



HAL
open science

Etudes d'ultrastructures hépatiques par microscopie électronique 3D de type FIB-SEM

Yousr Rekik

► **To cite this version:**

Yousr Rekik. Etudes d'ultrastructures hépatiques par microscopie électronique 3D de type FIB-SEM. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV042 . tel-04246007

HAL Id: tel-04246007

<https://theses.hal.science/tel-04246007>

Submitted on 17 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie cellulaire

Unité de recherche : Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux

Études d'ultrastructures hépatiques par microscopie électronique 3D de type FIB-SEM

Study of hepatic ultrastructures by FIB-SEM 3D electron microscopy

Présentée par :

Yousr REKIK

Direction de thèse :

Aurélien DENIAUD

MAITRE DE CONFERENCES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Mireille CHEVALLET

INGENIEUR CHERCHEUR, CEA Grenoble

Co-encadrante de thèse

Pierre-Henri JOUNEAU

INGENIEUR CHERCHEUR, CEA Grenoble

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

Jean-Marc VERBAVATZ

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris Cité

Claire WILHELM

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Ile-de-France Villejuif

Thèse soutenue publiquement le **28 juin 2023**, devant le jury composé de :

Aurélien DENIAUD

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Jean-Marc VERBAVATZ

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris Cité

Rapporteur

Claire WILHELM

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Ile-de-France Villejuif

Rapporteuse

Martine DAUJAT

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Occitanie Méditerranée

Examinatrice

Laurent CHARLET

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

Invités :

Mireille CHEVALLET

INGENIEUR DE RECHERCHE, CEA Grenoble

Pierre-Henri JOUNEAU

INGENIEUR DE RECHERCHE, CEA Grenoble



« It always seems impossible until it's done »

Nelson Mandela, 1^{er} président de l'Afrique du Sud

Remerciements

Pendant ma thèse, et surtout, pendant la rédaction de mon manuscrit, j'ai lu beaucoup de remerciements d'autres thèses et voilà mon tour pour écrire les miens. Il me sera très difficile de remercier tout le monde, car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du Jury, **Dr. Laurent Charlet**, **Dr. Jean-Marc Verbavatz**, **Dr. Claire Wilhelm** et **Dr. Martine Daujat**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Un grand merci pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux de thèse et pour la discussion très enrichissante et les questions pertinentes lors de ma soutenance.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement les chercheurs qui ont participé à mes comités de suivi de thèse (CSI) : **Dr. Catherine Picart**, **Dr. Christel Genoud**, **Dr. Martine Daujat** (merci encore !) et **Dr. Nicolas Brouilly**. Je vous remercie pour les échanges instructifs et pour les précieux conseils pour l'organisation de ma thèse, la rédaction de mon manuscrit et la définition de mon projet professionnel. J'adresse particulièrement ma profonde reconnaissance à **Dr. Liliana Buda-Prejbeanu** pour avoir accepté d'être ma tutrice durant ces CSI. Merci pour votre soutien continu depuis mes études à Grenoble INP/Phelma, vos mots encourageants et votre bienveillance infinie.

Ces travaux ont été réalisés entre le laboratoire de Chimie et de Biologie des Métaux (LCBM) et le laboratoire de Modélisation et d'Exploration des Matériaux (MEM). Je voudrais ainsi remercier **Dr. Stéphane Ménage** et **Dr. Vincent Artero**, respectivement directeur du LCBM au début et à la fin de ma thèse et **Dr. Thierry Deutsch**, directeur du MEM pour m'avoir accueillie au sein des deux laboratoires.

Je remercie infiniment mon directeur de thèse **Dr. Aurélien Deniaud** et mes encadrants **Dr. Mireille Chevallet** et **Dr. Pierre-Henri Jouneau**. Merci pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutien tout au long de ma thèse. Cela a été un plaisir de travailler avec vous, je vous remercie d'avoir fait de ma thèse une expérience enrichissante aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Grâce à votre accompagnement durant ces années, je me suis épanouie et j'ai beaucoup appris à vos côtés. Même dans les moments difficiles, comme pendant la période de confinement, vous m'avez encouragée, soutenue et aidée à continuer mon travail en me donnant l'opportunité de transporter la station de travail chez moi. Cela a rendu la période moins difficile et plus productive et je vous en suis reconnaissante ! Merci également pour vos corrections pointues de mon manuscrit, pour votre soutien dans la préparation de l'oral (c'est le cas, d'ailleurs, pour toutes les présentations que j'ai faites pendant ma thèse) et pour les échanges très instructifs pendant les répétitions.

Aurélien, je retiens surtout tes qualités managériales (tant pour diriger ma thèse que pour diriger l'équipe Met&Or) et ton efficacité à planifier les différents échelons de ma thèse, même si cela était parfois stressant pour moi. Je me souviendrai toujours de la première phrase que tu m'as dite lors de ma candidature pour la thèse (je conserve le sens mais peut-être pas exactement les mots) « Est-ce que tu es sûre de vouloir intégrer une équipe de

biologistes ? ». C'est vrai que j'ai embarqué dans cette expérience avec très peu de « bagage » en biologie vu mon profil initialement loin de la biologie, mais je te remercie pour m'avoir donnée cette opportunité pour découvrir le monde passionnant de la biologie cellulaire, et en particulier celle du foie. Merci encore pour m'avoir appris la culture cellulaire et pour m'avoir montré les manips ICP.

Mireille, avec la modification du sujet initial de la thèse à cause du confinement, nous n'avons pas fait beaucoup de manips ensemble comme prévu. Mais j'ai apprécié faire l'imagerie confocale et préparer les puces avec toi. Tu étais toujours là pour suivre l'avancée de mes travaux, me guider, me conseiller, m'encourager et je t'en suis extrêmement reconnaissante. Nous nous sommes un peu plus rapprochées durant les derniers mois de la thèse, les mois de rédaction du manuscrit, merci pour ta disponibilité, tes conseils avisés et surtout ton aide très précieuse et tes mots rassurants qui m'ont remonté le moral lors de la finalisation du manuscrit lorsque j'étais trop stressée pour le finir dans les délais.

PH, merci beaucoup pour m'avoir recommandée pour travailler sur ce sujet et pour ta confiance dès le premier jour. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et découvrir ta passion pour la microscopie électronique, surtout lorsque tu présentes la plateforme de la nanocaractérisation (PFNC) aux visiteurs. La plupart du temps, j'étais en position d'observateur durant les manips, mais j'ai beaucoup appris de toi sur le plan expérimental et je suis toujours impressionnée par ton perfectionnisme pour acquérir de belles images. Merci aussi pour ta bienveillance infinie, tes conseils et tes encouragements lorsque j'en avais besoin pour continuer... Enfin, merci pour m'avoir permise de travailler dans ton bureau pour me concentrer et rédiger tranquillement mon manuscrit.

Je vous souhaite, à tous les trois, le meilleur dans vos projets professionnels et personnels.

J'adresse mes sincères remerciements à **Dr. Giulia Veronesi** pour sa contribution à mes travaux de thèse sur le volet de l'imagerie élémentaire XRF. Merci beaucoup pour la visite du synchrotron qui m'a permis de découvrir en près les manips XRF. Merci encore pour ta gentillesse et pour avoir pris le temps pour assister à l'une de mes répétitions de thèse et m'expliquer soigneusement les notions de cette technique qui m'échappaient.

Ces travaux de thèse n'ont pas pu aboutir sans l'investissement fructueux de mes collaborateurs que je remercie vivement. Je tiens à remercier **Dr. Emmanuelle Tillet** et **Dr. Agnès Desroches-Castan** de l'équipe BAL du laboratoire Biologie et Biotechnologies pour la Santé (BioSanté) au CEA Grenoble pour la préparation des échantillons de foie de souris. Merci pour tout le travail que vous avez fait pour optimiser au mieux les protocoles de préparation et pour les discussions toujours intéressantes avec vous. Un grand merci pour m'avoir introduite au monde de la biologie des LSEC, j'ai pris tellement de plaisir à travailler dessus !

Je remercie également **Benoit Gallet** de la Plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble pour la préparation des échantillons de sphéroïdes et pour sa participation enrichissante dans l'amélioration de la préparation des échantillons de foie. Merci pour ta gentillesse à répondre à mes questions et pour m'avoir montré toutes les étapes de la congélation à haute pression et de la cryo-substitution. Enfin,

je salue ton courage à vouloir faire une thèse après tant d'années de carrière et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je profite aussi de ce manuscrit pour remercier des personnes formidables avec lesquelles j'ai moins collaboré mais dont la rencontre était remarquable pendant ma thèse. Je remercie particulièrement **Dr. Denis Falconet** pour avoir suivi de près mes travaux. Merci beaucoup pour tes encouragements, tes mots motivants. Je suis impressionnée par ton enthousiasme et ta passion infinie pour la recherche et j'espère être comme toi (un jour, peut-être) ! Je te souhaite une bonne retraite. Je remercie également **Dr. Karin Pernet Galley** du Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), cela a été un plaisir de te rencontrer et de discuter avec toi. Merci pour ta gentillesse, tes conseils en segmentation d'images et pour l'organisation des réunions du groupe de travail du RIME « Traitement et analyse d'images 3D en ME ».

À **Dr. Lucas Benoit**, merci pour ta bienveillance, pour avoir partagé avec moi tes codes d'analyse d'images et pour avoir pris le temps de te déplacer pour me les expliquer. Il m'est aussi impossible d'oublier de remercier **Dr. Clarisse Uwizeye** pour ses conseils avisés en analyse d'images (oui, tu es l'experte !). Tu as toujours fait de ton mieux pour m'aider et je t'en suis reconnaissante. Je te remercie également pour tes conseils avant la soutenance et pour le temps que tu as pris pour m'écouter en répétition.

La thèse était aussi une très belle aventure humaine à travers la rencontre de nombreuses personnes que ce soit au bâtiment K ou à la PFNC. Je vous remercie tous pour avoir fait part de cette expérience. Merci aux membres de la jeune équipe Métaux & Organes (**Met&Or**). Merci **Peggy** pour ta bienveillance et pour ton aide en culture cellulaire. À **Cécile** et **Denis**, je ne sais pas trop comment vous remercier pour votre aide précieuse le jour de la soutenance. Cela m'a beaucoup facilité la tâche d'organisation, mille merci. Que vous trouviez beaucoup de passion, et surtout, de patience pour vous épanouir en thèse et au-delà ! **Cécile**, tu prends le relais pour continuer mon projet, bon courage ! Merci aussi aux membres de l'ancienne équipe Biologie des Métaux (**BioMet**) pour leur accueil au début de ma thèse. Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe Étude des Matériaux par Microscopie Avancée (**LEMMA**) pour l'accueil dans leurs locaux à la PFNC.

Ces années de thèse ont permis de transformer des collègues en amies et c'est le cas d'**Abir** et **Kshipra**. Je vous remercie énormément, les filles, pour tous les moments partagés ensemble aussi bien les bons que les plus difficiles, au labo et en dehors du labo. Nous nous sommes serré les coudes dès le début jusqu'à la fin et j'en suis très fière et heureuse. Certainement, l'aventure n'aurait pas été la même sans vous, sans nos discussions pour décompresser et râler, sans nos folies au labo et nos sorties en courant le soir... Cela a été un plaisir de partager cette expérience avec vous.

Abir, merci pour les discussions qui ne finissent jamais sur nos rêves, sur la recherche, l'enseignement, la pédagogie et sur la vie en général. Je n'oublierai surtout pas nos courses à 20h30 pour sortir avant la fermeture du portail du CEA (notre affaire !). Notre binôme ne s'est pas restreint au CEA puisque qu'on a aussi partagé d'autres évènements ensemble comme l'organisation de la rencontre des jeunes physiciens (RJP), l'aventure scouts et la formation « ma thèse en 180 secondes ». J'ai beaucoup appris de ces expériences que je n'aurais pas

faites toute seule. Merci d'être là ! Je reste admirative devant ta détermination, ton sens de responsabilité, ta soif d'apprendre et ton audace qui t'ont permis d'arriver là où tu es et je suis sûre que tu vas arriver où tu veux pour accomplir tes rêves, je ne m'en doute pas ! Je te souhaite plein de courage pour la fin de rédaction de ton manuscrit et une brillante réussite pour ta soutenance (c'est presque fini !).

***Kshipra**, Dr. Kshipra, congratulations, you made it and I am very PROUD of you! You rocked as always! It was a pleasure to share this journey with you with its ups and downs. You were the first person I met at PFNC and you shortly became a close friend and not a simple colleague. I love your very positive energy (you are the sunshine of the office, as I am always saying), your sense of sharing and your easy going personality. Thank you for your support and for making this journey funny by knowing how to make us laugh (me and Abir), even in moments of intense stress. I will always remember your "How do you manage?" that you asked me each time I finished a CSI or any other step before you (it is always the case, even for the defense, by the way...). Your funny expressions when you try to speak french are also unforgettable : ça fait laffé (ça fait l'affaire), to cite just one example.*

Girls, I hope that our friendship will stay forever and let's keep in touch! I wish you all the best wherever you will be and a lot of happiness no matter what it will happen!

Je remercie particulièrement **Dr. Thomas David** et **Patrice Perrenot** du laboratoire d'innovation pour les technologies des énergies nouvelles et les nanomatériaux (CEA-Liten) pour leurs précieux conseils et leur aide de tout moment dans les segmentations, l'animation des vidéos et l'analyse d'images en général, surtout lorsque j'étais sur le point d'arracher mes cheveux parce que ma segmentation ne marche pas ! J'ai énormément appris de vous et je vous en suis très reconnaissante. **Thomas**, merci également pour m'avoir filmée pour préparer une vidéo sur mon travail de thèse. **Patrice**, merci encore pour les photos de l'évènement RJP et merci pour m'avoir découvert le monde des couleurs et de leur harmonie. Bon courage pour la fin de rédaction de ton manuscrit et pour ta soutenance !

J'exprime ma gratitude à **Dr. Patrick Quéméré** du laboratoire d'électronique et de technologie de l'information (CEA-Leti) pour son intérêt à mon travail, pour m'avoir montré ses *Jupyter Notebooks* et pour avoir pris le temps pour travailler sur mes images. Merci Patrick !

Andrea, merci beaucoup pour ta gentillesse, pour les bons moments qu'on a partagés ensemble, pour les échanges autour de la segmentation des images et pour les cadeaux (de Bolivie et d'Antibes !). Merci aussi pour les explications de la symbiose et pour m'avoir montré tes cultures d'algues. Je te souhaite une belle fin de thèse et j'espère que ton travail durant ces années sera récompensé à juste valeur.

À **Dr. Laure Guétaz**, merci pour les moments qu'on a partagés ensemble, pour toutes les discussions qu'on a eues dans la salle café et pour tes explications de l'EDX. Je pense que j'ai bien mérité le titre de « doctorante sans bureau », comme tu dis...

À **Dr. Anne-marie Papon**, merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et ton sourire communicatif qui incite naturellement à discuter avec toi : cela fait toujours plaisir de le voir.

Merci aussi pour les noix ! Enfin, je profite de cette occasion pour te dire que je suis impressionnée par ton enthousiasme à faire les manips !

Merci à toutes les autres personnes que j'ai côtoyées à la PFNC : **Bérangère, Claire, David, François** (Merci pour les discussions histoire et art), **Nathalie** (Merci pour les stylos :)), **Yves, Zyneb, Adem** et **Haythem** (Merci pour les discussions *deep learning*) et j'en oublie peut-être.

Je remercie également **Benjamin** pour les moments qu'on a partagés ensemble dans la salle café et pour le travail impressionnant de segmentation que tu as fait pendant ton stage. Ton passage à la PFNC est remarquable et je pense que je ne suis pas la seule à dire cela. Bon courage pour tout ce que tu fais !

Merci **Élise** pour tes mots encourageants lors de tes passages à la PFNC.

Merci **Manon**. Même si ton passage à la PFNC était court, nous nous sommes confiées rapidement l'une à l'autre et nous avons partagé de nombreuses sessions de segmentation dans la salle café. Merci pour ta sympathie, ton honnêteté et pour les discussions sur les podcasts (notre passion partagée). J'espère que tu t'épanouis dans ce que tu fais !

Faiza, je tiens à te remercier pour ta gentillesse et ton aide qui m'est très précieuse le jour de ma soutenance.

Ons et **Rania**, je suis heureuse de vous avoir rencontrées, bonne continuation les Dr. !

Mes remerciements s'adressent aussi aux personnes « hors labo » que j'ai eu l'occasion de rencontrer durant ces années de thèse.

Merci **Kylia**, cela a été un réel plaisir d'organiser l'évènement RJP avec toi. Je retiens surtout ton esprit d'équipe, ta persévérance et tes capacités de leadership. Je te souhaite une brillante fin de thèse et plein de courage pour la suite.

Doaa, we haven't known each other for a long time but we shortly became close friends. Thanks for sharing with me the special moment of my defense and thanks for the gift. It means a lot for me! I wish you a bright future, a lot of happiness, success and achievement of all your dreams! Good luck for finishing your thesis and for the defense!

Tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille, mes parents et ma sœur, vous êtes ma source de force et mon trésor dans la vie !

Un grand merci à mon très cher père **Abdelaziz** et à ma très chère mère **Najet**. Sans vous je ne serai rien. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, pour votre grande confiance en moi et votre soutien inconditionnel dans mes choix personnels et professionnels (je sais que je fais généralement les choix les plus difficiles...). Merci également pour les relectures de mon manuscrit et pour l'effort que vous avez fait pour comprendre des notions qui étaient au début difficiles pour vous. Mille merci maman pour m'avoir toujours soutenue et pour ton écoute lorsque je commençais à me plaindre. Merci d'être toujours là pour moi ! Tu dis toujours que c'est par un coup de génétique que je suis tombée « amoureuse » de la biologie, faisant référence à ta passion (et ta vocation, d'ailleurs) pour la médecine (et implicitement pour la biologie) et je commence vraiment à te croire. Enfin, j'étais

très contente de votre présence, mes chers, à mes côtés le jour de ma soutenance. Voir la fierté dans vos yeux m'a beaucoup émue ! J'espère que je serai toujours une source de fierté pour vous. Merci encore maman pour la préparation du pot, tout était parfait ! Ce modeste travail est pour moi l'occasion de vous exprimer mon éternelle gratitude pour tout ce que vous avez fait et vous faites pour moi, mon amour inconditionnel et mon attachement indéfectible à vous.

À ma sœur **Farah**, merci pour l'amour que tu me portes, pour ton soutien moral et tes encouragements. Tu peux toujours me faire rire, même dans les moments difficiles et c'est un don que j'apprécie beaucoup chez toi. Tu mets de la couleur dans ma vie et tu la rends palpitante ! Merci aussi de me comprendre si bien. Ta présence à ma soutenance m'a comblé de bonheur. Je te souhaite plein de courage pour ton concours de spécialisation en médecine et plein de succès pour le futur. Je te souhaite surtout d'être heureuse quoi qui arrive. Enfin, saches que je serai toujours là pour toi peu importe où la vie nous mènera.

Je remercie également mon très cher oncle **Mohamed** pour son soutien et ses encouragements. Tes messages motivants arrivent toujours au bon moment !

À ma très chère tante **Karima**, merci pour être une deuxième maman pour moi, merci pour ton soutien, ta grande affection et ton grand cœur, merci pour tout !

À ma chère amie **Maya**, merci beaucoup d'avoir fait la route pour assister à ma soutenance. Je suis très heureuse que tu as pu partager ce moment avec moi et que j'ai pu te revoir après tant d'années.

À ma chère amie **Nawras**, je te remercie énormément pour ton soutien moral durant la période de rédaction.

Une dédicace spéciale à **Dorra** et **Mounib** qui m'ont soutenue et encouragée à aller jusqu'au bout. Merci aussi pour les fleurs, cela m'a beaucoup touchée ! C'est toujours un plaisir de discuter avec vous, merci pour les précieux conseils. Écouter Mounib parler de sa passion pour la recherche, et en particulier pour la microscopie me laisse rêveuse. Que cette passion ne s'éteigne jamais ! Je vous souhaite plein de bonheur dans votre vie de famille avec le petit doudou.

J'exprime ma gratitude à **Dr. Sophie Quintin** avec laquelle j'ai mis mon premier pas dans le monde de la recherche pendant mon stage de master 1 à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Strasbourg. Je te remercie de tout mon cœur pour ta gentillesse, ta sympathie et ton soutien. À chaque fois que je lis les mots que tu m'as écrits à la fin de mon stage, j'ai les larmes aux yeux. J'espère vraiment être à la hauteur de ta grande confiance.

Merci aussi à toutes les personnes qui ont pu se libérer pour assister à ma soutenance de thèse (en présentiel ou en visio).

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre pendant ma thèse et dont les noms m'échappent en écrivant ces mots. Ils, elles se reconnaîtront.

Merci à tous pour rendre cette expérience inoubliable ! Je vous souhaite tous le meilleur dans vos projets professionnels et personnels. À bientôt, j'espère.

Pour finir, je dédie ce manuscrit à mon très cher grand-père **Mongi** que j'ai perdu un mois avant le début de ma thèse et qui me manque tellement ! Saches que tu ne m'as jamais quittée...

Préambule

Le développement des techniques de microscopie électronique volumique a marqué les deux dernières décennies et leur application en biologie a considérablement fait progresser le domaine de l'imagerie tissulaire et cellulaire. En particulier, l'utilisation de la technique FIB-SEM (pour *focused ion beam-scanning electron microscopy*) pour imager des échantillons biologiques a permis une avancée importante dans la compréhension de leur ultrastructure tridimensionnelle à une échelle nanométrique. Ceci a été rendu possible grâce aux développements continus des méthodes d'analyse et particulièrement de segmentation d'images. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse qui a consisté à développer des approches de segmentation d'images FIB-SEM dans le but de répondre à deux questions biologiques : la compréhension du devenir et des effets de nanoparticules d'argent (NP-Ag) dans le foie grâce à un modèle de sphéroïde hépatique et l'étude de l'ultrastructure fine du tissu hépatique avec un focus particulier sur la porosité de ses capillaires.

Ce travail s'est déroulé dans l'équipe Métaux et Organes (Met&Or) du laboratoire de Chimie et de Biologie des Métaux (LCBM) en collaboration avec l'équipe Étude des Matériaux par Microscopie Avancée (LEMMA) du laboratoire Modélisation et Exploration des Matériaux (MEM) du CEA Grenoble. Les travaux de l'équipe Met&Or sont centrés sur l'étude de l'homéostasie des métaux dans le foie et de leurs dérégulations lors de pathologies ou d'expositions exogènes, par exemple à des nanoparticules métalliques. L'équipe LEMMA est spécialisée dans l'étude de la structure et des propriétés des matériaux par microscopie électronique et ionique et a récemment commencé à utiliser ces techniques pour l'imagerie des échantillons biologiques.

Ce manuscrit de thèse s'articule en trois chapitres :

Un **premier chapitre d'introduction** qui présente l'anatomie, les fonctions et l'ultrastructure du foie avant de passer en revue les différents types cellulaires qui le composent. Ensuite, les principaux modèles hépatiques *in vitro* utilisés dans la littérature sont décrits. Puis, l'état de l'art des connaissances sur le devenir des NP-Ag chez les mammifères est présenté. Enfin, les techniques de microscopie électronique volumique sont décrites en mettant l'accent sur la technique FIB-SEM ainsi que sur les différentes étapes d'analyse d'images, et en particulier l'étape de segmentation.

Les travaux réalisés pour étudier le devenir des espèces d'Ag dans un modèle 3D de sphéroïde d'hépatocytes sont présentés dans le **chapitre 2**. Dans cette étude, ces sphéroïdes ont été exposés à des NP-Ag ou à un sel d'Ag afin de mimer le devenir de NP-Ag dans l'organisme dans le cas d'une exposition orale ou parentérale. L'utilisation de ce modèle hépatique nous a permis de comprendre les transformations et l'excrétion d'espèces d'Ag du foie et leurs effets sur l'ultrastructure cellulaire. Pour cela, nous avons combiné la technique FIB-SEM avec d'autres techniques d'imagerie de pointe et d'analyse chimique afin d'étudier la spéciation de l'Ag et sa distribution dans les hépatocytes à haute résolution et à haute sensibilité. L'utilisation de la technique FIB-SEM a permis de visualiser les différents compartiments

cellulaires en 3D et d'analyser les effets des NP-Ag sur l'ultrastructure des hépatocytes. Cette étude est présentée sous la forme de l'article récemment publié dans la revue *Environmental Science: Nano*.

Une analyse de l'ultrastructure du foie de souris par FIB-SEM est présentée dans le **chapitre 3**. Dans ce travail, un focus sur l'ultrastructure des cellules endothéliales sinusoïdales LSEC (pour *liver sinusoidal endothelial cells*) qui tapissent les vaisseaux hépatiques a été réalisé. Dans un premier temps, les résultats d'optimisation du protocole de préparation des blocs de foie pour bien préserver le tissu hépatique sont présentés. Dans un second temps, la méthode de segmentation que j'ai développée pour reconstruire en 3D les LSEC à haute résolution et pour permettre l'étude quantitative de leurs fenêtres est détaillée.

Enfin, les conclusions générales et les perspectives de mon travail de thèse sont présentées dans le dernier chapitre **conclusions et perspectives**. À la fin du manuscrit, le chapitre **matériels et méthodes** présente les détails expérimentaux des deux études.

Table des matières

Préambule	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations	9
Chapitre 1 : Introduction	11
1. Anatomie, fonctions et ultrastructure du foie	11
1.1. Anatomie générale du foie	11
1.2. Fonctions du foie.....	12
1.3. Architecture du tissu hépatique	13
2. Les modèles hépatiques	18
2.1. Les modèles in vivo	18
2.2. Les modèles in vitro	19
3. Le devenir des nanoparticules d'argent chez les mammifères	24
3.1. Définitions	24
3.2. Généralités sur l'argent (Ag) et les nanoparticules d'Ag (NP-Ag).....	25
3.3. Transformations des NP-Ag dans l'environnement et dans les milieux biologiques	27
3.4. Transformations des NP-Ag à l'échelle de l'organisme	31
3.5. Entrée, transformations et effets des NP-Ag dans les cellules mammifères	36
4. Les techniques de microscopie électronique volumique cellulaire et tissulaire.....	39
4.1. L'imagerie de coupes sériées en TEM.....	41
4.2. L'imagerie de coupes sériées en SEM	42
4.3. L'imagerie SBF-SEM.....	44
4.4. L'imagerie FIB-SEM	45
4.5. Des piles d'images 2D aux reconstructions 3D	48
5. Objectifs de la thèse	59
Chapitre 2 : Étude du devenir des NP-Ag jusqu'à leur excrétion dans un modèle de sphéroïde d'hépatocytes	63
Contexte	63
<i>Deciphering silver nanoparticle fate in liver up to biliary excretion using HepG2/C3A spheroids in scenarios mimicking different exposure pathways</i>	65
Perspectives.....	93

Chapitre 3 : Étude de l'ultrastructure de foie de souris par FIB-SEM.....	97
Introduction.....	97
1. Optimisation de la préparation des échantillons de foie de souris.....	100
1.1. Amélioration de la préservation de l'ultrastructure du tissu hépatique.....	100
1.2. Amélioration du contraste des structures hépatiques	102
1.3. Comparaison entre la méthode de contraste en bloc et la cryo-substitution	105
2. Reconstruction 3D des LSEC à partir d'images FIB-SEM.....	110
2.1. Segmentation des LSEC.....	110
2.2. Segmentation des LSEC d'un sinusöide hépatique	113
3. Discussion	122
Conclusion	128
Conclusions et perspectives	131
Matériels et méthodes.....	137
1. Les NP-Ag.....	137
2. Préparation des sphéroïdes d'hépatocytes et expositions aux espèces d'Ag.....	137
2.1. Culture cellulaire	137
2.2. Préparation des sphéroïdes d'hépatocytes	137
2.3. Exposition des sphéroïdes aux espèces d'Ag.....	138
3. Quantification de l'Ag par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES).....	138
4. Étude de la voie d'excrétion biliaire	139
5. Préparation des sphéroïdes pour l'imagerie	139
6. Préparation des blocs de foie de souris pour l'imagerie FIB-SEM.....	140
6.1. Fixation.....	140
6.2. Préparation à température ambiante - contraste en bloc (protocole 3)	141
6.3. Préparation avec congélation à haute pression et cryo-substitution (protocole 4).....	142
6.4. Différences des protocoles 1 et 2 par rapport aux protocoles 3 et 4.....	142
7. Acquisition et analyse des données STEM-EDX.....	144
8. Acquisitions FIB-SEM	144
9. Analyse des images FIB-SEM	148
9.1. Alignement des piles d'images	148
9.2. Analyse des images FIB-SEM des sphéroïdes traités avec les espèces d'Ag	149
9.3. Analyse des images FIB-SEM des LSEC.....	156
Références bibliographiques	163

Liste des figures

Figure 1 : Structure, vascularisation et voies biliaires du foie.....	11
Figure 2 : Lobule hépatique.....	13
Figure 3 : Polarisation des hépatocytes et organisation des différents types cellulaires autour d'une travée hépatique.	14
Figure 4 : Composition d'une NP-Ag.	26
Figure 5 : Les transformations des NP-Ag dans l'environnement et dans les milieux biologiques.	28
Figure 6 : Schéma représentant les différentes espèces d'Ag formées dans le tractus gastro- intestinal et leur passage éventuel dans le sang.	33
Figure 7 : Résumé des connaissances actuelles sur les transformations des NP-Ag dans les cellules mammifères.	39
Figure 8 : Techniques de microscopie électronique volumique.	42
Figure 9 : Les étapes d'analyse des images obtenues en microscopie électronique volumique.....	49
Figure 10 : Méthode de segmentation <i>carving</i> d'Ilastik.	55
Figure 11 : Méthode de segmentation <i>pixel classification</i> d'Ilastik.....	58
Figure 12 : Fixation d'échantillons de foie de souris par immersion et par perfusion suivie d'immersion.	101
Figure 13 : Préservation des fenêtres des LSEC dans un bloc de foie de souris fixé par perfusion suivie d'immersion.....	102
Figure 14 : Contraste des différentes structures hépatiques obtenu avec le protocole 1. ...	103
Figure 15 : Gouttelettes lipidiques dans un bloc de foie prélevé chez une souris âgée de 6 mois (protocole 2).	104
Figure 16 : Contraste des LSEC et des microvillosités hépatocytaires obtenu avec le protocole 2.	104
Figure 17 : Cavités dans un bloc de foie de souris préparé avec le protocole 2.....	105
Figure 18 : Coloration à température ambiante (contraste en bloc) et coloration à froid (cryo- substitution) de blocs de foie de souris.	106
Figure 19 : Contraste des différentes structures hépatiques obtenu avec le protocole 3. ...	107
Figure 20 : Contraste des différentes structures hépatiques obtenu avec le protocole 4. ...	108
Figure 21 : Les quatre protocoles de préparation testés sur des blocs de foie de souris.	109
Figure 22 : Méthode de segmentation des LSEC à deux étapes.	111
Figure 23 : Segmentation d'une LSEC à deux résolutions.....	112
Figure 24 : Sinusoïde segmenté.	113
Figure 25 : Définition de la bande de localisation des fenêtres des LSEC.....	115
Figure 26 : Segmentation des régions fenêtrées des LSEC.	116
Figure 27 : Détermination du bord extérieur du sinusoïde.	117
Figure 28 : Détermination du bord intérieur du sinusoïde.	118
Figure 29 : Définition de la bande de localisation des LSEC.....	118
Figure 30 : Application de la bande de localisation des LSEC aux images initiales.....	119

Figure 31 : Segmentation des régions nucléaires des LSEC.	119
Figure 32 : Segmentation finale des LSEC.	120
Figure 33 : Apprentissage du classifieur de la méthode <i>pixel classification</i> sur 4 et 6 sous-volumes dans l'étape 4 de la segmentation des LSEC.	121
Figure 34 : Rendu 3D du maillage des LSEC formant le bord du sinusöide segmenté	121
Figure 35 : Organisation des fenêtres d'une LSEC en deux couches	124
Figure 36 : Histogrammes de distribution des diamètres des fenêtres mesurés en 3D.....	126
Figure 37 : Microscope FIB-SEM Zeiss crossbeam XB 550	144
Figure 38 : Préparation d'échantillon pour l'acquisition FIB-SEM.	145

Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres d'acquisition FIB-SEM utilisés pour les différents échantillons analysés	147
Tableau 2 : Facteurs de <i>binning</i> ou de redimensionnement utilisés pour le prétraitement des images FIB-SEM des sphéroïdes hépatiques.....	149
Tableau 3 : Paramètres de filtrage par diffusion anisotrope	151
Tableau 4 : Paramètres de segmentation des différents organites et des régions de canalicules biliaires des sphéroïdes hépatiques.	153
Tableau 5 : Dimensions des sous-volumes utilisés pour l'apprentissage du classifieur de la méthode <i>pixel classification</i> dans l'étape 4 de segmentation des LSEC.....	160

Liste des abréviations

FIB-SEM	<i>Focused ion beam-scanning electron microscopy</i>
GSH	Glutathion
LSEC	<i>Liver sinusoidal endothelial cells</i>
Met	Métallothionéines, <i>metallothioneins</i>
NP	Nanoparticule
NP-Ag	Nanoparticule d'Ag
PVP	Polyvinyle pyrrolidone
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SBF-SEM	<i>Serial block face-scanning electron microscopy</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
(S)TEM-EDX	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>
vEM	<i>Volume electron microscopy</i>
XRF	<i>X-ray fluorescence microscopy</i>
XAS	<i>X-ray absorption spectroscopy</i>

Chapitre 1 : Introduction

1. Anatomie, fonctions et ultrastructure du foie

1.1. Anatomie générale du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, pesant entre 1,5 et 2 kg chez une personne adulte (Legallais et al., 2018). Il appartient au système digestif et il est situé dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale, en dessous du diaphragme. Il est composé de deux lobes asymétriques (le lobe gauche et le lobe droit) séparés par le ligament falciforme (**Figure 1**).

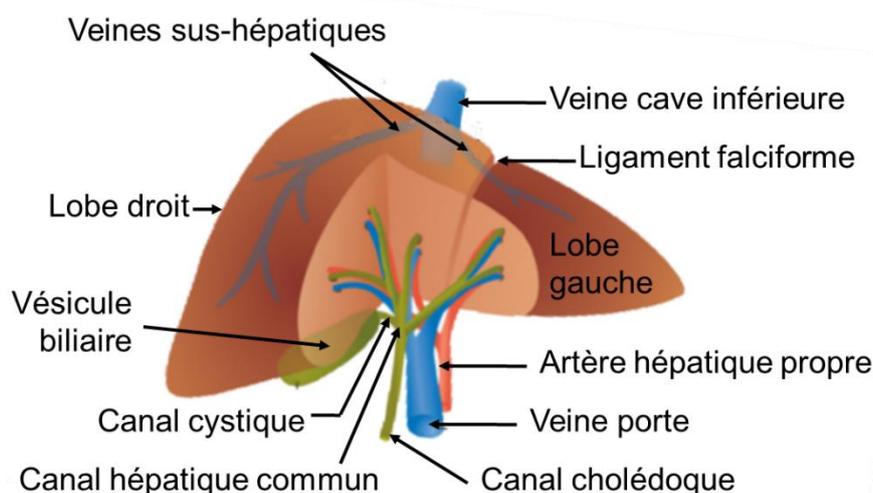


Figure 1 : Structure, vascularisation et voies biliaires du foie. La figure est issue du site du centre de transplantation d'organes (CTO) du centre hospitalier universitaire vaudois © CTO-CHUV (avec autorisation).

Sa vascularisation dense lui confère une couleur rouge très foncé, presque brune. En effet, il contient en moyenne 15 % du volume sanguin total du corps et il est traversé par plus d'un litre de sang chaque minute (pour un adulte). Le foie reçoit le sang de deux vaisseaux : l'artère hépatique et la veine porte (**Figure 1**). Environ 30 % de l'apport sanguin hépatique est assuré par l'artère hépatique qui irrigue le foie avec du sang oxygéné provenant du cœur. Le reste de l'apport sanguin hépatique provient de l'appareil digestif *via* la veine porte sous forme de sang désoxygéné mais riche en nutriments. Dans le foie, le sang de ces deux vaisseaux emprunte un réseau très dense de capillaires fins appelés sinusoides et ressort de l'organe par l'intermédiaire des veines centrolobulaires qui convergent vers les veines sus-hépatiques se jetant à leur tour dans la veine cave inférieure.

Le foie est également parcouru par de nombreuses voies biliaires qui transportent la bile synthétisée par les cellules hépatiques. La bile est une solution aqueuse jaunâtre contenant des électrolytes et des substances organiques (acides biliaires, phospholipides, cholestérol...).

Elle est acheminée du foie par le canal hépatique commun qui devient le canal cholédoque au niveau de l'intestin où elle participe à la digestion des graisses. La vésicule biliaire, reliée au canal cholédoque par le canal cystique, stocke la bile sous forme concentrée (**Figure 1**). Le flux biliaire est opposé à celui du sang.

1.2. Fonctions du foie

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme chez l'Homme, réalisant plus de 500 fonctions de transformation, de stockage, de synthèse et d'excrétion (Legallais et al., 2018).

Il est responsable du maintien de l'homéostasie glucidique en stockant le glucose sous forme de glycogène. En cas de besoins énergétiques, le glycogène est transformé en glucose (glycogénolyse) et distribué aux autres organes. Le foie permet également de synthétiser du glucose à partir de molécules non glucidiques comme les acides aminés selon un processus appelé la néoglucogenèse. Le foie est aussi impliqué dans le métabolisme des lipides. Dans le foie, ceux-ci sont transformés en triglycérides qui sont stockés dans les cellules hépatiques. Ces triglycérides peuvent être transformés en acides gras pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. De plus, le foie est le principal site de synthèse du cholestérol d'origine endogène (non apporté par l'alimentation). L'excès de cholestérol est transformé en acides biliaires et excrété dans la bile. En outre, le foie synthétise de nombreuses protéines sanguines telles que les facteurs de coagulation (comme le fibrinogène) ou l'albumine qui maintient la pression oncotique du sang.

Il produit également des protéines et des hormones impliquées dans l'homéostasie des métaux, fer (Fe) et cuivre (Cu), à l'échelle de l'organisme. En effet, il synthétise la transferrine qui est la protéine de transport du Fe dans le sang et l'hepcidine qui régule la concentration sanguine en Fe. De plus, le foie stocke l'excès de Fe sous forme de complexe avec la ferritine. Dans le cas d'une surcharge en Fe, la production d'hepcidine augmente et entraîne une baisse de l'absorption intestinale du Fe pour rétablir un taux de Fe normal dans le sang. La régulation se fait dans le sens inverse dans le cas d'une diminution du taux de Fe sanguin. Le Cu est aussi un élément essentiel à différentes fonctions cellulaires et le Cu libre est toxique pour l'organisme. Le Cu est absorbé par l'intestin et transporté, dans le sang, vers le foie sous forme de Cu(II) associé à des peptides et des protéines circulants. Ensuite, il est distribué à l'ensemble de l'organisme, en fonction des besoins, *via* la distribution sanguine sous forme de différents complexes avec des protéines et des peptides circulants. Enfin, l'excès de Cu est excrété par les hépatocytes dans la bile.

Outre les nutriments absorbés au niveau de l'intestin, la veine porte apporte au foie diverses substances exogènes (les xénobiotiques) comme les drogues, les alcools, les carcinogènes, les toxines et les médicaments et endogènes comme l'ammoniaque et la bilirubine libre. L'ammoniaque est produite par le côlon lors de la décomposition des protéines et est transformée par le foie en urée qui est ensuite éliminée dans l'urine. La bilirubine libre est produite lors de la dégradation des globules rouges dans la rate et est transformée dans le foie en bilirubine conjuguée. Les xénobiotiques sont transformés dans le foie en produits hydrosolubles ou liposolubles. Les produits hydrosolubles sont reversés dans le sang qui les

transporte vers les reins pour être éliminés dans l'urine. Les produits liposolubles sont excrétés dans la bile, transportés vers l'intestin et éliminés dans les selles.

Le foie est également un organe immunitaire original qui garantit à la fois une tolérance immunitaire envers les antigènes intestinaux et une réponse efficace contre les micro-organismes pathogènes (Ballot et al., 2012 ; Lapierre et Alvarez, 2007).

1.3. Architecture du tissu hépatique

Les fonctions du foie sont rendues possibles par son architecture bien spécifique. Il est composé de millions de lobules hépatiques qui représentent les unités fonctionnelles élémentaires. Décrit par Kiernan et Green en 1833 (Kiernan et Green, 1833), un lobule hépatique a une forme hexagonale et il est délimité par six espaces portes et centré autour d'une veine centrolobulaire appelée aussi veine centrale (**Figure 2A**). L'espace porte, appelé également triade portale, est constitué d'une branche de la veine porte, d'une branche de l'artère hépatique et d'un canal biliaire. Les lobules sont constitués d'hépatocytes organisés en travées qui sont disposées radialement à partir de la veine centrale jusqu'à la périphérie du lobule. Ces travées sont séparées les unes des autres par les sinusoides qui sont des capillaires hautement perméables reliant l'artère hépatique et la veine porte à la veine centrale (**Figure 2B**).

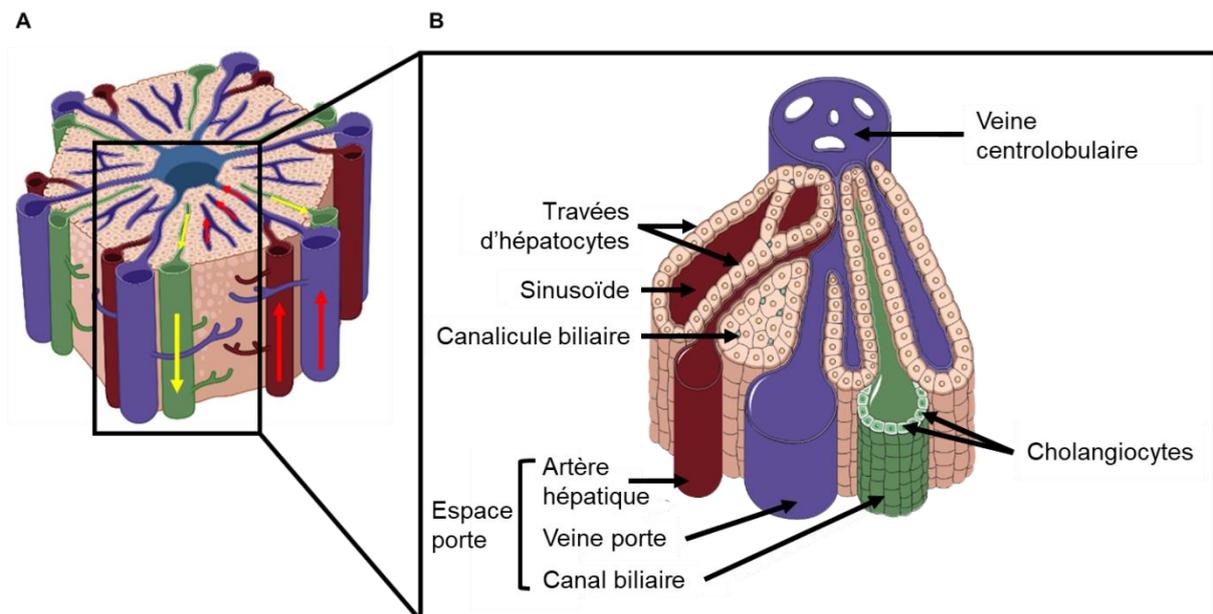


Figure 2 : Lobule hépatique. (A) Schéma d'une coupe d'un lobule hépatique. Le sang circule de l'espace porte vers la veine centrolobulaire en passant dans les sinusoides (flèches rouges). La bile, produite par les hépatocytes, est transportée des canalicules biliaires vers les canaux biliaires (flèches jaunes). (B) Schéma d'un zoom sur une partie d'un lobule hépatique montrant différentes cellules et structures hépatiques. La figure A est exportée de BioRender (BioRender.com). La figure B est réalisée grâce à la banque d'illustrations médicales de Servier (smart.servier.com).

Le tissu hépatique est constitué de deux catégories cellulaires : les cellules du parenchyme hépatique (les hépatocytes) et les cellules non parenchymateuses. Ces dernières comprennent différents types cellulaires résidents : les cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes, les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC), les cellules de Kupffer, les cellules stellaires hépatiques, les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les cellules ovales. Toutes ces cellules interagissent et coopèrent pour assurer les nombreuses fonctions hépatiques. D'autres types cellulaires existent également dans le tissu hépatique complétant l'ensemble des types cellulaires hépatiques qui est de l'ordre d'une vingtaine chez l'Homme (MacParland et al., 2018).

Les principaux types cellulaires sont décrits dans les paragraphes suivants.

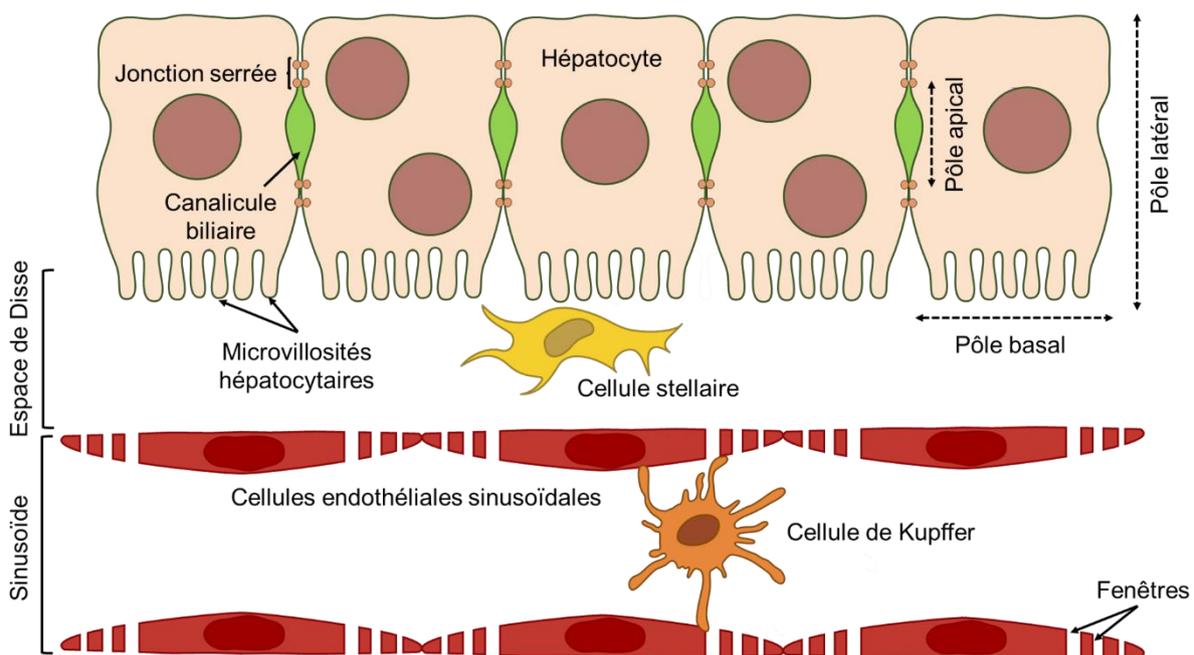


Figure 3 : Polarisation des hépatocytes et organisation des différents types cellulaires autour d'une travée hépatique. Le pôle basal des hépatocytes est situé en regard de l'espace de Disse qui les sépare des sinusoides. Les pôles apicaux d'hépatocytes voisins délimitent les canalicules biliaires qui sont entourés de jonctions serrées. Le pôle latéral est formé par les jonctions cellulaires entre les hépatocytes. Cette figure est réalisée à l'aide d'images modifiées de la banque d'illustrations médicales de Servier (smart.servier.com).

1.3.1. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules majoritaires du foie, représentant environ 60 % de toutes les cellules hépatiques et environ 80 % de la masse hépatique (Kmiec, 2001). Nous devons leur découverte à Dutrochet qui les décrivait comme des « cellules vésiculaires agglomérées » (Dutrochet, 1824). Ce sont des cellules épithéliales polyédriques mono- ou binucléées ayant un diamètre moyen d'environ 30 μm . Les hépatocytes assurent la plupart des fonctions hépatiques présentées ci-dessus (métabolisme et excrétion des xénobiotiques, synthèse de protéines, sécrétion de la bile, etc.). Proportionnellement à cette grande activité métabolique, le cytoplasme d'un hépatocyte est riche en organites divers : mitochondries,

réticulum endoplasmique lisse et granulaire, lysosomes, appareil de Golgi et peroxysomes (Kuntz et Kuntz, 2008 ; Kmiec, 2001 ; Blouin et al., 1977).

Les hépatocytes se caractérisent des autres cellules épithéliales par une polarisation particulière. En effet, une même cellule peut être en contact avec un ou deux sinusoides et peut former jusqu'à trois canalicules biliaires avec des cellules voisines. Leurs membranes sont en effet divisées en trois domaines ou pôles : le pôle basal ou sinusoidal, le pôle apical et le pôle latéral (**Figure 3**) :

- Le pôle basal ou sinusoidal est situé en regard des sinusoides. Il est séparé des hépatocytes par l'espace de Disse qui est caractérisé par une grande densité de microvillosités d'hépatocytes. Ces microvillosités augmentent par six la surface d'échange entre les hépatocytes et l'espace de Disse et favorisent ainsi les échanges de différentes molécules entre ces cellules et le sang des sinusoides (Wisse et al., 1985).
- Le pôle apical ou biliaire est en contact avec les canalicules biliaires. Ces structures micrométriques ne possèdent pas de membrane propre mais sont formées par des invaginations de la membrane plasmique entre deux hépatocytes adjacents. Les canalicules les plus larges peuvent être délimités par plus de deux cellules. Ils constituent les points de départ de collecte et de transport de la bile qui circule dans le sens opposé à celui du sang portal. En effet, les hépatocytes sécrètent la bile dans les canalicules biliaires qui l'acheminent vers des tubes biliaires (formés par les cholangiocytes) de plus en plus larges avant de la transporter vers le canal hépatique commun et l'intestin.
- Le pôle latéral ou intercellulaire est formé par les jonctions cellulaires entre les hépatocytes voisins et sépare le pôle basal du pôle apical. Les jonctions serrées scellent les canalicules biliaires pour permettre à leur contenu de ne pas diffuser en dehors des canalicules. Les jonctions intermédiaires et desmosomes assurent la cohésion entre les hépatocytes et les jonctions de type *gap* assurent les échanges intercellulaires (Kojima et al., 2009).

Le sang traverse le lobule hépatique de la périphérie jusqu'au centre créant des gradients d'oxygène, de concentration de nutriments et de xénobiotiques, etc. De ce fait, l'axe porto-central du lobule hépatique est divisé en trois zones : la zone périportale au niveau de l'espace porte, la zone centrale (ou périveineuse) au niveau de la veine centrale et la zone médio-lobulaire au milieu des deux autres. La morphologie et la fonction des hépatocytes diffèrent selon leur localisation dans l'une de ces zones : c'est la zonation métabolique du foie (Jungermann et Sasse, 1978). Cette zonation concerne différentes fonctions du foie comme le métabolisme des glucides, des lipides et des xénobiotiques (LeCluyse et al., 2012). À titre d'exemple, les hépatocytes de la zone périportale sont spécialisés dans le métabolisme oxydatif et la production de l'urée et ceux de la zone centrale assurent préférentiellement le métabolisme des xénobiotiques.

1.3.2. Les cellules endothéliales sinusoïdales ou LSEC

Les cellules endothéliales sinusoïdales (LSEC pour *liver sinusoidal endothelial cells*) tapissent la paroi des sinusoïdes. Elles représentent entre 15 et 20 % de toutes les cellules hépatiques (Blouin et al., 1977). Ce sont des cellules endothéliales particulières dites hautement spécialisées qui se distinguent des autres cellules endothéliales par la présence de fenêtres sans diaphragme et par l'absence de lame basale. Ces caractéristiques en font les cellules les plus perméables du système vasculaire des mammifères.

Les fenêtres sont des pores transmembranaires de 50 à 300 nm de diamètre, représentant entre 2 et 20 % de la surface totale d'une LSEC (Szafrńska et al., 2021a). Elles permettent l'échange bidirectionnel de différentes molécules (lipides, lipoprotéines, petits virus, métabolites...) entre les hépatocytes sous-jacents et le sang sinusoïdal par l'intermédiaire de l'espace de Disse (**Figure 3**). La barrière endothéliale sinusoïdale joue le rôle d'un filtre dynamique qui ne laisse passer que les molécules de taille plus petite que la taille des fenêtres (Braet et Wisse, 2002).

Les LSEC se distinguent également des autres cellules endothéliales par leur grande capacité d'endocytose qui se traduit par la richesse de leurs cytoplasmes en endolysosomes et par la présence de récepteurs d'endocytose spécifiques à leurs surfaces (Sørensen et al., 2015). Cette capacité leur confère un rôle d'éboueur efficace qui élimine les macromolécules et les nanoparticules de la circulation sanguine. En effet, la fonction d'épuration du sang est partagée dans le foie entre les LSEC et les macrophages du foie (les cellules de Kupffer) qui forment ensemble le système réticulo-endothélial hépatique (Bhandari et al., 2021). De plus, les LSEC permettent de réguler le flux sanguin sinusoïdal et de maintenir une faible pression sinusoïdale quelles que soient les modifications de flux qui peuvent avoir lieu lors de la digestion (Poisson et al., 2017). Les LSEC sont aussi impliquées dans le recrutement des leucocytes lors de la réponse immunitaire du foie et dans le maintien d'un état de tolérance immunitaire envers des antigènes intestinaux (Shetty et al., 2018). Grâce à la présence des fenêtres des LSEC, certaines cellules immunitaires (les lymphocytes T CD8+) peuvent établir un contact direct, par leurs extensions cytoplasmiques, avec les microvillosités des hépatocytes dans l'espace de Disse (Warren et al., 2006).

Dans des conditions pathologiques, les LSEC jouent un rôle central dans l'initiation et le développement de maladies hépatiques telles que les stéatoses hépatiques (alcoolique et non alcoolique), le carcinome hépatocellulaire, la fibrose hépatique et la cirrhose hépatique (Wilkinson et al., 2020 ; Poisson et al., 2017). En outre, les LSEC jouent un rôle important dans la régénération du foie suite à une lésion hépatique aiguë ou à une hépatectomie (De Rudder et al., 2021 ; DeLeve, 2013).

1.3.3. Les cellules de Kupffer

Observées et décrites pour la première fois par Karl Wilhelm von Kupffer en 1876 (Kupffer, 1876), les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie et représentent environ 15 % de toutes les cellules hépatiques (Kmiec, 2001). Elles constituent la plus grande population de macrophages résidents de l'organisme et elles sont situées dans la lumière des

sinusoïdes. Elles se caractérisent par leurs longs prolongements cytoplasmiques (pseudopodes et lamellipodes) qui leur permettent de rester en contact avec les LSEC et qui peuvent atteindre les hépatocytes en passant à travers les fenêtres des LSEC. La fonction principale des cellules de Kupffer est d'éliminer les débris cellulaires, les micro-organismes et les toxines de la circulation sanguine, majoritairement par phagocytose. En plus de leur fonction de détoxification du sang qu'ils partagent avec les LSEC, ces macrophages constituent la première ligne de défense hépatique lors des infections en orchestrant les premières phases de la réponse immunitaire.

1.3.4. Les cellules stellaires hépatiques

Les cellules stellaires hépatiques, appelées aussi cellules étoilées du foie, cellules de Ito, lipocytes ou cellules périsinusoïdales, sont des cellules en forme d'étoile situées dans l'espace de Disse qui sépare l'épithélium hépatocytaire de l'endothélium sinusoïdal. Elles présentent de longs prolongements cytoplasmiques qui entourent les sinusoïdes. Elles peuvent également être en contact avec les hépatocytes. Elles portent le nom du médecin japonais Ito qui a découvert, en 1952, une méthode de coloration pour identifier les gouttelettes lipidiques qu'elles contiennent (Ito et Nemoto, 1952). Ces gouttelettes stockent environ 70 % de la vitamine A de l'organisme sous forme d'esters de rétinol (Hendriks et al., 1985). De plus, les cellules stellaires synthétisent de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire de l'espace de Disse comme la fibronectine et certains types de collagène. Dans un foie normal, elles représentent entre 5 et 8 % de l'ensemble des cellules hépatiques et elles sont maintenues dans un état de repos dit quiescent grâce aux LSEC (Geerts, 2001). Néanmoins, en réponse à une lésion hépatique comme la fibrose, elles sont activées et expriment un phénotype de cellules contractiles : les myofibroblastes. Ces cellules déposent un tissu cicatriciel fibreux dans l'espace de Disse et favorisent le développement de la fibrose hépatique.

1.3.5. Les cellules épithéliales biliaires

Les cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes tapissent les canaux biliaires et représentent environ 5 % de l'ensemble des cellules du foie (LeCluyse et al., 2012). Elles modifient la composition de la bile, initialement produite par les hépatocytes, par leurs activités de sécrétion et de réabsorption. Elles régulent la réponse immunitaire hépatique, contribuent au métabolisme des xénobiotiques et interagissent avec les autres cellules grâce à la sécrétion de facteurs de croissance (Yoo et al., 2016).

1.3.6. Les lymphocytes et les cellules dendritiques

Différents types de cellules immunitaires sont également présents dans le foie (lymphocytes T, lymphocytes B, lymphocytes granulaires ou *pit cells*, cellules dendritiques...) et participent à l'élimination des cellules tumorales, des cellules mortes ou des cellules infectées par des virus. Elles contribuent aussi au développement d'une tolérance envers les antigènes intestinaux (Crispe, 2009).

2. Les modèles hépatiques

Les différents modèles hépatiques sont classés dans quatre catégories : les modèles *in vivo*, les modèles *ex vivo*, les modèles *in vitro* et les modèles *in silico* et sont plus ou moins pertinents en fonction de l'étude que nous souhaitons réaliser. La majorité des études hépatiques portent sur la compréhension du fonctionnement du foie ou de sa morphogénèse, la validation de nouveaux médicaments, l'analyse de la toxicité de substances chimiques (études de toxicologie) ou la modélisation de pathologies hépatiques.

2.1. Les modèles *in vivo*

Les animaux de laboratoire, majoritairement les rongeurs, ont été pendant longtemps les modèles de référence pour les études hépatiques, en particulier pour des études fonctionnelles ou des études sur le métabolisme et la toxicité de xénobiotiques. Les modèles animaux sont encore indispensables pour la détermination de la toxicité aiguë ou chronique d'un nouveau médicament et pour l'étude de la pharmacocinétique des xénobiotiques. La pharmacocinétique est l'étude du devenir des xénobiotiques dans l'organisme et regroupe les quatre étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion désignées par l'acronyme ADME (Viau et Tardif, 2003). Selon les objectifs de l'étude, les animaux utilisés peuvent être sains, modifiés génétiquement ou peuvent présenter une pathologie spontanée ou provoquée.

Les études *in vivo*, surtout celles de toxicité chronique, sont cependant longues et coûteuses. Par ailleurs, malgré la correspondance entre de nombreux résultats obtenus sur les modèles animaux et sur l'Homme, la variabilité inter-espèces rend souvent difficile l'extrapolation des résultats des expérimentations animales à l'Homme (Krewski et al., 2010). D'après la dernière enquête statistique publiée par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, le nombre moyen des animaux utilisés à des fins scientifiques en France s'élevait à presque 1,9 millions en 2021 (Enquête 2021). La réflexion éthique sur l'amélioration de la condition animale en recherche expérimentale a conduit à la mise en place de réglementations nationales et internationales qui encadrent les pratiques expérimentales. Ceci a commencé par la définition de la règle des 3R de Russell et Burch : *Replace – Reduce – Refine* ou Remplacer, Réduire et Raffiner (Russell et Burch, 1959) qui représente la référence éthique des expérimentateurs. Les lois, décrets et règlements de l'éthique animale succédant à la règle des 3R soulignent l'importance de l'utilisation de méthodes alternatives aux animaux (Code rural et de la pêche maritime, 2003 ; Décret n° 2013-118 du 1^{er} février 2013). En ce qui concerne les modèles hépatiques, ces méthodes alternatives doivent être fiables et capables de retranscrire la complexité du tissu hépatique dans des conditions physiologiques et pathologiques ou de permettre de prédire les mécanismes d'action et de toxicité des différents xénobiotiques. Les modèles hépatiques substitutifs aux animaux sont :

- Les modèles *ex vivo* qui reposent sur l'utilisation de foie isolé de l'animal et perfusé après extraction ou sur la culture de tranches fines de foie (*precision-cut liver slices*) (Dewyse et al., 2021).

- Les modèles *in vitro* qui reposent sur la culture de cellules primaires ou de lignées modèles dans des conditions contrôlées.
- Les modèles *in silico* qui se basent sur des modèles mathématiques et sur des données obtenues *in vivo* et *in vitro* pour prédire les propriétés ADME des xénobiotiques. Ils sont surtout utilisés en industrie pharmaceutique.

Les modèles hépatiques *ex vivo* et *in silico* ne sont pas détaillés dans la suite de cette section qui porte sur les principaux modèles hépatiques *in vitro*.

2.2. Les modèles *in vitro*

Les modèles hépatiques *in vitro* reposent sur différentes techniques de culture cellulaire : les cultures 2D, les cultures 3D et les cultures cellulaires intégrées dans des microsystèmes. Plusieurs supports de culture sont utilisés dans ces systèmes pour mimer l'environnement cellulaire *in vivo*. De plus, différents types cellulaires peuvent être cultivés. Ci-après, nous allons décrire les principaux modèles hépatiques *in vitro* ainsi que les modèles d'hépatocytes utilisés en culture.

2.2.1. Les modèles d'hépatocytes utilisés dans la littérature

2.2.1.1. Les lignées cellulaires

Les cellules issues de lignées cellulaires ont la capacité de proliférer d'une manière continue si elles sont cultivées dans un milieu de culture spécifique et dans des conditions appropriées. L'ATCC (*American Type Culture Collection*), la banque de cellules reconnue au niveau international, compte une vingtaine de lignées cellulaires hépatiques. Ces lignées sont soit dérivées de cellules cancéreuses prélevées chez un patient, soit des cellules primaires transfectées par un oncogène comme l'antigène T ou modifiées par mutations de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme le gène de la protéine P53. Puisqu'elles conservent des caractéristiques propres aux hépatocytes, les lignées cellulaires sont utilisées pour étudier les fonctions hépatiques et la toxicité des xénobiotiques (Jennen et al., 2010 ; Kanebratt et Andersson, 2008). En revanche, les lignées d'hépatocytes ne présentent pas toutes les fonctionnalités d'hépatocytes *in vivo* (Hilgendorf et al., 2007).

Les lignées HepaRG et HepG2 sont parmi les lignées les plus utilisées dans la littérature. La lignée HepaRG est dérivée d'un hépatocarcinome d'une patiente infectée par le virus de l'hépatite C (Gripon et al., 2002). Elle est brevetée par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) et vendue par l'entreprise française Biopredic International. La lignée HepG2 est dérivée d'un hépatocarcinome d'un patient âgé de 15 ans (Aden et al., 1979). Cette lignée conserve la majorité des fonctions métaboliques des hépatocytes et, de ce fait, elle est utilisée dans plusieurs études toxicologiques (LeCluyse et al., 2012). Un de ses sous-clones, HepG2/C3A, présente des propriétés plus intéressantes que sa lignée parentale : production élevée de protéines sécrétées dans le sang comme l'albumine, meilleure conservation des fonctions métaboliques des hépatocytes ainsi qu'une meilleure polarisation

et une capacité à former des canalicules biliaires fonctionnels (Sharma et al., 2020). C'est pour cela que nous avons utilisé cette lignée (HepG2/C3A) dans nos travaux.

2.2.1.2. Les hépatocytes primaires

Les hépatocytes primaires sont fraîchement isolés du foie. Ils peuvent être d'origine humaine ou animale, en particulier issus de foie de rat, mais la plupart des études utilisent des hépatocytes primaires humains. Ces cellules conservent de nombreuses caractéristiques physiologiques des hépatocytes telles que l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques. Cependant, une fois mises en culture, elles présentent une dédifférenciation rapide caractérisée par une perte progressive des marqueurs spécifiques des hépatocytes *in vivo*. C'est pourquoi elles ne sont pas adaptées à des cultures de long terme. Le développement des techniques de cryo-préservation a facilité la manipulation des hépatocytes primaires en permettant leur conservation (LeCluyse et al., 2012 ; Li et al., 1999). Pour pallier la non-prolifération des hépatocytes primaires humains, Burkard et al. ont modifié génétiquement des hépatocytes primaires pour développer des hépatocytes dits « uprégulés » (*upregulated hepatocytes*). Ces derniers sont capables de proliférer et conservent certains marqueurs d'hépatocytes primaires comme la capacité de stocker du glycogène (Burkard et al., 2012).

2.2.1.3. Les cellules souches

Les cellules souches peuvent être utilisées pour générer des hépatocytes. Les cellules souches sont présentes chez l'embryon et dans certains tissus adultes. Elles peuvent se multiplier à l'infini (autorenouvellement) et se différencier en cellules spécialisées (cellules des différents organes). Toutes les cellules souches ne présentent pas les mêmes capacités de différenciation. Différents protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes et de cellules souches adultes (unipotentes ou multipotentes) en hépatocytes sont décrits dans la littérature. Cependant, ces protocoles sont complexes et présentent un coût élevé (Tasnim et al., 2015 ; Snykers et al., 2009). Les cellules souches pluripotentes regroupent les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC pour *induced pluripotent stem cells*) obtenues par reprogrammation de cellules somatiques. Les cellules souches adultes pouvant être différenciées en hépatocytes regroupent les cellules progénitrices du foie et les cellules souches d'autres tissus comme celles de la moelle osseuse, du tissu adipeux et du cordon ombilical (LeCluyse et al., 2012 ; Snykers et al., 2009). Les hépatocytes générés à partir de cellules souches représentent une alternative prometteuse aux hépatocytes primaires et une source quasi illimitée d'hépatocytes (Si-Tayeb et al., 2010). Ils expriment les marqueurs spécifiques des hépatocytes et acquièrent les différentes fonctions hépatiques. Ces modèles cellulaires sont utilisés dans les études de toxicologie et de modélisation de pathologies hépatiques ou comme source d'hépatocytes pour la transplantation (Xie et al., 2021). Bien que leur phénotype soit plus proche de celui des hépatocytes *in vivo* que les lignées cellulaires, les hépatocytes générés à partir de cellules souches présentent des caractéristiques d'hépatocytes fœtaux ou nouveau-nés, donc d'hépatocytes immatures.

Comme nous l'avons montré ci-dessus, chaque modèle d'hépatocytes utilisés dans les systèmes de culture cellulaire a ses avantages et ses inconvénients. Le choix de l'un ou de l'autre dépend de l'application visée. Dans les paragraphes suivants, les systèmes les plus utilisés de culture cellulaire d'hépatocytes sont décrits.

2.2.2. Les différents types de culture d'hépatocytes

2.2.2.1. La culture cellulaire en 2D

Les cultures en monocouche dans des boîtes ou des flasques adaptées sont les systèmes conventionnels de culture *in vitro* d'hépatocytes. Elles présentent l'avantage d'être d'une utilisation simple mais sont cependant loin de la réalité d'un tissu. Par exemple, les hépatocytes primaires cultivés en 2D perdent leur polarisation ainsi que d'autres fonctions clés d'un hépatocyte après quelques jours de culture.

2.2.2.2. La culture cellulaire en sandwich

La culture cellulaire en sandwich consiste à cultiver les hépatocytes entre deux couches de matrice extracellulaire comme le collagène I ou le Matrigel. Ce type de culture permet d'améliorer la viabilité et la fonctionnalité des hépatocytes primaires jusqu'à quelques semaines en favorisant le développement de jonctions entre les hépatocytes, d'une part, et les interactions entre les hépatocytes et la matrice, d'autre part (Soldatow et al., 2013).

2.2.2.3. La culture cellulaire en 3D sans support ou échafaudage

- Les sphéroïdes hépatiques

Les sphéroïdes hépatiques sont des agrégats cellulaires tridimensionnels de forme plus ou moins sphérique allant jusqu'à 200 – 400 μm de diamètre et obtenus à partir d'hépatocytes primaires ou de lignées cellulaires. Au-delà de cette taille, un phénomène de nécrose des cellules au centre du sphéroïde est observé. La première culture de sphéroïdes hépatiques date de 1990 quand Koide et al. rapportaient l'agrégation d'hépatocytes de rat en sphéroïdes multicellulaires dans des plaques non adhérentes (Koide et al., 1990). La formation de sphéroïdes repose sur la capacité d'auto-assemblage des cellules qui forment des contacts directs entre elles. Ce processus d'auto-assemblage comporte des étapes de réarrangement et de compactage d'agrégats cellulaires, mettant en œuvre le réseau d'actine (protéine du cytosquelette cellulaire) et des molécules d'adhésion telles que des intégrines et la E-cadhérine (Lin et Chang, 2008 ; Lin et al., 2006 ; Tzanakakis et al., 2001). Pour favoriser les interactions directes entre les cellules, les techniques classiques de culture de sphéroïdes consistent à abolir les interactions cellule-support, par exemple en utilisant des plastiques traités pour empêcher l'adhérence des cellules. La culture de sphéroïdes en gouttes suspendues (*Hanging drop*), donc sans support pour adhérer, est aussi une technique très utilisée (Kelm et al., 2003). La culture sous forme de sphéroïdes d'hépatocytes de lignées cellulaires améliore l'expression de gènes spécifiques des hépatocytes tels que ceux liés au métabolisme des lipides, du glucose ou des xénobiotiques par rapport aux cultures 2D (Takahashi et al., 2015 ; Wang et al., 2015 ; Nakamura et al., 2011). Au sein de sphéroïdes obtenus avec la lignée HepG2/C3A, les hépatocytes sont bien polarisés et forment des

canalicules biliaires (Sharma et al., 2020 ; Gaskell et al., 2016 ; Wrzesinski et Fey, 2013). Le suivi, en microscopie confocale à fluorescence, de l'excrétion de composés fluorescents tels que des sels biliaires (ex. CLF pour *cholyl-lysyl-fluorescein*) ou des dérivés de fluorescéine, *via* des transporteurs spécifiques, dans les canalicules biliaires a permis de montrer que ces canalicules étaient fonctionnels (Sharma et al., 2020). Ce modèle est donc pertinent pour suivre le métabolisme de molécules ou de particules, et ce, jusqu'à leur excrétion dans la bile. Nous avons ainsi pu étudier le devenir des espèces d'argent jusqu'à leur excrétion dans des canalicules biliaires dans des sphéroïdes d'hépatocytes HepG2/C3A exposés à des nanoparticules d'argent. Les résultats obtenus sont détaillés dans le chapitre 2 du manuscrit.

Dans le cas d'hépatocytes primaires, la culture sous forme de sphéroïdes permet de prolonger la viabilité cellulaire jusqu'à quelques semaines tout en maintenant une expression constante de marqueurs hépatiques comme la synthèse de l'albumine et d'urée et l'activité des enzymes cytochrome P450 responsables du métabolisme (Bell et al., 2016). La mise au point de la culture dynamique de sphéroïdes dans des bioréacteurs sous agitation a permis la production en masse de sphéroïdes d'hépatocytes primaires de taille uniforme destinés principalement à être utilisés dans les systèmes de suppléance hépatique (foie bioartificiel) pour les patients atteints d'une insuffisance hépatique (Lin et Chang, 2008).

- Les organoïdes hépatiques

Les organoïdes hépatiques sont des assemblages tridimensionnels d'un ou de plusieurs types cellulaires et sont issus de la prolifération et de la différenciation de cellules souches embryonnaires, induites ou adultes (Zhu et al., 2021). Ils miment la micro-anatomie d'un organe et assurent une ou plusieurs de ses fonctions *in vitro*. Les techniques de culture des organoïdes sont semblables à celles des sphéroïdes (Luce et al., 2021). Des facteurs de croissance sont ajoutés au milieu de culture cellulaire pour imiter les voies de signalisation activées au cours de l'organogenèse du foie, par exemple et induire la différenciation des cellules. Dans le cas de cellules souches induites à partir de cellules somatiques, les protocoles de reprogrammation font appel à de l'ingénierie cellulaire. Ces modèles sont pertinents pour la modélisation de pathologies hépatiques (Gurevich et al., 2020 ; Nie et al., 2018 ; Ouchi et al., 2019). Outre leur pertinence biologique, les organoïdes présentent un fort potentiel thérapeutique. En effet, les cellules de départ peuvent être isolées d'un individu sain ou atteint d'une maladie ou d'une tumeur hépatique (Broutier et al., 2017), ce qui permet la génération d'organoïdes « personnalisés » dits « avatars biologiques ». Ces organoïdes sont utilisés pour évaluer l'efficacité des médicaments dans le but d'adapter les traitements en fonction des caractéristiques des patients. Ceci s'inscrit dans le cadre de développement d'une médecine personnalisée (Saltsman et al., 2020). Par ailleurs, les organoïdes pourraient être transplantés chez l'Homme pour traiter l'insuffisance hépatique. Le groupe de Hans Clevers (Hu et al., 2018) a proposé un système de culture 3D qui permet à des progéniteurs d'hépatocytes murins ou humains de se développer pendant 2 – 3 mois. Les organoïdes hépatiques humains obtenus prolifèrent après greffe chez la souris et miment la réponse proliférative à des dommages hépatiques. Des résultats très prometteurs ont été également obtenus par Takebe et al. qui ont réussi à produire des bourgeons hépatiques humains de cellules endodermiques, endothéliales et mésenchymateuses dérivées de cellules souches induites qui sont cultivées

pour former des organoïdes. De plus, ils ont démontré que ces bourgeons pouvaient restaurer les fonctions hépatiques après leur transplantation dans un modèle murin d'insuffisance hépatique aiguë (Takebe et al., 2017).

Enfin, malgré le fort potentiel des organoïdes hépatiques, leur culture reste longue (environ quelques mois) et coûteuse. Le manque de reproductibilité entre les lots et la difficulté d'une production de masse sont encore des verrous à lever pour ce modèle (Luce et al., 2021).

2.2.2.4. Les cultures 3D avec supports ou échafaudages

De nouvelles techniques issues des sciences des matériaux permettent depuis quelques années le développement de nouveaux modèles 3D visant à mieux mimer l'environnement tissulaire.

- L'utilisation d'hydrogel comme support ou échafaudage

La bio-impression 3D est une technique de fabrication additive qui repose sur le dépôt couche par couche ou point par point d'une bio-encre composée majoritairement de biomatériaux et de cellules pour fabriquer artificiellement des structures biologiques, en trois dimensions, à partir d'un modèle informatique défini à l'avance (Murphy et Atala, 2014 ; Guillemot et al., 2010). Les biomatériaux destinés à la bio-impression peuvent être des hydrogels (ex. : alginate, collagène, gélatine) ou une matrice extracellulaire décellularisée (Ma et al., 2020). La décellularisation est un processus utilisé pour isoler la matrice extracellulaire d'un tissu. L'application de la bio-impression aux modèles hépatiques varie de l'impression des échafaudages mimant les structures hépatiques aux mini-tissus imprimés et intégrés dans des micropuces.

- Les organes sur puces

L'adaptation des techniques de microfabrication, issues de la microélectronique, à la culture cellulaire a permis le développement des micropuces. Ces dispositifs miniaturisés de culture cellulaire sont généralement moulés dans du PDMS (Polydiméthylsiloxane) qui est un polymère transparent, biocompatible et perméable aux gaz et sont collés sur un support en verre. Au sein des micropuces, les cellules sont cultivées dans des microcanaux ou des microchambres sous un flux continu de milieu de culture (Bhatia et Ingber, 2014). L'utilisation des techniques de microfluidique permet ainsi de mieux reproduire les conditions réelles de l'organe.

Ces nouvelles approches sont actuellement en plein essor (Yun et al., 2023). Couplées aux modèles déjà proposés, elles vont probablement permettre le développement de modèles 3D encore plus pertinents dans le futur.

En conclusion, chaque modèle hépatique *in vitro* a ses avantages et ses limitations et aucun ne peut prétendre, pour le moment, reproduire toute la complexité structurale et fonctionnelle du foie et inclure tous les types cellulaires hépatiques. Il est donc nécessaire de bien définir les objectifs de l'étude pour choisir un modèle optimal qui permet de répondre au mieux à la question scientifique posée. Ces questions peuvent être d'ordre fondamental (étudier l'architecture hépatique et les interactions cellulaires, comprendre les

mécanismes qui gouvernent le développement de pathologies du foie, etc.) comme appliqué (ex. : criblage de molécules thérapeutiques pour l'industrie pharmaceutique).

3. Le devenir des nanoparticules d'argent chez les mammifères

3.1. Définitions

Les nanomatériaux (NM) sont des matériaux qui possèdent au moins une dimension entre 1 et 100 nm (échelle nanométrique). Ils peuvent se trouver naturellement dans l'environnement comme les poussières dégagées par un volcan, peuvent être produits d'une façon non-intentionnelle par des activités humaines comme les émissions de moteurs de combustions ou peuvent être manufacturés comme le dioxyde de titane (TiO_2) ou les nanotubes de carbone.

Les nanomatériaux manufacturés peuvent être des nano-objets qui possèdent au moins une dimension externe à l'échelle nanométrique ou des matériaux dits nanostructurés qui possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Les nano-objets sont classés en différentes catégories selon leur taille dans chacune des trois dimensions : les nanoparticules (NP) qui ont leurs trois dimensions inférieures à 100 nm, les nanotubes, nanofilaments, nanofibres ou nanobâtonnets qui ont deux dimensions inférieures à 100 nm et les nanofeuillets, nanocouches ou nanofilms qui ont une seule dimension inférieure à 100 nm. Les matériaux nanostructurés, quant à eux, regroupent les poudres nanostructurées, les nanocomposites, les nanomousses solides, les matériaux nanoporeux et les nanodispersions fluides (définitions de l'Organisation internationale de normalisation ISO).

Il est à noter qu'une définition standardisée d'un nanomatériau n'existe pas encore à l'heure actuelle et des nuances dans les définitions existent entre les différents organismes internationaux et dans la littérature, surtout en ce qui concerne la limite de taille (Teunenbroek et al., 2017).

Les NP sont classées selon leur composition en différentes catégories : les NP composées d'éléments carbonés comme les fullerènes, les NP inorganiques telles que les NP métalliques et les NP organiques comme les NP polymériques et lipidiques.

Leur taille nanométrique leur confère des propriétés chimiques et physiques (optiques, mécaniques, électriques, magnétiques et biologiques) différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle micro- ou macroscopique. Par exemple, l'or est inactif à l'échelle microscopique, alors qu'il est un bon catalyseur de réactions chimiques à l'échelle nanométrique.

Les NP se caractérisent par une surface spécifique très importante de plusieurs centaines de mètres carrés par gramme de particule (Lanone et Boczkowski, 2010) et par une réactivité de surface accrue due à la fraction élevée d'atomes de surface par rapport au nombre total d'atomes qui les composent (Auffan et al., 2009). De plus, les effets quantiques sont prédominants à l'échelle nanométrique, ce qui confère aux NP métalliques, en particulier, des propriétés électroniques et optiques originales. Ces différentes propriétés peuvent être

modulées en contrôlant la taille, la forme, la composition chimique et l'état de surface (fonctionnalisation, charge ou enrobage) des NP. Les caractéristiques spécifiques des NP justifient leur utilisation de plus en plus fréquente dans un large panel de produits pour des applications diverses, par exemple en électronique, en agroalimentaire et en énergie. En effet, environ 400 000 tonnes de substances à l'état nanoparticulaire sont produites ou importées chaque année en France (Anses, 2020). À titre d'exemples, les NP de TiO_2 sont utilisées dans les peintures, les cosmétiques et dans l'industrie alimentaire comme colorant blanc, les NP de cadmium sont utilisées dans les écrans et les NP polymériques sont utilisées comme vecteurs de médicaments dans l'industrie pharmaceutique.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux NP d'argent (NP-Ag) que je vais aborder en détail dans la suite de cette section. Je vais présenter leurs propriétés et passer en revue l'état actuel des connaissances sur leurs transformations dans l'environnement, dans les fluides biologiques et dans un organisme entier.

3.2. Généralités sur l'argent (Ag) et les nanoparticules d'Ag (NP-Ag)

L'argent (Ag) est un métal brillant, malléable et il est présent à l'état natif sous forme de filaments courbés ou de pépites. Il est le métal qui possède la résistance la plus faible et par conséquent, une conductivité thermique et électrique élevées. En plus de ses applications en bijouterie, en industrie et en photographie, l'Ag est utilisé comme un biocide naturel depuis l'Égypte antique (Ghobashy et al., 2021). Il est officiellement reconnu comme un agent antibactérien depuis 1954 aux États Unis (Nowack et al., 2011).

Les nanomatériaux d'Ag (NM-Ag), regroupés sous le terme nano-argent, sont utilisés depuis plus de cent ans. L'Ag colloïdal qui est constitué de NP-Ag (de diamètre < 25 nm) en suspension dans de l'eau a été la première forme de nano-argent à être utilisée principalement pour le traitement des plaies et des infections. Sa première commercialisation, sous le nom Collargol, date de 1897 (Nowack et al., 2011). Avec la découverte des antibiotiques dans les années 1940, l'utilisation de l'Ag colloïdal a été réduite et il est actuellement utilisé uniquement comme antiseptique local à usage externe sous forme de collyre pour le traitement des infections oculaires, par exemple. Aujourd'hui, les NP-Ag sont utilisées dans de nombreux produits de consommation quotidienne et dans des dispositifs médicaux principalement pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques dues à la libération continue d'ions Ag(I) en condition aérobie. Parmi les produits contenant des nanomatériaux, ceux contenant des NP-Ag sont les plus nombreux sur le marché : en 2015, ils représentaient 25 à 30 % du marché mondial des produits nano-fonctionnalisés (Vance et al., 2015). Il ne s'agit cependant pas de la production mondiale la plus importante en tonnes de NP. À titre d'illustration, la production mondiale de NP-Ag en 2014 était de 420 tonnes, alors que celle des NP de TiO_2 s'élevait à 150 000 tonnes (Anses, 2021).

Les produits de consommation courante contenant des NP-Ag regroupent principalement les produits de l'industrie alimentaire (additifs alimentaires comme le E174, emballages alimentaires, revêtements internes de réfrigérateurs, etc.), les produits cosmétiques et les produits de soin personnel (brosses à dents, dentifrices, etc.), les produits ménagers et

électroménagers (désinfectants, détergents, machines à laver, etc.) et les textiles (litterie, vêtements anti-odeur, chaussettes). Les NP-Ag sont également présentes dans les filtres d'eau potable et l'eau des piscines (Lem et al., 2012 ; Chaloupka et al., 2010 ; Bouwmeester et al., 2009 ; Wijnhoven et al., 2009). Dans le domaine médical, les NP-Ag sont utilisées dans des pansements et dans les revêtements antibactériens de différents dispositifs médicaux comme des cathéters, des implants et des prothèses. Outre leurs propriétés antibactériennes, les NP-Ag présentent des propriétés optiques qui les rendent intéressantes pour des applications en électronique (Sriram et al., 2015 ; Alshehri et al., 2012 ; McFarland et Van Duyne, 2003).

Les NP-Ag sont composées d'un cœur d'Ag métallique de degré d'oxydation 0 (Ag(0)) qui est synthétisé par réduction des ions Ag(I) en utilisant des méthodes chimiques, physico-chimiques ou biologiques (Roy et al., 2013 ; Iravani et al., 2014 ; Evanoff et Chumanov, 2005). Différentes formes comme des sphères, des cubes ou des triangles peuvent être produites (Levard et al., 2012). En condition aérobie, la couche externe de la NP-Ag s'oxyde en libérant des ions Ag(I). Ce sont ces ions qui sont responsables de l'effet biocide des NP-Ag en raison de leur toxicité pour les micro-organismes (Eckhardt et al., 2013 ; Beer et al., 2012). Les NP-Ag ne sont pas stables en suspension et ont tendance à s'agréger. Pour augmenter leur stabilité et empêcher leur agrégation, elles sont recouvertes d'un enrobage organique (**Figure 4A**) (Sharma et al., 2014). Le citrate et la polyvinyle pyrrolidone (PVP) sont les enrobages organiques les plus utilisés pour stabiliser les NP-Ag. Le citrate (**Figure 4B**) est une petite molécule organique qui s'associe à la surface des NP-Ag et les stabilise par répulsion électrostatique. Les ligands citrate complexés à la surface des NP-Ag sont en équilibre dynamique avec les ions citrate libres dans la solution et peuvent donc se dissocier de la surface des NP. La PVP (**Figure 4C**), quant à elle, est un polymère qui stabilise fortement les NP-Ag par répulsion stérique (Tejamaya et al., 2012).

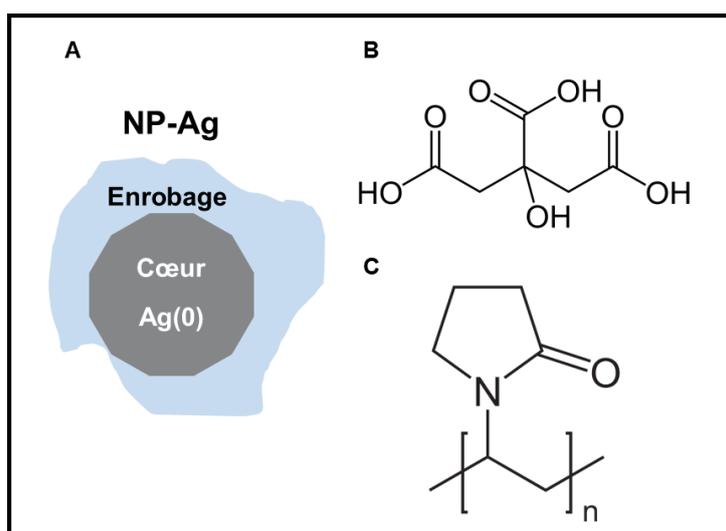


Figure 4 : Composition d'une NP-Ag. (A) Schéma montrant une NP-Ag formée par un cœur d'Ag(0) entouré d'un enrobage. (B) Formule semi-développée de la molécule de l'acide citrique. (C) Formule semi-développée de la molécule de polyvinyle pyrrolidone (PVP).

La croissance rapide de l'utilisation des NP-Ag suscite d'importantes préoccupations auprès de la société et de la communauté scientifique concernant leur impact sur l'environnement et la santé. En effet, l'utilisation de produits contenant des NP-Ag entraîne une exposition humaine *via* plusieurs voies : exposition orale par ingestion, exposition par voie cutanée (contact direct avec des textiles et des produits cosmétiques), exposition par inhalation (ex. utilisation des masques de protection imprégnés de NP-Ag) et exposition parentérale *via* l'utilisation de dispositifs médicaux. Pour la population générale, la voie orale est la principale voie d'exposition aux NP-Ag. L'inhalation et l'exposition par voie cutanée sont également possibles mais sont limitées à des cas spécifiques tels que l'utilisation de produits ménagers, électroménagers et cosmétiques et le niveau d'exposition aux NP-Ag dans ces situations n'est pas connu. La voie parentérale est la voie majeure d'exposition pour la population bénéficiant de soins médicaux spécifiques.

La toxicité des NP-Ag est principalement liée à leur capacité à libérer, en conditions aérobies, les ions Ag(I) qui ont un effet biocide mais qui sont également toxiques pour les cellules mammifères à doses plus élevées. Des NP-Ag et des ions Ag(I) sont libérés progressivement de la surface des différents produits contenant des NM-Ag et se trouvent disséminés dans l'environnement (Reidy et al., 2013). Compte tenu de leur haute réactivité, les NP-Ag subissent différentes transformations chimiques en conditions aérobies et en milieu aqueux comme dans l'environnement et dans les milieux biologiques. Dans l'environnement, les NP-Ag interagissent avec différentes molécules du milieu et subissent plusieurs transformations chimiques avant d'être éventuellement absorbées, notamment par l'Homme. Au contact des fluides biologiques, les NP-Ag interagissent également avec des biomolécules et subissent d'autres transformations. Toutes ces transformations induisent soit la dissolution des NP-Ag en ions Ag(I), soit leur agrégation et/ou leur stabilisation et déterminent ainsi la toxicité et la biodisponibilité des espèces d'Ag dans les différents organismes. Par conséquent, il est essentiel de les étudier.

3.3. Transformations des NP-Ag dans l'environnement et dans les milieux biologiques

Dans l'environnement et dans les milieux biologiques, les NP-Ag en solution sont recouvertes en surface d'une couche d'ions Ag(I) et sont en interaction avec différents molécules et ions. Les principales transformations qui peuvent se produire dans ces conditions sont résumées sur la **Figure 5**. Ces transformations sont la dissolution oxydative, la sulfuration, la précipitation par des chlorures ou l'interaction avec des molécules présentant des fonctions thiols (R-S-H).

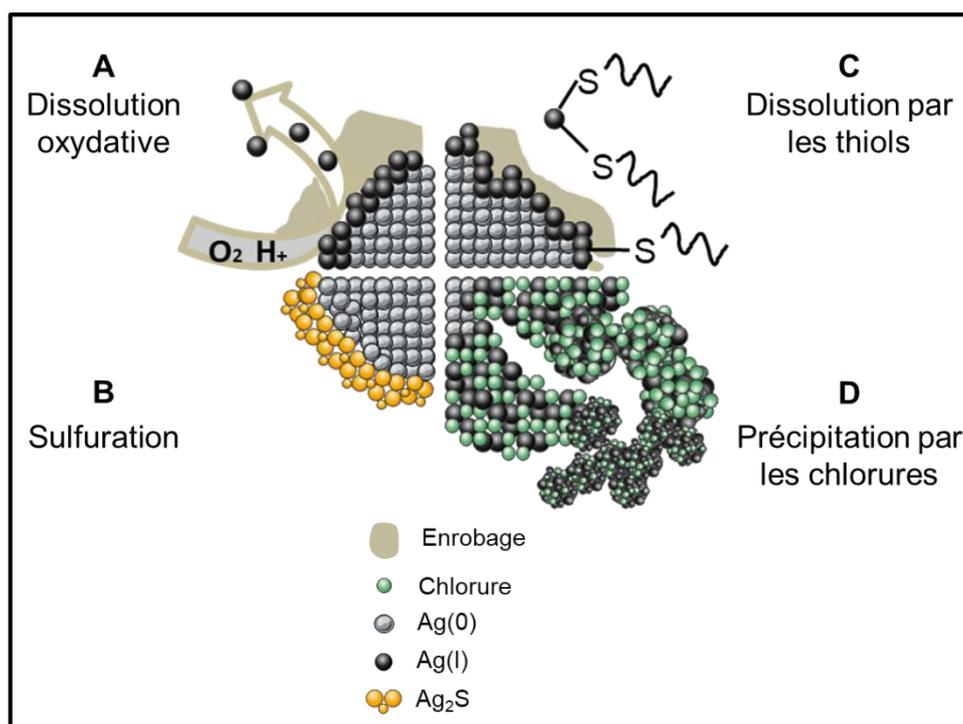
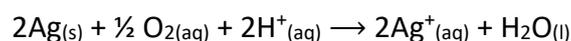


Figure 5 : Les transformations des NP-Ag dans l'environnement et dans les milieux biologiques. (A) La dissolution oxydative libère les ions Ag(I) de la surface des NP-Ag. (B) La sulfuration forme une couche d'Ag₂S à la surface des NP et empêche leur dissolution en ions Ag(I). (C) La dissolution induite par les thiols qui arrachent les Ag(I) de la surface des NP pour former des composés AgSR. (D) La précipitation des NP-Ag par les chlorures. Cette figure est réalisée grâce à la banque d'illustrations médicales de Servier (smart.servier.com) et est inspirée de Marchioni et al., 2018b.

3.3.1. Transformations des NP-Ag dans l'environnement

La dissolution oxydative des NP-Ag conduit à la libération d'ions Ag(I) (**Figure 5A**). Ce processus a été décrit en détail par Liu et Hurt (Liu et Hurt, 2010) qui ont mis en évidence la nécessité de l'oxygène et des protons pour permettre la réaction de dissolution suivante :



Les auteurs ont également montré la coexistence de trois espèces d'Ag dans ces conditions : (i) Ag(0) dans la NP, (ii) Ag(I) lié à la surface de la NP et (iii) Ag(I) en solution (Liu et Hurt, 2010).

De nombreuses études ont été réalisées afin d'analyser l'impact des molécules présentes dans l'environnement sur le devenir des NP-Ag en solution aqueuse. Deux transformations opposées peuvent avoir lieu à la suite de la réaction de NP-Ag avec des oxydants ou avec des sulfures. En effet, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Sigg et Lindauer, 2015) ou l'ozone (O_3) (Liu et al., 2010) induisent la dissolution des NP-Ag en Ag(I), alors que les sulfures induisent une sulfuration de la surface des NP-Ag, et donc leur passivation (Levard et al., 2013) (**Figure 5B**). En raison de la très faible constante de solubilité ($K_{sp} = 6.10^{-51} M$) du sulfure d'Ag (Ag_2S), la sulfuration est presque irréversible (Levard et al., 2012). Ce processus réduit la toxicité des NP-Ag en empêchant la libération d'ions Ag(I) et il est décrit comme étant la principale transformation des NP-Ag dans les sols et dans l'environnement (Pradas del Real et al., 2016).

La sulfuration peut également avoir lieu dans quelques cas spécifiques chez les mammifères comme le cas de la sulfuration des NP-Ag présentes dans les implants osseux (Geng et al., 2017) ou la sulfuration des NP-Ag dans les cellules microgliales¹ (Gonzalez-Carter et al., 2017).

3.3.2. Réactivité des NP-Ag et des ions Ag(I) avec les molécules thiolées

3.3.2.1. Réactivité des ions Ag(I) en solution avec les molécules thiolées

Les thiols sont des bases molles qui ont une forte affinité pour les acides mous tels que les ions Ag(I) et Cu(I). Par exemple, le glutathion (GSH) et la cystéine qui contiennent un seul thiol et qui sont les molécules thiolées les plus abondantes dans les fluides biologiques et dans le cytosol de la cellule ont une affinité de l'ordre du picomolaire pour les ions Ag(I) (Adams et Kramer, 1999). Ainsi, aucun ion Ag(I) libre n'est présent dans une cellule aussi longtemps qu'elle contient des thiols réduits libres.

Afin d'étudier la coordination des ions Ag(I) avec les biomolécules thiolées, des travaux de l'équipe ont été réalisés *in vitro* et ont décrit les sites de liaison de ces ions à différentes biomolécules qui contiennent un, deux ou trois thiols et à leurs mimes chimiques en solution et à pH physiologique (Veronesi et al., 2015a). Ces travaux ont montré que les ions Ag(I) peuvent être coordonnés par deux ou trois atomes de soufre pour former des complexes AgS₂ ou AgS₃. En particulier, il a été mis en évidence que le GSH et Atox1 chélatent les ions Ag(I) pour former des complexes AgS₂. Atox1 est une protéine chaperonne du Cu qui possède un site de liaison du Cu à deux thiols et qui transporte les ions Cu(I) vers les protéines ATP7A (*ATPase copper transporting alpha*) et ATP7B (*ATPase copper transporting beta*). De plus, il a été montré que les métallothionéines (Met) qui sont des protéines riches en cystéine et impliquées dans la régulation de l'homéostasie des métaux forment avec les ions Ag(I) des complexes de coordination mixte AgS₂/AgS₃ avec une prédominance de complexes AgS₃.

3.3.2.2. Réactivité des NP-Ag avec les molécules thiolées

Les biomolécules thiolées se lient également aux ions Ag(I) de la surface des NP-Ag et forment un nouvel enrobage qui stabilise les NP-Ag en suspension. Cependant, selon la nature de la molécule thiolée et de sa capacité chélatante, cet enrobage peut soit protéger la NP-Ag de la dissolution (Porcaro et al., 2016 ; Battocchio et al., 2012 ; Liu et al., 2010), soit entraîner sa dissolution en arrachant les ions Ag(I) de surface pour former des composés moléculaires AgSR (**Figure 5C**).

Plusieurs études *in vitro* ont montré que la cystéine et le GSH ont un double effet sur les NP-Ag : elles favorisent la dissolution des NP-Ag à faible concentration, alors qu'elles induisent leur agglomération à des concentrations élevées (Afshinnia et al., 2016 ; Sigg et Lindauer, 2015 ; Gondikas et al., 2012). D'autres études ont mis en évidence que les protéines contenant des sites de liaison du Cu avec au moins un thiol libre entraînent la dissolution des NP-Ag. Les Met, par exemple, induisent une dissolution massive des NP-Ag avec la formation de

¹Cellules immunitaires du cerveau

structures Ag-Met amorphes qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique à transmission TEM (pour *transmission electron microscopy*) (Liu et al., 2017).

Afin d'étudier l'interaction des biomolécules contenant plusieurs thiols avec les NP-Ag, des travaux de notre équipe ont été réalisés en analysant l'effet de différents ligands thiolés linéaires et de molécules avec une pré-organisation spatiale de thiols sur la dissolution de NP-Ag enrobées de citrate (Marchioni et al., 2018a). Ces travaux ont montré que la vitesse de dissolution des NP-Ag augmente avec le nombre de thiols par molécule thiolée linéaire. De plus, la dissolution des NP-Ag est plus rapide en présence d'une molécule avec une pré-organisation spatiale de thiols qui définit le site précis de liaison métallique qu'en présence d'une molécule linéaire contenant le même nombre de thiols. Ceci souligne que l'effet chélateur des molécules avec une pré-organisation spatiale de thiols favorise la dissolution des NP-Ag.

3.3.3. Réactivité des NP-Ag avec les chlorures

Les chlorures induisent la précipitation des NP-Ag et les protègent de la dissolution (Loza et al., 2014) (**Figure 5D**). En effet, en présence de chlorures, la solubilité des ions Ag(I) est très faible ($K_{sp} = 1,6 \cdot 10^{-10}$ M) et un précipité de chlorure d'Ag (AgCl) se forme à la surface des NP-Ag par complexation avec les ions Ag(I) qui y sont liés (Liu et Hurt, 2010). Le précipité formé protège les NP de la dissolution oxydative et entraîne leur agrégation par le biais des forces de Van Der Waals (Axson et al., 2015). Compte tenu de la concentration élevée des ions Cl^- (110 mM) dans le sang et dans l'espace extra-cellulaire, $AgCl_2^-$ est la forme prédominante des complexes de chlore formés avec l'Ag dans ces milieux (Liu et al., 2010).

3.3.4. Formation d'une couronne protéique dans les fluides biologiques

Dans les fluides biologiques, les NP-Ag et leurs produits de transformations sont en contact avec un mélange complexe de protéines, de peptides et d'acides aminés présents dans les milieux intra- et extra- cellulaires. Il a été montré que les protéines présentes dans le plasma comme l'albumine, les immunoglobulines (IgG) ou le fibrinogène enrobent les NP-Ag pour former une couronne de protéines (*protein corona*). Cette réaction n'est pas exclusive aux NP-Ag mais se produit pour tous les types de NP présents dans les milieux biologiques. La composition de cette couronne dépend de la taille et/ou de l'enrobage des NP (Durán et al., 2015 ; Podila et al., 2012).

Pour les NP-Ag enrobées de molécules organiques faiblement liées comme le citrate, les protéines prennent la place de l'enrobage à la surface des NP. Cependant, dans le cas d'enrobages polymériques tels que la PVP, des divergences existent dans la littérature entre la possibilité d'interaction protéines-enrobage (Treuel et al., 2012) ou protéines-NP (Miclăuş et al., 2014). En outre, Shannahan et al. ont rapporté que les protéines présentes dans la couronne protéique ont tendance à se déplier lors de leur liaison à la NP (Shannahan et al., 2015). La couronne protéique augmente la stabilité colloïdale des NP-Ag et limite la libération des ions Ag(I) en fonction de la concentration des protéines.

A l'échelle de la cellule, la couronne protéique est décrite comme limitant l'entrée cellulaire des NP-Ag chez les mammifères mais en ne diminuant que faiblement la cytotoxicité (Shannahan et al., 2015). Après l'entrée des NP-Ag dans la cellule, cette couronne de protéines est rapidement éliminée de la surface des NP. Toutefois, son influence sur la toxicité cellulaire est encore inconnue.

Dans la suite de cette section, je vais présenter l'état de l'art sur la distribution et les transformations des NP-Ag à l'échelle de l'organisme et de la cellule dans les cas d'expositions orale et parentérale à ces NP.

3.4. Transformations des NP-Ag à l'échelle de l'organisme

Différents modèles sont utilisés pour étudier les transformations des NP-Ag chez l'Homme allant des modèles *in vitro* à l'animal. Les modèles animaux, principalement les rongeurs, sont les meilleurs modèles actuellement utilisés dans les études toxicologiques afin d'étudier de façon globale l'ensemble des transformations des NP-Ag dans un organisme. Les études *in vitro* permettent d'étudier les transformations des NP-Ag dans les fluides biologiques en les incubant dans des milieux simulant le sang ou les fluides du tractus gastro-intestinal, par exemple. Les modèles *in cellulo* permettent d'analyser finement le devenir des NP-Ag à l'échelle de la cellule.

Dans ces études, l'effet des NP-Ag et d'un sel d'Ag, tel que le nitrate d'argent AgNO_3 , sont généralement comparés. Le sel d'Ag fournit directement une forme biodisponible d'Ag(I) qui peut entrer dans le cytosol des cellules *via* des transporteurs d'ions métalliques comme CTR1 qui est le transporteur majeur d'entrée cellulaire de Cu(I) (Bertinato et al., 2010). Le sel d'Ag présente ainsi un potentiel cytotoxique élevé et permet de mimer les effets des espèces Ag(I) relarguées des NP-Ag mais avec une voie d'entrée directe et beaucoup plus rapide.

Pour mimer l'exposition par voie parentérale, des NP-Ag pristines, c'est-à-dire des NP-Ag non transformées, sont ajoutées au milieu de culture cellulaire qui mime la composition des fluides biologiques. Les NP-Ag sont alors partiellement transformées avant d'entrer dans les cellules. En effet, les NP-Ag entourées par une couronne protéique sont considérées comme les principales espèces d'Ag auxquelles les cellules sont exposées (Walczyk et al., 2010) et ces espèces sont formées dans le milieu de culture grâce à la présence de protéines.

3.4.1. Transformations des NP-Ag administrées par voie orale

L'exposition orale aux NP-Ag ou à leurs produits de transformations peut provenir de multiples sources de contamination de produits alimentaires et de l'eau. En effet, les NP-Ag sont utilisées dans toutes les étapes de la production agro-alimentaire (production, transformation et emballage) principalement pour réduire le risque de contamination bactérienne des aliments destinés à la consommation (Wijnhoven et al., 2009). En particulier, les NP-Ag sont incorporées dans le revêtement des emballages alimentaires. Le risque d'exposition humaine dans ce cas se présente lorsqu'il y a relargage d'Ag, sous forme de NP ou d'ions Ag(I), de la surface de ces emballages. Néanmoins, cette libération d'Ag vers les aliments reste minime.

L'ingestion d'Ag colloïdal contenu dans des compléments alimentaires représente une voie d'exposition orale directe aux NP-Ag. L'ingestion excessive d'Ag colloïdal provoque le développement de l'argyrie caractérisé par la formation d'espèces d'Ag₂S dans la peau qui prend une teinte bleuâtre (Liu et al., 2012 ; Jonas et al., 2007).

Il est difficile de déterminer avec précision la quantité d'Ag moyenne ingérée par jour par un individu mais une gamme de valeurs entre 0,4 et 80 µg d'Ag ingéré par jour a été rapporté dans la littérature (Hadrup et Lam, 2014 ; Eckhardt et al., 2013 ; Wijnhoven et al., 2009).

Il a été mis en évidence chez des rongeurs traités avec des NP-Ag par gavage oral quotidien pendant plusieurs jours qu'entre 60 et 99 % de la dose d'Ag administrée est excrétée dans les fèces (Bove et al., 2017). La fraction restante d'Ag biodisponible est entre 1 et 40 % de la dose administrée et est absorbée au niveau de la barrière intestinale avant d'être distribuée aux autres organes. D'autres études *in vivo* analysant la distribution d'Ag après le même type d'exposition aux NP-Ag ou à un sel d'Ag ont montré une accumulation d'Ag principalement dans le foie, la rate et les reins (Jia et al., 2017 ; van der Zande et al., 2012 ; Loeschner et al., 2011 ; Park et al., 2011). Les espèces d'Ag présentes dans les différents organes ont été analysées par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (TEM-EDX pour *energy-dispersive X-ray spectroscopy*). Cette analyse a permis d'identifier des particules de 20 à 30 nm de diamètre contenant de l'Ag et du soufre dans le foie et de l'Ag, du soufre et du sélénium dans l'iléon (Loeschner et al., 2011 ; Jia et al., 2017).

Afin de comprendre les transformations gastro-intestinales pouvant se produire à la suite d'une exposition orale aux NP-Ag, des études *in vitro* utilisant des milieux qui miment les différentes régions du tractus gastro-intestinal ont été réalisées. Il a été mis en évidence que le transit à travers l'estomac entraîne une dissolution massive presque complète (de 95 %) des NP-Ag (Bove et al., 2017). Ensuite, après passage dans un milieu simulant le suc intestinal, de gros agrégats ont été observés en TEM mais aucun signal correspondant aux NP-Ag n'a été détecté en spectroscopie visible (Bove et al., 2017). Ceci signifie que le milieu intestinal favorise la formation de précipités, probablement d'AgCl. Une autre étude a montré la formation de particules contenant de l'Ag, du soufre et du chlore suite à l'incubation d'AgNO₃ dans un milieu simulant le milieu intestinal (Walczyk et al., 2010). Ces études montrent que AgCl est la principale spéciation de l'Ag dans l'intestin après ingestion de NP-Ag ou de sel d'Ag. Ces précipités/particules d'AgCl sont probablement en équilibre avec les espèces solubles, mais il reste difficile de prévoir la/les forme(s) d'Ag qui est/sont absorbée(s) au niveau de la barrière intestinale. De plus, des complexes organothiolés AgSR ou des complexes Ag(I)-protéine peuvent se former à partir d'AgCl et peuvent être transloqués dans le sang.

L'ensemble de ces transformations est résumé sur la **Figure 6**.

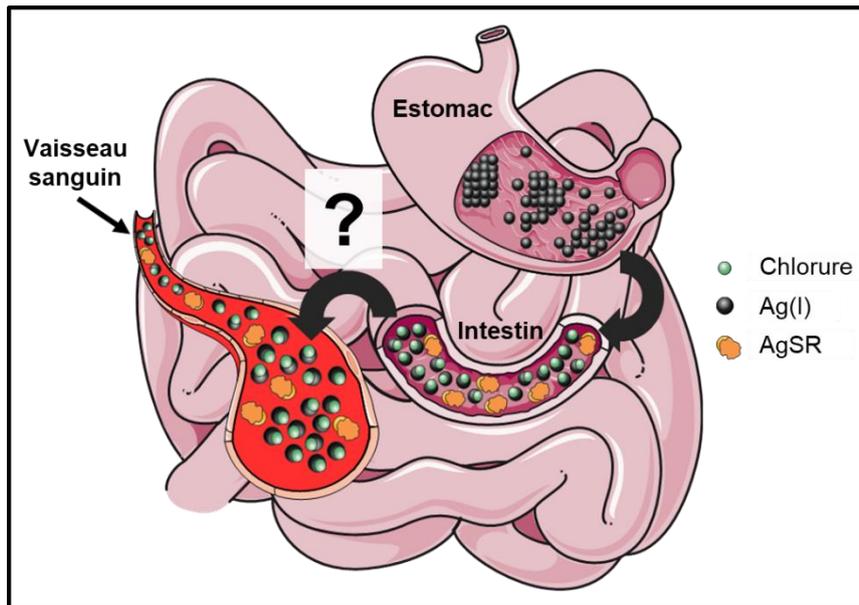


Figure 6 : Schéma représentant les différentes espèces d'Ag formées dans le tractus gastro-intestinal et leur passage éventuel dans le sang. Les NP-Ag ingérées subissent une dissolution dans l'estomac suivie d'une formation de particules contenant de l'Ag, du soufre et du chlore dans l'intestin. Ces NP ou d'autres complexes formés dans l'intestin peuvent être transloqués dans le sang. Cette figure est réalisée grâce à la banque d'illustrations médicales de Servier (smart.servier.com) et est inspirée de Marchioni et al., 2018b.

La comparaison entre l'exposition de rongeurs aux NP-Ag et aux sels d'Ag administrés par voie orale a révélé une distribution similaire d'Ag dans l'organisme. Cependant, la quantité d'Ag accumulée dans les différents organes pour une même dose administrée sous forme de NP ou de sel d'Ag est plus faible chez les animaux exposés à la forme nanoparticulaire de l'Ag. Ceci est expliqué par le fait que la fraction d'Ag absorbée au niveau de l'intestin est supérieure dans le cas d'ingestion de sel d'Ag, ce qui conduit à une quantité supérieure d'Ag distribuée aux différents organes. Ces données sont en accord avec une excrétion fécale d'Ag plus élevée suite à une exposition orale aux NP-Ag (Loeschner et al., 2011).

Van der Zande et al. ont analysé la quantité d'Ag dans le sang de rats suite à une exposition orale à des NP-Ag et à AgNO_3 pendant 28 jours et ont rapporté que la concentration en Ag dans le sang était 7 à 10 fois plus élevée dans le cas d'une exposition au sel d'Ag. Toutefois, en tenant compte uniquement de la fraction d'Ag soluble présente dans la solution des NP-Ag administrée aux rats, une quantité similaire d'Ag a été mesurée dans le sang dans les deux scénarios d'exposition. Ainsi, les auteurs ont proposé l'hypothèse qu'après une exposition orale aux NP-Ag, la principale espèce d'Ag absorbée dans le sang est la fraction ionique d'Ag présente dans la solution des NP-Ag (van der Zande et al., 2012). Selon cette hypothèse, le passage des NP-Ag dans le tractus gastro-intestinal n'entraînerait pas leur dissolution, ce qui contredit les résultats des études *in vitro* sur le modèle simulé du tractus gastro-intestinal (Bove et al., 2017). Cette hypothèse est également contradictoire avec les résultats rapportés par l'étude *in vivo* de Loeschner et al. (Loeschner et al., 2011) qui a montré une accumulation d'Ag 2 à 3 fois plus importante après exposition à un sel d'Ag qu'après exposition aux NP-Ag. Dans cette étude, la solution de NP-Ag administrée aux rats contient seulement 11 % d'espèces d'Ag(I), l'hypothèse de Van Der Zande ne permet donc pas d'expliquer la différence

entre les deux cas d'exposition. Dans l'étude de Loeschner et al., les rats ont été exposés à une même dose d'Ag administrée sous forme nanoparticulaire ou ionique ($9 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{jour}$), alors que Van der Zande et al. ont utilisé une dose de NP-Ag dix fois plus élevée ($90 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{jour}$) que celle du sel d'Ag ($9 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{jour}$). Par conséquent, la grande différence dans la quantité d'Ag absorbée entre l'exposition aux NP-Ag et au sel d'Ag rapportée par Van Der Zande et al. pourrait être liée à une saturation de l'absorption intestinale de l'Ag en présence d'une forte concentration d'Ag dans le cas de l'exposition aux NP-Ag.

En conclusion, l'ensemble de ces études *in vitro* et *in vivo* montre que les NP-Ag ingérées subissent de nombreuses transformations dans le tractus gastro-intestinal entraînant leur dissolution dans l'estomac et la formation de différentes espèces d'Ag telles que des précipités AgCl et des NP contenant de l'Ag et du soufre dans l'intestin. Il n'est cependant pas encore déterminé si ces précipités/particules sont transloqué(e)s dans le sang tel(le)s quel(le)s ou si ce sont plutôt des espèces solubles d'Ag(I) qui passent à travers la barrière intestinale dans le sang pour être distribuées aux différents organes. De plus, les études *in vivo* de comparaison d'exposition aux NP-Ag et aux sels d'Ag administrés par voie orale montrent des différences d'assimilation entre ces deux espèces d'Ag au niveau de l'organisme. Même si ces études ne permettent pas d'expliquer ces différences, elles mettent l'accent sur la nécessité d'études plus approfondies pour comprendre les mécanismes régissant l'assimilation, les transformations et la toxicité des NP-Ag et des ions Ag(I) à l'échelle de l'organisme.

3.4.2. Transformations des NP-Ag administrées par voie parentérale

Les avancées technologiques et scientifiques ont permis une mise sur le marché de nombreux dispositifs médicaux contenant ou recouverts de NP-Ag. Dans ces produits, les NP-Ag sont utilisées principalement pour leurs propriétés biocides mais aussi pour leurs propriétés anti-inflammatoires qui favorisent la cicatrisation des plaies. La présence de ces NP dans les revêtements antibactériens des dispositifs médicaux permet de réduire les infections nosocomiales qui peuvent être contractées au cours d'une hospitalisation. Ces infections touchent à peu près un patient sur vingt en France, ce qui représente environ 750 000 infections par an, qui seraient la cause directe de 4 000 décès (selon l'Inserm).

Les pansements de traitement des brûlures sont les dispositifs médicaux contenant des NP-Ag les plus représentés sur le marché. D'autres catégories de dispositifs sont également concernées et incluent des cathéters, des canules d'intubation endo-trachéales, des prothèses, des implants cardiaques et des ciments osseux (pour une revue, voir Chaloupka et al., 2010). L'utilisation accrue de dispositifs médicaux contenant des NP-Ag suscite de plus en plus d'inquiétude, car elle favorise le développement de souches bactériennes résistantes à l'Ag dans les hôpitaux, ce qui pourrait conduire à une situation critique dans le futur (Gunawan et al., 2017 ; Silver, 2003). Par ailleurs, les données sur les effets des NP-Ag et de leurs produits de transformations sur la santé des patients nécessitant des hospitalisations fréquentes ou de longue durée (comme pour les cancers et les transplantations d'organes) sont rares. Néanmoins, une étude récente a souligné que les foies de patients atteints de maladies

hépatiques qui nécessitent une longue hospitalisation accumulent trente fois plus d'Ag que les foies de personnes saines (Poznański et al., 2021).

L'utilisation de dispositifs médicaux contenant des NP-Ag conduit à une libération de NP-Ag pristines, non transformées directement dans le sang. Cette exposition dite parentérale conduit à une concentration d'Ag dans le sang dix fois supérieure à celle obtenue avec la même dose administrée par voie orale (Park et al., 2011).

Les études *in vivo* ont également montré que si l'Ag est presque complètement éliminé de l'organisme au bout de 24 heures après administration orale de NP-Ag, sa concentration dans le sang reste relativement constante cinq jours après injection de NP-Ag (Dziendzikowska et al., 2012 ; Park et al., 2011) avant de diminuer graduellement au cours du temps en raison de l'élimination de l'Ag principalement dans les urines (Dziendzikowska et al., 2012). Ceci entraîne une accumulation plus importante d'Ag dans les organes, en particulier dans le foie et les reins dans le cas d'injection de NP-Ag. Par exemple, dans le foie, cette accumulation est 10 à 1000 fois plus élevée que dans le cas d'ingestion de NP-Ag. De plus, la quantité d'Ag mesurée dans les organes testés reste constante pendant au moins un mois après administration intraveineuse de NP-Ag, alors qu'elle décroît rapidement à la suite d'une ingestion de la même dose de NP-Ag (Dziendzikowska et al., 2012 ; Park et al., 2011). Après injection de NP-Ag chez des rats, l'Ag a été également détecté dans les fèces 24 heures après le traitement. Ceci suggère fortement une excrétion *via* la bile (Park et al., 2011). En outre, l'observation en TEM de coupes de tissus de rats après injection de NP-Ag enrobées de citrate a mis en évidence la présence de particules dans le poumon, la rate, le foie, le rein et le cerveau (Dziendzikowska et al., 2012). Cependant, la composition chimique de ces particules reste inconnue puisqu'aucune analyse chimique n'a été effectuée. Cette analyse est nécessaire pour (i) prouver qu'il s'agit de NP-Ag et pas, par exemple de dépôts d'osmium (Os) et pour (ii) identifier si ce sont des NP-Ag ou des agrégats d'Ag et de soufre, comme observé dans les organes suite à une administration orale de NP-Ag (Loeschner et al., 2011). La différence dans l'excrétion de l'Ag entre l'exposition orale et parentérale de NP-Ag est probablement liée à la différence de spéciation de l'Ag entre les deux cas. En effet, comme expliqué dans la sous-section 3.4.1, les NP-Ag ingérées subissent différentes transformations avant d'arriver dans le sang sous forme d'un mélange d'espèces solubles ou de précipités d'AgSR, d'AgCl et/ou d'espèces d'Ag lié à des protéines, alors que les NP-Ag injectées dans le sang sont formées principalement d'Ag(0). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que les espèces solubles ainsi que les précipités d'Ag(I) seraient plus faciles à excréter à l'extérieur de l'organisme que les NP-Ag, car ces dernières doivent d'abord être transformées en espèces solubles Ag(I) qui vont être par la suite excrétées.

Les études sur les transformations et la distribution des NP-Ag relarguées des dispositifs médicaux dans le cadre d'une exposition parentérale humaine sont limitées. La plupart des données publiées concernent l'utilisation des pansements Acticoat® pour le traitement des brûlures. Par exemple, l'étude de Trop et al. a montré le développement d'argyrisme suite à l'utilisation des pansements Acticoat® pour traiter un patient brûlé sur 30 % de sa surface corporelle. Chez ce patient, des quantités élevées d'Ag ont été retrouvées dans son sang et son urine (Trop et al., 2006). Dans une autre étude, des concentrations significatives d'Ag (de

l'ordre de $57 \mu\text{g.L}^{-1}$) ont été mesurées dans le sang de trente patients brûlés dès le premier jour de leur traitement avec des pansements Acticoat®. Ces quantités retournent à la normale au bout de trois mois après la fin du traitement (Vlachou et al., 2007).

Les pansements Acticoat® sont constitués de fibres de polyéthylène recouvertes d'une couche de NP-Ag non enrobées, de 10 nm de diamètre. Afin d'analyser le devenir des NP-Ag relarguées de ces pansements dans le sang, Roman et al. ont étudié et comparé les transformations *in vitro* des pansements Acticoat®, des ions Ag(I) et des NP-Ag enrobées de PVP après 2 heures d'incubation dans du plasma humain ou dans une solution contenant de l'albumine humaine (Roman et al., 2016). L'étude de la spéciation de l'Ag a montré que, dans le plasma humain, les ions Ag(I) forment principalement des espèces AgCl et que les NP-Ag enrobées de PVP restent majoritairement sous forme nanoparticulaire. Pour les pansements Acticoat®, trois types d'espèces d'Ag co-existent dans le plasma : des NP-Ag prêtes, des complexes organothiolés d'Ag(I) et des espèces AgCl. Dans ces conditions, l'analyse de la spéciation locale de l'Ag au niveau de la NP a montré la présence d'espèces AgCl et AgSR à la surface de la NP-Ag. Ceci suggère que la transformation des NP-Ag libérées des pansements Acticoat® se fait à la surface de ces NP qui est une interface d'échange des différentes espèces d'Ag due à la présence d'Ag(I) en conditions aérobies. Dans l'ensemble, cette étude met en évidence la complexité des transformations des NP-Ag dans le sang puisque différentes espèces d'Ag peuvent être formées selon le type des NP-Ag.

3.5. Entrée, transformations et effets des NP-Ag dans les cellules mammifères

3.5.1. Entrée des NP-Ag dans la cellule

Les études d'exposition cellulaire aux NP-Ag ont rapporté une entrée de ces NP dans les cellules par endocytose. Ceci a été illustré, par exemple grâce à des observations en TEM qui ont permis de visualiser des invaginations de la membrane plasmique de cellules mammifères autour de NP-Ag (Marchioni et al., 2018b ; Veronesi et al., 2016). Ce mécanisme d'entrée des NP-Ag a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires, par exemple : des macrophages qui sont des cellules connues pour leur capacité phagocytaire (Singh et Ramarao, 2012 ; Wang et al., 2012), des cellules pulmonaires (Gliga et al., 2014), des cellules ovariennes (Jiang et al., 2015) et des hépatocytes (Veronesi et al., 2016). L'endocytose des NP-Ag a également été décrite dans des organismes modèles comme le ver *Caenorhabditis elegans* (Maurer et al., 2016). Cependant, aucune voie d'endocytose unique n'a été identifiée pour ces NP, pas même pour un type spécifique de NP-Ag (taille, forme, enrobage). En effet, aucun inhibiteur des voies connues d'endocytose (endocytose par vésicules de clathrine, endocytose par vésicules de cavéoline, pinocytose et phagocytose) n'a permis de bloquer complètement l'entrée des NP-Ag dans des cellules mammifères ou chez des organismes modèles (Maurer et al., 2016 ; Jiang et al., 2015 ; Gliga et al., 2014). Le seul moyen d'abolir l'entrée des NP-Ag dans les cellules est d'incuber les cellules à 4°C, température à laquelle l'activité métabolique est arrêtée (Jiang et al., 2015 ; Greulich et al., 2011). En conséquence, l'entrée des NP-Ag dans les cellules est un processus actif.

Une autre hypothèse, peu étudiée dans la littérature, est l'entrée d'ions Ag(I) dans la cellule sous forme de complexes organothiolés AgSR ou d'espèces solubles de type AgCl_x. Avant leur endocytose cellulaire, les NP-Ag peuvent relarguer des ions dans le milieu extracellulaire. Les ions Ag(I) peuvent entrer dans la cellule *via* le transporteur de Cu CTR1 (Bertinato et al., 2010). D'autres transporteurs comme les transporteurs de peptides pourraient transporter des molécules complexant des ions Ag(I). Les mécanismes de transport des espèces AgCl_x, principalement les AgCl₂⁻, sont inconnus mais leur prise en charge par un transporteur membranaire spécifique est peu probable. Cependant, un échange d'Ag(I) pourrait se produire entre ces espèces et le ligand d'un transporteur d'ions tel que CTR1, permettant ainsi l'entrée cellulaire des ions Ag(I) (Bertinato et al., 2010).

3.5.2. Dissolution endosomale des NP-Ag

Comme décrit précédemment, après endocytose, la couronne protéique se dissocie des NP-Ag et les atomes d'Ag de la surface des NP deviennent exposés au milieu endosomal. En parallèle, le processus de maturation de l'endosome en lysosome commence et s'accompagne d'une diminution du pH dans la vésicule, ce qui favorise la dissolution des NP-Ag comme cela a été montré *in vitro* (Liu et Hurt, 2010) (**Figure 7**).

Des observations en TEM de coupes d'hépatocytes exposés pendant 24 heures à des NP-Ag ont mis en évidence la diminution de la taille des NP dans les endosomes au cours de leur maturation en lysosomes. Par exemple, dans le cas d'une exposition à des NP-Ag de 100 nm de diamètre initial, seules de petites NP de 20 nm de diamètre ont été observées dans les lysosomes après 24 heures d'exposition. L'analyse chimique par EDX a confirmé la présence d'Ag dans ces NP. Ces observations ont été corroborées par l'analyse par microscopie de fluorescence des rayons X (XRF pour *X-ray fluorescence microscopy*) qui a permis, grâce à sa haute sensibilité, de visualiser la présence d'espèces Ag(I) solubles dans tous les compartiments cellulaires après la dissolution endolysosomale des NP-Ag (Tardillo Suárez et al., 2021 ; 2020 ; Marchioni et al., 2018b ; Veronesi et al., 2016).

L'augmentation de l'acidité dans le milieu endolysosomal n'est pas le seul déclencheur de la dissolution des NP-Ag. Au cours de la maturation des endosomes, la concentration en chlorures dans ces vésicules augmente également : de 20 – 30 mM dans les endosomes précoces (pH = 7) à 50 – 70 mM dans les endosomes tardifs (pH = 5,5) (Huotari et Helenius, 2011 ; Sonawane et al., 2002). Ces concentrations croissantes en chlorures favorisent la formation d'espèces de type AgCl_x. De ce fait, l'équilibre peut être déplacé vers la dissolution des NP-Ag en espèces Ag(I) solubles qui sont probablement transportées à travers la membrane endolysosomale vers le cytosol et distribuées dans toute la cellule, y compris dans le noyau et les mitochondries comme mis en évidence par les travaux de notre équipe (Tardillo Suárez et al., 2021 ; 2020 ; Veronesi et al., 2016).

3.5.3. Spéciation de l'Ag intracellulaire

La nature précise des espèces solubles d'Ag formées dans les endosomes et les mécanismes de leur transport des vésicules vers le cytosol restent à élucider. Des études par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS pour *X-ray absorption spectroscopy*) sur des culots cellulaires

ont montré que l'Ag intracellulaire se trouve principalement sous deux formes : des NP-Ag et des composés organothiols AgSR (Veronesi et al., 2016 ; 2015b ; Wang et al., 2015 ; Jiang et al., 2015). Le ratio entre ces deux espèces de l'Ag dépend du type cellulaire, du type des NP étudiées, de la dose administrée et du temps d'exposition.

Des quantifications d'ARN messenger après exposition de cellules HepG2 à des NP-Ag ont mis en évidence une surexpression de Met et de la glutamate-cystéine ligase (GCLM) qui est une enzyme impliquée dans la biosynthèse du GSH. Ces résultats permettent de proposer comme hypothèse que les ions Ag(I) libérés des endolysosomes se lient au GSH et aux Met, formant ainsi des espèces organothiols de coordination AgS₂ et AgS₃, respectivement (Veronesi et al., 2015a). La liaison des ions Ag(I) aux Met va libérer les ions Zn(II), ce qui va entraîner la mise en place d'un système de défense face au stress métallique en surexprimant différentes protéines dont les Met (**Figure 7**). En plus de cette réponse cellulaire primaire, notre équipe, en collaboration avec les équipes de W. Bal et A. Krezel en Pologne, a mis en évidence que les ions Ag(I) pouvaient déplacer les ions Zn(II) de motifs à doigt de zinc, en particulier dans des facteurs de transcription dont le motif permet la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN (Kluska et al., 2022 ; 2020 ; Tardillo Suárez et al., 2020). Nous avons montré que l'affinité des ions Ag(I) pour ces motifs est au moins 100 fois supérieure à celle des ions Zn(II), ce qui conduit à une inhibition de l'activité de ces facteurs de transcription *in vitro* mais également *in cellulo* dans des conditions d'exposition aux NP-Ag. En effet, l'exposition d'hépatocytes à des doses non toxiques de NP-Ag pendant plusieurs jours à plusieurs semaines conduit à l'inhibition de l'activité des récepteurs nucléaires LXR (*Liver X receptor*) et FXR (*Farnesyl X receptor*) qui sont des facteurs de transcription à doigt de zinc essentiels pour la régulation du métabolisme du glucose, des lipides, du cholestérol et des sels biliaires (Tardillo Suárez et al., 2020). Ces différents résultats montrent l'impact d'ions Ag(I) relargués des NP-Ag sur la fonction de métalloprotéines essentielles pour le bon fonctionnement de la cellule.

Un résumé des connaissances actuelles sur les transformations des NP-Ag dans les cellules mammifères est présenté sur la **Figure 7**.

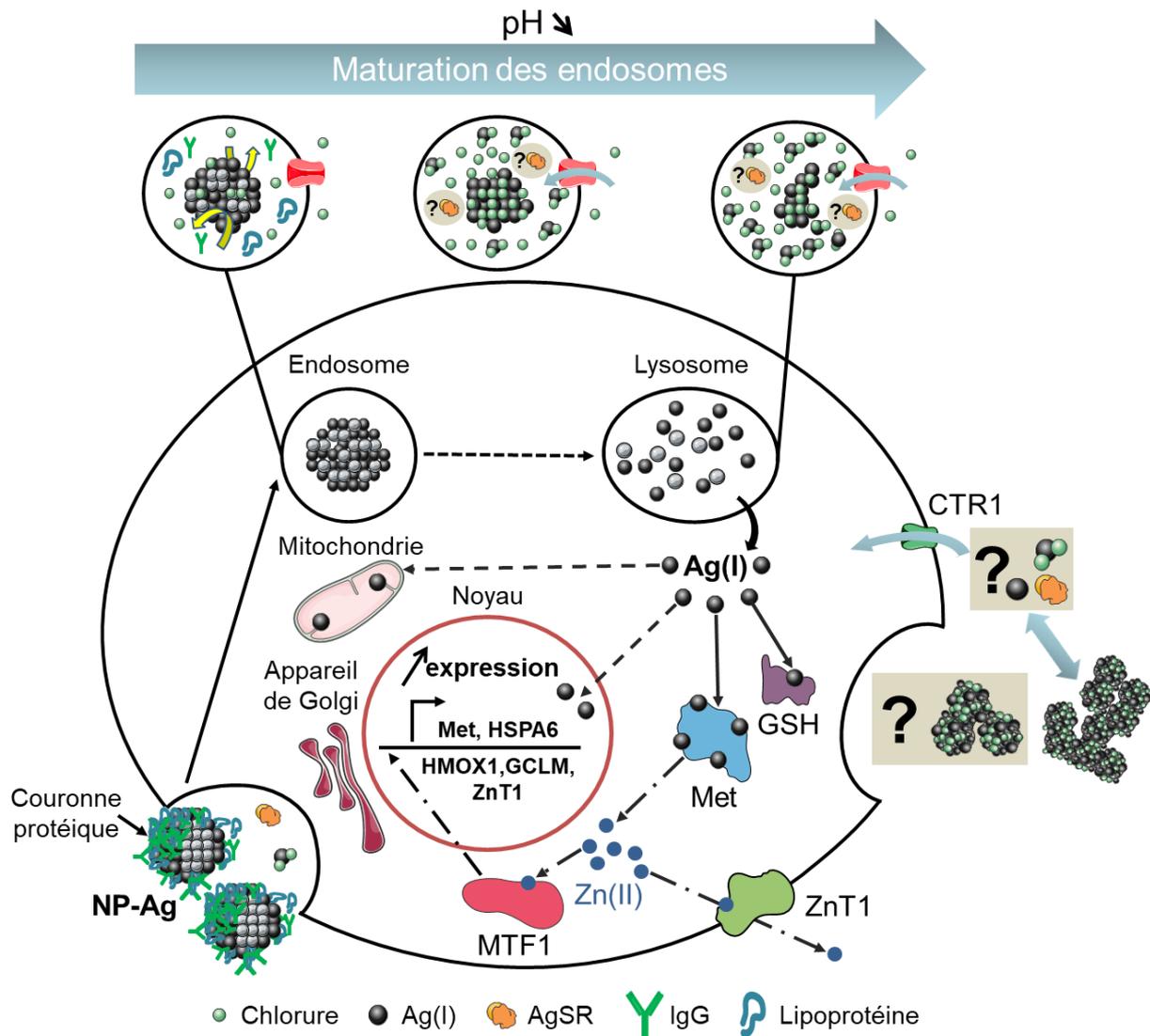


Figure 7 : Résumé des connaissances actuelles sur les transformations des NP-Ag dans les cellules mammifères. Les NP-Ag entrent dans la cellule par endocytose, alors que les ions $Ag(I)$ peuvent entrer via le transporteur de Cu CTR1. Durant la maturation des endosomes, le pH diminue et la concentration des chlorures augmente. Ces deux phénomènes favorisent la dissolution des NP-Ag en espèces solubles d' $Ag(I)$ dont la nature précise n'est pas connue. Ces espèces sont ensuite libérées dans le cytosol où les ions $Ag(I)$ sont complexés à des molécules thiolées, principalement le GSH et les Met. Ces complexes sont distribués dans toute la cellule. La liaison des ions $Ag(I)$ aux Met libère les ions $Zn(II)$. Ces ions se lient au facteur de transcription MTF1 (metal regulatory transcription factor 1) qui va transloquer vers le noyau et induire la surexpression de protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie des métaux (Met, HSPA6, HMOX1, GCLM, ZnT1). La protéine ZnT1 (zinc transporter 1) permet d'excéder les $Zn(II)$ en excès. Inspirée de Marchioni et al., 2018b.

4. Les techniques de microscopie électronique volumique cellulaire et tissulaire

Dans ce projet de thèse, nous avons utilisé la technique FIB-SEM (pour *focused ion beam-scanning electron microscopy*) pour étudier l'ultrastructure de sphéroïdes hépatiques et de blocs de foie de souris. Cette technique fait partie d'un ensemble de techniques de microscopie électronique qui permettent d'élucider l'ultrastructure tridimensionnelle des cellules, des tissus et des petits organismes modèles à une résolution nanométrique et qui sont groupées sous l'acronyme vEM pour *volume electron microscopy*.

Aperçu historique du développement des techniques vEM

La microscopie électronique avec ses deux modalités, microscopie électronique à transmission TEM et microscopie électronique à balayage SEM (pour *scanning electron microscopy*) permettent une observation à l'échelle nanométrique des tissus et des cellules. La microscopie TEM permet de détecter les électrons transmis à travers une coupe fine d'un échantillon, déposée sur une grille, ce qui crée une image recueillie sur un écran fluorescent ou à l'aide d'une caméra numérique. Dans un microscope électronique à balayage (SEM), l'échantillon est balayé par un faisceau d'électrons et il est possible de détecter les électrons rétrodiffusés ou les électrons secondaires réémis par l'échantillon qui donnent, respectivement, des images de contraste chimique ou de contraste topographique. Cette technique permet l'analyse de la surface d'échantillons épais. La technique SEM permet d'imager des champs plus larges que la technique TEM puisque la taille de l'échantillon à observer n'est pas limitée par la taille d'une grille de microscopie électronique de 3 mm de diamètre, en général.

Le développement des techniques vEM a marqué les deux dernières décennies et a fait considérablement progresser le domaine de l'imagerie électronique 3D des tissus et des cellules. En effet, traditionnellement, la microscopie électronique des tissus et des cellules a été réalisée en observant en TEM des coupes fines d'une épaisseur maximale de 100 nm. Cependant, cette technique 2D ne permet pas d'obtenir des informations volumétriques sur les échantillons étudiés. Les premiers essais pour imager l'ultrastructure 3D des cellules remontent aux années cinquante avec le développement de l'imagerie des coupes sériées en TEM ou ssTEM pour *serial section transmission electron microscopy* (Birch-Andersen, 1955). Ensuite, les progrès dans le domaine de l'instrumentation et des systèmes de détection ont permis le développement de microscopes SEM optimisés pour fournir des courants de sonde plus élevés (> 500 pA) à de faibles tensions d'accélération (entre 1,5 et 2 kV) et qui permettent d'atteindre une résolution similaire à celle des microscopes TEM et d'imager plus rapidement des champs plus larges (Titze et Genoud, 2016 ; Wanner et al., 2015). L'utilisation de cette nouvelle génération de microscopes SEM a permis le développement des techniques vEM automatisées qui permettent d'acquérir des volumes pouvant atteindre des centaines de micromètres dans chaque direction spatiale. Ceci a constitué une avancée significative dans le domaine de la microscopie électronique 3D, surtout avec la commercialisation de microscopes spécialisés dans ces techniques.

Les techniques vEM qui se basent sur l'imagerie SEM reposent soit sur l'imagerie en série de coupes réalisées avec un ultramicrotome en dehors du microscope (la technique AT pour *array tomography*) ou sur l'imagerie séquentielle et automatique de la surface de l'échantillon fraîchement exposée après abrasion avec un faisceau d'ions focalisé (la technique FIB-SEM) ou après découpe avec un ultramicrotome intégré dans la chambre d'un microscope SEM (la technique SBF-SEM pour *serial block-face scanning electron microscopy*).

Dans la suite de cette section, je vais décrire la technique ssTEM ainsi que les trois techniques vEM basées sur l'imagerie SEM tout en soulignant les avantages et les limites de chacune et en mettant l'accent sur la technique FIB-SEM. Le lecteur intéressé par une description plus

détaillée de ces techniques peut se référer aux revues de Peddie et al. (Peddie et al., 2022 ; Peddie et Collinson, 2014) et de Titze et Genoud (Titze et Genoud, 2016).

4.1. L'imagerie de coupes sériées en TEM

Cette technique consiste à réaliser, avec un ultramicrotome, des coupes de cellules ou de tissus enrobés dans une résine, de les transférer manuellement sur des grilles de microscopie électronique et de les observer une par une en TEM. Les images obtenues sont ensuite alignées et les structures d'intérêt sont segmentées et reconstruites en 3D (**Figure 8A**). Cette technique offre une résolution latérale entre 2 et 4 nm en x et en y mais la résolution en z est limitée par l'épaisseur de la coupe qui est généralement entre 30 et 100 nm (Kornfeld et Denk, 2018 ; Harris et al., 2006). La reconstruction du système nerveux du ver *Caenorhabditis elegans* est l'un des travaux pionniers de l'application de ssTEM en neurobiologie (White et al., 1986). En ce qui concerne ses applications pour l'imagerie du tissu hépatique, Belicova et al. l'ont utilisée parallèlement à la microscopie de fluorescence pour étudier la morphogenèse des canalicules biliaires lors de la différenciation d'hépatocytes de souris (Belicova et al., 2021). Récemment, Chun Chung et al. ont également publié un protocole détaillé pour imager avec ssTEM des hépatocytes de rongeurs et ont souligné la pertinence de la technique pour la visualisation des contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Chung et al., 2022). Néanmoins, le désavantage majeur de la technique ssTEM est la manipulation manuelle et chronophage des coupes qui nécessite une grande dextérité. Les coupes peuvent être facilement perdues et des distorsions (repliement, rétrécissement...) peuvent être introduites durant la réalisation des coupes, leur transfert sur les grilles ou la manipulation des grilles. Ceci rompt la continuité des structures imagées et rend difficile l'alignement des images (Titze et Genoud, 2016 ; Peddie et Collinson, 2014).

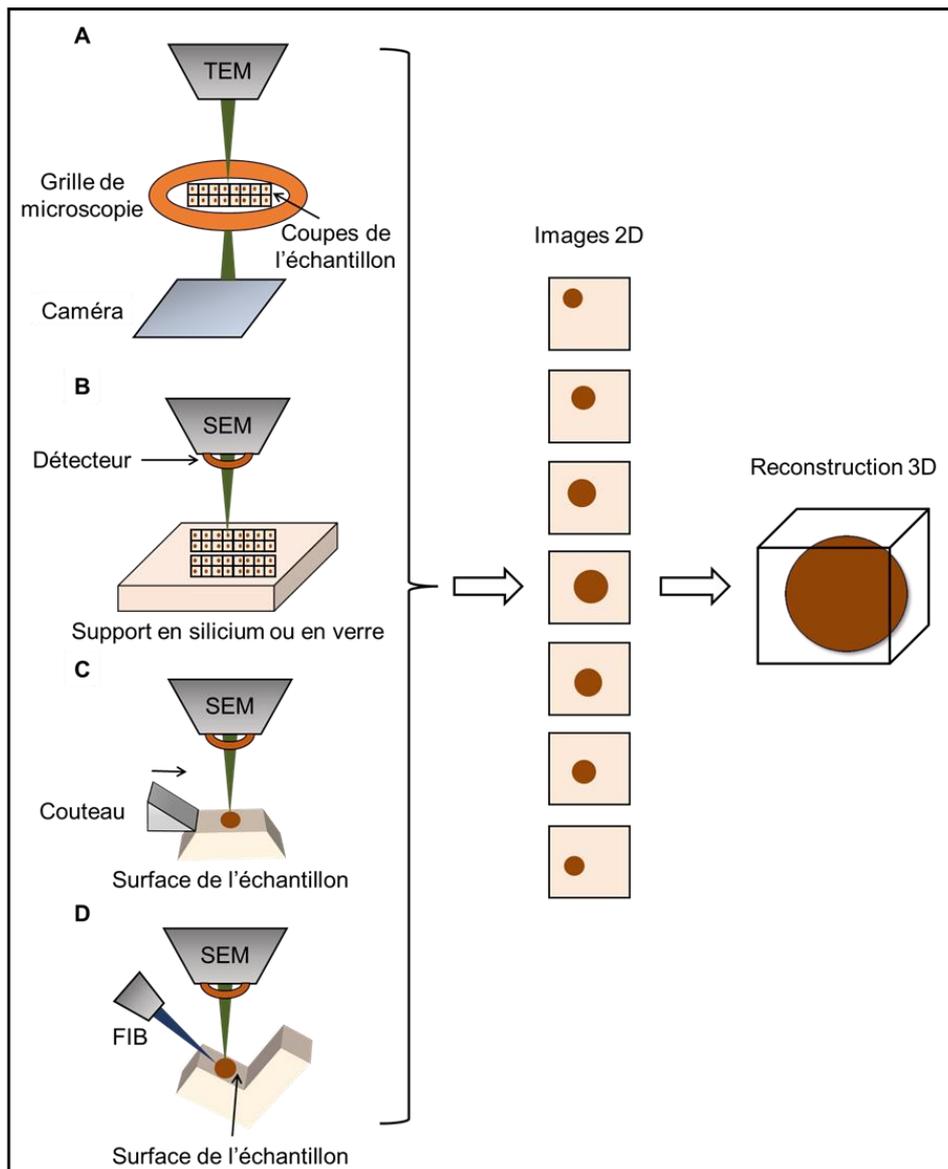


Figure 8 : Techniques de microscopie électronique volumique. (A) Imagerie de coupes sériées en TEM (ssTEM). (B) Imagerie de coupes sériées en SEM (AT). (C) Imagerie SBF-SEM. La flèche montre le sens d'avancement du couteau diamant. (D) Imagerie FIB-SEM. Inspirée de Miranda et al., 2015.

4.2. L'imagerie de coupes sériées en SEM

Développée en 2007, l'imagerie de coupes sériées en SEM ou *array tomography* (AT) est utilisée depuis comme une alternative à la technique ssTEM (Micheva et Smith, 2007). À la différence de ssTEM où les coupes sont collectées sur des grilles de microscopie électronique, les coupes observées en SEM sont collectées sur des substrats en silicium (Si) ou sur des lames en verre (**Figure 8B**). Grâce à l'utilisation de ces supports plus larges que les grilles de microscopie, la technique AT est compatible avec l'imagerie d'un grand nombre de coupes et les zones d'intérêt peuvent être visualisées sans être obstruées par les barres de la grille. La résolution latérale fournie par la technique AT est comparable à celle de la technique ssTEM (environ $2 \times 2 \text{ nm}^2$) et la résolution axiale est limitée par l'épaisseur de la coupe qui est

généralement entre 30 et 200 nm (Chung et al., 2022 ; Wacker et Schroeder, 2013 ; Smith, 2018).

Les supports en verre peuvent être imagés à la fois par microscopie électronique et par microscopie de fluorescence. Ils ont été utilisés, surtout en neurobiologie, dans des études combinant les deux modes d'imagerie d'une manière complémentaire pour corrélérer la fonction à l'ultrastructure (Smith, 2018). En effet, l'épaisseur fine des coupes permet une coloration rapide et efficace des structures d'intérêt et la réalisation de plusieurs cycles de marquage et d'imagerie utilisant différents anticorps est également possible avec la technique AT (Micheva et al., 2010 ; Micheva et Smith, 2007). La technique AT offre aussi la possibilité d'acquérir des images à différents grossissements, permettant ainsi une caractérisation multi-échelle allant de l'ultrastructure cellulaire jusqu'à l'organisation des cellules dans le tissu (Wacker et al., 2016).

Pour réduire les risques, de perte et de distorsion, induits par la manipulation manuelle des coupes, des méthodes semi-automatiques et automatiques ont été développées pour la collecte d'un grand nombre (> 100) de coupes (Templier, 2019 ; Koike et al., 2017 ; Wacker et al., 2016). Grâce à l'un de ces systèmes automatisés, une larve du ver *Caenorhabditis elegans* a été reconstruite en entier en imageant plus de 2000 coupes collectées sur 8 substrats en Si (Li et al., 2017). Le développement et la commercialisation de l'ultramicrotome ATUM (*Automated Tape-collecting UltraMicrotome*) a été un jalon dans l'automatisation de la technique AT (Schalek et al., 2012 ; Hayworth et al., 2006). Dans ce système, les coupes réalisées avec un couteau diamant sont automatiquement collectées sur un ruban adhésif, généralement en Kapton, qui s'enroule sur une bobine. Ensuite, le ruban est coupé en bandelettes qui sont collées manuellement sur des substrats en Si avant d'être observées en SEM : c'est la technique ATUM-SEM (Schalek et al., 2012). Avec ATUM, des milliers de coupes consécutives d'environ 30 nm d'épaisseur peuvent être réalisées en continu pendant plusieurs jours. L'ensemble de ces coupes forme des « librairies de coupes » (*section libraries*) qui peuvent être stockées plusieurs années si nécessaire et peuvent ainsi être observées plusieurs fois à différentes résolutions (Titze et Genoud, 2016). La technique ssTEM présente également l'avantage de pouvoir réimager les coupes. Pour cette raison, les deux techniques d'imagerie de coupes sériées sont dites « non destructives ». La technique ATUM-SEM est presque exclusivement utilisée en neurobiologie en raison de sa compatibilité avec l'imagerie de gros volumes à une résolution nanométrique. En effet, des coupes aussi larges que $3 \times 3 \text{ mm}^2$ peuvent être réalisées sans interruption sur une profondeur en z de l'ordre de 100 à 200 μm (limite de la course du bras de coupe de l'ultramicrotome). Ceci permet d'observer de grandes zones d'intérêt en utilisant l'option de tuilage (Titze et Genoud, 2016). Le développement de logiciels spécialisés dans l'acquisition rapide d'un grand nombre de coupes et dans le ciblage automatique de la zone d'intérêt dans les coupes successives (ex. WaferMapper) a diminué la complexité de la technique et a réduit la durée et le volume de données obtenues en imageant que les régions intéressantes dans les coupes millimétriques (Hayworth et al., 2014). L'étude de Kasthuri et al. fournit une très belle illustration de l'application de la technique ATUM-SEM pour révéler la complexité ultrastructurale d'une portion du néocortex de souris ($40 \times 40 \times 50 \mu\text{m}^3$, résolution latérale = $3 \times 3 \text{ nm}^2$, épaisseur des coupes = 30 nm, Kasthuri et al., 2015). À l'issue de cette

étude, une base de données de synapses a été créée (Kasthuri et al., 2015). Jiang et al. ont également utilisé la technique ATUM-SEM pour étudier et quantifier les contacts entre le réticulum endoplasmique et les autres organites de l'hépatocyte (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes, noyau et gouttelettes lipidiques) dans le foie de souris (Jiang et al., 2021).

4.3. L'imagerie SBF-SEM

Dans un système d'imagerie SBF-SEM ou SBEM (*serial block-face scanning electron microscopy*), un ultramicrotome équipé d'un couteau diamant est intégré dans la chambre d'un microscope SEM et permet d'enlever itérativement une fine couche de la surface de l'échantillon (**Figure 8C**). Après chaque coupe, la surface de l'échantillon, fraîchement exposée, est imagée. Ensuite, l'échantillon est remonté vers le haut d'un pas défini par l'épaisseur de la coupe à enlever (généralement entre 25 et 200 nm) et le cycle de « découpe – imagerie » se poursuit automatiquement et en continu pendant plusieurs jours, voire des mois (Titze et Genoud, 2016 ; Briggman et al., 2011). Les premiers essais d'intégration d'un ultramicrotome dans un microscope SEM remontent à 1981 (Leighton, 1981) mais l'automatisation complète de la technique n'a vu le jour qu'en 2004 avec la publication de l'article de Denk et Horstmann (Denk et Horstmann, 2004) et la commercialisation ultérieure du système développé qui est le système 3View™ fabriqué par Gatan. Actuellement, d'autres microscopes SBF-SEM sont commercialisés comme le système VolumeScope de Thermo Fischer Scientific.

A l'issue d'une acquisition SBF-SEM, des milliers d'images consécutives sont obtenues avec une résolution latérale entre 5 et 10 nm en x et en y pour des coupes d'environ 25 nm d'épaisseur (Peddie et Collinson, 2014). Cette résolution peut atteindre $2 \times 2 \text{ nm}^2$ comme rapportée dans Daum et al. (Daum et al., 2017), mais au prix de la réalisation de coupes plus épaisses (entre 50 et 100 nm). Ceci est lié à la sensibilité du système de découpe à la dose d'électrons qui est définie par le nombre d'électrons incidents irradiant l'échantillon par unité de surface (Kubota, 2015 ; Titze, 2013). En effet, augmenter la dose d'électrons est nécessaire pour améliorer la qualité des images, d'une part, mais rend difficile la réalisation de coupes fines, d'autre part. À forte dose, l'épaisseur des coupes n'est plus uniforme et des coupes non complètes peuvent être réalisées (Kubota, 2015). Par conséquent, un compromis est à faire entre la résolution latérale des images et l'épaisseur des coupes en z.

La largeur maximale de l'échantillon qui peut être observé en SBF-SEM est limitée par la largeur du couteau qui est d'environ 1 mm (pour le système 3View™) et la profondeur maximale en z qui peut être acquise en continu est de l'ordre de 700 μm . Avec une résolution latérale typique de 10 nm en x et en y, une épaisseur de coupes de 25 nm et une durée d'acquisition par pixel (*dwell time*) d'environ 1 μs , un volume de l'ordre de $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ peut être imagé en quelques jours (Titze et Genoud, 2016). Lorsque la région d'intérêt est plus large que le champ couvert par le faisceau d'électrons, une mosaïque de tuiles se chevauchant et couvrant la totalité de cette région est acquise en déplaçant l'échantillon latéralement. Par exemple, Briggman et al. ont acquis des images de rétine de souris composées de 1×7 tuiles avec une résolution latérale de $16,5 \times 16,5 \text{ nm}^2$ et une

épaisseur de coupes de 23 nm pour reconstruire un volume total de $350 \times 300 \times 60 \mu\text{m}^3$ (Briggman et al., 2011).

La technique SBF-SEM a été initialement utilisée en neurobiologie (Briggman et Denk, 2006), ensuite son champ d'application a été étendu pour analyser un large éventail d'échantillons biologiques en offrant une flexibilité quant au choix de la résolution latérale, de l'épaisseur des coupes et du volume acquis selon les objectifs de l'étude (pour une revue, voir Peddie et Collinson, 2014). En effet, un des atouts de l'imagerie SBF-SEM est la capacité qu'elle offre à appréhender la structure du vivant à différentes échelles : de l'organisme entier (un type de ver marin dans Vergara et al., 2021) jusqu'aux structures subcellulaires (comme les mitochondries de cellules musculaires dans Vincent et al., 2016) et subnucléaires (comme la chromatine dans des noyaux d'hépatocytes dans Rouquette et al., 2009) en passant par les cellules entières (comme des cellules de rein dans Lausecker et al., 2018) et les tissus (comme le tissu hépatique cancéreux dans De Senneville et al., 2021). Shami et al. ont utilisé cette technique pour étudier la microstructure du tissu hépatique de rat et ont extrait, après reconstruction 3D d'hépatocytes, de sinusoides et d'un réseau de canalicules biliaires, des informations morphométriques sur le diamètre, le volume ainsi que sur la surface de contact entre ces différentes structures (hépatocyte-hépatocyte, hépatocyte-sinusoïde et hépatocyte-calicules biliaires) (Shami et al., 2016).

Certains artéfacts liés à la réalisation de coupes incomplètes ou à l'accumulation de débris de coupes sur la surface de l'échantillon peuvent être introduits en imagerie SBF-SEM. En effet, puisque les coupes éliminées collent et s'empilent sur la lame du couteau diamant, elles peuvent tomber entièrement ou en morceaux (débris) sur la surface de l'échantillon et peuvent obscurcir par conséquent la région d'intérêt. Dans ce cas, une étape de nettoyage est effectuée en déplaçant le couteau près de la surface de l'échantillon pour repousser ces débris (Helmstaedter et al., 2013).

Les effets de charge qui résultent de l'accumulation des charges négatives sur la surface de l'échantillon est un problème courant pour l'imagerie SBF-SEM. Ces effets sont dus à la faible conductivité des échantillons biologiques et entraînent une distorsion des images et une variation du contraste. Pour réduire ce problème, des solutions ont été proposées comme l'utilisation d'un système de compensation de charge qui injecte localement un flux de gaz tel que l'azote sur la surface de l'échantillon (Deerinck et al., 2018) ou l'introduction d'une étape de dépôt conducteur entre la réalisation de la coupe et l'acquisition de l'image (Titze et Denk, 2013).

4.4. L'imagerie FIB-SEM

La technique FIB-SEM pour *focused ion beam-scanning electron microscopy* est la technique qui couple l'imagerie par SEM et l'usinage par un faisceau d'ions focalisés (FIB). Elle a été initialement utilisée dans l'industrie des semi-conducteurs et en science des matériaux et sa première application en biologie cellulaire date de 1997 (cellule de levure, Ballerini et al., 1997). Ensuite, ses premières utilisations pour l'imagerie 3D de tissus enrobés dans une résine ont été rapportées par Heymann et al. (Heymann et al., 2006) et Knott et al. (Knott et

al., 2008). Pour une introduction approfondie sur les applications de la technique FIB-SEM en biologie, le lecteur intéressé peut se référer à la revue de Narayan et Subramaniam (Narayan et Subramaniam, 2015).

Un microscope FIB-SEM est un microscope à double colonnes constitué d'une colonne électronique et d'une colonne ionique (**Figure 8D**). Les deux colonnes sont inclinées d'un angle qui varie en fonction du fabricant et qui est généralement entre 52° et 55°, sauf pour un microscope FIB-SEM commercialisé par Hitachi dans lequel les deux colonnes sont orthogonales (Kizilyaprak et al., 2019 ; Hara, 2016). Tout comme la technique SBF-SEM, la technique FIB-SEM permet l'imagerie de la surface de l'échantillon, mais dans ce cas c'est un faisceau d'ions énergétiques (généralement des ions Galium, Ga⁺), et pas un couteau diamant, qui permet d'abraser itérativement une fine couche de cette surface. Après chaque abrasion, la surface fraîchement exposée est imagée avec le faisceau d'électrons. La succession automatique de ce cycle d'« abrasion – imagerie » pendant quelques jours aboutit à l'obtention d'une pile d'images qui est ensuite analysée pour reconstruire en 3D les structures d'intérêt à l'échelle nanométrique. Avant de commencer le cycle d'acquisition, l'échantillon introduit dans le microscope est incliné pour le placer perpendiculairement au faisceau d'ions. Ensuite, il subit des étapes de préparation qui consistent à augmenter sa conductivité par un dépôt métallique assisté par le FIB, à placer des marques qui permettent le suivi automatique de l'acquisition et à creuser une tranchée pour dégager la zone d'intérêt à imager. Des protocoles détaillés de ces étapes sont décrits dans la littérature (Kizilyaprak et al., 2014 ; Bushby et al., 2011 ; Knott et al., 2011).

Grâce à la capacité du FIB à abraser précisément des couches aussi fines que quelques nanomètres, des images avec des voxels (pixels en 3D) de taille isotrope entre 3 et 5 nm peuvent être acquises (Wei et al., 2012 ; Knott et al., 2011). En effet, la technique FIB-SEM est la seule technique vEM qui offre cet atout, ce qui améliore la précision de segmentation des structures imagées. De plus, cette technique est moins sensible que la technique SBF-SEM aux effets de charge et à la dose d'électrons en raison de la compensation des charges positives des ions et des charges négatives des électrons. Ceci permet d'utiliser des doses d'électrons plus élevées et par conséquent, d'améliorer la qualité et la résolution des images (Helmstaedter et al., 2008). La résolution offerte par la technique FIB-SEM est suffisante pour élucider l'ultrastructure cellulaire en 3D (Schertel et al., 2013 ; Heymann et al., 2009), les contacts membranaires entre des organites cellulaires (Wu et al., 2017 ; Glancy et al., 2015) ainsi que les interactions entre des pathogènes et les membranes cellulaires (pour une revue sur les interactions cellule/virus, voir Baena et al., 2021). D'autres études ont rapporté la reconstruction 3D de cellules et de structures intercellulaires dans différents tissus comme les cellules de la rétine de souris dans Mustafi et al., 2011 et le réseau lacuno-canaliculaire osseux de souris dans Schneider et al., 2011. D'autres exemples sont rapportés dans les revues de Peddie et Collinson (Peddie et Collinson, 2014) et de Kizilyaprak et al. (Kizilyaprak et al., 2019).

La technique FIB-SEM a été également utilisée pour imager le tissu hépatique, et en particulier pour analyser les modifications ultrastructurales, à l'échelle des organites, dans des conditions pathologiques (Murphy et al., 2010) et en cas d'obésité (Parlakgöl et al., 2022). Murphy et al.

ont étudié les changements morphologiques de mitochondries d'hépatocytes de souris qui souffrent d'une maladie métabolique, l'acidémie méthylmalonique et ont rapporté une augmentation du ratio surface sur volume des mitochondries des hépatocytes atteints par rapport à celles des hépatocytes sains (Murphy et al., 2010). Parlakgöl et al., quant à eux, ont comparé l'ultrastructure du tissu hépatique chez des souris maigres et des souris obèses et ont montré une modification structurale du réticulum endoplasmique dans les hépatocytes des souris obèses avec une prédominance du réticulum endoplasmique tubulaire par rapport au réticulum endoplasmique en feuillet (Parlakgöl et al., 2022).

Toutefois, l'amélioration de la résolution de la technique FIB-SEM se fait au prix d'une limitation du volume pouvant être imagé à haute résolution qui est de quelques dizaines de micromètres dans chaque direction spatiale. Ceci est principalement lié au temps d'acquisition nécessaire pour imagier de grands volumes à haute résolution. À titre d'illustration, avec une taille de voxel de $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ et une durée d'acquisition par pixel de $10 \mu\text{s}$ (typique pour l'imagerie FIB-SEM), un volume de l'ordre de $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$ peut être imagé en environ deux jours. Avec les mêmes paramètres d'acquisition, un volume de $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$ nécessite plus de 10 jours d'acquisition pour être imagé (Titze et Genoud, 2016). De plus, les longues acquisitions génèrent de gros jeux de données qui sont difficiles à traiter. Ainsi, il est nécessaire de trouver un compromis entre une haute résolution, un volume suffisamment grand pour contenir les structures d'intérêt et un temps d'acquisition par pixel suffisamment long pour générer des images de qualité adéquate.

La limitation de volume accessible à haute résolution n'exclut pas l'utilisation de la technique FIB-SEM pour acquérir de plus grands volumes mais avec une résolution de quelques dizaines de nanomètres. Par exemple, Armer et al. ont imagé un volume total = $147,5 \times 127,3 \times 88,9 \mu\text{m}^3$ de vaisseaux sanguins de zebrafish avec des voxels de taille = $72 \times 72 \times 72 \text{ nm}^3$ (Armer et al., 2009). Dans les applications où la reconstruction de grands volumes à haute résolution est nécessaire comme l'imagerie des circuits neuronaux, les chercheurs ont exploré de nouvelles méthodes pour remédier au problème de limitation du volume acquis. C'est le cas de Hayworth et al. qui ont développé une méthode pour générer des coupes épaisses (d'environ $20 \mu\text{m}$) pour l'imagerie FIB-SEM à partir de blocs de cerveau de drosophile et de cortex de souris enrobés dans une résine. Les coupes sont ensuite abrasées et imagées au FIB-SEM et les piles d'images générées sont précisément alignées pour la segmentation des neurones (Hayworth et al., 2015).

En fonction de la nature de l'échantillon et des conditions d'acquisition, des artefacts tels que l'effet de drapé (*curtuning*) lié à une abrasion inhomogène le long de la surface de l'échantillon ou un redépôt de la matière abrasée sur les côtés de la zone imagée peuvent être introduits au cours des acquisitions FIB-SEM. L'effet de drapé apparaît sous la forme de stries verticales principalement sur les images collectées avec un détecteur d'électrons secondaires.

Les techniques vEM basées sur l'imagerie SEM sont complémentaires. La technique AT fournit la plus basse résolution axiale des trois techniques, mais présente la flexibilité de garder les coupes d'échantillons pour des observations multiples et à différentes résolutions. Elle est aussi plus adaptée à l'acquisition de grands volumes. Les techniques SBF-SEM et FIB-SEM

nécessitent moins de travail manuel grâce à leurs modes d'acquisition automatique et fournissent une meilleure résolution axiale. Cependant, ces deux techniques sont destructives. La technique FIB-SEM représente le meilleur choix pour l'acquisition de petits volumes à haute résolution isotrope de quelques nanomètres, alors que la technique SBF-SEM permet l'acquisition de plus grands volumes à une résolution axiale moyenne de quelques dizaines de nanomètres. Pour bénéficier de la complémentarité des atouts de chaque technique, la technique FIB-SEM a été combinée avec les techniques AT (Hirashima et al., 2022), ATUM-SEM (Kislinger et al., 2020) et SBF-SEM (Arkill et al., 2014 ; Armer et al., 2009) pour cibler plus rapidement des régions intéressantes à imager à plus haute résolution par FIB-SEM.

A l'issue d'une acquisition avec l'une des techniques vEM, de gros jeux de données, pouvant atteindre des téraoctets (Vergara et al., 2021 ; Hayworth et al., 2014), sont générés et ensuite analysés pour la reconstruction 3D des structures d'intérêt. Les étapes d'analyse d'images sont décrites dans la suite de cette section. Une attention particulière est accordée à l'analyse des images FIB-SEM utilisées pendant mes travaux de thèse.

Par commodité, le mot résolution est utilisé dans la suite du manuscrit pour désigner la taille de voxel, bien qu'il s'agisse d'un abus de langage.

4.5. Des piles d'images 2D aux reconstructions 3D

Un des goulots d'étranglement des techniques vEM est l'analyse d'images qui permet de visualiser en 3D les structures imagées et d'extraire des informations quantitatives pour répondre à la problématique biologique étudiée. La complexité de l'analyse des données vEM est due principalement au défaut d'un processus entièrement automatisé qui s'appliquerait à tous les échantillons. Souvent, les approches développées sont adaptées à un échantillon spécifique ou à une structure particulière. Ceci rend difficile leur généralisation à d'autres jeux de données. Dans les meilleurs des cas, cette généralisation nécessite des efforts supplémentaires pour adapter les approches d'analyse d'images aux exigences de la nouvelle application.

Le post-traitement des piles d'images obtenues en vEM comprend essentiellement cinq étapes : une étape d'alignement, une étape de prétraitement et de débruitage, une étape de segmentation, une étape de génération des maillages 3D et une étape de visualisation 3D. La **Figure 9** résume ces différentes étapes en indiquant, pour chaque étape, les logiciels utilisés au cours de ma thèse. Pour avoir des images avec un contraste comparable à celui des images TEM, le contraste des images FIB-SEM est inversé.

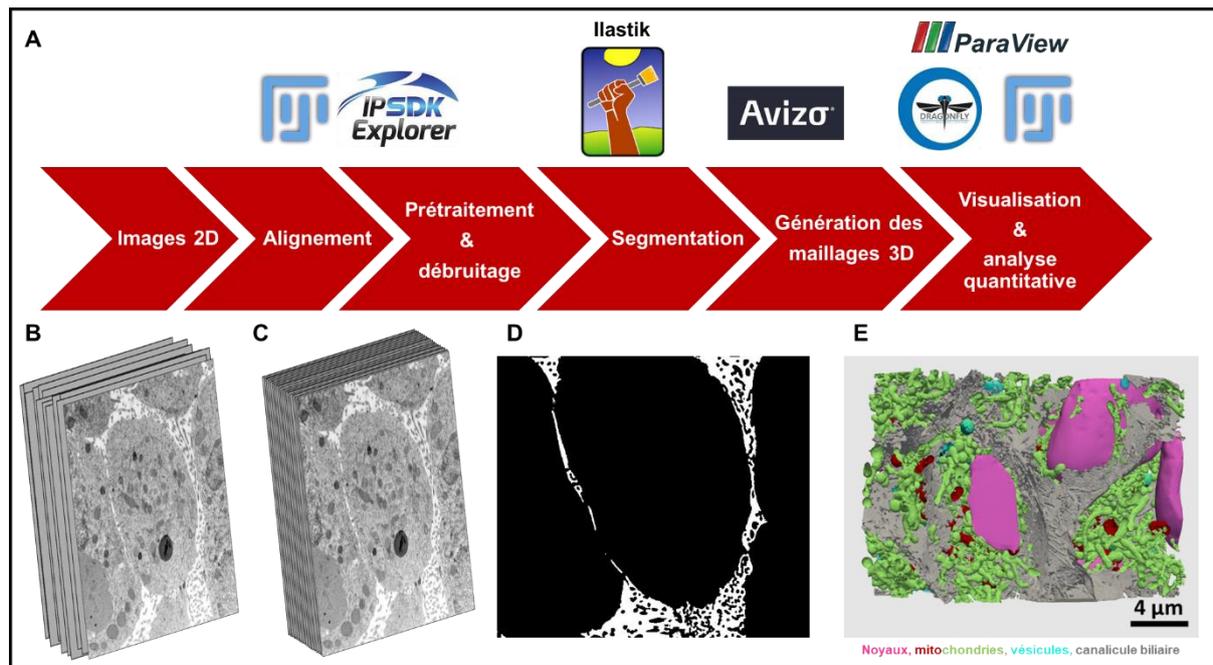


Figure 9 : Les étapes d'analyse des images obtenues en microscopie électronique volumique. (A) Enchaînement des étapes permettant de transformer une pile d'images 2D en modèles 3D. Un exemple d'une pile d'images récupérée à la fin d'une acquisition FIB-SEM est représentée sur l'image (B). Premièrement, dans l'étape d'alignement, les petits déplacements latéraux entre les images consécutives sont corrigés. (C) Résultat après alignement de la pile d'images représentée sur (B). L'étape d'alignement a été réalisée avec le logiciel Fiji. Deuxièmement, les images sont prétraitées et/ou débruitées. Cette étape est optionnelle. Dans notre cas, elle a été réalisée avec le logiciel Fiji et la bibliothèque IPSDK (Reactiv'IP). Au cours de l'étape de segmentation, les structures d'intérêt sont séparées du reste des structures. Le logiciel Ilastik a été utilisé dans cette étape. L'image (D) est extraite du masque de segmentation de l'espace intercellulaire dans un sphéroïde d'hépatocytes. Ensuite, les maillages 3D correspondants aux structures segmentées sont générés soit avec Ilastik ou avec Avizo (Thermo Fischer Scientific). Ces modèles 3D sont utilisés pour la visualisation 3D ou pour extraire des caractéristiques morphométriques (analyse quantitative). Les logiciels Paraview et Dragonfly (ORS) ont été utilisés pour les rendus volumiques des maillages 3D. Fiji a été utilisé pour réaliser l'analyse quantitative. L'image (E) est une représentation 3D d'un sphéroïde hépatique montrant des organites intracellulaires (noyaux, mitochondries et vésicules) et un canalicule biliaire.

4.5.1. L'alignement des images

L'objectif de cette étape est d'obtenir une représentation 3D en positionnant précisément les images 2D dans un volume virtuel (Titze et Genoud, 2016). Pour les techniques ssTEM et AT, ceci consiste à corriger les rotations entre les images ainsi que les distorsions non linéaires comme les plis (Fiala, 2005). Les images SBF-SEM et FIB-SEM sont plus faciles à aligner étant donné que leurs distorsions sont négligeables. Leur alignement consiste à corriger les petits déplacements latéraux entre les images consécutives. Ces déplacements sont dus aux problèmes d'instabilité de l'acquisition qui sont liés, par exemple à des problèmes de charge (Boergens et Denk, 2013). Lorsque plusieurs tuiles sont acquises en SBF-SEM, une étape de raboutage latéral (*stitching*) est également nécessaire pour joindre les tuiles en une seule image (Wanner et al., 2015). La corrélation croisée (Guizar-Sicairos et al., 2008) et la méthode SIFT, pour *scale invariant feature transform*, (Lowe, 1999) sont les méthodes les plus utilisées pour l'alignement des images.

L'alignement par corrélation croisée consiste à calculer le pic de la fonction de corrélation croisée entre deux images consécutives et à déterminer la translation à appliquer pour déplacer la deuxième image à la position du pic qui correspond à la valeur maximale de similitude entre les deux images. L'alignement par la méthode SIFT repose sur la détection de points d'intérêt dans chaque image (*features*) et leur mise en correspondance avec celles de l'image précédente. Ce sont des zones circulaires repérées chacune par son centre (point-clé) et son rayon qui est proportionnel à son échelle caractéristique. Ces zones doivent présenter certaines propriétés pour être sélectionnées : elles doivent être répétables, distinctives et locales. La répétabilité décrit leur invariance aux différences géométriques et photométriques entre les images. Elles doivent être discriminantes, c'est-à-dire qu'elles représentent des éléments distincts sur les images. Elles sont également locales parce qu'elles décrivent des caractéristiques locales de leurs voisinages. Pour chaque zone, l'algorithme calcule un descripteur (*feature descriptor*) caractérisé par son invariance à la translation, à l'orientation et à l'échelle de l'image et par sa robustesse aux changements de luminosité et de perspective. Les descripteurs sont également discriminants : deux objets différents ont des descripteurs différents. Ensuite, l'algorithme procède à une mise en correspondance des zones d'intérêt détectées dans les images consécutives (*feature matching*) en comparant leurs descripteurs. Cet appariement permet de calculer une matrice de translation qui est appliquée à la pile d'images pour l'aligner.

Au cours de ma thèse, ces deux méthodes ont été appliquées pour aligner les images FIB-SEM grâce à l'utilisation des plugins MultiStackReg (Thevenaz et al., 1998) et Linear Stack Alignment with SIFT (Lowe, 2004) du logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012). Le premier applique la fonction de corrélation croisée et le deuxième met en œuvre la méthode SIFT.

4.5.2. Le prétraitement et le débruitage des images

L'objectif de cette étape optionnelle est d'améliorer la qualité des images, c'est-à-dire améliorer le contraste et réduire le bruit. Débruiter les images permet d'augmenter leur ratio signal sur bruit et de filtrer les informations qui ne sont pas nécessaires pour la segmentation. En effet, plus la qualité des images est bonne, plus l'étape de segmentation est rapide et efficace. Le bruit dans les images peut provenir de différentes sources (Timischl et al., 2012) et dépend de différents paramètres. Par exemple, il varie selon l'inverse de la racine carrée de la durée d'acquisition par pixel (Sim et al., 2004). L'enjeu de l'étape de débruitage est de choisir des paramètres de filtrage optimaux pour réduire le bruit des images sans créer trop de flou ni introduire d'artéfacts qui modifient la forme des structures étudiées.

Le regroupement des voxels (*binning*) et le filtre de diffusion anisotrope, intégrés dans Fiji, ont été utilisés pour prétraiter et débruiter les images FIB-SEM analysées dans le cadre de ma thèse. Le *binning* regroupe les voxels voisins en un seul voxel en moyennant leurs intensités. Le facteur dit de *binning* définit le nombre de voxels à regrouper. Par exemple, un *binning* par $2 \times 2 \times 2$ réduit la taille de la pile d'images par un facteur $2^3 = 8$ et un *binning* par $3 \times 3 \times 3$ réduit sa taille par un facteur $3^3 = 27$. Le *binning* augmente ainsi la taille de voxel et réduit la résolution des images, mais il permet aussi d'atténuer le bruit dans les images.

Le filtre de diffusion anisotrope permet de débruiter les régions de l'image qui présentent un contraste uniforme, tout en préservant les contours (Tschumperle et Deriche, 2005). Le choix de ce filtre, parmi d'autres filtres classiquement utilisés comme le filtre gaussien, est basé sur la nature des structures à segmenter (ex. noyaux, mitochondries, vésicules...) qui sont délimitées par des membranes. Afin de segmenter correctement ces structures, il est important de préserver leurs membranes. Lorsque l'effet de drapé est prononcé sur les images, il peut être corrigé en utilisant l'algorithme VSNR ou *variational stationary noise remover* (Fehrenbach et al., 2012).

Il est à noter que pour la segmentation des fenêtres des LSEC de foie de souris, les images n'ont pas été binnées pour ne pas perdre de résolution. Le processus d'analyse des images des LSEC est expliqué en détail dans le chapitre 3.

Pour faciliter l'étape de segmentation, le choix de la zone à segmenter est également important. Il faut prendre soin de choisir une zone avec un contraste homogène et avec peu d'artéfacts liés à la préparation de l'échantillon.

4.5.3. La segmentation des images

La segmentation est la partition de l'image en régions qui correspondent à des structures biologiques distinctes ou à des parties d'une même structure (Jain et al., 2010). Pour ce faire, une étiquette est définie par objet à segmenter et est attribuée à chaque pixel appartenant à l'objet en question. Cette étape permet de séparer les structures d'intérêt de leur voisinage pour les visualiser en 3D et pour extraire des informations quantitatives, par exemple sur leurs volumes, leurs surfaces, leurs diamètres, les distances qui les séparent, etc. (Boges et al., 2020). À la fin de la segmentation, un masque binaire valant 1 là où les voxels appartiennent à la structure segmentée et 0 ailleurs est généré. La segmentation est la tâche la plus longue et la plus complexe de tout le processus d'analyse d'images. Ceci est lié à la complexité des jeux de données générées en vEM qui nécessitent, dans la plupart des cas, une segmentation manuelle ou une correction manuelle des segmentations automatiques (Peddie et Collinson, 2014). Malgré les avancées significatives réalisées dans le domaine d'analyse de données générées en vEM, en particulier dans le domaine de la connectomique qui est l'étude des connexions neuronales (Dorkenwald et al., 2022 ; Helmstaedter et al., 2013 ; Chklovskii et al., 2010), il n'existe pas encore à ce jour une approche de segmentation fiable, facile à utiliser et applicable à tous les jeux de données. En fonction de la taille des images à segmenter, de la complexité des structures étudiées et des outils disponibles, une segmentation manuelle, semi-automatique ou entièrement automatique peut être appliquée.

La segmentation manuelle consiste à annoter la structure à segmenter sur chaque image de la pile. Cette méthode est très précise mais très laborieuse, ce qui la rend plus adaptée aux petits jeux de données. À titre d'illustration, Heinrich et al. ont rapporté que la segmentation manuelle de tous les organites d'une cellule entière prendrait jusqu'à soixante années de travail (Heinrich et al., 2021). Plusieurs logiciels comme IMOD (Kremer et al., 1996) et Avizo (Thermo Fischer Scientific) offrent des outils de segmentation manuelle.

Les méthodes semi-automatiques combinent l'utilisation des annotations de l'utilisateur et les prédictions d'un algorithme de segmentation pour étiqueter les voxels. À l'inverse de la segmentation manuelle, l'utilisateur n'annote pas tous les voxels de la structure à segmenter, mais introduit quelques annotations que l'algorithme utilise pour déduire l'étiquette des voxels non annotés. Les approches semi-automatiques peuvent être classées en trois catégories : des approches de segmentation par région, des approches de segmentation par contour et des approches hybrides dites par coopération régions-contours. Les méthodes de segmentation par région permettent de séparer une image en régions de pixels homogènes. Le critère d'homogénéité peut être l'intensité, la couleur ou la texture locale. La segmentation par seuillage et l'algorithme de segmentation par ligne de partage des eaux (*watershed*) font partie de cette catégorie d'approches. La segmentation par seuillage, par exemple, se base sur la sélection de pixels dont l'intensité est comprise entre deux limites de niveaux de gris choisies par l'utilisateur. Elle est adaptée à la segmentation des structures bien contrastées par rapport à leur voisinage (Arkill et al., 2014 ; Pinali et al., 2013). Comme leur nom l'indique, les méthodes de segmentation par contour visent à séparer les différentes structures d'une image en se basant sur la détection de leurs contours. Le contour est un ensemble de pixels caractérisés par un changement brutal d'intensité par rapport à leur voisinage. Les approches par coopération régions-contours, quant à elles, combinent les caractéristiques des deux autres approches de segmentation pour améliorer la précision du résultat. Ces outils de segmentation semi-automatique sont intégrés dans plusieurs logiciels libres comme IMOD (Kremer et al., 1996), MIB (Belevich et al., 2016) et 3D Slicer (Fedorov et al., 2012) et commerciaux comme Avizo (Thermo Fischer Scientific) et Imaris (Oxford Instruments).

Tsai et al. ont comparé la performance de quelques méthodes de segmentation manuelle et semi-automatique en les appliquant sur différents jeux de données générés en SBF-SEM, en FIB-SEM et en tomographie électronique. Sur la base des résultats de cette comparaison, les auteurs ont proposé des recommandations pour un choix approprié de la méthode de segmentation. Les critères influençant ce choix sont soit liés aux caractéristiques des données (contraste et netteté des images, complexité de la forme des structures, etc.), soit liés au niveau de précision de segmentation souhaité par l'utilisateur et aux ressources matérielles et logicielles qui lui sont disponibles (Tsai et al., 2014).

Les méthodes automatiques de segmentation, dites aussi méthodes « par apprentissage », sont basées sur l'apprentissage machine : elles utilisent des données d'apprentissage fournies par l'utilisateur sous forme de segmentations de référence (*ground-truth segmentations*) pour estimer les paramètres du modèle de segmentation. Ce modèle peut être entraîné pour générer soit une segmentation sémantique, c'est-à-dire une segmentation en classes de pixels, soit une segmentation par instance qui sépare les instances d'un même objet. En guise d'illustration, la segmentation du réseau mitochondrial par rapport au reste des organites d'une cellule est une segmentation sémantique, alors que la segmentation de chaque mitochondrie formant ce réseau est une segmentation par instance. Les modèles de segmentation automatique peuvent être classés en deux catégories : les modèles d'apprentissage des caractéristiques (*feature-based learning*) et les modèles d'apprentissage profond (*deep learning*).

Les méthodes d'apprentissage des caractéristiques utilisent un ensemble de caractéristiques, généralement extraites en appliquant des filtres aux images, comme entrée d'un algorithme de classification (classifieur). En se basant sur ces caractéristiques, le classifieur apprend à séparer les différentes classes de pixels (ex. mitochondries, noyau...). Ces méthodes d'apprentissage peuvent être entraînées interactivement à partir d'annotations de l'utilisateur. À titre d'exemples, nous pouvons citer les méthodes de segmentation *pixel classification* et *auto-context* du logiciel Ilastik (Berg et al., 2019) et le plugin Weka de Fiji (Arganda-Carreras et al., 2017). Les méthodes d'apprentissage profond apprennent à la fois à extraire les caractéristiques des images et à établir une décision de segmentation à partir de ces caractéristiques. Elles sont basées sur l'utilisation de réseaux de neurones dont le plus populaire dans le domaine de la segmentation d'images générées en vEM est U-Net (Ronneberger et al., 2015). Ces méthodes sont plus performantes que les méthodes d'apprentissage des caractéristiques en termes de résolution de problèmes de segmentation plus difficiles, mais au prix d'une étape d'apprentissage plus longue sur de plus grands volumes de données segmentées manuellement ou avec des méthodes semi-automatiques. Elles nécessitent également plus de compétences en programmation et plus de ressources informatiques pour les mettre en œuvre. Les méthodes d'apprentissage profond ont été initialement développées pour la segmentation des neurones et des synapses (Kasthuri et al., 2015 ; Motta et al., 2019) et actuellement, leurs applications pour la segmentation d'autres cellules et tissus sont en plein essor (Heinrich et al., 2021 ; Machireddy et al., 2021 ; Parlakgöl et al., 2022). Pour une description plus détaillée des concepts de l'apprentissage profond et de ses applications en analyse d'images biologiques, le lecteur intéressé peut se référer à la revue de Hallou et al. (Hallou et al., 2021).

Au cours de ma thèse, j'ai principalement utilisé le logiciel Ilastik pour segmenter des sphéroïdes hépatiques traités avec des NP-Ag et des LSEC de foie de souris. Dans les paragraphes suivants, ce logiciel ainsi que ses méthodes de segmentation utilisées pendant ma thèse sont présentés.

4.5.4. Le logiciel Ilastik

Ilastik est un logiciel libre et simple d'utilisation qui offre différentes méthodes (*workflows*) de segmentation automatique et semi-automatique (Berg et al., 2019). Son interface graphique interactive permet d'introduire des annotations initiales, de vérifier les prédictions de l'algorithme de segmentation en temps réel et d'introduire de nouvelles annotations dans les régions où la prédiction est fautive. C'est pour cela que les annotations sont dites ciblées (*targeted annotations*). L'utilisateur peut ajouter ces annotations sur les images des trois plans, xy, yz et xz, qui sont affichées simultanément sur l'interface d'Ilastik, ce qui facilite le suivi des structures complexes liées en réseau (comme les mitochondries) et la segmentation des structures difficiles à séparer à partir d'images d'un seul plan. En prenant en compte les corrections de l'utilisateur, l'algorithme propose une autre segmentation qui est à son tour vérifiée et corrigée, et ce, jusqu'à satisfaction avec le résultat final ou convergence de l'algorithme. À la fin de la segmentation, le masque binaire et/ou le maillage 3D correspondant sont exportés. En outre, Ilastik présente un bon compromis entre la simplicité, la rapidité d'apprentissage et la gestion optimisée de jeux de données relativement

grands par rapport à d'autres logiciels de segmentation comme 3D slicer (Fedorov et al., 2012). Il permet également de traiter des données ayant jusqu'à cinq dimensions (les trois dimensions spatiales, le temps et les canaux de couleur). Les méthodes de segmentation *carving* et *pixel classification* (ou méthode de segmentation par classification de pixels) d'Ilastik ont été utilisées pour segmenter les différentes structures étudiées pendant ma thèse.

4.5.4.1. La méthode de segmentation *carving*

La méthode de segmentation *carving* est une méthode semi-automatique qui se base sur la détection des contours pour séparer les structures dans une image. Elle se compose de plusieurs étapes représentées sur la **Figure 10** dans le cas de segmentation des mitochondries d'hépatocytes cultivés sous forme de sphéroïde.

La première étape, l'étape de prétraitement, consiste à appliquer un filtre qui calcule le gradient d'intensité des voxels pour détecter les contours des objets représentés sur les images (**Figure 10B**). Si les contours ainsi calculés ne correspondent pas aux membranes des structures à segmenter, l'utilisateur peut changer le degré de lissage du filtre (*sigma*) jusqu'à satisfaction avec la carte des contours générée par Ilastik. Ensuite, les voxels voisins sont groupés dans des supervoxels en utilisant l'algorithme de *watershed* (**Figure 10C**). Le principe de cet algorithme est de partitionner une image en régions selon une approche topographique : l'image est assimilée à un relief topographique dont l'altitude de chaque point est donnée par l'intensité du pixel correspondant. Les pixels de forte intensité correspondent à des sommets et à des lignes de crêtes, tandis que les pixels de faible intensité correspondent aux fonds de vallées et aux bassins du relief. Lorsqu'il y a une montée des eaux, les bassins se propagent, c'est-à-dire augmentent en taille et gagnent de l'altitude. Une ligne de partage des eaux apparaît lorsque deux bassins se rejoignent au niveau d'un sommet. Pour éviter de mélanger les eaux des deux bassins, une digue est construite à cet endroit. Cette séparation des bassins se poursuit jusqu'à ce que la montée des eaux se termine. Dans le cadre de l'algorithme de *watershed*, les régions à séparer correspondent aux bassins et les frontières entre ces régions correspondent aux lignes de partage des eaux.

Dans le cas de la méthode *carving*, l'algorithme de *watershed* est appliqué sur la carte des contours : les voxels d'intensité de gradient élevée sont considérés comme des crêtes et les voxels de faible intensité de gradient sont considérés comme des vallées. L'algorithme vise à chercher le bassin versant (le supervoxel dans ce cas) correspondant à chaque vallée ou autrement dit, à chercher les lignes de partage des eaux entre les bassins. Pour ce faire, il associe à chaque voxel d'intensité de gradient minimale (minimum local) un nouveau supervoxel. À partir de chacun de ces voxels, la propagation des supervoxels est réalisée en ajoutant successivement des voxels voisins jusqu'à détection d'une ligne de partage des eaux (frontière entre deux supervoxels). Pour une segmentation correcte, les bords des supervoxels doivent correspondre aux membranes des structures à segmenter. Dans le cas contraire, le paramètre *superpixel regularity* qui détermine l'homogénéité de la taille des supervoxels peut être changé. C'est surtout important pour bien segmenter les structures fines. Ce paramètre a une valeur entre 0 et 1 : une valeur proche de 0 correspond à des supervoxels très hétérogènes en taille et une valeur proche de 1 correspond à des supervoxels

homogènes en taille. Les supervoxels générés sont par la suite regroupés dans un graphe dit d'adjacence de régions dans lequel chaque paire de supervoxels voisins est reliée par une arête pondérée par un poids. Ce poids dépend de la netteté de frontière entre les deux supervoxels : plus la frontière est nette sur la carte des contours, plus la valeur du poids est élevée. Dans l'étape suivante, l'utilisateur fournit des annotations pour marquer la structure à segmenter et l'arrière-plan (**Figure 10D**). En effet, la méthode *carving* permet la segmentation des objets un par un. Un second algorithme de *watershed (seeded watershed)* est ensuite appliqué aux supervoxels. Il utilise les annotations de l'utilisateur comme points d'initialisation (ou germes) des régions appartenant à la structure à segmenter, d'une part et de celles faisant partie de l'arrière-plan, d'autre part. La propagation des régions se fait selon les poids du graphe des supervoxels et l'algorithme propose une segmentation de la structure en question (**Figure 10E**). Cette segmentation peut être corrigée interactivement en ajoutant de nouvelles annotations. Enfin, le masque binaire ainsi que le maillage 3D (**Figure 10F**) sont générés et peuvent être exportés.

Le lecteur intéressé par une description plus formelle de l'algorithme de *carving* peut se référer à l'article de Straehle et al. (Straehle et al., 2012).

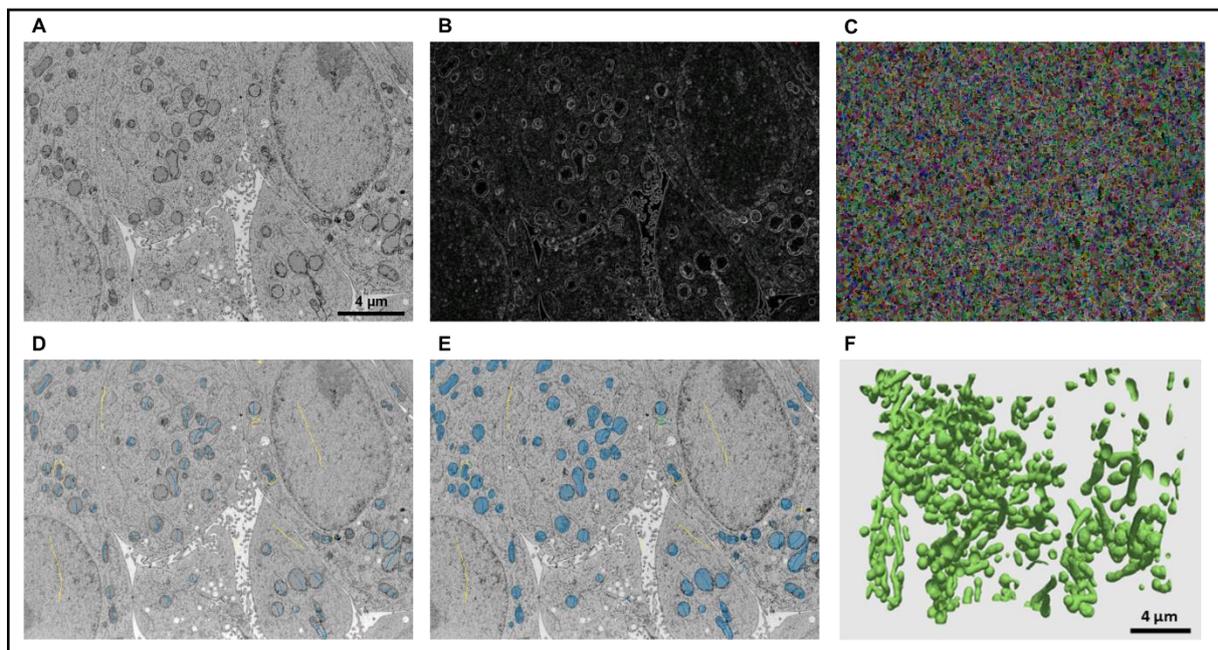


Figure 10 : Méthode de segmentation carving d'Ilastik. Exemple de segmentation de mitochondries d'hépatocytes cultivés sous forme de sphéroïde. (A) Micrographie extraite de la pile d'images FIB-SEM utilisée pour la segmentation. (B) Carte des contours générée dans l'étape de prétraitement. (C) Carte des supervoxels. (D) Annotations fournies par l'utilisateur pour marquer les mitochondries (bleu) et l'arrière-plan (jaune). (E) Segmentation des mitochondries. (F) Maillage 3D des mitochondries généré à partir du masque binaire exporté d'Ilastik.

4.5.4.2. La méthode de segmentation *pixel classification*

La méthode de segmentation *pixel classification* (ou segmentation par classification de pixels) est une méthode automatique qui repose sur l'apprentissage de caractéristiques locales des

voxels pour fournir une segmentation sémantique en classes définies par l'utilisateur. Les étapes de cette méthode sont représentées sur la **Figure 11** dans le cas de segmentation de LSEC de foie de souris.

La première étape de cette méthode est l'extraction de caractéristiques qui décrivent la couleur, l'intensité, la netteté des contours et la texture d'un voisinage local autour de chaque voxel. Pour cela, les images initiales sont d'abord filtrées avec un filtrage gaussien (**Figure 11B**) avant d'appliquer d'autres types de filtres comme des filtres de gradient et de texture. Le degré de lissage (*sigma*) de chaque filtre correspond à l'échelle de la caractéristique qu'il permet d'extraire : plus le degré est élevé, plus le voisinage des pixels pris en compte dans le calcul de cette caractéristique est large (Haubold et al., 2016). L'utilisateur peut choisir les types ainsi que les échelles des caractéristiques à extraire. Ensuite, après sélection des caractéristiques, l'utilisateur définit les classes à séparer en introduisant des annotations pour chaque classe (**Figure 11C**). En se basant sur les caractéristiques calculées pour chaque voxel et sur les annotations de l'utilisateur, le classifieur d'Ilastik propose des prédictions de classes pour les voxels qui ne sont pas initialement annotés (**Figure 11D**). Ces prédictions peuvent être corrigées en ajoutant des annotations et en réentraînant le classifieur. À la fin de la segmentation, le masque binaire est exporté et peut être corrigé manuellement avec un autre logiciel en cas d'erreurs de segmentation (**Figures 11E-G**).

Plus formellement, la méthode *pixel classification* utilise un classifieur de type forêt aléatoire ou *random forest* (Sommer et al., 2011). C'est un modèle dit ensembliste puisqu'il regroupe plusieurs classifieurs de type arbre de décision (100 dans le cas de la méthode *pixel classification*). Comme son nom l'indique, un arbre de décision prend des décisions pour classer des objets en se basant sur des variables. Ceci se fait en répondant à une série de questions-tests dont les réponses (oui ou non) mènent à la décision finale. Dans le cas de la méthode *pixel classification*, les variables sont les caractéristiques locales des voxels et la décision finale est l'attribution de classe qui est réalisée voxel par voxel. Chaque arbre est représenté par des branches, des nœuds et des feuilles. Les questions posées tout au long du processus de classification sont relatives aux caractéristiques des voxels et sont représentées par les nœuds. Un exemple de question peut être : est-ce que l'intensité du voxel est supérieure à un certain seuil ? Les réponses à chaque question ou, en d'autres termes les décisions binaires, sont représentées par les deux branches créées à partir de chaque nœud et liées aux nœuds descendants qui correspondent à d'autres tests binaires. En fonction de la réponse, une branche est choisie et le processus se poursuit jusqu'à arriver sur une feuille (extrémité de l'arbre) qui contient la classe à laquelle appartient le voxel en question : la décision est ainsi prise (Haubold et al., 2016). Les classes sont attribuées aux feuilles durant l'étape d'apprentissage en fonction des caractéristiques des voxels annotés par l'utilisateur. Pour assurer des décisions de classification plus fiables et plus robustes, le modèle de forêt aléatoire combine les résultats de plusieurs arbres de décisions. L'ensemble des données d'apprentissage, c'est-à-dire les voxels annotés par l'utilisateur, est découpé aléatoirement en plusieurs sous-ensembles et chaque arbre est entraîné sur un sous-ensemble. Pour un voxel non initialement annoté, chaque arbre propose une prédiction de classe ou « vote » pour une classe à attribuer à ce voxel. Les résultats de tous les arbres sont ensuite combinés et moyennés pour estimer la probabilité d'appartenance du voxel à une classe donnée. C'est

le principe de « mise en commun » ou du *bagging* sur lequel est basé le classifieur de type forêt aléatoire.

Les cartes de probabilités (*probability maps*) d'appartenance aux différentes classes peuvent être exportées sous forme de données multicanaux où chaque canal correspond à une classe donnée et contient pour chaque voxel la probabilité de son appartenance à cette classe. Les masques binaires de segmentation correspondant à chaque classe (*simple segmentation*) sont calculés en attribuant à chaque voxel la classe la plus probable parmi toutes les classes segmentées. Ces masques peuvent être également exportés.

Une fois entraîné interactivement sur les images en entrée, le classifieur peut être utilisé pour segmenter de nouvelles images grâce au mode « traitement par lots » ou *batch processing*. C'est la notion de généralisation qui est la capacité du classifieur à faire des prédictions sur des données non utilisées pour son apprentissage. Pour une meilleure généralisation des prédictions, les images utilisées pour l'apprentissage du classifieur doivent être représentatives de la variabilité de l'ensemble des images à segmenter. Pour les images FIB-SEM, des sous-volumes extraits de différentes régions de la pile d'images initiales sont utilisés pour l'apprentissage du classifieur et les résultats de segmentation sont ensuite généralisés à toute la pile d'images. La généralisation des prédictions avec Ilastik est faite par blocs (*blockwise*), c'est-à-dire que l'algorithme divise le volume 3D représentant la pile d'images à segmenter en plusieurs sous-volumes et propose pour chaque sous-volume des prédictions de classes. Ceci permet de traiter de grands volumes de données qui peuvent même dépasser la capacité de stockage de la mémoire RAM de la station de travail.

Ici, j'ai décrit le principe de segmentation de la méthode *pixel classification* d'Ilastik. Pour avoir plus de détails sur les algorithmes d'arbre de décision et de forêt aléatoire, le lecteur intéressé peut se référer aux articles de Geurts et al. (Geurts et al., 2009) et de Criminisi (Criminisi, 2011), respectivement.

En ce qui concerne les échantillons étudiés pendant ma thèse, j'ai utilisé la méthode *carving* pour la segmentation des sphéroïdes hépatiques traités avec des NP-Ag puisque toutes les structures d'intérêt sont délimitées par des membranes bien contrastées. Les résultats sur le devenir des NP-Ag dans les sphéroïdes hépatiques étudiés sont détaillés dans le chapitre 2. Pour la segmentation des LSEC de foie de souris, une procédure de segmentation combinant les deux méthodes d'Ilastik déjà présentées, à savoir *carving* et *pixel classification*, a été mise au point. Cette approche est détaillée dans le chapitre 3.

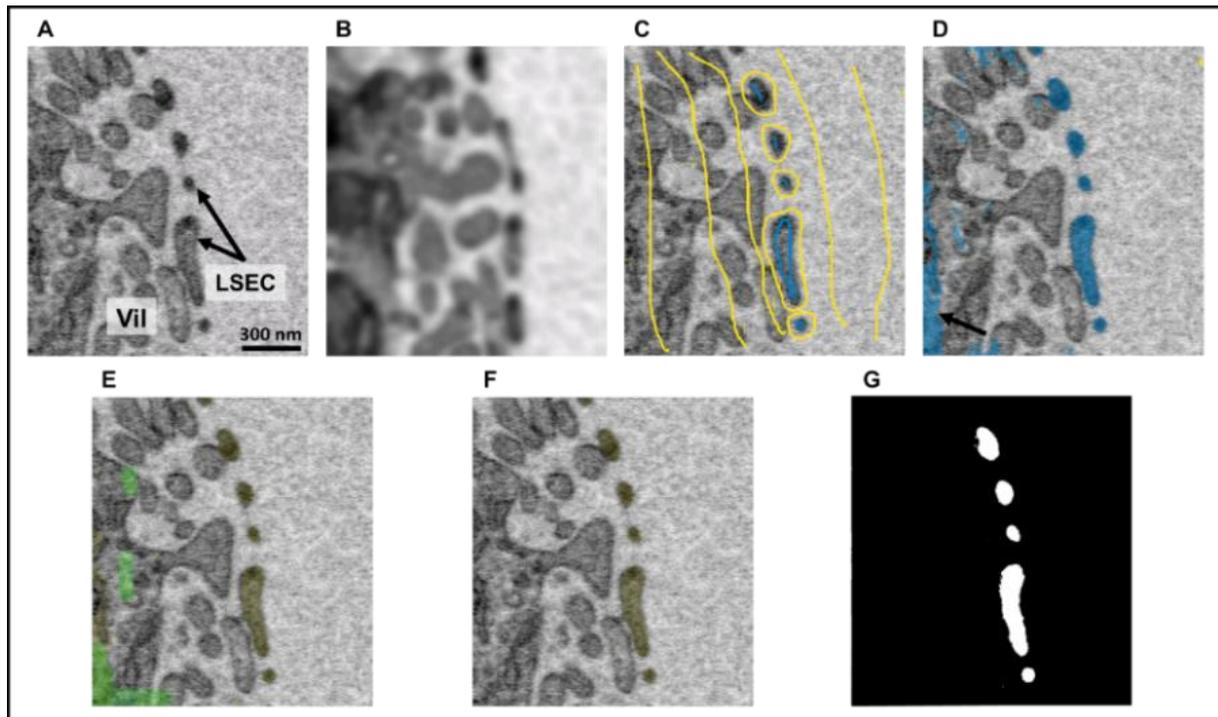


Figure 11 : Méthode de segmentation pixel classification d'Ilastik. Exemple de segmentation de LSEC de foie de souris. (A) Micrographie extraite de la pile d'images FIB-SEM utilisée pour la segmentation. (B) Résultat de filtrage gaussien avec un $\sigma = 5$. (C) Annotations fournies par l'utilisateur pour marquer les LSEC (bleu) et le reste des structures (jaune). (D) Segmentation des LSEC proposée par Ilastik. La flèche montre des erreurs de segmentation. (E) Correction manuelle (vert), avec le logiciel MIB, du masque binaire exporté d'Ilastik (jaune). (F) Segmentation des LSEC après correction. (G) Masque binaire corrigé.

4.5.5. Génération des maillages 3D

Le masque binaire généré à la fin de l'étape de segmentation peut contenir des erreurs de segmentation qui sont corrigées manuellement ou en appliquant des opérations de post-traitement sur le masque binaire. Le masque binaire corrigé est ensuite utilisé pour générer le maillage 3D (*mesh*) de la structure segmentée. En général, les algorithmes de génération du maillage permettent de déduire la représentation 3D d'un objet segmenté à partir de ses contours. Le maillage 3D est un ensemble de sommets (*vertices*), d'arêtes (*edges*) et de surfaces (*faces*). Une arête relie deux points et une surface est une séquence fermée de trois arêtes si elle est triangulaire ou de quatre arêtes si elle est quadrilatérale. Un point est partagé par au moins deux arêtes et une arête est partagée par au plus deux surfaces.

Les maillages 3D peuvent présenter des défauts géométriques qu'il est nécessaire de corriger surtout lorsque les maillages 3D sont utilisés pour extraire des informations quantitatives (Boges et al., 2020). Les défauts géométriques dépendent de la qualité de segmentation et de l'algorithme utilisé pour la génération du maillage. Cette étape de post-traitement comprend la suppression des parties isolées, la simplification du maillage, son lissage et la correction des géométries dites non solides (*non-manifold*). Les parties isolées du maillage sont généralement liées à des erreurs de segmentation difficiles à corriger. La simplification du maillage permet de réduire le nombre de ses surfaces, et donc de réduire sa taille, tout en préservant le degré de précision géométrique souhaitée. Ceci facilite la

manipulation du maillage avec les logiciels de visualisation 3D. Le lissage du maillage permet, quant à lui, de retirer les petites aspérités en surface. Les géométries non solides regroupent différents types de défauts tels que des formes avec une arête partagée par trois surfaces au lieu de deux ou des formes avec deux surfaces connectées à un sommet et pas à une arête. Pour simplifier et lisser les maillages 3D, le logiciel MeshLab (Cignoni et al., 2008) peut être utilisé.

4.5.6. Rendu volumique des maillages 3D

La dernière étape de l'analyse d'images obtenues en vEM est le rendu volumique des structures segmentées. Ceci permet d'appréhender leur organisation spatiale tridimensionnelle et leurs éventuels contacts. Des vidéos montrant les différents maillages 3D peuvent également être réalisées en ajoutant des effets de mouvement, de transparence et des zooms. Les logiciels Dragonfly (*Object Research Systems*, ORS) et Paraview (Ahrens et al., 2005) peuvent être utilisés pour les rendus volumiques des maillages 3D.

5. Objectifs de la thèse

Dans le contexte bibliographique que je viens de présenter, les travaux de ma thèse se sont articulés autour de deux objectifs.

Mon premier objectif a été de comprendre les transformations de NP-Ag dans le foie. Les modèles de culture cellulaire en 2D ne retranscrivent pas *in vitro* la fonction d'excrétion hépatique et les modèles *in vivo* fournissent une vision générale sur le devenir et l'excrétion des NP-Ag à l'échelle de l'organisme sans permettre l'identification des mécanismes cellulaires précis. Nous avons donc utilisé dans notre étude un modèle de culture 3D d'hépatocytes, sous forme de sphéroïde qui mime le tissu hépatique. En effet, le modèle de sphéroïde développé par notre équipe permet la polarisation des hépatocytes qui forment des canalicules biliaires fonctionnels, permettant l'excrétion de composés organiques et inorganiques (Sharma et al., 2020). Nous avons exposé ces sphéroïdes hépatiques à un sel d'Ag et à des NP-Ag afin de mimer les principales voies d'exposition humaine aux NP-Ag, orale et parentérale. Nous avons étudié la distribution et les transformations chimiques des espèces d'Ag dans les hépatocytes, jusqu'à leur excrétion du foie ainsi que leurs effets sur l'ultrastructure cellulaire. Pour cela, nous avons combiné plusieurs techniques de pointe comme l'imagerie FIB-SEM pour visualiser les différents compartiments cellulaires en 3D, l'imagerie élémentaire et l'analyse de spéciation, réalisées au synchrotron, pour étudier la distribution des espèces d'Ag à une échelle subcellulaire et la spéciation de l'Ag dans les différentes conditions testées. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de visualiser l'ultrastructure 3D des fenêtrures des LSEC dans un état aussi proche que possible de leur état natif dans le tissu hépatique. Les fenêtrures des LSEC permettent les échanges entre le sang sinusoidal et le sang qui baigne l'espace de Disse et elles jouent donc un rôle très important dans les échanges sang-hépatocytes et, indirectement, dans le rôle physiologique des hépatocytes. Les études sur les LSEC sont majoritairement des études réalisées en 2D qui ne permettent pas de comprendre

l'architecture 3D *in vivo* de ces cellules. Nous avons donc utilisé la technique FIB-SEM pour imager des blocs de foie de souris et j'ai développé une approche de segmentation originale qui permet de reconstruire en 3D les fenêtrés des LSEC à une résolution nanométrique. Mon approche devrait permettre, dans le futur, de réaliser une étude quantitative sur les fenêtrés en termes de nombre et de diamètre et en termes de porosité des LSEC. Cette étude pourrait être transposée à des conditions pathologiques et pourrait aider à modéliser les échanges entre le sang et les hépatocytes. Les résultats de l'étude ultrastructurale réalisée pendant ma thèse sont décrits dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

Chapitre 2 : Étude du devenir des NP-Ag jusqu'à leur excrétion dans un modèle de sphéroïde d'hépatocytes

Contexte

Les transformations des NP-Ag avant leur entrée dans la cellule ainsi que leurs transformations intracellulaires ont été largement décrites dans la littérature. Cependant, tout n'est pas totalement élucidé, en particulier les mécanismes impliqués dans l'excrétion des espèces d'Ag à l'extérieur de l'organisme.

En utilisant des techniques synchrotron (tomographie aux rayons X et XAS) et l'imagerie TEM, Wang et al. ont étudié, après exposition de monocytes (lignée THP-1) à des NP-Ag et endocytose de ces NP, la spéciation de l'Ag à l'échelle de la cellule unique (Wang et al., 2015). Les auteurs ont rapporté une accumulation d'Ag dans les cellules pendant l'exposition aux NP-Ag puis un relargage d'Ag lorsque les cellules ne sont plus exposées. L'analyse des culots cellulaires par XAS a montré que les NP-Ag sont progressivement transformés en espèces oxydées Ag_2O puis en composés organothiolés AgSR. Les espèces oxydées seraient des espèces intermédiaires formées au cours de la dissolution lysosomale des NP-Ag. Les observations de coupes cellulaires en TEM ont suggéré la présence de NP à l'extérieur des cellules dans des structures vésiculaires qui seraient, selon les auteurs, excrétées par les monocytes. Ceci a également été visualisé en imagerie 3D par tomographie aux rayons X. Cependant, cette imagerie 3D a une résolution limitée par rapport à l'imagerie FIB-SEM, et l'excrétion de telles vésicules n'est pas décrite ailleurs dans la littérature et est donc sujette à controverse.

De plus, la plupart des études cellulaires sont réalisées sur des cultures 2D qui ne sont pas les systèmes optimaux pour étudier l'excrétion des NP-Ag. En effet, dans ce cas, l'excrétion se produit directement dans le milieu de culture cellulaire *via* les membranes plasmiques, ce qui correspond à une surface d'échange importante, alors qu'*in vivo*, ces processus sont réalisés au niveau de structures biologiques bien définies, en particulier dans le cas des hépatocytes. À l'échelle de l'organisme, une étude *in vivo* a rapporté la possibilité d'excrétion biliaire de l'Ag (voir sous-section 3.4.2 du chapitre 1), mais les données sur les détails cellulaires et moléculaires qui conduisent à cette excrétion sont manquantes. Il en découle la nécessité d'utiliser des modèles hépatiques pertinents, à savoir des modèles 3D qui miment les fonctions d'excrétion biliaire, afin d'analyser à l'échelle cellulaire les espèces d'Ag transportées et excrétées par les hépatocytes.

Les travaux précédents de notre équipe ont étudié la distribution et les transformations intracellulaires des NP-Ag dans des hépatocytes HepG2 cultivés en 2D en utilisant l'imagerie élémentaire par XRF, la microscopie électronique TEM, l'analyse chimique par EDX et la spectroscopie XAS. La combinaison de ces techniques a permis de montrer qu'après endocytose, les NP-Ag sont dissoutes dans des endolysosomes et libèrent des ions $Ag(I)$ qui sont transportés vers le cytosol. Ces ions sont alors complexés par des biomolécules thiolées,

principalement le GSH et les Met, pour former des complexes AgS_2 et AgS_3 (Tardillo Suárez et al., 2020 ; Veronesi et al., 2016). De plus, le couplage entre l'imagerie XRF et la microscopie électronique a permis de mettre en évidence la présence de composés organothiolés dans les mitochondries (Tardillo Suárez et al., 2021) et également dans le noyau, avec une accumulation dans les nucléoles. Ces travaux ont aussi montré que l'exposition des hépatocytes aux NP-Ag conduit à une inhibition de certains facteurs de transcription à doigts de zinc (Tardillo Suárez et al., 2020).

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du devenir des NP-Ag dans le foie, l'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre a été d'étudier les transformations de ces NP jusqu'à leur excrétion dans un modèle hépatique plus pertinent pour s'approcher de ce qui se passe *in vivo*. En effet, nous avons travaillé avec un modèle 3D de sphéroïde d'hépatocytes qui présentent des canalicules biliaires fonctionnels (Sharma et al., 2020). Les canalicules biliaires ont pu être identifiés en immunofluorescence par la présence d'un de leurs transporteurs spécifiques, MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*), ainsi que par la présence d'un anneau d'actine entourant chaque canalicule. L'excrétion de composés fluorescents tels que le sel biliaire fluorescent CLF et le dérivé de fluorescéine CMFDA (*5-Chloromethylfluorescein diacetate*) dans les canalicules biliaires *via* les transporteurs BSEP (*bile salt export pump*) et les transporteurs MRP2 et BSEP, respectivement, a été mise en évidence. Ceci valide que les canalicules sont bien fonctionnels. Notre modèle de sphéroïde d'hépatocytes s'est également révélé pertinent pour suivre, dans le cas de l'exposition à un excès de Cu dans le milieu de culture cellulaire, la migration de la protéine ATP7B de l'appareil de Golgi vers les canalicules biliaires, et donc potentiellement l'excrétion du Cu.

En appliquant les approches d'imagerie développées précédemment par l'équipe pour des cultures 2D, nous avons analysé les transformations chimiques des NP-Ag et du sel d'Ag $AgNO_3$ jusqu'à leur excrétion dans les canalicules biliaires dans ce modèle de sphéroïde. Nous avons travaillé selon des scénarios d'exposition qui miment les deux voies majeures d'exposition humaine aux NP-Ag, orale et parentérale, en exposant les sphéroïdes, respectivement, à un sel d'Ag et à des NP-Ag. En effet, dans le cas d'une exposition orale aux NP-Ag, les espèces $Ag(I)$ sont les espèces d'Ag retrouvées dans la circulation sanguine. Ainsi, une exposition cellulaire au sel d'Ag permet de mimer l'exposition orale aux NP-Ag. Pour mimer l'exposition par voie parentérale, des NP-Ag pristines sont ajoutées au milieu de culture cellulaire (voir section 3.4 du chapitre 1). En outre, l'utilisation de la technique FIB-SEM a permis de visualiser les différents compartiments cellulaires en 3D, d'identifier la localisation subcellulaire des particules et d'analyser les effets des NP-Ag sur l'ultrastructure des hépatocytes.

Dans ce travail d'équipe, présenté dans l'article « *Deciphering silver nanoparticle fate in liver up to biliary excretion using HepG2/C3A spheroids in scenarios mimicking different exposure pathways* » qui est publié dans la revue *Environmental Science: Nano*, ma contribution a consisté à analyser et segmenter les images FIB-SEM et à réaliser l'étude quantitative de la sphéricité des mitochondries. À la fin de ce chapitre, je vais présenter quelques perspectives de ce travail.



Cite this: *Environ. Sci.: Nano*, 2023, 10, 1842

Deciphering silver nanoparticle fate in liver up to biliary excretion using HepG2/C3A spheroids in scenarios mimicking different exposure pathways†

Yousr Rekik,^{‡,ab} Vanessa Tardillo Suárez,^{‡,c} Vikas Raj Sharma,^{ab} Mireille Chevallet,^a Benoit Gallet,^d Denis Falconet,^{id e} Peggy Charbonnier,^a Isabelle Kieffer,^{id f} Rémi Tucoulou,^c Pierre-Henri Jouneau,^{*b} Giulia Veronesi,^{id *ac} and Aurélien Deniaud,^{id *a}

Silver nanoparticles (AgNP) are heavily used in consumer products and medical devices, including face masks to fight against COVID-19. AgNP effects on mammals have been studied both using cellular and animal models. The former elucidate molecular mechanisms occurring at the subcellular level, while the latter bring insight into the toxicity and accumulation at the organ level. It has not yet been possible to reconcile these two kinds of studies in a translational approach. In the current study, we use 3D HepG2/C3A hepatocyte cultures that partially reproduce liver architecture, leading to the formation of active bile canaliculi and exposure scenarios mimicking parenteral or oral exposure to AgNP. By using a combination of cutting edge imaging techniques, atomic spectroscopy, and cell biology, we reveal the formation of Ag sulphide or Ag–organothiol complexes in the different conditions, the storage of excess Ag into vacuoles, the excretion of Ag(I) ions into bile canaliculi through the ATP7B Cu transporter, and modifications of the mitochondrial network. These findings, made possible by the use of a pseudo-organ as a model, reveal exposure-dependent mechanisms that can inspire future studies on nanomaterial metabolism in mammals and risk-assessment, and thereof regulations. Moreover, they can help bridge the gap between cellular and animal studies, bringing significant advances into the understanding of AgNP fate in mammals.

Received 23rd March 2023,
Accepted 19th May 2023

DOI: 10.1039/d3en00177f

rs.li/es-nano

Environmental significance

Silver nanoparticles (AgNP) are massively used in consumer products and medical devices for their biocidal activity, which is due to the release of Ag(I) species. Moreover, AgNP can be transformed into various Ag species in biological and environmental conditions leading to increased exposure to these species and thereof to toxicological and ecotoxicological issues. In human, the main exposure routes are oral and parenteral and silver accumulates in the liver. In this study, the use of innovative 3D hepatic model in conditions mimicking oral and parenteral exposure to AgNP enabled to decipher the fate of Ag species up to their excretion. Three-dimensional cellular models thus offer the opportunity to mind the gap between cell cultures and animal models.

Introduction

The use of nanotechnologies has been exponentially growing since the nineties, as their incorporation within many materials can offer innovative properties. Among the most frequently found nanomaterials, silver nanoparticles (AgNP) are used for their biocidal activity, which is due to the long-lasting release of the Ag(I) ions produced by oxidation of surface Ag(0) atoms in aerobic conditions.¹ Due to their biocidal activity, AgNP are incorporated in various consumer products, including face masks to protect against COVID-19, and in medical devices, to prevent nosocomial infections. Therefore, humans are exposed to Ag species through two major routes: oral and parenteral. It has been estimated that

^a Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IRIG, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, F-38000 Grenoble, France. E-mail: giulia.veronesi@cea.fr, aurelien.deniaud@cea.fr

^b Univ. Grenoble Alpes, CEA, IRIG, MEM, F-38000 Grenoble, France. E-mail: pierre-henri.jouneau@cea.fr

^c ESRF, The European Synchrotron, 71 Avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

^d Univ. Grenoble Alpes CEA, CNRS, Institut de Biologie Structurale, 71 Avenue des Martyrs, F-38042 Grenoble, France

^e Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG-LPCV, Grenoble, France. E-mail: denis.falconet@gmail.com

^f BM30 FAME beamline, ESRF, Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble, Grenoble, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3en00177f>

‡ These authors contributed equally.



we ingest between 1 and 80 μg of Ag every day,² whereas little data are available on the human exposure through the parenteral route. Nonetheless, a micromolar concentration of Ag has been measured in the blood of burned patients treated with the Acticoat™ dressings,³ and a recent study described the accumulation of Ag in the liver of patients under long-term hospitalization.⁴ Data from *in vitro* studies showed that AgNP are heavily transformed in the gastrointestinal tract, leading to the translocation of soluble Ag(i) complexes as silver thiolate, or of the AgCl salt, and not of pristine AgNP particles to the blood.^{5,6} Therefore, the bioavailable species are Ag(i) and AgNP upon oral and parenteral exposure, respectively. This leads to exposure route-dependent metabolism kinetics, as observed in rodents, upon oral exposure, the level in the blood is ten times lower, and in the liver it is 100 to 1000 times lower than upon parenteral exposure.⁷ Similarly, the clearance rate is much faster in the former exposure scenario than in the latter, 24 h vs. more than 4 days.⁷ These data are consistent with the presence of different Ag species in the bloodstream: Ag(0) of pristine AgNP and Ag(i) complexes or particles originating from their transformation, in the parenteral and oral exposure route, respectively. This putatively results in different metabolism mechanisms, hence of toxicity thresholds, in the different exposure conditions. For Ag(i) ions, it has already been shown that they can be transported by copper transporters such as Ctr1 and ATP7B,^{8,9} and excess Cu(i) is known to be excreted *via* biliary pathway.¹⁰ Therefore, unravelling the fate of AgNP in the liver and the excretion mechanisms in these different exposure conditions is of capital importance to evaluate the toxicity of AgNP and define a regulatory framework for their safe use. Nonetheless, the details of AgNP transformations in an animal model are elusive, which originates a gap with conventional cellular studies that offer the possibility to follow particles and their by-products using different types of microscopies. This work aims to fill this gap by applying subcellular imaging and atomic spectroscopy to a physiologically relevant cellular model, in order to disclose physico-chemical transformations that are likely to occur *in vivo*.

In biological media, the surface of nanoparticles gets decorated with proteins and biomolecules that form the so called corona, which defines the biological identity of the nanoparticles, influencing their cellular uptake.¹¹ The relationship between the protein corona forming around PVP- and citrate-coated AgNP and their interactions with different cell types has been recently reviewed.¹² Following endocytosis, AgNP are transformed within endolysosomes and release Ag(i) ions that form complexes mainly with organothiol molecules.^{13–17} State of the art X-ray fluorescence nano-imaging (XRF) coupled with electron microscopy (EM), allowed us to visualize the translocation of Ag(i) complexes to the nucleus and mitochondria of hepatocytes exposed to AgNP.^{18,19}

As of today, it is clear that advanced imaging methods enable to nail down the fate of AgNP in 2D cell cultures.

However, considering that 2D cell cultures do not reproduce the physiology of the corresponding organ, it is highly desirable to implement these methodologies in biological models closer to *in vivo*. For this purpose, we focused this study on 3D hepatic cultures exposed to different Ag species. The kinetics of AgNP and Ag(i) ion uptake and excretion in this model reproduces the trends observed *in vivo*, proving that the 3D hepatic culture mimics the liver. The combined use of elemental imaging, 3D electron microscopy and speciation analysis showed the partial transformation of AgNP and/or organothiol-Ag(i) complexes into inorganic Ag₂S particles, most probably within vacuoles. The excretion of Ag(i) complexes into bile canaliculi was also observed. Moreover, 3D electron microscopy enabled to visualize alterations of the mitochondrial network upon exposure to different types of Ag species. Altogether, by making use of an advanced *in vitro* model, this work provides insights into the fate of Ag species and the consequent biological effects in the liver of mammals exposed to AgNP *via* the oral or parenteral pathway.

Methods

Spheroid preparation and exposure conditions

The cells used for the preparation of spheroids, HepG2/C3A, were provided by the ATCC. Spheroids were obtained in two steps. First, freshly trypsinized HepG2/C3A cells were seeded in cell carrier 96-well ULA plate from Perkin-Elmer with 200 cells in 150 μL of media (MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)) per well. After 96 hours of incubation, exposure to Ag species was initiated. Spheroids were exposed to the nominal Ag concentration of 25 μM for cit-AgNP (20 nm Citrate BioPure™ Silver from Nanocomposix), 50 μM for PVP-AgNP (90 nm from Sigma-Aldrich) or 5 μM for AgNO₃ (Sigma-Aldrich) for 2, 4 or 7 days with media renewal every 2 days. All silver species were directly added to complete cell culture media. In addition, an excretion protocol was used corresponding to an exposure to the different Ag species for 4 days followed by 3 days without Ag species in the media and renewal every day. Both types of AgNP were previously characterized.^{15,18} At the end of the exposure procedure, spheroids were rinsed three times in PBS and used for further experiments.

For the analysis of bile canaliculi excretion pathway, the excretion protocol was also used. To assess MDR and Mrp pathways, HepG2/C3A spheroids were exposed for 4 days to 50 μM PVP-AgNP and during the 7 days to 50 μM verapamil or 50 μM MK571, respectively. To assess the possible involvement of ATP7B, spheroids made of ATP7B-KO HepG2/C3A cells were prepared and used as for normal HepG2/C3A cells.

Ag quantification by ICP-AES

The amount of Ag present in spheroids was quantified by ICP-AES using a Shimadzu ICPE-9800 after an overnight mineralization of the spheroids at 50 °C in 65% HNO₃. Ag



amount was normalized based on the number of spheroids per analyzed sample.

Sample preparation for XRF, FIB-SEM and STEM-EDX

For high pressure freezing, 5 to 10 spheroids were dispersed in 2 μL of culture media supplemented with 20% FBS and loaded on the 200 μm side of a type A 3 mm gold platelet (Leica Microsystems), covered with the flat side of a type B 3 mm aluminum platelet (Leica Microsystems), and were vitrified by high-pressure freezing using an HPM100 system (Leica Microsystems). Next, the samples were freeze substituted at $-90\text{ }^\circ\text{C}$ for 40 h in acetone supplemented with 1% OsO_4 and warmed up slowly ($1\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$) to $-60\text{ }^\circ\text{C}$ in an automated freeze substitution device (AFS2; Leica Microsystems). After 12 h, the temperature was raised ($1\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$) to $-30\text{ }^\circ\text{C}$, and the samples were kept at this temperature for another 12 h before a step for 1 h at $0\text{ }^\circ\text{C}$, cooled down to $-30\text{ }^\circ\text{C}$ and then rinsed four times in pure acetone. The samples were then infiltrated with gradually increasing concentrations of araldite resin in acetone (1:2, 1:1, 2:1 [vol/vol] and pure) for 2 to 8 h while raising the temperature to -10 , 0 , 10 and $20\text{ }^\circ\text{C}$, respectively. Pure araldite resin was added at room temperature. After polymerization 48 h at $60\text{ }^\circ\text{C}$, 200 nm sections were obtained using an ultra-microtome UC7 (Leica Microsystems) and an Ultra 35 $^\circ$ diamond knife (DiATOME) and collected on 50 nm-thick Si_3N_4 membranes (Silson Ltd) before use at the synchrotron. The same preparation protocol was used for STEM-EDX but the sections were collected on formvar carbon coated 100 mesh copper grids and the sample block was then used in FIB-SEM experiments.

Nano-XRF data acquisition and analysis

The data were collected on the hard X-ray nanoprobe beamline ID16B-NA of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The experiment was performed in air at room temperature. The incoming photon beam energy was set to 29.6 keV. The beam was focused to $65 \times 60\text{ nm}^2$ ($V \times H$) with Kirkpatrick-Baez mirrors, providing a photon flux of $\sim 10^{11}$ photons per s. The X-ray fluorescence emission from the sample was recorded using two 3-element silicon drift detector arrays positioned at 13° from the sample. 200 nm-thick sections of spheroids laid on silicon nitride membranes were rapidly scanned at low resolution ($1 \times 1\text{ }\mu\text{m}^2$ step size, 50 ms per point dwell time) in order to locate the regions of interests. Then, high-resolution images were acquired by scanning the selected areas with $100 \times 100\text{ nm}^2$ step size and 500 ms per point dwell time. The hyperspectral images were analyzed using the PyMCA software package (<https://pymca.sourceforge.net/>).²⁰ The detector response was calibrated over a thin film multilayer sample from AXO (RF8-200-S2453). XRF data were energy calibrated, normalized by the incoming photon flux, and batch-fitted in order to extract spatially resolved elemental concentrations, assuming a biological matrix of light

elements and density 1 g cm^{-3} according to NIST standards (<https://physics.nist.gov/cgi-bin/Star/compos.pl?matno=261>).

XAS data acquisition and analysis

The X-ray absorption spectroscopy experiment was performed in cryogenic conditions on the beamline CRG-FAME-BM30 of the ESRF.²¹ 100 μL drops of spheroid cultures were deposited into a sample holder sealed with Kapton tape and immediately frozen in liquid nitrogen, then transferred into the He cryostat of the beamline and measured at 15 K. The edge region was scanned between 25.30 and 26.48 keV with a nitrogen-cooled Si(220) double-crystal monochromator.²² The incoming photon energy was calibrated with a Ag metallic foil, by defining the first inflexion point of its X-ray absorption spectrum at 25.514 keV. The preparation and measurement of the reference compounds is described elsewhere.^{23,24} The spectra are deposited in the SSHADE database²⁵ (AgS₂OT doi: https://doi.org/10.26302/SSHADE/EXPERIMENT_GV_20181121_001; AgS₃OT doi: https://doi.org/10.26302/SSHADE/EXPERIMENT_GV_20181121_002; Ag₂S doi: https://doi.org/10.26302/SSHADE/EXPERIMENT_GS_20170712_003). The spectra of cells were recorded in fluorescence mode, with a 30-element Ge solid state detector (Canberra). The data were normalized with standard methods and analyzed as linear combinations of reference compounds by using the Athena software provided with Demeter 0.9.26.²⁶

FIB-SEM acquisition

FIB-SEM experiments were performed using a Zeiss crossbeam 550 microscope. In a first step, the resin-embedded sample was coated by a thin layer of Pt (few nm) to avoid charge accumulation. The surface of the sample to be analyzed was then protected by the deposition of 2 μm -thick Pt or C layer on a surface of typically $20 \times 30\text{ }\mu\text{m}^2$. A large hole was then excavated with a Ga^+ beam of very high current of 30 nA approximately. The surface of this hole was then trenched slice by slice with the Ga^+ beam (with a current of 0.7 or 1.5 nA at a beam acceleration of 30 kV). Each new surface was then imaged with the electron beam. This was done at a low accelerating voltage (around 1.5 kV) and at a current of about 1 nA (except for the imaging of the PVP-AgNP sample which was at $I = 4\text{ nA}$) and using the in-lens backscattered detector (EsB detector, with a bias of 400 V or 600 V). Acquisitions were done at a resolution of 10 nm to obtain a voxel size of $10 \times 10 \times 10\text{ nm}^3$ except for the AgNO₃ sample for which the voxel size was $12 \times 12 \times 6\text{ nm}^3$. For this sample, the image stack was rescaled afterwards to form $12 \times 12 \times 12\text{ nm}^3$ isotropic voxels.

FIB-SEM analysis

Images were acquired as a series of 2-dimensional TIFF files. In order to compile a 3D tiff file format, the images were first registered in Fiji²⁷ using MultiStackReg²⁸ or Scale Invariant Feature Transform (SIFT) plugins.²⁹ MultiStackReg aligns each image with respect to the previous one using cross-



correlation and SIFT is based on the detection and matching of local image features between successive slices. For MultiStackReg, the first or the central image was used as a global reference for the whole stack and translation was used as the transformation type. After alignment, the image stack was checked in orthogonal views and if a misalignment persists, the angle of misalignment was corrected with a python script. The stack of images was then inverted (initial images were acquired in dark field regime), binned and denoised. Anisotropic diffusion³⁰ or median filters served as nice tools to remove noise while preserving organelle membranes. The median filter selects the median gray value of a voxel neighborhood and the anisotropic diffusion filter enables image smoothing with preservation of cell membranes. For some stacks, additional preprocessing steps were performed such as filtering with a variational stationary noise removal filter in Fiji,³¹ correcting the z drift using the FIB milling position or homogenizing the contrast in the z direction with python scripts.

Segmentation of different objects (nuclei, vesicles, vacuoles, Ag-containing particles, mitochondria and bile canaliculi) was done with Ilastik software.³² When needed, manual correction of Ilastik segmentation masks was performed in Microscopy Image Browser.³³ The two nuclei of the AgNO₃ sample were segmented manually with Imaris (Oxford Instruments). Meshes were either exported from Ilastik or generated in Amira-Avizo (Thermo Fisher Scientific). Visualization and 3D rendering were carried out in Paraview.³⁴

Mitochondria sphericity calculation

Mitochondria segmentation masks exported from Ilastik were imported in Fiji for sphericity calculations. 3D object counter (3D-OC) plugin³⁵ was first used to extract an object map of all mitochondria in each stack based on a voxel connectivity process. Then, the sphericity of all mitochondria found by 3D-OC was calculated by Morpholibj plugin.³⁶

STEM-EDX data acquisition and analysis

For the chemical identification of Ag-containing particles, thin sections were observed in STEM mode and analyzed by EDX using either a FEI/Tecnaï Osiris microscope or a FEI Titan microscope operated at 200 kV.

Results and discussion

Biological model and exposure scenarios

The great majority of nanotoxicology studies made use of either 2D cell cultures or animal models. The former enable the assessment of the disrupted cellular pathways and the intracellular physicochemical transformations of the nanomaterials, while the latter provide an overview of the organismal fate and excretion of the nanomaterials, and their general toxicity. Some studies have used 3D cultures, either to assess the general toxicity,³⁷ or to follow the fate of

nanomaterials upon long-term exposure.^{38,39} However, none of the 3D cell systems used in these studies reproduced the liver metabolism, from the entry up to the excretion of nanomaterials. Recently, we described a 3D hepatocyte model made of HepG2/C3A cells (Fig. S1†).⁴⁰ In this model, polarized hepatocytes actively excrete organics and inorganics in functional bile canaliculi-like regions, thus mimicking efficiently the liver metabolism. Three dimensional electron microscopy (3D-EM) deciphered the structure of these regions, made of the plasma membranes of neighboring hepatocytes with a high-density of microvilli extensions. Therefore, we used this liver model to analyze the subcellular fate of AgNP and of a Ag salt, up to the excretion of Ag species. Knowing that the transformations of the AgNP depend on their exposure route, we chose different exposure scenarios: to pristine AgNP and to Ag(I) ions, representing parenteral and oral exposure, respectively. As pristine NP, we selected two commonly used AgNP with different coatings that confer them different behaviors in solution, citrate-coated AgNP of 20 nm in diameter (cit-AgNP) and PVP-coated AgNP of 90 nm in diameter (PVP-AgNP). In cell culture media, PVP-AgNP are covered by a protein corona and remain monodisperse with a diameter around 90 nm, while cit-AgNP form aggregates of about 160 nm, as we previously observed.^{15,18} In addition, AgNO₃ was used to expose the cells directly to dissolved Ag(I) ions. Besides, all exposures were performed in cell culture media supplemented with FBS that is the closest condition to mimic the bloodstream. AgNP can thus be considered as covered by a protein corona under the chosen exposure conditions. 3D hepatocyte cultures were exposed to the Ag species for 2, 4 or 7 days, or for 4 days followed by 3 days without exposure to favor their excretion (excretion scenario). The goal was to analyze over several days the uptake, the transformation and the excretion of AgNP and Ag(I) ions in the liver that is the main target in humans, regardless of the exposure route. Previous experiments using 2D cultures showed that the first signs of toxicity for cit-AgNP, PVP-AgNP and AgNO₃ appear at 50, 100 and 5 μM, respectively.¹⁵ However, cytotoxicity is observed at higher doses in 3D compared to 2D cultures. Therefore, in order to fully preserve the viability of the cells while exposing them to a significant amount of Ag, we chose to work at 25, 50 and 5 μM in Ag for cit-AgNP, PVP-AgNP and AgNO₃, respectively. To analyze Ag uptake and its balance with excretion, the amount of Ag per spheroid was quantified by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) (Fig. 1). For cit-AgNP and AgNO₃, the amount of Ag gradually increased from 2 to 7 days of exposure, while for PVP-AgNP it reached a plateau after 4 days. However, for both types of AgNP, the maximum level of internalized Ag was similar, between 3 and 4 ng Ag per spheroid. The Ag accumulation with AgNO₃ was 6 to 8 times lower than with AgNP. Moreover, the excretion scenario showed a slower decrease in Ag in the case of AgNP exposure compared to a Ag salt. Indeed, after 3 days of excretion, the fraction of excreted Ag was 65% in the case of AgNO₃, and between 30 and 40% for the two types of AgNP.



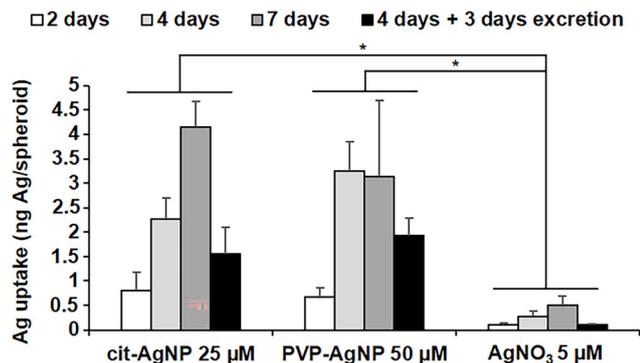


Fig. 1 Ag quantification in spheroids exposed to AgNP or AgNO₃. Amount of Ag in HepG2/C3A spheroids exposed to 25 μM cit-AgNP, 50 μM PVP-AgNP or 5 μM AgNO₃ for 2, 4, 7 days or 4 days plus 3 days of excretion. The quantification was normalized based on the number of spheroids and each experiment was repeated at least three times independently. * Stands for data statistically different between exposure treatments with $p < 0.01$.

This means that the dynamic for uptake, transformation, trafficking and excretion is faster upon exposure to dissolved Ag(I) compared to AgNP, which are a mixture of Ag(0) crystals covered by a Ag(I) layer. These data are consistent with experiments performed in mice exposed orally or intravenously to AgNP which showed a fast

decrease of Ag in blood and liver in the former case, while Ag remains high for several days in the latter case.⁷ Taken together, these results confirm the relevance of the 3D hepatocyte model to mimic the liver, and the consistency of the chosen exposure scenarios to mimic oral and parenteral exposure to AgNP.

In the last years, we have shown the interest of multimodal imaging, including XRF and EM, to analyze, with the highest sensitivity and resolution, the fate of AgNP in 2D cell cultures.^{15,18,19} In this study, we improved the methodology and extend it to a 3D hepatocyte model. First, the samples were prepared by high pressure freezing followed by cryo-substitution using acetone and not ethanol, in order to preserve the cell ultrastructure as well as its elemental content. Second, 200 nm-thick cell sections were analyzed by XRF at 100 nm² resolution, and 3D reconstructions from the remaining sample block were obtained at nanometer resolution with focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM). This was complemented by scanning transmission electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (STEM-EDX). Finally, bulk speciation analyses from 3D hepatocyte cultures were performed by X-ray absorption spectroscopy (XAS) to obtain quantitative information on Ag speciation under the selected conditions.

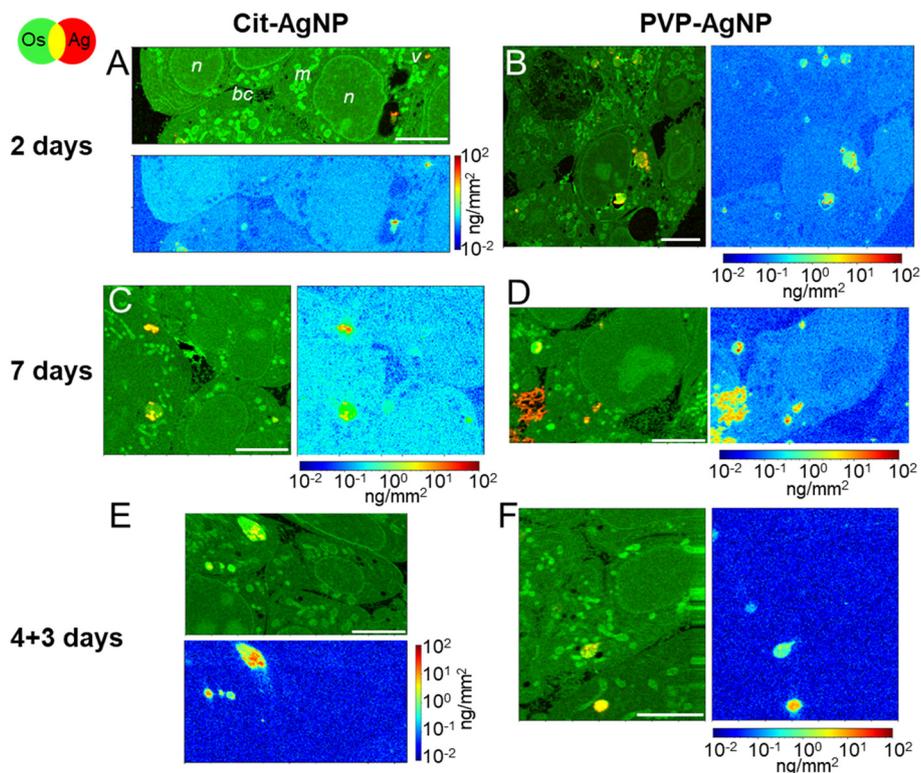


Fig. 2 Ag subcellular distribution in hepatocyte spheroids exposed to AgNP. False-color representation of Ag distribution in hepatocytes exposed to AgNP, extracted from XRF hyperspectral images with 100 × 100 nm² pixel size. Nanoparticles were coated either with citrate (A, C and E) or PVP (B, D and F). For each type of NP, three exposure conditions are reported: 2 days (A and B), 7 days (C and D), and 4 days of exposure followed by 3 days of recovery (E and F). In each figure panel, the first map represents the overlay of Os (green) and Ag (red), the second the quantitative distribution of the areal density of Ag over the same map area, in logarithmic scale. Scale bars = 5 μm.



Trafficking and transformations of AgNP in 3D hepatocyte cultures

The internalization of AgNP in hepatocytes, their progressive dissolution and trafficking up to their excretion was followed by means of XRF imaging and EM. With this multimodal imaging approach, we meant to retrieve the distribution of silver, regardless of its chemical state, in the different subcellular compartments, and, when excretion takes place, in bile canaliculi. Selected elemental images extracted from the XRF hyperspectral images collected in a synchrotron nanoprobe are reported in Fig. 2. All other images collected on 3D hepatocyte cultures exposed to cit-AgNP and PVP-AgNP are reported in Fig. S2 and S3,[†] respectively. For each exposure condition, we acquired at least three high-resolution images containing several cells, and, whenever possible, bile canaliculi. For all datasets, two maps representing the same sample area are reported (see Fig. 2A as an example): a first map shows the localization of Os (osmium, green) and Ag (red). The presence of Os is due to the use of OsO₄ for sample preparation, which reacts with lipids. Os signal thus reveals the structural details of the interior of the cell with high resolution, allowing for the identification of nuclei (n), mitochondrial networks (m), vesicles (v), and bile canaliculi (bc). The latter are recognizable as intercellular spaces filled by villi. Vesicles are often loaded with Ag (red signal), clearly indicative of the presence of nanoparticles internalized through endocytosis. Next to each Os and Ag co-localization map, the concentration of Ag in the same map area is reported. The concentrations are represented as areal densities ranging over five orders of magnitude, from 0.01 to 100 ng mm⁻², on a logarithmic scale. This visualization reveals the presence of Ag not only as highly concentrated hot-spots (10–100 ng mm⁻²) corresponding to NPs in vesicles, but also as a much weaker signal of the order of 0.05–0.1 ng mm⁻². A value of 0.05 ng mm⁻² corresponds to 0.6 × 10⁻¹⁸ g in the area probed by the beam, which gives an empirical estimation of the detection limit for Ag in our experimental conditions. In our previous work, we made a synergistic use of XAS, STEM/EDX, and XRF, which allowed us to assign the weak Ag signal observable all over the cell area in XRF to Ag(I) ions that are released from the NPs in vesicles and diffuse in the cytosol, where they form molecular complexes with thiolate biomolecules.^{18,19} In Fig. 2, the concentration of Ag can be visually compared among the different conditions, since the scale is the same for all maps.

After 2 days of exposure to cit-AgNP (Fig. 2A) or to PVP-AgNP (Fig. 2B), the NPs have partially dissolved in the endolysosomes, as clearly visible in Fig. 2B, for instance, and Ag(I) complexes are found in all cell compartments such as cytoplasm and nuclei. The concentration of Ag in the cell area appears to increase with the exposure time, for both kind of NP (Fig. 2A vs. C and B vs. D). This can be observed as a general trend among all Ag concentration maps, despite the variability between one cell and another (Fig. S2 and

S3[†]). Interestingly, after 7 days of exposure to PVP-AgNP, Ag is clearly observed in some bile canaliculi (Fig. 2D), with a spatial distribution that differs markedly from the hot-spots observed in the presence of nanoparticles, with its concentration roughly constant over bile canaliculi area and about one order of magnitude lower than NP found in endosomes. After four days of exposure to cit-AgNP, we observed the presence of large (~3–4 μm diameter) empty vesicles, which could putatively be vacuoles that store excess Ag, probably to protect the cell (Fig. S2C[†]). Interestingly, this feature has never been observed in 2D cultures, neither by us in hepatocytes, nor, to the best of our knowledge, in other cell types.

Finally, in the excretion scenario, *i.e.* AgNP exposure is stopped after four days, and then the cells are left to grow for three more days and rinsed daily with fresh media, Ag is observed in vesicles but not or only barely in the remaining cell area (Fig. 2E and F and S2F and G and S3B and C[†]). This implies that the Ag(I) complexes, observed in the cells already after two days of exposure, were largely excreted. This observation corroborates the hypothesis of the preferential excretion of Ag(I) soluble species with respect to the crystalline Ag(0) form or to transformed AgNP. In order to obtain more independent evidence for this phenomenon, we performed electron microscopy experiments. In the first instance, spheroid sections were observed by STEM-EDX, for samples exposed to AgNP, which showed neither electron-dense material, nor a Ag signal by EDX in bile canaliculi areas (Fig. S4[†]). However, it is possible to miss electron-dense objects by using cell sections that lead to a limited volume of analysis. To improve this point, FIB-SEM acquisitions were performed on samples that had been exposed for 7 days to both types of AgNP (Fig. 3, and Videos S1 and S2[†]). FIB-SEM allows the acquisition of volumes of several thousands of μm³. In these stacks of EM images, electron dense objects were never observed in bile canaliculi regions. For cit-AgNP, vacuoles with large amounts of AgNP and transformed AgNP were observed (Fig. 3B and C and S5[†]). An event of a fusion between an endolysosome and a vacuole was also observed (Fig. 3B and C). Therefore, in the case of cit-AgNP exposure, it is clear that to cope with the huge accumulation of cit-AgNP, the fast dissolution into Ag(I) ions and the slow excretion of the Ag species in the hepatocytes in 3D culture system, cells exposed to cit-AgNP store Ag particles inside vacuoles. This phenomenon was not observed in more classical 2D hepatocyte cultures, in which the excretion occurs in the large interface between cell plasma membranes and cell culture media. 3D cultures are thus better suited to mimic the fate of NP in the liver. Moreover, the fate and excretion could be different upon exposure to PVP- or cit-AgNP. Indeed, XRF showed Ag species in bile canaliculi areas only for the former, while vacuole storage was only observed for the latter. Currently, we are not able to provide an explanation for this difference, but we hypothesize that the intracellular



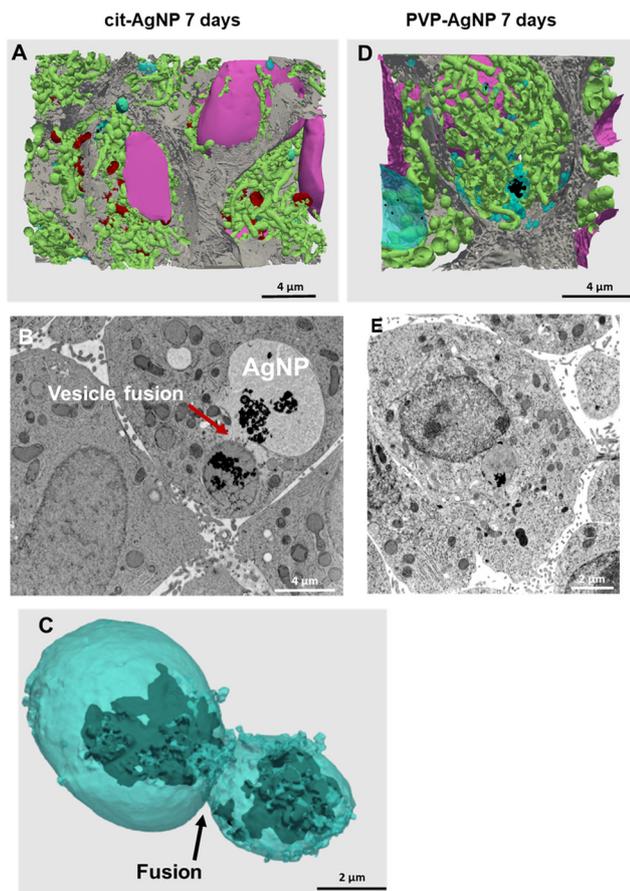


Fig. 3 3D reconstruction and segmentation of spheroids exposed to AgNP. (A) From the stack of images shown in Video S1,[†] the inside of a spheroid exposed to cit-AgNP for 7 days was reconstructed, segmented in the different organelles and represented with nuclei (pink), mitochondria (green), vesicles (blue), bile canaliculi (grey) and Ag-containing particles (black). The segmentation and 3D rendering are shown in Video S1.[†] (B) Electron micrograph of a single XY slice showing the fusion between a vacuole and a vesicle. (C) 3D rendering of the fusion of these vesicle and vacuoles. (D) From the stack of images shown in Video S2,[†] the inside of a spheroid exposed to PVP-AgNP for 7 days was reconstructed, segmented in the different organelles and represented with nuclei (pink), mitochondria (green), vesicles (blue), bile canaliculi (grey) and Ag-containing particles (black). The segmentation and 3D rendering are shown in Video S2.[†] (E) Electron micrograph of a single XY slice showing a AgNP-containing vesicle bound to the nuclear membrane.

concentration of soluble Ag(i) complexes reaches a threshold after which hepatocytes have to store Ag-particles in vacuoles to avoid toxicity, and that this threshold is reached only by cit-AgNP. In support of this hypothesis, we observed that upon cit-AgNP exposure, the excretion of Ag is the slowest showing only 30% of Ag excreted outside the spheroids after 3 days (Fig. 1).

STEM-EDX analysis of the elemental content of different Ag-particles, upon transformation in vesicles or vacuoles, always showed the co-localization of Ag and S with similar peak intensity, while chloride peak had a similar intensity to the level observed in non-particle locations (Fig. 4A and B

and S5 and S6[†]). Therefore, whatever the type of vesicles and coatings, AgNP are transformed into AgS complexes/particles with different shapes including sheets (Fig. S6[†]), small round particles (Fig. 4A) or larger, irregular objects (Fig. 4B).

Trafficking and transformations of AgNO₃ in 3D hepatocyte cultures

In order to discern the different cellular mechanisms that rule the detoxification from nanoparticles or from ions, we performed XRF and EM experiments on 3D hepatocyte cultures that were exposed to the AgNO₃ salt under the same exposure scenarios applied to AgNP. This allowed us to observe that the trafficking and excretion processes operated by hepatocytes were faster when the cells were exposed to the Ag salt rather than to AgNP. A sub-lethal dose of 5 μM AgNO₃ was administered, for 2, 4, 7 days, or in the excretion scenario (4 + 3 days). One XRF image per exposure condition is reported in Fig. 5. All other images, collected to increase the statistical significance of the results, are reported in Fig. S7.[†] The visualization is the same as for NP-exposed samples, including the range of the Ag concentration scale, to ease the comparison between different exposure conditions. Os (green) and Ag (red) co-localization maps in Fig. 5 and S7[†] reveal the presence of the latter in vesicles (e.g. in Fig. 5B), vacuoles (e.g. in Fig. 5A and S7E and F[†]), and very often in bile canaliculi (Fig. 5C and D and S7C and G[†]). A faint Ag signal is observed in the cell area after four or seven days of exposure (Fig. 5B and C and S7A–D[†]), where it is slightly distinguishable from the background. This signal is never observed in the excretion scenario, where Ag is instead systematically found in the bile canaliculi, suggesting that the excretion *via* the bile canaliculi targets the free soluble Ag(i) complexes that are not segregated into vesicles or vacuoles. Interestingly, the presence of Ag in bile canaliculi is observed only in the case of a 7 day exposure or in the excretion scenario. For shorter exposure times and exposures with no recovery (2 and 4 days), Ag is observed mainly in vesicles and vacuoles. This is probably due to the increase in Ag content in bile canaliculi over time as well as a higher number of bile canaliculi loaded with Ag that makes it easier to visualize Ag-loaded bile canaliculi 7 days after the beginning of AgNO₃ exposure.

It can be noticed that, in spite of the lower Ag dose administered in the form of salt with respect to NPs, and of the consequently lower intracellular accumulation of Ag, Ag-loaded bile canaliculi are more frequently observed in cells exposed to AgNO₃ than in those exposed to AgNP. A possible explanation would be that the main excretion pathway targets Ag(i) soluble species, which are readily available upon AgNO₃ exposure. In contrast, when AgNP are endocytosed into the cells, Ag(i) ions are progressively released from their surface within endolysosomes, limiting the rate of formation of molecular Ag complexes. Electron microscopy was performed to complete the understanding of the fate of AgNO₃ in hepatocyte 3D cultures. As for AgNP



Speciation analysis to understand AgNP and AgNO₃ transformations in 3D hepatocyte cultures

In order to disclose the chemical transformations that AgNP and a Ag salt go through in the hepatocyte 3D model, we performed XAS on the exposed spheroids. The linear combination fitting (LCF) of the near-edge spectral region (X-ray Absorption Near-Edge Structure, XANES) allows the detection of the Ag species present in the specimen and their relative fractions, provided that an exhaustive set of reference compounds is used. As reference compounds that represent the expected Ag species *in cellulo*, we chose pristine AgNP (*i.e.* as-synthesized citrate or PVP coated AgNP in colloidal suspension), corresponding to the undissolved fraction of AgNP *in cellulo*, Ag chloride and Ag-sulfur compounds, which are their commonest transformation products in the environment and in cells. In this study, we made a careful choice of different Ag-sulfur reference compounds in order to finely distinguish the transformation products of AgNP and AgNO₃. This allowed us to propose different mechanisms for handling the toxic Ag(I) ions in the two cases. Indeed, Ag-sulfur compounds deserve a special focus: in biological systems exposed to AgNP, the formation of both Ag₂S crystals and Ag-organothiol (Ag-OT) compounds has been reported.^{15,16,43} The latter are, for instance, the complexes formed with GSH and Met, where Ag occupies digonal AgS₂ and trigonal AgS₃ sites, respectively.²⁴ The spectra of the three Ag-S reference compounds, *i.e.* the Ag₂S crystal and two Ag-OT compounds in AgS₂ and AgS₃ coordination, reported in Fig. 7A, show small but significant variations depending on the coordination chemistry of Ag. In particular, the second post-edge oscillation, centered at 25 570 eV in the spectrum of Ag₂S, shifts at higher energy in the two Ag-OT compounds. Therefore, for a reliable LCF analysis, all three Ag-S references must be included. By doing so, and by extending the fitting range up to ~25 600 eV in such a way that the second post-edge oscillation is included, the LCF of the XANES spectra can provide information about the organic or inorganic nature of the Ag-S complexes formed in spheroids.

The LCF analysis results, providing the fraction of each Ag species in cells in the different exposure conditions, are reported in Table 1. The AgCl component was never detected, so the corresponding column is omitted.

We observe that the AgNP fraction in hepatocytes upon two days of exposure to cit-AgNP is 26 ± 1%, confirming that the NPs quickly transform, as observed in 2D cell cultures.^{15,18} The transformation is complete or almost (5% AgNP, below the detection limit of the technique) after 7 days of exposure to the same NP. For these AgNP, the fraction of Ag(I) occupies both Ag₂S crystal sites (~20% of total Ag, regardless of the exposure time) and digonal Ag-OT sites, notably with GSH but also in various proteins such as in Zn finger-containing proteins as we described recently.^{18,44,45} PVP-coated NPs show a slower transformation with 71 ± 2% of the Ag atoms still in the Ag(0) state of pristine NPs. The

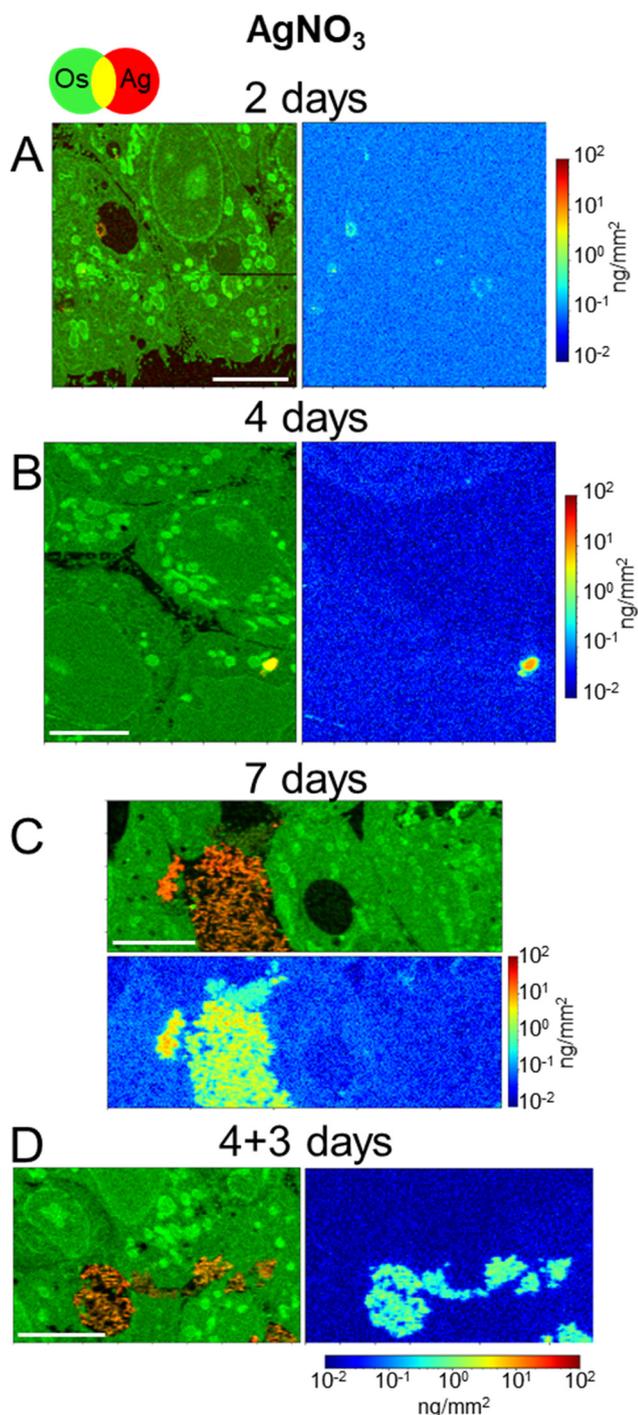


Fig. 5 Ag subcellular distribution in hepatocyte spheroids exposed to AgNO₃. False-color representation of Ag distribution in hepatocytes exposed to 5 μM Ag from the AgNO₃ salt, extracted from XRF hyperspectral images with 100 × 100 nm² pixel size. The exposure lasted for 2 days (A), 4 days (B), 7 days (C), or for 4 days followed by 3 days of growth with no exposure (D). In each figure panel, the first map represents the overlay of Os (green) and Ag (red), the second the quantitative distribution of the areal density of Ag over the same map area, in logarithmic scale. Scale bars = 5 μm.



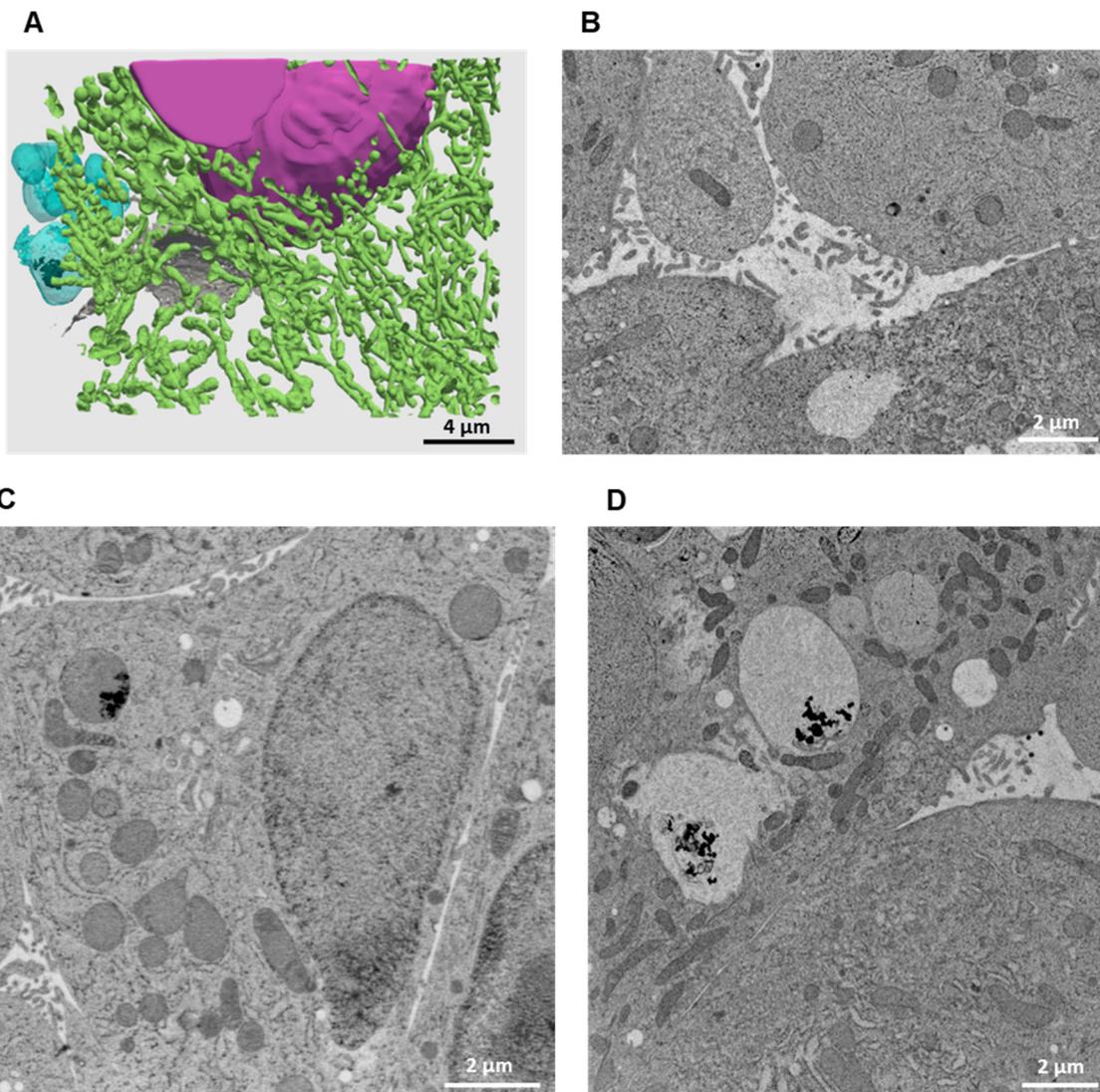


Fig. 6 3D reconstruction and segmentation of spheroids exposed to AgNO_3 . (A) From the stack of images shown in Video S3,† the inside of a spheroid exposed to AgNO_3 for 7 days was reconstructed, segmented in the different organelles and represented with nuclei (pink), mitochondria (green), vesicles (blue), bile canaliculi (grey) and Ag-containing particles (black). The segmentation and 3D rendering are shown in Video S3.† (B) Electron micrograph of a single XY slice showing a bile canaliculi area. (C) Electron micrograph of a single XY slice showing an endolysosome containing Ag-particles. (D) Electron micrograph of a single XY slice showing vacuoles containing Ag-particles.

slower transformation of PVP-coated AgNP with respect to citrate-coated AgNP in 2D hepatocyte cultures as well as in other cell cultures has been largely documented. It can be partly due to the larger diameter of this NP, and partly to the different ligands used for stabilization (PVP vs. citrate, used for steric and electrostatic stabilization, respectively).^{15,16} No AgNP formation is observed when 3D hepatocyte cell cultures are exposed to Ag(i) ions from the AgNO_3 salt (Table 1). Both inorganic and organic Ag(i)-sulfur species form, in proportions that differ significantly from the ones observed in the case of exposure to AgNP. In particular, the amount of inorganic Ag_2S is constant within the error (12–14%) between 2 and 7 days of exposure to the salt, and slightly lower than the amount of Ag_2S formed upon the complete transformation of cit-AgNP in 7 days ($20 \pm 2\%$).

Between the Ag-OT species formed, the most relevant geometry is trigonal AgS_3 , as in Met, whereas digonal AgS_2 -OT are minor ($22 \pm 4\%$ after 7 days of exposure) or below the detection limit. This is the main difference observed depending on the origin of the Ag(i) ions released in hepatocytes. The coordination chemistry of the Ag-OT complexes formed *in cellulo* is different depending if Ag(i) ions are slowly released from AgNP or readily released by a Ag salt. This suggests that the cells set up different mechanisms to handle Ag(i) ions in the two cases. It has been demonstrated that the exposure to AgNP induces Met overexpression in several human cell lines, as Caco-2, NHBE, BEAS-B2 or HepG2 cells,^{15,46} which is considered as a part of the cellular response to metal-induced stress. This is possible when the Ag(i) are slowly released in cells from the AgNP



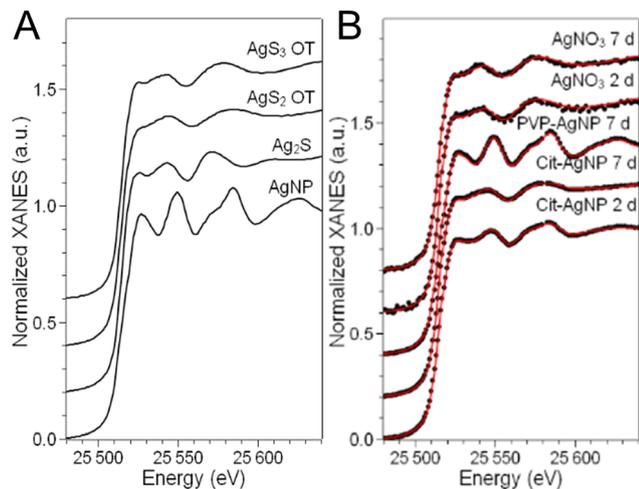


Fig. 7 Ag speciation in hepatocyte spheroids exposed to AgNP or AgNO₃. Ag K-edge XANES spectra of (A) reference compounds and (B) 3D cultures of hepatocytes exposed to AgNP or AgNO₃. In panel B, the best-fitting curves (red), obtained as linear combinations of the reference spectra reported in panel A, are overlapped to the experimental spectra (dots).

surface. In the case of direct exposure to a salt, instead, the entry of Ag(i) ions is faster and the Met overexpression mechanism is less efficient, resulting in an enhanced toxicity.

Overall, the main process of AgNP transformation is conserved between 2D and 3D cell cultures which leads to the release of Ag(i) ions that form Ag–OT complexes. However, XAS analyses revealed the significant presence of inorganic Ag₂S species in cit-AgNP and AgNO₃ conditions, even though we never observed this type of species in 2D hepatocyte culture. One can assume that it corresponds to particle species localized within vacuoles, since we also never observed Ag-containing vacuoles in 2D cell culture. Thereof, vacuoles would provide HS[−] or H₂S species that is a suitable chemical environment for Ag₂S formation. This kind of silver sulfidation mechanism has already been described in specific immunocompetent regions of the brain.⁴⁷ Besides, Ag–OT represent the great majority of the Ag species found in 3D hepatocyte cultures exposed to AgNO₃ (Table 1), which suggests that the Ag rich areas visible in the bile canaliculi of exposed cells (Fig. 5 and S7†) contain excreted Ag–OT complexes. These data support

our model for Ag(i) ions or molecular complexes excretion in bile canaliculi.

XAS data are also consistent with STEM-EDX mapping, which showed the presence of electron-dense materials in which Ag and S are co-localized in sections of spheroids exposed to cit-AgNP, PVP-AgNP and AgNO₃ (Fig. 4 and S5, S6, S9 and S10†). Since the proportion of the different species is very diverse depending on the type of exposure, we have to consider that electron-dense particles observed in endolysosomes are not all the same. In the case of PVP-AgNP and cit-AgNP, these objects are pristine particles and particles being transformed into AgS₂ species in different proportions depending on the NP. For AgNO₃ exposure, these by-products are Ag–OT and mainly AgS₃. However, the process driving the latter to endolysosomes remains elusive.

Molecular pathway for the main excretion of Ag species

Since we found that Ag is excreted as Ag(i) ions or molecular complexes in bile canaliculi, we assessed three possible excretion pathways: (i) *via* Mrp2 through which GSH-Ag(i) complexes could be transported, (ii) *via* ATP7B, a Cu(i) transporter, (iii) *via* MDR pumps that are unlikely to transport Ag(i) species. The excretion exposure scenario was used and applied to PVP-AgNP exposure, since this condition resulted in a significant excretion of Ag species in bile canaliculi, as reported above. In addition, verapamil or MK571 were added to inhibit the excretion *via* MDR or Mrp2, respectively. To test for the excretion *via* ATP7B, we used a cell line that was derived from HepG2/C3A from which we deleted its gene by Crispr/Cas9.⁴⁸

Hepatocytes were treated in such a way that the excretion pathways are selectively inhibited. At the chosen time point, cells were prepared and analyzed by nano-XRF. The accumulation of Ag in cells was assessed by measuring its concentration in selected areas of the XRF maps in the cytosol. At least three cells per condition were analyzed and the average Ag areal density in the cytosol of hepatocytes in the different conditions are reported in Table 2. The control samples in this experiment are HepG2/C3A with intact molecular pathways.

We observe that the inhibition of MDR (verapamil) does not influence the accumulation of Ag in hepatocytes. In the case of inhibition of Mrp2 (MK571), the concentration of Ag is significantly lower than in the control cells that present

Table 1 Relative amount of the different Ag species detected in 3D cultures of hepatocytes exposed to AgNP or to a Ag salt, obtained by linear combination fitting of XANES spectra. The errors relative to the last digit are reported in parenthesis

Ag source	Exposure time	XANES LCF results				$R_{\text{fit}} (10^{-4})$
		AgNP (%)	AgS ₂ OT (%)	AgS ₃ OT (%)	Ag ₂ S (%)	
Cit-AgNP	2 d	26 (1)	50 (4)	3 (5)	21 (4)	3.3
Cit-AgNP	7 d	5 (1)	75 (4)	—	20 (2)	2.2
PVP-AgNP	7 d	71 (2)	22 (5)	—	7 (3)	4.1
AgNO ₃	2 d	—	8 (10)	78 (7)	14 (5)	5.5
AgNO ₃	7 d	—	22 (4)	66 (7)	12 (5)	5.0



Table 2 Ag areal density in the cytosol of HepG2/C3A cells cultured in 3D and exposed to PVP-AgNP for 4 days, then allowed to recover for 3 days. Ag concentrations were extracted from XRF hyperspectral images, by manually selecting the regions of interest in n cells per condition. The average and standard deviation of the n analyzed cells are reported. The hepatocytes were treated in such a way that a single pathway was selectively inhibited

Sample	Treatment	n	Ag in cytosol (ng mm ⁻²)
Control	None	4	0.052 ± 0.012
Mrp2-inhibited	MK571	5	0.025 ± 0.003
MDR-inhibited	Verapamil	3	0.056 ± 0.010
ATP7B-absent	<i>atp7b</i> gene deletion	4	0.100 ± 0.014

functional Mrp2 pumps. In contrast, deleting the *atp7b* gene results in a dramatic accumulation of Ag in hepatocytes, double than in unaltered cells. This means that the excretion is drastically inhibited, which in turn proves that Ag(i) is mainly excreted in the bile canaliculi as ions transported through the ATP7B Cu transporter, and not as GSH-Ag(i) complexes through Mrp2. Our data are consistent with a previous publication showing that dissolved Ag from AgNP induced ATP7A trafficking to the plasma membrane of Caco2 cells.⁴⁹

Ultrastructural alterations analyzed by 3D electron microscopy

3D hepatocyte cultures exposed for 7 days to cit-AgNP, PVP-AgNP and AgNO₃ have been analyzed by FIB-SEM. This approach offers the advantage to acquire a volume of more than 1000 μm³ within the spheroid and at 10 nm resolution (Fig. 3 and 6, and Videos S1–S3†). As shown previously, it allowed us to visualize the distribution of Ag-particles within these volumes and thus provided a more accurate information than thin section analyses. In addition, the raw FIB-SEM volumes were segmented into the different types of organelles or the intercellular region that constitutes the bile canaliculi (Fig. 3 and 6). Among the different organelles, visual inspection showed that the mitochondrial network looks different between the control sample and the hepatocytes exposed to AgNP or AgNO₃ (Fig. 8). Indeed, upon exposure to cit-AgNP, it appears that mitochondria at the extremities of the network are swollen (red mitochondria), while upon exposure to PVP-AgNP and AgNO₃, mitochondria look more elongated forming tube-like networks. To confirm these observations, quantitative analyses were performed (Fig. 9). The sphericity of all the mitochondria present in each volume were determined. A sphericity value of 1 corresponds to a mitochondrion that would be a perfect sphere. Control sample had a sphericity distribution with mitochondria of various sphericity with a maximum in the distribution for the class between 0.4 and 0.5 in sphericity. Cit-AgNP had an even distribution except for the class 0.9–1 that was about twice more populated than the others. This class can clearly correspond to the swollen mitochondria. PVP-AgNP and AgNO₃ samples had similar sphericity

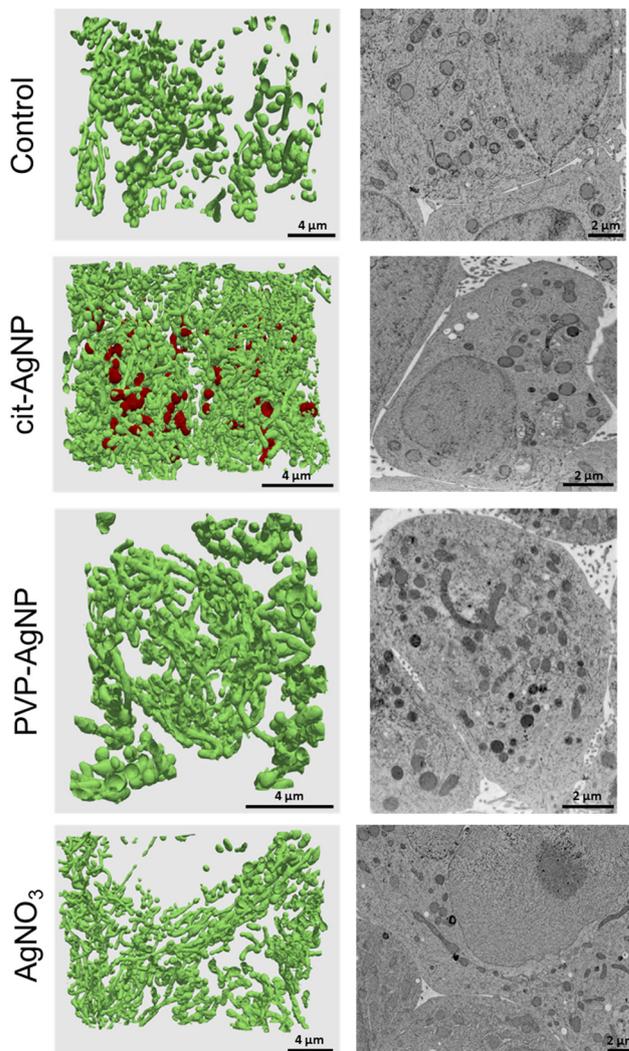


Fig. 8 Mitochondrial morphology changes upon exposure to cit-AgNP, PVP-AgNP or AgNO₃. For each sample, 3D rendering of the mitochondrial network is presented in the left panel and a representative electron micrograph showing mitochondrial morphology is presented in the right panel.

distributions that were shifted towards smaller values with the classes between 0 and 0.2 being the most populated. These classes correspond to 34 and 40% of all the mitochondria for PVP-AgNP and AgNO₃ exposures, respectively. These results corroborated the visual inspection since it meant that mitochondria were more elongated in these two samples. Therefore, FIB-SEM analyses demonstrated that mitochondria in hepatocyte spheroids are affected upon exposure to AgNP or a Ag salt. We cannot yet clearly establish the reason of the opposite effect observed between cit-AgNP on one side, and PVP-AgNP and AgNO₃ on the other side. However, based on XAS and XRF analyses, it is clear that the exposure to cit-AgNP induces the highest intracytosolic concentration of Ag(i) molecular species, which could explain the presence of swollen mitochondria as a mark of mitochondrial toxicity. In the case of PVP-AgNP and



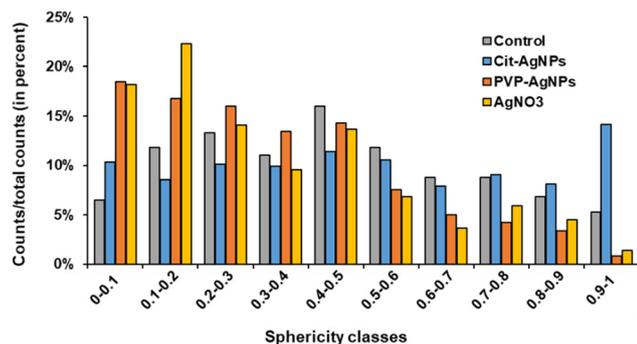


Fig. 9 Analysis of mitochondrial sphericity upon exposure to cit-AgNP, PVP-AgNP or AgNO₃. Mitochondrial sphericity was determined based on FIB-SEM segmented mitochondrial volume of a control sample and of samples exposed for 7 days to cit-AgNP, PVP-AgNP or AgNO₃.

AgNO₃, the amount of soluble Ag(I) in the cytosol is lower and not heavily toxic for mitochondria, but it seems to impact mitochondrial fusion–fission equilibrium, which could be, for instance, due to an adaptation of cellular metabolism in these conditions. These data are consistent with recent publications that described an impact of AgNP exposure on mitochondrial biogenesis and dynamics.^{50–52} However, this effect would not be directly due to interactions between AgNP and mitochondria but it could be explained by mitochondrial uptake of Ag(I) species that we recently showed to happen upon AgNP exposure.¹⁹

Conclusions

To follow the fate, from entry to excretion, of different types of Ag species in a model mimicking the liver, we developed 3D hepatocyte cell cultures with active bile canaliculi-like structures that perform excretion similar to *in vivo*. Besides, we combined state-of-the-art synchrotron-based elemental imaging with 3D electron microscopy to visualize all Ag

species with a resolution that allowed to locate them at the organelle level. The sample preparation was optimized to preserve the elemental content of the cells. By doing so, we could assess AgNP and AgNO₃ transformations in the liver with unequalled details, and unveil the Ag species excretion pathways (Fig. 10). It has been shown that the AgNP exposure pathway influences Ag clearance, which is very slow upon parenteral compared to oral exposure.⁷ To mimic these two situations, we have exposed spheroids to AgNP or AgNO₃, respectively, and observed similar trends in the accumulation and clearance of Ag. According to our results, Ag excretion is mainly mediated by transport of Ag(I) ions to bile canaliculi and through the Cu transporter ATP7B. These results are also consistent with clinical data that revealed an accumulation of Ag in the liver from patients with long-term hospitalization.⁴ Indeed, in this case the patients were exposed to pristine AgNP *via* parenteral exposure due to the release of AgNP from catheters. Moreover, in this cohort, Wilson patients with a defective ATP7B protein had significantly higher Ag accumulation compared to the whole cohort. These data are therefore consistent with the main liver excretion pathway we evidenced, *i.e. via* ATP7B.

The imaging methodology also allowed us to analyze the transformations of AgNP into other Ag species within the spheroids (Fig. 10). Ag-containing particles were observed following AgNO₃ exposure as shown in the liver of mice exposed to a Ag salt,^{41,42} confirming the *in vivo* relevance of our spheroid model. These Ag particles were located both in endolysosomes and vacuoles and correspond to both organothiol complexes (Ag₂S₂ and AgS₃) and to inorganic Ag₂S. Interestingly, this type of inorganic Ag was also detected by XAS upon cit-AgNP exposure. Concomitantly, Ag particles were visualized in vacuoles in this exposure condition, while we never observed Ag particles in vacuoles nor detected Ag₂S in 2D hepatocyte culture. Therefore, we formulate the hypothesis that hepatocytes can store Ag excess in vacuoles in the form of Ag₂S particles.

Finally, 3D electron microscopy enables to analyze cell ultrastructure in 3D at nanometer resolution. This approach revealed that the exposure to Ag can trigger either mitochondrial swelling, in conditions of high organothiol-Ag(I) accumulation (cit-AgNP), or mitochondrial network remodeling towards a more tubular morphology under low to moderate organothiol-Ag(I) accumulation (PVP-AgNP, AgNO₃). The ultrastructure of the other organelles and bile canaliculi were not significantly altered upon Ag exposure.

In conclusion, hepatocyte spheroids appeared to be a useful and pertinent tool to understand the fate of AgNP in the liver, since it recapitulates all data known from animal studies and it revealed information not accessible so far. Thus, this is an outstanding model to shed new lights on the metabolic liver transformations and excretion of engineered nanomaterials, beyond the specific case of AgNP. However, the integration of Kupffer cells in this system would enable to take into account the uptake and transformations performed by these macrophages.

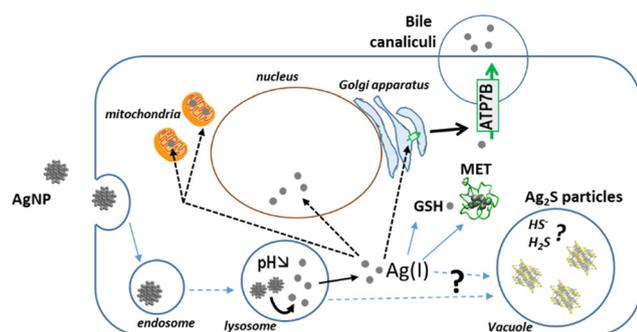


Fig. 10 Novel knowledge on AgNP fate based on 3D hepatocyte culture. In this liver-mimicking model, Ag(I) ions from organothiol species get excreted into the bile *via* the ATP7B Cu transporter. Moreover, hepatocytes protect themselves from excess Ag(I) by storing it into vacuoles. We also made the hypothesis that the physico-chemical environment within the vacuoles provide HS⁻ and/or H₂S species that lead to the formation of inorganic silver sulfide particles.



Author contributions

GV and AD conceived the project. PHJ, GV and AD designed the study. YR, VTS, VRS, MC, BG, DF, PC, IK, PHJ, GV and AD performed the experiments. YR, VTS, VRS, IK, RT, PHJ, GV and AD participated in data analysis. GV and AD wrote the manuscript.

Conflicts of interest

Authors have no competing interests to declare.

Acknowledgements

We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities (project LS-2967 on BM30 and LS-2710 on ID16B). This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The EM facility is headed by Guy Schoehn and supported by the Auvergne Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the fonds FEDER and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA). YR PhD is supported by the LabEx Gral and this project also received funding from Arcane Labex, programs from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003). This work was also supported by the CEA DRF-Impulsion grant FIB-Bio and the Région Auvergne Rhône-Alpes.

References

- J. Liu and R. H. Hurt, Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 2169–2175.
- S. W. Wijnhoven, W. J. Peijnenburg, C. A. Herberths, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens and D. Van De Meent, Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 2009, **3**, 109–138.
- E. C. M. Mimura, J. P. M. Favoreto, M. E. Favero, K. L. Bonifacio, T. S. Peixe, A. A. Morita, D. S. Barbosa, M. J. S. Yabe and A. J. F. Carrilho, Silver serum levels in burned patients treated with silver sulfadiazine and its toxicity on inflammatory cells, *Burns*, 2020, **46**(5), 1120–1127.
- J. Poznański, D. Słodacki, B. Czarkowska-Pączek, A. Bonna, O. Kornasiewicz, M. Krawczyk, W. Bal and L. Pączek, Cirrhotic Liver of Liver Transplant Recipients Accumulate Silver and Co-Accumulate Copper, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 1782.
- P. Bove, M. A. Malvindi, S. S. Kote, R. Bertorelli, M. Summa and S. Sabella, Dissolution test for risk assessment of nanoparticles: a pilot study, *Nanoscale*, 2017, **9**, 6315–6326.
- M. Marchioni, P.-H. Jouneau, M. Chevallet, I. Michaud-Soret and A. Deniaud, Silver nanoparticle fate in mammals: Bridging in vitro and in vivo studies, *Coord. Chem. Rev.*, 2018, **364**, 118–136.
- K. Park, E.-J. Park, I. K. Chun, K. Choi, S. H. Lee, J. Yoon and B. C. Lee, Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats, *Arch. Pharmacol. Res.*, 2011, **34**, 153–158.
- J. Bertinato, L. Cheung, R. Hoque and L. J. Plouffe, Ctr1 transports silver into mammalian cells, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2010, **24**, 178–184.
- A. Ibricevic, S. L. Brody, W. J. Youngs and C. L. Cannon, ATP7B detoxifies silver in ciliated airway epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, **243**, 315–322.
- M. Linder, L. Wooten, P. Cerveza, S. Cotton, R. Shulze and N. Lomeli, Copper transport, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, **67**, 965S–971S.
- D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch and K. A. Dawson, What the Cell “Sees” in Bionanoscience, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 5761–5768.
- N. Durán, C. P. Silveira, M. Durán and D. S. T. Martinez, Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review, *J. Nanobiotechnol.*, 2015, **13**(55), DOI: [10.1186/s12951-015-0114-4](https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4).
- X. Jiang, T. Miclăuş, L. Wang, R. Foldbjerg, D. S. Sutherland, H. Autrup, C. Chen and C. Beer, Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity, *Nanotoxicology*, 2015, **9**, 181–189.
- L. Wang, T. Zhang, P. Li, W. Huang, J. Tang, P. Wang, J. Liu, Q. Yuan, R. Bai, B. Li, K. Zhang, Y. Zhao and C. Chen, Use of Synchrotron Radiation-Analytical Techniques To Reveal Chemical Origin of Silver-Nanoparticle Cytotoxicity, *ACS Nano*, 2015, **9**, 6532–6547.
- G. Veronesi, A. Deniaud, T. Gallon, P.-H. Jouneau, J. Villanova, P. Delangle, M. Carrière, I. Kieffer, P. Charbonnier, E. Mintz and I. Michaud-Soret, Visualization, quantification and coordination of Ag⁺ ions released from silver nanoparticles in hepatocytes, *Nanoscale*, 2016, **8**, 17012–17021.
- G. Veronesi, C. Aude-Garcia, I. Kieffer, T. Gallon, P. Delangle, N. Herlin-Boime, T. Rabilloud and M. Carrière, Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages, *Nanoscale*, 2015, **7**, 7323–7330.
- L. Bobyk, A. Tarantini, D. Beal, G. Veronesi, I. Kieffer, S. Motellier, E. Valsami-Jones, I. Lynch, P.-H. Jouneau, K. Pernet-Gallay, C. Aude-Garcia, S. Sauvaigo, T. Douki, T. Rabilloud and M. Carriere, Toxicity and chemical transformation of silver nanoparticles in A549 lung cells: dose-rate-dependent genotoxic impact, *Environ. Sci.: Nano*, 2021, **8**, 806–821.
- V. Tardillo Suárez, E. Karepina, M. Chevallet, B. Gallet, C. Cottet-Rousselle, P. Charbonnier, C. Moriscot, I. Michaud-Soret, W. Bal, A. Fuchs, R. Tucoulou, P.-H. Jouneau, G. Veronesi and A. Deniaud, Nuclear translocation of silver ions and hepatocyte nuclear receptor impairment upon



- exposure to silver nanoparticles, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 1373–1387.
- 19 V. Tardillo Suárez, B. Gallet, M. Chevallet, P.-H. Jouneau, R. Tucoulou, G. Veronesi and A. Deniaud, Correlative transmission electron microscopy and high-resolution hard X-ray fluorescence microscopy of cell sections to measure trace element concentrations at the organelle level, *J. Struct. Biol.*, 2021, **213**, 107766.
 - 20 V. A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter and J. Susini, A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 63–68.
 - 21 O. Proux, X. Biquard, E. Lahera, J. J. Menthonnex, A. Prat, O. Ulrich, Y. Soldo, P. Trivison, G. Kapoujyan, G. Perroux, P. Taunier, D. Grand, P. Jeantet, M. Deleglise, J. Roux and J. Hazemann, FAME A New Beamline for XRay Absorption Investigations of VeryDiluted Systems of Environmental, Material and Biological Interests, *Phys. Scr.*, 2005, 970.
 - 22 O. Proux, V. Nassif, A. Prat, O. Ulrich, E. Lahera, X. Biquard, J.-J. Menthonnex and J.-L. Hazemann, Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances, *J. Synchrotron Radiat.*, 2006, **13**, 59–68.
 - 23 A. E. Pradas del Real, H. Castillo-Michel, R. Kaegi, B. Sinnet, V. Magnin, N. Findling, J. Villanova, M. Carrière, C. Santaella, A. Fernández-Martínez, C. Levard and G. Sarret, Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 1759–1768.
 - 24 G. Veronesi, T. Gallon, A. Deniaud, B. Boff, C. Gateau, C. Lebrun, C. Vidaud, F. Rollin-Genetet, M. Carrière, I. Kieffer, E. Mintz, P. Delangle and I. Michaud-Soret, XAS Investigation of Silver(I) Coordination in Copper(I) Biological Binding Sites, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 11688–11696.
 - 25 I. Kieffer and D. Testemale, *French Absorption spectroscopy beamline in Material and Environmental science*, database service, 2016.
 - 26 B. Ravel and M. Newville, ATHENA , ARTEMIS , HEPHAESTUS : data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, *J. Synchrotron Radiat.*, 2005, **12**, 537–541.
 - 27 J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona, *Nat. Methods*, 2012, **9**, 676–682.
 - 28 P. Thevenaz, U. E. Ruttimann and M. Unser, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *IEEE Trans. Image Process.*, 1998, **7**, 27–41.
 - 29 D. G. Lowe, Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints, *Int. J. Comput. Vis.*, 2004, **60**, 91–110.
 - 30 D. Tschumperle and R. Deriche, Vector-valued image regularization with PDEs: a common framework for different applications, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 2005, **27**, 506–517.
 - 31 J. Fehrenbach, P. Weiss and C. Lorenzo, Variational Algorithms to Remove Stationary Noise: Applications to Microscopy Imaging, *IEEE Trans. Image Process.*, 2012, **21**, 4420–4430.
 - 32 C. Sommer, C. Straehle, U. Kothe and F. A. Hamprecht, Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit, in *2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, IEEE, Chicago, IL, USA, 2011, pp. 230–233.
 - 33 I. Belevich, M. Joensuu, D. Kumar, H. Vihinen and E. Jokitalo, Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets, *PLoS Biol.*, 2016, **14**, e1002340.
 - 34 J. Ahrens, B. Geveci and C. Law, 36 - ParaView: An End-User Tool for Large-Data Visualization, in *Visualization Handbook*, ed. C. D. Hansen and C. R. Johnson, Butterworth-Heinemann, Burlington, 2005, pp. 717–731.
 - 35 S. Bolte and F. P. Cordelière, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *J. Microsc.*, 2006, **224**, 213–232.
 - 36 D. Legland, K. Kiéu and M.-F. Devaux, Computation of Minkowski Measures on 2D and 3D Binary Images, *Image Anal. Stereol.*, 2011, **26**, 83.
 - 37 A. Keramanizadeh, T. Berthing, E. Guźniczak, M. Wheeldon, G. Whyte, U. Vogel, W. Moritz and V. Stone, Assessment of nanomaterial-induced hepatotoxicity using a 3D human primary multi-cellular microtissue exposed repeatedly over 21 days - the suitability of the in vitro system as an in vivo surrogate, *Part. Fibre Toxicol.*, 2019, **16**(42), DOI: [10.1186/s12989-019-0326-0](https://doi.org/10.1186/s12989-019-0326-0).
 - 38 A. Espinosa, A. Curcio, S. Cabana, G. Radtke, M. Bugnet, J. Kolosnjaj-Tabi, C. Péchoux, C. Alvarez-Lorenzo, G. A. Botton, A. K. A. Silva, A. Abou-Hassan and C. Wilhelm, Intracellular Biodegradation of Ag Nanoparticles, Storage in Ferritin, and Protection by a Au Shell for Enhanced Photothermal Therapy, *ACS Nano*, 2018, **12**, 6523–6535.
 - 39 A. Curcio, A. V. de Walle, E. Benassai, A. Serrano, N. Luciani, N. Menguy, B. B. Manshian, A. Sargsian, S. Soenen, A. Espinosa, A. Abou-Hassan and C. Wilhelm, Massive Intracellular Remodeling of CuS Nanomaterials Produces Nontoxic Bioengineered Structures with Preserved Photothermal Potential, *ACS Nano*, 2021, **15**, 9782–9795.
 - 40 V. R. Sharma, A. Shrivastava, B. Gallet, E. Karepina, P. Charbonnier, M. Chevallet, P.-H. Jouneau and A. Deniaud, Canalicular domain structure and function in matrix-free hepatic spheroids, *Biomater. Sci.*, 2020, **8**, 485–496.
 - 41 K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H. R. Lam and E. H. Larsen, Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate, *Part. Fibre Toxicol.*, 2011, **8**, 18.
 - 42 M. van der Zande, R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. B. Peters, P. C. H. Hollman, P. J. M. Hendriksen, H. J. P. Marvin, A. A. C. M. Peijnenburg and H. Bouwmeester, Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure, *ACS Nano*, 2012, **6**, 7427–7442.



- 43 A. Malysheva, A. Ivask, C. L. Doolette, N. H. Voelcker and E. Lombi, Cellular binding, uptake and biotransformation of silver nanoparticles in human T lymphocytes, *Nat. Nanotechnol.*, 2021, **16**, 926–932.
- 44 K. Kluska, M. D. Peris-Díaz, D. Płonka, A. Moysa, M. Dadlez, A. Deniaud, W. Bal and A. Krężel, Formation of highly stable multinuclear Ag_nS_n clusters in zinc fingers disrupts their structure and function, *Chem. Commun.*, 2020, **56**, 1329–1332.
- 45 K. Kluska, G. Veronesi, A. Deniaud, B. Hajdu, B. Gyurcsik, W. Bal and A. Krężel, Structures of Silver Fingers and a Pathway to Their Genotoxicity, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2022, DOI: [10.1002/anie.202116621](https://doi.org/10.1002/anie.202116621).
- 46 H. Zhang, X. Wang, M. Wang, L. Li, C. H. Chang, Z. Ji, T. Xia and A. E. Nel, Mammalian Cells Exhibit a Range of Sensitivities to Silver Nanoparticles that are Partially Explicable by Variations in Antioxidant Defense and Metallothionein Expression, *Small*, 2015, **11**, 3797–3805.
- 47 D. A. Gonzalez-Carter, B. F. Leo, P. Ruenraroengsak, S. Chen, A. E. Goode, I. G. Theodorou, K. F. Chung, R. Carzaniga, M. S. Shaffer and D. T. Dexter, Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H₂S-synthesizing enzymes, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 42871.
- 48 P. Charbonnier, B. Chovelon, C. Ravelet, T. D. Ngo, M. Chevallet and A. Deniaud, ATP7B-Deficient Hepatocytes Reveal the Importance of Protein Misfolding Induced at Low Copper Concentration, *Cell*, 2022, **11**, 3400.
- 49 M. Minghetti and K. Schirmer, Interference of silver nanoparticles with essential metal homeostasis in a novel enterohepatic fish in vitro system, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 1777–1790.
- 50 J. Li, B. Zhang, X. Chang, J. Gan, W. Li, S. Niu, L. Kong, T. Wu, T. Zhang, M. Tang and Y. Xue, Silver nanoparticles modulate mitochondrial dynamics and biogenesis in HepG2 cells, *Environ. Pollut.*, 2020, **256**, 113430.
- 51 D. F. Mello, L. L. Maurer, I. T. Ryde, D. H. Songr, S. M. Marinakos, C. Jiang, M. R. Wiesner, H. Hsu-Kim and J. N. Meyer, In Vivo Effects of Silver Nanoparticles on Development, Behavior, and Mitochondrial Function are Altered by Genetic Defects in Mitochondrial Dynamics, *Environ. Sci. Technol.*, 2022, **56**, 1113–1124.
- 52 R. Holmila, H. Wu, J. Lee, A. W. Tsang, R. Singh and C. M. Furdui, Integrated Redox Proteomic Analysis Highlights New Mechanisms of Sensitivity to Silver Nanoparticles, *Mol. Cell. Proteomics*, 2021, **20**, 100073.



Supplementary Information

Deciphering silver nanoparticle fate in liver up to biliary excretion using HepG2/C3A spheroids in scenarios mimicking different exposure pathways

Yours Rekik^{a,b,‡}, Vanessa Tardillo Suárez^{c,‡}, Vikas Raj Sharma^{a,b}, Mireille Chevallet^a, Benoit Gallet^d, Denis Falconet^e, Peggy Charbonnier^a, Isabelle Kieffer^f, Rémi Tucoulou^c, Pierre-Henri Jouneau^{b,*}, Giulia Veronesi^{a,c,*} and Aurélien Deniaud^{a,*}

^a Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IRIG, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, F-38000 Grenoble, France

^b Univ. Grenoble Alpes, CEA, IRIG, MEM, F-38000 Grenoble, France

^c ESRF, The European Synchrotron. 71 avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

^d Univ. Grenoble Alpes CEA, CNRS, Institut de Biologie Structurale, 71 avenue des Martyrs, F-38042 Grenoble, France

^e Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG-LPCV, Grenoble, France.

^f BM30 FAME beamline, ESRF, Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble, Grenoble, France

* Correspondence should be addressed to pierre-henri.jouneau@cea.fr, giulia.veronesi@cea.fr or aurelien.deniaud@cea.fr

‡ These authors contributed equally.

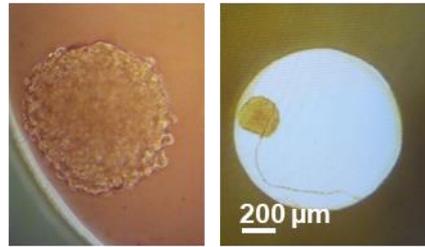
Captions for videos.

Video S1. The video presents the FIB-SEM stack of micrographs within a spheroid exposed to cit-AgNP for 7 days. The video shows the raw FIB-SEM volume and its segmentation into the different organelles: nuclei (pink), mitochondria (green), vesicles (blue), bile canaliculi (grey) and NP (black). The different segments are also shown sequentially to visualize the different cellular compartments.

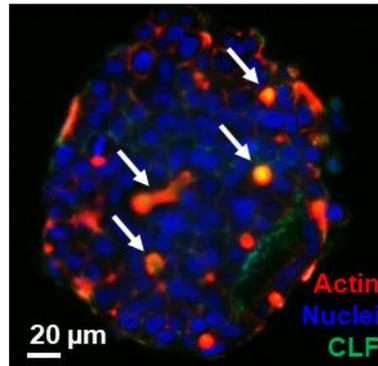
Video S2. The video presents the FIB-SEM stack of micrographs within a spheroid exposed to PVP-AgNP for 7 days. The video shows the raw FIB-SEM volume and its segmentation into the different organelles: nuclei (pink), mitochondria (green), vesicles (blue), bile canaliculi (grey) and NP (black). The different segments are also shown sequentially to visualize the different cellular compartments.

Video S3. The video presents the FIB-SEM stack of micrographs within a spheroid exposed to AgNO₃ for 7 days. The video shows the raw FIB-SEM volume and its segmentation into the different organelles: nuclei (pink), mitochondria (green), vesicles (blue), bile canaliculi (grey) and NP (black). The different segments are also shown sequentially to visualize the different cellular compartments.

A- Optical microscopy



B- Light sheet microscopy



C- Electron microscopy

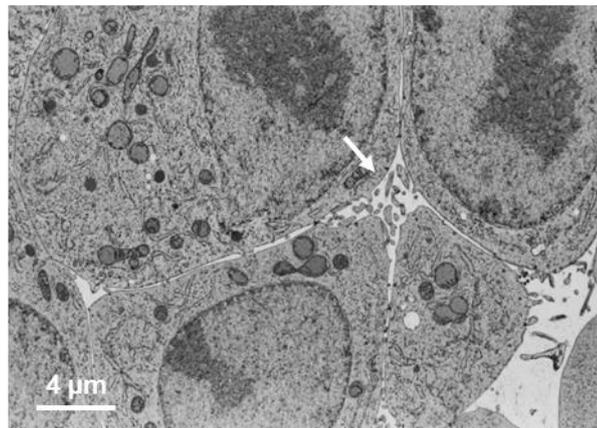


Fig. S1 Hepatocyte spheroid model characterization. (A) A mature HepG2/C3a spheroid observed by optical microscopy. (B) Single plan light sheet fluorescence microscopy of a matrix-free hepatic spheroid stained for actin (red), Hoechst (blue) and a fluorescent bile salt (CLF, green). White arrows locate active bile canaliculi regions. (C) Ultrastructure within a spheroid visualized by 3D electron microscopy (FIB-SEM). The white arrow pinpoints a bile canaliculus.

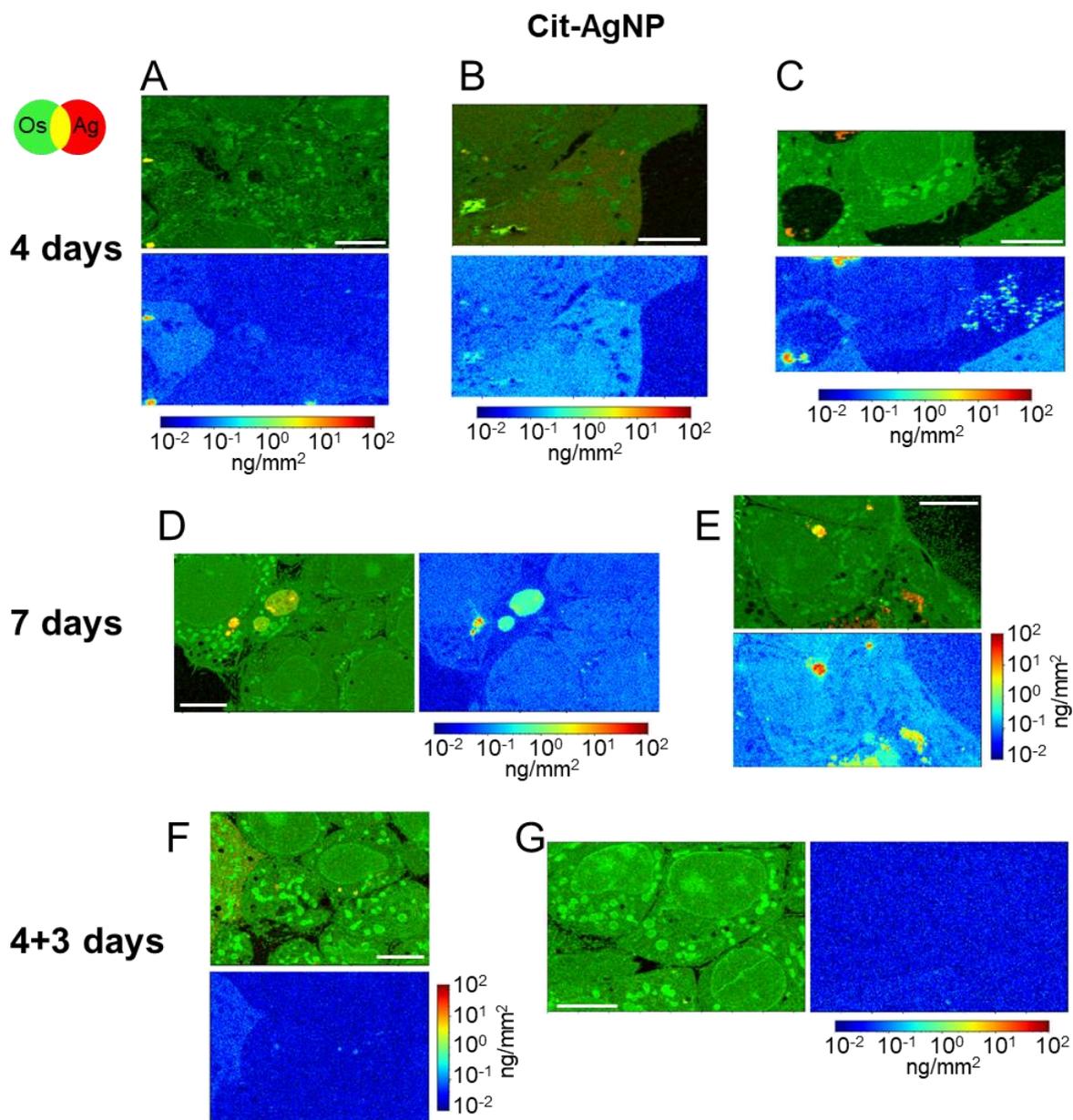


Fig. S2 False-color representation of Ag distribution in hepatocytes exposed to cit-AgNP, extracted from XRF hyperspectral images with $100 \times 100 \text{ nm}^2$ pixel size. Cells were exposed to citrate-AgNP for 4 days (A, B, C), 7 days (D, E), or for 4 days followed by 3 days of recovery (F, G). In each figure panel, the first map represents the overlay of Os (green) and Ag (red), the second the quantitative distribution of the areal density of Ag over the same map area, in logarithmic scale. Scale bars = $5 \mu\text{m}$.

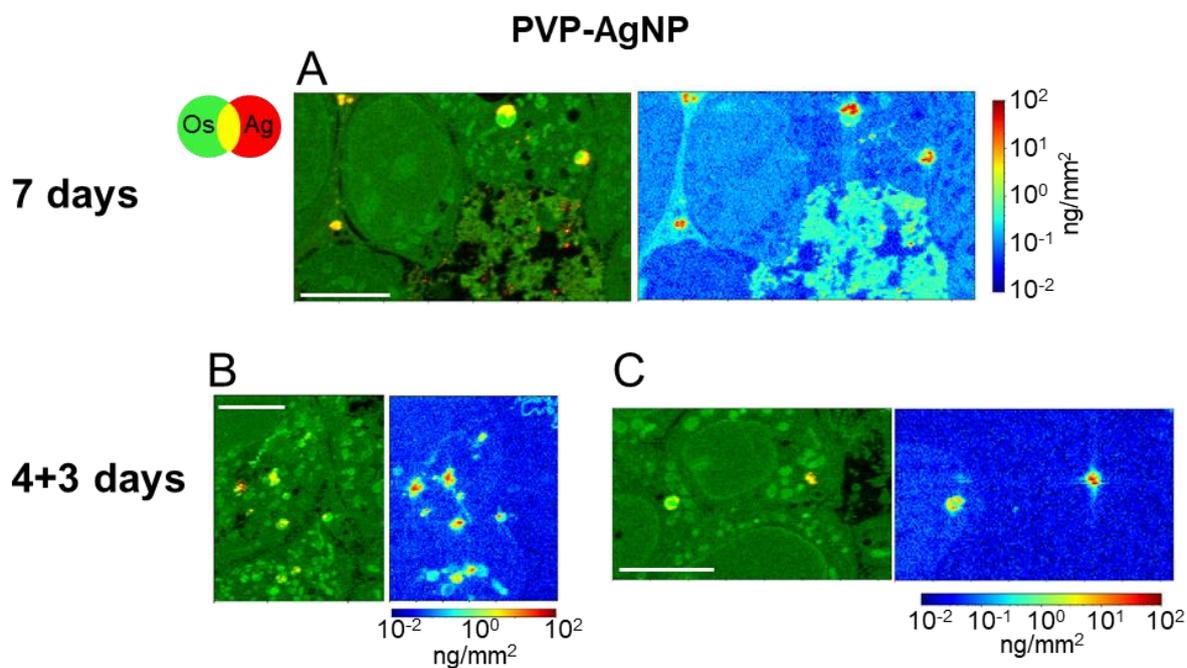
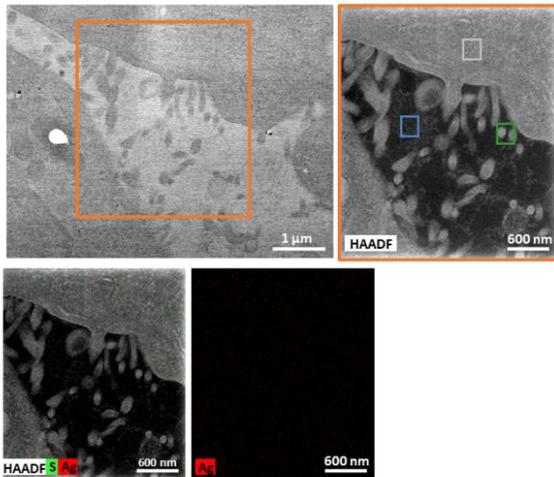


Fig. S3 False-color representation of Ag distribution in hepatocytes exposed to PVP-AgNP, extracted from XRF hyperspectral images with $100 \times 100 \text{ nm}^2$ pixel size. Cells were exposed to PVP-AgNP for 7 days (A), or for 4 days followed by 3 days of recovery (B, C). In each figure panel, the first map represents the overlay of Os (green) and Ag (red), the second the quantitative distribution of the areal density of Ag over the same map area, in logarithmic scale. Scale bars = $5 \mu\text{m}$.

A- PVP-AgNP – 7 days



B- cit-AgNP – 7 days

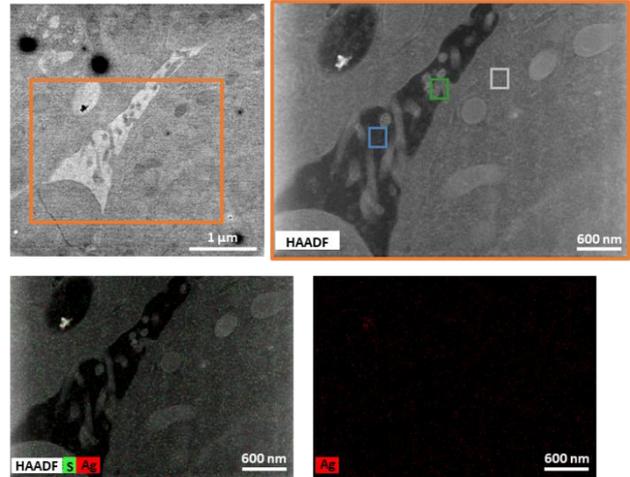


Fig. S4 Chemical analysis by STEM-EDX of spheroid sections exposed for 7 days to PVP-AgNP (A) or cit-AgNP (B). STEM micrograph field of view centered on a bile canaliculi area (upper panels). EDX maps of the region in the orange box (middle panels). EDX spectra of the different regions selected in the HAADF map (colored boxes) in the energy range 1 – 3.5 keV (lower panels). The position of Si, S, Cl and Ag peaks is highlighted.

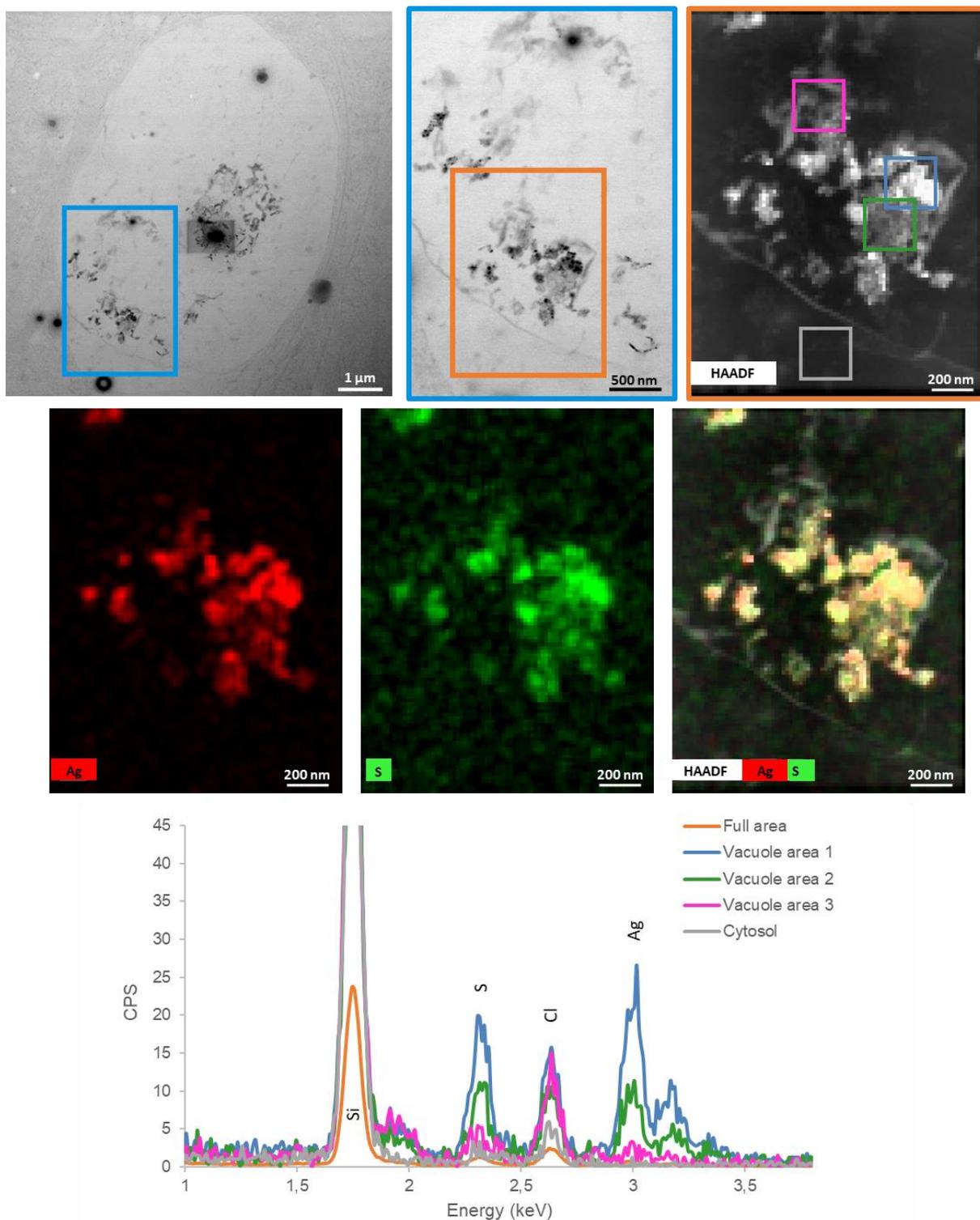


Fig. S5 Chemical analysis by STEM-EDX of a spheroid section exposed for 4 days to cit-AgNP. STEM micrograph field of view showing a vacuole containing transformed AgNP (upper panels). EDX maps of the region in the orange box (middle panels). EDX spectra of the different regions selected in the HAADF map (colored boxes) in the energy range 1 – 3.5 keV (lower panel). The position of Si, S, Cl and Ag peaks is highlighted.

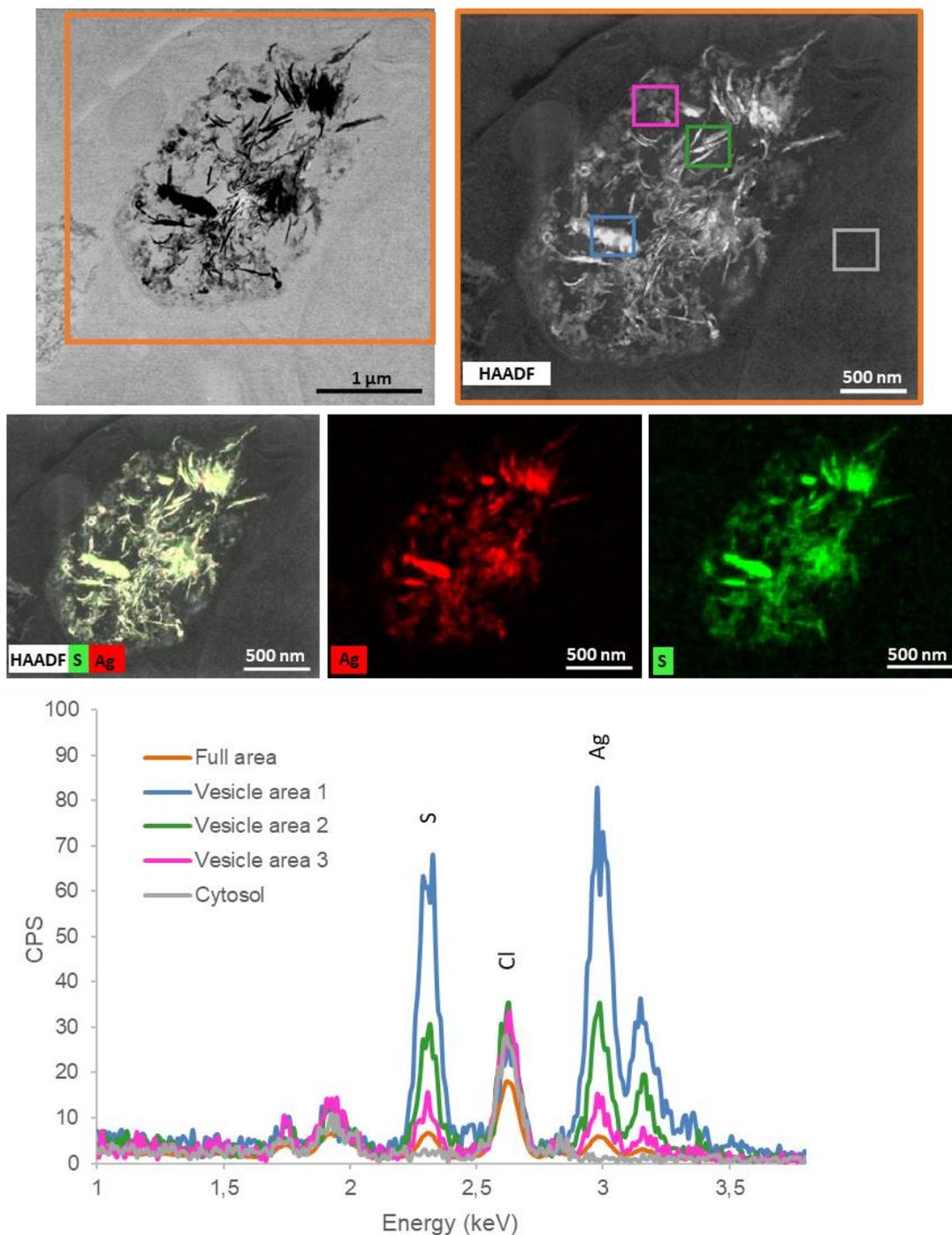


Fig. S6 Chemical analysis by STEM-EDX of a spheroid section exposed for 7 days to PVP-AgNP. STEM micrograph field of view showing a vesicle containing transformed AgNP (upper panels). EDX maps of the region in the orange box (middle panels). EDX spectra of the different regions selected in the HAADF map (colored boxes) in the energy range 1 – 3.5 keV (lower panel). The position of S, Cl and Ag peaks is highlighted.

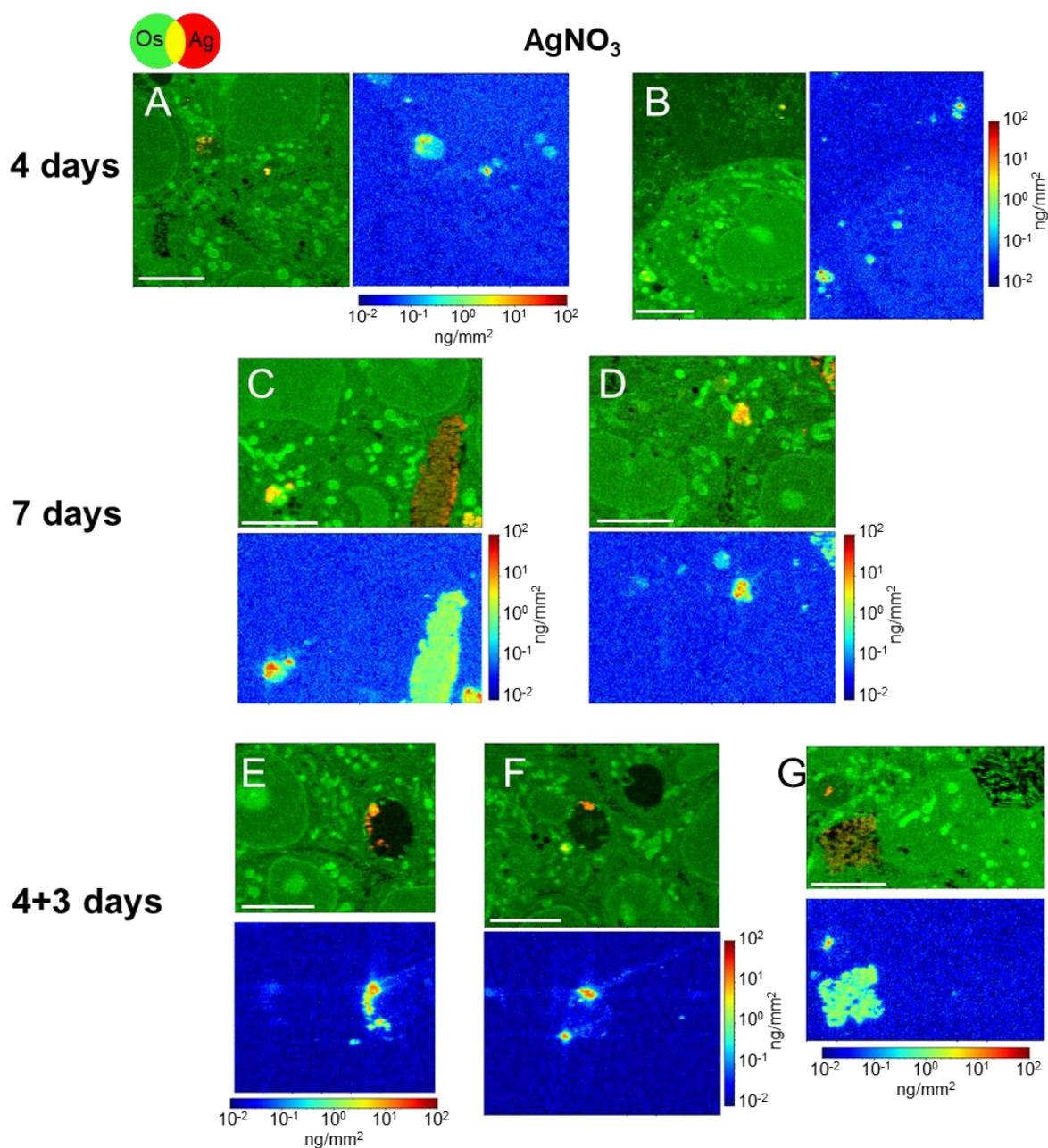


Fig. S7 False-color representation of Ag distribution in hepatocytes exposed to AgNO_3 , extracted from XRF hyperspectral images with $100 \times 100 \text{ nm}^2$ pixel size. Cells were exposed to a Ag salt for 4 days (A, B), 7 days (C, D), or for 4 days followed by 3 days of recovery (E, F, G). In each figure panel, the first map represents the overlay of Os (green) and Ag (red), the second the quantitative distribution of the areal density of Ag over the same map area, in logarithmic scale. Scale bars = $5 \mu\text{m}$.

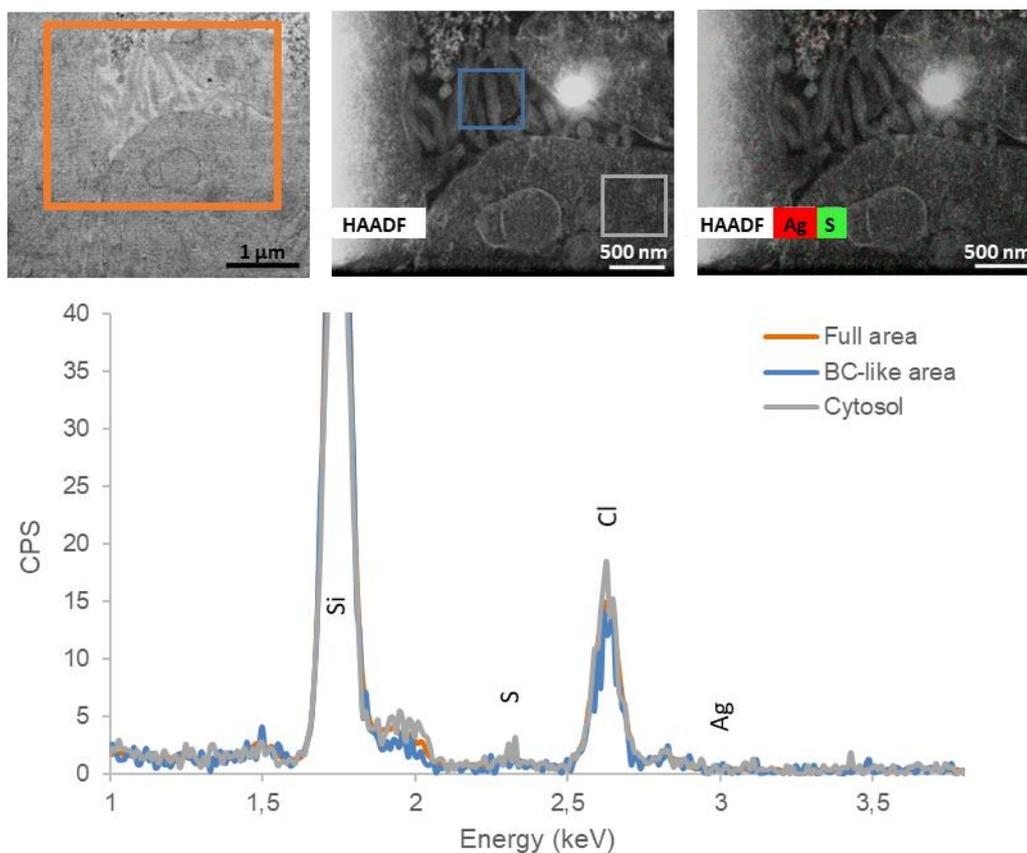


Fig. S8 Chemical analysis by STEM-EDX of spheroid sections exposed for 7 days to AgNO_3 . STEM micrograph field of view centered on a bile canaliculi area (upper left and center panels). EDX maps of the region in the orange box (upper right panel). EDX spectra of the different regions selected in the HAADF map (colored boxes) in the energy range 1 – 3.5 keV (lower panel). The position of Si, S, Cl and Ag peaks is highlighted.

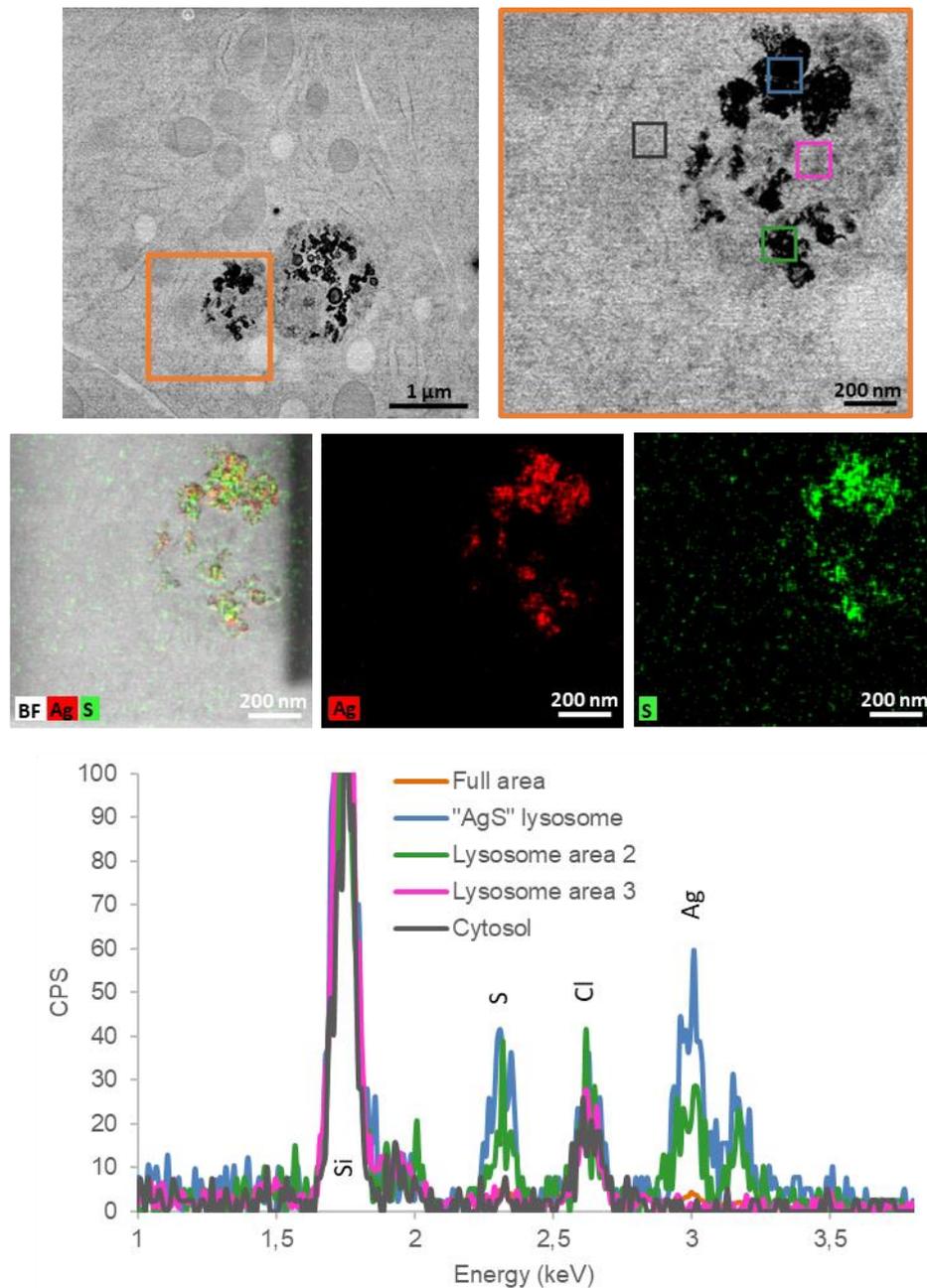


Fig. S9 Chemical analysis by STEM-EDX of a spheroid section exposed for 7 days to AgNO_3 . STEM micrograph field of view showing vesicles containing Ag particles (upper panels). EDX maps of the region in the orange box (middle panels). EDX spectra of the different regions selected in the HAADF map (colored boxes) in the energy range 1 – 3.5 keV (lower panel). The position of Si, S, Cl and Ag peaks is highlighted.

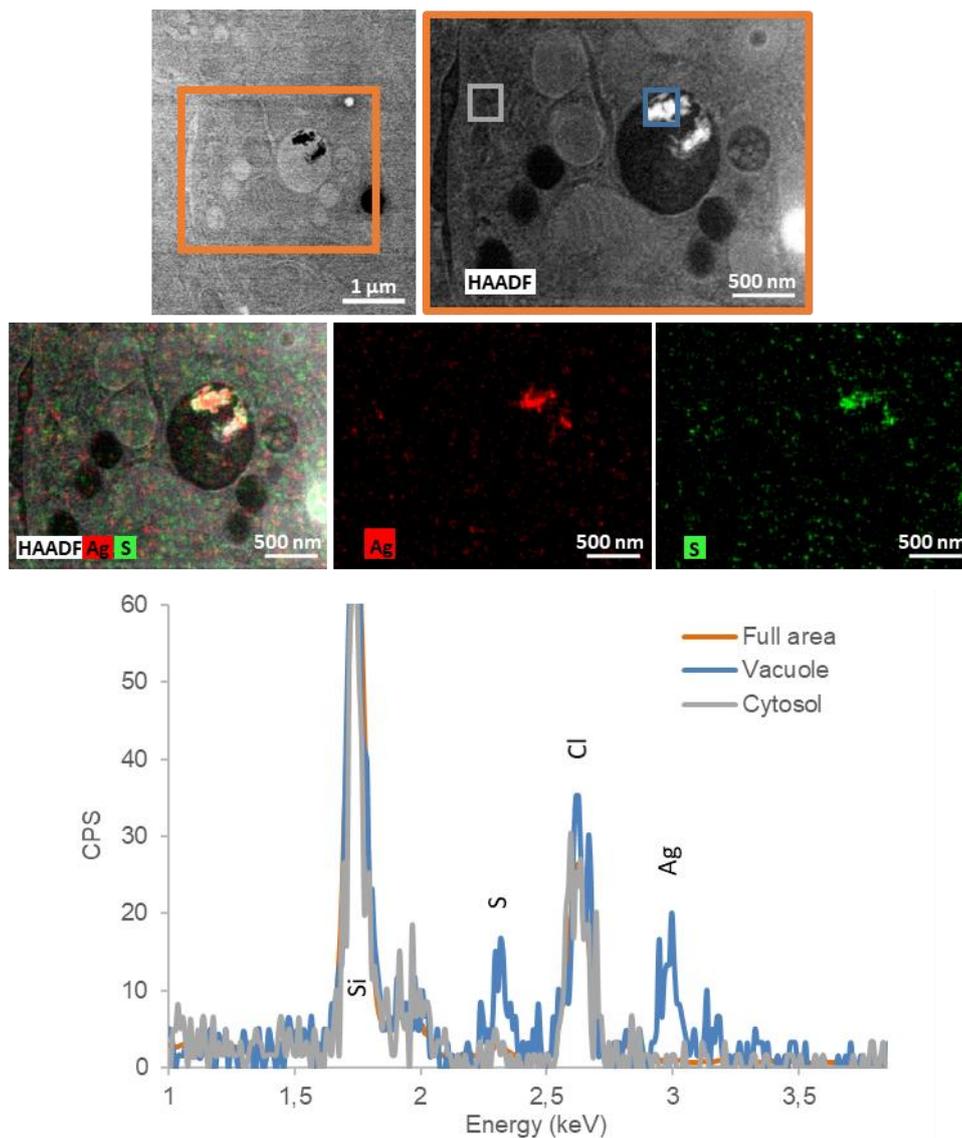


Fig. S10 Chemical analysis by STEM-EDX of a spheroid section exposed for 7 days to AgNO_3 . STEM micrograph field of view showing a vacuole containing Ag particles (upper panels). EDX maps of the region in the orange box (middle panels). EDX spectra of the different regions selected in the HAADF map (colored boxes) in the energy range 1 – 3.5 keV (lower panel). The position of Si, S, Cl and Ag peaks is highlighted.

Perspectives

L'article qui constitue le corps de ce chapitre présente une étude sur le devenir des espèces d'Ag dans un modèle 3D de sphéroïde d'hépatocytes dont l'objectif est de mimer le devenir de NP-Ag dans l'organisme, avec un focus sur leurs transformations et l'excrétion d'espèces d'Ag du foie ainsi que leurs effets sur l'ultrastructure des hépatocytes.

La combinaison des résultats obtenus avec les différentes techniques d'imagerie et d'analyse chimique utilisées a permis de montrer que le processus principal de transformation des NP-Ag dans les hépatocytes est conservé entre les systèmes de culture cellulaire en 2D et en 3D. Ce processus a lieu dans les lysosomes et entraîne la dissolution des NP-Ag et la libération des ions Ag(I) qui sont transportés vers le cytosol, où ils forment des composés organothiolés AgS_2 et AgS_3 .

Cependant, l'analyse de spéciation par XAS a montré la formation d'espèces inorganiques Ag_2S dans les cas d'exposition de sphéroïdes à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de citrate, alors que nous n'avons jamais détecté, dans les mêmes conditions d'exposition, ce type d'espèces dans des hépatocytes cultivés en 2D. Les différents types d'imagerie ont mis en évidence la présence de particules dans des vacuoles dans des coupes de sphéroïdes exposés à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de citrate. De plus, l'analyse chimique par EDX a montré que ces particules contiennent de l'Ag et du soufre. Ceci n'avait jamais été observé dans les systèmes de culture 2D d'hépatocytes. Ainsi, nous formulons l'hypothèse que l'excès d'Ag est stocké par les hépatocytes dans des vacuoles sous forme d'espèces Ag_2S . Puisque Ag_2S est un composé cristallin, la technique de choix pour vérifier notre hypothèse est la diffraction électronique. Cette technique a permis de prouver la formation de ces espèces d'Ag dans des cellules immunitaires du cerveau (Gonzalez-Carter et al., 2017) et dans un modèle d'algues (Wang et al., 2016), exposés aux NP-Ag. Au cours de ma thèse, nous avons fait quelques essais de diffraction électronique sur des coupes de sphéroïdes, mais nous n'avons pas réussi à résoudre des problèmes techniques lors de la mise en place de cette approche. Il serait intéressant de poursuivre cette approche dans le futur. Toutefois, cette technique a également ses limitations, car elle ne permet de visualiser des particules que lorsqu'elles ont une certaine taille.

Les mécanismes conduisant à la présence d'espèces Ag_2S dans les vacuoles restent encore à confirmer. Néanmoins, l'observation d'une fusion entre un endolysosome et une vacuole que nous avons reconstruits en 3D suggère que les endolysosomes pourraient vider leur contenu dans les vacuoles. Pour confirmer ceci, il serait nécessaire d'observer plusieurs échantillons. Je peux émettre l'hypothèse que le stockage de l'Ag dans les vacuoles serait un moyen pour réduire sa toxicité en le transformant en espèces non toxiques Ag_2S .

De plus, grâce à l'utilisation de la technique FIB-SEM, nous avons étudié les effets des espèces d'Ag sur l'ultrastructure des hépatocytes. Parmi les différents organites segmentés, les mitochondries ont présenté des modifications ultrastructurales différentes selon le type d'espèce auquel les sphéroïdes sont exposés. En effet, l'analyse quantitative de la sphéricité des réseaux mitochondriaux a mis en évidence le gonflement d'une fraction significative des

mitochondries dans le cas d'exposition aux NP-Ag enrobées de citrate et la formation d'un réseau mitochondrial plus tubulaire dans les cas d'exposition à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de PVP. Le gonflement des mitochondries pourrait être un signe de toxicité induite par les NP-Ag enrobées de citrate. La formation d'un réseau mitochondrial tubulaire suggère que l'équilibre de fusion-fission des mitochondries pourrait être altéré dans les cas d'exposition à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de PVP. Afin d'aller plus loin dans la compréhension des effets d'espèces d'Ag sur les mitochondries, il serait intéressant d'étudier l'expression des protéines impliquées dans l'équilibre fusion-fission de ces organites telles que DRP1 qui est impliquée dans la fission mitochondriale et MFN1 et MFN2 qui induisent la fusion mitochondriale. En raison de la forme tubulaire des mitochondries, nous pouvons nous attendre à avoir une surexpression des protéines MFN et/ou une régulation négative de la protéine DRP1 dans les cas d'exposition à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de PVP. Étant donné que la mitochondrie est un organe clé dans le maintien du métabolisme énergétique de la cellule, il serait également intéressant d'évaluer les effets des espèces d'Ag sur les fonctions mitochondriales en étudiant, par exemple la respiration mitochondriale, en mesurant le potentiel mitochondrial et en réalisant un bilan énergétique.

Dans l'ensemble, les résultats que nous avons obtenus, avec notre modèle 3D de sphéroïde d'hépatocytes, sur les transformations d'espèces d'Ag jusqu'à leur excrétion du foie sont en accord avec les résultats rapportés dans les études *in vivo* chez l'animal et avec les données cliniques sur l'accumulation de l'Ag dans les foies de personnes ayant subi une hospitalisation de longue durée. Ceci souligne la pertinence de notre modèle pour mimer *in vitro* le devenir des NP-Ag et de leurs produits de transformations tel qu'il peut se dérouler *in vivo* dans le foie. Notre approche d'imagerie couplée à notre modèle 3D pourrait être également pertinente pour étudier les transformations d'autres NP métalliques dans le foie et d'analyser la distribution de leurs produits de transformations à l'échelle de la cellule.

Il serait toutefois intéressant d'améliorer ce modèle afin de développer un modèle hépatique encore plus proche de la physiologie et de l'architecture du foie. Nous pourrions envisager de transposer notre modèle à des hépatocytes primaires ou à des cellules souches pluripotentes induites différenciées en hépatocytes, afin d'obtenir des modèles plus proches de la physiologie d'un foie. Mais, la culture de ces deux types cellulaires est plus délicate que celle des lignées. En effet, les hépatocytes primaires ne prolifèrent pas et peuvent se différencier en culture et à ma connaissance, il n'existe pas encore de protocole permettant d'obtenir des hépatocytes matures à partir de cellules souches.

In vivo, les NP-Ag qui arrivent *via* la circulation sanguine peuvent être en partie phagocytées par les cellules de Kupffer, les macrophages du foie présents dans les sinusoides et en contact avec les LSEC. Veronesi et al. ont étudié la spéciation de l'Ag dans des macrophages primaires murins exposés à des NP-Ag et ont montré la dissolution des NP et la formation d'espèces AgS_2 (Veronesi et al., 2015b). Il est difficile de prédire le devenir de ces espèces si elles sont excrétées des macrophages. Ainsi, la coculture d'hépatocytes sous forme de sphéroïde en présence de cellules de Kupffer permettrait de déterminer s'il y aurait une spéciation différente de l'Ag dans ces deux types cellulaires et si la présence des cellules de Kupffer aurait un impact sur la spéciation de l'Ag dans les hépatocytes. Cependant, ce qui est compliqué avec

ce modèle, c'est le maintien d'un ratio approprié entre les deux types cellulaires qui soit le plus proche possible du ratio *in vivo*, où les hépatocytes sont environ quatre fois plus nombreux que les cellules de Kupffer (Kmiec, 2001). Un autre point à prendre en considération est la difficulté de différencier les hépatocytes des cellules de Kupffer dans les études de spéciation réalisées avec un tel modèle.

En outre, dans le foie, les NP-Ag passent à travers la barrière endothéliale avant leur entrée dans les hépatocytes et peuvent être potentiellement endocytées par les LSEC, étant donné la grande capacité d'endocytose de ces cellules. Afin de vérifier ceci, les LSEC pourraient être cultivées en 2D et exposées aux NP-Ag dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les hépatocytes. L'analyse chimique par EDX pourrait confirmer ou non la présence d'endosomes contenant des NP-Ag dans les LSEC. Pour aller encore plus loin, les LSEC pourraient être intégrées dans le sphéroïde hépatique de façon à développer un sphéroïde vascularisé avec un réseau de sinusoides fenêtrés et des cellules de Kupffer pourraient être ajoutés afin de mimer plus fidèlement le microenvironnement cellulaire du foie. Actuellement, la difficulté à reproduire *in vitro* un réseau vasculaire rend le développement de tels modèles encore inaccessible, mais nous pouvons espérer que les améliorations futures des systèmes *in vitro* permettrait d'atteindre cet objectif à long terme.

Pour une étude plus complète du devenir des NP-Ag dans le foie, on pourrait envisager de connecter les canalicules biliaires à des tubes biliaires formés par des cholangiocytes ajoutés au système multicellulaire, ce qui permettrait de récupérer la bile et de doser l'Ag excrété.

Chapitre 3 : Étude de l'ultrastructure de foie de souris par FIB-SEM

Introduction

Les premières observations des fenêtres des LSEC remontent aux années cinquante avec les travaux de Fawcett (Fawcett, 1955) et Parks (Parks, 1957) qui ont mis en évidence, par microscopie électronique, la présence de discontinuités dans l'endothélium hépatique. Ensuite, l'ultrastructure des fenêtres a été détaillée en 1970 dans l'article d'Eddie Wisse qui a montré que ce sont des pores dans la membrane des LSEC plutôt que des espaces intercellulaires, mettant ainsi fin à la controverse quant à l'existence et à la nature exacte de ces structures (Wisse, 1970). Ces observations ont mis en évidence que les fenêtres se forment dans des zones plates des LSEC, principalement en dehors de la zone nucléaire. Elles sont dispersées à la surface des LSEC soit individuellement ou groupées dans des *sieve plates* ou « des plaques à tamis » qui sont des groupes de quelques fenêtres à quelques dizaines de fenêtres (Wisse et al., 1985). Le nom *sieve plate* provient du fait que ces groupes de fenêtres permettent de filtrer ou de cribler (*to sieve*, en anglais) les molécules qui les traversent en direction des hépatocytes ou en direction de la lumière du sinusoïde. Les *sieve plates* représentent entre 60 et 75 % de la totalité des fenêtres des LSEC chez le rat (Svistounov et al., 2012).

Jusqu'aux années quatre-vingt-dix, les techniques de microscopie électronique TEM et SEM ont été les techniques de référence pour l'étude des fenêtres des LSEC. L'introduction ultérieure de la microscopie à force atomique (AFM pour *atomic force microscopy*) et des techniques de microscopie photonique à super-résolution a permis d'apporter des connaissances complémentaires quant à l'ultrastructure des fenêtres et leur organisation spatiale dans des conditions physiologiques, pathologiques ou suite à des traitements avec différents agents influençant leur morphologie (pour des revues, voir Zapotoczny et al., 2020 pour les études des LSEC par AFM et Øie et al., 2018 pour les études par les techniques de microscopie à super-résolution). Récemment, des études combinant plusieurs de ces techniques d'imagerie ont également été réalisées (Butola et al., 2021 ; Tinguely et al., 2020 ; Mönkemöller et al., 2015). Les observations en microscopie électronique sont généralement réalisées soit sur des blocs ou des coupes de foie fixés soit sur des LSEC fraîchement isolées, cultivées et fixées. Conventionnellement, les études par AFM et par les techniques optiques se faisaient uniquement sur des LSEC isolées et fixées, et récemment, l'imagerie des LSEC isolées et vivantes est devenue possible (Zapotoczny et al., 2019 ; Di Martino et al., 2018 ; Zapotoczny et al., 2017). Les modèles animaux les plus utilisés sont le rat et la souris, mais les LSEC d'autres espèces animales (Braet et Wisse, 2002) ainsi que les LSEC humaines (Kong et al., 2021 ; Wisse et al., 2008) ont également été étudiées.

L'étape la plus critique dans l'étude des fenêtres des LSEC est la préservation de leur intégrité une fois les cellules ou les tissus isolés du foie. Les cellules du foie sont récupérées après perfusion du foie de l'animal à la collagénase et les LSEC sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de Percoll (Smedsrød et Pertoft, 1985). Les cellules fraîchement

isolées sont alors cultivées sur une lamelle de verre puis préparées et imagées. Cependant, les LSEC isolées peuvent perdre rapidement leurs fenêtres en culture et ne doivent pas être laissées plus de deux jours en culture avant leur observation. Mönkemöller et al. ont rapporté un protocole de cryo-préservation des LSEC de rat qui conservent, après décongélation, les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des LSEC fraîchement isolées, ce qui simplifie leur utilisation (Mönkemöller et al., 2018). Pour les préparations des échantillons de tissus, des petits morceaux de foie sont prélevés, fixés, colorés, inclus en résine et imagés. Dans ce cas, l'étape critique est l'étape de fixation, étape qui permet d'immobiliser et de stabiliser l'échantillon pour préserver son ultrastructure dans un état le plus proche possible de l'état vivant. Elle peut être réalisée par un fixateur en solution (fixation chimique) ou par congélation (cryo-fixation). Toutes les étapes de fixation doivent être finement contrôlées pour ne pas introduire d'artéfacts pouvant, par exemple modifier la structure des fenêtres (Cogger et al., 2015 ; Wisse et al., 2010). En effet, un problème de fixation peut induire la perte des fenêtres (défenestration), leur rétrécissement ou la formation de gros pores (*gaps*) qui ont un diamètre supérieur à 250 nm et qui sont probablement le résultat de fusion de fenêtres (Cogger et al., 2015). La présence de gros pores sur les images des LSEC peut mener à de fausses interprétations des observations, car ces pores peuvent être soit un artéfact de préparation, soit le résultat d'une altération des LSEC dans des conditions pathologiques ou suite à des traitements avec des agents toxiques ou des médicaments (Szafrńska et al., 2021a ; Cogger et al., 2004). Il en découle l'importance de l'optimisation de la préparation des échantillons pour une meilleure préservation des fenêtres des LSEC.

La caractérisation des fenêtres consiste principalement à déterminer leur diamètre, leur fréquence, c'est-à-dire leur nombre par cellule ou par unité de surface et à quantifier la porosité des LSEC qui est définie comme étant la fraction de la surface fenêtrée d'une LSEC (Szafrńska et al., 2021b). Ces paramètres dépendent de plusieurs facteurs tels que l'espèce étudiée et la nature de l'échantillon. Par exemple, le diamètre des fenêtres des LSEC isolées est plus large que celui des LSEC dans le tissu hépatique (Steffan et al., 1987). Ces mesures dépendent aussi de la technique d'imagerie. A titre d'illustration, les différences entre les diamètres mesurés à partir d'images de LSEC, obtenues avec différentes techniques peuvent être de l'ordre de 30 % (Szafrńska et al., 2022 ; informations supplémentaires de Zapotoczny et al., 2019). La position des fenêtres dans le lobule influence également leur diamètre et par conséquent, la porosité des LSEC. En effet, des études par SEM sur des LSEC humaines et des LSEC de rat ont montré que les fenêtres sont plus larges dans les zones périportales et que la porosité des LSEC est plus élevée dans les zones centrales (Horn et al., 1986 ; Wisse et al., 1983). Les fenêtres sont des structures dynamiques dont le diamètre change aussi en fonction de différents facteurs tels que le régime alimentaire (Cogger et al., 2016), l'état de jeûne (O'Reilly et al., 2010), le stress oxydant (Cogger et al., 2004) ou en réponse à divers médicaments, hormones, drogues et hépatotoxines (pour une revue, voir Szafrńska et al., 2021a). De plus, la morphologie de l'endothélium fenêtré est modifiée lors du vieillissement (Le Couteur et al., 2002) et dans le cas de pathologies hépatiques (Poisson et al., 2017). La défenestration est l'une des principales altérations de la barrière endothéliale. Elle est caractérisée par la perte des fenêtres ou la diminution de leur nombre et de leurs

diamètres et par conséquent, une diminution de la porosité des LSEC. Une étude comparative chez le rat a montré qu'entre un individu jeune de 6 semaines et un individu âgé de 26 semaines, les sinusoides perdent environ 50 % de leur porosité et qu'à l'inverse, l'épaisseur de leur paroi augmente d'environ 50 %. Ceci entraîne une dérégulation du transport des différentes molécules telles que les lipoprotéines qui ne passent pas ou plus difficilement à travers les LSEC de sujets âgés. Ce phénomène serait lié au développement de l'athérosclérose (Le Couteur et al., 2002). Lors du vieillissement, les sinusoides sont dans un état de pseudo-capillarisation. La défenestration des LSEC se produit également au cours de maladies chroniques du foie (DeLeve, 2015 ; Horn et al., 1987). La fibrose hépatique, par exemple, se caractérise par la défenestration des LSEC et le dépôt d'un tissu conjonctif dans l'espace de Disse. La fibrose peut évoluer vers une lésion plus grave appelée cirrhose. Au cours de cette évolution pathologique, une lame basale continue se forme sous l'endothélium hépatique qui perd ainsi ses propriétés de barrière de filtrage entre le sang et les hépatocytes. Cette transformation est appelée capillarisation des sinusoides (DeLeve, 2015). De plus, les LSEC possèdent une capacité intrinsèque à moduler le diamètre de leurs fenêtres comme cela a pu être mis en évidence par Zapotoczny et al. lors du suivi temporel par AFM des fenêtres de LSEC de rongeurs isolées, cultivées sur une lamette en verre et imagées dans leur milieu de culture (Zapotoczny et al., 2019 ; Zapotoczny et al., 2017). En effet, ces études ont montré que les fenêtres ont un cycle de vie de quelques minutes à environ 2 heures dans les LSEC isolées pendant lequel elles peuvent se former, se fermer et même se déplacer jusqu'à 5 μm dans les *sieve plates*. Les auteurs ont également observé des changements significatifs du diamètre d'une fenêtre individuelle, pouvant aller jusqu'à 200 % de sa taille. Ces changements de taille ne sont pas a priori corrélés avec le temps de vie des fenêtres (Zapotoczny et al., 2019). La modulation du diamètre des fenêtres est possible grâce à la structure particulière de leur cytosquelette riche en actine, appelé *fenestrae-associated cytoskeleton ring*, qui entoure chacune de ces structures. Un cytosquelette appelé *sieve plate-associated cytoskeleton ring* entoure aussi chaque *sieve plate* (Braet et al., 1996). Le lecteur intéressé par l'état de l'art sur les différents mécanismes à l'origine de la formation des fenêtres des LSEC et les voies de signalisation impliquées dans leur régulation peut se référer à la revue récente de Szafrńska et al. (Szafrńska et al., 2021a).

La plupart des études de caractérisation des fenêtres sont basées sur l'imagerie 2D des LSEC. Les études décrivant la structure 3D de ces cellules, et particulièrement de leurs fenêtres, sont très limitées. Braet et al. ont été les premiers à s'intéresser à l'étude de l'organisation spatiale 3D des fenêtres en utilisant la tomographie électronique de LSEC isolées et spécifiquement préparées pour la visualisation du cytosquelette des fenêtres (Braet et al., 2009 ; 2007). Cette technique leur a permis de reconstruire en 3D des rangées de fenêtres en train de se former. Le rendu volumique des modèles 3D montre que ces fenêtres présentent un diamètre croissant et entourent une structure particulière, appelée « centre de formation des fenêtres » ou *fenestrae-forming center* (FFC), qui joue un rôle central dans leur formation (Braet et al., 2007).

Comme je l'ai décrit précédemment, la qualité des images en microscopie dépend essentiellement de la préparation de l'échantillon à observer. Ceci est aussi vrai pour les acquisitions FIB-SEM. Pour cette technique, l'acquisition d'images de qualité est primordiale

pour obtenir une segmentation correcte des structures d'intérêt. Nous avons choisi comme modèle le foie de souris, car son ultrastructure est proche de celle de l'Homme et ce modèle animal permet d'appliquer des méthodes de préparation d'échantillons impossibles à réaliser sur une biopsie de foie humain. Pour étudier l'ultrastructure de foie de souris, et plus précisément celle des LSEC et de leurs fenêtres, nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'optimisation de la préparation de blocs de foie de souris pour l'imagerie FIB-SEM. En deuxième lieu, mon objectif a été de développer une approche de segmentation pour la reconstruction 3D des LSEC et de leurs fenêtres.

Dans ce chapitre, je vais présenter les résultats d'optimisation de la préparation des échantillons étudiés puis détailler la méthode de segmentation des LSEC et à la fin du chapitre, je vais discuter les intérêts et les limites de notre étude pour l'analyse de l'ultrastructure du tissu hépatique avant de présenter quelques perspectives de ce travail.

1. Optimisation de la préparation des échantillons de foie de souris

L'objectif de la première partie de notre étude a été de choisir une préparation d'échantillons de foie de souris qui permet de préserver l'ultrastructure du tissu hépatique et d'obtenir un contraste optimal pour une visualisation correcte des structures intercellulaires : sinusoïde, espace de Disse et canalicules biliaires. Pour cela, nous avons comparé quatre protocoles de préparation.

1.1. Amélioration de la préservation de l'ultrastructure du tissu hépatique

Avant acquisition au FIB-SEM, les blocs de foie sont fixés, contrastés par des métaux lourds, déshydratés et enrobés dans une résine. Les techniques de fixation chimique conventionnellement utilisées pour la préparation d'échantillons de foie prélevés chez des animaux de laboratoire sont la fixation par immersion et la fixation par perfusion suivie d'immersion. Dans la première technique, les échantillons sont prélevés chez l'animal, coupés en petits cubes et plongés dans le fixateur. La deuxième technique consiste à injecter la solution de fixation dans la circulation sanguine de l'animal vivant avant de prélever et de couper les échantillons. La fixation est ensuite poursuivie à l'extérieur de l'animal en plongeant les échantillons dans le fixateur qui est généralement une solution d'aldéhyde : glutaraldéhyde et/ou formaldéhyde.

Le premier bloc de foie de souris (échantillon 1) qui était à notre disposition a été fixé par immersion et préparé principalement pour réaliser des coupes histologiques. Il a ensuite été observé au FIB-SEM et une pile d'images a été acquise avec une taille de voxel de $10 \times 10 \times 10 \text{ nm}^3$. La **Figure 12A**, extraite de cette pile d'images, montre des hépatocytes entourés de sinusoïdes formés par des LSEC. Un canalicule biliaire est également visible sur cette figure. Il est à noter que les espaces de Disse apparaissent dilatés et contiennent une faible densité de microvillosités hépatocytaires (étoiles sur la **Figure 12A**). En outre, les fenêtres des LSEC sont mal préservées avec cette préparation et les LSEC apparaissent continues. Ceci confirme que la fixation par immersion ne permet pas une préservation

optimale de l'ultrastructure des sinusoides, comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (Vreuls et al., 2014 ; Wisse et al., 2010).

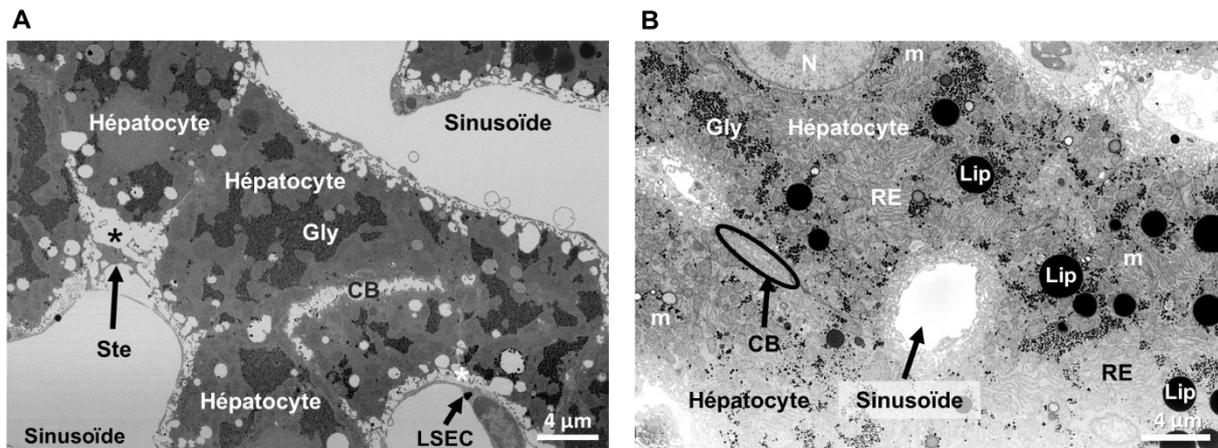


Figure 12 : Fixation d'échantillons de foie de souris par immersion et par perfusion suivie d'immersion. (A) Micrographie du tissu hépatique dans un bloc de foie de souris fixé par immersion (échantillon 1). Les étoiles montrent des espaces de Disse dilatés. (B) Micrographie du tissu hépatique dans un bloc de foie prélevé chez une souris perfusée en intracardiaque par la solution de fixation avant d'être immergé dans cette solution (échantillon 2). CB : canalicule biliaire, Gly : glycogène, Lip : gouttelette lipidique, m : mitochondrie, N : noyau, RE : réticulum endoplasmique, Ste : cellule stellaire.

Un deuxième bloc de foie (échantillon 2) a été prélevé chez une souris perfusée avec la solution de fixation, dans laquelle il a ensuite été immergé. Cet échantillon a été observé au FIB-SEM et une pile d'images a été acquise avec la même taille de voxel que l'échantillon 1. Dans ce deuxième échantillon, le tissu hépatique apparaît plus compact et les différents organites cellulaires comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique sont mieux préservés que dans l'échantillon 1 (**Figure 12B**). Une acquisition à plus haute résolution (taille de voxel = $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$) d'un sinusoides montre la préservation des fenêtres des LSEC et la compacité de l'espace de Disse qui présente une grande densité de microvillosités hépatocytaires (**Figure 13**). Ces observations sont en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature puisque la fixation par perfusion est considérée comme la technique de référence pour préserver l'ultrastructure des échantillons de foie prélevés chez des animaux de laboratoire (Wisse et al., 2010). Les différences en termes de préservation de l'intégrité du tissu hépatique entre les deux techniques de fixation sont principalement liées à une meilleure pénétration du fixateur dans les cellules dans le cas de perfusion de la souris. Au contraire, dans le cas de fixation par immersion, la pénétration du fixateur est plus lente, car elle est limitée par la diffusion. Ceci crée des gradients de fixation dans le tissu, en particulier entre les parties périphériques et le centre du bloc (Wisse et al., 2022 ; 1970).

Dans un souci de simplification du texte, je vais employer dans la suite du chapitre le terme haute résolution pour désigner une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$.

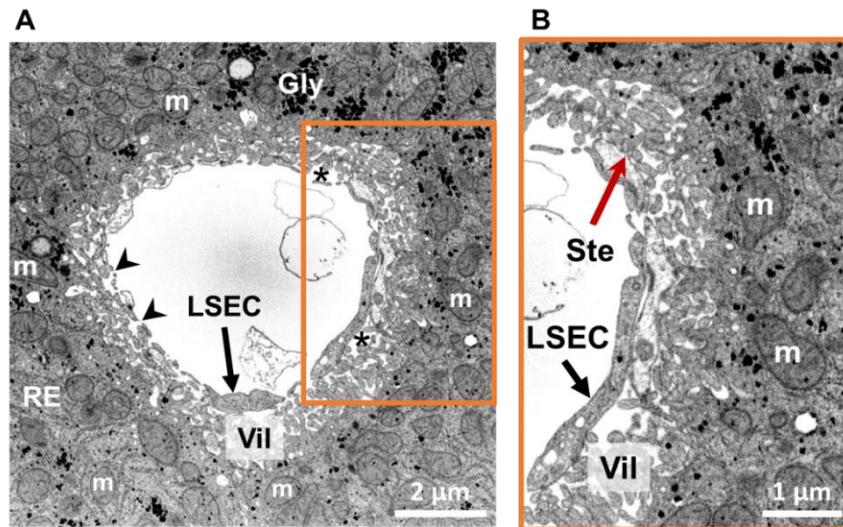


Figure 13 : Préservation des fenêtres des LSEC dans un bloc de foie de souris fixé par perfusion suivie d'immersion. (A) Micrographie d'un sinusoïde (échantillon 2). Les têtes de flèches pointent des fenêtres d'une LSEC. Les étoiles montrent l'espace de Disse. (B) Micrographie représentant un zoom sur le voisinage de la LSEC observée sur l'image A (rectangle orangé sur l'image A). La flèche rouge montre une cellule stellaire en contact avec la LSEC. Gly : glycogène, m : mitochondrie, RE : réticulum endoplasmique, Ste : cellule stellaire, Vil : microvillosités hépatocytaires.

1.2. Amélioration du contraste des structures hépatiques

Outre les altérations ultrastructurales du tissu hépatique, le contraste intracellulaire dans l'échantillon 1 n'est pas suffisant pour visualiser les différents organites cellulaires. Par exemple, les membranes des mitochondries des hépatocytes sont difficiles à distinguer (**Figure 14**). Le protocole 1 utilisé pour préparer cet échantillon est le protocole de préparation chimique conventionnelle. Il inclut une première étape de fixation avec du glutaraldéhyde, suivie d'une post-fixation avec un seul bain de tétr oxyde d'osmium OsO_4 (Sabatini et al., 1963). Le tétr oxyde d'osmium est utilisé pour fixer et contraster les lipides et par conséquent, les organites délimités par des membranes lipidiques (Wigglesworth, 1957). La coloration peu intense obtenue avec ce protocole peut être due à un double effet : une mauvaise pénétration d' OsO_4 dans les structures cibles en plus d'une mauvaise préservation de l'ultrastructure du tissu hépatique.

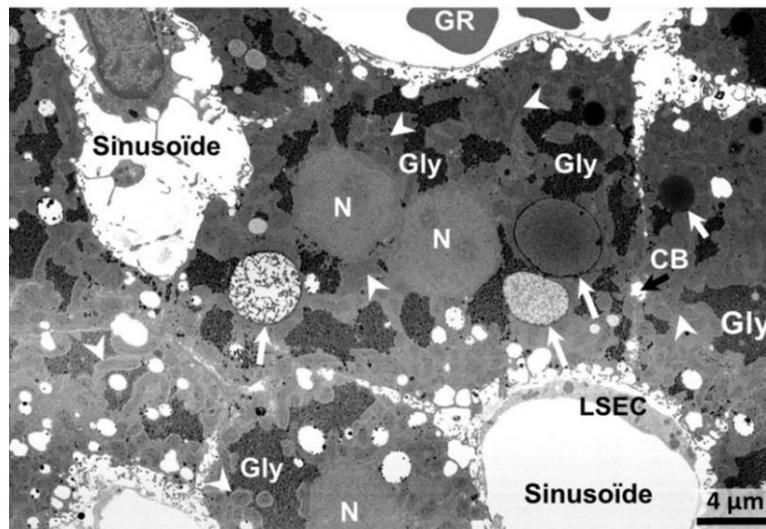


Figure 14 : Contraste des différentes structures hépatiques obtenu avec le protocole 1. Le contraste est poussé sur la micrographie pour des raisons de visualisation. Les têtes de flèches pointent des mitochondries. Un gradient de coloration est visible dans les gouttelettes lipidiques (flèches blanches). Des globules rouges sont observés dans le sinusoides en haut de l'image. CB : canalicule biliaire, Gly : glycogène, GR : globule rouge, N : noyau

L'échantillon 2 a été, quant à lui, préparé en utilisant deux bains d' OsO_4 : un premier bain d' OsO_4 réduit avec du ferrocyanure de potassium ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, abrégé en KFe) suivi d'un deuxième bain d' OsO_4 (protocole 2). Le tétraoxyde d'osmium réduit avec du ferrocyanure de potassium (OsO_4 - KFe) est généralement utilisé pour renforcer le contraste des membranes lipidiques (White et al., 1979 ; De Bruijn et Den Beejen, 1975). Comme le montre la **Figure 12B**, le contraste intracellulaire dans l'échantillon 2 est meilleur que celui dans l'échantillon 1. En effet, les différents organites peuvent être facilement distingués (mitochondries, réticulum endoplasmique, glycogène). Sur les images acquises à plus haute résolution, les crêtes mitochondriales sont clairement visibles (**Figure 13**). L'état de préservation et la coloration des mitochondries sont des critères d'évaluation de la qualité de préparation des échantillons biologiques pour la microscopie électronique (Liang et al., 2021 ; Shami et al., 2016). L'amélioration du contraste observée avec le protocole 2 est due à l'utilisation du ferrocyanure de potassium, d'une part et à une meilleure pénétration de l' OsO_4 dans le tissu, d'autre part.

Puisque l' OsO_4 réagit avec les lipides, les gouttelettes lipidiques apparaissent fortement contrastées sur les images FIB-SEM (**Figure 15**). En raison de l'abondance de ces gouttelettes dans l'échantillon 2 prélevé chez une souris âgée de 6 mois, les autres structures apparaissent faiblement contrastées. Comme les gouttelettes lipidiques s'accumulent avec l'âge de la souris (Geltinger et al., 2020 ; Gong et al., 2017), nous avons ensuite préparé des blocs de foie prélevés chez des souris plus jeunes, âgées de 4 semaines.

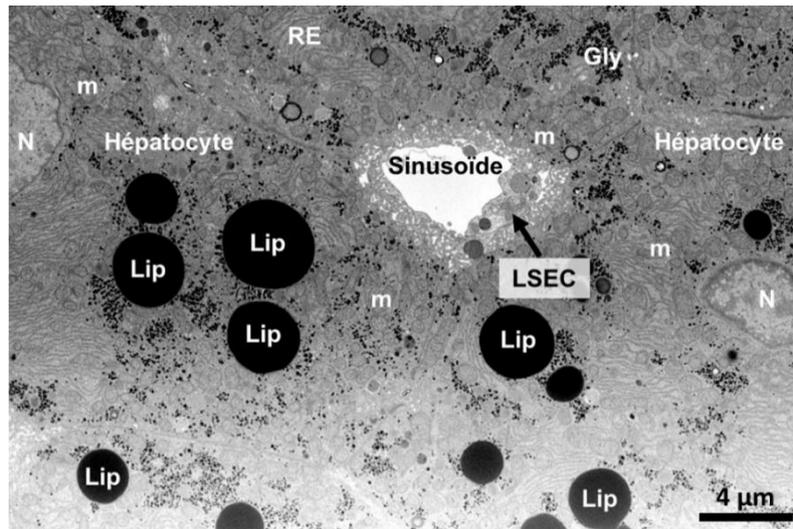


Figure 15 : Gouttelettes lipidiques dans un bloc de foie prélevé chez une souris âgée de 6 mois (protocole 2). Sur la micrographie, les gouttelettes lipidiques apparaissent fortement contrastées par rapport aux autres organites cellulaires. Gly : glycogène, Lip : gouttelette lipidique, m : mitochondrie, N : noyau, RE : réticulum endoplasmique.

Dans le même échantillon, les images acquises à plus haute résolution sur un sinusoiède montrent une similarité de contraste entre les membranes des LSEC et les microvillosités des hépatocytes de leur voisinage (**Figure 16**). Compte tenu de la proximité et du contact entre ces structures, cette similarité de contraste rend plus complexe la distinction des LSEC de leur voisinage cellulaire au cours de l'étape de segmentation. La présence éventuelle de cellules stellaires dans l'espace de Disse complique encore plus la tâche de segmentation des LSEC.

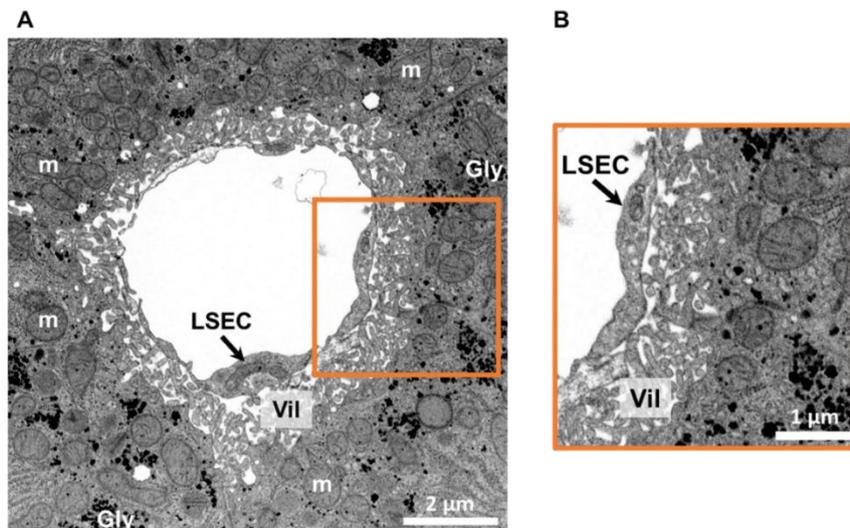


Figure 16 : Contraste des LSEC et des microvillosités hépatocytaires obtenu avec le protocole 2. (A) Micrographie montrant un sinusoiède hépatique et les hépatocytes qui les entourent. (B) Micrographie représentant un zoom sur le voisinage de la LSEC observée sur l'image A (carré orange sur l'image A). Notez la similarité de contraste entre la membrane de la LSEC et les microvillosités de l'hépatocyte sous-jacent. Gly : glycogène, m : mitochondrie, Vil : microvillosités hépatocytaires.

Dans un autre échantillon préparé avec le protocole 2, des zones de contraste noir ont été observées principalement dans les sinusoides (**Figure 17**). Ce sont des cavités dans lesquelles la résine ne s'est pas imprégnée et leur présence sur les images complique la segmentation des LSEC. Pour éviter ce problème de pénétration de la résine qui est plus récurrent dans les gros blocs de foie, des échantillons plus petits, d'environ 1 mm³, ont été préparés et utilisés dans les acquisitions suivantes.

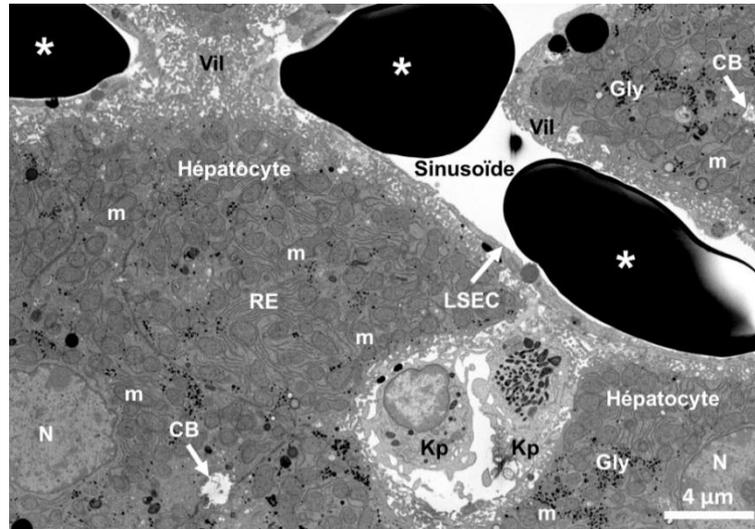


Figure 17 : Cavités dans un bloc de foie de souris préparé avec le protocole 2. Micrographie montrant des cavités dans des sinusoides de l'échantillon (étoiles). CB : canalicule biliaire, Gly : glycogène, Kp : cellule de Kupffer, m : mitochondrie, N : noyau, RE : réticulum endoplasmique, Vil : microvillosités hépatocytaires.

1.3. Comparaison entre la méthode de contraste en bloc et la cryo-substitution

Dans l'optique d'assurer une préservation optimale des LSEC et de renforcer leur contraste par rapport aux autres structures hépatiques, nous avons ensuite comparé la coloration chimique des blocs à température ambiante et la coloration à froid par cryo-substitution. Pour cela, nous avons testé deux protocoles (protocoles 3 et 4) sur des blocs de foie prélevés chez des souris jeunes perfusées (âgées de 4 semaines). Le protocole 3 est inspiré du protocole mis en place par le *National Center for Microscopy and Imaging Research* (NCMIR) pour améliorer le contraste membranaire des tissus de mammifères à observer en SBF-SEM (Deerinck et al., 2010). Ce protocole repose sur l'ajout de l'activateur thiocarbohydrazide (TCH) et des deux colorants : acétate d'uranyle et aspartate de plomb. Comparé à quatre autres protocoles de préparation, le protocole du NCMIR a permis d'obtenir une préservation et un contraste optimaux pour l'imagerie du tissu hépatique de rat par SBF-SEM (Shami et al., 2016). À l'inverse du protocole original, nous n'avons pas utilisé de TCH dans notre troisième protocole. Le TCH est généralement ajouté pour augmenter le contraste membranaire en renforçant la fixation de l'OsO₄ sur les lipides (Seligman et al., 1966). Par contre, il a été récemment rapporté qu'il augmente le risque de fracture mécanique des échantillons de cerveau par la formation probable de bulles d'azote (Mikula et Denk, 2015). Notre protocole 3 inclut une double imprégnation des échantillons par l'OsO₄, comme pour le protocole 2, suivie d'une coloration

à l'acétate d'uranyle et d'une coloration à l'aspartate de plomb. L'acétate d'uranyle est un sel de métal lourd utilisé pour la coloration des protéines et des acides nucléiques (Huxley et Zubay, 1961) et l'aspartate de plomb est utilisé principalement pour la coloration des protéines (Walton, 1979). Ces deux colorants permettent également d'augmenter la conductivité de l'échantillon et de réduire les effets de charge en microscopie électronique 3D (Kizilyaprak et al., 2019 ; Genoud et al., 2018). Le protocole 4, quant à lui, inclut une première étape de préfixation chimique (perfusion + immersion) suivie d'une congélation à haute pression et d'une cryo-substitution. La préfixation est nécessaire pour éviter les altérations ultrastructurales qui peuvent avoir lieu entre le prélèvement des échantillons et le début de leur congélation (K. McDonald et al., 2010). L' OsO_4 et l'acétate d'uranyle sont ajoutés au solvant de substitution (acétone) pour fixer et colorer les échantillons. Ils commencent à pénétrer dans le tissu à basse température (-90°C) avant de commencer leurs réactions progressivement avec la remontée de la température pendant le cycle de cryo-substitution. La fixation par l' OsO_4 , par exemple, se produit à partir d'une température de -70°C (White et al., 1976). Deux blocs de foie ont été préparés, un avec le protocole 3 et l'autre avec le protocole 4. Ils ont été observés au FIB-SEM et des piles d'images ont été acquises avec une taille de voxel de $10 \times 10 \times 10 \text{ nm}^3$. La **Figure 18** montre deux micrographies du tissu hépatique dans ces deux échantillons.

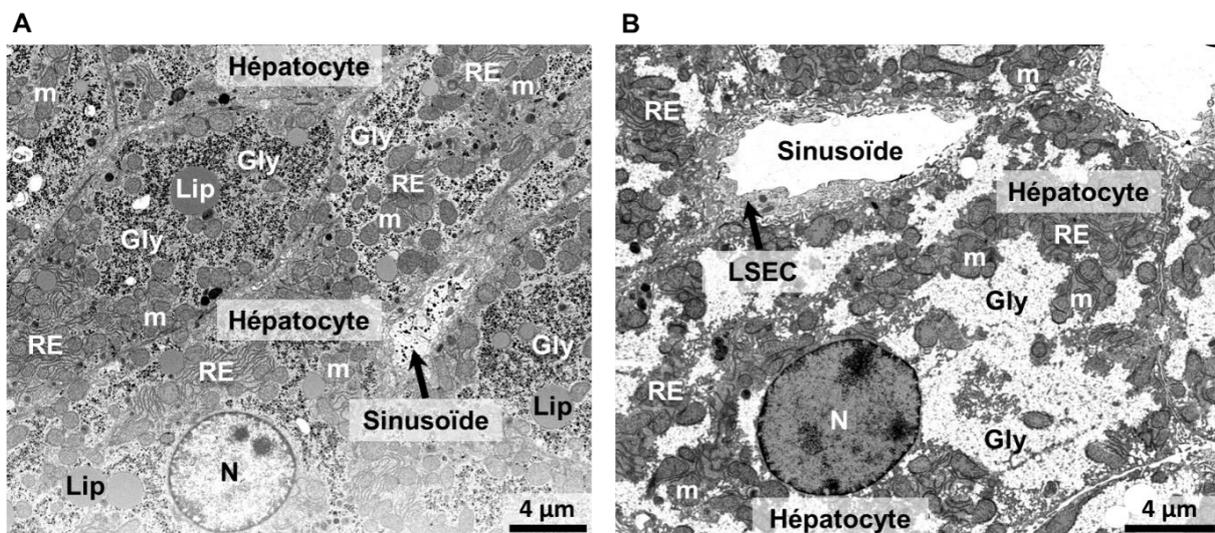


Figure 18 : Coloration à température ambiante (contraste en bloc) et coloration à froid (cryo-substitution) de blocs de foie de souris. (A) Micrographie d'un bloc de foie de souris préparé avec la méthode de contraste en bloc (protocole 3). (B) Micrographie d'un bloc de foie de souris préparé par congélation à haute pression suivie de cryo-substitution (protocole 4). Notez l'aspect en rosettes du glycogène, obtenu avec le protocole 3 (A) et sa forme en amas non colorés obtenue avec le protocole 4 (B). Gly : glycogène, Lip : gouttelette lipidique, m : mitochondrie, N : noyau, RE : réticulum endoplasmique.

Les deux échantillons présentent une bonne préservation du tissu hépatique et un contraste global plus marqué que celui obtenu avec le protocole 2. Les structures fines telles que les crêtes mitochondriales et le réticulum endoplasmique sont bien préservées et sont clairement visibles, surtout sur les images à plus haute résolution (**Figures 19 et 20**). Cependant, avec la coloration du protocole 4, le glycogène perd son aspect en rosettes, classique des préparations chimiques et apparaît sous forme d'amas non colorés (clairs sur les images) observés entre les

mitochondries et le réticulum endoplasmique. En effet, l'aspect du glycogène sur les images de microscopie électronique dépend fortement de la méthode de préparation de l'échantillon (Minio et al., 1966). Des amas de glycogène non colorés ont été précédemment décrits par von Schack et Fakan sur des images TEM de coupes de foie de souris colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb après préparation par congélation à haute pression suivie de cryo-substitution avec de l'acétone pure (von Schack et Fakan, 1994). De plus petites zones similaires ont également été observées dans des coupes de foie de rat préparées en utilisant le même protocole mais en ajoutant de l' OsO_4 au solvant de substitution (Hsieh et al., 2006). La nature exacte des réactions chimiques qui donnent un tel aspect au glycogène après cryo-fixation et cryo-substitution du tissu hépatique est inconnue. De plus, Vye et Fischman ont rapporté que la coloration en bloc avec des solutions non tamponnées d'acétate d'uranyle aqueux modifie considérablement l'aspect du glycogène particulaire dans le tissu musculaire humain et celui de la souris. En particulier, ils ont décrit l'extraction des particules du glycogène et par conséquent, l'apparition des amas non colorés sur des images TEM des tissus étudiés (Vye et Fischman, 1970). Ainsi, dans notre cas, le double effet de la préparation avec cryo-fixation et de la coloration à l'acétate d'uranyle pourrait expliquer l'aspect du glycogène obtenu avec le protocole 4.

Le contraste des mitochondries est plus marqué avec la coloration du protocole 4 et celui du réticulum endoplasmique est plus marqué avec la coloration du protocole 3, comme le montre les **Figures 19 et 20**. En ce qui concerne les LSEC, leur contraste sur les images obtenues avec le protocole 3 n'est pas suffisant pour distinguer leurs membranes des microvillosités hépatocytaires. À l'inverse, leurs membranes sont mieux contrastées avec la coloration du protocole 4 (**Figure 20A**). Ceci est surtout visible dans les régions fenêtrées des LSEC (**Figures 20C et 20D**).

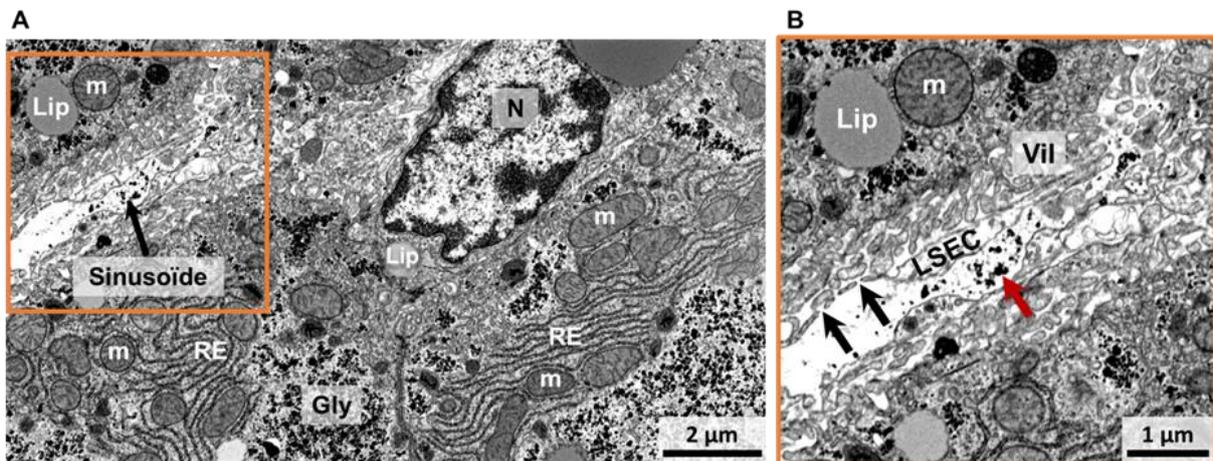


Figure 19 : Contraste des différentes structures hépatiques obtenu avec le protocole 3. (A) Micrographie montrant une partie d'un sinusoïde entouré d'hépatocytes dans un bloc de foie de souris préparé avec le protocole 3. Notez l'aspect en rosettes du glycogène dans les hépatocytes. (B) Micrographie représentant un zoom sur le sinusoïde observé sur l'image A (carré orangé sur l'image A). Les flèches noires montrent des fenêtrées d'une LSEC et la flèche rouge montre des précipités denses aux électrons dans la lumière du sinusoïde. Notez la similarité de contraste entre les membranes de la LSEC et les microvillosités de l'hépatocyte sous-jacent. Gly : glycogène, Lip : gouttelette lipidique, m : mitochondrie, N : noyau, RE : réticulum endoplasmique, Vil : microvillosités hépatocytaires.

En outre, dans la lumière des sinusoides du bloc de foie coloré à température ambiante, des dépôts denses aux électrons ont été observés (flèche rouge sur la **Figure 19B**). Ces précipités peuvent être des précipités de plomb ou des sels d'uranyle formés au cours de la préparation de l'échantillon. Leur présence encombre les sinusoides, ce qui rend difficile la distinction des membranes des LSEC du reste des structures et complique par conséquent la segmentation des LSEC. De tels précipités n'ont pas été observés dans les sinusoides du bloc coloré à froid. Comme le montre la **Figure 20**, la surface des LSEC dans cet échantillon est bien dégagée et les structures membranaires d'endocytose sont clairement visibles (têtes de flèches sur la **Figure 20B**).

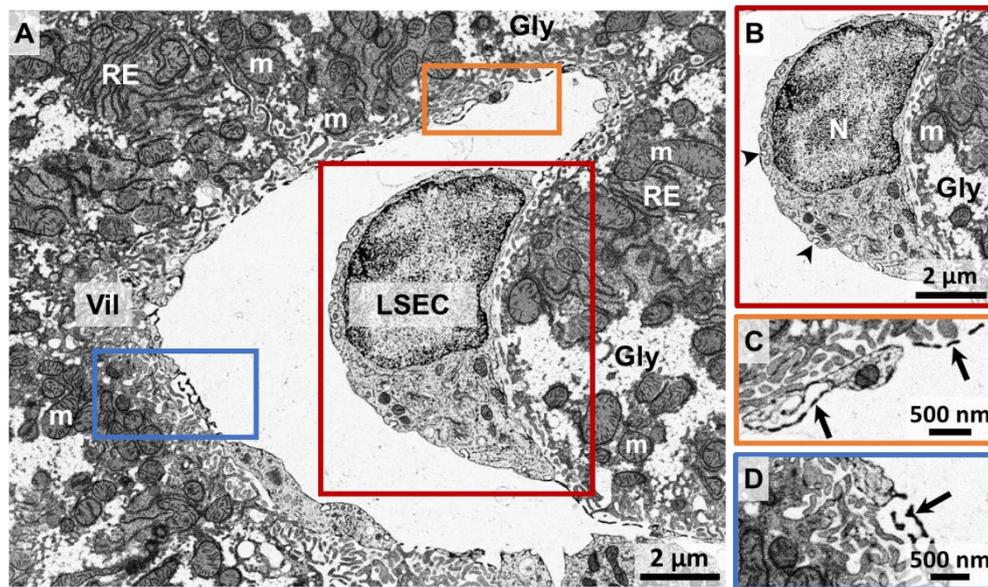


Figure 20 : Contraste des différentes structures hépatiques obtenu avec le protocole 4. (A) Micrographie d'un sinusoides dans un bloc de foie de souris préparé avec le protocole 4. (B) Micrographie représentant un zoom sur une région nucléaire d'une LSEC observée sur l'image A (carré rouge sur l'image A). Les têtes de flèches pointent des puits recouverts de clathrine sur la membrane de la LSEC. (C) Micrographie représentant un zoom sur des régions fenêtrées d'une LSEC (carré orangé sur l'image A). Les flèches montrent des membranes fortement contrastées de la LSEC. (D) Micrographie représentant un zoom sur une autre région fenêtrée (carré bleu sur l'image A). La flèche montre une organisation des fenêtrées en double couche. Gly : glycogène, m : mitochondrie, N : noyau, RE : réticulum endoplasmique, Vil : microvillosités hépatocytaires.

L'amélioration du contraste membranaire des LSEC avec le protocole 4 peut être expliquée par un double effet : une préservation optimale du tissu et une meilleure pénétration des agents contrastants à froid. En effet, il a été montré que la préfixation de tissus de mammifères avant leur congélation à haute pression permet d'obtenir une meilleure préservation de leur ultrastructure qu'une fixation chimique conventionnelle et une préservation comparable à celle obtenue après congélation directe (Bullen et al., 2014 ; Sosinsky et al., 2008). En particulier, il a été rapporté que la préfixation améliore la préservation des structures fragiles telles que les filaments d'actine de la membrane stéréociliaire des cellules sensorielles de l'oreille interne (Bullen et al., 2014). Par ailleurs, les fixateurs et les colorants pénètrent plus uniformément dans l'échantillon lorsqu'ils sont introduits à basse température, dans l'étape de cryo-substitution, que lorsqu'ils sont utilisés à température ambiante. Ceci est dû au fait

que durant le cycle de cryo-substitution, ils diffusent plus longtemps dans le tissu avant de commencer à le fixer et à le contraster. La coloration est ainsi plus homogène surtout en profondeur de l'échantillon. À l'inverse, leur action à température ambiante commence immédiatement dès leur contact avec le tissu, mais leur diffusion est plus rapide dans les zones périphériques que dans le centre du bloc. Par conséquent, la coloration résultante est plus intense en périphérie qu'au centre de l'échantillon.

Les protocoles que nous avons utilisés pour l'optimisation de la préparation de blocs de foie de souris sont résumés sur la **Figure 21**.

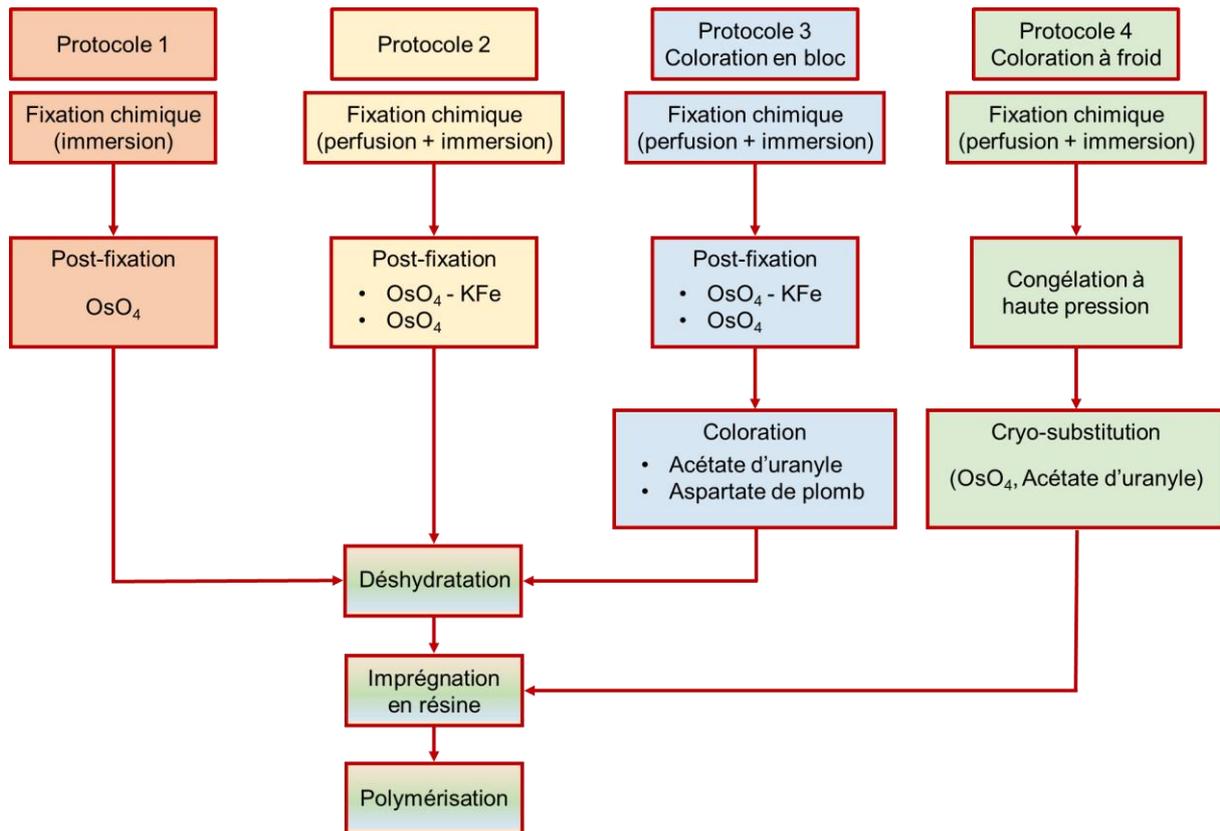


Figure 21 : Les quatre protocoles de préparation testés sur des blocs de foie de souris.

En conclusion, nous avons testé quatre protocoles de préparation de blocs de foie de souris pour l'imagerie FIB-SEM. Les résultats obtenus avec le protocole 1 n'ont pas été satisfaisants ni en termes de qualité de préservation ni en termes de niveau de contraste du tissu. La qualité de préservation a été améliorée avec le protocole 2, mais le niveau de contraste obtenu pour les différentes structures a été modéré. Les protocoles 3 et 4 ont fourni les meilleures qualités de préservation et de coloration du tissu hépatique. En particulier, le protocole 3 a permis d'améliorer le contraste du réticulum endoplasmique. Son utilisation serait plus adaptée pour l'étude de l'ultrastructure de cet organe. Il serait éventuellement nécessaire d'optimiser ce protocole pour éviter la formation de précipités dans les sinusoides.

En ce qui concerne les LSEC, l'amélioration la plus remarquable dans leur coloration a été obtenue avec le protocole 4. Par conséquent, nous l'avons choisi pour préparer des blocs de

foie à imager par FIB-SEM dans le but d'analyser l'ultrastructure de ces cellules. Afin d'éviter les problèmes de pénétration de résine et d'homogénéité de contraste, nous avons également choisi de prélever les échantillons chez des souris jeunes et de préparer de petits blocs d'environ 1 mm³. Les détails de la reconstruction 3D des LSEC sont présentés dans la section suivante.

2. Reconstruction 3D des LSEC à partir d'images FIB-SEM

2.1. Segmentation des LSEC

Pour visualiser correctement les fenêtrures des LSEC, les acquisitions FIB-SEM des sinusoides hépatiques ont été réalisées avec une résolution isotrope de 4 nm. Cependant, à cette résolution, les piles d'images générées sont très volumineuses et peuvent atteindre une centaine de gigaoctets (Go) pour une acquisition en continu pendant trois ou quatre jours. Ces piles d'images sont difficiles à traiter et à segmenter. La première question que je me suis ainsi posée a été de savoir si cette résolution est réellement nécessaire pour une segmentation correcte des fenêtrures des LSEC sans introduction d'artéfacts.

Pour répondre à cette question, j'ai comparé la qualité de segmentation obtenue à partir des images initiales acquises avec une taille de voxel de 4 × 4 × 4 nm³ et les images binnées par 2 × 2 × 2 ayant une taille de voxel de 8 × 8 × 8 nm³. Cette méthode de *binning* a été choisie, car elle permet de réduire la taille de la pile d'images d'un facteur 8, tout en gardant une résolution suffisante pour visualiser les fenêtrures des LSEC. La comparaison des segmentations a été faite sur un sous-volume de dimensions 1196 × 816 × 100 px³ (dimensions spatiales = 4780 × 3260 × 400 nm³), extrait d'une pile d'images acquises à haute résolution. La **Figure 23A** montre une image extraite de ce sous-volume qui représente une partie d'une LSEC. Inspirée de la procédure de segmentation des sphéroïdes hépatiques, j'ai initialement testé la méthode *carving* d'Ilastik pour la segmentation de la LSEC en question à partir des images à haute résolution. La méthode *carving* est détaillée dans la sous-section 4.5.4.1 du chapitre 1. Cependant, ce premier essai a échoué. En effet, la segmentation des LSEC nécessite de fournir beaucoup d'annotations, surtout autour des fenêtrures où les membranes de la cellule deviennent très fines. Ceci a été incompatible avec la mémoire de la station de travail, ce qui a entraîné un échec de la segmentation. Par conséquent, une segmentation directe en une seule étape des LSEC n'est pas possible avec Ilastik.

Pour pouvoir comparer la qualité des segmentations générées à partir des images initiales et des images binnées, la procédure de segmentation a été initialement adaptée aux LSEC. Dans cette première étape, la pile d'images initiales a été utilisée pour la segmentation.

2.1.1. Adaptation de la procédure de segmentation aux LSEC

En prenant en compte la forme de la LSEC qui est constituée d'une large région nucléaire et de régions fenêtrées plus fines, la segmentation de cette cellule est divisée en deux étapes, l'objectif de chaque étape étant de segmenter une partie de la LSEC (**Figure 22**). L'étape 1 dite de « segmentation grossière » est réalisée avec la méthode *carving* sur les images binnées par

$4 \times 4 \times 4$ ayant une taille de voxel de $16 \times 16 \times 16 \text{ nm}^3$ (**Figure 22B**). Puisque les membranes des régions fines de la LSEC ne sont pas nettes sur ces images binnées, cette étape permet la segmentation de la région nucléaire mais pas des régions fenêtrées de la LSEC. Le masque binaire obtenu a une résolution isotrope de 16 nm (**Figure 22C**). Il est ré-échantillonné avec Fiji pour le ramener à la résolution isotrope initiale de 4 nm en appliquant une interpolation bicubique (**Figure 22D**). Le masque binaire ré-échantillonné et la pile d'images initiales sont combinés en une pile d'images à deux canaux et sont appliqués en entrée d'une deuxième segmentation réalisée avec la méthode *pixel classification* d'Ilastik. Le principe de cette méthode est expliqué dans la sous-section 4.5.4.2 du chapitre 1. Dans l'étape 2, l'algorithme de segmentation calcule à la fois les caractéristiques des voxels de la pile d'images initiales et celles des voxels du masque binaire. Ceci facilite son apprentissage pour la segmentation de la région nucléaire de la LSEC à plus haute résolution. De plus, l'étape 2 est dite de « segmentation fine » puisqu'elle permet de raffiner la segmentation grossière de la LSEC autour des fenêtrées. A la fin des deux étapes, le masque de segmentation de la LSEC à 4 nm de résolution isotrope est créé (**Figure 22E**) et le maillage 3D correspondant est généré (**Figure 22F**).

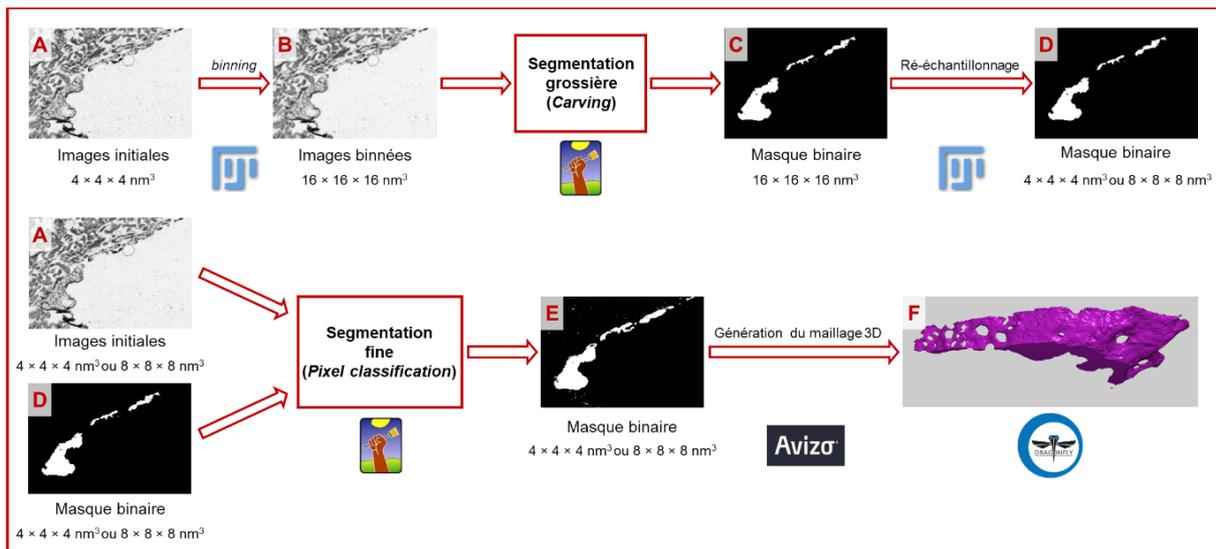


Figure 22 : Méthode de segmentation des LSEC à deux étapes. Diagramme illustrant la procédure à 2 étapes utilisée pour la segmentation des LSEC. L'étape 1 (segmentation grossière) permet de segmenter la région nucléaire de la LSEC (de A à D) en utilisant la méthode carving. L'étape 2 (segmentation fine) permet de segmenter les régions fenêtrées de la LSEC en utilisant la méthode pixel classification. Le masque généré à la fin de l'étape 1 (D) et les images initiales (A) sont appliqués en entrée de cette étape. Les images initiales utilisées dans l'étape 2 ont une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ ou de $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}^3$. Le masque final (E) est utilisé pour générer le maillage 3D (F). Les étapes de binning et d'échantillonnage sont réalisées avec Fiji. La segmentation est réalisée avec Ilastik. Les maillages 3D sont générés avec Avizo et visualisés avec Dragonfly.

Cette procédure de segmentation à deux étapes est inspirée de la méthode de segmentation *autocontext* d'Ilastik qui consiste à appliquer la méthode *pixel classification* deux fois de suite pour améliorer les prédictions finales des classes segmentées (Kreshuk et Zhang, 2019 ; Tu et Bai, 2010). Dans notre cas, nous appliquons une segmentation en cascade en utilisant les méthodes *carving* et *pixel classification*. Notre procédure tire à la fois profit de l'efficacité de

la méthode *carving* à segmenter les structures délimitées par des membranes et la capacité d'apprentissage de la méthode *pixel classification*. En outre, l'utilisation des images binnées par $4 \times 4 \times 4$ dans l'étape 1 réduit la taille des images initiales et facilite ainsi leur segmentation avec la méthode *carving*.

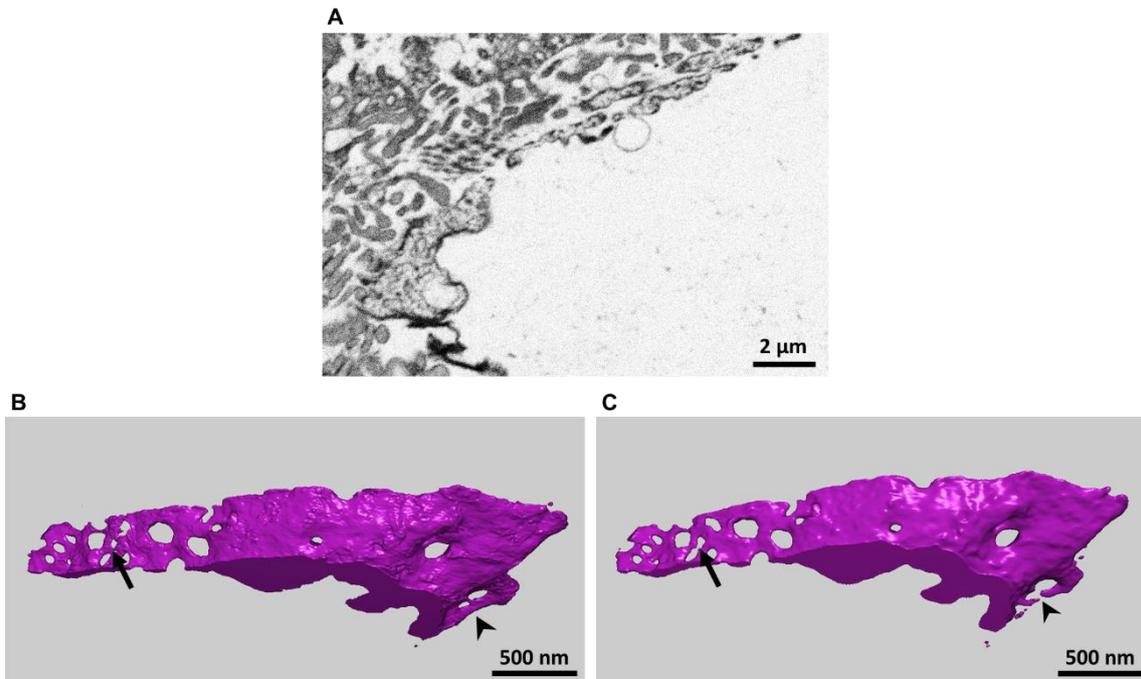


Figure 23 : Segmentation d'une LSEC à deux résolutions. (A) Micrographie extraite du sous-volume utilisé pour la segmentation d'une LSEC (taille de voxel = $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$). (B) Rendu 3D du maillage généré à partir du masque de segmentation à 4 nm de résolution isotrope. (C) Rendu 3D du maillage généré à partir du masque de segmentation à 8 nm de résolution isotrope. Les têtes de flèches pointent deux fenêtres qui sont correctement segmentées sur l'image B mais qui ne le sont pas sur l'image C. Les flèches montrent deux autres fenêtres correctement segmentées sur l'image B mais segmentées comme une seule fenêtre sur l'image C.

2.1.2. Influence de la résolution sur la segmentation des fenêtres des LSEC

Pour générer la segmentation de la LSEC à 8 nm de résolution isotrope, la procédure de segmentation décrite dans la sous-section précédente a été appliquée aux images binnées par $2 \times 2 \times 2$. Dans ce cas, le résultat de la segmentation grossière à 16 nm de résolution isotrope (**Figure 22C**) est ré-échantillonné pour avoir une taille de voxel de $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}^3$. Ensuite, le masque obtenu est combiné avec la pile d'images binnées en une pile d'images à deux canaux qui est appliquée en entrée de la deuxième segmentation avec *pixel classification*.

Les masques binaires de la LSEC obtenus à 4 nm et à 8 nm de résolutions isotropes ont été corrigés manuellement dans MIB (Belevich et al., 2016). Il est à noter que les opérations de post-traitement du masque binaire sont à éviter dans ce cas pour ne pas introduire d'artéfacts comme la fermeture des fenêtres segmentées. Les maillages 3D générés à partir des masques corrigés sont représentés sur les **Figures 23B et 23C**.

Le nombre de fenêtres correctement segmentées a été compté manuellement : 28 fenêtres ont été dénombrées sur le maillage obtenu à partir des données à 4 nm de résolution et 21 ont été dénombrées sur le maillage obtenu à partir des données à 8 nm de résolution. Ceci met en évidence que 25 % des fenêtres ne sont pas correctement segmentées dans le cas de l'utilisation des données binnées. En effet, la perte de résolution sur les membranes de la LSEC induit une segmentation incomplète des fenêtres (têtes de flèches sur les **Figures 23B et 23C**) ou la segmentation d'une seule fenêtre au lieu de deux (flèches sur les **Figures 23B et 23C**). En conclusion, une segmentation correcte des fenêtres des LSEC avec l'introduction d'un minimum d'artéfacts nécessite de travailler avec des images acquises à 4 nm de résolution.

2.2. Segmentation des LSEC d'un sinusoïde hépatique

Dans l'optique d'étudier le plus finement possible l'ultrastructure du tissu hépatique, et en particulier celle des sinusoïdes hépatiques, j'ai continué l'optimisation de la procédure de segmentation des LSEC afin de pouvoir segmenter correctement les LSEC qui forment le bord d'un sinusoïde hépatique. Pour cela, un sous-volume de dimensions $3696 \times 4280 \times 392 \text{ px}^3$ (dimensions spatiales = $14,78 \times 17,12 \times 1,57 \mu\text{m}^3$) a été extrait d'une pile d'images d'un sinusoïde, acquises à 4 nm de résolution isotrope et il a été utilisé pour la segmentation des LSEC. Une micrographie extraite de ce sous-volume est représentée sur la **Figure 24A**.

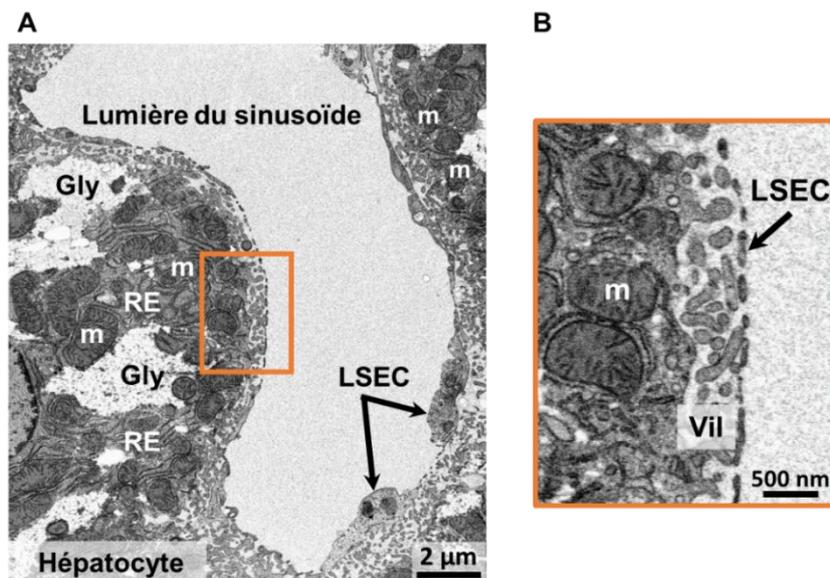


Figure 24 : Sinusoïde segmenté. (A) Micrographie extraite du sous-volume utilisé pour la segmentation d'une partie d'un sinusoïde (taille de voxel = $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$). (B) Micrographie représentant un zoom sur le bord du sinusoïde (rectangle orangé sur l'image A). Gly : glycogène, m : mitochondrie, RE : réticulum endoplasmique, Vil : microvillosités hépatocytaires.

En raison de la taille du sous-volume (environ 6 Go), une segmentation en une seule étape des LSEC avec la méthode *carving* n'est pas envisageable. La procédure à deux étapes décrite précédemment dans la sous-section 2.1.1 a été initialement appliquée pour la segmentation des LSEC du sinusoïde, mais les régions fenêtrées de ces cellules n'ont pas pu être segmentées.

Ceci est dû à la difficulté de distinction entre ces régions fines et les structures de l'espace de Disse avec lesquelles les LSEC sont en contact, notamment les microvillosités hépatocytaires et les extensions cytoplasmiques des cellules stellaires. Ces structures ont des formes similaires à celles des LSEC, ce qui complique la tâche de segmentation (**Figure 24B**). De plus, la présence des hépatocytes à proximité des LSEC introduit du « bruit » dans l'algorithme de segmentation, représentant ainsi un autre défi à relever pour la segmentation correcte des LSEC. Compte tenu de ces considérations et de la forme des LSEC, il s'est avéré nécessaire de « séparer » le bord du sinusöide des structures cellulaires de son voisinage et de segmenter chaque partie des LSEC (régions fenêtrées et régions nucléaires) séparément comme dans la procédure de segmentation précédente. Les techniques de *binning* et de ré-échantillonnage des images ont également été utilisées pour contourner le problème de volume des données.

L'optimisation de la méthode de segmentation des LSEC a abouti à la conception d'une procédure à quatre étapes, alternant des étapes de segmentation et de post-traitement réalisées dans différents logiciels. Les étapes sont :

- Étape 1 : définition de la bande de localisation des fenêtres des LSEC ;
- Étape 2 : segmentation des régions fenêtrées des LSEC ;
- Étape 3 : segmentation des régions nucléaires des LSEC ;
- Étape 4 : segmentation finale des LSEC.

Ces étapes sont détaillées dans les sous-sections suivantes.

2.2.1. Étape 1 : définition de la bande de localisation des fenêtres des LSEC

Les fenêtres des LSEC sont situées dans une zone fine sur le bord du sinusöide entre la lumière sinusöidale et l'espace de Disse. L'objectif de l'étape 1 est de définir une bande dite de localisation des fenêtres des LSEC qui permet de séparer cette zone du reste des structures cellulaires. Cette étape comporte deux sous-étapes : une segmentation de la lumière du sinusöide avec la méthode *carving* suivie d'un post-traitement du masque obtenu. La **Figure 25** présente ces sous-étapes ainsi que les logiciels utilisés pour les réaliser.

Puisque la segmentation de la lumière du sinusöide n'est pas un objectif en soi, elle est réalisée grossièrement à partir des données binnées par $16 \times 16 \times 16$ ayant une taille de voxel de $64 \times 64 \times 64 \text{ nm}^3$ (**Figure 25B**). Le masque obtenu à la fin de cette segmentation, appelé masque du sinusöide (**Figure 25C**), est ré-échantillonné pour revenir à la résolution initiale de 4 nm (**Figure 25D**). Ensuite, le masque binaire ré-échantillonné est post-traité en appliquant consécutivement un opérateur d'extraction de contour (*outline*), une dilatation et un filtre gaussien. Après extraction du contour (**Figure 25E**), la dilatation est appliquée pour définir la largeur de la bande des fenêtres des LSEC, tout en visant à choisir un rayon de dilatation qui inclut le minimum possible de microvillosités hépatocytaires (**Figure 25F**). Enfin, un filtre gaussien est appliqué au contour dilaté pour ajouter un aspect flou qui permet de mieux définir la localisation des fenêtres des LSEC (**Figure 25G**). Le résultat de l'étape 1 est appelé bande des fenêtres.

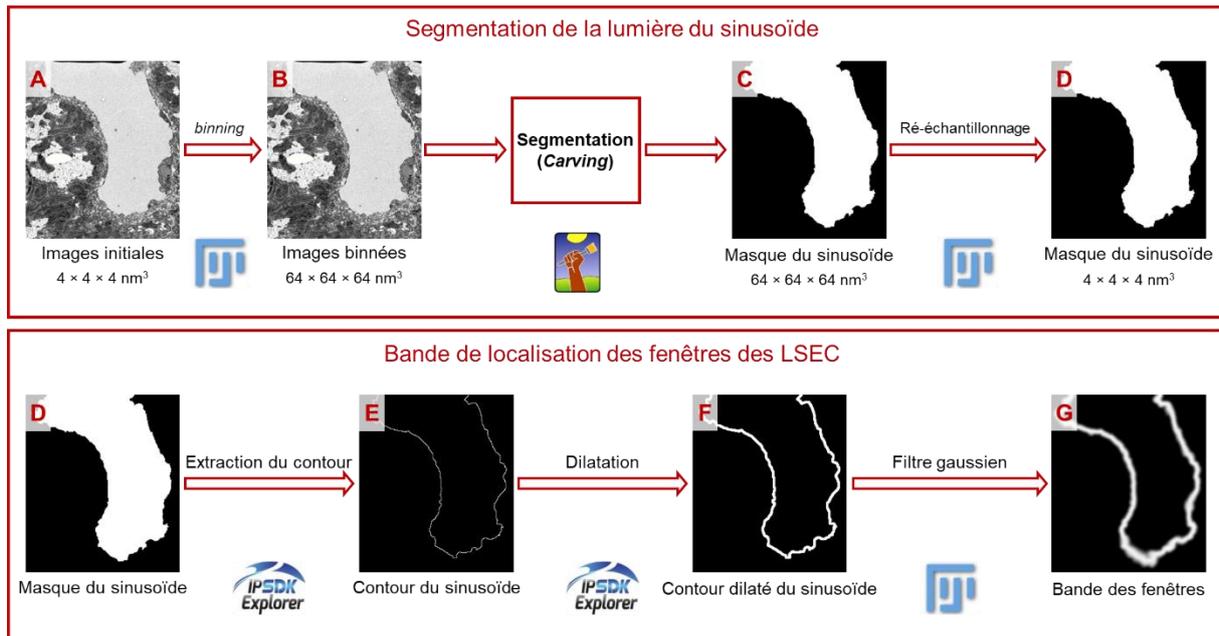


Figure 25 : Définition de la bande de localisation des fenêtres des LSEC. Schéma explicatif de l'étape 1 de segmentation des LSEC qui comporte une segmentation de la lumière du sinusoïde (de A à D) suivie d'étapes de post-traitement du masque de segmentation obtenu (de D à G). La segmentation est réalisée avec la méthode carving d'Ilastik et le post-traitement est réalisé avec Fiji et IPSDK. Le contour extrait a une épaisseur d'un pixel mais pour des raisons de visualisation, il est dilaté sur l'image E. Les étapes de binning et d'échantillonnage sont réalisées avec Fiji

2.2.2. Étape 2 : segmentation des régions fenêtrées des LSEC

L'objectif de cette étape est de générer une première segmentation des régions fenêtrées des LSEC à 4 nm de résolution isotrope. Pour cela, la méthode *pixel classification* est appliquée en utilisant les images initiales (**Figures 26A**) et la bande des fenêtres (**Figures 26B**) comme données d'entrée à deux canaux. Les caractéristiques des voxels calculées à partir de la bande des fenêtres fournissent au classifieur des informations sur la localisation des fenêtres des LSEC et facilitent ainsi leur segmentation. Deux sous-volumes de dimensions $354 \times 393 \times 392 \text{ px}^3$, extraits des régions encadrées sur les **Figures 26A et 26B** sont utilisés pour l'apprentissage du classifieur. Après segmentation de ces sous-volumes, la généralisation de la segmentation à toute la pile d'images initiales est réalisée. Le masque obtenu, appelé masque de segmentation 1 (**Figure 26C**), présente une segmentation plus au moins correcte des régions fenêtrées mais pas des régions nucléaires des LSEC (rectangles bleus sur la **Figure 26C**). Il contient également des erreurs de segmentations dans les hépatocytes (rectangles rouges sur la **Figure 26C**). Ces erreurs sont corrigées par un post-traitement du masque binaire en utilisant la bande des fenêtres définie dans l'étape 1 (**Figure 25G**).

Le post-traitement est composé de 2 étapes :

- Définition d'un « masque de soustraction » par inversion et dilatation de la bande des fenêtres. Ce masque de soustraction vaut la valeur 0 autour du bord du sinusoïde et la valeur 1 ailleurs et il est utilisé pour masquer les régions segmentées des LSEC ;
- Soustraction du « masque de soustraction » du masque de segmentation 1.

Le résultat obtenu après le post-traitement est appelé masque des régions fenêtrées des LSEC (**Figure 26D**).

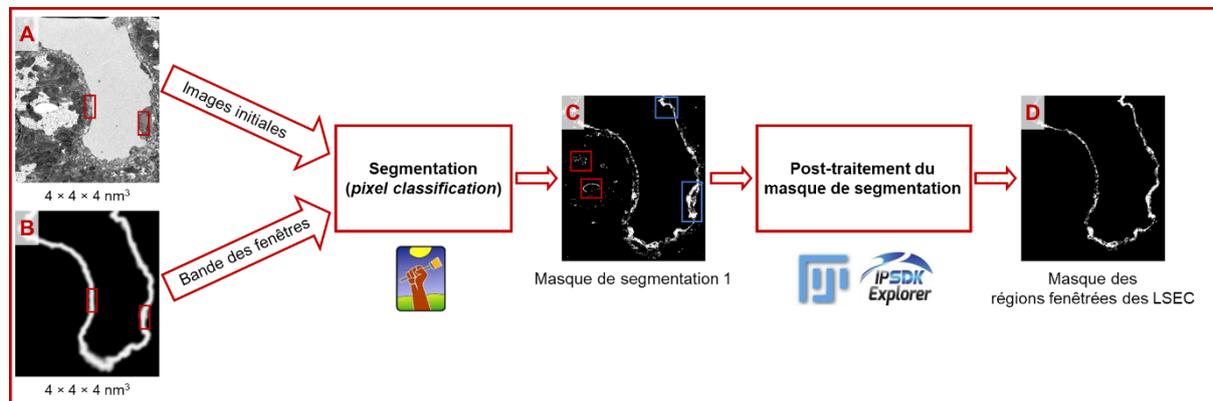


Figure 26 : Segmentation des régions fenêtrées des LSEC. Schéma explicatif de l'étape 2 de segmentation des LSEC réalisée avec la méthode *pixel classification* d'Ilastik. Les données d'entrée de cette segmentation sont les images initiales (A) et la bande des fenêtrées (B). Les deux sous-volumes utilisés pour l'apprentissage du classifieur sont extraits des régions encadrées en rouge sur les images A, B. Le masque binaire généré (C) est ensuite post-traité avec Fiji et IPSDK pour obtenir le masque des régions fenêtrées des LSEC (D). Les rectangles rouges sur l'image C montrent des exemples d'erreurs de segmentation dans les hépatocytes et les rectangles bleus montrent des régions nucléaires des LSEC qui ne sont pas correctement segmentées.

2.2.3. Étape 3 : segmentation des régions nucléaires des LSEC

La troisième étape de la procédure de segmentation vise à segmenter les régions nucléaires des LSEC. Comme les membranes de ces régions sont bien définies sur les images FIB-SEM, la méthode *carving* a été utilisée. Les premiers tests de segmentation n'ont pas été concluants, car les membranes des hépatocytes entourant le sinusoïde sont détectées par le filtre appliqué dans l'étape de prétraitement de la méthode *carving* et introduisent du « bruit » dans la carte des contours générée (voir sous-section 4.5.4.1 du chapitre 1). Il est donc nécessaire de fournir beaucoup d'annotations pour segmenter correctement les LSEC, ce qui rend complexe la tâche de segmentation. Pour remédier à ce problème, les hépatocytes sont masqués en définissant une bande de localisation des LSEC qui inclut à la fois les régions fenêtrées et les régions nucléaires de ces cellules avec le minimum de microvillosités hépatocytaires. Cette bande est ensuite appliquée aux images initiales avant de segmenter les régions nucléaires des LSEC.

2.2.3.1. Prétraitement des images initiales

La bande de localisation des LSEC est définie par l'extension de ces cellules de part et d'autre du contour du sinusoïde déterminé dans l'étape 1 (**Figure 25E**). Sa largeur est divisée en : largeur de l'extension des LSEC vers la lumière du sinusoïde, appelée bord intérieur du sinusoïde et largeur de l'extension de ces cellules vers les hépatocytes, appelée bord extérieur du sinusoïde. Les étapes de prétraitement sont : (i) la détermination du bord extérieur du sinusoïde, (ii) la détermination du bord intérieur du sinusoïde, (iii) la définition de la bande de localisation des LSEC, (iv) l'application de cette bande aux images initiales. Ces étapes utilisent

le masque du sinusoïde (**Figure 25D**) et son contour (**Figure 25E**) générés dans l'étape 1 (**Figure 25**).

- Détermination du bord extérieur du sinusoïde

La **Figure 27** résume cette étape qui consiste premièrement à dilater le masque du sinusoïde (**Figure 27B**) et deuxièmement à soustraire le masque initial au masque dilaté. Le résultat obtenu définit le bord extérieur du sinusoïde (**Figure 27C**). La dilatation est une opération de morphologie mathématique qui permet d'agrandir des objets (en 2D ou en 3D) sur des images binaires en suivant la forme d'un élément structurant. Dans notre cas, la dilatation est appliquée en 3D en utilisant la sphère comme élément structurant.

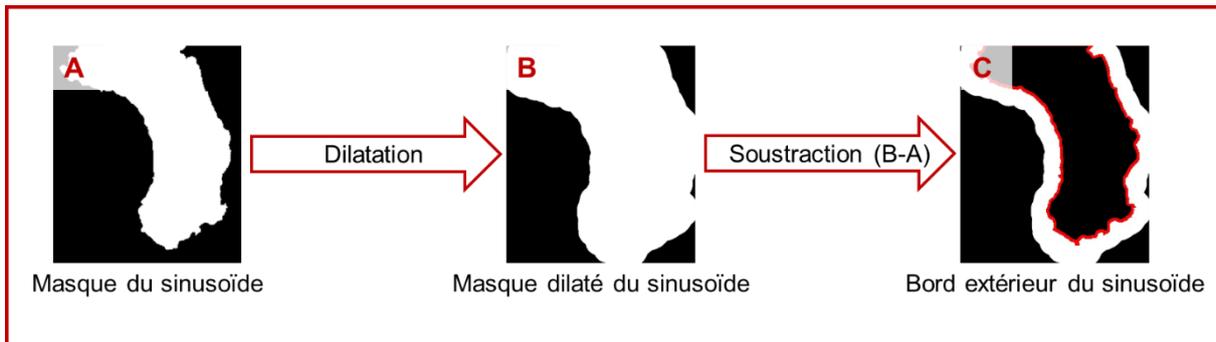


Figure 27 : Détermination du bord extérieur du sinusoïde. Schéma représentant les 2 sous-étapes de prétraitement appliquées au masque du sinusoïde (A) pour définir le bord extérieur du sinusoïde (C). Le contour du sinusoïde, représenté en rouge, est superposé sur l'image C. Le contour a une épaisseur d'un pixel mais pour des raisons de visualisation, il est dilaté avant de le superposer sur l'image. Ces étapes sont réalisées avec IPSPDK.

- Détermination du bord intérieur du sinusoïde

La **Figure 28** résume les étapes suivies pour définir le bord intérieur du sinusoïde. Les deux premières étapes sont similaires à celles de la détermination du bord extérieur du sinusoïde, à savoir l'application d'une dilatation suivie d'une soustraction. La dilatation est appliquée ici en utilisant une sphère de rayon plus petit que celui choisi pour définir le bord extérieur du sinusoïde (**Figure 28B**). Le masque intermédiaire obtenu est représenté sur la **Figure 28C**. Le contour du sinusoïde est également dilaté avec le même rayon et le résultat obtenu est représenté sur la **Figure 28E**. Finalement, le masque intermédiaire est soustrait au contour dilaté et le résultat obtenu définit le bord intérieur du sinusoïde (**Figure 28F**).

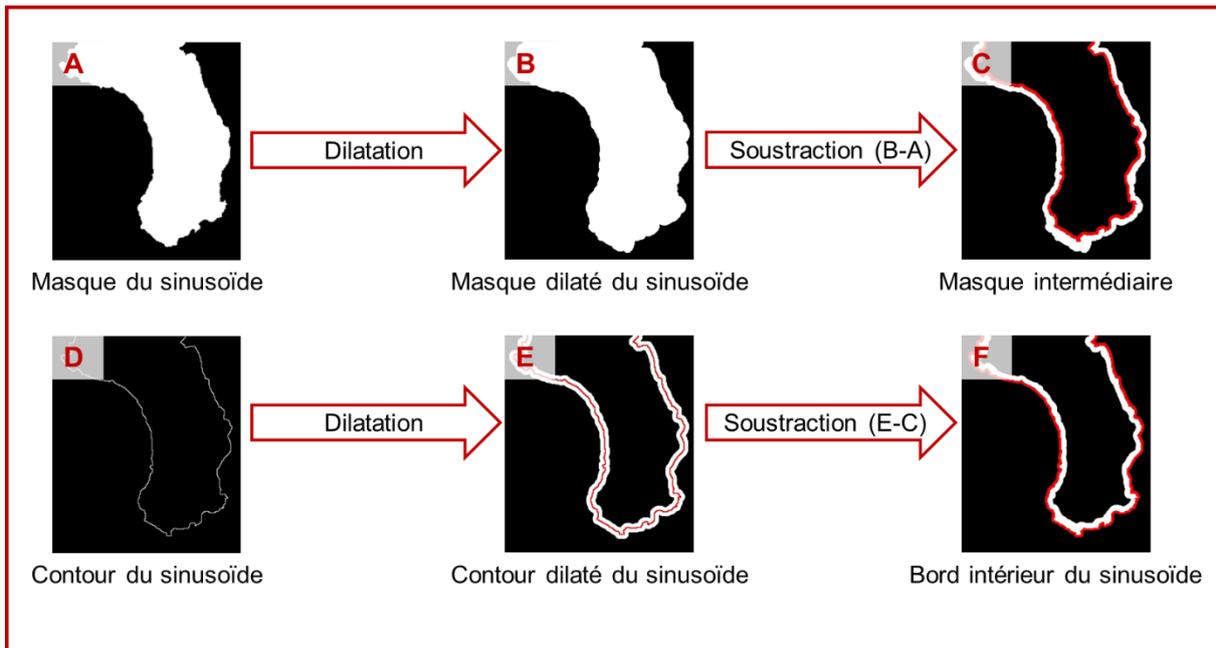


Figure 28 : Détermination du bord intérieur du sinusoïde. Schéma représentant les étapes de prétraitement appliquées au masque (A) et au contour du sinusoïde (D) pour définir le bord intérieur du sinusoïde (F). Le contour du sinusoïde, représenté en rouge, est superposé sur les images C, E et F. Le contour a une épaisseur d'un pixel mais pour des raisons de visualisation, il est dilaté sur les images C, D, E et F. Ces étapes sont réalisées avec IPSDK.

- Définition de la bande de localisation des LSEC

Les deux bords du sinusoïde définis dans les étapes précédentes sont additionnés pour définir la bande de localisation des LSEC, comme le montre la **Figure 29**.

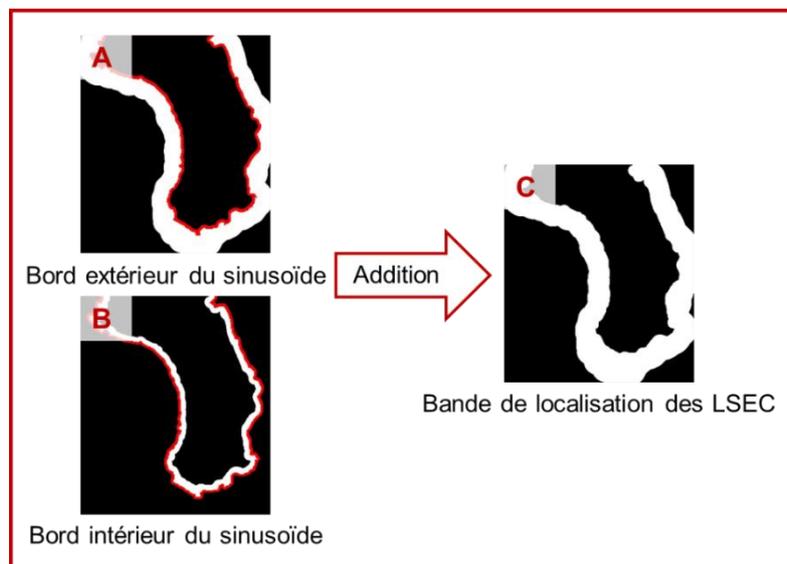


Figure 29 : Définition de la bande de localisation des LSEC. Schéma représentant l'étape d'addition des deux bords du sinusoïde, extérieur (A) et intérieur (B), pour définir la bande de localisation des LSEC (C). Le contour du sinusoïde, représenté en rouge, est superposé sur les images A et B. Le contour a une épaisseur d'un pixel mais pour des raisons de visualisation, il est dilaté avant de le superposer sur les images. Cette étape est réalisée avec Fiji.

- Application de la bande de localisation des LSEC aux images initiales

Les images initiales sont soustraites à la bande de localisation des LSEC et le contraste est inversé (**Figure 30**). Les images initiales ainsi prétraitées représentent principalement les LSEC et incluent quelques parties de l'espace de Disse et des hépatocytes sous-jacents.



Figure 30 : Application de la bande de localisation des LSEC aux images initiales. La soustraction des images initiales (B) à la bande de localisation des LSEC (A) permet de mettre en évidence les structures à segmenter, les LSEC, sur les images prétraitées (C). Cette étape est réalisée avec Fiji.

2.3.3.2. Segmentation des régions nucléaires des LSEC

Les images initiales prétraitées sont binnées par $8 \times 8 \times 8$ (taille de voxel = $32 \times 32 \times 32 \text{ nm}^3$) et les régions nucléaires des LSEC sont segmentées à partir de ces images (**Figures 31B**). Grâce au prétraitement des images, la segmentation est moins bruitée et plus rapide. Enfin, le masque binaire obtenu (**Figure 31C**) est ré-échantillonné pour revenir à une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$. Le masque final est le masque des régions nucléaires des LSEC (**Figure 31D**).

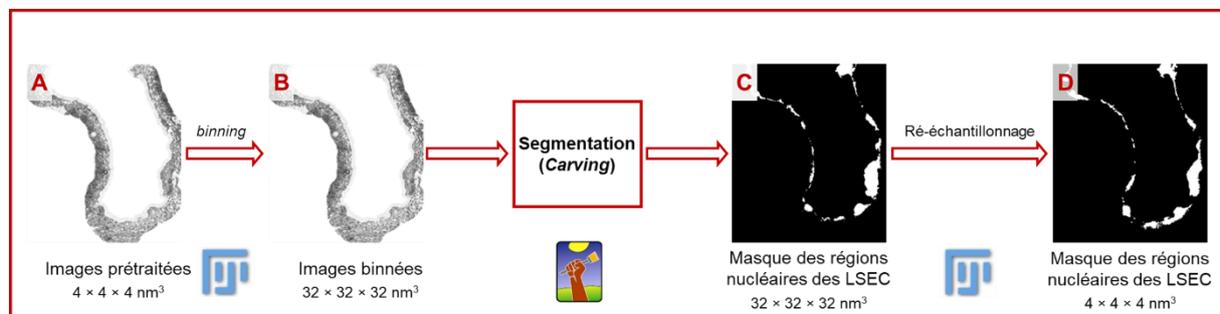


Figure 31 : Segmentation des régions nucléaires des LSEC. Schéma explicatif de l'étape 3 de segmentation des LSEC réalisée avec la méthode carving d'Ilastik. La segmentation est réalisée à partir des images prétraitées et binnées (B). Le masque de segmentation obtenu (C) est ré-échantillonné pour revenir à une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ (D). Les étapes de binning et d'échantillonnage sont réalisées avec Fiji.

2.2.4. Étape 4 : segmentation finale des LSEC

L'étape finale vise à combiner les résultats des étapes 2 et 3 pour fournir une segmentation finale des LSEC avec leurs régions fenêtrées et nucléaires à 4 nm de résolution isotrope (**Figure 32**). Cette segmentation est réalisée avec la méthode *pixel classification* en utilisant les images initiales prétraitées (**Figures 32A**), le masque des régions fenêtrées des LSEC (**Figures 32B**) et le masque des régions nucléaires des LSEC (**Figures 32C**) comme données d'entrée à trois canaux. Des sous-volumes sont extraits de différentes régions des LSEC et plusieurs combinaisons de ces sous-volumes sont utilisées pour l'apprentissage du classifieur avant de généraliser le résultat à toute la pile d'images prétraitées. Les meilleurs résultats de segmentation ont été obtenus avec l'apprentissage sur 4 (**Figure 32D**) et sur 6 sous-volumes (**Figure 32E**). Les 4 sous-volumes sont extraits des régions encadrées en bleu sur les **Figure 32A, 32B et 32C**. Ces 4 sous-volumes sont complétés par deux autres sous-volumes extraits des régions encadrées en rouge sur les **Figure 32A, 32B et 32C** pour former les 6 sous-volumes d'apprentissage. En particulier, la segmentation des régions nucléaires des LSEC est meilleure avec l'apprentissage du classifieur sur les 4 sous-volumes et les régions fenêtrées des LSEC sont mieux segmentées avec l'apprentissage sur les 6 sous-volumes, comme le montre la **Figure 33**. Les masques binaires de segmentations obtenus avec les deux apprentissages sont combinés en appliquant l'opération logique OR. Ensuite, le masque final est utilisé pour générer le maillage 3D du sinusoïde avec IPSDK. En effet, la génération du maillage 3D avec Avizo n'a pas été possible en raison du gros volume des données. Le maillage est simplifié et lissé avec Meshlab (Cignoni et al., 2008) et enfin visualisé avec Paraview (Ahrens et al., 2005) (**Figure 32F**).

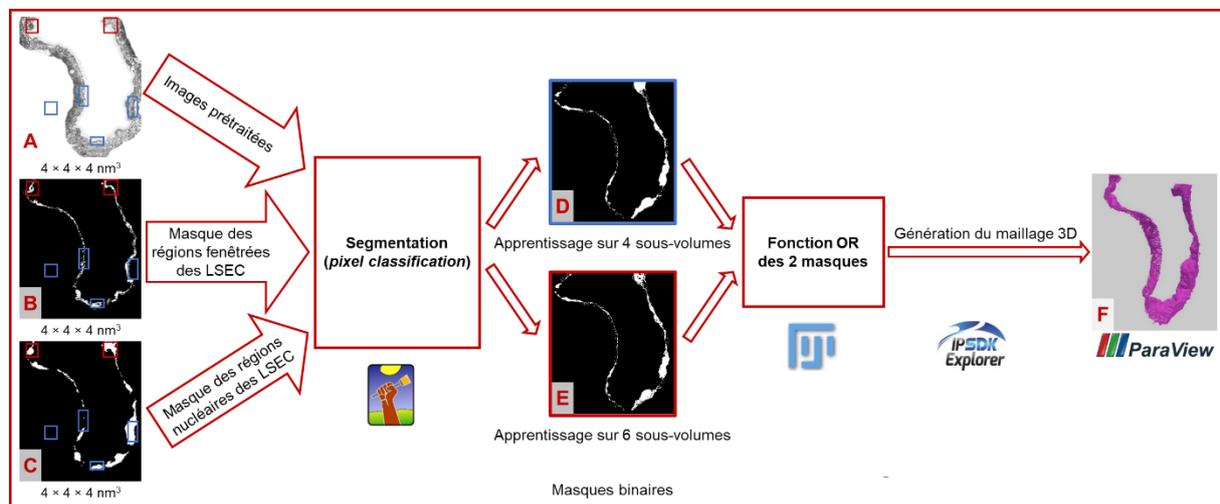


Figure 32 : Segmentation finale des LSEC. Schéma explicatif de l'étape 4 de segmentation des LSEC réalisée avec la méthode *pixel classification* d'Ilastik. Les images initiales prétraitées (A) et les masques des régions, fenêtrées (B) et nucléaires (C), des LSEC sont appliqués en entrée à 3 canaux de cette segmentation. Les sous-volumes utilisés pour l'apprentissage du classifieur sont extraits des régions encadrées en bleu et en rouge sur les images A, B et C. Les images (D) et (E) sont extraites des masques binaires obtenus avec l'apprentissage du classifieur, respectivement, sur les 4 et les 6 sous-volumes choisis pour la généralisation de la segmentation. Les deux masques binaires obtenus avec les deux apprentissages sont post-traités avec Fiji en utilisant la fonction logique OR. Enfin, le maillage 3D du sinusoïde est généré avec IPSDK et son rendu volumique est visualisé avec Paraview (F).

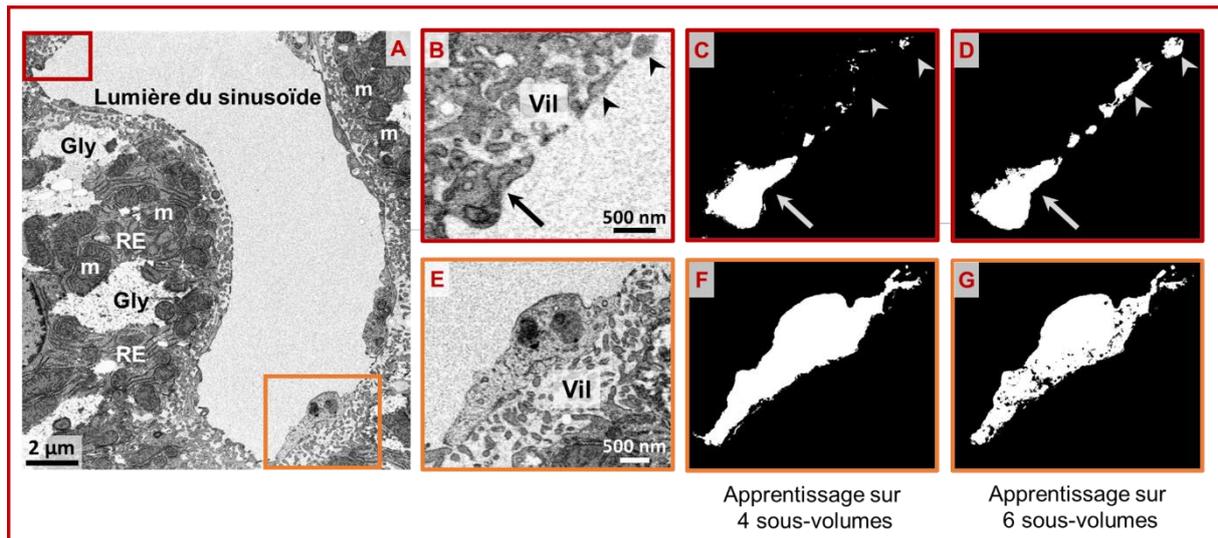


Figure 33 : Apprentissage du classifieur de la méthode pixel classification sur 4 et 6 sous-volumes dans l'étape 4 de la segmentation des LSEC. (A) Micrographie extraite de la pile d'images du sinusoïde. (B) Micrographie représentant un zoom sur une région fenêtrée d'une LSEC (carré rouge sur l'image A). Les têtes de flèches pointent des régions fines de la LSEC et la flèche montre une région plus large. (C) Résultat de segmentation, avec la méthode pixel classification, de la région B avec un apprentissage du classifieur sur 4 sous-volumes. Les régions fines de la LSEC ne sont pas segmentées avec cet apprentissage (têtes de flèches). (D) Résultat de segmentation, avec la méthode pixel classification, de la région B avec un apprentissage du classifieur sur 6 sous-volumes. Les régions fines de la LSEC sont correctement segmentées avec cet apprentissage (têtes de flèches). La segmentation de la région plus large (flèche) est similaire entre les deux apprentissages. (E) Micrographie représentant un zoom sur une région nucléaire d'une LSEC (carré orangé sur l'image A). (F) Résultat de segmentation, avec la méthode pixel classification, de la région E avec un apprentissage du classifieur sur 4 sous-volumes. (G) Résultat de segmentation, avec la méthode pixel classification, de la région E avec un apprentissage du classifieur sur 6 sous-volumes. La segmentation de la région nucléaire est meilleure avec l'apprentissage sur 4 sous-volumes (notez les petites zones non segmentées sur l'image G). Gly : glycogène, m : mitochondrie, RE : réticulum endoplasmique, Vil : microvillosités hépatocytaires.

Un rendu volumique du maillage 3D final est représenté sur la **Figure 34**. Les deux parties des LSEC : les régions nucléaires (flèche) et les régions fenêtrées (rectangle) sont clairement visibles sur le maillage.

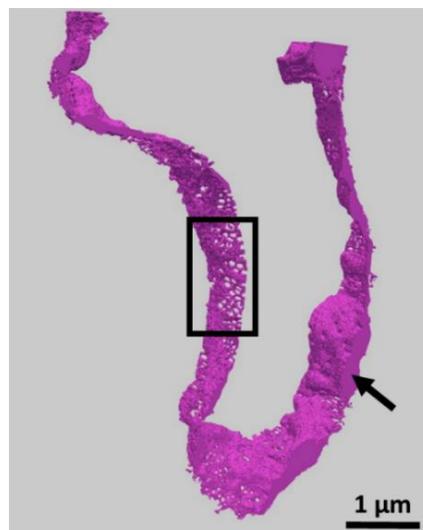


Figure 34 : Rendu 3D du maillage des LSEC formant le bord du sinusoïde segmenté.

En conclusion, la procédure de segmentation que j'ai développée permet de segmenter à haute résolution les LSEC qui forment le bord d'un sinusoïde hépatique d'un foie de souris, tout en préservant leurs fenêtres. Cette procédure de segmentation en cascade consiste en quatre étapes alternant segmentation et traitement des images. Les différentes étapes ont été mises au point pour prendre en compte la particularité des LSEC, c'est-à-dire leur forme et leur position par rapport aux structures de leur voisinage cellulaire. La procédure de segmentation tire profit des avantages de deux méthodes de segmentation d'Ilastik, *carving* et *pixel classification*, tout en prenant en considération les limites de chaque méthode. En particulier, elle combine l'efficacité de la méthode *carving* pour la segmentation des structures délimitées par des membranes et la capacité d'apprentissage de la méthode *pixel classification*. En outre, la capacité de cette dernière à traiter de gros volumes de données grâce à son option de « traitement par lots » a permis de générer une segmentation de la pile d'images du sinusoïde qui est impossible à segmenter uniquement avec la méthode *carving* en raison de sa taille trop importante. De plus, l'application du *binning* et du ré-échantillonnage des images a permis de contourner le problème du volume des données.

3. Discussion

La reconstruction 3D que j'ai réalisée pendant ma thèse des LSEC dans leur environnement tissulaire à une résolution nanométrique est une première. En effet, les études sur ces cellules sont généralement basées sur des observations de coupes en 2D réalisées sous différents angles dans le but d'avoir une idée de l'organisation 3D des fenêtres. Les rares reconstructions 3D rapportées dans la littérature sont réalisées sur des LSEC isolées et imagées en tomographie électronique (Braet et al., 2009 ; 2007) ou en FIB-SEM (Tinguely et al., 2020). En particulier, dans l'étude par FIB-SEM, les fenêtres sont reconstruites en 3D à partir de LSEC cultivées en monocouche dans un dispositif optique permettant la corrélation d'imageries optique et électronique (Tinguely et al., 2020). Cependant, il s'agit d'une étude preuve de concept de l'application du dispositif et les auteurs n'ont pas interprété les résultats obtenus avec ces reconstructions. Notre étude 3D sur le tissu hépatique est donc pertinente, car elle permet de visualiser et d'analyser l'organisation spatiale des fenêtres des LSEC dans leur environnement biologique.

Méthode de segmentation des LSEC

La procédure de segmentation des LSEC que j'ai développée représente une avancée méthodologique qui permet d'élucider l'ultrastructure des LSEC en 3D à une résolution nanométrique. Néanmoins, elle nécessite de longues étapes de traitement et de segmentation d'images, ce qui représente un frein à la segmentation de plusieurs volumes FIB-SEM. À titre d'illustration, le sous-volume du sinusoïde que j'ai segmenté représente moins d'un cinquième du volume FIB-SEM total et sa segmentation a nécessité plusieurs mois. Il est toutefois important de noter que cette durée correspond à la durée totale du développement de la méthode de segmentation incluant les différents tests qui ont échoué. L'ajout de certaines étapes dans la démarche de segmentation s'est avéré nécessaire pour contourner la limite intrinsèque de la méthode *carving* pour segmenter de gros volumes de données. Une solution à cette limite serait de changer l'implémentation de la méthode *carving*

pour l'adapter à l'analyse de gros jeux de données. À cette fin, Hoslt et al. (Holst et al., 2016) ont proposé de modifier l'algorithme de *carving* pour analyser les données par blocs, c'est-à-dire que le volume des données initiales est divisé en plusieurs sous-volumes plus faciles à segmenter. Avec ces modifications, ils ont réussi à segmenter un volume FIB-SEM d'une dizaine de Go. L'application du « traitement par blocs » à la méthode *carving* pourrait réduire le nombre des étapes de ma procédure de segmentation, mais demanderait des efforts importants de développement, surtout que cette option n'est pas librement disponible. Une piste intéressante à tester pour automatiser la segmentation des LSEC serait de fournir le résultat obtenu avec Ilastik comme segmentation de référence à un algorithme d'apprentissage profond. Ces algorithmes basés sur différents modèles de réseaux de neurones sont en plein essor dans le domaine de l'analyse d'images de microscopie électronique 3D (Heinrich et al., 2021). Récemment, Parlakgül et al. ont utilisé un de ces modèles pour segmenter les organites d'hépatocytes de souris à partir d'images FIB-SEM dans l'objectif d'étudier leurs modifications ultrastructurales dans un contexte de souris obèses (Parlaskgül et al., 2022). Les méthodes d'apprentissage profond ont également été utilisées pour segmenter les fenêtres des LSEC à partir d'images AFM (Li et al., 2020). Des étapes de développement seront également nécessaires pour la mise en place de ces méthodes de segmentation automatique, mais le développement continu de solutions simples et faciles d'utilisation simplifie de plus en plus cette tâche.

Organisation 3D des fenêtres des LSEC

Pour comprendre les échanges entre le sang des sinusoides et celui baignant les espaces de Disse, il faut s'intéresser aux deux mécanismes qui sont liés à l'interaction entre les LSEC et les cellules du sang et qui influencent le transport des particules et la circulation des fluides dans le sinusoides hépatique : le filtrage forcé (*forced sieving*) et le massage endothélial (*endothelial massage*) (Wisse et al., 1985). Les érythrocytes sont des cellules souples qui peuvent passer dans les sinusoides étroits en se repliant. Lors de leur passage dans la lumière sinusoidale, ils dirigent le mouvement initialement aléatoire des particules transportées dans le sang et favorisent ainsi leur entrée dans l'espace de Disse *via* les fenêtres des LSEC, c'est le filtrage forcé. À l'inverse, les globules blancs sont des cellules rigides et leur taille est généralement supérieure à celle des sinusoides. En passant dans la lumière sinusoidale, ils compriment l'espace de Disse entraînant ainsi une sortie du fluide de cet espace vers la lumière du sinusoides *via* les fenêtres des LSEC, c'est le massage endothélial. Après le passage du globule blanc, les microvillosités des hépatocytes et les LSEC reprennent leurs formes initiales et par conséquent, du fluide frais est aspiré dans l'espace de Disse. Ce mécanisme permet le rafraîchissement, le mélange et le transport des fluides baignant cet espace. Ceci montre bien l'importance d'étudier l'organisation 3D et la taille des fenêtres des LSEC pour nous aider à comprendre les échanges entre le sinusoides et l'espace de Disse en conditions physiologiques et pathologiques.

Mes reconstructions 3D des LSEC m'ont permis de mettre en évidence la complexité de l'organisation de leurs fenêtres qui ne forment pas toujours une monocouche dans le tissu hépatique. En particulier, j'ai pu observer des structures en double couche de fenêtres (cercle sur la **Figure 35**), comme cela a déjà été montré dans la littérature.

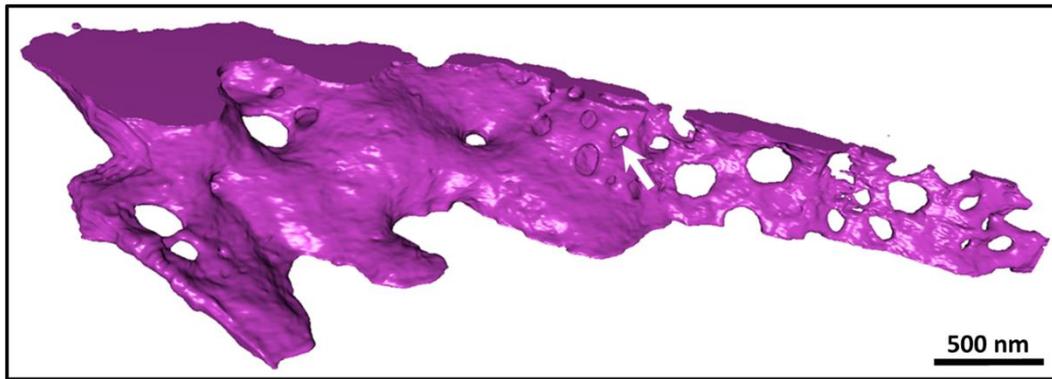


Figure 35 : Organisation des fenêtres d'une LSEC en deux couches

En effet, l'existence de telles structures a été proposée à partir d'observations en TEM de coupes de foie de rongeurs depuis le premier article de caractérisation des fenêtres des LSEC (Wisse, 1970) et récemment, à partir d'observations en SEM et en AFM de LSEC de rongeurs isolées et cultivées sur des supports de microscopie (informations supplémentaires de Szafrńska et al., 2022). Notre étude 3D sur le foie de souris confirme l'existence de ces structures *in vivo*. L'étude en 3D des LSEC, réalisée par Braet et al. (Braet et al., 2009), a montré l'existence de structures encore plus complexes sous forme de labyrinthes de fenêtres dans des LSEC de rats isolées et observées par tomographie électronique. Les auteurs ont également reconstruit en 3D une de ces structures à une résolution isotrope d'environ 3 nm. Les structures en labyrinthes de fenêtres ont été observées principalement dans les régions périnucléaires des LSEC, alors que des monocouches de fenêtres dites « ouvertes, sans obstruction » ont été observées dans les régions fenêtrées fines des LSEC. La présence de monocouches de fenêtres et des structures en multicouches de fenêtres dans les LSEC pourrait, selon les auteurs, influencer les mécanismes de transport des molécules à travers la barrière endothéliale. En effet, deux types de transport pourraient avoir lieu : un transport direct et rapide à travers les monocouches de fenêtres et un transport plus lent à travers les structures en labyrinthes qui pourraient aussi piéger des molécules lors de leur passage du sinusioïde vers les hépatocytes ou inversement (Braet et al., 2009). Néanmoins, Braet et al. ont utilisé une méthode de préparation des LSEC qui permet d'éliminer leur cytoplasme afin de mieux visualiser leurs membranes. Cette méthode pourrait potentiellement induire des artéfacts. De plus, le volume acquis et reconstruit en 3D dans leur étude, qui est d'environ $0,0375 \mu\text{m}^3$, ne permet de visualiser qu'une partie d'une LSEC. Grâce à l'utilisation de la technique FIB-SEM, nous sommes capables de reconstruire en 3D et à une résolution similaire un volume dix-mille fois plus grand ($400 \mu\text{m}^3$), ce qui pourrait permettre de suivre un sinusioïde. Notre approche d'imagerie FIB-SEM couplée à notre préparation d'échantillons optimisée pour bien préserver les fenêtres des LSEC et aux méthodes d'analyse d'images que j'ai développées serait donc plus performante pour confirmer l'existence et étudier ces structures en labyrinthes de fenêtres dans le tissu hépatique.

Développement de méthode de quantification des diamètres des fenêtres des LSEC

Sur des images de LSEC isolées et cultivées sur des supports de microscopie, les méthodes conventionnelles d'analyse quantitative des fenêtres en 2D se basent sur la délimitation

manuelle ou la détection semi-automatique ou entièrement automatique des contours des fenêtres (Szafrńska et al., 2021b). La méthode manuelle consiste à dessiner le contour des fenêtres à la main, la méthode semi-automatique est basée sur la segmentation des fenêtres par seuillage d'images et la méthode automatique utilise des outils de segmentation tels qu'Ilastik. Szafrńska et al., ont comparé et discuté les atouts et les limites de chaque méthode en termes d'efficacité et de précision de mesures. Ils ont également évalué le biais introduit par l'utilisateur en comparant les résultats de mesures obtenus par cinq utilisateurs (Szafrńska et al., 2021b). La méthode manuelle s'est avérée la méthode la plus précise pour la quantification du nombre des fenêtres, mais un biais significatif de l'utilisateur est introduit dans les mesures. La méthode semi-automatique a donné la meilleure précision pour les mesures des diamètres et le moins de biais de l'utilisateur pour ces mesures. La méthode automatique est la plus efficace, car elle permet de faire des mesures sur des milliers de fenêtres en même temps, mais nécessite des images de bonne qualité. Finalement, le choix de l'une ou de l'autre de ces méthodes dépend de la technique d'imagerie, de la qualité des images et du volume des données à analyser. Grâce à ces différentes méthodes d'analyse quantitative des fenêtres des LSEC, il est possible de mesurer dans des études en 2D sur cellules isolées les diamètres de plusieurs centaines voire de plusieurs milliers de fenêtres avec des temps d'analyse plus ou moins longs. Pour le tissu hépatique, les mesures des paramètres quantitatifs tels que le diamètre, la surface et la fréquence des fenêtres sont principalement réalisées sur des images SEM de la surface interne de sinusoides qui est accessible après coupe d'un bloc de foie par une lame de rasoir. Elles sont basées sur la délimitation manuelle de la surface de la LSEC et la mesure manuelle des diamètres des fenêtres (Cogger et al., 2015). Dans le cas de cellule isolée et étalée sur un support plat, les fenêtres sont sur un même plan et sont donc faciles à visualiser et à quantifier, l'approche d'analyse en 2D est alors efficace. Mais cette approche est plus complexe pour un tissu où il faut tenir compte de l'environnement cellulaire 3D, et notamment de la courbure des sinusoides. Ceci montre la nécessité de développer des méthodes de quantification en 3D plus adaptées au tissu.

Grâce à la méthode de segmentation que j'ai optimisée, des milliers de fenêtres peuvent être reconstruites en 3D à partir d'un même volume FIB-SEM, ce qui peut permettre de quantifier de façon statistique leurs diamètres. Afin de déterminer ces diamètres, j'ai testé sur quelques dizaines de fenêtres la méthode de mesure semi-manuelle qui est déjà utilisée pour quantifier les fenêtres à partir de coupes 2D de LSEC (Szafrńska et al., 2021b) et que j'ai appliquée en 3D. De plus, j'ai essayé de développer une méthode de mesure en 3D, originale et automatique. La méthode semi-manuelle consiste, premièrement, à extraire manuellement à partir du maillage 3D un plan qui coupe une ou plusieurs fenêtres et deuxièmement, à mesurer son/leurs diamètres. La méthode automatique est basée sur une approximation sphérique des fenêtres. Elle consiste à calculer le diamètre de la plus grande sphère qui s'inscrit dans chaque fenêtre. Les diamètres calculés avec la méthode semi-manuelle sont dispersés entre 80 et 250 nm (**Figure 36A**), alors que ceux calculés avec la méthode automatique ne sont pas dispersés, et leur distribution présente un pic (environ 60 %) pour la valeur de 124 nm (**Figure 36B**).

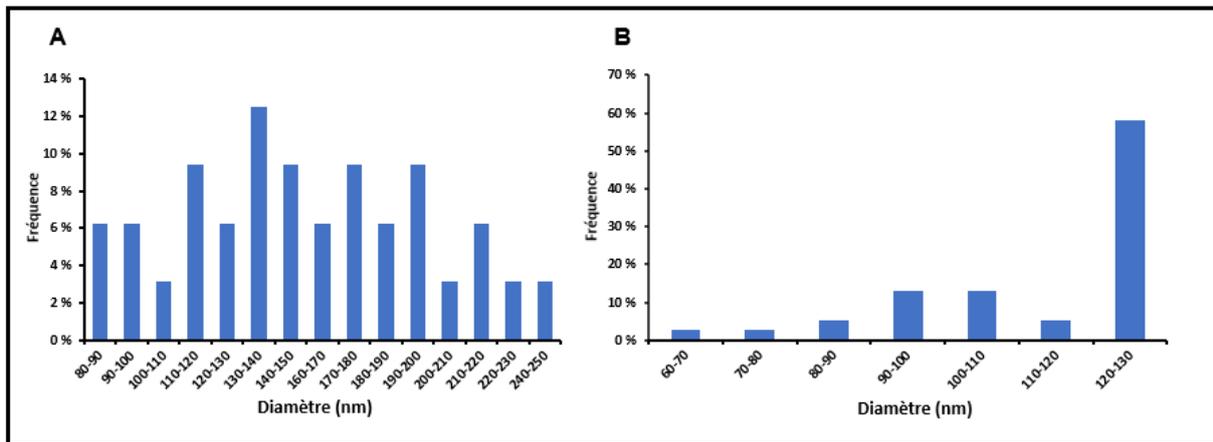


Figure 36 : Histogrammes de distribution des diamètres des fenêtres mesurés en 3D. (A) Résultats de la méthode semi-manuelle. (B) Résultats de la méthode automatique.

Les mesures de la méthode semi-manuelle que j'ai appliquée en 3D sont proches des mesures rapportées dans la littérature (Szafrńska et al., 2021b ; Cogger et al., 2015). Cette méthode est efficace pour quantifier les diamètres des fenêtres en 3D, mais elle nécessite beaucoup de temps. La distribution des diamètres mesurés avec la méthode automatique ne reflète pas la réalité. En effet, la taille des fenêtres est hétérogène dans le tissu hépatique, et cette méthode n'est pas adaptée pour détecter cette hétérogénéité. Elle ne permet donc pas la mesure des diamètres des fenêtres en 3D.

Il serait ainsi nécessaire de continuer à travailler sur le développement de méthode automatique pour gagner en rapidité. Une idée intéressante à explorer serait de projeter la surface du sinusoïde segmenté sur un plan afin de quantifier les diamètres des fenêtres. Nous pourrions cependant, dans un premier temps, mesurer les diamètres d'un plus grand nombre de fenêtres avec la méthode semi-manuelle pour proposer des résultats statistiques permettant de déterminer la distribution des diamètres des fenêtres des LSEC dans l'échantillon de foie analysé. Il serait également intéressant de comparer cette distribution dans différentes zones du lobule hépatique (de la zone centrale vers la zone périportale) pour modéliser les différences de porosité au sein du lobule, et donc des différences potentielles dans les échanges entre le sang et les hépatocytes. Ces informations seraient utiles pour la compréhension des différences fonctionnelles des hépatocytes en fonction de leur position dans le lobule hépatique.

Ma procédure de segmentation et de quantification pourra également permettre de comparer l'ultrastructure du tissu hépatique dans des conditions physiologiques et pathologiques. En effet, plusieurs pathologies sont associées à une diminution du nombre et du diamètre ou à une perte des fenêtres des LSEC. Par exemple, nous nous intéressons au modèle de souris BMP9-KO (*BMP9-knockout*) généré par nos collaborateurs par inactivation du gène codant pour la protéine BMP9 (*bone morphogenetic protein 9*) impliquée dans le développement des vaisseaux sanguins et dans la mise en place des fenêtres des LSEC (Desroches-Castan et al., 2019). La caractérisation du phénotype de ces souris par observations en SEM de blocs de foie et de LSEC isolées a montré une réduction du nombre des fenêtres des LSEC par rapport aux LSEC de souris saines. De plus, des observations immunohistochimiques de coupes de foie ont

permis de mettre en évidence le développement d'une fibrose périsinusoïdale chez ces souris. Néanmoins, les techniques de caractérisation utilisées ne permettent pas de décrire finement les modifications ultrastructurales des LSEC. C'est dans cette perspective que nous avons commencé à imager par FIB-SEM des blocs de foie prélevés chez des souris BMP9-KO. La continuité de ce travail sera de segmenter des LSEC à partir de ces échantillons et de comparer leur porosité ainsi que le diamètre de leurs fenêtres avec des LSEC de souris saines pour véritablement quantifier le pourcentage de perte des fenêtres chez les souris BMP9-KO. Il serait aussi intéressant d'observer et de quantifier le dépôt du tissu cicatriciel dans l'espace de Disse pour suivre l'évolution de la fibrose développée chez ces souris KO.

Outre l'étude quantitative des fenêtres des LSEC, l'imagerie 3D du tissu hépatique ouvre d'autres perspectives d'études ultrastructurales sur d'autres zones d'intérêts du lobule hépatique. Dans le lobule hépatique, les fenêtres des LSEC présentent une zonation : elles sont plus larges dans la zone périportale et plus petites mais plus nombreuses (porosité supérieure) dans la zone centrale, ce qui peut influencer les échanges entre le sang sinusoïdal et les hépatocytes. Cette zonation pourrait influencer la densité des microvillosités des hépatocytes en regard des zones plus ou moins fenêtrées. On pourrait en effet imaginer qu'au niveau des zones plus fenêtrées, les échanges entre les hépatocytes et les sinusoides seraient plus importants et que, par conséquent, les microvillosités des hépatocytes seraient plus denses afin d'assurer une surface d'échange plus élevée avec le sang de l'espace de Disse. Par ailleurs, il est décrit que les hépatocytes présentent une zonation métabolique (voir section 1.3.1 du chapitre 1) en fonction de leur position dans le lobule. Notre étude pourrait ainsi permettre de corrélérer la zonation des LSEC avec celle des hépatocytes. Grâce à la haute résolution de la technique FIB-SEM, cette hypothèse pourrait aussi être analysée à l'échelle d'une LSEC pour vérifier si les microvillosités hépatocytaires en regard des régions fenêtrées de la LSEC sont plus nombreuses que celles en regard des régions nucléaires. Il serait également intéressant d'étudier la densité du réseau mitochondrial des hépatocytes en fonction de leur position dans le lobule hépatique et de la corrélérer avec leurs fonctions métaboliques. Une telle étude nécessiterait de combiner la technique FIB-SEM avec d'autres techniques d'imagerie qui permettent l'acquisition de plus gros volumes comme le SBF-SEM.

Pour aller plus loin, le développement d'un processus automatique et rapide de segmentation et de quantification des diamètres des fenêtres des LSEC pourrait permettre sur le long terme d'imager des biopsies de patients atteints de maladies du foie et de déterminer la porosité de leurs sinusoides dans différentes zones du lobule hépatique. Pour cela, on pourrait envisager de coupler l'imagerie SBF-SEM et l'imagerie FIB-SEM afin de repérer précisément des zones d'intérêt du lobule hépatique par SBF-SEM avant de les imager ensuite à plus haute résolution par FIB-SEM. L'application de telles approches de diagnostic s'inscrirait dans une perspective de développement d'une médecine personnalisée (du diagnostic à l'adaptation du traitement).

Un autre axe de recherche serait d'étudier les zones de jonction entre les LSEC pour visualiser en 3D leurs dispositions à la périphérie d'un sinusoides et déterminer si une seule cellule fait forcément le tour d'un sinusoides. Il serait également intéressant d'étudier le contact entre LSEC et cellules de Kupffer qui résident dans le sinusoides malgré le flux sinusoïdal et le passage

des cellules sanguines. De la même façon, nous pourrions vérifier si un contact est possible entre les cellules de Kupffer, *via* leurs prolongements à travers les fenêtres des LSEC, et les hépatocytes sous-jacents.

Dans une perspective de corrélation entre l'ultrastructure et la physiologie du foie, il est indispensable de combiner ces observations ultrastructurales au FIB-SEM avec des études de biologie cellulaire comme des approches par transcriptomique et protéomique à l'échelle de cellules uniques ou sur coupes tissulaires.

Conclusion

Nous avons mis au point un protocole de préparation d'échantillons de foie de souris pour l'imagerie FIB-SEM afin de préserver l'ultrastructure du tissu hépatique et d'obtenir un niveau de contraste suffisant pour visualiser correctement les fenêtres des LSEC et l'espace de Disse. Pour segmenter les LSEC, j'ai développé une procédure de segmentation multi-étapes qui permet de segmenter les régions nucléaires et fenêtrées de ces cellules à une résolution nanométrique. Cette avancée méthodologique permet d'élucider en 3D l'ultrastructure des fenêtres des LSEC qui sont généralement étudiées en 2D. L'automatisation de la segmentation et des méthodes d'analyse d'images permettrait d'extraire des données quantitatives pour caractériser de façon statistique, par exemple la porosité des LSEC dans des conditions physiologiques et pathologiques. Notre approche pourrait également être appliquée à l'étude de l'ultrastructure d'autres zones d'intérêts du tissu hépatique. Associée à des études de biologie cellulaire ciblée, elle permettrait de mieux comprendre certaines fonctions hépatiques en conditions physiologiques, voire pathologiques.

Conclusions et perspectives

Mon projet de thèse a porté sur l'utilisation de la microscopie électronique 3D de type FIB-SEM pour l'analyse d'échantillons hépatiques. Deux études indépendantes ont été présentées dans ce manuscrit, utilisant deux modèles de foie, un modèle *in vitro* et un modèle *in vivo* :

- L'étude du devenir des espèces d'Ag dans un modèle *in vitro* de sphéroïde d'hépatocytes afin de mimer le devenir de NP-Ag dans l'organisme, avec un focus sur leurs transformations et l'excrétion d'espèces d'Ag du foie ainsi que leurs effets sur l'ultrastructure cellulaire.
- L'étude de l'ultrastructure de foie de souris (modèle *in vivo*) à une échelle nanométrique, avec un focus sur les fenêtres des LSEC.

Je vais reprendre dans cette conclusion les principaux résultats obtenus et discuter les apports et les limites de la technique FIB-SEM et de l'analyse d'images réalisée dans nos études.

• **L'étude du devenir des espèces d'Ag dans un modèle *in vitro* de sphéroïde d'hépatocytes**

Pour étudier les transformations des espèces d'Ag depuis leur entrée dans les cellules jusqu'à leur excrétion, nous avons utilisé un modèle de culture 3D de cellules HepG2/C3A qui reproduit *in vitro* les fonctions d'excrétion biliaire. Afin de mimer les voies principales d'exposition humaine aux NP-Ag, à savoir les voies orale et parentérale, nous avons exposé nos sphéroïdes, respectivement, au sel d'Ag AgNO_3 et à deux types de NP-Ag qui diffèrent par leur enrobage : des NP-Ag enrobées de PVP et des NP-Ag enrobées de citrate. La combinaison de différentes techniques d'imagerie, d'analyse chimique et de spéciation nous a permis de visualiser les différentes espèces d'Ag formées dans les hépatocytes, leur composition élémentaire et leur distribution à une échelle subcellulaire. Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- i. La formation intracellulaire de composés organothiolés de coordination Ag_2S et Ag_3S_3 dans tous les scénarios d'exposition étudiés ;
- ii. La présence de particules contenant de l'Ag et du soufre dans des vacuoles dans les cas d'exposition à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de citrate. Ces particules pourraient être des espèces inorganiques Ag_2S que les hépatocytes stockeraient dans des vacuoles pour limiter la toxicité de l'excès d'Ag ;
- iii. L'excrétion d'ions Ag(I) dans les canalicules biliaires par le transporteur de Cu ATP7B ;
- iv. La modification de l'ultrastructure du réseau mitochondrial des hépatocytes mise en évidence par le gonflement d'une fraction significative des mitochondries dans le cas d'exposition aux NP-Ag enrobées de citrate et la formation d'un réseau mitochondrial plus tubulaire dans les cas d'exposition à AgNO_3 et aux NP-Ag enrobées de PVP. Ceci suggère que les espèces solubles Ag(I) peuvent être toxiques pour les mitochondries ou modifier leur équilibre de fusion-fission.

L'utilisation de notre modèle 3D a permis d'analyser le devenir des NP-Ag et de leurs produits de transformations tel qu'il peut se dérouler *in vivo* et d'apporter de nouvelles connaissances

par rapport aux études utilisant des cultures cellulaires en 2D, en particulier en ce qui concerne l'excrétion des ions Ag(I), le stockage de l'Ag en excès et les effets des espèces d'Ag sur les mitochondries. De plus, certains scénarios d'exposition utilisés miment la voie d'exposition parentérale, associée à l'utilisation de dispositifs médicaux contenant des NP-Ag, qui est rarement étudiée dans la littérature. La compréhension des transformations *in vivo* des NP-Ag relarguées des dispositifs médicaux dans la circulation sanguine permettra de mieux prédire le risque de toxicité pour la population hospitalisée. La prise en compte de ces risques participe à la conception de dispositifs dits plus sûrs qui permettent de libérer suffisamment d'ions Ag (I) pour leur activité biocide sans libération de NP-Ag. En outre, la pertinence de notre modèle biologique pour récapituler les transformations des espèces d'Ag *in vitro* montre son importance pour étudier le devenir d'autres nanomatériaux dans le foie comme d'autres types de NP ou des nanomédicaments dont le devenir et les mécanismes d'élimination sont mal connus.

Des questions sur le devenir des NP-Ag dans les hépatocytes restent néanmoins en suspens et mériteraient plus d'approfondissement afin de compléter nos connaissances sur le sujet :

- Comment les ions Ag(I) sont-ils transportés des endolysosomes au cytosol ?
- Comment des composés organothiols sont internalisés dans des endolysosomes dans le cas d'exposition à AgNO₃ ?
- Quel(s) processus permet(tent) la formation d'espèces Ag₂S à la suite d'une exposition à AgNO₃ et aux NP-Ag enrobées de citrate et comment s'effectue le transfert des espèces d'Ag des endolysosomes aux vacuoles ?
- Quels sont les effets des NP-Ag sur les mécanismes de fusion-fission des mitochondries ?

- **L'étude de l'ultrastructure de foie de souris à l'échelle nanométrique**

Afin d'analyser l'ultrastructure du tissu hépatique en 3D à une résolution nanométrique, nous avons imagé des blocs de foie de souris par FIB-SEM. Je me suis particulièrement intéressée à l'architecture 3D des fenêtres des LSEC qui sont essentiellement étudiées en 2D dans la littérature. Pour reconstruire en 3D les LSEC, j'ai développé une approche de segmentation multi-étapes basée sur la combinaison d'une méthode de segmentation semi-automatique et d'une méthode automatique, les deux implémentées dans le logiciel libre Ilastik. Cette approche originale fournit un outil qui permet d'analyser en 3D les fenêtres des LSEC dans leur environnement tissulaire à une résolution isotrope de 4 nm. Ceci est une première, car jusqu'à présent, les études sur les LSEC sont basées sur des observations en 2D de coupes de foie ou de LSEC isolées et cultivées en 2D. La segmentation des fenêtres devrait également permettre de quantifier statistiquement leurs diamètres et de déterminer la porosité des LSEC dans le tissu. Pendant ma thèse, j'ai testé des méthodes de quantification de diamètres des fenêtres, mais les résultats n'ont pas été concluants. Ce travail doit être poursuivi afin de développer une méthode automatique permettant d'extraire des mesures fiables en 3D, tout en prenant en considération la courbure des sinusoides et l'irrégularité de l'épaisseur des LSEC. L'analyse quantitative des fenêtres des LSEC (diamètre, nombre, fréquence, etc.) dans différentes zones

du lobule hépatique permettrait d'avoir une cartographie de la porosité des sinusoides à l'échelle du lobule. Ceci pourrait permettre de modéliser le transport de différentes substances ou médicaments à travers la barrière endothéliale en fonction de la zonation. La comparaison de l'analyse des fenêtres dans des conditions physiologiques et pathologiques permettrait de suivre la dérégulation du transport endothélial lors du vieillissement et au cours de maladies chroniques du foie. Cette approche sera validée par notre étude sur les souris BMP9-KO. Le but ultime serait de pouvoir utiliser ce genre d'étude pour vérifier l'état du réseau sinusoidal de patients dans le cadre d'une approche de médecine personnalisée. Notre démarche pourrait également être appliquée à l'étude d'autres cellules endothéliales comme les cellules endothéliales glomérulaires dont la structure est similaire à celle des LSEC (présence de fenêtres). Notamment, l'application de mon approche de segmentation à ces cellules permettrait d'obtenir une segmentation plus rapide et plus efficace par rapport à l'approche manuelle proposée par Kawasaki et al., et donc d'analyser un plus grand nombre de cellules (Kawasaki et al., 2021).

En outre, le principe de l'approche de segmentation développée pendant ma thèse, en particulier l'application des deux méthodes *carving* et *pixel classification* d'Ilastik pourrait être utilisé pour segmenter d'autres structures hépatiques complexes comme les microvillosités des hépatocytes qui baignent dans l'espace de Disse et qui augmentent la surface d'échange sang-hépatocytes. La zone de jonction entre un canalicule biliaire et un tube biliaire (formé par les cholangiocytes), appelée canal de Hering, reste encore mal connue, et notre approche pourrait également permettre de révéler son organisation. Ces structures sont situées à la périphérie du lobule hépatique, à proximité de l'espace porte dans lequel se trouve le tube biliaire, et une approche multi-échelle serait indispensable pour les repérer et les imager à haute résolution. Les cellules souches qui sont indispensables à la régénération hépatique se trouvent potentiellement dans cette zone de connexion entre hépatocytes et cholangiocytes. Notre approche couplée à d'autres types d'imagerie pourrait permettre de reconstruire en 3D pour la première fois cette structure particulière en termes de localisation et de rôle physiologique dans le foie. Ceci permettrait d'aller plus loin dans la compréhension de l'architecture du foie et participerait sur le long terme au développement de modèles d'organoïdes hépatiques multicellulaires (ex. un modèle hépatobiliaire) qui seraient plus pertinents pour mimer la physiologie du foie et qui pourraient également être caractérisés par cette approche.

La technique FIB-SEM ne permet pas d'imager de grands volumes et entraîne la destruction de la zone observée, ce qui nécessite un choix judicieux de la zone d'intérêt. Cette technique pourrait être combinée avec d'autres techniques de microscopie vEM comme la technique SBF-SEM qui est également destructive mais qui permettrait d'imager un plus grand volume à plus faible résolution et de passer sur le FIB-SEM quand une zone d'intérêt serait repérée pour l'imager à plus haute résolution. Selon les applications, la tomographie des rayons X, technique non destructive mais moins résolutive, permettrait aussi de réaliser une analyse multi-échelle et de cibler plus rapidement les régions à imager par FIB-SEM.

Cependant, le goulot d'étranglement de la technique FIB-SEM reste l'analyse d'images qui est l'étape la plus longue de tout le processus permettant d'obtenir la reconstruction 3D finale

des structures d'intérêt. De plus, au cours de ma thèse, j'ai atteint les limites des logiciels utilisés. En effet, j'ai utilisé des méthodes de segmentation implémentées dans Ilastik qui reposent sur la détection des membranes des structures à segmenter ou sur l'apprentissage des caractéristiques locales des voxels. Ces méthodes sont adaptées aux échantillons analysés, mais requièrent de longues étapes de correction manuelle de la segmentation. Dans le futur, il sera nécessaire d'automatiser la procédure de segmentation en utilisant, par exemple des réseaux de neurones afin de pouvoir analyser des jeux de données plus grands, ce qui est indispensable pour des études statistiques. De la même façon, il sera nécessaire d'automatiser les méthodes de quantification en 3D pour que ces analyses soient utilisables à grande échelle dans le but répondre à diverses questions allant de la biologie fondamentale jusqu'à des applications en santé.

Matériels et méthodes

1. Les NP-Ag

Les NP-Ag enrobées de citrate sont achetées auprès de Nanocomposix (20 nm Citrate BioPure™ Silver) et les NP-Ag enrobées de PVP ainsi que le nitrate d'Ag (AgNO_3) sont achetés auprès de Sigma-Aldrich. La caractérisation des deux types de NP-Ag est décrite dans Veronesi et al. (Veronesi et al., 2016). La caractérisation de la taille des NP-Ag par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*) et par microscopie électronique a montré une distribution bimodale des tailles avec deux populations distinctes de 19 et de 101 nm de diamètre pour les NP-Ag enrobées de PVP et une distribution monomodale autour de 25 nm de diamètre pour les NP-Ag enrobées de citrate. Ces mesures sont obtenues après dilution des NP-Ag dans l'eau.

Les mesures des tailles des NP-Ag diluées dans un milieu de culture MEM (*minimal essential medium*, Sigma-Aldrich) complété par du sérum de veau fœtal (SVF) a montré une agglomération partielle des NP-Ag enrobées de citrate avec une population présentant une distribution homogène autour de 160 nm de diamètre. Les NP-Ag enrobées de PVP forment, quant à elles, une distribution homogène avec une population autour de 90 nm de diamètre.

2. Préparation des sphéroïdes d'hépatocytes et expositions aux espèces d'Ag

Les cellules HepG2/C3A utilisées pour la préparation des sphéroïdes nous sont fournies par l'*American Type Culture Collection (ATCC, The Global Bioresource Center)*.

2.1. Culture cellulaire

Les cellules HepG2/C3A qui sont des cellules adhérentes sont cultivées dans le milieu de culture dans des boîtes de Pétri traitées pour la culture cellulaire, de 10 cm de diamètre à une température de 37°C et sous une atmosphère humide enrichie de 5 % de CO_2 . Le milieu de culture utilisé est un milieu MEM complété par 10 % de SVF, 2 mM glutamine et 1 % de pénicilline-streptomycine. Lorsque les cellules atteignent entre 80 et 90 % de confluence, elles sont lavées avec du tampon phosphate salin (PBS). Après aspiration du PBS, 1 mL d'une solution de trypsine-EDTA (0,05 % – 1 mM) est ajouté et les cellules sont incubées pendant quelques minutes pour les détacher de la boîte de Pétri. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de 1 mL de milieu complet (MEM + SVF). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 3 min à 1200 tours par minute. Puis, le surnageant est aspiré, le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu frais et les cellules sont remises en culture après dilution.

2.2. Préparation des sphéroïdes d'hépatocytes

Les sphéroïdes sont obtenus en deux étapes. Tout d'abord, des cellules HepG2/C3A fraîchement trypsinées sont centrifugées, suspendues dans du milieu frais et comptées à

l'aide d'un compteur cellulaire automatisé (BioRad TC20) en utilisant le bleu Trypan. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une plaque ULA 96 puits de Perkin-Elmer à raison de 200 cellules dans 150 μL de milieu par puits et incubées à 37°C et sous une atmosphère enrichie de 5 % de CO_2 . Les sphéroïdes sont observés régulièrement au microscope. Après 4 jours d'incubation, les sphéroïdes sont exposés aux NP-Ag ou à AgNO_3 .

2.3. Exposition des sphéroïdes aux espèces d'Ag

Différents scénarios d'exposition sont utilisés : les sphéroïdes sont exposés à 25 μM de NP-Ag enrobées de citrate, à 50 μM de NP-Ag enrobées de PVP ou à 5 μM d' AgNO_3 pendant 2, 4 ou 7 jours avec un renouvellement du milieu d'exposition tous les 2 jours. Pour les scénarios d'excrétion, les sphéroïdes sont exposés aux différentes espèces d'Ag pendant 4 jours suivis de 3 jours dans du milieu sans NP-Ag ni AgNO_3 avec un renouvellement quotidien du milieu. À la fin de l'exposition, les sphéroïdes sont rincés trois fois avec du PBS avant d'être utilisés pour d'autres expériences.

3. Quantification de l'Ag par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES)

La spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES pour *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) est une méthode d'analyse qui permet de quantifier, par voie liquide, les éléments d'un échantillon avec une sensibilité de l'ordre du ppb ($\mu\text{g/L}$). Les échantillons doivent être préalablement minéralisés pour obtenir les éléments individuels en solution. Les échantillons biologiques sont donc minéralisés dans une solution d'acide fort (comme l'acide nitrique HNO_3 ou l'acide chlorhydrique HCl) avant d'être analysés. Dans le spectromètre, l'échantillon est d'abord transformé en aérosol liquide par un nébuliseur. Ensuite, les gouttelettes de taille supérieures à 10 μm sont filtrées dans une chambre de nébulisation avant d'injecter l'échantillon dans un plasma d'argon. Le plasma excite et ionise les atomes de l'échantillon à doser par la forte température de la torche à plasma (entre 6000 et 8000 K) et les photons émis par les atomes excités sont détectés. L'énergie, et donc la longueur d'onde de ces photons est caractéristique de chaque élément chimique et l'intensité du signal photonique mesuré est proportionnel à la concentration de l'élément dans l'échantillon.

Partie expérimentale

Les sphéroïdes sont minéralisés pendant une nuit à 50°C dans 800 μL de HNO_3 à 65 %. Les échantillons sont préparés en complétant les solutions à 6 mL avec de l'eau ultra pure Milli-Q. Avant analyse, les échantillons sont centrifugés à 5000 tours par minutes pendant 10 min pour sédimenter les éventuels débris cellulaires restants après minéralisation. La quantité d'Ag présente dans les sphéroïdes est quantifiée par ICP-AES à l'aide d'un ICPE-9800 de Shimadzu. La longueur d'onde choisie pour l'analyse de l'Ag est 328 nm. La quantification est réalisée grâce à une gamme étalon d'un standard Ag (Sigma-Aldrich). Les solutions étalons ont des concentrations en Ag de 10, 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. L'ensemble

des mesures est également corrigé par un étalon interne, l'Ytterbium (Yb) à $166,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Pour chaque échantillon, 3 mesures successives de 60 secondes chacune sont réalisées et la valeur moyenne des 3 mesures représente la quantité d'Ag dans l'échantillon. Un rinçage pendant 90 secondes dans une solution de HNO_3 est effectué entre deux échantillons successifs. Les valeurs sont analysées avec le logiciel ICPEsolution et la quantité d'Ag est normalisée par rapport au nombre de sphéroïdes par échantillon analysé. Les quantifications sont répétées 3 fois sur des échantillons indépendants pour chaque condition d'exposition.

4. Étude de la voie d'excrétion biliaire

Pour l'analyse de la voie d'excrétion du canalicule biliaire, le scénario d'excrétion est utilisé. Pour évaluer les voies MDR (*multidrug resistance proteins*) et MRP, des sphéroïdes de HepG2/C3A sont exposés pendant 4 jours à $50 \mu\text{M}$ de NP-Ag enrobées de PVP et pendant les 7 jours à, respectivement, $50 \mu\text{M}$ de vérapamil ou $50 \mu\text{M}$ de MK571. Pour évaluer l'implication éventuelle d'ATP7B dans l'excrétion de l'Ag, des sphéroïdes formés de cellules ATP7B-KO HepG2/C3A inactivées pour le gène codant pour la protéine ATP7B (Charbonnier et al., 2022) sont préparés et cultivés comme décrit pour les cellules HepG2/C3A normales.

5. Préparation des sphéroïdes pour l'imagerie

Les sphéroïdes contrôles et ceux exposés aux différentes espèces d'Ag sont préparés par congélation à haute pression suivie d'une cryo-substitution.

Pour la congélation à haute pression, 5 à 10 sphéroïdes sont re-suspendus dans $2 \mu\text{L}$ du milieu de culture complété par 20 % de SVF et déposés sur un support de congélation haute-pression en aluminium de type A et de 3 mm de diamètre (Leica Microsystems). Cette cupule de congélation est ensuite recouverte sur le côté plat d'une autre cupule de congélation de type B et de diamètre 3 mm (Leica Microsystems) et l'ensemble est introduit dans un cryo-fixateur HPM100 (Leica Microsystems). Cette méthode de congélation utilise de l'azote liquide ($T = -196^\circ\text{C}$) à haute pression (210 MPa) pour fixer l'échantillon. À cette pression, l'eau est beaucoup plus visqueuse qu'à pression atmosphérique, ce qui limite la croissance de cristaux de glace.

Après cryo-fixation, les échantillons sont transférés dans un automate de cryo-substitution (AFS2, Leica Microsystems). La cryo-substitution permet de remplacer, à basse température, l'eau vitrifiée de l'échantillon par un solvant et d'introduire l' OsO_4 dans l'échantillon. Le cycle de cryo-substitution utilisé est le suivant. Premièrement, les échantillons sont incubés dans un bain d'acétone complétée par 1 % d' OsO_4 à -90°C durant 40 h. Ensuite, ils sont réchauffés lentement jusqu'à -60°C ($1^\circ\text{C}/\text{h}$) et maintenus à cette température pendant 12 h. Puis, la température est progressivement remontée à -30°C à raison de $1^\circ\text{C}/\text{h}$. Après 12 h, la température est rapidement remontée à 0°C et les échantillons sont maintenus à cette température pendant 1 h. Cette étape permet une meilleure pénétration de l' OsO_4 dans les échantillons. De nouveau, les échantillons sont refroidis à -30°C puis rincés quatre fois dans de l'acétone pure pendant 15 min à la même température. Les échantillons sont ensuite inclus en résine par incubation dans 3 bains successifs de concentrations croissantes

de résine araldite *Durcupan ACM Epoxy* (*Electron Microscopy Science*, EMS, 14040) dans de l'acétone. Ils sont laissés 2 h dans chaque bain, tout en augmentant progressivement la température de - 30°C à 20°C : 2 h dans un mélange 1 : 2 (volume : volume) de résine : acétone en remontant la température de - 30°C à - 10°C, 2 h dans un mélange 1 : 1 de résine : acétone en remontant la température de - 10°C à 10°C et 2 h dans un mélange 2 : 1 de résine : acétone en remontant la température de 10°C à 20°C. Puis, les échantillons sont incubés dans un bain de résine pure à température ambiante entre 8 et 10 h suivi d'un bain dans un mélange de résine pure et d'accélérateur benzyldiméthylamine (BDMA) pendant 8 h à température ambiante. Enfin, la résine est polymérisée à 60°C pendant 48 h.

À partir des blocs obtenus après polymérisation de la résine, des coupes de 200 nm d'épaisseur sont réalisées avec un ultramicrotome UC7 (Leica Microsystems) équipé d'un couteau diamant Ultra 35° (DiATOME). Les coupes sont déposées sur des membranes Si₃N₄ de 50 nm d'épaisseur (Silson Ltd) avant utilisation au synchrotron pour les expériences d'imagerie XRF.

Les coupes analysées par STEM-EDX sont préparées de la même façon et déposées sur des grilles de cuivre de 100 *mesh*, de 3 mm de diamètre recouvertes d'un film de carbone/formvar. Le bloc d'échantillon restant peut ensuite être observé au FIB-SEM.

6. Préparation des blocs de foie de souris pour l'imagerie FIB-SEM

Dans cette section, le protocole 3 (coloration à température ambiante – contraste en bloc) et le protocole 4 (congélation à haute pression suivie d'une cryo-substitution) utilisés pour la préparation de blocs de foie de souris sont détaillés. À la fin de la section, les étapes des protocoles 1 et 2 qui sont différentes de celles des protocoles 3 et 4 sont détaillées.

Durant l'optimisation de préparation des blocs de foie de souris, les protocoles 3 et 4 sont testés sur des souris de fond génétique C57Bl/6 âgées de 4 semaines. L'échantillon observé au FIB-SEM et utilisé pour la segmentation des LSEC détaillée dans la section 2.2 du chapitre 3 est préparé avec le protocole 4 à partir d'une souris de fond génétique 129/Ola âgée de 4 semaines.

6.1. Fixation

La souris est perfusée en intracardiaque avec du tampon PBS (environ 10 – 15 mL) pour éliminer le sang puis avec 10 – 15 mL de la solution de fixation : glutaraldéhyde à 2,5 % et paraformaldéhyde PFA à 1,5 % dans un tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) contenant du chlorure de calcium CaCl₂ à 2 mM. Le foie est ensuite prélevé et une partie est coupée en petits morceaux.

6.2. Préparation à température ambiante - contraste en bloc (protocole 3)

6.2.1. Lavage

Les morceaux de foie sont plongés dans la solution de fixation pendant 2 à 4 h à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C. Les échantillons ainsi fixés sont rincés dans un tampon de lavage froid (à 4°C) entre 2 h et une nuit avec renouvellement du bain de lavage au moins trois fois. Le tampon de lavage est préparé de la même façon que celui de fixation mais en ajoutant du saccharose pour ajuster l'osmolarité du tampon à 400 mOsm.

6.2.2. Post-fixation

Les échantillons sont post-fixés pendant 1 h et à l'abri de la lumière dans une solution d' OsO_4 (EMS) à 2 % réduit avec du ferrocyanure de potassium $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, abrégé en KFe (EMS, 25154-10) à 1,5 % dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) contenant 2 mM de CaCl_2 . Cette solution de post-fixation est ensuite échangée sans rinçage préalable par une solution tamponnée contenant 2 % d' OsO_4 . Ce deuxième bain dure également 1 h. Les échantillons sont ensuite rincés 5 fois dans de l'eau distillée ultra pure (3 min/lavage).

6.2.3. Coloration à l'acétate d'uranyle

Les échantillons sont incubés dans une solution d'acétate d'uranyle à 1 % dans l'eau à 4°C pendant une nuit.

6.2.4. Coloration à l'aspartate de plomb

La solution d'aspartate de plomb est préparée en mélangeant 0,066 g de nitrate de plomb $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (EMS, 17900) dans 10 mL d'acide aspartique 0,03 M (Sigma-Aldrich, A9256-100G) à 60°C. Le pH est ajusté à 5,5 avec de l'hydroxyde de potassium KOH, et la solution est placée pendant 30 min à l'étuve à 60°C. À cette étape, aucun précipité ne doit se former. Avant coloration avec l'aspartate de plomb, les échantillons sont lavés 5 fois dans de l'eau distillée ultra pure (3 min/lavage) à température ambiante. Ils sont ensuite placés dans la solution d'aspartate de plomb et incubés pendant 30 min à 60°C. À la fin de cette étape, un deuxième cycle de lavage (5 fois, 3 min/lavage) à température ambiante est réalisé.

6.2.5. Déshydratation

Les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs à concentration croissante en éthanol dans l'eau dans des récipients fermés pendant 5 min pour chaque bain à 4°C. Les bains sont dans l'ordre à : 20 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 % et 100 % (deuxième bain) d'éthanol.

Ensuite, les échantillons sont placés dans l'acétone anhydre froide (stockée à 4°C) pendant 10 min suivi d'un deuxième bain dans l'acétone anhydre froide de même durée à température ambiante. Enfin, ils sont placés dans de l'acétone anhydre à température ambiante pendant 10 min. Les solutions d'alcool dans l'eau doivent être fraîchement préparées. L'utilisation de

réipients fermés, surtout pour l'éthanol 100 % est importante pour éviter que les solutions qui sont à 4°C n'absorbent de l'eau au contact de l'atmosphère à température ambiante.

6.2.6. Substitution et imprégnation

La résine utilisée est l'araldite *Durcupan ACM Epoxy* (EMS, 14040). Les échantillons sont placés à température ambiante successivement dans des mélanges 1 : 3 (volume : volume), 1 : 1 et 3 : 1 de résine : acétone anhydre pendant 2 h chacun. Enfin, ils sont placés dans deux bains de résine pure à température ambiante : le premier pendant une nuit et le deuxième pendant 2 à 5 h (après renouvellement de la résine).

6.2.7. Inclusion et polymérisation

Les échantillons sont inclus dans de la résine fraîchement préparée, dans des gélules ou des moules plats très secs, avant de laisser polymériser la résine à 60°C pendant 48 h.

6.3. Préparation avec congélation à haute pression et cryo-substitution (protocole 4)

Pour cette préparation, une partie du foie prélevé après perfusion de la souris est coupée en morceaux d'environ 5 × 5 × 5 mm³. Les échantillons ainsi coupés sont plongés dans la solution de fixation et sont transférés dans le système de congélation à haute pression.

Ensuite, ils sont préparés comme décrit dans la section 5 pour les sphéroïdes. Dans ce cas, les échantillons sont déposés sur le support de congélation à haute-pression dans quelques gouttes de cryo-protectant (*bovine serum albumin* BSA ou dextran). Pour la cryo-substitution, un mélange d'OsO₄ à 2 % et d'acétate d'uranyle à 0,5 % dans de l'acétone séchée est utilisé.

6.4. Différences des protocoles 1 et 2 par rapport aux protocoles 3 et 4

Dans les sous-sections suivantes, les différences des protocoles 1 et 2 de préparation de blocs de foie de souris par rapport aux protocoles 3 et 4 sont écrites en italique.

6.4.1. Fixation

Pour le **protocole 1**, la souris *n'est pas perfusée. La souris est anesthésiée puis disséquée*, et son foie est prélevé. De petits morceaux du foie sont rapidement découpés et plongés dans 1 à 2 mL de la solution de fixation (glutaraldéhyde à 2 % et PFA à 1,25 % dans du tampon cacodylate à 0,1 M *ne contenant pas de CaCl₂*) où ils sont recoupés pour avoir des échantillons de l'ordre de 1 à 2 mm³.

Pour le **protocole 2**, une souris adulte *âgée de 6 mois* est perfusée comme pour le protocole 3 avec la solution de fixation suivante : glutaraldéhyde à 2 % dans un *tampon phosphate* à 0,125 M (450 mOsm, pH 7,4). Comme pour le protocole 3, la fixation est ensuite poursuivie pendant 2 à 4 h à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C.

6.4.2. Lavage

Le tampon de lavage utilisé dans le **protocole 1** est le même que celui utilisé dans le protocole 3 mais *sans* CaCl_2 .

Le tampon de lavage utilisé dans le **protocole 2** est *le tampon phosphate (mono Na/di K) à 0,18 M et à 360 mOsm*.

6.4.3. Post-fixation

Pour le **protocole 1**, les échantillons sont post-fixés pendant 1 h dans *un seul bain* d' OsO_4 tamponné dans du cacodylate à 0,15 M.

Pour le **protocole 2**, les échantillons sont post-fixés dans 2 bains :

- 1 h dans un premier bain d' OsO_4 à 1 % réduit avec du KFe à 1,5 % dans du tampon phosphate (0,1M, pH = 7,4) *sans* CaCl_2 .
- 1h dans un deuxième bain d' OsO_4 à 1 % *dans du tampon phosphate (0,1M, pH = 7,4) sans* CaCl_2 (Solution échangée sans rinçage).

6.4.4. Coloration

Pas de coloration à l'acétate d'uranyle ni à de l'aspartate de plomb dans les deux premiers protocoles.

6.4.5. Déshydratation

Pour **les protocoles 1 et 2**, les échantillons sont placés dans des bains successifs à concentration croissante en éthanol dans l'eau : 30 % (5 à 10 min), 50 % (5 à 10 min), 70 % (5 à 10 min ou plus longtemps si nécessaire), 95 % (5 à 10 min) et 2 bains à 100 % (15 min chacun). *En plus de ces bains, les échantillons préparés avec le protocole 1 sont placés dans trois derniers bains d'oxyde de propylène (10 min chacun).*

6.4.6. Substitution et imprégnation

La résine utilisée dans les **2 premiers protocoles** est *l'epon embed 812 (EMS, 14120)*. Pour le **protocole 1**, *l'oxyde de propylène* est utilisé pour la substitution. Les échantillons sont placés à température ambiante dans un mélange 1 : 1 (volume : volume) *d'oxyde de propylène : résine* pendant 2 h suivi d'un mélange 1 : 2 *d'oxyde de propylène : résine* pendant une nuit. Enfin, ils sont incubés dans un premier bain de résine pure pendant 4 h suivi d'un deuxième bain de 2 h après renouvellement de la résine.

6.4.7. Inclusion et polymérisation

Pour les deux **protocoles 1 et 2**, la résine est polymérisée pendant *une journée à 37°C suivie de 3 jours à 60°C*.

7. Acquisition et analyse des données STEM-EDX

Les coupes de sphéroïdes sont observées en mode STEM et analysés par EDX avec un microscope FEI Tecnai Osiris ou un microscope FEI Titan en utilisant une tension d'accélération de 200 kV. Les cartographies élémentaires sont analysées avec le logiciel Esprit 2.2 (Bruker). Les spectres sont exportés et mis en forme dans Excel. Les images acquises en mode STEM au format SER sont converties au format TIFF avec Fiji en utilisant le plugin TIA Reader :

Plugins → Input-Output → TIA reader (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/tia-reader.html>)

8. Acquisitions FIB-SEM

Les acquisitions FIB-SEM sont réalisées avec un microscope Zeiss crossbeam XB 550 (**Figure 37**). Ce microscope est équipé d'une colonne électronique Gemini 2 et d'une source gallium pour la colonne ionique (Ga⁺). Les deux colonnes sont inclinées d'un angle de 54° l'une par rapport à l'autre.

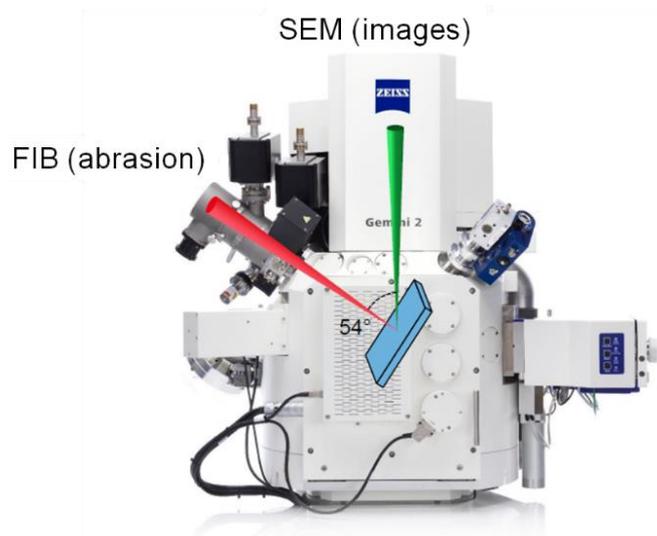


Figure 37 : Microscope FIB-SEM Zeiss crossbeam XB 550

Le bloc d'échantillon enrobé de résine est d'abord taillé pour avoir une forme de pyramide. Ensuite, il est coupé avec une scie à fil (ESCIL) diamanté, et la partie contenant l'échantillon est collée sur un stub de microscopie avec de la laque d'Ag. Pour augmenter la conductivité de l'échantillon, la laque d'Ag est également ajoutée sur les côtés de l'échantillon. Un premier dépôt d'environ 1 à 2 nm de platine (Pt) est ensuite réalisé à l'aide d'un métalliseur PECS (*precision etching coating system*, Gatan) afin d'améliorer la conductivité de l'échantillon qui est ensuite introduit dans le microscope. Dans le microscope FIB-SEM, la surface de l'échantillon est placée en position eucentrique et au point de coïncidence des colonnes FIB et SEM. L'échantillon est incliné de 54° pour placer sa surface perpendiculaire au faisceau FIB (**Figure 38A**). Après identification de la zone d'intérêt, les étapes suivantes de préparation d'échantillon sont réalisées par l'intermédiaire du logiciel ATLAS 3D (Fibics) installé sur le microscope.

Premièrement, une couche protectrice de Pt d'environ $2\ \mu\text{m}$ d'épaisseur est déposée localement sur la zone d'intérêt pour améliorer sa conductivité et obtenir une surface plus homogène, ce qui permet de limiter les effets de drapé lors de l'abrasion ionique (**Figure 38A**). Ce dépôt assisté par FIB est réalisé sur une surface de 20 à 50 μm de longueur et de 30 μm de largeur avec un courant ionique $I = 1,5\ \text{nA}$. Deuxièmement, des tranchées sont creusées par FIB à la surface de la couche de Pt avec un courant $I = 50\ \text{pA}$. Au total 5 marques sont creusées : 3 rectilignes au centre de la zone et 2 inclinées partant chacune de chaque côté (vers la gauche et vers la droite) et convergeant l'une vers l'autre sans croiser celles du milieu (**Figure 38A**). Troisièmement, un dépôt carbone est réalisé avec un courant ionique $I = 1,5\ \text{nA}$ pour remplir les tranchées. Ce dépôt augmente le contraste des marques par rapport au dépôt Pt. Les marques du centre sont utilisées par le programme d'acquisition comme référence pour les réglages automatiques du focus et de l'astigmatisme (marques d'autofocus et d'autostigmatisme). Les marques inclinées sont les marques de suivi de l'acquisition qui permettent de contrôler la dérive latérale de la zone d'acquisition (*drift* en x et y) ainsi que sa dérive en profondeur entre une image et la suivante (*drift* en z). En effet, si l'angle d'inclinaison de ces marques et la distance qui les sépare sont déterminées pour chaque image, la profondeur d'abrasion entre deux images successives peut être calculée. De la même manière, chaque marque prise séparément permet de déterminer les décalages latéraux (en x et en y) entre deux images successives.

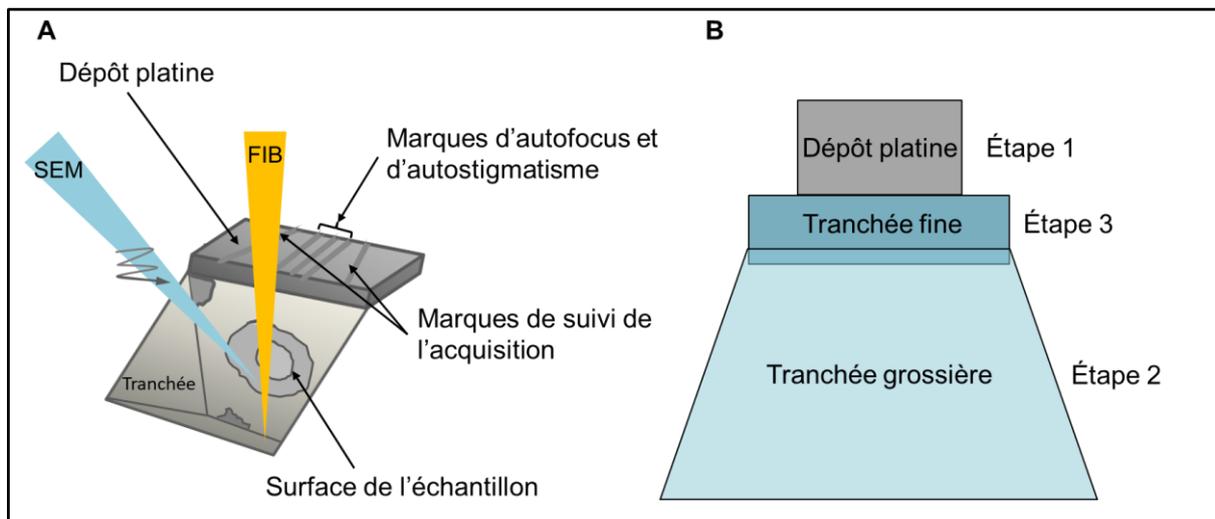


Figure 38 : Préparation d'échantillon pour l'acquisition FIB-SEM. (A) Schéma explicatif des différentes étapes de préparation. Inspirée de Narayan et Subramaniam, 2015. (B) Schéma de l'enchaînement du dépôt protecteur et des tranchées de préparation.

L'étape suivante consiste à dégager la zone d'intérêt pour pouvoir accéder à la surface de l'échantillon (**Figure 38A**). Une première tranchée trapézoïdale grossière est creusée avec un courant ionique $I = 30\ \text{nA}$ devant la zone d'intérêt à une distance qui permet d'avoir une profondeur suffisante pour les acquisitions (**Figure 38B**). Les dimensions que nous avons utilisées pour cette tranchée sont d'environ $50 \times 30\ \mu\text{m}^2$ pour les échantillons de sphéroïdes et d'environ $50 \times 60\ \mu\text{m}^2$ pour les blocs de foie. Une deuxième tranchée parallélépipédique

est abrasée plus finement avec un courant $I = 3$ ou 7 nA pour faire la jonction entre la première tranchée et la zone d'intérêt et pour révéler la première surface à imager (**Figure 38B**). Les tranchées creusées sont plus larges que la zone d'intérêt pour limiter les effets d'ombrage et de redépôt sur les côtés de cette zone. Ces effets peuvent perturber les contrastes dans le volume imagé. Après ces étapes, l'échantillon est prêt pour l'acquisition FIB-SEM.

Les paramètres d'acquisition sont optimisés pour chaque échantillon. Ils sont le résultat d'un compromis entre une résolution suffisante pour observer correctement les structures d'intérêt et un temps d'acquisition raisonnable. Généralement, une région d'intérêt (*region of interest* ROI) de quelques dizaines de micromètres est choisie. La surface de l'échantillon est abrasée avec un courant ionique $I = 700$ pA ou $1,5$ nA à une accélération de 30 kV. Les images SEM sont acquises en utilisant le détecteur des électrons rétrodiffusés de la colonne (*in-lens backscattered detector* EsB) avec une tension de polarisation de 400 ou de 600 V. Cette polarisation permet de filtrer les électrons rétrodiffusés de faible énergie. Une taille de pixel de 10 nm est choisie pour les échantillons de sphéroïdes et une taille de 4 nm est choisie pour les acquisitions des fenêtres des LSEC de foie de souris. L'épaisseur de la tranche à abraser est ajustée selon l'échantillon pour avoir des images avec des voxels isotropes. Le mode moyennage de ligne ou *line averaging* est utilisé pour diminuer le bruit des images. En effet, avec ce mode, chaque ligne de l'image est scannée plusieurs fois avec le faisceau d'électrons et la valeur moyenne des taux de détection pour chaque pixel est enregistrée. Le nombre de balayages par ligne ainsi que le *dwell time* sont réglés pour avoir un temps d'acquisition par image qui ne dépasse pas 2 min. Pour une meilleure stabilité de l'acquisition, l'abrasion avec le FIB et la prise d'images SEM sont exécutées simultanément en utilisant le mode *continuous imaging and milling*.

Après définition de ces différents paramètres, les acquisitions FIB-SEM sont lancées et s'exécutent automatiquement pendant 3 à 4 jours en continu. Pendant l'acquisition, une correction automatique de l'autofocus et de l'astigmatisme est réalisée, respectivement, toutes les 30 et 120 min. Malgré l'automatisation de l'acquisition, il est tout de même nécessaire de surveiller régulièrement sa stabilité et la focalisation des images. Les différents paramètres utilisés dans les acquisitions des échantillons étudiés pendant ma thèse sont détaillés dans le **Tableau 1**.

Nom de l'échantillon	Paramètres SEM				Paramètres FIB		Taille du volume acquis (μm^3)
	I (nA)	V (kV)	Taille du px (nm)	Dwell time (μs)	I (nA)	Épaisseur d'abrasion (nm)	
Sphéroïde contrôle	1	1,5	10	24	0,7	10	23,22 × 16,80 × 15,6
Sphéroïde traité avec des NP-Ag PVP (50 μM , 7j)	4	1,2	10	32	1,5	10	21,81 × 14,88 × 16,3
Sphéroïde traité avec des NP-Ag citrate (25 μM , 7j)	1,5	1,5	10	30	0,7	10	21,45 × 15,54 × 18,9
Sphéroïde traité avec AgNO_3 (5 μM , 7j)	1,8	1,4	12	12	0,69	6	33 × 18,82 × 15,63
Bloc 1 de foie de souris (protocole 1)*	1,2	1,5	10	12	0,69	10	39,1 × 27 × 13,46
Bloc 2 de foie de souris (protocole 2)*	1,2	1,5	10	17	1,5	10	33,82 × 23,84 × 15,19
Bloc 3 de foie de souris (protocole 3)	1	1,5	10	9,5	1,5	10	40,86 × 25,6 × 22,2
Bloc 4 de foie de souris (protocole 4)**	1	1,5	10	9,5	1,5	10	38,56 × 21,66 × 24,06
Bloc 4 de foie de souris (protocole 4)	1	1,5	4	6	1,49	4	25,88 × 17,88 × 6,51
Bloc 5 de foie de souris (protocole 4)**	1	1,5	4	5	0,7	4	19,98 × 22,04 × 9,38

Tableau 1 : Paramètres d'acquisition FIB-SEM utilisés pour les différents échantillons analysés. Les notations NP-Ag citrate et NP-Ag PVP désignent les NP-Ag enrobées de citrate et les NP-Ag enrobées de PVP, respectivement. *Les blocs 1 et 2 de foie de souris sont, respectivement, l'échantillon 1 et l'échantillon 2 comparés dans le chapitre 3 (voir sections 1.1 et 1.2 du chapitre 3). **Le bloc 4 de foie de souris est l'échantillon utilisé pour les 1^{ères} segmentations des LSEC (voir section 2.1 du chapitre 3) et le bloc 5 de foie de souris est l'échantillon utilisé pour la segmentation des LSEC du sinusoïde (voir section 2.2 du chapitre 3).

9. Analyse des images FIB-SEM

Les piles d'images (entre 1000 et plus de 2000 images) obtenues à la fin des acquisitions FIB-SEM (au format TIFF) font de quelques dizaines à environ une centaine de Go (pour les piles d'images d'acquisition des sinusoides de foie de souris). Les intensités des pixels en niveaux de gris de ces images sont codées sur 16 bits, c'est-à-dire sur $2^{16} = 65536$ niveaux de gris.

Chaque pile d'images est d'abord importée dans Fiji en tant qu'une séquence d'images (*File* → *Import* → *Image Sequence*). Ensuite, la région d'intérêt imagée en SEM est extraite avec la commande : *Image* → *Crop*. Les premières images de la pile (généralement quelques dizaines) sont acquises lorsque l'acquisition n'est pas encore stable et présentent beaucoup de variation de contraste. De ce fait, elles sont retirées de la pile d'images avec la commande : *Image* → *Duplicate* en cochant l'option *Duplicate stack* et en commençant la copie à partir de la première image présentant un contraste homogène. Pour la même raison, les dernières images sont également supprimées. Les images sont ensuite converties en 8 bits (codage sur $2^8 = 256$ niveaux de gris) pour réduire d'un facteur 2 l'espace mémoire qu'elles occupent : *Image* → *Type* → *8-bit*. Le contraste est inversé pour avoir des images comparables aux images TEM (*Edit* → *Invert*) et la taille du voxel en x, y et z est définie avec *Image* → *Properties*. La luminosité et le contraste sont ajustés avec *Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast*.

9.1. Alignement des piles d'images

L'alignement des piles d'images est réalisé en utilisant les plugins *MultistackReg* ou SIFT de Fiji. Pour les piles d'images alignées avec *MultistackReg*, l'alignement est initialement réalisé sur un sous-volume extrait de la pile d'images et la matrice de translation obtenue à l'issue de cette étape est ensuite appliquée à toute la pile d'images :

1. Après extraction du sous-volume, le premier alignement est réalisé avec la commande : *Plugins* → *Registration* → *MultiStackReg* (Thevenaz et al., 1998) en choisissant *Translation* comme type de transformation et *Align* comme action à exécuter (*Action1*). Pour enregistrer la matrice de translation (sous le format .txt), l'option *Save Transformation File* est cochée. L'image centrale est utilisée comme référence globale pour l'alignement (c'est l'image active lors du lancement du plugin) ;
2. Pour avoir un aperçu du résultat de l'alignement dans les autres vues (yz et xz) de la pile d'images, la commande suivante est utilisée : *Image* → *Stacks* → *Orthogonal Views*. Le déplacement des images pendant l'alignement entraîne l'apparition de bords noirs qui apparaissent comme « une pente » sur la vue yz. Cette pente est aplatie en utilisant un programme Python qui est appliqué à la matrice de translation obtenue après l'étape 1 ;
3. La matrice de translation ainsi corrigée est appliquée à toute la pile d'images pour l'aligner. L'action choisie ici est *Load Transformation File*.

Pour l'alignement avec la méthode SIFT (<https://imagej.net/plugins/linear-stack-alignment-with-sift>), la commande suivante est utilisée :

Plugins → *Registration* → *Linear Stack Alignment with SIFT*, en précisant la translation comme type de transformation entre les images (choisir *Translation* dans *expected transformation*). Les valeurs par défaut des autres paramètres du SIFT ne sont pas changées. Une explication plus détaillée de ces paramètres se trouve dans ce tutoriel : https://www.ini.uzh.ch/~acardona/howto.html#sift_parameters.

« La pente » qui apparaît sur la vue yz de la pile d'images alignée est corrigée avec un script Python.

Les étapes détaillées jusqu'ici sont réalisées de manière similaire pour les piles d'images des sphéroïdes hépatiques et pour les piles d'images des blocs de foie de souris. Les étapes qui sont décrites dans les paragraphes suivants sont spécifiques à chaque type d'échantillons.

9.2. Analyse des images FIB-SEM des sphéroïdes traités avec les espèces d'Ag

9.2.1. Prétraitement et débruitage et des images

9.2.1.1. *Binning* et redimensionnement des piles d'images

Les piles d'images sont soit binnées ou redimensionnées avec Fiji. Le *binning* des images est réalisé en utilisant la commande suivante : *Image* → *Transform* → *Bin*. La méthode de moyennage des voxels est utilisée (sélection de *Average* dans *Bin Method*). Le redimensionnement des images est réalisé en utilisant la commande : *Image* → *Scale*. Les facteurs de *binning* ou de redimensionnement en x, y et z utilisés pour les 4 échantillons de sphéroïdes sont détaillés dans le **Tableau 2**. Ces facteurs sont choisis pour répondre à deux exigences : réduire suffisamment la taille des piles d'images pour être segmentées avec Ilastik, tout en gardant une résolution suffisante pour visualiser correctement les structures d'intérêt.

	Sphéroïde contrôle	Sphéroïde traité avec des NP-Ag citrate	Sphéroïde traité avec des NP-Ag PVP	Sphéroïde traité avec AgNO ₃
Taille initiale du voxel (nm ³)	10 × 10 × 10	10 × 10 × 10	10 × 10 × 10	12 × 12 × 6
Facteurs de <i>binning</i> /redimensionnement	3 × 3 × 2	2,8 × 2,8 × 4	2 × 2 × 2	2 × 2 × 4
Taille du voxel après <i>binning</i> /redimensionnement (nm ³)	30 × 30 × 20	28 × 28 × 40	20 × 20 × 20	24 × 24 × 24

Tableau 2 : Facteurs de *binning* ou de redimensionnement utilisés pour le prétraitement des images FIB-SEM des sphéroïdes hépatiques. Ces facteurs sont représentés sous la forme : facteur de *binning* en x × facteur de *binning* en y × facteur de *binning* en z. Le facteur de redimensionnement = 1/ facteur de *binning*. Les notations NP-Ag citrate et NP-Ag PVP désignent les NP-Ag enrobées de citrate et les NP-Ag enrobées de PVP, respectivement

9.2.1.2. Diffusion anisotrope

Ce filtrage est réalisé en appliquant la méthode de Tschumperle et Deriche (Tschumperle et Deriche, 2005) en 3D sur les piles d'images FIB-SEM. Pour avoir accès à ce filtre, la librairie de plugins « xlib » (<https://imagej.net/plugins/xlib>) est installée. Ensuite, le filtre de diffusion anisotrope est appliqué aux images (*Plugins* → *xlib* → *anisotropic diffusion*). Ce filtre permet de débruiter une image, tout en préservant ses contours. Le filtrage peut être réalisé sur les images 2D ou sur les piles d'images selon deux modes : en 3D (mode *volumetric*) ou en filtrant chaque image indépendamment des autres (mode *slice-wise*).

L'algorithme de diffusion anisotrope appliqué aux images est inspiré du phénomène de diffusion thermique. En effet, les intensités de pixels sont considérées comme des valeurs de température et le filtrage peut être vu comme une diffusion de ces valeurs. Cette diffusion est anisotrope, c'est-à-dire qu'elle dépend du voisinage des pixels (ou des voxels en 3D) et se fait selon des directions préférentielles. Localement, ces directions sont déterminées en fonction de la direction et de la valeur du gradient de l'image : la diffusion est plus élevée dans les régions à faible gradient (les régions de contraste homogène) et elle est plus faible dans les régions à fort gradient comme les contours. Dans Fiji, en 2D, ces directions sont la direction de variation minimale et la direction de variation maximale du gradient. En 3D, à ces deux directions, une direction de variation intermédiaire est ajoutée. À chacune de ces directions, correspond un paramètre dont la valeur définit une limite de diffusion dans cette direction (*diffusion limiter*). Ces paramètres sont annotés a_1 , a_2 et a_3 en 3D et correspondent, respectivement, aux directions de variation minimale, de variation intermédiaire et de variation maximale du gradient. En 2D, a_1 et a_2 correspondent, respectivement, aux directions de variation minimale et maximale du gradient. Le long de ces directions, un filtrage gaussien dit anisotrope est effectué pour filtrer les images. Le filtrage est fait itérativement sur les images et plusieurs filtrages peuvent être effectués par itération. Le nombre d'itérations (*max number of complete iterations*) ainsi que le nombre de filtrages par itération (*smoothing number per iteration*) sont définis par l'utilisateur. D'autres paramètres peuvent également être définis comme le paramètre temporel élémentaire *time step* et la valeur seuil de l'amplitude des contours à préserver ou *edge threshold height*. Le temps total du filtrage est proportionnel au paramètre temporel élémentaire et la valeur seuil de l'amplitude des contours détermine la limite à partir de laquelle un contour de la carte de gradients de l'image est considéré comme significatif, et donc à préserver par l'algorithme.

Le choix des paramètres optimaux de ce filtrage pour les piles d'images est fait en testant plusieurs valeurs pour chaque paramètre sur une image test extraite de la pile d'images (généralement, une image du milieu de la pile). Les paramètres ainsi obtenus sont ensuite appliqués à la pile d'images en cochant *entire stack processing* et en utilisant le mode *volumetric*. Plus précisément, les valeurs des paramètres a_1 et a_2 obtenues pour l'image test correspondent aux a_1 et a_3 appliquées à la pile d'images et le milieu entre les deux valeurs a_1 et a_3 est choisi comme la valeur a_2 appliquée en 3D. J'ai appliqué ce filtrage aux piles d'images du sphéroïde traité avec des NP-Ag enrobées de PVP et celui traité avec AgNO_3 . Les paramètres utilisés pour ces deux échantillons sont détaillés dans le **Tableau 3**. Les paramètres non mentionnés dans le tableau sont laissés à leurs valeurs par défaut dans Fiji.

Échantillon	Sphéroïde traité avec des NP-Ag enrobées de PVP	Sphéroïde traité avec AgNO ₃
Paramètres de diffusion anisotrope		
Nombre d'itérations	6	5
Nombre de lissages par itération	1	2
Paramètre a1	0,3	0,3
Paramètre a2	0,65	0,65
Paramètre a3	1	1
Valeur seuil de l'amplitude du contour	10	10

Tableau 3 : Paramètres de filtrage par diffusion anisotrope

Les images obtenues pour ces deux piles d'images étaient plus bruitées que celles des autres échantillons, ce qui a nécessité l'application d'étapes de filtrage supplémentaires.

Pour la pile d'images de l'échantillon traité avec les NP-Ag enrobées de PVP, une correction du contraste dans la direction z et un filtre VSNR sont appliqués.

9.2.1.3. Correction du contraste en z

Cette étape est réalisée par un programme Python qui extrait 10 zones de chaque slice, de dimensions 41×41 px² chacune. Pour chaque image, il calcule et affiche la moyenne et la médiane des intensités des pixels pour chaque zone ainsi que la moyenne et la médiane de ces 10 zones (moyenne totale par image et médiane totale par image). Pour les images de l'échantillon traité avec des NP-Ag enrobées de PVP, la courbe de variations des valeurs de la moyenne totale par image est plus lisse (presque constante) que celle des variations de la médiane totale par image. Ainsi, la valeur moyenne est choisie comme référence, c'est-à-dire que le code Python permet d'égaliser les moyennes des images de toute la pile.

9.2.1.4. Filtrage VSNR

Après correction du contraste en z, des variations en forme de lignes verticales sont encore présentes sur la vue yz. Pour les corriger, la pile d'images est ré-échantillonnée pour avoir les données yz (*Image* → *Stacks* → *Reslice*) et la pile d'images résultante est filtrée en utilisant le plugin VSNR 2 (*Plugins* → *Process* → *VSNR_V2* après son installation). Les filtres de VSNR permettent de lisser un bruit dit structuré et stationnaire. Le filtre Gabor est utilisé avec les paramètres suivants : *sigma_x* (épaisseur en pixels des stries) = 0.5 et *sigma_y* (longueur en pixels des stries) = 150, *noise level* (niveau du bruit) = 4, *iteration_nber* (nombre d'itérations) = 50. Le filtrage est réalisé en 2D (image par image). Le choix de ces valeurs est fait en testant différentes valeurs des paramètres sur une image extraite de la pile d'images et ensuite, les valeurs optimales sont appliquées à toute la pile. Pour accélérer le filtrage, la version GPU du plugin est utilisée.

En résumé, ces différentes étapes sont réalisées dans cet ordre pour l'échantillon traité avec les NP-Ag PVP : alignement de la pile d'images, *binning* des images, correction du contraste en z, filtrage par VSNR et diffusion anisotrope.

9.2.1.5. Correction des positions z des images

En raison des problèmes d'instabilité, la pile d'images de l'échantillon traité par AgNO_3 présente beaucoup de variations du contraste. Le suivi, par un programme Python, des mesures enregistrées par le microscope de l'épaisseur de la tranche abrasée en fonction de la avancement en z a permis de déduire une oscillation des épaisseurs autour de la valeur théorique de 6 nm avec une variance de 1,5 nm. Pour corriger cette variation et avoir une épaisseur constante égale à 6 nm entre toutes les images successives, un code Python est utilisé. Ce code permet de créer une grille avec les positions théoriques des images. Pour chaque position théorique, si une correspondance avec une position d'une image acquise existe, cette dernière est laissée à sa position. Sinon, l'image placée à la position théorique est calculée par une moyenne pondérée entre les deux images les plus proches en distance de cette position (l'image la plus proche a plus de poids dans le calcul). Cette étape est réalisée après l'alignement des images et avant leur *binning*.

En résumé, ces différentes étapes sont réalisées dans cet ordre pour l'échantillon traité avec AgNO_3 : alignement de la pile d'images, correction des positions z des images, *binning* des images et diffusion anisotrope.

9.2.2. Segmentation

Ilastik (versions 1.3.3 et 1.4b) est utilisé pour la segmentation des différents organites (mitochondries, noyaux, vésicules et NP-Ag) et de l'espace intercellulaire à partir des images FIB-SEM des sphéroïdes. Cependant, les noyaux de l'échantillon traité avec AgNO_3 sont segmentés avec le logiciel commercial Imaris (Oxford Instruments). Ceci est fait manuellement en traçant leurs contours approximativement toutes les deux images et en réalisant une interpolation pour déduire les contours sur les autres images. Pour l'échantillon contrôle et les échantillons traités avec des NP-Ag, la même pile d'images est utilisée pour la segmentation des différentes structures d'intérêt et pour l'échantillon AgNO_3 , différents sous-volumes sont extraits de la pile d'images initiales et utilisés chacun pour la segmentation d'une structure d'intérêt.

En utilisant le plugin Ilastik de Fiji (https://www.ilastik.org/documentation/fiji_export/plugin), ces piles d'images sont d'abord converties au format HDF5 : *Plugins* → *Ilastik* → *Export HDF5*. Ensuite, elles sont importées dans Ilastik en tant que *Raw Data (Add separate Image(s))*.

Les dimensions de ces piles d'images, le(s) méthode(s) de segmentation utilisée(s) ainsi que les paramètres ajustés pour chaque structure segmentée dans chaque échantillon sont détaillés dans le **Tableau 4**.

Échantillon		Contrôle	Traité avec des NP-Ag enrobées de		Traité avec AgNO ₃
			citrate	PVP	
Paramètres de segmentation					
Volume de segmentation (px ³)		774 × 560 × 463	760 × 552 × 463	600 × 680 × 480	
Noyaux	Volume (px ³)				1377 × 784 × 200
	Méthode	Carving			Manuelle (Imaris)
	Paramètres	Step edge, $\sigma = 1$	Dark lines, $\sigma = 1,6$		
Mitochondries	Volume (px ³)				1001 × 784 × 200*
	Méthode	Carving			
	Paramètres	Step edge, $\sigma = 1$	Step edge, $\sigma = 1,6$	Step edge, $\sigma = 1$	
Vésicules	Volume (px ³)				406 × 576 × 248**
	Méthode	Carving			
	Paramètres	Step edge, $\sigma = 1$	Step edge, $\sigma = 1,6$	Step edge, $\sigma = 1$	Step edge, $\sigma = 1,6$
Particules dans des endo-lysosomes ou des vacuoles	Volume (px ³)				406 × 576 × 248**
	Méthode		Carving	Pixel classification	
	Paramètres		Step edge, $\sigma = 1,6$	Segmentation sur 200 images et batch processing sur toute la pile	Masque binaire des vacuoles = prediction mask (voir remarque)
Canalicule biliaire	Volume (px ³)				736 × 448 × 130
	Méthode	Carving			
	Paramètres	Step edge, $\sigma = 1$	Step edge, $\sigma = 0,8$	Step edge, $\sigma = 1$	Step edge, $\sigma = 0,8$

Tableau 4 : Paramètres de segmentation des différents organites et des régions de canalicules biliaires des sphéroïdes hépatiques. Pour la segmentation avec la méthode carving, les paramètres sont affichés dans cet ordre : type d'apparence des membranes (step edge, dark lines...) et sigma du filtre appliqué en prétraitement. *Le sous-volume utilisé pour la segmentation des mitochondries a été extrait de celui de segmentation des noyaux. ** Pour l'échantillon traité avec AgNO₃, seules les vacuoles ont été segmentées.

Remarques :

- En raison de leur contraste prononcé sur les images FIB-SEM, les particules contenues dans les vésicules (endolysosomes ou vacuoles) de l'échantillon traité avec AgNO₃ et de celui traité avec les NP-Ag enrobées de PVP sont segmentées avec la méthode *pixel classification*. Pour l'échantillon traité avec AgNO₃, la segmentation des vacuoles est d'abord réalisée avec la méthode *carving*. Ensuite, dans un deuxième projet Ilastik de segmentation des particules (méthode *pixel classification*), le sous-volume de

segmentation des vacuoles est utilisé comme *Raw Data* et le masque binaire de segmentation des vacuoles est utilisé comme *Prediction Mask*. Cela permet de n'afficher que la partie intérieure des vacuoles (pour les *Raw Data*) et de masquer toutes les autres structures sur les images, ce qui permet de faciliter la segmentation des particules.

- La segmentation du canalicule biliaire de l'échantillon traité avec les NP-Ag enrobées de PVP n'est pas possible en une seule étape avec la méthode *carving* : l'algorithme converge avant de compléter la segmentation. Cette première segmentation du canalicule biliaire est enregistrée en tant qu'objet 1. Un deuxième objet représentant les parties manquantes du canalicule biliaire dans la première segmentation est créé dans le même projet *carving*. Ensuite, les deux segmentations sont combinées et exportées en tant qu'une seule segmentation (*completed segments, unicolor*). Pour pouvoir segmenter correctement le canalicule biliaire, la valeur du paramètre *superpixel regularity* est changée de 0,5 (valeur par défaut) à 0,1. Pour les autres organites segmentés avec la méthode *carving*, cette valeur est laissée à sa valeur par défaut.

Le maillage 3D de la structure segmentée avec la méthode *carving* peut être visualisé en cochant l'option *Show 3D* dans la fenêtre en bas à droite de l'interface d'Ilastik. À la fin de l'étape de segmentation, le masque binaire et/ou le maillage 3D sont exportés :

- Le masque binaire est exporté en cliquant sur l'onglet *segmentation* et en sélectionnant l'option *Export*
- Pour l'export du maillage 3D, ce dernier est d'abord enregistré en cliquant sur l'option *save current object* et ensuite il est exporté sous le format *OBJ* en cliquant sur *Export all meshes*. Plusieurs objets peuvent être segmentés dans un seul projet Ilastik (méthode *carving*) et les maillages correspondants peuvent également être générés et enregistrés dans le même projet.

9.2.3. Génération des maillages 3D

Le masque binaire exporté d'Ilastik (format HDF5) est d'abord converti au format TIFF avec le plugin Ilastik de Fiji (*Plugins* → *Ilastik* → *Import HDF5*). Ensuite, il est importé avec la pile d'images initiales dans le logiciel MIB, version 2.81 (Belevich et al., 2016) pour correction manuelle de la segmentation (si nécessaire) avec l'outil pinceau. Il est à noter ici que le masque binaire doit être importé en tant que modèle (*Models* → *load model*) dans MIB pour pouvoir le voir en superposition sur la pile d'images correspondante. Après correction de la segmentation, la pile d'images est enregistrée (*File* → *Save image as*) sous le format *Amira mesh binary* (propre à Amira/Avizo Fire, d'extension .am) et le masque binaire est enregistré en tant que modèle (*Models* → *Save model as*) sous le même format. L'enregistrement du masque binaire en tant que modèle est nécessaire pour pouvoir le lier à la pile d'images dans le logiciel Avizo Fire (voir l'étape suivante) et l'utilisation du format *Amira mesh binary* est nécessaire pour pouvoir ouvrir les deux fichiers dans Avizo Fire. Ces deux fichiers (en .am) sont ensuite importés dans Avizo Fire (version 7.0, Thermo Fisher Scientific). Le masque binaire est lié à la pile d'images correspondante (avec un clic droit sur le masque et sélection de l'option *ImageData*). Ensuite, le maillage 3D est généré avec les étapes suivantes : clic gauche sur le

masque, sélection de *SurfaceGen* et sélection du mode de lissage *Unconstrained smoothing* dans l'onglet *Properties* en bas. Le maillage s'affiche par défaut sous le format objet propre à Avizo, SURF. Pour le visualiser, il faut cliquer droit dessus et choisir l'option *Surfaceview*. Le maillage 3D est finalement enregistré sous le format *OBJ*. Ces différentes étapes sont détaillées dans cette vidéo : <https://www.youtube.com/watch?v=4DkZE-HGNNU>

9.2.4. Visualisation des maillages 3D

Les maillages 3D exportés d'Ilastik ou générés avec Avizo Fire sont importés dans Paraview (version 5.8) ou Dragonfly (licence non commerciale, ORS).

9.2.5. Calcul de sphéricité des mitochondries

Le calcul de sphéricité des mitochondries des 4 échantillons de sphéroïdes étudiés est réalisé sur les masques binaires exportés d'Ilastik. Après conversion de ces masques au format TIFF, le plugin *3D objects counter* (<https://imagej.net/plugins/3d-objects-counter>) présenté dans l'article de Bolte et Cordelières, 2006 est utilisé pour séparer les différentes mitochondries qui forment le réseau mitochondrial : *Analyze* → *3D Objects Counter*. Pour ce faire, le plugin utilise la connectivité entre les voxels : le masque binaire est parcouru pixel par pixel et image par image. Pour une image donnée, chaque fois qu'un pixel appartenant à l'objet segmenté (ici, le réseau de mitochondries) est détecté, une étiquette lui est attribuée. L'étiquette est un numéro unique qui est porté par tous les voxels appartenant à un même objet détecté par ce processus. À chaque fois qu'un nouveau pixel appartenant au réseau de mitochondries est détecté, les étiquettes de ses 4 plus proches pixels voisins sur la même image ainsi que celles de ses 9 plus proches voisins sur l'image précédente dans la pile d'images sont vérifiées et la valeur minimale de ces étiquettes lui est attribuée. Si ses voisins n'appartiennent pas à des objets déjà détectés, une nouvelle étiquette d'un nouvel objet est attribuée à ce pixel. À la fin de ce processus, une carte des objets détectés est affichée en cochant *Objects* dans l'option *Maps to show* dans la fenêtre qui correspond au plugin. Sur la pile d'images obtenue, les voxels d'un même objet ont la même intensité : celle de leur étiquette. Ces étiquettes peuvent être affichées en cochant *Show numbers* dans la fenêtre des paramètres du plugin : *Analyze* → *3D OC options*. Dans notre cas, cette option est décochée pour que les pixels formant les étiquettes ne soient pas pris en compte dans le calcul de sphéricité. La carte des objets ainsi générée est enregistrée et utilisée par un deuxième plugin de Fiji, *MorpholibJ* (<https://imagej.net/plugins/morpholibj>) qui est présenté dans l'article de Legland et al., 2016. Avec ce plugin, la sphéricité de chaque mitochondrie détectée est calculée en utilisant la commande : *Plugins* → *MorpholibJ* → *Analyze* → *Analyze Regions 3D*. Dans la fenêtre qui s'affiche, vérifier que le volume, la surface et la sphéricité sont cochés (*Volume*, *Surface Area*, *Sphericity*). La méthode de calcul de surface choisie (*Surface area method*) est *Crofton (13 dirs.)* et la connectivité C26 est choisie pour *Euler Connectivity* pour prendre en compte tous les 26 plus proches voisins de chaque voxel dans le calcul de sphéricité. La formule utilisée par *MorpholibJ* pour le calcul de ce paramètre est la suivante : $\frac{36\pi V^2}{S^3}$ où V est le volume de l'objet et S est sa surface.

Les mesures obtenues avec ce plugin sont enregistrées (format .csv) et mises en forme dans Excel. Bien que les valeurs théoriques de la sphéricité doivent être entre 0 et 1, les erreurs éventuelles du calcul peuvent produire des valeurs supérieures à 1. Ces valeurs sont seuillées à 1 dans Excel. La distribution des valeurs de sphéricité (classes entre 0 et 1 par pas de 0,1) est normalisée par le nombre total de mitochondries détectées dans chaque échantillon (par le plugin *3D objects counter*).

9.3. Analyse des images FIB-SEM des LSEC

Comme détaillé dans le chapitre 3, les images FIB-SEM des LSEC ne sont pas filtrées afin de préserver la netteté des fenêtres.

9.3.1. Segmentation des LSEC à 4 nm et à 8 nm de résolutions isotropes

Les premières segmentations des LSEC réalisées dans le but de déterminer la résolution nécessaire pour une segmentation correcte de leurs fenêtres sont faites sur un sous-volume extrait d'une pile d'images d'un sinusöide dans un bloc de foie de souris préparé avec le protocole 4 (voir section 6 de ce chapitre). Les dimensions de ce sous-volume qui présente une partie d'une cellule LSEC sont $1196 \times 816 \times 100 \text{ px}^3$ (taille de voxel = $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$). Ce sous-volume est désigné par pile d'images initiales dans les deux sous-sections suivantes, 9.3.1.1 et 9.3.1.2.

9.3.1.1. Première étape de segmentation, « segmentation grossière »

La taille du sous-volume est d'abord réduite par *binning* avec Fiji en appliquant un facteur de *binning* de 4 dans chaque direction spatiale. Ceci permet d'obtenir une pile d'images de dimensions $299 \times 352 \times 25 \text{ px}^3$ avec une taille de voxel de $16 \times 16 \times 16 \text{ nm}^3$. Cette pile d'images binnée est ensuite utilisée comme données initiales (*Raw Data*) d'un projet Ilastik (méthode *carving*). Les paramètres suivants sont utilisés : *Dark lines* pour le type d'apparence des membranes sur les images, *Filter scale* = 1 et *superpixel regularity* = 0,1

Le masque binaire de cette première segmentation est exporté d'Ilastik et est ré-échantillonné avec Fiji en utilisant la commande : *Image* → *Scale* et en utilisant une interpolation bicubique. Cette commande permet de redimensionner les images suivant un facteur d'échelle inférieur ou supérieur à 1. Dans notre cas, le facteur est 4 dans les 3 directions x, y et z (mettre 4 dans *X Scale*, *Y Scale* et *Z Scale* en cochant *Process entire stack*). Ceci permet de déduire les intensités des voxels par interpolation pour remplir une grille 4 fois plus grande en largeur, en hauteur et en profondeur. La pile d'images qui en résulte a les dimensions de la pile d'images initiales ($1196 \times 816 \times 100 \text{ px}^3$) à quelques pixels près (erreurs d'interpolation). Ensuite, la pile d'images initiales et ce masque rééchantillonné sont combinés pour former une pile d'images à 2 canaux avec la commande suivante : *Image* → *Color* → *Merge Channels*.

9.3.1.2. Deuxième étape de segmentation, « segmentation fine »

La pile d'images à 2 canaux ainsi obtenue est utilisée comme *Raw Data* d'un deuxième projet Ilastik (méthode *Pixel classification*). Toutes les caractéristiques de voxels (*features*)

proposées par Ilastik sont sélectionnées, sauf celles qui correspondent à $\sigma = 10$ (la plus grande valeur proposée par Ilastik). Cette valeur est exclue du calcul des caractéristiques de voxels, car l'objectif de cette étape est de corriger la segmentation des régions fines des LSEC et de s'intéresser donc au voisinage local des voxels appartenant aux LSEC plutôt qu'aux voisinages plus étendus. En outre, ce choix permet d'accélérer le calcul.

Pour la segmentation à 8 nm de résolution isotrope, la pile d'images initiales est d'abord binnée avec un facteur 2 dans chaque direction spatiale. La pile d'images obtenue a les dimensions suivantes : $598 \times 408 \times 50 \text{ px}^3$ (taille de voxel = $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}^3$). Dans ce cas, le masque binaire exporté à la fin de la première étape de segmentation qui a une résolution isotrope de 16 nm est ré-échantillonné avec un facteur d'échelle 2 dans les 3 directions spatiales (*X Scale*, *Y Scale* et *Z Scale*). Ensuite, le masque binaire ré-échantillonné et la pile d'images initiales binnée (taille de voxel = $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}^3$) sont combinés pour former une pile d'images à 2 canaux comme expliqué précédemment. Cette dernière est utilisée comme *Raw Data* d'un autre projet Ilastik (méthode *pixel classification*) en utilisant les mêmes *features* que celles utilisées pour la segmentation des images à 4 nm de résolution isotrope.

À la fin de cette deuxième étape de segmentation, le masque binaire est exporté (pour les deux résolutions) : dans l'onglet *Prediction Export*, sous *Export Settings*, choisir *Simple Segmentation* dans *Source* et cliquer sur *Export*.

Comme expliqué dans la sous-section 9.2.3, les masques binaires sont corrigés manuellement dans MIB et les maillages 3D correspondants sont générés dans Avizo Fire. Dragonfly est utilisé pour le rendu 3D.

9.3.2. Segmentation des LSEC d'un sinusöide hépatique

Le sous-volume utilisé pour la segmentation des LSEC formant le bord d'un sinusöide a les dimensions $3696 \times 4280 \times 392 \text{ px}^3$ avec une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$. Ce sous-volume est désigné par pile d'images initiales dans les sous-sections suivantes.

9.3.2.1. Étape 1 : définition de la bande de localisation des fenêtres des LSEC

La pile d'images initiales est d'abord binnée avec Fiji (méthode *Average* et facteur de *binning* 16 dans chaque direction spatiale). La pile d'images obtenue a les dimensions suivantes : $231 \times 268 \times 25 \text{ px}^3$ avec une taille de voxel de $64 \times 64 \times 64 \text{ nm}^3$. Ensuite, cette pile d'images binnée est utilisée comme *Raw Data* d'un projet Ilastik (méthode *carving*) pour la segmentation de la lumière du sinusöide. Les paramètres suivants sont utilisés : *dark lines*, *filter scale* = 1,6. Le masque de segmentation exporté d'Ilastik (masque du sinusöide) est ré-échantillonné avec Fiji avec une interpolation bicubique et un facteur d'échelle 16 dans les 3 directions spatiales pour revenir à la résolution isotrope initiale de 4 nm.

Les étapes de post-traitement de ce masque ré-échantillonné sont ensuite réalisées dans IPSDK (<https://www.reactivip.com/fr/traitement-dimages>) qui est une bibliothèque d'analyse d'images écrite dans le langage Python et commercialisée par l'entreprise Reactiv'IP. Dans l'ordre, ces étapes sont :

- Binarisation du masque (étape nécessaire, même si le masque de segmentation est initialement binaire) : *Binarization* → *Simple Threshold* ;
- Application du filtre *outline* (*Basic Morphology* → *Boundary 3D*) pour extraire le contour du sinusöide. La connectivité des 6 plus proches voisins d'un voxel (*connexity 6*) est choisie dans *Neighborhood* ;
- Application d'une dilatation en 3D (*Basic Morphology* → *Dilatation 3D*) avec un élément structurant sphérique de rayon 30.

Enfin, un filtre gaussien de variance (*sigma*) 30 dans les 3 directions spatiales est appliqué avec Fiji : *Process* → *Filters* → *Gaussian Blur 3D*. Ainsi, la bande des fenêtres est créée.

9.3.2.2. Étape 2 : segmentation des régions fenêtrées des LSEC

La pile d'images initiales et la bande des fenêtres (de l'étape 1) sont combinées avec Fiji pour former une pile d'images à 2 canaux. Deux sous-volumes de dimensions 354 x 393 x 392 px³ sont extraits de cette pile d'images et convertis au format HDF5 avec Fiji avant d'être importés comme *Raw Data* dans un projet Ilastik (méthode *pixel classification*). Toutes les *features* proposées par Ilastik sont sélectionnées. Après segmentation de ces deux sous-volumes, la segmentation est généralisée à toute la pile d'images (à 2 canaux) : dans l'onglet *Batch Processing* du projet Ilastik, cliquer sur *Select Raw Data Files*, importer la pile d'images à segmenter (à 2 canaux) et cliquer enfin sur *Process all files*. Pour exporter le masque binaire de segmentation et pas la carte des probabilités, choisir *Simple Segmentation* dans l'onglet *Prediction Export* (comme expliqué en haut).

Après le *batch processing*, le masque binaire généré (masque de segmentation 1) est post-traité en appliquant les étapes suivantes :

- Inversion de la bande des fenêtres suivie d'une dilatation en 3D avec un élément structurant sphérique de rayon 50. Puisque IP SDK est plus rapide que Fiji pour analyser les images, il est utilisé dans cette étape. Le rayon est choisi après des étapes d'essai-erreur. Le masque résultant est appelé masque de soustraction ;
- Soustraction du masque de soustraction du masque de segmentation 1 avec Fiji : *Process* → *Image Calculator*, mettre le masque de segmentation 1 dans *Image1*, le masque de soustraction dans *Image2* et *Subtract* dans *Operation*. Les deux piles d'images doivent être ouvertes dans Fiji avant de faire la soustraction.

Le résultat final de cette étape est le masque de segmentation des régions fenêtrées des LSEC.

9.3.2.3. Étape 3 : segmentation des régions nucléaires des LSEC

- Prétraitement des données initiales

Détermination du bord extérieur du sinusöide

Dans IP SDK, le masque du sinusöide à 4 nm de résolution isotrope (voir étape 1) est dilaté en 3D avec un élément structurant sphérique de rayon 285. Ensuite, le masque non dilaté est

soustrait du masque ainsi dilaté (*Arithmetic* → *Substraction Image*). Le résultat définit le bord extérieur du sinusoïde.

Détermination du bord intérieur du sinusoïde

Les étapes suivantes sont réalisées dans IP SDK :

- Dilatation en 3D du masque du sinusoïde à 4 nm de résolution isotrope avec un élément structurant sphérique de rayon 85 ;
- Soustraction du masque non dilaté du masque ainsi dilaté. Le résultat est appelé masque intermédiaire ;
- Dilatation en 3D du contour du sinusoïde (voir étape 1) avec un élément structurant sphérique de rayon 85 ;
- Soustraction du masque intermédiaire du masque du contour dilaté. Le résultat définit le bord intérieur du sinusoïde.

Définition de la bande de localisation des LSEC

Les deux bords intérieur et extérieur sont additionnés avec Fiji : *Process* → *Image Calculator*, choisir *Add* dans *Operation* et mettre les deux piles d'images représentant les deux bords du sinusoïde dans *Image1* et *Image2*. Les deux piles d'images doivent être ouvertes dans Fiji avant de faire l'addition.

Application de la bande de localisation des LSEC aux images initiales

Les étapes suivantes sont réalisées avec Fiji :

- Soustraction : bande de localisation des LSEC - pile d'images initiales ;
- Inversion du contraste du résultat de soustraction.

La pile d'images obtenue est la pile d'images initiales prétraitées.

- Segmentation des régions nucléaires des LSEC

Les images initiales prétraitées sont binnées avec Fiji avec la méthode *Average* et avec un facteur de *binning* de 8 dans les 3 directions spatiales. La pile d'images obtenue a les dimensions suivantes : $462 \times 535 \times 49 \text{ px}^3$ avec une taille de voxel de $32 \times 32 \times 32 \text{ nm}^3$. Elle est ensuite utilisée comme *Raw Data* d'un projet Ilastik (méthode *carving*). Les paramètres suivants sont utilisés : *dark lines*, *filter scale* = 1,6. Le masque de segmentation est exporté d'Ilastik et est ré-échantillonné avec Fiji en utilisant une interpolation bicubique pour revenir à la résolution de 4 nm. Ce masque est le masque des régions nucléaires des LSEC.

9.3.2.4. Étape 4 : segmentation finale des LSEC

Les images initiales prétraitées, le masque des régions fenêtrées des LSEC et le masque des régions nucléaires des LSEC sont combinés avec Fiji pour former une pile d'images à 3 canaux : *Image* → *Color* → *Merge Channels*. Au total, 6 sous-volumes sont extraits de cette pile

d'images et convertis au format HDF5 avec Fiji avant d'être importés comme *Raw Data* dans un projet Ilastik (méthode *pixel classification*).

Toutes les *features* proposées par Ilastik sont sélectionnées. Après apprentissage du classifieur sur les sous-volumes, la segmentation est généralisée à toute la pile d'images (à 3 canaux). Les dimensions des sous-volumes utilisés pour l'apprentissage du classifieur sont détaillées dans le **Tableau 5**

Numéro du sous-volume	1	2	3	4	5	6
Dimensions (px ³)	160 × 242 × 392	171 × 474 × 392	216 × 216 × 392	231 × 188 × 392	262 × 292 × 392	286 × 321 × 392

Tableau 5 : Dimensions des sous-volumes utilisés pour l'apprentissage du classifieur de la méthode *pixel classification* dans l'étape 4 de segmentation des LSEC.

9.3.2.5. Génération et post-traitement du maillage 3D

Après apprentissage sur les 4 sous-volumes numérotés de 1 à 4 dans le **Tableau 5** et sur les 6 sous-volumes numérotés de 1 à 6 dans le **Tableau 5** et après généralisation de la segmentation à toute la pile d'images, les masques binaires obtenus pour ces deux apprentissages sont exportés d'Ilastik. Ensuite, après conversion au format TIFF, ils sont post-traités avec Fiji en appliquant l'opération arithmétique OR : *Process* → *Image Calculator*, mettre les deux masques en tant qu'*Image1* et *Image2* et choisir OR dans *Operation*. Comme mentionné en haut, les deux piles d'images doivent être ouvertes dans Fiji avant de faire cette opération. Le masque ainsi obtenu est importé dans IPSDK. Pour réduire les erreurs de segmentation, une analyse en composantes connexes (*connected components analysis*) est initialement appliquée au masque pour séparer ses composantes connexes (groupes de voxels connectés) : *Advanced Morphology* → *Connected Component 3D* en choisissant une connectivité des 6 plus proches voisins d'un voxel (*connexity 6* dans *Neighborhood*). Un filtrage de taille est ensuite réalisé sur les composantes (ou les objets) détectées pour ne laisser que la plus grande composante : *Advanced Morphology* → *Keep big shape 3D*. Le maillage 3D correspondant à cette composante est créé : *Shape Segmentation* → *Label Shape Extraction 3D*, dans *Label Image*, mettre le résultat obtenu après l'opération *Keep big shape 3D*. Le maillage 3D généré est sauvegardé dans le menu *Values* → *Shapes* (en haut à gauche). Il est enregistré au format STL et converti au format OBJ dans Paraview. Ensuite, il est simplifié dans MeshLab (version v2020) : *Filters* → *Remeshing, Simplification and Reconstruction* → *Quality Edge Collapse Decimation*. Le paramètre *Quality threshold* choisi est 0,3 pour diminuer le nombre de surfaces du maillage de 30 %, l'option *Optimal position of simplified vertices* est cochée et les autres paramètres sont laissés à leurs valeurs par défaut. Le maillage simplifié est finalement lissé avec un filtrage de type Taubin : *Filters* → *Smoothing, Fairing and Deformation* → *Taubin Smooth* avec les paramètres suivants : $\lambda = 0,6$, $\mu = -0,53$ et 100 itérations. Paraview est utilisé pour le rendu volumique final.

Références bibliographiques

- Adams, N.W.H., Kramer, J.R., 1999. Potentiometric Determination of Silver Thiolate Formation Constants Using a Ag₂S Electrode. *Aquat. Geochem.* 5, 1–11.
<https://doi.org/10.1023/A:1009699617808>
- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615–616.
<https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Afshinnia, K., Gibson, I., Merrifield, R., Baalousha, M., 2016. The concentration-dependent aggregation of Ag NPs induced by cystine. *Sci. Total Environ.* 557–558, 395–403.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.212>
- Ahrens, J., Geveci, B., Law, C., 2005. ParaView: An End-User Tool for Large-Data Visualization. In: Hansen, C., Johnson, C.R. (Eds.), *Visualization Handbook*. Elsevier Butterworth–Heinemann, pp. 717–731.
<https://doi.org/10.1016/B978-012387582-2/50038-1>
- Alshehri, A.H., Jakubowska, M., Młozniak, A., Horaczek, M., Rudka, D., Free, C., Carey, J.D., 2012. Enhanced Electrical Conductivity of Silver Nanoparticles for High Frequency Electronic Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 7007–7010.
<https://doi.org/10.1021/am3022569>
- Anses, 2020. Rapport d'expertise collective de l'agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire, environnement, travail : Registre R-Nano, Évaluation des potentialités d'exploitation et de partage des données déclarées. Disponible sur :
<https://www.anses.fr/fr/system/files/AP2019SA0157Ra.pdf>
- Anses, 2021. Agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire, environnement, travail, les Cahiers de la Recherche Santé, Environnement, Travail : Microplastiques et nanomatériaux, Comprendre où en est la recherche. Disponible sur :
<https://www.anses.fr/fr/system/files/CDLR-mg-MicroplastiquesNanomateriaux17.pdf>
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W., Schindelin, J., Cardona, A., Sebastian Seung, H., 2017. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 33, 2424–2426.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx180>
- Arkill, K.P., Qvortrup, K., Starborg, T., Mantell, J.M., Knupp, C., Michel, C.C., Harper, S.J., Salmon, A.H., Squire, J.M., Bates, D.O., Neal, C.R., 2014. Resolution of the three dimensional structure of components of the glomerular filtration barrier. *BMC Nephrol.* 15, 24.
<https://doi.org/10.1186/1471-2369-15-24>
- Armer, H.E.J., Mariggi, G., Png, K.M.Y., Genoud, C., Monteith, A.G., Bushby, A.J., Gerhardt, H., Collinson, L.M., 2009. Imaging Transient Blood Vessel Fusion Events in Zebrafish by Correlative Volume Electron Microscopy. *PLOS ONE* 4, e7716.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007716>
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut., The Behaviour and Effects of Nanoparticles in the Environment* 157, 1127–1133.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.002>

- Axson, J.L., Stark, D.I., Bondy, A.L., Capracotta, S.S., Maynard, A.D., Philbert, M.A., Bergin, I.L., Ault, A.P., 2015. Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid. *J. Phys. Chem. C* 119, 20632–20641.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03634>
- Baena, V., Conrad, R., Friday, P., Fitzgerald, E., Kim, T., Bernbaum, J., Berensmann, H., Harned, A., Nagashima, K., Narayan, K., 2021. FIB-SEM as a Volume Electron Microscopy Approach to Study Cellular Architectures in SARS-CoV-2 and Other Viral Infections: A Practical Primer for a Virologist. *Viruses* 13, 611.
<https://doi.org/10.3390/v13040611>
- Ballerini, M., Milani, M., Costato, M., Squadrini, F., Turcu, I.C., 1997. Life science applications of focused ion beams (FIB). *Eur. J. Histochem. EJH* 41 Suppl 2, 89–90.
- Ballot, E., Beleoken, E., Mustafa, M., Johanet, C., Duclos-Vallée, J.-C., 2012. Relations entre foie et immunité. *EMC - Hépatologie* 7, 1–14.
[https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(12\)54243-9](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(12)54243-9)
- Battocchio, C., Meneghini, C., Fratoddi, I., Venditti, I., Russo, M.V., Aquilanti, G., Maurizio, C., Bondino, F., Matassa, R., Rossi, M., Mobilio, S., Polzonetti, G., 2012. Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols: A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure. *J. Phys. Chem. C* 116, 19571–19578.
<https://doi.org/10.1021/jp305748a>
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H., 2012. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* 208, 286–292.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>
- Belevich, I., Joensuu, M., Kumar, D., Vihinen, H., Jokitalo, E., 2016. Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets. *PLOS Biol.* 14, e1002340.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002340>
- Belicova, L., Repnik, U., Delpierre, J., Gralinska, E., Seifert, S., Valenzuela, J.I., Morales-Navarrete, H.A., Franke, C., Räägel, H., Shcherbinina, E., Prikazchikova, T., Koteliensky, V., Vingron, M., Kalaidzidis, Y.L., Zatsepin, T., Zerial, M., 2021. Anisotropic expansion of hepatocyte lumina enforced by apical bulkheads. *J. Cell Biol.* 220, e202103003.
<https://doi.org/10.1083/jcb.202103003>
- Bell, C.C., Hendriks, D.F.G., Moro, S.M.L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A.C.A., Jacobs, F., Snoeys, J., Sison-Young, R.L., Jenkins, R.E., Nordling, Å., Mkrtchian, S., Park, B.K., Kitteringham, N.R., Goldring, C.E.P., Lauschke, V.M., Ingelman-Sundberg, M., 2016. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci. Rep.* 6, 25187.
<https://doi.org/10.1038/srep25187>
- Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C.N., Kausler, B.X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J.I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F.A., Kreshuk, A., 2019. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat. Methods* 16, 1226–1232.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9>
- Bertinato, J., Cheung, L., Hoque, R., Plouffe, L.J., 2010. Ctr1 transports silver into mammalian cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24, 178–184.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.009>

- Bhandari, S., Larsen, A.K., McCourt, P., Smedsrød, B., Sørensen, K.K., 2021. The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease. *Front. Physiol.* 12, 757469
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.757469>
- Bhatia, S.N., Ingber, D.E., 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 32, 760–772.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2989>
- Birch-andersen, A., Seruminstut, S., 1955. Reconstruction of the Nuclear Sites of Salmonella typhimurium from Electron Micrographs of Serial Sections. *J. Gen Microbiol.* Oct;13(2):327-9.
<https://doi.org/10.1099/00221287-13-2-327>
- Blouin, A., Bolender, R.P., Weibel, E.R., 1977. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non hepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* 72, 441–455.
<https://doi.org/10.1083/jcb.72.2.441>
- Boergens, K.M., Denk, W., 2013. Controlling FIB-SBEM slice thickness by monitoring the transmitted ion beam. *J. Microsc.* 252, 258–262.
<https://doi.org/10.1111/jmi.12086>
- Boges, D.J., Agus, M., Magistretti, P.J., Cali, C., 2020. Forget About Electron Micrographs: A Novel Guide for Using 3D models for Quantitative Analysis of Dense Reconstructions. In: Wacker, I., Hummel, E., Burgold, S., Schröder, R. (Eds.), *Volume Microscopy: Multiscale Imaging with Photons, Electrons, and Ions*. Humana Press, New York, USA, pp. 263–304. (Neuromethods, 155)
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0691-9_14
- Bolte, S., Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., ten Voorde, S.E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin, H.J.P., Sips, A.J.A.M., 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 53, 52–62.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.10.008>
- Bove, P., Malvindi, M.A., Kote, S.S., Bertorelli, R., Summa, M., Sabella, S., 2017. Dissolution test for risk assessment of nanoparticles: a pilot study. *Nanoscale* 9, 6315–6326.
<https://doi.org/10.1039/C6NR08131B>
- Braet, F., Riches, J., Geerts, W., Jahn, K.A., Wisse, E., Frederik, P., 2009. Three-dimensional organization of fenestrae labyrinths in liver sinusoidal endothelial cells. *Liver Int.* 29, 603–613.
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01836.x>
- Braet, F., Wisse, E., 2002. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 1, 1.
<https://doi.org/10.1186/1476-5926-1-1>
- Braet, F., Wisse, E., Bomans, P., Frederik, P., Geerts, W., Koster, A., Soon, L., Ringer, S., 2007. Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions. *Microsc. Res. Tech.* 70, 230–242.
<https://doi.org/10.1002/jemt.20408>
- Braet, F., Zanger, R.D., Kalle, W., Raap, A., Tanke, H., Wisse, E., 1996. Comparative Scanning, Transmission and Atomic Force Microscopy of the Microtubular Cytoskeleton in Fenestrated Liver Endothelial Cells. *Scanning Microsc Suppl.* 10, 225-236.

- Briggman, K.L., Denk, W., 2006. Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Curr. Opin. Neurobiol., Neuronal and glial cell biology / New technologies* 16, 562–570.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.08.010>
- Briggman, K.L., Helmstaedter, M., Denk, W., 2011. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature* 471, 183–188.
<https://doi.org/10.1038/nature09818>
- Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M.M., Francies, H.E., Gavarró, L.M., Bradshaw, C.R., Allen, G.E., Arnes-Benito, R., Sidorova, O., Gaspersz, M.P., Georgakopoulos, N., Koo, B.-K., Dietmann, S., Davies, S.E., Praseedom, R.K., Lieshout, R., IJzermans, J.N.M., Wigmore, S.J., Saeb-Parsy, K., Garnett, M.J., van der Laan, L.J., Huch, M., 2017. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat. Med.* 23, 1424–1435.
<https://doi.org/10.1038/nm.4438>
- Bullen, A., Taylor, R.R., Kachar, B., Moores, C., Fleck, R.A., Forge, A., 2014. Inner ear tissue preservation by rapid freezing: Improving fixation by high-pressure freezing and hybrid methods. *Hear. Res.* 315, 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2014.06.006>
- Burkard, A., Dähn, C., Heinz, S., Zutavern, A., Sonntag-Buck, V., Maltman, D., Przyborski, S., Hewitt, N.J., Braspenning, J., 2012. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 42, 939–956.
<https://doi.org/10.3109/00498254.2012.675093>
- Bushby, A.J., P'ng, K.M.Y., Young, R.D., Pinali, C., Knupp, C., Quantock, A.J., 2011. Imaging three-dimensional tissue architectures by focused ion beam scanning electron microscopy. *Nat. Protoc.* 6, 845–858.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2011.332>
- Butola, A., Coucheron, D.A., Szafranska, K., Ahmad, A., Mao, H., Tinguely, J.-C., McCourt, P., Senthikumar, P., Mehta, D.S., Agarwal, K., Ahluwalia, B.S., 2021. Multimodal on-chip nanoscopy and quantitative phase imaging reveals the nanoscale morphology of liver sinusoidal endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 118, e2115323118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2115323118>
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M., 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28, 580–588.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>
- Charbonnier, P., Chovelon, B., Ravelet, C., Ngo, T.D., Chevallet, M., Deniaud, A., 2022. ATP7B-Deficient Hepatocytes Reveal the Importance of Protein Misfolding Induced at Low Copper Concentration. *Cells* 11, 3400.
<https://doi.org/10.3390/cells11213400>
- Chklovskii, D.B., Vitaladevuni, S., Scheffer, L.K., 2010. Semi-automated reconstruction of neural circuits using electron microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol., Neuronal and glial cell biology – New technologies* 20, 667–675.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.002>
- Chung, G.H.C., Gissen, P., Stefan, C.J., Burden, J.J., 2022. Three-dimensional Characterization of Interorganelle Contact Sites in Hepatocytes using Serial Section Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.*, 184, e63496.
<https://doi.org/10.3791/63496>

- Cignoni, P., Callieri, M., Corsini, M., Dellepiane, M., Ganovelli, F., Ranzuglia, G., 2008. MeshLab: an Open-Source Mesh Processing Tool. In: Scarano, V., De Chiara, R., Erra, U. (Eds.), Eurographics Italian Chapter Conference. The Eurographics Association, pp. 129–136.
- Code rural et de la pêche maritime, 2003. Disponible sur : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006071367/LEGISCTA000006152478/#LEGISCTA000006152478
- Cogger, V.C., Mohamad, M., Solon-Biet, S.M., Senior, A.M., Warren, A., O'Reilly, J.N., Tung, B.T., Svistounov, D., McMahon, A.C., Fraser, R., Raubenheimer, D., Holmes, A.J., Simpson, S.J., Le Couteur, D.G., 2016. Dietary macronutrients and the aging liver sinusoidal endothelial cell. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 310, H1064–H1070. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00949.2015>
- Cogger, V.C., Muller, M., Fraser, R., McLean, A.J., Khan, J., Le Couteur, D.G., 2004. The effects of oxidative stress on the liver sieve. *J. Hepatol.* 41, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.04.034>
- Cogger, V.C., O'Reilly, J.N., Warren, A., Couteur, D.G.L., 2015. A Standardized Method for the Analysis of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Fenestrations by Scanning Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* 98, e52698. <https://doi.org/10.3791/52698>
- Criminisi, A., 2011. Decision Forests: A Unified Framework for Classification, Regression, Density Estimation, Manifold Learning and Semi-Supervised Learning. *Found. Trends® Comput. Graph. Vis.* 7, 81–227. <https://doi.org/10.1561/06000000035>
- Crispe, I.N., 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 147–163. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132629>
- Daum, J.M., Keles, Ö., Holwerda, S.J., Kohler, H., Rijli, F.M., Stadler, M., Roska, B., 2017. The formation of the light-sensing compartment of cone photoreceptors coincides with a transcriptional switch. *eLife* 6, e31437. <https://doi.org/10.7554/eLife.31437>
- De Bruijn, W.C., Den Beejen, P., 1975. Glycogen, its chemistry and morphological appearance in the electron microscope.11. The complex formed in the selective contrast staining of glycogen. *Histochem. J.* 7, 205–229. <https://doi.org/10.1007/BF01003591>
- De Rudder, M., Dili, A., Stärkel, P., Leclercq, I.A., 2021. Critical Role of LSEC in Post-Hepatectomy Liver Regeneration and Failure. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8053. <https://doi.org/10.3390/ijms22158053>
- de Senneville, B.D., Khoubai, F.Z., Bevilacqua, M., Labedade, A., Flosseau, K., Chardot, C., Branchereau, S., Ripoché, J., Cairo, S., Gontier, E., Grosset, C.F., 2021. Deciphering tumour tissue organization by 3D electron microscopy and machine learning. *Commun. Biol.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02919-z>
- Décret n° 2013-118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, 2013. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000027037840>
- Deerinck, T. j., Shone, T. m., Bushong, E. a., Ramachandra, R., Peltier, S. t., Ellisman, M. h., 2018. High-performance serial block-face SEM of nonconductive biological samples enabled by focal gas injection-based charge compensation. *J. Microsc.* 270, 142–149. <https://doi.org/10.1111/jmi.12667>

- Deerinck, T.J., Bushong, E.A., Thor, A., Ellisman, M.H., 2010. NCMIR methods for 3D EM: a new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. Disponible sur : <https://ncmir.ucsd.edu/sbem-protocol>
- DeLeve, L.D., 2015. Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Hepatic Fibrosis. *Hepatology* 61, 1740–1746. <https://doi.org/10.1002/hep.27376>
- DeLeve, L.D., 2013. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 123, 1861–1866. <https://doi.org/10.1172/JCI66025>
- Denk, W., Horstmann, H., 2004. Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure. *PLOS Biol.* 2, e329. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>
- Desroches-Castan, A., Tillet, E., Ricard, N., Ouarné, M., Mallet, C., Belmudes, L., Couté, Y., Boillot, O., Scoazec, J.-Y., Bailly, S., Feige, J.-J., 2019. Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis. *Hepatology* 70, 1392–1408. <https://doi.org/10.1002/hep.30655>
- Dewyse, L., Reynaert, H., van Grunsven, L.A., 2021. Best Practices and Progress in Precision-Cut Liver Slice Cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7137. <https://doi.org/10.3390/ijms22137137>
- Di Martino, J., Mascalchi, P., Legros, P., Lacomme, S., Gontier, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Moreau, V., Saltel, F., 2018. STED microscopy: A simplified method for liver sinusoidal endothelial fenestrae analysis. *Biol. Cell* 110, 159–168. <https://doi.org/10.1111/boc.201800016>
- Dorkenwald, S., McKellar, C.E., Macrina, T., Kemnitz, N., Lee, K., Lu, R., Wu, J., Popovych, S., Mitchell, E., Nehoran, B., Jia, Z., Bae, J.A., Mu, S., Ih, D., Castro, M., Ogedengbe, O., Halageri, A., Kuehner, K., Sterling, A.R., Ashwood, Z., Zung, J., Brittain, D., Collman, F., Schneider-Mizell, C., Jordan, C., Silversmith, W., Baker, C., Deutsch, D., Encarnacion-Rivera, L., Kumar, S., Burke, A., Bland, D., Gager, J., Hebdtich, J., Koolman, S., Moore, M., Morejohn, S., Silverman, B., Willie, K., Willie, R., Yu, S., Murthy, M., Seung, H.S., 2022. FlyWire: online community for whole-brain connectomics. *Nat. Methods* 19, 119–128. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01330-0>
- Durán, N., Silveira, C.P., Durán, M., Martínez, D.S.T., 2015. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J. Nanobiotechnology* 13, 55. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4>
- Dutrochet, H.A., 1824. Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux et sur leur motilité. J.B. Bailliere, Paris, France, 247 p. ([Reprod.]). Disponible sur : <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k97538k>.
- Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff, A., Oczkowski, M., Krawczyńska, A., Chwastowska, J., Sadowska-Bratek, M., Chajduk, E., Wojewódzka, M., Dušínská, M., Kruszewski, M., 2012. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 32, 920–928. <https://doi.org/10.1002/jat.2758>
- Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., Fromm, K.M., 2013. Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. *Chem. Rev.* 113, 4708 – 4754. <https://doi.org/10.1021/cr300288v>

- Enquête, 2021. Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche : Utilisation d'animaux à des fins scientifiques dans les établissements français, Enquête statistique 2021. Disponible sur :
<https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2023-02/enqu-te-2021-utilisation-des-animaux-des-fins-scientifiques-26480.pdf>
- Evanoff Jr., D.D., Chumanov, G., 2005. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem* 6, 1221–1231.
<https://doi.org/10.1002/cphc.200500113>
- Fawcett, D.W., 1955. Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 15, Issue Supplement_5, 1475–1503.
https://doi.org/10.1093/jnci/15.Supplement_5.1475
- Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robin, J.-C., Pujol, S., Bauer, C., Jennings, D., Fennessy, F., Sonka, M., Buatti, J., Aylward, S., Miller, J.V., Pieper, S., Kikinis, R., 2012. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn. Reson. Imaging* 30, 1323–1341.
<https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.05.001>
- Fehrenbach, J., Weiss, P., Lorenzo, C., 2012. Variational Algorithms to Remove Stationary Noise: Applications to Microscopy Imaging. *IEEE Trans. Image Process.* 21, 4420–4430.
<https://doi.org/10.1109/TIP.2012.2206037>
- Fiala, J.C., 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* 218, 52–61.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01466.x>
- Gaskell, H., Sharma, P., Colley, H.E., Murdoch, C., Williams, D.P., Webb, S.D., 2016. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. *Toxicol. Res.* 5, 1053–1065.
<https://doi.org/10.1039/C6TX00101G>
- Geerts, A., 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21, 311–335.
<https://doi.org/10.1055/s-2001-17550>
- Geltinger, F., Schartel, L., Wiederstein, M., Tevini, J., Aigner, E., Felder, T.K., Rinnerthaler, M., 2020. Friend or Foe: Lipid Droplets as Organelles for Protein and Lipid Storage in Cellular Stress Response, Aging and Disease. *Molecules* 25, 5053.
<https://doi.org/10.3390/molecules25215053>
- Geng, H., Poologasundarampillai, G., Todd, N., Devlin-Mullin, A., Moore, K.L., Golrokhi, Z., Gilchrist, J.B., Jones, E., Potter, R.J., Sutcliffe, C., O'Brien, M., Hukins, D.W.L., Cartmell, S., Mitchell, C.A., Lee, P.D., 2017. Biotransformation of Silver Released from Nanoparticle Coated Titanium Implants Revealed in Regenerating Bone. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 21169–21180.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b05150>
- Genoud, C., Titze, B., Graff-Meyer, A., Friedrich, R.W., 2018. Fast Homogeneous En Bloc Staining of Large Tissue Samples for Volume Electron Microscopy. *Front. Neuroanat.* 12, 76
<https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00076>
- Geurts, P., Irtthum, A., Wehenkel, L., 2009. Supervised learning with decision tree-based methods in computational and systems biology. *Mol. Biosyst.* 5, 1593–1605.
<https://doi.org/10.1039/B907946G>
- Ghobashy, M.M., Elkodous, M.A., Shabaka, S.H., Younis, S.A., Alshangiti, D.M., Madani, M., Al-Gahtany, S.A., Elkhatib, W.F., Noreddin, A.M., Nady, N., El-Sayyad, G.S., 2021. An overview of methods for production and detection of silver nanoparticles, with emphasis on their fate

- and toxicological effects on human, soil, and aquatic environment. *Nanotechnol. Rev.* 10, 954–977.
<https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0066>
- Glancy, B., Hartnell, L.M., Malide, D., Yu, Z.-X., Combs, C.A., Connelly, P.S., Subramaniam, S., Balaban, R.S., 2015. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature* 523, 617–620.
<https://doi.org/10.1038/nature14614>
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., Karlsson, H.L., 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 11.
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>
- Gondikas, A.P., Morris, A., Reinsch, B.C., Marinakos, S.M., Lowry, G.V., Hsu-Kim, H., 2012. Cysteine-Induced Modifications of Zero-valent Silver Nanomaterials: Implications for Particle Surface Chemistry, Aggregation, Dissolution, and Silver Speciation. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7037–7045.
<https://doi.org/10.1021/es3001757>
- Gong, Z., Tas, E., Yakar, S., Muzumdar, R., 2017. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging. *Mol. Cell. Endocrinol., Metabolism of Aging* 455, 115–130.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.022>
- Gonzalez-Carter, D.A., Leo, B.F., Ruenraroengsak, P., Chen, S., Goode, A.E., Theodorou, I.G., Chung, K.F., Carzaniga, R., Shaffer, M.S.P., Dexter, D.T., Ryan, M.P., Porter, A.E., 2017. Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H2S-synthesizing enzymes. *Sci. Rep.* 7, 42871.
<https://doi.org/10.1038/srep42871>
- Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M., Köller, M., 2011. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 7, 347–354.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.003>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15655–15660.
<https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Guillemot, F., Mironov, V., Nakamura, M., 2010. Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication* 2, 010201.
<https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/1/010201>
- Guizar-Sicarios, M., Thurman, S.T., Fienup, J.R., 2008. Efficient subpixel image registration algorithms. *Opt. Lett.* 33, 156–158.
<https://doi.org/10.1364/OL.33.000156>
- Gunawan, C., Marquis, C.P., Amal, R., Sotiriou, G.A., Rice, S.A., Harry, E.J., 2017. Widespread and Indiscriminate Nanosilver Use: Genuine Potential for Microbial Resistance. *ACS Nano* 11, 3438–3445.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01166>
- Gurevich, I., Burton, S.A., Munn, C., Ohshima, M., Goedland, M.E., Czysz, K., Rajesh, D., 2020. iPSC-derived hepatocytes generated from NASH donors provide a valuable platform for disease modeling and drug discovery. *Biol. Open* 9, bio055087.
<https://doi.org/10.1242/bio.055087>

- Hadrup, N., Lam, H.R., 2014. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.11.002>
- Hallou, A., Yevick, H., Dumitrascu, B., Uhlmann, V., 2021. Deep learning for bioimage analysis. *arXiv:2107.02584*.
<https://doi.org/10.48550/arXiv.2107.02584>
- Hara, T., 2016. Microstructure Analysis by Means of the Orthogonally-arranged FIB-SEM. *Hitachi Review* 65 (7), 201–206.
- Harris, K.M., Perry, E., Bourne, J., Feinberg, M., Ostroff, L., Hurlburt, J., 2006. Uniform Serial Sectioning for Transmission Electron Microscopy. *J. Neurosci.* 26, 12101–12103.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3994-06.2006>
- Haubold, C., Schiegg, M., Kreshuk, A., Berg, S., Köthe, U., Hamprecht, F., 2016. Segmenting and Tracking Multiple Dividing Targets Using ilastik. In: De Vos, W. H. , Munck, S., Timmermans, J.-P. (Eds.), *Focus on Bio-Image Informatics*. Springer International Publishing AG Switzerland (Springer Nature), Cham, Switzerland, pp. 199–229. (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, 219)
https://doi.org/10.1007/978-3-319-28549-8_8
- Hayworth, K.J., Kasthuri, N., Schalek, R., Lichtman, J.W., 2006. Automating the Collection of Ultrathin Serial Sections for Large Volume TEM Reconstructions. *Microsc. Microanal.* 12, 86–87.
<https://doi.org/10.1017/S1431927606066268>
- Hayworth, K.J., Morgan, J.L., Schalek, R., Berger, D.R., Hildebrand, D.G.C., Lichtman, J.W., 2014. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. *Front. Neural Circuits* 8, 68.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00068>
- Hayworth, K.J., Xu, C.S., Lu, Z., Knott, G.W., Fetter, R.D., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Hess, H.F., 2015. Ultrastructurally smooth thick partitioning and volume stitching for large-scale connectomics. *Nat. Methods* 12, 319–322.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3292>
- Heinrich, L., Bennett, D., Ackerman, D., Park, W., Bogovic, J., Eckstein, N., Petruncio, A., Clements, J., Pang, S., Xu, C.S., Funke, J., Korff, W., Hess, H.F., Lippincott-Schwartz, J., Saalfeld, S., Weigel, A.V., 2021. Whole-cell organelle segmentation in volume electron microscopy. *Nature* 599, 141–146.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03977-3>
- Helmstaedter, M., Briggman, K.L., Denk, W., 2008. 3D structural imaging of the brain with photons and electrons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 633–641.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.03.005>
- Helmstaedter, M., Briggman, K.L., Turaga, S.C., Jain, V., Seung, H.S., Denk, W., 2013. Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. *Nature* 500, 168–174.
<https://doi.org/10.1038/nature12346>
- Hendriks, H.F., Verhoofstad, W.A., Brouwer, A., de Leeuw, A.M., Knook, D.L., 1985. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp. Cell Res.* 160, 138–149.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90243-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90243-5)
- Heymann, J.A.W., Hayles, M., Gestmann, I., Giannuzzi, L.A., Lich, B., Subramaniam, S., 2006. Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope. *J. Struct. Biol.* 155, 63–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.03.006>

- Heymann, J.A.W., Shi, D., Kim, S., Bliss, D., Milne, J.L.S., Subramaniam, S., 2009. 3D Imaging of mammalian cells with ion-abrasion scanning electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 166, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.11.005>
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.-L., Karlsson, J., 2007. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 1333–1340. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014902>
- Hirashima, S., Ohta, K., Rikimaru-Nishi, Y., Togo, A., Funatsu, T., Tsuneyoshi, R., Shima, Y., Nakamura, K., 2022. Correlative volume-imaging using combined array tomography and FIB-SEM tomography with beam deceleration for 3D architecture visualization in tissue. *Microscopy* 71, 187–192. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfac015>
- Holst, G., Berg, S., Kare, K., Magistretti, P., Cali, C., 2016. Adding large EM stack support. In: 2016 4th Saudi International Conference on Information Technology (Big Data Analysis) (KACSTIT, Riyadh, Saudi Arabia). IEEE, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1109/KACSTIT.2016.7756066>
- Horn, T., Christoffersen, P., Henriksen, J.H., 1987. Alcoholic liver injury: Defenestration in noncirrhotic livers—a scanning electron microscopic study. *Hepatology* 7, 77–82. <https://doi.org/10.1002/hep.1840070117>
- Horn, T., Henriksen, J.H., Christoffersen, P., 1986. The sinusoidal lining cells in “normal” human liver. A scanning electron microscopic investigation. *Liver* 6, 98–110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1986.tb00275.x>
- Hsieh, C.-E., Leith, A., Mannella, C.A., Frank, J., Marko, M., 2006. Towards high-resolution three-dimensional imaging of native mammalian tissue: Electron tomography of frozen-hydrated rat liver sections. *J. Struct. Biol.* 153, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.10.004>
- Hu, H., Gehart, H., Artegiani, B., López-Iglesias, C., Dekkers, F., Basak, O., van Es, J., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Begthel, H., Korving, J., van den Born, M., Zou, C., Quirk, C., Chiriboga, L., Rice, C.M., Ma, S., Rios, A., Peters, P.J., de Jong, Y.P., Clevers, H., 2018. Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell* 175, 1591-1606 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.013>
- Huotari, J., Helenius, A., 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Huxley, H.E., Zubay, G., 1961. Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 273–296. <https://doi.org/10.1083/jcb.11.2.273>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V., Zolfaghari, B., 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res. Pharm. Sci.* 9, 385–406.
- Ito, T., Nemoto, M., 1952. Über die Kupfferschen Sternzellen und die “Fettspeicherungszellen” (“fat storing cells”) in der Blutkapillarenwand der menschlichen Leber. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 24, 243–258. https://doi.org/10.2535/ofaj1936.24.4_243
- Jain, V., Seung, H.S., Turaga, S.C., 2010. Machines that learn to segment images: a crucial technology for connectomics. *Curr. Opin. Neurobiol., Neuronal and glial cell biology – New technologies* 20, 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.07.004>

- Jennen, D.G.J., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H.B., van Herwijnen, M.H.M., Kleinjans, J.C.S., van Delft, J.H.M., 2010. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 115, 66–79.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq026>
- Jia, J., Li, F., Zhou, H., Bai, Y., Liu, S., Jiang, Y., Jiang, G., Yan, B., 2017. Oral Exposure to Silver Nanoparticles or Silver Ions May Aggravate Fatty Liver Disease in Overweight Mice. *Environ. Sci. Technol.* 51, 9334–9343.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02752>
- Jiang, X., Miclăuș, T., Wang, L., Foldbjerg, R., Sutherland, D.S., Autrup, H., Chen, C., Beer, C., 2015. Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity. *Nanotoxicology* 9, 181–189.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.907457>
- Jiang, Y., Li, L., Chen, X., Liu, J., Yuan, J., Xie, Q., Han, H., 2021. Three-dimensional ATUM-SEM reconstruction and analysis of hepatic endoplasmic reticulum–organelle interactions. *J. Mol. Cell Biol.*
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjab032>
- Jonas, L., Bloch, C., Zimmermann, R., Stadie, V., Gross, G., Schäd, S., 2007. Detection of Silver Sulfide Deposits in the Skin of Patients with Argyria After Long-term Use of Silver-containing Drugs. *Ultrastruct. Pathol.* 31, 379–84.
<https://doi.org/10.1080/01913120701696221>
- Jungermann, K., Sasse, D., 1978. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem. Sci.* 3, 198–202.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(78\)91764-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(78)91764-4)
- Kanebratt, K.P., Andersson, T.B., 2008. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 36, 1444–1452.
<https://doi.org/10.1124/dmd.107.020016>
- Kasthuri, N., Hayworth, K.J., Berger, D.R., Schalek, R.L., Conchello, J.A., Knowles-Barley, S., Lee, D., Vázquez-Reina, A., Kaynig, V., Jones, T.R., Roberts, M., Morgan, J.L., Tapia, J.C., Seung, H.S., Roncal, W.G., Vogelstein, J.T., Burns, R., Sussman, D.L., Priebe, C.E., Pfister, H., Lichtman, J.W., 2015. Saturated Reconstruction of a Volume of Neocortex. *Cell* 162, 648–661.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.054>
- Kawasaki, Y., Hosoyamada, Y., Miyaki, T., Yamaguchi, J., Kakuta, S., Sakai, T., Ichimura, K., 2021. Three-Dimensional Architecture of Glomerular Endothelial Cells Revealed by FIB-SEM Tomography. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 653472.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.653472>
- Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., Nielsen, L.K., 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 173–180.
<https://doi.org/10.1002/bit.10655>
- Kiernan, F., Green, J.H., 1833. XXIX. The anatomy and physiology of the liver. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 123, 711–770.
<https://doi.org/10.1098/rstl.1833.0031>
- Kislinger, G., Gnägi, H., Kerschensteiner, M., Simons, M., Misgeld, T., Schifferer, M., 2020. Multiscale ATUM-FIB Microscopy Enables Targeted Ultrastructural Analysis at Isotropic Resolution. *iScience*, 23(7), 101290. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101290>

- Kizilyaprak, C., Bellis, D.D., Blanchard, W., Daraspe, J., Humbel, B.M., 2019a. FIB-SEM Tomography of Biological Samples: Explore the Life in 3D. In: Fleck, R.A., Humbel, B. M. (Eds.), *Biological Field Emission Scanning Electron Microscopy*, I. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, pp. 545–566.
<https://doi.org/10.1002/9781118663233.ch26>
- Kizilyaprak, C., Bittermann, A.G., Daraspe, J., Humbel, B.M., 2014. FIB-SEM Tomography in Biology. In: Kuo, J. (Ed.), *Electron Microscopy: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 541–558. (Methods in Molecular Biology, 1117).
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1_24
- Kizilyaprak, C., Stierhof, Y.-D., Humbel, B.M., 2019b. Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography. *Tissue and Cell* 57, 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.09.006>
- Kluska, K., Peris-Díaz, M.D., Płonka, D., Moysa, A., Dadlez, M., Deniaud, A., Bal, W., Krężel, A., 2020. Formation of highly stable multinuclear AgnSn clusters in zinc fingers disrupts their structure and function. *Chem. Commun.* 56, 1329–1332.
<https://doi.org/10.1039/C9CC09418K>
- Kluska, K., Veronesi, G., Deniaud, A., Hajdu, B., Gyurcsik, B., Bal, W., Krężel, A., 2022. Structures of Silver Fingers and a Pathway to Their Genotoxicity. *Angew. Chem. Int. Ed.* 61, e202116621.
<https://doi.org/10.1002/anie.202116621>
- Kmieć, Z., 2001. Introduction - Morphology of the liver lobule. In: *Cooperation of Liver Cells in Health and Disease*. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 1–6. (Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology, 161)
https://doi.org/10.1007/978-3-642-56553-3_1
- Knott, G., Marchman, H., Wall, D., Lich, B., 2008. Serial Section Scanning Electron Microscopy of Adult Brain Tissue Using Focused Ion Beam Milling. *J. Neurosci.* 28, 2959–2964.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008>
- Knott, G., Rosset, S., Cantoni, M., 2011. Focussed Ion Beam Milling and Scanning Electron Microscopy of Brain Tissue. *J. Vis. Exp.* 53, e2588.
<https://doi.org/10.3791/2588>
- Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., Kawaguchi, M., Matsushima, H., Takenami, T., Shinji, T., Mori, M., Tsuji, T., 1990. Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Exp. Cell Res.* 186, 227–235.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(90\)90300-y](https://doi.org/10.1016/0014-4827(90)90300-y)
- Koike, T., Kataoka, Y., Maeda, M., Hasebe, Y., Yamaguchi, Y., Suga, M., Saito, A., Yamada, H., 2017. A Device for Ribbon Collection for Array Tomography with Scanning Electron Microscopy. *Acta Histochem. Cytochem.* 50, 135–140.
<https://doi.org/10.1267/ahc.17013>
- Kojima, T., Sawada, N., Yamaguchi, H., Fort, A.G., Spray, D.C., 2009. Gap and Tight Junctions in Liver: Composition, Regulation, and Function. In: Irwin, A.M. (Ed.), *The Liver: Biology and Pathobiology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, pp. 201–220.
<https://doi.org/10.1002/9780470747919.ch14>
- Kong, C., Bobe, S., Pilger, C., Lachetta, M., Øie, C.I., Kirschnick, N., Mönkemöller, V., Hübner, W., Förster, C., Schüttpelz, M., Kiefer, F., Huser, T., Schulte am Esch, J., 2021. Multiscale and Multimodal Optical Imaging of the Ultrastructure of Human Liver Biopsies. *Front. Physiol.* 12, 637136.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.637136>

- Kornfeld, J., Denk, W., 2018. Progress and remaining challenges in high-throughput volume electron microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol., Neurotechnologies* 50, 261–267.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.030>
- Kremer, J.R., Mastrorarde, D.N., McIntosh, J.R., 1996. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116, 71–76.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0013>
- Kreshuk, A., Zhang, C., 2019. Machine Learning: Advanced Image Segmentation Using ilastik. In: Rebollo, E., Bosch, M. (Eds.), *Computer Optimized Microscopy: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, USA, pp. 449–463. (Methods in Molecular Biology, 2040)
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9686-5_21
- Krewski, D., Acosta, D., Andersen, M., Anderson, H., Bailar, J.C., Boekelheide, K., Brent, R., Charnley, G., Cheung, V.G., Green, S., Kelsey, K.T., Kerkvliet, N.I., Li, A.A., McCray, L., Meyer, O., Patterson, R.D., Pennie, W., Scala, R.A., Solomon, G.M., Stephens, M., Yager, J., Zeise, L., 2010. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 13, 51–138.
<https://doi.org/10.1080/10937404.2010.483176>
- Kubota, Y., 2015. New developments in electron microscopy for serial image acquisition of neuronal profiles. *Microscopy* 64, 27–36.
<https://doi.org/10.1093/jmicro/dfu111>
- Kuntz, E., Kuntz, H.-D., 2008. *Hepatology Textbook and Atlas*. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 937 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-76839-5>
- Kupffer, C., 1876. Ueber Sternzellen der Leber. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* 12, 353–358.
<https://doi.org/10.1007/BF02933897>
- Lanone, S., Boczkowski, J., 2010. Les sources de nanoparticules. *Rev. Fr. Allergol.* 50(3), 211–213.
<https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.039>
- Lapierre, P., Alvarez, F., 2007. Le foie : un organe du système immunitaire ? *Med. Sci.* 23, 985–990.
<https://doi.org/10.1051/medsci/20072311985>
- Lausecker, F., Tian, X., Inoue, K., Wang, Z., Pedigo, C.E., Hassan, H., Liu, C., Zimmer, M., Jinno, S., Huckle, A.L., Hamidi, H., Ross, R.S., Zent, R., Ballestrem, C., Lennon, R., Ishibe, S., 2018. Vinculin is required to maintain glomerular barrier integrity. *Kidney Int.* 93, 643–655.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.09.021>
- Le Couteur, D.G., Fraser, R., Cogger, V.C., McLean, A.J., 2002. Hepatic pseudocapillarisation and atherosclerosis in ageing. *Lancet Lond. Engl.* 359, 1612–1615.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08524-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08524-0)
- LeCluyse, E.L., Witek, R.P., Andersen, M.E., Powers, M.J., 2012. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 501–548.
<https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>
- Legallais, C., Kim, D., Mihaila, S.M., Mihajlovic, M., Figliuzzi, M., Bonandrini, B., Salerno, S., Yengej, F.A.Y., Rookmaaker, M.B., Romero, N.S., Sainz-Arnal, P., Pereira, U., Pasqua, M., Gerritsen, K.G.F., Verhaar, M.C., Remuzzi, A., Baptista, P.M., Bartolo, L.D., Masereeuw, R., Stamatialis, D., 2018. Bioengineering Organs for Blood Detoxification. *Adv. Healthc. Mater.* 7, 1800430.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201800430>
- Legland, D., Arganda-Carreras, I., Andrey, P., 2016. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32, 3532–3534.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw413>

- Leighton, S.B., 1981. SEM images of block faces, cut by a miniature microtome within the SEM - a technical note. *Scan. Electron Microsc.* 73–76.
- Lem, K.W., Choudhury, A., Lakhani, A.A., Kuyate, P., Haw, J.R., Lee, D.S., Iqbal, Z., Brumlik, C.J., 2012. Use of Nanosilver in Consumer Products. *Recent Pat. Nanotechnol.* 6, 60–72.
<https://dx.doi.org/10.2174/187221012798109318>
- Levard, C., Hotze, E.M., Colman, B.P., Dale, A.L., Truong, L., Yang, X.Y., Bone, A.J., Brown, G.E.Jr., Tanguay, R.L., Di Giulio, R.T., Bernhardt, E.S., Meyer, J.N., Wiesner, M.R., Lowry, G.V., 2013. Sulfidation of Silver Nanoparticles: Natural Antidote to Their Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13440–13448.
<https://doi.org/10.1021/es403527n>
- Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G.V., Brown, G.E.Jr., 2012. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6900–6914.
<https://doi.org/10.1021/es2037405>
- Li, A.P., Lu, C., Brent, J.A., Pham, C., Fackett, A., Ruegg, C.E., Silber, P.M., 1999. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem. Biol. Interact.* 121, 17–35.
[https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(99\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(99)00088-5)
- Li, P., Zhou, J., Li, W., Wu, H., Hu, J., Ding, Q., Lü, S., Pan, J., Zhang, C., Li, N., Long, M., 2020. Characterizing liver sinusoidal endothelial cell fenestrae on soft substrates upon AFM imaging and deep learning. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1864, 129702.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129702>
- Li, X., Ji, G., Chen, X., Ding, W., Sun, L., Xu, W., Han, H., Sun, F., 2017. Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM. *J. Struct. Biol.* 200, 87–96.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.09.010>
- Liang, F.-X., Petzold, C., Dancel-Manning, K., Sall, J., Ren, P.H., Zhou, C., 2021. Challenges Facing an EM Core Laboratory: Mitochondria Structural Preservation and 3DEM Data Presentation. *Microsc. Today* 29, 18–23.
<https://doi.org/10.1017/S1551929520001777>
- Lin, Rwei-Zeng, Lin, Rwei-Zhen, Chang, H.-Y., 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* 3, 1172–1184.
<https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
- Lin, R.-Z., Chou, L.-F., Chien, C.-C.M., Chang, H.-Y., 2006. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res.* 324, 411–422.
<https://doi.org/10.1007/s00441-005-0148-2>
- Liu, J., Hurt, R.H., 2010. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2169–2175.
<https://doi.org/10.1021/es9035557>
- Liu, J., Sonshine, D.A., Shervani, S., Hurt, R.H., 2010. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano* 4, 6903–6913.
<https://doi.org/10.1021/nn102272n>
- Liu, J., Wang, Z., Liu, F.D., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2012. Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* 6, 9887–9899.
<https://doi.org/10.1021/nn303449n>

- Liu, W., Worms, I.A.M., Herlin-Boime, N., Truffier-Boutry, D., Michaud-Soret, I., Mintz, E., Vidaud, C., Rollin-Genetet, F., 2017. Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin: impact on metal substitution by Ag(I), corona formation and enzymatic activity. *Nanoscale* 9, 6581–6594.
<https://doi.org/10.1039/C7NR01075C>
- Loeschner, K., Hadrup, N., Qvortrup, K., Larsen, A., Gao, X., Vogel, U., Mortensen, A., Lam, H.R., Larsen, E.H., 2011. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Part. *Fibre Toxicol.* 8, 18.
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>
- Lowe, D.G., 2004. Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *Int. J. Comput. Vis.* 60, 91–110.
<https://doi.org/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94>
- Lowe, D.G., 1999. Object recognition from local scale-invariant features. In: *Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV, Kerkyra, Greece)*. IEEE, pp. 1150–1157 vol.2.
<https://doi.org/10.1109/ICCV.1999.790410>
- Loza, K., Sengstock, C., Chernousova, S., Köller, M., Epple, M., 2014. The predominant species of ionic silver in biological media is colloidally dispersed nanoparticulate silver chloride. *RSC Adv.* 4, 35290–35297.
<https://doi.org/10.1039/C4RA04764H>
- Luce, E., Messina, A., Caillaud, A., Si-Tayeb, K., Cariou, B., Bur, E., Dubart-Kupperschmitt, A., Duclos-Vallée, J.-C., 2021. Les organoïdes hépatiques - Quels sont les enjeux ? *Med. Sci.* 37, 902–909.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2021119>
- Ma, L., Wu, Y., Li, Y., Aazmi, A., Zhou, H., Zhang, B., Yang, H., 2020. Current Advances on 3D-Bioprinted Liver Tissue Models. *Adv. Healthc. Mater.* 9, 2001517.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202001517>
- Machireddy, A., Thibault, G., Loftis, K.G., Stoltz, K., Bueno, C.E., Smith, H.R., Riesterer, J.L., Gray, J.W., Song, X., 2021. Robust Segmentation of Cellular Ultrastructure on Sparsely Labeled 3D Electron Microscopy Images using Deep Learning. *bioRxiv* 2021.05.27.446019.
<https://doi.org/10.1101/2021.05.27.446019>
- MacParland, S.A., Liu, J.C., Ma, X.-Z., Innes, B.T., Bartczak, A.M., Gage, B.K., Manuel, J., Khuu, N., Echeverri, J., Linares, I., Gupta, R., Cheng, M.L., Liu, L.Y., Camat, D., Chung, S.W., Seliga, R.K., Shao, Z., Lee, E., Ogawa, S., Ogawa, M., Wilson, M.D., Fish, J.E., Selzner, M., Ghanekar, A., Grant, D., Greig, P., Sapisochin, G., Selzner, N., Winegarden, N., Adeyi, O., Keller, G., Bader, G.D., McGilvray, I.D., 2018. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat. Commun.* 9, 4383.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06318-7>
- Marchioni, M., Gallon, T., Worms, I., Jouneau, P.-H., Lebrun, C., Veronesi, G., Truffier-Boutry, D., Mintz, E., Delangle, P., Deniaud, A., Michaud-Soret, I., 2018a. Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by bio-relevant molecules. *Environ. Sci. Nano* 5, 1911–1920.
<https://doi.org/10.1039/C8EN00340H>
- Marchioni, M., Jouneau, P.-H., Chevallet, M., Michaud-Soret, I., Deniaud, A., 2018b. Silver nanoparticle fate in mammals: Bridging in vitro and in vivo studies. *Coord. Chem. Rev.* 364, 118–136.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.008>
- Maurer, L.L., Yang, X., Schindler, A.J., Taggart, R.K., Jiang, C., Hsu-Kim, H., Sherwood, D.R., Meyer, J.N., 2016. Intracellular trafficking pathways in silver nanoparticle uptake and toxicity in

- Caenorhabditis elegans. *Nanotoxicology* 10, 831–835.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1110759>
- McDonald, K., Schwarz, H., Müller-Reichert, T., Webb, R., Buser, C., Morphew, M., 2010. “Tips and Tricks” for High-Pressure Freezing of Model Systems. In: Müller-Reichert, T. (Ed.), *Methods in Cell Biology*, volume 96, *Electron Microscopy of Model Systems*. Academic Press, pp. 671–693.
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96028-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96028-7)
- McFarland, A.D., Van Duyne, R.P., 2003. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.* 3, 1057–1062.
<https://doi.org/10.1021/nl034372s>
- Micheva, K.D., O’Rourke, N., Busse, B., Smith, S.J., 2010. Array Tomography: High-Resolution Three-Dimensional Immunofluorescence. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.top89.
<https://doi.org/10.1101/pdb.top89>
- Micheva, K.D., Smith, S.J., 2007. Array Tomography: A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron* 55, 25–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.014>
- Miclăuș, T., Bochenkov, V.E., Ogaki, R., Howard, K.A., Sutherland, D.S., 2014. Spatial Mapping and Quantification of Soft and Hard Protein Coronas at Silver Nanocubes. *Nano Lett.* 14, 2086–2093.
<https://doi.org/10.1021/nl500277c>
- Mikula, S., Denk, W., 2015. High-resolution whole-brain staining for electron microscopic circuit reconstruction. *Nat. Methods* 12, 541–546.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3361>
- Minio, F., Lombardi, L., Gautier, A., 1966. Mise en évidence et ultrastructure du glycogène hépatique influence des techniques de préparation. *J. Ultrastruct. Res.* 16, 339–358.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(66\)80067-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(66)80067-9)
- Miranda, K., Girard-Dias, W., Attias, M., Souza, W. de, Ramos, I., 2015. Three dimensional reconstruction by electron microscopy in the life sciences: An introduction for cell and tissue biologists. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 530–547.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22455>
- Mönkemöller, V., Mao, H., Hübner, W., Dumitriu, G., Heimann, P., Levy, G., Huser, T., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Øie, C.I., 2018. Primary rat LSECs preserve their characteristic phenotype after cryopreservation. *Sci. Rep.* 8, 14657.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32103-z>
- Mönkemöller, V., Øie, C., Hübner, W., Huser, T., McCourt, P., 2015. Multimodal super-resolution optical microscopy visualizes the close connection between membrane and the cytoskeleton in liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *Sci. Rep.* 5, 16279.
<https://doi.org/10.1038/srep16279>
- Motta, A., Berning, M., Boergens, K.M., Staffler, B., Beining, M., Loomba, S., Hennig, P., Wissler, H., Helmstaedter, M., 2019. Dense connectomic reconstruction in layer 4 of the somatosensory cortex. *Science* 366, eaay3134.
<https://doi.org/10.1126/science.aay3134>
- Murphy, G.E., Lowekamp, B.C., Zervas, P.M., Chandler, R.J., Venditti, C.P., Subramaniam, S., 2010. Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals distorted liver mitochondrial morphology in murine methylmalonic acidemia. *J. Struct. Biol.* 171, 125–132.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.04.005>

- Murphy, S.V., Atala, A., 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32, 773–785.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Mustafi, D., Avishai, A., Avishai, N., Engel, A., Heuer, A., Palczewski, K., 2011. Serial sectioning for examination of photoreceptor cell architecture by focused ion beam technology. *J. Neurosci. Methods* 198, 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.03.013>
- Nakamura, K., Kato, N., Aizawa, K., Mizutani, R., Yamauchi, J., Tanoue, A., 2011. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *J. Toxicol. Sci.* 36, 625–633.
<https://doi.org/10.2131/jts.36.625>
- Narayan, K., Subramaniam, S., 2015. Focused ion beams in biology. *Nat. Methods* 12, 1021–1031.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3623>
- Nie, Y.-Z., Zheng, Y.-W., Miyakawa, K., Murata, S., Zhang, R.-R., Sekine, K., Ueno, Y., Takebe, T., Wakita, T., Ryo, A., Taniguchi, H., 2018. Recapitulation of hepatitis B virus–host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine* 35, 114–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.014>
- Nowack, B., Krug, H.F., Height, M., 2011. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1177–1183.
<https://doi.org/10.1021/es103316q>
- Øie, C.I., Mönkemöller, V., Hübner, W., Schüttpelz, M., Mao, H., Ahluwalia, B.S., Huser, T.R., McCourt, P., 2018. New ways of looking at very small holes – using optical nanoscopy to visualize liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *Nanophotonics* 7, 575–596.
<https://doi.org/10.1515/nanoph-2017-0055>
- O’Reilly, J.N., Cogger, V.C., Fraser, R., Le Couteur, D.G., 2010. The effect of feeding and fasting on fenestrations in the liver sinusoidal endothelial cell. *Pathology* 42, 255–258.
<https://doi.org/10.3109/00313021003636469>
- Ouchi, R., Togo, S., Kimura, M., Shinozawa, T., Koido, M., Koike, H., Thompson, W., Karns, R.A., Mayhew, C.N., McGrath, P.S., McCauley, H.A., Zhang, R.-R., Lewis, K., Hakozaiki, S., Ferguson, A., Saiki, N., Yoneyama, Y., Takeuchi, I., Mabuchi, Y., Akazawa, C., Yoshikawa, H.Y., Wells, J.M., Takebe, T., 2019. Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metab.* 30, 374–384.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007>
- Park, K., Park, E.-J., Chun, I.K., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., 2011. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch. Pharm. Res.* 34, 153–158.
<https://doi.org/10.1007/s12272-011-0118-z>
- Parks, H. F., 1957. The hepatic sinusoidal endothelial cell and its histological relationships. In: Sjostrand, F.S., Rhodin, J., *Electron Microscopy, Proceedings of the Stockholm Conference*, Academic Press, New York, USA.
- Parlakgöl, G., Arruda, A.P., Pang, S., Cagampan, E., Min, N., Güney, E., Lee, G.Y., Inouye, K., Hess, H.F., Xu, C.S., Hotamışlıgil, G.S., 2022. Regulation of liver subcellular architecture controls metabolic homeostasis. *Nature* 603, 736–742.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04488-5>
- Peddie, C.J., Genoud, C., Kreshuk, A., Meechan, K., Micheva, K.D., Narayan, K., Pape, C., Parton, R.G., Schieber, N.L., Schwab, Y., Titze, B., Verkade, P., Weigel, A., Collinson, L.M., 2022. Volume electron microscopy. *Nat Rev Methods Primers* 2, 51.
<https://doi.org/10.1038/s43586-022-00131-9>

- Peddie, C.J., Collinson, L.M., 2014. Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age. *Micron* 61, 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.01.009>
- Pinali, C., Bennett, H., Davenport, J.B., Trafford, A.W., Kitmitto, A., 2013. Three-Dimensional Reconstruction of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Reveals a Continuous Network Linking Transverse-Tubules. *Circ. Res.* 113, 1219–1230.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301348>
- Podila, R., Chen, R., Ke, P.C., Brown, J.M., Rao, A.M., 2012. Effects of surface functional groups on the formation of nanoparticle-protein corona. *Appl. Phys. Lett.* 101, 263701.
<https://doi.org/10.1063/1.4772509>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., Rautou, P.-E., 2017. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* 66, 212–227.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Porcaro, F., Carlini, L., Ugolini, A., Visaggio, D., Visca, P., Fratoddi, I., Venditti, I., Meneghini, C., Simonelli, L., Marini, C., Olszewski, W., Ramanan, N., Luisetto, I., Battocchio, C., 2016. Synthesis and Structural Characterization of Silver Nanoparticles Stabilized with 3-Mercapto-1-Propansulfonate and 1-Thioglucose Mixed Thiols for Antibacterial Applications. *Materials* 9, 1028.
<https://doi.org/10.3390/ma9121028>
- Poznański, J., Słodacki, D., Czarkowska-Pączek, B., Bonna, A., Kornasiewicz, O., Krawczyk, M., Bal, W., Pączek, L., 2021. Cirrhotic Liver of Liver Transplant Recipients Accumulate Silver and Co-Accumulate Copper. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1782.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041782>
- Pradas del Real, A.E., Castillo-Michel, H., Kaegi, R., Sinnet, B., Magnin, V., Findling, N., Villanova, J., Carrière, M., Santaella, C., Fernández-Martínez, A., Levard, C., Sarret, G., 2016. Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils. *Environ. Sci. Technol.* 50, 1759–1768.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04550>
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K.A., Lynch, I., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* 6, 2295–2350.
<https://doi.org/10.3390/ma6062295>
- Roman, M., Rigo, C., Castillo-Michel, H., Munivrana, I., Vindigni, V., Mičetić, I., Benetti, F., Manodori, L., Cairns, W.R.L., 2016. Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of AgNPs and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 5109–5124.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9014-6>
- Ronneberger, O., Fischer, P., Brox, T., 2015. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. *arXiv:1505.04597*.
<https://doi.org/10.48550/arXiv.1505.04597>
- Rouquette, J., Genoud, C., Vazquez-Nin, G.H., Kraus, B., Cremer, T., Fakan, S., 2009. Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: A novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture. *Chromosome Res.* 17, 801.
<https://doi.org/10.1007/s10577-009-9070-x>

- Roy, N., Gaur, A., Jain, A., Bhattacharya, S., Rani, V., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 807–812.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.005>
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, UK, 252 p.
- Sabatini, D.D., Bensch, K., Barnett, R.J., 1963. Cytochemistry and electron microscopy: The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. *J. Cell Biol.* 17, 19–58.
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.19>
- Saltsman, J.A., Hammond, W.J., Narayan, N.J.C., Requena, D., Gehart, H., Lalazar, G., LaQuaglia, M.P., Clevers, H., Simon, S., 2020. A Human Organoid Model of Aggressive Hepatoblastoma for Disease Modeling and Drug Testing. *Cancers* 12, 2668.
<https://doi.org/10.3390/cancers12092668>
- Schalek, R., Wilson, A., Lichtman, J., Josh, M., Kasthuri, N., Berger, D., Seung, S., Anger, P., Hayworth, K., Aderhold, D., 2012. ATUM-based SEM for High-Speed Large-Volume Biological Reconstructions. *Microsc. Microanal.* 18, 572–573.
<https://doi.org/10.1017/S1431927612004710>
- Schertel, A., Snaidero, N., Han, H.-M., Ruhwedel, T., Laue, M., Grabenbauer, M., Möbius, W., 2013. Cryo FIB-SEM: Volume imaging of cellular ultrastructure in native frozen specimens. *J. Struct. Biol.* 184, 355–360.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.09.024>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, P., Meier, M., Wepf, R., Müller, R., 2011. Serial FIB/SEM imaging for quantitative 3D assessment of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone* 49, 304–311.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.005>
- Seligman, A.M., Wasserkrug, H.L., Hanker, J.S., 1966. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH). *J. Cell Biol.* 30, 424–432.
<https://doi.org/10.1083/jcb.30.2.424>
- Shami, G.J., Cheng, D., Huynh, M., Vreuls, C., Wisse, E., Braet, F., 2016. 3-D EM exploration of the hepatic microarchitecture – lessons learned from large-volume in situ serial sectioning. *Sci. Rep.* 6, 36744.
<https://doi.org/10.1038/srep36744>
- Shannahan, J.H., Podila, R., Aldossari, A.A., Emerson, H., Powell, B.A., Ke, P.C., Rao, A.M., Brown, J.M., 2015. Formation of a Protein Corona on Silver Nanoparticles Mediates Cellular Toxicity via Scavenger Receptors. *Toxicol. Sci.* 143, 136–146.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu217>
- Sharma, V.K., Siskova, K.M., Zboril, R., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Adv. Colloid Interface Sci.* 204, 15–34.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>

- Sharma, V.R., Shrivastava, A., Gallet, B., Karepina, E., Charbonnier, P., Chevallet, M., Jouneau, P.-H., Deniaud, A., 2020a. Canalicular domain structure and function in matrix-free hepatic spheroids. *Biomater. Sci.* 8, 485–496.
<https://doi.org/10.1039/C9BM01143A>
- Shetty, S., Lalor, P.F., Adams, D.H., 2018. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 555–567.
<https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y>
- Sigg, L., Lindauer, U., 2015. Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide. *Environ. Pollut.* 206, 582–587.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.017>
- Silver, S., 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00047-0)
- Sim, K.S., Thong, J.T.L., Phang, J.C.H., 2004. Effect of shot noise and secondary emission noise in scanning electron microscope images. *Scanning* 26, 36–40.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950260106>
- Singh, R.P., Ramarao, P., 2012. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 213, 249–259.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.07.009>
- Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., Duncan, S.A., 2010. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297–305.
<https://doi.org/10.1002/hep.23354>
- Smedsrød, B., Pertoft, H., 1985. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J. Leukoc. Biol.* 38, 213–230.
<https://doi.org/10.1002/jlb.38.2.213>
- Smith, S.J., 2018. Q&A: Array tomography. *BMC Biol.* 16, 98.
<https://doi.org/10.1186/s12915-018-0560-1>
- Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., Vanhaecke, T., 2009. In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells into Hepatocytes: State of the Art. *Stem Cells* 27, 577–605.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0963>
- Soldatow, V.Y., LeCluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I., 2013. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res.* 2, 23–39.
<https://doi.org/10.1039/C2TX20051A>
- Sommer, C., Straehle, C., Köthe, U., Hamprecht, F.A., 2011. Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. In: 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro (Chicago, IL, USA). IEEE, pp. 230–233.
<https://doi.org/10.1109/ISBI.2011.5872394>
- Sonawane, N.D., Thiagarajah, J.R., Verkman, A.S., 2002. Chloride Concentration in Endosomes Measured Using a Ratioable Fluorescent Cl⁻ Indicator: EVIDENCE FOR CHLORIDE ACCUMULATION DURING ACIDIFICATION. *J. Biol. Chem.* 277, 5506–5513.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110818200>
- Sørensen, K.K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R.S., Smedsrød, B., 2015. Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Comprehensive Physiology* 5, 1751–1774.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c140078>

- Sosinsky, G.E., Crum, J., Jones, Y.Z., Lanman, J., Smarr, B., Terada, M., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Johnson, J.E., Ellisman, M.H., 2008. The Combination of Chemical Fixation Procedures with High Pressure Freezing and Freeze Substitution Preserves Highly Labile Tissue Ultrastructure for Electron Tomography Applications. *J. Struct. Biol.* 161, 359–371.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.09.002>
- Sriram, M., Zong, K., Vivekchand, S.R.C., Gooding, J.J., 2015. Single Nanoparticle Plasmonic Sensors. *Sensors* 15, 25774–25792.
<https://doi.org/10.3390/s151025774>
- Steffan, A.-M., Gendrault, J.-L., Kirn, A., 1987. Increase in the number of fenestrae in mouse endothelial liver cells by altering the cytoskeleton with cytochalasin B. *Hepatology* 7, 1230–1238.
<https://doi.org/10.1002/hep.1840070610>
- Straehle, C., Koethe, U., Knott, G., Briggman, K., Denk, W., Hamprecht, F.A., 2012. Seeded watershed cut uncertainty estimators for guided interactive segmentation. In: 2012 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR, Providence, RI, USA). IEEE, pp. 765–772.
<https://doi.org/10.1109/CVPR.2012.6247747>
- Svistounov, D., Zykova, S., Cogger, V., Warren, A., McMahon, A., Fraser, R., Couteur, D., 2012. Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Regulation of Blood Lipoproteins. In: Kelishadi, R. (Ed.), *Dyslipidemia - From Prevention to Treatment*. IntechOpen, London, UK, pp. 263–278.
<https://doi.org/10.5772/29169>
- Szafrańska, K., Kruse, L.D., Holte, C.F., McCourt, P., Zapotoczny, B., 2021a. The wHole Story About Fenestrations in LSEC. *Front. Physiol.* 12, 735573.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.735573>
- Szafrańska, K., Holte, C.F., Kruse, L.D., Mao, H., Øie, C.I., Szymonski, M., Zapotoczny, B., McCourt, P.A.G., 2021b. Quantitative analysis methods for studying fenestrations in liver sinusoidal endothelial cells. A comparative study. *Micron* 150, 103121.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103121>
- Szafrańska, K., Neuman, T., Baster, Z., Rajfur, Z., Szelest, O., Holte, C., Kubisiak, A., Kus, E., Wolfson, D., Chlopicki, S., Ahluwalia, B., Lekka, M., Szymonski, M., McCourt, P., Zapotoczny, B., 2022. From fixed-dried to wet-fixed to live – comparative super-resolution microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *Nanophotonics* 11, 2253-2270
<https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0818>
- Takahashi, Y., Hori, Y., Yamamoto, T., Urashima, T., Ohara, Y., Tanaka, H., 2015. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci. Rep.* 35, e00208.
<https://doi.org/10.1042/BSR20150034>
- Takebe, T., Sekine, K., Kimura, M., Yoshizawa, E., Ayano, S., Koido, M., Funayama, S., Nakanishi, N., Hisai, T., Kobayashi, T., Kasai, T., Kitada, R., Mori, A., Ayabe, H., Ejiri, Y., Amimoto, N., Yamazaki, Y., Ogawa, S., Ishikawa, M., Kiyota, Y., Sato, Y., Nozawa, K., Okamoto, S., Ueno, Y., Taniguchi, H., 2017. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 21, 2661–2670.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.005>
- Tardillo Suárez, V., Karepina, E., Chevallet, M., Gallet, B., Cottet-Rousselle, C., Charbonnier, P., Moriscot, C., Michaud-Soret, I., Bal, W., Fuchs, A., Tucoulou, R., Jouneau, P.-H., Veronesi, G., Deniaud, A., 2020. Nuclear translocation of silver ions and hepatocyte nuclear receptor impairment upon exposure to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* 7, 1373–1387.
<https://doi.org/10.1039/C9EN01348B>

- Tardillo Suárez, V., Gallet, B., Chevallet, M., Jouneau, P.-H., Tucoulou, R., Veronesi, G., Deniaud, A., 2021. Correlative transmission electron microscopy and high-resolution hard X-ray fluorescence microscopy of cell sections to measure trace element concentrations at the organelle level. *J. Struct. Biol.* 213, 107766.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107766>
- Tasnim, F., Phan, D., Toh, Y.-C., Yu, H., 2015. Cost-effective differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules. *Biomaterials* 70, 115–125.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.002>
- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R.C., Lead, J.R., 2012. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7011–7017.
<https://doi.org/10.1021/es2038596>
- Templier, T., 2019. MagC, magnetic collection of ultrathin sections for volumetric correlative light and electron microscopy. *eLife* 8, e45696.
<https://doi.org/10.7554/eLife.45696>
- Teunenbroek, T.V., Baker, J., Dijkzeul, A., 2017. Towards a more effective and efficient governance and regulation of nanomaterials. *Part. Fibre Toxicol.* 14, 54.
<https://doi.org/10.1186/s12989-017-0235-z>
- Thevenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M., 1998. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 27–41.
<https://doi.org/10.1109/83.650848>
- Timischl, F., Date, M., Nemoto, S., 2012. A statistical model of signal–noise in scanning electron microscopy. *Scanning* 34, 137–144.
<https://doi.org/10.1002/sca.20282>
- Tinguely, J.-C., Steyer, A.M., Øie, C.I., Helle, Ø.I., Dullo, F.T., Olsen, R., McCourt, P., Schwab, Y., Ahluwalia, B.S., 2020. Photonic-chip assisted correlative light and electron microscopy. *Commun. Biol.* 3, 1–7.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01473-4>
- Titze, B., 2013. *Techniques to prevent sample surface charging and reduce beam damage effects for SBEM imaging*. Thèse de doctorat d'université. Université de Heidelberg, Heidelberg, Allemagne, 112 p. Disponible sur :
<http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/15372>
- Titze, B., Denk, W., 2013. Automated in-chamber specimen coating for serial block-face electron microscopy. *J. Microsc.* 250, 101–110.
<https://doi.org/10.1111/jmi.12023>
- Titze, B., Genoud, C., 2016. Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure. *Biol. Cell* 108, 307–323.
<https://doi.org/10.1111/boc.201600024>
- Treuel, L., Malissek, M., Grass, S., Diendorf, J., Mahl, D., Meyer-Zaika, W., Epple, M., 2012. Quantifying the influence of polymer coatings on the serum albumin corona formation around silver and gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1102.
<https://doi.org/10.1007/s11051-012-1102-3>
- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., Goessler, W., 2006. Silver-Coated Dressing Acticoat Caused Raised Liver Enzymes and Argyria-like Symptoms in Burn Patient. *J. Trauma Acute Care Surg.* 60, 648–652.
<https://doi.org/10.1097/01.ta.0000208126.22089.b6>

- Tsai, W.-T., Hassan, A., Sarkar, P., Correa, J., Metlagel, Z., Jorgens, D.M., Auer, M., 2014. From Voxels to Knowledge: A Practical Guide to the Segmentation of Complex Electron Microscopy 3D-Data. *J. Vis. Exp.* 90, e51673
<https://doi.org/10.3791/51673>
- Tschumperle, D., Deriche, R., 2005. Vector-valued image regularization with PDEs: a common framework for different applications. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 27, 506–517.
<https://doi.org/10.1109/TPAMI.2005.87>
- Tu, Z., Bai, X., 2010. Auto-Context and Its Application to High-Level Vision Tasks and 3D Brain Image Segmentation. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 32, 1744–1757.
<https://doi.org/10.1109/TPAMI.2009.186>
- Tzanakakis, E.S., Hansen, L.K., Hu, W.S., 2001. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil. Cytoskeleton* 48, 175–189.
[https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200103\)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200103)48:3<175::AID-CM1007>3.0.CO;2-2)
- van der Zande, M., Vandebriel, R.J., Van Doren, E., Kramer, E., Herrera Rivera, Z., Serrano-Rojero, C.S., Gremmer, E.R., Mast, J., Peters, R.J.B., Hollman, P.C.H., Hendriksen, P.J.M., Marvin, H.J.P., Peijnenburg, A.A.C.M., Bouwmeester, H., 2012. Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *ACS Nano* 6, 7427–7442.
<https://doi.org/10.1021/nn302649p>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780.
<https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vergara, H.M., Pape, C., Meechan, K.I., Zinchenko, V., Genoud, C., Wanner, A.A., Mutemi, K.N., Titze, B., Templin, R.M., Bertucci, P.Y., Simakov, O., Dürichen, W., Machado, P., Savage, E.L., Schermelleh, L., Schwab, Y., Friedrich, R.W., Kreshuk, A., Tischer, C., Arendt, D., 2021. Whole-body integration of gene expression and single-cell morphology. *Cell* 184, 4819–4837.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.017>
- Veronesi, Giulia, Gallon, T., Deniaud, A., Boff, B., Gateau, C., Lebrun, C., Vidaud, C., Rollin-Genetet, F., Carrière, M., Kieffer, I., Mintz, E., Delangle, P., Michaud-Soret, I., 2015a. XAS Investigation of Silver(I) Coordination in Copper(I) Biological Binding Sites. *Inorg. Chem.* 54, 11688–11696.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01658>
- Veronesi, G., Aude-Garcia, C., Kieffer, I., Gallon, T., Delangle, P., Herlin-Boime, N., Rabilloud, T., Carrière, M., 2015b. Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in Ag₂S sites in primary murine macrophages. *Nanoscale* 7, 7323–7330.
<https://doi.org/10.1039/C5NR00353A>
- Veronesi, G., Deniaud, A., Gallon, T., Jouneau, P.-H., Villanova, J., Delangle, P., Carrière, M., Kieffer, I., Charbonnier, P., Mintz, E., Michaud-Soret, I., 2016. Visualization, quantification and coordination of Ag⁺ ions released from silver nanoparticles in hepatocytes. *Nanoscale* 8, 17012–17021.
<https://doi.org/10.1039/C6NR04381J>
- Viau, C., Tardif, R., 2003. Toxicologie. In: Guérin, M., Gosselin, P., Cordier, S., Viau, C., Quénel, P., Dewailly, É., Environnement et santé publique – Fondements et pratique. Édisem/Tec & Doc, Acton Vale/Paris, Canda/France, pp. 119-143. Disponible sur :
https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/12280/Chapitre_5.pdf?sequence=8&isAllowed=y

- Vincent, A.E., Ng, Y.S., White, K., Davey, T., Mannella, C., Falkous, G., Feeney, C., Schaefer, A.M., McFarland, R., Gorman, G.S., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Picard, M., 2016. The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Sci. Rep.* 6, 30610. <https://doi.org/10.1038/srep30610>
- Vlachou, E., Chipp, E., Shale, E., Wilson, Y.T., Papini, R., Moiemmen, N.S., 2007. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption. *Burns* 33, 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.07.014>
- von Schack, M.L., Fakan, S., 1994. Retention of glycogen in cryosubstituted mouse liver. *Histochemistry* 102, 451–455. <https://doi.org/10.1007/BF00269577>
- Vreuls, C., Wisse, E., Duimel, H., Stevens, K., Verheyen, F., Braet, F., Driessen, A., Koek, G., 2014. Jet-fixation: A novel method to improve microscopy of human liver needle biopsies. *Hepatology* 59, 737–739. <https://doi.org/10.1002/hep.26532>
- Vye, M.V., Fischman, D.A., 1970. The morphological alteration of particulate glycogen by en bloc staining with uranyl acetate. *J. Ultrastruct. Res.* 33, 278–291. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(70\)90022-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(70)90022-5)
- Wacker, I., Schroeder, R. R., 2013. Array tomography. *J. Microsc.* 252, 93–99. <https://doi.org/10.1111/jmi.12087>
- Wacker, I., Spomer, W., Hofmann, A., Thaler, M., Hillmer, S., Gengenbach, U., Schröder, R.R., 2016. Hierarchical imaging: a new concept for targeted imaging of large volumes from cells to tissues. *BMC Cell Biol.* 17, 38. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0122-8>
- Walczyk, D., Bombelli, F.B., Monopoli, M.P., Lynch, I., Dawson, K.A., 2010. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5761–5768. <https://doi.org/10.1021/ja910675v>
- Walton, J., 1979. Lead aspartate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1337–1342. <https://doi.org/10.1177/27.10.512319>
- Wang, H., Wu, L., Reinhard, B.M., 2012. Scavenger Receptor Mediated Endocytosis of Silver Nanoparticles into J774A.1 Macrophages Is Heterogeneous. *ACS Nano* 6, 7122–7132. <https://doi.org/10.1021/nn302186n>
- Wang, L., Zhang, T., Li, P., Huang, W., Tang, J., Wang, P., Liu, J., Yuan, Q., Bai, R., Li, B., Zhang, K., Zhao, Y., Chen, C., 2015. Use of Synchrotron Radiation-Analytical Techniques To Reveal Chemical Origin of Silver-Nanoparticle Cytotoxicity. *ACS Nano* 9, 6532–6547. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02483>
- Wang, S., Lv, J., Ma, J., Zhang, S., 2016. Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotoxicology* 10, 1129–1135. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1179809>
- Wang, Z., Luo, X., Anene-Nzulu, C., Yu, Y., Hong, X., Singh, N.H., Xia, L., Liu, S., Yu, H., 2015. HepaRG culture in tethered spheroids as an in vitro three-dimensional model for drug safety screening. *J. Appl. Toxicol.* 35, 909–917. <https://doi.org/10.1002/jat.3090>

- Wanner, A.A., Kirschmann, M.A., Genoud, C., 2015. Challenges of microtome-based serial block-face scanning electron microscopy in neuroscience. *J. Microsc.* 259, 137–142.
<https://doi.org/10.1111/jmi.12244>
- Warren, A., Le Couteur, D.G., Fraser, R., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., Bertolino, P., 2006. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182–1190.
<https://doi.org/10.1002/hep.21378>
- Wei, D., Jacobs, S., Modla, S., Zhang, S., Young, C.L., Cirino, R., Caplan, J., Czymmek, K., 2012. High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using focused-ion beam scanning electron microscopy. *BioTechniques* 53, 41–48.
<https://doi.org/10.2144/000113850>
- White, D.L., Andrews, S.B., Faller, J.W., Barnett, R.J., 1976. The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by X-ray photoelectron spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 436, 577–592.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90442-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90442-9)
- White, D.L., Mazurkiewicz, J.E., Barnett, R.J., 1979. A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferrocyanide mixtures. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1084–1091.
<https://doi.org/10.1177/27.7.89155>
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., Brenner, S., 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 314, 1–340.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Wigglesworth, V.B., 1957. The use of osmium in the fixation and staining of tissues. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 147, 185–199.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0043>
- Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Meent, D.V.D., Dekkers, S., Jong, W.H.D., Zijverden, M. van, Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E., 2009. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3, 109–138.
<https://doi.org/10.1080/17435390902725914>
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A., 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1035–1042.
<https://doi.org/10.1124/dmd.31.8.1035>
- Wilkinson, A.L., Qurashi, M., Shetty, S., 2020. The Role of Sinusoidal Endothelial Cells in the Axis of Inflammation and Cancer Within the Liver. *Front. Physiol.* 11, 990
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00990>
- Wisse, E., 1970. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125–150.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(70\)90150-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(70)90150-4)
- Wisse, E., Braet, F., Duimel, H., Vreuls, C., Koek, G., Olde Damink, S.W., van den Broek, M.A., De Geest, B., Dejong, C.H., Tateno, C., Frederik, P., 2010. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *World J. Gastroenterol.* 16, 2851–2866.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i23.2851>

- Wisse, E., Braet, F., Shami, G.J., Zapotoczny, B., Vreuls, C., Verhaegh, P., Frederik, P., Peters, P.J., Olde Damink, S., Koek, G., 2022. Fat causes necrosis and inflammation in parenchymal cells in human steatotic liver. *Histochem. Cell Biol.* 157, 27–38. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02030-8>
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., McCuskey, R.S., 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5, 683–692. <https://doi.org/10.1002/hep.1840050427>
- Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P., De Geest, B., 2008. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* 15, 1193–1199. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.60>
- Wisse, E., Zanger, R., Jacobs, R., Mccuskey, R., 1983. Scanning electron microscope observations on the structure of portal veins, sinusoids and central veins in rat liver. *Scan. Electron Microsc.* 3, 1441–52.
- Wrzesinski, K., Fey, S.J., 2013. After trypsinisation, 3D spheroids of C3A hepatocytes need 18 days to re-establish similar levels of key physiological functions to those seen in the liver. *Toxicol. Res.* 2, 123–135. <https://doi.org/10.1039/C2TX20060K>
- Wu, Y., Whiteus, C., Xu, C.S., Hayworth, K.J., Weinberg, R.J., Hess, H.F., De Camilli, P., 2017. Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 114, E4859–E4867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701078114>
- Xie, Y., Yao, J., Jin, W., Ren, L., Li, X., 2021. Induction and Maturation of Hepatocyte-Like Cells In Vitro: Focus on Technological Advances and Challenges. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 765980 <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.765980>
- Yoo, K.-S., Lim, W.T., Choi, H.S., 2016. Biology of Cholangiocytes: From Bench to Bedside. *Gut Liver* 10, 687–698. <https://doi.org/10.5009/gnl16033>
- Yun, C., Kim, S.H., Jung, Y.-S., 2023. Current Research Trends in the Application of In Vitro Three-Dimensional Models of Liver Cells. *Pharmaceutics* 15, 54. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010054>
- Zapotoczny, B., Braet, F., Wisse, E., Lekka, M., Szymonski, M., 2020. Biophysical nanocharacterization of liver sinusoidal endothelial cells through atomic force microscopy. *Biophys. Rev.* 12, 625–636. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00699-0>
- Zapotoczny, B., Szafranska, K., Kus, E., Braet, F., Wisse, E., Chlopicki, S., Szymonski, M., 2019. Tracking Fenestrae Dynamics in Live Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Hepatology* 69, 876–888. <https://doi.org/10.1002/hep.30232>
- Zapotoczny, B., Szafranska, K., Owczarczyk, K., Kus, E., Chlopicki, S., Szymonski, M., 2017. Atomic Force Microscopy Reveals the Dynamic Morphology of Fenestrations in Live Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Sci. Rep.* 7, 7994. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08555-0>
- Zhu, X., Zhang, B., He, Y., Bao, J., 2021. Liver Organoids: Formation Strategies and Biomedical Applications. *Tissue Eng. Regen. Med.* 18, 573–585. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00357-w>

Résumé

Le développement des techniques de microscopie électronique volumique a révolutionné l'imagerie cellulaire et tissulaire. En particulier, la technique FIB-SEM (pour *focused ion beam-scanning electron microscopy*) permet d'élucider l'ultrastructure tridimensionnelle de structures biologiques à une échelle nanométrique. Dans le cadre de ma thèse, deux études indépendantes ont été réalisées en utilisant l'approche FIB-SEM. Dans une première étude, j'ai travaillé sur les nanoparticules d'argent (NP-Ag) qui sont utilisées, pour leur activité biocide, dans des produits du quotidien (emballages alimentaires, vêtements anti-odeur...) ainsi que dans des dispositifs médicaux (pansements, cathéters...). Les ions Ag(I) relargués de ces NP sont responsables de l'effet biocide, mais sont également toxiques pour les cellules mammifères. Afin de mimer le devenir des NP-Ag dans l'organisme avec un focus sur leurs transformations et l'excrétion d'espèces d'argent du foie, nous avons utilisé un modèle 3D de sphéroïde d'hépatocytes qui mime le foie et qui permet d'étudier l'excrétion biliaire. Ces sphéroïdes ont été exposés à un sel d'Ag et à deux types de NP-Ag pour mimer, respectivement, le cas d'exposition orale et parentérale qui sont les deux principales voies d'exposition humaine à ces NP. La combinaison de la technique FIB-SEM avec d'autres techniques d'imagerie élémentaire, d'analyse chimique et de spéciation nous a permis d'étudier les transformations des différentes espèces d'Ag, de visualiser leurs distributions à une échelle subcellulaire, de mettre en évidence le stockage de l'excès d'argent dans des vacuoles et l'excrétion biliaire d'ions Ag(I) et d'analyser l'impact des espèces d'argent sur l'ultrastructure des hépatocytes, en particulier sur le réseau mitochondrial. Ces résultats soulignent la pertinence de notre modèle hépatique pour étudier les transformations de nanomatériaux dans le foie au-delà des NP-Ag. Dans une deuxième étude, j'ai travaillé sur les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC) qui tapissent la paroi des capillaires hépatiques ou sinusoides. Les LSEC sont des cellules endothéliales hautement spécialisées qui présentent des fenêtres permettant des échanges bidirectionnels entre le sang sinusoidal et les hépatocytes. Les études décrivant la structure des LSEC sont majoritairement des études en 2D qui ne permettent d'étudier que partiellement l'architecture *in vivo* de ces cellules et l'organisation spatiale de leurs fenêtres. La technique FIB-SEM a été utilisée pour imager des échantillons de foie de souris en se focalisant sur la porosité des sinusoides. Un protocole de préparation des échantillons de foie qui préserve bien l'ultrastructure des sinusoides a été mis au point. Ensuite, j'ai développé une méthode de segmentation qui a permis de reconstruire en 3D et à haute résolution les LSEC. L'étude de l'architecture 3D des LSEC et la détermination des diamètres de leurs fenêtres ouvrent de nouvelles perspectives pour approfondir la compréhension de la corrélation entre la fonction et la structure de ces cellules dans des conditions physiologiques et pathologiques. Notre approche pourrait également aider à modéliser le transport des différentes substances ou médicaments entre le sang et les hépatocytes et pourrait être utilisée pour vérifier la porosité des sinusoides de patients dans le cadre d'applications en médecine personnalisée.

Mots clés : microscopie électronique volumique, FIB-SEM, foie, culture cellulaire 3D, nanoparticules d'argent, LSEC, fenêtres.

Abstract

The development of volume electron microscopy techniques has revolutionized cell and tissue imaging. In particular, FIB-SEM (focused ion beam-scanning electron microscopy) imaging allows to elucidate the three-dimensional ultrastructure of biological structures at a nanometric scale. In the framework of my PhD project, two independent studies were performed using the FIB-SEM approach. In a first study, I worked on silver nanoparticles (AgNP) which are used, for their biocidal activity, in everyday products (food packaging, anti-odor clothes...) as well as in medical devices (wound dressings, catheters...). These NP release Ag(I) ions that are responsible for the biocidal effect but are also toxic for mammalian cells. In order to mimic the fate of AgNP in the organism with a focus on their transformations and the excretion of silver species from the liver, we used a 3D model of hepatocyte spheroid which mimics the liver and allows to study biliary excretion. These spheroids were exposed to a silver salt and to two types of AgNP to mimic, respectively, oral and parenteral exposure which are the two main routes of human exposure to these NP. The combination of FIB-SEM technique with other elemental imaging, chemical analysis and speciation techniques allowed us to study the transformations of the different silver species, to visualize their distributions at a subcellular scale, to highlight the storage of silver excess into vacuoles and the biliary excretion of Ag(I) ions and to analyze the impact of silver species on the ultrastructure of hepatocytes, in particular on the mitochondrial network. These results highlight the relevance of our hepatic model to study the transformations of nanomaterials in the liver beyond AgNP. In a second study, I worked on liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) that line the wall of hepatic capillaries or sinusoids. LSEC are highly specialized endothelial cells that have fenestrations or fenestrae allowing for bidirectional exchange between sinusoidal blood and hepatocytes. Studies describing the structure of LSEC are mostly 2D studies that do not allow to fully elucidate the *in vivo* architecture of these cells and the spatial organization of their fenestrations. The FIB-SEM technique was used to image mouse liver samples focusing on the porosity of sinusoids. A preparation protocol of liver samples that properly preserves the ultrastructure of sinusoids was established. Then, I developed a segmentation method that allowed 3D reconstruction of LSEC at high resolution. The study of the 3D architecture of LSEC and the determination of their fenestrae diameters open new perspectives to further understand the correlation between the function and the structure of these cells under physiological and pathological conditions. Our approach could also help to model the transport of different substances or drugs between blood and hepatocytes and could be used to study the sinusoidal porosity of patients for personalized medicine applications.

Keywords: volume electron microscopy, FIB-SEM, liver, 3D cell culture, silver nanoparticles, LSEC, fenestrations.