

Biologie spatiale des tumeurs neuroendocrines : Prolonger le regard du pathologiste au-delà de la morphologie



Dr Antonin FATTORI

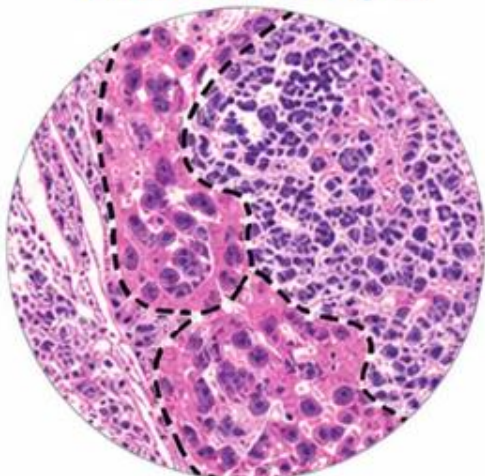


Département de Pathologie de Strasbourg

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

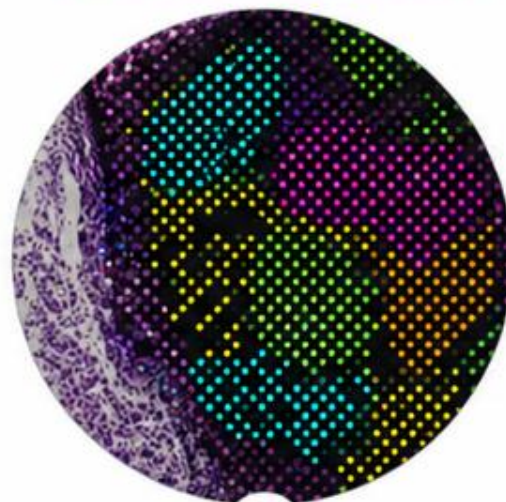


ANATOMIE PATHOLOGIQUE



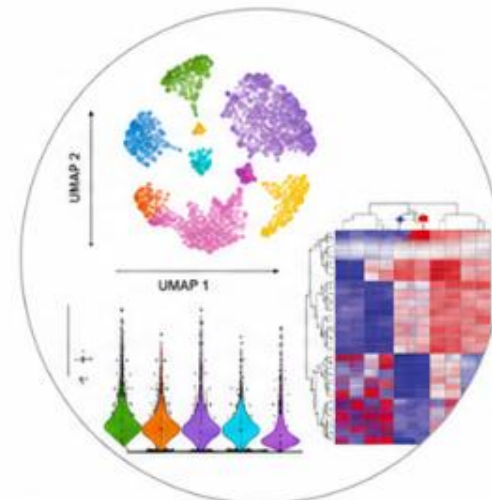
- Morphologie & classification
- Biomarqueurs diagnostiques

BIOLOGIE SPATIALE



- Intégration morphologie + moléculaire
- Résolution cellulaire
- Organisation spatiale

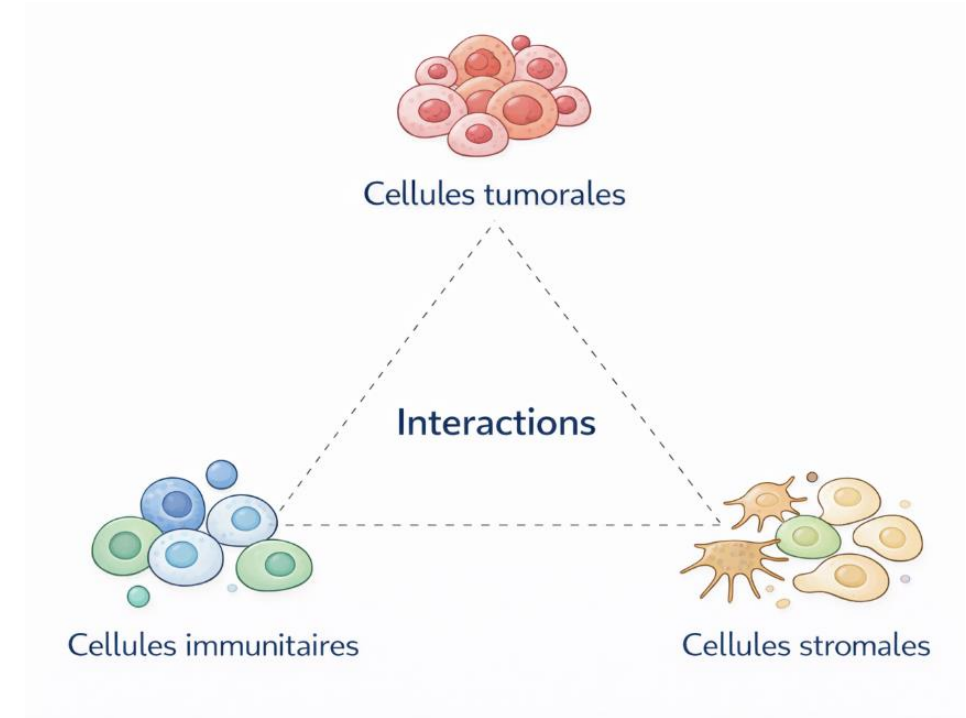
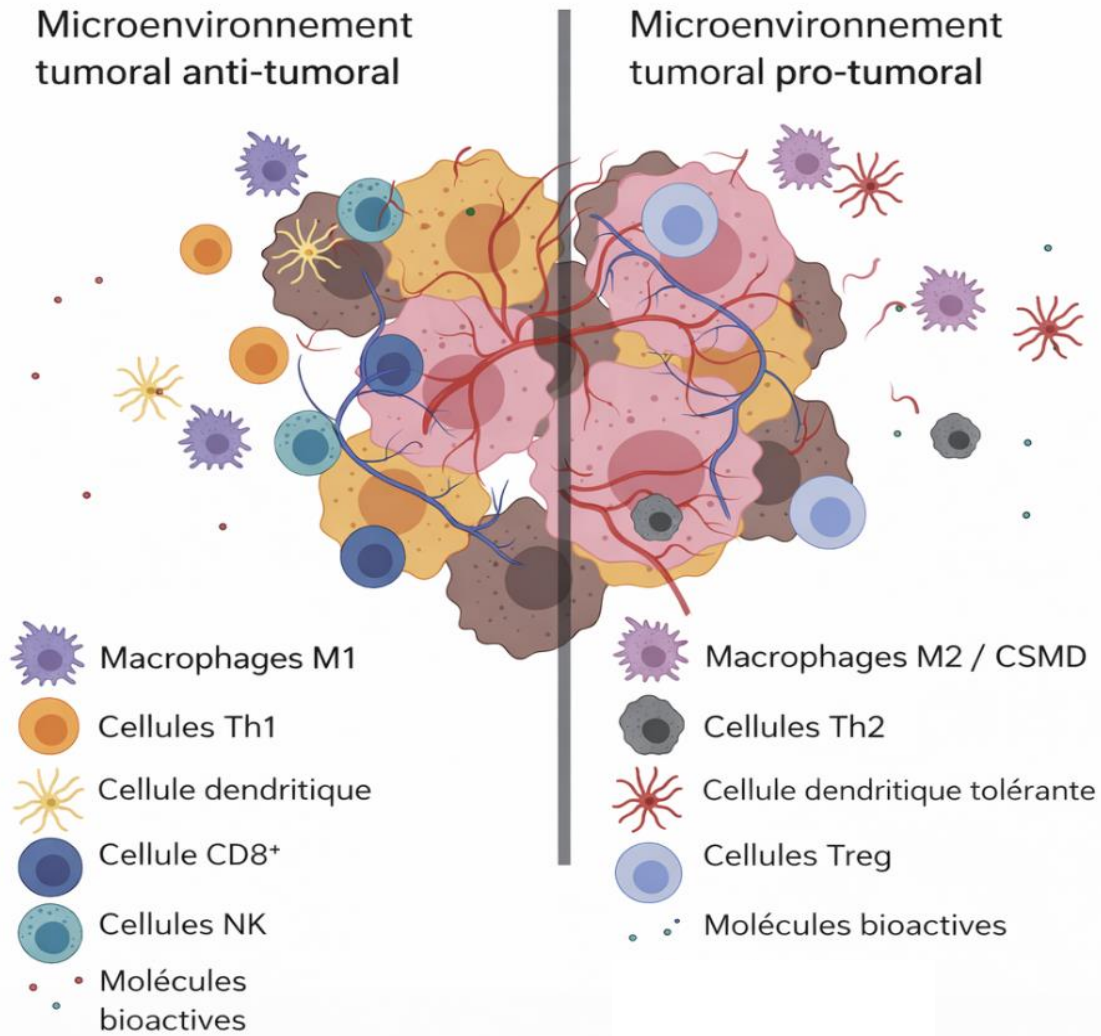
RECHERCHE



- Mécanismes biologiques
- Signatures moléculaires
- Nouvelles cibles thérapeutiques

Une tumeur : bien plus qu'un amas de cellules tumorales

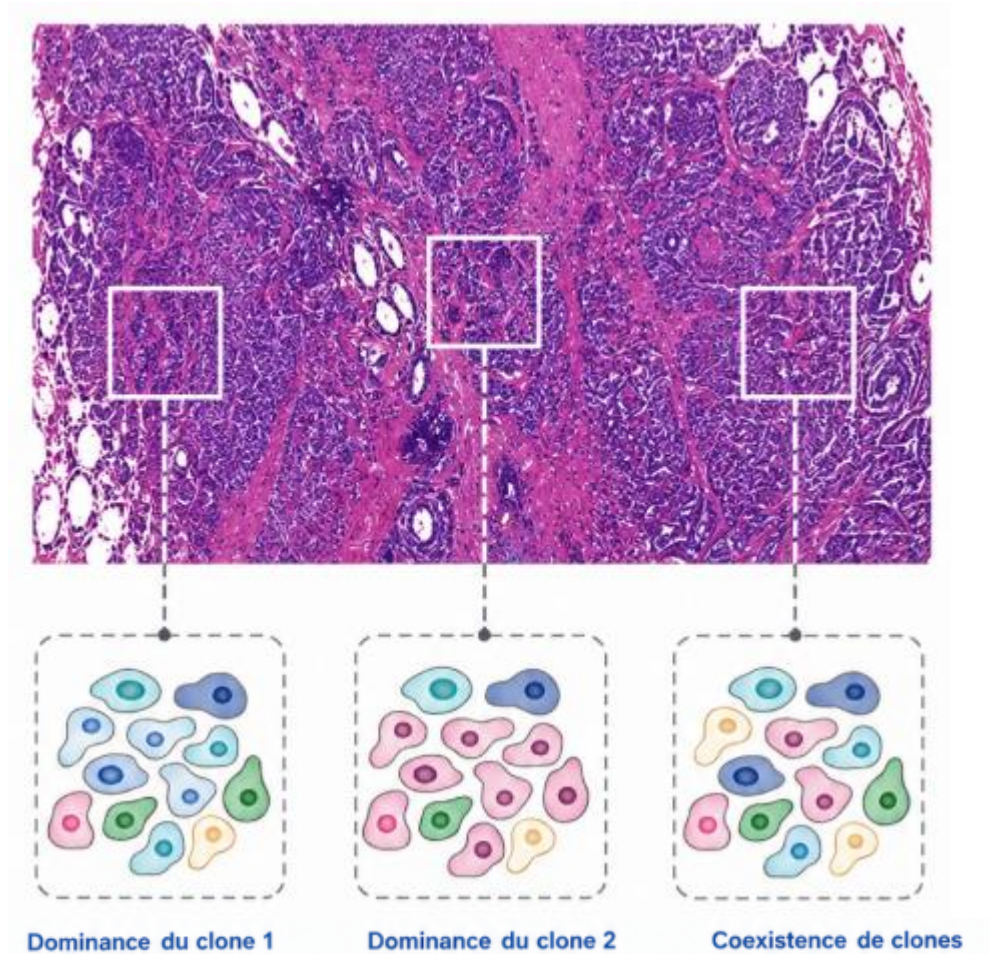
Un écosystème dynamique



Une tumeur : bien plus qu'un amas de cellules tumorales

Un écosystème dynamique et spatialement hétérogène

Hétérogénéité intra-tumorale



Centre de la tumeur

- Peu de vaisseaux (hypoxie)
- Cellules tumorales compactes
- Peu de stroma
- Peu d'infiltrat immun

Front d'invasion

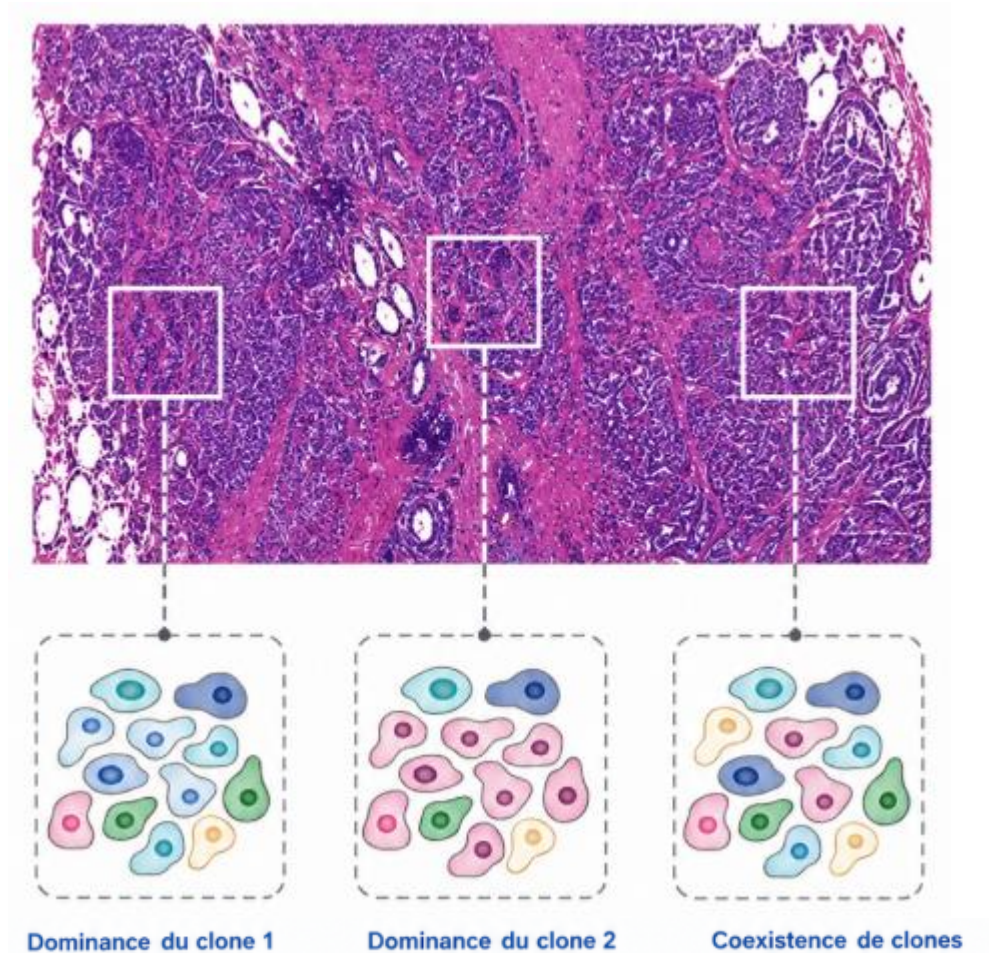
- Angiogenèse
- Cellules tumorales dispersées
- Contact avec stroma
- Infiltration immune
- Migration / invasion

Mosaïque de niches biologiques

Une tumeur : bien plus qu'un amas de cellules tumorales

Un écosystème dynamique et spatialement hétérogène

Hétérogénéité intra-tumorale



Centre de la tumeur

- Peu de vaisseaux (hypoxie)
- Cellules tumorales compactes
- Peu de stroma
- Peu d'infiltrat immun

Front d'invasion

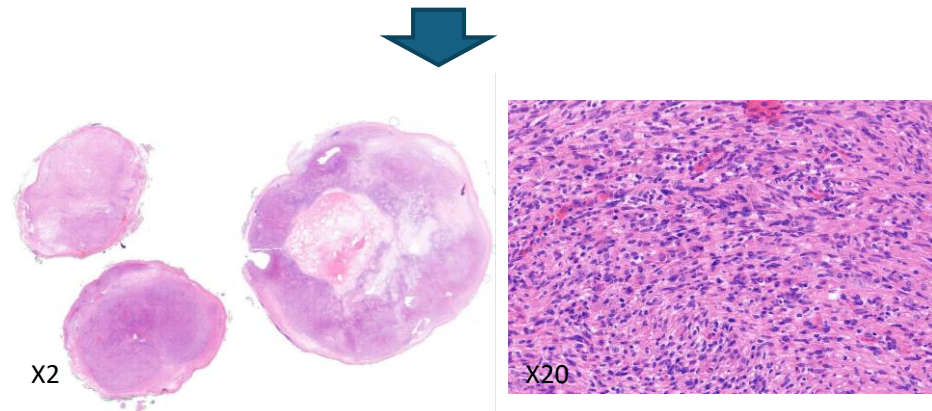
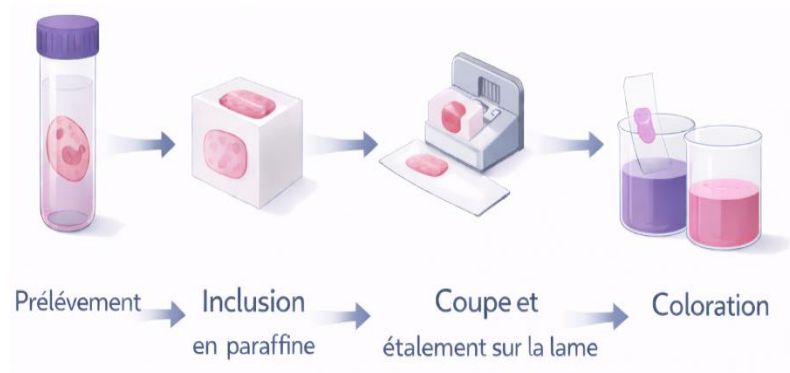
- Angiogenèse
- Cellules tumorales dispersées
- Contact avec stroma
- Infiltration immune
- Migration / invasion

+ hétérogénéité inter-patient

Mosaïque de niches biologiques

Les outils actuels en pathologie tumorale

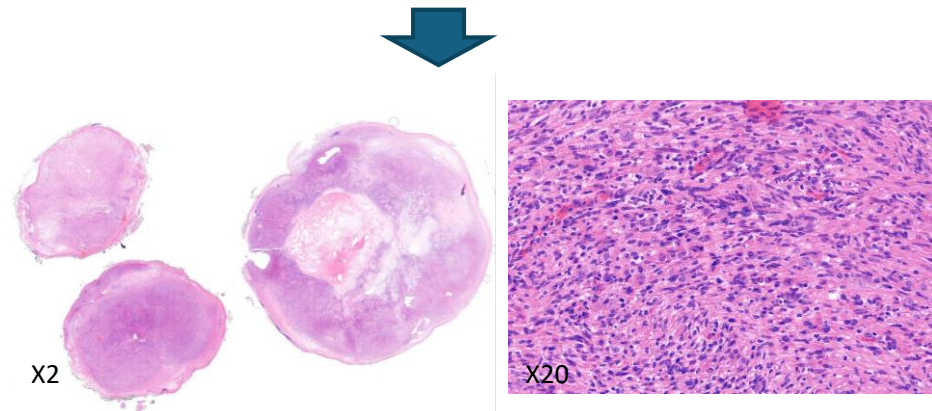
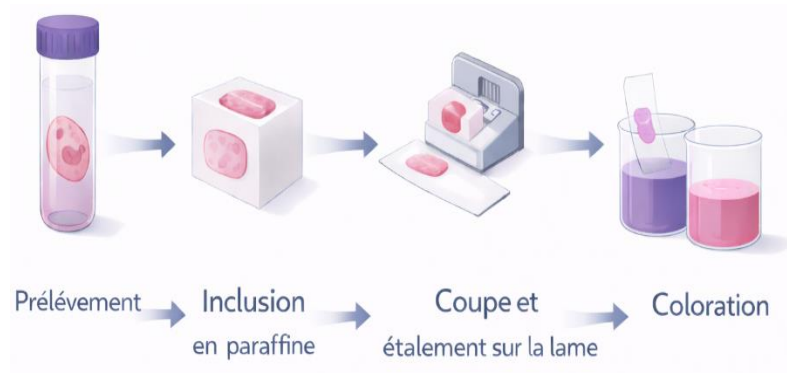
L'étude morphologique



Information restreinte à l'analyse morphologique de la tumeur dans l'espace

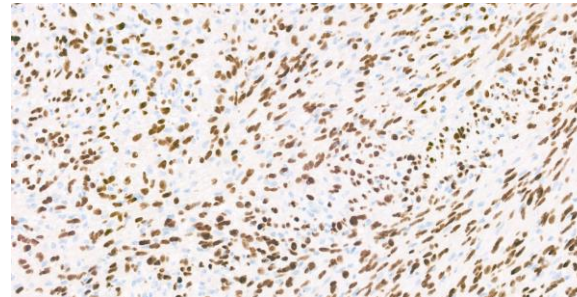
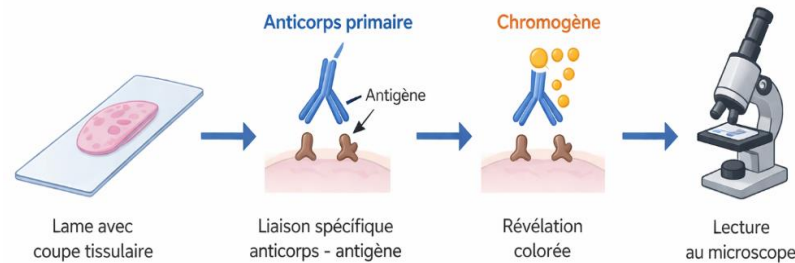
Les outils actuels en pathologie tumorale

L'étude morphologique



Information restreinte à l'analyse morphologique de la tumeur dans l'espace

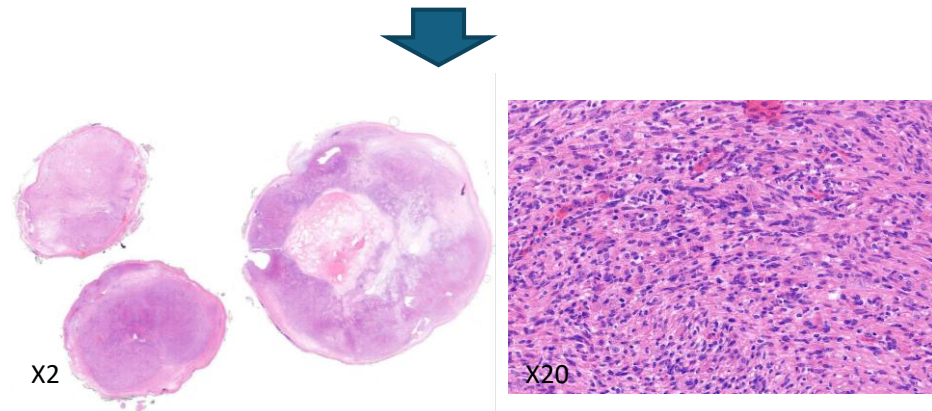
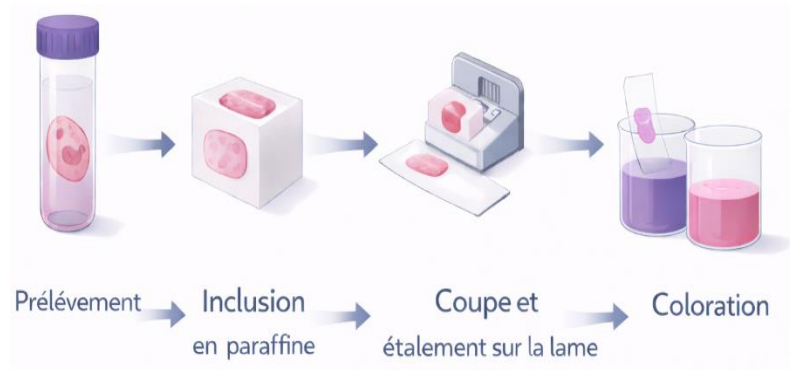
L'immunohistochimie



Information restreinte à l'étude de l'expression d'une protéine dans l'espace

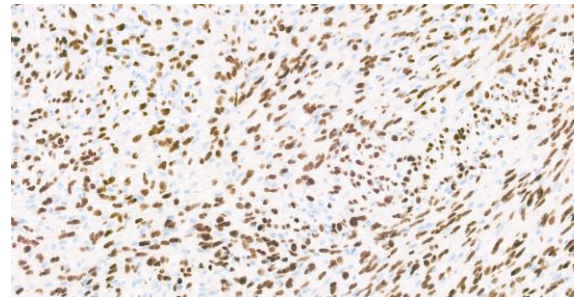
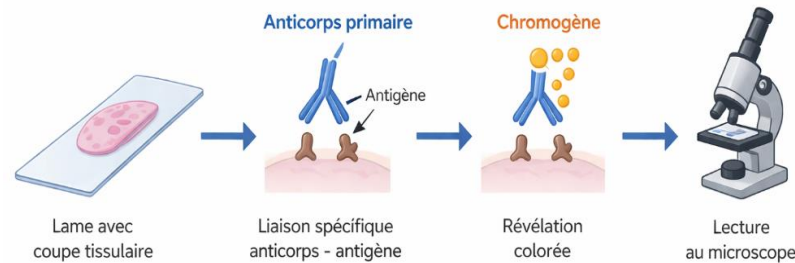
Les outils actuels en pathologie tumorale

L'étude morphologique



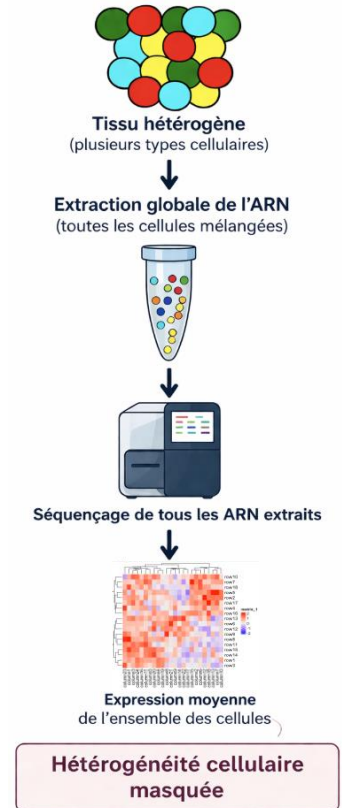
Information restreinte à l'analyse morphologique de la tumeur dans l'espace

L'immunohistochimie



Information restreinte à l'étude de l'expression d'une protéine dans l'espace

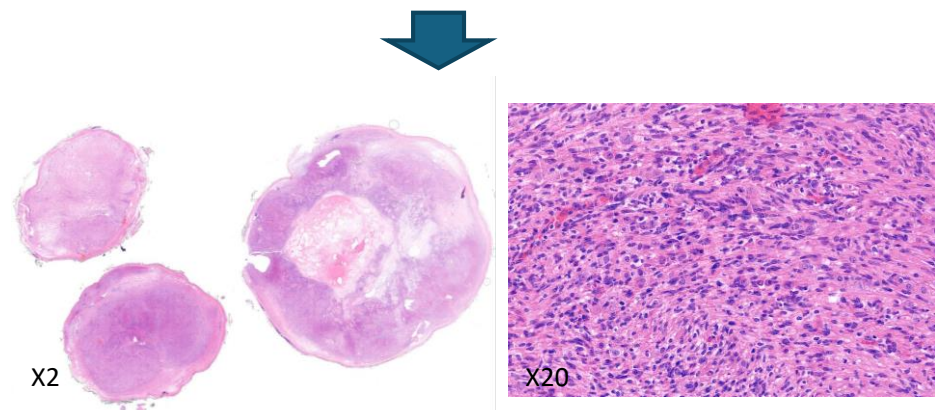
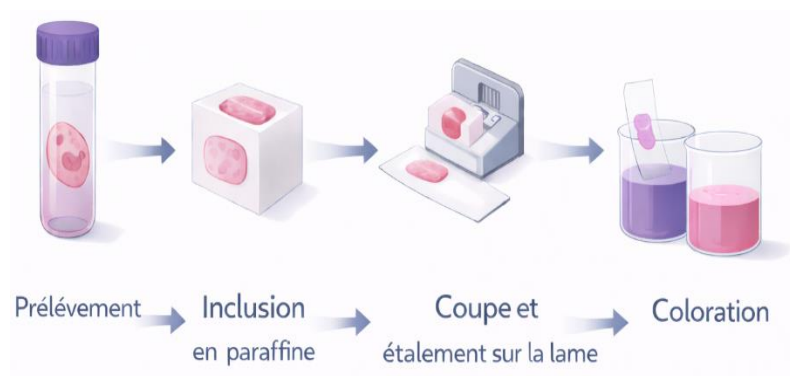
La biologie moléculaire



Information moléculaire profonde, mais perte de l'information spatiale

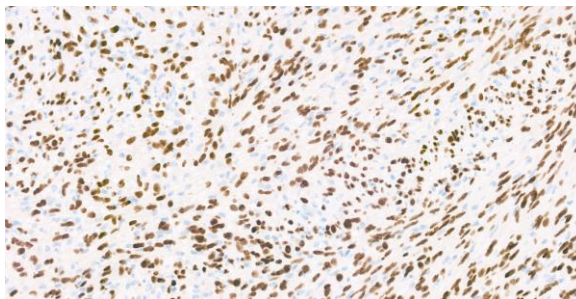
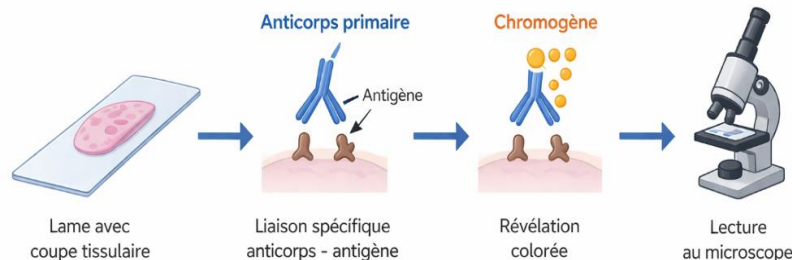
Les outils actuels en pathologie tumorale

L'étude morphologique



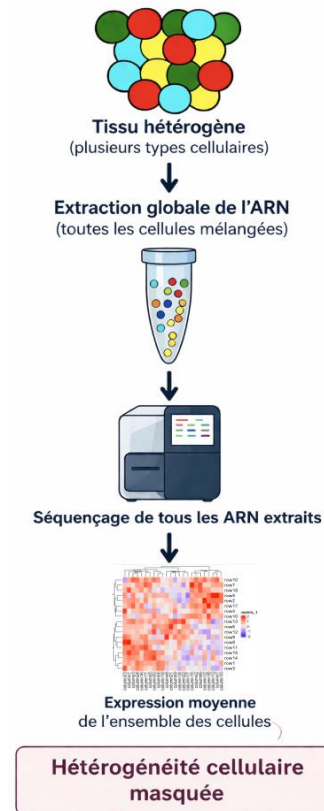
Information restreinte à l'analyse morphologique de la tumeur dans l'espace

L'immunohistochimie



Information restreinte à l'étude de l'expression d'une protéine dans l'espace

La biologie moléculaire



Information moléculaire profonde, mais perte de l'information spatiale

Voir ou comprendre... faut-il choisir ?

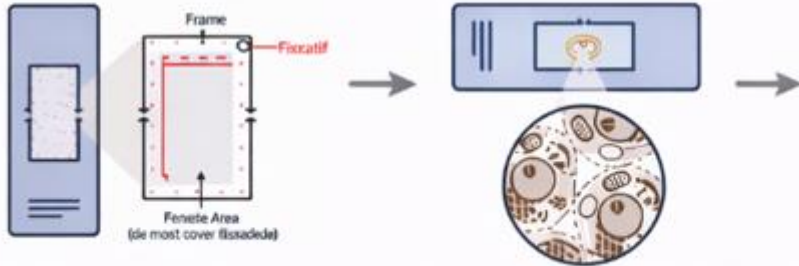
La transcriptomique spatiale : l'exemple de la technologie Xenium (10x Genomics)

La transcriptomique spatiale : l'exemple de la technologie Xenium (10x Genomics)

Préparation de l'échantillon

FF ou FFPE
Coupes tissulaires
sur lames Xenium

Fixation & perméabilisation (FF)
ou
Déparaffinage & démasquage (FFPE)



Coupe d'un bloc de **tissu fixé au formol et inclus en paraffine** (FFPE) ou **d'un tissu frais** (FF) et étalement sur lame Xenium

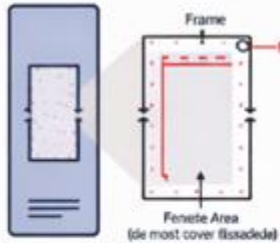
Surface imageable : ~ 2 cm x 1 cm



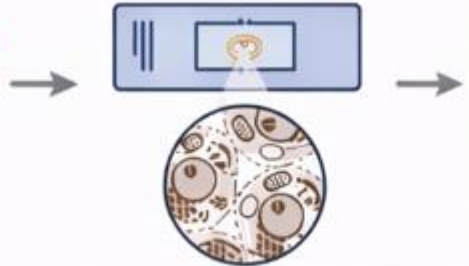
La transcriptomique spatiale : l'exemple de la technologie Xenium (10x Genomics)

Préparation de l'échantillon

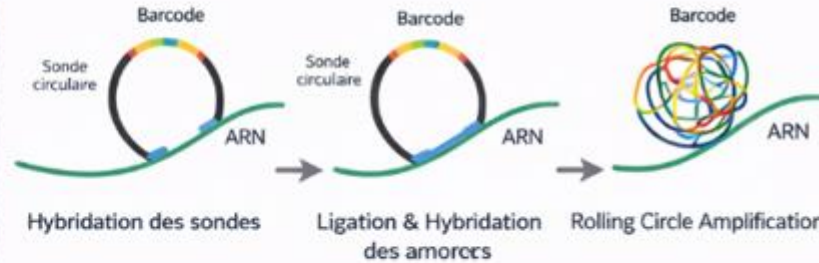
FF ou FFPE
Coupes tissulaires
sur lames Xenium



Fixation & perméabilisation (FF)
ou
Déparaffinage & démasquage (FFPE)



Hybridation des sondes, Ligation & Amplification



Sonde circulaire

Barcode → ATGCCAGTAC
Séquence nucléotidique
unique (barcode)

ARN

Hybridation de **sondes circulaires** aux **ARN** présents dans les tissus

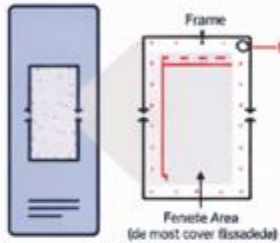
~ **5 000 sondes** différentes, chacune **spécifique d'un gène**

Chaque sonde porte un **barcode unique**

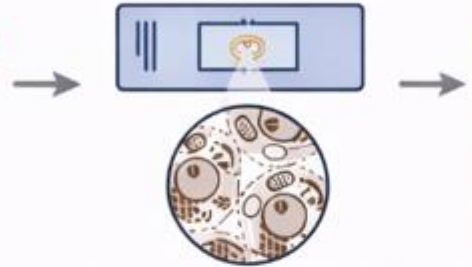
La transcriptomique spatiale : l'exemple de la technologie Xenium (10x Genomics)

Préparation de l'échantillon

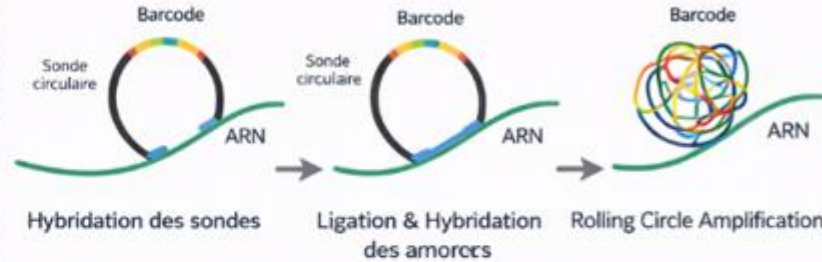
FF ou FFPE
Coupes tissulaires
sur lames Xenium



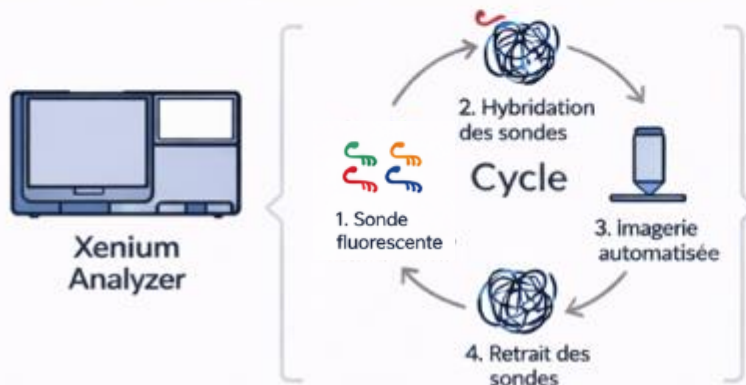
Fixation & perméabilisation (FF)
ou
Déparaffinage & démasquage (FFPE)



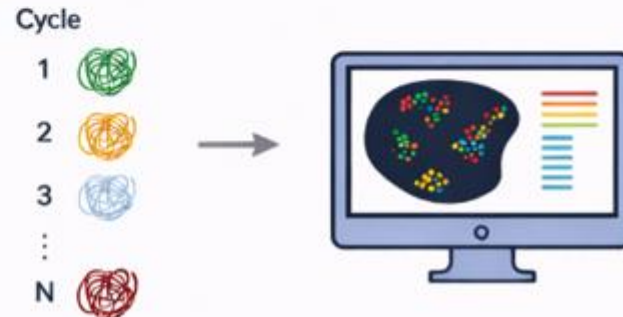
Hybridation des sondes, Ligation & Amplification



Hybridation fluorescente, Imagerie, & Décodage



Visualisation des données

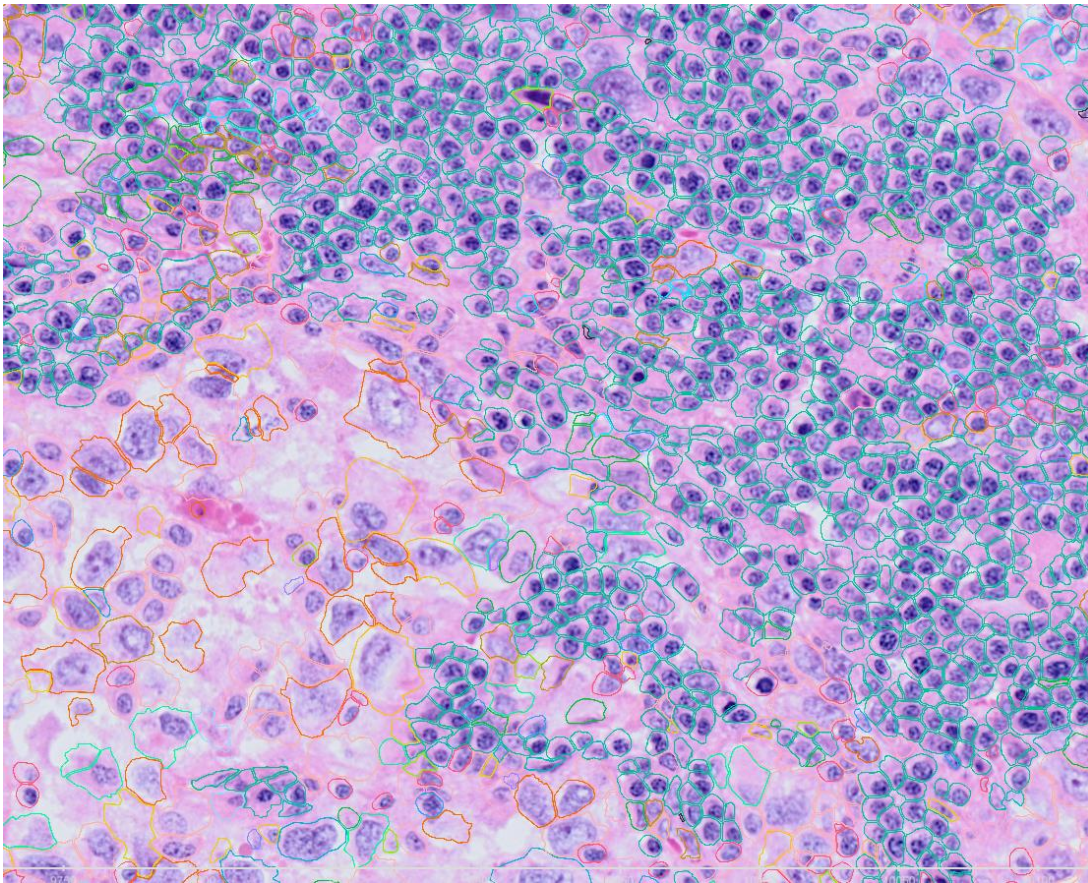


Hybridations successives de **sondes fluorescentes** ciblant les barcodes

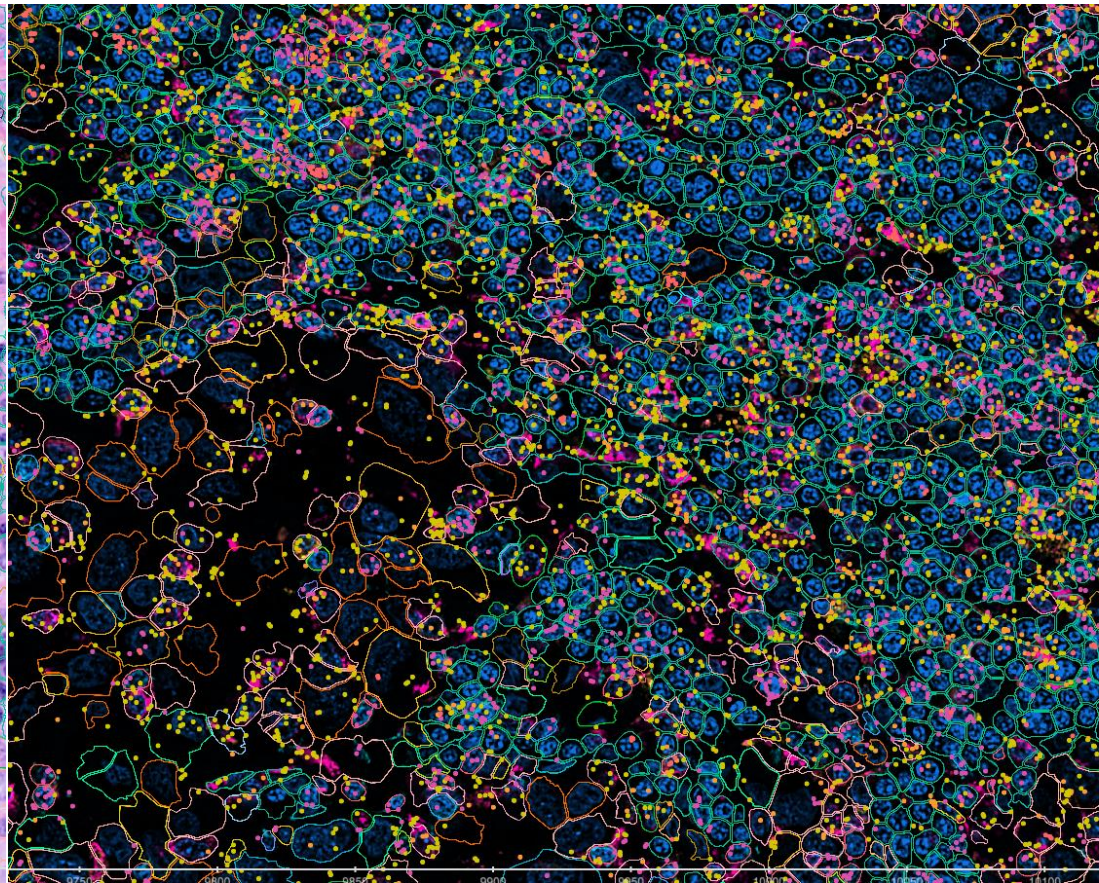
Décodage des signaux

Cartographie et quantification de l'expression de ~5 000 gènes

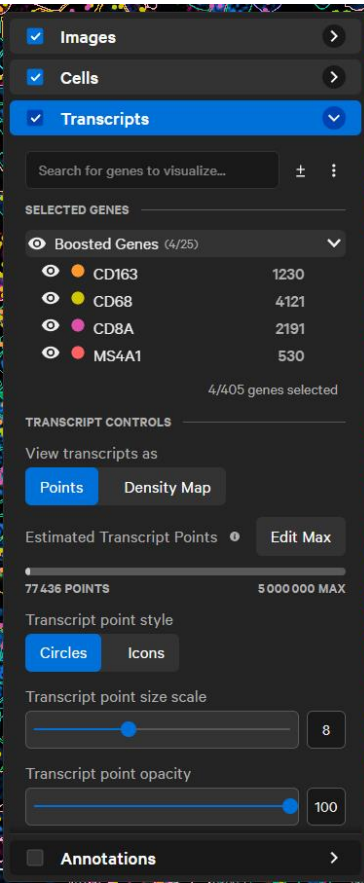
La transcriptomique spatiale : l'exemple de la technologie Xenium (10x Genomics)



Lame colorée à l'HE et superposée sur les données Xenium – cellules cerclées



Projection des données du transcriptome sur la lame à l'HE



La transcriptomique spatiale : l'exemple de la technologie Xenium (10x Genomics)

Cartographie cellulaire des tumeurs et révèle leur organisation spatiale

Coupe tissulaire fine jusqu'à **2 cm de grand axe**

Compatible avec les échantillons FFPE, y compris avec **ARN dégradé**

Un exemple d'application de la technologie Xenium : Les tumeurs neuroendocrines

Généralités

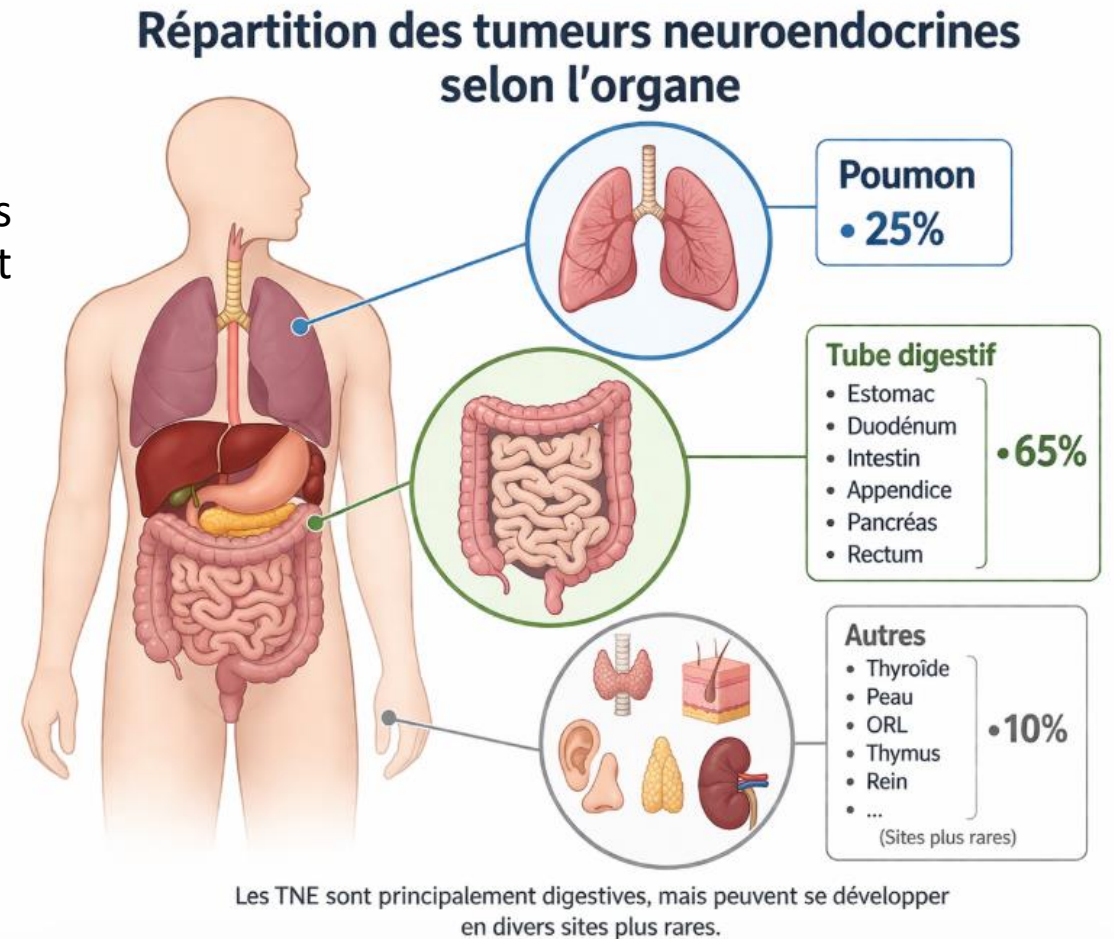
Tumeurs neuroendocrines

Famille hétérogène de tumeurs épithéliales dont les cellules présentent des caractéristiques structurales, phénotypiques et fonctionnelles rappelant celles des cellules neuroendocrines

Cellules neuroendocrines

Phénotype hybride – neuronal et endocrine

Tumeurs de distribution ubiquitaire



Les tumeurs neuroendocrines

Partagent des caractéristiques communes

Cliniques

Syndrome fonctionnel

Histologiques

Morphologie

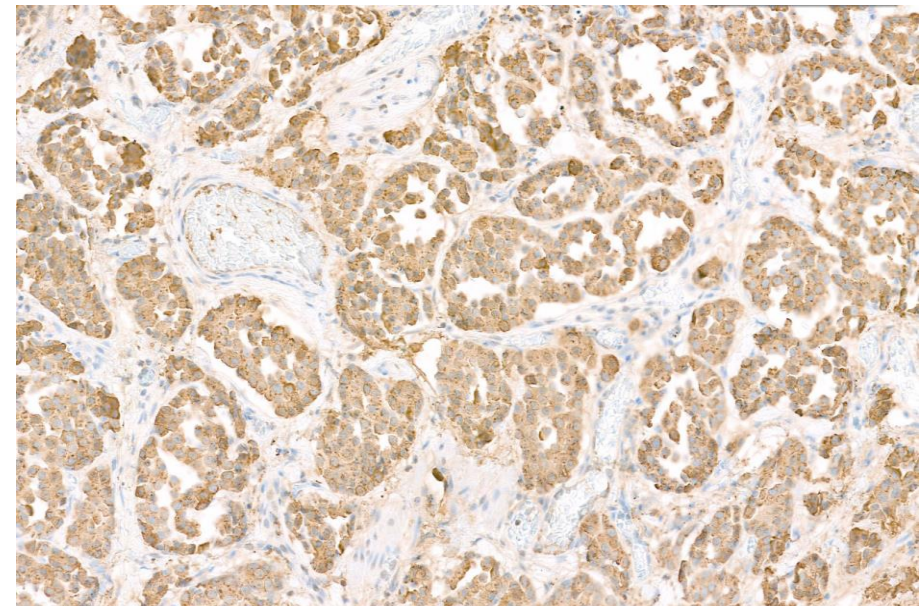
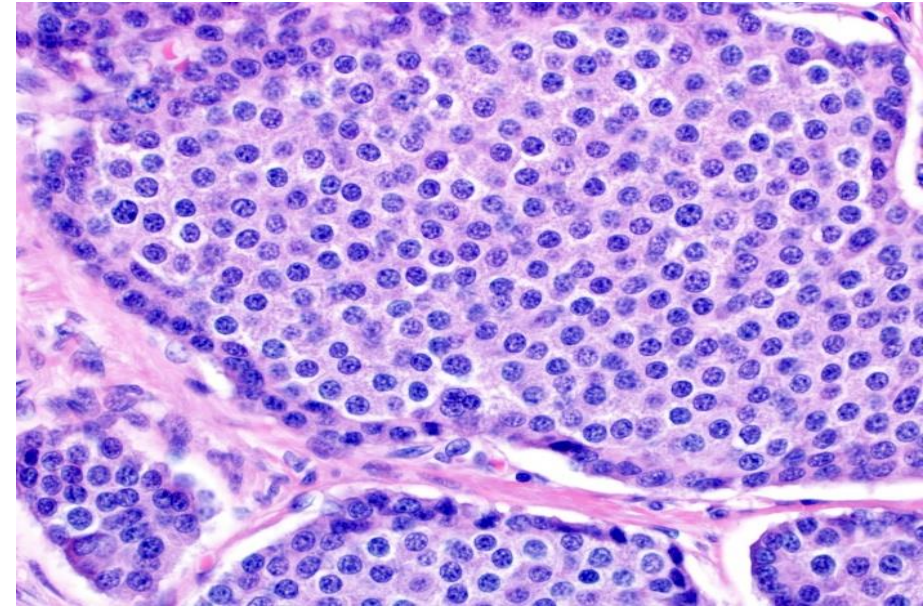
Expression protéique en IHC

Génétique

Faible charge mutationnelle

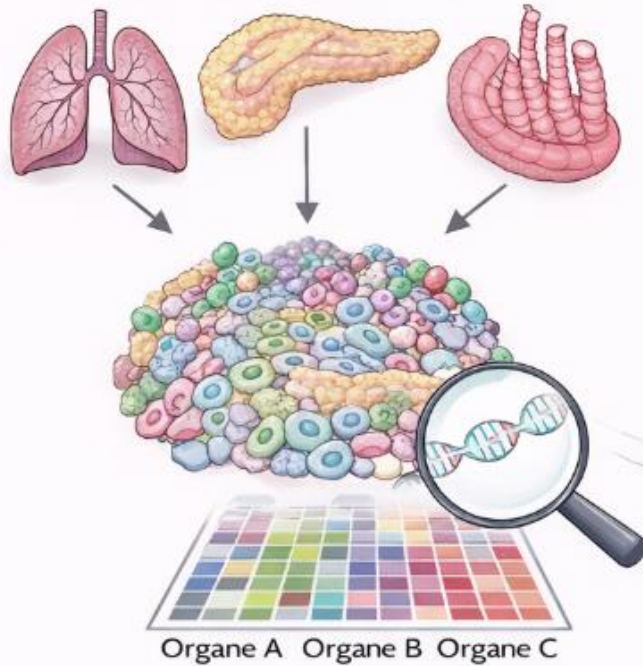
Altérations de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine

Recherche cloisonnée



Objectifs de recherche

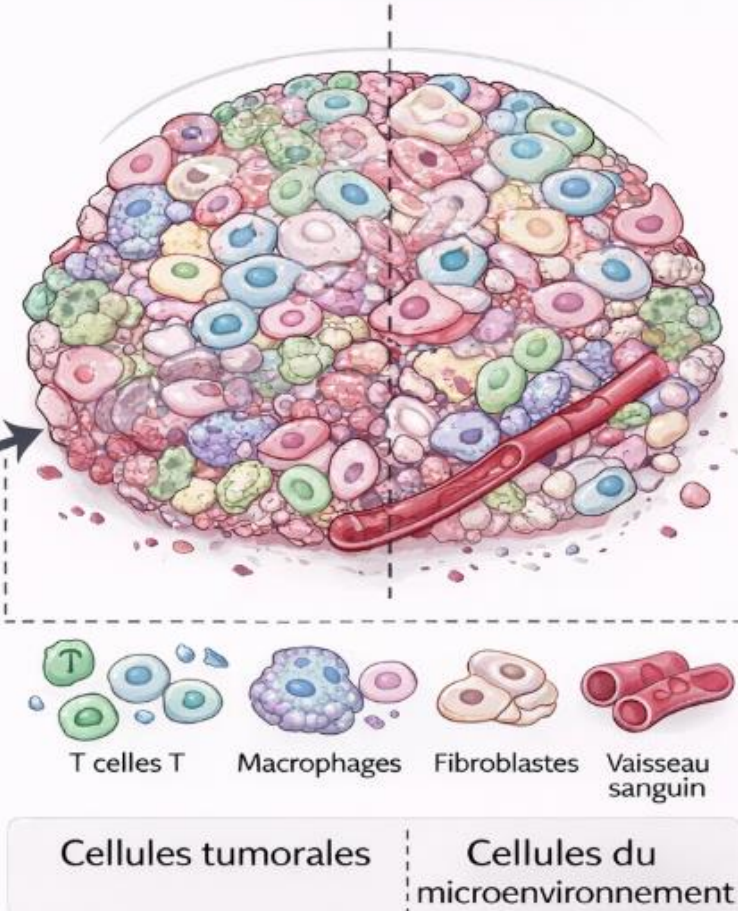
1. Comparaison des profils transcriptomiques par organe



Différences dans le microenvironnement tumoral selon l'organe d'origine

Organe A Organe B Organe C

2. Exploration de l'hétérogénéité intra-tumorale

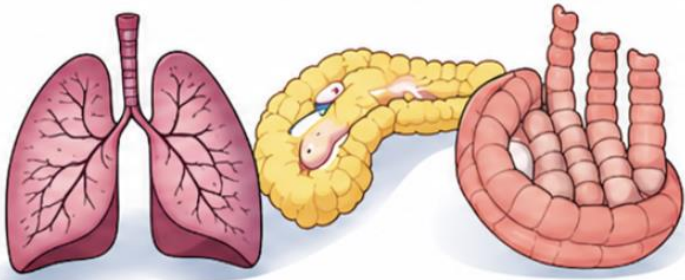


Méthodologie

1 Étape 1

Échantillons de TNE d'origines diverses

(poumon, pancréas, iléon, rectum, estomac, appendice, colon, thyroïde)



2 Étape 2

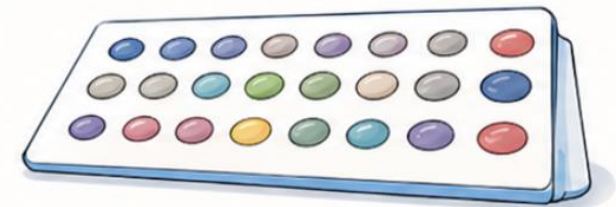
Données cliniques

- Survie, récurrence
- Réévaluation histologique
- Microdissection

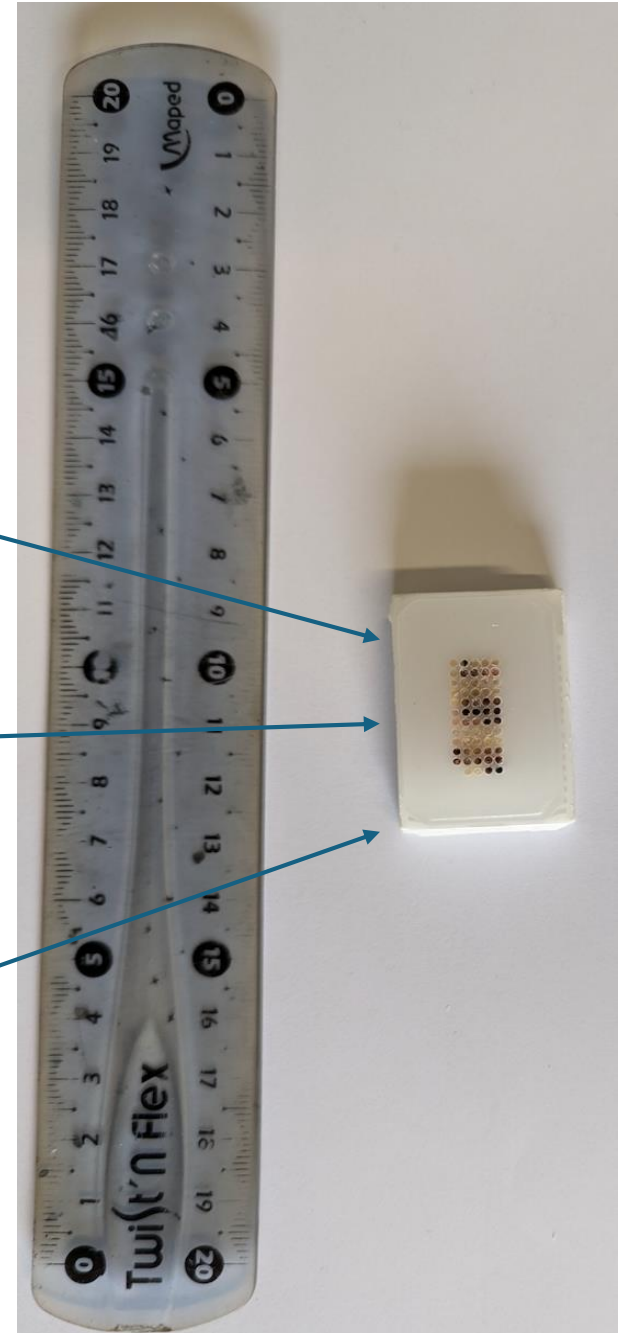
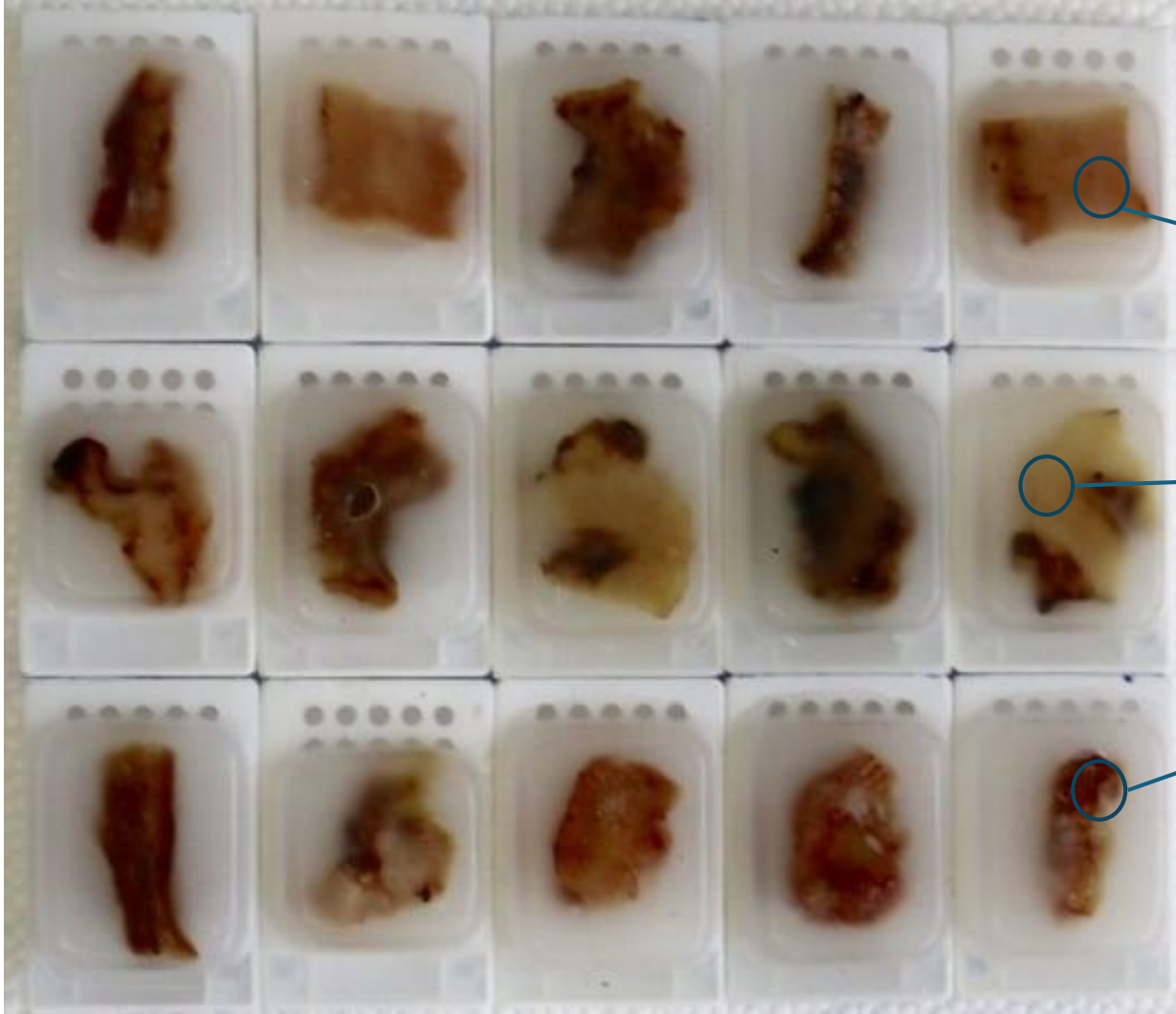


3 Étape 3

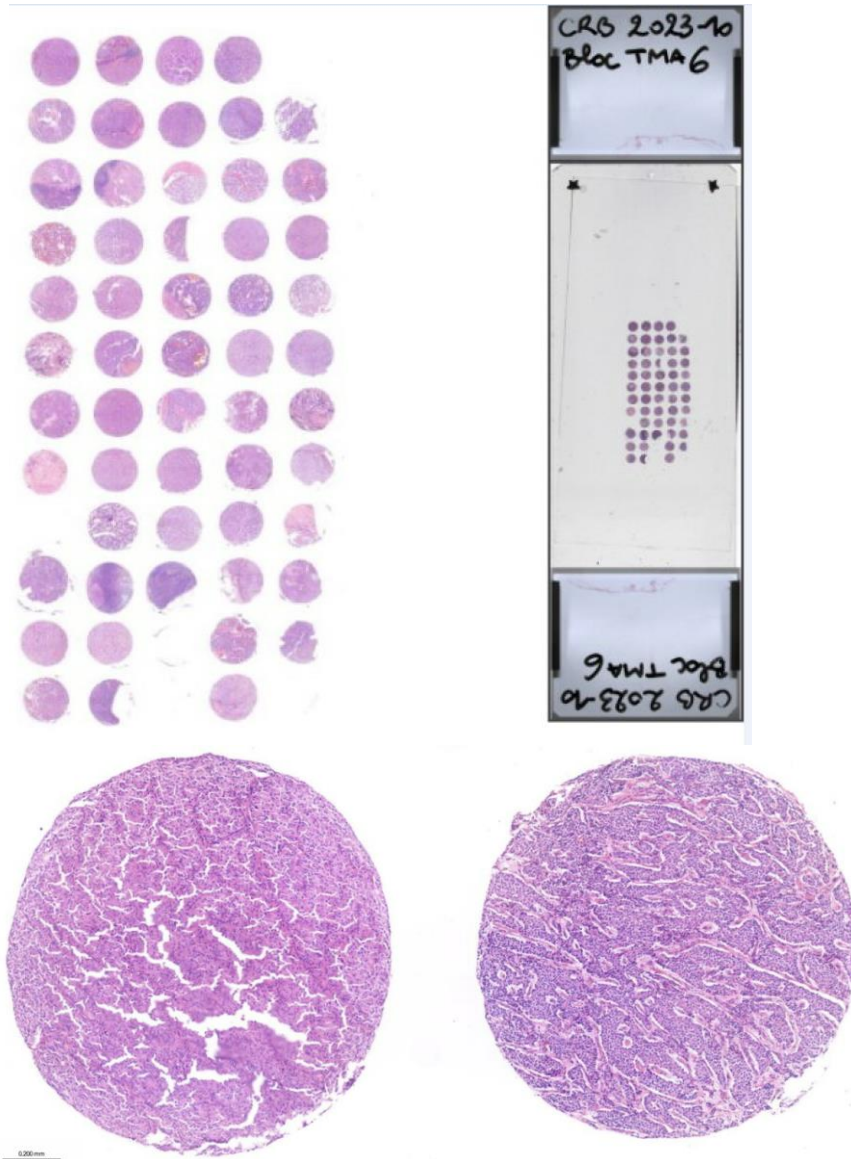
Constructions de tissu micro-arrays (TMA)



TMA



TMA



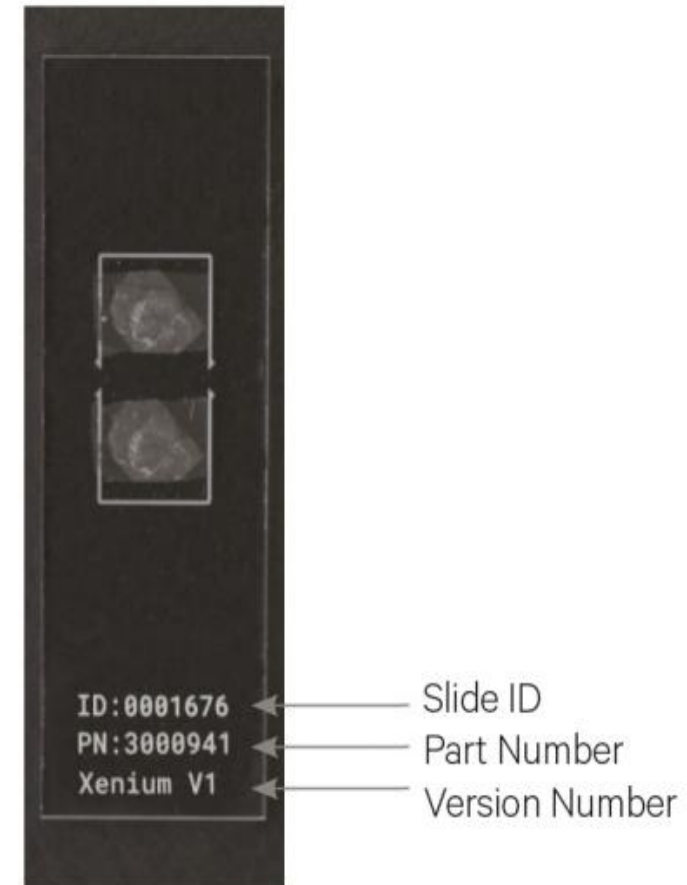
5000 cellules tumorales par échantillons

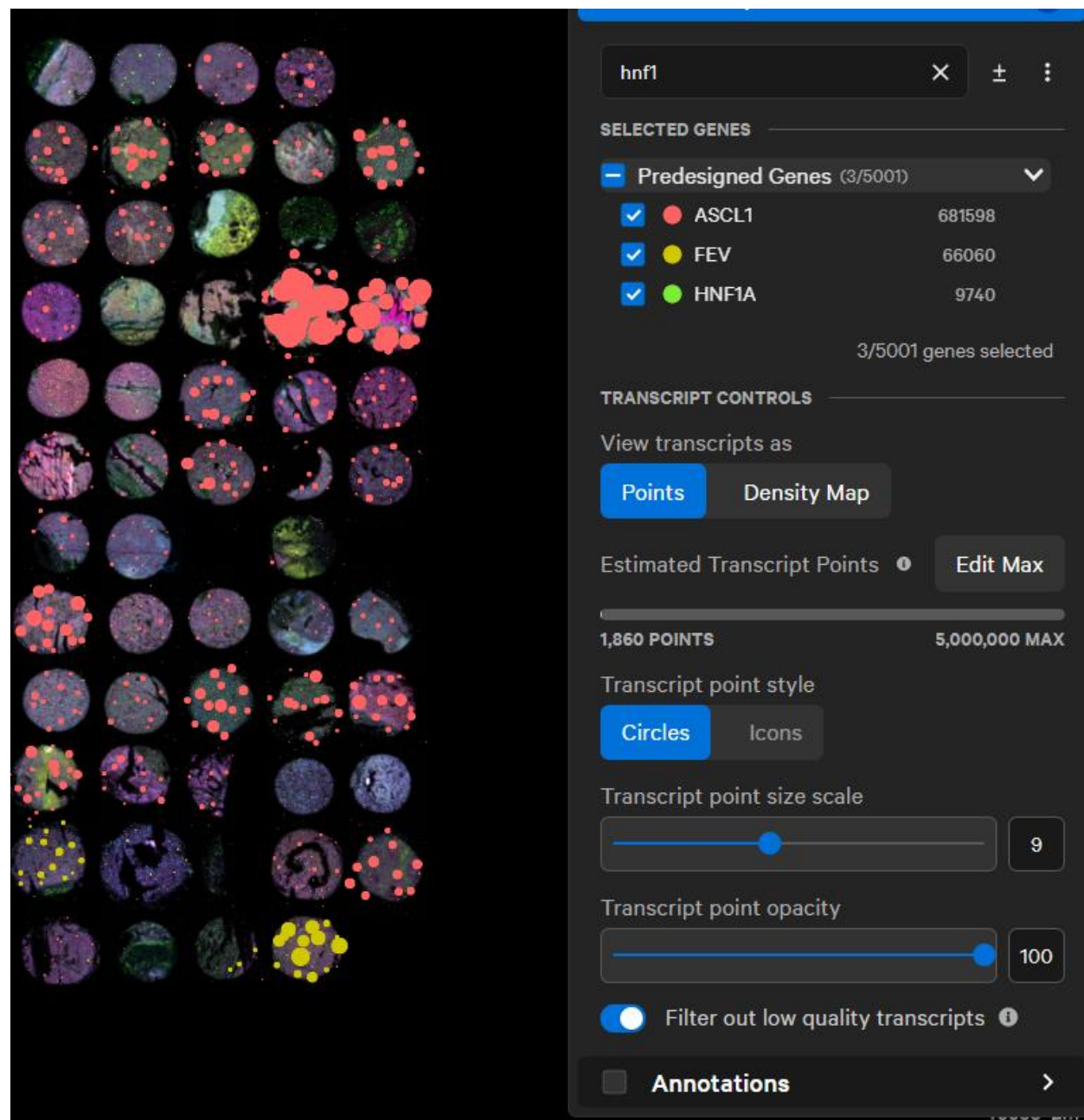
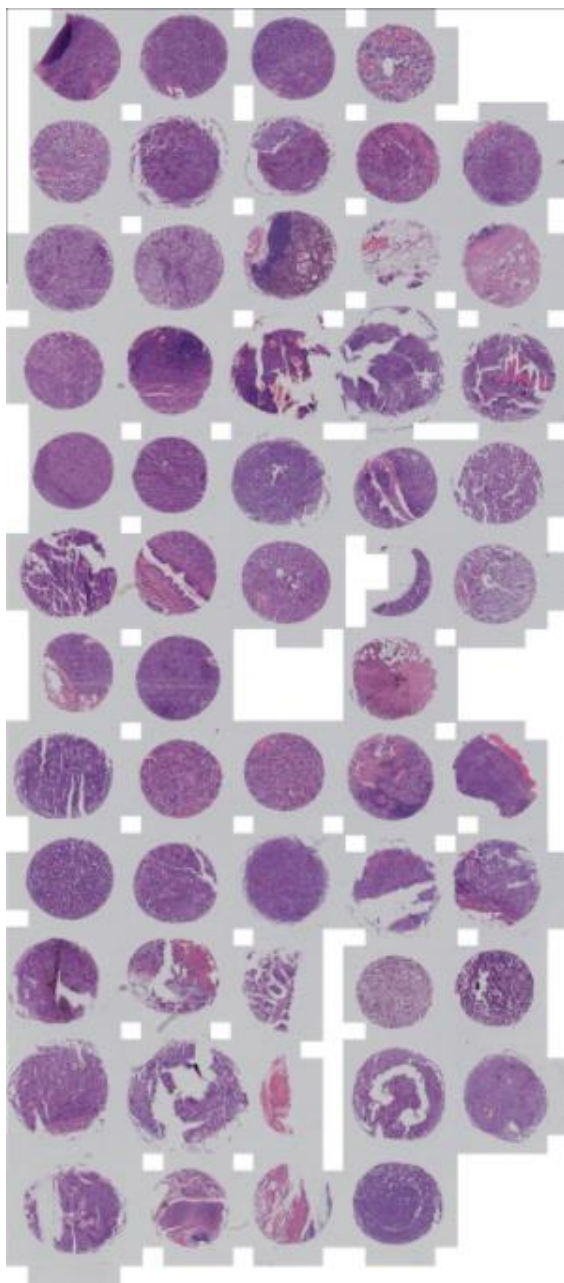
TMA optimisé

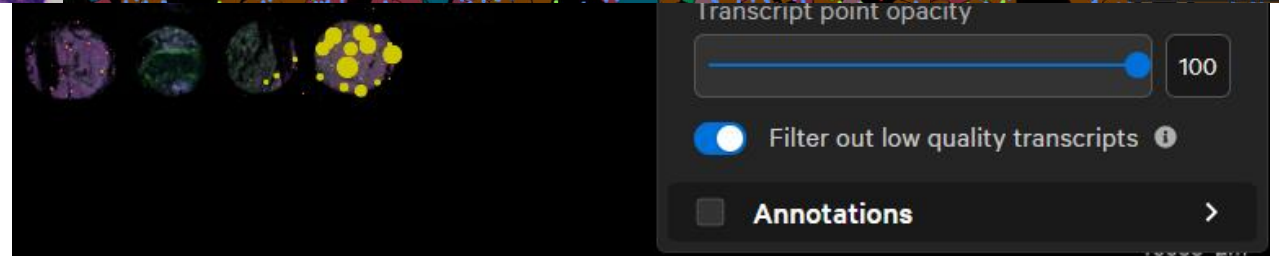
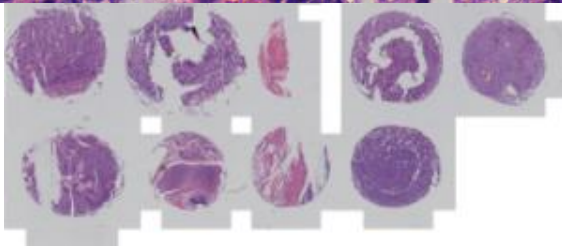
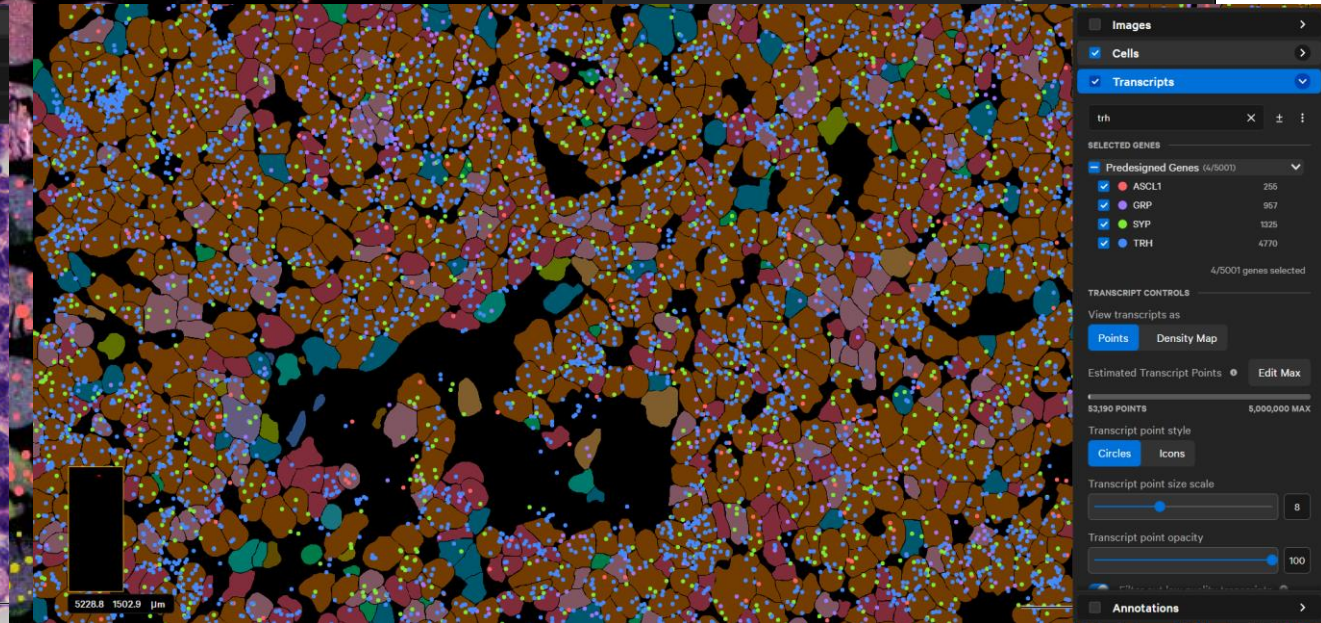
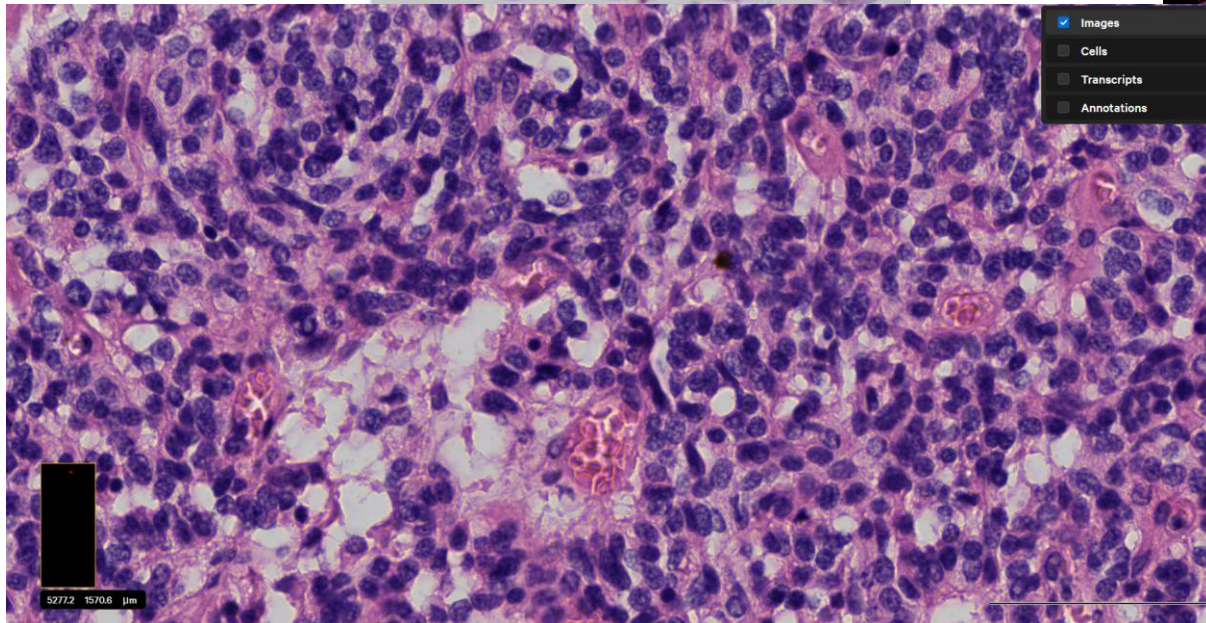
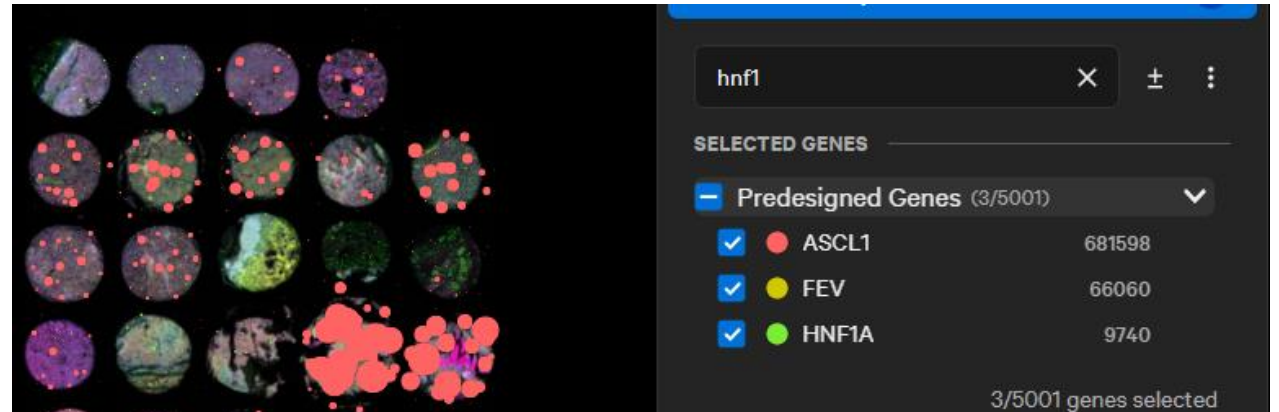
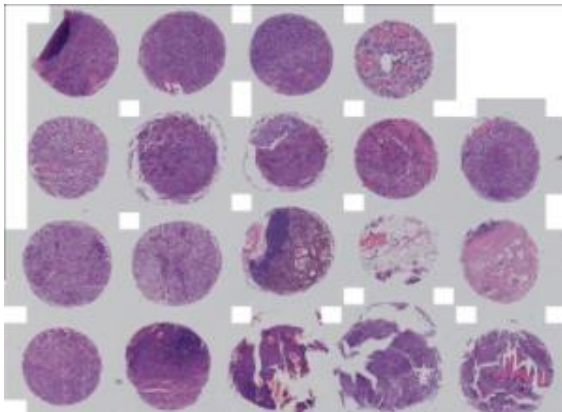
59 échantillons de TNE

Plusieurs échantillons/patients

Xenium Slide with Tissue Sections





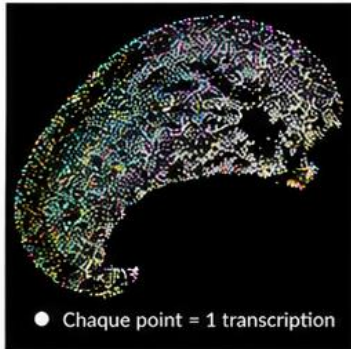


Analyse single-cell à partir des données Xenium

Chaque point représente une cellule

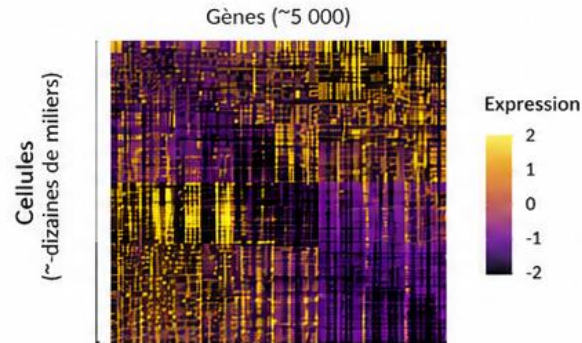
1. Données brutes Xenium

Transcrits détectés
(~5 000 gènes)



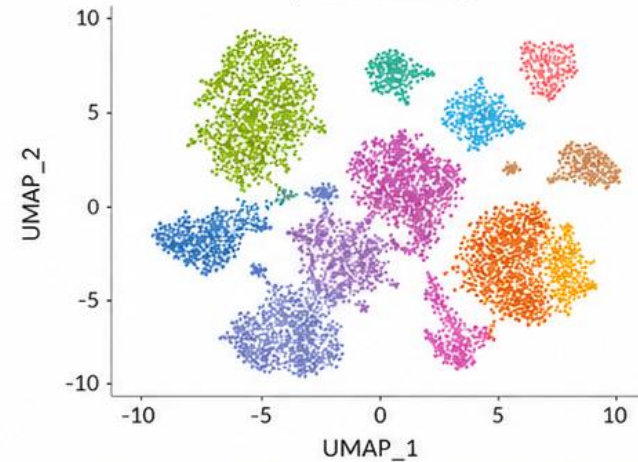
2. Matrice cellules x gènes

(données brutes extraites)

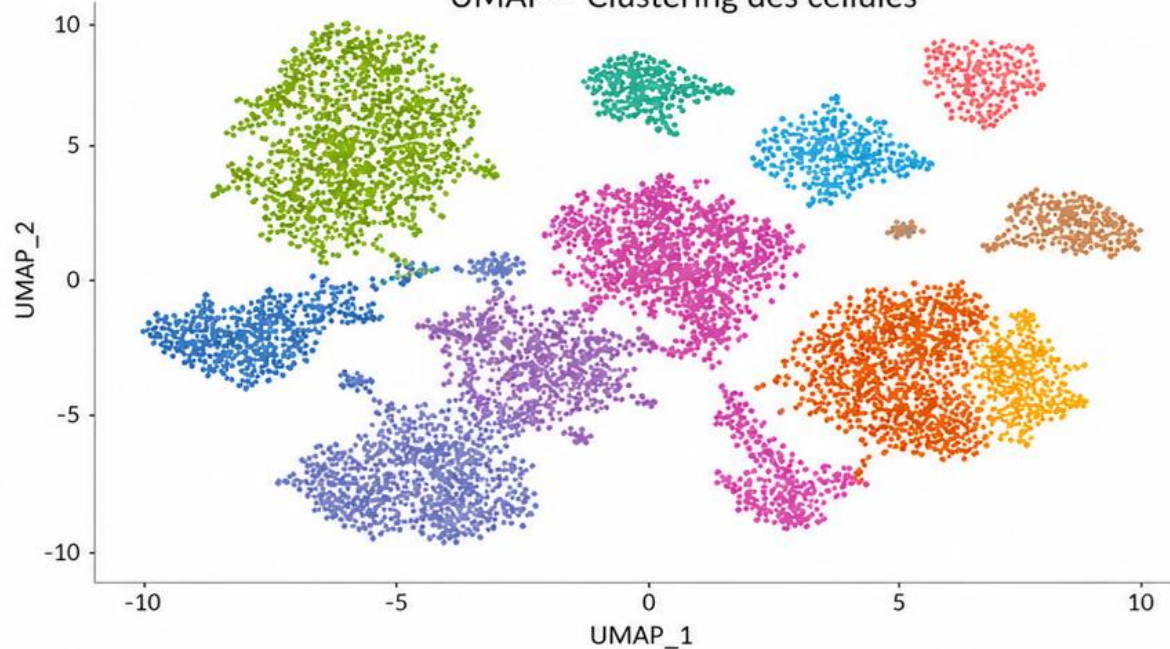


3. Projection UMAP

(visualisation 2D)



UMAP – Clustering des cellules



Annotations des clusters (types cellulaires)

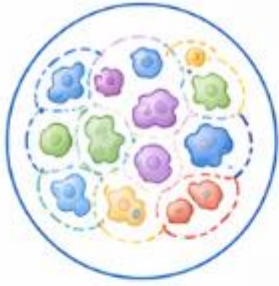
● Cellules tumorales (NE)	176 000
● Cellules T CD8+	144 000
● Cellules T CD4+	120 000
● Cellules B	96 000
● Macrophages / Monocytes	88 000
● Cellules dendritiques	52 000
● Fibroblastes	64 000
● Cellules endothéliales	32 000
● Cellules NK	20 000
● Autres	8 000

Résumé

- ~ 800 000 cellules analysées
- ~ 5 000 gènes par cellule
- Projection UMAP basée sur les 30 premiers PCs
- Chaque point = une cellule
- Clusters annotés selon les signatures transcriptionnelles

Apport de la technologie Xenium

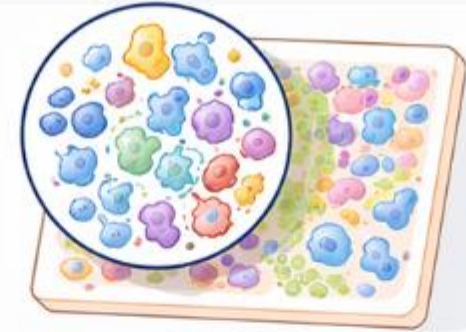
1



Cartographie cellulaire

Qui est en présence ?

- Identification précise des types cellulaires
- Résolution single-cell à l'échelle spatiale
- Découverte de populations rares et niches



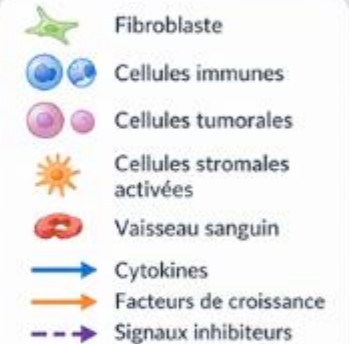
2



Organisation spatiale des tumeurs et interactions cellulaires

Que font les cellules ?

- Analyse des interactions cellule-cellule
- Caractérisation du microenvironnement tumoral
- Compréhension des processus biologiques à l'échelle spatiale



3



Comparaison à grande échelle à coût réduit

Comparativement aux approches habituelles

- Analyse de nombreux échantillons et régions
- Coût par échantillon réduit
- Études multicentriques et de cohortes facilitée

Approches habituelles



€ € € € €
Couverture limitée
Coût élevé

VS

Xenium



€
Couverture étendue
Coût réduit

GRANDE
ÉCHELLE
↓
COÛT
RÉDUIT

MERCI POUR VOTRE ATTENTION