

***MiFoBio 2018***

***TR144***

**Clearing and Labeling Techniques for Imaging:  
which method for which sample?**

*Romina D'Angelo et David Godefroy*

# ***PLAN***

1. Bref rappel de qu'est ce que la « transparisation »: de la préparation d'échantillons à la 3D
2. Des pistes pour s'y retrouver
3. Retours sur la « transparisation » durant ce MiFoBio

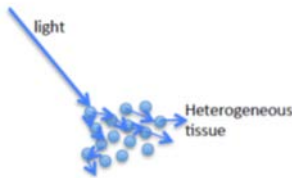
# Principe de la « transparisation » d'échantillons

Beaucoup de tissus biologiques ne sont pas transparents



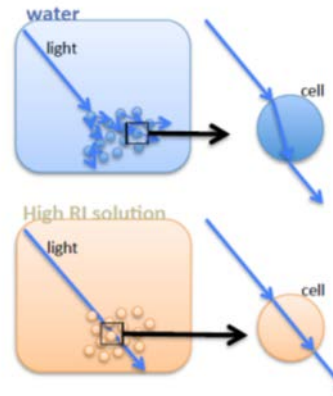
Pourquoi ?

Light scattering



Light scattering accounts for 99% of lost Transmission in biological tissues

Refraction Index Homogenization



Refraction index of:

- Phospholipids : about 1.45
- Proteins : 1.52-1.56

Protocoles de « transparisation »



Tissus biologiques transparents

# 5 familles de « transparisation »

Solvent

Dehydrating solvent +  
Clearing solvent +  
Water  
Lipid

**Transparency Excellent (>7mm)**

Methyl salicylate RI - 1.52  
Benzyl alcohol RI - 1.54  
Benzyl benzoate RI - 1.57  
Dibenzylether RI - 1.56  
Dichloromethane RI - 1.42

Simple Immersion

Aqueous clearing solution +

**Transparency Poor (<500µm)**

Sucrose RI - 1.44 (60% w/v in water)  
Glycerol RI - 1.44 (80% w/v in water)  
Formamide RI - 1.44  
Glucose RI - 1.45 (30% w/v in water @ 37C)  
Diatricic Acid RI - 1.40 (0.74M)  
2,2'-thiodiethanol RI - 1.51 (97% v/v in water) RI - 1.45 (60% v/v in water)

Hyperhydratation

Aqueous clearing solution +  
Urea/formamide +  
Lipid  
Protein  
Water +

**Transparency Medium (<2mm)**

Urea RI - 1.36 (4M)

Hydrogel embedding

Perfusion:  
1. Fixative  
2. Hydrogel monomer  
3. Temperature sensitive crosslinker

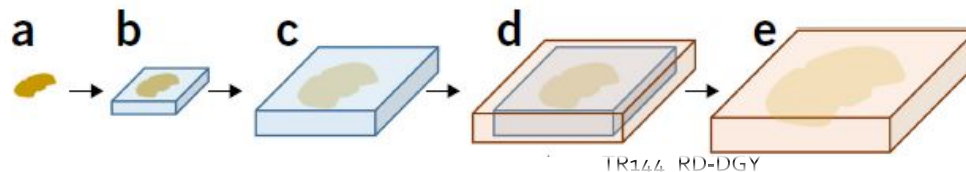
Detergent solution +  
Optional electrophoresis  
Aqueous clearing solution +  
Lipid

**Transparency Good (<4mm)**

Histodenz RI - 1.44 (70% w/v)

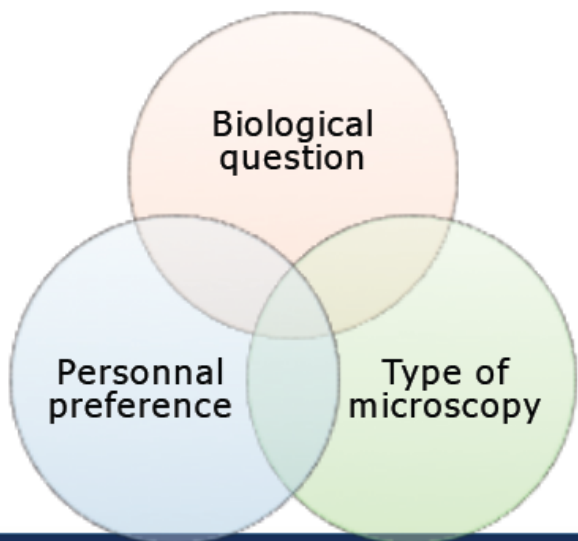
Clarifying tissue Clearing  
, Cell, Richardson and Lichtman, 2015

Hydrogel embedding and expanding

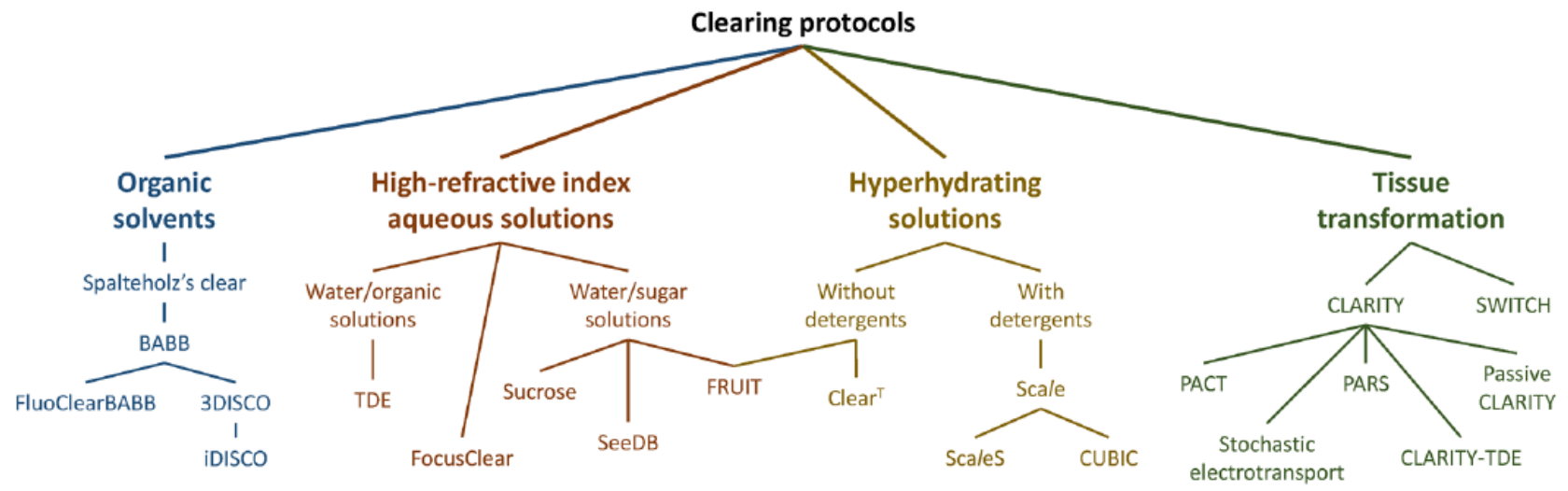


Iterative expansion microscopy, Nature Methods, Chang JB et al., 2017

# How to decide which protocol to implement?



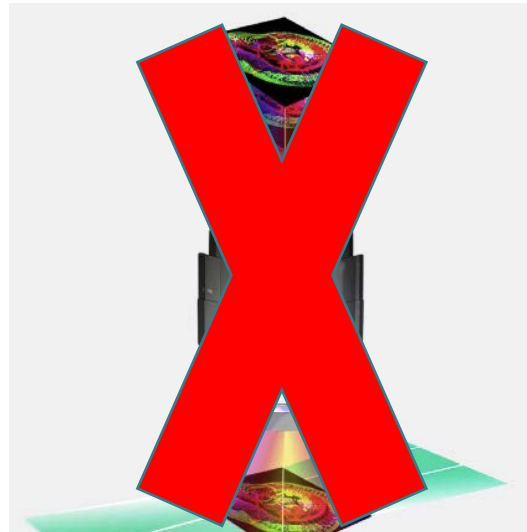
Silvestri et al.: Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective



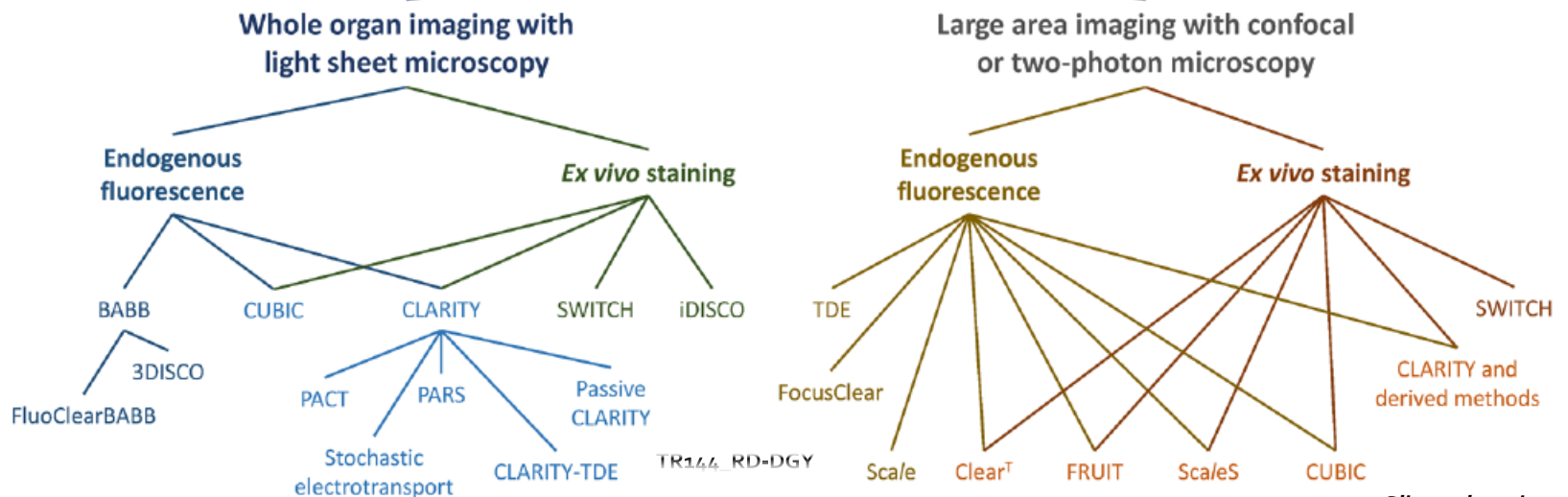
**Fig. 1** The classical taxonomy of clearing methods.

# Clearing

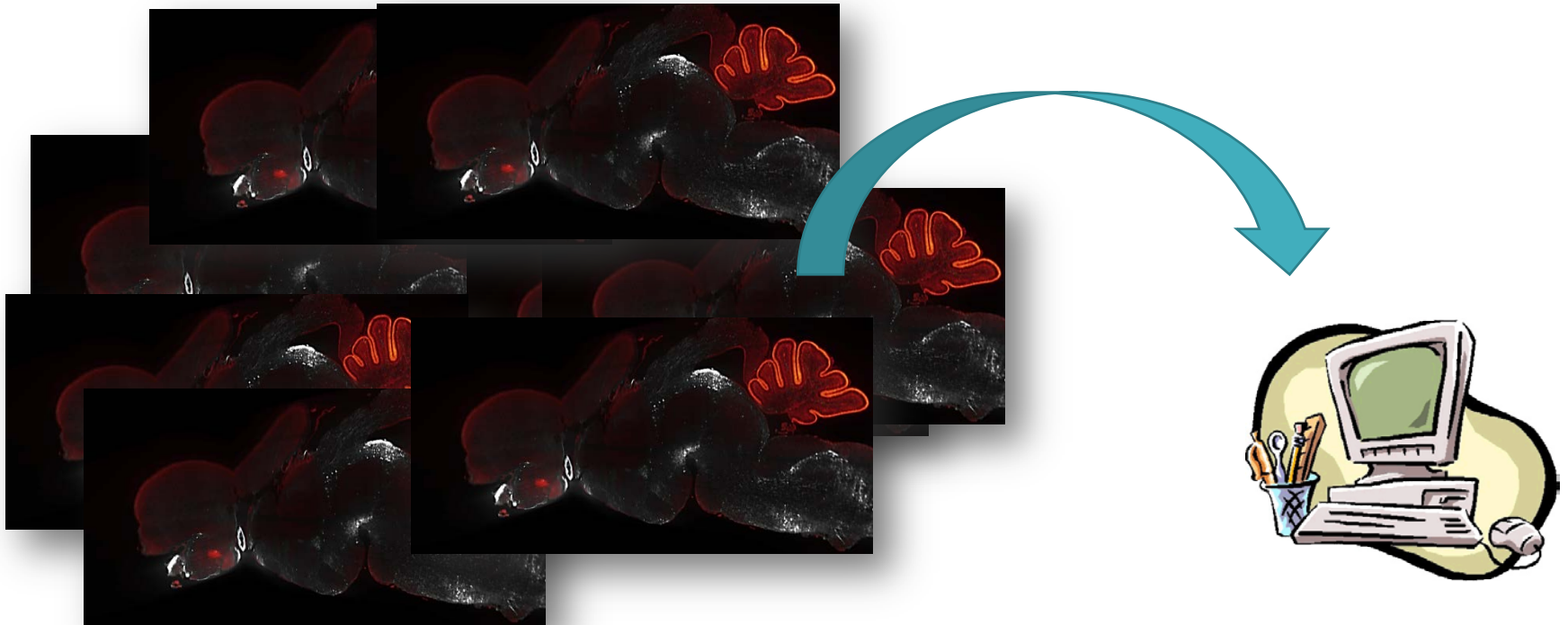
ne rime pas forcément avec Microscopie Feuille de lumière



## Clearing protocols



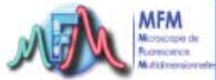
# Le traitement informatique



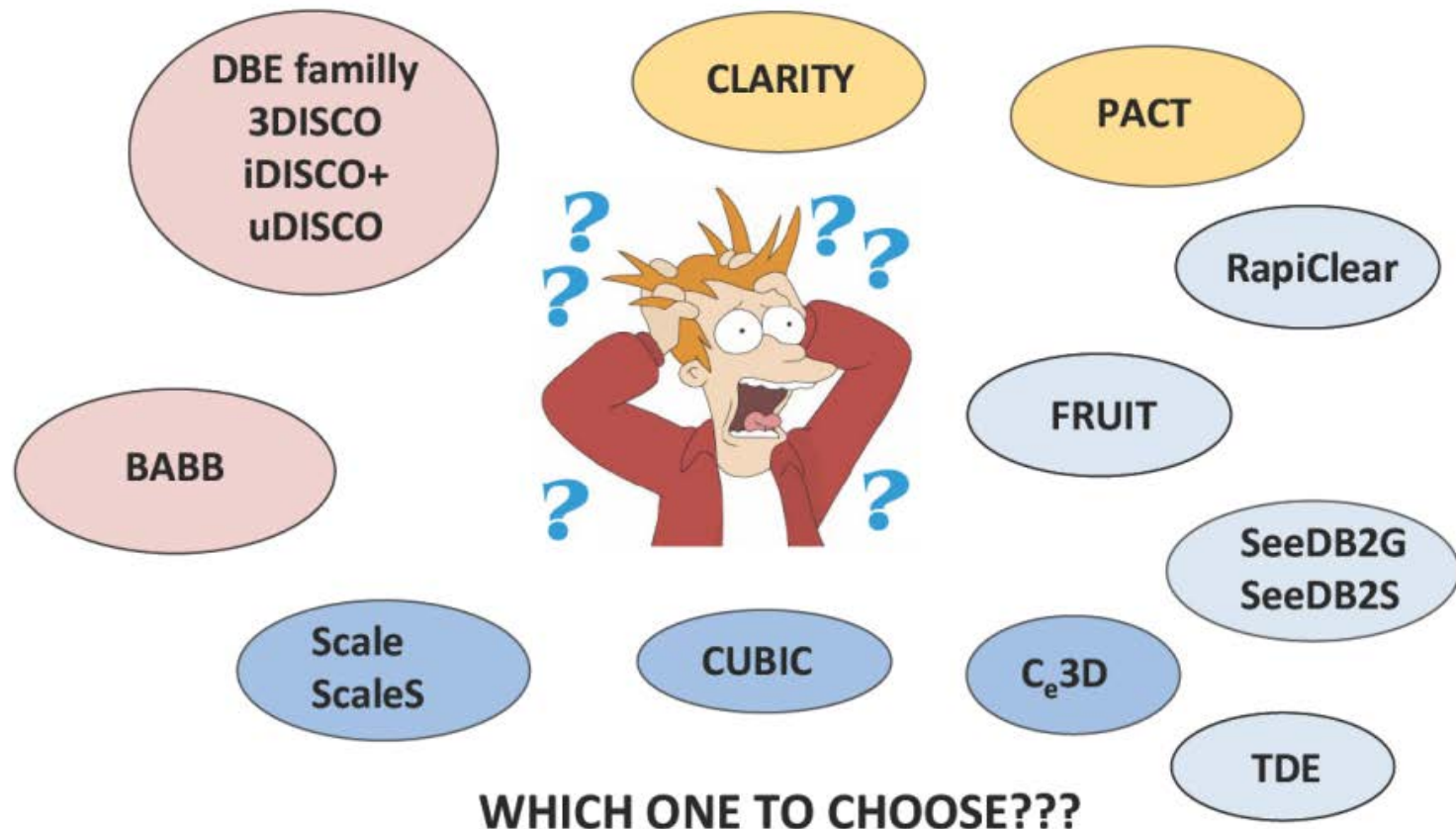




# Comment s'y retrouver?



Some existing techniques...



# Quelques références

Nom ▲
2012_Exp Neurology_Erturk A_High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent
2012_nature protocols_Erturk A_Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO
2013_Nature_Chung K_Structural and molecular interrogation of intact biological systems
2014_Cell Reports_Belle M_A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous S...
2014_Cell_Renier N_iDISCO A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging
2014_Cell_Susaki EA_Whole-Brain Imaging with Single-Cell
2015_Cell_Richardson D_Clarifying Tissue Clearing
2016_Cell_Renier N_mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes supp
2016_Irene Constantini Review_Journal of Biomedical Optics
2016_nature biotech_Tillberg PW_Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard flu...
2016_Nature_Pan C_Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO
2016_Seo et al. Molecules& Cell_Clearing and labeling techniques for large scale tissues
2017_Cell_Richardson DS_SnapShot Tissue Clearing
2017_J of Biophotonics_Yu T_Optical clearing for multiscale biological tissues
2017_Nature_Chang JB_Iterative expansion microscopy
2017_Perbellini_FASTClear on Myocardial tissue_Scientific Report
2017_PNAS_Li W_Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue
2017_Three-Dimensional_Imaging_of_the_Intracellular_Fat_Zs Green and 3 clearing methods_PlosOne
2017_Wan P_neurophotonics_Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain
2018_Annual reviews of biophysic_Gradinaru V_Hydrogel-Tissue Chemistry
2018_Cell Metabolism_Tissue adipose_Cohen
2018_Cell Reports_Tissue adipose_Xiang
2018_Cell research_Jing D_Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS
2018_zoological letters_Konno A_Aqueous-based tissue clearing in crustaceans

Attention: pour qu'un protocole identifié sur une publi marche, il « doit s'appliquer au même échantillon avec même marquages, même machine ... »  
(Nicolas Renier dixit le 5/10/2018 !)

# Sous-Groupe de Travail : Transparisation

Création: Assises mars 2017, Marseille

## Constats:

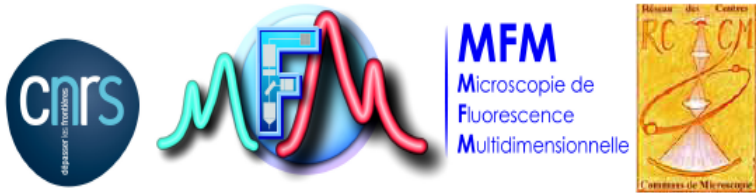
- utilisation croissante des méthodes de transparisation
- forte demande de trouver les protocoles adéquats

## Membres du sous-GT:

Pierre Affaticati (TEFOR - Gif-s-Yvette)  
Corinne Barreau (Stromalab-Toulouse)  
Geneviève-Conéjéro (MRI-Montpellier)  
**Romina D'Angelo** (TRI-I2MC-Toulouse)  
Laurence Dubreil (APEX – Nantes)

**Orestis Faklaris** (IJM-Paris)  
**David Godefroy** (U1239-Rouen)  
Nicolas Goudin (SFR Necker-Paris)  
Thomas Guilbert (Cochin-Paris)  
François Michel (InMAGIC-Marseille)





## Préparation d'échantillons pour la Microscopie : de la protéine unique jusqu'à les organismes modèles, tissus et organes

Lundi 27 novembre 2017  
Institut Jacques Monod

Amphithéâtre Turing, Bâtiment Sophie Germain  
8 place Aurélie Nemours, Paris 75013



Groupe de travail : Préparation Echantillons  
**Axe TRANSPARISATION**



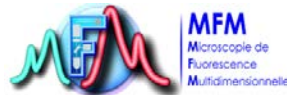
## Transparisation des échantillons biologiques: Quelles méthodes, pour quels échantillons ?

Lundi 25 juin 2018

Institut Jacques Monod – Université Paris Diderot

Amphithéâtre Turing, Bâtiment Sophie Germain  
8 place Aurélie Nemours Paris 75013

Assises du RTmFm, Mars 2108, Rouen



### Table ronde

## Transparisation et imagerie des échantillons biologiques clarifiés : quelle méthode? quelle application?

R. D'Angelo, L. Dubreil, O. Faklaris, T. Guilbert

- Description/comparaison des méthodes et des applications sur 4 plateformes
- Discussion – échange d'expertise – identifier les besoins

# JT du 25 juin : qu'en est-il ressorti?

Participation : 90 (participants+orateurs)

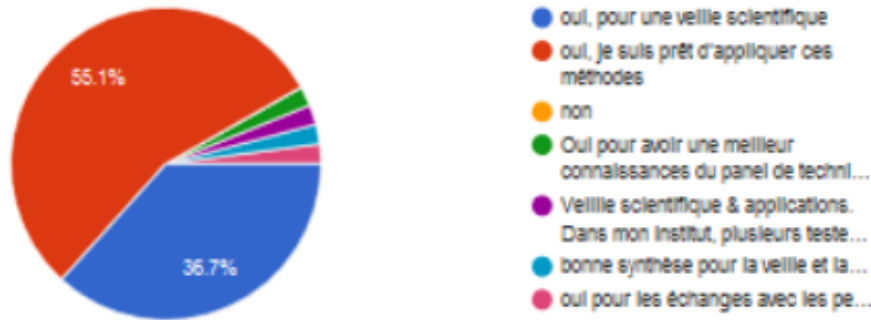


Appréciation de la journée :



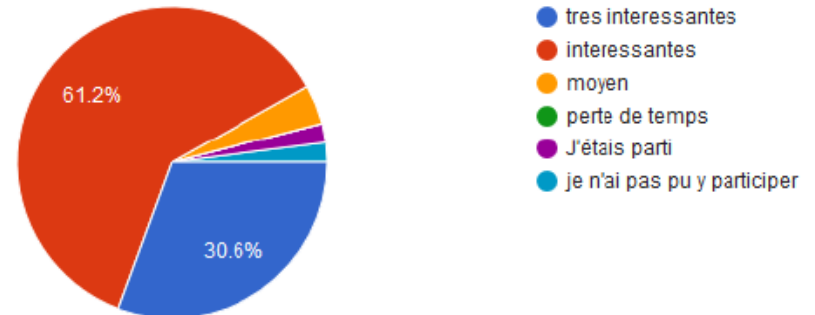
Les participants ont trouvé la journée très intéressante ou intéressante

Est-ce que les présentations étaient utiles ?



55% Je suis prêt à appliquer ces méthodes.

Tables rondes



92% ont trouvé cela intéressant voir très!  
Aucun n'a répondu perte de temps.

## Pas de recettes magiques ...

# Actions en cours

## Choses qui existent :

### Formations:

Institut de la Vision, Paris (régulière)

CNRS Entreprise, par Suzanne Bolte, Pierre Affaticati, Christelle Langevin (Paris, fin juin)  
Spécificité sur embryons

ANF du GT Transparisation en attente de validation (Paris, dernier semestre 2019)  
Complémentaire et spécificité sur tissus-organs

### Liens utiles / Forums:

<https://forum.claritytechniques.org/>

<https://idisco.info/>

<https://cubic.riken.jp/>

<https://transparent-human-embryo.com> (Morgane Belle)

## Choses qui vont exister :

### Par le GT-Transparisation

Système interactif pour aider, aiguiller les gens : Questionnaire sur place

Un kit du débutant

Autres Journées Thématiques (2019)

# MiFoBio édition 2018

: Séminaires  
Ateliers  
Challenge(s)  
Table ronde

## Ateliers Clearing MiFoBio : une vraie montée en puissance!

1 atelier en 2014

4 ateliers en 2016

### 10 ateliers en 2018 :

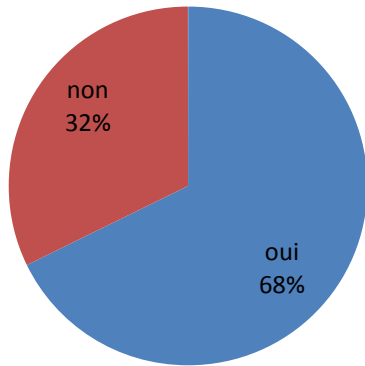
1. **A4**\_Organ clearing to investigate the central nervous system and peripheric organs with preservation of GFP and SHG on few mm of cleared samples. *Laurence Dubreil, Romain Fleurisson*
2. **A92**\_Visualization of neuronal projections in entire brain *Christel Poujol*
3. **A95**\_Comment optimiser l'acquisition de grands échantillons « transparisés » avec la microscopie à feuille de lumière en vue de traitements semi automatisés d'images tridimensionnelles *David Godefroy*
4. **A5**\_Organisation spatiale des signaux de mort/survie dans le cœur de souris après ischémie-reperfusion : clarification d'organe, microscopie en feuille de lumière et quantification automatisée *Meryem Tardivel, Antonino Bongiovanni*
5. **A48**\_La microscopie à feuillet de lumière pour l'étude en profondeur des organoïdes : limites et optimisation. *Nicolas Goudin, Corinne Lebreton*
6. **A127**\_Comparaison de 3 méthodes de transparisation sur un nouveau système d'imagerie confocal rapide Nicolas *Goudin, Louison Lallemand*
7. **A85**\_Etude comparative de méthodes de clarifications sur différents modèles animaux et végétaux par microscopie à sectionnement optique. *Cécile Pouzet, Jacques Rouquette*
8. **A31**\_Zebrafish embryonic morphogenesis and functional imaging with high speed and high resolution using light sheet and confocal microscopy *Elvire Guiot, Susanne Bolte*
9. **A77**\_Mono vs 2-photon comparisation on large clarified embryo: the catshark *S. canicula* model *Ronan Lagadec, David Pecqueur*
10. **A26**\_Immunofluorescence et imagerie à feuille de lumière sur organes transparisés : quelle stratégie de mise au point adopter? *Simon Lachambre, Sophie Abélanet*

### Les machines utilisées

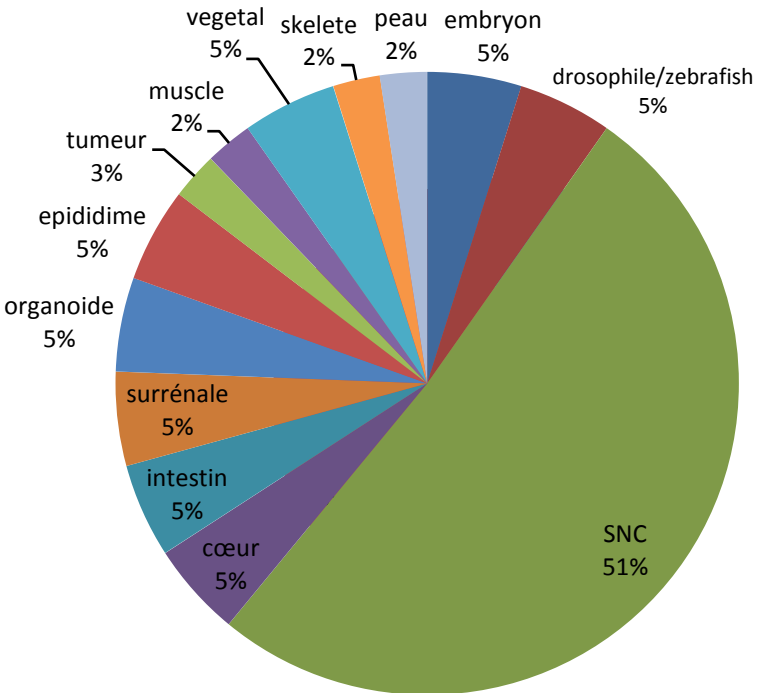
Confocal  
Lightsheet , Confocal  
Lightsheet  
Lightsheet  
Lightsheet  
Confocal  
Confocal, Lightsheet  
Confocal, Lightsheet  
Confocal  
Lightsheet

# Résultats du sondage

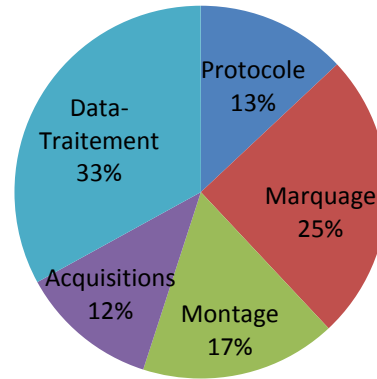
Travaillez vous sur une plateforme ?



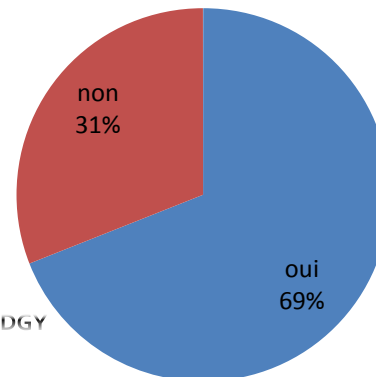
Types d'échantillon



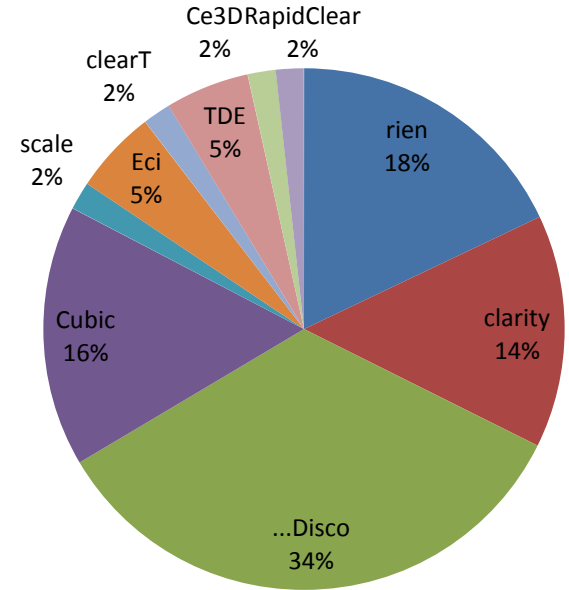
Vos contraintes



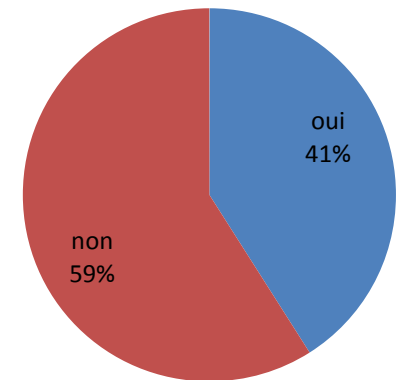
Gestion des datas



Quelle "transparisation" ?



Assurez vous les prestations ?





## Challenge 1. Franck Debarbieux

Suivre la réponse à cette question comme exemple de façon de trouver solution

Optimisation d'un protocole de clarification pour la moelle épinière de souris adulte permettant de conserver à la fois l'intégrité de la myéline et la fluorescence des protéines fluorescentes CFP, EGFP et EYFP.

Imagerie à résolution microscopique 3D en fluorescence + CARS des segments thoraciques de la moelle transparaissée

Segmentation automatique et quantification de la densité de neurones et cellules microgliales marqués dans l'ensemble du volume.

Je peux fournir des échantillons multicolores à clarifier.

### Le problème aujourd'hui est pour nous

1° d'améliorer la clarification qui conserve la myéline,

2° d'optimiser la vitesse d'acquisition des images par des acquisitions feuilles de lumière,

3° d'avoir une chaîne de traitement des images la plus optimisée possible pour accélérer la production de données quantitative.

L'absence d'un set-up de CARS pourrait probablement être contournée par un marquage fluorescent lipophile s'il s'agissait de tester l'action de différentes recettes de clarification sur la myéline...

Dans ce cas des set-up de light sheet multicolore feraient l'affaire. D'expérience nous aurions besoin des lasers suivants:

405nm, 488nm, 515nm et si possible 561nm ou 594nm.

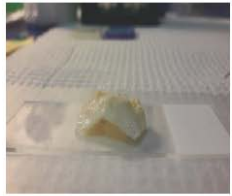
J'amènerai des échantillons fixés quoiqu'il en soit.

Tissu – microscopie super-Resolution

Organoides

Plantes

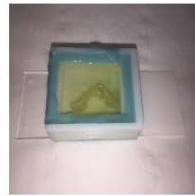
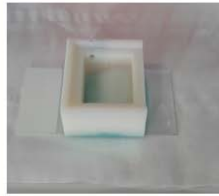
## Challenge de Alexei sur son atelier FCS



Avant clarification



Après clarification au BABB



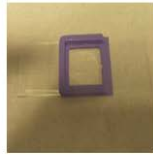
Montage en chambre fabriquée en 3D



Tudor MANOLIOU  
Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris

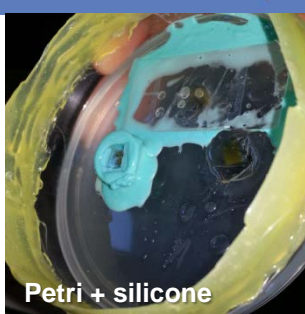


Tranche de rein transparisée au BABB

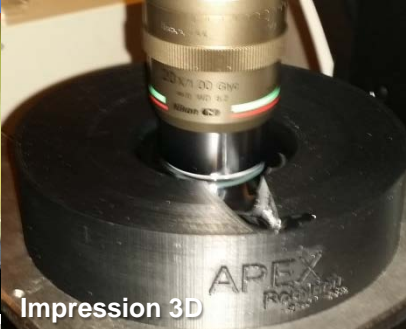


Montage dans le BABB entre lame et lamelle

Version finalisée de Thomas GUILBERT  
MiFoBio disponible !



Petri + silicone



Impression 3D



Systèmes Ibidi en silicone à détacher et poser sur lamelle

Romina D'Angelo  
Toulouse



Spacers

Laurence Dubreil  
Romain Florisson  
Nantes



Système Navig -  
Joint de  $\neq$  épaisseurs

# MiFoBio édition 2018 : grand crû pour la « transparence »???

Vos retours, coups de cœur, astuces, et attentes

Echangeons des astuces: quelles réponses j'ai obtenus en participant à tel ou tel atelier que je vous fais partager

Encore une fois la réponse unique n'existe pas :  
à vos paillasse et échanges avec la communauté!

Merci

Type de tissu	Protocole family	Quel machine	quel montage	Quel traitement
---------------	------------------	--------------	--------------	-----------------