des méthodes de production fondées sur le recours aux animaux de laboratoire, souvent associées à une contrainte éthique forte, et s'inscrit pleinement dans la promotion de pratiques expérimentales plus robustes, plus reproductibles et plus respectueuses du bien-être animal.

Une étape importante pour notre association, ou encore une occasion de voir la vie en couleurs !

Au-delà de ces événements scientifiques conviviaux et de haut niveau, l'année écoulée marque également un tournant décisif pour notre Revue. Après plusieurs années d'efforts constants, et à la suite d'une première étape clé avec la création des DOI, la Revue Française d'HistoTechnologie est désormais indexée dans Scopus, l'une des principales bases de données bibliographiques scientifiques internationales.



Cette reconnaissance majeure, fruit d'un travail collectif mené avec conviction et persévérance, renforce significativement la visibilité de la revue et répond à l'un des engagements forts de l'AFH envers ses adhérents, ses auteurs et ses partenaires. L'indexation concerne les articles publiés à partir de 2020, et les retours d'évaluation des experts de Scopus sont à la fois très positifs, flatteurs et particulièrement encourageants : nous pouvons être fiers du chemin parcouru !

Au niveau national, la revue est aussi désormais indexée sur Mir@bel, un réseau qui facilite l'accès aux revues scientifiques et académiques. Notre revue est répertoriée dans la rubrique Médecine, Pharmacie et Sciences de la vie.



Pour les auteurs relevant d'organismes publics français, il est par ailleurs possible de déposer les articles sur HAL, infrastructure publique pérenne largement référencée par les moteurs de recherche.

Chaque article de la *Revue Française d'HistoTechnologie* est publié sous licence Creative Commons **CC BY NC 4.0**

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Ceci signifie que vous êtes libre de partager et d'adapter ce contenu, à condition de créditer les auteurs et pour un usage non commercial.

Gageons que cette visibilité accrue favorisera de nombreuses citations et contribuera à la reconnaissance des travaux publiés dans notre revue. N'hésitez pas à citer les articles de notre revue dans vos autres publications.

Rappelons aussi que notre revue est distribuée aux participants du congrès annuel ainsi qu'aux auteurs ayant contribué au volume correspondant. Quelques exemplaires imprimés restent disponibles et, dans la limite des stocks, peuvent être commandés avec frais de port offerts pour les adhérents de l'AFH (cf. <https://www.afhisto.fr/guide-pour-les-auteurs>). La version numérique, quant à elle, est mise en ligne en *open access* peu de temps après l'impression.

Et maintenant ? Cap sur l'édition 2027 !

À peine cette édition publiée, l'édition 2027 de la Revue Française d'HistoTechnologie est d'ores et déjà ouverte. Nous invitons chaleureusement tous les participants à notre 39^e congrès annuel à Nîmes et d'une façon plus générale la communauté à nous soumettre ses propositions d'articles en histotechnologie, en suivant les instructions aux auteurs disponibles sur le site de l'AFH : <https://www.afhisto.fr/guide-pour-les-auteurs>.

Un point d'attention essentiel : le respect des consignes éditoriales et du calendrier de soumission est indispensable pour faciliter le travail du comité de rédaction, qui œuvre chaque année bénévolement afin de faire naître une nouvelle édition riche des productions scientifiques et techniques de notre communauté.

Bien plus qu'un simple outil d'organisation, le calendrier éditorial (**Figure 3**) incarne la dynamique collective qui permet de construire un volume exigeant, cohérent et de qualité internationale. En respectant les formats et les échéances, chaque auteur contribue activement à la fluidité du processus éditorial et soutient l'action du comité de rédaction, en particulier de la rédactrice en chef, engagée tout au long de l'année pour faire vivre une revue qui rassemble, valorise et fait rayonner l'ensemble de notre communauté.

En attendant la prochaine édition, savourons pleinement celle qui s'offre à vous : elle comprend notamment les actes du congrès de Grasse ainsi qu'une superbe galerie issue du concours photo 2025.

Place désormais aux rencontres !

Profitons pleinement de notre congrès annuel à Nîmes, tout près des arènes, autour d'un programme riche en présentations scientifiques et en ateliers proposés par nos partenaires. Science, convivialité et, cette année, une touche ludique avec un Woodclap spécial seront au rendez-vous.

Continuons ensemble à faire rayonner l'histotechnologie !

Anna et Nathalie

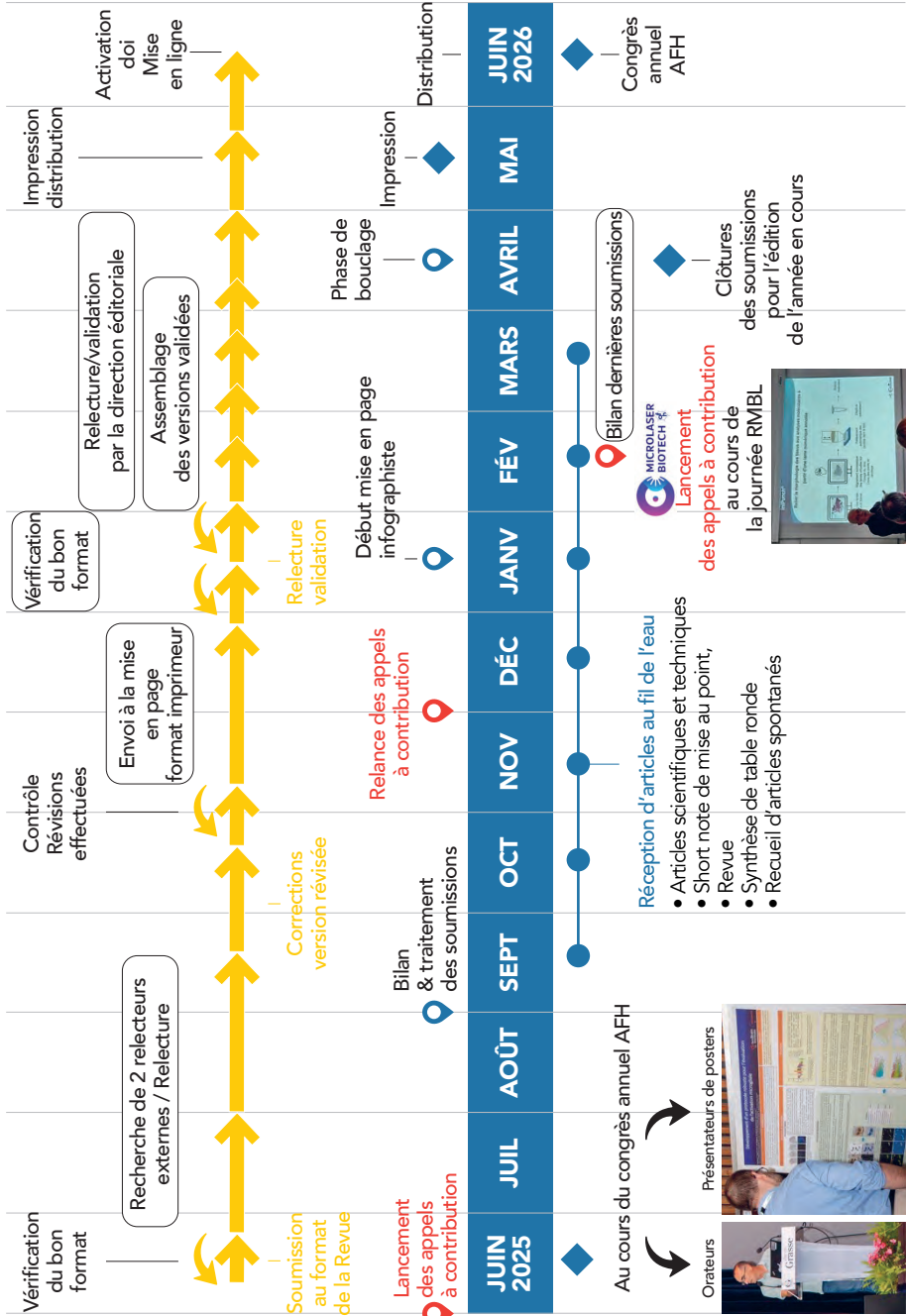


Figure 3 : Ce schéma présente le calendrier éditorial de la *Revue Française d'HistoTechnologie*, publiée une fois par an. Les soumissions d'articles sont possibles au fil de l'eau ; toutefois, afin qu'une contribution puisse être intégrée à l'édition annuelle (publiée en juin), il est indispensable de la soumettre dans un délai compatible avec la réalisation de l'ensemble des étapes du processus éditorial. Celles-ci sont illustrées par la succession de flèches jaunes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ORTIZ-HIDALGO C, PINA-OVIEDO S, « Hematoxylin: Mesoamerica's Gift to Histopathology. Palo de Campeche (Logwood Tree), Pirates' Most Desired Treasure, and Irreplaceable Tissue Stain. », *Int J Surg Pathol*, 2019, **27**, 1, 4–14.
- [2] YPEY A., Vervolg ob de Avbeeldingen der artseny-gewassen met derzelver Nederduitsche en Latynsche beschryvingen, Eersde Deel, 1813 published by Kurt Stüber, <http://www.biolib.de>
- [3] PONTING K.G. « Logwood: an interesting Dye », *Journal of European Economic History*, 1973, **2**, 1, 109–119.
- [4] SMITH C, « Our debt to the logwood tree: the history of hematoxylin. », *MLO Med Lab Obs*, vol. 2006, **38**, 5, 18, 20–2.
- [5] BÖHMER F. Zur pathologischen Anatomie der Meningitis cerebromedularis epidemica. Aertzliches Intelligenzblatt (Munich), 1865.

HISTOLOGY OR LIFE IN PINK AND BLUE

ABSTRACT

This editorial invites readers on an original journey at the intersection of textile history and the biology of tissues. Through the symbolism of indigo blue and the pink-and-blue hues of hematoxylin and eosin staining, it highlights the central role of color in the observation, interpretation, and understanding of tissues, whether textile or biological. It also offers an overview of the principal blue histological dyes, with particular emphasis on hematoxylin, tracing its path from its natural origins to its current status as a standard stain in histopathology. Finally, drawing on recent AFH events, the journal's editorial developments, and the perspectives offered by contributions from our authors, this editorial underscores the continuing evolution of our discipline - histology - at the crossroads of tradition and innovation.

KEY WORDS

Blue, Histology, Staining, Tissue.

L'HISTOLOGIE OU LA VIE EN ROSE ET BLEU

RÉSUMÉ

Cet éditorial invite le lecteur à un voyage original où se croisent histoire textile et science des tissus biologiques. À travers la symbolique du bleu de l'indigo et du rose et bleu de l'hématoxyline éosine, le rôle central de la couleur dans la lecture et l'interprétation des tissus, qu'ils soient textiles ou biologiques est mis en lumière. L'occasion de dresser un panorama des principaux colorants histologiques aux teintes bleues, avec un focus sur l'hématoxyline, depuis ses origines naturelles jusqu'à son usage actuel comme standard en histopathologie. Enfin à travers les événements récents de l'AFH, les avancées éditoriales de la revue et les perspectives offertes par les contributions de nos auteurs, cet éditorial souligne la constante évolution de notre discipline, l'histologie, au croisement de la tradition et de l'innovation.

MOTS CLÉS

Colorations, Bleu, Histologie, Tissu.

LES ORGANOÏDES, UN MODÈLE POLYVALENT À UTILISER À BON ESCIENT

CINQUANTA Guillaume, ABELANET Sophie, DAVIDOVIC Laetitia,
KHALFALLAH Olfa

*Université Côte d'Azur, CNRS UMR7275, Inserm U1323,
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire,
Valbonne, Provence-Alpes-Côte d'Azur, France*

Auteur correspondant : khalfallah@ipmc.cnrs.fr

OPEN ACCESS 

Received: December 23, 2025

Revised: March 15, 2026

Accepted: March 25, 2026

Published: June, 2026

 **CC BY-NC 4.0**

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.27

ORGANOIDS: A POWERFUL YET CONTEXT-DEPENDENT MODEL

ABSTRACT

The growing development of organoids has positioned them as powerful biological models bridging the gap between simplified *in vitro* systems and animal models. Derived from pluripotent or adult stem cells, organoids are three-dimensional self-organizing structures that partially recapitulate the architecture, cellular diversity and selected functions of the organs they model. They provide unprecedented access to developmental and pathological processes that are difficult to study directly in humans, notably organogenesis and neurological diseases, and open promising avenues for therapeutic applications. Despite these advances, organoids remain simplified systems, limited by incomplete maturation, lack of systemic integration and substantial variability. Their effective use therefore relies on rigorous experimental design, standardization of practices and ongoing ethical reflection, positioning organoids as complementary - rather than substitutive - models within the broader biomedical research landscape.

KEY WORDS

Adult stem cells, Brain organoids, Model, Organoids, Pathology, Personalised medicine, Pluripotent stem cells.

RÉSUMÉ

Les organoïdes, dont le développement ne cesse de progresser, apparaissent comme des modèles biologiques puissants, comblant l'écart entre les systèmes *in vitro* simplifiés et les modèles animaux. Dérivés de cellules souches pluripotentes ou adultes, les organoïdes sont des structures tridimensionnelles auto-organisées qui récapitulent partiellement l'architecture, la diversité cellulaire et certaines fonctions des organes modélisés. Ils offrent un accès inédit à des processus développementaux et pathologiques difficilement étudiables directement chez l'homme, notamment l'organogenèse et les maladies neurologiques, et ouvrent des perspectives prometteuses en thérapies. Malgré ces avancées, les organoïdes demeurent des systèmes simplifiés, limités par une maturation incomplète, une absence de vascularisation, d'innervation et d'interaction avec d'autres organes, ainsi qu'une variabilité importante. Leur utilisation efficace repose donc sur une conception expérimentale rigoureuse, la standardisation des pratiques et une réflexion éthique continue, positionnant les organoïdes comme des modèles complémentaires - et non substitutifs - au sein du paysage plus large de la recherche biomédicale.

MOTS CLÉS

Cellules souches adultes, Cellules souches pluripotentes, Médecine personnalisée, Modèle, Organoïdes, Organoïdes cérébraux, Pathologie.

LES ORGANOÏDES: UN MODÈLE BIOLOGIQUE PARMIS D'AUTRES

1. Qu'est-ce qu'un modèle ?

L'étude des tissus et processus biologiques, souvent difficilement accessibles chez l'humain — tels que le développement embryonnaire ou cérébral — repose sur l'utilisation de modèles expérimentaux. Un modèle biologique est un système simplifié permettant d'examiner un phénomène complexe. S'il ne reproduit jamais entièrement et fidèlement l'organisme ou le processus étudié, il en capture néanmoins les caractéristiques essentielles, autorisant l'observation, la manipulation expérimentale et l'établissement de conclusions généralisables. La pertinence d'un modèle repose sur l'adéquation entre la question scientifique posée et les limites intrinsèques du système choisi, et implique un compromis constant entre fidélité biologique et maîtrise expérimentale.

Le biologiste doit ainsi choisir entre la pertinence physiologique des modèles animaux dits intégrés, mais souvent complexes et coûteux, et le degré de contrôle expérimental offert par les systèmes *in vitro*, parfois trop simplifiés. Dans cette quête du « top-modèle », les modèles animaux, et en particulier le modèle murin, se sont imposés comme des standards en recherche biomédicale. Cependant, cette hégémonie a conduit à une forme de biais de perception, dans laquelle la biologie humaine est interprétée à travers un prisme murin. Or, des différences majeures de physiologie, de métabolisme et de pharmacocinétique entre espèces limitent la transposabilité de ces résultats, particulièrement en neurosciences et pharmacologie, conduisant à de fréquents échecs d'essais cliniques [1, 2]. Ces limites sont d'autant plus marquées dans l'étude du cerveau, dont le développement, l'organisation, la complexité et les fonctions diffèrent profondément entre l'humain et le modèle murin. Les primates non humains, plus proches sur le plan évolutif et neurobiologique, constituent des modèles plus pertinents pour l'étude du cerveau ; toutefois, leur utilisation reste fortement contrainte par des coûts élevés ainsi que par des considérations éthiques majeures. De ce constat est née la nécessité d'élargir le panel de modèles biologiques disponibles, en intégrant des systèmes plus proches des tissus et de la physiologie humaine, comme les organoïdes.

2. De la cellule souche à l'organoïde

Les progrès récents dans le domaine des cellules souches ont profondément modifié le paysage des modèles biologiques, notamment avec le développement des organoïdes. Les organoïdes correspondent à des structures tridimensionnelles

dérivées de cellules souches, capables d'auto-organisation et reproduisant partiellement l'architecture et certaines fonctions des organes humains ciblés [3, 4]. Les organoïdes peuvent être générés à partir de deux grands types de cellules souches. D'une part, les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) qui possèdent un potentiel de différenciation étendu, leur permettant de générer pratiquement tous les types cellulaires de l'organisme; d'autre part, les cellules souches adultes (CSA) présentant un potentiel plus restreint, limité à leur tissu d'origine (**Figure 1**).

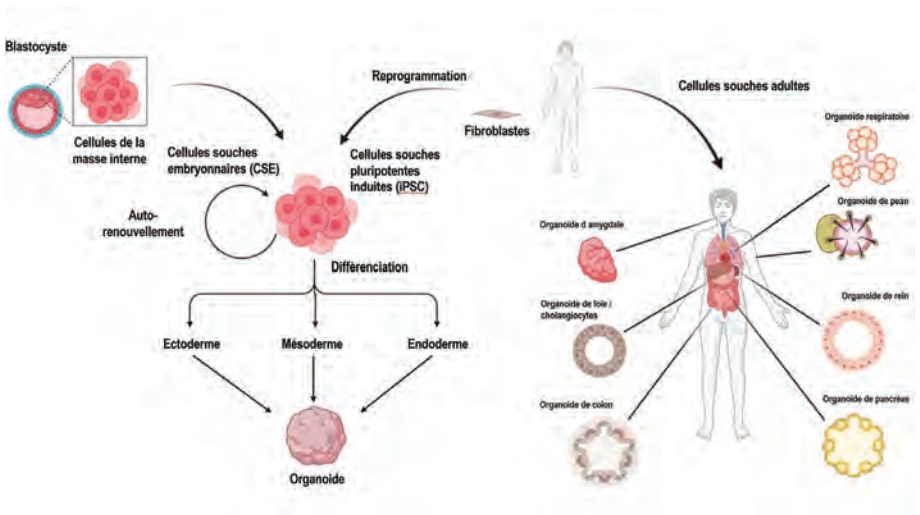


Figure 1 : Origine des cellules souches et génération des organoïdes

Schéma illustrant les différentes sources de cellules souches utilisées pour la génération d'organoïdes et les principes généraux de leur différenciation. Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont dérivées des cellules de la masse interne du blastocyste et possèdent une capacité d'auto-renouvellement ainsi qu'un potentiel de différenciation vers les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Les cellules somatiques adultes, telles que les fibroblastes, peuvent être reprogrammées génétiquement en cellules souches pluripotentes induites (iPSC), partageant des propriétés similaires aux CSE. En parallèle, des cellules souches adultes, issues de tissus spécifiques, peuvent également être isolées et utilisées. Sous l'influence de signaux de différenciation et de mécanismes d'auto-organisation, ces différentes sources cellulaires permettent la modélisation de divers organes humains, tels que l'amygdale, le foie et les cholangiocytes, différents segments de l'intestin comme le côlon, le rein, le pancréas, la peau, l'appareil respiratoire, etc. Figure créée à l'aide de BioRender.com.

La différenciation à partir de CSA permet d'obtenir des organoïdes plus rapidement, avec un degré de maturation plus avancé. À l'inverse, les protocoles reposant sur des CSE ou iPSC impliquent un plus grand nombre d'étapes de différenciation du fait de leur état indifférencié, augmentant les sources de variabilité, et conduisant à une hétérogénéité plus importante des organoïdes obtenus [5].

Selon la source cellulaire utilisée, il est aujourd'hui possible de produire des organoïdes représentant la majorité des organes humains (**Figure 1**). Il convient cependant de distinguer les organoïdes d'autres structures cellulaires tridimensionnelles. Les structures issues d'un seul type cellulaire relèvent du concept de «sphère» ou de «tissu-oïde». Les structures dérivées de lignées tumorales sont désignées comme sphéroïdes, tandis que les cultures 3D dérivées de tumeurs primaires sont qualifiées de tumoroïdes.

3. Les organoïdes cérébraux: un cas particulier

Les organoïdes cérébraux constituent un cas particulier en raison de la complexité du cerveau humain. Contrairement à de nombreux organes, le cerveau ne dispose pas de CSA exploitables pour la génération d'organoïdes, imposant le recours à des cellules pluripotentes CSE ou iPSC.

La régionalisation du cerveau peut être modélisée selon deux grandes approches : i) des protocoles de différenciation non dirigée, générant des organoïdes contenant différentes structures cérébrales (cortex, hypothalamus, rétine, etc.) dont le nombre d'exemplaires et l'organisation générale sont aléatoires, ii) des protocoles de différenciation orientée, permettant de générer des organoïdes modélisant une seule structure cérébrale telle que le cortex, l'hippocampe ou encore le cervelet.

Ces derniers peuvent ensuite être fusionnés pour former des assemblages, afin d'étudier les interactions inter-régionales. Les organoïdes cérébraux constituent ainsi des outils précieux pour étudier le cerveau humain, notamment en modélisant les processus développementaux comme la neurogenèse, la migration neuronale, la stratification corticale et la formation des circuits neuronaux [6, 7].

DOMAINES D'APPLICATION DES ORGANOÏDES

1. Étude du développement, de la pathologie : vers une révolution biomédicale

Les organoïdes permettent d'étudier le développement normal et pathologique de nombreux organes, y compris dans un contexte génétique spécifique, soit en reprogrammant directement les cellules somatiques des patients, soit par édition ciblée du génome (CRISPR/Cas9). Ils offrent ainsi un accès inédit à des périodes développementales jusqu'alors difficilement étudiables et constituent un outil particulièrement précieux pour la recherche sur les maladies rares ou orphelines [8, 9].

En reproduisant certains aspects de la physiologie humaine, les organoïdes deviennent :

- des plateformes de criblage à haut débit pour évaluer la toxicité ou l'efficacité thérapeutique de molécules, y compris dans des approches de médecine personnalisée [10] ;
- des systèmes de production de molécules biologiques d'intérêt, telles que des hormones, enzymes ou toxines ;
- des modèles pour l'étude des interactions organe–pathogène ou organe–cellules tumorales [11] ;
- des perspectives prometteuses pour la médecine régénérative, avec l'objectif à long terme de produire des organoïdes autologues susceptibles de pallier la pénurie de greffons et de limiter les rejets immunitaires.

2. Concept « *One Health* »

Les organoïdes ne se limitent pas aux modèles humains : ils peuvent également être générés à partir de nombreuses espèces animales, offrant un outil puissant pour explorer les mécanismes évolutifs et comparer la biologie entre espèces. Depuis peu, la notion d'organoïde s'étend également au règne végétal, où des cellules racinaires sont reprogrammées pour générer des structures tridimensionnelles organisées, capables de reproduire une hétérogénéité tissulaire et de produire des métabolites particuliers [12].

Dans cette perspective, les organoïdes s'inscrivent pleinement dans l'approche *One Health*, qui repose sur la reconnaissance de l'interdépendance étroite entre la santé humaine, animale et environnementale. Les organoïdes dérivés de différentes espèces constituent ainsi une plateforme comparative particulièrement pertinente pour analyser la sensibilité relative de tissus humains et animaux face à un même agent pathogène ou à une même molécule. Ces approches comparatives sont essentielles pour élucider les mécanismes gouvernant le tropisme tissulaire et la transmission inter-espèces, et contribuent à une meilleure compréhension de nombreuses menaces sanitaires contemporaines — telles que les zoonoses, les pandémies virales, l'antibiorésistance ou l'impact des polluants — ainsi que de leur circulation entre espèces dans les écosystèmes [13].

TECHNIQUES D'ANALYSE

Les organoïdes offrent un terrain propice à l'intégration de nombreuses approches, qui permettent d'explorer les mécanismes moléculaires, cellulaires et fonctionnels au sein des organoïdes.

1. Transcriptomique et approches multi-omiques

Les approches multi-omiques, qui combinent différentes technologies et jeux de données tels que la transcriptomique, l'épigénomique, la protéomique ou la métabolomique, permettent d'étudier les processus biologiques et les états pathologiques avec un niveau de résolution sans précédent.

Les technologies de séquençage unicellulaire ont largement contribué à ce développement en offrant la possibilité d'analyser simultanément plusieurs niveaux de régulation cellulaire. Par exemple, la transcriptomique unicellulaire (scRNA-seq) permet de caractériser l'expression génique à l'échelle de la cellule individuelle et de révéler l'hétérogénéité des populations cellulaires au sein des organoïdes, leurs états de différenciation et leurs trajectoires développementales, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques.

Ces données peuvent également être comparées à des atlas de tissus humains afin d'évaluer la fidélité biologique des organoïdes, mais aussi à des tissus provenant d'autres espèces, pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'évolution des espèces [14].

2. Imagerie conventionnelle ou tridimensionnelle

L'imagerie constitue un outil essentiel pour étudier l'architecture tridimensionnelle et la dynamique cellulaire des organoïdes. La microscopie conventionnelle permet d'obtenir des images à haute résolution afin d'analyser la distribution de marqueurs cellulaires, la cytoarchitecture et les interactions entre populations cellulaires. Des approches tridimensionnelles, comme la microscopie par feuillet de lumière (*light-sheet*), permettent d'observer les organoïdes entiers avec une phototoxicité limitée, notamment lorsqu'elles sont associées à des techniques de transparence tissulaire. Enfin, l'imagerie temporelle (*time-lapse*) permet de suivre en temps réel des processus dynamiques tels que la migration cellulaire, la prolifération et l'organisation morphogénétique, apportant ainsi des informations précieuses sur la formation et l'évolution des organoïdes [15].

Immunofluorescence sur coupes d'organoïdes cérébraux et analyses automatisées

L'immunofluorescence sur coupes fines constitue une approche de référence pour l'analyse de la composition cellulaire et de l'organisation architecturale des organoïdes cérébraux. Après fixation et inclusion, les organoïdes sont sectionnés afin de permettre une pénétration homogène des anticorps et une imagerie à haute résolution.

Cette méthode permet l'identification des principaux types cellulaires, l'analyse de la cytoarchitecture, ainsi que l'évaluation de processus dynamiques tels que la prolifération, l'apoptose et la maturation neuronale, y compris par des marquages multiplexés.

Le volume important de données générées par l'imagerie confocale ou épifluorescente nécessite de développer des analyses automatisées (**Figure 2**).

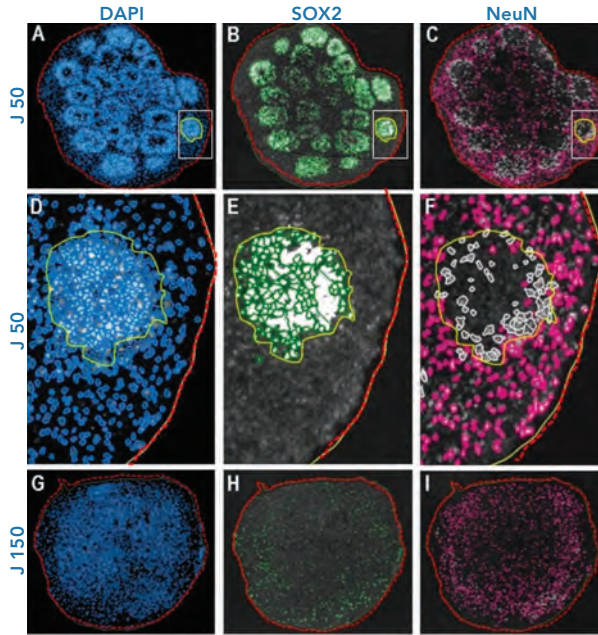


Figure 2: Analyse cytoarchitecturale d'organoïdes cérébraux par immunofluorescence (IF) et quantification automatisée

IF sur coupes d'organoïdes cérébraux humains à 50 et 150 jours (J) de maturation. Images en niveaux de gris avec tracés de segmentation colorés pour marquer les noyaux (DAPI⁺ en bleu), les progéniteurs neuraux (SOX2⁺ en vert) et les neurones post-mitotiques (NeuN⁺ en magenta). (A–C) Vue d'ensemble d'un organoïde cérébral à J50 montrant sa cytoarchitecture, avec les zones ventriculaires, à forte densité de progéniteurs neuraux, entourées par les neurones, bien individualisés.

(D–F) Agrandissements de la région encadrée dans (A–C), illustrant les informations extraites par les analyses automatisées, incluant la segmentation cellulaire et la délimitation des ventricules (en jaune). L'individualisation des cellules est possible en dehors de la zone ventriculaire, ce qui permet un comptage précis des neurones. En revanche, la densité des progéniteurs neuraux trop importante dans la zone ventriculaire, nécessite d'utiliser l'intensité de fluorescence comme paramètre d'analyse.

(G–I) Coupes représentatives d'organoïdes cérébraux à J150 montrant une diminution relative des progéniteurs SOX2⁺ et une disparition des zones ventriculaires, accompagnée par une augmentation des neurones NeuN⁺, témoignant de la maturation progressive du tissu. Dans ce cas, l'analyse repose uniquement sur la segmentation cellulaire.

Sur toutes les images, les lignes rouges pointillées délimitent l'organoïde, identifié automatiquement, afin de mesurer les paramètres morphologiques (aire, périmètre).

Ainsi, classiquement, les pipelines de traitement d'images sont optimisés pour réaliser les étapes suivantes :

1. Acquisition des images.
2. Prétraitement pour vérifier la qualité des images et standardiser les conditions d'analyse.
3. Segmentation pour individualiser les cellules et extraire les paramètres morphométriques: densité cellulaire, intensité des marqueurs, taille / circularité des cellules, co-expression de marqueurs.
4. Des analyses spatiales plus avancées sont utilisées pour extraire des informations sur la cytoarchitecture de l'organoïde, telle que la distribution radiale des cellules, la stratification cellulaire ou encore les relations spatiales entre populations cellulaires.
5. Des approches d'apprentissage automatique (*Deep learning*) peuvent venir compléter les analyses pour la reconnaissance de structures complexes et le traitement automatisé à grande échelle, améliorant la reproductibilité donc la fiabilité des résultats.

Transparisation et imagerie par feuillet de lumière

L'analyse d'organoïdes entiers est limitée par leur épaisseur et leur opacité, qui restreignent la profondeur d'imagerie des techniques conventionnelles. La transparisation tissulaire (*optical clearing*) permet de réduire la diffusion lumineuse en homogénéisant l'indice de réfraction des tissus, rendant les organoïdes optiquement transparents tout en préservant leur intégrité structurale. Différentes stratégies sont utilisées, notamment des méthodes aqueuses (CUBIC, SeeDB), à solvants (iDISCO, uDISCO) ou à base d'hydrogels (CLARITY), chacune impliquant un compromis entre efficacité de clarification, préservation morphologique et compatibilité avec l'immunomarquage.

Couplée à la transparisation, la microscopie par feuillet de lumière permet l'imagerie tridimensionnelle rapide d'organoïdes entiers avec une phototoxicité réduite. Cette technique repose sur l'illumination sélective d'un plan optique, limitant l'excitation aux régions observées.

Elle est particulièrement adaptée à l'étude de la cytoarchitecture globale, de la stratification tissulaire, de la migration cellulaire et de la distribution des types cellulaires à l'échelle de l'organoïde, en conservant l'information spatiale intacte, sur des échantillons de grande taille (millimétriques) (**Figure 3**) [16, 17].

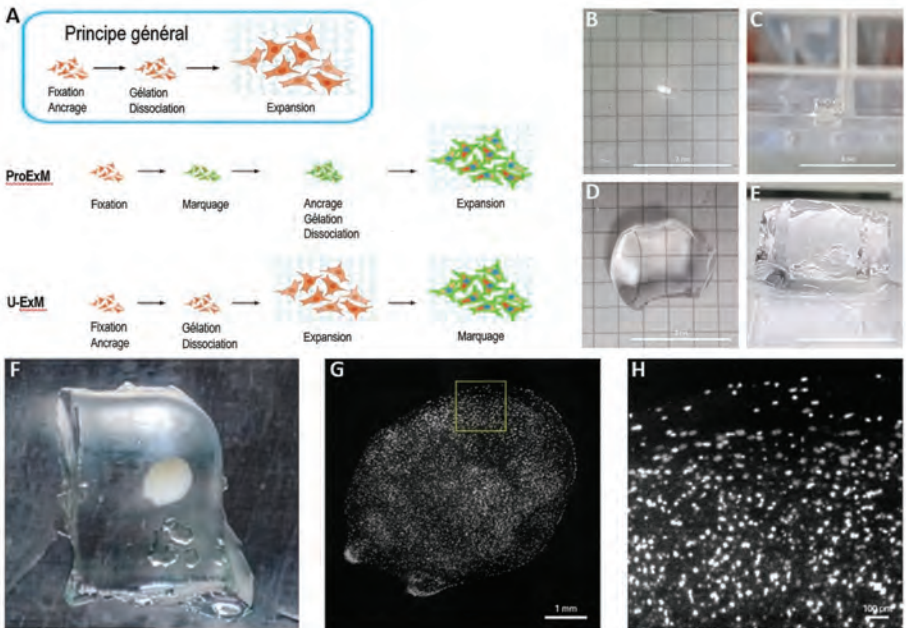


Figure 3 : Présentation des différentes étapes permettant l'analyse d'organoïdes entiers par IF.

(A) Principe général de l'expansion des organoïdes, combinée à l'IF, qui peut être réalisée selon deux approches expérimentales distinctes (ProExM et U-ExM).

(B-C) Expansion des organoïdes au sein d'un gel, l'augmentation de leur volume favorise la pénétration homogène des réactifs.

(D-E) Transpareinisation des organoïdes expansés, permettant de réduire la diffusion de la lumière et d'optimiser l'imagerie tridimensionnelle.

(F) Organoïde immunomarqué inclus dans le gel.

(G) Acquisition d'images par microscopie à feuillet de lumière, offrant une visualisation tridimensionnelle de l'organoïde entier, neurones immunomarqués (NeuN⁺). (H) Détail à fort grossissement illustrant la haute résolution spatiale obtenue, permettant l'observation fine de l'organisation neuronale.

3. Electrophysiologie et imagerie fonctionnelle

Dans le cas des organoïdes neuronaux, l'étude de la fonction cellulaire et de l'activité des réseaux constitue un enjeu majeur. Les techniques d'électrophysiologie, telles que le patch-clamp, permettent d'enregistrer l'activité électrique de neurones individuels et d'évaluer leurs propriétés électrophysiologiques, notamment la génération de potentiels d'action et la formation de synapses fonctionnelles. Les systèmes d'électrophysiologie en 3D offrent une approche complémentaire permettant d'enregistrer simultanément l'activité de réseaux neuronaux entiers. Ils permettent d'étudier la synchronisation des neurones, l'émergence d'activités oscillatoires et la maturation fonctionnelle des circuits [18].

L'imagerie calcique constitue un outil clé pour accéder à la dimension fonctionnelle des organoïdes cérébraux en visualisant l'activité neuronale en temps réel. Elle repose sur l'utilisation d'indicateurs fluorescents sensibles aux variations de calcium intracellulaire, lesquelles accompagnent l'activité électrique neuronale. Cette approche peut être réalisée sur des organoïdes entiers ou en tranches épaisses, maintenus dans des conditions physiologiques pendant l'enregistrement de la fluorescence au cours du temps, dans un champ fixe. L'analyse quantitative repose sur la segmentation des régions d'intérêt, l'extraction des signaux de fluorescence et le calcul des variations relatives de signal, permettant de déterminer l'activité spontanée des cellules, les potentiels d'action (Figure 4).

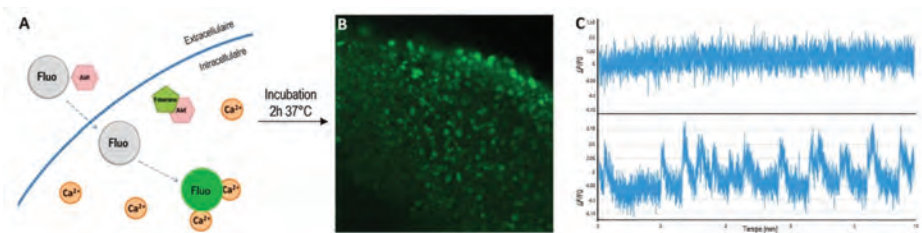


Figure 4: Analyse fonctionnelle des organoïdes cérébraux par imagerie calcique

Le calcium intracellulaire est détecté à l'aide d'un fluorochrome (fluo) sensible au Ca^{2+} , conjugué à des groupements esters acétoxyméthyle (AM), qui pénètrent passivement à travers la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur de la cellule, l'hydrolyse des groupements AM permet la rétention du fluorochrome, dont l'intensité de fluorescence augmente lors de la liaison aux ions Ca^{2+} (A). Les organoïdes sont incubés pendant 2 heures en présence de ce traceur calcique, puis l'activité est enregistrée par imagerie de fluorescence sur un champ fixe pendant 10 minutes (B). Les signaux obtenus sont ensuite analysés à l'aide de pipelines automatisés, permettant de caractériser les profils d'activité calcique et de discriminer les neurones immatures (C, graphe du haut) des neurones matures (C, graphe du bas) au sein des organoïdes.

Des analyses de réseau permettent ensuite d'évaluer la synchronisation intercellulaire, les corrélations fonctionnelles et l'émergence de motifs d'activité collective. L'imagerie calcique constitue ainsi un outil clé pour étudier la maturation fonctionnelle des réseaux neuronaux, modéliser des pathologies neurologiques et évaluer les effets de composés pharmacologiques [19].

4. Édition génique

Les technologies d'édition du génome constituent un outil particulièrement puissant pour étudier les mécanismes moléculaires au sein des organoïdes. Elles permettent d'introduire de manière ciblée des modifications génétiques afin de modéliser des maladies humaines en reproduisant les altérations observées chez les patients, de corriger des variants pathogènes ou encore de moduler l'expression de gènes spécifiques. Ces approches rendent également possible la génération de lignées cellulaires rapporteurs exprimant des marqueurs fluorescents, facilitant ainsi l'étude de processus biologiques tels que la différenciation cellulaire, l'organisation tissulaire ou la formation de structures complexes au cours du développement des organoïdes [20, 21].

LIMITES ET DÉFIS ACTUELS

1. Un modèle partiel du vivant

Même si les organoïdes constituent de très bons modèles pour comprendre la formation et la physiologie des organes, ils n'en restent pas moins des « avatars » d'organes et non des « mini-organes ». L'absence de vascularisation, d'innervation et d'interaction avec d'autres organes restreint leur maturation, et les cellules d'organoïdes présentent souvent une différenciation incomplète. Le défi actuel est d'améliorer leur maturation en intégrant la vascularisation, par microfluidique ou intégration de cellules endothéliales. Des stratégies visant à accroître leur complexité sont en développement, incluant la co-culture avec des types cellulaires d'autres origines embryonnaires, telles que les cellules immunitaires, des fusions entre organoïdes, appelées assembloïdes, (surtout entre régions du cerveau), ou encore les organoïdes-on-chip qui simulent des conditions biologiques dynamiques entre organoïdes de différentes régions [22]. Enfin, la transplantation *in vivo*, notamment chez des modèles animaux immunodéficients, constitue une autre approche permettant d'améliorer la maturation et la vascularisation des organoïdes.

Après greffe, ces structures peuvent s'intégrer partiellement dans le tissu hôte et bénéficier d'un environnement physiologique plus complexe, incluant l'apport sanguin, les signaux hormonaux et les interactions cellulaires. Cette stratégie a notamment été utilisée pour favoriser la maturation d'organoïdes cérébraux, intestinaux ou hépatiques, permettant ainsi d'étudier plus fidèlement certains aspects du développement et de la physiologie des organes humains. Toutefois, bien que performante, cette approche présente plusieurs limites importantes. En effet, elle repose sur l'implantation des organoïdes humains immatures, donc en développement, dans un organisme hôte adulte, généralement murin. Ceci engendre un chimérisme inter-espèces, un décalage développemental et une localisation de l'organoïde non physiologique au sein de l'hôte. Enfin, le recours à l'expérimentation animale apparaît en contradiction avec le principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), qui vise à limiter l'utilisation d'animaux, et souligne les limites actuelles des modèles alternatifs, encore insuffisants pour reproduire pleinement la complexité du vivant.

2. Variabilité génétique et reproductibilité

La grande variabilité interindividuelle des cellules souches utilisées, combinée à l'hétérogénéité des protocoles posent des défis majeurs en termes de reproductibilité. L'établissement de « bonnes pratiques de différenciation », le contrôle qualité rigoureux des cellules souches, et la validation systématique des structures générées constituent des exigences clés. Par ailleurs, il est indispensable de considérer la notion de réplicats pour vérifier la fiabilité des résultats, qui peut être à l'échelle de structures au sein de l'organoïde (comme les ventricules dans les organoïdes corticaux), de l'organoïde, du nombre de différenciations, voire du nombre de lignées de cellules souches utilisées ou du nombre d'individus recrutés au départ [23, 24].

3. Enjeux réglementaires et éthiques

Si les organoïdes offrent des perspectives inédites pour étudier le développement, les maladies humaines et explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques, leur essor soulève également des questions réglementaires et éthiques importantes en raison de l'utilisation de cellules humaines et de la complexité croissante de ces systèmes biologiques. Leur production et leur utilisation s'inscrivent ainsi dans un cadre juridique et éthique strict visant à garantir la protection des donneurs et à prévenir toute utilisation abusive

d'éléments du corps humain, conformément au code de la santé publique et aux lois de bioéthique françaises. Pour cela, les recherches impliquant directement des participants doivent être évaluées par un Comité de Protection des Personnes (CPP), qui examine notamment la validité scientifique des projets justifiant l'utilisation de matériel humain, les conditions d'obtention du consentement libre et éclairé, ainsi que les mesures garantissant la protection et la confidentialité des participants. Les collections d'échantillons biologiques humains sont quant à elles déclarées ou autorisées auprès du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et peuvent être évaluées par le Comité consultatif sur les collections d'échantillons biologiques humains (CODECOH), afin d'assurer la traçabilité et les conditions d'accès aux ressources biologiques. Les données associées aux échantillons doivent également respecter le Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD), sous le contrôle de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL). En complément de ces exigences générales applicables à tout échantillon humain, l'utilisation de cellules souches humaines est soumise à des dispositions spécifiques. Les CSE humaines sont encadrées de manière particulièrement stricte en raison des enjeux éthiques liés à l'utilisation d'embryons humains.

Les protocoles impliquant ces cellules nécessitent une autorisation préalable délivrée par l'Agence de la biomédecine, qui évalue la pertinence scientifique des projets ainsi que leur conformité aux principes éthiques. Cette autorisation concerne notamment la dérivation, l'importation, la conservation et l'utilisation de lignées de cellules souches embryonnaires. Les iPSC humaines, obtenues par reprogrammation de cellules somatiques adultes, ne soulèvent pas les mêmes enjeux liés au statut de l'embryon. Leur utilisation reste toutefois soumise aux règles générales applicables à la recherche utilisant des éléments du corps humain, notamment en matière de consentement, de traçabilité et de protection des données.

Au-delà de ces considérations réglementaires, le développement rapide des organoïdes soulève également des questions éthiques liées aux attentes sociétales et aux perspectives thérapeutiques qu'ils suscitent. Bien que ces modèles constituent des outils particulièrement puissants pour la recherche fondamentale et biomédicale, il est essentiel d'éviter toute surinterprétation de leurs capacités actuelles et de ne pas susciter d'attentes irréalistes quant à leurs applications cliniques à court terme. La question de l'équité d'accès aux futures innovations thérapeutiques issues de ces technologies constitue également un enjeu important dans le contexte émergent de la médecine personnalisée.

Enfin, les organoïdes cérébraux soulèvent des interrogations éthiques inédites en raison de l'apparition d'activités neuronales organisées proches de celles observées pendant le développement cérébral. Ces avancées alimentent notamment les débats sur le statut moral potentiel de ces structures, sur les limites expérimentales à définir pour leur maturation, leur intégration dans des modèles chimériques, ainsi que sur les implications du concept émergent d'« *organoid intelligence* », qui propose d'intégrer des réseaux neuronaux issus d'organoïdes dans des systèmes électroniques capables d'apprentissage adaptatif. Ces avancées appellent ainsi à une réflexion collective impliquant chercheurs, bioéthiciens, juristes et décideurs publics afin d'encadrer de manière responsable les usages actuels et futurs des organoïdes et de prévenir d'éventuelles dérives [25, 26].

CONCLUSION

Les organoïdes redéfinissent la frontière entre modèle expérimental et système biologique complexe. S'ils ne remplaceront pas les modèles animaux intégrés, ils constituent aujourd'hui un outil central pour comprendre le développement humain, modéliser les maladies, et tester des thérapies de plus en plus ciblées. Leur avenir reposera sur l'amélioration de leur complexité, leur intégration raisonnée dans un écosystème de modèles complémentaires, et sur une réflexion éthique continue accompagnant leur développement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] MAK I.W., EVANIEW N., GHERT M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*, 2014, **6**(2), 114-8.
- [2] POUND P., RITSKES-HOITINGA M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med*, 2018, **16**(1), 304.
- [3] CLEVERS H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 2016, **165**(7), 1586-1597.
- [4] KIM J., KOO B.K., KNOBLICH J.A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(10), 571-584.
- [5] SCHUTGENS F., CLEVERS H. Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annu Rev Pathol*, 2020, **15**, 211-234.
- [6] LANCASTER M.A., KNOBLICH J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2014, **9**(10), 2329-40.
- [7] KELLEY K.W., PAŞÇA S.P. Human brain organogenesis: Toward a cellular understanding of development and disease. *Cell*, 2022, **185**(1), 42-61.
- [8] ONESTO M.M., KIM J.I., PASCA S.P. Assembloid models of cell-cell interaction to study tissue and disease biology. *Cell Stem Cell*, 2024 Nov 7; **31**(11):1563-1573.
- [9] FATEHULLAH A, TAN SH, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat Cell Biol*, 2016 Mar; **18**(3):246-54.
- [10] VLACHOGIANNIS G, *et al.* Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 2018, **359**(6378), 920-926.
- [11] KRENN V., *et al.* Organoid modeling of Zika and herpes simplex virus 1 infections reveals virus-specific responses leading to microcephaly. *Cell Stem Cell*, 2021, **28**(8), 1362-1379.e7.
- [12] ZAVALA-ORTIZ D.A., *et al.* Plant Cell Organoids of *Catharanthus roseus*: A Novel Biotechnological Platform for Vinblastine and Indole-Derived Alkaloids. *Biotechnol Bioeng*, 2025, **122**(12), 3496-3502.
- [13] KIM H., *et al.* Diverse bat organoids provide pathophysiological models for zoonotic viruses. *Science*, 2025, **388**(6748), 756-762.

- [14] GU Y. *et al.* Organoid assessment technologies. *Clin Transl Med*, 2023, **13**(12):e1499.
- [15] BREMOND MARTIN C., SIMON CHANE C., CLOUCHOUX C., HISTACE A. Recent Trends and Perspectives in Cerebral Organoids Imaging and Analysis. *Front Neurosci*, 2021, **15**:629067.
- [16] ADHYA D., *et al.* Application of Airy beam light sheet microscopy to examine early neurodevelopmental structures in 3D hiPSC-derived human cortical spheroids. *Mol Autism*, 2021, **12**(1), 4.
- [17] TRISAL A., SINGH A.K. CLARITY in Alzheimer's Research: Merging Tissue Transparency with Next-Gen Neurotechnologies. *J Neurosci Methods*, 2025, **423**, 110554.
- [18] PASSARO A.P., STICE S.L. Electrophysiological Analysis of Brain Organoids: Current Approaches and Advancements. *Front Neurosci*, 2021, **12**;14:622137.
- [19] KIM J.I., *et al.* Human assembloid model of the ascending neural sensory pathway. *Nature*, 2025, **642**(8066), 143-153.
- [20] KLOMPSTRA T.M., YOON K.J., KOO B.K. Evolution of organoid genetics. *Eur J Cell Biol*, 2025, **104**(2):151481.
- [21] GOPAL S., RODRIGUES A.L., DORDICK J.S. Exploiting CRISPR Cas9 in Three-Dimensional Stem Cell Cultures to Model Disease. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, **24**;8:692.
- [22] PARK S.E., GEORGESCU A., HUH D. Organoids-on-a-chip. *Science*, 2019, **364**(6444), 960-965.
- [23] ZHAO Z., *et al.* Organoids. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, **2**, 94.
- [24] SANDOVAL S.O., *et al.* Rigor and reproducibility in human brain organoid research: Where we are and where we need to go. *Stem Cell Reports*, 2024, **19**(6):796-816.
- [25] PAŞÇA S.P., *et al.* The need for a global effort to attend to human neural organoid and assembloid research. *Science*, 2025, **390**(6773), 574-577.
- [26] de JONGH D., MASSEY E.K.; VANGUARD consortium and BUNNIK E.M. Organoids: a systematic review of ethical issues. *Stem Cell Res Ther* 2022, **13**(1):337.

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

GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela

Bayer SAS – Crop Science Division

Pathology – Mechanistic Toxicology

355 rue Dostoievski - 06560 Sophia Antipolis – France

Auteur correspondant : marciarafaela.goncalvesmachado@bayer.com

OPEN ACCESS 

Received: March 9, 2026

Revised: April 22, 2026

Accepted: April 23, 2026

Published: June, 2026

 **CC BY-NC 4.0**

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.47

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

ABSTRACT

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

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

KEY WORDS

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

RÉSUMÉ

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

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

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

MOTS CLÉS

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

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

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

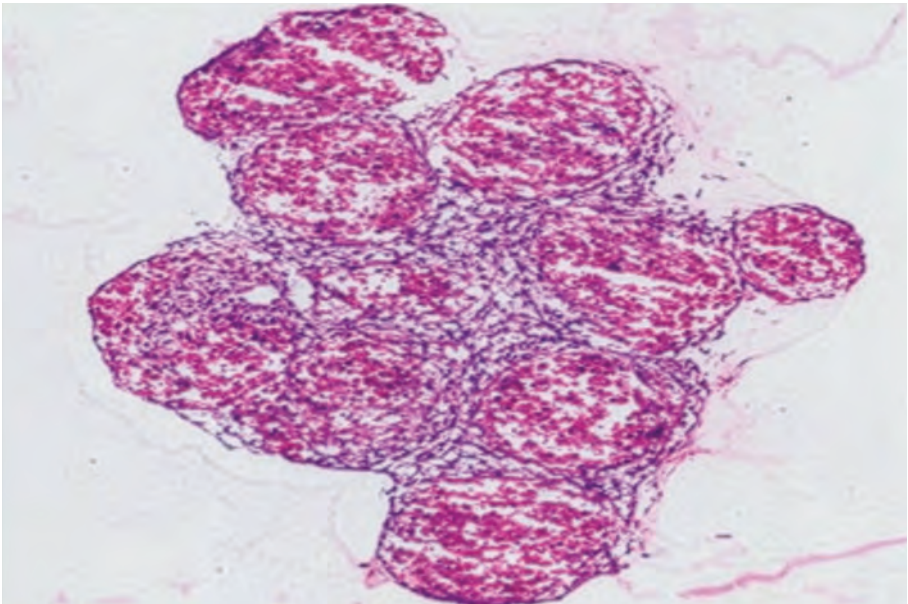


Figure 1 : Coupe congelée de sphéroïde de foie de Rat, HE, capture à l'objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica).

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

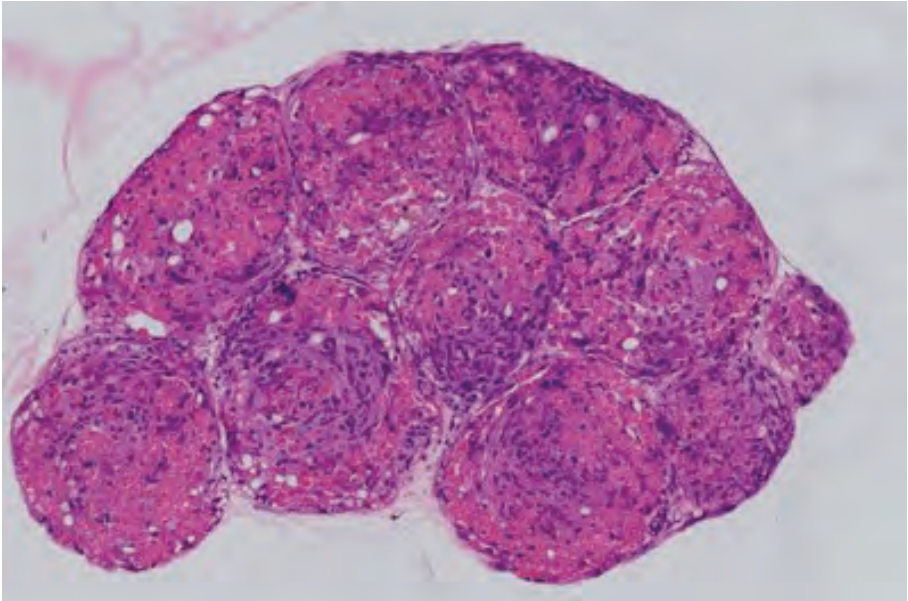


Figure 2 : Coupe en paraffine de sphéroïde de foie de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica).

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

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

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

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

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

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

1.1.1. Méthode en HistoGel™

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

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

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

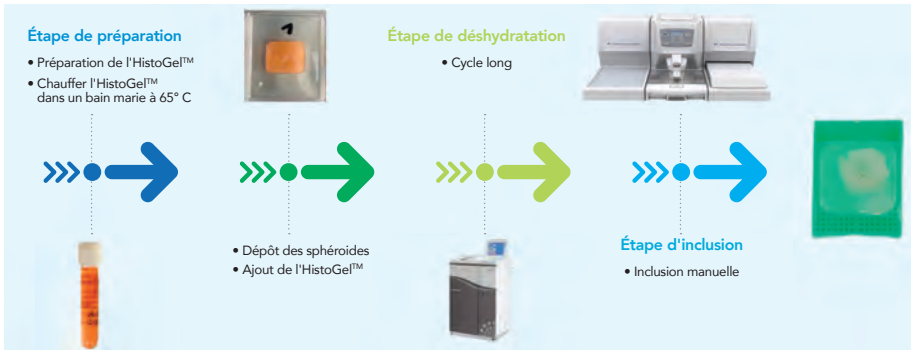


Figure 3 : Illustration des étapes clés de l'HistoGel™.

1.1.2. Méthode sur mousse

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

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

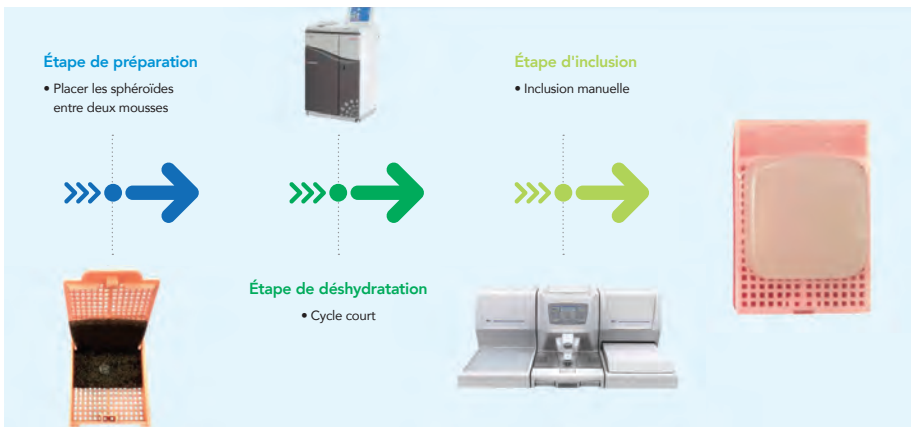


Figure 4 : Illustration des étapes clés de la méthode avec mousse.

1.1.3. Résultats

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

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

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

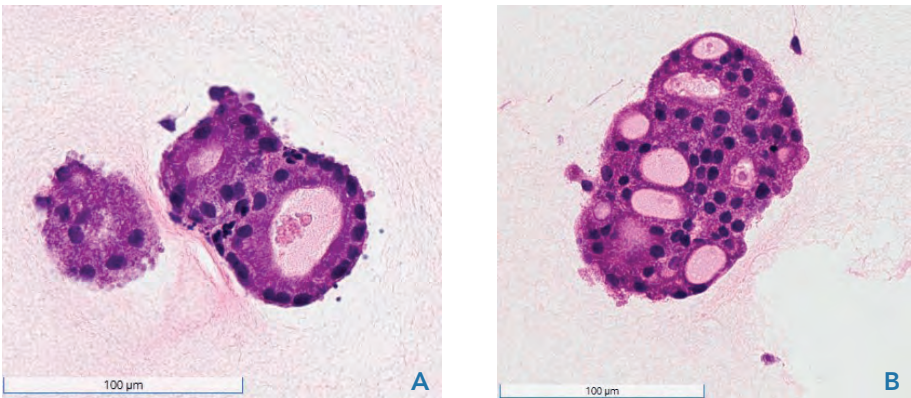


Figure 5 A : Résultat de la méthode avec l'HistoGel™. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica). **B** : Résultat de la méthode avec mousse. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2,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

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

1.2. Méthodes de Préparation des Sphéroïdes de Foie

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

1.2.1. Méthode en HistoGel™

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

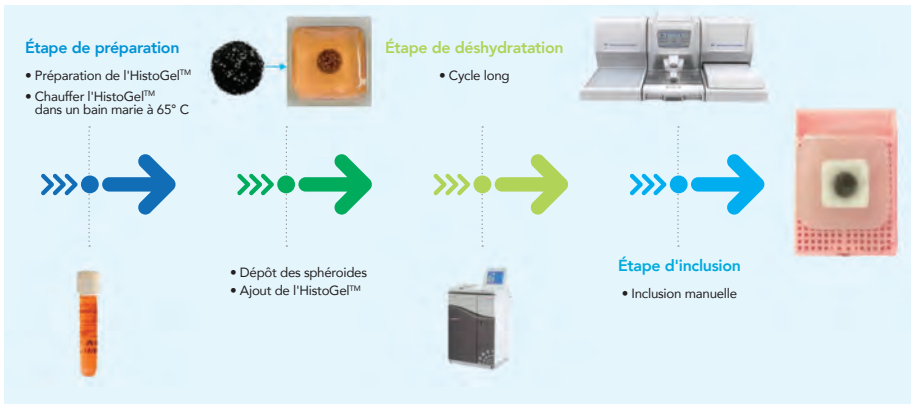


Figure 6 : Illustration des étapes clés de la méthode à l'HistoGel™.

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

1.2.2. Méthode avec le CytoPath® Disc

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



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

1.2.3. Résultats

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

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

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

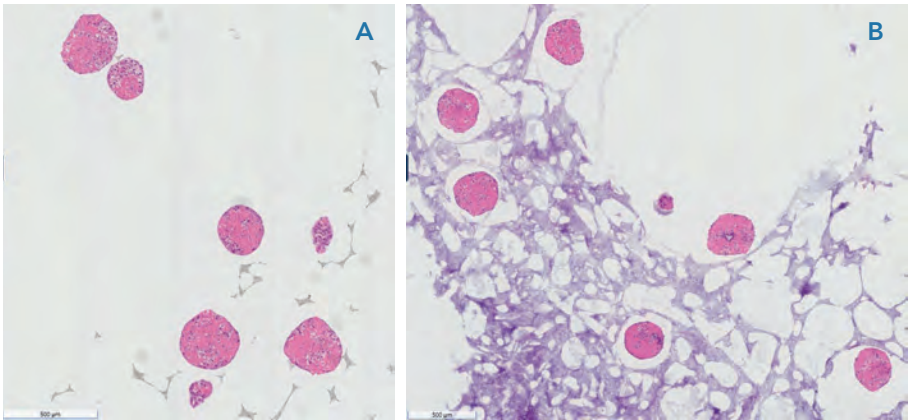


Figure 8 A : Résultat de la méthode avec l'HistoGel™. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio AT2, Leica). **B :** Résultat de la méthode avec CytoPath® Disc. Coupe FFPE, Sphéroïde de thyroïde de Rat, HE, objectif x40 (image scannée avec scanner Aperio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

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

CONCLUSION

Avec l'essor des modèles *in vitro* 3D dans les laboratoires, le développement de nouvelles techniques devient indispensable afin d'optimiser les processus existants. Ces évolutions sont nécessaires pour permettre à l'histologie de conserver toute sa pertinence dans l'analyse *in vivo*, tout en s'intégrant pleinement aux approches *in vitro*.

Les différentes techniques de préparation évaluées dans cet article apparaissent particulièrement prometteuses pour les recherches futures. Leur performance en termes de préservation morphologique associée à leur facilité de mise en œuvre, permet d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, conditions indispensables à la validation des travaux scientifiques. L'intégration de ces méthodes dans les protocoles d'histotechnologie, offre ainsi la possibilité d'approfondir la compréhension des effets des produits phytosanitaires sur les tissus cibles, contribuant de manière significative aux avancées dans le domaine de la toxicologie. Par ailleurs ces optimisations présentent un potentiel de transposition à d'autres contextes expérimentaux, ouvrant la voie à leur application dans un large éventail d'études.

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

REMERCIEMENTS

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

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

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

COMBINAISON DE DEUX SYSTÈMES DE DÉMASQUAGE À LA CHALEUR POUR UNE DÉTECTION PAR IMMUNOFLOUORESCENCE MULTIPLEX DE STRUCTURES RÉNALES PAR DES ANTICORPS PRIMAIRES DE MÊME ESPÈCE

ACCART Nathalie et LAMBERT Christian

*Novartis Pharma AG - Biomedical Research
Diseases of Aging and Regenerative Medicine
Postfach – 4057 BALE - Suisse*

Auteur correspondant : nathalie.accart_gris@novartis.com
ORCID : 0000-0002-7981-2866

OPEN ACCESS 

Received: January 27, 2026

Revised: April 9, 2026

Accepted: April 14, 2026

Published: June, 2026

 **CC BY-NC 4.0**

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.61

COMBINATION OF TWO HEAT-BASED UNMASKING SYSTEMS FOR AN IMMUNOFLUORESCENCE MULTIPLEX DETECTION OF RENAL STRUCTURES BY PRIMARY ANTIBODIES FROM THE SAME SPECIES

ABSTRACT

In the context of the characterization of cortical structures of the kidney such as glomeruli and proximal convoluted tubules, antibodies (Ab) were used against podocin, Wilms tumor protein 1 (WT1) and megalin, respectively. Podocin plays a role in the regulation of glomerular permeability and is a marker of podocytes. WT1, through its binding function to specific deoxyribonucleic acid (DNA) sequences, is an important transcription factor in the development of the urogenital system and is therefore a marker of podocyte precursors. Megalin mediates tubular absorption and clearance of leptin and is a marker of proximal convoluted tubules. The three specific antibodies and conditions used for the detection of those three proteins of interest are:

- 1) for WT1, a rabbit monoclonal Ab (ab267377, Abcam diluted at 1/500) whose corresponding epitope is unmasked by incubation in Tris-EDTA buffer pH 8.0 at 95 °C for 40 minutes,
- 2) for podocin, a rabbit polyclonal Ab (ab50339, Abcam diluted at 1/6000) unmasked by incubation in 10 mM buffer of sodium citrate pH 6.0 at 91 °C for 24 minutes,
- 3) and finally, for megalin, a rabbit monoclonal Ab (ab76969, Abcam diluted at 1/1000) recognizing an epitope unmasked by incubation in 10 mM buffer of sodium citrate pH 6.0 at 91 °C for 24 minutes.

Despite recent advances in the combination of primary antibodies of the same species and the use of heat stripping steps between each labeling cycle, we have wondered about the combination of these different unmasking steps in the case of multiplexing. This article demonstrates the feasibility of combining different heat antigen unmasking protocols in the context of the use of primary antibodies of the same species.

KEY WORDS

Glomerulus, Immunofluorescence, Kidney, Megalin, Multiplexing, Podocin, Proximal Convoluted Tubules, Wilms Tumor Protein 1.

RÉSUMÉ

Dans le cadre de la caractérisation de structures corticales du rein que sont les glomérules et les tubes contournés proximaux (TCP), nous avons utilisé des anticorps (Ac) dirigés contre la podocine, la protéine 1 de la tumeur de Wilms (WT1) et la mégaline. La podocine joue un rôle dans la régulation de la perméabilité glomérulaire et est un marqueur des podocytes. WT1 par sa fonction de liaison à des séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) spécifiques est un facteur de transcription important dans le développement du système uro-génital et est de ce fait un marqueur des précurseurs podocytaires. La mégaline médie l'absorption tubulaire et la clairance de la leptine et est un marqueur des TCP.

Les trois anticorps spécifiques et conditions utilisés pour la détection de ces trois protéines d'intérêt sont :

- 1) pour WT1, un Ac monoclonal de lapin (ab267377, Abcam dilué à 1/500) dont l'épitope correspondant est démasqué par une incubation dans un tampon Tris-EDTA pH 8 à 95 °C pendant 40 minutes,
- 2) pour la podocine, un Ac polyclonal de lapin (ab50339, Abcam dilué à 1/6000) démasqué par une incubation dans un tampon 10 mM de citrate de sodium pH 6 à 91 °C pendant 24 minutes,
- 3) et enfin pour la mégaline, un Ac monoclonal de lapin (ab76969, Abcam dilué à 1/1000) reconnaissant un épitope démasqué par une incubation dans un tampon 10 mM de citrate de sodium pH 6 à 91 °C pendant 24 minutes.

Malgré les avancées récentes dans la combinaison d'Ac primaires de même espèce et le fait d'utiliser des étapes de décapage à la chaleur entre chaque cycle de marquage, nous nous sommes posés la question de la combinaison de ces différents démasquages dans le cas de multiplexing. Cet article démontre la faisabilité de la combinaison de différents protocoles de démasquages antigéniques à la chaleur dans le cadre de l'utilisation d'anticorps primaires de même espèce.

MOTS CLÉS

Glomérule, Immunofluorescence, Mégaline, Multiplexage, Podocine, Protéine 1 de la tumeur de Wilms, Rein, Tubes Contournés Proximaux (TCP).

INTRODUCTION

Nous nous sommes intéressés au rein dans le cadre d'un projet sur la diminution liée à l'âge de l'expression d'une protéine d'intérêt. Dans le but de caractériser la structure de ce tissu, nous avons donc décidé d'utiliser la technique de multiplexage en immunofluorescence (IF) pour mettre en lumière l'architecture du tissu et notamment certaines structures d'intérêt comme les glomérules et les tubules contournés proximaux (TCP).

Le rein est un organe de l'appareil urinaire des vertébrés [2]. Il a de multiples fonctions: hormonales, de régulation de la pression sanguine et d'élimination des toxines. Il assure ainsi, par filtration et excrétion d'urine, l'équilibre hydroélectrolytique (homéostasie) du sang et de l'organisme en général. Ses fonctions hormonales comprennent la synthèse de l'érythropoïétine, du calcitriol (forme active de la vitamine D) et de la rénine. Il existe une relation très importante entre la morphologie et la fonction rénale. Un rein normal de forme caractéristique en haricot, montre des structures bien distinctes comme le cortex, la médulla ou le hile mais aussi microscopiques comme le néphron composé de son glomérule et son système de tubes épithéliaux que sont les tubes contournés distaux (TCD) et proximaux (TCP), ainsi que le tissu conjonctif rénal composé de fibroblastes, de cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les lymphocytes et les macrophages, sans oublier le système vasculaire (Figure 1) [2][3]. L'intégrité et la densité des glomérules et des tubes, sont directement corrélées avec la fonction rénale dont le taux de filtration glomérulaire est un marqueur important [4].

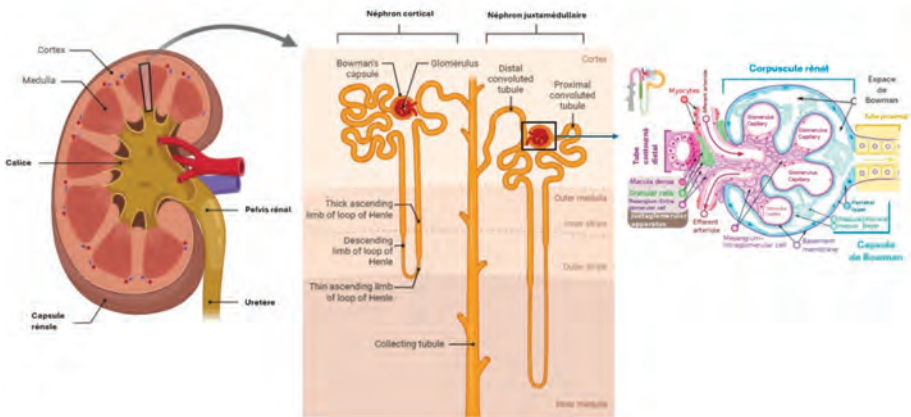


Figure 1 : Schéma illustrant l'organisation du rein, depuis l'échelle du tissu rénal jusqu'à celle du glomérule. Le rein est composé d'unités fonctionnelles de filtration appelées néphrons (d'après [2]).

Dans le cadre de l'étude des lésions apportées aux reins et à leur fonction après perfusion du rein, nous avons développé une technique d'immunofluorescence (IF) pour la détection de trois marqueurs protéiques de cellules présentes dans les structures corticales que sont les glomérules et les TCP. Tout d'abord, la podocine, protéine encodée par le gène *NPHS2*, joue un rôle important dans le système rénal. Cette protéine membranaire largement exprimée dans les podocytes du glomérule joue un rôle essentiel pour le maintien de la barrière de filtration du rein, empêchant les protéines de se déverser dans l'urine primitive. La podocine interagit étroitement avec d'autres protéines comme la néphrine. Cette interaction est nécessaire à la formation et à la stabilisation du système qui filtre le plasma sanguin dans le glomérule. Son emplacement et sa fonction assurent la perméabilité sélective de la barrière de filtration [5].

Ensuite, la mégaline est un récepteur endocytaire à ligands multiples qui agit avec la cubiline (CUBN) pour médier l'endocytose des lipoprotéines de haute densité. Dans le rein, la mégaline assure l'absorption tubulaire et l'élimination de la leptine. La leptine est également transportée à travers la barrière hémato-encéphalique du système nerveux central par endocytose au niveau de l'épithélium du plexus choroïde qui exprime également la mégaline. Dans le rein, la mégaline intervient dans l'endocytose et la dégradation lysosomale ultérieure de la cystatine C (CST3) au niveau des cellules des tubules proximaux du rein régularisant l'absorption rénale de nombreuses autres protéines et complexes [6].

Finalement, la protéine tumorale de Wilms, communément appelée WT1, est un facteur de transcription critique impliqué dans plusieurs processus cellulaires. Il est largement exprimé dans différents tissus. La protéine WT1 régule l'expression des gènes en se liant à des séquences d'ADN spécifiques, influençant la croissance et la différenciation cellulaires. WT1 joue un rôle essentiel dans le développement du système urogénital et dans le maintien des cellules mésothéliales. La protéine WT1 est essentielle au développement normal des reins et des gonades, soulignant son importance dans l'embryogenèse [5].

L'IF est une méthode classiquement utilisée en histologie pour la détection des protéines dans des tissus [7]. Elle est aussi bien utilisée sur tissus congelés que sur des tissus fixés et inclus en paraffine. L'utilisation de l'IF sur des tissus en paraffine nécessite généralement d'ajouter une étape de démasquage antigénique dans le protocole d'IF [8]. Dans le cadre de multiplexage des Ac, il est beaucoup plus facile de combiner des Ac primaires d'espèces différentes fonctionnant après un démasquage antigénique unique, permettant ainsi en un seul cycle de marquage d'incuber tous les Ac primaires ensemble, puis tous les Ac secondaires ensemble. La combinaison d'Ac primaires de même espèce détectant des antigènes révélés après des démasquages différents accroît la difficulté et demande notamment

beaucoup plus d'étapes de validation, comme la place des différents Ac primaires au fil du protocole, leur résistance aux différents cycles de démasquage-dénaturation, le choix des Ac secondaires. Dans ce cas, il est alors nécessaire de faire appel à des protocoles de dénaturation des complexes Ac primaire-secondaire entre chaque cycle d'incubation des Ac, afin d'éviter des réactions entre Ac primaires et secondaires indésirables. Dans cet article, nous présenterons la méthodologie utilisée pour le développement d'une technique de multiplexage par la combinaison d'Ac primaires de même espèce et de protocoles de démasquages antigéniques différents. L'intérêt de cette technique réside dans le choix des Ac qui n'est donc plus limité à des Ac d'espèces différentes ou nécessitant des étapes de démasquage antigénique similaire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

a. Animaux

Une souris femelle (C57Bl6, The Jackson Laboratory), a été maintenue dans une animalerie approuvée par l'AAALAC (Association pour l'évaluation et l'accréditation des soins aux animaux de laboratoire) selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures (h). Elle a été acclimatée aux conditions de l'animalerie pendant un minimum de 7 jours avant la manipulation expérimentale. Toutes les expériences ont été conformes au Guide des *National Institutes of Health* pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le Comité institutionnel de soins et d'utilisation des animaux de la société NOVARTIS (Bâle). Des contrôles ont été effectués quotidiennement afin de garantir la bonne santé de l'animal qui a été sacrifié à l'âge de 8 semaines.

b. Prélèvement et préparation des tissus

Les deux reins ont été prélevés sur une souris profondément anesthésiée par une dose d'isoflurane létale de 3 à 5 %, puis perfusée par voie transcardiaque avec une solution 0,1 M phosphate tamponnée à pH 7,4 et réfrigérée (PBS, 10010-031, Gibco, Suisse) jusqu'à ce que les extrémités des pattes deviennent blanches, puis pendant 4 min par une solution de paraformaldéhyde à 4 % préparée par dilution 1/4 d'une solution stock à 16 % (15710-S, Electron Microscopy Sciences, Etats Unis d'Amérique). Les reins ont ensuite été isolés et post-fixés par immersion dans une solution tamponnée de formaline à 10 % (HT501320, Sigma-Aldrich, Suisse) pendant 16 h à température ambiante (TA). La post-fixation a été standardisée afin de ne pas induire de problème de destruction des épitopes protéiques.

Après déshydratation dans des bains d'éthanol (82343-156, Brenntag, Suisse) de pourcentage croissant suivis par des bains de xylène (82510-156, Brenntag, Suisse), les tissus ont été imprégnés puis inclus en paraffine (39602004, Leica Biosystems, Suisse). Les blocs ont été stockés à TA jusqu'à utilisation. Les coupes de reins de 5 μm d'épaisseur ont été recueillies sur des lames Histobond M+ (Marienfeld GmbH & Co. KG, Allemagne). Les lames ont été séchées complètement à 37 °C puis à TA pendant un minimum de trois jours avant d'être utilisées pour les immunomarquages la semaine suivant la coupe, garantissant la bonne conservation des antigènes.

c. Anticorps utilisés et protocole final du triplex

Le **Tableau I** donne les caractéristiques des Ac primaires et secondaires utilisés dans les expériences menées. Les anticorps ont d'abord été testés en simple marquage afin de déterminer la meilleure condition de détection des protéines d'intérêt, notamment de démasquage antigénique et de concentration de l'anticorps. Les conditions de démasquage antigénique testées classiquement en immunohistochimie et utilisées ici sont le tampon Tris EDTA pH 8 (tampon CC1, Réf.950-223, Roche) utilisé à 95 °C pendant 40 min; le tampon 10 mM de citrate de sodium à pH 6 (tampon CC2, Réf. 950-224, Roche) utilisé à 91 °C pendant 24 min; une solution commerciale de protéase (Protéase 1, Réf. 760-2018, Roche) appliquée pendant 4 min à 37 °C ou une solution de pepsine (Prétraitement 3, Réf. 760-2020, Roche) appliquée à 37 °C pendant 16 min. Les Ac primaires, tous développés chez le lapin, ont été révélés par l'OmniMAP (Réf. 760-4311, Roche) anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) révélée ensuite par le ChromoMAP-DAB (Réf. 760-159, Roche). Une étape de contre-coloration des noyaux à l'Hématoxyline II (Réf. 790-2208, Roche) suivie d'une étape de bleuissement à l'aide du Bluing Reagent (Réf. 760-2037, Roche) permet d'identifier les structures tissulaires.

Dans un second temps, la séquence des deux protocoles de démasquage antigénique à la chaleur dans deux tampons de composition et de pH différents est testée sur le simple marquage de chaque protéine-cible. Les marquages ont été réalisés selon le protocole précédent excepté qu'un double démasquage en tampon CC2 puis CC1, ou en tampon CC1 puis CC2, a été initialement effectué afin de vérifier la résistance de chaque marquage dans ces conditions. La révélation est dans ce cas encore chromogénique suivie d'une contre-coloration à l'Hématoxyline II.

Anticorps Primaire	Espèce	Référence	Fournisseur	Concentration Initiale	Dilution	Anticorps Secondaire	Amplification et Fluorochrome	Référence	Fournisseur
Monoclonal IgG anti-WT1	lapin	Cat. N° ab267377	Abcam	0,383 mg/mL	1/500	OmniMAP anti-IgG de lapin	Tyramide-Rhodamine	760-233	Roche
Polyclonal IgG anti-Podocine	lapin	Cat. N° ab50339	Abcam	1,3 mg/mL	1/6000	OmniMAP anti-IgG de lapin	Tyramide-FITC	760-232	Roche
Monoclonal IgG anti-Mégaline	lapin	Cat. N° ab76969	Abcam	0,9 mg/mL	1/1000	OmniMAP anti-IgG de lapin	Tyramide-Cy5	760-238	Roche
Polyclonal IgG contrôle	lapin	Cat. N° bs-0295P	Bioss	1 mg/mL	1/1000	OmniMAP anti-IgG de lapin	ChromoMAP DAB	760-159	Roche

Tableau I : Caractéristiques et références des anticorps primaires et secondaires utilisés dans les protocoles d'IF.

Enfin les Ac ont été combinés et les conditions testées afin de valider l'absence de cross-réactivité des anticorps avant et après dénaturation à la chaleur sont référencées dans le **Tableau II**. Globalement les protocoles d'IF en simple marquage ou en marquages multiples séquentiels ont été menés dans l'automate d'immunohistochimie Ultra Discovery™ (Roche).

Combinaison finale			
Cycle Ac1 : Tampon CC1 95 °C, 40 min - IHC1			
Suivi du Cycle Ac2 : Tampon CC2 100 °C, 8 min - IHC2			
Suivi du Cycle Ac3 : Tampon CC2 100 °C, 8 min - IHC3			
Condition 1	Ac1 - WT1 Tyramide - Rhodamine	Ac1 - WT1 Tyramide - FITC	Ac1 - WT1 Tyramide - Cy5
Condition 2	X	Podocine	Mégaline
Condition 3	WT1	X	Mégaline
Condition 4	WT1	Podocine	X
Condition 5	WT1	X	X
Condition 6	X	X	X

Tableau II : Tableau des conditions testées afin de valider l'absence de cross-réactivité des anticorps avant et après décapage à la chaleur.

Les anticorps (**Tableau I**) sont préparés par dilution dans le tampon de dilution Dako *Ab diluent* (Réf. S080983, Agilent). Les lames sont déparaffinées et réhydratées dans l'automate puis le premier démasquage en tampon EDTA pH 8 est réalisé à l'aide du tampon Ultra-CC1 (Réf. 950-223, Roche) à 95 °C pendant 40 min. Le premier Ac anti-WT1 est incubé pendant 1 h puis révélé par l'OmniMAP (Réf. 760-4311, Roche) pendant 16 min. Après révélation de la réaction par un kit Discovery Rhodamine (Réf. 760-233, Roche) pendant 8 min, les lames sont soumises à une étape de dénaturation à la chaleur à 100 °C pendant 8 min, qui sert également de démasquage antigénique en tampon pH 6 Ultra CC2 (Réf. 950-224, Roche). Cette étape est suivie par une étape d'inhibition des peroxydases à l'aide du réactif Discovery Inhibitor (Réf. 760-4840, Roche) pendant 8 min. Les lames sont ensuite incubées dans le second Ac primaire anti-podocine pendant 1 h, puis dans le système de révélation OmniMAP dont le substrat est le kit Discovery FITC (Réf. 760-232, Roche). Encore une fois, les lames sont soumises à une étape de dénaturation à la chaleur dans le tampon pH 6 Ultra CC2 suivie d'une étape d'inhibition des peroxydases à l'aide du réactif Discovery Inhibitor. Les lames sont alors incubées dans le dernier Ac anti-mégaline pendant 1 h. L'Ac secondaire OmniMAP (Réf. 760-4311, Roche) est alors utilisé pour la révélation et la réaction est amplifiée par l'utilisation de la Tyramide-Cy5 (Réf. 760-238, Roche). Les kits couplés aux fluorophores sont basés sur la réaction de la Tyramide avec l'HRP et ont été sélectionnés pour leur capacité à générer la plus faible autofluorescence sur tissus fixés et inclus en paraffine. Le choix du fluorophore a été fait pour la mégaline, étant donné que cette cible apparaît sur des cellules tapissées de microvillosités dans la lumière des TCP, ce qui aurait pu engendrer un bruit de fond plus important par la densité de ces structures. Nous avons donc choisi de les marquer avec la TSA-Cy5, les longueurs d'onde du rouge lointain étant plus compatibles spectralement avec un faible bruit de fond sur des coupes FFPE (*Formalin-fixed, paraffin-embedded*) et des structures denses. Les deux autres fluorophores ont été attribués aux deux autres cibles par défaut. Après rinçage, les lames sont finalement contre-colorées dans l'Hématoxyline II pendant 4 min puis dans le *bluing reagent* pendant 4 min. Après une étape de rinçage à l'eau chaude et au savon liquide, les lames sont finalement incubées dans 0,1 µg / mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Réf. 323108, Roche) pendant 10 min à TA.

Après lavage dans de l'eau distillée (dH₂O), les lames sont montées au Mowiol® 4-88 (Réf. 47-590-4100GM, Calbiochem-Fischer scientifique) et stockées à TA pendant au moins 1 h, puis à 4 °C pour un stockage prolongé.

d. Microscopie

Les images en fond clair ont été acquises à l'aide d'un scanner de lames Aperio™ (Aperio™ HT 2.0, Leica Biosystems) pour une imagerie avec un objectif 20X d'ouverture numérique de 0,4. Les paramètres d'image correspondent à une taille de pixel de 0,25 µm/pixel et sont enregistrées sous format jpeg tuilées dont les tuiles ont une taille de 240 pixels par 240 pixels. Les images ont été obtenues à partir d'une seule coupe de tissu. Pour chaque coupe de tissu, un champ de vision a été capturé dans une zone corticale, région choisie pour son contenu des types cellulaires d'intérêt.

Les images en fluorescence ont été acquises à l'aide d'un scanner de lames Nanozoomer™ S60 (Hamamatsu) pour une imagerie avec un objectif 20X d'ouverture numérique de 0,4. Les images ont été obtenues à partir d'une seule coupe de la zone corticale du rein. Les paramètres d'image ont été acquis avec 23296 × 16128 pixels en XY en utilisant une taille de pixel de 0,44 µm/pixel. Les filtres utilisés étaient de longueur d'ondes d'excitation de 370 nm, 488 nm, 561 nm et 638 nm, associés à des filtres d'émission de 430/50, 525/50, 600/50 et 685/70 nm, respectivement. Les temps d'acquisition de chaque canal ont été choisis afin d'éviter la génération d'un bruit de fond lié au tissu. Les temps d'acquisition ont été standardisés pour chaque canal entre chaque protocole d'IF afin de pouvoir comparer l'efficacité de chaque condition. Aucune analyse d'images n'a été réalisée étant donné que la portée de cet article est focalisée sur le développement de cette méthode et non sur la quantification des signaux. Les images ont été ouvertes et manipulées avec le logiciel QuPath [9] afin de créer les planches.

RÉSULTATS

a. Détermination des conditions optimales de marquage pour chaque Ac testé

La première étape pour garantir le succès de notre approche a d'abord été de vérifier l'efficacité des Ac en comparant les résultats de la détection des protéines d'intérêt dans des conditions de démasquage antigénique classiquement utilisées en immunohistochimie. La **Figure 2A** illustre les marquages obtenus dans les différentes conditions de démasquage antigénique pour chacun des trois Ac. Les encadrements de couleur montrent la qualité des marquages obtenus, les encadrements en vert correspondant aux meilleurs signaux obtenus, les encadrements en orange aux signaux de qualité moyenne et les encadrements en rouge aux signaux de moindre qualité. Les images non-encadrées ne montrent aucun marquage.

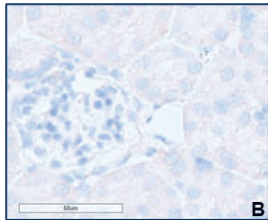
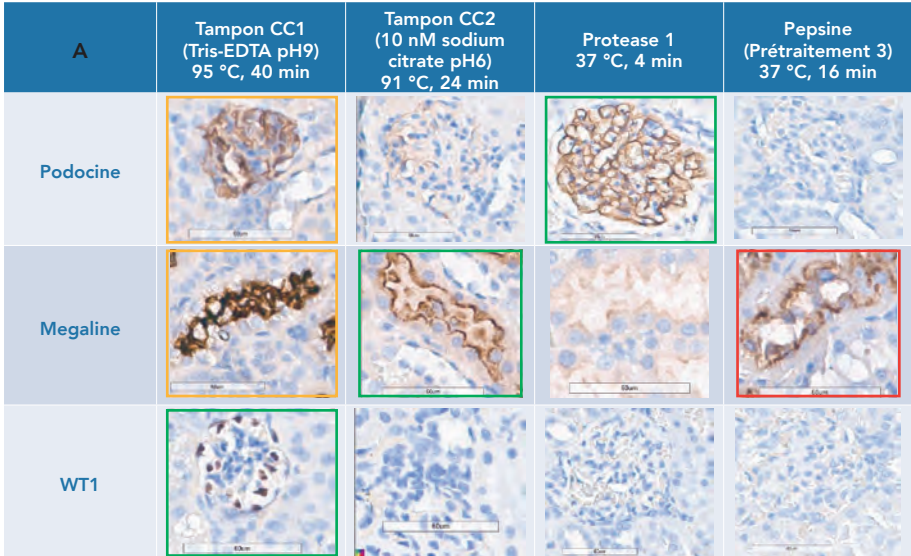


Figure 2: Test des différentes conditions de démasquage antigénique pour la détection de chaque protéine-cible. L'IHC a été réalisée sur des lames de rein. **A)** Ligne du haut: détection de la podocine; Ligne du milieu: détection de la mégaline; Ligne du bas: détection de WT1. Les encadrements verts correspondent aux meilleurs signaux obtenus, les encadrements oranges aux signaux de qualité moyenne et les encadrements rouges aux signaux de moindre qualité. Les images non-encadrées ne montrent aucun marquage. **B)** Image obtenue avec l'Ac isotypique contrôle utilisé dans la condition de démasquage antigénique au tampon CC2 à 91 °C pendant 24 min. Les barres d'échelle représentent 60 µm.

Nous pouvons donc dire que la podocine est bien révélée après un démasquage enzymatique à la protéase ou par la chaleur dans un tampon Tris-EDTA pH 9 (CC1). La mégaline est démasquée par les deux systèmes basés sur la chaleur quel que soit le tampon (CC1 ou CC2). Par contre, les deux démasquages enzymatiques soit dégradent la protéine (Protéase 1) soit le tissu (Prétraitement 3). Quant à la protéine WT1, elle n'est détectée que dans la condition de démasquage à la chaleur en tampon CC1. Les marquages obtenus sont validés par comparaison avec un Ac isotypique contrôle qui ne démontre aucun marquage dans les différentes conditions testées. La **Figure 2B** illustre un exemple de l'absence de réactivité en présence de l'Ac isotypique contrôle dans les conditions de prétraitement dans le tampon CC2. De plus, les marquages obtenus sont conformes aux marquages illustrés par les fournisseurs dans les fiches techniques correspondantes et ne sont pas visibles sur les structures rénales non-ciblées, confirmant ainsi leur spécificité.

b. Combinaison des démasquages antigéniques

Etant donné les résultats obtenus en simple marquage, il est donc nécessaire de combiner les démasquages antigéniques à la chaleur en tampons de pH différents testés précédemment. La deuxième étape consiste donc à vérifier le maintien du marquage des trois protéines après plusieurs étapes d'inhibition et de dénaturation. Pour cela, les deux démasquages antigéniques sont réalisés consécutivement. Puis chaque Ac est incubé et révélé par le système d'amplification anti-lapin-HRP suivi de l'incubation au DAB, puis d'une contre-coloration à l'Hématoxyline. La **Figure 3** montre les résultats obtenus après les deux séquences de démasquage antigénique appliquées consécutivement. Les deux combinaisons de démasquages antigéniques ont donné des résultats satisfaisants avec cependant un avantage sur la combinaison du tampon CC1 en première position suivi par le tampon CC2, qui donne une meilleure conservation du tissu, notamment pour le marquage podocine. Notre choix se portera donc sur la séquence de démasquage en tampon CC1 incubé à 95 °C pendant 40 min suivi du démasquage en tampon CC2 incubé à 100 °C pendant 8 min pour la détection de WT1, mégaline ou podocine, ce qui garantira le succès de notre approche.

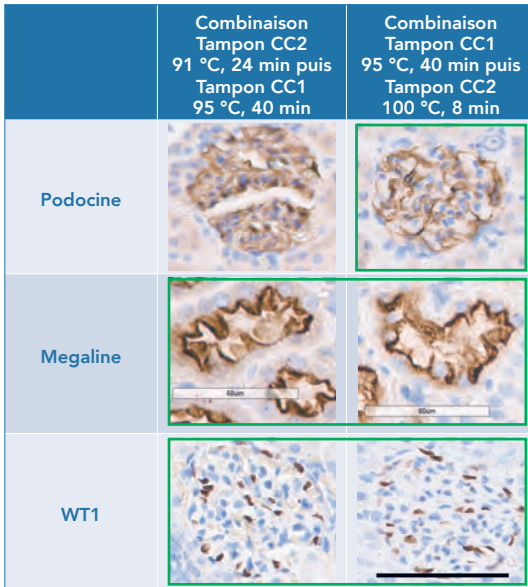


Figure 3: Combinaison de démasquage antigénique. La séquence des deux protocoles de démasquage antigénique à la chaleur dans deux tampons de composition et pH différents est testée sur le simple marquage de chaque protéine-cible. Le marquage apparaît en brun après révélation à la DAB. L'encadrement en vert représente les meilleurs marquages obtenus pour chaque protéine-cible. La barre d'échelle représente 60 µm.

c. Validation de la combinaison des trois Ac de même espèce

Dans ce contexte d'utilisation de différents systèmes de démasquage antigénique et dans le but de combiner plusieurs Ac de même espèce, nous avons utilisé le même tampon CC2 dans des étapes de dénaturation à la chaleur entre chaque cycle de marquage. Nous avons donc vérifié la compatibilité des multiples dénaturations en tampon CC2 utilisé à 100 °C pendant 8 min avec la détection des protéines ciblées.

Des étapes de neutralisation des HRP à l'eau oxygénée (H₂O₂) sont aussi incluses entre chaque cycle d'incubation des anticorps de même espèce. La **Figure 4** démontre l'absence de cross-réaction des anticorps avant et après dénaturation à la chaleur. Chaque condition testée est basée sur la même séquence de démasquage antigénique, de dénaturation et d'inhibition des peroxydases comme décrit dans le paragraphe c de la section Matériels et méthodes. En absence d'Ac primaire, aucun marquage n'apparaît dans le canal correspondant ni dans les autres canaux, confirmant l'absence de cross-réactivité des Ac secondaires avec d'autres Ac primaires. La présence des signaux spécifiques après incubation des trois Ac valide notre approche. La podocine apparaît en vert, la mégaline apparaît en rouge et le marqueur WT1 apparaît en magenta. Les signaux sont présents sur les structures attendues.

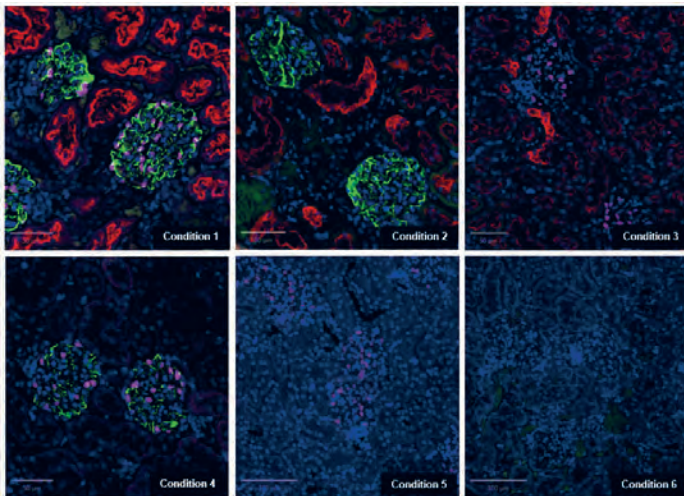


Figure 4 : Démonstration de l'absence de cross-réaction des anticorps avant et après stripping à la chaleur. Nous avons donc vérifié la compatibilité des conditions de dénaturation (tampon CC2 utilisé à 100 °C pendant 8 min) avec la détection des protéines ciblées. Des étapes de neutralisation des HRP à l'H₂O₂ sont aussi incluses entre chaque cycle d'incubation des anticorps de même espèce. Nous vérifions l'absence de cross-réaction entre les Ac. La podocine apparaît en vert, la mégaline apparaît en rouge et le marqueur WT1 apparaît en magenta. Les barres d'échelle (conditions 1 à 4) représentent 50 µm et les barres d'échelle (conditions 5 et 6) représentent 100 µm.

CONCLUSION

Les avancées récentes dans l'utilisation d'étapes de dénaturation à la chaleur entre chaque cycle de marquage a permis la combinaison d'Ac primaires de même espèce. Ce travail démontre la faisabilité de la combinaison de différents protocoles de démasquages antigéniques à la chaleur dans des tampons différents incluant le tampon 10 mM citrate pH6 utilisé dans les étapes de dénaturation entre chaque séquence de marquage par des anticorps de même espèce, et associé à des étapes de neutralisation des HRP entre chaque cycle. Le triple marquage podocine-mégaline-WT1 sur le tissu rénal a été réalisé avec succès. Nous avons donc pu mettre en évidence l'architecture du tissu rénal par un protocole qui sera utilisé dans un modèle pathologique, et qui sera associé à la détection d'une protéine d'intérêt pour nos recherches. Plus globalement ce travail permet de lever les barrières posées par le multiplexage réalisé avec des Ac d'espèces différentes utilisés dans des conditions de démasquage antigénique unique. Cela ouvre également la possibilité d'utilisation d'Ac recombinants basés sur des séquences de même espèce, par exemple, ainsi que d'augmenter de ce fait le nombre de cibles pouvant être détectées sur un même échantillon tissulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ROBINSON P.G., *et al.* A large drawing of a nephron for teaching medical students renal physiology, histology, and pharmacology. *Adv Physiol Educ*, 2018, **42**(2), 192-199.
- [2] MURRAY I.V., PAOLINI M.A. Histology, Kidney and Glomerulus. In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publication Janvier 2025. Disponible sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554544/>
- [3] KAISLING B., HEGYI I., LOFFING J., LE HIR M. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)*. 1996, **193**(4), 303-18.
- [4] GERACI S., *et al.* Combining new tools to assess renal function and morphology: a holistic approach to study the effects of aging and a congenital nephron deficit. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, **313**(3), F576-F584.
- [5] FUNK J., *et al.* Semiautomated quantitative image analysis of glomerular immunohistochemistry markers desmin, vimentin, podocin, synaptopodin and WT-1 in acute and chronic rat kidney disease models. *Histochem Cell Biol*, 2016, **145**(3), 315-26.

[6] LENHARD, S, et al. *In vivo* imaging of small molecular weight peptides for targeted renal drug delivery: a study in normal and polycystic kidney diseased mice. *J Pharmacol Experim Therap*, 2019, **370**, 786-795.

[7] GENTON C.Y. L'immunohistochimie: son principe, ses applications et ses limites. *Clin Mother Child Health*, 2006, **3** (1), 477-481.

[8] WERNER M., CHOTT A., FABIANO A., BATTIFORA H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 2000, **24**, 1016-19.

[9] BANKHEAD, P, et al. QuPath: Open-source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 2017, **7** (1), 16878-84. (<https://qupath.github.io>)

Cette publication, issue du poster présenté lors du dernier congrès de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), organisé à Grasse en 2025, reprend les données présentées en apportant des précisions techniques.

Déclaration relative à l'utilisation de l'IA générative et des technologies assistées par l'IA dans la rédaction scientifique

Les auteurs déclarent avoir utilisé l'outil d'intelligence artificielle CoPilot afin d'améliorer la lisibilité, la structure et la clarté de cette publication rédigée au préalable par leurs soins. Cet outil a été utilisé pour affiner le langage, reformuler et réorganiser certains passages tout en préservant strictement le contenu scientifique. Après avoir utilisé cet outil, les auteurs ont soigneusement relu l'intégralité du manuscrit, approuvé son contenu et assument l'entière responsabilité de la version soumise.

DISSECTION MOLÉCULAIRE DE LA NICHE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES CHEZ L'EMBRYON

CANTO Pierre-Yves^{1,2,3}, CHARBORD Pierre^{1,2}, JAFFREDO Thierry^{1,2}, DURAND Charles^{1,2*}

¹Sorbonne Université, CNRS, Inserm, Development, Adaptation and Ageing, Dev2A, 75005 – Paris - France

²Sorbonne Université, CNRS, Inserm, Institut de Biologie Paris-Seine, IBPS, 75005 – Paris - France

³Sorbonne Université, CNRS, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris - France

Auteur correspondant: charles.durand@sorbonne-universite.fr

OPEN ACCESS 

Received: March 3, 2026

Revised: April 22, 2026

Accepted: April 22, 2026

Published: June, 2026

 CC BY-NC 4.0

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.77

MOLECULAR DISSECTION OF THE EMBRYONIC HEMATOPOIETIC STEM CELL NICHE

ABSTRACT

Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) are responsible for regenerating the blood system throughout life, and their deregulation leads to blood cancers. In the vertebrate embryo, HSPCs are produced in the AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros) region, specifically in the dorsal aorta. To further characterize the aortic microenvironment *in vivo*, we combined laser microdissection with transcriptomics and computational approaches. Laser microdissection allowed us to isolate, from mouse embryonic sections at different developmental stages, cells located beneath the dorsal aorta, and in between the notochord and the roof of the aorta. This process required adjustments during the microdissection itself, as well as upstream and downstream, to collect high quality biological samples for molecular analyses. The combination of bulk (microarrays for microdissected tissues) and single cell (for the entire AGM) transcriptomics revealed the heterogeneity of the aortic mesenchyme and the existence of a mesenchymal cell population, located beneath the dorsal aorta that co-expresses adhesive and neuronal genes. Functional experiments showed that Decorin, a component of the extracellular matrix, is necessary for HSPC development. These findings provide new insights into the HSPC niche in the developing embryo.

KEY WORDS

Embryo, Hematopoietic stem cells, Laser microdissection, Niche, Stroma, Transcriptomics.

RÉSUMÉ

Les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) sont responsables du renouvellement continu des différentes lignées de cellules sanguines et leur dérèglement est à l'origine de cancers du système sanguin. Chez l'embryon de vertébré, les CSPH émergent dans la région AGM (Aorte Gonades Mésonéphros), plus précisément au niveau de l'aorte dorsale. Afin de mieux caractériser la signature moléculaire du microenvironnement aortique *in vivo*, nous avons combiné des approches de microdissection laser, de transcriptomique et de biologie computationnelle. La microdissection laser nous a permis d'isoler sur coupes d'embryons de souris à plusieurs stades du développement des cellules situées sous l'aorte dorsale et entre la notochorde et le plafond de l'aorte. Elle a nécessité des ajustements à l'étape de microdissection proprement dite mais aussi en amont et en aval afin de collecter des échantillons biologiques de qualité pour des analyses moléculaires. La combinaison d'approches transcriptomiques à l'échelle populationnelle (puces à ADN pour les tissus microdisséqués) et à l'échelle cellule unique (pour l'AGM entière) a révélé l'hétérogénéité du mésenchyme aortique et l'existence d'une population de cellules mésenchymateuses sous-aortiques exprimant à la fois des gènes mésenchymateux et neuraux. Des expériences fonctionnelles ont indiqué que la molécule Décorine, un composant de la matrice extracellulaire, est nécessaire au développement des CSPH. Ces résultats apportent un éclairage original sur la niche des CSPH chez l'embryon.

MOTS CLÉS

Cellules souches hématopoïétiques, Embryon, Microdissection laser, Niche, Stroma, Transcriptomique.

INTRODUCTION

La biologie des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à la base du système sanguin et assurent son renouvellement tout au long de la vie. Elles jouent un rôle primordial dans les protocoles de transplantation cellulaire visant à traiter des patients atteints d'hémopathies malignes et de troubles hématologiques (leucémies, lymphomes, déficits immunitaires et aplasie médullaire notamment). Leurs propriétés de survie, de prolifération et de différenciation sont intimement contrôlées par les cellules de leur microenvironnement, encore appelé niche. Chez l'adulte, les CSH sont localisées dans la moelle osseuse à proximité des artérioles et sinusoides et en étroite association avec des cellules stromales mésenchymateuses qui produisent des facteurs extrinsèques clés pour la régulation des CSH tels que la cytokine Scf (*Stem cell factor*) et la chémokine Cxcl12 [1-3]. D'autres types cellulaires participent au microenvironnement médullaire, notamment des ostéoblastes, des cellules hématopoïétiques (macrophages, mégacaryocytes, lymphocytes T régulateurs) et des dérivés du système nerveux sympathique [4, 5]. Les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) émergent chez l'embryon de vertébré dans la région AGM (Aorte-Gonades-Mésonephros), plus précisément au niveau de l'aorte dorsale. Il est important de noter que ce processus opère durant une courte période développementale, entre les jours 10,5 et 12,5 de gestation chez la souris [6, 7]. Sa manifestation morphologique réside dans la production de groupes ("*clusters*") de cellules hématopoïétiques attachés à l'endothélium aortique [8, 9]. Il est maintenant bien établi que les CSPH se différencient à partir de cellules endothéliales aortiques dites hémogéniques lors d'une transition cellule endothéliale-cellule hématopoïétique [10-15]. Chez l'embryon de poisson-zèbre, d'oiseau et humain, les bourgeonnements de cellules hématopoïétiques sont exclusivement localisés dans la région ventrale de l'aorte. La souris fait mesure d'exception puisque des "*clusters*" de cellules hématopoïétiques sont détectés non seulement dans la partie ventrale de l'aorte mais également sur les parois latérales et dorsale. Néanmoins, des expériences fonctionnelles ont démontré que l'activité des CSH, évaluée par leurs capacités de reconstitution à long terme du système sanguin et de multipotence, est préférentiellement localisée dans la région ventrale de l'aorte [16, 17]. Enfin, des approches d'ablation chez l'embryon de poulet ont démontré que l'installation du mésenchyme sous l'aorte dorsale est requise pour la formation des clusters de cellules hématopoïétiques dans l'aorte dorsale [18]. L'ensemble de ces données suggèrent que le développement des CSPH au niveau de l'aorte est régionalisé selon l'axe dorso-ventral de l'embryon et que le mésenchyme sous-aortique joue un rôle essentiel dans ce processus.

La niche des CSPH chez l'embryon

L'étude du microenvironnement hématopoïétique de l'AGM fait l'objet d'intenses travaux de recherche. Ils visent à identifier les mécanismes fondamentaux qui président à la formation des premières cellules souches du sang. Ces connaissances sont importantes pour la communauté scientifique afin de produire de façon efficace des CSH transplantables à partir de cellules précurseurs à des fins de thérapie cellulaire chez l'homme. Ainsi que pour la moelle osseuse, plusieurs populations cellulaires ont été identifiées comme des constituants essentiels de la niche aortique. Il s'agit notamment de cellules dérivées du système nerveux sympathique, de cellules de l'immunité innée (telles que les neutrophiles et les macrophages) et de cellules stromales périvasculaires [19-24]. Si le mésenchyme sous-aortique est décrit comme une source majeure de molécules régulatrices clés des CSPH telles que le morphogène *Bone morphogenetic protein 4* (Bmp4), la protéine *BMP-binding endothelial regulator* (Bmper) et la cytokine Scf [25-28, 16] (**Figure 1**), d'autres cytokines actives dans l'AGM ont également été décrites ; c'est le cas des molécules *Pleiotrophin* (Ptn), *Interleukin-3* (Il-3) et *Thrombopoietin* (Tpo) [29-31]. Le système nerveux sympathique participe à la régulation de l'hématopoïèse aortique via la production de catécholamines qui pourraient se lier directement aux récepteurs β 2-adrénergiques exprimés à la surface des CSPH [21, 22] (**Figure 1**).

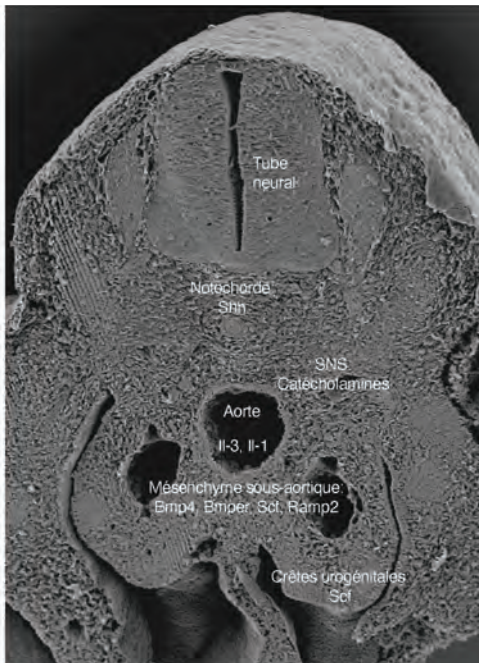


Figure 1 : Le microenvironnement hématopoïétique de l'AGM.

Image de microscopie électronique à balayage d'une coupe transversale d'embryon de souris au jour 11,5 de gestation. Cette figure illustre certains composants cellulaires de la niche hématopoïétique et plusieurs molécules régulatrices des CSPH. SNS : système nerveux sympathique ; Shh : Sonic hedgehog.

De façon intéressante, des expériences réalisées chez le poisson-zèbre et la souris ont révélé le rôle critique de molécules inflammatoires telles que l'*Interferon gamma* (Ifn γ), le *Tumor necrosis factor alpha* (Tnf α) et l'*Interleukin-1* (IL-1) dans la formation des premières CSPH [20, 32, 23, 33, 34]. Ainsi, des embryons de poisson-zèbre déficients pour Tnf α ou son récepteur Tnfr2 présentent une diminution d'environ 50% du nombre de CSPH dans l'aorte dorsale comparativement aux embryons contrôles [20]. Cet effet est médié par des neutrophiles et implique en aval la voie de signalisation Jag1/Notch1 et le facteur de transcription Nf κ b [20]. Ces résultats plaident donc en faveur d'un rôle régulateur du système pro-inflammatoire, en l'absence d'infection, dans le développement des CSPH chez l'embryon.

Plus récemment, des analyses transcriptomiques couplées à de tests fonctionnels ont identifié plusieurs nouveaux régulateurs des CSPH dans l'AGM : l'endothéline [35], le couple ligand-récepteur Adm/Ramp2 et la molécule Svep1 [36].

Stratégie expérimentale et résultats

Afin d'étudier de façon approfondie l'identité moléculaire du mésenchyme sous-aortique chez la souris, nous avons récemment combiné des approches de microdissection laser, de transcriptomique à l'échelle populationnelle et cellule unique et de biologie computationnelle [37]. Plus précisément, nous avons préparé des coupes d'embryons de 20 μ m au stades 10,5, 11,5 et 12,5 de gestation et utilisé l'équipement Arcturus^{XT} Capture Microdissection System pour isoler les cellules situées sous l'aorte dorsale (tissus ventraux, VT) et entre le plafond de l'aorte et la notochorde (tissus dorsaux, DT) (**Figure 2**).

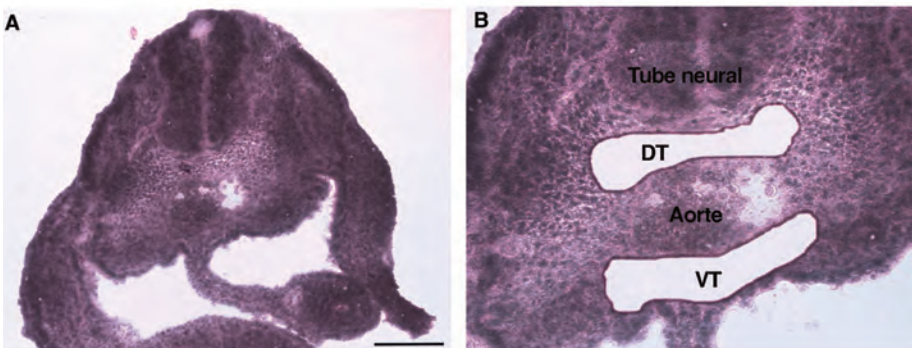


Figure 2 : Approche de microdissection laser sur coupes d'embryon de souris au jour 10,5 de gestation.

A) Coupe avant microdissection laser. B) Coupe après microdissection laser. VT : tissus ventraux, DT : tissus dorsaux. Echelle de dimension : 50 μ m. B est un agrandissement de A.

Ce microscope est équipé de deux lasers, un laser ultraviolet qui permet de disséquer des zones d'intérêt sur coupes et un laser infra-rouge permettant de fixer les microdissections sur des capsules de récolte en fusionnant la membrane de la capsule au tissu sous-jacent. Les embryons non fixés sont incubés dans le milieu d'enrobage cryogénique OCT™ en présence d'isopentane à -65°C. Des coupes ont été réalisées au cryostat, déposées sur lame de verre à membrane PEN (polyéthylène naphthalate), déshydratées puis colorées avec le colorant nucléaire et cytoplasmique LCM Arcturus™ Histogene™ avant l'étape de microdissection laser proprement dite. De façon importante, nous avons collecté à partir d'un même embryon à la fois les tissus dorsaux et ventraux. En fonction des stades de développement, nous avons collecté entre trois et huit tissus microdisséqués, correspondant à une surface de 84 431 à 412 076 μm^2 .

Nous avons ensuite extrait les ARN totaux des tissus microdisséqués à l'aide du kit d'isolement ARNPicoPure™ et testé leur intégrité au bioanalyseur (Agilent). Pour les trois stades du développement, trois à quatre échantillons d'ARN correspondant à DT et VT ont été préparés à partir d'embryons indépendants. Nous avons ensuite utilisé les puces Affymetrix GeneChip® Mousegene 2.0 ST pour explorer le profil d'expression génétique des tissus microdisséqués.

Nous avons dans un premier temps étudié le contraste DT vs. VT aux trois stades du développement par GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) pour identifier des ensembles de gènes statistiquement enrichis dans DT et VT [38] puis extrait les listes de gènes différentiellement exprimés entre DT et VT par ANOVA. L'interrogation des catégories biologiques représentatives de DT et VT à l'aide de l'outil DAVID [39] nous a permis de mettre en évidence des identités moléculaires distinctes pour les tissus dorsaux et ventraux, notamment un fort enrichissement de molécules associées à la matrice extracellulaire dans VT au jour 11,5 de gestation [37].

Dans la mesure où les tissus prélevés peuvent contenir plusieurs types cellulaires (mésenchyme, cellules de crêtes neurales, cellules endothéliales et hématopoïétiques) et afin de concentrer notre étude sur la signature moléculaire du mésenchyme aortique, nous avons incorporé dans la matrice d'expression originale à E11,5 des transcriptomes correspondants soit à des lignées de cellules stromales issues de l'AGM [40, 41] soit à des cellules endothéliales CD144⁺CD45⁻, hématopoïétiques CD34^{+/-}Kit^{+/-}CD45⁺ et des CSPH CD34⁺⁺Kit⁺⁺ isolées par cytométrie en flux à partir de l'AGM à E11,5.

L'analyse du contraste DT vs. VT dans ces deux configurations, nous a permis d'extraire une liste de 2401 gènes différentiellement exprimés entre DT et VT. Cette approche originale, combinée à des analyses en composantes principales (ACP) et de reconstruction de réseaux moléculaires à l'aide de l'outil Weighted Gene Correlation Network Analysis [42] nous a permis d'identifier des modules de gènes représentatifs de chacune de ces populations cellulaires. De façon particulièrement intéressante, l'un des modules enrichis dans VT à E11,5 comprend des gènes connectés impliqués à la fois dans des fonctions mésenchymateuses (adhésion cellulaire, membrane basale et matrice extracellulaire) et neurales (synapse, canaux ioniques, signalisation médiée par des neurotransmetteurs/neurotrophines).

Pour affiner notre analyse, nous avons ensuite réalisé des expériences de transcriptomique à l'échelle cellule unique (10X Genomics) sur l'AGM entière à E11,5 et de traçage cellulaire à l'aide d'un modèle de souris transgénique permettant de suivre le développement des cellules de crêtes neurales. L'ensemble de ces approches a révélé une forte hétérogénéité du mésenchyme aortique et notamment deux sous-populations de cellules mésenchymateuses sous-aortiques exprimant une signature moléculaire singulière que nous avons qualifiée de 'neuro-mésenchymateuse' en référence à la co-expression de gènes impliqués dans des fonctions adhésives et neurales [37]. Ces cellules ne dérivent pas des crêtes neurales étant négatives pour l'expression de marqueurs de différenciation caractéristiques tels que *Sox10*, *Phox2a* et *Phox2b*.

Les outils bio-informatiques que nous utilisons nous permettent d'extraire des paramètres quantitatifs tels que le degré de connectivité des gènes, leur rang selon GSEA, la corrélation de leur profil d'expression par rapport aux composantes principales de l'ACP. Ces critères sont précieux pour sélectionner des molécules candidates pour des approches histologiques et fonctionnelles. Nous nous sommes en particulier intéressés aux gènes *Dcn*, *Tnc* et *Ntrk3* codant respectivement les protéines Décorine et Ténascine C, deux composants de la matrice extracellulaire et le récepteur aux neurotrophines TrkC. Des expériences d'immunodétection ont montré que Décorine est exprimée, chez l'embryon de souris à E11,5, autour de la notochorde, autour de l'aorte dorsale et au niveau du mésenchyme sous-aortique. En accord avec la littérature [27], la Ténascine C est abondamment détectée dans la région sous aortique (**Figure 3**).

TrkC est exprimée au niveau des ganglions de la racine dorsale, des muscles lisses entourant de l'aorte et sous l'aorte dorsale. Finalement, des expériences de perte de fonction chez le poisson-zèbre ont démontré que l'expression de *dcn* est requise pour le développement des CSPH dans l'aorte dorsale.

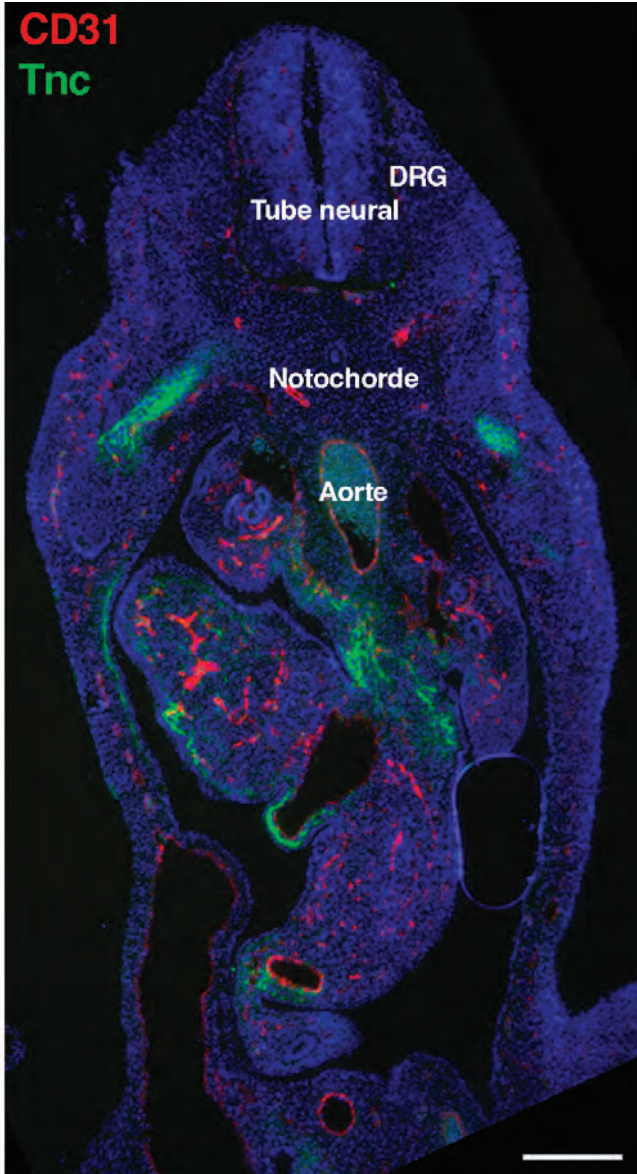


Figure 3 : Détection des protéines CD31 et Ténascine C par immunofluorescence.

Coupe transversale d'embryon de souris au jour 11,5 de gestation. Les noyaux (en bleu) sont marqués au DAPI. Ténascine C (Tnc) est détectée en vert et CD31 (un marqueur endothélial) en rouge. DRG : ganglion de la racine dorsale. Echelle de dimension : 50 μ m.

DISCUSSION

L'approche de microdissection laser a été déterminante dans le cadre de notre projet. Elle a permis d'isoler de façon fine les tissus entourant l'aorte dorsale à plusieurs stades du développement. Plusieurs étapes clés en amont, pendant et en aval de la microdissection laser ont nécessité des optimisations. Il s'agit notamment de l'enrobage des embryons avant la réalisation des coupes au cryostat, de la coloration des coupes pour une meilleure observation des tissus au microscope, de la puissance des lasers pour ne pas endommager les tissus et finalement du protocole pour l'extraction des acides nucléiques. La quantité et la qualité des ARN collectés a permis d'explorer le transcriptome des tissus microdisséqués à l'aide de puces à ADN. L'intégration de transcriptomes additionnels à la matrice d'expression initiale et l'interrogation de données transcriptomiques à l'échelle populationnelle (puces à ADN pour les tissus microdisséqués) et à l'échelle d'une cellule unique (pour l'AGM entière) nous ont permis d'identifier une population de cellules mésenchymateuses singulière exprimant une dualité moléculaire (mésenchymateuse et neurale). Nous tentons actuellement d'isoler cette population par cytométrie en flux afin de mieux la caractériser sur le plan moléculaire et fonctionnel. Cette étude ouvre par conséquent de nouvelles perspectives sur l'interaction entre le système nerveux en développement et le mésenchyme sous aortique dans le processus de production des premières CSPH chez l'embryon. Une avancée méthodologique majeure résiderait dans la possibilité de coupler les approches de microdissection laser aux technologies "omiques" à l'échelle unicellulaire, afin de mieux capturer l'hétérogénéité des tissus microdisséqués.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20100318258 et EQU201903007867) et nos institutions (CNRS, Inserm et Sorbonne Université) pour leurs soutiens financiers.

Nous remercions les membres de l'équipe Origines et Régulation des Cellules Souches Hématopoïétiques (CNRS UMR8263, Inserm U1345 et Sorbonne Université) pour les discussions scientifiques et conseils avisés en lien avec ce projet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] CRANE G.M., JEFFERY E. & MORRISON S.J. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*, 2017,**17** (9): 573-590.
- [2] DURAND C., CHARBORD P. & JAFFREDO T. The crosstalk between hematopoietic stem cells and their niches. *Curr Opin Hematol*, 2018,**25** (4): 285-289.
- [3] MORRISON S.J. & SCADDEN D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 2014,**505** (7483): 327-334.
- [4] COMAZZETTO S., SHEN B. & MORRISON S.J. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell*, 2021,**56** (13): 1848-1860 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34146467>.
- [5] GAO X., et al. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development*, 2018,**145** (2): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358215>
- [6] KUMARAVELU P., et al. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*, 2002,**129** (21): 4891-4899.
- [7] MEDVINSKY A. & DZIERZAK E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 1996,**86** (6): 897-906.
- [8] DZIERZAK E. & BIGAS A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell*, 2018,**22** (5): 639-651.
- [9] YVERNOGÉAU L., DAINÈSE G. & JAFFREDO T. Dorsal aorta polarization and haematopoietic stem cell emergence. *Development*, 2023,**150** (1): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36602140>
- [10] BERTRAND J.Y., et al. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*, 2010,**464** (7285): 108-111.
- [11] BOISSET J.C., et al. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 2010,**464** (7285): 116-120.
- [12] DE BRUIJN M.F., et al. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity*, 2002,**16** (5): 673-683.
- [13] JAFFREDO T., et al. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, 1998,**125** (22): 4575-4583.
- [14] KISSA K. & HERBOMEL P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010,**464** (7285): 112-115.
- [15] OBERLIN E., et al. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*, 2002,**129** (17): 4147-4157.

- [16]. SOUILHOL C., *et al.* Inductive interactions mediated by interplay of asymmetric signalling underlie development of adult haematopoietic stem cells. *Nat Commun*, 2016,**7** 10784.
- [17] TAOUDI S. & MEDVINSKY A. Functional identification of the hematopoietic stem cell niche in the ventral domain of the embryonic dorsal aorta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007,**104** (22): 9399-9403.
- [18] RICHARD C., *et al.* Endothelio-mesenchymal interaction controls runx1 expression and modulates the notch pathway to initiate aortic hematopoiesis. *Dev Cell*, 2013,**24** (6): 600-611.
- [19] CHANDRAKANTHAN V., *et al.* Mesoderm-derived PDGFRA(+) cells regulate the emergence of hematopoietic stem cells in the dorsal aorta. *Nat Cell Biol*, 2022,**24** (8): 1211-1225. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35902769>
- [20] ESPÍN-PALAZÓN R., *et al.* Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell*, 2014,**159** (5): 1070-1085.
- [21] FITCH S.R., *et al.* Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell*, 2012,**11** (4): 554-566.
- [22] KAPENI C., *et al.* p57Kip2 regulates embryonic blood stem cells by controlling sympathoadrenal progenitor expansion. *Blood*, 2022,**140** (5): 464-477. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35653588>
- [23] MARIANI S.A., *et al.* Pro-inflammatory Aorta-Associated Macrophages Are Involved in Embryonic Development of Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*, 2019,**50** (6): 1439-1452.e1435.
- [24] SA DA BANDEIRA D., *et al.* PDGFRbeta(+) cells play a dual role as hematopoietic precursors and niche cells during mouse ontogeny. *Cell Rep*, 2022,**40** (3): 111114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35858557>
- [25] CRISAN M., *et al.* BMP signalling differentially regulates distinct haematopoietic stem cell types. *Nat Commun*, 2015,**6** 8040. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26282601>
- [26]. DURAND C., *et al.* Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007,**104** (52): 20838-20843.
- [27] MARSHALL C.J., KINNON C. & THRASHER A.J. Polarized expression of bone morphogenetic protein-4 in the human aorta-gonad-mesonephros region. *Blood*, 2000,**96** (4): 1591-1593.
- [28] MCGARVEY A.C., *et al.* A molecular roadmap of the AGM region reveals BMPER as a novel regulator of HSC maturation. *J Exp Med*, 2017,**214** (12): 3731-3751. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29093060>

- [29] FADLULLAH M.Z.H., *et al.* Murine AGM single-cell profiling identifies a continuum of hemogenic endothelium differentiation marked by ACE. *Blood*, 2022,**139** (3): 343-356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34517413>
- [30] PETIT-COCAULT L., *et al.* Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitive hematopoiesis. *Development*, 2007,**134** (16): 3031-3040.
- [31] ROBIN C., *et al.* An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 2006,**11** (2): 171-180.
- [32] LI Y., *et al.* Inflammatory signaling regulates embryonic hematopoietic stem and progenitor cell production. *Genes Dev*, 2014,**28** (23): 2597-2612.
- [33] ORELIO C., *et al.* Interleukin-1-mediated hematopoietic cell regulation in the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood*, 2008,**112** (13): 4895-4904. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805969>
- [34] SAWAMIPHAK S., KONTARAKIS Z. & STAINIER D.Y. Interferon gamma signaling positively regulates hematopoietic stem cell emergence. *Dev Cell*, 2014,**31** (5): 640-653.
- [35] CROSSE E.I., *et al.* Multi-layered Spatial Transcriptomics Identify Secretory Factors Promoting Human Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell Stem Cell*, 2020,**27** (5): 822-839.e828.
- [36] YVERNOGÉAU L., *et al.* Multispecies RNA tomography reveals regulators of hematopoietic stem cell birth in the embryonic aorta. *Blood*, 2020. **133**(7):831-844.
- [37] MILADINOVIC O., *et al.* A multistep computational approach reveals a neuro-mesenchymal cell population in the embryonic hematopoietic stem cell niche. *Development*, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38451068>
- [38] SUBRAMANIAN A., *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005,**102** (43): 15545-15550.
- [39] HUANG D.W., *et al.* DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 2007,**35** (Web Server issue): W169-175.
- [40] CHARBORD P., *et al.* A systems biology approach for defining the molecular framework of the hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 2014,**15** (3): 376-391.
- [41] OOSTENDORP R.A., *et al.* Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*, 2002,**99** (4): 1183-1189.
- [42] LANGFELDER P. & HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008,**9** 559.

VALIDATION D'ANTICORPS RECOMBINANTS EN HISTOLOGIE : UNE ALTERNATIVE ÉTHIQUE SANS COMPROMIS SUR LA QUALITÉ SCIENTIFIQUE

DEMY Doris Lou ^{1,2*}, PIROT Nelly ^{3,4*}, BROYON Morgane ^{3,4}, LE BERT Marc ^{1,5}, GOMEZ Susana ^{1,2}, LEGRAND Véronique ^{1,2}, DORSCHNER Stéphane ^{1,6}, SOTIROPOULOS Athanassia ^{1,2,7#}, BENCSIK Anna ^{8#}

¹ GIS FC3R, École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

² Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France

³ IRCM, Univ. Montpellier, ICM, INSERM, Montpellier, France

⁴ BCM, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

⁵ CNRS, UMR7355, Orléans - France

⁶ CEA, France

⁷ U1016, Institut Cochin, Paris - France

⁸ Université Lyon 1, Anses Laboratoire de Lyon, Lyon, France

* co-premiers auteurs

co-derniers auteurs

Auteurs correspondants : doris-lou.demy@fc3r.com ; nelly.pirot@inserm.fr


OPEN ACCESS 

Received: December 3, 2025

Revised: May 13, 2026

Accepted: May 19, 2026

Published: June, 2026

 CC BY-NC 4.0

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.91

VALIDATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES IN HISTOLOGY: AN ETHICAL ALTERNATIVE WITHOUT COMPROMISING SCIENTIFIC QUALITY

ABSTRACT

The use of animal-derived antibodies remains widespread in research – including in histotechnology – despite well-documented ethical concerns (e.g., the use of large numbers of animals, painful procedures) and limitations in scientific robustness (such as batch to batch variability and lack of reproducibility). In contrast, recombinant antibodies, produced *in vitro* from defined sequences, provide more reliable, ethically sound, and ultimately, more cost-effective alternatives. Consequently, since 2020, both European (EURL ECVAM, the European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) and French (CNREEA, the National Committee for Ethical Reflection on Animal Experimentation) committees have advocated a transition towards the use of these recombinant antibodies whenever feasible.

The French Centre for the 3Rs (FC3R) seeks to promote and implement the 3Rs principle (Replacement, Reduction, Refinement of animal testing) in France by fostering responsible and innovative research, education and transparent communication. To support researchers in the transition from using animal-derived antibodies to *in vitro*- produced 'recombinant' alternatives, the FC3R has launched, in collaboration with the French Association of Histotechnology (AFH), a study involving a network of French histology platforms.

The first phase of this study was conducted in partnership with the AFH and involved the development and dissemination of a survey targeting French histology platforms. The aim was to identify the antibodies most commonly used, as well as the conditions under which they are employed. A total of twelve platforms responded, reporting 36 antibodies considered 'to be replaced'. Among these, 61% were polyclonal and 25% monoclonal, some of which are produced using ascites fluid, a severe procedure associated with significant animal suffering. Interestingly, five of the antibodies identified were already recombinant, highlighting the need for improved transparency in the communication and labeling of recombinant antibodies, including by suppliers.

Since late 2024, a pilot study has been underway at sites selected from the survey with the aim of comparing the performance of usual polyclonal and monoclonal antibodies to that of their recombinant counterparts. Funded by the FC3R, this initiative covers both the procurement of recombinant antibodies and the technical services provided by the participating platforms. The preliminary results are highly encouraging: effective recombinant alternatives have been successfully identified for the detection of CD3, CD31, GFAP, GFP, CHGA, Occludin, KRT14 and Ki67. In this article, comparative analyses of anti-GFP antibodies from Abcam and CST are presented as a case study to illustrate both the methodology and the outcomes. The complete set of results will be widely disseminated, particularly via the FC3R website and the AFH network, in order to raise awareness within the scientific community and to support the transition toward more robust and ethically responsible practices.

KEY WORDS

Antibodies, Histology, Immunostaining, *In vitro* production, Recombinant, Replace Reproducibility, 3Rs.

RÉSUMÉ

L'utilisation d'anticorps produits chez des animaux reste très courante en recherche - notamment en histotechnologie - en dépit d'enjeux éthiques majeurs (grand nombre d'animaux, procédures potentiellement douloureuses) et des limites scientifiques bien documentées (comme par exemple la variabilité entre lots, le manque de reproductibilité). Des alternatives recombinantes, produites *in vitro* à partir de séquences connues, offrent pourtant aujourd'hui des solutions plus fiables, plus éthiques, et à terme, plus économiques. C'est pourquoi des comités européen (EURL ECVAM laboratoire de référence européen pour les alternatives aux tests animaux) et français (CNREEA, comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale) préconisent, depuis 2020, la transition vers ces anticorps recombinants chaque fois que cela est possible.

Dans ce contexte, le Centre Français pour les 3R (FC3R) a pour mission de promouvoir la mise en œuvre du principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner l'expérimentation animale) en soutenant une recherche responsable et innovante, l'éducation et une communication transparente. Afin d'accompagner les acteurs de la recherche dans une transition visant à remplacer l'utilisation d'anticorps d'origine animale par des anticorps recombinants produits *in vitro*, le FC3R a engagé une étude en collaboration avec l'Association Française d'Histotechnologie (AFH) mobilisant des plateformes d'histologie françaises.

La première phase de ce travail, conduite en partenariat avec l'AFH, a consisté à élaborer et diffuser un questionnaire à destination des plateformes d'histologie françaises, afin d'identifier les anticorps les plus couramment utilisés ainsi que leurs conditions d'utilisation. Douze plateformes ont répondu à cette enquête, listant 36 anticorps « à remplacer ». Parmi eux, 61 % étaient polyclonaux, particulièrement problématiques en termes de reproductibilité et d'impact éthique, et 25 % monoclonaux, certains produits par liquide d'ascite, une méthode reconnue comme sévère pour les animaux. De manière notable, 5 anticorps listés étaient déjà recombinants, révélant un manque de visibilité de cette qualité et soulignant la nécessité d'une meilleure transparence dans la communication et l'étiquetage des anticorps recombinants, y compris par les fournisseurs.

Depuis fin 2024, une étude pilote est menée au sein de plateformes issues de l'enquête afin de comparer les performances des anticorps usuels polyclonaux et monoclonaux avec leurs équivalents recombinants. Financée par le FC3R, elle couvre l'acquisition des anticorps recombinants ainsi que les prestations techniques des plateformes. Les premiers résultats sont très encourageants : des alternatives recombinantes efficaces ont été identifiées pour la détection de CD3, CD31, GFAP, GFP, CHGA, Occludine, KRT14 et Ki67. Dans le présent article à travers l'exemple d'études comparatives des anticorps Abcam et CST anti-GFP, nous illustrons la démarche et les résultats. L'ensemble des résultats sera largement diffusé, notamment sur le site web du FC3R et le réseau de l'AFH, afin de sensibiliser la communauté et d'accompagner la transition vers des pratiques plus robustes et plus responsables sur le plan éthique.

KEY WORDS

Anticorps, Histologie, Immunomarquages, Production *in vitro*, Recombinant, Remplacer, Reproductibilité, 3R.

INTRODUCTION

Les anticorps constituent des outils essentiels en recherche biomédicale, en diagnostic et en thérapeutique. L'histologie, pilier de la recherche biomédicale et du diagnostic, repose fortement sur leur utilisation pour visualiser des protéines et autres molécules au sein des cellules et des tissus, permettant ainsi de mettre en évidence des structures spécifiques. En Europe, le marché des anticorps de recherche représente un secteur en forte expansion, avec plus de 8,6 millions d'anticorps disponibles commercialement et près de 400 fournisseurs (<https://www.citeab.com/market-data/antibodies-market-reports>, consulté le 16 avril 2026).

Ces réactifs constituent des outils incontournables dans de nombreux domaines scientifiques et biomédicaux, et leur demande ne cesse de croître. Historiquement, la production des anticorps repose majoritairement sur l'immunisation animale, conduisant à la génération d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux [1]. Les anticorps polyclonaux sont obtenus par immunisation d'animaux (souris, lapins, chèvres, etc.), suivie de la collecte de sérum contenant un mélange d'immunoglobulines dirigées contre différents épitopes d'un antigène donné. À l'inverse, les anticorps monoclonaux sont traditionnellement produits via la technologie des hybridomes - décrite par Georges J. F. Köhler et César Milstein lors de la découverte fondatrice ayant conduit au prix Nobel de physiologie ou médecine de 1984 - reposant sur la fusion de lymphocytes B producteurs d'anticorps et de cellules myéломateuses immortalisées.

Malgré l'existence d'alternatives technologiques, la majorité des anticorps utilisés en recherche demeure encore aujourd'hui produite par immunisation d'animaux de différentes espèces [2], un processus qui conduit au sacrifice estimé d'environ 1 million d'animaux par an dans l'Union européenne [3]. Ce chiffre issu des recommandations de l'EURL ECVAM (laboratoire de référence européen pour les alternatives aux tests animaux), s'inscrit dans un contexte de procédures reconnues comme potentiellement douloureuses et sources de souffrance animale.

Bien que les espèces principalement concernées - souris, rats, lapins et animaux de grande taille - ainsi que le rôle prépondérant des anticorps polyclonaux soient clairement identifiés dans la littérature, aucune donnée statistique publique ne permet à ce jour d'établir une répartition quantitative précise par espèce ou par type d'anticorps. En effet, les statistiques de l'Union européenne (Directive 2010/63) regroupent les animaux par finalité (recherche, production, enseignement), sans distinguer spécifiquement la

production d'anticorps par espèce, les anticorps polyclonaux et monoclonaux sont comptabilisés conjointement dans la catégorie « production biologique ». À cela s'ajoute le caractère confidentiel des données industrielles.

Cependant l'usage des espèces animales dans la production d'anticorps est bien identifié. Les souris sont principalement utilisées pour la génération d'hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux, les rats pour des anticorps monoclonaux et polyclonaux, les lapins - majoritaires en recherche - pour des anticorps polyclonaux, les chèvres, moutons, ânes et chevaux pour des productions de grands volumes d'anticorps polyclonaux ; plus récemment les lamas et alpagas sont de plus en plus employés pour la génération d'anticorps à domaine unique de type VHH (*nanobodies*) [4, 3].

Souvent sous-estimé, le coût éthique massif de la production d'anticorps d'origine animale existe bel et bien et est plutôt bien documenté [5]. La souffrance associée à ces procédures est souvent invisibilisée alors même que la production d'anticorps polyclonaux repose sur des protocoles invasifs impliquant des injections répétées d'antigènes associés à des adjuvants inflammatoires. Ces pratiques provoquent des effets indésirables tels que douleur, abcès, ulcérations, perte de poids et altérations comportementales [6] observés systématiquement chez toutes les espèces concernées, bien que leur expression varie selon les modèles animaux (lagomorphes, caprins et ovins,...). À ces effets s'ajoutent des prélèvements sanguins répétés constituant des contraintes supplémentaires et cumulatives sur le bien-être animal. Malgré les mesures de raffinement existantes, ces atteintes au bien-être animal demeurent intrinsèques à la méthode et persistent tant que des alternatives non animales ne sont pas adoptées [3].

Au-delà des enjeux éthiques, ce mode de production repose sur des réponses immunitaires animales intrinsèquement variables conduisant à la génération d'anticorps polyclonaux hétérogènes, dont la spécificité, l'affinité et la composition clonale varient d'un lot à l'autre. Chaque lot correspondant à une réponse immunitaire unique, les performances analytiques ne peuvent être strictement reproduites dans le temps. De nombreuses analyses indépendantes ont montré qu'une proportion très importante d'anticorps de recherche commercialisés ne reconnaît pas correctement leur cible ou présente des liaisons hors cible significatives, certaines études estimant que jusqu'à 50 % des anticorps testés sont non spécifiques ou inadaptés à l'application revendiquée [7-10].

Cette faible fiabilité des anticorps polyclonaux, combinée à l'absence fréquente de données de caractérisation robustes et à la variabilité inter-lots, affecte directement la qualité de la recherche en compromettant l'obtention de résultats robustes et reproductibles. Les conséquences pour les laboratoires

et les plateformes d'analyses sont multiples : perte de temps, augmentation des coûts expérimentaux, mobilisation inutile de ressources, fragilisation des conclusions scientifiques et impact potentiel sur des domaines critiques pour la santé publique, tels que le diagnostic et les stratégies thérapeutiques [11].

Face aux limites des anticorps polyclonaux, les dernières décennies ont vu émerger des approches fondées sur des anticorps définis (pour revue voir [12]). Les anticorps monoclonaux issus de la technologie des hybridomes ont constitué historiquement une première réponse majeure à ces enjeux, en permettant l'obtention d'anticorps dirigés contre un épitope unique. Comparativement aux polyclonaux, ces anticorps monoclonaux offrent une meilleure spécificité analytique et une reproductibilité accrue, contribuant ainsi de manière décisive à l'amélioration de la qualité de nombreux travaux de recherche biomédicale [5].

Toutefois, malgré ces avantages, les anticorps monoclonaux produits par hybridomes présentent eux aussi des limites : instabilité génétique des lignées, dérives fonctionnelles au cours du temps, variations entre lots (bien que ces problématiques soient en principe atténuées par le développement de procédures de stabilisation des lignées et de contrôles qualité rigoureux lors des productions, en particulier au sein des entreprises ayant une certification qualité), coexistence possible de plusieurs chaînes fonctionnelles remettant en cause la mono-spécificité supposée de ces anticorps et dépendance persistante à l'immunisation animale. En effet, comme pour les polyclonaux, la production initiale d'hybridomes repose sur l'immunisation animale, celle-ci n'intervenant toutefois qu'au début du processus, ce qui constitue l'un des principaux avantages de cette technologie. Ces éléments soulèvent des enjeux à la fois éthiques et de standardisation biologique [12, 5].

Les anticorps recombinants à séquence définie, produits par des plateformes *in vitro* (*phage display*, *yeast display* ou expression recombinante), permettent de lever la majorité de ces verrous. Leur identité moléculaire est entièrement caractérisée, leur production est indépendante de l'animal et leur reproductibilité intrinsèque, puisque, comme pour les hybridomes monoclonaux, la même séquence peut être exprimée à l'identique indéfiniment.

Ainsi les avancées technologiques actuelles offrent des solutions permettant simultanément d'améliorer la fiabilité, la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité de la recherche, tout en réduisant, voire éliminant le recours à l'animal en cohérence avec les principes des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), formalisés dès 1959 par William Russell et Rex Burch dans le chapitre 4 de leur ouvrage intitulé « *The Principles of Humane Experimental Technique* » (en français, « Les principes des techniques expérimentales humaines ») [13].

L'approche recombinante consiste au i) **remplacement** de l'utilisation d'animaux pour la production d'anticorps, ii) à la **réduction** du nombre d'animaux nécessaires et iii) au **raffinement** des pratiques expérimentales en limitant les procédures invasives. Les avantages et les limites de ces méthodes de production d'anticorps sont synthétisés dans le **Tableau I**.

TYPE D'ANTICORPS	MÉTHODE DE PRODUCTION	AVANTAGES	LIMITES	IMPACT 3R
Polyclonaux	Immunisation animale + Collecte de sérum	Sensibilité élevée Reconnaissance multi-épitopes	Variabilité inter-lots Faible reproductibilité	Impact négatif (nombre important d'animaux + souffrance animale)
Monoclonaux (hybridomes)	Fusion lymphocytes B / myélome	Spécificité élevée Production continue	Dérive cellulaire Parfois production <i>in vivo</i> (ascite)	Impact modéré à sévère (ascites)
Recombinants	Séquençage + Expression <i>in vitro</i> (cellules, <i>phage display</i>)	Reproductibilité Traçabilité Ingénierie facile	Coût initial (<i>nanobody</i>) Adoption limitée	Impact positif (remplacement complet possible)

Tableau I : Synthèse des avantages et limites des méthodologies de production des anticorps et de leur impact vis à vis des 3R.

Pourtant, bien que le remplacement des anticorps d'origine animale par des anticorps recombinants soit possible depuis plus de vingt ans, cette technologie peine encore à s'imposer durablement dans les laboratoires de recherche comme dans ceux des plateformes d'histotechnologie.

Dans le cadre réglementaire de l'Union européenne, l'application de la Directive 2010/63/EU implique que les États membres ne devraient plus autoriser le développement et la production d'anticorps par immunisation animale en l'absence d'une justification scientifique solide et dûment étayée. Or, l'existence, la disponibilité commerciale et la robustesse désormais bien établie des anticorps recombinants fragilisent fortement les différents arguments historiquement avancés en faveur du maintien des anticorps d'origine animale [9]. En cohérence avec ce constat, l'EURL ECVAM recommande depuis 2020 l'abandon du recours aux animaux pour le développement et la production d'anticorps destinés à la recherche, au diagnostic ainsi qu'aux applications réglementaires et thérapeutiques, au profit de méthodes de production alternatives *in vitro* [3]. Cette orientation a été déclinée au niveau national avec la publication, fin 2022, d'une recommandation du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale (CNREEA), adaptée au contexte de la recherche française.

Privilégier les anticorps recombinants lorsque cela est possible, constitue ainsi une démarche responsable, reposant sur l'utilisation d'outils fiables et robustes, tout en contribuant concrètement à la réduction du recours aux animaux élevés à des fins de production de réactifs pour la recherche. Une adoption plus généralisée des anticorps recombinants en recherche s'inscrirait pleinement dans le cadre du principe des 3R et serait une alternative solide aux anticorps d'origine animale pour de nombreuses applications, comme les tests d'immunohistochimie (IHC).

À cet égard, le Centre Français pour les 3R (FC3R) qui a pour mission de promouvoir et d'accompagner la mise en œuvre du principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner l'expérimentation animale) en France, notamment par la valorisation d'une recherche innovante, l'éducation et une communication transparente, a contacté l'Association Française d'Histotechnologie (AFH) en 2024, pour un projet d'implémentation visant à comparer les performances des anticorps usuels polyclonaux et monoclonaux avec leurs équivalents recombinants.

Réalisé en trois étapes avec les plateformes d'histologie françaises membres de l'AFH, il s'appuie sur 1), une enquête nationale, recensant les anticorps les plus usuellement mis en œuvre ainsi que leurs conditions d'utilisation, 2), une étude-pilote de comparaison avec des homologues recombinants et 3), une phase de dissémination des résultats obtenus. Dans le présent article, nous présentons les principes de la démarche mise en œuvre, les modalités de l'enquête nationale conduite, ainsi que les anticorps identifiés, lesquels ont été classés en fonction de leur impact scientifique et de leur pertinence au regard des principes des 3R. Cette étude se focalise sur l'une des cibles ainsi identifiées, la GFP (*Green Fluorescent Protein*), une protéine fluorescente rapportrice dérivée de la méduse *Aequorea victoria* et largement utilisée dans de nombreux modèles expérimentaux, par exemple chez les souris transgéniques. Le gène rapporteur *gfp* permet notamment de suivre des lignées cellulaires ou, lorsqu'il est fusionné à un gène d'intérêt, d'analyser l'expression de ce dernier au sein des cellules et des tissus. La cross-réactivité des anticorps dirigés contre la GFP avec la protéine YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), protéine produite à partir d'un mutant du gène codant la *gfp*, a également été examinée [14]. À travers l'exemple d'études comparatives menées sur des anticorps anti-GFP commercialisés par les fournisseurs Abcam et Cell Signaling Technology (CST), nous illustrons concrètement l'approche méthodologique adoptée ainsi que les résultats obtenus.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Stratégie

L'objectif de cette étude est de faciliter et d'accélérer l'adoption des anticorps recombinants (Ac recomb.) en France, en démontrant scientifiquement leur fiabilité en tant qu'alternatives aux anticorps d'origine animale. Dans cette perspective, le FC3R a financé une étude visant 1) à fournir des anticorps recombinants, 2) à assurer leur caractérisation analytique et 3) à diffuser les résultats auprès des utilisateurs. L'enjeu est double : produire des données robustes pour attester de la validité scientifique des anticorps recombinants et favoriser leur adoption à grande échelle au sein de la communauté scientifique.

Dans ce contexte, le Centre Français des 3R (FC3R) a mené avec le soutien de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), une enquête nationale auprès des plateformes françaises d'histologie, membres de l'AFH, afin d'identifier les anticorps polyclonaux considérés comme prioritaires à remplacer. Le choix de solliciter les plateformes plutôt que les équipes de recherche reposait sur plusieurs arguments :

- **Volume et impact** : les plateformes traitent un nombre élevé d'échantillons, ce qui leur confère un fort levier d'action et maximise l'impact potentiel en matière de réduction de l'utilisation d'animaux.
- **Nature des cibles** : elles recourent majoritairement à des anticorps dits de « routine », correspondant à des cibles pour lesquelles des anticorps recombinants sont plus susceptibles d'exister, d'être disponibles dans le commerce et parfois même partiellement caractérisés.
- **Dimension économique** : au regard des volumes d'anticorps utilisés, les plateformes sont davantage sensibles aux gains économiques potentiels associés à l'emploi d'anticorps recombinants que les équipes de recherche individuelles.
- **Expertise et ressources** : elles bénéficient d'un haut niveau de compétences scientifiques et techniques, de protocoles validés et souvent automatisés, de banques de tissus, d'équipements performants et rigoureusement entretenus, ainsi que des systèmes de gestion des données.
- **Rayonnement et effet réseau** : les plateformes regroupent un large éventail d'utilisateurs issus de domaines variés, ce qui favorise la diffusion, l'appropriation et l'adoption des anticorps validés au sein de la communauté scientifique.

Enquête nationale

Une enquête nationale a été menée auprès des plateformes françaises d'histotechnologie membres de l'AFH, afin d'identifier les anticorps prioritaires à remplacer. L'enquête, élaborée sous LimeSurvey avec l'aide des membres du bureau de l'AFH, comportait 60 questions, qui couvraient différents domaines : caractéristiques des plateformes, critères de sélection des anticorps (fournisseur, prix, clonalité...), anticorps « à remplacer » (jusqu'à 5 par plateforme), matériel biologique concerné (tissu/organe/lignée cellulaire, espèce, mode de fixation, de conservation etc.), protocoles expérimentaux, équipements utilisés, ressources biologiques disponibles.

L'enquête a été ouverte du 15 février au 1^{er} avril 2024 et diffusée *via* les comptes de réseaux sociaux et la newsletter du FC3R, ainsi que la liste de diffusion de l'AFH. Au total, 52 questionnaires ont été commencés et 12 réponses complètes ont été enregistrées.

Sélection des cibles prioritaires

Les cibles et leurs anticorps identifiés ont été classés selon leur impact scientifique et leur pertinence au regard des principes des 3R. Une attention particulière a été portée aux anticorps polyclonaux et aux anticorps monoclonaux produits par ascite (à remplacer en priorité), ainsi qu'aux cibles partagées entre plusieurs plateformes.

Sélection des plateformes

L'identification des anticorps « prioritaires » a permis d'établir une présélection parmi les plateformes répondantes, c'est-à-dire celles utilisant en routine les anticorps retenus. Lorsque plusieurs plateformes s'étaient portées candidates pour caractériser un même anticorps, la priorité a été donnée à celles ayant proposé plusieurs anticorps à tester. D'autres critères de sélection ont également été pris en compte : estimation des coûts (devis), disponibilité pour réaliser les marquages selon le calendrier établi par le FC3R, présence en interne des contrôles et échantillons de tissus nécessaires, et absence de nécessité de sacrifier de nouveaux animaux.

Sélection des anticorps recombinants

Les alternatives recombinantes ont été identifiées via les bases de données spécialisées (CiteAb et Recombinant Antibodies & Mimetics Database) et sélectionnées selon la validation de ces anticorps pour différentes applications (IF, IHC, P-IHC, etc.), espèces et isotypes de la fraction cristallisable (Fc) proposées, gamme de prix... Pour garantir une diversité d'origine des produits, la sélection a intégré à la fois des groupes industriels majeurs et des start-ups européennes. Cinq fournisseurs ont émergé, dont quatre ont été retenus: Abcam, ABCD Antibodies, Absolute Antibody et CST/Ozyme. En effet ces derniers ont accepté de collaborer avec des réductions de prix ou une fourniture gratuite des anticorps.

Pour chaque cible, les plateformes ont reçu la liste des alternatives recombinantes issues de ces fournisseurs et ont choisi *in fine* 3 à 4 anticorps par cible, en veillant à répartir équitablement leur sélection entre les différents fournisseurs.

Montage et conduite des projets

Les projets ont été coordonnés entre le FC3R et les plateformes partenaires, incluant la sélection des anticorps à tester, la définition des stratégies de validation (comparaison, modèles Knock Out), la planification expérimentale, la gestion des ressources.

Anticorps

Les anticorps recombinants anti-GFP testés et présentés dans cette étude sont indiqués dans le **Tableau II** ci-dessous. Deux anticorps recombinants fournis par le fournisseur ABCD Antibodies ont également été testés (cf. site du FC3R <https://www.fc3r.com/anticorps/>).

RÉFÉRENCE	CLONE	FOURNISSEUR	ESPÈCE HÔTE	CONCENTRATION STOCK
ab183734	EPR14104	Abcam	Lapin	138 µg/mL
2956	D5.1	CST	Lapin	7 µg/mL
A11122	Polyclonal	Invitrogen	Lapin	2000 µg/mL

Tableau II : Liste des Ac recombinants (clone, fournisseur, espèce hôte, concentration stock) utilisés dans les tests comparatifs illustrés dans cet article.

Tissus

L'ensemble des échantillons étudiés correspond à des tissus murins fixés et inclus en paraffine, déjà traités et issus de la « blocothèque » du Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM). Les blocs ont été sélectionnés de façon à inclure des échantillons correspondant à des conditions de contrôle positif et de contrôle négatif. Des souris exprimant le rapporteur mTomato-mGFP (Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP) Luo) ou YFP (Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos) sous le contrôle du promoteur Rosa26 ont été croisées avec des animaux exprimant la recombinaise Cre, inductible par le tamoxifène, et fusionnée au récepteur nucléaire ER sous le contrôle du promoteur du locus Rosa26 (Gt(ROSA)26Sortm2(cre/ERT2)Brn). L'expression de la GFP ou de la YFP a été induite par l'application topique de tamoxifène (Sigma, T5648) sur la peau du dos (cinq fois 2 mg pour les animaux transgéniques GFP et une fois 400 µg pour les animaux transgéniques YFP). Des souris dépourvues de l'allèle Rosa26-CreER mais ayant reçu une application de tamoxifène ont été utilisées comme témoins négatifs. Des prélèvements de peau et de foie de ces souris ont été réalisés 6 jours après la première application de tamoxifène, puis fixés pendant 24 h dans du formol tamponné neutre à 10 %, avant d'être rincés trois fois dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Les échantillons ont été déshydratés à l'aide d'un automate d'imprégnation en paraffine (ASP300S, Leica) par des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes : éthanol à 70 % (4 h, puis 30 min), éthanol à 95 % (15 min, puis 30 min) et éthanol à 100 % (45 min, 1 h, puis 1 h 30 min). La déshydratation a été suivie d'une clarification au xylène par des bains successifs (45 min, puis 1 h à deux reprises), puis d'une imprégnation de paraffine à l'aide de bains successifs de paraffine liquide à 58 °C (45 min, puis 1 h et 1 h 30 min). Les échantillons ont ensuite été inclus en bloc dans de la paraffine liquide à l'aide d'une station d'inclusion en paraffine (Arcadia, Leica), puis refroidis jusqu'à solidification. Ces blocs de tissus inclus en paraffine ont été utilisés pour préparer des coupes histologiques de 3 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (HM355S, MM France), montées sur des lames TOMO (Roche), puis séchées à 37 °C pendant une nuit.

Immunomarquages et acquisition d'images

Les mises au point des marquages immunohistochimiques dirigés contre la GFP ou l'YFP ont été réalisées sur un automate d'immunomarquage Ventana Discovery Ultra® (Roche Diagnostics), conformément aux recommandations du fournisseur et en utilisant les kits associés. La stratégie de mise au point retenue est celle classiquement décrite dans la littérature [15].

Dans un premier temps, 2 conditions de démasquages ont été testées pour pouvoir effectuer une comparaison efficace : démasquage à la chaleur en tampon Tris-EDTA pH 8 durant 24 min à 95 °C (Tampon CC1, Ventana, 05424569001) et tampon citrate pH 6 pendant 24 min à 91 °C (Tampon CC2, Ventana, 05424542001). Pour les premiers tests, les anticorps primaires ont été dilués au 1/100 dans un tampon Standard (ST) (Agilent, S0809) et incubés durant 60 min à 37 °C. Tous les anticorps primaires ont été révélés avec une solution prête à l'emploi d'anticorps secondaire anti-Immuglobuline de lapin (OmniMap Rabbit, Ventana, 05266548001). Le substrat, le DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Ventana, 05266645001) a été déposé durant 8 min. La contre-coloration des noyaux a été ensuite effectuée en incubant 8 min les lames avec de l'hématoxyline II (Ventana, 05277965001) suivie d'une incubation pendant 4 min avec une solution de « *Bluing reagent* » (Ventana, 05266769001). Selon les résultats obtenus, le signal a été optimisé pour chaque anticorps selon deux méthodes : une amplification du signal (augmentation de la concentration de l'Ac primaire jusqu'à 30 µg/mL, remplacement du diluant d'Ac par du diluant "*low background*" S3022 d'Agilent, remplacement du kit d'amplification par le kit HQ (Ventana, DISCOVERY Anti-Rabbit HQ # 07017812001, DISCOVERY Anti-HQ # 07017936001)) ou une réduction du signal/bruit de fond (gamme de dilution du primaire, remplacement du diluant d'Ac par du diluant "*low background*" ou diminution du temps d'incubation de l'Ac primaire).

Les lames ont été déshydratées à l'aide d'un Autostainer XL (Leica), puis montées sous lamelles avec le milieu de montage Pertex à l'aide d'un appareil de montage de lames CTM6 (MM France). Les lames immunomarquées ont été numérisées à l'aide d'un scanner MIDI2 (3DHitech) et les images ont été visualisées à l'aide du logiciel Slideviewer.

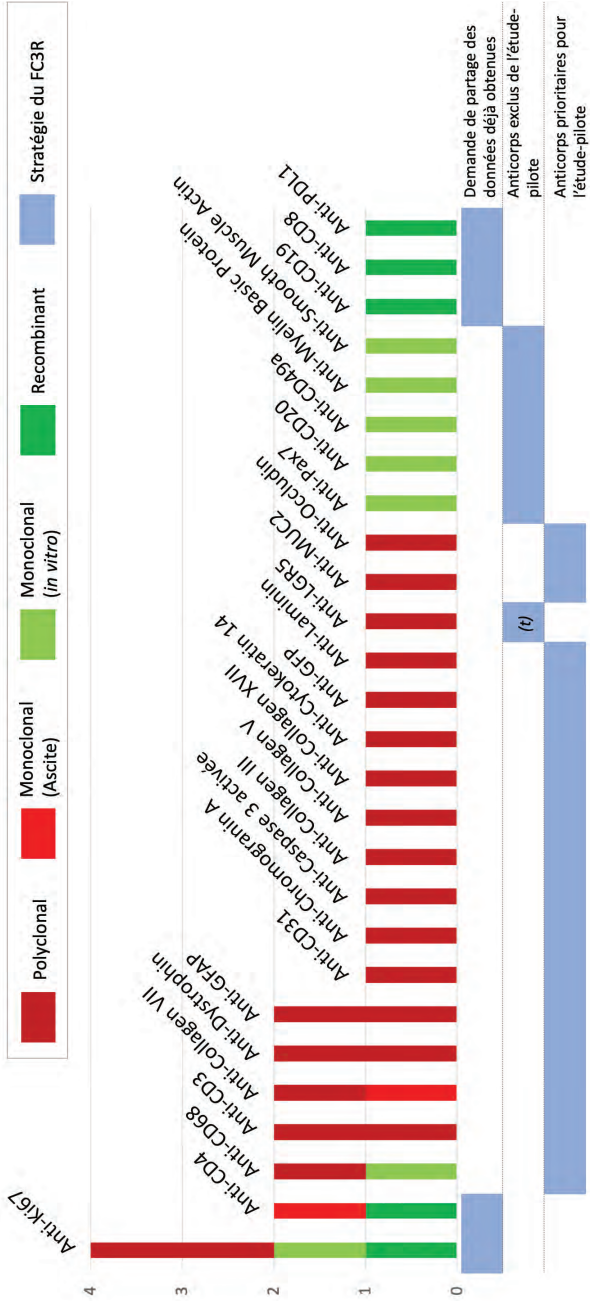


Figure 1 : Synthèse des résultats de l'enquête nationale auprès des plateformes françaises d'histologie en matière d'Ac candidats au remplacement par des Ac recombinants. Les anticorps déclarés comme « à remplacer » (n = 36) sont présentés sous forme d'histogramme et regroupés par cible (n = 27, axe des abscisses). Chaque anticorps (axe des ordonnées) est représenté en fonction de sa clonalité. En bleu, sont indiquées les stratégies initiales du FC3R pour chaque cible. La cible marquée (t) a été exclue de l'étude pilote pour des raisons techniques.

RÉSULTATS

Résultats de l'enquête

Douze plateformes nationales d'histotechnologie ont répondu à l'enquête, pour un total de 36 anticorps « à remplacer » dirigés contre 27 protéines cibles. Le FC3R a procédé à l'analyse des différentes réponses, pour interclasser les anticorps « à remplacer » par ordre de priorité en termes de reproductibilité et d'impact 3R (**Figure 1**).

Cinq anticorps dirigés contre cinq cibles distinctes se sont révélés être déjà recombinants. Les déposants ont été contactés pour partager et publier les résultats disponibles (**Figure 1**, histogramme **vert foncé**). Neuf anticorps, ciblant neuf protéines différentes, ont été identifiés comme des monoclonaux. Les fournisseurs ont été sollicités afin de préciser leurs modalités de production (*in vitro* ou *via* des animaux (ascites)) : un anticorps n'était plus commercialisé, six étaient produits *in vitro* (**Figure 1**, histogramme **vert clair**), deux par ascite (**Figure 1**, histogramme **rouge vif**).

Vingt-deux anticorps, ciblant 18 protéines distinctes, sont des polyclonaux et soulèvent donc à ce titre des enjeux à la fois éthiques (principe des 3R) et scientifiques (variabilité, non-spécificité, et manque de reproductibilité) (**Figure 1**, histogramme **rouge foncé**). Les anticorps polyclonaux ainsi que les monoclonaux produits par ascite et déclarés comme « à remplacer » par plusieurs plateformes ont été définis comme prioritaires. Les autres anticorps ont été, sont ou seront intégrés à l'étude, en fonction des disponibilités des plateformes, de l'existence d'alternatives recombinantes et des contraintes budgétaires du FC3R. La caractérisation d'alternatives recombinantes pour les anticorps prioritaires a débuté en septembre 2024 et se poursuivra jusqu'à fin 2026.

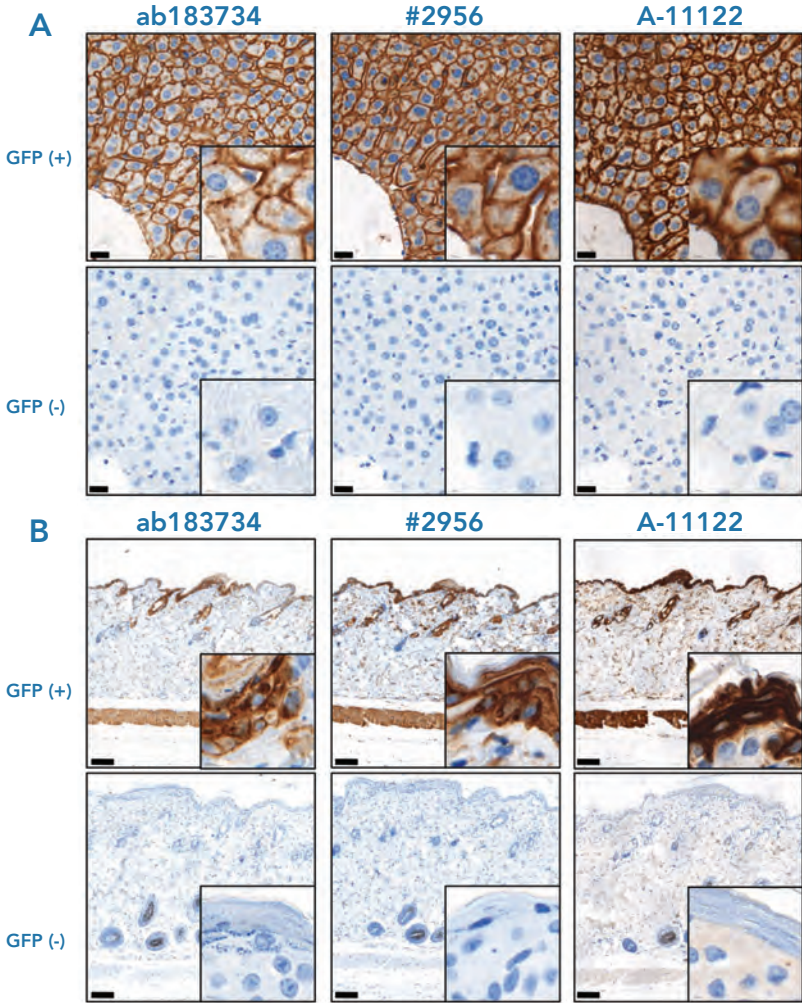


Figure 2 : Comparaison des marquages immunohistochimiques obtenus entre les anticorps recombinants et l'anticorps polyclonal de référence sur les tissus exprimant ou non la GFP. Illustration des marquages obtenus avec les anticorps recombinants ab183734 et #2956 et l'anticorps polyclonal A-11122 sur du foie (A) et de la peau (B) de souris GFP (+) et GFP (-), photos prises à l'objectif x40 (barre d'échelle de 20 µm) et x10 (barre d'échelle de 100 µm) et encadrés à l'objectif x244. Les encadrés représentent, à plus fort grossissement, le marquage des hépatocytes situés près de la veine centro-lobulaire dans le foie et les kératinocytes de l'épiderme de la peau. Les marquages présentés sont obtenus avec des concentrations jugées optimales pour chaque anticorps primaire à savoir 16 µg/mL pour l'anticorps polyclonal A-11122 et respectivement 0,069 µg/mL et 0,035 µg/mL pour les anticorps recombinants ab183734 et #2956.

Évaluation d'anticorps recombinants ciblant la GFP

L'enquête a mis en évidence, pour l'une des plateformes participantes, la nécessité de remplacer un anticorps polyclonal utilisé pour la détection de la protéine fluorescente GFP, largement utilisée comme rapporteur pour déterminer l'expression de gènes et la localisation de protéines. Pour cela, deux anticorps recombinants anti-GFP - ab183734 (Abcam) et #2956 (CST) - ont été testés sur des tissus (peau et foie) de souris transgéniques exprimant ou non la GFP. La spécificité ainsi que l'intensité des marquages obtenus ont été comparées avec celles de l'anticorps polyclonal de référence A-11122 (Invitrogen) (**Figure 2A**).

Comme illustré par la **Figure 2A**, le marquage membranaire des hépatocytes obtenu avec les anticorps ab183734 et #2956 est équivalent à celui obtenu avec l'anticorps polyclonal tant en termes d'intensité de signal que de spécificité. Dans l'épiderme, les marquages obtenus sont également équivalents à celui de l'anticorps de référence même si on note un signal quelque peu plus faible mais avec un très bon rapport signal sur bruit (**Figure 2B**). Quel que soit l'anticorps, on note une absence de marquage sur les tissus témoins négatifs n'exprimant pas la GFP.

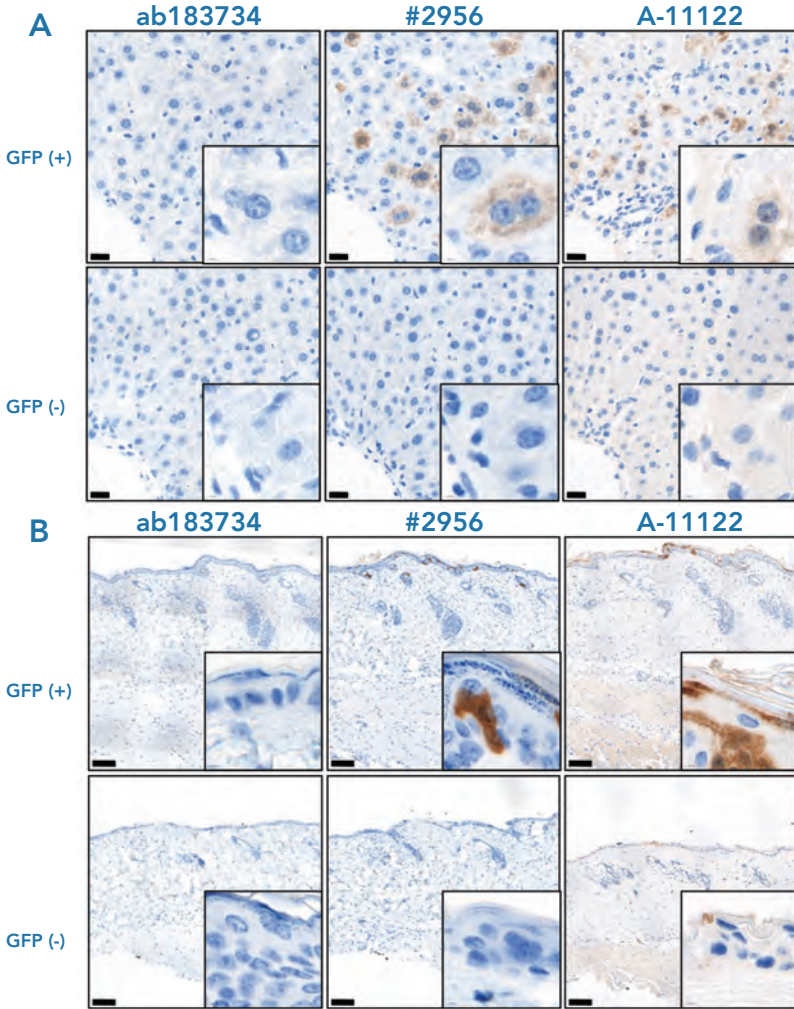


Figure 3: Comparaison des marquages immunohistochimiques obtenus entre les anticorps recombinants et l'anticorps polyclonal de référence sur les tissus exprimant ou non la YFP. Illustration des marquages obtenus avec les anticorps recombinants ab183734 et #2956 et l'anticorps polyclonal A-11122 sur du foie (A) et de la peau (B) de souris YFP (+) et YFP (-), photos prises respectivement à l'objectif x40 (barre d'échelle de 20 μ m) et x10 (barre d'échelle de 100 μ m) et encadrés à l'objectif x244. Les encadrés représentent le marquage des hépatocytes situés près de la veine centro-lobulaire dans le foie et les kératinocytes de l'épiderme à plus fort grossissement. Les marquages présentés sont obtenus avec des concentrations jugées optimales pour chaque anticorps primaire à savoir 16 μ g/mL pour l'anticorps polyclonal A-11122 et respectivement 0,069 μ g/mL et 0,035 μ g/mL pour les anticorps recombinants ab183734 et #2956.

Évaluation d'anticorps recombinants ciblant la YFP

Compte tenu de la possibilité de réactivité croisée entre les anticorps dirigés contre la GFP et la protéine YFP, la cross-réactivité des anticorps anti-GFP avec la protéine YFP a également été étudiée (**Figure 3**). Pour cela, les deux anticorps recombinants ont été testés sur des tissus (peau et foie) de souris transgéniques exprimant ou non la YFP. La spécificité ainsi que l'intensité des marquages obtenus ont été comparées avec celles de l'anticorps polyclonal de référence A-11122.

Comme illustré par la **Figure 3A**, des deux anticorps recombinants, seul l'anticorps #2956 de CST reconnaît la protéine YFP selon un profil similaire à celui obtenu avec l'anticorps polyclonal. Le marquage cytoplasmique des hépatocytes obtenu avec cet anticorps est, à dilution 457 fois plus importante, d'intensité légèrement supérieure à celui obtenu avec l'anticorps polyclonal A-11122. Dans l'épiderme, les marquages obtenus sont identiques entre l'anticorps recombinant #2956 et l'anticorps de référence (**Figure 3B**). Quel que soit l'anticorps, on note une absence de marquage sur les tissus témoins négatifs n'exprimant pas la YFP.

Conditions optimales d'IHC validées pour les anticorps anti-GFP et YFP

Le **Tableau III** synthétise les conditions optimales d'IHC pour les anticorps recombinants testés sur l'automate Ventana Discovery Ultra® de Roche Diagnostics. La référence ab183734 a également été testée sur le Bond RX et des résultats équivalents ont été obtenus avec les kits du fournisseur Leica et un démasquage en tampon pH 9 de Leica (résultats non illustrés).

RÉFÉRENCE	DÉMASQUAGE	ANTICORPS PRIMAIRE	SYSTÈME D'AMPLIFICATION
ab183734	CC1 (pH 8) – 24 min 95 °C	0,069 µg/mL, diluant ST - 60 min 37 °C	Kit OmniMap Lapin HRP
#2956	CC1 (pH 8) – 24 min 95 °C	0,035 µg/mL, diluant ST - 60 min 37 °C	Kit OmniMap Lapin HRP
A11122	Protéase 1 – 4 min 37 °C	16 µg/mL, diluant LB - 60 min 37 °C	Kit Anti-Lapin HQ et Anti-HQ HRP

Tableau III : Protocoles d'immunomarquages validés pour les anticorps recombinants et polyclonaux anti-GFP sur l'Automate Ventana Discovery Ultra® de Roche Diagnostics.

Le tableau ci-dessus montre que les concentrations optimales de travail sont respectivement 232 et 457 fois plus faibles pour les anticorps recombinants ab183734 et #2956 que pour l'anticorps de référence polyclonal A11122. On note par ailleurs que ce dernier nécessite en plus une amplification renforcée de son signal à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un haptène et d'un anticorps tertiaire dirigé contre cet haptène.

Synthèse des résultats préliminaires de l'étude

Comme illustré dans la présente étude pour la cible GFP, plusieurs autres anticorps recombinants ont été évalués par trois plateformes d'histologie françaises en vue de remplacer des anticorps polyclonaux dirigés contre diverses protéines d'intérêts. Le **Tableau IV** présente, pour chacune de ces trois plateformes (APEX, RHEM et atelier interne INRAE St Gilles), les cibles étudiées, les anticorps recombinants testés, les anticorps polyclonaux de référence utilisés pour comparaison, ainsi que les tissus et espèces analysés et les résultats obtenus (**Tableau IV**).

Cible	Anticorps polyclonal de référence	Anticorps testés	Organes et espèces testées	Anticorps validés avec des propriétés d'immunomarquage identiques ou supérieures à l'anticorps polyclonal de référence
Plateforme APEX				
CD3 (cluster de différenciation 3)	A0452 (Dako)	ab16669 (Abcam)	Rate de souris, rat, macaque	ab16669 et #85061 sur les tissus issus des 3 espèces testées.
		#85061 (CST)		
		YTH 12.5 (Absolute Antibody)		
		ABCD_AD036 (ABCD Antibodies)		
GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	Z0334 (Dako)	ab278054 (Abcam)	Cerveau de souris, rat, macaque	ab278054, ABCD_AK148 et #80788 sur les tissus issus des 3 espèces testées.
		ABCD_AK148 (ABCD Antibodies)		
		#80788 (CST)		
Plateforme RHEM				
CD31 (cluster de différenciation 31)	ab28364 (Abcam)	ab182981 (abcam)	Poumons, rate et foie de souris et rat Foie et côlon humains	ab182981 et ab281583 sur les tissus issus des 3 espèces testées. JC70 sur tissus humains uniquement mais avec un rapport signal sur bruit faible.
		ab281583 (Abcam)		
		JC70 (Absolute Antibody)		
		ABCD_AD217 (ABCD Antibodies)		
Ki67	M3064 (AMSBIO)	ab279653 (Abcam)	Intestin et rate de souris Lignée cellulaire humaine exprimant ou non la protéine Ki67	ab279653, ab281583 at MA5-1450 sur tissu de souris et humains. ab281583 donne le meilleur rapport signal sur bruit.
		ab281583 (Abcam)		
		MA5-14520 (Invitrogen)		
Atelier d'histologie interne de l'INRAE de St Gilles				
CHGA (Chromogranin A)	ab45179 (Abcam)	ab283265 (Abcam)	Tissus de porc, souris et rat	ab283265 sur tissus issus des 3 espèces.
		#36468 (CST)		
KRT14 (Kératine 14)	sc-17104 (Santa Cruz)	#49565 (Cell Signaling Tech.)	Cellules et sur tissus de vache, chèvre et truie	ab119695 sur tissu et culture cellulaire 2D de vache ainsi que chez la truie.
		ab119695 (Abcam)		
		2GA (Absolute Antibody)		
		ABCD_AD217 (ABCD Antibodies)		
Occludine	33-1500 (Invitrogen)	ab216327 (Abcam)	Cellules et sur tissus de souris, porc et vache	ab216327 sur tissus de porc mais les résultats sont mitigés chez la vache.
		1-3 (Absolute Antibody)		
		37-5 (Absolute Antibody)		
		#91131 (CST)		

Tableau IV : Synthèse des validations en IHC des anticorps recombinants testés en fonction de 7 cibles identifiées dans l'enquête et obtenus par les trois plateformes françaises participant à cette étude. La dernière colonne de droite liste les Ac recombinants validés et permet ainsi d'estimer le taux global de validation des anticorps recombinants. L'ensemble des résultats obtenus pour ces différentes cibles est consultable sur le site du FC3R (<https://www.fc3r.com/anticorps/>).

Comme indiqué dans le **Tableau IV**, incluant les résultats obtenus pour la cible GFP, 26 anticorps recombinants ont été évalués contre 8 cibles distinctes : CD3, CD31, CHGA, GFP, GFAP, Ki67, KRT14 et Occludine. Parmi eux, 17 ont été validés par les plateformes partenaires pour une utilisation dans leurs conditions expérimentales spécifiques (protocole, espèces, tissus, réactifs, équipements, etc.).

DISCUSSION

Cette étude, visant à démontrer la pertinence des anticorps recombinants comme alternatives des anticorps polyclonaux pour les marquages immunohistochimiques sur tissus, a bénéficié de la contribution de 12 plateformes d'histologie françaises, dont 4 ont été impliquées dans la phase expérimentale. Parmi celles-ci, les résultats de 3 sont en partie présentés dans ce travail. Deux plateformes (APEX et RHEM) ont conduit leurs développements sur automate, tandis que la 3^e, (INRAE St Gilles) a réalisé les essais en manuel. Le taux global de validation des anticorps recombinants s'élève à 65,3 %. Ce qui signifie un taux seulement de 34,7 % de non reconnaissance de la cible testée. Ce pourcentage est inférieur au 50 % rapporté dans la littérature concernant les anticorps produits chez l'animal qui se révèlent non spécifiques ou inadaptés à l'application revendiquée [7-10]. Cette performance peut s'expliquer par une sélection rigoureuse des anticorps, privilégiant ceux validés pour des applications sur coupes tissulaires (immunofluorescence (IF), IHC, P-IHC). Ce taux de réussite apparaît nettement plus élevé dans des conditions dites "standards", lorsque l'espèce cible correspond aux spécifications du fournisseur (82 % soit 14/17). En comparaison, des essais exploratoires réalisés "à l'aveugle" sur des espèces non documentées telles que vache, porc et chèvre (non couvertes par la fiche technique) indiquent un taux de seulement 40 % (4/10). En moyenne, « 3,25 » anticorps recombinants ont été évalués par cible, ce qui a permis d'identifier au moins une alternative fonctionnelle pour chacune d'elles, correspondant à un taux de succès de 100 % à l'échelle des cibles étudiées.

Nous montrons dans cette étude que les anticorps recombinants anti-GFP ab183734 et #2956 constituent une alternative plus sensible pour la détection de l'expression de la GFP en IHC. Des intensités de marquage équivalentes, voire supérieures à celles obtenues avec l'anticorps de référence, sont observées avec des concentrations d'anticorps considérablement plus faibles (un facteur de 232 et 457 pour ab183734 et #2956, respectivement). Nos résultats sont cohérents avec d'autres études qui montrent également, dans des conditions applicatives proches, une meilleure performance et une reproductibilité accrue des anticorps recombinants par rapport aux anticorps usuels non recombinants [16].

Cette observation peut s'expliquer par l'aptitude des Ac recombinants à maximiser la probabilité de détection de leur cible par rapport aux Ac polyclonaux. Dans le cas des *nanobodies*, cela peut également s'expliquer par leur capacité accrue de pénétration tissulaire du fait de leur petite taille. Cependant, à séquence identique, un anticorps recombinant ne présente pas intrinsèquement de performances supérieures à celles d'un anticorps monoclonal d'origine animale.

L'anticorps # 2956 présente par ailleurs, une propriété intéressante à relever de réactivité croisée avec la protéine YFP. Il serait pertinent d'évaluer également la capacité de ces anticorps à reconnaître la protéine, mCitrine, une variante génétiquement modifiée dérivée de la YFP [17]. Par ailleurs, ces deux anticorps recombinants anti-GFP présentent l'avantage de fonctionner avec un démasquage des épitopes par la chaleur (HIER) contrairement à l'anticorps polyclonal de référence qui nécessite un démasquage enzymatique. Le démasquage thermique est généralement privilégié en IHC multiplexée en raison de sa meilleure reproductibilité et de sa capacité à préserver l'intégrité tissulaire, tandis que les méthodes protéolytiques peuvent induire une variabilité accrue et altérer les tissus [18]. Ainsi, ces deux Ac recombinants offrent un atout supplémentaire pour leur intégration dans des protocoles de marquage IHC multiplexé, qu'ils soient séquentiels ou non, ou encore en imagerie de masse (par exemple, avec la technologie Hyperion).

Comme pour les anticorps anti-GFP, la majorité des autres Ac recombinants validés, cités dans cette étude, a systématiquement présenté des performances d'immunomarquage satisfaisantes, voire supérieures à celles des anticorps de référence se traduisant notamment par un signal plus intense, un bruit de fond réduit et une utilisation possible à des dilutions plus élevées ou concentrations plus faibles. Toutefois, l'affirmation selon laquelle les anticorps recombinants présentent des performances d'immunomarquage systématiquement supérieures ou équivalentes, doit être quelque peu nuancée. En effet, les anticorps polyclonaux de référence utilisés dans cette étude correspondent le plus souvent à des réactifs historiquement adoptés par les plateformes, sans garantie qu'ils représentent les solutions les plus performantes actuellement disponibles pour les cibles considérées. Les performances en termes de reproductibilité (entre expériences, entre lots, entre opérateurs ou entre laboratoires), la compatibilité avec les tissus cryoconservés, ainsi que la sensibilité des anticorps (c'est-à-dire leur capacité à détecter des antigènes faiblement exprimés) n'ont pas été évaluées dans cette étude. Leur exploration constituerait néanmoins une perspective pertinente pour approfondir la caractérisation de ces anticorps en immunohistochimie.

La possibilité d'utiliser certains anticorps recombinants à des dilutions plus élevées représente un avantage économique notable pour les plateformes. Le coût par lame peut ainsi être considérablement réduit, jusqu'à un facteur de 22 dans certains cas, comme illustré pour l'anticorps recombinant anti-GFP ab183734 (0,20 € contre 4.45 € pour l'anticorps de référence). Compte tenu des volumes importants d'anticorps consommés en routine sur les plateformes d'histologie, le recours aux anticorps recombinants peut s'avérer particulièrement avantageux sur le plan économique. D'autant plus que souvent pour les anticorps polyclonaux, la variabilité inter-lots liées à des facteurs biologiques (animal, durée d'immunisation, réponse immunitaire) impose des ajustements réguliers de dilution afin de maintenir un marquage reproductible. À l'inverse, la meilleure standardisation des anticorps recombinants limite ces ajustements. En réduisant le nombre d'expériences nécessaires pour obtenir des résultats reproductibles, leur utilisation contribue indirectement à diminuer le recours aux animaux.

Au-delà des aspects scientifiques et opérationnels, l'adoption des anticorps recombinants s'inscrit pleinement dans le respect des exigences éthiques et réglementaires actuelles, notamment à travers les principes des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Les Ac recombinants apparaissent offrir une réponse cohérente aux exigences éthiques et réglementaires contemporaines visant à minimiser la souffrance animale tout en améliorant la qualité des données scientifiques. En se substituant aux anticorps polyclonaux d'origine animale, leur utilisation participe directement au Remplacement des méthodes reposant sur l'immunisation animale. Par ailleurs, leur forte reproductibilité et leur standardisation limitent les besoins de réajustement expérimental, contribuant ainsi à la Réduction du nombre d'expériences nécessaires et, indirectement, du recours aux animaux. Enfin, l'amélioration de la robustesse et de la qualité des marquages s'inscrit dans une logique de Raffinement, en optimisant les protocoles expérimentaux et la fiabilité des données obtenues.

Cette étude démontre d'ores et déjà, à travers huit cibles, la fiabilité des anticorps recombinants comme alternatives aux anticorps d'origine animale en IHC. La démarche engagée et les résultats obtenus ont été valorisés au travers de plusieurs actions de diffusion, incluant des webinaires (FC3R, INRAE), et des congrès (J3R, AFH). Des ressources dédiées, en français et en anglais, leur sont également dédiées sur le site web du FC3R (<http://www.fc3r.com/>). D'autres actions de valorisation sont en cours telles que des campagnes de communication sur les réseaux sociaux, la rédaction d'articles scientifiques (*Short Notes ou Antibody Reports*), ainsi que l'intégration des données dans les bases de données spécialisées et chez les fournisseurs.

Par exemple, une *Short Note*, consacrée à la caractérisation des anticorps anti-KRT14, met en évidence la qualité des marquages obtenus avec ces anticorps recombinants sur des tissus d'espèces moins couramment étudiées telles que des animaux de ferme [19]. Enfin, de nouvelles caractérisations (CD68, CD4, Dystrophine, Laminine, MUC2, Collagène VII, etc....) viendront compléter ces travaux et renforcer l'évidence que les anticorps recombinants constituent une alternative à la fois scientifiquement robuste et éthiquement responsable.

Une perspective pertinente à ces travaux de transition vers des pratiques plus robustes et plus responsables sur le plan éthique, serait d'étendre cette démarche aux anticorps secondaires, pour lesquels des alternatives recombinantes sont désormais disponibles (anti-mouse ou anti-rabbit recombinants, Ac secondaires basés sur *nanobodies* pour immunofluorescence). Notamment des alternatives recombinantes aux anticorps secondaires sous forme de *nanobodies* anti-IgG, ont récemment été développées et validées pour diverses applications, dont l'immunofluorescence et l'imagerie à haute résolution [20-22]. Bien que leur offre reste à ce jour plus limitée et souvent plus coûteuse que celle des anticorps habituels, leur développement rapide laisse entrevoir un potentiel important d'adoption dans les années à venir.

CONCLUSION

Ainsi, l'intégration progressive des anticorps recombinants ne constitue pas seulement une évolution technologique, mais bien un changement de paradigme, conciliant excellence scientifique, reproductibilité des résultats et engagement concret en faveur du bien-être animal. Elle met également en lumière le rôle central des praticiens de l'histologie, dont l'expertise technique, la capacité à optimiser les protocoles et l'exigence de qualité sont essentielles pour exploiter pleinement ces innovations, garantir la fiabilité des données produites et ouvrir la voie à leur adoption par d'autres utilisateurs d'anticorps dans des domaines variés.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le GIS FC3R. Le FC3R remercie les membres du bureau de l'AFH pour leur accompagnement et leurs conseils précieux ainsi que les fournisseurs collaborateurs pour leurs gestes commerciaux et leur soutien. Nous remercions particulièrement les plateformes APEX, l'atelier d'histologie de l'INRAE de St Gilles, le RHEM pour leurs expertises en histologie et leur investissement. Le RHEM bénéficie du soutien de REACT-EU (Recovery Assistance for Cohesion and the Territories of Europe), de l'IBiSA, de la Ligue contre le cancer, de la région Occitanie / Pyrénées-Méditerranée, de l'université de Montpellier et du GIS FC3R, dont les fonds sont gérés par l'Inserm.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BURNS R. Immunisation strategies for antibody production. *Methods Mol Biol*, 2009,**508** 27-35.
- [2] LEENAARS M. & HENDRIKSEN C.F. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar j*, 2005,**46** (3): 269-279.
- [3] VIEGAS BARROSO J.F., HALDER M.E. & WHELAN M. EURL ECVAM recommendation on non-animal-derived antibodies. Publications Office of the European Union, 2020.
<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC120199>
- [4] THOMPSON M.K., et al. Optimizing selection of large animals for antibody production by screening immune response to standard vaccines. *J Immunol Methods*, 2016,**430** 56-60.
- [5] GRAY A., et al. Animal-free alternatives and the antibody iceberg. *Nature Biotechnology*, 2020,**38** (11): 1234-1239. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0687-9>
- [6] LEENAARS P.P.A.M., et al. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Laboratory Animals*, 1998,**32** (4): 387-406.
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367798780599884>
- [7] BAKER M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*, 2015,**521** (7552): 274-276. <https://doi.org/10.1038/521274a>
- [8] BERGLUND L., et al. A Genecentric Human Protein Atlas for Expression Profiles Based on Antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008,**7** (10): 2019-2027.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535947620312834>

- [9] BRADBURY A. & PLÜCKTHUN A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature*, 2015,**518** (7537): 27-29. <https://doi.org/10.1038/518027a>
- [10] WELLER M.G. Quality Issues of Research Antibodies. *Anal Chem Insights*, 2016,**11** 21-27.
- [11] BIDDLE M., et al. Improving the integrity and reproducibility of research that uses antibodies: a technical, data sharing, behavioral and policy challenge. *mAbs*, 2024,**16** (1): 2323706. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2323706>
- [12] DANGER Y. Revue des méthodes actuelles d'obtention des anticorps monoclonaux pour un usage diagnostique. *Revue française d'histotechnologie*, 2025,**37** (1): 171-187. <https://www.afhisto.fr/revue/2025-8>
- [13] RUSSELL W.M.S. & BURCH R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1960,1.
- [14] REMINGTON S.J., et al. zFP538, a Yellow-Fluorescent Protein from *Zoanthus*, Contains a Novel Three-Ring Chromophore. *Biochemistry*, 2005,**44** (1): 202-212. <https://doi.org/10.1021/bi048383r>
- [15] MANSOURI H., et al. Les bonnes pratiques, outils et astuces pour la mise au point d'anticorps en immunohistochimie (synthèse table ronde, congrès AFH, Saint-Malo 2024). *Revue française d'histotechnologie*, 2025,**37** (1): 189-203. <https://www.afhisto.fr/revue/2025-9>
- [16] AYOUBI R., et al. Scaling of an antibody validation procedure enables quantification of antibody performance in major research applications. *Elife*, 2023,**12**.
- [17] GRIESBECK O., et al. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: MECHANISM AND APPLICATIONS*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001,**276** (31): 29188-29194. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820803858>
- [18] PARRA E.R., et al. Procedural Requirements and Recommendations for Multiplex Immunofluorescence Tyramide Signal Amplification Assays to Support Translational Oncology Studies. *Cancers (Basel)*, 2020,**12** (2): 255; <https://doi.org/10.3390/cancers12020255>
- [19] WIART-LETORT S. & FINOT L. Two recombinant antibodies recognize (cyto)keratin 14 by immunofluorescence in farm animals (cow, goat and swine) Deux anticorps recombinants reconnaissent la (cyto)kératine 14 par immunofluorescence chez les animaux d'élevage (vaches, chèvres et porcs). 2025: n.p. <https://hal.science/hal-05285752>

[20] PLEINER T., BATES M. & GÖRLICH D. A toolbox of anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary nanobodies. *Journal of Cell Biology*, 2017,**217** (3): 1143-1154. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709115>

[21] SHENG W., *et al.* Development of SNAP-Tag Based Nanobodies as Secondary Antibody Mimics for Indirect Immunofluorescence Assays. *Cells*, 2025,**14** (10): 691. <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/10/691>

[22] SOGRATE-IDRISSI S., *et al.* Circumvention of common labelling artefacts using secondary nanobodies. *Nanoscale*, 2020,**12** (18): 10226-10239. <http://dx.doi.org/10.1039/D0NR00227E>

RESSOURCES INTERNET – SITE WEB

AFH : <https://www.afhisto.fr/>

Avis sur l'utilisation d'anticorps d'origine animale ou non-animale : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2022-11/avis-sur-l-utilisation-d-anticorps-d-origine-animale-ou-non-animale-valid-le-7-novembre-2022--25402.pdf>

CNREEA: <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2022-11/avis-sur-l-utilisation-d-anticorps-d-origine-animale-ou-non-animale-valid-le-7-novembre-2022--25402.pdf>

CiteAb : <https://www.citeab.com/>

Directive 2010/63/EU :

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>

EURL ECVAM : https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam/eurl-ecvam-faqs/frequently-asked-questions-eurl-ecvam-recommendation-non-animal-derived-antibodies_en

FC3R : <http://www.fc3r.com/>

Pages « Anticorps » du site FC3R : <https://www.fc3r.com/anticorps/>

Plateforme APEX : <https://anatomie-pathologique-sante-animale.hub.inrae.fr/>

Plateforme Atelier Histo de l'Inrae de St Gilles : <https://pegase.rennes.hub.inrae.fr/recherche/ateliers-de-laboratoire/atelier-histologie2>

Plateforme RHEM : <https://www.rhem.cnrs.fr/>

Recombinant Antibodies & Mimetics Database :

<https://antibodies.humanspecificresearch.org/>

ENJEUX DES DONNÉES ÉLECTRONIQUES D'HISTOPATHOLOGIE À L'HEURE DE L'INTELLIGENCE ARTIFICIELLE: IMPORTANCE DE LA COOPÉRATION ENTRE MÉTIERS

(Synthèse table ronde, Congrès AFH, Grasse 2025)

OTTINI Marie-Christine

Evoquap, 75 avenue Amiral de Grasse, 06530, Peymeinade, France

Auteur correspondant: mcottini@evoquap.fr

OPEN ACCESS 

Received: November 21, 2025

Revised: February 23, 2026

Accepted: February 24, 2026

Published: June, 2026

 **CC BY-NC 4.0**

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.121

CHALLENGES OF ELECTRONIC HISTOPATHOLOGY DATA IN THE AGE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE: THE IMPORTANCE OF CROSS-DISCIPLINARY COLLABORATION

(Round table report, AFH congress, Grasse 2025)

ABSTRACT

Digital tools and Artificial Intelligence arrived in histopathology. They are attractive and useful but we may face some tough problems such as the data reliability and therefore their compliance. To sort this out, it is necessary that users, quality assurance and information technology units work together.

KEY WORDS

Archiving, Artificial Intelligence, Certification, Data, Histology, Quality System, Validation.

RÉSUMÉ

Les outils informatisés et l'Intelligence Artificielle sont omniprésents dans nos métiers. Ils sont très attractifs. Cependant à l'utilisation, ils présentent des difficultés au départ insoupçonnées. Notamment, vient la question de la fiabilité des données générées et par là-même de leur conformité réglementaire. Il est nécessaire que les utilisateurs, l'assurance qualité et les services informatiques travaillent en collaboration pour pallier les écueils rencontrés.

MOTS CLÉS

Archivage, Certification, Données, Histologie, Intelligence Artificielle, Système Qualité, Traçabilité, Validation.

INTRODUCTION

L'informatisation omniprésente dans nos métiers s'accompagne d'enjeux importants de fiabilité, de traçabilité et de lisibilité à long terme, et plus généralement de recevabilité réglementaire des données conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Des lignes directrices existent pour nous guider dans la validation des systèmes informatisés, préalable indispensable à leur utilisation. Ce sont généralement les informaticiens et les qualitatifs qui possèdent la maîtrise de ces référentiels. Ils doivent travailler ensemble et avec les utilisateurs afin d'établir la fiabilité du processus électronique pour toute la durée de vie de la donnée.

L'intelligence artificielle (IA) apporte une nouvelle aide aux pathologistes et de nouveaux risques.

Les discussions proposées au cours de ces tables rondes ont porté sur des exemples d'utilisation de l'informatique dans l'analyse des données de pathologie, de leur intérêt, des problématiques associées et des solutions d'avenir.

LES POINTS DE DISCUSSION

Gérer le projet d'acquisition du système

Les outils informatisés sont omniprésents dans nos métiers: préparation d'échantillons, analyse d'image, applications multi-omiques, histologie numérique en sont quelques exemples, avec une percée en forte croissance de l'IA.

Les utilisateurs peuvent cependant rencontrer des freins ou des points de blocage à l'acquisition de systèmes, parmi lesquels :

- **Manque de confiance** de la part de la direction dans les systèmes hébergés, donc *a fortiori* dans l'IA, pour des raisons de sécurité et de confidentialité.
- **Comment assurer la sécurité et la confidentialité des données ?**

Or, l'utilisation de « *clouds* », systèmes hébergés sur des serveurs distants, est désormais incontournable et les autorités de tutelle en acceptent l'utilisation en Bonnes Pratiques réglementaires (BPx), à condition de les valider. La validation est effectuée conjointement avec les services informatique et qualité, chacun apportant son expertise. La validation du *cloud*, à l'instar d'un logiciel, assure l'intégrité et la sécurité des données. Il ne doit donc plus y avoir de blocage à ce sujet.

La mise en place d'un outil de gestion informatisé peut aussi être freinée par les utilisateurs eux-mêmes: blocage au changement, temps à y consacrer.

Dans tous les cas, il faut fonctionner selon les fondamentaux de la gestion de projet: définir les besoins, s'assurer de choisir la solution qui y répond, lister les tâches à effectuer et les ressources associées, le coût, en se ménageant des marges de sécurité pour les imprévus. Il faut embarquer l'équipe: communiquer à toutes les étapes du projet, échanger, tenir compte de l'avis des parties prenantes, leur permettre de s'approprier le système.

Il faut aussi pouvoir évoluer avec l'évolution technique quasi annuelle des outils développés par l'IA.

Hébergement et archivage

Viennent ensuite des questions sur l'hébergement et l'archivage des données:

- **Hébergement interne versus externe**

- **Archivage: quelle responsabilité de la plateforme? Quelle durée d'archivage?**

Les données et spécimens appartiennent au donneur d'ordre/sponsor (celui qui paie).

Dans le cadre des BPL, les données doivent être archivées sur le site qui les génère. Cela permet au site de continuer à être certifié lorsque les inspecteurs viennent examiner les études réalisées. Les autorités demandent un archivage sur site pendant 3 cycles d'inspection, soit 9 ans. Il est aussi possible de les archiver ailleurs (chez le sponsor ou autre site d'archivage qualifié) à condition d'être en capacité de les rapatrier pour l'inspection dans un délai court (24h) sans risque d'altération. Le lieu et la durée d'archivage doivent être mentionnés dans le rapport d'étude. À l'issue de la période, le donneur d'ordre et le prestataire se mettent d'accord sur le devenir des données et spécimens archivés.

En dehors du cadre des BPL, il s'agit d'un accord contractuel entre le donneur d'ordre et la plateforme.

- **En histologie, que doit-on conserver ?**

En BPL, les spécimens c'est-à-dire les organes en pots de formol, les blocs et les lames doivent être conservés aussi longtemps qu'ils sont stables. Hors BPL, c'est selon le souhait du client ou du centre de recherche, en fonction des enjeux du projet.

Les lectures des pathologistes sont des données brutes BPL donc à conserver.

- **L'archivage des lames peut représenter un gros volume. Peut-on en conserver des photos ?**

Ceci est accepté en Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) (études cliniques), pas en BPL (toxicologie).

En BPL, les copies numériques ne peuvent être conservées en tant que données brutes seulement si la preuve est apportée qu'elles constituent le reflet exact, complet et fidèle des données sources.

Fiabilité et traçabilité des données

- **Automates de laboratoire** : certes les logiciels sont validés mais qu'en est-il de la fiabilité de la mesure ?

Les automates doivent être qualifiés au même titre que tout instrument de laboratoire : balance, pipette, détecteur...

Les logiciels utilisés en histologie, par exemple en immuno-marquage doivent permettre la traçabilité et être validés sur ce point, depuis l'animal (ou le patient) jusqu'à l'analyse, que les processus soient papier, électronique ou hybride.

- **Le cahier de laboratoire électronique**

Il permet de tracer les manipulations réalisées ainsi que les équipements, les réactifs, les opérateurs, à l'instar du cahier de laboratoire "papier". Le cahier électronique offre la possibilité de retrouver de manière simple et rapide l'ensemble des données rattachées à un projet.

- **Les feuilles Excel**

Il faut démontrer que la feuille Excel et/ou le logiciel de calcul présentent des résultats fiables.

Solutions de gestion documentaire

- **Quelles applications/logiciels utiliser ?**

Il existe plusieurs outils de GED (Gestion Electronique des Documents) sur le marché. Pour choisir, vous devez d'abord définir vos besoins.

Le site de l'AFH met à disposition un forum dédié permettant aux membres d'échanger et de partager leurs retours d'expérience. (<https://www.afhisto.fr/forum-2025>). Cet outil constitue une ressource utile pour recueillir des avis sur des solutions déjà éprouvées.

Entraînement et validation d'une intelligence artificielle

- **Comment valider une IA ?**

La démarche est identique à celle d'une validation de logiciel :

1. Définir le cahier des charges / URS (*User Requirement Specification*).
2. Rédiger puis dérouler des scripts de tests.
3. Corriger/conclure.

Pour la lecture en histologie, l'étape 2 se décompose en 3 étapes effectuées sur des groupes de lames différentes qui sont :

- a) Training de l'IA.
- b) Validation aussi appelée « *tuning* » pour la différencier de la validation informatique.
- c) Tests : résultat contre l'analyse du pathologiste à partir de lames standards de référence.

Une IA évolue au cours du temps sans qu'on en ait le contrôle. Il est donc important de dater les paramètres du modèle testé. Les tests de validation effectués ne sont valables que dans le contexte des paramètres à cette date.

Une IA ne doit pas être une boîte noire. Vous devez savoir comment vos données sont traitées. Il existe des articles sur l'explicabilité des modèles. On peut les trouver sur Internet.

L'approche processus est une démarche pour vous aider en ce sens : vous définissez les données d'entrée/la question posée, les données de sortie/réponses de l'IA. Puis vous schématisez ce qu'il se passe entre les deux, comment les données d'entrée sont transformées en données de sortie. À partir de ce schéma, vous réalisez une analyse de risque à chaque étape : quelles sont les risques que le processus me donne une information erronée ? Veillez à identifier les risques aux interfaces là où les erreurs sont les plus fréquentes.

La validation d'un logiciel ou d'une IA doit être conduite en collaboration avec les utilisateurs, le service Informatique et l'Assurance Qualité. Cette concertation permettra de définir le niveau de qualité attendu.

Systèmes qualité et certifications

- **Bonnes Pratiques réglementaires (BPx) versus International Organization for Standardization (ISO)**

Un système qualité est un ensemble de dispositions qui permet de répondre aux exigences réglementaires. Les BPL sont obligatoires pour les études de sécurité non-cliniques, les BPC pour les études cliniques, les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) pour la fabrication des médicaments humains ou vétérinaires. Les autorités de tutelle certifient BPL un laboratoire après une première étude de sécurité non-clinique, au vu des données, attestant de la conformité des études réalisées, ne s'engageant pas sur celles à venir.

ISO 9001 est une norme non obligatoire, choisie par l'entreprise.

ISO 17025 réunit les principes de l'ISO 9001 et des BPL, très utile pour les laboratoires d'analyse.

Il existe d'autres normes ISO spécifiques pour la Cosmétique, les dispositifs médicaux...

- **Normes applicables aux outils informatiques**

Il en existe plusieurs. Notamment pour la cybersécurité (ISO 27001), les coffres électroniques... (voir ci-dessous dans la liste des références réglementaires fournies).

CONCLUSION

Cette table ronde a permis de revisiter les principaux points à considérer concernant la fiabilité des données générées en histologie numérique et, par conséquent, leur conformité réglementaire. Il en ressort qu'il est essentiel de définir, en concertation avec les équipes informatiques et l'assurance qualité, le niveau de qualité acceptable au regard des besoins, des risques et des enjeux propres à chaque projet.

REMERCIEMENTS

À Nicole Bordier (Bayer Cropscience) pour la co-animation de la première table ronde.
À Erio Barale-Thomas (J&J) pour la co-animation de la deuxième table ronde.

RÉFÉRENCES

<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-use-artificial-intelligence-support-regulatory-decision-making-drug-and-biological>

WHO. (2024). *WHO Ethics governance AI for health - Guidance on large multi-modal models*.

OECD. (2023). Advancing accountability in AI. Governing and managing risks throughout the lifecycle for trustworthy ai.

https://legalinstruments.oecd.org/en/instruments/OECD-LEGAL-0449#_ga=2.146748404.1136144054.1560323227-292976604.1559739428

<https://ec.europa.eu/digital-single-market/en/news/ethics-guidelines-trustworthy-ai>

<https://ec.europa.eu/digital-single-market/en/news/definition-artificial-intelligence-main-capabilities-and-scientific-disciplines>

ENREGISTREMENT DES DONNÉES DE TOXICOLOGIE SUR L'ANIMAL DANS L'INDUSTRIE (RITA): GUIDES POUR L'ÉCHANTILLONNAGE ET LA RECOUPE DE SPÉCIMENS CHEZ LE RAT ET LA SOURIS

(Synthèse table ronde, Congrès AFH, Grasse 2025)

GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela¹, BORDIER Nicole¹,
BARALE-THOMAS Erio², ACCART Nathalie³

¹ Bayer SAS - Crop Science Division
Pathology → Mechanistic Toxicology
55 rue Dostoievski - 06560 Sophia Antipolis - France

² Johnson & Johnson - Beerse – Belgique
ORCID: [0000-0002-3799-5692](https://orcid.org/0000-0002-3799-5692)

³ Novartis Pharma AG – Biomedical Research
Diseases of Aging and Regenerative Medicines
Postfach - CH-4057 - Bâle - Suisse
ORCID: [0000-0002-7981-2866](https://orcid.org/0000-0002-7981-2866)

Auteur correspondant: marciarafaela.goncalvesmachado@bayer.com


OPEN ACCESS 

Received: January 27, 2026

Revised: March 10, 2026

Accepted: April 16, 2026

Published: June, 2026

 **CC BY-NC 4.0**

© Association Française d'Histotechnologie 2026

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

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.131

REGISTRY OF INDUSTRIAL TOXICOLOGY OF ANIMAL-DATA (RITA): GUIDANCES FOR SPECIMEN SAMPLING AND TRIMMING IN RATS AND MICE

(Round table report, AFH congress, Grasse 2025)

ABSTRACT

Research has provided protocols and methodological advances that directly address best practices for preserving tissue integrity during organ sampling in rats and mice for regulatory toxicity studies. All of these informations have been collected in documentation under the name of Registry of Industrial Toxicology of Animal-data or RITA. These results focus on optimizing tissue processing, imaging, and analytical techniques to maintain the structural and molecular fidelity of various tissue types. Guides for organ sampling and trimming in rats and mice provide comprehensive instructions for standardizing and improving the quality of tissue preparation in regulatory toxicity studies [1].

This effort is an important aspect of standardisation, which allows the comparability of histopathological evaluations across different studies within the same laboratory or between laboratories. Detailed instructions are also provided, such as the optimal location for tissue preparation, sample size, section orientation, and number of sections to be prepared. Specific guidelines cover various organ systems in a series of three initial articles [2, 3, 4]. The guides also provide technical guidance for preparatory techniques during autopsy, fixation and recut, facilitating daily work in the histotechnology laboratory and promoting intra- and inter-study reproducibility [5].

These guides will be presented, and we will discuss the benefits of implementing these recommendations in the lab and the constant advances in this field.

KEY WORDS

RITA, Sampling, Trimming, Specimen.

RÉSUMÉ

De très nombreuses recherches ont fourni des protocoles et des avancées méthodologiques qui abordent directement les meilleures pratiques pour préserver l'intégrité des tissus lors de l'échantillonnage d'organes chez le rat et la souris dans le cadre des études de toxicologie réglementaire. Toutes ces informations ont été collectées dans une documentation connue sous le nom de Registry of Industrial Toxicology of Animal-data ou RITA. Ces résultats mettent l'accent sur l'optimisation du traitement des tissus, de l'imagerie et des techniques analytiques pour maintenir la fidélité structurale et moléculaire de divers types de tissus. Les guides pour l'échantillonnage et la recoupe d'organes chez le rat et la souris fournissent des instructions complètes pour normaliser et améliorer la qualité de la préparation des tissus dans les études de toxicité réglementaires [1].

Cet effort constitue un aspect important de la standardisation, qui permet alors la comparabilité des évaluations histopathologiques à travers différentes études au sein d'un même laboratoire ou entre laboratoires. Des instructions détaillées sont aussi fournies, comme la localisation optimale pour la préparation des tissus, la taille de l'échantillon, l'orientation de la section et le nombre de sections à préparer. Des directives spécifiques couvrent divers systèmes d'organes dans une série de trois articles initiaux [2, 3, 4]. Les guides fournissent également des conseils techniques pour les techniques préparatoires lors de l'autopsie, de la fixation et de la recoupe, facilitant les techniques de routine et favorisant la reproductibilité intra et inter-études [5].

Ces guides seront présentés et nous débattrons des avantages liés à la mise en place de ces recommandations au sein du laboratoire ainsi que des avancées constantes dans ce domaine.

MOTS CLÉS

Échantillonnage, Recoupe, RITA, Spécimen.

DÉFINITION

Registry of Industrial Toxicology of Animal-data (RITA) est un registre de données en toxicologie animale qui permet de centraliser la collecte de données historiques issues d'animaux témoins utilisés dans les études de cancérogénicité des rongeurs provenant de différents laboratoires, en exploitant l'expertise et les ressources partagées. Bien qu'ils travaillent en collaboration avec NACAD (North America Control Animal Database) et INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria), nous retenons essentiellement le nom RITA, qui représente l'initiative phare de ce partenariat. De ce registre en découle un guide qui a été mis en place afin de standardiser la réalisation des prélèvements histologiques au cours de l'autopsie et de la recoupe des prélèvements.

Bien que l'idée première de RITA était de standardiser la recoupe des tissus issus d'études de carcinogénèse, les guides ont été également utilisés dans les études de toxicologie en général. Les données RITA sont le fruit d'une coopération internationale unique entre des entreprises chimiques et pharmaceutiques et une organisation à but non lucratif. Il est géré par l'Institut Fraunhofer de toxicologie et de médecine expérimentale (ITEM) de Hanovre [5]. L'examen inter-organisationnel des études signifie que l'évaluation histopathologique des spécimens (en particulier des tumeurs) répond à des normes optimisées en matière de fiabilité, de robustesse et de qualité.

RITA est bien plus qu'une archive de données. L'effort conjoint des participants, appartenant pour la plupart à des départements de toxicologie et de sécurité de grandes sociétés pharmaceutiques, a permis de créer une plateforme de communication, sur laquelle se déroulent des examens microscopiques avec des microscopes à plusieurs têtes ainsi que des tables rondes, réunions d'experts pour la conduite et l'évaluation des études de cancérogénicité chez les rongeurs, y compris la conception de l'étude, les procédures techniques, les approches de diagnostic, le développement de la plateforme matérielle de base de données et la reconnaissance par les organismes de réglementation dont la majorité des participants font partie.

Grâce à ces caractéristiques, RITA facilite la normalisation des prélèvements pour l'analyse histopathologique des études de toxicologie, incluant des informations sur des niveaux de coupes spécifiques de certains organes. De telles études sont demandées par les autorités réglementaires dans le cadre de l'évaluation des risques chimiques ou pharmaceutiques pour l'homme.

ORGANISATION



L'objectif de RITA est d'optimiser la comparabilité et l'interprétation des données. Pour cela, RITA répond à 3 défis majeurs : la collecte, l'analyse et l'accessibilité des données sur les animaux dans l'industrie. L'architecture du site web [6] et l'interface utilisateur permettent d'accéder aux pages publiques concernant les autopsies et la recoupe ainsi que la nomenclature et les critères diagnostiques en pathologie toxicologique [7].

La collecte de données est standardisée grâce à la plateforme, ce qui garantit une cohérence dans les informations recueillies. Les données sont accessibles grâce à leur centralisation, ce qui permet à tous les acteurs de l'industrie de collaborer plus efficacement. Des outils d'analyse avancés sont proposés par RITA. Ils englobent entre autres la conception des études, les procédures techniques, les approches de diagnostic et sont reconnus par les agences de réglementation. Cela facilite l'intégration et la comparaison des données à travers différents systèmes et régions géographiques.

Les idées ont été présentées et commentées au fur et à mesure, suscitant des discussions portant sur des retours d'expérience très riches et complémentaires. Grâce à ces exercices d'intelligence collective toute une liste de bonnes pratiques a pu être collectée et chaque session s'est terminée par la conviction d'actions possibles, simples, pratiques et souvent économiques.

EXEMPLES D'APPLICATION

Les techniques standardisées et la reproductibilité des résultats qui en découle sont un bénéfice pour les chercheurs aussi bien dans l'industrie que dans la recherche académique. L'amélioration de la qualité des données en autopsie et en histologie, la facilitation de la collaboration entre les chercheurs permettent l'optimisation des processus de recherche et développement.

Nous exposons ici l'exemple de la gestion d'un échantillon de cerveau. Le site RITA [6] permet l'accès en cliquant sur l'icône  à une liste d'organes ou sur l'icône  à une liste de systèmes (respiratoire, gastro-intestinal, etc.).

Chaque page est ensuite organisée de la même manière avec les espèces étudiées, les parties observées, les localisations de chaque partie, les sections et leur orientation, des remarques concernant l'enrobage par exemple. Chaque planche contient des images macroscopiques orientées et contenant des indications pour la recoupe (**Figure 1**).

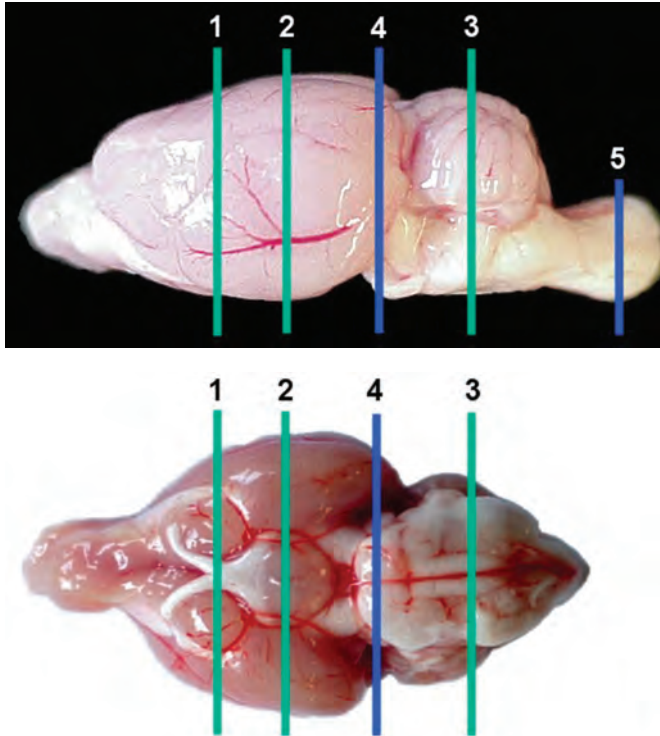


Figure 1 : Cerveau de souris en vue latérale (haut) ou en vue ventrale (bas). Les localisations de recoupe sont matérialisées par les lignes verticales de 1 à 5. La localisation 1 correspond au chiasma optique, 2 à la base de l'hypothalamus postérieur, 3 se situe à mi-cervelet et moelle allongée, les localisations optionnelles sont 4 sur le pont au milieu de sa protrusion et finalement 5 pour la moelle épinière crâniale cervicale.

Puis la planche suivante correspond aux coupes histologiques réalisées après inclusion en paraffine des tranches de cerveau dont la face antérieure a été placée au fond des moules d'inclusion, les rendant directement accessibles (**Figure 2**).

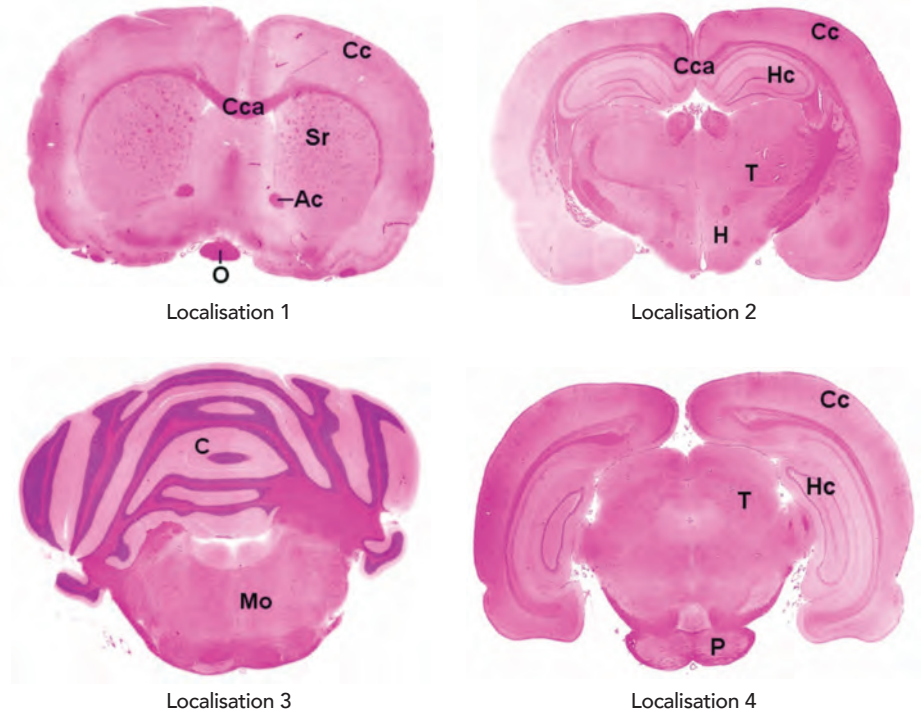


Figure 2 : Coupes histologiques de cerveau de souris colorées à l'Hémathoxyline-Eosine. Encéphale en localisation 1, encéphale en localisation 2, cervelet et moelle allongée en localisation 3, et finalement encéphale et pont en localisation 4. Abréviations utilisées : **Ac:** commissure antérieure, **C:** cervelet, **Cc:** cortex cérébral, **Cca:** corps calleux, **H:** hypothalamus, **Hc:** hippocampe, **Mo:** moelle allongée, **O:** chiasma optique, **P:** pont, **Sr:** striatum, **T:** thalamus.

Puis suivent les recommandations comme par exemple des informations sur les moules pour une aide à la recoupe précise (**Figure 3**).

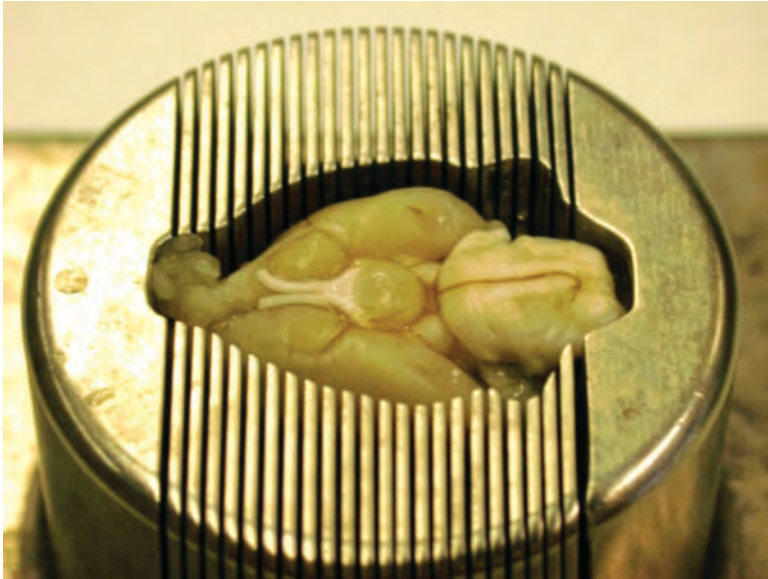


Figure 3 : Moule pour la recoupe coronale de cerveau (Coronal Brain Matrix System, Semrau GmbH und Co, 45549 Sprockhoevel, Germany).

On trouve aussi les recommandations pour l'usage de ce type de coupes comme le choix de l'axe de recoupe, coronal ou sagittal (transversal) afin de rechercher des caractéristiques qui sont plutôt uni- ou bilatérales et symétriques ou non. De même le choix des aires cérébrales d'intérêt peut être dicté par le fait que la neurotoxicité, incluant l'oncogénicité, sont plutôt retrouvées dans certaines régions du cerveau comparées à d'autres régions. Pour finir, des références sont aussi listées ainsi que les indications des autorités de santé.

Prenons un autre exemple de standardisation qui concerne les données quantitatives sur la prolifération cellulaire qui est partie intégrante de l'évaluation des risques de nombreux composés pharmaceutiques, chimiques et agrochimiques. Il n'existait pas de guides techniques pour la réalisation d'études sur la prolifération cellulaire jusqu'à ce qu'un groupe de travail RITA-CEPA (Cell Proliferation and Apoptosis) constitué de pathologistes se forme dans le but d'élaborer des recommandations pour la réalisation d'études sur ce sujet.

C'est ainsi qu'un guide général BrdU ainsi que les guides spécifiques aux organes pour les hépatocytes, les cellules folliculaires de la glande thyroïde et les cellules épithéliales tubulaires rénales chez le rat ont vu le jour. Aujourd'hui, RITA-CEPA dispose de guides pour les études de prolifération des cellules BrdU dans 20 organes ainsi que pour les études avec le PCNA comme marqueur de prolifération et pour les études d'apoptose avec la technique TUNEL. Les informations pertinentes provenant de plus de 500 publications sélectionnées sont organisées dans une structure de base de données afin de faciliter la traçabilité. Les membres du groupe CEPA continuent leur travail par la préparation des guides d'organes et élargiront la série pour d'autres marqueurs de prolifération, par exemple le Ki-67. L'adhésion au groupe CEPA est ouverte à toutes les organisations industrielles qui développent des produits chimiques, agrochimiques ou pharmaceutiques [8].

DÉFIS ET PERSPECTIVES

Il existe des défis liés à l'implémentation de RITA. En effet cela nécessite de la formation et l'adoption de nouvelles méthodologies, changements qui peuvent introduire certains coûts. RITA est un exemple concret d'évolution constante de ce type de pratiques de laboratoire. Mais ce n'est pas le seul. L'évolution et l'amélioration des techniques sont constamment décrites dans les publications. Ainsi sont décrits l'Histo-LOOP, nouvel outil d'enrobage en paraffine des tissus creux, remplaçant la technique du "Swiss Roll" [9] ou plus récemment des études d'optimisation du traitement du tissu et des protocoles de préservation des tissus [10, 11, 12]. L'intégrité du tissu osseux est obtenue par un protocole détaillé pour l'analyse *ex vivo* de l'os. Le protocole met l'accent sur une manipulation, une fixation et un traitement soigneux des tissus afin de préserver la structure osseuse et la composition cellulaire, garantissant une évaluation précise de l'intégrité osseuse [10]. L'échantillonnage du nerf optique chez les rongeurs est obtenu par un protocole qui décrit des méthodes précises de dissection, post-fixation et cryosection. L'utilisation de cryosections longitudinales et de microscopie électronique en coupe transversale, combinée à une coloration immunohistochimique, est mise en avant pour maintenir l'intégrité de la myéline et des axones, permettant une évaluation pathologique régionale fiable [11]. Enfin la manipulation optimale des tissus musculaires permet le traçage de la lignée macrophagique pour les macrophages associés à la régénération dans les muscles squelettiques de souris.

Le protocole détaille les étapes des blessures musculaires, du traitement des tissus et de l'isolation cellulaire. Le protocole souligne l'importance de l'induction standardisée des blessures, du traitement rapide des tissus et de l'isolement cellulaire doux pour préserver l'intégrité tissulaire et cellulaire lors du phénotypage en aval [12].

CONCLUSION

La discussion au cours de cette table ronde a mené nos participants à exposer les difficultés de standardisation au sein de leurs laboratoires, et à mentionner leur intérêt pour les techniques exposées. Nous espérons avoir suscité la curiosité de nos congressistes pour ces techniques et leur intérêt à les implémenter au sein de leurs structures. Nous avons également proposé de publier des articles similaires pour l'application des recommandations RITA sur d'autres espèces d'animaux de laboratoire, afin d'étendre ces techniques dans le cadre du travail sur des animaux différents des rongeurs comme les mini-porcs par exemple.

RÉFÉRENCES

- [1] BAHNEMANN R., *et al.* RITA--registry of industrial toxicology animal-data--guides for organ sampling and trimming procedures in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 1995, **47**(4), 247-266. doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80259-9.
- [2] RUEHL-FEHLERT C., *et al.* RITA Group, NACAD Group. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol*, 2003, **55**(2-3), 91-106. doi.org/10.1078/0940-2993-00311.
- [3] KITTEL B., *et al.* RITA Group, NACAD Group. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*, 2004, **55**(6):413-431. doi.org/10.1078/0940-2993-00349.
- [4] MORAWIETZ G., *et al.* RITA Group, NACAD Group. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*, 2004, **55**(6), 433-449. doi.org/10.1078/0940-2993-00350.
- [5] Pathology - Fraunhofer ITEM. https://www.item.fraunhofer.de/en/services-expertise/chemical-safety-assessment/toxicological_testing/pathology.html
- [6] Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice. <https://reni.item.fraunhofer.de/reni/trimming/>
- [7] <https://www.goreni.org>
- [8] NOLTE T., *et al.* Standardized assessment of cell proliferation: the approach of the RITA-CEPA working group. *Exp Toxicol Pathol*, 2005, **57**(2), 91-103. doi.org/10.1016/j.etp.2005.06.002.
- [9] NILCHAM P., *et al.* Histo-LOOP: A Novel Embedding Tool for Standardizing, Simplifying, and Advancing Histological Tissue Preparation. *J Histochem Cytochem*, 2025, **73**(3-4):97-107. doi.org/10.1369/00221554251329978.
- [10] LEWIS J. W., *et al.* Protocol for assessing the structural architecture, integrity, and cellular composition of murine bone ex vivo. *STAR Protoc*, 2025, **6**(2):103843. doi.org/10.1016/j.xpro.2025.103843.
- [11] MEY G. M. *et al.* Protocol for assessing regional pathology in the rodent optic nerve using longitudinal cryosections and cross-sectional electron microscopy. *STAR Protoc*, 2025, **6**(2):103860. doi.org/10.1016/j.xpro.2025.103860.
- [12] SOUSA N. S. *et al.* Protocol for *in vivo* lineage tracing of regeneration-associated macrophages from injured skeletal muscle of adult mice. *STAR Protoc*, 2025, **6**(2):103844. doi.org/10.1016/j.xpro.2025.103844.

38^e CONGRÈS DE L'AFH

Grasse

L'histologie se met au parfum

Mercredi 18 Juin 2025

13h30 - 14h30: Accueil des congressistes

14h30 - 14h45: Ouverture du congrès, Nathalie Accart, présidente de l'AFH et Nicole Bordier, organisatrice scientifique.

SESSION 1 - TECHNOLOGIE (modérateur 1)

14h45 - 15h05 : Voyage au cœur des tissus: l'histologie comme outil de la recherche translationnelle - Cédric Gaggioli (CNRS – Nice)

15h05 - 15h25 : Apport de l'histologie comparée à l'anatomie pathologique expérimentale - André Sales (Vetopath – Antibes)

15h25 - 15h45: Comment guider au mieux la caractérisation d'un modèle «organ on chip: foie- thyroïde» et la pertinence de combiner lecture pathologique et métabolique - Nicolas Orsini (Bayer SAS – Sophia Antipolis)

15h45 - 17h00 : Visite des stands-exposants et ateliers/posters

17h00 - 17h45: Histoire des parfums: de l'empirisme aux parfums modernes, un long parcours - Xavier Fernandez (Université Côte d'Azur – Nice)

18h00 - 21h00 : Cocktail de bienvenue

Jeudi 19 Juin 2025

SESSION 2 - TECHNOLOGIE (modérateur 2)

09h00 - 09h20 : Microscopie Imagerie Cytométrie Azur, MICA : de l'acquisition à la gestion et analyse d'images en biologie - Frédéric Brau (Université Côte d'Azur – Nice)

09h20 - 09h40 : Imagerie par spectrométrie de masse pour une analyse multiparamétrique et une cartographie des interactions cellulaires - Clémence Ginet (AMK Biotech – Sophia Antipolis)

09h40 - 10h00 : Implémentation des anticorps recombinants sur les plateformes d'histologie françaises - Doris Lou Demy (FC3R – Paris)

10h00 - 10h20: Analyse morphologique comparative des effets des traitements sur des échantillons *in vitro* 3D de thyroïde de rat - Marcia Goncalves Machado (Bayer SAS Sophia Antipolis)

10h20 - 10h40 : Pause-café, visite de l'exposition, session posters

10h40 - 11h40 : Visite des stands-exposants et ateliers

SESSION 3 - QUALITÉ (modérateur 3)

- 11h40 - 12h00 : Déploiement de la traçabilité électronique dans un laboratoire d'histomorphologie - Majdi Maiel (Bayer SAS – Sophia Antipolis)
- 12h00 - 12h20 : BPL : un parfum de fiabilité - Marie-Christine Ottini (Evoquap – Peymeinade)

12h20 - 14h00 : Déjeuner

14h00 - 15h30 : Sessions parallèles - Visite des stands-exposants et ateliers, 2 Tables rondes (RITA / BPL), session posters

SESSION 4 - MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES (modérateur 4)

- 15h30 - 15h50 : Tous les modèles sont faux mais certains sont utiles : organoïdes de prostate et perturbateurs endocriniens - Stephan Clavel (IPMC – Sophia Antipolis)
- 15h50 - 16h10 : Caractérisation des modèles complexes *in vitro* en toxicopathologie : une approche collaborative entre biologistes, bioingénieurs et pathologistes - Julia Kuehnlenz (Bayer SAS – Sophia Antipolis)

16h10 - 17h00 : Assemblée générale et clôture de la deuxième journée

17h15 : Évènement surprise

20h00 : Soirée AFH

Vendredi 20 Juin 2025**SESSION 4 (suite) - MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES (modérateur 5)**

- 09h00 - 09h20 : Organisation architecturale de la lame basale et perméabilité à l'infiltration cellulaire - Frédéric Luton (IPMC – Sophia Antipolis)
- 09h20 - 9h40 : Exploiter le potentiel des organoïdes cérébraux pour mieux comprendre le cerveau humain - Olfa Khalfallah (IPMC – Sophia Antipolis)

09h40 - 11h10 : Sessions parallèles - Visite des stands-exposants et ateliers, 2 Tables rondes (RITA / BPL), Pause-café, session posters

11h10 : Remise des prix du meilleur poster et du concours photo

SESSION 6 - PATHOLOGIE DIGITALE (modérateur 6)

- 11h20 - 11h40 : Corrélations pronostiques dans le cancer de la prostate : apport de l'analyse d'images sur sections scannées - Samah Rekima (IPMC – Sophia Antipolis)
- 11h40 - 12h00 : L'analyse d'images en support à l'évaluation de pathologies toxicologiques des produits agrochimiques - Pierre-Maxence Vaysse (Bayer SAS – Sophia Antipolis)
- 12h00 - 12h20 : Apport de la numérisation en histologie par les données dématérialisées et apport de l'IA dans le contexte du contrôle qualité - Erio Barale-Thomas (Johnson&Johnson - Beerse – Belgique)

Clôture du congrès

CONFÉRENCE DÉCOUVERTE

Histoire des parfums: de l'empirisme aux parfums modernes, un long parcours

Xavier FERNANDEZ

Université Côte d'Azur, Institut de Chimie de Nice, CNRS UMR7272,
Parc Valrose, 06108 NICE Cedex 2, France

xavier.fernandez@univ-cotedazur.fr

Odeurs et Humanité ont toujours été liées. Dès l'âge du Bronze, les hommes ont rendu grâce aux dieux à l'aide de résines ou de bois odorants dont la combustion à l'odeur agréable permettait de les attirer dans leurs temples [1].

Aujourd'hui, le parfum désigne à la fois une perception sensorielle et un produit du commerce. On perçoit ainsi le parfum d'une plante, d'un proche mais on achète également des produits manufacturés vendus sous le même nom. Dans notre société moderne, le parfum est partout et jalonne des étapes de notre vie quotidienne. De façon subjective, il conditionne souvent certains de nos choix [2].

Même si la parfumerie est souvent associée à la notion de tradition, les savoir-faire et les procédés ont beaucoup évolué à travers les âges en tenant compte des avancées scientifiques et sociétales. La conception de nouvelles molécules odorantes, leurs synthèses et l'extraction des matières premières naturelles ont beaucoup progressé au cours des siècles [3, 4].

L'évolution de la parfumerie à travers les âges en s'appuyant sur des périodes importantes et des exemples concrets sera présentée lors de cette intervention.

Mots Clés: Extraction, Formulation, Histoire, Parfums, Synthèse.

- [1] BRUN JP, FERNANDEZ X. «Parfums antiques: de l'archéologue au chimiste». Editions Silvana, Milan, 2015.
- [2] FERNANDEZ X., ANTONIOTTI S., BUSSOTTI E., HUREL M.-P. "Parfum, Chimie et Création" *L'Actualité Chimique*, 2008, **323-324**, 42-51.
- [3] MEIERHENRICH U. J., GOLEBIOWSKI J., FERNANDEZ X., CABROL-BASS D., "The molecular basis of olfactory chemoreception", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6410-6412.
- [4] FERNANDEZ X., ANTONIOTTI S., "Formulation des parfums", *Techniques de l'Ingénieur*, 2015, J2304, 1-28.

SESSION 1 : TECHNOLOGIE

Voyage au cœur des tissus: l'histologie comme outil de la recherche translationnelle

Cédric GAGGIOLI

Université Côte d'Azur, CNRS UMR7284, Inserm U1081,
Institut de Recherche sur le cancer et le vieillissement, IRCAN,
3D-Hub-S-Facility – NICE, France

cedric.gaggioli@gmail.fr

L'histologie est un pilier fondamental de la recherche biomédicale, permettant d'explorer l'organisation tissulaire et les interactions cellulaires dans des contextes physiologiques et pathologiques. Les approches classiques, telles que les colorations histologiques standards, l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*, restent des outils incontournables pour l'analyse morphologique et moléculaire des tissus. Parallèlement, l'émergence de technologies de pointe, comme l'immunofluorescence multiplexe, la transcriptomique spatiale, la microscopie à super-résolution et l'imagerie 3D après *clearing* des tissus, révolutionne notre capacité à décrypter l'hétérogénéité cellulaire et le microenvironnement tumoral. En combinant tradition et innovation, l'histologie s'impose ainsi comme un outil clé de la recherche translationnelle, favorisant une meilleure compréhension des maladies et le développement de stratégies thérapeutiques ciblées. Dans cette présentation, nous illustrerons comment l'histologie, associée à des outils moléculaires et d'imagerie avancée, permet d'établir des ponts entre la recherche fondamentale et la clinique.

À travers des exemples concrets, nous verrons comment cette discipline joue un rôle clé dans la compréhension des maladies et l'optimisation des traitements.

SESSION 1 : TECHNOLOGIE

Apport de l'histologie comparée à l'anatomie pathologique expérimentale

André SALES

CES d'HHAPAL, Laboratoire VETOPATH Complexe EURO92

282 Rue des Cistes Les 3 Moulins - 06600 ANTIBES, France

andre.sales0654@gmail.com

1. Modèles de maladies

L'histologie comparée peut aider à identifier des modèles animaux appropriés pour des études expérimentales, en se basant sur des similitudes anatomiques et histologiques avec l'homme.

2. Compréhension des mécanismes pathologiques

En comparant les tissus de différentes espèces, les chercheurs peuvent mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des maladies, ce qui peut conduire à des découvertes sur la pathologie humaine.

3. Évolution des maladies

L'histologie comparée permet d'étudier comment certaines maladies ont évolué dans différentes espèces, ce qui peut fournir des informations sur la susceptibilité et la résistance aux maladies.

4. Interprétation des résultats

Les connaissances en histologie comparée enrichissent l'interprétation des résultats obtenus en anatomie pathologique expérimentale, en mettant en lumière les variabilités interspécifiques et les réponses tissulaires.

En résumé, l'histologie comparée apporte une perspective évolutive et comparative qui est précieuse pour l'anatomie pathologique expérimentale, enrichissant ainsi notre compréhension des maladies et de leur impact sur les tissus.

SESSION 1 : TECHNOLOGIE

Comment guider au mieux la caractérisation d'un modèle « *organ on chip*: foie-thyroïde » et la pertinence de combiner la lecture pathologique et métabolique

Nicolas ORSINI

Bayer SAS, 355 Rue Dostoïevski - CS90153 Valbonne,
06906 SOPHIA ANTIPOLIS Cedex, France

nicolas.orsini@bayer.com

Les perturbations du système hormonal thyroïdien représentent un problème majeur dans le domaine agrochimique. Afin de garantir la sécurité de ces produits, il est essentiel de procéder à des évaluations approfondies durant leurs développements. Dans ce contexte, les nouvelles approches méthodologiques (NAMs) se présentent comme une solution prometteuse. Elles permettent d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action, mais aussi de réduire le recours aux tests sur animaux, en s'inscrivant dans la démarche des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Un des défis majeurs dans ce domaine est la caractérisation des modèles « *organ on chip* », qui visent à reproduire *in vitro* les interactions entre différents organes.

Notre modèle combinant le foie et la thyroïde a été conçu pour simuler les fonctions physiologiques de ces deux organes essentiels. Il est particulièrement utile pour identifier les dangers liés aux perturbateurs endocriniens, qu'ils agissent directement sur la thyroïde ou par le biais d'effets médiés par le foie.

Pour optimiser la caractérisation de ce modèle, il est crucial d'adopter une approche multidisciplinaire. Notre approche combine des techniques de biologie cellulaire, de spectrométrie de masse et d'histologie. L'analyse pathologique permet de détecter les réponses physiologiques, tandis que l'évaluation métabolique révèle les voies biochimiques affectées. L'utilisation de biomarqueurs spécifiques est cruciale pour quantifier les effets des perturbateurs endocriniens sur les cellules et identifier les changements métaboliques. Dans ce contexte, nos travaux actuels seront présentés et plus particulièrement sur l'utilisation de la microscopie confocale.

Finalement, un modèle « *organ on chip* » bien caractérisé, intégrant le foie et la thyroïde, pourrait non seulement faciliter le développement de nouveaux produits agrochimiques, mais également améliorer notre compréhension des interactions complexes entre ces organes. Cette approche innovante pourrait avoir des applications significatives dans le domaine de la toxicologie et de l'étude du métabolisme et contribuer ainsi à la création de produits plus sûrs et à une meilleure protection de la santé humaine et environnementale.

SESSION 2: TECHNOLOGIE

MICA: de l'acquisition à la gestion et l'analyse d'images en biologie

Frédéric BRAU

IRCAN - Inserm U1081 - CNRS UMR7284 – UniCA, Campus Santé Pasteur, Faculté de Médecine, 28 avenue Valombrose, 06107 NICE Cedex 2, France

frederic.brau@cnr.fr

Implantée dans le département des Alpes-Maritimes, la plateforme multi-sites Microscopie Imagerie Cytométrie Azur (MICA) est unique dans le Sud Est à fédérer autant de services d'imagerie cellulaire de laboratoires académiques en sciences de la vie depuis sa création et labélisation par le GIS IBISA en 2010. Elle regroupe les expertises en cytométrie en flux, analyse du plancton, microscopie/imagerie et analyse d'images de 8 partenaires sur la Côte d'Azur: l'Institut de Biologie Valrose (UMR7277 CNRS - INSERM U1091 -UniCA, Nice), l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS UMR7275 -INSERM U1323 - UniCA), le Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (UMR INSERM U1065 - UniCA, Nice), l'Institut de la Mer de Villefranche s/Mer (IMEV CNRS – Sorbonne Université, Villefranche-sur-Mer), le Centre Commun de Microscopie Appliquée (UniCA, Nice), l'Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement (UMR7284 CNRS - INSERM 1081 - UniCA), l'Institut Sophia Agrobiotech (ISA, UMR INRAE 1355, CNRS 7254, UniCA), Valbonne) et l'équipe projet Morpheme (INRIA/I3S/iBV).

Elle est à disposition immédiate des 97 équipes et ~1200 personnels de recherche de ces laboratoires où elle est déployée et ouverte à tous les laboratoires académiques et sociétés privées. Ainsi, depuis 15 ans toute la communauté académique et industrielle régionale ou nationale bénéficie des équipements (56 systèmes de microscopie à ce jour) et de l'expertise technologique du personnel (34 ingénieurs et chercheurs). Cette expertise est notamment reconnue au travers des enseignements et des formations dispensées auprès de ces publics (notamment au catalogue de CNRS Formations Entreprises).



Les expertises de la plateforme sont principalement la microscopie à fluorescence, la microscopie électronique, la cytométrie en flux/tri cellulaire et l'imagerie automatisée du plancton et l'analyse d'images. Cette présentation sera focalisée sur l'offre de service en imagerie de l'organe à la cellule, les développements technologiques et méthodologiques dans ce domaine ainsi que les potentialités et outils en analyse d'images. Nous exposerons notamment notre solution pour maîtriser le cycle de vie des images de façon FAIR (*Findable Accessible Interoperable Reproducible*) et leur analyse. Ces outils sont disponibles depuis 2019 pour l'ensemble des laboratoires en sciences de la vie d'Université Côte d'Azur et les stations d'EMBRC-France en partenariat avec l'Infrastructure Nationale en Biologie Santé (INBS) Institut Français de Bioinformatique (IFB).

SESSION 2: TECHNOLOGIE

Imagerie par spectrométrie de masse pour une analyse multiparamétrique et une cartographie des interactions cellulaires

Clémence GINET-CORNEJO, Lisa NOTTOLI, Aïda MEGHRAOUI

AMKbiotech, 2400, route des Colles – BIOT, France

ginet@amkbiotech.fr

L'analyse HyperPlex est une approche optimale pour étudier les interactions cellulaires dans des systèmes biologiques complexes, en permettant une exploration multiparamétrique du microenvironnement et des populations cellulaires. Basé sur les avantages de l'imagerie par spectrométrie de masse et l'expertise d'AMKBiotech, un panel de 40 marqueurs a été développé et optimisé pour analyser l'expression de cibles spécifiques dans différents types de tissus. Ce panel permet d'étudier l'hétérogénéité spatiale et la diversité des microenvironnements tissulaires, grâce à une analyse robuste et reproductible, soutenue par l'intelligence artificielle (IA).

Dans l'étude, le système Hyperion XTi (Standard Biotoools) a permis l'acquisition de régions d'intérêt (ROI) sur 8 types de tissus, dont le cancer colorectal et le mélanome, avec une haute résolution (1 pixel/ μm) et sur de larges surfaces (jusqu'à 16mm^2). Une première acquisition en « *Preview Mode* » (1 pixel/ $20\mu\text{m}$) permet d'obtenir une vue d'ensemble de la section tissulaire, pour affiner la sélection des ROIs en haute résolution. Les images sont nettoyées, segmentées et analysées par des algorithmes d'IA, permettant d'approfondir la compréhension des mécanismes pathologiques et des interactions cellulaires.

Cette méthode permet une évaluation quantitative des composants du microenvironnement et de leurs interactions, et peut être adaptée à différents systèmes biologiques (tumeurs, organoïdes, cultures cellulaires). Les données obtenues peuvent être associées à des informations cliniques ou expérimentales, afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs, cibles thérapeutiques ou différences entre conditions expérimentales.

Mots-clés: Analyse multiparamétrique, Imagerie de section complète, Imagerie par spectrométrie de masse, Intelligence artificielle.

SESSION 2: TECHNOLOGIE

Implémentation des anticorps recombinants sur les plateformes d'histologie françaises

Doris Lou DEMY^{1,2}, Athanassia SOTIROPOULOS^{1,3}

¹ GIS FC3R, École nationale vétérinaire d'Alfort, MAISONS-ALFORT, France

² Inserm: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, PARIS, France

³ U1016, Institut Cochin, PARIS, France

doris-lou.demy@fc3r.com

L'utilisation d'anticorps produits chez des animaux est encore largement répandue en recherche - et notamment en histotechnologie - alors qu'elle pose à la fois des problèmes éthiques (utilisation de beaucoup d'animaux, protocoles douloureux, etc.) et de robustesse scientifique (variabilité, manque de reproductibilité, etc.) (Baker, 2015; Bradbury et al., 2015). Il existe des alternatives recombinantes plus fiables, plus éthiques, et plus économiques: des anticorps produits *in vitro* sur séquence. Les instances règlementaires européenne (EURL ECVAM) et française (CNREEA) recommandent ainsi depuis 2020 la transition vers ces alternatives recombinantes pour remplacer les anticorps d'origine animale, lorsque c'est possible.

Le Centre Français pour les 3R (GIS FC3R) a pour mission de promouvoir et d'implémenter le principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner l'expérimentation animale) en France *via* la valorisation d'une recherche responsable et innovante, l'éducation et une communication transparente. Pour accompagner les acteurs de la recherche dans une transition visant à remplacer l'utilisation d'anticorps issus d'animaux par des anticorps alternatifs « recombinants » produits *in vitro*, le GIS FC3R a lancé une étude-pilote avec les plateformes d'histologie françaises.

La première phase de cette étude, menée en partenariat avec l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), a consisté en l'élaboration et la diffusion publique d'un questionnaire à destination des plateformes d'histologie françaises, afin d'identifier les anticorps les plus utilisés et leurs conditions d'utilisation. 12 plateformes ont répondu à cette enquête, pour un total de 36 anticorps « à remplacer ». Parmi ces anticorps, 61% sont polyclonaux, présentant des défis majeurs en termes de reproductibilité et d'éthique, tandis que 25% sont monoclonaux, certains étant produits par liquide d'ascite, un procédé extrêmement douloureux pour les animaux.

Il est également intéressant de noter que 4 des anticorps listés étaient déjà recombinants, soulignant la nécessité d'améliorer la transparence de communication autour de ces anticorps recombinants, y compris par les fournisseurs d'anticorps.

L'étude-pilote conduite depuis fin 2024 au sein de plateformes sélectionnées parmi les répondants au sondage a pour objectif de comparer les performances des anticorps conventionnels à celles d'équivalents recombinants. Cette étude a été intégralement financée par le GIS FC3R, couvrant à la fois la fourniture des anticorps recombinants et les services des plateformes, et a déjà permis d'identifier plusieurs alternatives recombinantes efficaces. Les résultats de ces études comparatives seront présentés, puis largement diffusés, notamment sur le site web du GIS FC3R et au sein du réseau de l'AFH, pour contribuer à la sensibilisation et aider au changement de pratiques.

SESSION 2: TECHNOLOGIE

Analyse morphologique comparative des effets des traitements sur des échantillons *in vitro* 3D de thyroïde de rat

Marcia GONCALVES-MACHADO

*Bayer SAS, 355 Rue Dostoïevski - CS90153 Valbonne,
06906 SOPHIA ANTIPOLIS Cedex, France*

marciarafaela.goncalvesmachado@bayer.com

L'enrobage en paraffine constitue une technique essentielle pour l'analyse histologique approfondie des sphéroïdes de thyroïde de rat, permettant de préserver l'intégrité des échantillons tout en facilitant leur étude morphologique. Actuellement, plusieurs méthodes d'enrobage en paraffine sont spécifiquement appliquées à ces échantillons, chacune étant dotée de protocoles adaptés aux particularités uniques des sphéroïdes de thyroïde.

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

SESSION 3 : QUALITÉ

Déploiement de la traçabilité électronique dans un laboratoire d'histomorphologie

Majdi MAIEL

*Bayer Corp, 355 Rue Dostoïevski, CS90153 Valbonne
06906 SOPHIA ANTIPOLIS Cedex, France*

majdi.maiel@bayer.com

Dans un centre de toxicologie, la traçabilité constitue un processus fondamental pour un laboratoire d'histomorphologie accrédité Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Elle permet de suivre chaque échantillon à travers toutes les étapes de son traitement, depuis la réception des échantillons jusqu'à l'analyse histologique et l'archivage des spécimens.

Jusqu'à présent, cette traçabilité reposait sur des formulaires papier, qui nécessitaient un enregistrement manuel de la réalisation de chaque étape du workflow, ainsi que le suivi des réactifs et des équipements utilisés. Ce système traditionnel présente plusieurs contraintes notamment une charge administrative importante, des risques d'erreurs humaines, une visibilité limitée sur les processus en temps réel et des difficultés liées à la vérification et l'archivage physique des documents.

Pour relever ces contraintes, nous avons développé une solution informatique qui assure une traçabilité électronique complète du workflow. Ce système permet de documenter automatiquement et de manière sécurisée l'ensemble des étapes du processus. Les données sont enregistrées en temps réel, offrant un suivi précis de l'utilisation des réactifs et des équipements, et sont immédiatement disponibles pour les audits et les contrôles qualité.

En conclusion, la transition vers la traçabilité électronique représente une avancée majeure pour répondre aux exigences réglementaires tout en optimisant les processus opérationnels dans un environnement de haute exigence.

SESSION 3 : QUALITÉ

BPL : Un parfum de fiabilité

Marie-Christine OTTINI

*Evoquap – Evolution Qualité Performance,
Avenue Amiral de Grasse - 06530 PEYMEINADE, France*

mcottini@evoquap.fr

Les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) sont un ensemble de principes décrits en France dans l'arrêté du 14 mars 2000 ainsi que dans le document BPL OCDE. Elles s'appliquent aux études de sécurité non-cliniques afin d'en assurer la fiabilité. Le respect strict de ces principes permet aux autorités de santé d'avoir confiance et d'accepter les résultats des études de toxicologie avant de donner l'autorisation d'essai clinique ou d'autoriser la mise sur le marché d'un produit chimique.

Elles sont mises en œuvre au moyen d'un système qualité constitué des ingrédients suivants :

- Connaissance approfondie du produit testé *in vitro* ou *in vivo*
- Procédures précises de réalisation de l'essai
- Environnement maîtrisé afin d'éviter toute interférence avec les conditions d'étude
- Personnel compétent
- Equipements de mesure et d'enregistrement des résultats fiables

Les établissements et les études où elles sont réalisées sont inspectés par les autorités de tutelle auxquelles il faut apporter la preuve du respect des BPL donc de la fiabilité des résultats.

La responsabilité de la conformité réglementaire d'une étude repose sur 3 acteurs clés :

- Le donneur d'ordre, ultime responsable.
- La Direction du site d'essai, responsable d'établir un système qualité et de nommer un Directeur d'étude.
- Le Directeur d'étude, responsable de l'étude aux plans scientifique et réglementaire.

Il faut connaître et comprendre les BPL afin de s'assumer ces responsabilités. La fiabilité d'une étude repose essentiellement sur la fiabilité de ses données. Celles-ci sont de plus en plus souvent numériques, en particulier en histopathologie. Assurer et prouver la fiabilité des données numériques représente un enjeu majeur qui se gagne par la mise en œuvre d'une méthodologie rigoureuse et appropriée.

SESSION 4: MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES

Tous les modèles sont faux mais certains sont utiles: organoïdes de prostate et perturbateurs endocriniens

Stephan CLAVEL

*Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire,
660 Rte des Lucioles - 06560 VALBONNE, France*

stephan.clavel@ipmc.cnrs.fr

Les pathologies humaines peuvent être grossièrement classées en deux catégories, les maladies « de la malchance » ou « inévitables » et les maladies liées à des causes environnementales et donc partiellement évitables. Cette dernière catégorie comprend les pathologies liées à notre mode de vie moderne, qu'il s'agisse de la propagation de nouvelles maladies infectieuses, des habitudes alimentaires, des normes esthétiques (bronzage), du productivisme agricole ou de la pollution de l'environnement.

Au cours des dernières décennies, l'émergence de ces nouveaux facteurs de risque constitue une menace omniprésente pour la santé humaine. Particulièrement préoccupants, les perturbateurs endocriniens (PE) constituent une catégorie de polluants issus essentiellement des activités humaines (industrie chimique). Pour limiter les risques liés à ces composés chimiques, l'Union européenne (UE) tente de réglementer la mise sur le marché de nouvelles molécules de synthèse ayant une activité potentielle de perturbation endocrinienne.

Cependant, cette panoplie législative nécessite la mise en place de tests toxicologiques robustes et de lignes directrices permettant une évaluation fiable de la dangerosité chez l'homme. Pour s'attaquer à ce problème et améliorer les outils d'analyse, nous utilisons la technologie des organoïdes pour tester la toxicité des perturbateurs endocriniens.

SESSION 4: MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES**Caractérisation des modèles complexes *in vitro* en toxicopathologie: une approche collaborative entre biologistes, bioingénieurs et pathologistes**

Julia KÜHNLENZ au nom du groupe de travail ESTP/STP et du groupe d'intérêt spécial (SIG) de la STP sur les modèles complexes *in vitro* (CIVM) et la pathologie

Bayer SAS, CropScience, Pathology & Mechanistic Toxicology,
355 Rue Dostoïevski - CS90153 Valbonne,
06906 SOPHIA ANTIPOLIS Cedex, France

julia.kuehnlenz@bayer.com

Les modèles complexes *in vitro* (CIVM) offrent une alternative prometteuse pour améliorer la pertinence clinique des évaluations de l'efficacité et de la toxicité des nouvelles substances chimiques, qu'il s'agisse de médicaments, d'agents agrochimiques ou d'autres produits innovants. La Société Européenne de Pathologie Toxicologique (ESTP) et la Société de Pathologie Toxicologique (STP) mettent en avant le rôle essentiel des pathologistes dans le développement et l'application des CIVM. Leur expertise en médecine comparée permet d'établir des liens entre modèles animaux et humains, contribuant ainsi à la validation et à l'interprétation des données. Une collaboration interdisciplinaire entre ingénieurs, biologistes et pathologistes est essentielle pour définir l'utilisation optimale de ces modèles. L'évaluation morphologique, soutenue par des techniques histologiques avancées, l'analyse d'images et des biomarqueurs translationnels, joue un rôle clé dans cette approche. Dans cette présentation, nous illustrons comment ces technologies tissulaires et outils analytiques soutiennent le développement et l'utilisation des CIVM pour l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité des substances chimiques.

Références:

STOKAR-REGENSCHEIT N., et al. "Complex *in vitro* Model Characterization for Context of Use in Toxicologic Pathology: Use Cases by Collaborative Teams of Biologists, Bioengineers, and Pathologists." *Toxicologic pathology* **52**,2-3 (2024): 123-137. doi:10.1177/01926233241253811

SESSION 5: MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES

Organisation architecturale de la membrane basale et perméabilité à l'infiltration cellulaire

Alain CORINUS¹, Sophie ABELANET¹, Julia DUBREUIL¹, Zhenyu ZHU², Sabrina PISANO³, Christelle BOSCAGLI⁴, Anne-Sophie GAY¹, Delphine DEBAYLE¹, Marin TRUCHI¹, Kevin LEBRIGAND¹, Sandra LACAS-GERVAIS⁴, Frédéric BRAU¹, Xavier DESCOMBES², Patricia ROUELLE⁵, Michel RANCO¹, Frédéric LUTON¹

¹ Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, Inserm U1323 – SOPHIA ANTIPOLIS, France

² Université Côte d'Azur, INRIA, CNRS, Laboratoire I3S SOPHIA ANTIPOLIS, France

³ Université Côte d'Azur, Institute for Research on Cancer and Aging, CNRS UMR7284, Inserm U1081 – NICE, France

⁴ Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée NICE, France

⁵ Université de Lyon, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, CNRS UMR5305 – LYON, France

luton@ipmc.cnrs.fr

La grande majorité des cancers du sein sont d'origine canalaire, parmi lesquelles 20% sont diagnostiqués *in situ* (carcinome canalaire *in situ*, CCIS), ce qui signifie que les cellules tumorales n'ont pas traversé la membrane basale (MB) qui entoure l'épithélium mammaire et sert de barrière à la dissémination tumorale. Au moins un tiers des tumeurs CCIS resteraient *in situ* et bénignes, tandis que les autres progresseraient vers un stade invasif (carcinome canalaire invasif, CCI) après avoir traversé la MB. Malheureusement, aucun marqueur prédictif ni traitement spécifique n'existe pour anticiper et prévenir la transition critique du stade CCIS au stade CCI. Nous explorons l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales qui progressent vers le stade CCI modifient au préalable la composition moléculaire et l'organisation structurale de la MB pour faciliter son passage. L'identification de ces altérations chez les patientes permettraient de prédire la progression vers le stade CCI et éviter le sur-traitement des patientes dont la MB resterait intacte.



Pour tester cette hypothèse, nous utilisons des systèmes de culture 3D permettant de reproduire l'assemblage de la MB autour de sphéroïdes mammaires humains. Nous avons caractérisé la MB endogène de deux modèles de cellules mammaires humaines normales. Ces MBs contiennent tous les composants essentiels, s'organisent normalement en réseaux superposés de laminine et de collagène IV, et présentent une ultrastructure microporeuse classique. Au contraire, nous montrons que les cellules tumorales assemblent une MB avec une composition altérée et des pores plus gros traversés par des extensions membranaires qui facilitent le passage de la MB. Par manipulation génétique, nous évaluons l'impact de la mutation de chaque composant sur l'organisation structurelle et la perméabilité à l'infiltration de la MB afin d'identifier les mutations qui facilitent la transition du stade *in situ* au stade invasif.

SESSION 5: MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES

Exploiter le potentiel des organoïdes cérébraux pour mieux comprendre le cerveau humain

Olfa KHALFALLAH, C. CINQUANTA, A. RIBEAR, S. ABELANET, M. TOFT, N. GLAICHENHAUS, P. POUSINHA, L. DAVIDOVIC

Université Côte d'Azur, CNRS UMR7275, Inserm U1323,

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - VALBONNE, France

khalfallah@ipmc.cnrs.fr

L'étude du cerveau humain, depuis sa formation jusqu'à l'âge adulte, représente un défi majeur pour comprendre son évolution et la physiopathologie des maladies psychiatriques et neurologiques. En raison de sa complexité, de son accessibilité restreinte et des considérations éthiques, plusieurs modèles sont utilisés pour étudier le cerveau humain, y compris les organoïdes cérébraux. Dérivées à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSCs), ces structures récapitulent le développement du cerveau en 3D en reproduisant l'architecture complexe ainsi que les interactions fonctionnelles sophistiquées entre différents types cellulaires présents dans le cerveau humain.

Actuellement, il est possible de modéliser la formation de plusieurs régions cérébrales et de les fusionner afin de simuler leurs interactions fonctionnelles. Associées à des outils tels que l'édition génétique CRISPR-Cas9 ou la transduction par vecteurs viraux, ces méthodes offrent un modèle sans précédent pour étudier les mécanismes moléculaires, cellulaires et les propriétés électrophysiologiques du cerveau humain dans des conditions normales et pathologiques. Enfin, les organoïdes cérébraux ouvrent de nouvelles perspectives en médecine personnalisée, régénérative et pour le criblage de molécules thérapeutiques, révolutionnant la façon d'aborder les pathologies cérébrales.

SESSION 6: PATHOLOGIE DIGITALE

Corrélations pronostiques dans le cancer de la prostate: apport de l'analyse d'images sur sections scannées

Samah REKIMA¹, Marc Pujalte-Martin²

¹ Université Côte d'Azur, CNRS UMR7275, Inserm U1323,

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire – SOPHIA ANTIPOLIS, France

² Université Nice, Grand Château - 28 Avenue de Valrose - 06103 NICE CEDEX 2

rekima@ipmc.cnrs.fr & marc.pujalte-martin@nice.unicancer.fr

Le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme en France, avec 59 885 nouveaux cas diagnostiqués en 2018, représentant 24% des cancers masculins. Son incidence augmente avec l'âge, avec un diagnostic médian à 69 ans. Bien que souvent à évolution lente, il constitue un enjeu majeur en oncologie, nécessitant des outils diagnostiques précis pour optimiser la prise en charge des patients, il est important d'évaluer les patients à haut risque de rechute notamment pour déterminer le risque de développer des formes métastatiques de la maladie.

Le score de Gleason, basé sur l'analyse microscopique des cellules tumorales, permet d'évaluer l'agressivité de la maladie et d'orienter la stratégie thérapeutique. Cependant, l'évaluation traditionnelle du score de Gleason repose sur l'observation humaine, pouvant entraîner une variabilité inter-observateur.

Dans le cadre d'une étude translationnelle, nous avons analysé des échantillons humains issus d'une cohorte rétrospective afin d'établir des corrélations robustes entre le score de Gleason et l'expression de biomarqueurs spécifiques. L'étude repose sur l'analyse d'images histologiques numérisées et l'utilisation d'algorithmes avancés pour automatiser l'évaluation des grades tumoraux et des biomarqueurs. Cette approche vise à améliorer la reproductibilité des analyses et à réduire la variabilité diagnostique.

Les analyses en cours devraient permettre de mieux comprendre les liens entre l'architecture tumorale et l'expression des biomarqueurs dans le cancer de la prostate. Ces travaux s'inscrivent dans une démarche de modernisation du diagnostic en pathologie digitale et ouvrent des perspectives pour une meilleure standardisation et automatisation de l'évaluation pronostique.

SESSION 6: PATHOLOGIE DIGITALE

Analyse d'images en support à l'évaluation de la pathologie toxicologique des produits agrochimiques

Pierre-Maxence VAYSSE

Bayer S.A.S. - 355 Rue Dostoïevski, CS90153 Valbonne
06906 SOPHIA ANTIPOLIS Cedex, France

pierre-maxence.vaysse@bayer.com

Les études de toxicologie menées sur les rongeurs jouent un rôle crucial dans l'évaluation des risques des produits agrochimiques pour la santé. Ces études comprennent une analyse histologique approfondie de divers organes, réalisée par des pathologistes, afin de rapporter l'incidence de lésions microscopiques. Cependant, cette analyse demeure semi-quantitative, subjective et laborieuse notamment si elle implique le comptage de cellules, ce qui peut rendre l'identification d'une dose sans effet toxique parfois complexe. Cela est particulièrement pertinent dans le cadre de processus de carcinogenèse hépatique pouvant avoir lieu lors des études de cancérologie.

L'analyse d'images d'histopathologie a émergé pour quantifier objectivement les éléments tissulaires permettant d'anticiper la formation de tumeurs. Des coupes de foies de rongeurs issus d'études explorant les effets de produits agrochimiques ont été marquées au Ki67 pour évaluer la prolifération cellulaire, suivi d'une contre-coloration à l'hématoxyline. Un algorithme a été développé pour quantifier la prolifération des hépatocytes sur coupe entière dans le but d'automatiser autant que possible le rendu des résultats: une première séquence détecte le tissu, une seconde séquence compte les cellules et distingue les cellules marquées seulement par l'hématoxyline et les cellules marquées au Ki67. Les hépatocytes sont distingués des autres cellules (exemple: cellules endothéliales) par leur forme et leur taille. La proportion d'hépatocytes marqués au Ki67 est rapportée au nombre total d'hépatocytes pour quantifier leur prolifération.

Ces résultats sont discutés au regard de l'analyse histopathologique, du mécanisme d'action du produit agrochimique et de données biologiques complémentaires. Les résultats quantitatifs de l'analyse d'image en identifiant un seuil d'effet et une dose réponse dans les études court terme peuvent ainsi participer au choix de dose pour les études long-terme de cancérologie et exemplifier le potentiel de l'analyse d'image à participer à l'évolution de la toxicologie.

SESSION 6: PATHOLOGIE DIGITALE

Apport de la numérisation en histologie par les données dématérialisées et apport de l'IA en histologie dans le contexte du contrôle-qualité

Erio BARALE-THOMAS

*Johnson & Johnson Innovative Medicine, Dial 295,
office BEERSE 022/1C3, post 409, Belgique*

ebarale@its.jnj.com

L'anatomo-pathologie numérique se développe fortement depuis quelques années, tant pour les systèmes de visualisation de lames numérisées sur écran, que d'analyse automatisée et quantitative de ces lames avec l'avènement de l'intelligence artificielle. Ce nouveau flux de travail a de nombreuses conséquences sur les autres parties, pré-analytiques pour l'histologie, et post-analytique pour l'analyse de données, le rapport et l'archivage.

Durant cette session, nous présenterons 2 exemples d'application pré-analytique. La première concerne la numérisation de la documentation de l'histotechnique, de façon à ne plus avoir à saisir d'information manuellement. Nous présenterons le flux de travail adapté aux postes de travail classiques d'un laboratoire d'histologie, mais aussi le matériel nécessaire et les rapports rétrospectifs et prévisionnels qu'il est possible de produire et qui permettent d'augmenter la productivité des techniciens.

Le second exemple concerne un modèle d'IA de contrôle qualité des lames numériques. De nombreux artefacts peuvent être présents sur une lame numérique, certains créés lors de l'histotechnique, d'autres, lors de la numérisation. Ces artefacts peuvent rendre difficile ou impossible la lecture sur écran, contrairement à ce qui se passe au microscope. Nous présenterons les artefacts les plus fréquents et les plus problématiques, mais aussi l'intérêt de les marquer (annotations) pour les étapes de détection et de quantification par IA, et surtout le bénéfice pour les techniciens, en raison du temps gagné pour cette phase de contrôle qualité.

Ces 2 exemples permettront de montrer que l'histotechnique, une technique encore largement manuelle, va continuer à soutenir utilement tout le processus anatomo-pathologique, y compris par l'adoption de la numérisation.

TABLES RONDES

Les données d'histopathologie : quand l'électronique nous donne des notes de tête, de cœur, et de fond

Marie-Christine OTTINI¹ et Nicole BORDIER²

¹ EVOQUAP, Quality Management Consulting,
75, Avenue Amiral de Grasse - 06530 PEYMEINADE, France

² Bayer SAS – Crop Science Division, Histomorphology,
355, rue Dostoievski - 06560 SOPHIA ANTIPOLIS, France

mcottini@evoquap.fr

nicole.bordier@bayer.com

Les outils informatisés présentent des notes de tête qui nous attirent immédiatement. Ils fournissent une aide précieuse pour gagner du temps dans l'analyse et pour stocker la grande quantité de données générées dans les études de toxicité réglementaires.

Les notes de cœur se révèlent à l'utilisation, lorsque le pathologiste constate et se réjouit des aspects pratiques.

Plus lentement et insidieusement, les notes de fond se libèrent alors que la sécurité ou l'intégrité des données est mise à mal, parce qu'elles sont par exemple perdues ou corrompues.

L'informatisation s'accompagne d'un enjeu important en termes de fiabilité, traçabilité, lisibilité long terme et donc d'une manière générale de recevabilité réglementaire des données conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Des lignes directrices existent pour nous guider dans la validation des systèmes informatisés, préalablement indispensable à leur utilisation. Ce sont généralement les informaticiens et les qualitatifs qui possèdent la maîtrise de ces référentiels. Ils doivent travailler ensemble et avec les utilisateurs afin d'établir la fiabilité du processus électronique pour toute la durée de vie de la donnée.

L'intelligence artificielle apporte une nouvelle aide aux pathologistes et de nouveaux risques.

Nous présenterons des exemples d'utilisation de l'informatique dans l'analyse des données de pathologie, de leur intérêt, des problématiques associées et des solutions d'avenir dans le cadre de l'évolution technologique.

TABLES RONDES

Enregistrement des données de toxicologie sur l'animal dans l'industrie (RITA): guides pour l'échantillonnage et la recoupe d'organes chez le rat et la souris

Marcia Rafaela GONCALVES MACHADO¹ et Nathalie ACCART²

¹ Bayer SAS – Crop Science Division Pathology - Mechanistic Toxicology, 355 rue Dostoievski - 06560 SOPHIA ANTIPOLIS, France

² Novartis Pharma AG, Diseases of Aging and Regenerative Medicines, Fabrikstrasse 28.3.4 - CH-4057 - BÂLE, Suisse

marciarafaela.goncalvesmachado@bayer.com

nathalie.accart_gris@novartis.com

Les guides pour l'échantillonnage et la recoupe d'organes chez le rat et la souris fournissent des instructions complètes pour normaliser et améliorer la qualité de la préparation des tissus dans les études de toxicité réglementaires.

(Bahnmann R, et al. RITA--registry of industrial toxicology animal-data--guides for organ sampling and trimming procedures in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 1995 Sep;47(4):247-66).

La normalisation permet alors la comparabilité des évaluations histopathologiques à travers différentes études au sein d'un même laboratoire ou entre laboratoires. Des instructions détaillées sont aussi fournies, comme la localisation optimale pour la préparation des tissus, la taille de l'échantillon, la direction de la section et le nombre de sections à préparer. Des directives spécifiques couvrent divers systèmes d'organes dans une série de trois articles initiaux. Les guides fournissent également des conseils techniques pour les techniques préparatoires lors de l'autopsie, de la fixation et de la recoupe, facilitant le travail quotidien dans le laboratoire d'histotechnique et favorisant la reproductibilité intra et inter-études (Morawietz Gerd et al., 2004; Kittel Birgit et al., 2004).

Ces guides seront présentés et nous débattons des avantages dans la mise en place de ces recommandations au sein du laboratoire et des constantes avancées dans ce domaine.

CONCOURS PHOTO

Depuis 2020, l'Association Française d'Histotechnologie organise son **Concours des plus belles photos «histo-artistico-scientifiques»**. Reconduit chaque année, 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 faites au cours de la mise en œuvre des 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 doivent être esthétiques et présenter un caractère original (voir les détails dans le règlement reproduit dans ce numéro). 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'ils soient praticiens confirmés, débutants, ou véritables passionnés de longue date d'histologie, ils ont tous eu, à coup sûr, des coups de cœur ou des émotions en observant de belles choses, d'autres inattendues, ou bien encore des rigolotes.

Le concours annuel de 2025 a permis de recueillir 20 superbes propositions, toutes respectant le règlement. Elles ont d'abord été mises en ligne sur le site internet de l'AFH puis à l'issue d'une période de vote, 1 lauréat a été sélectionné sur la base du plus grand nombre de votes récoltés. Il a reçu un prix distribué à l'occasion de notre congrès annuel. À présent et comme chaque année, nous sommes heureux de reproduire dans l'édition de la *Revue Française d'HistoTechnologie* toutes les photos soumises par nos adhérents afin de mettre en valeur le lauréat mais aussi mettre en avant toute la diversité des talents des praticiens de l'histologie.

Nous vous invitons à revoir les plus belles photos histo-artistico-scientifiques soumises au concours 2025, en feuilletant ces dernières pages de notre revue dédiées à cette belle galerie d'images, qui débute donc avec la photo remportant le 1^{er} prix, prolongeant ainsi l'opportunité de partager les émotions révélées par nos adhérents. Peut-être certains clichés vous inspireront l'envie de participer à votre tour? Il suffit pour cela de mettre de côté dès à présent vos photos préférées et tenter votre chance au prochain concours pour lequel nous vous espérons plus nombreux encore.

Montrez vos talents !



COUCOU, JE VOUS VOIS !

Coupe transversale de Zebrafish, coloration HES, x10.

Aurélié COVINHES

Plateforme RHEM, MONTPELLIER

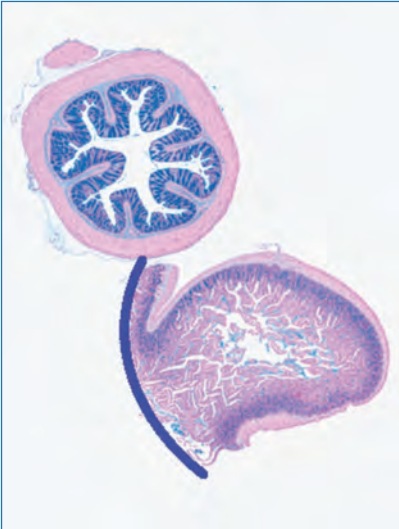
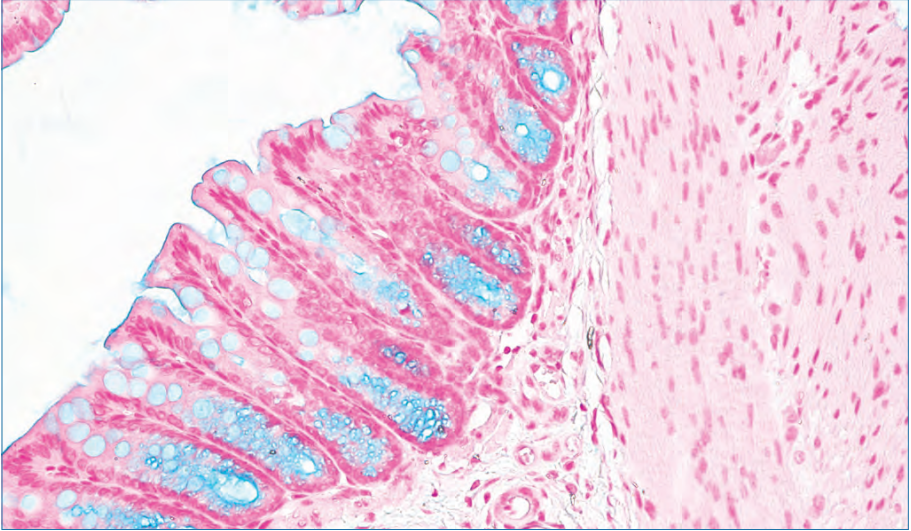
aurelie.covinhaes@inserm.fr



DOUCEUR DES COULEURS

Coupe de colon de souris colorée au rouge nucléaire, bleu Alcian. Grossissement x200

Tristan GIRARD • Licence Professionnelle GBHQ, NICE
sandra.lacas-gervais@univ-cotedazur.fr



LA FLEUR INTESTINALE

Intestins, en coupe transversale de rat, colorés en Bleu Alcian.

Amélie LEBATARD

ATLANTIC BONE SCREEN, NANTES
amelie.lebatard@atlantic-bone-screen.com

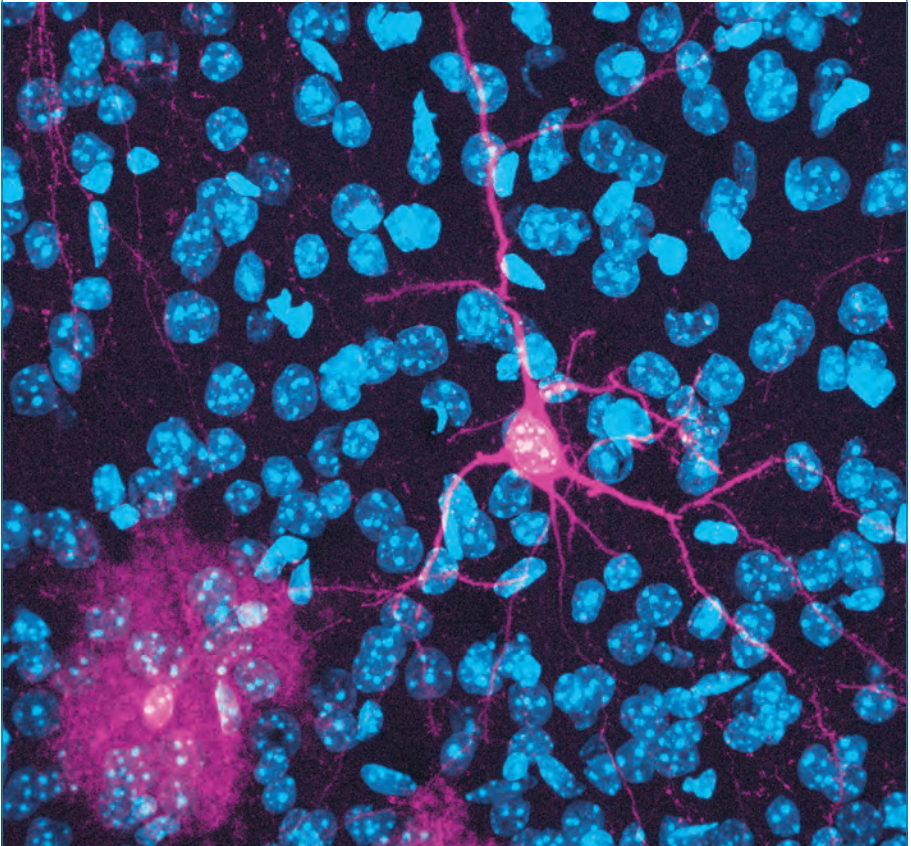
DIALOGUE SILENCIEUX: L'ÉTREINTE MURMURÉE D'UN INTERNEURONE ET D'UNE PYRAMIDE DU CORTEX

Dans l'intimité du cortex, un interneurone tend ses bras fins vers le dendrite basal d'un neurone pyramidal. Leur rencontre, invisible à l'œil nu, devient ici visible - une synapse, fragile passerelle où circule le langage muet du cerveau. C'est dans ces étreintes microscopiques que naissent la pensée, le mouvement et la mémoire, sculptés par des échanges d'une précision infinie.

Iria GONZALEZ-DOPESES REYES

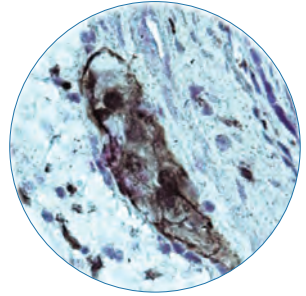
RHEM UMR5535, MONTPELLIER

iria.gonzalez-dopeso-reyes@igmm.cnrs.fr



GASTR'HOST LE PETIT FANTÔME

Coupe d'intestin de souris colorée à l'hématoxyline-éosine - Mise en évidence de cellules gliales entériques dans un ganglion du plexus sous muqueux identifiées par immunohistochimie (Ac anti-GFAP) révélées par les dépôts noirâtres de DAB intensifié au chlorure de nickel. Le marquage qui révèle les contours du ganglion nerveux et les corps cellulaires dessine la silhouette d'un petit fantôme caché dans les parois du tube gastro-intestinal.

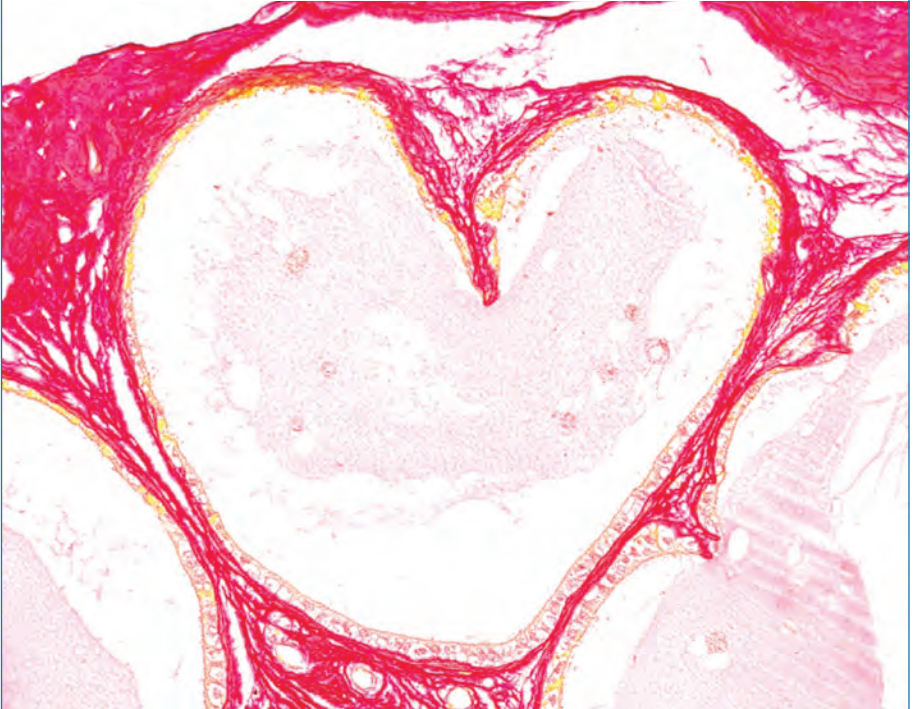


Anna BENCSIK • ANSES, LYON
anna.bencsik@anses.fr

EN PLEIN CŒUR !

Testis de souris, coloration rouge Sirius, x10

Aurélié COVINHES • Plateforme RHEM – MONTPELLIER
aurelie.covinhes@inserm.fr

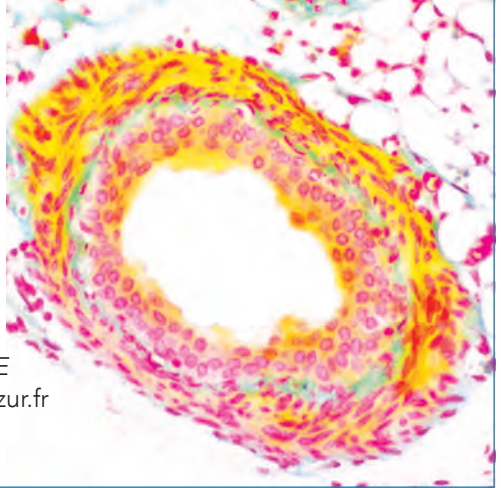


COULEURS D'ÉTÉ

Coupe d'uretère de souris colorée au rouge nucléaire, micro-indigo carmen.
Grossissement x400.

Emilie RICCA

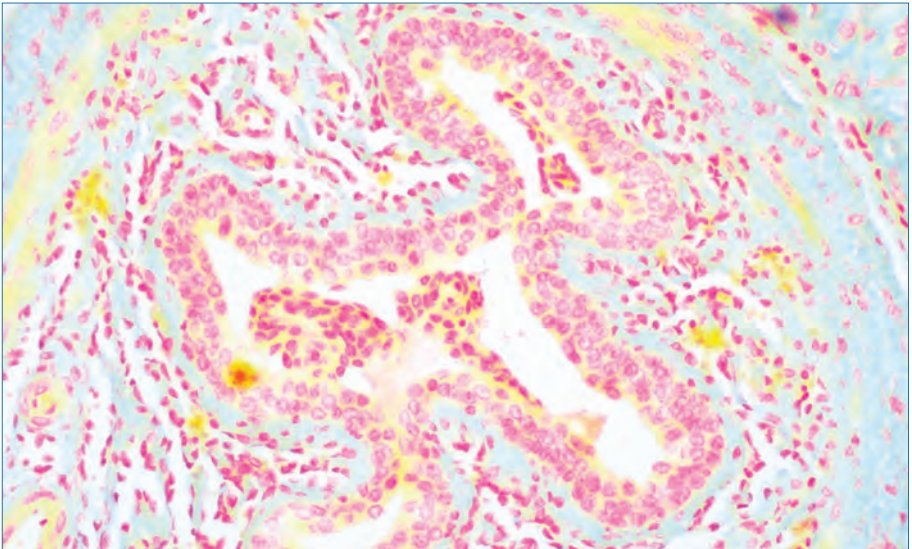
Licence Professionnelle GBHQ, NICE
sandra.lacas-gervais@univ-cotedazur.fr



PASTEL ANATOMIQUE

Coupe de pénis de souris colorée au rouge nucléaire micro-indigo-carmen.
Grossissement x200.

Marie CLAUSSE • *Licence Professionnelle GBHQ, NICE*
sandra.lacas-gervais@univ-cotedazur.fr



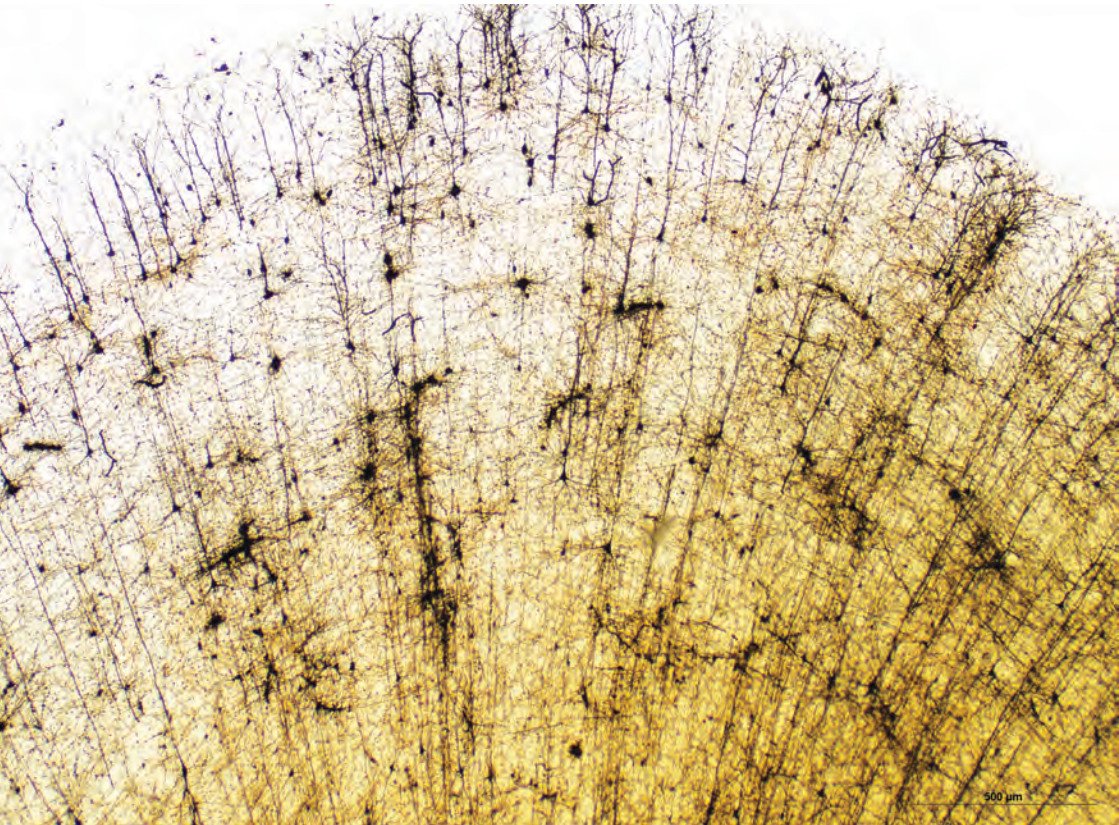
FORÊT DE LA PENSÉE: NEURONES EN FLEUR SOUS L'ENCRE DE GOLGI

Sous la magie de la coloration de Golgi, le cortex révèle son secret: un entrelacs d'arbres neuronaux, aux branches fines comme des pensées, aux racines plongées dans le silence. Chaque neurone, unique, se dresse comme un arbre de vie dans cette forêt invisible qui façonne nos rêves, nos gestes et nos souvenirs.

Iria GONZALEZ-DOPESO REYES

RHEM UMR5535, MONTPELLIER

iria.gonzalez-dopeso-reyes@igmm.cnrs.fr

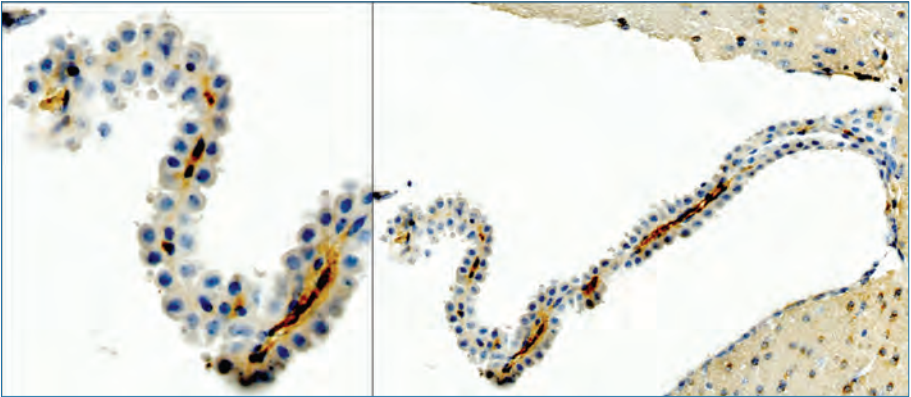


UN DRAGON D'EAU MYSTIQUE VENTRICULAIRE

Un animal mystique s'est glissé dans une immunohistochimie réalisée sur un cerveau de souris. Ce marquage dans le ventricule, semble non spécifique à la protéine recherchée. Photo prise au x20, Axioscan Z1.

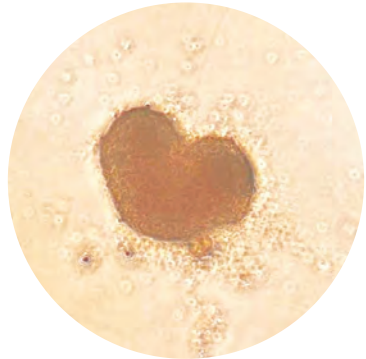
Marlène BEZOT

Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques U1039, GRENOBLE
marlene.debiossat@univ-grenoble-alpes.fr



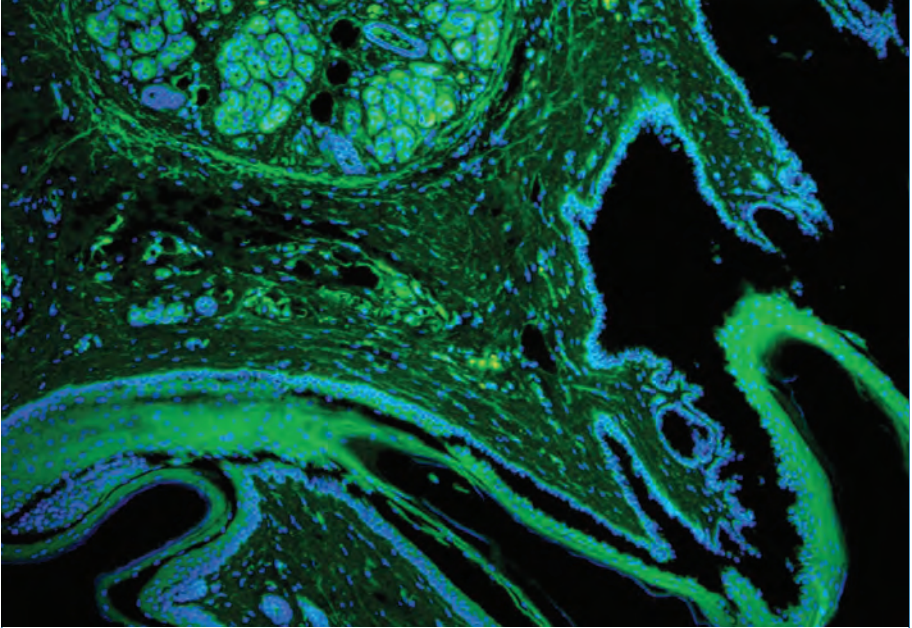
QUAND LES CELLULES FONT L'AMOUR

Au cœur même de cette cellule, un symbole puissant se dessine: un cœur, fragile mais vibrant, comme une déclaration d'amour inscrite dans l'infiniment petit. Cette sphère biologique, qui pourrait être un embryon de vie, porte en elle l'essence du monde vivant—l'organisation minutieuse, la symétrie, mais aussi la spontanéité de la création. Photo d'un sphéroïde de SHEDs + HUVECs, contraste de phase, Leica, objectif x10.



Asmaa FODA

UMR-S 1333 Inserm, Université Paris-Cité, PARIS
asmaa.foda@u-paris.fr



LES CHIMÈRES DU MICROSCOPE: DRAGONS ÉMERGEANT DES ABYSSES CELLULAIRES

Coupe histologique d'une patte de souris inclus en paraffine, autofluorescence keratin 14, keratin (vert), DAPI (bleu), Microscope DMi8 Leica, objectif x10.

Asmaa FODA

UMR-S 1333 Inserm, Université Paris-Cité, PARIS

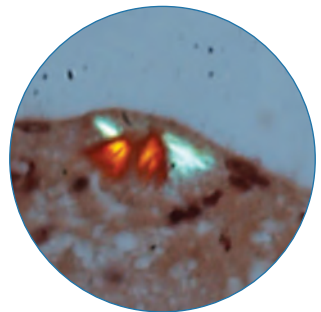
asmaa.foda@u-paris.fr

ÉRUPTION VOLCANIQUE

Plaque amyloïde nichée en bordure du ventricule latéral d'un cerveau de souris colorée au rouge Congo et dont la nature amyloïde est révélée sous lumière polarisée. Sa localisation donne l'illusion d'un volcan d'où s'échappe une coulée de lave.

Anna BENCSIK • ANSES, LYON

anna.bencsik@anses.fr



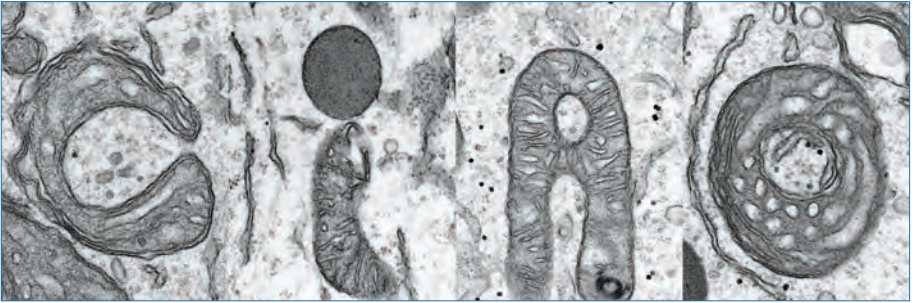
CIAO BELLA MITOCHONDRIA

Montage de 4 clichés de microscopie électronique en transmission de mitochondries en forme de lettres. Le microscope utilisé est un JEOL 1400 équipé d'une caméra GATAN RIO9. Contraste aux Lanthanides et citrate de plomb. Grossissement x80 000.

Sandra LACAS-GERVAIS

Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), NICE

Sandra.lacas-gervais@univ-cotedazur.fr



FLEUR

Cliché de microscopie électronique en transmission de prolongements cellulaires. Le microscope utilisé est un JEOL 1400. Contraste aux Lanthanides et citrate de plomb. Grossissement x25000.

Sandra LACAS-GERVAIS

Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), NICE

Sandra.lacas-gervais@univ-cotedazur.fr

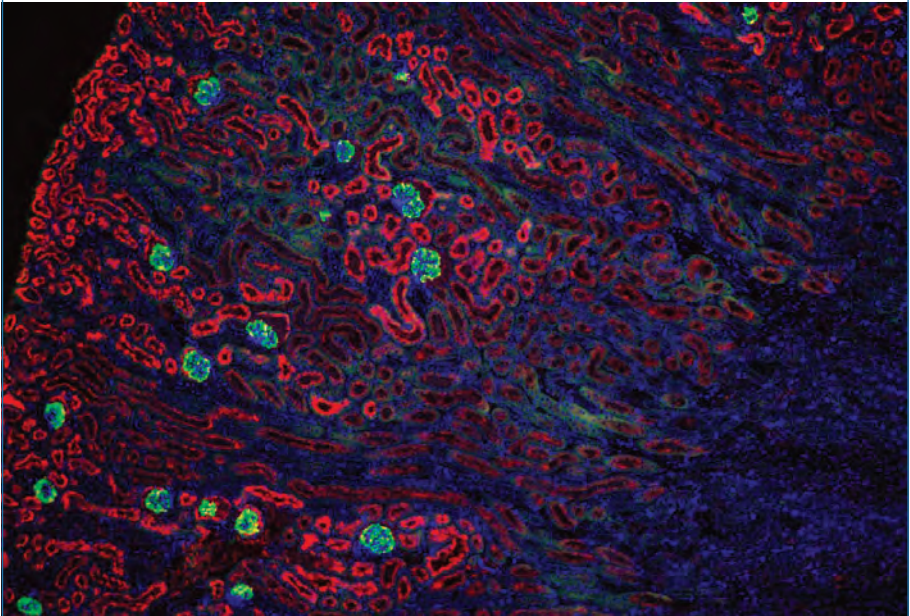


DELTA DE RIVIÈRES POURPRES

Multiplex pour la mise en évidence des podocytes glomérulaires (vert, Podocine), des progéniteurs des podocytes glomérulaires (orange, Wilm's tumor protein 1), et des tubes contournés proximaux (rouge, Mégaline), réalisé sur une coupe de 5 μm de rein de souris, fixé et inclus en paraffine. Image acquise en champ large avec le microscope Nikon Eclipse NiE, équipé d'un objectif 4X et des filtres de fluorescence pour l'excitation et l'émission des fluorophores DAPI, FITC, Cy3 et Cy5. Barre d'échelle 100 μm .

Nathalie ACCART

Novartis Pharma AG, BÂLE, SUISSE
nathalie.accart_gris@novartis.com



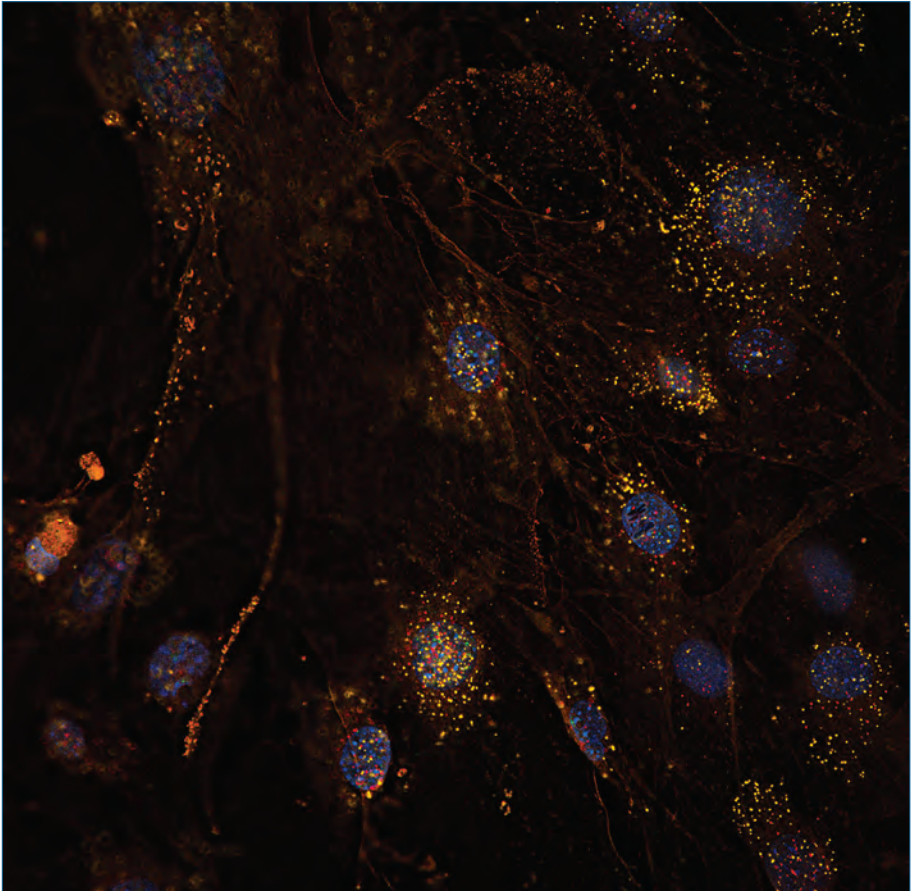


DANSE LUMINEUSE AU CŒUR DES CELLULES

Dans l'obscurité d'un univers microscopique, des constellations de lumière s'éveillent. Des sphères bleutées, semblables à des planètes lointaines, flottent dans un océan de ténèbres. Chaque point, chaque éclat, raconte l'histoire silencieuse de la vie à une échelle invisible, où l'infiniment petit devient infiniment grand. RNAScope sur des cellules osseuses (ostéoblastes) de souris (Vasorin-Rouge, Cathepsin K-Vert, Runx2-Jaune, DAPI-bleu), Microscope Eclipse Ti2-E Microscope inversé Nikon, objectif x60.

Coralie TORRENS

UMR-S 1333 Inserm, Université Paris-Cité, PARIS
coralie.torrens@u-paris.fr



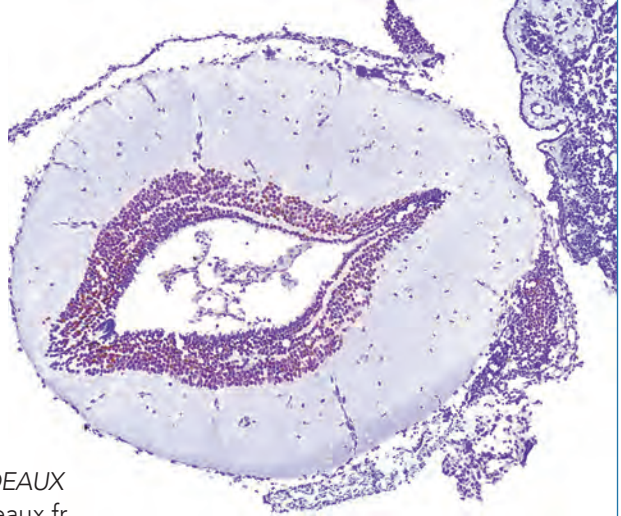
NEWT BRAIN LOOKING TO YOU

Coupe de cerveau de salamandre colorée au Crésyl Violet et acquise au Panoramic Scanner II (3D-Histech) au x20.

Sandra DOVERO

HistoCARE –

*Plateforme d'histologie
en Neurosciences, BORDEAUX
sandra.dovero@u-bordeaux.fr*

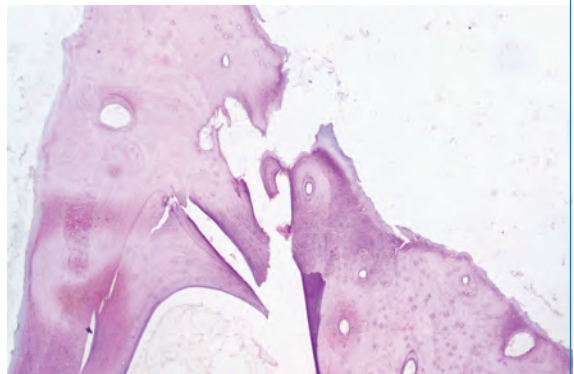


DEUX OISEAUX FIGÉS DANS LA MÉMOIRE D'UN OS HUMAIN

Dans cet univers microscopique, la science et la poésie s'entrelacent comme les filaments mystérieux d'une nébuleuse cellulaire. Les noyaux, éclats bleutés suspendus dans l'infini d'un cytoplasme doré, ressemblent à des étoiles dispersées dans l'immensité d'un cosmos intérieur. Leurs lueurs dévoilent le rythme secret du vivant. Coupe histologique d'une patte de souris inclus en paraffine, autofluorescence keratin 14, keratin (vert), DAPI (bleu), Microscope DMI8 Leica, objectif x10.

Coralie TORRENS

*UMR-S 1333 Inserm,
Université Paris-Cité, PARIS
coralie.torrens@u-paris.fr*



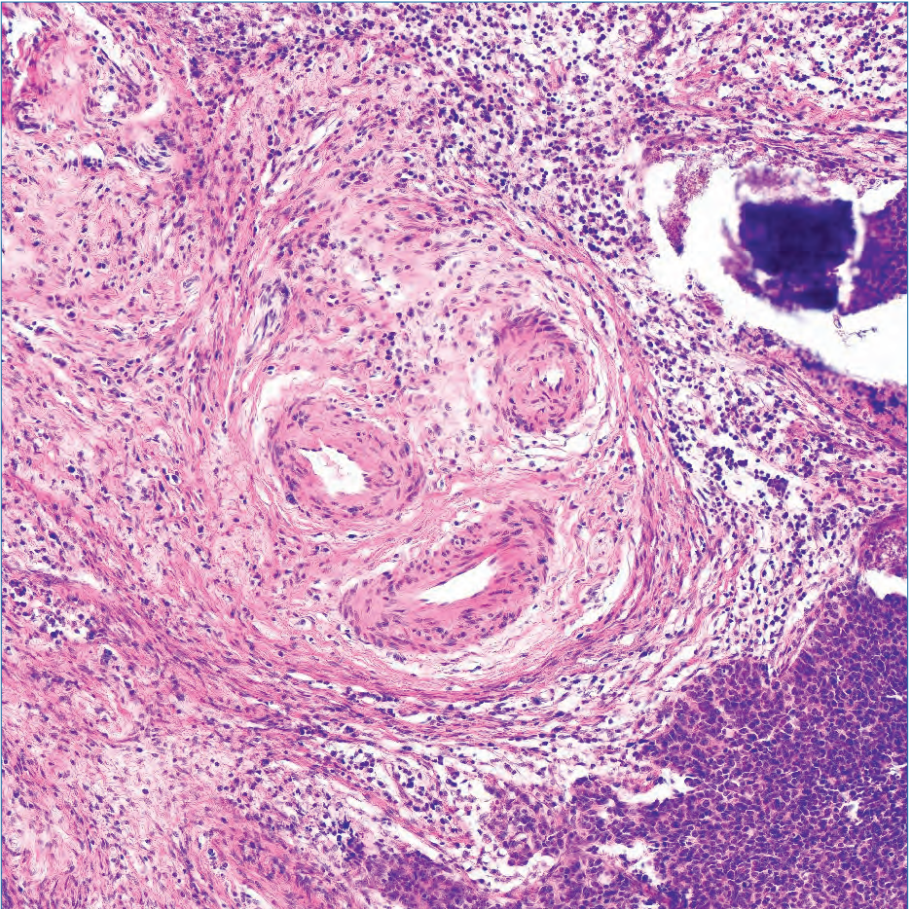


LYMPHOÏDE ATTITUDE: KEEP SMILING!

Coloration H&E d'une coupe de cancer du col de l'utérus. Un enchevêtrement vasculaire dessine les contours d'un visage souriant, dans un stroma tumoral marqué par une infiltration lymphoïde intense. Grossissement x40 – Microscopie optique – Scanner Aperio GT450.

Christine CARREIRA

*Histopathologie, Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), LYON
carreirac@iarc.who.int*



RÈGLEMENT 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 un concours photo du 1^{er} mars au 30 avril 2025, 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 (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 œuvre par mail à l'adresse suivante :

afhisto@outlook.fr avant la date limite du 30/04/2025 minuit, l'heure de réception du courriel faisant foi.

Les participants devront indiquer :

- En objet du mail : « Concours photo AFH 2025 »,
- 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 vote sur le site de l'association :

www.afhisto.fr/concours-photo du 12 au 31 mai 2025, date de clôture des votes.

ARTICLE 4 – SPÉCIFICITÉ 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 – DÉSIGNATION DES GAGNANTS ET DOTATION

Les adhérents de l'AFH pourront voter sur www.afhisto.fr/concours-photo pour leur photo préférée (un choix par adhérent).

Les votes sont ouverts du 12 au 31 mai 2025. 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^{er} 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 LIBERTÉS

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

ARTICLE 8 – ACCEPTATION DU RÈGLEMENT

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 – DÉPÔT DU RÈGLEMENT

Ce règlement peut être consulté sur le site de l'association www.afhisto.fr/

TABLE OF CONTENTS

EDITORIAL 2026

HISTOLOGY OR LIFE IN PINK AND BLUE
BENCSEK Anna & ACCART Nathalie p. 13

ARTICLES 2026

ORGANOIDS: A POWERFUL YET CONTEXT-DEPENDENT MODEL
CINQUANTA Guillaume *et al.* p. 27

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF TRAITEMENTS ON 3D *IN VITRO* SAMPLES OF RAT THYROID AND LIVER
GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela *et al.*..... p. 47

COMBINATION OF TWO HEAT-BASED UNMASKING SYSTEMS FOR AN IMMUNO-FLUORESCENCE MULTIPLEX DETECTION OF RENAL STRUCTURES BY PRIMARY ANTIBODIES FROM THE SAME SPECIES
ACCART Nathalie & LAMBERT Christian ... p. 61

MOLECULAR DISSECTION OF THE EMBRYONIC HEMATOPOIETIC STEM CELL NICHE
CANTO Pierre-Yves *et al.* p. 77

VALIDATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES IN HISTOLOGY: AN ETHICAL ALTERNATIVE WITHOUT COMPROMISING SCIENTIFIC QUALITY
DEMY Doris Lou *et al.* p. 91

CHALLENGES OF ELECTRONIC HISTOPATHOLOGY DATA IN THE AGE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE: THE IMPORTANCE OF CROSS-DISCIPLINARY COLLABORATION
OTTINI Marie-Christine p. 121

RECORDING OF ANIMAL TOXICOLOGY DATA IN INDUSTRY (RITA): GUIDANCES FOR ORGAN SAMPLING AND TRIMMING IN RATS AND MICE
GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela *et al.*..... p. 131

PROCEEDINGS: 38th AFH CONGRESS – L’histologie se met au parfum – GRASSE 2025

PROGRAMME p. 142 - 143

INAUGURAL CONFERENCEp. 144

SESSION 1: TECHNOLOGYp. 145

SESSION 2: TECHNOLOGYp. 148

SESSION 3: QUALITYp. 154

SESSION 4: COMPLEX *IN VITRO* MODELS AND ORGANOIDSp. 156

SESSION 5: COMPLEX *IN VITRO* MODELS AND ORGANOIDSp. 158

SESSION 6: DIGITAL PATHOLOGYp. 161

PHOTO CONTEST 2025

5th photo contest for the most beautiful “histo-artistico-scientific” picturep. 167

Contest rules..... p. 182 - 183

FRONT PAGE ILLUSTRATION

Mouse colon adenocarcinoma, triple immunofluorescent staining: Ki67 (cyan), e-cadherin (pink) and CD3 (yellow). Courtesy of Nicolas Gadot, CLB, Lyon.

BACK PAGE ILLUSTRATIONS

From left to right: Mouse colon adenocarcinoma, triple chromogenic staining: Ki67 (cyan), e-cadherin (pink), and CD3 (yellow) - Human tonsil, triple chromogenic staining: CD20 (cyan), Ki67 (pink), and cleaved papp (yellow) - Human hepatocellular carcinoma, Masson's trichrome stain Courtesy of Nicolas Gadot, CLB, Lyon.

SOMMAIRE

ÉDITORIAL 2026

L'HISTOLOGIE OU LA VIE EN ROSE ET BLEU
BENCOS Anna & ACCART Nathalie p. 13

ARTICLES 2026

LES ORGANOÏDES, UN MODÈLE POLYVALENT À UTILISER À BON ESCIENT
CINQUANTA Guillaume *et al.* p. 27

ANALYSE MORPHOLOGIQUE COMPARATIVE DES EFFETS DES TRAITEMENTS SUR DES ÉCHANTILLONS *IN VITRO* 3D DE THYROÏDE ET FOIE DE RAT
GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela *et al.* p. 47

COMBINAISON DE DEUX SYSTÈMES DE DÉMASQUAGE À LA CHALEUR POUR UNE DÉTECTION PAR IMMUNOFLUORESCENCE MULTIPLEX DE STRUCTURES RÉNALES PAR DES ANTICORPS PRIMAIRES DE MÊME ESPÈCE
ACCART Nathalie & LAMBERT Christian ... p. 61

DISSECTION MOLÉCULAIRE DE LA NICHE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES CHEZ L'EMBRYON
CANTO Pierre-Yves *et al.* p. 77

VALIDATION D'ANTICORPS RECOMBINANTS EN HISTOLOGIE : UNE ALTERNATIVE ÉTHIQUE SANS COMPROMIS SUR LA QUALITÉ SCIENTIFIQUE
DEMY Doris Lou *et al.* p. 91

ENJEUX DES DONNÉES ÉLECTRONIQUES D'HISTOPATHOLOGIE À L'HEURE DE L'INTELLIGENCE ARTIFICIELLE : IMPORTANCE DE LA COOPÉRATION ENTRE MÉTIERS
OTTINI Marie-Christine p. 121

ENREGISTREMENT DES DONNÉES DE TOXICOLOGIE SUR L'ANIMAL DANS L'INDUSTRIE (RITA) : GUIDES POUR L'ÉCHANTILLONNAGE ET LA RECOUPE D'ORGANES CHEZ LE RAT ET LA SOURIS
GONCALVES MACHADO Marcia Rafaela *et al.* p. 131

ACTES 38° CONGRÈS AFH – L'histologie se met au parfum – GRASSE 2025

PROGRAMME p. 142 - 143

CONFÉRENCE D'OUVERTURE p. 144

SESSION 1 : TECHNOLOGIE p. 145

SESSION 2 : TECHNOLOGIE p. 148

SESSION 3 : QUALITÉ p. 154

SESSION 4 : MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES p. 156

SESSION 5 : MODÈLES COMPLEXES *IN VITRO* ET ORGANOÏDES p. 158

SESSION 6 : PATHOLOGIE DIGITALE p. 161

CONCOURS PHOTO 2025

5° Concours des plus belles photos « histo-artistico-scientifiques » p. 167

Règlement du Concours p. 182 - 183

ILLUSTRATION DE LA PREMIÈRE PAGE

Adénocarcinome du colon de souris, triple marquage immunofluorescent : Ki67 (cyan), e-cadhérine (rose) et CD3 (jaune). Avec l'aimable autorisation de Nicolas Gadot, CLB, Lyon.

ILLUSTRATIONS DE LA PAGE ARRIÈRE

De gauche à droite : Adénocarcinome du colon de souris, triple marquage chromogénique Ki67 (cyan), e-cadhérine (rose) et CD3 (jaune) - Amygdale humaine, triple marquage chromogénique CD20 (cyan), Ki67 (rose) et parp clivée (jaune) - Hépatocarcinome humain, trichrome de Masson. Avec l'aimable autorisation de Nicolas Gadot, CLB, Lyon.

