

ATELIERS

2) Small animal Imaging (Fluorescence/bioluminescence)

Bioluminescence/Fluo :

Deux systèmes d'imagerie macroscopique du petit animal seront présentés :

- Hamamatsu Aequoria system équipé avec l'option Luciflux et soft Wasabi (voir pdf)
- Caliper : IVIS Kinetic (voir pdf)

Ces appareils permettent de suivre l'expression de la plupart des gènes reporters couramment utilisés en biologie (luciférase, β -galactosidase, GFP) mais aussi de suivre de façon non invasive la distribution de fluorophores qui émettent dans le proche infrarouge.

Imagerie Fluorescence en 3D :

Un appareil développé en interne et prochainement commercialisé permettant de faire de l'imagerie profonde en 3D en fluorescence sera présenté. Cet appareil dispose des avantages du système de fluorescence 2D mais permet aussi la reconstruction d'images en 3D, et donne accès à des informations en provenance d'organes profonds (cœur, foie, poumons...), comme par exemple la progression de métastases pulmonaires, non-visibles en 2D mais accessibles après reconstruction 3D.

Imagerie de Fluorescence en 2D :

En plus des 2 appareils Aequoria et IVIS, nous utiliserons :

Le Fluobeam : développé pour la chirurgie assistée par l'imagerie optique : cet appareil commercialisé par la société Fluoptics (<http://fluoptics.com>) permet de faire de l'imagerie fluorescente en 2D. Ce système est portable et travaille en fluorescence même sous un fort éclairage typique des salles de chirurgie (scialytique).

Macrofluo (Leica : voir pdf) : Ce système ressemble à une binoculaire et permet de faire la jonction entre les mondes macro et micro.

3) TCSPC-FLIM

L'atelier « Microscopie en durée de vie de fluorescence par comptage de photons uniques corrélés dans le temps » (TCSPC-FLIM) » est orienté vers les personnes (étudiants, ITA ou chercheurs) souhaitant utiliser l'approche FLIM dans le domaine temporel ou développer cette instrumentation sur la base d'un microscope biphotonique. L'application du FLIM pour la détection du microenvironnement des sondes fluorescentes, l'étude des interactions moléculaires, ou encore la combinaison du FLIM avec d'autres F-techniques seront considérés d'un point de vue théorique et pratique.

4) RICS/FCS

L'atelier est consacré à la technique de Raster Image Correlation Spectroscopy (RICS) en comparaison avec la Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) sur la base de microscope Carl Zeiss LSM710/Confocor 3. Le microscope multimodal permettra d'appliquer différentes F-techniques sur le même échantillon pour déterminer les paramètres de diffusion moléculaire sans perturber l'équilibre des processus biologiques. Les deux méthodes complémentaires permettront de déterminer la vitesse de diffusion, la concentration locale, l'anisotropie de mobilité, le nombre de composantes etc.

5) Rapid cytosolic protein silencing by photoinactivation (CALI)

In order to induce a rapid depletion of a specific cytosolic protein, we propose to couple genetic approach with rescue experiments, using proteins tagged with the photosensitizer protein Killer Red.

6) DHM (Digital Holographic Microscopy)

DHM is a new microscopy which gives access to information on the optical properties of living material and namely the refraction index and optical thickness. For example, it makes it possible to observe and quantify rapid morphological changes of cells in the axial direction with a very high accuracy (nanometer range) in real time. It is also possible to measure changes in ionic content in the cytosol in real time. The aim of this workshop is to introduce this new technology and some examples of applications on living cells will be shown.

7) Elastography of biological samples by atomic force spectroscopy (AFM)

This session focuses on the determination of the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. Demonstration will be conducted using the spectroscopy force mode, showing how force distance curves can be obtained by indentation of the biological sample on specific locations. Analysis of the experimental curves will be illustrated and discussed with regard to the considered assumptions.

8) FCS multipoint

Nous montrerons une expérience de FCS multicon focale (en cours de développement, en collaboration avec l'IAB et TIMC), en utilisant un modulateur spatial de lumière (tel que ceux utilisés pour les pinces optiques holographiques) et une caméra EM-CCD (très rapide et très sensible). Il est possible de recueillir simultanément les signaux de fluorescence provenant de plusieurs spots laser positionnés à la demande dans une ou plusieurs cellules vivantes. On obtient ainsi des informations sur la concentration et la mobilité des molécules marquées en fluorescence, comme en FCS "classique".

9) Cytométrie par analyse d'images

L'atelier concerne l'application des techniques de cytométrie par analyse d'images en utilisant le système Olympus ScanR. Le système se base sur un microscope automatisé pour l'acquisition de données en masse sur des supports et des conditions variées (P96, Petri, lame) couplé à un logiciel d'analyse d'images permettant le traitement de données en masse (HCS).

10) Cryo-electron microscopy

We would like to introduce what we can do in biology (single particle and tomography) using a state of art cryo electron microscope. This demo will start with the freezing of the sample using a fully automate vitrobot, continue with the transfer and the imaging of the frozen sample in the microscope. If time is available we will also talk about 3D reconstruction technique and the results we can obtain.

11) Imagerie topographique par AFM sur objets biologiques: protéines, bactéries et cellules

L'atelier est consacré à la microscopie à force atomique, une technique en très fort développement actuellement pour des applications à l'imagerie *in situ* en milieu liquide d'échantillons biologiques. Par AFM, différentes structures moléculaires et cellulaires peuvent être résolues avec une résolution latérale pouvant aller jusqu'au nanomètre (celle-ci dépend de la pointe utilisée). Nous verrons le principe de la mesure, ainsi que les modes d'observation courants avant d'imager la topographie d'échantillons biologiques déposés sur des supports : une protéine de la matrice extra-cellulaire, un biofilm bactérien et des protrusions membranaires formées par des cellules.

12) Using Adhesive Micropatterns for Cell Normalization and Quantitative Cell Analysis

Reducing cell variability and developing efficient image analysis methodologies are key in reaching high quality quantitative cell analysis both in fundamental cell biology and in a vast range of High Content Analysis assays. This scientific workshop will introduce researchers to a powerful technology based on CYTOO's adhesive micropatterns which normalize cell architecture down to their internal organization. The workshop will focus on the practical aspects of using micropatterned CYTOOchips™ in a model "dose-response" drug assay. During the session, after a presentation of a typical adhesive micropattern experiment workflow, we will demonstrate how to: (i) efficiently automate the image acquisition with cells plated on micropatterned CYTOOchips using a motorized fluorescence microscope; (ii) apply various cell analysis algorithms to measure parameters of interest within individual cells (using MetaMorph or ImageJ macros) ; (iii) introduce the concept of a Reference Cell™ and (iv) compare the reproducibility of results obtained on micropatterned vs conventional supports. Criteria for designing Custom micropatterns will be discussed as well.