

Bilan de la table ronde #147 “organoïdes & imagerie : défis et attentes”

Introduction:

Parmi les grands axes développés, les objectifs de la TR définis avant Mifobio étaient d'évoquer les problématiques liées : 1/ à l'obtention des échantillons (méthodes de préparation de cultures 3D ou des tissus notamment), 2/ aux marquages en profondeur (endogènes ou exogènes), 3/ au montage et à l'immobilisation des échantillons (pour le live ou le fixé), 4/ aux questions liées à la diffusion de la lumière (microscopie multiphotonique ou à feuillet de lumière, et la transparisation pour les échantillons fixés par exemple), 5/ à l'obtention de paramètres mesurables et quantifiables (les readouts) et 6/ aux approches d'analyses de jeux de données multidimensionnels complexes.

Modalités de la table ronde

Cette table ronde a eu lieu le 7 octobre au soir dans la salle Atlantique.

14 personnes étaient inscrites, mais nous avons comptabilisé 21 personnes présentes dans la salle et actives dans les discussions.

Un bref tour de table initial nous a permis de mettre en relief un certain nombre de problématiques partagées par les participants, que nous avons ensuite discutées.

La table ronde a été un lieu d'échange et les animateurs ont fait le choix de ne pas utiliser les présentations qu'ils avaient préparées mais plutôt de favoriser l'interactivité en animant le débat

Les participants représentaient une grande diversité de champs disciplinaires (Biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et physiopathologie, opticiens, opto-acousticiens, spécialistes du traitement du signal...), avec des profils variés (chercheuses et chercheurs, étudiantes et étudiants, ingénieurs, en laboratoire ou sur plateforme...)

Principaux thèmes abordés et conclusions

Un des premiers problèmes abordés est la difficulté d'imager ou d'interpréter le faible signal de fluorescence au centre de l'agrégat cellulaire, que ce soit sur des échantillons vivants ou fixés.

Les techniques de biphoton et de light sheet microscopy ont été comparées et apportent des solutions intéressantes, avec des phototoxicités bien évidemment différentes, mais restent à optimiser pour visualiser au mieux l'ensemble des sphéroïdes/organoïdes.

La diffraction de la lumière liée aux nombreux changements d'indices de réfraction est évidemment un souci, auquel la clarification peut apporter une solution pour des échantillons fixés.

L'utilisation de TDE (milieu de montage) peut aussi améliorer l'imagerie en profondeur. Nous avons aussi pointé là, la nécessité de mettre en parallèle le signal observé in toto, versus le signal observé sur des coupes fines, marqués après coupe, qui est le seul moyen de savoir si la baisse de signal au centre est due à une baisse du signal, une difficulté de pénétration de la molécule marquante ou un problème de diffusion de la lumière au centre.

Les approches d'optique adaptative pourraient en théorie améliorer la résolution de l'imagerie en profondeur, mais les premiers essais n'ont apparemment pas pour l'instant répondu aux attentes.

Suite aux questionnements relatifs à la transparisation ont été aussi abordés les questions relatives à la matrice extracellulaire, qu'elle soit ajoutée (Matrigel par exemple) ou naturellement sécrétée. Les participants évoquent les problèmes de textures de la

matrice, qui génère des difficultés lors de la préparation aux marquages et à la transparence, mais également des problèmes lors de l'inclusion préalable à la coupe (agarose, OCT, paraffine, méthode de coupe : cryostat, microtome ou vibratome), ou s'il y a nécessité de dissocier les cellules pour une méthode d'analyse spécifique (FACS par exemple).

Suite à cette collection de problèmes plus en relation avec le traitement des échantillons, les participants ont évoqué les possibles solutions apportées par les techniques d'imagerie, qu'elles soient optiques ou autres.

Les différentes techniques de microscopie et leurs développements spécifiques particulièrement adaptés à l'imagerie d'échantillons épais ont bien entendu été abordés : microscopie à feuille de lumière (que beaucoup dans l'audience utilisent fréquemment), microscopies confocales visibles (point par point ou à disque rotatif), microscopie multiphotonique, optiques adaptatives... Les participants ont aussi exploré les possibilités autres que l'imagerie photonique pour pallier aux propriétés intrinsèques des sphéroïdes qui sont réfractaires à leur investigation par la lumière visible. C'est ainsi qu'ont été abordées des méthodes d'imagerie en contraste de phase aux rayons X et microscopies de rayons X disponibles sur les synchrotrons, d'imagerie acoustique...

La possibilité de production d'un grand nombre d'organoïdes associée au fait que ce soit un modèle particulièrement apprécié pour les tests pharmacologiques amène également à évoquer les techniques d'imagerie au débit (HCS) et aux techniques d'analyse des données produites (HCA).

Parmi les autres points abordés s'est aussi posée la question de la compatibilité des matrices utilisées en bioimpression 3D avec les protocoles de marquage de coupes. De nombreuses matrices y résistent apparemment difficilement. Le choix des matrices, leur concentration et la fixation des échantillons ainsi que le choix du mode de coupe (vibratome vs microtome/cryo) ont été évoquées comme autant de solutions à creuser.

La plupart des techniques d'imagerie employées conduisent à la production de plus en plus importante de données numériques. Ce qui pose plusieurs questions : le transfert (protocoles, bande passante) du matériel d'acquisition au matériel de stockage (serveurs, IN2P3), la disponibilité (données comprimées, stockées sur site ou externalisées), la nécessité de curation (quelles données garder, combien de temps), l'ordonnement (référencement, bases de données), l'accès (protection, rapidité d'accès), la sécurité du stockage lui-même (à la fois résistance aux piratages, mais aussi pérennisation de la donnée), et enfin, l'analyse des données elles-mêmes (logiciels de traitement et d'analyse clé en main open ou payants : Fiji-ImageJ, Icy, Ilastik, Imaris, Amira, Arivis... versus des solutions développées sur mesure)

Conclusions générales et perspectives

Il a enfin été conclu que l'imagerie des organoïdes tend à répondre à des questions biologiques à différentes échelles : cellulaire, subcellulaire, moléculaire, et sur des échantillons vivants ou fixés. En fonction de ces questions, les contraintes techniques sont différentes et il n'est pas judicieux de réfléchir à une solution unique mais plutôt d'adapter différentes solutions pertinentes.

Nous avons convenu de dresser une liste des savoir-faire et une liste de sous-besoins distincts afin de réfléchir à des solutions personnalisées pour chaque question.

Enfin, participants et organisateurs souhaitent qu'à la suite de cette table ronde soit créée une communauté qui pourrait d'abord se constituer autour d'une base de données des personnes intéressées et une structure permettant d'échanger questions et réponses à la communauté (à propos de tous les sujets abordés ci-dessus). Dans un premier temps une liste de diffusion par email sera créée (multicell-3d@services.cnrs.fr), puis suite aux échanges qui s'y passeraient, les différents intervenants pourraient être invités à téléverser les protocoles et informations qui seraient mise à disposition de tous sur le web (pourquoi pas sur une page web dédiée, hébergée sur le site internet du GDR).