



Analyse d'un échantillon en 3 dimensions par une technique de Serial Block Face Imaging amovible

Marine Malloci, Stéphanie Blandin, Paul Dorval, Philippe Hulin, Pierre-Alix Dancer, Perrine Paul-Gilloteaux

► To cite this version:

Marine Malloci, Stéphanie Blandin, Paul Dorval, Philippe Hulin, Pierre-Alix Dancer, et al.. Analyse d'un échantillon en 3 dimensions par une technique de Serial Block Face Imaging amovible. AFH 2019, Jun 2019, Strasbourg, France. hal-02267585

HAL Id: hal-02267585

<https://hal.science/hal-02267585>

Submitted on 19 Aug 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Introduction

L'analyse tridimensionnelle d'un échantillon trouve ses champs d'application dans l'étude de la micro-anatomie et la biologie du développement. Elle peut être réalisée à partir d'échantillons histologiques. Le principe méthodique est de générer une grande quantité d'images directement à partir de la surface du bloc dans lequel est inclus l'échantillon, et ce, au fur et à mesure qu'il soit sectionné mécaniquement (technique de Serial Block Face Imaging). Les images sériées sont alors déjà alignées et permettent de reconstruire en trois dimensions l'échantillon, afin de l'explorer selon n'importe quel plan de coupe virtuel. Actuellement, il existe sur le marché différents systèmes intégrés de microscopie épiscopique haute résolution (HREM), mais les appareils et leurs consommables sont onéreux, la préparation des échantillons est fastidieuse et toxique (fixation en méthanol, inclusion en résine colorée JB-4 (Polyscience)).

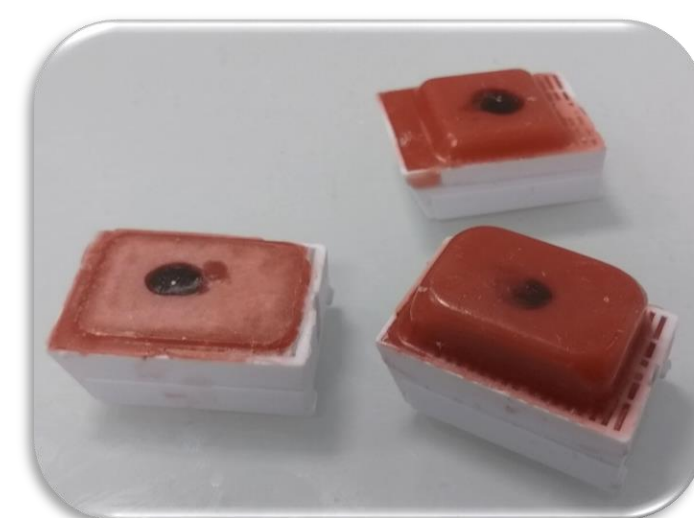
Objectif : La plate-forme MicroPICell collabore avec la société Kaer Labs afin de mettre au point un système modulable de Serial Block Face Imaging, demandant une préparation simple de l'échantillon. Dans cette étude, nous l'adapterons en collaboration avec une équipe de recherche travaillant sur les valvulopathies cardiaques.

Matériel et Méthode

→ **Principe :** Prendre des images en série de la surface du bloc coupé au microtome/cryostat puis reconstruire l'échantillon en 3D

Préparation de l'échantillon

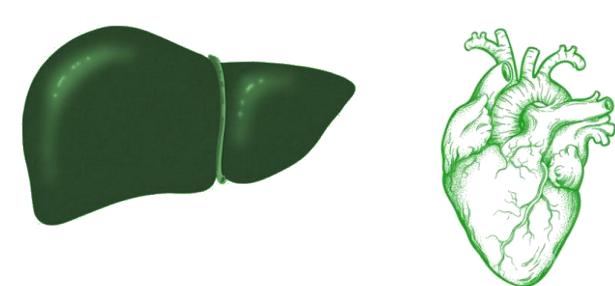
Échantillons inclus en paraffine :



Cœurs de Rat sauvage Sprague Dawley inclus en paraffine colorée avec le colorant Oil Red O = meilleur contraste qu'avec la paraffine classique

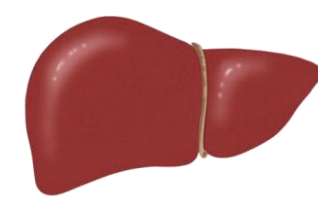
Détection de l'autofluorescence du tissu

Échantillons congelés :



Foie et cœur de Souris C57BL/6 exprimant la GFP de façon ubiquitaire (GFP +)

Détection de la fluorescence (GFP)



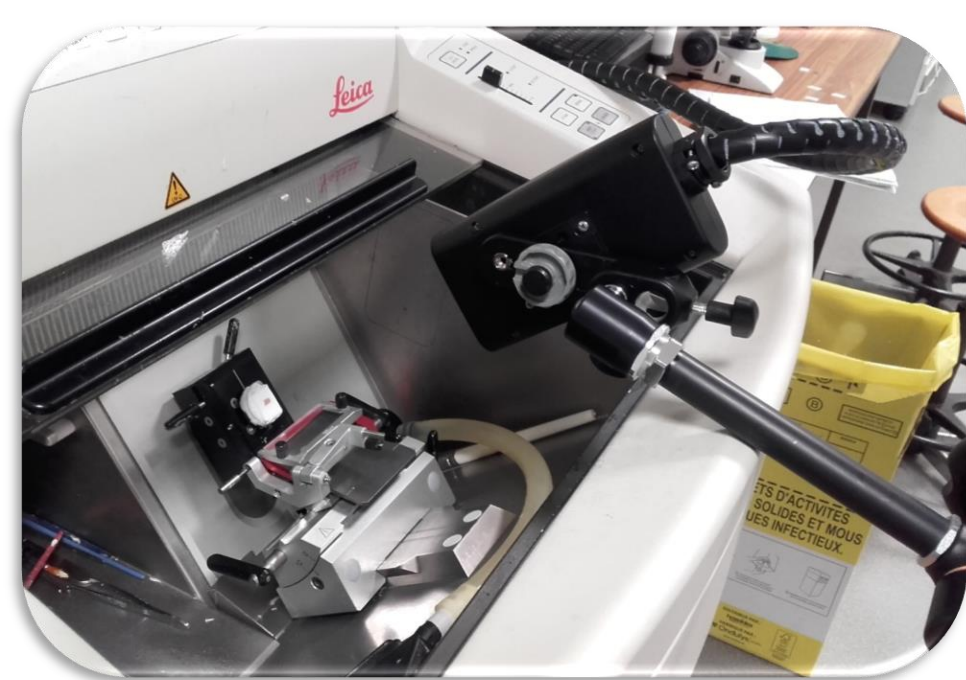
Foie contrôle

Détection de l'autofluorescence

Système amovible



Microtome (RM2255, Leica)



Cryostat (CM 1950, Leica)

Caméra Kaer Imaging System avec bras amovible et noix de serrage, logiciel KIS Control (Kaer Labs)

Paramètres d'acquisition :

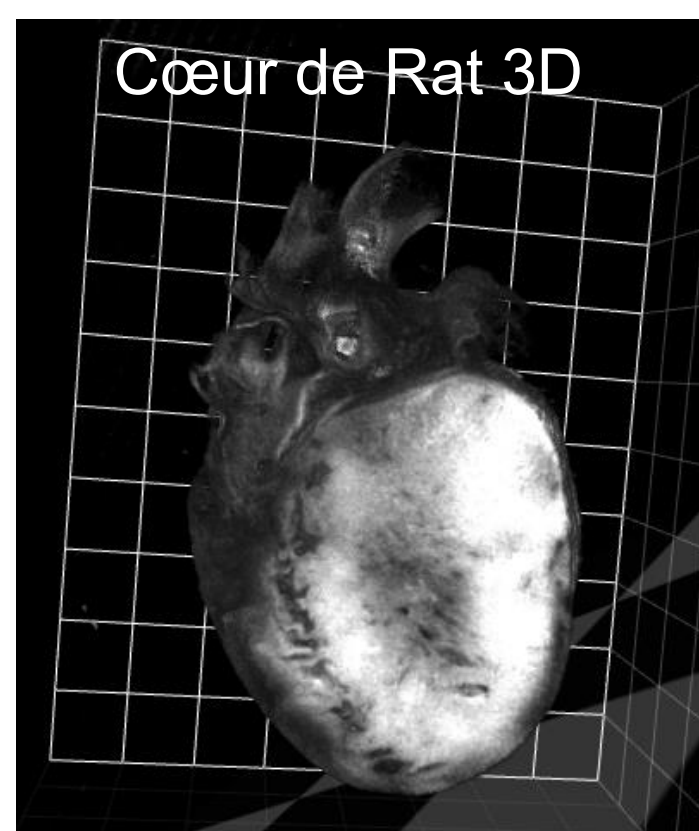
- Excitation 470 nm (adaptée à l'autofluorescence et la GFP)
- Émission >500 nm
- Temps d'exposition pour cette étude : entre 374 et 800 ms selon les échantillons
- Résolution : z= 20µm, x et y = 40µm

Reconstruction 3D et plans orthogonaux avec les logiciels Fiji et Volocity

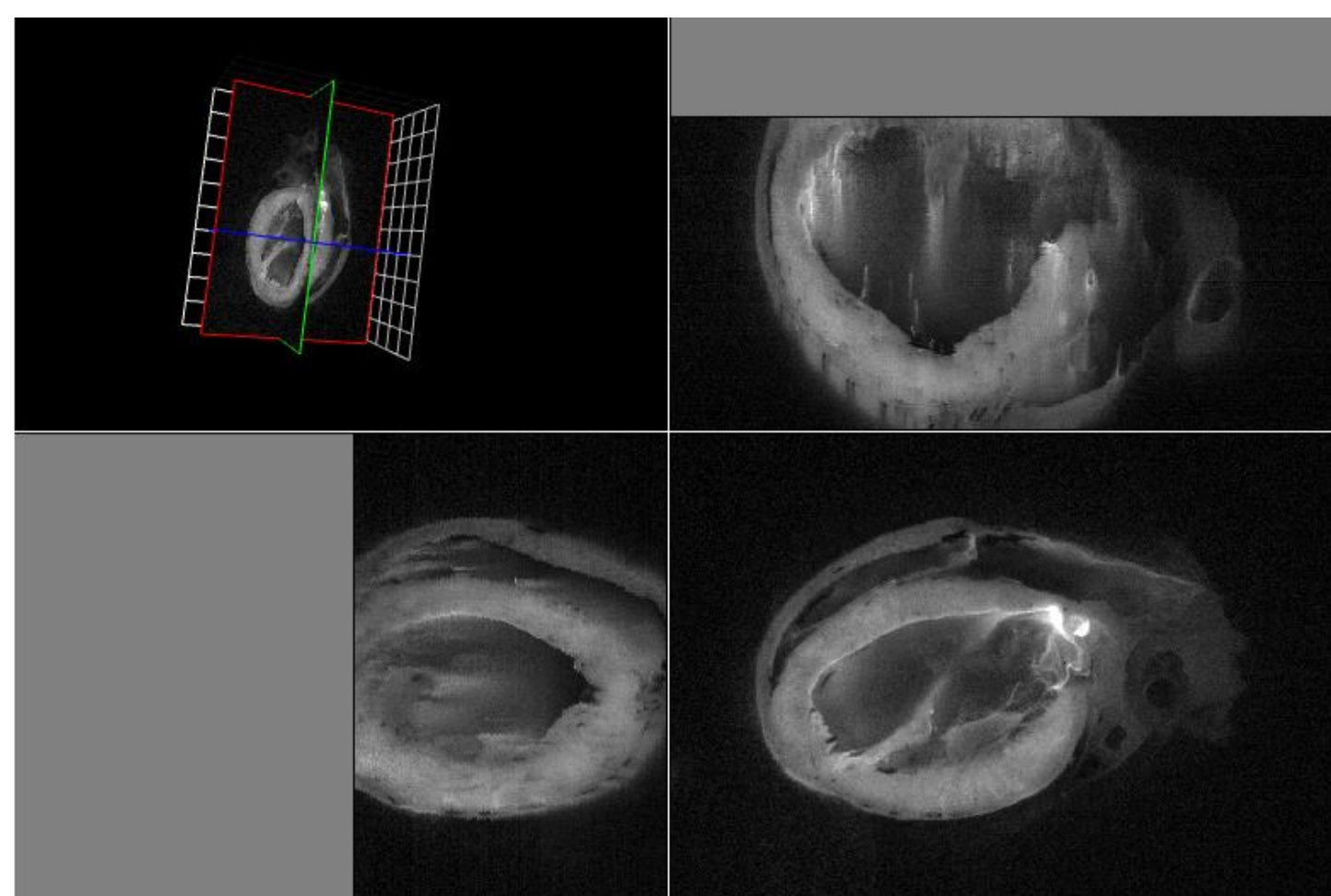
Résultats

Reconstruction 3D de cœur inclus en paraffine

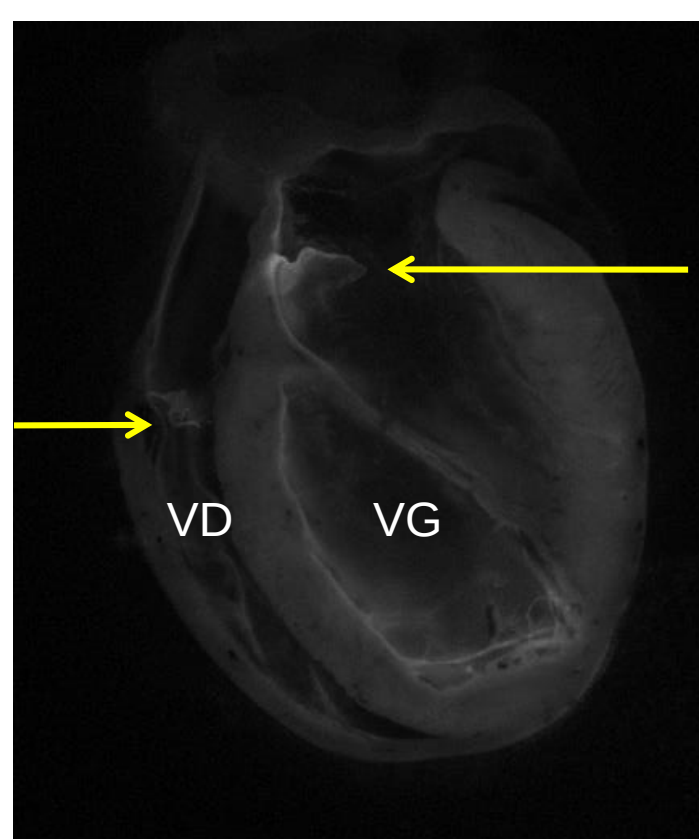
(a)



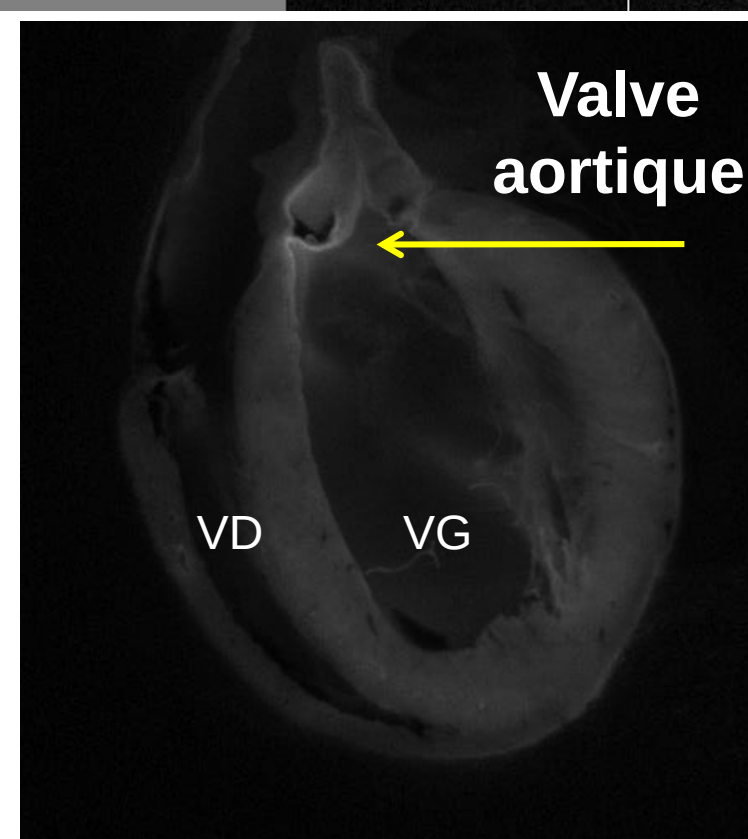
(b)



(c)



(d)

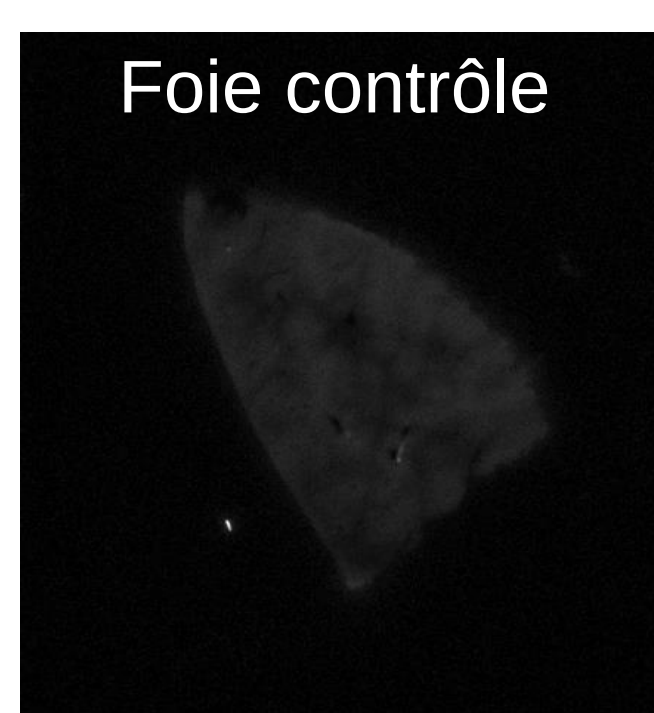


VD = Ventricule droit
VG = Ventricule gauche

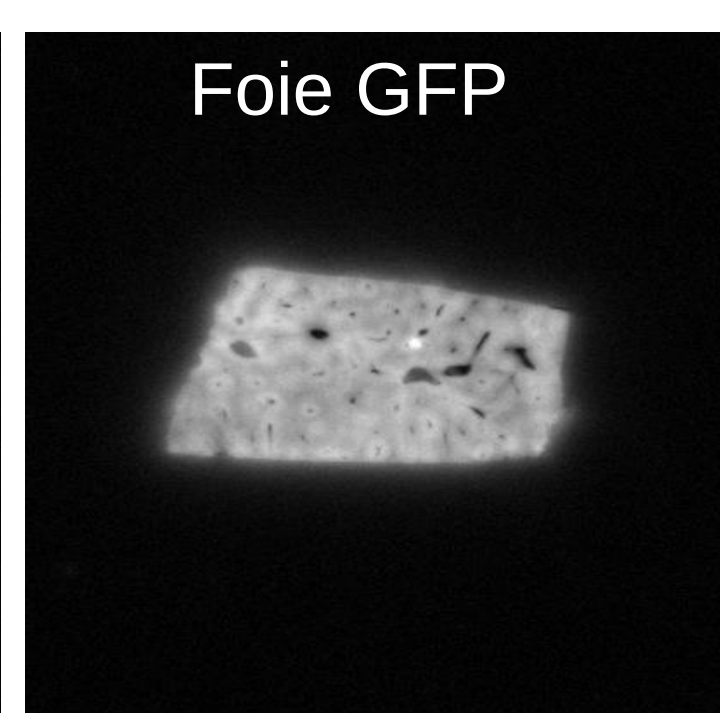
Figure 1 : (a) Reconstruction 3D à partir des 350 coupes effectuées (800 ms d'exposition) (b) Plans orthogonaux du cœur reconstruit (c) et (d) Visualisation des zones d'intérêt.

Reconstruction 3D d'échantillons congelés GFP+

(a)

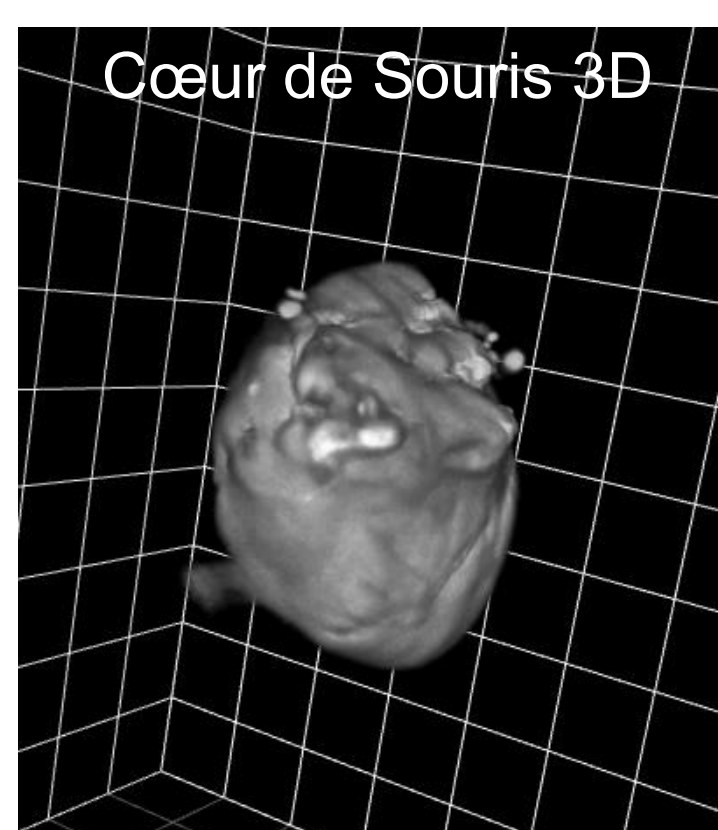


Foie GFP



Détection aussi bien de l'autofluorescence que la fluorescence spécifique de la GFP

(b)



(c)

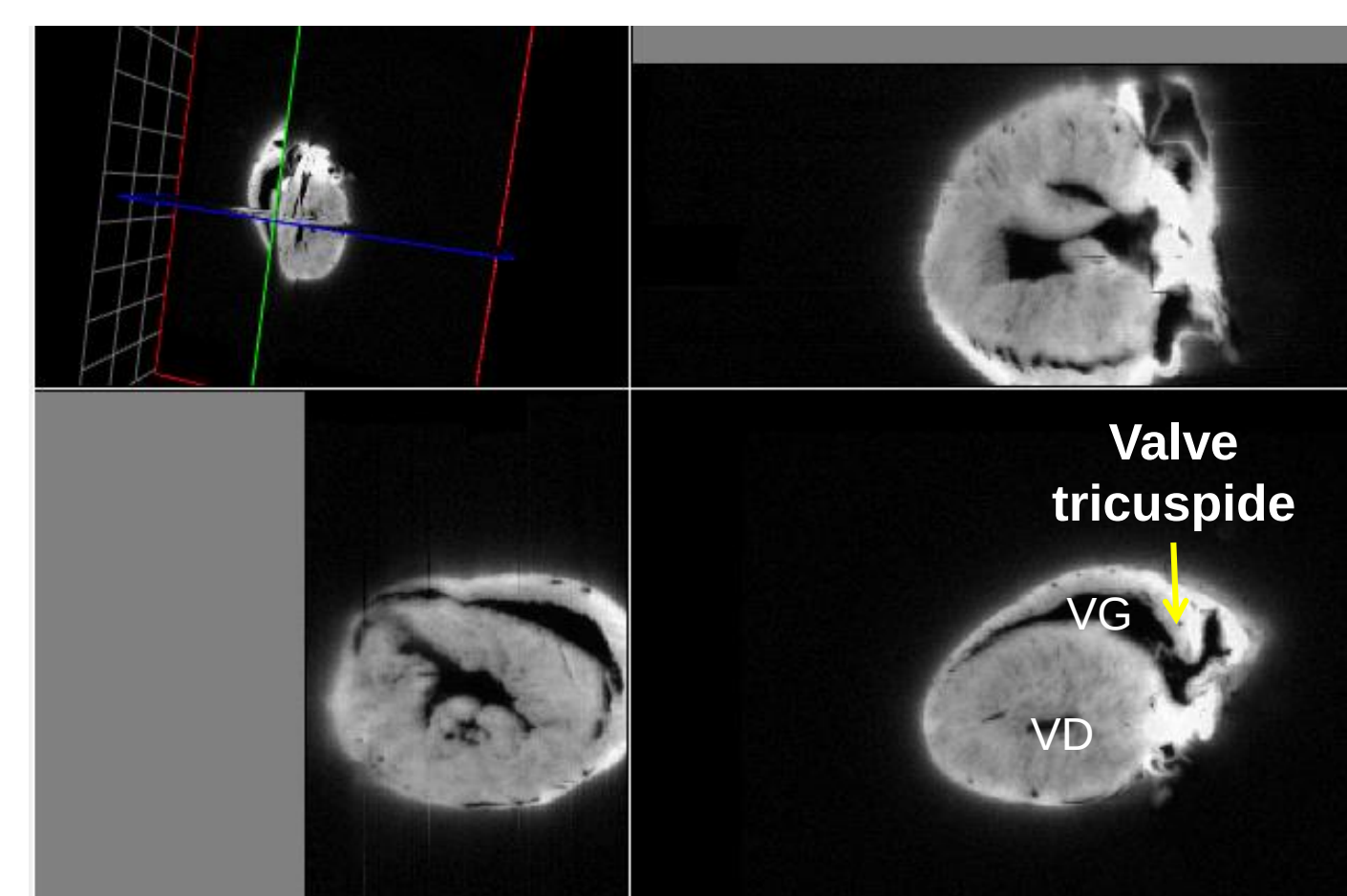


Figure 2 : (a) Comparaison entre un foie contrôle et un foie GFP + (374 ms d'exposition) (b) Reconstruction 3D du cœur de souris GFP + à partir des 261 coupes (520 ms d'exposition) (c) Plans orthogonaux du cœur reconstruit.

Conclusion et Perspectives

→ Par rapport aux systèmes d'HREM commerciaux, cette technique demande une préparation plus simple et moins onéreuse des échantillons. De plus, ce système est modulable, peu encombrant et adaptable aussi bien pour des échantillons inclus en paraffine qu'en congelé. Cette technique nous a permis de faire une reconstruction simplifiée qui conserve les structures de l'échantillon. Les structures demeurent mieux conservées en paraffine qu'en congelé. En congelé, nous avons montré la possibilité de travailler avec des marquages fluorescents type GFP.

→ En perspectives, nous travaillons à automatiser ce système (prise d'images et coupe). Il sera également nécessaire de tester d'autres échantillons (cerveau, œil...). En ajoutant une deuxième source laser en excitation (647 nm), cela nous permettrait de visualiser des marquages dans le rouge lointain pour les échantillons congelés, afin de les distinguer de l'autofluorescence du tissu. Enfin, nous travaillons à un système pour récupérer les coupes et faire des colorations et immunomarquages sur les zones d'intérêts.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'équipe 1 de l'Institut du Thorax (UMR 1087) et Malo Daniel (CRTI-UMR1064) pour l'expertise scientifique et les échantillons utilisés dans cette étude.