THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant
Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie
Unité de recherche : Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux

Microscopie électronique 3D multi-échelle pour l'analyse de l'architecture du foie

Multiscale 3D electron microscopy to decipher Liver Architecture

Présentée par :

Cécile POHAR

Direction de thèse :

Aurélien DENIAUD — Directeur de thèse
MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Rapporteurs :

Christel GENOUD
FULL PROFESSOR, Université de Lausanne
Carole FRINDEL
MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, INSA Lyon

Thèse soutenue publiquement le **20 novembre 2025**, devant le jury composé de :

Emmanuelle PLANUS, — Présidente
PROFESSEURE DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES
Christel GENOUD, — Rapporteure
FULL PROFESSOR, Université de Lausanne
Carole FRINDEL, — Rapporteure
MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, INSA Lyon
Jean-Christophe OLIVO-MARIN, — Examinateur
PROFESSEUR, Institut Pasteur

Invités :

Pierre-Henri Jouneau
INGENIEUR DE RECHERCHE, CEA Grenoble
Aurelien DENIAUD
MCF, UGA

« Dans la vie, rien n’est à craindre, tout est à comprendre. »

Marie Curie, propos rapportés (vers 1933).

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) et au laboratoire Modélisation et Exploration des Matériaux (MEM).

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Emmanuelle Planus (Professeure, Université Grenoble Alpes) et Jean-Christophe Olivo-Marin (Professeur, Institut Pasteur), pour ces échanges de grande qualité lors de la soutenance et pour leurs précieux conseils pour la suite de ma carrière scientifique.
Christel Genoud (Professeure, Université de Lausanne) et Carole Frindel (Maîtresse de conférences, INSA Lyon), pour l'intérêt porté à l'évaluation de mes travaux de thèse et pour les discussions enrichissantes.

Je tiens à remercier avec la plus grande sincérité mon directeur de thèse, Aurélien Deniaud, ainsi que mon encadrant, Pierre-Henri Jouneau.

Aurélien, merci de m'avoir permis de découvrir la complexité du foie et l'univers de la biologie. Je vous remercie également pour la confiance accordée tout au long de ma thèse, notamment dans mes propositions, en particulier sur la partie consacrée à l'exploration par nano-tomographie à rayons X au synchrotron. Le suivi régulier et les échanges quotidiens autour des différentes problématiques ont permis d'avancer efficacement, dans un climat de communication constructive. Le planning de fin de thèse, clairement défini, m'a permis de mener ce travail à son terme dans les meilleurs délais, avec un accompagnement structurant. Enfin, vos corrections rigoureuses et efficaces du manuscrit ont été essentielles pour respecter les échéances.

Pierre-Henri, merci avant tout pour ta disponibilité quotidienne et pour le partage de ta passion pour les acquisitions d'images en FIB-SEM appliquées à la biologie. Tu m'as permis de garder confiance en moi tout au long de ces trois années de thèse. J'ai énormément apprécié travailler à tes côtés, ta bonne humeur, ton enthousiasme et ton engagement pour la recherche. Merci pour avoir répondu à mes nombreuses questions, et pour ton soutien constant dans ce parcours. Tu m'as transmis ton engouement pour la recherche et m'as aidée à gagner confiance en moi et en mes convictions. Tes conseils ont été précieux. Un simple paragraphe ne suffit sans doute pas à exprimer toute ma reconnaissance… J'espère sincèrement que nos chemins se croiseront à nouveau dans le monde de la recherche. Enfin, j'ai aussi beaucoup appris de tes récits de trails en montagne, peut-être je m'y mettrai un jour !

Je tiens à remercier tout particulièrement Nicola Vigano pour le développement de la partie deep learning (nnU-Net) de ce projet de thèse. Tu as été un véritable pilier dans cette partie du travail, merci pour ton temps, ta patience et ta pédagogie. J'ai découvert le deep learning et la programmation à tes côtés, toujours dans une ambiance motivante et bienveillante. Nous avons pu mener à bien des étapes complexes de ce projet. Merci également pour tes encouragements constants, qui m'ont permis de persévérer.

Je remercie également Kassem pour son aide précieuse en programmation Python et en deep learning. Partant de loin dans ces domaines, tu m'as guidée avec rigueur et bienveillance. Tu as su me rassurer lorsque cela était nécessaire. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, toujours dans une atmosphère

conviviale. Tes corrections sur le manuscrit, en particulier sur la partie deep learning, ont apporté un réel appui scientifique à ce travail.

Je remercie Vincent Artero, directeur du LCBM, pour son accompagnement tout au long de ces trois années de thèse.
Je remercie Thierry Deutsch, directeur du MEM, pour m'avoir accueillie à la Plateforme de Nano-caractérisation (PFNC) pendant toute la durée de ma thèse et pour m'avoir donné accès aux équipements nécessaires à l'avancée de mes travaux. J'ai beaucoup apprécié travailler au sein de la PFNC, les échanges avec l'équipe du LEMMA ont été déterminants pour orienter certaines parties essentielles du projet. Merci également pour le soutien et les conseils apportés.

Je remercie les membres du Comité de Suivi Individuel de thèse.
Baudouin Denis de Senneville et Emmanuelle Tillet, je tiens à vous remercier pour la qualité de nos échanges, vos remarques constructives et votre accompagnement tout au long de ces trois années, qui ont permis de guider efficacement ce projet de thèse.
Emmanuel Le Clezio, je vous remercie sincèrement pour vos conseils avisés et votre accompagnement tout au long de la thèse, ainsi que durant le Master. La qualité de vos enseignements et vos encouragements m'ont donné l'envie de poursuivre dans cette voie.

Je remercie Anne-Mathilde Thierry et Sandrine Vittu pour l'organisation des événements GRAL, qui ont favorisé les échanges entre doctorants de différents laboratoires, ainsi que pour les formations pédagogiques, qui ont constitué un réel soutien dans ce parcours.
Sandrine, merci tout particulièrement pour ta gentillesse et ton soutien, j'ai beaucoup apprécié partager ces formations à tes côtés.

Je remercie les membres de l'équipe Met&Or : Mireille Chevallet, Peggy Charbonnier et Denis Estrade.
Merci Mireille pour les propositions et les discussions autour de la complexité du foie lors des réunions.
Peggy, même si nous n'avons pas travaillé directement ensemble, j'ai beaucoup apprécié nos échanges, ta convivialité et ta bonne humeur.
Denis, un grand merci pour ton soutien et ton écoute tout au long de ces trois années. Tu as été un binôme essentiel pour ce projet de thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie Benoît Gallet pour la préparation des échantillons, grâce à laquelle ont été réalisées de très belles acquisitions et analyses d'images, ainsi que pour sa gentillesse, ses conseils et la qualité de nos échanges.

Collaborations

Je remercie l'ensemble des personnes et équipes dont les collaborations ont été essentielles à la réalisation et à l'aboutissement de ces travaux de recherche.

Je remercie les chercheurs de l'ESRF, ligne ID16B, en particulier Julie Villanova, pour son temps, son implication lors des différents essais et du proposal, ainsi que pour son accompagnement dans cette approche exploratoire originale.
Je remercie également Sandra Benter pour son aide lors de l'ensemble des acquisitions sur la ligne ID16B et pour ses conseils déterminants, ainsi que pour sa disponibilité pendant et après le proposal.

Je remercie les chercheurs de l'Institut Pasteur, de la plateforme Hub d'analyse d'images.
Je remercie tout particulièrement Jean-Yves Tinevez pour avoir accepté cette collaboration, pour sa disponibilité et ses propositions très instructives, qui ont permis de construire ce workflow.
Je remercie Minh Son Phan pour cette rencontre à l'Institut Francis Crick lors d'une conférence sur l'analyse d'images, pour son intérêt pour mon projet, son implication et la qualité de nos échanges. Ce travail a permis de compléter les données de quantification. Merci beaucoup pour le workflow et la documentation détaillée.

Je remercie les membres de la PFNC.
Hanako Okuno, merci pour ta gentillesse, ton écoute et ta bienveillance, en particulier durant les derniers mois de la thèse.
Laure Guetaz, merci pour les échanges constructifs, tes conseils pour la thèse et la suite, ainsi que pour ta gentillesse.
Thomas David, merci pour tes précieux conseils en analyse d'images, toujours très constructifs, ainsi que pour ta pédagogie et ta disponibilité, qui m'ont guidée au mieux dans mes travaux de thèse.

Un grand merci aux doctorants et post-doctorants de la PFNC.

Tout d'abord, un immense merci aux doctorants avec qui j'ai partagé le bureau pendant ces trois années d'aventure.
Pytha, merci pour ton écoute toujours attentive, à tout moment. Tu as été un véritable soutien, en particulier durant les derniers mois de la thèse. Tu es une personne humainement exceptionnelle, et tu m'as aidée à relativiser sur de nombreux aspects de la thèse. Je te souhaite le meilleur pour ta dernière année et pour la suite de ton parcours, tu le mérites pleinement.
Marty, merci pour ta bonne humeur et ton écoute. Tu m'as énormément soutenue et encouragée, notamment en fin de thèse. Ton enthousiasme a contribué à une réelle harmonie dans ce bureau, avec de très beaux moments partagés et beaucoup de cafés !
Alexis, merci pour ta gentillesse, ton calme et ton écoute constante, j'ai beaucoup apprécié nos échanges.
Alexander, tu as été un pilier en programmation lorsque j'en avais besoin. Merci pour ton aide, ton temps et ta gentillesse, toujours dans la bonne humeur.
Antonin, merci pour ton soutien et ta disponibilité permanente. Tes conseils en programmation m'ont été très utiles, et merci d'avoir contribué à maintenir un cadre de travail collaboratif au sein du bureau.

Nicolas et Serge, merci à vous deux pour ce cheminement vécu ensemble.
Serge, tu as été la première personne que j'ai rencontrée à la PFNC. Merci pour ton soutien, ton écoute et tes blagues toujours aussi drôles.
Nicolas, merci pour ton humour et ton soutien. Je garde de très beaux souvenirs de ces trois années, de nos discussions toujours en salle café. Les échanges de conseils avisés en segmentation resteront mémorables.

Claire, merci beaucoup pour ton soutien tout au long de ces trois années de thèse. C'était un réel plaisir d'échanger avec toi, ta passion pour la recherche est contagieuse. Merci également pour ton écoute et tes précieux conseils.

Bérangère, merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ton rire communicatif. Tu as toujours été de très bons conseils.

Stasa, nous nous sommes rencontrées lors de ton stage, puis durant ta thèse. Merci pour ta gentillesse, ton sourire et ton écoute. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, et j'espère qu'ils se poursuivront en dehors du laboratoire.

Yousr, merci pour ton aide sur ce projet de thèse. Tu as été la première à initier les étapes de segmentation sur les LSEC, un travail complexe et courageux. Je retiens particulièrement ta détermination et ta passion pour ce projet. Merci pour ton temps, tes explications et ta bienveillance, nos échanges m'ont été très précieux.

Je terminerai en remerciant ma famille et mes amis.

Je remercie infiniment mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mon parcours académique et encouragée jusqu'à l'aboutissement de cette aventure. Vous avez toujours été présents dans tous les moments. Les derniers mois de thèse ont été particulièrement éprouvants, comme vous avez pu le constater malgré la distance, mais grâce à votre soutien constant, j'ai pu mener ce travail à son terme.

Je remercie ma grand-mère, qui a toujours été une très bonne supportrice dans mes études. Je suis arrivée au bout, comme je te l'avais promis. Un grand merci également à Jacques pour son soutien durant mes études, mon seul regret est de ne pas avoir pu partager l'aboutissement.
Je remercie également mon grand-père, qui m'a transmis la conviction qu'un métier se choisit avant tout par passion. J'aurais aimé pouvoir te raconter la finalité.

Bertrand, merci infiniment pour ton soutien pendant toute cette thèse, et plus encore durant les derniers mois. Après ta dernière année de thèse, c'était à mon tour. Tu as été présent au quotidien, lors des soirées, des nuits et des week-ends de rédaction. Merci de m'avoir aidée à garder confiance en moi lorsque j'en avais le plus besoin. Ce que je retiendrai avant tout, ce sont ces moments difficiles métamorphosés en rires ou en randonnées aux dénivelés sans cesse croissants.

Je remercie Chloé, mon amie depuis le CP à l'école primaire. Depuis toutes ces années, tu as toujours été présente. Merci d'être venue me rendre visite en montagne, d'avoir assisté à ma soutenance sous la neige, et d'avoir toujours été présente dans tous les moments. Aujourd'hui, docteures toutes les deux qui l'aurait cru lorsque nous avions six ans.

Clara, merci pour ton soutien fidèle depuis le CP. Merci également d'être venue à ma soutenance et d'avoir bravé la neige à la Bastille. Je garde de merveilleux souvenirs de tous ces moments partagés.

Je remercie mes amies Noémie et Marianne.
Noémie, depuis Montpellier et l'Australie, tu m'as beaucoup soutenue. Merci pour tes conseils, ton écoute et ta vision toujours réconfortante. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes voyages.
Marianne, merci pour ton soutien et tes messages aux moments où j'en avais le plus besoin durant ces trois années.

Abella et Alice, notre rencontre lors du Master et l'amitié qui a suivi m'ont donné le courage de poursuivre mes projets. Merci pour votre bienveillance, votre présence constante et d'être venues à ma soutenance. Malgré la distance, vous avez toujours été là.
Alice, merci de m'avoir appris à persévérer, quelles que soient les situations.
Abella, je garde de très beaux souvenirs de nos TP d'électronique en binôme, toujours studieux mais dans la bonne humeur.

Charlène, merci pour tes encouragements tout au long de ma thèse et pour ta présence depuis le lycée.

Julie, merci pour ton soutien durant ces trois années de thèse. Notre amitié, qui nous lie depuis quasiment notre naissance, et aujourd'hui nous sommes toutes les deux docteures. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta carrière.

Audrey, notre rencontre lors du stage de fin d'études restera un souvenir marquant. Tu as été une collègue de bureau exceptionnelle. Ces moments partagés ont largement contribué à me guider vers la recherche. Je garde des souvenirs incroyables de cette période, que j'aurais aimé voir se prolonger. Désormais, je viendrai te rendre visite à Berlin pour de nouvelles aventures.

Préambule

Le développement de la microscopie électronique volumique et l'essor récent des approches d'intelligence artificielle appliquées à l'analyse d'images ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude de l'architecture hépatique. Ces avancées permettent non seulement de visualiser en trois dimensions des structures dans leur environnement tissulaire, mais aussi d'en extraire des mesures quantitatives essentielles pour la comparaison dans différents contextes biologiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse, à l'interface entre microscopie corrélative et analyse d'images, visant à explorer l'ultrastructure hépatique. Dans ce travail de thèse, l'approche choisie a combiné la tomographie à rayons X pour la localisation des régions d'intérêt et l'imagerie FIB-SEM (*Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy)* pour l'acquisition de volumes nanométriques. Le développement d'outils d'analyse d'images adaptés, allant du machine learning au deep learning, a constitué un enjeu majeur de ce travail, afin d'obtenir des segmentations précises et d'automatiser la quantification des structures clés de l'architecture hépatique.

Mon projet de thèse a été réalisé en collaboration entre deux équipes de recherche, l'équipe Met&Or (Métaux et Organes) du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) et l'équipe LEMMA du laboratoire Modélisation et Exploration des Matériaux (MEM). L'équipe Met&Or s'intéresse à l'étude de l'homéostasie des métaux chez les mammifères en conditions physiologiques et altérées ainsi qu'à l'architecture du foie. Un ensemble de techniques d'imagerie et de biologie cellulaire et moléculaire y est utilisé pour étudier ces questions. Le LEMMA possède, quant à lui, une expertise dans les acquisitions d'images par microscopie électronique et les développements autour de l'analyse d'images notamment en programmation Python et le déploiement d'outils de deep learning à la Plateforme de Nano-caractérisation (PFNC).

Ce manuscrit de thèse s'articule en trois chapitres :

Un **premier chapitre d'introduction** présente l'ultrastructure hépatique et ses principales fonctions. Deux phénotypes de foie de souris, WT et BMP9-KO, ont été étudiés afin d'évaluer l'influence de la cytokine BMP9 sur l'ultrastructure hépatique. L'état de l'art en imagerie volumique est ensuite détaillé, en mettant l'accent sur la technique FIB-SEM, ainsi que sur des approches non destructives telles que la tomographie à rayons X. La microscopie corrélative, qui représente une stratégie privilégiée pour de nombreuses problématiques, est également présentée. Enfin, l'analyse d'images est abordée à travers les méthodes de machine learning et de deep learning, avec un focus particulier sur la segmentation en biologie.

Le **chapitre 2** est consacré à l'analyse quantitative des fenêtres des cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques à partir de données FIB-SEM acquises à l'échelle nanométrique. L'objectif de cette étude a été d'extraire des mesures quantitatives dans divers contextes biologiques, tout en développant un processus de segmentation innovant permettant la reconstruction tridimensionnelle à haute résolution des LSEC. Ce pipeline a évolué vers l'intégration d'outils automatisés adaptés à nos données, incluant des approches de deep learning. L'ensemble de ces travaux est présenté sous la forme d'un article intitulé *« A general methodology for sinusoid fenestration analysis based on 3D electron microscopy data »*, destiné à être soumis pour publication au journal *Hepatology*.

Le **chapitre 3** est consacré à la mise en œuvre d'une approche de microscopie corrélative appliquée à l'étude du canal de Hering. Cette structure, rare et de taille micrométrique, est susceptible d'abriter une niche de progéniteurs hépatiques. Une stratégie tridimensionnelle multi-échelle a été développée afin de localiser précisément le canal de Hering, puis d'en analyser l'ultrastructure à une résolution

nanométrique. Pour atteindre cet objectif, une approche d'imagerie corrélative associant la nanotomographie à rayons X réalisée sur la ligne de lumière ID16B au synchrotron Européen et la microscopie FIB-SEM est en cours de développement. Parallèlement, une méthode de préparation optimale des échantillons a été élaborée afin de répondre aux contraintes spécifiques de la ligne de lumière. Les choix méthodologiques opérés sont discutés dans ce chapitre.

Le dernier chapitre, intitulé **conclusions et perspectives**, regroupe les conclusions générales de ce travail de thèse et les perspectives. A la fin du manuscrit, le chapitre **matériels et méthodes** précise les détails expérimentaux propres à ce travail de thèse.

Table des matières

Préambule **1**

Table des figures **5**

Liste des abréviations **6**

Chapitre 1: Introduction **7**

I. Le foie **7**

I.1. Architecture hépatique et fonctions 7

I.2. Influence de la cytokine BMP9 sur l'ultrastructure du foie 15

II. Imagerie volumique **17**

II.1. Microscopie électronique volumique 17

II.2. Tomographie à rayons X 22

II.3. Microscopie corrélative 24

III. Analyse d'images **27**

III.1. Analyse d'images par Machine Learning : de la classification à la segmentation 27

III.2. Approches de Deep Learning pour l'analyse d'images 29

IV. Objectifs **39**

Chapitre 2 : De l'imagerie FIB-SEM à l'analyse ultrastructurale : exploration des LSEC et des canalicules biliaires chez les souris WT et BMP9-KO **41**

I. Contexte **41**

II. Analyse de la fenestration des LSEC par FIB-SEM **44**

II.1. Manuscrit en préparation 44

A general methodology for sinusoid fenestration analysis based on 3D electron microscopy data. **45**

Supplementary information **75**

II.2. Conclusion – Perspectives 88

III. Analyse de l'ultrastructure des canalicules biliaires chez les souris WT et BMP9-KO **91**

III.1. Introduction 91

III.2. Analyses de canalicules biliaires par FIB-SEM 92

III.3. Segmentation des canalicules biliaires 94

III.4. Conclusion - perspectives 96

Chapitre 3 : La microscopie corrélative pour l'étude du canal de Hering 99

I. Architecture et fonction du réseau biliaire 99

I.1. Arbre biliaire 99

I.2. Canal de Hering 101

II. Objectifs 103

III. Résultats 103

III.1. Optimisation expérimentale 103

III.2. Tomographie à rayons X en laboratoire 104

III.3 Nanotomographie à rayons X utilisant le rayonnement synchrotron 105

IV. Conclusion 108

Conclusion générale et perspectives 111

Matériels et Méthodes : 115

I. Acquisitions FIB-SEM : 115

II. Analyse des images FIB-SEM : 116

II.1. Processus global : Segmentation 117

II.2. Segmentation des images FIB-SEM des LSEC 117

III. Codes mise en place 130

III.1. Guide d'utilisation nnU-Net : commandes détaillées 131

IV. Génération du maillage 3D 135

V. Mesures quantitatives 136

V.1. Mesure du diamètre des LSEC entre souris WT et souris BMP9-KO 136

VI. Préparation d'échantillons pour les expériences de nanotomographie à rayons X au synchrotron 137

Références bibliographiques 139

Table des figures

Figure 1: Vascularisation et drainage biliaire du foie. 7
Figure 2 : Organisation cellulaire et polarité des hépatocytes au sein des travées hépatiques.....9
Figure 3 : Partie de la membrane de la LSEC – acquisition FIB-SEM – taille de voxel : 4 x 4 x 4 nm³. 11
Figure 4 : Techniques de microscopie électronique pour l'imagerie volumique. 17
Figure 5 : Schéma de principe d'un tomographe à rayons X...... 23
Figure 6 : Reconstruction 3D des principales structures tissulaires de la microarchitecture hépatique...... 26
Figure 7 : Représentation 3D du parenchyme hépatique sous nnU-Net...... 37
Figure 8 : Masques entièrement annotés de manière automatique par SAM, de haute qualité et très diversifiés...... 38
Figure 9 : Canalicule biliaire pour un échantillon de foie de souris WT - Acquisition FIB-SEM – taille de voxel 16 x 16 x 16 nm³...... 92
Figure 10 : Canalicule biliaire pour un échantillon de foie de souris BMP9-KO. Taille de voxel 12 x 12 x 12 nm³. 93
Figure 11 : Étapes de segmentation sémantique du canalicule biliaire avec le logiciel Ilastik..... 94
Figure 12 : Segmentation sémantique sous Ilastik du canalicule biliaire dans différents contextes biologiques...... 95
Figure 13 : Acquisitions FIB-SEM...... 95
Figure 14 : Structure et fonction de l'arbre biliaire. 99
Figure 15 : Le canal de Hering...... 101
Figure 16 : Analyse de l'ultrastructure du canal de Hering par TEM. 102
Figure 17 : Tomographie à rayons X en laboratoire sur un échantillon de foie de souris WT...... 104
Figure 18 : Acquisitions réalisées sur la ligne de lumière ID16B à l'ESRF, nanotomographie à rayons X, taille de pixel 50 nm. 105
Figure 19 : Échantillon foie de souris WT, acquisitions ID16B. Type d'artefact : cercle concentrique en périphérie du champ sur un échantillon de géométrie parallélépipédique...... 106
Figure 20 : Échantillons préparés au PFIB-SEM pour l'usinage des piliers – Reconstruction à partir de données acquises sur la ligne de lumière ID16B. Taille de pixel 150 nm. 107
Figure 21 : Échantillon WT...... 108
Figure 22 : Microscope FIB-SEM Zeiss Cross Beam 550 à la plateforme de nano-caractérisation. . 115
Figure 23 : Acquisition FIB-SEM – taille de voxel 15 x 15 x 15 nm³...... 116
Figure 24 : Vue d'ensemble de l'architecture d'apprentissage profond de nnU-Net...... 120
Figure 25 : Opérations de convolution sur l'image en niveaux de gris...... 121
Figure 26 : Exemple de l'opération de max-pooling sur une portion de l'image. 122
Figure 27 : Schéma d'un poids de réseau de neurones. 122
Figure 28 : Segmentation sur 1 sous-volume...... 126
Figure 29 : Préparation au fine-tuning 127
Figure 30 : Segmentation partielle (1/4) 128
Figure 31 : Comparaison Score de Dice et Score IoU...... 133
Figure 32 : Interface de contrôle du microscope Helios PFIB-SEM.. 138

Liste des abréviations

AFM : *microscopie à force atomique*
ALK *: activin receptor-like kinase*
AT *: array tomography*
BMP9 *: bone morphogenetic protein 9*
CNN *: convolutional neural network*
cPSD *: continuous pore size distribution*
dPSD *: discrete pore size distribution*
FIB-SEM *: focused ion beam-scanning electron microscopy*
LSEC *: liver sinusoidal endothelial cells*
MEC *: matrice extra-cellulaire*
MIP *: mercury intrusion porosimetry*
nnU-Net *: no-new-U-Net*
PFIB-SEM *: Plasma FIB-SEM*
ReLU *: rectified linear unit*
ROI *: region of interest*
SBF-SEM *: serial block face-scanning electron microscopy*
SEM *: scanning electron microscopy*
SIM : *microscopie à illumination structurée*
TEM *: transmission electron microscopy*
TGF-β *: transforming growth factor beta*
vEM *: volume electron microscopy*

Anglicisme :

Cross-Entropy Loss : entropie croisée
Epoch : époques
Ground truth : vérité de terrain
Loss function : fonction perte
Overfitting : sur-apprentissage

Chapitre 1: Introduction

I. Le foie

I.1. Architecture hépatique et fonctions

I.1.a. Organisation générale

Le foie, plus grand organe interne du corps humain, représente entre 2% et 5% du poids total de l'organisme (Øie *et al.*, 2018). Le foie est l'organe majeur du métabolisme qui est rendu possible par une architecture complexe (**Figure 1A**). Sur le plan de l'anatomie macroscopique, ce manuel d'hépatologie clinique (Benhamou *et al.*, 2002) décrit le foie avec une configuration en forme de H, dans laquelle on trouve deux lobes principaux, le lobe droit et le lobe gauche eux-mêmes subdivisés en huit segments.

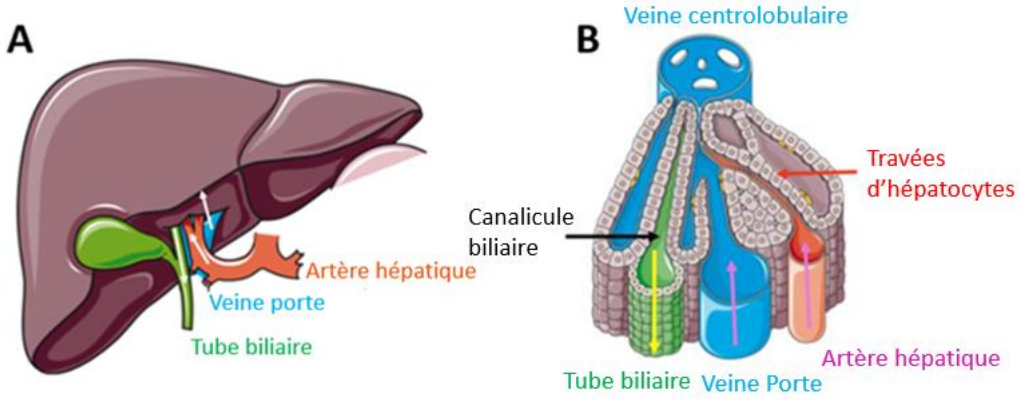


Figure 1: Vascularisation et drainage biliaire du foie. *(A) Schéma anatomique du foie montrant les voies vasculaires et biliaires principales : la veine porte (en bleu), l'artère hépatique (en rouge) et le tube biliaire (en vert). (B) Organisation schématique d'un lobule hépatique. Figures réalisées à partir de la banque d'illustrations médicales de Servier (smart.servier.com).*

Le lobe droit a la particularité d'être le lobe le plus large des deux lobes principaux et il possède 3 faces. Le parenchyme hépatique reçoit environ 25% du débit cardiaque, dont 70 à 75% provient de la veine porte transportant du sang riche en nutriments du tractus gastro-intestinal, du pancréas et de la rate, et 25 à 30% de l'artère hépatique (Le Couteur *et al.*, 2008). Ce flux sanguin est ensuite distribué par des capillaires sanguins fins nommés sinusoïdes hépatiques jusqu'à atteindre la veine centrolobulaire.

En 1833, l'anatomiste et pathologiste Francis Kiernan a mis en évidence la structure segmentaire du foie dans son manuel (Jean-Pierre Benhamou *et al.*, 2002). Il y décrit les lobules hépatiques, les triades portales ainsi que la veine centrolobulaire. Les lobules hépatiques peuvent être comparés à des feuilles, le parenchyme hépatique s'organisant autour de fines ramifications veineuses, à l'image de la disposition du parenchyme foliaire. Les vaisseaux dans lesquels convergent ces petites veines évoquent les branches d'un arbre qui, en se réunissant, forment le tronc.

Les lobes hépatiques sont subdivisés en milliers d'unités appelées lobules hépatiques. Ces structures, de forme hexagonale, contiennent des rangées d'hépatocytes disposées de manière radiale autour d'une veine centrale au centre du lobule (**Figure 1B**). En périphérie du lobule se situe la triade portale composée de la veine porte, de l'artère hépatique et du tube biliaire. Du côté des échanges sanguins, la veine porte transporte le sang riche en nutriments provenant du tube digestif, et l'artère hépatique apporte le sang oxygéné. Ces deux réseaux vasculaires se ramifient à plusieurs niveaux jusqu'à atteindre la microcirculation des lobules hépatiques. Le sang y est mélangé dans les sinusoïdes, de petits capillaires hépatiques à parois fenêtrées, permettant ainsi les échanges nécessaires à l'activité métabolique des hépatocytes qui entourent ces micro vaisseaux.

Les cellules parenchymateuses représentent plus de 80% de la masse du parenchyme hépatique (Slim *et al.*, 2013). Les composés étrangers à l'organisme, les xénobiotiques sont évacués dans la bile au sein du réseau biliaire. Des systèmes de culture cellulaire permettent de mimer ces mécanismes (Sharma *et al.*, 2020).
D'autres types cellulaires jouent un rôle clé dans la structure et la fonction hépatique. Parmi celles-ci, on trouve les cellules étoilées hépatiques, situées dans l'espace de Disse, ainsi que les cellules de Kupffer, présentes dans la lumière des sinusoïdes.

I.1.b. Fonctions du foie

Le foie est un organe vital qui remplit plus de 500 fonctions dans le corps humain (Legallais *et al.*, 2018). Il joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme des glucides, lipides et protéines, tout en assurant la synthèse et la dégradation des protéines plasmatiques, la production de glycogène, le stockage des vitamines, l'homéostasie des métaux, la sécrétion de la bile, et le métabolisme des xénobiotiques. Le foie constitue le principal organe de détoxification, permettant de maintenir un équilibre métabolique stable dans l'organisme (Gao *et al.*, 2024).
L'architecture complexe du foie rend possible ses multiples rôles, principalement par son unité fonctionnelle appelée lobule hépatique. Dans un lobule hépatique, deux systèmes circulatoires fonctionnent en sens opposé : d'une part, la circulation sanguine, et d'autre part la sécrétion biliaire. La dynamique des fluides sanguins dans le foie sur des sujets sains et pathologiques a été largement étudiée, notamment les vitesses sanguines mesurées par IRM 4D, nécessaire dans certaines prises de décisions lors de pratiques cliniques (Piergiovanni *et al.*, 2017).

L'homéostasie hépatique garantit l'équilibre et le bon fonctionnement des principales activités du foie, indispensables à la santé de l'organisme. Le foie est capable de maintenir ses fonctions physiologiques essentielles malgré l'exposition à divers agents pathogènes ou toxiques. Il est considéré comme l'organe présentant la plus forte capacité de régénération cellulaire parmi les organes viscéraux. En effet, le foie peut se régénérer jusqu'à 70 % de sa masse perdue, principalement grâce à la prolifération des hépatocytes.

Le domaine apical des hépatocytes borde les canalicules biliaires, où se produit la sécrétion de la bile, tandis que leur domaine basal est en étroite interaction avec les sinusoïdes hépatiques (**Figure 2**). La veine porte se divise en veinules qui alimentent les sinusoïdes hépatiques, tandis que l'artère hépatique donne les artérioles hépatiques, contribuant également à l'irrigation des sinusoïdes. Les sinusoïdes hépatiques sont des capillaires à travers lesquels le sang mélangé, issu de la veine porte hépatique et de l'artère hépatique, est ensuite drainé vers la veine centrale avant d'être évacué hors

du foie. Les sinusoïdes hépatiques sont bordés par un endothélium fenêtré fin, leur diamètre moyen est inférieur à 10 µm et les sinusoïdes représentent 19,2% du volume total de la microarchitecture hépatique (Shami *et al.*, 2016).
L'espace de Disse, nommé ainsi d'après l'anatomiste et histologiste allemand Joseph Disse en 1890, constitue l'espace périsinusoïdal du parenchyme hépatique (**Figure 2**). Cet espace, délimité par les cellules endothéliales sinusoïdales (LSEC), se situe précisément entre la paroi des sinusoïdes et les microvillosités des hépatocytes.

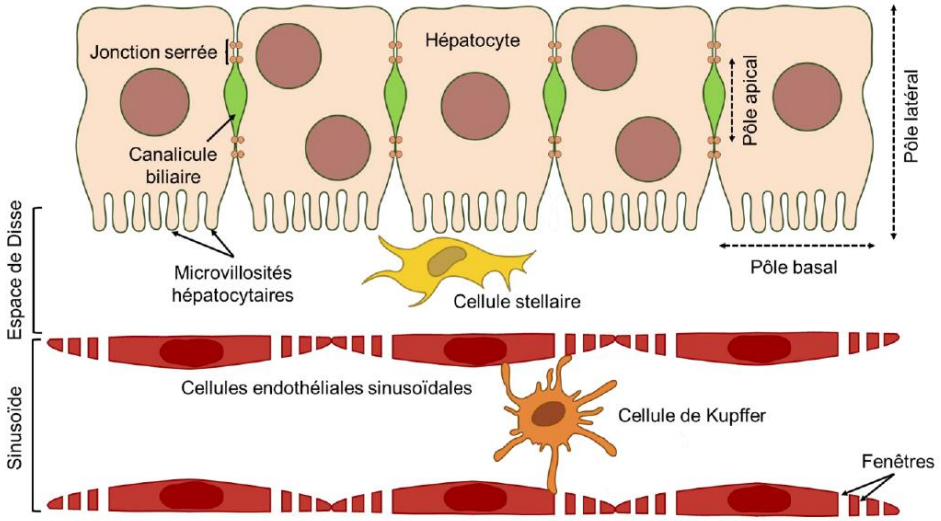


Figure 2 : Organisation cellulaire et polarité des hépatocytes au sein des travées hépatiques. *Le pôle basal des hépatocytes est orienté vers l'espace de Disse, lequel les sépare des sinusoïdes. Les pôles apicaux de deux hépatocytes adjacents forment les canalicules biliaires, délimités par des jonctions serrées. Le pôle latéral correspond aux zones de contact entre les hépatocytes, marquées par diverses jonctions cellulaires. Cette illustration a été élaborée à partir d'images modifiées provenant de la banque d'illustrations médicales de Servier (smart.servier.com).*

Dans notre organisme, pour une personne de corpulence moyenne, on compte approximativement un milliard de sinusoïdes. Le foie humain a un poids moyen compris entre 1,4 kg et 1,8 kg et contient environ 1 à 1,5 litre de sang. On estime qu'un foie humain possède entre 50 000 à 100 000 lobules hépatiques. L'endothélium hépatique, constitué de fenêtres, agit comme un filtre dynamique (Le Couteur *et al.*, 2008). Ces fenêtres permettent le passage de substrats tels que des protéines plasmatiques et des lipoprotéines dans l'espace extravasculaire de Disse, tout en bloquant les particules de plus de 0,2 µm, telles que les chylomicrons. Toute modification de l'endothélium influence le métabolisme des lipoprotéines. Par exemple, l'entrée de la vitamine A dans les hépatocytes et les cellules étoilées est régulée par le transport des résidus de chylomicrons dans l'espace de Disse.

Ces résidus jouent un rôle clé en activant les cellules étoilées, ce qui affecte l'évolution de la fibrose hépatique. Les fenêtres endothéliales, en facilitant les échanges entre le sang et l'espace de Disse, sont donc essentielles pour le métabolisme des lipides et de la vitamine A, contribuant ainsi à l'homéostasie hépatique. La production de chylomicrons, des lipoprotéines riches en triglycérides, représente la première étape du métabolisme des graisses alimentaires. En raison de leur taille excessive pour

traverser les fenêtres endothéliales, les chylomicrons subissent une transformation en résidus plus petits de 30 à 80 nm. Ces résidus sont ensuite dirigés vers l'espace de Disse, où ils sont pris en charge et métabolisés par les hépatocytes. La perte de fenêtres affecte l'élimination hépatique, contribuant à des évènements néfastes tels qu'un temps de circulation prolongé des résidus de chylomicrons lorsque les fenêtres ont une taille réduite.

Les hépatocytes sécrètent la bile au niveau de leur pôle apical, directement dans les canalicules biliaires. Cette bile est composée principalement d'acides et sels biliaires, de phospholipides et de cholestérol, mais elle peut également contenir des produits du métabolisme hépatique, des toxines, ainsi que des médicaments et leurs métabolites. La bile est ensuite transportée à travers le réseau biliaire : depuis les canalicules, elle rejoint les canaux biliaires via le canal de Hering, une structure encore imparfaitement caractérisée ((Crawford *et al.*, 1998), (Theise *et al.*, 1999)).

I.1.c. Principaux types cellulaires hépatiques

I.1.c.i. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules principales du foie, représentant environ 80% de la masse hépatique. Les hépatocytes sont disposés en travées et présentent une polarisation spécifique, différente de la polarisation épithéliale classique en colonnes. Leur membrane est organisée en trois pôles : apical, basal et latéral. Le pôle apical s'oriente vers les canalicules biliaires, tandis que le pôle basolatéral est en contact avec l'espace de Disse (**Figure 2**) permettant, respectivement, la sécrétion de bile et les échanges avec le sang.

- Le **pôle basal** des hépatocytes fait face à l'espace de Disse, dans lequel les hépatocytes forment de nombreuses microvillosités qui sont en contact avec le sang riche en nutriment au niveau des sinusoïdes hépatiques (**Figure 2**).
- Le **pôle apical** joue un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques liées à la sécrétion biliaire. En outre, le pôle apical contribue au maintien de l'intégrité cellulaire en jouant un rôle clé dans les jonctions intercellulaires, qui assurent l'adhésion des hépatocytes entre eux et soutiennent l'organisation fonctionnelle du foie (**Figure 2**).
- Le **pôle latéral** des hépatocytes est constitué des jonctions cellulaires reliant les hépatocytes adjacents. Parmi celles-ci, les jonctions serrées jouent un rôle essentiel en isolant les canalicules biliaires, assurant ainsi que la bile reste confinée à l'intérieur de ces structures et ne diffuse pas vers les espaces extracellulaires environnants (**Figure 2**).

Chaque hépatocyte adjacent contribue à la formation de membranes apicales, donnant naissance aux canalicules biliaires, les plus petites branches du réseau biliaire, formées par des jonctions serrées. Les microvillosités couvrent environ 13 % de la surface de la membrane plasmique des hépatocytes comprenant les faces apicales et les faces basolatérales. Les jonctions cellulaires assurent la cohésion entre les cellules. En l'absence de jonctions serrées, les hépatocytes se dépolarisent. Ces cellules forment un réseau ramifié de canalicules biliaires qui drainent la bile hors du parenchyme hépatique tout en la maintenant séparée du sang (Slim *et al.*, 2013). Les facteurs régulant la polarité des hépatocytes et leur impact potentiel sur les maladies héréditaires ont été largement étudiés (Braet &

Wisse, 2002). Cette polarité dépend d'une coordination précise entre les molécules d'adhésion cellulaire, les jonctions intercellulaires, le cytosquelette, la matrice extracellulaire et le système de trafic intracellulaire. Tout dysfonctionnement de cette polarisation peut conduire au développement de maladies hépatiques graves.

I.1.c.ii. Les cellules endothéliales sinusoïdales du foie (LSEC)

Les LSEC constituent des cellules spécialisées formant la paroi des sinusoïdes hépatiques, également appelées revêtement endothélial. Les sinusoïdes sont de petits vaisseaux sanguins qui permettent aux hépatocytes d'entrer en contact direct avec le sang. Quant aux LSEC (**Figure 3A**), elles tapissent les sinusoïdes. L'échange de substances telles que les nutriments, les toxines, les déchets métaboliques, entre le sang et les hépatocytes est rendu possible par la présence de fenêtres sans diaphragme des LSEC (**Figure 3B**). Ces fenestrations confèrent aux LSEC une perméabilité extrêmement élevée, les distinguant de la plupart des autres cellules endothéliales de l'organisme et faisant des sinusoïdes hépatiques des capillaires uniques (Braet & Wisse, 2002).

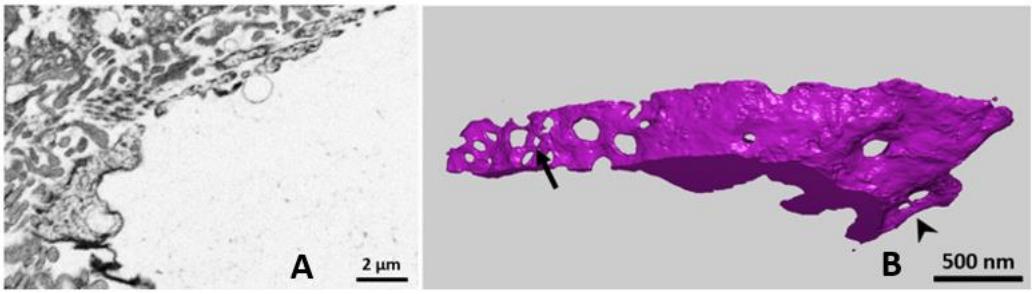


Figure 3 : Partie de la membrane de la LSEC – acquisition FIB-SEM – taille de voxel : 4 x 4 x 4 nm³. *(A) Une image parmi la pile d'images obtenues par FIB-SEM. (B) Reconstruction 3D des fenêtres des LSEC.*

La première observation des fenestrations des LSEC par microscopie électronique a été réalisée par Eddie Wisse, qui a détaillé l'ultrastructure des LSEC en 1970 (Wisse, 1970). Les membranes des LSEC du côté abluminal interagissent avec les cellules étoilées hépatiques et les hépatocytes. La fixation par perfusion du foie de souris a permis d'analyser la porosité des LSEC formée par les fenêtres, regroupées en amas ou « plaques à tamis », appelées sieve plates. Néanmoins, certaines fenêtres peuvent tout de même être réparties individuellement sur la surface endothéliale (Szafranska, Kruse, *et al.*, 2021). Concernant leur répartition, les sieve plates se situent principalement dans les zones cytoplasmiques éloignées du noyau. Les LSEC représentent 15 à 20% des cellules du foie, mais seulement 3% du volume total du foie en raison de leur épaisseur très fine. Les fenêtres représentent entre 2 et 20% de la surface des LSEC, en fonction de l'espèce et des conditions physiopathologiques. Certaines publications évoquent un gradient zonal dans la distribution des fenestrations au sein du lobule hépatique (Poisson *et al.*, 2017). Cette étude montre que, dans la région périportale, les fenêtres sont plus grandes mais moins nombreuses par *sieve plates*, tandis que dans la région centrolobulaire, elles sont plus petites mais plus nombreuses par *sieve plates*. Dans cette étude (Braet & Wisse, 2002), le diamètre des fenêtres et leur fréquence par µm² ont été comparés entre les espèces, révélant une importante variabilité.

Les petites molécules telles que les médicaments, les protéines, les lipoprotéines, et les virus peuvent traverser la barrière endothéliale par les fenêtres, perçues telle une structure de communication entre le foie et le reste de l'organisme.

Les LSEC participent activement à l'épuration du sang en assurant l'endocytose de diverses substances telles que l'albumine, les lipoprotéines, ou encore les immunoglobulines. Lorsque ces substances traversent la cellule pour être transférées de la lumière sinusoïdale vers l'espace de Disse, ce processus est désigné sous le nom de transcytose, et il constitue un mécanisme clé dans la communication entre le compartiment vasculaire et les hépatocytes. Certaines molécules, dont le diamètre est trop grand pour traverser les fenêtres, peuvent se déformer pour circuler. Ce phénomène est connu sous le nom de perméabilité sélective (Poisson *et al.*, 2017). Les membranes des LSEC possèdent une capacité endocytaire très élevée, leur permettant de capturer et de dégrader des substances qui circulent dans le sang, de nettoyer les déchets, de réguler l'immunité vasculaire et de maintenir l'homéostasie des glycoprotéines. Les LSEC éliminent les déchets grâce à leurs récepteurs scavengers, des protéines situées à leur surface, constituant un processus essentiel pour maintenir l'homéostasie hépatique et prévenir toute accumulation de substances toxiques. Comme conséquence directe, on peut mentionner la formation de plaques d'athérosclérose (Le Couteur *et al.*, 2002).
La défenestration des LSEC peut avoir plusieurs causes. L'une des premières explications tient à la durée de vie limitée de celles-ci, qui se forment et se referment naturellement avec le temps.

Les petites fenestrations dans les LSEC ne sont pas toutes visibles en même temps lorsqu'on met ces cellules en culture (Zapotoczny *et al.*, 2019). Même après 24 heures en culture, de nouvelles fenêtres peuvent encore apparaître, ce qui suggère que leur formation est un processus progressif et dynamique. La défenestration est un marqueur présent dans de nombreuses pathologies hépatiques, notamment la stéatose hépatique non alcoolique et la cirrhose. Une pathologie associée à une défénestration est la fibrose hépatique résultant d'une inflammation chronique du foie et la formation de lésions dont une accumulation de tissu conjonctif, principalement du collagène, remplace les hépatocytes. Une fibrose hépatique avancée dégénère en cirrhose, dont le tissu cicatriciel s'étend. L'activation des cellules étoilées est responsable de l'accumulation anormale de matrice extra-cellulaire (MEC) dans les tissus, amenant à la fibrose. Cette activation est directement liée à la perte de l'état de différenciation des LSEC. La défenestration est accompagnée de la formation d'une membrane basale entrainant le processus de capillarisation, cela signifie que les LSEC se transforment en capillaires conventionnels qui possèdent seulement une membrane basale. Ce mécanisme engendre la détérioration des fonctions hépatiques puisque les échanges entre le sang et les hépatocytes deviennent moins efficaces. Concernant les mécanismes de capillarisation, les LSEC sont capables de maintenir les cellules étoilées hépatiques au repos tant que les LSEC sont différenciées, pouvant être décrites comme des gardiennes de la fibrose. Un autre type de défenestration existe et est causée par l'âge, nommée « pseudocapillarisation » (Le Couteur *et al.*, 2002). Le dosage des médicaments, notamment chez les personnes âgées présentant une diminution de la porosité, doit être pris en compte pour ajuster les doses par rapport à la population jeune. La population vieillissante, qui consomme souvent cinq médicaments ou plus, est particulièrement concernée. Ces médicaments traversent l'endothélium hépatique et peuvent interagir, affectant la porosité des LSEC. Avec l'âge, l'épaisseur des LSEC augmente de 50 %, tandis que le nombre de fenêtres diminue de 50 %, et une membrane basale se forme (Le Couteur *et al.*, 2008). Il a été suggéré que la fibrose devient irréversible après la formation de cette membrane basale endothéliale. Le rôle des LSEC dans les conditions physiologiques ainsi que leur implication dans les pathologies hépatiques ont été largement décrits (Poisson *et al.*, 2017). En raison de leur implication dans de nombreuses maladies du foie, les LSEC sont considérées comme une cible thérapeutique prometteuse, car il serait possible d'agir directement sur

elles pour restaurer leur fonction, limiter leur contribution à la progression des pathologies hépatiques ou encore exploiter leurs capacités d'endocytose pour la délivrance ciblée de traitements.
Les LSEC constituent une cible pour divers agents pathogènes et toxiques. Lors d'une infection par les virus de l'hépatite B ou C, leurs membranes peuvent capturer les particules virales via des récepteurs spécifiques, contribuant ainsi à la réponse immunitaire hépatique. Par ailleurs, des facteurs non infectieux tels que la consommation excessive et chronique d'alcool altèrent également la fonction des LSEC. En effet, cette exposition modifie le diamètre des fenestrations, facilitant le passage des lipides vers l'espace de Disse et favorisant le développement de la stéatose hépatique. Des études réalisées sur des modèles animaux montrent par ailleurs qu'une consommation prolongée d'alcool entraîne une perte massive des fenestrations endothéliales (Jean-Pierre Benhamou *et al.*, 2002). En conclusion, l'altération de l'intégrité structurelle des LSEC engendre des effets délétères sur les hépatocytes et compromet la fonction hépatique, avec des conséquences pathologiques majeures.

I.1.c.ii.1 Approches microscopiques pour l'étude des fenêtres des LSEC

Microscopie électronique

La microscopie électronique permet d'atteindre une résolution beaucoup plus grande que la microscopie optique, grâce à la longueur d'onde beaucoup plus courte des électrons. Elle constitue ainsi une méthode privilégiée pour l'étude des structures de taille comprise entre 50 et 200 nm, comme les fenêtres des LSEC. Par microscopie électronique à balayage (SEM), les fenêtres mesurent entre 150 et 175 nm de diamètre, avec une densité allant de 9 à 13 fenestrations par μm^2 (Zapotoczny *et al.*, 2019).

Lors de la préparation des échantillons (Wisse, 1970), certaines étapes comme la fixation et la déshydratation peuvent provoquer des artefacts, notamment un rétrécissement des tissus et des modifications de leur structure. Toute ouverture supérieure à 250 nm dans le cytoplasme des LSEC est assimilée à un artefact pouvant mettre en lumière une mauvaise perfusion ou fixation, ou bien révéler dans certains cas des maladies, de la toxicité (Cogger *et al.*, 2015).

Microscopie à illumination structurée (SIM)

La technique SIM a été utilisée pour observer les fenêtres des LSEC, aussi bien dans des cellules fixées que vivantes (Øie *et al.*, 2018). Les sieve plates sont délimitées par des microtubules, tandis que chaque fenestration est bordée de filaments d'actine (Poisson *et al.*, 2017). En utilisant la technique SIM en trois dimensions (3D-SIM) sur des cellules fixées marquées au CellMask Orange, un diamètre moyen de 123 ± 24 nm a été mesuré pour ces fenêtres et varie entre 69 et 171 nm avec une distribution à peu près normale, similaire aux tailles et structures obtenues par des études de microscopie électronique à balayage (Cogger *et al.*, 2010). La technique SIM présente l'avantage d'approcher la résolution du SEM. La microscopie de fluorescence à super résolution aussi appelée nanoscopie optique, est également présentée comme une technique avancée pour l'étude des fenêtres des LSEC (Øie *et al.*, 2018).

Microscopie à force atomique (AFM)

Le diamètre des fenêtres des cellules vivantes a été mesuré par **AFM** (Zapotoczny *et al.*, 2019)**.** Cette approche a permis le suivi en temps réel de la position, la taille et le nombre de fenêtres sur des « sieve

plates » in vitro. La taille moyenne des fenêtres des LSEC vivantes déterminée par AFM est d'environ 180 nm, tandis que sur cellules fixées la valeur du diamètre moyen est de 143 nm.

Méthodes mesures quantitatives

La porosité, définie comme le pourcentage de la surface de la LSEC recouverte par les fenêtres, est un paramètre qui peut être calculé. Pour comparer les mesures quantitatives entre les expériences, il est nécessaire d'utiliser des paramètres proches tels que la même technique d'acquisition et la même méthode de mesure. L'impact de la méthode de segmentation qu'elle soit manuelle, semi-automatique ou automatique a été analysé en détail dans les travaux de Szafranska (Szafranska, Holte, *et al.*, 2021). La méthode manuelle repose sur l'approximation que les fenêtres soient circulaires et la méthode reste tout de même très chronophage et manuelle, mais aussi sujette à des variations selon l'utilisateur introduisant des biais. Avec les approches automatisées, la qualité des images devient déterminante. Il faut limiter les artefacts et standardiser le contraste et la luminosité. Ces méthodes utilisent souvent l'apprentissage supervisé, basé sur des annotations manuelles utilisées pour référence. Si les annotations sont précises, ce type d'apprentissage permet une segmentation performante y compris sur des structures complexes et bruitées. Pour minimiser les biais liés à l'annotation, cinq chercheurs indépendants ont été impliqués dans l'évaluation (Szafranska, Holte, *et al.*, 2021). Les méthodes semi-automatiques ou automatiques modélisent chaque fenêtre comme un objet aux contours définis. À partir de là, des outils comme le plugin "Analyze Particles" sous Fiji permettent d'extraire automatiquement des données telles que l'aire ou le diamètre. Enfin, la puissance de calcul de l'ordinateur influence directement la vitesse d'exécution du traitement.

I.1.c.iii. Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer résident au sein de la lumière du sinusoïde et constituent les macrophages hépatiques.

Ces cellules jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie hépatique et assurent une fonction immunitaire clé dans la défense du foie. Les cellules de Kupffer et les lymphocytes résidents sont positionnés sur la face luminale de la paroi des sinusoïdes. De par leur localisation, elles ont un rôle pour filtrer le sang provenant du tube digestif. Les fonctions principales sont la phagocytose qui permet d'éliminer les débris cellulaires, la détoxification en éliminant les agents pathogènes et les toxines, la régulation de l'inflammation notamment la régulation des réponses immunitaires locales au niveau des lésions tissulaires, ou encore le métabolisme des lipides et du fer (Jean-Pierre Benhamou *et al.*, 2002). Les cellules de Kupffer vont nettoyer le tissu des cellules sanguines vieillies, des débris cellulaires, des parasites, virus, bactéries ou cellules tumorales. Dans l'étude d'E. Wisse, l'analyse de la structure des cellules de Kupffer dans le foie de rat sain a été réalisée par TEM (Wisse, 1970). Les LSEC possèdent des fenêtres et une matrice extracellulaire spécialisée qui favorisent l'interaction avec les macrophages, adaptés pour s'ancrer à cette surface unique et poreuse. Les LSEC filtrent le sang et présentent des antigènes aux cellules de Kupffer. Cette proximité optimise leur fonction immunitaire, permettant une reconnaissance rapide des pathogènes, des toxines ou des débris cellulaires.

I.1.c.iv. Les cellules stellaires

Les cellules stellaires jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme hépatique. Ces cellules interviennent activement dans les processus de réparation tissulaire, notamment lors de pathologies comme la fibrose hépatique. Elles se situent dans l'espace périsinusoïdal, aussi appelé espace de Disse,

entre les sinusoïdes et les hépatocytes, où elles réagissent aux signaux provenant de leur microenvironnement cellulaire (Øie *et al.*, 2018). Lorsqu'une cellule étoilée stocke des lipides, elle s'étend dans la lumière sinusoïdale (Le Couteur *et al.*, 2008). L'aspect gonflé des cellules stellaires témoigne de leur richesse en gouttelettes lipidiques contenant de la vitamine A (Jean-Pierre Benhamou *et al.*, 2002). Dans cet état, elles sont dites quiescentes ou non activées. In vivo, l'activation des cellules étoilées entraîne un dépôt excessif de matrice extracellulaire, particulièrement marqué dans les zones où les conditions sont favorables à la formation de fibres de collagène. Cet excès conduit à l'apparition de tissu fibreux dans le foie et participe au développement de la fibrose hépatique. Lors d'une inflammation, les cellules de Kupffer s'activent et libèrent divers médiateurs, tels que des cytokines et des facteurs de croissance, dont le Transforming Growth Factor Beta (TGF-β), qui régulent la réponse immunitaire et orientent les processus de régénération ou de fibrose.
La capacité des cellules étoilées à stocker la vitamine A est déterminante dans leur fonction : en cas de lésion hépatique ou de fibrose, elles s'activent et perdent progressivement leurs réserves lipidiques (Poisson *et al.*, 2017). Une fois activées, elles se différencient en myofibroblastes, responsables de la production massive de matrice extracellulaire.

I.2. Influence de la cytokine BMP9 sur l'ultrastructure du foie

La protéine morphogénétique osseuse 9 (Bone Morphogenetic Protein 9 - BMP9), également connue sous le nom de Growth and Differentiation Factor 2 (GDF2), est une cytokine autocrine et paracrine impliquée dans le maintien de la stabilité vasculaire et la régulation de divers processus physiologiques. Cette protéine est sécrétée par les cellules étoilées hépatiques, et joue un rôle clé dans le maintien de la quiescence vasculaire, c'est-à-dire l'état stable et non prolifératif des vaisseaux sanguins. BMP9 circule dans le sang principalement sous la forme d'un hétérodimère BMP9 -BMP10 (Desroches-Castan *et al.*, 2019) et (Desroches-Castan *et al.*, 2019).
Les BMPs transmettent leur signal en se liant à des récepteurs membranaires de type activin receptor-like kinase (ALK), en particulier le récepteur ALK1, exprimé sur les cellules endothéliales. A l'aide d'un modèle de souris dont le gène codant la protéine BMP9 a été délété, Desroches-Castan et al ont montré que la différenciation terminale et les fonctions des LSEC sont altérées (Desroches-Castan *et al.*, 2019). Dans cette étude, l'invalidation du gène BMP9 chez les souris de fond génétique 129/Ola entraîne une fibrose hépatique spontanée, mettant en évidence le rôle central de BMP9 dans l'homéostasie du foie. Le premier événement précédant la fibrose hépatique est la capillarisation des sinusoïdes, caractérisée par l'absence de différenciation des LSEC, la perte de fenêtres et la formation d'une membrane basale dans l'espace de Disse. L'étude conclut que BMP9 est un régulateur clé de la différenciation terminale des LSEC et joue un rôle essentiel dans l'équilibre homéostatique hépatique. Ainsi, l'invalidation génétique de BMP9 déclenche une cascade d'événements menant à la fibrose hépatique :

1. Altération précoce des fenêtres des LSEC : perte des fenêtres dès 2 semaines d'âge.
2. Dilatation sinusoïdale progressive : apparition dès 20 semaines et s'accentue à 25 semaines.
3. Développement de la fibrose et de l'inflammation : fibrose périsinusoïdale s'installe dès 15 semaines, accompagnée d'une activation des cellules stellaires hépatiques indiquant une réponse inflammatoire.

En revanche, la délétion du gène codant pour la protéine BMP9 chez les souris de fond génétique C57BL/6 n'induit ni fibrose spontanée ni capillarisation marquée, ce qui pourrait s'expliquer par un état basal plus capillarisé des LSEC dans cette souche. Dans la circulation sanguine, des niveaux plus

bas de BMP9 sont également observés chez la souris C57BL/6 et l'absence de BMP9 dans la souche C57BL/6 n'affecte pas l'état de différenciation des cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques.
L'analyse en SEM sur des tissus hépatiques de souris sauvage de 26 semaines a montré que les fenêtres sont organisées en sieve plates, alors qu'elles sont très rares chez les souris BMP9-KO. L'analyse quantitative révèle que le nombre moyen de fenêtres par unité de surface est de 6/µm² dans les foies de souris sauvages, contre seulement 1,5/µm² chez les BMP9-KO. Concernant les sieve plates, elles contiennent 20-30 fenêtres chez les souris WT, mais leur nombre est divisé par deux chez les souris BMP9-KO.
L'absence de BMP9 conduit à une réduction significative de l'expression du gène GATA4, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des LSEC. L'expression de GATA4 est fortement réduite chez les souris BMP9-KO 129/Ola par rapport aux souris sauvages, pouvant expliquer la perte de fenêtres et la capillarisation des LSEC. Chez les souris 129/Ola, la délétion de BMP9 conduit à une mortalité prématurée avec une perte de poids significative de 10 à 20%.

II. Imagerie volumique

II.1. Microscopie électronique volumique

La microscopie électronique volumique (vEM) s'impose depuis le début des années 2000 comme un outil majeur pour l'étude volumique de l'ultrastructure cellulaire et tissulaire, soutenue par une communauté scientifique en expansion (Collinson *et al.*, 2023). Plus récemment, *Nature* a désigné la vEM parmi les « sept technologies à suivre » en 2023, confirmant son rôle stratégique dans l'exploration multi-échelle du vivant (Higginbotham, 2023).

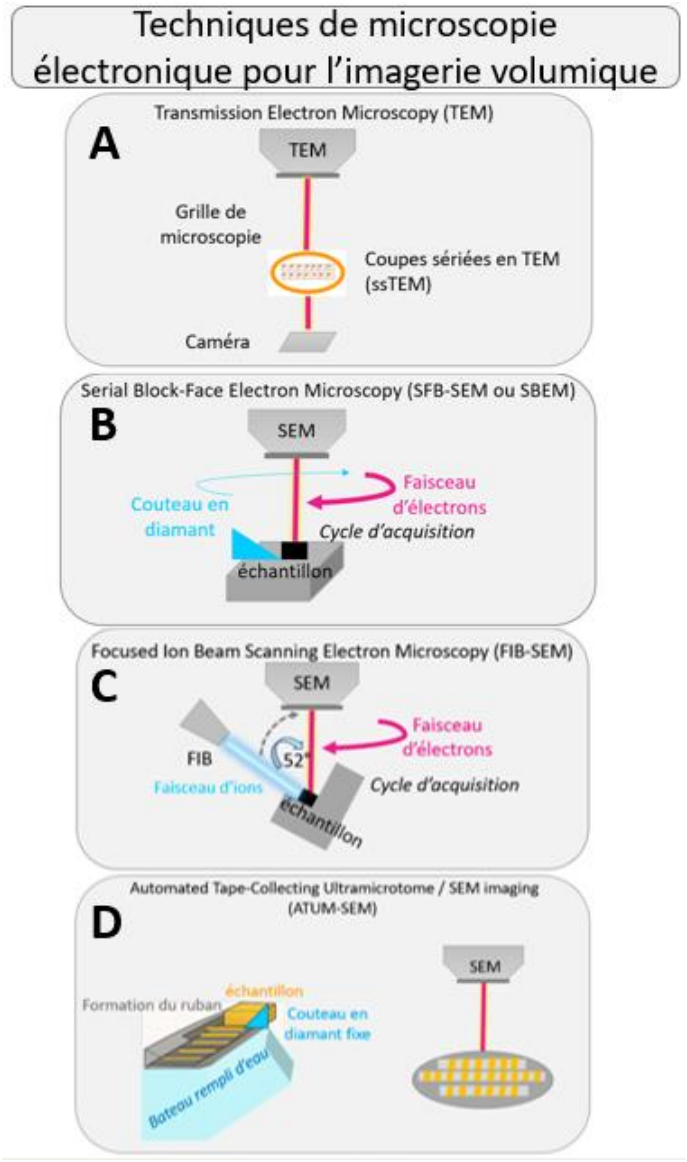


Figure 4 : Techniques de microscopie électronique pour l'imagerie volumique. *(A) TEM sérié. (B) SBF-SEM. (C) FIB-SEM. (D) ATUM-SEM.*

La vEM regroupe un ensemble de techniques de microscopie permettant de reconstruire des volumes en 3D à partir d'une série d'images 2D (**Figure 4**). Ces images peuvent être obtenues par microscopie électronique en transmission (TEM) ou par microscopie électronique à balayage (SEM) appliquée à de fines sections séquentielles de l'échantillon, une approche connue sous le nom d'Array Tomography

(AT). Une autre technique consiste à exposer progressivement la face du bloc d'échantillon à l'aide d'un couteau en diamant Serial Block Face – Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) ou d'un faisceau d'ions focalisé Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) (McCafferty *et al.*, 2024). Les différentes techniques de microscopie électronique volumique sont illustrées de manière schématique sur la **Figure 4**. Chacune de ces techniques possède des avantages et des inconvénients présentées dans cet article (Titze & Genoud, 2016). Parmi les critères susceptibles d'influencer le choix figurent la disponibilité et le bon état de fonctionnement des instruments, ainsi que les caractéristiques de la région d'intérêt (ROI) (Peddie *et al.*, 2022), notamment sa taille qui détermine l'adaptation du champ de vue et la résolution requise, laquelle doit être suffisante pour assurer une visualisation précise des structures étudiées. Dans cet article (Peddie *et al.*, 2022), il est suggéré de réaliser une vérification par TEM ou par imagerie à rayons X pour évaluer la qualité de la fixation de l'échantillon inclus en résine.
On peut souligner que la résolution spatiale ne correspond pas directement à la taille du voxel, mais est généralement 2 à 3 fois plus grande (Maire & Withers, 2014). La résolution est limitée par la taille assignée à chaque pixel, elle-même définie par le rapport entre la largeur de l'échantillon et le nombre de pixels captés par le détecteur.

La technique TEM (**Figure 4A**) est apparue dans les années 1950 (Birch-Andersen, 1955) et permet d'atteindre des résolutions nanométriques voire sub-nanométriques. Des coupes sont réalisées à l'aide d'un couteau en diamant d'épaisseur typique de 50 à 100 nm et déposées sur une grille de support pour l'imagerie TEM.
Lorsque la préservation de l'intégrité de l'échantillon est requise pour des analyses ultérieures, les techniques fortement destructives telles que le SBF-SEM ou le FIB-SEM doivent être évitées au profit d'approches sérielles plus conservatrices, comme l'Array Tomography (AT) (Titze & Genoud, 2016). Le terme *array tomography* a été introduit pour la première fois par Stephen Smith (Micheva & Smith, 2007) et a ensuite été développé pour l'imagerie protéomique des circuits neuronaux par le même laboratoire (Micheva *et al.*, 2016). Sur la **Figure 4D**, la méthode d'AT est présentée, il s'agit d'une technique d'imagerie relativement récente (Wacker & Schroeder, 2013). Des ensembles ordonnés de sections ultrafines en série, disposées en rubans, sont déposés sur un wafer de silicium puis imagés au SEM.

Aujourd'hui, la vEM s'impose comme une technologie clé pour explorer la complexité biologique à différentes échelles, allant de l'organisation des cellules dans les tissus aux détails moléculaires des environnements cellulaires (McCafferty *et al.*, 2024). Elle a notamment permis d'étudier la migration de cellules tumorales lors de processus métastatiques, les réponses immunitaires face aux agressions extérieures et le transport des agents pathogènes dans les tissus. Dans le domaine des neurosciences, la vEM permet de cartographier des réseaux neuronaux et l'étude de la connectivité cérébrale. Par exemple, la vEM multi-échelle a été appliquée à des organismes modèles comme *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* (Witvliet *et al.,* 2021) (Peddie *et al.*, 2022) pour reconstruire leurs circuits neuronaux avec une résolution synaptique. Le serial section TEM (ssTEM) permet d'obtenir des images de structures neuronales en haute résolution, tandis que l'AT est utilisé pour suivre l'évolution des connectomes et la complexité des connexions synaptiques au cours du développement. L'imagerie neuronale connaît des avancées notables en termes de vitesse d'acquisition, autrefois perçue comme une limitation (Titze & Genoud, 2016). Par exemple, l'intégralité

du cerveau d'une mouche femelle adulte, qui contient environ 100 000 neurones (Zheng *et al.*, 2018), a été imagée avec une résolution nanométrique permettant de distinguer les synapses.

II.1.a. Préparation des échantillons pour la vEM

Il est essentiel, en amont, d'optimiser la préparation de l'échantillon afin de garantir sa compatibilité avec le vide et les conditions du faisceau d'électrons (courant et tension), tout en assurant une conductivité et une rigidité adéquates. La préparation doit également permettre de faire ressortir suffisamment les contrastes et de préserver l'échantillon dans un état proche de celui in vivo, notamment pour permettre une découpe précise en sections.
Dans les techniques de microscopie électronique, l'interaction des électrons avec l'échantillon est fondamentale pour générer des images et obtenir des informations structurales. En SEM, l'imagerie repose principalement sur les électrons secondaires et rétrodiffusés : le faisceau d'électrons primaires interagit avec la surface de l'échantillon, provoquant l'émission d'électrons secondaires dont l'énergie est faible, de l'ordre de quelques eV.

Préparation chimique de l'échantillon :

Après dissection, le tissu subit plusieurs étapes pour préserver son ultrastructure (Titze & Genoud, 2016) :

- **Fixation :** 1) fixation chimique avec un mélange de 2 à 4 % paraformaldéhyde (fixateur) et de 1 à 4 % de glutaraldéhyde (fixateur).
- **Coloration :** métaux lourds tels que l'osmium, le plomb, l'uranium (agents de contraste). La coloration est essentielle pour un contraste pour l'imagerie SEM, notamment le contraste des membranes biologiques, et améliore la conductivité de l'échantillon tout en diminuant les effets de charge. La particularité de la microscopie électronique est de fonctionner sous vide, ce qui impose l'élimination complète de l'eau dans le tissu biologique par un processus de déshydratation. Les exigences varient selon la méthode de microscopie électronique volumique employée : en TEM, un contraste élevé est nécessaire pour visualiser les structures internes grâce à la différence d'absorption des électrons, tandis qu'en FIB-SEM, le contraste chimique est produit principalement par les électrons rétrodiffusés et dépend de la composition atomique de l'échantillon. Un avantage du FIB-SEM réside dans sa capacité à compenser les charges négatives induites par le faisceau d'électrons, grâce à l'exposition de la surface de l'échantillon aux ions positifs issus du faisceau d'ions (Ronchi *et al.*, 2021).

Après les étapes de fixation et de coloration en bloc aux métaux lourds, l'échantillon est déshydraté, infiltré puis enrobé dans une résine époxy et polymérisée. Ce n'est qu'ensuite que le bloc de résine est taillé (souvent en pyramide) : il peut alors être utilisé pour l'imagerie block-face en SBF-SEM ou FIB-SEM, ou être sectionné en série à l'ultramicrotome pour l'Array Tomography (AT). Concernant le SBF-SEM, les échantillons peuvent être colorés suivant le protocole rOTO (réduction d'osmium – thiocarbohydrazide – osmium). Ce protocole présente l'avantage d'améliorer le contraste des membranes cellulaires, d'augmenter la conductivité et de réduire les artefacts liés aux charges électrostatiques et permet une bonne préservation de l'échantillon.

II.1.b. Array Tomography (AT)

Avec la technique **AT**, l'échantillon enrobé dans la résine est sectionné à l'aide d'un ultramicrotome en coupes successives sous la forme d'un ruban (**Figure 4D**). Les coupes ont alors une épaisseur minimale de 30 nm ce qui permet d'atteindre une taille minimale de voxel de ~ 3 x 3 x 30 nm^3. Lors de la découpe des sections (Burel *et al.*, 2018), celles-ci sont transférées sur un support solide, comme une lame de verre ou un wafer de silicium, facilitant leur analyse ultérieure, en général par SEM ((Micheva & Smith, 2007);Wacker & Schroeder, 2013)). Au SEM, les images acquises en mode rétrodiffusé offrent un contraste élevé grâce à une coloration aux métaux lourds, généralement au tétroxyde d'osmium (OsO_4), afin d'accentuer la visibilité des membranes lipidiques. L'assemblage en forme de ruban peut aussi être visualisé en amont par microscopie optique pour l'analyse de tissus marqués par des protéines fluorescentes (Wacker & Schroeder, 2013), (Micheva & Smith, 2007). Une approche optimisée est proposée dans cette étude (Burel *et al.*, 2018) pour l'analyse volumique en série d'échantillons asymétriques sur des organismes modèles dans le domaine de la neuroscience et de la connectomique via l'AT. L'imagerie des circuits neuronaux contenant des architectures complexes de circuits et de synapses, est présentée dans cette publication (Micheva & Smith, 2007).

La technique **ATUM-SEM** permet de réaliser des coupes ultrafines d'échantillons biologiques à l'aide d'un ultramicrotome avec collecte des coupes sous forme de ruban. Cette bande est ensuite découpée manuellement, puis transférée sur des wafers avant d'être insérée dans le SEM pour l'imagerie. Contrairement aux méthodes SBF-SEM/FIB-SEM, où les distorsions et décalages entre les coupes sont relativement limités, l'ATUM-SEM présente ce défi supplémentaire (Titze & Genoud, 2016). En effet, cette technique implique la collecte des tranches sur un support externe, ce qui peut introduire des variations nécessitant l'utilisation d'algorithmes davantage sophistiqués pour assurer un assemblage et un alignement précis des images successives.

II.1.c. SBF-SEM

La technique **SBF-SEM** (**Figure 4B**) a été conceptualisée pour la première fois en 1981 par Leighton, qui a conçu un ultramicrotome miniature intégré à un SEM. La technique a ensuite été développée par Denk et Horstman en 2004 (Denk & Horstmann, 2004) avant d'être commercialisée par Gatan sous le nom de 3View (Borrett & Hughes, 2016). Le SBF-SEM utilise un couteau en diamant d'ultramicrotomie directement intégré dans la chambre du SEM (Denk & Horstmann, 2004). Le SBF-SEM (McCafferty *et al.*, 2024) constitue une méthode destructive et est recommandée dans le cadre de l'imagerie d'échantillons de grands volumes. Le SBF-SEM fonctionne en retirant successivement de fines couches de l'échantillon à l'aide du couteau diamant. Après chaque coupe, la surface exposée est imagée par un faisceau d'électrons. Le SBF-SEM ne permet pas d'obtenir une résolution isotrope, car la résolution en Z est limitée par l'épaisseur des coupes réalisées au couteau. La résolution latérale en X et Y est généralement comprise entre 5 et 10 nm, pour des coupes d'environ 25 nm d'épaisseur en Z. Une résolution latérale plus fine, jusqu'à 2 nm, est possible, mais pour des coupes plus épaisses, entre 50 et 100 nm. La largeur maximale de l'échantillon est quant à elle limitée par la largeur du couteau utilisé (Titze & Genoud, 2016).

En vEM, la technique choisie dépend de la résolution recherchée : atteindre une très haute résolution implique souvent de réduire la taille du volume d'échantillon analysé. Dans l'équipe de C. Kizilyaprak *et al.* (Kizilyaprak *et al.*, 2019), les auteurs présentent les différentes techniques de microscopie

volumique comme étant complémentaires, plutôt que concurrentes. Au SBF-SEM, l'épaisseur des sections est d'environ 25 nm, tandis qu'au FIB-SEM on peut atteindre quelques nm.
La reconstruction en 3D des structures des tissus sur plusieurs centaines de microns, tout en maintenant une résolution adéquate (Denk & Horstmann, 2004), constitue un défi majeur pour la modélisation et le suivi des structures 3D dans des tissus complexes, telles que les vésicules synaptiques, permettant ainsi l'étude de la connectivité locale des réseaux neuronaux. Dans les travaux de K. Ichimura *et al.* (Ichimura *et al.*, 2015), l'imagerie en série par SBF-SEM a révélé de nouvelles structures dans l'architecture 3D des podocytes, des structures difficiles à identifier avec le TEM ou les techniques SEM en 2D. Cette méthode est ainsi présentée comme un outil puissant pour l'analyse de l'ultrastructure des podocytes, des cellules spécialisées du glomérule rénal. La post-fixation à l'aide du tétroxyde d'osmium permet d'obtenir un bon contraste sur les organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Ichimura *et al.*, 2015). L'ultrastructure 3D d'une biopsie rénale sur des patients atteints de néphrite lupique a été obtenue par SBF-SEM. Un volume de 3700 μm^3 a été acquis, et la segmentation a permis de révéler que la membrane basale glomérulaire est perturbée. Il est rapporté que 182 cellules tumorales et 113 noyaux ont été segmentées dans le volume total analysé par une approche semi-automatique (Peddie *et al.*, 2022).

Dans une étude appliquée au tissu hépatique de souris, le SBF-SEM a permis d'acquérir de grands volumes d'échantillons avec une résolution inégalée dans les trois dimensions (Shami *et al.*, 2016). Cette technique permet une reconstruction automatique sur des échantillons inclus en résine, avec une profondeur pouvant atteindre 600 µm. Les données morphométriques obtenues ont permis de caractériser les cellules du parenchyme hépatique, en particulier les sinusoïdes et les canalicules biliaires. Les reconstructions 3D ont montré que les cellules parenchymateuses présentent une morphologie polyédrique allongée. Leur diamètre moyen est de 27,3 ± 6,8 µm et elles représentent 80,6 % du volume total du tissu hépatique (Shami *et al.*, 2016).

Si la technique SBF-SEM est particulièrement adaptée à l'imagerie de grands volumes, le FIB-SEM se distingue par sa capacité à fournir une résolution isotrope plus fine, permettant ainsi une analyse plus détaillée de structures subcellulaires.

II.1.d. FIB-SEM

La technique **FIB-SEM** se distingue par sa résolution supérieure en Z, offrant des voxels isotropes jusqu'à 3 × 3 × 3 nm^3 (**Figure 4C**).
Le microscope FIB-SEM associe un faisceau focalisé d'ions gallium à haute énergie utilisé pour l'ablation, à un faisceau d'électrons dédié à l'imagerie SEM. L'appareil comprend principalement une chambre à vide, une colonne ionique pour focaliser le faisceau d'ions, ainsi qu'une colonne électronique. Des dépôts de platine et carbone, assistés par le faisceau ionique, sont utilisés pour améliorer la conductivité électrique des surfaces de l'échantillon. Après chaque cycle de fraisage, la surface de l'échantillon exposée par le faisceau d'ions gallium est ensuite imagée par le faisceau d'électrons. Pour illustrer, avec une taille de voxel de 5 x 5 x 5 nm^3, on peut acquérir un volume de l'ordre de 10 x 10 x 10 μm^3 en approximativement deux jours. Le FIB-SEM est une technique en microscopie décrite comme optimale lorsque le volume d'intérêt a une taille limitée de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres de côté. L'imagerie de grands volumes, notamment en neurosciences, sur la reconstruction automatique des connectomes (Hayworth *et al.*,

2015), peut être réalisée avec la technique FIB-SEM. Toutefois, la réalisation de tels travaux nécessite l'accès à plusieurs FIB-SEM.
Avant une acquisition par FIB-SEM (**Figure 4C**), une couche protectrice de 1 µm de carbone ou de platine est déposée sur l'échantillon. Lors de la préparation de l'échantillon, l'étape de congélation à haute pression limite la hauteur de l'échantillon en raison des dimensions de la cupule. L'étape de congélation à haute pression offre une préservation très fine et profonde des tissus (Sosinsky et al., 2008). Cette approche est particulièrement avantageuse pour analyser des volumes importants ou pour localiser une région d'intérêt (ROI) peu fréquente.

La colonne FIB est intégrée à un SEM, inclinée entre 52 et 55 degrés par rapport à l'axe de la colonne d'électrons (Kizilyaprak *et al.*, 2014). Le phénomène de pulvérisation ionique, ou *sputtering*, survient lorsque des ions bombardent la surface de l'échantillon, expulsant les atomes de la couche superficielle par effet de collision. L'utilisation d'un faisceau ionique peut donner lieu à certaines limitations. Parmi elles, on retrouve un artefact connu sous le nom de « curtaining », qui se manifeste par des stries parallèles ou des ondulations sur la surface usinée. Ce phénomène peut altérer l'homogénéité de la surface, compromettant ainsi l'analyse et l'interprétation des images. Le *curtaining* est particulièrement prononcé à courant ionique élevé. Par ailleurs, la redéposition du matériau sur la surface de l'échantillon constitue un inconvénient notable, susceptible de masquer partiellement les zones d'intérêt dans l'image.

La technique FIB-SEM est particulièrement recommandée pour l'acquisition de petits volumes avec une résolution élevée et isotrope. En revanche, la technique SBF-SEM permet d'imager des volumes plus grands, mais avec une résolution inférieure à celle du FIB-SEM, tout en conservant de bonnes performances pour l'observation de structures volumineuses avec une résolution satisfaisante. Toutefois, le FIB-SEM se distingue par sa capacité à réaliser des coupes très précises et localisées. Il est également plus rapide et plus fiable pour les sessions d'imagerie longues. Cela soulève cependant la question du stockage des données générées. Le plasma FIB (PFIB), quant à lui, offre une ablation rapide sur de grands volumes (Berger *et al.*, 2023).

II.2. Tomographie à rayons X

Le principal intérêt de la tomographie à rayons X (Rawson *et al.*, 2020) est qu'elle offre un mode d'imagerie non invasif à plusieurs échelles. Une stratégie efficace consiste à localiser dans un premier temps à l'aide d'une imagerie à basse résolution, offrant un large champ de vue. Une fois la zone d'intérêt repérée, une imagerie à haute résolution peut être appliquée de manière ciblée sur la région sélectionnée. Cette technique consiste à acquérir des projections de rayons X sous différents angles autour de l'échantillon (Rawson *et al.*, 2020). Leur combinaison permet de reconstruire une image tridimensionnelle de l'objet analysé, chaque voxel étant associé à un niveau de gris proportionnel à la capacité d'atténuation du matériau traversé.

La tomographie à rayons X a fait ses preuves dans le diagnostic de l'ostéoporose, où des mesures densitométriques permettent d'évaluer la densité minérale osseuse (Genant *et al.*, 1987). Couramment employée pour l'analyse quantitative des minéraux osseux, elle sert à étudier les modifications du squelette liées à l'ostéoporose et à d'autres maladies métaboliques osseuses.

L'absorption des rayons X par un matériau augmente généralement avec le numéro atomique des éléments qui le composent : plus ce numéro est élevé, plus l'absorption est importante. Elle dépend également de l'énergie des rayons X et de la densité du matériau.

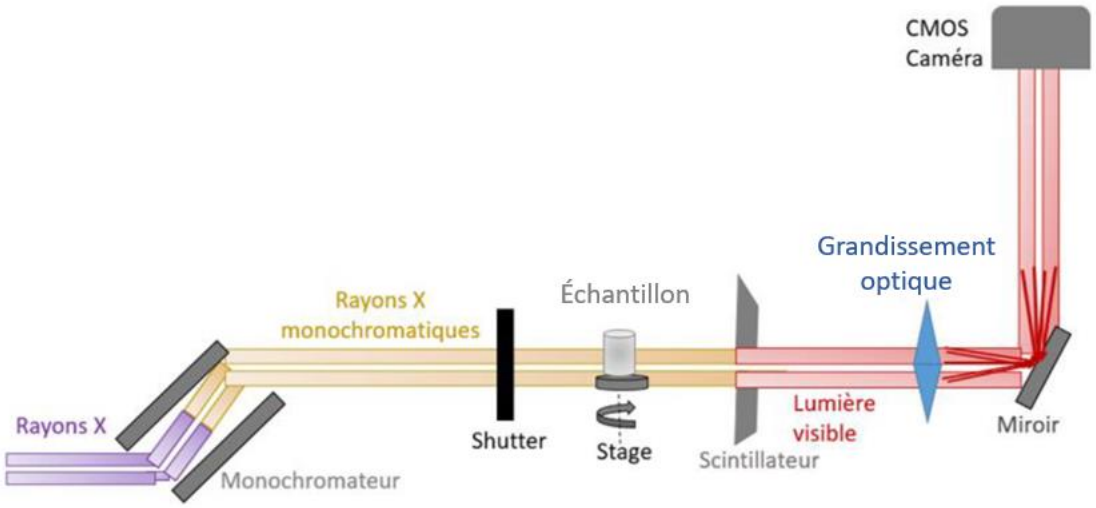


Figure 5 : Schéma de principe d'un tomographe à rayons X.

La **Figure 5** illustre le système expérimental de tomographie à rayons X. Un faisceau de rayons X, produit par l'accélération d'électrons émis par un filament chauffé vers une cible métallique (généralement du tungstène), est dévié par des aimants, générant des rayons X brillants, cohérents et directionnels, de bien meilleure intensité que ceux d'un tube à rayons X classique (Rudolph-Schöpping *et al.*, 2024). Les rayons X passent ensuite dans un monochromateur (Ströh *et al.*, 2022) pour obtenir un faisceau monochromatique. L'obturateur, lorsqu'il est ouvert, laisse le faisceau atteindre l'échantillon, placé sur un porte-échantillon effectuant une rotation de 360° pour permettre l'acquisition complète. Les rayons X transmis sont convertis en lumière visible par un scintillateur, amplifiée par le grandissement optique, puis transformée en signaux électriques par le détecteur CMOS pour produire des images numériques. Ce schéma (**Figure 5**) concerne une ligne de faisceau au synchrotron capables de produire des rayons X monochromatiques. En revanche, la tomographie à rayons X de laboratoire (µCT) utilise des rayons polychromatiques.
Pour comprendre les limites et les potentialités de l'imagerie par rayons X sur les tissus biologiques, il est utile de rappeler quelques principes fondamentaux. Les rayons X durs (Rawson *et al.*, 2020) sont moins absorbés par les tissus biologiques, tandis que les rayons X mous, de basse énergie et de longueur d'onde plus longue, sont davantage absorbés. La tomographie à rayons X est aujourd'hui décrite comme un outil tourné vers l'analyse quantitative (Maire & Withers, 2014). À l'origine, cette technique était principalement utilisée pour l'acquisition d'images 3D à des fins de diagnostic médical, mais elle s'est progressivement étendue à des applications de recherche pour caractériser la microstructure de différents tissus.

Les auteurs de cet article (Khulbe & Matsuura, 2021) présentent la tomographie à rayons X comme suit : « *une méthode de caractérisation idéale devrait être non destructive, précise, répétable et rapide* ». Le système synchrotron répond particulièrement bien à ces critères, grâce à la qualité de son faisceau et à sa cohérence élevée. Le système synchrotron offre un faisceau parallèle à haute cohérence, permettant une résolution très élevée, supérieure à celle d'une tomographie à rayons X de

laboratoire. En laboratoire, la tomographie à rayons X utilise généralement un faisceau conique et repose sur l'absorption des rayons X par les matériaux, produisant des images 3D polychromatiques basées sur les différences de densité.

À ce jour, la nanotomographie à rayons X à haute résolution (avec une résolution inférieure à ~50 nm) nécessite souvent une source de rayons X très brillante et cohérente, comme un synchrotron (Pacureanu *et al.,* 2025). Grâce à la tomographie à rayons X au synchrotron, il est désormais possible d'obtenir des images avec une taille de voxel allant jusqu'à 25 x 25 x 25 nm^3 avec un temps d'acquisition extrêmement rapide d'une dizaine de minutes.

Tomographie par contraste de phase :
Ce type de tomographie, appelé tomographie par contraste de phase, est principalement utilisé au synchrotron. L'imagerie repose à la fois sur l'intensité des rayons X traversant l'échantillon et sur les modifications de phase de ces rayons. Elle est influencée par la distance entre l'échantillon et le détecteur, et les différences de phase à l'intérieur de l'échantillon génèrent des franges de propagation autour des contours, appelées effets de bord, qui permettent de récupérer la phase.
Dans ces travaux (Disney *et al.*, 2019), la tomographie par contraste de phase a permis de visualiser pour la première fois la déformation microstructurale en 3D d'un disque intervertébral intact. Les auteurs soulignent que les douleurs lombaires peuvent être associées à la dégénérescence du disque. Ainsi, la caractérisation de la microstructure 3D du disque permettrait de mieux comprendre cette dégénérescence et de développer de nouveaux traitements. Dans cette étude, l'imagerie a été réalisée sur des segments de colonne lombaire de rat ex vivo, mais conservés in situ, c'est-à-dire dans leur configuration anatomique naturelle, tout en étant soumis à une compression simulant les contraintes physiologiques.

II.3. Microscopie corrélative

Les techniques de microscopie corrélative permettent d'obtenir une vision intégrée et multi-échelle des tissus biologiques et ces approches sont applicables dans de nombreux contextes biologiques. Plusieurs méthodes peuvent être combinées pour fournir une analyse complète. La microscopie optique constitue souvent une première étape : grâce à des marqueurs fluorescents, elle permet d'identifier rapidement des zones d'intérêt. L'utilisation de microscopes confocaux ou de microscopes multiphotoniques permet également d'acquérir des images tridimensionnelles en empilant les coupes optiques. D'autre part, la tomographie à rayons X permet de reconstruire en 3D l'architecture globale d'une région du tissu, sans détruire l'échantillon. En microscopie électronique, plusieurs techniques peuvent être combinées de manière corrélative. La technique SBF-SEM permet l'acquisition de grands volumes en 3D, donnant une vue contextuelle de l'organisation cellulaire, tandis que la technique FIB-SEM fournit une résolution beaucoup plus élevée sur un volume plus restreint, ce qui permet d'analyser avec précision l'ultrastructure dans une région d'intérêt localisée par SBF-SEM.

Quelques exemples en biologie sont présentés ci-dessous pour illustrer les applications de la microscopie corrélative.

La difficulté d'acquérir des événements rares dans l'échantillon avec la microscopie électronique reste un défi, c'est pourquoi de nombreuses approches de microscopie corrélative ont été développées. Dans l'étude de A. Karreman *et al.* (Karreman *et al.*, 2015), une combinaison de techniques a révélé

des cellules tumorales uniques dans la vascularisation du cortex cérébral et dans des tumeurs sous-cutanées. En connaissant la distance entre la surface du bloc et la position de la cellule tumorale par tomographie à rayons X, un découpage précis a été réalisé pour atteindre cette région d'intérêt (ROI) par FIB-SEM. L'échantillon de départ inclus dans la résine a une épaisseur d'environ 1 millimètre. Comme le FIB-SEM ne peut pas atteindre une ROI en profondeur dans la résine, le flanc du bloc a été taillé perpendiculairement au faisceau FIB, à environ 20 µm de la cellule tumorale d'intérêt.

L'équipe de E. Bushong (Bushong *et al.*, 2015) a utilisé la corrélation de la tomographie à rayons X avec le SBF-SEM. Il est courant d'imager un volume plus large afin de s'assurer que la ROI soit bien incluse, toutefois, cela se traduit par un temps d'acquisition accru, voire parfois une qualité d'image compromise lorsque la résolution est réduite. Dans ce contexte, la tomographie à rayons X est utilisée pour localiser précisément les ROIs, cette technique permettant d'obtenir des informations structurales détaillées sur l'échantillon, tout en étant compatible avec le protocole de préparation destiné au SBF-SEM.

La combinaison de la tomographie à rayons X et de la microscopie électronique, en particulier le FIB-SEM, a également permis d'étudier l'enthèse fibrocartilagineuse du tendon d'Achille chez la souris dans différents contextes biologiques (Buss *et al.*, 2025). Les souris possédant la mutation du gène PHEX présentent un retard dans le développement de la minéralisation fibrocartilagineuse.

D'autre part, une approche d'imagerie combinant la tomographie en série AT et la tomographie FIB-SEM est utilisée pour l'analyse de l'ultrastructure des chondrocytes, cellules principales du cartilage qui comportent de fins prolongements dendritiques, de longueur environ 300 nm et de largeur 30 nm (Hirashima *et al.*, 2022).

L'approche multidimensionnelle appelée CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy) associe la microscopie photonique et la microscopie électronique. Dans cet article (Shami *et al.*, 2016), l'imagerie par SBF-SEM permet d'obtenir des données morphométriques à grande échelle sur les cellules parenchymateuses (**Figure 6**), les sinusoïdes et les canalicules biliaires chez la souris. L'intégration de la microscopie confocale a facilité l'étude du tissu hépatique. Dans cette approche, la microscopie confocale a permis de visualiser en fluorescence le réseau d'actine, les noyaux des hépatocytes, les cellules sinusoïdales (marqueurs spécifiques) et les gouttelettes lipidiques afin de cartographier le tissu hépatique avant l'imagerie électronique. Pour l'analyse ultrastructurale du tissu, la veine centrale a été utilisée comme repère. Afin de s'assurer qu'il s'agissait bien de la veine centrale et non d'un gros vaisseau sanguin, l'imagerie par micro-CT a été employée pour localiser cette ROI. Une fois celle-ci identifiée, l'imagerie par SBF-SEM a pu être réalisée. Sur la **Figure 6** issue de l'article (Shami *et al.*, 2016), la reconstruction 3D des principales structures tissulaires de la microarchitecture hépatique est réalisée. On y distingue deux cellules parenchymateuses adjacentes, le réseau de canalicules biliaires, et les sinusoïdes hépatiques.

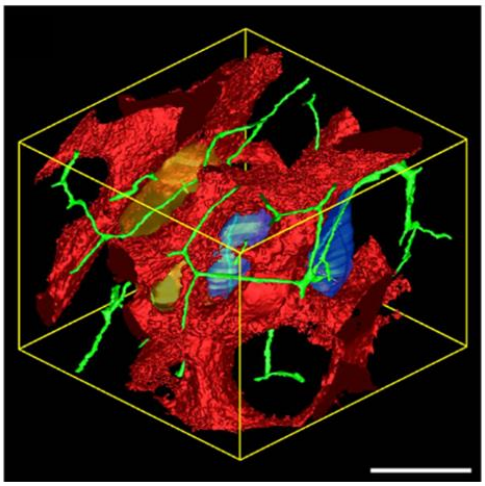


Figure 6 : Reconstruction 3D des principales structures tissulaires de la microarchitecture hépatique. *Volume 3D reconstruit composé de 610 images consécutives, Taille de voxel binée = 78 nm³. Deux cellules parenchymateuses adjacentes (en or et en bleu). Réseau des canalicules biliaires (en vert). Sinusoïdes hépatiques (en rouge). Barre d'échelle = 20 µm. Issus de (Shami et al., 2016).*

Cet article (Helmstaedter & Mitra, 2012) présente la reconstruction de 950 neurones et de leurs connexions, réalisée par SBF-SEM, ce qui peut nécessiter plusieurs mois pour générer des volumes de données à une échelle et une résolution suffisante pour analyser la connectivité neuronale.
À titre d'illustration, l'imagerie d'un cerveau de souris réalisée en microscopie optique génère un téraoctet de données, tandis que l'emploi de la microscopie électronique pour analyser un échantillon de 1 mm³ de cerveau produit environ un demi-pétaoctet de données, soit 500 téraoctets. L'utilisation de la microscopie électronique implique une gestion efficace et un stockage adapté des données. Ce sont des éléments clés pour assurer l'exploitation optimale des résultats obtenus (Helmstaedter & Mitra, 2012).

III. Analyse d'images

III.1. Analyse d'images par Machine Learning : de la classification à la segmentation

L'intelligence artificielle (IA) contribue à la réalisation de tâches habituellement effectuées par l'intelligence humaine. Elle s'avère particulièrement utile pour traiter des problèmes complexes, notamment dans le cadre de projets d'analyse d'images (Royer, 2023). Dans sa définition la plus commune, l'intelligence artificielle contient l'ensemble des techniques permettant à une machine d'imiter ou de reproduire certaines capacités de l'intelligence humaine. Elle englobe le machine learning (apprentissage automatique), qui consiste à permettre aux systèmes d'apprendre automatiquement à partir de données sans être explicitement programmés. À son tour, le machine learning comprend le deep learning (apprentissage profond), qui est un sous-domaine basé sur des réseaux de neurones profonds capables d'automatiser la tâche de l'extraction des caractéristiques (features) des données. Cependant, l'utilisation de ces réseaux nécessite une base de données étendue et représentative des différentes variations, ce qui peut s'avérer complexe à obtenir.

Parmi les applications, le deep learning peut être utilisé pour la segmentation d'images, qui consiste à partitionner les images numériques en régions d'intérêt correspondant, par exemple, à des structures anatomiques, des objets biologiques. Il existe deux types différents de segmentation, la segmentation sémantique qui consiste à attribuer à chaque pixel une étiquette correspondant à sa classe, et la segmentation par instance qui permet d'identifier et de différencier chaque objet de manière individuelle, même lorsqu'ils appartiennent à la même classe.

Pour réaliser une segmentation, il est nécessaire de constituer des bases de données annotées permettant d'entraîner les algorithmes de deep learning. En raison du grand nombre de paramètres nécessaires pour capturer des relations complexes dans les données, une grande quantité de données sont nécessaires pour l'apprentissage. Ces annotations peuvent être effectuées manuellement, ce qui consiste à dessiner ou à délimiter les contours des régions sur les images pour générer des masques de vérité terrain, le ground truth. Cependant, ce processus est souvent chronophage et exigeant. C'est pourquoi des techniques interactives permettent de réduire l'effort d'annotation en mettant à jour automatiquement la segmentation après chaque correction de l'utilisateur (Straehle *et al.*, 2012), ce qui limite le nombre total d'annotations nécessaires. Enfin, pour accroître la quantité et la diversité des données d'entraînement, on peut recourir à des techniques d'augmentation de données (data augmentation), qui appliquent des transformations comme des rotations, des inversions ou des modifications de contraste, afin d'améliorer la robustesse et la généralisation du modèle.

III.1.a. Ilastik pour l'analyse d'images

Ilastik est un logiciel open source d'analyse d'images (Sommer *et al.*, 2011), particulièrement utilisé pour la segmentation, la classification et le suivi d'objets dans des acquisitions volumiques notamment en biologie pour l'imagerie cellulaire. L'un de ses atouts essentiels est de ne pas exiger de formation préalable en traitement d'images, tout en s'inscrivant dans une démarche open source. Le logiciel permet en particulier à l'utilisateur de générer une segmentation de référence destinée à constituer le ground truth pour l'entraînement d'un réseau de neurones. L'interface type « peinture » sous Ilastik par des annotations au pinceau, permet au classifieur d'apprendre directement à partir des annotations fournies par l'utilisateur, ce qui donne des exemples de classification. Ce logiciel allie une

interface intuitive à des algorithmes avancés où une documentation en ligne est proposée. Grâce à l'implication active de la communauté de développeurs, de nouveaux workflows sont régulièrement ajoutés, faisant ainsi évoluer continuellement le logiciel dans un cadre collaboratif (Berg *et al.*, 2019). Un workflow constitue un « pipeline » prédéfini qui guide l'utilisateur dans plusieurs tâches : import des images, annotations, entraînement d'un classifieur, segmentation, suivi d'objets. Quelques workflows disponibles sous Ilastik sont présentés ci-après.

Le **workflow *Pixel Classification*** permet de classifier les pixels en générant des cartes de probabilité. Une fois les caractéristiques pertinentes identifiées, un classifieur de type forêt aléatoire « Random Forest » (Sommer *et al.*, 2011) est entraîné de manière interactive à partir des annotations fournies par l'utilisateur.
Le **workflow *Autocontext*** est une amélioration du workflow Pixel Classification. Le modèle utilise non seulement les caractéristiques locales des pixels, mais également les prédictions issues de l'étape précédente.
Le **workflow *Object Classification*** a pour objectif de catégoriser des objets entiers en se basant sur des caractéristiques calculées au niveau de l'objet et sur les annotations fournies par l'utilisateur. Dans ce contexte, un objet est défini comme un ensemble de pixels correspondant à une même instance.
Le **workflow *Boundary-based segmentation with Multicut*** permet de segmenter des images à partir d'informations de contour. À partir d'une carte de probabilités de contour, l'image est d'abord découpée en superpixels, qui sont ensuite fusionnés afin de produire des segments délimités par des surfaces fermées, sans bords suspendus.
Le **workflow *Carving*** est basé sur l'algorithme du Watershed « ligne de partage des eaux » détaillé plus loin.

Ilastik est principalement utilisé pour la segmentation sémantique en utilisant un algorithme appelé **«** Random Forest » disponible sous le workflow *Pixel Classification* (Berg *et al.*, 2019)**.** Le classifieur est défini sous la forme d'un algorithme de prise de décision qui ensuite généralise aux autres pixels non annotés. Le résultat de la prédiction donne l'information où le classifieur pourrait faire des erreurs. De plus, la carte d'incertitude révèle les prédictions erronées, donnant la possibilité à l'utilisateur de cibler les régions à annoter en priorité. Par la phase de traitement en lot appelée « Batch processing », Ilastik automatise la segmentation sur un ensemble d'images, dès qu'un classifieur est entraîné sur un jeu représentatif.

III.1.b. Segmentation assistée par Ilastik dans le contexte biologique

Dans le contexte de la segmentation en biologie, les applications des workflows *Carving* et *Pixel Classification* sont les outils principalement utilisés.

La prolifération cellulaire et les contraintes spatiales au sein des tissus ont été étudiées par microscope confocal (Streichan *et al.*, 2014)**.** Dans cette étude, le workflow *Pixel Classification* a été utilisé afin de segmenter les noyaux dans plusieurs échantillons. Une deuxième étape de segmentation a été requise. Celle-ci utilise comme entrée les résultats de la première étape superposés sur les données brutes comme canal supplémentaire. En effet, les prédictions précédentes apportent des connaissances sur le contexte sémantique spatial et permettent ainsi d'avoir des prédictions à l'étape finale moins bruitées, davantage cohérentes.

L'algorithme de ligne de partage des eaux (Watershed, (Beucher & Lantuéjoul, 1979)), disponible dans le workflow *Carving,* se prête particulièrement bien à l'analyse des tissus neuronaux, du fait de leur organisation morphologique caractérisée par des prolongements fins et allongés. Son principe consiste à regrouper les pixels adjacents en régions cohérentes, réduisant ainsi le nombre d'annotations nécessaires. L'image est interprétée comme un relief topographique, où l'intensité des pixels correspond à l'altitude. L'algorithme simule alors une inondation de ce relief à partir des points les plus bas, appelés minima locaux. Les bassins se remplissent progressivement et, lorsque deux bassins entrent en contact, une ligne de crête est tracée pour les séparer : ce sont les lignes de partage des eaux qui définissent ainsi les frontières des objets segmentés.

En revanche, les algorithmes de segmentation basés sur des modèles comme Random Forest sous le workflow *Pixel Classification* ont tendance à sous-segmenter ce type d'objets d'intérêt. Cela est principalement dû à des incertitudes au niveau des frontières, qui rendent difficile la distinction entre les classes objet et background (Benson C. C. *et al.*, 2015). Le workflow *Pixel Classification* dans Ilastik permet d'effectuer une segmentation sémantique de l'image en attribuant à chaque pixel une étiquette correspondant à l'une des classes définies par l'utilisateur. Pour définir ces classes, l'utilisateur annote simplement les données en peignant, directement sur l'image, les régions représentatives de chaque classe (Sommer *et al.*, 2011) . À partir de ces annotations partielles, Ilastik entraîne le classifieur de Random Forest, qui prévoit la probabilité d'appartenance des autres pixels non annotés à chaque classe, permettant ainsi une généralisation à l'ensemble de l'image (Berg *et al.*, 2019). Il est basé sur un ensemble d'arbres de décision dont chaque arbre est entrainé sur un sous-échantillon des données. À chaque nœud de l'arbre, un ensemble aléatoire de variables est tiré au sort, et la meilleure variable est choisie pour effectuer la séparation. C'est cette sélection aléatoire qui confère son caractère « aléatoire - random » à l'algorithme. Sous Ilastik, le classifieur random forest possède 100 arbres de décision.

III.2. Approches de Deep Learning pour l'analyse d'images

Contrairement à des approches comme Ilastik, qui reposent sur une extraction explicite de caractéristiques, le deep learning, notamment via les réseaux de neurones convolutifs (CNN), a l'avantage de traiter directement les images brutes en apprenant automatiquement les caractéristiques pertinentes. Ces modèles apprennent des représentations hiérarchiques des pixels, ce qui leur confère une grande capacité d'adaptation pour des structures complexes au sein des images. Les développements algorithmiques en deep learning pour l'analyse d'images, notamment en biologie, connaissent une évolution rapide et continue (Berg *et al.*, 2019).

III.2.a. Introduction aux outils de Deep Learning pour l'imagerie

Suite aux avancées récentes en intelligence artificielle, les méthodes de deep learning, et en particulier les CNN, se sont imposées comme des outils incontournables pour l'analyse d'images. Leur capacité à extraire automatiquement des caractéristiques pertinentes à partir des données brutes permet de traiter des tâches complexes telles que la segmentation, la classification, la détection d'objets, le débruitage, la représentation d'objets 3D, la reconstruction de problèmes inverse, la super-résolution, l'inpainting et bien d'autres.

Les CNN sont répartis en différentes couches :

1- Couche d'entrée (Input layer)

La couche d'entrée reçoit les données sous une représentation correspondant aux dimensions de l'image (hauteur, largeur et nombre de canaux). Par exemple, pour une image couleur composée de trois canaux (rouge, vert et bleu) et de dimensions 224 x 224 pixels, la représentation en entrée est de taille 224 x 224 x 3.

2- Couches de convolution (Convolutional layers)

L'utilisation de réseaux de neurones entièrement connectés devient rapidement complexe pour traiter des images de grande dimension. En analyse d'images, on fait appel à l'opérateur de convolution, un outil fondamental qui permet de transformer une image brute en cartes de caractéristiques (feature maps). Ces cartes représentent les éléments essentiels de l'image (bords, textures, motifs) de manière plus simple et abstraite. Ce processus constitue l'extraction automatique de caractéristiques**,** une étape clé qui fait le lien entre les images d'entrée et les traitements plus avancés (classification, reconnaissance, etc.).

Une couche convolutive combine :

a. La convolution

Un petit filtre (ou kernel) est déplacé sur l'image. À chaque position, une multiplication élément par élément est effectuée suivie d'une somme, produisant une nouvelle carte de caractéristiques.

- Un padding qui consiste à ajouter des pixels supplémentaires autour des bords d'une image peut être appliqué pour conserver les dimensions.
- Une fonction d'activation (ReLU, Sigmoid) est ensuite ajoutée pour apprendre des motifs complexes.
- Un avantage essentiel du partage des poids est que le réseau peut identifier les mêmes motifs, tout en limitant considérablement le nombre de paramètres à apprendre.

Suite à la couche convolutive, une couche pour le sous-échantillonnage (souvent appelée pooling layer) peut suivre.

b. Sous-échantillonnage (Pooling)

Après une couche convolutive, une couche de sous-échantillonnage (pooling) peut être appliquée. Elle réduit la taille des cartes de caractéristiques tout en conservant les informations les plus importantes. Les méthodes les plus courantes sont :

- **Max-pooling** : conserve la valeur maximale dans chaque région.
- **Average-pooling** : calcule la moyenne des valeurs.

Plusieurs outils basés sur l'architecture CNN, conçus pour répondre à des problématiques spécifiques en biologie, sont introduits dans cette section.

Premièrement, **EMBEDSEG** est un outil open source disponible sous Github, une plateforme en ligne pour gérer et partager du code, pour la segmentation par instance basée sur des embeddings (Lalit *et al.*, 2022). Un embedding est une représentation numérique compacte d'une image dans un espace

vectoriel. Chaque objet dans l'image est transformé en un vecteur de nombres qui capture ses caractéristiques principales. EMBEDSEG dispose d'un plugin Napari, un logiciel open source qui permet de visualiser et d'analyser des images multidimensionnelles, appelé napari-embedseg qui offre une interface conviviale permettant d'effectuer l'entraînement et la segmentation sans nécessiter de compétences avancées en programmation.
A partir de métriques d'évaluation, l'outil Embedseg est comparé à : 3-Class U-Net (prédire trois classes différentes), Cellpose et StartDist (Lalit *et al.*, 2022) sur des données 2D et 3D.

I. Contexte biologique et image de microscopie

Dans cette application (Dietler *et al.*, 2020), il s'agit de l'analyse de levures sur l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae* à partir d'un ensemble d'entraînement constitué de plus de 10 000 images de levures segmentées avec précision. Afin d'introduire une variabilité biologique au sein du jeu de données, des mutants correspondant dans ce contexte à des cellules exposées à un stress, ont été inclus. Cette hétérogénéité a permis d'évaluer la capacité de généralisation du modèle, laquelle s'est avérée robuste face à ces variations phénotypiques. La structure d'environ 2 200 cellules, incluant des cellules de type sauvage et mutantes, a pu être analysée à l'aide d'un CNN. L'un des avantages des CNN est leur capacité à s'adapter à de nouveaux cas d'études, à condition que le modèle ait été entraîné avec un nombre suffisant d'exemples représentatifs (Dietler *et al.*, 2020).

II. Comparaison des architectures CNN appliquées à la segmentation

Trois approches basées sur des réseaux de neurones convolutifs sont comparées (Dietler *et al.*, 2020) *:*

StarDist, Mask-RCNN, U-Net.

1. StarDist :

Les instructions d'installation de **StarDist** sont détaillées sur Github. Cet outil, basé sur l'apprentissage profond, est particulièrement recommandé pour la segmentation d'instances de noyaux cellulaires, dont les formes présentent généralement une structure dite étoilée, en adéquation avec les objets segmentés dans cet article (Stevens *et al.*, 2022). L'outil Stardist représente les contours des objets sous forme de polygones étoilés, mais cette méthode présente des limites lorsqu'il s'agit de formes allongées ou filamenteuses (Dietler *et al.*, 2020). L'efficacité de cet outil est démontrée notamment dans la détection des cellules tumorales dans des images issues du système CellSearch.

2. Mask R-CNN :

Mask R-CNN (Mask Region-based Convolutional Neural Network) est un algorithme de segmentation d'images basé sur l'apprentissage profond, conçu par Facebook AI Research (FAIR) en 2017 (Kaiming He, 2017). Cette méthode permet à la fois de détecter des objets dans une image et de segmenter précisément leurs contours.

3. U-Net et variantes

L'application de U-Net pour la segmentation d'image biomédicale est apparue en 2015 (Ronneberger *et al.*, 2015). U-Net peut être employé pour séparer en deux classes objet / background où le fonctionnement d'un CNN est décrit comme suit : le réseau attribue une probabilité comprise entre 0 et 1, indiquant si le pixel appartient à la classe objet (1 pour l'objet, 0 pour le background) (Dietler *et al.*, 2020).

Avant de détailler le modèle, quelques termes techniques sont nécessaires :

- **Encodeur** : extrait les caractéristiques de l'image à l'aide de couches de convolution, de fonctions d'activation et de pooling.
- **Décodeur** : reconstruit l'image segmentée à partir des caractéristiques extraites.
- **ReLU** : fonction d'activation.
- **Pooling (sous-échantillonnage)** : réduit la taille spatiale des cartes de caractéristiques pour permettre au réseau de percevoir un contexte plus large.
- **Padding** : ajout de zéros autour des cartes de caractéristiques pour conserver leurs dimensions lors des convolutions.

Lorsque les cellules sont très proches, le modèle peut avoir des difficultés à prédire les contours. Les expérimentations ont été réalisées dans le cadre du Cell Tracking Challenge, une compétition internationale destinée à évaluer et à comparer les méthodes automatiques de segmentation.

4. Cellpose : un modèle généraliste

Un autre modèle de CNN conçu spécifiquement pour détecter et délimiter des cellules dans des images microscopiques est Cellpose, un logiciel open source de segmentation d'images cellulaires basé sur l'apprentissage profond (Stringer *et al.*, 2021). Il se distingue par sa capacité à fonctionner sans nécessiter de réentraînement du modèle ni d'ajustement manuel des paramètres, ce qui en fait un outil accessible et prêt à l'emploi. L'actualisation régulière à l'aide de nouvelles données annotées fournies par la communauté permet de ré-entrainer régulièrement le modèle. Les méthodes actuelles basées sur l'apprentissage profond requièrent en général des jeux de données d'entrainement de grande taille pour atteindre des performances optimales (Stringer *et al.*, 2021). On peut mentionner cette étude (Stringer *et al.*, 2021) où le jeu de données correspond à des protéines marquées en fluorescence localisées dans le cytoplasme et la segmentation par instance est réalisée à l'aide de Cellpose. Cet outil a obtenu le meilleur score Intersection over Union (IoU) lorsqu'il est entraîné et testé sur des données spécialisées. La métrique IoU la plus élevée est attribuée pour la méthode qui a la meilleure capacité à suivre précisément les contours cellulaires, mettant en avant la capacité de cette interface à détecter des formes complexes. La mesure de la précision moyenne est de 0,91 pour Cellpose contre 0,76 pour StarDist et 0,80 pour Mask R-CNN. Le modèle généraliste Cellpose est entrainé à partir des données qui se trouvent sur Cell Image Library.

5. Approfondissement sur U-Net

Olaf Ronneberger, Philipp Fischer et Thomas Brox ont introduit en 2015 l'architecture U-Net, un réseau de neurones convolutifs spécialement conçu pour la segmentation d'images biomédicales (Ronneberger *et al.*, 2015). Le Vanilla U-Net utilise SGD (Stochastic Gradient Descent) et l'Adam U-Net utilise Adam, deux optimiseurs qui définissent la manière dont le réseau ajuste ses paramètres pour améliorer ses performances. SGD effectue des mises à jour progressives classiques des poids, tandis qu'Adam adapte automatiquement la vitesse et l'ampleur de ces ajustements pour rendre l'apprentissage plus rapide et stable. La différence entre les deux modèles réside donc uniquement dans la stratégie d'optimisation, et non dans l'architecture du réseau.

III. Compétitions en analyses d'images et bases de données

Dans le domaine de l'analyse d'images biomédicales, il existe de nombreux concours et challenges internationaux. Ces compétitions visent à comparer les performances des algorithmes de segmentation ou de détection sur des jeux de données de référence. Dans ce qui suit, plusieurs compétitions d'analyse d'images sont présentées, lesquelles ont contribué à orienter notre choix.

Un grand jeu de données d'images de noyaux pré-segmentés est disponible suite à la compétition Kaggle Data Science Bowl en 2018 (Caicedo *et al.*, 2019). Cette compétition a su rassembler 3891 équipes à travers le monde dont l'objectif est de proposer une méthode de segmentation pouvant être appliquée sur n'importe quelle image 2D de microscopie optique de noyaux colorés, sans aucun réglage manuel des paramètres de segmentation. Lorsque les noyaux cellulaires présentent des aspects très variés, la segmentation basée sur l'apprentissage automatique s'adapte bien aux variations de structure des noyaux (Kumar *et al.*, 2017).

De plus, le Medical Segmentation Decathlon (MSD) (Antonelli *et al.*, 2022) est un défi d'analyses d'images biomédicales dans lequel des algorithmes sont évalués et testés sur leur niveau de performance. La méthode qui l'emporte est nnU-Net, notamment pour sa capacité d'adaptabilité à surpasser une solution qui est conçue sur mesure pour une tâche donnée (Isensee *et al.*, 2021). La capacité des algorithmes à la généralisation est un enjeu central dans ce défi. La segmentation d'images nécessite des experts du domaine et la segmentation manuelle peut rapidement devenir chronophage, pouvant limiter les usages cliniques (Antonelli *et al.*, 2022). L'objectif final du Medical Segmentation Decathlon est de mettre en place un algorithme unique pour la généralisation des prédictions sur plusieurs tâches médicales avec des propriétés différentes, sans nécessiter d'annotations manuelles par la suite. Ce défi d'analyse d'images comporte dix ensembles de données différents testés sur deux phases qui se suivent, la première constitue la phase de développement des modèles et la seconde concerne la phase mystère pendant laquelle une seule solution était proposée pour résoudre l'ensemble des problématiques sans modification de l'architecture du réseau et des hyperparamètres (Antonelli *et al.*, 2022).
Les jeux de données sont complexes et présentent chacun des spécificités afin d'évaluer le comportement des algorithmes sur des petits jeux de données, des étiquettes déséquilibrées, des objets de taille petite. La phase mystère teste si les algorithmes peuvent se généraliser à des tâches de segmentations inconnues. Les méthodes qui remportent la phase mystère sont toutes basées sur des réseaux de neurones convolutifs avec U-Net (Kingma & Ba, 2017).
Dans le contexte du défi d'analyse d'images lors du Medical Segmentation Decathlon, on peut citer la détection des tumeurs cérébrales qui est réalisée à partir d'images au scanner (CT scan) (Eali *et al.*, 2022), où plusieurs méthodes de segmentation ont été évaluées pour leur capacité à localiser et différencier les tumeurs bénignes et malignes. Le prétraitement ciblé est réalisé seulement sur une petite partie de l'image au lieu de traiter l'intégralité de l'image.
Un des défis a concerné l'analyse du foie à partir de données issues de l'imagerie CT (Computed Tomography) (Antonelli *et al.*, 2022). Les données étaient soit des volumes, soit un empilement de coupes 2D successives (scans). L'objectif de cette tâche est la segmentation simultanée du foie dans son intégralité ainsi que celle de tumeurs hépatiques. Ce type de tâche présente une difficulté majeure : un déséquilibre important entre les classes, le foie occupant une large portion du volume tandis que les tumeurs sont beaucoup plus petites et moins nombreuses (Antonelli *et al.*, 2022).

nnU-Net s'est révélée être la méthode la plus robuste pour les deux phases face à la diversité des tâches et des régions cibles.

Lors du Kidney and Kidney Tumor Segmentation Challenge (KiTS) 2019, huit variantes de nnU-Net se sont classées parmi les quinze meilleurs algorithmes. De même, la plupart des meilleurs modèles du COVID-19 Lung CT Lesion Segmentation Challenge 2020 reposent sur nnU-Net. Deux ans après le Medical Segmentation Decathlon, nnU-Net a également remporté le BraTS Challenge 2020, démontrant sa capacité à se généraliser à de nouvelles tâches et à surpasser des solutions conçues sur mesure.
Ainsi, à travers l'ensemble de ces défis d'analyse d'images, nnU-Net s'impose comme l'une des méthodes les plus performantes, ce qui justifie son choix pour nos travaux.

IV. Présentation de certaines métriques utilisées en deep learning pour l'analyse d'images

L'évaluation des performances des modèles d'apprentissage profond appliqués à la segmentation d'images nécessite l'utilisation de métriques permettant de confronter les prédictions générées par le modèle à la segmentation de référence (ground truth). Dans les applications de segmentations détaillées ci-dessus, plusieurs métriques sont utilisées pour évaluer la précision du modèle. Toutes les métriques présentées prennent des valeurs comprises entre 0 et 1, une valeur proche de 1 indiquant une forte similitude entre la segmentation prédite et la segmentation de référence.
Certaines de ces métriques sont expliquées en détail ci-dessous.

Indice de Jaccard ou IoU :

L'indice de Jaccard, également appelé **IoU** (Intersection over Union), est une mesure de similarité couramment utilisée pour évaluer la performance des modèles de segmentation d'images (Stringer *et al.*, 2021). Il correspond au rapport entre l'intersection et l'union des deux ensembles comparés : la vérité terrain et la prédiction du modèle.

Équation 1 : Indice de Jaccard ou IoU

$$\mathrm{IoU} = \frac{\mathrm{TP}}{\mathrm{TP} + \mathrm{FP} + \mathrm{FN}}$$

- **TP** : pixels correctement prédits comme appartenant à la classe d'intérêt
- **FP** : pixels incorrectement prédits comme appartenant à la classe d'intérêt
- **FN** : pixels appartenant à la classe d'intérêt mais non détectés par le modèle

Une autre façon de calculer l'indice de Jaccard ou IoU est la suivante.

Équation 2: Indice de Jaccard ou IoU

$$\mathrm{J(A,B)ou\ IoU} = \frac{|\,\mathrm{A} \cap \mathrm{B}\,|}{|\,\mathrm{A} \cup \mathrm{B}\,|}$$

A : masque prédit par le modèle
B : masque de vérité terrain (ground truth)

A ∩ **B** : l'intersection des ensembles A et B.
A ∪ **B** : l'union des ensembles A et B, c'est-à-dire tous les pixels qui appartiennent soit au masque prédit, soit au masque ground truth, ou aux deux.

F1 score ou score de Dice :

Équation 3 : F1 score ou Dice score

$$\mathrm{F1} = \frac{2 \times \mathrm{TP}}{2 \times \mathrm{TP} + \mathrm{FP} + \mathrm{FN}}$$

- **TP** : pixels correctement prédits comme positifs
- **FP** : pixels prédits positifs mais incorrects
- **FN** : pixels positifs non détectés

Le **F1-score** fournit une mesure globale de la performance d'un modèle en combinant la précision et le rappel, c'est-à-dire à la fois la justesse des prédictions et la capacité à détecter tous les éléments pertinents. Il est particulièrement utile lorsque les classes sont déséquilibrées.

Comparaison des principales métriques

L'**IoU** (ou indice de Jaccard) et le **F1-score** (ou score de Dice) sont deux mesures de similarité utilisées pour évaluer la qualité d'une segmentation. L'IoU quantifie le chevauchement exact entre le masque prédit et le ground truth, tandis que le F1-score est une mesure plus souple qui tient compte à la fois des pixels correctement prédits et des pixels manqués par le modèle, reflétant ainsi la qualité globale de la segmentation.

Au niveau mathématique, ces deux métriques sont liées et le constat est qu'un F1-score élevé implique un IoU élevé, mais le F1-score est toujours supérieur ou égal à l'IoU pour la même prédiction.

Équation 4 : F1 Score

$$\mathrm{F1} = \frac{2 \times \mathrm{IoU}}{1 + \mathrm{IoU}}$$

Équation 5 : IoU

$$\mathrm{IoU} = \frac{\mathrm{F1}}{2 - \mathrm{F1}}$$

Les métriques permettent, dans le cadre d'un défi d'analyse d'images, d'évaluer la pertinence des outils utilisés pour l'analyse des données.

III.2.b. nnU-Net pour la segmentation d'images

III.2.b.i. Présentation de l'outil nnU-Net

nnU-Net est présenté comme un outil qui utilise une adaptation dynamique entièrement automatisée sur le pipeline pour la segmentation. La particularité est que le pipeline est en grande partie automatisée : prétraitement des images, architecture du réseau et post-traitement (Isensee *et al.*, 2021). Pour améliorer l'apprentissage, un grand nombre d'exemples annotés est nécessaire. Dans

cette optique, la stratégie adoptée repose principalement sur l'augmentation de données, afin d'exploiter plus efficacement les images annotées déjà disponibles (Ronneberger *et al.*, 2015).
Dans tout système de réseau de neurones, une fonction de perte doit être mise en place afin de mesurer à quel point la prédiction du réseau est éloignée de la vérité de terrain. La loss indique à quel point le réseau s'écarte de la vérité et l'entrainement consiste à minimiser cette perte au maximum. Sous nnU-Net, deux types de fonction perte sont employés : la perte de Dice (Dice Loss) capture la forme globale et gère les classes déséquilibrées et la perte par entropie croisée -- Cross-Entropy loss, garantit une précision locale au niveau des pixels.
nnU-Net utilise lors de l'entrainement la méthode *five-fold cross validation (five-fold CV)*, où les données sont divisées aléatoirement en 5 sous-ensembles égaux, appelés « plis ou folds ». À chaque itération, un fold est utilisé comme jeu de test, et les autres comme jeu d'entraînement. Le processus est répété plusieurs fois jusqu'à ce que chaque fold ait servi une fois de test. Les performances finales sont obtenues en moyennant les résultats des différentes itérations. L'emploi du five fold CV réduit le phénomène de sur-apprentissage (Overfitting), garantissant au mieux des prédictions robustes et généralisables à de nouvelles données.

III.2.b.ii. Quelques applications de nnU-Net en imagerie médicale

nnU-Net a été utilisé pour la segmentation, afin de classifier des stades de fibrose hépatique sur des images obtenues par IRM (Zhang *et al.*, 2024) (Anteby *et al.*, 2021). La segmentation du foie a été évaluée par différentes métriques, notamment le score de Dice avec une valeur obtenue de 0,8477 (Zhang *et al.*, 2024). Plus la valeur du score de Dice se rapproche de 1, meilleure est la correspondance entre la prédiction du modèle et la vérité terrain, ce qui traduit une segmentation plus précise. nnU-Net est donc d'une grande précision pour la segmentation du foie comme l'atteste le score de Dice et également l'évaluation de la fibrose hépatique puisque le modèle a pu reconnaître correctement si une image correspondait à une fibrose légère, modérée ou avancée (Zhang *et al.*, 2024).

Les modalités d'imagerie suivantes sont concernées : échographie, tomodensitométrie (CT), imagerie par résonance magnétique (IRM). Au total 40 405 images radiologiques issues de 15 853 patients sont analysées à travers 16 études (Anteby *et al.*, 2021). Le score Metavir a permis de classer la sévérité de la fibrose sur une échelle de F0 (absence de fibrose) à F4 (cirrhose) (Zhang *et al.*, 2024). Il est rapporté qu'en général dans les ensembles de données, les cas d'échantillons avec des stades avancés sont davantage représentés. Le risque est que le déséquilibre dans les ensembles de données conduise à des erreurs. Pour y remédier, le partage d'images dans des bases de données publiques, notamment à travers des défis internationaux d'analyse d'images, permet de constituer des ensembles plus représentatifs. De plus, la mise à disposition des bases de données et de rapports standardisés par les cliniciens contribue à améliorer la généralisation des modèles, en limitant l'impact de la variabilité inter-observateurs. Au-delà de l'estimation du stade de la fibrose, la segmentation hépatique offre également la possibilité d'évaluer de manière précise le volume et la morphologie du foie avant une procédure de transplantation.
À partir de ces segmentations, le clinicien peut extraire des mesures spécifiques, telles que la distance antéro-postérieure et le volume hépatique total (TLV) (Pettit *et al.*, 2022). Dans ce contexte, des modèles performants comme nnU-Net se sont révélés particulièrement efficaces pour estimer avec précision le volume du foie et en permettre une visualisation en 3D (**Figure 7**). Les images médicales sont obtenues par tomodensitométrie (CT scan), et les bordures du foie sont annotées sur plusieurs

CT scans afin de former le ground truth. Ensuite comme présenté précédemment, les scans sont répartis en entrainement, validation, et test. nnU-Net a identifié avec précision les bordures du foie avec une moyenne de 97,5 % par rapport au ground truth. En effet, le score de Dice est obtenu avec un score de 0,974 entre la segmentation fournie par un radiologue et nnU-Net. Concernant les estimations de volume calculées, on atteint une erreur moyenne de 1.92% ce qui est relativement faible (Pettit *et al.*, 2022).

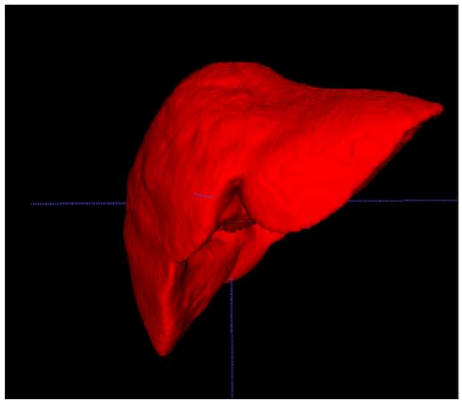


***Figure 7* : Représentation 3D du parenchyme hépatique sous nnU-Net.** Issu de (Pettit *et al.*, 2022).

Haylaz et son équipe (Haylaz *et al.*, 2025) ont présenté une autre utilisation de nnU-Net, appliquée à la segmentation automatique du canal nasolacrymal. Afin de former le ground truth, le canal est d'abord annoté par segmentation manuelle sous le logiciel d'imagerie 3D Slicer. L'architecture nnU-Net (version 2) a la capacité de prédire et de générer les poids optimaux de l'algorithme. Les métriques employées pour évaluer la précision et les performances du modèle sont la matrice de confusion, le coefficient de Dice, l'IoU, le F1-Score et la distance de Hausdorff (Haylaz *et al.*, 2025). La segmentation automatisée du canal nasolacrymal vise ainsi à assister les cliniciens dans la sélection de la technique chirurgicale la plus adaptée. (Haylaz *et al.*, 2025).

Dans la littérature, les applications du nnU-Net en imagerie médicale portent majoritairement sur la segmentation d'organes entiers, tandis que son utilisation à une échelle cellulaire ou subcellulaire se fait plus rare. L'entraînement d'un réseau de neurones convolutif (CNN) repose avant tout sur la disponibilité d'un jeu de données de ground truth. Bien que certains défis en analyse d'images aient permis la constitution de bases de données open source déjà annotées, ces ressources ne couvrent pas toujours les besoins spécifiques de chaque application. Il peut donc s'avérer difficile de trouver des données immédiatement exploitables pour l'entraînement de modèles CNN. Face à cette problématique, plusieurs outils ont émergé pour faciliter la génération du ground truth.

III.2.b.iii. Segmentation d'images avec SAM

Parmi les approches récentes dédiées à la segmentation d'images en microscopie, on peut citer SAM – Segment Anything for Microscopy (Archit *et al.*, 2025), un outil conçu pour la segmentation et le suivi dans les données de microscopie multidimensionnelle (**Figure 8**). Basé sur le modèle initial Segment Anything, cet outil a été adapté pour produire des modèles généralistes applicables aussi bien à la microscopie photonique qu'à la microscopie électronique, avec une forte capacité d'adaptation aux différentes conditions d'imagerie.



Figure 8 : Masques entièrement annotés de manière automatique par SAM, de haute qualité et très diversifiés. *Issu de (Kirillov et al., 2023).*

Le plugin Napari dans le cadre de SAM permet une segmentation interactive et automatique, adaptable pour tous les types de microscopie. Du point de vue de l'accessibilité, les modèles sont disponibles sur BioImage.IO dans un format standardisé, et une bibliothèque Python documentée est proposée pour faciliter leur intégration dans les workflows (Archit *et al.*, 2025). Un projet en cours vise à développer un modèle généraliste EM pour la segmentation des organelles, en s'appuyant sur les données d'Open Organelle. Par ailleurs, des travaux explorent comment rendre SAM "sémantiquement conscient", associant une signification aux régions segmentées, afin de mieux gérer les cas de segmentation ambigus, notamment en microscopie électronique.

IV. Objectifs

Mes travaux de thèse se situe dans le contexte présenté précédemment avec des objectifs situés à l'interface entre microscopie corrélative et analyse d'images, afin d'étudier l'architecture hépatique.

Le premier objectif de ma thèse a été de développer une méthodologie permettant d'analyser l'ultrastructure hépatique à une résolution nanométrique, en se concentrant sur l'endothélium fenêtré. La stratégie adoptée repose sur la microscopie corrélative, combinant la tomographie à rayons X et la microscopie électronique à faisceau d'ions focalisé (FIB-SEM). La tomographie à rayons X permet de localiser les régions d'intérêt, dense en tissu et riche en vaisseaux sanguins fins, appelés sinusoïdes et, délimités par les LSEC. Des acquisitions FIB-SEM ont permis la reconstruction 3D des LSEC et des canalicules biliaires à différentes résolutions, jusqu'à une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4$ nm³. L'un des principaux défis a été la mise en place d'un pipeline d'analyse d'images robuste et automatisé. Dans un premier temps, le machine learning a été appliqué avec Ilastik afin de générer des segmentations de référence (ground truth) sur les sinusoïdes et les canalicules biliaires. L'émergence du deep learning a ensuite orienté la stratégie vers des méthodes plus performantes, en particulier nnU-Net, un outil basé sur l'architecture U-Net, connu pour ses applications pour la segmentation d'images médicales. Ce modèle présente l'avantage de s'autoconfigurer pour le prétraitement, l'architecture du réseau et le post-traitement. Toutefois, des scripts Python ont dû être développés afin d'optimiser son entraînement et d'adapter les paramètres aux spécificités de nos données. Afin d'automatiser les mesures quantitatives des fenêtres des LSEC, leur diamètre a été évalué avec la méthode cPSD (*continuous Pore Size Distribution*) dans Fiji, tandis que leur nombre a été déterminé par une projection du maillage 3D en surface 2D, selon un workflow développé par la plateforme Image Analysis Hub de l'Institut Pasteur. Cette méthodologie a permis de comparer l'ultrastructure du foie de souris sauvages avec celui de souris dont le gène codant pour BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) a été délété. Des travaux antérieurs ont montré que l'absence de BMP9 entraîne une capillarisation des LSEC et une fibrose hépatique, soulignant son rôle essentiel dans le maintien de leur état différencié, mais aussi dans la préservation de l'architecture et des fonctions hépatiques.
Ainsi, ce premier objectif de thèse se situe à l'interface entre la microscopie électronique corrélative et l'analyse d'images avancée, combinant innovations méthodologiques et outils d'apprentissage automatique pour explorer, à haute résolution, l'organisation tridimensionnelle des sinusoïdes hépatiques et ses altérations dans un contexte biologique particulier.

Le deuxième objectif de ma thèse était de développer une approche multi-échelle pour localiser et analyser l'ultrastructure du canal de Hering, ce canal pouvant contenir des cellules progénitrices hépatiques. La stratégie choisie pour atteindre cet objectif a été de coupler nanotomographie à rayons X réalisé au synchrotron sur la ligne de lumière ID16B à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) et FIB-SEM afin, respectivement, de localiser ce canal puis d'en étudier sa structure. Les échantillons ont été préparés sous forme de piliers compatibles avec la nanotomographie à rayons X. Les tomogrammes ont permis de sélectionner des zones d'intérêt destinées à des acquisitions ultérieures en FIB-SEM. Cette méthodologie ouvre la voie à l'étude de l'organisation et de l'ultrastructure du canal de Hering à une échelle nanométrique.

Chapitre 2 : De l'imagerie FIB-SEM à l'analyse ultrastructurale : exploration des LSEC et des canalicules biliaires chez les souris WT et BMP9-KO

I. Contexte

Le foie possède une architecture complexe, essentielle à l'accomplissement de ses nombreuses fonctions métaboliques. L'analyse de l'architecture hépatique est primordiale pour approfondir nos connaissances sur l'ultrastructure et la physiologie du foie, et pour mettre en évidence d'éventuelles altérations. L'analyse de la fenestration des sinusoïdes en conditions physiologiques et pathologiques permet de comprendre la dérégulation du transport endothélial liée au vieillissement ou aux maladies chroniques du foie. L'objectif ultime serait d'exploiter ce type d'approche pour évaluer l'état du réseau sinusoïdal chez des patients, dans une perspective de médecine personnalisée. Le foie de souris est utilisé comme modèle expérimental en raison de la grande similarité de son ultrastructure avec celle de l'homme. La première observation des fenêtres des LSEC par microscopie électronique a été réalisée par Eddie Wisse, qui a détaillé leur ultrastructure (Wisse, 1970).
L'équipe BAL du laboratoire BioSanté au CEA Grenoble s'intéresse aux protéines de la famille des BMP (Bone Morphogenetic Proteins). L'équipe a notamment étudié le rôle de la protéine BMP9, une protéine produite par les cellules étoilées hépatiques, dans le maintien de l'homéostasie hépatique (Desroches-Castan *et al.*, 2019). Pour se faire, des modèles murins dont le gène codant pour la protéine BMP9 ont été mis en place. Chez les souris de fond génétique 129/Ola, l'invalidation génétique du gène entraîne une fibrose hépatique spontanée précédée d'une capillarisation des sinusoïdes, caractérisée par la perte des fenêtres des LSEC, l'apparition d'une membrane basale et l'activation des cellules stellaires. Cette cascade évolue avec le temps vers une fibrose. En revanche, les souris de phénotype C57BL/6 ne développent ni fibrose ni capillarisation significative, probablement en raison de différences basales dans l'état des LSEC et du taux circulant de BMP9. L'analyse en microscopie électronique confirme une diminution du nombre et de l'organisation des fenêtres chez les souris BMP9-KO, corrélée à une réduction de l'expression de GATA4, facteur clé de différenciation des LSEC. Enfin, la délétion de BMP9 dans la souche 129/Ola conduit à une mortalité précoce et à une perte pondérale significative. Ces résultats montrent que BMP9 est un régulateur central de l'intégrité vasculaire et de la différenciation des LSEC.

Afin d'explorer plus en détail ces altérations et de quantifier précisément les fenêtres des LSEC, il est toutefois nécessaire de disposer de tissus préservés de manière optimale après prélèvement. La qualité de la préparation des échantillons conditionne directement la fiabilité des mesures, ce qui rend cette étape méthodologique essentielle. L'étape la plus sensible concerne la préservation des tissus après le prélèvement du foie, celle-ci dépendant étroitement du protocole de préparation des échantillons. Avant de définir ce protocole, il est essentiel de connaître la technique d'imagerie qui sera utilisée, car la taille des fenêtres peut varier jusqu'à 30 % en fonction de la méthode de préparation choisie (Szafranska *et al.*, 2022). La fixation chimique par perfusion de l'animal constitue une étape clé du processus, car elle permet de stabiliser le tissu dans un état aussi proche que possible de son état natif. Une étape de cryo-fixation peut également être réalisée dans un second temps afin de mieux préserver l'ultrastructure et d'améliorer le processus de coloration qui suit. Une fois fixé, le tissu est imprégné avec des métaux lourds afin de contraster les structures biologiques. La qualité des images obtenues par FIB-SEM dépend en grande partie de la préparation de l'échantillon, condition essentielle pour permettre une segmentation précise des structures d'intérêt.

Cette exigence méthodologique est d'autant plus importante que, jusqu'ici, les fenêtres des LSEC ont principalement été étudiées en 2D, à partir d'observations en microscopie électronique sur des coupes de foie ou sur des cellules isolées et cultivées en 2D. Pour aller plus loin, notre équipe a mis en place une méthodologie pour la reconstruction 3D des fenêtres dans leur environnement tissulaire à une résolution isotrope de 4 x 4 x 4 nm^3. Le développement de technologies d'imagerie 3D toujours plus innovantes permet de dépasser les limites de la microscopie 2D, en offrant une visualisation volumique de l'échantillon (Higginbotham, s. d.). L'analyse de l'ultrastructure hépatique à une résolution de l'ordre de quelques nanomètres est rendue possible grâce à la microscopie FIB-SEM. Cette technique permet de reconstruire des volumes avec une taille de voxel de $4 \times 4 \times 4$ nm^3. Toutefois, en raison de son caractère destructif et du volume restreint pouvant être acquis, dans certains cas il parait nécessaire d'identifier avec précision la zone d'intérêt avant l'acquisition. Dans ce contexte, certaines approches d'imagerie 3D à plus basse résolution, comme la tomographie à rayons X, peuvent être mobilisées pour localiser efficacement la région à analyser, notamment des régions denses de l'échantillon qui pourraient contenir des sinusoïdes. Une fois cette étape de localisation réalisée, l'attention se porte sur l'exploitation des données obtenues.

À la suite des acquisitions, la priorité est donnée à l'analyse de la pile d'images. L'objectif de l'analyse d'images est de répondre à des questions biologiques, par exemple l'évaluation de l'impact de la protéine BMP9 sur l'ultrastructure du foie à partir de mesures quantitatives sur le diamètre et le nombre de fenêtres des LSEC. Pour atteindre cet objectif, un traitement adapté des données est indispensable.

Dans cette publication, nous présentons un pipeline de segmentation innovant, intégrant l'ensemble des étapes nécessaires pour obtenir la segmentation de sinusoïdes hépatiques ainsi que les caractéristiques de leur fenestration de manière semi-automatique. Ce pipeline a été initié au cours d'un précédent projet de thèse qui s'est focalisé sur l'analyse d'échantillons de foie de souris sauvage (WT) (Rekik, 2023). Cette étude a mis en évidence les limites du logiciel Ilastik, et la nécessité de corrections manuelles pour affiner la segmentation. L'analyse de jeux de données plus volumineux en vue d'obtenir des données quantitatives, tout en automatisant la procédure de segmentation, constitue donc un enjeu majeur.
La méthode permettant de générer le ground truth pour les souris BMP9-KO est largement basée sur celui des souris WT, avec quelques ajustements spécifiques au niveau de la segmentation. L'approche est ajustée car les membranes de la LSEC sont davantage discontinues, et le contraste en niveau de gris par rapport aux villosités des hépatocytes sous-jacentes aux sinusoïdes apparait moins prononcé pour les souris BMP9-KO par rapport aux WT.
Les discussions autour de l'automatisation et l'émergence du deep learning nous ont poussé à développer notre méthodologie d'analyse d'images vers l'utilisation des outils d'apprentissage profond, en particulier nnU-Net (Isensee *et al.*, 2021), une méthode d'apprentissage automatique pour la segmentation en imagerie médicale, basée sur le réseau de neurones U-Net. Une motivation majeure pour l'utilisation de nnU-Net tient à son aptitude à s'adapter automatiquement aux différentes étapes du flux de traitement, incluant le prétraitement des données, la configuration de l'architecture du réseau et le post-traitement des résultats. En pratique, plusieurs ajustements sont nécessaires, notamment au niveau des hyperparamètres, et nécessitent la mise en place de scripts Python afin d'adapter le traitement aux spécificités des données. L'originalité de notre étude réside

dans l'application de nnU-Net, non pas sur un organe entier comme cela est plus couramment répandu, mais sur l'analyse de l'ultrastructure de régions intra- et intercellulaires. L'objectif de ce travail a été de lancer les prédictions sur des sinusoïdes hépatiques issues de foie sain aussi bien que BMP9-KO dont le réseau de neurones n'a jamais eu connaissance auparavant. Cette spécificité nécessite lors de l'acquisition par FIB-SEM d'acquérir des piles d'images avec les mêmes contrastes, taille de voxels et le moins d'artefacts possibles afin d'avoir des caractéristiques similaires pour les voxels des données initiales et celles du ground truth.
Une fois la segmentation de la pile d'images FIB-SEM réalisée et la reconstruction 3D obtenue, l'étape suivante a consisté à effectuer des mesures quantitatives sur les fenêtres des LSEC. La plupart des études utilisent des méthodes manuelles et semi-automatiques pour réaliser des mesures quantitatives sur les fenêtres des LSEC (Szafranska, Holte, *et al.*, 2021). Ce type de méthode présente néanmoins des biais, notamment liés à l'interprétation de l'utilisateur.
Pour aller plus loin dans l'automatisation de l'analyse d'images, nous présentons une méthode de mesure automatique pour déterminer d'une part le diamètre des fenêtres des LSEC, et d'autre part leur nombre. Pour se faire une projection du maillage 3D en surface 2D a été réalisée à l'aide d'un workflow développé par la plateforme Hub d'analyse d'images de l'Institut Pasteur. L'objectif principal en mesures automatiques sur les fenêtres des LSEC est de permettre de gagner en rapidité pour la mesure des fenêtres mais aussi d'avoir des mesures plus précises et non biaisées par l'utilisateur.
Pour pousser la compréhension de l'ultrastructure des fenêtres des LSEC, l'objectif présenté dans cet article est d'obtenir une méthodologie permettant *in fine* d'obtenir des mesures quantitatives sur le diamètre et le nombre de fenêtres dans différents contextes biologiques, souris WT *vs* souris BMP9-KO.

Dans ce travail, présenté sous la forme d'un article en préparation, ma contribution a consisté d'une part à développer une méthode permettant d'établir le ground truth sur des souris BMP9-KO, et d'autre part à adapter des outils automatiques, tels que nnU-Net, ainsi que des méthodes d'évaluation des mesures quantitatives sur les fenêtres des LSEC. Nos résultats ont confirmé des altérations significatives de la morphologie et de la répartition des fenêtres des LSEC dans le foie des souris déficientes en BMP9 (BMP9-KO). A la fin de ce chapitre, les perspectives de ces travaux sont développées.

II. Analyse de la fenestration des LSEC par FIB-SEM

II.1. Manuscrit en préparation

A general methodology for sinusoid fenestration analysis based on 3D electron microscopy data.

Cécile Pohar [a,b,‡], *Yousr Rekik* [a,b,‡], *Minh Son Phan* [c], *Benoit Gallet* [d], *Agnès Desroches-Castan* [e], *Sabine Bailly* [e], *Jean-Yves Tinevez* [c], *Emmanuelle Tillet* [e], *Nicola Vigano* [b], *Pierre-Henri Jouneau* [b,*], *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] Pasteur Institute, Paris, France

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

[e] Laboratoire Biosanté U1292, Université Grenoble Alpes, Inserm, CEA, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

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

‡ These authors contributed equally.

Author contributions: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data: CP, YR, MSP, BG, ADC, SB, ET, NV, PHJ, AD; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content: CP, YR; PHJ, AD and 3) final approval of the version to be published: CP, YR, MSP, BG, ADC, SB, ET, NV, PHJ, AD.

Address for Correspondence

Financial support and sponsorship. This project received funding from GRAL, the Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology, a program from the Chemistry Biology Health Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003).

Conflicts of interest: nothing to report

Keywords: liver, sinusoid, Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy, image analysis, nnU-Net

Abstract

Liver has a complex architecture composed of millions of lobules. Within these lobules, hepatocytes, the main liver cells, are organized in rows separated by blood capillaries known as sinusoids. These capillaries are formed by liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) that form a very specific fenestrated endothelium essential for the exchange of metabolites and proteins between the blood and hepatocytes. The analysis of liver architecture is thus of utmost importance for advancing our knowledge of liver ultrastructure and physiology and to be able to evidence possible alterations.

Liver architecture has been studied since decades, mainly using 2D electron microscopy and more recently using advanced super resolution fluorescence microscopy. In the last years, volume electron microscopy including focused ion beam scanning-electron microscopy (FIB-SEM) progressed and nowadays enables the 3D reconstruction of biological ultrastructures down to nanometer resolution. However, analyzing samples of several tens of μm^3 are still struggled by the segmentation step often limited when dealing with large dataset. In the current study, we developed a workflow to semi-automatically segment sinusoid from FIB-SEM mice liver datasets using the convoluted neural network tool nnU-Net after fine-tuning a ground truth model. Tools for semi-automatically quantify sinusoid fenestrae diameters and sinusoid porosity from segmented datasets were also implemented. This workflow enabled to compare sinusoid fenestration in wild-type versus BMP9-deleted mice, confirming the importance of BMP9 for LSEC differentiation. Therefore, the developed methodology proved to be useful to characterize the fenestrated endothelium in different biological context including in diseases.

Introduction

Liver is a major organ in humans, performing many metabolic functions that are important both for the storage and distribution of various nutrients and for xenobiotic transformations and excretion in the feces via the bile. This central role is made possible by its architecture and the specific polarity of hepatocytes, which are the main type of liver cell types and represent around 80% of the liver mass [1]. Indeed, hepatocytes have three distinct poles, i) a basal pole where hepatocytes are in contact with the sinusoids, ii) an apical pole at the level of the bile canaliculi, and iii) a lateral pole, located between the hepatocytes and separating the basal and apical poles. Sinusoids are small blood capillaries lined with Liver Sinusoidal Endothelial Cells (LSEC) [2], where blood rich in both oxygen and nutrients merges before draining into the central vein, through which it is transported out of the liver. Nutrient-rich blood, which is crucial for the liver metabolic functions, arrives from the intestine *via* the portal vein. Sinusoids possess a highly specialized porous endothelium in direct contact with the underlying hepatocyte microvilli, which enables an efficient nutrient uptake by hepatocytes. Indeed, LSEC are perforated with transmembrane pores, called fenestrations or fenestrae, whose diameters vary between 50 and 300 nm [3]. Fenestrations lack a diaphragm and allow the bidirectional exchange of small molecules and proteins such as lipoproteins between blood and hepatocytes through the space of Disse, while filtering out larger molecules. This size-dependent transport makes LSEC an efficient ultrafiltration system.

Atomic force microscopy experiments performed on isolated living mouse LSEC have shown that fenestrae are dynamic structures, able to modulate their diameter within minutes to hours [4]. Super-resolution optical microscopy techniques have provided complementary insights into the ultrastructure of fenestrae and their spatial organization under physiological and pathological conditions, as well as following treatments with various agents (toxins, drugs…) that influence their diameter and/or number [5]. In various diseases as well as upon aging, the sinusoidal endothelium undergoes defenestration and capillarization characterized by the loss of fenestrations and the deposition of a basal membrane. In chronic hepatic diseases, these alterations usually occur

concomitantly with fibrosis, marked by excessive deposition of extracellular matrix in the space of Disse, leading to a decrease in LSEC porosity and thereof to reduced molecule exchanges between hepatocytes and the blood [6,7]. For instance, it has been shown that the deletion of the gene coding for BMP9 in the liver leads to a slight increase in the diameter of fenestrae and a three-fold decrease in their number in the mouse sinusoidal endothelium [8]. These results showed the importance of BMP9 on LSEC differentiation.

The most standard methods for the analysis of LSEC fenestrations are electron microscopy techniques performed on liver blocks, sections, or isolated LSEC [9,10]. However, a nanometer-resolution three-dimensional analysis of sinusoids in the hepatic context has not yet been achieved. Such an approach is essential to obtain accurate quantitative information on the number, diameter, and spatial distribution of LSEC fenestrations, parameters of utmost importance for understanding sinusoidal function in health and pathology.

To achieve this goal, we developed a methodology based on volume electron microscopy by Focused Ion Beam – SEM (FIB-SEM) performed on mouse liver samples to acquire three-dimensional data at nanometer resolution. To obtain information as close as possible to the native state, liver sample preparation was optimized, including a high-pressure freezing step, which increased the contrast between sinusoids and the underlying hepatocyte microvilli. This step was essential to segment the sinusoid in a multi-step workflow tacking into account the structural specificities of LSEC which include both thin fenestrated regions and large nuclear parts. Since the ultimate goal was to develop a methodology enabling large-scale semi-automatic segmentation, the use of deep-learning approaches was essential. Indeed, deep learning tools have evolved significantly in recent years. During the Medical Segmentation Decathlon (MSD) [11], a biomedical image analysis challenge, nnU-Net [12] demonstrated remarkable adaptability and outperformed custom-designed solutions tailored to specific tasks. nnU-Net was thus chosen for the sinusoids segmentation. Finally, we developed tools to semi-automatically quantify the number and the diameter of LSEC fenestrations based on the sinusoid segmentation. Altogether, an integrated workflow covering the entire process from liver sample

preparation to the extraction of quantitative information on sinusoidal fenestrations was established. Moreover, it can be applied to various liver samples, with BMP9-deleted mice. This approach is therefore of high interest for comparing sinusoid fenestrations in different biological contexts.

Methods

Mouse Liver Sample Preparation

The mouse is perfused intracardially with PBS buffer followed by 10-15 ml of fixative buffer (2.5% glutaraldehyde and 1.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, containing 2 mM calcium chloride $CaCl_2$). The liver is then harvested and cut into small cubes of approximately 5 × 5 × 5 mm^3 that are maintained in fixative until freezing.

The liver cubes are placed on a type A aluminum high-pressure freezing carrier of 3 or 6 mm diameter (Leica Microsystems) in a few drops of cryo-protectant (20% BSA). This freezing cup is then covered on the flat side with another type B freezing cup of 3 or 6 mm diameter (Leica Microsystems) and the assembly is introduced into an HPM100 cryofixator (Leica Microsystems). This method uses liquid nitrogen (T = -196°C) at high pressure (210 MPa) to fix the sample.

After cryo-fixation, the samples are transferred to an automated freeze substitution system (AFS2, Leica Microsystems). The freeze substitution cycle used is as follows. First, the samples are incubated in an acetone bath supplemented with 2% osmium tetroxide and 0.5% uranyl acetate in dried acetone at -90°C for 40 h. Then, they are slowly warmed to -60°C (1°C/h) and maintained at this temperature for 12 h. Next, the temperature is gradually increased to -30°C at a rate of 1°C/h. After 12 h, the temperature is rapidly raised to 0°C and the samples are maintained for 1 h at this temperature. Again, the samples are cooled to -30°C then rinsed four times in pure acetone for 15 minutes at the same temperature. The samples are then resin-embedded by incubation in 3 successive baths of increasing concentrations of araldite *Durcupan ACM Epoxy* resin (*Electron Microscopy Science*, EMS, 14040) in acetone. They are

left for 2 h in each bath while gradually increasing the temperature from -30°C to 20°C: 2 h in a 1:2 (volume:volume) resin:acetone mixture while raising the temperature from -30°C to -10°C; 2 h in a 1:1 resin:acetone mixture while raising the temperature from -10°C to 10°C; and 2 h in a 2:1 resin:acetone mixture while raising the temperature from 10°C to 20°C.

The samples are then incubated in a pure resin bath at room temperature for 8-10 h followed by a mixture of pure resin and the accelerator benzyldimethylamine for 8 h at room temperature. Finally, the resin is polymerized at 60°C for 48 h.

FIB-SEM data acquisition

3D FIB-SEM stacks were acquired using a Zeiss CB550 microscope. After trimming with an ultramicrotome (Leica UC6) to obtain a flat surface, the resin block was mounted on an aluminum stub with silver paste, fully coated with a 5-nm-thick platinum layer for conductivity (Safematic CCU-010), and transferred to the microscope for acquisition with the Atlas 5 software (Zeiss). Two converging fiducial lines were engraved between a platinum layer and a carbon layer deposited on the target area. A large trench was then opened in front of this region using a 30 kV / 30 nA Ga^+ beam. Image stacks were obtained by simultaneously milling the surface with the Ga^+ beam and recording backscattered electron SEM images with the in-column EsB detector. Fiducial lines were used to dynamically compensate for drift and to monitor slice thickness accuracy.

FIB-SEM enables isotropic volume acquisition, with slice thickness matching the SEM pixel size. A trade-off must be made between resolution, total volume size, and acquisition time. In this study, each sample was typically imaged twice: i) at high resolution (4 nm voxel size) to measure fenestrations and ii) at lower resolution (10-30 nm voxel size) for a broader ultrastructural context. Typical acquisition parameters are 30 kV / 700 pA or 1.5 nA for Ga^+ milling, and 1.5 kV / 1 or 1.5 nA / 5 - 10 µs dwell time for SEM acquisition with the EsB

detector, with an EsB grid voltage of 600 V. Depending on the size of the area of interest, the dwell time is chosen so that the acquisition time for one frame stays below 2 minutes for better stability.

Aligned raw image stacks and detailed acquisition parameters are provided in the Supplementary Information.

Preprocessing of FIB-SEM image stacks

FIB-SEM image stacks were aligned in Fiji [13] using MultiStackReg [14] or Scale Invariant Feature Transform (SIFT) [15] plugins. 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 persisted, the angle of misalignment was corrected using a Python script.

LSEC ground truth segmentation for WT mice samples

The segmentation ground truth was generated from an image stack of a sinusoid acquired on a WT mouse liver block.

Step 1: Definition of the LSEC fenestration localization region

This step aimed to define the LSEC fenestrated region that refers to the area containing fenestrations and serves as a mask for subsequent segmentation steps.

The initial FIB-SEM image stack was first binned in Fiji to achieve a voxel size of $64 \times 64 \times 64$ nm³. This binned image stack was then used as *raw data* for an Ilastik (version 1.33 or 1.4b) [16] project *(Carving)* to segment the sinusoid lumen. The resulting segmentation mask was resampled in Fiji using bicubic interpolation to recover the original isotropic

resolution of 4 nm in all three directions. Post-processing of this resampled mask was performed in IPSDK in the following order:

- 'Binarization' of the mask
- Application of the *outline* filter to extract the sinusoid contour
- Application of a 3D dilation with a radius of 30 using a spherical structuring element

Finally, a Gaussian filter with a standard deviation (*sigma*) of 30 in all 3 directions was applied, generating the mask that defines the fenestration localization region.

Step 2: Segmentation of the LSEC fenestrated regions

The initial image stack and the mask of the fenestration localization region (result of step 1) were combined in Fiji to form a 2-channel image stack. Two sub-volumes representing a fenestrated and a nuclear region of LSEC were then extracted and converted to HDF5 format before being imported as raw data into an Ilastik project (pixel classification). After segmentation of these two sub-volumes, the segmentation was generalized to the entire (2-channel) image stack. The resulting binary mask (segmentation mask 1) was post-processed in Fiji to refine the segmentation following these steps:

- Inversion of the fenestration localization region mask followed by a 3D dilation (radius = 50, spherical structuring element) to generate a subtraction mask.
- Subtraction of the subtraction mask from the segmentation mask 1.

The final result of this step was the LSEC fenestrated regions segmentation mask.

Step 3: Segmentation of the LSEC nuclear regions

In this step, images were first preprocessed to define the LSEC localization region, followed by segmentation of the LSEC nuclear regions.

Initial data preprocessing

The LSEC localization region corresponds to the area occupied by LSEC around the sinusoid contour, defined in step 1. It was subdivided into two parts: the LSEC luminal region extending

towards the sinusoidal lumen and the LSEC parenchymal region extending towards the hepatocytes.

Determination of the LSEC parenchymal region

In IPSDK, the segmentation mask of the sinusoid lumen (step 1) was dilated in 3D with a radius of 285 using a spherical structuring element. The non-dilated mask was then subtracted from the dilated one, defining the LSEC parenchymal region.

Determination of the LSEC luminal region

The following steps were performed in IPSDK:

- Dilation of the segmentation mask of the sinusoid lumen with a radius of 85 using a spherical structuring element.
- Subtraction of the non-dilated mask from the dilated mask. The result was called the intermediate mask.
- Dilation of the sinusoid contour, defined in step 1, with a radius of 85 using a spherical structuring element.
- Subtraction of the intermediate mask from the dilated contour mask. The result defined the LSEC luminal region.

Determination of the LSEC localization region

A pixel-wise addition of the LSEC parenchymal and luminal regions was performed in Fiji to define the LSEC localization region.

Application of the LSEC localization region to the initial images

The following steps were performed in Fiji:

- Subtraction of the initial data from the LSEC localization region: LSEC localization region - initial data
- Contrast inversion of the subtraction result

Hepatocytes were masked in the preprocessed initial stack, leaving only LSEC for subsequent segmentation.

Segmentation of the LSEC nuclear regions

The preprocessed initial images were binned with a factor of 8 in all three directions, resulting in a voxel size of 32 × 32 × 32 nm³. The binned stack was used as raw data in an Ilastik project (carving) to segment LSEC nuclear parts.

The resulting binary segmentation mask was resampled in Fiji using cubic interpolation to restore the original isotropic 4 nm resolution. This mask defined the LSEC nuclear regions.

Step 4: Final LSEC segmentation

The preprocessed initial images (voxel size = 4 × 4 × 4 nm³), the LSEC fenestration mask, and the LSEC nuclear region mask were combined in Fiji to form a 3-channel image stack. In total, six sub-volumes were extracted from this image stack and converted to HDF5 format before being imported as raw data into an Ilastik project (pixel classification).

After training the classifier on the sub-volumes, the segmentation was generalized to the entire image stack. The dimensions of the sub-volumes used in the training are detailed in **Table S1**.

LSEC ground truth segmentation for BMP9-KO mice samples

At the level of LSEC membranes, the acquisition reveals that, visually, the structures appear more discontinuous in BMP9-KO mouse livers. This discontinuity makes it more challenging for the neural network to recognize the structures. In addition, the contrast of LSEC membranes was found to be less pronounced in BMP9-KO liver samples. These differences led us to adapt the pipeline initially designed for WT mouse livers to BMP9-KO livers. The main difference lies in the reference segmentation (ground truth): three classes had to be defined for BMP9-KO mice, compared to only two for WT mice as described above.

Generation of the final mesh

The segmentation masks obtained after Ilastik training on 4 and 6 sub-volumes followed by segmentation generalization to the entire image stack: sub-volumes 1–4 and 1–6 (**Table S1**) were exported, converted to TIFF, and combined in Fiji using an arithmetic OR operation. The resulting mask was imported into IPSDK, where a connected components analysis was applied, and the largest connected component was retained. A 3D mesh of this component was then generated. Mesh smoothing were performed in MeshLab (v2020) [17], and final 3D rendering was carried out in ParaView (version 5.8) [18].

nnU-Net

Starting from the generated ground truth, deep learning tools were used to obtain clean segmented volumes and generalize segmentation for larger or previously unseen raw volumes. nnU-Net [9] was selected, which leverages convolutional neural networks (CNNs), using Ilastik's segmentation as "ground truth" to train the model.

nnU-Net requires specific steps to process the data: setting up a dedicated Python environment with all the required dependencies (including the machine-learning library “PyTorch”); Creating and referencing with environment variables the raw data, pre-processed data and trained model weights directories; and transforming arbitrary raw data into the required nnU-Net input data format.

The package offers CNN architectures following the U-Net design [19]: an encoding path extracting larger scale features and a symmetric decoding path reconstructing segmentation by combining spatial details. nnU-Net automatically scales models and employs five-fold cross-validation for hyperparameter tuning, dividing training data into five subsets and repeating training five times (**Figure S1**). While nnU-Net can automatically tune most of its parameters, some still need to be adjusted according to the characteristics of the input data. This includes the choice of various types of models (e.g., standard U-Net vs residual encoder U-nets, etc) and

their dimensionality (i.e., 2D vs 3D). When working with large volumes, it might also be advisable to divide them into smaller sub-volumes. The sub-volume size requires additional careful evaluation. We use a JSON (JavaScript Object Notation) file to store all these different attributes and parameters.

Key parameters optimized for our data include **dimensionality** (2D vs 3D U-Net selection based on computational resources and data complexity), **patch size** (balancing spatial context preservation with sufficient sub-volume representation), using (50, 50, 50) overlap to prevent boundary discontinuities, **epochs** (150 for 2D, 350 for 3D U-Net convergence, **Figure S2**), and **optimizer** (Adam optimizer). Our **fine-tuning approach** adapting pre-trained models via deeper layer adjustment with low learning rates resulted in the most accurate predictions for new FIB-SEM data acquired under similar conditions.

Quantitative analysis of sinusoid fenestration

Fenestrae counting

The overall methodology is described in **Figure 5**. 3D binary mask of LSEC was converted to 3D mesh using Avizo. The original mesh containing millions of faces was then simplified by MeshLab [17] to reduce the number of faces to about 200,000 faces. Coordinates of the mesh vertices were scaled into [0, 1] and ISOMAP [20] was applied to embed the mesh into 2D. To reduce the computation, 30,000 vertices among all vertices were randomly selected and used in ISOMAP to learn the mapping function. We next rescaled the embedded 2D mesh to original scale and rasterized it into 2D binary image. We used morphological opening with a disk size of 3 pixels to correct the rasterization artifact. Distinct objects were then identified in the image and the pore-objects were selected based on the object area from 50 pixels^2 to 10,000 pixels^2. The pores touching the image border were not counted. The pipeline only worked for opened 3D mesh. In case of closed mesh, we used MeshLab to manually find a region having no pores

and truncate it to produce the opened mesh. The source code of the LSEC pores counting can be found at gitlab.pasteur.fr/iah-public/lsec-fenestrae-counting.

Fenestrae diameter distribution.

The distribution of LSEC fenestration diameters was analyzed using the cPSD (Continuous Pore Size Distribution) method from the *xlib* plugin, developed by Beat Munch [21] within the Fiji software. The cPSD technique provides an accurate quantification of pore sizes in the form of a cumulative distribution [22]. The pore space is modeled as a continuous volume filled with spheres of varying radii [21]. The cPSD method allows pore sizes to be measured throughout the entire volume, across a value range [20-150] of radius. This interval was selected based on literature reports of fenestration diameters between 50 and 300 nm, with a step size of 4 corresponding to the pixel size in our case. The analyses were conducted on 3D reconstructions of sinusoids. Once the cPSD simulation is complete in Fiji, a text file is generated containing three columns: fenestrae radius (nm), number of voxels greater than or equal to the radius, and pore volume (nm^3). Calculations in Excel, along with normalization, are then applied to determine the frequency distribution of pore radii.

Results

Sample preparation with optimal preservation and differential contrast for LSEC

To preserve liver architecture as well as possible, and in particular sinusoid ultrastructure and LSEC fenestrations [9], liver tissue was initially fixed by mice perfusion followed by high-pressure freezing of small liver pieces (~1 mm^3). The main advancement over en-bloc staining method and conventional methods was that staining and water substitution were performed in cryogenic conditions. This protocol led to LSEC darker than the underlying hepatocyte villosities (**Figure 1**) enabling selective segmentation of LSEC, which is a prerequisite for the

development of a methodology able to accurately analyze LSEC fenestrations based on FIB-SEM data.

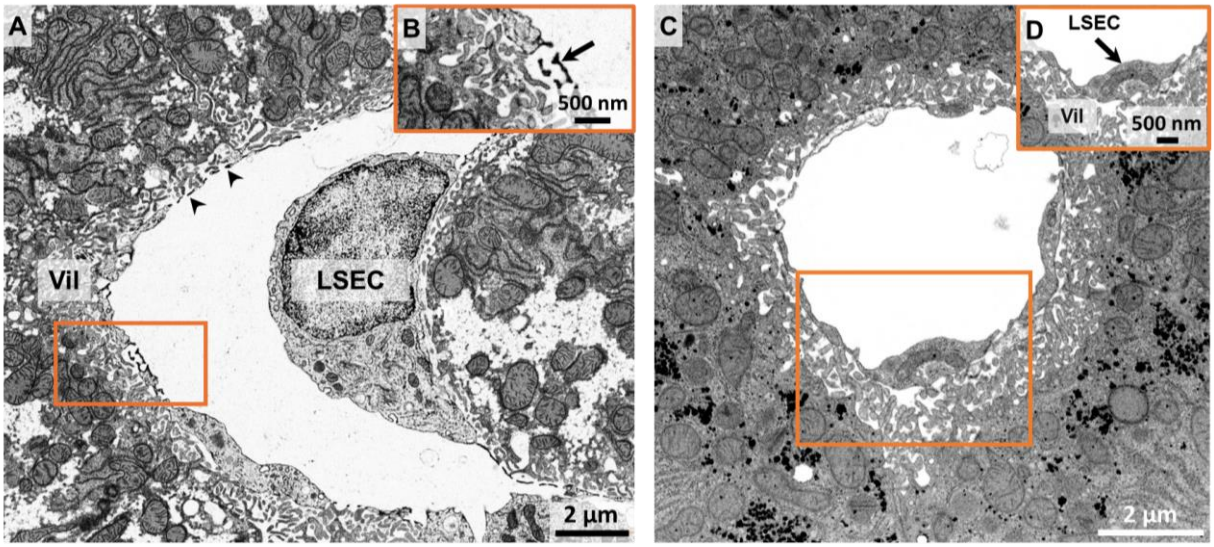


Figure 1. Comparison of sample staining from FIB-SEM data. A, *Single FIB-SEM image from a liver block with optimized sample preparation protocol with zoom-in, in* ***B****, highlighting the differential contrast between LSEC (darker, black arrow) compared to underlying hepatocyte microvilli.* ***C****, Single FIB-SEM image from a liver block prepared without high-pressure freezing nor cryo-substitution with zoom in, in* ***D****, on LSEC membrane that does not have a higher contrast than hepatocyte microvilli.*

Segmentation strategy to get LSEC ground truth

FIB-SEM acquisitions of hepatic sinusoids were performed with an isotropic resolution of $4 \times 4 \times 4$ nm³. However, at this resolution, the generated image stacks are very large, often reaching several hundred gigabytes (Gb). This makes them difficult to process and segment. Binning the data reduced the file size, but led to the loss of some fenestrae during segmentation (**Figure S3**), meaning that correct segmentation of LSEC fenestrations with minimal artifacts requires working with data initially at $4 \times 4 \times 4$ nm³ resolution. The use of membrane-based carving segmentation method [23] in Ilastik for segmenting the LSEC failed due to the large

number of annotations needed to draw around fenestrations, where LSEC membranes become very thin, and because of the difficulty in distinguishing these thin structures from surrounding tissue in the space of Disse, including hepatocyte microvilli and stellate cell cytoplasmic extensions.

These neighboring structures exhibit similar shapes and contrasts with LSEC, creating substantial segmentation noise. Additionally, LSEC occupy a narrow zone relative to the surrounding hepatocytes, which further complicates the segmentation task. This one-step segmentation approach proved unsuitable for LSEC segmentation, as it exceeded the workstation memory and ultimately failed.

Taking into account the LSEC shape which consists of a large region at the nucleus level and thin fenestrated regions, we developed an optimized multi-step segmentation workflow for LSEC segmentation in 3D (**Figure 2**). To address challenges related to LSEC shape and position, we designed a four-step cascade segmentation approach that separates the sinusoid edge from the neighboring cellular structures while handling each LSEC region distinctly. The first step defines an LSEC fenestration localization region by performing a coarse sinusoidal lumen segmentation on heavily binned data ($64 \times 64 \times 64$ nm³ voxels), followed by outline extraction, dilation, and Gaussian filtering to create a "fenestrations localization region " that highlights the thin zone between the sinusoidal lumen and the space of Disse. The second step segments LSEC fenestrated regions using pixel classification method (in Ilastik) [24] with a dual-channel input combining the original images and the fenestration localization region. The latter serves as a spatial prior, guiding the classifier to focus on the narrow zone containing fenestrations.

Training was performed on selected sub-volumes (~$300 \times 300 \times 300$ px³), enabling the classifier to generalize across the entire image stack. Post-processing corrected mis-segmented

hepatocytes by applying a subtraction mask derived from the inverted and dilated fenestration band, ensuring accurate identification of LSEC fenestrations with minimal artifacts.

The third step focuses on the segmentation of LSEC nuclear regions using the carving method. Since hepatocyte membranes introduce noise in the boundary map, the images were preprocessed by defining an LSEC localization region that encompasses both fenestrated and nuclear regions while minimizing hepatocyte microvilli inclusion. This involves determining LSEC extensions towards the sinusoidal lumen (LSEC luminal region) and towards the hepatocytes (LSEC mesenchymal region) through controlled dilation and subtraction operations, then applying the resulting localization region to mask hepatocytes before segmentation. The final step combines the results from steps two and three using pixel classification segmentation with a three-channel input: the preprocessed initial images, the LSEC fenestrated region mask, and the LSEC nuclear region mask. Training on different sub-volume combinations (4 and 6 sub-volumes, shown in red and blue in **Figure 2**) optimizes segmentation of different LSEC regions, with nuclear regions better segmented using 4 sub-volumes and fenestrated regions using 6 sub-volumes. The segmentation masks resulting from both trainings are combined using a logical OR operation to generate the final mask used to create the 3D mesh of the sinusoid.

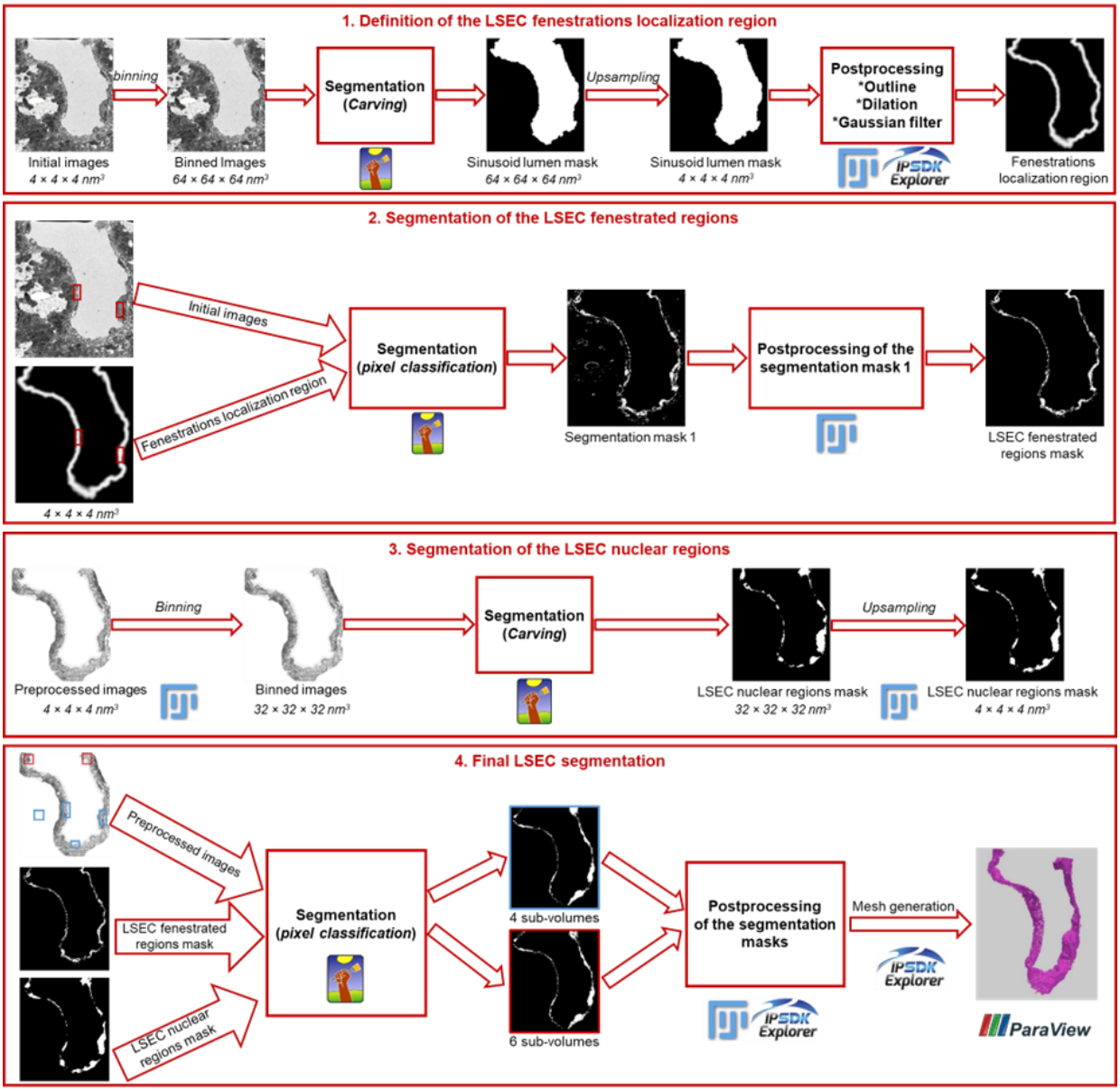


Figure 2. Multi-step LSEC segmentation workflow.

This cascade workflow successfully achieves high-resolution 3D LSEC segmentation while preserving fenestrations. It leverages the complementary strengths of Ilastik's carving and pixel classification methods while circumventing their individual limitations. The carving method efficiently segments membrane-delimited structures, whereas the pixel classification method offers the possibility to train the classifier on small sub-volumes and to generalize the result to large datasets through its batch processing option. Furthermore, strategic use of binning and resampling addresses computational constraints without compromising the segmentation

quality. The resulting 3D mesh clearly visualizes both broad LSEC nuclear regions and thin fenestrated regions (**Figure 3**), enabling detailed ultrastructural analysis of hepatic sinusoids.

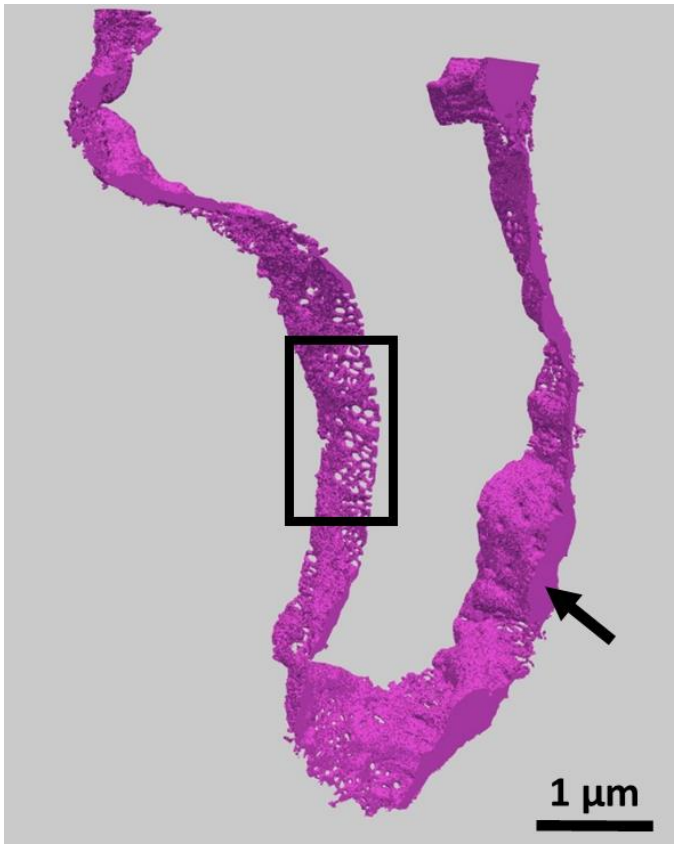


Figure 3. Final obtained using the multi-step LSEC segmentation workflow. *The black arrow highlights wide nuclear region and the black box a thin fenestrae region.*

Towards semi-automatic LSEC segmentation

The optimal LSEC segmentation obtained was used as ground truth for deep learning training. This approach was mandatory to be able to perform segmentation on larger and multiple datasets and thereof to obtain quantitative data and perform statistical analysis on fenestrae numbers and diameters. nnU-Net was selected for deep learning for its adaptability, allowing it to outperform a solution specifically tailored for a given task. nnU-Net is presented as a tool that performs fully automated dynamic adaptation of the entire segmentation pipeline, including image preprocessing, network architecture configuration, and post-processing. Data

augmentation is used to compensate for limited annotated data and improve learning efficiency. Several hyperparameters were optimized during the training process. First, the patch size, the blocks of volumes extracted from the initial dataset and used as input for the network during training was set to (30, 900, 900) for the WT sample, corresponding to the number of pixels along (X, Y, Z). An overlap of (50, 50, 50) pixels between patches was applied to avoid artifacts and improve the robustness of the predictions. The learning rate of the optimizer was initialized at 0.001 and progressively decreased during training. The chosen optimizer was **Adam**, selected for its fast convergence and robustness. The activation function was **Leaky ReLU**, which enables the modeling of complex relationships. In the **2D U-Net configuration**, the number of epochs was set to 150, whereas in the **3D U-Net configuration**, it was set to 350. The higher number of epochs in 3D is explained by the increased complexity of volumetric learning.

After an optimal training, the segmentation of the same dataset using nnU-Net led to several improvements. Incorrect annotations are removed, the outline of the LSEC are better defined and the objects are continuous thanks to the removal of isolated pixels wrongly annotated either in the object or in the background (**Figure 4**).

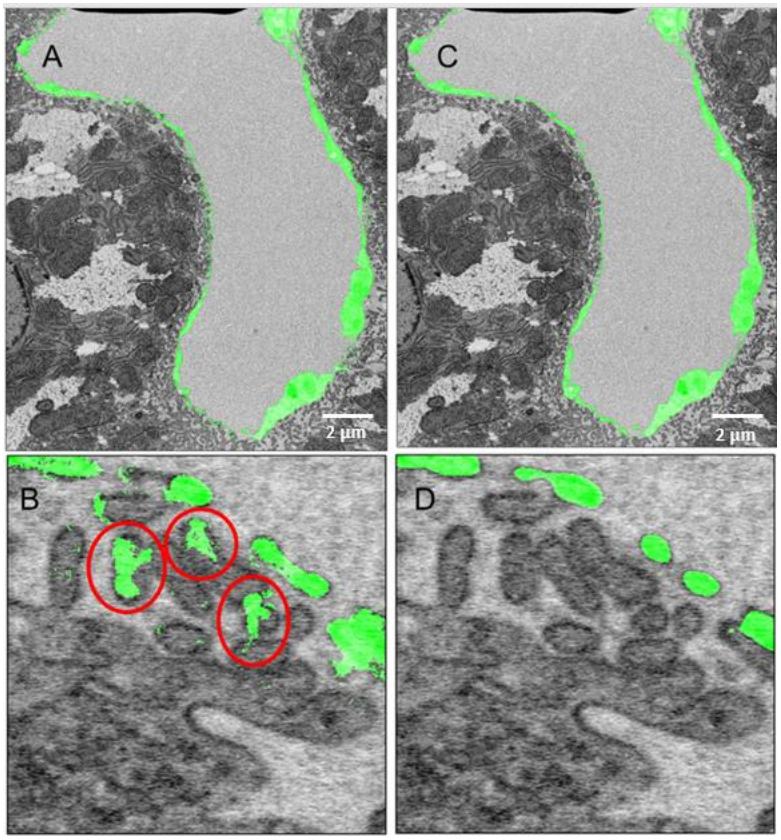


Figure 4. nnU-Net segmentation improvement. *Segmentation performed with Ilastik large field of view (**A**) and zoom-in (**B**) showing unproperly assigned hepatocyte microvilli (red circles). (**C-D**) Segmentation of the same region obtained with nnU-Net.*

Quantification of LSEC fenestration

Current method for determining LSEC fenestrae densities and diameters are mainly manual precluding the possibility to perform large scale comparative and statistical analyses. To be consistent with the development of a pipeline for LSEC fenestration analysis, such semi-automatic quantitative method is required. To this end, we implemented a dual approach using, on the one hand, cPSD to determine diameter distribution in the LSEC segment, and on the other hand, we developed a tool based on manifold embedding allowing to count the number of fenestrae in the same segment. The cPSD method enables the measurement of pore sizes throughout the 3D volume, using a user-defined range and step size. Originally developed for analyzing porous materials, its application to biological tissues is novel. One of the key

advantages of cPSD is that it is fully automated, ensuring statistically robust and unbiased measurements, independent of any user-driven segmentation or manual intervention. For our analysis, we applied pore radii ranging from 20 to 150 nm with a step size of 4 nm. The voxel dimensions were set to 4.0 nm in X, Y, and Z, since FIB-SEM acquisition is isotropic at 4 × 4 × 4 nm^3. We employed the 3D variant of the cPSD method, as our data is a stack of images.

The distribution of diameter is gaussian (**Figure S4**) with average and median diameters of 142 and 140 nm, respectively. These data are consistent with the literature [8] confirming the appropriateness of this method.

Since the cPSD approach does not provide individual diameters, it cannot provide counts of fenestrae. Moreover, automatic pore counting in 3D is not possible. Therefore, to determine the number of fenestrae per LSEC segment, we developed a method using ISOMAP [20] to embed the 3D mesh of LSEC into 2D. Then, the 2D embedded mesh was converted to image and the pores were identified by labeling the distinct objects in the image (**Figure 5**). On the WT dataset, a total of 168 fenestrae were counted corresponding to a fenestrae density of 10.8 fenestrae per μm^2. These data are also relatively close to previously published data showing around 6 fenestrae par μm^2 [8].

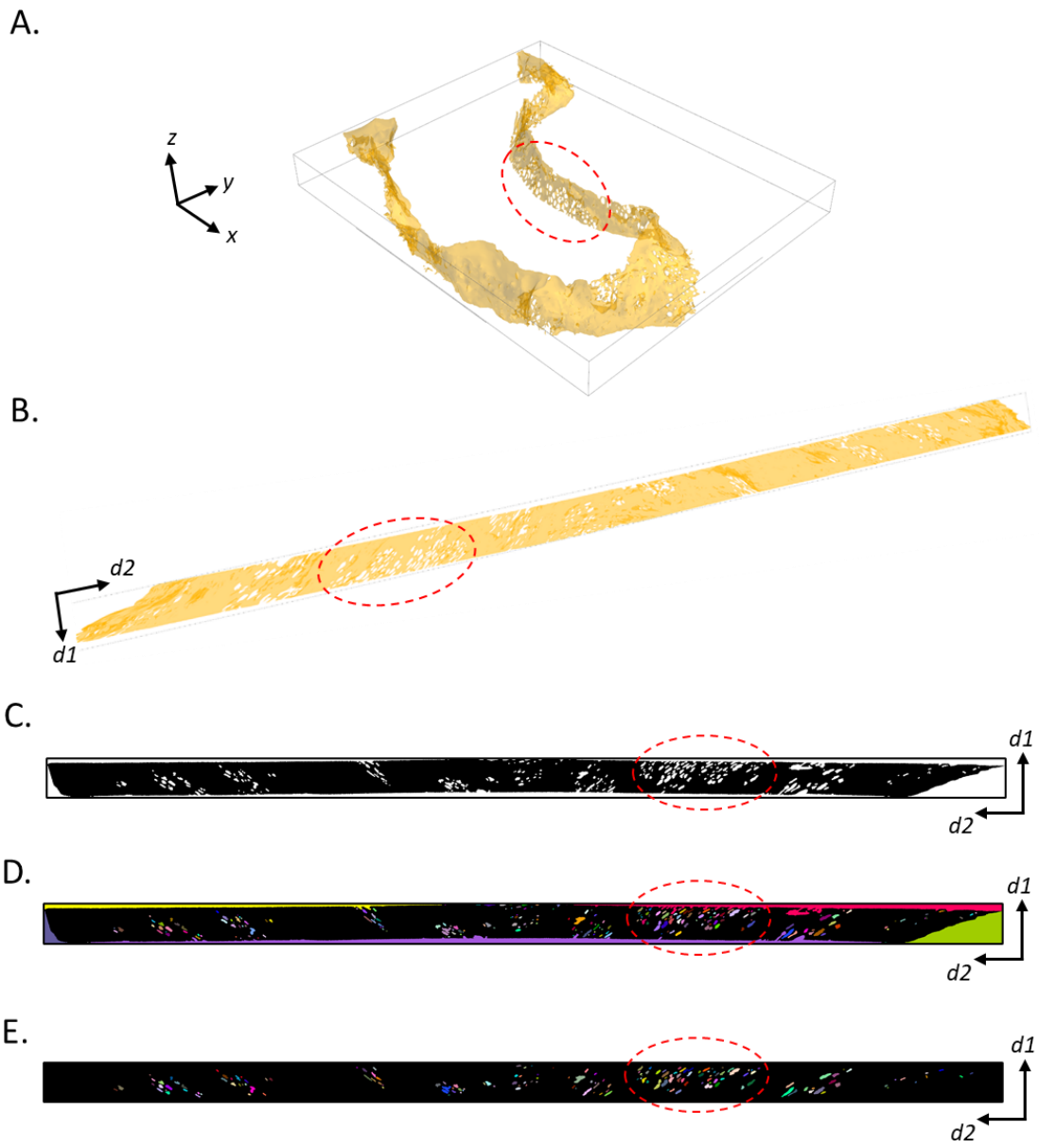


Figure 5: LSEC fenestrae counting. A, *3D mesh of LSEC generated from its 3D binary mask. It is simplified and smoothed in MeshLab.* ***B****, 2D embedding of 3D mesh using ISOMAP. The 2D mapping preserves the geodesic distances on the 3D mesh.* ***C****, Image rasterization from 2D embedded mesh. Morphological opening is used to correct the rasterization artifact.* ***D****, Image labeling to identify distinct objects in the image.* ***E****, Remove undesired objects based on area. The pores touching the image borders are not counted. The dashed circle in red highlights a LSEC region throughout the steps as a reference.*

Generalization of the pipeline to liver with altered LSEC ultrastructure

Since our pipeline appears efficient for LSEC segmentation and quantitative analysis of their fenestration, we decided to apply it to other types of liver samples with known alteration in LSEC ultrastructure. It has been shown that BMP9 is important for LSEC differentiation and its deletion leads to alteration in LSEC fenestration [8]. Liver samples from mice with genetic ablation of BMP9 were thus imaged by FIB-SEM. The 3D reconstruction of the sinusoid appeared different compared to samples from WT mice. There is a lower density of fenestration with more variable diameters including large ones (**Figure 6A**, white arrow). Initially, segmentation was performed with nnU-Net using the training from wild-type (WT) mice samples. However, this led to a limited segmentation of the LSEC mainly missing some fenestrated parts (**Figure 6B**, red circle). This can easily be explained by the fact that the object we want to segment has very different features in the BMP9-KO dataset. To obtain a better segmentation of the BMP9-KO images, a specific ground truth was built (**Figure 6C**). FIB-SEM data shows higher contrast for LSEC membranes in WT sample compared to BMP9-KO, enabling segmentation with only two classes, object and background. In contrast, BMP9-KO requires three classes to better guide the network during training. The grayscale contrast is less pronounced, and the LSEC membranes are more discontinuous. As for WT, the ground truth can then be improved after nnU-Net has been trained on this ground truth leading to more complete and accurate segmentation of the LSEC, in particular in the fenestrated region (**Figure 6D**, red circle).

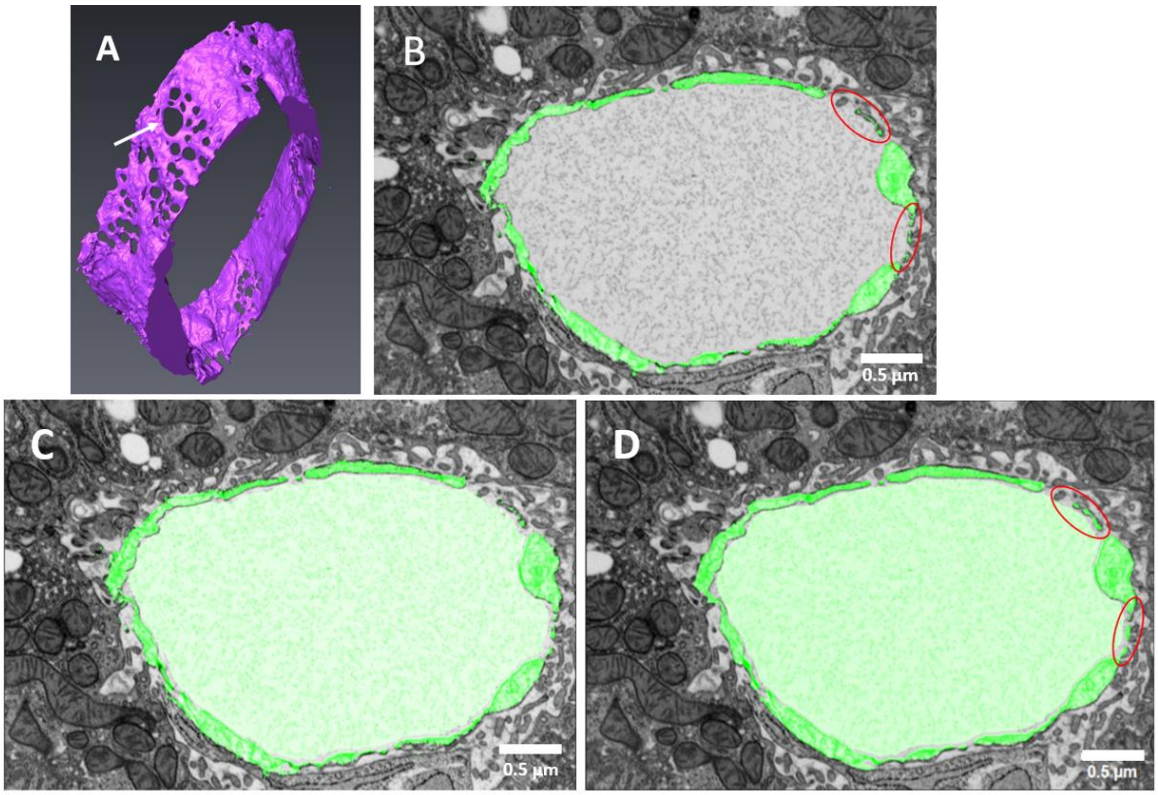


Figure 6: Segmentation of BMP9-KO sinusoid. *(**A**) 3D reconstruction of a BMP9-KO hepatic sinusoid showing large fenestrae (white arrow). (**B-C**) Ilastik-based segmentation of LSEC membranes using a method similar as for WT (**B**) or using three classes (**C**). (**D**) Prediction results obtained with nnU-Net based on the three classes ground truth.*

Using LSEC volume from the BMP9-KO dataset, diameter distribution and fenestrae counting were performed using cPSD and manifold embedding methods, respectively. Contrary to WT samples, diameter distribution appeared to be non-Gaussian (**Figure S5**) with average and median diameter of 170 and 160 nm, respectively. In the KO dataset, a total of 53 fenestrae have been counted leading to an average of 6.5 fenestrae per µm². Therefore, the diameter is slightly larger and the density of fenestrae lower in BMP9-KO compared to WT LSEC. These results are consistent with published data on the same mice [8]. Moreover, our methodology also showed that the distribution of fenestrae diameter is more heterogenous in BMP9-KO compared to WT sinusoid endothelium with a diameter distribution that clearly shows a

significant amount of fenestrae with large diameter in BMP9-KO data, larger than 130 nm, which are almost absent in the WT data. Therefore, using an appropriate ground truth it is possible to segment LSEC from various datasets and quantify fenestrae diameter distribution and density in these endothelia.

Discussion

In this study, we developed a complete workflow enabling to reconstruct the fenestrated endothelium of LSEC from mouse liver in 3D and at nanometer resolution, and to quantify the number and the diameter distribution of the fenestrae. Given the critical role of the fenestrated endothelium in liver functions, this methodology is of paramount interest in the field of liver biology. Moreover, we have shown that the methodology can be applied to samples with altered LSEC ultrastructure. Therefore, it can be used in various contexts to characterize the status of the fenestrated endothelium, i.e., upon aging or in liver-related diseases. In addition, mouse liver was used as a test case, but the methodology could be extended to other species, particularly humans, in order to identify liver dysfunction or monitor disease progression. Indeed, implementing the nnU-Net deep learning method in the workflow makes it very powerful and generalizable to various samples, with the ability to process large volumes. The originality of our study lies in the application of nnU-Net not to an entire organ, as is more commonly done, but to a specific intracellular region [11]. Although ground truth segmentation is assumed error-free, sparse annotations often introduce inaccuracies. nnU-Net predictions demonstrate the capacity to correct these, highlighting its robustness. In our study, the fine-tuning strategy yielded the most accurate predictions. This approach relies on adapting a pre-trained model rather than training from scratch. By updating only the deeper layers with a low learning rate, the model gradually learns dataset-specific features while retaining the general representations it had already acquired. This balance between prior knowledge and adaptation

likely explains its superior performance compared to other training strategies. In conclusion, a powerful workflow devoted to the analysis of the liver fenestrated endothelium can be used for the analysis of various liver samples.

Acknowledgments

References

[1] Z. Kmieć, Cooperation of Liver Cells in Health and Disease, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56553-3.

[2] Y.J. Yoon, S. Chang, O.Y. Kim, B.-K. Kang, J. Park, J.-H. Lim, J. Yun Huang, Y.-K. Kim, J.H. Byun, Y.S. Gho, Three-Dimensional Imaging of Hepatic Sinusoids in Mice Using Synchrotron Radiation Micro-Computed Tomography, PLoS ONE 8 (2013) e68600. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068600.

[3] K. Szafranska, L.D. Kruse, C.F. Holte, P. McCourt, B. Zapotoczny, The wHole Story About Fenestrations in LSEC, Front. Physiol. 12 (2021) 735573. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.735573.

[4] B. Zapotoczny, K. Szafranska, E. Kus, F. Braet, E. Wisse, S. Chlopicki, M. Szymonski, Tracking Fenestrae Dynamics in Live Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells, Hepatology 69 (2019) 876–888. https://doi.org/10.1002/hep.30232.

[5] C.I. Øie, V. Mönkemöller, W. Hübner, M. Schüttpelz, H. Mao, B.S. Ahluwalia, T.R. Huser, P. McCourt, New ways of looking at very small holes – using optical nanoscopy to visualize liver sinusoidal endothelial cell fenestrations, Nanophotonics 7 (2018) 575–596. https://doi.org/10.1515/nanoph-2017-0055.

[6] D.G. Le Couteur, A. Warren, V.C. Cogger, B. Smedsrød, K.K. Sørensen, R. De Cabo, R. Fraser, R.S. Mccuskey, Old Age and the Hepatic Sinusoid, Anat. Rec. 291 (2008) 672–683. https://doi.org/10.1002/ar.20661.

[7] J. Poisson, S. Lemoinne, C. Boulanger, F. Durand, R. Moreau, D. Valla, P.-E. Rautou, Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases, J. Hepatol. 66 (2017) 212–227. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009.

[8] A. Desroches-Castan, E. Tillet, N. Ricard, M. Ouarné, C. Mallet, L. Belmudes, Y. Couté, O. Boillot, J. Scoazec, S. Bailly, J. Feige, Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis, Hepatology 70 (2019) 1392–1408. https://doi.org/10.1002/hep.30655.

[9] V.C. Cogger, J.N. O'Reilly, A. Warren, D.G. Le Couteur, A Standardized Method for the Analysis of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Fenestrations by Scanning Electron Microscopy, J. Vis. Exp. (2015) 52698. https://doi.org/10.3791/52698.

[10] F. Braet, E. Wisse, P. Bomans, P. Frederik, W. Geerts, A. Koster, L. Soon, S. Ringer, Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions, Microsc. Res. Tech. 70 (2007) 230–242. https://doi.org/10.1002/jemt.20408.

[11] M. Antonelli, A. Reinke, S. Bakas, K. Farahani, A. Kopp-Schneider, B.A. Landman, G. Litjens, B. Menze, O. Ronneberger, R.M. Summers, B. van Ginneken, M. Bilello, P. Bilic, P.F. Christ, R.K.G. Do, M.J. Gollub, S.H. Heckers, H. Huisman, W.R. Jarnagin, M.K. McHugo, S. Napel, J.S.G. Pernicka, K. Rhode, C. Tobon-Gomez, E. Vorontsov, J.A. Meakin, S. Ourselin, M. Wiesenfarth, P. Arbeláez, B. Bae, S. Chen, L. Daza, J. Feng, B. He, F. Isensee, Y. Ji, F. Jia, I. Kim, K. Maier-Hein, D. Merhof, A. Pai, B. Park, M. Perslev, R. Rezaiifar, O. Rippel, I. Sarasua, W. Shen, J. Son, C. Wachinger, L. Wang,

Y. Wang, Y. Xia, D. Xu, Z. Xu, Y. Zheng, A.L. Simpson, L. Maier-Hein, M.J. Cardoso, The Medical Segmentation Decathlon, Nat. Commun. 13 (2022) 4128. https://doi.org/10.1038/s41467-022-30695-9.

[12] F. Isensee, P.F. Jaeger, S.A.A. Kohl, J. Petersen, K.H. Maier-Hein, nnU-Net: a self-configuring method for deep learning-based biomedical image segmentation, Nat. Methods 18 (2021) 203–211. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01008-z.

[13] 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, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nat. Methods 9 (2012) 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

[14] P. Thevenaz, U.E. Ruttimann, M. Unser, A pyramid approach to subpixel registration based on intensity, IEEE Trans. Image Process. 7 (1998) 27–41. https://doi.org/10.1109/83.650848.

[15] D.G. Lowe, Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints, Int. J. Comput. Vis. 60 (2004) 91–110. https://doi.org/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94.

[16] S. Berg, D. Kutra, T. Kroeger, C.N. Straehle, B.X. Kausler, C. Haubold, M. Schiegg, J. Ales, T. Beier, M. Rudy, K. Eren, J.I. Cervantes, B. Xu, F. Beuttenmueller, A. Wolny, C. Zhang, U. Koethe, F.A. Hamprecht, A. Kreshuk, ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis, Nat. Methods 16 (2019) 1226–1232. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9.

[17] P. Cignoni, M. Callieri, M. Corsini, M. Dellepiane, F. Ganovelli, G. Ranzuglia, Meshlab: an open-source mesh processing tool, Eurographics Ital. Chapter Conf. (2008) 129–136.

[18] J. Ahrens, B. Geveci, C. Law, Paraview: An end-user tool for large data visualization., in: Vis. Handb., 2005.

[19] O. Ronneberger, P. Fischer, T. Brox, U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation, in: N. Navab, J. Hornegger, W.M. Wells, A.F. Frangi (Eds.), Med. Image Comput. Comput.-Assist. Interv. – MICCAI 2015, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 234–241. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28.

[20] J.B. Tenenbaum, V. de Silva, J.C. Langford, A Global Geometric Framework for Nonlinear Dimensionality Reduction, Science 290 (2000) 2319–2323. https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2319.

[21] B. Münch, L. Holzer, Contradicting Geometrical Concepts in Pore Size Analysis Attained with Electron Microscopy and Mercury Intrusion, J. Am. Ceram. Soc. 91 (2008) 4059–4067. https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02736.x.

[22] N. Prochukhan, A. Rafferty, M. Canavan, D. Daly, A. Selkirk, S. Rameshkumar, M.A. Morris, Development and application of a 3D image analysis strategy for focused ion beam – Scanning electron microscopy tomography of porous soft materials, Microsc. Res. Tech. 87 (2024) 1335–1347. https://doi.org/10.1002/jemt.24514.

[23] C.N. Straehle, U. Köthe, G. Knott, F.A. Hamprecht, Carving: Scalable Interactive Segmentation of Neural Volume Electron Microscopy Images, in: G. Fichtinger, A. Martel, T. Peters (Eds.), Med. Image Comput. Comput.-Assist. Interv. – MICCAI 2011, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011: pp. 653–660. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23623-5_82.

[24] C. Sommer, C. Straehle, U. Kothe, F.A. Hamprecht, Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit, in: 2011 IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging Nano Macro, IEEE, Chicago, IL, USA, 2011: pp. 230–233. https://doi.org/10.1109/ISBI.2011.5872394.

Supplementary information

A general methodology for sinusoid fenestration analysis based on 3D electron microscopy data.

Cécile Pohar [a,b,‡], *Yousr Rekik* [a,b,‡], *Minh Son Phan* [c], *Benoit Gallet* [d], *Agnès Desroches-Castan* [e], *Sabine Bailly* [e], *Jean-Yves Tinevez* [c], *Emmanuelle Tillet* [e], *Nicola Vigano* [b], *Pierre-Henri Jouneau* [b,*], *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] Pasteur Institute, Paris, France

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

[e] Laboratoire Biosanté U1292, Université Grenoble Alpes, Inserm, CEA, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

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

‡ These authors contributed equally.

LSEC segmentation full method

Step 1: Definition of the LSEC fenestration localization region

The initial image stack is first binned in Fiji (using the *Average* method with a *binning* factor of 16 in each spatial direction). The resulting image stack has the following dimensions: 231 × 268 × 25 px³ with a voxel size of 64 nm³. This binned image stack is then used as *Raw Data* for an Ilastik *(Carving)* project for sinusoid lumen segmentation. The following parameters are used: *dark lines*, filter scale = 1.6. The segmentation mask exported from Ilastik is resampled in Fiji using bicubic interpolation with a scaling factor of 8 in all 3 directions.

The post-processing steps for this resampled mask are then performed in IPSDK (https://www.reactivip.com/fr/traitement-dimages/), which is an image analysis library written in Python and commercialized by the company Reactiv'IP. These steps are performed in the following order:

- 'Binarization' of the mask (necessary step even though the segmentation mask is initially binary) (*Binarization ⟶ Simple Threshold*)
- Application of the *outline* filter (*Basic Morphology ⟶ Boundary 3D*) to extract the sinusoid contour. The 6-nearest neighbor connectivity of a voxel (*connectivity 6*) is selected in *Neighborhood*
- Application of 3D dilation (*Basic Morphology ⟶ Dilation 3D*) with a radius of 30 using a spherical structuring element

Finally, a Gaussian filter with variance (*sigma*) of 30 in all 3 directions is applied in Fiji: *Process ⟶ Filters ⟶ Gaussian Blur 3D*. Thus, the mask of the fenestrated regions is created.

Step 2: Segmentation of LSEC Fenestrated Regions

The initial image stack and the mask of the fenestration localization region (from step 1) are combined in Fiji to form a 2-channel image stack. Two sub-volumes of dimensions 354 x 393 x 392 px³ are extracted from this image stack and converted to HDF5 format in Fiji before being

imported as Raw Data into an Ilastik project (pixel classification). All features proposed by Ilastik are selected. After segmentation of these two sub-volumes, the segmentation is generalized to the entire (2-channel) image stack: in the batch processing tab of the Ilastik project, click on Select Raw Data Files, import the entire image stack to be segmented (2-channel image stack) and finally click on Process all files. To export the binary segmentation mask and not the probability map, choose Simple Segmentation in the Prediction Export tab (as explained above).

After batch processing, the generated binary mask (segmentation mask 1) is post-processed in Fiji by applying the following steps:

- Inversion of the mask of the fenestrated regions followed by 3D dilation with radius 50 using a spherical structuring element. Since IPSDK is faster than Fiji for image analysis, it is used for dilation. The radius is chosen after trial-and-error steps. The resulting mask is called the subtraction mask.
- Subtraction of the subtraction mask from the mask generated after batch processing: Process → Image Calculator, put segmentation mask 1 in Image1, the subtraction mask in Image2 and Subtract in Operation. Both image stacks must be open in Fiji before performing the subtraction.

The final result of this step is the LSEC segmentation mask of the fenestrated regions.

Step 3: Segmentation of LSEC Nuclear Regions

Initial Data Preprocessing

Determination of the sinusoid outer edge. In IPSDK, the resampled segmentation mask of the sinusoid lumen (see step 1) is dilated in 3D with radius 285 using a spherical structuring element. Then, the non-dilated mask is subtracted from the thus dilated mask (Arithmetic → Subtraction Image). The result defines the sinusoid outer edge.

Determination of the sinusoid inner edge. The following steps are performed in IPSDK:

- Dilation of the resampled segmentation mask of the sinusoid lumen with radius 85 using a spherical structuring element.
- Subtraction of the non-dilated mask from the thus dilated mask. The result is called the intermediate mask.
- Dilation of the sinusoid contour (see step 1) with radius 85 using a spherical structuring element.
- Subtraction of the intermediate mask from the dilated contour mask. The result defines the sinusoid inner edge.

Definition of the LSEC localization band. The two inner and outer edges are added in Fiji: Process → Image Calculator, choose Add in Operation and put the two image stacks representing the two sinusoid edges in Image1 and Image2. Both image stacks must be open in Fiji before performing the addition.

Application of the LSEC localization band to initial images. The following steps are performed in Fiji:

- Subtraction: LSEC localization band - initial data
- Contrast inversion of the subtraction result

Segmentation of LSEC Nuclear Regions

The preprocessed initial images are binned in Fiji using the Average method with a binning factor of 8 in all 3 directions. The resulting image stack has the following dimensions: 462 × 535 × 49 px^3 and a voxel size of 32 nm^3. It is then used as Raw Data for an Ilastik project (Carving) with parameters dark lines, filter scale = 1.6. The binary segmentation mask is exported from Ilastik and resampled by interpolation in Fiji. This mask is the LSEC nuclear region mask.

Step 4: Final LSEC Segmentation

The preprocessed initial images (voxel size = 4 nm^3), the LSEC mask of the fenestrated regions, and the LSEC nuclear region mask are combined in Fiji to form a 3-channel image stack: Image → Color → Merge Channels. In total, 6 sub-volumes are extracted from this image stack and converted to HDF5 format in Fiji before being imported as Raw Data into an Ilastik project (pixel classification).

All features proposed by Ilastik are selected. After training the classifier on the sub-volumes, the segmentation is generalized to the entire (3-channel) image stack. The dimensions of the sub-volumes used in algorithm training are detailed in **Table S1**.

Sub-volume number	**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

Table S1: Dimensions of the sub-volumes used for Pixel classification algorithm training in step 4 of hepatic sinusoid segmentation.

The binary masks of the entire image stack obtained after training on 4 sub-volumes (sub-volumes 1 to 4 from **Table S1**) and on 6 sub-volumes (sub-volumes 1 to 6 from **Table S1**) are exported from Ilastik. Then, after conversion to TIFF format, they are post-processed in Fiji by applying the OR arithmetic operation: *Process → Image Calculator*, put the two masks as *Image1 and Image2* and choose *OR* in *Operation*. As mentioned above, both image stacks must be open in Fiji before performing this operation. The resulting mask is then imported into IPSDK. To reduce segmentation errors of this binary mask, a connected components analysis is initially applied to separate its connected components (groups of connected voxels):

Advanced Morphology → *Connected Component 3D* and choosing 6-nearest neighbor connectivity of a voxel (*connectivity 6* in *Neighborhood*).

Size filtering is then performed on the detected components (or objects) to keep only the largest component: *Advanced Morphology* → *Keep big shape 3D*. The corresponding 3D mesh is created: *Shape Segmentation* → *Label Shape Extraction 3D*, in *Label Image*, put the result obtained after the *Keep big shape 3D* operation. The generated 3D mesh is saved in the *Values* → *Shapes* menu (top left). It is saved in STL format (*Standard Triangle Language*, with .stl extension) and converted to OBJ format in Paraview. Then, it is simplified in MeshLab (version v2020): Filters → *Remeshing, Simplification and Reconstruction* → *Quality Edge Collapse Decimation*. The chosen *Quality threshold* parameter is 0.3 to reduce the number of mesh surfaces by 30%, the *Optimal position of simplified vertices* option is checked, and other parameters are left at their default values. The simplified mesh is finally smoothed with Taubin filtering: Filters → *Smoothing, Fairing and Deformation* → *Taubin Smooth* with the following parameters: λ (lambda) = 0.6, μ (mu) = -0.53 and 100 iterations. Paraview is used for 3D rendering.

nnU-Net

While Ilastik-based segmentation depends on human labeling, it suffers from various artifacts. This prompted us to explore the use of deep learning tools, with the hope to both clean the segmented volumes, and generalize possibly automatize the segmentation of larger or similar but previously unseen raw volumes. For this task, we selected the Python package "nnU-Net" [1], which leverages deep convolutional neural networks (CNNs). We used the reference segmentation from Ilastik as "ground truth" to train the CNN segmentation model from nnU-Net.

The nnU-Net package requires specific steps to process the data: Setting up a dedicated Python environment with all the required dependencies (including the machine-learning library "PyTorch"); creating and referencing with environment variables the raw data, pre-processed data and trained model weights directories; and transforming arbitrary raw data into the required nnU-Net input data format. The structure of the said data format is based on the format used for the image analysis challenge from the Medical Segmentation Decathlon [2].

nnU-Net automatically scales the underlying CNN model depending on the data shape, and uses cross-validation (CV) as an unbiased technique to fine-tune the model hyperparameters during training. In particular, nnU-Net uses the so-called five-fold cross-validation, that is depicted in **Figure S1**. It divides the training data into 5 equally-sized subsets (called "folds"), and repeats the training of the model also five times. Each time, a different fold is excluded from the training data, and it is used to evaluate the segmentation performance of the model.

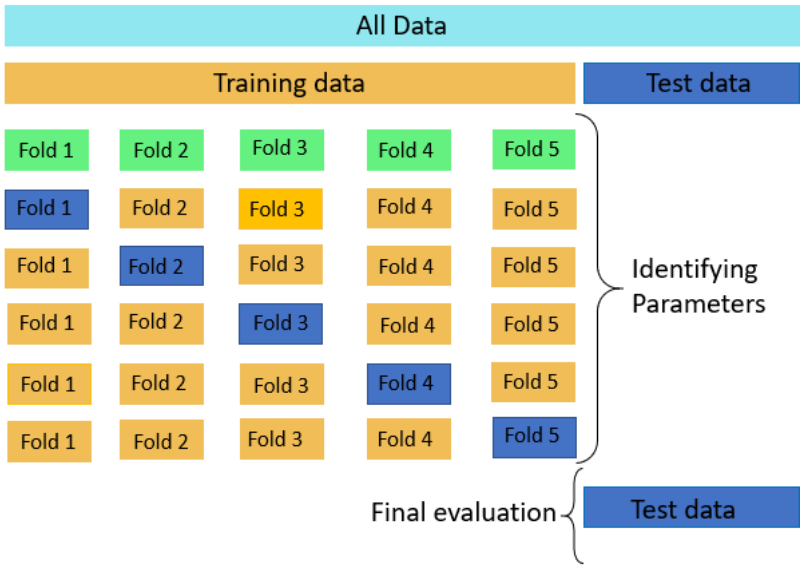


Figure S1: *Training and Validation Using Five Equally Sized Subsets ("Folds").*

The package nnU-Net offers out-of-the-box various CNN architectures, which follow the U-Net design [3]: an encoding path that progressively extracts larger scale features from the image, and a symmetric decoding path that reconstructs the segmentation by combining spatial

details from various scales. While nnU-Net can automatically tune most of its parameters, some still need to be adjusted according to the characteristics of the input data. This includes the choice of various types of models (e.g., standard U-Net vs residual encoder U-nets, etc) and their dimensionality (i.e., 2D vs 3D). When working with large volumes, it might also be advisable to divide them into smaller sub-volumes. The sub-volume size requires additional careful evaluation. We use a JSON (JavaScript Object Notation) file to store all these different attributes and parameters.

The key parameters optimized according to the characteristics of our data are detailed below.

Dimensionality: The selection of the U-Net architecture dimensionality (i.e., 2D vs 3D) depends on the following criteria and constraints: the complexity of the target structure; the dimensionality of the data (image vs volumes); and the available computational resources (small local workstation vs large node on a HPC cluster). In our case, for instance, we worked with 3D data on a moderately old Linux workstation, equipped with a NVIDIA RTX 5000 GPU (equivalent to a NVIDIA RTX 2080 Ti). This configuration made us first consider training a 2D U-Net (using 2D convolutions), which is faster (by approx. a factor 2) and uses less GPU memory than a 3D U-Net. We used this 2D U-Net to fine-tune sub-volumes sizes (i.e., **patch size**) and other parameters. Following this initial parameter-tuning step, we also trained a 3D U-Net, which is better suited for the complexity of the features in our data.

Epochs: The number of epochs is chosen to minimize the training time in order to prevent overfitting. For our data, we have observed that a 2D U-Net converges in 150 epochs (**Figure S2**), while a 3D U-net converges in 350 epochs. We have modified the nnU-Net code to allow manually choosing the number of epochs.

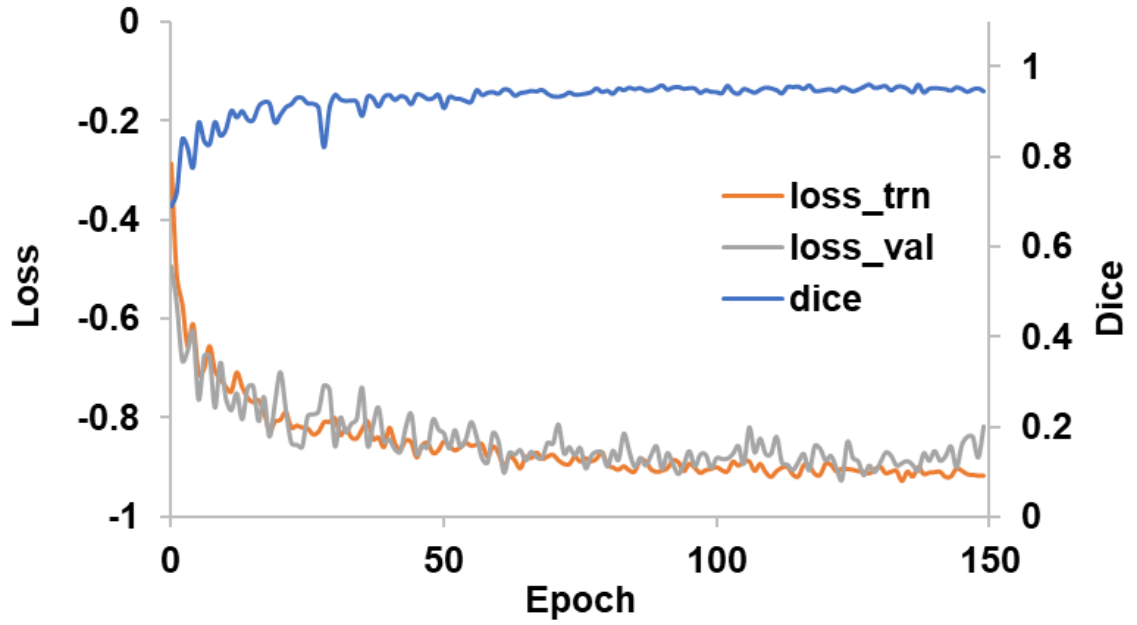


Figure S2: Dice score and loss function values at each number of epoch during the training with a 2D U-Net configuration. *Under nnU-Net, the loss function is a combination: Loss = DiceLoss + CrossEntropyLoss. The Dice Loss is well suited for segmentation cases with imbalanced classes, particularly when the background predominates over the object of interest. Cross-entropy loss is used to impact classification errors at the pixel level, which helps to ensure stable convergence. This score ranges from 0 to 1. The closer the score is to 1, the greater the similarity between the predictions and the ground truth. In this graph, the Dice score reaches a value of 0.98, indicating that the model is able to generalize. The higher the Dice score, the lower the loss function as shown here.*

Patch size: Larger patches (sub-volumes) are preferred as they preserve more spatial context, which is crucial for accurate segmentation. However, since some of the sub-volumes are dedicated to the test and cross-validation sets, we need a sufficient number of sub-volumes in order to have enough representation for different regions of the raw volume. Thus, the user should find an equilibrium between larger and smaller patch sizes that satisfies both constraints. As mentioned above, the sub-volume split creates boundary discontinuities between patches,

which can lead to fragmented segmentation. For this reason, we allow some **overlap** between adjacent sub-volumes, by extending them. The overlap was: (50, 50, 50).

Optimizer: The Adam optimizer was used [reference: 1. D. P. Kingma and J. L. Ba, "Adam: A method for stochastic optimization," in 3rd International Conference on Learning Representations, ICLR 2015 (2015).].

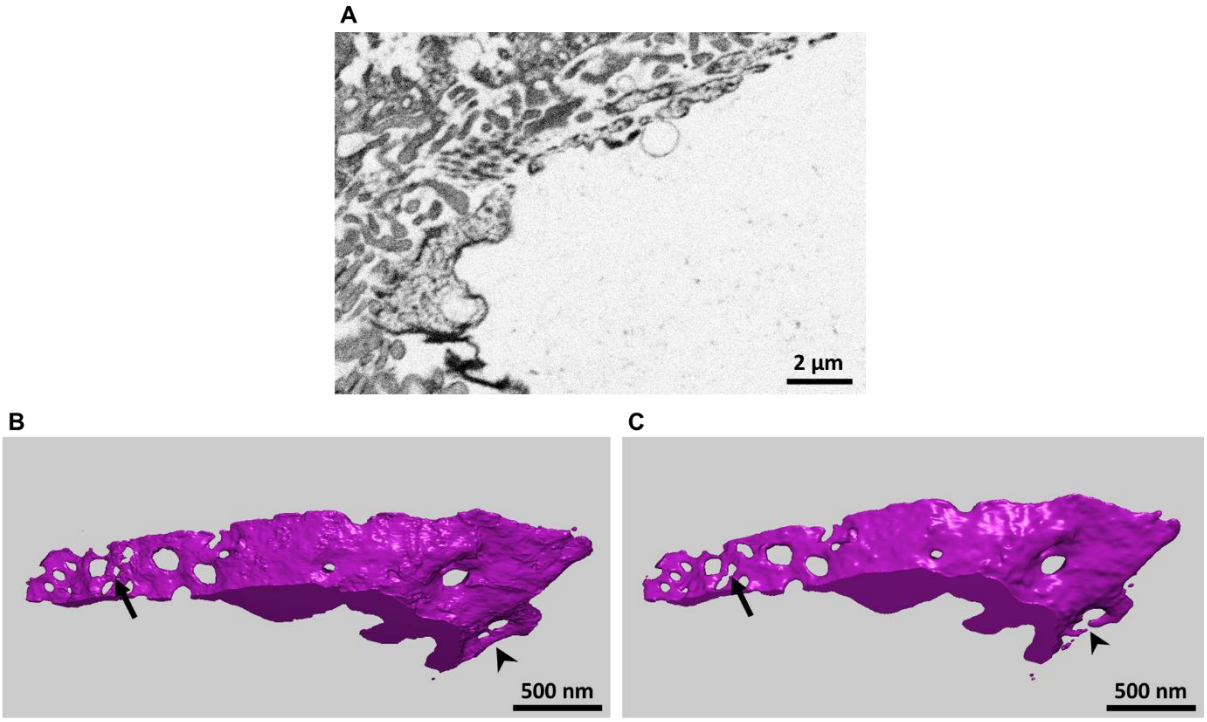


Figure S3: Loss of LSEC fenestrae upon binning. *Segmentation of a region with LSEC fenestrae* ***(A)*** *using data at 4 × 4 × 4 nm³ (****B****) or binned at 8 × 8 × 8 nm³ (****C****). 3D mesh obtained for both segmentation shows fenestrae properly segmented in (****B****), while they are connected fused in (****C****).*

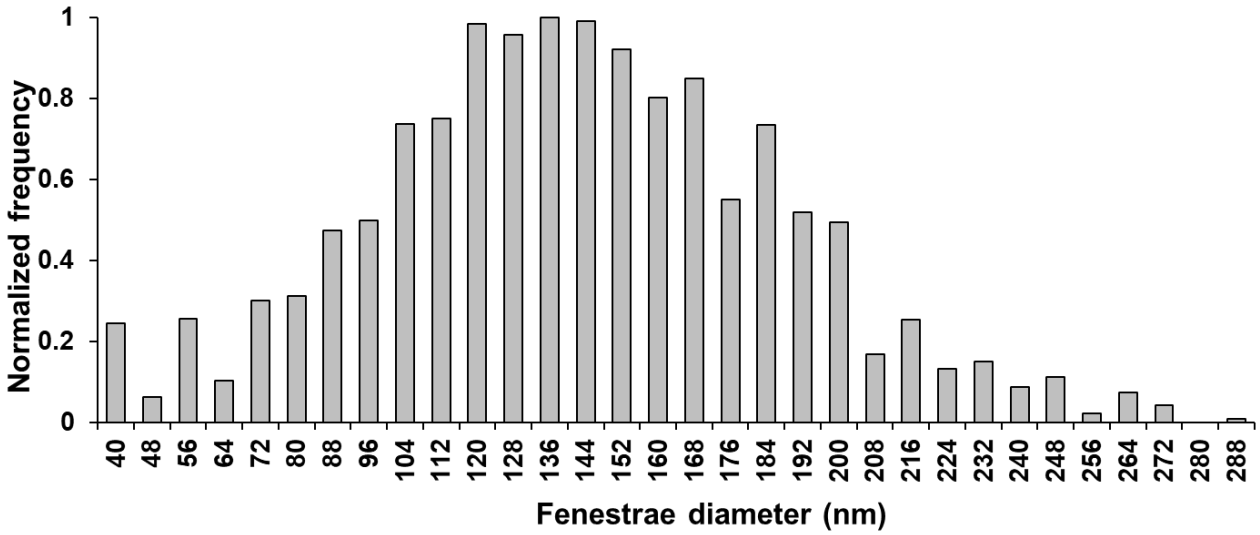


Figure S4: Determination of the distribution of LSEC fenestrae diameters in WT dataset. *Automated measurement method for determining LSEC fenestrae diameters from the binary segmentation mask, using the continuous Pore Size Distribution (cPSD) under the xlib plugin in Fiji. Normalized histogram. Measurements were performed on data with a voxel size of 4 × 4 × 4 nm³. The weighted average and median are obtained from this data.*

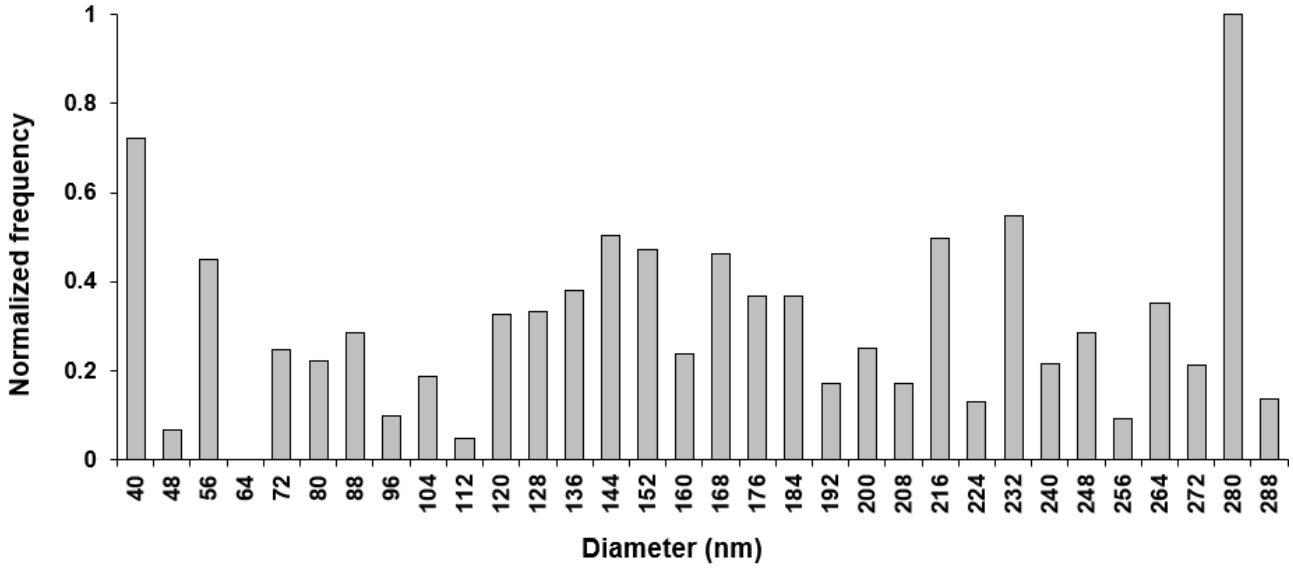


Figure S5: Determination of the distribution of LSEC fenestrae diameters in BMP9-KO dataset. *Automated measurement method for determining LSEC fenestrae diameters from the binary segmentation mask, using the continuous Pore Size Distribution (cPSD) under the xlib plugin in Fiji. Normalized histogram. Measurements were performed on data with a voxel size of 4 × 4 × 4 nm³. The weighted average and median are obtained from this data.*

II.2. Conclusion – Perspectives

Ce manuscrit en préparation expose une stratégie pour l'analyse des fenêtres des LSEC. Au cours de ma thèse, l'entraînement d'un réseau de neurones, ainsi que l'ajustement des paramètres aux spécificités de nos données, ont représenté les principaux défis méthodologiques réalisés au cours de la thèse.

Les résultats obtenus ont mis en évidence des différences notables dans l'ultrastructure des sinusoïdes hépatiques selon le contexte biologique.

Premièrement, au niveau des membranes des LSEC, l'acquisition montre que, visuellement, les structures apparaissent plus discontinues dans les foies de souris BMP9-KO. Cette discontinuité rend la reconnaissance des structures plus complexe pour le réseau de neurones. De plus, le contraste des membranes des LSEC s'est avéré moins prononcé sur les échantillons de foie de souris BMP9-KO. Ces différences nous ont amené à adapter le pipeline transposé d'un foie de souris WT vers un foie de souris BMP9-KO. En effet, la principale différence réside dans la segmentation de référence (ground truth) : trois classes ont dû être utilisées pour les souris BMP9-KO, contre deux pour les souris WT.

En théorie, une classification en un plus grand nombre de classes peut potentiellement fournir au réseau de neurones des informations plus détaillées, à condition que les classes soient bien définies et représentées de manière cohérente dans les données. Les échantillons analysés présentent un environnement tissulaire dense ce qui peut venir complexifier la différentiation entre les classes et encore plus lorsque les classes sont disproportionnées. La proportion des membranes des LSEC par rapport au background révèle rapidement un déséquilibre, l'objet étant nettement moins représenté que le background.

L'analyse d'images pour ce projet étant particulièrement complexe, l'utilisation d'un outil de deep learning performant était nécessaire. C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de nnU-Net. L'article de Fabian Isensee (Isensee *et al.*, 2021) a servi de référence pour l'exploration de nnU-Net dans le cadre de ce projet. La structure prédéfinie du réseau de neurones ainsi que l'intégration automatisée de nombreux hyperparamètres dans nnU-Net facilitent grandement sa prise en main.

Dans la littérature, nnU-Net est davantage utilisé pour la segmentation d'un organe (Haylaz *et al.*, 2025). Notre cas d'étude constitue une problématique complexe en raison de la structure et de l'environnement dense entourant les membranes des LSEC. A ce jour, la méthode a été développée en local sur une station de travail sous le système d'exploitation Linux comportant un GPU RTX 5000, similaire à un GPU de 2080 TI. Avec le FIB-SEM, l'acquisition génère une pile d'images pouvant dépasser 2000 coupes, en fonction de la durée d'utilisation du microscope et du type d'analyse effectuée. Pour appliquer la segmentation à l'ensemble de ces images, des ressources importantes en stockage et en calcul sont nécessaires, généralement via des clusters de calcul. La complexité de l'environnement nnU-Net se manifeste notamment lors de la modification de ses scripts, en raison de l'imbrication des différents modules. Bien qu'il soit possible de transférer l'environnement local vers un cluster de calcul, cette opération nécessite des compétences informatiques avancées afin d'assurer le bon enchaînement des différentes composantes du pipeline. La prochaine étape sera donc d'implémenter nnU-Net sur un cluster de calculs et de lancer les prédictions sur la totalité de la pile d'images acquise au FIB-SEM. L'intérêt d'avoir une segmentation sur la pile d'images complète est d'obtenir des données quantitatives à plus grande échelle augmentant ainsi la statistique.

Des logiciels comme Ilastik ne sont pas conçus pour traiter efficacement un très grand volume d'images (plus de 1000 images) lors de la généralisation avec le module *BatchProcessing*. En effet, Ilastik montre des limites importantes en termes de gestion de la mémoire, de stabilité et de performance à grande échelle.

Nos résultats ont montré que le fine-tuning appliqué dans le cadre de nnU-Net guide le réseau de neurones sur la segmentation de nouvelles données du même type d'objet. Une des méthodes de fine-tuning consiste à segmenter une dizaine de coupes de la pile d'images avec Ilastik. Ensuite, la segmentation est élargie sur une centaine de coupes avec précision par nnU-Net sur un nouveau jeu de données. A ce stade, les performances de nnU-Net ont été validées mais cela aurait pu être davantage étendu sur la pile d'images si nnU-Net fonctionnait sur un cluster. En l'absence de fine-tuning, c'est-à-dire sans ré-entraînement du réseau sur un jeu de données cible, l'architecture 3D U-Net en configuration *full_resolution* est celle ayant fourni les meilleures performances de prédiction à ce jour, suggérant une bonne capacité de généralisation. A ce jour, la meilleure prédiction est obtenue avec le fine-tuning en 2D, et si aucune annotation n'est réalisée en amont il s'agit de l'architecture 3D U-Net. Suite à cette analyse, la meilleure prédiction de segmentation est attendue avec une architecture 3D U-Net sur laquelle le fine-tuning serait appliqué. En effet, si la transposition des plans d'entraînement générés par nnU-Net vers un nouveau jeu de données s'avère fonctionnelle dans le cadre de l'architecture U-Net 2D, elle ne l'est pas pour l'architecture U-Net 3D, dont le traitement repose sur l'analyse tridimensionnelle des données. Les stratégies d'applications du fine-tuning sur l'architecture 3D U-Net sont à explorer pour pouvoir travailler en trois dimensions.
Le deuxième point à développer sur nnU-Net est la généralisation du modèle. En effet, on travaille avec deux types de génotypes de souris : BMP9-KO et WT. A ce jour, le modèle n'arrive pas à généraliser aux deux phénotypes. En d'autres termes, l'entrainement sur un jeu de données WT n'a pas permis de générer des prédictions sur un jeu de données BMP9-KO. Lorsqu'on utilise un outil de deep learning, on s'attend à avoir accès à une large base de données pour être capable de représenter toutes les variabilités possibles. En pratique, les temps d'acquisition en microscopie sont longs, ce qui limite la quantité de données pouvant être produites dans un seul projet. De plus, l'espace de stockage nécessaire pour stocker ces données représente un aspect non négligeable. Pour pallier à cela, des bases de données ouvertes telles qu'OpenOrganelle ont été mises en place afin de fournir un accès libre à un large ensemble de données volumétriques déjà annoté en biologie. Dans notre contexte, aucune image FIB-SEM des sinusoïdes hépatiques correspondant aux phénotypes précédemment mentionnés ne sont actuellement disponibles en ligne.

Après la segmentation générée par nnU-Net, puis la reconstruction 3D sous le logiciel Avizo, l'étape finale a consisté à extraire des mesures quantitatives, ciblant spécifiquement les fenêtres des LSEC. L'extraction automatique du diamètre des fenêtres des LSEC en 3D constitue un défi majeur. En effet, les fenêtres sont des ouvertures, et non des objets avec un contour, ce qui complique leur mesure directe. L'utilisation d'outils standards comme le plugin *Analyze Particles* de Fiji (Szafranska, Holte, *et al.*, 2021), bien qu'efficace pour des objets aux contours nets, se révèle inadaptée pour l'analyse d'objets aux limites mal définies. Segmenter les fenêtres comme des objets reviendrait à leur attribuer artificiellement des limites morphologiques, telles qu'un contour ou une membrane, alors qu'elles sont, par définition, des structures ouvertes.
La recherche d'une méthode automatique m'a amené à la méthode cPSD (continuous Pore Size Distribution) développée par Beat Munch (Münch & Holzer, 2008). Cette méthode a été appliquée sur

des réseaux de pores en 3D à haute résolution sur des matériaux. L'originalité de notre étude réside dans l'application de cette méthode à des données biologiques, accompagnée d'un ajustement des paramètres du plugin *xlib* sous Fiji. Les valeurs obtenues ont pu être comparées aux résultats précédemment obtenus par l'équipe BAL au CEA IRIG (Desroches-Castan *et al.*, 2019), qui ont réalisé des mesures manuelles en 2D sur des images acquises SEM. Les profils de variation du diamètre en fonction des phénotypes reproduisent des tendances analogues à celles identifiées dans notre analyse. Nos résultats montrent que les souris BMP9-KO présentent un diamètre de fenêtres des LSEC plus élevé que les souris WT, ce qui suggère une implication possible de la cytokine BMP9 dans l'organisation des sinusoïdes hépatiques. Cette modification de la taille des fenêtres pourrait altérer leur rôle de filtration, bien que des recherches complémentaires soient nécessaires pour confirmer l'ampleur et les conséquences fonctionnelles de ce phénomène.

Pour avoir une étude quantitative complète, il est essentiel de pouvoir quantifier le nombre de fenêtres par unité de surface entre les deux phénotypes. Le plugin xlib sous Fiji, codé en Java, ne permet pas d'extraire directement le nombre de fenêtres. Toujours dans l'optique de trouver une méthode automatisée, une collaboration avec la plateforme Hub d'analyse d'images de l'Institut Pasteur a permis de réaliser l'extraction du nombre de fenêtres sur des données issues d'échantillons de foie de souris WT et BMP9-KO. Le workflow mis en place dans un projet Gitlab sous Python, transpose un maillage 3D en surface 2D (Jung-Shiong Chang *et al.*, 2008). La seule condition est que le maillage 3D possède une zone d'ouverture afin de l'étirer en surface 2D. L'absence de BMP9 pourrait altérer la morphologie des LSEC, entraînant une diminution de la densité des fenêtres par rapport aux souris WT.
Pour renforcer la portée de cette étude, l'utilisation de nnU-Net pourrait être optimisée, notamment en améliorant la capacité de généralisation du modèle à différents contextes biologiques, de manière à ce que ses performances ne dépendent ni du contexte WT ni du contexte BMP9-KO. Par ailleurs, l'entraînement du modèle pourrait être accéléré grâce à l'utilisation de clusters de calcul. Enfin, il serait pertinent d'étendre le volume des prédictions en traitant l'ensemble du stack d'acquisition FIB-SEM, pouvant dépasser 1000 coupes, plutôt que de se limiter à une centaine de coupes, afin d'exploiter pleinement les informations disponibles en 3D. Cela nécessiterait l'utilisation d'un cluster de calcul.

III. Analyse de l'ultrastructure des canalicules biliaires chez les souris WT et BMP9-KO

III.1. Introduction

Les hépatocytes présentent une polarité particulière : leurs membranes basolatérales font face aux LSEC, tandis que leurs membranes apicales forment les canalicules biliaires, canaux micrométriques assurant l'acheminement de la bile (Gissen & Arias, 2015). Les hépatocytes produisent la bile primaire qui est sécrétée dans les canalicules biliaires ce qui initie le flux biliaire nécessaire à la digestion des lipides et à l'élimination de composés tels que la bilirubine. Les canalicules biliaires, dont le diamètre est de l'ordre du micromètre et varie selon la zone hépatique, représentent environ 0,2 % du volume total de la microarchitecture hépatique. Un hépatocyte peut établir jusqu'à trois canalicules avec ses cellules voisines (Shami *et al.*, 2016). Les canalicules biliaires constituent la plus petite unité du réseau biliaire et sont formés par l'espace délimité par les membranes apicales adjacentes des hépatocytes, sans membrane propre indépendante.

Lorsque l'intégrité des jonctions est compromise une dépolarisation des hépatocytes est observée, pouvant évoluer vers des lésions cellulaires. L'accumulation d'acides biliaires induit alors un stress cytotoxique, suggérant un lien entre la perte de polarité, les dysfonctionnements mitochondriaux, le déséquilibre énergétique et la cholestase. Cette dernière correspond à un ralentissement ou un arrêt de l'écoulement de la bile vers l'intestin (Gissen & Arias, 2015).

En microscopie électronique volumique, le réseau canaliculaire apparaît comme une structure complexe, ramifiée et tridimensionnelle. A la périphérie des lobules, les canalicules fusionnent pour former des structures tubulaires connectées au canal de Hering, zone de transition entre les canalicules biliaires et les tubes biliaires tapissés de cholangiocytes. Ces cellules modifient la composition de la bile au cours de son parcours, notamment dans des structures dites "en rosette" (Gupta, 2023). Plus en aval, les voies biliaires s'organisent en ramifications de plus en plus larges qui conduisent la bile vers la vésicule biliaire ou directement vers l'intestin grêle via les canaux hépatiques communs et cholédoques.

La revue de (Gupta, 2023) identifie quatre modules fonctionnels impliqués dans l'organisation et la stabilité du réseau canaliculaire : transport, contraction, barrière et mécanoperception. Les jonctions adhérentes et serrées jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'étanchéité entre les hépatocytes, garantissant ainsi l'efficacité de la barrière sang–bile. Parmi les contraintes mécaniques s'exerçant sur ce réseau, la pression intracanaliculaire liée à l'accumulation de bile constitue la principale force. Elle engendre une tension sur la membrane apicale et ses jonctions, détectée par les hépatocytes via des mécanismes de mécanoperception. Ce processus déclenche des réponses adaptatives permettant d'ajuster dynamiquement la perméabilité des jonctions afin de préserver l'intégrité fonctionnelle du réseau. De plus, le foie possède une remarquable capacité de régénération, incluant la reformation du réseau canaliculaire. Toutefois, les mécanismes de maturation et d'allongement de ces structures ne sont que partiellement compris. Il est admis que la formation initiale du pôle apical dans l'hépatocyte engendre une petite lumière sphérique, remodelée par la suite en un canal allongé sous l'action de forces intracellulaires. Ce remodelage repose sur un réseau d'actomyosine apical associé aux jonctions, qui confère aux canalicules leur forme ainsi que leur capacité contractile, facilitant la propulsion de la bile (Bebelman *et al.*, 2023). Les membranes apicales des hépatocytes qui délimitent le canalicule biliaire sont reliées par des extensions membranaires intracanaliculaires, appelées *bulkheads* apicaux (Belicova *et al.*, 2021).

III.2. Analyses de canalicules biliaires par FIB-SEM

- **Foie de souris WT**

L'évolution de la structure du canalicule biliaire, illustrée sur la **Figure 9**, a été étudiée dans un foie de souris WT. On observe nettement la lumière du canalicule biliaire, dont le diamètre maximal atteint environ 0,9 µm, en supposant une forme circulaire comme dans les analyses précédentes. La division du canalicule en deux branches distinctes illustre l'organisation ramifiée caractéristique du réseau biliaire (**Figure 9B-D**).

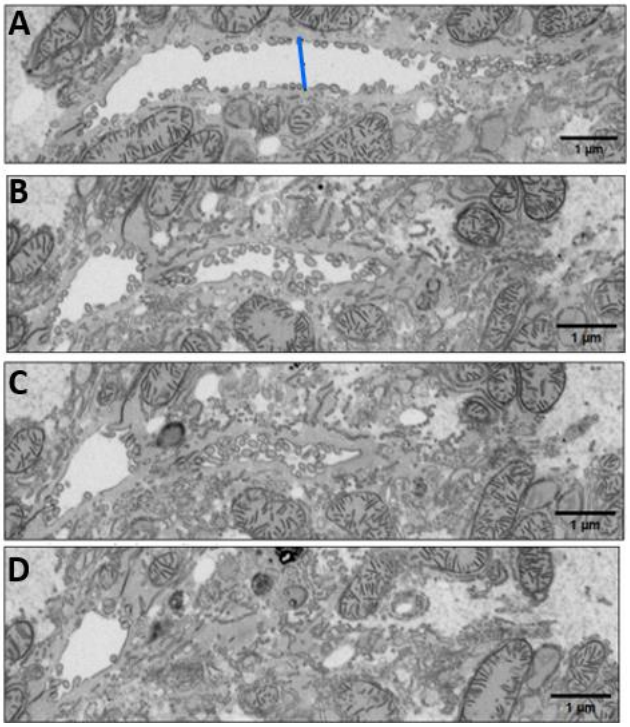


Figure 9 : Canalicule biliaire pour un échantillon de foie de souris WT - Acquisition FIB-SEM – taille de voxel 16 x 16 x 16 nm³. *(A) Diamètre du canalicule biliaire au niveau le plus large : 0,9 µm (trait bleu). (B) Division du canalicule en deux branches distinctes. (C) & (D) Évolution des deux branches dans la pile d'images.*

La membrane apicale des hépatocytes forme des microvillosités qui tapissent l'intérieur des canalicules biliaires et augmentent la surface d'échange facilitant ainsi la sécrétion de la bile. La visualisation sous Fiji à l'aide du plugin 3D Viewer facilite l'observation de l'organisation des microvillosités. Visuellement, les microvillosités ont une organisation dense et désordonnée sur un échantillon de foie de souris WT. Dans la littérature (Bebelman *et al.*, 2023), une variabilité spatiale des canalicules biliaires selon leur position dans le lobule hépatique a été décrite. En général, les canalicules biliaires positionnés près de la veine porte peuvent être de taille plus réduite avec des microvillosités plus compactes tandis qu'autour de la veine centro-lobulaire, les canalicules péricentro-lobulaires peuvent être plus larges avec une morphologie différente (Gupta, 2023).

- **Foie de souris KO**

Lorsque la cytokine BMP9 n'est pas exprimée, la structure du canalicule biliaire est davantage atrophiée, étroite, rendant la segmentation difficile puisque les microvillosités ne sont plus suffisantes pour déterminer les contours du canalicule biliaire. Sur la **Figure 10**, on peut suivre l'évolution de la structure du canalicule biliaire dans la pile d'images 2D issue d'une souris BMP9-KO obtenue par FIB-SEM à une taille de voxel de 12 x 12 x 12 nm^3. La zone de jonction entre les hépatocytes est clairement visible, entourée en rouge sur la **Figure 10A**. La **Figure 10B** montre ensuite le début de la formation de la lumière canaliculaire, identifiable par un amas de microvillosités provenant des hépatocytes. Enfin, la Figure **10C** illustre l'état le plus dilaté du canalicule biliaire. Bien que la section ne soit pas parfaitement circulaire, nous avons supposé une forme circulaire afin d'estimer un diamètre équivalent, qui est d'environ 0,5 µm selon les mesures réalisées avec Fiji.

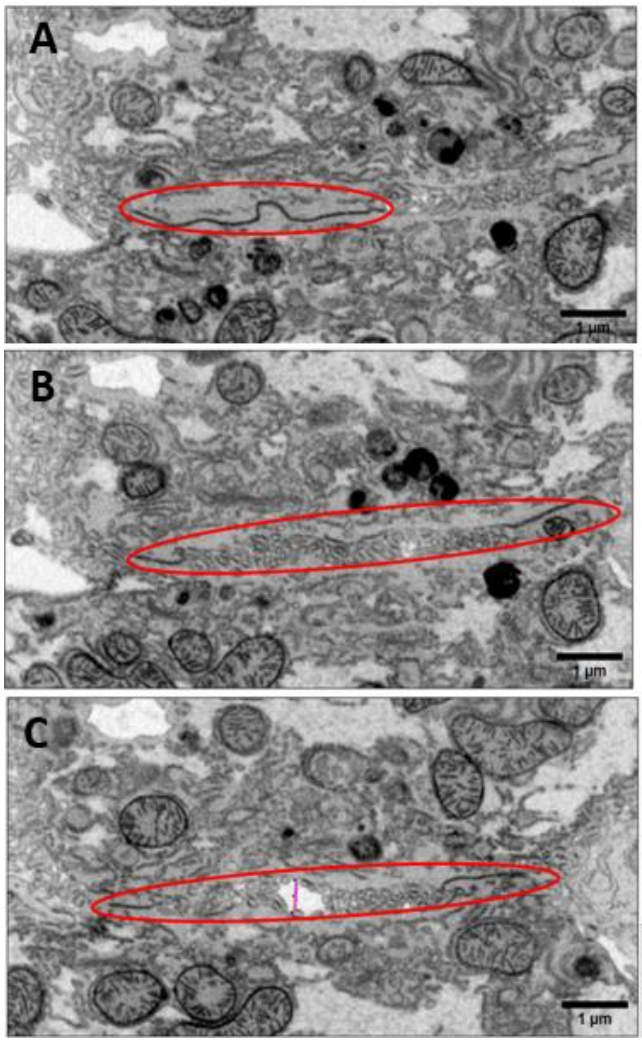


Figure 10 : Canalicule biliaire pour un échantillon de foie de souris BMP9-KO. Taille de voxel 12 x 12 x 12 nm^3. *(A) Zone de jonction des hépatocytes entourée en rouge – les jonctions intercellulaires (jonctions serrées) apparaissent avant la lumière canaliculaire et sont indispensables à sa formation. (B) Formation de la lumière du canalicule biliaire. (C) Diamètre maximal de la lumière du canalicule biliaire, mesuré au niveau de son point le plus large (trait violet) 0,5 µm.*

III.3. Segmentation des canalicules biliaires

- **Foie de souris WT**

L'étude de l'ultrastructure du canalicule biliaire dans différents contextes biologiques permet de mieux comprendre ses caractéristiques fondamentales, y compris dans des conditions pathologiques potentielles. La segmentation du canalicule biliaire, illustrée à la **Figure 11** sur un foie de souris WT, a été réalisée à partir d'un volume de données obtenu par FIB-SEM avec une taille de voxel de 10 × 10 × 10 nm³. Une combinaison des workflows *Carving* et *Pixel Classification* dans le logiciel Ilastik a permis d'obtenir le masque de segmentation. Le maillage 3D a été reconstruit avec le logiciel Avizo et visualisé à l'aide de Paraview.

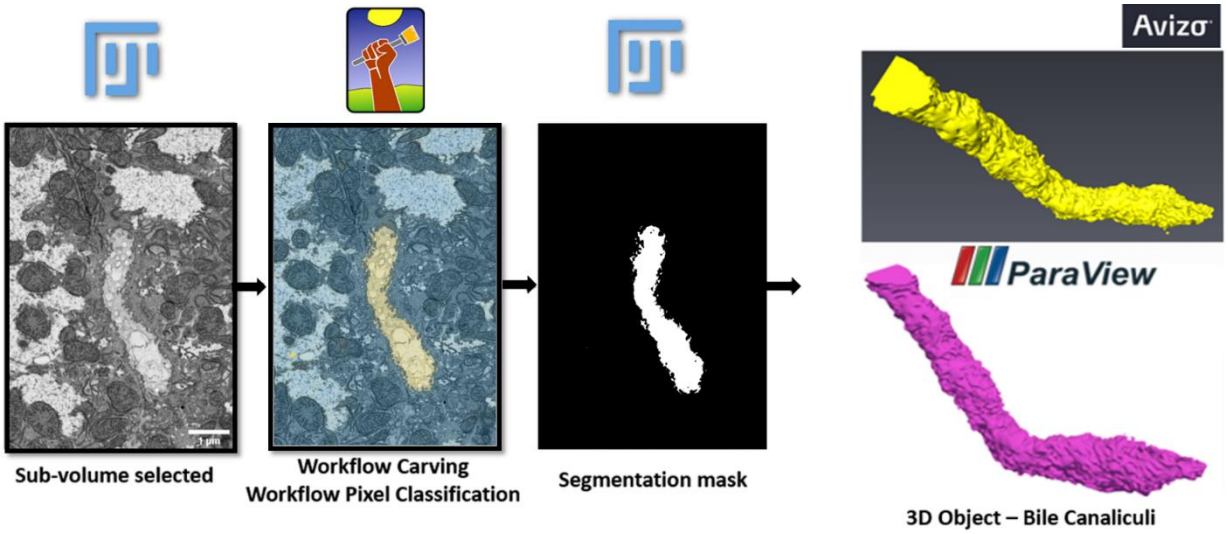


Figure 11 : Étapes de segmentation sémantique du canalicule biliaire avec le logiciel Ilastik *– Acquisition FIB-SEM – taille de voxel 10 x 10 x 10 nm³. Foie de souris WT.*

- **Comparaison foie de souris WT et KO :**

La segmentation d'un canalicule biliaire provenant d'un foie de souris sauvage (WT) réalisée à l'aide du logiciel Ilastik est présentée **Figure 12A**. En comparaison, la **Figure 12B** illustre la segmentation d'un canalicule biliaire issu d'un foie de souris BMP9-KO, obtenue selon la même approche. L'analyse visuelle révèle des altérations morphologiques des canalicules biliaires chez les souris BMP9-KO en contraste avec la structure observée chez les souris WT. Ces caractéristiques de rétrécissement et de déformation des canalicules sont illustrées dans la **Figure 13B**.

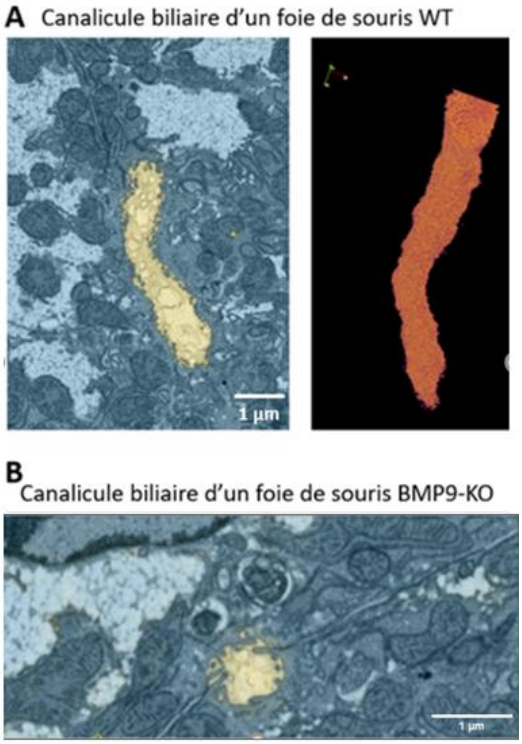


Figure 12 : Segmentation sémantique sous Ilastik du canalicule biliaire dans différents contextes biologiques. *(A) Canalicule biliaire d'un foie de souris WT. (B) Canalicule biliaire d'un foie de souris BMP9-KO.*

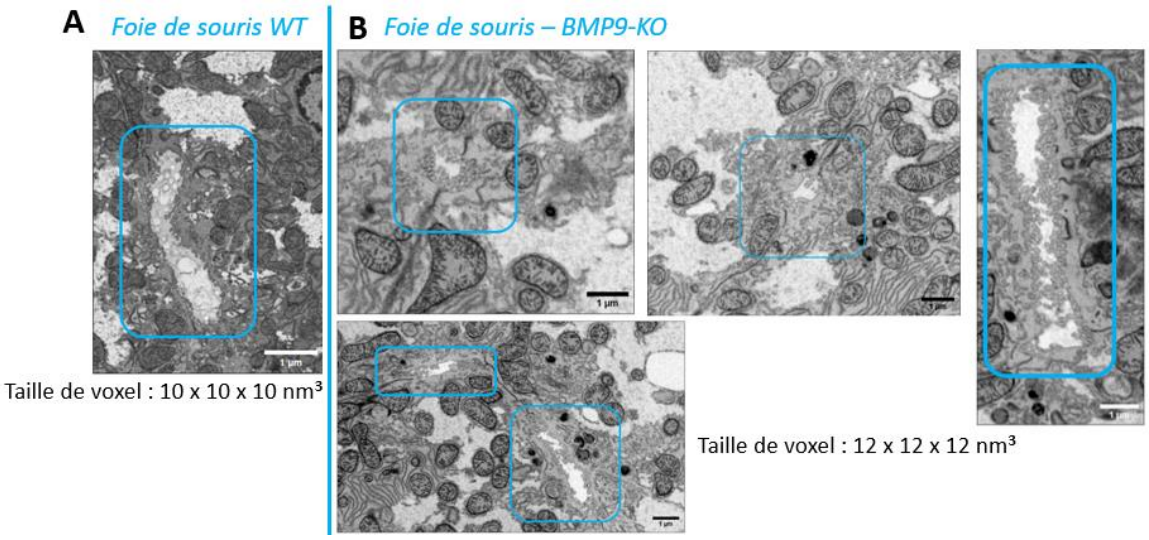


Figure 13 : Acquisitions FIB-SEM. *(A) Structure d'un canalicule biliaire – taille de voxel : 10 x 10 x 10 nm³. (B) Structure d'un canalicule biliaire – taille de voxel 12 x 12 x 12 nm³.*

L'ensemble de ces données met en évidence des différences ultrastructurales importantes entre les souris WT et BMP9-KO.

III.4. Conclusion - perspectives

La morphologie des canalicules biliaires varie en fonction du génotype, en particulier chez les souris BMP9-KO pour lesquelles ils apparaissent plus atrophiés et moins dilatés que chez leurs homologues sauvages. L'analyse par microscopie électronique volumique s'est révélée particulièrement adaptée pour visualiser le réseau complexe des canalicules biliaires. Grâce à l'acquisition de piles d'images 2D, il est possible de visualiser finement les microvillosités tapissant le réseau tubulaire. Une méthode de segmentation combinant deux workflows sous Ilastik a permis d'obtenir une reconstruction 3D à partir d'un échantillon de foie de souris WT. Cette reconstruction met en évidence la forme plus ou moins circulaire des canalicules et la complexité de leur réseau (**Figure 11**). En revanche, pour les échantillons BMP9-KO, la segmentation automatique n'a pas pu être réalisée. En effet, l'absence quasi complète de lumière dans les canalicules biliaires ne permet plus de distinguer clairement leurs contours, rendant la segmentation et la reconstruction difficilement réalisables.

Des mesures du diamètre à différentes étapes de la formation des canalicules biliaires devront être effectuées sur au moins trois échantillons WT et trois échantillons BMP9-KO de foie de souris, à travers la pile d'images 2D, afin de confirmer une différence significative entre les canalicules biliaires des deux types de souris, au-delà de l'observation visuelle.

L'altération de l'ultrastructure canaliculaire chez les souris BMP9-KO pourrait traduire une perturbation de la polarité ou de la différenciation terminale des hépatocytes. Nos résultats suggèrent que BMP9 soit un régulateur important de la morphogenèse canaliculaire. Cependant, ces résultats ne sont pas corroborés par un impact sur les fonctions biliaires des souris BMP9-KO.

Chapitre 3 : La microscopie corrélative pour l'étude du canal de Hering

I. Architecture et fonction du réseau biliaire

I.1. Arbre biliaire

L'arbre biliaire joue un rôle essentiel dans le transport, le stockage dans la vésicule biliaire et la transformation de la bile, avant son acheminement vers l'intestin (**Figure 14A**). La bile est principalement composée d'eau et d'électrolytes, ainsi que d'acides biliaires, de pigments biliaires tels que la bilirubine, de lipides, d'ions organiques et de xénobiotiques (DAEMS, 1961). En particulier, les acides biliaires sont fabriqués par les hépatocytes, puis modifiés par les cholangiocytes, avant d'être transformés à leur tour par le microbiote intestinal.

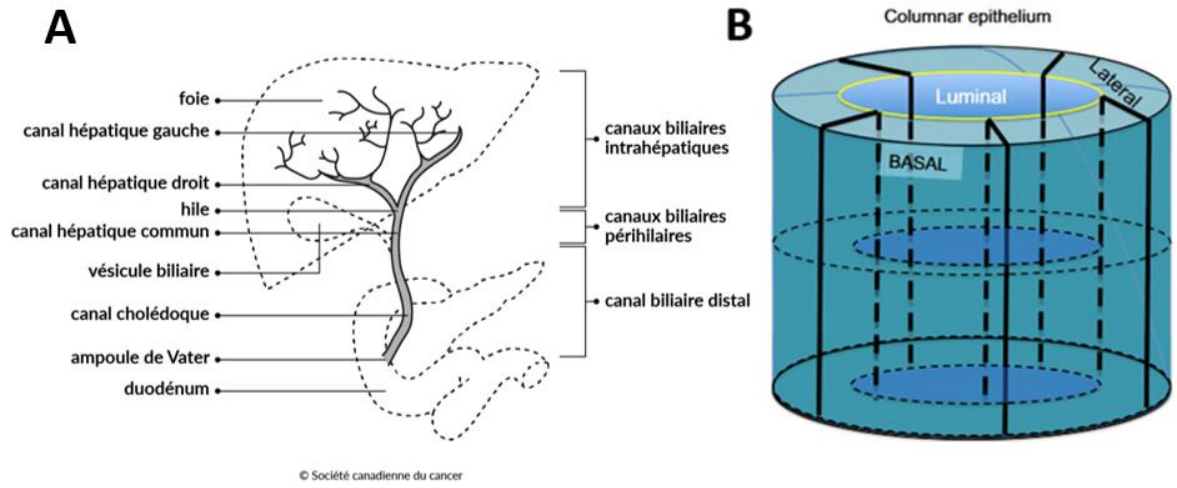


Figure 14 : Structure et fonction de l'arbre biliaire. *(A) Structure de l'arbre biliaire. Source : Société canadienne du cancer. (B) Représentation de la structure d'un épithélium à polarité simple ou en colonne. Issu de (Gissen & Arias, 2015).*

Les canalicules biliaires constituent les premières voies de transport de la bile, directement sécrétée par les hépatocytes (**Figure 14B**). La bile s'écoule ensuite vers la périphérie du lobule hépatique, en direction des canaux biliaires périportaux, selon un trajet opposé à celui du sang. L'ensemble des canalicules biliaires est présenté comme un réseau 3D complexe et se forment par l'accolement des membranes plasmiques des hépatocytes, avec un minimum de 2 faces d'hépatocytes impliquées dans leur formation (Shami *et al.*, 2016). En termes de dimensions, les canalicules biliaires ont un diamètre de l'ordre du micromètre. Les cholangiocytes constituent environ 5 % des cellules hépatiques. Ces cellules épithéliales cylindriques s'organisent en un revêtement qui borde les conduits biliaires. Les cholangiocytes participent non seulement à l'acheminement de la bile vers l'intestin et à son passage transitoire dans la vésicule biliaire, mais aussi à l'ajustement de sa composition sous l'influence de signaux hormonaux et nerveux. Une caractéristique des petits cholangiocytes est leur capacité à se multiplier rapidement, ce qui leur permet de donner naissance à des cholangiocytes plus grands, qualifiés de gros cholangiocytes, en particulier lors d'une lésion aiguë des canaux biliaires.

En 1866, Ewald Hering découvre une zone de jonction entre les canalicules et les tubes biliaires qui porte son nom : le canal de Hering (Takahashi-Iwanaga & Fujita, 1991). Le canal de Hering se draine dans le tube biliaire, dont le diamètre augmente progressivement jusqu'à atteindre le canal hépatique

commun. Dans de nombreux manuels d'histologie, le canal de Hering est perçu comme une petite branche simple et courte qui se ramifie à partir d'un réseau de canaux interconnectés. Les canaux de Hering se dirigent vers les canaux biliaires intra-hépatiques plus larges qui sont recouverts par les cholangiocytes. Dans les régions extralobulaires, ces canaux constituent les plus grandes branches de l'arbre biliaire. Ils conduisent la bile soit vers la vésicule biliaire, soit directement vers l'intestin grêle via le canal hépatique et le canal cholédoque. Le canal hépatique constitue le conduit principal qui reçoit la bile. Le foie étant organisé en deux lobes principaux, on trouve le canal hépatique droit et le canal hépatique gauche. Le canal cholédoque est issu de la fusion du canal hépatique commun avec le canal cystique provenant de la vésicule biliaire.

Une incertitude subsiste sur l'organisation des canaux biliaires dans le foie (Smin & Catruthes, 1961). Deux hypothèses sont envisagées : soit chaque canal de Hering se forme à partir d'un unique canalicule biliaire, soit plusieurs canalicules biliaires convergent pour former un confluent avant d'entrer dans une région bordée de cholangiocytes, correspondant au canal de Hering.

L'arbre biliaire a pour fonction de transporter et de réguler le flux de bile. Toutefois, dans certaines pathologies telles que les cholestases, ce sont les hépatocytes ou les canaux biliaires qui sont affectés en premier lieu, ce qui peut indirectement altérer la fonction du canal de Hering. En 1952, Popper et Schaffner proposent la définition suivante pour la cholestase : « *La cholestase est une altération du débit biliaire survenant après la formation de la bile. Elle peut être due à des facteurs intra-hépatiques ou extra-hépatiques, ce que les tests en laboratoire ne permettent pas de différencier* » (Jean-Pierre Benhamou *et al.*, 2002). Le terme cholestase désigne l'arrêt ou la suppression de l'écoulement de la bile dû à une obstruction survenant dans l'arbre biliaire. Si l'altération de la sécrétion biliaire se situe au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, on parle de « cholestase hépatocellulaire ». En 1965, Albot et coll. ont affirmé la définition de la cholestase comme « une rétention de la bile dans le sang, résultant d'une obstruction mécanique à l'écoulement de la bile dans les canaux biliaires, ductules ou canalicules. Dans la cholestase hépatique, cette obstruction est localisée au niveau du parenchyme hépatique. »
La compréhension de la cholestase reste complexe en raison de la multiplicité des facteurs pouvant être impliqués (Brevini *et al.*, 2020). Les maladies hépatiques cholestatiques constituent un défi majeur en hépatologie, étant associées au taux le plus élevé de cancers parmi les affections du foie. Les options thérapeutiques sont limitées, la transplantation hépatique restant souvent la seule alternative, bien qu'elle ne permette pas toujours de guérir, notamment en cas de cholangiopathie ischémique, liée à un apport de sang insuffisant. Cette dernière peut induire des lésions hépatocellulaires, favorisant la progression vers la fibrose, voire la cirrhose en cas de maladie chronique (Sharma *et al.*, 2020). Dans les maladies hépatiques, les cholangiocytes et les hépatocytes peuvent être altérés. La cholestase, résultant de l'accumulation d'acides biliaires, induit des dommages mitochondriaux et perturbe les voies de trafic des protéines canaliculaires, favorisant ainsi le développement de pathologies associées à des altérations de la polarité cellulaire.
La protéine E-cadhérine joue un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire, en contribuant à maintenir l'architecture tissulaire et la stabilité des hépatocytes dans leur organisation au sein des lobules hépatiques. Une altération de l'E-cadhérine entraine la perte de l'adhésion cellulaire, perturbant à son tour la formation des canalicules biliaires et favorisant la progression tumorale (Braet & Wisse, 2002). La maladie hépatique auto-immune la plus courante est la cirrhose biliaire primitive, résultant d'un défaut dans les voies de polarité connues et les jonctions d'adhérence. La perte de la polarité des

hépatocytes a un rôle dans le cancer du foie puisque les cellules cancéreuses se dépolarisent. Chez plus de la moitié des patients atteints de cancer, une accumulation anormale de bêta-caténine est observée dans le cytoplasme et le noyau, notamment en présence d'un hépatoblastome sporadique, une tumeur maligne de l'enfant. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le type le plus courant de cancer primitif du foie, il se développe à partir des hépatocytes (Braet & Wisse, 2002)**.**

Des développements en ingénierie tissulaire et en culture cellulaire 3D sont en plein développement pour essayer de développer des modèles hépatiques qui pourraient permettre de mieux comprendre ces pathologies et de mettre au point des traitements innovants.

I.2. Canal de Hering

Le canal de Hering peut être qualifié de structure rare et possède une structure mal connue reliant les canalicules biliaires au tube biliaire, un canal de taille micrométrique (**Figure 15A**). L'étude de l'architecture du canal de Hering demeure un défi, car il serait positionné tous les ~10 µm le long du canal biliaire. La difficulté pour caractériser cette zone dans des modèles cellulaires, animaux ou biopsies humaines rend cette zone peu observée.

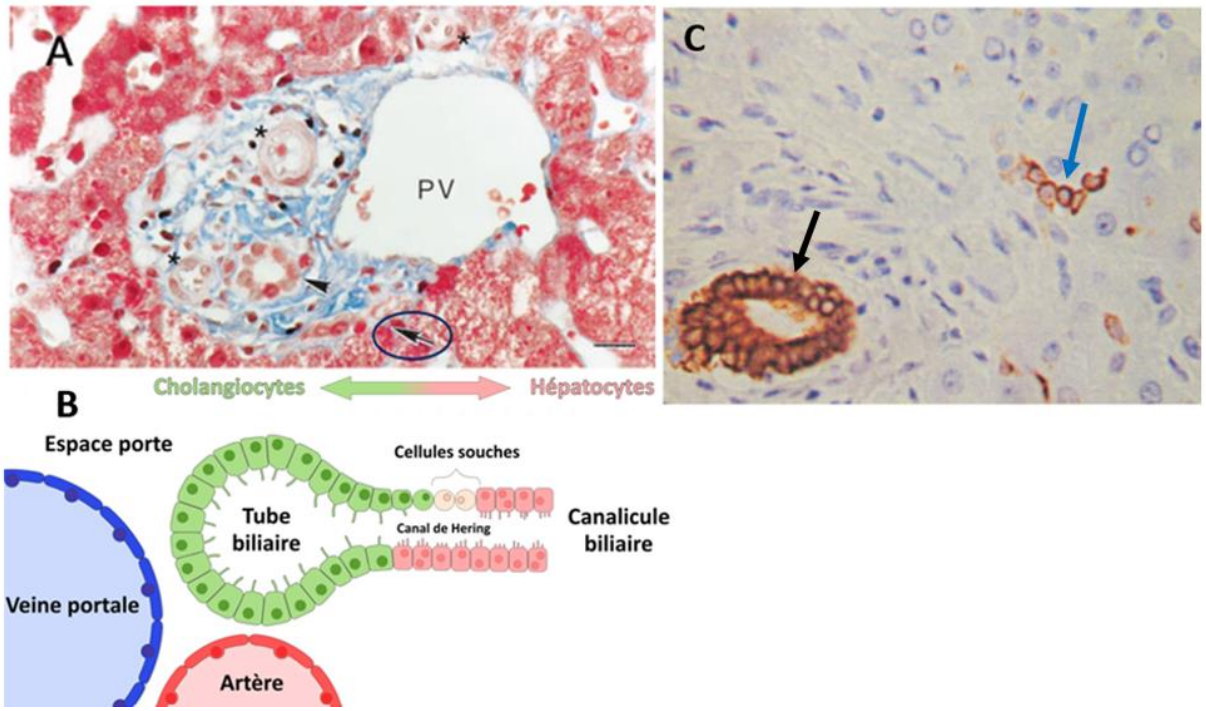


Figure 15 : Le canal de Hering. *(A) Organisation de la triade portale. Veine porte (PV), étoiles * : artères hépatiques, tête de flèche : tube biliaire, flèche entourée probablement le canal de Hering. Issu de (Crawford et al., 1998). (B) Organisation schématique supposée du canal de Hering. (C) Immunomarquage au CK19 (en orange) sur une coupe de foie. Le cercle orange (flèche noire) à gauche est assimilé à un tube biliaire entièrement bordé de cholangiocytes et un potentiel canal de Hering (flèche bleue) sur la droite bordée sur une moitié de cholangiocytes. Issu de (Roskams et al., 2004).*

Les cellules souches sont non spécialisées, mais elles ont la capacité de se différencier en types cellulaires hautement spécialisés en réponse à des signaux spécifiques. Dans le foie, ces cellules, appelées hépatoblastes, sont des cellules bipotentes qui ont la capacité de se différencier en deux types cellulaires : hépatocytes et cholangiocytes. Ce type de cellules souches intervient lors de lésions

hépatiques sévères et persistantes, par exemple, lors d'une hépatite virale chronique, ou de la stéato-hépatite, une inflammation du foie associée à une accumulation excessive de graisse**.**
Le canal de Hering est considéré comme une potentielle niche de ces progéniteurs (**Figure 15B**), susceptibles d'intervenir dans les processus de régénération hépatique. L'hypothèse qui reste à démontrer serait que ces progéniteurs soient situés dans cette zone de transition. En 1978, Raymond Schofield a émis l'hypothèse de la niche de cellules souches qui se localiserait dans des compartiments fixes bien établis afin de conserver leurs propriétés uniques (Schofield, 1978).

En microscopie optique, l'identification du canal de Hering reste délicate sur des coupes histologiques, son identification peut être facilitée par l'utilisation de marqueurs spécifiques, caractérisant les cellules qui le bordent, en l'occurrence les cholangiocytes dans cette étude. Les marqueurs CK7 et CK19 sont couramment utilisés pour révéler ces structures (Theise *et al.*, 1999). Sur la **Figure 15C**, les marqueurs des cholangiocytes CK19 bordent les canaux (Roskams *et al.*, 2004). Une approche par reconstruction tridimensionnelle est suggérée comme une piste prometteuse pour mieux comprendre l'organisation du canal de Hering (Crawford *et al.*, 1998). Des structures considérées comme de possibles canaux de Hering ont été détectées en périphérie des tractus portaux et au sein du parenchyme lobulaire, lors de biopsies hépatiques à l'aiguille sur des foies adultes humains (Crawford *et al.*, 1998).
En microscopie électronique, l'observation de coupes de foie au TEM (**Figure 16**) a permis de décrire le canal de Hering comme étant tapissé de cellules épithéliales (Crawford *et al.*, 1998). Ces cellules forment une structure luminale semi-lunaire avec des hépatocytes apposés. Au SEM, le canal de Hering a été étudié par l'équipe de H. Takahashi-Iwanaga (Takahashi-Iwanaga & Fujita, 1991).

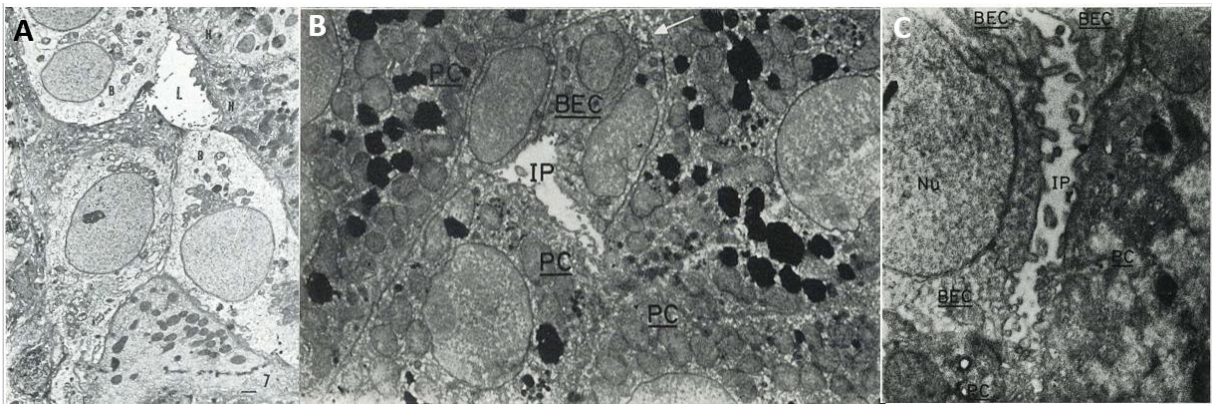


Figure 16 : Analyse de l'ultrastructure du canal de Hering par TEM. *(A) Canal de Hering provenant d'un foie humain, présentant des caractéristiques comparables à celles observées dans le foie de souris. Légende : B, cholangiocyte ; H, hépatocyte ; L, lumen. Issu de (Jezequel, 1962). (B) Coupe transversale d'un canal de Hering (BEC, cholangiocytes ; PC, hepatocytes; IP, Intermediate piece). Issu de (Daems, 1961). (C) Section longitudinale d'un canal de Hering comprenant deux cholangiocytes et deux hépatocytes. Issu de (Daems, 1961).*

L'étude de Daems de 1961 (DAEMS, 1961) reste, à ce jour, l'une des descriptions les plus détaillées du canal de Hering. L'étude présente notamment six images en coupe transversale de ce canal (**Figure 16B et 16C**).

II. Objectifs

L'objectif de cette partie de la thèse a été de mettre au point une approche 3D multi-échelle permettant de localiser le canal de Hering puis d'étudier son ultrastructure à une résolution nanométrique. Notre raisonnement se base sur plusieurs études utilisant la microscopie corrélative.

Pour localiser le canal de Hering, la méthodologie retenue est la nanotomographie à rayons X réalisée au synchrotron. Ensuite, le canal de Hering pourra être analysé à haute résolution par FIB-SEM. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la résolution du FIB-SEM nous a déjà permis de segmenter et de reconstruire en 3D les canalicules biliaires ou les sinusoïdes hépatiques. Néanmoins, cette technique utilisée seule reste limitée car elle ne permet pas de localiser une zone d'intérêt relativement rare comme le canal de Hering ni d'obtenir une vue complète de son environnement. Le recours à une méthodologie multi-échelle et corrélative accroît les chances d'obtenir l'ultrastructure *in situ* du canal de Hering.

III. Résultats

III.1. Optimisation expérimentale

La méthode de préparation des échantillons mise au point pour le projet sur les LSEC utilise la congélation haute pression afin d'obtenir une meilleure préservation du tissu et une meilleure pénétration des colorants. Cependant, le système de congélation haute pression limite la taille de l'échantillon à quelques centaines de micromètres de côté. Étant donné la rareté des canaux de Hering, certains échantillons ont été préparés de manière plus classique afin d'obtenir des blocs de 2 à 4 mm de hauteur.
Cette stratégie de préparation répondait à l'objectif principal : améliorer la qualité des acquisitions en nanotomographie à rayons X. Plusieurs réflexions ont été menées. D'abord, sur le positionnement des piliers afin de faciliter la reconstruction volumique, l'alignement de l'axe de rotation de l'échantillon avec celui du support étant crucial pour éviter des artefacts. Ensuite, la forme de l'échantillon a été évaluée : l'obtention de piliers cylindriques par ablation au PFIB au xénon a été identifiée comme une alternative prometteuse aux piliers de forme parallélépipèdique usinés à la scie à fil diamantée, permettant une reconstruction plus fiable. Enfin, des ajustements visant à améliorer la conductivité de la surface, tels que le dépôt d'une fine couche de platine, ont été intégrés afin d'optimiser les acquisitions. Les détails méthodologiques de préparation d'échantillons sont développés dans la section : Matériels et Méthodes VI/ Préparation d'échantillons pour les expériences de nanotomographie à rayons X au Synchrotron.

Les étapes de préparation décrites ont été adaptées en fonction de la stratégie d'imagerie sur la ligne de lumière ID16B à l'ESRF. Les piliers peuvent être imagés avec une taille de voxel allant jusqu'à 25 × 25 × 25 nm^3. Dans un premier temps, les acquisitions sont réalisées avec une taille de voxel de 200 × 200 × 200 nm^3, afin de disposer d'un champ de vue étendu, permettant d'identifier précisément la région d'intérêt. Quatre acquisitions tomographiques seront effectuées, chacune comprenant 2505 projections, et réalisées à quatre distances de propagation différentes, avec une énergie de faisceau fixée à 29,6 keV. Cette approche progressive permet ensuite de centrer l'analyse sur la zone choisie, qui peut être étudiée à plus haute résolution par FIB-SEM, notamment au niveau du canal de Hering.

La comparaison des différentes stratégies de préparation et d'acquisition a permis de définir les conditions les plus adaptées pour l'analyse du canal de Hering par nanotomographie à rayons X.

III.2. Tomographie à rayons X en laboratoire

La tomographie à rayons X réalisée en laboratoire a constitué la première méthode d'imagerie utilisée pour observer l'échantillon en trois dimensions sans l'altérer. La **Figure 17** présente la reconstruction obtenue, où un échantillon de cette série est imagé par tomographie à rayons X en laboratoire. Les **Figures 17A et 17B** montrent un échantillon de foie de souris WT, préparé sans l'étape de congélation à haute pression, permettant la reconstruction d'un bloc d'environ 3 mm de côté. Pour imager l'échantillon en intégralité, les dimensions de l'échantillon étant plus importantes sur cette série, la taille de voxel est de 3 x 3 x 3 µm³. Un focus sur une région permet de mettre en évidence les sinusoïdes hépatiques (**Figure 17B**). La tomographie à rayons X en laboratoire peut permettre d'identifier une potentielle triade portale en périphérie du lobule (**Figure 17A**), où peut se trouver le canal biliaire. Pour distinguer avec plus de précision la triade portale et en particulier le réseau biliaire, il est judicieux de réaliser des acquisitions à plus haute résolution. L'observation des canalicules biliaires n'est réellement possible qu'au moyen du FIB-SEM, dont la résolution permet de les distinguer.
La **Figure 17C** présente quant à elle un échantillon traité par congélation à haute pression, de dimensions proches de 1 mm de côté.

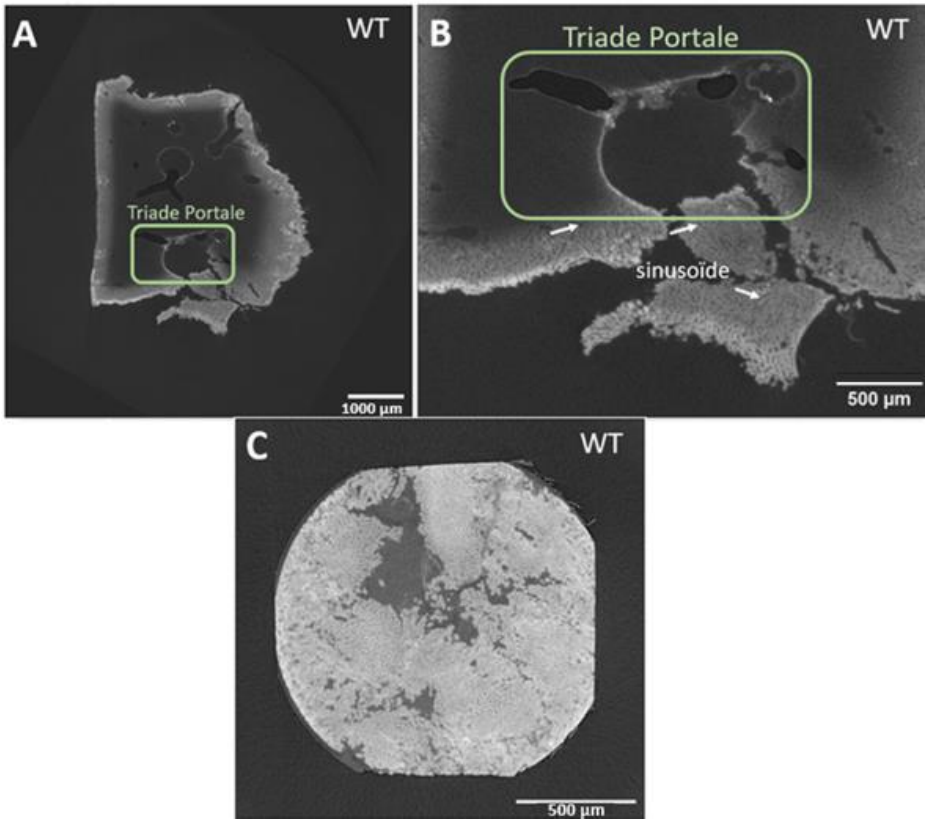


Figure 17 : Tomographie à rayons X en laboratoire sur un échantillon de foie de souris WT. *(A) & (B) Échantillon de foie de souris WT. Bloc préparé par fixation chimique sans congélation à haute pression. Dimensions des blocs de 2-4 mm de côté. Reconstruction tomographie à rayons X en laboratoire. Taille de pixel 3 µm. (C) Échantillon* de *foie de souris WT. Préparation échantillon : fixation chimique suivie d'une congélation à haute pression. Taille de pixel 1 µm.*

La tomographie à rayons X réalisée en laboratoire présente plusieurs limites. Tout d'abord, la résolution reste relativement faible, avec une taille de pixel pouvant atteindre jusqu'à 1 µm. Ensuite,

le temps d'acquisition est particulièrement long : il faut compter environ douze heures pour un seul échantillon. Enfin, les contrastes obtenus ne sont pas toujours suffisants. Pour dépasser ces contraintes, nous nous sommes tournés vers la nanotomographie à rayons X au synchrotron. Celle-ci offre d'une part une plus haute résolution, et permet, d'autre part, une acquisition beaucoup plus rapide. Au lieu de douze heures, l'acquisition d'un échantillon ne prend qu'une dizaine de minutes. À titre d'exemple, en 48 heures de temps de faisceau, il est possible d'imager une vingtaine d'échantillons. De plus, les reconstructions réalisées sont supposées offrir des contrastes plus importants. Nous avons donc réalisé une expérience de nanotomographie à rayons X sur la ligne ID16B de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) afin de localiser des canaux de Hering potentiels dans nos échantillons.

III.3 Nanotomographie à rayons X utilisant le rayonnement synchrotron

La ligne de lumière ID16B de l'ESRF offre la possibilité de réaliser des analyses de nano-tomographie à rayons X avec une taille de pixel modulable entre 25 nm et 200 nm, permettant ainsi d'examiner des zones d'intérêt à différentes échelles. Le protocole suivi consiste généralement à effectuer une première acquisition avec une taille de pixel de 200 nm afin d'obtenir un large champ de vue, puis à affiner progressivement l'analyse en ciblant une région jugée pertinente en diminuant la taille de pixel.

- **Préparation des échantillons :**

Les acquisitions effectuées sur la ligne ID16B nécessitent des conditions spécifiques de préparation des échantillons. En particulier, les piliers doivent présenter un diamètre compris entre 250 et 300 µm, une dimension relativement réduite qui rend la découpe à la scie à fil plus délicate. Cette contrainte est indispensable afin d'assurer une transmission des rayons X à travers l'échantillon de l'ordre de 80%.

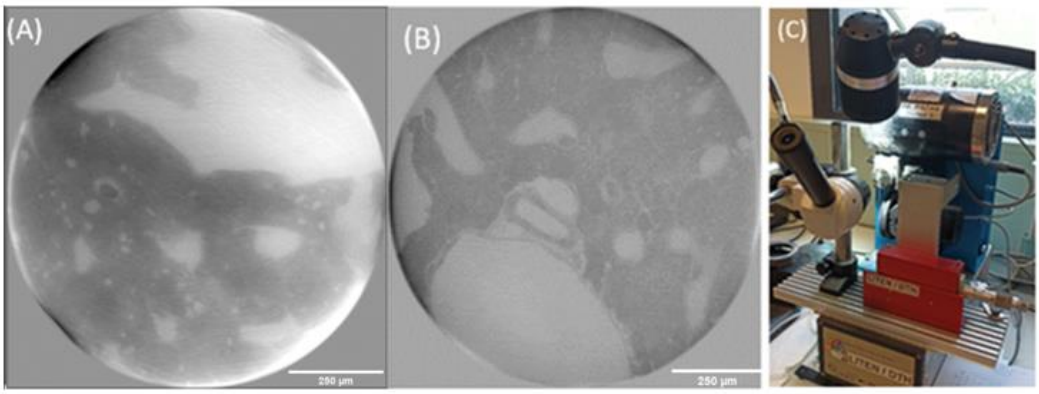


Figure 18 : Acquisitions réalisées sur la ligne de lumière ID16B à l'ESRF, nanotomographie à rayons X, taille de pixel 50 nm. *(A) Échantillon WT et (B) Échantillon BMP9-KO. (C) Scie à fil diamantée utilisée pour préparer certains échantillons sous forme parallélépipèdique de 1 mm de côté.*

La **Figure 18** présente des acquisitions réalisées sur la ligne de lumière ID16B, à une taille de pixel de 50 nm, sur des échantillons de foie de souris WT et BMP9-KO. Pour ces premiers essais, les échantillons ont été préparés à l'aide d'une scie à fil diamantée (**Figure 18C**) sous forme parallélépipèdique d'une hauteur maximale de 300 µm, limite imposée par la congélation à haute pression en raison de la taille restreinte des cupules. Comme le montre la **Figure 18B**, le contraste obtenu est très encourageant en comparaison avec la tomographie en laboratoire. Ces premières reconstructions permettent de distinguer une partie du réseau sanguin dans les deux phénotypes étudiés (WT et BMP9-KO). Toutefois,

l'identification du canal de Hering nécessite également une visualisation du réseau biliaire. Dans ce cas, la limitation ne provient pas de la ligne de lumière elle-même, mais des dimensions réduites des échantillons. En effet, une hauteur d'environ 300 µm rend peu probable l'observation d'un événement rare. Une hauteur de l'ordre de 1 mm apparaît plus adaptée, tandis qu'au-delà de 3–4 mm il devient difficile d'obtenir un échantillon parfaitement aligné sur l'axe Z.
Par ailleurs, le diamètre du pilier, qui correspond à l'épaisseur effective traversée par le faisceau, constitue un paramètre critique pour assurer une transmission optimale. Dans les exemples présentés en **Figures 18A** et **18B**, le diamètre des échantillons avoisine 1 mm, une réduction à environ 250 µm doit améliorer significativement la transmission et, par conséquent, la qualité des acquisitions.

- **Artefacts angulaires :**

Un second point de réflexion concernant la préparation des échantillons a été d'éviter la présence d'angles. En effet, lorsque des parallélépipèdes d'environ 300 µm de côté et 1 mm de hauteur sont usinés à la scie à fil diamantée, les arêtes ainsi formées peuvent engendrer des artefacts lors des acquisitions tels que les anneaux visibles sur la **Figure 19**.

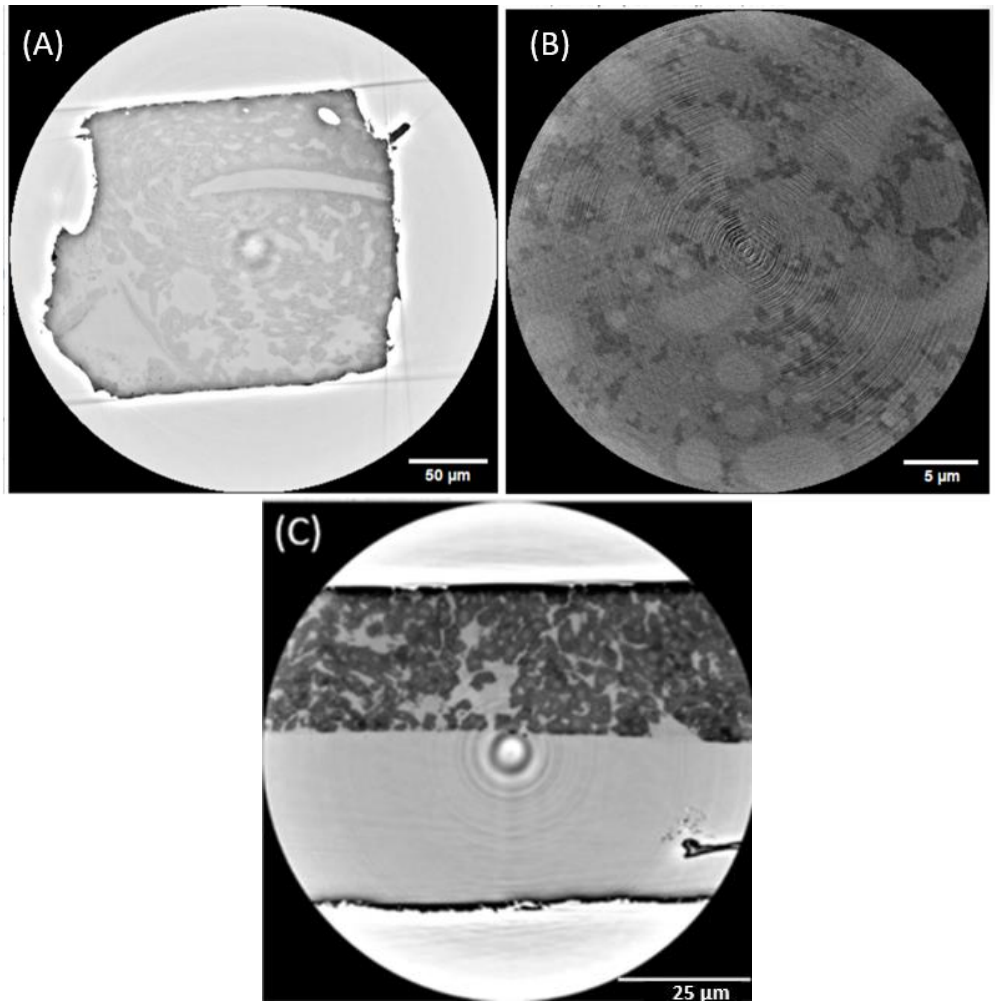


Figure 19 : Échantillon foie de souris WT, acquisitions ID16B. Type d'artefact : cercle concentrique en périphérie du champ sur un échantillon de géométrie parallélépipédique. *(A) Taille de voxel 240,8 x 240,8 x 240,8 nm³. (B) Taille de voxel 25 x 25 x 25 nm³. (C) Taille de voxel 150 x 150 x 150 nm³.*

Sur la **Figure 19C**, des anneaux ou cercles concentriques sont apparus en périphérie du champ sur les reconstructions, traduisant la présence d'artéfacts sur certains de nos échantillons présentant des arêtes ou des géométries anguleuses. Au centre des **Figures 19A et 19B**, des motifs circulaires apparaissent également au centre de l'image. Pour limiter ce type d'artefact, il est nécessaire d'éliminer les angles dans nos échantillons.
Dans ce but, en s'inspirant des travaux de Bosch *et al.* (2023), des tests ont été réalisés pour produire des piliers d'une hauteur comprise entre 450 et 830 µm et d'un diamètre pouvant atteindre 250 µm, en utilisant un laser femtoseconde. Les premiers essais d'usinage au laser se sont avérés peu concluants, principalement en raison d'une maîtrise encore limitée de l'outil.

- **Altération des échantillons**

Comme alternative au laser femtoseconde, nous avons utilisé le PFIB-SEM pour réaliser l'usinage de piliers cylindriques d'environ 250 µm de diamètre (**Figure 20**). Toutefois, le courant s'est révélé trop élevé pour nos échantillons biologiques, entraînant une dégradation des contours (**Figure 20**). Bien que ce risque aurait pu être anticipé, l'altération des bords ne représentait pas, initialement, un obstacle majeur pour la localisation de la zone d'intérêt. Cependant, il s'est avéré que l'énergie délivrée par le faisceau d'ions xénon, a également altéré la structure cellulaire interne de l'échantillon conduisant à la perte de tous les détails des organelles intracellulaires. Ces modifications ont été mises en évidence par les images de nanotomographie à rayons X obtenues à l'ESRF (**Figure 20**). Les détails de l'organisation des vaisseaux principaux, ainsi que celle des structures plus fines comme les sinusoïdes, sont également altérés.

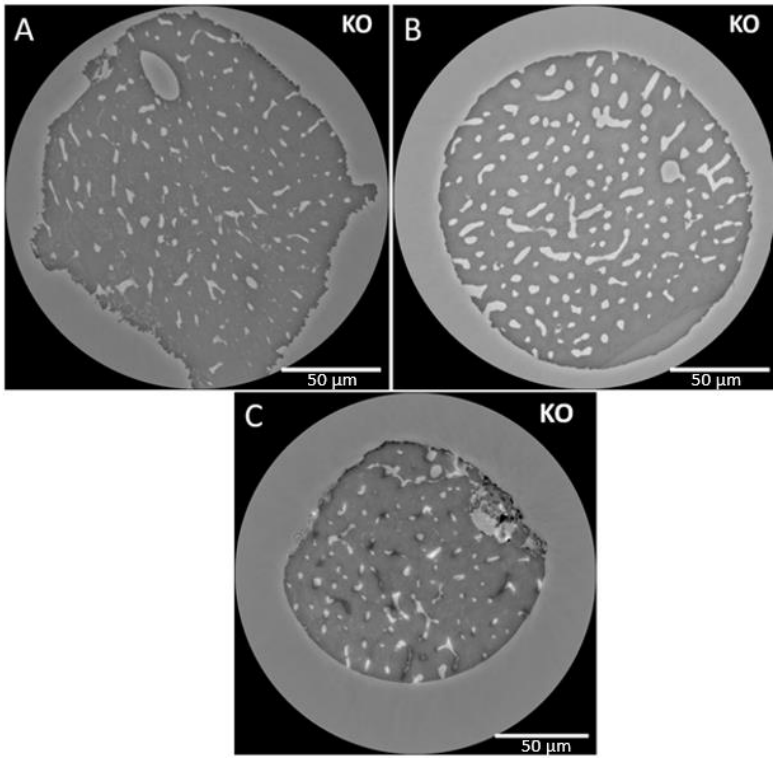


Figure 20 : Échantillons préparés au PFIB-SEM pour l'usinage des piliers – Reconstruction à partir de données acquises sur la ligne de lumière ID16B. Taille de pixel 150 nm. *(A) & (C) Les contours de l'échantillon apparaissent endommagés. (A), (B) & (C) Les organelles intracellulaires ne sont pas visibles sur les reconstructions.*

- **Localiser la zone du potentiel canal de Hering :**

Sur les échantillons préparés seulement à la scie fil diamantée puis collés sur le pin, les contours des échantillons sont préservés (**Figure 21**). Dans les cellules on peut distinguer des éléments de structures intracellulaires, organelles. L'échantillon est de forme parallélépipèdique de longueur 1 mm et de côté 300 µm.

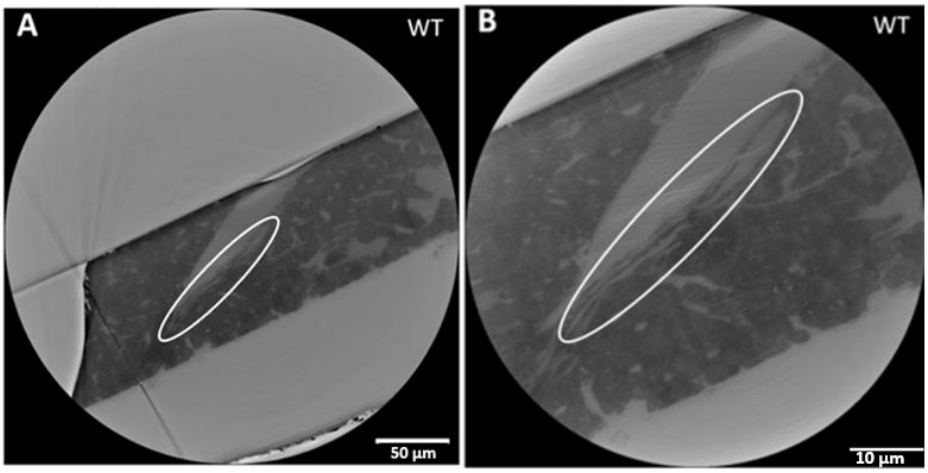


Figure 21 : Échantillon WT. *Acquisition réalisée sur la ligne ID16B. Zoom effectué sur une connexion où un des vaisseaux doit être un tube biliaire ou une artère hépatique, entouré en blanc. (A) Taille de pixel 150 nm. (B) Taille de pixel 100 nm.*

L'objectif consiste à identifier une zone de jonction susceptible de correspondre au canal de Hering. Pour cela, il est d'abord nécessaire de localiser la région la plus favorable à son observation. Sur les reconstructions obtenues avec les données collectées sur la ligne ID16B, la zone sélectionnée, entourée en blanc (**Figure 21**), présente un vaisseau pouvant correspondre soit à un tube biliaire, soit à une artère hépatique. Le canal de Hering se situe entre les canalicules biliaires et le tube biliaire, ce sont donc des régions telles que celle-ci, pouvant contenir des canaux biliaires, que nous devons cibler pour une analyse ultérieure par FIB-SEM. L'objectif est désormais de positionner la région d'intérêt (ROI) aussi près que possible du canal biliaire afin d'optimiser l'observation de cette zone de jonction au FIB-SEM.

IV. Conclusion

La stratégie d'observation du canal de Hering, reposant sur la combinaison de la nanotomographie à rayons X et du FIB-SEM, offre une approche corrélative originale. Les premiers essais réalisés en tomographie à rayons X de laboratoire ont permis de mettre en évidence plusieurs atouts de cette technique : son caractère non destructif, la possibilité de localiser le réseau vasculaire et d'atteindre une taille de pixel proche du micromètre. Ces tests ont cependant souligné certaines limites, notamment en termes de résolution, de temps d'acquisition et de contraste. Dans ce contexte, l'étude du canal de Hering, structure rare et de dimensions micrométriques, a nécessité l'utilisation d'une méthode non destructive permettant de le localiser. La nanotomographie à rayons X utilisant le rayonnement synchrotron s'est révélée être la méthode la plus pertinente pour la localisation du canal de Hering. Les acquisitions réalisées sur une vingtaine d'échantillons ont permis de localiser sur

plusieurs échantillons des régions portales dont certaines montrent des structures correspondant soit à des artères hépatiques soit à des canaux biliaires. Ces derniers correspondent à notre zone d'intérêt et seront donc analysés par FIB-SEM

Le principal défi réside dans le positionnement précis au niveau d'un tube biliaire potentiel, afin d'initier une acquisition à haute résolution et, idéalement, d'observer la zone de jonction correspondant au canal de Hering entre le tube biliaire et les canalicules biliaires.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié différents aspects de l'architecture hépatique en utilisant des techniques de microscopie, en particulier la microscopie électronique volumique de type FIB-SEM. Deux axes de recherche complémentaires ont été développés :

- D'une part, une caractérisation approfondie des fenêtres des LSEC qui a permis d'aboutir à une analyse quantitative du diamètre et de la densité des fenêtres chez des souris sauvages ou délétées pour le gène codant pour BMP9.
- D'autre part, une méthodologie de microscopie corrélative combinant la nanotomographie à rayons X et l'imagerie FIB-SEM a été initiée afin de pouvoir étudier l'ultrastructure du canal de Hering.

Cette conclusion synthétise les principaux résultats obtenus et met en perspective les apports ainsi que les limites des techniques d'acquisition et d'analyse d'images utilisées au cours de ma thèse.

- **L'étude sur l'automatisation de l'extraction des données quantitatives concernant les fenêtres des LSEC à partir d'acquisitions FIB-SEM.**

Au cours de la thèse ayant précédé celle-ci, un protocole de segmentation des LSEC de souris WT a été développé. La complexité de cette segmentation a nécessité d'utiliser une approche multi-étape. Cette méthodologie constitue une première puisque les travaux antérieurs consacrés aux fenêtres des LSEC se sont limités à des observations en 2D, réalisées soit sur des coupes de tissu hépatique, soit sur des cellules isolées et cultivées en 2D. A la suite de ce travail, il était nécessaire de développer des méthodes automatiques pour extraire des mesures fiables en 3D afin de connaitre la porosité des LSEC dans différents contextes biologiques. L'un des objectifs étant de comparer des souris sauvages et des souris dont le gène codant pour la protéine BMP9 a été délété et pour lesquelles il avait déjà été montré des altérations de l'endothélium fenêtré. Cependant, la segmentation des LSEC pour ces souris BMP9-KO a nécessité le développement d'un protocole différent de celui précédemment mis au point.

La majeure partie de mon travail de thèse a ainsi été de développer une approche d'analyse d'images permettant de traiter de grand volumes de données avec une approche la plus automatisée possible. Ainsi, face au volume considérable des acquisitions en microscopie électronique 3D, au caractère chronophage des étapes d'annotation et aux limites des approches semi-automatiques, je me suis tournée vers les méthodes d'analyse d'images basées sur les réseaux de neurones convolutifs. L'examen de la littérature et des résultats des défis internationaux en segmentation ont identifié nnU-Net comme l'outil de deep learning le plus adapté à notre problématique. Ce réseau convolutif, reposant sur l'apprentissage supervisé, se distingue par son caractère auto-configurable, automatisant les étapes essentielles telles que le prétraitement, la définition de l'architecture et le post-traitement. Sa performance a été démontrée par les résultats obtenus, figurant parmi les meilleurs dans la majorité des compétitions d'analyse d'images biomédicales.
Le principal risque lié à l'utilisation d'un outil comme nnU-Net est de le considérer comme une « boîte noire ». En pratique, plusieurs ajustements sont nécessaires pour adapter le modèle aux données spécifiques. Mon travail de thèse a consisté à ajuster un certain nombre d'hyperparamètres en fonction de nos données. Sous nnU-Net, le suivi de l'évolution du score de Dice et de la fonction de perte au fil des epochs permet d'évaluer plusieurs biais potentiels, notamment le sur-apprentissage

(Overfitting). Des codes complémentaires ont permis d'introduire de nouvelles métriques pour l'apprentissage du modèle lors de l'entraînement. Certains scripts ont aussi permis d'intervenir directement sur les étapes de prétraitement pour le traitement des volumes de données en entrée du réseau. La génération des prédictions a également été adaptée en fonction de nos contraintes d'espace et de stockage sur la station de travail.
La stratégie de fine-tuning s'est avérée la plus performante pour la prédiction sur nos données. Néanmoins, à ce stade, le modèle reste non généralisable à n'importe quel type de souris en raison de sa dépendance au phénotype. Chez les souris BMP9-KO, les membranes des LSEC présentent une structure plus discontinue, ce qui rend plus difficile le suivi par le réseau de leur évolution au sein de la pile d'images 2D. De plus, le contraste en niveaux de gris y est moins marqué, compliquant la distinction entre les membranes des LSEC et les microvillosités adjacentes. La complexité plus marquée de la structure membranaire des LSEC chez les souris BMP9-KO justifie cette adaptation, le modèle requiert un guidage plus précis pour générer les prédictions dans un environnement tissulaire dense.

L'utilisation de nnU-Net pour nos travaux a également permis de révéler certaines limites. Tout d'abord, la quantité de données annotées constitue un facteur critique : un nombre insuffisant d'exemples étiquetés peut limiter significativement la performance du modèle. La qualité des segmentations utilisées pour constituer le ground truth est également primordiale. De manière notable, lorsque l'on atteint les limites des outils de segmentation semi-automatique comme Ilastik, nnU-Net est parfois capable de corriger de petites erreurs dans les annotations issues du ground truth, dans le cas où celles-ci concernent une faible proportion de voxels. Bien que les techniques de data augmentation permettent de compenser partiellement le manque de données en produisant des transformations synthétiques, elles ne remplacent pas complètement la diversité réelle des données. Enfin, l'entraînement et l'utilisation du modèle nécessitent des moyens informatiques adaptés, notamment en termes de temps de calcul et d'espace de stockage, qui doivent être pris en compte lors de sa mise en œuvre.

En perspective de ce travail, des améliorations de nnU-Net apparaissent nécessaires, en particulier concernant la réduction des temps d'entraînement et l'accélération de la génération des prédictions. À cette fin, le recours à des clusters de calcul est recommandé. L'environnement de nnU-Net, ainsi que les codes développés en station de travail locale, devront être transférés et déployés sur l'interface du cluster. Par ailleurs, l'exploration de nouveaux hyperparamètres et l'intégration de métriques d'évaluation plus spécifiques à nos données constituent des pistes d'optimisation complémentaires. L'objectif ultime de ces développements est de concevoir un modèle généralisable, capable de fonctionner indépendamment du phénotype de la souris. De plus, le modèle étant sensible à la qualité et à la quantité de données annotées, l'amélioration des annotations et des métriques d'évaluation apparaît également comme un axe prioritaire. Le partage des modèles et des pipelines sous forme de ressources open-source faciliterait leur adoption par d'autres laboratoires et renforcerait la comparaison des travaux dans le domaine.

À partir du masque de segmentation, la reconstruction 3D du sinusoïde hépatique d'un foie de souris WT et d'un foie de souris BMP9-KO a permis d'extraire des mesures quantitatives. Une méthode semi-automatique capable, d'une part, d'extraire le diamètre des fenêtres des LSEC et, d'autre part, de compter le nombre de fenêtres afin de déterminer la porosité des LSEC dans différents contextes biologiques a été mise en place.

La méthode cPSD a permis de caractériser la distribution des diamètres des fenêtres et d'en mesurer le diamètre moyen. Pour compléter l'étude, il était indispensable de mesurer la porosité, mais aucune méthode directe n'était disponible. Une collaboration avec la plateforme Hub d'analyse d'images de l'Institut Pasteur a permis de développer une approche utilisant ISOMAP pour projeter le maillage 3D du sinusoïde en surface 2D. La surface 2D ainsi obtenue a ensuite été convertie en image, et les pores ont été dénombrés en étiquetant les objets distincts de l'image.
Ces premiers résultats suggèrent que le diamètre des fenêtres est plus important chez les souris BMP9-KO. En termes de densité, les sinusoïdes hépatiques du phénotype BMP9-KO présentent un nombre de fenêtres inférieur à celui observé chez les souris sauvages. Les valeurs obtenues ont pu être comparées à celles rapportées par l'équipe BAL au CEA IRIG (Desroches-Castan *et al.*, 2019), qui avait réalisé des mesures manuelles en 2D à partir d'images acquises en SEM. Ces travaux pourraient être étendus à l'étude d'autres facteurs morphogéniques ou de stress hépatique afin de mieux comprendre comment la protéine BMP9 module la dynamique membranaire et la fonction endothéliale. Les différences observées en porosité et en densité de fenêtres pourraient également être corrélées à des altérations de la filtration hépatique ou du métabolisme des lipoprotéines, ouvrant la voie à des collaborations avec des équipes de physiologistes pour relier les mesures structurales à des mesures fonctionnelles.

Les acquisitions FIB-SEM ont été réalisées sur des foies de souris WT et BMP9-KO afin d'analyser les fenêtres des LSEC. Le FIB-SEM s'est révélé particulièrement pertinent pour notre problématique grâce à sa haute résolution, permettant des acquisitions isotropes de 4 × 4 × 4 nm³ nécessaires à l'analyse des fenêtres des LSEC. La principale limitation réside néanmoins dans la localisation précise de la zone d'intérêt contenant un sinusoïde. En raison du caractère destructif du FIB-SEM, l'examen de la littérature a conduit à considérer la tomographie à rayons X comme une approche complémentaire pertinente. Cette technique non destructive permet de pré-localiser des régions tissulaires denses susceptibles de contenir des sinusoïdes, facilitant ainsi le repérage des acquisitions FIB-SEM.

L'automatisation de l'extraction des données quantitatives relatives aux fenêtres des LSEC à partir d'acquisitions FIB-SEM a apporté des avancées méthodologiques importantes pour étudier l'influence de la protéine BMP9 sur leur ultrastructure. Afin de compléter cette analyse, il était nécessaire de s'intéresser à d'autres structures clés de la physiologie hépatique. Dans cette perspective, nous avons mené une seconde étude consacrée au canal de Hering, en utilisant une approche de microscopie corrélative permettant une analyse à différentes échelles, ce qui enrichit ainsi la compréhension de l'organisation hépatique.

- **L'étude du canal de Hering par microscopie corrélative**

Le canal de Hering reste énigmatique et pourrait constituer comme une possible niche de cellules progénitrices hépatiques. L'étude de son ultrastructure reste un défi majeur, étant donné qu'il est supposé se situer tous les ~10 µm le long du canal biliaire et que ses dimensions micrométriques le rendent difficilement observable. L'élaboration d'une stratégie de localisation adaptée a donc constitué une étape essentielle de ce travail.

La nanotomographie à rayons X au synchrotron a été identifiée comme une technique capable de concilier haute résolution, contraste d'imagerie élevé et acquisitions rapides. Cette méthode permet d'obtenir des champs de vue larges avec des voxels de 200 × 200 × 200 nm³, tout en offrant la

possibilité de localiser et d'acquérir des régions d'intérêt jusqu'à 25 × 25 × 25 nm^3 sur un nombre important d'échantillons. Un défi majeur pour les travaux futurs consistera à localiser les tubes biliaires, afin d'orienter avec précision les acquisitions FIB-SEM à haute résolution et d'étudier de manière ciblée la jonction entre le tube biliaire et les canalicules biliaires constituant le canal de Hering. L'augmentation du nombre d'échantillons analysés permettrait de mieux caractériser la variabilité inter- et intra-hépatique des canaux de Hering et de renforcer la robustesse des observations.

En parallèle, l'équipe Met&Or développe une approche destinée à reproduire la zone du canal de Hering, située à l'interface entre hépatocytes et cholangiocytes, afin de reconstituer ce canal. Cette approche repose sur la mise en place d'organoïdes hépatobiliaires. Pour ce faire, des techniques de micropatterning et de microfabrication sont utilisées afin de reconstituer cette niche. La stratégie consiste à contrôler le contact entre les deux types cellulaires par des procédés d'ingénierie, de manière à favoriser la formation de connexions entre canalicules et tubes biliaires ainsi que leurs structures, un phénomène rarement observé dans les modèles existants.
Enfin, le développement d'outils automatisés pour l'analyse volumique tel que nnU-Net pour les LSEC, pourrait faciliter la segmentation et l'identification des structures biliaires dans de grands volumes, tout en réduisant le temps d'annotation et en améliorant la reproductibilité, permettant ainsi d'imager la complexité du réseau biliaire dans son ensemble.

Ces perspectives combinées ouvrent la voie à une compréhension plus approfondie de l'ultrastructure et de la fonction du canal de Hering.

Matériels et Méthodes :

I. Acquisitions FIB-SEM :

Nos données ont été acquises à l'aide d'un microscope FIB-SEM *Zeiss Cross Beam 550* qui permet d'atteindre une taille de voxel de l'ordre de 3 x 3 x 3 nm³. Ce microscope électronique est composé d'une colonne électronique et d'une colonne ionique séparées par un angle de 54° (**Figure 22**). L'alternance entre l'abrasion du bloc par le faisceau d'ions et l'imagerie par le faisceau d'électrons produit une pile d'images 2D. Dans le cadre de l'analyse des fenêtres des LSEC, l'acquisition est réalisée avec une taille de voxel de 4 x 4 x 4 nm³. Quant à l'analyse du canalicule biliaire, l'acquisition est réalisée avec une taille de voxel de 10 x 10 x 10 nm³. Avec une taille de voxel de 4 × 4 × 4 nm³ et un temps d'acquisition de 10 µs par pixel (valeur typique pour l'imagerie SEM), il est possible d'imager sur la région sélectionnée un volume isotrope d'environ 10 × 10 × 10 µm³ en environ 70 heures, avec un volume de données généré d'environ 60 Go.

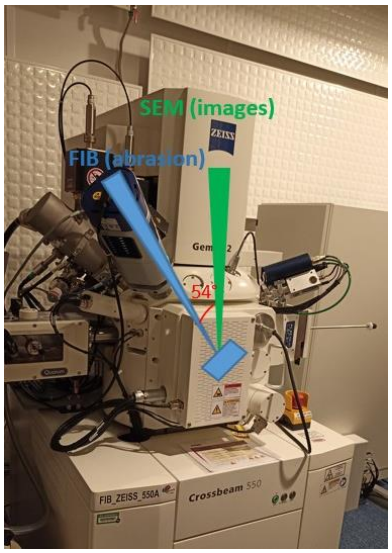


Figure 22 : Microscope FIB-SEM Zeiss Cross Beam 550 à la plateforme de nano-caractérisation. *Colonne électronique (SEM) et colonne ionique (FIB) séparées l'une de l'autre d'un angle de 54°.*

II. Analyse des images FIB-SEM :

Une fois la pile d'images 2D acquise, généralement constituée de 1000 à 2000 coupes au format TIFF, les données codées en 16 bits (sur 2^{16} = 65536 niveaux de gris) représentent un volume de l'ordre de quelques dizaines de Gigaoctets. Pour le traitement des images, celles-ci sont converties en 8 bits, ce qui réduit de moitié la taille des fichiers en mémoire et en stockage. Cette conversion implique un codage sur 256 niveaux de gris.

L'alignement des piles d'images est effectué dans Fiji à l'aide des plugins MultiStackReg ou SIFT. Dans les deux cas, la transformation appliquée est une translation entre les images, et la matrice obtenue est ensuite corrigée pour compenser l'apparition de dérives dans les vues orthogonales. Pour l'alignement de la pile d'images, les différentes étapes sont décrites dans la section 9.1 de Matériels & Méthodes dans le manuscrit de Y. Rekik (Rekik, 2023).
Sous Fiji, un filtre Mean3D est souvent utilisé pour réduire le bruit dans l'image ce qui permet de lisser le volume 3D. Chaque voxel est remplacé par la moyenne de ses voisins, cela réduit les variations brusques et le bruit aléatoire. Les avantages du filtre Mean3D pour les données FIB-SEM sont : la réduction du bruit, un rendu 3D plus lisse et plus clair (visible sur la **Figure 23B**).

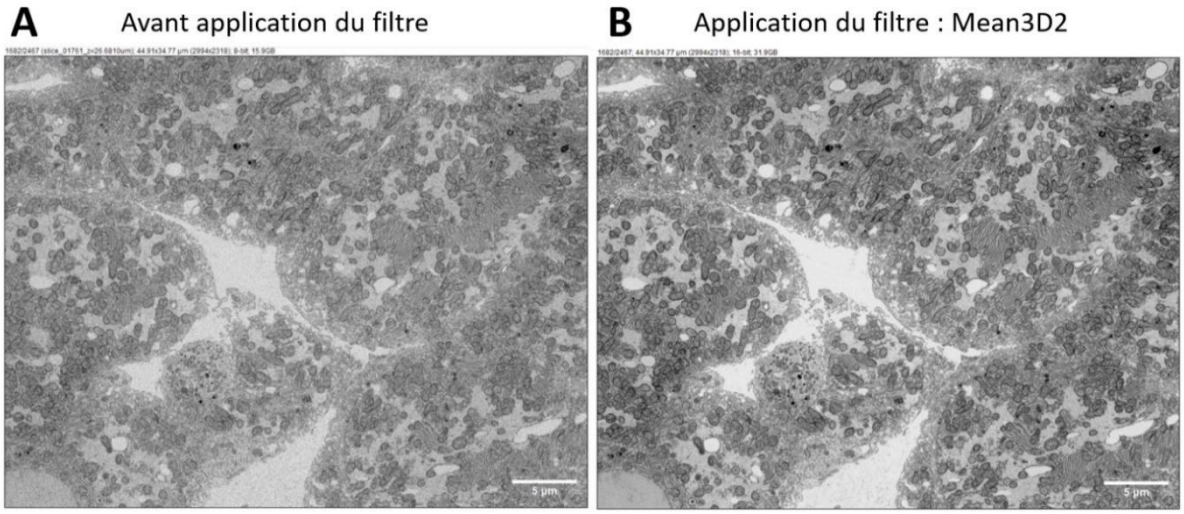


Figure 23 : Acquisition FIB-SEM – taille de voxel 15 x 15 x 15 nm³. *(A) Une image avant application du filtre Mean3D. (B) La même image après application du filtre Mean3D.*

Les étapes du processus global de la segmentation et génération du maillage 3D commencent par les images brutes, initialement au format TIFF, qui sont ensuite converties au format HDF5 afin de faciliter leur traitement. La segmentation semi-automatique est réalisée à l'aide du logiciel Ilastik (v1.4) (Berg *et al.*, 2019) dont plusieurs workflows sont proposés pour faire la segmentation, puis affinée manuellement sous MIB (Microscopy Image Browser, v2.81) conformément à la méthodologie décrite par Cocks *et al.* (Cocks *et al.*, 2018).

Les masques de segmentation ainsi obtenus sont ensuite convertis en maillages 3D à l'aide du logiciel Avizo (v7.0), permettant leur exportation au format .obj pour visualisation ou post-traitement dans Paraview ou Meshlab.

Cette chaîne de traitement a permis de construire le ground truth, utilisée ensuite comme référence pour entraîner un modèle de deep learning (nnU-Net), présenté dans la section suivante.

II.1. Processus global : Segmentation

Les étapes du processus global sont décrites allant de la génération de la segmentation à partir des données initiales acquises au FIB-SEM à la reconstruction 3D.

La pile d'images 2D au format TIFF est convertie au format .HDF5 par un plugin sous le logiciel Fiji : '' *Plugins → Ilastik → Export HDF5 ''*, afin d'optimiser la segmentation.

Le logiciel Ilastik (version 1.4) est utilisé pour la segmentation. Les étapes du processus de segmentation sont détaillées ci-dessous. Depuis Ilastik, on peut exporter le masque de segmentation au format HDF5 et le visualiser sous Fiji : *Plugins → Ilastik → Import HDF5.*

II.2. Segmentation des images FIB-SEM des LSEC

II.2.a. Méthode : Formation du Ground Truth

- ***Analyse de la structure des membranes de la LSEC – segmentation du sinusoïde***

Deux phénotypes de souris ont été étudiés : des souris sauvages (WT) et des souris BMP9-KO pour lesquelles le gène codant la protéine BMP9 a été délété.

L'élaboration de la segmentation de référence, dite ground truth, a suivi des protocoles distincts selon le phénotype de la souris, tout en partageant certaines étapes méthodologiques communes.
Sur les échantillons de souris WT, les étapes de segmentation suite à une acquisition FIB-SEM à une taille de voxel de 4 x 4 x 4 nm^3 sont détaillées dans le manuscrit (Rekik, 2023) : section Matériels et Méthodes. Le manuscrit (Rekik, 2023) correspond à la thèse ayant précédée celle-ci. Cette thèse avait établi un protocole principalement sur l'approche de segmentation des LSEC sur des échantillons de foies de souris WT.
Pour les souris BMP9-KO, une pile d'images 2D est acquise dans les mêmes conditions que pour les souris WT, afin d'éviter tout biais lié aux modalités d'acquisition. La segmentation sémantique par machine learning est réalisée sous *Ilastik*, dont l'objectif est de former le ground truth, utilisé lors de la phase d'entrainement en deep learning. Pour cela, un processus en deux étapes est mis en œuvre à l'aide du logiciel Ilastik :

Étape 1- Workflow *Carving* : Le workflow *Carving* permet de réaliser une première segmentation dite grossière mais essentielle pour délimiter les membranes de la LSEC. Ce workflow présente l'avantage de remplir rapidement les zones de la membrane nucléaire. Le workflow *Carving* est basé sur l'algorithme de ligne de partage des eaux ou Watershed (Beucher & Lantuéjoul, 1979). En effet, la méthode du Watershed permet de regrouper les pixels adjacents en régions cohérentes, limitant le nombre d'annotations nécessaires. L'image est représentée comme un relief topographique sur laquelle l'intensité des pixels représente l'altitude. Ces algorithmes s'inspirent de la répartition de l'eau dans un paysage en suivant un relief formé de lignes de crêtes et de bassins versants. L'algorithme fait la simulation d'une inondation du relief depuis les points les plus bas, appelés minima locaux dans ce contexte. En premier, ce sont les bassins qui se remplissent à partir des minima, ensuite au moment où deux bassins se rencontrent une ligne de crête est créée pour les séparer, c'est ce qu'on appelle ligne de partage des eaux perçue comme les frontières des objets segmentés. Cette méthode donne accès à une segmentation interactive de très grands ensembles de données 3D (Straehle *et al.*, 2012). L'objectif dans la méthode semi-automatique est de solliciter le moins possible l'utilisateur en termes

d'interactions, soit d'annotations. Trois vues orthogonales sont affichées et les coupes peuvent être défilées.

Une fois cette première segmentation faite, on superpose le masque de segmentation sur le volume de données brutes initial sous Fiji. L'entrée à l'étape 2 est formée de doubles canaux.

Étape 2- Workflow *Pixel Classification* : La seconde étape utilise le workflow *Pixel Classification*, basé sur un modèle d'apprentissage supervisé appelé Random Forest pour la classification (Berg *et al.*, 2019). Le retour visuel de la segmentation en temps réel permet à l'utilisateur d'ajuster les annotations et améliore de ce fait le classifieur (Sommer *et al.*, 2011). Il est basé sur l'extraction des caractéristiques des voxels telles que l'intensité, le contour et la texture. A travers cette interface interactive basée sur des annotations, la segmentation est affinée au mieux. L'étape du Batch processing est essentielle pour ensuite généraliser la segmentation. Le masque de segmentation final est obtenu et forme notre ground truth.

Des ajustements manuels de la segmentation peuvent être réalisés à l'aide du logiciel MIB (Microscopy Image Browser). Le maillage 3D est ensuite généré sous Avizo. Si nécessaire, le maillage peut être modifié ou optimisé à l'aide du logiciel MeshLab en vue de traitements ultérieurs.

Segmentation automatisée du sinusoïde hépatique chez des souris WT et des souris KO

Dans nos travaux, nous utilisons l'apprentissage supervisé avec des réseaux de neurones. Le modèle de segmentation est entraîné sur des données labellisées, dont la segmentation de référence est établie à l'aide d'outils semi-automatiques. L'objectif est d'adapter le réseau nnU-Net (Isensee *et al.*, 2021) à nos données spécifiques afin de permettre la segmentation automatique de volumes présentant des caractéristiques similaires.
Les étapes majeures sont les suivantes :

1. Entrainement à partir du ground truth
2. Ajuster les paramètres du pré-traitement des données
3. Mise en place et optimisation des hyperparamètres du modèle
4. Générer les prédictions : inférences
5. Tester et évaluer la performance du modèle sur un nouveau volume de données
6. Affiner le modèle pour obtenir des prédictions précises à l'aide du fine-tuning

   Dans ce cadre, un modèle pré-entraîné est adapté à une nouvelle tâche, autrement dit un nouveau jeu de données, en réajustant certaines de ses couches, notamment les plus profondes, à l'aide d'un faible taux d'apprentissage. Il est important de bien distinguer le transfer learning et le fine-tuning : le premier consiste à réutiliser un modèle pré-entraîné pour une tâche différente, tandis que le second implique de réentraîner tout ou une partie du modèle pour l'adapter plus finement à cette nouvelle tâche.

1) Entrainement à partir du ground truth

Dans le cadre de nos travaux, nous utilisons un réseau de neurones convolutifs, nnU-Net (Isensee *et al.*, 2021), dont le choix est motivé par les performances obtenues lors de défis internationaux d'analyse d'images. Il s'agit d'un réseau de neurones supervisé, ce qui signifie qu'il nécessite une base de données annotée (ground truth) lors de l'apprentissage.

2) Ajuster les paramètres du pré-traitement des données

- Installation de l'environnement nnU-Net :

L'installation de l'environnement nnU-Net est détaillée sur le compte GitHub de Fabian Isensee, accessible via ce lien : https://github.com/MIC-DKFZ/nnUNet.
L'environnement nnU-Net a été installé avec l'aide de Nicola Vigano, numéricien à la PFNC. L'installation est réalisée en local sur un poste de travail sous le système d'exploitation Linux comportant un GPU NVIDIA RTX 5000 (équivalent à un GPU NVIDIA RTX 2080 TI). nnU-Net est installé dans un environnement virtuel par Miniconda. La version 3.10 de Python et la version 2 de nnU-Net (v2) sont utilisées. nnU-Net utilise PyTorch comme framework principal. Les variables d'environnement sont imbriquées selon une architecture précise pour leur localisation : des données brutes, des données pré-traitées et les poids des modèles entraînés. Un certain nombre de modifications du code source a été réalisé afin d'optimiser les hyperparamètres du CNN sur nos propres jeux de données. À ce jour, l'environnement de nnU-Net v2 a été adapté sur une station de travail locale. Toutefois, le déploiement de l'ensemble des codes sur un cluster permettrait d'accélérer l'entraînement et, par conséquent, d'améliorer la généralisation de la segmentation sur l'ensemble de la pile d'images 2D obtenues par FIB-SEM, pouvant facilement dépasser les 1000 acquisitions. Sur la station locale, les contraintes liées à la mémoire et à l'espace de stockage limitent en effet la généralisation des prédictions à une centaine d'images successives.
Au niveau de la méthode, nnU-Net utilise lors de l'entrainement la méthode *five-fold cross validation (five-fold CV)*, où les données sont divisées aléatoirement en 5 sous-ensembles égaux, appelés « plis ou folds ». L'emploi du five-fold cross-validation permet de limiter le phénomène de sur-apprentissage (Overfitting), c'est-à-dire la situation où le modèle s'adapte trop spécifiquement aux données d'entraînement et perd sa capacité à généraliser à de nouvelles images. En répartissant les données en plusieurs sous-ensembles pour l'entraînement et la validation, cette méthode garantit que le modèle apprend des caractéristiques représentatives plutôt que des détails propres à un jeu de données particulier, ce qui favorise des prédictions plus robustes et généralisables.

L'architecture de base suit le schéma classique U-Net : un chemin d'encodage qui extrait progressivement des caractéristiques globales de l'image via des couches de convolutions et des couches de max pooling, et un chemin de décodage symétrique qui reconstruit la segmentation en combinant les détails spatiaux via des connexions de saut (skip connections). Cette section présente les architectures intégrées dans nnU-Net.

- **Architectures de nnU-Net disponibles :**

La plupart des architectures U-Net adoptent la même configuration courante : deux blocs majeurs par niveau de résolution, avec l'encodeur en entrée et le décodeur en sortie.

Les architectures disponibles sous nnU-Net sont :

- **U-Net** prédéfinies 2D U-Net (**Figure 24**) pour les données d'images 2D
- **3D U-Net** sous 3D Full Resolution utilisant des images 3D complètes et 3D Low Resolution à partir du sous-échantillonnage d'images 3D (Isensee *et al.*, 2021)
- **Cascaded 3D U-Net** combine des modèles pour optimiser les performances.

On sélectionne pour les premiers entrainements la configuration 2D U-Net illustrée sur la Figure **24**. Cette configuration entraine le réseau image par image en 2D, sans information simultanée dans les 3 dimensions. Pour des premiers essais, l'architecture 2D U-Net est plus rapide en temps d'apprentissage sur la station de travail local et de ce fait plus facilement ajustable pour le réglage des hyperparamètres. Sur la partie gauche de la Figure **24**, l'encodeur extrait les caractéristiques des images en entrée. L'encodeur est constitué de plusieurs couches, organisées en une alternance de deux types de blocs principaux : les couches de convolution et les couches de max pooling.

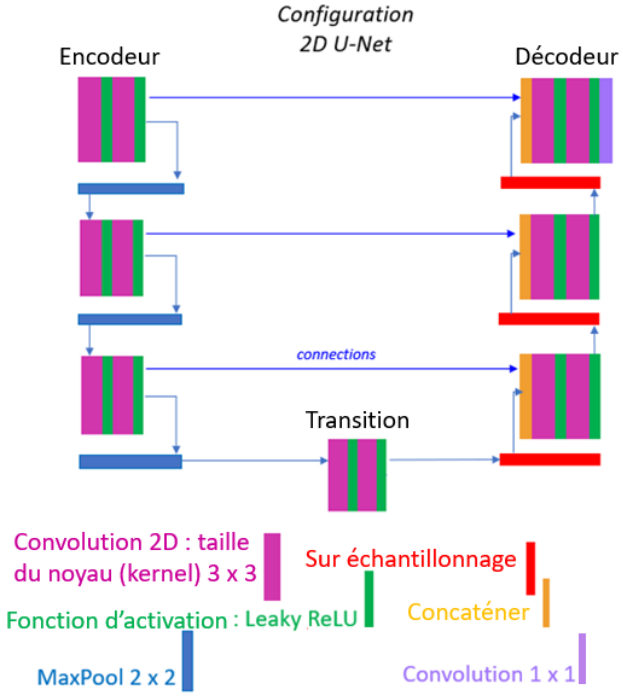


Figure 24 : Vue d'ensemble de l'architecture d'apprentissage profond de nnU-Net. *Configuration 2D U-Net. Partie gauche encodeur et partie droite décodeur.*

Encodeur :

- Premier bloc - Couches 2D de convolution : une image en niveau de gris peut être vue comme une matrice 2D, où chaque pixel correspond à une valeur numérique au sein de cette matrice. Le réseau est formé de nombreuses couches, chacune de ces couches contient plusieurs filtres convolutifs appelés aussi noyaux de convolution ou plus couramment kernel. Chaque filtre est une petite matrice de poids, de dimension 3 x 3, formée de valeurs 0 ou 1, appliquée aux pixels de l'image résultant en une carte de caractéristique appelé « feature map ». Plusieurs filtres sont appliqués, chacun

permettant d'extraire des caractéristiques pertinentes telles que les contours, les bords, les textures ou d'autres informations utiles à la phase d'entraînement ainsi qu'à la tâche assignée au modèle, en l'occurrence la segmentation.

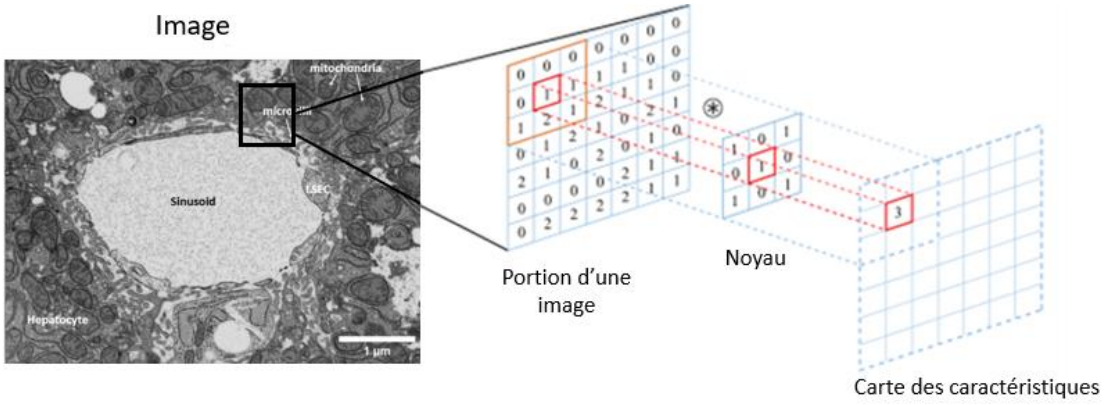


Figure 25 : Opérations de convolution sur l'image en niveaux de gris. *Chaque pixel de l'image correspond à une valeur numérique au sein d'une matrice sur laquelle un kernel est appliqué pour extraire des caractéristiques locales.*

La somme des produits est effectuée entre les valeurs de la région sélectionnée de l'image et les éléments du filtre (**Figure 25**). En sortie de cette somme, on obtient un seul nombre dans la carte de caractéristiques de sortie. Le noyau se déplace sur l'image d'entrée et applique l'opération de manière répétée sur chaque fenêtre de l'image. A la sortie, la carte de caractéristiques est extraite et est utilisée comme entrée dans la couche suivante. Au fil des couches, le réseau détecte des caractéristiques de plus en plus complexes.

Premier bloc - Fonction d'Activation :

Après une opération de convolution, la couche suivante est la fonction d'activation non linéaire telle que ReLU (Rectified Linear Unit). La fonction d'activation permet de comprendre des relations plus complexes.

Premier bloc - Couches de max pooling : La couche de max pooling est une opération de sous-échantillonnage qui permet de réduire les dimensions des cartes de caractéristiques tout en conservant l'essentiel de l'information. Cette étape permet d'offrir au réseau une capacité d'analyse multi-échelle. Les fenêtres de pooling sont généralement de taille 2 × 2, avec un pas (stride) de 2. Concrètement, l'opération consiste à sélectionner la valeur maximale des pixels à l'intérieur de chaque fenêtre (**Figure 26**). La couche de max pooling est une opération de sous-échantillonnage qui permet non seulement de réduire la taille des cartes de caractéristiques, mais surtout d'offrir au réseau une vision à plus large échelle.

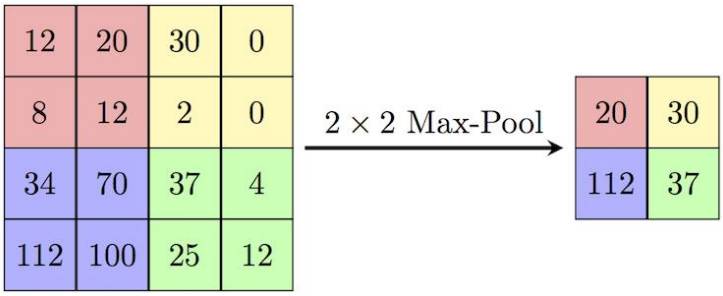


Figure 26 : Exemple de l'opération de max-pooling sur une portion de l'image.

En résumé, l'encodeur peut être attribué à une représentation comprimée de l'image d'entrée contenant les informations principales à différentes échelles.

Deuxième bloc - Décodeur :

Sur la partie droite de la **Figure 24**, on trouve le décodeur. Des connexions relient l'encodeur au décodeur. L'encodeur transmet à chaque niveau les caractéristiques extraites au décodeur. On retrouve pour le décodeur plusieurs couches avec deux blocs principaux dont un de ces blocs est la couche de convolution suivie de la fonction d'activation décrits ci-dessus et le deuxième bloc concerne la couche de suréchantillonnage (upsampling).

Deuxième bloc - Couche de suréchantillonnage (upsampling) :

Plusieurs méthodes sont possibles : convolution transposée, interpolation, unpooling. Sous U-Net, la convolution transposée augmente la taille spatiale de l'entrée. Dans cette configuration, le filtre de convolution ajoute des zéros entre les pixels en entrée puis effectue une convolution normale. Le décodeur utilise les caractéristiques envoyées par l'encodeur pour reconstruire l'image à une résolution plus élevée.
Dans l'architecture 3D de U-Net, les noyaux de convolution ont des dimensions de 3 × 3 × 3 et les opérations de max pooling utilisent des fenêtres de 2 × 2 × 2, ce qui permet de traiter des volumes 3D plutôt que des images 2D.
Lors de la phase d'entrainement du modèle, les poids du réseau de neurones sont ajustés. La définition d'un poids d'un réseau de neurones est mentionnée ci-dessous.

- **Poids d'un réseau de neurones**

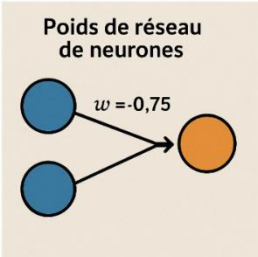


Figure 27 : Schéma d'un poids de réseau de neurones.

Ce poids **w** est un paramètre appris qui connecte un neurone d'une couche à un neurone de la couche suivante (**Figure 27**). Sa valeur indique l'influence que l'entrée exerce sur la sortie.

Par exemple, si w = - 0,75, le nombre 0,75 mesure la force de l'effet qu'à cette connexion. Une valeur proche de 1 (ou -1) signifie une influence marquée, tandis qu'une valeur proche de 0 correspond à une influence négligeable.

Un neurone est une unité de calcul qui reçoit des entrées numériques, chacune multipliée par un poids. La somme de ces valeurs, plus un biais, passe ensuite dans une fonction d'activation comme Leaky ReLU. La ReLU ne bloque que les valeurs négatives de la somme totale : les signaux positifs passent, tandis que les signaux négatifs sont transformés en 0.

3) Mise en place et optimisation des hyperparamètres du modèle

nnU-Net est présenté comme conçu pour être automatique sur l'ensemble du pipeline. En pratique, beaucoup de paramètres sont à ajuster voire modifier. Le risque lié à l'utilisation de l'outil nnU-Net, tel que proposé sur GitHub, est de percevoir cette interface comme une boîte noire. En raison du temps d'apprentissage relativement long et de la complexité liée au grand nombre d'hyperparamètres, dont l'optimisation exige une recherche rigoureuse, une part importante de ce travail de thèse est consacrée à cette partie. Un fichier JSON (JavaScript Object Notation) est utilisé pour décrire les caractéristiques du jeu de données, en structurant l'ensemble des paramètres nécessaires à sa configuration.

Un aperçu de chaque paramètre optimisé selon les caractéristiques de nos données est présenté dans ce projet.

Choix de l'architecture du CNN : 2D U-Net**,** 3D full resolution, 3D low resolution disponibles. L'architecture U-Net 2D est privilégiée dans un premier temps, en raison de sa rapidité d'entraînement supérieure à celle de l'architecture U-Net 3D full resolution sur une station de travail local. En 3D, le modèle prend plus de temps à converger et le temps de calcul est beaucoup plus long avec la configuration 3d_fullres puisque cela nécessite une puissance de calcul importante et davantage de mémoire. On constate qu'un apprentissage en configuration *3D fullres* est environ deux fois plus long qu'un entraînement en configuration U-Net 2D, principalement en raison du nombre plus élevé d'époques nécessaires en 3D. Une fois les paramètres optimisés, l'entraînement du modèle a été réalisé en configuration 3D full resolution, cette approche étant mieux adaptée au traitement de données volumiques.

Patch size : taille des blocs des volumes extraits à partir du volume initial comme entrée du réseau pendant l'entraînement → échantillon WT (30, 900, 900) et échantillon KO (30, 300, 300), nombre de pixels en (Z, X, Y).

Batch size : le batch correspond au nombre d'images, ou plus précisément aux patchs d'images, traitées simultanément par le réseau lors de l'entraînement pour effectuer une seule mise à jour des poids. C'est sur cet ensemble que le gradient est calculé afin d'ajuster les poids. Le gradient est un vecteur indiquant la direction et l'amplitude du changement de chaque poids nécessaire pour réduire la fonction de perte.

Overlap : le volume est découpé en sous-volumes, les bordures des patchs se chevauchent afin d'éviter des artefacts et ainsi améliorer la robustesse des prédictions.

Learning rate : le taux d'apprentissage (learning rate) de l'optimiseur est initialisé à 0,001 puis décroît progressivement au cours de l'entraînement. Il correspond au pas utilisé pour mettre à jour les poids lors de la descente de gradient, un algorithme fondamental de l'apprentissage des réseaux de neurones. Ce processus consiste à ajuster les paramètres du modèle de manière à minimiser la fonction de perte (loss function). À chaque itération, le gradient est calculé afin de guider cette mise à jour. Le choix du taux d'apprentissage est déterminant, car il influence à la fois la rapidité et la stabilité de la convergence.

Optimiseur : par défaut, nnU-Net utilise l'optimiseur Stochastic Gradient Descent (SGD) avec momentum de Nesterov (μ=0,99). Dans notre projet, le choix de l'optimiseur pour l'entrainement d'un réseau dépend de plusieurs facteurs : nature du problème et des données, les ressources de calculs disponibles, la vitesse de convergence et la liste se poursuit. On s'oriente vers l'optimiseur Adam principalement pour sa rapidité de convergence et sa robustesse, plutôt que l'optimiseur SGD. De plus, Adam nécessite souvent moins d'ajustements fins sur les paramètres ce qui le rend plus efficace dans des scénarios de recherche d'hyperparamètres.

Fonction d'activation : Leaky ReLU constitue une fonction d'activation performante et la plus utilisée du fait qu'elle permet l'accélération du processus d'apprentissage tout en introduisant de la non-linéarité indispensable à la modélisation de relations complexes entre les données.

Test_percentage : valeur fixée à 20% selon la pratique courante. Parmi tous les sous-volumes extraits du volume total, 20%, choisis de manière aléatoire, ne sont pas utilisés durant la phase d'entraînement du CNN. Ces 20 % de sous-volumes sont dédiés à l'évaluation des prédictions sur des données inédites pour le réseau.

Num_epochs : le nombre d'époques est adapté à l'architecture du réseau. Pour notre configuration U-Net 2D, le nombre d'époques (plus connu sous le terme « epochs » en anglais) est fixé à **150** époques. Dans le cas de notre configuration U-Net 3D, le nombre d'époques est fixé à **350**. Ce nombre plus élevé en configuration 3D U-Net s'explique par la complexité accrue de l'apprentissage en trois dimensions. Une augmentation du nombre d'époques sur nos données entraîne un temps d'entraînement plus long et augmente le risque de surapprentissage, ce qui peut réduire la capacité du modèle à généraliser et produire des prédictions moins fiables.
Fabian Isensee et son équipe (Isensee *et al.*, 2021) ont réalisé les entrainements sur 1000 époques sur leurs jeux de données. Le choix du nombre d'époques dépend de la complexité des données afin d'optimiser l'apprentissage.

Influence du phénotype et du nombre de classes sur le modèle

Le nombre de classes utilisé pour la constitution du ground truth varie en fonction du phénotype de la souris :

- Phénotype BMP9-KO : trois classes sont nécessaires, ce qui conduit à des prédictions à trois classes.
- Phénotype WT : deux classes sont suffisantes, aboutissant à des prédictions à deux classes.

Cette distinction méthodologique s'explique par les différences morphologiques et de contraste observées entre les deux phénotypes. Chez les souris WT, le contraste en niveaux de gris des membranes des LSEC est plus marqué, permettant une segmentation binaire (objet / arrière-plan). En revanche, chez les souris BMP9-KO, les membranes présentent davantage de discontinuités structurelles, ce qui complique leur suivi volumique par le CNN. Une annotation plus fine est donc requise, distinguant (i) la lumière sinusoïdale, (ii) les membranes des LSEC et (iii) l'espace extra-sinusoïdal. Compte tenu de la spécificité imposée par nnU-Net, qui requiert un nombre de classes fixe et défini, ces paramètres doivent être spécifiés dans le fichier JSON de configuration. Ce dernier indique explicitement, en fonction du phénotype, si deux ou trois classes doivent être utilisées lors de l'entraînement et de l'inférence.

Fonction de perte : sous nnU-Net il s'agit d'une combinaison : *Loss = DiceLoss + CrossEntropyLoss.*

La Dice Loss est bien adaptée aux cas de segmentation avec des classes déséquilibrées, particulièrement lorsque le background est prédominant par rapport à l'objet d'intérêt. Mathématiquement, la formule de calcul du coefficient de Dice est :

Équation 6

$$D(A,B) = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|}$$

Où |A∩B| désigne le nombre de pixels communs (intersection) entre l'ensemble des pixels prédits A et l'ensemble des pixels réels B.

|A| et |B| représentent respectivement le nombre de pixels appartenant à A et à B.

La ***Cross-Entropy Loss*** (ou entropie croisée) est couramment utilisée en segmentation sémantique afin de pénaliser les erreurs de classification pixel par pixel.
Elle compare, pour chaque pixel, la distribution de probabilité prédite par le réseau à la distribution réelle (issue du ground truth).

4) Générer les prédictions : inférences

- Sous-volumes (20 % pourcentage test)

Lorsque le volume est divisé en sous-volumes, 20 % de ceux-ci sont réservés à la phase de test, durant laquelle les performances du réseau de neurones sont évaluées. Avant d'utiliser des métriques pour une comparaison quantitative précise, une première évaluation visuelle peut être effectuée. Sur la **Figure 28A**, on visualise un sous-volume des données initiales, sur la **Figure 28B** la segmentation du ground truth et sur la **Figure 28C** la segmentation provenant de la prédiction générée par nnU-Net. Dans le cas présenté, la segmentation réalisée par nnU-Net montre des contours nets, continus et bien définis de l'objet ciblé, la membrane des LSEC. La segmentation obtenue avec Ilastik présente

néanmoins certaines irrégularités, se traduisant par des zones partiellement mal délimitées ou par la présence de bruit résiduel.

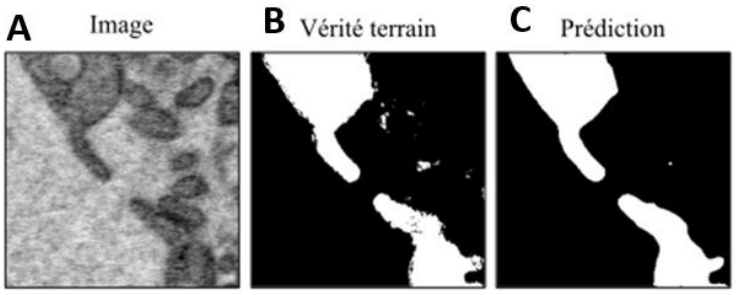


Figure 28 : Segmentation sur 1 sous-volume. *(A) Sous-volume de la pile d'images. (B) Segmentation générée par Ilastik – ground truth. (C) Segmentation générée sous nnU-Net.*

De plus, la segmentation par nnU-Net permet d'avoir moins de bruit dans le background, on a quasiment une absence totale de pixels isolés dans le background tandis qu'avec Ilastik on a la présence de bruit de segmentation dans l'arrière plan, ce qu'on appelle des faux positifs. Avec Ilastik, les structures présentent parfois des trous à l'intérieur de la membrane (**Figure 28B**), un artefact que nnU-Net parvient à corriger.

5) Tester et évaluer la performance du modèle sur un nouveau volume de données

Pour générer les prédictions, plusieurs approches sont possibles. La méthode la plus simple, tant en termes de temps de calcul que d'utilisation mémoire, consiste à appliquer le modèle avec l'architecture **U-Net 2D**. Cependant, lorsque l'on travaille sur des volumes 3D, l'utilisation de l'architecture **U-Net 3D** est généralement plus précise, car le réseau prend en compte l'information spatiale en traitant des sous-volumes, appelés patchs 3D.

De plus, afin d'améliorer la pertinence de la segmentation, il est possible d'utiliser une étape de **fine-tuning**. Cette opération consiste à affiner un modèle pré-entraîné sur un jeu de données existant en le réentraînant sur un nouvel ensemble de données, préalablement annotées, afin d'orienter son apprentissage et d'accroître la robustesse. Actuellement, la configuration **U-Net 2D** est utilisée en association avec le fine-tuning. De manière logique, l'application de la configuration **U-Net 3D** couplée au fine-tuning est susceptible d'obtenir des prédictions encore plus précises et robustes.

6) Affiner le modèle pour obtenir des prédictions précises à l'aide du fine-tuning

Fine-Tuning : le fine-tuning revient à adapter un modèle pré-entraîné à un nouveau contexte, soit à un nouveau jeu de données qui a des spécificités qui lui sont propres. Les poids appris lors de l'entrainement initial, le pretraining, sont conservés. Un code pour la préparation au fine-tuning a été mis en place.

Dans cette configuration, seulement certaines couches vont être à nouveau entrainées sur un nouveau jeu de données, en général il s'agit des dernières couches. L'objectif est une meilleure performance sur des tâches spécifiques. Le fine-tuning a été mis en pratique sur les deux phénotypes de souris WT et BMP9-KO.

Configuration 2D et 3D U-Net :

Dans la configuration 2D U-Net, le fine-tuning s'appuie sur une segmentation préliminaire rapide. En pratique, une dizaine d'images consécutives de la pile sont segmentées à l'aide du workflow *Pixel Classification* d'Ilastik (**Figure 29**). Les masques obtenus peuvent ensuite être ajustés manuellement à l'aide du logiciel MIB.



***Figure 29 : Préparation au fine-tuning** : segmentation d'une dizaine d'images consécutives sous Ilastik, avec 3 classes pour l'échantillon BMP9-KO.*

À ce jour, la méthode de fine-tuning en configuration 3D U-Net ne donne pas de résultats satisfaisants, probablement en raison de problèmes liés aux dimensions des données. En effet, le réseau initial est entraîné sur un volume comportant un nombre élevé de coupes dans l'axe Z (392 coupes pour l'échantillon WT), tandis que la première tentative de fine-tuning s'appuie sur des volumes nettement plus limités, comprenant environ une dizaine de coupes seulement.

Une autre approche explorée pour pallier ces limitations est de segmenter environ cinquante images consécutives (**Figure 30**), en se limitant à un quart de l'image, afin de rester compatible avec les contraintes d'annotation dans Ilastik. L'objectif est de vérifier si l'augmentation de la dimension Z, en cohérence avec la nature volumique du réseau 3D U-Net, permettait d'améliorer les performances. Cependant, cette stratégie n'a pas fourni de résultats satisfaisants jusqu'à présent.

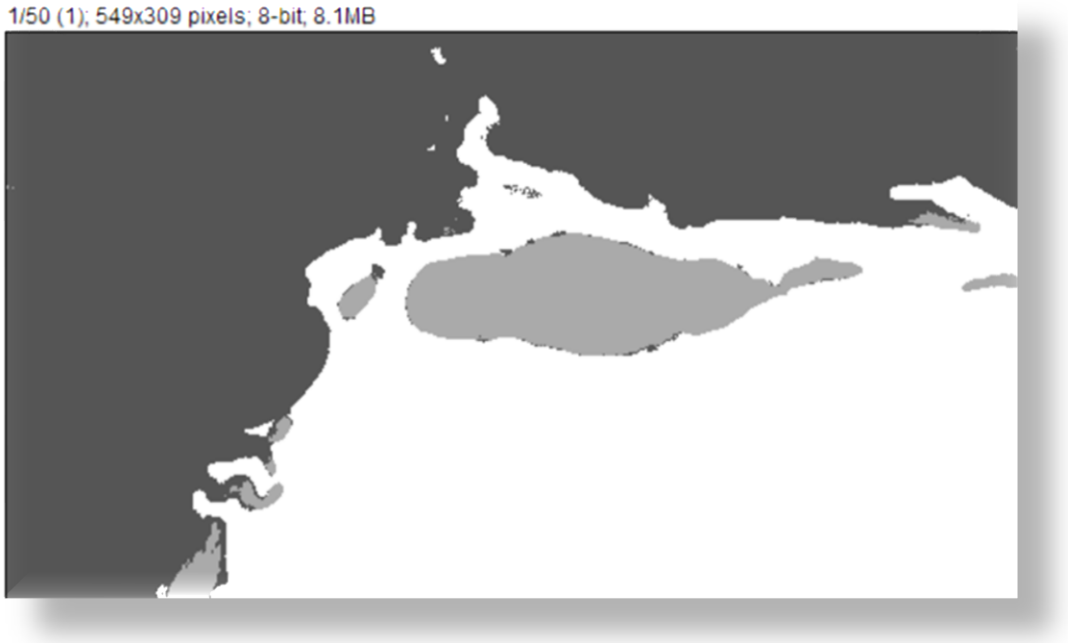


Figure 30 : Segmentation partielle (1/4) *d'une image dans une pile de 50 images sous Ilastik, avec 3 classes – échantillon BMP9-KO.*

Cette difficulté pourrait être due à un chargement incomplet ou incorrect des poids pré-entraînés, ce qui aurait conduit à une réinitialisation totale du modèle plutôt qu'à un fine-tuning effectif des couches finales.

Tableau récapitulatif des paramètres optimisés :

Données Ground Truth	**520 WT** **Ground Truth**	**540 KO** **Ground Truth**	**91 KO**	**519 WT**
Paramètres du training			Utilisation du training du 540 KO	Utilisation du training du 520 WT
Optimiseur	Adam	Adam	Adam	Adam
Configuration U-Net	3D 2D	3D 2D	2D – finetuning (Meilleur résultat)	2D – finetuning (Meilleur résultat)
Subvolume_shape (Z, X, Y)	(30, 900, 900)	(30, 300, 300)	(30, 300, 300)	(30, 900, 900)
Overlap (Z, X, Y)	(50, 50, 50)	(50, 50, 50)	(50, 50, 50)	(50, 50, 50)
Test_percentage	20 %	20 %	20 %	20 %
Num_epochs	3D – 350 epochs 2D - 150 epochs	3D – 350 epochs 2D - 150 epochs	2D – 150 epochs	2D – 150 epochs
Number of labels	2 labels	3 labels	3 labels	2 labels
Finetuning	**X**	**X**	✓ Segmentation 10 slices - Ilastik	✓ Segmentation 10 slices - Ilastik
Données brutes ↓ **Prédictions par nnU-Net**	**520 WT** **Comparaison :** Segmentation semi-automatique puis segmentation nnU-Net	**540 KO** **Comparaison :** Segmentation semi-automatique puis segmentation nnU-Net	**91 KO** **Segmentation :** Sur une partie du stack en entrée par nnU-Net	**519 WT** **Segmentation :** Sur une partie du stack en entrée par nnU-Net

III. Codes mise en place

Depuis ce compte GitHub : https://github.com/MIC-DKFZ/nnUNet, mise en place par Fabian Isensee et son équipe, les installations d'instruction sont détaillées. L'environnement nnU-Net a nécessité des adaptations par rapport à nos propres jeux de données. Dans ce cadre, plusieurs codes ont été adaptés et mis en place avec l'aide de Nicola Vigano.

- **1) Code principal :**

Le code principal est : « **prepare_data_ilastik2nnunet.py** », comme son nom l'indique a pour objectif de préparer l'entrée des données.
Ce script constitue un outil de préparation et de traitement de volumes d'images en vue de prédictions avec le framework nnU-Net. Ce script permet notamment à l'utilisateur de spécifier le chemin du volume à prédire, l'index du jeu de données. Le fichier de configuration, JSON, est chargé.
Le volume d'entrée est lu par la bibliothèque Python « tifffile », pour lire et sauvegarder des images TIFF, il est découpé en sous-volumes selon les paramètres spécifiés. L'ensemble de ces sous-volumes est sauvegardé dans un dossier temporaire et les informations de découpage sont dans un fichier HDF5 pour reconstruire le volume complet. En résumé, ce script a plusieurs objectifs : les étapes de découpage, normalisation, sauvegarde, reconstruction, assemblage des sous-volumes.
Le code permet de charger et de valider un fichier de configuration JSON (format de fichier utilisé pour stocker et échanger des données structurées de manière simple et lisible). Le schéma de validation CONF_SCHEMA définit en partie la structure attendue du fichier de configuration. La configuration est retournée sous la forme d'un dictionnaire Python, prête à être utilisée par le reste du programme. Ce module garantit que les fichiers de configuration sont valides et bien structurés avant leur utilisation.
Ce code permet de découper le volume en sous-volumes, composé de trois fonctions principales. L'approche générale est de diviser un volume 3D en sous-volumes (soit les patchs), avec recouvrement (l'overlap précisé dans le fichier JSON), d'extraire ces sous-volumes, et ensuite de les réassembler après traitement. Il en est de même pour les prédictions.

Quelques informations sur chacune des 3 fonctions du code principal mis en place :

- **compute_subvolume_coordinates :** calcule les coordonnées des sous-volumes à extraire à partir d'un volume 3D. Cette fonction prend en compte la forme du volume, la taille souhaitée des sous-volumes, un recouvrement possible.
- **Extract_subvolumes :** utilise les coordonnées pour extraire les sous-volumes. Pour chaque ensemble de coordonnées, la fonction découpe une sous-partie du volume et l'ajoute à une liste.
- **Assemble_subvolumes :** reconstruit le volume 3D d'origine à partir des sous-volumes.

Ce code principal découpe proprement un volume 3D en sous-volumes (sous forme de patchs), et les assemble avec précision.
Des scripts supplémentaires ont ensuite été mis en place pour le traitement de nos données via nnU-Net, en particulier pour l'étape de fine-tuning.

III.1. Guide d'utilisation nnU-Net : commandes détaillées

Liste des commandes en protocole :

mount_kiev

bash

1. Se placer dans l'environnement nnU-Net

conda activate nnu-net

2. Lancer l'entrainement

nnUNetv2_train 168 2d 0,1,2,3,4 --npz -tr nnUNetTrainerAdam1en3 --num_epochs 100

5 folds (5 sous-segments du jeu de données) successifs : 0, 1, 2, 3, 4

Optimiseur : nnUNetTrainerAdam1en3

--num_epochs on choisit directement dans la ligne de commande le nombre d'epochs : 100 epochs

2.1 Fine-Tuning

Se reporter au code : **prepare_finetuning.py**

Transposer les plans d'entraînement définis par nnU-Net sur le nouveau jeu de données lors de l'étape de fine-tuning :

%run prepare_finetuning.py --pre-training 188 --fine-tuning 190

188 : modèle pré-entrainé

190 : modèle fine-tuné

Lancer l'entraînement de fine-tuning avec le nouveau jeu de données :

nnUNetv2_train 190 2d 0,1,2,3,4 -pretrained_weights /nnunet_data/models/Dataset188_LSEC_4nm_540KO/nnUNetTrainer__nnUNetPlans__2d/fold_4/checkpoint_best.pth -tr nnUNetTrainerAdam --num_epochs 100

190 : nouveau jeu de données.

-tr nnUNetTrainerAdam : optimiseur sélectionné.

--num_epochs 100 : nombre d'époques lors de l'entrainement.

Dataset188_LSEC_4nm_540KO : on utilise l'entrainement du jeu de données numéro 188.

3. Lancement des prédictions

3.1 Sur les sous-volumes exclus de l'entraînement pour tester les prédictions (fichier JSON Test_percentage : 20%)

- Commande :

nnUNetv2_predict -i nnunet_data/raw/Dataset195_LSEC_4nm_91KO/imagesTs/ -o nnunet_data/inference/195_test/ -d 195 -c 3d_fullres

- Numéro du jeu de données se référant à l'entrainement utilisé : **195**
- Chemin pour récupérer les sous-volumes : Dossier **raw** → Sous-dossier : **Dataset195_LSEC_4nm_91KO** → Sous-dossier : répartition des données : **imagesTs**
- Chemin pour récupérer les prédictions : Dossier **inference** → Sous-dossier : **195_test**
- Configuration U-Net sélectionnée : 3d_fullres

3.2 Sur un nouveau jeu de données

On utilise directement en entrée le jeu de données initial, que le modèle n'a jamais vu auparavant.

%run launch_predictions.py --input_volume /home/cp272394/data/data_519WT/519WT.tiff -d 198 -c 2d

Nom du jeu de données : 519WT.tiff

Modèle utilisé pour la génération des prédictions : 198

4. Métriques d'évaluation

Se reporter au code : **evaluate_test_performance.py**

- Commande :

%run evaluate_test_performance.py /home/cp272394/nnunet_data/inference/183_test --force_reference /home/cp272394/nnunet_data/raw/Dataset183_LSEC_4nm_540KO/labelsTs

Comparaison entre les prédictions générées par nnU-Net sur les sous-volumes réservés pour le test (20 % des données) : *Dossier nnunet_data → sous-dossier : inference → sous-dossier : 183_test* et les sous-volumes correspondants issus du ground truth : *Dossier : nnunet_data → sous-dossier : raw → sous-dossier : nom du jeu de donnée → sous-dossier : labelsTs*.

Les métriques utilisées dans ce code sont :

➔ **Le score de Dice :**

L'évaluation des prédictions s'effectue à l'aide du score de Dice et du score IoU (Intersection over Union) (DIA, 2024). Ci-dessous, on constate un écart de valeur entre la moyenne du score de l'IoU et la moyenne du score de Dice. Ces métriques sont obtenues sur une configuration 2D U-Net et une centaine de sous-volumes sont évalués.

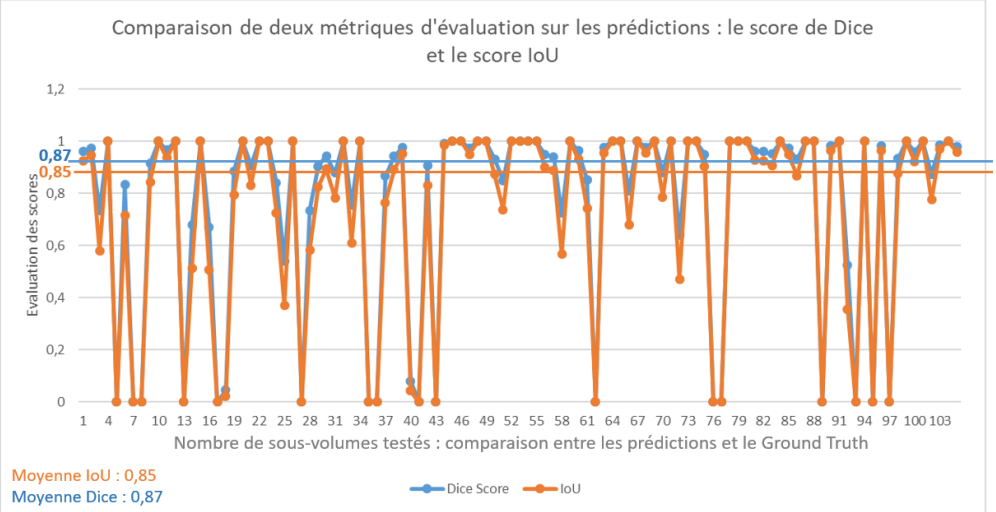


Figure 31 : Comparaison Score de Dice et Score IoU.

Pour comprendre pourquoi le score de Dice (0,87) est plus élevé que l'IoU (0,85) (**Figure 31**), on se réfère aux formules.

1. Score de Dice

Rappel de la formule du **score de Dice** :

$$DSC = \frac{2 \times |A \cap B|}{|A| + |B|},$$

A : ensemble des pixels prédits comme positifs

B : ensemble des pixels annotés comme positifs dans le ground truth

2. Score IoU (Intersection over Union)

La formule du **score IoU** est :

$$IoU = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|},$$

A : ensemble des pixels prédits comme positifs

B : ensemble des pixels annotés comme positifs dans le ground truth

Dans le score de Dice, le poids de l'intersection entre les ensembles prédits et le ground truth est doublé, donnant une évaluation plus favorable lorsqu'on trouve une correspondance entre les deux ensembles.

IV. Génération du maillage 3D

Sous le logiciel Fiji, le masque de segmentation est converti au format .TIFF et la pile d'images 2D est importée sous le logiciel MIB version 2.81 (Microscopy Image Browser) (Cocks *et al.*, 2018) pour affiner la segmentation par des annotations manuelles. Sous MIB, il est nécessaire de superposer sur le stack de données brutes le masque de segmentation généré par Ilastik importé en tant que modèle : '' *Models → Load Model* ''. Une fois la segmentation corrigée, la pile d'images initiale est enregistrée comme suit : '' *File → Save image as* '' au format suivant : *Amira mesh binary*. Concernant le masque de segmentation, il est enregistré tel un modèle, soit '' *Models → Save model as* '' au même format, qui porte l'extension .am.

La conversion du masque de segmentation en un maillage 3D a été réalisée à l'aide du logiciel Avizo (version 7.0) de Thermo Fisher Scientific. Les deux fichiers au format .am sont importés dans Avizo, puis le fichier correspondant au masque de segmentation est relié à l'image initiale en accédant à l'option *ImageData* via un clic droit. Pour produire le maillage 3D, il faut se placer sur le fichier de segmentation puis faire un clic gauche : l'option *SurfaceGen* s'affiche. Dans l'interface, une partie concerne les propriétés : le mode lissage *Uncontraisned smoothing* est utilisé. Le maillage 3D apparait avec nom_fichier.surf, un clic droit sur ce fichier est nécessaire pour présenter la reconstruction 3D, option *Surfaceview*. Ensuite le maillage 3D est enregistré au format .obj et peut être visualisé sous le logiciel Paraview (version 5.8) pour faire des animations ou bien le logiciel Meshlab pour directement modifier le maillage 3D.

Sectionner une partie du maillage 3D – MeshLab :

Il est nécessaire de retirer une partie du maillage 3D correspondant à une région nucléaire, afin de pouvoir utiliser ensuite le projet de la plateforme Hub d'analyse d'images pour extraire le nombre de fenêtres. Les étapes pour découper une partie du maillage 3D sont détaillées.

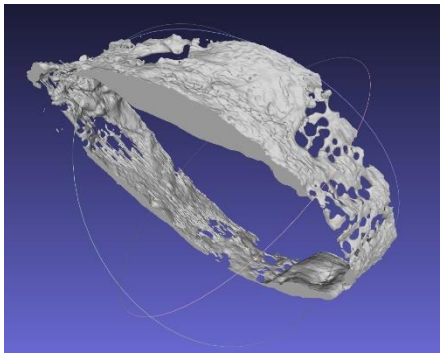
Le maillage 3D est enregistré au format **.obj** sous Avizo. On ouvre le logiciel MeshLab.

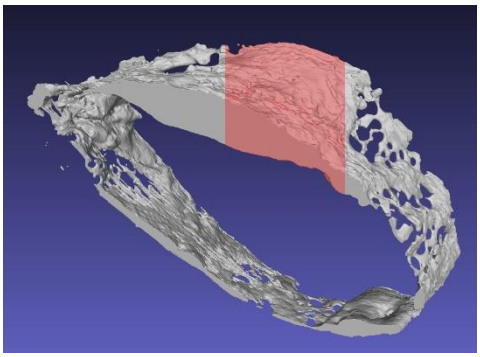
Il faut glisser le maillage 3D dans l'interface de MeshLab.



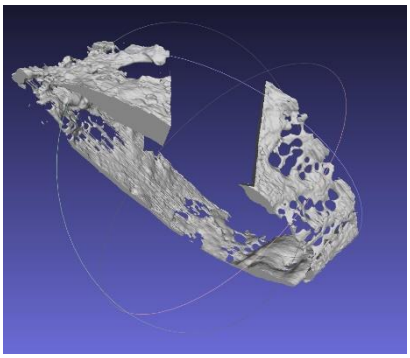
Pour sectionner une partie du maillage :

- Cliquer dans la barre d'outils sur l'icône entourée en rose : *Select Faces in a rectangular region.*





- Cliquer sur l'icône entourée en vert pour sectionner la zone d'intérêt : *« Delete the current set of selected faces, vertices that remains unreferenced are not deleted. »*



- Sauvegarder le maillage 3D modifié : File → Export Mesh as → sélectionner le chemin → puis le format .obj.

V. Mesures quantitatives

V.1. Mesure du diamètre des LSEC entre souris WT et souris BMP9-KO

La distribution du diamètre des fenêtres des LSEC a été analysée par la méthode cPSD (Continuous Pore Size Distribution) du plugin xlib développé par Beat Munch (Münch & Holzer, 2008) sous le logiciel Fiji. La technique cPSD fournit une distribution cumulée de la taille des pores (Prochukhan *et al.*, 2024). L'espace des pores est perçu comme un volume continu rempli de balles de différents rayons (Münch & Holzer, 2008). La méthode cPSD permet d'obtenir la taille des pores dans l'ensemble du volume sur une plage de valeur et en utilisant un pas, tous deux fixés par l'utilisateur. En général la méthode cPSD est comparée avec la simulation MIP (Mercury Intrusion Porosimetry) (Prochukhan *et al.*, 2024). Avec une simulation MIP, des sphères de rayon décroissant sont introduites depuis la surface du matériau et progressent vers l'intérieur de la structure à l'aide d'un algorithme de progression (E.J. Garboczi, D. P. Bentz, 1991). L'intérêt réel de la méthode MIP par rapport à la méthode cPSD est de pouvoir comparer la simulation numérique à une expérience. En biologie sur un tissu mou, une expérience d'intrusion de mercure n'est pas envisageable du fait de l'absorption du tissu ayant une structure poreuse. Quant à la méthode dPSD (Discrete Pore Size Distribution), elle est plutôt pertinente pour l'analyse d'images en 2D (Münch & Holzer, 2008).

Les analyses ont été réalisées sur des reconstructions 3D d'échantillons de foie de souris WT et BMP9-KO.

Lorsque la simulation cPSD sous Fiji se termine, on obtient un fichier texte contenant 3 colonnes : Rayon des pores (nm) / Nombre de voxels supérieur ou égal au rayon / Volume de pores nm^3.

```
# Pore radius     #vox >= radius        Pore volume
#      [nm]              []                 [nm^3]
```

Ensuite, des calculs sous Excel et une normalisation sont appliqués afin de connaître la fréquence de répartition des rayons des pores.

VI. Préparation d'échantillons pour les expériences de nanotomographie à rayons X au synchrotron

Les échantillons destinés à l'usinage présentent les mêmes caractéristiques que ceux préparés pour la microscopie électronique. Les acquisitions en tomographie à rayons X réalisées en laboratoire ne requièrent pas de préparation spécifique préalable, il suffit de fixer l'échantillon sur un support à l'aide d'une colle. Deux types d'échantillons ont été analysés par tomographie à rayons X en laboratoire : (i) des échantillons fixés par congélation à haute pression, dont la taille est contrainte par les dimensions des cupules (300 µm de hauteur), et (ii) des échantillons traités uniquement par fixation chimique, permettant l'obtention de volumes plus importants 2-4 mm de hauteur.

En pratique, les premiers essais de préparation d'échantillons reposent sur l'utilisation d'une scie à fil diamantée pour l'usinage. Initialement, la zone choisie pour réaliser les piliers devait se localiser au niveau de la triade portale à partir des images obtenues par tomographie à rayons X en laboratoire ce qui s'est avéré assez complexe. La préparation des piliers a donc été effectuée de manière aléatoire.

Suite à la découpe à la scie à fil diamantée, on obtient un échantillon sous forme parallélépipèdique. Une fois les piliers d'environ 1mm de hauteur usinés, ils sont fixés sur un pin Huber compatible avec la ligne de faisceau ID16B à l'ESRF à l'aide de colle forte, une opération délicate nécessitant de la précision. En effet, un mauvais alignement de l'échantillon selon l'axe Z peut compliquer la reconstruction du volume, puisque les acquisitions sur la ligne ID16B ne permettent un déplacement que le long de cet axe, une fois la macro d'acquisition lancée. Plus précisément, si l'échantillon n'est pas correctement aligné, son axe de rotation ne coïncide pas avec celui du pin, ce qui compromet la qualité de la reconstruction.

La première méthode envisagée pour façonner le pilier en cylindre consiste à utiliser un laser femtoseconde intégré au système FIB-SEM (Bosch *et al.*, 2023). Les premiers essais d'usinage au laser se sont révélés peu concluants, en grande partie en raison d'une maîtrise encore insuffisante de l'outil au moment de sa prise en main pour la préparation des échantillons.

L'utilisation du Plasma FIB (PFIB) au xénon s'est révélée être une alternative prometteuse pour l'ablation de matière afin d'obtenir un pilier cylindrique (**Figure 32**). Les dimensions des échantillons sous forme cylindrique sont de 300 µm de diamètre et 1 mm de hauteur. Le courant ionique plus élevé du PFIB au xénon, par rapport aux sources au gallium, permet un usinage accéléré : dans notre cas, environ 12 heures par échantillon. Par ailleurs, afin d'améliorer la conductivité de l'échantillon, un dépôt de platine d'environ 4 nm d'épaisseur est réalisé pour rendre la surface plus conductrice sur nos échantillons. Toutefois, certains échantillons ont été préparés uniquement à l'aide de la scie à fil diamantée, aboutissant à un parallélépipède. On a donc pu comparer l'influence de ces deux modes de préparation sur les données de nanotomographie à rayons X obtenues et détaillées dans la section III/ Résultats du Chapitre 3.

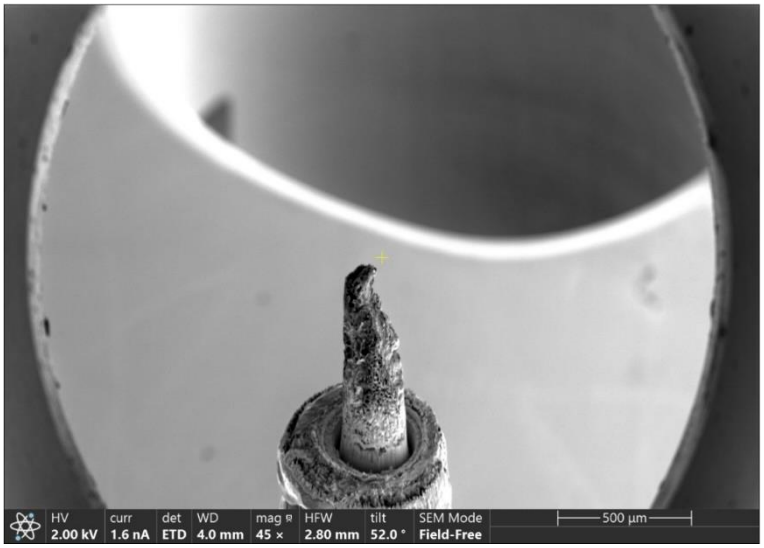


Figure 32 : Interface de contrôle du microscope Helios PFIB-SEM. *Essai échantillon usinage en forme cylindrique. Échantillon déposé sur le pin huber.*

Références bibliographiques

Albot Jezequel - 1962 - Presse Med.pdf.

Anteby, R., Klang, E., Horesh, N., Nachmany, I., Shimon, O., Barash, Y., Kopylov, U., & Soffer, S. (2021). Deep learning for noninvasive liver fibrosis classification : A systematic review. *Liver International*, *41*(10), 2269-2278. https://doi.org/10.1111/liv.14966

Antonelli, M., Reinke, A., Bakas, S., Farahani, K., Kopp-Schneider, A., Landman, B. A., Litjens, G., Menze, B., Ronneberger, O., Summers, R. M., van Ginneken, B., Bilello, M., Bilic, P., Christ, P. F., Do, R. K. G., Gollub, M. J., Heckers, S. H., Huisman, H., Jarnagin, W. R., … Cardoso, M. J. (2022). The Medical Segmentation Decathlon. *Nature Communications*, *13*(1), 4128. https://doi.org/10.1038/s41467-022-30695-9

Archit, A., Freckmann, L., Nair, S., Khalid, N., Hilt, P., Rajashekar, V., Freitag, M., Teuber, C., Buckley, G., Von Haaren, S., Gupta, S., Dengel, A., Ahmed, S., & Pape, C. (2025). Segment Anything for Microscopy. *Nature Methods*. https://doi.org/10.1038/s41592-024-02580-4

Bebelman, M. P., Bovyn, M. J., Mayer, C. M., Delpierre, J., Naumann, R., Martins, N. P., Honigmann, A., Kalaidzidis, Y., Haas, P. A., & Zerial, M. (2023). Hepatocyte apical bulkheads provide a mechanical means to oppose bile pressure. *Journal of Cell Biology*, *222*(4). https://doi.org/10.1083/jcb.202208002

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., Koteliansky, V., Vingron, M., Kalaidzidis, Y. L., Zatsepin, T., & Zerial, M. (2021). Anisotropic expansion of hepatocyte lumina enforced by apical bulkheads. *Journal of Cell Biology*, *220*(10). https://doi.org/10.1083/jcb.202103003

Benson C. C., Lajish V. L., & Rajamani, K. (2015). Brain tumor extraction from MRI brain images using marker based watershed algorithm. *2015 International Conference on Advances in Computing, Communications and Informatics (ICACCI)*, 318-323. https://doi.org/10.1109/ICACCI.2015.7275628

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. *Nature Methods*, *16*(12), 1226-1232. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9

Berger, C., Dumoux, M., Glen, T., Yee, N. B. -y., Mitchels, J. M., Patáková, Z., Darrow, M. C., Naismith, J. H., & Grange, M. (2023). Plasma FIB milling for the determination of structures in situ. *Nature Communications*, *14*(1), 629. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36372-9

Beucher, S., & Lantuéjoul, C. (1979). *Use of Watersheds in Contour Detection*.

Birch-Andersen, A. (1955). Reconstruction of the Nuclear Sites of Salmonella typhimurium from Electron Micrographs of Serial Sections. *Journal of General Microbiology*, *13*(2), 327–329. https://doi.org/10.1099/00221287-13-2-327

Borrett, S., & Hughes, L. (2016). Reporting methods for processing and analysis of data from serial block face scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, *263*(1), 3-9. https://doi.org/10.1111/jmi.12377

Bosch, C., Lindenau, J., Pacureanu, A., Peddie, C. J., Majkut, M., Douglas, A. C., Carzaniga, R., Rack, A., Collinson, L., Schaefer, A. T., & Stegmann, H. (2023). Femtosecond laser preparation of resin embedded samples for correlative microscopy workflows in life sciences. *Applied Physics Letters*, *122*(14), 143701. https://doi.org/10.1063/5.0142405

Braet, F., & Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae : A review. *Comparative Hepatology*.

Brevini, T., Tysoe, O. C., & Sampaziotis, F. (2020). Tissue engineering of the biliary tract and modelling of cholestatic disorders. *Journal of Hepatology*, *73*(4), 918-932. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.049

Burel, A., Lavault, M.-T., Chevalier, C., Gnaegi, H., Prigent, S., Mucciolo, A., Dutertre, S., Humbel, B. M., Guillaudeux, T., & Kolotuev, I. (2018). A targeted 3D EM and correlative microscopy method using SEM array tomography. *Development*, dev.160879. https://doi.org/10.1242/dev.160879

Bushong, E. A., Johnson, D. D., Kim, K.-Y., Terada, M., Hatori, M., Peltier, S. T., Panda, S., Merkle, A., & Ellisman, M. H. (2015). X-Ray Microscopy as an Approach to Increasing Accuracy and Efficiency of Serial Block-Face Imaging for Correlated Light and Electron Microscopy of Biological Specimens. *Microscopy and Microanalysis*, *21*(1), 231-238. https://doi.org/10.1017/S1431927614013579

Buss, D. J., Deering, J., Reznikov, N., & McKee, M. D. (2025). Understanding the structural biology of osteomalacia through multiscale 3D X-ray and electron tomographic imaging : A review of X-linked hypophosphatemia, the *Hyp* mouse model, and imaging methods. *JBMR Plus*, *9*(2), ziae176. https://doi.org/10.1093/jbmrpl/ziae176

Caicedo, J. C., Goodman, A., Karhohs, K. W., Cimini, B. A., Ackerman, J., Haghighi, M., Heng, C., Becker, T., Doan, M., McQuin, C., Rohban, M., Singh, S., & Carpenter, A. E. (2019). Nucleus segmentation across imaging experiments : The 2018 Data Science Bowl. *Nature Methods*, *16*(12), 1247-1253. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0612-7

Cocks, E., Taggart, M., Rind, F. C., & White, K. (2018). A guide to analysis and reconstruction of serial block face scanning electron microscopy data : A GUIDE TO ANALYSIS

AND RECONSTRUCTION. *Journal of Microscopy*, *270*(2), 217-234. https://doi.org/10.1111/jmi.12676

Cogger, V. C., McNerney, G. P., Nyunt, T., DeLeve, L. D., McCourt, P., Smedsrød, B., Le Couteur, D. G., & Huser, T. R. (2010). Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *Journal of Structural Biology*, *171*(3), 382-388. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.001

Cogger, V. C., O'Reilly, J. N., Warren, A., & Le Couteur, D. G. (2015). A Standardized Method for the Analysis of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Fenestrations by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, *98*, 52698. https://doi.org/10.3791/52698

Collinson, L. M., Bosch, C., Bullen, A., Burden, J. J., Carzaniga, R., Cheng, C., Darrow, M. C., Fletcher, G., Johnson, E., Narayan, K., Peddie, C. J., Winn, M., Wood, C., Patwardhan, A., Kleywegt, G. J., & Verkade, P. (2023). Volume EM : A quiet revolution takes shape. *Nature Methods*, *20*(6), 777-782. https://doi.org/10.1038/s41592-023-01861-8

Crawford, A. R., Lin, X.-Z., & Crawford, J. M. (1998). The normal adult human liver biopsy : A quantitative reference standard. *Hepatology*, *28*(2), 323-331. https://doi.org/10.1002/hep.510280206

DAEMS - The micro-anatomy of the smallest biliary pathways.pdf. (1961).

Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure. *PLoS Biology*, *2*(11), 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., Bailly, S., & Feige, J. (2019). Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and

Protecting Against Hepatic Fibrosis. *Hepatology*, *70*(4), 1392-1408. https://doi.org/10.1002/hep.30655

Desroches-Castan, A., Tillet, E., Ricard, N., Ouarné, M., Mallet, C., Feige, J.-J., & Bailly, S. (2019). Differential Consequences of Bmp9 Deletion on Sinusoidal Endothelial Cell Differentiation and Liver Fibrosis in 129/Ola and C57BL/6 Mice. *Cells*, *8*(9), 1079. https://doi.org/10.3390/cells8091079

DIA, K. (2024). *Apport des méthodes d'apprentissage par réseaux de neurones à la caractérisation des écoulements polyphasiques par acquisition et traitement d'images*.

Dietler, N., Minder, M., Gligorovski, V., Economou, A. M., Joly, D. A. H. L., Sadeghi, A., Chan, C. H. M., Koziński, M., Weigert, M., Bitbol, A.-F., & Rahi, S. J. (2020). A convolutional neural network segments yeast microscopy images with high accuracy. *Nature Communications*, *11*(1), 5723. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19557-4

Disney, C. M., Eckersley, A., McConnell, J. C., Geng, H., Bodey, A. J., Hoyland, J. A., Lee, P. D., Sherratt, M. J., & Bay, B. K. (2019). Synchrotron tomography of intervertebral disc deformation quantified by digital volume correlation reveals microstructural influence on strain patterns. *Acta Biomaterialia*, *92*, 290-304. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.021

Eali, S. N. J., Bhattacharyya, D., Nakka, T. R., & Hong, S.-P. (2022). A Novel Approach in Bio-Medical Image Segmentation for Analyzing Brain Cancer Images with U-NET Semantic Segmentation and TPLD Models Using SVM. *Traitement Du Signal*, *39*(2), 419-430. https://doi.org/10.18280/ts.390203

E.J. Garboczi, D. P. Bentz. (1991, janvier). *Digitized Simulation of Mercury Intrusion Porosimetry*.

Gao, J., Zuo, B., & He, Y. (2024). Liver sinusoidal endothelial cells as potential drivers of liver fibrosis (Review). *Molecular Medicine Reports*, *29*(3), 40. https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13164

Genant, H. K., Block, J. E., Steiger, P., Glueer, C.-C., & Smith, R. (1987). Quantitative computed tomography in assessment of osteoporosis. *Seminars in Nuclear Medicine*, *17*(4), 316-333. https://doi.org/10.1016/S0001-2998(87)80024-7

Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology*, *63*(4), 1023-1037. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015

Gupta, K. (2023). A modular analysis of bile canalicular function and its implications for cholestasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *325*(1), G14-G22. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00165.2022

Haylaz, E., Gumussoy, I., Duman, S. B., Kalabalik, F., Eren, M. C., Demirsoy, M. S., Celik, O., & Bayrakdar, I. S. (2025). Automatic Segmentation of the Nasolacrimal Canal : Application of the nnU-Net v2 Model in CBCT Imaging. *Journal of Clinical Medicine*, *14*(3), 778. https://doi.org/10.3390/jcm14030778

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. *Nature Methods*, *12*(4), 319-322. https://doi.org/10.1038/nmeth.3292

Helmstaedter, M., & Mitra, P. P. (2012). Computational methods and challenges for large-scale circuit mapping. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(1), 162-169. https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.11.010

He_Mask_R-CNN_ICCV_2017_paper.pdf.

Higginbotham, D. (2023). *Work / Technology & tools*.

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*(3), 187-192. https://doi.org/10.1093/jmicro/dfac015

Ichimura, K., Miyazaki, N., Sadayama, S., Murata, K., Koike, M., Nakamura, K., Ohta, K., & Sakai, T. (s. d.). Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *SCIENTIFIC REPORTS*.

Isensee, F., Jaeger, P. F., Kohl, S. A. A., Petersen, J., & Maier-Hein, K. H. (2021). nnU-Net : A self-configuring method for deep learning-based biomedical image segmentation. *Nature Methods*, *18*(2), 203-211. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01008-z

Jean-Pierre Benhamou, Johannes Bircher, Neil McIntyre, Mario Rizzetto, & Juan Rodés. (2002). *Hépatologie clinique*.

Jung-Shiong Chang, Shih, A. C.-C., Lin, H.-Y., Kao, H.-F., Liao, M., & Fang, W.-H. (2008). 3-D mesh representation and retrieval using Isomap manifold. *2008 IEEE 10th Workshop on Multimedia Signal Processing*, 541-546. https://doi.org/10.1109/MMSP.2008.4665137

Karreman, M. A., Mercier, L., Schieber, N. L., Solecki, G., Allio, G., Winkler, F., Ruthensteiner, B., Goetz, J. G., & Schwab, Y. (2015). Fast and precise targeting of single tumor cells *in vivo* by multimodal correlative microscopy. *Journal of Cell Science*, jcs.181842. https://doi.org/10.1242/jcs.181842

Khulbe, K. C., & Matsuura, T. (2021). *Nanotechnology in Membrane Processes* (Vol. 29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64183-2

Kingma, D. P., & Ba, J. (2017). *Adam : A Method for Stochastic Optimization* (arXiv:1412.6980). arXiv. https://doi.org/10.48550/arXiv.1412.6980

Kirillov, A., Mintun, E., Ravi, N., Mao, H., Rolland, C., Gustafson, L., Xiao, T., Whitehead, S., Berg, A. C., Lo, W.-Y., Dollár, P., & Girshick, R. (2023). Segment Anything. *2023 IEEE/CVF International Conference on Computer Vision (ICCV)*, 3992-4003. https://doi.org/10.1109/ICCV51070.2023.00371

Kizilyaprak, C., Daraspe, J., & Humbel, B. M. (2014). Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. *Journal of Microscopy*, *254*(3), 109-114. https://doi.org/10.1111/jmi.12127

Kizilyaprak, C., Stierhof, Y.-D., & Humbel, B. M. (2019). Volume microscopy in biology : FIB-SEM tomography. *Tissue and Cell*, *57*, 123-128. https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.09.006

Kumar, N., Verma, R., Sharma, S., Bhargava, S., Vahadane, A., & Sethi, A. (2017). A Dataset and a Technique for Generalized Nuclear Segmentation for Computational Pathology. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, *36*(7), 1550-1560. https://doi.org/10.1109/TMI.2017.2677499

Lalit, M., Tomancak, P., & Jug, F. (2022). EmbedSeg : Embedding-based Instance Segmentation for Biomedical Microscopy Data. *Medical Image Analysis*, *81*, 102523. https://doi.org/10.1016/j.media.2022.102523

Le Couteur, D. G., Fraser, R., Cogger, V. C., & McLean, A. J. (2002). Hepatic pseudocapillarisation and atherosclerosis in ageing. *The Lancet*, *359*(9317), 1612-1615. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08524-0

Le Couteur, D. G., Warren, A., Cogger, V. C., Smedsrød, B., Sørensen, K. K., De Cabo, R., Fraser, R., & Mccuskey, R. S. (2008). Old Age and the Hepatic Sinusoid. *The Anatomical Record*, *291*(6), 672-683. https://doi.org/10.1002/ar.20661

Legallais, C., Kim, D., Mihaila, S. M., Mihajlovic, M., Figliuzzi, M., Bonandrini, B., Salerno, S., Yousef Yengej, F. A., Rookmaaker, M. B., Sanchez Romero, N., Sainz-Arnal, P.,

Pereira, U., Pasqua, M., Gerritsen, K. G. F., Verhaar, M. C., Remuzzi, A., Baptista, P. M., De Bartolo, L., Masereeuw, R., & Stamatialis, D. (2018). Bioengineering Organs for Blood Detoxification. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(21), 1800430. https://doi.org/10.1002/adhm.201800430

Maire, E., & Withers, P. J. (2014). Quantitative X-ray tomography. *International Materials Reviews*, *59*(1), 1-43. https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000023

McCafferty, C. L., Klumpe, S., Amaro, R. E., Kukulski, W., Collinson, L., & Engel, B. D. (2024). Integrating cellular electron microscopy with multimodal data to explore biology across space and time. *Cell*, *187*(3), 563-584. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.005

Micheva, K. D., & Smith, S. J. (2007). Array Tomography : A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron*, *55*(1), 25-36. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.014

Micheva, K. D., Wolman, D., Mensh, B. D., Pax, E., Buchanan, J., Smith, S. J., & Bock, D. D. (2016). A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *eLife*, *5*, e15784. https://doi.org/10.7554/eLife.15784

Münch, B., & Holzer, L. (2008). Contradicting Geometrical Concepts in Pore Size Analysis Attained with Electron Microscopy and Mercury Intrusion. *Journal of the American Ceramic Society*, *91*(12), 4059-4067. https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02736.x

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*(3), 575-596. https://doi.org/10.1515/nanoph-2017-0055

Pacureanu, A., Thies, T., Bosch, C., Holler, M., Guizar-Sicairos, M., Müller, E., Reuteler, J., Karpov, D., Schaefer, A. T., Cloetens, P., Menzel, A., & Diaz, A. (2025). Experimental comparison of X-ray ptychographic and holographic nanotomography of metal-stained neuronal tissue. *Optics Express*, *33*(13), 26915. https://doi.org/10.1364/OE.563186

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. *Nature Reviews Methods Primers*, *2*(1), 51. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00131-9

Pettit, R. W., Marlatt, B. B., Corr, S. J., Havelka, J., & Rana, A. (2022). nnU-Net Deep Learning Method for Segmenting Parenchyma and Determining Liver Volume From Computed Tomography Images. *Annals of Surgery Open*, *3*(2), e155. https://doi.org/10.1097/AS9.0000000000000155

Piergiovanni, M., Bianchi, E., Capitani, G., Li Piani, I., Ganzer, L., Guidotti, L. G., Iannacone, M., & Dubini, G. (2017). Microcirculation in the murine liver : A computational fluid dynamic model based on 3D reconstruction from in vivo microscopy. *Journal of Biomechanics*, *63*, 125-134. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2017.08.011

Poisson, J., Lemoinne, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells : Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, *66*(1), 212-227. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009

Prochukhan, N., Rafferty, A., Canavan, M., Daly, D., Selkirk, A., Rameshkumar, S., & Morris, M. A. (2024). Development and application of a 3D image analysis strategy for focused ion beam – Scanning electron microscopy tomography of porous soft materials. *Microscopy Research and Technique*, *87*(6), 1335-1347. https://doi.org/10.1002/jemt.24514

Rawson, S. D., Maksimcuka, J., Withers, P. J., & Cartmell, S. H. (2020). X-ray computed tomography in life sciences. *BMC Biology*, *18*(1), 21. https://doi.org/10.1186/s12915-020-0753-2

Rekik, Y. (2023). *Études d'ultrastructures hépatiques par microscopie électronique 3D de type FIB- SEM* [PhD].

Ronchi, P., Mizzon, G., Machado, P., D'Imprima, E., Best, B. T., Cassella, L., Schnorrenberg, S., Montero, M. G., Jechlinger, M., Ephrussi, A., Leptin, M., Mahamid, J., & Schwab, Y. (2021). High-precision targeting workflow for volume electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, *220*(9), e202104069. https://doi.org/10.1083/jcb.202104069

Ronneberger, O., Fischer, P., & Brox, T. (2015). U-Net : Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells, & A. F. Frangi (Éds.), *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015* (Vol. 9351, p. 234-241). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28

Roskams, T. A., Theise, N. D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P. S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E. M., Crawford, J. M., Crosby, H. A., Desmet, V., Finegold, M. J., Geller, S. A., Gouw, A. S. H., Hytiroglou, P., Knisely, A. S., Kojiro, M., Lefkowitch, J. H., Nakanuma, Y., Olynyk, J. K., … West, B. A. (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree : Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, *39*(6), 1739-1745. https://doi.org/10.1002/hep.20130

Royer, L. A. (2023). The future of bioimage analysis : A dialog between mind and machine. *Nature Methods*, *20*(7), 951-952. https://doi.org/10.1038/s41592-023-01930-y

Rudolph-Schöpping, G., Larsson, E., Pingel, T. N., Guizar-Sicairos, M., Villanueva-Perez, P., Hall, S., & Lipnizki, F. (2024). Towards multiscale X-ray tomographic imaging in

membrane science—A perspective. *Journal of Membrane Science*, *690*, 122245. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2023.122245

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. *Scientific Reports*, *6*(1), 36744. https://doi.org/10.1038/srep36744

Sharma, V. R., Shrivastava, A., Gallet, B., Karepina, E., Charbonnier, P., Chevallet, M., Jouneau, P.-H., & Deniaud, A. (2020). Canalicular domain structure and function in matrix-free hepatic spheroids. *Biomaterials Science*, *8*(1), 485-496. https://doi.org/10.1039/C9BM01143A

Slim, C. L., Lázaro-Diéguez, F., Bijlard, M., Toussaint, M. J. M., De Bruin, A., Du, Q., Müsch, A., & Van IJzendoorn, S. C. D. (2013). Par1b Induces Asymmetric Inheritance of Plasma Membrane Domains via LGN-Dependent Mitotic Spindle Orientation in Proliferating Hepatocytes. *PLoS Biology*, *11*(12), e1001739. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001739

J. W., & CARRUTHERS, J. S. (1961). *I. THE MORPHOLOGY OF NORMAL BILE CANALICULI, BILE PRE-DUCTULES*. *38*(6).

Sommer, C., Straehle, C., Kothe, U., & Hamprecht, F. A. (2011). Ilastik : Interactive learning and segmentation toolkit. *2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, 230-233. https://doi.org/10.1109/ISBI.2011.5872394

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. *Journal of Structural Biology*, *161*(3), 359-371. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.09.002

Stevens, M., Nanou, A., Terstappen, L. W. M. M., Driemel, C., Stoecklein, N. H., & Coumans, F. A. W. (2022). StarDist Image Segmentation Improves Circulating Tumor Cell Detection. *Cancers*, *14*(12), 2916. https://doi.org/10.3390/cancers14122916

Straehle, C., Koethe, U., Knott, G., Briggman, K., Denk, W., & Hamprecht, F. A. (2012). Seeded watershed cut uncertainty estimators for guided interactive segmentation. *2012 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 765-772. https://doi.org/10.1109/CVPR.2012.6247747

Streichan, S. J., Hoerner, C. R., Schneidt, T., Holzer, D., & Hufnagel, L. (2014). Spatial constraints control cell proliferation in tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(15), 5586-5591. https://doi.org/10.1073/pnas.1323016111

Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose : A generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, *18*(1), 100-106. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x

Ströh, S., Hammerschmith, E. W., Tank, D. W., Seung, H. S., & Wanner, A. A. (2022). In situ X-ray-assisted electron microscopy staining for large biological samples. *eLife*, *11*, e72147. https://doi.org/10.7554/eLife.72147

Szafranska, K., Holte, C. F., Kruse, L. D., Mao, H., Øie, C. I., Szymonski, M., Zapotoczny, B., & McCourt, P. A. G. (2021). 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

Szafranska, K., Kruse, L. D., Holte, C. F., McCourt, P., & Zapotoczny, B. (2021). The wHole Story About Fenestrations in LSEC. *Frontiers in Physiology*, *12*, 735573. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.735573

Szafranska, K., Neuman, T., Baster, Z., Rajfur, Z., Szelest, O., Holte, C., Kubisiak, A., Kus, E., Wolfson, D. L., Chlopicki, S., Ahluwalia, B. S., 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*(10), 2253-2270. https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0818

Takahashi-Iwanaga, H., & Fujita, T. (1991). A Scanning Electron Microscopic Study of the Intercalated Portion of the Biliary System in the Rat Liver. *Archives of Histology and Cytology*, *54*(4), 455-464. https://doi.org/10.1679/aohc.54.455

Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., & Crawford, J. M. (1999). The canals of hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*, *30*(6), 1425-1433. https://doi.org/10.1002/hep.510300614

Titze, B., & Genoud, C. (2016). Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure : Volume scanning electron microscopy. *Biology of the Cell*, *108*(11), 307-323. https://doi.org/10.1111/boc.201600024

Wacker, I., & Schroeder, R. R. (2013). Array tomography. *Journal of Microscopy*, *252*(2), 93-99. https://doi.org/10.1111/jmi.12087

Wisse, E. (1974). *Observations on the Fine Structure and Peroxidose Cytochemistry of Normol Rot Liver Kupffer Cells*.

Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of Ultrastructure Research*, *31*(1-2), 125-150. https://doi.org/10.1016/S0022-5320(70)90150-4

Witvliet, D., Mulcahy, B., Mitchell, J. K., Meirovitch, Y., Berger, D. R., Wu, Y., Liu, Y., Koh, W. X., Parvathala, R., Holmyard, D., Schalek, R. L., Shavit, N., Chisholm, A. D., Lichtman, J. W., Samuel, A. D. T., & Zhen, M. (2021). Connectomes across development reveal principles of brain maturation. *Nature*, *596*(7871), 257–261. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03778-8

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*(2), 876-888. https://doi.org/10.1002/hep.30232

Zhang, W., Zhao, N., Gao, Y., Huang, B., Wang, L., Zhou, X., & Li, Z. (2024). Automatic liver segmentation and assessment of liver fibrosis using deep learning with MR T1-weighted images in rats. *Magnetic Resonance Imaging*, *107*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.mri.2023.12.006

Zheng, Z., Lauritzen, J. S., Perlman, E., Robinson, C. G., Nichols, M., Milkie, D., Torrens, O., Price, J., Fisher, C. B., Sharifi, N., Calle-Schuler, S. A., Kmecova, L., Ali, I. J., Karsh, B., Trautman, E. T., Bogovic, J. A., Hanslovsky, P., Jefferis, G. S. X. E., Kazhdan, M., … Bock, D. D. (2018). A Complete Electron Microscopy Volume of the Brain of Adult Drosophila melanogaster. *Cell*, *174*(3), 730-743.e22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.019

Résumé

Le foie possède une architecture complexe, essentielle à ses fonctions métaboliques. Il est composé de millions d'unités hexagonales appelées lobules. À l'intérieur, les hépatocytes, principales cellules hépatiques, sont organisés en rangées séparées par des capillaires sanguins appelés sinusoïdes. Ces capillaires sont formés par les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques (LSECs), constituant un endothélium fenêtré spécifique, crucial pour les échanges de métabolites et de protéines entre le sang et les hépatocytes. De plus, les hépatocytes voisins forment des canalicules biliaires, canaux micrométriques impliqués dans l'excrétion de la bile. L'étude de l'architecture hépatique est donc primordiale pour approfondir nos connaissances de l'ultrastructure et de la physiologie du foie, et pour identifier d'éventuelles altérations dans des contextes pathologiques ou génétiques. À la sortie du foie, la bile est dirigée vers les canaux biliaires via le canal de Hering, une jonction dont la composition cellulaire et l'organisation restent encore peu connues.

Ce projet de thèse s'inscrit à l'interface entre microscopie corrélative et analyse d'images pour étudier l'architecture hépatique. Le premier objectif a été de développer une méthode permettant d'analyser l'ultrastructure hépatique à une résolution nanométrique, en se concentrant sur l'endothélium fenêtré. La tomographie à rayons X a d'abord été utilisée pour identifier des régions d'intérêt dans les blocs de foie, suivie d'acquisitions en microscopie électronique à faisceau d'ions focalisé (FIB-SEM), permettant d'obtenir des volumes à différentes résolutions, jusqu'à quelques nanomètres. L'un des défis majeurs a été le développement d'un pipeline d'analyse d'images précis et efficace. Le machine learning a d'abord été appliqué avec Ilastik pour générer des segmentations de référence, ground truth, sur des sinusoïdes et canalicules biliaires. L'essor du deep learning a ensuite orienté notre stratégie vers des outils avancés, en particulier nnU-Net, basé sur l'architecture U-Net et utilisé pour la segmentation d'images médicales. Ce modèle est reconnu pour sa capacité à s'autoconfigurer pour le prétraitement, l'architecture et le post-traitement. Des optimisations ont néanmoins été nécessaires pour adapter son entraînement à nos données. Pour automatiser les mesures quantitatives des fenêtres des LSEC, la méthode cPSD (continuous Pore Size Distribution), a été utilisée pour quantifier les diamètres. Le dénombrement des fenêtres a quant-à-lui été réalisé via une projection du maillage 3D en 2D, selon un workflow développé par la plateforme Image Analysis Hub de l'Institut Pasteur (Paris).

Cette méthodologie a permis de comparer l'ultrastructure du foie de souris sauvages avec celui de souris dont le gène codant pour BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) a été délété. Des travaux antérieurs ont montré que l'absence de BMP9 provoque la capillarisation des LSEC et une fibrose hépatique. BMP9 joue donc un rôle important dans le maintien de l'état de différenciation des LSEC ce qui peut avoir un impact sur l'architecture et les fonctions hépatiques. Nos analyses quantitatives ont révélé des différences significatives dans la fenestration des LSEC chez les souris BMP9-KO, confirmant les observations précédentes.

Le deuxième objectif de la thèse était de développer une approche multi-échelle pour localiser et analyser l'ultrastructure du canal de Hering. Les échantillons ont été préparés sous forme de piliers compatibles avec la nanotomographie à rayons X sur la ligne ID16B de l'ESRF. Les tomogrammes ont permis de cibler des zones précises pour les acquisitions en FIB-SEM. Cette méthodologie ouvre la voie à une étude fine de l'organisation et de l'ultrastructure du canal de Hering à l'échelle nanométrique.

Abstract

Liver has a complex architecture essential for its metabolic functions. It is composed of millions of hexagonal units called lobules. Within these lobules, hepatocytes, the main liver cells, are organized in rows separated by blood capillaries known as sinusoids. These capillaries are formed by liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), that form a very specific fenestrated endothelium, essential for the exchange of metabolites and proteins between the blood and hepatocytes. Additionally, neighboring hepatocytes form bile canaliculi that are micrometric channels involved in bile excretion. The analysis of liver architecture is thus of utmost importance for advancing our knowledge of liver ultrastructure and physiology and to evidence possible alterations in specific genetic and/or pathologic context. Furthermore, at the exit of the liver bile collected in bile canaliculi is secreted into bile ducts. This connection is known as the canal of Hering where cell type composition and organization remain largely unknown.

This PhD project lies at the intersection of correlative microscopy and image analysis to study liver architecture. The first objective was to develop a method for analyzing liver ultrastructure at nanometric resolution, with a focus on the fenestrated endothelium. X-ray tomography was first used to identify regions of interest in liver block samples, followed by acquisitions using focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM), which enabled volume imaging at various resolutions down to a few nanometers. A major challenge was the development of an effective image analysis pipeline. Machine learning was initially applied using Ilastik to generate high-quality reference segmentations, ground truth, of sinusoids and bile canaliculi. The rise of deep learning then guided our strategy toward more advanced tools, particularly the nnU-Net method, based on the U-Net architecture and widely used for medical image segmentation. This model is known for its ability to self-configure preprocessing, network architecture, and postprocessing. However, the training had to be optimized to adapt to the specificity of our data. To automate quantitative measurements, the cPSD (continuous Pore Size Distribution) method, was used to quantify fenestrae diameters, while their number was determined by projecting the 3D mesh into 2D, following a workflow developed by the Image Analysis Hub at the Institute Pasteur (Paris).

This methodology enabled comparison of the liver ultrastructure of wild-type and BMP9 knock-out mice (Bone Morphogenetic Protein 9). Previous studies have shown that BMP9 deletion leads to LSEC capillarization and liver fibrosis. BMP9 is thus important for maintaining the differentiated state of LSECs and may ultimately influence liver architecture and functions. Quantitative analysis of our EM data revealed significant changes in LSEC fenestrations in BMP9-KO mice, confirming previous findings.

The second objective of the PhD was to develop a multiscale approach to localize and analyze the ultrastructure of the canal of Hering. Samples were prepared as pillars to be compatible with X-ray nanotomography performed on beamline ID16B at the ESRF. Tomograms allowed precise targeting of regions for FIB-SEM acquisitions. This methodology should thus be suitable to study the organization and ultrastructure of the canal of Hering down to the nanometer scale.