

# ANF PALM/STORM

## Microscopie de super-résolution basée sur la détection de molécules individuelles

Bases théoriques et pratiques

**Du mardi 21 au vendredi 24 Juin 2022**

3.5 jours de cours théoriques et travaux pratiques : de la préparation d'échantillon à l'analyse d'images

<b>Public</b>	Chercheurs, Ingénieurs, Techniciens, Doctorants
<b>Objectifs</b>	<p>Acquérir les bases théoriques et pratiques en microscopie de super-résolution basée sur la détection de molécules individuelles et s'initier aux méthodes d'analyses :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PALM (Photo-Activated Localization Microscopy), sptPALM (Single Particle Tracking –PALM), (d)STORM (direct STOchastic Reconstruction Microscopy , DNA-PAINT (DNA-based Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography)</li> <li>- Marquages multicolours.</li> <li>- 2D, 3D</li> </ul> <p>Analyse et quantification des données en SMLM (Single Molecule Localization Microscopy/ Imagerie par localisation de molécules uniques) : détection, grouping, rendering, clustering, colocalisation, etc.</p> <p><b>Pré-requis</b> : Avoir de bonnes connaissances théoriques et pratiques en microscopie de fluorescence</p>
<b>Programme</b>	<p>Un nouveau format hybride permettant de privilégier des cours communs en visio et des TP locaux distribués sur 4 plateformes réparties sur le territoire, permettant de maintenir la formation quel que soit le statut sanitaire et assurant un faible nombre de candidats par microscope (&lt;4 par machine).</p> <p>Les TP sur les différents sites aborderont les mêmes notions techniques (molécule unique en PALM, STORM ou DNA-PAINT, 2D ou 3D) mais seront colorés par des thématiques biologiques locales (Infectiologie, Neurosciences, structure des organelles). “</p> <p><b>Cours théoriques communs (8 h) :</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Présentation générale des techniques de super-résolution SMLM</li> <li>2) Intérêts, avantages et limites de chaque technique</li> <li>3) Sondes fluorescentes et stratégies de marquage pour la super-résolution</li> <li>4) Les apports de la SMLM en biologie cellulaire</li> <li>5) Analyse et quantification des données de SMLM</li> </ol> <p><b>Phase pratique (8 h) :</b> sur chaque site, deux après-midis de TP sont dédiées à la préparation et à l'acquisition des données selon différentes modalités (Voir programme détaillé).</p> <p><b>Analyse d'images (7 h cours et TD) :</b> les stagiaires auront l'opportunité de tester deux outils parmi 4 proposés lors d'une session pratique (voir programme détaillé).</p>

<b>Intervenants</b>	<b>Organisateurs</b> : D. Muriaux, L. Danglot, S. Mailfert, K. Monier, M. Mondin <b>Intervenants</b> : P. Bun, R. Dibsby, C. Favard, R. Galland, D. Geny, F. Levet, J. Nguyen, C. Malleval, C. Rousset, M. Sainlos
<b>Inscription</b>	Retourner la fiche d'inscription dûment remplie à : <a href="mailto:dr13.FP@cnrs.fr">dr13.FP@cnrs.fr</a> Date limite d'inscription : 16 Mai 2022

	Mardi 21 juin	Mercredi 22 juin	Jeudi 23 juin	Vendredi 24 juin	
8h30				Analyses et colocalisation avec ICY-SODA (LD)	
9h		Défis et solutions pour la microscopie SMLM 3D en profondeur (RG)	Retour de chaque site sur les TP de la veille. Présentation de 5 min +5 min de questions/discussions par trinôme.  questions ouvertes (30 min)		
9h30				Démo ICY-SODA	
10h	Apport de la SR en Neurosciences et sur la structure des organelles ( applications 3D avec le biplane) : exemple de l'appareil de Golgi, des endosomes et de la synapse (LD)			Introduction au traitement des données en SMLM (SM)	Quantification de données SMLM multidimensionnelles (FL)
10h30				Démo UNLOC (SM)	Démo SR-Tesserler (FL)
11h		Dynamique dans la cellule à l'échelle de la molécule unique (CF)			
11h30					
12h	Arrivée et accueil des stagiaires	Temps de convivialité (questions/réponses)			
12h30					
13h	Présentation du programme ANF (15 min)	Déjeuner	Déjeuner	Déjeuner	
13h30	Présentation des stagiaires (45min)				
14h					
14h30	Principes des techniques SMLM (MM)			Démo analyse dynamique ( CF)	
15h	Préparation d'échantillons: vue d'ensemble des fluorochromes et des stratégies de marquage (MS)	Sessions pratiques (voir le détail pour chaque site) : comprenant préparation des échantillons, acquisition de données sur système d'imagerie et analyse rapide	Sessions pratiques (voir le détail pour chaque site) : comprenant préparation des échantillons, acquisition de données sur système d'imagerie et analyse rapide		
15h30				Evaluation à chaud	
16h	Pause Café				
16h30					
17h	Apport de la SR en infectiologie (DM)				
17h30					
18h	Apport de la SR en biologie cellulaire (KM)				

Temps de partage
Pause et déjeuner
Cours Théoriques
Analyse d'images
Sessions pratiques

BORDEAUX		Mercredi 22 Juin		Jeudi 23 Juin	
	Sur site			Sur site	
14h-18h	<b>Trinôme I (BIC)</b> Acquisition STORM 2D multi-couleur sur culture primaire de neurones (marquage synaptique et du cytosquelette). Reconstruction et représentation des données avec PalmTracer. (4h, MM)	<b>Trinôme II (IINS)</b> Analyse du réseau de microtubules sur cellules COS7. Acquisition DNA-PAINT en 3D par astigmatisme, reconstruction en temps réel en utilisant WaveTracer. (4h, RG)	<b>Trinôme I (IINS)</b> Analyse du réseau de microtubules sur cellules COS7. Acquisition DNA-PAINT en 3D par astigmatisme, reconstruction en temps réel en utilisant WaveTracer. (4h, RG)	<b>Trinôme II (BIC)</b> Acquisition STORM 2D multi-couleur sur culture primaire de neurones (marquage synaptique et du cytosquelette). Reconstruction et représentation des données avec PalmTracer. (4h, MM)	

LYON		Mercredi 22 Juin		Jeudi 23 Juin	
	Sur site			Sur site	
14h-18h	<b>Trinôme I (PLATIM)</b> Montage des cellules marquées sur support Willco avec Tampon Everspark (1h, CR) Acquisition STORM 2D/3D 2 couleurs et analyse (3h, KM) sur centrosome et cil dans des cellules RPE1 différenciées avec ELYRA Zeiss	<b>Trinôme II (INMG)</b> Préparation de fibres musculaires isolées (1h, CM) Acquisition STORM 3D en profondeur et analyse (3h, CR) sur sur corps nucléaires PML et cytosquelette tubuline dans fibre musculaire isolées avec Vutara VXL Bruker	<b>Trinôme I (INMG)</b> Préparation de fibres musculaires isolées (1h, CM) Acquisition STORM 3D en profondeur et analyse (3h, CR) sur sur corps nucléaires PML et cytosquelette tubuline dans fibre musculaire isolées avec Vutara VXL Bruker	<b>Trinôme II (PLATIM)</b> Montage des cellules marquées sur support Willco avec Tampon Everspark (1h, CR) Acquisition STORM 2D/3D 2 couleurs et analyse (3h, KM) sur centrosome et cil dans des cellules RPE1 différenciées avec ELYRA Zeiss	

Montpellier		Mercredi 22 Juin		Jeudi 23 Juin	
	Sur site			Sur site	
14h-18h	<b>Trinôme I (en BSL3, CEMIPAI)</b> Préparation d'échantillons (1h) - DM Acquisition STORM sur cellules fixées et analyse (3h RD) sur virus bourgeonnant des cellules et sur Lymphocytes T infectés HIV-1(i)mEOS2 avec TIRF/PALM Nikon inversé	<b>Trinôme II (MRI)</b> Acquisition spt PALM /TIRF sur cellules vivantes pour observer l'assemblage viral (2h) - CF et influence des paramètres d'acquisition sur la qualité des données brutes de SMLM (2h) - SM avec TIRF/PALM/STORM Nikon inversé	<b>Trinôme I (MRI)</b> Préparations d'échantillons (1h) - DM Acquisition spt PALM /TIRF sur cellules vivantes (non infectieuses) et analyses (3h CF) pour observer le bourgeonnement viral à la membrane plasmique + protéine virale cytosolique avec TIRF/PALM/STORM Nikon	<b>Trinôme II (en BSL3, CEMIPAI)</b> Préparation d'échantillons (1h) - DM Acquisition STORM sur cellules fixées et analyse (3h RD) sur virus bourgeonnant des cellules et sur Lymphocytes T infectés HIV-1(i)mEOS2 avec TIRF/PALM Nikon inversé	

Paris		Mercredi 22 Juin		Jeudi 23 Juin	
	Sur site			Sur site	
14h-18h	<b>Trinôme I (NeurImag)</b> Préparation des échantillons (1h, JN) Acquisition STORM 3D et analyse (3h, LD) sur golgi membrane synapse avec Vutara de Bruker	<b>Trinôme II (NeurImag)</b> Préparation des échantillons (1h, JN) Acquisition STORM 2D et analyse (3h, PB) sur golgi cytosquelette pore nucléaire Avec ELYRA de Zeiss	<b>Trinôme I (NeurImag)</b> Acquisition STORM 2D et analyse (3h, DG) sur golgi cytosquelette pore nucléaire Avec ELYRA de Zeiss. Analyse d'images (1h, PB)	<b>Trinôme II (NeurImag)</b> Analyse d'images (1h, PB). Acquisition STORM 3D et analyse (3h, LD) sur golgi membrane synapse avec Vutara de Bruker	