

IMAGERIE TRI-DIMENSIONNELLE D'ÉCHANTILLONS PAR UNE TECHNIQUE DE *SERIAL BLOCK FACE IMAGING* AMOVIBLE

Marine MALLOCI^{1*}, Stéphanie BLANDIN¹, Philippe HULIN¹, Paul DORVAL²,
Steven NEDELLEC¹, Guillaume SCHMID², Pierre-Alix DANCER²,
Perrine PAUL-GILLOTEAUX¹

*marine.malloci@univ-nantes.fr

1. *MicroPICell Facility, SFR Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex, France*
2. *Kaer Labs, 2 rue Alfred Kastler, 44300 Nantes, France*

3D-IMAGING OF SAMPLES USING A REMOVABLE SERIAL BLOCK FACE IMAGING TECHNIQUE

ABSTRACT

The three-dimensional analysis of sample by Serial Block Face Imaging finds its fields of application in the study of micro-anatomy and developmental biology. The concept is to produce a large amount of images directly from the surface of a block in which the sample is included, as it is cut (microtome or cryostat). Serial images are already pre-aligned and allow reconstructing the sample in three dimensions and exploring it in any virtual cutting plane. The MicroPICell platform and the company Kaer Labs are collaborating to develop this technique, by combining a removable camera with an integrated LED excitation source, positioned in front of a conventional microtome or cryostat.

From organs included in colored paraffin or frozen in OCT, this technique allowed us to acquire serial images thanks to the fluorescence contrast between the sample and the embedding medium. We could then make a simplified 3D reconstruction of these samples, keeping their structures. Compared to the commercial systems available, this system is inexpensive, requires simple sample preparation and is adaptable for both paraffin and frozen samples.

KEY WORDS

Histology, microscopy, 3D analysis, Serial Block Face Imaging

RESUME

L'analyse tridimensionnelle d'un échantillon par Serial Block Face Imaging trouve ses champs d'application dans l'étude de la micro-anatomie et la biologie du développement. Le concept est de produire une grande quantité d'images directement à partir de la surface d'un bloc dans lequel est inclus l'échantillon, et ce, au fur et à mesure de sa coupe (au microtome ou cryostat). Les images sériées sont de fait déjà pré-alignées et permettent de reconstruire en trois dimensions l'échantillon et de l'explorer selon n'importe quel plan de coupe virtuel. La plateforme MicroPICell et la société Kaer Labs collaborent afin de reproduire cette technique, avec une caméra amovible comprenant une source d'excitation LED intégrée, positionnée en face d'un microtome ou d'un cryostat classique.

A partir d'organes soit inclus en paraffine colorée soit congelés et enrobés dans de l'OCT, cette technique nous a permis d'acquérir des images en série grâce au contraste de fluorescence entre l'échantillon et le milieu d'enrobage. Nous avons pu ensuite faire une reconstruction 3D de ces échantillons, en conservant leurs structures. Par rapport aux systèmes commerciaux disponibles, ce système est peu onéreux, demande une préparation simple des échantillons et est adaptable aussi bien pour des échantillons inclus en paraffine qu'en congelé.

MOTS CLES

Histologie, microscopie, analyse 3D, Serial Block Face Imaging

INTRODUCTION

L'analyse tridimensionnelle d'un échantillon peut améliorer notre compréhension des mécanismes physiopathologiques, que ce soit par des quantifications de volumes, ou par l'observation et la localisation de marqueurs immunofluorescents. Elle trouve également ses champs d'application dans l'étude de la micro-anatomie et la biologie du développement. En histologie classique, la reconstitution d'un organe entier par coupe manuelle est longue et fastidieuse. Les coupes optiques en microscopie par fluorescence, confocale ou par feuille de lumière, sont limitées dans leur capacité à pénétrer un échantillon épais. Comme alternative, il peut être mis en place des techniques de « Serial Block Face Imaging ». Le concept est d'imager directement la surface d'un bloc dans lequel est inclus l'échantillon, au fur et à mesure de la coupe de ce bloc grâce au microtome (ou cryostat), produisant ainsi des images sériées de la surface du bloc avant coupe. Les images sériées sont déjà alignées et permettent de reconstruire en trois dimensions l'échantillon, et de l'explorer selon n'importe quel plan de coupe virtuel.

Il existe actuellement des solutions commerciales comme le OHREM (Optical High Resolution Episcopic Microscope System, Indigo Scientifique) basé sur les publications de Muhun et Weninge [1] ou encore le système Xerra (Emit Imaging). Cependant, ces systèmes intégrés sont onéreux et peu modulables (uniquement des échantillons inclus en résine pour le OHREM et seulement à partir d'échantillons congelés pour le Xerra). De plus, la préparation des échantillons semble fastidieuse : pour le OHREM, les échantillons doivent être inclus dans une résine colorée avec de l'acridine-orange et de l'éosine (JB4, Polysciences), dont la préparation est longue et potentiellement toxique pour l'utilisateur. Il existe également des systèmes « home made », pour lesquels la préparation des échantillons est simplifiée : paraffine avec additifs (stéarine et vybar) colorée au Sudan IV [2] ou encore enrobage de l'échantillon dans de l'agarose [3].

La plate-forme MicroPICell collabore avec la société Kaer Labs afin de reproduire cette technique, grâce à l'utilisation combinée de microtome ou cryostat classiques et de la caméra Kaer Imaging System (KIS, de Kaer Labs). Cette caméra est amovible, avec une source d'excitation LED intégrée et peut être facilement positionnée en face du microtome/cryostat. Dans cette étude, nous l'avons adaptée pour une collaboration avec une équipe de recherche travaillant sur les valvulopathies cardiaques.

Nous avons choisi de travailler avec des échantillons inclus soit en paraffine colorée, soit en OCT pour les échantillons congelés, et d'observer les images obtenues, grâce au contraste d'autofluorescence entre l'échantillon et le milieu d'enrobage. La série d'images obtenues au fur et à mesure de la coupe est alors assemblée en rendu volumique, qui peut faire par exemple l'objet de quantification morphologique par segmentation de volumes.

MATERIELS ET METHODES

Préparations des échantillons :

Cœur de rat inclus en paraffine :

Le cœur d'un rat de lignée sauvage Sprague Dawley est fixé 48h dans du formol 4%. Il est ensuite déshydraté dans des bains progressifs d'alcools (70%, 95%, 100%) puis dans deux bains de xylène pour être inclus en paraffine colorée à l'Oil Red O (colorant lipophile rouge, Diapath). L'Oil Red O prêt à l'emploi est mélangé de façon homogène à de la paraffine blanche (10% du volume de paraffine, afin que le mélange soit rouge foncé). La coloration à l'Oil Red O permet de réduire la transparence de la paraffine blanche classique et d'obtenir un meilleur contraste entre l'organe et ce milieu d'enrobage coloré : l'autofluorescence du tissu acquise à 520 nm présente un contraste élevé par rapport à la paraffine rouge qui n'absorbe pas les photons issus de la source LED.

Echantillons congelés :

Pour cette étude, des organes entiers provenant de souris C57BL/6 contrôle et de souris exprimant la GFP de manière ubiquitaire sont préparés. Les organes d'intérêt sont enrobés dans de l'OCT et congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide.

Coupe et acquisition des images

Les échantillons sont coupés avec une épaisseur de coupe de 20µm, soit au microtome (RM2255, Leica) soit au cryostat (CM 1950, Leica), en face du(des)quel(s)

est positionnée la caméra KIS grâce à un bras amovible (**Figure 1 A et B**). La caméra est dotée d'une source LED intégrée ($\lambda = 470 \text{ nm}$) et d'un filtre d'émission permettant de récupérer les photons émis ayant une longueur d'onde supérieure à 500 nm. Ces longueurs d'onde permettent de visualiser l'autofluorescence des tissus ainsi que la fluorescence émise par les fluorochromes type GFP (dont le pic d'absorption est à 475 nm et l'émission à 504 nm). La caméra acquiert un couple d'images : une image sans excitation afin d'enregistrer le bruit de fond de la préparation (image « Lumière blanche »), puis une image sous excitation LED à 475 nm qui permet de visualiser la fluorescence du tissu (image « fluorescence »). Le logiciel KIS Control génère ensuite une nouvelle image, résultant de l'opération « Fluorescence » moins « Lumière blanche » (**Figure 2 A, B et C**). Cette dernière image sera conservée pour la visualisation en volume. La résolution spatiale obtenue en xy est de $35 \mu\text{m}/\text{pixel}$. En z, elle dépendra de l'absorption de la lumière par la pièce anatomique. Les coupes de l'échantillon et prises d'image de la surface du bloc sont automatisées sur le microtome par le logiciel KIS Control. Le logiciel déclenche par un signal TTL la mise en rotation du microtome ainsi que l'intervalle temps entre deux rotations. De cette façon, l'utilisateur n'a pas besoin d'intervenir ni pour la coupe ni pour la prise d'image pendant toute la réalisation de l'expérience. En ce qui concerne les échantillons congelés coupés au cryostat, la coupe et l'acquisition des images se réalisent pour le moment manuellement, et demande donc deux intervenants : un pour la coupe et un pour la prise d'image. Les images sériées sont enregistrées sous forme de stack (pile d'images) avec le logiciel libre Fiji [4] et peuvent être alignées si besoin avec le plugin Correct 3D Drift [5] (recalage en translation uniquement). Les coupes étant alignées, il suffit alors d'indiquer la résolution spatiale et le pas de coupe en taille de voxel pour visualiser le volume en rendu volumique par exemple. La visualisation du volume 3D et les différentes vues orthogonales ont été réalisées avec le logiciel Amira (Thermo Fisher Scientific).

Figure 1 : Installation de la caméra KIS face aux microtome (A) et cryostat (B) grâce à un bras amovible fixé à la paillasse par une noix de serrage.



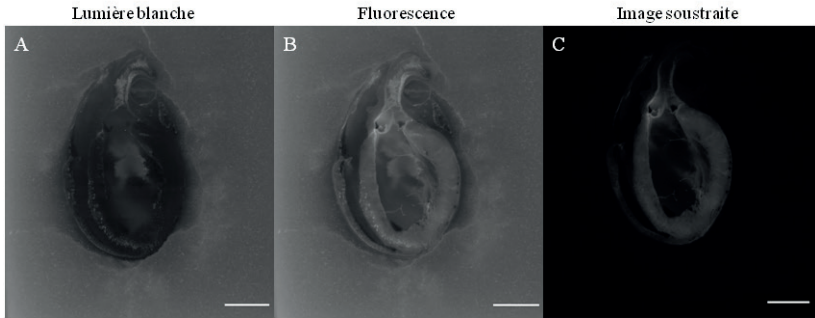


Figure 2 : Acquisition du cœur paraffiné de rat en lumière blanche (bruit environnant) (A), puis en fluorescence (B), pour récupérer l'image de la fluorescence sans le bruit environnant (C). Barre d'échelle : 0,25 cm.

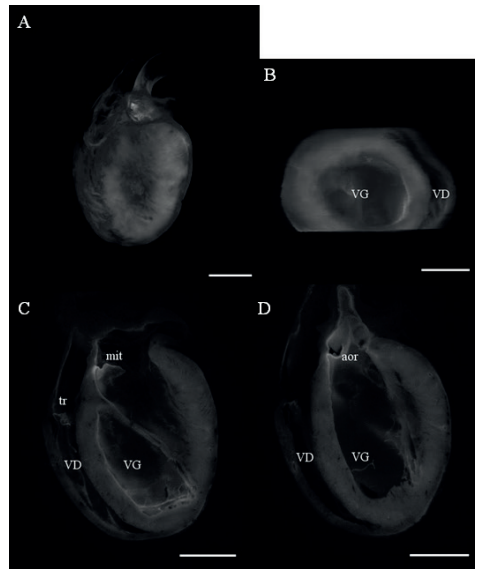


Figure 3 : (A) Volume 3D du cœur de rat reconstruit à partir des 350 coupes effectuées. (B) Coupe transversale du volume 3D. (C et D) Visualisation des structures d'intérêts : tr = valve tricuspide, mit = valve mitrale, aor = valve aortique. VD = ventricule droit, VG = ventricule gauche. Barre d'échelle : 0,25 cm.

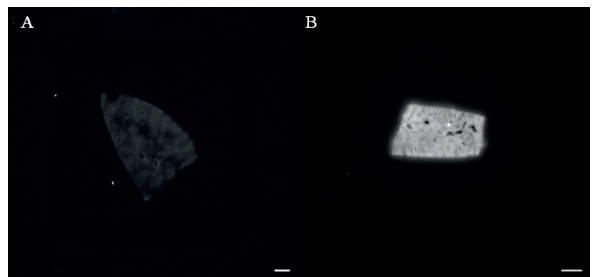


Figure 4 : Comparaison de la fluorescence observée entre un foie de souris contrôle (A) et un foie fluorescent pour la GFP (B) à 374 ms d'exposition. Barre d'échelle : 1000 μ m.

RESULTATS

Analyse tridimensionnelle d'un cœur de rat paraffiné

A partir d'un cœur de rat, nous avons effectué 350 coupes en 1 heure environ, dans le sens longitudinal, avec un temps d'exposition de la caméra de 800 ms. L'autofluorescence des tissus est suffisante pour obtenir des images bien contrastées, nous permettant une reconstruction 3D du cœur (**Figure 3 A**). Le volume 3D peut ainsi être coupé dans différents plans virtuels (par exemple en transversal, **Figure 3 B**). La structure semble bien conservée et nous permet d'identifier les différentes cavités et valves cardiaques (**Figure 3 C et D**).

Analyse de différents organes congelés contrôle et GFP positif

Afin de tester la technique sur un échantillon congelé, nous avons imagé un foie de souris contrôle, de manière à visualiser son autofluorescence (**Figure 4 A**). Puis, avec le même temps d'exposition (374 ms), nous avons imagé un foie provenant d'une souris exprimant la GFP de manière ubiquitaire (**Figure 4 B**). Le signal de fluorescence obtenu est plus important et les images présentent un fort contraste entre l'échantillon et le milieu d'enrobage. Afin de comparer avec l'analyse 3D de l'échantillon paraffiné réalisé précédemment et d'évaluer la structure 3D d'un échantillon congelé entier par cette technique, nous avons procédé à la coupe longitudinale d'un cœur exprimant également la GFP. Il a été reconstruit en volume 3D (**Figure 5 A**) et peut être coupé dans différents plans virtuels (par exemple en transversal, **Figure 5 B**). Différentes structures cardiaques ont pu être identifiées (**Figure 5 C**).

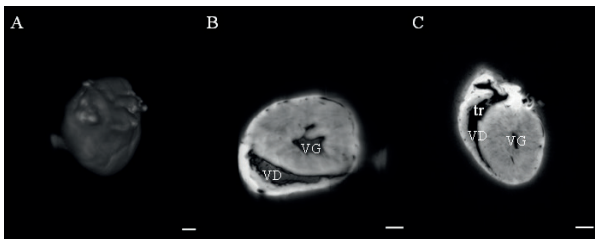


Figure 5 : (A) Volume 3D du cœur de souris fluorescent pour la GFP à partir des 261 coupes effectuées. (B) Coupe transversale du volume 3D. (C) Exemple d'identification d'une structure d'intérêt : tr = valve tricuspide, VD = ventricule droit, VG = ventricule gauche. Barre d'échelle : 1000 µm.

DISCUSSION

A partir d'un cœur simplement inclus en paraffine colorée, nous avons montré la possibilité de reconstruire un volume 3D d'un organe entier, sans marquage, simplement à partir de l'autofluorescence du tissu. A partir d'échantillons congelés dans de l'OCT, il est également possible de visualiser l'autofluorescence d'un tissu (du foie) ainsi que des organes fluorescents pour la GFP (du foie et du cœur) et d'observer le rendu volumique grâce aux images sériées acquises. Pour les deux modes de préparation, la reconstruction 3D permet de visualiser les cœurs entiers dans différents plans de coupes virtuels, ici présentés en transversal (**Figure 3 B** et **Figure 5 B**).

En paraffine et en congelé, la structure des cœurs est préservée tout au long de la coupe, permettant une reconnaissance des zones d'intérêt. Cependant, en congelé, nous remarquons une moins bonne conservation de la structure du tissu qu'avec la paraffine, en rendu volumique (**Figure 5 A** versus **Figure 3 A**). Il est à noter que pour les techniques classiques OHREM, les échantillons sont inclus avec des enrobages plus rigides comme de la résine, contrairement à la paraffine, qui, elle, est sensible à la température et aurait tendance à se déformer lorsque l'échantillon se réchauffe au cours de la coupe. Ainsi, il serait intéressant d'analyser de manière quantitative la possible déformation des organes tout au long de la coupe.

En perspectives, il serait pertinent dans un premier temps, de tester cette technique sur d'autres modèles d'étude (cerveau, œil, souris entière...). De plus, nous travaillons à automatiser ce système (prise d'images et coupe) sur le cryostat, pour nous permettre facilement de visualiser des échantillons fluorescents. Dans le cas où cela ne serait pas réalisable, il pourrait être intéressant de développer des protocoles permettant de conserver la fluorescence lors de l'inclusion en paraffine [6,7].

Il sera également nécessaire d'améliorer la résolution spatiale, qui est actuellement de 35 μm /pixel en x et en y pour ce système alors que pour le OHREM par exemple, elle est de 1 μm /pixel [8]. En effet, pour l'instant cette technique permettra plutôt d'analyser les macrostructures ou la macro-anatomie d'un organe entier.

Enfin, il serait envisageable d'ajouter une deuxième source d'excitation, par exemple 647 nm, qui nous permettrait de visualiser des marquages dans le rouge lointain pour les échantillons congelés, afin de les distinguer de l'autofluorescence du tissu.

CONCLUSION

En comparaison avec les systèmes commerciaux, ce système est moins onéreux et demande une préparation plus simple des échantillons. De plus, il est modulable, peu encombrant et adaptable aussi bien pour des échantillons inclus en paraffine qu'en congelé. Cette technique nous permet de faire une reconstruction 3D directement à partir des images acquises, sur des organes non marqués ou fluorescents, en conservant les structures de l'échantillon, et sans limitation de pénétration de la lumière dans l'échantillon puisqu'il est coupé au fur et à mesure de l'acquisition. Ce système présente donc une alternative intéressante d'imagerie des échantillons épais.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'équipe 1 de l'Institut du Thorax (INSERM UMR 1087) en particulier Pascal Aumond, et Malo Daniel (INSERM CRTI-UMR1064) pour l'expertise scientifique et les échantillons utilisés dans cette étude. La plateforme MicroPICell fait partie de l'infrastructure France-Biolmaging (ANR-10-INBS-04).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MOHUN TJ and WENINGER WJ: Generation of volume data by episcopic three-dimensional imaging of embryos. *Cold Spring HarbProtoc.*, 2012, **(6)**, 681-2.
2. LAMIAE A., MATHO1 KS, CLAVREUL S, MAHOU P, SINTES JM, SOLINAS X, ARGANDA-CARRERAS I, TURNEY SG, LICHTMAN JW, CHESEL A, BEMELMANS AP, LOULIER K, SUPATTO W, LIVET J & BEAUREPAIRE E : Multicolor multiscale brain imaging with chromatic multiphoton serial microscopy. *Nature communications*, 2019, **10**: 1662
3. SIVAGURU M, FRIED GA, MILLER CAH & FOUKEB W: Multimodal Optical Microscopy Methods Reveal Polyp Tissue Morphology and Structure in Caribbean Reef Building Corals. *JVis Exp.*, 2014, **(91)** : 51824.
4. PARSLow A, CARDONA A & BRYSON-RICHARDSON RJ: Sample drift correction following 4D confocal time-lapse imaging. *J Vis Exp*, 2014, **12**;(86).
5. SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I. & FRISE, E. et al. : «Fiji : an open-source platform for biological-image analysis», *Nature methods*, 2012, **9**(7): 676-682,

6. NAKAGAWA A, VON ALT K, LILLEMØE KD, FERNÁNDEZ-DEL CASTILLO C, WARSHAW AL, & LISS AS : A method for fixing and paraffin embedding tissue to retain the natural fluorescence of reporter proteins. *BioTechniques*, 2015, **58**:153-155.
7. ZHANMU O, ZHAO P, YANG Y, YANG X, GONG H & LI X: Maintenance of Fluorescence During Paraffin Embedding of Fluorescent Protein-Labeled Specimens. *Front. Neurosci.*, 2019, **13**:752.
8. GEYER SH, MAURER-GESEK B, REISSIG LF & WENINGER WJ, High-resolution Episcopic Microscopy (HREM) - Simple and Robust Protocols for Processing and Visualizing Organic Materials. *J. Vis. Exp*, 2017, (**125**), e56071.