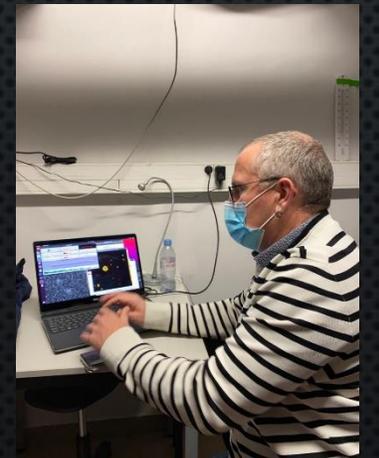
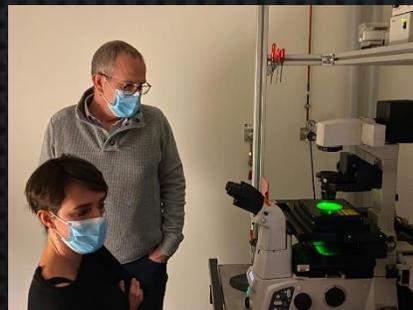
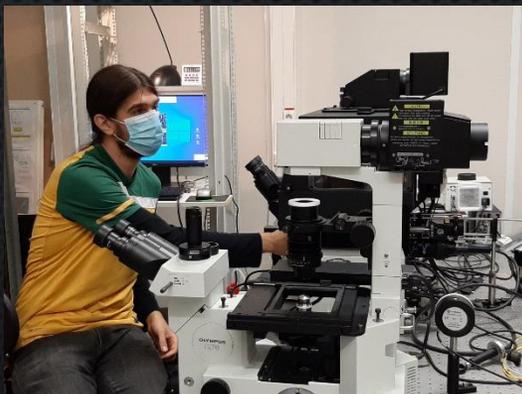


GT POINTILLISME

ASSISES DES PLATEFORMES 2021

LE GT QUI CLIGNOTE

- 12-14 personnes
- Paris, Montpellier, Lyon, Bordeaux, Marseille
- Ingénieurs, chercheurs, étudiants
- Opticiens, Biologistes, spécialistes de l'analyse et du traitement des données
- STORM, PALM, PAINT



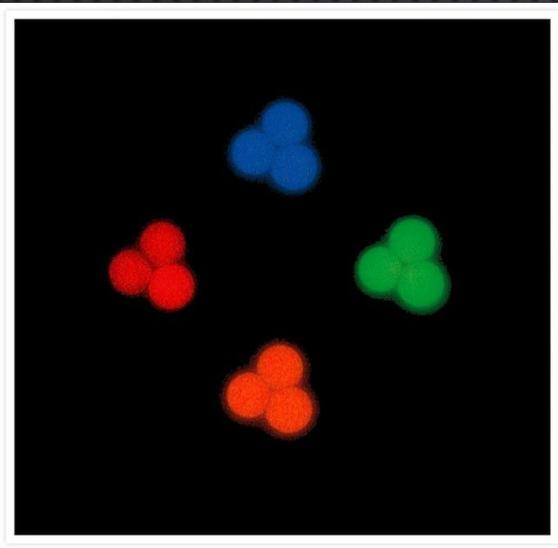
LE GT QUI CLIGNOTE

- Réunions/Ateliers : sur un site, manip pendant 1 ou 2 jours, complétées par des manip faites sur les sites de chacun
- 2021, 2 grands axes:
 - Comparaison de différents marqueurs fiduciaires:
 - Recalage de drift
 - Recalage multi-canaux
 - Test de nouveaux fluorophores:
 - Emergence des Janelia Fluor
 - Comparaison avec nos dyes de référence (Alexas ou CF)
- Actions en 2021 (déplacements limités):
 - Commande de produits
 - Manip sur nos sites respectifs dans nos conditions respectives
 - 1 atelier à Lyon (29-30 Novembre)
 - Pool des données, analyses, mise en forme des résultats (à venir 😊)

LES MARQUEURS FIDUCIAIRES

- Un bon marqueur fiduciaire doit être brillant, stable dans le temps, facile à utiliser, multi-canal
« Je ne pense pas qu'il y ait de bons ou de mauvais marqueurs »

Tetraspecks 100 nm
(ThermoFischerT7279)



NanoDiamants 140 nm
(NDNV 140nmMd10ml, Adamas)

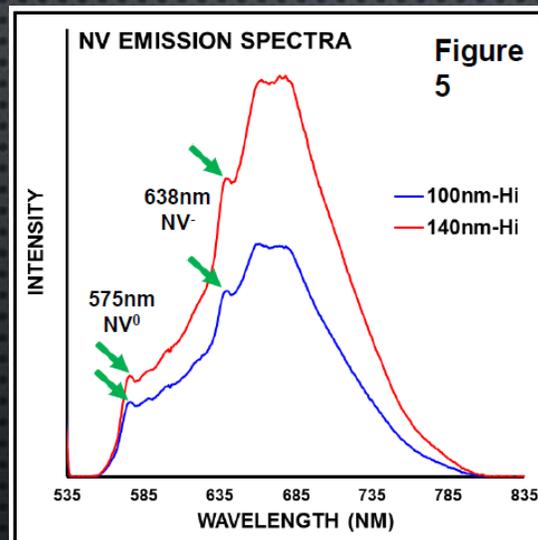


Figure 5 : Photoluminescence spectra of 100 nm and 140 nm high brightness. 15 mW 532 nm CW laser excitation Coherent Sapphire . Ocean Optics HR2000 Spectrometer, 750 msec integration time. ZPL indicated by green arrows.

NanoGolds 90 nm
(CD-CG-90-20 Gold Nanoparticles, Euromedex)

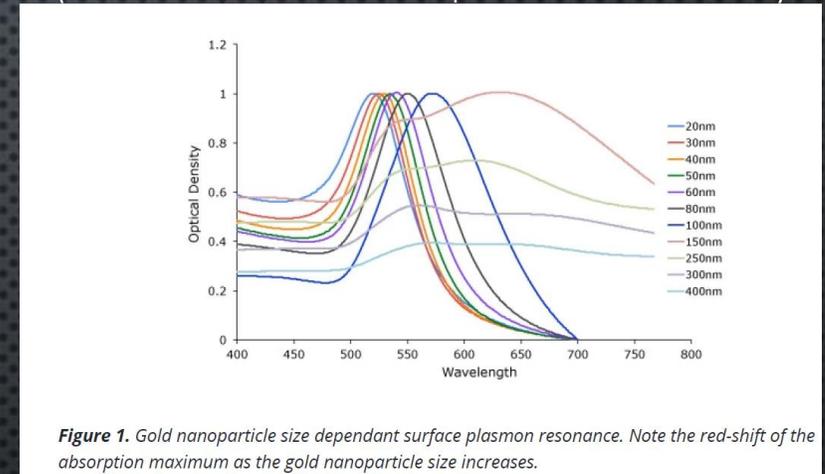


Figure 1. Gold nanoparticle size dependant surface plasmon resonance. Note the red-shift of the absorption maximum as the gold nanoparticle size increases.

NanoRods 25 nm
(A12-25-650-CTAB-DIH-1-25, NanoPartz)

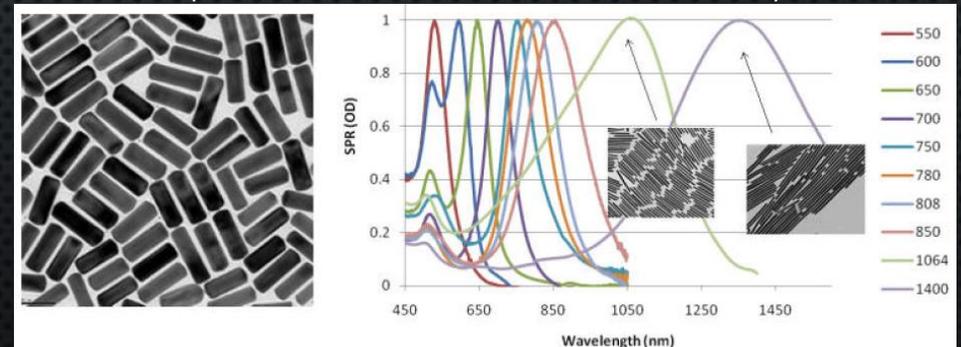
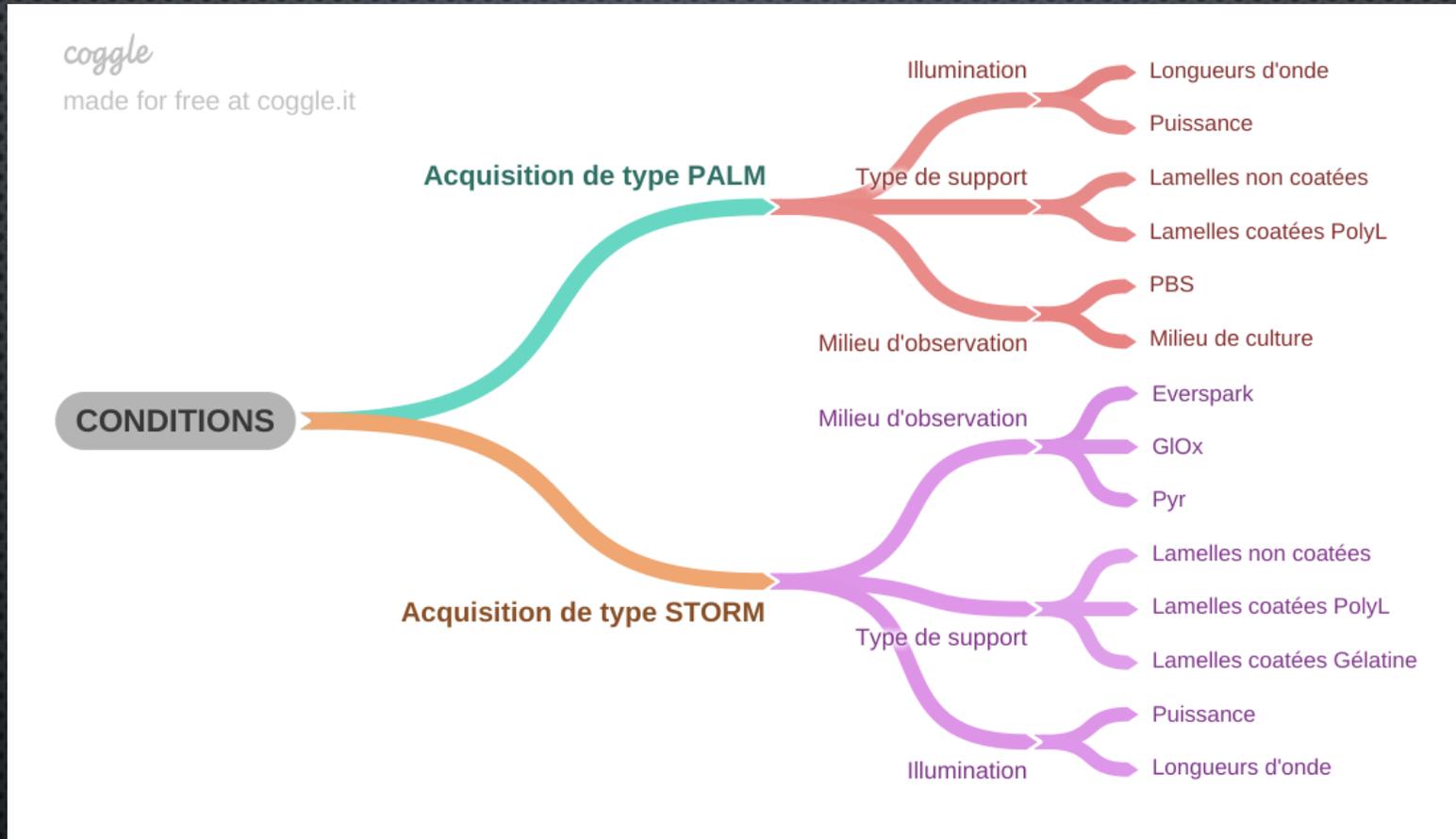


Figure 1. Left: TEM image of typical gold nanorods (10nm x 40nm) (Product No. 716820). Right: Gold nanorod peak absorption and scattering (extinction) can be tuned across the visible and near IR spectra shown on a plot of Surface Plasmon Resonance (SPR) to Wavelength.

LES MARQUEURS FIDUCIAIRES

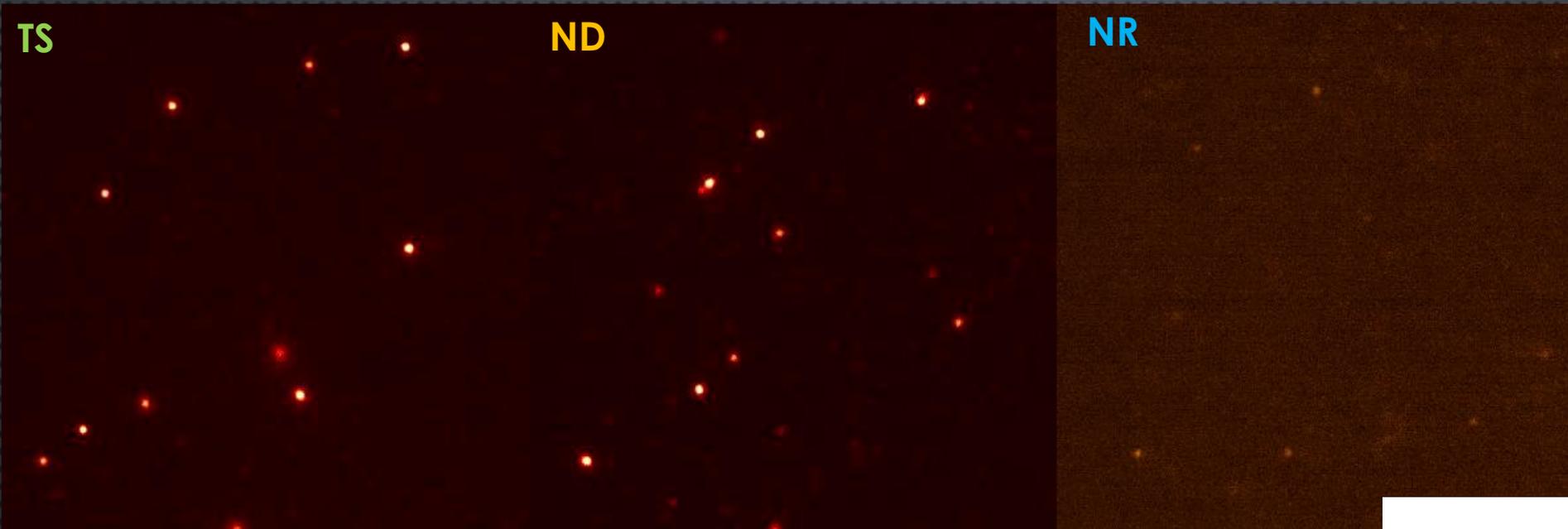


Paramètres à évaluer:

- Stabilité signal (puissance illumination Vs durée)
- Intensité signal / signal des singles
- Capacité à servir pour la correction du drift
 - Précision de localisation Vs niveau de drift

LES MARQUEURS FIDUCIAIRES

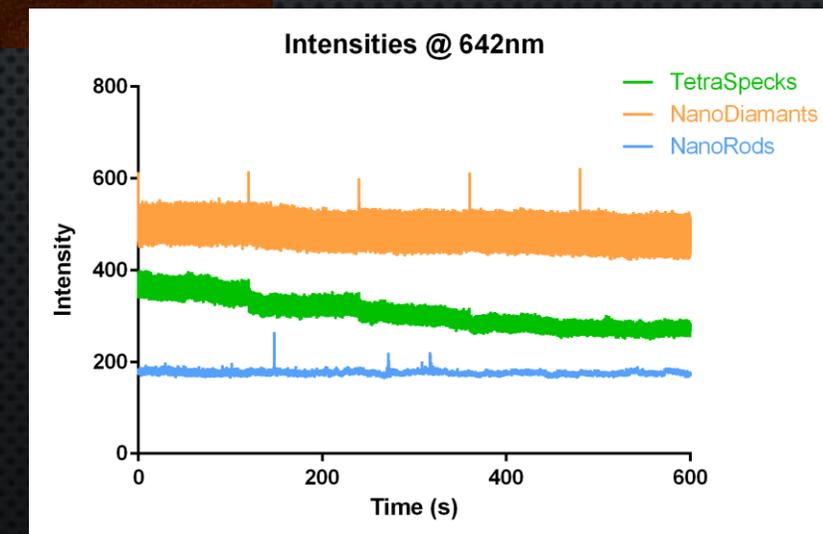
Ex: Lamelles non coatées, culture COS-7Cells, Conditions STORM, milieu Pyranose



Nano Diamants : + intense que NR et TS et stable au cours du temps

TetraSpecks : intensité diminue au cours de l'acquisition

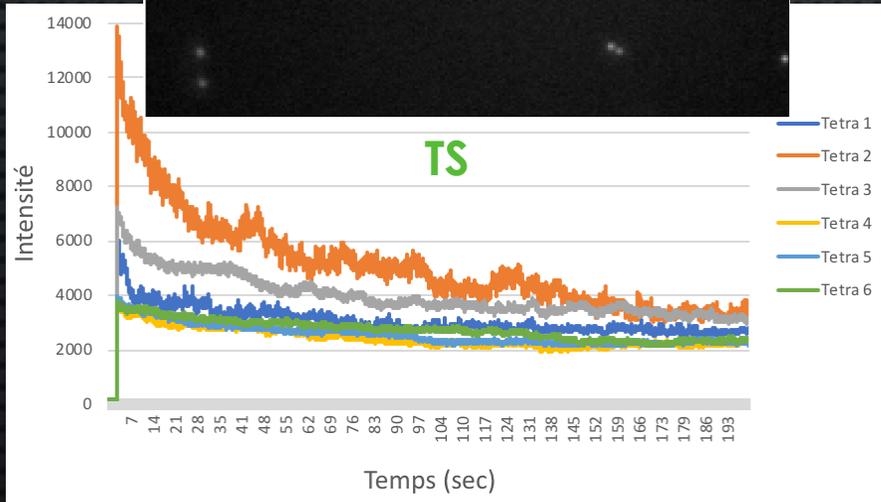
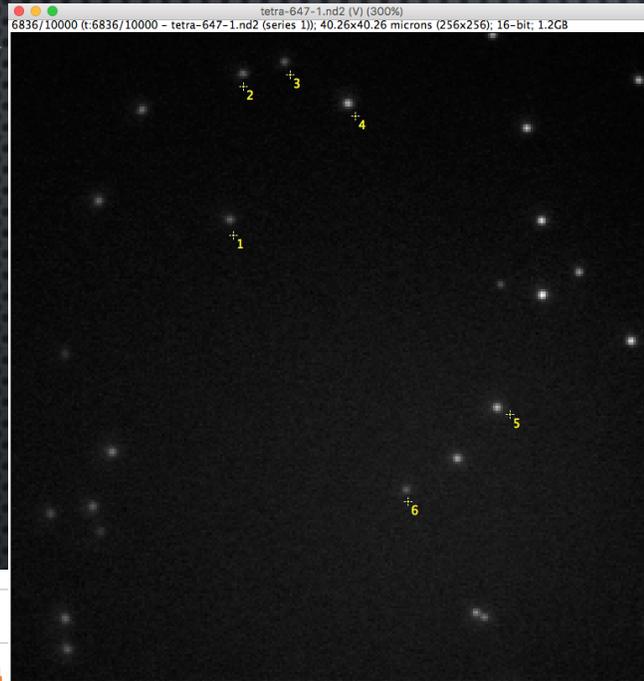
Nano Rods : peu intense et intensité stable au cours du temps



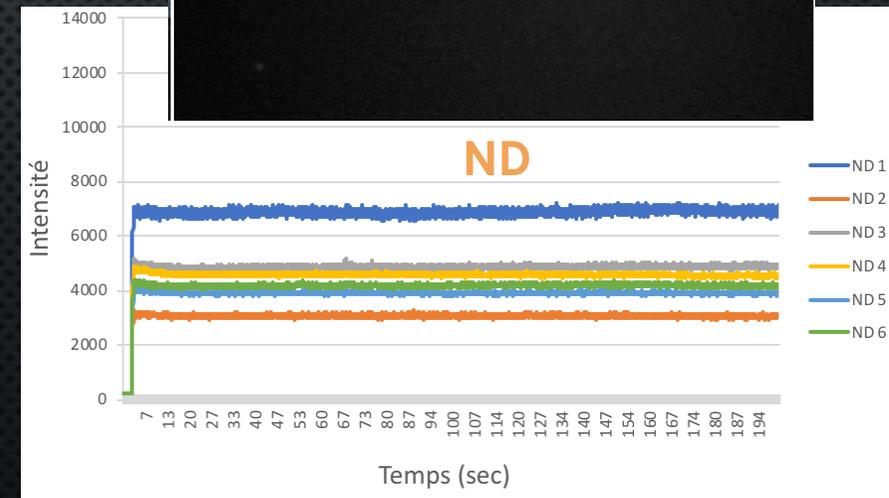
LES MARQUEURS FIDUCIAIRES

Ex: Lamelles gélatinées montées sur lame dépression, Conditions STORM, laser 647, milieu Everspark,

TetraSpeck



NanoDiamond

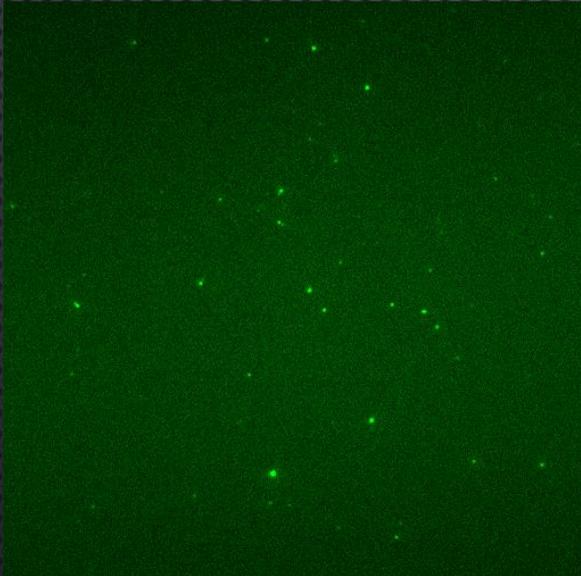


LES MARQUEURS FIDUCIAIRES

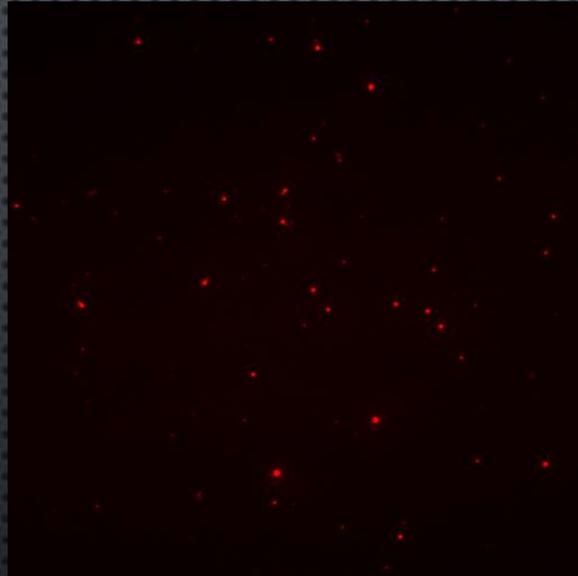
Ex: Lamelle coatée polylysine, Conditions PALM

ND

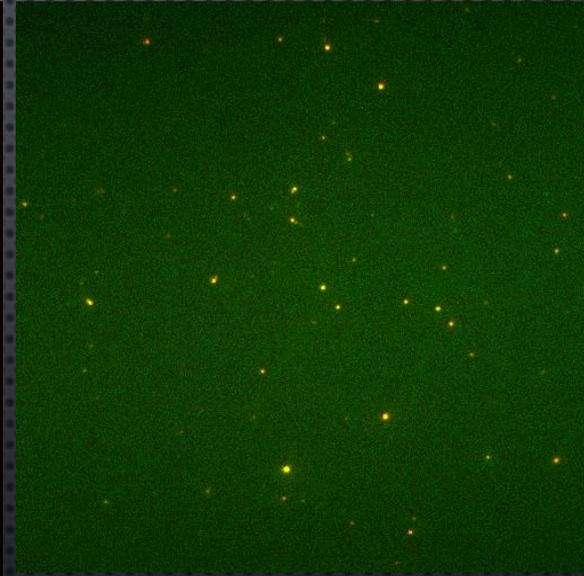
488nm



561nm



Merge



NanoDiamants

- **visible with 488**
- **Visible with 561**
- **100% merging 488 and 561**

LES MARQUEURS FIDUCIAIRES ND

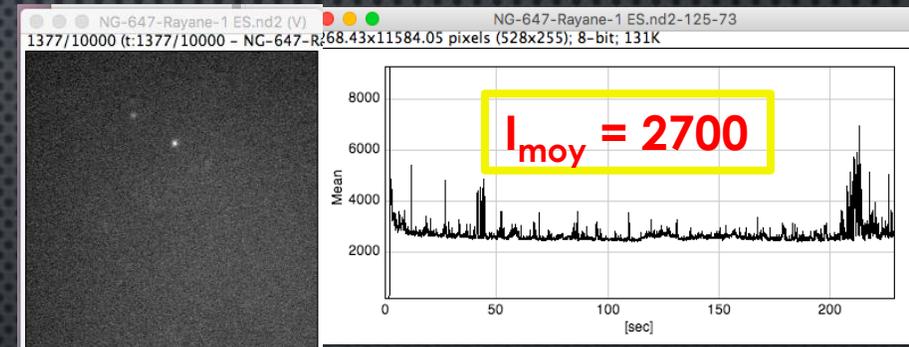
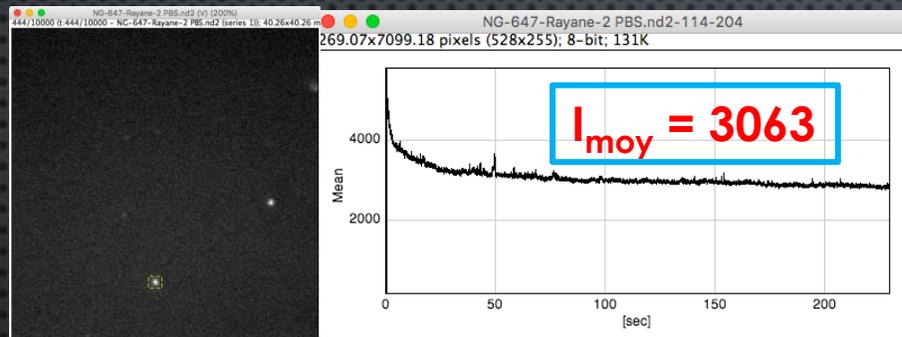
Ex: Lamelles non coatés (montage Peacon), culture cellules 293T HEK avec HIV-1 Gag-EOS, PBS/MEA

NanoDiamond

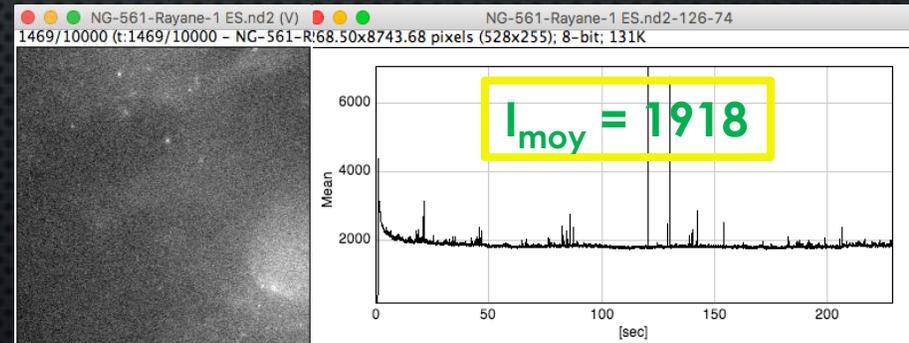
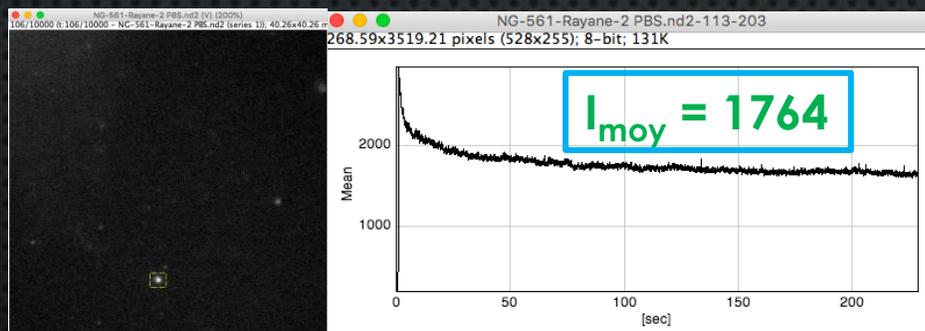
PBS

MEA (Tampon Everspark non scellé)

647 nm



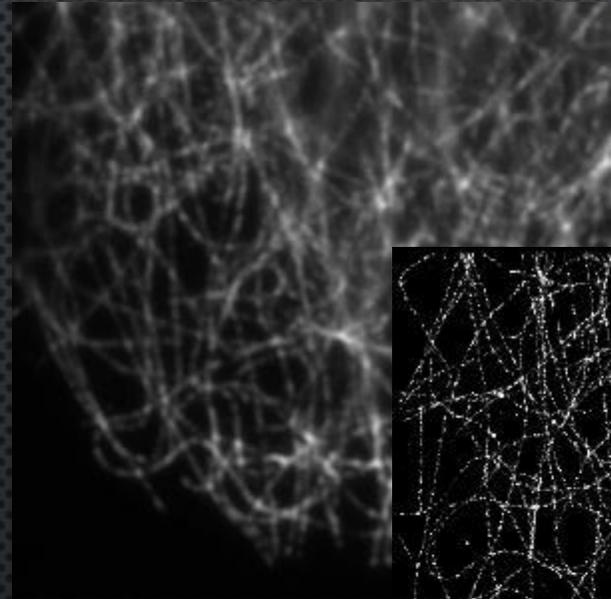
561 nm



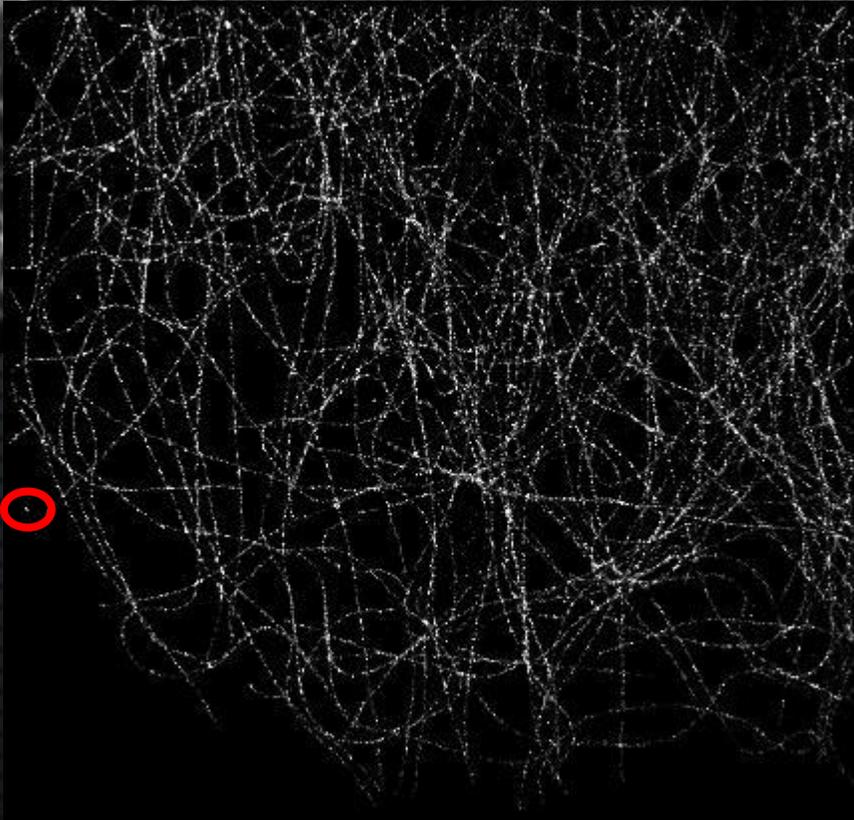
LES MARQUEURS FIDUCIAIRES

Ex: Lamelles non coatées, culture COS-7Cells, Conditions STORM, milieu Pyranose

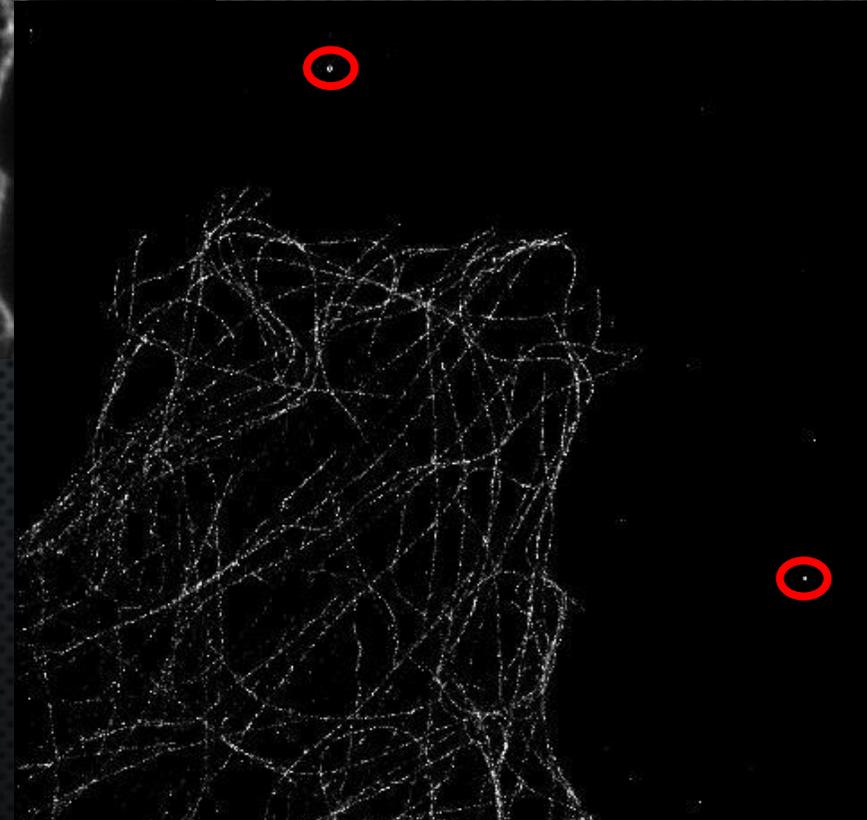
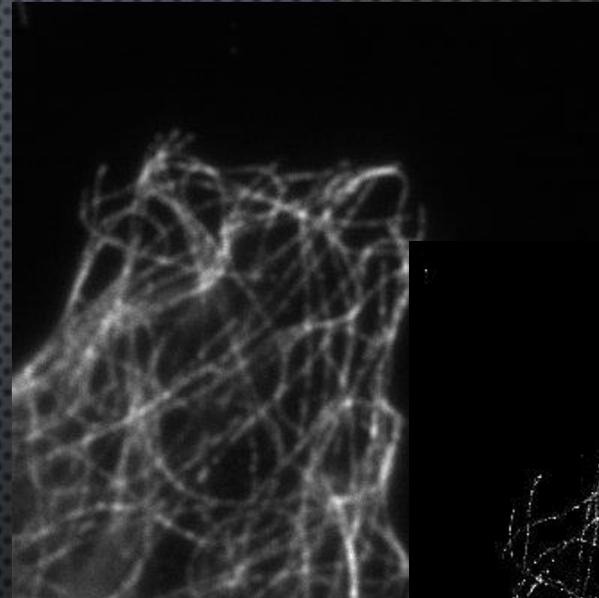
Tetraspecks



Tubuline-AF647



Nanodiamants

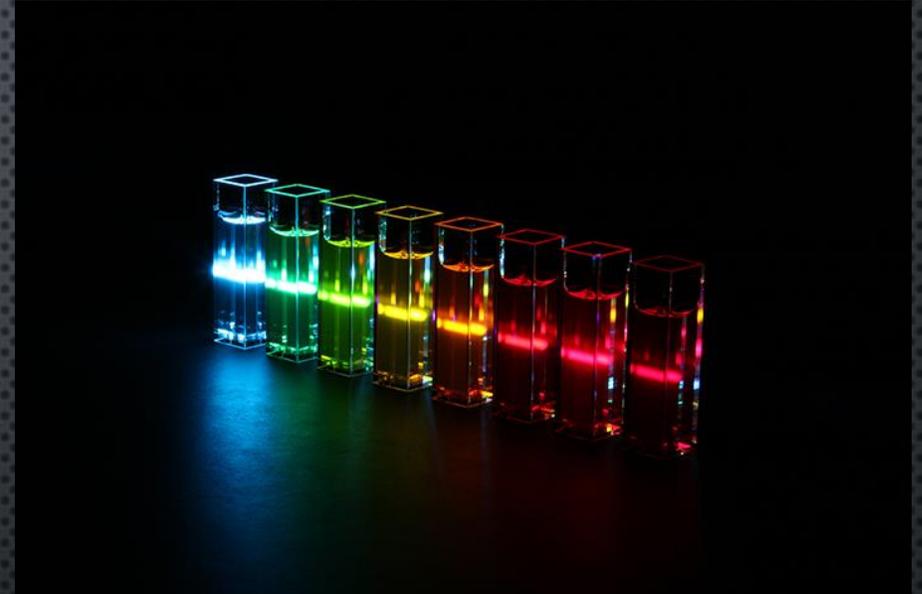


LES MARQUEURS FIDUCIAIRES: CONCLUSIONS PRÉLIMINAIRES

- En terme d'intensité, les **TS** et les **ND** semblent plus adaptées que les NG et les NR (STORM Vs PALM)
- Les **TS** photo-blanchissent au cours du temps avec le risque de les perdre avant la fin de l'acquisition
- L'intensité des **ND** peut être très forte par rapport à la dynamique du signal
- Sur les lamelles non coatées, densité de ND/NG/NR plus faible
- Utilisation des NG et NR à mettre au point, coating sur les lamelle avant culture par ex

UTILISATION DES JANELIA FLUOR EN dSTORM

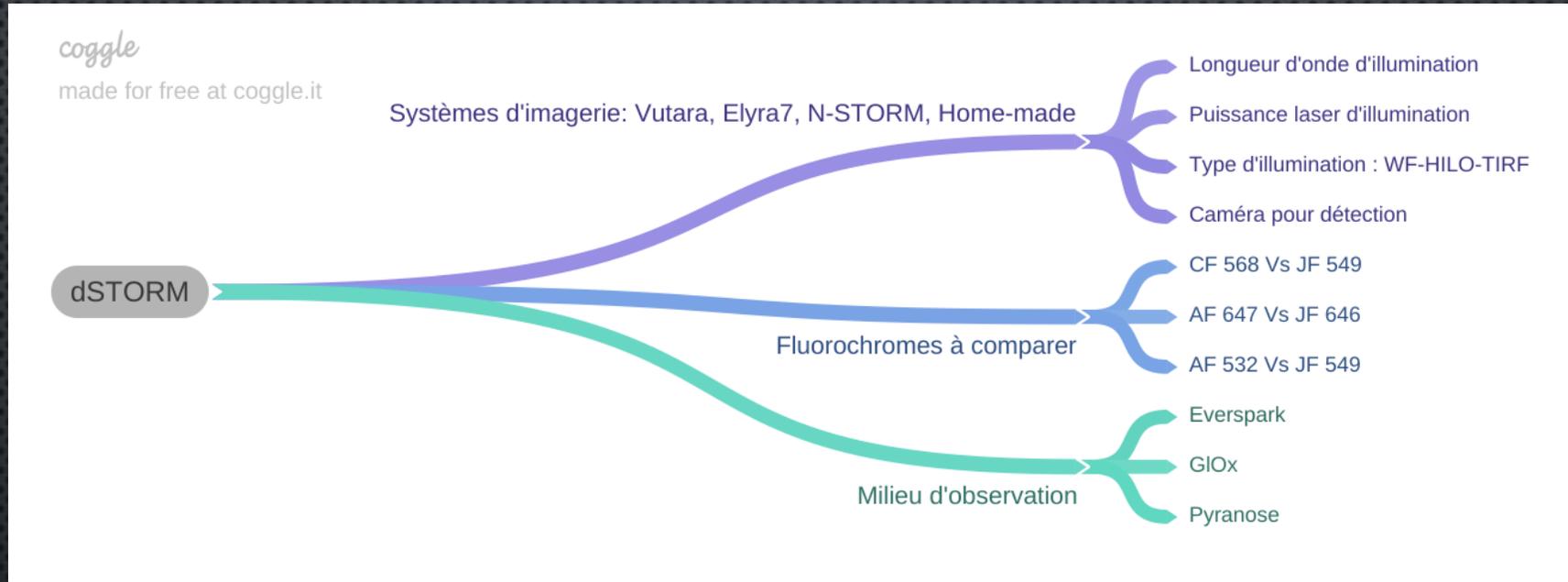
- Un bon fluorophore pour le dSTORM
 - Brillant
 - Resistant au photobleaching
 - Propriétés photophysiques en fonction de la manip
 - Vitesse de switch dans le dark state
 - Fréquence de blink
 - Duty cycle



A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy

Jonathan B Grimm¹, Brian P English¹, Jiji Chen¹, Joel P Slaughter¹, Zhengjian Zhang¹, Andrey Revyakin^{1,2}, Ronak Patel¹, John J Macklin¹, Davide Normanno^{1,3}, Robert H Singer^{1,4}, Timothée Lionnet¹ & Luke D Lavis¹

UTILISATION DES JANELIA FLUOR EN dSTORM



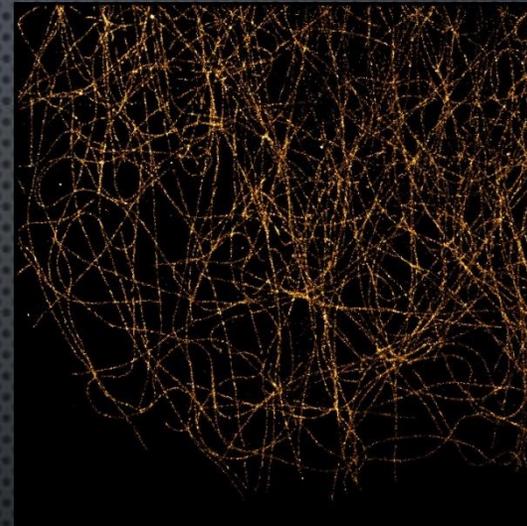
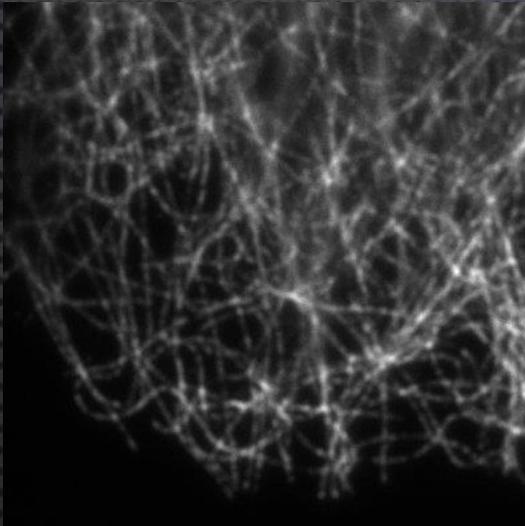
Paramètres à évaluer:

- Comparaison deux à deux (JF Vs AF ou CF) afin de s'affranchir des variations de systèmes
- Temps de passage en dark state
- Bleaching
- Intensité
- Précision de localisation
- **Données en cours de processing**

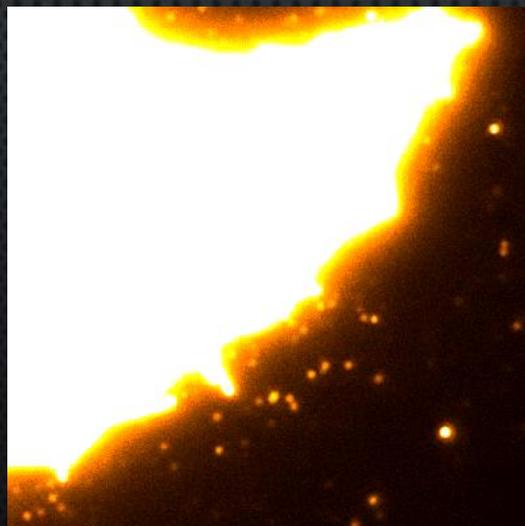
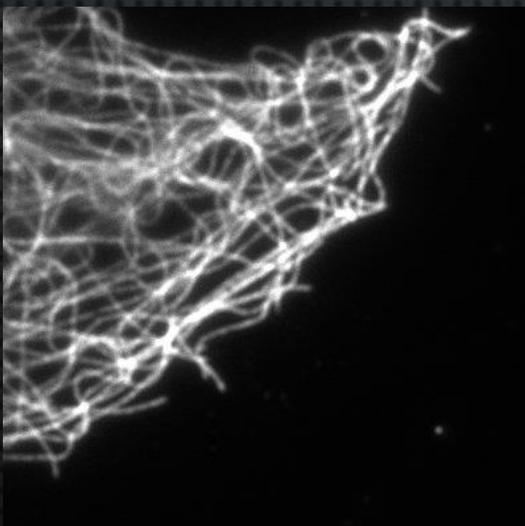
UTILISATION DES JANELIA FLUOR EN dSTORM

Ex: Lamelles non coatées, culture COS-7Cells, Conditions STORM, milieu **Pyranose**

Tubuline-AF647



Tubuline-JF646



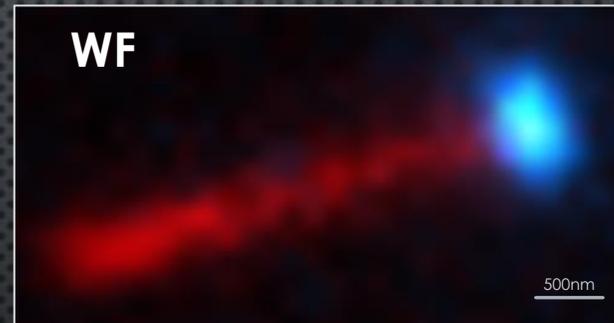
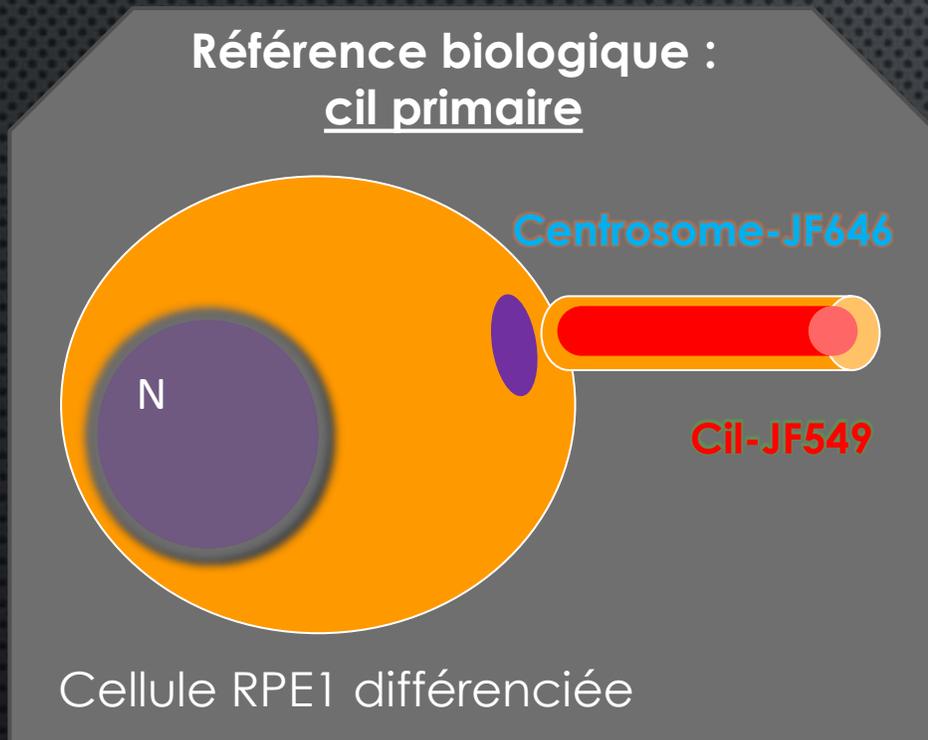
Dans ces conditions, pumping inefficace

- Revoir ICC (densité marquage)
- Comparer les milieux d'observation
- Modifier fréquence d'acquisition

TEMPS DE PASSAGE EN DARK STATE

Ex : Willco, cellules RPE1, marquage centrosome (Acs I et II), Everspark, ELYRA V7

Temps de passage en dark state : AF 647 < CF568 < JF549 ≤ JF647 < DL550



centro-JF646 et cil-JF549

Compatibles
avec dual PALM
sequential

Passage en
dark state
30-45 sec



J646 VS AF647 EN dSTORM

Ex : Willco 22mm, cellules RPE1, marquage centrosome (Acs I et II), **Everspark**, ELYRA V7

CONDITION ACQUISITION dSTORM À ADAPTER POUR CHAQUE FLUOROCHROME

	AF647	JF646
Temps passage en dark state	10 sec	30 sec
Puissance laser 642nm à 500 mW	100% UHP	100% UHP
Temps exposition caméra	10 ms	10 ms
Présence « multiple emitters »	faible	modérée
Résistance au photobleaching	modérée	forte

JANELIA FLUOR 646 EN dSTORM

Ex : Willco 22mm, cellules RPE1, marquage centrosome (Acs I et II), **Everspark**, ELYRA V7

JF646 : CONDITIONS ACQUISITION/ANALYSE À ADAPTER POUR IMAGERIE dSTORM

2 séries de 10 000 images

TEMPS EXPOSITION DE : 33MS

TEMPS EXPOSITION DE : 10MS

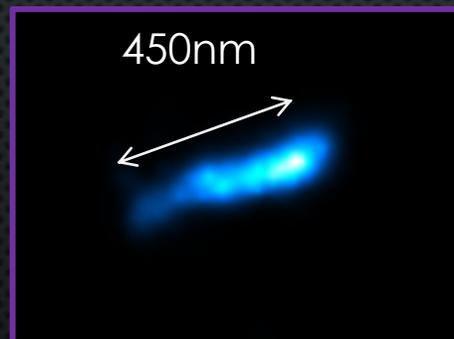
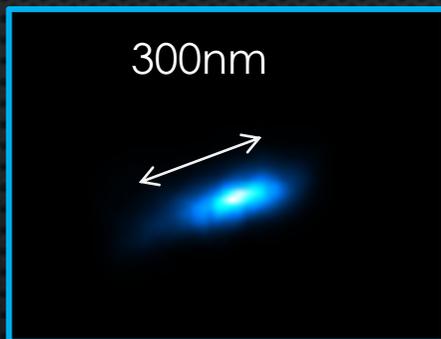
Reconstructions

Totalité

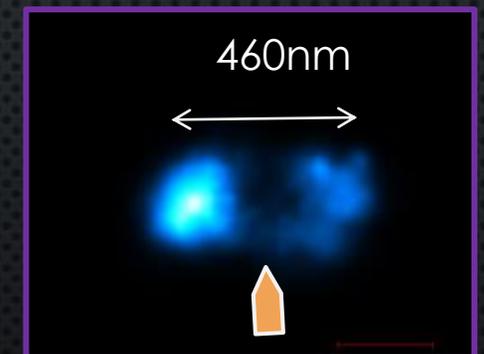
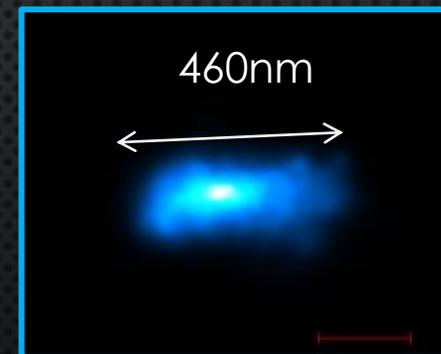
Filtré 1^{er} pic PSF

Totalité

FILTRE 1^{ER} PIC PSF



Appendices
distaux corps
basal



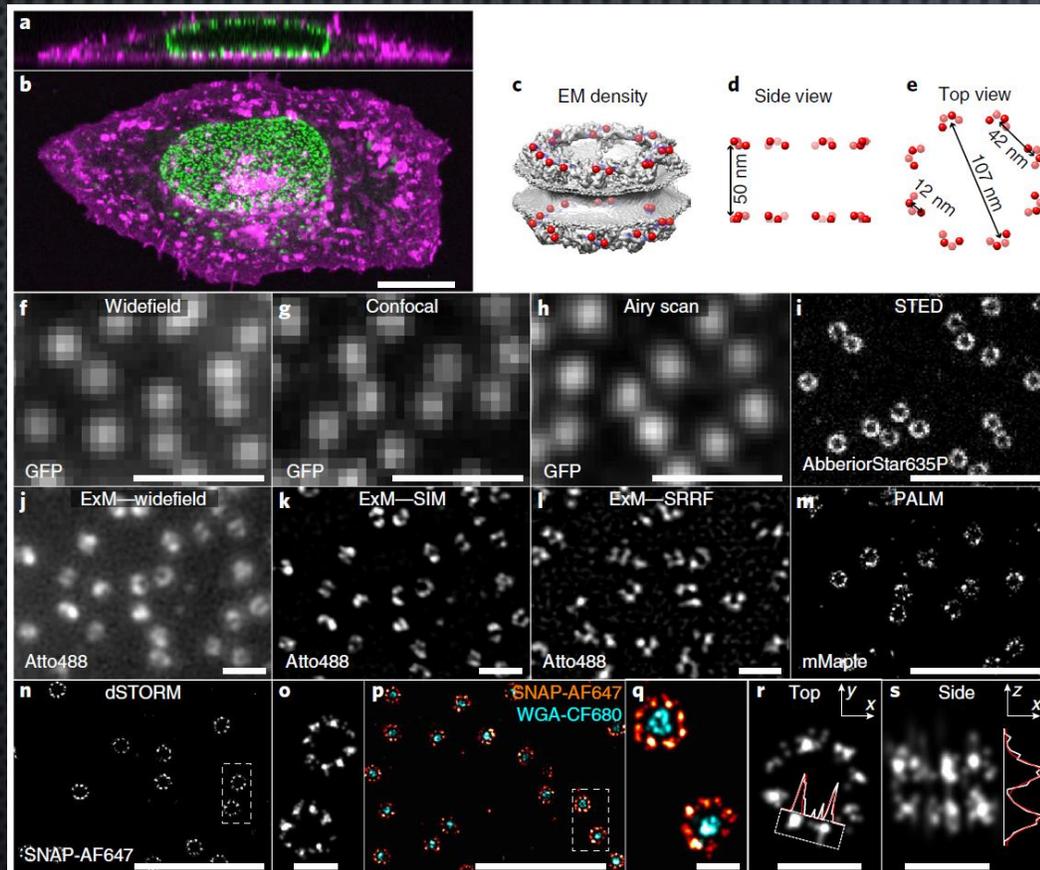
UTILISATION DES JANELIA FLUOR EN dSTORM: CONCLUSIONS PRELIMINAIRES

- Les JF ont une photo-physique différente des AF selon les milieux d'observation: à caractériser
- En milieu Everspark, les JF ont un temps de passage en dark state plus long que les AF
- En milieu Everspark JF 646 et JF 549 ont un temps de passage en dark state proche, et sont donc plus facilement utilisable pour du deux couleurs séquentiel rapide
- En milieu Everspark, le JF 646 semble avoir une fréquence de blink $>$ à AF 647. Il faut donc adapter les conditions d'illumination
- De manière générale les propriétés photo-physiques des JF VS AF doivent être quantifiées dans les différents milieux

WHAT'S NEXT ?

- Utiliser un échantillon calibré pour comparer nos méthodes et systèmes:
Lignées cellulaires de Jonas Ries (Crispr/CAS9 NUP96)

Nat Methods
2019 Oct;16(10):1045-1053.
doi: 10.1038/s41592-019-0574-9



Nuclear pores as versatile reference standards for quantitative superresolution microscopy

Jervis Vermal Thevathasan^{1,2,10}, Maurice Kahnwald^{1,10}, Konstanty Cieśliński¹, Philipp Hoess^{1,2}, Sudheer Kumar Peneti^{1,4}, Manuel Reitberger^{1,5}, Daniel Heid^{1,6}, Krishna Chaitanya Kasuba^{1,7}, Sarah Janice Hoerner^{1,8}, Yiming Li¹, Yu-Le Wu^{1,2}, Markus Mund^{1,9}, Ulf Matti¹, Pedro Matos Pereira³, Ricardo Henriques³, Bianca Nijmeijer¹, Moritz Kueblbeck¹, Vilma Jimenez Sabinina¹, Jan Ellenberg¹ and Jonas Ries^{1*}

NUP96-mEGFP
NUP96-mMaple
NUP96-SNAP
NUP96-HALO

Tester la lignée la plus adaptée à nos applications
Etablir un protocole de métrologie à partager

- système
- dye
- analyse

ON CLIGNOTE BIEN MAIS ON CLIGNOTE TROP

