

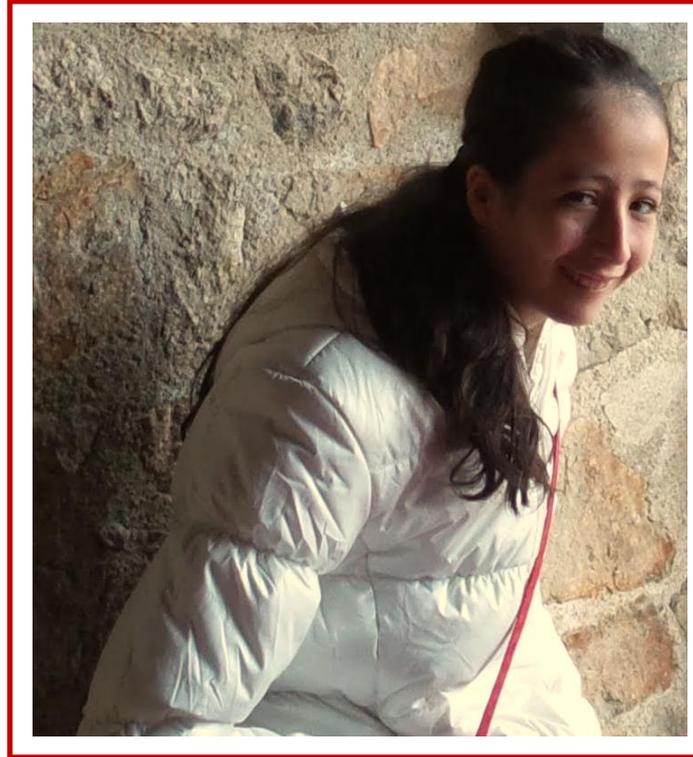
# Neurogénétique des modèles murin. Microscopie épiscopique à haute résolution pour l'histologie cérébrale en 3D

Laboratoire NeuroGeMM  
Nouvelle équipe émergente de l'Unité1231  
(direction B. Yalcin)

Stephan Collins  
15/06/2023



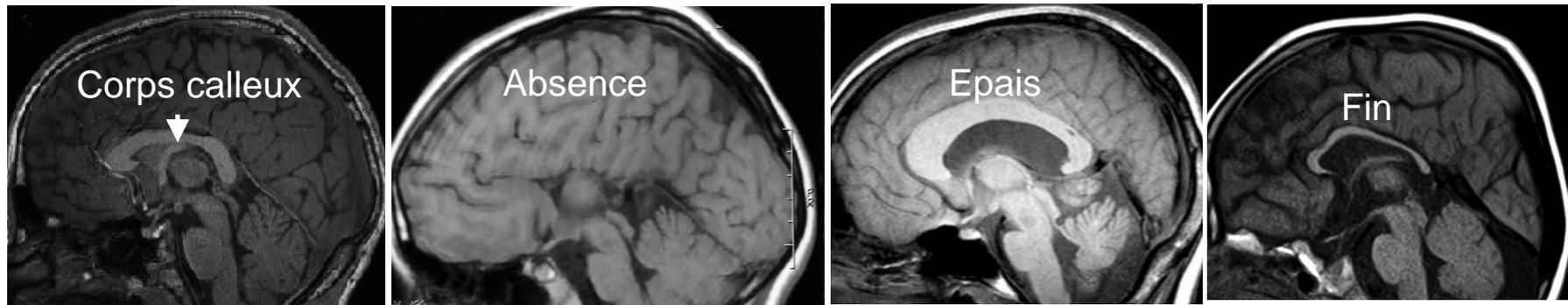
# Les maladies du neuro-développement: un enjeu majeur de santé publique



- En Europe, des millions d'enfants sont en attente d'un diagnostic génétique

# Maladies du neuro-développement avec malformations cérébrales

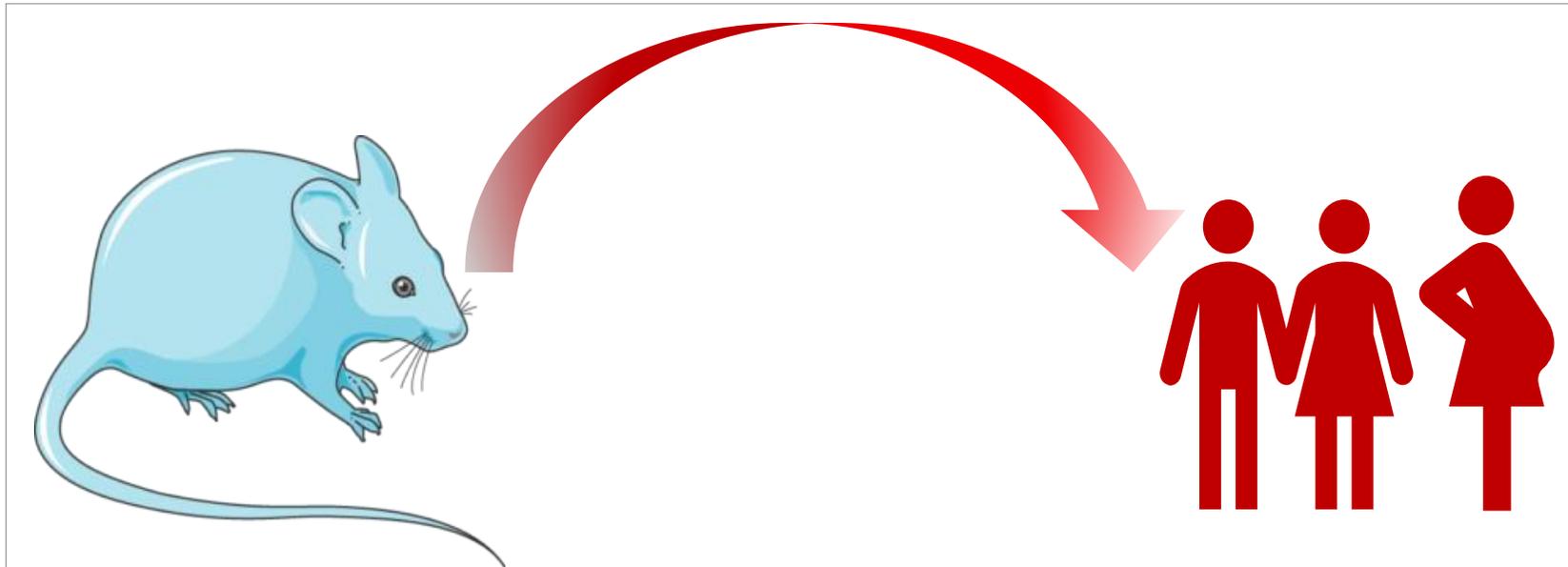
- >55% des gènes impliqués dans les maladies du neuro-développement sont associés à des malformations cérébrales (*i.e.* malformations du corps calleux, atrophie cérébelleuse et hippocampique, microcéphalie ...)



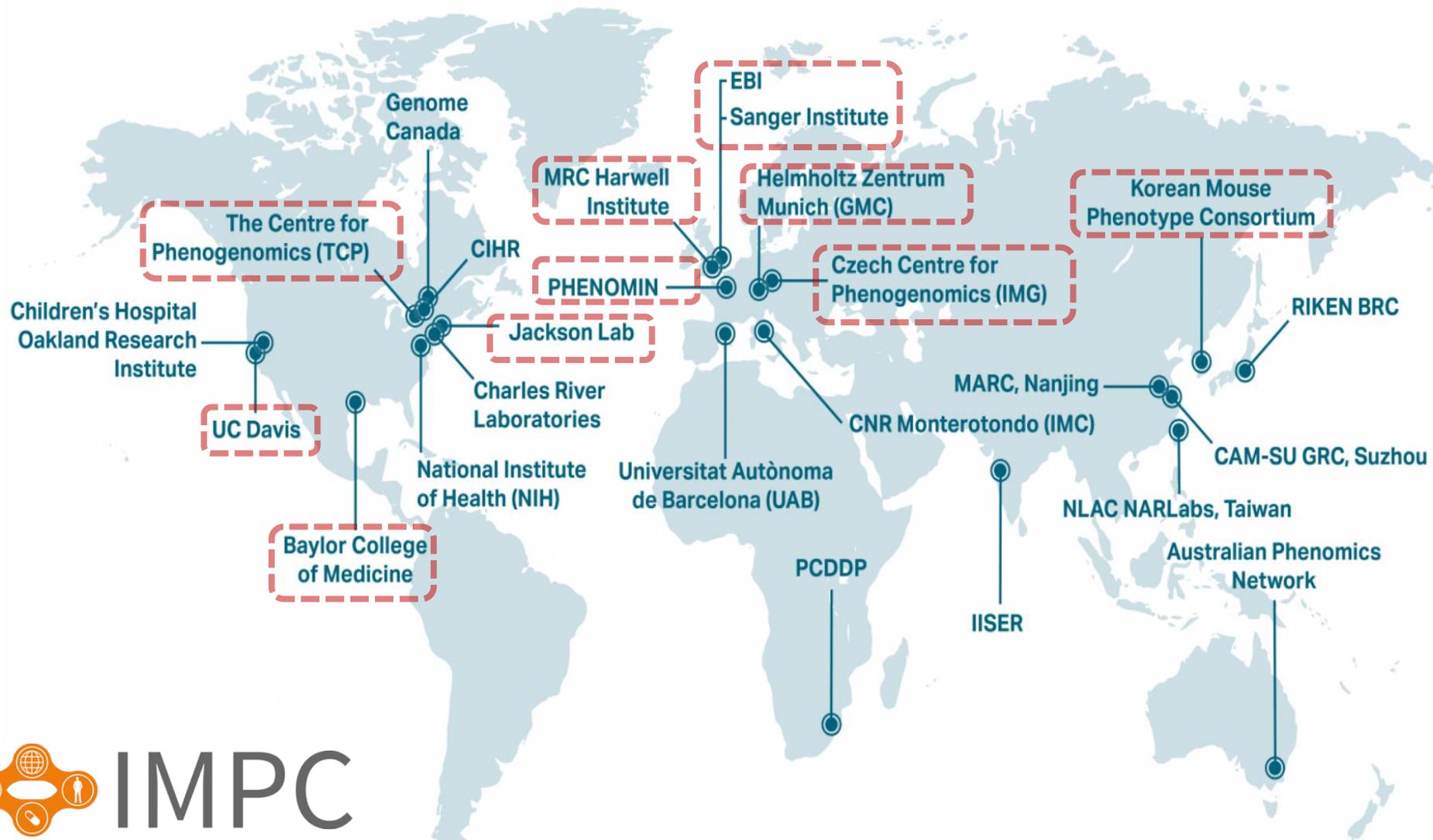
- Utilisation de **phénotypes neuro-anatomiques** comme **endo-phénotypes** fiables et facilement mesurables (« NeuroAnatomical Phenotypes » ou NAPs)

# Objectif à NeuroGeMM

Etablir un atlas complet de gènes de la souris et de leur profil neuro-anatomique de manière ultra-standardisée et à haut-débit afin de réduire l'odyssée diagnostique

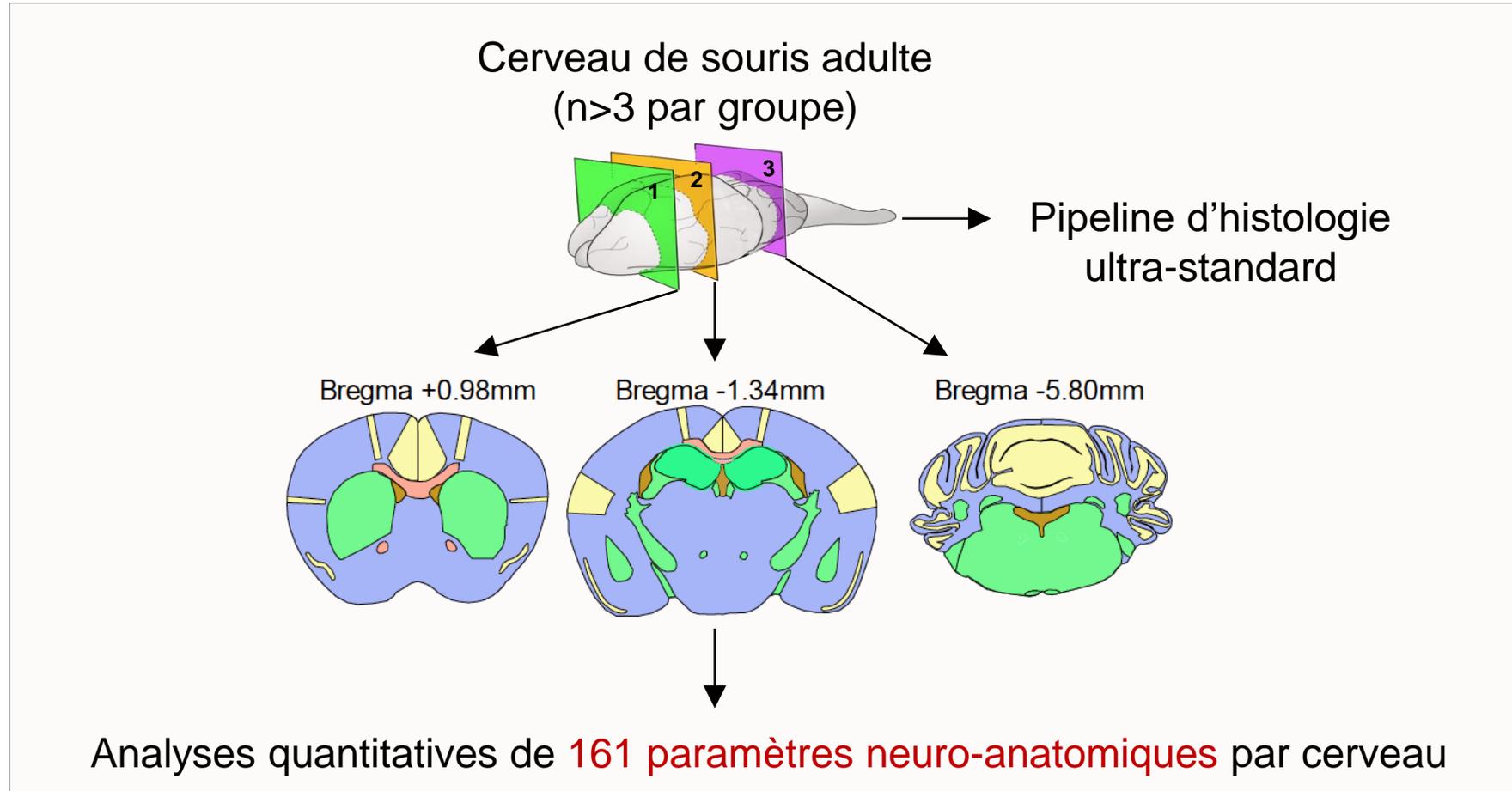


# Consortium International de Phénotypage de la Souris



IMPC

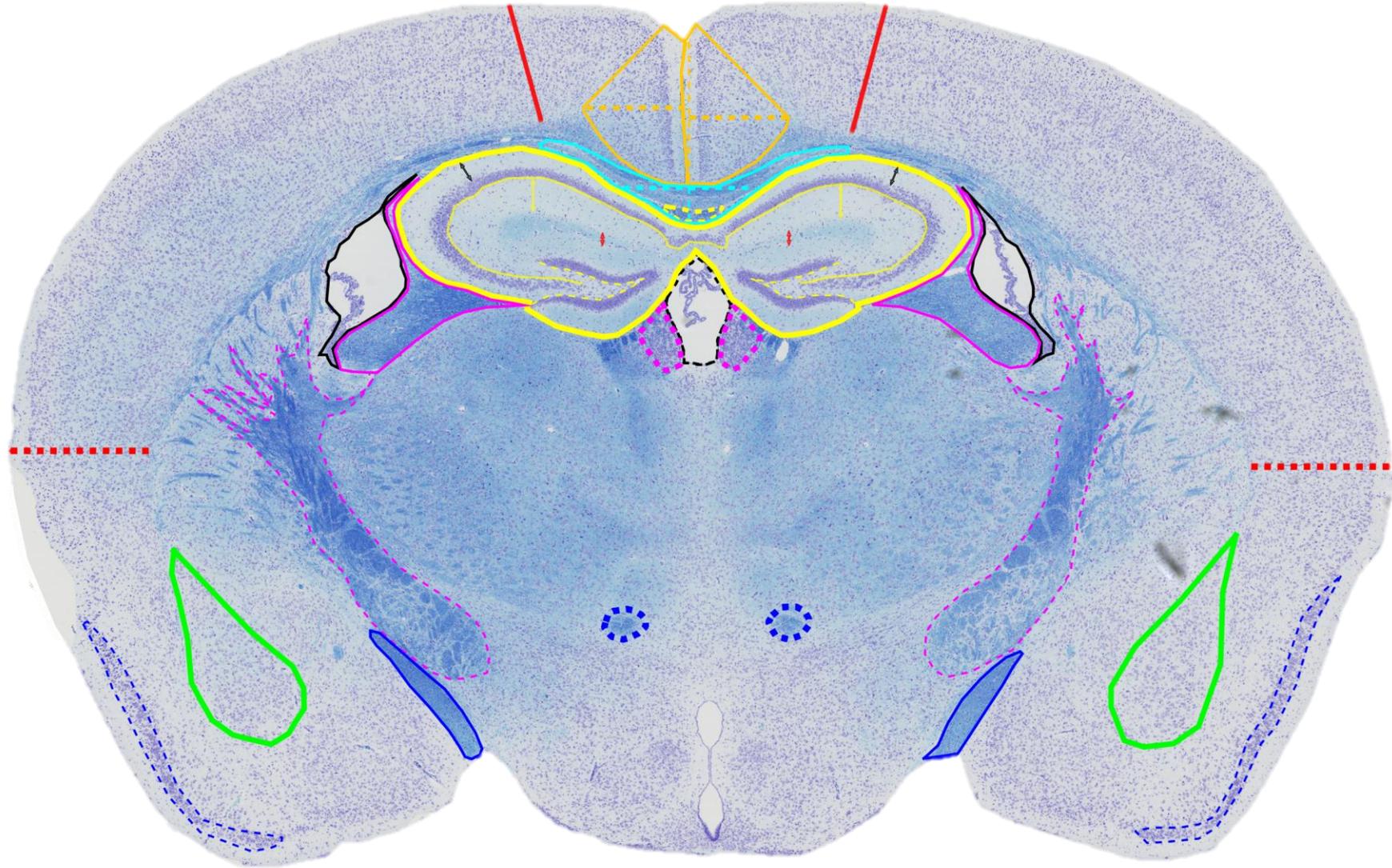
# Stratégie expérimentale



Mikhaleva *et al.* CPMB 2016 et Collins *et al.* CPMB 2018

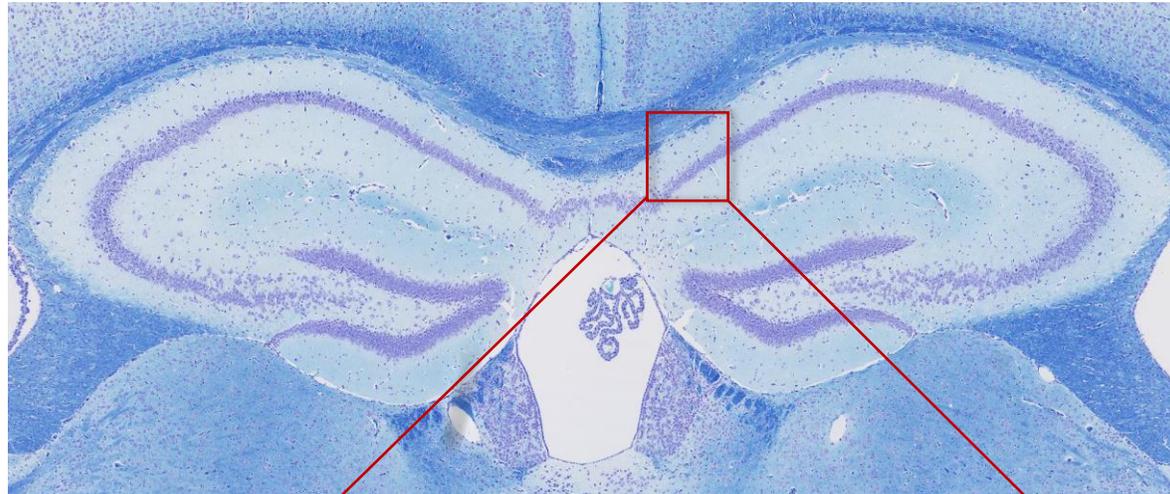
\* Allez voir le poster de **Lucile Tonneau** qui détaille le pipeline d'analyse en coupe parasagittale

# Bregma -1.34mm: 41 mesures quantitatives



# Résolution cellulaire

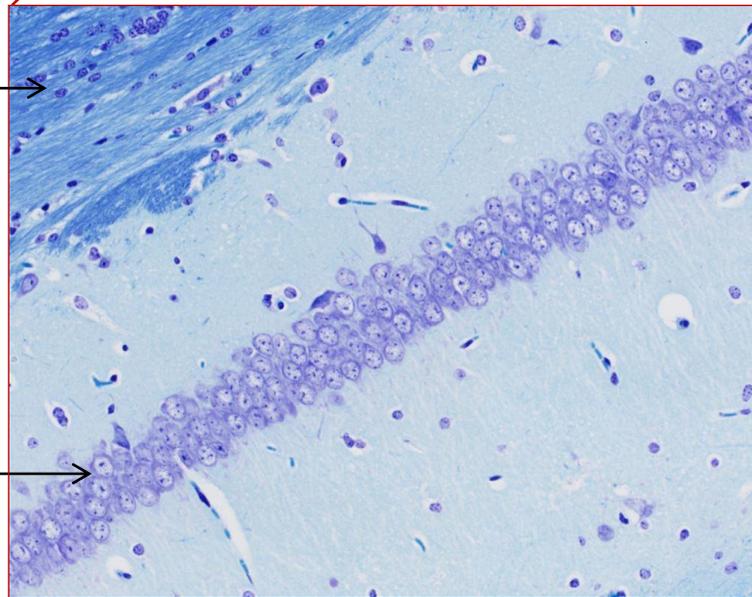
Bregma  
-1.34 mm



Oligodendrocytes  
du corps calleux



Cellules pyramidales  
de l'hippocampe

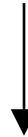


# Collecte de données et analyses statistiques

- 3,001,362 mesures manuelles\*
- 18,642 images
- 6,214 échantillons
- 1,566 allèles
- **1,446 gènes**



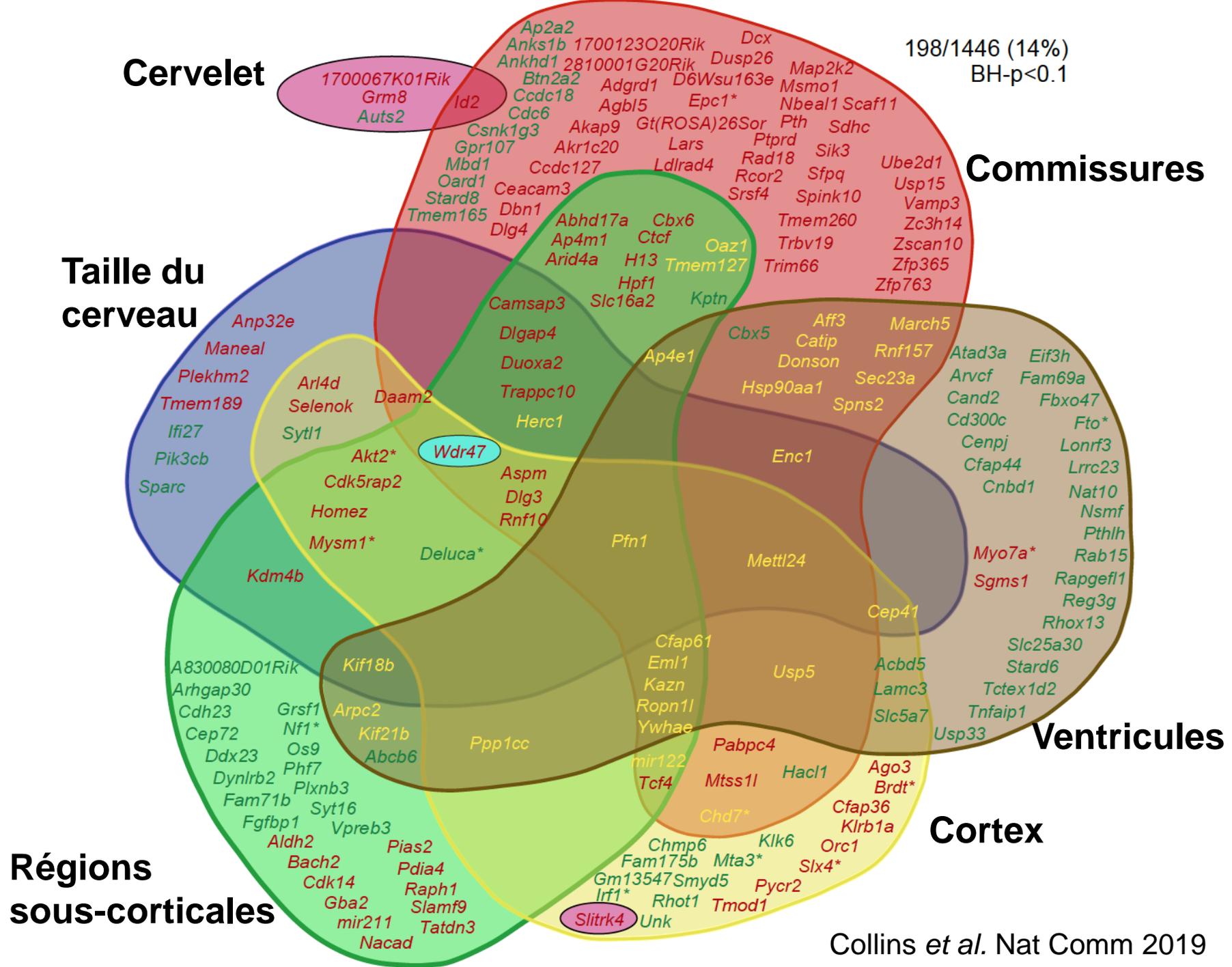
- Modèle linéaire à effets mixtes
- Correction des tests multiples
- 10% FDR



**198 gènes NAP**  
« **NeuroAnatomical Phenotype** »

\* Allez voir le poster de **Juan Cisneros** qui montre comment l'intelligence artificielle remplace désormais la prise de mesure manuelle

# 198 gènes façonnent le cerveau de la souris



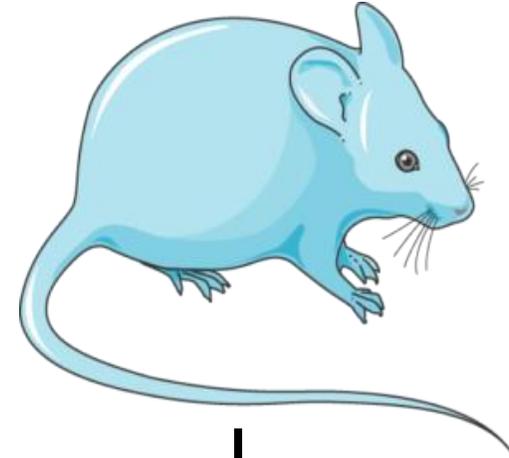
Parmi les 198 gènes nouvellement identifiés chez la souris, lesquels sont associés à des maladies du neuro-développement avec malformations cérébrales chez l'homme?

# Haut-potentiel pour la découverte de nouveaux gènes

**198 gènes NAP**  
(« NeuroAnatomical Phenotype »)



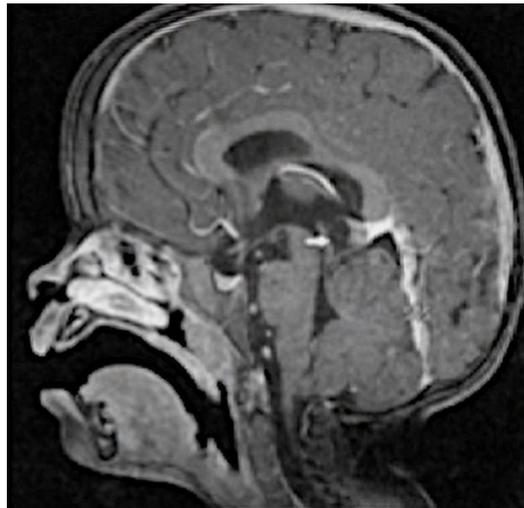
**17%** connus  
**83%** nouveaux



# 34 gènes connus en pathologie humaine

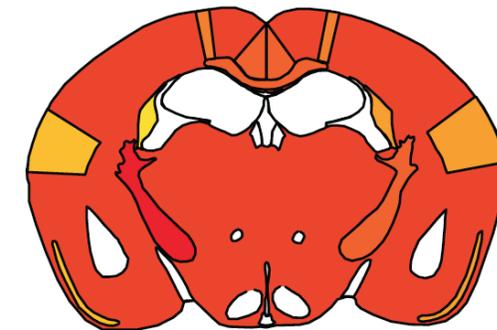
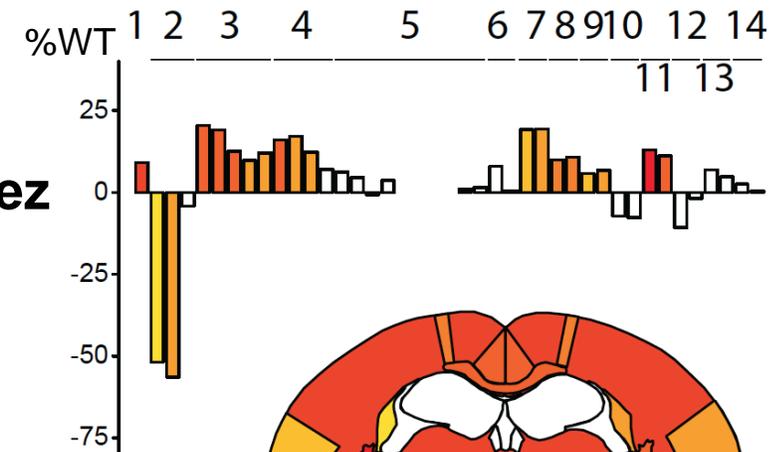
ALDH18A1 AP4E1 AP4M1 ARID1B ASPM CC2D2A CDK5RAP2 CENPJ CEP41  
CTCF DCX DONSON EML1 GRIN1 HERC1 **KPTN** LAMC3 MCPH1 MTOR  
ORC1 PGAP2 PIK3R2 RNF125 SLC16A2 TCF4 TMEM165 TUBG1 COG6  
DNMT3A DPM1 ELAC2 ENTPD1 EZH2 SLC1A4 TRAPPC9 TRMT10A VPS53

HOMME



Lucena et al. AJMG 2020

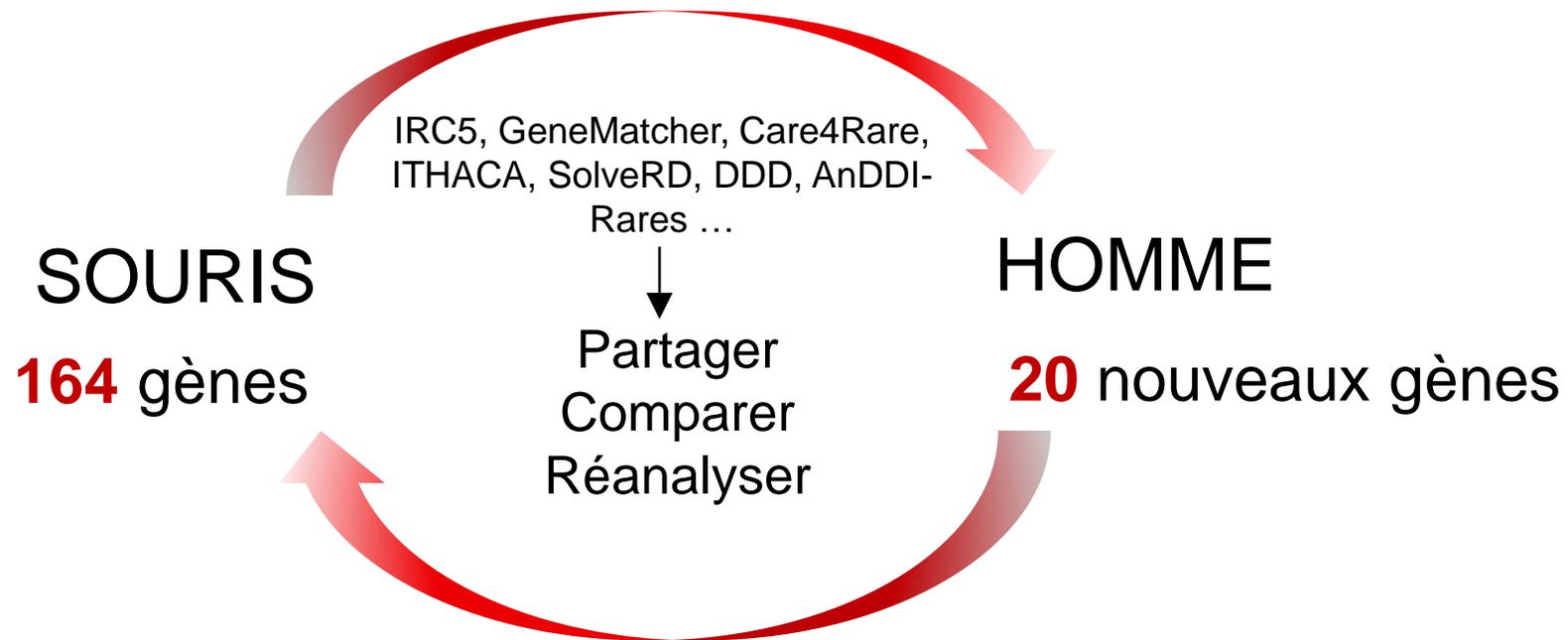
SOURIS



Levitin et al. Soumis

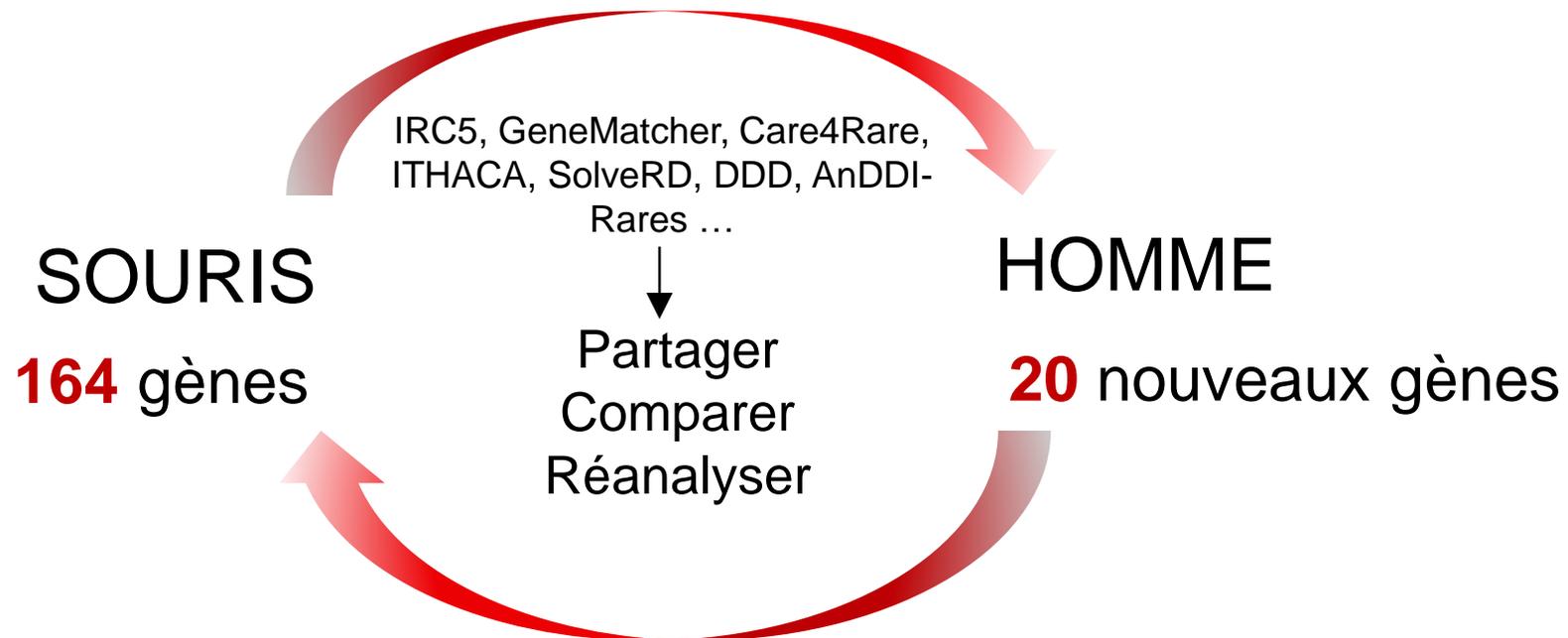
# 164 nouveaux gènes impliqués dans des malformations cérébrales chez la souris

*Abhd17a Adamts3 Adgrb1 Akt2 Aldh3b1 Ap2a2 Arid4a Arl4d Arpc2 Arvcf Bach2  
Camsap3 Cand2 Catip Cbx5 Cbx6 Ccdc127 Cfap36 Cfap61 Crlf3 Csnk1g3  
Daam2 Dbn1 Dusp26 Dusp3 Dynll1 Eif3h Enc1 Fam92a Frrs1 Gpr107 Grm8 Hpf1  
Hsp90aa1 Kazn Kiaa1143 Kif18b Klk6 Idlrad4 Irmp Itbp1 Magee2 Mettl24 Miga2  
Mkrn2 Mta1 Mta3 Mvp Mysm1 Nacad Nsmf Os9 Pabpc4 Pfn1 Pias2 Pik3cb Pth  
Rab15 Raph1 Rhot1 Rnf10 Rnf157 Ropn1l Sec23a Selenok Sh3bgrl3 Sik3  
Slc44a5 Slitrk4 Sparc Spns2 Stard6 Sytl1 Tmem126a Tmem127 Tmem241  
Tmod1 Trappc10 Unk Usp13 Vamp3 Wdr47 Zscan10*



# 164 nouveaux gènes impliqués dans des malformations cérébrales chez la souris

*Abhd17a Adamts3 Adgrb1 Akt2 Aldh3b1 Ap2a2 Arid4a Arl4d Arpc2 Arvcf Bach2  
Camsap3 Cand2 Catip Cbx5 Cbx6 Ccdc127 Cfap36 Cfap61 Crlf3 Csnk1g3  
Daam2 Dbn1 Dusp26 Dusp3 Dynll1 Eif3h Enc1 Fam92a Frrs1 Gpr107 Grm8 Hpf1  
Hsp90aa1 Kazn Kiaa1143 Kif18b Klk6 Idlrad4 Irmp Itbp1 **Magee2** Mettl24 Miga2  
Mkrn2 Mta1 Mta3 **Mvp** Mysm1 Nacad Nsmf Os9 Pabpc4 Pfn1 Pias2 Pik3cb Pth  
Rab15 Raph1 Rhot1 Rnf10 Rnf157 Ropn1l Sec23a Selenok Sh3bgrl3 Sik3  
Slc44a5 **Slitrk4** Sparc Spns2 Stard6 Sytl1 Tmem126a Tmem127 Tmem241  
Tmod1 Trappc10 Unk Usp13 Vamp3 **Wdr47** Zscan10*

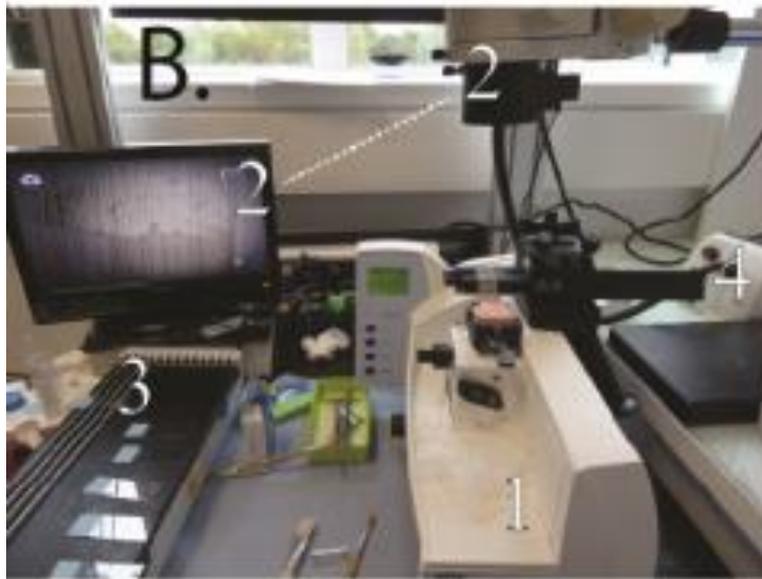


# Alors pourquoi de nouvelles technologies pour détecter les phénotypes neuroanatomiques en 3D ?

Parceque l'histologie 2D a ses limites:

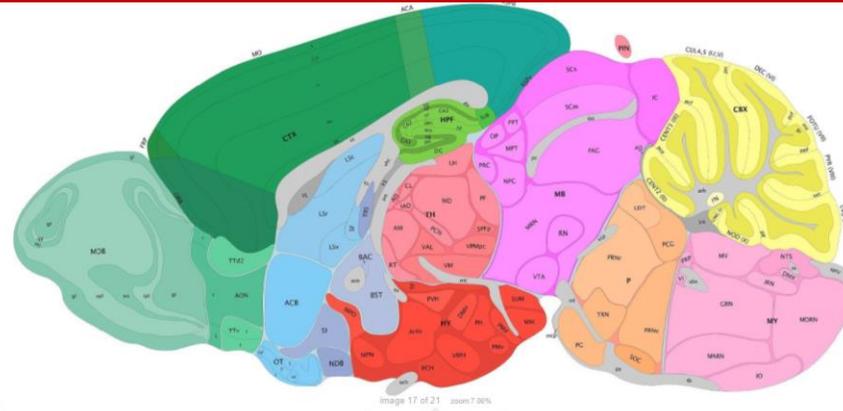
- N'identifie pas des phénotypes neuroanatomiques en dehors du plan
- Caractérise mal le défaut au sein d'une structure affectée (aires ou longueurs, pas de volumes)
- Identifie mal la structure malformée au sein du cerveau quand une structure déformée « pousse » d'autres structures saines dans ou en dehors du plan de coupe
- Impossible de corriger a posteriori les erreurs de coupes (coupe non critique, section asymétrique ou lorsque les défauts neuroanatomiques déforment trop le cerveau test par rapport à l'atlas)

# Exemple d'erreur de coupe

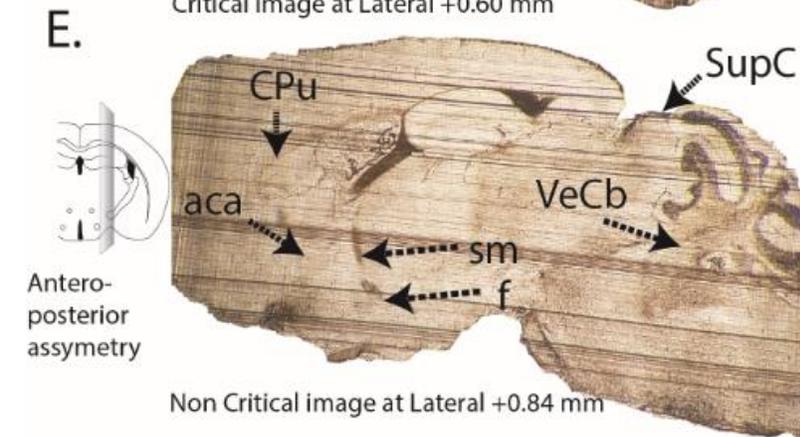
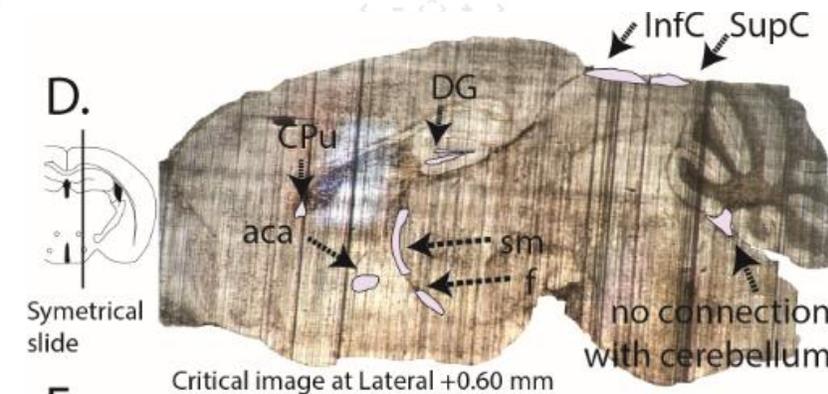


Système de coupe 2D  
caméra + anneau lumineux à 5 degrés)

Collins et al Curr Protoco Mouse Biol 2018  
Sep;8(3):e48



<http://atlas.brain-map.org/>



Y a-t-il une solution commerciale 3D adaptée au haut débit?

-> OHREM: Imagerie épiscopique de la « face du bloc »

Principe: utiliser des échantillons intégrés dans de la résine et prendre une image de la face du bloc, pas la section!

résolution limitée par : L'épaisseur de champs/caméra/méthode de visualisation aucune limite supérieure sur la taille de l'échantillon

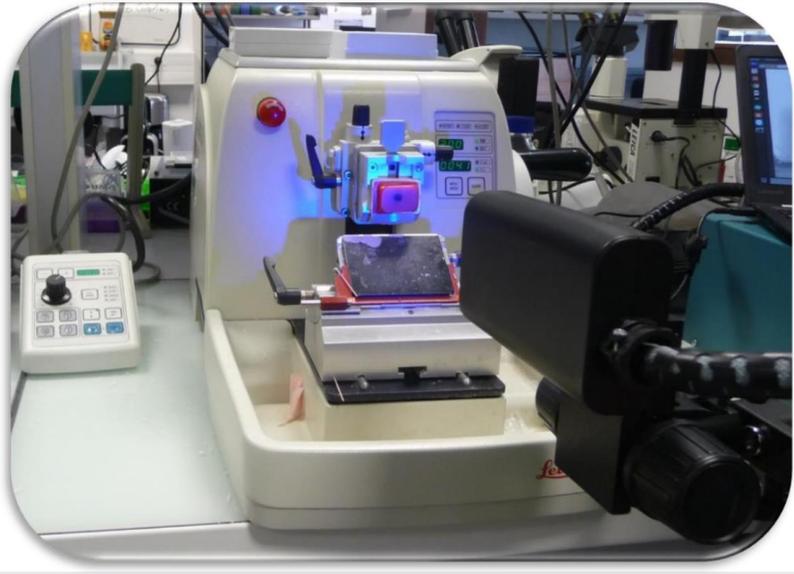
# HREM commerciaux

1.

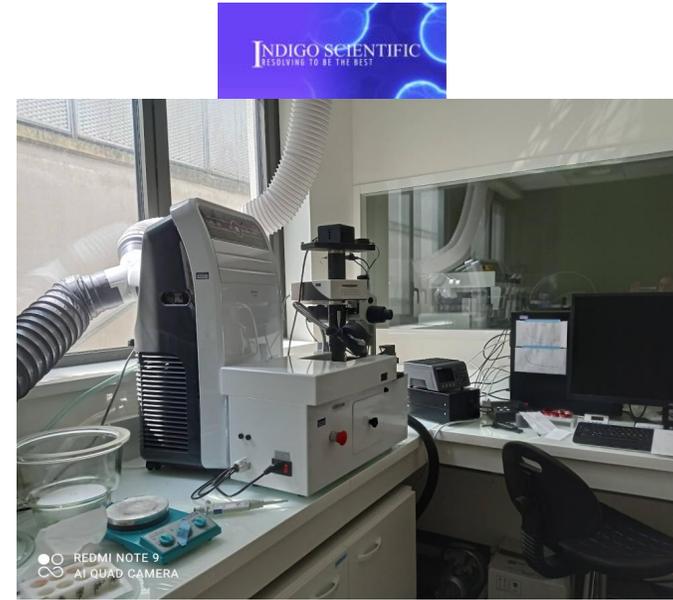
Société Kaer  
Labs (Nantes)

Kratoscope

Système  
ultra simple  
mais  
efficace



2.



Développé par Tim Mohun  
et Wolfgang Weninger  
Commercialisé par Indigo  
Scientific (GB)

Système  
intermediaire

3.

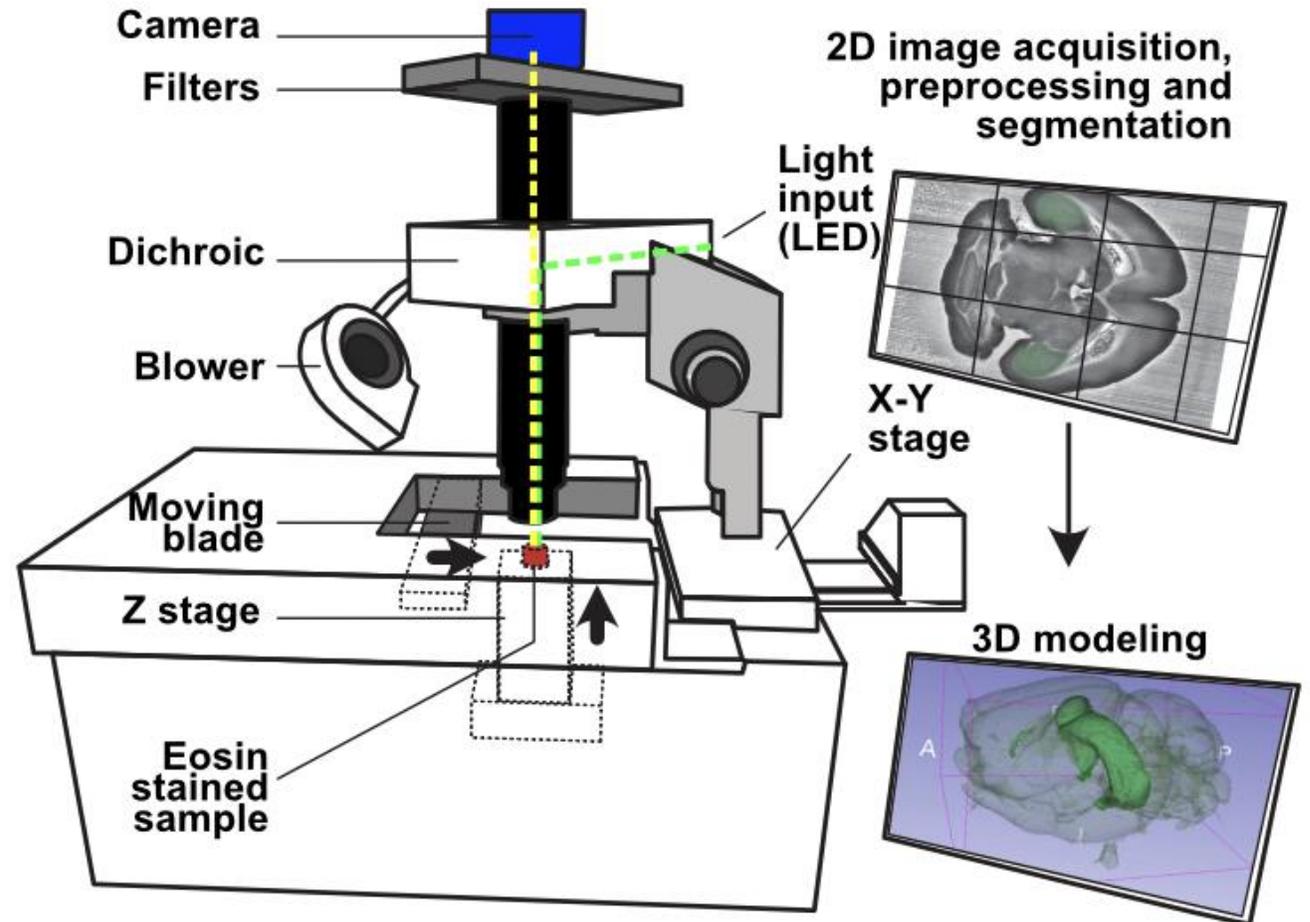
A venir, une solution par Leica ? (en  
développement avec l'IGBMC)  
Résolution élevée, petits échantillons  
??

4. micro-optical sectioning tomography (MOST)



Système  
haut de  
gamme

# HREM commerciaux





Speed

Quelques h /  
échantillons

**No collection, registration or staining!**

Individual sections do not need to be collected, registered or stained, allowing for rapid imaging of samples. E.g. Sectioning an E14.5 mouse embryo at 3 microns would produce around 3,500 images in 8 hours!

**No clearing required!**



Optical imaging

**Flexible, optical-based system**

A flexible, optical-based system, suitable for use over a broad range of magnifications that can be configured for multiple fluorescent channels.

Possible de combiner data structurelles et LACZ expression



Resolution

>1µm voxels  
En pratique pour le cerveau, je coupe à 2.88 µm

**Constant resolution throughout depth**

Sections can be cut as thin as 1 µm, which results in 3D models with a typical voxel resolutions of 1-8 µm<sup>3</sup>. This resolution enables identification of blood vessels and nerves, often not visible using lower-resolution techniques such as optical projection tomography (OPT), micro-magnetic resonance imaging (µMRI) or micro-computed tomography (µCT).



Applications

**Most tissue types and bone possible**

Ideal for developmental biology, and used in laboratories world-wide for 3D imaging of mouse embryos, embryonic organs, different tissue types and even plants.

Os = crâne possible ?



No sample distortion

Moins d'artefacts

**Sample sizes up to 30 mm**

Samples are embedded in a hard plastic resin that enables sections from 1 - 10 microns to be accurately removed.



Alternate views

Phénotypage complet

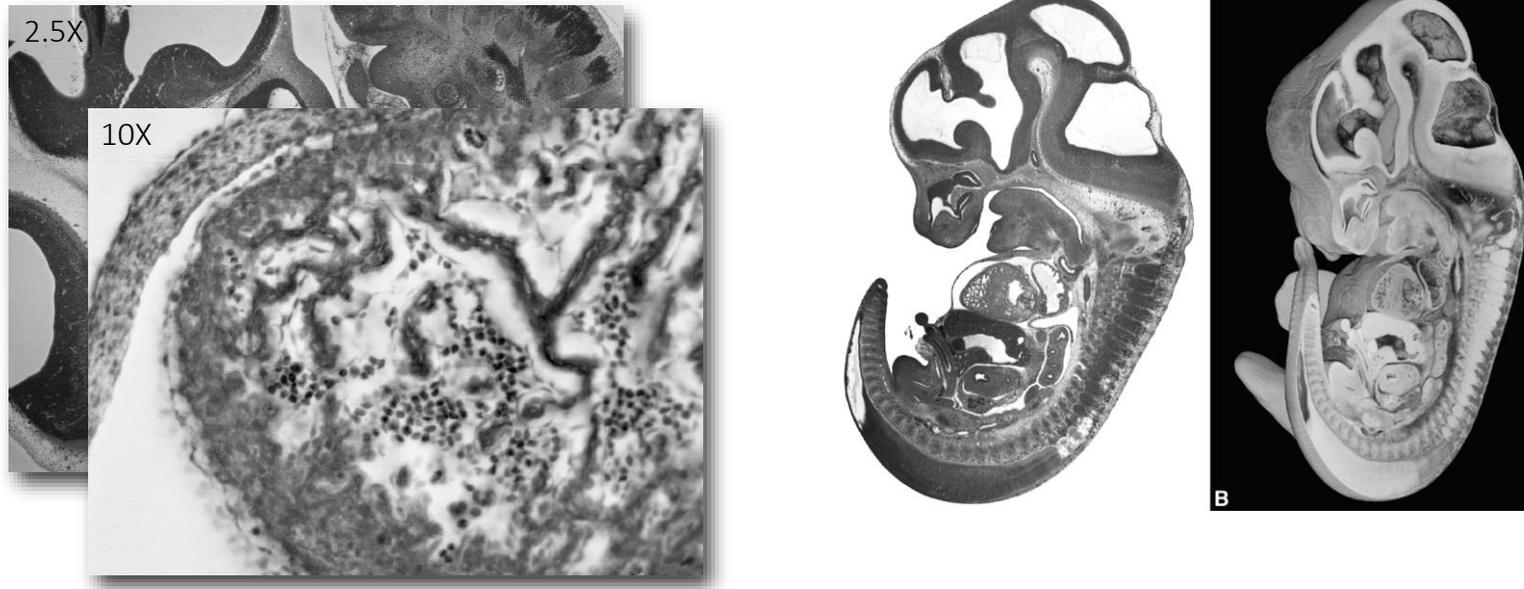
**Orthogonal and oblique views**

Image data produced can be used to calculate orthogonal and oblique views of the tissue sample, with little resolution lost. These views can provide important additional information about sample morphology.

# HREM: High Resolution Episcopic Microscopy

Methode validée:

hyper robuste pour détecter les malformations chez l'embryon de souris (consortium DMDD + de 500 lignées KO phénotypées de cette manière)



Principe:

- Résine de plastique en Methacrylate plastique (Très dur -> plus de déchirures)
- Plastique rendu fluorescent (éosine) plus de contraste
- Caméra large format (5400x3600)
- 2 LEDS pour l'illumination (2 LEDs)
- Automatique

Résolution numérique excellente

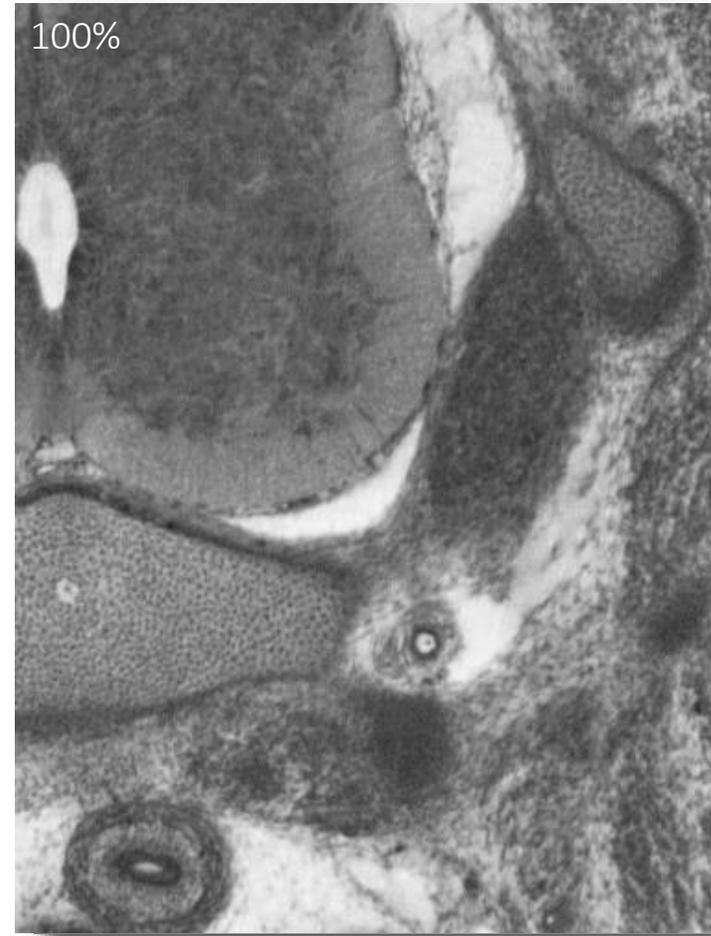
"A scanning xy platform is now available for larger samples - only time is the issue here"

"An alternative higher mag zoom microscope can be used"

# Exemple de comparaison HREM vs $\mu$ CT

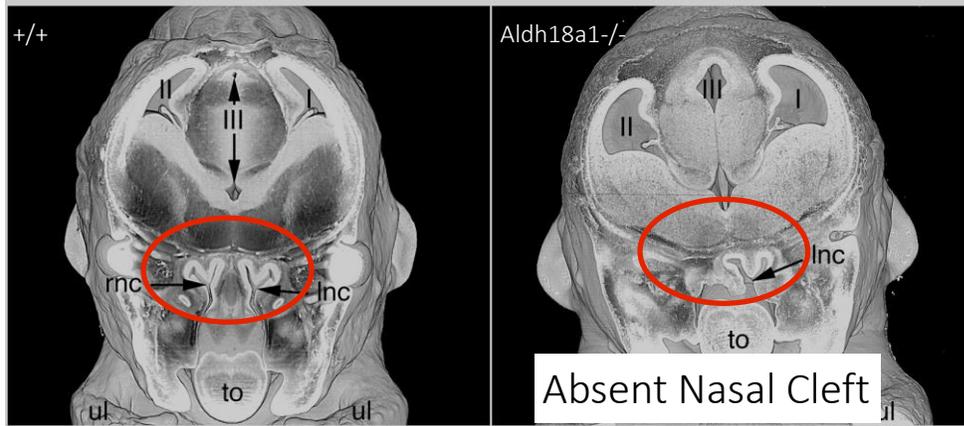
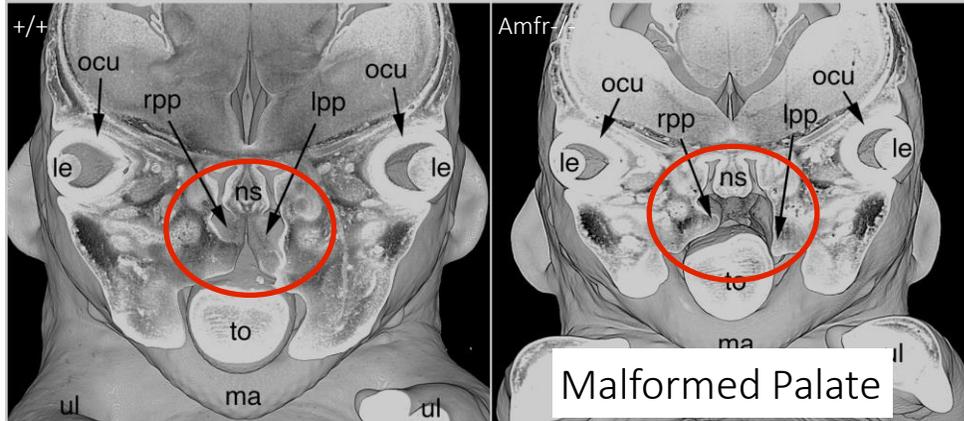
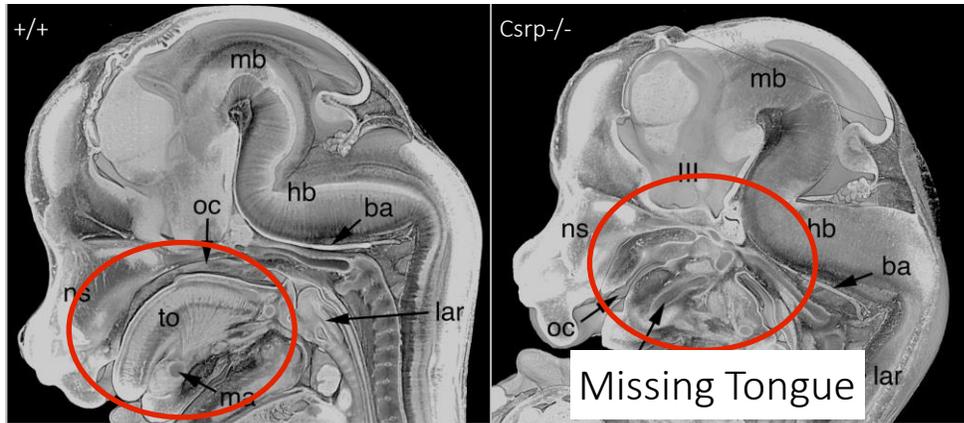


$\mu$ CT  
(Jurgen Schneider)

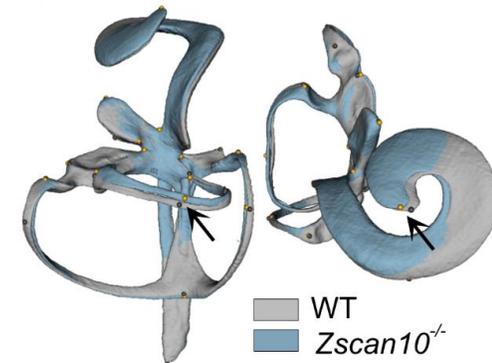
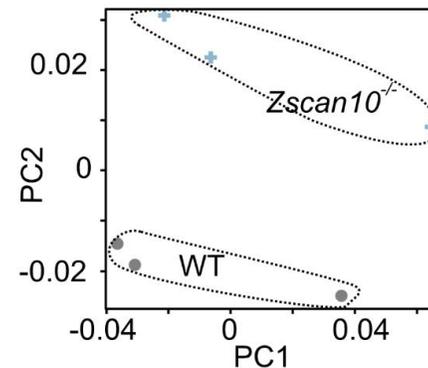
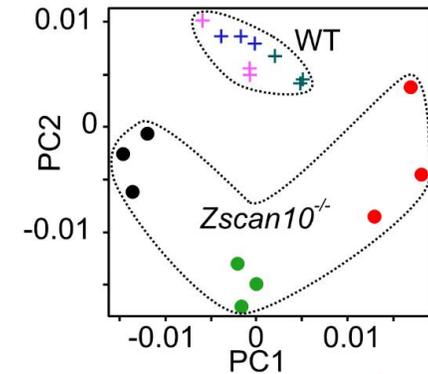
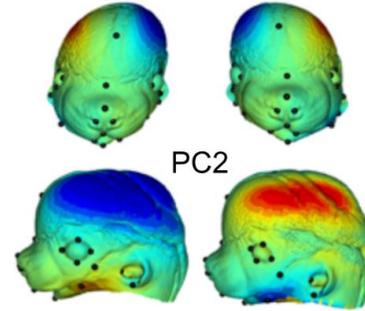


HREM

# Phénotypes développementaux précis



asymmetric variation



Modèles  
donnés  
par  
F. Prin

Collaboration L Laugwitz (Tubingen), F. Prin (Crick institute),  
Sebastien Couette, N. Navarro (Biogéosciences)

# HREM: Marche sur tout les organismes

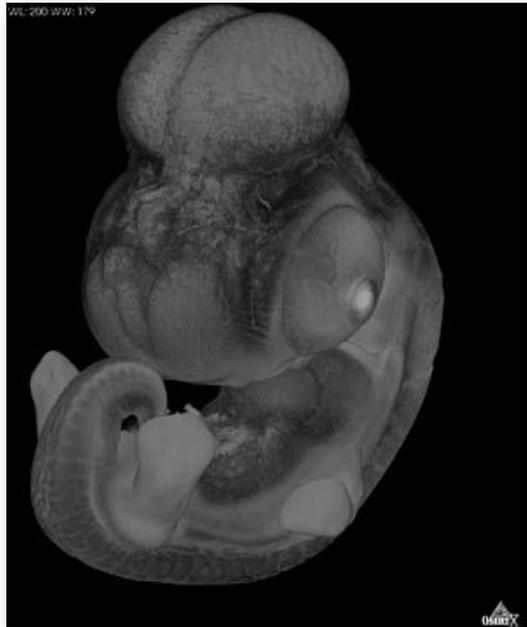
Poisson



têtard



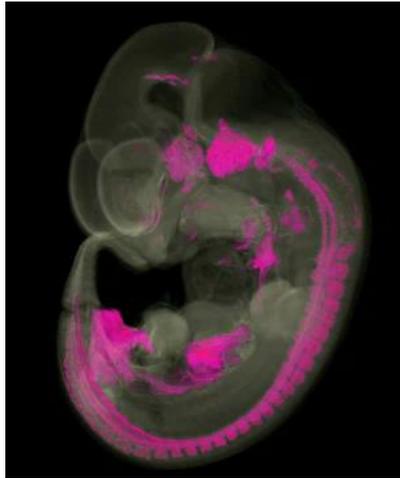
Poulet



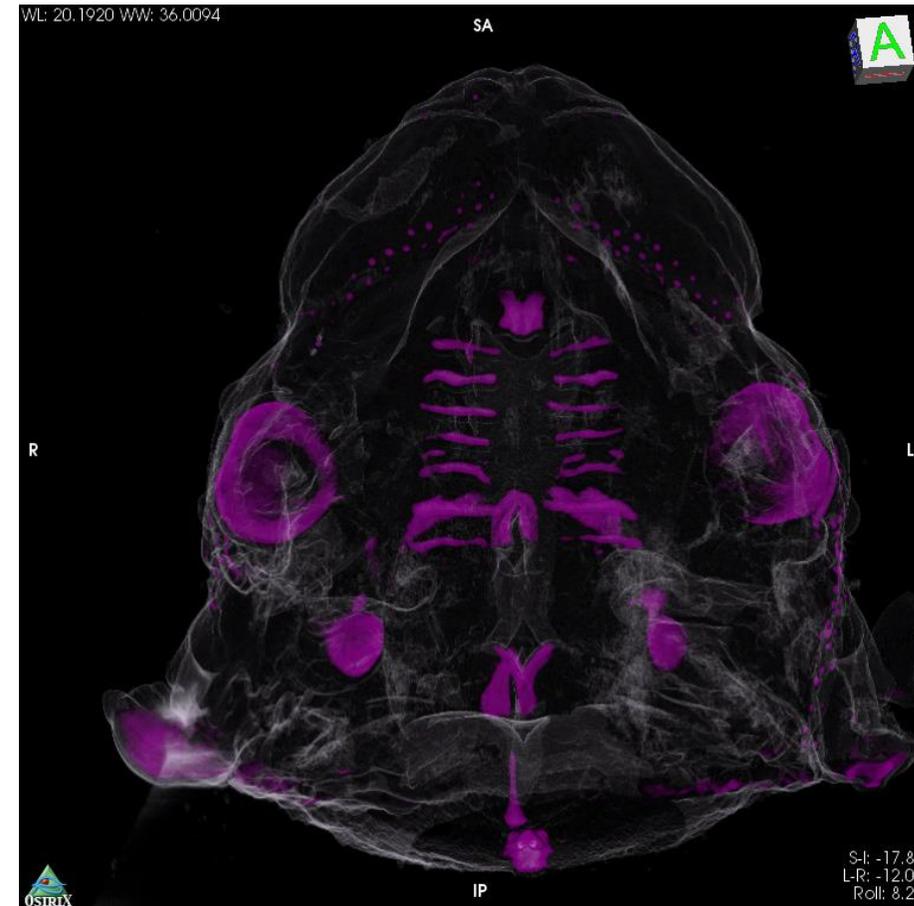
mouche



# Permet la localisation du signal LacZ



Isl1-LacZ detection



Detection of Shh transcripts on E15.5 mouse head  
Selleri lab, UCSF

Le signal colorimétrique est détecté sur un canal séparé (LacZ, ARN ISH, ...)

# Flux de travail

De l'échantillon au data analysées : Jusqu'à 3-4 semaines

Fixation/déshydratation -> Infiltration -> incorporation/durcissement -> acquisition -> pretraitement d'image

3 jrs

2 semaines

2 jrs

12 h

6 h

Beaucoup de bains – prévoir un système automatique...

Avec notre système « X-Y stage », possible de traiter plusieurs échantillons (actuellement 3)

Routines ImageJ(Fiji) en ligne de commande sur un serveur de calcul car fichiers volumineux ~50GB

- reconstitution de la mosaïque
- ajustement du stack
- CLAHE
- correction des artefacts de reconstitution

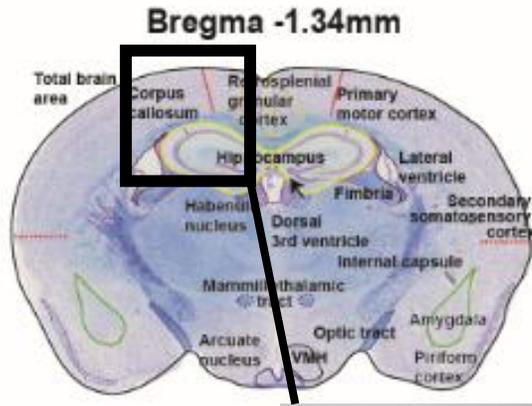
- Alignement
- Segmentation manuelle
- Modelage 3D pour les modèles intéressants

8 h

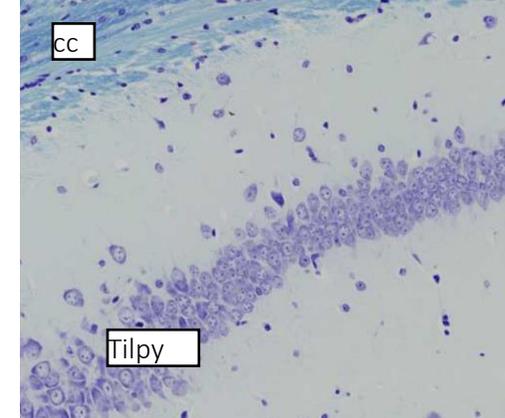
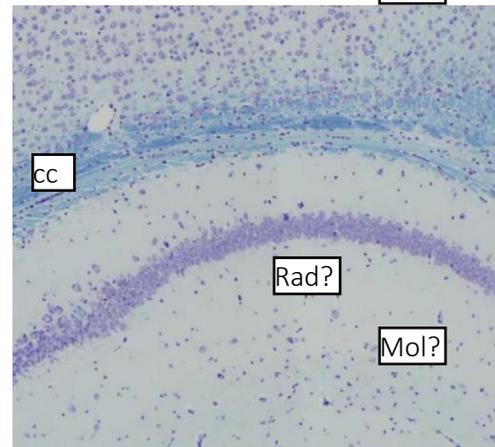
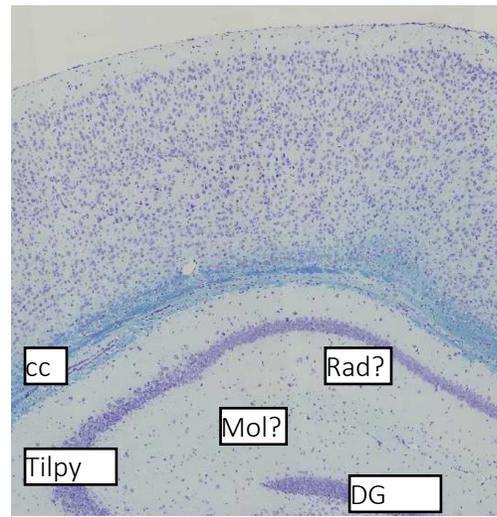
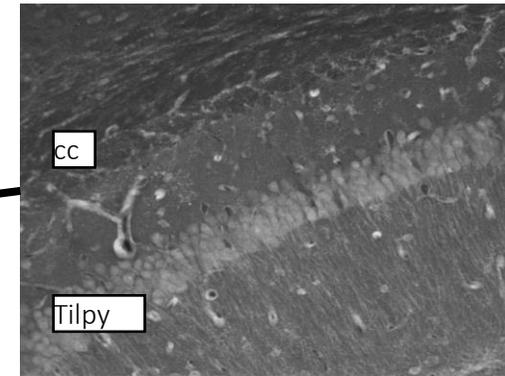
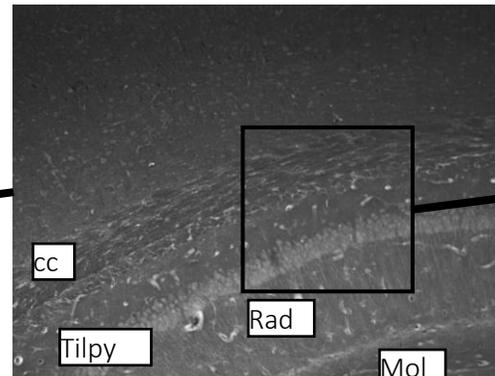
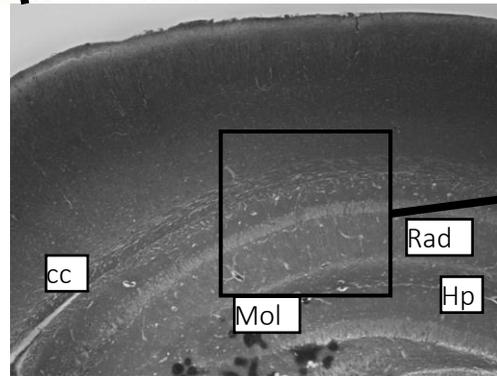
Analyses statistiques

De 8 h à une semaine

# Premières images HREM de cerveau de souris adultes



Images : Tim Mohun  
Échantillon coloré avec de l'éosine B  
Acquisition il y a 10 ans  
(système avec caméra fixe, pas de capture en mosaïque)



Comparatif en coloration  
Luxol-Nissl

# Multifluorescence High-Resolution Episcopic Microscopy for 3D Imaging of Adult Murine Organs

Claire Walsh,\* Natalie A. Holroyd, Eoin Finnerty, Sean G. Ryan, Paul W. Sweeney, Rebecca J. Shipley, and Simon Walker-Samuel

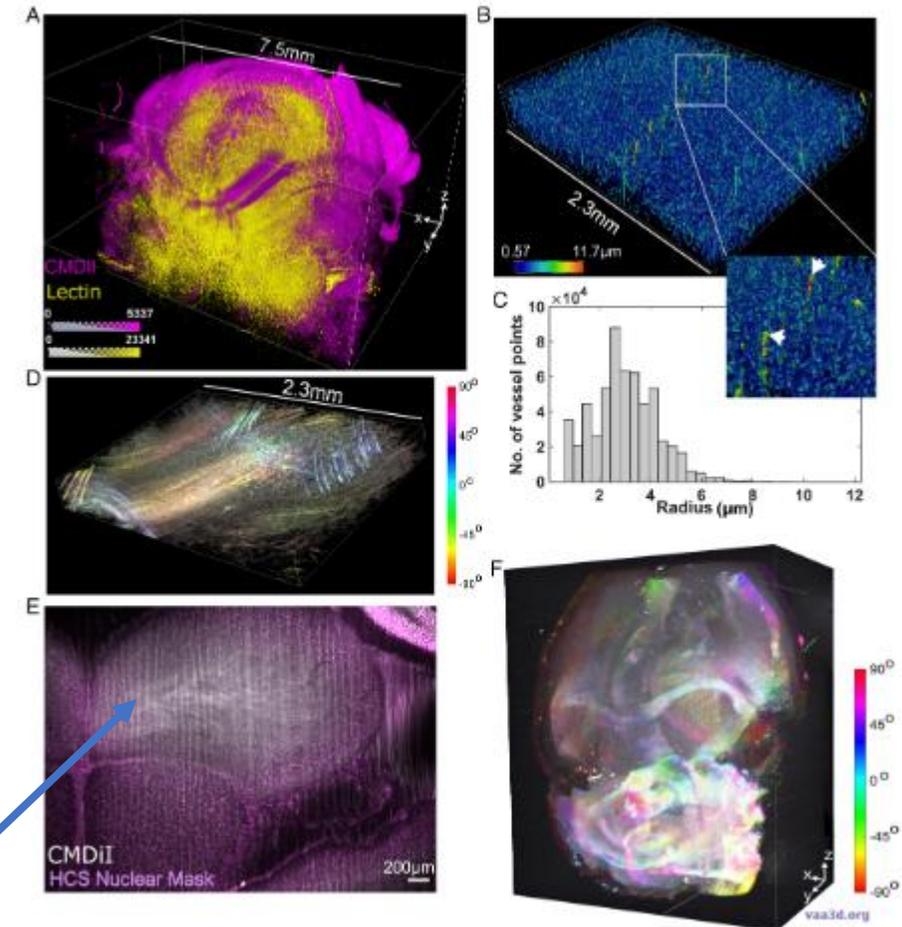
2021

Article récent avec un système à deux canaux

Jaune: cellules  
Rose: fibres

Utilisation de colorant spécifiques mais très coûteux

Artefact visible dû à un problème de température (réfrigération des échantillons pendant la coupe nécessaire)





3D Slicer  
Welcome

**DATA** **DCM** **SAVE** Modules: Welcome to Slicer

**DATA** Add Data **DCM** Add DICOM Data

Install Slicer Extensions **DCM** Download Sample Data

Customize Slicer Explore Added Data

Feedback

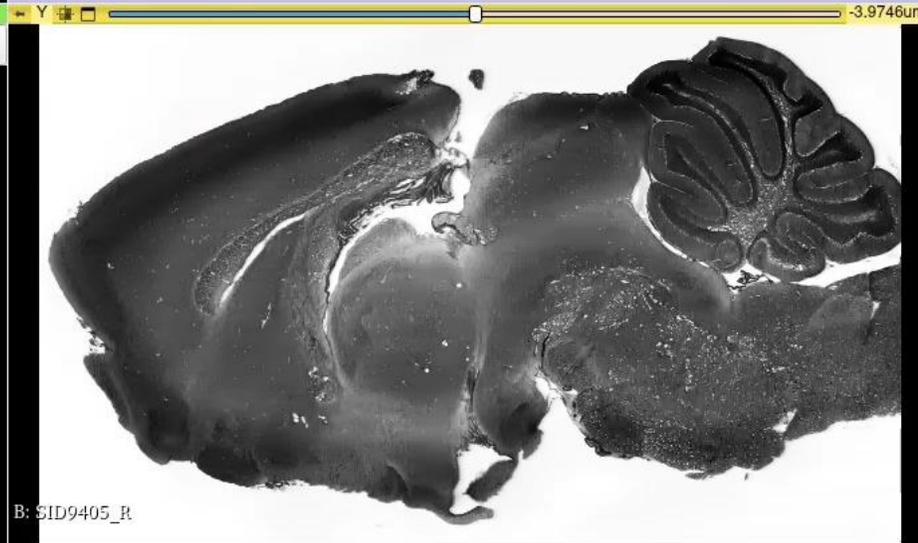
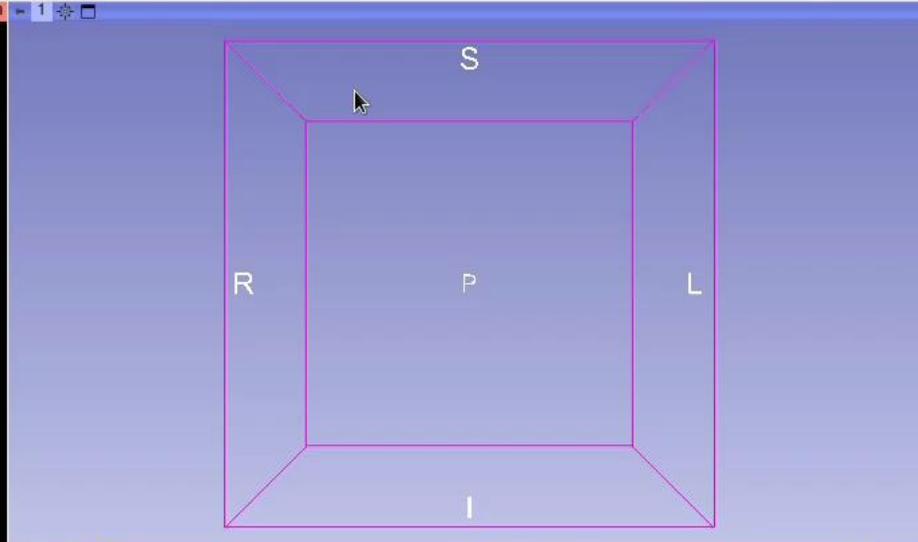
Share your stories with us on the [Slicer forum](#) and let us know about how 3D Slicer has enabled your research.

We are always interested in improving 3D Slicer, to tell us about your problem or submit a bug report, open **Help** -> **Report a Bug**.

About

Documentation & Tutorials

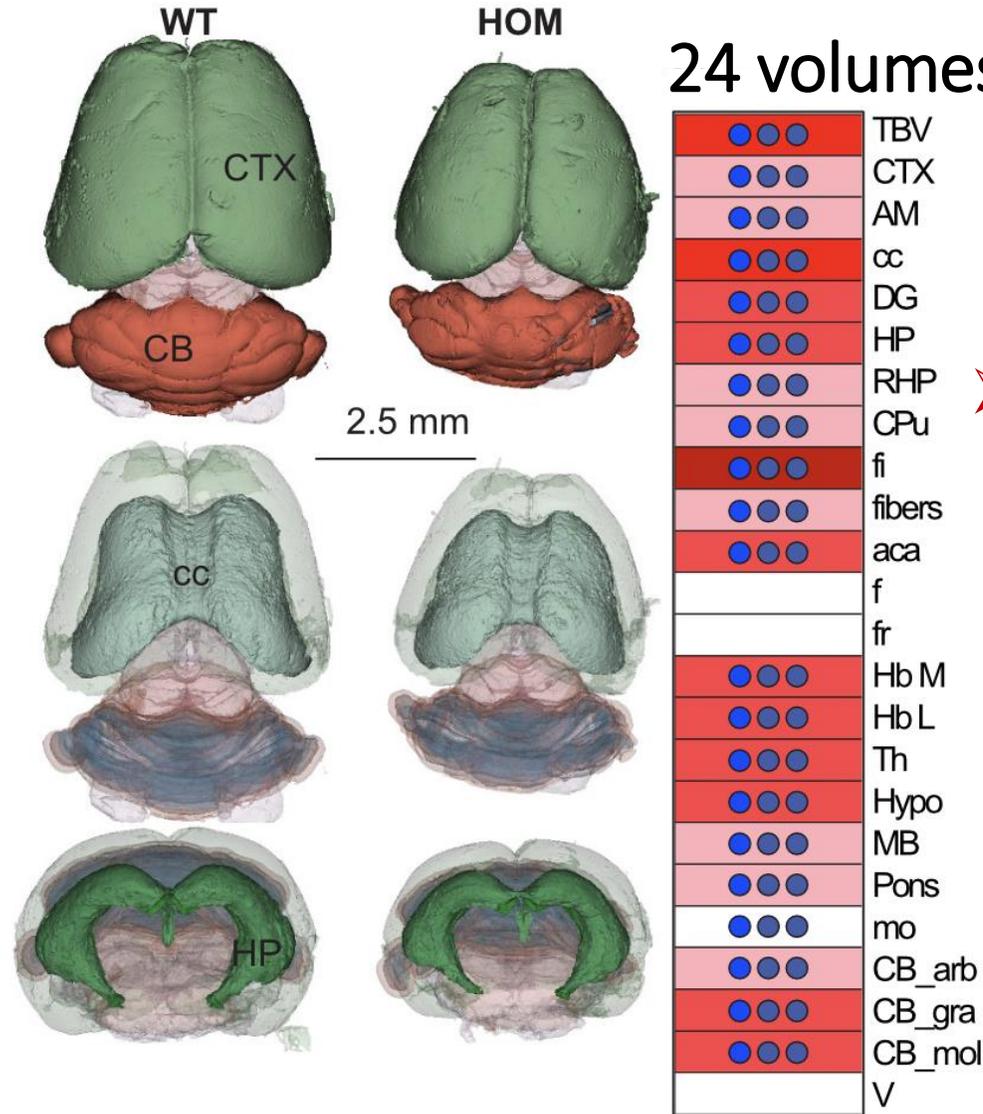
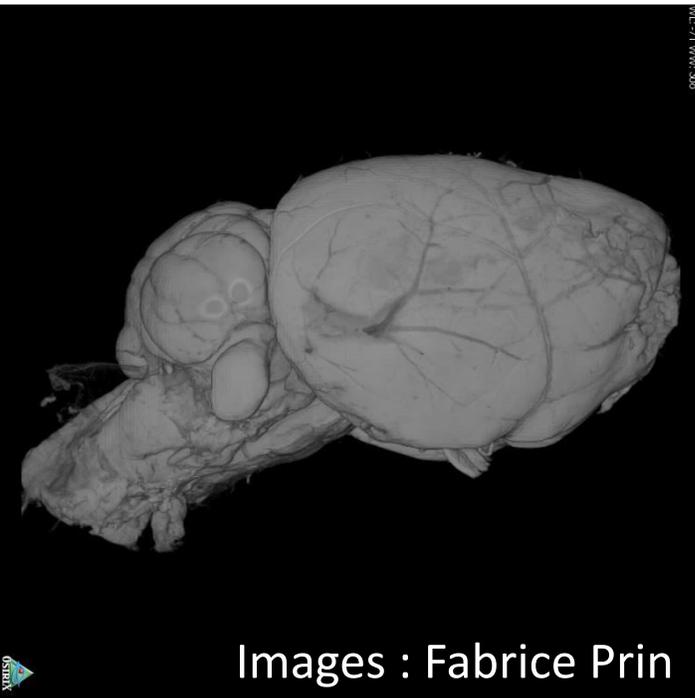
Acknowledgment



Python Interactor

```
Python 3.9.10 (main, May 6 2022, 06:54:16)
[GCC 7.3.1 20180303 (Red Hat 7.3.1-5)] on linux2
>>>
```

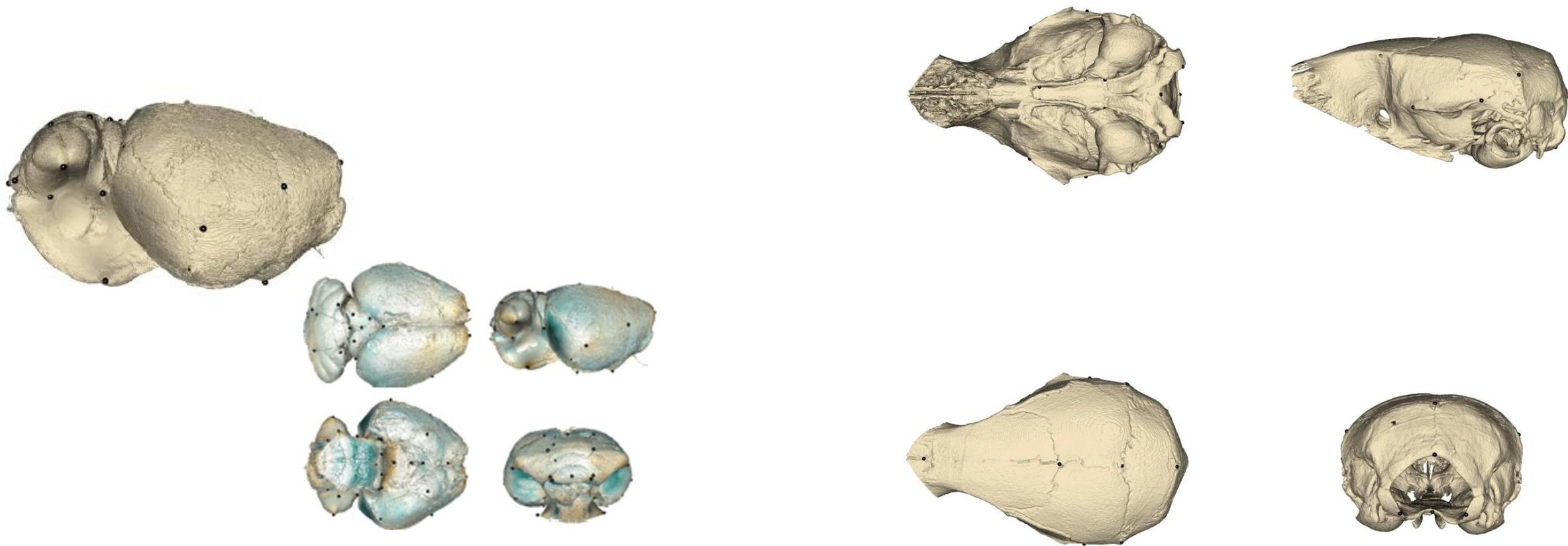
# Exemple d'étude en cours (*Vps13b*)



➤ Réduction de taille d'une majorité (21/24) en accord avec la microcéphalie (-28%,  $P = 2.93E-05$ ).

# Exemple d'étude en cours (*Vps13b*)

$\mu$ CT et HREM collaboration Nicolas Navarro (Biogéosciences)



# Financements

NG

NeuroGeMM  
Mouse NeuroGenetics Laboratory



*Cercle Gutenberg*



UNION EUROPÉENNE

Fonds Européen de Développement Régional



FONDS NATIONAL SUISSE  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



INFRAFRONTIER



**Inserm**