

*Année universitaire 2024-2025*

Mathis BOUVET

**Cartographie intégrée de la région  
lombo-sacrée embryonnaire humaine  
par imagerie 3D et immunofluorescence  
multiplexée**

DECODE

Developmental Embryonic COMplexity by Depp Exploration

Responsable du stage : Pr Alain Chédotal

Institut de la Vision – Paris 75012

## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Alain Chedotal, qui m'a accueilli dans son laboratoire et au sein de son équipe. Merci de m'avoir fait confiance sur le MACSima, une machine complexe à gérer avec toutes ses données, et de m'avoir laissé exprimer mes idées d'analyse. Je suis reconnaissant d'avoir pu travailler dans un laboratoire à la pointe de la recherche en embryologie, avec un accès à un équipement et à des échantillons de grande valeur. Cela a renforcé mon attrait pour l'embryologie et les processus du développement. Vous êtes une source d'inspiration par votre exemplarité et votre rigueur, qui permettent d'atteindre de tels résultats.

Je remercie également Eve Blanquart. Sans toi, ce travail n'aurait pas vu le jour. Ta connaissance de la machine et de l'immunofluorescence a été un atout majeur dans le développement de mes expériences et dans ma réflexion pour la suite des expérimentations.

Je remercie aussi toute l'équipe de m'avoir intégré et de m'avoir transmis tant d'aspects de la recherche. Un merci tout particulier à Ehmada : tes connaissances anatomiques encyclopédiques ont été d'une aide précieuse et m'ont permis d'aborder mon analyse avec rigueur et justesse. Merci également à Frédérique et Aymeric de m'avoir guidé dans cette zone si riche et complexe qu'est la région hypogastrique. Merci également à Stéphane pour l'aide et la patience sur le MACSima, rendez-vous au prochain 9To

Je remercie encore une fois le professeur Catherine Yardin de la faculté de médecine de Limoges. Ce stage illustre parfaitement l'aboutissement de mon envie de faire de l'embryologie, née de vos cours en médecine. C'est toujours un plaisir de venir partager mon travail avec vous, accompagné de ces belles images.

Et pour finir, j'aimerais remercier tous mes proches et amis. Mes Parisiens préférés, Yogan et Eva, qui m'apportent un point de vue que je ne pourrai jamais avoir autrement sur ce métier. Merci à toi, Léonie. On a partagé nos 18 m<sup>2</sup> tous les deux (avec nos chats), les trajets le matin, les balades le dimanche. Bref, sans toi, cette ville a une autre couleur. Il est toujours difficile d'exprimer à quel point tu es importante dans ma vie, autant sur le plan personnel que professionnel. J'espère qu'on continuera tout ça à deux

Et merci à ma maman. Je ne sais pas si j'arriverai un jour à développer tes connaissances cliniques et oncologiques, sans limite, mais j'espère que ce que je construis te rendra fière, peu importe la voie que j'emprunte.

## Résumé

L'exploration du développement embryonnaire humain exige des outils capables d'intégrer l'organisation morphologique et l'identité cellulaire. Dans ce travail, nous avons combiné l'imagerie tridimensionnelle par transparence à la microscopie à feuille de lumière avec l'immunofluorescence multiplexée par MACSima sur des embryons humains entre PCW7 et PCW8. Cette approche couplée permet d'associer une cartographie globale des structures à une résolution moléculaire fine, offrant une lecture multi-échelle du développement. Les données obtenues révèlent l'organisation du système nerveux autonome, la structuration de la dure-mère et la différenciation du tube digestif postérieur. La segmentation cellulaire et l'analyse spatiale des marqueurs ont permis d'identifier des sous-populations spécifiques, de décrire des trajectoires de différenciation et de caractériser des structures transitoires comme l'organe de Zuckerkandl. Cette convergence ouvre la voie à une embryologie fonctionnelle, connectant l'identité cellulaire, la localisation topographique et la dynamique tissulaire. Toutefois, la mise en œuvre de la technologie MACSima présente des défis importants : la conception de panels nécessite une validation fine des anticorps, chaque acquisition peut s'étendre sur plusieurs jours, et les fichiers générés atteignent plusieurs téraoctets. Malgré ces contraintes, cette stratégie surmonte les limites des approches classiques et fournit une base robuste pour cartographier les trajectoires cellulaires, décrypter les niches de spécialisation et mieux comprendre les origines embryonnaires de pathologies humaines. Elle s'inscrit pleinement dans les objectifs des atlas développementaux humains de nouvelle génération.

## Summary

Exploring human embryonic development requires tools capable of integrating morphological organization and cellular identity. In this study, we combined three-dimensional imaging via tissue clearing and light-sheet microscopy with cyclic multiplex immunofluorescence using the MACSima platform on human embryos between PCW7 and PCW8. This dual approach enables the association of global structural mapping with fine molecular resolution, offering a multi-scale view of development. The resulting data reveal the organization of the autonomic nervous system, the architecture of the embryonic dura mater, and the differentiation of the posterior digestive tract. Cellular segmentation and spatial marker analysis allowed the identification of specific subpopulations, the description of differentiation trajectories, and the characterization of transient structures such as the organ of Zuckerkandl. This convergence paves the way for a functional embryology that links cell identity, spatial localization, and tissue dynamics. However, implementing MACSima technology presents significant challenges: panel design requires precise antibody validation, each acquisition may take several days, and the resulting datasets can reach hundreds of terabytes. Despite these constraints, this strategy overcomes the limitations of classical approaches and provides a robust framework for mapping cellular trajectories, deciphering specialization niches, and gaining insight into the embryonic origins of human pathologies. It aligns closely with the goals of next-generation human developmental cell atlases.

# Table des matières

<b>I. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>II. Résultats</b>	<b>4</b>
<b>1. Mise en place et validation progressive du protocole d'immunomarquage multiplexé dans le testicule fœtal humain</b>	<b>4</b>
<b>2. Analyse d'une coupe embryonnaire à PCW8</b>	<b>7</b>
a. Analyse de la racine dorsale en formation et validation des marqueurs axonaux sur la lame ZBA	9
b. Sous-populations Syk <sup>+</sup> et organisation cellulaire de la dure-mère embryonnaire à PCW8 sur la lame ZBA	11
c. Différenciation endodermique et mésenchymateuse du tube digestif postérieur de la lame ZBA	13
<b>3. Visualisation tridimensionnelle et caractérisation moléculaire des structures sympathiques dans la région aorto-hypogastrique embryonnaire</b>	<b>16</b>
a. Organisation topographique et expression moléculaire des troncs sympathiques embryonnaires segmentaire	16
a. Reconstruction topographique du système orthosympathique pelvien en microscopie 3D	17
d. Caractérisation moléculaire de l'organe de Zuckerkandl par immunomarquage multiplexé	18
<b>III. Discussion</b>	<b>20</b>
<b>IV. Conclusion</b>	<b>25</b>
<b>V. Matériel et méthode</b>	<b>26</b>
<b>VI. Bibliographie</b>	<b>31</b>
<b>VII. Annexes</b>	<b>34</b>

## Liste des figures

FIGURE 1 : ANALYSE MULTI-ECHELLE ET MULTI-MARQUEURS DU TESTICULE EMBRYONNAIRE HUMAIN A PCW7 ET PCW20	6
FIGURE 2 : OBSERVATION ET SELECTION CRYOSTATEE D'UN ECHANTILLON EMBRYONNAIRE A PCW8 ET ANALYSE IMMUNOFLOUORESCENTE DES STRUCTURES LOMBO-SACREES	8
FIGURE 3 : ANALYSE SPATIALE ET PHENOTYPIQUE DES CELLULES SYK <sup>+</sup> DANS LA DURE-MERE EMBRYONNAIRE HUMAINE A PCW8	12
FIGURE 4 : SEGMENTATION ET CARACTERISATION DES STRUCTURES DIGESTIVES EMBRYONNAIRES A PCW8	14
FIGURE 5 : ANALYSE SPATIALE MULTI-ECHELLE DES STRUCTURES LOMBO-PELVIENNES EMBRYONNAIRES	19

## Liste des abréviations

MACSima : Magnetic Activated Cell Sorting Imaging Microarray

HuDeCa : Human Developmental Cell Atlas

PCW : semaine post-concetion (post conception week)

MEC : matrice extra-cellulaire

IF : immunofluorscence

IM : immunomarquage

UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection

## I. Introduction

L'étude du développement embryonnaire humain s'inscrit dans une tradition scientifique ancienne, initiée dès l'Antiquité avec Aristote, qui fut l'un des premiers à proposer une théorie du développement fondée sur l'observation de l'embryogenèse chez l'animal. Pendant des siècles, ces approches sont restées théoriques, limitées par l'absence d'instruments adéquats. L'avènement du microscope au XVIIIe siècle, puis les premières observations de cellules, marquent un tournant, initiant les grands débats entre préformation et épigenèse. C'est au XIXe siècle, avec les travaux de Karl Ernst von Baer, que l'embryologie prend une tournure résolument moderne. Von Baer identifie des structures embryonnaires communes à tous les vertébrés et formalise les premières lois du développement, jetant les bases de la morphogenèse comparée. Cette époque voit aussi émerger des techniques histologiques qui permettront, au siècle suivant, une description fine des étapes du développement embryonnaire humain.

Au XXe siècle, la création de la classification des stades de Carnegie (O'Rahilly and Müller, 1987) permet de standardiser l'étude des embryons humains, en associant des critères morphologiques précis à chaque stade de développement pendant les huit premières semaines post-conception. Toutefois, l'anatomie seule ne permet pas de comprendre la dynamique sous-jacente du développement. Avec l'essor de la biologie cellulaire et moléculaire, il devient alors nécessaire d'associer les niveaux d'analyses pour caractériser non seulement les structures, mais aussi les populations cellulaires qui les composent et leurs trajectoires différentielles. Le cas typique des cellules de crête neurale, dont les trajectoires de migrations aboutissent à des lignages extrêmement diversifiés (neurones sensoriels, cellules gliales, cellules chromaffines, etc...) illustre parfaitement la problématique. Elle dépend à la fois de signaux moléculaires, de leur position dans le tissu et de l'histoire développementale (Soldatov et al., 2019). D'autres cellules à l'apparence moins complexe comme les cellules somatiques de la gonade fœtale mâle, reposent sur un programme transcriptionnel initié par le gène SRY, suivi d'une activation spatio-temporelle de Sox9, et ne peut être pleinement comprise sans replacer ces transitions moléculaires dans leur contexte architectural au sein de la gonade (Stevant et al., 2018).

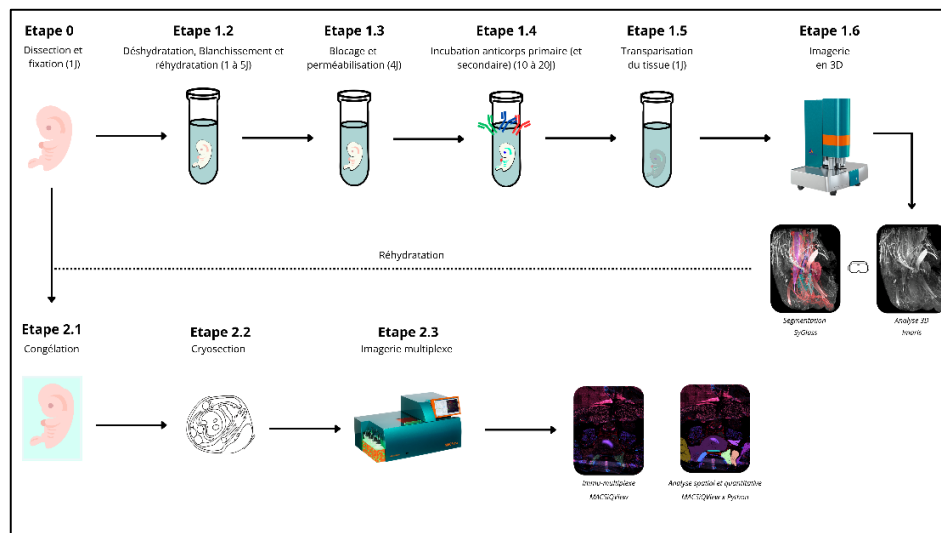
Dans ce cadre, les techniques d'imageries tridimensionnelles (3D) appliquées à l'embryon humain ont connu un essor considérable grâce au développement de protocoles de transparence tels que l'iDISCO (Renier et al., 2014). Cette approche, combinant un immunomarquage en profondeur de tissus entier à leur transparence (blanchiment, déshydratation et délipidation) permet un immunomarquage en profondeur et une acquisition

volumique par microscopie à feuillet de lumière. Elle autorise ainsi la reconstruction complète de l'organisation spatiale des structures embryonnaires, offrant une vision intégrée du développement dans son contexte morphologique natif. Cependant, l'interprétation des reconstructions 3D reste parfois limitée par le faible nombre d'anticorps utilisables simultanément, ce qui rend difficile l'identification précise de certaines structures ou lignages. Pour pallier cette limite, une stratégie complémentaire consiste à utiliser l'immunofluorescence multiplexée/cyclique, en particulier via la plateforme MACSima (Magnetic Activated Cell Sorting Imaging Microarray). Cette technologie permet l'application séquentielle de multiples anticorps sur une même coupe, produisant une carte cellulaire et moléculaire à haute résolution. Elle permet non seulement d'identifier des sous-populations cellulaires, mais aussi d'analyser leurs profils d'expression, leur état fonctionnel (prolifération, différenciation, migration), leurs interactions, et leur position dans l'espace tissulaire. Toutefois, la performance de chaque anticorps dans ce système dépend fortement de conditions expérimentales spécifiques (fixation, exposition, détachement cyclique), rendant indispensable une phase d'optimisation préalable des panels utilisés (Kinkhabwala A et al., 2022). Dans ce travail, une étape systématique d'évaluation a été conduite pour tester la compatibilité de chaque anticorps avec le protocole MACSima, révélant des disparités importantes entre les anticorps validés en immunofluorescence classique et ceux fonctionnels en conditions multiplexées. Ce calibrage en amont conditionne la qualité des données et la fiabilité des profils obtenus.

Cependant, la richesse des données obtenues ne prend tout son sens qu'à condition de disposer d'une segmentation cellulaire fiable (Caicedo et al., 2021). La segmentation constitue en effet le point de départ de toute quantification. Chaque cellule doit être correctement identifiée, séparée de ses voisines et assignée à un ensemble de pixels cohérent pour que les mesures d'intensité, de position, de voisinage ou d'expression soient valides. Une segmentation imparfaite, contours mal définis, fusions ou divisions incorrectes, entraîne des artefacts dans les analyses en aval : expression biaisée, regroupements cellulaires erronés (clustering), positionnement spatial bruité. Dans ce contexte, l'évaluation rigoureuse des méthodes de segmentation devient un enjeu méthodologique majeur. Notre approche consiste à comparer les résultats automatiques ou semi-automatiques à une segmentation manuelle de référence, construite sur un ensemble restreint mais bien annoté. Cette étape permet de calibrer et valider les algorithmes de segmentation selon des critères objectifs. Elle est d'autant plus cruciale que la qualité de la segmentation conditionne directement la pertinence biologique des analyses ultérieures.

Enfin, ce travail s'inscrit dans le cadre du projet HuDeCa (Human Developmental Cell Atlas), qui vise à cartographier les tissus embryonnaires humains à haute résolution. Nous avons ici ciblé spécifiquement la région lombo-hypogastrique, où se mettent en place des structures majeures du système reproducteur (gonades, tractus urogénital), mais aussi leur environnement neurovasculaire, incluant l'innervation autonome émergente. Cette période, autour de 7 à 8 semaines post-conception (PCW), correspond à une phase clef de mise en place des interactions entre les compartiments mésodermiques, endodermiques et neuroectodermiques. Ce couplage entre imagerie tridimensionnelle et immunofluorescence cyclique nous a ainsi permis de relier l'organisation morphologique globale, visualisée in toto par transparence, à l'identité moléculaire fine révélée à l'échelle cellulaire. Il devient alors possible d'interpréter des structures embryonnaires dans leur contexte spatial natif tout en caractérisant précisément leurs populations constitutives. Cette approche intégrée, combinant continuité topographique et résolution moléculaire, constitue un outil supplémentaire pour décrypter les processus complexes du développement humain, notamment dans des territoires à forte hétérogénéité cellulaire comme la région lombo-hypogastrique.

Dans ce travail, nous avons d'abord réalisé une imagerie cyclique (MACSima) sur un échantillon testiculaire humain à PCW20 et PCW7 montrant ainsi les opportunités, les limites et les optimisations des panels d'anticorps utilisés. Leur analyse, notamment de la segmentation et l'application des optimisations, ont permis par la suite l'acquisition en immunomarquage multiplexe de deux régions hypogastriques d'un embryon à PCW8. Cette dernière a bénéficié d'un large panel d'anticorps, incluant des marqueurs d'identité cellulaire, de prolifération, de différenciation neuronale, ainsi que des protéines associées à des fonctions épithéliales, musculaires ou immunitaires/inflammatoires, des marqueurs de matrice extracellulaire (MEC) et de spécialisation endocrinienne.



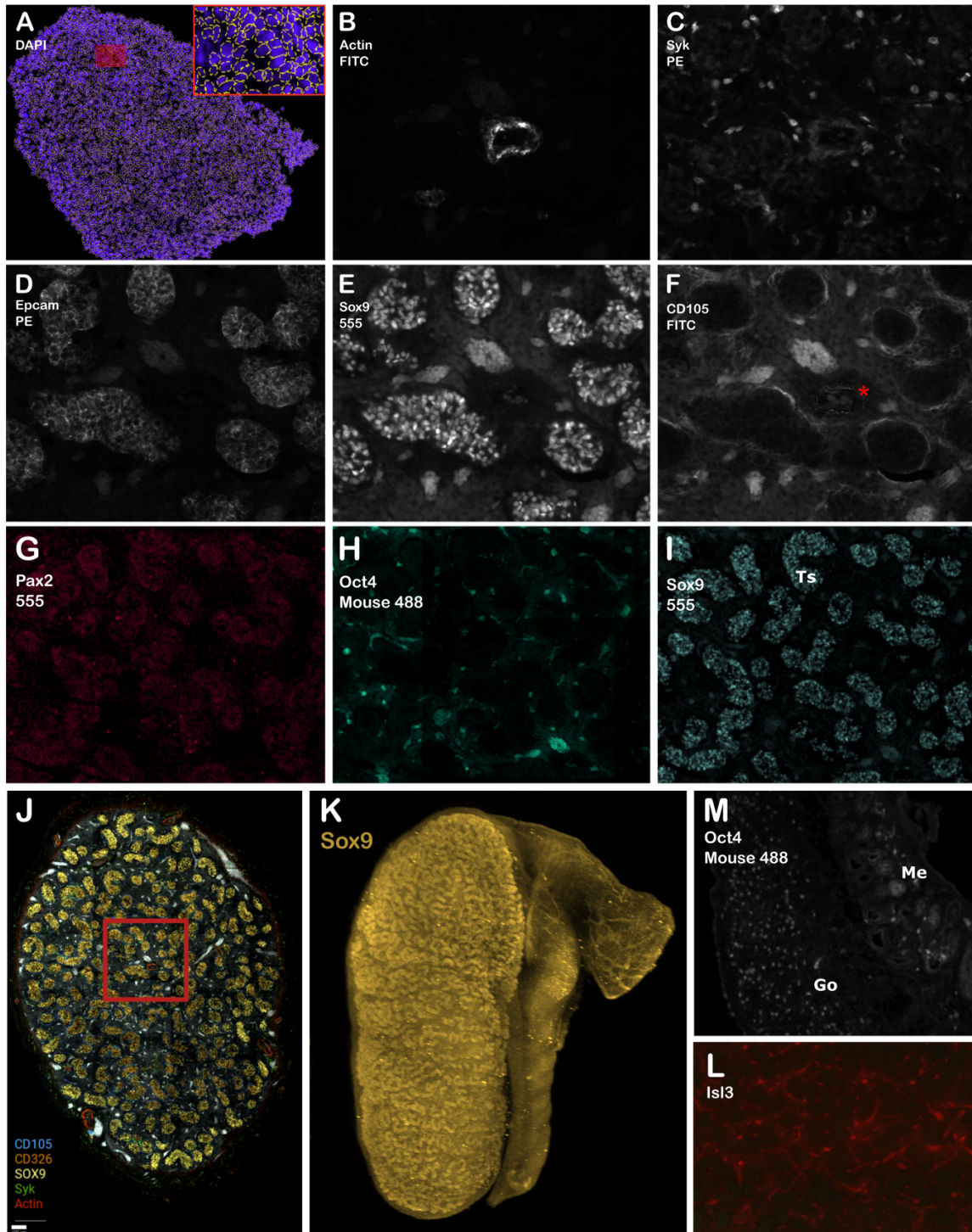
## II. Résultats

### 1. Mise en place et validation progressive du protocole d'immunomarquage multiplexé dans le testicule foetal humain

L'immunomarquage multiplexé a d'abord été testé sur des coupes de gonades mâles et femelles entre PCW7 et PCW12, à l'aide d'un panel d'anticorps validés, majoritairement ciblés sur des marqueurs immunitaires. Ces immunomarquages ont été réalisés sur la plateforme d'imagerie de Miltenyi en Allemagne qui nous a les données/images brutes. Comme mentionné précédemment, la segmentation cellulaire constitue une étape clé pour relier les données d'immunomarquage aux futures analyses spatiales. Le logiciel MACSiQ View intègre un module de segmentation automatique basé sur la détection des contours cellulaires. Pour évaluer la robustesse, une coupe testiculaire embryonnaire à PCW7 a été segmentée manuellement, dans le but de générer un masque qui sert de base à la segmentation automatique de MACSiQ View (figure 1A). Les paramètres de la segmentation automatique sont ensuite utilisés comme référence pour entraîner un modèle d'apprentissage supervisé, destiné à valider automatiquement la segmentation sur des coupes plus complexes, incluant davantage de structures et de cellules. Ce modèle constitue désormais une référence méthodologique pour la suite des analyses quantitatives. L'ensemble de la méthode est présenté en Annexe 1. Dans la continuité de cette approche, nous avons élargi notre collection d'échantillons à des âges embryonnaires plus avancés. Un testicule embryonnaire à PCW20 a ainsi été imagé. Dans un premier temps, l'organisation des structures testiculaires, notamment les tubes séminifères Sox9<sup>+</sup>, a été examinée en microscopie 3D (figure 1K). Cette technique s'est révélée particulièrement efficace pour visualiser la morphologie des tubes séminifères. L'objectif à terme est d'atteindre une segmentation précise et efficace des tubes séminifères, afin de caractériser leur organisation, potentiellement non aléatoire, et de remonter à des trajectoires développementales spécifiques au sein du testicule. Cette hypothèse, encore en cours d'exploration, demeure plausible bien que certaines limites techniques aient été observées : l'échantillon à PCW20 présente un marquage globalement faible, en particulier sur les coupes transversales, ce qui complique les approches d'apprentissage automatique (deep learning). Nous avons également utilisé cet échantillon pour tester l'immunomarquage multiplexé via la plateforme MACSima. Un total de 37 anticorps a été testé. Parmi eux, 21 ont produit un signal spécifique, morphologiquement et topographiquement interprétable. Ces anticorps sont : Actin,  $\beta$ 3-tubuline, CD105 (Endogline), CD117 (c-Kit), CD239 (BCAM), CD326 (EpCAM), CD34,

CD74, Cytokératine-19, Lyve-1, Pax2 (APC et PE), S100A8, SMA (Smooth Muscle Actin) (PE, APC, FITC), Sox9 (PE, APC, FITC), Syk, TCL1 et TH (PE et APC). En revanche, 16 anticorps n'ont pas généré de signal exploitable, soit en raison d'un marquage absent, soit d'un bruit de fond trop important : Annexin-1, CD28, CD31 (PECAM-1), CD45 (PTPRC), CD64 (FC $\gamma$ RI), Collagène IV, EGF Receptor, Galectine-3, HLA-DR/DP/DQ, Ki-67, Myosine Smooth Muscle, Nanog, Oct2, Oct3/4, PLP (Proteolipid Protein 1), TSPAN8 (Tetraspanin 8), CD235a, SUSD2 et Oct3/4 non conjugué (Santa Cruz). L'ensemble du panel d'anticorps et leur évaluation est présenté en Annexe 2.

L'échantillon à PCW20 montre un immunomarquage riche et cohérent avec l'organisation attendue du testicule fœtal, confirmée en microscopie 3D (figure 1B – 1F et figure 1J). Les tubes séminifères sont bien individualisés, caractérisés par une expression nucléaire de Sox9 dans les cellules de Sertoli, et une expression cytoplasmique de EpCAM dans les cellules épithéliales (figure 1J). Cette expérience valide ainsi l'approche technique et met également en évidence la nécessité d'une phase d'optimisation préalable pour chaque anticorps utilisé avec la technologie MACSima. En effet, certains marqueurs n'ont pas eu le profil d'expression attendu. L'anticorps Oct3/4 (Santa Cruz), pourtant fonctionnel en immunofluorescence classique (figure 1M), n'a généré aucun signal dans ce contexte (figure 1H). Un autre paramètre technique important est la persistance de la fluorescence entre les cycles. Celle-ci peut interférer avec l'interprétation : le signal de Pax2 au cycle 20, faible mais localisé dans les tubes séminifères, semble contaminé par le résidu de signal de Sox9 détecté dans le cycle précédent (figures 1H et 1I). Ce phénomène est également visible sur le marquage de CD105, précédé du marquage SMA (figure 1F). Ces observations soulignent l'importance des ajustements nécessaires pour constituer des panels d'anticorps optimisés, garants d'une lecture fiable et biologiquement pertinente. Elles servent ainsi de base méthodologique pour la suite du projet. Enfin, le compartiment interstitiel présente des cellules Insl3<sup>+</sup> compatibles avec des cellules de Leydig, identifiées en microscopie 3D sur un échantillon triple marquage (Sox9, TO-PRO, Insl3. Nous permettant d'envisager une analyse commune des deux techniques.



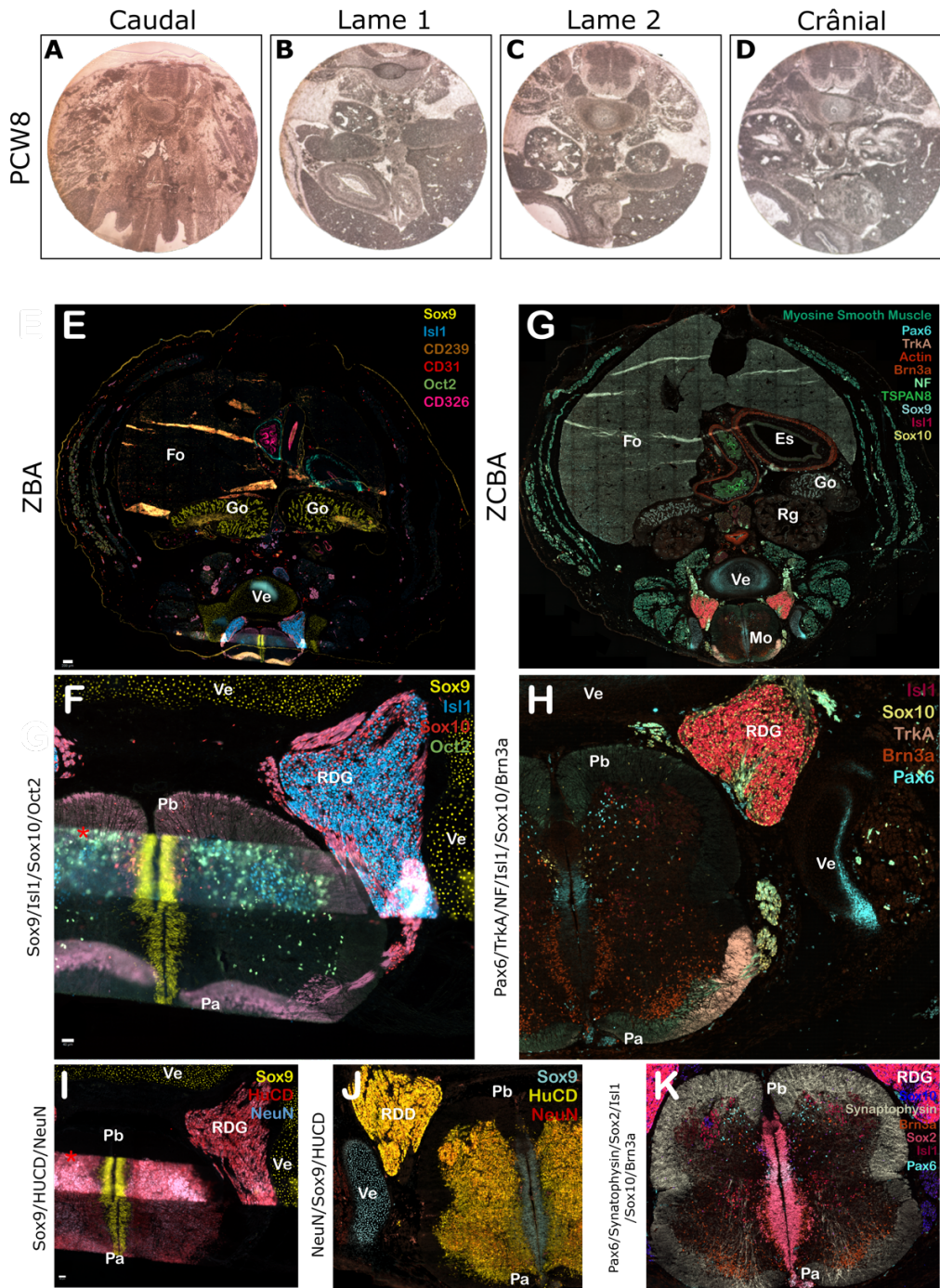
**Figure 1 : Analyse multi-échelle et multi-marqueurs du testicule embryonnaire humain à PCW7 et PCW20.** (A) Coupe testiculaire à PCW7 avec segmentation des noyaux basée sur la marquage DAPI. (B-F) Visualisation individuelle en niveaux de gris de chaque canal (B) l'actine, (C) Syk, (D) EpCAM, (E) Sox9 et (F) CD105 ou \* représente l'artéfact de CD105 issu de SMA. (G-I) Immunomarquage issu du MACSima pour la coupe testiculaire PCW20 mettant en évidence (G) Pax2, (H) Oct4 et (I) Sox9. (J) Coupe testiculaire complète à PCW20 analysée par imagerie multiplexée MACSima avec en bleu CD105, en orange CD326, en jaune Sox9, en vert Syk et en rouge Actin. (K) Imagerie tridimensionnelle de l'échantillon PCW20 sur le marqueur Sox9 en jaune et Isl3 en rouge sur une vue en coupe (L). (M) Marquage Oct3 sur un échantillon PCW6.

Abréviation : Me = mésonéphrose, Go = gonade, Ts = tube séminifère

## 2. Analyse d'une coupe embryonnaire à PCW8

Le tissu testiculaire à PCW20, bien qu'issu d'un embryon plus âgé, nous a permis de valider l'utilisation de la technologie MACSima, d'en tirer des paramètres d'optimisations, et de confirmer la bonne convergence des résultats obtenus avec ceux de la microscopie 3D. En tenant compte des difficultés rencontrées avec certains anticorps, nous avons constitué d'un second panel sur un embryon à PCW8. Cet échantillon a été coupé au cryostat sur une large portion de la région sacro-lombaire (figure 2A et 2D). Dans le cadre de ce projet d'étude du développement du système nerveux autonome et de l'organisation des gonades, nous avons sélectionné grâce aux premières observations sortie du cryostat, deux coupes. La première située juste après la bifurcation de l'aorte en artères iliaques communes (figure 2B), contient les deux gonades, le rein gauche et une portion du tube digestif. La deuxième coupe est sélectionnée à un niveau légèrement plus crânial, juste au-dessus de la bifurcation aortique (figure 2D).

Sur cette première coupe lame 1 que l'on nommera « ZBA » pour *zone bifurcation aortique*, un panel de 64 anticorps a été appliqué par deux panels successifs réunis. Ce panel final comprend des marqueurs neuronaux et neuroendocriniens tels que HuC/D, NeuN, Isl1, Phox2B, TH, Synaptophysine, Synapsine, FOXP2, FoxP1, FoxC1, FoxF1, ChAT, VGLUT2, NF, NeuF-H/M,  $\beta$ 3-tubuline et  $\alpha$ -tubuline, permettant d'identifier divers sous-types neuronaux, notamment sensitifs, et d'observer les circuits en formation. Il inclut également des facteurs de transcription comme Sox2, Sox9, Sox10, Sox17, Pax2, Pax3, Pax6, Oct3/4, Sall4, Olig2 et GATA3. Des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux tels que EpCAM, CD239, Cytokératine-19, Vimentine, Podoplanine, Myogenine, SMA et Myosine lisse permettent de délimiter les épithéliums, les structures musculaires lisses et les zones de transition tissulaire. S'y ajoutent des marqueurs vasculaires et lymphatiques comme CD31, LYVE-1, Collagène III et IV, ainsi que diverses protéines comme PCNA, Ki-67, Insl3, CYP17A1 et Fetoprotein. Enfin, plusieurs protéines à expression immunitaire ou inflammatoire, telles que Iba1, S100A8, SHIP-1, Syk et les antigènes HLA-A/B, ainsi que des marqueurs liés à la pluripotence ou aux lignages germinaux comme Oct4 et Nanog. L'ensemble des résultats qui suivent se base uniquement sur les anticorps ayant donné un marquage exploitable, tandis que la liste complète des anticorps testés, leur statut et leur optimisation sont présentés en Annexe 3.



**Figure 2 : Observation et sélection cryostatée d'un échantillon embryonnaire à PCW8 et analyse immunofluorescence des structures lombo-sacrées.** (A-D) Photographie de l'observation microscopique des lames sorties du cryostat avec la portion la plus caudal (A), la portion choisie pour la première lame (B), la portion choisie pour la deuxième lame (C), la portion la plus crâniale (D). Vue d'ensemble d'une coupe transversale à hauteur de la jonction lombo-sacrée, marquée par immunofluorescence multiplexée pour la lame ZBA (E) et la lame ZCBA (G). Zoom sur la vertèbre de la lame ZBA (F) ou \* marque le pli de la coupe, ZCBA (H). Marquage HUCD/NeuN/Sox9 pour la lame ZBA (I) et ZCBA (J). (K) Vue centrée sur la moelle de ZCBA. Le marquage Sox9 est en bleu dans la figure J. Le marquage Sox10 est bleu dans la figure K, jaune en H et rouge en F. HUCD est rouge en I et jaune en J. NeuN est bleu en J et rouge en I.

Abréviations : VE = vertèbre, PA = plaque alaire, PB = plaque basale, RDG = racine dorsale gauche, Fo = foie, Es = estomac, Rg = rein gauche, Go = gonade, Mo = moelle épinière, RDD = racine dorsale droite

La deuxième lame, que l'on nommera « ZCBA » pour *zone crâniale bifurcation aortique*, a disposé d'un second panel d'anticorps combinant des anticorps validés dans le panel n°1 ainsi que de nouveaux anticorps. L'expérience étant encore en cours, sur une acquisition de plus de 7 jours, nous nous concentrerons sur la lame ZBA, bien que nous montrions les images préliminaires issues des premières acquisitions de ZCBA. La liste des anticorps en cours est présentée en Annexe 4

Concernant la lame ZBA, l'estimation de sa position rostro-caudale repose sur plusieurs critères morpho-anatomiques convergents. La présence de la bifurcation de l'aorte en artères iliaques communes suggère une localisation autour du segment vertébral L5/S1 (figure 2E). Cette hypothèse est confortée par l'identification d'organes typiques de cette région, notamment le rein droit et les deux gonades, visibles en avant de cette bifurcation. L'analyse des structures vertébrales corrobore cette localisation : la vertèbre L5 présente une morphologie ovale et allongée, tandis que S1 apparaît plus large et arrondie, configuration typique de la transition lombo-sacrée. Les mesures du corps vertébral (1342  $\mu\text{m}$  de largeur pour 708  $\mu\text{m}$  de hauteur) donnent un rapport largeur/hauteur de 1,9, compatible avec le profil morphométrique d'une vertèbre sacrée en cours de formation. La fusion des arcs neuraxiaux est asynchrone, avec un contact complet à gauche et incomplet à droite, ce qui reste physiologique à ce stade, en lien avec la progression segmentaire non synchrone de la métamérisation para-axiale (Szpinda et al., 2013). Enfin, l'expression de Sox9 dans les condensations mésenchymateuses chondrogéniques valide l'identité vertébrale de ces structures en cours de chondrification, en particulier au sein des corps vertébraux (figure 2E).

**a. Analyse de la racine dorsale en formation et validation des marqueurs axonaux sur la lame ZBA**

Pour observer l'organisation para-rachidienne, plusieurs marqueurs du cytosquelette neuronal ont été testés :  $\beta$ 3-tubuline,  $\alpha$ -tubuline, neurofilament pan (NF), et NeuF-H (neurofilament lourd phosphorylé). Cependant, les marquages obtenus pour  $\beta$ 3-tubuline,  $\alpha$ -tubuline et le NF présentaient une qualité insuffisante (Annexe 5). Les signaux étaient diffus, peu spécifiques, et entachés d'artéfacts de reconstruction liés au pré-processing effectué par la plateforme MACSima (voir matériel et méthode), rendant leur interprétation difficile, voire inexploitable dans certains cas. Le marquage de la  $\beta$ 3-tubuline a montré une spécificité correcte pour la détection des axones/tronc nerveux. Toutefois, l'analyse quantitative a révélé une valeur de Gray Value avoisinant les 50000, indiquant un niveau de fluorescence à saturation. Cette forte

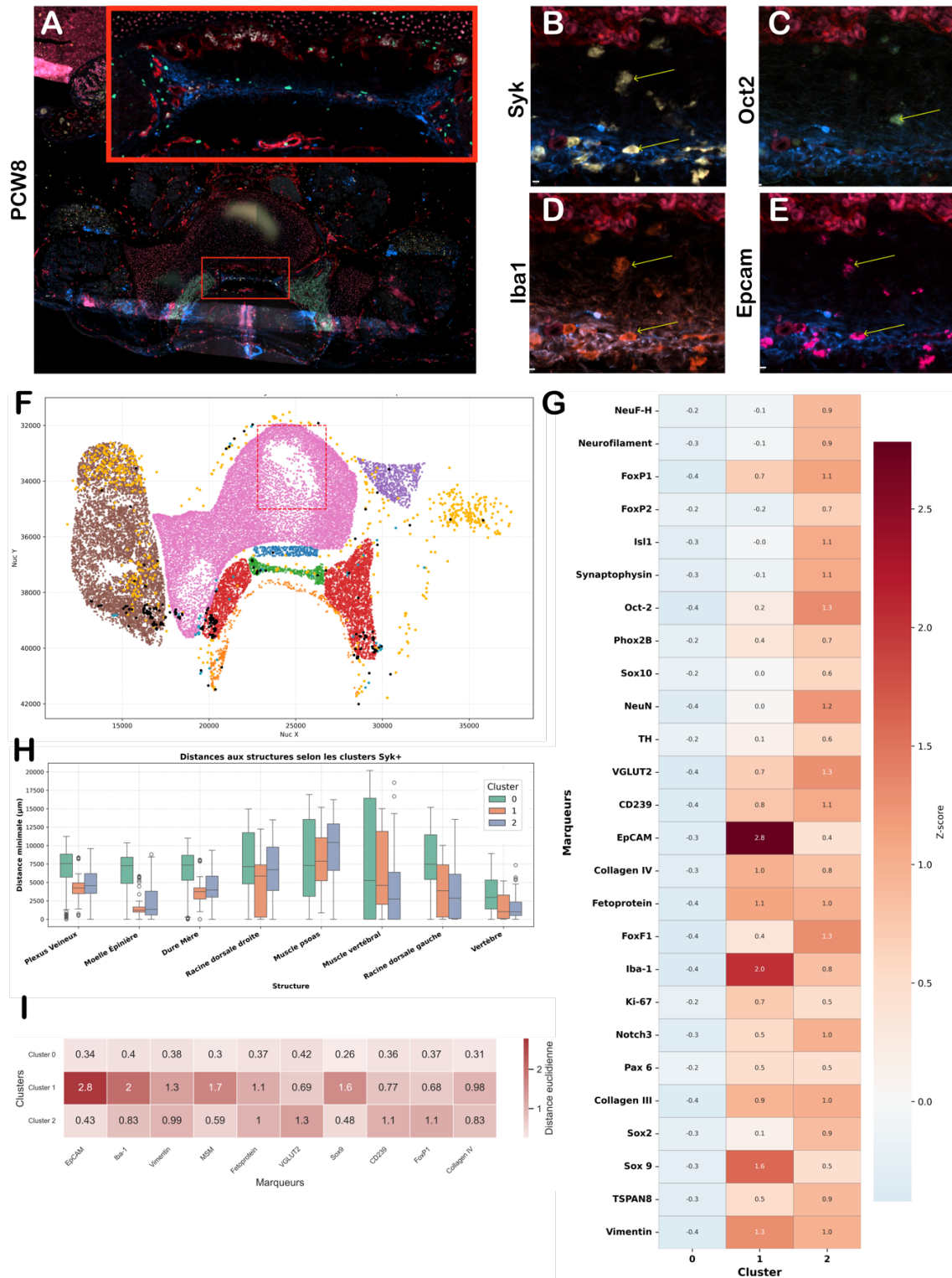
intensité compromet la linéarité du signal, rendant la quantification imprécise. Le marquage neurofilament et  $\alpha$ -tubuline bénéficie lui aussi d'une bonne qualité de signal, cependant, on observe un décalage spatial du signal résultat d'une erreur d'alignement ou d'un artefact d'assemblage des carrés d'images de la mosaïque (voir matériel et méthode). En revanche, le marquage avec NeuF-H s'est révélé net, structuré et reproductible (figure 2F). Ce marqueur, spécifique des neurofilaments lourds phosphorylés, est particulièrement adapté pour visualiser les axones en cours de maturation. À la périphérie dorsale de la moelle, un ensemble de faisceaux NeuF-H<sup>+</sup> converge donc vers la racine dorsale en formation. Les cellules qui la composent présentent une expression conjointe de Sox10, Isl1, HuCD et NeuN, traduisant une population hétérogène en cours de différenciation (figure 2F, 2I et 2J). Sox10, en tant que marqueur canonique des dérivés de la crête neurale, est exprimé dans les précurseurs gliaux (futurs cellules de Schwann) et les neurones sensoriels en développement. Sa présence, exclusive aux lignées périphériques, exclut toute origine centrale motoneuronale. L'expression simultanée d'Isl1, bien que typiquement associée aux motoneurones ventraux, peut être observée transitoirement dans certains neurones sensoriels dorsaux embryonnaires, notamment avant la formation des ganglions rachidiens. Cette co-expression Isl1<sup>+</sup>/Sox10<sup>+</sup> marque donc une étape intermédiaire de la différenciation neuronale sensorielle. Par ailleurs, la positivité pour NeuN et HuCD confirme la présence de neurones post-mitotiques ou en cours de différenciation (figure 2I et 2J). Le marquage de ZCBA montre une coupe plus adaptée à une interprétation précise, en effet, elle ne présente pas de pli comme la ZBA (figure 2G). Les premiers marqueurs ont pu être extraits du MACSima est confirmé les observations détaillées observées pour ZBA. De plus, nous disposons en plus du marquage Brn3a qui montre les neurones sensoriels ainsi que TrkA (figure 2H). Nous mettons également en évidence une distribution spécifique des différents marqueurs au sein de la moelle. Pax6 marque principalement les cellules localisées dans la partie ventrale de la commissure médiane (figure 2K), certaines semblant migrer latéralement. Sox2 est exprimé au niveau de la commissure médiane, marquant des cellules réparties sur toute sa longueur et présentant également une migration latérale. Isl1 est détecté dans deux populations distinctes : une paire ventrale, correspondant vraisemblablement aux motoneurones, et une paire intermédiaire. La Synaptophysine marque des structures filamenteuses évoquant des axones en cours de projection. Sox10 est exprimé dans des cellules migrantes à l'intérieur de la moelle, suggérant une origine gliale ou crête neurale. Enfin, Brn3a marque principalement des cellules situées en position dorsale, compatibles avec une neurogenèse active (figure 2K).

## **b. Sous-populations Syk<sup>+</sup> et organisation cellulaire de la dure-mère embryonnaire à PCW8 sur la lame ZBA**

En analyse de la ZBA, nous nous intéressons à la région située entre la moelle épinière et le corps vertébral, occupée par l'espace sous-arachnoïdien, principalement constitué de structures vasculaires telles que l'artère vertébro-spinale. En avant de cet espace, l'ébauche de l'espace épidual, qui contiendra ultérieurement les artères épidurales, est délimitée par une structure dense et épaisse identifiable comme la dure-mère embryonnaire (figure 3A).

Cette dernière, est caractérisée par une forte expression de Vimentine et de Collagène III, ainsi que par une activité proliférative localisée marquée par Ki-67 (figure 3A). La MEC riche et permissive qu'elle forme crée un environnement propice à la migration cellulaire et à l'intégration de cellules immunitaires en expansion, parmi lesquelles figurent les cellules Syk<sup>+</sup> observées. Ces cellules sont également positives à Iba1, EpCAM et Oct2 (figure 3B – 3E) révélant potentiellement des sous-populations spécifiques réparties probablement à des structures également spécifiques de ce profil. Pour valider cette hypothèse, nous segmentons uniquement la région dorsale de l'embryon. Celle-ci est ensuite validée par le modèle d'apprentissage décrit précédemment et présente un taux de 77,57% +/- 10% de cellules bien segmentées. Toutes les cellules étant Syk<sup>+</sup>, la discrimination repose ici sur l'identité fonctionnelle et le positionnement spatial relatif à des structures clés de l'embryon. Grâce aux coordonnées X et Y, nous pouvons calculer le positionnement exact des cellules et analyser leur proximité avec d'autres marqueurs et les structures environnantes (figure 3F).

Le cluster 0 présente une signature marquée par des marqueurs mésenchymateux et prolifératifs tels que SMA,  $\alpha$ -tubuline, Fetoprotéine, Vimentine, Ki-67 et Collagène III, couplée à une absence notable d'expression d'Iba1, Oct2 et EpCAM, ce qui suggère une population conjonctive proliférative non engagée dans des processus immunitaires ou épithéliaux (figure 3G). Spatialement, il est localisé à proximité de structures centrales telles que la moelle épinière, la dure-mère et la racine dorsale gauche, tout en restant plus éloigné des structures périphériques comme le plexus veineux ou les muscles (figure 3F et 3H). Son expression modérée de marqueurs neuronaux précoces (Neurofilament, NeuF-H, Sox2) renforce l'hypothèse d'une population positionnée à l'interface entre tissu mésenchymateux et environnement neuronal en formation. Le cluster 1, en revanche, se distingue par une co-expression très forte de Iba1, EpCAM et Oct2, accompagnée de marqueurs associés à une activité immunitaire et épithéliale comme TSPAN8 et Notch3 (figure 3G).



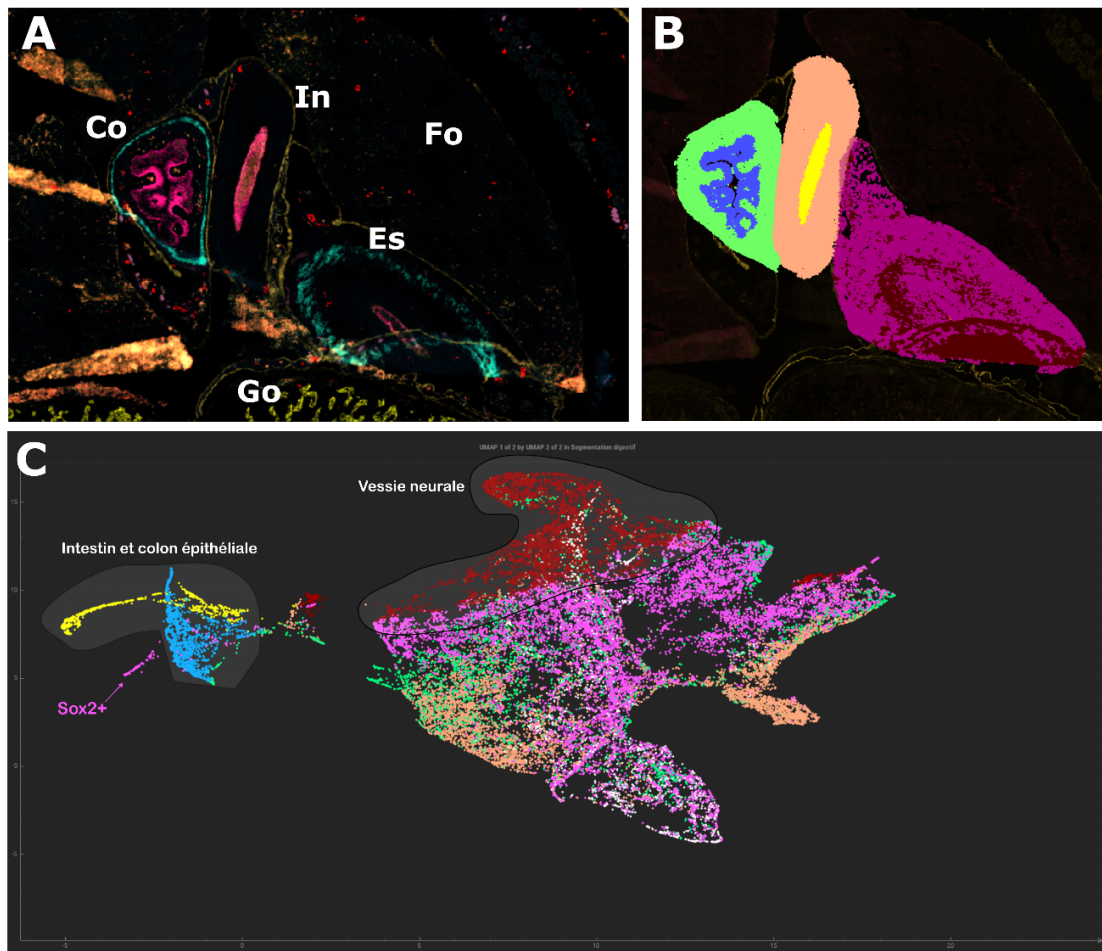
**Figure 3 : Analyse spatiale et phénotypique des cellules Syk<sup>+</sup> dans la dure-mère embryonnaire humaine à PCW8.** (A) Vue centrée sur la région dorsale sur la coupe ZBA. (B-E) Marquage des cellules de la dure mère, Syk (B), Oct2 (C), Iba1 (D) et EpCAM (E) les cellules d'intérêt sont montrées avec une flèche jaune. (F) Visualisations des coordonnées X et Y des structures précédemment segmentées. En rose la vertèbre, en bleu le plexus veineux, en violet le muscle psoas, en vert la dure mère, en orange la moelle épinière, en rouge les racines dorsales et en marron le muscle prévertébral. (G) Profils d'expression normalisés des marqueurs discriminants par cluster. (H) Mesure des distances de chaque cluster par rapport aux structures. (I) Analyse de la distance phénotypique de chaque cluster par rapport à l'intensité moyenne des marqueurs.

Ce profil évoque une population mixte immuno-épithéliale hautement activée, potentiellement des lymphocytes B, des microglies ou des cellules méningées en cours de spécialisation. Ce cluster est principalement localisé à proximité du plexus veineux, des racines dorsales droites, des muscles psoas et des vertèbres, c'est-à-dire dans des zones où les interactions vasculaires, neuronales et immunitaires sont les plus denses (figure 3F et 3H). L'absence de prolifération (faible Ki-67, FoxP1) et la forte activation moléculaire indiquent une phase de spécialisation terminale ou de participation active aux interactions tissulaires. Enfin, le cluster 2 présente un profil plus équilibré, exprimant de façon modérée Oct2, EpCAM et Iba1, ainsi que des marqueurs gliaux et neuronaux différenciés comme Sox10, NeuN, et Myogenin (figure 3G). Ce pattern traduit un état plus mature et différencié, situé entre les identités immunitaires, épithéliales et gliales. Ce cluster est situé préférentiellement dans les zones de transition entre tissus nerveux et musculaires comme les muscles psoas, le plexus veineux et les racines dorsales (figure 3F et 3H). Sa proximité avec des marqueurs de maturation neuronale et vasculaire (Sox2, CD31, MSM, Vimentine) confirme une fonction potentiellement intégrative au sein des niches neurovasculaires en développement (figure 3I).

**c. Différenciation endodermique et mésenchymateuse du tube digestif postérieur de la lame ZBA**

Dans la région digestive, on distingue trois structures tubulaires se différenciant par leur morphologie et leur profil d'expression (figure 4A). Bien que toutes bordées d'un épithélium EpCAM<sup>+</sup>, confirmant une origine endodermique ou urogénitale, elles se distinguent par leur calibre, leur degré de maturation musculaire et leur signature transcriptionnelle, suggérant des identités anatomiques ou des états de différenciation variés. On segmente les trois structures pour les différencier. La validation de la segmentation est confirmée par le modèle d'apprentissage pour un taux de cellules bien segmentées de 81,02% +/- 10% (figure 4B). Après la segmentation, un clustering est réalisé sur 18 marqueurs observés dans cette région, soit :  $\beta$ 3-tubuline, Synapsine, Oct2, Sox10, Phox2B, HUCD, Sox2, FoxF1, Ki-67, EpCAM, CD239, GATA3, TSPAN8, Collagène III et IV, Syk, Myosine Smooth Muscle, CD31, Fetoprotein et Vimentine.

La première structure, localisée à gauche du champ, mesure environ 561  $\mu$ m de largeur pour 863  $\mu$ m de longueur (Figure 4A). Elle présente une lumière bien individualisée entourée d'un épithélium cylindrique exprimant fortement EpCAM, d'une épaisseur de 523  $\mu$ m de longueur sur 324  $\mu$ m de largeur.



**D**

Marqueurs	Clusters (structures)						Expression moyenne
	Colon_C0	Colon_C1	Intestin_C0	Intestin_C1	Estomac_C0	Estomac_C1	
B3 Tubulin	7166.6	309.6	502.3	6961.4	7798.8	603.7	
Synapsin	1328.1	648.1	605.4	988.4	1237.5	526.5	
Oct_2	701.3	154.6	135.4	578.7	587.0	151.3	
Sox10	701.6	68.5	79.0	813.0	568.9	82.0	
Phox2B	543.8	46.6	48.0	268.7	203.2	47.5	
HUCD	7626.1	829.8	834.9	4612.1	4061.2	803.5	
Sox2	465.7	68.0	75.5	624.2	747.7	79.8	
FoxF1	2506.9	2528.3	3144.4	2426.4	2081.8	2488.7	
Ki67	2036.7	1520.6	1214.9	1897.6	1340.9	1093.2	
CD326	155.0	3143.2	1273.8	95.1	1111.1	121.6	
CD239	193.2	260.8	306.1	167.7	267.2	284.4	
TSPAN8	47.9	682.6	73.0	38.0	144.2	34.9	
Collagen III	436.5	413.3	332.8	273.1	411.4	531.3	
Syk	1330.6	2814.4	1538.4	547.1	2322.7	2651.2	
Myosin SM	2636.3	1683.8	752.4	816.1	1735.2	1736.5	
CD31	545.7	465.2	287.7	381.5	357.4	393.9	
Fetoprotéine	5655.4	6171.1	5306.0	4761.4	8425.3	10108.4	
Vimentin	202.0	135.0	72.0	106.0	90.6	79.1	

**Figure 4 : Segmentation et caractérisation des structures digestives embryonnaires à PCW8.** (A) Coupe embryonnaire PCW8 centrée sur la région hypogastrique. (B) Visualisation de la segmentation avec la projection des clusters, de la partie neuronale de l'estomac (en rouge), du côlon (en bleu) et de l'intestin (en orange) ainsi que de la partie épithéliale de l'estomac (en rose), du côlon (en vert), de l'intestin (en jaune). (C) UMAP de la répartition des clusters. (D) Profil de marquage des populations des clusters pour les structures digestives.

Abréviations : Co = colon, In = intestin, Es = estomac, Fo = Foie, Go = gonade

Cette structure est entourée d'un mésenchyme exprimant à la fois l'alpha-fœtoprotéine (AFP) et FoxF1, confirmant son origine splanchnopleurale viscérale. La différenciation musculaire y est particulièrement marquée, avec une couche de myosine musculaire lisse bien organisée, traduisant une progression avancée du programme de différenciation mésodermique. Le tissu est richement vascularisé, comme en témoigne la forte expression de CD31 dans les structures endothéliales périphériques, et on note la présence ponctuelle de GATA3, compatible avec une signature transcriptionnelle propre aux segments distaux de l'intestin postérieur (figure 4D). Ces éléments morphologiques et moléculaires sont en faveur d'une structure correspondant au côlon, à un stade de maturation avancée. Immédiatement à droite de cette structure se trouve la deuxième entité tubulaire, plus étroite mais plus allongée, mesurant environ 348  $\mu\text{m}$  de largeur pour 1218  $\mu\text{m}$  de longueur. Son épithélium EpCAM<sup>+</sup>, d'environ 607  $\mu\text{m}$  de long pour 84  $\mu\text{m}$  de large, est replié et ne présente pas de lumière visible, ce qui peut traduire un état morphologique plus immature (Colon\_C1). La couche musculaire lisse périphérique, identifiée par l'expression de la myosine musculaire lisse, est peu développée, et la vascularisation est nettement moins dense par rapport à la précédente. Le mésenchyme sous-jacent exprime également AFP et FoxF1, confirmant la continuité de l'origine splanchnopleurale (figure 4D). L'absence de GATA3 et le profil musculaire immature suggèrent que cette structure correspond à un segment plus proximal du tube digestif postérieur, probablement au niveau du côlon ascendant ou de la jonction iléo-colique. Sa moindre différenciation par rapport à la structure 1 illustre un gradient rostro-caudal de maturation dans le tube digestif embryonnaire. En position plus basse et légèrement postérieure se trouve une troisième structure, plus large et allongée, mesurant environ 680  $\mu\text{m}$  de largeur pour 1324  $\mu\text{m}$  de longueur. Son épithélium EpCAM<sup>+</sup> s'étend sur 440  $\mu\text{m}$  de long pour 59  $\mu\text{m}$  de large et, comme pour la structure 2, ne présente pas de lumière apparente. Ce qui la distingue fondamentalement est l'expression de Sox2 (Estomac\_C1) dans son épithélium, colocalisée avec EpCAM. Cette expression est absente dans les structures 1 et 2, ce qui exclut une nature intestinale et oriente vers une origine gastrique. Elle dispose également de structure plus neuronale avec l'expression de  $\beta$ 3-tubuline, HuCD, Synapsine et toujours Sox2 (Estomac\_C0) (figure 4D).

La représentation des clusters peut être visualiser en UMAP (figure 4C). Elle met en évidence l'existence de deux grandes populations cellulaires transversales aux structures. Le groupe majoritaire comprend les cellules épithéliales différenciées de l'estomac ainsi que des cellules neuronales ou gliales des structures intestinales, traduisant un recouvrement partiel de programmes transcriptionnels entre tissus endodermiques et neuroectodermiques. En revanche,

un groupe minoritaire distinct, situé à l'opposé dans l'espace UMAP, regroupe des cellules épithéliales du côlon et de l'intestin ainsi qu'un petit contingent de cellules gastriques caractérisées par une forte expression de Sox2. Cette organisation suggère la présence, dans l'estomac, d'un sous-ensemble de cellules présentant un profil transcriptionnel mixte ou immature, en transition entre une identité mésenchymateuse et épithéliale. L'ensemble du tissu est fortement AFP<sup>+</sup>, en particulier dans le mésenchyme sous-jacent, et exprime également Phox2B, FoxP2, Sox10, NeuN, Oct2 et légèrement Sox2 dans des faisceaux neuro-mésenchymateux situés entre la couche épithéliale et la périphérie. Des cellules en prolifération Ki-67<sup>+</sup> sont présentes dans la zone intermédiaire entre l'anneau épithélial EpCAM<sup>+</sup> et les faisceaux CD239<sup>+</sup>, suggérant une activité proliférative intense. Une couche de myosine musculaire lisse est visible en périphérie, bien qu'elle soit partiellement intégrée à la couche neuronale Phox2B<sup>+</sup>, contrairement aux structures 1 et 2 où la distinction est plus nette. Cette organisation intégrée, la colocalisation épithéliale de Sox2 et EpCAM, ainsi que la richesse du signal neuro-mésenchymateux, plaident fortement pour l'identité de cette structure comme étant l'estomac embryonnaire en formation. Son positionnement légèrement plus postérieur, souvent contre-intuitif, est compatible avec la topographie embryonnaire à PCW8, où les dérivés digestifs supérieurs et postérieurs peuvent encore être en proximité spatiale.

### **3. Visualisation tridimensionnelle et caractérisation moléculaire des structures sympathiques dans la région aorto-hypogastrique embryonnaire**

#### **a. Organisation topographique et expression moléculaire des troncs sympathiques embryonnaires segmentaire**

Le choix des lames nous permet de couvrir deux régions distinctes caractérisées par la présence de structures appartenant au système nerveux autonome. A l'étage de la bifurcation aortique, dans l'observation de la lame ZBA, dans la région située entre la face antérieure de la vertèbre en formation et les structures urogénitales, s'organise un compartiment riche en éléments neurovasculaires et mésenchymateux (figure 5A). Cette région se situe de part et d'autre de la ligne médiane, à proximité des muscles psoas et autour des vaisseaux iliaques communs. On y observe comme attendu les artères iliaques communes droite et gauche, symétriquement disposées, encadrant en arrière l'artère sacrée médiane, elle-même accompagnée de structures veineuses, dont la veine droite apparaît partiellement collapsée (figure 5A – 5C).

L'ensemble du réseau vasculaire est marqué par une forte expression de CD31, soulignant l'endothélium vasculaire en formation, ainsi que par la présence de SMA (figure 5C et Annexe 6), indiquant une différenciation active de la média vasculaire. À proximité immédiate de la face antérieure de la vertèbre, deux structures bilatérales, légèrement décalées de la ligne médiane, sont bien individualisées. La structure gauche est clairement visible, tandis que la structure droite semble absente de la coupe, probablement détachée lors de la préparation, bien que son empreinte soit encore perceptible. Ces structures expriment fortement NF (figure 5B et 5C), traduisant une densité axonale marquée. Leur signal est complété par l'expression de Ki-67 et Oct2 (figure 5C) mais aussi d'Isl1, Synapsine, HuCD, Sox2 et Phox2B (Annexe 6). L'ensemble de ces caractéristiques, topographiques et moléculaires, permet d'identifier ces structures comme les troncs sympathiques embryonnaires, encore en cours de segmentation mais déjà organisés en chaînes bilatérales le long de l'axe vertébral. Leur position en regard des vaisseaux et leur expression combinée de marqueurs neuronaux et gliaux renforcent cette interprétation. Deux structures tubulaires d'environ 86 µm de diamètre, localisées en antéro-latéral des troncs sympathiques et au contact des artères iliaques communes, ont été identifiées comme des faisceaux axonaux périphériques, positifs à Neurofilament (figure 5A) et β3-tubuline (Annexe 6) et négatif à TH et Isl1 (Annexe 6). Leur position adjacente au muscle psoas évoque des nerfs somatiques du plexus lombaire, tels que les nerfs ilio-hypogastriques ou génito-fémoraux.

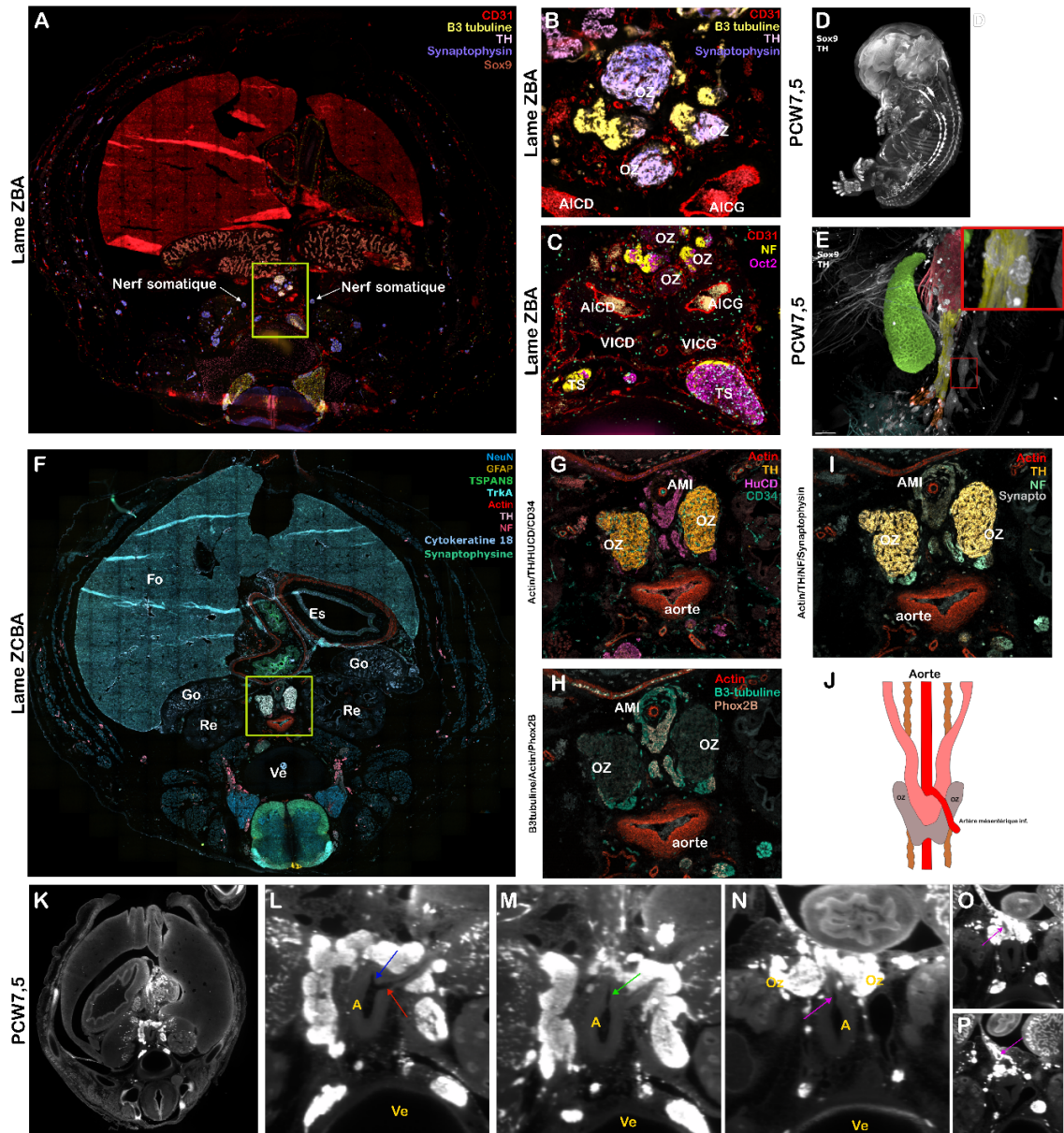
#### **a. Reconstruction topographique du système orthosympathique pelvien en microscopie 3D**

Cette région est observée en microscopie 3D sur un embryon légèrement plus jeune, à PCW7 (figure 5D). Le marquage de la TH permet de distinguer clairement le territoire orthosympathique innervant la région pelvienne. Le plexus hypogastrique inférieur (en bleu) innerve la portion distale de l'intestin ainsi que la vessie. Les fibres orthosympathiques TH<sup>+</sup> de ce plexus sont issues des nerfs hypogastriques (en rouge), que l'on voit converger en une disposition typique en Y (en vert) (figure 5E). En suivant une description caudo-crâniale, le trajet des nerfs hypogastriques remonte vers une convergence médiane issue du plexus hypogastrique supérieur. En microscopie 3D, on distingue à l'intérieur des nerfs hypogastriques de discrets renflements TH<sup>+</sup>, évoquant des petits ganglions intermédiaires (figure 5E). Ces structures sont clairement distinguables de la chaîne sympathique paravertébrale, visible plus dorsalement, en arrière des axes vasculaires, au contact des corps vertébraux. Pour cerner cette zone, nous partons plus crânialement le long de l'aorte abdominale. Les coupes transversales de la microscopie 3D permettent d'identifier successivement les principales branches artérielles

(figure 5K – 5P). En poursuivant l'analyse caudalement, on arrive à l'émergence de l'artère mésentérique supérieure, bien identifiable (figure 5M) ainsi que de l'artère rénale gauche (figure 5L). Cette région est entourée d'un réseau nerveux peu dense, vraisemblablement correspondant au plexus mésentérique supérieur, prolongement du plexus cœliaque. Ce plexus distribue les fibres post-ganglionnaires orthosympathiques TH<sup>+</sup> vers l'intestin moyen. En descendant, l'artère mésentérique inférieure émerge de l'aorte abdominale, dernière ramification de l'aorte avant la bifurcation (figure 5N – 5P). Elle est entourée d'un amas de fibres TH<sup>+</sup> bien individualisé correspondant au plexus mésentérique inférieur, qui assure l'innervation orthosympathique du côlon descendant, sigmoïde et du rectum proximal. A ce niveau, nous sommes en phase de retrouver l'émergence des nerfs hypogastriques décrits précédemment. Juste en avant de l'aorte, à proximité immédiate de l'origine de l'artère mésentérique inférieure, deux masses symétriques sont observées. Ces structures sont clairement séparées de la chaîne sympathique paravertébrale, localisée en position dorsale. Ces résultats sont insuffisants pour caractériser avec précision les structures apparentes. Pour valider ces structures nous observons leur organisations en immunomarquage multiplexé.

#### **d. Caractérisation moléculaire de l'organe de Zuckerkandl par immunomarquage multiplexé**

L'observation 3D indique une zone indistinguable marquée à TH<sup>+</sup> là où nous devrions observer plusieurs structures et notamment l'organe de Zuckerkandle qui se distingue des structures du système nerveux autonomes. La lame ZCBA montre 2 structures avec une expression intense de TH, associées à une expression de la synaptophysine (figure 5G et 5I) et une absence d'expression de la  $\beta$ 3-tubuline (figure 5H). De plus nous observons un marquage CD34 au sein de ces 2 structures (figure 5G). Ce profil moléculaire, combiné à leur position anatomique et leur organisation bilatérale, est caractéristique de l'organe de Zuckerkandle, structure neuroendocrinienne dérivée de la crête neurale. De plus, les deux organes ont une architecture typique en Zellballen (un amas cellulaire bien délimité disposés en nids entourés de stroma fibrovasculaire). Il correspond vraisemblablement aux 2 structures observées sur la coupe transversale en 3D (figure 6N). Sa position en avant de l'aorte, entre le plexus mésentérique inférieur et le plexus hypogastrique supérieur, ainsi que son marquage homogène, permettent de le distinguer des ganglions sympathiques classiques. Si on se place plus caudalement, au-dessous de la bifurcation aortique (lame ZBA) on retrouve les ganglions TH<sup>+</sup>/Synaptophysine<sup>+</sup> ainsi que la structure Zellballen (figure 5J).



**Figure 5 : Analyse spatiale multi-échelle des structures lombo-pelviennes embryonnaires.** (A) Vue générale de la coupe issue de la lame ZBA avec une zone centrée sur la bifurcation avec un marquage CD31,  $\beta$ 3-tubuline, TH, Synaptophysine (B) et un marquage CD31, NF et Oct2 (C). (D) Microscopie 3D sur un embryon PCW7,5 marqué par Sox9 et TH I et segmentation des structures (E) avec en vert la gonade, en rouge le plexus hypogastrique supérieur, en jaune le(s) nerf(s) hypogastrique(s), en orange le nerf hypogastrique droit et gauche et en bleu le plexus hypogastrique inférieur. (F) Vue générale de la coupe issue de la lame ZCBA à PCW8 avec un grossissement sur l'aorte et un marquage Actin, TH, HuCD et CD34 en (G), Actin,  $\beta$ 3-tubuline et Phox2B en (H) et Actin, TH, NF, Synaptophysine en (I). (J) Représentation schématique de l'OZ. (K) Coupe transversale de l'embryon PCW7,5 avec un grossissement sur l'aorte en (L) où la flèche bleu représente l'AMS et la flèche rouge l'artère rénale gauche. (M) Coupe transversale plus caudale où la flèche verte représente l'AMS. (N) Coupe transversale plus caudale où la flèche rose représente le début de la ramification de l'AIM ou le trajet et suivie en (O) et en (P).

Abréviation : AICG/D : artère iliaque commune gauche/droite, OZ = organe de Zuckerkandle, Fo = foie, Es = estomac, Go = gonade, Re = rein, Ve = vertèbre, AMI = artère mésentérique inférieur, TS = tronc sympathique, VICD/G = veine iliaque commune droite/gauche

### III. Discussion

L'enjeu de ce travail réside dans la capacité à combiner l'expérience technique et l'expérience biologique pour ainsi obtenir une validation solide face à des données précises et conséquentes. La validation des anticorps autant sur le plan fonctionnel que sur le plan qualitatif est primordial et s'est avérée être, par moment, un obstacle dans notre analyse.

Dans l'échantillon testiculaire à PCW20, 21 des 37 anticorps utilisés dans le protocole ont généré un signal exploitable. Ce taux d'échec, reflète les contraintes techniques inhérentes aux technologies de marquage MACSima. En effet, un anticorps fonctionnel en IF classique peut ne pas être compatible avec une détection directe et répétée, en raison de plusieurs facteurs : format conjugué, stabilité du fluorophore, affinité de l'anticorps, sensibilité de l'épitope à la fixation ou aux cycles de marquage-effacement. Ces limitations sont bien documentées dans les systèmes comparables comme CODEX, où la perte de signal au fil des cycles, l'accumulation de bruit, et la variabilité d'accès aux épitopes compromettent parfois la détection de certains marqueurs pourtant bien caractérisés par d'autres approches (Goltsev et al., 2018). De plus, la nature des tissus humains, souvent plus hétérogènes et moins standardisés que les tissus modèles murins, renforce ces difficultés, comme le souligne Mohammed Zidane et al., (2023) dans l'analyse multiplexée de tumeurs humaines. Dans les pistes envisagés pour l'optimisation de notre panel, nous retenons deux problèmes majeurs. La première est le non-effacement des marquages, se répercutant sur les marquages suivants (Pankratz, et al., 2021 ; Najem et al., 2025). Nous avons fait cette observation sur le marquage Sox9 et Pax2, où se derniers présenté des similarités avec le marqueur PE du cycle précédent, Sox9. Pour pallier ce problème, nous pouvons diminuer la concentration de Sox9 et augmenter les cycles de nettoyages inter-cycles. Le deuxième problème peut venir de l'incubation et/ou de la concentration d'anticorps. Ces paramètres vont directement influencer la valeur de Gray Value obtenu. Dans le meilleur des cas, l'image obtenue aura un background profond. Mais il se peut que lors du stitching, le logiciel a du mal à interpréter les valeurs de saturations et affiche des zones de sur-saturation, comme nous l'avons observé pour notre marquage  $\beta$ 3-tubuline lors de notre panel n°1 sur la lame ZBA. De plus, l'incubation et la concentration jouent sur le temps et le prix d'une acquisition. L'optimisation peut être alors un gain de temps sur des acquisitions pouvant aller jusqu'à 7 jours (ex : panel n°2 sur lame ZCBA). Ainsi, le filtrage rigoureux des anticorps à chaque nouvelle application reste indispensable pour garantir la fiabilité des données, quitte à réduire la taille du panel initialement envisagé. Les limites du système MACSima ne sont pas encore totalement élucidées (Eng et al., 2022) ce qui contraint notre

optimisation sur la technique d'acquisition et non sur l'entièreté de l'expérience. C'est pourquoi nous avons mis au point une optimisation indirecte visant à caractériser les cellules segmentées par le MACSima. Notre approche par un modèle d'apprentissage nous a permis de valider des segmentations plus complexes sur des tissus tout autant complexes et non homogènes. A ce jour, nous n'avons pas de connaissance sur un modèle de vérification existant.

La suite logique a été de se concentrer sur un tissu plus jeune, plus en phase avec le développement et reposant sur une littérature plus fournie, permettant une description plus complète. Le panel de 64 anticorps (panel 1) a permis de montrer que l'immunomarquage multiplexé était un atout dans la description anatomique, permettant un niveau d'analyse jusqu'à l'échelle cellulaire. Dans la région péri-médullaire dorsale, l'identification de faisceaux axonaux NeuF-H<sup>+</sup> convergeant vers la racine dorsale en formation, combinée à l'expression conjointe de marqueurs comme Sox10, HuCD, NeuN, Isl1 et Sox2, indique l'émergence d'une population neuro-sensorielle en cours de différenciation (Carney et al., 2006 ; Xie et al., 2023). Parmi ces marqueurs, Isl1 joue un rôle singulier, car s'il est classiquement associé aux motoneurones ventraux, son expression transitoire dans les neurones sensoriels dorsaux embryonnaires a été rapportée, notamment dans des stades précoces avant la condensation définitive des ganglions rachidiens (Dasen et al., 2009). Dans notre exploration, la co-expression d'Isl1 et de Sox10 au sein des cellules de la racine dorsale suggère un état intermédiaire de différenciation caractéristique des neurones sensoriels dérivés de la crête neurale. Ce stade transitoire pourrait correspondre à une phase au cours de laquelle ces neurones migrent, s'organisent spatialement. La présence simultanée de marqueurs gliaux Sox10<sup>+</sup>, neurogènes immatures Sox2<sup>+</sup> et neuronaux post-mitotiques NeuN<sup>+</sup> et HuCD<sup>+</sup> témoigne d'un microenvironnement encore permissif et plastique, dans lequel Isl1 participerait à la définition de l'identité neuronale sensorielle (Sun et al., 2009) Cette plasticité transcriptionnelle s'inscrit dans les observations faites chez la souris, où Isl1 est exprimé de manière transitoire dans les neurones sensoriels au cours du développement précoce. Il a été démontré que Sox10 est activement exprimé dans les précurseurs de la crête neurale contribuant à la lignée sensorielle, et qu'en son absence, les neurones sensoriels persistent mais sans leur environnement glial associé, traduisant son rôle clé dans la séparation des lignages gliaux et neuronaux (Carney et al., 2006). L'expression conjointe d'Isl1 et de Sox10 dans la racine dorsale humaine à PCW8 pourrait ainsi refléter cette phase développementale critique de différenciation neuronale sensorielle encore instable, marquée par une co-activation de réseaux transcriptionnels encore indécis. Au-delà de la région dorsale, l'analyse des marquages dans la zone ventrale et au niveau

de la commissure médiane permet de compléter cette cartographie développementale. L'expression de Pax6 et de Sox2 au sein de la commissure médiane et dans ses prolongements latéraux révèle la persistance de cellules progénitrices neurales impliquées dans la neurogenèse et potentiellement dans l'établissement des circuits commissuraux. La double localisation d'Isl1, ventrale et intermédiaire, est cohérente avec la présence conjointe de motoneurons et d'interneurones moteurs, soutenant une différenciation segmentaire organisée (Sandra Gómez-López et al., 2011) Le marquage filamenteux de la Synaptophysine souligne l'activité de projection axonale en cours, traduisant l'émergence de connexions fonctionnelles. Par ailleurs, des cellules Sox10<sup>+</sup> en migration à l'intérieur de la moelle évoquent l'invasion progressive du tissu glial dérivé de la crête neurale. Enfin, la distribution dorsale des cellules Brn3a suggère une organisation sensorielle plus avancée, en lien probable avec la structuration des circuits sensoriels primaires. (Xu, et al., 2024)

Toujours dans une approche d'exploration des profils cellulaires, nous nous sommes intéressés au marqueur Syk. Cette tyrosine kinase a été caractérisée dans les cellules de la lignée hématopoïétique. Elle est impliquée dans les récepteurs immunitaires de type ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), intervenant dans les cascades de signalisation des lymphocytes B et T, des cellules NK ou encore des cellules dendritiques (Noraz et al., 2016). Il a été montré que cette signalisation basée sur l'ITAM a été étendue aux récepteurs non immunorécepteur pour réguler des fonctions cellulaires variées comme la migration, l'adhésion cellulaire ou les interactions cellules-MEC (Mócsai et al., 2010). Dans le système nerveux, Syk est phosphorylée dans des axones en croissance, notamment au niveau des zones de synaptogenèse ou dans les régions où s'opèrent des processus de répulsion axonale, comme démontré dans le guidage commissural via la voie ephrin/Eph (Noraz et al., 2016). Ces données suggèrent que les fonctions de Syk excèdent largement le périmètre de l'immunité pour englober des rôles structurants dans l'organisation tissulaire. Loin de constituer une population homogène, les cellules Syk<sup>+</sup> identifiées par MACSima forment plusieurs sous-groupes phénotypiquement et spatialement distincts. Trois clusters principaux ont pu être caractérisés à partir de leur profil de co-expression en Iba1, EpCAM et Oct2, ainsi que par leur position relative vis-à-vis de structures embryonnaires majeures. Le premier, évoque une population mésenchymateuse proliférative, probablement issue du mésoderme paraxial ou de la crête neurale, engagée dans la structuration de la matrice extracellulaire méningée. Le second cluster est compatible avec une origine neurocrétale et une spécialisation terminale. Le troisième cluster, plus différencié, pourrait correspondre à des cellules associées

aux faisceaux nerveux périphériques, en cours de myélinisation ou d'organisation périneuronale. La localisation des clusters Syk<sup>+</sup> dans des niches neurovasculaires en formation, et leur signature moléculaire composite, indiquent une implication précoce dans des fonctions multiples : signalisation immune, différenciation mésenchymateuse, organisation gliale ou vasculaire. En particulier, le fait que la co-expression de marqueurs comme Iba1, EpCAM, Oct2 ou Sox10 varie selon les régions et que certains profils émergent à l'interface entre compartiments (nerf-muscle, moelle-dure-mère, veine-muscle) suggèrent que les cellules Syk<sup>+</sup> contribuent activement à la spécialisation fonctionnelle des méninges.

Cependant, malgré la richesse des observations obtenues, plusieurs limites doivent être prises en compte. D'une part, l'interprétation fonctionnelle des sous-populations Syk<sup>+</sup> repose essentiellement sur une approche indirecte basée sur les profils de co-expression et leur position anatomique. Si notre méthodologie permet d'émettre des hypothèses robustes, elle ne permet pas d'attribuer avec certitude une fonction précise à chaque cluster. En particulier, l'implication de Syk dans des processus de type lymphatique, comme suggéré dans les modèles murins avec l'émergence de la membrane SLYM (Subarachnoid LYmphatic-like Membrane) et la présence de marqueurs valide tels que Prox1 ou Podoplanine (Da Mesquita et al., 2021), reste ici difficile à évaluer en l'absence de ces marqueurs dans notre panel. Le rôle exact de Syk dans la compartimentation méningée humaine embryonnaire, notamment dans les voies de drainage ou d'interaction immuno-vasculaire, demeure donc spéculatif. Par ailleurs, l'absence de certains marqueurs classiques de l'immunité innée ou adaptative (CD45, CD11b, F4/80, LYVE1) limite notre capacité à distinguer avec précision les populations myéloïdes matures des cellules mésenchymateuses immunocompétentes (Rua & McGavern, 2018). De plus, la détection de Syk reflète une activité kinase potentielle mais non nécessairement une activation fonctionnelle soutenue ou spécifique. Il est donc possible que cette expression traduise un état transitoire de plasticité cellulaire, plutôt qu'un engagement définitif dans une fonction immune ou structurelle. En ce sens, des données transcriptomiques ou des approches fonctionnelles permettront de mieux cerner l'identité et le rôle réel de ces cellules. Néanmoins, les résultats obtenus ici témoignent déjà de l'existence d'une organisation fonctionnelle et spatialement définie des cellules Syk<sup>+</sup> au sein de la dure-mère embryonnaire humaine.

La présence marquée de Sox2 dans l'épithélium de l'estomac, en contraste avec son absence dans les autres segments digestifs ou urogénitaux, suggère une fonction spécifique de ce facteur de transcription dans cet organe. Sox2 est connu pour maintenir l'état de pluripotence et d'immaturité cellulaire dans divers tissus embryonnaires et adultes (Pan, et al., 2016). La

première hypothèse serait que Sox2 maintient une plasticité épithéliale, permettant à ces cellules de répondre à des contraintes mécaniques ou métaboliques particulières. La seconde est qu'il marque une spécialisation sensorielle ou sécrétoire, à l'image de son expression dans les cellules basales de l'épithélium respiratoire ou gustatif (Arnold et al., 2011). Par ailleurs, l'interaction Oct4–Sox2 a été impliquée dans le contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Lorsque cette interaction est rompue, des programmes de différenciation mésendodermique et de plasticité cellulaire sont activés, ce qui pourrait indiquer que Sox2 participe ici à un état épithélial intermédiaire, associé à une certaine capacité de régénération ou de remodelage tissulaire (Pan et al., 2016).

Le passage des 64 anticorps (panel n°1) sur la lame ZBA nous offrent une perspective d'analyse particulièrement complète. Toutefois, cette approche n'est pas substitutive, mais bien complémentaire à l'analyse 3D. Elle s'avère notamment précieuse pour discriminer la région hypogastrique. Bien que certains marqueurs soient limités dans la distinction de certaines lignées, en particulier catécholaminergiques, nous avons pu identifier clairement des marquages TH<sup>+</sup> et Synaptophysine<sup>+</sup> distincts des structures NeuF-M ou  $\beta$ 3-tubuline, là où la microscopie 3D montrait un marquage plus uniforme. En revanche, les coupes transversales obtenues en 3D nous ont permis de mieux appréhender la topographie régionale. Cette complémentarité est particulièrement évidente dans l'analyse de l'organe de Zuckerkandle (OZ), une structure neuroendocrinienne transitoire dérivée de la crête neurale, identifiable notamment par l'expression de la TH. Dans notre étude, cette structure semble observable en microscopie 3D au niveau de l'émergence de l'artère mésentérique inférieure, sous forme de deux amas bilatéraux TH<sup>+</sup> (Furlan et al., 2017). Cependant, ce marquage met en évidence l'ensemble du système orthosympathique, incluant les nerfs hypogastriques, les plexus associés et la chaîne paravertébrale, ce qui complique la distinction morphologique de l'OZ, en raison de sa proximité avec les ganglions sympathiques classiques. C'est donc avec l'imagerie MACSima, révélant une co-expression de TH et de la synaptophysine au sein de deux structures symétriques situées en avant de l'aorte abdominale, que l'identification plus soutenue de l'OZ a pu être réalisée. Ces structures présentent une architecture en Zellballen, caractérisée par des amas bien délimités de cellules principales entourées de cellules sustentaculaires dans un stroma richement vascularisé. Leur position, entre les plexus mésentérique inférieur et hypogastrique supérieur, est conforme aux descriptions classiques de l'OZ chez l'humain (Kastriti et al., 2019 ; Mete et al., 2018).

Sur le plan embryologique, nos observations confirment que l'OZ se développe en étroite association avec les ganglions sympathiques adjacents et les trajets vasculaires abdominaux, suggérant un rôle probable dans la régulation circulatoire et métabolique fœtale. Ces données expérimentales soulignent la valeur d'une lecture développementale intégrée, combinant analyse morphologique tridimensionnelle et caractérisation moléculaire multiplexée. Elles apportent également des éléments dans la compréhension des paragangliomes abdominaux de l'adulte. En effet, en oncologie, l'identification d'un paragangliome de OZ repose moins sur des critères immunohistochimiques, souvent partagés avec d'autres tumeurs neuroendocrines (chromogranine A, synaptophysine, S100), que sur des critères de localisation anatomique. Par convention, une tumeur située entre l'artère mésentérique inférieure et la bifurcation aortique est considérée comme d'origine Zuckerkandlienne (Mete et al., 2018). Cette spécificité topographique est cruciale, car la dispersion embryologique des cellules chromaffines est large, rendant possible l'émergence de paragangliomes dans presque toutes les régions du corps. Cette ubiquité peut induire des erreurs diagnostiques fréquentes, notamment dans les localisations rares. La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de 2017 a d'ailleurs abandonné la notion de paragangliome bénin, car aucun critère histologique ne permet de prédire de manière fiable son comportement biologique. La malignité n'est définie que par la présence de métastases à distance, dans des tissus normalement dépourvus de paraganglions (ex. os, cerveau). De ce fait, la caractérisation histologique est un terrain de recherche dans le bon déroulement d'un diagnostic de paragangliome (Ozgur Mete et al, 2022). Des perspectives d'immunomarquages multiplexés semblent être une piste intéressante comme démontré ci-dessus.

#### IV. Conclusion

L'approche combinée d'imagerie tridimensionnelle par microscopie à feuillet de lumière et d'immunofluorescence multiplexée par la plateforme MACSima s'est révélée particulièrement intéressante pour explorer le développement de la région lombo-sacrée chez l'embryon humain, entre PCW7 et PCW8. Chaque technique apporte une lecture distincte mais complémentaire : l'imagerie 3D permet une visualisation globale et in toto de l'architecture morphologique embryonnaire dans son contexte spatial natif, tandis que la technologie MACSima offre une résolution moléculaire fine, en détectant simultanément des dizaines de marqueurs sur une seule coupe histologique. Cette complémentarité est cruciale pour décrypter les dynamiques développementales. Il devient ainsi possible de cartographier avec plus de précision la

distribution de sous-populations cellulaires, d'identifier des états transitoires de différenciation ou de prolifération, et d'associer ces données à leur position exacte dans l'espace embryonnaire. L'intégration de ces deux niveaux d'analyse, macroscopique et microscopique, morphologique et moléculaire, offre une lecture multi-échelle du développement embryonnaire. Elle permet de dépasser les limites des approches classiques en offrant une vue intégrée des processus de morphogenèse, de spécialisation tissulaire et d'organisation cellulaire. À travers cette stratégie, des territoires aussi complexes que la jonction lombo-sacrée, les racines nerveuses en formation ou les compartiments méningés deviennent lisibles, non seulement dans leur forme, mais aussi dans leur composition et leur dynamique. Cette approche ouvre ainsi la voie à une anatomie embryologique fonctionnelle, capable de relier les structures visibles à leur identité moléculaire et à leur devenir.

## V. Matériel et méthode

### **Récupération de l'échantillon**

Les échantillons embryonnaires utilisés dans cette étude ont été obtenus dans le cadre du protocole HuDeCa (<https://hudeca.genouest.org>), déclaré auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (CODECOH n° DC-2019-3716) ainsi qu'auprès de l'Agence de la Biomédecine (PFS19-012). Ce protocole a reçu un avis favorable du Comité d'évaluation éthique de l'Inserm (IRB00003888). Après obtention du consentement éclairé des donneuses, les échantillons sont recueillis par aspiration, conformément aux règles éthiques encadrant l'interruption volontaire de grossesse. Ils sont immédiatement fixés sur site dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 %. L'estimation de l'âge de développement embryonnaire a été initialement réalisée par hystérocopie, puis affinée au moment de la collecte en se basant sur les critères morphologiques des stades de Carnegie (SC), tels que définis par O'Rahilly et Müller (1987). Parmi les critères utilisés figuraient l'âge gestationnel (en semaines menstruelles), la morphologie globale de l'embryon et la longueur cranio-caudale (CRL). L'échantillon PCW20 ne fait pas partie d'HuDeCa qui fixe sa limite à PCW14. Celui-ci a été donné par le Professeur Sophie Collardeau du service d'anatomopathologie de l'hôpital Lyon Est.

### **Préparation de l'échantillon pour la microscopie 3D**

Les échantillons embryonnaires PCW20 et PCW7,5 ont été préparés selon une adaptation du protocole de transparençation de type iDISCO (Renier et al., 2014 ; Belle et al., 2017), optimisé

pour l'IM d'échantillons/tissus épais et la microscopie à feuillet de lumière. Afin de réduire le bruit de fond, d'éliminer les pigments endogènes (notamment l'hémoglobine) et d'améliorer la pénétration des anticorps, un blanchiment préalable a été effectué. Les échantillons ont d'abord été déshydratés à température ambiante et sous agitation dans deux bains successifs de méthanol à 40 % puis 80 %, pendant une heure chacun. Ils ont ensuite été incubés toute une nuit à la lumière dans une solution de méthanol et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 11 %) pour le blanchiment. Le lendemain, les échantillons ont été réhydratés progressivement dans des bains successifs de méthanol 80 %, méthanol 40 %, puis PBS 1X, chaque étape durant 1h30 sous agitation. Après réhydratation, les échantillons ont été placés dans une solution de PBSGT (PBS 1X complété avec 0,2 % de gélatine, 0,5 % de Triton X-100 et 0,01 % de Thimerosal) pendant quatre jours à température ambiante, avec agitation douce. Ils ont ensuite été incubés avec les anticorps primaires pendant huit jours dans une solution de PBSGT, à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation (voir Annexe 8). Le rinçage a été effectué par cinq bains successifs de PBSGT, d'une heure chacun. L'incubation avec les anticorps secondaires s'est déroulée pendant trois jours dans les mêmes conditions (PBSGT), suivis de cinq bains de rinçage dans du PBS 1X. Une seconde déshydratation a ensuite été réalisée dans des bains croissants de méthanol à 40 %, 60 %, 80 %, puis deux bains à 100 %, chacun pendant une heure. Les échantillons ont été transférés pour une incubation nocturne dans une solution de méthanol/dichlorométhane (MeOH/DCM, 2:3), puis incubés pendant 20 minutes dans du dichlorométhane pur (DCM 100 %). Enfin, ils ont été plongés dans du dibenzyl éther (DBE) jusqu'à obtention d'une transparence complète, en vue de son imagerie en microscopie 3D.

L'acquisition des images tridimensionnelles a été réalisée à l'aide de l'Ultramicroscope Blaze (Miltenyi Biotec), équipé d'une caméra sCMOS 5,5 mégapixels et du logiciel Inspector Pro (version 7.3.2). Le système repose sur l'utilisation de nappes de lumière générées par des lasers aux longueurs d'onde d'excitation de 488 nm, 561 nm, et 640 nm, permettant l'imagerie multiplexée des fluorochromes présents dans l'échantillon clarifié. Les acquisitions ont été réalisées exclusivement avec un objectif MI Plan 12× (NA 0,53). Le pas z entre chaque plan a été fixé à 6 µm, permettant une couverture volumique efficace de l'échantillon. Les images ont été enregistrées au format TIFF 16 bits, puis converties en fichiers .ims à l'aide d'Imaris File Converter (version 9.8, Bitplane, Royaume-Uni).

## **Préparation des embryons pour l'immunofluorescence multiplex**

Les embryons sont disséqués de manière à conserver la région comprise entre l'émergence des membres inférieur et la limite supérieure du foie (au-dessus des reins). Après dissection, ils sont placés pendant une nuit dans une solution de saccharose à 10 %, en vue de la cryoprotection. Ils ont ensuite été congelés par immersion pendant une minute dans l'isopentane préalablement refroidi à  $-45^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'un bain de carboglace, pendant une minute. Le bloc obtenu a été cryosectionné à  $-19^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'un cryostat (Leica), pour générer une série de coupes de 10 à 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, déposées sur des lames SuperFrost+ Leica BOND Plus et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation pour l'immunomarquage. Une photo est prise pour chaque lame sortant du cryostat guidant le choix fait dans l'analyse MACSima.

## **Plateforme d'imagerie**

Les lames ont été décongelées dans une chambre humide pendant 10 minutes puis séchées brièvement à l'air libre. Le cadre d'imagerie MACSwell™ approprié (Miltenyi Biotec) a été immédiatement monté sur la lame, et un volume adapté de tampon de migration MACSima™ a été ajouté selon les instructions du fabricant. Avant le lancement de l'instrument MACSima™, une précoloration au DAPI dilué au 1/10 a été réalisée pendant 10 minutes, suivie de trois lavages dans le tampon MACSima™. L'imagerie a été effectuée avec la MACSima™ Imaging Platform (Miltenyi Biotec), un système automatisé combinant microscopie à épifluorescence et manipulation robotisée des liquides, permettant une IF cyclique entièrement automatisée. Chaque cycle de marquage comprend l'application d'un ou plusieurs anticorps conjugués à des fluorophores, distincts (FITC, PE, APC, Alexa488, Alexa555, Alexa647), un temps d'incubation spécifique, l'acquisition d'image des trois canaux, puis une étape d'effacement du signal (photoblanchiment à la lumière ou digestion enzymatique via les réactifs REAlease). Les images sont acquises à l'aide d'un objectif Nikon 20× S Plan Fluor ELWD. La caméra sCMOS monochromatique du système, associée à cet objectif, fournit une résolution de 106 nm/pixel. Un autofocus combiné (optique infrarouge + image DAPI) assure une stabilité optimale du plan focal entre les cycles. Trois panels ont été construits et présentés dans ce rapport, tous présentés en Annexe 2, 3 et 4. De manière générale, ces anticorps ciblent diverses protéines, notamment des facteurs de transcription et d'identité cellulaire, des marqueurs neuronaux et gliaux, des protéines de structure, des marqueurs épithéliaux, immunitaires, métaboliques, ainsi que des molécules d'adhérence cellulaire.

## Analyse des images

Les images acquises ont été transférées dans le logiciel MACSiQ View pour le pré-traitement. Pour la lame 1 (ZBA), les deux panels d'anticorps ont été pré-processés simultanément à l'aide des paramètres par défaut fournis par le système MACSima™. Ce pré-traitement inclut la suppression du signal de fond ainsi que l'alignement automatique des images de chaque cycle sur la base du marquage nucléaire DAPI. La validation des marquages repose sur deux critères complémentaires. Le premier, une comparaison visuelle entre l'image obtenue avant marquage et après marquage. Le deuxième, une confrontation avec des données de référence issues d'IF classique ou de précédentes expériences sur la plateforme MACSima.

La segmentation cellulaire manuelle a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (version 2.16.0), en s'appuyant sur l'image DAPI. Ces images provenaient d'un échantillon de testis PCW7 imagé sur la plateforme Miltenyi en Allemagne. Les ROIs (Regions of Interest) ainsi générées ont été exportées vers un environnement JupyterLab 4.2.5 (Python 3.13), où elles ont été converties en masques d'image servant de base à l'analyse. Quatre types de masques ont été générés selon des paramètres de visualisation différentes : masque multicolore (chaque ROI reçoit une couleur unique, sans restriction), masque à trois couleurs (les couleurs sont attribuées pour distinguer visuellement les chevauchements entre ROIs), masque en nuances de gris (les intensités reflètent le degré de chevauchement entre les ROIs) et masque en niveaux de gris avec contours (chaque ROI est affiché en gris uniforme avec un contour noir). Ces masques ont été exportés au format TIF puis importés dans MACSiQ View, où différents modes de segmentation sont testés : Import Mask, Import Label, Single Cell et Tissue. Afin d'évaluer leur qualité, un script Python est écrit pour comparer les résultats à une segmentation de référence (Annexe 7). La segmentation par la méthode « Tissue » s'est révélée être la plus proche de la segmentation manuelle. Nous utilisons cette référence pour construire une méthode d'apprentissage non supervisée utilisant un modèle Isolation Forest, permettant de détecter les cellules considérées comme mal segmentées. Nous avons gardé 7 points d'observation : taille de la cellule et du noyau, forme (circularité, allongement et convexité) et qualité de mise au point et de la segmentation nucléaire. Ces données ont été normalisées à l'aide d'un StandardScaler, puis utilisées pour entraîner un modèle d'Isolation Forest en supposant que 5% des cellules sont potentiellement mal segmentées (valeurs aberrants). Le modèle a ensuite été appliqué aux segmentations automatiques réalisés sur les coupes embryonnaires entières, et chaque cellule a été classée comme normale ou anormalement segmentée. Le score final est défini comme le pourcentage de cellules jugées bien segmentées.

Une segmentation de la région postérieure lombo-sacrée est réalisée. Un premier prétraitement a consisté à exclure une zone rectangulaire artéfactuelle située entre 22 800 – 26 750 px en abscisse (Nuc X) et 32 000 – 35 000 px en ordonnée (Nuc Y), correspondant à une région parasite de l'image. Pour chaque cellule Syk<sup>+</sup>, les intensités de trois autres marqueurs soit Iba1, EpCAM et Oct2 ont été extraites. Les valeurs sont normalisées via un z-score (StandardScaler, scikit-learn), puis un algorithme de clustering non supervisé (K-means, k=4) a été appliqué pour identifier des groupes de cellules Syk<sup>+</sup>. Pour chaque cellule Syk<sup>+</sup>, la distance minimale par rapport aux structures d'intérêt a été calculée. Les coordonnées de chaque structure ont été extraites depuis des fichiers .csv, eux même issus de la segmentation initiale, et les distances minimales calculées en 2D euclidienne à partir des centres nucléaires. Les distributions de distance par cluster ont été comparées via un test non paramétrique de Mann-Whitney U, en tenant compte uniquement des comparaisons pertinentes par structure. Les profils d'intensité moyenne de fluorescence des cellules Syk<sup>+</sup> précédemment clusterisées sont identifiés sur les marqueurs les plus caractéristiques. Les marqueurs non informatifs ou trop ubiquitaires ont été exclus de l'analyse. Les intensités de fluorescence restantes ont été normalisées (z-score), puis les moyennes par cluster ont été calculées. Pour chaque cluster, la distance euclidienne entre la moyenne normalisée du cluster et la moyenne globale (toutes cellules Syk<sup>+</sup> confondues) a été calculée marqueur par marqueur. Les dix marqueurs présentant les plus fortes distances ont été retenus pour chaque cluster comme candidats discriminants.

Les structures digestives sont segmentées manuellement via la segmentation automatique de MACSiQView. Pour chaque structure, les intensités des 18 marqueurs jugés pertinents par leur expression, soit  $\beta$ 3-tubuline, Synapsine, Oct2, Sox10, Phox2B, HUCD, Sox2, FoxF1, Ki-67, Epcam, CD239, GATA3, TSPAN8, Collagène III et IV, Syk, Myosine Smooth Muscle, CD31, Fetoprotéine et Vimentine, ont été centrées et réduites à l'aide de la méthode StandardScaler (sklearn). Une recherche du nombre optimal de clusters a été réalisée via un K-means itératif (k = 2 à 9) en évaluant le silhouette score. Le clustering final a été appliqué avec la valeur optimale de k. Une réduction de dimension par UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) a permis de visualiser la structure des données dans un espace 2D.

Les échantillons en 3D sont visualisés et traités avec IMARIS (10.2) et segmentés via SyGlass (2.3.0) puis réimportés dans IMARIS.

## VI. Bibliographie

1. Sun, Y. *et al.* A central role for *Islet1* in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci* **11**, 1283–1293 (2008).
2. Carney, T. J. *et al.* A direct role for *Sox10* in specification of neural crest-derived sensory neurons. *Development* **133**, 4619–4630 (2006).
3. Eng, J. *et al.* A framework for multiplex imaging optimization and reproducible analysis. *Commun Biol* **5**, 438 (2022).
4. Zidane, M. *et al.* A review on deep learning applications in highly multiplexed tissue imaging data analysis. *Front Bioinform* **3**, 1159381 (2023).
5. Rua, R. & McGavern, D. B. Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol Med* **24**, 542–559 (2018).
6. Dasen, J. S. Chapter 4 Transcriptional Networks in the Early Development of Sensory–Motor Circuits. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 87 119–148 (Academic Press, 2009).
7. Goltsev, Y. *et al.* Deep Profiling of Mouse Splenic Architecture with CODEX Multiplexed Imaging. *Cell* **174**, 968–981.e15 (2018).
8. O’Rahilly, R. & Müller, F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs* **192**, 73–84 (2010).
9. Stévant, I. *et al.* Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep* **26**, 3272–3283.e3 (2019).
10. Caicedo, J. C. *et al.* Evaluation of Deep Learning Strategies for Nucleus Segmentation in Fluorescence Images. *Cytometry Part A* **95**, 952–965 (2019).

11. Da Mesquita, S. *et al.* Functional aspects of meningeal lymphatics in aging and Alzheimer's disease. *Nature* **560**, 185–191 (2018).
12. Najem, H. *et al.* High Dimensional Proteomic Multiplex Imaging of the Central Nervous System Using the COMET™ System. *bioRxiv* 2025.02.14.638299 (2025) doi:10.1101/2025.02.14.638299.
13. Renier, N. *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).
14. Xu, M. *et al.* ISL1 and POU4F1 Directly Interact to Regulate the Differentiation and Survival of Inner Ear Sensory Neurons. *J Neurosci* **44**, e1718232024 (2024).
15. Pankratz, J. *et al.* Iterative ultrahigh-content imaging with the MACSima™ Imaging Platform using novel releasable antibody- fluorochrome conjugates based on REAlease® Technology.
16. Kinkhabwala, A. *et al.* MACSima imaging cyclic staining (MICS) technology reveals combinatorial target pairs for CAR T cell treatment of solid tumors. *Sci Rep* **12**, 1911 (2022).
17. Szpinda, M. *et al.* Morphometric study of the T6 vertebra and its three ossification centers in the human fetus. *Surg Radiol Anat* **35**, 901–916 (2013).
18. Mete, O. *et al.* Overview of the 2022 WHO Classification of Paragangliomas and Pheochromocytomas. *Endocr Pathol* **33**, 90–114 (2022).
19. Zhang, X. *et al.* Reimagining the meninges from a neuroimmune perspective: a boundary, but not peripheral. *J Neuroinflammation* **21**, 299 (2024).
20. Kastriti, M. E. *et al.* Schwann Cell Precursors Generate the Majority of Chromaffin Cells in Zuckerkandl Organ and Some Sympathetic Neurons in Paraganglia. *Front Mol Neurosci* **12**, 6 (2019).

21. Xie, K., Cheng, X., Zhu, T. & Zhang, D. Single-cell transcriptomic profiling of dorsal root ganglion: an overview. *Front Neuroanat* **17**, 1162049 (2023).
22. Gómez-López, S. *et al.* Sox2 and Pax6 maintain the proliferative and developmental potential of gliogenic neural stem cells In vitro. *Glia* **59**, 1588–1599 (2011).
23. Arnold, K. *et al.* Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* **9**, 317–329 (2011).
24. Soldatov, R. *et al.* Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science* **364**, eaas9536 (2019).
25. Noraz, N. *et al.* Syk kinases are required for spinal commissural axon repulsion at the midline via the ephrin/Eph pathway. *Development* **143**, 2183–2193 (2016).
26. Hiraki, C. & Tsuruta, F. The Meninges as CNS Interfaces and the Roles of Meningeal Macrophages. *Biomolecules* **15**, 497 (2025).
27. Mócsai, A., Ruland, J. & Tybulewicz, V. L. J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* **10**, 387–402 (2010).
28. Belle, M. *et al.* Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell* **169**, 161-173.e12 (2017).
29. Harris, A. *et al.* ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 5474–5479 (2018).