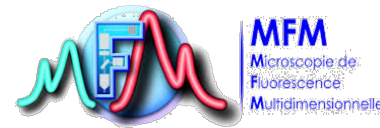


Transparisation et Imagerie des échantillons épais

Groupe de Travail du RTmFm



Assises du RTmFm - 2021

Romina D'Angelo – Matthieu Simion

Inserm - Toulouse

Tefor - Paris Saclay

It is made available under a [CC-BY-ND 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Qui sommes nous

Laurence Dubreil (APEX UMR703 – Nantes)

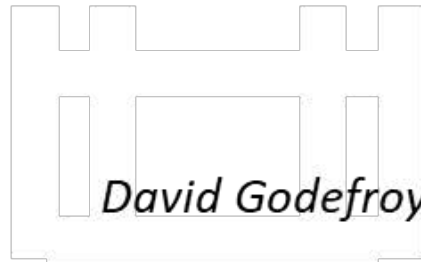


Geneviève Conéjéro (MRI-Montpellier)

Jeremie Teillon (BIC-Bordeaux)



Matthieu Simion (TEFOR – Paris-Saclay)



David Godefroy (DC2N-Rouen)



François Michel (InMAGIC-Marseille)

*Romina D'Angelo (TRI -Toulouse)
(coordinatrice du groupe)*





Journée de Travail Présentiel ☺

15 octobre 2021 _ Paris Saclay

Réunions Régulières

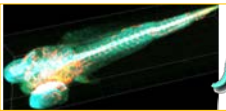
2020 : 3 visio + hybride sept.

2021 : 4 visio + Journée Présentiel

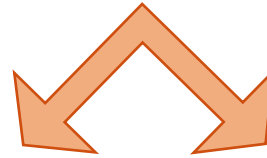
Prévues 2022 : 1 présentiel + 3 minimum en visio

Budgets

2021 : 3000€ – alloués / 2800€ (?) dépensés



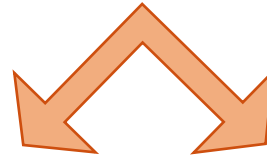
Objectif -> assurer aux utilisateurs les meilleures images possibles



Fonctionnement
optimal des
microscopes =
métrologie

Echantillons de bonne
qualité
+
Conseil dans le choix
du microscope le plus
adapté

Objectif -> assurer aux utilisateurs les meilleures images possibles

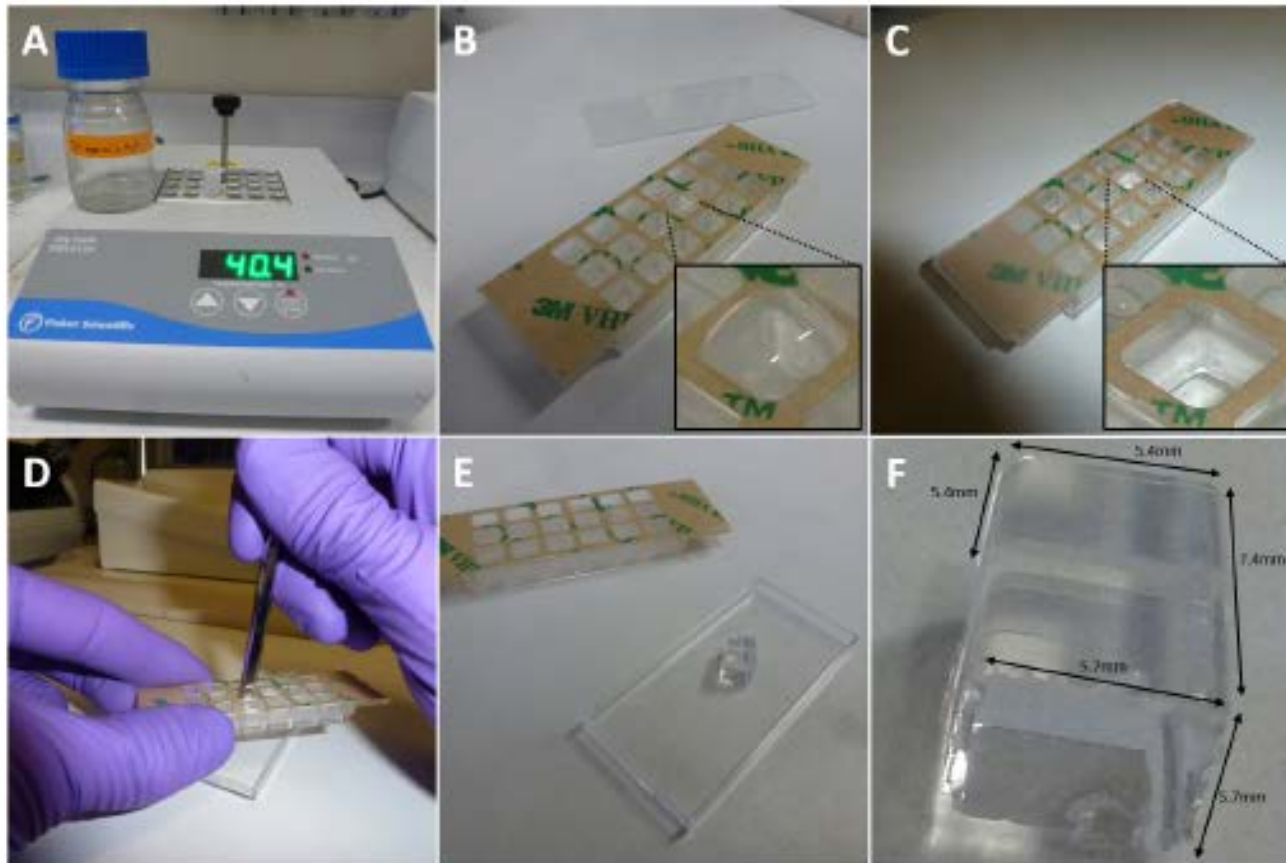


Fonctionnement
optimal des
microscopes =
métrologie

-> métrologie pour
light-sheet

-> éventuels effets des milieux d'immersion
sur résolution sur tous les systèmes

Réalisation d'un outil de métrologie pour la transparensation

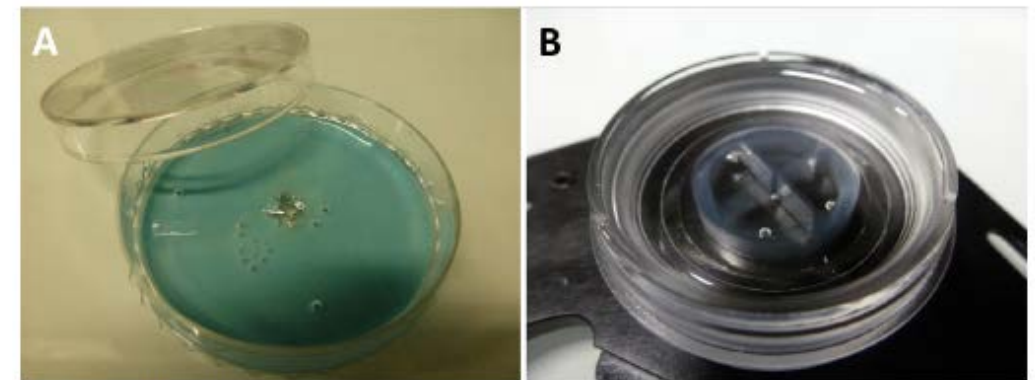


Réflexion et préparation du protocole unique

Choix et achats de 2 types de billes adaptées :

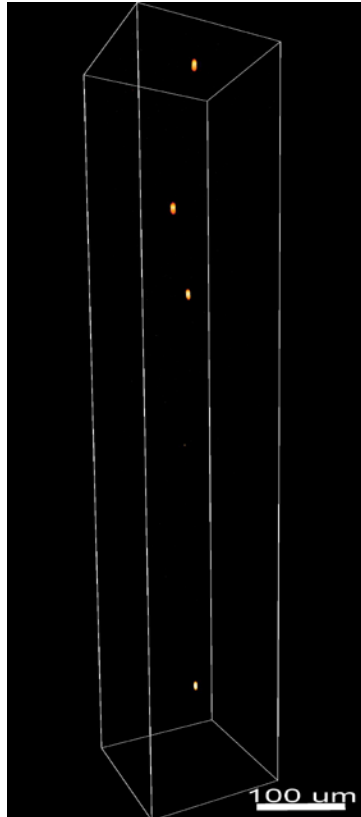
- TetraSpeck™ Microspheres, 4.0 μm , fluorescent blue/green/orange/dark red(ThermoFisher Scientific, cat.no T7283)

-DiagNano™ Green Fluorescent Silica Particles, 1 μm (Creative Diagnostics, cat.no DNG-L028)



Réalisation d'un outil de métrologie pour la transparensation

LEICA SP5-MP à 800 nm (Bordeaux)



Z= 10 µm



500 µm



1200 µm

Mise en place du protocole unique

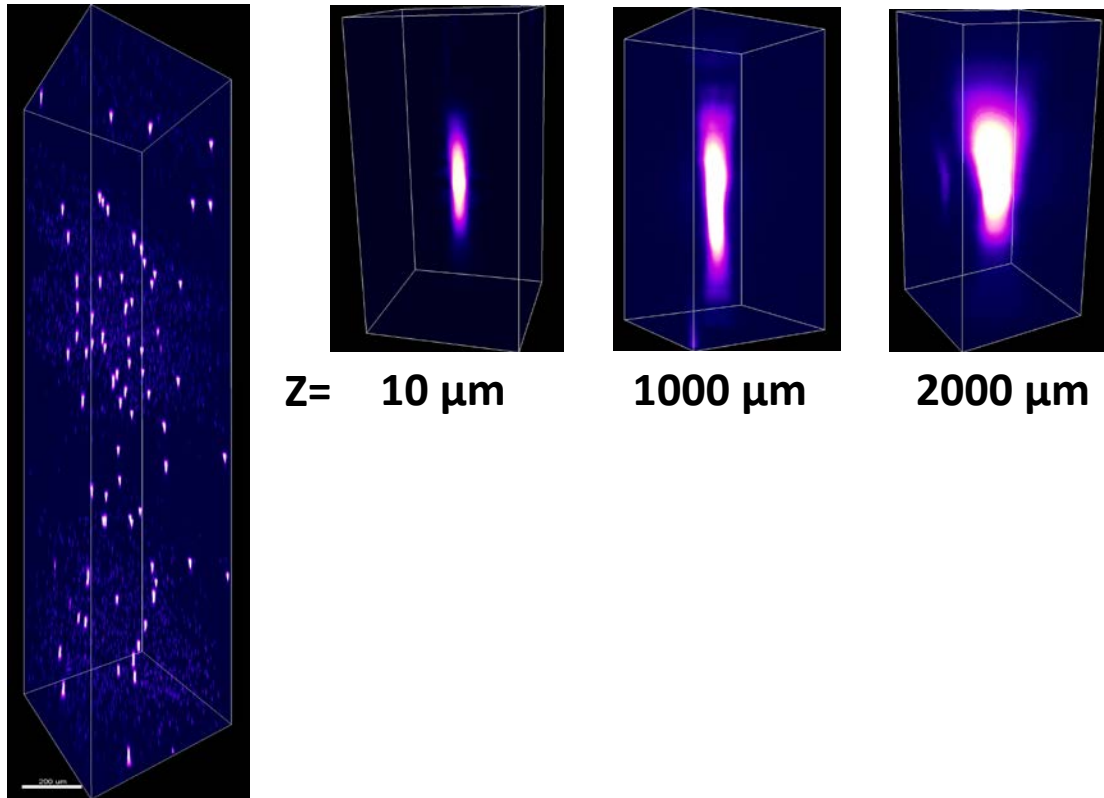
Distribution de l'outil en doublons à tous les membres

Acquisitions multicentriques du même outil sur 4 systèmes :

1. Confocal (Toulouse, Marseille, Paris)
2. Bi-photon (Montpellier, Nantes, Bordeaux)
3. Feuille de lumière (Montpellier, Marseille, Bordeaux, Rouen)
4. Spinning disk (en cours de recrutement)

Réalisation d'un outil de métrologie pour la transparensation

Ultramicroscope II



Mise en place du protocole unique

Distribution de l'outil en doublons à tous les membres

Acquisitions multicentriques du même outil sur 4 systèmes :

1. Confocal (Toulouse, Marseille, Paris)
2. Bi-photon (Montpellier, Nantes, Bordeaux)
3. Feuille de lumière (Montpellier, Marseille, Bordeaux, Rouen)
4. Spinning disk (en cours de recrutement)

Réalisation d'un outil de métrologie pour la transparisation

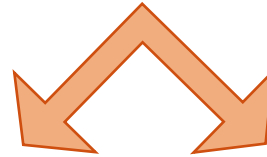
Actions en cours

Fabrication du cube d'agarose sur chacune des plateformes

Immersion du cube dans la solution de transparisation choisie (CUBIC) et acquisition sur tous les systèmes

-> besoin conseils : appel au groupe métrologie

Objectif -> assurer aux utilisateurs les meilleures images possibles



Echantillons de bonne
qualité
+
Guide dans le choix du
microscope le plus
adapté

Comparaison des systèmes d'acquisition et reproductibilité des données



Acquisition d'un même échantillon sur différents systèmes en doublon

Tests préliminaires sur zébra

Actions à venir_Projet sur 4 ans

Préparations des 2 échantillons biologiques (larvae zebra + cerveau)

Acquisitions sur tous les systèmes des échantillons biologiques

Edition d'un guide référentiel & mise à jour du kit

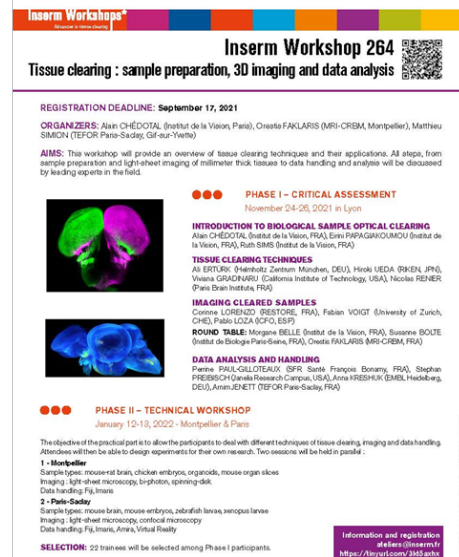
Training Sessions_Bilan

Inserm Workshop 264

November 24-26th 2021 – Phase I - Lyon

January 12-13th 2022 - practical workshops

Paris-Saclay & Montpellier



Inserm Workshop 264
Tissue clearing : sample preparation, 3D imaging and data analysis

REGISTRATION DEADLINE: September 17, 2021

ORGANIZERS: Alan CHÉDOTAL (Institut de la Vision, Paris), Oreste FAKLARI (MIR-CRBM, Montpellier), Matthieu SIMON (TEFOR Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette)

AIMS: This workshop will provide an overview of tissue clearing techniques and their applications. All steps, from sample preparation and light-sheet imaging of millimeter thick tissues to data handling and analysis will be discussed by leading experts in the field.

PHASE I – CRITICAL ASSESSMENT
November 24-26, 2021 in Lyon

INTRODUCTION TO BIOLOGICAL SAMPLE OPTICAL CLEARING
Alan CHÉDOTAL (Institut de la Vision, Paris), Emmanuelle PAPAVERA (Institut de la Vision, Paris), Ruth SIMS (Institut de la Vision, Paris)

TISSUE CLEARING TECHNIQUES
As ERTURK (Helmholtz Zentrum München, DEU), Hideo UEDA (RIKEN, JPN), Vincent GRACIARU (California Institute of Technology, USA), Nicolas REIMER (Paris Brain Institute, FRA)

IMAGING CLEARED SAMPLES
Corinne LOIREAU (Brestone, FRA), Fabien VOIGT (University of Zurich, CHE), Pablo LOZA (ICFO, ESP)

ROUND TABLE Morgane BELLE (Institut de la Vision, Paris), Suzanne BOUTE (Institut de Biologie Paris-Saclay, FRA), Christa FAULSTICH (MIR-CRBM, FRA)

DATA ANALYSIS AND HANDLING
Pierre PAUL-GILLOTEAU (SFR, Saint François Bonamy, FRA), Stephen PRESSON (Genentech Research Campus, USA), Anne FRESHER (EMBL Heidelberg, DEU), Anne-JENET (TEFOR Paris-Saclay, FRA)

PHASE II – TECHNICAL WORKSHOP
January 12-13, 2022 - Montpellier & Paris

The objective of the practical part is to allow the participants to deal with different techniques of tissue clearing, imaging and data handling. Attendees will then be able to design experiments for their own research. Two sessions will be held in parallel:

1 - Montpellier
Sample types: mouse brain, chicken embryos, organoids, mouse organ slices
Imaging: light-sheet microscopy, bi-photon, spinning-disk
Data handling: Fiji, Image

2 - Paris-Saclay
Sample types: mouse brain, mouse embryos, zebrafish larvae, serous larvae
Imaging: light-sheet microscopy, confocal microscopy
Data handling: Fiji, Image, Arivis, Virtual Reality

SELECTION: 22 trainees will be selected among Phase I participants.

Information and registration: <https://inserm.fr/264>

Ateliers Inserm 264, nov. 2021 – Cours Théoriques

N° Participants : >70

Provenance / statuts: chercheurs et ITA, 50% débutants

Retours questionnaires satisfaction : besoin de reprendre les bases, frustration sur le distanciel de certains orateurs.

Animation d'un atelier sur la transparenisation à MiFoBio (2021)

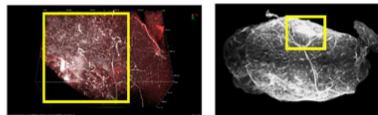
Atelier A039 : Imagerie 3D de la vascularisation par feuille de lumière pour évaluer l'évolution d'une pathologie et/ou l'efficacité d'un traitement

François Michel, InMagic INMed Marseille
Laurence Dubreil, APEX UMR703 PAnTher Nantes

❖ Imagerie 3D de la vascularisation du gliome et du muscle squelettique dystrophique chez le rat

Quelle stratégie de marquage, de clearing et d'imagerie pour obtenir quelles informations?

Imagerie 3D en microscopie confocale Imagerie 3D en Feuille de Lumière



MiFoBio School



Collaboration Y. Prezado (Institut Curie), Karl Rouger (PAnTher INRAE Oniris)



Ateliers MiFoBio nov. 2021

N° Participants : > 30

Provenance / statuts: ITA & chercheurs

Retours satisfaction du public :

-identification d'un besoin du back to basic

- intérêt sur le spinning disk et la méthode de marquages

vaisseaux sanguins _ Blue Evans



Groupe de Travail
Transparenisation
& imagerie des échantillons épais

Training Sessions_A venir

Inserm Workshop 264

November 24-26th 2021 – Phase I - Lyon

January 12-13th 2022 - practical workshops

Paris-Saclay & Montpellier

Inserm Workshops*

Inserm Workshop 264

Tissue clearing : sample preparation, 3D imaging and data analysis

REGISTRATION DEADLINE: **September 17, 2021**

ORGANIZERS: Alain CHÉDOTAL (Institut de la Vision, Paris), Oreste FAKLARIIS (MIR-CRBM, Montpellier), Matthieu SIMON (TEFOR Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette)

AIMS: This workshop will provide an overview of tissue clearing techniques and their applications. All steps, from sample preparation and light-sheet imaging of millimeter thick tissues to data handling and analysis will be discussed by leading experts in the field.

PHASE I – CRITICAL ASSESSMENT
November 24-26, 2021 in Lyon

INTRODUCTION TO BIOLOGICAL SAMPLE OPTICAL CLEARING
Alain CHÉDOTAL (Institut de la Vision, FRA), Emi PAPAGYIOUMOU (Institut de la Vision, FRA), Ruth SIMS (Institut de la Vision, FRA)

TISSUE CLEARING TECHNIQUES
As ERTURK (Charité - Universitätsmedizin, DEU), Hironaka UEDA (RIKEN, JPN), Nicolas GRACIARU (California Institute of Technology, USA), Nicolas REIMER (Paris Brain Institute, FRA)

IMAGING CLEARED SAMPLES
Corinne LORENZO (BESSTON, FRA), Fabien VOIGT (University of Zurich, CHE), Pablo LOZA (ICFO, ESP)

ROUND TABLE Morgane BELLE (Institut de la Vision, FRA), Suzanne BOUTE (Institut de Biologie Paris-Saclay, FRA), Oreste FAKLARIIS (MIR-CRBM, FRA)

DATA ANALYSIS AND HANDLING
Pierre PAUL-GILLOTEAU (SFR - Santé Française, Bonamy, FRA), Stephan PIESCHON (Carlsberg Research Campus, USA), Anna FRESHER (EMBL Heidelberg, DEU), Annick JENNETT (TEFOR Paris-Saclay, FRA)

PHASE II – TECHNICAL WORKSHOP
January 12-13, 2022 - Montpellier & Paris

The objective of the practical part is to allow the participants to deal with different techniques of tissue clearing, imaging and data handling. Attendees will then be able to design experiments for their own research. Two sessions will be held in parallel:

1 - Montpellier
Sample types: mouse rat brain, chicken embryos, organoids, mouse organ slices
Imaging: light-sheet microscopy, bi-photon, spinning-disk
Data handling: Fiji, Imaris

2 - Paris-Saclay
Sample types: mouse brain, mouse embryos, zebrafish larvae, seropus larvae
Imaging: light-sheet microscopy, confocal microscopy
Data handling: Fiji, Imaris, Arivis, Virtual Reality

SELECTION: 22 trainees will be selected among Phase I participants.

Information and registration
stales@inserm.fr
<https://inserm.fr/264>

Ateliers Inserm 264, Jan 2022 – Cours Pratiques

2 sites : Paris –Saclay & Montpellier MRI

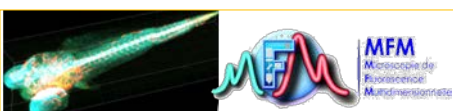
Multi-échantillons et multi-systèmes

N° Participants attendus: 12 + 12

Scénarisation pour vidéos pratiques

Courant 2022

? Informations matériels MITI & sa disponibilités ?



Begginner's kit



Table des matières

Accéder au monde de la transparisation.

Table des matières

A - Prologue	4
B - Accéder au monde de la « transparisation »	6
1-Déshydratation et délipidation par les solvants organiques	6
1-1 - Solvants: 3DISCO et DISCO+	6
2-Hyperhydratation	9
2-1 - CUBIC-1	9
3-Gel embedding + hyperhydratation	14
3-1 - CLARITY	14
4-Simple immersion : RIMs refractive index matching solutions	22
4-1 - TDE	22
4-2- RapiClear	24
C-Et pour les plantes ?	26
1-Protocoles de transparisation pour les plantes :	26
1-1 ClearSee	26
1-2 TDE	27
D-Comment observer les échantillons	29
BIBLIOGRAPHIE	33

En ligne depuis Juin 2019

- ☐ protocoles et astuces utiles
- ☐ matériel nécessaire (+ les ref. produits)
- ☐ avantages et inconvénients
- ☐ références bibliographiques

Bilan

Retours des usagers très positifs sur l'aide apporté

D - Comment observer les échantillons

Objectifs

Pour imager des échantillons « transparisés » beaucoup de solutions d'imagerie sont envisageables. Pour obtenir des images exploitables il est important d'identifier le matériel dont on dispose et de vérifier qu'il répond à certains critères indispensables au type d'échantillons à imager :

- la distance de travail (WD) de l'objectif pour l'épaisseur d'observation
- l'ouverture numérique pour la précision
- la présence d'une bague de correction sur les objectifs pour les adapter à l'indice du milieu d'immersion.
- les supports ne sont pas tous compatibles avec les solvants utilisés.



Comment mesurer l'WD du réseau ?

Pour mesurer l'indice réfractométrique utiliser un Réfractomètre.

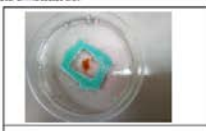


Réfractomètre : Réfracto JGUS (ANETUER TOLEDO), disponible aussi dans la version métrologique mise à disposition par le Groupe de Travail Imagerie du RTTref.

Montages

Le montage est dépendant du type de microscope et du type de système à disposition, souvent ce sont des "hot stages". Nous vous donnons ici quelques exemples :

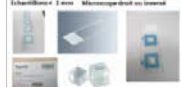
- Ours d'incubation pour le CUBIC (cf. parag.)
- Montage pour un microscope DMi




Immobilisation dans du Silicose

Montage des échantillons

Echantillon + 1 mm Microscopie en lumière



Echantillon + 1 mm Microscopie DMi



Boite de gel

This guide (Jun 2019)* is a tool to help novices on clearing approaches navigate through the multitude of existing protocols and gives several tips for their setting up.
It's an helpful manual, at the moment in French.

*The guide is currently in the process of updating

Ce document est mis à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](#).



Begginner's kit



Table des matières

Accéder au monde de la transparisation.

Table des matières

A - Prologue	4
B - Accéder au monde de la « transparisation »	6
1-Déshydratation et délipidation par les solvants organiques	6
1-1 - Solvants: 3DISCO et DISCO+	6
2-Hyperhydratation	9
2-1 - CUBIC-1	9
3-Gel embedding + hyperhydratation	14
3-1 - CLARITY	14
4-Simple immersion : RIMs refractive index matching solutions	22
4-1 - TDE	22
4-2- RapiClear	24
C-Et pour les plantes ?	26
1-Protocoles de transparisation pour les plantes :	26
1-1 ClearSee	26
1-2 TDE	27
D-Comment observer les échantillons	29
BIBLIOGRAPHIE	33

Pas d'évolution majeur en 2021

Actions prévues :

1. Mise à jour partie méthodologique
2. Meilleure diffusion via le nouveau site
3. Implémentation avec chapitres supplémentaires et vidéos pratiques
4. Edition en bilingue pour le nouveau site internet du RTmFm

D - Comment observer les échantillons

Objectifs

Pour imager des échantillons « transparisés » beaucoup de solutions d'imagerie sont envisageables. Pour obtenir des images exploitables il est important d'identifier le matériel dont on dispose et de vérifier qu'il répond à certains critères indispensables au type d'échantillons à imager :

- la distance de travail (WD) de l'objectif pour l'épaisseur d'observation
- l'ouverture numérique pour la précision
- la présence d'une bague de correction sur les objectifs pour les adapter à l'indice du milieu d'immersion.
- les supports ne sont pas tous compatibles avec les solvants utilisés.



Comment mesurer l'WD du réfectif ?

Pour mesurer l'indice réfractométrique utiliser un Réfractomètre.



Refractomètre : Réfracto JGUS (ANETIER TOLEDO), disponible aussi dans la version métrologique mise à disposition par le Groupe de Travail Métrologie du RTmFm.

Montages

Le montage est dépendant du type de microscopie et du type de système à disposition, souvent on sort de "two major". Nous vous donnons ci-dessous quelques exemples :

- Ours d'incubation pour le Cubic (cf. page 10)
- Montage pour un microscope anti



Immobilisation dans du Silicose

Montage des échantillons

Echantillon + 1 mm Microscopie anti



Echantillon + 1 mm Microscopie anti



Boite de gel

This guide (Jun 2019)* is a tool to help novices on clearing approaches navigate through the multitude of existing protocols and gives several tips for their setting up.
It's an helpful manual, at the moment in French.

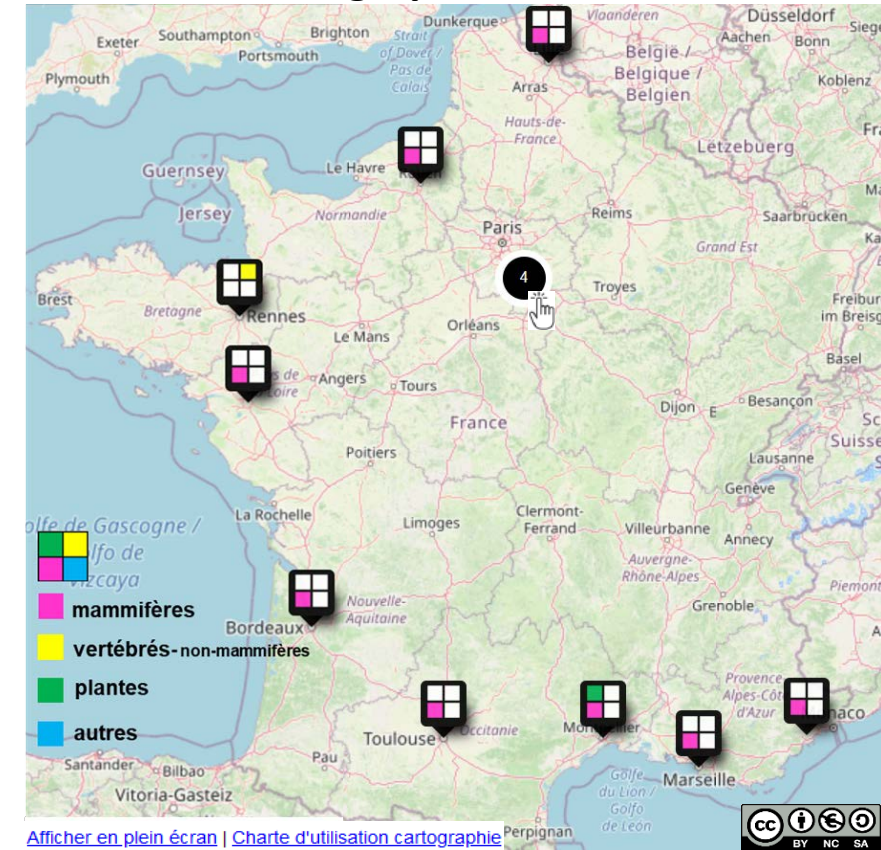
*The guide is currently in the process of updating

Ce document est mis à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](#).




Dissemination and Sharing Tools

Cartographie Interactive

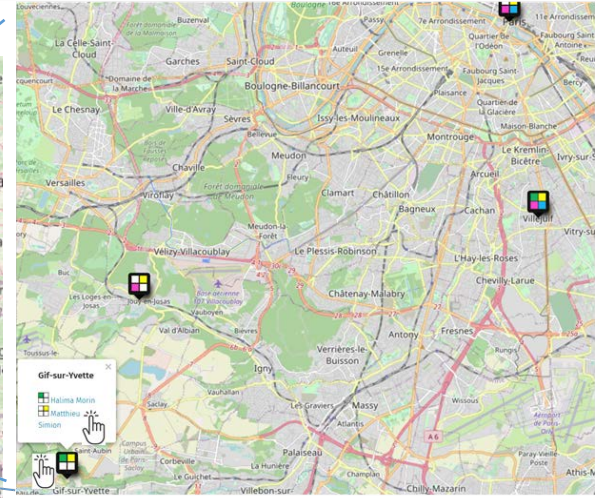
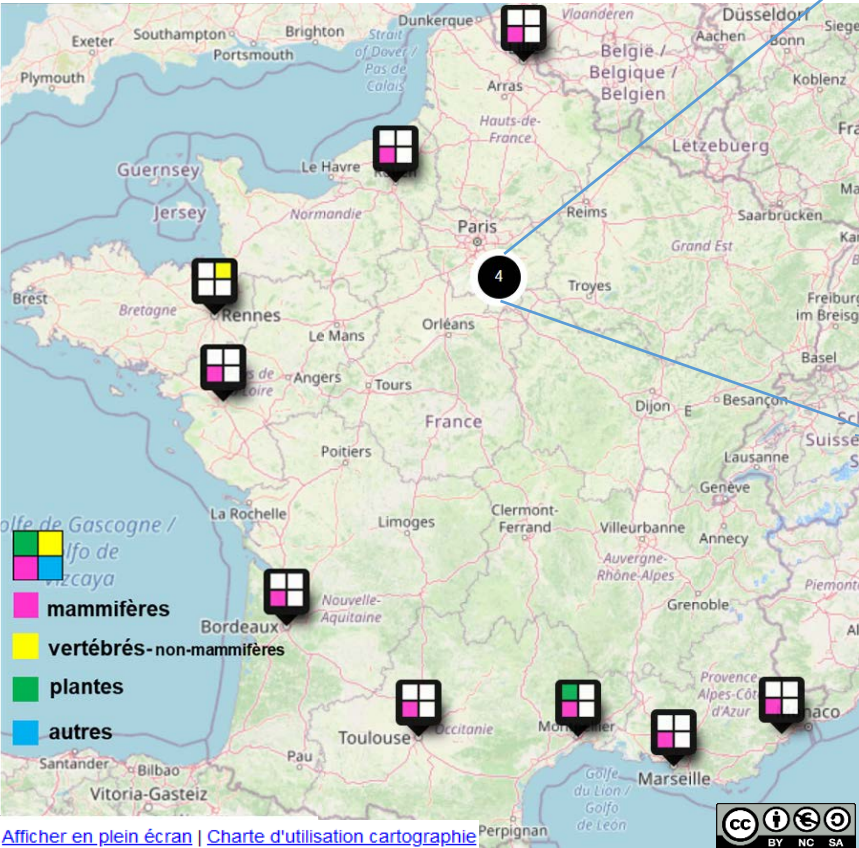


Fonctionnement de la cartographie :

1. Entrée par type échantillons  ou géographique
2. Fiches experts cartographiées

Dissemination and Sharing Tools

Cartographie Interactive





Transparisation
Le Groupe de Travail
à l'Imagerie des échantillons épais

Fiche de contact **Matthieu Simion**, Gf-sur-Yvette, CNRSUMS 2010 TPS

Méthodes utilisées	Passive Clarity, CUBIC-1, CUBIC-1a, CUBIC-L, simple immersion (MD, CUBIC-2).
Types d'échantillon traités	Zebrafishentiers: 5dpf, 6dpf, 7dpf, 15dpf, 21dpf, 28dpf Cerveau disséqué de zebrafish: 21dpf, 6wpf Medaka entier: 10 dpf Cerveau disséqué de Medaka: 1wpf Xenope: stade 45 Coupe de cerveau de souris adulte: 1mm.
Microscopes utilisés	Leica SP8 MP, Zeiss 880 airy-scan, Nikon A1R.
Traitements des images	Rendu volumique, segmentation.
Prestation de service	Oui pour espèces aquatiques.

[Contacter l'expert](#)



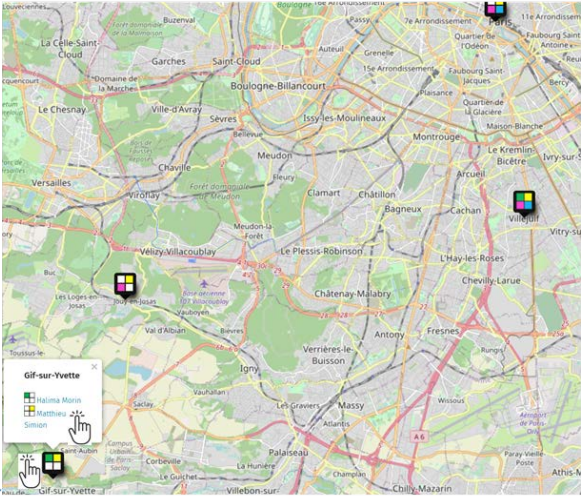
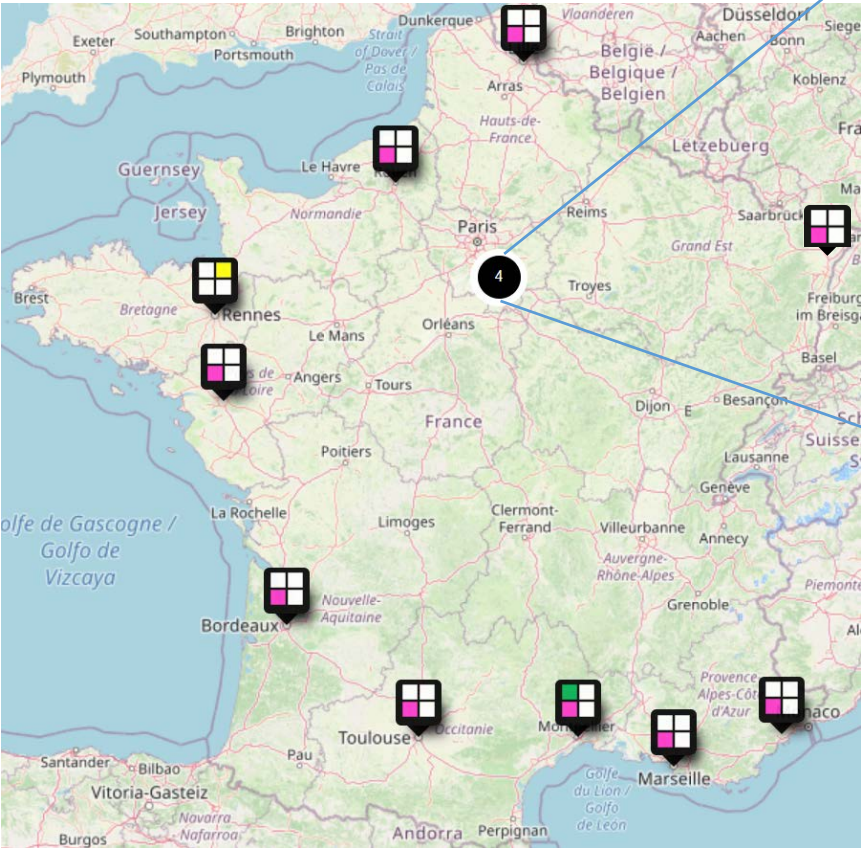
Zebrafish 21dpf traité en CUBIC-1 contre-marqué en DM

Fonctionnement de la cartographie :

- 3. Formulaire de contact envoyé à l'expert
- 4. Tous les autres « experts » seront en cc pour suivi « veille technologique » _ point technique à améliorer

Dissemination and Sharing Tools

Cartographie Interactive



Bilan 2021

Implémentations de 3 nouvelles expertises

- Tours
- Strasbourg

Un outil en mode interactif et évolutif !

Etre personne « contact / relais » : ré-actives,
s'impliquer dans la veille du GT, s'engager réellement
dans les échanges
Cf. Charte

Transparisation Le Groupe de Travail à l'imagerie des échantillons épais	
Fiche de contact Christelle ROSSIGNOL INRAE, UMR 1282 ISP	
Méthodes:	
Types d'échantillons:	
Microscopie:	
Traitements:	
Prestations:	
Transparisation Le Groupe de Travail à l'imagerie des échantillons épais	
Fiche de contact : Yves Lutz, IIGBMC-INSERM U.1258	
Transparisation Le Groupe de Travail à l'imagerie des échantillons épais	
Pierre Hener, Strasbourg, UPR3212 INCI	
Transparisation Le Groupe de Travail à l'imagerie des échantillons épais	
Méthodes utilisées	CUBIC, TDE
Types d'échantillons traités	Cerveau et tranche de cerveau de souris Moelle épinière de souris
Microscopes utilisés	Confocal Leica SP5 objectif 16x NA 0.6 multi-immersion
Traitements des images	
Prestation de service	Non
Contacter l'expert	

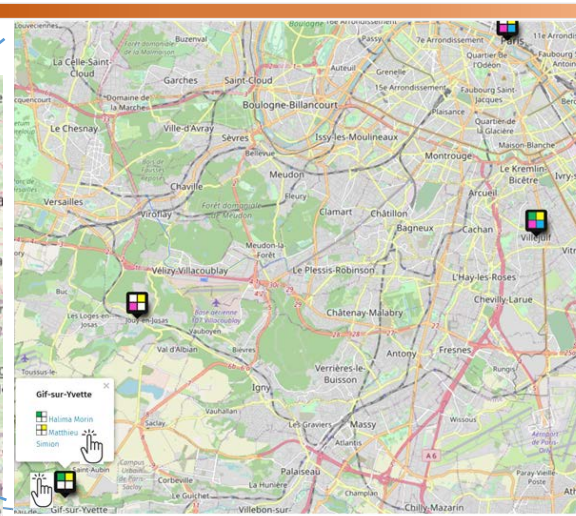


Dissemination and Sharing Tools

Cartographie Interactive

Un outil en mode interactif et évolutif !

Etre personne « contact / relais » : ré-actives,
s'impliquer dans la veille du GT, s'engager réellement
dans les échanges
Cf. Charte



		Groupe de Travail Transparisation <i>la imagerie des échantillons épais</i>	
Méthodes:		Fiche de contact : Christine ROSSIGNOL INRAE, UMR 1282 ISP	
Types d'éc		Fiche de contact : Yves Lutz, IGBMC-INSERM U.1258	
Microscop		Pierre Hener, Strasbourg, UPR3212 INCI	
Traitemen	Méthodes utilisées	CUBIC, TDE	
Prestatior	Types d'échantillon traités	Cerveau et tranche de cerveau de souris Moelle épinière de souris	
ment	Microscopes utilisés	Confocal Leica SP5 objectif 16x NA 0.6 multi-immersion	
	Traitements des images		
	Prestation de service	Non	
		Contacter l'expert	

Bilan 2021

Implémentations de 3 nouvelles expertises

- Tours
- Strasbourg

Actions prévues :

1. Continuer de l'implémenter
2. Mise à jour des fiches expertises
3. Refonte et passage sur le nouveau site du RTmFm
4. Meilleure diffusion via le nouveau site



Participation à des animations scientifiques autour de la transparisation & Imagerie 3D:

- Présentation aux 10^{ème} Journée des Microscopistes INRAE/Univ TOURS (oct. 2021)
- Workshop « Imagerie 3D », CRCT Toulouse (Juin 2021)
- 2 webinaires sur la feuilles de lumière, INRAE/Univ TOURS (Fév. 2021)

Edition d'un Poster sur les actions et outils du groupe de travail, présenté à :

- MiFoBio
- 10^{ème} Journée des Microscopistes INRAE/Univ TOURS (oct. 2021)
- Atelier Inserm 264
- Assises 2021

Edition & diffusion d'un Flyer

- Distribution à MiFoBio
- Actions 2022: Impression et distribution sur les plateformes des experts de la cartographie



ACTIVITIES

Our working group aims to help the community discover the extraordinary potential of "transparisation" techniques and to make Clearing less "opaque".

We carry out different actions and pay particular attention on subjects and samples transversality (from methodology up to data management; from tissues-organs up to *in toto* organisms including plants).

To establish tutorials ("Beginner's Kit") and "Expert Mapping" shared online.

To promote, with the participation of recognized specialists in the field, thematic days. To inform and discuss about new developments in this field.

To organize Training sessions on the clearing approaches, the use of microscopes and mounting adapted to the type of samples, 3D images processing.

THE GROUP

Geneviève Conejero, Romina D'Angelo, Laurence Dubreil, David Godefroy, François Michel, Matthieu Simon, Jérémie Teillon
Thanks to: Pierre Affaticati, Orestis Faklari, Nicolas Goudin, Thomas Guibert (past members)

CONTACT

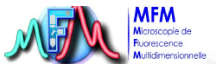
transparisation@groupes.renater.fr
cartographie.transparisation@groupes.renater.fr
<http://trtmfn.cnrs.fr>

Practical Sheets and Tutorials

<http://trtmfn.cnrs.fr/documentation/gt-transparisation/>
<https://experts.tefor.net/transparisation/>

Tutorship

Mission for Transversal and Interdisciplinary Initiatives



Groupe de Travail
Transparisation
la cartographie des échantillons épais

To help you make
"transparisation"
an effective tool

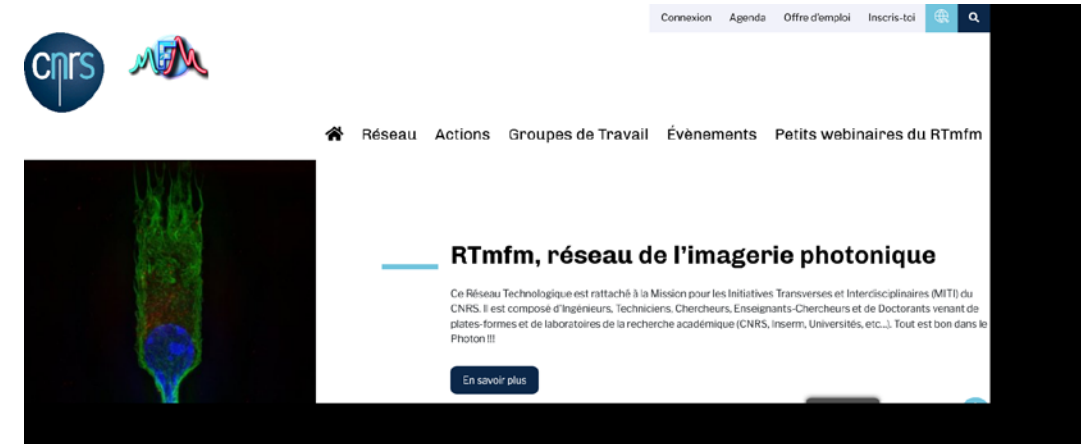


Groupe de Travail
Transparisation
& Imagerie des échantillons épais

Actions 2022

Mise à jour sur le nouveau site du RTmFm

- Groupe de Travail - Accueil
- Téléchargement kit du débutant
- Transfert cartographie + amélioration architecture
- Création pages évènements



CONTACT

transparisation@groupes.renater.fr

cartographie.transparisation@groupes.renater.fr

Practical Sheets and Tutorials

<http://rtmfm.cnrs.fr/documentation/gt-transparisation/>

<https://experts.tefor.net/transparisation/>

<http://rtmfm.cnrs.fr>