

5-12
Oct
2018



Seignosses
France

Lectures

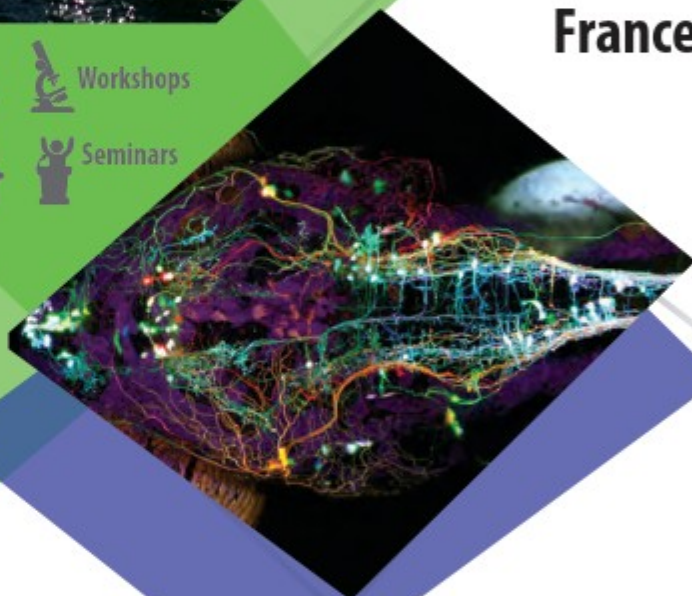
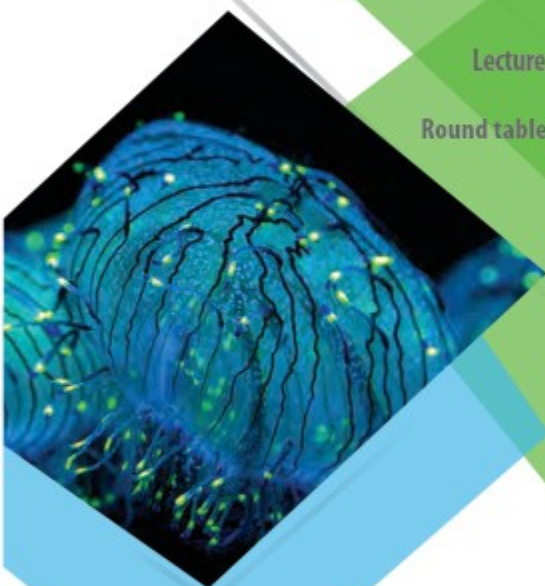


Workshops

Round tables



Seminars



MiFoBio

Functional Microscopy for **Biology**



CNRS Thematic School

MiFoBio2018

GdR ImaBio



CNRS-Inserm-Aviesan-FBI-RTmfm

Partenaires Académiques

MiFoBio 2018



SOMMAIRE

<i>Sommaire</i>	1
<i>Remerciements</i>	3
<i>Deux des nôtres manquent à l'appel cette année</i>	5
<i>MiFoBio une école en évolution permanente</i>	6
<i>Comité d'organisation</i>	7
<i>Pré-modules</i>	9
<i>Modules fondamentaux</i>	11
<i>Planning des cours</i>	13
<i>Modules</i>	21
MODULE 1 : Imagerie Multicellulaire : Embryon, organoïdes et tissus	21
MODULE 2 : Nanoscopies : de la molécule à la cellule, marquage, quantification	27
MODULE 3 : Mécanobiologie	34
MODULE 4 : Analyse et modélisation des Dynamiques et interactions Moléculaires en cellules vivantes	38
MODULE 5 : Nouveaux agents de contraste, biosenseurs, sondes, nanovecteurs, physique des fluorophores	43
MODULE 6 : Ondes sur le vivant (avec GDR ondes) : Imagerie dans les tissus, le défi des milieux diffusants hétérogènes – optique adaptative	48
MODULE 7 : Automatisation, haut contenu, et multimodalité	53
<i>Séminaires</i>	59
<i>Challenge Bio</i>	67
<i>Modules avancés / Tables rondes</i>	68
<i>Modules avancés</i>	69
<i>Tables rondes</i>	71
<i>Parcours thématiques</i>	77
<i>Bar à images</i>	87
<i>Challenge HCS</i>	89
<i>FABLAB</i>	93
<i>Planning ateliers</i>	95
<i>Fiches descriptives des ateliers</i>	107
<i>Partenaires académiques</i>	173
<i>Sponsors</i>	175
<i>Partenaires culture 2018</i>	177
<i>Partenaires MiFoBio 2018</i>	179
<i>Liste des participants</i>	185
<i>Liste des intervenants</i>	203



REMERCIEMENTS

L'équipe d'organisation est heureuse de vous accueillir pour cette nouvelle édition 2018 de l'école CNRS : MiFoBio. Cette formation est portée par le GDR ImaBio (imagerie et microscopie pour la biologie) dans le cadre des actions de la Formation Permanente du CNRS en collaboration avec les formations permanentes de l'INSERM. Elle est organisée avec le soutien de France BioImaging (FBI), AVIESAN (ITMO BCDE et ITS), ainsi que du réseau technologique de microscopie optique (RT mfm). Cette formation bénéficie aussi de l'aide des communautés des GDRs Ondes, ADN, Isis et CellTiss.

Nous souhaitons remercier les personnels des formations permanentes et des services administratifs du CNRS et de l'INSERM, en particulier Dorothee Terryn, Aline Macau, Fabienne Lebleu, Anne-Sophie Bonne, Pierre Silveira, Marie-Claude Begot, et Franck Lienard pour leur soutien et leur aide, au combien importante et chronophage, dans la mise en place de cette école.

Que Jean Marc Blondy et son équipe qui assurent la gestion au niveau national des écoles thématiques, trouvent ici l'expression de nos remerciements pour leur travail à long terme pour rendre possible au CNRS de tels événements. Nous remercions également Jean-Claude Pommier, Chargé de mission pour la formation permanente à l'INSIS, pour son soutien et son accompagnement dans ce projet et pour cette première édition de MiFoBio sous le patronage de l'INSIS.

Nous exprimons nos sincères remerciements aux intervenants pour leur participation, la qualité de leurs cours et conférences, et pour leur enthousiasme. De même, nous remercions ceux qui ont accepté d'animer les pré-modules, les modules avancés et tables rondes.

L'ensemble de l'équipe tient à remercier tous les collègues impliqués dans la mise au point et la réalisation de chaque atelier dont la variété est une richesse pour l'école, mais aussi ceux qui ont assuré la mise à disposition des modèles cellulaires et animaux.

Nous tenons à saluer en particulier l'effort des équipes qui apportent à MiFoBio des systèmes expérimentaux "home made". Nous savons que c'est un investissement en temps et moyens important. Ces ateliers sont des « locomotives » pour les développements instrumentaux. Un grand merci à celles et ceux qui les portent.

Nous remercions les partenaires industriels de cette école pour leur engagement dans cette aventure, leur fort soutien et la mise à disposition d'un parc technologique exceptionnel, qui nous permet de réaliser les ateliers pratiques dans d'excellentes conditions, sur du matériel à l'état de l'art.

Nous remercions le comité scientifique de MiFoBio qui a rendu possible ce projet, ainsi que plusieurs DSA et chargés de missions de l'INSIS, l'INSB, l'INP et l'INC, pour leur soutien. De même, nous remercions les comités des sections scientifiques du CNRS qui nous ont fortement soutenus lors de leur évaluation du projet.

Nous remercions également le personnel du centre de vacances Belambra, pour son accueil et son aide, la mise à disposition de locaux et le soutien technique qu'il nous a apporté.

Nous n'oublions pas l'ensemble des membres du comité d'organisation et plus généralement tous ceux et celles qui ont mis la "main à la pâte" pour la qualité des échanges et du travail réalisé depuis 12 mois.

A ce titre nous souhaitons souligner la forte implication des groupes Ateliers, Logistique et salle de culture qui fournissent au fil des éditions de MiFoBio un travail toujours plus important, de grande qualité et avec dévouement pour la communauté. Nous souhaitons ajouter un remerciement particulier pour la nouvelle équipe de suivi des parcours thématiques (atelier, tables-rondes, cours avancés...) qui a porté une nouvelle dynamique dans l'articulation pédagogique de l'école. Comme en 2016, Fabrice Cordelières a apporté son savoir-faire et beaucoup de son temps dans la mise en place d'un outil efficace de gestion des ateliers en ligne dont vous avez tous pu bénéficier lors de vos inscriptions. Un grand merci au nom de tous. Qu'Aurélien Agneray et Tristan Piolot trouvent aussi l'expression des remerciements de tous pour la mise en place, dans des conditions difficiles, du nouveau site web du GdR ImaBio, qui héberge les pages de MiFoBio. Ils ont travaillé d'arrache pied pour trouver des solutions dans l'urgence afin de lancer les inscriptions... Cette nouvelle solution pérenne sera un atout pour les années à venir !

L'équipe qui assure le fonctionnement de la salle de culture et le maintien des modèles aquatiques mérite la reconnaissance de l'ensemble des participants pour son dévouement à cette tâche qui les prive de fait d'une pleine participation à MiFoBio.

Pour finir, nous remercions Stéphanie Costeur, qui participe à son premier MiFoBio comme gestionnaire du GdR ImaBio, pour tout le travail réalisé pour cette école : gestions des billets des intervenants, des commandes d'équipement, transport, locations, Nous avons une pensée affectueuse pour Paulette Souillard qui profite avec bonheur de sa retraite bien méritée !

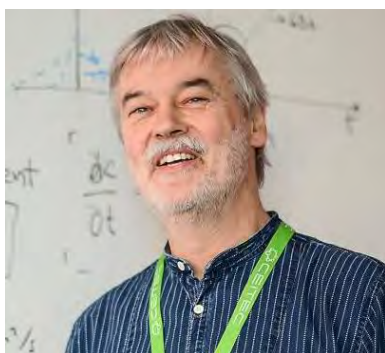
Merci à toutes et tous pour avoir rendu possible cette exceptionnelle aventure humaine et technologique.

*Laurent Héliot, Serge Monneret, Tristan Piolot
pour le comité de pilotage*



DEUX DES NÔTRES MANQUENT À L'APPEL CETTE ANNÉE....

Deux des nôtres manquent à l'appel cette année... C'est avec tristesse que nous apprenions en mai 2017 le décès de Joerg Langowski, puis en août dernier celui de Maxime Dahan, nous laissant sans voix, désespérés devant des départs aussi brutaux. Nous avons naturellement une pensée pour eux et leurs familles au moment de lancer cette nouvelle édition de l'école. L'un comme l'autre ont toujours apporté leur soutien indéfectible à ce projet d'école et au GdR. Ils y ont contribué par des enseignements, l'implication dans des ateliers et de façon plus discrète en répondant à chacune de nos demandes de conseils sur le programme. Ils ont mis leurs réseaux de contacts au service de l'école pour faire venir plusieurs intervenants de grande qualité avec toujours beaucoup de justesse dans les choix. C'est à Maxime que nous devons la participation d'Eric Bezig en 2014 à la veille de l'attribution du prix Nobel! Mais plus encore, Joerg et Maxime avaient le goût de partager leur savoir avec sympathie et dynamisme mais aussi humour et ils avaient le sens de la fête et de la vie à partager. Nous aurons l'occasion lors de MiFoBio de rendre hommage à ces deux collègues qui ont contribué à la reconnaissance actuelle de notre école.



It is with sadness that we learn in May 2017 the death of Joerg Langowski in August 2018 that of Maxime Dahan. We were helpless in the face of such brutal departures. Of course, we have a thought for them and their families at the time of launching this new edition of the school MiFoBio to which one and the other had to participate!

Both have always supported this school and the GoR. They have contributed lessons, involvement in workshops and more discreetly by responding to each of our requests for advice on the program. They put their networks of contacts at the service of the school to bring several high quality speakers with great accuracy in the choices. It is to Maxime that we owe the participation of Eric Bezig in 2014 on the eve of the awarding of the Nobel Prize!

Joerg and Maxime had the taste to share their knowledge with sympathy and dynamism but also humor and they had the sense of celebration and life to share together. We will have the opportunity at MiFoBio to pay tribute to these two colleagues who have contributed to the current recognition of our school.

MiFoBio UNE ECOLE EN EVOLUTION PERMANENTE.....

Pour cette édition 2018, l'école MiFoBio reste au pied du même phare qu'en 2014 et 2016, à Seignosse. Mais si l'amarre reste la même, le bateau quant à lui a encore bien évolué, avec un accent particulier sur la pédagogie de transmissions des savoir-faire. MiFoBio 2018 permettra d'explorer les plus récents développements en microscopie, de présenter des approches de plus en plus interdisciplinaires pour comprendre et interpréter les dynamiques et interactions moléculaires en cellules, suivre les développements en optogénétique, biosenseurs ou sur les organoïdes et leur manipulation, appréhender la continuité entre la biomécanique cellulaire et l'imagerie dynamique dans les petits animaux, découvrir les nouvelles imageries du vivant et le potentiel émergent des progrès en optique et biologie cellulaire...

L'aventure continue, et nous souhaitons que MiFoBio reste une entreprise commune d'échange des savoirs où chacune et chacun apprend et enseigne, car nous sommes tous détenteur d'un peu de savoir et de beaucoup d'ignorance.

Bon MiFobio 2018 à toutes et à tous !

On the occasion of this new edition 2018 MiFoBio school, we remain at the foot of the same lighthouse in 2014 and 2016, in Seignosse. But if the mooring remains the same, the boat has evolved again, with a particular emphasis on the pedagogy of transmissions of practical know-how at the level of workshops and a FabLab.

MiFoBio 2018 will allow to explore the latest developments in microscopy, to present more and more interdisciplinary approaches to understand and interpret molecular dynamics and interactions in cells, to follow developments in optogenetics, biosensors or organoids and their handling, to apprehend the continuity between cellular biomechanics and dynamic imaging in small animals, discovering the new imaging of life and the emerging potential of advances in optics and cell biology ...

The adventure continues, and we hope that MiFoBio will remain a "common laboratory" for the exchange of knowledge where everyone learns and teaches, because we are all holders of a little knowledge and a lot of ignorance.

Good MiFobio 2018 to all!



COMITÉ D'ORGANISATION

Responsables Scientifiques	Responsables formations permanentes	Responsable administrative
<p>Laurent Héliot PhLAM UMR 8523 laurent.heliot@univ-lille1.fr</p> <p>Serge Monneret Institut Fresnel-UMR7249 serge.monneret@fresnel.fr</p> <p>Tristan Piolot Collège de France- CNRS tristan.piolot@college-de-france.fr</p>	<p>Pierre Silveira Formation INSERM DR 18 pierre.silveira@dr18.cnrs.fr</p> <p>Dorothee Terryn Formation Inserm DR Nord-Ouest dorothee.terryn@inserm.fr</p>	<p>Stéphanie Costeur GDR ImaBio PhLAM UMR 8523 Villeneuve d'Ascq Stephanie.costeur@univ-lille.fr</p>

Comité d'Organisation 2018

<p>Modules et séminaires</p> <p>Martial Balland Hugues Berry Gabriel Bidaux Dominique Bourgeois Sophie Brasselet Antoine Coulon Cyril Favard Laurent Héliot* Laetitia Kurzawa Sandrine Lévêque-Fort* Gaël Moneron Fabienne Mérola Catherine Picart Cathie Vantalou Thomas Walter</p> <p>Pré-modules</p> <p>Gabriel Bidaux Frédéric Bolze* Olivier Haeberlé Delphine Muriaux Bertrand Simon Thomas Walter</p> <p>Modules avancés et tables rondes</p> <p>Alain Dieterlen Perrine Paul-Gilloteaux*</p> <p>Bar à Image</p> <p>Fabrice Cordellières Perrine Paul-Gilloteaux Daniel Sage</p> <p>Sponsors académiques</p> <p>Olivier Renaud * Membres du comité de pilotage</p>	<p>FabLab MiFoBio</p> <p>Brice Detailleur Marie Fournier Christian Rouvière</p> <p>Setion Posters</p> <p>Bertrand Simon</p> <p>Coordination Ateliers</p> <p>Fabrice Cordellières* Sandrine Lécart* Christine Terryn*</p> <p>Gestion des thématiques ateliers et parcours</p> <p>Sophie Allart Giulia Bertolin Gabriel Bidaux* Fabrice Cordellières Lydia Danglot Alessandro Furlan* Sandrine Lécart Gaëlle Recher Christine Terryn</p> <p>Gestion des intervenants</p> <p>Stéphanie Costeur Frédéric Bolze</p> <p>Gestion des inscrits</p> <p>Marie-Claude Begot Aline Macau Fabienne Lebleu Serge Monneret* Sophie Salomé-Desnoullez Elisabeth Werkmeister</p> <p>Gestion des challenges Bio et HCS</p> <p>Alessandro Furlan Virginie Georget</p>	<p>Salle de Culture cellulaire</p> <p>Sophie Abélanet Florence Agbazahou Gabriel Bidaux Elodie Charte Didier Décimo* Marilyne Duffraisse Alessandro Furlan Yves Gouriou Raoul Torero Elodie Teruel</p> <p>Animalerie</p> <p>Fanny Husson David Pecqueur Nadine Peyrieras Remi Pillot Pascal Romans Grégoire Perrin</p> <p>Infrastructure et logistique technologique</p> <p>Estelle Anceume Vincent Contremoulins Aurélien Dauphin Simon Desjardins Julien Dumont Marion Marchand Virginie Georget Tristan Piolot* Olivier Renaud</p> <p>Accueil péri-scolaire</p> <p>Frédéric Bolze Marie Noëlle Soler</p> <p>Captation vidéo</p> <p>Julien Cau</p>	<p>Gestion intervenants</p> <p>Stéphanie Costeur Frédéric Bolze Serge Monneret</p> <p>Site Web</p> <p>Fabrice Cordellières Tristan Piolot Julien Dumont Aurélien Agneray Serge Monneret</p> <p>Logistique événementielle</p> <p>Dorian Champelovier Marie Fournier Stéphanie Costeur</p> <p>Partenaires et Sponsors</p> <p>Didier Decimo Cédric Matthews</p> <p>Gestion financière</p> <p>Stéphanie Costeur Aline Macau</p> <p>Accueil et badge</p> <p>Stéphanie Costeur* Sophie Salomé-Desnoullez Claire Guéné Elisabeth Werkmeister</p> <p>Fascicule Mifobio</p> <p>Frédéric Bolze Sandrine Lévêque-Fort</p> <p>Gestion des partenariats industriels</p> <p>Anne-Sophie Bonne Cédric Matthews* Tristan Piolot</p>
--	---	---	---

PRE-MODULES

Lectures



Les pré-modules sont l'occasion d'acquérir et/ou de rafraîchir des notions essentielles qui sont ensuite utilisées dans les cours (et qui ne sont pas reprécisées à cette occasion). Conçus en fonction des différentes catégories d'élèves (origine Maths, Informatique, Physique, Chimie, Biologie), ils posent les bases d'un vocabulaire commun.

PM 1 - Optique pour les nuls

Ce prémodule propose de reprendre des notions de base et de les replacer dans le contexte des différentes technologies qui seront abordées plus en profondeur lors des modules.

Responsable : Olivier Haeberlé (olivier.haeberle@uha.fr)

PM 2 - Bases en analyse d'image

Ce prémodule reprendra la notion d'une image numérique, les problématiques liées au format et les techniques de base de prétraitement et segmentation des images (seuillage, filtres, frontières, binarisation & analyses morphologiques).

Responsable : Bertrand Simon (bertrand.simon@institutoptique.fr)

PM 3 - Bases en biologie cellulaire

Le prémodule permettra de présenter à un public non biologiste les bases de la biologie cellulaire et tissulaire qui seront repris lors de l'école thématique au cours des modules (Atelier A84) et séminaires. Les notions de physiques et les ordres de grandeurs dans différents processus seront abordés. Une partie théorique permettra aux participants de comprendre comment les échantillons qu'ils peuvent observer/analyser en microscopie de fluorescence sont produits (culture cellulaire et transfection de plasmides exprimant les protéines d'intérêt fluorescentes).

La partie pratique aura lieu au cours de l'atelier A84. Ici ne seront exposées que les bases en TD (**sans TP**).

Responsables : Gabriel Bidaux (gabriel.bidaux@univ-lyon1.fr), Delphine Muriaux (delphine.muriaux@irim.cnrs.fr)

PM 4 – Bases en photochimie pour l'imagerie en biologie

Ce pré-module propose de faire un point sur les différents processus liés à l'absorption de la lumière et à la fluorescence, en mettant l'accent sur les propriétés des fluorophores utiles en microscopie (spectres d'absorption, coefficient d'absorption molaire, spectres d'émission, rendement quantique, brillance, durée de vie, fluorescence versus

Ecole thématique interdisciplinaire du CNRS : Microscopie Fonctionnelle en Biologie

phosphorescence, réactions avec l'environnement, blanchiment, optique non-linéaire et absorption à deux photons, génération de second harmonique. Nous aborderons aussi brièvement les réactions chimiques induites par l'absorption de lumière (photo-isomérisations et décaage).

Responsable : Frederic Bolze (frederic.bolze@unistra.fr)



MODULES FONDAMENTAUX

Basics of photochemistry for fluorescent microscopy

Lectures



Dominique Bourgeois

dominique.bourgeois@ibs.fr

Fluorescence microscopy always starts with the choice of a suitable fluorescent marker. Beyond live-cell compatibility, labeling specificity, preservation of target biological function, minimization of cyto- and photo-toxicity, suitable emission color and maximization of fluorescence brightness, the performance of all fluorescence microscopy techniques, and notably advanced methods such as super resolution or FRET-based imaging strongly depends on the highly complex photochemical properties of the chosen markers or sensors. In this lecture, after reviewing the essential vocabulary, I will recapitulate the main photochemical and photophysical parameters to consider when selecting fluorophores and I will introduce the different families of fluorescent markers, from fluorescent proteins to organic dyes and nanoparticles, listing their main advantages and drawbacks.

Concepts fondamentaux sous-jacents aux techniques de microscopie avancées

Gael Moneron

gael.moneron@pasteur.fr

L'idée de ce « module fondamental » d'optique est de voir ou revoir certains concepts fondamentaux sous-jacents aux techniques de microscopie avancées, et en particulier de super-résolution, dans le but de mieux appréhender les principes des méthodes et instruments qui seront présentés et utilisés au cours de cette école thématique. Cette présentation orale sera faite en Français avec un support en Anglais. L'intervenant s'efforcera de rappeler les acronymes et mots-clés d'usage liés à ces concepts.

Mesurer et analyser la dynamique des molécules dans les cellules

Cyril Favard

cyril.favard@irim.cnrs.fr

Dans une première partie, nous verrons l'essentiel des méthodes de microscopies qui permettent de mesurer la dynamique des molécules sous un microscope (FRAP, FCS et SPT). Nous commencerons par décrire les principes de ces méthodes puis nous verrons leur récente évolution vers des mesures spatio-temporelles permettant de cartographier les mouvements d'une molécule dans la cellule, en microscopie classique (ICS et leurs variantes, high-density SPT) et super-résolue (scanning STED FCS, spt-PALM...).

Dans la seconde partie, nous aborderons rapidement l'analyse de ces mouvements sur des bases physiques et verrons les limites actuelles de ces analyses dans chacune des méthodes abordées précédemment.

Bases de la biologie cellulaire

Delphine Muriaux

delphine.muriaux@irim.cnrs.fr

Ce cours vise à présenter les bases, et la sémantique, de la biologie cellulaire. Il s'agira d'aborder des notions de biologie cellulaire, de la molécule à l'organisme vivant, en passant par la description des éléments constituant une cellule, puis un tissu et un organe jusqu'à l'organisme. Nous aborderons les notions de la synthèse des protéines, la constitution du cytosquelette cellulaire, du noyau, de la division cellulaire, des membranes cellulaires, des phénomènes d'endocytose-exocytose, ...ect. Nous évoquerons également les techniques préférées des biologistes cellulaires pour étudier la cellule et ses mystères, où la belle part est donnée à la microscopie.



PLANNING DES COURS

Lectures



Samedi 6 octobre Matin

Salle Atlantique

Module 1 : Imagerie multicellulaire : embryon, organoïdes et tissus

8h15-9h00 M1-1.

High resolution miniature two-photon microscopy

Liangyi Chen¹

State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Molecular Medicine, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

9h00-9h45 M1-2.

Systemic imaging with light sheet fluorescence microscopy

Andrea Bassi

*Dipartimento di Fisica, Politecnico di Milano, piazza Leonardo da Vinci 32, Milan, 20133, Italy
Istituto di Fotonica e Nanotecnologie, Consiglio Nazionale delle Ricerche, piazza Leonardo da Vinci 32, Milan, 20133, Italy*

9h45-10h30 pause

Salle Atlantique

Module 1 : Imagerie multicellulaire : embryon, organoïdes et tissus

10h30-11h15 M1-3.

Principles and applications of optogenetics in neuroscience

Guillaume Dugué

Institut de biologie de l'École normale supérieure, CNRS UMR8197, Inserm U1024, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris

11h15-12h00 M1-4.

A framework for the study of molecular patterns, axonal projections and neuronal activity in intact adult brains using light sheet microscopy

Nicolas Renier

ICM Brain and Spine Institute, INSERM U1127, 75013 Paris France

Salle Gallipot

Module 7 : Automatisation, haut contenu et multimodalité

10h30-11h15 M7-5.

How Localization-based resolution imaging meets High Content Screening ?

Anne Beghin

Institut interdisciplinaire de Neurosciences IINS - UMR 5297 - Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, Bordeaux (FRANCE)

11h15-12h00 M7-6.

High throughput using biomaterials and biomimetic surfaces

Catherine Picart

*CNRS, LMGP, UMR5628, 3 parvis Louis Néel, 38031 GRENOBLE Cedex 01²Grenoble
Institute of Technology (INPG), LMGP, 3 parvis Louis Néel, 38031 GRENOBLE Cedex 01*

Samedi 6 octobre Après-midi

Salle Atlantique

Module 2 : Nanoscopies : de la molécule à la cellule, marquage, quantification

16h-16h45 M2-1.

Super-resolution microscopy for neuroscience: new methods & applications

Valentin Nägerl

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, University of Bordeaux / CNRS

16h45-17h30 M2-2.

Computational enhancements of single molecule localization microscopy

Christophe Zimmer

Imaging and Modeling Unit, Institut Pasteur, Paris, France

17h30-18h15 pause

Salle Atlantique

Module 2 : Nanoscopies

18h15-19h00 M2-3.

Super-resolution microscopy with DNA molecules

Ralf Jungman

MPI of Biochemistry,

Am Klopferspitz 18 , 82152 Martinsried

19h00-19h45 M2-4.

MoNaLISA optical nanoscopy for gentle and rapid live cell imaging

Ilaria Testa

KTH Royal Institute of Technology/Science for Life Laboratory, Tomtebodavägen 23A, 17165 Stockholm, Sweden

Salle Gallipot

Module 1 : Imagerie multicellulaire : embryon, organoïdes et tissus

18h15-19h00 M1-5.

Driving cell self-assembly for the generation of shape-controlled organoids

Gaëlle Recher

Université de Bordeaux, CNRS UMR 5298 Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, IOGS, Talence, France

19h00-19h45 M1-6.

BigStitcher: Reconstructing high-resolution image datasets of cleared and expanded samples

David Hörl

LMU Munich, Department of Biology II, 82152 Planegg-Martinsried Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin Institute of Medical Systems Biology, 13125 Berlin-Buch, Germany

Dimanche 7 octobre Matin

Salle Atlantique

Module 3 : Mécanobiologie

8h15-9h00 M3-1.

Mechanoadaptation at the nucleoskeleton-chromatin interface

Sara A. Wickström^{1,2,3}

¹*Helsinki Institute of Life Science, University of Helsinki, Finland*

²*Wihuri Research Institute, Helsinki, Finland*

³*Max Planck Institute for Biology of Ageing, Cologne, Germany*

9h00-9h45 M3-2.

Traction force microscopy

Ulrich Schwarz

Heidelberg University, BioQuant and Institute for Theoretical Physics, 69120 Heidelberg, Germany

9h45-10h30 pause

Salle Atlantique

Module 3 : Mécanobiologie

10h30-11h15 M3-3.

Regulation of actin filament dynamics by proteins and mechanical stress

Antoine Jégou

Institut Jacques Monod, CNRS, 15 rue Hélène Brion, 75013 Paris

11h15-12h00 M3-4.

Cortical tension participates in chromosome alignment in mouse oocytes.

Marie-Emilie Terret

CIRB, Collège de France, UMR7241/U1050, PSL, 75005 Paris, France.

Salle Gallipot

Module 2 : Nanoscopies

10h30-11h15 M2-5.

Accessing the third dimension in single molecule localization microscopy: challenges and implementations

Bassam Hajj

Laboratoire Physico Chimie Curie, Institut Curie, CNRS UMR 168, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris

11h15-12h00 M2-6.

Democratising high-quality super-resolution microscopy enabled by open-source analytics in ImageJ

Ricardo Henriques

MRC-Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London.

Lundi 8 octobre Matin

Salle Atlantique

Module 4 : Analyse et modélisation des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante

8h15-9h00 M4-1.

First passage times, ergodicity and ageing for single-particle tracking in biological membranes

Diego Krapf

Department of Electrical and Computer Engineering and School of Biomedical Engineering, Colorado State University, Fort Collins CO, USA

9h00-9h45 M4-2.

The embryo as a laboratory

Thomas Gregor

Institut Pasteur

9h45-10h30 pause

Salle Atlantique

Module 4 : Analyse et modélisation des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante

10h30-11h15 M4-3.

Elucidating the nanoscale architecture of the plasma membrane with super-resolution spectroscopy

Erdinc Sezgin

University of Oxford

11h15-12h M4-4.

Linking nano- and meso-scale compartmentalization of the plasma membrane using high density single particle tracking tools.

Maria Garcia-Parajo

ICREA Research Professor

ICFO – The Institute of Photonic Sciences, Mediterranean Technology Park 08860 Castelldefels (Barcelona) Spain

Salle Gallipot

Module 3 : Mécanobiologie

10h30-11h15 M3-5.

Cortical flow aligns actin filaments to form a furrow

Anne-Cécile Reymann

IGBMC, Strasbourg

11h15-12h M3-6.

Mechanics of blastocyst morphogenesis

Jean-Leon Maitre

Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris

Mardi 9 octobre Après-midi

Salle Atlantique

Module 5 : Nouveaux agents de contraste, biosenseurs, sondes, nano-vecteurs, photophysique des fluorophores

13h45-14h30 M5-1.

Imaging of cell structure and activity using SOFI imaging

Peter Dedecker

Department of Chemistry, KU Leuven, Belgium

14h30-15h15 M5-2.

Spying on cells with glowing chemical-genetic hybrids

Arnaud Gautier

Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France.

15h15-16h pause

Salle Atlantique

Module 5 : Nouveaux agents de contraste, biosenseurs, sondes, nano-vecteurs, photophysique des fluorophores

16h-16h45 M5-3.

From concepts to practise: How to get from a specific biological research question to a robust experimental SMLM implementation!

Ulrike Endesfelder^{1,2}

¹*Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology*

²*LOEWE Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO), Marburg, Germany*

16h45-17h30 M5-4. Insight in Fluorescent Lipid Probes, from plasma membrane to lipid droplets

Mayeul Collot

Laboratoire de Biophotonique et Pathologies, UMR 7021 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, Route du Rhin, 67401 ILLKIRCH Cedex, France

Salle Gallipot

Module 4 : Mécanobiologie cellulaire et tissulaire : expérimentation et modélisation

16h-16h45 M4-5.

Live-cell single molecule imaging of transcription factors: past, present and future challenges.

Davide Mazza

San Raffaele Scientific Institute. Experimental Imaging Center. Milan, Italy

16h45-17h30 M4-6.

Single molecule imaging to study transcription and genome organization

Xavier Darzacq

Université Berkeley

Mercredi 10 octobre Matin*Salle Atlantique***Module 6 : Ondes sur le vivant, imagerie en milieux très diffusants (avec le GDR « Ondes »)****8h15-9h00 M6-1.****Non-linear microscopy in deep tissues***Benjamin Judkewitz**Charité / Humboldt University Berlin***9h00-9h45 M6-2.****Nonlinear endoscopes***Hervé Rigneault**Institut Fresnel, Aix-Marseille Univ, CNRS, Ecole Centrale de Marseille
Marseille - France***9h45-10h30 pause***Salle Atlantique***Module 6 : Ondes sur le vivant (avec le GDR ondes)****10h30-11h10 M6-3.****3D X-ray microscopy by absorption and phase Computerized Tomography***Françoise Peyrin**Univ Lyon, INSA-Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Inserm, CREATIS UMR 5220, U1206, F-69621 Cedex, Lyon, France***11h10-12h00 M6-4. Multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT)***Daniel Razansky**Technical University of Munich and Helmholtz Center
Munich, Germany**Salle Gallipot***Module 5 : Nouveaux agents de contraste, biosenseurs, sondes, nano-vecteurs, photophysique des fluorophores****10h30-11h10 M5-5.****Click Chemistry for Imaging***Boris Vauzeilles^{1,2}*¹ Chemical Biology Department, ICSN, CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette (France)² Synthesis of Bioactive Molecules and Macromolecules, ICMMO, CNRS UMR 8182, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay (France)**11h10-12h00****M5-6.****Design of NIR fluorophores: from solution to solid-state***Yann Bretonnière**Laboratoire de Chimie
ENS de Lyon*

Jeudi 11 octobre Matin*Salle Atlantique***Module 7 : Microscopie à haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale****8h15-9h00 M7-1.****Single cell imaging and sequencing**

Christian Conrad

*German Cancer Research Center (DKFZ)**BioQuant Center Heidelberg University (BQ0020)**Im Neuenheimer Feld 267, D-69120 Heidelberg, Germany***9h00-9h45 M7-2.****Organoids imaging**

Nathalie Picollet

*Univ. Grenoble Alpes, CEA BIG-BGE, INSERM F-38000 Grenoble, France***9h45-10h30 pause***Salle Atlantique***Module 7 : Imagerie multiechelle et biologie intégrative****10h30-11h15 M7-5.****Machine Learning for Bioimaging**Thomas Walter^{1,2,3}¹ *MINES ParisTech, PSL Research University, CBIO-Centre for Computational Biology, F-75006 Paris, France*² *Institut Curie, PSL Research University, F-75005 Paris, France*³ *INSERM, U900, F-75005 Paris, France***11h15-12h M7-6.****Paths toward open quantitative biology with systems microscopy**

Anatole Chessel

*LOB, CNRS, INSERM, Ecole polytechnique, Palaiseau, France**Salle Gallipot***Module 6 : Ondes sur le vivant****10h30-11h15 M6-5.****Waves manipulation for imaging in scattering media**

Sylvain Gigan

*Laboratoire Kastler-Brossel, UMR8552-**Sorbonne Université, Ecole Normale**Supérieure, CNRS, Collège de France, 24 rue**Lhomond 75005 PARIS***11h15-12h M6-6.****Brillouin imaging in life sciences: from single cell to tissues**

Thomas Dehoux

*Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1,**CNRS, Institut Lumière Matière, F-69622,**Villeurbanne, France*

MODULES

Lectures



MODULE 1 : IMAGERIE MULTICELLULAIRE : EMBRYON, ORGANOÏDES ET TISSUS

Coordination : Cathie Ventalon et Gabriel Bidaux

Introduction

L'imagerie multicellulaire est un défi important pour un très grand champ d'applications allant de la biologie du développement aux approches cliniques en passant par les neurosciences. L'un des enjeux majeurs est d'améliorer la pénétration de la lumière dans les milieux biologiques en limitant les effets de l'absorption et la diffusion. Pour cela, de nouvelles approches ont vu le jour consistant à utiliser des échantillons peu diffusants, que ce soit en modifiant les tissus pour les rendre transparents ou en tirant partie de systèmes modèles tels que les organoïdes ou la larve de poisson zèbre. Ces échantillons peuvent être observés par des méthodes d'imagerie linéaires telles que la microscopie confocale ou la microscopie à feuille de lumière. D'autre part, les tissus épais et diffusants tels que le cerveau de rongeurs peuvent être observés *in vivo* à l'aide de méthodes d'imagerie non-linéaire. De récentes prouesses technologiques ont permis de miniaturiser ces outils pour imager le cerveau de rongeurs non-contraints. Ces méthodes optiques peuvent être couplées avec des outils optogénétiques, permettant ainsi de mesurer et de contrôler l'activité de populations identifiées de neurones *in vivo*. Finalement, pour toutes ces approches d'imagerie multicellulaire à grand champ, un nouvel enjeu important est apparu dans la manipulation, l'analyse et le stockage des grandes quantités de données collectées.

Samedi 6 octobre - 8h15

High resolution miniature two-photon microscopy

Liangyi Chen

¹ State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Molecular Medicine, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Recent developments in miniaturized microscopes have furthered the quest to visualize brain activities and structural dynamics in animals engaged in self-determined behaviors. However, it remains an unmet challenge to resolve activity at single dendritic spines, the elemental units underlying neuronal computation, in freely-behaving animals. Here, we report the design, testing, and application of a fast, high-resolution, miniaturized two-photon microscope (FHIRM-TPM) that accomplishes this goal. With a headpiece weighing 2.15 g and a new type of hollow-core photonic crystal fiber to deliver 920-nm femtosecond laser pulses, the FHIRM-TPM is capable of imaging commonly used biosensors at high spatiotemporal resolution (0.64 μm laterally and 3.35 μm axially, 40 Hz at 256 \times 256 pixels).

Its micro-electromechanical systems scanner also enables random-access capability and free-line scanning at up to 10,000 Hz. It compares favorably with benchtop two-photon microscopy and miniature wide-field fluorescence microscopy in the structural and functional imaging of Thy1-GFP- or GCaMP6f-labeled neurons. Further, we demonstrate the second generation of FHIRM-TPM 2.0, which has a field of view of $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ that enables hundreds of neurons to be recorded. Last, we will demonstrate a few collaborative projects in using our FHIRM-TPM to solving brain related questions.

Systemic imaging with light sheet fluorescence microscopy

Andrea Bassi

*Dipartimento di Fisica, Politecnico di Milano, piazza Leonardo da Vinci 32, Milan, 20133, Italy
Istituto di Fotonica e Nanotecnologie, Consiglio Nazionale delle Ricerche, piazza Leonardo da Vinci 32, Milan, 20133, Italy*

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Light sheet fluorescence microscopy is a powerful tool to image biological specimens at systemic level, being able to image whole tissues while maintaining high spatio-temporal resolution of cells morphology and dynamics. Here we describe the principle of light sheet microscopy and we show examples of applications including long term acquisition of developing specimens and calcium imaging. We then show how high throughput acquisition can be obtained by combining the technique with optofluidics

Principles and applications of optogenetics in neuroscience

Guillaume Dugué

Institut de biologie de l'École normale supérieure, CNRS UMR8197, Inserm U1024, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Depuis une quinzaine d'années, les techniques optogénétiques permettant de mesurer et de contrôler l'activité de populations identifiées de neurones in vivo ont révolutionné la pratique expérimentale en neurophysiologie. En décuplant la spécificité des observations et interventions sur le système nerveux, ces techniques ont permis un gain significatif dans la pertinence et la puissance des données récoltées. Après un bref historique des fondements de l'optogénétique, qui se situent à la confluence de découvertes dans le domaine de la génétique et d'innovations dans l'instrumentation en optique, nous passerons en revue les principaux outils moléculaires, sondes d'activité et actuateurs, utilisés aujourd'hui, les techniques permettant d'obtenir leur expression dans des populations définies de neurones et les méthodes d'illumination et/ou de mesure de la lumière actuellement utilisées en laboratoire. L'optogénétique étant un domaine en constante évolution, nous nous pencherons ensuite sur les évolutions récentes et celles à venir ainsi que leurs enjeux.

A framework for the study of molecular patterns, axonal projections and neuronal activity in intact adult brains using light sheet microscopy

Nicolas Renier

ICM Brain and Spine Institute, INSERM U1127, 75013 Paris France

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

There has been over the past 6 years a convergence in the fields of optics, biochemistry and computing leading to dramatic improvements in light sheet microscopy, tissue clearing protocols and image analysis algorithms. The convergence of these different fields has the potential to streamline brain studies by accelerating data acquisition speed and reliability over the current whole brain analysis pipelines based on serial sectioning methods. We previously developed the iDISCO¹ protocol for immunostaining and imaging intact adult mouse brains. As a companion tool, we also developed and distribute ClearMap^{2,3}, an open source environment to segment objects and map them onto reference atlases optimized for large 3D datasets. We used this pipeline as a discovery tool to find brain regions active in correlation with various behaviors by mapping neuronal activity landscapes derived from Fos expression^{4,5}. Here, I will present recent unpublished projects made possible by our upcoming brain mapping pipeline ClearMap 2, expanding the repertoire of applications derived from intact whole brain preparations. We hope that ongoing developments in light sheet microscopy and image analysis pipelines will facilitate our understanding of individual variations in brain activity, connectivity and structure.

1. Renier, N. *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).
2. Renier, N. *et al.* Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* **165**, 1789–1802 (2016).
3. Liebmann, T. *et al.* Three-Dimensional Study of Alzheimer's Disease Hallmarks Using the iDISCO Clearing Method. *Cell Rep* **16**, 1138–1152 (2016).
4. Renier, N. *et al.* A mutant with bilateral whisker to barrel inputs unveils somatosensory mapping rules in the cerebral cortex. *Elife* **6**, 700 (2017).
5. Nectow, A. R. *et al.* Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. *Cell* **170**, 429–442.e11 (2017).

Samedi 6 octobre 18h15

Driving cell self-assembly for the generation of shape-controlled organoids

Recher, Gaëlle

¹ *Université de Bordeaux, Bordeaux, France*

² *CNRS UMR 5298 Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, Talence, France*

³ *IOGS, Talence, France*

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

Cells and tissue morphogenesis occur in tight interrelation with a complex environment which embrace a multiplicity of biological/physical/chemical parameters. Physiologically relevant *in vitro* models that tend to take that complexity in consideration are difficult to tackle.

I will show how combining tailored approaches [micro-fluidics + cell engineering + microscopies + image analysis] in different cells and tissues context opens avenues for generating functional and physiologically relevant models for both tissue engineering & morphogenesis comprehension.

The Cellular Capsule Technology serves for the generation of tubular blood-vessel-like organoids (that we named vesseloids) and spherical B-cell Lymphoma niche organoids (combining stromal cells & tumour cells) that are independently generated and characterised (including with live cell imaging). Future directions will then consist in combining both approaches to generate vascularised organoids.

BigStitcher: Reconstructing high-resolution image datasets of cleared and expanded samples

David Hörl

¹ LMU Munich, Department of Biology II, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

² Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin Institute of Medical Systems Biology, 13125 Berlin-Buch, Germany

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

The continuous advancements in microscopy and novel sample preparation methods such as clearing or expansion allow for the investigation of ever larger and more complex biological samples at high resolution. This entails increasingly large datasets that may consist of hundreds of large three-dimensional images of one sample that are not aligned, suffer from optical disturbances and often cannot even be opened as a whole, which can pose a serious bottleneck to scientific inquiries. With terabyte-sized datasets becoming more and more common, the development of software tools that make handling of large and complex image data available to the broader scientific community is an urgent issue.

To allow efficient handling and reconstruction of large multi-tile and multi-view image data, we developed the BigStitcher software. It enables automatic import from most file formats, interactive handling, fast, precise and globally optimal alignment, as well as deconvolution and real-time fusion of large, high-dimensional image datasets. We additionally support the alignment of multi-tile acquisitions taken from different physical orientations, effectively doubling the size of objects that can be imaged. We also enable the correction of a variety of optical distortions, e.g. via automatic illumination selection, on-the-fly flat-field correction and interest-point-based correction of chromatic aberrations.

We implemented BigStitcher using the state-of-the-art frameworks ImgLib2 and BigDataViewer. By combining multi-resolution data representation and sub-pixel accurate registration algorithms, even very large datasets can be reconstructed on conventional, off-the-shelf hardware. In an effort to make large sample reconstruction available as a routine task, we provide a user-friendly graphical user interface (GUI) to manually guide the alignment and interactively display the intermediate results using BigDataViewer. BigStitcher is open-source and provided as a Fiji-plugin, making it a powerful, scalable tool for automated processing of very large image datasets.

Dans la même thématique

Tables rondes :

- TR144-Clearing and Labeling Techniques for Imaging: which method for which sample?
- TR147-Organoides et imagerie défis et attentes

Ateliers :

- A1-Imagerie de super-résolution 3D en profondeur dans les tissus biologiques
- A4-Organ clearing to investigate the central nervous system and peripheral organs with preservation of GFP and SHG on few mm of cleared samples.
- A5-Organisation spatiale des signaux de mort/survie dans le cœur de souris après ischémie-reperfusion : clarification d'organe, microscopie en feuille de lumière et quantification automatisée
- A7-ATELIER SPHEROID COAST TO COAST « De la préparation aux traitements des données en passant par l'acquisition en Light sheet fluorescence microscopy »
- A26-Immunofluorescence et imagerie à feuille de lumière sur organes transparisés : quelles stratégies de mise au point adopter ?
- A31-Zebrafish embryonic morphogenesis and functional imaging with high speed and high resolution using light sheet and confocal microscopy
- A32-Two-photon functional Imaging of murine and human intestinal Organoids
- A37-Lung organoids as an original model to explore cell migration during inflammation
- A39-In vivo measurement of both pH and anions concentration using a ratiometric sensor in Arabidopsis plantlets
- A40-Quantification of vesicular release by TIRF microscopy
- A48-La microscopie à feuillet de lumière pour l'étude en profondeur des organoïdes : limites et optimisation.
- A58-Imagerie confocale spectrale : caractérisation de l'autofluorescence sur tissus
- A60-Analysis of mitochondrial connectivity in vivo in the drosophila nervous system.
- A62-Mesure de l'activité cérébrale chez la drosophile en réponse à un stimulus olfactif, ou comment augmenter la facilitation sociale de la mémoire
- A67-La culture cellulaire en 3D : sphéroïdes, gels... pour une meilleure compréhension de la physiologie des cellules
- A74-Ex vivo imaging of T cells in vibratome tumor slices using confocal microscopy
- A77- Mono VS Two photon comparison on a large clarified embryo: the catshark S. canicula model
- A83-Comparison between conventional and fast confocal system for three colors acquisition in living plant samples.
- A85-Etude comparative de méthodes de clarifications sur différents modèles animaux et végétaux par microscopie à sectionnement optique.
- A90-OPenT - Bring your sample & learn how to build and use an OPT optical tomography mesoscope
- A92-Visualization of neuronal projections in entire brain
- A95-Comment optimiser l'acquisition de grands échantillons « transparisés » avec la microscopie à feuille de lumière en vue de traitements semi automatisés

d'images tridimensionnelles

- A99-The zebrafish as a model to study dynamics of single membrane proteins
- A100-Quantifying synaptic plasticity in primary neurons using microfluidic culture devices and a custom image analysis workflow
- A109-Quantitative analysis of zebrafish pectoral fin early growth and shape changes
- A112-Open Source Inverted Microscope (OSIM) for timelapse imaging
- A117-Phy-aWaaS Webservice for 3D+time imaging data management and cell lineage analysis
- A118-SPIM-FCS to probe Cadherin1 dynamics along the cell lineage in zebrafish early embryogenesis
- A127-Comparaison de 3 méthodes de transparisation sur un nouveau système d'imagerie confocal rapide



MODULE 2 : NANOSCOPIES : DE LA MOLECULE A LA CELLULE, MARQUAGE, QUANTIFICATION

Coordination : Sandrine Lévêque-Fort et Gaël Moneron

Introduction

Avec le groupe de travail SuperRes du GdR ImaBio

Ce module présente l'intérêt des concepts d'imageries dites « super-résolue » (illumination structurée, PALM/STORM, STED, ...) et « corrélatives » (fluorescence/microscopie électronique, fluorescence/sonde locale, ...) qui permettent l'imagerie structurale et moléculaire du vivant. Ces nouveaux concepts de super-résolution reposent sur les propriétés chimiques et photophysiques de molécules fluorescentes, sur la façon de les exciter, mais aussi sur l'analyse des images obtenues. Les microscopies corrélatives représentent une autre voie pour accéder à l'ultrastructure cellulaire en fusionnant les approches de microscopie optique et électronique. Elles se heurtent encore aux problèmes de repositionnement de l'échantillon et de la conservation de sa structure fine entre les différentes modalités d'imagerie. L'ensemble de ces points seront abordés.

Samedi 6 octobre 16h

Super-resolution microscopy for neuroscience: new methods & applications

Valentin Nägerl

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, University of Bordeaux / CNRS

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

The advent of super-resolution microscopy has created unprecedented opportunities to study the mammalian central nervous system, which is dominated by anatomical structures whose nanoscale dimensions critically influence their biophysical properties. I will present our recent methodological advances 1) to analyze dendritic spines in the hippocampus *in vivo*; 2) to visualize the extracellular space of the brain and 3) to reveal the morphological structure and molecular arrangement of adhesive structures and synapses in live cells at the nanoscale level.

We established chronic *in vivo* super-resolution imaging of dendritic spines in the hippocampus, based on an upright 2P-STED microscope equipped with a long working distance objective and 'hippocampal window' to reach this deeply embedded structure. We measured spine density on pyramidal neurons in the CA1 area and determined spine turnover by repetitive imaging. Spine density was two times higher than reported by conventional 2P microscopy, and around 40% of all spines turned over within 4 days, indicating a high level of structural remodeling.

We combined 3D-STED microscopy and fluorescent labeling of the extracellular fluid to develop super-resolution shadow imaging (SUSHI) of brain ECS in living brain slices. SUSHI enables quantitative analysis of ECS structure and produces sharp negative images of all cellular structures, providing an unbiased view of unlabeled brain cells with respect to their complete anatomical context in a live tissue setting.

Current super-resolution microscopes are proficient at collecting either single molecule or morphological information, but not both. I will present a new super-resolution

platform that permits correlative single molecule imaging and STED microscopy in living cells. We demonstrate that this multi-modal approach can give access to both kinds of information by revealing on a nanometer spatial scale protein localization and dynamics and cellular morphology.

1. Inavalli VGGK, Lenz MO, Butler C, Angibaud J, Compans B, Levet F, Tønnesen J, Rossier O, Giannone G, Thoumine O, Hosity E, Choquet D, Sibarita JB, **Nägerl UV**. A super-resolution platform for correlative single molecule imaging and STED microscopy (*under revision at Nature Methods*)
2. Pfeiffer T, Poll S, Bancelin S, Inavalli VVGK, Keppler K, Fuhrmann M, **Nägerl UV**. Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus *in vivo*. **eLife**. 2018; DOI10.7554/eLife.34700
3. Tønnesen J, Inavalli VVGK, **Nägerl UV**. Super-resolution imaging of the extracellular space in living brain tissue. **Cell**. 2018 Feb 22;172(5):1108-1121.e15.
4. Chéreau R, Saraceno GE, Angibaud J, Cattaert D, **Nägerl UV**. Super-resolution imaging reveals activity-dependent plasticity of axon morphology linked to changes in action potential conduction velocity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2017 Feb 7;114(6):1401-1406.
5. Pfeiffer T, Avignone E, **Nägerl UV**. Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. **Sci Rep**. 2016 Sep 8;6:32422.
6. Tønnesen J, Katona G, Rózsa B, **Nägerl UV**. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. **Nat Neurosci**. 2014 May;17(5):678-85.

Computational enhancements of single molecule localization microscopy

Christophe Zimmer

Imaging and Modeling Unit, Institut Pasteur, Paris, France

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Single molecule localization microscopy (SMLM) has matured into one of the most powerful and widely used super-resolution imaging methods. In this talk, we'll highlight recent developments of our lab to push the limits of SMLM using computational approaches.

One long-standing challenge is to visualize cells at high resolution and with high throughput. SMLM delivers exquisite spatial resolution, but at the price of very low throughput. Previous approaches to accelerate SMLM typically trade off spatial resolution. We present ANNA-PALM, a computational technique based on deep learning that can reconstruct high resolution views from strongly under-sampled SMLM data and widefield images, enabling considerable speed-ups without any compromise on spatial resolution¹. We illustrate ANNA-PALM's robustness and potential for high throughput super-resolution imaging and highlight a dedicated web platform (annapalm.pasteur.fr). We will also discuss limitations and perspectives of ANNA-PALM.

Another challenge is to extend SMLM to 3D imaging of entire cells. While many approaches for 3D SMLM have been proposed, the need remains for a more accessible and flexible technique. We present ZOLA-3D a combined optical and computational method

that enables versatile 3D super-resolution imaging over up to ~ 5 μm depth². Software and sample data are freely available from github.com/imodpasteur/ZOLA-3D.

Finally, the microscopy field could greatly benefit from easier access to SMLM data generated by the community, especially to train machine learning models. We will briefly highlight shareloc.xyz, an online platform to facilitate the sharing and reanalysis of SMLM data.

1. Ouyang, W., Aristov, A., Lelek, M., Hao, X. & Zimmer, C. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy. *Nat. Biotechnol.* **36**, (2018).
2. Aristov, A., Lelandais, B., Rensen, E. & Zimmer, C. ZOLA-3D allows flexible 3D localization microscopy over an adjustable axial range. *Nat. Commun.* **9**, (2018).

Samedi 6 octobre 18h15

Super-resolution microscopy with DNA molecules

Jungman Ralf

MPI of Biochemistry,

Am Klopferspitz 18

82152 Martinsried

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Super-resolution fluorescence microscopy is a powerful tool for biological research. We use the transient binding of short fluorescently labeled oligonucleotides (DNA-PAINT) for simple and easy-to-implement multiplexed super-resolution imaging that technically achieves sub-5-nm spatial resolution. However, this does not translate to achievable image resolution in biological specimen, mainly due to the lack of readily available small and specific affinity reagents.

We now introduce an entirely new Super-resolution fluorescence microscopy is a powerful tool for biological research. We use the transient binding of short fluorescently labeled oligonucleotides (DNA-PAINT) for simple and easy-to-implement multiplexed super-resolution imaging that technically achieves sub-5-nm spatial resolution. However, this does not translate to achievable image resolution in biological specimen, mainly due to the lack of readily available small and specific affinity reagents.

We introduce Slow Off-rate Modified Aptamers (SOMAmers) for DNA-PAINT super-resolution microscopy as efficient and quantitative labeling reagents. We demonstrate the achievable image resolution and specificity by labeling and imaging of transmembrane as well as intracellular targets in fixed and live cell-specimen.

Apart from ever increasing spatial resolution, efficient multiplexing strategies for the simultaneous detection approach to multiplexed super-resolution microscopy by designing the blinking behavior of targets with engineered binding frequency and duration in DNA-PAINT. We assay this kinetic barcoding approach in silico and in vitro using DNA origami structures, show the applicability for multiplexed RNA and protein detection in

cells and finally experimentally demonstrate 124-plex super-resolution imaging within minutes.

MoNaLISA optical nanoscopy for gentle and rapid live cell imaging

Ilaria Testa

KTH Royal Institute of Technology/Science for Life Laboratory, Tomtebodavägen 23A, 17165 Stockholm, Sweden

E-mail: ilaria.testa@scilifelab.se

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

The observation of the dynamics of the organelles as well as the interaction of specific macromolecular complexes inside living cells and tissues requires the continuous development of minimally invasive optical systems able to achieve high spatio-temporal resolution. Although, the theoretically unlimited spatial resolution of fluorescence nanoscopy often comes at the expense of time, contrast and increased dose of energy for recording.

We developed a gentle fluorescent nanoscope based on the RESOLFT (REversible Saturable-Switchable Optical Fluorescent Transition) concept, capable of imaging structures at a scale of 45–65 nm within the entire cell volume at low light intensities (W–kW/cm²). Our approach, named MoNaLISA, for Molecular Nanoscale Live Imaging with Sectioning Ability, is based on thousands of focal spots which switch and read-out the fluorescence signal emitted by reversible switchable fluorescent proteins simultaneously. The three-step imaging scheme is achieved by three distinctly modulated illumination patterns crafted and combined in an optimized way to gain fluorescence ON-OFF switching cycles and image contrast. By maximizing the detected photon flux, MoNaLISA enables prolonged (40–50 frames) and large (50 x 50 μm²) recordings at 0.3–1.3 Hz with enhanced optical sectioning ability. We demonstrated the general use of our approach by 4D imaging of organelles and fine structures in epithelial human cells, colonies of mouse embryonic stem cells, brain cells, and organotypic tissues.

1. Luciano Masullo, Andreas Boden, Francesca Pennacchietti, Giovanna Coceano, Michael Ratz, Ilaria Testa, Enhanced photon collection enables four dimensional fluorescence nanoscopy of living systems, bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/248880>

Dimanche 7 octobre 10h30

Accessing the third dimension in single molecule localization microscopy: challenges and implementations

Bassam Hajj ¹

¹Laboratoire Physico Chimie Curie, Institut Curie, CNRS UMR 168, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

Localization based super-resolution microscopy has become a widely thought-after technique in a variety of biological studies. While super-resolution imaging is primarily performed in 2D, there is an increasing demand to explore the structures of the cells in the three dimensions. The desire to image and localize single molecules away from the coverglass raises many challenges among which: (i) localizing molecules in 3D over a relevant imaging depth, (ii) overcoming the signal to noise reduction due to out of focus blur and sample-induced aberrations, and (iii) compatibility with live cell imaging.

The purpose of this course is to review the different optical methods for accessing the axial position of single molecules [1-3], including PSF engineering, multiplane imaging, exploiting the full extent of the numerical aperture of the collection objectives and interferometry. Additionally, the effort in single molecule deep imaging by light sheet excitation and adaptive optics will be highlighted [4, 5]. For each approach, an overview of the optical and computational implementations will be provided and discussed in the context of its applicability. During this course, the different topic-related workshops will be introduced gradually.

1. Hajj, B., et al., *Accessing the third dimension in localization-based super-resolution microscopy*. Phys Chem Chem Phys, 2014. **16**(31): p. 16340-8.
2. Hajj, B., et al., *Whole-cell, multicolor superresolution imaging using volumetric multifocus microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(49): p. 17480-5.
3. Bourg, N., et al., *Direct optical nanoscopy with axially localized detection*. Nature Photonics, 2015. **9**(9): p. 587.
4. Legant, W.R., et al., *High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes*. Nat Methods, 2016. **13**(4): p. 359-65.
5. Galland, R., et al., *3D high- and super-resolution imaging using single-objective SPIM (vol 12, pg 641, 2015)*. Nature Methods, 2015. **12**(7).

Democratising high-quality super-resolution microscopy enabled by open-source analytics in ImageJ

Ricardo Henriques

MRC-Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London.

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

I will present high-performance open-source approaches we have developed for ImageJ dedicated to enabling, enhancing or quantifying super-resolution microscopy. This toolbox - named NanoJ - provides a full analytical framework that can be applied to every step of a super-resolution imaging experiment. It encompasses popular algorithms such as SRRF, SQUIRREL, NanoJ-Fluidics (also known as Pumpy) and VirusMapper. My talk will cover each of these features of NanoJ, providing an overview of how they work, how to use them and giving several examples of their application in experiments. I will particularly focus on SRRF, a new super-resolution method capable of enabling live-cell nanoscopy with illumination intensities orders of magnitude lower than methods such as SMLM or STED. The capacity of SRRF for low-phototoxicity, allows unprecedented imaging for long acquisition times at resolution equivalent or better than SIM.

Dans la même thématique

Tables rondes :

- TR156-Nanoscopie : de la molécule à la cellule, marquage, quantification (Lévêque-fort & Moneron) Salle de conf

Ateliers :

- A11-Organization of mitochondrial nucleoids mtDNA by super resolution dSTORM
- A15-Super-resolution radial fluctuations (SRRF) : what are the pro and the cons of this analytical open-source super resolution method ?
- A19-Study of DNA-protein complex at the single molecule level combining microfluidics and TIRF microscopy
- A21-Mise en évidence de multimères protéiques en microscopie confocale par la technique de Proximity Ligation Assay.
- A27-A practical guide to super-resolution techniques for imaging cellular structures within thin and thick biological samples
- A30-Fast multicolor Super Resolution Live Cell imaging
- A33-Imagerie STORM de spores en germination de la bactérie *B. subtilis* : préparation des échantillons, acquisition des données et reconstruction des images.
- A35- The functional characterization of new multi-specific monoclonal antibodies in immuno-oncology by multicolor PALM/STORM approach
- A36-dSTORM, un nouvel outil pour l'étude de la co-localisation à la mitochondrie
- A38-Mesure de la dynamique de protéines membranaires par photo-conversion et FRAP : Avantages et limites.
- A42-Nuclear Pore Complex : the performance tool for super-resolution, from sample preparation to the super-resolved image
- A46-The fastFLIM microscope: how to combine FLIM with speed of acquisition
- A50-Fast and sensitive 4D imaging using Multifocus microscopy
- A53-3D high and super-resolution imaging of biological samples using a single-objective Selective Plane Illumination Microscope.
- A54-AFM on microbial surfaces : from imaging to physico-chemical properties
- A55-3D tomography imaging by holotomography
- A56-Combined AFM-optical-fluorescence microscopy to study microbial adhesion and host-pathogen interaction
- A59-L'imagerie de super-résolution tissulaire : du mythe à la réalité de la pailleasse ! De l'optimisation de la fixation et du marquage aux modalités d'imagerie et de reconstruction 3D
- A72-A Versatile 3D Superresolution Speckle imaging for a wide range of biological applications : from bacteria to tissue.

- A78-An integrated combination of atomic-force microscopy and STED microscopy for nanoscopic imaging and mechanical characterizations of biological samples, such as viruses.
- "A80-GcoPS : A fast automatic colocalization method for 3D live cell and super-resolution microscopy
- A87-Exploration des nouvelles techniques d'amélioration de résolution compatible à une imagerie de cellules vivantes. Ex sur le processus d'autophagie.
- A89-Scanning FCS workshop.
- A97-Imagerie super-résolution et en 3D de la surface apicale des cellules polarisées
- A102-Optimisation des acquisitions sur un microscope avec gain de résolution : exemple de la visualisation de la bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin chez *C. elegans*
- A105-Versatile wide-field homogeneous illumination for SMLM
- A106-Calibration strategies for 3D single-molecule localization microscopy
- A113-Combining complementary 3D single molecule localization techniques for reliable multicolor bioimaging over extended depth ranges
- A119-dSTORM : Nano-objets 3D de standardisation et imagerie in cellulo des centrosomes.



MODULE 3 : MECANOLOGIE

Coordination Laetitia Kurzawa et Martial Balland

Introduction

La cellule est un édifice moléculaire complexe qui est naturellement soumis à des contraintes physiques environnementales et qui doit s'y adapter, répondre à la modification de cet environnement en particulier dans des conditions de stress. Elle est aussi capable d'une grande plasticité mécanique et fonctionnelle, tant au niveau des membranes que de la chromatine. Enfin, les cellules sont aussi capables de s'organiser entre elles et de communiquer dans des tissus ou des organes, atteignant ainsi un très haut niveau de complexité fonctionnelle. Ces ensembles sont alors dotés de propriétés mécaniques originales. Cet aspect biomécanique des cellules et tissus fait l'objet d'études d'intérêt à la fois pour les biologistes et les physiciens, qui contribuent ensemble à en comprendre la dynamique

Dimanche 7 octobre 8h15

Mechanoadaptation at the nucleoskeleton-chromatin interface

Sara A. Wickström^{1,2,3}

¹*Helsinki Institute of Life Science, University of Helsinki, Finland*

²*Wihuri Research Institute, Helsinki, Finland*

³*Max Planck Institute for Biology of Ageing, Cologne, Germany*

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Cells are constantly subjected to a spectrum of mechanical cues, such as shear stress, compression, differential tissue rigidity, and strain, to which they adapt by engaging mechanisms of mechanotransduction. These forces are important morphogenetic cues that are transmitted to the nucleus to alter genetic programs. On the other hand, excessive mechanical stresses cause dynamic changes in the nuclear lamina and the surrounding cytoskeleton that modify mechanical properties of the nucleus to protect genetic material from damage. In my presentation I will discuss our recent research on dynamic changes in chromatin organization upon application of force and the mechanisms that facilitate cellular adaption to differential force environments.

Traction force microscopy

Ulrich Schwarz

Heidelberg University, BioQuant and Institute for Theoretical Physics, 69120 Heidelberg, Germany

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Over the last two decades, mechanobiology has emerged as a new research field at the interface between cell biology and biophysics. It was initially triggered by the finding that the mechanical stiffness of the extracellular environment has a strong impact on cellular decision making, including cell spreading, adhesion, migration, division, differentiation and fate. Key to the field of mechanobiology is the capability to measure cellular forces. The

standard technique for this purpose is traction force microscopy on soft elastic substrates, for which several variants and different software packages have been developed over the years. I will present an overview over the current state of traction force microscopy, including recent applications, how to use it in the lab, and how it can be combined with mathematical models for the mechanics of cells and cell monolayers.

Regulation of actin filament dynamics by proteins and mechanical stress

Antoine Jégou

Institut Jacques Monod, CNRS, 15 rue Hélène Brion, 75013 Paris

[Salle Atlantique – Session parallèle](#)

Many essential cellular processes such as cell division, migration and morphogenesis are carried out largely thanks to the actin cytoskeleton organized into various architectures. To decipher the activities of actin regulatory proteins in charge of the dynamics of actin networks, we combine microfluidics and fluorescence microscopy approaches. Formins are one of the central players to assemble actin networks. They are processive filament elongators and accelerate the polymerization rate of filaments. We show that formins processivity depends of the speed of assembly and are surprisingly sensitive to mechanical pulling forces (1). Using polarization microscopy, we are able to investigate the importance that formins can freely rotate at the filament barbed ends when filaments are crosslinked with each other in actin networks. ADF/cofilin are the most essential proteins to regulate the disassembly of filaments. We characterize their ability to sever filaments and promote their disassembly from both ends. Strikingly, we show that the barbed ends of ADF/cofilin-decorated filaments can hardly stop depolymerizing, even when actin monomers and capping proteins are available (2). In addition, we quantify the impact of mechanical tension, curvature and torque on the binding and severing activity of ADF/cofilin. We find that the mechanical context can dramatically increase the rate of filament severing by ADF/cofilin.

1. Cao, L., Kerleau, M., Suzuki, E.L., Wioland, H., Jouet, S., Guichard, B., Lenz, M., Romet-Lemonne, G., and Jégou, A. (2018). Modulation of formin processivity by profilin and mechanical tension. *eLife Sciences* 7, e34176.
2. Wioland, H., Guichard, B., Senju, Y., Myram, S., Lappalainen, P., Jégou, A., and Romet-Lemonne, G. (2017). ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends. *Curr. Biol.* 27, 1956–1967.e7.

Cortical tension participates in chromosome alignment in mouse oocytes.

Isma Bennabi¹, Flora Crozet¹, Agathe Chaigne², Marie-Hélène Verlhac¹ and Marie-Emilie Terret¹.

¹*CIRB, Collège de France, UMR7241/U1050, PSL, 75005 Paris, France.*

²*MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, UCL, London WC1E 6BT, UK.*

[Salle Atlantique – Session parallèle](#)

In oocytes, cells lacking canonical centrosomes, two F-actin networks replace astral microtubules for spindle positioning. They exert forces on the spindle sufficient to embark it to the cortex, leading to an asymmetric division in size. The first actin mesh is cytoplasmic and includes an actin cage surrounding the meiotic spindle. The second one consists of a cortical actin thickening that promotes a decrease in cortical tension and cortex softening. We have shown previously that this change in cortex mechanics controls the geometry of oocyte (and embryo) division since oocytes presenting too stiff or too soft cortices divide symmetrically (1-3). Interestingly, human and mouse oocytes developmental potential is accurately predicted by their cortical tension within hours after fertilization: if they are too stiff or too soft, embryos will cease development (4). Our goal is to understand the origin of early developmental failure due to cortical tension defects. Our results point towards a role of cortical tension in chromosome alignment in mouse oocytes. We show that aberrant cortical tension, a frequent defect in a normal population, could lead to chromosome alignment defects in oocytes, potentially contributing to oocyte predisposition to chromosome segregation defects, a leading cause of aneuploidy in embryos.

1. Chaigne A *et al.* A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nat Cell Biol* **15** : 958-66 (2013).
2. Chaigne A *et al.* A narrow window of cortical tension guides asymmetric spindle positioning in the mouse oocyte. *Nat Commun* **6**, 6027 (2015).
3. Chaigne A *et al.* F-Actin Mechanics Control Spindle Centring In The Mouse Zygote. *Nat Commun* **7**,10253 (2016).
4. Yanez LZ *et al.* Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nat Commun* **7**, 10809 (2016).

Lundi 8 octobre 10h30

Cortical flow aligns actin filaments to form a furrow

Anne-Cécile Reymann

IGBMC, Strasbourg

[Salle Gallipot – Session parallèle](#)

The cortex is a thin layer of actin filaments attached to the cellular membrane controlling the form and movement of cells through a constant remodeling of its network of filaments. This architecture is modulated by a combination of specific signaling pathways, numerous regulatory proteins, but is also modified through feedbacks with the mechanical properties and dynamics of this gel like material. As a result, the cortical layer is spatially and temporally regulated in order to robustly control several morphogenetic processes, allowing a cell to polarize, divide or selectively interact with its environment. As such, at the onset of cytokinesis the recruitment of multiple proteins to the equatorial cell cortex is orchestrated by specific signaling events while reproducible compressive cortical flows have been observed. This brings up the question of the contribution of the mechanics during this initial phase of contractile ring assembly. We have investigated how myosin-

induced cortical flows directly initiate stable ingression by mechanically remodeling the actin architecture. We quantified the dynamical organization of actin filaments at the onset of ring assembly in the *C. elegans* zygote and provided a framework for determining emergent actomyosin material parameters by the use of active nematic gel theory. These *in vivo* observations are reinforced by findings *in vitro* with purified actin systems showing that the angle of contacts between filaments changes bundle's efficiency and that antiparallel filaments favor contraction.

1. Reymann *et al*, Cortical flow aligns actin filaments to form a furrow. *eLife* (2016).
2. Reymann *et al*, Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* (2012).

Mechanics of blastocyst morphogenesis

Jean-Leon Maitre

Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris

[Salle Gallipot – Session parallèle](#)

During pre-implantation development, the mammalian embryo forms the blastocyst, which will implant into the uterus. The architecture of the blastocyst is essential to the specification of the first mammalian lineages and to the implantation of the embryo. Consisting of an epithelium enveloping a fluid-filled cavity and the inner cell mass, the blastocyst is sculpted by a succession of morphogenetic events. These deformations result from the changes in the forces and mechanical properties of the tissue composing the embryo. Using microaspiration, live-imaging, genetics and theoretical modelling, we study the biophysical and cellular changes leading to the formation of the blastocyst.

Dans la même thématique

Tables rondes :

- TR143-Nouveaux défis instrumentaux en mécanobiologie

Ateliers :

- A2-Organisation des podosomes par nanoscopie de fluorescence basée sur la collection de l'émission super-critique.
- A12-High Resolution Traction Force Microscopy
- A41-Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules
- A52-Contrôle optogénétique de voies de signalisation et de la morphologie cellulaire.
- A76-Multiple protein photopatterning and associated cellular traction forces determination on soft polyacrylamide gels
- A129-Probing mechanical properties of living cell cytoskeleton in Peak Force QNM
- A130-Probing mechanical properties of plant tissues
- A131-Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules

MODULE 4 : ANALYSE ET MODELISATION DES DYNAMIQUES ET INTERACTIONS MOLECULAIRES EN CELLULES VIVANTES

Coordination *Hugues Berry, Antoine Coulon et Cyril Favard*

Introduction

L'étude des mécanismes cellulaires, de leurs régulations et intégrations, nécessite de mesurer en cellule vivante les dynamiques et interactions moléculaires tant sur la base de molécules individuelles que de réponses moyennes sur des statistiques moléculaires par des méthodes de spectroscopies. Les résultats de ces différentes méthodes sont complémentaires mais difficiles à combiner entre elles. Le dialogue entre expérimentateurs et théoriciens permet de nouvelles avancées dans ce domaine. Cela ouvre la porte à une vision intégrative de ces processus moléculaires élémentaires. Cela permet aussi d'orienter la pratique expérimentale, d'orienter le travail expérimental.

Lundi 8 octobre 8h15

First passage times, ergodicity and ageing for single-particle tracking in biological membranes

Diego Krapf

Department of Electrical and Computer Engineering and School of Biomedical Engineering, Colorado State University, Fort Collins CO, USA

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Single-molecule tracking of proteins allows the discrimination of inhomogeneous molecular distributions, providing access to the underlying mechanisms that govern protein mobility. Tracking individual proteins on the surface of mammalian cells reveals strikingly complex dynamics involving anomalous diffusion, transient confinement, clustering, and immobilization, to name a few examples. Theoretical models show that anomalous subdiffusion can be caused by vastly different processes. By performing time series and ensemble analysis of extensive single-molecule tracking we find that different anomalous subdiffusion processes coexist in live cells. Furthermore, the time-averaged mean square displacements (MSD) are different from the ensemble-averaged MSD, an indication of ergodicity breaking [1]. Non-ergodic dynamics are found to be caused by immobilization events that take place when the proteins are captured within specific macromolecular complexes. This process can be modelled as a continuous time random walk (CTRW) with a heavy tail distribution of waiting times [2]. One of the most interesting phenomena of heavy-tailed CTRWs is that they can exhibit aging, that is, the MSD depends on the time that passed since the onset of the process, i.e., it depends on the age of the system.

A different diffusion process is observed for peripheral proteins, where protein-membrane interactions are transient [3,4]. Thus, these proteins alternate between periods of two-dimensional diffusion on the membrane and three-dimensional diffusion in the bulk. When proteins dissociate from the membrane, they exert a three-dimensional random walk until they find the membrane again and are able to rebind, i.e., the process is governed by the distribution of first return times. These bulk excursions have broad implications on protein dynamics. Again, we study bulk-mediated diffusion using single-

molecule tracking methods. The experimental observations are explained in terms of bulk excursions that introduce jumps with a heavy-tail distribution, rapidly increasing the explored area.

1. A. Weron, K. Burnecki, E. J. Akin, L. Solé, M. Balcerek, M.M. Tamkun, and D. Krapf, Ergodicity breaking on the neuronal surface emerges from random switching between diffusive states. *Sci. Rep.* **7**, 5405 (2017).
2. A. V. Weigel, B. Simon, M. M. Tamkun, and D. Krapf, Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single molecule tracking". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 6438 (2011)
3. G. Campagnola, K. Nepal, B. W. Schroder, O. B. Peersen, and D. Krapf, "Superdiffusive motion of membrane-targeting C2 domains". *Sci. Rep.* **5**, 17721 (2015)
4. D. Krapf, G. Campagnola, K. Nepal, and O. B. Peersen, "Strange kinetics of bulk-mediated diffusion on lipid bilayers". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 12633 (2016)

The embryo as a laboratory

Thomas Gregor

Institut Pasteur

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Transcriptional regulation of gene expression is fundamental to most cellular processes, including determination of cellular fates. Quantitative studies of transcription in cultured cells have led to significant advances in identifying mechanisms underlying transcriptional control. Recent progress allowed implementation of these same quantitative methods in multicellular organisms to ask how transcriptional regulation unfolds both in vivo and at the single molecule level in the context of embryonic development. I will review some of these advances in early Drosophila development, which bring the embryo on par with its single celled counterparts. In particular, I will discuss recent progress in optical measurements of mRNA and protein distributions in fixed and living embryos, and highlight some initial applications that, when combined with theory, lead to fundamental new insights about the molecular underpinnings of transcription. I will end with an outlook on how to further exploit the unique advantages that come with investigating transcriptional control in the multicellular context of development.

Elucidating the nanoscale architecture of the plasma membrane with super-resolution spectroscopy

Erdinc Sezgin

University of Oxford

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Diffusion and interaction dynamics of molecules at the plasma membrane play an important role in cellular signalling. Nanoscale mobility of lipids and proteins in the plasma membrane is highly heterogeneous. This heterogeneity gives invaluable information on the bioactivity of these molecules. Thus, it is crucial to accurately measure the diffusion dynamics of the membrane molecules. Here, I will explain how we utilize super-resolution

STED microscopy combined with fluorescence correlation spectroscopy (STED-FCS) to access the diffusion characteristics of fluorescently labelled lipid analogues and proteins in the live cell plasma membrane. In order to elucidate the role of cortical actin cytoskeleton, we also measure the diffusion dynamics in cytoskeleton-free cell derived giant plasma membrane vesicles (GPMVs). Hindered diffusion of phospho- and sphingolipids is abolished in the GPMVs while transient nanodomain incorporation of gangliosides is apparent both in the live cell membrane and in GPMVs. This data underline the crucial role of the actin cortex in maintaining hindered diffusion modes of many but not all of the membrane molecules, and highlight a powerful experimental approach to decipher specific influences on molecular plasma membrane dynamics. I will next address whether the diffusion behaviour of the proteins is a direct measure for the bioactivity. We demonstrate that canonical Wnt3 ligand of the Wnt pathway (responsible for cell proliferation and regeneration) exhibits domain-like diffusion which is influenced by specific lipids. Disturbing this domain-like behaviour is directly translated to the activity of the pathway leading to significant decrease in signalling in cells and relatedly an abrupt phenotype in zebrafish. Later, I will show how we can use super-resolution STED in combination with spectral imaging to demonstrate the heterogeneity in the membrane.

Linking nano- and meso-scale compartmentalization of the plasma membrane using high density single particle tracking tools.

Maria Garcia-Parajo

ICREA Research Professor

ICFO – The Institute of Photonic Sciences, Mediterranean Technology Park

08860 Castelldefels (Barcelona) Spain

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Organization by compartmentalization is a general property of natural systems that efficiently facilitates and orchestrates biological events in space and time. In the last decade, compartmentalization of the plasma membrane of living cells has emerged as a dominant feature present at different spatiotemporal scales and regulating key cell functions. The advent of super-resolution microscopy and single molecule dynamic approaches has allowed the study of the cell membrane with unprecedented levels of details. From these studies it is becoming clear that receptor nanoclustering prior to ligand presentation constitutes a functional working unit of mammalian cells, including those of the immune system. In this talk, I will first describe the working principle of these advanced optical techniques and will then focus on recent studies in my group trying to link spatial and temporal organization at the nano- and meso-scales. For this, we combine single particle tracking approaches at different labelling densities. Low density conditions allow us to reconstruct the mobility of individual receptors and their transient interaction with other molecular partners, while high density labeling conditions provide complementary information on the spatial and temporal length scales of membrane regions re-visited (or forbidden) for receptors.

Mardi 9 octobre 16h00

Single molecule imaging of transcription factors in living cells: past, present and future challenges.

Davide Mazza

San Raffaele Scientific Institute. Experimental Imaging Center. Milan, Italy

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

In the last ten years, applications of single-molecule approaches to study the dynamic behavior individual proteins inside living cells have multiplied, especially in the field of transcription and gene expression. Single molecule tracking of nuclear factors (NFs), for example, has been used to determine that: (i) Most TFs only bind transiently to their responsive elements on DNA (ii) individual NFs use distinct search mechanisms to scan for their binding sites (2); (iii) longer binding times of transcriptional activators and repressors result in stronger activation/repression of target genes (3, 4). I will describe the methods we and others used to acquire, analyze and interpret single molecule data of NFs, and discuss some of the challenges that our field has faced, from the necessity of common grounds for data analysis, to the possibility of multiplexing SMT with other advanced fluorescence techniques and to the extension of the method to thicker three-dimensional samples – e.g. living embryos. More challenges lie ahead, towards the goal of a single-molecule description of the transcriptional activation process in living cells.

- (1) Mazza D, Abernathy A, Golob N, Morisaki T, McNally JG. A benchmark for chromatin binding measurements in live cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e119.
- (2) Izeddin I, Récamier V, Bosanac L, Cissé II, Boudarene L, Dugast-Darzacq C, et al. Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus. *eLife* 2014: 3.
- (3) Loffreda A, Jacchetti E, Antunes S, Rainone P, Daniele T, Morisaki T, et al. Live-cell p53 single-molecule binding is modulated by C-terminal acetylation and correlates with transcriptional activity. *Nat Commun.* 2017;8:313.
- (4) Clauß K, Popp AP, Schulze L, Hettich J, Reisser M, Escoter Torres L, et al. DNA residence time is a regulatory factor of transcription repression. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:11121–30.

Single molecule imaging to study transcription and genome organization

Xavier Darzacq

Université Berkeley

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

In recent years measurements of the single molecule dynamics of transcription factors as they explore the nucleoplasm and bind DNA have provide novel insights on the mechanisms of gene regulation in cell-culture model systems. However, due to constraints on achievable signal-to-noise ratios using conventional imaging approaches, measuring single molecule dynamics in live embryos has not been possible. Here, I will first demonstrate that by using lattice light-sheet microscopy with minor modifications we can

precisely measure the single molecule dynamics of transcription factors in living embryos during development at a wide range of temporal scales. I will show how a combination of single molecule and genomics data, and live imaging of transcription has enabled us to reveal previously unknown mechanisms of gene regulation and provided key insights into the dynamics of zygotic genome activation during the earliest stages of embryonic development. Specifically, we have characterized the single molecule biophysical properties of two proteins, Zelda, a pioneer factor, and Bicoid, a morphogen, that play an essential role in controlling the spatial and temporal dynamics of gene expression in the early *Drosophila* embryo. By performing single molecule measurements at a range of temporal scales we have quantified the off-rates of specific and non-specific protein-DNA interactions, diffusion coefficients, fraction bound, and the spatial-temporal distributions of binding events. We find that although the DNA-binding off-rates of both Zelda and Bicoid are remarkably high, Zelda can modulate the on-rates of Bicoid binding by mediating the formation of local high concentration hubs. By performing single molecule measurements in the context of the bulk spatial distributions of proteins we found that Zelda forms large dynamic clusters that are enriched for Bicoid binding events. To further investigate how this clustering is linked to gene activation we measured the spatial distribution of Zelda in the context of transcriptional activity by utilizing the MS2-MCP system and found that Zelda clusters transiently interact with active genes. Collectively our data suggests that that mechanisms have evolved to control the on-rate of DNA binding through a well regulated modulation of local concentrations of proteins within the nucleoplasm. We propose a model in which the pioneer factor Zelda potentiates robust gene activation by escorting critical factors to the correct genomic locations at precise times during development.

Dans la même thématique

Modules avancés /Tables rondes :

- MA137-Fluorescence correlation spectroscopy: from basic theory to applications
- TR152-Mesure et analyse des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante : expérimentation et modélisation (Favard & Izeddin)

Ateliers :

- A25-Mitochondrial dyes and FRET biosensors to determine the mitochondrial energy potential: a complementary approach
- A43-Adaptive confocal microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy
- A51-Mitochondrial Ca²⁺ and ATP FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM during hypoxia-reoxygenation
- A104-Spot detector sous Icy l'outil 3 en 1 ! : coloc, tracking et segmentation
- A110-Microscopes Metrology in database
- A120-Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) : mesure, automatisation et analyse
- A121-Detecting protein aggregation and interactions in live cells: a practical on Number and Brightness
- A123-Spotlight on mitochondria: how it explodes and how it is digested

Ecole thématique interdisciplinaire du CNRS : Microscopie Fonctionnelle en Biologie

MODULE 5 : NOUVEAUX AGENTS DE CONTRASTE, BIOSENSEURS, SONDES, NNAOVECTEURS, PHYSIQUE DES FLUOROPHORES

Coordination Dominique Bourgeois, Fabienne Mérola et Arnaud Gautier

Introduction

L'apparition récente de techniques permettant de contrôler et moduler de façon spatio-temporelle la fonction de certains gènes permet de comprendre différents processus complexes du vivant (neurologie, développement). En parallèle les biosenseurs, et notamment ceux génétiquement encodés, permettent de réaliser de manière dynamique des mesures en cellule vivante. Ces techniques, qui sont en pleine évolution, nécessitent à la fois des développements technologiques, la mise au point de nouvelles sondes et de nouveaux outils de modélisation afin de progresser dans la connaissance des réseaux cellulaires de signalisation et de régulation et au-delà dans des organismes modèles.

Mardi 9 octobre 13h45

Seeing cells at work using genetically-encoded biosensors

Peter Dedecker

Lab for Nanobiology, Department of Chemistry, KU Leuven, Belgium

Peter.dedecker@kuleuven.be

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

In this lecture I will strive to give an overview of the various genetically-encoded biosensors that are available to see reactions and processes happening inside living cells. I will focus on why this is relevant, what strategies and scaffolds are available, as well as some critical thoughts on their development and use. Since many of these biosensors are based on fluorescent proteins, I will also include an overview on the properties and development of these fundamental building blocks. The lecture is intended to be accessible to those unfamiliar with the field, though I will also touch on (some of) the latest developments.

Spying on cells with glowing chemical-genetic hybrids

Arnaud Gautier

Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France.

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Deciphering the complex mechanisms controlling cells and organisms requires effective imaging systems and fluorescent probes to observe and quantify biomolecules in real time with high spatiotemporal resolution. A common strategy for imaging proteins is to fuse them to peptide or protein sequences that provide fluorescence, such as autofluorescent proteins. Recently, the fluorescence toolkit has been expanded with methods for labeling biomolecules with exogenously applied small synthetic fluorescent probes. These innovative technologies offer additional labeling refinement and broaden fluorescent labeling to more diverse cellular molecules. Selectivity is ensured through fusion to a

genetic tag that binds selectively tailored fluorescent molecules. The modular nature of such an approach enables one to tune the synthetic part by molecular engineering, in order to address biological questions with the molecular diversity offered by modern chemistry. To be usable within living systems, the genetic tag must fold and function in various cellular compartments, while the fluorescent probes must ideally not show unspecific interaction/reaction with cell components. A way to avoid unspecific background in cells and achieve high imaging contrast is to use fluorescent probes that display no fluorescence until labeling occurs. Such probes are often called fluorogenic probes to highlight their ability to generate fluorescence upon reaction/interaction with their target. During this lecture, I will present the development and applications of tunable fluorescent markers that enable high imaging contrast relying on genetically encoded protein that bind and activate fluorogenic molecules.

From concepts to practise: How to get from a specific biological research question to a robust experimental SMLM implementation!

Ulrike Endesfelder^{1,2}

¹Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology

²LOEWE Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO), Marburg, Germany

ulrike.endesfelder@synmikro.mpi-marburg.mpg.de

www.mpi-marburg.mpg.de/endesfelder

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

In this talk I will discuss practical strategies on how to find and evaluate good SMLM imaging schemes for specific biological questions:

How do dyes perform in comparison to fluorescent proteins for different samples, e.g. how does one tackle advanced multi-colour or live cell imaging approaches? And are there good heuristics to decide and evaluate your diverse experimental implementation ideas?

I will give und discuss some concrete examples and will end with perspectives on how current developments might shape the future!

[1] Turkowyd, Virant and Endesfelder (2016). "From single molecules to life – microscopy at the nanoscale." *Anal Bioanal Chem* **408**, **25**, 6885–6911, doi: 10.1007/s00216-016-9781-8

[2] Vojnovic, Winkelmeier and Endesfelder (2018). "Visualizing the inner life of microbes: Practices of multicolor single molecule localization microscopy in microbiology", *Biochem. Soc. Trans.*, *under revision*.

Insight in Fluorescent Lipid Probes, from plasma membrane to lipid droplets

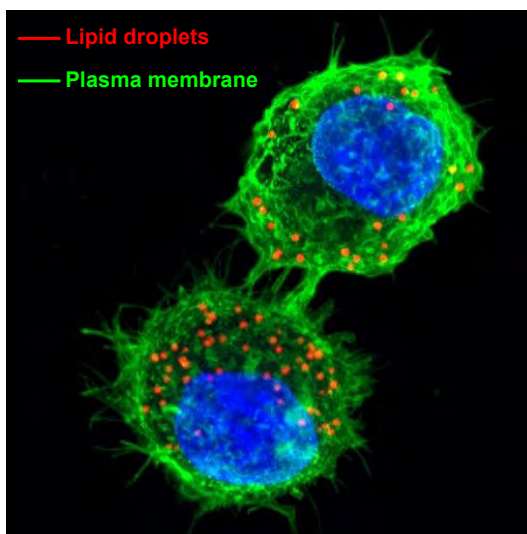
Mayeul Collot,¹ Lydia Danglot,² Andrey S. Klymchenko¹

¹ Laboratoire de Biophotonique et Pathologies, UMR 7021 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, Route du Rhin, 67401 ILLKIRCH Cedex, France.

² INSERM U894, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, Membrane Traffic in Healthy and Diseased Brain, 102 rue de la Santé, 75 014 PARIS.

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Fluorescence imaging of cell and tissues requires specific molecular probes owning defined features such as specificity, multicolor compatibility, brightness and photostability. In this session we will focus on lipid probes able to stain plasma membrane¹⁻³ and lipid droplets.⁴ We will review the available molecular probes and discuss their limitations. We will also focus on recent advances in the field and the chemical challenges to access probes with enhanced compatibility with various modality of microscopy including two-photon excitation, photo-conversion and super resolution microscopy.



¹ Collot, M.; Kreder, R.; Tatarets, A. L.; Patsenker, L. D.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S. *Chem. Commun.*, **51** (96), 17136–17139 (2015).

² Klymchenko, A. S.; Kreder, R. *Chem. Biol.*, **21** (1), 97–113 (2014). ³ Kucherak, O. A.; Oncul, S.; Darwich, Z.; Yushchenko, D. A.; Arntz, Y.; Didier, P.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*; **132** (13), 4907–4916 (2010).

⁴ Collot, M.; Fam, T. K.; Ashokkumar, P.; Faklaris, O.; Galli, T.; Danglot, L.; Klymchenko, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **140** (16), 5401–5411 (2018).

Mercredi 10 octobre 10h30

Click Chemistry for Imaging

Boris Vauzeilles^{1,2}

¹ Chemical Biology Department, ICSN, CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette (France)

² Synthesis of Bioactive Molecules and Macromolecules, ICMMO, CNRS UMR 8182, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay (France)

boris.vauzeilles@u-psud.fr

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

“Click chemistry” has been introduced at the turn of the century^[1] as a strategy to rapidly access new molecular structures by modular assembly of modules presenting complementary and highly efficient reactivities. This concept has been rapidly assimilated by the scientific community, resulting in numerous applications in various fields of

research. Some of the reactions identified during this process^[2] proved to be sufficiently compatible with biological media, as well as sufficiently specific, to be considered as biorthogonal,^[3] and have found various applications in the labelling of biomolecules for *in cellulo* or *in vivo* imaging. This lecture will present the fundamental concepts as well as some representative strategies exploiting click chemistry for imaging, including super-resolution imaging of living bacteria.^[4]

1. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004-2021 (2001).
2. F. Clerc, A. Commerçon, B. Vauzeilles, *L'Act. Chim.*, **393-394**, 24-30 (2015)
3. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6974-6998 (2009).
4. C. Cabriel, N. Bourg, P. Jouchet, G. Dupuis, C. Leterrier, A. Baron, M.-A. Badet-Denisot, B. Vauzeilles, E. Fort, S. Lévêque-Fort, *BioRxiv*, 385799 (2018). Available from: <https://doi.org/10.1101/385799>

Design of NIR fluorophores: from solution to solid-state

Yann Bretoniere

Laboratoire de Chimie

ENS de Lyon

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

In depth *in-vivo* optical imaging requires long wavelength fluorophores absorbing and emitting in the far-red/NIR (650 – 1300 nm), which corresponds to the optical transparency window of tissues, but efficient fluorophores are still rare. We will try to show in this presentation how chemists tackle this issue by designing new fluorophores structures and exploring new approaches based in particular on nanoparticle formulation. Emphasis will be given to the recent work developed in the Laboratory of Chemistry of ENS Lyon in that particular field.

Dans la même thématique

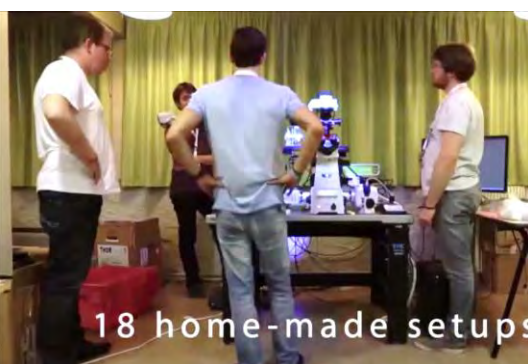
Tables rondes :

- TR153-Nouveaux agents de contrastes, biosenseurs, sondes, nanovecteur, photophysique des fluorophores (Bourgeois)

Ateliers :

- A22-Fluorescent nanoparticles for RGB color coding of living cells
- A28-Efficient plasma membrane staining using MemBright probes : from live dynamics to super-resolution
- A47-Automated drug inhibitor screening of Aurora A kinase activity based on a FRET biosensor
- A71-Real-time intracellular quantum dot to fluorescent protein FRET.
- A98-Visualization of multiple (7) immune-cell biomarkers in human tumors by multiplex Tyramide Signal Amplification system: Staining strategy, Multispectral imaging and Linear unmixing

- A103/133-FAST: next generation of inducible chemical-genetic fluorescent markers for advanced biological imaging
- A122-From visualization to quantitative analysis of ERK activity dynamics in single cell migration and collective cell migration using ratiometric FRET imaging.



Teaser MiFoBio: www.youtube.com/watch?reload=9&v=Bnpx5JGUlyA

[Attirez l'attention du lecteur avec une citation du document ou utilisez cet espace pour mettre en valeur un point clé. Pour placer cette zone de texte n'importe où sur la page, faites-la simplement glisser.]

MODULE 6 : ONDES SUR LE VIVANT (AVEC GDR ONDES) : IMAGERIE DANS LES TISSUS, LE DEFI DES MILIEUX DIFFUSANTS HETEROGENES – OPTIQUE ADAPTATIVE

Coordination Sophie Brasselet

Avec le GdR Ondes



Introduction

Ce module est proposé, comme lors de la session 2014 et 2016, en collaboration avec le GDR Ondes. Il a pour but d'étendre les techniques d'imagerie du vivant à d'autres modalités que l'optique (ultrasons, etc.), mais aussi d'apporter de nouveaux concepts issus du contrôle spatio-temporel des ondes (imagerie à travers des milieux très diffusants).

Mercredi 10 octobre 8h15

Non-linear microscopy in deep tissues

Benjamin Judkewitz

Charité / Humboldt University Berlin

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Recent advances in resolution, speed, labelling and the advent of optogenetics have greatly extended the use of optical techniques and enabled many biomedical breakthroughs. Yet, when light propagates through thick biological tissues, refractive index inhomogeneities cause diffuse scattering that increases with depth. This poses a major challenge to optical techniques, limiting their biomedical usefulness in vivo to superficial layers of tissue (in rodents) or to larval stages (in zebrafish). In this talk I will describe several strategies to address this key challenge using techniques based on wavefront engineering and optical time reversal, in order to enable optical imaging at unprecedented depths in biological tissues.

Nonlinear endoscopes

Hervé Rigneault

Institut Fresnel, Aix-Marseille Univ, CNRS, Ecole Centrale de Marseille

Marseille - France

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

Multiphoton processes such as 2photon and 3photon fluorescence, second harmonic generation, third harmonic generation or coherent Raman (CARS and SRS) have become the war horses in many field of biology. These contrasts require the delivery of ultra-short pulses and the collection of the faint generated photons. Implemented with near infra-red

radiations these contrasts can be activated within the depth of living tissue up to few hundreds of microscope. However there exists a fundamental limit where imaging in depth is impossible this is when the photons are absorbed. In this talk I will explore this regime that requires to bring photon through endoscopes. However delivering ultra-short pulse at the end of an endoscope, collecting the generated faint photons and performing imaging comes with a number of challenges that require the development of dedicated technologies. I will present our efforts using hollow and multicore fibres to generate multiphoton imaging at the end of flexible endoscopes, the smallest being the size of the fibre itself and enabling to access region in the brain that remain unexplored.

Scanning tip multiphoton endoscope:

A. Lombardini, V. Mytskaniuk, S. Sivankutty, E. R. Andresen, X. Chen, J. Wenger, M. Fabert, N. Joly, F. Louradour, A. Kudlinski, and H. Rigneault, "High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope" *Light: Science & Applications* 7, 10 (2018)

Lensless endoscope:

Esben Ravn Andresen, Siddharth Sivankutty, Viktor Tsvirkun, Géraud Bouwmans, Hervé Rigneault, "Ultrathin endoscopes based on multicore fibers and adaptive optics: a status review and perspectives" *J. Biomed. Opt.* 21(12), 121506 (2016)

3D X-ray microscopy by absorption and phase Computerized Tomography

Françoise Peyrin

Univ Lyon, INSA-Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Inserm, CREATIS UMR 5220, U1206, F-69621 Cedex, Lyon, France

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

There is currently a growing interest in 3D microscopic imaging techniques. In this presentation, we show the potential of synchrotron based 3D X-ray micro-CT and phase nano-CT for the exploration of living tissue up to the cellular scale [1] [2]. These developments rely on the rapid spreading out of computerized tomography (CT) techniques from clinical imaging to pre-clinical and biological imaging. X-ray micro-CT systems made commercially available have received applications in a huge number of fields (biology/medicine, material science, industry, environment...). Another very promising field is phase contrast imaging, which is a coherent imaging technique improving the sensitivity of X-rays by exploiting another mode of contrast than absorption.

We will particularly present micro/nano-CT based on synchrotron radiation (SR) and their advantages in terms of image quality over systems using standard X-ray sources, as well as the setups developed at ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), Grenoble, France. We will also describe the data processing steps involved in the image formation process [3] and image analysis. We will focus on applications of these methods for the multiscale characterization of bone tissue. While micro-CT permit a detailed analysis of bone micro architecture in terms of geometry and mineralization with spatial resolution of a few micrometers, phase nano-CT permit to investigate in details the lacuno-canalicular network (LCN) embedding the osteocyte system in bone with spatial resolution of a few tenth of nanometers. According to the setup, it is possible either to obtain a global assessment of the LCN in entire osteons or a detailed analysis around a few cells (Figure 1).

Moreover, phase nano-CT permit to quantify locally the mineralization of the extra cellular matrix as well as to get information about the organization of the collagen fibers constituting the bone matrix.

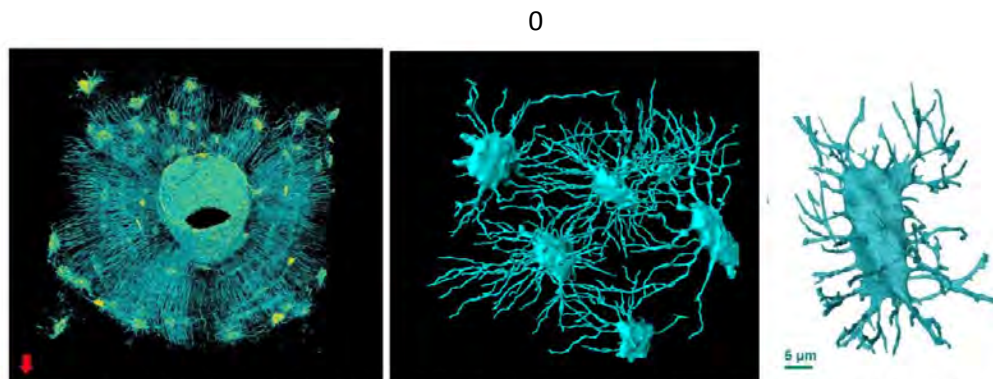


Figure 1 : left, 3D display of the LCN by parallel beam SR CT, (voxel size:300 nm) in one osteon, middle, a few lacunae and their canaliculi after segmentation by a 3D geodesic voting method (voxel size:300 nm), right, 3D rendering of an isolated lacunae and its canaliculi (voxel size:60 nm)

- [1] Pacureanu A, Langer M, Boller E, Tafforeau P, Peyrin F. Med Phys 2012;39:2229.
- [2] Langer M, Pacureanu A, Suhonen H, Grimal Q, Cloetens P, Peyrin F. PLoS ONE 2012;7:e35691.
- [3] Yu B, Weber L, Pacureanu A, Langer M, Olivier C, Cloetens P, Peyrin F, Optics Express 2018 in press

Multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT)

Daniel Razansky

Technical University of Munich and Helmholtz Center

Munich, Germany, E:mail: dr@tum.de

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Optoacoustic imaging is increasingly attracting the attention of the biomedical research community due to its excellent spatial and temporal resolution, centimeter scale penetration into living tissues, and versatile endogenous and exogenous optical absorption contrast. State-of-the-art implementations of multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT) are based on multi-wavelength excitation of tissues to visualize specific molecules within opaque tissues. As a result, the MSOT technology can noninvasively deliver structural, functional, metabolic, and molecular information from living tissues. Our recent efforts in the field of optoacoustic functional and molecular imaging have established new technological platforms employing spherical matrix arrays, parallel acquisition hardware, GPU-based data processing and fast-tuning laser systems in order to enable acquisition and visualization of spectroscopic information from entire tissue volumes at video rates. This has set the stage for the so-called five dimensional (real-time three-dimensional multi-spectral) optoacoustic imaging that offers unparalleled capabilities among the existing bio-imaging modalities. Applications are explored in the areas of functional neuro-imaging, fast

tracking of agent kinetics and biodistribution, cardiovascular research, monitoring of therapies and drug efficacy as well as targeted molecular imaging studies.

Jeudi 11 octobre 10h30

Waves manipulation for imaging in scattering media

Sylvain Gigan

Laboratoire Kastler-Brossel, UMR8552– Sorbonne Université, Ecole Normale Supérieure, CNRS, Collège de France, 24 rue Lhomond 75005 PARIS

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

Imaging at depth in biological tissues with light is limited by tissues scattering and aberrations. At shallow depth, several microscopy techniques allow retrieving an image, with sectioning ability, for instance 2PEF, OCT, Confocal microscopies. However, “useful” light for microscopy is attenuated exponentially at depth, due to the Beer Lambert law. Most microscopy techniques are thus limited in depth to few tens to hundreds of microns.

However, scattered light, acting as background for microscopy, is still present at centimetric depth in tissues and can be in principle used for imaging, thanks to a recent arsenal of tools and techniques known as “wavefront shaping”, derived from the field of adaptive optics. In essence, actively controlling the incident wave allows manipulating scattered light interferences at depth, deterministically. This in turn opens the possibility to focus or image with micronic or submicronic resolution with scattered light. I will describe some of the recent advances in our team to achieve imaging at depth in tissues.

1. S. Rotter, S. Gigan, Light fields in complex media: mesoscopic scattering meets wave control, *Rev. Mod. Phys.* 89, 015005 (2017)

Brillouin imaging in life sciences: from single cell to tissues

Thomas Dehoux

Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut Lumière Matière, F-69622, Villeurbanne, France

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

In the first part of this talk I will briefly review state-of-the-art techniques available to measure the mechanical and adhesive properties of cells at a subcell scale. In this context, I will discuss the opportunity to use the time-resolved Brillouin spectroscopy to detect acoustic waves in cells with a subcell resolution. I will describe the technique from an experimental and theoretical point of view, and I will discuss the potential of the technique to produce high-resolution images of single cells with the mechanical and adhesive properties as the contrast mechanism. In the second part, I will present the implementation of Brillouin spectroscopy in tissues. Through examples in live

tumor models I will demonstrate the potential of the technique for cancer research and drug screening. Finally, I will discuss some of the emerging challenges awaiting Brillouin spectroscopy

Dans la même thématique

Tables rondes :

- TR154-Ondes sur le vivant (avec GDR Ondes) , imagerie des milieux très diffusants

Ateliers :

- A128-Full-field interferometric microscope for detection and sorting of label-free biotic and non-biotic nanoparticles
- A16-Microscopie thermique sub-Kelvin par imagerie de phase quantitative appliquée à l'étude de cellules en culture
- A23-Mesure de dynamique intracellulaire sans marquage par analyse de front d'onde à très haute définition
- A88-Real time acquisition of inflammation and regeneration processes on zebrafish models using photonic microscopy and second harmonic generation.
- A93-Non-Rigid and Deformable Registration For Medical and Biological Data
- A101-Simple phase and fluorescence microscopy for the time-lapse acquisition of adherent cell cultures
- A108-Speed Opium for multiplexed observations in microscopic, macroscopic, and endoscopic fluorescence imaging
- A115-4D multi-plane and multi-colour (4D-MPMC) microscopy imaging with quadratically distorted (QD) grating and grisms
- A116-Imaging in scattering biological tissues: ultra fast wavefront shaping and speckle imaging



MODULE 7 : AUTOMATISATION, HAUT CONTENU, ET MULTIMODALITE

Coordination Catherine Picard et Thomas Walter

Introduction

In High-Throughput- and High-Content Screening (HTS/HCS) we aim at performing many experiments in order to probe a large set of experimental conditions. This includes genetic screens, where we probe individual gene with respect to their loss-of-function phenotype or drug screens where we investigate the effect of a drug on a cellular population. This type of assays relies on heavy automatization of microscopy and sample preparation and generates large data sets that can no longer be analyzed by visual inspection. For this reason, the technical developments in this field also triggered the use of computer vision and machine learning methods to classify cellular phenotypes and to deal with these large and complex data sets in a statistically sound and robust way. This module shows how advanced microscopy techniques and experimental protocols can be used in this context and also how the formidable challenge of analyzing these data can be addressed with new tools of bioimage informatics.

Samedi 6 octobre 10h30

How Localization-based resolution imaging meets High Content Screening ?

Anne Beghin

Institut interdisciplinaire de Neurosciences

IINS - UMR 5297 - Centre Broca Nouvelle-Aquitaine

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex (FRANCE)

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

Single-Molecule-Localization Microscopy approaches (SMLM) has proven to be an essential tool for quantitatively monitoring biological processes with high spatial and temporal resolution as well as rich data content. Nevertheless, while they can provide unprecedented insights on nanoscale proteins organization and dynamics, they face important limitations in both their throughput and penetration depth capacities.

In term of throughput, there is still a real challenge for research laboratories to have access to these technologies without compromise on systematization capabilities in order to screen a sufficient number of conditions to answer biological questions (like in High Content Screening (HCS)). The huge amount of data generated that need to be computed combined with the lack of automation and data mining software strongly limit the throughput of SMLM techniques. However, such HCS capacities would be crucial for the identification of new mechanisms of action, biomarkers or potentials therapeutic targets.

We developed a new HCS-SMLM platform (1) dedicated to biologists and biochemists allowing the automatic screening in 96-wells plate with nanoscale resolution. The acquisition and data analysis are achieved in a single automated workflow, generating a database of quantitative single-molecule descriptors such as position, dynamics, clustering, etc. and allowing navigating through this huge forest of metadata (up to 2 billion of objects).

Another strong limitation of SMLM approaches are their low penetrations depth inside biological samples or tissues. To overcome this limitation, we developed a new light sheet-based microscope architecture, called soSPIM, which relies on the use of micro-fabricated chips featuring 45° mirror alongside micro-wells. This architecture provides good optical sectioning and high sensitivity (2), enabling to perform multicolour SMLM up to a few tens of microns above the coverslip. In addition, soSPIM offers the possibility to greatly increased the throughput of light-sheet approaches as compared to the standard light-sheet architectures, opening the capacity to screen physiologic and complex objects such as organoids, spheroids, or explants, with very high spatial and temporal resolutions.

1. Beghin A., et al., *Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening*. Nat Methods, 2017. **14**(12):1184–90.
2. Galland, R., et al., *3D high- and super-resolution imaging using single-objective SPIM*. Nat Methods, 2015. **12**(7):641-4.

High throughput using biomaterials and biomimetic surfaces

PICART Catherine^{1,2}

¹CNRS, LMGP, UMR5628, 3 parvis Louis Néel, 38031 GRENOBLE Cedex 01

²Grenoble Institute of Technology (INPG), LMGP, 3 parvis Louis Néel, 38031 GRENOBLE Cedex 01

[Salle Galipot – Cours parallèle](#)

It is now widely recognized that cells sense their surrounding matrix and are sensitive to biochemical, topographical and mechanical signals [1]. The commonly used plastic and tissue culture polystyrene are far too rigid to mimic physiological conditions. Therefore, 2D and 3D engineered biomimetic environments are more and more used to study cellular behaviors in more physiologically-relevant environments [2, 3]. The most widely used techniques to prepare these engineered materials are microfluidics [4], microprinting [5], inkjet and liquid handling robots [6] [7]. They enable to study cells at different length scale, from the single cell level to collective cellular assemblies, depending on the processing parameters. Ideally, engineered biomimetic environments should be compatible with microscopic imaging and high content screening techniques. In this presentation, I will discuss the potentialities, specific requirements, advantages and difficulties, of engineered 3D materials and 2D surfaces in term of automation, high content screening and data acquisition using multiple modalities.

[1] Irianto J, Pfeifer CR, Xia Y, Discher DE. SnapShot: Mechanosensing Matrix. Cell. 2016;165:1820- e1.

[2] Seo J, Shin JY, Leijten J, Jeon O, Camci-Unal G, Dikina AD, Brinegar K, Ghaemmaghami AM, Alsberg E, Khademhosseini A. High-throughput approaches for screening and analysis of cell behaviors. Biomaterials. 2018;153:85-101.

[3] Holle AW, McIntyre AJ, Kehe J, Wijesekara P, Young JL, Vincent LG, Engler AJ. High content image analysis of focal adhesion-dependent mechanosensitive stem cell differentiation. Integr Biol. 2016;8:1049-58.

[4] Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, Delgado C, Trushko A, Krause KH, Vignjevic D, Nassoy P, Roux A. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). Lab Chip. 2016;16:1593-604.

- [5] Vignaud T, Ennomani H, They M. Polyacrylamide hydrogel micropatterning. *Methods in cell biology*. 2014;120:93-116.
- [6] Ranga A, Gobaa S, Okawa Y, Mosiewicz K, Negro A, Lutolf MP. 3D niche microarrays for systems-level analyses of cell fate. *Nat Commun*. 2014;5:4324.
- [7] Machillot P, Quintal, C., Dalonneau, F., Hermant, L., Monnot, P., Matthews, K., Fitzpatrick, V., Liu, J., Pignot-Paintrand, I., Picart, C. Automated buildup of biomimetic films in cell culture microplates for high throughput screening of cellular behaviors *Adv Mater*. 2018;e1801097.

Jeudi 11 octobre 8h15

Single cell imaging and sequencing

Christian Conrad

German Cancer Research Center (DKFZ)

BioQuant Center Heidelberg University (BQ0020)

Im Neuenheimer Feld 267, D-69120 Heidelberg, Germany

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

The correlative genomic analysis and classification of single cells opens new avenues in understanding biological heterogeneity, cancer disease progression and monitoring. We have developed a workflow to isolate and classify micro tissues for single cell or tissue transcriptomics to more accurately correlate 3D phenotypes with multicellular gene expression profiles. By combining image based classification, drug sensitivities or genomic profiling, we can link specific gene expression programs to heterogeneous micro tissue phenotypes in the 3D cell culture model towards personalized health applications.

Organoids imaging

Nathalie Picollet-D'hahan

¹ *Univ. Grenoble Alpes, CEA BIG-BGE, INSERM F-38000 Grenoble, France*

[Salle Atlantique – Cours plénier](#)

A major limitation in the development of new disease treatments is the lack of good model systems to identify potential drug targets, screen toxicity and predict clinical drug efficacy in humans. Although the physiological relevance of **human organoids as models** to mimic cancer and to increase the predictive values of *in vitro* drug evaluation is now accepted, the practical use of organoids in HTS (High-Throughput Screening) is still limited by the low yield of mature and viable organoids.

One aspect we address here is the use of microtechnologies (e.g. microfluidic-based encapsulation) for the **engineering** of organoids for single-cell and HT functional genomics to characterize cell intrinsic properties [1], [2].

Another aspect is to illustrate how technologies (e.g. organoids electroporation, 3D imaging) combined with RNAi-based organoids HTS would help **analyzing** consistent and reproducible organoids, a prerequisite for applications including disease and cancer modeling and drug development assays. We recently showed 3D direct transfection preserves the natural self-organization of organoids along with spatial architecture and

polarity and demonstrated the feasibility of organoids-based genetic screen on direct-transfected organoids [3].

The last aspect is to illustrate how phenotypic analysis of organoids can rely on two different types of imaging, depending the targeted issue. Sophisticated techniques have emerged for the **imaging** of live cellular organoids such as light-sheet-based fluorescence microscopy, single-plane illumination microscopy and, more specifically, the two-photon approach. While these methods provide High-Content Information of 3D organoids, they are not well suited for HT-counting and imaging as they are time-consuming and costly and most of the time they require cell fixation. To overcome these limitations, the entirely different strategy of lens-free holographic microscopy is being pursued in our group [4]. It allows the observation of living cells, does not require any label and enable HT analysis of hundreds of fixed or living organoids observed at the same time in a very large field of view. Moreover, lensfree videomicroscopy allowed us to observe the dynamics of cell trafficking in between human 3D organoids in real time.

[1] Controlled 3D culture in Matrigel microbeads to analyze clonal acinar Development.

Dolega ME, Abeille F, Picollet-D'hahan N, Gidrol X. *Biomaterials* **52**, 347-357 (2015)

[2] Deciphering cell intrinsic properties: A key issue for robust organoids production.

Nathalie Picollet-D'hahan, Monika E. Dolega, Delphine Freida, Donald K Martin. Xavier Gidrol. *Trends in Biotech. Trends in Biotech* **35** (11):1035-1048 (2017).

[3] Direct transfection of clonal organoids in Matrigel microbeads: a promising approach towards organoid-based genetic screens. Laperrousaz Bastien, Porte Stephanie, Gerbaud Sophie, Härmä Ville, Kermarrec Frédérique, Virginie Hourtane, Frédéric Bottausci, Gidrol Xavier, Picollet-D'hahan Nathalie. *Nucleic Acid Res.*, 1-13 (2018).

[4] Lensfree diffractive tomography for the imaging of 3D cell cultures. Momey F., A. Berdeu, T. Bordy, J.-M. Dinten, F. Kermarrec Marcel, N. Picollet-D'hahan, X. Gidrol, and C. Allier. *Biomedical Optics Express* **7** (3), 949-962 (2016).

Machine Learning for Bioimaging

Thomas Walter

¹ MINES ParisTech, PSL Research University, CBIO-Centre for Computational Biology, F-75006 Paris, France

² Institut Curie, PSL Research University, F-75005 Paris, France

³ INSERM, U900, F-75005 Paris, France

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

Machine Learning is a rapidly evolving field with an extreme impact on our daily live. Indeed, Machine Learning algorithms underlie many tools that we are using – knowingly or unknowingly – on a daily basis, and concern many different fields and aspects of our life. Applications are as diverse as the prediction of products we might be interested in given our browsing history or the prediction of a diagnosis given medical measurements, such as genetic mutations or medical imaging data.

Biology and in particular Bioimaging are no exceptions to this trend: with the increase in size and complexity of imaging experiments, and the requirements imposed by

the reproducible science paradigm, computational image analysis is today an essential step of most image-based assays. Machine learning is becoming increasingly important in this context, in particular in cases where it is easier to provide examples than to exactly define the image measurements that are to be calculated, for instance when cells are to be classified according to their phenotype¹ or localization pattern². With the advent of deep learning, machine learning is also more and more applied to traditional image processing and bioimage analysis tasks, such as detection of spots³, tracking or segmentation of cells⁴. Another application task of increasing importance is the simulation of microscopy data.

In this lecture, I will give a gentle introduction to machine learning for bioimaging. The applications include classification of cellular phenotypes and localization patterns as well as deep learning approaches for image segmentation.

1. Neumann, B., Walter, T., et al. (2010). Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, 464(7289), 721–7.
2. Glory, E., & Murphy, R. F. (2007). Automated subcellular location determination and high-throughput microscopy. *Developmental Cell*, 12(1), 7–16.
3. Nehme, E., Weiss, L. E., Michaeli, T., & Shechtman, Y. (2018). Deep-STORM: Super Resolution Single Molecule Microscopy by Deep Learning. <http://arxiv.org/abs/1801.09631>
4. Van Valen, D. A., Kudo, T., Lane, K. M., Macklin, D. N., Quach, N. T., DeFelice, M. M., ... Covert, M. W. (2016). Deep Learning Automates the Quantitative Analysis of Individual Cells in Live-Cell Imaging Experiments. *PLoS Computational Biology*, 12(11), 1–24.

Paths toward open quantitative biology with systems microscopy

Anatole Chessel

LOB, CNRS, INSERM, Ecole polytechnique, Palaiseau, France

[Salle Atlantique – Cours parallèle](#)

We are now able to acquire imaging data at the level of a whole system at once, with methods sometime called 'systems microscopy'; they use HCS and full genome screens, or high resolution very large volume of whole tissues or organisms. Image and data processing and analysis techniques are needed to extract information 'at-scale' from those datasets. But even then the question of how to fulfill the promises of those acquisition methods is still fairly open. How do we fully integrate them into biological knowledge? How do we do biology with systems microscopy datasets? In this talk/course we will cover some possible answers. One is open reproducible science, with the sharing of data, metadata and code to allow the larger community to refine and reuse datasets and methods and integrate them together. Another is to try and go beyond 'hit lists' and targeted questions; we will cover some examples using network inference techniques.

Dans la même thématique

Modules avancés et Tables rondes :

- MA135-Introduction to machine learning
- MA136-Imagerie de phase et d'indice pour la biologie
- TR146-Imagerie corrélative fluorescence + (phase, indice, biréfringence etc) : perspectives et attentes des biologistes
- TR155-Microscopie haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale (Picart & Walter)

Ateliers :

- A3-TANGO : un plugin ImageJ pour l'analyse d'image 3D à haut-débit.
- A6-Intelligence artificielle pour l'analyse d'image automatique en microscopie. Initiation au deep learning
- A9-Create your own ImageJ plugin as easy as pie
- A10-Coordinate-based quantification of 1- and 2-colors single-molecule localization microscopy data
- A49-High throughput screening of cell adhesion and spreading on biomimetic coatings of controlled stiffness and bioactivity
- A57-Pilotages de périphériques: Atelier de conception d'une automatisation/contrôle/Pilotage/surveillance d'un aquarium d'élevage d'animalerie de recherche
- A70-Correlative Microscopies: Image and Volume Registration
- A75-Giving access to machine learning for the quantitative analysis of big histological images through the deployment of virtual machines.
- A96-Pattern recognition in whole organism for automated microscopy or data-analysis using open source solutions
- A124-Tracing the internalization of bacteria into host cells using multidimensional high-content imaging



SÉMINAIRES

Vendredi 5 octobre

Lectures



S1 - 17h00 : Engineering new colors and functions of optogenetic indicators and actuators for biological microscopy

Robert E. Campbell

Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2G2 CANADA and
Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo,
113-0033 JAPAN

The advent of optogenetic tools, broadly defined here as both actuators for cell control and indicators for cell visualization, has revolutionized our ability to spy on the otherwise invisible world of neuronal activities. The most versatile class of optogenetic indicators are the Ca^{2+} indicators that change their fluorescence intensity or color in response to intracellular signaling events. These indicators are frequently used in combination with optogenetic actuators to enable simultaneous control and visualization of cellular signalling with precise spatial and temporal resolution. However, a persistent challenge in this area is achieving sufficient spectral separation between the wavelengths of light required to excite the actuator and the indicator. In this seminar I will describe our most recent efforts to use protein engineering to make highly red-shifted genetically encoded Ca^{2+} indicators that are suitable for use in combination with blue-light activatable optogenetic actuators. In addition, I will discuss recent progress to improve the robustness and sensitivity of the blue-light photocleavable optogenetic actuator, PhoCl.

S2 - 17h10 : Label-free Chemical Microscopy: Unveiling hidden signatures in living systems for precision diagnosis and treatment

Ji-Xin Cheng

Photonics Center, Boston University, 8 Saint Marys Street, Boston, MA 02215

Optical microscopy has been a fundamental tool to life science and materials science since its invention in the 17th century. Various labelling approaches have enabled selective visualization of cellular structures or biomolecules with high specificity under a light microscope. Despite great advances made recently, the labelling approach also has limitations: First, labels may perturb the function of a biological molecule or structure; Second, the labelling approach offers limited capacity of discovery because it is only applicable to mapping known species; Third, delivery of labels to a target could be difficult, especially under *in vivo* conditions; Fourth, potential toxicity often prevents the use of labels on human patients. Chemical microscopy, based on optical spectroscopic signals, opens a way to circumvent these barriers. I will present various advanced modalities of chemical microscopy including stimulated Raman scattering microscopy and transient

absorption microscopy. I will also present discoveries of hidden signatures in microstructures, esp. in living organisms, enabled by chemical microscopy.

Further readings:

1. Haonan Lin, Chien-Sheng Liao, Pu Wang, Nan Kong*, Ji-Xin Cheng*, “Spectroscopic stimulated Raman scattering imaging of highly dynamic specimens through matrix completion”, *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 17179
2. Xueli Chen, Chi Zhang, Peng Lin, Kai-Chih Huang, Jimin Liang, Jie Tian, Ji-Xin Cheng*, “Volumetric chemical imaging by stimulated Raman projection microscopy and tomography”, *Nature Communications*, 2017, 8: 15117
3. Delong Zhang, Chen Li, Chi Zhang, Mikhail N. Slipchenko, Gregory Eakins, Ji-Xin Cheng*, “Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organism with sub-micron spatial resolution”, *Science Advances*, 2016, 2: e1600521
4. Chien-Sheng Liao, Mikhail N. Slipchenko, Ping Wang, Junjie Li, Seung-Young Lee, Robert A. Oglesbee, Ji-Xin Cheng*, Microsecond scale vibrational spectroscopic imaging by multiplex stimulated Raman scattering microscopy, *Light: Science & Applications*, 2015, 4: e265.
5. Shuhua Yue, Junjie Li, Seung-Young Lee, Hyeon Jeong Lee, Tian Shao, Bing Song, Liang Cheng, Timothy A. Masterson, Xiaoqi Liu, Timothy L. Ratliff, Ji-Xin Cheng*, Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metabolism*, 2014 March, 18: 393-406.

S3 – 18h40 : STATISTICAL COLOCALISATION ANALYSIS FROM CONVENTIONAL TO SUPER RESOLUTION MICROSCOPY : TIPS AND TRICK FOR MOLECULAR MAPPING.

Lydia Danglot

Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, Inserm U894. 102 rue de la Santé, 75014, Paris, France

lydia.danglot@inserm.fr

KEYWORDS: Statistical Image Analysis, Super-resolution microscopy (SIM, STED, 3D STORM), synapse, SNARE.

During development and plasticity, synaptic molecules are transported to the synapse via vesicular and endosomal carriers in the range of 50-100 nm. Fusion of these carriers with the synaptic zone is achieved by SNARE proteins. We aim to unravel the transport and targeting of new protein at pre and post synaptic site of the synapse during development. Elucidating molecular organization during synapse construction requires to precisely localize single or aggregated molecules and to analyze quantitatively their spatial distributions.

We investigated the distribution of synaptic proteins with multi-color Super resolution microscopy (SIM, STED and STORM) on primary hippocampal neurons and brain slices. To unravel fine distance and molecular arrangement we developed a new user friendly plugin called SODA for Statistical Object Distance Analysis. SODA uses micro- and nano-scopy to significantly improve standard colocalisation analysis and is freely available in ICY [1]. Based

on Ripley's function our method considers both the geometry of the cell and the densities of molecules to provide colored maps of isolated and statistically coupled molecules.

We used SODA with three-color Structured-Illumination Microscopy (SIM) images of hippocampal neurons, and statistically characterized spatial organization of thousands of synapses. We show that presynaptic synapsin is arranged in asymmetric triangle with the 2 post-synaptic markers homer and PSD95 indicating a deeper localization of homer. As a proof of concept, we then imaged presynaptic glutamatergic terminals with 3D-STORM microscopy and analysed the coupling between more than 180,000 localizations of vesicular Glutamate Transporter (VGLUT) and Synapsin molecules inside synaptic boutons. We evaluated with SODA that each Synapsin or VGLUT localization is at a mean distance of $52 \pm 0,04$ nm.

These results demonstrate that SODA is a versatile and effective tool to statistically map large data sets of multi-color molecular assemblies with high spatial resolution. We are now on the way to use new super-resolution membrane probes [2] to investigate subcellular localization of VAMP2 AND VAMP7 in the presynaptic terminal and the postsynaptic dendritic spine. Using quantitative analysis of super-resolution microscopy, we investigate if these v-SNAREs are present in the same synaptic vesicle or if they are present in different synaptic vesicles pools.

[1] T. Lagache , A. Grassart , S. Dallongeville , O. Faklaris , N. Sauvonnet , A. Dufour,, L. Danglot *, J.C. Olivo-Marin*. *corresponding authors

Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics.

Nat Commun. (2018) Feb 15;9(1):698.

[2] M.Collot*, P. Ashokkumar, H. Anton, E. Boutant, O. Faklaris, T. Galli, Y. Mely, L. Danglot*, A. S. Klymchenko * *corresponding authors

MemBright: a Family of Fluorescent Membrane Probes for Advanced Cellular Imaging and Neuroscience. **BioRxiv** doi: <https://doi.org/10.1101/380451>

Dimanche 7 octobre

S4 – 18h15 : Imaging life with the new frontiers in spatial and temporal resolution

Teng-Leong Chew

Advanced Imaging Center, Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA 20147

Visualizing and understanding complex biological processes demands the integrated efforts of biologists and physicists. The mission of the Advanced Imaging Center (AIC) is to make cutting-edge imaging technologies developed at Janelia widely accessible, and at no cost, to scientists outside of Janelia, before the instruments are commercially available. Operating strategically at the interface of engineering and biological applications, the AIC is positioned to drastically reduce the time between instrument development and widespread use in the increasingly technology-intensive field of biology. The AIC will expand the number and diversity of biologists who have access to the unique, state-of-the-art optical imaging microscopes developed at Janelia years before they become commercially available. This unique imaging center is thus uniquely positioned to empower investigators with tools currently not widely available elsewhere. In alignment with

Janelia's philosophy of encouraging bold and risky science, the AIC welcomes proposals with high-risk-high-gain projects that may challenge the current paradigm. In fact, it serves as an ideal platform for researchers to test out their novel ideas with the emerging microscopy technologies, fully supported by Janelia's in-house imaging experts and research infrastructure

S5 – 19h00 : Acousto-optic wavefront shaping in multiphoton microscopy to record and control neuronal activity.

Benjamin Mathieu¹, Vincent Villette¹, Walther Akemann¹, Stephan W. Evans², Mariya Chavarha^{2,3}, Jonathan Bradley¹, Dongqing Shi^{2,4}, Laurent Bourdieu¹, Michael Lin^{2,3}, Stéphane Dieudonné¹

1 - IBENS, Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure, CNRS, Inserm, PSL Research University, F-75005 Paris, France.

2 - Department of Neurobiology, Stanford University, Stanford, California, USA.

3 - Department of Bioengineering, Stanford University, Stanford, California, USA.

4 - School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, China.

Technologies for recording and manipulating neuronal activity *in vivo* in defined neuronal populations with high fidelity will be essential to understand how information is represented, processed, and propagated in the brain. Genetically encoded calcium indicators (GECIs), voltage indicators (GEVIs) and optogenetic actuators are especially promising as they can be expressed in defined cell types and are compatible with long-term chronic imaging *in vivo*. Cellular voltage imaging *in vivo*, however, suffers from limitations of both speed and sensitivity inherent in current indicators and imaging modalities.

In vivo 2P excitation of membrane proteins like voltage sensors or optogenetic actuators has been limited by three main factors: the low number of membrane proteins within a 2P focal volume, the low frame rate of standard 2P imaging and the possible imaging artefacts linked to brain motion in awake behaving mice. To address these three issues, we have developed light patterning strategies based on the acousto-optic technology. These strategies combine fast scanning (resonant rate), fast pointing (100 kHz) or so-called random-access, holographic shaping of the focal volume and beam multiplexing. Using acousto-optic deflectors (AODs) as fast wavefront shaping devices, laser pulses are phase-modulated to create dynamic excitation volumes covering large segments of neuronal membrane, including their anticipated displacement during tissue motion, and thereby enable motion-resistant membrane recordings at sufficiently high 2-photon excitation yield.

We demonstrate 10 kHz random-access recordings from ensembles of neurons in awake behaving mice. Using ASAP3, a newly developed fast GEVI displaying 50 % fluorescence change in the physiological voltage range, we report single spike detection with sub-millisecond precision and subthreshold membrane potential oscillations with cellular resolution deep in the cortex and hippocampus of awake mice. Recordings were performed in multiple neurons across several days. We also show activation of the optogenetic actuator ChR2 at reduced laser power and with equivalent XY and Z resolution. Finally, we present new developments for 3D imaging and stimulation and demonstrate

GCaMP6 calcium imaging at 1 kHz sampling speed of neurons at different laminar positions within a 400x400x400 μm volume of mouse sensory cortex.

Lundi 8 octobre

S6 – 16h15 : Imaging mitochondrial dynamics and functionality: from low to high throughput imaging

Marta Giacomello

Department of Biology, University of Padova., Via Ugo Bassi 58b, Padova

Email: marta.giacomello@unipd.it

When firstly discovered, mitochondria were mostly regarded as the powerhouse of the cell, due to their substantial contribution to ATP production. However, it became rapidly clear that these are pleiotropic organelles control a bunch of cell processes, ranging from programmed cell death to Ca^{2+} and redox homeostasis. All these tasks can be accomplished not only by their proprietary assets/toolkits, but also through quick tuning of their morphology and of their association and crosstalk with other intracellular compartments, which are referred to as “mitochondrial dynamics”.

In this talk, I will provide a brief overview of the functions and dynamics of these organelles, as well as of the state-of-the-art single cell imaging methods to study mitochondrial biology. Finally, I will illustrate how to upscale these low throughput assays into a high content imaging format.

Mardi 9 octobre

S7 – 18h15 : Machine learning and automation of (bio)image analysis

Anna Kreshuk

European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

Machine learning is at the heart of the on-going computer vision revolution. For many image analysis tasks learning-based algorithms are now approaching human parity. I will introduce the main concepts of machine learning, including deep convolutional neural networks, and show how they can be applied to common segmentation, tracking and counting problems.

S8 – 19h00 : The axonal cytoskeleton at the nanoscale

Christophe Leterrier

NeuroCyto, Aix Marseille Université, CNRS, NICN UMR7259, 13344 cedex 15, Marseille, France

The intricate connectivity and molecular identity of axons is maintained for decades, but also adapts to changes in neuronal activity and environment. The axon fulfills these paradoxical demands thanks to a compartmented cytoskeletal architecture that ensures the transport, anchoring and mobility of axonal components ¹. We can now directly visualize these molecular assemblies in situ, thanks to the development of optical super-resolution microscopy techniques. We use Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) to map the nano-architecture of cytoskeletal and scaffold assemblies within the axon. In the axon initial segment, a key compartment for the maintenance of neuronal polarity, we quantitatively resolved a highly organized actin/spectrin/ankyrin scaffold ². We have also visualized new actin structures along the axon shaft and are now interrogating their functions ^{3,4}. We are now developing new versatile labeling, acquisition and processing strategies ⁵ to characterize the nanoscale architecture of the axon, bringing insights on how it organizes axonal transport and presynaptic function.

1. Leterrier, C., Dubey, P. & Roy, S. The nano-architecture of the axonal cytoskeleton. *Nat. Rev. Neurosci* **18**, 713–726 (2017).
2. Leterrier, C. *et al.* Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold. *Cell Rep* **13**, 2781–2793 (2015).
3. Ganguly, A. *et al.* A dynamic formin-dependent deep F-actin network in axons. *J. Cell Biol.* **104**, 20576–417 (2015).
4. Papandréou, M.-J. & Leterrier, C. The functional architecture of axonal actin. *Mol. Cell. Neurosci* (2018).
5. Culley, S. *et al.* Quantitative mapping and minimization of super-resolution optical imaging artifacts. *Nat. Methods* **15**, 263–266 (2018).

Mercredi 10 octobre

S9 – 18h15 DNA origami tools for single-molecule biophysics

Philip Tinnefeld

Lehrstuhl für Physikalische Chemie, Ludwig Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 11 Haus E, 81377 München, Germany

In recent years, DNA nanotechnology has matured to enable robust production of complex nanostructures and hybrid materials. We have combined DNA nanotechnology with sensitive optical detection to create functional single-molecule devices that enable new applications in single-molecule biophysics. Starting with superresolution nanorulers [1], a single-molecule mirage [2] and energy transfer switches [3] we developed DNA origami nano-adapters for targeted placement of single molecules in zeromode waveguides used for DNA sequencing [4].

Furthermore, a plasmonic fluorescence amplifier [5] is used for sensitive biosensing and single-molecule detection on low-tec detection devices such as a smartphone. Finally, we present a molecular force spectroscopy employing DNA origami force clamps that work

autonomously without any physical connection to the macroscopic world [6]. We used the conformer switching of a Holliday junction as a benchmark and studied the interaction of DNA binding proteins with DNA when the DNA is under 0-15 pN tension.

- [1] Schmied, J.J. et al. DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nature protocols* 9, 1367-1391 (2014).
- [2] Raab, M., Vietz, C., Stefani, F.D., Acuna, G.P. & Tinnefeld, P. Shifting molecular localization by plasmonic coupling in a singlemolecule mirage. *Nature communications* 8, 13966 (2017).
- [3] Stein, I.H., Steinhauer, C. & Tinnefeld, P. Single-Molecule Four-Color FRET Visualizes Energy-Transfer Paths on DNA Origami. *J Am Chem Soc* 133, 4193-4195 (2011).
- [4] Pibiri, E., Holzmeister, P., Lalkens, B., Acuna, G.P. & Tinnefeld, P. Single-molecule positioning in zeromode waveguides by DNA origami nanoadapters. *Nano letters* 14, 3499-3503 (2014).
- [5] Acuna, G.P. et al. Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas. *Science* 338, 506-510 (2012).
- [6] Nickels, P.C. et al. Molecular force spectroscopy with a DNA origami-based nanoscopic force clamp. *Science* 354, 305-307 (2016).

S10 – 19h00 : *In vivo* Multiphoton Microscopy of the Mouse Brain

Chris Xu

School of Applied and Engineering Physics, Cornell University, Ithaca, NY 14853, U. S. A.

E-mail: chris.xu@cornell.edu

Over the last two decades, multiphoton microscopy has created a renaissance in the brain imaging community. It has changed how we visualize neurons by providing high-resolution, non-invasive imaging capability deep within intact brain tissue. Multiphoton imaging will likely play an essential role in understanding how the brain works at the level of neural circuits, which will provide a bridge between microscopic interactions at the neuronal level and the complex computations performed at larger scales. In this talk, the fundamental challenges of deep tissue, high-resolution optical imaging are discussed. New technologies for in vivo structural and functional imaging of mouse brain using long wavelength excitation and three-photon microscopy will be presented. We will illustrate the requirements for imaging the dynamic neuronal activity at the cellular level over a large area and depth in awake and behaving animals, and show applications where 3-photon microscopy outperforms conventional 2-photon microscopy in both signal strength and image contrast. Finally, we will discuss several future directions, including adaptive optics and new laser sources, to further improve the imaging depth and speed in biological tissues.

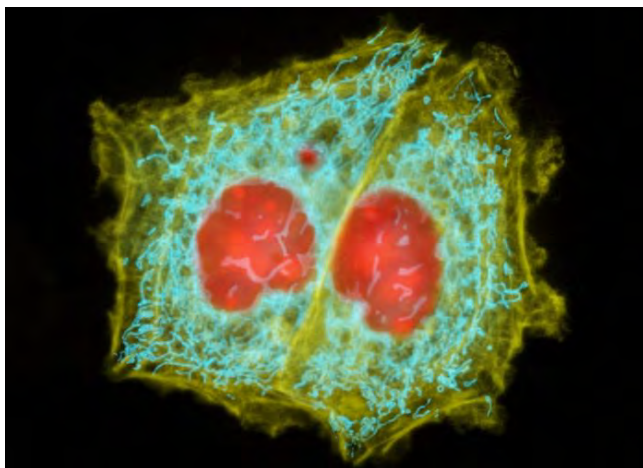
Jeudi 11 octobre

S11 – 18h15 : Boite noire vs boîte noire. Lutter contre l’opacité épistémologique

Vincent Bontems

Larsim-CEA Saclay. Orme des Merisiers , 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

L’opacité épistémologique peut trouver sa source dans de nombreux facteurs théoriques, techniques, organisationnels et sociaux de la recherche. Dès lors qu’une opération modifie l’information sans être elle-même objectivable, elle constitue une boîte noire susceptible de faire obstacle à l’éclairage épistémologique mais surtout d’affaiblir l’indépendance du champ scientifique, voire la fiabilité même des résultats. Dans le cadre du projet Episteme, j’ai entrepris avec mon collègue du CEA, l’astrophysicien Vincent Minier, d’élucider non seulement le fonctionnement phénoménotechnique des instruments de l’observatoire spatial Herschel mais aussi d’enquêter sur le fonctionnement du “segment sol” qui lui est associé. Grâce à notre partenariat avec Yannick Prié et Florian Melki de l’université de Nantes, nous avons pu retracer et visualiser les étapes et les évolutions du traitement algorithmique des données depuis leur programmation jusqu’à la constitution des images destinées à la publication. Notre stratégie a donc consisté à mettre en place une autre forme de “boîte noire”, celle qui assure la persistance des traces de l’élaboration du savoir et des manifestations de l’inventivité afin de garantir certaines conditions technologiques de l’autonomie relative du champ scientifique.



Image@microscopyU

CHALLENGE BIO



Responsable : Alessandro Furlan, (alessandro.furlan@univ.lille.fr)

Les "Challenge bio" ont été introduits en 2016 et sont reconduits pour l'édition 2018. Le principe est simple : les biologistes, en particulier ceux qui n'utilisent pas la microscopie habituellement ou qui souhaitent tester de nouvelles modalités en microscopie, peuvent **proposer une problématique biologique pour laquelle ils ont besoin d'imagerie**.

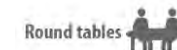
Il n'est pas nécessaire d'avoir un *a priori* sur les méthodes d'imagerie (acquisition, analyse et modélisation) à mettre en œuvre. Ce sont les personnes impliquées en imagerie (acquisition, analyse et modélisation) qui pourront reconnaître dans la problématique posée un intérêt ou un potentiel pour leur technique et proposer des expériences qui seront réalisées durant MiFoBio.

L'objectif est de tirer avantage de la conjonction en un même lieu d'un plateau technologique exceptionnel et de compétences de pointe dans les diverses disciplines, pour défricher de nouvelles problématiques et ouvrir la voie à des collaborations au-delà de l'école.



MODULES AVANCÉS / TABLES RONDES

Module Avancé ou Table Ronde- /-Numéro module associé ou Transversal-/-Numéro MA ou TR



Timeslot	Sat 06 Oct	Sun 07 Oct	Mon 08 Oct	Wed 10 Oct
14:00-16:00			MA135-Introduction to machine learning (Rousseau & Rasti) Tente	MA138-Formation des images en microscopie (Soulez & Faklaris) Salle de conf
16:30-18:15		MA136-Imagerie de phase et d'indice pour la biologie (Haerberle & Bon) Salle de conf		
21:30-00:00	MA137-Fluorescence correlation spectroscopy: from basic theory to applications (Wohland) Salle de conf			

Timeslot	Sat 06 Oct	Sun 07 Oct	Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct	Thu 11 Oct
14:00-16:00			TR150 Membranes et trafic membranaire (Danglot & Mallevial) Salle de conf		TR152-Mesure et analyse des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante : expérimentation et modélisation (Favard & Izeddin) Tente	TR145-Imagerie pour la mitochondrie : une vue d'ensemble. Comment la microscopie peut aider l'étude de la mitochondrie ? (Bertolin & Bidaux) Salle de conf TR151 FabLab (Rouviere) Tente
16:30-18:15		TR156-Nanoscopie : de la molécule à la cellule, marquage, quantification (Lévêque-fort & Moneron) Salle de conf			TR149-Systèmes de réservation et gestion plateforme (Geny & Hulin) Tente TR154-Ondes sur le vivant (avec GDR Ondes) , imagerie des milieux très diffusant (Brasselet) Salle de conf	TR144-Clearing and Labeling Techniques for Imaging: which method for which sample? (D'angelo & Godefroy) Salle de conf TR155-Microscopie haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale (Picart & Walter) Tente
21:30-00:00	TR148-bioprinting 3D (André & Detailleur) Tente	TR147-Organoides et imagerie défis et attentes (Recher & Furlan) Salle de conf		TR143-Nouveaux défis instrumentaux en mécanobiologie (Balland & Kurzawa) Salle de conf TR146-Imagerie corrélative fluorescence + (phase, indice, biréfringence etc) : perspectives et attentes des biologistes (Serge monneret & Bon) Tente	TR153-Nouveaux agents de contrastes, biosenseurs, sondes, nanovecteur, photophysique des fluorophores (Bourgeois) Salle de conf	

MODULES AVANCÉS

MA135-Introduction to machine learning

Proposer/Coanimator

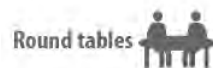
David Rousseau

Pejman Rasti

Abstract

The objectives are: Introduce the participants with the main concepts and methods of this extremely active field of artificial intelligence which is machine learning. Provide typical recent successful examples of machine learning applied to microscopy.

The advanced module includes introduction to supervised-unsupervised learning, regression-classification, cross-validation, overfitting... Also, main families of tools (K-means, SVM, Random Forest, Neural Networks) will be illustrated on images with Fiji plugin and other free softwares with large community of users inside the bioimaging community.



MA136-Imagerie de phase et d'indice pour la biologie

Proposer/Coanimator

Olivier Haerberle

Pierre Bon

Abstract

Les objectifs sont: Reprendre les bases de la formation d'images en microscopie de phase et microscopie holographique. Principe d'imagerie 3D. Extension à la microscopie de phase en fluorescence.

Partie 1 : Microscopie Tomographique Diffractive : Principe et applications sur des spécimens biologiques (présentation 45mn + discussions) : Olivier Haerberlé

Partie 2 : Microscopie de Phase et Microscopie de Fluorescence combinée (présentation 45mn + discussion) : Pierre Bon

MA137-Fluorescence correlation spectroscopy: from basic theory to applications

Proposer

Thorsten Wohland

Abstract

The objective is learning basic principles of FCS and the concepts behind signal fluctuations and correlations.

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is a widely used single-molecule sensitive technique to measure the dynamics of molecular processes. Any molecular process creates fluctuations in an observable parameter from which the dynamics and the nature of the process can be inferred. In FCS the observable parameter is the fluorescence signal from a small, typically femtoliter-sized, observation volume. Analysis of the fluorescence fluctuations from this volume allows determining the characteristics of molecular processes

ranging from molecular blinking events and photophysics, to chemical reactions, and especially molecular movement. In this tutorial we will discuss the basic principles of FCS and the concepts behind signal fluctuations and correlations [1]. After explaining the structure of the experimental data and its fitting we will investigate FCS limitations and how they can be solved by various FCS modalities. We will then concentrate on multi-wavelength approaches as used in Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (FCCS), an especially powerful tool to quantitatively measure molecular interactions [2]. Finally, we will introduce multiplexed approaches in which FCS curves can be recorded in whole images [3]. In all parts of the tutorial we will concentrate on the basics concepts behind the FCS modalities and emphasize biological applications.

[1] X. Shi and T. Wohland, *Nanoscopy*, Chapter 6: "Fluorescence Correlation Spectroscopy" (CRC Press, Taylor and Francis Group, 2010)

[2] Foo, Y.H.; Naredi-Rainer, N.; Lamb, D.C.; Ahmed, S.; Wohland, T. Factors Affecting the Quantification of Biomolecular Interactions by Fluorescence Cross -Correlation Spectroscopy, *Biophys J*, 102 (2012) 1174-1 183.

[3] Bag, N.; Wohland, T. Imaging Fluorescence Fluctuation Spectroscopy: New Tools for Quantitative Bioimaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 65 (2014) 225– 48

MA138-Formation des images en microscopie

Proposer/Coanimateur

Ferréol Soulez

Orestis Faklaris

Abstract

Le but de ce module avancé est de faire (re)découvrir aux participants une approche unifiée de la formation des images en microscopie. Il s'agit de montrer qu'à l'aide de quelques outils d'optique de Fourier il est possible de simuler des observations en optique cohérente comme en microscopie holographique mais aussi en d'expliquer et de simuler la PSF en microscopie de fluorescence. L'idée sert de faire sentir au participant ce qui se passe lorsqu'on observe et d'où viennent les forces et les limites de différentes modalités. A ce titre, cela ne s'adresse pas tant aux purs biologistes qu'aux personnes qui gravitent autour des microscopes: biologistes avertis, personnels de plateformes, traiteurs d'images et étudiants en thèse sur de nouveaux setup,...

Ce module avancé propose un point de vue global sur la formation des images en microscopie. Après une introduction la plus graphique possible de l'optique de Fourier, nous illustrerons le voyage de l'onde lumineuse au travers du microscope. Cette approche permet d'expliquer simplement la formation des images pour un grand nombre de modalités en microscopie. Dans un premier temps la microscopie en microscopie diffractive comme la microscopie holographie et microscopie sans lentille. Ces techniques d'imageries cohérentes permettent d'introduire la formation de la PSF. Dans un second temps il sera donc question des méthodes de fluorescence en partant de l'épifluorescence. En montrant que la PSF d'un microscope est le produit de la PSF d'illumination et de la PSF de détection, nous décrirons les façons d'améliorer la PSF (microscopie confocale, 2-photons, STED). D'un point de vue pratique, cet atelier sera un exposé illustré par des simulations via des plugins Icy qui permettront d'observer les effets des différentes techniques sur l'image observée.

TABLES RONDES

TR143-Nouveaux défis instrumentaux en mécanobiologie

Proposer/Coanimateur

Martial Balland

Laëtitia Kurzawa

Abstract

Table ronde permettant de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au module 3: Mécanobiologie .



TR144-Clearing and Labeling Techniques for Imaging: which method for which sample?

Proposer/Coanimateur

Romina D'angelo

David Godefroy

Abstract

Le but de cette table ronde est de répondre à plusieurs questions afin d'éclairer les participants dans leurs démarches : Comment rendre des échantillons transparents ? Quels sont les avantages et inconvénients des différents protocoles de « transparençation » ? Comment marquer et/ou conserver le marquage? Comment imager les échantillons « transparençés » ? Comment utiliser et gérer les images issues d'échantillons transparents ? Imager un organe et l'observer en 3 dimensions donne accès à de nouvelles informations et ouvre des perspectives d'analyses nouvelles dans le domaine de la recherche biologique. Pour accéder à ce type d'imagerie, la « transparençation » d'échantillons est une étape nécessaire qui a connu un développement important ces dernières années. De nombreux protocoles issues de différentes «familles de transparençation » sont décrits dans la littérature. La communauté scientifique est très intéressée par ces approches de « transparençation » mais elle est cependant perdue devant la multitude des techniques décrites depuis plus de 5 ans. Une utilisation croissante des méthodes de « transparençation » par de nombreuses équipes de recherches et une forte demande de trouver les protocoles adéquats pour les problématiques étudiées nous ont donné envie de proposer cette table ronde qui s'articulera autour de différents points : Discuter des protocoles de « transparençation » : choisir la bonne démarche pour répondre au mieux aux besoins. Adapter la démarche à l'échantillon étudié et au microscope photonique utilisé, les échantillons « transparençés » pouvant être imagés avec un large spectre de systèmes, du microscope confocal jusqu'à la super-résolution en passant par la microscopie à feuille de lumière. Les techniques de marquages, ou l'utilisation de protéines fluorescentes endogènes tel que la GFP, nécessitent des adaptations importantes lorsque la « transparençation » d'échantillon est envisagée. Le maintien des propriétés spectrales des fluorochromes utilisés est donc un sujet crucial pour exploiter les échantillons « transparençés ».

La variété des échantillons « transparisés » avec leurs spécificités est un point de discussion aussi très important : Quel type d'échantillon est «transparisable»? Dans le domaine de la biologie animal ou végétal, de l'organe à l'animal entier, comment utiliser le bon protocole ? . Comment exploiter les images tridimensionnelles ? Quels sont les systèmes informatiques et les logiciels adaptés pour ce type d'image. Comment envisager et gérer le stockage des données volumineuses ?

Keywords

Clearing/Transparisation/Labeling/Plant and Animal tissues/Organs

TR145-Imagerie pour la mitochondrie : une vue d'ensemble. Comment la microscopie peut aider l'étude de la mitochondrie ?

Proposer/Coanimateur

Giulia Bertolin

Gabriel Bidaux

Abstract

Le but de la table ronde est de résumer les méthodes pour aborder l'analyse de la physiologie mitochondriale et de faire un focus sur les développements en microscopies vont aider à lever les verrous technologiques de l'étude des mitochondries.

Tous les porteurs d'ateliers du parcours "Mitochondrie" participeront à la table ronde en tant que co-animateurs pour initier la discussion. Tout d'abord, on fera un petit récapitulatif des fonctions mitochondriales analysables avec la microscopie de fluorescence à l'état actuel. On discutera tout particulièrement sur les aspects améliorables et/ou qui nécessitent d'une aide ultérieure par les approches de microscopie. Ensuite, on ouvrira la discussion sur les fonctions mitochondriales/aspects de la mitochondrie toujours pas analysables : comment la microscopie pourra aider dans un avenir immédiat ? et à moyen terme ? A tout moment, la discussion sera ouverte à la communauté des participants qui pourront apporter leur expertise et leurs questions.

TR146-Imagerie corrélative fluorescence + (phase, indice, biréfringence etc) : perspectives et attentes des biologistes

Proposer/Coanimateur

Serge Serge monneret

Pierre Bon

Abstract

Quelles sont les évolution attendues dans le domaine de la corrélation de la fluorescence et des modalités de mesures de phases ou d'indice (du point de vue instrumentation et imagerie) et quels sont les attendus des biologistes par rapport à cette nouvelle modalité d'imagerie?

TR147-Organoides et imagerie défis et attentes

Proposer/Coanimateur

Gaëlle Recher

Alessandro Furlan

Abstract

Le but de la table ronde est de discuter la plupart des étapes du workflow nécessaire à l'imagerie des échantillons multicellulaires en 3D

Les méthodes qui seront discutées sont liées :

- 1/ à l'obtention des échantillons (méthodes de préparation de cultures 3D ou des tissus notamment),
- 2/ aux marquages en profondeur (endogènes ou exogènes),
- 3/ au montage et à l'immobilisation des échantillons (pour le live ou le fixé),
- 4/ aux questions liées à la diffusion de la lumière (microscopie multiphotonique ou à feuillet de lumière, et la transparençation pour les échantillons fixés par exemple),
- 5/ à l'obtention de paramètres mesurables et quantifiables (les readouts) et
- 6/ aux approches d'analyses de jeux de données multidimensionnels complexes

TR148-bioprinting 3D

Proposer/Coanimateur

Jean Claude André

Brice Detailleur

Abstract

Le but de cette table ronde est de présenter l'impression 3D du vivant et son approche interdisciplinaire.

Issu des technologies de fabrication additive, inatteignable il y a quelques années, le bio-printing ouvre de nouvelles possibilités d'intervention dans le monde vivant et d'imagination de possibles futurs. Il appartient à la bio-ingénierie, qui intègre les sciences physiques, chimiques, mathématiques, ainsi que les principes d'ingénieries/technologies. Il permet en principe d'étudier la biologie, la médecine, les comportements cellulaires et la santé. Il envisage à terme la fabrication d'organes vivants issus de nos propres cellules.

La matière vivante peut-être ordonnée, ce qui signifie que sa forme peut être, au moins en première approximation, décrite géométriquement. En concevant des éléments de formes par fabrication additive (incluant matière inerte et matière vivante), il est possible de penser qu'on arrivera à réparer ou fabriquer des organes en introduisant, là où il faut et quand il faut, des cellules vivantes qui sauront se développer pour une fin donnée. Dans ce contexte, le bio-printing se situerait entre la fabrication additive « classique » et la biologie, voire les sciences de la vie « naturelle ».

Mais les lois de croissances biologiques sont associées à des phénomènes dynamiques non linéaires. L'appropriation du domaine de la bio-impression nécessite une approche transversale (impliquant toutes les disciplines concernées) pour faire avancer le sujet.

En proposant une démarche intégrée/interdisciplinaire, la table ronde devrait avoir pour rôle d'impulser une réflexion critique sur les idées directrices, les intentions fondatrices, les concepts directeurs, les présupposés méthodologiques, paradigmatiques, épistémologiques, éthiques de chaque discipline. Mais en même temps, elle vise à accepter de se cantonner humblement dans une tâche de clarification qui ne saurait prétendre à une solution ultime ou à une vérité première.

TR149-Systemes de réservation et gestion plateforme

Proposer/Coanimateur

David Geny

Philippe Hulin

Abstract

La table ronde s'adresse principalement aux ingénieurs de plateformes technologiques. Il est souvent difficile de vérifier si un utilisateur a bel et bien réservé le système qu'il utilise. C'est surtout vrai pour les plateformes ayant une grande diversité de systèmes. De cette correcte quantification découle la facturation des heures d'utilisation et donc la durabilité de la plateforme technologique.

Le but de cette table ronde est de discuter autour de la thématique afin de pouvoir réaliser un cahier des charge du système "idéal". L'objectif est également de partager l'expérience des participants sur le développement, l'installation ou l'utilisation de solutions (home made ou software) permettant de répondre à ces problématiques.

Quels sont les systèmes de gestion existants? quels sont leurs avantages/inconvénients respectifs? De quoi devrait être composé un système de gestion "idéal"? Quid de l'utilisation "sauvage" (sans réservation préalable) des systèmes d'une plateforme - comment en contrôler l'utilisation?

TR150 Membranes et trafic membranaire

Proposer/Coanimateur

Lydia Danglot

Céline Mallevall

Abstract

Le but de la table ronde est de faire un bilan intermédiaire du parcours Membrane cellulaire et trafic membranaire.

Nous essaierons dans la mesure du possible de faire un premier bilan des 19 ateliers du parcours membrane lors de cette table ronde.

- Exposer les contraintes techniques et difficultés rencontrées lors de l'analyse de la membrane plasmique, et du trafic membranaire (exocytose, endocytose).
- Exposer les différentes techniques utilisables et la faisabilité de leur mise en œuvre.
- Ouvrir des perspectives sur les nouveaux outils développés et à développer dans le domaine de la plasmique : quelles sondes et quelles techniques sont elles les plus adaptées pour quelle question ?

- Permettre à des communautés d'échanger des protocoles et des stratégies (nouvelles sondes, préparation d'échantillon, nouvelles méthodes pour suivre rapidement les déformations).

Keywords

Parcours Membrane

TR151 FabLab

Proposer

Christian Rouviere

Abstract

Cette table ronde a pour but de faire le bilan du Fablab de Mifobio et d'échanger sur les expériences et difficultés rencontrées des participants.

Cette année nous innovons avec un espace 'fablab'. Son objectif sera tout d'abord d'apprendre à réaliser par soi même un dispositif simple pouvant inclure des aspects électroniques optomécaniques, informatique...). Dans le principe, ces dispositifs peuvent être :

soit réalisés en suivant des fiches techniques mises au point par l'équipe fablab
soit par accompagnement sur un petit projet personnel.

Le déroulement sera en accès libre afin que les apprenants, viennent à leur convenance, travailler dans un espace dédié ou se trouve des équipements : fer à souder, ordi, une imprimante 3D etc.

D'autre part, il y aura chaque jour, un petit cours (20' à 30' maximum) sur un sujet (programmation, mise en œuvre d'un micro contrôleur, d'un afficheur tactile, d'un montage optique...

Les cours seront dispensés tous les jours à partir du 6 octobre à 13:15 dans l'espace dédié. Ces cours seront suivis d'une heure de réalisation avec assistance puis une autre heure en libre afin de terminer ou entamer une autre fiche de réalisation technique.

Dans ce cadre là, si vous envisagez de réaliser un petit projet, nous aimerions recevoir en amont, un résumé de celui ci. Nous vous aiderons à le réaliser et autant que possible, vous le ramènerez avec vous.

Un challenge vous sera proposé le temps de l'école thématique.

TR156-Nanoscopie : de la molécule à la cellule, marquage, quantification

Proposer/Coanimateur

Sandrine Lévêque-fort

Gael Moneron

Abstract

Table ronde permettant de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au module 2: Nanoscopie

TR152-Mesure et analyse des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante :
expérimentation et modélisation

Proposer/Coanimator

Cyril Favard

Ignacio Izeddin

Abstract

Table ronde permettant de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au
module 4: Mesure et analyse des dynamiques et interactions moléculaires en cellule
vivante : expérimentation et modélisation

TR153-Nouveaux agents de contrastes, biosenseurs, sondes, nanovecteur, photophysique
des fluorophores

Proposer

Dominique Bourgeois

Abstract

Table ronde permettant de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au
module 5: Nouveaux agents de contrastes, biosenseurs, sondes, nanovecteur,
photophysique des fluorophores

TR154-Ondes sur le vivant (avec GDR Ondes) , imagerie des milieux très diffusant

Proposer

Sophie Brasselet

Abstract

Table ronde permettant de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au
Module 6: Ondes sur le vivant(avec GDR Ondes) , imagerie des milieux très diffusants

TR155-Microscopie haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale

Proposer/Coanimator

Catherine Picart

Thomas Walter

Abstract

Table ronde permettant de réaliser un bilan intermédiaire des cours et ateliers rattachés au
Module 7: Microscopie haut contenu : HCS, automatisation, microscopie multimodale

PARCOURS THEMATIQUES

Round tables



Lectures



Workshops

Nouveauté 2018, les parcours thématiques ont pour objectif de rassembler des ateliers, tables-rondes et séminaires sur des thèmes sélectionnés par l'organisation sur la base des propositions d'ateliers reçues au cours de l'année.

Pour MIFOBIO 2018, nous avons donc sélectionné 3 parcours :

- Imagerie pour la mitochondrie
- Membrane cellulaire
- Systèmes multicellulaires

Vous trouverez dans les pages suivantes, le synopsis des parcours ainsi que les ateliers, tables-rondes et séminaires associés.

N'hésitez pas à nous donner vos retours à la fin de MIFOBIO de sorte à évaluer la pertinence de ces parcours ainsi que d'éventuelles idées d'amélioration.

Parcours thématique : *Imagerie pour la mitochondrie*

Résumé

Aujourd'hui, la communauté des experts en mitochondrie utilise principalement des approches biochimiques à grand échelle pour étudier la réponse mitochondriale, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. La production d'énergie, la morphologie mitochondriale, la structure des organites et l'élimination des mitochondries défectueuses sont peu étudiées avec des méthodes d'imagerie. Ceci est lié à deux problématiques : (i) le manque d'outils suffisamment sensibles pour détecter la réponse mitochondriale en cellules uniques et (ii) le manque de méthodes d'analyse d'image adaptés à ces organites très dynamiques et qui permettent l'analyse du réseau mitochondrial *in vivo*.

Nous proposons un parcours thématique focalisé sur l'analyse des différents aspects de la physiologie mitochondriale par des méthodes d'imagerie. Ce parcours propose d'analyser de la structure mitochondriale par microscopie à super-résolution, d'aborder l'étude de la dynamique mitochondriale *in vivo*, d'explorer la dégradation mitochondriale par microscopie en temps réel et la production d'ATP par FRET (biosenseurs). En conclusion du parcours, une discussion autour d'une table ronde avec les animateurs d'atelier et les participants nous aidera en lumière les verrous à lever dans le domaine à moyen terme.

Objectifs pédagogiques du parcours

- Montrer les avantages et les inconvénients de l'analyse de la mitochondrie par imagerie
- Montrer la faisabilité de la mise en œuvre des techniques d'imagerie pour la mitochondrie
- Ouvrir des perspectives sur les nouveaux outils développés et à développer dans le domaine de la mitochondrie : quel outil pour quelle question ?
- Ouvrir la discussion : comment passer de l'analyse qualitative à l'analyse quantitative des résultats ?

Fiche signalétique

Modules rattachés :

- Module 1 – Imagerie multicellulaire : embryon, organoïdes et tissus
- Module 4 – Analyse et modélisation des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante
- Module 5 – Nouveaux agents de contraste, biosenseurs, sondes, nano-vecteurs, photophysique des fluorophores

Séminaires : Marta Giacomello (Luca Scorrano Lab), Université de Padoue

Ateliers rattachés

Sous thématique 1 : analyse de la structure mitochondriale par super résolution

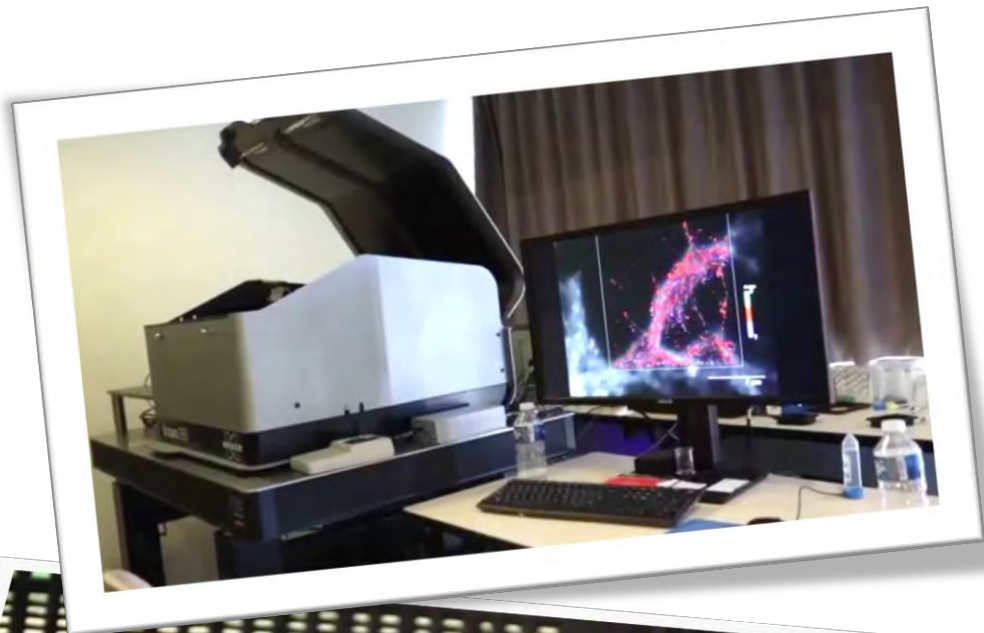
- A36- dSTORM, un nouvel outil pour l'étude de la co-localisation à la mitochondrie/ porteur : Béatrice Durel
- A11-Organization of mitochondrial nucleoids mtDNA by super resolution dSTORM/ porteur : Arnaud Chévrollier
- A53-3D high and super-resolution imaging of biological samples using a single-objective Selective Plane Illumination Microscope. porteur : Remi Galland & Corey Butler

Sous thématique 2 : étude de l'élimination des mitochondries défectueuses

- A123-Spotlight on mitochondria: how it explodes and how it is digested. porteur : Gabriel Ichim
- A87-Exploration des nouvelles techniques d'amélioration de résolution compatible à une imagerie de cellules vivantes. Ex sur le processus d'autophagie. porteurs : Elisabeth Werkmeister & Sophie Salomé

Sous thématique 3 : étude des fonctionnalités mitochondriales par biosenseurs FRET

- A51-Mitochondrial Ca^{2+} and ATP FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM during hypoxia-reoxygenation.
porteurs: Yves Goriou & Gabriel Bidaux
- A25-Mitochondrial dyes and FRET biosensors to determine the mitochondrial energy potential: a complementary approach/ porteur: Giulia Bertolin
- A60-Analysis of mitochondrial connectivity in vivo in the drosophila nervous system_ porteur : Xavier Pinson & Thomas Rival
- A15-Super-resolution radial fluctuations (SRRF) : what are the pro and the cons of this analytical open-source super resolution method?/ porteurs : Audrey Salles & Aurélien Dauphin



Parcours thématique : *Membrane cellulaire et trafic membranaire***Résumé**

Les organismes uni ou pluricellulaires sont délimités par une membrane lipidique fluide et dotée d'une grande capacité de déformation et de morphogenèse. Composée à la fois de lipides et de protéines, la membrane plasmique suscite de nombreuses questions biologiques différentes (diffusion des lipides et microdomaines membranaire, agrégation des récepteurs, ciblage des molécules d'adhésion aux sites de contact cellulaires, formation des protrusions membranaires, déformation membranaire et interaction avec le cytosquelette sous-jacent, internalisation de molécules ou de parasite, exocytose de neurotransmetteur, polarisation de la cellule...).

Les cellules pouvant changer de forme très rapidement dans le temps et dans l'espace, l'imagerie de la membrane plasmique impose ainsi de nombreuses contraintes techniques. Nous proposons un parcours thématique focalisé sur l'imagerie de la membrane cellulaire dans tous ces états. Les 7 séminaires ainsi que les 19 ateliers pratiques sélectionnés vous permettront d'appréhender les différentes techniques utilisables pour aborder certaines questions. Nous aborderons ainsi :

1. Les méthodes permettant d'étudier la **morphologie cellulaire** que ce soit sur tissus vivants ou fixés, en AFM ou en super-résolution.
2. Les méthodes permettant d'imager rapidement et en 3D les déformations lors du **trafic membranaire** (internalisation de parasites ou de molécules, sécrétion, exocytose).
3. les méthodes permettant d'imager la **diffusion des lipides ou des protéines** à la membrane plasmique et notamment les nouvelles sondes fluorescentes disponibles ainsi que les techniques de photoactivation.
4. Les méthodes permettant d'imager **les cellules au sein d'un organe ou de l'organisme** (connexion synaptique entre deux cellules en super-resolution, réseaux neuronaux au sein du cerveau après transparasitisation et light sheet microscopy, microscopie 2 photons pour suivre la dynamique des neurones in vivo,...).
5. Les méthodes permettant d'imager la **signalisation à la membrane plasmique**.

En conclusion du parcours, une discussion autour d'une TABLE RONDE (le lundi à 14h) avec les animateurs d'atelier et les participants nous aidera en lumière les verrous à lever dans le domaine à moyen terme.

Objectifs pédagogiques du parcours

- Exposer les contraintes techniques et difficultés rencontrées lors de l'analyse de la membrane plasmique, et du trafic membranaire (exocytose, endocytose).
- Exposer les différentes techniques utilisables et la faisabilité de leur mise en œuvre.
- Ouvrir des perspectives sur les nouveaux outils développés et à développer dans le domaine de la plasmique : quelles sondes et quelles techniques sont elles les plus adaptées pour quelle question ?
- Permettre à des communautés d'échanger des protocoles et des stratégies (nouvelles sondes, préparation d'échantillon, nouvelles méthodes pour suivre rapidement les déformations).

Fiche signalétique

Modules rattachés :

- Module 1 – Imagerie multicellulaire : embryon, organoïdes et tissus

Nicolas RENIER, ICM, Paris, France – A framework for the study of molecular patterns, axonal projections and neuronal activity in intact adult brains using light sheet microscopy.

- Module 4 – Analyse et modélisation des dynamiques et interactions moléculaires en cellule vivante **Diego KRAPF**, Colorado State Univ., USA – First passage times, ergodicity and ageing for single-particle tracking in biological membranes.

Erdinc SEZGIN, Radcliffe Medical Institute, Oxford Univ., Grande-Bretagne – Elucidating the nanoscale architecture of the plasma membrane with super-resolution spectroscopy.

Maria GARCIA-PARAJO, ICFO, Barcelona, Espagne – Linking nano- and meso-scale compartmentalization of the plasma membrane using high density single particle tracking tools.

- Module 5 – Nouveaux agents de contraste, biosenseurs, sondes, nano-vecteurs, photophysique des fluorophores

Mayeul COLLOT, université de Strasbourg, Strasbourg, France – Insight in Fluorescent Lipid Probes, from plasma membrane to lipid droplets.

Séminaires :

- **Chris XU**, Cornell Univ., USA – *In vivo* Multiphoton Microscopy of the Mouse Brain
- **Lydia DANGLLOT**, CPN, Paris, France – Statistical colocalisation analysis from conventional to super resolution microscopy : tips and trick for molecular mapping

Ateliers rattachés :

1. Les méthodes permettant d'étudier la morphologie cellulaire que ce soit sur tissus vivants ou fixés, en AFM ou en super-résolution.

- A54-AFM on microbial surfaces : from imaging to physico-chemical properties, Proposer/Coanimator : Audrey Audrey beaussart, Isabelle Isabellebihannic
- A33-Imagerie STORM de spores en germination de la bactérie *B. subtilis* : préparation des échantillons, acquisition des données et reconstruction des images. Proposer : Pascale Winckler
- A97-Imagerie super-résolution et en 3D de la surface apicale des cellules polarisées, Proposer : Anne Cantereau

- A2-Organisation des podosomes par nanoscopie de fluorescence basée sur la collection de l'émission super-critique., Proposer/Coanimateur : Renaud Poincloux, Natacha Natacha escallier
 - A76-Multiple protein photopatterning and associated cellular traction forces determination on soft polyacrylamide gels, Proposer : Laëticia Kurzawa
 - A129-Probing mechanical properties of living cell cytoskeleton in Peak Force QNM
 - Proposer : Simone Bovio
2. Les méthodes permettant d'imager rapidement et en 3D les déformations lors du trafic membranaire (internalisation de parasites ou de molécules, sécrétion, exocytose).
- A40-Quantification of vesicular release by TIRF microscopy, Proposer/Coanimateur : Olivier Pascual, Céline Malleval
 - A55-3D tomography imaging by holotomography, Proposer/Coanimateur : Isabelle Bihannic, Audrey Beaussart
 - A124-Tracing the internalization of bacteria into host cells using multidimensional high-content imaging, Proposer : Laurent Audry
 - A3-TANGO : un plugin ImageJ pour l'analyse d'image 3D à haut-débit., Proposer/Coanimateur : François Loll, Christophe Escudé
3. les méthodes permettant d'imager la diffusion des lipides ou des protéines à la membrane plasmique et notamment les nouvelles sondes fluorescentes disponibles ainsi que les techniques de photoactivation.
- A52-Contrôle optogénétique de voies de signalisation et de la morphologie cellulaire., Proposer/Coanimateur : Damien Ramel, Anne Mazars
 - A118-SPIM-FCS to probe Cadherin1 dynamics along the cell lineage in zebrafish early embryogenesis, Proposer/Coanimateur : Svetlana Jovanic, Nadine Peyrieras
 - A28-Efficient plasma membrane staining using MemBright probes : from live dynamics to super-resolution, Proposer/Coanimateur : Lydia Danglot, Mayeul Collot
 - A38-Mesure de la dynamique de protéines membranaires par photo-conversion et FRAP : Avantages et limites., Proposer/Coanimateur : Chloé Guedj, Xavier Baudin
4. Les méthodes permettant d'imager les cellules au sein d'un organe ou de l'organisme (connexion synaptique entre deux cellules en super-resolution, réseaux neuronaux au sein du cerveau après transparaissance et light sheet microscopy, microscopie 2 photons pour suivre la dynamique des neurones in vivo,...).
- **A99**-The zebrafish as a model to study dynamics of single membrane proteins, Proposer/Coanimateur : Radoslaw jakub Gora, Salomé Muñoz sánchez

- **A27**-A practical guide to super-resolution techniques for imaging cellular structures within thin and thick biological samples, Proposer/Coanimator : Philippe Bun, David Geny
 - **A100**-Quantifying synaptic plasticity in primary neurons using microfluidic culture devices and a custom image analysis workflow, Proposer/Coanimator : Nicolas Malmanche, Devrim Kilinc
5. Les méthodes permettant d'imager la signalisation à la membrane plasmique.
- A89-Scanning FCS workshop., Proposer/Coanimator : Jakub Chojnacki, Cyril Favard
6. photochimique / Membrane et récepteurs, signalisation
- A52-Contrôle optogénétique de voies de signalisation et de la morphologie cellulaire., Proposer/Coanimator : Damien Ramel, Anne Mazars



Parcours thématique : *Systèmes 3D multicellulaires***Résumé**

Par essence, certaines communautés de la biologie sont confrontées depuis longtemps aux problématiques de l'imagerie de tissus épais (embryons en biologie du développement, tranches de cerveau en neurobiologie, ou explants pour l'étude d'autres organes). Cependant la biologie cellulaire a aussi fait sa révolution copernicienne et les modèles classiques de culture en deux dimensions ont montré certaines limites en terme de physiologie.

Les modèles de cultures cellulaire en trois-dimensions ont fait une apparition très remarquée, que ce soit pour la modélisation des tumeurs cancéreuses (sphéroïdes tumoraux multicellulaires), que pour la modélisation d'organes (organoïdes à partir de cellules souches).

Toutes ces communautés, de par la nature de leurs échantillons, sont confrontées à des problématiques similaires et ce parcours thématique a pour vocation de favoriser les échanges de savoirs et savoir-faires spécifiques.

Parmi les grands axes développés, nous évoquerons les problématiques liées : 1/ à l'obtention des échantillons (méthodes de préparation de cultures 3D ou des tissus notamment), 2/ aux marquages en profondeur (endogènes ou exogènes), 3/ au montage et à l'immobilisation des échantillons (pour le live ou le fixé), 4/ aux questions liées à la diffusion de la lumière (microscopie multiphotonique ou à feuillet de lumière, et la transparisation pour les échantillons fixés par exemple), 5/ à l'obtention de paramètres mesurables et quantifiables (les readouts) et 6/ aux approches d'analyses de jeux de données multidimensionnels complexes.

En résumé ce parcours permet de couvrir la plupart des étapes du workflow nécessaire à l'imagerie des échantillons multicellulaires en 3D.

La diversité des approches nous permettra aussi de prolonger les échanges à l'occasion d'une table ronde axée sur les différents modes d'obtention d'échantillons 3D (bio-impression, encapsulations, cultures en gouttes...) et peut être d'un module avancé où seront abordées les questions plus spécifiques d'imagerie, de la complexité d'imager des objets épais et diffusants.

Objectifs pédagogiques du parcours

- présenter les contraintes communes aux systèmes 3D multicellulaires qui conditionnent la mise en œuvre de stratégies adaptées pour l'imagerie propre aux systèmes épais
- permettre à des communautés d'échanger des protocoles et des stratégies (montage, marquage...)
- la biologie en 3D : nouveaux modèles pour de nouvelles questions (interactions cellulaires dans des environnements complexes, rôle des matrices extracellulaires,

mécaniques cellulaires et tissulaires) et leur gain en terme de fonctionnalité physiologique

- et après ? état des lieux des difficultés pour l'instant irrésolues, inventaire des besoins de développements méthodologiques, apprendre à s'aider des 'fablab', 'open-community' et autres 'DIY' (utilité de développer ses propres outils par microfabrication)
- enfin prolonger des initiatives déjà initiées pour organiser sur le long terme la communauté de la 3D de manière plus pérenne et organiser d'autres échanges et rencontres

Fiche signalétique

Modules rattachés :

- Module 1 : Imagerie multicellulaire : Embryon, organoïdes et tissus (modérateurs Cathie Ventalon, Gabriel Bidaux)
- Module 3 : Mécanobiologie (modérateurs : Laetita Kurzawa, Martial Balland)
- Module 6 : Milieux très diffusants (modératrice : Sophie Brasselet)

Séminaires :

Module 1 G Recher

Ateliers rattachés

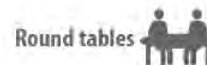
- A43 "Home made Adaptive confocal microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy in thick samples" (Antoine Delon et Alexei Grichine)
- A37 " Lung organoids as an original model to explore cell migration during inflammation" (Antonio Peixoto et Nino Iakobachvilli)
- A7 "De la préparation aux traitements des données en passant par l'acquisition en Light sheet fluorescence microscopy» (David Rousseau et Charlotte Rivière)
- A41 "Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules" (Gaëlle Recher et Amaël Mombereau)
- A48 "La microscopie à feuillet de lumière pour l'étude en profondeur des organoïdes : limites et optimisation" (Nicolas Goudin et Corinne Lebreton)
- A32 "Two-photon functional Imaging of murine and human intestinal Organoids" (Sophie Allart et Danièle Daviaud)
- A67 "La culture cellulaire en 3D : sphéroïdes, gels... pour une meilleure compréhension de la physiologie des cellules" (Alessandro Furlan)



BAR A IMAGES



Porteurs: Perrine Paul-Gilloteaux, Daniel Sage, Fabrice Cordelières



- Avez-vous des questions ou besoins en analyse d'images ?
- Avez-vous ou envisagez-vous d'acquérir une quantité importante d'images dans le but de les analyser quantitativement ?
- Souhaitez-vous découvrir ou approfondir l'utilisation d'un logiciel avec leurs auteurs dans un format encore plus interactif que les ateliers ?
- Souhaiteriez-vous un (ou plusieurs) avis d'experts avant de vous lancer ?

Le bar à images est fait pour vous !

Pour MiFoBio 2018, le bar à images évolue. Plusieurs créneaux ont été réservés durant la semaine, et vous proposent un format type "portes ouvertes" : en vous y inscrivant, vous avez la possibilité de discuter avec un groupe d'"experts", chacun spécialisé dans leur domaine, sur tout ce qui traite de l'utilisation des logiciels et algorithmes de visualisation et d'analyse d'images. Ces discussions se feront soit en tête à tête, soit en petits groupes, en fonction des besoins des participants et des compétences des animateurs présents à chaque créneau. Vous pouvez également apporter vos propres images, et vous aurez l'occasion de présenter votre problème (ou vos solutions!) d'analyse.

Vous y retrouverez également certains des ateliers d'analyse d'image, pour un échange plus approfondi ou une discussion sur leur utilisation pour vos propres thématiques!

Un document partagé et accessible à tous les participants d'un bar à image permettra d'échanger sur les problèmes rencontrés et les solutions proposées, et de proposer des solutions même en dehors du temps imparti au bar à images!

- *Do you have questions or needs in image analysis?*
- *Have you or do you intend to acquire a large number of images in order to analyze them quantitatively?*
- *Would you like to discover or deepen the use of software with their developers in an even more interactive format than workshops?*
- *Would you like one (or more) expert advice before you start?*

The "BAR à Image" is for you!

For MiFoBio 2018, the "BAR à Image" has slightly evolved. Several slots have been reserved during the week, and offer you a discussion forum: by registering, you have the opportunity to discuss with a group of experts, each specialized in their field, on everything that deals with the use of software and workflows for viewing and analyzing images. These discussions will be either face-to-face or in small groups, depending on the needs of the participants and the skills of the experts present in each slot. You can also bring your own images, and you will have the opportunity to present your problem

*(or your solutions!) Analysis. You will also find here some of the image analysis workshops, for a more in-depth exchange or a discussion on their use for your own themes!
A document shared and accessible to all the participants will allow to exchange on the problems encountered and the proposed solutions, and to propose solutions even outside the time allocated to the "Bar à Image"!*



CHALLENGE HCS



Coordination : Virginie Georget (virginie.georget@mri.cnrs.fr)

Atelier dans le hall

Vous rêvez de ne pas faire vos statistiques sur 10 cellules ou embryons mais des 10aines de milliers de cellules ou centaines d'embryons, sphéroïdes.....

Vous rêvez d'imager des cellules rares sans passer des heures à les chercher !

Vous rêvez de tester des drogues en dose réponse sur votre réponse cellulaire favorite avec une analyse d'images intégrée ou à la volée

Vous rêvez d'automatiser vos manip de FRAP dans n cellules.....

Vous rêvez de définir quelle drogue ou siRNA ralentit la motilité de vos cellules....

.....imaginez bien d'autres types d'expériences !

Aujourd'hui, différentes solutions commerciales existent en microscopie champ plein ou confocale. Il n'est pas interdit de penser que ce choix peut s'élargir à des technologies plus complexes.

Des solutions d'automatisation en microscopie existent et seront accessibles à MifoBio grâce à nos partenaires industriels ! Nous disposerons de plusieurs systèmes HCS. Les acquisitions pourront être faites durant MifoBio et nous organiserons des séances de travail sur l'analyse de ces données lors d'ateliers.

En parallèle des ateliers, nous vous proposons de venir faire vos expériences pendant MifoBio ! Nous organisons vos manips sur les machines les plus adaptées à vos besoins !

Si votre projet nécessite des cellules vivantes, nous pouvons envisager leur préparation sur site. Le plus simple est de pouvoir préparer en amont vos échantillons fixés. Soit vous êtes en capacité de le faire et vous venez avec, soit nous pouvons vous aider à Montpellier à préparer vos échantillons et nous vous les amenons.

You dream not to do your statistics on 10 cells or embryos but 10 tens of thousands of cells or hundreds of embryos, spheroids

You dream of imaging rare cells without spending hours looking for them

You dream of testing dose-response drugs on your favorite cellular response with integrated or on-the-fly image analysis

You dream of automating your FRAP experiments in n cells

You dream to define which drug or siRNA slows down the motility of your cells

..... Imagine many other applications!

Today, different commercial solutions exist in wide-field or confocal microscopy. It is not forbidden to think that automation can be extended to more complex technologies tomorrow.

Microscopy automation solutions exist and will be available at Mifobio thanks to our industrial partners! We will have several HCS systems. Acquisitions can be made during Mifobio and we will organize workshops on the analysis of these data.

***In parallel of the workshops, we suggest you to come and do your experiments during Mifobio!
We organize your experiments on the machines the most adapted to your needs!***

If your project requires live cells, we can consider their preparation on Mifobio site. The simplest is to prepare your fixed samples beforehand. Either you are able to do it and you come with it, or we can help you in Montpellier to prepare your samples and we bring them to you.

Projets:

-projet 1: Laura Clauzier/Catherine Picard: Le labo fabrique des films biomimétiques à caractéristiques variables en fonction de leur composition. Les cellules cultivées dessus vont réagir différemment en fonction de ce support variable. Les porteurs de projet veulent pouvoir caractériser la réaction de leurs cellules en fonction du support, et ce de manière statistique sur des critères de taille, de morphologie (marquage actine) et de la localisation d'une de leur protéine d'intérêt qui est cytoplasmique ou nucléaire en fonction de son état d'activation (ratio cyto/noyau). Le film biomimétique préparé au fond des puits en verre est transparent. Plusieurs conditions de films biomimétiques seront comparées.

-projet 2: Anne Cantereau: L'équipe cultive des cellules sur des filtres (transwell), les cellules poussent en multi-couches et la couche superficielle se différencie et se polarise. Anne fait un double marquage par deux anticorps primaires différents contre la même protéine qui sera à la membrane apicale des cellules différenciées. Toutes les cellules ne sont pas marquées et le marquage est très hétérogène sur le filtre. Anne veut connaître le % de cellules positives Ac 1 et % de cellules positives Ac 2 et les deux. Il faudra scanner l'ensemble du filtre.

-projet 3: Mayeul Collot: Le labo développe des marqueurs fluorescents. Ils ont développé une sonde qui est fluorescente uniquement lorsqu'elle se lie aux récepteurs à l'acide folique (marquage membranaire). Toutes les cellules HeLa ne sont pas marquées, il y a une réponse hétérogène. Il aimerait connaître le % de cellules positives (environ 1-5% des cellules). Ce test se fait sur cellules vivantes. Il combinera ce marquage avec leur marquage membranaire MemBright et suivra l'endocytose du récepteur à acide folique.

-projet 4: Alexandre Bokhobza: Le labo dispose de lignée sauvages ou simple KO, ou double KO de deux protéines d'intérêt. L'effet du KO sera évalué 1) sur la motilité des cellules par tracking de cellules individuelles soit en lumière transmise si cela fonctionne, soit avec un marqueur cellulaire vital en fluo et 2) sur la morphologie des cellules sur échantillon fixé. Il souhaite également transfecter ces deux protéines d'intérêt taggées GFP et Cherry dans les lignées KO pour connaître leur co-localisation dans des sous-régions membranaires. Les différentes conditions seront préparées en plaque 96 puits.

-projet 5: Manon Boul: Le labo fabrique des chambres microfluidiques en série (une vingtaine) pour reproduire la micro-architecture du foie. Les cellulesensemencées dans ces chambres ont tendance à pousser en îlot 3D et se retrouvent dans un environnement contrôlé par des microcanaux. Ils aimeraient voir l'impact de la série sur les cellules dans les 20 chambres en terme de nombre, de forme, de différenciation grâce à un marqueur

cytoplasmique ou nucléaire selon de degré de différenciation et en terme de production d'albumine par un marquage cytoplasmique.

-projet 6: Virginie Georget: Le labo aimerait détecter des spots EdU dans des cellules mitotiques. Il faut identifier parmi les cellules mitotiques (1-5% des cellules) les cellules Edu+ (1-5% des cellules). Ils aimeraient connaître le % de cellules doublement positives (mitotique et Edu+), puis pouvoir compter le nombre de spots Edu dans au moins 100 cellules doublement positives. C'est la rareté de l'évènement qui est challenging. Il faudra passer par un pré-scan, sinon il faudrait imager 1 million de cellules.

Ces projets seront testés sur les 4 systèmes disponibles :

GE Healthcare: In Cell 6500

Proteigene: CQ1 Confocal Quantitative Imager Yokogawa

Zeiss: Cell Discoverer 7

Nikon: LIPSI High Content Live Cell Imaging.

Les informations concernant les rendez-vous acquisition et analyse pour chaque projet seront affichées dans le hall près des setups HCS

The information regarding the acquisition and analysis meetings for each project will be posted in the hall, near the HCS setups.

Contact: virginie.georget@mri.cnrs.fr





FABLAB



Coordination : Christian Rouvière (rouviere@obs-vlfr.fr)

Un espace "Fablab" vous est proposé cette année. Il s'agit d'un espace d'apprentissage et de réalisation de petit montage optique et électronique. Des ateliers pratiques encadrés ou libre (fiche TP) vous sont proposés, ainsi que des cours (voir planning). Le principe est que vous puissiez vous y rendre à tous moments hors des plages horaires occupées par des ateliers, et de pouvoir utiliser les outils mis à votre disposition (4 ordinateurs + soft, une imprimante 3D, des composants, fer à souder, petit outillage, table optique, matériel optique et de diagnostic (thorsLab),...)

Des fiches préparées pour vous aider dans différents montages vous seront proposées, mais vous pouvez aussi profiter de cet espace pour développer un projet personnel et si besoin nous consulter, prendre un rdv et discuter avec les différents spécialistes.

Nous vous proposons des petits cours pratiques de 20 min. Ces cours ont pour objectif de traiter en un temps court et de la manière la plus concrète possible un point technique ou pratique. Ils sont des introductions aux ateliers FabLab que nous suivons et à l'utilisation libre des fiches FabLab. Ils peuvent être suivis librement aussi.

A "FabLab" space is a space of learning and realization of small optical and electronic assembly. Practical workshops supervised or free (worksheet) are offered, as well as courses (see schedule). The principle is that you can go there at any time outside the time slots occupied by workshops, and can use the tools at your disposal (4 computers + soft, a 3D printer, components, soldering iron, small tools, optical table, optical and diagnostic equipment (thorsLab), ...)

Worksheets prepared to help you in different settings will be proposed, but you can also take advantage of this space to develop a personal project and need to consult us, take a meeting and discuss with the various specialists.

We propose you a small practical course of 20 min. The aim of these courses is to deal in a short time and as concretely as possible with a technical or practical point. They are introductions to the FabLab workshops that will follow and to the free use of the FabLab files. They can be followed freely too.

Cours/Courses :

- Sat 06 oct : 13h15-13h45, Pilotages de périphériques sous Arduino / *Arduinio bases for setup driving* (B. Detailleur)
- Sat 06 oct : 21h30-22h, Initiation à l'optique de Fourier / *Fourier bases* (M. Fournier)
- Sun 07 oct : 13h15-13h45, Comprendre et analyser les fronts d'onde / *Onde wave analysis* (M. Fournier)

- Mon 08 oct : 13h15-13h45, Comment incruster des informations mesurées en temps réel sur l'image vidéo d'une webcam (C. Rouviere)
- Tue 09 oct : 13h15-13h45, Utilisation d'un Arduino comme périphérique dans Micromanager (J. Mutterer)
- Wed 10 oct : 13h15-13h45, Pilotages de périphériques à l'aide d'écrans tactiles programmables (B. Ronsin)
- Thur 11 oct : 13h15-13h45, *From a Z stack image to a 3D printed object* (T. Manoliu)

Mails des intervenants :

- marie.fournier@etudiant.univ-lille1.fr
- jerome.mutterer@ibmp-cnrs.unistra.fr,
- brice.ronsin@univ-tlse3.fr,
- brice.detailleur@univ-amu.fr,
- rouviere@obs-vlfr.fr
- tudor.manoliu@icm-institute.org

Planning des Ateliers de pratique dirigée/Planning of practical workshops supervised:

Workshop (FabLab- Hall)	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct	Mon 08 Oct	Wed 10 Oct		Thur 11 oct
	14:00-16:00	21:30 00:00	14:00 16:00	14:00 16:00	14:00 16:00	21:30 00:00	14:00 16:00
F164- Atelier de conception d'une automatisation/contrôle/Pilotage/surveillance d'un aquarium d'élevage d'animalerie de recherche (Detailleur & Rouviere)	X						
F165-Pilotages de périphériques à l'aide d'écrans tactiles programmables (Ronsin & Mutterer)					X		
F166-Comment incruster des informations mesurées en temps réel sur l'image vidéo d'une webcam (sous application ImageJ, Processing, mise en œuvre d'une arducam) (Rouviere & Mutterer)				X			
F167-Utilisation d'un Arduino comme périphérique dans Micromanager: 3 solutions (Mutterer&Ronsin)							X
F170-Initiation à l'optique de Fourier (Fournier& Hubert)		X					
F169-Comprendre et analyser les fronts d'onde (Fournier& Hubert)			X				
F172-From a Z stack image to a 3D printed object (Manoliu)						X	

PLANNING ATELIERS

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08	Tue 09	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A1-Imagerie de super-résolution 3D en profondeur dans les tissus biologiques (Bon & Linarès-loyez)		Gouffy			Gouffy					Gouffy		
A2-Organisation des podosomes par nanoscopie de fluorescence basée sur la collection de l'émission super-critique. (Poincloux & Natacha escallier)	Chistera								Chistera			
A3-TANGO : un plugin ImageJ pour l'analyse d'image 3D à haut-débit. (Loll & Escudé)								Bar				IT Room 1
A4-Organ clearing to investigate the central nervous system and peripheric organs with preservation of GFP and SHG on few mm of cleared samples. (Dubreil & Fleurisson)		Ramutcho		Ramutcho								
A5-Organisation spatiale des signaux de mort/survie dans le cœur de souris après ischémie-reperfusion : clarification d'organe, microscopie en feuille de lumière et quantification automatisée (Meryem tardivel & Bongiovanni)				Chistera						Athos		
A6-Intelligence artificielle pour l'analyse d'image automatique en microscopie. Initiation au "deep learning" (Rousseau & Rasti)							IT Room 1					
A7-ATELIER SPHEROID COAST TO COAST « De la préparation aux traitements des données en passant par l'acquisition en Light sheet fluorescence microscopy» (Rousseau & Riviere)										Trinquet	Trinquet	
A9-Create your own ImageJ plugin as easy as pie (Fortun & Sage)							IT Room 2			IT Room 1		

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08	Tue 09	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A10-Coordinate-based quantification of 1- and 2-colors single-molecule localization microscopy data (Levet)						IT Room 1			Bar			
A11-Organization of mitochondrial nucleoids mtDNA by super resolution dSTORM (Chevrollier)			Chistera		Athos							
A12-High Resolution Traction Force Microscopy (Ronde & Carl)		Soulé						Soulé				
A15-Super-resolution radial fluctuations (SRRF) : what are the pro and the cons of this analytical open-source super resolution method ? (Salles & Dauphin)		Pala			Pala					Pala		Pala
A16-Microscopie thermique sub-Kelvin par imagerie de phase quantitative appliquée à l'étude de cellules en culture (Baffou)									Gouffy			Gouffy
A17-3D deconvolution microscopy (Soulez & Sage)				IT Room 2					IT Room 1			
A19-Study of DNA-protein complex at the single molecule level combining microfluidics and TIRF microscopy (Cantaloube & Hertzog)										Gouffy		Gouffy
A20-L'impression 3D pour la microscopie (Detaillier & Ludovic.leconte)				Fab lab (Hall)					Fab lab (Hall)			
A21-Mise en évidence de multimères protéiques en microscopie confocale par la technique de Proximity Ligation Assay. (Boutin & Nedellec)					Ramutcho						Ramutcho	
A22-Fluorescent nanoparticles for RGB color coding of living cells (Reisch & Vauchelles)	Soulé		Pala					Pala				
A23-Mesure de dynamique intracellulaire sans marquage par analyse de front d'onde à très haute définition (Savatie)								Gouffy			Gouffy	
A24-Analyses de colocalisation (Gilles & Contremoulins)			IT Room 1		IT Room 2							

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A25-Mitochondrial dyes and FRET biosensors to determine the mitochondrial energy potential: a complementary approach (Bertolin & Béatrice drel)						Soulé	Soulé					
A26-Immunofluorescence et imagerie à feuille de lumière sur organes transparisés : quelles stratégies de mise au point adopter ? (Lachambre & Abélanet)										Entrée restaurant		Entrée restaurant
A27-A practical guide to super-resolution techniques for imaging cellular structures within thin and thick biological samples (Bun & Geny)		Trinquet				Trinquet				Trinquet		
A28-Efficient plasma membrane staining using MemBright probes : from live dynamics to super-resolution (Danglot & Collot)							Athos		Trinquet			Trinquet
A30-Fast multicolor Super Resolution Live Cell imaging (Ludovic.leconte & Anceaume)							Galipot gauche				Galipot gauche	
A31-Zebrafish embryonic morphogenesis and functional imaging with high speed and high resolution using light sheet and confocal microscopy (Guiot & Bolte)	Soulé	Soulé										
A32-Two-photon functional Imaging of murine and human intestinal Organoids (Allart & Daviaud)			Soulé			Soulé						
A33-Imagerie STORM de spores en germination de la bactérie B. subtilis : préparation des échantillons, acquisition des données et reconstruction des images. (Winckler)			Athos								Galipot gauche	
A35- The functional characterization of new multi-specific monoclonal antibodies in immunoncology by multicolor PALM/STORM approach (Cassé & Bodier)										Chistera		Chistera

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A36-dSTORM, un nouvel outil pour l'étude de la co-localisation à la mitochondrie (Béatrice durel & Bertolin)		Chistera			Galipot gauche							
A37-Lung organoids as an original model to explore cell migration during inflammation (Peixoto & Iakobachvili)				Chistera					Chistera			
A38-Mesure de la dynamique de protéines membranaires par photo-conversion et FRAP : Avantages et limites. (Guedj & Baudin)							Chistera				Chistera	
A39-In vivo measurement of both pH and anions concentration using a ratiometric sensor in Arabidopsis plantlets (Besse & Le bars)					Soulé & Athos				Soulé & Athos			
A40-Quantification of vesicular release by TIRF microscopy (Pascual & Malleval)			Soulé									Soulé
A41-Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules (Recher & Mombereau)	Trinquet						Trinquet					
A41-Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules (Recher & Mombereau)	Chistera & Trinquet						Chistera & Trinquet					
A42-Nuclear Pore Complex : the performance tool for super-resolution, from sample preparation to the super-resolved image (Faklaris & Sellés)		Athos		Chistera								
A42-Nuclear Pore Complex : the performance tool for super-resolution, from sample preparation to the super-resolved image (Faklaris & Sellés)		Galipot gauche										
A43-Adaptive confocal microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy (Delon & Grichine)						Gouffy	Gouffy			Gouffy		

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A44-DIVA: Quantify Your Microscopy Images Using Virtual Reality (El beheiry & Doutreligne)	Bar	IT Room 1										
A46-The fastFLIM microscope: how to combine FLIM with speed of acquisition (Tramier & Le marchand)			Galipot droite						Galipot droite			
A47-Automated drug inhibitor screening of Aurora A kinase activity based on a FRET biosensor (Sizaïre & Le marchand)	Galipot droite										Galipot droite	
A48-La microscopie à feuillet de lumière pour l'étude en profondeur des organoïdes : limites et optimisation. (Goudin & Lebreton)			Trinquet			Trinquet						
A49-High throughput screening of cell adhesion and spreading on biomimetic coatings of controlled stiffness and bioactivity (Picart & Machillot)				Trinquet		Trinquet						
A50-Fast and sensitive 4D imaging using Multifocus microscopy (Bassam hajj)	Gouffy		Gouffy									
A51-Mitochondrial Ca2+ and ATP FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM during hypoxia-reoxygenation (Gouriou & Bidaux)		Galipot droite					Galipot droite					
A52-Contrôle optogénétique de voies de signalisation et de la morphologie cellulaire. (Ramel & Mazars)				Trinquet				Trinquet				
A53-3D high and super-resolution imaging of biological samples using a single-objective Selective Plane Illumination Microscope. (Galland & Butler)	Gouffy			Gouffy				Gouffy				
A54-AFM on microbial surfaces : from imaging to physico-chemical properties (Audrey beaussart & Isabellebihannic)		Sauna /Douche							Sauna /Douche			
A55-3D tomography imaging by holotomography (Isabellebihannic & Audrey beaussart)						Galipot droite				Galipot droite		

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A56-Combined AFM-optical-fluorescence microscopy to study microbial adhesion and host-pathogen interaction (El-kirat-chatel & Audrey beaussart)			Sauna /Douche								Sauna /Douche	
A58-Imagerie confocale spectrale : caractérisation de l'autofluorescence sur tissus (Mailfert & Fallet)			Trinquet								Trinquet	
A59-L'imagerie de super-résolution tissulaire : du mythe à la réalité de la paillasse ! De l'optimisation de la fixation et du marquage aux modalités d'imagerie et de reconstruction 3D (Ferreira & Bon)			Gouffy						Gouffy			
A60-Analysis of mitochondrial connectivity in vivo in the drosophila nervous system. (Pinson & Rival)			Chistera								Pala	
A62-Mesure de l'activité cérébrale chez la drosophile en réponse à un stimulus olfactif, ou comment augmenter la facilitation sociale de la mémoire (Ronsin & Muria)	Ramutcho					Chistera						
A67-La culture cellulaire en 3D : sphéroïdes, gels... pour une meilleure compréhension de la physiologie des cellules (Furlan)				Cell Culture Room					Cell Culture Room			
A70-Correlative Microscopies: Image and Volume Registration (Paul-gilloteaux)			IT Room 2	IT Room 1								
A71-Real-time intracellular quantum dot to fluorescent protein FRET. (Cardoso dos santos)				Soulé		Soulé						
A72-A Versatile 3D Superresolution Speckle imaging for a wide range of biological applications : from bacteria to tissue. (Mangeat & Idier)										Entrée restaurant	Entrée restaurant	

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A74-Ex vivo imaging of T cells in vibratome tumor slices using confocal microscopy (Donnadieu & Barrin)						Pala				Chistera		
A75-Giving access to machine learning for the quantitative analysis of big histological images through the deployment of virtual machines. (Paul-gilloteaux & Blandin)		Bar										
A76-Multiple protein photopatterning and associated cellular traction forces determination on soft polyacrylamide gels (Kurzawa)								Pala				Pala
A77-Mono VS Two photon comparison on a large clarified embryo: the catshark <i>S. canicula</i> model (Lagadec & Pecqueur)							Chistera		Pala			
A78-An integrated combination of atomic-force microscopy and STED microscopy for nanoscopic imaging and mechanical characterizations of biological samples, such as viruses. (Muriaux & Lyonnais)	Sauna					Sauna						
A81-Examen des performances d'un microscope optique : de la métrologie au diagnostic – microscopie champ large (niveau 1) (Faklaris & Guilbert)					Soulé							
A82-Examen des performances d'un microscope optique : de la métrologie au diagnostic – Microscopie Confocale (niveau 2) (Guilbert & Schapman)									Chistera		Trinquet	
A83-Comparison between conventional and fast confocal system for three colors acquisition in living plant samples. (Bancel & Brocard)					Trinquet		Trinquet					
A84-Monitor your cell culture to optimize your cell transfection (Muriaux)					Cell Culture Room		Cell Culture Room					

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A85-Etude comparative de méthodes de clarifications sur différents modèles animaux et végétaux par microscopie à sectionnement optique. (Pouzet & Rouquette)				Pala				Chistera				
A85-Etude comparative de méthodes de clarifications sur différents modèles animaux et végétaux par microscopie à sectionnement optique. (Pouzet & Rouquette)											Athos	
A87-Exploration des nouvelles techniques d'amélioration de résolution compatible à une imagerie de cellules vivantes. Ex sur le processus d'autophagie. (Werkmeister & Salomé-desnoullez)				Galipot gauche				Trinquet				
A88-Real time acquisition of inflammation and regeneration processes on zebrafish models using photonic microscopy and second harmonic generation. (Frétaud & Langevin)				Soulé				Soulé				
A89-Scanning FCS workshop. (Chojnacki & Favard)	Trinquet											Soulé
A90-OPenT - Bring your sample & learn how to build and use an OPT optical tomography mesoscope (G. martins)		Entrée restaurant			Entrée restaurant				Entrée restaurant			
A92-Visualization of neuronal projections in entire brain (Poujol)			Pala			Athos						
A95-Comment optimiser l'acquisition de grands échantillons « transparisés » avec la microscopie à feuille de lumière en vue de traitements semi automatisés d'images tridimensionnelles (Godefroy)	Athos			Athos								

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A96-Pattern recognition in whole organism for automated microscopy or data-analysis using open source solutions (Thomas & Okock)					Bar				IT Room 2			
A97-Imagerie super-résolution et en 3D de la surface apicale des cellules polarisées (Cantereau)								Chistera		Athos		
A98-Visualization of multiple (7) immune-cell biomarkers in human tumors by multiplex Tyramide Signal Amplification system: Staining strategy, Multispectral imaging and Linear unmixing (Chevalier & Dutertre)				Soulé						Trinquet		
A99-The zebrafish as a model to study dynamics of single membrane proteins (Gora & Muñoz sánchez)							Soulé			Soulé		
A100-Quantifying synaptic plasticity in primary neurons using microfluidic culture devices and a custom image analysis workflow (Malmanche & Kilinc)									Bar & Trinquet			Bar & Trinquet
A101-Simple phase and fluorescence microscopy for the time-lapse acquisition of adherent cell cultures (Allier)										Cell Culture Room	Cell Culture Room	
A102-Optimisation des acquisitions sur un microscope avec gain de résolution : exemple de la visualisation de la bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin chez C. elegans (Dutertre & Prigent)		Trinquet										Trinquet
A103-FAST: next generation of inducible chemical-genetic fluorescent markers for advanced biological imaging (Gautier)			Soulé							Soulé		
A103-FAST: next generation of inducible chemical-genetic fluorescent markers for advanced biological imaging (Gautier)			Chistera							Chistera		

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A104-Spot detector sous Icy l'outil 3 en 1 ! : coloc, tracking et segmentation (Goudin & Lallemand)								IT Room 1			Bar	
A105-Versatile wide-field homogeneous illumination for SMLM (Mau & Lévêque-fort)	Gouffy		Gouffy									
A106-Calibration strategies for 3D single-molecule localization microscopy (Lévêque-fort & Dupuis)		Gouffy					Gouffy					
A107-Sample's environment control in LSFM: mechanics, electronics, 3D printing, and programming for microscopy. (Bernardello matteo)					Fab lab (Hall)		Fab lab (Hall)					
A108-Speed Opiom for multiplexed observations in microscopic, macroscopic, and endoscopic fluorescence imaging (Le saux)						Entrée restaurant		Entrée restaurant				
A109-Quantitative analysis of zebrafish pectoral fin early growth and shape changes (Nguyen & Kardash)		Chistera	Chistera						Chistera			
A110-Microscopes Metrology in database (Matthews & Paul-gilloteaux)					IT Room 1	IT Room 2						
A111-faire renaitre son confocal avec un rescann confocal (Matthews)												
A112-Open Source Inverted Microscope (OSIM) for timelapse imaging (De rossi)			Entrée restaurant				Entrée restaurant					
A113-Combining complementary 3D single molecule localization techniques for reliable multicolor biomaging over extended depth ranges (Jouchet & Cabriel)					Gouffy	Gouffy						
A114-L'art du tunning low cost en microscopie : optimisation par des exemples concrets de toute la chaine de l'imagerie (Simon & Bon)				Gouffy		Gouffy						

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00
A115-4D multi-plane and multi-colour (4D-MPMC) microscopy imaging with quadratically distorted (QD) grating and grisms (Feng & Frain)								Entrée restaurant				Entrée restaurant
A116-Imaging in scattering biological tissues: ultra fast wavefront shaping and speckle imaging (Hofer & Blochet)			Entrée restaurant		Entrée restaurant		Entrée restaurant			Entrée restaurant		
A117-Phy-aWaaS Webservice for 3D+time imaging data management and cell lineage analysis (Hammons & Peyrieras)												IT Room 2
A118-SPIM-FCS to probe Cadherin1 dynamics along the cell lineage in zebrafish early embryogenesis (Jovanic & Peyrieras)				Chistera				Chistera				
A119-dSTORM : Nano-objets 3D de standardisation et imagerie in cellulo des centrosomes. (Monier & Place)					Chistera	Chistera						
A120-Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) : mesure, automatisation et analyse (Champelovier & Leray)	Ramutcho						Ramutcho					
A121-Detecting protein aggregation and interactions in live cells: a practical on Number and Brightness (Alvarez & Padilla-parra)								Soulé			Soulé	
A122-From visualization to quantitative analysis of ERK activity dynamics in single cell migration and collective cell migration using ratiometric FRET imaging. (Sipieter & Leray)			Ramutcho						Ramutcho			
A123-Spotlight on mitochondria: how it explodes and how it is digested (Ichim)					Trinquet				Trinquet			
A124-Tracing the internalization of bacteria into host cells using multidimensional high-content imaging (Audry)					Hall		Hall	Hall			Hall	
A126-Programming bioimage analysis workflows in python and R using Jupyter Notebook (Hassen-khodja & Bäcker)								IT Room 2			IT Room 2	

Workshop	Sat 06 Oct		Sun 07 Oct			Mon 08 Oct	Tue 09 Oct	Wed 10 Oct			Thu 11 Oct	
	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15	21:30-00:00	14:00-16:00	16:30-18:15
A127-Comparaison de 3 méthodes de transparisation sur un nouveau système d'imagerie confocal rapide (Goudin & Lallemand)		Pala										Pala
A128-Full-field interferometric microscope for detection and sorting of label-free biotic and non-biotic nanoparticles (Fedala & Izeddin)		Entrée restaurant		Entrée restaurant		Entrée restaurant			Entrée restaurant		Entrée restaurant	Entrée restaurant
A129-Probing mechanical properties of living cell cytoskeleton in Peak Force QNM (Bovio)	Sauna/Douche											Sauna/Douche
A130-Probing mechanical properties of plant tissues (Bovio)				Sauna				Sauna				
A171-Imaging Cylindrical / Tubular tissues to investigate intra-tissular micro-architecture, challenging the multi-view capabilities (Recher)												
A172-Mesure de FCS et FCCS en cellule vivante (Wohland)				Ramutcho		Ramutcho						
A173-Live zebrafish nervous system study using dual-sided illumination light-sheet microscopy (Gurchenkov)					Athos				Athos			
A174-Virtual Reality for better understanding of complex neuronal networks (Gurchenkov)		Bar				Bar						

FICHES DESCRIPTIVES DES ATELIERS



Le concept original développé lors de la création de MiFoBio était de permettre aux participants de ne pas se limiter à des échanges théoriques, mais de se confronter avec l'instrument en conditions réelles de fonctionnement, sur des échantillons d'intérêt biologique. Ce concept, a priori risqué, s'est avéré extrêmement attractif et forme un des principaux attraits de l'Ecole. Il s'inscrit pleinement dans la pédagogie participative qui est au cœur du projet de l'école.

A1-Imagerie de super-résolution 3D en profondeur dans les tissus biologiques

Proposer/Coanimateur

Pierre Bon

Jeanne Linarès-loyez

Abstract

L'imagerie de super-résolution 3D est actuellement limitée à des échantillons fins (monocouche cellulaire) ou des tissus fortement modifiés (transparisation, expansion...). Dans ce TP nous illustrerons tant théoriquement qu'expérimentalement une nouvelle approche pour la super-résolution 3D, basée sur l'imagerie de phase quantitative en fluorescence. Cette technique présente l'intérêt majeure d'être quasi-insensible aux aberrations optiques, notamment celles introduites par l'échantillon lui-même. Nous montrerons donc que l'on peut obtenir une super-résolution 3D quasi-isotrope au sein d'un tissu non-modifié et ce jusqu'à plus de 50 μ m de profondeur. Nous discuterons également de tracking de molécules uniques (ex. Qdots fonctionnalisés) au sein d'échantillon de tissus vivants.

Keywords

Super-résolution 3D ; imagerie tissulaire profonde ; single particle tracking ; imagerie de phase

A2-Organisation des podosomes par nanoscopie de fluorescence basée sur la collection de l'émission super-critique.

Proposer/Coanimateur

Renaud Poincloux

Natacha Natacha escallier

Abstract

Les podosomes sont des structures d'adhérence sous-micrométriques capables de générer des forces de protrusion sur l'environnement extracellulaire (Proag A et al. ACS Nano 2015 ; Proag A et al. Methods 2015 ; Labernadie A et al. Nat. Commun. 2014). Nous étudions l'organisation moléculaire tridimensionnelle des podosomes (Bouissou et al. ACS Nano 2017) grâce à une méthode de nanoscopie de fluorescence basée sur la collection de l'émission super-critique (SAF). Cette

méthode permet en théorie de super-localiser la position axiale absolue de chaque fluorophore détecté par rapport à la lamelle avec une précision de l'ordre de 15 nm (Bourg et al. Nat. Photonics 2015). Au cours de cet atelier, nous expliquerons comment nous préparons les échantillons, ferons la démonstration de l'acquisition des données, et nous détaillerons comment les analyser.

Keywords

dSTORM, SAF, podosomes, cell adhesion

A3-TANGO : un plugin ImageJ pour l'analyse d'image 3D à haut-débit.

Proposer/Coanimateur

François Loll

Christophe Escudé

Abstract

TANGO est un plugin ImageJ développé dans le but d'extraire des données quantitatives à partir d'images de microscopie à fluorescence 3D. Ce freeware possède une interface utilisateur intuitive qui permet, sans aucune connaissance en programmation, de construire pas à pas une procédure de traitement d'images et de segmentation et de conduire différents types d'analyses (distance, colocalisation, intensité, volume, etc), en s'appuyant sur l'ensemble des outils disponibles pour la communauté. Les mesures réalisées sont analysées à l'aide du logiciel R.

Les applications de ce logiciel, initialement développé pour l'étude de l'organisation spatiale du noyau, dépassent aujourd'hui largement ce cadre (analyse de bactéries, etc). Un exemple tiré de l'étude de l'organisation nucléaire servira de support pour illustrer les différentes fonctionnalités de TANGO. L'objectif est d'accompagner les participants tout au long du processus, de l'import des images jusqu'à l'analyse statistique.

Keywords

analyses, images 3D, haut-débit, TANGO, R, segmentation, statistique

A4-Organ clearing to investigate the central nervous system and peripheric organs with preservation of GFP and SHG on few mm of cleared samples.

Proposer/Coanimateur

Laurence Dubreil

Romain Fleurisson

Abstract

3D imaging of the central nervous system (brain, spinal cord) and peripheric organs as skeletal muscle and cardiac muscle at the microscopic level is essential to investigate morphological changes of various diseases or to assess the efficacy of a treatment. However, this 3D exploration of the tissues is very limited because of the small volumes and the opacity of the tissues, which does not allow the passage of the light. Technological advances in fluorescence bio-imaging with the development of numerous methods in tissue clearing represent innovative solutions for exploring the organs at the cellular level. These methods are very promising tools to assess new therapeutic strategies on neurodegenerative diseases using animal models and AAV vector encoding fluorescent proteins. In this workshop, we will demonstrate how it is possible to preserve native GFP and image SHG on few mm of a cleared sample and we will show the interest of the resonant scanner coupled to sensitive detectors to

Keywords

Brain, spinal cord, muscle, neuromuscular junction, clearing, refractive index, GFP, SHG, resonant scanner, confocal, biphoton

A5-Organisation spatiale des signaux de mort/survie dans le cœur de souris après ischémie-reperfusion : clarification d'organe, microscopie en feuille de lumière et quantification automatisée

Proposer/Coanimateur

Meryem Meryem tardivel

Antonino Bongiovanni

Abstract

La transposition des données issues de la microscopie en cellules isolées au contexte d'un organe entier est encore un frein à la compréhension de la physiologie. L'alliance de la clarification (ou transparençation) de tissu et la microscopie à feuille de lumière (ou single plane illumination microscopy, SPIM) permet maintenant de reconstruire la position des signaux moléculaires et cellulaire en 3D dans l'organe entier. Ces 2 techniques ouvrent donc les portes à la compréhension de l'organisation des réseaux cellulaires (typiquement le réseau neuronale), le remodelage ou l'homéostasie cellulaire des tissus, mais aussi l'organisation spatiale des signaux moléculaires, de la migration cellulaire ou de l'invasion cellulaire. Si la majorité des travaux publiés ces dernières années concerne le cerveau, l'évolution de systèmes et méthodes de clarification permet aujourd'hui de rendre transparent des organes de consistance plus fibreuse comme le cœur ou le rein.

Keywords

Clarification, SPIM, cœur, cerveau, fœtus de souris, Imaris, ImageJ, automatisation, organisation spatiale

A6-Intelligence artificielle pour l'analyse d'image automatique en microscopie. Initiation au "deep learning"

Proposer/Coanimateur

David Rousseau

Pejman Rasti

Abstract

Nous vous présenterons le principe des méthodes actuellement les plus avancées en intelligence artificielle, l'apprentissage profond via les réseaux de neurones artificiels pour de la reconnaissance de formes dans des images (Xing, F. et al. 2017 A Survey. IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems). Nous vous montrerons comment à partir d'un premier exemple jouet (reconnaissance de caractères) vous pourrez adapter des codes existant pour vos propres images. Nous appliquerons ensuite pour illustration en bioimagerie ces méthodes à une problématique de détection de cellules en 3D. Dans cet atelier, vous apprendrez comment réaliser vous même un réseau de neurones artificiels via le langage tensor flow (dérivé de Python) développé par Google. Les codes informatiques des exemples seront distribués aux participants.

Keywords

Intelligence artificielle, Deep Learning, Bioimagerie

A7-ATELIER SPHEROID COAST TO COAST « De la préparation aux traitements des données en passant par l'acquisition en Light sheet fluorescence microscopy »

Proposer/Coanimateur

David Rousseau
Charlotte Riviere

Abstract

Les sphéroïdes sont des agrégats cellulaires en 3D très utilisés en biologie in vitro que ce soit pour des approches biophysiques liées des questions sur les propriétés des cellules ou en biochimie via le test d'effet de produits à vocations pharmaceutiques. Dans cet atelier, nous proposons aux participants d'apprendre à réaliser des sphéroïdes, de les acquérir en microscopie à feuille de lumière et de traiter les images en vue d'une interprétation quantitative. Le microscope utilisé sera le Z1 de ZEISS ; Les techniques pour préparer des sphéroïdes à partir de cellules cohésives et non-cohésives seront présentées ainsi que les techniques pour la visualisation; Les traitements des données présentés inclueront : le recalage de stack 3D volumineux, le débruitage, la déconvolution et la détection de cellules par des algorithmes de machines learning (deep learning notamment).

Keywords

Spheroid, acquisition, registration, analysis

A9-Create your own ImageJ plugin as easy as pie

Proposer/Coanimateur

Denis Fortun
Daniel Sage

Abstract

ImageJ is the most popular software for image analysis in biological imaging. The biologists mainly use the manual commands and the macros for automation. However, there exists another more powerful way to perform image processing tasks by directly creating ImageJ plugins with Java. The procedure is simple and not reserved to computer scientists.

In this workshop, we will learn how to easily develop ImageJ plugins with minimal programming knowledge. We will show how to make basic and advanced pixel-wise operations on multi-dimensional images, which would require tedious effort with existing tools of ImageJ. For this purpose, we exploit the straightforward interface between the Eclipse coding environment and the ImageJ API. We rely on our long experience in teaching image processing in this framework for Master students. We will guide the participants in writing their own image analysis routines for multidimensional images.

Keywords

ImageJ, plugin, analyse d'image

A10-Coordinate-based quantification of 1- and 2-colors single-molecule localization microscopy data

Proposer

Florian Levet

Abstract

Single-molecule localization microscopy (SMLM) has made it possible to monitor the organization and dynamics of biomolecules at down to a few nanometers resolution, in 2 and 3 dimensions. When used with multiple colors, it enables investigating potential interactions between subcellular components at the nanoscale. After more than a decade of existence, it has become clear that while seemingly simple, quantitative SMLM is particularly complex in reality. Indeed, several experimental and analytical pitfalls have to be accounted for.

In this workshop we will both present the experimental particularities of SMLM as well as various analytical methods designed to quantify single-molecule localization microscopy (SMLM) data directly from the localization coordinates. It aims at guiding users for choosing the most appropriate methods to their problem, whether it be for structural or colocalization analysis. As a support, we will use simulation and experimental data.

Keywords

Single-molecule localization microscopy, coordinate-based quantification, segmentation, molecular counting, colocalization analysis

A11-Organization of mitochondrial nucleoids mtDNA by super resolution dSTORM

Proposer

Arnaud Chevrollier

Abstract

Mitochondria are highly dynamic organelles that can build large interconnected networks by constantly fusing and dividing. Mitochondria possess their own genome, the mitochondrial DNA (mtDNA) organized into nucleo-protein structures, or nucleoids. The importance of the relationship between mitochondrial dynamics and the maintenance of mtDNA is insured at the clinical level by the existence of neurodegenerative pathologies. Several hundred copies of mtDNA are distributed throughout the mitochondrial volume within a single cell. Mitochondria have a diameter of 250 to 400 nm. Using dSTORM, it has been shown that nucleoids mtDNA vary in size from 31 to 318 nm. We proposed to analyse the nucleoid organization and volume in fibroblasts mutated in a replication enzyme. Nucleoids imaging is a really nice approach to discover the mitochondrial dynamics. These nucleoids acquisitions by 3DSTORM are good examples to show the advantages of imaging nanodomains and to test the limits of SR microscopy

Keywords

Mitochondrial dynamics, nucleoid, dSTORM

A12-High Resolution Traction Force Microscopy

Proposer/Coanimateur

Philippe Ronde

Philippe Carl

Abstract

Cells adhering to the extracellular matrix can sense and respond to a wide variety of chemical and physical features of the adhesive surface. The response of the cell includes contractile force generation which plays a critical role in cell adhesion, migration, and extracellular matrix reorganization. Thus, characterization of cellular forces has led to a greater understanding of cellular mechanosensing. Through their actomyosin machinery the cell generates an internal tension that contracts the cell body and thus exerts tractions on the underlying substrate mediated by focal adhesions. Focal adhesions are subcellular structures that physically link the actin cytoskeleton to the extracellular matrix. The TFM (Traction Force Microscopy) technique allows determining the tensile forces exerted by the cells on their substrate. For this purpose, cells are cultured on polyacrylamide hydrogels containing fluorescent microbeads as markers for the determination of stresses due to tensile forces

Keywords

Mecanobiology, Traction Force, Adhesion, Migration

A15-Super-resolution radial fluctuations (SRRF) : what are the pro and the cons of this analytical open-source super resolution method ?

Proposer/Coanimateur

Audrey Salles

Aurelien Dauphin

Abstract

Super resolution demands top-notch systems, rigorous sample preparation, high power lasers and specialised staffs. Such constraints prevent super resolution technics from being more widely used. Moreover, high power laser excitation is unlikely to be done for live cell imaging. Super-resolution radial fluctuations (SRRF) technic, promise to extract super resolution information on current fluorescence microscopes (Widefield, confocal and TIRF) with common sample preparation, using less excitation power than other super resolution technics leading to the possibility to do live cell imaging. The aim of this workshop is to present the pro and the cons of the SRRF open-source method on different structures of fixed and living samples (from mitochondria to nucleopores). We will discuss about technical and analytical parameters, such as sample preparation, camera type and analysis settings. Users will be able to compare it to other high resolution technics (WF, confocal deconvolution).

Keywords

Super-resolution radial fluctuations, SRRF, fluorescence, image analysis, live cell imaging, open-source software

A16-Microscopie thermique sub-Kelvin par imagerie de phase quantitative appliquée à l'étude de cellules en culture

Proposer

Guillaume Baffou

Abstract

L'atelier a pour but de présenter une technique optique de microscopie thermique sans marquage, basée sur l'utilisation d'une caméra analyseur de front d'onde, et destinée à l'étude du comportement de cellules en culture soumises à des variations de température allant de quelques degrés jusqu'à plus 100°C. Nous présenterons les enjeux actuels de l'imagerie de température en biologie, les caractéristiques de notre technique (résolution, sensibilité), les moyens de chauffer aux petites échelles (notamment en utilisant un effet photothermique de nanoparticules d'or), et nous étudierons le comportement, en fonction de la température, de différentes cellules (en fonction des disponibilités : cellules de rétines, levures mutantes thermosensibles et bactéries thermophiles).

Keywords

Microscopie thermique, Imagerie de phase, plasmonique, nano-particules d'or, échantillons biologiques thermo-sensibles

A17-3D deconvolution microscopy

Proposer/Coanimator

Ferréol Soulez

Daniel Sage

Abstract

Le but de la déconvolution est de compenser numériquement le flou introduit par le microscope. En microscopie 3D, la déconvolution permet de restaurer les images 3D notamment:

- en améliorant la résolution (axiale en particulier),
- en réduisant le bruit (en particulier à faible flux),
- en augmentant le contraste.

Cela fait de la déconvolution un outil précieux pour rendre possible la segmentation et la quantification des images.

Cet atelier propose de démystifier les méthodes de déconvolution et propose une prise en main des logiciels libres de déconvolution.

Il sera en 4 parties:

- brève description théorique ;
- questions pratiques pour réussir une déconvolution ;
- comparaison de méthodes classiques avec le plugin DeconvolutionLab2 sur données simulées et réelles en épifluorescence et en confocal ;
- dans le cas où la PSF n'est pas connue nous guiderons les utilisateurs dans l'utilisation d'EpiDEMIC, un plugin Icy de déconvolution aveugle pour l'épifluorescence.

Keywords

Traitement d'images, déconvolution, microscopie de fluorescence,

A18-Formation des images en microscopie

Proposer/Coanimateur

Ferréol Soulez
éric Thiébaud

Abstract

Cet atelier propose un point de vue global sur la formation des images en microscopie. Après une introduction la plus graphique possible de l'optique de Fourier, j'illustrerais le voyage de l'onde lumineuse au travers du microscope. Cette approche permet d'expliquer simplement la formation des images pour un grand nombre de modalités en microscopie.

Dans un premier temps la microscopie en microscopie diffractive comme la microscopie holographie et microscopie sans lentille. Ces techniques d'imageries cohérentes permettent d'introduire la formation de la PSF. Dans un second temps il sera donc question des méthodes de fluorescence en partant de l'épifluorescence. En montrant que la PSF d'un microscope est le produit de la PSF d'illumination et de la PSF de détection, je décrirais les façons d'améliorer la PSF (microscopie confocale, 2-photons, STED).

Cet atelier sera illustré par des simulations sur Icy qui permettront d'observer les effets des différentes techniques sur l'image observée

Keywords

Optique, simulation de données

A19-Study of DNA-protein complex at the single molecule level combining microfluidics and TIRF microscopy

Proposer/Coanimateur

Sylvain Cantaloube
Maud Hertzog

Abstract

The recent advances in single molecule methods allow the direct observation of proteins acting on their DNA substrate in real time. Whereas these data are inaccessible in ensemble experiments, single molecule imaging of DNA-proteins complexes enable the identification of unique subpopulations or reaction intermediate. We are developing new approaches to study purified DNA-protein complexes involved in genome dynamics or maintenance at the single molecule level combining microfluidics and TIRF-M (Total Internal Reflection Fluorescence-Microscopy). During the workshop, we will show and discuss the different steps for the preparation of flow cells and materials (fluorescent proteins and DNA substrate) dedicated to single DNA-molecule in vitro analysis, preparation of functionalized surfaces for attachment of DNA, detection and kinetic of fluorescent protein activities on DNA.

Keywords

in vitro DNA, purified fluorescent proteins, single molecule, TIRF-M, microfluidics

A20-L'impression 3D pour la microscopie

Proposer/Coanimateur

Brice Detailleur

Ludovic Ludovic.leconte

Abstract

L'impression 3D se démocratise un peu plus chaque jour dans nos laboratoires dans un esprit de fabrication simple, rapide et performant.

Cette technologie de fabrication additive n'est, hélas, pas aussi facile à mettre en œuvre car elle demande des compétences dans des domaines tel que la Conception Assisté par Ordinateur, l'utilisation de logiciels de paramétrage d'imprimante 3D ou encore de logiciel de traitement d'images.

Au cours de cet atelier nous vous proposons un retour d'expérience sur les technologies les plus couramment utilisées de dépôt d'un fil thermoplastique et de polymérisation de résine qui est particulièrement adaptée aux problématiques de micro-fluidique.

Nous vous initierons au processus d'obtention d'un objet par impression 3D en utilisant :

- le logiciel de CAO Solidworks, pour la création numérique en 3D d'objets virtuels.
- en paramétrant ces objets, via des logiciels propriétaires ou Open Source, afin d'obtenir un objet physique.

Keywords

Impression en 3D, polyjet, solidworks , Inventor, FDM,

A21-Mise en évidence de multimères protéiques en microscopie confocale par la technique de Proximity Ligation Assay.

Proposer/Coanimateur

Lola Boutin

Steven Nedellec

Abstract

Certains récepteurs membranaires adoptent une conformation active en passant d'un état monomérique à la formation d'un complexe multimérique. Compte tenu des limites de résolution en imagerie optique, pouvoir documenter des interactions protéine-protéine en microscopie peut nécessiter la mise en oeuvre de système parfois complexes (mesure de FRET par FLIM, FCCS, Super Resolution). La méthode de Proximity Ligation Assay (PLA) permet de mettre en évidence de tels phénomènes moléculaires en utilisant des systèmes optiques simples (confocal, wide-field), la limite étant de travailler sur des échantillons biologiques fixés.

Lors de cet atelier, nous présenterons la technique de PLA qui permet de révéler des interactions protéiques par un signal de fluorescence. Ce signal est obtenu à l'aide de 2 sondes couplées à de l'ADN simple brin. Nous décrirons le protocole de marquage des cellules, la préparation des échantillons pour l'observation et la stratégie d'acquisition des images en microscopie confocale. L'analyse quantitative du signal PLA sera réalisée sous Fiji. Enfin, nous aborderons les limites et avantages de cette technique, en insistant sur les contrôles à effectuer pour valider ces résultats.

Le modèle biologique choisi pour cet atelier concerne la molécule BTN3A1, une protéine transmembranaire impliquée dans l'activation d'une population de lymphocytes T humains, et qui est suspectée de former des homodimères sous l'action d'un stress métabolique. Le comportement

de cette molécule semble avoir un impact majeur sur tout un pan du système immunologique adaptatif assuré par les lymphocytes T gamma delta humains.

Keywords

confocal microscopy - Proximity Ligation Assay - Membrane receptor- dimerization -

A22-Fluorescent nanoparticles for RGB color coding of living cells

Proposer/Coanimator

Andreas Reisch

Romain Vauchelles

Abstract

In this workshop a set of 3 fluorescent polymer nanoparticles of distinct colors but identical size and surface properties will be used to label cell populations by various color codes. Labelling of cells will be performed directly during the workshop. The resulting colored cell populations will be mixed and imaged. Automatized image analysis will be applied to extract information on the behavior of different cell populations. Several applications of this color-coding approach for cellular and in vivo imaging will be presented. The synthesis of the used fluorescent nanoparticles will be explained and shown. All steps of the protocol, from particle preparation to image analysis, will be directly visible to the participants.

Keywords

cell labelling, color coding, fluorescent nanoparticles

A23-Mesure de dynamique intracellulaire sans marquage par analyse de front d'onde à très haute définition

Proposer

Julien Savatier

Abstract

Nous présenterons les nouvelles possibilités en analyse de dynamique intracellulaire sur cellules biologiques vivantes non marquées, permises par le développement d'une nouvelle technique de mesure de front d'onde offrant une grande résolution spatiale. Ce prototype conserve une fréquence d'acquisition assez rapide pour l'étude de trajectoires vésiculaires comme de flux de matière.

Nous expliquerons le principe de cette nouvelle méthode de mesure et décrirons ses caractéristiques (résolution, taille de champ, sensibilité). Nous présenterons ensuite un dispositif instrumental inédit de cette nouvelle technique, avec le logiciel associé. Nous l'appliquerons à l'analyse quantitative de la dynamique de certains composants intra-cellulaires.

Cet atelier est plutôt destiné à des gens connaissant l'imagerie de phase, quantitative ou non. Il a pour but de permettre aux utilisateurs de voir une avancée majeure dans ce domaine en termes de définition d'image et de taille de champ, mais également de tester leurs divers échantillons et d'engager une discussion sur leurs besoins en imagerie de phase quantitative.

Keywords

Imagerie de phase quantitative, microscopie, nouvelle technologie, haute résolution, sans marquage, dynamique intracellulaire

A24-Analyses de colocalisation

Proposer/Coanimateur

Jean-françois Gilles

Vincent Contremoulins

Abstract

Les techniques pour analyser la colocalisation de deux molécules sont nombreuses.

Cet atelier a pour but de faire un point sur les méthodes de colocalisations et les outils disponibles en imagerie 2 couleurs, 2D et 3D.

Après un introduction sur les différentes méthodes d'analyses de colocalisation spatiale basées sur les approches pixels et objets, en abordant les difficultés et limites (entre autres liées au bruit et à l'échantillonnage), l'atelier se déroulera sous la forme d'études de cas biologiques concrets avec différents outils d'analyses d'images disponibles sur ImageJ et Icy tels que Jacop, Diana ou Colocalization studio.

Keywords

analyse d'images, colocalisation, segmentation, ImageJ



A25-Mitochondrial dyes and FRET biosensors to determine the mitochondrial energy potential: a complementary approach

Proposer/Coanimateur

Giulia Bertolin

Béatrice Béatrice durel

Abstract

Mitochondria are the energy production hub of the cell. Biochemical approaches allow to determine the quantity of energy produced by mitochondria (ATP) in cell populations. Fluorescence microscopy-based approaches to visualise ATP production on a single-cell basis are few and still require a thorough methodological development. This workshop aims at presenting the currently available ways of inferring the mitochondrial energy potential by quantitative microscopy, and at introducing the benefits of FRET biosensors to directly quantify ATP production. First, we will calculate the mitochondrial membrane potential (which is linked to ATP production) by commercial probes (JC-1, TMRM). Second, we will introduce our recently developed FRET biosensor of ATP5B, the protein devoted to ATP production in mitochondria. Changes in FRET efficiency will help to infer the conformation of ATP5B and to distinguish whether ATP is being produced (assembled), or hydrolysed (disassembled).

Keywords

Mitochondria, ATP production, membrane potential, JC-1, TMRM, FRET biosensors, ATP5B.

A26-Immunofluorescence et imagerie à feuille de lumière sur organes transparisés : quelles stratégies de mise au point adopter ?

Proposer/Coanimateur

Simon Lachambre

Sophie Abélanet

Abstract

Pour imager de gros échantillons en microscopie à feuille de lumière, la phase de préparation est cruciale afin d'optimiser le marquage et permettre d'obtenir une image tridimensionnelle complète. La mise au point de marquages immunologiques sur des organes entiers implique une toute autre approche en comparaison à des marquages fluorescents classiques. En effet nous ne réfléchissons plus à la même échelle, le temps investi et les quantités d'Ac nécessaires sont bien plus importants, des choix doivent être fait pour optimiser rapidement et efficacement la préparation de l'échantillon, mais par où commencer?

Le but de cet atelier est de présenter et identifier les étapes clefs et astuces pour optimiser les marquages sur un panel d'échantillons murins. Les acquisitions seront réalisées sur un ultramicroscope modulaire développé sur la plateforme MICA, adaptable à tous les microscopes du marché et piloté sous μ Manager. Nous présenterons la démarche complète d'acquisition.

Keywords

Light sheet, ultramicroscopie, immunomarquages in toto, clarification, μ Manager

A27-A practical guide to super-resolution techniques for imaging cellular structures within thin and thick biological samples

Proposer/Coanimateur

Philippe Bun

David Geny

Abstract

Fluorescence microscopy is a common tool for biological studies due to its ability to acquire data at high speed and target molecules of interest with specific labeling strategies. The development of super-resolution techniques enabled us to go beyond the diffraction-limited spatial resolution for visualizing delicate details of 3D subcellular structures. Three major approaches are commonly used to achieve resolution of tens to a hundred nanometers based on (1) patterned illumination (e.g. SIM), (2) stimulated emission depletion (e.g. STED) and (3) single-molecule localization imaging (e.g. STORM, PALM). Here we propose to assess the strengths and limitations of SIM, PALM/STORM or STED and the commercially available AiryScan method that potentially bridges the gap between conventional and super-resolution techniques. To illustrate our points, we focus on imaging filamentous and aggregate-like structures in biological samples such as neurons (thin) and brain section (thick) from mice.

Keywords

Fluorescence microscopy, Super-resolution imaging, spatial resolution, thin sample, thick sample, AiryScan

A28-Efficient plasma membrane staining using MemBright probes : from live dynamics to super-resolution

Proposer/Coanimateur

Lydia Danglot

Mayeul Collot

Abstract

The proper staining of the plasma membrane (PM) is critical in bioimaging as it delimits the cell surface. We developed MemBright: a family of efficient fluorescent PM probes that span their emission wavelengths from blue to near infra-red and offer homogeneous and selective PM staining with excellent contrast in imaging experiments due to their weak fluorescence in aqueous media and their important turn-on effect when anchored to the PM. These probes are compatible with live and fixed cells both in confocal and two-photon imaging and also successfully served in STED and STORM super resolution imaging. MemBright probes thus constitute a universal toolkit for biomembrane and neuroscience imaging with a variety of microscopy techniques. We propose to show how to handle these probes on live cells and with super-resolution imaging. To provide an overview of existing dyes, we will compare MemBright® staining with commercially available dyes like DiD, Fm dyes, mCling or WGA.

Keywords

Membrane probes, cell imaging, super-resolution, live cell dynamics

A30-Fast multicolor Super Resolution Live Cell imaging

Proposer/Coanimateur

Ludovic Ludovic.leconte

Estelle Anceaume

Abstract

The microscope is based on optically demodulated structured illumination technique with online processing. Combined with spinning confocal, it enables Super Resolution to be achieved at high speed and low photo-toxicity. Moreover, because of the nature of the light modulation, no line or pattern artifact is created.

Keywords

Super resolution, spinning, image processing

A31-Zebrafish embryonic morphogenesis and functional imaging with high speed and high resolution using light sheet and confocal microscopy

Proposer/Coanimateur

Elvire Guiot

Susanne Bolte

Abstract

In this workshop we study the complementary performance of lightsheet imaging (Leica TCS SP8 DLS) and high-resolution confocal imaging (confocal with deconvolution and Zeiss AiryScan technique) on live and fixed zebrafish embryos. Biological applications will include morphogenesis and functional imaging of the heart and 3D-morphology and high resolution imaging of the neuronal circuit wiring. We propose specific sample preparation protocols optimized for the two techniques. We will perform high-speed functional imaging on live samples, then switch to fixed samples, where we provide a 3D-overview of the biological structures in the whole embryo. Then we switch to confocal mode followed by deconvolution to show details of these biological structures at the subcellular level. We aim at showing the limits and advantages of each techniques and compare their performances and possibilities in terms of resolution, speed, sensitivity, imaging depth.

Keywords

Light-sheet microscopy, confocal microscopy, high speed imaging, 3D high resolution imaging, zebrafish morphogenesis, optical clearing or transparency improvement, neuronal connectivity

A32-Two-photon functional Imaging of murine and human intestinal Organoids

Proposer/Coanimateur

Sophie Allart

Daniele Daviaud

Abstract

The aim of this workshop is to observe 3D culture of organoids derived from tissue stem cells from human or mouse intestinal crypt or bladder. Our aim is to show and to discuss the interest of the two-photon excitation microscopy approach to unravel the functionality of such mini-organ and to show that this type of 3D culture fill the criteria to be a real organ in term of cellular architecture and functionality.

Keywords

intestinal Organoid, functionality, two-photon microscopy, comparison with lighsheet microscopy

A33-Imagerie STORM de spores en germination de la bactérie *B. subtilis* : préparation des échantillons, acquisition des données et reconstruction des images.

Proposer

Pascale Winckler

Abstract

L'atelier a pour but de montrer une expérience de STORM sur bactéries *B. subtilis* à différents stades de germination, en montrant les étapes de montage de l'échantillon, d'imagerie des molécules uniques et de reconstruction des images. Différents marquages seront réalisés, l'un des membranes, l'autre des peptidoglycanes de la paroi bactérienne. Cet atelier sera l'occasion de discuter des différents problèmes pratiques rencontrés lors de la mise en œuvre d'une expérience de STORM (bruit de fond, immobilisation des échantillons, artefacts de reconstruction...).

Keywords

STORM ; bactérie ; membrane ; paroi ; spore

A35- The functional characterization of new multi-specific monoclonal antibodies in immuno-oncology by multicolor PALM/STORM approach

Proposer/Coanimator

Al hassan Cassé

Nicolas Bodier

Abstract

A major breakthrough in cancer immunotherapy was the discovery of immune checkpoint proteins, which function to either inhibit or activate the immune system.

To understand the mechanism of action of such mAbs, many in vitro and in vivo studies were realized. Here, we propose a method to better understand receptor clustering on activated T cell. By a multiplexed immunofluorescence staining approach, we would like to determine whether or not some immune-checkpoint receptors

statistically clustered together. Single molecule microscopy method, will allow us to visualize and quantify cell receptors local density, diameter and area and correlate those parameters to functional data like cytokine release and cell activation level. We will also discuss how generated data can be analyzed and which program is better adapted to which study type

Monitoring the tropism of two or three protein receptors to cluster together by Voronoi or Bayesian methods is also key to determine the best multi-specific mAbs configuration design. The final goal is to quantify receptors density and clustering pattern, in order to select the more potent antibody in activating or inhibiting immune checkpoint.

Keywords

High resolution microscopy, photoactivation microscopy, receptor clustering, immune checkpoint, Voronoi and Bayesian methods

A36-dSTORM, un nouvel outil pour l'étude de la co-localisation à la mitochondrie

Proposer/Coanimateur

Béatrice Béatrice durel

Giulia Bertolin

Abstract

Cet atelier vise à présenter une approche de dSTORM optimisée pour l'analyse de la co-localisation protéique dans la mitochondrie. Durant l'atelier nous aborderons les différentes étapes qui vont de la préparation des échantillons à l'acquisition d'images et nous évoquerons une possible collaboration avec des informaticiens pour approfondir l'aspect «analyse d'images».

A travers un exemple pratique, nous analyserons la distribution de la protéine kinase AURKA et des marqueurs de la membrane mitochondriale externe (TOM22), ou de la matrice interne (PMPCB), ainsi que leur co-localisation. L'atelier répondra donc à un véritable besoin dans la communauté de la mitochondrie : pouvoir établir la co-localisation protéique avec des techniques de microscopie à haut potentiel résolutif par rapport à la microscopie confocale classique. A ce propos, on espère aussi fournir une approche alternative à la microscopie électronique, optimisée pour l'analyse de deux marqueurs fluorescents en simultané.

Keywords

STORM, Mitochondrie, préparation d'échantillon, co-localisation

A37-Lung organoids as an original model to explore cell migration during inflammation

Proposer/Coanimateur

Antonio Peixoto

Nino Iakobachvili

Abstract

The mechanisms of human diseases are frequently explored using cellular and animal models of different species. However, these findings are often difficult to generalize to human patients. Organoids are 3D cellular models capable of mimicking organ structure and function that hold the potential to investigate the mechanisms of human disease and the effects of treatments. For instance, lung organoids can be explored to study cell migration in response to a lung pathogen or an inflammatory insult, the impact of genetic deficiencies and the efficiency of current treatments. In this workshop, we plan to discuss the potential and limitations of lung organoid culture and manipulation as well as to provide a proof of principle of its use to study cell migration in response to a recombinant viral protein from Respiratory syncytial virus or TLR agonist.

Keywords

Lung organoids, cell migration, live imaging, macrophages, inflammation

A38-Mesure de la dynamique de protéines membranaires par photo-conversion et FRAP : Avantages et limites.

Proposer/Coanimateur

Chloé Guedj
Xavier Baudin

Abstract

Les protéines photoconvertibles sont des outils importants pour faire un suivi de cellules, d'organelles ou de protéines et pour des études de dynamiques, de structures intracellulaires et de protéines. C'est cette dernière application que nous développerons dans notre atelier. La photoconversion nous permettra de suivre la migration d'une protéine membranaire lors de la formation d'une synapse immunologique dans des lymphocytes T en présence de certains stimuli. Avec les images recueillies lors de l'atelier, nous utiliserons divers programmes d'analyse pour quantifier le déplacement de ces protéines dans différentes conditions. Nous aborderons les biais liés à ces techniques et les corrections.

L'atelier devrait permettre à chacun des participants d'évaluer l'intérêt et la faisabilité de protocoles utilisant les techniques de FRAP ou de photo-conversion, appliqués à leur propre problématique.

Keywords

Photoconversion, FRAP, dynamique.

A39-In vivo measurement of both pH and anions concentration using a ratiometric sensor in Arabidopsis plantlets

Proposer/Coanimateur

Laetitia Besse
Romain Le bars

Abstract

Calibration and use of the ClopH biosensor expressed in Arabidopsis thaliana plants, to measure the pH and the anions concentration (chlorides and nitrates).

Keywords

Biosensor, ratiometric measurements, pH, anions, plants, microfluidic

A40-Quantification of vesicular release by TIRF microscopy

Proposer/Coanimateur

Olivier Pascual
Céline Mallevat

Abstract

Astrocytes, a subtype of glial cell are important modulators of synaptic transmission by the release of transmitters such as glutamate ATP and D-serine. Among various release mechanisms, vesicular release is thought to be one of the most important for the modulation of synaptic transmission and plasticity. The aim of this workshop consist to show how to load fluorescent probe to the vesicular compartment , physiologically stimulate cells and monitor vesicular release by TIRF microscopy. Tracking and analysis of vesicles will be performed using Icy.

Keywords

vesicles, TIRF, image analysis, live staining, live cell imaging

A41-Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules

Proposer/Coanimator

Gaëlle Recher

Amaël Mombereau

Abstract

We are interested in the importance of mechanotransduction during cell and tissue growth in confined environment.

To address these questions, we have developed in the lab the "Cellular Capsule Technology", which consists in encapsulating cells within the liquid core of a hollow alginate capsule.

In this workshop we will image fluorescently labelled cells grown in an alginate shell in which we would have included fluorescent beads.

This imaging will be performed with a space-resolved microscope and will provide us 3D+time movies.

The joint analysis of both cell movements and beads displacement will provide insights about how cells sense and deform their surrounding environment, like they would do in physiological (developmental morphogenesis) or pathological context (tumourisation).

Keywords

mechanotransduction, organoids, force imaging, alginate hollow capsules

A42-Nuclear Pore Complex : the performance tool for super-resolution, from sample preparation to the super-resolved image

Proposer/Coanimator

Orestis Faklaris

Julien Sellés

Abstract

The performance evaluation of a super-resolution microscope is a challenging but also necessary task. The aim of this workshop is to use a biological sample, the nuclear pore complex, as a performance tool for super-resolution microscopy.

We will show the whole pipeline of the experiment, from sample preparation, labelling, image acquisition until the image formation and the metrology measurement.

We will raise aspects like the sample preparation (like fixation and permeabilisation methods for biological samples), the fluorophore labeling density, or the acquisition parameters (like the time or laser powers, ..) and the filtering parameters to obtain the final super-resolved image. We will present an analysis method based on autocorrelation calculations to determine the mean diameter of the NPC.

After the analysis, a discussion with the participants will help realise how closely related is the result to the biological reference sample and to the acquisition.

Keywords

Nuclear pore complex, Xenopus oocyte, nuclear membrane, super-resolution microscope performance, artefacts, super-resolution microscopy

A43-Adaptive confocal microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy

Proposer/Coanimateur

Antoine Delon

Alexei Grichine

Abstract

In confocal microscopy the average number of emitters, their types, mobilities and interactions may be unraveled using Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and associated quantitative techniques. However, the implementation of FCS for measurements in tissues is extremely difficult because it is particularly sensitive to optical aberrations. Indeed, most aberrations widen and deform the confocal observation volume and subsequently increase the average number of molecules and the diffusion time, while drastically reducing the fluorescence count rate per molecule (also called brightness). Correction of aberrations can be done with Adaptive Optics (AO). The goal of this workshop is to demonstrate the improvement of quality of FCS and of in-depth imaging using the AO prototype, jointly developed by the Laboratory of Physics (LIPhy) and an imaging platform (MicroCell, IAB). This development is based on the integration of the AO prototype in a multi-functional confocal microscope.

Keywords

FCS, Adaptive Optics, Confocal, In depth imaging, quantitative microscopy

A44-DIVA: Quantify Your Microscopy Images Using Virtual Reality

Proposer/Coanimateur

Mohamed El beheiry

Sébastien Doutreligne

Abstract

Today microscopy is used to volumetrically image a diversity of living systems. A consistent challenge faced by researchers in the domain is the interpretation of the images they acquire and inferring useful information from these images. Furthermore, in most cases the analysis of microscopy images cannot be done in a fully automated fashion and requires active user intervention. There is thus a need for methods to intuitively represent microscopy images for users. Immersive display technologies such as virtual reality (VR) place users inside detailed computer-generated environments. Adapted to microscopy images, VR allows users to manipulate their imaged specimens as they would real-life objects, permitting easy spatial understanding of complex morphologies and dynamics. In this interactive workshop, users will be introduced to our VR visualisation tools. A short introduction will be followed by interactive sessions where users are invited to view their own 3D microscopy images in VR.

Keywords

Virtual Reality, 3D Microscopy, Image Treatment, Data Visualization

A46-The fastFLIM microscope: how to combine FLIM with speed of acquisition

Proposer/Coanimateur

Marc Tramier

Gilles Le marchand

Abstract

FLIM is a powerful method for quantitative fluorescence microscopy unmixing concentration and fluorescence quantum yield of the probe in imaging mode. In particular, FRET by FLIM permits the quantification of protein-protein interactions even when the quantity of donor and acceptor cannot be controlled, as in living cells. But the main limitation of FLIM is generally the speed of acquisition which is not adequate to follow localized transient and dynamic molecular processes. By combining wide field illumination of pulsed laser, time gated camera and online mean lifetime image calculation, we have developed a fastFLIM lab prototype (which was first presented at mifobio 2012). Here by working in the side of instrument controls and software development using InScopper in collaboration with Combo Microtech, we will present new capabilities of the fastFLIM approach by using example of FRET-FLIM acquisition in living cells for spatiotemporal regulation of protein-protein interactions.

Keywords

FLIM, FRET, new microscopy system, speed of acquisition

A47-Automated drug inhibitor screening of Aurora A kinase activity based on a FRET biosensor

Proposer/Coanimateur

Florian Sizaire

Gilles Le marchand

Abstract

Overexpression of AURKA is a major hallmark of some epithelial cancers. So far, no inhibitor of this oncogene has been FDA-approved and therefore it is of great importance to identify new molecules. We have developed a FRET biosensor for Aurka consisting of the whole kinase flanking by two fluorophores, GFP and mCherry. The change of conformation of Aurka when activated by the phosphorylation of T288 will bring closer GFP and mCherry allowing FRET and this phenomenon leads to a decrease of donor fluorescence lifetime. We have established a fast-FLIM microscope prototype allowing us to take rapidly fluorescence lifetime images in living cell expressing the biosensor at endogenous levels.

By combining these methods, we are able to establish a new methodology to perform a drug screening targeting the activity of Aurka in order to find new therapeutics molecules against Aurka in cancer cells.

Keywords

Screening Kinase activity FRET Inhibitors

A48-La microscopie à feuillet de lumière pour l'étude en profondeur des organoïdes : limites et optimisation.

Proposer/Coanimateur

Nicolas Goudin
Corinne Lebreton

Abstract

Le sujet biologique porte sur l'étude du rôle de l'épithélium intestinal, de l'endocytose et de l'apprêtage des antigènes alimentaires et leurs implications sur la réponse immunitaire dans la maladie cœliaque. Cette étude se fait dans les organoïdes intestinaux murin afin d'être dans des conditions plus proches du in vivo.

Nous avons choisi la microscopie à feuillet de lumière pour sa faible phototoxicité, sa possibilité de tourner l'échantillon, sa rapidité d'acquisition et une grande profondeur d'observation.

Lors de cet atelier nous observerons des organoïdes intestinaux murins fixés : toujours inclus dans le matrigel, sans matrigel, transparisés et présenterons les limites de ces conditions d'observation.

Nous décrivons autour de ce sujet biologique : la reconstruction d'organoïdes intestinaux murins, la technique du clearing et de la feuille de lumière et de leur optimisation.

Nous la comparerons au multiphoton autre technique d'observation en profondeur (cf. l'atelier de Sophie Allart). Les objectifs de cet atelier sont :

- de présenter aux participants la reconstruction d'organoïdes intestinaux murins
- de les faire réfléchir sur les limites et les optimisations possible pour l'observation en microscopie à feuille de lumière
- et de leur permettre de faire le bon choix avec l'autre technique d'observation en profondeur : la microscopie biphotonique

Keywords

lightsheet, clearing, organoïdes

A49-High throughput screening of cell adhesion and spreading on biomimetic coatings of controlled stiffness and bioactivity

Proposer/Coanimateur

Catherine Picart
Paul Machillot

Abstract

The objective of this workshop is to introduce the participants to cell culture on other surfaces than those traditionally used in cell biology (glass, polystyrene), especially to use biomimetic coatings of controlled stiffness and bioactivity. Made of natural biopolymers, these coatings will be deposited using a robotic arm at the bottom of the microwells. This will enable to study and quantify how cells adhere and spread on the different biomimetic films of controlled stiffness and bioactivity (growth factors, chemokines...). We will use a confocal microscope to acquire images- in multiple wells and at multiple positions in each single well- of the biomimetic films and of adherent cells. Automated image acquisition and analyses will enable to obtain relevant parameters (film thickness, number of adherent cells and cell spreading area).

Keywords

Automated image acquisition and analysis, high throughput, surface modification, biomimetic coatings, stiffness, bioactivity, cell adhesion,

Techniques: confocal microscopy, Zen software, Image J

A50-Fast and sensitive 4D imaging using Multifocus microscopy

Proposer

Bassam Bassam hajj

Abstract

Many challenges raise up when imaging cell organelles in high resolution. Optical microscopy must take into consideration the 3D extent and dynamics of cellular structures. More specifically, fast 3D single molecule imaging remains challenging over relevant depths for cellular processes. Recently we have shown that Multifocus Microscopy (MFM) allows sensitive and fast volumetric imaging without any mechanical movement.

By inserting several diffractive elements, MFM acquires the images of multiple planes in parallel on a single camera. The volumetric acquisition achieves unprecedented acquisition times thanks to the lack of mechanical movement.

MFM capabilities will be shown by fast 3D imaging. Single molecules will be imaged over 4 μ m depths in PALM/STORM mode. Participants are welcome to bring their samples for fast testing.

Keywords

Multifocus microscopy, 3D microscopy, single molecule



A51-Mitochondrial Ca²⁺ and ATP FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM during hypoxia-reoxygenation

Proposer/Coanimateur

Yves Gouriou

Gabriel Bidaux

Abstract

Monitoring dynamic alterations in mitochondrial calcium and ATP homeostasis simultaneously during ischemia using multiplex FRET biosensors provides an opportunity to study the sequence of events occurring upon hypoxia. Based on the strategy developed by the group of M. Tramier (Déméautis et al., Scientific Reports, 2017), we plan to use a 440 single excitation wavelength of the two donor mTFP1 (mTFP1) and LSSmOrange and a dual color FLIM system to simultaneously measure two genetically encoded FRET biosensors. To avoid any spectral bleed through we use the non-fluorescent acceptor ShadowG for mTQ2 and red-shifted mKate2 for LSSmOrange. The original biosensors used for this strategy is 4mtD3cpv for calcium (Palmer et al Chem Biol. 2006) and Ateam mito for ATP (Imamura H., PNAS. 2009). The aim is to detect fluorescence lifetime images of two donors in the same cellular localization by using FRET biosensors in H9C2-sv40 rat cardiomyoblast cell line.

Keywords

FLIM, FRET, mTFP1, mTQ, mVenus, LSSmOrange, mKate

A52-Contrôle optogénétique de voies de signalisation et de la morphologie cellulaire.

Proposer/Coanimateur

Damien Ramel

Anne Mazars

Abstract

Au sein des cellules, les voies de transduction du signal sont extrêmement dynamiques et contrôlées finement spatio-temporellement. Même si les techniques classiques d'étude de ces voies (inhibiteurs, RNAi,) ont permis des avancées majeures, l'aspect spatio-temporel de leur régulation est très souvent impossible à résoudre avec ces techniques. Ainsi, l'émergence des techniques d'optogénétique, basées sur l'utilisation de sondes codées génétiquement et manipulables par la lumière, permet de révolutionner l'approche de l'étude des voies de signalisation. En effet, la lumière peut être utilisée pour activer, désactiver, séquestrer ou relocaliser une enzyme avec une précision spatiale et temporelle jamais égalée à ce jour avec un minimum de cytotoxicité. Cette stratégie a été adaptée avec succès à un grand nombre de protéines de la signalisation telles que les RhoGTPases, les MAPK ou la PI3K alpha et peut être étendue à un grand nombre d'autres cibles.

Dans cet atelier, nous utiliserons le module Cry2/CIBN pour induire le recrutement de la PI3K à la membrane plasmique des cellules par un traitement aux UV. Nous suivrons ensuite le recrutement à la membrane de la PI3K et ses effets sur la morphologie cellulaire en microscopie confocale en temps réel. La reconstruction des films via ImageJ nous permettra ensuite de visualiser l'impact de la photomanipulation de la PI3K sur le cytosquelette d'active et la morphologie cellulaire. Nous réaliserons la même approche avec le système LARIAT, qui permet au contraire, de séquestrer des protéines dans le cytoplasme.

Keywords

optogenetic, multiple wavelenght, actin cytoskeleton, membrane protrusions

A53-3D high and super-resolution imaging of biological samples using a single-objective Selective Plane Illumination Microscope.

Proposer/Coanimator

Rémi Galland

Corey Butler

Abstract

The goal of the workshop is to achieve Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) in depth and present how the soSPIM technology can help addressing this challenge.

In addition, we plan to image for the first time at the nanometre scale, the entire network of mitochondria in 3D in a whole cell in collaboration with Arnaud Chevrollier (MitoLab - Angers) who aims at better understand the relation between mitochondria network structure and function.

We will first explain the unique architecture of the soSPIM system and how it allows imaging various kinds of samples ranging from whole organisms such as drosophila embryos or *C. Elegans*, down to the single cell level with low photobleaching and radiation damages, on a conventional inverted microscope.

We will then focus on the challenge to perform SMLM tens of microns above a coverslip and how soSPIM can represent an efficient solution to image single molecules in depth simply by using high NA objectives.

We will demonstrate how the combination between soSPIM and Adaptive Optics technology allows performing aberration-free 3D SMLM at few tens of μm above the coverslip.

Finally, we will discuss the solutions to implement real-time drift correction with the goal to achieve 3D DNA-PAINT experiments.

These technical developments will ultimately be used to image the Mitochondria network in the whole volume of a cell at the nanometre scale. Tubular mitochondria network imaging represents an important challenge as Mitochondria diameter is below the diffraction limit but the entire network can span the entire volume of cells with very dense areas. We therefore plan to use the unique optical sectioning capability of the soSPIM to image this network in 3D in a whole cell. This work will be performed in collaboration with Arnaud Chevrollier whose workshop aims to image the mitochondrial DNA organization by two-color STORM imaging with TIRF illumination which is limited in term of penetration

Keywords

Selective Plane Illumination Microscopy, 3D imaging, Single Molecule Localisation Microscopy, Super-resolution, Multi-scale imaging

A54-AFM on microbial surfaces : from imaging to physico-chemical properties

Proposer/Coanimator

Audrey Beaussart

Isabelle Bihannic

Abstract

Cell surface does not only serve to delimit compartments but it also plays pivotal roles in cellular adhesion, signalling, mechanosensing etc. To study these properties, atomic force microscopy (AFM) is a particularly adapted tool as it allows visualizing structures at the surfaces of microbes while keeping them alive. In this practical, we will observe and qualify fine structures present at the surface of living organisms with a few nanometers resolution using the latest developments in imaging techniques. AFM is also a functional microscopy technique to probe the physico-chemical properties of biosurfaces at the nanoscale. AFM tips are then functionalized i) with ligands to map the distribution of the corresponding receptors at the cell surface or ii) with chemical functions to decipher specific physico-chemical properties of the microbes (bacteria or yeast).

In a first step, different techniques will be shown to immobilize microbes (adhesion via electrostatic interactions on charges surfaces, by mechanical trapping in porous membranes)

Images of the living cells will be acquired in liquid conditions, comparison will be done between contact mode and peak force tapping imaging. Participants will have the possibility to try to acquire their own images by choosing the mode and varying the parameters to apprehend the optimal imaging conditions.

Here, we will sense how to assess the hydrophobic properties of microbial surfaces by force spectroscopy using hydrophobic functionalized tips. Mapping of hydrophobic properties of the microbial surface will be acquired in force volume mode using hydrophobic tips. Participants will be trained to correctly mount the set-up, align the laser, and replace bare tips by functionalized tips upon correct identification of the microorganism location on the sample.

Data treatment will be explained (and compared to previous data obtained in the lab using tips functionalized with eg. Abs).

Keywords

AFM, chemical force microscopy, microorganisms, force spectroscopy, living cell

A55-3D tomography imaging by holotomography

Proposer/Coanimator

Isabelle Lebihannic

Audrey Beaussart

Abstract

The goal of this practical is to show the capacities of imaging by holotomography, a technique that allows visualizing structures and cells in 3D with a spatial resolution equivalent to those of optical microscopes, without preparation and fluorescence labelling. Real time measurements are allowed on living cells in physiological conditions.

The principle is based on the fact that the contrast is generated by the refractive index differences of the various elements of cells or biological assemblies. The reconstructed image is a 3D matrix of refractive indexes, that can be post-treated (e.g. segmentation) to retrieve quantitative information. Holotomography is a label-free imaging technique, therefore avoiding phototoxicity problems and bleaching.

The demonstration will be carried out on bacterial biofilms, whose structures are modulated by the surface appendages decorating the microorganisms (e.g. fimbriae, flagella). Nanoparticles (NPs) will be added to the bacteria cultures prior to biofilm formation. The aim is to demonstrate the easiness of use on thick samples in their natural environment and the acquisition rapidity (a 3D image is taken and reconstructed in less than a few seconds). This rapidity allows time resolved measurements, but also to acquire large sets of data for various physico-chemical conditions (e.g. NPs/bacteria ratio, NPs surface charge, size...).

Attention will be paid to data processing, quantitative analysis and metrics that can be derived from this technique. For biofilms, these metrics concern the characterization of bacteria at the individual cell level (mean volume, aspect ratio...) and at the population scale (number of bacteria, mean distance between cells, spatial distribution function....). Bacteria motility and trajectories may be followed thanks to time resolved measurements.

Keywords

holotomography, 3D imaging, refractive index, bacterial biofilms



A56-Combined AFM-optical-fluorescence microscopy to study microbial adhesion and host-pathogen interaction

Proposer/Coanimateur

Sofiane El-kirat-chatel

Audrey Beaussart

Abstract

AFM allows to image and sense forces at the surface of cells with nanometer and piconewton resolutions. Now set-ups are adapted to correlative analysis with optical and fluorescence microscopy in physiological conditions and this is particularly relevant for biological samples.

The general principle of AFM and data treatment will be introduced and participants will be taught to set-up an experiment and adjust the acquisition parameters. The workshop is open to biologists, chemists and physicists.

We will acquire AFM - fluorescence images of live or fixed cells (pneumocytes, macrophages...) in order to demonstrate how this technique allows to correlate intracellular organization to topographical surface features.

As AFM can also be used to measure molecular and cellular interactions, the single cell force spectroscopy mode will be presented to show how the AFM cantilever can be used to probe the interaction of single microbial cells towards abiotic or biotic surfaces. The procedure needed to grab a single cell on an AFM cantilever will be shown and participants will be able to practice.

For the imaging part, participants are welcome to bring fixed cells adhered on a support, stained with fluorescent dyes and kept in buffer (cells have to be adherent or settled on a glass slide, i.e. coverslip or glass bottomed Petri dish of 45 mm maximum diameter).

Keywords

AFM, fluorescence, correlative microscopy, single cell force spectroscopy, cell adhesion

A57-Pilotages de périphériques: Atelier de conception d'une automatisation/contrôle/Pilotage/surveillance d'un aquarium d'élevage d'animalerie de recherche

Proposer/Coanimateur

Christian Rouviere

Jerome Mutterer

Abstract

Description de l'environnement : De nombreuses plateformes/services d'animalerie sont présents dans nos institutions. Dans certain cas la mise en place de dispositifs de surveillances automatiques pourraient être implémentés afin d'une part de soulager le personnel responsable des élevages et d'autre part augmenter la sécurité de l'intégrité des collections vivantes et précieuses.

Le but de l'atelier repose surtout sur l'apprentissage du pilotage de capteurs positionneurs et contrôleurs de l'environnement, le cas pratique se fera, sur un dispositif portable : un petit aquarium dédié à la surveillance d'animaux aquatiques transgéniques (échantillons souvent très précieux) où il est très important de réguler, alerter, et agir de manière automatique en fonction d'un dérèglement des paramètres physiques ou chimiques de l'environnement. Les régulations mises en jeux peuvent tout aussi bien être mises en place autour d'un microscope ou d'un montage particulier pour adapter

l'échantillon à son observation sous loupe binoculaires ou microscope. Ces réglations peuvent tout aussi bien être adaptées à un montage particulier pour l'observation d'un échantillon sur une loupe binoculaire ou un microscope.

Cadre de l'application pratique de cet atelier de type "FabLab".

Description du dispositif à assembler : une réserve d'eau, un bac de filtration et l'aquarium. Des capteurs ou dispositifs commandés : webcam, électrovanne, capteur de niveau, capteurs de températures, hygrométrie et débitmètre.

Une caméra sera aussi pilotée en tant que capteur. Elle sera par des moyens de traitement et bien sûr d'analyse d'image intégrés au dispositif de surveillance. Nous montrerons comment à partir d'un simple capteur vidéo de faible cout, il est possible d'analyser un milieu vivant confiné.

Nous utiliserons pour cela des langages informatiques de pilotage, de traitement d'images et des drivers développés par des membres du groupe de travail PPP du réseau mfm de la MI-CNRS

Keywords

Automatisation, contrôle, pilotage, surveillance, actionneurs, capteurs

A58-Imagerie confocale spectrale : caractérisation de l'autofluorescence sur tissus

Proposer/Coanimateur

Sébastien Mailfert

Mathieu Fallet

Abstract

Cet atelier porte sur l'autofluorescence qui peut être utilisée comme source d'information alors qu'elle est considérée généralement comme nuisible voire source d'artefacts. Nous aborderons dans cet atelier les aspects techniques de l'imagerie confocale spectrale et sa mise en œuvre pratique.

L'idée est ici d'identifier des signatures spectrales physico-chimiques que l'on peut relier avec une fonctionnalité biologique (types cellulaires, myéline, flavines, lipofuscine, etc.). Nous ne rentrerons pas dans les détails des méthodes de décomposition spectrale et nous focaliserons sur les échantillons biologiques (coupes de tissus murins).

A l'issue de cet atelier, les participants seront conscients du potentiel de l'imagerie spectrale pour l'immunofluorescence et l'imagerie de l'autofluorescence. Nous ne formerons pas les participants sur un système et leur donnerons plutôt des clés pour exploiter l'autofluorescence et l'imagerie spectrale dans leurs laboratoires et sur leurs thématiques biologiques. Nous donnerons des pistes pour choisir des sondes fluorescentes compatibles avec l'autofluorescence.

Après avoir proposé en 2016 un atelier d'imagerie spectrale 10 couleurs, nous avons depuis publié une note d'application sur ce thème et développons des projets d'imagerie spectrale au sein de notre institut (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy).

Nous alternerons entre cours théorique et manipulation pratique où les participants feront eux-mêmes l'acquisition des images. Si cela est possible, nous essayerons de comparer les résultats obtenus avec différents ateliers sur le même types d'échantillons non marqués.

Keywords

Imagerie confocale spectrale multi-couleurs – Autofluorescence – Propriété physico-chimiques – Immunologie

A59-L'imagerie de super-résolution tissulaire : du mythe à la réalité de la paillasse ! De l'optimisation de la fixation et du marquage aux modalités d'imagerie et de reconstruction 3D

Proposer/Coanimator

Joana Ferreira

Pierre Bon

Abstract

L'imagerie de super-résolution (SR) par molécules uniques ainsi que le single particle tracking (SPT) présentent aujourd'hui de plus en plus d'applications pour quantifier la distribution de protéines endogènes. Cependant, la nécessité de passer à des échantillons épais tels que des organoïdes ou des tissus ex-vivo tout en conservant la haute résolution se fait de plus en plus importante. La préparation et l'observation de ces échantillons épais en microscopie de molécules uniques restent une problématique complexe. Dans ce TP nous illustrerons tant théoriquement qu'expérimentalement différentes techniques de fixations, de marquage, mais également de clignotement et d'imagerie adaptés à la SR pour les tissus épais. Nous montrerons notamment l'impact sur l'interprétation des résultats de chacune des étapes. Ce TP vise à la fois les personnes intéressées par sauter la barrière de la cellule adhérente et celles présentant déjà un besoin en imagerie tissulaire à très haute résolution.

Keywords

Imagerie de super-résolution tissulaire, Single particle tracking, reconstruction 3D.

A60-Analysis of mitochondrial connectivity in vivo in the drosophila nervous system.

Proposer/Coanimator

Xavier Pinson

Thomas Rival

Abstract

Mitochondria continuously move, fuse and divide. These properties are essential for proper localization, function and degradation of mitochondria. Consistently, mutations in mitochondrial transport, fission and fusion genes cause human neurological disorders. One important role of mitochondrial dynamics is to homogenize mitochondrial activity by allowing mitochondrial molecules to diffuse throughout the mitochondrial network. Indeed, when fusion connects mitochondria together, this rapidly results in a mixing of their content. Methods to assess the connectivity of mitochondria are now becoming available in in vivo systems and allow to better link mitochondrial dynamics to physiological functions. In this workshop, we propose to analyze mitochondria connectivity in live motor-neurons of drosophila mutant strains by live confocal microscopy using a genetically encoded mitochondrial targeted photo-convertible probe.

Keywords

Mitochondria ; mitochondrial dynamics ; mitochondrial fusion ; photo-conversion ; live confocal imaging

A62-Mesure de l'activité cérébrale chez la drosophile en réponse à un stimulus olfactif, ou comment augmenter la facilitation sociale de la mémoire

Proposer/Coanimateur

Brice Ronsin
Aurélie Muria

Abstract

Il a été mis en évidence, chez la drosophile, qu'une mémoire olfactive aversive (odeur associée à des chocs électriques) est facilitée par le contexte social : anesthesia-resistant memory. En effet, les mouches testées en groupe montrent une mémoire augmentée par rapport à celles testées individuellement. Nous avons montré au laboratoire que ce phénomène est dépendant de l'activation d'une paire de neurones sérotoninergiques : les neurones DPM.

Mais comment se comportent exactement ces neurones en réponse aux odeurs ?

L'imagerie calcique permet de visualiser l'activité neuronale en temps réel. Un robot olfactif, piloté sous arduino et contrôlé par l'acquisition du microscope confocal, permet de présenter les odeurs à la drosophile vivante sous le microscope. Le but du workshop serait donc de monter ce dispositif permettant d'enregistrer les signaux calciques des neurones DPM en réponse aux différentes odeurs conditionnées

Keywords

Drosophiles vivantes, mémoire olfactive, comportement, arduino, confocal, imagerie calcique, neurones sérotoninergiques, Dorsal Paired Median

A67-La culture cellulaire en 3D : sphéroïdes, gels... pour une meilleure compréhension de la physiologie des cellules

Proposer

Alessandro Furlan

Abstract

La culture de cellules de mammifères se fait traditionnellement en boîtes de Petri sur des supports de plastique ou verre traités pour favoriser l'adhérence des cellules. Les cellules sont ainsi libres de proliférer et de migrer sur ces supports 2D.

Il est toutefois devenu évident au cours des dernières années que ces modèles 2D entraînaient une modification de la signalisation et du comportement des cellules par rapport à leur physiologie dans leur environnement natif en 3D.

Des modèles de culture 3D ont donc été développés pour essayer de combler cet écart en reproduisant des conditions d'environnement plus physiologique.

L'objectif de cet atelier est de discuter de l'intérêt de ces modèles pour des questions de physiologie cellulaire, et de présenter concrètement les solutions techniques pour préparer des sphéroïdes en suspension et acquérir les structures 3D au microscope.

Cet atelier sera réalisé en pièce de culture cellulaire et les cellules seront marquées et ensemencées par les participants.

Keywords

3D, sphéroïdes, matrice extracellulaire, agencement cellulaire, physiologie

A70-Correlative Microscopies: Image and Volume Registration

Proposer/Coanimateur

Perrine Paul-gilloteaux

Xavier Heiligenstein

Abstract

The objective of this workshop is to provide participants with solutions for the last part of a correlative microscopy workflow, e.g. light microscopy images and electron microscopy data fusion. Several examples will be demonstrated: Clathrin coat formation (Avinoam 2015), plant cells (Marion 2017), synthetic biology (Lee 2018)...

The first part of the workshop will aim at introducing shortly theoretical keys about image and volume registration (correlation) and the specificities of correlative microscopies registration, in particular CLEM.

The second part will consist in practical on correlative light electron microscopy in order to demonstrate the use of user-friendly open source tools, ec-CLEM under ICY (Paul-Gilloteaux Heiligenstein 2017), to perform multi-scale and multi-modal image registration in a reproducible way and with a measurable accuracy. Practical advice in the design of the correlative microscopy full workflow will also be given, in order to facilitate and optimize the correlation.

Participants would be able to bring their own images or to use the ones from related workshops in addition to the examples provided.

References:

Briggs et al Science 2015 Endocytic sites mature by continuous bending and remodeling of the clathrin coat.

Paul-Gilloteaux, Heiligenstein et al Nature Methods 2017 Ec-Clem

Marion et al 2017 Journal of Structural Biology Optimizing CLEM protocols for plants cells: GMA embedding and cryosections as alternatives for preservation of GFP fluorescence in Arabidopsis roots

Lee et al 2018 Chemical Biology Engineered synthetic scaffolds for organizing proteins within the bacterial cytoplasm

Keywords

bio image informatics, data fusion, image registration, multimodal imaging, correlative microscopies

A71-Real-time intracellular quantum dot to fluorescent protein FRET.

Proposer

Marcelina Cardoso dos santos

Abstract

Luminescent quantum dots (QD) are nanoscale probes whose photophysical properties are excellent for a real-time sensing of intracellular, biomolecular interactions. The major advantages are high quantum yield, large "effective" Stoke shift and resistance to photobleaching. Moreover, their broad absorption and narrow emission spectra make them excellent donors for Förster resonance energy transfer (FRET). We use QD donor-mCherry acceptor platform that is engineered to self-assemble in situ wherein the fluorescent protein (FP) acceptor is expressed via transient transfection and the QD donor is microinjected into the cell. Microinjected QD are designed with a special capping ligand self-assemble to mCherry present in cytosol via a terminal poly-histidine epitope on the FP acceptor. During this workshop we would like to present how use QD-to-FP FRET and the utility as intracellular FRET-based sensing platforms for detection of biomolecular interactions.

Keywords

FRET, cell biosensing, Quantum Dots, mCherry

A72-A Versatile 3D Superresolution Speckle imaging for a wide range of biological applications : from bacteria to tissue.

Proposer/Coanimator

Thomas Mangeat

Jerome Idier

Abstract

In this workshop, we will present a new versatile and Open Source superresolved microscopy methods based on dynamic speckle for a wide range of biological applications. We will demonstrate the ability to gaining confidence on living intracellular cell nanoscopy on many sensitive and complex biological situations. Our system is expected to exhibit a resolution close to 100 nm transversally and 250 nm axially with a much greater ease of use. We will explain how to build the system and the generation of several speckle illumination patterns will be explained with simple binary phase SLM(a frame rate around 2ms). The low toxicity allows superresolved critical biological function study like mitosis, cell migration or subcellular force production during the morphogenesis process in thick tissue. Several Algorithm strategies will be explained, from simplest second central moment based to blind-SIM and sparse based methods. These new methods combine structured illumination paradigm with fluctuation methods. The methods reduce the number of image need in bayesian or SOFI microscopy, and present a very robust compromise for living superresolved imaging in tissue. These key points will be explainement experimentally ad theoretically during the workshop.

During the whorkshop we will focus in the actin-myosin network, a generator of forces allowing cell shape changes and tissue remodeling during Drosophila morphogenesis. A robust comparaisn with ISM will be discussed during the workshop in conclusion. The workshop is open to test many kind of biological sample.

In the conclusion of the workshop, we will discussed on a very low cost setup. The goal is to built a simple system for a wide range of biological microscope. the problem of temporal resolution will be comment and a solution for 100ms temporal resolution will be exposed.

Keywords

supperresolution, Fast SIM, dynamic Speckle, inverse problem, versatile, live imaging, 3D imaging, Variance and Covariance, Tissu



A74-Ex vivo imaging of T cells in vibratome tumor slices using confocal microscopy

Proposer/Coanimateur

Emmanuel Donnadieu

Sarah Barrin

Abstract

Ex vivo tissue slices is a promising technique, as it preserves the original tissue microenvironment. Over the years, we have set up this approach to track the distribution and dynamics of T lymphocytes in various tissues (1, 2). In this workshop, we propose to analyze the localization and motile behavior of fluorescent labeled T cells plated on top of tumor slice. The different steps consist in loading T cells with a fluorescent dye; plating T cells onto tumor slices; staining slices with fluorescent antibodies against tumor cells and stromal components; monitoring the distribution and dynamics of T cells within tumor slices. Finally, we will discuss the advantages and limitations of this approach. This approach will be useful to address the following questions:

- In which parts of the tumor tissue T cells localize? The distribution of plated and endogenous T cells will be assessed in relation with tumor cells and other cells.

- What is the motility of the plated T cells in a preserved tumor environment? Time-lapse experiments will be performed on a confocal microscope.

1. Peranzoni, E. et al. Ex Vivo Imaging of Resident CD8 T Lymphocytes in Human Lung Tumor Slices Using Confocal Microscopy. *J. Vis. Exp.* 1–7 (2017). doi:10.3791/55709

2. Salmon, H. et al. Ex vivo imaging of T cells in murine lymph node slices with widefield and confocal microscopes. *J. Vis. Exp.* e3054 (2011). doi:10.3791/3054

Keywords

Tissue slice; Confocal microscopy; cell motility; T lymphocytes

A75-Giving access to machine learning for the quantitative analysis of big histological images through the deployment of virtual machines.

Proposer/Coanimateur

Perrine Paul-gilloteaux

Stéphanie Blandin

Abstract

Machine learning approaches have become very popular in the biomedical image processing community. However in biology, the end-user has very little access to these techniques. In particular, research studies or clinical studies based on the identification of phenotypes from colored tissue section imaging still face the problem of data analysis. The size of these images, stored in a pyramidal format, easily reaches 80k pixels by 80k pixels and are not managed by personal computers limited in RAM. Moreover, the choice of the analysis in order to search for the phenotypic events of interest is very dependent on the problem and the type of coloration.

For this reason, the availability of the algorithms of machine learning adapted via a virtual machine seems all indicated. It allows the user via a simple and familiar user interface to access computational resources. During the workshop, we will give access to this virtual machine and how it could be deployed elsewhere.

Keywords

histologie, machine virtuelle, machine learning, deconvolution couleur, analyse d'image, big data

A76-Multiple protein photopatterning and associated cellular traction forces determination on soft polyacrylamide gels

Proposer

Laëtitia Kurzawa

Abstract

Controlling cells microenvironment by patterning has proven useful to understand cytoskeletal network self-organization and its importance in cell mechanics. Our workshop will provide the opportunity of examining simultaneously traction forces exerted by epithelial cells on a polyacrylamide gel coated with different subsets of adhesive proteins. We will indeed take advantage of Primo photopatterning system to design custom micropatterns and coat them sequentially with adhesive proteins of the extracellular matrix known to trigger different signaling pathways. Following their transfer on polyacrylamide gels, we will examine simultaneously the contractility of cells originating from the same population but spread on different adhesive proteins. We will particularly emphasize the technical and troubleshooting aspects of controlling both the cellular microenvironment by micropatterning and their chemistry. Scientific outcomes of the traction force measurements will also be discussed.

Keywords

Multiple photopatterning ; Traction force microscopy; Adhesion proteins ; cell mechanics;

A77- Mono VS Two photon comparison on a large clarified embryo: the catshark *S. canicula* model

Proposer/Coanimator

Ronan Lagadec

David Pecqueur

Abstract

The study of non conventional models has become crucial to understand how developmental mechanisms evolved and diversified across animals. Our laboratory is interesting in this general issue and aims at understanding the cellular basis for the spectacular changes in early embryonic architecture, which take place in vertebrates, concomitantly with the increase in egg yolk content. To address this question, we focus on an elasmobranch, the catshark *Scyliorhinus canicula*, which like amniotes develops as a broad, large blastoderm from telolecithal eggs. Our general strategy relies on 3D and 4D imaging of the pre-gastrulation embryo and the development of a genome-wide molecular atlas. By its size and slow development, the catshark has the potential to yield descriptions of cell behaviours with an excellent temporal and spatial resolution. However, these characteristics, as well as the embryo inaccessibility and limited transparency also raise novel challenges in imaging

Keywords

1 vs 2-photon microscopy; Catshark; Lamprey; Evo-Devo; tissue clearing; 3D imaging

A78-An integrated combination of atomic-force microscopy and STED microscopy for nanoscopic imaging and mechanical characterizations of biological samples, such as viruses.

Proposer

Delphine Muriaux

Abstract

Whereas fluorescence microscopy has become essential for cell biology studies, the diffraction barrier has for a long time set a limit for observation of structural dynamics of biological assemblies in vitro and in vivo. Atomic Force Microscopy (AFM) partly bridges that spatial resolution gap and brings force application/measurement capabilities for investigation of mechanotransductive processes in biological systems - the known number of which having largely increased in recent years. However, in systems such as cells, tissues and microbes, absence of labelling in AFM complicates identification of regions of interest. Hence for optimal application in biology, the AFM must be designed for use in combination with an identification method that would perform in a similar resolution range. The recent advent of superresolution microscopies such as STED has revolutionized observation of biological samples, enabling lateral resolution of a few tens of nanometers.

Keywords

Atomic force microscopy - Fluorescence - STED - super resolution - biological samples (cells, virus)

A80-GcoPS : A fast automatic colocalization method for 3D live cell and super-resolution microscopy GcoPS : A fast automatic colocalization method for 3D live cell and super-resolution microscopy

Proposer

Charles Kervrann

Abstract

Colocalization is an open problem for which no satisfying solution has been found up to now. It is still a struggling point of analysis and is usually badly interpreted. In this session, we present an objective, automated, robust-to-noise and very fast (no simulation unlike previous methods) colocalization method, which only needs the adjustment of a p-value that guarantees more reproducibility and more objective interpretation. The so-called GcoPS (Geo-coPositioning System – Icy plugin(<http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/GcoPS>)) is based on the analysis of normalized Pearson's correlation between two 2D-3D binary segmented images. It amounts to quantifying the interaction strength by the area/volume of the intersection between the two binary images. GcoPS is able to automatically evaluate the colocalization between large regions and small dots and to detect significant negative colocalization. The typical processing time is two milliseconds per image pair in 2D and a few seconds in 3D.

Keywords

colocalization, segmentation, detection, microscopy, super-resolution

A81-Examen des performances d'un microscope optique : de la métrologie au diagnostic – microscopie champ large (niveau 1)

Proposer/Coanimateur

Orestis Faklaris

Thomas Guilbert

Abstract

L'utilisation et la maintenance de microscopes optiques nécessite une connaissance des caractéristiques des différents périphériques du microscope.

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, il faut tout impérativement assurer un suivi de la performance du microscope, avec des protocoles simples et rigoureux.

Cet atelier de niveau 1 souhaite donner aux doctorants, aux chercheurs et aux ingénieurs de laboratoires et/ou plateformes, les bases de la métrologie et du diagnostic, lorsque se présente un souci sur un microscope de type champ large. Toutes les composantes de base du microscope seront examinées, de l'illumination jusqu'à la détection, en passant par le statif du microscope et ses différents composants optiques, afin de rendre le public autonome pour évaluer les performances du microscope et comprendre les origines des soucis principaux.

Les outils nécessaires de la métrologie seront présentés et utilisés, ainsi que les conseils de diagnostic, avec des exemples concrets.

Keywords

Diagnostic, Mesures et suivi de Performances, Métrologie, Microscopie Plein Champ, Evaluation



A82-Examen des performances d'un microscope optique : de la métrologie au diagnostic – Microscopie Confocale (niveau 2)

Proposer/Coanimateur

Thomas Guilbert

Damien Schapman

Abstract

L'utilisation et la maintenance de microscopes optiques nécessite une connaissance des caractéristiques des différents périphériques du microscope.

Afin d'obtenir résultats reproductibles et qualité d'imagerie, il faut tout impérativement assurer un suivi de la performance du microscope, avec des organigrammes et des protocoles simples et rigoureux.

Cet atelier de niveau 2 souhaite donner aux doctorants, aux chercheurs et aux ingénieurs de laboratoires et/ou de plateformes, des notions avancées en métrologie et diagnostic des différents problèmes rencontrés lors de l'utilisation intensive d'un microscope confocal. Toutes les composantes de base du microscope seront examinées, des lasers jusqu'à la détection, en passant par le statif du microscope avec ses différents composants optiques, afin de rendre le public autonome pour évaluer les performances du microscope et comprendre les origines des soucis principaux.

Les outils nécessaires de métrologie seront présentés et utilisés, ainsi que

Keywords

Diagnostic, Mesures et suivi de Performances, Métrologie, Microscopie Confocale, Evaluation

A83-Comparison between conventional and fast confocal system for three colors acquisition in living plant samples.

Proposer/Coanimateur

Leslie Bancel

Lysiane Brocard

Abstract

Dans ce workshop, nous proposons de réaliser des acquisitions 3 couleurs sur des échantillons végétaux vivants pour comparer une méthode de microscopie confocale classique, utilisant un pinhole, et une rapide, grâce à un détecteur multifacette. Nous évaluerons les gains de ce nouveau système en se focalisant sur la vitesse d'acquisition, la résolution ainsi que sur le rapport signal sur bruit. Nous verrons également les contraintes liées à cette nouvelle technologie.

Pour comparer ces 2 méthodes, nous observerons des gouttelettes lipidiques au sein de cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Ces gouttelettes lipidiques sont des compartiments cellulaires très mobiles, source de triglycérides, stabilisées par des protéines à leur périphérie. Pour suivre leur déplacement et leur localisation relative à la fois vis-à-vis du réticulum endoplasmique et des chloroplastes, nous observerons des lignées d'*A. thaliana* où ces 3 compartiments sont étiquetés par des molécules fluorescentes spécifiques. Enfin, un module de déconvolution spectrale sera utilisé pour séparer ces 3 fluorochromes.

Keywords

Fast confocal acquisition / Live samples Plant / Three-color acquisition / Spectral deconvolution

A84-Monitor your cell culture to optimize your cell transfection

Proposer

Delphine Muriaux

Abstract

In cell biology studies, accuracy and efficiency in cell culture quality are crucial in order to get the best for downstream microscopy acquisition and image analysis. This workshop is to acquire the knowledge and good basic practices in cell culture for scientist who want to study cell biology for microscopy. In this workshop, attendees will be trained for cell culture basics and tips to optimize cell transfection for biophotonic microscopy.

First, we will show how we can monitor the cell culture in order to increase the success rate in the transfection step. Different cell parameters such as cell confluency, cell counting will be assessing thanks to the InCellis System. Second, attendees will be trained with this new tools which calculate cell confluency, cell number, transfection efficiency, in an automated manner. Third, we will monitor one way to do cell transfection, and discuss other alternatives. Best cell contentant for microscopy will also be presented and discussed.

Keywords

cell culture, cell transfection, efficiency

A85-Etude comparative de méthodes de clarifications sur différents modèles animaux et végétaux par microscopie à sectionnement optique.

Proposer/Coanimateur

Cécile Pouzet

Jacques Rouquette

Abstract

De nombreuses méthodes de clarifications ont été développées ces dernières années pour l'observation d'organes en profondeur et à grande échelle afin de s'adapter aux différents types de tissus et d'optimiser le maintien de la fluorescence au cours du temps.

Ainsi, le choix de l'une ou l'autre de ces méthodes se fait en fonction de l'échantillon biologique (nature, taille) mais également des priorités de l'expérimentateur (préservation de la fluorescence, rapidité, toxicité). Nous proposons, dans cet atelier, de comparer 4 techniques (uDISCO, BABB, Rapiclear, chlorale hydrate) sur différents modèles biologiques :

-Animal :

- o tissu de souris (tumeurs cutanée, ganglion)
- o organe de souris (en fonction de la demande des participants)

-Végétal :

- o Modèle d'étude : plantule d'arabette
- o Modèle d'intérêt agronomique : la tomate (feuille, tige, fruit)

Nous présenterons les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles en les imageant par microscopie à sectionnement optique.

Keywords

clarification, tissu, vegetal, uDISCO, BABB, Rapiclear, Chlorale hydrate, ECI

A87-Exploration des nouvelles techniques d'amélioration de résolution compatible à une imagerie de cellules vivantes. Ex sur le processus d'autophagie.

Proposer/Coanimateur

Elisabeth Werkmeister

Sophie Salomé-desnoulz

Abstract

Cet atelier propose, à partir de systèmes confocaux monofocal ou multi-focal, de produire une image super-résolue sur des échantillons pour lesquels la limite de résolution confocale de 280nm XY est limitante. Et d'identifier les approches compatibles avec l'imagerie de dynamiques cellulaires rapides.

Sur la base de l'imagerie de 2 types d'échantillons (un échantillon fixé multimarqué et un échantillon vivant), nous confronterons 3 pratiques d'amélioration de résolution : confocale 0.6AU déconvolué, confocal-Airy Scan, Spinning disk-Live SR.

L'échantillon sélectionné est une culture de cellules Hela transfectées par un plasmide LC3-GFP-RFP permettant de distinguer différentes étapes du processus d'autophagie pour lequel certaines vésicules sont inférieures à 300µm et peuvent se déplacer jusqu'à 1.2µm/sec.

Les limites de la microscopie confocale traditionnelle en terme de résolution et de photo-toxicité ne permet pas d'imager le processus d'autophagie sur le long terme (principalement à cause du photoblanchiment). Au cours du TP nous verrons comment l'utilisation des techniques d'amélioration de résolution confocale permettent d'améliorer la résolution spatiale et temporelle des vésicules, ainsi que la durée d'observation du processus d'autophagie.

Keywords

Amélioration de résolution, Autophagie, video microscopie

A88-Real time acquisition of inflammation and regeneration processes on zebrafish models using photonic microscopy and second harmonic generation.

Proposer/Coanimateur

Maxence Frétaud

Christelle Langevin

Abstract

Unresolved inflammation fosters or supports the development a wide range of human pathologies (autoinflammatory or infectious diseases, cancer, ...). Thus, development of therapeutic strategies in response to inflammations represents a real challenge, which requires the emergence of new models and/or screening methods in accordance with 3R principles. We developed inflammatory models in zebrafish larvae dedicated to real time analysis of inflammatory response (dynamic of immune cells) and tissue damage (SHG of collagen fibers). The aim of the workshop will be to demonstrate the contribution of the zebrafish model to address the scientific questions related to inflammatory diseases and further explain all the potential in term of screening methods for related therapeutics.

We propose to show specimen preparation, real time imaging of activated immune cell populations and SHG signals of tissue damage.

Keywords

live imaging, SHG, zebrafish larvae, inflammation

A89-Scanning FCS workshop.

Proposer/Coanimator

Jakub Chojnacki

Cyril Favard

Abstract

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is a powerful tool for detailed investigation of molecular mobility of lipids and proteins in cells. Unfortunately, point FCS suffers from very low capacity in probing spatial heterogeneities existing in cells. The aim of this workshop is to introduce the participants to the principles of scanning FCS and guide them through a complete analysis of a biological sample. This will highlight the advantages of this technique as well as provide the participants with the working knowledge required to replicate these experiments in their own research environments.

Keywords

FCS, scanning FCS.

A90-OPeT - Bring your sample & learn how to build and use an OPT optical tomography mesoscope

Proposer

Gabriel G. martins

Abstract

Optical uTomography (OPT) is a technique vastly unexplored in biomedical research. OPT provides 3D isometric datasets of large samples (>5mm), not accessible to confocal/2p or even light-sheet microscopy. OPT has been instrumental eg, for the Intl Mouse Phenotyping Consortium to characterize thousands of phenotypes (Dickinson et al 16). We introduced the 1st open-source OPT scanner, integrated in the OpenSpin microscopy platform (Gualda et al 13,14). OPeT is a spinoff project now featured in 4 new publications, 2 online anatomical databases, 1 intl. prize, has been demo'd in 4 intl workshops and we are providing support to multiple labs worldwide building their own versions. OPT is not available commercially, but an OPeT prototype is very simple to build and operate and produces images of high quality, anatomical detail and visual impact; it can be built with only basic knowledge on electronics and optics, and is significantly easier to operate than a light-sheet setup. In this workshop I will present the technique, its advantages and challenges, how to prepare the samples, and how to build and operate the OPeT mesoscope; participants will be allowed to image their own samples using a fully working OPeT prototype, and also learn how to reconstruct and analyse the 3D datasets.

Keywords

OPT, OPeT, optical tomography, mesoscopy, 3D embryos, anatomical datasets

A92-Visualization of neuronal projections in entire brain

Proposer

Christel Poujol

Abstract

With the development of light sheet illumination, it becomes possible to observe fluorescence inside tissue like entire adult mouse brain. Depending on the tissue, a clearing is often needed to avoid light scattering. In this workshop, we will describe the complete workflow from sample preparation using U-DISCO protocol, mosaic acquisitions, and 3D reconstruction and analysis in order to be able to observe and quantify neuronal projections from entire adult mouse brain following virus injection. We will be able to characterize the difference in two mouse models: wild-type mouse and a neuro-developmental disorder model.

Keywords

Light sheet illumination, clearing, U-DISCO, entire brain, 3D reconstruction, big data

A93-Non-Rigid and Deformable Registration For Medical and Biological Data

Proposer

Polycarp Okock

Abstract

Registration is the determination of the geometrical transformation that aligns points in one view of an object with corresponding points in another view. In Medical Imaging, this view can be defined as images produced by imaging technologies such as X-rays, MRI, tomography such as CT, SPECT etc. where the focus is on noninvasive production of images of the internal aspects of the human anatomy. Medical image registration is a necessitated step in the treatment planning and diagnosis of a disease evolution and in research because of the widespread interest in accurately relating information from different images and deciding the necessary therapies regarding the patient conditions. Non-rigid distortions inherent either in the imaging acquisition tools or nature of the human body (deformation) or inter-subject mapping has led to the need to factor in non-uniform transformation so as to get the true insight into the diagnosis of a patient condition. Several toolkits have been developed to assist in non-rigid registration, albeit most are specialized for particular human anatomy. Nevertheless this is still an actively ongoing on researched area as many registration problems remain unsolved and still requires the input from a medical expert (hand-based).

In this regard, we shall examine and demonstrate non-rigid and deformable medical image registration open source toolkit(s), with highlights on the algorithms they are using, interactive visualization of the process, some of the challenges faced, available options that can be used to optimize the algorithms and best case scenarios (human anatomy) for each of the algorithms.

Keywords

Non-rigid, Deformable, Open Source, Toolkit, Image Registration

A95-Comment optimiser l'acquisition de grands échantillons « transparisés » avec la microscopie à feuille de lumière en vue de traitements semi automatisés d'images tridimensionnelles

Proposer

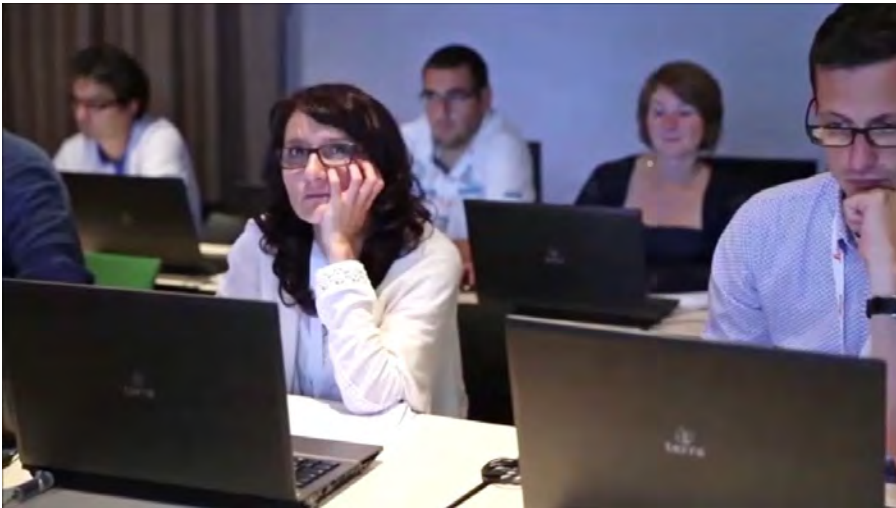
David Godefroy

Abstract

L'imagerie à feuille de lumière d'échantillon « transparisés » est une technique en pleine essor. L'utilisation de l'Ultramicroscope permet l'imagerie très précise en 3 dimensions de nombreux types d'échantillons (embryon, système nerveux centrale, cœur etc...). Le but de cet atelier est de montrer comment en optimisant les paramètres d'acquisition nous améliorons le post-traitement des reconstructions 3D.

Keywords

Ultramicroscope, mosaïques, Terasticher, « transparisation », traitement semi-automatique



A96-Pattern recognition in whole organism for automated microscopy or data-analysis using open source solutions

Proposer/Coanimateur

Laurent Thomas

Polycarp Okock

Abstract

In screening scenarios, it remains challenging to analyse large image datasets generated by automated microscopy. Pattern recognition techniques can be used to detect and classify features of interest, categorize datasets and aid in quantitative scoring of read-outs. Moreover, in combination with feedback microscopy it allows the selective automated imaging of regions of interest in smart imaging applications. This includes rare event detection, zooming-in on regions of interest or decision making based on presence of interesting features. A large variety of pattern recognition techniques are available ranging from simple template matching to more advanced machine learning-methods. In this workshop we will present some pattern recognition methods that can be applied to biological image data. We will demonstrate their usage using the open workflow development platform KNIME in combination with Python/openCV. Functionalities will be illustrated on zebrafish images originating from phenotypic screening experiments. We will present workflows for the specific detection of subregions like the head, yolk or eye region, or on fluorescently labelled structures such as the embryonic kidney. No programming skills are required to attend this workshop, but a basic understanding of image processing techniques is advantageous. Participants are welcome to submit own data in advance to the workshop organizers to discuss potential applications of pattern recognition methods.

Keywords

Pattern recognition, image-processing, screening microscopy, feedback microscopy, zebrafish, Knime, Python, openCV, machine-learning

A97-Imagerie super-résolution et en 3D de la surface apicale des cellules polarisées

Proposer

Anne Cantereau

Abstract

La culture sur filtre de cellules épithéliales permet de disposer d'un modèle in vitro de cellules polarisées. Cette polarisation se caractérise par l'adressage sur la face apicale de protéines impliquées dans les échanges entre les cellules et la lumière des organes creux. Après différenciation, les cellules sont marquées avec des anticorps fluorescents puis le filtre supportant les cellules est déposé sur une lamelle de verre afin de réaliser l'imagerie des cellules. Ce montage est idéal pour réaliser une imagerie TIRF et STORM car la surface apicale des cellules se retrouve ainsi directement contre la lamelle de verre. Lorsque la culture est bien différenciée, la plaque apicale concentre les protéines sur une seule couche, c'est du moins ce que permet d'imaginer la microscopie confocale dont la résolution dans l'épaisseur est limitée par la diffraction (400-500nm). La technique de nanoscopie 3D (3D STORM) montre au contraire que les protéines ne sont pas situées sur le même plan Z (résolution 20nm). Cet atelier est ouvert à un public très large et pluridisciplinaire. En effet, au cours de l'atelier, nous aborderons d'une part les problèmes liés à la culture 3D sur insert et l'exposition des marqueurs fluorescents au tampon de scintillement et d'autre part, l'acquisition et

le traitement des images pour la représentation en 3D. Nous aborderons également les évolutions méthodologiques actuelles de la technique de super-localisation STORM, accessibles grâce à ce modèle biologique : imagerie multicolore, imagerie sur cellules vivantes, comptage de protéines.

Keywords

Culture 3D, 3D-STORM, multimarquage

A98-Visualization of multiple (7) immune-cell biomarkers in human tumors by multiplex Tyramide Signal Amplification system: Staining strategy, Multispectral imaging and Linear unmixing

Proposer/Coanimateur

Clément Chevalier

Stéphanie Dutertre

Abstract

After immunohistochemistry (IHC) began to be used routinely, several investigators worked on methods for staining multiple molecules in the same tissue sections or cells to improve both clinical prognostic evaluations and fundamental research purpose. However, achieving this goal was challenging because of persistent issues with multiple staining methodologies and technical limitations of microscopes. We present in this workshop the refresh of a methodology developed in the late 80's called Multiplex Tyramide signal amplification (TSA). This method allows the use of multiple primary antibodies of the same species, thus allowing, in theory, an infinite number of staining while increasing the fluorescent intensity compared to a "classical" immunostaining. However, this method was, until recently, limited by the ability of microscopes to separate efficiently fluorescent signal from fluorophores showing highly overlapping emission spectra. With the joint development of new tyramide-coupled fluorophores (Opal or Tyramide-Alexa-Fluor), multispectral detectors on microscopes, and linear unmixing algorithm to efficiently separate the different fluorescent signals, the TSA appears today as a strong method to visualize more than 6 different staining in fixed sample.

By using section from FFPE human tumors as a model, this workshop will focus on (1) Theory and tips about TSA labelling; (2) Experiment controls, individual fluorophore spectra recording and multispectral acquisition of the multiplex sample; (3) Presentation and use of linear unmixing algorithm to efficiently separate the fluorescent signals and generate 7 color images.

Keywords

Multispectral imaging; Tyramide signal amplification; Linear unmixing; Tumor multiplex labelling



A99-The zebrafish as a model to study dynamics of single membrane proteins

Proposer/Coanimator

Radoslaw jakub Gora

Salomé Muñoz sánchez

Abstract

BACKGROUND. The zebrafish has already proven to be a suitable model for studying microdomain organization along with tracking single membrane proteins. In the study by Schaaf et al., 2009, the zebrafish was used as an in vivo animal model for expressing YFP-C10H-Ras, a membrane anchor of the human H-Ras protein, comprising 10 carboxyl-terminal amino acids, including the CAAX motif, fused with a yellow fluorescent protein (YFP). The CAAX motif constitutes a part of the minimal membrane anchor, located in the highly variable region (HVR), containing well-characterized membrane anchoring sequences of several isoforms of the Ras proteins. YFP-C10H-Ras had been studied in detail in cultured cells using SMM and its diffusion patterns analyzed. This exposed mobility patterns of YFP-C10H-Ras similar to those of the membrane anchors of human Lck and K-Ras proteins, and showed analogous diffusion patterns to the activated full-length H-Ras proteins. These molecular properties made YFP-C10H-Ras an excellent model protein for studying dynamics of proteins anchored in a cytoplasmic leaflet of the plasma membrane. **PROTOCOL.** It is possible to study the dynamics of fluorescently labeled proteins by single-molecule microscopy, but until now this technology has been applied only to individual cells in culture. In this workshop we extend such studies to living vertebrate organisms, two-day-old zebrafish embryos. The embryos are injected with the mRNA of H-Ras protein fused with YFP, which has been shown to serve as a model for proteins anchored in the plasma membrane. Total-internal-reflection microscopy is used to image embryonic epidermal cells in the tail fin region, in order to reveal possible microdomains presence and modes of protein dynamics in the plasma membrane. **DATA ANALYSIS.** A self-developed MATLAB plug-in will serve as a tool to reconstruct 2D trajectories of the fluorescent proteins and to fit them into existing mathematical models of protein diffusion.

Keywords

Zebrafish, Total Internal Reflection Microscopy, H-Ras, TIRF, embryo, diffusion, YFP, GFP, CAAX

A100-Quantifying synaptic plasticity in primary neurons using microfluidic culture devices and a custom image analysis workflow

Proposer/Coanimator

Nicolas Malmanche

Devrim Kilinc

Abstract

Synaptic plasticity is the activity dependent strengthening or weakening of synapses and is considered to be the basis of learning and memory. The cognitive decline observed in many neurodegenerative diseases is associated with synaptic failure and loss. To study the relation between synapse formation/loss during development and disease processes, we developed a compartmentalized microfluidic device to culture primary hippocampal rat neurons. The device allows for separately treating neurons in distinct chambers (termed pre- and post- synaptic chambers) with drugs or lentiviral vectors, and observing specific effects on synapses in a third chamber (termed synaptic chamber). To assess synapse formation and complexity, we identified, among commercial antibodies, the best pre-/post-synaptic markers for immunofluorescence. To determine the most reliable parameters for representing synaptic plasticity, we acquired images

Ecole thématique interdisciplinaire du CNRS : Microscopie Fonctionnelle en Biologie

using three microscopic systems with increasing pixel definition: confocal, Airyscan and SIM. We applied Imaris-based image segmentation to isolate volumes of synaptic compartments and wrote a custom Matlab code to assign each post-synaptic signal to the closest pre-synaptic signal. The code not only calculates the mean number and distance of post-synaptic assignments, but also the fraction of non-assigned pre-synaptic densities. In this workshop, we will describe these processes in detail and illustrate that subtle effects of localized treatments on synapses can be captured. Practically, we will image pre-stained microfluidic neuronal cultures using two different microscope systems and perform subsequent Imaris and Matlab analyses.

Keywords

Synapse plasticity; primary neuron culture; microfluidics; Imaris; Matlab; neurodegeneration

A101-Simple phase and fluorescence microscopy for the time-lapse acquisition of adherent cell cultures

Proposer

Cédric Allier

Abstract

In this workshop we will introduce and conduct experiments and analysis with two new microscopy techniques for the time-lapse acquisition of adherent cell cultures:

- video lens-free microscopy
- dual microscope for phase and fluorescence imaging based on chromatic aberration

These microscopy techniques are mechanically simple and easy to use and they provide large field of view (3-30mm²) to capture thousands of cells simultaneously. This workshop will allow the participants to evaluate the potentials of the two techniques and discuss their application to biological research. It will be structured as follows:

- description of the two microscopes
- time-lapse acquisition of adherent cell culture directly in the incubator over several days
- use of holographic reconstruction algorithms to recover the phase image of the cells
- data analysis of the obtained time-lapse acquisitions

Keywords

Phase imaging, Cell culture monitoring, Fluorescence microscopy

A102-Optimisation des acquisitions sur un microscope avec gain de résolution : exemple de la visualisation de la bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin chez *C. elegans*

Proposer/Coanimator

Stéphanie Dutertre

Sylvain Prigent

Abstract

C. elegans représente un organisme modèle simple pour l'étude des mécanismes à l'origine de pathologies congénitale rares de l'absorption intestinale. Il permet par exemple la réalisation de cribles RNAi pour l'identification de nouveaux gènes responsables de la polarisation des entérocytes et de la mise en place des microvillosités. Deux difficultés majeures se sont présentées pour la

visualisation des microvillosités de la bordure en brosse. D'une part, leur espacement (100 nm) est à la limite de la résolution optique en microscopie confocale, ce qui rend difficile leur visualisation en microscopie optique classique. D'autre part, l'épaisseur de l'échantillon a restreint les techniques de microscopie de superrésolution utilisables. Les acquisitions ont été réalisées sur un confocal Airyscan avec ses avantages (gain de résolution, travail en profondeur) mais aussi ses inconvénients (post-traitement des images = boîte noire).

Le but de cet atelier est d'utiliser ce modèle d'étude et de réaliser des images de bordure en brosse de cellules épithéliales de l'intestin de *C. elegans* in vivo en abordant les critères d'acquisitions optimums sur un microscope avec gain de résolution. Les images brutes acquises sur le microscope seront analysées et retravaillées en dehors du logiciel Zen sur un logiciel open-source.

Keywords

C. elegans ; bordure en brosse ; super-resolution ; deconvolution ; imagerie en profondeur

A103-FAST: next generation of inducible chemical-genetic fluorescent markers for advanced biological imaging

Proposer

Arnaud Gautier

Abstract

Deciphering the complex mechanisms controlling cells and organisms requires effective imaging systems and fluorescent probes to observe and quantify biomolecules in real time with high spatiotemporal resolution. A common strategy for imaging proteins is to fuse them to peptide or protein sequences that provide fluorescence, such as autofluorescent proteins. Recently, the fluorescence toolkit has been expanded with methods for labeling biomolecules with exogenously applied small synthetic fluorescent probes. These innovative technologies offer additional labeling refinement and broaden fluorescent labeling to more diverse cellular molecules. Selectivity is ensured through fusion to a genetic tag that binds selectively tailored fluorescent molecules. The modular nature of such an approach enables one to tune the synthetic part by molecular engineering, in order to address biological questions with the molecular diversity offered by modern chemistry. To be usable within living systems, the genetic tag must fold and function in various cellular compartments, while the fluorescent probes must ideally not show unspecific interaction/reaction with cell components. A way to avoid unspecific background in cells and achieve high imaging contrast is to use fluorogenic probes that display no fluorescence until labeling occurs. During this workshop, we will present FAST, the next generation of inducible chemical-genetic fluorescent markers. FAST provides an experimental versatility not encountered with common fluorescent proteins because (i) labeling is fully reversible allowing to control experimentally when the protein is fluorescent, and (ii) its spectral properties can be changed from green to red by choosing the appropriate fluorogenic ligand. The workshop will enable users to test this new technology on real samples.

Keywords

next-generation fluorescent markers

A104-Spot detector sous Icy l'outil 3 en 1 ! : coloc, tracking et segmentation

Proposer/Coanimateur

Nicolas Goudin
Louison Lallemand

Abstract

Beaucoup d'études portent sur l'analyse de "spots" tels que des vésicules, Fish, etc.

L'objet de cet atelier est de montrer l'utilisation de l'outil "spot detector" du programme libre Icy pour 3 types d'analyses :

- la segmentation de spots en 2D et 3D pour un dénombrement, mesure de surface, d'intensité moyenne.
- l'étude de colocalisation (distance entre objets)
- le tracking.

Pour cela nous utiliserons une banque d'images ou des images de participants et nous débattrons des différentes approches d'analyse possible avec les " spots "

L'atelier s'adresse à toutes personnes qui connaissent déjà Icy de manière simple ou plus complexe.

L'objectif est de pratiquer avec eux les 3 différents types d'analyses que permet Spot detector et de leur montrer les points clefs qu'ils pourront utiliser pour ajuster au mieux leurs analyses.

Keywords

spots analyses Icy segmentation colocalisation tracking

A105-Versatile wide-field homogeneous illumination for SMLM

Proposer/Coanimateur

Adrien Mau
Sandrine Lévêque-fort

Abstract

Single molecule localization microscopy (SMLM) imaging has proved to be an efficient way of breaking the diffraction limit, achieving lateral resolution in the order of 20nm and enabling major advances in the fields of biology and medicines. In general, SMLM on biological samples is limited to a homogeneous field of view (FOV) of approximately $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ due to illumination and/or detection constraints and prevents a wide observation and comprehension of biological phenomena. If modern cameras such as sCMOS devices allow large FOV ($221 \times 221 \mu\text{m}^2$) imaging while preserving a good detection sensitivity, the fluorescence process involved in wide-field SMLM imposes the use of 2-6W laser-sources which are expensive and prevent the use of Total Internal Reflection techniques, which could damage the objective while focusing in its back focal plane.

Here we present an unique versatile homogeneous illumination method which offers $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ SMLM images with the use of standard SMLM lasers (300 mW maximum) and thus in TIRF or widefield excitation.

Keywords

SMLM, versatile wide field homogeneous illumination, low power sources, TIRF

A106-Calibration strategies for 3D single-molecule localization microscopy

Proposer/Coanimateur

Sandrine Lévêque-fort

Guillaume Dupuis

Abstract

Three-dimensional imaging in single-molecule localization microscopy (SMLM) typically requires additional axial information that can be provided either by point spread function (PSF) shape measurement methods (such as astigmatism), or by intensity-based methods (such as supercritical angle fluorescence detection). In particular astigmatism calls for a calibration to establish the relationship between the measured value and the depth. The usual approach is based on a single layer of fluorescent nanospheres deposited on a coverslip and an axial scan of the objective. While inexpensive and simple to perform, this method exhibits several drawbacks.

The goal of this workshop is to present new strategies recently made available to determine the axial localization in SMLM and to compare them to this standard technique. Two alternative approaches will be proposed during the workshop. The first calibration sample consists of large biotin-coated spheres that are combined with streptavidin labelled with a standard dSTORM dye. This sample is observed with a standard dSTORM buffer in order to be in standard dSTORM imaging conditions. The second calibration sample is a nano-structured resin-based substrate with the appropriate refraction index and controlled depths. This type of samples is currently under development in collaboration with a CNRS MI funding and could be used not only to calibrate 3D-SMLM data but more generally any microscope that need an axial nanometric ruler.

For each calibration sample (including the standard single layer of fluorescent nanospheres deposited on a coverslip), sample preparation, image acquisition and data processing will be detailed and demonstrated. Comparison of the different calibration techniques will be performed on similar data sets to evidence the gain between the different approaches.

Keywords

single-molecule localization microscopy, SMLM, calibration, 3D, metrology, dSTORM, astigmatism, PSF shaping, optical aberrations

A107-Sample's environment control in LSFM: mechanics, electronics, 3D printing, and programming for microscopy.

Proposer

Matteo Bernardello

Abstract

The goal of this workshop is to show possible solutions for research labs to address sample-mounting issues, and for maintain a zebrafish sample healthy for long period during imaging, in Light Sheet Fluorescence Microscopy.

During the workshop, the use of CAD software and 3D printing will be presented as fast prototyping tool for LSFM chamber design, a critical component in LSFM, and for specific purposes, as for example the temperature's control of sample media.

In addition, complementary modules as sample motorization tools, and simple microscopes shutters will be overviewed and controlled thanks to the use of accessible components as Arduino.

The hardware's control will be shown through Arduino IDE and LabVIEW software.

Keywords

3D printing, CAD design, LSFM chamber, automatization, Arduino, LabVIEW

A108-Speed Opiom for multiplexed observations in microscopic, macroscopic, and endoscopic fluorescence imaging

Proposer

Thomas Le saux

Abstract

Our group has recently introduced speed Out-of-Phase Imaging after Optical Modulation (OPIOM) [1], which exploits reversible photoswitchable fluorophores as fluorescent labels and combines optimized periodic illumination with phase-sensitive detection to specifically retrieve multiple signals from different labels emitting in the same channel in fluorescence micro- and macroscopy. Photoswitchable fluorophores are here discriminated by their photoswitching dynamics even under adverse imaging conditions (e.g. strong autofluorescence, ambient light), which opens a complementary dimension to spectral discrimination for highly multiplexed fluorescence imaging. In this workshop, we will (i) show how to implement these imaging modalities on various systems in microscopy and macroscopy (epifluorescence microscopy, endoscopic fluorescence imaging, remote fluorescence imaging) with a minimal equipment and (ii) examine in practice which parameters are key for a successful implementation of these two techniques.

[1] J. Quérard et al, Nat. Commun. Int. Ed., 2017, 8, 969-977.

Keywords

Multiplexed fluorescence imaging, reversibly photoswitchable fluorescent proteins

A109-Quantitative analysis of zebrafish pectoral fin early growth and shape changes

Proposer/Coanimator

Hanh Nguyen

Elena Kardash

Abstract

During embryonic development, successfully coordinated combination of multiple processes such as cell growth, cell differentiation and cell death, are essential to the formation of a new organism. Among the major established models to study these fundamental processes is the vertebrate limb formation. One of the advantages of studying the developing limb is that it is not a vital organ; therefore, genetic and physical manipulations that disrupt its formation would not interfere with survival and further development of the embryo. Pectoral fin in zebrafish serves as an animal model for vertebrate limb development. Pectoral fin is an excellent model to study shape formation because the structure is relatively simple during early stages of development and is easily accessible for microscopy observation and physical manipulations. Currently most studies on pectoral fin formation have focused on the time frame between 2 to 5 days post fertilization while very little is known about the earlier stages (18-48 hours post fertilization) due to the lack of early-stage markers.

We will demonstrate our strategy for mounting and imaging 30 hour old embryos to visualize the cellular dynamics in a forming fin. We will acquire 3D+time data sets of the developing fin and measure the changes in fin morphology, cellular shape, cell displacement, and cell division orientations. We will use a recently established transgenic fish line carrying a GFP reporter expressed in the pectoral fins to distinguish between cells of different origin and fate. In addition, because of the high-cell density in the fin bud, automated cell tracking is best achieved with mosaic nuclear staining obtained by photoconversion of Eos.

Keywords

zebrafish, pectoral fin, in vivo, confocal, photoconversion

A110-Microscopes Metrology in database

Proposer/Coanimateur

Cedric Matthews

Perrine Paul-gilloteaux

Abstract

Le workflow de la métrologie nécessite un travail long pour éditer une fiche synthétique par microscope. Il n'est plus possible de le faire si l'on veut couvrir l'ensemble des instruments présents sur une plateforme. De plus en plus de plateformes d'imagerie sont équipés d'une base de données d'images (Omero, Openimadis...). Cette ressource organisée annotée et indexée, constitue la base de la gestion patrimoniale d'une masse importante de données générées par nos instruments. L'atelier propose la prise en main du développement réalisé par le Nœud PIDM de France Bio Imaging (1), où il sera proposé de prendre en main le workflow d'estimation de qualité des microscopes via l'interface développée sous ICY. Il sera montré comment interroger les bases de données type Omero ou openimadis pour mesurer des PSF estimées sur des images venant de différents microscopes. La qualité de la PSF mesurée donnera un état de performance de chaque système et donc de la plateforme. Une vision d'un tableau de bord de pilotage de plateforme sera proposée à cette occasion.

Keywords

Metrologie, base de données, Omero, openimadis, PSF, moment centré, déconvolution aveugle

A111-faire renaître son confocal avec un rescane confocal

Proposer

Cedric Matthews

Abstract

Le but de cet atelier est de combiner la technologie de rescane (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28120817>) avec le recyclage d'éléments venant d'un ancien confocal.

Il sera ainsi montré qu'il est possible de réutiliser un statif et son banc laser (quel que soit la marque) et de le synchroniser avec la tête commercialisée par confocal.nl (<http://www.confocal.nl/>).

Après avoir montré les différentes étapes du couplage optique et électronique, il sera effectué les mesures de résolution montrant une résolution isotrope de 170 en XY et de 500 nm en Z.

Keywords

Rescane confocal, résolution, recyclage instrumental, interruption instrumentale

A112-Open Source Inverted Microscope (OSIM) for timelapse imaging

Proposer

Sylvain De rossi

Abstract

The aim of this project is to image by time-lapse microscopy (brightfield imaging), *phalusia mammilata* embryo development, with a final magnification of around 20x.

A conventional microscope uses a motorized stage in order to choose the good field of view we want to image, in this case these movements disrupt samples and make impossible timelapse imaging because embryos are just deposited in salt water and they are very sensitive to vibration.

So we have to keep samples stable in the plate and in time. It is why we decided to build our own transmission microscope with a scanning detection. In our prototype, objective and camera move below the plate in order to keep the stage fixed.

This homemade microscope is built around one main idea : keep live samples static in order to stabilize them and give us the opportunity to follow their developpement by timelapse imaging microscopy.

Keywords

home made microscope, timelapse imaging, Brightfield imaging, marins organisms, *phalusia mammilata*, static stage, scanning detection, 3D printing

A113-Combining complementary 3D single molecule localization techniques for reliable multicolor bioimaging over extended depth ranges

Proposer/Coanimator

Pierre Jouchet

Clément Cabriel

Abstract

While Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) is widely used in bioimaging, both for structural Imaging and tracking, the use of 3D SMLM through Point Spread Function (PSF) shaping methods remains somewhat limited due to its lack of reliability and reproducibility. Strongly anisotropic 3D resolutions limit its field of applications. Besides, PSF shaping methods are subject to many potential experimental biases, including axial drifts, chromatic aberrations, sample tilts and field-varying geometrical aberrations.

In this workshop, we propose a straightforward optical setup, named DAISY (Dual-view Astigmatic Imaging with SAF Yield) that addresses these problems by using a dual-view detection scheme that combines both astigmatism-based PSF shaping and Supercritical Angle Fluorescence (SAF) measurements. We will discuss the optimization of the 3D localization precisions and the advantage of the absolute reference brought by the SAF detection to render measurements insensitive to the previously mentioned biases. The viability of the method in dSTORM acquisitions will be demonstrated by imaging cytoskeleton and endocytosis proteins in fixed biological samples to produce images over several micron depth by stacking sequential acquisitions.

Keywords

single molecule localization microscopy, 3D imaging, dSTORM, PSF shaping, Supercritical Angle Fluorescence, multicolor imaging

A114-L'art du tuning low cost en microscopie : optimisation par des exemples concrets de toute la chaine de l'imagerie

Proposer/Coanimateur

Bertrand Simon

Pierre Bon

Abstract

La plupart des systèmes de microscopie existants combine des matériels et/ou des logiciels le plus souvent propriétaires qu'ils peut être parfois difficile de faire opérer entre eux ou simplement trop chers. A travers un sélection d'exemples déjà validés sur un dispositif expérimental, cet atelier propose des solutions pour contourner ces difficultés par l'utilisation de différents outils : SDK, logiciels libres, dispositifs open-source, impression 3D, électronique numérique. L'objectif de ce TP n'est pas faire un catalogue de réalisations mais bien de discuter de toute la chaine nécessaire à l'obtention d'images en microscopie. L'idée est de montrer qu'à chacune des étapes (i) préparation et maintien d'échantillons, (ii) excitation, (iii) imagerie, (iv) détection il est possible de lister les besoins de chacun et qu'il est possible de trouver des solutions commerciales ou non et de les faire toutes cohabiter sur un microscope-couteau suisse.

Nous voulons donc montrer comment intégrer plusieurs fonctionnalités d'un système de microscopie de fluorescence pour l'imagerie de spécimens vivants: contrôle de source laser, platine x-y, focus (alt. platine z), autofocus, correction d'aberration sphérique par motorisation de la bague de correction de l'objectif, contrôle de la caméra et de l'acquisition des images. Nous présenterons également des solutions pour la manipulation ou le maintien de spécimens (pompe péristaltique imprimée en 3D, support de spécimen fait-maison, dispositif pour la rotation de spécimens).

Keywords

Tuning, low cost, on-est-pas-des-vaches-à-lait, arduino, impression 3D, micro-moteurs



A115-4D multi-plane and multi-colour (4D-MPMC) microscopy imaging with quadratically distorted (QD) grating and grisms

Proposer/Coanimator

Yan Feng

Monique Frain

Abstract

Microscopy imaging for high content phenotyping in biomedicine still awaits breakthroughs in temporal resolution. The possibility to achieve simultaneous multi-plane imaging has been increasingly explored in the recent years. We demonstrate a simple, on axis, multi-plane and multi-colour (4D MPMC) microscopy imaging setup that delivers real time 3D broadband images over the volume of living specimens from cells to entire small organisms. Quadratically distorted (QD) grating, in the form of an off axis-Fresnel zone plate, images multiple object planes simultaneously on a single image plane. Grism, a blazed grating and prism combination, achieves chromatic control in the 4D multi-plane imaging. A pair of grisms, whose separation can be varied, provides a collimated beam with a tuneable chromatic shear from a collimated polychromatic input. The optical system based on QD grating and grisms appended to the camera port of a commercial microscope has been validated for simultaneous 3-plane multi-colour microscopy imaging. Implementation of the simultaneous broadband 3-plane imaging concept on a dedicated microscopy platform with the relevant modalities (such as brightfield, epifluorescence and differential interference contrast (DIC)) will allow further validation for a large range of biological applications. In comparison with the state-of-art techniques, 4D MPMC concept can meet versatile requirements, such as changing the distance between focussed planes by simply adjusting the optical relay design. Moreover, our imaging device is user-friendly and compact and will serve a large range of high throughput applications in biomedicine, pharmacology and toxicology.

Keywords

4D multi-plane multi-colour (4D MPMC) microscopy imaging, quadratically distorted (QD) grating, grisms, high throughput 3D+time imaging

A116-Imaging in scattering biological tissues: ultra fast wavefront shaping and speckle imaging

Proposer/Coanimator

Matthias Hofer

Baptiste Blochet

Abstract

Optical microscopy and Optical Coherence Tomography, which are widely used to image biological tissues, exploit generally ballistic photons to access in-depth structures. Recently, other techniques have emerged that take advantage of scattered photons, which undergo more complex propagation pathways inside the medium that ultimately scrambles the image. In this workshop we will present solutions to provide imaging through scattering media by exploiting directly these scattered photons. The first method uses directly the spatial correlation properties of the image produced by scattering (speckle) to reconstruct the shape of fluorescence structures behind a scattering medium. We will show that epi-fluorescence imaging is accessible behind 1 mm thick biological tissues, using phase retrieval algorithms on the recorded scrambled image.

The second method is based on the shaping of the incident wave front of light, by spatial light modulators (SLMs), to reconstruct a focus behind a scattering medium. We will in particular address the issue of imaging in dynamics biological media. Indeed the fast decorrelation time of living tissues imposes the use of fast SLMs. The LKB (Paris) team has developed a solution based on MEMS micro-mirrors (Boston Micromachines) and fast electronics FPGA control, for ultra-fast (10 kHz) focusing of light through scattering media. To focus light through the medium, an optimization algorithm uses the intensity measured on a photomultiplier as a metric, during phase variations applied to the SLM, on which a thousands of specific spatial modes are encoded. The whole optimization process takes only 250 ms, which offers interesting perspectives for dynamics tissue imaging.

Keywords

Scattering tissues, wave front shaping, speckle imaging, fluorescence image reconstruction in scattering media

A117-Phy-aWaaS Webservice for 3D+time imaging data management and cell lineage analysis

Proposer/Coanimator

Mark Hammons

Nadine Peyrieras

Abstract

We will introduce and demonstrate the Phy-aWaaS webservice for uploading, managing, and analyzing 3d and 4d data including large image datasets from developing organisms, organotypic cultures and 3D cell cultures. The Phy-aWaaS concept is made to go as fast and efficiently as possible from the microscope to a secure webstorage through a dedicated interface for data description with the relevant ontologies. Data uploaded to an IRODS server is directly available for an image processing workflow and processing through custom designed pipelines. Typically, the full cell lineage reconstruction from 3D+time image datasets with the appropriate spatio-temporal resolution is obtained through filtering, approximate cell center detection and cell tracking. Cell center detection is achieved from fluorescently labelled nuclei and can be used for the segmentation of nuclei and cell membrane, provided that membrane staining is available. The detection and tracking strategies have been also successfully used for organelles smaller than nuclei. Data validation and correction is achieved with the custom interactive visualisation software Mov-IT. We expect to demonstrate the functionalities of the Phy-aWaaS webservice on imaging data acquired at MIFOBIO during the week.

Description

In this workshop we will walk attendees through the process of using our Phy-aWaaS webservice and associated tooling for data conversion, compression and upload on an IRODS server. We will train

Keywords

3D, 4D microscopy imaging, image processing, cell lineage reconstruction and analysis, Play, Scala, BTRFS, Mesos

A118-SPIM-FCS to probe Cadherin1 dynamics along the cell lineage in zebrafish early embryogenesis

Proposer/Coanimateur

Svetlana Jovanic

Nadine Peyrieras

Abstract

How the coupling of cell behaviors and cell adhesion dynamics is achieved during zebrafish gastrulation is unknown. Cadherin1 is a transmembrane protein, member of the calcium dependent cell adhesion family, known to play a role in cell-cell adhesion during epiboly movements (T. Shimizu et al., 2005). We propose to combine in single plane illumination microscopy (SPIM), 3D+time imaging of cell displacements and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) to assess Cadherin1 dynamics at the cell surface and cell-cell contacts. Performing SPIM-FCS is used to map protein mobility by measuring fluorescence fluctuations in a large focal volume and with less phototoxicity than in typical confocal FCS. Cadherin1 dynamics will be measured in live zebrafish embryos expressing a Cadherin1-eGFP fusion protein and H2B-mcherry to stain nuclei and achieve cell tracking. 3D stacks over time will be analyzed to construct a dynamic map of concentration and diffusion coefficient along the cell lineage.

Keywords

SPIM, FCS, Live 3D+time imaging, image processing for cell tracking and protein dynamics

A119-dSTORM : Nano-objets 3D de standardisation et imagerie in cellulo des centrosomes.

Proposer/Coanimateur

Karine Monier

Christophe Place

Abstract

Notre atelier est centré sur la technique d'ultra-localisation basée sur l'induction du scintillement de fluorophores organiques, décrite sous le nom de dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), pour déterminer avec une précision de l'ordre de 10 à 20 nm, la localisation in cellulo de protéines centrosomales.

Le 1er module de notre atelier sera focalisé sur l'utilisation de Nano-Objets 3D, utilisables comme des standards de fluorescence et rendus scintillants en 2D et en 3D pour vérifier la calibration du système notamment pour la partie 3D. Différents tampons d'observation induisant le scintillement seront testés et permettront de démontrer l'utilité d'un nouveau tampon permettant des conditions de scintillement non-éphémères (de quelques heures à plusieurs semaines).

Le 2ème module sera consacré à l'acquisition sur un système calibré de spécimens biologiques dans différents tampons de scintillement. Deux protéines du centrosome mature immuno-localisées dans des cellules adhérentes humaines fixées seront ciblées. Des séquences d'acquisitions seront réalisées en 2 couleurs dSTORM 3D avec différents tampons de scintillement pour évaluer leur potentiel en terme de nombre de photons, précision de localisation et reconstruction de structure. Les différentes étapes inhérentes à la génération des images de super-résolution en 2D et en 3D seront abordées et expérimentées pour les acquisitions en simple couleur et en multicolore. Les

images reconstruites avec les différents tampons seront comparées aux structures de la littérature générée en microscopie électronique.

Keywords

super-résolution, dSTORM, centrosome, distal appendages, 3D calibration, blinking buffer, Nano-Objects, standardisation

A120-Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) : mesure, automatisation et analyse

Proposer/Coanimateur

Dorian Champelovier

Aymeric Leray

Abstract

La FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), permet de mesurer la concentration et le dynamique de molécules marquée par fluorescence en cellule vivante avec une résolution de l'ordre de la microseconde. Dans cet atelier nous souhaitons former les participants à la mise en place des mesures de FCS en cellule vivante et à l'analyse des données en mode automatisé.

La réalisation de mesures FCS sur des cellules vivantes nécessite d'effectuer plusieurs mesures locales par cellule (minimum 5 mesures de 30s), le tout sur une population importante, entraînant des temps d'acquisition longs avec néanmoins des temps morts entre chaque mesure trop courts pour être rentabilisés. De ce fait, une approche automatique des mesures est très avantageuse pour rendre possible de longues campagne de mesures tout en réduisant le plus possible le temps passé par l'expérimentateur à lancer les acquisitions afin de le recentré sur l'analyse des résultats.

Dans cet atelier, dans un premier temps, nous proposerons une initiation aux mesures de FCS et au calibrage de l'instrument et les conséquences sur l'analyse, puis nous réaliserons des mesures sur des facteurs de transcription (complexe de levée de pause : P-TEFb et ses partenaires). Nous verrons sur cette exemple les outils d'analyse de bases et ceux développé par le laboratoire. Nous aborderons ensuite les aspects d'automatisation de l'acquisition et de l'analyse des mesures.

Keywords

FCS, dynamique, automatisation

A121-Detecting protein aggregation and interactions in live cells: a practical on Number and Brightness

Proposer/Coanimateur

Luis Alvarez

Sergi Padilla-parra

Abstract

The possibility to detect and quantify protein-protein interactions with good spatial and temporal resolutions in live cells is crucial in biology. Number and Brightness is a powerful approach to detect both protein aggregation/desegregation dynamics and stoichiometry in live cells. Importantly, this technique can be applied in commercial set ups. We will use a commercial laser scanning confocal system with photon counting detectors to show participants how to carry out N&B acquisitions and how to properly analyse their data to quantitatively assess protein oligomerisation and protein-protein interactions.

Keywords

Number and Brightness; quantitative imaging; bleaching correction; protein-protein interactions; protein oligomerisation

A122-From visualization to quantitative analysis of ERK activity dynamics in single cell migration and collective cell migration using ratiometric FRET imaging.

Proposer/Coanimator

Francois Sipieter

Aymeric Leray

Abstract

Signal transduction networks transmit information about the external environment of the cell and integrate these inputs to trigger specific cell fate decisions. While biochemical data provided a detailed view of the molecular mechanisms involved in specific cellular processes, much less is known about how quantitative information is transmitted by these molecular networks. Extracellular signal-related kinase (ERK) mitogen-activated protein kinase, a Ser/Thr kinase, participates in the MAPK/ERK signaling cascade and is known to play a major role in multiple cellular processes. Live-cell imaging of a FRET biosensor for ERK activity revealed that ERK activity is pulsatile and that the modulation of these pulses both in frequency and amplitude drive or regulate cellular outcome.

ERK is known to phosphorylate several cytoskeletal proteins, and promotes single cell migration. Cell-to-cell propagation of ERK activation has been observed in a scratched confluent monolayer and it was recently shown that the propagation wave of ERK activation is anti-correlated to the direction of collective cell migration, reporting therefore on the crucial role of ERK in collective cell migration. We will first explain some practical aspects of FRET biosensors imaging in living cells. Then, we will monitor ERK activity both in isolated and in collectively migrating MDCK cells using an optimized version of the FRET biosensor for ERK activity, by intensity-based ratiometric imaging methods. We will sequentially visualize, monitor and analyze the biosensing data using our new home-made analysis software dedicated for FRET biosensor imaging and more specifically for quantitative analysis of ERK kinase activity pulses. We will therefore cover all the aspects of “FRET biosensing” from the visualization to the analysis part, leading finally to the generation of spatio-temporal profiles of ERK activity in two different cellular contexts, in the field of cellular migration.

Keywords

Migration – Collective cell migration – MAPK/ERK activity – Ratiometric FRET imaging – FRET biosensor – Oscillations.

A123-Spotlight on mitochondria: how it explodes and how it is digested

Proposer

Gabriel Ichim

Abstract

Mitochondria are the organelles of life and death: in life, they produce the energy needed for the survival of all cells while in death, they are the suicide capsule that could efficiently trigger the apoptotic process.

Apoptosis, which is the most-well studied form of cell death, relies on a central event called mitochondrial outer-membrane permeabilisation or MOMP. More precisely, lethal stresses activate

pore-forming proteins that will puncture the outer-mitochondrial membrane. As a consequence, several pro-apoptotic mitochondrial proteins are released into the cytosol, leading eventually to the activation of a class of proteases called caspases. Until now, MOMP was mainly visualized by monitoring the cytosolic release of mitochondrial proteins such as cytochrome c or SMAC. The major drawback of these techniques was that specifically permeabilised mitochondria were not actually visualized. In this workshop we propose to use a novel fluorescence reporter based on GFP re-localisation into the permeabilised mitochondria allowing real-time imaging of MOMP in live cells. Since damaged mitochondria are dangerous for the survival of the cell since they generate oxidative stress or could propagate MOMP, the unhealthy mitochondria are continuously removed through mitophagy. While well described mechanistically, mitophagy still lacks high-resolution imaging approaches. This workshop will also take advantage of state-of-the-art imaging techniques and microscopes (emphasis in confocal microscopy) to reveal new mechanistic insights into the dynamics of mitophagy.

Keywords

mitochondria, MOMP, fluorescence reporter, Cyto-GFP, Mito-mCherry, MOMP kinetics, mitophagy, PARKIN

A124-Tracing the internalization of bacteria into host cells using multidimensional high-content imaging

Proposer

Laurent Audry

Abstract

Host cells are challenged by bacterial pathogens, as the microbes are capable to hijack host trafficking pathways for their own purposes. Especially, intracellular bacteria reprogram host trafficking pathways to induce their endocytosis to avoid their delivery to hostile environments, such as the lysosome, and to determine their intracellular niche. For example, macropinocytosis is a key trafficking pathway that is subverted by bacterial pathogens. It has been shown that macropinocytosis is used by microbes to enter into cells or to change their intracellular localization, for example to rupture endocytic vacuoles. High-content imaging is the tool of choice to investigate the intracellular niche of bacterial pathogens. Using fluorescent markers, it is possible to decipher details of the host-pathogen crosstalk with high precision. Combining reporters for host factors and the bacteria with libraries of bacterial mutants provides the means to decipher how specific bacterial factors reprogram the host. With this workshop, we propose to use *Shigella* as model in such a high-content screening approach. A library of *Shigella* mutants will be tested to investigate how bacterial factors affect pathogen entry and the subversion of macropinocytosis. We will discuss challenges of high-content screening, such as data acquisition, analysis and appropriate interpretation of the obtained data.

Keywords

bacterial pathogens macropinocytosis host trafficking pathways endocytic vacuoles High-content imaging fluorescent markers

A126-Programming bioimage analysis workflows in python and R using Jupyter Notebook

Proposer/Coanimateur

Cedric Hassen-khodja

Volker Bäcker

Abstract

"The Jupyter Notebook is an open-source web application that allows you to create and share documents that contain live code, equations, visualizations and narrative text" (<http://jupyter.org/>). In the context of bioimage analysis it can provide a convenient way to create and share interactive teaching material. It can also be used to create, distribute and run image analysis workflows online, with the advantage that explanatory text and visualizations can be included. In this workshop we will show how to create image analysis workflows using Jupyter Notebook with python and R. The workflows will load the input images from the OMERO image database. The workshop will consist of short presentations to introduce each topic and Jupyter Notebooks containing further explanations, exercises and solutions. Each participant needs to have access to a computer with an internet connection. Participant can use their own laptop computers.

Keywords

Jupyter, bioimage analysis, statistics, workflows, python, R

A127-Comparaison de 3 méthodes de transparisation sur un nouveau système d'imagerie confocal rapide

Proposer/Coanimateur

Nicolas Goudin

Louison Lallemand

Abstract

L'imagerie 3D d'organes entiers à l'échelle micrométrique est un défi important à relever. Pour répondre à ces besoins, il est possible de rendre ces tissus transparents optiquement.

Un grand nombre de techniques de transparisation a été développé, dont certaines à base de solvants, d'autres à base de solutions aqueuses.

L'épaisseur toujours plus importante d'observation des échantillons entraîne un autre défi : la vitesse d'observation couplée à une bonne précision.

Après un bref rappel des différentes techniques nous proposerons lors de l'atelier 3 types de transparisation sur différents types d'échantillons allant de l'organoïde murin à l'organe de souris adulte : Organoïdes sans transparisation, Transparisation "simple" avec bain successif de TDE, Transparisation CUBIC (solution aqueuse), Transparisation DISCO (solvant)

Pour cela nous utiliserons un nouveau microscope confocal dédié à l'acquisition très rapide des échantillons couplé à un objectif à longue distance de travail.

Nous pourrons ainsi comparer l'efficacité des différentes méthodes de transparisation en mesurant le rapport signal sur bruit à différentes profondeurs. Et nous ferons un parallèle avec une autre technique d'acquisition rapide d'échantillon épais : le lightsheet (comparaison des résolution d'image, vitesse d'acquisition, etc.)

Keywords

Clearing, transpatisation, CUBIC, DISCO, TDE, MAVIG RS-G4, confocal rapide

A128-Full-field interferometric microscope for detection and sorting of label-free biotic and non-biotic nanoparticles

Proposer/Coanimator

Yasmina Fedala

Ignacio Izeddin

Abstract

At the Institut Langevin, ESPCI Paris, in collaboration with various Biology laboratories, we have developed a new, sensitive, interferometric, and non-destructive optical approach to detect label-free single (biotic) nanoparticles (NPs) that allows us to count and sort different types of nanoparticles (Boccaro et al, Biomed. Opt. Exp. 2016). In short, we measure the light scattered by the nanoparticles and obtain an interferometric signal related to their size; this measurement is complemented with single particle tracking of their Brownian motion.

With this technique, we have studied the diffusion properties of different biological samples such as bacteriophages in different aquatic environments, membrane and extracellular vesicles, etc. The ability of classifying virus in a given environment according to their size and structure is an essential tool in applications ranging from environmental to medical studies. In our previous experiments, we tested a number of samples from the Tara-Oceans expedition, as well as samples taken from the Marne River. One of the main concerns in rivers and water bodies remains the risk of fecal contamination and an abundance of small viruses has been correlated to fecal contamination. Our experiments indicated indeed an increase in viral abundance correlated with an increase in algal populations, often associated to toxin contamination.

Keywords

Bacteriophage; Interferometry; Single Particle Tracking; Brownian Motion; Anomalous diffusion; Anisotropy; Environment



A129-Probing mechanical properties of living cell cytoskeleton in Peak Force QNM

Proposer

Simone Bovio

Abstract

AFM is used in biology to obtain high-resolution topographies of cells, bacteria or supported membranes, to measure adhesion and specific interactions and to study cell elastic and viscoelastic properties. Specifically, for measuring mechanical properties, the AFM has to be used in force spectroscopy modality, generally realizing forces curves over a matrix of points covering the region of interest. A great effort is being devoted to the development of high speed AFMs for increasing the acquisition rate, so increasing the resolution of the maps and/or lowering the acquisition time. Peak Force QNM have been developed on this purpose. In this workshop, this technique will be used for measuring the Young's modulus of living animal cells. Cells will then be treated by cytochalasin in order to perturb the actin network and highlight its role on the measured mechanical properties. Part of the workshop will deal with the calibration procedure (of both the cantilever and the Peak Force QNM), which is fundamental for obtaining robust and reproducible data.

Keywords

AFM, Peak Force QNM, Young's modulus, cytoskeleton

A130-Probing mechanical properties of plant tissues

Proposer

Simone Bovio

Abstract

AFM in recent years has been widely used in biology for measuring mechanical properties (elasticity, viscoelasticity) of single cells. The scientific community is now trying to push the limits of the technique in moving from single cell to tissue analysis: an example is the study of mechanical properties of plant tissues. This transition is not easy, either from the point of view of data analysis and interpretation or technically. In fact, AFMs are conceived to achieve nanometric resolutions, so their scan range is generally limited, especially along the vertical (Z) direction, preventing the acquisition of maps on samples having strong height differences. Some higher range Z piezos are proposed by several companies. In particular, JPK offers an additional 100 μ m piezo (called CellHesion module) that is well suited for measurement on tissues.

In this workshop we will use this module for realizing mechanical measurements on hypocotyls of *Arabidopsis Thaliana*. On the technical side, the workshop will be focused in how to set up measurements on samples having height differences up to microns or tens of microns and on the possible artifacts induced by highly-tilted topography. On the biological side, it will be shown that there is an elasticity gradient along the long axis of the hypocotyl, reflecting the differential growth rate of cells along the organ, in going from the root toward the cotyledons.

Keywords

AFM, plant mechanical properties, CellHesion

A131-Tissue growth in confined environment: monitoring mechanotransduction with Hollowed Alginate Capsules

Proposer/Coanimateur

Gaelle Recher

Amaël Mombereau

Abstract

We are interested in the importance of mechanotransduction during cell and tissue growth in confined environment.

To address these questions, we have developed in the lab the "Cellular Capsule Technology", which consists in encapsulating cells within the liquid core of a hollow alginate capsule.

In this workshop we will image fluorescently labelled cells grown in an alginate shell in which we would have included fluorescent beads.

This imaging will be performed with a space-resolved microscope and will provide us 3D+time movies.

The joint analysis of both cell movements and beads displacement will provide insights about how cells sense and deform their surrounding environment, like they would do in physiological (developmental morphogenesis) or pathological context (tumourisation).

Keywords

mechanotransduction, organoids, force imaging, alginate hollow capsules

A132-Efficient plasma membrane staining using MemBright probes : from live dynamics to super-resolution

Proposer/Coanimateur

Lydia Danglot - Mayeul Collot

Abstract

The proper staining of the plasma membrane (PM) is critical in bioimaging as it delimits the cell surface. We developed MemBright: a family of efficient fluorescent PM probes that span their emission wavelengths from blue to near infra-red and offer homogeneous and selective PM staining with excellent contrast in imaging experiments due to their weak fluorescence in aqueous media and their important turn-on effect when anchored to the PM. These probes are compatible with live and fixed cells both in confocal and two-photon imaging and also successfully served in STED and STORM super resolution imaging. MemBright probes thus constitute a universal toolkit for biomembrane and neuroscience imaging with a variety of microscopy techniques. We propose to show how to handle these probes on live cells and with super-resolution imaging. To provide an overview of existing dyes, we will compare MemBright® staining with commercially available dyes like DiD, Fm dyes, mCling or WGA.

Keywords

Membrane probes, cell imaging, super-resolution, live cell dynamics

A171-Imaging Cylindrical / Tubular tissues to investigate intra-tissular micro-architecture, challenging the multi-view capabilities

Proposer

Gaëlle Recher

Abstract

During this workshop, we will address the question of imaging thick tissues in depth to resolve emergent self-organised tissue architecture.

As a sample model, we will use tubular alginate capsules, filled with fluorescent hepatic cells. Alginate capsule is used as a multifunction scaffold: 1/ it drives cells self-organisation by confining them in a prepatterned shape, 2/ it protects the cells from mechanical stress due to manipulation, 3/ when cells are confluent within the lumen of the tube, they are confined & eventually compressed by the alginate shell (the capsule is a mechanical cue), 4/ at the same time, due to action-reaction principle, the thinning of the capsule reflects the force cells exert to the capsule (the capsule is a mechanical sensor).

Because of all these features, cells behave as they would in a complex tissular environment and self-organise so that histological structures could spontaneously emerge.

We expect these hepatic cells to organise so that small cavities and eventually tubules (canalicules-like) spontaneously appear.

During this workshop, we will mount the alginate tubes on the sample holder (traditionally used for small objects embedded in agarose gel) and take advantage of the multiview light sheet to investigate the presence of cavities within the sample.

High-resolution / large field of view 3D stacks will then be processed and rendered to provide the best evidence of the presence of the structures.

Keywords

alginate hollowed tubes, hepatic cells, tissue self-organisation, multi-view in depth light sheet imaging

A172- Practical Fluorescence Correlation and Cross-Correlation Spectroscopy

Proposer

Thorsten Wohland

Abstract

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is a widely used tool to measure biomolecular dynamics and interactions in vitro and in vivo. However, researchers often shun the use of FCS due to its perceived difficulty. In this workshop, we will introduce FCS as a simple to apply method in solution and in cells. For this purpose, the participants will first calibrate the system with standard dyes to determine the size of the observation volume. We will then measure solutions of different viscosity and concentrations to demonstrate the capabilities of FCS to measure molecular dynamics and concentrations before measuring proteins in the cytosol and in the membrane of live cells. Finally, we will discuss artefacts and corrections to FCS measurements. This workshop does not require

any prior knowledge about FCS and is aimed at demonstrating how to get reliable results from FCS measurements in an acceptable time and how to judge the quality of FCS measurements in vitro and in vivo.

Keywords

FCS, FCCS

A173-Live zebrafish nervous system study using dual-sided illumination light-sheet microscopy

Proposer

Basile Gurchenkov

Abstract

Despite the spectacular advances in the field of microscopy, multidimensional imaging of living systems this task presents a great challenge. We will present the use of dual-sided illumination light-sheet microscopy in order to study the nervous system of living zebrafish larvae. We justify the use of this technique which, compared to other techniques (e.g. confocal laser scanning and spinning disc microscopy), allows for a deeper insight into dynamic biological processes.

Keywords

SPIM, Light-sheet, Nervous system

A174-Virtual Reality for better understanding of complex neuronal networks

Proposer

Basile Gurchenkov

Abstract

3D Morphometry is a challenging task. This workshop will demonstrate how virtual reality (VR) platform can facilitate it.

Morphometry of complex three-dimensional structures such as neuronal networks is a challenging task. Very often, it is extremely difficult to take properly into account the depth of the structures using a conventional two-dimensional screen. However, it is essential for the multiscale description of normal and pathological states of nervous systems. The existing VR solutions are sometimes limited in terms of length of usage as flickering or apparent displacement of the entire depth of field disconnected from the operator movement are very tiresome.

Our workshop, using the InViewR virtual reality (VR) platform from arivis, will demonstrate how VR can be applied to the visualization, understanding and analysis of multi-dimensional datasets produced by optical sectioning microscopy (confocal, live-cell imaging systems, multiphoton, light sheet, etc.).

We will use a panel of images from various biological samples acquired in the microscopy facility of the ICM, and if possible data acquired during MifoBio.

Procedure

- 1) Introduction of the model systems and difficulties of 2D study of 3D datasets.
- 2) Image acquisition strategies.
- 3) Introduction to arivis InViewR system
- 4) Playing around with datasets (visualization, analysis)
- 5) Concluding remarks - closing

Keywords

VR, Nervous system



PARTENAIRES ACADÉMIQUES

GdR Imagerie et Microscopie en Biologie –ImaBio- (CNRS - INSIS)	
Inserm (Formation permanente)	
France BioImaging (FBI)	
Réseau Technologique RTmfm CNRS	
Aviesan (ITMO BCBDE)	
Collège-de-France	 <p data-bbox="891 1497 1227 1651">COLLÈGE DE FRANCE — 1530 —</p>

<p>Q-Life Institut de Convergences – PSL Université (Paris)</p>	 
<p>Biolmaging Center of Lille (Plateforme de Microscopie et Imagerie des haut de france)</p>	
<p>Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris)</p>	
<h3>Autres GdR Partenaires (CNRS)</h3>	
<p>GdR –Ondes- (INSIS)</p>	
<p>GdR Information, Signal, Image et ViSionIsis – ISIS- (INS2I)</p>	
<p>GdR Architecture du Noyau –ADN- (INP)</p>	
<p>GdR Pyhisique de la cellule aux tissus –CellTiss- (INP)</p>	





SPONSORS

<p>Belambra</p> <p>http://www.belambra.fr/</p>	
<p>Boston micromachines corporation</p> <p>Michael Feinberg 30 Spinelli Place, Suite 103 Cambridge, MA 02138 T: +1 617 868 4178 mrf@bostonmicromachines.com</p>	
<p>Bruker</p> <p>Frédéric Eghiaian, Ph.D BioAFM specialist Bruker Nano Surfaces +33 (0)6 48 45 05 19 frederic.eghiaian@bruker.com https://www.bruker.com</p>	
<p>Myriade</p> <p>68 Bd de Port-Royal 75005 Paris Luc Talini luc.talini@lequattrocento.com</p>	
<p>PI</p> <p>https://www.physikinstrumente.com Stephane Bussa S.Bussa@pi.ws</p>	
<p>Physio-Extrem</p> <p>Pascal Zenatti pzenatti@physio-extrem.com http://www.physio-extrem.com/infos/</p>	

<p>Optoprim http://www.optoprim.com/ François Beck fbeck@optoprim.com Yann Joly yjoly@optoprim.com</p>	
<p>Tebu-bio Pierre Picard--Genod Account Manager Tel : +33 6 49 29 83 27 pierre.picard-genod@tebu-bio.com www.tebu-bio.com -</p>	
<p>THORLABS France Lydia Ouibrahim <i>Ingénieur support Technique</i> Tel : +33 (0)970 440 844 http://www.thorlabs.com techsupport.fr@thorlabs.com</p>	
<p>Twinkle Bioscience Luc Lenglet Président Twinkle Bioscience S.A.S 8 rue Mathilde Girault, 92300 Levallois-Perret +33 6 10 92 02 24 llenglet@gmail.com</p>	
<p>Vib & Tec Benjamin Maffé 06 71 25 31 33 Benjamin.MAFFE@vib-et-tec.fr</p>	 TECHNOLOGIES ANTIVIBRATOIRES COMPENSATION ELECTROMAGNETIQUE
Pauses café et prix	
<p>PI https://www.physikinstrumente.com/ Stephane Bussa S.Bussa@pi.ws</p>	 Piezo · Nano · Positioning
<p>Noroit 13, rue des coteaux de Grand Lieu, 44830 Bouaye www.noroitlabo.com Matthieu Rolland- Tél. 06 46 21 68 78 matthieurolland@noroitlabo.com</p>	

PARTENAIRES CULTURE 2018

<p> http://www.bertin.fr/ OLIVIER VARET olivier.varet@bertin.fr 33(0)1 39 30 62 91 33(0)6 79 13 03 96 </p>	
<p> GILLES VALARCHER Associate District Manager France & South Belgium +336 32 45 60 36 valarcherg@corning.com Tel Customer Service : 0800 916 882 E-mail Scientific Support : scientificsupporteu@corning.com </p>	
<p> http://www.dutscher.com MARIANNE MARCEAU mmarceau@dutscher.com 33(0)4.78.43.85.05 33(0)6.23.38.97.86 </p>	
<p> http://www.eppendorf.fr OLIVIER MBAREK mbarek.o@eppendorf.fr 33(0)1 30 15 67 45 33 (0)6 24 64 69 25 </p>	
<p> CYRIL DOMENJOZ Salesreps - Bioscience & Diagnostic Divisions Greiner Bio-One SAS T: · M: +33 6 09 65 14 08 · F: Cyril.Domenjoz@gbo.com · www.gbo.com </p>	
<p> MARION ARBAUDIE > Sales Manager/ Responsable Commerciale 11 rue du Drac - 38180 SEYSSINS- France ☎ +33 (0) 4 78 82 82 11 ☎ +33 (0) 6 28 08 54 08 m.arbaudie@clentgroup.com www.imebio.com </p>	

<p>CHRISTOPHE ZAFFANELLA Mail : christophe.zaffanella@instrumat.fr Tél : +33 (0)6 11 54 82 47 www.instrumat.fr <i>(Votre spécialiste en matériel de laboratoire)</i></p>	
<p>KARINE LABOUR Directrice Europe – Logos Biosystems Tel: 06 68 28 39 68 www.logosbio.com</p>	
<p>GERARD FONG-PONNE Support Technico-Commercial France Mobile: + 33 6 61 94 43 70 Telefon/Phone: +33 3 89 20 43 81 bureau de liaison Colmar Telefax/Fax: +33 3 89 20 43 79 gfontp@memmert.com</p>	
<p>Noroit www.noroitlabo.com 13, rue des coteaux de Grand Lieu 44830 Bouaye MATTHIEU ROLLAND Tél. 06 46 21 68 78 matthieurolland@noroitlabo.com SEBASTIEN COUDERT Tél. 06 03 60 06 16 sebastiencoudert@noroitlabo.com</p>	
<p>http://www.ozyme.fr/ ISABELLE AUFORT iaufort@ozyme.fr 33(0)1 30 85 92 92 33(0)6 75 01 40 77 Pierre-Olivier de FRANCO podefranco@ozyme.fr 33(0)6 70 79 48 38</p>	
<p>MIKAEL BERROU, Market Manager Be., Fr., Es. T: +33 (0)970 44 90 00 F: +44 (0)1462 424701 www.wpi-europe.com</p>	

PARTENAIRES MIFoBio 2018

<p>AbbeLight http://www.abelight.com/ Nicolas BOURG nbourg@abelight.com</p>	
<p>Andor –Bitplane http://www.andor.com/ William Fresquet w.fresquet@andor.com Bruno Combettes b.combettes@andor.com Georgia Golfis g.golfis@bitplane.com</p>	 
<p>ARGOLIGHT <i>Dr. Gautier PAPON - Co-Founder & CEO</i> <i>Tel : +33 (0)6 31 64 26 67</i> <i>Argolight, A Precision Company</i> www.argolight.com</p>	
<p>Vincent Hardy General Manager Tel : +33 624 597 741 Vincent HARDY vincent.hardy@alpao.fr https://www.alpao.com</p>	
<p>Alveolab www.alveolelab.com Marie-Charlotte Manus Operational Marketing Manager Alvéole 30 rue de Campo Formio - 75013 Paris - France Tel. : +33 (0)1 84 17 22 28 alveolelab.com</p>	
<p>Arivis AG Am Kabutzenhof 21, 18057 Rostock Germany fabien.bonnaud@arivis.com +337 89 83 63 78 https://www.arivis.com/</p>	

<p>BRUKER NANO SURFACES DIVISION https://www.bruker.com/fr.html jerome Beaumale jerome.beaumale@bruker.com Michel Biocco michel.biocco@bruker.com 7 rue de la Croix Martre 91120 Palaiseau, France Tel : +33 1 72 86 61 04</p>	
<p>COHERENT FRANCE Jean-Luc TAPIÉ - Directeur Commercial, Coherent France tel : +33 1 80 38 10 11 portable: +33 6 09 17 40 72 Dom. Techno. de Saclay – Bat. Azur 4 rue Rene Razel, 91892 Orsay Cedex – France jean-luc.tapie@coherent.com www.coherent.com</p>	
<p>Email: Liz.Stark@cooled.com Tel: +44 (0)1264 323040 US Toll Free: 1-800-877-0128 Fax: +44 (0)1264 723897 www.cooled.com</p>	
<p>Errol http://www.errol-laser.com/ Christian Hubert errol.laser@gmail.com</p>	
<p>Charlotte Dentzer Sales and Application Engineer Gataca systems 23 rue Aristide Briand 92170 Vanves Mobile : 06.80.72.49.68 http://www.gataca-systems.com/ eric.morcet@gataca-systems.fr</p>	
<p>GE Healthcare www.gelifesciences.com David Pointu david.pointu@ge.com Florian Bossard florian.bossard@ge.com</p>	

<p>HAMAMATSU PHOTONICS France www.hamamatsu.fr Antoine Discher adischer@hamamatsu.fr Bruno Enica benica@hamamatsu.fr 8, Rue du Saule Trapu Parc du Moulin de Massy, 91882 Massy Cédex – France Tel : 01 69 53 71 00</p>	
<p>Marie-George Côme, PhD Business Development Manager & Founder Marie-George.Come@Imagxcell.com Phone : 33 7 68 04 75 06</p>	
<p>Olivier CHANTEUX Co-founder & CEO olivier.chanteux@inscoper.com +33(0) 7 81 405 406 1137 A avenue des Champs Blancs 35510 Cesson-Sévigné www.inscoper.com</p>	
<p>Geoffrey ESTEBAN General Manager CAP ALPHA Avenue de l'Europe 34830 CLAPIERS – FRANCE Cell : +33 686 32 56 55 Office : +33 467 59 30 55 gesteban@iprasense.com</p>	
<p>LAVISION BIOTEC GmbH Christian Feuillet - Technico commercial TEL : 07 85 27 81 15 LaVision BioTec GmbH, Astastr. 14, 33617 Bielefeld Tel : 00 49 521 915139-0 feuillet@lavidionbiotec.com www.lavidionbiotec.com</p>	

<p>Rudy HUIS, PhD Leica Microsystems Life Science Research Division 1 RUE DU 1ER MAI, IMMEUBLE AXE SUR SEINE, HALL PARALLELE CS 50169, 92752 NANTERRE CEDEX Mobile. +33 (0)7 76 30 55 47 SAV OneCall : 01 56 05 23 26 sav.france@leica-microsystems.com</p>	
<p>Dr. Valérie Bonfardin Sales and Application Specialist MAVIG Research (PhD Biologie) Phone +49 (0) 89 420 96 359 bonfardin@mavig.com</p>	
<p>NEWPORT SPECTRAPHYSICS www.spectra-physics.com Sabrina Pfeffer Sabrina.Pfeffer@newport.com Guy Flaquière guy.flaquiere@spectra-physics.com Spectra-Physics 9, rue du Bois Sauvage 91055 Évry Cedex - France Office Tel: +33-1-60-91-68-68</p>	 <p>MICRO-CONTROLE une société Newport</p>  <p>Spectra-Physics. une société Newport</p>
<p>Lionel MALÉCOT Ligne directe : 06 72 36 45 41 Télécopie : 01 60 78 14 70</p>  <p>101 rue Pereire Parc Pereire – Bâtiment EH 78100 – Saint Germain en Laye www.micromecanique.fr</p>	 

<p>NIKON FRANCE S.A.S Sandrine Batard <i>Sales administration & Marketing Manager</i> DDI : +33(0)1 45 16 45 29 Mob : +33(0)6 85 59 47 48 sandrine.batard@nikon.fr 191 rue du marché rollay 94504 Champigny/Marne Cédex – France. www.nikon.fr</p>	
<p>OLYMPUS France Philippe Rouhier, Directeur Bio-industrie France et Benelux philippe.rouhier@olympus.fr 74 rue Arcueil – SILIC 165 94533 Rungis – France Tel : 01 45 60 23 46 www.olympus.fr</p>	
<p>Dr Raphael Jorand Applications Scientist raphael.jorand@oxfordni.com https://www.oxfordni.com/ +44 (0) 7465974857</p>	
<p>Oxxius http://www.oxxius.com/fr Pascal Voluer pvoluer@oxxius.com Arnaud Maguis namaguis@oxxius.com</p>	
<p>PHASICS http://www.phasicscorp.com/ Benoit Wattellier bw@phasics.fr Marie Begona Lebrun mbl@phasics.fr XTEC BAT 404 Campus de l'Ecole Polytechnique 91128 Palaiseau Tel : +33 1 69 33 89 93</p>	

<p>Phaseview http://phaseview.com/ Gael Launay gael.launay@phaseview.com</p>	
<p>PHOTON LINES Thomas Gelot th-gelot@photonlines.com 30 av de l'Amiral Lemonnier BP 51 78164 Marly le Roy Cedex Tel: 01 30 08 99 00 www.photonlines.com</p>	 <p>PHOTON LINES Solutions optiques</p>
<p>Antoine DUTRIAT ✉ a.dutriat@proteigene.com ☎ +33 (0)2.32.64.45.45 7 Rue Léo Lagrange - BP1134 27950 – Saint-Marcel France</p>	 <p>PROTEIGENE</p>
<p>SANOFI-SYNTHELABO Al Hassan CASSE Alhassan.Casse2@sanofi.com Global Biotherapeutics-Bio Innovation Molecular Histology group TÉL. : +33 (0) 1.58.93.81.13 13, Quai Jules Guesde 94400 – Vitry/Seine – France www.sanofi-aventis.com</p>	 <p>SANOFI</p>
<p>CARL ZEISS S.A.S Fabrice Schmitt Phone: +33 1 34 80 20 49 Mobile: +33 6 82 84 35 56 fschmitt@zeiss.fr http://www.zeiss.fr/micro 60, route de Sartrouville 78230 LE PECQ – France Tel: 01 34 80 20 49 www.zeiss.fr</p>	

LISTE DES PARTICIPANTS

ABÉLANET Sophie

IPMC
Valbonne, France
abelanet@ipmc.cnrs.fr

AGNIEL Rémy

Université Cergy Pontoise
Neuville Sur Oise, France
remy.agniel@u-cergy.fr

ALLIER Cédric

CEA-LETI
Grenoble, France
cedric.allier@cea.fr

ANCEAUME Estelle

Collège de France
Paris, France
estelle.anceaume@college-de-france.fr

ARGOUL Françoise

Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine
Talence, France
francoise.argooul@u-bordeaux.fr

AUDRY Laurent

Institut Pasteur
Paris, France
audry@pasteur.fr

BAFFOU Guillaume

Institut Fresnel
Marseille, France
guillaume.baffou@fresnel.fr

BALLUET Maël

Institut de Génétique et Développement
Rennes, France
mael.balluet@univ-rennes1.fr

BARDET SYLVIA

Xlim
Limoges, France
sylvia.bardetcoste@unilim.fr

AGBAZAHOU Florence

Physique, Lasers, Atomes et Molécules
Villeneuve D'Ascq, France
florence.agbazahou@univ-lille.fr

ALLART Sophie

CPTP
Toulouse, France
sophie.allart@inserm.fr

ALVAREZ Luis

Wellcome Centre Human Genetics
Oxford, United Kingdom
lalvarez@well.ox.ac.uk

ANDRIQUE Laetitia

Angiogenèse et microenvironnement des cancers
Pessac, France
laetitia.andrique@inserm.fr

ARVANITIS Constandina

Maladies Métaboliques et
Cardiovasculaires
Toulouse, France
constandina.arvanitis@inserm.fr

BÄCKER Volker

BioCampus
Montpellier, France
volker.baecker@mri.cnrs.fr

BALLAND Martial

Laboratoire Interdisciplinaire de Physique
Grenoble, France
martial.balland@univ-grenoble-alpes.fr

BANCEL Leslie

Bordeaux Imaging Center
Bordeaux, France
leslie.bancel-vallee@u-bordeaux.fr

BARDOU Marion

Institut des Sciences Moléculaires
Orsay, France
marion.bardou@u-psud.fr

BLOCHET Baptiste

Laboratoire Kastler Brossel
Paris, France
baptiste.bloch@lkb.ens.fr

BOKHOBZA Alexandre

Laboratoire de Physiologie Cellulaire
Villeneuve D'Ascq, France
alexandre.bokhobza@inserm.fr

BOLZE Frederic

Conception et Application de Molécules Bioactives
Illkirch, France
frederic.bolze@unistra.fr

BONGIOVANNI Antonino

Biomedicine Center Lille
Lille, France
antonino.bongiovanni@univ-lille.fr

BORGHI Nicolas

Institut Jacques Monod
Paris, France
nicolas.borghi@ijm.fr

BOUL Manon

ENS Cachan - Institut d'Alembert
Cachan, France
manon.boul@ens-cachan.fr

BOURGEOIS DOMINIQUE

Institut de Biologie Structurale
Grenoble, France
dominique.bourgeois@ibs.fr

BOVIO Simone

PLATIM SFR BioScience
Lyon, France
simone.bovio@ens-lyon.fr

BRAU Frédéric

Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Valbonne, France
brau@ipmc.cnrs.fr

BOCCARA Martine

Institut Langevin
Paris, France
martine.boccara@espci.fr

BOLTE Susanne

Institut de Biologie Paris-Seine
Paris, France
susanne.bolte@upmc.fr

BON Pierre

Laboratoire Photonique Numérique et
Nanosciences
Talence, France
pierre.bon@institutoptique.fr

BONNEFOND Sylvain

Institut de Physique de Nice
Sophia-Antipolis, France
sylvain.bonnefond@inphyni.cnrs.fr

BOROWCZYK Coraline

Institut des Sciences Moléculaires
Talence, France
coraline.borowczyk@u-bordeaux.fr

BOURDEAUX Jessie

LBCMCP
Toulouse, France
jessie.bourdeaux@univ-tlse3.fr

BOUTIN Lola

Université de Nantes
Nantes, France
lola.boutin@univ-nantes.fr

BRASSELET Sophie

Institut Fresnel
Marseille, France
sophie.brasselet@fresnel.fr

BRESSON-BÉPOLDIN Laurence

FR TransBioMed
Bordeaux, France
laurence.bresson-bepoldin@inserm.fr

BRETONNIERE Yann

ENS - Laboratoire de Chimie
Lyon, France
yann.bretonniere@ens-lyon.fr

BROCARD Lysiane

Bordeaux Imaging Center
Bordeaux, France
lysiane.brocard@inra.fr

BRUNOUD Géraldine

Reproduction et Développement des Plantes
Lyon, France
geraldine.brunoud@ens-lyon.fr

BUN Philippe

Centre de Psychiatrie et de Neurosciences
Paris, France
philippe.bun@inserm.fr

CABILLIC Marine

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
marine.cabillic@u-bordeaux.fr

CACCIANINI Laura

Institut Curie
Paris, France
laura.caccianini@curie.fr

CANEVER Helena

Institut Jacques Monod
Paris, France
helena.canever@ijm.fr

CANTEREAU Anne

Signalisation et transports ioniques membranaires
Poitiers, France
anne.cantereau@univ-poitiers.fr

CARL Philippe

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
Illkirch, France
philippe.carl@unistra.fr

BREVIER Julien

Xlim
Limoges, France
julien.brevier@unilim.fr

BROCH Fanny

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
fanny.broch@ens.fr

BRUSTLEIN Sophie

Institut de Biologie du Développement
Marseille, France
sophie.brustlein@univ-amu.fr

BUTLER Corey

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
corey.butler@u-bordeaux.fr

CABRIEL Clément

Institut des Sciences Moléculaires
Orsay, France
clement.cabriel@ens-paris-saclay.fr

CAMPALANS Anna

CEA - Institut de Biologie François Jacob
Fontenays Aux Roses, France
anna.campalans@cea.fr

CANTALOUBE Sylvain

Centre de Biologie Intégrative
Toulouse, France
sylvain.cantaloube@ibcg.biotoul.fr

CARDOSO DOS SANTOS Marcelina

Biologie Intégrative de la Cellule
Orsay, France
marcelina.cardoso-dos-santos@i2bc.paris-saclay.fr

CARRION Claire

CRIBL
Limoges, France
claire.carrion@unilim.fr

CAU Julien

BioCampus
Montpellier, France
julien.cau@igh.cnrs.fr

CAVELLINI Laetitia

Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes
Paris, France
laetitia.cavellini@ibpc.fr

CHATRE Elodie

PLATIM SFR BioScience
Lyon, France
elodie.chatre@ens-lyon.fr

CHEVROLIER Arnaud

MitoLab
Angers, France
arnaud.chevrollier@univ-angers.fr

CHOU Qiao-Ling

Laboratoire Aimé Cotton
Antony, France
qiao-ling.chou@u-psud.fr

CIFLIKU VJONA

NanoBioPhotonics
Orsay, France
vjona.cifliku@i2bc.paris-saclay.fr

CLAUZIER Laura

Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique
Grenoble, France
laura.clauzier@grenoble-inp.fr

COLIN Sebastien

Station biologique
Roscoff, France
colin@sb-roscoff.fr

CONTREMOULINS Vincent

Institut Jacques Monod
Paris, France
vincent.contremoulins@ijm.fr

CAVDARLI Sumeyye

Glycobiologie structurale et fonctionnelle
Villeneuve D'Ascq, France
sumeyye.cavdarli@univ-lille1.fr

CHAMPELOVIER Dorian

Physique, Lasers, Atomes et Molécules
Villeneuve D'Ascq, France
dorian.champelovier@univ-lille.fr

CHEVALIER Clément

Center for Microscopy and Molecular Imaging
Gosselies, Belgique
clement.chevalier@ulb.ac.be

CHOJNACKI Jakub

Retrovirology and Clinical Studies (GREC)
Barcelona, Spain
jchojnacki@irsicaixa.es

CHOUKET Raja

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
raja.chouket@ens.fr

CINQUIN Bertrand

Laboratoire de Biologie et Pharmacologie
Appliquée
Cachan, France
bcinquin@ens-cachan.fr

CODRON Philippe

MitoLab
Angers, France
philippe.codron@inserm.fr

COMTE Jean-Christophe

Centre de Recherche en Neurosciences
Lyon, France
jchrist.comte@gmail.com

CORDELIÈRES Fabrice

Bordeaux Imaging Center
Bordeaux, France
fabrice.cordelieres@u-bordeaux.fr

CORIDON Jennifer

Centre Universitaire des Saints Pères
Paris, France
jennifer.coridon@hotmail.fr

COURTAIS Elise

Microbiologie et Génétique Moléculaires
Toulouse, France
elise.courtais@ibcg.biotoul.fr

DANGLOT Lydia

Centre de Psychiatrie et de Neurosciences
Paris, France
lydia.danglot@inserm.fr

DAUPHIN Aurélien

Génétique et biologie du développement
Paris, France
aurelien.dauphin@curie.fr

DE KERNIER Isaure

CEA-LETI
Grenoble, France
isaure.dekernier@cea.fr

DE LIMA Julien

Phy-Os
Nantes, France
julien.de-lima@inserm.fr

DEBARBIEUX Franck

Institut de Neurosciences Timone
Marseille, France
franck.debarbieux@univ-amu.fr

DELON Antoine

Laboratoire Interdisciplinaire de Physique
Grenoble, France
antoine.delon@univ-grenoble-alpes.fr

DETAILLEUR Brice

Institut de Biologie du Développement
Marseille, France
brice.detailleur@univ-amu.fr

COULON Antoine

Institut Curie
Paris, France
antoine.coulon@curie.fr

D'ANGELO Romina

Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
Toulouse, France
romina.dangelo@inserm.fr

DANIEL Jonathan

Institut des Sciences Moléculaires
Talence, France
jonathan.daniel@u-bordeaux.fr

DAVIAUD Daniele

Centre de Physiopathologie
Toulouse, France
daniele.daviaud@inserm.fr

DE LEEUW Frederic

Plate-Forme Imagerie et Cytométrie
Villejuif, France
frederic.deleeuw@gustaveroussy.fr

DE ROSSI Sylvain

BioCampus
Montpellier, France
sylvain.derossi@mri.cnrs.fr

DECIMO Didier

CIRI - Infectiologie
Lyon, France
didier.decimo@ens-lyon.fr

DESJARDINS Simon

ENS - Institut de biologie
Paris, France
simon.desjardins@ens.fr

DIETERLEN Alain

Informatique, Mathématiques, Automatique et
Signal
Mulhouse, France
alain.dieterlen@uha.fr

DOKMEGANG Joel

Complex Systems and Machine Intelligence
Manchester, United Kingdom
joel.dokmegang-kassap@stu.mmu.ac.uk

DOUTRELIGNE Sébastien

Institut Pasteur
Paris, France
sebastien.doutreligne@pasteur.fr

DUFFRAISSE Marilyne

Institut de Génomique Fonctionnelle
Lyon, France
Marilyne.Duffraisse@ens-lyon.fr

DUMONT Julien

Collège de France
Paris, France
julien.dumont@college-de-france.fr

DUPOIS Guillaume

Fédération Lumière Matière
Orsay, France
guillaume.dupuis@u-psud.fr

DUREL Béatrice

Institut Cochin
Paris, France
beatrice.durel@inserm.fr

EJSMONT Paulina

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière
Paris, France
paulina@ejsmont.net

EL-KIRAT-CHATEL Sofiane

LCPME
Villers Les Nancy, France
elkirat1@univ-lorraine.fr

ESCALLIER Natacha

Pharmacologie et Biologie Structurale
Toulouse, France
Natacha.Escalier@ipbs.fr

DONNADIEU Emmanuel

Institut Cochin
Paris, France
emmanuel.donnadieu@inserm.fr

DUBREIL Laurence

PanTher
Nantes, France
laurence.dubreil@oniris-nantes.fr

DUFOUR Samy

Institut de Biologie Structurale
Grenoble, France
samy.dufour@etu.univ-grenoble-alpes.fr

DUPRÉ Catherine

GEPEA
Nantes, France
catherine.dupre@univ-nantes.fr

DURDEVIC Ljiljana

Institut Fresnel
Marseille, France
ljiljana.durdevic@fresnel.fr

DUTERTRE Stéphanie

Biosit
Rennes, France
stephanie.dutertre@univ-rennes1.fr

EL BEHEIRY Mohamed

Institut Curie
Paris, France
mohamed.el-beheiry@curie.fr

ENNINGA Jost

Institut Pasteur
Paris, France
jost.enninga@pasteur.fr

ESCUDE Christophe

Muséum National d'Histoire Naturelle
Paris, France
christophe.escude@mnhn.fr

FABRE Laura

Ingénierie des Matériaux Polymères
Villeurbanne, France
laura.fabre@insa-lyon.fr

FALLET Mathieu

Centre d'Immunologie de Marseille Luminy
Marseille, France
fallet@ciml.univ-mrs.fr

FAVARD Cyril

IRIM - Infectiologie
Montpellier, France
cyril.favard@irim.cnrs.fr

FEDALA yasmina

Institut Langevin
Paris, France
yasmina.fedala@espci.fr

FERNANDEZ-MONREAL Monica

Bordeaux Imaging Center
Bordeaux, France
monica.fernandez-monreal@u-bordeaux.fr

FERREIRA Joana

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
joana.ferreira@u-bordeaux.fr

FLEURISSON Romain

PanTher
Nantes, France
romain.fleurisson@oniris-nantes.fr

FORRIÈRE Hisham

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
hisham.forriere@etu.u-bordeaux.fr

FOUQUET Stephane

Institut de la Vision
Paris, France
stephane.fouquet@inserm.fr

FAKLARIS Orestis

Institut Jacques Monod
Paris, France
orestis.faklaris@ijm.fr

FAUNY Jean-Daniel

I2CT
Strasbourg, France
jd.fauny@ibmc-cnrs.unistra.fr

FAVIER Arnaud

Ingénierie des Matériaux Polymères
Villeurbanne Cedex, France
arnaud.favier@univ-lyon1.fr

FENG Yan

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
yan.feng@cnrs.fr

FERRARO Teresa

Biologie du Développement
Paris, France
teresa.ferraro@sorbonne-universite.fr

FERRER ORTAS Júlia

Laboratoire d'Optique et Biosciences
Palaiseau, France
julia.ferrer-ortas@polytechnique.edu

FLORES-FLORES Rémy

Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
Toulouse, France
remy.flores-flores@inserm.fr

FORTUN Denis

ICUBE
Illkirch, France
dfortun@unistra.fr

FOURNIER Corinne

Laboratoire Hubert Curien
Saint-Etienne, France
fcorinne@univ-st-etienne.fr

FOURNIER Marie

Physique, Lasers, Atomes et Molécules
Villeneuve D'Ascq, France
marie.fournier@univ-lille.fr

FRAISIER Vincent

Institut Curie
Paris, France
vincent.fraisier@curie.fr

FRÉTAUD Maxence

Virologie et immunologie moléculaires
Jouy En Josas, France
maxence.fretaud@inra.fr

G. MARTINS Gabriel

Advanced Imaging Facility - IGC
Oeiras, Portugal
gaby@igc.gulbenkian.pt

GALLAND Rémi

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
remi.galland@u-bordeaux.fr

GARNIER Mickaël

Institut Curie
Paris, France
mickael.garnier@curie.fr

GEORGET Virginie

Plateforme Montpellier Ressources Imagerie
Montpellier, France
virginie.georget@mri.cnrs.fr

GISSOT Lionel

Institut Jean-Pierre Bourgin
Versailles, France
lionel.gissot@inra.fr

GODEFROY David

DC2N
Rouen, France
david.godefroy@inserm.fr

FRAIN Monique

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
monique.frain@inaf.cnrs-gif.fr

FRANETICH Jean-François

Immunologie et Maladies Infectieuses
Paris, France
jean-francois.franetich@upmc.fr

FURLAN Alessandro

Physique, Lasers, Atomes et Molécules
Villeneuve D'Ascq, France
alessandro.furlan@univ-lille.fr

GALGANI Tommaso

Institut Curie
Paris, France
tommaso.galgani@curie.fr

GARCIN Isabelle

Interactions Cellulaires et Physiopathologie
Hépatique
Orsay, France
isabelle.garcin@u-psud.fr

GENY David

Institut de Psychiatrie et Neurosciences
Paris, France
david.geny@inserm.fr

GILLES Jean-François

Institut de Biologie Paris-Seine
Paris, France
jean-francois.gilles@sorbonne-universite.fr

GLUSHONKOV Oleksandr

Institut de Biologie Structurale
Grenoble, France
sasha.glushonkov@gmail.com

GORA Radoslaw jakub

Faculty of Science, Institute of Biology
Leiden, The Netherlands
r.j.gora@biology.leidenuniv.nl

GORSHKOVA Oksana

Inserm
Marseille, France
oksana.gorshkova@inserm.fr

GOURIOU Yves

IHU OPERA
Bron, France
yves.gouriou@univ-lyon1.fr

GRICHINE Alexei

Institute for Advanced Biosciences
La Tronche, France
alexi.grichine@univ-grenoble-alpes.fr

GUILBERT Thomas

Institut Cochin
Paris, France
thomas.guilbert@inserm.fr

GURCHENKOV Basile

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière
Paris, France
basile.gurchenkov@inserm.fr

HAMMONS Mark

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
mark.hammons@inaf.cnrs-gif.fr

HELIOT Laurent

Physique, Lasers, Atomes et Molécules
Villeneuve D'Ascq, France
laurent.heliot@univ-lille1.fr

HIVERT Bruno

Institut de Neurosciences Timone
Marseille, France
bruno.hivert@univ-amu.fr

HOUEL Ludivine

Centre de Photonique Biomédicale
Orsay, France
ludivine.houel-renault@u-psud.fr

GOUDIN Nicolas

Hopital Necker
Paris, France
nicolas.goudin@inserm.fr

GRANDGIRARD Erwan

IGBMC
Illkirch, France
grandgie@igbmc.fr

GUEDJ Chloé

Institut Jacques Monod
Paris, France
chloe.guedj@ijm.fr

GUIOT Elvire

IGBMC
Illkirch, France
guiote@igbmc.fr

HAEBERLÉ Olivier

Informatique, Mathématiques, Automatique et
Signal
Mulhouse, France
olivier.haeberle@uha.fr

HASSEN-KHODJA Cedric

Centre de Recherche en Biologie cellulaire
Montpellier, France
cedric.hassen-khodja@mri.cnrs.fr

HERTZOG Maud

Centre de Biologie Intégrative
Toulouse, France
maud.hertzog@ibcg.biotoul.fr

HOFER Matthias

Institut Fresnel
Marseille, France
matthias.hofer@fresnel.fr

HULIN Philippe

Plateforme MicroPICell
Nantes, France
philippe.hulin@inserm.fr

IAKOBACHVILI Nino

M4I Nanoscopy Division
Maastricht, Netherlands
n.iakobachvili@maastrichtuniversity.nl

IDIER JEROME

Lab. des Sciences du Numérique
Nantes, France
jerome.idier@ls2n.fr

JALIL Abdelali

Physiologie Cérébrale
Paris, France
ali.jalil@parisdescartes.fr

JOUD Fadwa

Cancer Research UK Cambridge Institute
Cambridge, United Kingdom
fadwa.joud@cruk.cam.ac.uk

KAMARAJ Mageshi

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
mageshi.kamaraj@cnrs.fr

KERLIN Maciej

Institut Curie
Paris, France
maciej.kerlin@curie.fr

KLYMCHENKO Andrey

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
Illkirch, France
andrey.klymchenko@unistra.fr

LACHAMBRE Simon

Institut de Biologie Valrose
Nice, France
slachambre@unice.fr

LALLEMANT Louison

Hopital Necker
Paris, France
louison.lallemant@gmail.com

ICHIM Gabriel

CRCL Lyon
Lyon, France
gabriel.ichim@lyon.unicancer.fr

IZEDDIN Ignacio

Institut Langevin
Paris, France
ignacio.izeddin@espci.fr

JOUCHET Pierre

Institut des Sciences Moléculaires
Orsay, France
pierre.jouchet@u-psud.fr

JOVANIC Svetlana

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
svetlana.jovanic@cnrs.fr

KARDASH Elena

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
elena.kardash@cnrs.fr

KILINC Devrim

Institut Pasteur de Lille
Lille, France
devrim.kilinc@pasteur-lille.fr

KURZAWA Laëtitia

CEA - Institut de Biosciences et Biotechnologies
Grenoble, France
laetitia.kurzawa@cea.fr

LAGADEC Ronan

Biologie Intégrative des organismes marins
Banyuls-Sur-Mer, France
lagadec@obs-banyuls.fr

LANGEVIN Christelle

Virologie et immunologie moléculaires
Jouy En Josas, France
christelle.langevin@inra.fr

LAUSSU Julien

CRBM
Montpellier, France
julien.laussu@crbm.cnrs.fr

LE MARCHAND Gilles

Institut de Génétique et Développement
Rennes, France
gilles.le-marchand@univ-rennes1.fr

LEBRETON Corinne

Institut IMAGINE
Paris, France
corinne.lebreton@inserm.fr

LECONTE Ludovic

Institut Curie
Paris, France
ludovic.leconte@curie.fr

LELANDAIS Benoit

Institut Pasteur
Paris, France
benoit.lelandais@pasteur.fr

LETEUR Céline

I-STEM
Corbeil-Essonnes, France
cleteur@istem.fr

LEVET Florian

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
florian.levet@inserm.fr

LUCCARDINI Camilla

Institut NeuroMyogène
Lyon, France
camilla.luccardini@univ-lyon1.fr

MAILFERT Sébastien

Centre d'Immunologie de Marseille Luminy
Marseille, France
mailfert@ciml.univ-mrs.fr

LE BARS Romain

Institut de Biologie Intégrative de la Cellule
Gif Sur Yvette, France
romain.lebars@i2bc.paris-saclay.fr

LE SAUX Thomas

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
thomas.lesaux@ens.fr

LECART Sandrine

I2BC
Gif Sur Yvette, France
sandrine.lecart@u-psud.fr

LEGLAND David

Biopolymères, Interactions Assemblages
Nantes, France
david.legland@inra.fr

LERAY Aymeric

Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne
Dijon, France
aymeric.leray@u-bourgogne.fr

LÉVÊQUE-FORT Sandrine

Institut des Sciences Moléculaires
Orsay, France
sandrine.leveque-fort@u-psud.fr

LINARÈS-LOYEZ Jeanne

Laboratoire Photonique Numérique et
Nanosciences
Talence, France
jeanne.linares@institutoptique.fr

LYONNAIS Sébastien

Maladies infectieuses et Pharmacologie anti-
infectieuse
Montpellier, France
sebastien.lyonnais@cemipai.cnrs.fr

MALLEVAL Céline

Institut NeuroMyogène
Lyon, France
celine.malleval@inserm.fr

MALMANCHE Nicolas

Institut Pasteur de Lille
Lille, France
nicolas.malmanche@pasteur-lille.fr

MANGEAT Thomas

Centre de Biologie Intégrative
Toulouse, France
thomas.mangeat@univ-tlse3.fr

MARCHAND Marion

Collège de France
Paris, France
marion.marchand@college-de-france.fr

MATEOS ESTEVEZ Nicolas

ICFO - The institute of Photonic science
Castelldefels, Spain
nicolas.mateos@icfo.eu

MAU Adrien

Institut des Sciences Moléculaires
Orsay, France
adrien.mau@u-psud.fr

MÈGE René-Marc

Institut Jacques Monod
Paris, France
rene-marc.mege@ijm.fr

MEROLA Fabienne

Laboratoire de Chimie Physique
Orsay, France
fabienne.merola@u-psud.fr

MICHEL Deborah

Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
Toulouse, France
deborah.michel@inserm.fr

MOMBEREAU Amaël

Laboratoire Photonique Numérique et
Nanosciences
Talence, France
amael.mombereau@institutoptique.fr

MANDULA Ondrej

CEA-LETI
Grenoble, France
Ondrej.MANDULA@cea.fr

MANOLIU Tudor

Institut du Cerveau et de la Moëlle épinière
Paris, France
tudor.manoliu@icm-institute.org

MARTIN Emmanuel

LBCMCP
Toulouse, France
emmanuel.martin1@univ-tlse3.fr

MATTHEWS Cédric

Institut de Biologie du Développement
Marseille, France
cedric.matthews@univ-amu.fr

MAZARS Anne

Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
Toulouse, France
anne.mazars@inserm.fr

MENETRIER Franck

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation
Dijon, France
franck.menetrier@inra.fr

MIART Fabien

Institut Jean-Pierre Bourgin
Versailles, France
fabien.miard@inra.fr

MILLECAMPS Aymeric

Institut du Cerveau et de la Moëlle épinière
Paris, France
aymeric.millecamps@icm-institute.org

MONERON Gael

Institut Pasteur
Paris, France
gael.moneron@pasteur.fr

MONIER Karine

Centre de Recherche en Cancérologie
Lyon, France
karine.monier@lyon.unicancer.fr

MORETTI Claudio

Laboratoire Kastler Brossel
Paris, France
claudio.moretti@lkb.ens.fr

MORICHON Romain

Plateforme d'imagerie St Antoine
Paris, France
romain.morichon@upmc.fr

MURIA Aurélie

Centre de Recherche sur la Cognition Animale
Toulouse, France
aurelie.muria@univ-tlse3.fr

MUTTERER Jerome

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
Strasbourg, France
jerome.mutterer@cnsr.fr

NGUYEN Hanh

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
hanh.nguyen@cnsr.fr

NOYER Lucile

Laboratoire de Physiologie Cellulaire
Villeneuve D'Ascq, France
lucile.noyer@inserm.fr

OLIVIER Thomas

Laboratoire Hubert Curien
Saint-Etienne, France
thomas.olivier@univ-st-etienne.fr

PASCUAL Olivier

Institut NeuroMyoGène
Lyon, France
olivier.pascual@inserm.fr

MONNERET Serge

Institut Fresnel
Marseille, France
serge.monneret@fresnel.fr

MORGADO BRAJONES Javier

ITAV
Toulouse, France
javier.morgado@itav.fr

MUÑOZ SÁNCHEZ Salomé

Faculty of Science. Institute of Biology
Leiden, The Netherlands
s.munoz.sanchez@biology.leidenuniv.nl

MURIAUX Delphine

IRIM - Infectiologie
Montpellier, France
delphine.muriaux@irim.cnsr.fr

NEDELLEC Steven

Plateforme MicroPICell
Nantes, France
steven.nedellec@univ-nantes.fr

NIEPCERON Frédéric

Institut des molécules et matériaux du Mans
Le Mans, France
frederick.niepceron@univ-lemans.fr

OKOCK Polycarp

Slovak University of Technology
Bratislava, Slovakia
polycarp.okock@tatramed.sk

PADILLA-PARRA Sergi

Wellcome Centre Human Genetics
Oxford, United Kingdom
spadilla@well.ox.ac.uk

PAUL-GILLOTEAUX Perrine

Plateforme MicroPICell
Nantes, France
perrine.paul-gilloteaux@univ-nantes.fr

PECQUEUR David

Observatoire Océanologique
Banyuls Sur Mer, France
pecqueur@obs-banyuls.fr

PELLISSIER-TANON Agnès

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
agnes.pellissier-tanon@ens.fr

PERRIN Grégoire

Observatoire Océanologique
Banyuls Sur Mer, France
gregoire.perrin@obs-banyuls.fr

PEZET Mylene

Institut pour l'Avancée des Biosciences
Grenoble, France
mylene.pezet@inserm.fr

PINOT Anthony

Institut de Génomique Fonctionnelle
Montpellier, France
anthony.pinot@igf.cnrs.fr

PIOLOT Tristan

Collège de France
Paris, France
tristan.piolot@college-de-france.fr

POINCLOUX Renaud

Pharmacologie et Biologie Structurale
Toulouse, France
renaud.poincloux@ipbs.fr

POUJOL Christel

Bordeaux Imaging Center
Bordeaux, France
christel.poujol@u-bordeaux.fr

PRIGENT Sylvain

France Bio Imaging
Rennes, France
sylvain.prigent@inria.fr

PEIXOTO Antonio

Pharmacologie et Biologie Structurale
Toulouse, France
antonio.peixoto@ipbs.fr

PERESSE Tiphaine

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
tperesse@ens.fr

PEYRIERAS Nadine

BioEmergences
Gif Sur Yvette, France
nadine.peyrieras@cnrs.fr

PIETTE Nathalie

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
nathalie.piette@u-bordeaux.fr

PINSON Xavier

Biosit
Rennes, France
xavier.pinson@univ-rennes1.fr

PLACE Christophe

ENS - Laboratoire de Physique
Lyon, France
christophe.place@ens-lyon.fr

POUCHIN Pierre

Génétique, Reproduction et Développement
Clermont-Ferrand, France
pierre.pouchin@uca.fr

POUZET Cécile

Agrobiosciences Interactions et Biodiversités
Auzeville, France
pouzet@lrsv.ups-tlse.fr

RAMEL Damien

Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
Toulouse, France
damien.ramel@inserm.fr

RASTI Pejman

LARIS
Angers, France
pejman.rasti@univ-angers.fr

REISCH Andreas

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
Illkirch, France
reisch@unistra.fr

RENSEN Elena

Institut Pasteur
Paris, France
elena.rensen@pasteur.fr

RIQUET Franck

Death Dynamics Team
Ghent, Belgium
franck.riquet@irc.vib-UGent.be

ROBERT Hadrien

Institut Fresnel
Marseille, France
robert@fresnel.fr

RONDE Philippe

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
Illkirch, France
philippe.ronde@unistra.fr

RONSIN Brice

Centre de Biologie Intégrative
Toulouse, France
brice.ronsin@univ-tlse3.fr

ROUQUETTE Jacques

ITAV
Toulouse, France
jacques.rouquette@itav.fr

ROUVIERE Christian

Biologie du Développement
Villefranche/Mer, France
rouvriere@obs-vlfr.fr

RAULIN Lesly

Institut Pasteur
Paris, France
lesly.raulin@pasteur.fr

RENAUD Olivier

Institut Curie
Paris, France
olivier.renaud@curie.fr

RIGATO Annafrancesca

Institut Fresnel
Marseille, France
annafrancesca.rigato@fresnel.fr

RIVIERE Charlotte

Institut Lumière Matière
Villeurbanne, France
charlotte.riviere@univ-lyon1.fr

ROMANS Pascal

Observatoire Océanologique
Banyuls Sur Mer, France
pascal.romans@obs-banyuls.fr

RONSCH Julia

Institut Curie
Paris, France
julia.ronsch@curie.fr

ROSSIER Olivier

Institut Interdisciplinaire des Neurosciences
Bordeaux, France
olivier.rossier@u-bordeaux.fr

ROUSSEAU David

LARIS
Angers, France
david.rousseau@univ-angers.fr

RUNSER Anne

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
Illkirch, France
anne.runser@unistra.fr

SAGE Daniel

EPFL - Biomedical Imaging Group
Lausanne, Suisse
daniel.sage@epfl.ch

SALOMÉ-DESNOULEZ Sophie

Biolmaging Center Lille
Lille, France
sophie.salome-desnoullez@ibl.cnrs.fr

SAOUDI Yasmina

Institut des Neurosciences
La Tronche, France
yasmina.saoudi@univ-grenoble-alpes.fr

SAVATIER Julien

Institut Fresnel
Marseille, France
julien.savatier@fresnel.fr

SELLÉS Julien

Institut de Biologie Physico-Chimique
Paris, France
julien.selles@ibpc.fr

SIMON Bertrand

Laboratoire Photonique Numérique et
Nanosciences
Talence, France
bertrand.simon@institutoptique.fr

SIPKA Tamara

Interactions Membranaires Normales et
Pathologiques
Montpellier, France
tamara.sipka@etu.umontpellier.fr

SOLER Marie-Noëlle

Institut Curie
Orsay, France
marie-noelle.soler@curie.fr

SRIDHAR Susmita

Institut Curie
Paris, France
susmita.sridhar@curie.fr

SALLES Audrey

Institut Pasteur
Paris, France
audrey.salles@pasteur.fr

SALOMON Antoine

INRIA
Rennes, France
antoine.salomon@inria.fr

SARRI Barbara

Institut Fresnel
Marseille, France
barbara.sarri@fresnel.fr

SCHAPMAN Damien

Plate-forme PRIMACEN
Mont Saint Aignan, France
damien.schapman@univ-rouen.fr

SENGER fabrice

CytoMorphoLab
Grenoble, France
fabrice.senger@cea.fr

SIPIETER Francois

Institut Jacques Monod
Paris, France
francois.sipieter@ijm.fr

SIZAIRE Florian

Institut de Génétique et Développement
Rennes, France
florian.sizaire@univ-rennes1.fr

SOULEZ Ferréol

Centre de Recherche Astrophysique
Lyon, France
ferreol.soulez@univ-lyon1.fr

TANGARA astou

ENS - Institut de biologie
Paris, France
tangara@biologie.ens.fr

TARDIVEL Meryem

Bioluminescence Center Lille
Lille, France
meryem.tardivel@univ-lille.fr

TEBO Alison

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
alison.tebo@ens.fr

TEMAGOULT Mébarek

Biologie du Développement
Villefranche/Mer, France
mebarek@obs-vlfr.fr

TERRYN Christine

Plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire
Reims, France
christine.terryn@univ-reims.fr

THOMAS Laurent

Université d'Heidelberg
Heidelberg, Germany
l.thomas@acquiifer.de

TOURET Anne-Lou

Institut Pasteur
Paris, France
anne-lou.touret@pasteur.fr

TROUVÉ Jennyfer

Institut de Biologie Structurale
Grenoble, France
jennyfer.trouve@gmail.com

VACHIAS Caroline

Génétique, Reproduction et Développement
Clermont-Ferrand, France
caroline.vachias@uca.fr

VANDERPERRE Solène

Institut de Génétique Fonctionnelle
Lyon, France
solene.vanderperre@ens-lyon.fr

TAUC Patrick

Laboratoire de Biologie et Pharmacologie
Appliquée
Cachan, France
tauc@lbpa.ens-cachan.fr

TEILLON Jérémie

Biologie des maladies cardiovasculaires
Pessac, France
jeremie.teillon@inserm.fr

TERRAS Ferial

Laboratoire Aimé Cotton
Orsay, France
feriel.terras@u-psud.fr

TERUEL Elodie

CIRI - Infectiologie
Lyon, France
elodie.teruel@ens-lyon.fr

TORERO Raoul

Physique, Lasers, Atomes et Molécules
Villeneuve D'Ascq, France
raoul.torero@univ-lille.fr

TRAMIER Marc

Institut de Génétique et Développement
Rennes, France
marc.tramier@univ-rennes1.fr

UBA Markjoe

Slovak University of Technology
Bratislava, Slovakia
MARKJOE.UBA@STUBA.SK

VANDEN ABEELE Fabien

Laboratoire de Physiologie Cellulaire
Villeneuve D'Ascq, France
fabien.vanden-abeele@inserm.fr

VANZETTA Ivo

Institut de Neurosciences Timone
Marseille, France
ivo.vanzetta@univ-amu.fr

VAUCHELLES Romain

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
Illkirch, France
romain.vauchelles@unistra.fr

VENTALON Cathie

ENS - Institut de biologie
Paris, France
cathie.ventalon@ens.fr

VIANAY Benoit

CytoMorphoLab
Paris, France
benoit.vianay@cea.fr

VIGNEAU Mathieu

ITAV
Toulouse, France
mathieu.vigneau@itav.fr

VIMEUX Lene

Institut Cochin
Paris, France
lene.vimeux@inserm.fr

WERKMEISTER Elisabeth

Biolmaging Center Lille
Lille, France
elisabeth.werkmeister@ibl.cnrs.fr

WINCKLER Pascale

Procédés Alimentaires et Microbiologiques
Dijon, France
pascale.winckler@u-bourgogne.fr

ZHANG Ruikang

ENS - Laboratoire PASTEUR
Paris, France
ruikang.zhang@ens.fr

VEGA Elodie

Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
Toulouse, France
elodie.vega@inserm.fr

VERNHEES Emeline

Microbiologie et Génétique Moléculaires
Toulouse, France
emeline.vernhes@ibcg.biotoul.fr

VICTOR Jean-Marc

Physique Théorique de la Matière Condensée
Paris, France
victor@lptmc.jussieu.fr

VIGNERON Pascale

BioMécanique et BioIngénierie
Compiègne, France
pascale.vigneron@utc.fr

WEBERLING Antonia

Cambridge University
Cambridge, United Kingdom
absw2@cam.ac.uk

WESTBROOK Nathalie

Laboratoire Charles Fabry
Palaiseau, France
nathalie.westbrook@institutoptique.fr

WORINGER Maxime

Institut Pasteur
Paris, France
maxime.woringer@berkeley.edu

LISTE DES INTERVENANTS

Mr Andrea BASSI

andreabassi@polimi.it
Dipartimento di Fisica, Politecnico di Milano,
Milan

Mr Vincent BONTMES

vincent.bontems@cea.fr

Mr Robert CAMPBELL

rc4@ualberta.ca
Department of Chemistry, University of
Alberta, Edmonton, CANADA

Mr Ji-Xin CHENG

jxcheng@bu.edu
Photonics Center, Boston University, Boston,
MA

Mr Teng-Leong CHEW

chewt@janelia.hhmi.org
Advanced Imaging Center, Janelia Farm
Research Campus, Ashburn

Mr Christian CONRAD

c.conrad@dkfz.de
German Cancer Research Center, BioQuant
Center Heidelberg University, Heidelberg,
Germany

Mr Peter DEDECKER

Peter.dedecker@kuleuven.be
Lab for Nanobiology, Department of
Chemistry, KU Leuven, Belgium

Mr Stéphane DIEUDONNE

dieudon@biologie.ens.fr
IBENS, Département de Biologie, Ecole
Normale Supérieure, Paris, France.

Mme Ulrike ENDEFELDER

ulrike.endesfelder@synmikro.mpi-
marburg.mpg.de
Max Planck Institute for Terrestrial
Microbiology

Mme Anne BEGHIN

anne.beghin@u-bordeaux.fr
Institut interdisciplinaire de Neurosciences
Bordeaux

Mr Yann BRETONIERE

yann.bretonniere@ens-lyon.fr
Laboratoire de Chimie
ENS de Lyon

Mr Liangyi CHEN

lychen@pku.edu.cn
State Key Laboratory of Membrane Biology,
Institute of Molecular Medicine, Peking

Mr Anatol CHESSEL

anatole.chessel@polytechnique.edu
Ecole polytechnique, Palaiseau, France

Mr Mayeul COLLOT

mayeul.collot@unistra.fr
Laboratoire de Biophotonique et Pathologies,
ILLKIRCH, France

Mme Lydia DANGLLOT

lydia.danglot@inserm.fr
Institut de Psychiatrie et Neurosciences de
Paris, Paris, France

Mr Thomas DEHOUX

thomas.dehoux@univ-lyon1.fr
Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1,
Villeurbanne, France

Mr Guillaume DUGUE

gdugue.ens@gmail.com
Institut de biologie de l'École normale
supérieure, Paris

Mme Maria GARCIA-PARAJO

maria.garcia-parajo@icfo.eu
The Institute of Photonic Sciences,
Castelldefels (Barcelona) Spain

Mr Arnaud GAUTIER

arnaud.gautier@ens.fr
Département de Chimie, École Normale
Supérieure, Paris, France.

Mr Sylvain GIGAN

sylvain.gigan@lkb.ens.fr
Laboratoire Kastler-Brossel, PARIS

Mr Bassam HAJJ

Bassam.Hajj@curie.fr
Laboratoire Physico Chimie Curie, Institut Curie,
Paris

Mr David HÖRL

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare
Medizin (MDC), Berlin Institute of Medical
Systems Biology, Germany

Mr Benjamin JUDKEWITZ

benjamin.judkewitz@charite.de
Charité / Humboldt University Berlin

Mr Diego KRAPP

diego.krapf@colostate.edu
Department of Electrical and Computer
Engineering and School of Biomedical
Engineering, Colorado State University, Fort
Collins CO, USA

Mr Christophe LETERRIER

christophe.leterrier@univ-amu.fr
NeuroCyto, Marseille, France

Mr Davide MAZZA

mazza.davide@hsr.it
San Raffaele Scientific Institute. Experimental
Imaging Center. Milan, Italy

Mme Françoise PEYRIN

peyrin@esrf.fr
Univ Lyon, INSA-Lyon, Lyon, France

Mme Nathalie PICOLLET D'HAHAN

nathalie.picollet-dhahan@cea.fr
Univ. Grenoble Alpes, CEA BIG-BGE, INSERM,
Grenoble, France

Mme Gaëlle RECHER

gaelle.recher@institutoptique.fr
Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Mme Marta GIACOMELLO

marta.giacomello@unipd.it
Department of Biology, University of Padova.
Via Ugo Bassi 58b, Padova

Mr Thomas GREGOR

thomas.gregor@pasteur.fr
Institut Pasteur, Paris

Mr Ricardo HENRIQUES

r.henriques@ucl.ac.uk
MRC-Laboratory for Molecular Cell Biology,
University College London

Mr Antoine JEGOU

antoine.jegou@ijm.fr
Institut Jacques Monod, Paris

Mr Ralf JUNGSMANN

jungsmann@biochem.mpg.de
MPI of Biochemistry, Martinsried

Mme Anna KRESHUK

anna.kreshuk@iwr.uni-heidelberg.de
European Molecular Biology Laboratory
(EMBL)

Mr Jean-Léon MAITRE

Jean-Léon.Maitre@curie.fr
Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris

Mr Valentin NAGERL

valentin.nagerl@u-bordeaux.fr
Interdisciplinary Institute for Neuroscience,
University of Bordeaux / CNRS

Mme Catherine PICART

Catherine.Picart@grenoble-inp.fr
Grenoble Institute of Technology, GRENOBLE

Mr Daniel RAZANSKY

dr@tum.de
Technical University of Munich and Helmholtz
Center, Munich, Germany,

Mr Nicolas RENIER

nicolas.renier@icm-institute.org
ICM Brain and Spine Institute, Paris

Mme Anne-Cécile REYMANN

reymanna@igbmc.fr
IGBMC, Strasbourg

Mr Erdinc SEZGIN

erdinc.sezgin@rdm.ox.ac.uk
University of Oxford

Mme Marie-Emilie TERRET

marie-emilie.terret@college-de-france.fr
1CIRB, Collège de France, UMR7241/U1050,
PSL, 75005 Paris, France.

Mr Philip TINNEFELD

phtipc@cup.uni-muenchen.de
Lehrstuhl für Physikalische Chemie
Ludwig Maximilians-Universität München
München, Germany

Mr Walter THOMAS

thomas.walter@mines-paristech.fr
MINES ParisTech, PSL Research University,
CBIO
Centre for Computational Biology, Paris,
France

Mme Sara-Annika WICKSTRÖM

wickstroem@age.mpg.de
Helsinki Institute of Life Science, University of
Helsinki. Finland

Christophe ZIMMER

czimmer@pasteur.fr
Imaging and Modeling Unit, Institut Pasteur,
Paris, France

Mr Hervé RIGNEAULT

herve.rigneault@fresnel.fr
Institut Fresnel, Marseille - France

Mr Ulrich SCHWARZ

schwarz@thphys.uni-heidelberg.de
Heidelberg University, BioQuant and Institute
for Theoretical Physics, Heidelberg, Germany

Mme Ilaria TESTA

ilaria.testa@scilifelab.se
KTH Royal Institute of Technology/Science for
Life Laboratory, Stockholm, Sweden

Mr Wholand THORSTEN

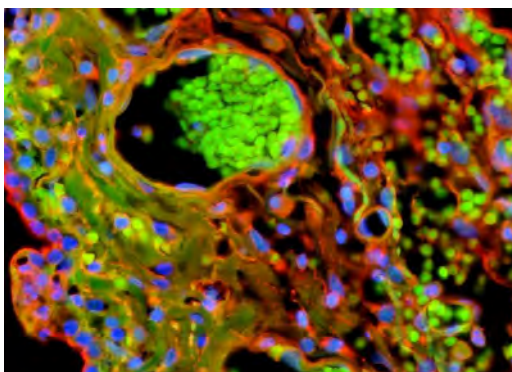
twoland@nus.edu.sg
National University of Singapore

Mr Boris VAUZEILLES

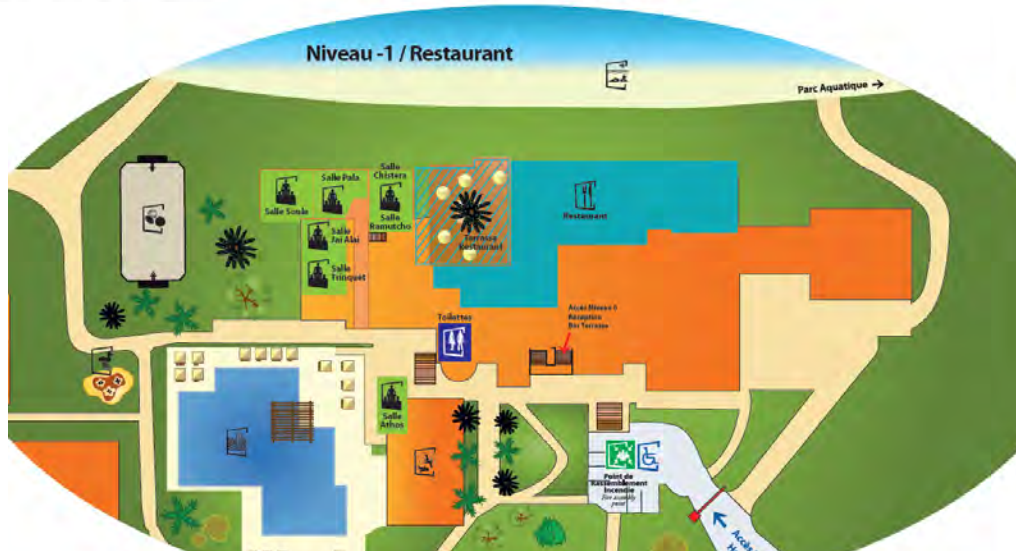
boris.vauzeilles@u-psud.fr
Chemical Biology Department, ICSN, Gif-sur-
Yvette (France)

Mr Chris XU

chris.xu@cornell.edu
School of Applied and Engineering Physics
Cornell University, Ithaca, U. S. A.



microscopyU@Nikon



Belambra
business



alvéole 



















































CNRS-Inserm-Aviesan-FBL-RTMfm

	Friday 5 th Oct	Saturday 6 th Oct	Sunday 7 th Oct	Monday 8 th Oct	Tuesday 9 th Oct	Wednesday 10 th Oct	Thursday 11 th Oct	
8h15		Module 1: Multicellular imaging	Module 3: Mechanobiology	Module 4: Molecular Dynamics	Free/Sport	Module 6: Wave on Live	Module 7: Automatisation, HCS, Multimodality in Microscopy	
9h00	Pre-module							
10h00		Module 1	Module 2	Module 3	Coffee Break (25')			
10h30		Module 7	Module 3	Module 3	Module 4	Module 5	Module 6	
12h00							Module 5	
12h15							Module 6	
13h15	Module F: basic keys	Repas						Module 7
13h45		Workshops Round-tables Advanced modules	Workshops Round-tables Advanced modules	Workshops Round-tables Advanced modules	Module 5 Sondes and Biosensors	Workshops Round-tables Advanced modules	Workshops Round-tables Advanced modules	
15h45								
16h00		Module 2: Nanoscopia	Workshops Round-tables Advanced modules	16h15 Seminar: S6: <i>Marta Giacomello</i>	Module 4	Workshops Round-tables Advanced modules	Workshops Round-tables Advanced modules	
16h30	Pause			17h Hommage Jozef Langowski Par Thorsten Wholand Maxime Dahan Par Bassam Hajji				
17h00	3 Seminars S1: <i>Robert Campbell</i> S2: <i>Ji-Xin Cheng</i> S3: <i>Lydia Dargiot</i>		Workshops Round-tables Advanced modules	Tasting or Apéro				
18h00		Module 2	2 Seminars S4: <i>Leong Chew</i> S5: <i>Stephane Dieudonné</i>			Coffee Break (15')		
18h15								
20h00							1 Seminar SHS S11: <i>Vincent Boritmes</i>	
21h30	Poster-bar session	Workshops Round-tables Advanced modules	Workshops Round-tables Advanced modules	Biophotonic party	Workshops Round-tables Advanced modules	2 Seminars S9: <i>Philip Timnefeld</i> S10: <i>Chris Xu</i>	AG ImaBio	
00h00							Final party	