



HAL
open science

Analyse morphométrique du cerveau de poisson zèbre : mise en place de procédures d'imagerie et de segmentations rapides

Sylvain Lempereur

► **To cite this version:**

Sylvain Lempereur. Analyse morphométrique du cerveau de poisson zèbre : mise en place de procédures d'imagerie et de segmentations rapides. Bio-informatique [q-bio.QM]. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC2091 . tel-03442655

HAL Id: tel-03442655

<https://theses.hal.science/tel-03442655>

Submitted on 23 Nov 2021

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.



Université Paris Est

Ecole doctorale Mathématiques et Sciences et Technologies de l'Information et de la
Communication

Thèse présentée pour l'obtention du titre de
Docteur en philosophie
spécialité Informatique

ANALYSE MORPHOMÉTRIQUE DU CERVEAU DU POISSON ZÈBRE:
MISE EN PLACE DE PROCÉDURES
D'IMAGERIE ET DE SEGMENTATIONS RAPIDES

par

SYLVAIN LEMPEREUR

soutenue publiquement le 18 décembre 2020 devant le jury composé de:

Directeur de thèse	HUGUES TALBOT	Professeur, Centrale Supélec
Directeur de thèse	JEAN-STÉPHANE JOLY	Directeur de recherche, CNRS/INRAE
Président	LAURENT NAJMAN	Professeur, ESIEE
Rapporteur	NICOLAS DAVID	Professeur assistant, Ecole Polytechnique
Rapporteur	BEATRIZ MARCOTEGUI	Maîtresse de recherche, Mines ParisTech
Examineur	NOÉMIE DE CROZÉ	Ingénieure de recherche, L'Oréal
Examineur	KARIMA KISSA	Chargée de recherche, CNRS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier NOÉMIE DE CROZÉ et KARIMA KISSA qui ont accepté de faire partie de mon jury, ainsi que NICOLAS DAVID et BEATRIZ MARCOTEGUI pour avoir pris le temps de rapporter mon manuscrit de thèse, ainsi que LAURENT NAJAMN d'avoir accepté de présider mon jury.

Je tiens ensuite à remercier mes deux directeurs de thèse. Pour commencer, HUGUES TALBOT. Merci de m'avoir éveillé à l'analyse d'image lorsque tu étais mon professeur, et merci de m'avoir autant donné envie de continuer dans ce domaine. Ensuite, JEAN-STÉPHANE JOLY, qui a eu suffisamment confiance en moi pour m'accueillir dans son équipe pendant toutes ses années, et pour m'avoir tant apporté humainement comme scientifiquement.

Je remercie tous les autres membres de Tefor Paris Saclay, présents comme passés, pour m'avoir soutenu pendant un total de presque 6 ans. En particulier: JOHANNA pour ses conseils, ARNIM pour m'avoir permis de partager mes travaux et PIERRE pour m'avoir apporté la rigueur et le sérieux qui me manquaient, MARIE-ELISE pour m'avoir permis de mieux connaître les conditions d'élevage, FABRICE pour tous ses débats qui m'ont tant apportés, aussi bien personnellement que pour ma thèse et LIONEL, mon petit canard en plastique jaune, pour m'avoir permis de débayer par sa simple écoute.

Je tiens aussi à remercier PATRICK PARRA, pour m'avoir ouvert son atelier et pour m'avoir initié à l'impression 3D.

Enfin, un remerciement vraiment spécial à ELODIE, sans qui aucune image n'aurait été produite pendant cette thèse, et que j'ai si souvent attachée à sa paillasse pour obtenir des échantillons. Je te dois bien une peluche en crochet pour l'essence que tu as dépensé pour moi.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à l'ESIEE. En particulier, parmi la longue liste de doctorants, d'étudiants et de stagiaires, je tiens à remercier CLARA, ELODIE, ODYSSÉE, JULIE, THIBAUT, LAURENT et DIANE. Mais je dois tout particulièrement remercier YANN, qui m'a accompagné dans ses deux structures, et qui m'a souvent été d'une grande aide pendant nos échanges.

Merci à *ma belle-famille, ma famille* et à *mes amis* pour leur soutien indéfectible. J'espère que vous pourrez être à ma soutenance, que je puisse vous donner un aperçu du travail effectué pendant ces quatre dernières années.

En particulier, merci à BARBARA et KÉVIN pour avoir été à mes côtés depuis tant d'années. J'ai souvent cru craquer, et votre présence a souvent été d'un réel réconfort.

Merci à SPOCK, TOTORO, IDOU et MIMI, pour votre douceur.

Un merci tout particulier à ma femme, VIRGINIE, qui m'a constamment supporté dans cette épreuve, malgré les difficultés, les retards et les incertitudes. Ces quatre années ont été chaotiques, mais tu étais le petit coin d'ordre qui me permettait de ne pas perdre pied.

Enfin, je remercie ERNEST. Tu n'es pas là depuis longtemps, mais ta seule présence me force à tenir le cap et à ne pas flancher. Tu as beau m'empêcher de dormir correctement, un simple sourire de ta part me donne suffisamment d'énergie pour tenir 24 heures. J'espère maintenant pouvoir profiter au maximum des futurs moments que l'on va passer ensemble.

MOTS-CLEFS

poisson zèbre, Vision par ordinateur, morphologie mathématique, cribles haut contenu, Toxicologie

RÉSUMÉ

L'observation d'organismes vivants par microscopie est d'un intérêt scientifique indéniable. Le poisson zèbre est un modèle de choix pour tirer le meilleur de ces observations, sa transparence pouvant être améliorée par des méthodes de clarification de tissus. L'objectif de ma thèse a été de développer un ensemble de méthodes permettant la mise au point d'une plateforme d'analyse à haut débit. Toutes les étapes ont été considérées : préparation et montage des échantillons, optimisation des acquisitions, développement de méthodes d'analyse des images 3D. Cette plateforme permet d'observer une centaine d'échantillons alignés par recalage de l'axe interoculaire. La segmentation de l'alevin et d'une partie de son cerveau permet l'analyse volumétrique des différentes structures. La capacité de cette méthode a été testée avec deux projets à portée biomédicale : l'étude de mutants possédant des défauts neurodéveloppementaux et l'effet tératogène de traitements anticancéreux. Nous avons montré que la plateforme permet l'obtention de résultats précis par la volumétrie. Cette plateforme et les résultats associés ont fait l'objet d'une publication. Au cours de ma thèse, je me suis aperçu des limites des méthodes de clarification. J'ai donc développé un algorithme de correction du contraste publié dans un second article. Je suis convaincu que mon travail de thèse va offrir à la communauté poisson zèbre comme à d'autres communautés un nouvel outil permettant d'analyser de nombreux processus biologiques à grande échelle et avec une très forte résolution. Des applications supplémentaires sont discutées dans la partie perspectives de ma thèse.

Morphometric analysis of zebrafish brains: Development of fast imaging and segmentations procedures

KEYWORDS:

zebrafish, computer vision, mathematical morphology, high content screening, toxicology

ABSTRACT

The observation of living organisms by microscopy is of high scientific significance. Zebrafish is a well-adapted model for microscopic observations because of its transparency which can be improved by tissue clearing. The objective of my work was to develop a set of methods to develop a high-throughput platform for zebrafish. All steps are considered: sample preparation and mounting, acquisition optimization and automatic analysis of 3D images. The proposed complete methodology makes it possible to observe in the order of a hundred samples per batch. An alignment was obtained by automatic registration of the images based on the interocular axis. Segmentation of the shape of the embryo and of a part of its brain opens the possibility of volumetric analysis. Precision and versatility of the algorithms were estimated. Capacity of this method to generate original results has been tested with two projects in the biomedical scope: analysis of mutants with neurodevelopmental defects and teratogenic effect of anticancer treatments. We have shown that the platform results in considerably improved precision thanks to volumetric estimations. This platform and the obtained results led to a publication. During my work, I noticed the limits of the clearing methods. I develop a contrast correction algorithm that was published in a second article. In addition, a user-friendly software package was developed. This work will offer the zebrafish and similar communities working on other model species a new tool allowing the analyze of a wide variety of biological processes on a large scale and with high resolution. Additional applications are discussed in the “perspective” part of my work.

LIEUX DE RÉALISATION DE LA THÈSE

Thèse préparée entre

- le Laboratoire d'Informatique Gaspard Monge, UMR 8049. ES-IEE, 2 Boulevard Blaise Pascal, 93160 Noisy-le-Grand
- Tefor paris saclay, UMS 2010. Bât. 32, 1 avenue de la Terrasse 91198 Gif-Sur-Yvette Cedex

PUBLICATIONS

- Stéphanie Bouffard, Emilie Dambroise, Alessandro Brombin, Sylvain Lempereur, Isabelle Hatin, Matthieu Simion, Raphaël Corre, Franck Bourrat, Jean-Stéphane Joly et Françoise Jamen
Fibrillarin is essential for S-phase progression and neuronal differentiation in zebrafish dorsal midbrain and retina.
Dev. Biol. (2018) 437,1-16
- Sylvain Lempereur, Arnim Jenett, Elodie Machado, Ignacio Arganda-Carreras, Matthieu Simion, Pierre Affaticati, Jean-Stéphane Joly et Hugues Talbot
Automated segmentation of thick confocal microscopy 3D images for the measurement of white matter volumes in zebrafish brain.
MMTA (2020) 4,31-45
- Sylvain Lempereur, Matthieu Simion, Elodie Machado, Fabrice Licata, Lilian Buzer, Payel Chatterjee, Noémie De Crozé, Marc Léonard, Pierre Affaticati, Arnim Jenett, Hugues Talbot, Jean-Stéphane Joly
ZeBraInspector, a platform for the automated segmentation and analysis of body and brain volumes in whole 5 dpf zebrafish following simultaneous visualization with identical orientations.
Soumis à *Dev. Biol.*

TABLE DES MATIÈRES

I	INTRODUCTION	1
1	LE POISSON ZÈBRE, UN MODÈLE IDÉAL POUR LES CRIBLES HAUT-CONTENU	3
1.1	Le poisson zèbre, le second modèle le plus utilisé en laboratoire	3
1.1.1	Un modèle compact et fertile	4
1.1.2	De nombreux protocoles expérimentaux sont disponibles chez le poisson zèbre	5
1.1.3	De nombreuses applications en recherche biomédicale	6
1.2	Autres modèles animaux pouvant tirer profit des résultats de ma thèse	7
1.2.1	Le médaka, un modèle complémentaire au poisson zèbre très utilisé en toxicologie	7
1.2.2	Le xénope, un modèle de référence en biologie du développement	9
1.2.3	La souris, un modèle omniprésent en neurosciences	11
1.3	La transparence du poisson zèbre en fait un modèle idéal pour l'imagerie en fluorescence	11
1.3.1	La récente diversification des méthodes de microscopie en fluorescence	11
1.3.2	La microscopie confocale, la méthodologie la plus adaptée au crible haut-contenu	15
1.4	La clarification de tissu, une approche récente permettant l'imagerie d'échantillons épais	16
1.4.1	L'absorbance et la réfraction, les deux limites à la pénétration de la lumière	16
1.4.2	Les quatre étapes de la clarification de tissus	18
1.4.3	Particularités des méthodes par déshydratation et hyperhydratation	20
1.5	Le crible haut-contenu, une approche de choix pour l'étude toxicologique	21
1.5.1	Les cribles haut-contenu nécessitent des expertises multiples	21
1.5.2	Différentes approches de crible haut-contenu utilisent déjà le poisson zèbre	22
2	L'ANALYSE D'IMAGE EST AU CŒUR DES MÉTHODOLOGIES DE CRIBLE HAUT-CONTENU	27
2.1	Présentation de différentes stratégies de segmentation automatique	27
2.1.1	Le seuillage, une approche simple mais insuffisante	27

2.1.2	La morphologie mathématique améliore la précision des segmentations	29
2.1.3	Une approche émergente, la segmentation par réseaux de neurones profonds	32
2.1.4	Le fond peut-il toujours être différencié de l'objet?	35
2.2	L'amélioration de contraste, une méthode indispensable pour compenser la perte d'intensité lumineuse en profondeur	37
2.2.1	L'égalisation d'histogrammes, une approche historique mais limitée	37
2.2.2	Compensation de l'atténuation par la modélisation d'une exponentielle décroissante	40
2.2.3	La multiplication des acquisitions permet de corriger le contraste des images 3D	41
2.3	Enjeux des algorithmes de recalage et segmentation pour l'analyse haut-contenu	44
2.3.1	Le temps d'analyse d'image ne doit pas dépasser celui de l'acquisition	44
2.3.2	Les algorithmes de segmentation pour l'analyse haut-contenu: un compromis entre rapidité et robustesse	45
II ALGORITHMES ET RÉSULTATS		47
3	MÉTHODE 1 : UNIFORMISER LE MONTAGE PERMET DE SIMPLIFIER ET D'ACCÉLÉRER L'ACQUISITION DES ÉCHANTILLONS	49
3.1	L'impression 3D permet de créer rapidement et simplement des solutions de montage peu onéreuses	49
3.2	Plusieurs approches infructueuses ont été développées avant d'utiliser l'impression 3D	52
3.3	L'optimisation des paramètres et des conditions d'impression est nécessaire à des impressions 3D reproductibles	54
4	MÉTHODE 2 : PRÉSENTATION D'UN ENSEMBLE D'ALGORITHMES DE SEGMENTATION, DE RECALAGE ET D'AMÉLIORATION DE CONTRASTE	57
4.1	Le recalage des échantillons peut être réalisé en utilisant les cristallins et la matière blanche	57
4.1.1	Le marqueur lipophile permet la détection de la matière blanche et des cristallins	57
4.1.2	Les segmentations de la matière blanche et des cristallins permet la mise en place d'un recalage rigide	59
4.2	La segmentation de la larve entière doit tenir compte de la déperdition lumineuse, fonction de l'épaisseur de tissu traversé	62

4.2.1	Pourquoi segmenter la larve entière et quelles sont les difficultés?	62
4.2.2	Un algorithme de segmentation pensé pour diminuer les temps de calcul	63
4.3	Un algorithme qui compense la perte lumineuse en profondeur dans l'échantillon nécessite d'avoir segmenté l'échantillon entier	66
4.3.1	Description des hypothèses sous-tendant la logique de l'algorithme	66
4.3.2	Un algorithme compensant la déperdition lumineuse en fonction de l'épaisseur des tissus traversés	67
4.4	La segmentation de la matière blanche, une étape centrale de la plateforme ZBI.	68
4.4.1	Le marqueur lipophile révèle fortement la matière blanche	68
4.4.2	Un algorithme pour isoler le cerveau des autres régions marquées	69
5	ARTICLE 1 : LA FIBRILLARINE EST ESSENTIELLE POUR LA PROGRESSION DE LA PHASE S ET LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE DANS LA RÉTINE ET LA PARTIE DORSALE DU MÉENCÉPHALE DU POISSON ZÈBRE	73
5.1	Présentation de l'article 1	73
5.2	Article 1 publié dans <i>Developmental Biology</i>	75
6	ARTICLE 2 : SEGMENTATIONS AUTOMATIQUES D'IMAGES 3D ACQUISES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE POUR LA MESURE DE LA MATIÈRE BLANCHE DE CERVEAUX DE POISSONS ZÈBRES	93
6.1	Présentation de l'article 2	93
6.2	Article 2 publié dans <i>Mathematical Morphology-Theory and Applications</i>	96
7	ARTICLE 3 : ZEBRAINSPECTOR, UNE PLATEFORME DE CRIBLE À HAUT-CONTENU ET HAUT-DÉBIT D'ORGANISMES ENTIERS PERMETTANT L'ANALYSE VOLUMÉTRIQUE DE LA MATIÈRE BLANCHE CÉRÉBRALE DU POISSON ZÈBRE	113
7.1	Présentation de l'article 3	113
7.2	Article 3 déposé sur BioRxiv	118
8	RÉSULTAT NON PUBLIÉ 1 : SBLC: UN ALGORITHME POUR COMPENSER DES GRADIENTS DE MARQUAGES	169
8.1	La décroissance des marquages suit une loi exponentielle fonction de l'épaisseur des tissus traversés	169
8.2	SBLC corrige les défauts de pénétration des marqueurs selon une stratégie similaire à celle développée pour corriger les défauts de pénétration de la lumière	170
8.3	Cette approche, bien que rapide, n'est pas applicable à tous les marqueurs	171

9	RÉSULTAT NON PUBLIÉ 2 :L'UTILISATION D'UN MARQUEUR PAN-NEURONAL PERMET DE DÉTECTER LA MATIÈRE GRISE AU SEIN DU CERVEAU DU POISSON ZÈBRE	175
9.1	Le marquage anti-HuC pour détecter les défauts de neurogenèse ou compléter l'estimation volumétrique du cerveau	175
9.2	La segmentation de la matière grise est réalisée par ligne de partage des eaux	175
9.3	Cet algorithme est précis, mais très sensible aux défauts de marquage	176
III DISCUSSION - PERSPECTIVES		179
10	ZBI POURRAIT ÊTRE ADAPTÉ À D'AUTRES MARQUEURS ET D'AUTRES ORGANISMES MODÈLES. OPTIMISATIONS FUTURES.	181
10.1	Discussion sur les Perspectives offertes par le pipeline ZBI développé au cours de ma thèse	181
10.2	L'adaptation de ZeBraInspector à d'autres marquages pourraient permettre d'approfondir l'étude du poisson zèbre	182
10.2.1	D'autres marqueurs cérébraux pourraient permettre d'apporter des informations complémentaires	182
10.2.2	L'adaptation de ZeBraInspector à des marqueurs vasculaires permettrait d'utiliser le poisson zèbre pour comprendre la formation de cancers chez l'humain	183
10.3	ZBI pourrait être utilisée pour d'autres organismes modèles	185
10.3.1	L'utilisation de ZBI sur le médaka ne demanderait que peu de modifications	185
10.3.2	L'adaptation de ZBI au xénope nécessiterait la création de nouveaux tampons en plus d'une modification des algorithmes	186
10.3.3	L'adaptation de ZBI à des coupes de cerveaux de souris permettrait l'étude de maladies neurodégénératives	186
10.4	Plusieurs pistes pour accélérer et rendre plus reproductibles les acquisitions	187
10.4.1	L'utilisation de robot-pipeteurs permettrait des expériences d'immuno-histochimie moins chronophages et plus reproductibles	187
10.4.2	Le montage, un enjeu important pour réduire le temps du crible haut-contenu	188
10.4.3	Le présacan des plaques permettrait l'optimisation des acquisitions	191

11 FUTURES AMÉLIORATIONS DES ALGORITHMES DE ZBI ET ÉLARGISSEMENT DU CHAMP DES APPLICATIONS	193
11.1 Vers un recalage plus robuste et des segmentations plus précises et versatiles	193
11.1.1 L'étude de la symétrie du cerveau permettrait d'améliorer la qualité du recalage	193
11.1.2 Vers des segmentations plus rapides et plus pré- cises avec l'apprentissage profond	194
11.1.3 La segmentation d'autres régions d'intéret per- mettrait d'augmenter la versatilité de la plate- forme ZBI	195
11.2 Vers une augmentation de la quantité de mesures four- nies par les segmentations	198
11.2.1 Les segmentations déjà mises en place pourraient fournir plus d'informations concernant la mor- phologie des échantillons	198
11.2.2 La mise en place d'une approche utilisant des recalages élastiques permettrait de connaître les déformations locales du cerveau	199

ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
dpf	jours post-fertilisation (de l'anglais days post fertilization)
EE	Eleuthéroembryon
Fbl	Fibrillarine
HCA	Analyse haut-contenu (de l'anglais high content analysis)
HCS	Crible haut-contenu (de l'anglais high content screening)
hpf	heures post-fertilisation
HTI	Imagerie haut-débit (de l'anglais high throughput imaging)
SBDDCC	segmentation-based depth-dependent contrast correction
SBLC	segmentation-based label compensation
VAST	Vertebrate Automated Screening Technology bioimager
wpf	semaines post-fertilisation (de l'anglais week post fertilisation)
ZBI	ZeBraInspector

Part I

INTRODUCTION

LE POISSON ZÈBRE, UN MODÈLE IDÉAL POUR LES CRIBLES HAUT-CONTENU

1.1 LE POISSON ZÈBRE, LE SECOND MODÈLE LE PLUS UTILISÉ EN LABORATOIRE

Le poisson zèbre est une espèce de poisson d'eau douce originaire d'Asie et très commune au nord de l'Inde (voir [Figure 1](#)). Il appartient à la famille des Cyprinidae, comme la carpe commune.



Figure 1: poisson zèbre adulte.

Ce poisson d'eau douce est un organisme modèle important pour la communauté scientifique.

Il s'agit du second organisme modèle le plus employé. Presque quatre mille publications ont utilisé le mot "zebrafish" en 2019 selon [PubMed](#)(voir [Figure 2](#)).

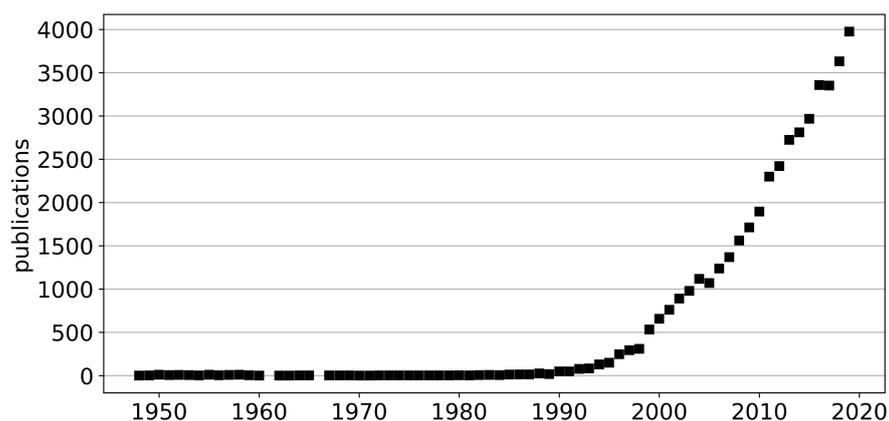


Figure 2: Référencement du terme "zebrafish" au sein de [PubMed](#).

Presque 4000 publications en 2019 sur le poisson zèbre, le second modèle le plus utilisé en laboratoire.

Son utilisation en tant qu'organisme modèle est fréquente pour plusieurs raisons.

1.1.1 *Un modèle compact et fertile*

Le poisson zèbre adulte mesure environ quatre centimètres. Cette petite taille présente plusieurs avantages.

Tout d'abord, il est possible d'élever un grand nombre de poissons dans un espace réduit [11]. Un second avantage de cette petite taille est qu'elle permet de faciliter le transport et les expérimentations avec ce modèle. Il est en effet possible de transporter facilement un grand nombre d'oeufs mais aussi des juvéniles ou des adultes. Cet aspect facilite le partage de lignées mutantes ou transgéniques. La petite taille de cette espèce permet de réduire le coût des expérimentations. Elle permet par exemple d'utiliser moins d'anticorps pour effectuer le marquage immuno-histochimique d'échantillons entiers ou permet de réduire le nombre de champs optiques nécessaires pour la réalisation d'imagerie d'individus entiers. La petite taille permet aussi de manipuler facilement un grand nombre d'échantillons en parallèle [21, 215]. Les pipetages à large échelle sont possibles à des stades précoces, ce qui rend possible l'automatisation de différents traitements [123, 191].

Le poisson zèbre possède une fertilité adaptée aux expériences impliquant un grand nombre d'échantillons. Tout d'abord, la femelle pond les oeufs qui coulent au fond de l'aquarium ce qui permet de les récupérer aisément. Chaque ponte contient entre 100 et 500 oeufs ce qui permet par exemple facilement d'identifier des combinaisons de mutations dans la descendance d'un animal édité. TPS s'est doté de structures d'élevage qui permettent de caractériser près de 200 poissons en parallèle isolés dans une cage unique dans de bonnes conditions de bien-être (Marie-Elise Schwartz, TPS-AQUA, communication personnelle). En permettant d'utiliser un plus grand nombre d'échantillons, la grande quantité d'oeufs obtenus par reproduction permet d'augmenter la significativité statistique des analyses réalisées, ce qui permet de valider des processus biologiques discrets. Enfin, dans des conditions optimales d'élevage, le poisson zèbre devient fertile en environ 3 mois. Cet intervalle entre générations peut être raccourci à 2 mois pour les mâles en utilisant des robots nourrisseurs qui effectuent quatre nourrissages quotidiens, week-end compris.

Le statut légal du poisson zèbre aux stades précoces renforce l'intérêt de son utilisation en laboratoire. En effet, une espèce aquatique élevée en laboratoire rentre dans le cadre de la directive européenne n°2010/63/UE seulement à partir des stades larvaires autotrophes soit environ à 6 jours post-fertilisation (dpf) chez le poisson zèbre. Cette définition permet donc de ne pas considérer les stades de développement du poisson zèbre entre la ponte et 5dpf comme animal de

laboratoire nécessitant une autorisation d'expérimenter. L'alevin vésiculé de poisson zèbre à 5 dpf, aussi appelé eleuthéroembryon (EE), est ainsi largement employé en toxicologie. De plus, à ces stades, les larves de poissons zèbres vivantes présentent une forte transparence (voir [Figure 3](#)), ce qui permet d'imager des structures non périphériques sans réaliser de coupes [[9](#), [30](#), [68](#), [98](#)].

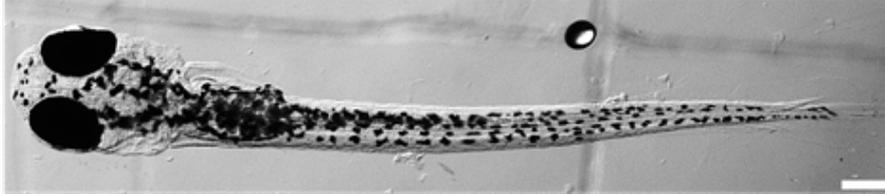


Figure 3: Vue dorsale d'un EE de poisson zèbre.

À des stades de développement précoces, cet organisme modèle est très transparent. Il présente néanmoins des mélanocytes pigmentés qui doivent être rendus transparents par un traitement de dépigmentation.

Malgré tous les avantages présentés ici, l'utilisation du poisson zèbre en laboratoire serait limitée s'il ne possédait pas un grand nombre de ressources dédiées. Nous allons donc maintenant présenter certaines de ces ressources.

1.1.2 *De nombreux protocoles expérimentaux sont disponibles chez le poisson zèbre*

L'utilisation du poisson zèbre comme organisme modèle a pris son essor durant les années 1970 [[106](#)]. En 50 ans, ce modèle a ainsi été largement étudié en laboratoire. En particulier, des études ont rapidement essayé de déterminer les conditions optimales nécessaires à une bonne croissance et une reproduction efficace du poisson zèbre en captivité, dans des conditions de bien-être acceptables [[45](#), [46](#)]. De plus, la présence de longue date de cette espèce au sein des laboratoires a permis la mise en place d'au moins 34 fonds génétiques de référence pour les individus sauvages, permettant d'étudier la diversité des génomes des individus étudiés. Afin d'utiliser au mieux ce modèle, de nombreux outils ont été développés. En particulier, la plupart des techniques permettant la modification de génomes ont été adaptées au poisson zèbre [[10](#), [18](#), [54](#), [89](#)]. Il est ainsi possible de créer facilement différents types de lignées de poissons zèbres génétiquement modifiées, que ce soit pour la création de lignées rapportrices [[21](#), [62](#)] ou pour la création de lignées KO ou KI [[115](#)]. Plusieurs centres de ressources et bases de données ont été créés. Par exemple, le **Zebrafish International Resource center** (ZIRC), situé à Eugene en Oregon, met à disposition de la communauté plus de 43000 lignées. Ce centre de ressources permet ainsi d'assurer une meilleure repro-

ductibilité des études en permettant d'accéder à des poissons ayant un fond génétique déterminé et des insertions ou mutations validées. En plus de ce centre de référence, le **Zebrafish Information Network** (ZFIN) est une base de données centrée sur le poisson zèbre. Cette base de données concentre en un unique site l'ensemble des informations utiles pour effectuer des expérimentations sur le poisson zèbre. Dans ce cadre, un catalogue de protocoles a été mis à disposition pour permettre de faciliter la diffusion des méthodes permettant de travailler avec le poisson zèbre.

Ce modèle est aussi référencé par des institutions gouvernementales pour le développement d'essais toxicologiques. L'OCDE a ainsi émis différents protocoles visant à standardiser son utilisation pour l'étude de la toxicité aiguë pour les embryons [145]. Ces tests peuvent mesurer la toxicité à de courtes expositions durant les stades précoces (embryon et EE) [144] ou bien étudier des stades plus tardifs, et par exemple caractériser les défauts de croissance juvénile suivant l'exposition à des molécules toxiques [142]. La directive REACH de l'Union Européenne, qui vise à réglementer les études des risques liés aux substances chimiques, se concentre particulièrement sur l'étude des perturbateurs endocriniens. Dans ce cadre, une méthode de mise en évidence de l'activité endocrine d'une substance chimique sur des EEs de poisson zèbre est reconnue comme méthode de référence [43].

Il ne fait ainsi pas de doute que poisson zèbre est pertinent pour détecter d'éventuels effets délétères de molécules chimiques sur les poissons des rivières et même les poissons marins. En revanche, du fait de la distance évolutive avec l'homme, les conclusions tirées d'études sur le poisson zèbre ne peuvent constituer que de premiers éléments qui doivent être confirmés par des tests sur d'autres espèces, bien évidemment des mammifères, mais aussi des amphibiens. En cas de caractérisation d'effets toxiques d'une molécule sur les stades précoces, on peut considérer le poisson zèbre comme un lanceur d'alerte concernant le potentiel tératogénique de cette molécule en particulier. En aucun cas, l'absence d'effet ne peut être une preuve de son innocuité.

1.1.3 *De nombreuses applications en recherche biomédicale*

Le poisson zèbre possède 80% de gènes homologues avec l'humain [81]. Ce taux d'homologie permet d'utiliser le poisson zèbre pour la modélisation d'un certain nombre de maladies humaines. En particulier avec l'apparition des dernières méthodes d'édition du génome permettant d'introduire des mutations ponctuelles par reverse transcription [135, 221], il est possible de modéliser les maladies humaines avec précision, en introduisant chez le poisson zèbre des variations à des positions orthologues de variations pathogènes humaines. Bien entendu, ces modèles, en particulier du fait de leur capacité à effectuer

de la microscopie à haut-contenu et haut-débit contribuent à la compréhension des mécanismes physio-pathologiques, du génotype au phénotype, et à éclairer comment une mutation entraîne des effets cellulaires ciblés et parfois discrets sur le long terme, dans le cadre de l'organisme entier. Ils permettent aussi d'effectuer des études pré-cliniques visant à déterminer des cibles thérapeutiques, voir tester des traitements contre ces maladies [158, 173, 200] en particulier les thérapies innovantes utilisant des cellules souches ou immunitaires, ou des méthodes d'édition du génome. Une grande diversité de maladies sont abordées, car l'EE et les juvéniles possèdent des organes très similaires à l'humain, même s'ils sont de plus petite taille et considérablement simplifiés. On peut par exemple citer les maladies neurodégénératives [55], les anomalies du développement [118, 175] ou les maladies cardiaques [24, 207].

La [Table 1](#) résume les caractéristiques du poisson zèbre ainsi que les avantages que l'on peut en tirer.

CARACTÉRISTIQUES	AVANTAGES
Petite taille	Faible coût d'entretien et d'imagerie
Haute capacité de reproduction	Grande taille d'échantillons permettant une haute puissance statistique capable de détecter des phénomènes biologiques discrets
Développement rapide	Réduction du temps d'expérimentation
Modèle bien établi	Vaste quantité de ressources et de bases de données
Possibilité de création de mutants grâce à une large variété d'outils de modification du génome	Possibilité d'étude d'un gène précis

Table 1: La poisson zèbre présente de nombreux avantages expliquant sa large utilisation dans la communauté scientifique

1.2 AUTRES MODÈLES ANIMAUX POUVANT TIRER PROFIT DES RÉSULTATS DE MA THÈSE

Nous allons maintenant présenter trois espèces par ordre croissant de divergence avec le poisson zèbre: le médaka, le xénope et la souris.

1.2.1 *Le médaka, un modèle complémentaire au poisson zèbre très utilisé en toxicologie*

Le médaka est un poisson téléostéen originaire d'Asie du Sud-Est (voir [Figure 4](#)).

Il est de taille comparable au poisson zèbre et présente une gestation courte et prolifique. Sa capacité à résister au froid, et son dévelop-



Figure 4: Femelle médaka portant une grappe d'oeufs située sous son ventre.

Son développement embryonnaire plus long que le poisson zèbre et sa capacité à résister au froid permet de faciliter l'envoi d'échantillons.

pement embryonnaire, non pas de 48h comme chez le poisson zèbre mais de l'ordre de dix jours, facilite son transport, permettant ainsi par exemple pour une plateforme de facilement distribuer des oeufs à d'autres laboratoires. Plusieurs outils de modification du génome ont été mis en place chez *Oryzias latipes* [7, 99], ce qui permet la création de lignées rapportrices, de lignées knock-out et de lignées knock-in [1, 58, 93, 163, 208]. Enfin, à l'instar du poisson zèbre avant 120 heures post-fertilisation (hpf), le médaka avant 240 hpf n'est pas autotrophe. Les embryons et eleutheroembryons ne sont donc pas dans le périmètre de la directive 2010/63/EU de l'Union Européenne. Ainsi, ces stades ne font pas l'objet de demande d'expérimentation animale avant tout projet étant susceptible d'induire une douleur.

C'est aussi un poisson très résistant, qui possède un génome plus compact que le poisson zèbre et très distant évolutivement de ce dernier (plus de distance qu'entre le poulet et l'homme) et qui a de très bons taux en édition du génome du fait de la possibilité de refroidir l'oeuf. Il possède aussi de nombreuses sous espèces ou espèces soeurs, dont certaines sont marines, ce qui permet de très intéressantes études comparées. On retrouve ainsi les premières publications utilisant *Oryzias latipes* dès 1921 [4]. Son utilisation dans le cadre de publications scientifiques reste assez faible, avec en moyenne deux cents publications annuelles référencées par PubMed (voir Figure 5). Mais il est par exemple utilisé dans l'étude du système reproducteur [58, 75] ou en toxicologie [16, 29, 33, 161]. En particulier, son utilisation dans l'étude des perturbateurs endocriniens a été l'objet d'un protocole de l'OCDE [143], en faisant un organisme de choix dans l'étude de l'activité endocrine d'une molécule [31, 38, 181].

Les premières utilisations du médaka dans le cadre de crible haut-contenu sont référencées dès les années 1980 [27, 71]. Cependant, il s'agit d'un organisme rarement référencé pour le crible haut-contenu par imagerie [59, 61].

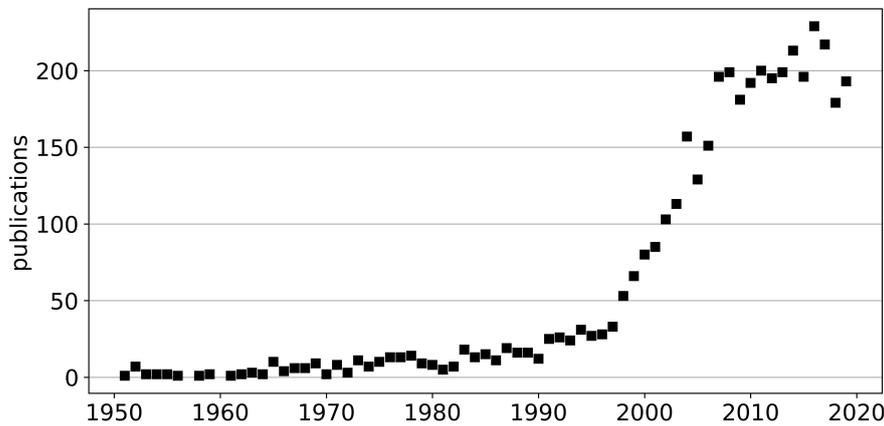


Figure 5: Référencement du terme "medaka" au sein de PubMed.

Le médaka est un modèle complémentaire au poisson zèbre, surtout utilisé en toxicologie. La communauté de chercheurs travaillant sur le médaka reste de taille beaucoup plus restreinte que celle travaillant sur le poisson zèbre.

Il est pourtant possible d'utiliser un système d'imagerie développé sur le poisson zèbre en effectuant peu de modifications pour le faire fonctionner sur le médaka.

1.2.2 *Le xénope, un modèle de référence en biologie du développement*

Xenopus laevis est une espèce d'amphibiens originaire d'Afrique australe (voir Figure 6). Bien qu'une femelle ne puisse être stimulée pour la reproduction que tous les trois mois, sa capacité à produire jusqu'à 4000 oeufs par ponte permet d'avoir rapidement un grand nombre d'échantillons. Elle est en particulier connue du grand public pour être la base d'un des premiers procédés de détection de grossesse chez l'humain dans les années 1950 [40, 78, 160] et pour avoir servi de modèle pour le clonage, ce qui a été récemment récompensé en incluant aux côtés d'autres chercheurs JOHN GURDON dans un prix Nobel attribué au clonage.

Il s'agit donc d'un organisme modèle établi de très longue date dans la communauté scientifique. Les premières publications scientifiques l'utilisant date de 1930 [47], et plus de 1000 publications y faisaient référence en 2000. Son utilisation est cependant en baisse depuis 2010. (voir Figure 7).

Le xénope est un modèle d'intérêt pour plusieurs domaines. Il s'agit par exemple d'un modèle de référence dans l'étude du système visuel [95, 164, 202], en particulier grâce à sa capacité de régénération de la lentille de l'oeil après ablation de cette lentille [74]. Le passage de l'état de têtard à l'état juvénile, appelé métamorphose, est contrôlé chez *Xenopus laevis* par des hormones thyroïdiennes [23, 57]. Cette particularité rend ce modèle particulièrement intéressant dans l'étude



Figure 6: Xénopes adultes.

C'est un modèle utilisé de longue date en embryologie. Ses ovocytes sont aussi utilisés pour exprimer des protéines. De plus, sa métamorphose étant contrôlée par des hormones thyroïdiennes, il s'agit d'un modèle de choix pour l'étude des perturbateurs endocriniens.

Photographie prise par David J. Stang et mise à disposition sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International

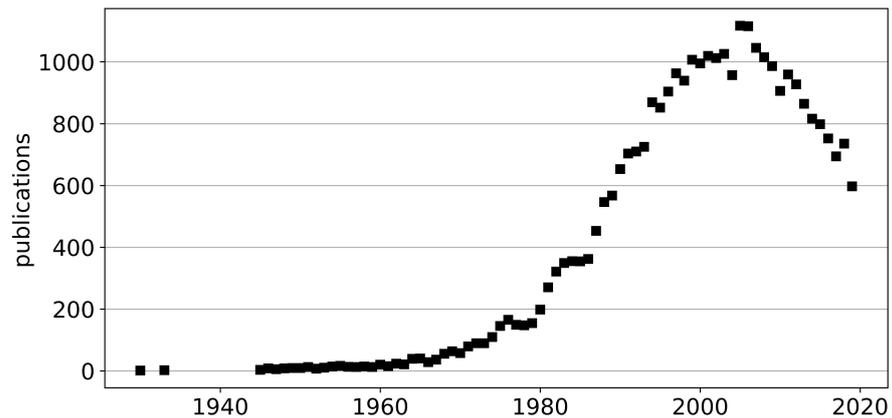


Figure 7: Référencement des termes "xenopus laevis" au sein de PubMed.

Le xénope est un modèle historiquement très utilisé qui reste encore important pour la communauté scientifique même si le nombre de publications est en baisse.

des perturbateurs thyroïdiens [34, 112, 113]. Enfin, *Xenopus laevis* ne développe que peu de cancers spontanés [170] mais il est possible d'induire la formation de tumeurs. Ces caractéristiques en font un modèle de choix aussi bien dans l'étude de la réponse immunitaire anti-tumorale que dans le développement des cancers [70]. Ces dernières années, le développement de méthodes de transgénèse chez *Xenopus laevis* [190] a permis la mise en place rapide de lignées rapportrices ou de lignées permettant l'étude de mutations responsables de maladies humaines.

1.2.3 *La souris, un modèle omniprésent en neuroscience*

La souris est l'organisme vertébré le plus étudié en laboratoire. Son utilisation est décrite dès le dix-septième siècle. Plus de 80000 publications référenciaient ce modèle en 2019 (voir [Figure 8](#)).

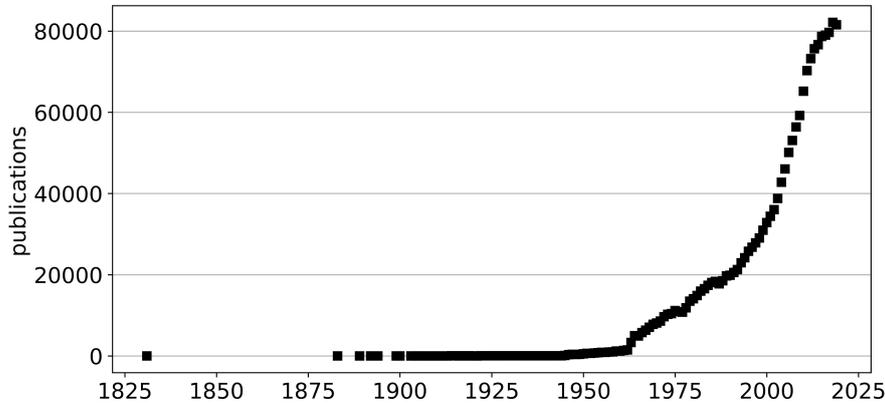


Figure 8: Référencement des termes "mus musculus" au sein de PubMed.

La souris est incontestablement le modèle le plus utilisé par les chercheurs.

Les outils permettant la modification de son génome sont largement développés [107]. Il est donc possible de modifier le génome de souris pour pouvoir utiliser ce modèle comme outil d'étude de pathologie humaine. Par exemple, la souris est régulièrement utilisée pour étudier diverses maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer [69, 177, 193], la sclérose latérale amyotrophique [3, 102, 127] ou la maladie de Huntington [39, 42, 156].

1.3 LA TRANSPARENCE DU POISSON ZÈBRE EN FAIT UN MODÈLE IDÉAL POUR L'IMAGERIE EN FLUORESCENCE

Afin d'être par exemple en mesure de détecter les déformations induites par l'exposition d'un poisson zèbre à un polluant, ou d'analyser le patron de fluorescence d'une lignée rapportrice, il est nécessaire d'adapter différents systèmes d'imagerie aux poissons zèbre. Nous allons donc présenter différents systèmes d'imageries en fluorescence utilisés chez le poisson zèbre.

1.3.1 *La récente diversification des méthodes de microscopie en fluorescence*

La manière la plus simple d'effectuer une imagerie en fluorescence implique l'épifluorescence. Ceci consiste à émettre un faisceau lumineux par le moyen d'une source lumineuse avec un spectre variant de l'infrarouge jusqu'à l'ultraviolet. La sélection de la longueur d'onde désirée pour l'observation se fait simplement par le choix d'un filtre.

La simplicité, la rapidité et le faible coût de cette approche la rend particulièrement répandue dans les laboratoires, alors qu'elle présente plusieurs limitations. Son défaut principal est sa forte profondeur de champs. Quelque soit la position du plan focal, le détecteur recevra des photons d'autres positions en Z, ce qui limite fortement la résolution de l'image, même si des post-traitements par déconvolution sont effectués.

La microscopie confocale par balayage laser est une des premières méthodes d'imagerie ayant été mise au point pour compenser ce défaut. Brevetée en 1957 (voir Figure 9), la microscopie confocale repose sur l'utilisation d'une source lumineuse laser et d'un iris.

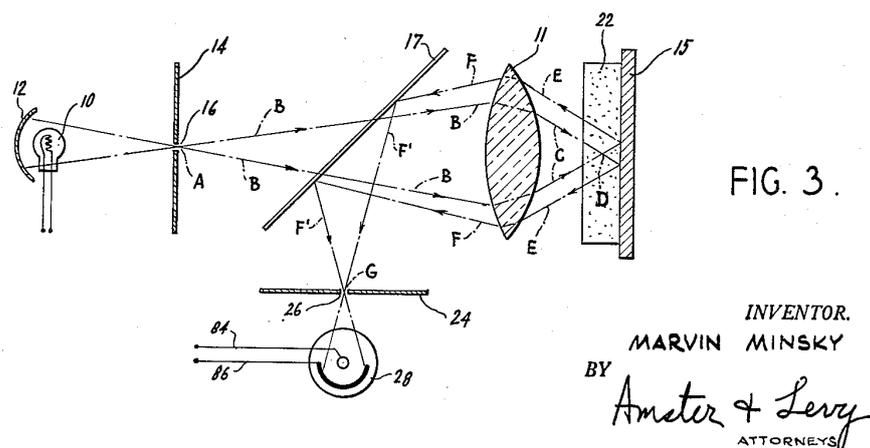


Figure 9: Principe de fonctionnement d'un microscope confocal

Le point principal de cette approche consiste à placer le capteur (28) après un iris (26). Cet iris va empêcher la captation de photons ne se trouvant pas dans le plan focal de la lentille (11), ce qui permet d'obtenir une très faible profondeur de champ.

Schéma issu du brevet de MARVIN MINSKY déposé en 1957.

Placé dans le plan focal conjugué de l'objectif utilisé, cet iris va empêcher les photons ne se trouvant pas dans le plan focal de l'objectif d'atteindre le détecteur. De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal observé retournent au détecteur, ce qui permet d'obtenir une profondeur de champs très faible. Cette dernière sera proportionnelle au diamètre de l'iris. Au minimum, une profondeur de champs d'environ 400nm peut être obtenue. En déplaçant l'objet avec une platine motorisée, il devient alors possible de réaliser des images 3D ayant des résolutions inférieures au micron. La grande précision de cette méthode et la versatilité permise par les méthodes de marquages en ont ainsi fait un outil de choix pour l'étude de phénomènes cellulaires et sub-cellulaires.

Cependant, cette méthode présente deux défauts majeurs. Premièrement, l'énergie nécessaire pour l'illumination de l'objet est importante, ce qui produit un risque de photo-toxicité et de photo-blanchiment. Deuxièmement, l'atténuation lumineuse des faisceaux lasers

utilisés ne permet pas d'étudier des échantillons épais sans clarification préalable.

La microscopie par excitation biphotons améliore la pénétration au sein de l'échantillon. Le concept d'excitation à deux photons est basé sur le fait que pour exciter un électron à un niveau quantique supérieur, plusieurs photons (d'énergie plus basse) peuvent de façon combinée apporter l'énergie nécessaire à l'excitation (voir Figure 10). Chaque photon transporte environ la moitié de l'énergie nécessaire pour exciter la molécule. Cette excitation entraîne l'émission ultérieure d'un photon de fluorescence. Pour que deux photons ayant une forte longueur d'onde et une faible énergie soient en mesure d'exciter un fluorophore, ils doivent être absorbés simultanément. Sans dispositif particulier, la probabilité d'un tel événement est très faible. Par conséquent, un puissant pic de photons d'excitation est généralement requis, ce qui peut être généré par un laser femto-seconde.

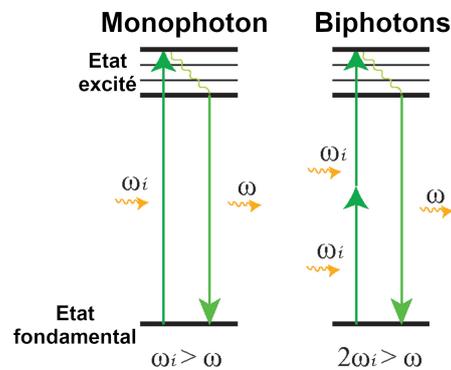


Figure 10: Principe des excitations mono-photon et bi-photon.

Pour exciter une molécule, il est nécessaire que le photon interagissant avec cette molécule ait une énergie supérieure à l'écart d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité. Cependant, si deux photons incapables d'exciter une molécule interagissent simultanément avec la molécule, leurs énergies seront sommées, ce qui peut permettre de fournir assez d'énergie.

Traduit et adapté de Obeidy, Tong et Weninger, Journal of Investigative Dermatology, 2018 [146].

L'utilisation de l'excitation biphotons présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la réduction de l'énergie des photons infra-rouge émis permet de réduire la photo-toxicité et le photo-blanchiment. La lumière infra-rouge pénètre mieux et diffuse moins dans les tissus, ce qui permet d'imager des tissus plus épais (voir Section 1.4.1). Cependant, l'utilisation de laser femto-secondes implique une forte augmentation des coûts d'achat et de maintenance relativement à l'emploi d'un microscope confocal à balayage laser.

Une autre stratégie permettant l'imagerie en fluorescence est l'imagerie par nappe de lumière [204] (voir Figure 11). Cette dernière consiste principalement à rajouter une lentille sphérique dans le trajet du faisceau laser émis, pour générer une fine nappe lumineuse qui va se

former autour du point focal de cette lentille. En plaçant l'échantillon à imager dans le plan focal de la lentille, il est alors possible d'exciter les fluorophores sur une très faible épaisseur. Il suffit alors de placer l'objectif perpendiculairement aux faisceaux émis pour récupérer le résultat de l'excitation des fluorophores au sein de la nappe de lumière.

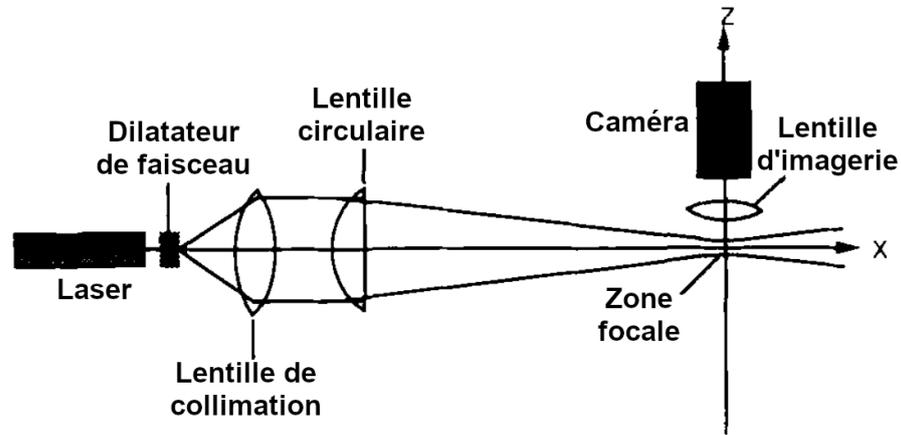


Figure 11: Principe de fonctionnement d'un microscope par nappe de lumière.

Une lentille circulaire permet de créer une nappe de lumière au niveau de la zone focale. En plaçant l'échantillon au sein de cette nappe, il est alors possible de diminuer la quantité de lumière traversant l'échantillon, ce qui réduit la photo-toxicité.

Traduction d'une figure provenant de Voie, Burns et Spelman, *Journal of Microscopy*, 1993 [204].

Cette approche présente plusieurs avantages. En illuminant l'ensemble du plan en une seule fois, il est possible d'acquérir le signal avec une caméra qui a une vitesse d'acquisition supérieure aux scanners qui captent la lumière point par point. Cela réduit considérablement la photo-toxicité et le photo-blanchiment, ce qui est particulièrement avantageux pour les observations *in vivo*. De nombreuses améliorations sont apparues au fil du temps, comme par exemple des feuilles de lumière plus homogènes obtenues grâce à l'emploi de deux sources opposées [84], ou bien l'emploi de deux objectifs. Cependant, l'utilisation de la nappe de lumière limite la pénétration en profondeur dans l'échantillon, ainsi que la taille du champ d'acquisition, ce qui oblige à des acquisitions chevauchantes et des opérations de stitching des images très lourdes. Enfin, cette méthode génère des images de taille considérable (environ 1 To par image), ce qui rallonge les opérations informatiques comme le transfert des données, leur archivage et le traitement des images.

1.3.2 *La microscopie confocale, la méthodologie la plus adaptée au crible haut-contenu*

Deux stratégies permettent de faciliter l'acquisition de poisson zèbre en grand nombre: l'utilisation de cuves contenant les échantillons, ou l'utilisation de capillaires.

Il est possible de faciliter l'acquisition du poisson zèbre par deux approches: Assurer une régularité de placement entre les échantillons, pour pouvoir paramétrer plus facilement le système d'imagerie, et assurer l'orientation des échantillons. La première approche consiste à utiliser des plaques standardisées (par exemple avec 96 puits) qui possèdent des espacements réguliers. Un échantillon est placé dans chaque puits, puis l'ensemble du puits est imagé. Cette stratégie permet des procédures robotisées ce qui multiplie le nombre d'échantillons gérés simultanément. Cependant, cette approche impose d'effectuer des images bien plus grandes que l'objet d'intérêt et une grande partie des images ne contiennent donc pas d'information. Souvent, la grande taille de la zone d'acquisition rend impossible le développement d'imagerie à haute résolution.

La seconde approche implique l'utilisation de moules de montage. On peut soit utiliser des moules permettant de créer des puits dans un gel, puits dans lesquels les échantillons seront insérés [41, 100], soit des moules pour créer des pièges faisant appel à la microfluidique pour contraindre les échantillons [96]. Dans les deux cas, ces solutions permettent d'imposer l'orientation des échantillons. De plus, les systèmes de créations de puits ont été couplés avec l'utilisation de plaques standardisées [215]. Il est ainsi possible de coupler les avantages des deux approches afin de limiter la zone d'imagerie et en ayant des échantillons présentant l'orientation désirée.

Le Vertebrate Automated Screening Technology bioimager [152] (VAST) est la méthode de robotisation d'acquisition d'images de poisson zèbre par capillaire la plus représentée dans la littérature [91, 191]. Il permet d'imager des échantillons entre 2 et 5 dpf (voir Figure 12).

Ce système est un accessoire à associer à un microscope droit ou inversé, que ce soient des microscopes à épifluorescences, des microscopes confocaux ou des microscopes à disque rotatif [44, 65]. Le VAST est un système de pompes et de moteurs permettant d'aspirer des larves de poisson zèbre dans un capillaire, dont une partie en verre est placée sur la platine du microscope. Il est possible de faire tourner le capillaire afin d'assurer l'orientation désirée de l'échantillon. Cet outil permet donc de faciliter l'imagerie du poisson zèbre en assurant la qualité de positionnement des échantillons.

Il est possible de réaliser un chargement manuel des échantillons ou bien d'utiliser un robot de chargement des échantillons permettant de pipeter automatiquement des échantillons qui se trouvent dans une plaque de culture cellulaire (ayant jusqu'à 96 puits). Cepen-

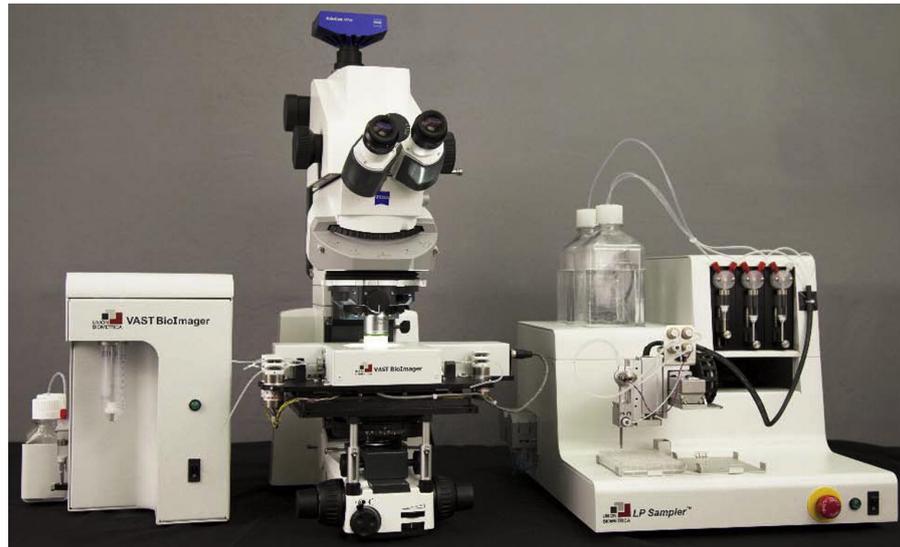


Figure 12: VAST couplé à un microscope Zeiss Axio.

Le VAST est un système d'automatisation d'acquisitions basé sur l'utilisation de capillaires. Les EE de poisson zèbre sont pipetés dans le capillaire. Une partie du capillaire est attachée sur la platine d'un microscope de manière à permettre l'acquisition de l'échantillon. Un moteur permet à cette partie de tourner afin d'orienter les échantillons. La reconnaissance de cette orientation est automatique, ce qui assure à l'utilisateur une orientation optimale de l'acquisition.

Reproduit à partir de Pulack, *Methods*, 2016 [162].

dant, ce système, lourd à mettre en oeuvre, est de plus relativement fragile, et requiert une longue expertise du système pour être fiable. De plus, l'utilisation de capillaires induit des aberrations optiques en dehors du centre du capillaire ce qui empêche l'obtention d'images 3D sans aberration sur les côtés et donc par exemple toute analyse volumétrique. Enfin, l'utilisation de capillaires limite la gamme de diamètres des échantillons, les juvéniles ne pouvant par exemple pas être observés.

1.4 LA CLARIFICATION DE TISSU, UNE APPROCHE RÉCENTE PERMETTANT L'IMAGERIE D'ÉCHANTILLONS ÉPAIS

1.4.1 *L'absorbance et la réfraction, les deux limites à la pénétration de la lumière*

Deux propriétés physiques peuvent limiter la pénétration de la lumière au sein des tissus [174]. La première est l'absorption lumineuse, due à la capacité de certaines molécules à capter les photons qu'elle rencontre. L'absorption induit ainsi une diminution de l'intensité lumineuse proportionnelle à la quantité de milieu traversé, ce qui entraîne la perte partielle ou totale de l'information dans les images

3D. Bien entendu, les pigments en particulier absorbent énormément de lumière. Ainsi, trois molécules sont les principales cibles de la dépigmentation de tissus animaux [8, 154, 174] (voir Figure 13 et Figure 14a). En particulier, pour les longueurs d'ondes inférieures à 600 nm, la mélanine et l'hème de l'hémoglobine. Les fluorophores sont excités par des longueurs d'ondes principalement comprises entre 480 nm et 650 nm, et ré-émettent des photons ayant une longueur d'onde comprise entre 500 nm et 670 nm. Pour les lignées transgéniques, le développement de méthodes de clarification optique doit donc nécessairement comporter une étape permettant en priorité de limiter la présence de ces molécules.

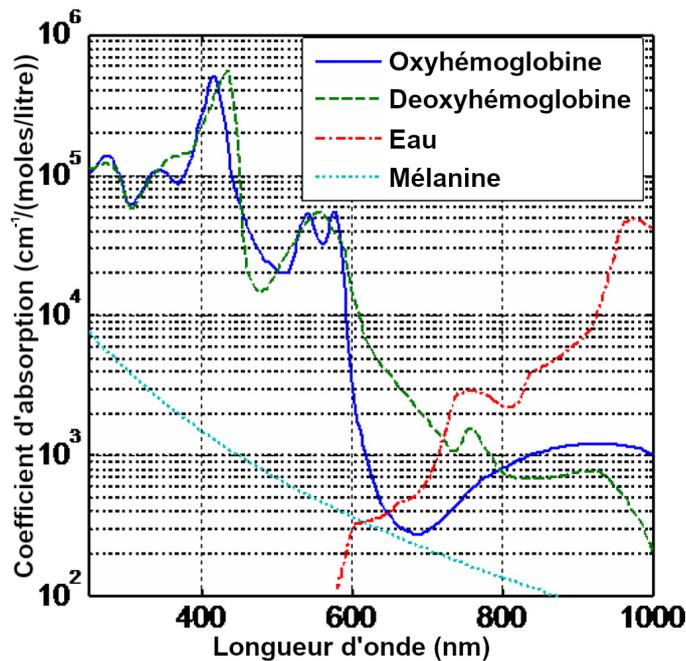


Figure 13: Absorption de l'hémoglobine, de l'eau et de la mélanine en fonction de la longueur d'onde.

Ces molécules sont les cibles principales de la dépigmentation car elles sont les principales causes d'absorption lumineuse au sein des tissus. En particulier, on remarque un pic d'absorption entre 400 et 600nm, ce qui correspond malheureusement aux longueurs d'ondes des fluorochromes utilisés.

Traduction d'une figure provenant de Sandell et Zhu, *Journal of biophotonics*, 2012 [174].

La seconde propriété qui perturbe l'imagerie est la réfraction de la lumière: en passant d'un milieu ayant un indice de réfraction à un autre, un faisceau lumineux va être dévié en fonction de son angle d'incidence. En modifiant le trajet des photons, il est possible que deux photons arrivant au même endroit n'aient pas la même source. Ainsi, la réfraction rend les images floues. De plus, le passage d'un photon d'un milieu à un autre peut être impossible si le milieu d'arrivée dispose d'un indice de réfraction plus bas que le milieu de départ.

En particulier, certains photons ne traverseront pas un tissu efficacement (voir Figure 14b).

Au sein de tissu biologique, la réfraction est due à des hétérogénéités à deux échelles. Au niveau cellulaire, les lipides contenus dans les membranes de la cellule ou du noyau entraînent les changements d'indice de réfraction. Au niveau d'un organe, un type cellulaire peut avoir un indice de réfraction très différent d'un autre, et donc être plus ou moins différent du milieu d'imagerie. Les méthodes de clarification de tissu ont donc en partie pour objectif de diminuer l'importance de ces hétérogénéités (voir Figure 14c).

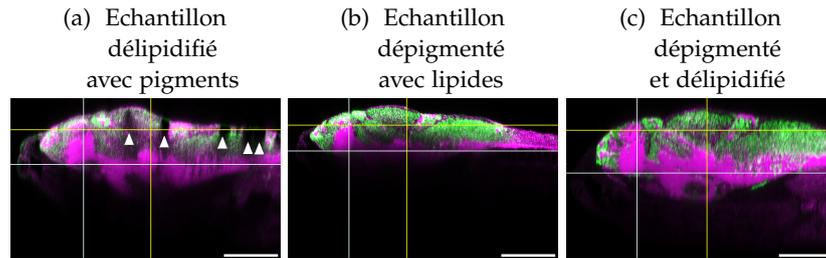


Figure 14: Coupes parasagittales d'EE de poissons zèbres acquises par microscopie confocale après appariement de l'indice de réfraction. (a) Sans dépigmentation, L'absorption lumineuse par la mélanine se trouvant dans les pigments rend l'acquisition impossible sous ces pigments. On voit ainsi des cônes sombres au sein de l'échantillon (têtes de flèche). (b) Sans délipidification, la réfraction au sein des tissus empêche l'acquisition des régions profondes et floute l'acquisition. (c) Coupler la délipidification et la dépigmentation permet d'obtenir une imagerie optimale sur l'ensemble de l'échantillon.

1.4.2 Les quatre étapes de la clarification de tissu

Quatre étapes sont généralement mises en oeuvre [187, 198]: la fixation, la dépigmentation, la délipidification et l'appariement de l'indice de réfraction.

Au sein des tissus, la plupart des protéines n'induisent pas de modifications du trajet de la lumière. En liant les protéines entre elles, il est alors possible de solubiliser les lipides sans risquer de modifier la morphologie des structures. Avant clarification, plusieurs molécules peuvent être utilisées, comme le méthanol et le paraformaldéhyde. Le méthanol dénature les protéines et les précipite, ce qui crée un maillage à partir des protéines se trouvant dans les tissus. Le paraformaldéhyde va former des liaisons covalentes avec les atomes d'azote se trouvant dans les protéines, ce qui permet une fois encore de créer des liens entre les protéines.

La dépigmentation consiste à détruire chimiquement les pigments par l'utilisation de peroxyde d'hydrogène, qui va entraîner une oxy-

dation des protéines, avec deux effets principaux. Le premier est bien sûr de détruire les pigments mélaniques. De plus, en dénaturant les protéines, le peroxyde d'hydrogène va diminuer les interactions entre les protéines et les photons. Les réactions utilisant le peroxyde d'hydrogène sont catalysées par la lumière. Il peut donc être compliqué d'obtenir un traitement adapté car il n'est pas simple de parfaitement maîtriser la lumière environnante. De plus, les protéines sont dénaturées sans sélectivité, et les protéines fluorescentes perdent leur activité. On doit alors à nouveau marquer ces protéines à l'aide d'anticorps, ce qui rallonge considérablement le protocole. Pour imager de telles lignées, il est ainsi préférable d'utiliser des lignées de mutants ne présentant pas de pigmentations sur le corps [8, 213].

Comme vu précédemment, les lipides constituent une des sources principales de réfraction. La délipidification fait appel à des détergents, comme le dodécylsulfate de sodium (SDS), le triton-X100 ou le tween-20.

Enfin, pour supprimer la réfraction due à l'hétérogénéité des indices de réfraction entre l'objet à étudier et le milieu d'imagerie, des solutions d'appariement de l'indice de réfraction ont été développées. Cette étape consiste donc simplement à effectuer des bains de solutions pour changer l'indice de réfraction de l'ensemble des tissus, afin d'imposer le même indice de réfraction pour les tissus et pour le milieu d'imagerie. Deux types de solutions sont utilisés pour réaliser l'appariement d'indice de réfraction.

On peut utiliser des solvants organiques comme l'éther dibenzyle ou le tétrahydrofurane, solutions qui possèdent un indice de réfraction (1.56) proche de l'indice du verre (1.54). Elles sont très efficaces mais déshydratent les échantillons, ce qui les fragilise et complexifie l'acquisition microscopique. En effet, ces solutions présentent des risques importants pour la santé humaine et pour l'environnement. Ces solutions sont donc à privilégier seulement pour l'imagerie d'échantillons de très grandes tailles quand les autres méthodes ne sont pas assez efficaces. En utilisant alors des macroscopes, il est plus facile de construire des cuves étanches pour l'imagerie, la distance de travail et la taille des champs étant très grandes.

Afin d'apparier l'indice de réfraction, il est aussi possible de préparer de grands volumes de solutions aqueuses sans risque pour la santé, et d'utiliser des objectifs plongeants. Ce sont par exemple des solutions très concentrées en sucres (fructose ou sorbitol). Leur coût est très faible. D'autres produits moins visqueux sont maintenant privilégiés. L'indice de réfraction de la solution étant proportionnel à la concentration, il est possible d'adapter l'indice de réfraction en fonction du tissu à étudier sans toutefois pouvoir dépasser 1.49. Cet indice inférieur au verre conduit à utiliser des objectifs plongeants dédiés. La présence d'eau dans le milieu rend l'imagerie d'échantil-

lons en profondeur moins performante typiquement pour des échantillons de plus de 1mm.

1.4.3 Particularités des méthodes par deshydratation et hyperhydratation

Au fil du temps, de très nombreux protocoles de clarification de tissus ont été publiés. Je présente ici les plus emblématiques, certains ayant été adaptés par TPS au poisson zèbre, et étant couramment utilisés.

Sans clarification, le signal obtenu avec un microscope confocal est très dégradé si la lumière a parcouru quelques centaines de microns dans une larve ou un cerveau de poisson zèbre. Pour des échantillons présentant une épaisseur maximale de 800 microns, tel qu'un EE de poisson zèbre, il est possible d'utiliser une procédure de clarification relativement simple et rapide n'impliquant que deux étapes : la dépigmentation et l'appariement de l'indice de réfraction [2].

iDISCO [167] est une méthode de clarification commençant par la déshydratation des tissus par méthanolisation avec les avantages décrits précédemment. L'appariement de l'indice de réfraction est ensuite réalisé en plaçant les échantillons dans une solution d'éther dibenzyle. Cette solution permet une clarification optique optimale, en éliminant l'ensemble des éléments pouvant opacifier les échantillons. Il est ainsi possible d'imager des échantillons de grandes tailles, comme des souris entières. Mais comme indiqué précédemment, l'utilisation de solvants organiques et en particulier de solvants aromatiques présente des risques importants pour la santé et pour l'environnement. De plus, en retirant l'eau des échantillons, ces approches réduisent la taille des échantillons [56]. Cette réduction permet d'imager des échantillons plus gros, car en perdant en épaisseur, il sera plus facile d'imager l'ensemble de l'objet. Mais la déformation induite sur les tissus peut être suffisamment importante pour déformer une structure et empêcher toute analyse volumétrique.

La génération de protocoles les plus récemment publiés ont pris le nom de CUBIC [185, 186]. Il impliquent plusieurs solutions de délipidification et d'appariement d'indice de réfraction, une d'elle étant formulée pour obtenir de l'hyperhydratation grâce à la présence d'urée. Bien que cet ajout d'eau puisse sembler contre intuitif, ces solutions permettent d'homogénéiser l'indice de réfraction en augmentant la proportion d'eau dans les tissus. L'emploi d'urée va de plus entraîner un éclatement des membranes, ce qui va permettre de faciliter la délipidification. Ceci peut détruire certains types cellulaires complexes. Aussi, l'hyperhydratation génère une augmentation de la taille des tissus [56] avec le risque de les déformer. Pour la clarification d'échantillons de grandes tailles, il est pertinent de réaliser une surfixation des tissus par hydrogel [32, 168]. La matrice d'hydrogel va remplacer le milieu interstitiel, limitant ainsi la modification de taille des tissus [56].

CUBIC présente l'avantage de pouvoir être utilisé avec une grande variété de solutions de clarification, adaptées à une grande diversité de tissus.

1.5 LE CRIBLE HAUT-CONTENU, UNE APPROCHE DE CHOIX POUR L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE

1.5.1 Les cribles haut-contenu nécessitent des expertises multiples

A l'origine, le crible haut-contenu est un ensemble de méthodes développé pour étudier rapidement les effets d'un grand nombre de molécules chimiques. Ces méthodes sont particulièrement utilisées en toxicologie [224] ou dans la recherche de candidats médicaments [120].

Afin d'expliquer le fonctionnement d'une procédure de crible haut-contenu, je prends l'exemple de l'analyse toxicologique. Pour commencer, des échantillons biologiques vont être placés individuellement dans des plaques multi-puits. Les échantillons biologiques peuvent être de différentes natures, comme des protéines, des cellules, ou des individus entiers. Chaque échantillon va ensuite recevoir une solution ayant une concentration connue de la molécule à étudier. L'effet de la molécule à chaque concentration sera alors enregistré par une procédure de mesure, selon l'étape dite de phénotypage. Il peut s'agir de mesure physico-chimiques ou de mesures par imageries. Ces mesures vont alors être automatiquement analysées pour déterminer si la molécule utilisée est toxique. Un schéma résumant le principe du crible haut-contenu est visible en [Figure 15](#).

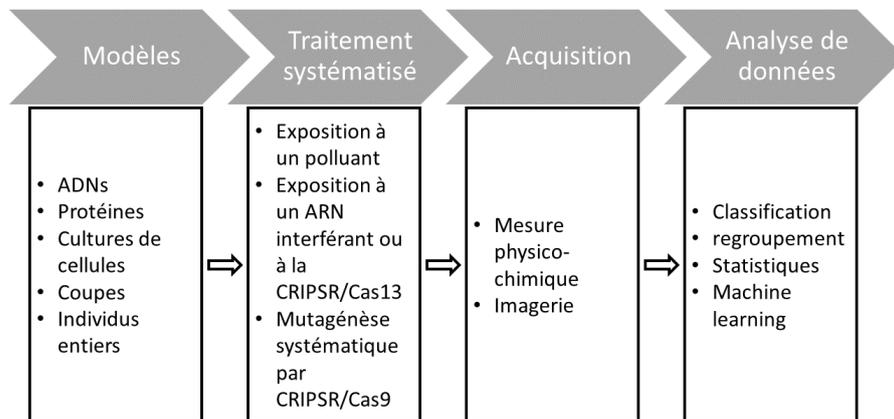


Figure 15: Schéma du principe du crible haut-contenu

L'objectif de ces approches est d'être en mesure de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons. Les approches développées doivent donc être simples et précises, et chaque étape doit être la plus optimisée possible. Cette optimisation passe souvent par la robotisation et l'informatisation.

Pour gérer le très haut-débit des expériences, il est souvent nécessaire de développer des méthodes de robotisations soit pour charger

les échantillons en plaque, soit pour permettre d'effectuer automatiquement les traitements, ou encore pour effectuer automatiquement les mesures. De la même manière, il est nécessaire de réaliser l'automatisation du traitement des mesures effectuées. En effet, la quantité souvent colossale de données générées par ce type d'approches nécessite de lourds pipelines informatiques. Le développement d'une approche de crible haut-contenu repose donc sur une association de biologie, de robotique et d'informatique (voir [Figure 16](#)).

Ces méthodes ont deux avantages: elles permettent tout d'abord de tester rapidement une grande quantité de molécules et de concentrations. Certaines plateformes de crible haut-contenu sont ainsi capable d'étudier jusqu'à cent milles molécules par jour en routine, comme le [Molecular Screening Shared Resources de UCLA](#). De plus, par la multiplication du nombre d'échantillons pour chaque condition, ces méthodes possèdent une forte représentativité statistique. Enfin, en permettant de standardiser l'ensemble des étapes de traitements, les procédures de crible haut-contenu offrent une reproductibilité inégalée.

Cependant, ces méthodes ne se généralisent pas pour tous à cause de trois défauts majeurs. Ces dispositifs impliquent l'achat de systèmes de robotisation et d'informatique au coût souvent prohibitif. Elles nécessitent des compétences multi-disciplinaires pour assurer qu'aucun goulet d'étranglement n'affecte l'efficacité des pipelines, mais aussi des spécialistes très pointus et expérimentés dans chaque domaine par exemple pour assurer la maintenance des outils. Ceci est tout particulièrement vrai pour les cribles impliquant des étapes d'imagerie. En effet, un grand nombre d'étapes complexifient l'utilisation de l'imagerie. Ce sont par exemple des méthodes fines de montage d'échantillons nécessitant des impressions en 3D d'objets dédiés, ou des pipelines informatiques originaux pour piloter les microscopes automatiques. Il faut ensuite développer une grande variété de programmes informatiques dont des algorithmes de détection automatique permettant d'extraire les informations souhaitées des images. Les solutions de crible haut-contenu utilisant l'imagerie de poisson zèbre sont actuellement peu nombreuses, encore un plus faible nombre sont commercialisées et elles n'impliquent quasiment jamais l'acquisition d'images 3D.

1.5.2 *Différentes approches de crible haut-contenu utilisent déjà le poisson zèbre*

Nous avons vu dans la [Section 1.3.2](#) que différentes méthodes permettant de faciliter l'acquisition d'images de poisson zèbre ont été mises au point. Pour pouvoir utiliser ces méthodes dans le cadre de crible haut-contenu, il est nécessaire de mettre au point des procédures de traitement d'images automatiques. Nous allons donc voir différents

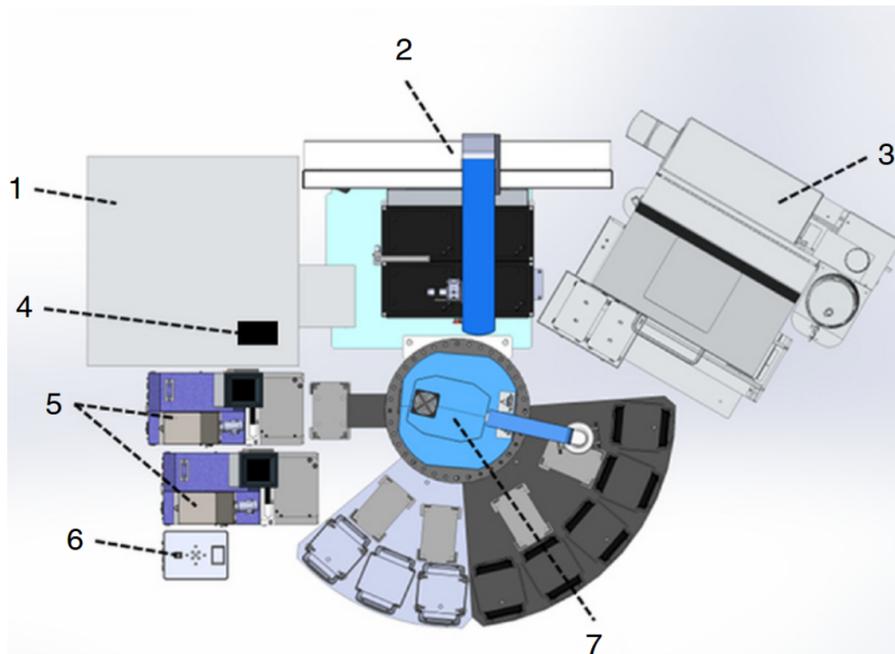


Figure 16: ARQiv-HTS, un parfait exemple de plateforme permettant le Crible haut-débit.

Cette plateforme a été développée pour utiliser le poisson zèbre comme modèle d'étude de candidats médicaments. La robotisation de la manipulation des échantillons et de l'imagerie, couplée à l'analyse automatique des mesures effectuées permet ainsi de traiter jusqu'à 13000 échantillons par semaine. C'est une plateforme haut-débit particulièrement efficace. En revanche, seule une analyse en fluorométrie simple est réalisée. Ce n'est donc pas une plateforme à haut-contenu.

(1) Lecteur automatique de plaque. Cet appareil va automatiquement réaliser la mesure de quantité de fluorescence pour chaque échantillon au sein de la plaque introduite. (2) Un système de pipetage permet d'automatiser la réalisation de dilutions sériées et l'administration des candidats médicaments. (3) Un robot de pipetage trie les alevins et les place dans des plaques 96 puits. (4) Un lecteur de codes barres identifie les plaques au moyen d'un code barre. (5) Un robot pipeteur automatise l'administration d'anesthésiant aux alevins. (6) Un clapet anti-retour permet de changer de solution sans risquer de polluer les solutions mères. (7) Un robot manipulateur de plaque permet de déplacer les plaques entre les différents éléments de la plateforme.

Reproduit à partir de White et al, *Nature Protocols*, 2016 [212].

exemples de méthodes ayant automatisé l'acquisition et le traitement des échantillons afin de permettre le développement de crible haut-contenu.

Comme décrit en Section 1.3.2, le VAST permet d'effectuer rapidement des acquisitions très standardisées de poisson zèbre. Suite à la commercialisation de cet outil, différentes équipes ont utilisé les ima-

ges produites pour mettre au point des procédures de segmentation semi-automatiques ou automatiques des acquisitions réalisées.

FishInspector [191] est un logiciel réalisant automatiquement la détection de plusieurs caractéristiques des échantillons imagés. Il s'agit de l'étude la plus avancée dans le développement d'une méthode de crible utilisant le VAST. Le VAST est utilisé pour acquérir 4 images: une vue dorsale, une vue ventrale et une vue de chaque côté. Ces images sont utilisées pour détecter automatiquement les caractéristiques suivantes: la forme générale de la larve, l'oeil, la notochorde, les pigments, le sac vitellin, l'otolithe, la position de l'extrémité de la mâchoire inférieure, la vessie et le péricarde. Afin d'améliorer la précision des segmentations automatiques, le logiciel offre à l'utilisateur des outils permettant de les modifier. Une fois les segmentations validées, un workflow Knime est utilisé pour réaliser l'analyse des résultats. Cette étude propose donc une méthode permettant d'automatiser le positionnement des échantillons sous le microscope, l'imagerie des échantillons, la détection des régions d'intérêt et l'analyse de ces régions. En couplant cette procédure à un robot de traitement des échantillons, il est ainsi possible de réaliser un crible haut-contenu complet permettant d'étudier des défauts morphologiques chez le poisson zèbre. Cependant, cette méthode ne semble pas être en mesure d'effectuer des analyses de signaux fluorescents alors que le VAST peut être placé sur des microscopes à fluorescence. Les images ont aussi des aberrations dues à l'acquisition en capillaire.

L'équipement d'imagerie ACQUIFER permet d'automatiser l'acquisition d'échantillons placés dans des plaques de 96 puits. Sans développement particulier, il s'agit simplement d'une plateforme d'imagerie haut-débit optimisée pour l'imagerie du poisson zèbre. En utilisant des moules de montage [215] (voir Section 1.3.2), il est possible d'assurer un montage identique pour tous les échantillons. Le dispositif va alors être en mesure de réaliser des images présentant toujours les mêmes caractéristiques. Différentes routines d'analyses des images obtenues ont été proposées pour étudier plusieurs organes comme les reins ou le coeur [150, 182, 211]. Des images 2D et 3D à faible résolution sont obtenues en raison d'objectifs à faibles grossissements.

Les méthodes de cribles employant le poisson zèbre utilisent des méthodes d'imagerie 2D ou des méthodes ayant une faible résolution en profondeur. Comme vu en Section 1.3.2, les limitations imposées par les capillaires du VAST imposent l'emploi d'images 2D, et les microscopes à épifluorescence ont une profondeur de champ importante, ce qui implique un manque de précision dans l'acquisition.

L'utilisation d'une unique image 2D est un frein pour deux raisons. Considérons pour la suite que le système d'imagerie utilisé dispose d'une faible profondeur de champs. Considérons de plus l'imagerie d'une structure plane, comme une toile d'araignée. Si la toile se

trouve dans le plan d'acquisition, il sera possible de réaliser une acquisition de celle-ci sans problème. Cependant, la moindre déviation du plan d'acquisition entraîne une impossibilité d'imager la structure. L'utilisation d'une simple image 2D avec un système à faible profondeur de champ implique donc d'être en mesure d'assurer un parallélisme parfait entre l'objet et la lentille de l'objectif. En prenant l'exemple de la toile d'araignée, il est possible de faire une estimation du parallélisme nécessaire. Imaginons que l'on essaie d'imager une toile d'araignée parfaitement plane faisant 1 millimètre de diamètre et une épaisseur négligeable avec un dispositif d'acquisition ayant une profondeur de champs de 1 microns. Afin de s'assurer que l'ensemble de la toile soit incluse dans la profondeur de champ, il serait nécessaire que l'angle formé par la lentille de l'objectif et le support d'acquisition soit inférieur à 0.06° .

Deux situations peuvent alors se produire. Si on utilise un système d'imagerie ne filtrant pas les photons qui proviennent de la coupe optique désirée, tout élément de la toile sortant de la zone couverte par la profondeur de champs sera flou. A l'inverse, si on utilise un système ne permettant de capter que les photons provenant de l'épaisseur décrite par la profondeur de champ, comme un microscope confocal, alors tout élément sortant de cette zone ne sera pas visible. Il est donc quasi impossible d'imager correctement des structures planes en utilisant des images 2D. De plus, la plupart des structures biologiques ne sont pas planes mais au contraire très complexes en 3D. Ainsi, le développement de cribles pour l'étude de structures cérébrales par imagerie 2D est souvent insuffisante pour donner des informations ne risquant pas de comporter des artefacts, sauf si l'objet peut être réorienté automatiquement et précisément, comme dans le cas de la plateforme ZeBraInspector que nous avons développé, qui implique des images 3D permettant de capturer des images 2D dans n'importe quelle orientation.

L'ANALYSE D'IMAGE EST AU CŒUR DES MÉTHODOLOGIES DE CRIBLE HAUT-CONTENU

2.1 PRÉSENTATION DE DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE SEGMENTATION AUTOMATIQUE

La segmentation d'image consiste à grouper des pixels afin d'extraire une information de l'image, par exemple identifier une ou plusieurs régions d'intérêt. Dans le cadre d'imageries de tissus biologiques, ces régions d'intérêt peuvent être un organe entier ou une sous-région de cet organe [44, 67, 116], une anomalie dans une structure [82, 171, 205] ou un caractère particulier [191]. L'approche la plus simple de segmentation consiste à manuellement annoter l'image que l'on souhaite étudier pixel par pixel. Cette approche permet en principe d'avoir le résultat le plus précis, mais c'est une procédure extrêmement longue, ce qui rend son emploi incompatible avec le traitement d'un grand nombre d'images. Il est interminable de définir manuellement et de façon précise les limites d'une région, et la segmentation manuelle présente de forts risques de biais inter et intra-individuels [76]. Les biais intra-individuels peuvent être limités par l'utilisation d'outils de segmentation semi-manuels [14, 15] qui permettent à l'utilisateur de définir un ensemble de paramètres qui seront ensuite appliqués à toutes les segmentations manuelles effectuées par cet utilisateur. La segmentation manuelle reste malgré tout une procédure de choix dans l'évaluation d'algorithmes de segmentation. Pour accélérer la segmentation et la rendre plus précise, il est possible de mettre en place des algorithmes de segmentations automatiques. Nous allons donc maintenant faire un état de l'art de différentes approches de segmentations automatiques, et aussi exposer les limites inhérentes à ces algorithmes.

2.1.1 *Le seuillage, une approche simple mais insuffisante*

Le seuillage est une procédure d'étiquetage des pixels en deux classes en fonction des valeurs de gris des pixels. Elle consiste à conserver tous les pixels supérieurs à une valeur définie. De par sa simplicité, elle a été une des premières stratégies de segmentation automatique [148, 172]. De plus, il s'agit d'une procédure régulièrement utilisée dans l'initiation de segmentations manuelles. Cette méthode est applicable dans de nombreux cas: par exemple pour estimer la radiodensité d'un tissu dans le cas d'images de scanner, ou pour mettre en avant des régions d'intérêt par un marqueur, tel qu'un anticorps lié

à un fluorophore. Au fur et à mesure du développement des méthodes de segmentations automatiques, les seuillages se sont diversifiés. Nous allons donc maintenant présenter diverses approches de seuillages présentes dans la littérature.

L'approche la plus simple est l'emploi d'une valeur de seuil définie à priori [77]. De nombreux outils de visualisation d'images permettent d'effectuer rapidement ce type de procédures et de les automatiser, par exemple avec des macros ImageJ.

Cependant, la détermination de la valeur seuil est un point limitant de cette méthode, du fait de la variabilité des niveaux de gris entre acquisitions, en particulier si les dispositifs d'imagerie ne sont pas calibrés. Si les images ne sont pas saturées, le même histogramme de valeur de gris pour une modalité donnée est obtenu quelque soit l'opérateur ou l'appareil employé. Différentes approches de seuillage utilisent cet histogramme pour choisir la valeur seuil.

La solution la plus simple consiste à ne conserver qu'une proportion de pixels, en choisissant la valeur seuil de manière à ce que le nombre de pixels ayant une valeur supérieure à ce seuil soit équivalent à la proportion de pixels que l'on souhaite conserver. Cette méthode présente toutefois le défaut de devoir prédéfinir la surface totale de la segmentation, ce qui peut induire des défauts importants de segmentations si la taille ou la forme des objets varient. Il est donc souhaitable de tenter de définir automatiquement la valeur seuil, une des premières approches de ce type ayant été proposé par NOBUYUKI OTSU [148].

Considérons une image pouvant être scindée en deux classes de valeurs de gris. Il existe alors une valeur de gris permettant de maximiser la variance inter-groupe des valeurs de gris au sein des deux classes définies par cette valeur. On appelle cette valeur de gris critère d'OTSU. Ce critère est intéressant car en maximisant la variance inter-classe, on minimise les variances intra-classes. Or, on suppose que des classes ayant une variance interne minimale possèdent une plus grande cohérence. On utilise ainsi l'histogramme des valeurs de gris de l'image pour chercher le critère d'OTSU qui coupe alors l'image en deux régions cohérentes. Cette méthode est encore régulièrement employée pour réaliser des segmentations automatiques [83, 87, 104].

Cette approche est facilement généralisable à la segmentation de plusieurs classes de pixels. Pour une segmentation en n classes, il suffit alors de chercher les $n - 1$ critères permettant de maximiser les variances entre chaque groupe.

La simplicité des algorithmes de seuillage les rend présents dans de nombreuses algorithmes de segmentations automatiques alors que ces approches présentent de nombreux défauts. Tout d'abord, ces approches considèrent que l'image est séparable en région ayant des valeurs de gris proches. Il est cependant possible qu'une région d'intérêt ne soit pas uniforme, et présente en son sein une grande variété

de valeurs de gris. Si les transitions ne sont pas abruptes, l'utilisation d'algorithmes de seuillage devient alors impossible. Ensuite, il s'agit pour la plupart d'algorithmes appliqués sur l'ensemble de l'image ce qui peut entraîner de nombreuses complications. Ne prenant pas en compte le voisinage de chaque pixel, ces algorithmes considèrent indifféremment un pixel se trouvant bien au centre de la région segmentée ou à l'extérieur, isolé sur un fond plus sombre par exemple. Cela mène à des isolats de pixel au sein d'une région. Enfin, ces procédures n'étant basées que sur la séparation de l'image en deux classes de valeurs de gris, il n'est pas possible de segmenter des régions ayant des valeurs de gris similaires mais séparées par un changement de textures ou séparées par un changement local d'intensité lumineuse. Dans certains cas, l'emploi de filtres avant et après le seuillage peut permettre d'obtenir malgré tout une segmentation correcte. La morphologie mathématique apporte certains filtres, mais aussi ses propres procédures de segmentation.

2.1.2 *La morphologie mathématique améliore la précision des segmentations*

La morphologie mathématique est une théorie mathématique principalement développée afin de mettre au point des procédures d'analyse d'image [138]. Deux opérateurs de bases sont employés, l'érosion et la dilatation. Pour une image en niveaux de gris, il s'agit de calculer respectivement le minimum ou le maximum au sein du voisinage de chaque pixel (Voir [Figure 17](#)). Ce voisinage est appelé élément structurant, et peut avoir un grand nombre de formes .

L'utilisation d'une forme particulière peut permettre de révéler une structure particulière dans une image (voir [Figure 18](#)). Par exemple, une érosion par un ensemble de lignes ayant différents angles peut permettre de faire disparaître les structures linéaires. Un troisième opérateur est le filtre de rang, qui consiste à conserver pour chaque pixel la $n^{\text{ième}}$ valeur de gris au sein de l'élément structurant, n étant le rang de l'élément. L'exemple de filtre de rang le plus connu est le filtre médian, qui remplace le pixel par la valeur médiane au sein de l'élément structurant choisi.

En combinant l'érosion et la dilatation, deux opérateurs se rajoutent. La succession d'une érosion puis d'une dilatation utilisant le même élément structurant est appelé une ouverture (voir [Figure 19b](#)). Cet opérateur permet de supprimer des objets de petites tailles ou des structures fines. A l'inverse, la succession d'une dilatation puis d'une érosion est appelée une fermeture (voir [Figure 19c](#)). A l'inverse de l'ouverture, cet opérateur permet de remplir des aires et permet de joindre des éléments proches entre eux. L'ouverture, la fermeture et le filtre de rang sont ainsi des outils de choix pour le pré-traitement

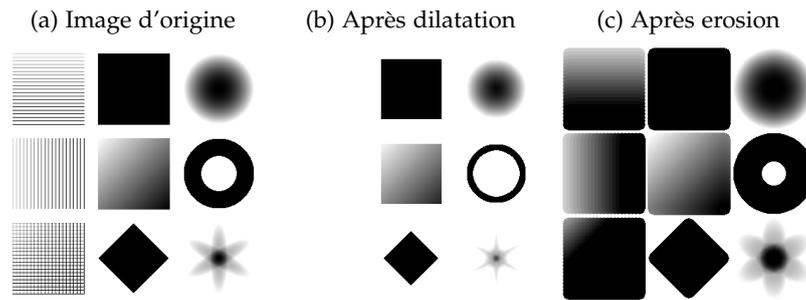


Figure 17: Exemple d'application d'une érosion et d'une dilatation.
La dilatation consistant à conserver pour chaque pixel le maximum local se trouvant au sein du voisinage, elle va avoir pour effet d'étaler les blancs. A l'inverse, l'érosion va étaler les noirs.

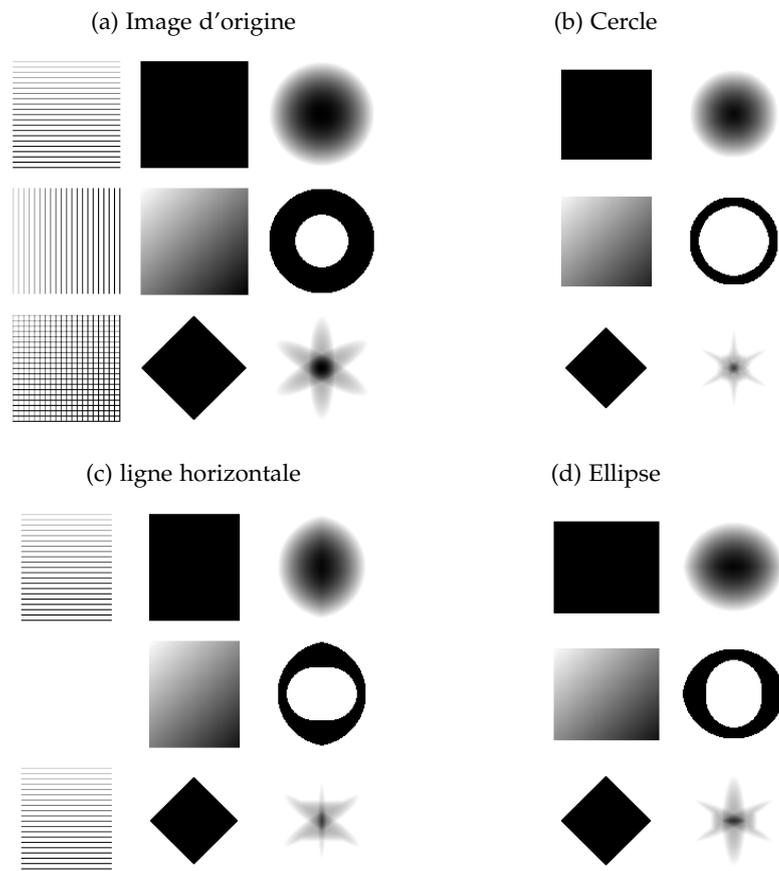


Figure 18: Exemple d'application d'une dilatation avec différentes formes d'éléments structurants, comme indiqué au dessus de chaque panneau.

Le choix de l'élément structurant utilisé a un impact important sur le résultat. L'utilisation d'éléments structurants circulaires ou elliptiques ne permet pas de conserver les lignes. L'utilisation de ligne horizontale fera disparaître toute ligne n'ayant pas la même orientation.

d'images, en permettant d'apporter une cohérence topographique à l'image que l'on veut étudier.

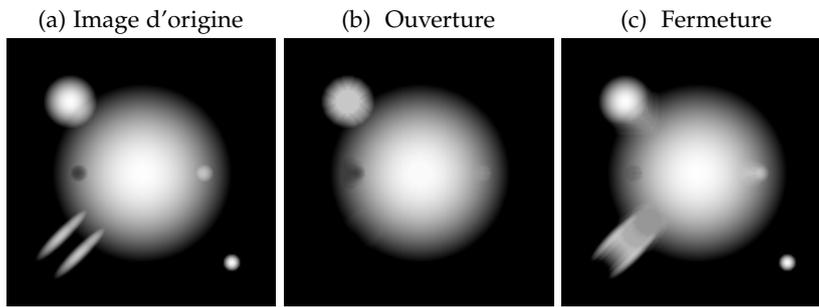


Figure 19: Exemple d'application d'une ouverture et d'une fermeture.

L'ouverture permet de supprimer les éléments fins ou isolés. La fermeture permet de relier deux régions ou de supprimer des zones sombres. En lissant les images en fonction du voisinage de chaque pixel, ces opérateurs améliorent les segmentations par seuillage

La fermeture et l'ouverture permettent de définir deux transformations, les chapeaux haut-de-forme blanc et noir[20, 50, 51]. Le chapeau haut-de-forme blanc consiste en la soustraction d'une ouverture à l'image d'origine, alors que le chapeau haut-de-forme noir est la soustraction de l'image d'origine à une fermeture de cette image. L'utilisation du chapeau haut-de-forme blanc permet la mise en évidence de régions ayant une forte intensité dans une zone restreinte ou ayant une forme particulière (voir Figure 20b). A l'inverse, le chapeau haut-de-forme noir permet la mise en évidence de la proximité entre deux régions, ou la délimitation entre deux objets clairs (voir Figure 20c). Enfin, une dernière transformation est le gradient morphologique. Calculé comme la soustraction d'une érosion à une dilatation d'une image, le gradient morphologique permet de connaître l'évolution des valeurs de gris en chaque point de l'image (voir Figure 21b).

Ces différents opérateurs et transformations sont régulièrement employés conjointement à une segmentation par seuillage, que ce soit pour préparer le seuillage ou améliorer ses résultats [12, 88].

De plus, la morphologie mathématique propose un outil de segmentation, la ligne de partage des eaux [17, 35, 108, 131, 132, 203]. En hydrologie, la ligne de partage des eaux est la ligne permettant de séparer différents bassins versants. Ces lignes sont définies principalement en fonction de la topographie de la région étudiée, et suivent ainsi les crêtes topographiques. En considérant les valeurs de gris d'une image comme décrivant la hauteur d'un pixel, il est alors possible d'effectuer une analogie entre les deux systèmes. Un algorithme de ligne de partage des eaux aura ainsi pour but de définir à quelle région appartient chaque pixel. Pour définir son appartenance, cet algorithme calculera à quel bassin versant appartient chaque pixel. Pour cela, il utilise deux informations: une image qui servira de carte

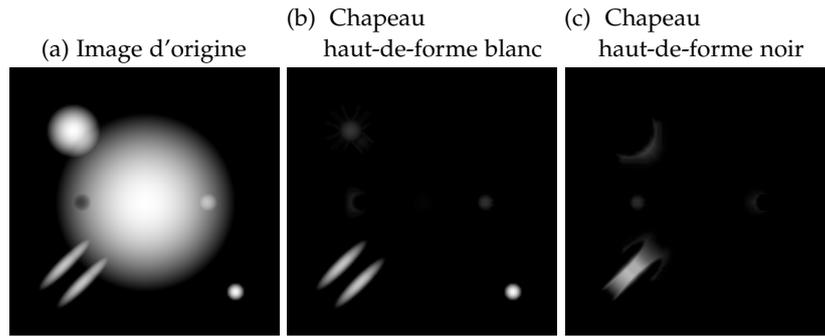


Figure 20: Exemple de l'application d'un chapeau haut-de-forme.

Le chapeau haut-de-forme noir consiste à soustraire l'image d'origine à une fermeture de cette image. À l'inverse, le chapeau haut-de-forme blanc consiste à soustraire une ouverture à l'image d'origine.

Les chapeaux haut-de-forme permettent ainsi de détecter des éléments isolés, de mettre en avant des démarcations ou des régions situées entre deux objets proches.

topographique, comme le gradient d'une image, et une liste de marqueurs qui serviront à définir les bassins versants (voir [Figure 21b](#)). L'algorithme va alors attribuer à chaque pixel un label définissant à quel bassin versant il appartient (voir [Figure 21c](#) et [Figure 21d](#)). Les lignes de partages des eaux seront alors l'ensemble des pixels pour lesquels deux bassins versants se sont rencontrés. Cette approche permet ainsi de relier entre elles des régions présentant des valeurs de gris cohérentes afin de segmenter les régions par proximité topographiques des pixels [49, 114].

Cependant, la sélection des marqueurs permettant l'initialisation du calcul de lignes de partage des eaux constitue une limite de cette méthode. En effet, l'utilisation d'un trop grand nombre de points peut amener à un découpage en un trop grand nombre de parties différentes (voir [Figure 22a](#)). De plus, un marqueur absent ou mal positionné induira une mauvaise segmentation de la région d'intérêt (voir [Figure 22b](#)).

Ces approches ont été remplacées au cours de la dernière décennie par des algorithmes utilisant les réseaux de neurones profonds.

2.1.3 Une approche émergente, la segmentation par réseaux de neurones profonds

L'apprentissage par réseau de neurones est une technique de classification basée sur une analogie avec une vision simplifiée du fonctionnement du cerveau. Un ensemble de signaux interagit avec une première couche de neurones. Chaque neurone de cette première couche va étudier ce signal, et émettre un signal répondant à sa fonction d'activation. Ces signaux vont alors exciter ou inhiber une seconde couche

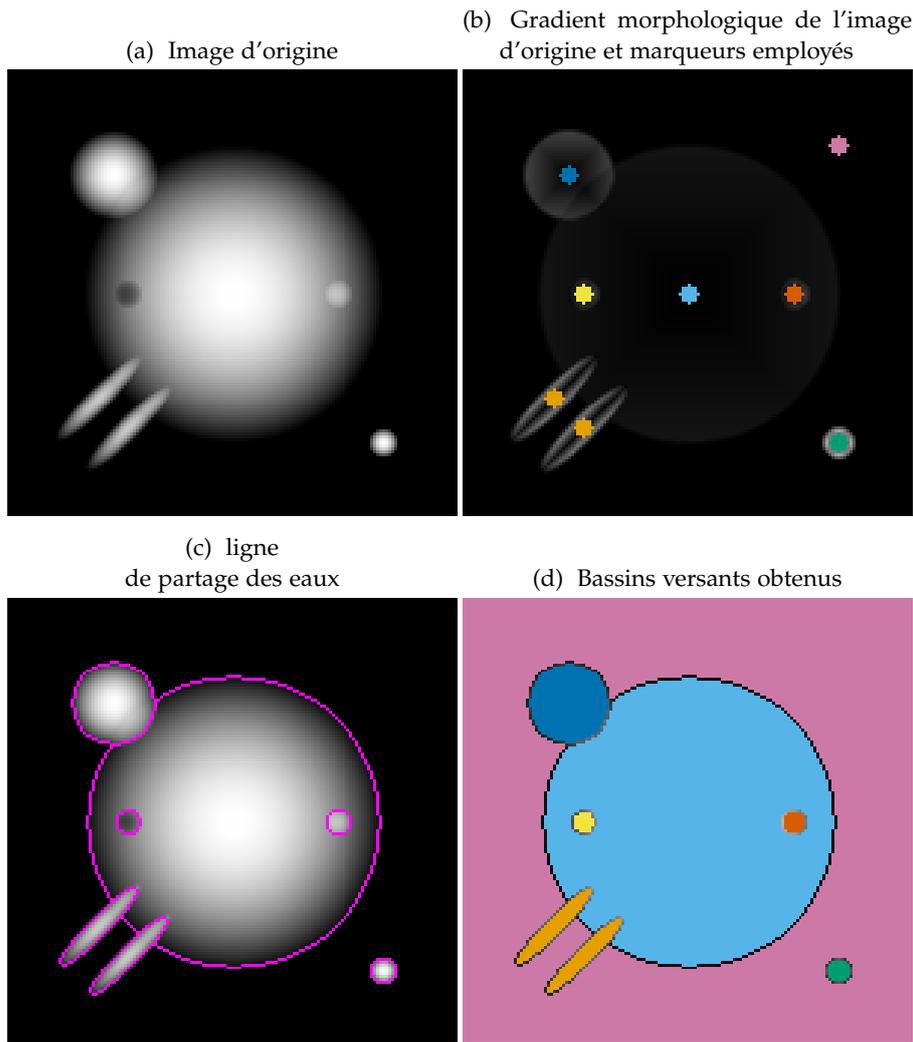


Figure 21: Exemple d'application d'une ligne de partage des eaux.

La ligne de partage des eaux est calculée en utilisant le gradient morphologique de l'image d'origine et les marqueurs représentés en (b). Le gradient morphologique est un opérateur de morphologie mathématique consistant à soustraire une érosion à une dilatation de l'image d'entrée, ce qui permet de connaître l'évolution locale des niveaux de gris. La ligne de partage des eaux fournit ainsi une démarcation entre différents bassins versants, ce qui fournit une segmentation de l'image.

de neurones, qui vont émettre à leur tour un signal répondant à la fonction d'activation choisie. Les signaux vont ensuite être propagés vers les couches plus profondes jusqu'à atteindre la dernière couche de neurones, qui fournira le résultat désiré. Cependant, pour chaque neurone, les signaux reçus doivent être pondérés afin de faire réagir chaque neurone d'une même couche différemment. L'étape d'apprentissage du réseau de neurones consiste ainsi à faire varier ces poids pour que les résultats du réseau de neurones convergent vers une situation d'équilibre donnant les meilleurs résultats pour la clas-

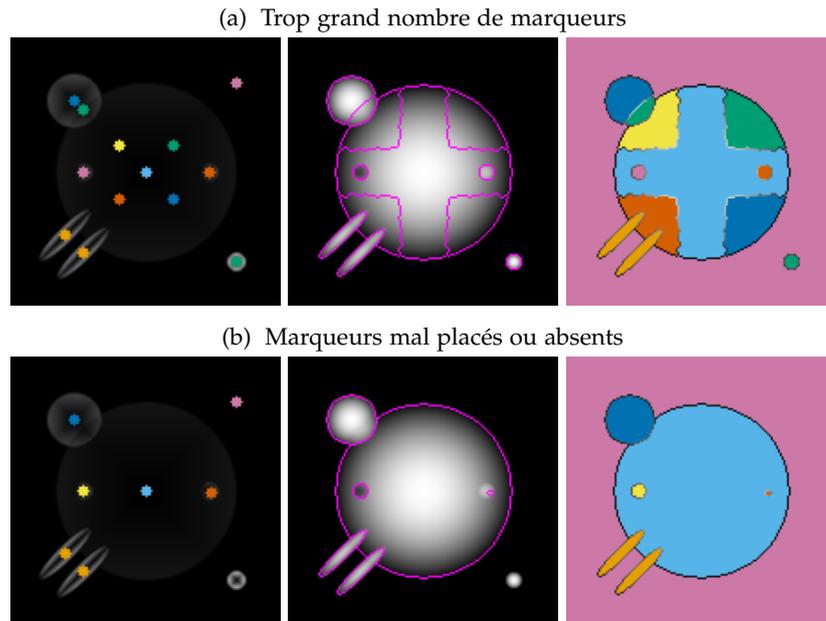


Figure 22: Exemple de marqueurs entraînant des erreurs de segmentation. Un trop grand nombre de classes de marqueurs va entraîner un sur-découpage, alors qu'un mauvais placement des marqueurs peut mener à omettre certains éléments ou mener à de mauvaises définitions de la ligne de partage des eaux.

sification des signaux d'entrée utilisés pour l'entraînement. La profondeur du réseau de neurones est alors définie par le nombre de couches employé. Une fois entraînés, ces réseaux de neurones permettent d'obtenir rapidement une classification efficace des signaux fournis.

Les premières utilisations de l'apprentissage par réseaux de neurones profonds pour l'analyse d'images a été la classification d'images en différentes classes [103, 109, 178]. L'évolution des systèmes informatiques durant la dernière décennie ayant permis d'effectuer des réseaux de neurones de plus en plus profonds et de plus en plus peuplés, il a été possible de transformer ces classifications d'images en classification de pixels permettant ainsi de mettre au point les premières méthodes de segmentation par réseau de neurones profonds. [134, 169]. Les méthodes de segmentations par réseaux de neurones profonds ont alors été employés pour réaliser des segmentations de tout type d'objets et sur un large panel de systèmes d'imageries [97, 216, 217, 219, 220, 223]. Ces méthodes consistent principalement à utiliser un réseau de neurones existant en l'entraînant avec un jeu de données développé pour permettre de réaliser la segmentation désirée. Cependant, il est parfois impossible d'acquérir un jeu d'entraînement ayant une taille suffisante. Cette collecte peut être rendue impossible par la rareté du système d'imagerie ou par la difficulté d'annoter une quantité suffisante de données. Ce dernier point est

particulièrement prégnant pour la segmentation de structures complexes sur des jeux d'images tridimensionnelles. Nous allons maintenant présenter trois solutions pour compenser ce défaut.

La première solution est l'enrichissement artificiel du jeu d'entraînement [122, 134, 222]. Cette solution consiste à appliquer aléatoirement des déformations aux images du jeu d'entraînement, afin d'augmenter la variabilité des images utilisées pour l'entraînement tout en connaissant une segmentation manuelle.

La seconde solution est le recours à la science participative [94, 214]. La science participative consiste à demander à un grand nombre de volontaires d'annoter manuellement des données. Les annotations fournies par l'ensemble des utilisateurs sont alors combinées pour créer un jeu d'entraînement. Par la fusion des segmentations manuelles d'un grand nombre de volontaires, il est alors possible d'égaliser en qualité des segmentations manuelles faites par un expert [128]. Cette approche présente comme avantages le fait d'être peu coûteuse et simple à mettre en place grâce à des plate-formes comme *zooniverse*. La mise en place d'un jeu d'entraînement peut cependant être laborieuse, en fonction de l'intérêt des volontaires pour la tâche demandée.

La dernière solution est le transfert de réseau de neurones. Cette procédure consiste à utiliser un réseau de neurones préalablement entraîné pour réaliser une autre segmentation, que ce soit pour d'autres objets [206] ou pour d'autres modalités d'imagerie [66]. Le réseau est alors ré-entraîné avec un jeu d'entraînement contenant un faible nombre d'images tout en obtenant des résultats appropriés.

Cependant, les algorithmes de segmentation par réseaux de neurones profonds, tout comme les méthodes présentées précédemment sont basées sur un a priori. En effet, ces algorithmes considèrent que l'objet possède des particularités intrinsèques permettant de différencier le fond de l'objet. Nous allons maintenant discuter cet a priori.

2.1.4 *Le fond peut-il toujours être différencié de l'objet?*

La plus grande partie des approches de segmentation automatique considèrent que l'objet est toujours différent du fond. Ces différences peuvent par exemple être des différences de valeurs de gris, de forme ou de texture. Cet a priori est souvent considéré comme un axiome dans le développement d'algorithmes de segmentations automatiques. Dans de nombreux cas, cette hypothèse est validée, car le système d'imagerie a été optimisé afin d'obtenir la meilleure acquisition possible de l'objet à étudier. Il existe cependant plusieurs cas où cette hypothèse n'est pas validée.

Dans le cas de l'imagerie d'échantillons épais, l'intensité lumineuse va décroître en fonction de l'épaisseur de tissu à parcourir. Cette

décroissance induit alors un gradient d'intensité lumineuse. Plus le tissu sera opaque ou aura un indice de réfraction inapproprié à l'acquisition, plus ce gradient sera important. Il est alors possible que l'intensité lumineuse d'une région d'intérêt ne puisse plus être différenciée du fond. L'emploi d'une méthode de segmentation visant à attribuer un label en fonction de l'intensité lumineuse des pixels devient alors incapable de déterminer la classe à attribuer à chaque pixel.

Il est aussi possible que l'échantillon imagé présente en son sein des variations d'intensités lumineuses au sein d'une même région (voir [Figure 23a](#)). Il devient alors possible qu'une région d'intérêt présente les mêmes valeurs de gris que le fond, ce qui empêche l'utilisation d'une méthode de segmentation basée sur les différences de valeurs de gris (voir [Figure 23b](#), [Figure 23c](#) et [Figure 23d](#)).

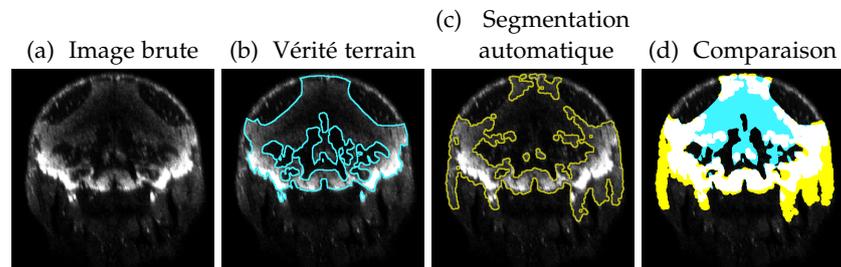


Figure 23: Résultat de segmentation sur une coupe transversale d'un échantillon de poisson zèbre à 5 dpf marquée par anticorps anti-HuC/D et acquise en microscopie confocale.

La présence d'un important défaut de marquage peut entraîner simultanément une sous-segmentation et une sur-segmentation. Ce défaut peut ainsi compromettre la distinction entre le fond et l'objet d'intérêt. Cet exemple montre qu'un marquage insuffisamment contrasté ne peut être segmenté correctement par la machine alors qu'un opérateur humain est en mesure d'effectuer une segmentation correcte en utilisant ses connaissances.

Les pixels cyan, jaune et blanc représentent respectivement une segmentation manuelle considérée comme la vérité de terrain, le résultat de la segmentation automatique et la superposition entre les deux.

Dans ces deux cas, les méthodes de segmentations basées sur une différence de valeur de gris seront incapables de déterminer efficacement la position de l'objet d'intérêt. De plus, s'il n'est pas possible de fournir d'autres caractéristiques à la segmentation, la détection de l'objet d'intérêt sera impossible sans pré-traitement des images obtenues.

Nous allons donc maintenant voir différentes approches ayant été proposées pour compenser de potentiels défauts de contraste au sein d'image.

2.2 L'AMÉLIORATION DE CONTRASTE, UNE MÉTHODE INDISPENSABLE POUR COMPENSER LA PERTE D'INTENSITÉ LUMINEUSE EN PROFONDEUR

Comme vu précédemment, les images obtenues par un système d'imagerie peuvent présenter de fortes disparités de contraste, ayant différentes origines, et il n'est pas toujours possible de corriger tous les défauts lors de l'acquisition. Il a donc été nécessaire de développer un certain nombre d'approches de corrections de contraste. Je vais aborder trois sortes de méthodes permettant de compenser des défauts de contraste: des approches basées sur l'étude de l'histogramme des valeurs de gris, des approches basées sur la correction de la loi de Beer-Lambert et enfin des approches basées sur de multiples acquisitions.

2.2.1 L'égalisation d'histogrammes, une approche historique mais limitée

Une des premières approches d'amélioration de contraste fut l'égalisation d'histogramme. Cette méthode vise à "aplanir" l'histogramme des valeurs de gris de l'image. En considérant la probabilité qu'un pixel ait une valeur inférieure ou égale à une certaine valeur de gris, il est possible de calculer une fonction de répartition, qui attribuera à chaque valeur de gris une nouvelle valeur. De cette manière, le nouvel histogramme aura une répartition plus homogène des valeurs de gris, ce qui permet en principe d'améliorer le contraste de l'image (voir [Figure 24](#)).

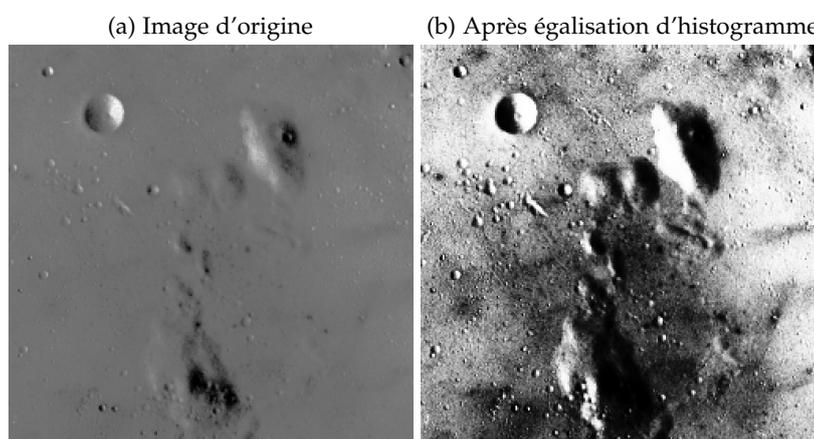


Figure 24: Exemple d'application d'une égalisation d'histogramme. Après égalisation d'histogramme, le contraste est augmenté ce qui permet de rendre visibles certaines structures tout en entraînant une saturation de certaines régions. L'image d'origine et l'algorithme d'égalisation d'histogramme ont été extraits respectivement du module `data` et du module `exposure` de skimage

Cependant, cette approche calculant les nouvelles valeurs de gris sur la base de l'histogramme des valeurs de gris de l'ensemble de l'image, cette approche ne tient pas compte du voisinage de chaque pixel. Cette approche ne sera par exemple pas en mesure de détecter un gradient de contraste au sein de l'image, ou une modification locale d'illumination. Une correction de ce défaut a été apportée par le développement de l'égalisation adaptative d'histogramme[86]. Cette méthode consiste à calculer pour chaque pixel une fonction de répartition. On choisit pour cela une forme représentant le voisinage de chaque pixel. L'égalisation adaptative d'histogramme calcule la valeur de gris de chaque pixel en effectuant une égalisation d'histogramme au sein du voisinage. Cette approche locale permet ainsi de compenser des défauts liés à l'égalisation d'histogramme simple. Cependant, cette approche est très sensible au bruit. En effet, le calcul de la fonction de répartition d'un pixel de bruit présent dans une région à intensité quasi-constante entraîne l'amplification du bruit (voir [Figure 25](#)). La première solution proposée pour corriger ce défaut fut l'application d'un filtre Laplacien avant de calculer l'égalisation adaptative d'histogramme [86]. Malheureusement, cela peut altérer certaines structures de l'image d'origine, et ainsi faire perdre de l'information.

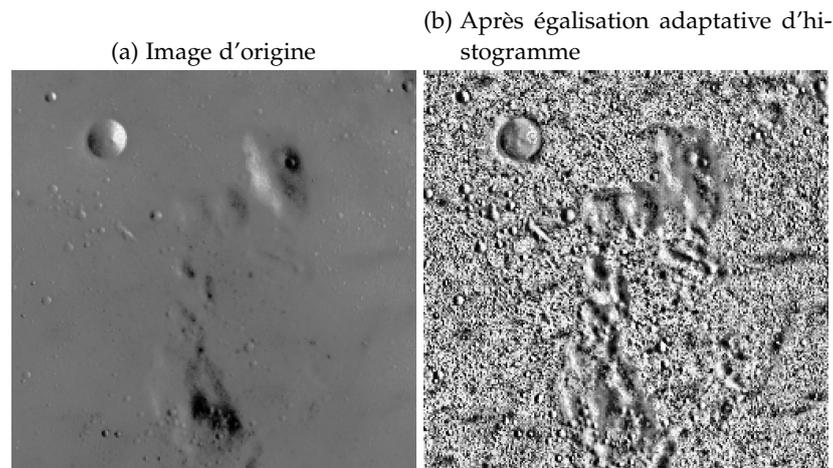


Figure 25: Exemple d'application d'une égalisation adaptative d'histogramme.

Un noyau de 16 pixels a été choisi. Les régions que l'égalisation d'histogramme saturait ne le sont plus, mais le résultat de l'égalisation adaptative d'histogramme est particulièrement bruité.

Une solution ultérieure fut le développement de l'égalisation adaptative d'histogramme à contraste limité [159] (voir [Figure 26a](#) et [Figure 26b](#)).

Avant le calcul de l'égalisation adaptative d'histogramme à contraste limité, on définit une valeur seuil. L'histogramme des valeurs de gris pour chaque pixel est calculé et le nombre de pixels pour

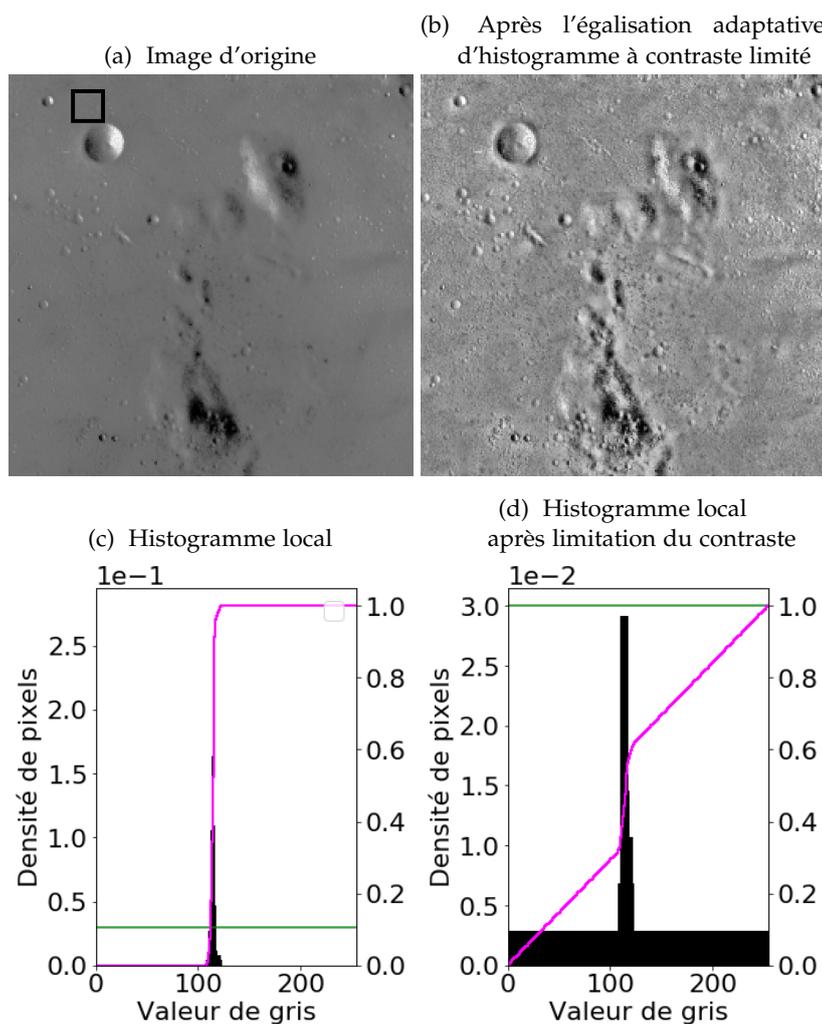


Figure 26: Exemple d'application de l'égalisation adaptative d'histogramme à contraste limité.

Le cadre noir représente la région utilisée pour calculer l'histogramme des valeurs de gris. Un noyau de 16 pixels et une valeur seuil de 0.03 ont été choisis. Pour les histogrammes, les lignes vertes et magentas représentent respectivement la valeur seuil et l'histogramme cumulé. En empêchant la sureprésentation de certaines classes de pixels, la limitation de contraste permet d'étaler l'histogramme des valeurs de gris, évitant ainsi un pic sur l'histogramme cumulé qui aurait entraîné une saturation de pixels de bruit.

chaque valeur de gris est comparé à la valeur seuil choisie. Si une valeur de gris a un nombre de pixels supérieure à la valeur seuil, on redistribue cet excédant aux autres valeurs de gris (voir [Figure 26c](#) et [Figure 26d](#)). La fonction de répartition est alors calculée sur cet histogramme tronqué plutôt que sur l'histogramme d'origine. Pour une région quasi-constante, la redistribution des valeurs trop présentes transforme un histogramme présentant quelques pics en un hi-

stogramme plat. Ce changement de forme de l'histogramme permet de réduire l'amplification du bruit, car un pixel de bruit dans une zone constante ne sera plus détectable sur l'histogramme de répartition obtenue, et ne sera donc que peu modifié par l'application de la fonction de répartition.

Bien que publiée pour la première fois en 1987 [159], l'égalisation adaptative d'histogramme à contraste limité est encore largement utilisée [36, 119, 180]. En effet, il s'agit d'une méthode dont les principes sont simples à comprendre, ce qui la rend plus accessible et ce qui a mené à des développements supplémentaires très nombreux. Il est facile d'utiliser cet algorithme sans posséder de connaissances techniques pointues en analyse d'images. Cette méthode a été largement implémentée dans différents logiciels de traitement d'images, comme *ImageJ*, *icy* et *imagemagik*. Cependant, même si le grand nombre de publications a rendu cette technique très populaire, elle possède néanmoins deux défauts majeurs. Le premier est que l'égalisation adaptative d'histogramme à contraste limité demande un temps de calcul important. En effet, le calcul de l'histogramme du voisinage de chaque pixel est une tâche lourde, et même si des algorithmes permettant de réduire les temps de calculs ont été proposés [184], l'utilisation de l'égalisation adaptative d'histogramme à contraste limité pour des images de grande taille n'a longtemps pas pu être réalisé dans un temps raisonnable sur des ordinateurs de bureau. De plus, la lourdeur des calculs nécessaires a empêché sa généralisation à des dimensions supérieures à 2 jusqu'à récemment [6, 183]. Le second défaut est inhérent à la méthode employée. En ne considérant que l'information fournie par l'image, ces algorithmes ne prennent pas en compte de potentiels défauts provenant de considérations physiques. Cependant, d'autres méthodes ont été développées pour permettre de tenir compte de défauts provenant du système d'imagerie lui-même.

2.2.2 Compensation de l'atténuation par la modélisation d'une exponentielle décroissante

La loi de Beer-Lambert décrit l'absorption d'un faisceau lumineux en fonction de l'épaisseur de milieu traversé. Elle établit ainsi que l'absorption d'un rayon lumineux dans un milieu est proportionnelle à l'intensité lumineuse du rayon, la distance parcourue par ce rayon et la concentration de molécules responsables de l'atténuation. Cette loi peut être décrite par la formule suivante:

$$L(d) = L_0 e^{-\kappa d} \quad (1)$$

avec d la distance parcourue, L_0 l'intensité lumineuse initiale, et κ le coefficient d'absorption du milieu.

Cette loi est fréquemment utilisée en spectrophotométrie. En fixant l'intensité lumineuse et la distance à parcourir, l'absorbance ne devient ainsi plus que fonction de la concentration. Mais cette loi a aussi été utilisée dans des cadres très variés, comme l'évolution de l'état de santé des canopées [117, 125], ou la mesure de la radiation stellaire.

En traitement d'image, la compensation de la loi de Beer-Lambert permet d'améliorer le contraste d'une image en compensant la perte d'intensité lumineuse induite par le milieu. L'hypothèse de départ est alors que seule l'absorption est responsable de l'atténuation de la lumière dans le milieu, négligeant ainsi l'importance de la diffusion ou de la diffraction. Cependant, la loi de Beer-Lambert étant proportionnelle aux concentrations de molécules absorbantes, le coefficient d'atténuation est fonction de toutes les concentrations dans le milieu. Utiliser la loi de Beer-Lambert est facile à réaliser dans un milieu contrôlé ne contenant qu'une molécule absorbante [133]. La modélisation de l'absorption devient cependant plus complexe dans des solutions contenant plus d'espèces de molécules, le coefficient d'absorption de la solution devenant la somme des coefficients d'absorption pour chaque espèce présente dans le milieu.

Ainsi, pour l'imagerie d'échantillons biologiques, tous les tissus ne vont pas contenir les mêmes concentrations d'espèces absorbantes. L'absorption ne peut donc pas être calculée pour une profondeur donnée, mais doit être calculée pour chaque colonne de voxels [141, 147, 153].

Ces approches demandent cependant une grande quantité de calculs, car il est nécessaire d'effectuer une modélisation pour chaque colonne. Pour des images de grande taille, le temps nécessaire à de tels calculs peut être trop long. Il est alors possible de compenser la loi de Beer-Lambert en multipliant les acquisitions. Nous allons donc maintenant voir différentes solutions utilisant la multiplication des acquisitions.

2.2.3 *La multiplication des acquisitions permet de corriger le contraste des images 3D*

Plusieurs approches font appel à des acquisitions successives afin d'améliorer le contraste de l'image finale.

Vibe-Z [169] est un logiciel permettant d'étudier le cerveau de poisson zèbre à 72 hpf. Pour ce faire, un modèle statistique de poisson zèbre a été créé en recalant les marquages au TOTO-3 de 85 échantillons. Chaque échantillon présente en plus un contre marquage pouvant être une révélation par fluorescence par hybridation *in situ*, par immuno-histochimie ou par l'emploi d'une lignée rapportrice. En appliquant à ce contre marquage la matrice de déformation employée pour recalculer le marquage au TOTO-3 sur le modèle statistique, il est alors

possible de connaître la position la plus statistiquement représentative de ce contre marquage. Ceci permet ainsi de mettre en évidence de potentiels colocalisations sans effectuer de multiples marquages.

Vibe-Z comporte deux étapes d'améliorations de contraste basées sur l'utilisation de plusieurs acquisitions. La première étape consiste à comparer chaque acquisition avec une acquisition de la base de données du logiciel. L'acquisition de référence est alors choisie pour être l'acquisition ayant le marquage le plus homogène au sein de la base de données. Le coefficient d'atténuation de chaque voxel est alors calculé comme étant le quotient entre l'intensité de l'échantillon de référence et le coefficient de l'acquisition à améliorer. Cette approche permet donc de corriger le contraste d'une image par l'emploi d'une image de référence. Cependant, cette étape ne permet pas de compenser l'atténuation du signal en profondeur.

Cette correction est réalisée par la seconde étape, qui consiste à calculer le maximum par paire de voxels entre les deux acquisitions corrigées. L'acquisition dorsale permet alors de compenser l'atténuation en profondeur de l'acquisition ventrale et inversement. La fusion de deux acquisitions permet ainsi de corriger les défauts présents sur l'une d'entre elles. En augmentant le nombre d'acquisitions, il est alors possible d'améliorer le contraste de l'image finale.

La fusion de plusieurs acquisitions pour la formation d'une image finale est la base de la tomographie. La tomographie consiste à calculer pour chaque voxel de l'image finale une valeur basée sur une série d'acquisitions 2D. L'exemple le plus connu de tomographie est la tomodensitométrie [80]. Au cours d'un examen tomodensitométrique, plusieurs acquisitions radiologiques sont effectuées pour chaque plan de coupe de l'objet à analyser en effectuant une rotation autour de l'objet. Chaque acquisition 2D pouvant être considérée comme une représentation de la somme des radiodensités pour un pixel, il est possible de combiner ces acquisitions afin de créer une carte de radiodensité. Une fois ces radiodensités calculées, on considère ces valeurs comme les valeurs de gris de l'image. En reconstruisant l'image à partir d'une collection d'images 2D, il a ainsi été possible de reconstruire une image 3D dont le contraste ne varie que peu. Cette méthode a ainsi été employée pour d'autres systèmes d'acquisitions.

Comme présenté en [Section 1.3.2](#), le VAST [152] est un système d'imagerie développé pour permettre l'imagerie haut-débit de poisson zèbre. L'acquisition étant effectuée par le biais de capillaire en verre, il n'est pas possible de réaliser d'imagerie 3D sans développer d'algorithme pour corriger les effets de lentilles induits par le capillaire. Les seuls plans d'acquisition permettant d'éviter ce phénomène sont donc les plans se trouvant au centre du capillaire. Cependant, ce système a été mis au point pour permettre d'effectuer des rotations du capillaire, et donc de l'échantillon à imager.

De cette manière, il est possible d'utiliser le VAST comme un système d'acquisition permettant de faire de la tomographie optique [151], en effectuant plusieurs acquisitions du même échantillon selon des angles différents. En microscopie en champ clair, cette approche a d'ailleurs été employée pour réaliser la volumétrie de la larve entière de poisson zèbre [65]. Mais son utilisation couplée à un système de microscopie confocale peut permettre l'acquisition relativement simple d'images 3D par tomographie optique.

La microscopie par nappe de lumière est une méthode de microscopie par fluorescence [204] (voir Section 1.3). L'illumination de la région à imager est effectuée par la création d'une nappe de lumière. Il est ainsi possible d'illuminer toute une région de l'échantillon, permettant ainsi d'accélérer l'acquisition tout en ayant une résolution axiale comparable à celle d'un microscope confocal. Cependant, la feuille de lumière n'est générée que par une source unique. Tout objet se trouvant ainsi sur le passage de la feuille de lumière peut induire une atténuation lumineuse.

Une solution proposée est le développement d'un système permettant de réaliser une tomographie optique à partir de différentes acquisitions [85, 126]. L'échantillon est alors placé sur une platine motorisée permettant de réaliser des rotations. En permettant de réaliser l'acquisition 3D d'un même échantillon selon différents angles, il devient possible de réaliser une tomographie optique de l'échantillon. Cette approche est intéressante car elle permet de faire une tomographie optique en se basant sur des données tridimensionnelles.

Bien que ces approches permettent d'obtenir des images plus proches de la réalité biologique ou physique de l'échantillon étudié, les dispositifs nécessaires à ces acquisitions sont limitants. Concernant Vibe-Z, il est rare qu'un microscope dispose des deux objectifs permettant de réaliser l'imagerie d'un échantillon selon deux positions opposées. Il est possible de réaliser l'imagerie des deux faces de l'échantillon séquentiellement en retournant l'échantillon, puis de recalibrer les deux acquisitions entre elles, mais la grande quantité de manipulations nécessaires rend cette solution incompatible avec le développement d'une plateforme d'imagerie haut-débit. De la même manière, l'utilisation d'outils comme le VAST demande un système d'imagerie spécifique et peu versatile. Il est ainsi nécessaire de dédier un microscope uniquement à l'imagerie haut-débit, ce qui n'est pas forcément intéressant. Enfin, avec les solutions basées sur la microscopie en nappe de lumière, il est difficilement possible de réaliser un montage permettant l'acquisition de plusieurs échantillons en une seule session d'imagerie. Ces méthodes nécessitent pour la plupart de multiplier les acquisitions nécessaires à la réalisation d'une seule image, augmentant le temps dévolu à l'imagerie et au traitement de l'image. L'approche de l'amélioration de contraste par l'emploi de

plusieurs acquisitions semble en résumé peu compatible avec le développement d'une plateforme de crible haut-contenu.

2.3 ENJEUX DES ALGORITHMES DE RECALAGE ET SEGMENTATION POUR L'ANALYSE HAUT-CONTENU

Le développement d'une procédure d'analyse haut-contenu nécessite le développement de segmentations et d'analyses automatiques, rendues nécessaires par la quantité de données générées, impossible à traiter manuellement, et parce que l'automatisation des analyses assure une meilleure reproductibilité des analyses. Deux enjeux cruciaux pour les analyses automatiques sont la rapidité d'exécution des algorithmes et la robustesse des approches proposées.

2.3.1 *Le temps d'analyse d'image ne doit pas dépasser celui de l'acquisition*

Le développement de procédure d'analyse haut-contenu nécessite le traitement d'un grand nombre d'échantillons en un temps limité, typiquement 96 échantillons imagés lors d'une unique session. Si le temps nécessaire à l'application des algorithmes de segmentation et d'analyse est supérieur au temps nécessaire à l'acquisition, le goulet d'étranglement se situe au niveau du traitement informatique des échantillons.

Les systèmes d'imagerie en 3D créent en effet des images de grande taille et la saturation des disques durs est un problème récurrent. Une seule session nocturne d'imagerie à TPS peut engendrer plusieurs centaines de giga-octets de données et les disques tera-octets sont rapidement saturés. Une fois les échantillons analysés, il est souvent nécessaire de les archiver afin de libérer de l'espace disque pour les futures images. Le problème s'accroît avec l'optimisation des cribles. Un crible de juvéniles de 21 jours, deux fois plus longs et larges que des EE de poisson zèbre, conduit à des images presque 10 fois plus grandes. Or, le temps de traitement étant souvent fonction du nombre de voxels, l'augmentation des tailles des images induit en premier lieu une augmentation du temps de calcul. Le développement d'algorithmes de segmentation automatiques devient alors un compromis entre vitesse d'exécution et exactitude des segmentations obtenues.

Dans la plupart des cas, les méthodes développées depuis plusieurs décennies impliquent des calculs optimisés [155, 197, 199], ce qui permet ainsi souvent de créer des algorithmes rapides. Plus le nombre d'acquisitions nécessaires pour la création d'une image est élevé, plus le temps nécessaire d'enregistrement est long. Ce point est souvent compris dans le temps d'acquisition, car les systèmes d'imageries réalisent cette étape automatiquement en routine après l'acquisition. Néanmoins, pour des stratégies originales comme OPTiSPIM ou la tomographie par VAST, la reconstruction de l'image est à réaliser

par l'utilisateur, ce qui ralentit l'analyse informatique. D'autres traitements peuvent aussi augmenter les temps d'analyse comme le recalage des échantillons ou la correction en profondeur des contrastes des piles d'images. Dans ce cas, l'optimisation de la préparation d'échantillons, du montage ou du système d'imagerie adaptés aux objets à étudier sont nécessaires.

2.3.2 *Les algorithmes de segmentation pour l'analyse haut-contenu: un compromis entre rapidité et robustesse*

La mise au point d'algorithmes de segmentation automatique est nécessaire pour le développement d'une plateforme de crible haut-contenu. Assurer la meilleure précision possible pour cette segmentation est évidemment un point essentiel, mais il peut être plus important de réduire la précision pour assurer une meilleure reproductibilité. En effet, le crible haut-contenu étant basé sur l'analyse de plusieurs dizaines voire centaines d'échantillons, il est préférable d'assurer une plus grande reproductibilité dans l'erreur obtenue, plutôt que de viser une précision très élevée mais une forte variabilité dans cette précision. En se focalisant sur la reproductibilité de l'erreur, le système possède alors un biais constant entre les échantillons. Même si la segmentation n'est pas parfaite, il sera malgré tout possible de comparer les volumes car l'erreur sera identique pour tous les échantillons traités.

Une première approche pour améliorer cette reproductibilité est d'assurer une qualité équivalente pour toutes les images. Le moyen le plus évident permettant d'éviter des écarts de qualité est de fixer des règles précises pour l'imagerie. Cependant, il n'est parfois pas possible d'assurer une qualité d'imagerie constante, pour des raisons diverses, comme des aléas liés aux marquages immuno-histochimique ou à cause de paramètres physiques comme une mauvaise homogénéité de l'indice de réfraction de la solution d'imagerie.

Lorsque les images ne sont pas homogènes en profondeur, l'amélioration de contraste peut permettre de compenser les aléas précédemment cités. Une seconde approche est la création d'algorithmes les plus résistants possibles aux bruits et aux défauts d'imagerie. Une solution simple peut être le développement de méthodes de segmentation basées uniquement sur un seuillage. Mais il est rare que des images issues de microscopie en fluorescence présentent des contrastes homogènes entre échantillons et entre expériences, et le développement de méthodes de segmentations robustes doit bien souvent intégrer une détermination automatique et variable des paramètres de segmentation adaptés à chaque image. Ces approches indispensables sont souvent très longues.

En résumé, le développement d'algorithmes de segmentations automatiques doit répondre à un compromis visant à réduire au maxi-

mum le temps de calcul tout en assurant la plus grande exactitude et reproductibilité possible. Dans la suite de ce manuscrit, j'expliquerai comment une plate-forme d'imagerie à moyen débit a été développée, et les difficultés rencontrées pour optimiser les algorithmes de traitement d'images automatisant la détection du cerveau et du corps de l'alevin du poisson zèbre.

Part II

ALGORITHMES ET RÉSULTATS

MÉTHODE 1 : UNIFORMISER LE MONTAGE PERMET DE SIMPLIFIER ET D'ACCÉLÉRER L'ACQUISITION DES ÉCHANTILLONS

3.1 L'IMPRESSIION 3D PERMET DE CRÉER RAPIDEMENT ET SIM- PLEMENT DES SOLUTIONS DE MONTAGE PEU ONÉREUSES

Grâce aux avantages que l'on présentera dans le [Chapitres 7](#), le développement de l'impression 3D a permis l'émergence d'un grand nombre d'applications. Pour le grand public, la crise actuelle du coronavirus a démontré l'intérêt de l'impression 3D pour des projet simples, comme la production de protections ou de raccords de matériels médicaux [26, 90, 210], ou pour des projets plus complexes, comme la création de respirateurs artificiels ou de [pousse-seringues](#) open-sources [192]. Cette crise a ainsi montré la rapidité et l'adaptabilité de l'impression 3D. Mais la communauté scientifique avait déjà intégré cette technologie pour le prototypage [72], la normalisation d'expériences [157] ou encore l'éducation [121].

L'acquisition automatique des échantillons nécessite la mise en place de procédures simples et reproductibles permettant de placer les échantillons. Différentes procédures de montages ont été publiées ces dernières années. J'ai choisi d'utiliser l'impression 3D, car cette technologie permet de coupler versatilité, simplicité et reproductibilité.

Dans le cadre de l'acquisition automatique, les projets les plus intéressants consistent en la création de tampons comportant des encoches. L'impression de ces tampons dans un support comme l'agarose, une pâte dentaire ou le silicone permet tout d'abord de créer un système de coordonnées précis permettant de simplifier l'automatisation de l'acquisition. En effet, la précision de l'impression 3D permet de définir précisément l'espacement entre deux échantillons. Il est ainsi possible de paramétrer des acquisitions multiples en renseignant la position du premier échantillon puis les distances entre les échantillons.

Un second avantage est la création d'un guide pour faciliter les montages. Dans la plupart des cas, le montage des échantillons dos vers le haut (vue dorsale) est le plus favorable à l'acquisition d'échantillons entiers. En vue latérale, le cristallin et la rétine interfèrent avec la diffusion de la lumière au sein des tissus et mènent à des images inappropriées. Dans le cas d'acquisitions ventrales, la forte quantité de protéines et de lipides se trouvant dans le sac vitellin empêchent l'acquisition au travers de ce tissu. L'utilisation d'un tampon dédié

va permettre de créer des encoches ayant une forme spécifiquement destinée à favoriser le montage dos vers le haut.

Une première publication notable dans l'emploi de l'impression 3D pour le montage d'échantillons de poisson zèbre utilisait des plaques 96 puits [215]. Il s'agissait d'imprimer deux parties distinctes. La première partie, qui doit être imprimée six fois, consiste en une ligne présentant des projections. Ces projections servent à imprimer dans chaque puits de la plaque une encoche dans de l'agarose. Deux formes d'encoches sont proposées, une première permettant le montage en latéral quand la seconde forme permet le montage en position dorsale. La seconde partie à imprimer est un cadre permettant d'assurer l'espacement entre les lignes.

Ce processus permet de placer les échantillons précisément au centre des puits d'une plaque 96 puits tout en simplifiant l'orientation de ces échantillons. Malheureusement, cette méthode présente l'inconvénient de ne pouvoir effectuer des images avec des objectifs plongeants à haut indice de réfraction, leur diamètre étant trop grand pour leur permettre de réaliser des images sans aberration liées aux bord des puits.

Une seconde publication propose l'utilisation de cadres imprimés en 3D permettant de monter les échantillons entre deux lamelles [5]. Dans cette publication, trois parties sont imprimées. La première est un cadre servant de réceptacle pour une première lamelle en verre et un cadre en polydiméthylsiloxane. La lamelle sert de support à une feuille d'agarose. Le cadre en polydiméthylsiloxane sert de joint. La seconde partie est un tampon permettant la création de niches circulaires au sein de la feuille d'agarose. Ces niches vont ensuite accueillir des oeufs de poisson zèbre. Une fois les oeufs placés dans les niches, la feuille d'agarose est recouverte d'une seconde lamelle en verre. Enfin, la dernière partie imprimée est un couvercle permettant de sceller l'ensemble.

Cette stratégie permet de réaliser le montage d'une grande quantité d'échantillons de petite taille, comme des oeufs de poisson zèbre. L'ensemble étant scellé, il est ainsi possible d'imager l'ensemble avec un montage microscopique droit comme un montage inversé. Cependant, la petite taille de la lamelle empêche d'imager des stades tardifs, et la création d'un ensemble scellé empêche l'imagerie d'échantillons très épais.

Enfin, la publication de Kleinhans et Lecaunday en 2019 propose l'impression d'un tampon permettant d'imprimer des encoches dans de l'agarose placé au fond d'une boîte de Petri [100]. Ce tampon permet le montage en latéral d'eleuthéroembryon (EE) de poisson zèbre entre 22 et 96 heures post-fertilisation (hpf). Une fois le tampon imprimé, il est placé sur une tête de vis afin de pouvoir être aisément saisi. Cette approche est comparable à celle que j'ai développée au cours de ma thèse, mais j'ai procédé à plusieurs optimisations.

Elle a pour avantage d'être compatible avec l'utilisation d'objectifs à lentille plongeante, car elle permet de créer des espaces vides autour de la zone d'acquisition. De plus, Il est possible de facilement adapter la forme de la base à différents types de supports, que ce soit des boîtes de Pétri ou des plaques de cultures cellulaires. En revanche, la présence d'une couche d'agarose entre le fond du support de montage et l'échantillon rend l'utilisation de cette solution incompatible avec un montage microscopique inversé.

Dans le cadre de la publication présentée en [Chapitres 7](#), nous avons proposé des tampons permettant de monter 12 ou 48 poissons zèbres à 5 jours post-fertilisation (dpf) (voir [Figure 27](#) et [Figure 28](#)).

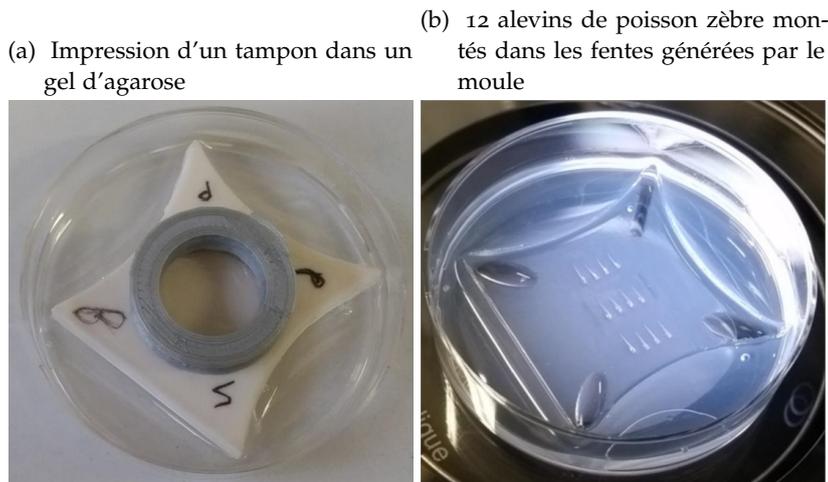


Figure 27: Utilisation d'un tampon pour monter 12 alevins de poissons zèbres.

Cette solution permet de monter facilement et précisément les échantillons afin d'automatiser l'imagerie. En permettant le montage des échantillons dans des boîtes de Petri ou des boîtes de culture cellulaire à un puits, cette approche permet l'utilisation d'objectifs plongeants.

Au cours de ma thèse, d'autres modèles de tampons ont été développés afin de tester la versatilité de notre approche tout en répondant aux demandes variées des utilisateurs de TPS. Ainsi, le tampon créé pour des poissons zèbres à 5 dpf (voir [Figure 29a](#)) a été utilisé pour monter des poissons zèbres entre 3 et 10 dpf. Pour monter des poissons zèbres plus âgés, deux tampons ont été créés, ce qui permet de couvrir l'ensemble des stades entre 3 et 21 dpf. De plus, des formes spécifiques ont été développées pour permettre le montage d'échantillons d' *Oryzias latipes*, ou pour permettre le montage de cerveaux de poisson zèbre à 21 dpf et 6 semaines post-fertilisation (wpf) (voir [Figure 29b](#) et [Figure 29c](#)).

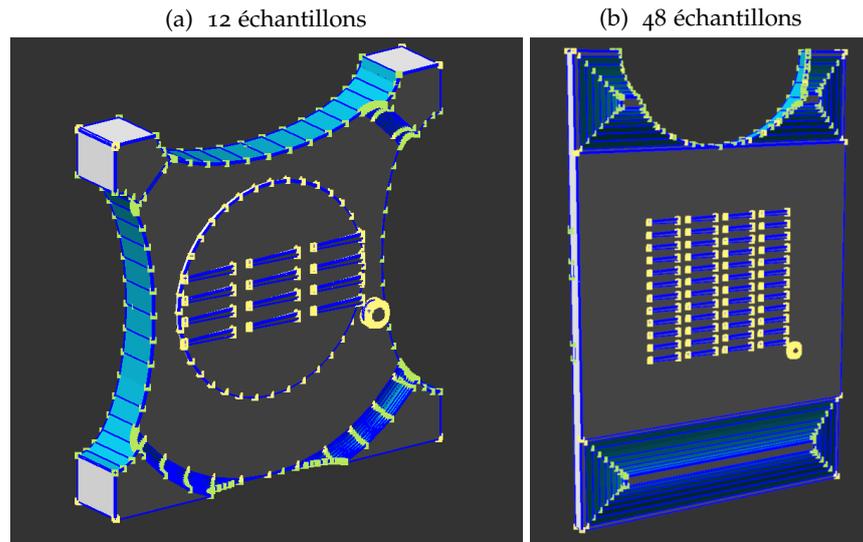


Figure 28: Représentations surfaciques de moules permettant le montage de 12 ou 48 alevins de poissons zèbres. Ces moules permettent d'assurer un espacement régulier entre les échantillons.

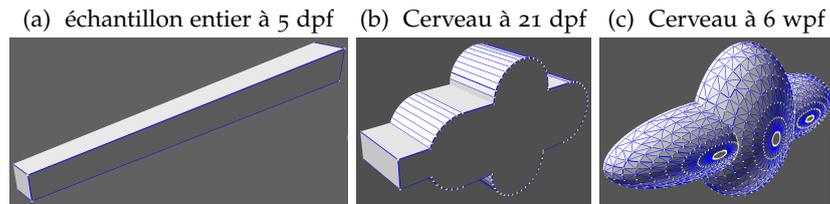


Figure 29: Représentations surfaciques des encoches permettant le montage de poissons zèbres. Ces encoches permettent ainsi de s'adapter à différents stades de développement ou permettent de monter un organe disséqué comme le cerveau.

3.2 PLUSIEURS APPROCHES INFRUCTUEUSES ONT ÉTÉ DÉVELOPPÉES AVANT D'UTILISER L'IMPRESSIION 3D

La méthode de montage présentée dans le cadre de cette thèse et ses dérivés se basent sur la version la plus aboutie des moules. Dans cette section, nous allons faire une rétrospective des approches de montages envisagées, en présentant quelles étaient les perspectives offertes par chaque approche, ainsi que les raisons ayant menées à l'abandon de ces approches.

La première approche développée consistait simplement en l'impression d'une grille type papier millimétré placée sous le fond d'une boîte de Pétri, afin d'aligner le mieux possible les échantillons. Une fois les échantillons placés sur la plaque, ils étaient recouverts d'une goutte d'agarose ou de phytigel afin de les stabiliser.

Cette technique présente de nombreux défauts. Tout d'abord, la qualité d'orientation des échantillons est très mauvaise, et dépend

pour beaucoup de l'opérateur. Ensuite, bien que l'utilisation d'une grille permette un positionnement visuellement bon, l'imprécision générée par cette méthode était incompatible avec les nécessités de l'imagerie par microscopie confocale. Enfin, la mise en place de la goutte d'agarose amplifiait les problèmes précédents, car la larve n'étant pas correctement maintenue en place, il était fréquent que la larve se déplace une fois la goutte d'agarose déposée. Cette méthode nécessitait un compromis important entre vitesse et qualité de montage.

Malgré tout, cette approche a été conservée pour le montage d'échantillons ayant des formes adaptées, comme les coupes épaisses de tissus cérébraux murins. De plus, il s'agit actuellement de la seule méthode permettant d'effectuer l'acquisition d'un même échantillon via un objectif à lentille plongeante et via un montage destiné à un microscope inversé.

Une seconde approche consistait en l'utilisation de deux parties usinées. La première partie était simplement une cuve en aluminium comportant des filetages. C'est sur cette plaque que les échantillons à imager devaient être fixés par une goutte d'agarose. L'aluminium a été choisi afin de favoriser l'adhérence, afin de pouvoir s'assurer de la planéarité de la zone d'acquisition et pour servir de réceptacle étanche et sans risque pour les échantillons. Les filetages servaient à aligner précisément la seconde partie dans cette cuve, et permettaient d'améliorer l'étanchéité entre les deux parties. La seconde partie consistait en une plaque de téflon (un matériau très peu adhérent) possédant des fentes, ainsi que des trous en opposition aux filetages de la cuve en aluminium. La distance entre les fentes a été choisie afin de permettre de charger la plaque via l'utilisation d'un micropipette multi-canaux. Ainsi, la plaque en téflon devait à la fois servir de guide pour le placement des échantillons, puis de cage pour empêcher le déplacement des échantillons lors de l'ajout de l'agarose. L'agarose aurait alors adhéré à la plaque en aluminium.

Cette stratégie a été abandonnée car il était impossible de faire adhérer les échantillons sur le fond de la cuve d'acquisition tout en s'assurant de leur positionnement. En effet, l'agarose se fixait régulièrement dans les fentes de la plaque en téflon lorsque l'étanchéité entre les deux plaques était forte, mais les échantillons passaient entre les deux parties si cette étanchéité était réduite. Plusieurs tentatives de modifications ont été effectuées, comme l'inclusion d'un grillage fixé au fond de la cuve en aluminium permettant de faciliter l'adhérence, ou encore l'addition d'une troisième plaque pour permettre à l'agarose de ne pas rester dans les fentes de la plaque en Téflon, mais aucune des modifications effectuées ne fut en mesure de permettre de rendre cette approche praticable. Notre dernière approche fut l'emploi de l'impression 3D comme décrit précédemment. Cherchant à imprimer des pièces ayant une précision de l'ordre de la centaine

de micromètres, une optimisation des méthodes d'impressions a été nécessaire.

3.3 L'OPTIMISATION DES PARAMÈTRES ET DES CONDITIONS D'IMPRESSION EST NÉCESSAIRE À DES IMPRESSIONS 3D REPRODUCTIBLES

Avec les technologies à budget de moyenne gamme dont nous disposions au laboratoire, l'impression 3D présentait de nombreuses limitations pour la création d'objets précis. Dans cette section, je décris un certain nombre d'optimisations que j'ai réalisées afin de contribuer à la pérennité de cette technologie au sein de la plateforme.

Une première limitation était la taille de la buse, qui empêchait la création d'objets présentant des parties minces. En effet, l'emploi d'une buse d'impression ayant un diamètre de 0.25 mm ne permet pas l'impression d'éléments ayant une taille inférieure à 0.30 mm, à cause de l'étalement de la matière autour du lieu de dépôt. Les puits pour des EE à 5 dpf possédant une taille de 0,25mm dans la région caudale risquaient donc d'être insuffisamment précisément imprimés. Nous avons résolu ce problème en imprimant les régions d'intérêt non plus à l'horizontale mais à la verticale (voir [Figure 30a](#) et [Figure 30b](#)). Comme l'épaisseur minimale d'une couche est de 60 µm en utilisant la même buse de 0.25 mm, il devenait possible de créer des formes possédant la taille désirée avec une précision suffisante. Une ligne de quelques centaines de micromètres devient alors une surface complexe ayant toujours une épaisseur supérieure à la taille limite de 60 µm (voir [Figure 30c](#) et [Figure 30d](#)). Ainsi, j'ai pu imprimer des éléments plus fins (voir [Figure 30e](#) et [Figure 30f](#)).

Malheureusement, en position verticale, lorsque l'impression est orientée orthogonalement à la grande longueur de la plaque, les forces de cisaillement lors des aller-retours très rapides de la buse entraînaient des cassures de la pièce en cours d'impression. Une première stratégie pour résoudre ce problème a été de réduire la vitesse de déplacement de la buse afin de limiter l'impact des déplacements. Cependant, ce réglage s'est révélé insuffisant. Une seconde stratégie a tiré parti du mode d'impression. En effet, Cura produit des fichiers dont l'impression des parties internes de l'objet se fait en diagonale par rapport au plateau de l'imprimante (voir [Figure 31a](#)). Ainsi, afin de permettre de réduire par deux les à-coups, les pièces à imprimer ont été placées de manière à ce que leur plus grande longueur se situe dans la diagonale du plateau d'impression (voir [Figure 31b](#)).

Par ailleurs, l'impression 3D est sensible aux conditions de température ou de flux d'air du local où l'impression est effectuée. Les courants d'air induisaient des défauts aléatoires, surtout avec les pièces fines. Afin de pallier à ce problème, certaines imprimantes 3D (pas l'Ultimaker 2 disponible au laboratoire), possèdent une enceinte fer-

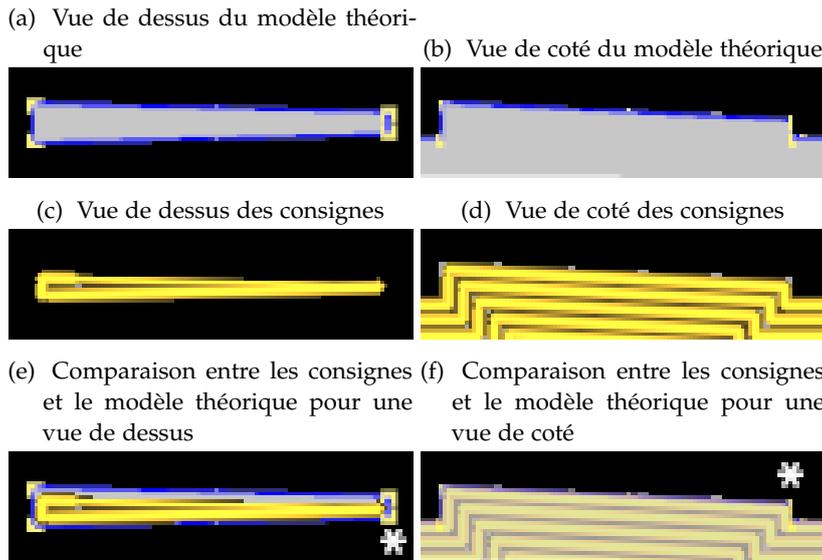


Figure 30: L'impression des tampons à la verticale permet de profiter au mieux de la précision permise par l'impression 3D (taille minimale d'impression : $250\ \mu\text{m}$ à l'horizontal contre $60\ \mu\text{m}$ à la verticale).

Le modèle théorique (a;b) est issu du logiciel de conception 3D **openscad**. Le logiciel de découpe de modèle 3D **Cura 4** permet de traduire le modèle théorique en consigne pour l'impression (c;d) en découpant le modèle en couche que l'imprimante sera capable de déposer. Le comparaison entre le modèle théorique et la consigne obtenue montre des différences importantes si le tampon est imprimé à l'horizontal, différences qui seront amplifiées lors de l'impression (e;f). En particulier, les parties fines prévues pour accueillir la queue de l'EE (astérisque) ne pourront pas être correctement imprimées.

mée, ce qui permet de mieux contrôler la température au sein de cette enceinte. J'ai pu compenser ce problème par l'impression d'une enceinte pare-brise, option permise par le logiciel de découpe par tranche Cura 4 (voir [Figure 31c](#)). De cette manière, une enceinte va se créer autour de l'objet à imprimer, permettant de réduire les risques de courants d'air tout en permettant de maintenir plus facilement une température homogène dans cette enceinte. Cette solution ne permet cependant pas de s'abstenir de protéger complètement l'imprimante contre les courants d'airs, mais constitue une solution d'appoint pour limiter leur impact.

En couplant ces différentes optimisations, j'ai pu réaliser des impressions précises, tout en réduisant les taux d'échec d'impression.

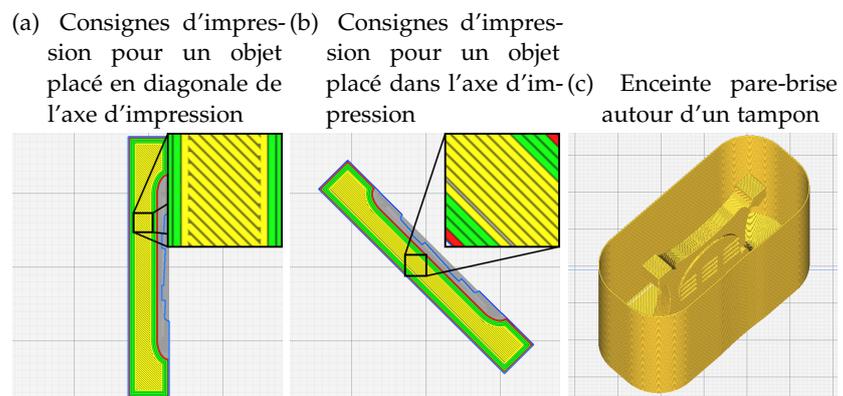


Figure 31: Exemple de solutions permettant l'amélioration de la qualité d'impression.

Comme on peut le voir dans les encarts de (a) et (b), positionner le moule dans l'axe d'impression permet d'augmenter la longueur des allers-retours, ce qui réduit les stress mécaniques et limite les risques de ruptures de la pièce en impression. L'impression d'une enceinte pare-brise simultanément à l'impression des tampons (c) empêche les différences thermiques pouvant affecter la qualité d'impression.

MÉTHODE 2 : PRÉSENTATION D'UN ENSEMBLE D'ALGORITHMES DE SEGMENTATION, DE RECALAGE ET D'AMÉLIORATION DE CONTRASTE

Cette section présente en détails les algorithmes développés au cours de cette thèse. Leur implémentation en Python est disponible sur un [dépôt gitlab](#). L'ensemble des notations utilisées sont disponibles au sein de la table [Table 2](#).

4.1 LE RECALAGE DES ÉCHANTILLONS PEUT ÊTRE RÉALISÉ EN UTILISANT LES CRISTALLINS ET LA MATIÈRE BLANCHE

4.1.1 *Le marqueur lipophile permet la détection de la matière blanche et des cristallins*

Le marqueur lipophile permet de détecter la matière blanche, comme montré en [Section 4.4](#). Cependant, ce marquage a pour particularité de ne marquer que très faiblement les cristallins. Une seconde propriété des cristallins est d'être sphérique. Ces deux particularités permettent ainsi d'imaginer une approche de segmentation automatique des cristallins.

En détectant les deux cristallins, il devient possible de définir l'axe interoculaire de la larve. De plus, le calcul de l'ellipsoïde englobant la matière blanche permet de définir trois axes décrivant la matière blanche. L'axe majeur de la matière blanche décrit ainsi la direction prise par la larve. Ces deux axes peuvent permettre de définir une matrice de transformation permettant d'aligner les échantillons sur le repère de coordonnées.

De prime abord, le calcul des axes décrivant l'ellipsoïde englobant la matière blanche paraît suffisant pour aligner les échantillons. Cependant, le plus grand demi-axe pouvant avoir une longueur importante, il est possible que le cerveau de l'échantillon possède une courbure. En considérant l'axe interoculaire comme axe de référence pour l'alignement des échantillons, l'axe principal de la matière blanche ne sert qu'à définir l'axe de roulis de l'échantillon, ce qui permet de réduire les risques de mauvais alignements dus à de potentielles courbures du cerveau.

Dans le cadre de l'analyse haut-contenu, l'utilisation d'une procédure de recalage rigide a été choisie pour plusieurs raisons. Une fois la matrice de transformation obtenue, le recalage des échantillons est réalisé par l'application d'une transformée affine. Ce calcul pouvant être facilement parallélisé, cette procédure permet de rapi-

Notations	Noms	Definitions
I	une image de $M \times N \times O$ voxels encodée en 12-bit image	$\forall p \in [1, M] \times [1, N] \times [1, O],$ $I(p) \in [0; 4095] \cap \mathbb{Z}$
F	une cadre de $N \times M \times O$ voxels	$\forall x \in [1, M], \forall y \in [1, N], \forall z \in [1, O],$ $F(x, y, z) = \begin{cases} 1 & \text{si } x \in \{0, M\} \\ 1 & \text{si } y \in \{0, N\} \\ 1 & \text{si } z \in \{0, O\} \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases}$
$\max(I)$	Valeur maximale de I	
$\text{local_maxima}(I)$	Maxima locaux de I	
$(I)_{\geq \theta}$	Seuillage	$\forall p \in I,$ $I(p) = \begin{cases} 1 & \text{si } I(p) \geq \theta \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases}$
$\text{inv}(I)$	Inverse de l'image I	$\forall p, \text{inv}(I(p)) = 4095 - I(p)$
\vee	Pointwise maximum	
\wedge	Pointwise minimum	
c_i	cube de taille i^3	
$\delta_{se}(I)$	Dilatation par un élément structurant se	$\bigvee_{v \in se} I_{-v}$
$\delta_{I^2}(I)$	Dilatation géodésique de I utilisant I^2 comme masque	$\bigvee_{v \in I^2} I_{-v}$
$\varepsilon_{se}(I)$	Erosion par un élément structurant se	$\bigwedge_{v \in se} I_v$
$\varphi_{se}(I)$	Fermeture par un élément structurant se	$\delta_{se}(\varepsilon_{se}(I))$
$\gamma_{se}(I)$	Ouverture par un élément structurant se	$\varepsilon_{se}(\delta_{se}(I))$
$\text{grad}_M(I)$	Gradient morphologique de I	$\text{grad}_M(I) = \delta_{s_1}(I) - \varepsilon_{s_1}(I)$
$\gamma_\lambda^\alpha(I)$	Ouverture par volume	$\bigvee_{se, \text{volume}(se)=\lambda} \gamma_{se}(I)$
$\gamma_u^\alpha(I)$	Sélection de la plus grande région	
$\text{median}_{se}(I)$	Filtre médian utilisant un élément structurant se	
$\text{watershed}(I, I^2)$	Ligne de partage des eaux de l'image I en utilisant les racines contenues dans I^2	
$\mu = \text{median}(I)$	Médian scalaire d'une matrice I	$\forall p, M(p) = \text{median}(I)$
$\text{percentile}_q(I)$	Qième pourcentil de l'image I	

Table 2: Notations mathématiques employées.

dement effectuer le recalage, quelque soit le nombre de canaux de

l'image. Contrairement à d'autres approches de recalage, l'approche proposée ne demande pas de référence pour le recalage. Cette procédure peut donc être développée sans demander de préparation initiale. Enfin, cette approche ne consiste qu'en l'application d'une rotation et d'une translation. Elle n'implique donc pas de modifications de la morphologie de l'échantillon, ce qui permet de conserver intactes les dimensions d'origines de l'échantillon. Dans le cadre de cette thèse, le recalage ne visait qu'à permettre la comparaison visuelle d'échantillons. Il était donc nécessaire d'utiliser une méthode ne déformant pas les échantillons. En ne cherchant qu'à comparer les échantillons visuellement, il n'est de plus pas nécessaire de recalibrer très précisément les échantillons. Cependant, la grande quantité d'échantillons à comparer rendait nécessaire l'utilisation d'une méthode rapide, d'où l'emploi d'un recalage rigide.

4.1.2 *Les segmentations de la matière blanche et des cristallins permet la mise en place d'un recalage rigide*

Pour effectuer le recalage rigide, il est nécessaire d'effectuer une segmentation de la matière blanche et de la larve entière. Je vais présenter en [Section 4.2](#) et [Section 4.4](#) deux algorithmes permettant d'obtenir des segmentations précises de ces deux éléments. Cependant, ces segmentations demandent un temps de calcul relativement long. Afin de réduire le temps de calcul si ces segmentations n'ont pas été effectuées, des procédures de segmentation grossières ont été développées, que nous allons commencer par décrire.

Soit I une image représentant l'acquisition d'un marqueur lipophile. Pour réaliser une segmentation de la matière blanche, on commence par réaliser une ouverture par un élément structurant carré de 5 voxels d'arête (2) puis une fermeture par le même élément structurant (3). On calcule ensuite le neuvième décile de cette image (4). La segmentation de la matière blanche est obtenue en conservant tous les voxels supérieurs à cette valeur seuil (5).

$$W'_1 = \gamma_{c_5}(I) \quad (2)$$

$$W'_2 = \varphi_{c_5}(W'_1) \quad (3)$$

$$\beta = \text{percentile}_{90}(W'_2) \quad (4)$$

$$S'_w = T_\beta(W'_2) \quad (5)$$

La segmentation grossière de la larve entière commence par un seuillage. On conserve ainsi tous les voxels ayant une valeur de gris supérieure à 100 (6). On sélectionne la plus grande région pour ne conserver que le plus gros objet détecté par seuillage (7). On ferme ensuite cette sélection par l'application d'un élément structurant carré de 25 voxels d'arête (8). Enfin, afin de supprimer de potentiels trous dans l'objet détecté, on applique une dilatation géodésique d'un cadre en utilisant l'inverse de L'_3 (9). Le résultat de cette dilatation géodésique sera notre segmentation grossière de la larve entière.

$$L'_1 = T_{100}(I) \quad (6)$$

$$L'_2 = \gamma_u^\alpha(L'_1) \quad (7)$$

$$L'_3 = \varphi_{c_25}(L'_2) \quad (8)$$

$$S'_l = \delta_{\text{inv}(L'_3)}(F) \quad (9)$$

Dans la suite, S_l et S_w décriront respectivement la segmentation de la larve entière et la segmentation de la matière blanche, qu'il s'agisse des segmentations grossières ou des segmentations obtenues par l'application des algorithmes dans les [Section 4.2](#) et [Section 4.4](#).

Pour calculer l'axe interoculaire, on commence par réaliser la segmentation des cristallins. On calcule tout d'abord le premier centile de l'image (10). On effectue un seuillage afin de conserver les voxels ayant une valeur inférieure au premier centile (11). Afin de ne conserver que les régions se trouvant à l'intérieur de la larve, on calcule l'intersection entre ce seuillage et la segmentation de la larve entière (12).

$$\zeta = \text{percentile}_1(I) \quad (10)$$

$$E_1 = T_\zeta(I) \quad (11)$$

$$E_2 = E_1 \cap S_l \quad (12)$$

On seuille une seconde fois I pour ne conserver que les voxels ayant une valeur de gris supérieure au médian de I (13). On calcule ensuite

l'union entre ce second seuillage et la segmentation de la larve entière (14). Afin de supprimer de petits éléments pouvant se trouver dans cette image, on calcule une érosion par un élément structurant cubique de 5 voxels d'arête (15), puis une dilatation géodésique de cette érosion en utilisant E_4 comme masque (16).

$$E_3 = T_{\mu(I)}(I) \quad (13)$$

$$E_4 = E_3 \cup S_1 \quad (14)$$

$$E_5 = \varepsilon_{c_5}(E_4) \quad (15)$$

$$E_6 = \delta_{E_4}(E_5) \quad (16)$$

On combine ensuite E_6 et E_2 pour obtenir une carte des racines internes et externes aux cristallins (17). On calcule le gradient morphologique de I (18). On calcule ensuite une ligne de partage des eaux en utilisant E_7 comme liste de racines et E_8 comme carte topologique (19).

$$E_7 = E_6 + 2 * E_2 \quad (17)$$

$$E_8 = \text{grad}_M(I) \quad (18)$$

$$E_9 = \text{watershed}(E_8, E_7) \quad (19)$$

On calcule maintenant la sphéricité de chaque objet de E_9 , et on ne conserve que les objets ayant une sphéricité supérieure à 0.8. En conservant les deux plus grands objets restants, on obtient la segmentation des deux cristallins. En calculant le vecteur unitaire allant du centre de I au centre des deux cristallins, on obtient le vecteur décrivant la translation que l'on souhaite appliquer lors de notre transformation rigide. Appelons ce vecteur T . On calcule ensuite le vecteur unitaire allant du centre du cristallin gauche au centre du cristallin droit. Appelons ce vecteur V_e .

On cherche ensuite à calculer le vecteur décrivant l'axe majeur de la matière blanche. Pour ce faire, on commence par calculer les moments seconds de S_w . Le calcul des vecteurs propres de ces moments permet d'obtenir les vecteurs décrivant l'ellipsoïde englobant la matière

blanche. On conserve le plus grand demi-axe. Pour définir un vecteur unitaire à partir de demi-axe, on oriente le vecteur de manière à ce qu'il aille du centre de la matière blanche vers le projeté du centre de S_l sur la droite définie par le plus grand demi axe et le centre de la matière blanche. De cette manière, ce vecteur est orienté de la tête vers la queue. Appelons le V_m .

Afin d'assurer l'orthogonalité de la base que l'on cherche à définir, on calcule le projeté de V_m sur V_e . Cette projection sera appelée V_p . Afin d'obtenir le troisième vecteur décrivant la rotation à effectuer, on calcule le produit vectoriel entre V_p et V_e . L'orientation de ce vecteur est choisie de manière à pointer du centre de S_l vers le projeté du centre de la matière blanche. Appelons ce vecteur V_t .

Il est donc possible de construire la matrice décrivant la transformation rigide à effectuer en associant T , V_e , V_p et V_t . Appelons cette matrice M_T . Le recalage est alors effectué en calculant la transformée affine de I par M_T .

Une fois la matrice de transformation obtenue, il est possible d'appliquer la transformation affine décrite à n'importe quelle image. Cette approche permet ainsi de calculer une matrice de transformation sur le canal de référence tout en appliquant la même transformation à tous les canaux ayant été acquis simultanément.

4.2 LA SEGMENTATION DE LA LARVE ENTIÈRE DOIT TENIR COMPTE DE LA DÉPERDITION LUMINEUSE, FONCTION DE L'ÉPAISSEUR DE TISSU TRAVERSÉ

4.2.1 *Pourquoi segmenter la larve entière et quelles sont les difficultés?*

La segmentation de la larve entière est une étape essentielle, car elle permet d'abord d'obtenir un important volume pour l'analyse, mais en plus d'initier des calculs ultérieurs. En permettant de mesurer le volume total de l'alevin, on peut par exemple déterminer si un échantillon présente un nanisme. De plus, la mesure du volume de la matière blanche doit être comparée au volume de l'alevin, pour par exemple caractériser si un polluant a un impact plus fort sur le développement du cerveau que sur le reste du corps. De plus, au cours de cette thèse, la détection de la larve entière a été utilisée comme étape initiale pour le calcul d'autres algorithmes, comme le recalage des larves avec le système de coordonnées de l'acquisition ou encore le calcul des améliorations de contrastes que sont la segmentation-based depth-dependent contrast correction ou la segmentation-based label compensation.

La segmentation de la larve entière semble a priori aisée, par exemple par l'utilisation d'un simple seuillage. En effet, à première vue, la larve est facilement différenciable du reste de l'image. Néanmoins, la perte de lumière induite par des solutions de clarifications insuff-

isamment puissantes entraîne une perte de contraste et de luminosité en profondeur. On doit donc adapter la segmentation à ce défaut car la segmentation par seuillage ne fonctionne pas. On réalise une première segmentation par l'emploi d'une ligne de partage des eaux, puis une amélioration de la segmentation par la réduction du signal du côté de l'acquisition.

4.2.2 *Un algorithme de segmentation pensé pour diminuer les temps de calcul*

Considérons I comme l'image 3D produite pendant l'acquisition d'une larve de poisson zèbre.

Afin de réduire le temps de calcul, une première segmentation par watershed est calculée sur une version sous-échantillonnée de I . Appelons D l'image sous-échantillonnée. Le sous-échantillonnage est réalisé en calculant un spline d'interpolation de degré 3 avec un facteur de zoom de 0.25. D subit tout d'abord une fermeture par un élément structurant cubique de 5 voxel d'arête (20). Cette image fermée est alors seuillée deux fois, une première fois pour conserver les pixels ayant une valeur supérieure à 150 (21), une seconde fois pour conserver les voxels nuls (22). Ces deux seuillages sont alors utilisés pour définir des régions supposées internes et externes à notre échantillon (23).

$$D_1 = \varphi_{c_5}(D) \quad (20)$$

$$D_2 = T_{150}(D_1) \quad (21)$$

$$D_3 = \text{inv}(T_0(D_1)) \quad (22)$$

$$D_4 = D_3 + 2D_2 \quad (23)$$

La définition de ces régions va permettre de définir des racines pour l'initialisation du calcul de ligne de partage des eaux. On définit tout d'abord une carte des maxima locaux de D_1 (24). Les racines sont alors définies comme le produit entre la carte des maxima et les régions définies par D_4 (25). Une fois ces racines calculées, on va aussi calculer le gradient morphologique de D_1 (26). En utilisant ces racines et ce gradient morphologique, on calcule enfin la ligne de partage des eaux (27). Enfin, on sélectionne la région la plus grande pour ne conserver que le plus gros objet défini par la ligne de partage

des eaux (28). Ce plus gros objet est considéré comme une première segmentation de la larve entière.

$$D_5 = \text{local_maxima}(D_1) \quad (24)$$

$$D_6 = D_5 * D_4 \quad (25)$$

$$D_7 = \text{grad}_M D_1 \quad (26)$$

$$D_8 = \text{watershed}(D_7, D_6) \quad (27)$$

$$D_9 = \gamma_u^\alpha(D_8) \quad (28)$$

En effectuant cette procédure sur une image sous-échantillonnée, on obtient un résultat de segmentation insuffisant. Cependant, cette première segmentation peut servir à la définition d'une boîte englobante qui permet d'effectuer un nouveau calcul de ligne de partage des eaux sur l'image à résolution originale. En réduisant la taille de l'image à traiter, cette approche permet ainsi de réduire le temps nécessaire au calcul de cette première étape. Appelons B la région de I se trouvant au sein de la boîte englobante. On commence par appliquer à B une fermeture par un élément structurant cubique de 7 voxels d'arête (29). On applique ensuite une ouverture par le même élément structurant (30). On calcule ensuite deux seuillages, un premier conservant les voxels de B_2 ayant une valeur supérieure à 200 (31) et un second conservant les voxels ayant une valeur inférieure à 50 (32). Grâce à ces deux seuillages, on définit une carte de zones internes et externes (33). On calcule ensuite la position des maxima locaux (34), pour ensuite définir une liste de racines (35). On calcule ensuite un gradient morphologique de B_2 (36). On calcule une ligne de partage des eaux en utilisant B_7 et B_8 (37). Enfin, on sélectionne la région la plus grande pour ne conserver que le plus gros objet obtenu par le calcul de la ligne de partage des eaux (38).

$$B_1 = \varphi_{c_7}(B) \quad (29)$$

$$B_2 = \gamma_{c_7}(B_1) \quad (30)$$

$$B_3 = T_{200}(B_2) \quad (31)$$

$$B_4 = \text{inv}(T_{50}(B_2)) \quad (32)$$

$$B_5 = B_4 + 2B_3 \quad (33)$$

$$B_6 = \text{local_maxima}(B_2) \quad (34)$$

$$B_7 = B_5 * B_6 \quad (35)$$

$$B_8 = \text{grad}_M(B_6) \quad (36)$$

$$B_9 = \text{watershed}(B_8, B_7) \quad (37)$$

$$B_{10} = \gamma_{\alpha u}(B_9) \quad (38)$$

Ces étapes permettent ainsi d'obtenir rapidement une segmentation de la larve entière. Cependant, comme décrit précédemment, la méthode de clarification de tissus employée induit une déperdition de contraste proportionnelle à la quantité de tissus rencontrée. Posons b le dernier plan de I depuis le côté de l'acquisition. Afin de corriger ce défaut et éviter une sur-segmentation de l'échantillon du côté de l'acquisition, nous avons développé une procédure de seuillage directionnel. La première étape consiste à calculer une somme cumulative depuis le plan d'acquisition (39). Cette somme est alors considérée comme une mesure de la distance que doit parcourir un photon au sein des tissus. On calcule alors la valeur du médian de valeur de gris pour chaque couche et on détermine la couche d_{\max} , couche ayant la valeur médiane la plus élevée. Cette couche est considérée comme la dernière couche de l'échantillon pour laquelle la déperdition lumineuse n'est pas mesurable. On applique alors un seuillage afin de ne conserver que les couches de l'échantillon se trouvant au dessus de cette couche limite (40). Enfin, on calcule un seuillage conservant les voxels ayant une valeur de gris supérieure à 500 au sein de L_2 (41). Enfin, afin de supprimer les trous au sein de l'échantillon, on

applique une dernière fermeture par un élément structurant cubique de 51 voxels d'arête (42).

$$\forall z \in [0, b], L_1(z) = \sum_{n=1}^z (B_{10}(n)) \quad (39)$$

$$L_2 = \text{inv}(T_{d_{\max}}(L_1) \cap B_{10}) \quad (40)$$

$$L_3 = T_{500}(I) * L_2 + B_{10} \cap T_{d_{\max}}(L_1) \quad (41)$$

$$S_1 = \varphi_{c_{51}}(L_3) \quad (42)$$

4.3 UN ALGORITHME QUI COMPENSE LA PERTE LUMINEUSE EN PROFONDEUR DANS L'ÉCHANTILLON NÉCESSITE D'AVOIR SEGMENTÉ L'ÉCHANTILLON ENTIER

4.3.1 Description des hypothèses sous-tendant la logique de l'algorithme

Lors de l'acquisition d'échantillons de poissons zèbres clarifiés par simple immersion, il subsiste une diminution de la lumière au sein des tissus. Cette atténuation étant proportionnelle à la quantité de tissus traversée, on peut supposer qu'elle suit la loi de Beer-Lambert décrite en [Section 2.2.2](#). Comme expliqué en [Section 1.4.2](#), la clarification de tissus permet d'homogénéiser l'indice de réfraction de l'échantillon. En considérant l'indice de réfraction comme constant, l'atténuation par la loi de Beer-Lambert est donc uniquement fonction de la profondeur de tissus pénétrés.

En partant de cet a priori, nous avons développé une méthode de compensation de contraste, le segmentation-based depth-dependent contrast correction (SBDDCC). En utilisant la segmentation de la larve entière obtenue en [Section 4.2](#), il est possible de mesurer la distance parcourue par les photons au sein des tissus (voir [Figure 32b](#)). Cette carte des distances permet alors de déterminer une métrique qui permettra de déterminer le coefficient d'absorption des tissus. Nous avons choisi d'utiliser le médian des valeurs de gris en fonction de la profondeur de tissu traversée comme métrique. Ce choix a été réalisé car il s'agit d'une métrique simple à calculer, et qui est moins sensible au bruit que la moyenne des valeurs de gris. Cette métrique pourrait permettre de modéliser la décroissance exponentielle au sein des tissus, ce qui permettrait de connaître le coefficient d'absorption. Cependant, cette étape de modélisation aurait demandé un temps de

calcul important. Pour éviter cela, j'ai choisi de normaliser les valeurs de médians pour les couches profondes. Cette solution permet de rapidement obtenir une compensation de la déperdition lumineuse avec la profondeur (voir [Figure 32c](#)).

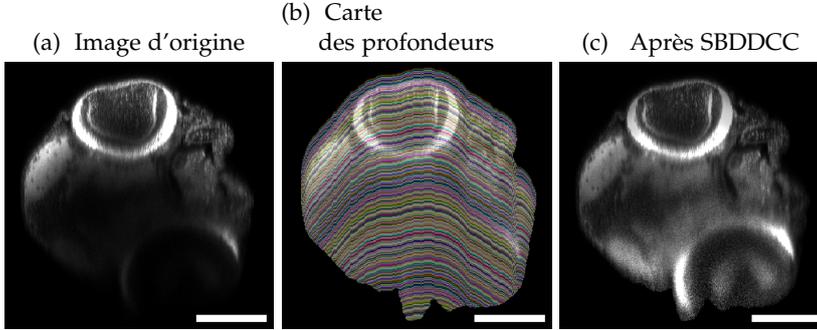


Figure 32: Résultat de l'application du SBDDCC visualisé sur une coupe transversale d'alevins de poisson zèbre.

Cet algorithme commence par calculer le médian des valeurs de gris en fonction de la profondeur de tissus traversée. Cette fonction est ensuite utilisée pour normaliser les médians des couches profondes, ce qui permet de compenser l'atténuation lumineuse au sein de l'échantillon.

Barre d'échelle: 250 μm

4.3.2 Un algorithme compensant la déperdition lumineuse en fonction de l'épaisseur des tissus traversés

Considérons I l'acquisition à traiter et S_{larva} la segmentation de la larve entière au sein de cette acquisition (Voir la [Section 4.2](#) pour une description de l'algorithme permettant la segmentation de la larve entière).

Soit b le dernier plan de I dans le sens de l'acquisition. On calcule tout d'abord une somme cumulative de S_{larva} dans le sens de l'acquisition (43). On multiplie ensuite cette somme cumulative par S_{larva} pour obtenir une carte de la quantité de tissus à parcourir depuis le plan d'acquisition (44). Soit d une quantité de tissus à pénétrer quelconque, d_b la plus grande quantité de tissus à pénétrer.

$$\forall z \in [0; b], C_1(z) = \sum_{n=1}^z S_{\text{larva}}(n) \quad (43)$$

$$C_2 = C_1 * S_{\text{larva}} \quad (44)$$

On calcule la valeur de gris médiane des voxels de I se trouvant pour chaque couche. Appelons $\mu(d)$ la valeur médiane de I pour la couche

d , μ_{\max} la valeur maximale de $\mu(d)$ et d_{\max} l'indice de μ_{\max} au sein de $\mu(d)$. L'amélioration de contraste est réalisée en multipliant chaque valeur de gris au sein des couches d plus grande que d_{\max} par μ_{\max} divisé par μ_d (45).

$$\forall d \in [d_{\max}; d_b], I_c(d) = I(d) * \frac{\mu_{\max}}{\mu(d)} \quad (45)$$

4.4 LA SEGMENTATION DE LA MATIÈRE BLANCHE, UNE ÉTAPE CENTRALE DE LA PLATEFORME ZBI.

4.4.1 *Le marqueur lipophile révèle fortement la matière blanche*

Les marqueurs lipophiles marquent fortement les lipides, ce qui entraîne deux types de marquages au sein du poisson zèbre. En marquant les lipides contenus dans les membranes, ils produisent un marquage dans l'ensemble de l'échantillon. Dans le cadre de la détection de la matière blanche cérébrale, ce marquage peut être considéré comme du bruit, bien qu'il permette de réaliser la segmentation de la larve entière. Le second marquage est le marquage des fibres de myéline qui entoure certaines projections neuronales. Ces gaines de myélines, formées de lipides, servent à isoler l'axone. De cette manière, les gaines de myéline permettent d'accélérer la propagation du potentiel d'action au sein des neurones, tout en protégeant l'axone de potentielles agressions. La forte teneur en lipides de ces gaines de myéline va induire un marquage beaucoup plus intense, ce qui permet de détecter la matière blanche cérébrale.

L'étude de la matière blanche est intéressante en recherche biomédicale pour plusieurs raisons. Tout d'abord, certaines pathologies comme la sclérose en plaque ou les formes démyélinisantes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth altèrent la myéline. La matière blanche peut donc être un marqueur de l'avancement d'une de ces maladies, et peut ainsi servir à étudier la réponse du poisson zèbre à un traitement visant à soigner une de ces pathologies [25, 105]. Le cerveau peut être découpé en deux parties différentes : la matière grise, composée principalement des corps cellulaires des neurones et de certaines cellules gliales, et la matière blanche, composée des projections myélinisées des neurones. La mesure de la matière blanche peut donc être une première approximation du volume cérébral en l'absence de marqueur de la matière grise. Cela doit être utilisé avec précaution, car il est possible que le ratio entre matière grise et matière blanche soit affecté par une pathologie ou un agent neurotoxique. Mais en étant couplé à une détection de la matière grise, la détection de la matière blanche peut donc permettre de détecter une anomalie dans le développement cérébral en mesurant le ratio entre matière grise

et matière blanche et peut permettre la mesure du volume total du cerveau.

Cette thèse a donc été l'occasion de développer un algorithme de segmentation de la matière blanche en utilisant les propriétés des marqueurs lipophiles.

4.4.2 Un algorithme pour isoler le cerveau des autres régions marquées

Considérons I comme une acquisition d'un marqueur lipophile. Si la segmentation de la larve entière a été réalisée, I est réduit à la boîte englobante de la segmentation de la larve entière afin de réduire le temps de calcul. De plus, s'il a été jugé utile de réaliser un SBDDCC (voir [Section 4.3](#)), l'image à segmenter peut être l'image après application de l'algorithme de correction de contraste. Dans la suite, I décrira ainsi indistinctement quatre types d'images: une image brute, la sous-région de l'image brute contenant la larve, l'image après application de SBDDCC ou encore la sous-région de l'image après SBDDCC dans laquelle se trouve la larve.

Afin de réduire l'importance du bruit, on applique une ouverture par un élément structurant cubique de 5 voxels d'arête (46) puis une fermeture par le même élément structurant (47).

$$W_1 = \gamma_{c_5}(I) \quad (46)$$

$$W_2 = \varphi_{c_5}(W_1) \quad (47)$$

On calcule ensuite les valeurs de gris représentant le médian des valeurs de gris de l'image (48) et le neuvième décile des valeurs de gris de l'image (48). On seuille ensuite W_2 une première fois pour conserver les voxels supérieurs au neuvième décile (50), puis une seconde fois pour conserver les voxels inférieurs au médian (51). On applique à ce second seuillage une érosion par un élément structurant cubique de 15 voxels d'arête (52).

$$\mu_w = \text{median}(W_2) \quad (48)$$

$$\alpha = \text{percentile}_{90}(W_2) \quad (49)$$

$$W_3 = T_\alpha(W_2) \quad (50)$$

$$W_4 = \text{inv}(T_{\mu_w}(W_2)) \quad (51)$$

$$W_5 = \varepsilon_{c_{15}}(W_4) \quad (52)$$

On associe le résultat de cette érosion avec le premier seuillage pour obtenir une première approximation des zones internes et externes à la matière blanche (53). On calcule ensuite la liste des maxima locaux de W_2 (54). En combinant la liste des maxima locaux avec les zones précédemment calculées, on obtient une liste de racines intérieures et extérieures à la matière blanche (55)

$$W_6 = W_5 + 2W_3 \quad (53)$$

$$W_7 = \text{local_maxima}(W_2) \quad (54)$$

$$W_8 = W_7 * W_6 \quad (55)$$

On calcule maintenant le gradient morphologique de W_2 (56). On utilise ensuite le gradient morphologique et W_7 pour calculer une ligne de partage des eaux (57). Cette ligne de partage des eaux permet de détecter la matière blanche, mais détecte aussi d'autres régions présentant des marquages importants, comme le sac vitélin. Afin de supprimer ces éléments, on sélectionne la région la plus grande du résultat de la ligne de partage des eaux (58).

$$W_9 = \text{grad}_M(W_2) \quad (56)$$

$$W_{10} = \text{watershed}(W_9, W_8) \quad (57)$$

$$W_{11} = \gamma_u^\alpha(W_{10}) \quad (58)$$

Cette procédure détruit cependant toutes les petites régions cérébrales. Pour les récupérer, on commence par calculer une dilatation de W_{11} par un élément structurant cubique de 11 voxels d'arête (59). On calcule ensuite l'intersection entre le résultat du calcul de la ligne de partage des eaux et la dilatation précédente (60). La segmentation finale est alors la dilatation géodésique de l'intersection en utilisant le résultat du calcul de la ligne de partage des eaux comme masque (61).

$$W_{12} = \delta_{c_{11}}(W_{11}) \quad (59)$$

$$W_{13} = W_{12} \cap W_{W10} \quad (60)$$

$$S_w = \delta_{W_{10}}(W_{13}) \quad (61)$$

ARTICLE 1 : LA FIBRILLARINE EST ESSENTIELLE POUR LA PROGRESSION DE LA PHASE S ET LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE DANS LA RÉTINE ET LA PARTIE DORSALE DU MÉSENCÉPHALE DU POISSON ZÈBRE

5.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1

La biogénèse des ribosomes est un processus central pour les cellules qui recouvre l'ensemble des processus biologiques de production de ribosomes. Elle implique un grand nombre de protéines telles que la Fibrillarine (Fbl) par exemple. Cette protéine est aussi impliquée dans la méthylation des ARNs ribosomiques et des histones de l'ADN ribosomique.

Les études de la perte de fonction de gène *fbl* chez la levure et la souris ont montré que cette protéine était nécessaire au développement précoce. De plus, il a été démontré que cette protéine joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire et l'identité des cellules souches. Enfin, une surabondance de Fbl est mesurable chez les patients atteints de plusieurs formes de cancers, comme certains cancers du sein, certaines néoplasies prostatiques intra-épithéliales ou encore certains carcinomes des cellules squameuses cervicales. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliquant Fbl dans la régulation du cycle cellulaire pourrait ouvrir de nouvelles pistes dans des domaines thérapeutiques variés.

Le poisson zèbre a été choisi dans le cadre de cette étude car, en plus des avantages présentés au chapitre 1, il possède une région ayant une croissance orientée dans la partie dorsale du cerveau moyen, nommée le toit optique. Cette région présente ainsi des colonnes ordonnées de cellules possédant un gradient de différenciation croissant allant de la périphérie vers le centre de la structure. L'observation de cette région est ainsi idéale pour étudier le rôle de la Fbl dans le contrôle du cycle cellulaire et l'homéostasie cellulaire.

Entre autre, deux marqueurs du système nerveux central ont été employés. Le premier est un marqueur des lipides, le DiI, permettant de mesurer le volume de la matière blanche et des yeux. Le second est un marquage par anticorps anti-HuC/D, protéine produite par le gène *elavl3*. Cette protéine étant impliquée dans la neurogénèse, son marquage permet de visualiser les corps cellulaires des neurones en différenciation. En couplant ces deux marqueurs, on peut mesurer la taille du cerveau, et aussi détecter une anomalie de la neurogénèse.

Nous avons ainsi mis en évidence que les mutants $fb^{hi2581Tg}$ présentent une forte diminution du volume cérébral et du volume des yeux. La réduction du volume cérébral est particulièrement notable dans la partie dorsale du mésencéphale. De plus, l'étude du marquage anti-HuC/D a permis de mettre en évidence un défaut de neurogénèse dans ce même mésencéphale.

Dans le cadre de cette thèse, les résultats d'intérêts publiés au sein de *Developmental Biology* [19] sont les suivants:

- L'emploi d'un marqueur des lipides permet de mesurer le volume de la matière blanche ainsi que le volume de la rétine.
- La mesure de ces deux volumes permet de mettre en évidence la présence d'une microcéphalie et d'une microphthalmie chez les mutants *fb*.
- Un marquage par un anticorps anti-HuC/D permet de détecter la matière grise.
- Une segmentation de la matière grise permet de mettre en évidence un défaut de neurogénèse au sein de la partie dorsale du mésencéphale de ces mutants.
- Ces deux marqueurs sont donc des candidats privilégiés dans l'analyse des volumes cérébraux.
- La segmentation de ces deux marqueurs permet ainsi de mettre en évidence de potentiels défauts induits par une mutation.

Pour réaliser ces mesures, nous avons réalisé des segmentations manuelles. Dix-huit échantillons ont été segmentés, six mutants homozygotes, six mutants hétérozygotes et six sauvages. Pour cette étude, quatre segmentations ont été réalisées pour chaque échantillon: Le cerveau, la zone HuC/D positive, l'oeil gauche et l'oeil droit. Une semaine complète a été nécessaire pour réaliser les soixante-douze segmentations nécessaires. La segmentation manuelle d'un grand nombre d'échantillons nécessiterait donc l'emploi d'une personne uniquement dédiée à cette tâche. Il est ainsi apparu nécessaire de mettre en place des algorithmes de segmentations automatiques pour permettre le développement d'une plateforme d'HTA (analyse d'image à haut-débit) dédiée à l'étude des défauts pouvant être provoqués par une mutation ou un produit neurotoxique. Le développement de tels algorithmes a donc été un élément central de cette thèse, et est présenté en [Chapitres 6](#) et en [Chapitres 9](#).

De plus, cette étude met en évidence que la localisation d'un défaut de neurogénèse au sein de la partie dorsale du mésencéphale n'aurait pas été possible avec une seule vue dorsale 2D de l'échantillon. La multiplication des plans d'acquisition afin d'obtenir des voxels isotropiques est nécessaire pour permettre la mesure précise de déformation du système nerveux central.

5.2 ARTICLE 1 PUBLIÉ DANS DEVELOPMENTAL BIOLOGY



Fibrillarin is essential for S-phase progression and neuronal differentiation in zebrafish dorsal midbrain and retina



Stéphanie Bouffard^a, Emilie Dambroise^{a,1}, Alessandro Brombin^{a,2}, Sylvain Lempereur^{b,c}, Isabelle Hatin^d, Matthieu Simion^a, Raphaël Corre^{a,3}, Franck Bourrat^a, Jean-Stéphane Joly^{a,b}, Françoise Jamen^{a,*}

^a INRA CASBAH Group, Neurosciences Paris-Saclay Institute, CNRS, Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, Gif-sur-Yvette, France

^b Tefor Core Facility, TEFOR Infrastructure, NeuroPSI, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

^c Université Paris-Est, LIGM, ESIEE, Noisy-le-Grand, France

^d Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Bâtiment 400, 91400 Orsay, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ribosome biogenesis
Danio rerio
 Cell cycle regulation
 Optic tectum
 Differentiation
 Neural progenitors

ABSTRACT

Fibrillarin (Fbl) is a highly conserved protein that plays an essential role in ribosome biogenesis and more particularly in the methylation of ribosomal RNAs and rDNA histones. In cellular models, FBL was shown to play an important role in tumorigenesis and stem cell differentiation. We used the zebrafish as an *in vivo* model to study Fbl function during embryonic development. We show here that the optic tectum and the eye are severely affected by Fbl depletion whereas ventral regions of the brain are less impacted. The morphogenesis defects are associated with impaired neural differentiation and massive apoptosis. Polysome gradient experiments show that *fbl* mutant larvae display defects in ribosome biogenesis and activity. Strikingly, flow cytometry analyses revealed different S-phase profiles between wild-type and mutant cells, suggesting a defect in S-phase progression.

1. Introduction

Fibrillarin (Fbl) is an essential nucleolar protein with a sequence and function conserved throughout evolution (Rodriguez-Corona et al., 2015; Shubina et al., 2016). This protein needs to associate with two other core proteins Nop56 and Nop58 and the RNA-binding protein 15.5-kDa in order to function as methyltransferase. Guided by C/D box small nucleolar RNAs (snoRNAs), fibrillarin catalyzes the 2'-O-methylation (2'-O-Me) of ribosomal RNAs (rRNAs). This post-transcriptional modification is crucial for the precise cleavage and maturation of rRNA, essential for its correct folding and association with ribosomal proteins (Mullineux and Lafontaine, 2012). The 2'-O-Me thus participates to the regulation of ribosome activity. Indeed it has been recently shown that the knockdown of FBL in human cells alters the intrinsic capacity of ribosomes to initiate translation from internal ribosome entry site (IRES) elements (Erales et al., 2017). Finally fibrillarin is also involved in the methylation of histone H2A at rDNA loci, and plays a major role in the regulation of rDNA transcription (Tessarz et al.,

2014).

Although ribosome biogenesis is a ubiquitous and fundamental process, fibrillarin expression level was recently shown to vary depending on physiological and pathological contexts (Marcel et al., 2013; Recher et al., 2013; Su et al., 2014; Watanabe-Susaki et al., 2014; Rodriguez-Corona et al., 2015). Previous functional studies on fibrillarin have highlighted its importance in several cellular processes. In particular, loss-of-function analyses in yeast and mice have shown that fibrillarin is required for cell survival and early development (Schimmang et al., 1989; Newton et al., 2003). In addition, Watanabe-Susaki et al. showed in cell culture that FBL is important for cell homeostasis and stem cell identity, through the regulation of pluripotency and ability of pluripotent stem cells to differentiate (Watanabe-Susaki et al., 2014). FBL plays a particularly important role in cell cycle regulation, as highlighted by the abnormally high levels of this protein in several cancers, including human breast cancer (Marcel et al., 2013; Su et al., 2014), squamous cell cervical carcinoma (Choi et al., 2007) and prostatic intraepithelial neoplasia (Koh et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: francoise.jamen@cnrs.fr (F. Jamen).

¹ Present address: INSERM U1163, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France.

² Present address: MRC Human Genetics Unit, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

³ Present address: Institut Gustave Roussy, UMR8200, CNRS, Villejuif, France.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.006>

Received 5 September 2017; Received in revised form 11 January 2018; Accepted 13 February 2018

Available online 23 February 2018

0012-1606/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

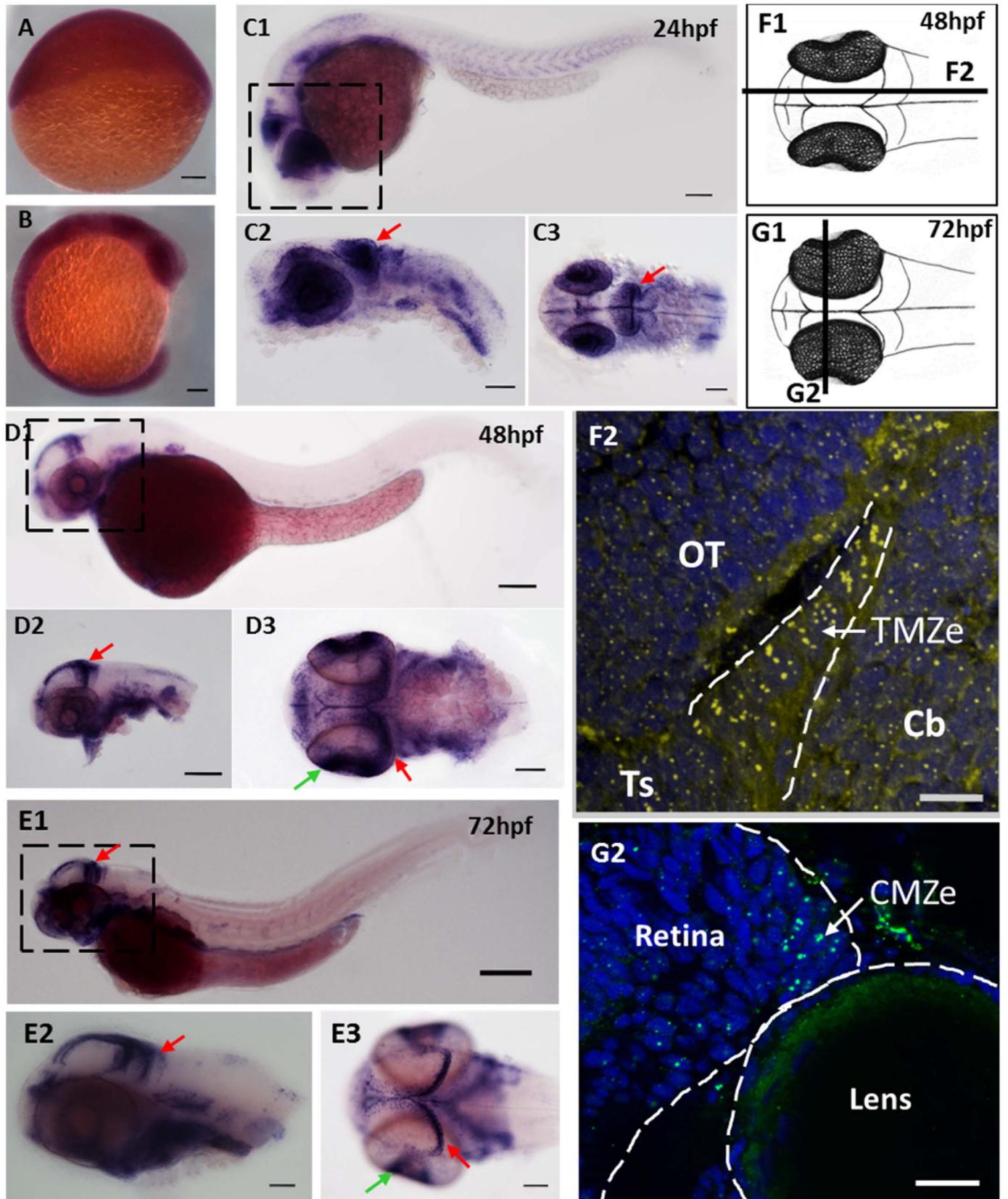


Fig. 1. *fbl* transcripts and Fbl protein are preferentially expressed in neural progenitors during zebrafish development. **(A–E)** *In situ* hybridization showing the progressive restriction of *fbl* expression during the development of zebrafish embryos **(A)** *fbl* is ubiquitously expressed at 6 hpf. **(B)** *fbl* expression begins to be restricted to highly proliferative regions (eyes, midbrain, and somites) during neurulation **(C)** At 24 hpf, *fbl* transcripts are abundant in the optic tectum (red arrows) and the retina. C1–C2: lateral views, C3: dorsal view **(D–E)** At 2 dpf **(D)** and 3 dpf **(E)**, *fbl* is preferentially expressed in the neuroepithelial progenitors of the TMZe at the periphery of the OT (red arrows), and in the external edge of the ciliary marginal zone (CMZe) of the retina (green arrows). Additional expression can be detected in the digestive system D1–D2 and E1–E2: lateral views, D3 and E3: dorsal views. Scale bars: 100 μ m. Anterior is to the left. **(F)** F1: Drawing of a 2dpf zebrafish embryo in dorsal view. The dark line corresponds to the sagittal section represented in F2. F2: Immunostaining showing Fbl protein on a sagittal section of a 2 dpf embryo. The Fbl protein, which is localized in the nucleoli, is present in all cells (yellow dots) but the punctate domains of expression are larger in TMZe neuroepithelial progenitors (surrounded by white dashed lines) than in other cells in the optic tectum (OT), cerebellum or *torus semicircularis*. **(G)** G1: Drawing of a 3dpf zebrafish embryo in dorsal view. The dark line corresponds to the transverse section represented in G2. G2: Immunostaining showing Fbl protein on a transverse section of a 3dpf embryo. The Fbl protein accumulates at the periphery of the retina where neuroepithelial cells are located (CMZe). Scale bars: 25 μ m. Ch: cerebellum; CMZe: external edge of the ciliary marginal zone; OT: optic tectum; Ts: *torus semicircularis*; TMZe: external edge of the tectal marginal zone.

2011). Marcel et al. also showed in breast cancer cell lines, that *FBL* overexpression leads to aberrant rRNA methylation, changes in ribosome activity, poor translation fidelity and an increase in the initiation of IRES-dependent translation for the products of cancer-related genes, such as IGF1R, c-Myc and FGF1/2 (Marcel et al., 2013). Conversely, the repression of *FBL* with siRNA decreases the proliferation of breast cancer cells (Su et al., 2014). Understanding the integrated roles of *FBL* in cell cycle regulation, cell proliferation and ribosome biogenesis has therefore become a real challenge.

The zebrafish is an ideal model for *in vivo* functional study. In zebrafish, the dorsal part of the midbrain, the optic tectum (OT) displays oriented growth during development, leading to the formation of ordered columns of cells with different levels of differentiation, from the periphery towards the center of the structure (Nguyen et al., 1999; Deves and Bourrat, 2012). This cellular model is thus ideal for studies of the specific role of *Fbl* in cell cycle regulation and cell homeostasis (Joly et al., 2016). At early stages of development, the proliferative neural population is located throughout the alar plate. Following somitogenesis, progenitor cells differentiate into functional neurons, which are found at the center of the OT. However, proliferation persists in a small zone of the midbrain, at the periphery of the optic tectum. This zone, homologous to the proliferative zone of the retina, is called the tectal marginal zone (TMZ; Joly et al., 2016).

Using live imaging, we previously identified two types of progenitors on the basis of their rates of proliferation in the transparent embryo (Recher et al., 2013). The neuroepithelial progenitors located at the external edge of the TMZ (TMZe) are slow-amplifying progenitors (SAPs). SAPs divide and give rise to fast-amplifying progenitors (FAPs) located in the intermediate layer (TMZi, (Joly et al., 2016). Each cell population is characterized by the preferential expression of various genes. In particular, transcripts encoding ribosome biogenesis factors, such as components of the box C/D complex, and *Fbl* in particular, are strongly expressed in SAPs, whereas these “house-keeping” genes are less strongly expressed in FAPs and differentiated cells (Recher et al., 2013). These striking observations led us to suggest that *Fbl* might be involved in cell cycle regulation in the slow-amplifying progenitors. We therefore performed an *in vivo* functional analysis of *Fbl* by characterizing zebrafish mutants for *fbl*. Homozygous mutant embryos showed strong defects in the brain and eyes development. Indeed, we observed a decrease in the volume of the central nervous system with increased apoptosis and deregulation of the cell cycle observed in the head. In addition, mutant larvae displayed specific defaults of neuronal differentiation in the visual system. Our findings highlight, for the first time *in vivo*, the importance of *Fbl* in midbrain development and the regulation of S-phase progression.

2. Results

2.1. Neuroepithelial slow-amplifying progenitors (SAPs) express high levels of fibrillar transcripts and proteins

We first characterized the *fibrillar* (*fbl*) gene expression pattern during zebrafish embryogenesis, by whole-mount *in situ* hybridization (WMISH). We found that *fbl* was ubiquitously expressed during gastrulation (6 h post-fertilization (hpf), Fig. 1A). At the onset of

neurulation, *Fbl* mRNAs begins to accumulate in the eyes, brain and somites (Fig. 1B). From 1 day post-fertilization (dpf), *fbl* expression begins to be restricted to the OT, retina, gut and somites (Fig. 1C2–C3). At the long-pec (2 dpf) and protruding mouth (3 dpf) stages, high levels of *fbl* expression are observed at the periphery of the OT, in the external tectal marginal zone (TMZe) in which SAPs divide (Fig. 1D1–D3, E1–E3). These results demonstrated that *fbl* expression is thus progressively restricted during zebrafish embryogenesis. Immunohistochemistry (IHC) analysis revealed the presence of *Fbl* protein in all tectal cells, within the nucleoli, but this protein was more abundant at the extreme edge of the OT, where the SAPs are found (Fig. 1F1–F2). *Fbl* protein is also expressed at the extreme edge of the retina, in the ciliary marginal zone (CMZ), in which the progenitors and stem cells are localized (Fig. 1G1–G2). Thus *Fbl* is preferentially expressed in the proliferating cells of the OT and retina, which are thought to be sister cell types (Joly et al., 2016). These findings strongly suggest that *Fbl* may play an essential role in tectal and retinal cell proliferation.

2.2. Mutation of the zebrafish *fbl* gene leads to a smaller brain volume and larval death

We investigated the function of *Fbl* in tectal cell proliferation, in a *fbl*^{hi2581Tg} mutant zebrafish line that was previously generated by inserting a 6 kb retroviral sequence into the 5'UTR of the *fbl* gene (Amsterdam et al., 2004). By RT-qPCR, no *fbl* mRNA has been detected in mutant embryos from 24hpf, confirming that *fbl*^{hi2581Tg} is a null mutant (Fig. 2A).

Heterozygous embryos developed normally. By contrast, homozygous *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos began to display phenotypic differences relative to their control siblings as early as 24 hpf (Fig. 2B). From this stage onwards, tissue disorganization was observed, particularly in the head (Fig. 2B2, black arrow). At 2 dpf (Fig. 2B3–B4) and 3dpf (data not shown), homozygous mutants exhibited abnormal pigmentation, smaller eyes and heads, pericardiac edema, and a larger and rounder yolk with a thinner yolk extension than the wild type. At 4 dpf, the brain abnormalities became more pronounced, probably due to general defects along the whole body axis of the embryo (data not shown). The *fbl*^{hi2581Tg} larvae had a smaller body, with an increasingly curved tail, and they died by day 4 or 5 post-fertilization.

To determine whether the observed defects in mutant embryos were due to the loss of *Fbl*, rescue experiments were carried out by injecting mRNA encoding wild-type *Fbl*. Injection of 200 pg of *fbl* mRNA induced severe developmental defects (cyclopia, absence of head, truncated body) and high level of mortality (data not shown). We thus decreased the injection dose to 100 pg. At this dose, only 1.6% of the injected embryos at 48 hpf displayed a mutant phenotype while 24.7% were observed in non-injected embryos, percentage expected for homozygous mutants following a *fbl*^{hi2581Tg} heterozygote incross. Most importantly, 17.3% of the injected embryos displayed a rescued phenotype although slightly smaller eyes than in wild-type embryos were still observed (Fig. 2B5–B6, C). Thus taken together these results show that *fbl* mRNA largely rescued the mutant phenotype and that the defects observed in *fbl* mutants result from the loss of *Fbl*.

We quantified brain defects at 3 dpf, by measuring the volume of

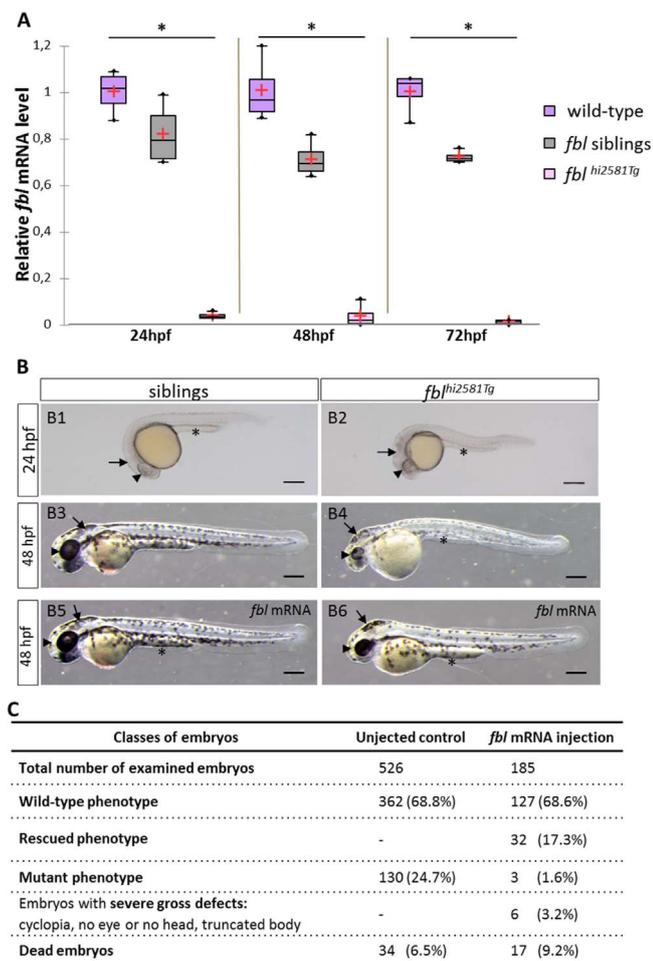


Fig. 2. Gross morphological defects in *fbl* null mutants are mainly seen in the head and eyes and are rescued by injection of *fbl* mRNA. **(A)** RT-qPCR quantification of relative levels of *fbl* mRNA at the indicated developmental stages shows the absence of *fbl* expression in mutants as early as the 24 hpf stage. Purple: wild-type, gray: siblings, pink: mutants. Statistical analyses were performed on four biological samples per condition. p-value (Kruskal-Wallis test) polysomes: 0.02. n.s., non-significant. **(B1-B6)** Lateral views of live embryos with anterior to the left and dorsal up. **(B1-B2)** *fbl*^{hi2581Tg} mutants start to display phenotypic abnormalities as early as the 24 hpf stage with necrosis in the midbrain area, slightly smaller eyes and a thin yolk extension. **(B3-B4)** At 48 hpf, mutant embryos have smaller eyes and smaller head than their siblings. In addition, mutant embryos display less pigmentation, pericardiac edema, a larger and rounder yolk and a thinner yolk extension. **(B5-B6)** At 48 hpf, *fbl* mutant embryos are largely rescued by *fbl* mRNA. In injected mutants, midbrain and yolk extension look similar in size to the ones in siblings. The size of the eye is bigger than in not injected mutants although remaining slightly smaller than in siblings. In panels B1-B9, eyes, midbrain area and yolk extension are respectively indicated by arrowheads, arrows and asterisks. Scale bar = 200 μ m. **(C)** Classes of phenotypes of *fbl* mRNA injected embryos from an *fbl*^{hi2581Tg} incross. A strong decrease in the number of injected embryos with mutant phenotype is observed indicating that the *fbl* mRNA rescues the mutation.

the central nervous system (CNS; including brain and eyes): we stained lipidic structures with DiI, obtained 3D images by confocal microscopy and manually segmented the brain (Fig. 3A).

CNS volume was significantly smaller in *fbl*^{hi2581Tg} larvae than in their wild-type or heterozygous at the same developmental stage. More precisely, CNS volume in the mutants was one third smaller than in their siblings or the wild-type larvae (Fig. 3B). We also quantified the eye volume in *fbl* mutant, siblings and wild-type larvae. Interestingly, the eye volume of the mutant larvae was five times reduced in comparison with the siblings and wild-type larvae (Fig. 3C). Taken together, these data suggest a role of Fbl in the development of the brain and the eye.

2.3. Ribosome biogenesis is affected in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos

Fbl is involved in the methylation of rRNA and rDNA histones. We therefore hypothesized that *fbl* loss of function would lead to lower levels of rDNA transcription and a disruption of ribosome biogenesis. Ribosome biogenesis begins with the transcription of the 47S intermediate rRNA, which contains a 5' externally transcribed sequence (ETS) and two internally transcribed sequences (ITS1 and ITS2). The intermediate 47S rRNA is processed after its transcription: the 5' ETS is cleaved first, followed by the ITS1 and ITS2, to generate the mature 18S, 5.8S and 28S rRNAs. The 5' ETS, ITS1 and ITS2 are used to estimate relative rRNA transcription levels.

We used RT-qPCR to investigate rDNA transcription and rRNA processing by quantifying the levels of 5'ETS, 18S, ITS1 and ITS2 rRNA. At 3 dpf, 18S mature rRNA levels were significantly lower (of 93%) in *fbl*^{hi2581Tg} larvae, whereas we did not observe any significant differences in *fbl* siblings larvae and wild-type larvae (Fig. 4A). Surprisingly, 5' ETS rRNA levels were slightly higher in *fbl*^{hi2581Tg} larvae than in the wild type. However, ITS1 and ITS2 rRNA levels did not differ between the three genotypes (Fig. 4A). Overall, these data indicate that 47S rDNA transcription is not impaired in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos, but that rRNA processing is greatly impaired, as demonstrated by the relative levels of mature 18S rRNA.

As 18S rRNA processing is considered to be a rate-limiting step in ribosome biogenesis (Laferte et al., 2006), we hypothesized that impaired rRNA processing in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos and possible subsequent alterations to rRNA posttranslational modifications would result in an overall decrease in ribosome biogenesis. We used polysome profiling to evaluate ribosome biogenesis in 3 dpf *fbl* mutant embryos, control siblings and wild-type embryos (Fig. 4B-C). Fewer polysomes were observed in the mutants as compared to the wild-type larvae. The polysomal fraction, which corresponds to ribosomes bound to mRNA, provides an indication of the translational activity of the ribosomes. Polysome peaks were smaller for the mutant larvae than for their siblings and wild-type larvae, indicating that smaller numbers of ribosomes were bound to mRNA in the mutants (Fig. 4B). Thus, for every seven ribosomes binding mRNA in wild-type and sibling embryos, only five were bound to mRNA in *fbl*^{hi2581Tg} embryos. We measured the area under each peak, and calculated the ratio between the 80S and polysome peaks (Fig. 4B-C). The polysome ratio was lower in the mutants than in the wild-type embryos, highlighting lower levels of ribosomal activity.

We performed similar experiments at 2 dpf, when the embryos are less affected. Despite the similarity of the defects observed (data not shown), differences in ribosome biogenesis between wild-type and mutant embryos were less marked. This is not surprising and highlights the worsening of the phenotype as development proceeds. Collectively, these data suggest that *fbl* mutation leads to an impaired ribosome biogenesis at late steps of the pathway and lower levels of ribosome activity.

2.4. The dorsal midbrain and the retina are the most strongly affected structures in the *fbl*^{hi2581Tg} brain

We demonstrated that *fbl*^{hi2581Tg} larvae display smaller CNS. To further characterize those brain defects, we analyzed different regions of the brain by DiI and Elavl3 (marker of neural differentiation) labeling and generated 3D visualization of the stained larvae (supplemental data, movie 1). Several basal domains, such as the ventral telencephalon, olfactory epithelium and hypothalamus, were recognizable but disorganized (Fig. 5A). We also detected the presence of the tracts of the anterior (tac) and post-optic commissures (tpoc), as well as the optic recess region (ORR, Affaticati et al., 2015) which are ventral/basal brain structures (Fig. 5A). Overall, these data suggest that the *fbl* mutation leads to more or less correct differentiation events in the ventral part of the brain, and to the generation of most of the domains of the brain.

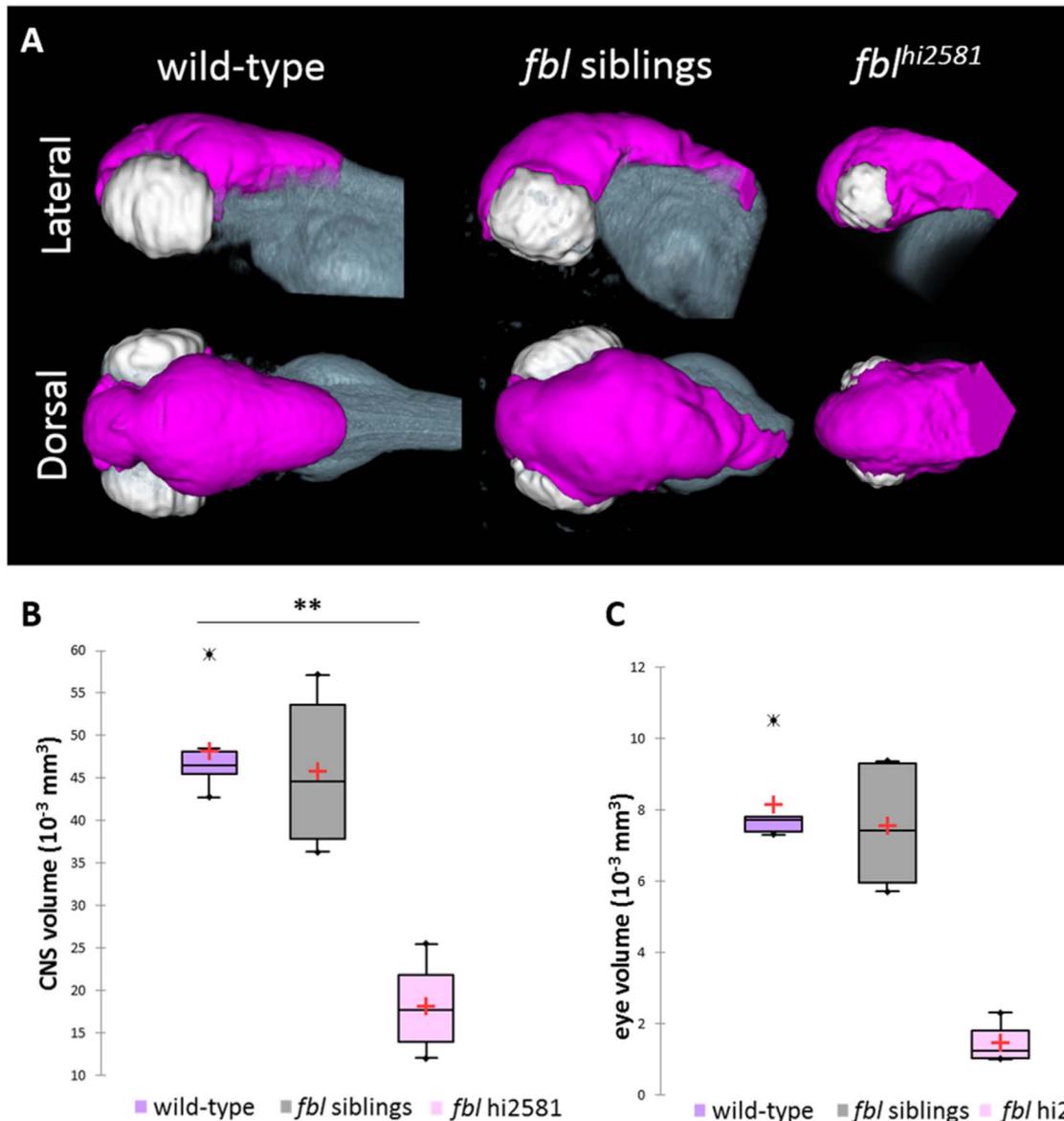


Fig. 3. The *fbl*^{hi2581Tg} mutation mostly affects midbrain structures from 24 hpf. **(A)** Volume rendering of the DiI-positive domains (gray) and surface rendering of a manual segmentation of the CNS (magenta) and eye (white) based on the DiI signal in 3dpf wild-type, *fbl* siblings and *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos. *fbl* mutant larvae display an apparent reduction of the CNS volume compared to their siblings or wild-type larvae. Lateral views: anterior to the left, dorsal to the top. Dorsal view: anterior to the left, right to the top. **(B)** Quantification of mean CNS volume highlights a significant difference between *fbl* mutants, their siblings and wild-type larvae. Statistical analyses were performed on six samples per condition. *p*-value: .003 (Kruskal-Wallis test). **(C)** Quantification of mean eye volume highlights a significant difference between *fbl* mutants, their siblings and wild-type larvae. Statistical analyses were performed on the mean size of both eye of six samples per condition. *p*-value: .005 (Kruskal-Wallis test). Purple: wild-type, gray: *fbl* siblings, pink: *fbl*^{hi2581Tg}. Scale bar: 100 μ m. Anterior is to the left.

Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.006>.

At 3dpf, the wild-type retina is organized as a cortical structure with distinct layers: layers of neurons labeled with Elavl3 and plexiform layers (Fig. 5A1). In mutant embryos, we see a nearly complete absence of Elavl3 labeling, indicating that in the retina, there is no neuronal differentiation (Fig. 5A2).

Surprisingly, histological analyses revealed that 2 dpf mutants had a smaller tectum than their siblings (Fig. 5B). Moreover, acellular zones were detected in this midbrain structure (Fig. 5B2–B4). However, the proliferative region of the TMZe seemed to be correctly formed, but thicker than stage-matched WT embryos (Fig. 5B2, white arrows). Thus, the mutation strongly affects the dorsal midbrain and retina, structures in which the *fbl* gene is preferentially expressed, consistent with a specific role for Fbl in these regions.

Fbl is known to be required for the maintenance of normal nucleolar morphology (Amin et al., 2007; Ma et al., 2016). We therefore studied nuclear and nucleolar morphologies in control and mutant embryo midbrains. DAPI staining of the nucleus revealed differences in nuclear shape between *fbl* mutant larvae and their siblings (Fig. 5C, purple). Wild-type embryos had round nuclei at the center of the OT and in FAPs. By contrast the nuclei in the SAPs were more elongated and had larger nucleoli (Recher et al., 2013). Surprisingly, in *fbl*^{hi2581Tg} embryos, the nuclei of cells over the entire surface of the tectum were elongated, and resembled those of wild-type SAPs (Fig. 5C).

By contrast, the nuclei of the ventral structure of the midbrain, the torus semicircularis (TS) presented no change in shape (data not shown). On 3D views, we selected the larger axis of the nuclei for measurements. The quantification of nuclear diameters in the OT and

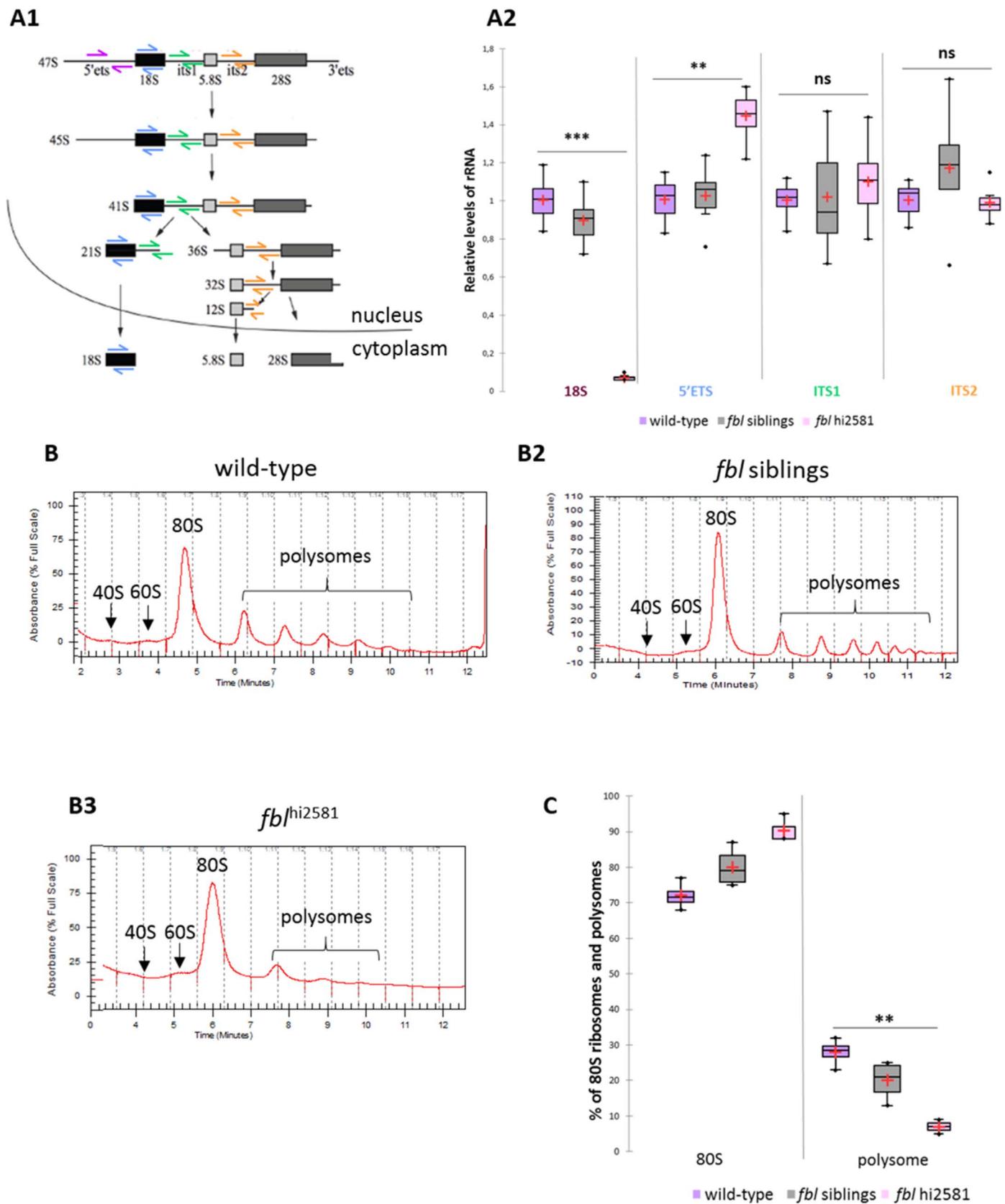


Fig. 4. Ribosome biogenesis is impaired in *fbl* mutant embryos. **(A)** RT-qPCR quantification of 5'ETS, ITS1, ITS2 and 18S rRNAs in mutant, siblings and wild-type larvae at 3 dpf. **A1:** Scheme of rRNA processing, adapted from (Le Bouteiller et al., 2013). Arrows indicate the location of the amplified regions: 18S: purple, 5'ETS: blue, ITS1: green and ITS2: orange. **A2.** Mutant embryos have lower levels of 18S rRNA (93% lower). **(B)** Polysome profiling of 3 dpf wild-type **(B1)**, *fbl* siblings **(B2)** and *fbl*^{hi2581Tg} mutant **(B3)** embryos showed a lower polysome ratio in *fbl*^{hi2581Tg} larvae, indicating impaired ribosomal activity in these larvae. **(C)** Quantification of the relative proportions of 80S and polysomes (ratio of the 80S or polysome area with global area). Statistical analyses were performed on four samples per condition. *p*-value (Kruskal-Wallis test) polysomes: 0.0041. Purple: wild-type, gray: *fbl* siblings, pink: *fbl*^{hi2581Tg}.

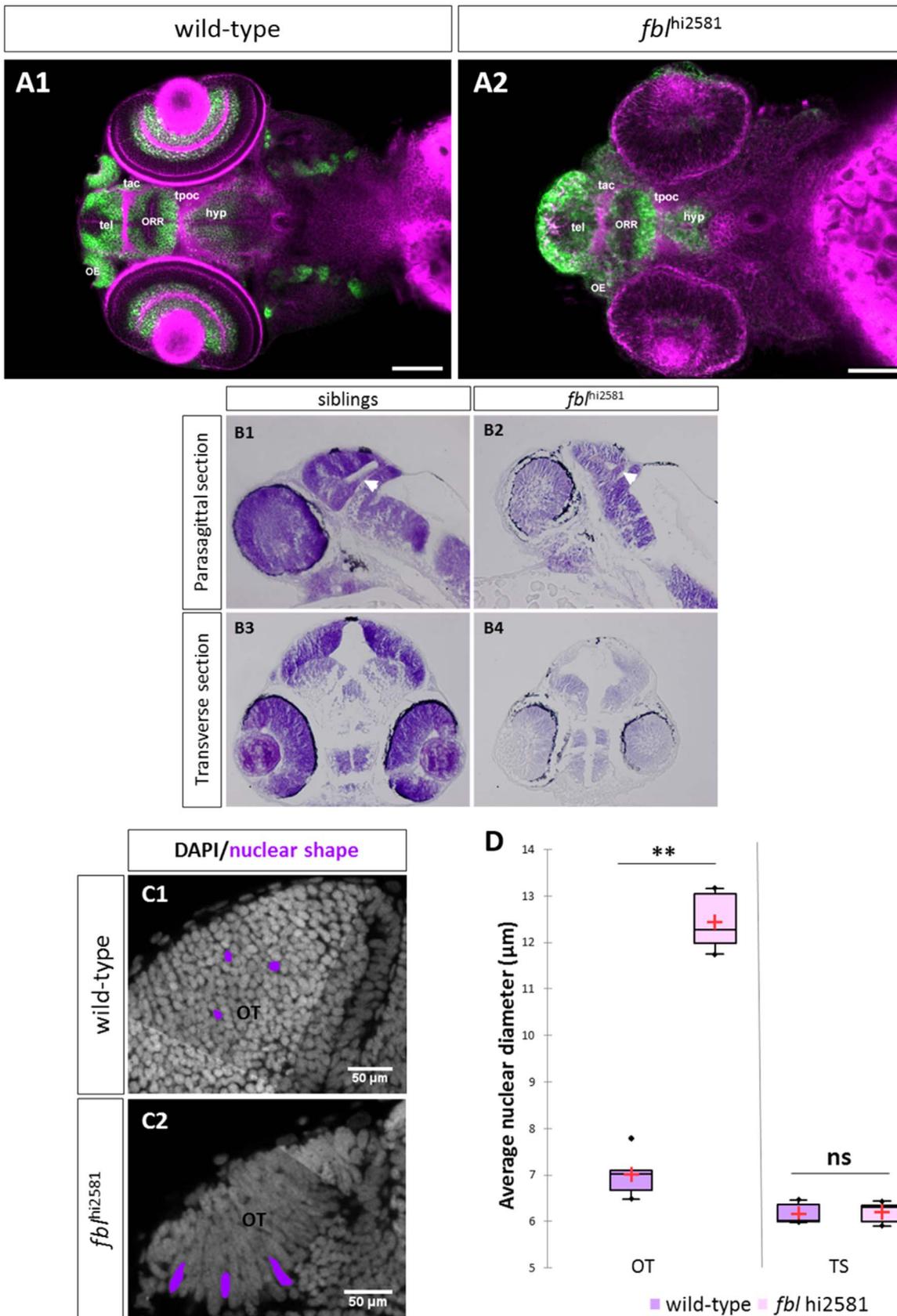


Fig. 5. *fbl* mutants have specific midbrain and retina defects. **(A)** Horizontal optical sections of Elavl3 (marker of neural differentiation) immunolabelling and DiI staining in wild-type **(A1)** and mutant **(A2)** embryos at 3dpf. Pink: DiI labeling, Green: Elavl3 staining. Scale bars: 100 μm . Anterior is to the left. Most brain domains and axon tracts are present but have a disrupted organization in *fbl* mutant embryos. **(B)** Sagittal (A1-A2) and transverse (A3-A4) paraffin sections of wild-type (left) and *fbl*^{hi2581Tg} mutant (right) embryos at 2dpf. Histological analysis with cresyl violet staining revealed smaller tecta and acellular zones in the mutant embryos. The proliferation region (TMZe) is thicker in the mutant embryos (white arrow) **(B2, B4)** than in their siblings **(B1, B3)**. Anterior is to the left. **(C)** Nuclear labeling (DAPI) in the optic tectum of 2dpf wild-type **(C1)** and mutant **(C2)** embryos at 2dpf, showing the larger nuclear diameter in the tectum of mutant larvae. Scale bar: 50 μm **(D)** Quantification of the nuclear diameter of wild-type (purple) and *fbl*^{hi2581Tg} (pink) 2dpf embryos. Nuclear diameters were measured with Fiji software. We measured the longest dimension of 50 nuclei on selected 2D images of the nuclei of 2 dpf embryos. Statistical analyses were performed on the mean diameters of nuclei from five mutant or wild-type embryos. *p*-value (Mann & Whitney test) OT: 0.008; *p*-value TS: 1.000. Hyp: hypothalamus, OE: olfactory epithelium, ORR: optic recess region OT: optic tectum, tac: tract of the anterior commissure, tel: telencephalon, tpoc: tract of the post-optic commissure, TS: *torus semicircularis*.

TS of wild-type and mutant embryos indicated a specific increase of the area within the OT, with no change in the TS (Fig. 5D). Indeed, wild-type tectal nuclei had a mean longest diameter of 7 μm , whereas *fbl*^{hi2581Tg} tectal nuclei reached diameters of up to 12 μm . By contrast, the nuclei in the TS of both mutant and wild-type embryos had a mean diameter of 6 μm . These findings suggest that the dorsal part of the midbrain was most affected in *fbl* mutant embryos.

2.5. Neuronal specification and differentiation are impaired in mutant embryos

The observed dorsal midbrain patterning defects suggested that neural specification and differentiation might also be impaired in this region. We first addressed this question by quantifying *neuroD1* mRNA levels by RT-qPCR to assess neural specification. Interestingly, we found that *neuroD1* expression levels were 91% lower in mutant embryos than in wild-type embryos (Fig. 6A). Neural specification was, therefore, disrupted in *fbl* mutant embryos.

We also analyzed neural tissue specification in different regions of the brain, by analyzing by *in situ* hybridization (ISH) the expression pattern of *eomes* and *otx2*, which are involved in the specification of the anterior territories of the developing brain. *Otx2* expression is an anterior brain marker in the neural tube but becomes restricted to the developing midbrain later in development, whereas *eomes* is specifically expressed in the forebrain. In mutant embryos, at both 2 dpf (Fig. 6B1-B2) and 3 dpf (data not shown), *eomes* expression was maintained in the developing forebrain. By contrast, *otx2* expression was affected in the dorsal midbrain of mutants, whereas the expression of this gene was unaffected in the most ventral and anterior domains in mutants (Fig. 6B3-B4). These findings confirm the presence of mid-brain-specific defects in neural specification in *fbl* mutant embryos.

We then analyzed neural differentiation by immunohistochemical staining for Elavl3, a marker of neural differentiation. Neural differentiation begins at 2 dpf in wild-type embryos, and tectal Elavl3-positive neurons are located in the center of the optic tectum. At this stage, no Elavl3 labeling was detected in mutant embryos (Fig. 6C).

We investigated possible links between this phenotype and developmental delay, by analyzing neural differentiation at 3 dpf. In *fbl*^{hi2581Tg} embryos, no Elavl3-positive neurons were detected in the dorsal midbrain at 3 dpf (Fig. 6D-E), whereas a few Elavl3-positive neurons were detected ventrally in the TS (Fig. 6E) and posteriorly in the spinal cord (data not shown). These data indicate that neural differentiation is specifically impaired in the dorsal midbrain structures of *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos.

These results suggest that the neuronal lineage is specifically disrupted in the dorsal midbrain of *fbl* mutants. This finding is consistent with a tissue-specific role of *Fbl* in midbrain morphogenesis.

2.6. Mutant cells undergo massive apoptosis

We investigated the mechanisms underlying the apparent decrease in tectum neuronal differentiation and the presence of acellular zones in the OT, by evaluating the role of *fbl* in cell survival. We therefore performed TUNEL staining (Fig. 7), to label DNA breaks. At 24 hpf, cell death rates were higher in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos than in wild-type embryos (Fig. 7A). Cell culture studies have shown that the knockdown

of *FBL* expression induces p53 activation (Su et al., 2014). We therefore hypothesized that the apoptosis observed in *fbl* mutant embryos might be p53-mediated. Quantitative RT-PCR revealed that *tp53* transcript levels were significantly higher in mutant embryos than in wild-type embryos at 24 hpf, 48 hpf and 72 hpf (Fig. 7B-C). These results suggest that the atrophy of the optic tectum in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos may result from *tp53*-dependent apoptosis.

2.7. The spatial distribution of proliferative cells is disorganized in *fbl* mutant embryos

Hypoplasia may result from an increase in apoptosis and/or an inhibition of proliferation. In 2 dpf wild-type embryos, proliferation is restricted to the periphery of the OT. We analyzed the total proliferating cell population by immunostaining for PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Strikingly, at 2 dpf (Fig. 8A) and 3 dpf (data not shown), PCNA labeling was observed in most of the tectal cells of the mutant larvae (Fig. 8A1), whereas it was spatially restricted to a subset of tectal cells present at the periphery in the wild type larvae (Fig. 8A2). These findings suggest that all the cells of the OT are proliferating in mutant embryos.

We then analyzed DNA replication by monitoring the incorporation of a thymidine analog (EdU). After a two-hour pulse, we were able to determine the location of the actively dividing cells. In WT embryos, at 2 dpf, EdU incorporation was observed at the OT margins and in the TMZe. By contrast, EdU-positive cells were found scattered over the entire optic tectum in mutant embryos (Fig. 8B2). We observed the same unrestricted pattern of EdU incorporation at a later stage (3 dpf, data not shown). However, the quantification of EdU-positive cells over the entire OT showed that about 40–50% of tectal cells were positive for EdU in both mutant and wild-type embryos (Fig. 8C).

Similarly, pH3 (phospho-histone 3) staining, which labels cells in M-phase showed that mitotic cells were not restricted to the margin in mutant embryos (Fig. 8D). Quantification of the population of mitotic cells within the OT revealed no difference in the proportion of this population between mutant and wild-type embryos at 2 dpf (Fig. 8E).

Taken together, these data reveal the presence of a cell-cycle defect, with a larger population of proliferative cells and an abnormal distribution of actively dividing cells in the tectum of mutant embryos.

2.8. S-phase progression is impaired in *fbl* mutant embryos

We assessed the cell cycle profiles of mutant cells more precisely and determined whether the rate of cell cycling differed between wild-type and mutant embryos, by analyzing DNA content by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). For this purpose, we incorporated EdU for 2 h at 3dpf, in both mutant and wild-type embryos, and then labeled the DNA with the intercalating agent 7-AAD (7-aminoactinomycin D). We carried out FACS analyses on dissociated cells from the dissected heads of control and mutant embryos. In wild-type embryos (Fig. 9A), 80% of the cells, on average, were in G0/G1 phase. Less than 1% of the cells were in G2/M phase and 7–8% were in S-phase. An additional phase, the SubG1, consisting of cell aggregates and dying cells, accounted for 5% of all cells in the heads. The distribution of cells in the different phases of the cell cycle in *fbl* mutant embryos (Fig. 9B) was similar to that in wild-type embryos (Fig. 9C).

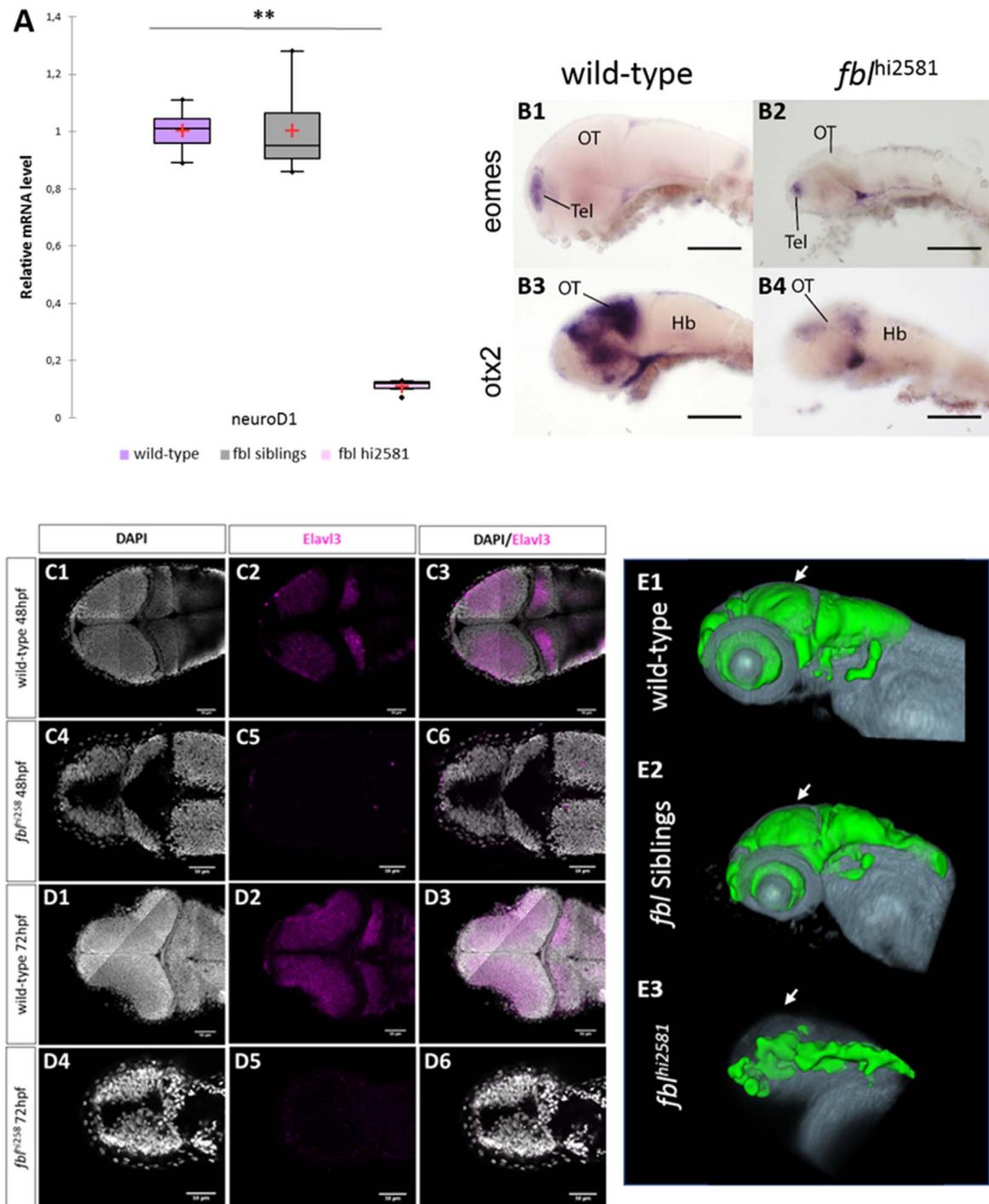


Fig. 6. Neural specification and neural differentiation are impaired in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos. **(A)** RT-qPCR quantification of the relative levels of *neuroD1* mRNA. Purple: wild-type, gray: siblings, pink: mutants. **(B)** Expression patterns of *eomes* and *otx2*, two markers of neural specification, in 3 dpf wild-type (**B1**, **B3**) and *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos (**B2**, **B4**). The expression of *eomes* (**B1**–**B2**), a marker of forebrain specification, was similar in wild-type and mutant embryos, whereas that of *otx2* (**B3**–**B4**), a marker of midbrain specification, is absent in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos. Scale bars: 50 μ m. Hb: hindbrain, OT: optic tectum, Tel: telencephalon. **(C)** Horizontal optical sections of *elavl3* (marker of neural differentiation) labeling in 2dpf wild-type (**C1**–**C3**) and mutant (**C4**–**C6**) embryos and in 3dpf wild-type (**D1**–**D3**) and mutant (**D4**–**D6**) embryos. Gray: DAPI staining, pink: Elavl3 staining. Scale bars: 50 μ m. Anterior is to the left. **(E)** Volume rendering of the DiI-positive domains (gray) and surface rendering of a manual segmentation of the Elavl3-positive (green) domains in 3dpf wild-type (**E1**), *fbl* siblings (**E2**) and *fbl*^{hi2581} mutant embryos (**E3**). For lateral views, anterior to the left and dorsal to the top. White arrows point out to the midbrain. Neural differentiation is specifically impaired dorsally in *fbl* mutant.

We concluded that mutant cells were not blocked in any phase of the cell cycle and seemed to cycle in a similar manner to wild-type embryo cells.

However, 7-AAD/EdU flow cytometry revealed a marked difference in S-phase profiles on histogram plots (Fig. 9B), with lower levels of EdU incorporation for cells in *fbl* mutants than in wild-type larvae.

This indicates that either mutant cells incorporate EdU less efficiently than wild-type cells, or that they die in S-phase. We quantified these differences in profile, by analyzing the distribution of cells within S-phase through determinations of the percentages of cells in early S, mid-S and late S phase (Fig. 9D). In wild-type embryo heads, almost 70% of the S-phase population was in early S-phase. Intriguingly, the

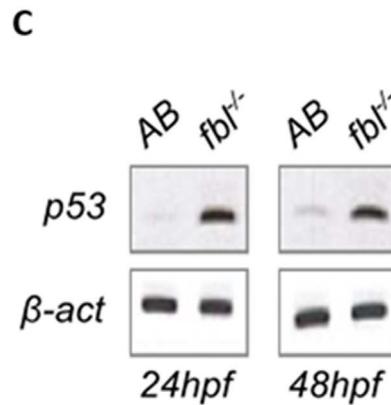
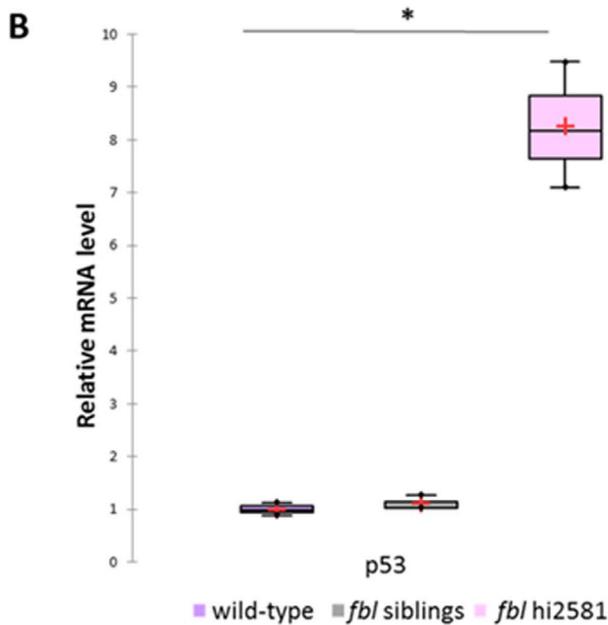
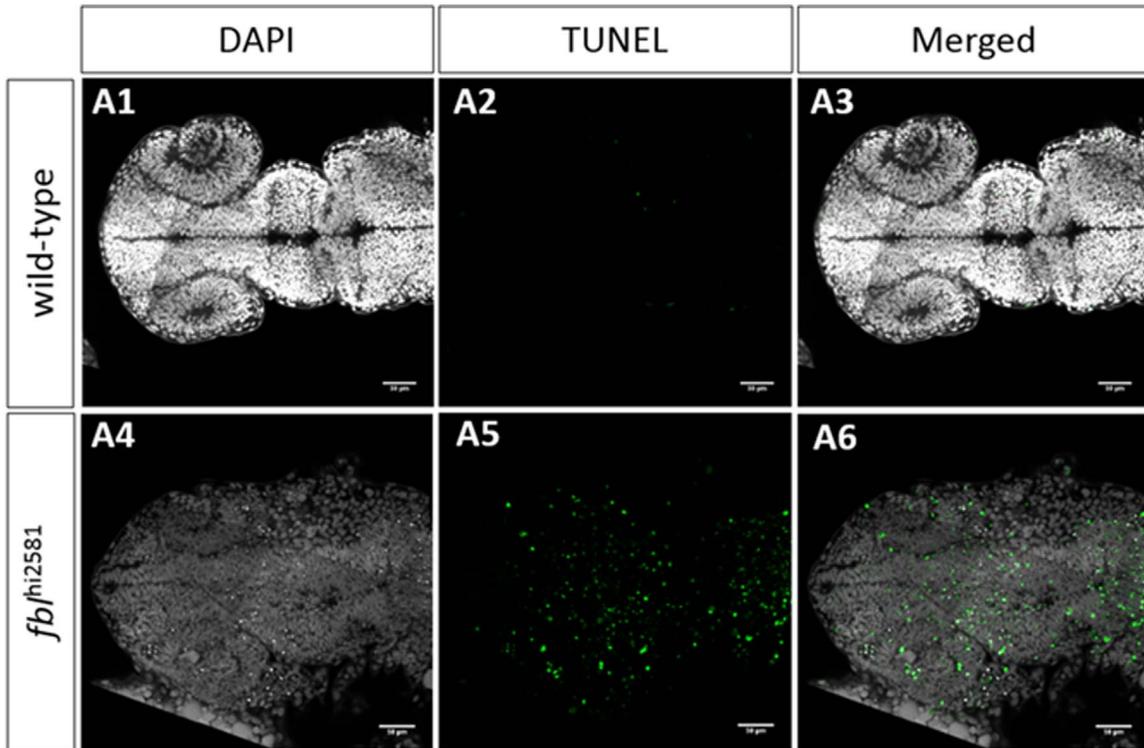


Fig. 7. Massive p53-dependent apoptosis in the *fbl* mutant. **(A)** Horizontal optic sections of TUNEL labeling at 24 hpf in wild-type (**A1-A3**) and mutant (**A4-A6**) embryos. Gray: DAPI staining, Green: TUNEL staining. Scale bar: 50 μ m. Anterior is to the left. **(B)** RT-qPCR quantification of relative levels of *tp53* mRNA at 72 hpf shows a strong increase in *tp53* expression in mutants. Purple: wild-type, gray: siblings, pink: mutants. Statistical analyses were performed on biological triplicates, *p*-value (Kruskal-Wallis test): 0.049. **(C)** RT-PCR for *tp53* in 24 hpf and 48 hpf mutant embryos showing a large increase in *tp53* expression. Anterior is to the left.

proportion of S-phase cells in early S phase was lower (50%) in mutant head cells. By contrast, the proportions of mutant cells in the mid- and late S phases were higher than those for wild-type cells (Fig. 9D). Indeed, 18% of wild-type cells were in mid-S phase and 12% were in late S-phase, whereas the corresponding proportions for mutant cells were 28% and 20%.

We investigated the alterations of S-phase in *fbl* mutants further, by evaluating the level of expression of *cdkn1a* (also called *p21^{waf1}*), the product of which is involved in both the regulation of G1 progression

and S-phase DNA replication and accumulates during DNA damage repair (Li et al., 1994). Levels of *cdkn1a* expression were markedly higher in mutant embryos than in control and sibling embryos at 3 dpf (Fig. 9E). This suggests that the progression of DNA replication in S-phase is disturbed in the mutant larvae.

3. Discussion

The goal of this study was to investigate the role of Fbl in cell

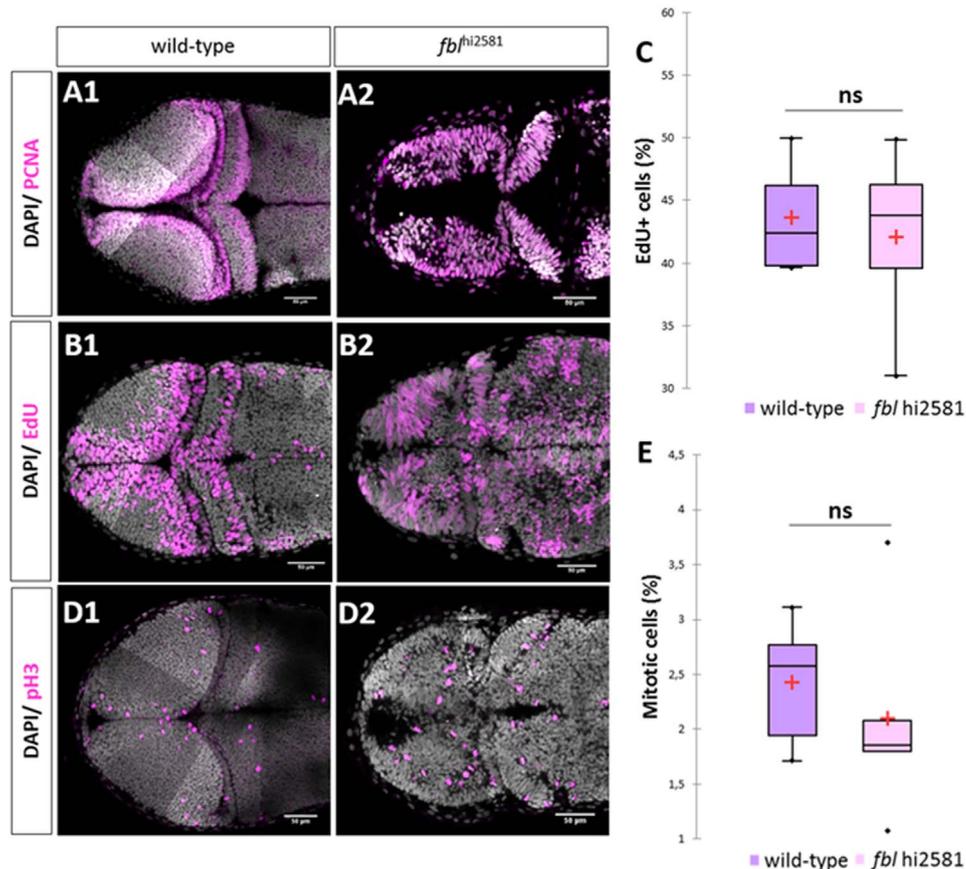


Fig. 8. In *fbl* mutants, the S-phase of the cell cycle is affected. **(A)** PCNA staining in 2dpf wild type **(A1)** and mutant **(A2)**. In wild-type larvae, proliferative cells were restricted to the periphery of each tectal lobes. In *fbl*^{hi2581Tg} PCNA positive cells were observed in almost all tectal cells. **(B)** EdU incorporation experiments in 2dpf wild type **(A1)** and mutant **(A2)** embryos after two hour pulse. In wild-type embryos, EdU-positive cells are restricted to the periphery of the OT while in the *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos EdU-positive cells are spread all over the structure. **(C)** EdU-positive cells quantification in wild-type (purple) and mutant (pink) embryos at 2dpf. Statistical analyzes have been performed on four samples per conditions, p-value (Mann & Whitney test): 1.00. **(D)** pH3 staining in 2dpf wild types **(E1)** and mutants **(E2)** embryos. Similar abnormal patterns in mutants as for EdU incorporation experiments. **(E)** pH3-positive cells quantification in wild-type (purple) and mutant (pink) embryos at 2dpf. Statistical analyzes have been performed on four samples per conditions, p-value (Mann & Whitney test): 0.53 **(E)** embryos. Gray: DAPI staining, Pink: EdU, pH3 or PCNA staining. Scale bar: 50 μ m. Anterior is to the left.

homeostasis *in vivo* in a vertebrate model. A convenient feature of zebrafish is the ease of studying mutant embryogenesis during early development due to the availability of maternal supplies. In the mouse, homozygous depletion of fibrillarlin leads to death prior to implantation (Newton et al., 2003). In zebrafish mutants, defects occur later, after gastrulation and during somitogenesis. The large maternal stocks of mature ribosomes and RBFs present in the zebrafish oocyte is used up during the first day after fertilization (Azuma et al., 2006).

First, in the mutant used in this study, we checked by RT-qPCR the loss of *fbl* expression. No *fbl* transcript could be detected as early as the 24 hpf stage. We also checked that the injection of *fbl* mRNA rescued the mutant phenotype. It is noteworthy that mutations in genes encoding Nop56 and Nop58, two core proteins of the C/D box complex led to the same developmental defects (*nop56*^{hi3101Tg} and *nop58*^{hi3118Tg}, ZFIN).

3.1. Why are the defects of fibrillarlin mutants mostly found in the tectum and the eyes?

We show here that Fbl is preferentially expressed in slow-amplifying progenitors (SAPs) of the retina (CMZ) and tectum (TMZe). However, the Fbl protein is not totally absent from differentiated cells and fast-amplifying progenitors (FAPs), but present in various amounts in the different cell types of the OT and retina.

fbl mutant embryos are hypomorphic, particularly for the brain and eye. We also observed severe cellular hypoplasia and an impairment of neuronal differentiation and specification specifically in the dorsal

midbrain and in retina.

An explanation why the dorsal midbrain and eyes are severely affected is linked to the differences in the kinetics of development between the dorsal midbrain and other more posterior or ventral regions. Neurogenesis begins earlier in the ventral part of the brain. After the completion of neural differentiation in the ventral regions, the dorsal part of the brain, including the OT, continues to produce neurons to support its specific sustained growth (Joly et al., 2016). The ventral and dorsal midbrain neural cells may therefore be affected differently by the lack of Fbl.

Despite the specific accumulation of Fbl in the SAPs of the TMZe, these cells are not strongly affected, as they continue to divide, display little apoptosis and the neuroepithelial layer connecting the OT to the TS (Recher et al., 2013) seems to be unaffected in mutants (although it is somewhat thicker). Since TMZe progenitors cycle at a lower rate than TMZi cells (Recher et al., 2013), they may remain protected until later in development. In these cells, the dilution of maternal stocks of ribosomes or of correctly methylated ribosomes may be slower than in more actively dividing cells.

By contrast, the FAPs are profoundly disturbed and they have a different distribution, with a massive presence in the center of the tectum at 3 dpf in mutants, whereas these cells are peripheral in the wild type. There are at least two possible reasons for this difference of localization of progenitors. First, *fbl* loss of function could lead to a developmental delay, as proliferative cells are found throughout the entire structure at earlier stages. Another most likely hypothesis is that the *fbl* mutation may lead to cell cycle deregulation due to the rapid

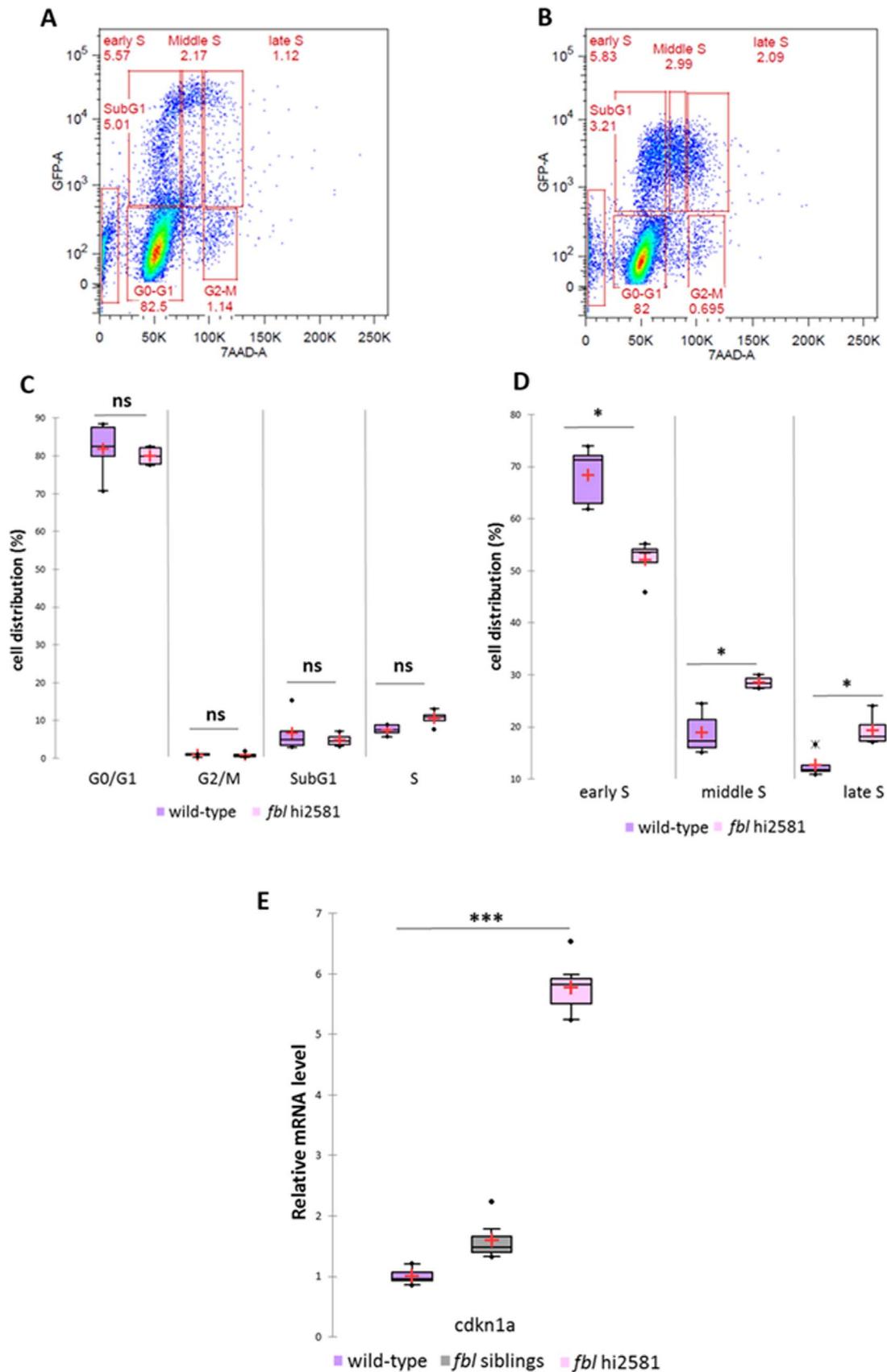


Fig. 9. S-phase progression is altered in *fbl* mutant embryos. **(A–B)** FACS analyses of 3 dpf wild-type and mutant heads after a two-hour pulse of EdU. DNA content was assessed by labeling with 7-AAD. **(C–D)** Quantification and analysis of the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle. Statistical analyses were performed on five replicates for the wild-type embryos and four for the mutant embryos, *p*-values (Mann & Whitney test): subG1 = 0.903; G0/G1 = 0.461; S = 0.066; G2/M = 0.713; Early S = 0.016; Mid-S = 0.016; Late S = 0.016. **(E)** RT-qPCR quantification of relative levels of mRNA for *cdkn1a* at 3 dpf showing higher levels of *cdkn1a* expression in mutants, consistent with an alteration of DNA replication. Statistical analyses were performed on biological triplicates, *p*-value (Mann & Whitney test): 0.027. Purple: wild-type, gray: siblings, pink: mutants.

dilution of maternal components in these cells. In favor of this hypothesis, we observed that in *fbl* mutants, S-phase progression was disrupted.

In human, ribosomopathies, a group of diseases associated with defects in ribosome biogenesis, display tissue specificity and variability in their clinical manifestations (Danilova and Gazda, 2015). In zebrafish models of ribosomopathies, tissues the most affected are the ones with high rate of proliferation (brain, eye, intestine, hematopoietic lineage...).

3.2. Potential consequences of the impairment of ribosome biogenesis and translational activity in *fbl* mutants

Fbl is the methyltransferase of the box C/D complex. It is responsible for the methylation of both rRNA and histones associated with rDNA loci. An absence of Fbl or low levels of this protein lead to abnormally low levels of rDNA transcription and changes of the posttranscriptional modification of rRNAs (Erales et al., 2017).

We show here, *in vivo*, that *fbl* mutants display impaired ribosome biogenesis, and, more particularly, low levels of ribosome activity, as illustrated by the low proportion of polysomes. This finding may be explained by translation initiation defects. Indeed, we observed no change in the size of the 80 S peak, corresponding to the binding of one ribosome to the target mRNA. We also found that 18 S rRNA levels were much lower in *fbl*^{hi2581Tg} mutant embryos than in the wild type, strongly suggesting that the last steps of the ribosome biogenesis pathway are impaired. Therefore it seems likely that the ribosomes can bind to mRNA, but that the translation initiation defects prevent the binding of other ribosomes. However, it remains possible that a feedback loop detects the decrease in translation and subsequently decreases the rates of formation of the two subunits.

The lower level of ribosome activity may be due to lower levels of rRNA methylation, resulting in a lower affinity for specific mRNA targets. Indeed, using RiboMethSeq, it has recently been shown that FBL knockdown in human cells led to modification of 2'-O-methylation on functional domains of ribosomes (Erales et al., 2017).

We also suggest that Fbl may accumulate specifically in SAPs for the production of different ribosomes responsible for the translation of specific targeted mRNAs. Indeed, many RBF-coding genes have tissue-specific patterns of expression in zebrafish (Brombin et al., 2015). In particular, rRNA post-transcriptional modifications and ribosomal protein contents differ between the ribosomes of different cell types, particularly between stem and progenitor cells (Brombin et al., 2015). Moreover, different types of rRNAs are produced in oocytes and during zebrafish development (Locati et al., 2017). Kraushar et al. recently suggested that ribosomes drive the spatiotemporal development of the neocortex (Kraushar et al., 2016). This hypothesis is based on the putative existence of a progenitor-specific ribosome signature during brain development, highlighting the tissue specificity of ribosome biogenesis.

3.3. Why is S-phase progression disrupted in *fbl* mutant embryos?

As mentioned above, there are several compelling lines of evidence suggesting that cell division is disturbed in *fbl* mutants. The impairment of ribosome biogenesis often leads to disturbance of the cell cycle (Xu et al., 2016), and cells are often arrested at the G1/S transition (James et al., 2014) or, in rarer cases, at the G2/M checkpoint (Fumagalli et al., 2012; Negi and Brown, 2015).

Surprisingly, FACS analysis of *fbl*^{hi2581Tg} mutant cells revealed that the mutant cells were not blocked at the G1/S or G2/M checkpoints, but that they progressed through the cell cycle, as the distribution of cells in the different phases of the cell cycle was similar to that for wild-type cells (Xu et al., 2016).

However, the distribution of cells in the various parts of S-phase was disrupted in *fbl*^{hi2581Tg} mutants, suggesting a delay in S-phase and in the

replication fork progression. The observed distributions on FACS analysis of mutant and wild-type cells suggests that replication origins normally activated early in S phase might be activated later in S phase in mutant cells. The low intensity of EdU incorporation is consistent with this hypothesis. The genomic material is replicated during S-phase, for subsequent mitosis. The impairment of pre-rRNA processing might interfere with transcription and, ultimately, with DNA replication (Bermejo et al., 2012). S-phase progression is tightly regulated by the replication timing process (Lucas and Feng, 2003; Mendez, 2009; Fragkos et al., 2015; Zink, 2006). In particular, the tight regulation of replication timing facilitates the sequential activation of replication origins during S-phase. We suggest that, in the absence of Fbl, the lower levels of ribosomal translation activity due to the disruption of ribosome biogenesis, delay or decrease the translation of many proteins. In particular, proteins involved in DNA replication and origin firing could be lacking, preventing the correct timing of DNA replication and leading to replication stress and genomic instability.

We also observed higher levels of p21^{waf1} expression in mutant cells. In addition to its role in cell cycle exit, p21^{waf1} accumulation leads to a DNA replication block and cell cycle arrest in S-phase (Li et al., 1994; Waga et al., 1994). This protein accumulates when DNA is damaged. The observed accumulation of *tp53* transcripts is also consistent with the presence of DNA breaks. These findings suggest that the intra-S defects in *fbl*^{hi2581Tg} embryos may be linked not only to defective replication, but also to the presence of DNA damage, resulting in replication stress. Other nucleolar proteins, such as nucleostemin, have been implicated in both ribosome biogenesis, and the maintenance of genome integrity.

Further studies are required to deepen our understanding of the origin of the tissue-specific intra-S defects in *fbl* mutants. Such studies should also provide insight into the tissue-specific defects observed in ribosomopathies (Yelick and Trainor, 2015).

4. Material and methods

4.1. Zebrafish lines and husbandry

We used the following *Danio rerio* lines for this work: wild-type strain AB and *fbl*^{hi2581Tg} mutants (ZIRC, Eugene, OR, USA). All zebrafish lines were maintained at 28 °C in our facility. Embryos were kept at 28 °C and staged as described by Kimmel (Kimmel et al., 1995). *fbl*^{hi2581Tg} adult zebrafish were maintained as heterozygotes and inbred to generate homozygous mutant embryos. PCR was conducted on adults, to check for the presence of the insertional mutation. The wild-type *fbl* allele was detected with the following primers: forward 5'-GAGGAAAAGCGGGTCTGAG-3' and reverse 5'-AGTGCCTGGC-TAACTCATCC-3'. The *fbl* mutant allele was detected with the following primers: forward 5'-GAGGAAAAGCGGGTCTGAG-3' and reverse 5'-GAAGCCTATAGTACGAGCCATAG-3'. All procedures were performed in accordance with European Union Directive 2011/63/EU.

4.2. mRNA synthesis and injection

cDNA full length encoding for zebrafish Fbl was cloned into pCS2 + vector. Fbl-PCS2 plasmid was linearized with Kpn1 endonuclease (New England Biolabs) and used for the *in vitro* synthesis of mRNAs by the mMACHINE mMACHINE T3 Transcription Kit (Life Technologies). Purified *fbl* mRNA (60, 100, 200 pg/embryo) was injected into one-cell stage embryos of *fbl*^{hi2581Tg} heterozygous in cross progeny.

4.3. Immunohistochemistry

Whole-mount immunohistochemistry (WMIHC) was performed as previously described (Inoue and Wittbrodt, 2011). Embryos were first incubated in a depigmentation solution (0.5 × SSC/5%formamide/3%

H₂O₂) at room temperature for 30 min. WMIHC for PCNA was performed specifically, with the fast protocol of the Tefor Core Facility (<http://tcf.tefor.net>; unpublished protocol): following depigmentation, embryos were incubated in unmasking solution (HistoVT One, 06980–05, Nacalai Tesque) at 68 °C for 1 h. Blocking and permeabilization (10% NGS, 10% DMSO, 5% PBS-1 M glycine, 0.5% Triton X-100, 0.1% Tween 20, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% NP40) were performed simultaneously over a period of five hours. The embryos were incubated with antibodies for three days at 4 °C, in staining solution (2% NGS, 20% DMSO, 10 µg/ml heparin, 0.2% Triton X-100, 1 × PBS, 0.1% Tween 20, 0.05% sodium azide).

We used mouse anti-PCNA (Dako, 1:150), human anti-FBL (1:1000, autoimmune serum, gift from Danièle Hernandez-Verdun, Jacques Monod Institute, Paris France), rabbit anti-pH3 (Millipore, 1:500) and mouse anti-elavl3 (Molecular Probes, Life Technologies, 1:100) primary antibodies.

The fluorescent secondary antibodies used for detection were AlexaFluor 488- or AlexaFluor 555-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-mouse or goat anti-human antibodies (1:200, Molecular Probes, Life Technologies).

4.4. EdU labeling

We injected 1 nl of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, 10 mM, Molecular Probes, Life Technologies) into the pericardiac cavity of 48 hpf and 72 hpf wild-type and mutant embryos, which were fixed two hours later. EdU was detected with the EdU Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 or 647 Imaging kit (Molecular Probes, Life Technologies), according to the manufacturer's protocol.

4.5. TUNEL staining

TUNEL labeling was performed with the Deadend Fluorometric TUNEL system (Promega), according to manufacturer's instructions. Embryos were washed in PBS, counterstained with DAPI (Sigma) and mounted in Vectashield hard-set mounting medium (Vector Laboratories).

4.6. Whole-mount *in situ* hybridization

Riboprobes were synthesized as follows: cDNA (PCR-amplified with specific primers was inserted into a pCR II-TOPO vector (Molecular Probes). The sequence and orientation of the inserts were checked by direct sequencing (GATC Biotech). The products of PCR amplification of the inserts with generic SP6-T7 primers were used to synthesize the antisense riboprobes, with T7 or SP6 polymerase (Promega) (chosen on the basis of the sequencing results). Digoxigenin (DIG)-conjugated probes were synthesized with the UTP-DIG nucleotide mix (Roche) and purified with RNA clean-up kit (Macherey-Nagel).

Whole-mount *in situ* hybridization was performed on manually staged (according to Kimmel et al., 1995) dechorionated PTU-treated embryos fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate-buffered saline (PBS) and stored in methanol at –20 °C. Briefly, embryos stored in methanol were rehydrated in a methanol/PBS series, permeabilized with proteinase K (10 mg/ml), prehybridized, and then hybridized overnight at 65 °C in hybridization mixture (HM: 50% formamide, 5 × standard saline citrate (SSC), 0.1% Tween 20, 100 mg/ml heparin, 100 mg/ml tRNA in water). The embryos were subjected to a series of washes in 50% SSC/formamide and SSC/PBST, and were then incubated in blocking solution for one hour (0.2% Tween 20, 0.2% Triton X-100, 2% sheep serum in PBST) and overnight at 4 °C with AP-conjugated anti-DIG antibodies (Roche) diluted 1:4000 in blocking solution. Embryos were then washed in PBST, soaked in staining buffer (TMN: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 0.1% Tween 20 in water) and incubated in NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) solution (Roche).

4.7. Cresyl violet staining

PFA-fixed embryos were dehydrated in ethanol solutions of increasing concentration and incubated in butanol before embedding in paraffin. Serial sections were prepared with a Leica rotary microtome and mounted on glass slides according to standard procedures, then stained with a cresyl violet-thionine solution.

4.8. Imaging

Bright-field imaging was performed with a Nikon AZ100 microscope (Camera: Nikon Digital Sight DSRI1; Objectives: AZ-Plan Fluor 5 × (O.N.: 0.5/D.T.: 15 mm)). Fluorescence imaging was performed using a confocal laser scanning microscope (Leica SP8) with internal photomultiplier tubes (Airy: 1; Objectives: Fluotar VISIR 25 × /0.95 WATER; Plan-APOCHROMAT 40 × /1.10 WATER).

4.9. Segmentation

The 3D-visualization and segmentation of zebrafish specimens were generated using 3D Slicer 4 (Fedorov et al., 2012) on a HP computer with a 2.9 GHz Intel Core i7-4910MQ CPU and 32 Gb of RAM.

To first obtain global larva shape, we performed 3D visualization of DiI-staining using the volume rendering module of 3D Slicer which transforms brightness values into opacity values. Using this module, we rendered dark voxels transparent, bright voxels more opaque.

Prior to segmentation, we downsampled the data to a voxel size of 3.5 × 3.5 × 3.5 µm using the python script SimpleITK (Lowekamp et al., 2013) and NumPy.

We segmented the patterns of interest using the segment editor module of 3D Slicer. The nervous system was segmented using the DiI channel by applying a manual threshold and refining the segmentation with the paint and erase tools, restricting it to eyes and brain. Due to its high specificity, this correction step was not necessary for Elavl3-staining pattern and a similar segmentation strategy was applied. For label smoothing, we subsequently applied a median filter of 5 × 5 × 5 voxels.

We visualized segmentations with a surface rendering, using the Create surface function of the Segment editor module of 3D Slicer. For each segmentation, we generated a label map volume, counted the number of voxels and computed the volume for each by multiplying the number of voxels by the size of a voxel.

4.10. Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from 72 hpf zebrafish embryos in TRIzol reagent (Invitrogen), purified and treated with DNase, with the Macherey Nagel NucleoSpin® RNAII kit. RNA was quantified with a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and the integrity of the RNAs was checked with an Agilent 2100 bioanalyzer and the eukaryote total RNA Nano assay (Agilent Technologies). We reverse-transcribed 1 µg of total RNA in a final reaction volume of 20 µl, with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), RNase inhibitor and random primers, according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed on a QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR System with a SYBR green detection protocol. We mixed 1.5 ng of cDNA with Fast SYBR® Green Master Mix and 500 nM of each primer, in a final volume of 10 µl. The reaction mixture was subjected to 40 cycles of PCR (95 °C/20 s; [95 °C/1 s; 60 °C/20 s] X40) followed by a fusion cycle, for analysis of the melting curve of the PCR products. Negative controls without reverse transcriptase were introduced, to check for the absence of genomic DNA contaminants. Primers were designed with the Primer-Blast tool from NCBI and Primer Express 3.0 software (Life Technologies). With

the exception of the ribosomal primers, the primers used bound to one exon and one exon-exon junction. Specificity and the absence of multi-locus matching at the primer site were checked by BLAST analysis. The amplification efficiencies of primers were determined from the slopes of standard curves generated with a four-fold dilution series. The amplification specificity of each real-time PCR was confirmed by analyzing the dissociation curves. The Ct values obtained were then used for further analyses, with the *gapdh*, *actb1* and *tbp* genes as references. Each sample was assessed at least in duplicate.

The primers used were as follows:

<i>gapdh-F</i>	TTAACGGATTTCGGTCGCATT
<i>gapdh-R</i>	CCGCCTTCTGCCTTAACCTC
<i>actb1-F</i>	TACACAGCCATGGATGAGGAAAT
<i>actb1-R</i>	TCCCTGATGTCTGGGTCGTC
<i>tbp-F</i>	ATCTCCACAGGGAGCCATGA
<i>tbp-R</i>	CAGGAGGGACAAGCTGTTGG
<i>fbl-F</i>	GAGGATGCTCTGGTCACAAAG
<i>fbl-R</i>	CTGAAAGGATTCCACGCTCT
<i>5'ETS-F</i>	CCGGTCTACCTCGAAAGTC
<i>5'ETS-R</i>	CGAGCAGAGTGGTAGAGGAAG
<i>ITS1-F</i>	CTCGGAAAACGGTGAACCTG
<i>ITS1-R</i>	GTGTTTCGTTTCAGGGTCCG
<i>ITS2-F</i>	CCTAAGCGCAGACCGT
<i>ITS2-R</i>	AGCGCTGGCCTCGGAGATC
<i>18S-F</i>	ACACGGGGAGGTAGTGACGA
<i>18S-R</i>	TCGCCATGGGTTTAGGATA
<i>tp53-F</i>	GAACCCCGGATGGAGATAACTT
<i>tp53-R</i>	CAGTTGTCCATTCAGACCAAG
<i>neurod1-F</i>	CAACACACCCTAGAGTTCGGACAT
<i>neurod1-R</i>	CCACGTCTCGTTCGTTCTGG
<i>cdkn1a-F</i>	TTGCAGAAGCTCAAAACATATTGTC
<i>cdkn1a-R</i>	ACGCAAAGTCGAAGCTCCAG

4.11. Polysome profile

We collected 60 wild-type and 100 mutant embryos per sample at 3dpf. Embryos were deyolked, rinsed with ice-cold PBS and dissociated in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1% Triton-X100, 2 mM DTT, 100 µg/ml cycloheximide, 200 U/ml RNasin (Promega), and protease inhibitor (Sigma)). Dissociated cells were subjected to sucrose gradient centrifugation (31% sucrose, 50 mM Tris-acetate pH 7.6, 50 mM NH₄Cl, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT). Gradients were successively frozen and thawed before use. The gradients were then centrifuged for 3 h in an SW41 rotor (4 °C, 39,000 rpm) and fractionated with the ISCO system.

4.12. Cell dissociation and FACS

Injection of 1nL of EdU (10 µM) was first performed in pericardial space of embryos. Following EdU incorporation, embryos were placed in ice-cold embryo medium (5.03 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂·2H₂O, 0.33 mM MgSO₄·7H₂O) for 10 min and transferred to ice-cold Ringer solution for 10 min. The tails and bodies of the embryos were removed and the heads were placed in 500 µl of FACSMAX (Manoli and Driever, 2012). Cells were dissociated by manual squishing of the embryos cell strainer (with 40-µm mesh). Cells were collected by centrifugation (500 × g, 10 min, 4 °C) of the suspensions, and fixed by incubation in ethanol 70% at -20 °C for 2 days. EdU was detected as described in the “EdU labeling” section. Cells were then incubated in PBS buffer containing 0.1% Triton X-100, RNase A (SIGMA, 0.5 µg/ml) and 7-AAD (BD Pharmingen 559925, 20 µl in 1 ml buffer), and then incubated for 1 h in the dark at 37 °C before flow cytometry analysis. DNA content was assessed with a BD FACSCalibur analyzer and analyses were performed with FlowJo software.

4.13. Statistical analyses

Statistical analysis was performed with Microsoft Excel XLSTAT software. All data are expressed as means ± standard deviations. We calculated two-tailed *p*-values for Kruskal-Wallis non-parametric tests with Bonferroni correction for comparisons between three groups, and Mann-Whitney tests for comparisons of two groups.

Acknowledgments

We wish to thank Julien Hemon, Arnim Jennet, Elodie Machado and Laurie Rivière (Tefor Core Facility) and Charlène Lasgi (Curie Institute, flow cytometry platform) for technical assistance; Pierre Affaticati (Tefor Core Facility), Odile Bronchain (NeuroPsi), Jean-Michel Hermel and Aurélie Heuzé (CASBAH group), Olivier Namy (I2BC), Vincent Pennaneach (Curie Institute) for fruitful discussion and Frédéric Catez (CRCL) for sharing unpublished data. This work has benefited from the facilities and expertise of TEFOR (TEFOR Infrastructure - Investissement d'avenir - ANR-II-INBS-0014). This research received financial support from the FINEST project (ANR-11-BSV2-0029), INRA PHASE department and from a grant of the “Fondation Leducq”. Stéphanie Bouffard acknowledge the receipt of MENESR (French minister) fellowship.

Author contributions

Stéphanie Bouffard and Françoise Jamen: Conception and design, Collection and assembly of data, Data analysis and interpretation, manuscript writing and manuscript proof reading; Alessandro Brombin and Emilie Dambrose: conception and design, Collection and assembly of data, Data analysis and interpretation; Sylvain Lempereur, Isabelle Hatin and Raphaël Corre: Collection and assembly of data; Franck Bourrat and Matthieu Simion: Data analysis and interpretation and manuscript proof reading; Jean-Stéphane Joly: Conception and design, Data analysis and interpretation and manuscript proof reading.

References

- Affaticati, P., Yamamoto, K., Rizzi, B., Bureau, C., Peyrieras, N., Pasqualini, C., Demarque, M., Vernier, P., 2015. Identification of the optic recess region as a morphogenetic entity in the zebrafish forebrain. *Sci. Rep.* 5, 8738.
- Amin, M.A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., Fukui, K., 2007. Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 320–326.
- Amsterdam, A., Nissen, R.M., Sun, Z., Swindell, E.C., Farrington, S., Hopkins, N., 2004. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12792–12797.
- Azuma, M., Toyama, R., Laver, E., Dawid, I.B., 2006. Perturbation of rRNA synthesis in the bap28 mutation leads to apoptosis mediated by p53 in the zebrafish central nervous system. *J. Biol. Chem.* 281, 13309–13316.
- Brombin, A., Joly, J.S., Jamen, F., 2015. New tricks for an old dog: ribosome biogenesis contributes to stem cell homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 34, 61–70.
- Choi, Y.W., Kim, Y.W., Bae, S.M., Kwak, S.Y., Chun, H.J., Tong, S.Y., Lee, H.N., Shin, J.C., Kim, K.T., Kim, Y.J., Ahn, W.S., 2007. Identification of differentially expressed genes using annealing control primer-based GeneFishing in human squamous cell cervical carcinoma. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 19, 308–318.
- Danilova, N., Gazda, H.T., 2015. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis. Model Mech.* 8, 1013–1026.
- Deves, M., Bourrat, F., 2012. Transcriptional mechanisms of developmental cell cycle arrest: problems and models. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 290–297.
- Erales, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S.E., Garcia, M., Laforets, F., Marcel, V., Baudin-Baillieu, A., Bertin, P., Coute, Y., Adrait, A., Meyer, M., Therizols, G., Yusupov, M., Namy, O., Ohlmann, T., Motorin, Y., Catez, F., Diaz, J.J., 2017. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 12934–12939.
- Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robin, J.C., Pujol, S., Bauer, C., Jennings, D., Fennessy, F., Sonka, M., Buatti, J., Aylward, S., Miller, J.V., Pieper, S., Kikinis, R., 2012. 3D slicer as an image computing platform for the quantitative imaging network. *Magn. Reson. Imaging* 30, 1323–1341.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., Mechali, M., 2015. DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 360–374.
- Fumagalli, S., Ivanenkov, V.V., Teng, T., Thomas, G., 2012. Suprainduction of p53 by

- disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev.* 26, 1028–1040.
- Inoue, D., Wittbrodt, J., 2011. One for all – a highly efficient and versatile method for fluorescent immunostaining in fish embryos. *PLoS ONE* 6, e19713.
- James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R., DiMario, P., 2014. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* 5, 402–426.
- Joly, J.S., Recher, G., Brombin, A., Ngo, K., Hartenstein, V., 2016. A conserved developmental mechanism builds complex visual systems in insects and vertebrates. *Curr. Biol.* 26, R1001–R1009.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Koh, C.M., Iwata, T., Zheng, Q., Bethel, C., Yegnasubramanian, S., De Marzo, A.M., 2011. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget* 2, 669–683.
- Kraushar, M.L., Popovitchenko, T., Volk, N.L., Rasin, M.R., 2016. The frontier of RNA metamorphosis and ribosome signature in neocortical development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 55, 131–139.
- Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., Chedin, S., 2006. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev.* 20, 2030–2040.
- Le Bouteiller, M., Souilhoul, C., Beck-Cormier, S., Stedman, A., Burlen-Defranoux, O., Vandormael-Pournin, S., Bernex, F., Cumano, A., Cohen-Tannoudji, M., 2013. Notchless-dependent ribosome synthesis is required for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 210, 2351–2369.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B., 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534–537.
- Locati, M.D., Pagano, J.F.B., Girard, G., Ensink, W.A., van Olst, M., van Leeuwen, S., Nehrlich, U., Spaink, H.P., Rauwerda, H., Jonker, M.J., Dekker, R.J., Breit, T.M., 2017. Expression of distinct maternal and somatic 5.8S, 18S, and 28S rRNA types during zebrafish development. *RNA* 23, 1188–1199.
- Lowekamp, B.C., Chen, D.T., Ibanez, L., Blezek, D., 2013. The Design of SimpleITK. *Front. Neuroinform.* 7, 45.
- Lucas, I., Feng, W., 2003. The essence of replication timing: determinants and significance. *Cell Cycle* 2, 560–563.
- Ma, T.H., Lee, L.W., Lee, C.C., Yi, Y.H., Chan, S.P., Tan, B.C., Lo, S.J., 2016. Genetic control of nucleolar size: an evolutionary perspective. *Nucleus* 7, 112–120.
- Manoli, M., Driever, W., 2012. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of fluorescently tagged cells from zebrafish larvae for RNA isolation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012.
- Marcel, V., Catez, F., Diaz, J.J., 2013. p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene* 34, 5513–5523.
- Mendez, J., 2009. Temporal regulation of DNA replication in mammalian cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 343–351.
- Mullineux, S.T., Lafontaine, D.L., 2012. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* 94, 1521–1532.
- Negi, S.S., Brown, P., 2015. rRNA synthesis inhibitor, CX-5461, activates ATM/ATR pathway in acute lymphoblastic leukemia, arrests cells in G2 phase and induces apoptosis. *Oncotarget* 6, 18094–18104.
- Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D., Caceres, J.F., 2003. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8519–8527.
- Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J.S., Wittbrodt, J., Chourrou, D., Bourrat, F., 1999. Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): a morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. *J. Comp. Neurol.* 413, 385–404.
- Recher, G., Jouralet, J., Brombin, A., Heuze, A., Mugniery, E., Hermel, J.M., Desnoulze, S., Savy, T., Herbomel, P., Bourrat, F., Peyrieras, N., Jamen, F., Joly, J.S., 2013. Zebrafish midbrain slow-amplifying progenitors exhibit high levels of transcripts for nucleotide and ribosome biogenesis. *Development* 140, 4860–4869.
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L.C., Hozak, P., Castano, E., 2015. Fibrillarin from *Archaea* to human. *Biol. Cell* 107, 159–174.
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R., Hurt, E.C., 1989. A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *Embo J.* 8, 4015–4024.
- Shubina, M.Y., Musinova, Y.R., Sheval, E.V., 2016. Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin: evolution of Structure and Functions. *Biochemistry (Mosc)* 81, 941–950.
- Su, H., Xu, T., Ganapathy, S., Shadfan, M., Long, M., Huang, T.H., Thompson, I., Yuan, Z.M., 2014. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* 33, 1348–1358.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., Kouzarides, T., 2014. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B., 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574–578.
- Watanabe-Susaki, K., Takada, H., Enomoto, K., Miwata, K., Ishimine, H., Intoh, A., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Sugino, H., Asashima, M., Kurisaki, A., 2014. Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. *Stem Cells* 32, 3099–3111.
- Xu, X., Xiong, X., Sun, Y., 2016. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci. China Life Sci.* 59, 656–672.
- Yelick, P.C., Trainor, P.A., 2015. Ribosomopathies: global process, tissue specific defects. *Rare Dis.* 3, e1025185.
- Zink, D., 2006. The temporal program of DNA replication: new insights into old questions. *Chromosoma* 115, 273–287.

ARTICLE 2 : SEGMENTATIONS AUTOMATIQUES D'IMAGES 3D ACQUISES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE POUR LA MESURE DE LA MATIÈRE BLANCHE DE CERVEAUX DE POISSONS ZÈBRES

6.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2

Comme vu dans la [Section 5.1](#), l'emploi d'un marqueur fluorescent lipophile, par exemple 1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate (DiI), permet de marquer les lipides se trouvant au sein d'un tissu. Le marquage d'un poisson zèbre au DiI sépare l'échantillon en deux plages d'intensités. Une première plage, très intense, se retrouve au sein des zones très fortement lipidiques, comme les gaines de myéline entourant certains neurones, les jonctions serrées au sein du tube digestif ou encore le contenu du sac vitellin. La seconde plage d'intensité, plus faible, correspond au marquage de l'ensemble des enveloppes cellulaires, ce qui permet de marquer l'ensemble de l'échantillon. En utilisant la différence d'intensité lumineuse induite par ces marquages, il est possible de détecter la matière blanche se trouvant dans le système nerveux central ainsi que l'ensemble de l'échantillon.

Nous avons donc développé un premier algorithme visant à segmenter l'ensemble de l'échantillon, puis un second servant à segmenter la matière blanche. Au sein de ce second algorithme, une étape d'élimination de la rétine a été implémentée afin de limiter la segmentation à la matière blanche cérébrale. Ces deux algorithmes couplent des méthodes de morphologies mathématiques et de seuillages afin d'obtenir les deux segmentations désirées en un minimum de temps. La mise à jour des algorithmes publiés est disponible en [Section 4.2](#) et [Section 4.4](#) pour respectivement la segmentation de l'ensemble de l'échantillon et de la larve entière.

Malheureusement, la diffusion de la lumière au sein du tissu, plus importante que dans le milieu d'acquisition, induit une réduction du contraste suivant l'axe d'acquisition. Cette déperdition, qui suit la loi de Beer-Lambert (voir [Section 2.2.2](#)), induit une imprécision de la détection de la matière blanche dans les zones profondes du cerveau. Par exemple, dans le cas d'une acquisition dorsale, cette déperdition peut induire une sous-segmentation de l'hypothalamus. Afin de compenser cette déperdition, nous avons développé un algorithme de compensation utilisant la segmentation de l'échantillon entier, que nous avons nommé segmentation-based depth-dependent contrast correction (SBDDCC).

Pour initier le SBDDCC, on commence par calculer une carte de la profondeur au sein de l'échantillon. Cette carte consiste en une somme cumulative de la segmentation de l'échantillon entier suivant l'axe d'acquisition. Cette carte permet le calcul des valeurs de gris médianes pour chaque couche. On normalise ensuite la valeur des médians des couches profondes pour qu'elles valent la même valeur que le médian maximal. Cet algorithme de correction, qui compense une décroissance exponentielle comme prédit par la loi de Beer-Lambert, a l'intérêt de ne nécessiter qu'une seule acquisition, contrairement aux méthodes de tomographie. De plus, il permet de réduire le temps de calcul contrairement à des méthodes plus complexes. En revanche, la réduction de cette correction à la segmentation de l'échantillon entier permet d'améliorer l'application de cette méthode de calcul en tenant compte de la forme de l'échantillon.

En résumé, les résultats principaux de la publication au sein de *Mathematical Morphology - Theory and Application* [110] sont les suivants:

- Le marquage d'un poisson zèbre au DiI permet la mise en place d'un algorithme de segmentation de l'intégralité de l'échantillon (voir [Figure 33b](#)).
- Cet algorithme couple des procédures de seuillages et de morphologies mathématiques afin d'initier le calcul de lignes de partage des eaux.
- L'algorithme de segmentation de l'intégralité de l'échantillon fournit rapidement et de manière robuste un résultat précis.
- Malgré l'emploi d'une clarification optique, un phénomène de diffusion suivant la loi de Beer-Lambert peut apparaître au sein de l'échantillon.
- En se basant sur la segmentation de la larve entière, un algorithme de compensation de l'atténuation lumineuse a été développé, nommé segmentation-based depth-dependent contrast correction (voir [Figure 33c](#)).
- Le SBDDCC commence par mesurer la profondeur au sein de l'échantillon
- Le SBDDCC calcule ensuite le médian des valeurs de gris pour chaque coupe.
- Le SBDDCC normalise le médian des valeurs de gris des couches profondes au médian maximal.
- La valeur médiane des niveaux de gris pour chaque profondeur suivant une décroissance exponentielle, cet algorithme permet de compenser la loi de Beer-Lambert.

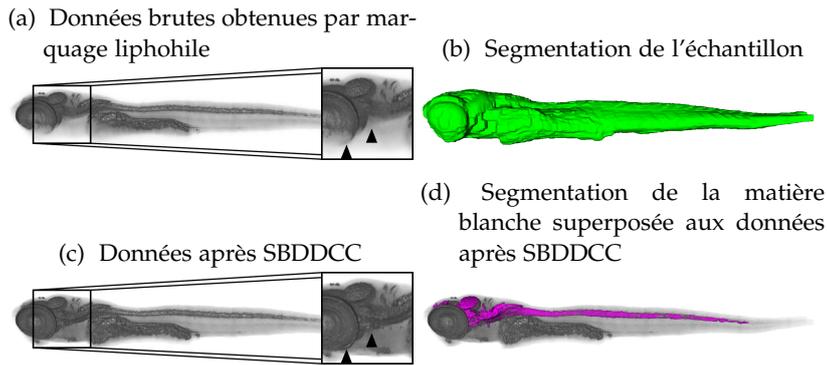


Figure 33: Représentation 3D des résultats de l'application des algorithmes sur des alevins de poisson zèbre.

(a) On aperçoit le signal faible permettant de segmenter la larve entière, ainsi que de forts marquages dans diverses régions dont la matière blanche du cerveau. L'encart met en évidence le défaut de pénétration de la lumière dans les régions profondes. Les têtes de flèche indiquent en particulier une perte de signal dans la partie ventrale de la rétine et dans l'hypothalamus. (b) L'algorithme de segmentation de l'alevin entier permet d'obtenir une segmentation précise de l'échantillon malgré la présence de la déperdition lumineuse au sein de l'échantillon. (c) En revanche, il est nécessaire de compenser cette déperdition lumineuse pour obtenir une segmentation correcte de la matière blanche. L'algorithme nommé SBDDCC nécessite la segmentation montrée en b de façon à connaître la forme de l'échantillon et ainsi mesurer la quantité de tissu traversé. Cet algorithme permet de compenser efficacement les défauts de pénétration de la lumière, comme on peut le voir dans l'encart (têtes de flèche). (d) L'application du SBDDCC permet d'effectuer une segmentation précise de la matière blanche. L'algorithme développé est en mesure de supprimer les régions fortement marquées mais extérieures au système nerveux central, comme les rétines ou le sac vitellin.

Les segmentations sont représentées par des rendus surfaciques, tandis que les données en valeurs de gris sont représentées par des rendus volumiques.

- Cet algorithme permet d'effectuer peu de calculs, et permet de simplifier les acquisitions.
- L'algorithme de compensation permet d'améliorer significativement la qualité du recalage de deux acquisitions du même échantillon.
- De plus, cet algorithme de compensation permet à un opérateur spécialisé d'améliorer la précision de ses segmentations manuelles.
- En utilisant une seconde fois le marqueur lipophile, un algorithme de segmentation de la matière blanche cérébrale a été mis

au point en couplant des méthodes de morphologies mathématiques à des seuillages (Voir [Figure 33d](#)).

- Cet algorithme de segmentation de la matière blanche utilise l'algorithme de compensation afin d'améliorer sa précision.
- Afin de limiter la segmentation de la matière blanche au cerveau, un algorithme de détection des rétines a été développé.
- L'algorithme de segmentation de la matière blanche fournit rapidement un résultat précis.

Enfin, l'algorithme de segmentation de la matière blanche cérébrale a servi de base au développement de la segmentation de la matière grise présentée en [Chapitres 9](#), et le SBDDCC a servi de base pour le développement d'un algorithme de compensation d'un défaut de marquage immuno-histochimique présenté en [Chapitres 8](#).

6.2 ARTICLE 2 PUBLIÉ DANS MATHEMATICAL MORPHOLOGY-THEORY AND APPLICATIONS

Research Article

Open Access

Sylvain Lempereur*, Arnim Jenett, Elodie Machado, Ignacio Arganda-Carreras, Matthieu Simion, Pierre Affaticati, Jean-Stéphane Joly, and Hugues Talbot

Automated segmentation of thick confocal microscopy 3D images for the measurement of white matter volumes in zebrafish brains

<https://doi.org/10.1515/mathm-2020-0100>

Received November 21, 2019; accepted April 20, 2020

Abstract: Tissue clearing methods have boosted the microscopic observations of thick samples such as whole-mount mouse or zebrafish. Even with the best tissue clearing methods, specimens are not completely transparent and light attenuation increases with depth, reducing signal output and signal-to-noise ratio. In addition, since tissue clearing and microscopic acquisition techniques have become faster, automated image analysis is now an issue. In this context, mounting specimens at large scale often leads to imperfectly aligned or oriented samples, which makes relying on predefined, sample-independent parameters to correct signal attenuation impossible.

Here, we propose a sample-dependent method for contrast correction. It relies on segmenting the sample, and estimating sample depth isosurfaces that serve as reference for the correction. We segment the brain white matter of zebrafish larvae. We show that this correction allows a better stitching of opposite sides of each larva, in order to image the entire larva with a high signal-to-noise ratio throughout. We also show that our proposed contrast correction method makes it possible to better recognize the deep structures of the brain by comparing manual vs. automated segmentations. This is expected to improve image observations and analyses in high-content methods where signal loss in the samples is significant.

Keywords: contrast correction, image restoration, light attenuation, registration, high-content screening, watershed segmentation

MSC: 68U10, 92C55

1 Introduction

Due to its small size, its robustness, affordability and its high reproduction rate, zebrafish have become a popular vertebrate model over the last decades, which is used in a variety of screening experiments [7]. These screens are performed for the study of behaviour [4], gene expressions [10], drug-toxicity [16] or exposure to toxicological compounds [3]. However, image-based screening approaches, which are using whole zebrafish

***Corresponding Author: Sylvain Lempereur:** LIGM, Univ Gustave Eiffel, CNRS, ESIEE Paris, F-77454 Marne-la-Vallée, France, E-mail: sylv.lempereur@gmail.com

Tefor Paris-Saclay, UMS2010, CNRS/INRA, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette, France

Arnim Jenett, Elodie Machado, Matthieu Simion, Pierre Affaticati, Jean-Stéphane Joly: Tefor Paris-Saclay, UMS2010, CNRS/INRA, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette, France

Ignacio Arganda-Carreras: Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain, Computer Science and Artificial Intelligence Department, University of the Basque Country, San Sebastian, Spai, Donostia International Physics Center, San Sebastian, Spain

Hugues Talbot: LIGM, Univ Gustave Eiffel, CNRS, ESIEE Paris, F-77454 Marne-la-Vallée, France, Université Paris-Saclay, CentraleSupélec, Inria, 91190, Gif-sur-Yvette, France

embryos, are mainly performed on the basis of 2D images [17, 19]. While 3D-based screening methods do exist, they are either using unconventional microscopy setups, or need multiple acquisitions of the same sample [2, 8, 14, 15, 21], which renders them unsuitable for large scale analysis.

Recently developed tissue clearing methods allow biologists to perform anatomic studies on the basis of *in-toto* confocal image acquisitions of thick samples, such as mouse brain or entire zebrafish [6]. However, tissue clearing of large samples is time consuming. In addition, the most effective techniques involve hazardous compounds like organic solvents [20] which complicates their application at large scale. Furthermore, some tissue clearing protocols have the potential of changing the size or – even worse – the shape of the processed tissue [23]. Simpler protocols are now becoming available; they are reducing size alteration, and are both less toxic and faster [1].

These fast tissue clearing protocols open the route to new high content screenings (HCS) using deep confocal imaging on tissue cleared samples, like whole-mount zebrafish larvae. Such protocols allow the detection of subtle abnormalities of larvae due to drug exposure or mutations. This approach is based on two technological developments: first, fast mounting procedures, which are an improvement of earlier work [22] and allow the reliable mounting and imaging of numerous samples. Second, the automatic image analysis, combining signal improvement, feature detection and measurement of regions of interest.

In this article, we describe an automatic and accurate segmentation procedure for measuring the volumes of whole larvae and the volumes of brain white matter of *in-toto* 5 days post-fertilization (dpf) zebrafish imaged by confocal microscopy. Our protocol involves a new and fast contrast correction step, which reduces the impact of light attenuation and dispersion in the samples.

Indeed, current contrast corrections are based on the Beer-Lambert attenuation model [13] which demands time-consuming computations and often require multiple acquisitions in different orientations to achieve robust results [12, 18]. Using the median value at each depth of the acquired sample, we show that our method reproduces a Beer-Lambert attenuation over the sample while accelerating computation by reducing the algorithmic complexity of the contrast correction.

2 Methods

2.1 Tissue clearing

Zebrafish larvae are fixed in formaldehyde (4% formaldehyde, 0.1% Tween20 in 1X phosphate buffered saline (PBS)) and washed in 0.1% Tween20/PBS (PBStw). Fixed larvae are then bleached by incubation in H₂O₂-based depigmentation solution for 2.5 hours (1.5 hours in 0.5X saline sodium citrate buffer (SSC), 0.1% Tween20 in dH₂O followed by 1 hour in 0.5X SSC, 5% formamide and 3% H₂O₂ in dH₂O) and then thoroughly washed in PBStw. Larvae are dehydrated in a series of ethanol concentrations (25%, 50%, 75% and 100% in PBStw) and stored at -20°C in 100% methanol. After rehydration in a series of ethanol concentrations (100%, 75%, 50% and 25% in 0.5% Triton X-100 in 1XPBS (PBStr)), larvae are washed in PBStr prior to proteinase K treatment (at 20 µg/ml in 0.5% PBStr). They are post-fixed (2% formaldehyde, 0.1% Tween20, DMSO 2% in 1X PBS) for 1 hour and washed in PBStr. Larvae are blocked 4 hours in 10% NGS, 0.05% Azide in 1XPBStr (IB) and finally labeled with 1 mM Dil (DiI18(3) Stain, Molecular Probes) in IB for 2 days and washed in PBStw. We used the fluorescent lipophilic DiI stain, which causes an intense and consistent staining predominantly in the white matter due to the high density of lipid-rich myelinated fibers. Due to the comparatively small size of the specimens, the applied tissue clearing procedure only involves the matching of the refractive index (RI) between the specimen and the surrounding medium. In the context of HCS on 5 dpf zebrafish larvae, this protocol is currently the fastest, safest and most economic way for generating a large number of transparent specimens. The tissue clearing medium is a fructose-based high-refractive-index solution (FHRI) prepared as follows: 70% fructose (wt/vol), 20% DMSO (wt/vol) in 0.002 M PBS, 0.005% sodium azide (wt/vol). The RI of the solution was adjusted to 1.457 using a refractometer (Kruss, Germany). Two kinds of mountings are used. To evaluate accuracy of white matter segmentation, specimens were mounted with dorsal side up in a Petri

dish by embedding them in a drop of 0.8% Phytigel (Sigma-Aldrich, #P8169) in embryo medium. To evaluate signal decrease over depth of the sample, in particular below the eyes, specimens were mounted between two coverslips in lateral position to allow imaging from both the left and right sides. To prevent motion between both side acquisitions, specimen were embedded in 0.8% low-melting agarose within 700 μm thick silicone spacers. The RI is equilibrated by incubating the specimen in fHRI for at least 12 h and another coverslip is then added and sealed with silicone.

2.2 Confocal microscopy

Confocal microscopy image stacks (3D images) of whole-mount zebrafish larvae (5 dpf) were acquired with a 12-bit encoded dynamic range. DiI signals were recorded using a Leica TCS SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM motCorr objective. For specimens embedded between two coverslips, acquisitions of opposite orientations of the specimens are registered by a two-step process using the Elastix software package [11]. First, the so-called moving image is flipped horizontally and the order of its slices is reversed to compensate for the physical flipping of the specimen. Second, the moving image is aligned to the fixed image in a multi-resolution fashion (using 4 resolution levels of a Gaussian pyramid in our case), using an affine transformation to model the deformation between both images, and either the Mean Square Difference (MSD) or Mutual Information (MI) of the voxel intensities is used as similarity metric. Finally, the transformed moving image and the fixed image are fused using their maximum voxel intensities.

2.3 Segmentation accuracy

We manually performed 3D segmentations of whole larvae and their white matter using using 3D Slicer [9] and Amira for Life & Biomedical Sciences (Thermo Fisher Scientific) software packages. These manual segmentation were then compared to corresponding automatic ones.

We measure the segmentation accuracy with a Matthews correlation coefficient (MCC), which considers both true positives and true negatives. We also use Sørensen-Dice coefficient (DSC), which does not consider true negatives. To balance the importance of false positive over false negative voxels, we also used the general balanced metric [5]. Setting $\delta = 2$, this metric is called GB2 in the sequel. Coupled with DSC, this metric informs on the ratio of false positive voxels over false negatives ones.

The imaging procedure leads to numerous black pixels, which could artificially impact positively the MCC. To avoid this artefact, we chose to reduce each acquisition to the bounding box of the union between the ground truth and the result of the segmentation, with a tolerance of 5 voxels in each direction. This bounding box is computed to reduce the amount of true negative voxels, thus reducing their impact on the MCC computation.

3 Algorithms

The following sections use notations given in Table 1.

3.1 Whole larva segmentation

Let I_i be the initial 3D acquired volume.

Table 1: Mathematical notations.

Notations	Name	Definitions
I	an $N \times M \times O$, 12-bit image	$\forall p \in [1, N] \times [1, M] \times [1, O], I(p) \in [0; 4095] \cap \mathbb{Z}$
$\max(I)$	Maximum value of I	
$\text{local_maxima}(I)$	Local maxima of I	
$(I)_{\geq \theta}$	Thresholding	$\forall p \in I, I(p) = 1$ if $I(p) \geq \theta$; 0 otherwise
T_{Otsu}	Otsu thresholding	
T_{Otsu}^n	n class Otsu thresholding	
$\text{inv}(I)$	Inverse of image I	$\forall p, \text{inv}(I(p)) = 4095 - I(p)$
\bigvee	Pointwise maximum	
\bigwedge	Pointwise minimum	
c_i	cube of size i^3	
$\delta_{se}(I)$	Dilation with structuring element se	$\bigvee_{v \in se} I_{-v}$
$\delta_{I^2}(I)$	Geodesic dilation of I using I^2 as mask	$\bigvee_{v \in I^2} I_{-v}$
$\varepsilon_{se}(I)$	Erosion with structuring element se	$\bigwedge_{v \in se} I_v$
$\varphi_{se}(I)$	Closing with structuring element se	$\delta_{se}(\varepsilon_{se}(I))$
$\gamma_{se}(I)$	opening with structuring element se	$\varepsilon_{se}(\delta_{se}(I))$
$\text{grad}_M(I)$	Morphological gradient of I	$\text{grad}_M(I) = \delta_{s_1}(I) - \varepsilon_{s_1}(I)$
$\gamma_\lambda^\alpha(I)$	Volume opening	$\bigvee_{se, \text{volume}(se)=\lambda} \gamma_{se}(I)$
$\gamma_u^\alpha(I)$	Ultimate volume opening	
$\text{median}_{se}(I)$	median filter with structuring element se	
$\mu = \text{median}(I)$	Scalar median of an array	$\forall p, M(p) = \text{median}(I)$
$\text{percentile}_q(I)$	qth percentile of an array I	

To initiate whole larva segmentation, a morphological opening using a cubic structuring element of size $15 \times 15 \times 15$ voxels¹ is performed to smooth the signal (Eq. (1)). Then, a first mask of the segmentation is computed. To achieve this, the opened image is thresholded (Eq. (2)) using the first percentile of grey values of non-black voxels of I_i (Eq. (3)) as thresholding value. Then, a marker image is created by setting local maxima of I_i inside A^2 (Eq. (4)) to 2, the frame of the image to 1 and every other voxels to 0 (Eq. (5)). A morphological gradient is then performed on the opened image (Eq. (6)). Then, a classical watershed is computed using the previously explained marker image and the morphological gradient (Eq. (7)). This resulting image is closed using a cubic structuring element of size 11 (Eq. (8)) to smooth the resulting volume. The last step of the segmentation of the whole larva is an ultimate volume opening (Eq. (9)). This step consists of performing a succession of volume openings until a single object remains on the array. This last object is kept as the final larva segmentation result.

$$A^1 = \gamma_{c_{15}}(I_i) \quad (1)$$

$$A^2 = (A^1)_{\geq p_1} \quad (2)$$

$$p_1 = \text{percentile}_1(A^1) \quad (3)$$

$$A^3 = A^2 \cap \text{local_maxima}(I_i) \quad (4)$$

¹ Later structuring element sizes will be abbreviated with a single number, such as “size 15”

$$M_{\text{whole}} = 2A^3 + F \quad (5)$$

$$A^5 = \text{grad}(A^1) \quad (6)$$

$$A^6 = \text{watershed}(A^5, M_{\text{whole}}) \quad (7)$$

$$A^7 = \varphi_{c_{11}}(A^6) \quad (8)$$

$$S_{\text{larva}} = \gamma_u^\alpha(A^7) \quad (9)$$

3.2 Segmentation-based depth-dependent contrast correction

Using the previously obtained segmentation of the whole larva S_{larva} , we now compute the depth map (Fig. 1B) of the specimen along the Z axis. The first step is a cumulative sum of S_{larva} along the Z axis (Eq. (10)). Then, we compute the multiplication of the original segmentation and the cumulative sum, to reduce values to the previously segmented shape, as in Eq. (11). The results of this multiplication is the depth of each pixel into the specimen starting from the acquisition side.

Let d be the value of the depth in the sample, d_b the last value of d , $\mu(d)$ the median grey value of the original image at level d , μ_{max} the maximum value of $\mu(d)$ and d_{max} the index of μ_{max} in $\mu(d)$. For each d from d_{max} to d_b we compute the new voxel value by multiplying each grey value of d by μ_{max} divided by $\mu(d)$ (Eq. (12)).

A result of this procedure is displayed on Fig.1.C.

$$\forall z \in [0; b], B^1(z) = \sum_{n=1}^z S_{\text{larva}}(n) \quad (10)$$

$$B^2 = B^1 * S_{\text{larva}} \quad (11)$$

$$\forall d \in [d_{\text{max}} : d_b], C(d) = I(d) * \frac{\mu_{\text{max}}}{\mu(d)} \quad (12)$$

3.3 White matter segmentation

The first step of the segmentation of the grey matter in our sample is the segmentation-based depth-dependent contrast correction computation of I_{Dil} . Let C_{Dil} be the contrast corrected image.

We next compute a median filter with a cubic structuring element of size 3 on C_{Dil} (Eq. (13)). After this median filter, we compute a four-class pixel binning based on Otsu thresholding, from which we retain only the two highest classes (Eq. (14)). This step provided a rough segmentation of our region of interest. However, this segmentation also contained eyes and yolk. We now propose additional steps to remove these tissues.

$$D^1 = \text{median}_{c_3}(C_{\text{Dil}}) \quad (13)$$

$$D^2 = T_{\geq 3}(T_{\text{Otsu}}^4(D^1)) \quad (14)$$

Due to the Dil labeling, the retina appear over-saturated on the image. Therefore, we use this information to detect retinas with a threshold 99% of $2^{12} - 1$ (Eq. (15)). This value was chosen because our datasets were

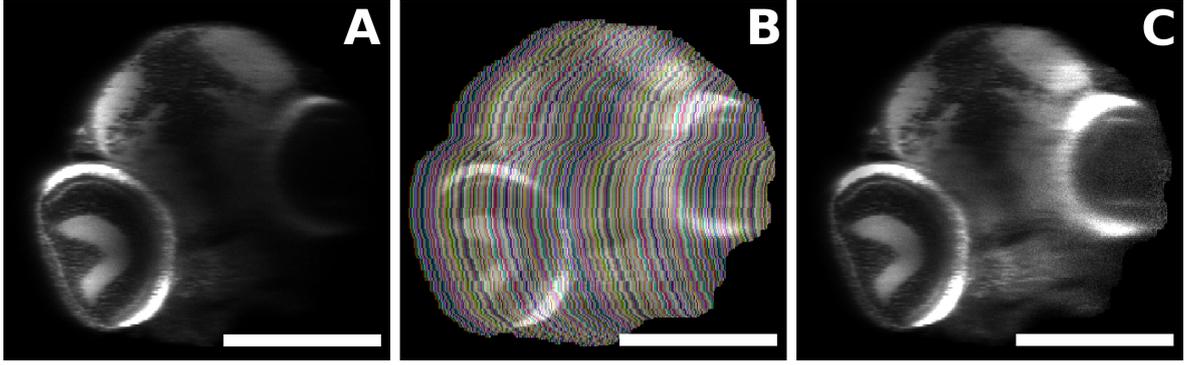


Figure 1: Result of the shape-aware contrast correction algorithm on a transversal section of a zebrafish larva
 A. Transversal view of a confocal microscopy acquisition from the left side of a zebrafish larva. B. depth map of the sample, computed from the left side. Depth levels are color coded to differentiate each layer. C. Result of the segmentation-based attenuation correction on this image. Previously invisible central white matter of the brain became visible after processing. scale bar = 250 μm

encoded in 12 bits. Then, saturated grey values are set to $2^{12} - 1$. However, after contrast correction, parts of the specimen can exceed this value (Eq. (16)). Taking every pixel brighter than 99% of 2^{12} flags saturated pixels and their neighborhoods. A volume opening of size 200 is then computed (Eq. (17)), and the result of this opening is closed using a cubic structuring element of size 7 (Eq. (18)). This segmentation was additionally dilated by a cubic structuring element of size 7 (Eq. (19)) and removed from the approximate white matter segmentation. (Eq. (20)).

$$\eta = 0.99 * (2^{12} - 1) \quad (15)$$

$$E^1 = (C_{\text{Dil}})_{\geq \eta} \quad (16)$$

$$E^2 = \gamma_{200}^\alpha(E^1) \quad (17)$$

$$E^3 = \varphi_{c_7}(E^2) \quad (18)$$

$$E^4 = \delta_{c_7}(E^3) \quad (19)$$

$$D^3 = D^2 - E^4 \quad (20)$$

Then, a dilation with a cubic structuring element of size 7 is applied. (Eq. (21)). The dilation result is recorded as D^4 . An erosion with a cubic structuring element of size 7 is computed (Eq. (22)). Then, an ultimate volume opening of the result of this erosion step is computed (Eq. (23)). This ultimate erosion step is stored as D^7 . In parallel, we remove D^4 from the segmentation of the whole larvae (Eq. (24)). After this removal, an erosion with a cubic structuring element of size 7 is computed to improve the size of the boundary between in and out regions (Eq. (25)). The result of this last step is summed with two times D^7 Eq.(26). This step creates a map of inside and outside zones. The results of this step is called D^9 . A marker image is created by keeping the local maxima of D^1 and by attributing to these later values stored in D^9 (Eq. (27)). A morphological gradient of D^1 is computed (Eq. (28)). Using this gradient and previously explained markers, a classical watershed is computed (Eq. (29)).

To finish, a last ultimate volume opening is computed (Eq. (30)) to obtain the segmentation of the white matter.

$$D^4 = \delta_{c_7}(D^3) \quad (21)$$

Table 2: Time spent to segment whole larvae in seconds

	1 st sample	2 nd sample	3 rd sample	4 th sample	5 th sample	6 th sample	Mean value
specialist 1	360	360	480	300	180	240	320
specialist 2	534	357	332	1015	213	449	483
Automated	117	103	104	118	114	106	110

$$D^5 = \varepsilon_{c_7}(D^4) \quad (22)$$

$$D^6 = \gamma_u^\alpha(D^5) \quad (23)$$

$$D^7 = S_{larvae} - D^4 \quad (24)$$

$$D^8 = \varepsilon_{c_7}(D^7) \quad (25)$$

$$D^9 = 2 * D^6 + D^8 \quad (26)$$

$$M_{\text{white_matter}} = D^9 * \text{local_maxima}(D^1) \quad (27)$$

$$D^{10} = \text{grad}(D^1) \quad (28)$$

$$D^{11} = \text{watershed}(D^{10}, M_{\text{white_matter}}) \quad (29)$$

$$S_{\text{white_matter}} = \gamma_u^\alpha(D^{11}) \quad (30)$$

4 Results

4.1 Segmentation of whole larvae

We chose the dorso-ventral orientation, because with lateral acquisitions, the eyes are too opaque. This would result in important signal loss, hiding the data behind them. Automated segmentation of whole larvae was performed as described in the Methods section. These segmentations were compared with the results of the 12 manual segmentations performed by two neuroanatomists. A visual example of these comparisons is shown in Fig. 2 C.

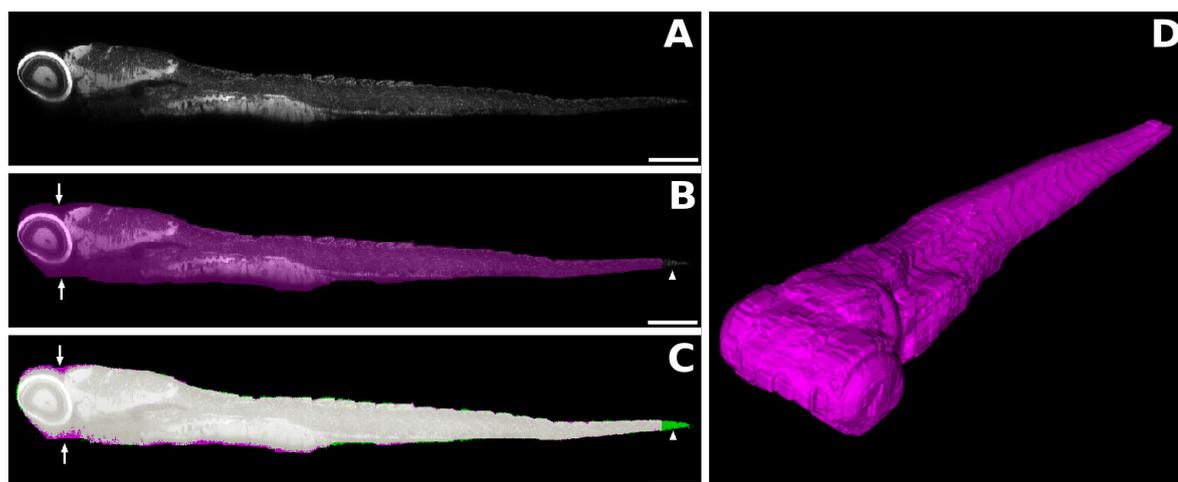
Time spent to segment whole larvae was measured for both specialists and for automated segmentation on 6 samples. These times are listed in Table 2. Automated segmentation of these files was almost 3 times faster than performing manual segmentation.

MCC, GB2 and DSC results are shown on Table 3.

MCC scores were high enough to consider this algorithm as accurate. However, some regions of the larvae have not been included in the segmented domain, such as the end of the tail (arrow head in Fig. 2.B and C) and, to the contrary, over-segmentation was also observed (arrow in Fig. 2.B and C). However, false positive and negative regions were very small compared to the size of the ground truth segmented domain.

Table 3: MCC, GB2 and DSC values for each sample compared to manual segmentation performed by two trained specialists

Sample ID	Specialist 1			Specialist 2		
	DSC	GB2	MCC	DSC	GB2	MCC
1	0.9659	0.9658	0.9593	0.9515	0.8487	0.9443
2	0.9451	0.9406	0.9345	0.9541	0.9521	0.9444
3	0.9593	0.9593	0.9514	0.9457	0.9453	0.9354
4	0.9421	0.9421	0.9373	0.9464	0.9455	0.9362
5	0.9532	0.9532	0.9448	0.9371	0.9342	0.9242
6	0.9669	0.9668	0.9602	0.9520	0.9508	0.9411
7	0.8296	0.7435	0.8173	0.9053	0.8859	0.8863
8	0.8462	0.7803	0.8386	0.9201	0.9069	0.9044
9	0.8540	0.7972	0.8481	0.9254	0.9147	0.9096
10	0.8440	0.7769	0.8362	0.9318	0.9237	0.9187
11	0.8242	0.7321	0.8148	0.8800	0.8448	0.8607
12	0.8143	0.7067	0.8093	0.9333	0.9266	0.9193
Median values	0.8980	0.8689	0.8913	0.9352	0.9304	0.9218

**Figure 2:** Whole segmentation of a zebrafish larva.

A. Lateral view of a 3D acquisition of a zebrafish 5-dpf larva. B. Automated segmentation of whole larva. Magenta pixels correspond to automatically segmented pixels. This segmentation presents over-segmentation on the head of the fish (arrows) and miss some parts of the tail (arrow head). C. Comparison between a manual segmentation and the automated segmentation. Magenta pixels are automatically segmented pixels, green ones are manually segmented ones. Grey pixels are the overlap between manually and automatically segmented pixels. This comparison confirms the over-segmentation on the head part (arrows) and the missing part on the tail (arrowhead). D. 3D visualisation of the segmentation of whole larva scale bar = 250 μm

4.2 Confocal microscopy acquisition and signal decrease in optical sections

In conjunction with the fact that zebrafish larvae are small and relatively transparent, our fast tissue clearing protocol allows acquisition of images with a conventional confocal microscope. Despite this protocol, attenuation of the excitation light as well as the emitted light occurred, leading to signal loss in the deepest regions of the specimens, as shown in a transversal X-Z optical section computed from the image pile (Fig.1.A). This prompted us to develop algorithms improving contrast in the deepest regions of the specimen. To better esti-

mate signal loss, we chose to record samples from opposite directions (left and right sides of the larvae). Two successive acquisitions were indeed possible because fluorescent dye (DiI) was not bleaching out.

4.3 Median value of signal loss follows an exponential decrease

The overall signal loss vs. depth into a specimen follows a Lambert law (see Fig. 3). Our contrast correction algorithm started at the depth in the sample where the maximum median value was observed. This maximum value is not located on the first layer of the segmented domain because the skin is not strongly labelled by DiI and thus has low luminosity values.

Using this information, we fitted an affine function to the log of median grey value for each depth above maximum median value using least median of square to evaluate if our estimation followed an exponential decrease.

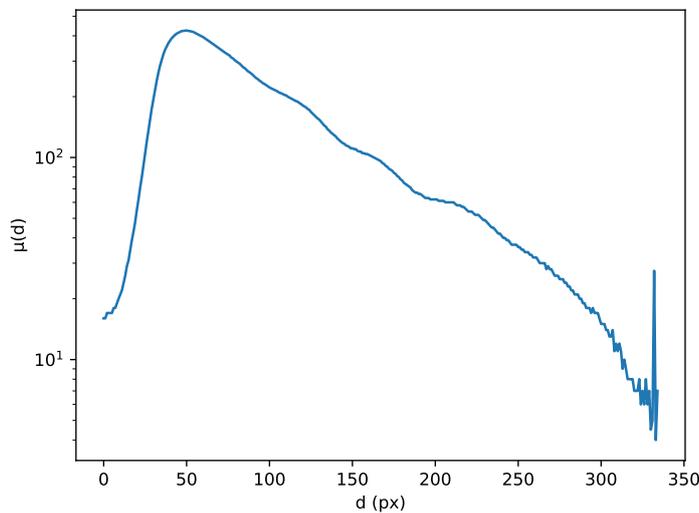


Figure 3: Log-plot of the median grey value over depth levels.

4.4 Contrast correction improves registration

Since the opposite images of the same specimen differ only in the direction of the z-axis, we hypothesized that a rigid registration (rotation, translation) should be sufficient to align two opposite acquisitions. Initially, the rigid registration of datasets without correction led to strongly misaligned elements. This induced a duplication of the retina, tecta (Fig.4.A) and spinal cord (data not shown), making any further analysis impossible.

We show in Fig.4 that computing a segmentation-based contrast correction on both acquisitions of a specimen prior to registration led to a visible improvement of the alignment (Fig.5.B), in particular in the retina and tecta (box in Fig.4A).

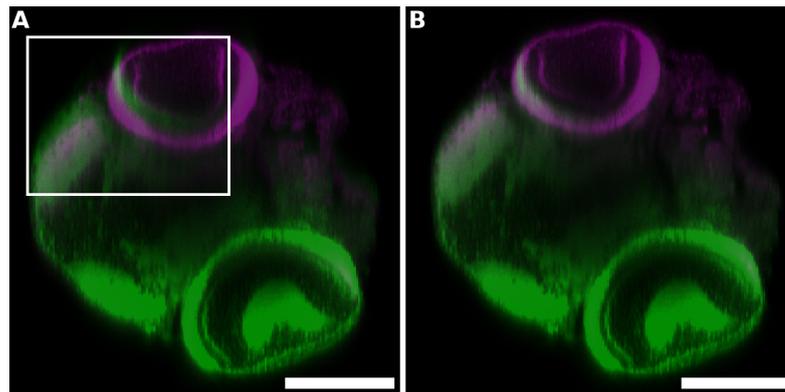


Figure 4: Registration improvement by segmentation-based depth-dependent contrast correction. A. Direct registration of the datasets led to strongly misaligned retinas and optic tecta (box). B. Registration of segmentation-based contrast corrected datasets improved alignments. Fixed dataset is in green, registered dataset is in magenta. Scale bar = 250 μm

4.5 Deep signals restoration after segmentation-based contrast correction

In this section, we provide another illustration of image improvements following the application of our algorithm. We applied the parameters of registration, which were previously generated from the alignment of the images acquired from the left and right sides to the initial images, and applied the segmentation-based contrast correction algorithm to both side acquisitions. Fig.5 shows that segmentation-based depth-dependent contrast correction strongly enhances the signal-to-noise ratio in elements like retina (arrowhead), tectum (arrow) or ventral part of the brain (Compare C to A and D to B). However, a blurring effect, which is due to the depth-dependent changes the point spread function (PSF), is not corrected by this method. We however estimate that this will not alter subsequent volumetric analysis of the white matter much, because this blurring effect does not affect significantly the global shape of the positive domain.

4.6 Segmentation-based contrast correction allows the improvement of manual segmentation

To measure the efficiency of our contrast correction method, one of our neuroanatomists segmented the white matter of the same specimens before and after contrast correction. Results of the difference between manual segmentations are visible in Fig. 6.

Clearly, the white matter of the ventralmost part of the brain was under-segmented when no contrast correction was applied. From the shape of the ventralmost part of the segmented white matter, we hypothesize that it belongs to the hypothalamus, the ventralmost part of the brain and therefore, that the whole brain was segmented following contrast correction.

Before contrast correction, a large part of the ventral part of the brain white matter was missed due to contrast loss over depth. This loss is visible in Fig. 6 A and B.

As with the segmentation of whole larvae (refer to section 4.1), two trained specialists manually segmented the white matter on raw data. The times spent to perform manual and automated segmentation of 6 samples are visible on Table 4. Automated segmentation of white matter on these files is at least 4 times faster than performing manual segmentations. To measure the miss-targeting effect on raw data, DSC, GB2 and MCC were computed, comparing these segmentations to manual ones performed after contrast correction. These measurements are shown on Table 5.

MCC and DSC results show a strong impact of the contrast correction. For example, MCC shows a median discrepancy of 17.76% for the first neuroanatomist. These errors are impacting volume and position

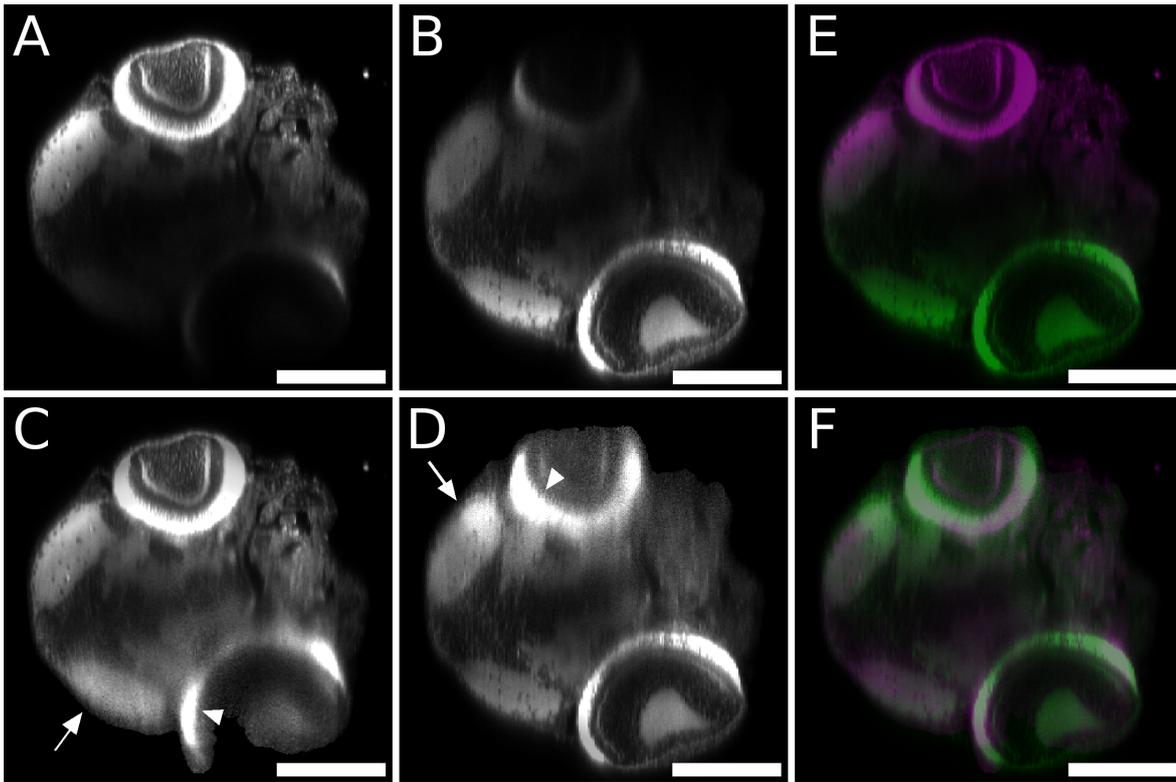


Figure 5: Segmentation-based contrast correction of co-registered data sets improves signals in deep regions. A, B: Original images after registration. A: image acquired from the left side of the larva. B: image acquired from the right side. Due to internal diffraction of the excitation and emission wavelength the recorded signal decays with depth in the specimen. C, D: Same data as above after segmentation-based contrast correction. C: Acquisition from the left side, D: Acquisition from the right side. E/F: Overlay of left (magenta) and right (green) acquisition before fusion. E: original data set after registration F: result of segmentation-based depth-dependent contrast performed on data from panel E. Scale bar = 250 μm .

Table 4: Time spent to segment white matter in seconds

	1 st sample	2 nd sample	3 rd sample	4 th sample	5 th sample	6 th sample	Mean value
specialist 1	1260	720	660	600	1080	1020	890
specialist 2	976	1420	1143	686	832	1131	1031
automated	208	187	190	218	208	194	201

of the detected white matter. We now compare automated segmentations of the white matter with manual segmentations performed after contrast correction.

4.7 Accurate white matter segmentation

We compared manual segmentations performed on contrast corrected data to corresponding automated white matter segmentations. Visualisation of automated white matter segmentations and their comparisons against manual results is shown on Fig. 7. Manually segmented regions present a large variety of shapes, such as linear elements in the tail (data not shown) or small dots in the dorsalmost part of the brain (arrows in Fig. 7 A and C) which were not well detected by our algorithm.

MCC, GB2 and DSC scores of these comparisons are shown in Table 6. Median MCC, GB2 and DSC scores are respectively, 86,18%, 85,66% and 86,11%. By comparing these results with those given in Table 5, we con-

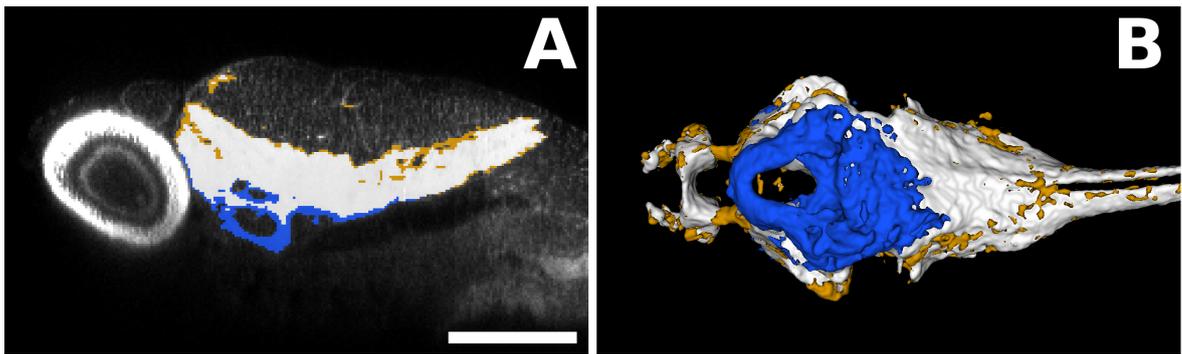


Figure 6: Segmentation-based contrast correction improves manual segmentation accuracy.

Orange represents the segmentation before contrast correction, blue is segmentation after contrast correction and white is the overlap between these two categories. A. Comparison between manual segmentations performed before and after segmentation-based contrast correction. Ventral part of the brain, deep in the specimen, was missed without contrast correction. B. Ventral view of the surface rendering of the comparison between manual segmentations performed before and after segmentation-based contrast correction. A large part of the ventralmost part of the brain was missed without contrast correction and was present after the application of the contrast correction procedure. scale bar = 250 μm .

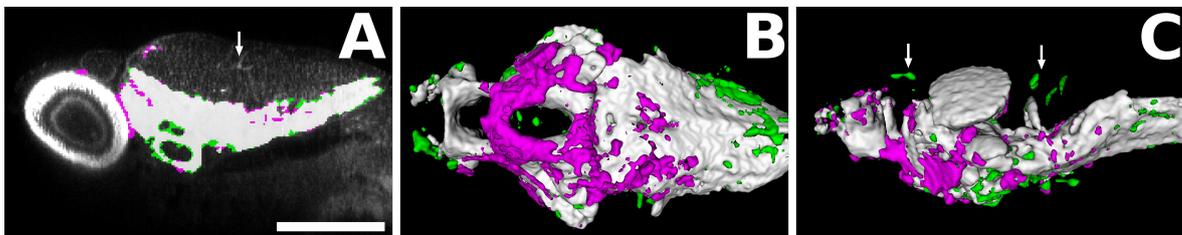


Figure 7: Comparison between manual segmentation performed on contrast corrected data and the automated segmentation including contrast correction.

Magenta represents automatically segmented voxels (including contrast correction). Green represents manually segmented voxels. White represents overlap between automated and manual segmentations. Ultimate volume opening removed the non-connected elements of the brain (arrows). A. Parasagittal optical sections. B. Ventral views of surface renderings. C. Lateral views of surface renderings. scale bar = 250 μm

clude that the automated segmentation of the white matter is more accurate than the manual segmentations performed without contrast correction.

5 Conclusion

In this paper, we describe a simple and accurate method to automatically segment and then measure the shape of an entire 5dpf zebrafish larva and its white matter. This algorithm opens the route to large scale white matter volume analyses in the framework of High-Content/High Throughput Screening. Measurement of these volumes could for example be used to perform toxicological screens for analysing the impact of a drug on the central nervous system or to study the effect of a mutation affecting overall brain morphology.

In addition to this labelling of the white matter, labelling of the grey matter using an anti-HuC antibody labelling could be additionally performed, enabling the analysis of whole brain volumetry.

Also, in the near future, new markers of brain sub-domains may provide refined analysis of potential abnormalities. Finally, our method will provide the ability to parcellate brain regions, in conjunction with both classical statistical, image registration-based atlas methods, as well as learning-based methods thus opening the route to more refined morphometric analyses. All these avenues for future work are currently under investigation.

Table 5: Measure of the MCC and DSC for the segmentations of the brain white matter comparing manual segmentations performed on raw data by two neuroanatomists to manual segmentations performed on contrast corrected data by one of these neuroanatomists.

Sample ID	Specialist 1			Specialist 2		
	DSC	GB2	MCC	DSC	GB2	MCC
1	0.8527	0.8470	0.8492	0.8493	0.8465	0.8474
2	0.8500	0.8479	0.8477	0.8042	0.8039	0.8066
3	0.7956	0.7933	0.7963	0.8108	0.8071	0.8099
4	0.6490	0.6486	0.6755	0.6985	0.6967	0.7144
5	0.8146	0.8140	0.8184	0.8013	0.8011	0.8063
6	0.8236	0.8207	0.8213	0.8027	0.7996	0.8040
7	0.8239	0.8197	0.8212	0.7873	0.7866	0.7914
8	0.7962	0.7955	0.8004	0.8441	0.8403	0.8413
9	0.8218	0.8146	0.8189	0.8176	0.8140	0.8161
10	0.8304	0.8280	0.8294	0.8516	0.8496	0.8496
11	0.8231	0.8222	0.8247	0.8405	0.8368	0.8381
12	0.8141	0.8130	0.8157	0.8202	0.8186	0.8192
Median values	0.8224	0.8172	0.8200	0.8142	0.8105	0.8130

Table 6: Measure of MCC, GB2 and SDC coefficient of segmentation of brain white matter compared to manual segmentations performed on contrast corrected data.

Sample ID	DSC	GB2	MCC
1	0.8865	0.8774	0.8828
2	0.9029	0.8954	0.9006
3	0.8754	0.8660	0.8725
4	0.7509	0.7505	0.7626
5	0.8908	0.8823	0.8872
6	0.8852	0.8769	0.8817
7	0.8277	0.8271	0.8306
8	0.8225	0.8222	0.8278
9	0.8394	0.8391	0.8434
10	0.8476	0.8472	0.8497
11	0.8774	0.8765	0.8764
12	0.8481	0.8471	0.8488
Median values	0.8618	0.8566	0.8611

Acknowledgement: The authors acknowledge the following funding sources: TEFOR ANR project (grant ANR-II-INBS-0014), Fish-RNAVax ANR project (grant ANR-16-CE20-0002) and a PhD award from Université Paris-Est to SL. We thank Julien Hémon for fish maintenance. Furthermore, we also thank Yann Bihan-Poudec, Elodie De Job, Laurie Rivière, Barbara Rizzi and Isabelle Robineau for performing preliminary experiments. Finally, we also thank Johanna Djian-Zaouche and Lionel Moreira for useful discussions and advices.

References

- [1] Pierre Affaticati, Matthieu Simion, Elodie De Job, Laurie Rivière, Jean-Michel Hermel, Elodie Machado, Jean-Stéphane Joly, and Arnim Jenett. zPACT: Tissue Clearing and Immunohistochemistry on Juvenile Zebrafish Brain. *Bio-Protocol*, 7(23), 2017.
- [2] Amin Allalou, Yuelong Wu, Mostafa Ghannad-Rezaie, Peter M. Eimon, and Mehmet Fatih Yanik. Automated deep-phenotyping of the vertebrate brain. *eLife*, 6:1–26, 2017.
- [3] François Brion, Yann Le Page, Benjamin Piccini, Olivier Cardoso, Sok Keng Tong, Bon chu Chung, and Olivier Kah. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 7(5):e36069, may 2012.
- [4] Jonathan Cachat, Adam Stewart, Eli Utterback, Peter Hart, Siddharth Gaikwad, Keith Wong, Evan Kyzar, Nadine Wu, and Allan V. Kalueff. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS ONE*, 6(3), 2011.
- [5] Fabio A.M. Cappabianco, Pedro F.O. Ribeiro, Paulo A.V. De Miranda, and Jayaram K. Udupa. A General and Balanced Region-Based Metric for Evaluating Medical Image Segmentation Algorithms. *Proceedings - International Conference on Image Processing, ICIP*, 2019-Sept:1525–1529, 2019.
- [6] M. R. Cronan, A. F. Rosenberg, S. H. Oehlers, J. W. Saelens, D. M. Sisk, K. L. Jurcic Smith, S. Lee, and D. M. Tobin. CLARITY and PACT-based imaging of adult zebrafish and mouse for whole-animal analysis of infections. *Disease Models & Mechanisms*, 8(12):1643–1650, 2015.
- [7] W Driever, L Solnica-Krezel, A F Schier, S C Neuhauss, J Malicki, D L Stemple, D Y Stainier, F Zwartkruis, S Abdelilah, Z Rangini, J Belak, and C Boggs. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 123(1):37–46, 1996.
- [8] Jason J Early, Katy LH Cole, Jill M Williamson, Matthew Swire, Hari Kamadurai, Marc Muskavitch, and David A Lyons. An automated high-resolution in vivo screen in zebrafish to identify chemical regulators of myelination. *eLife*, 7:1–31, 2018.
- [9] Andrey Fedorov, Reinhard Beichel, Jayashree Kalphaty-Cramer, Julien Finet, J-C Fillion-Robbin, Sonia Pujol, Christian Bauer, Dominique Jennings, Fiona Fennesy, Milan Sonka, John Buatti, Stephen Aylward, James V. Miller, Steve Pieper, and Ron Kikinis. 3D slicers as an image computing platform for thw quantitative imaging network. *Magnetic resonance imaging*, 30(9):1323–1341, 2012.
- [10] Jochen Gehrig, Markus Reischl, Eva Kalmár, Marco Ferg, Yavor Hadzhiev, Andreas Zaucker, Chengyi Song, Simone Schindler, Urban Liebel, and Ferenc Müller. Automated high-throughput mapping of promoter-enhancer interactions in zebrafish embryos. *Nature methods*, 6(12):911–916, 2009.
- [11] Stefan Klein, Marius Staring, Keelin Murphy, Max A. Viergever, and Josien P W Pluim. Elastix: A toolbox for intensity-based medical image registration. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(1):196–205, 2010.
- [12] Jürgen Mayer, Alexandre Robert-moreno, James Sharpe, and Jim Swoger. Attenuation artifacts in light sheet fluorescence microscopy corrected by OPTiSPIM. *Light: Science & Applications*, 2018.
- [13] Merlin Mikulewitsch, Matthias Marcus Auerswald, Axel Von Freyberg, and Andreas Fischer. Geometry Measurement of Submerged Metallic Micro-Parts Using Confocal Fluorescence Microscopy. *Nanomanufacturing and Metrology*, 1(3):171–179, 2018.
- [14] Raghuvuor Parthasarathy, Ryan P. Baker, Edouard A. Hay, Michael J. Taormina, Savannah L. Logan, and Christopher Dudley. Automated high-throughput light-sheet fluorescence microscopy of larval zebrafish. *Plos One*, 13(11):e0198705, 2018.
- [15] Olaf Ronneberger, Kun Liu, Meta Rath, Dominik Rue, Thomas Mueller, Henrik Skibbe, Benjamin Drayer, Thorsten Schmidt, Alida Filippi, Roland Nitschke, Thomas Brox, Hans Burkhardt, and Wolfgang Driever. ViBE-Z: A framework for 3D virtual colocalization analysis in zebrafish larval brains. *Nature Methods*, 9(7):735–742, jun 2012.
- [16] Suraiya Saleem and Rajaretinam Rajesh Kannan. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer’s disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discovery*, 5(1):45, 2018.
- [17] Mark Schutera, Thomas Dickmeis, Marina Mione, Ravindra Peravali, Daniel Marcato, Markus Reischl, Ralf Mikut, and Christian Pylatiuk. Automated Phenotype Pattern Recognition of Zebrafish for High - throughput Screening. *Bioengineered*, 5979(September), 2016.
- [18] Pier-Luc Tardif, Marie-jeanne Bertrand, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, Joël Lefebvre, Barbara Stähli, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Pascale Geoffroy, Mélanie Mecteau, David Busseuil, Feng Ni, Abednasser Abulrob, Éric Rhéaume, Philippe L’Allier, Jean-claude Tardif, and Frédéric Lesage. Validating Intravascular Imaging with Serial Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12):2110, dec 2016.
- [19] Elisabet Teixidó, Tobias R Kießling, Eckart Krupp, Celia Quevedo, Arantza Muriana, and Stefan Scholz. Automated morphological feature assessment for zebrafish embryo developmental toxicity screens. *Toxicological Sciences*, pages 1–12, 2018.
- [20] Jennifer Brooke Treweek and Viviana Gradinaru. Extracting structural and functional features of widely distributed biological circuits with single cell resolution via tissue clearing and delivery vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 40:193–207, 2016.
- [21] Y Uanhao G Uo, W Outer J V Eneman, H Erman P S Paink, and F O N S J V Erbeek. Three-dimensional reconstruction and measurements of zebrafish larvae from high-throughput axial-view in vivo imaging. *Biomedical Optics Express*, 8(5):23–32,

2017.

- [22] Jonas N Wittbrodt, Urban Liebel, and Jochen Gehrig. Generation of orientation tools for automated zebrafish screening assays using desktop 3D printing. *BMC biotechnology*, 14(1):36, 2014.
- [23] Tingting Yu, Yisong Qi, Hui Gong, Qingming Luo, and Dan Zhu. Optical clearing for multiscale biological tissues. *Journal of Biophotonics*, 11(2), 2018.

ARTICLE 3 : ZEBRAINSPECTOR, UNE
PLATEFORME DE CRIBLE À HAUT-CONTENU ET
HAUT-DÉBIT D'ORGANISMES ENTIERS
PERMETTANT L'ANALYSE VOLUMÉTRIQUE DE LA
MATIÈRE BLANCHE CÉRÉBRALE DU POISSON
ZÈBRE

7.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 3

Au cours de ma thèse, j'ai établi une plateforme pour effectuer une imagerie haut-contenu(HCI) et une analyse haut-contenu(HCA) d'images 3D de lignées transgéniques fluorescentes dans le contexte du neurodéveloppement du poisson zèbre, dont le principe est décrit dans cette publication. Sur la base de l'observation que les traceurs lipophiles produisent un marquage intense dans le cerveau, une procédure simple et standardisée pour colorer, monter, imager et analyser les eleuthéroembryons (EE) de poissons zèbres entiers a été mise au point pour permettre à la fois de redresser les échantillons et d'observer et estimer leur taille et le volume de la matière blanche de leur cerveau. Toutes les étapes minimisent le temps et les efforts de l'expérience et favorisent sa portabilité. En considérant un lot de 48 échantillons, il ne faut qu'environ huit jours pour effectuer l'expérience, de la fixation initiale à la quantification du cerveau et des volumes d'alevins entiers (Figure 1 du manuscrit).

Concernant le poisson zèbre, deux types de protocoles ont été développés. Le premier est très rapide et s'effectue sur des poissons possédant des mutations de pigmentation (comme casper ou nacre) ce qui évite de procéder à une étape de dépigmentation qui efface les fluorescences natives des protéines vertes ou rouges. Ainsi le protocole se résume à une courte fixation, et au protocole de marquage par le marqueur lipophile, avec une légère perméabilisation par la saponine, un détergent doux et l'imagerie dans un tampon dont l'indice de réfraction est proche de l'échantillon. Dans le second protocole, une première étape consiste en la destruction des pigments se trouvant sur la peau et dans la rétine, ainsi que la destruction de l'hémoglobine. Une seconde étape pour mieux clarifier l'échantillon implique une délipidification pouvant détruire les membranes cellulaires. Il est souvent nécessaire d'apporter des étapes de fixation longues des tissus pour limiter l'impact de la disparition des membranes. Enfin, la dernière étape consiste en une expérience d'immunohistochimie pour reconnaître avec des anticorps primaires la GFP ou la RFP.

Pour accélérer le protocole, Matthieu Simion et Elodie Machado ont développé une méthode de clarification optique simple, rapide et moins dangereuse que nous avons appelée zFaCT. Cette méthode est composée de quatre étapes. La première étape est la dépigmentation des échantillons par l'emploi de peroxyde d'hydrogène. Cette étape permet de réduire l'absorption de la lumière par les tissus. La seconde étape est le blocage. Cette étape permet de saturer l'échantillon avec des fragments d'anticorps non spécifiques. De cette manière, le marquage de l'anticorps utilisé sera plus spécifique car l'anticorps se fixera uniquement sur l'antigène ciblé. De plus, cette étape contient des détergents permettant de perméabiliser l'échantillon afin de favoriser la pénétration des anticorps au sein des tissus. Les détergents vont aussi produire une délipidification partielle de l'échantillon ce qui permet de réduire la diffusion de la lumière dans les tissus tout en conservant l'intégrité des tissus. La troisième étape est le marquage des tissus. Nous employons le DiI comme marqueur de référence. Mais il est possible d'effectuer des marquages immuno-histochimiques en complément, afin d'étudier d'autres tissus ou d'autres zones d'intérêt. Enfin, la dernière étape consiste en un appariement de l'indice de réfraction. L'indice de réfraction de l'EE est apparié par l'emploi d'un milieu d'imagerie dédié. L'ensemble de ces étapes est réalisé en cinq jours pour un marquage au DiI, et peut prendre jusqu'à 15 jours pour un triple marquage consistant en un marquage DiI auquel s'additionnent deux marquages par anticorps. Cette méthode permet d'obtenir rapidement un grand nombre d'échantillons. Elle permet ainsi le développement de l'analyse haut-débit par imagerie d'échantillons complets.

Afin de pouvoir traiter une grande quantité d'échantillons, il a été nécessaire d'automatiser au maximum l'acquisition par imagerie confocale. Le choix de l'imagerie confocale a été fait car ce type d'imagerie permet d'effectuer une acquisition tridimensionnelle des échantillons à une échelle cellulaire avec des outils distribués commercialement et très fiables et simples à utiliser. En effet, nous avons choisi de développer notre plateforme d'imagerie en utilisant un microscope confocal commercial plutôt que de développer une plateforme dédiée afin de garder la plus grande versatilité possible.

Dans le cadre d'une procédure d'HTI, il a été nécessaire de mettre au point une stratégie de montage des échantillons permettant d'automatiser leur acquisition. Dans ce but, nous avons développé des tampons imprimables par impression 3D. Cette technologie a plusieurs avantages. Le premier est le faible coût des matières premières, permettant de limiter le coût de production des prototypes. Le deuxième avantage est la rapidité de production des prototypes, permettant ainsi de créer rapidement de nouvelles formes par exemple pour d'autres stades ou d'autres espèces. Le troisième avantage est la flexibilité que permet cette technologie. On peut facilement mod-

ifier le tampon, sans risquer de perdre l'ensemble du travail effectué, comme lors des procédures par usinage manuel. La quatrième qualité de l'impression 3D est la précision. Une imprimante Ultimaker 2⁺ de moyenne gamme est en mesure de réaliser des impressions avec des précisions horizontales et verticales de respectivement 40 et 60 μm . En couplant cette machine à une buse d'impression d'un diamètre de 0,25 mm, il devient possible de réaliser des pièces ayant des parties de quelques centaines de μm . Le dernier avantage est la reproductibilité des impressions qui permet de produire des séries de moules identiques.

Les tampons que nous avons développés ont pour objectif de permettre de faciliter le montage en position dorsale et d'assurer un espacement précis et connu entre les échantillons. Pour cela, le tampon est utilisé pour imprimer des encoches dans de l'agarose solubilisé dans un milieu de culture pour embryons de poisson zèbre. La précision permise par l'impression 3D assure ainsi un espacement exact entre les échantillons. Il suffit ensuite de placer un échantillon par encoche au moyen d'un pinceau, puis de fixer cet échantillon avec du phytigel, un gel aux qualités optiques exceptionnelles, supérieures à l'agarose. Des éléments supplémentaires concernant les méthodes de montages sont disponibles en [Chapitres 3](#).

Une fois les échantillons montés avec un espacement connu, nous avons mis au point une procédure d'imagerie standardisée. Le but de cette standardisation est de diminuer le temps nécessaire à l'acquisition en diminuant les risques d'acquisitions incompatibles avec le traitement informatique. Pour standardiser l'imagerie, deux procédures ont été mises en place. Premièrement, un guide d'imagerie a été dessiné afin d'uniformiser les acquisitions. Ensuite, une macro d'imagerie a été développée, permettant de réduire le temps de paramétrage nécessaire.

Une fois les données imagées, la mise en place de notre plateforme d'HTA nécessite le développement d'algorithmes informatiques permettant de traiter la grande quantité de données générées. Dans le cadre de nos travaux, nous avons créé deux traitements distincts.

La plus grande originalité et le gain le plus important et versatile du pipeline ZeBraInspector sont la mise au point d'une méthode de recalage permettant à des spécialistes de comparer un grand nombre d'échantillons et de capturer des images à des niveaux et avec des orientations identiques grâce à un logiciel dédié qui permet de naviguer dans tous les échantillons simultanément. Ainsi, lors du montage, il y a moins de contraintes, et il n'est pas utile d'orienter parfaitement les échantillons. Il suffit qu'ils soient dans une orientation permettant une acquisition en vue dorsale. Une description complète de l'algorithme permettant de réaliser ce recalage rigide est disponible en [Section 4.1](#).

Le second traitement est la mise au point d'une méthode permettant de segmenter automatiquement l'ensemble de l'échantillon ainsi que sa matière blanche. C'est une méthode importante comme nous le démontrons avec deux applications en neurobiologie et en toxicologie. Les algorithmes permettant de segmenter la larve entière et la matière blanche sont présentés respectivement en [Section 4.2](#) et [Section 4.4](#). La segmentation automatique permet de mesurer le volume de la matière blanche cérébrale ainsi que de l'ensemble de l'échantillon, permettant de comparer les variations de ces volumes.

Afin de mettre à disposition ces algorithmes, j'ai développé une interface graphique avec la collaboration de Lilian Buzer pour la programmation en python. En plus de permettre de lancer les algorithmes de recalage et de segmentation, cette interface permet de visualiser simultanément jusqu'à 18 acquisitions ayant un triple marquage, ainsi que les résultats des traitements. Une grande quantité d'options de visualisation ont été implémentées, comme la possibilité de changer l'orientation des échantillons, de les sous-échantillonner pour réduire l'utilisation de mémoire vive, ou encore de réaliser des projections d'intensité maximale de coupes épaisses dont on peut déterminer l'épaisseur et l'orientation.

J'ai d'abord utilisé ZBI pour l'analyse de l'effet d'une mutation du gène *Wdr12*, connue pour générer des microcéphalies et ensuite, pour l'analyse de l'exposition à un traitement anti-cancer, le 5-Fluorouracyl (5-FU). L'analyse des mutants *Wdr12* nous a permis d'observer la présence d'un nanisme général des individus homozygotes, mais pas de microcéphalie relative. En effet, bien que la taille absolue du cerveau soit inférieure chez le mutant homozygote, le ratio du volume de la matière blanche sur le volume de l'ensemble de l'échantillon ne montre pas de différence significative entre les mutants homozygotes et leur fratrie. En revanche, l'exposition d'embryons de poisson zèbre au 5-FU (doses similaires au traitement médical) mène à un nanisme des larves, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature. De plus ZBI a révélé que les larves présentent une sévère microcéphalie, les larves traitées présentant un ratio du volume de la matière blanche sur le volume de l'ensemble de l'échantillon significativement inférieur aux contrôles. Ainsi ZBI nous a permis de pointer des effets discrets de la molécule, ce qui est crucial pour indiquer un potentiel effet tératogène de la molécule chez l'homme.

Pour résumer, les résultats de l'article soumis déposé sur BioRxiv sont les suivants:

- une nouvelle méthode de transparisation a été développée.
- Cette méthode permet d'obtenir rapidement et sans danger des échantillons clarifiés.
- Ces échantillons clarifiés sont montés dans des encoches imprimées dans l'agarose.

- Ces encoches ont pu être créées en employant un tampon imprimé en 3D.
- L'impression 3D a été choisie afin d'assurer la précision, la versatilité, la reproductibilité et l'adaptabilité des tampons.
- Ces tampons permettent d'effectuer un montage rapide au pinceau des échantillons et de fixer précisément et régulièrement les distances entre les échantillons.
- Le montage dans ces encoches permet la mise en place de macros d'imagerie confocale afin de faciliter le lancement de l'acquisition en batch et d'accélérer le processus d'acquisition.
- Afin de faciliter la comparaison des échantillons dont l'orientation et le positionnement ne sont jamais parfaits, nous avons développé un algorithme de recalage des images obtenues.
- Ce recalage est effectué en alignant le système de coordonnées de l'image avec des vecteurs: l'axe entre le centre des deux cristallins, le plus grand demi-axe de l'ellipsoïde englobant la matière blanche, et le produit vectoriel entre les deux axes précédents.
- D'autre part, deux algorithmes de segmentation ont été mis en place afin de permettre la mesure du volume de l'échantillon ainsi que le volume de sa matière blanche.
- En utilisant cet algorithme de segmentation, nous avons été en mesure de mesurer l'ampleur de la diminution de taille induite par la mutation du gène *wdr12*.
- L'utilisation de l'algorithme de segmentation sur des échantillons exposés au 5-FU a permis de mettre en évidence le nanisme induit par cet antimétabolite.
- De plus, il est apparu que le 5-Fu induisait une diminution relative du volume de la matière blanche.

Un fichier exécutable pour ZBI est disponible pour [Windows](#) à condition d'avoir installé le [package redistribuable visual C++ 2017](#). L'ensemble des codes est disponible sur [gitlab](#).

Afin de raffiner les mesures obtenues, l'emploi d'un second marqueur permettant la détection de la matière grise a été mis au point, ce qui permet d'observer des défauts de neurogénèse. Cette amélioration est présentée en [Chapitres 9](#). De plus, la mise en place de différentes automatisations pourrait permettre d'accélérer l'ensemble du processus, comme nous le discuterons en [Section 10.4](#). Il serait aussi possible d'adapter cette plateforme à d'autres espèces, comme nous le discuterons en [Section 10.3](#).

7.2 ARTICLE 3 DÉPOSÉ SUR BIORXIV

1 **ZeBrainInspector, a platform for the automated segmentation and analysis of body and brain**
2
3 **volumes in whole 5 dpf zebrafish following simultaneous visualization with identical orientations**
4
5

6 Sylvain Lempereur^{a,b,*}, Matthieu Simion^b, Elodie Machado^b, Fabrice Licata^b, Lilian Buzer^a, Isabelle
7 Robineau^b, Julien Hémon^b, Payel Banerjee^b, Noémie De Crozé^c, Marc Léonard^c, Pierre Affaticati^b,
8 Arnim Jenett^b, Hugues Talbot^{a,d}, Jean-Stéphane Joly^{b,*}
9
10
11
12
13

14 **AFFILIATION**
15

- 16
17
18 a. LIGM, Univ Gustave Eiffel, CNRS, ESIEE Paris, F-77454 Marne-la-Vallée, France
19
20 b. Tefor Paris-Saclay, UMS 2010, CNRS, INRAE, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette, France
21
22 c. L'Oréal, Research & Innovation, Aulnay sous Bois, France
23
24 d. Université Paris-Saclay, Centrale Supélec, INRIA, 91190, Gif-sur-Yvette, France
25
26
27

28
29 * Corresponding authors:

30
31 E-mail addresses: sylv.lempeur@gmail.com (S. Lempereur); jean-stephane.joly@cnrs.fr (J.-S. Joly)
32
33

34 websites:

- 35
36
37
38 • [TEFOR Paris-Saclay – Research and Development for the Tefor Infrastructure](#)
39
40 • [ZeBrainInspector – Tefor](#)
41
42 • [ZeBrainInspector – Gitlab repository](#)
43
44
45

46 Keywords: fish, tissue clearing, confocal imaging, morphometry, computer vision, teratology
47
48

49 **Acknowledgements**
50

51
52 We wish to thank Marie-Elise Schwartz and Julien Hémon for skillful fish rearing. We thank Jean-
53 Pierre Levraud for sharing pictures of two transgenic lines, and Koji Ando for the *kdlr-DsRED* line. We
54 thank Elodie De Job and Laurie Rivière for their expert technical contributions to the development of
55 our tissue-clearing procedures, Anna Renoux for the genotyping of *wdr12* fish, Maxence Frétaud,
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Christelle Langevin and Violette Thermes for their contributions to protocol development through helpful discussions in the framework of the TEFOR phenotyping group. We also thank Lionel Moreira and Vincent Jourdain for their contribution to the TEFOR portfolio webpage, and Giovanni Cherchia and Barbara Rizzi for advice concerning algorithm developments. Kleio Petratou, Ali Kiai provided helpful comments on the ZBI software. We thank Johanna Djian-Zaouche for discussions and support. This work was supported by ANR-TEFOR-“Investissement d’avenir” (ANR-II-INBS-0014), ANR Fish-RNAvox (ANR-16-CE20-0002-01), ANR FEATS (ANR-19 -CE34-0005-05) and institutional grants from the CNRS and INRAE. We warmly thank the Leducq foundation for the RETP grant and constant support, which was central to the development of the ZBI platform. SL received a PhD grant from Université Paris-Est.

SUMMARY

In recent years, the zebrafish has become a well-established laboratory model. We describe here the ZeBrainInspector (ZBI) platform for high-content 3D imaging (HCI) of 5 dpf zebrafish eleuthero-embryos (EEs). This platform includes a mounting method based on 3D-printed stamps to create a grid of wells in an agarose cast, facilitating batch acquisitions with a fast-confocal laser scanning microscope. We describe reference labeling in cleared fish with a fluorescent lipophilic dye.

Based on this labeling, the ZBI software registers EE 3D images, making it possible to visualize numerous identically oriented EEs on a single screen, and to compare their morphologies and any fluorescent patterns at a glance. High-resolution 2D snapshots can be extracted. ZBI software is therefore useful for diverse high-content analyses (HCAs).

Following automated segmentation of the lipophilic dye signal, the ZBI software performs volumetric analyses on whole EEs and their nervous system white matter. Through two examples, we illustrate the power of these analyses for obtaining statistically significant results from a small number of samples: the characterization of a phenotype associated with a neurodevelopmental mutation, and of the defects caused by treatments with a toxic anti-cancer compound.

Introduction

High-content imaging (HCI) and high-content analysis (HCA) at medium or large scales traditionally involve cell culture experiments, including the use of advanced 3D cell cultures or organoids. However, animal models remain indispensable, and small-animal models, such as invertebrates or aquatic models, are clearly more appropriate for medium or large scale analysis than larger mammalian species.

The need for HCI and HCA has greatly diversified. Various pipelines involve simple 2D imaging methods (Beaumont et al., 2015; Staal et al., 2018), 2D+time (Cornet et al., 2017), high-throughput-techniques in 2D (Jarque et al., 2018) and pseudo-3D (optical projection tomography (OPT) (Xiaoqin Tang et al., 2016). Automated systems have been developed, including some that deliver zebrafish eleuthero-embryos (EEs) in capillaries (vertebrate automated screening technology (VAST) (Early et al., 2018; Guo et al., 2017; Pulak, 2016)

For HCI, light-sheet microscopes are fast, but can analyze only a limited number of mounted samples per batch. Confocal microscopes can be used for medium-throughput imaging, but are of limited use for the imaging of deeper structures (Bruneel and Witten, 2015), due to refraction at the interface of adjacent tissue components with different refractive indices. However, tissue-clearing methods have recently progressed sufficiently for deeper imaging in a number of species, including zebrafish (Affaticati et al., 2017; Susaki et al., 2014). One of the key steps for rendering tissues optically clear is matching the refractive index (RI) of the samples to that of the mounting medium.

Zebrafish, a vertebrate model, is very similar to humans in terms of its biological and physiological properties and its body plan (Planchart et al., 2016; Roper and Tanguay, 2018), and studies in this species are subjected to fewer ethical concerns. Indeed, EEs, which do not feed, are not covered by the European directive on animal experimentation (Halder et al., 2010). This model has several

1 advantages for HCl, including low breeding costs, high fecundity and transparency. EEs are small, and
2 can therefore be studied in high-throughput settings. A very large collection of zebrafish mutants is
3 now available. More than 500 are annotated in the Zfin database as having brain development
4 defects (Davis et al., 2014). In most cases, phenotyping is performed with a dissecting microscope or
5 the annotations are extracted from published studies.
6

7
8
9
10 We developed the ZeBrainInspector (ZBI) platform, which uses rapid labeling and tissue-clearing
11 protocols, dedicated 3D-printed mounting stamps and a fast-automated confocal laser scanning
12 microscope. The use of 3D imaging overcomes the problems encountered with 2D images, which
13 may provide misleading information about the shape of an organ or tissue if the orientation of the
14 sample is imperfect. Registered 3D images also speed up the mounting step, by making it possible to
15 align 3D images with imperfect orientations.
16

17
18
19
20 This platform includes the ZBI software (<https://tefor.net/portfolio/zebrainspector>), which has three
21 features. Firstly, numerous aligned samples, registered by different methods, can be visualized
22 simultaneously on a screen, with a reference dye channel, and two fluorescence patterns in two
23 other channels. This property is useful for many different applications, and high-resolution snapshots
24 can be obtained in any orientation. Secondly, this software performs automatic segmentation on
25 whole EEs and the white matter of their brains, based on staining with lipophilic dyes (such as Dil or
26 DiO). The interface, showing numerous aligned samples, can be used to validate segmentations and
27 to select samples for volumetric analysis. Finally, the software computes the volumetric analysis of
28 the segmented domains.
29

30
31
32
33 We highlight the usefulness of the ZBI platform here, by focusing on a mutant with potential
34 microcephaly and a long-prescribed chemotherapeutic drug found as a contaminant in the
35 environment, with effects on aquatic animals and potential teratogenic effects in humans.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Materials and Methods

Zebrafish housing and husbandry

Fish were reared at a density of five adults per liter, under controlled conditions, according to European recommendations for zebrafish housing and care (Aleström et al., 2019). The environmental parameters were as follows : photoperiod = 14 h/10 h light/dark, temperature = 26.5 ± 1 °C, pH = 7.8 ± 0.1; conductivity = 240 ± 30 µS/cm, NH₄⁺ = 0 mg/L, NO₂⁻ = 0 mg/L, NO₃⁻ < 50 mg/L. Fish were fed on rotifers (*Brachionus plicatilis*, > 500/fish/day) for the first two weeks of feeding, and then with brine shrimps (*Artemia nauplii*, ~250/fish/day) and dry food (Skretting, Gemma Micro, to apparent satiation, two times/day). The lines used in these studies were AB (from the European Zebrafish Resource Center, Germany), casper (from the Zon laboratory, Harvard University, USA), *Tg(kdrl:DsRed)* (obtained from the Betsholtz laboratory), *Tg(fli:GFP)* and the *wdr12^{hi3.120Tg}* mutant line (from the Zebrafish International Resource Centre, Eugene, Oregon). All procedures were performed in accordance with European Union Directive 2011/63/EU, with the approval of the local ethics committee (no. 59 CEEA).

Four rapid staining protocols for lipophilic carbocyanine dyes (DiI, DiO, DiD, DiR), fluorescent proteins, and optional staining with various antibodies

Single-dye staining (Fig. 2A)

Five days post-fertilization (dpf), EEs were killed and immersed overnight in fixative solution (4% formaldehyde in 1 x phosphate-buffered saline (PBS), 0.1% Tween 20 (PBST) at 4 °C. They were processed immediately or stored for up to several weeks at 4 °C in 0.5% formaldehyde and 0.05% sodium azide in PBST. The EEs were thoroughly washed in PBST for two days and incubated in 0.5 x saline sodium citrate buffer (SSC) with 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature (RT). Melanocytes were bleached by incubating the EEs in fresh depigmentation solution (0.5 x SSC, 5% formamide, 3%

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

H₂O₂) for 1 h at RT, and the samples were then washed overnight in PBST. The samples were blocked by incubation for at least 5 h in blocking solution (10% normal goat serum, 10% DMSO, 5% PBS-glycine, 0.5% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% NP40 and 0.1% saponin in PBST) at room temperature. They were then briefly rinsed in PBST and labeled by incubation for three days with 1 µg/mL lipophilic dye (DiI, DiO, DiA, DiD or DiR, L7781, Thermo Fisher Scientific) in labeling solution (1 x PBST supplemented with 2% normal goat serum, 20% DMSO, 0.05% sodium azide, 0.2% Triton X-100, 10 µg/mL heparin and 0.1% saponin) at RT with gentle shaking. Samples were then subjected to refractive index (RI) matching and mounting.

Dye staining with the preservation of native fluorescent proteins (Fig. 2B-C)

Five days post-fertilization (dpf), EEs were killed and immersed overnight at 4 °C or for 2 hours at room temperature in fixative solution (4% formaldehyde in 1 x PBS, 0.1% Tween 20 (PBST)). They were processed immediately or stored for up to several weeks at 4 °C in PBST supplemented with 0.5% formaldehyde and 0.05% sodium azide. They were thoroughly washed in PBST for two days and immersed in blocking solution (10% normal goat serum, 10% DMSO, 5% PBS-glycine, 0.5% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% NP40 and 0.1% saponin in PBST) for at least five hours at room temperature. Samples were briefly rinsed in PBST and labeled by incubation for three days with 1 µg/mL lipophilic dye (DiI, DiO, DiA, DiD or DiR, L7781, Thermo Fisher Scientific) in labeling solution (1 x PBST supplemented with 2% normal goat serum, 20% DMSO, 0.05% sodium azide, 0.2% Triton X-100, 10 µg/mL heparin and 0.1% saponin) at RT, with gentle shaking. Samples were then subjected to refractive index (RI) matching and mounting.

Dye staining coupled with immunodetection (Fig.2D-H)

We proceeded as follows, to combine whole-mount lipophilic dye staining with immunodetection. Five days post-fertilization (dpf), EEs were killed and immersed overnight in fixative solution (4% formaldehyde in PBST) at 4 °C. They were processed immediately or stored for up to several weeks

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

at 4 °C in PBST supplemented with 0.5% formaldehyde and 0.05% sodium azide. They were thoroughly washed in PBST for two days and incubated in 0.5 x saline sodium citrate buffer (SSC) supplemented with 0.1% Tween 20 for 1 h at RT. Melanocytes were then bleached by incubation in fresh depigmentation solution (0.5 x SSC, 5% formamide, 3% H₂O₂) for 1 h at RT, and the samples were then washed overnight in PBST. The samples were blocked by incubation in blocking solution (10% normal goat serum, 10% DMSO, 5% PBS-glycine, 0.5% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% NP40 and 0.1% saponin in PBST) for at least five hours at room temperature, and were then briefly rinsed in PBST and incubated with primary antibodies in staining solution (1 x PBST buffer supplemented with 2% NGS, 20% DMSO, 0.05% sodium azide, 0.2% Triton X-100, 10 µg/mL heparin and 0.1% saponin) for three days at 37 °C with gentle shaking. Samples were washed for at least 1 h in PBST at RT and incubated with secondary antibodies in staining solution without saponin for three days at 37 °C in the dark, with gentle shaking. Samples were washed for at least 2 h in PBST and stained by incubation with 1 µg/ml of lipophilic dye (DiI, DiO, DiA, DiD or DiR, L7781, Thermo Fisher Scientific) in staining solution without saponin for three days at RT with gentle shaking. The samples were then subjected to refractive index (RI) matching and mounting.

5-FU and *wdr12* samples were immunolabeled with anti-HuC/D antibodies (not shown) (ab210554, abcam, used at a dilution of 1:600). Anti-GFP (GFP-1020, Avès Laboratories) and anti-DsRed (632496, Ozyme) antibodies were used at dilutions of 1:400-1:600. The secondary antibodies used were Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-rabbit (A-21428, Thermo Fisher Scientific, used at a dilution of 1:600), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-chicken (A-11039, Thermo Fisher Scientific, used at a dilution of 1:600).

Mounting and refractive index (RI) matching

We used a RI matching medium (50% sucrose (w/v), 20% nicotinamide (w/v), 10% triethanolamine (w/v) and 0.1% Triton X-100 (v/v)), referred to hereafter as MD+, a modified form of the CUBIC-2 (Susaki et al., 2015) solution. We replaced the urea of CUBIC-2 with nicotinamide, which has a strong

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

optical clearing ability (Tainaka et al., 2018). The RI of MD+ was adjusted, with water, to 1.457. Dye-stained samples were first incubated in 0.5 x MD+ (50% (vol/vol) in dH₂O) for at least two hours, and were then transferred to MD+ solution. Mounting plates were coated with hot agarose/MD+ (1.5% and 2% agarose solubilized in MD+ for standard 60 mm Petri dishes and single-well plates, respectively) and appropriate stamps were rapidly positioned. The stamps were removed after the agarose hardened. Using a paintbrush, we carefully positioned the fish in the resulting niches, encasing them in small drops of phytigel/MD+ (1% phytigel solubilized in MD+) to stabilize them during subsequent steps. The mounting plates were filled with MD+ and the RI was checked several hours later. Plates with a RI matching 1.457 were imaged. If the RI did not match, the MD+ solution was renewed as often as required to reach this value.

3D-printed mounting molds

We used the open source CAD software Openscad (Kintel and Wolf, 2020), the files of which are hosted on gitlab:

stamp for 12 samples: https://gitlab.com/sylv.lempereur/tcfmodels/-/blob/master/petri_whole_5dpf_dr.scad

stamp for 48 samples: https://gitlab.com/sylv.lempereur/tcfmodels/-/blob/master/halfPlate_whole_5dpf_dr.scad

stamp for 96 samples: https://gitlab.com/sylv.lempereur/tcfmodels/-/blob/master/plate_whole_5dpf_dr.scad

handle for all stamps: <https://gitlab.com/sylv.lempereur/tcfmodels/-/blob/master/handle.scad>

These files were sliced with Cura 4 (Ultimaker, Netherlands) and printed in polylactic acid (PLA) on a standard Ultimaker 2⁺ (Ultimaker, Netherlands) with a 0.25 mm nozzle. We printed the stamps upright and standing on the straight edge of the long side, to achieve the highest resolution and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

fidelity in the ridges forming the small niches for the EEs. All stamps were handled with one to two default handles, which were printed in bulk separately and affixed to the stamp with superGlue (cyanoacrylate, CA).

Imaging plates

For small batches (up to 12 EEs), we used standard 60 mm Petri dishes (Greiner Bio One International, catalog number: 628160) with the 12-sample stamp. Larger batches were mounted with the stamps for 48 or 96 specimens in single-well plates (Thermo Fisher Scientific, #140156). This system provided ample space for the objective of the microscope and had the same outer dimensions as a standard 96-well plate (Fig. 4C). This made it possible to mount the dish on the stage of a microscope with standard hardware.

Confocal imaging

Due to the large number of samples we needed to process, our HCl system required an efficient, high-speed image acquisition setup. We therefore designed a setup based on a NIKON A1R HD microscope combined with a long-range piezo scanner objective (2 mm), a fast motorized stage and a low-magnification objective lens (10 x, 0.5 NA).

This microscope incorporates a high-definition resonant scanner, a band-pass (BP)-filtered four-channel detector unit equipped with two high-sensitivity GaAsP detectors (BP 525/50 & 595/50) and two photomultiplier tubes (PMT) (BP 450/50 & 700/75). The laser unit is equipped with four laser diodes (405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm. Power > 15 mW), with switching via an acousto-optic-tunable filter (AOTF). We chose a fast motorized stage (Prior H101P2) to allow high-speed plate displacement in the *x/y* plane.

For optimization of the field of view, we combined the Nikon A1R microscope, which has a large field of view (18 mm), with a CFI Plan Apo 10XC Glyc (0.5 NA) immersion objective (Nikon), to allow the

1 acquisition of images (tiles) with x - y sizes of 1200 x 1200 μm , such that the 5 dpf fish (diameter: 800
2 μm , length: 4 mm) could be captured in their entirety with only five tiles. This setup also provides a
3 working distance of 5.5 mm and can correct for wide range of refractive indices, from 1.33 to 1.51.
4
5

6
7 We used a fast-piezo objective scanner (PIFOC, Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany), which
8 allows high-speed acquisitions over 2 mm in the z direction to ensure rapid image acquisition in the
9 z -plane.
10
11

12 **Filename-based data management for HCA**

13
14 We developed a data management system, using structured file names, to maintain flexibility in the
15 choice of analytical tools and accessibility for diverse users. The data organization can be maintained
16 even after export to a different environment, such as the laboratory of a coworker or a user of the
17 service unit, because it is independent of a centralized tracking database.
18
19

20 The structured file name constitutes the 'globally unique identifier' (GUID) for each sample and is as
21 easily readable to humans as it is to machines, due to its consistent structure.
22
23

24 For images, this file name consists of a combination of condensed composite IDs, separated by
25 underscores: scanID_specimenID_experiment-descriptor_data-descriptor. Each of these IDs can be
26 broken down into less complex descriptors:
27
28

- 29 ● The scanID is the date of acquisition in `yyymmdd` (year, month, day; two digits each, zero-
30 padded) format followed by the initial of the person who acquired the image (capitalized)
31 and an alphabetic counter (a-z) counting the scans performed by this person on this day.
32 Having the scanID in this form and at this position forces the files into chronological order,
33 thereby making it easier to find (potentially related) files from the same session in a file
34 management system (Explorer, Finder, Nautilus).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- The specimenID consists of the experimentID, which identifies a batch of samples from a project, and an alphabetical counter, identifying each specimen individually.
- The experiment-descriptor contains a shorthand descriptor of the developmental stage of the specimen, the projectID it belongs to, an X-voxel count, providing information about the resolution of the image, a freeform comment for non-HCS-acquisitions and a machineID, which identifies the microscope and the technique used to acquire the image. The projectID can also be broken down into the abbreviated project name, a numerical counter and an abbreviation of the Latin species name of the specimen, all separated by hyphens.
- The data-descriptor differentiates between the different stages of processing and analysis of the image. As all the data derived from a given data set carry the same base name (the first three descriptors), the data-descriptor informs the user of the status for the mode of data considered.

Under individual-image conditions, file names are constructed interactively with a helper application that checks the integrity of the GUID. However, names cannot be assigned directly by the microscope software, and we therefore developed a software tool allowing users to re-establish the association between the experimental history of the sample and its HCI image stack by translating the file name assigned by the microscope into the appropriate file name for the ZeBrainInspector system.

This process is based on a pseudodatabase system consisting of two spreadsheets (one for input, the other for output) and a couple of javascript and python scripts. These scripts ensure that the function of the filename as a GUID is not damaged, by checking that the right file name components are applied to the correct image and preventing duplications. The correlation between the image and the underlying sample is thus established on the basis of the position of the sample in the mounting grid. This information is conveyed in the microscope-generated file name and entered into the input

spreadsheet. Careful user guidance on the input spreadsheet facilitates the use of this spreadsheet and increases user confidence.

***wdr12* mutants**

wdr12^{h13120Tg} mutants were obtained from the Zebrafish International Resource Center (ZIRC, Eugene, OR, USA). Adult zebrafish were maintained as heterozygotes and inbred to generate homozygous mutant embryos. EEs were sorted under a stereomicroscope (Olympus SZX16) on day 5. Almost 25% of these EEs had eyes that appeared to be smaller than those of non-mutant EEs at the same developmental stage and were considered, *a priori*, to be mutants. Putative mutants and their siblings were processed according to the zFaCT protocol. After imaging, all fish were unmounted and subjected *a posteriori* to genotyping (not shown). Wildtype and mutant *wdr12* alleles were detected with the following primers: forward 5'-ACCCAGCTGACATTTGCTCT-3', reverse 5'-TTCTTGCTCCAGCAGTTT-3' and reverse2 5'-CAATATCACCAGCTGAAGCCTA-3'. PCR with the forward and reverse primers yielded a 244 bp amplicon for the wild-type allele, and an 831 bp amplicon for the mutant allele.

5-FU treatments

5-fluorouracil (Sigma, USA) was applied in DMSO, which was used as a carrier. Three types of control conditions were used: zebrafish in embryo medium, zebrafish placed in six-well plates in 5-FU-containing medium, zebrafish in embryo medium+DMSO. The 5-FU application protocol is described in the results section. At 5 dpf, all EEs were imaged under the dissecting microscope. The EEs were then mounted in 48-well molds to ensure homogeneous acquisitions between samples with our fast confocal microscope. The microscopy parameters were kept constant between the three successive experiments.

Image processing and statistical analysis

We performed registration, segmentation, statistical analysis and graph plotting in a python 3.7 environment under Ubuntu 16.04 and Windows 10, on an HP computer with an Intel Core i7 vPro CPU and 32 GB of RAM. We used Numpy, Scipy (Virtanen et al., 2020), scikit Image (van der Walt et al., 2014; Yaniv et al., 2018), matplotlib (Hunter, 2007), openpyxl, Pink (Couprie, 2011) and SimpleITK (Yaniv et al., 2018).

Statistical analysis was performed as follows: Fisher's exact test was performed to compare the variances of two clusters. If the variances were found to be equal, Student's t test was performed. Otherwise, a Welch test was performed.

We manually performed 3D segmentations of whole EE and their white matter, using Amira for Life & Biomedical Sciences software (Thermo Fisher Scientific, USA). We then compared these segmentations with those obtained automatically.

We assessed segmentation accuracy, by calculating Matthews' correlation coefficient (MCC), the Sørensen-Dice coefficient (DSC) and a general balanced metric (Cappabianco et al., 2019) setting $\beta = 2$ (GB2). DSC and GB2 did not take true negatives into account. This problem was counterbalanced by computation of the MCC. However, the large numbers of black voxels around the sample could create computational artifacts. We prevented these artifacts by calculating MCC in a bounding box around the union of the manual and automatic segmentations, with a tolerance of 5 voxels. We also calculated GB2 because this coefficient favors false positives over false negatives. When combined with DSC and MCC, this led to a better estimation of segmentation accuracy.

Our ZeBrainspector (ZBI) graphical interface was developed with the Pyside2 library. The workspace screen displays up to 6x3 views simultaneously. Rotations, slice stacking, section moves and contrast enhancement are computed in real time with the Numba library to obtain Python and Numpy code acceleration. The software was thus built exclusively from native Python code.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results and discussion

We established the ZeBrainInspector (ZBI) platform for high-content imaging (HCI) and high-content analysis (HCA) of 3D images for studies of zebrafish neurodevelopment. Based on the observation that lipophilic tracers yield intense labeling in the brain, we designed a simple standardized procedure for staining, mounting and analyzing whole 5 dpf EEs with these dyes. This procedure is currently tested and adapted with other samples: it works in our hand with 3dpf fish (eye-less registration mode) and up to seven days (not shown). ZBI may certainly be used with other fish species such as *Astyanax* or medaka.

Staining made it possible to register signals, resulting in a gain of time at the mounting step by allowing the use of poorly oriented samples. The software also performs volumetric estimations of the whole body and of the brain matter. All steps have been optimized to minimize time and effort and to increase the generalizability of the experiment. For a batch of 48 samples, only about eight days are required for completion, from initial fixation to the quantification of brain and whole EE volumes (Fig. 1).

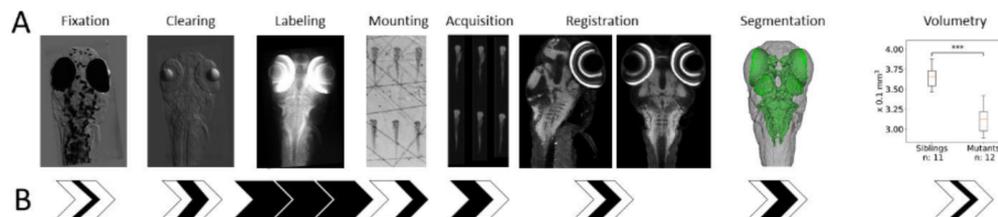


Fig. 1 The ZeBrainInspector (ZBI) platform

(A) The ZeBrainInspector platform involves several steps. After fixation, a tissue clearing process is performed to reduce light diffusion and absorption, and the samples are then stained with a lipophilic dye. Samples are mounted in specific molds for rapid automatic acquisition on a microscope. The 3D images can be registered or segmented, and a volumetric analysis of the EE and white matter can be performed.

(B) Time required for each step of the ZeBrainSpector platform. Each arrow represents a day of treatment. Black sections correspond approximately to the time required for one day of experimentation. The whole process takes about 10 days from fixation to volumetric analysis.

High-content 3D image analysis requires reliable features for automatic segmentation: a robust labeling and tissue clearing protocol

High-content analysis (HCA) requires consistent fluorescence signals for automatic segmentation. We tested lipophilic dyes of the carbocyanine family (e.g. DiO, Dil and DiD) for reliable visualization of the main morphological features of the EEs (Fig. 2 and Fig. 3). When applied as a counterstain, which is facilitated by the small size of the EE, this type of dye, which is traditionally used for electrode marking and neuronal tracing, strongly stains the membrane-rich white matter of the brain. Due to the lower density of membranes in non-neural tissues, the staining was less pronounced in these tissues than in the brain, but nevertheless sufficient for automatic segmentation of the whole body. We established a staining protocol yielding optimal permeabilization while preserving the shape of the EE.

This protocol can be tuned for direct recording of the native fluorescence of reporter lines (Fig. 2B-C), skipping the depigmentation step, provided that an unpigmented genetic background is used (Materials and Methods). This approach is scalable with an optional immunolabeling step using anti-GFP/RFP or other antibodies (Fig. 2D-H) if additional morphological data are needed.

Sample clearing is necessary for confocal microscopy, because a slight signal loss would otherwise be observed with increasing depth in 5 dpf zebrafish. Indeed, homogeneously contrasted images are required for the subsequent automatic segmentation steps, and along the z axis of the image stack. Incubation in mild detergents leads to a partial delipidification, promoting sample clearing. The imaging buffer is crucial for successful tissue clearing, as it renders the refractive index (RI) of the sample equal to that of the surrounding medium, thereby rendering cell membranes, cytoplasmic

1 proteins and other cell components transparent. After testing several products and concentrations,
2 we opted for a medium based principally on sucrose, nicotinamide and triethanolamine (MD+, see
3 the Materials and Methods section), which has suitable optical parameters for imaging with dipping
4 lens objectives with high or tunable RIs.
5
6
7
8
9

10 The DiO labeling of a representative 5 dpf zebrafish is shown in Fig. 3. As shown in Fig. 3A, DiO
11 labeling is observed throughout the body, but is strongest in areas in which the density of myelinated
12 fibers is high. Retina photoreceptors, olfactory bulbs and the main fiber tracts of the brain display a
13 very strong DiO signal, making it possible to detect fine anatomical structures and landmarks (Fig. 3
14 E-H: telencephalon, optic commissures, lateral forebrain bundle, optic tectum, medial longitudinal
15 fascicle). Moreover, all anatomical structures are labeled. Outside the brain, ganglions and motor
16 neurons (Fig. 3A), appearing as dots along the spinal cord, are strongly positive. Muscles (Fig. 3A) and
17 other non-neuronal structures (Fig. 3C: yolk, digestive tract and organs, etc.) have a much weaker
18 DiO fluorescence signal than brain structures, but nevertheless remain detectable. Overall, these
19 data show that DiO can be used as a marker of brain structures and for the detection of whole EEs,
20 on the basis of background labeling.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

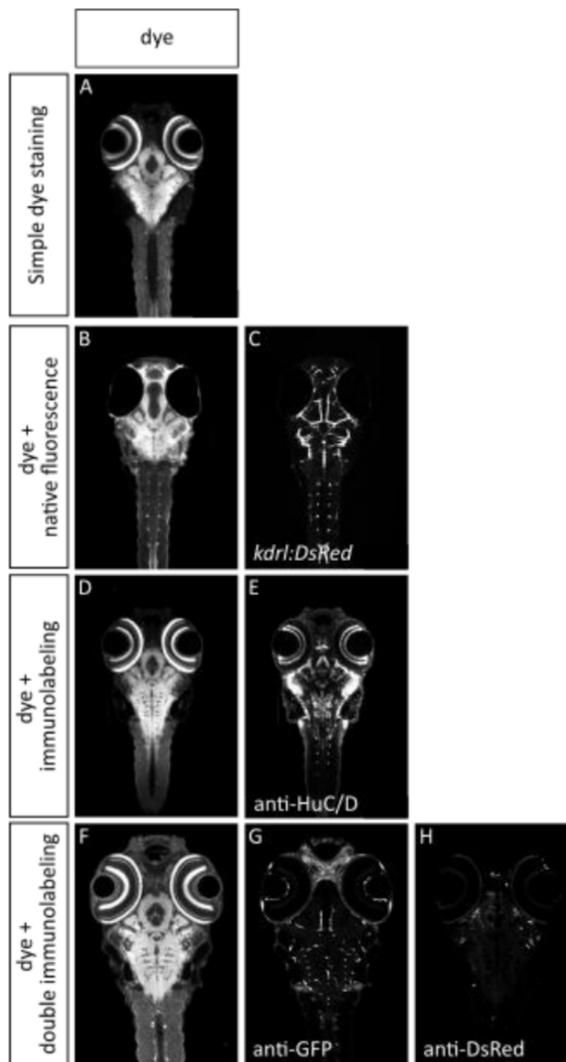


Fig. 2: Four examples of fast staining protocols compatible with the ZeBrainInspector (ZBI) platform

(A) Confocal horizontal optical section of a 5 dpf zebrafish after DiO staining. (B-C) The zFACT labeling protocol is compatible with native fluorescence imaging. A 5 dpf EE from the *Tg(kdr1:DsRed);casper* transgenic reporter line, in which the endothelial cells of the blood vasculature are counterstained with DiO. (B) Confocal horizontal optical section of the DiO channel. (C) The same optical section, showing DsRed fluorescence. (D-E) The zFACT labeling protocol allows whole-mount immunolabeling. A 5 dpf EE incubated with an anti-HuC/D antibody to label neurons and counterstained with DiO. DiO and anti-HuC/D antibody staining patterns from the same horizontal optical section are shown in D and E, respectively. (F-H) Three-channel imaging was performed on immunolabeled 5 dpf EE from the *Tg(fli:GFP)* transgenic line into which SINV-

mCherry/2A was injected on day 3. DiI, GFP (anti-GFP antibody) and mCherry (anti-DsRed antibody) fluorescence patterns from the same horizontal optical section are shown in F, G and H, respectively.

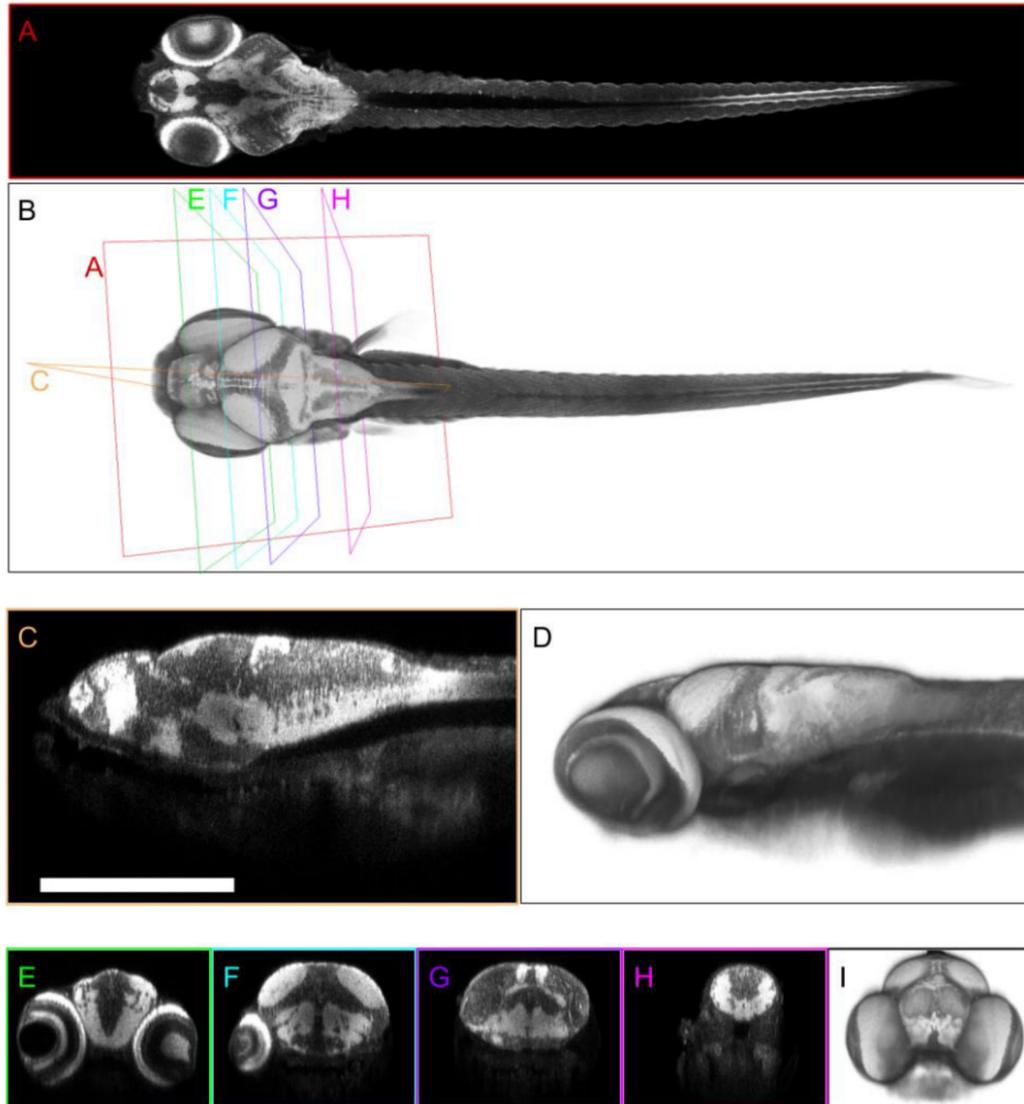


Fig. 3 The lipophilic dye DiO: a reliable marker visualizing brain white matter and whole EE.

Zebrafish EE (5 dpf) were labeled with the lipophilic marker DiO and cleared. (A, C, E-H) Optical sections, 2 microns thick (raw data), from confocal microscopy are shown in Fig. 4. Section planes are shown in B. B, D, I: 3D volume rendering of

the EE (raw data). (A) Horizontal section, imaging plane. (B) Dorsal view. (C) Sagittal section (posterior region cropped). (D) Lateral view of the anterior region of the EE. (E-H) Transverse sections. (I) Frontal view of the EE head.

HCI: description of rapid-mounting setups for EEs

Many mounting strategies for the high-throughput microscopy of zebrafish EEs have been published (Alessandri et al., 2017; Donoughe et al., 2018; Kleinhans and Lecaudey, 2019; Staal et al., 2018; Westhoff et al., 2013; Wittbrodt et al., 2014), but most are suitable for embryos but not for 5 dpf EEs. We therefore designed 3D printed fixtures for the generation of regular grids of small niches of approximately the shape and size of 5 dpf EEs (Fig. 4). Once placed in these narrow niches with fine paintbrushes, the EEs remain in the chosen orientation, dorsal side-up in this pipeline. This mounting strategy is possible because EEs dry out more slowly in high RI medium than in water. EEs are immobilized with a drop of phytigel, a transparent plant culture medium (Zhou et al., 2019), which serendipitously proved to be ideal for microscopy. One of the advantages of this platform is that the orientation of the EEs does not need to be perfect, provided that there is no eye in too dorsal position to disturb the acquisition of the brain region below the eye. The imaging plates and stamps are chosen according to the number of samples.

HCI requires speed: a description of the main advantages of fast confocal laser scanning microscopy

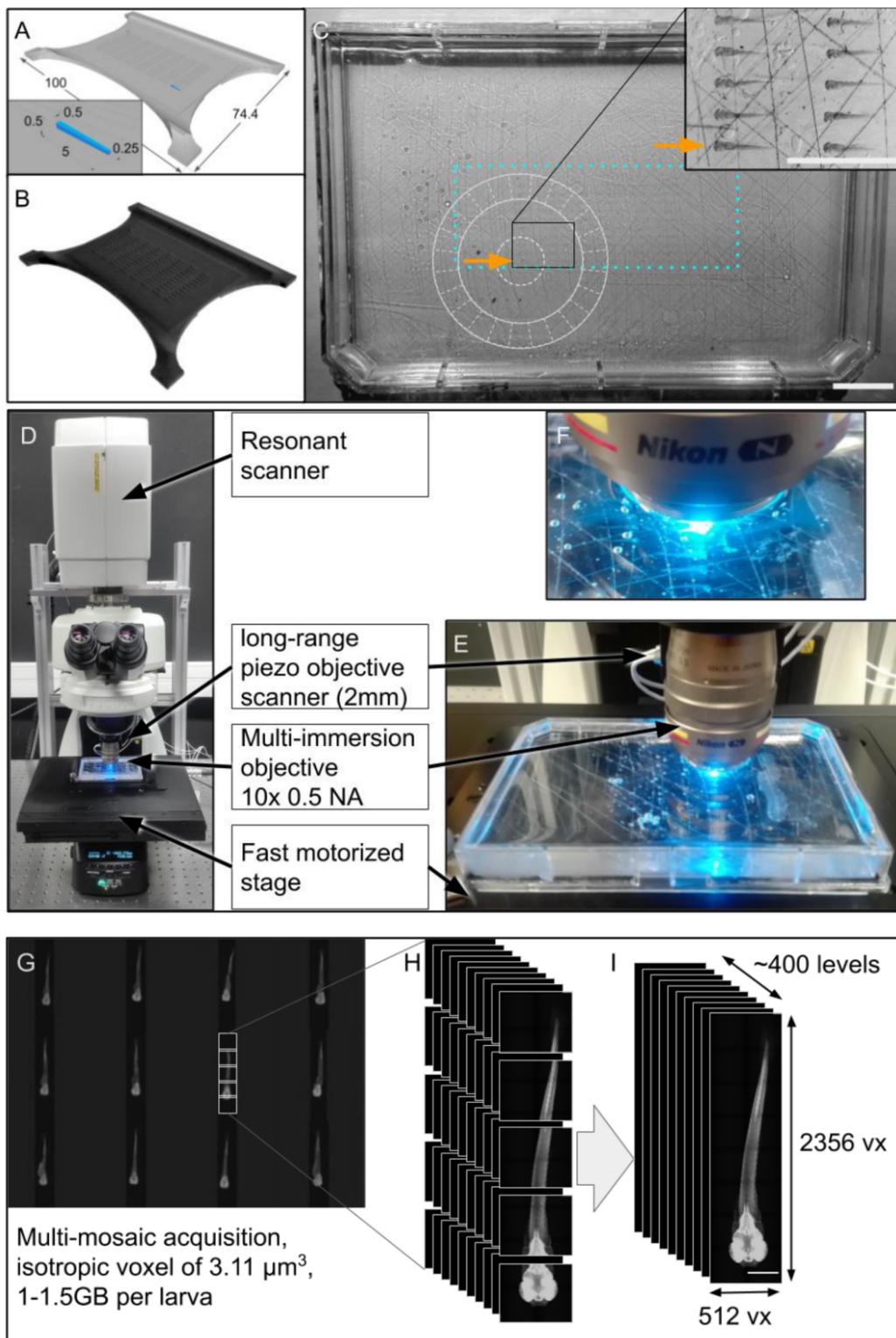
Light-sheet microscopy is the most powerful method for live applications, but we chose not to use it here, because it does not allow large-scale mounting and requires a high level of expertise in optics and computing (Albert-Smet et al., 2019).

We chose a commercially available fast confocal laser scanning microscope, which was reasonably priced and easy to use. The images generated were of a reasonable size. Depth-dependent signal

loss is a drawback of confocal microscopy, but can be overcome by tissue-clearing techniques.

Several options make rapid acquisition possible: a piezo-electric objective scanning nanofocusing system allowing high-speed movements in the z plane over a range of 2 mm, a large field objective allowing the imaging of an entire 5 dpf EE with only five tiles, and a high-definition resonant scanner coupled to two high-sensitivity photomultipliers.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 4 HCI tools and strategy

(A) Modeling the stamp in CAD software. All measurements are in millimeters. (B) 3D-printed plastic stamp. (C) Dissecting microscope view of a single-well plate with 48 embedded samples. The round, light-gray line diagram represents the microscope objective; this demonstrates why so much space is required between the rim of the single-well plate and the specimens. The cyan dotted rectangle outlines the overall scan area. The gray lines are scratches made manually in the plastic of the plate to strengthen the adhesion of the agarose to the dish. Scale bar: 5 mm. (D) Overview of the CLSM setup. (E) Focus on the dipping lens and the long-range piezo objective scanner. (F) High-magnification view of the imaging setup displaying the grid of embedded fish (21 dpf) (G) Partial screenshot from the Nikon acquisition software (NIS-element) displaying a multi-mosaic acquisition for 12 samples. (H) Mosaic acquisition: as the specimen is larger than the field of view, multiple tile-stacks with a 10% overlap are acquired independently. These data are recorded with a sampling rate of 512x512 voxels (vx) of 2.5 x 2.5 μm . With a correspondingly adjusted z-step size, this results in isotropic voxels. (I) Dimensions of a standard data set. The resulting image-stack after merging of the tile-stacks contains about 400 slices, each 512 voxels wide and 2256 voxels long.

HCA of whole EEs and their brain white matter

Presentation of the pipeline

For analysis of the large amounts of data acquired, we developed computer software to automate the analysis as much as possible (Fig. 5). The first step in the analysis involves the use of a renaming tool to give the files names that are informative for the user. Robust image traceability is, indeed, essential, with links to sample names and experimental procedures.

Within the ZeBrainspector (ZBI) software, registration makes it possible to simplify comparisons between samples. Maximum intensity projections of substacks of the image can be generated. This makes it possible to remove invalid samples before segmentation to reduce the computing time. These segmentations automatically detect the positions of the EE and its white matter in the original acquisition. However, segmentation errors are possible, and a new visualization is provided to the user, to make it possible to eliminate such errors. This visualization displays the segmentations for comparison with the raw data. Once any incorrect segmentations have been removed, ZBI performs a volumetric analysis.

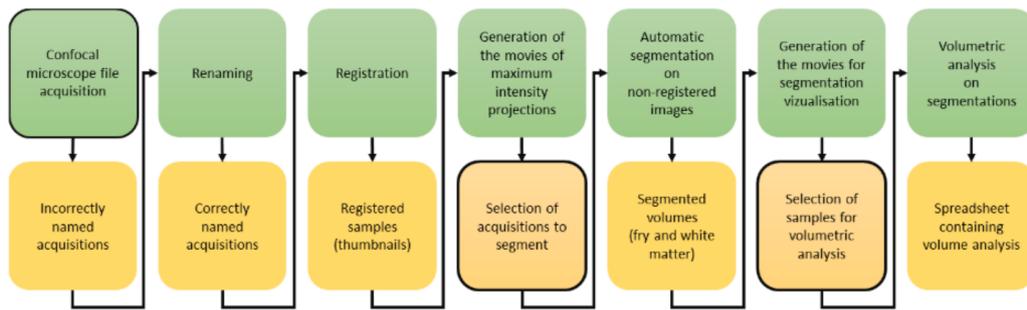


Fig. 5 The ZeBrainInspector informatic pipeline, making it possible to register, segment and visualize high-content 3D images

The ZBI pipeline consists of a succession of computation steps. The datasets acquired are renamed, registered and segmented. Segmentations are used for volumetric analysis. Framed squares represent sequences movies requiring manipulation by the user.

Registration for faster batch visualization of EEs

Comparisons between samples were facilitated by implementing several procedures for sample registration in ZBI. We provide a detailed description below of the first of these procedures, using the lenses as landmarks.

The original image (Fig. 6A,E) is morphologically closed, and then morphologically opened to smooth the signal. This smoothed image is then thresholded to keep the top ten percent of gray values. A rough segmentation of the white matter is then obtained by keeping the largest element resulting from this thresholding (Fig. 6B,F). A vector describing the main orientation of the white matter is defined, retaining the largest half axis (major semi-axis) of the ellipse encompassing the thresholded voxels. The computing time required for subsequent steps is reduced by downsampling the original image to a quarter of its original size in each dimension. A rough segmentation of the whole larva is computed by thresholding the downsampled image, keeping the largest element resulting from this thresholding and then closing the image and removing internal holes. For the detection of black elements in the specimen, a watershed is computed using the lowest five per cent of gray values as

1 interior markers, then the outside of the larva and the top 50% of gray values as external markers,
2 and a morphological gradient of the closed image as the topological map. Lenses are detected among
3 the dark elements by retaining the two largest spherical elements (Fig. 6 B,F). Using these two
4 landmarks, it is, therefore, possible to obtain two vectors: the interocular vector, from the center of
5 one crystalline lens to the other, and the translation vector, pointing from the center of the lenses
6 to the center of the whole image. Orthogonality is ensured by projecting the vector describing the
7 main axis of the white matter onto the plane defined by the interocular vector. A final vector is
8 obtained by calculating the product of the interocular and projected vectors. This fourth vector is
9 oriented to point to the part of the image with the highest mean gray value. The four vectors (Fig. 6
10 C,G) are then used to calculate the transformation matrix used to align the image with its axis (Fig. 6
11 D,H). The calculation of the translation and rotation matrices based on the DiO channel data makes
12 it possible to apply this image registration to all signals acquired in parallel to the DiO reference
13 channel.

14 However, it may not be possible to use the lenses as landmarks, if the eyes are pigmented and the
15 light cannot penetrate them, for example. Two other registration processes, similar to that described
16 above, have been developed to get around this problem, but are not described in detail here. For
17 the registration of fish with pigmented eyes, the algorithm uses whole eyes as landmarks, with
18 differences only for some morphological kernels and threshold values. A third registration does not
19 use the eyes at all, instead computing the bounding ellipsoid from the white matter, using its axes as
20 vectors for alignment. This option may orient samples less precisely, but we recommend its use in
21 cases in which registration based on the lenses or eyes is unsuccessful. All the algorithms are
22 available from the gitlab repository.

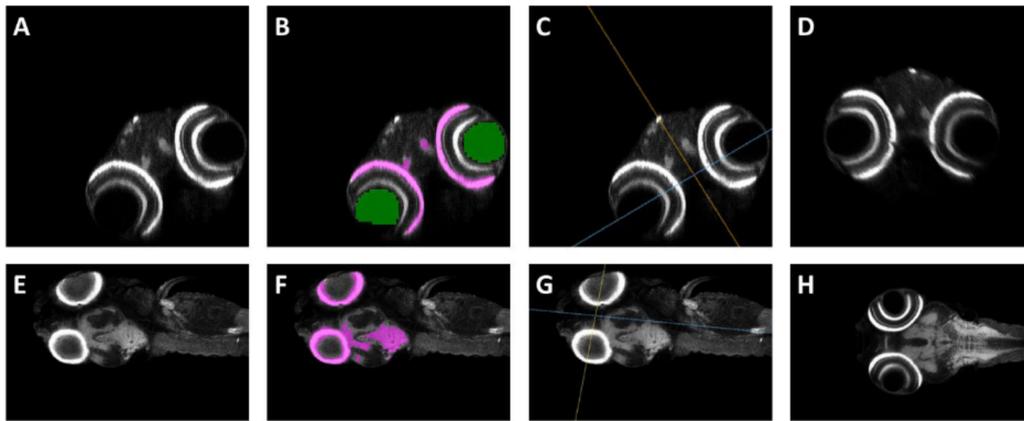


Fig. 6 A registration method using the lenses as landmarks and the fitting of an ellipsoid to the brain white matter for EE axis definition

(A-D) Midbrain dorsal sections. (E-H) Midbrain transverse section (A,E) Raw data. (B, F) Superimpositions of segmentations of the white matter (magenta) and crystalline lenses (green) onto the raw data (gray). These landmarks are used to compute the direction of the white matter. (C, G) Superimposition of orientation planes onto raw data (gray). Yellow, blue and red lines represent the lens-to-lens, main axis and third axis planes, respectively. (D,H) Results of the registration. The sample is centered and the white matter is aligned with the main axis of the image.

Segmentation of the whole EE

One of the key tasks in our processing pipeline is the segmentation of the whole EE. For automatic segmentation that flexibly adapts to images displaying some diversity in terms of intensity and quality, many steps are required, regardless of the standardization efforts made. A morphological closing is initially required to eliminate local undersegmentation due to local gradients. This is followed by a morphological opening eliminating background noise external to the sample. The resulting smoothed image is first used to calculate a morphological gradient reflecting the transition of grayscale values over the image. The pixels are white in areas of abrupt transition, and dark in homogeneous regions. A topological map is obtained as an intermediate result. Two thresholds based on the gray levels of the smoothed image are then applied: the first threshold corresponds to the internal zones (body) of the sample, with high values retained, and the second corresponds to

the external zones (background), with low values retained. Using these thresholds, we labeled the local maxima of the smoothed image by assigning values of 0, 1 or 2, depending on the area in which they were located. 0, 1 and 2 correspond to neutral, external and internal seeds, respectively.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The next step is a segmentation based on the watershed method, which requires seeds and a topological map. The seeds, corresponding to the values 1 or 2 defined above, are used to initialize the watershed. During the watershed procedure, these seeds grow to fill the area of interest. The algorithm is first applied to a downsampled version of the image, to locate the sample. This makes it possible to limit the computation of the sample watershed when the high-resolution image is processed, thereby reducing the calculation time. However, due to residual light diffusion into tissues, the acquisition side is brighter than the opposite side. A specific threshold is calculated to remove low grayscale values on the acquisition side, to solve this problem and to improve segmentation accuracy. Finally, a morphological closure is applied to eliminate potential non-segmented areas within the EE.

For validation of this segmentation method, we imaged 12 samples with the corresponding grid and computed segmentations with our pipeline (Fig. 7A). Following segmentation, the results were checked with ZBI, and this led to two very badly labeled samples being discarded that would otherwise undoubtedly have yielded abnormal segmentations. We compared the automatic segmentations (Fig. 7B-E) with those obtained manually (Fig. 7F-I). We obtained median Sorensen-Dice coefficient, general balanced metric (GB2) and Matthew's correlation coefficient (MCC) values of about 0.95 (Fig. 7J). These high scores indicate a high degree of correspondence between the manual and automatic segmentations. On average, it took six minutes to calculate an automatic segmentation, which is not significantly different to the eight minutes required for acquisition. This calculation time, estimated on standard laptops, could certainly be reduced by parallel calculations on dedicated computation servers. In conclusion, our automatic segmentation method provides a precise segmentation of the whole EE.

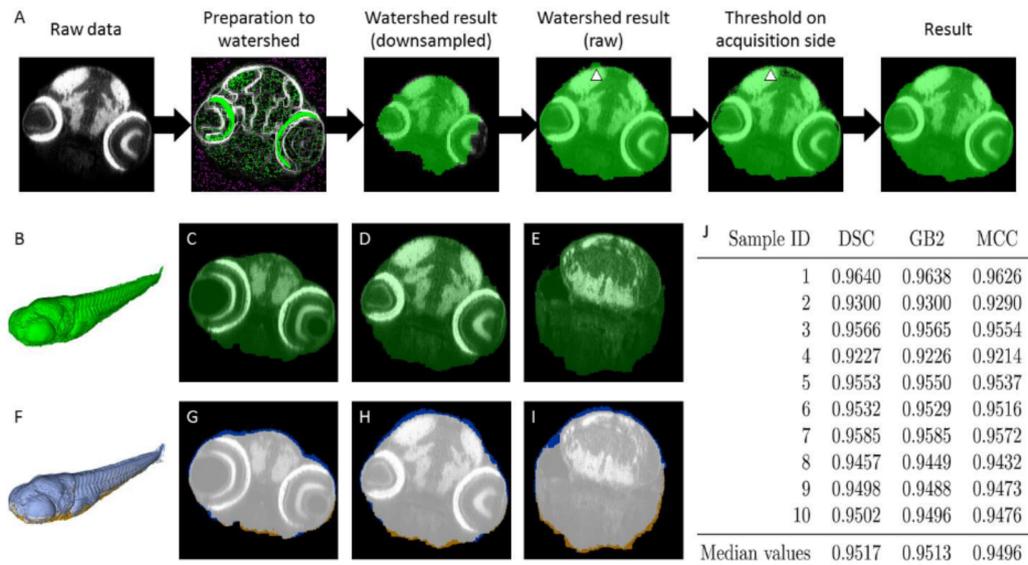


Fig. 7 Pipeline and validation of EE segmentation

(A) Main steps in the computation of EE segmentation by watershedding. Each step is illustrated with a transverse section of the midbrain. Due to light scattering, the acquisition side is brighter than the opposite size. The watershed oversegments dorsally (arrowheads). This problem is solved by applying a specific threshold on the acquisition side. The algorithms are available from gitlab (see the Materials and Methods). (B-E) Segmentation results. Segmentation in green, raw data in gray. B. 3D surface rendering. C-E. Transverse section. (F-I) Comparison of manual and automatic segmentations. Raw data are shown in gray. Manual segmentation only, automatic segmentation only and the intersection between these intersections are shown in brown, blue and white, respectively. F. 3D surface rendering. (G-I) Transverse section. (J) MCC, GB2 and SDC coefficients for automatic segmentations compared with those for manual segmentations. The median values of these coefficients are about 0.95, indicating that the two segmentation strategies yield almost identical results.

Brain white matter segmentations

We made use of the ability of DiO to label brain white matter strongly, for the automatic segmentation of this tissue. As for the segmentation of the whole EE, the first step was the calculation of a morphological opening followed by a closing. These steps generate a smoothed image, which was used to calculate a first threshold for retaining the 10% highest grayscale values in the image. This thresholding creates a class of voxels that we consider to correspond to white matter.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A second thresholding is then performed on the smoothed image, to retain the lowest 50% of the grayscale values of the image. We improved the precision of the segmentation by watershedding, by eroding the thresholding results to ensure the presence of a neutral range between the two zones. As described above, we then retained the local maxima of the smoothed images within each zone to create an image including the necessary seeds for watershedding.

The presence of elements strongly labeled with DiO outside the brain, within the digestive tract for example, made it necessary to introduce a second step to refine the segmentation, limiting it to the brain. For this, we select the largest segmented element, corresponding to the brain. We then calculate a morphological expansion of this object, to create the root allowing the calculation of a geodesic expansion, using the watershedding result as a mask. This step removes elements that are not part of the brain, while retaining small isolated brain structures.

Using a strategy similar to that described above to validate the segmentation, we segmented the brain white matter of the 10 previous EEs (Fig. 8). Comparisons between automatic and manual segmentations (Fig. 8F-I) yielded median DSC, GB2, and MCC values of about 0.88 (Fig. 8J). Automatic segmentation took an mean of three minutes longer. Thus, whole-body and brain white matter segmentations took a time similar to that required for image acquisition.

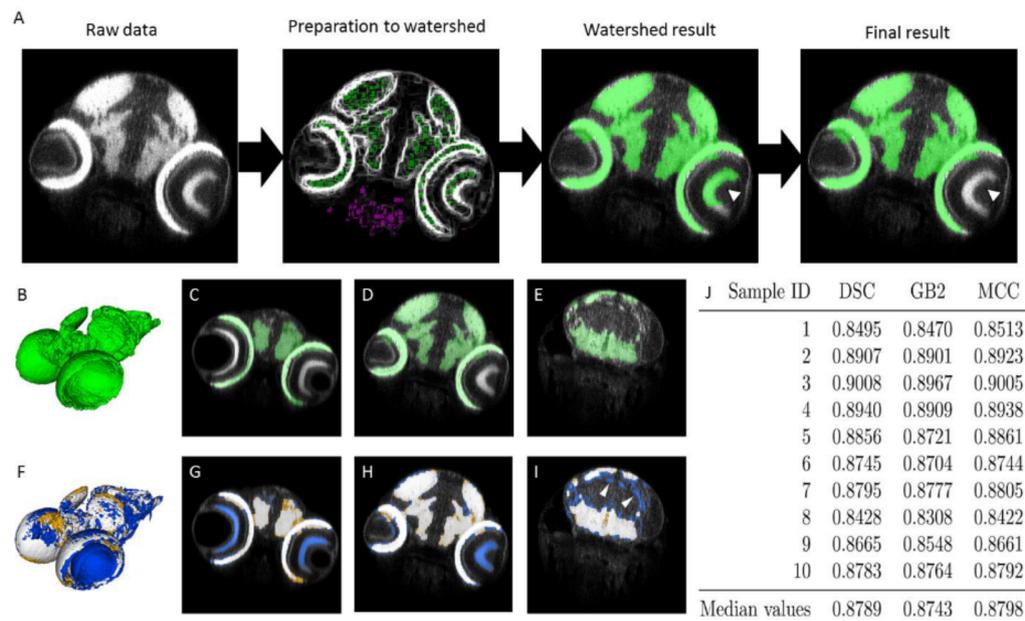


Fig. 8 Pipeline and validation of white matter segmentation

(A) The main steps in the computation for white matter segmentation by watershedding. Each step is illustrated with a transverse section of the midbrain. Watershed computation detects unwanted elements, such as the retina (arrowhead) or yolk (not shown). These oversegmentations are removed by selecting the largest elements and their near neighbors. Details of this process are available from gitlab (see the Materials and Methods). (B-E) Results of segmentation. Segmentation in green, raw data in gray. (B) 3D surface rendering. (C-E) Transverse section. (F-I) Comparison of manual and automatic segmentations. Raw data in gray. Manual segmentation only, automatic segmentation only and intersection between the two segmentations, in brown, blue and white, respectively. (F) 3D surface rendering. (G-I) Transverse section. (J) MCC, GB2 and SDC coefficients for automatic segmentation relative to manual segmentations. Coefficients are greater than 0.8, indicating that automatic segmentations are precise enough for volumetric analysis. Indeed, segmentation errors were similar for all samples. For example, small white matter tracts in the brain are not segmented (arrowheads in I).

Checking of segmentation accuracy by the user

The software allows users to check segmentation quality manually, by producing an image superimposing the segmentation of the white matter on the segmentation of the whole EE. These segmentations can then be compared with raw data via ITK-SNAP or any other viewer allowing

1 navigation within 3D images. Furthermore, this superimposition of segmentations makes possible
2 the automatic creation of images showing the overlay of the segmentation on the raw data, on
3 transverse sections, for example. These images can be used to detect potential segmentation errors,
4 making it possible to remove some samples before starting statistical analyses.
5
6
7
8
9

10 Our software can also display segmentation on the desired channel, making it possible to detect
11 segmentation failures. The software then proposes the elimination of these failures before statistical
12 analyses.
13
14
15
16
17

18 **Volumetric analysis**

19
20
21
22 Volumetric analyses are performed by multiplying the number of segmented voxels in each
23 segmented specimen by the physical size of the voxel, to obtain its real-world volume. This
24 computation, when performed for both segmentations, provides two different volumes: the whole
25 EE volume and the volume of its white matter. Dividing the volume of the white matter by the volume
26 of the EE, we obtain a ratio providing information about more subtle defects of neural development
27 such as impaired neurogenesis. The values obtained are automatically recorded in an Excel
28 spreadsheet and provided to the user.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

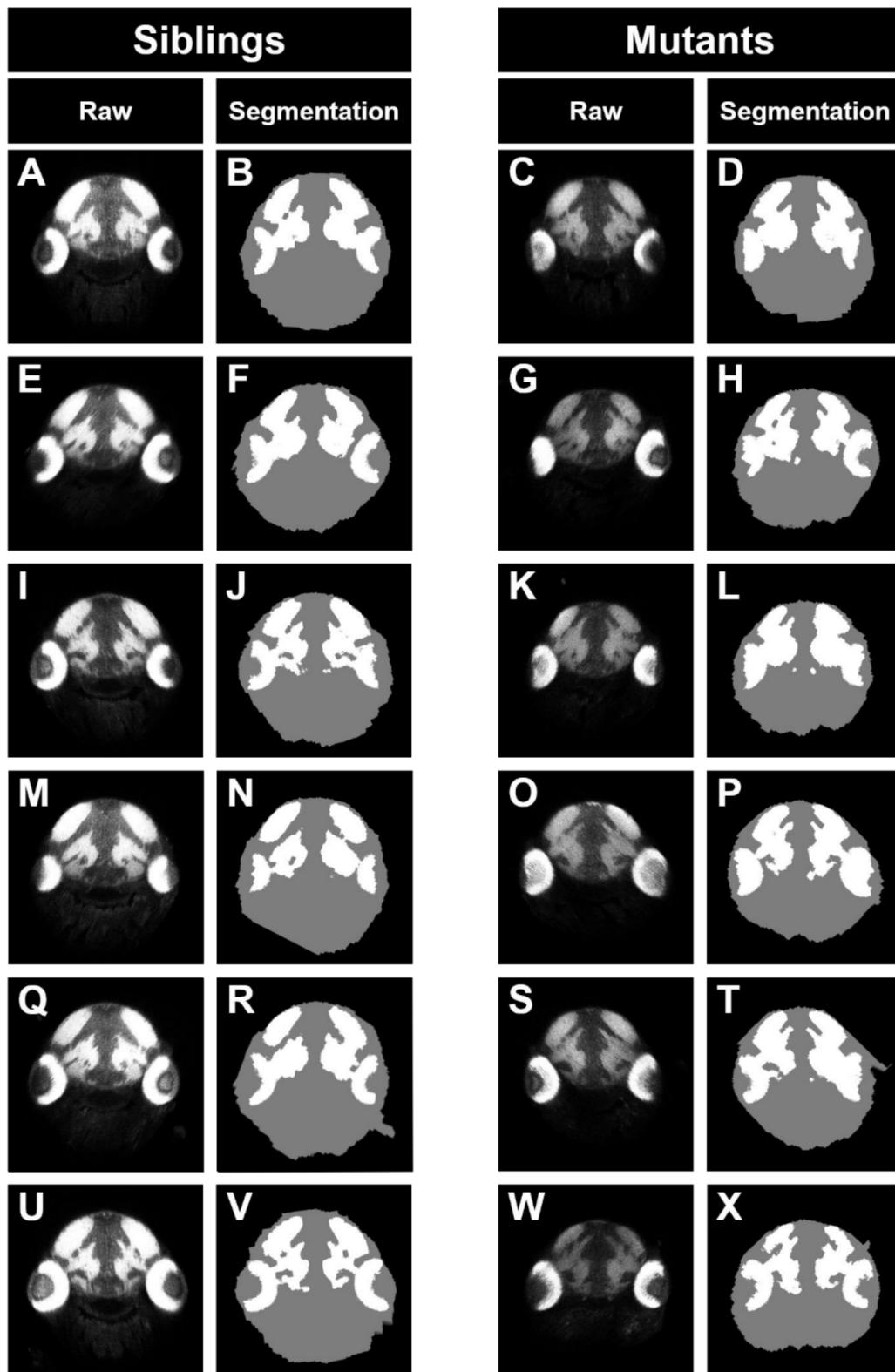
39 **HCA by the ZeBrainInspector (ZBI) platform reveals discreet, but statistically significant brain** 40 **defects**

41
42
43
44
45 We describe here the use of our pipeline to refine the characterization of a microphthalmic mutation
46 in a ribosome biogenesis gene. We selected the *Wdr12* mutant line, in which visible eye
47 microphthalmia was on lateral transmission light microscopy pictures (2 and 6 dpf) was reported in
48 the Zfin database (Fig. 10A). We crossed heterozygous founders and selected approximately one
49 quarter of the 5 dpf EEs on the basis of microphthalmia criteria. We first confirmed on one batch of
50 EEs that the affected EEs were homozygous for the mutation (data not shown). Eye phenotypes were
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

100% penetrant in *wdr12* homozygous (Hmz) embryos, whereas heterozygous (Htz) embryos were indistinguishable from their wild-type (Wt) siblings.

We assessed whether brain hypomorphy, which was not obvious on observation under a dissecting microscope, could be characterized by ZBI. We first used the snapshot button of ZBI to extract maximum-intensity projections of transverse thick sections of the midbrain (Fig. 9, see te Methods for details of the protocol and guidelines). This operation was greatly accelerated by navigation in parallel in registered samples, visualized in the same orientation and at identical levels. ZBI can thus be used for efficient rapid analyses of images in batches.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 9 Use of the ZebraFishInspector (ZBI) platform to study midbrain morphology in *wdr12* mutants

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The 12 samples shown highlight the homogeneity of brain size in mutants and wild-type EEs.

A slight hypomorphy of the whole body (gray disk) and brain white matter (in white) can be observed in the mutants (C, G, K, O, S, W) relative to their siblings (A, E, I, M, Q, U). Nevertheless the quantitative results of the volumetric analysis of 3D images (Fig. 11) reveal much more striking and statistically significant differences in the size of the body and brain white matter between mutants and siblings, demonstrating the advantage of using 3D images. Volumetric analysis, which can be used as the basis of statistical tests, is performed on segmentation results (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X). The accuracy of the segmentation algorithm is demonstrated in this figure.

We then launched the ZBI algorithms on 11 Wt/Htz EEs (one lost sample) and 12 Hmz mutant EEs, to estimate EE and brain white matter volumes. This volumetric analysis clearly revealed that the mutants were smaller than their Wt/Htz siblings (Fig. 10G; Welch test: $p=5 \times 10^{-08}$), confirming the overall growth deficits observed in these mutants. Furthermore, despite the much smaller white matter volume in the mutants (Welch test, $p=3 \times 10^{-06}$) (Fig. 10H), the volume of the white matter relative to global EE volume was no smaller in the mutants than in the wild type (Fig. 10I), strongly suggesting that this mutation affected brain growth, but that the decrease in brain white matter volume was no greater than the decrease in the growth of other organs, instead being associated with general dwarfism. A visual analysis of the images recorded revealed a normal morphology of the brain.

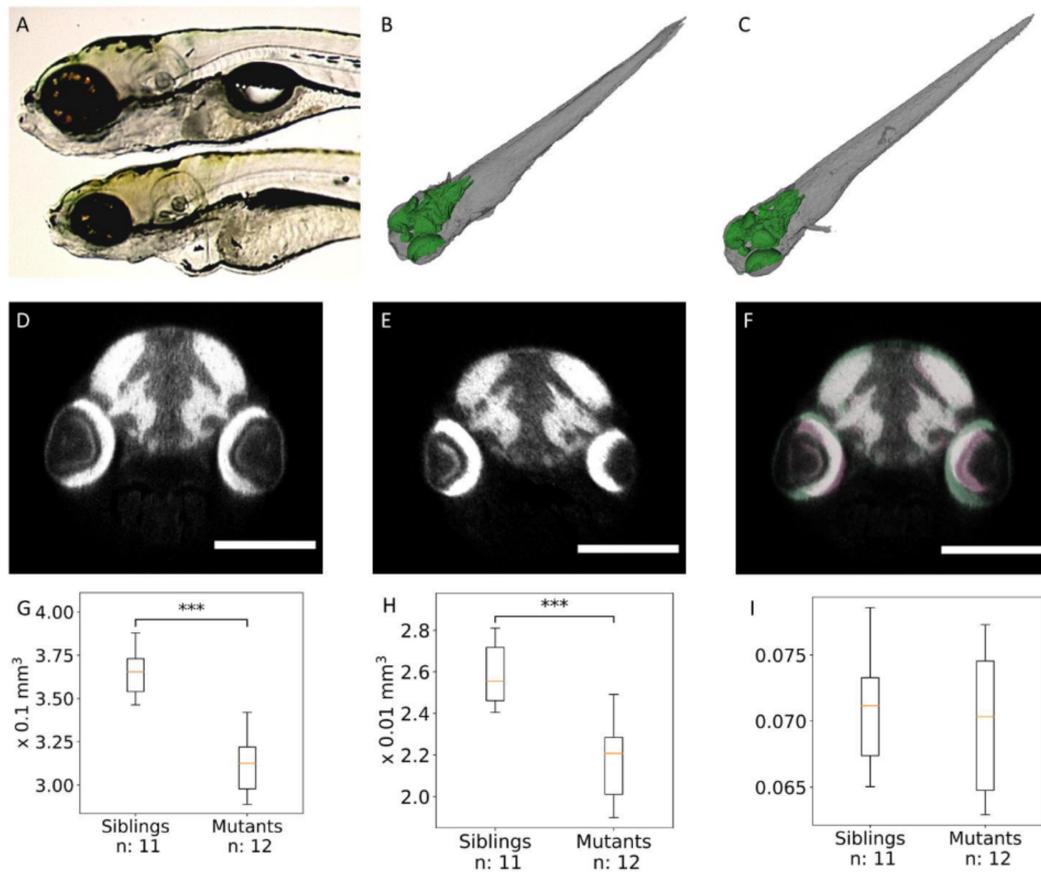


Fig. 10 Volumetric analysis of white matter and of the whole body in *Wdr12* mutants reveals statistically significant global hypomorphy

(A) Wide-field microscopy of 6 dpf EEs. The wild type is shown at the top, and the *wdr12*^{hi3120Tg/hi3120Tg} mutants below. The mutants have smaller eyes, but it is not clear whether brain size differs between the mutants and their siblings (source Zfin). (B-C) 3D surface rendering of segmentations. EE in gray, white matter in green. These visualizations reveal no obvious difference between mutants and their siblings. (B) WT or Htz mutants (C) Hmz mutants. (D-E) Transverse sections. The mutants clearly have smaller eyes, but it is not possible to distinguish between the brain phenotypes of the mutants and their siblings on these 2D pictures. (F) Superimposition of the transverse sections shown in D and E. Siblings in green, mutants in pink. (G-I) Boxplots of whole EE volumes (G), brain volumes (H) and brain-to-EE volume ratios (I). The mutants are significantly smaller than their wild-type siblings. Brain volume is also significantly smaller in the mutants. However, EE and brain volume decreases are homothetic.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

This study highlights the power of our approach for detecting and confirming, with as few as 12 samples, discrete differences, with significantly EE and brain volumes in the mutants, not otherwise clearly visible and which have not been reported before. Fast volumetric analysis successfully generated statistically significant results from as few as 12 3D images (Fig. 10G-H). The identification of brain volume defects in eight mutants is therefore possible by imaging only two dishes containing 48 samples. This proposed method paves the way for other refined analyses involving other brain markers or other organs.

HCA for assessing the effect of early developmental exposure to environmentally relevant concentrations of 5-fluorouracil

We estimated the performance of the ZeBrainInspector platform for large-scale HCI in toxicology, by treating zebrafish EEs with 5-fluorouracil (5-FU). The active concentrations of 5-FU used were as reported by [Kovács et al., \(2016\)](#), and corresponded to approximately one million times the concentrations found in the environment ([Kosjek et al., 2013](#)) and 2 to 40 times the concentrations found in the plasma of human patients treated for colon cancer ([Casale et al., 2004](#)).

We tested five concentrations, by placing five batches of 20 recently spawned eggs in six-well plates. We included two controls in each experiment (embryo medium alone, and embryo medium/DMSO). The controls were placed in separate dishes, to prevent any toxicity due to the passage of 5-FU in air. For all treatments, EEs were exposed to 5-FU for five days, starting one hour post-fertilization, with daily renewal of the medium. Each day, mortality was recorded and the dead fish, a maximum of three dead fish per batch (see figure for *n*), were removed, with no significant difference between control and treated EEs (not shown). Most samples appeared indistinguishable from the controls under the dissecting microscope. Only about 20% of the EEs exposed to 2 g/L 5-FU presented obvious abnormalities: a short body axis and head, microphthalmia, cardiac edema, an abnormal swim bladder and short yolk vesicle (Fig. 11B).

1 We measured EE volume with ZBI (Fig. 11I). The EEs incubated with the highest 5-FU concentrations
2 were significantly smaller. This finding contrasts with previous reports that, surprisingly, found no
3 effect or even an increase in fish size due to 5-FU treatments (Kovács et al., 2016). We suggest that
4 these contradictory results may reflect differences in the timing of treatment. Ng et al. (2020)
5 initiated treatment at 5dpf, whereas we initiated treatment less than one hour after spawning, as
6 we hypothesized that this would maximize 5-FU entry into the chorion. Indeed the perivitelline space
7 continues to grow until 1 hpf, due to osmotic water inflow, with the chorion subsequently hardening
8 and becoming less permeable. This hypothesis was confirmed by experiments involving treatment
9 initiation at later time points (>6 hpf), for which no defects were induced, even at high doses (data
10 not shown).
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Our analysis revealed a significant decrease in the volume of the brain white matter (Fig. 11J), more
25 marked than that for whole EE volume (Fig. 11I), as shown by the ratio of the white matter and EE
26 volumes (Fig. 11K). Interestingly, this difference was not obvious on transverse sections (Fig. 11C-H).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Thus, using 3D images, we were able to detect discreet defects that were not otherwise obvious.

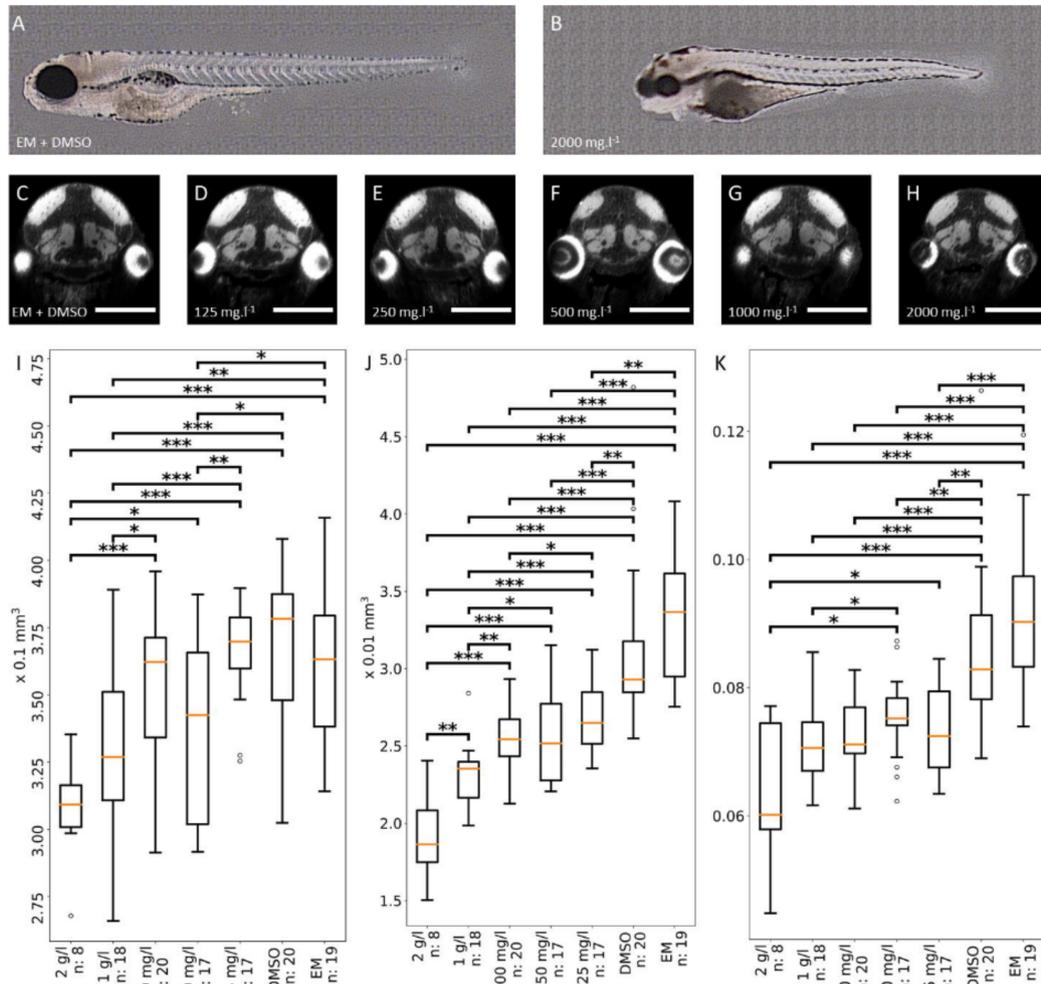


Fig. 11 Medically relevant concentrations of 5-FU lead to dwarfism and microcephaly

(A) Dissecting microscope side view of a control EE. (B) Corresponding side view of an EE treated with 2 g/L 5-FU, with a short body axis, cardiac edema, and diverse abnormalities. (C-H) Transverse 2D sections through the midbrains of control zebrafish or fish exposed to 5-FU appear to be similar. Identical levels were selected for brain sectioning. However, due to variations in the orientations of sections, the eyes were not always sectioned at the same level. (AC control EE exposed to DMSO. (D-H) EE exposed to 125, 250, 500, 1000 and 2000 mg/L 5-FU, respectively. Scale bar = 250 μm (G-L) (I-K) Boxplots of whole EE volumes. (I), brain volumes (J) and brain-to-EE volume ratios (K). EEs treated with high concentrations of 5-FU are significantly smaller than controls. Their brains are also significantly smaller. Moreover, white

matter/whole EE volume ratios indicate that brains the decrease in brain size is greater than the decrease in overall EE
body size, suggesting that 5-FU may specifically affect neurogenesis, causing strong microcephaly.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7 Overall, these results from our platform reveal that the exposure of zebrafish embryos to medically
8 relevant concentrations of 5-FU very early in growth affects growth and brain white-matter size, as
9 expected for treatment with an antiproliferative agent.
10
11
12
13
14

15 **Conclusion and Perspectives**

16
17
18 We have developed a fast and flexible high-resolution 3D image acquisition and analysis platform for
19 HCI on 5 dpf EEs: ZeBraInspector. The basic volumetric analysis of this pipeline can be performed
20 with simple lipophilic dye labeling, but more specialized phenotypes can be investigated by
21 integrating immunohistochemical labeling for appropriate epitopes or using transgenic lines
22 expressing a fluorophore in the region/tissue of interest. Standardized rearing, staining, mounting
23 and imaging techniques ensure consistent quality and the obtainment of the large number of 3D
24 images required for statistical analysis at population level. As a convenient way of interacting with
25 the automated volumetric analysis, a graphical user interface enables users to review data quality
26 and to sample the population on the basis of preprocessed, lightweight representations of the raw
27 data. This interface also can be used for the analysis of highly variable phenotypes resulting from
28 zebrafish mutants. For example, it can be used to sort samples with various degrees of defect and to
29 analyze transgene expression or antibody labeling patterns more reliably.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 The modular nature of our processing pipeline makes it possible to integrate additional analysis
48 modules, which can be developed specifically for a given application. The active development of
49 additional analysis modules is currently focused on the integration of machine learning, to accelerate
50 the image segmentation process for volumetry, and non-rigid registration to increase the sensitivity
51 of detection for volumetrically neutral deformations within the sample. For larger studies, we foresee
52 an increase in productivity through the further robotization of specimen handling during mounting
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 and image acquisition, through the use of 96-well plates and, if possible in the study concerned, a
2 decrease in sampling rate.
3

4 This pipeline was tested in studies of subtle volumetric aberrations in transgenic mutants and of the
5 neurodevelopmental impact of an ecotoxic compound. It could be modified and scaled to any
6 application involving investigations of the impact of test compounds on an entire, physiologically
7 intact vertebrate model organism, at a holistic level.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Bibliography

- 1
2
3
4
5 Affaticati, P., Simion, M., De Job, E., Rivière, L., Hermel, J.-M., Machado, E., Joly, J.-S., Jenett, A., 2017.
6 zPACT: Tissue clearing and immunohistochemistry on juvenile zebrafish brain. *Bio Protoc* 7.
7 doi:10.21769/BioProtoc.2636
8
9
10
11
12 Albert-Smet, I., Marcos-Vidal, A., Vaquero, J.J., Desco, M., Muñoz-Barrutia, A., Ripoll, J., 2019.
13 Applications of light-sheet microscopy in microdevices. *Front. Neuroanat.* 13, 1.
14 doi:10.3389/fnana.2019.00001
15
16
17
18
19 Alessandri, K., Andrique, L., Feyeux, M., Bikfalvi, A., Nassoy, P., Recher, G., 2017. All-in-one 3D printed
20 microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide. *Sci. Rep.* 7, 42378.
21 doi:10.1038/srep42378
22
23
24
25
26
27 Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P.J., Schorderet, D.F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., Warner, S.,
28 2019. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab. Anim.* 23677219869037.
29 doi:10.1177/0023677219869037
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Beaumont, K.A., Anfosso, A., Ahmed, F., Weninger, W., Haass, N.K., 2015. Imaging- and flow
cytometry-based analysis of cell position and the cell cycle in 3D melanoma spheroids. *J. Vis.
Exp.* e53486. doi:10.3791/53486
- Brombin, A., Joly, J.-S., Jamen, F., 2015. New tricks for an old dog: ribosome biogenesis contributes
to stem cell homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 34, 61–70. doi:10.1016/j.gde.2015.07.006
- Brooks, S.S., Wall, A.L., Golzio, C., Reid, D.W., Kondyles, A., Willer, J.R., Botti, C., Nicchitta, C.V.,
Katsanis, N., Davis, E.E., 2014. A novel ribosomopathy caused by dysfunction of RPL10 disrupts
neurodevelopment and causes X-linked microcephaly in humans. *Genetics* 198, 723–733.
doi:10.1534/genetics.114.168211
- Bruneel, B., Witten, P.E., 2015. Power and challenges of using zebrafish as a model for skeletal tissue
imaging. *Connect. Tissue Res.* 56, 161–173. doi:10.3109/03008207.2015.1013193
- Buitrago Santanilla, A., Regalado, E.L., Pereira, T., Shevlin, M., Bateman, K., Campeau, L.-C.,

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Schneeweis, J., Berritt, S., Shi, Z.-C., Nantermet, P., Liu, Y., Helmy, R., Welch, C.J., Vachal, P., Davies, I.W., Cernak, T., Dreher, S.D., 2015. Organic chemistry. Nanomole-scale high-throughput chemistry for the synthesis of complex molecules. *Science* 347, 49–53. doi:10.1126/science.1259203
- Cappabianco, F.A.M., Ribeiro, P.F.O., de Miranda, P.A.V., Udupa, J.K., 2019. A General and Balanced Region-Based Metric for Evaluating Medical Image Segmentation Algorithms, in: 2019 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP). Presented at the 2019 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), IEEE, pp. 1525–1529. doi:10.1109/ICIP.2019.8803083
- Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C.D., Costa, M., Mairone, L., Zara, G.P., Fornari, G., Eandi, M., 2004. Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacol. Res.* 50, 173–179. doi:10.1016/j.phrs.2004.01.006
- Cernak, T., Gesmundo, N.J., Dykstra, K., Yu, Y., Wu, Z., Shi, Z.-C., Vachal, P., Sperbeck, D., He, S., Murphy, B.A., Sonatore, L., Williams, S., Madeira, M., Verras, A., Reiter, M., Lee, C.H., Cuff, J., Sherer, E.C., Kuethe, J., Goble, S., Dreher, S.D., 2017. Microscale high-throughput experimentation as an enabling technology in drug discovery: application in the discovery of (piperidinyl)pyridinyl-1h-benzimidazole diacylglycerol acyltransferase 1 inhibitors. *J. Med. Chem.* 60, 3594–3605. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01543
- Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., van Doornmalen, E., Rutjes, H., Savy, T., D’Amico, D., Terriente, J., 2017. Zeglobaltox: an innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18040864
- Couprrie, M., 2011. PINK image processing library. Presented at the European Python Scientific Conference.
- Davis, E.E., Frangakis, S., Katsanis, N., 2014. Interpreting human genetic variation with *in vivo* zebrafish assays. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1960–1970. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.024
- Donoughe, S., Kim, C., Extavour, C.G., 2018. High-throughput live-imaging of embryos in microwell arrays using a modular specimen mounting system. *Biol. Open* 7. doi:10.1242/bio.031260

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Early, J.J., Cole, K.L., Williamson, J.M., Swire, M., Kamadurai, H., Muskavitch, M., Lyons, D.A., 2018. An automated high-resolution *in vivo* screen in zebrafish to identify chemical regulators of myelination. *elife* 7. doi:10.7554/eLife.35136
- Guo, Y., Veneman, W.J., Spaink, H.P., Verbeek, F.J., 2017. Three-dimensional reconstruction and measurements of zebrafish larvae from high-throughput axial-view *in vivo* imaging. *Biomed. Opt. Express* 8, 2611–2634. doi:10.1364/BOE.8.002611
- Halder, M., Léonard, M., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T., Lillicrap, A., 2010. Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 484–491. doi:10.1002/ieam.48
- Hunter, J.D., 2007. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* 9, 90–95. doi:10.1109/MCSE.2007.55
- Jarque, S., Fetter, E., Veneman, W.J., Spaink, H.P., Peravali, R., Strähle, U., Scholz, S., 2018. An automated screening method for detecting compounds with goitrogenic activity using transgenic zebrafish embryos. *PLoS ONE* 13, e0203087. doi:10.1371/journal.pone.0203087
- Kintel, M., Wolf, C., 2020. OpenSCAD, The Programmers Solid 3D CAD Modeller [WWW Document]. URL <https://www.openscad.org/> (accessed 6.11.20).
- Kleinhans, D.S., Lecaudey, V., 2019. Standardized mounting method of (zebrafish) embryos using a 3D-printed stamp for high-content, semi-automated confocal imaging. *BMC Biotechnol.* 19, 68. doi:10.1186/s12896-019-0558-y
- Kosjek, T., Perko, S., Žigon, D., Heath, E., 2013. Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. *J. Chromatogr. A* 1290, 62–72. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.046
- Kovács, R., Bakos, K., Urbányi, B., Kövesi, J., Gazsi, G., Csepeli, A., Appl, Á.J., Bencsik, D., Csenki, Z., Horváth, Á., 2016. Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 14718–14729. doi:10.1007/s11356-015-5036-z
- Lempereur, S., Jenett, A., Machado, E., Arganda-Carreras, I., Simion, M., Affaticati, P., Joly, J.-S.,

- 1 Talbot, H., 2020. Automated segmentation of thick confocal microscopy 3D images for the
2 measurement of white matter volumes in zebrafish brains. *Mathematical Morphology - Theory*
3 *and Applications* 4, 31–45. doi:10.1515/mathm-2020-0100
4
5
6
7 Ng, M., DeCicco-Skinner, K., Connaughton, V.P., 2020. Using zebrafish to assess the effect of chronic,
8 early developmental exposure to environmentally relevant concentrations of 5-fluorouracil and
9 leucovorin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 76, 103356. doi:10.1016/j.etap.2020.103356
10
11
12
13
14 Planchart, A., Mattingly, C.J., Allen, D., Ceger, P., Casey, W., Hinton, D., Kanungo, J., Kullman, S.W.,
15 Tal, T., Bondesson, M., Burgess, S.M., Sullivan, C., Kim, C., Behl, M., Padilla, S., Reif, D.M.,
16 Tanguay, R.L., Hamm, J., 2016. Advancing toxicology research using *in vivo* high throughput
17 toxicology with small fish models. *ALTEX* 33, 435–452. doi:10.14573/altex.1601281
18
19
20
21
22
23
24 Pulak, R., 2016. Tools for automating the imaging of zebrafish larvae. *Methods* 96, 118–126.
25 doi:10.1016/j.ymeth.2015.11.021
26
27
28
29 Roper, C., Tanguay, R.L., 2018. Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology, in:
30 *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. Elsevier, pp. 143–151. doi:10.1016/B978-0-12-
31 809405-1.00012-2
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Tainaka, K., Murakami, T.C., Susaki, E.A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., Ikemura, M., Ushiku, T., Shimizu, Y., Murakami, M., Tanaka, K.F., Iino, M., Kasai, H., Sasaoka, T., Kobayashi, K., Miyazono, K., Ueda, H.R., 2018. Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents. *Cell Rep.* 24, 2196-2210.e9. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.056
- van der Walt, S., Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., scikit-image contributors, 2014. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2, e453. doi:10.7717/peerj.453
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S.J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K.J., Mayorov, N., Nelson, A.R.J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C.J., SciPy 1.0 Contributors, 2020. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* 17, 261–272. doi:10.1038/s41592-019-0686-2
- Westhoff, J.H., Giselbrecht, S., Schmidts, M., Schindler, S., Beales, P.L., Tönshoff, B., Liebel, U., Gehrig, J., 2013. Development of an automated imaging pipeline for the analysis of the zebrafish larval kidney. *PLoS ONE* 8, e82137. doi:10.1371/journal.pone.0082137
- Wittbrodt, J.N., Liebel, U., Gehrig, J., 2014. Generation of orientation tools for automated zebrafish screening assays using desktop 3D printing. *BMC Biotechnol.* 14, 36. doi:10.1186/1472-6750-14-36
- Xiaoqin Tang, van't Hoff, M., Hoogenboom, J., Yuanhao Guo, Fuyu Cai, Lamers, G., Verbeek, F., 2016. Fluorescence and bright-field 3D image fusion based on sinogram unification for optical projection tomography, in: 2016 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM). Presented at the 2016 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM), IEEE, pp. 403–410. doi:10.1109/BIBM.2016.7822552
- Yaniv, Z., Lowekamp, B.C., Johnson, H.J., Beare, R., 2018. SimpleITK Image-Analysis Notebooks: a Collaborative Environment for Education and Reproducible Research. *J. Digit. Imaging* 31, 290–

303. doi:10.1007/s10278-017-0037-8

Zhou, Y., Yan, J., Xu, B.Y., Wang, B.C., 2019. The study on mechanical properties of Phytigel medium.

IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 346, 012089. doi:10.1088/1755-1315/346/1/012089

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RÉSULTAT NON PUBLIÉ 1 : SBLC: UN ALGORITHME POUR COMPENSER DES GRADIENTS DE MARQUAGES

Du fait de nombreuses étapes de traitements, d'échantillons potentiellement variables, et d'événements perturbateurs comme l'adhérence des échantillons aux parois des tubes ou l'adhérence des échantillons entre eux, les marquages immuno-histochimiques peuvent être de qualité variable. Il est donc souvent compliqué d'optimiser un marquage par anticorps, en particulier pour des expériences dites *in toto*, impliquant par exemple une larve de poisson zèbre entière. Les difficultés rencontrées avec le marquage par anticorps anti-HuC/D (qui marque les cellules en neurogenèse de façon complémentaire aux marqueurs lipophiles qui marquent principalement les fibres neuronales) nous a obligé à mettre au point une procédure de compensation des défauts de marquage. En partant d'une hypothèse physique simple, nous avons supposé que la concentration de marquage au sein d'un tissu suivait une loi de décroissance exponentielle selon la profondeur. L'algorithme de compensation de défaut de marquage a été nommé *segmentation-based label compensation* (SBLC). Dans la suite de cette section je présente les hypothèses, une description de l'algorithme créé, une présentation des résultats obtenus et finalement une discussion des limites de ce procédé.

8.1 LA DÉCROISSANCE DES MARQUAGES SUIT UNE LOI EXPONENTIELLE FONCTION DE L'ÉPAISSEUR DES TISSUS TRAVERSÉS

Dans un tissu fixé, la diffusion des anticorps peut être modélisée comme un mouvement brownien. Dans le cadre d'une coupe mince, les anticorps vont circuler dans le milieu sans contrainte. Une coupe mince de cerveau de poisson zèbre a une épaisseur comprise entre 2 et 25 μm . La surface est ainsi tellement grande par rapport au volume qu'il est possible de marquer rapidement et uniformément la coupe.

Dans le cadre de tissus plus épais, les anticorps vont interagir avec le tissu, et ce dernier va limiter la pénétration de l'anticorps. De manière homologue à la diffusion de la chaleur, on peut alors modéliser la diffusion des anticorps dans le tissu comme une exponentielle décroissante. En partant de ce principe, on peut en déduire que la concentration en anticorps est corrélée à l'épaisseur de tissu traversé. Ainsi, il paraît possible de corriger un défaut de marquage par l'application d'une correction suivant la profondeur des tissus pénétrés par

l'anticorps. Les hypothèses posées m'ont donc permises de mettre au point une méthode de correction d'un défaut de marquage immunohistochimique se basant sur la profondeur de tissus pénétrée par les anticorps. En utilisant une méthode de correction similaire au SBD-DCC (voir [Section 4.3](#) et [Chapitres 6](#)), nous avons ainsi mis au point un algorithme permettant la correction d'un tel défaut de marquage.

8.2 SBLC CORRIGE LES DÉFAUTS DE PÉNÉTRATION DES MARQUEURS SELON UNE STRATÉGIE SIMILAIRE À CELLE DÉVELOPPÉE POUR CORRIGER LES DÉFAUTS DE PÉNÉTRATION DE LA LUMIÈRE

L'obtention de la segmentation de l'échantillon entier est un pré-requis au calcul de cet algorithme. Une manière de réaliser cette segmentation a été présentée en [Chapitres 6](#).

La première étape de l'algorithme est le calcul d'une carte des distances. Ces distances sont mesurées depuis la surface de la région segmentée. Ainsi, cette carte indiquera le nombre de voxels minimal qu'il faut traverser pour atteindre chaque voxel au sein de la segmentation. Cette carte va ainsi générer des lignes concentriques au sein de l'échantillon. De cette manière, il est possible de modéliser l'épaisseur de tissus qu'un anticorps a dû traverser avant d'atteindre un point précis.

En utilisant cette carte, on peut alors mesurer la valeur médiane de fluorescence pour chaque épaisseur de tissu. De manière analogue au SBDDCC, on normalise la valeur des médians des valeurs de gris au médian le plus élevé. Si la profondeur d'une couche est supérieure à la profondeur de la couche ayant le plus grand médian, on multiplie tous les pixels de cette profondeur par le quotient de la valeur médiane maximale et de la valeur médiane de la profondeur de la couche. De cette manière, un défaut de marquage immunohistochimique induisant une perte croissante de l'intensité de la fluorescence avec l'épaisseur de tissus à pénétrer pour l'anticorps peut être compensé.

Afin de visualiser les résultats de cet algorithme, un fantôme théorique a été créé. Pour cela, une ellipse comportant des valeurs de gris aléatoirement attribuées entre 1 et 4095 a été générée. Cette image est appelée F (voir [Figure 34a](#)). On conserve les contours de l'ellipse, que l'on considérera par la suite comme la segmentation de l'échantillon (voir [Figure 34b](#)). On calcule la carte des distances au sein de l'ellipse originelle. Cette carte est appelée P (voir [Figure 34c](#)). On va ensuite calculer pour chaque couche un coefficient de décroissance. En prenant pour demi-vie le quart de la profondeur maximale dans l'échantillon (62), on calcule alors la valeur d'une exponentielle décroissante pour chaque profondeur (63). Ces coefficients sont alors utilisés pour reproduire l'effet d'une déperdition exponentielle au sein de chaque couche en multipliant les valeurs de gris d'une couche par

le coefficient calculé pour cette profondeur (64). De plus, un seuillage est appliqué (65) pour supprimer les valeurs trop basses dans les zones ayant été dégradées. Le résultat de l'application de cette décroissance exponentielle est visible en Figure 34d.

$$t_{1/2} = \frac{\max(P)}{4} \quad (62)$$

$$\forall e \in [1 ; \max(P)], \eta(e) = e^{-t/t_{1/2}} \quad (63)$$

$$\forall x \in I, D(x) = \eta(P(x)) * F(x) \quad (64)$$

$$\forall x \in D, T(x) = \begin{cases} D(x), & \text{si } P(x) < \frac{\max(P)}{2} \\ D(x), & \text{si } P(x) > \frac{\max(P)}{2} \text{ et } D(x) > 10 \\ 0, & \text{autrement} \end{cases} \quad (65)$$

L'image ainsi produite est ensuite corrigée en utilisant le SBLC (voir Figure 34e). En comparant visuellement le résultat au modèle d'origine, il est difficile d'observer une différence à l'oeil nu. Afin de confirmer cette impression, on a calculé pour chaque voxel le ratio entre le modèle et le résultat de la correction sur l'image dégradée (66). La visualisation de ce ratio est visible en Figure 34f.

$$\forall x \in F, R(x) = \left| 1 - \frac{T(x)}{F(x)} \right| \quad (66)$$

8.3 CETTE APPROCHE, BIEN QUE RAPIDE, N'EST PAS APPLICABLE À TOUS LES MARQUEURS

Dans le cadre des marquages immuno-histochimiques, cette approche peut donc permettre de compenser des défauts de pénétration d'anticorps. Certains anticorps, comme anti-HuC/D, présente des gradients de marquages importants. La région marquée ayant une taille importante, il est difficile d'obtenir un marquage homogène sur l'ensemble des tissus. Le SBLC pourrait ainsi permettre de compenser ce défaut de marquage en corrigeant informatiquement les valeurs de gris.

En raison des pré-requis nécessaires à l'emploi de cette méthode, plusieurs limites d'utilisation sont prévisibles.

Tout d'abord, cette méthode nécessite que le marquage à corriger suive un gradient régulier suivant la profondeur de tissus. L'emploi

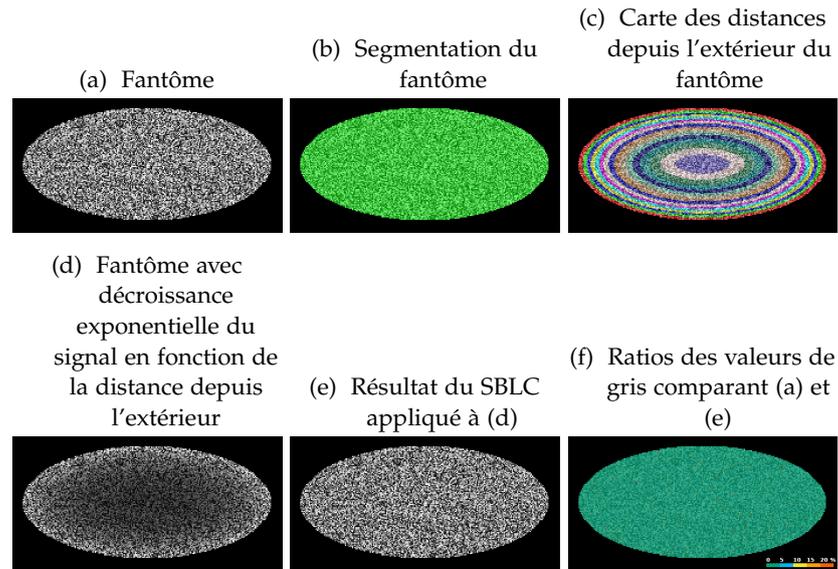


Figure 34: Illustration du segmentation-based label compensation (SBLC) par l'emploi d'un fantôme.

Comme le montre la comparaison entre (d) et (e), le SBLC permet de compenser une atténuation exponentielle.

d'un anticorps marquant une zone limitée dans l'espace pourrait ainsi être problématique, car le signal qui serait amplifié ne serait que du bruit de fond.

Pour un exemple plus concret, imaginons un antigène présent uniquement sur la peau du poisson zèbre. Les anticorps se fixeraient alors sur la peau, ce qui impliquerait une fluorescence induite uniquement sur les couches superficielles de l'échantillon. L'image obtenue serait alors saturée autour de la peau, et quasi-nulle au sein de l'échantillon. Même si l'emploi du SBLC dans ce contexte paraît peu adapté, imaginons le résultat de son application sur cette image. Pour les voxels de la peau, les valeurs de gris ne seraient que peu modifiées. À l'intérieur de l'échantillon, deux cas de figures apparaissent. Si le voxel à corriger a une valeur nulle, alors l'emploi d'une multiplication n'induirait aucun changement. En revanche, si la valeur du voxel est différente de zéro, la normalisation de la valeur de ce voxel lui attribuerait une valeur proche des valeurs de gris des régions d'intérêt. L'échantillon se verrait ainsi artificiellement "rempli" par un signal n'existant pas (voir [Figure 35](#)).

A contrario, cette approche ne s'appliquant qu'à partir de l'épaisseur où le médian des valeurs de gris décroît, un signal présent uniquement dans la profondeur de l'échantillon ne serait que peu modifié par cet algorithme. Il est donc impossible de compenser un défaut de marquage d'antigènes se trouvant dans les parties les plus profondes de l'échantillon. Imaginons le marquage d'un antigène se trouvant dans l'hypothalamus d'un poisson zèbre à 5 dpf. Cette ré-

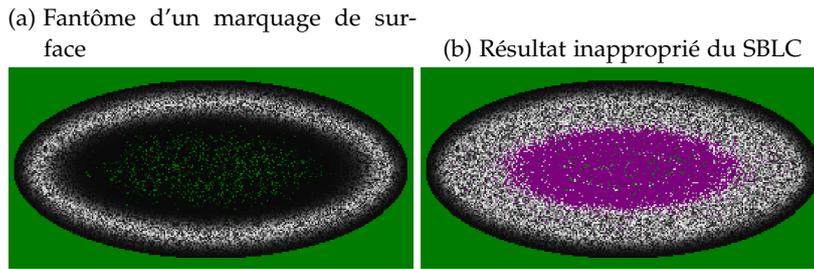


Figure 35: Modélisation de l'utilisation du SBLC sur un marquage de surface.

Dans ce cas, le SBLC entraîne une augmentation du bruit, pouvant aller jusqu'à saturation. Il est donc contre-indiqué d'utiliser cet algorithme pour ce type de marquage.

Les voxels ayant une valeur de gris nulle ou supérieure à 4095 sont représentés respectivement en vert et en magenta.

gion étant une des régions les plus profondes au sein d'un poisson zèbre à ce stade, un défaut de marquage ne pourrait pas être compensé, car il serait alors impossible de différencier le signal positif du bruit de fond se trouvant au niveau de la peau. Ce défaut présente en soit une qualité car il permet de s'assurer qu'aucun signal ne sera créé *ex-nihilo* (voir [Figure 36](#)).

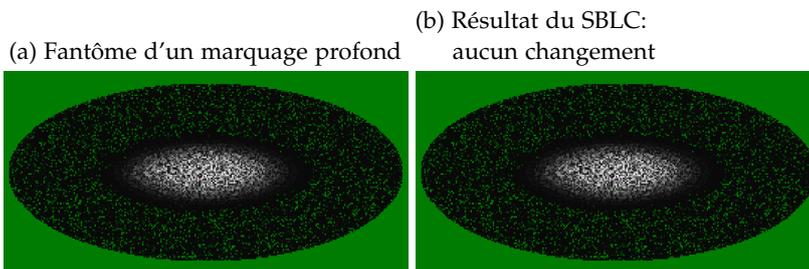


Figure 36: Modélisation de l'emploi du SBLC sur un marquage profond.

Sur ce type de marquage, le SBLC n'induit aucune modification. Son utilisation ne présente donc pas d'intérêt sur des marquages profonds de bonne qualité, comme ceux obtenus par révélation anticorps de lignées rapportrices de gènes puissamment exprimés.

Les voxels ayant une valeur de gris nulle sont représentés en vert.

Par ailleurs, cet algorithme étant basé sur la multiplication de chaque couche par un coefficient, un signal ayant complètement disparu ne pourra pas être récupéré (voir [Figure 37](#)). Les méthodes de clarification des larves de poisson zèbre restent donc indispensables. En leur absence, le centre de la larve possède en effet des signaux trop faibles pour que cet algorithme puisse compenser la perte trop forte de signal.

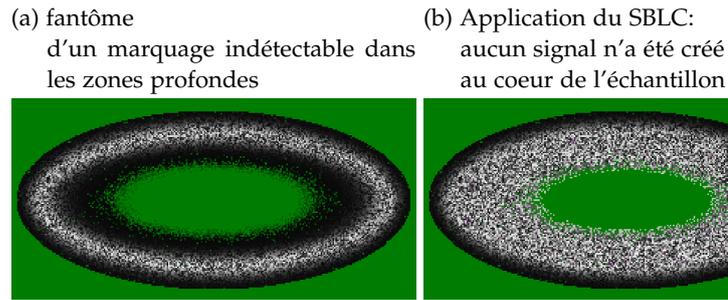


Figure 37: Modélisation de l'emploi du SBLC sur un marquage indétectable au coeur de l'échantillon.

Cette approche n'est pas en mesure de corriger des signaux non détectés. Elle ne crée donc pas de signal *ex-nihilo*.

Les voxels ayant une valeur de gris nulle sont représentés en vert.

Enfin, cette approche se basant sur un quotient entre valeur médiane maximale et valeur médiane pour la profondeur considérée, cette méthode permet de ne pas modifier un échantillon ayant été correctement marqué. En effet, si les valeurs médianes ne sont que peu modifiées au fur et à mesure que l'on pénètre dans l'échantillon, le SBLC ne modifiera que très peu les valeurs de gris des couches.

RÉSULTAT NON PUBLIÉ 2 : L'UTILISATION D'UN MARQUEUR PAN-NEURONAL PERMET DE DÉTECTER LA MATIÈRE GRISE AU SEIN DU CERVEAU DU POISSON ZÈBRE

9.1 LE MARQUAGE ANTI-HUC POUR DÉTECTER LES DÉFAUTS DE NEUROGENÈSE OU COMPLÉTER L'ESTIMATION VOLUMÉTRIQUE DU CERVEAU

HuC est une protéine spécifique des neurones. Elle se lie à l'ARN, et a un rôle de régulation de la neurogénèse. Cette protéine, aussi connue sous le nom d'Elav-13, est présente dans l'ensemble des neurones. Cette protéine est fortement conservée au cours de l'évolution. Le poisson zèbre possède ainsi une protéine homologue à 89% à la protéine HuC humaine. Chez le poisson zèbre, cette protéine est présente dans l'ensemble du système nerveux. L'utilisation d'un anticorps anti-HuC permet ainsi un marquage pan-neuronal du poisson zèbre. Trois marquages prédominants sont tout de même visibles. Un premier marquage se trouve au niveau de la matière grise du cerveau. Un second marquage se trouve dans les couches de la rétine. Le dernier marquage se trouve autour du système digestif. Un marquage anti-HuC permet donc la détection de la matière grise cérébrale, à condition d'être en mesure de séparer les neurones cérébraux des autres régions. En couplant ce marquage avec un marqueur lipophile comme le DiI, on peut détecter l'ensemble du volume cérébral, car le volume de la matière blanche est estimé par le DiI et celui de la matière grise par l'anticorps anti-HuC. Dans la suite, j'expose un algorithme permettant de segmenter automatiquement les régions HuC positives du cerveau, je propose une méthode d'estimation de la qualité des segmentations, pour terminer par une discussion sur les perspectives offertes par cette approche.

9.2 LA SEGMENTATION DE LA MATIÈRE GRISE EST RÉALISÉE PAR LIGNE DE PARTAGE DES EAUX

De manière analogue à la segmentation de la matière blanche (voir [Chapitres 6](#)), la segmentation de la matière grise par la segmentation d'un marquage anti-HuC est réalisée par l'utilisation de lignes de partage des eaux (voir [Section 2.1.2](#)). Pour cette stratégie, il est nécessaire d'établir une carte topologique et une liste de marqueurs. Afin d'obtenir la carte topologique, on commence par réaliser une ouverture de l'image. Cette étape agit comme un filtre passe-bas, qui

lisse l'image. De cette manière, on réduit l'impact du bruit sur la segmentation que l'on souhaite obtenir. Pour obtenir la carte topologique désirée, on calcule un demi-gradient morphologique sur l'image ouverte. Le demi-gradient consiste en la soustraction de l'image à la dilatation de l'image par un élément structurant sphérique de la taille d'un voxel. Deuxièmement, on définit des marqueurs afin de différencier l'objet que l'on cherche à segmenter du reste de l'image. Pour obtenir la liste de marqueurs, on commence par calculer un seuillage d'Otsu sur l'image d'origine. Comme vu en [Section 2.1.1](#), ce seuillage va séparer les voxels en deux groupes ayant une variance interne minimale. De cette manière, on peut supposer que ce seuillage fournit une segmentation approximative de la zone d'intérêt. Cependant, ce seuillage va conserver toutes les régions présentant un marquage important. Afin d'éliminer des régions non désirées, comme le tube digestif, on ne conserve que l'objet le plus gros résultant de la segmentation.

Cet objet va ensuite servir à attribuer une valeur à chaque maxima local de l'image. Les maxima locaux se trouvant dans l'objet sont considérés comme à l'intérieur, quand les autres maxima sont considérés à l'extérieur de la zone d'intérêt. De cette manière, on obtient la liste des marqueurs permettant de calculer les lignes de partage des eaux. Cette liste consiste en une image où chaque voxel a une valeur comprise entre 0 et 2. Au sein de cette image, 0, 1 et 2 indiquent respectivement un voxel neutre, un voxel externe et un voxel interne à la région d'intérêt.

En utilisant la carte topologique et la liste de marqueurs, on peut maintenant calculer une segmentation par ligne de partage des eaux. Ainsi, on obtient une segmentation de la matière grise cérébrale.

9.3 CET ALGORITHME EST PRÉCIS, MAIS TRÈS SENSIBLE AUX DÉFAUTS DE MARQUAGE

Afin de mesurer les erreurs induites par notre procédure de segmentation, nous avons demandé à un spécialiste d'effectuer la segmentation manuelle de la matière grise de six poissons zèbres à 5 dpf. En comparant les segmentations manuelles aux segmentations automatiques, nous avons pu mesurer le coefficient de Sørensen-Dice (SDC) pour ces segmentations. Nous avons ainsi obtenu un SDC ayant une valeur moyenne de 0.860 ± 0.014 . Une telle valeur est compatible avec la mise en place d'une procédure d'analyse haut-débit.

Cependant, notre algorithme possède plusieurs faiblesses prévisibles. Tout d'abord, l'emploi d'un seuillage initial par Otsu peut poser problème. Ce seuillage crée deux classes de voxels par minimisation de la variance au sein des deux groupes de voxels. Cela est bien adapté dans le cas de signaux bien différenciés créant deux régions

avec des valeurs de gris bien séparées (voir Figure 38a, Figure 38c et Figure 38e).

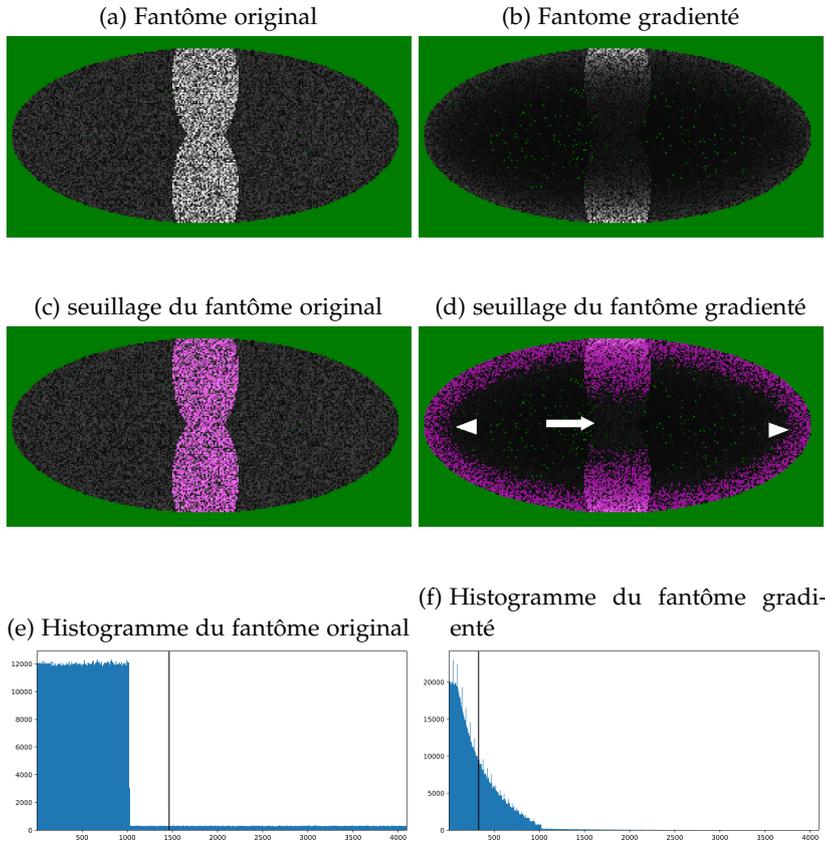


Figure 38: Représentation d’une limite des seuillages d’Otsu

La présence d’un gradient induit une diminution de la valeur seuil(e;f). La nouvelle valeur de seuil peut devenir suffisamment basse pour détecter du bruit de fond ((d): têtes de flèche). A l’inverse, le signal d’intérêt peut ne plus être détecté si sa valeur devient inférieure à la valeur seuil ((d): flèche).

Les voxels ayant une valeur de gris nulle sont représentés en vert. Les voxels segmentés par seuillage d’Otsu sont représentés en magenta. Les barres noires verticales au sein des histogrammes représentent la valeur du critère d’Otsu.

Cependant, si une hétérogénéité apparaît au sein d’une des régions, le résultat peut être fortement modifié. Prenons pour exemple le cas d’une image présentant une intensité lumineuse allant de la surface vers le centre de l’échantillon(voir Figure 38b). Dans cette situation, deux types de défauts de segmentations peuvent apparaître (voir Figure 38d). Le premier est une sous-segmentation de la région d’intérêt (Flèche dans la Figure 38d). Le second est l’apparition d’une sur-segmentation à l’extérieur de l’échantillon (Tête de flèche dans la Figure 38d). L’apparition de ces deux défauts de segmentation induit une mauvaise affectation des maxima locaux, ce qui va induire un

défaut prévisible de segmentation. Il s'agit d'une des raisons ayant amenée au développement du SBLC (voir [Chapitres 8](#)).

Un autre défaut est la restriction au plus grand objet de l'image. Imaginons un défaut dans la matière grise qui produirait une séparation entre la partie gauche et la partie droite du cerveau. La réduction au plus grand objet supprimerait alors l'un des deux hémisphères cérébraux. Dans le cas où le volume de la matière grise serait fortement réduit comme chez les mutants homozygotes *Fbl* (voir [Section 5.1](#)), il est possible que le volume de la matière grise devienne plus petit que le volume du signal autour du tube digestif, par exemple. De plus, la segmentation de petits éléments isolés au sein du cerveau est ainsi impossible, comme les corps cellulaires se trouvant au sein du toit optique. Afin de supprimer cette étape il serait possible de mettre en place une procédure utilisant la segmentation de la matière blanche. En conservant seulement les objets proches de la segmentation de la matière blanche, il serait alors possible de compenser ce défaut.

Part III

DISCUSSION - PERSPECTIVES

ZBI POURRAIT ÊTRE ADAPTÉ À D'AUTRES MARQUEURS ET D'AUTRES ORGANISMES MODÈLES. OPTIMISATIONS FUTURES.

10.1 DISCUSSION SUR LES PERSPECTIVES OFFERTES PAR LE PIPELINE ZBI DÉVELOPPÉ AU COURS DE MA THÈSE

Les résultats obtenus avec le marqueur lyphophilique pour l'analyse des mutants fibrillarine et *wdr12* démontrent clairement tout l'intérêt de ce marqueur pour pointer vers des problèmes morphologiques dans le cerveau d'eleuthéroembryon(EE) de poisson zèbre. Toutefois, ce marqueur qui a la propriété de révéler essentiellement les fibres des neurones ne permet pas de comprendre la nature et l'origine des défauts observés extrêmement variables qui peuvent perturber la mise en place du système nerveux. Problème de différenciation neuronale? Neurogenèse retardée? Problèmes développementaux plus globaux et précoces?

Dans la [Section 10.2](#), je propose une liste d'un certain nombre de marqueurs à développer et valoriser grâce au pipeline ZBI.

Plusieurs autres directions de travail pour optimiser ZBI et le rendre flexible, hormis l'application à d'autres modèles animaux ([Section 10.3](#)), sont aussi envisageables à court terme. En introduction je donne ci dessous l'exemple, de quelques projets en cours en particulier avec la contribution de Matthieu Simion, Fabrice Licata et Payel Chatterjee.

Un résultat intéressant des expériences 5-Fu est l'influence de la date de début de traitement. Seul le traitement précoce qui permet l'entrée massive du produit conduit à un effet d'hypomorphie claire et reproductible. Il pourrait être en lien avec les effets du produit sur les clivages précoces, la gastrulation et la neurulation.

Un important paramètre dans ce type de test toxicologique est donc la capacité du produit à traverser le chorion. En ce qui concerne par exemple les perturbateurs endocriniens [21], ils traversent le chorion sans problème d'où la possibilité d'effectuer des traitements quotidiens avec un temps d'initiation des traitements plus simple à déterminer.

En premier lieu, le pipeline ZBI et son logiciel semblent dans ce cadre bien adaptés pour améliorer le test OCDE EASZY [22] (Banerjee, Lempereur, travail en cours), car le marquage DiI permettra pour une part de réaligner les larves in silico (gain de temps) et permettra une extraction de photos parfaitement orientées des patrons aromatasase (*cyp 19b*). Cela pourrait être une nouvelle application publi-

able à court terme de ZBI dans le cadre du projet ANR FEATS obtenu par TPS et coordonné par Francois Brion de l'INERIS. Par ailleurs, j'espère que la publication du pipeline ZBI engendrera de nombreuses autres applications.

Une autre application pourrait être d'appliquer ZBI à d'autres stades du poisson zèbre. En post-éclosion, l'épithélium très cohésif ne laisse pas passer les molécules chimiques. L'EE, alevin vésiculé dont le vitellus n'est pas encore résorbé, ne mange pas non plus et utilise sans doute encore beaucoup de respiration cutanée et peu de respiration branchiale. Un second type de test toxicologique à des stades plus tardifs de poisson zèbre pourrait être testé avec la plateforme ZBI.

L'élevage de poisson zèbre dans des eaux polluées ou nourris avec des aliments contenant des composés toxiques pourrait durer de 5 à 21 jours ce qui diversifierait beaucoup les modes d'administration et les phénotypes possibles à observer (par exemple la différenciation sexuelle). On pourrait alors aussi utiliser ZBI sur des poissons zèbres à 21 jours post-fertilisation(DPF). Payel Banerjee pourrait dans un avenir proche débiter de telles expériences, sur la base de l'optimisation qu'elle réalise de l'utilisation de ZBI pour l'étude de la régénération chez le poisson zèbre entre 21 dpf et 28 dpf.

ZBI devrait se révéler très adapté pour extraire des données concernant le toit optique. En effet, après redressement des larves, il devrait être possible de les faire tourner autour de leur axe principal pour placer dans une orientation permettant l'observation optimal du toit optique, un objet privilégié d'étude au TPS, et de régler l'épaisseur des coupes optiques sur lesquelles on souhaite appliquer une projection maximale, afin de visualiser une projection de l'ensemble du tectum sur une seule image 2D. Ainsi, en utilisant le marqueur lipophile, on pourra déterminer l'emplacement de l'ensemble du toit optique et d'une potentielle blessure réalisée préalablement. Avec le pipeline ZBI, j'espère avec Payel Banerjee que le toit optique permettra d'analyser en 2D la migration de cellules gfp+ vers cette blessure, et que le toit optique du poisson zèbre devienne un tissu privilégié pour étudier les mécanismes de la régénération du système nerveux central des vertébrés avec de potentielles applications chez l'homme.

10.2 L'ADAPTATION DE ZEBRAINSPECTOR À D'AUTRES MARQUAGES POURRAIENT PERMETTRE D'APPROFONDIR L'ÉTUDE DU POISSON ZÈBRE

10.2.1 *D'autres marqueurs cérébraux pourraient permettre d'apporter des informations complémentaires*

Dans le cadre de cette thèse, deux marqueurs du système nerveux ont été employés. Le DiI a été utilisé car il permettait de marquer la ma-

tière blanche. Le marquage par anticorps anti-HuC a été ajouté pour permettre de détecter la matière grise. Ces deux marqueurs permettent d'avoir une première approximation du volume cérébral. Cependant, l'utilisation de certains marqueurs spécifiques pourrait apporter des informations supplémentaires pour étudier le cerveau du poisson zèbre.

Zonula occludens-1 (ZO-1) est une protéine membranaire impliquée dans la formation de jonctions serrées. Cette protéine est produite par le gène *tjp1a*. Ce gène possède des orthologues chez l'humain, la souris et le poisson zèbre. Chez le poisson zèbre, cette protéine se retrouve en particulier dans la couche de cellules bordant les ventricules cérébraux. Le marquage de cette protéine peut ainsi servir de marqueur de la surface des ventricules. La segmentation de ce marquage pourrait alors permettre de déterminer le volume du ventricule. Chez l'humain, l'augmentation du volume des ventricules cérébraux est associée à l'hydrocéphalie, par exemple une complication possible de la tuberculose, en particulier chez les patients atteints par le VIH. Par analogie, l'analyse du volume des ventricules peut donc être intéressante dans le cadre de l'étude des infections cérébrales chez le poisson zèbre. De plus, l'étude de ZO-1 permet la détection chez le poisson zèbre d'une augmentation du volume des ventricules en cas de scolioses [201].

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) est une protéine impliquée dans la réplication du génome, la réparation et la recombinaison de l'ADN. On retrouve ainsi cette protéine dans l'ensemble des zones de prolifération cellulaires. Au sein du cerveau de poisson zèbre, les zones de prolifération se trouvent principalement autour des ventricules. Couplés à un marquage anti-HuC et DiI, le marquage de PCNA pourrait ainsi permettre d'étudier l'ensemble des cellules formant le cerveau, à l'exclusion de populations cellulaires marginales comme les méninges ou les cellules souches.

10.2.2 *L'adaptation de ZeBraInspector à des marqueurs vasculaires permettrait d'utiliser le poisson zèbre pour comprendre la formation de cancers chez l'humain*

En adaptant les algorithmes de segmentation automatique de ZBI, il sera possible de créer une plateforme d'HTA pour d'autres tissus.

Parmi les types cellulaires demandant le plus d'adaptation des algorithmes se trouvent certainement le système vasculaire, les systèmes lymphatiques, veineux et artériels. En effet, la segmentation automatique de structures curvilignes pose de nombreux problèmes, et la mise au point d'algorithmes permettant une détection robuste de ce type de structures est encore en cours [129, 136, 137]. Cependant, la mise en place d'une procédure d'analyse automatique du système vasculaire est importante car il existe de nombreuses causes de mo-

difications du système vasculaire qui impactent fortement le système nerveux. Prenons deux exemples.

Les tissus cancéreux présentent souvent une vascularisation importante. Il est alors important d'étudier la formation de la vascularisation des tumeurs malignes, ce que l'on appelle angiogénèse tumorale. La compréhension de l'angiogénèse tumorale peut ainsi permettre de prédire l'apparition de cancers et aussi permettre de trouver de nouveaux traitements thérapeutiques. Le poisson zèbre est employé depuis de nombreuses années comme modèle pour l'étude de l'angiogénèse tumorale [64, 111, 139]. Il est pertinent d'étudier l'angiogénèse tumorale du poisson zèbre car les mécanismes moléculaires de l'angiogénèse sont similaires à ceux que l'on observe chez l'humain [194].

De nombreuses molécules ont un effet sur le développement du système vasculaire des foetus humains [101]. La consommation de tabac par inhalation de fumée chez les femmes enceintes entraîne des modifications de l'angiogénèse du foetus. On note ainsi que ces foetus présentent une diminution du diamètre des vaisseaux et des défauts de l'arborescence vasculaire. L'étude de l'exposition de poisson zèbre à 5 dpf à des concentrés de fumée de cigarette montre des effets variés [48, 124]. On peut en particulier noter l'apparition d'hémorragies cérébrales ou une diminution de la fréquence cardiaque. L'étude du réseau vasculaire de poisson zèbre pourrait ainsi permettre de mieux prédire la toxicité de telles molécules qui affectent au premier chef le système vasculaire.

Afin de marquer le système vasculaire, nous avons utilisé trois marqueurs très utilisés par la communauté poisson zèbre travaillant sur le système vasculaire.

Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et leurs récepteurs paraissent être une cible de choix dans l'étude du système vasculaire, ces protéines étant nécessaires à l'angiogénèse et la vasculogénèse [13]. Leur étude permet ainsi d'étudier la néoangiogénèse induite par l'apparition de tumeur [139]. KDR est un récepteur des VEGF présentant un gène orthologue chez le poisson zèbre et chez l'humain. Son marquage par immuno-histochimie ou l'emploi de lignées rapportrices permet donc d'étudier le système vasculaire du poisson zèbre [176].

Une autre possibilité est l'étude du facteur de transcription FLI1 (Friend leukemia integration 1). Cette protéine est impliquée dans l'angiogénèse, et se retrouve donc dans le système cardiovasculaire. Il s'agit ainsi d'une cible de choix dans l'étude du système vasculaire du poisson zèbre [111].

10.3 ZBI POURRAIT ÊTRE UTILISÉE POUR D'AUTRES ORGANISMES MODÈLES

L'ensemble des algorithmes présentés précédemment ont été développés sur le poisson zèbre. Bien qu'il s'agisse du modèle aquatique le plus largement utilisé en laboratoire, il n'est pas nécessairement pertinent pour l'étude de la toxicologie de composés chimiques pour l'humain, du fait de sa distance évolutive, et effectuer des tests sur plusieurs espèces semble être un moyen d'éviter d'obtenir des conclusions erronées. L'adaptation des travaux présentés précédemment à d'autres modèles animaux pourrait donc être réalisée. Nous allons maintenant présenter ce que ZBI pourrait apporter à l'étude des trois espèces présentées en [Section 1.2](#).

10.3.1 *L'utilisation de ZBI sur le médaka ne demanderait que peu de modifications*

Dans le cadre de ma thèse, j'ai essayé d'utiliser les algorithmes développés pour le recalage et la segmentation de poissons zèbres de 5 dpf sur des images de médakas à 10 dpf (voir [Section 1.2.1](#)). Un exemple d'application de l'algorithme de recalage est ainsi visible en [Figure 39](#). Ces données restent préliminaires, car je n'ai pas pu reproduire ces expériences sur suffisamment d'échantillons provenant d'expériences indépendantes. De plus, je n'ai pas réalisé de mesures quantitatives de la précision de segmentation, par comparaison avec des segmentations manuelles. L'emploi de ces algorithmes sur cet autre organisme modèle ne demanderait donc simplement qu'une validation des algorithmes de segmentation ainsi qu'une multiplication des essais pour valider la reproductibilité des résultats obtenus.

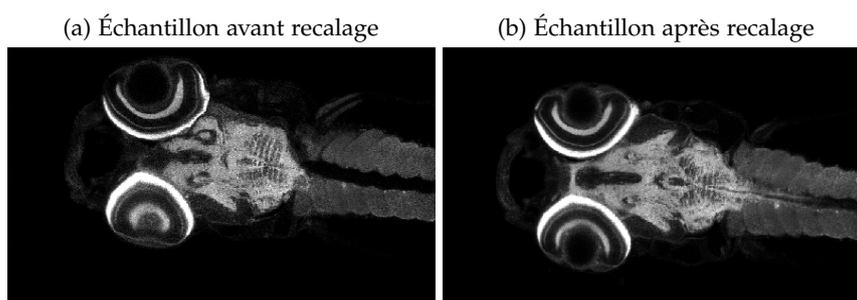


Figure 39: Application du recalage à un échantillon d'*Oryzias latipes*. À la vue de ce résultat, l'utilisation des algorithmes développés pour le poisson zèbre semble possible sans modification.

10.3.2 *L'adaptation de ZBI au xénope nécessiterait la création de nouveaux tampons en plus d'une modification des algorithmes*

Ces dernières années, les méthodes de clarification de tissus mises au point chez le poisson zèbre et la souris ont été adaptées avec succès au *Xenopus laevis* [2, 53]. Il est donc déjà possible d'employer notre procédure d'imagerie haut-débit. Il pourrait cependant être nécessaire de développer de nouveaux tampons afin de simplifier le montage des échantillons tout en améliorant ainsi la robustesse de l'acquisition automatique. Enfin, la forme du cerveau des têtards de xénopes présentant une forte différence avec le cerveau du poisson zèbre à 5 dpf, une adaptation des algorithmes de segmentation risque d'être nécessaire pour permettre d'automatiser l'analyse de ces échantillons.

10.3.3 *L'adaptation de ZBI à des coupes de cerveaux de souris permettrait l'étude de maladies neurodégénératives*

De nombreuses méthodes de clarification optiques de tissus ont été mises au point chez la souris [187, 195]. La taille des échantillons est cependant incompatible avec la mise en place de procédures d'imagerie haut-débit. Il serait cependant possible d'adapter les procédures informatiques à ces échantillons. Ainsi, l'utilisation du segmentation-based depth-dependent contrast correction et du segmentation-based label compensation permettrait d'améliorer l'analyse de tissus transparisés. Le segmentation-based label compensation pourrait permettre de réduire le temps nécessaire au marquage immunohistochimique en compensant le gradient de marquage périphérique. Le segmentation-based depth-dependent contrast correction permettrait de réduire l'importance de la déperdition lumineuse pour l'imagerie d'organe entier. L'adaptation des procédures de segmentations automatiques pourraient permettre d'accélérer l'analyse préliminaire des échantillons. Par exemple, l'utilisation des algorithmes de segmentations sur des modèles d'étude de sclérose en plaque pourrait permettre d'effectuer des cribles de médicament permettant le traitement de cette maladie. A TPS, l'imagerie de tranches de cerveaux de rats transparisés à large échelle a été optimisée dans le cadre d'un projet financé par la Fondation Leducq. Des méthodes de segmentation des vaisseaux ont été optimisées par Arnim Jenet afin d'étudier d'éventuels défauts des jonctions glio-vasculaires dans certains rats possédant des mutations dans la dystrophine. Les mutations de cette protéine engendrent habituellement des myopathies, comme la myopathie de Duchenne ou de Becker. Ce n'est cependant pas le cas des mutants étudiés, qui présentent à la place des défauts cognitifs sévères (collaboration Cyrille Vaillend). L'étude du ratio entre matière blanche et volume du cerveau pourrait ainsi à des stades relativement précoces, où le cerveau a encore une taille de seulement quelques mil-

limètres, permettre de détecter de potentielles modifications dans le volume de myéline induites par un traitement médicamenteux.

10.4 PLUSIEURS PISTES POUR ACCÉLÉRER ET RENDRE PLUS REPRODUCTIBLES LES ACQUISITIONS

Dans l'état actuel du projet, de nombreuses étapes du protocole d'imagerie haut-débit nécessitent encore de lourds et longs investissements en main d'oeuvre. L'automatisation de ces étapes pourrait ainsi permettre d'augmenter le rendement de ce procédé. De plus, il serait possible de libérer les opérateurs humains actuellement nécessaires, permettant ainsi leur implication dans des projets de développement technologiques plutôt qu'aux seules routines de traitement. J'envisage donc différentes voies d'amélioration permettant l'optimisation de l'imagerie haut-débit.

10.4.1 *L'utilisation de robot-pipeteurs permettrait des expériences d'immuno-histochimie moins chronophages et plus reproductibles*

Actuellement, le traitement immuno-histochimique des échantillons est l'étape la plus longue du protocole d'imagerie haut-débit. Il représente à lui seul deux tiers du temps nécessaire au crible haut-contenu. Malheureusement, il semble difficilement possible de réduire le temps nécessaire à cette étape, car la plus grande partie des opérations consiste en des bains nécessairement longs, pour que les marquages avec le marqueur lipophile ou bien les marquages anticorps puissent pénétrer dans la profondeur des tissus des larves. Les temps imposés par ces marquages empêchent le lancement de ces traitements certains jours de la semaine, car il serait alors nécessaire d'imposer à l'opérateur de travailler le week-end.

De plus, avec des robots, il serait possible de lancer un plus grand nombre de lots au même moment. Actuellement, l'expérience montre qu'un opérateur humain ne peut pas traiter plus de cent larves par semaine. L'imagerie d'un échantillon d'un EE de poisson zèbre est effectué en moyenne en huit minutes. Il est donc possible d'imager cent échantillons en moins d'une journée. En tenant compte du temps nécessaire au montage de ces échantillons, à l'équilibration du milieu d'imagerie et du temps nécessaire à la mise en place des paramètres d'imagerie, il est donc possible d'imager cent échantillons par jour sur un seul microscope. De son côté, les segmentations présentées précédemment demandent dix minutes de calcul sur un ordinateur ayant une architecture standard. Sans parallélisation des calculs, il est donc possible de traiter cent échantillons en environ dix-sept heures. En prenant donc compte des week-ends, il serait en principe possible d'imager et de segmenter cinq cents échantillons par semaine. Le traitement immuno-histochimique par un opérateur humain in-

duit donc une perte de rendement de quatre-vingts pourcents. L'automatisation de ce traitement pourrait donc permettre d'atteindre les pleines capacités de traitement de ce processus sans nécessité de personnel supplémentaire.

Ce problème peut être résolu par l'emploi de robots pipeteurs comme ceux de la marque Eppendorf (présents à TPS) et qui sont en cours d'adaptation pour ces protocoles. Ces robots, comme l'*epmotion d'Eppendorf*, permettent d'automatiser les changements de milieu, d'automatiser les lavages entre les différentes étapes et d'assurer une plus grande reproductibilité des résultats en limitant les opérations à effectuer par des opérateurs humains. Ces appareils fonctionnant parfaitement seuls, il serait donc possible de lancer le traitement d'échantillons à n'importe quel moment de la semaine. De plus, l'appareil effectuant seul les lavages nécessaires entre les différents bains, l'opérateur humain serait ainsi libéré de ces étapes longues et fastidieuses. De plus, la plupart de ces robots sont enfermés dans des enceintes. Ce paramètre permet d'assurer un meilleur contrôle de critères comme la température, assurant ainsi les meilleures conditions pour le traitement des échantillons. Enfin, ces appareils sont pour la plupart capables de traiter plusieurs plaques en parallèles. Certains modèles proposant le traitement de 5 plaques 96 puits, il est donc possible de traiter quatre cent quatre vingt échantillons en une seule fois. De cette manière, il est possible d'assurer le même traitement à l'ensemble des échantillons. L'utilisation d'un tel robot pourrait donc permettre de faire coïncider le nombre d'échantillons produits par semaine avec les capacités d'imagerie et de segmentations.

Cependant, l'emploi de tel robot demande un plus grand temps de préparation. Actuellement, les échantillons sont traités en lot dans des tubes de 5 ml, chaque tube pouvait contenir environ dix échantillons. Cependant, l'utilisation de robot pipeteur nécessite souvent l'utilisation de plaque 96 puits. Il est donc nécessaire de placer une larve par puits, ce qui est aussi une tâche longue et fastidieuse. Cependant, la mise en place des échantillons dans des plaques 96 puits peut être accélérée par un robot pipeteur d'embryons mis au point par le **KIT** à Karlsruhe. Son acquisition avait été envisagée par TPS dans le cadre du projet d'investissement d'avenir TEFOR mais il n'a pas été réalisé par manque de temps et de demande des utilisateurs pour des traitements à grande échelle par TPS.

10.4.2 *Le montage, un enjeu important pour réduire le temps du crible haut-contenu*

Le montage des échantillons est actuellement réalisé par un opérateur (voir [Section 7.1](#)). Pour rappel, il s'agit de placer manuellement chaque échantillon dans une encoche créée dans une semelle d'a-

garose solubilisée dans du milieu de culture d'embryons de poissons zèbres. Ainsi, une personne expérimentée a besoin d'une demi-journée de travail pour pouvoir monter cent échantillons. De plus, la solubilisation de l'agarose dans un milieu principalement aqueux est source de problème. Nous allons donc maintenant voir des solutions permettant de réduire le temps nécessaire au montage.

La nécessité d'apparier l'indice de réfraction du milieu à l'indice de réfraction de l'échantillon ralentit le processus. L'agarose étant solubilisé dans du milieu de culture d'embryons de poissons zèbres, la semelle utilisée comme guide possède une grande quantité d'eau. Une fois recouverte de solution pour l'appariement de l'indice de réfraction (MD^+), l'eau présente dans la semelle diffuse dans le MD^+ , ce qui diminue l'indice de réfraction du milieu d'imagerie. Avant l'imagerie, il est donc nécessaire de réaliser plusieurs changements de milieux afin de s'assurer d'avoir l'indice de réfraction désiré. Ces changements de milieux successifs induisent plusieurs problèmes. Tout d'abord, ils augmentent le temps nécessaire entre le montage et l'imagerie. Ensuite, les mouvements d'eau entre la semelle et le milieu d'imagerie entraînent un stress mécanique pour les échantillons. Ce stress mécanique peut alors entraîner un décollement des échantillons de la semelle d'agarose, ou bien un décollement de la semelle du fond de la boîte utilisée pour le montage. Enfin, le MD^+ étant une solution très visqueuse, l'homogénéité du milieu est difficile à assurer. Il est ainsi possible que le milieu d'imagerie ne soit pas homogène, ce qui induit un indice de réfraction irrégulier dans la plaque.

Afin de résoudre ce problème, la solubilisation de l'agarose dans du MD^+ a été réalisée par Matthieu Simion. De cette manière, la semelle d'agarose possède déjà l'indice de réfraction voulu. Ceci entraîne donc une réduction du nombre de changement de bains. Cette solution n'avait pas été envisagée précédemment car la viscosité des premières versions de milieu d'appariement de l'indice de réfraction empêchait la solubilisation de l'agarose. Cependant, le développement récent du MD^+ , solution moins visqueuse, a permis de résoudre ce problème.

L'automatisation du montage est difficilement réalisable en utilisant le dispositif actuel. En effet, la forme des puits imprimés dans les semelles d'agarose empêche de monter les larves avec un volume de liquide important, d'où la stratégie de montage avec un pinceau. Si une trop grande quantité de liquide était déposée en même temps que l'échantillon, l'échantillon risquerait de sortir de son puits ou d'être mal stabilisé par le phytigel. Pour des échantillons de poisson zèbre à 5 dpf, les puits ont un volume inférieur à 2mm^3 . Le pipetage d'échantillon de poisson zèbre nécessite au minimum une dizaine de microlitres, ce qui empêcherait l'emploi de robot de pipetage de larves qui distribue les larves dans un volume minimum d'environ 100 microlitres. Afin de permettre le pipetage des échantillons par un robot,

il pourrait simplement être nécessaire de créer de nouveaux tampons permettant de former dans l'agarose des pyramides au dessus des puits initiaux ne contenant pas d'agarose, afin de ne pas gêner l'imagerie par nos très gros objectifs. Aussi, en augmentant la distance existante entre deux échantillons et l'épaisseur d'agarose, il serait possible de pipeter une plus grande quantité de liquide tout en assurant que les échantillons ne ressortent pas des puits. Mais aussi en séchant légèrement au préalable les moules d'agarose, il est probable que l'agarose ait la capacité d'absorber le liquide déposé. Une autre possibilité, impliquant probablement des imprimantes plus performantes serait d'imprimer une grille sous les puits dans un tampon qui serait placé sous le moule d'agarose. Ainsi on pourrait favoriser l'écoulement du liquide.

De plus, un autre problème du montage automatisé est l'orientation aléatoire des échantillons, certaines orientations étant incompatibles avec la mise en place d'une procédure de crible haut-contenu. Ainsi, l'orientation parfaitement latérale induit par exemple des abérations lors de l'imagerie du cerveau moyen, car même si la dépigmentation a été préalablement réalisée, l'épithélium de la rétine n'est pas transparent aux rayons des lasers des microscopes confocaux et induit une perte d'information dans les tissus situés sous elle.

Une solution à court terme pour résoudre ce problème d'orientations pourrait être d'enlever les yeux avant imagerie, une opération relativement rapide. On pourrait aussi optimiser un protocole permettant d'imager au travers des yeux, ou finalement de trouver une forme de puits adaptée permettant de contraindre la larve à être dans une orientation pseudo-dorsale dans son puits. De tels puits ont été développés par l'équipe der Wittbrodt [215] pour des stades plus précoces (de 24 à 48 hpf).

Une autre possibilité de montage a émergé ces dernières années. Il s'agit de l'utilisation de dispositifs utilisant la microfluidique [96]. Ces dispositifs consistent en l'impression d'un piège dans un matériau polymère, comme du polystyrène ou du polydiméthylsiloxane. Dans l'utilisation la plus courante, le dispositif est recouvert d'une lamelle afin de permettre d'imager les échantillons. Cette procédure est incompatible avec l'imagerie par objectif à lentille plongeante. Mais une fois chaque échantillon en place, il pourrait être possible de les fixer dans leur position en venant placer une goutte de phytigel au dessus de chaque échantillon.

La mise en place de tels dispositifs pouvant permettre de monter rapidement un grand nombre d'échantillons, la simplification du paramétrage de l'imagerie deviendra une étape cruciale pour permettre d'assurer le meilleur rendement de la procédure d'imagerie haut-débit développée.

10.4.3 *Le préscan des plaques permettrait l'optimisation des acquisitions*

Actuellement, le paramétrage est déjà largement automatisé, que ce soit par l'emploi du logiciel Matrix Screener pour les microscopes Leica ou bien Jobs pour les microscopes Nikon. Ces logiciels permettent ainsi de fournir une série d'informations physiques concernant la plaque à acquérir afin d'automatiser l'acquisition de chaque échantillon. Mais de nombreuses limites existent encore. Je vais donc maintenant décrire deux de ces limites, tout en proposant à chaque fois une solution.

Une première limitation est la détection des échantillons. Il est actuellement obligatoire de demander à un opérateur humain de fournir la position du premier échantillon, puis de lui faire calibrer la position du premier champ d'acquisition en fonction de l'ensemble des échantillons. En effet, la position des échantillons dans chaque puits n'est pas identique, en fonction de la taille de l'échantillon. La mise en place d'une procédure de pré-scan en utilisant une loupe fluorescente ou une procédure précédant l'acquisition sur le microscope confocal utilisé pourrait ainsi permettre d'automatiser la détection de la position de chaque échantillon au sein de la plaque fournie. Une fois ces positions connues, il serait alors possible de déterminer automatiquement la position optimale des champs d'acquisition.

Une seconde limitation est la détection du nombre de plan d'acquisitions nécessaires en Z. De manière similaire à la position du premier champ optique, il est actuellement nécessaire de déterminer les positions du premier et du dernier plan d'acquisition permettant l'acquisition entière de l'ensemble des échantillons. Deux éléments rendent cette vérification nécessaire. Le premier provient du montage. La profondeur des encoches faites dans l'agarose n'est pas constante. Ainsi, un échantillon se trouvant plus proche du bord le plus large du puits sera plus bas qu'un échantillon plus proche du bord le plus fin. L'opérateur utilisant la plage de largeurs proposée pour positionner au mieux les échantillons, les échantillons vont donc présenter plusieurs profondeurs en fonction de la taille de l'échantillon. Un second problème potentiel peut venir d'un mauvais parallélisme entre la platine d'acquisition et l'objectif. Étant donné la faible taille des échantillons imagés et la grande taille des moules, un mauvais positionnement peut entraîner une divergence importante en Z.

Cette vérification peut être réalisée lorsque peu d'échantillons sont imagés mais est bien plus fastidieuse lorsqu'il s'agit de vérifier la position en Z de 96 échantillons. Pour résoudre ce problème, il serait possible de mettre en place un préscan à faible résolution des deux positions limites de chaque échantillon. Durant ce pré-scan, les positions des plans seraient repoussés d'un plan vers l'extérieur si le plan limite étudié contient de l'information.

En conclusion, l'essentiel de l'optimisation de l'imagerie consistera en la reconnaissance par des pré-scans par les microscopes confocaux des échantillons, afin d'éviter les pertes de temps liées à l'acquisition de zones sans échantillons (actuellement programmées pour éviter de rogner l'image d'une larve par une acquisition trop justement programmée) cette optimisation devrait être facilement réalisable en raison des marqueurs utilisés. Aussi, avec l'augmentation de la taille des échantillons (par exemple des alevins entiers d'un mois), il sera nécessaire d'augmenter la vitesse d'acquisition, ce qui pourra se faire par de futures générations de microscopes. En effet, à l'heure actuelle, pour de tels échantillons, nous sommes contraints de diminuer la résolution des images jusqu'à quatre microns si plus de douze échantillons sont acquis en une nuit, ce qui pourrait limiter la bonne détection de fibres, vaisseaux petites cellules ou noyaux.

FUTURES AMÉLIORATIONS DES ALGORITHMES DE ZBI ET ÉLARGISSEMENT DU CHAMP DES APPLICATIONS

11.1 VERS UN RECALAGE PLUS ROBUSTE ET DES SEGMENTATIONS PLUS PRÉCISES ET VERSATILES

Dans leurs états actuels, les algorithmes de segmentation, relativement lents, permettent d'obtenir des résultats robustes. En revanche, les algorithmes de recalage présentent des failles prévisibles possibles à corriger dans le futur. Je présente ci-dessous des pistes pour améliorer les segmentations et le recalage, ainsi que des solutions pour réduire les temps de calculs nécessaires.

11.1.1 *L'étude de la symétrie du cerveau permettrait d'améliorer la qualité du recalage*

La méthode de recalage actuellement développée est basée sur la segmentation automatique des cristallins ainsi que sur une segmentation grossière de la matière blanche. Cet algorithme possède un certain nombre de défauts, principalement liés à l'utilisation des cristallins, qui malheureusement ne sont pas détectables dans toutes les souches de poisson zèbre, en particulier celles qui possèdent des mutations de pigmentation .

Avec plusieurs mutations de pigmentation, la souche de poisson zèbre casper présente une forte dépigmentation sur tout le corps [213], qui la rend très utile en imagerie du poisson zèbre [28, 73, 209], en permettant d'étudier les patrons de protéines fluorescentes natives. Lors de la clarification des échantillons, elle permet ainsi d'éviter l'étape de dépigmentation, qui dénature les protéines fluorescentes, et rend nécessaires les longs protocoles utilisant des anticorps. Néanmoins, chez les casper, la rétine reste pigmentée, ce qui rend impossible la pénétration de la lumière dans l'oeil et donc l'observation du cristallin, indispensable au recalage

Il est possible d'adapter l'algorithme de segmentation du cristallin à la segmentation de l'oeil pour définir un axe de référence permettant le recalage. En effet, l'oeil est recouvert par une structure marquée par les marqueurs lipophiles, au moins dans la partie supérieure. Ainsi, dans une image 3D obtenue avec un microscope confocal, l'oeil prend la forme d'une demie sphère possédant des valeurs de gris nulles. En diminuant le coefficient de sphéricité utilisé pour reconnaître les cristallins, l'algorithme va identifier l'oeil comme le plus

grand objet quasi-sphérique et obscur au sein de l'EE. Ainsi, l'axe inter-oculaire est identifié comme axe de référence. Néanmoins, comme l'oeil est plus grand que le cristallin, il est possible que les échantillons soient moins précisément recalés.

Une seconde possibilité consiste à identifier un plan de symétrie permettant de définir un premier axe de référence. Comme le cerveau est symétrique par rapport au plan sagittal, il devrait être aussi possible d'utiliser le vecteur normal au plan de symétrie de la segmentation de la matière blanche comme axe de référence. Ainsi, le recalage ne se baserait que sur la segmentation de la matière blanche. De nombreuses publications décrivent des algorithmes de détection automatique du plan de symétrie du cerveau, en particulier dans des images acquises par imagerie par résonance magnétique ou par scanner [140, 166, 189]. En adaptant ces méthodes publiées au poisson zèbre, on obtiendrait sans doute un algorithme ayant une robustesse supérieure.

Cependant, la segmentation de la matière blanche est actuellement effectuée rapidement, et les axes obtenus par la détection de l'ellipsoïde entourant une segmentation approximative de la matière blanche pourrait induire une certaine imprécision. Une procédure de segmentation plus précise serait donc peut-être nécessaire, mais son trop long temps de calcul est actuellement incompatible avec un traitement des échantillons suffisamment rapide pour traiter de nombreux échantillons dans le cadre du crible haut-contenu. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies de segmentations plus rapides.

11.1.2 *Vers des segmentations plus rapides et plus précises avec l'apprentissage profond*

Dans le cadre de ce projet, quatre méthodes de segmentations ont été développées et validées: la segmentation de l'ensemble de l'échantillon, de la matière blanche, de la matière grise, et des cristallins. Cependant, ces segmentations sont actuellement lentes, avec une durée de deux à six minutes.

Je présente une stratégie qui pourrait permettre d'accélérer les calculs tout en obtenant des résultats précis. Durant la dernière décennie, les algorithmes d'apprentissage profond ont permis le développement d'outils pour la segmentation automatique de tout type d'organes acquis par divers systèmes d'imagerie [63, 79, 149, 220]. Ces méthodologies ont été développées car elles sont robustes et rapides une fois entraînées. Elles peuvent de plus être couplées à des annotations manuelles et l'utilisation de plusieurs annotations sur le même jeu d'entraînement permet de générer une segmentation par région d'intérêt [52, 196, 223]. La multiplication des calculs nécessaires pour obtenir les résultats de segmentation rendent nécessaire l'utilisation

de coûteuses cartes graphiques dédiées. De plus, cette méthode nécessite une étape d'entraînement du réseau de neurones qui peut être lourde [60, 92, 218]. Cette étape nécessite en effet de recalculer un grand nombre de fois les différents poids du réseau de neurones. De plus, cette étape d'entraînement nécessite des jeux d'images annotées manuellement pour indiquer les régions à segmenter. Le nombre d'images nécessaires pour cette étape est proportionnel à la profondeur du réseau de neurones, et parfois, en raison de la rareté de l'échantillon à étudier, ou bien de la complexité de la structure d'intérêt, il peut être impossible d'obtenir suffisamment d'images de référence. Des solutions doivent alors être trouvées, soit pour simplifier l'annotation, soit pour réduire le nombre d'images pour l'entraînement. Pour simplifier l'annotation, des procédures de segmentations préliminaires rapides ont été développées [165]. Elles rendent possible le calcul rapide de segmentations précises des régions d'intérêt identifiées qui pourront alors être utilisées comme images de référence pour de futures segmentations. Une autre possibilité est d'effectuer de l'apprentissage par transfert en utilisant des réseaux de neurones pré-entraînés à réaliser des segmentations automatiques différentes des segmentations désirées.

L'emploi d'une méthode d'apprentissage par réseau de neurones profonds couplé à un apprentissage par transfert pourrait ainsi permettre d'améliorer la précision de la segmentation tout en réduisant le temps de calcul nécessaire à sa réalisation.

11.1.3 *La segmentation d'autres régions d'intérêt permettrait d'augmenter la versatilité de la plateforme ZBI*

Les segmentations que j'ai développées au cours de ma thèse visent à automatiser la mesure du cerveau. Cependant, comme le montre l'exemple de la segmentation du cristallin, il est possible de détecter d'autres organes grâce aux marquages employés. De plus, comme vu en [Section 10.2](#), le développement de nouveaux marqueurs nécessitera la mise en place de nouveaux algorithmes adaptés aux objets à détecter. Je vais maintenant donner des exemples de segmentations pouvant être réalisées, ainsi que les algorithmes à développer pour automatiser ces segmentations.

Le marqueur lipophile permet de mettre en évidence les lipides, et donc l'ensemble des membranes cellulaires. De plus, l'absence de marquage au sein d'une région peut aussi permettre de les segmenter. En utilisant cette propriété, deux autres types de tissus paraissent identifiables en utilisant l'absence de marquage. La notochorde est une structure tubulaire située sous le tube neural (voir [Figure 40](#)). Elle joue le rôle de squelette pour les embryons.

Avec un marqueur lipophile, elle est reconnaissable car il s'agit d'une région de très faible intensité lumineuse. Ainsi, une fois l'EE

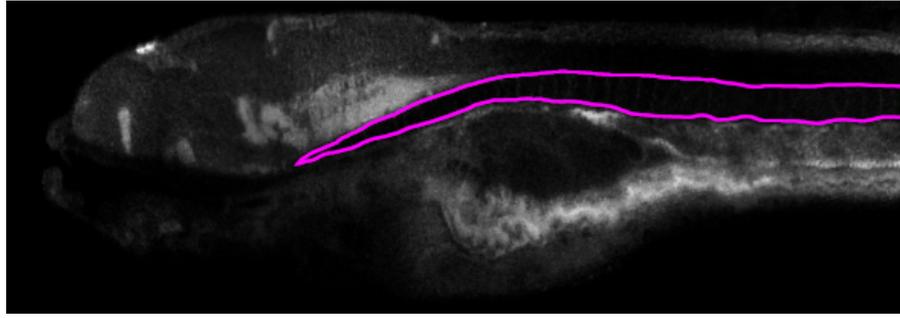


Figure 40: Coupe parasagittale d'une acquisition confocale d'un marquage lipophile d'un alevin de poisson zèbre.

La notochorde est une structure tubulaire servant de squelette aux alevins. La notochorde étant une structure faiblement marquée par le marqueur lipophile, la segmentation de cette région pourrait être réalisée par la recherche de la plus longue région tubulaire ayant de faibles valeurs de gris.

La ligne magenta représente la délimitation de la segmentation manuelle de la notochorde.

segmenté, la détection de la notochorde pourrait être réalisée en cherchant une région cylindrique de très faible intensité. Au vue de la simplicité de la forme à détecter, cette détection pourrait être effectuée en suivant les étapes suivantes: d'abord, la segmentation de la larve entière, puis un seuillage manuel en prenant une valeur très basse de gris, ensuite une fermeture par segment qui conserve uniquement les éléments linéaires, et finalement la sélection du plus grand objet, en l'occurrence la notochorde.

D'autres structures d'intérêt ne présentant pas de marquage sont les deux vésicules otiques, sous-partie de l'oreille interne des vertébrés (voir [Figure 41](#)). Elles se trouvent entre la peau et le médula oblongata, et sont symétriques par rapport au plan sagittal du cerveau.

Avec un marqueur lipophile, les otolithes constituent deux régions ovoïdes à faibles valeurs de gris, qui peuvent être segmentées selon le protocole suivant. Une fois les segmentations de la larve entière et de la matière blanche obtenues, on recherche l'axe de symétrie de la matière blanche au sein de la larve. On effectue ensuite un seuillage au sein de la larve afin de détecter les régions ayant des valeurs de gris très faibles. En utilisant la position de la matière blanche, on recherche alors deux éléments placés symétriquement par rapport au cerveau et se trouvant proche de la limite interne de la segmentation. Ainsi, cette information permet de faire la distinction avec les deux yeux (en fond casper).

La détection d'autres tissus peut être réalisée avec d'autres marquages. Comme dernier exemple, je vais présenter la segmentation du réseau vasculaire. En [Section 10.2.2](#), j'ai expliqué qu'un marquage présent dans une lignée Kdrl-RFP marque le système vasculaire du poisson zèbre. La segmentation automatique de structures curvilignes

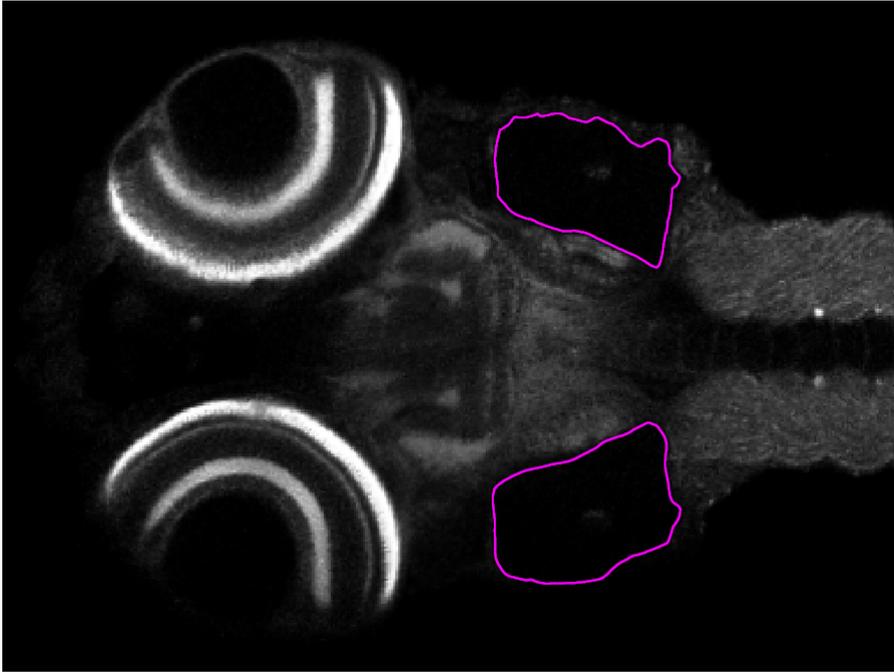


Figure 41: Coupe transversale d'une acquisition confocale d'un marquage lipophile d'un alevin de poisson zèbre.

Les vésicules otiques sont deux structures situées symétriquement par rapport à l'axe parasagittal de l'alevin, entre la peau et la médula oblongata. S'agissant de régions faiblement marquées par le marqueur lipophile, leurs segmentations pourraient être réalisées en s'appuyant sur la segmentation de la matière blanche. Les lignes magentas représentent les délimitations de segmentations manuelles des vésicules otiques.

comme les vaisseaux est complexe et constitue un sujet de recherche à part entière. Trois stratégies différentes permettant de réaliser de telles segmentations.

Afin d'obtenir rapidement un résultat de segmentation, il est possible d'employer un seuillage automatisé [104], approche simple à mettre en place. Cependant, comme nous avons pu le voir précédemment, cette méthode est particulièrement sensible au bruit et à l'homogénéité de l'histogramme des valeurs de gris de l'image. Il est donc préférable d'utiliser d'autres approches plus robustes. Une fermeture morphologique peut par exemple être effectuée en utilisant comme élément structurant un ensemble de lignes à orientations variées, qui permettent de détecter des structures linéaires [179]. Ces approches ne sont pas néanmoins pas très efficaces pour la détection de structures sinueuses, ce qui les rend peu adaptées à la détection du système vasculaire. Des méthodes de fermetures par chemins ont été développées [130, 188]. Ces chemins permettent ainsi de suivre les sinuosités de structures curvilignes, ce qui permet de réaliser la segmentation de vaisseaux sanguins. Cette stratégie présente une forte robustesse en cas d'image non homogène ou bruitée. L'emploi d'un

réseau de neurones profonds pour la segmentation automatique de vaisseaux de poisson zèbre a déjà été effectuée dans d'autres cadres [37, 219]. Comme vu précédemment, il est possible de simplement utiliser un transfert de réseau de neurones afin de permettre de diminuer le quantité de données nécessaires à l'entraînement du réseau de neurones. Ces segmentations pourraient donc servir de base au développement de méthodes chez le poisson zèbre.

11.2 VERS UNE AUGMENTATION DE LA QUANTITÉ DE MESURES FOURNIES PAR LES SEGMENTATIONS

Dans l'état actuel des algorithmes, la détection d'anomalies est effectuée sur la seule estimation du volume total de chaque région segmentée. Cette stratégie permet la détection de certains défauts dans le développement des tissus, mais ne détecte pas certaines anomalies de formes, qui n'affecteraient pas le volume total de celui-ci, comme la réduction d'une région particulière au profit d'une autre.

Afin d'améliorer les capacités d'analyse permises par ZBI, il sera donc nécessaire de mettre en place de nouvelles mesures.

11.2.1 *Les segmentations déjà mises en place pourraient fournir plus d'informations concernant la morphologie des échantillons*

En utilisant les algorithmes actuellement développés au cours de cette thèse, cinq volumes sont segmentés: l'échantillon entier, sa matière blanche, sa matière grise et ses deux cristallins. Avec ces segmentations, il est possible d'extraire cinq volumes supplémentaires. Le premier est le cerveau entier, obtenu par l'union entre la matière blanche et la matière grise. En utilisant les segmentations des cristallins et la segmentation de la matière blanche, il est possible d'obtenir la segmentation de chaque oeil dans leur ensemble. Enfin, l'association entre la segmentation de la larve entière et la segmentation du cerveau peut permettre de séparer la tête du corps. Ces dix segmentations peuvent alors être étudiées pour obtenir différentes métriques. Les plus simples sont le volume, la surface et la plus grande longueur de chaque volume. On pourrait aussi développer des mesures de la linéarité de la queue pour identifier d'éventuelles déformations. Concernant d'autres structures, plusieurs métriques supplémentaires semblent intéressantes. La mesure de la sphéricité de chaque segmentation donne une information sur la compacité de chaque volume. De la même manière, il est possible de mesurer l'excentricité de l'ellipsoïde englobant chaque volume, ce qui compare le plus grand et le plus petit demi-axe décrivant l'ellipsoïde, et donne ainsi une information sur la forme de chaque volume. La mesure des harmoniques sphériques de chaque volume pourrait aussi permettre d'améliorer l'analyse de potentiels défauts.

En complément à ces mesures génériques, il est possible de mesurer différents ratios apportant des informations spécifiques. Le ratio entre le volume de matière blanche et le volume total du cerveau donne une estimation des événements de neurogénèse. Le ratio entre volume de l'oeil droit et volume de l'oeil gauche peut informer d'une anomalie dans la symétrie de l'échantillon. Le ratio du volume des yeux sur le volume total de la larve permet de détecter une microphthalmie. Le ratio du volume du cristallin gauche sur le volume total de l'oeil gauche informe sur une anomalie de la formation de la rétine. De tels ratios, donnés en exemple, permettraient donc de fournir des informations complémentaires apportant une meilleure description des échantillons. En utilisant les segmentations obtenues, il est aussi possible d'obtenir des mesures spécifiques à certains organes ou tissus, par exemple la distance entre les deux cristallins, ce qui permet d'avoir une approximation de la largeur du télencéphale et identifier des cyclopies. Ces mesures ne nécessiteraient pas la mise en place de procédures longues à développer, avec ce qui a été développé au cours de ma thèse..

11.2.2 *La mise en place d'une approche utilisant des recalages élastiques permettrait de connaître les déformations locales du cerveau*

Grâce à la méthode d'imagerie mise en place au cours de cette thèse, il est maintenant possible d'imager un grand nombre d'échantillons en peu de temps. A partir de ces nombreux échantillons, il est aussi possible par recalage de créer rapidement un modèle statistique de cerveau de poisson zèbre pour le stade de développement désiré. La variabilité existante entre les échantillons est gommée pour correspondre à un modèle statistiquement représentatif de poisson zèbre. A TPS, Arnim Jenett développe de telles stratégies. Plus le nombre d'échantillons utilisés pour calculer le modèle est grand, plus le modèle statistique se rapprochera de la réalité biologique d'un échantillon prototypique.

Ce modèle statistique peut ensuite servir de modèle afin de recaler un échantillon supplémentaire, normal ou anormal. La mesure du champ de déformation ayant permis de recaler cet échantillon sur le modèle statistique est ensuite conservée comme métrique pour des analyses ultérieures.

Cette méthode peut de plus être améliorée par l'emploi des atlas. La segmentation d'une liste définie de régions peut être effectuée au sein du modèle statistique. Dans la suite, l'atlas des segmentations manuelles sera nommé atlas statistique.

Une fois ce dernier obtenu, on recale les échantillons que l'on veut étudier sur le modèle statistique. On obtient ainsi une carte des déformations nécessaires pour recaler chaque région de l'échantillon sur le modèle statistique. Ces déformations permettent ensuite d'effectuer

la transformation inverse pour transformer l'atlas statistique en segmentation des sous-régions de l'échantillon à traiter.

On obtient pour chaque échantillon une segmentation de chaque sous-région ainsi qu'une carte des déformations nécessaires pour faire correspondre cet échantillon à un modèle statistique. Il est alors possible de décrire quelles sont les sous-régions les plus fortement affectées par un polluant ou par une mutation.

En revanche, la mise en place d'une telle stratégie est relativement longue et coûteuse car la création du modèle statistique demande d'imager un grand nombre d'échantillons sauvages. La création manuelle de l'atlas statistique demande l'effort de plusieurs spécialistes pour s'assurer d'avoir un modèle le plus correct possible. Les calculs de recalage élastiques sont très lourds, et donc peu adaptés à une stratégie d'analyse haut-débit. Cette stratégie reste néanmoins la plus robuste pour obtenir un grand nombre de descripteurs, ce qui peut améliorer l'automatisation de la détection d'anomalies discrètes au sein des échantillons.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Ahmed Abdel-Moneim, Cecon T Mahapatra, and Maria S Sepúlveda. "In vivo visual reporter system for estrogenic contaminant exposure using transgenic see-through Japanese medaka *Oryzias latipes*." In: *Chemosphere* 201 (June 2018), pp. 251–253. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2018.02.184](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.184).
- [2] Pierre Affaticati, Sébastien Le Mével, Arnim Jenett, Laurie Rivière, Elodie Machado, Bilal B Mughal, and Jean-Baptiste Fini. "X-FaCT: Xenopus-Fast Clearing Technique." In: *Methods in Molecular Biology* 1865 (2018), pp. 233–241. DOI: [10.1007/978-1-4939-8784-9_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8784-9_16).
- [3] Hazem Ahmed et al. "Preclinical Development of 18F-OF-NB1 for Imaging GluN2B-Containing N-Methyl-D-Aspartate Receptors and its Utility as a Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis." In: *Journal of Nuclear Medicine* (July 2020). DOI: [10.2967/jnumed.120.246785](https://doi.org/10.2967/jnumed.120.246785).
- [4] T Aida. "On the Inheritance of Color in a Fresh-Water Fish, *APLOCHEILUS LATIPES* Temmick and Schlegel, with Special Reference to Sex-Linked Inheritance." In: *Genetics* 6.6 (Nov. 1921), pp. 554–573.
- [5] Kevin Alessandri, Laetitia Andrique, Maxime Feyeux, Andreas Bikfalvi, Pierre Nassoy, and Gaëlle Recher. "All-in-one 3D printed microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide." In: *Scientific Reports* 7 (Feb. 2017), p. 42378. DOI: [10.1038/srep42378](https://doi.org/10.1038/srep42378).
- [6] Paulo Amorim, Thiago Moraes, Jorge Silva, and Helio Pedrini. "3D adaptive histogram equalization method for medical volumes." In: *Proceedings of the 13th International Joint Conference on Computer Vision, Imaging and Computer Graphics Theory and Applications*. SCITEPRESS - Science and Technology Publications, Jan. 2018, pp. 363–370. ISBN: 978-989-758-290-5. DOI: [10.5220/0006615303630370](https://doi.org/10.5220/0006615303630370).
- [7] Satoshi Ansai and Masato Kinoshita. "Genome editing of medaka." In: *Methods in Molecular Biology* 1630 (2017), pp. 175–188. DOI: [10.1007/978-1-4939-7128-2_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7128-2_15).
- [8] Paride Antinucci and Robert Hindges. "A crystal-clear zebrafish for in vivo imaging." In: *Scientific Reports* 6 (July 2016), p. 29490. DOI: [10.1038/srep29490](https://doi.org/10.1038/srep29490).

- [9] Nandini Asokan et al. "Long-term in vivo imaging reveals tumor-specific dissemination and captures host tumor interaction in zebrafish xenografts." In: *Scientific Reports* 10.1 (Aug. 2020), p. 13254. DOI: [10.1038/s41598-020-69956-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69956-2).
- [10] Thomas O Auer and Filippo Del Bene. "CRISPR/Cas9 and TALEN-Mediated knock-in approaches in zebrafish." In: *Methods* 69.2 (Sept. 2014), pp. 142–150. DOI: [10.1016/j.ymeth.2014.03.027](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.027).
- [11] Avdesh Avdesh et al. "Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction." In: *Journal of Visualized Experiments* 69 (Nov. 2012), e4196. DOI: [10.3791/4196](https://doi.org/10.3791/4196).
- [12] Khan BahadarKhan, Amir A Khaliq, and Muhammad Shahid. "A morphological hessian based approach for retinal blood vessels segmentation and denoising using region based otsu thresholding." In: *Plos One* 11.7 (July 2016), e0158996. DOI: [10.1371/journal.pone.0158996](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158996).
- [13] Nathan Bahary, Katsutoshi Goishi, Carsten Stuckenholtz, Gerhard Weber, Jocelyn Leblanc, Christopher A Schafer, Sarah S Berman, Michael Klagsbrun, and Leonard I Zon. "Duplicate VegfA genes and orthologues of the KDR receptor tyrosine kinase family mediate vascular development in the zebrafish." In: *Blood* 110.10 (Nov. 2007), pp. 3627–3636. DOI: [10.1182/blood-2006-04-016378](https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016378).
- [14] Rodrigo Benenson, Stefan Popov, and Vittorio Ferrari. "Large-Scale Interactive Object Segmentation With Human Annotators." In: *2019 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. IEEE, June 2019, pp. 11692–11701. ISBN: 978-1-7281-3293-8. DOI: [10.1109/CVPR.2019.011197](https://doi.org/10.1109/CVPR.2019.011197).
- [15] Stuart Berg et al. "ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis." In: *Nature Methods* 16.12 (Sept. 2019), pp. 1226–1232. ISSN: 1548-7091. DOI: [10.1038/s41592-019-0582-9](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9).
- [16] Luísa Becker Bertotto, Richard Bruce, Shuying Li, Jaben Richards, Rafid Sikder, Luka Baljkas, Marissa Giroux, Jay Gan, and Daniel Schlenk. "Effects of bifenthrin on sex differentiation in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)." In: *Environmental Research* 177 (June 2019), p. 108564. DOI: [10.1016/j.envres.2019.108564](https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108564).
- [17] Serge Beucher and Christian Lantuéjoul. "Use of Watersheds in Contour Detection." In: vol. 132. Jan. 1979.
- [18] Brent R Bill, Andrew M Petzold, Karl J Clark, Lisa A Schimmenti, and Stephen C Ekker. "A primer for morpholino use in zebrafish." In: *Zebrafish* 6.1 (Mar. 2009), pp. 69–77. DOI: [10.1089/zeb.2008.0555](https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0555).

- [19] Stéphanie Bouffard, Emilie Dambroise, Alessandro Brombin, Sylvain Lempereur, Isabelle Hatin, Matthieu Simion, Raphaël Corre, Franck Bourrat, Jean-Stéphane Joly, and Françoise Jamen. "Fibrillarin is essential for S-phase progression and neuronal differentiation in zebrafish dorsal midbrain and retina." In: *Developmental Biology* 437.1 (May 2018), pp. 1–16. DOI: [10.1016/j.ydbio.2018.02.006](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.006).
- [20] David S. Bright and Eric B. Steel. "Two-dimensional top hat filter for extracting spots and spheres from digital images." In: *Journal of Microscopy* 146.2 (May 1987), pp. 191–200. ISSN: 00222720. DOI: [10.1111/j.1365-2818.1987.tb01340.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb01340.x).
- [21] François Brion, Yann Le Page, Benjamin Piccini, Olivier Cardoso, Sok-Keng Tong, Bon-chu Chung, and Olivier Kah. "Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos." In: *Plos One* 7.5 (May 2012), e36069. DOI: [10.1371/journal.pone.0036069](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069).
- [22] François Brion et al. "Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values." In: *Environment International* 130 (June 2019), p. 104896. DOI: [10.1016/j.envint.2019.06.006](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.06.006).
- [23] D D Brown, Z Wang, J D Furlow, A Kanamori, R A Schwartzman, B F Remo, and A Pinder. "The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.5 (Mar. 1996), pp. 1924–1929. DOI: [10.1073/pnas.93.5.1924](https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1924).
- [24] Daniel R Brown, Leigh Ann Samsa, Li Qian, and Jiandong Liu. "Advances in the study of heart development and disease using zebrafish." In: *Journal of cardiovascular development and disease* 3.2 (June 2016). DOI: [10.3390/jcdd3020013](https://doi.org/10.3390/jcdd3020013).
- [25] David John Burrows, Alexander McGown, Saurabh A Jain, Milena De Felice, Tennore M Ramesh, Basil Sharrack, and Arshad Majid. "Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish." In: *Multiple Sclerosis* 25.3 (2019), pp. 306–324. DOI: [10.1177/1352458518805246](https://doi.org/10.1177/1352458518805246).
- [26] Cody J Callahan et al. "Open Development and Clinical Validation of Multiple 3D-Printed Nasopharyngeal Collection Swabs: Rapid Resolution of a Critical COVID-19 Testing Bottleneck." In: *Journal of Clinical Microbiology* 58.8 (July 2020). DOI: [10.1128/JCM.00876-20](https://doi.org/10.1128/JCM.00876-20).

- [27] I L Cameron, W C Lawrence, and J B Lum. "Medaka eggs as a model system for screening potential teratogens." In: *Progress in clinical and biological research* 163C (1985), pp. 239–243.
- [28] Giuseppina Camiolo et al. "Iron regulates myeloma cell/macrophage interaction and drives resistance to bortezomib." In: *Redox biology* 36 (June 2020), p. 101611. DOI: [10.1016/j.redox.2020.101611](https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101611).
- [29] Michael J Carvan, Evan P Gallagher, Anders Goks, Mark E Hahn, and D G Joakim Larsson. "Fish models in toxicology." In: *Zebrafish* 4.1 (2007), pp. 9–20. DOI: [10.1089/zeb.2006.9998](https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9998).
- [30] J Chen, KE Poskanzer, MR Freeman, and KR Monk. "Live-imaging of astrocyte morphogenesis and function in zebrafish neural circuits." In: *Nature Neuroscience* 23.10 (Oct. 2020), pp. 1297–1306. ISSN: 1097-6256. DOI: [10.1038/s41593-020-0703-x](https://doi.org/10.1038/s41593-020-0703-x).
- [31] Lianguo Chen, Chenyan Hu, Mirabelle M P Tsui, Teng Wan, Drew R Peterson, Qipeng Shi, Paul K S Lam, Doris W T Au, James C W Lam, and Bingsheng Zhou. "Multigenerational Disruption of the Thyroid Endocrine System in Marine Medaka after a Life-Cycle Exposure to Perfluorobutanesulfonate." In: *Environmental Science & Technology* 52.7 (Apr. 2018), pp. 4432–4439. DOI: [10.1021/acs.est.8b00700](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00700).
- [32] Kwanghun Chung and Karl Deisseroth. "CLARITY for mapping the nervous system." In: *Nature Methods* 10.6 (June 2013), pp. 508–513. DOI: [10.1038/nmeth.2481](https://doi.org/10.1038/nmeth.2481).
- [33] Jacob A Cleary, Donald E Tillitt, Frederick S Vom Saal, Diane K Nicks, Rachel A Claunch, and Ramji K Bhandari. "Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*)." In: *Environmental Pollution* 251 (Aug. 2019), pp. 639–650. DOI: [10.1016/j.envpol.2019.05.013](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.013).
- [34] Stephan Couderq, Michelle Leemans, and Jean-Baptiste Fini. "Testing for thyroid hormone disruptors, a review of non-mammalian in vivo models." In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 508 (May 2020), p. 110779. DOI: [10.1016/j.mce.2020.110779](https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110779).
- [35] Jean Cousty, Gilles Bertrand, Laurent Najman, and Michel Couprie. "Watershed cuts: Minimum spanning forests and the drop of water principle." In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 31.8 (2008), pp. 1362–1374.
- [36] Jyoti Dabass, Shaveta Arora, Rekha Vig, and Madasu Hanmandlu. "Mammogram image enhancement using entropy and CLAHE based intuitionistic fuzzy method." In: *2019 6th International Conference on Signal Processing and Integrated Networks*

- (SPIN). IEEE, Mar. 2019, pp. 24–29. ISBN: 978-1-7281-1380-7. DOI: [10.1109/SPIN.2019.8711696](https://doi.org/10.1109/SPIN.2019.8711696).
- [37] Stephan Daetwyler, Ulrik Günther, Carl D Modes, Kyle Harrington, and Jan Huisken. “Multi-sample SPIM image acquisition, processing and analysis of vascular growth in zebrafish.” In: *Development* 146.6 (Mar. 2019). DOI: [10.1242/dev.173757](https://doi.org/10.1242/dev.173757).
- [38] ZhiChao Dang and Aude Kienzler. “Changes in fish sex ratio as a basis for regulating endocrine disruptors.” In: *Environment International* 130 (July 2019), p. 104928. DOI: [10.1016/j.envint.2019.104928](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104928).
- [39] Yunping Deng, Hongbing Wang, Marion Joni, Radhika Sekhri, and Anton Reiner. “Progression of Basal Ganglia Pathology in Heterozygous Q175 Knock-in Huntington’s Disease Mice.” In: *The Journal of Comparative Neurology* (Sept. 2020). DOI: [10.1002/cne.25023](https://doi.org/10.1002/cne.25023).
- [40] M Dittebrandt. “Use of *Xenopus laevis* in testing for pregnancy; analysis of 1100 tests.” In: *American Journal of Clinical Pathology* 19.3 (Mar. 1949), pp. 284–288. DOI: [10.1093/ajcp/19.3_ts.284](https://doi.org/10.1093/ajcp/19.3_ts.284).
- [41] Seth Donoughe, Chiyoung Kim, and Cassandra G Extavour. “high-throughput live-imaging of embryos in microwell arrays using a modular specimen mounting system.” In: *Biology open* 7.7 (July 2018). DOI: [10.1242/bio.031260](https://doi.org/10.1242/bio.031260).
- [42] Haikel Dridi et al. “Role of defective calcium regulation in cardiorespiratory dysfunction in Huntington’s disease.” In: *Journal of Clinical Investigation Insight* (Sept. 2020). DOI: [10.1172/jci.insight.140614](https://doi.org/10.1172/jci.insight.140614).
- [43] European Chemical Agency (ECHA) et al. “Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009.” In: *EFSA Journal* 16.6 (June 2018). ISSN: 18314732. DOI: [10.2903/j.efsa.2018.5311](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311).
- [44] Jason J Early, Katy Lh Cole, Jill M Williamson, Matthew Swire, Hari Kamadurai, Marc Muskavitch, and David A Lyons. “An automated high-resolution in vivo screen in zebrafish to identify chemical regulators of myelination.” In: 7 (July 2018). ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.35136](https://doi.org/10.7554/eLife.35136).
- [45] Robert C. Eaton and Roger D. Farley. “Growth and the Reduction of Depensation of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, Reared in the Laboratory.” In: *Copeia* 1974.1 (Mar. 1974), p. 204. ISSN: 00458511. DOI: [10.2307/1443024](https://doi.org/10.2307/1443024).

- [46] Robert C. Eaton and Roger D. Farley. "Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory." In: *Copeia* 1974.1 (Mar. 1974), p. 195. ISSN: 00458511. DOI: [10.2307/1443023](https://doi.org/10.2307/1443023).
- [47] F H Edgeworth. "On the masticatory and hyoid muscles of larvae of *xenopus laevis*." In: *Journal of Anatomy* 64.Pt 2 (Jan. 1930), pp. 184–188.
- [48] Lee D Ellis, Evelyn C Soo, John C Achenbach, Michael G Morash, and Kelly H Soanes. "Use of the zebrafish larvae as a model to study cigarette smoke condensate toxicity." In: *Plos One* 9.12 (Dec. 2014), e115305. DOI: [10.1371/journal.pone.0115305](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115305).
- [49] Dennis Eschweiler, Thiago V. Spina, Rohan C. Choudhury, Elliot Meyerowitz, Alexandre Cunha, and Johannes Stegmaier. "CNN-Based Preprocessing to Optimize Watershed-Based Cell Segmentation in 3D Confocal Microscopy Images." In: *2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019)*. IEEE, Apr. 2019, pp. 223–227. ISBN: 978-1-5386-3641-1. DOI: [10.1109/ISBI.2019.8759242](https://doi.org/10.1109/ISBI.2019.8759242).
- [50] Meyer F. "Contrast Feature Extraction." In: *Special issue of practical metallography* 8 (Mar. 1977).
- [51] Meyer F. "Two-dimensional top hat filter for extracting spots and spheres from digital images." In: *Journal of microscopy* 146 (May 1987).
- [52] Xue Feng, Kun Qing, Nicholas J Tustison, Craig H Meyer, and Quan Chen. "Deep convolutional neural network for segmentation of thoracic organs-at-risk using cropped 3D images." In: *Medical Physics* 46.5 (May 2019), pp. 2169–2180. DOI: [10.1002/mp.13466](https://doi.org/10.1002/mp.13466).
- [53] Jean-Baptiste Fini, Bilal B Mughal, Sébastien Le Mével, Michelle Leemans, Mélodie Lettmann, Petra Spirhanzlova, Pierre Affaticati, Arnim Jenett, and Barbara A Demeneix. "Human amniotic fluid contaminants alter thyroid hormone signalling and early brain development in *Xenopus* embryos." In: *Scientific Reports* 7 (Mar. 2017), p. 43786. DOI: [10.1038/srep43786](https://doi.org/10.1038/srep43786).
- [54] Jonathan E Foley, Morgan L Maeder, Joseph Pearlberg, J Keith Joung, Randall T Peterson, and Jing-Ruey J Yeh. "Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases." In: *Nature Protocols* 4.12 (2009), pp. 1855–1867. DOI: [10.1038/nprot.2009.209](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.209).
- [55] Barbara D Fontana, Nathana J Mezzomo, Allan V Kalueff, and Denis B Rosemberg. "The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review." In: *Experimental Neurology* 299.Pt A (2018), pp. 157–171. DOI: [10.1016/j.expneurol.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004).

- [56] Maxence Frétaud, Laurie Rivière, Élodie De Job, Stéphanie Gay, Jean-Jacques Lareyre, Jean-Stéphane Joly, Pierre Affaticati, and Violette Thermes. “high-resolution 3D imaging of whole organ after clearing: taking a new look at the zebrafish testis.” In: *Scientific Reports* 7 (Feb. 2017), p. 43012. DOI: [10.1038/srep43012](https://doi.org/10.1038/srep43012).
- [57] J David Furlow and Eric S Neff. “A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis.” In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17.2 (Mar. 2006), pp. 40–47. DOI: [10.1016/j.tem.2006.01.007](https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.007).
- [58] Stéphanie Gay et al. “MiR-202 controls female fecundity by regulating medaka oogenesis.” In: *PLoS Genetics* 14.9 (Sept. 2018), e1007593. DOI: [10.1371/journal.pgen.1007593](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007593).
- [59] Diane Genest, Elodie Puybareau, Marc Léonard, Jean Cousty, Noémie De Crozé, and Hugues Talbot. “High throughput automated detection of axial malformations in Medaka embryo.” In: *Computers in biology and medicine* 105 (Jan. 2019), pp. 157–168. DOI: [10.1016/j.compbiomed.2018.12.016](https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2018.12.016).
- [60] Mohsen Ghafoorian et al. “Transfer learning for domain adaptation in MRI: application in brain lesion segmentation.” In: *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention MICCAI 2017*. Ed. by Maxime Descoteaux, Lena Maier-Hein, Alfred Franz, Pierre Jannin, D. Louis Collins, and Simon Duchesne. Vol. 10435. Lecture notes in computer science. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 516–524. ISBN: 978-3-319-66178-0. DOI: [10.1007/978-3-319-66179-7_59](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66179-7_59).
- [61] Jakob Gierten, Christian Pylatiuk, Omar T Hammouda, Christian Schock, Johannes Stegmaier, Joachim Wittbrodt, Jochen Gehrig, and Felix Loosli. “Automated high-throughput heart-beat quantification in medaka and zebrafish embryos under physiological conditions.” In: *Scientific Reports* 10.1 (Feb. 2020), p. 2046. DOI: [10.1038/s41598-020-58563-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58563-w).
- [62] D Goldman, M Hankin, Z Li, X Dai, and J Ding. “Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration.” In: *Transgenic Research* 10.1 (2001), pp. 21–33. DOI: [10.1023/a:1008998832552](https://doi.org/10.1023/a:1008998832552).
- [63] Ram Deepak Gottapu and Cihan H Dagli. “Densenet for anatomical brain segmentation.” In: *Procedia Computer Science* 140 (2018), pp. 179–185. ISSN: 18770509. DOI: [10.1016/j.procs.2018.10.327](https://doi.org/10.1016/j.procs.2018.10.327).
- [64] Jessica Guerra, Chiara Tobia, Marco Presta, and Andrea Barbieri. “Zebrafish embryo as an experimental model to study tumor angiogenesis.” In: *Tumor Vascularization*. Elsevier, 2020,

- pp. 129–145. ISBN: 9780128194942. DOI: [10.1016/B978-0-12-819494-2.00008-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819494-2.00008-0).
- [65] Yuanhao Guo, Wouter J Veneman, Herman P Spaink, and Fons J Verbeek. “Three-dimensional reconstruction and measurements of zebrafish larvae from high-throughput axial-view in vivo imaging.” In: *Biomedical optics express* 8.5 (May 2017), pp. 2611–2634. DOI: [10.1364/B0E.8.002611](https://doi.org/10.1364/B0E.8.002611).
- [66] Yue Guo, Qian Wang, Oleh Krupa, Jason Stein, Guorong Wu, Kira Bradford, and Ashok Krishnamurthy. “Cross modality microscopy segmentation via adversarial adaptation.” In: *Bioinformatics and Biomedical Engineering : 7th International Work-Conference, IWBBIO 2019, Granada, Spain, May 8-10, 2019, Proceedings, Parts I and II. IWBBIO (Conference) (7th : 2019 : Granada, Spain)* 11466 (May 2019), pp. 469–478. ISSN: 0302-9743. DOI: [10.1007/978-3-030-17935-9_42](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17935-9_42).
- [67] Tripti Gupta, Gregory D Marquart, Eric J Horstick, Kathryn M Tabor, Sinisa Pajevic, and Harold A Burgess. “Morphometric analysis and neuroanatomical mapping of the zebrafish brain.” In: *Methods* 150 (Nov. 2018), pp. 49–62. DOI: [10.1016/j.ymeth.2018.06.008](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.06.008).
- [68] Lloyd Hamilton, Katy R Astell, Gergana Velikova, and Dirk Sieger. “A zebrafish live imaging model reveals differential responses of microglia toward glioblastoma cells in vivo.” In: *Zebrafish* 13.6 (Oct. 2016), pp. 523–534. DOI: [10.1089/zeb.2016.1339](https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1339).
- [69] Yang Han, Xiaoyang Chu, Lin Cui, Shiyao Fu, Chunsheng Gao, Yi Li, and Baoshan Sun. “Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer’s disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems.” In: *Drug delivery* 27.1 (Dec. 2020), pp. 502–518. DOI: [10.1080/10717544.2020.1745328](https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1745328).
- [70] Laura J A Hardwick and Anna Philpott. “An oncologists friend: How *Xenopus* contributes to cancer research.” In: *Developmental Biology* 408.2 (Dec. 2015), pp. 180–187. DOI: [10.1016/j.ydbio.2015.02.003](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.02.003).
- [71] J Hatanaka, N Doke, T Harada, T Aikawa, and M Enomoto. “Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in medaka, *Oryzias latipes*.” In: *The Japanese journal of experimental medicine* 52.5 (Oct. 1982), pp. 243–253.
- [72] Yong He, Yan Wu, Jian-zhong Fu, Qing Gao, and Jing-jiang Qiu. “Developments of 3D Printing Microfluidics and Applications in Chemistry and Biology: a Review.” In: *Electroanalysis*

- 28.8 (Aug. 2016), pp. 1658–1678. ISSN: 10400397. DOI: [10.1002/elan.201600043](https://doi.org/10.1002/elan.201600043).
- [73] Alexander Hecker, Pamela Anger, Philipp N Braaker, Wolfram Schulze, and Stefan Schuster. “high-resolution mapping of injury-site dependent functional recovery in a single axon in zebrafish.” In: *Communications Biology* 3.1 (June 2020), p. 307. DOI: [10.1038/s42003-020-1034-x](https://doi.org/10.1038/s42003-020-1034-x).
- [74] Jonathan J Henry, Kimberly J Perry, and Paul W Hamilton. “Methods for examining lens regeneration in xenopus.” In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2019.4 (Apr. 2019). DOI: [10.1101/pdb.prot101527](https://doi.org/10.1101/pdb.prot101527).
- [75] Sarah Herberg, Krista R Gert, Alexander Schleiffer, and Andrea Pauli. “The Ly6/uPAR protein Bouncer is necessary and sufficient for species-specific fertilization.” In: *Science* 361.6406 (Sept. 2018), pp. 1029–1033. ISSN: 0036-8075. DOI: [10.1126/science.aat7113](https://doi.org/10.1126/science.aat7113).
- [76] Tobias Heye et al. “Reproducibility of dynamic contrast-enhanced MR imaging. Part II. Comparison of intra- and inter-observer variability with manual region of interest placement versus semiautomatic lesion segmentation and histogram analysis.” In: *Radiology* 266.3 (Mar. 2013), pp. 812–821. DOI: [10.1148/radiol.12120255](https://doi.org/10.1148/radiol.12120255).
- [77] Nathalie Hinfray, Cleo Tebby, Benjamin Piccini, Gaelle Bourgine, Sélim Aït-Aïssa, Jean-Marc Porcher, Farzad Pakdel, and François Brion. “Mixture Concentration-Response Modeling Reveals Antagonistic Effects of Estradiol and Genistein in Combination on Brain Aromatase Gene (*cyp19a1b*) in Zebrafish.” In: *International Journal of Molecular Sciences* 19.4 (Apr. 2018). DOI: [10.3390/ijms19041047](https://doi.org/10.3390/ijms19041047).
- [78] B M Hobson. “Some observations on the use of female *Xenopus laevis* for the diagnosis of pregnancy.” In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 75.4 (Apr. 1958), pp. 825–828. ISSN: 00029378. DOI: [10.1016/0002-9378\(58\)90664-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(58)90664-1).
- [79] Shahruk Hossain, Suhail Najeeb, Asif Shahriyar, Zaowad R. Abdullah, and M. Ariful Haque. “A Pipeline for Lung Tumor Detection and Segmentation from CT Scans Using Dilated Convolutional Neural Networks.” In: *ICA 2019 - 2019 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICA)*. IEEE, May 2019, pp. 1348–1352. ISBN: 978-1-4799-8131-1. DOI: [10.1109/ICASSP.2019.8683802](https://doi.org/10.1109/ICASSP.2019.8683802).
- [80] G N Hounsfield. “Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system.” In: *The British Journal of Radiology* 46.552 (Dec. 1973), pp. 1016–1022. DOI: [10.1259/0007-1285-46-552-1016](https://doi.org/10.1259/0007-1285-46-552-1016).

- [81] Kerstin Howe et al. "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." In: *Nature* 496.7446 (Apr. 2013), pp. 498–503. DOI: [10.1038/nature12111](https://doi.org/10.1038/nature12111).
- [82] Chen Huang, Junru Tian, Chenglang Yuan, Ping Zeng, Xueping He, Hanwei Chen, Yi Huang, and Bingsheng Huang. "Fully automated segmentation of lower extremity deep vein thrombosis using convolutional neural network." In: *BioMed research international* 2019 (June 2019), p. 3401683. DOI: [10.1155/2019/3401683](https://doi.org/10.1155/2019/3401683).
- [83] Chunyan Huang, Xiaorui Li, and Yunliang Wen. "AN OTSU image segmentation based on fruitfly optimization algorithm." In: *Alexandria Engineering Journal* (July 2020). ISSN: 11100168. DOI: [10.1016/j.aej.2020.06.054](https://doi.org/10.1016/j.aej.2020.06.054).
- [84] Jan Huisken and Didier Y R Stainier. "Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)." In: *Optics Letters* 32.17 (Sept. 2007), pp. 2608–2610. DOI: [10.1364/ol.32.002608](https://doi.org/10.1364/ol.32.002608).
- [85] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy." In: *Science* 305.5686 (Aug. 2004), pp. 1007–1009. ISSN: 1095-9203. DOI: [10.1126/science.1100035](https://doi.org/10.1126/science.1100035).
- [86] Robert Hummel. "Image enhancement by histogram transformation." In: *Computer Graphics and Image Processing* 6.2 (Apr. 1977), pp. 184–195. ISSN: 0146664X. DOI: [10.1016/S0146-664X\(77\)80011-7](https://doi.org/10.1016/S0146-664X(77)80011-7).
- [87] Abdelhameed Ibrahim, Shaimaa Mohammed, Hesham Arafat Ali, and Sherif E. Hussein. "Breast cancer segmentation from thermal images based on chaotic salp swarm algorithm." In: *IEEE access : practical innovations, open solutions* 8 (2020), pp. 122121–122134. ISSN: 2169-3536. DOI: [10.1109/ACCESS.2020.0110001](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.0110001).
- [88] Umit Ilhan and Ahmet Ilhan. "Brain tumor segmentation based on a new threshold approach." In: *Procedia Computer Science* 120 (2017), pp. 580–587. ISSN: 18770509. DOI: [10.1016/j.procs.2017.11.282](https://doi.org/10.1016/j.procs.2017.11.282).
- [89] Uwe Irion, Jana Krauss, and Christiane Nüsslein-Volhard. "Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system." In: *Development* 141.24 (Dec. 2014), pp. 4827–4830. DOI: [10.1242/dev.115584](https://doi.org/10.1242/dev.115584).
- [90] Stephanie Ishack and Shari R Lipner. "Applications of 3D Printing Technology to Address COVID-19-Related Supply Shortages." In: *The American Journal of Medicine* (Apr. 2020). DOI: [10.1016/j.amjmed.2020.04.002](https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.04.002).

- [91] Sergio Jarque, Eva Fetter, Wouter J Veneman, Herman P Spaink, Ravindra Peravali, Uwe Strähle, and Stefan Scholz. "An automated screening method for detecting compounds with goitrogenic activity using transgenic zebrafish embryos." In: *Plos One* 13.8 (Aug. 2018), e0203087. DOI: [10.1371/journal.pone.0203087](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203087).
- [92] Zhexin Jiang, Hao Zhang, Yi Wang, and Seok-Bum Ko. "Retinal blood vessel segmentation using fully convolutional network with transfer learning." In: *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society* 68 (Apr. 2018), pp. 1–15. DOI: [10.1016/j.compmedimag.2018.04.005](https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2018.04.005).
- [93] Byungseok Jin, Tokiro Ishikawa, Mai Taniguchi, Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Shigehide Kagaya, and Kazutoshi Mori. "Development of a Rapid in vivo Assay to Evaluate the Efficacy of IRE1-specific Inhibitors of the Unfolded Protein Response Using Medaka Fish." In: *Cell Structure and Function* 45.1 (Feb. 2020), pp. 23–31. DOI: [10.1247/csf.19032](https://doi.org/10.1247/csf.19032).
- [94] Anisha Keshavan, Jason D Yeatman, and Ariel Rokem. "Combining citizen science and deep learning to amplify expertise in neuroimaging." In: *Frontiers in Neuroinformatics* 13 (May 2019), p. 29. ISSN: 1662-5196. DOI: [10.3389/fninf.2019.00029](https://doi.org/10.3389/fninf.2019.00029).
- [95] Cindy X Kha, Dylan J Guerin, and Kelly Ai-Sun Tseng. "Studying In Vivo Retinal Progenitor Cell Proliferation in *Xenopus laevis*." In: *Methods in Molecular Biology* 2092 (2020), pp. 19–33. DOI: [10.1007/978-1-0716-0175-4_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0175-4_2).
- [96] Arezoo Khalili and Pouya Rezai. "Microfluidic devices for embryonic and larval zebrafish studies." In: *Briefings in functional genomics* 18.6 (Nov. 2019), pp. 419–432. DOI: [10.1093/bfgp/elz006](https://doi.org/10.1093/bfgp/elz006).
- [97] Faraz Ahmad Khan, Ute Voß, Michael P Pound, and Andrew P French. "Volumetric segmentation of cell cycle markers in confocal images using machine learning and deep learning." In: *Frontiers in plant science* 11 (Aug. 2020), p. 1275. ISSN: 1664-462X. DOI: [10.3389/fpls.2020.01275](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01275).
- [98] Hidetaka Kioka et al. "In vivo real-time ATP imaging in zebrafish hearts reveals Gos2 induces ischemic tolerance." In: *The FASEB Journal* 34.2 (Jan. 2020), pp. 2041–2054. DOI: [10.1096/fj.201901686R](https://doi.org/10.1096/fj.201901686R).
- [99] Stephan Kirchmaier, Kiyoshi Naruse, Joachim Wittbrodt, and Felix Loosli. "The genomic and genetic toolbox of the teleost medaka (*Oryzias latipes*)." In: *Genetics* 199.4 (Apr. 2015), pp. 905–918. DOI: [10.1534/genetics.114.173849](https://doi.org/10.1534/genetics.114.173849).

- [100] David Simon Kleinhans and Virginie Lecaudey. "Standardized mounting method of (zebrafish) embryos using a 3D-printed stamp for high-content, semi-automated confocal imaging." In: *BMC Biotechnology* 19.1 (Oct. 2019), p. 68. DOI: [10.1186/s12896-019-0558-y](https://doi.org/10.1186/s12896-019-0558-y).
- [101] Thomas B Knudsen and Nicole C Kleinstreuer. "Disruption of embryonic vascular development in predictive toxicology." In: *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 93.4 (Dec. 2011), pp. 312–323. DOI: [10.1002/bdrc.20223](https://doi.org/10.1002/bdrc.20223).
- [102] Anna Konopka et al. "Impaired NHEJ repair in amyotrophic lateral sclerosis is associated with TDP-43 mutations." In: *Molecular Neurodegeneration* 15.1 (Sept. 2020), p. 51. DOI: [10.1186/s13024-020-00386-4](https://doi.org/10.1186/s13024-020-00386-4).
- [103] Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever, and Geoffrey E. Hinton. "ImageNet classification with deep convolutional neural networks." In: *Communications of the ACM* 60.6 (May 2012), pp. 84–90. ISSN: 0001-0782. DOI: [10.1145/3065386](https://doi.org/10.1145/3065386).
- [104] Elisabeth Kugler, Karen Plant, Timothy Chico, and Paul Armitage. "Enhancement and segmentation workflow for the developing zebrafish vasculature." In: *Journal of Imaging* 5.1 (Jan. 2019), p. 14. ISSN: 2313-433X. DOI: [10.3390/jimaging5010014](https://doi.org/10.3390/jimaging5010014).
- [105] Pushkar Kulkarni, Swapna Yellanki, Raghavender Medishetti, Dharmarajan Sriram, Uday Saxena, and Perumal Yogeewari. "Novel Zebrafish EAE model: A quick in vivo screen for multiple sclerosis." In: *Multiple sclerosis and related disorders* 11 (Jan. 2017), pp. 32–39. DOI: [10.1016/j.msard.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.11.010).
- [106] Hans W. Laale. "The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research.. A literature review." In: *Journal of Fish Biology* 10.2 (Feb. 1977), pp. 121–173. ISSN: 0022-1112. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x).
- [107] Thomas M Lanigan, Hui C Kopera, and Thomas L Saunders. "Principles of genetic engineering." In: *Genes* 11.3 (Mar. 2020). DOI: [10.3390/genes11030291](https://doi.org/10.3390/genes11030291).
- [108] C. Lantuejoul and S. Beucher. "On the use of the geodesic metric in image analysis." In: *Journal of Microscopy* 121.1 (Jan. 1981), pp. 39–49. ISSN: 00222720. DOI: [10.1111/j.1365-2818.1981.tb01197.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1981.tb01197.x).
- [109] Y. LeCun, B. Boser, J. S. Denker, D. Henderson, R. E. Howard, W. Hubbard, and L. D. Jackel. "Backpropagation applied to handwritten zip code recognition." In: *Neural Computation* 1.4 (Dec. 1989), pp. 541–551. ISSN: 0899-7667. DOI: [10.1162/neco.1989.1.4.541](https://doi.org/10.1162/neco.1989.1.4.541).

- [110] Sylvain Lempereur, Arnim Jenett, Elodie Machado, Ignacio Arganda-Carreras, Matthieu Simion, Pierre Affaticati, Jean-Stéphane Joly, and Hugues Talbot. "Automated segmentation of thick confocal microscopy 3D images for the measurement of white matter volumes in zebrafish brains." In: *Mathematical Morphology - Theory and Applications* 4.1 (July 2020), pp. 31–45. ISSN: 2353-3390. DOI: [10.1515/mathm-2020-0100](https://doi.org/10.1515/mathm-2020-0100).
- [111] Patricia Letrado, Irene de Miguel, Iranzu Lamberto, Roberto Díez-Martínez, and Julen Oyarzabal. "Zebrafish: speeding up the cancer drug discovery process." In: *Cancer Research* 78.21 (Nov. 2018), pp. 6048–6058. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-18-1029](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1029).
- [112] Meng Li, Jiaping Zhu, Mengcen Wang, Hua Fang, Guonian Zhu, and Qiangwei Wang. "Exposure to graphene oxide at environmental concentrations induces thyroid endocrine disruption and lipid metabolic disturbance in *Xenopus laevis*." In: *Chemosphere* 236 (Dec. 2019), p. 124834. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.124834](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124834).
- [113] Shuying Li, Kun Qiao, Yao Jiang, Qiong Wu, Scott Coffin, Wenjun Gui, and Guonian Zhu. "Disruptive effects of two organotin pesticides on the thyroid signaling pathway in *Xenopus laevis* during metamorphosis." In: *The Science of the Total Environment* 697 (Dec. 2019), p. 134140. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.134140](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134140).
- [114] Yingbo Liang and Jian Fu. "Watershed algorithm for medical image segmentation based on morphology and total variation model." In: *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence* 33.05 (May 2019), p. 1954019. ISSN: 0218-0014. DOI: [10.1142/S0218001419540193](https://doi.org/10.1142/S0218001419540193).
- [115] Kaili Liu, Cassidy Petree, Teresa Requena, Pratishta Varshney, and Gaurav K Varshney. "Expanding the CRISPR toolbox in zebrafish for studying development and disease." In: *Frontiers in cell and developmental biology* 7 (Mar. 2019), p. 13. ISSN: 2296-634X. DOI: [10.3389/fcell.2019.00013](https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00013).
- [116] Manhua Liu, Fan Li, Hao Yan, Kundong Wang, Yixin Ma, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Li Shen, and Mingqing Xu. "A multi-model deep convolutional neural network for automatic hippocampus segmentation and classification in Alzheimer's disease." In: *Neuroimage* 208 (2020), p. 116459. DOI: [10.1016/j.neuroimage.2019.116459](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116459).
- [117] Tao Liu, Yonghui Pan, Zhifeng Lu, Tao Ren, and Jianwei Lu. "Canopy light and nitrogen distribution are closely related to nitrogen allocation within leaves in *Brassica napus* L." In: *Field crops research* 258 (Nov. 2020), p. 107958. ISSN: 03784290. DOI: [10.1016/j.fcr.2020.107958](https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107958).

- [118] Charles Ben Lovely, Yohaán Fernandes, and Johann K Eberhart. "Fishing for fetal alcohol spectrum disorders: zebrafish as a model for ethanol teratogenesis." In: *Zebrafish* 13.5 (May 2016), pp. 391–398. DOI: [10.1089/zeb.2016.1270](https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1270).
- [119] Jidong Lv, Fan Wang, Liming Xu, Zhenghua Ma, and Biao Yang. "A segmentation method of bagged green apple image." In: *Scientia horticulturae* 246 (Feb. 2019), pp. 411–417. ISSN: 03044238. DOI: [10.1016/j.scienta.2018.11.030](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.030).
- [120] Ricardo Macarron et al. "Impact of high-throughput screening in biomedical research." In: *Nature Reviews. Drug Discovery* 10.3 (2011), pp. 188–195. DOI: [10.1038/nrd3368](https://doi.org/10.1038/nrd3368).
- [121] Andre Maia Chagas, Lucia L Prieto-Godino, Aristides B Arrenberg, and Tom Baden. "The 100 lab: A 3D-printable open-source platform for fluorescence microscopy, optogenetics, and accurate temperature control during behaviour of zebrafish, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*." In: *PLoS Biology* 15.7 (July 2017), e2002702. DOI: [10.1371/journal.pbio.2002702](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002702).
- [122] Michael Majurski, Petru Manescu, Sarala Padi, Nicholas Schaub, Nathan Hotaling, Carl Simon Jr, and Peter Bajcsy. "Cell Image Segmentation Using Generative Adversarial Networks, Transfer Learning, and Augmentations." In: (2019).
- [123] David Mandrell, Lisa Truong, Caleb Jephson, Mushfiqur R Sarker, Aaron Moore, Christopher Lang, Michael T Simonich, and Robert L Tanguay. "Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens." In: *Journal of laboratory automation* 17.1 (Feb. 2012), pp. 66–74. DOI: [10.1177/2211068211432197](https://doi.org/10.1177/2211068211432197).
- [124] Andrey Massarsky, G L Prasad, and Richard T Di Giulio. "Total particulate matter from cigarette smoke disrupts vascular development in zebrafish brain (*Danio rerio*)." In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 339 (Jan. 2018), pp. 85–96. DOI: [10.1016/j.taap.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.12.003).
- [125] Eduardo M. de Mattos, Dan Binkley, Otavio C. Campoe, Clayton A. Alvares, and Jose L. Stape. "Variation in canopy structure, leaf area, light interception and light use efficiency among *Eucalyptus* clones." In: *Forest Ecology and Management* 463 (May 2020), p. 118038. ISSN: 03781127. DOI: [10.1016/j.foreco.2020.118038](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118038).
- [126] Jürgen Mayer, Alexandre Robert-Moreno, James Sharpe, and Jim Swoger. "Attenuation artifacts in light sheet fluorescence microscopy corrected by OPTiSPIM." In: *Light, science & applications* 7 (Oct. 2018), p. 70. DOI: [10.1038/s41377-018-0068-z](https://doi.org/10.1038/s41377-018-0068-z).

- [127] Victoria M McLeod, Mathew D F Chiam, Chew L Lau, Thusitha W Rupasinghe, Wah C Boon, and Bradley J Turner. "Dysregulation of Steroid Hormone Receptors in Motor Neurons and Glia Associates with Disease Progression in ALS Mice." In: *Endocrinology* 161.9 (Sept. 2020). DOI: [10.1210/endocr/bqaa113](https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa113).
- [128] Judith R Meakin, Ryan M Ames, J Charles G Jeynes, Jo Welsman, Michael Gundry, Karen Knapp, and Richard Everson. "The feasibility of using citizens to segment anatomy from medical images: Accuracy and motivation." In: *Plos One* 14.10 (Oct. 2019), e0222523. DOI: [10.1371/journal.pone.0222523](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222523).
- [129] Odyssee Merveille, Benoit Naegel, Hugues Talbot, and Nicolas Passat. "n D Variational Restoration of Curvilinear Structures With Prior-Based Directional Regularization." In: *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society* 28.8 (Aug. 2019), pp. 3848–3859. DOI: [10.1109/TIP.2019.2901706](https://doi.org/10.1109/TIP.2019.2901706).
- [130] Odyssee Merveille, Hugues Talbot, Laurent Najman, and Nicolas Passat. "Curvilinear structure analysis by ranking the orientation responses of path operators." In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 40.2 (2018), pp. 304–317. DOI: [10.1109/TPAMI.2017.2672972](https://doi.org/10.1109/TPAMI.2017.2672972).
- [131] F. Meyer and S. Beucher. "Morphological segmentation." In: *Journal of visual communication and image representation* 1.1 (Sept. 1990), pp. 21–46. ISSN: 10473203. DOI: [10.1016/1047-3203\(90\)90014-M](https://doi.org/10.1016/1047-3203(90)90014-M).
- [132] Fernand Meyer. "Topographic distance and watershed lines." In: *Signal processing* 38.1 (July 1994), pp. 113–125. ISSN: 01651684. DOI: [10.1016/0165-1684\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0165-1684(94)90060-4).
- [133] Merlin Mikulewitsch, Matthias Marcus Auerswald, Axel von Freyberg, and Andreas Fischer. "Geometry Measurement of Submerged Metallic Micro-Parts Using Confocal Fluorescence Microscopy." In: *Nanomanufacturing and Metrology* 1.3 (Sept. 2018), pp. 171–179. ISSN: 2520-811X. DOI: [10.1007/s41871-018-0019-6](https://doi.org/10.1007/s41871-018-0019-6).
- [134] Fausto Milletari, Nassir Navab, and Seyed-Ahmad Ahmadi. "V-Net: Fully Convolutional Neural Networks for Volumetric Medical Image Segmentation." In: *2016 Fourth International Conference on 3D Vision (3DV)*. IEEE, Oct. 2016, pp. 565–571. ISBN: 978-1-5090-5407-7. DOI: [10.1109/3DV.2016.79](https://doi.org/10.1109/3DV.2016.79).
- [135] Kutubuddin A Molla and Yinong Yang. "CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications." In: *Trends in Biotechnology* 37.10 (Apr. 2019), pp. 1121–1142. DOI: [10.1016/j.tibtech.2019.03.008](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.008).

- [136] Agata Mosinska, Mateusz Kozinski, and Pascal Fua. "Joint segmentation and path classification of curvilinear structures." In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 42.6 (June 2020), pp. 1515–1521. DOI: [10.1109/TPAMI.2019.2921327](https://doi.org/10.1109/TPAMI.2019.2921327).
- [137] Lei Mou, Yitian Zhao, Li Chen, Jun Cheng, Zaiwang Gu, Huaying Hao, Hong Qi, Yalin Zheng, Alejandro Frangi, and Jiang Liu. "CS-Net: Channel and Spatial Attention Network for Curvilinear Structure Segmentation." In: *Medical image computing and computer assisted intervention – MICCAI 2019: 22nd international conference, shenzhen, china, october 13–17, 2019, proceedings, part I*. Ed. by Dinggang Shen, Tianming Liu, Terry M. Peters, Lawrence H. Staib, Caroline Essert, Sean Zhou, Pew-Thian Yap, and Ali Khan. Vol. 11764. Lecture notes in computer science. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 721–730. ISBN: 978-3-030-32238-0. DOI: [10.1007/978-3-030-32239-7_80](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32239-7_80).
- [138] Laurent Najman and Hugues Talbot. *Mathematical morphology: from theory to applications*. John Wiley & Sons, 2013.
- [139] Stefania Nicoli and Marco Presta. "The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay." In: *Nature Protocols* 2.11 (2007), pp. 2918–2923. DOI: [10.1038/nprot.2007.412](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.412).
- [140] Seyed Mohammad Reza Noori, Parastoo Farnia, Mohammad Bayat, Naghme Bahrami, Ali Shakourirad, and Alireza Ahmadian. "Automatic detection of symmetry plane for computer-aided surgical simulation in craniomaxillofacial surgery." In: *Physical and Engineering Sciences in Medicine* 43.3 (Sept. 2020), pp. 1087–1099. DOI: [10.1007/s13246-020-00909-9](https://doi.org/10.1007/s13246-020-00909-9).
- [141] Jonathan Nylk, Kaley McCluskey, Miguel A Preciado, Michael Mazilu, Zhengyi Yang, Frank J Gunn-Moore, Sanya Aggarwal, Javier A Tello, David E K Ferrier, and Kishan Dholakia. "Light-sheet microscopy with attenuation-compensated propagation-invariant beams." In: *Science Advances* 4.4 (Apr. 2018), eaar4817. ISSN: 2375-2548. DOI: [10.1126/sciadv.aar4817](https://doi.org/10.1126/sciadv.aar4817).
- [142] OECD. *Test no. 215: fish, juvenile growth test*. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: effects on biotic systems. OECD, Jan. 2000. ISBN: 9789264070202. DOI: [10.1787/9789264070202-en](https://doi.org/10.1787/9789264070202-en).
- [143] OECD. *Test No. 230: 21-day Fish Assay*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Sept. 2009. ISBN: 9789264076228. DOI: [10.1787/9789264076228-en](https://doi.org/10.1787/9789264076228-en).

- [144] OECD. *Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, July 2013. ISBN: 9789264203785. DOI: [10.1787/9789264203785-en](https://doi.org/10.1787/9789264203785-en).
- [145] OECD. *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, July 2013. ISBN: 9789264203709. DOI: [10.1787/9789264203709-en](https://doi.org/10.1787/9789264203709-en).
- [146] Peyman Obeidy, Philip L Tong, and Wolfgang Weninger. “Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin.” In: *The Journal of Investigative Dermatology* 138.4 (2018), pp. 720–725. DOI: [10.1016/j.jid.2018.01.017](https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.017).
- [147] J Ohser, P Haas, F Fahrbach, P Menstell, A Schwämmle, S Osterroth, and D Dobrovolskij. “Attenuation correction for confocal laser scanning microscopy and its application in chromatography.” In: *Journal of Microscopy* 278.2 (May 2020), pp. 76–88. DOI: [10.1111/jmi.12888](https://doi.org/10.1111/jmi.12888).
- [148] Nobuyuki Otsu. “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms.” In: *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics* 9.1 (Jan. 1979), pp. 62–66. ISSN: 0018-9472. DOI: [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076).
- [149] Ismail Oztel, Gozde Yolcu, Ilker Ersoy, Tommi White, and Filiz Bunyak. “Mitochondria segmentation in electron microscopy volumes using deep convolutional neural network.” In: *2017 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)*. IEEE, Nov. 2017, pp. 1195–1200. ISBN: 978-1-5090-3050-7. DOI: [10.1109/BIBM.2017.8217827](https://doi.org/10.1109/BIBM.2017.8217827).
- [150] Gunjan Pandey, Jens H Westhoff, Franz Schaefer, and Jochen Gehrig. “A Smart Imaging Workflow for Organ-Specific Screening in a Cystic Kidney Zebrafish Disease Model.” In: *International Journal of Molecular Sciences* 20.6 (Mar. 2019). DOI: [10.3390/ijms20061290](https://doi.org/10.3390/ijms20061290).
- [151] Carlos Pardo-Martin, Amin Allalou, Jaime Medina, Peter M Eimon, Carolina Wählby, and Mehmet Fatih Yanik. “high-throughput hyperdimensional vertebrate phenotyping.” In: *Nature Communications* 4 (2013), p. 1467. DOI: [10.1038/ncomms2475](https://doi.org/10.1038/ncomms2475).
- [152] Carlos Pardo-Martin, Tsung-Yao Chang, Bryan Kyo Koo, Cody L Gilleland, Steven C Wasserman, and Mehmet Fatih Yanik. “high-throughput in vivo vertebrate screening.” In: *Nature Methods* 7.8 (Aug. 2010), pp. 634–636. DOI: [10.1038/nmeth.1481](https://doi.org/10.1038/nmeth.1481).
- [153] A E Parker, J A Christen, L Lorenz, and H Smith. “Optimal surface estimation and thresholding of confocal microscope images of biofilms using Beer’s Law.” In: *Journal of Microbi-*

- ological Methods* 174 (July 2020), p. 105943. DOI: [10.1016/j.mimet.2020.105943](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105943).
- [154] Marko Pende et al. "A versatile depigmentation, clearing, and labeling method for exploring nervous system diversity." In: *Science Advances* 6.22 (May 2020), eaba0365. ISSN: 2375-2548. DOI: [10.1126/sciadv.aba0365](https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0365).
- [155] Simon Perreault and Patrick Hebert. "Median filtering in constant time." In: *IEEE Transactions on Image Processing* 16.9 (Sept. 2007), pp. 2389–2394. ISSN: 1057-7149. DOI: [10.1109/TIP.2007.902329](https://doi.org/10.1109/TIP.2007.902329).
- [156] Edith L Pfister and Neil Aronin. "Huntington's disease: les jeux sont faits?" In: *Trends in Molecular Medicine* (Sept. 2020). DOI: [10.1016/j.molmed.2020.08.004](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.08.004).
- [157] Vadim Pinskiy, Alexander S Tolpygo, Jamie Jones, Kevin Weber, Neil Franciotti, and Partha P Mitra. "A low-cost technique to cryo-protect and freeze rodent brains, precisely aligned to stereotaxic coordinates for whole-brain cryosectioning." In: *Journal of Neuroscience Methods* 218.2 (Sept. 2013), pp. 206–213. DOI: [10.1016/j.jneumeth.2013.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.03.004).
- [158] Arjun Pitchai, Rajesh Kannan Rajaretinam, and Jennifer L Freeman. "Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders." In: *Medicines* 6.2 (May 2019). DOI: [10.3390/medicines6020061](https://doi.org/10.3390/medicines6020061).
- [159] Stephen M. Pizer, E. Philip Amburn, John D. Austin, Robert Cromartie, Ari Geselowitz, Trey Greer, Bart ter Haar Romeny, John B. Zimmerman, and Karel Zuiderveld. "Adaptive histogram equalization and its variations." In: *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* 39.3 (Sept. 1987), pp. 355–368. ISSN: 0734189X. DOI: [10.1016/S0734-189X\(87\)80186-X](https://doi.org/10.1016/S0734-189X(87)80186-X).
- [160] S S Polack. "The xenopus pregnancy test." In: *Canadian Medical Association journal* 60.2 (Feb. 1949), pp. 159–161.
- [161] Doris K Powe, Asok K Dasmahapatra, Joseph L Russell, and Paul B Tchounwou. "Toxicity implications for early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to oxyfluorfen." In: *Environmental toxicology* 33.5 (May 2018), pp. 555–568. DOI: [10.1002/tox.22541](https://doi.org/10.1002/tox.22541).
- [162] Rock Pulak. "Tools for automating the imaging of zebrafish larvae." In: *Methods* 96 (Mar. 2016), pp. 118–126. DOI: [10.1016/j.ymeth.2015.11.021](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.021).
- [163] Chao Qiu, Bin Cheng, Yunsheng Zhang, Rong Huang, Lanjie Liao, Yongming Li, Daji Luo, Wei Hu, and Yaping Wang. "Efficient knockout of transplanted green fluorescent protein gene in medaka using TALENs." In: *Marine Biotechnology* 16.6 (Dec. 2014), pp. 674–683. DOI: [10.1007/s10126-014-9584-x](https://doi.org/10.1007/s10126-014-9584-x).

- [164] Tasnia N Rahman, Martin Munz, Elena Kutsarova, Olesia M Bilash, and Edward S Ruthazer. "Stentian structural plasticity in the developing visual system." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117.20 (May 2020), pp. 10636–10638. DOI: [10.1073/pnas.2001107117](https://doi.org/10.1073/pnas.2001107117).
- [165] Martin Rajchl et al. "Deepcut: object segmentation from bounding box annotations using convolutional neural networks." In: *IEEE transactions on medical imaging* 36.2 (2017), pp. 674–683. DOI: [10.1109/TMI.2016.2621185](https://doi.org/10.1109/TMI.2016.2621185).
- [166] Hafiz Rehman and Sungon Lee. "An efficient automatic mid-sagittal plane extraction in brain MRI." In: *Applied Sciences* 8.11 (Nov. 2018), p. 2203. ISSN: 2076-3417. DOI: [10.3390/app8112203](https://doi.org/10.3390/app8112203).
- [167] Nicolas Renier, Zhuhao Wu, David J Simon, Jing Yang, Pablo Ariel, and Marc Tessier-Lavigne. "iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging." In: *Cell* 159.4 (Nov. 2014), pp. 896–910. ISSN: 00928674. DOI: [10.1016/j.cell.2014.10.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010).
- [168] Alexander Richardson, Sandra Fok, Victoria Lee, Kerry-Anne Rye, Nick Di Girolamo, and Blake J. Cochran. "Use of high-refractive index hydrogels and tissue clearing for large biological sample imaging." In: *BioRxiv* (Jan. 2020). DOI: [10.1101/2020.01.22.905695](https://doi.org/10.1101/2020.01.22.905695).
- [169] Olaf Ronneberger, Philipp Fischer, and Thomas Brox. "U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation." In: *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI)*. Ed. by Nassir Navab, Joachim Hornegger, William M. Wells, and Alejandro F. Frangi. Vol. 9351. Lecture notes in computer science. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 234–241. ISBN: 978-3-319-24573-7. DOI: [10.1007/978-3-319-24574-4_28](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28).
- [170] Laurens N Ruben, Richard H Clothier, and Michael Balls. "Cancer resistance in amphibians." In: *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 35.5 (Oct. 2007), pp. 463–470. DOI: [10.1177/026119290703500514](https://doi.org/10.1177/026119290703500514).
- [171] Darshan D Ruikar, K C Santosh, and Ravindra S Hegadi. "Automated Fractured Bone Segmentation and Labeling from CT Images." In: *Journal of medical systems* 43.3 (Feb. 2019), p. 60. DOI: [10.1007/s10916-019-1176-x](https://doi.org/10.1007/s10916-019-1176-x).
- [172] T. Sakai, M. Nagao, and S. Fujibayashi. "Line extraction and pattern detection in a photograph." In: *Pattern recognition* 1.3 (Mar. 1969), pp. 233–248. ISSN: 00313203. DOI: [10.1016/0031-3203\(69\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0031-3203(69)90006-5).

- [173] Suraiya Saleem and Rajaretinam Rajesh Kannan. "Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery." In: *Cell death discovery* 4 (Oct. 2018), p. 45. ISSN: 2058-7716. DOI: [10.1038/s41420-018-0109-7](https://doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7).
- [174] Julia L Sandell and Timothy C Zhu. "A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT." In: *Journal of biophotonics* 4.11-12 (Nov. 2011), pp. 773-787. DOI: [10.1002/jbio.201100062](https://doi.org/10.1002/jbio.201100062).
- [175] Swapnalee Sarmah and James A Marrs. "Zebrafish as a vertebrate model system to evaluate effects of environmental toxicants on cardiac development and function." In: *International Journal of Molecular Sciences* 17.12 (Dec. 2016). DOI: [10.3390/ijms17122123](https://doi.org/10.3390/ijms17122123).
- [176] Aaron M Savage et al. "tmem33 is essential for VEGF-Mediated endothelial calcium oscillations and angiogenesis." In: *Nature Communications* 10.1 (Feb. 2019), p. 732. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-019-08590-7](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08590-7).
- [177] Sang-Wook Shin, Dong-Hee Kim, Won Kyung Jeon, and Jung-Soo Han. "4-Hydroxynonenal Immunoreactivity Is Increased in the Frontal Cortex of 5XFAD Transgenic Mice." In: *Biomedicines* 8.9 (Sept. 2020). DOI: [10.3390/biomedicines8090326](https://doi.org/10.3390/biomedicines8090326).
- [178] Karen Simonyan and Andrew Zisserman. "Very Deep Convolutional Networks for Large-Scale Image Recognition." In: *arXiv* (Sept. 2014).
- [179] P. Soille and H. Talbot. "Directional morphological filtering." In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 23.11 (2001), pp. 1313-1329. ISSN: 01628828. DOI: [10.1109/34.969120](https://doi.org/10.1109/34.969120).
- [180] Sonali, Sima Sahu, Amit Kumar Singh, S.P. Ghrera, and Mohamed Elhoseny. "An approach for de-noising and contrast enhancement of retinal fundus image using CLAHE." In: *Optics & Laser Technology* 110 (July 2018), pp. 87-98. ISSN: 00303992. DOI: [10.1016/j.optlastec.2018.06.061](https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.06.061).
- [181] Petra Spirhanzlova, Mathilde Leleu, Anthony Sébillot, Gregory F Lemkine, Taisen Iguchi, Barbara A Demeneix, and Andrew J Tindall. "Oestrogen reporter transgenic medaka for non-invasive evaluation of aromatase activity." In: *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology* 179 (Jan. 2016), pp. 64-71. DOI: [10.1016/j.cbpc.2015.08.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.011).
- [182] Petrus J Steenbergen, Jana Heigwer, Gunjan Pandey, Burkhard Tönshoff, Jochen Gehrig, and Jens H Westhoff. "A multiparametric assay platform for simultaneous in vivo assessment of

- pronephric morphology, renal function and heart rate in larval zebrafish." In: *Cells* 9.5 (May 2020). DOI: [10.3390/cells9051269](https://doi.org/10.3390/cells9051269).
- [183] Vincent Stimper, Stefan Bauer, Ralph Ernstorfer, Bernhard Scholkopf, and Rui Patrick Xian. "Multidimensional contrast limited adaptive histogram equalization." In: *IEEE access : practical innovations, open solutions* 7 (2019), pp. 165437–165447. ISSN: 2169-3536. DOI: [10.1109/ACCESS.2019.2952899](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2952899).
- [184] T Sund and A M. "Sliding window adaptive histogram equalization of intraoral radiographs: effect on image quality." In: *Dento Maxillo Facial Radiology* 35.3 (May 2006), pp. 133–138. DOI: [10.1259/dmfr/21936923](https://doi.org/10.1259/dmfr/21936923).
- [185] Etsuo A Susaki, Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Hiroko Yukinaga, Akihiro Kuno, and Hiroki R Ueda. "Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging." In: *Nature Protocols* 10.11 (Nov. 2015), pp. 1709–1727. DOI: [10.1038/nprot.2015.085](https://doi.org/10.1038/nprot.2015.085).
- [186] Etsuo A Susaki et al. "Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis." In: *Cell* 157.3 (Apr. 2014), pp. 726–739. DOI: [10.1016/j.cell.2014.03.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042).
- [187] Kazuki Tainaka, Akihiro Kuno, Shimpei I Kubota, Tatzya Murakami, and Hiroki R Ueda. "Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling." In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32 (Oct. 2016), pp. 713–741. DOI: [10.1146/annurev-cellbio-111315-125001](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125001).
- [188] Hugues Talbot and Ben Appleton. "Efficient complete and incomplete path openings and closings." In: *Image and vision computing* 25.4 (Apr. 2007), pp. 416–425. ISSN: 02628856. DOI: [10.1016/j.imavis.2006.07.021](https://doi.org/10.1016/j.imavis.2006.07.021).
- [189] Wenjun Tan, Ying Kang, Zhiwei Dong, Chao Chen, Xiaoxia Yin, Ying Su, Yanchun Zhang, Li Zhang, and Lisheng Xu. "An approach to extraction midsagittal plane of skull from brain CT images for oral and maxillofacial surgery." In: *IEEE access : practical innovations, open solutions* 7 (2019), pp. 118203–118217. ISSN: 2169-3536. DOI: [10.1109/ACCESS.2019.2920862](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2920862).
- [190] Panna Tandon, Frank Conlon, J David Furlow, and Marko E Horb. "Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: Approaches and opportunities for human disease modeling." In: *Developmental Biology* 426.2 (June 2017), pp. 325–335. DOI: [10.1016/j.ydbio.2016.04.009](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.009).

- [191] Elisabet Teixidó, Tobias R Kie, Eckart Krupp, Celia Quevedo, Arantza Muriana, and Stefan Scholz. "Automated morphological feature assessment for zebrafish embryo developmental toxicity screens." In: *Toxicological Sciences* 167.2 (Feb. 2019), pp. 438–449. DOI: [10.1093/toxsci/kfy250](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy250).
- [192] *Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition* | en | OECD. WEBSITE.
- [193] Nidheesh Thadathil, David F Delotterie, Jianfeng Xiao, Roderick Hori, Michael P McDonald, and Mohammad Moshahid Khan. "DNA Double-Strand Break Accumulation in Alzheimer's Disease: Evidence from Experimental Models and Postmortem Human Brains." In: *Molecular Neurobiology* (Sept. 2020). DOI: [10.1007/s12035-020-02109-8](https://doi.org/10.1007/s12035-020-02109-8).
- [194] Chiara Tobia, Giulia De Sena, and Marco Presta. "Zebrafish embryo, a tool to study tumor angiogenesis." In: *The International Journal of Developmental Biology* 55.4-5 (2011), pp. 505–509. DOI: [10.1387/ijdb.103238ct](https://doi.org/10.1387/ijdb.103238ct).
- [195] Raju Tomer, Li Ye, Brian Hsueh, and Karl Deisseroth. "Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues." In: *Nature Protocols* 9.7 (July 2014), pp. 1682–1697. DOI: [10.1038/nprot.2014.123](https://doi.org/10.1038/nprot.2014.123).
- [196] Nuo Tong, Shuiping Gou, Shuyuan Yang, Dan Ruan, and Ke Sheng. "Fully automatic multi-organ segmentation for head and neck cancer radiotherapy using shape representation model constrained fully convolutional neural networks." In: *Medical Physics* 45.10 (Oct. 2018), pp. 4558–4567. DOI: [10.1002/mp.13147](https://doi.org/10.1002/mp.13147).
- [197] Dang Ba Khac Trieu and Tsutomu Maruyama. "Real-time image segmentation based on a parallel and pipelined watershed algorithm." In: *Journal of Real-Time Image Processing* 2.4 (Dec. 2007), pp. 319–329. ISSN: 1861-8200. DOI: [10.1007/s11554-007-0051-z](https://doi.org/10.1007/s11554-007-0051-z).
- [198] Hiroki R Ueda, Ali Ertürk, Kwanghun Chung, Viviana Gradinaru, Alain Chédotal, Pavel Tomancak, and Philipp J Keller. "Tissue clearing and its applications in neuroscience." In: *Nature Reviews. Neuroscience* 21.2 (2020), pp. 61–79. ISSN: 1471-003X. DOI: [10.1038/s41583-019-0250-1](https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1).
- [199] Marc Van Droogenbroeck and Hugues Talbot. "Fast computation of morphological operations with arbitrary structuring elements." In: *Pattern recognition letters* 17.14 (Dec. 1996), pp. 1451–1460. ISSN: 01678655. DOI: [10.1016/S0167-8655\(96\)00113-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(96)00113-4).

- [200] Rita L Vaz, Tiago F Outeiro, and Joaquim J Ferreira. “Zebrafish as an animal model for drug discovery in parkinson’s disease and other movement disorders: A systematic review.” In: *Frontiers in neurology* 9 (June 2018), p. 347. ISSN: 1664-2295. DOI: [10.3389/fneur.2018.00347](https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00347).
- [201] Christine Vesque et al. “Loss of the Reissner Fiber and increased URP neuropeptide signaling underlie scoliosis in a zebrafish ciliopathy mutant.” In: *BioRxiv* (Dec. 2019). DOI: [10.1101/2019.12.19.882258](https://doi.org/10.1101/2019.12.19.882258).
- [202] Justine Viet, David Reboutier, Serge Hardy, Salil A Lachke, Luc Paillard, and Carole Gautier-Courteille. “Modeling ocular lens disease in *Xenopus*.” In: *Developmental Dynamics* 249.5 (May 2020), pp. 610–621. DOI: [10.1002/dvdy.147](https://doi.org/10.1002/dvdy.147).
- [203] L. Vincent and P. Soille. “Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations.” In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 13.6 (June 1991), pp. 583–598. ISSN: 01628828. DOI: [10.1109/34.87344](https://doi.org/10.1109/34.87344).
- [204] A H Voie, D H Burns, and F A Spelman. “Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens.” In: *Journal of Microscopy* 170.Pt 3 (June 1993), pp. 229–236. ISSN: 00222720. DOI: [10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x).
- [205] Anjali Wadhwa, Anuj Bhardwaj, and Vivek Singh Verma. “A review on brain tumor segmentation of MRI images.” In: *Magnetic Resonance Imaging* 61 (June 2019), pp. 247–259. DOI: [10.1016/j.mri.2019.05.043](https://doi.org/10.1016/j.mri.2019.05.043).
- [206] Noorul Wahab, Asifullah Khan, and Yeon Soo Lee. “Transfer learning based deep CNN for segmentation and detection of mitoses in breast cancer histopathological images.” In: *Microscopy (Oxford, England)* 68.3 (June 2019), pp. 216–233. DOI: [10.1093/jmicro/dfz002](https://doi.org/10.1093/jmicro/dfz002).
- [207] Brian P Walcott and Randall T Peterson. “Zebrafish models of cerebrovascular disease.” In: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34.4 (Apr. 2014), pp. 571–577. DOI: [10.1038/jcbfm.2014.27](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.27).
- [208] Ikuko Watakabe, Hisashi Hashimoto, Yukiko Kimura, Saori Yokoi, Kiyoshi Naruse, and Shin-Ichi Higashijima. “Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-Mediated genome engineering.” In: *Zoological Letters* 4 (Feb. 2018), p. 3. DOI: [10.1186/s40851-017-0086-3](https://doi.org/10.1186/s40851-017-0086-3).
- [209] Jaime N Wertman, Nicole Melong, Matthew R Stoyek, Olivia Piccolo, Stewart Langley, Benno Orr, Shelby L Steele, Babak Razaghi, and Jason N Berman. “The identification of dual protective agents against cisplatin-induced oto- and nephrotoxic-

- ity using the zebrafish model." In: 9 (July 2020). DOI: [10.7554/eLife.56235](https://doi.org/10.7554/eLife.56235).
- [210] Christian Wesemann, Stefano Pieralli, Tobias Fretwurst, Julian Nold, Katja Nelson, Rainer Schmelzeisen, Elmar Hellwig, and Benedikt Christopher Spies. "3-D Printed Protective Equipment during COVID-19 Pandemic." In: *Materials* 13.8 (Apr. 2020). DOI: [10.3390/ma13081997](https://doi.org/10.3390/ma13081997).
- [211] Jens H Westhoff, Petrus J Steenbergen, Laurent S V Thomas, Jana Heigwer, Thomas Bruckner, Ledean Cooper, Burkhard Tönshoff, Georg F Hoffmann, and Jochen Gehrig. "In vivo high-Content Screening in Zebrafish for Developmental Nephrotoxicity of Approved Drugs." In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8 (July 2020), p. 583. DOI: [10.3389/fcell.2020.00583](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00583).
- [212] David T White et al. "ARQiv-HTS, a versatile whole-organism screening platform enabling in vivo drug discovery at high-throughput rates." In: *Nature Protocols* 11.12 (Dec. 2016), pp. 2432–2453. DOI: [10.1038/nprot.2016.142](https://doi.org/10.1038/nprot.2016.142).
- [213] Richard Mark White et al. "Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis." In: *Cell Stem Cell* 2.2 (Feb. 2008), pp. 183–189. DOI: [10.1016/j.stem.2007.11.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002).
- [214] Marco Willi, Ross T. Pitman, Anabelle W. Cardoso, Christina Locke, Alexandra Swanson, Amy Boyer, Marten Veldhuis, and Lucy Fortson. "Identifying animal species in camera trap images using deep learning and citizen science." In: *Methods in ecology and evolution / British Ecological Society* 10.1 (Jan. 2019), pp. 80–91. ISSN: 2041-210X. DOI: [10.1111/2041-210X.13099](https://doi.org/10.1111/2041-210X.13099).
- [215] Jonas N Wittbrodt, Urban Liebel, and Jochen Gehrig. "Generation of orientation tools for automated zebrafish screening assays using desktop 3D printing." In: *BMC Biotechnology* 14 (May 2014), p. 36. DOI: [10.1186/1472-6750-14-36](https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-36).
- [216] Fengying Xie, Jiawen Yang, Jie Liu, Zhiguo Jiang, Yushan Zheng, and Yukun Wang. "Skin lesion segmentation using high-resolution convolutional neural network." In: *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 186 (Apr. 2020), p. 105241. DOI: [10.1016/j.cmpb.2019.105241](https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105241).
- [217] Lu Xu et al. "DW-Net: A cascaded convolutional neural network for apical four-chamber view segmentation in fetal echocardiography." In: *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society* 80 (2020), p. 101690. DOI: [10.1016/j.compmedimag.2019.101690](https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2019.101690).

- [218] Yongchao Xu, Thierry Géraud, Élodie Puybureau, Isabelle Bloch, and Joseph Chazalon. “White matter hyperintensities segmentation in a few seconds using fully convolutional network and transfer learning.” In: *Brainlesion: Glioma, Multiple Sclerosis, Stroke and Traumatic Brain Injuries: Third International Workshop, BrainLes 2017, Held in Conjunction with MICCAI 2017, Quebec City, QC, Canada, September 14, 2017, Revised Selected Papers*. Ed. by Alessandro Crimi, Spyridon Bakas, Hugo Kuijf, Bjoern Menze, and Mauricio Reyes. Vol. 10670. Lecture notes in computer science. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 501–514. ISBN: 978-3-319-75237-2. DOI: [10.1007/978-3-319-75238-9_42](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75238-9_42).
- [219] Kun Zhang, Hongbin Zhang, Huiyu Zhou, Danny Crookes, Ling Li, Yeqin Shao, and Dong Liu. “Zebrafish embryo vessel segmentation using a novel dual resunet model.” In: *Computational intelligence and neuroscience 2019* (Feb. 2019), p. 8214975. DOI: [10.1155/2019/8214975](https://doi.org/10.1155/2019/8214975).
- [220] Ning Zhang, Susan Francis, Rayaz A. Malik, and Xin Chen. “A spatially constrained deep convolutional neural network for nerve fiber segmentation in corneal confocal microscopic images using inaccurate annotations.” In: *2020 IEEE 17th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. IEEE, Apr. 2020, pp. 456–460. ISBN: 978-1-5386-9330-8. DOI: [10.1109/ISBI45749.2020.9098662](https://doi.org/10.1109/ISBI45749.2020.9098662).
- [221] Yihan Zhang, Wei Qin, Xiaochan Lu, Jason Xu, Haigen Huang, Haipeng Bai, Song Li, and Shuo Lin. “Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system.” In: *Nature Communications* 8.1 (July 2017), p. 118. DOI: [10.1038/s41467-017-00175-6](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00175-6).
- [222] Amy Zhao, Guha Balakrishnan, Fredo Durand, John V. Guttag, and Adrian V. Dalca. “Data Augmentation Using Learned Transformations for One-Shot Medical Image Segmentation.” In: *2019 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. IEEE, June 2019, pp. 8535–8545. ISBN: 978-1-7281-3293-8. DOI: [10.1109/CVPR.2019.00874](https://doi.org/10.1109/CVPR.2019.00874).
- [223] Yu Zhao, Hongwei Li, Shaohua Wan, Anjany Sekuboyina, Xiaobin Hu, Giles Tetteh, Marie Piraud, and Bjoern Menze. “Knowledge-aided Convolutional Neural Network for Small Organ Segmentation.” In: *IEEE journal of biomedical and health informatics* 23.4 (Jan. 2019), pp. 1363–1373. DOI: [10.1109/JBHI.2019.2891526](https://doi.org/10.1109/JBHI.2019.2891526).
- [224] Hao Zhu and Menghang Xia, eds. *high-Throughput Screening Assays in Toxicology*. Vol. 1473. Methods in molecular biology. New York, NY: Springer New York, 2016. ISBN: 978-1-4939-6344-7. DOI: [10.1007/978-1-4939-6346-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1).

COLOPHON

This document was typeset using the typographical look-and-feel `classicthesis` developed by André Miede. The style was inspired by Robert Bringhurst's seminal book on typography "*The Elements of Typographic Style*". `classicthesis` is available for both \LaTeX and \LyX :

<https://bitbucket.org/amiede/classicthesis/>

Happy users of `classicthesis` usually send a real postcard to the author, a collection of postcards received so far is featured here:

<http://postcards.miede.de/>

Final Version as of March 18, 2021 (`classicthesis`).