

UE8 M2S1

Neuroimagerie et outils de diagnostics

- Microscopie optique, microscopie confocale et STED (2 heures, Mardi 12 Novembre 15 h à 17 h)
- Microdissection laser (30 minutes, Mardi 12 Novembre 17 h à 17 h 30)
- F-techniques (30 minutes, Mercredi 13 Novembre 11 h à 11 h 30)
- Conférence Dr Laurent Bourdieu
‘Fast sampling of neuronal activity by holographic 3D-random-access two-photon microscopy’
(Jeudi 14 Novembre 10 h, Salle 66 Curib)



SÉMINAIRE IRIB

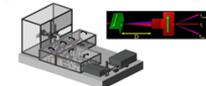
Jeudi 14 novembre 2019
à 10h00

Salle 66, CURIB, Mont-Saint-Aignan

DR Laurent BOURDIEU

Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure,
CNRS UMR 8197 INSERM U1024, ENS Paris

« Fast sampling of neuronal activity by
holographic 3D-random-access two-
photon microscopy »



Invité par David Vaudry (david.vaudry@univ-rouen.fr)





SÉMINAIRE IRIB

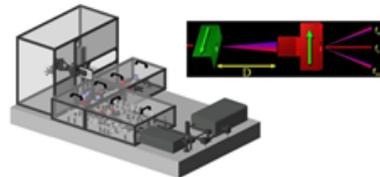
Jeudi 14 novembre 2019
à 10h00

Salle 66, CURIB, Mont-Saint-Aignan

DR Laurent BOURDIEU

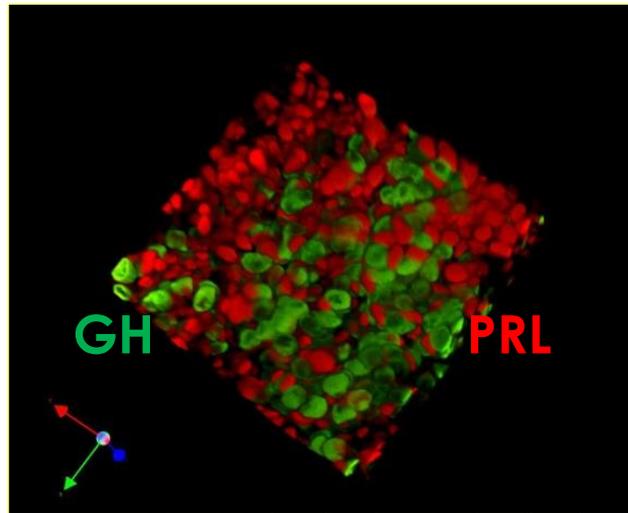
Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure,
CNRS UMR 8197 INSERM U1024, ENS Paris

« Fast sampling of neuronal activity by
holographic 3D-random-access two-
photon microscopy »

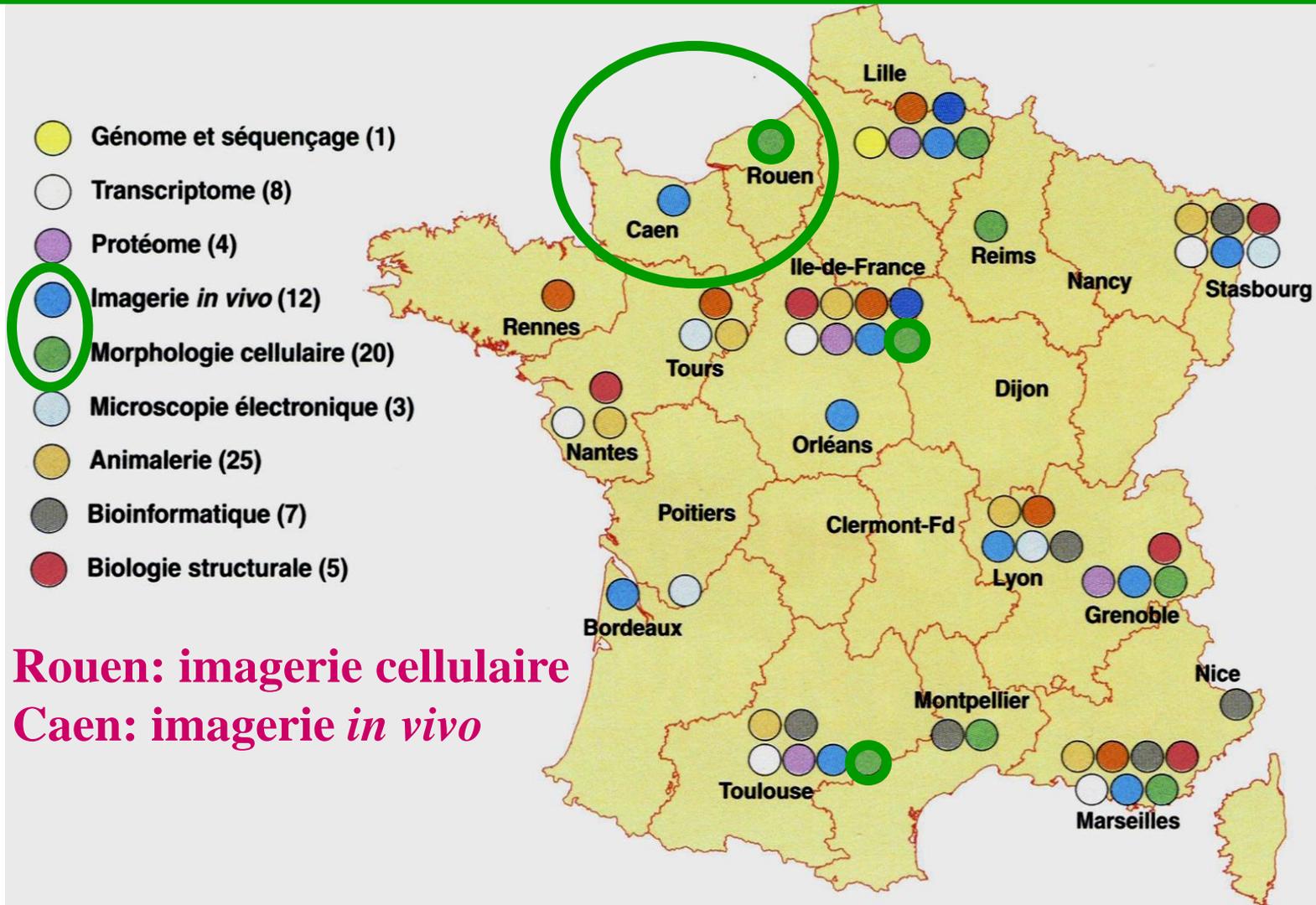


Invité par David Vaudry (david.vaudry@univ-rouen.fr)

Microscopie optique, microscopie confocale et STED



Recensement 2001: 82 Plates-Formes de Recherche opérationnelles



Rouen: imagerie cellulaire

Caen: imagerie *in vivo*

RIO = CNRS, INSERM, INRA, CEA

Depuis 2008: RIO remplacé par IBiSA

IBiSA = RIO + génopôle

"Infrastructures en Biologie, Santé et
Agronomie"



Charte des Plates-Formes de Recherche en Sciences du vivant:

- Définition
- Ouverture
- Mode de gestion
- Evolution technologique
- Formation
- Evolution

<http://www.ibisa.net>

En 2018, 23 Plateformes de recherche référencées en Imagerie Cellulaire
19 Plateformes de recherche référencées en Imagerie In Vivo

Plate forme Régionale de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie

4 services :

- Synthèse peptides et criblage fonctionnel
- Bio Imagerie Photonique
- Microdissection et Q-PCR
- Microscopie électronique

Localisée CURIB, 3^{ème} étage



Evaluation et
renouvellement label
IBiSA en 2019



Demande d'accès PRIMACEN: <http://www.primacen.fr>

iPRIMACEN

Login iPRIMACEN vaudrdav
Mot de passe OK
Password oublié ?

NOS ÉQUIPEMENTS NOS TARIFS DEMANDER UN ACCÈS NOUS CONTACTER PLAN D'ACCÈS NOS LOGOS

Recherche rapide OK

PRIMACEN : Plate-Forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie

- ACCUEIL
- INFORMATIONS
 - Toutes les nouvelles
 - Présentation des services
 - Grille de tarification
 - Contacts
 - Publications
 - La lettre des Plates-Formes
- ACTIONS**
 - Demande d'accès**
- SUPPORT
 - Liens utiles
 - Partenaires
- AIDE
 - FLUX RSS
- GALERIE

Bienvenue sur iPRIMACEN, l'outil interactif de gestion de la Plate-Forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie (PRIMACEN). Ce site web est composé de plusieurs modules qui vous permettent d'obtenir des informations relatives à nos services et nos équipements. Pour utiliser les ressources de PRIMACEN, merci de remplir une demande d'accès qui nous permettra de répondre au mieux à votre demande (formation, collaboration, prestation). Vous pourrez ensuite accéder à la réservation en ligne, à la métrologie des équipements, à des outils d'analyse et à la documentation qualité.

IRIB

L'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB) a été identifié Structure Fédérative de Recherche (SFR) par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche au 1^{er} janvier 2012 et fait suite à l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP 23). Grâce au soutien du Ministère de la Recherche, de l'Inserm, du CNRS, de l'Université de Rouen, des collectivités territoriales, des fonds européens et des associations caritatives, l'IRIB dispose d'infrastructures de recherches exceptionnelles constituées de la Plate-Forme d'imagerie cellulaire PRIMACEN, de la Plate-Forme de Protéomique PISSARO et de 7 services communs dotés d'équipements très performants.



PRIMACEN

Dirigée par le Dr David VAUDRY, animée par le Dr Ludovic GALAS, PRIMACEN a été identifiée "plate-forme opérationnelle" en 2001 et 2003 par la Réunion Inter-Organismes (qui regroupe l'Inserm, le CNRS, l'INRA et le CEA). Elle a reçu le label de "plate-forme régionale" en 2004 et 2006, et le label IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) depuis 2008. PRIMACEN regroupe cinq services qui couvrent un large spectre d'activités dans le domaine de l'imagerie cellulaire depuis la synthèse de biomarqueurs et la préparation des échantillons jusqu'à la localisation et la détermination de l'activité biologique d'une molécule d'intérêt.



Accès rapide

- Nos équipements
- Nos tarifs
- Faire une demande d'accès
- Nous contacter
- Plan d'accès
- Nos logos

Film PRIMACEN



Master Imagerie



Événements

Novembre

L	M	M	J	V	S	D
20	21	22	23	24	25	28
27	28	29	30	01	02	03
04	05	06	07	08	09	10
11	12	13	14	15	16	17

NOUVELLE DU 10/11/17 NOUVELLE DU 09/10/17 NOUVELLE DU 29/09/17 NOUVELLE DU 08/09/17

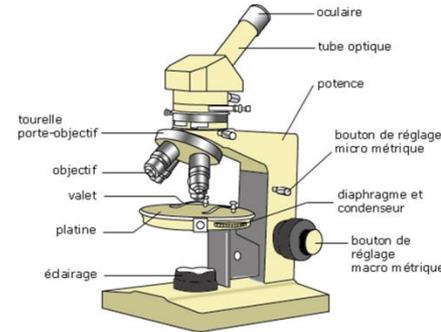
29 sep 2017



Microscopie optique (appliquée à la biologie)

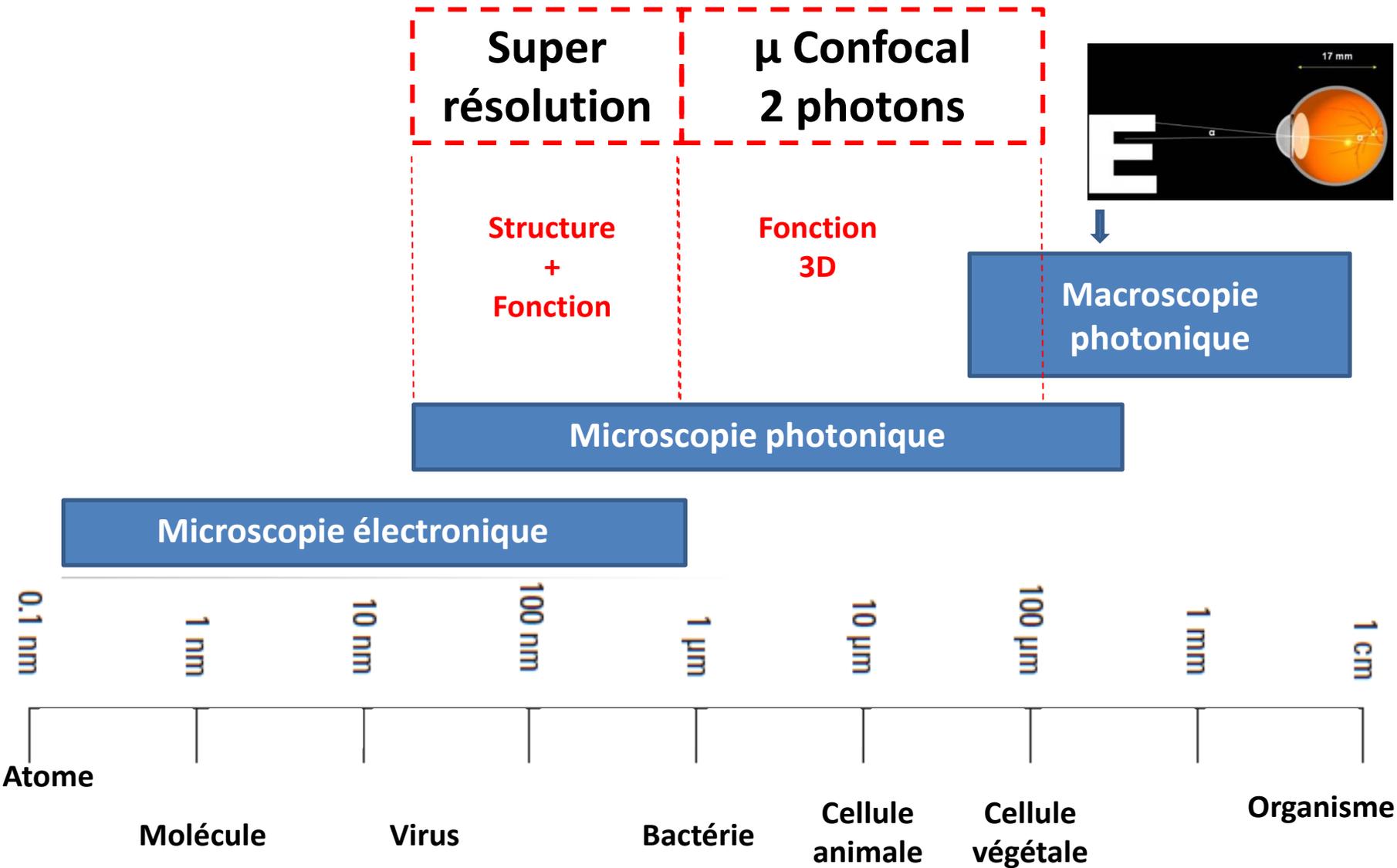
A quoi peut servir un microscope?

- A donner une image grossie d'un petit objet
= grossissement
- A séparer les détails d'un objet sur une image
= résolution
- A rendre visible des détails à l'œil ou avec une caméra

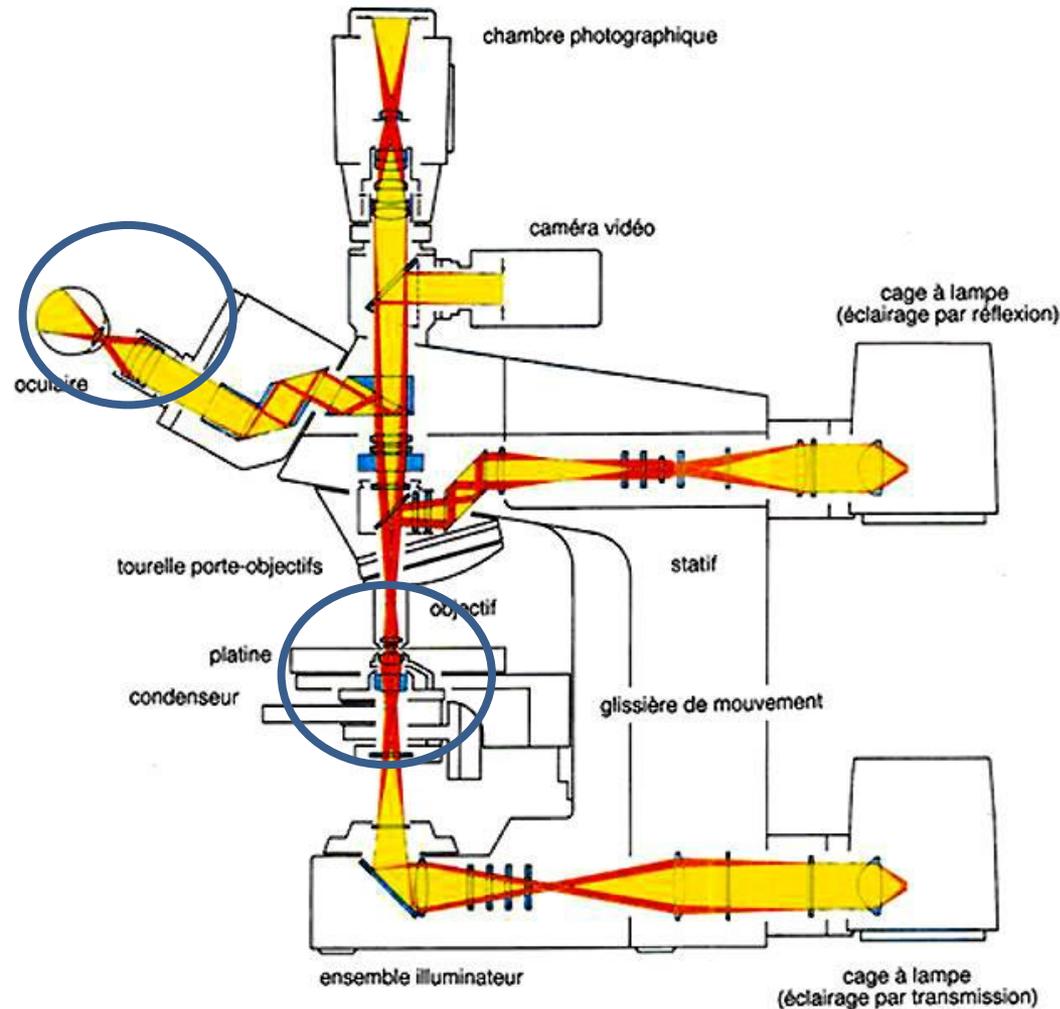


Un microscope optique est un **instrument** composé de plusieurs lentilles superposées permettant d'augmenter le pouvoir grossissant.

Grandeurs en Microscopie optique



1. ➤ Éléments d'un microscope optique



Le microscope optique utilise la lumière.

Il est doté de deux lentilles principales:

- l'une dans l'objectif, pour agrandir l'objet que l'on souhaite observer (il existe plusieurs grossissements)

- l'autre dans l'oculaire (grossissement fixe)

1. ➤ Éléments en microscopie optique

Source de lumière

Lampe Blanche
Lampe UV
...



Agents de contraste

Absorbants
Diffusants
Dépolarisants
Fluorescents
...



Optique

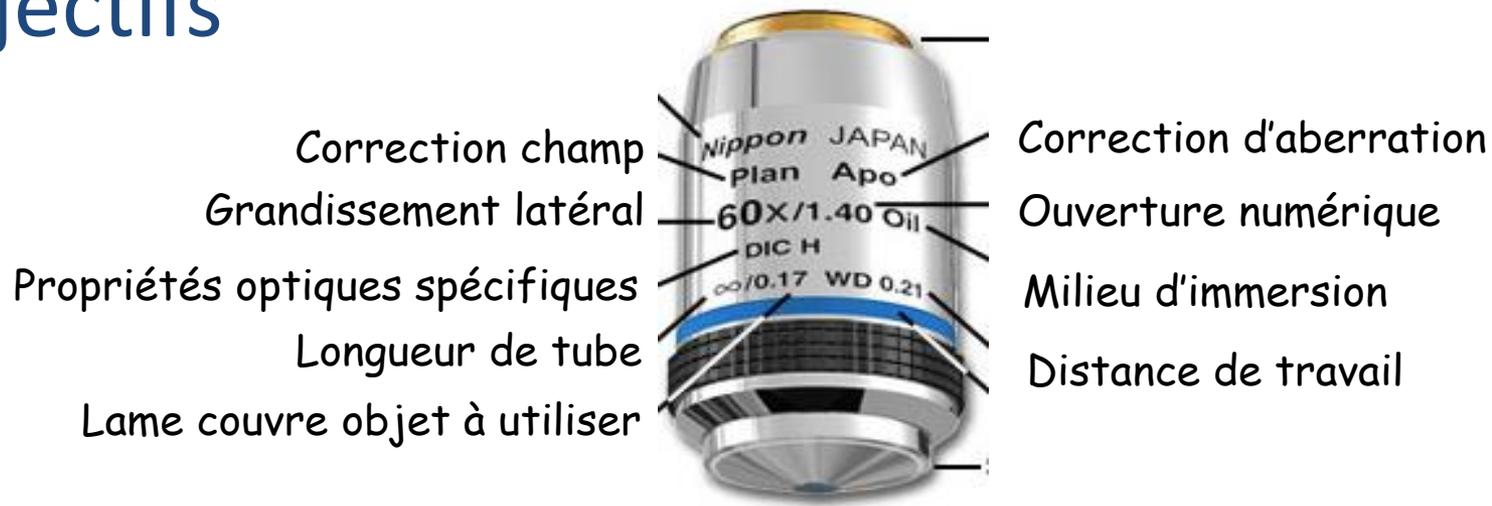
Lentilles
Miroirs
Filtres
...



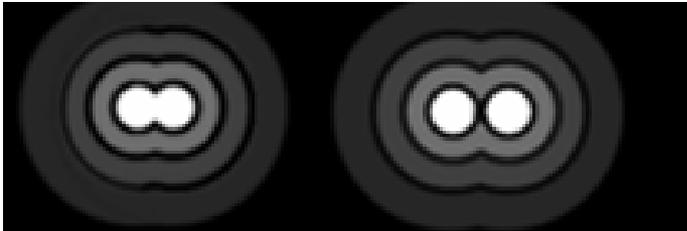
Détecteur

Œil
Caméra
PMTs
...

2. ➤ Les objectifs



◆ Résolution théorique en optique



$$\text{Résolution} = \frac{0.61 \times \lambda_o}{\text{NA obj}}$$

Résolution du microscope : plus petite distance entre deux points tels qu'ils puissent être considérés comme entités distinctes (extension de la tâche principale d'Airy)



NA=0.12

R= 2.7 μm



NA=0.34

R= 980 nm



NA=0.87

R= 380 nm

Pour $\lambda = 550 \text{ nm}$

2. ➤ Les objectifs

◆ La résolution latérale détermine le grossissement

grossissement	NA	résolution théorique à 488 nm ($\lambda = 500$ nm)
4 ×	0.1	3.05 μm
40 ×	0.65	0.47 μm
63 ×	1.4	0.18 μm
100 ×	1.3	0.23 μm



$$\text{Résolution} = \frac{0.61 \times 0.5}{1.3} = 0.23 \mu\text{m}$$

Limite séparation œil humain : 100 μm
Soit un gain de 500.

Résolution des microscopes optiques ne peut être supérieure à 0,18 micromètre, cette résolution étant limitée par la diffraction de la lumière. Pour approcher de cette limite, nécessité d'utilisation d'un objectif à immersion à huile.

Calcul rapide du grossissement possible: NA * 1000

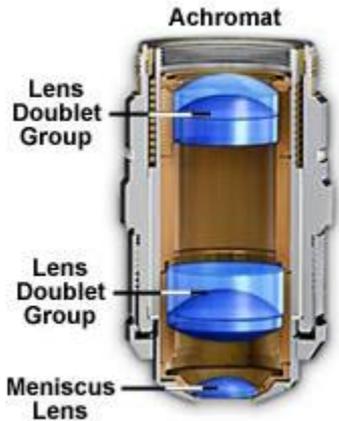
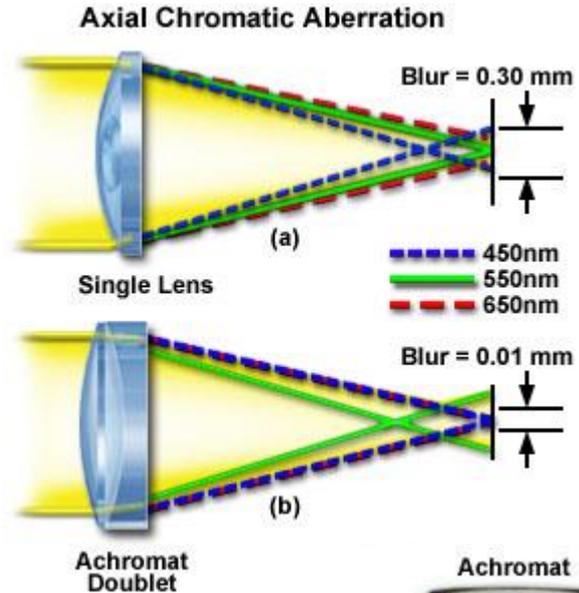
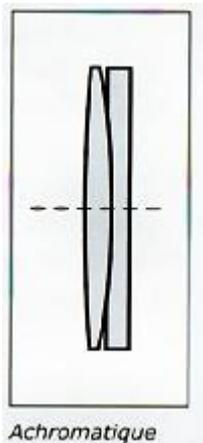
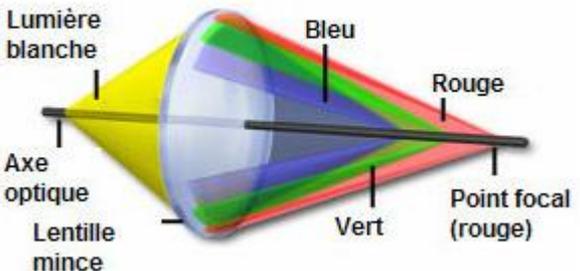
Grossissement max recommandé = 1.3 × 1000 = 1300

2. ➤ Les objectifs

◆ Correction des aberrations des lentilles

Aberrations chromatiques, sphériques, de coma, astigmatismes et de courbure de champ

Ex: Aberration chromatique:

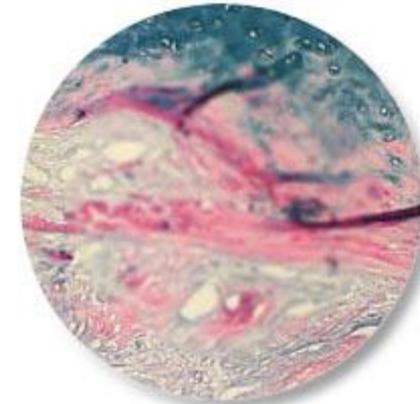


	PLAPON60xOSC	UPLSAPO60xO
Axial chromatic aberration (Z direction) Compared for PSF fluorescent beads (405 nm, 633 nm).	Approx. 0 μm	Approx. 0.5 μm
Lateral chromatic aberration (X-Y direction) Compared for PSF fluorescent beads (405 nm, 488 nm, 633 nm).	Approx. 0.1 μm	Approx. 0.2 μm

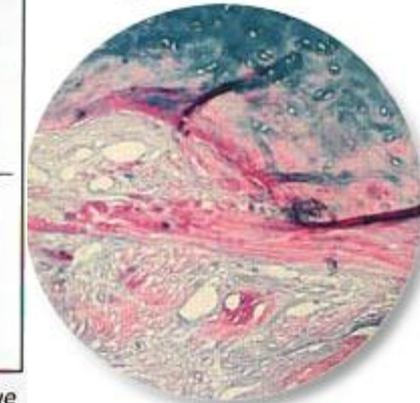


Ex: Courbure de champ:

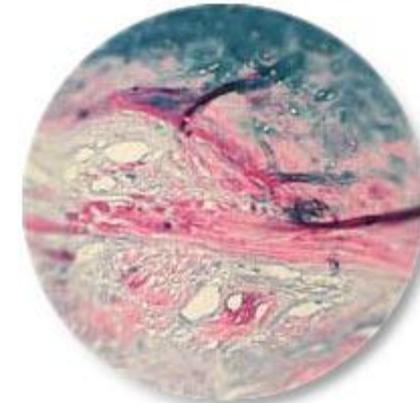
Après passage dans une lentille, l'image d'un plan n'est pas un plan, mais une surface sphérique concave (si lentille convergente) ou convexe (si lentille divergente).



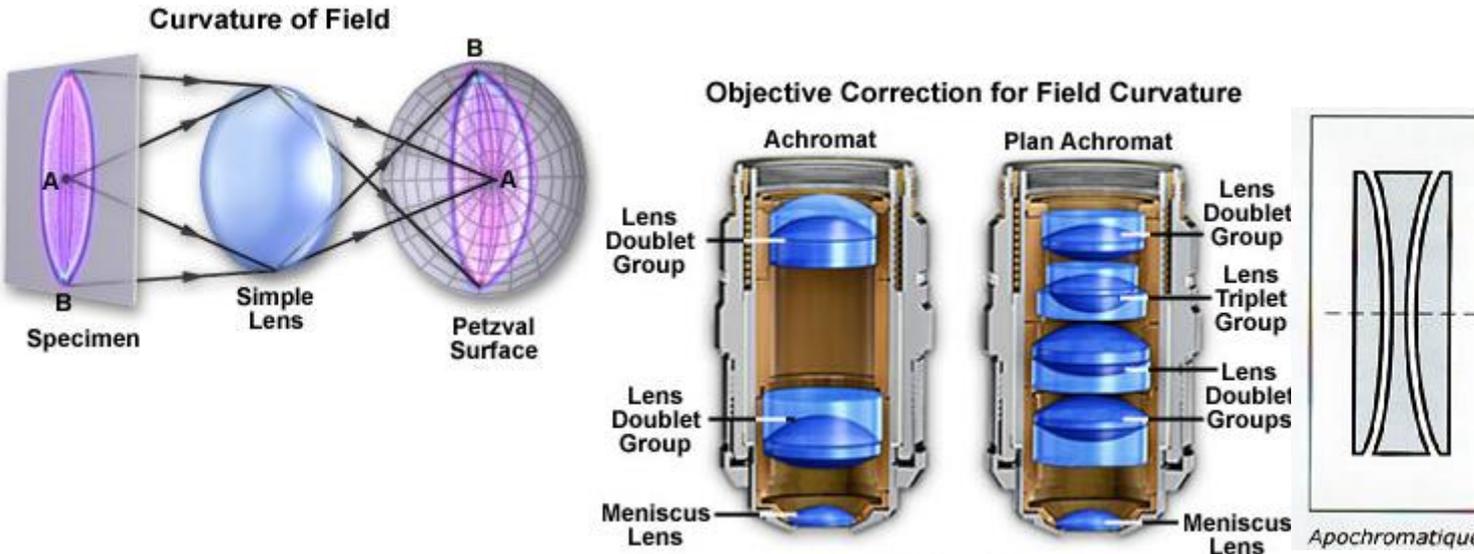
(a) Edges in Focus



(b) Entire Viewfield in Focus



(c) Center in Focus



Correction: association de lentilles

Les aberrations peuvent être corrigées par association de lentilles ou traitement des surfaces mais cela rend les objectifs de microscopes compliqués, fragiles et coûteux : à respecter

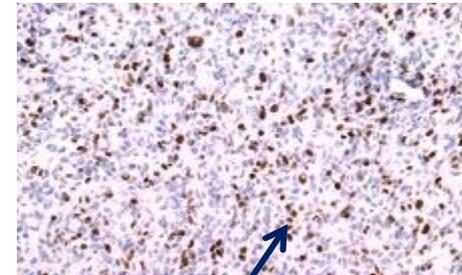
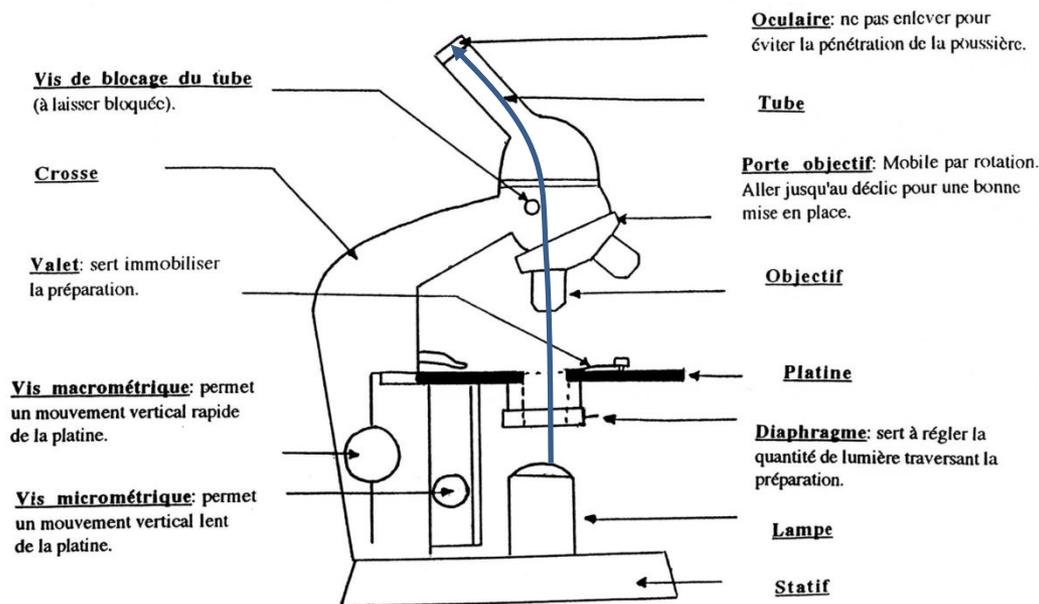
3. ➤ Comment voir l'échantillon

Les méthodes de contraste optique

Fond clair, contraste de phase, contraste interférentiel (Normarski), fond noir

◆ Microscopie en fond clair

Un objet atténue la lumière le traversant.
Nécessite d'observer un objet coloré



Prolifération dans coupe de glioblastome (1^{er} AC anti Ki67 et 2nd AC avidine-biotine-peroxydase qui permet la coloration du tissu exposé à la diaminobenzidine) = immunoperoxydase-DAB.

3. ➤ Comment voir l'échantillon

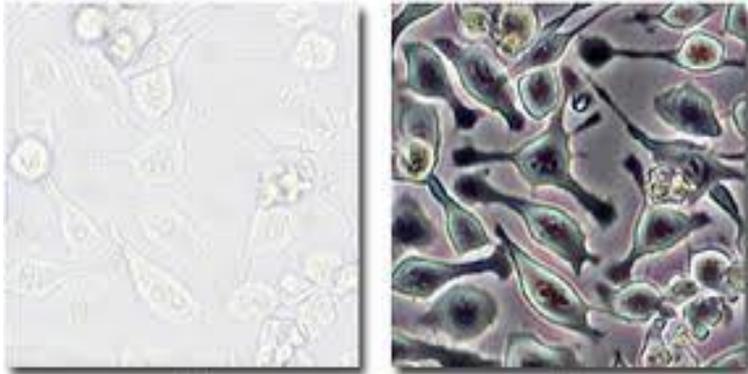
Les méthodes de contraste optique

Fond clair, contraste de phase, contraste interférentiel (Normarski), fond noir

◆ Microscopie à contraste de phase

Échantillons minces non colorés sont transparents en fond clair.

Living Cells in Brightfield and Phase Contrast



transmis

Contrats de phase

Phase Contrast Microscope Optical Train

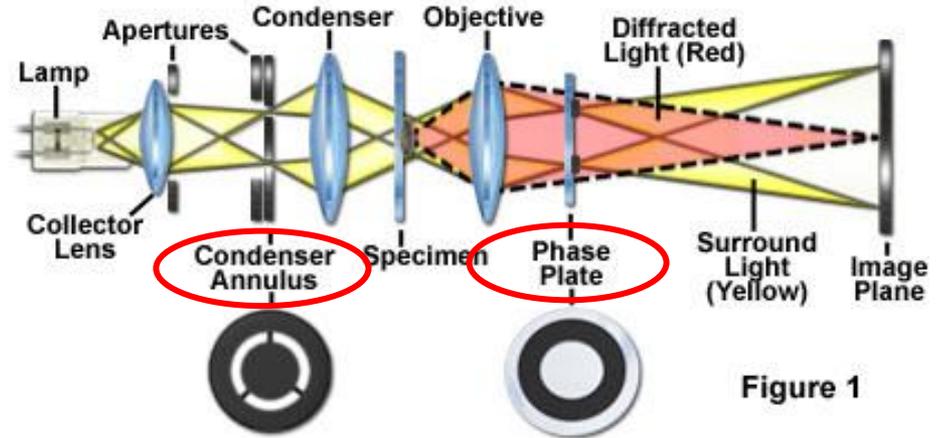


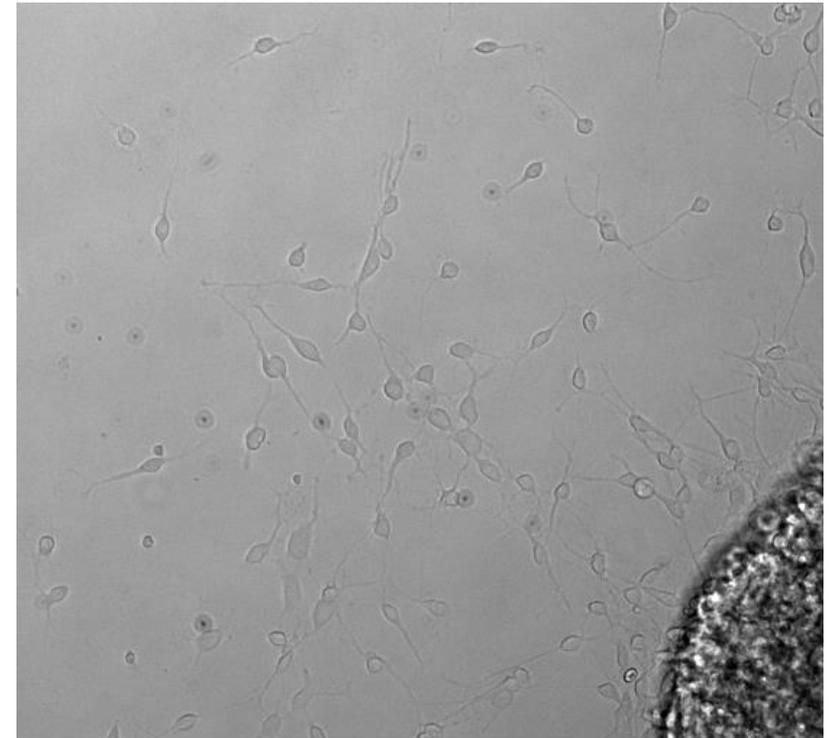
Figure 1

Variables selon objectif

3. ➤ Comment voir l'échantillon

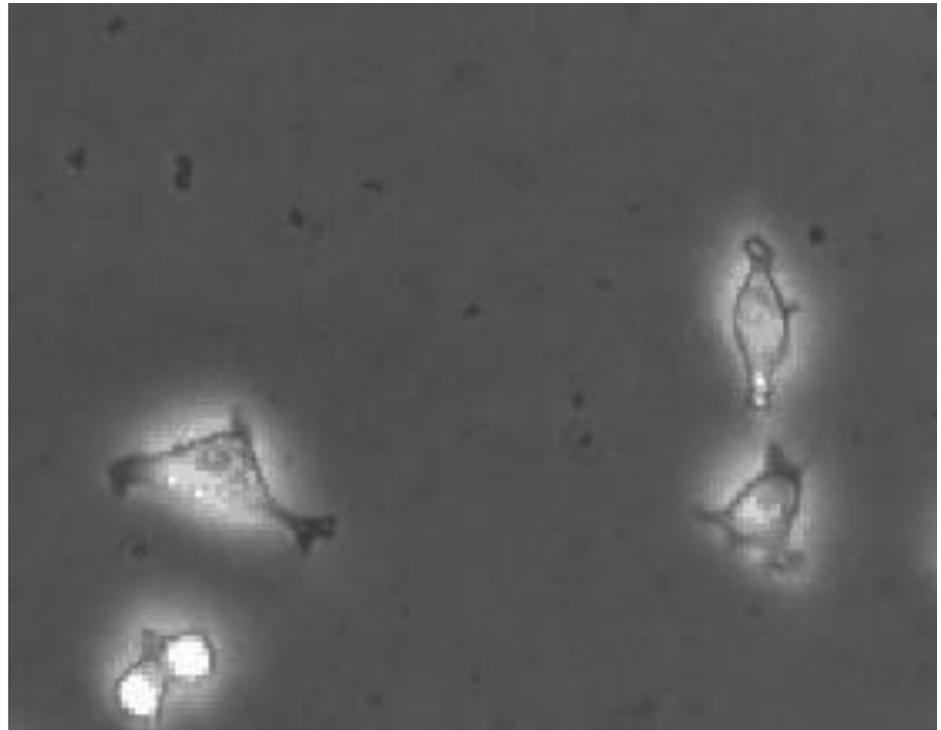
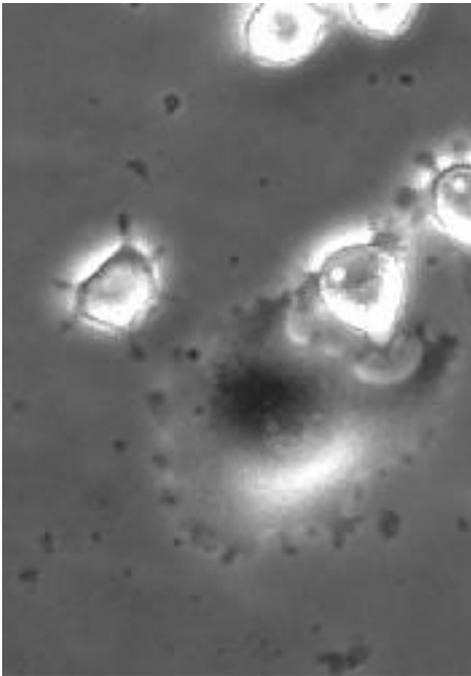
Exemple d'application: Les études de migration cellulaire

- ◆ Etude dynamique de la formation des prolongements cellulaires sur une durée de 12 à 24 h



3. ➤ Comment voir l'échantillon

Exemple d'application: Les études de motilité et division cellulaire



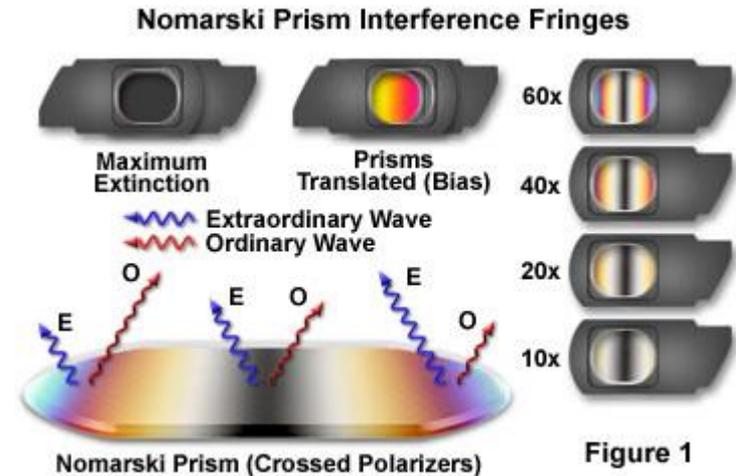
3. ➤ Comment voir l'échantillon

Les méthodes de contraste optique

Fond clair, contraste de phase, contraste interférentiel (Normarski), fond noir

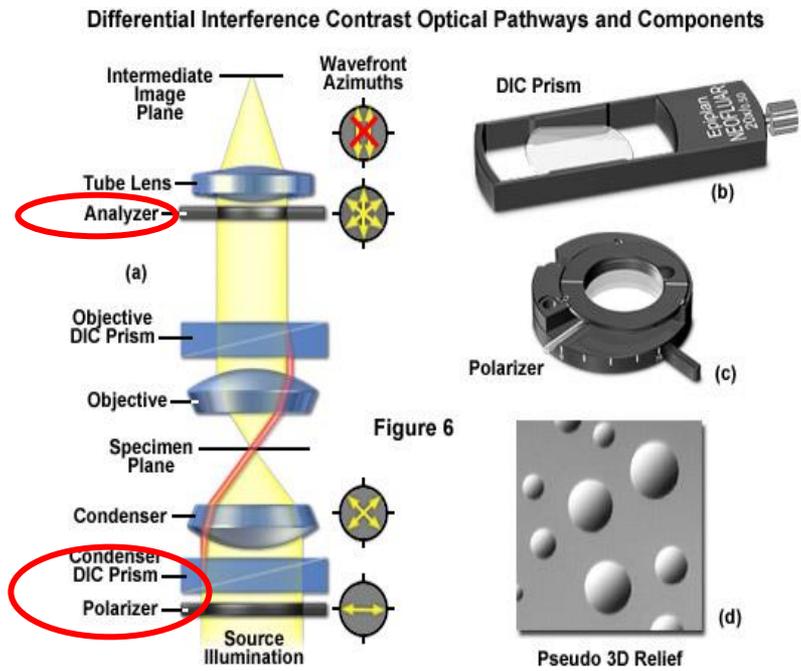
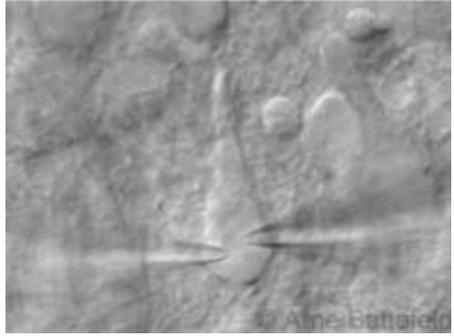
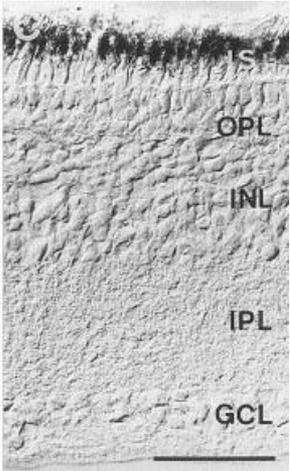
◆ Microscopie à contraste interférentiel (Normarski)

Échantillons minces non colorés sont transparents en fond clair.



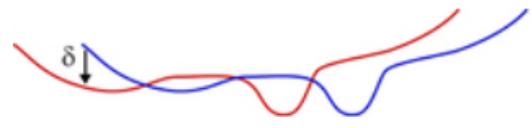
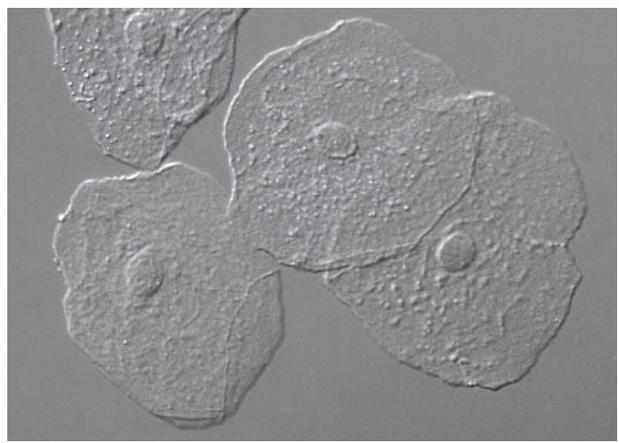
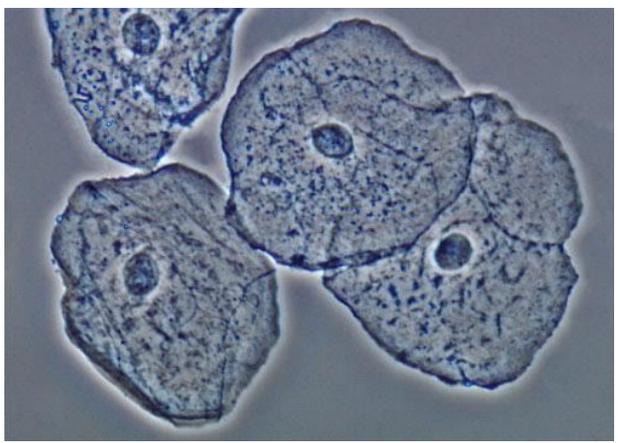
3. ➤ Comment voir l'échantillon

◆ Microscopie à contraste interférentiel différentielle (DIC)



DIC= differential interference contraste

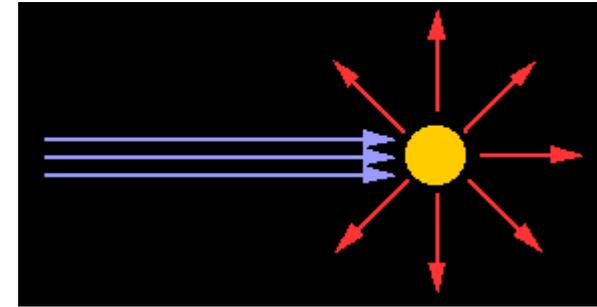
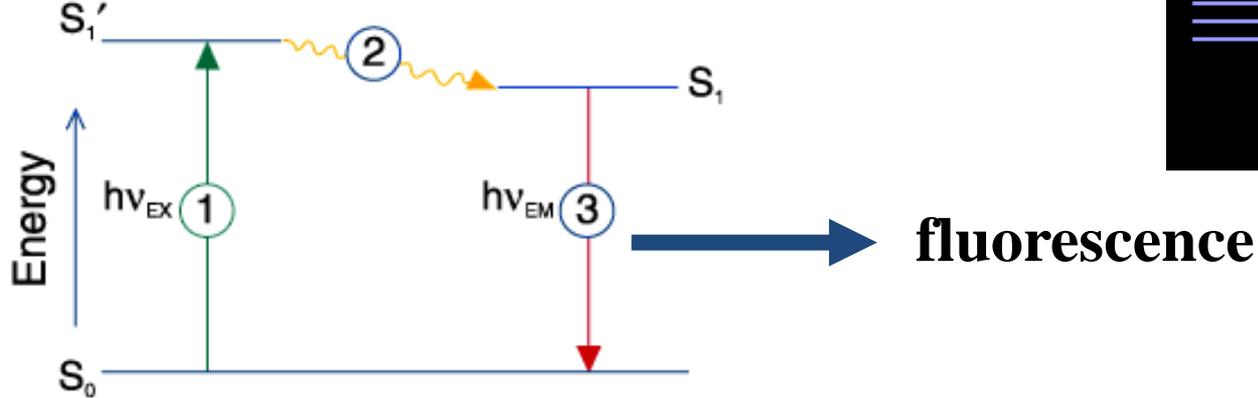
Contraste de phase versus DIC



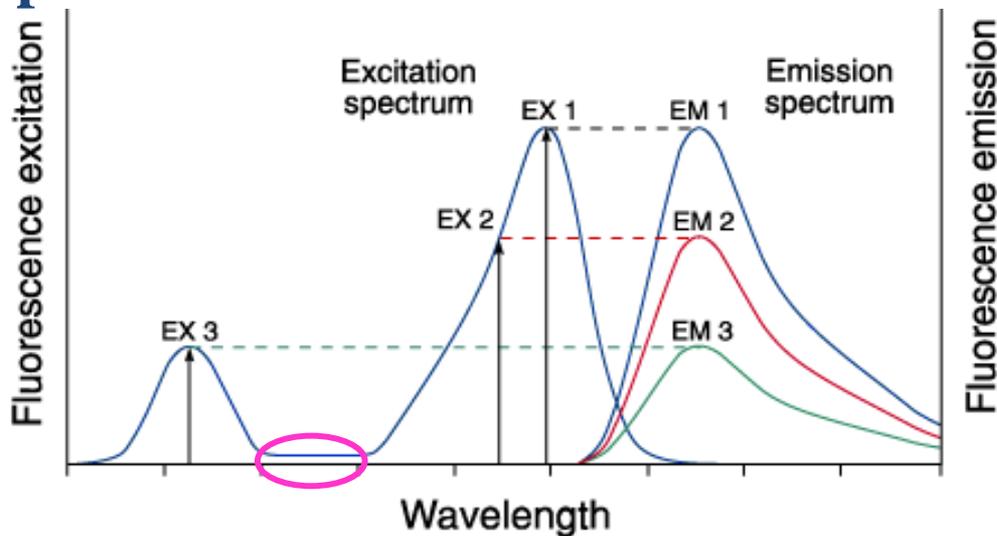
3. ➤ Comment voir l'échantillon

Microscopie à fluorescence

◆ principe



◆ spectres



3. ➤ Comment voir plusieurs marqueurs dans l'échantillon

1 excitation, 2 émissions

Alexa Fluor 488

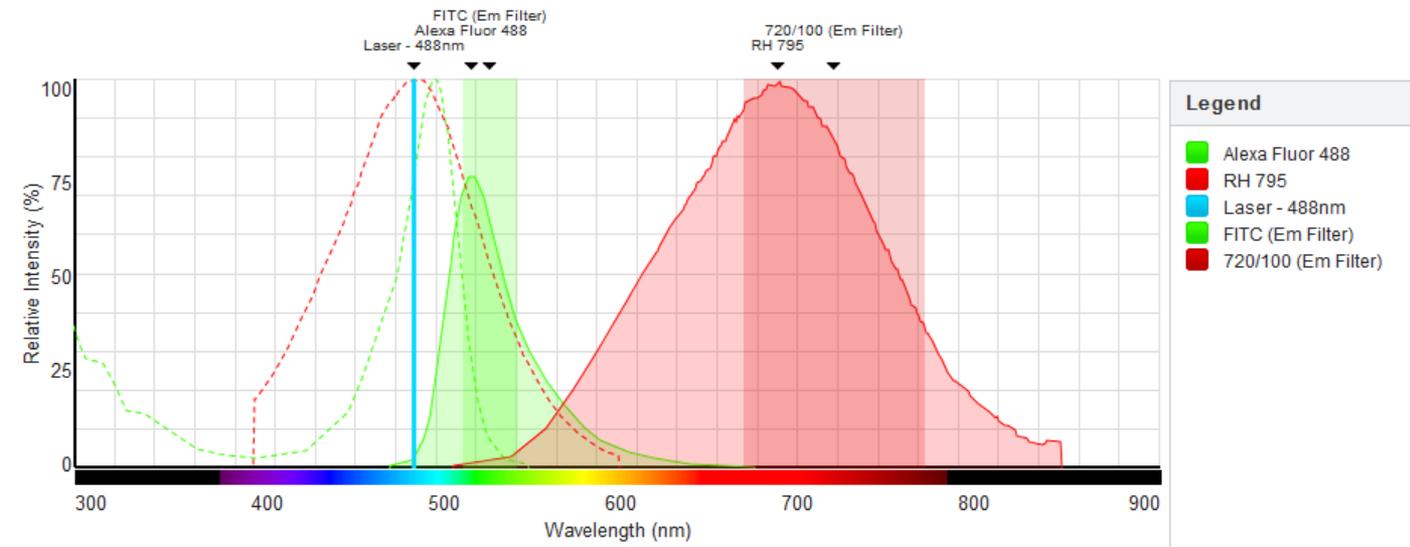
RH 795

Pyridinium, 4-[4-(4-(diethylamino)phenyl)-1,3-butadienyl]-1-[2-hydroxy-3-[(2-hydroxyethyl)dimethylammonio]propyl]-, dibromide 172807-13-5

Fluorescence SpectraViewer

Load/Save Print Export Spillover Table

[Review Products and Purchase](#)



Pointer Location: 413nm, 4%
Fluorophores: RH 795

Fluorophores Light Sources Excitation Filters Emission Filters Reset

Filter	Wavelength	Bandwidth	Display on plot	Action
1. FITC	530	30	<input checked="" type="checkbox"/>	Remove
2. Custom Filter	720	100	<input checked="" type="checkbox"/>	Remove

+ Add

Display Options

- Grid
- Labels
- Excitation Plots
- Emission Plots
- Light Sources
- Filters

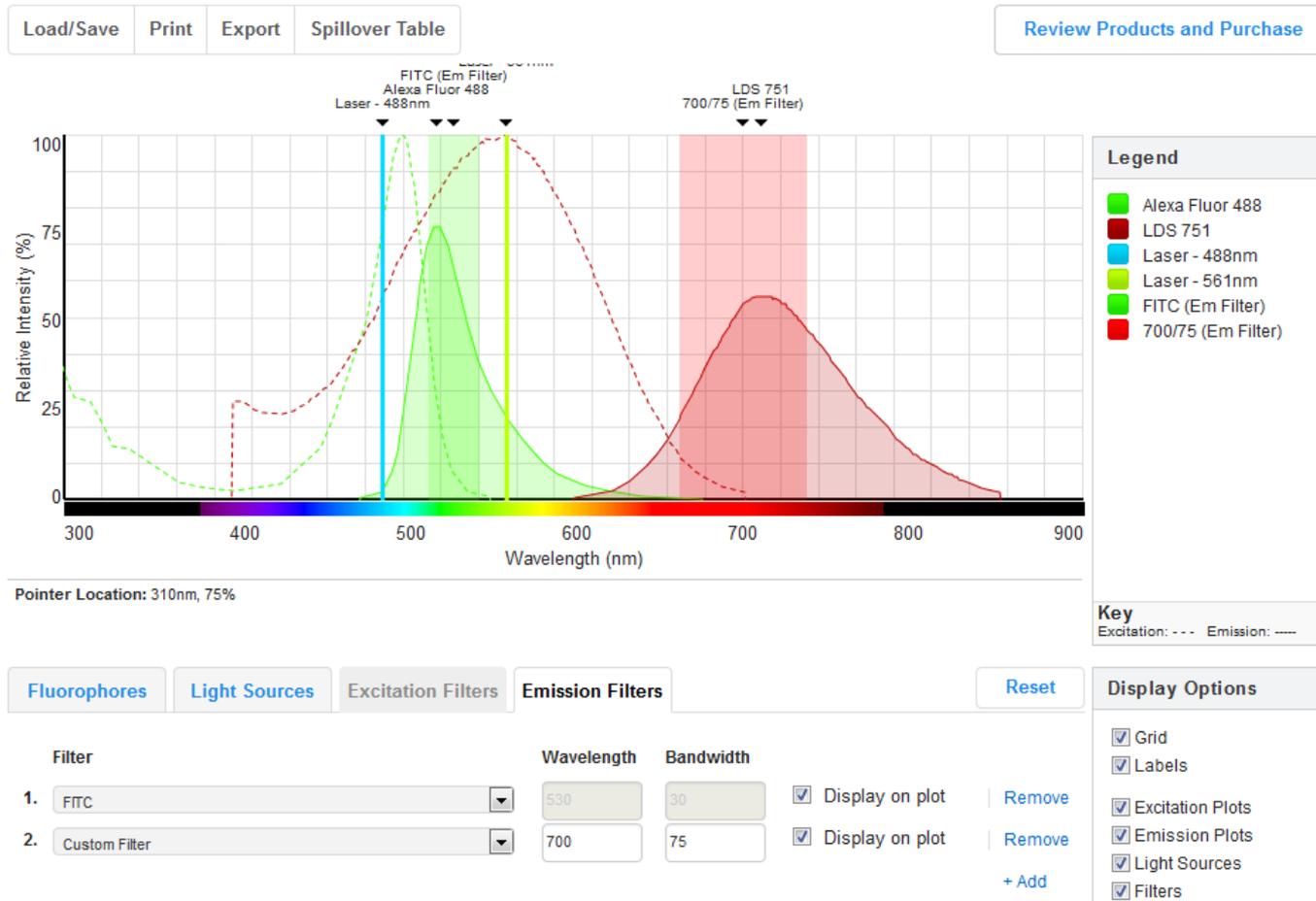
3. ➤ Comment voir plusieurs marqueurs dans l'échantillon

2 excitations, 2 émissions

Alexa Fluor 488

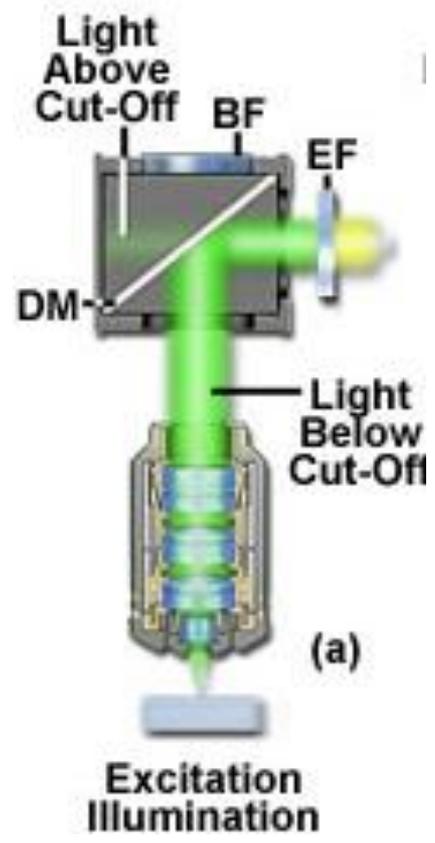
LSD 751

Fluorescence SpectraViewer

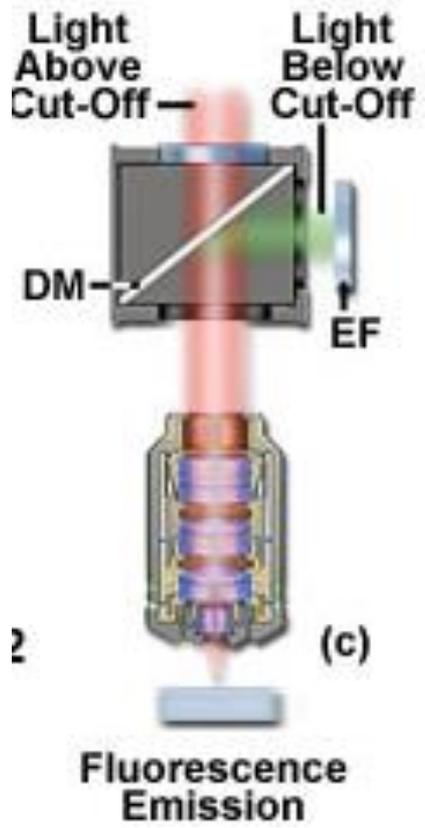


3. Fluorescence microscope

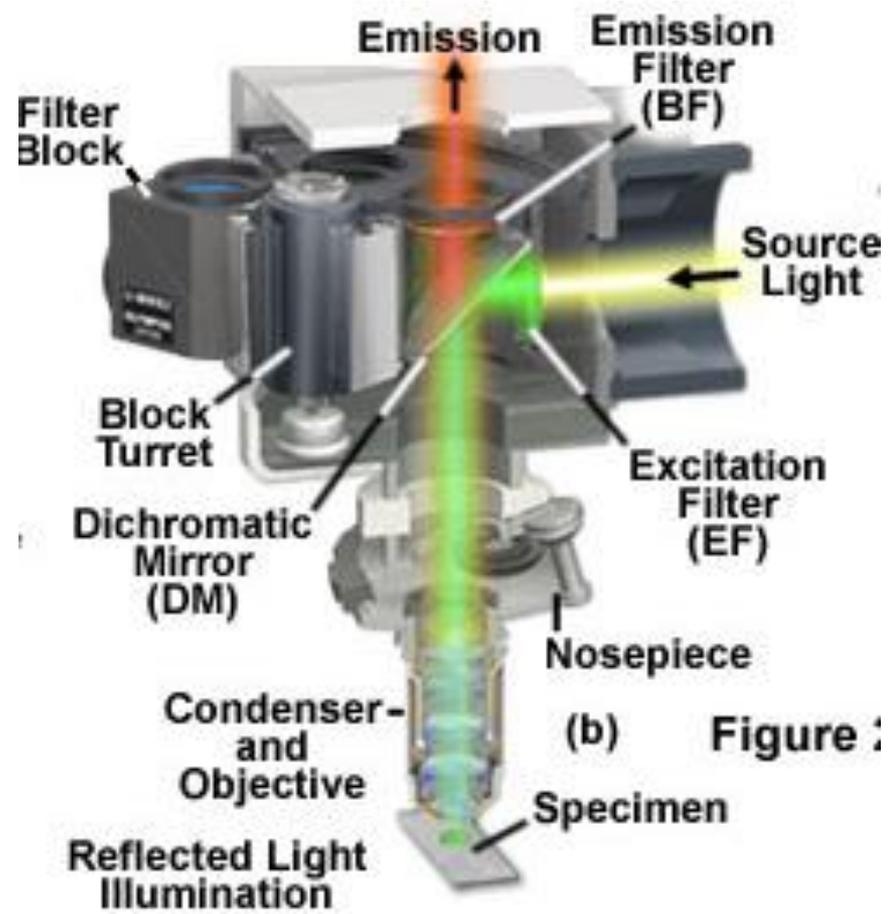
Excitation



Emission



Combinaison



3. ➤ Les différents modes de microscopie en fluorescence

Fluorescence Imaging Modes in Live-Cell Microscopy

Figure 12

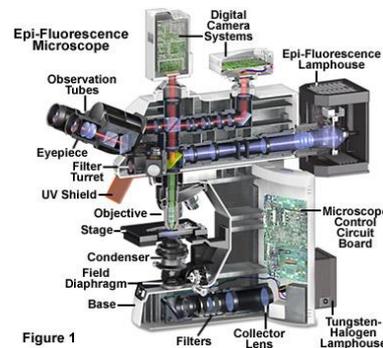
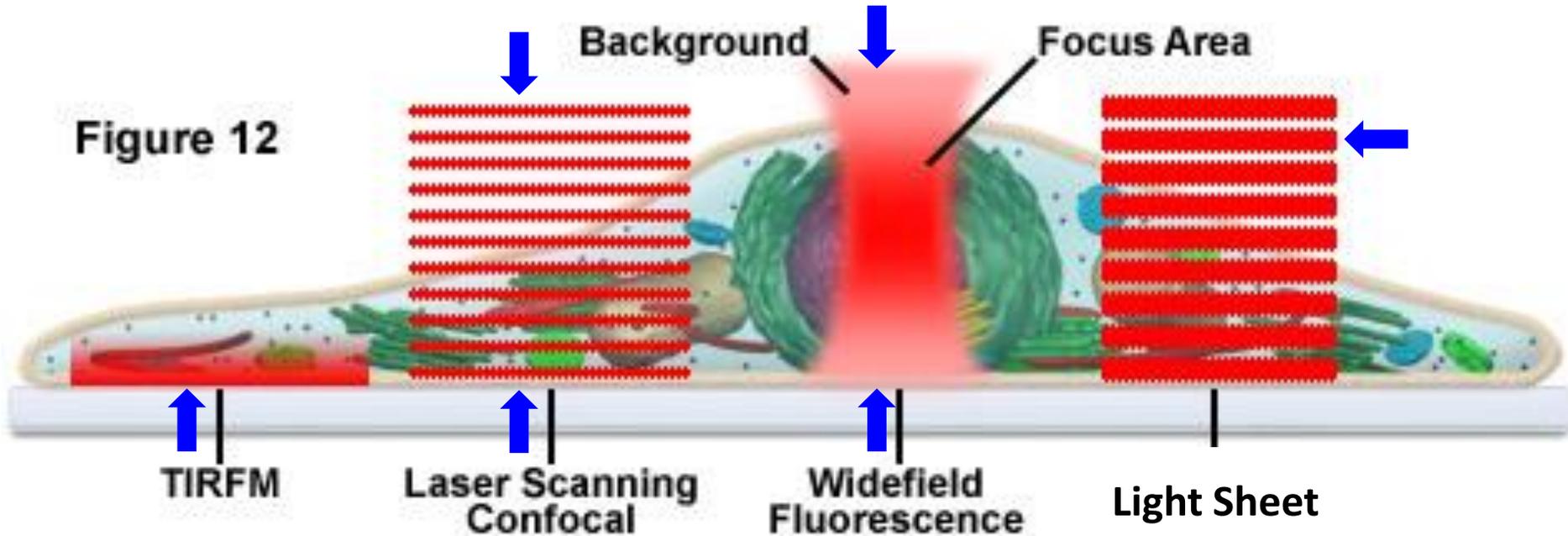
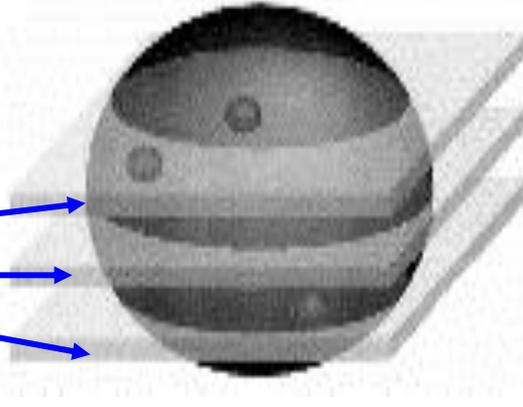


Figure 1

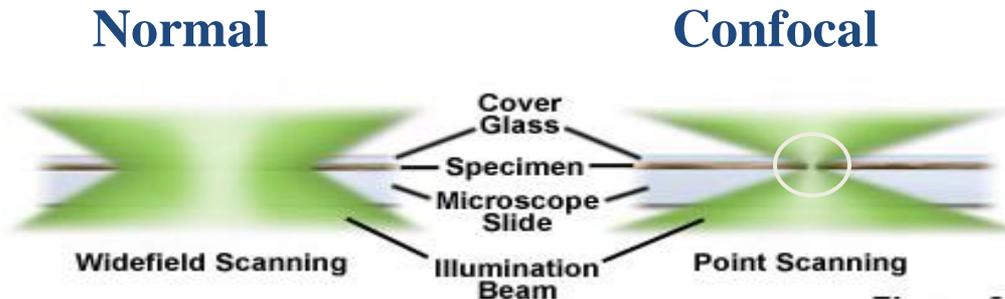
4. ➤ Objectifs de la microscopie confocale



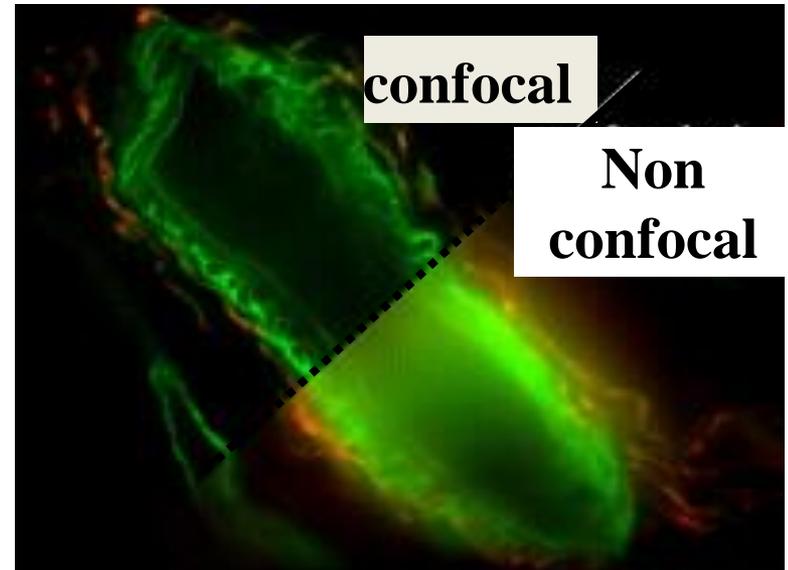
sections
optiques

- Acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D
- Elimination du signal fluorescent provenant d'autres plans grâce au pinhole, augmenter le contraste
- Augmentation de la résolution latérale et axiale
- Observation simultanée de différentes sondes fluorescentes
- Possibilité de faire de la représentation en X D

◆ Principe



Sélection de lumière provenant d'un point et le rejet de celle provenant des autres points



4. ➤ Principe de la microscopie confocale

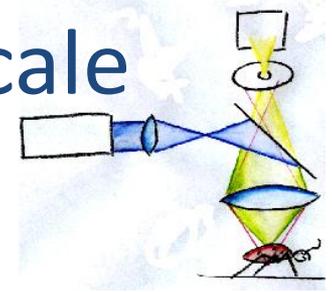
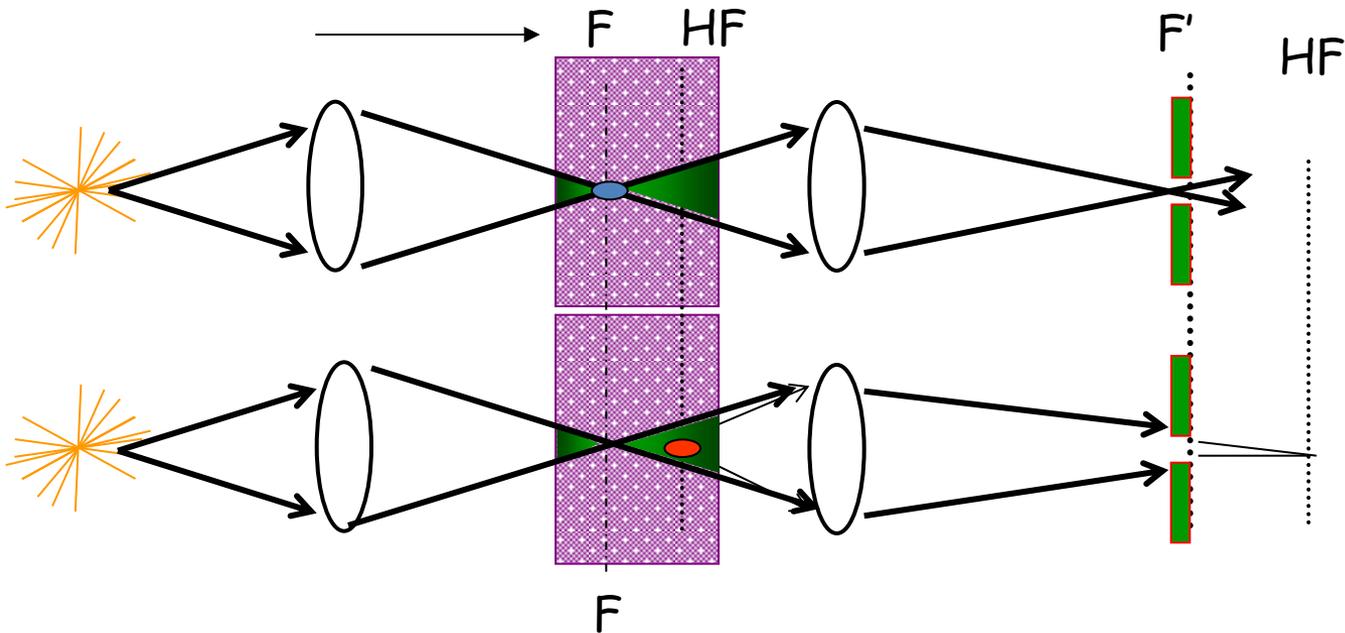


Image du point ● dans le plan focal de la lentille

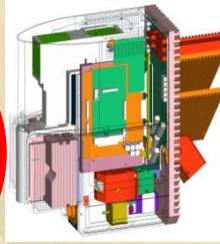
Image du point ● hors du plan focal de la lentille



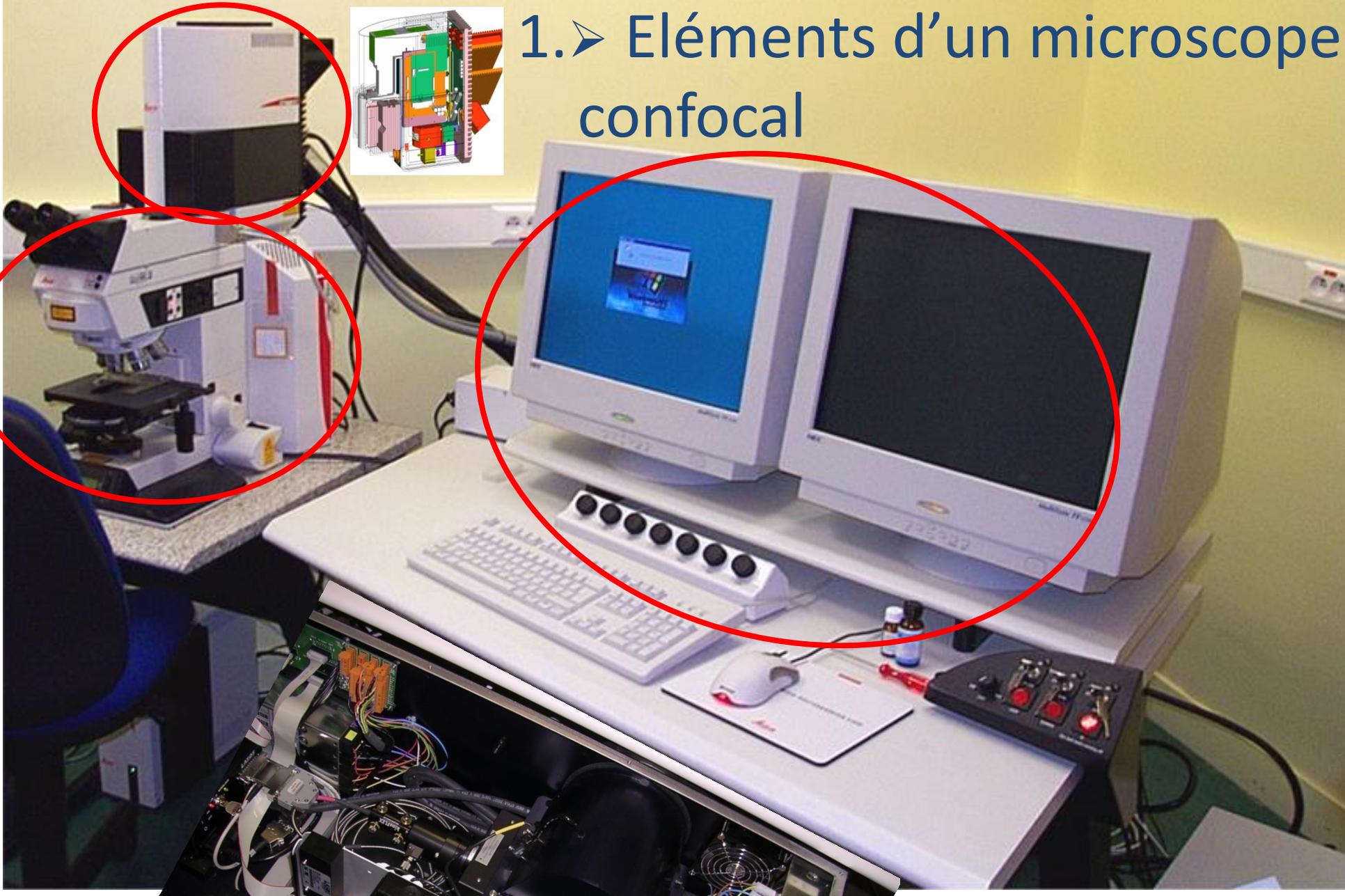
Un diaphragme (pinhole) placé dans le plan F laisse passer la lumière provenant du point ●

Le pinhole bloque presque toute la lumière provenant du point (HF) ●

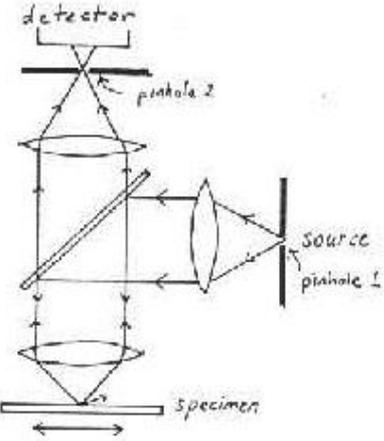
Microscopie confocale



1. ➤ Éléments d'un microscope confocal



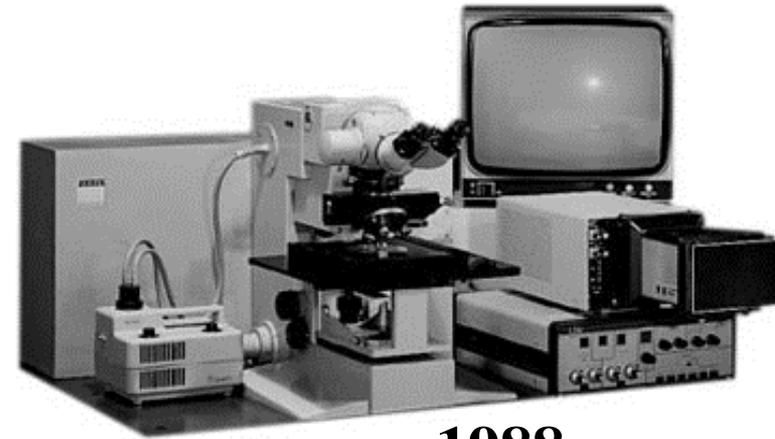
4. ➤ Historique de la microscopie confocale



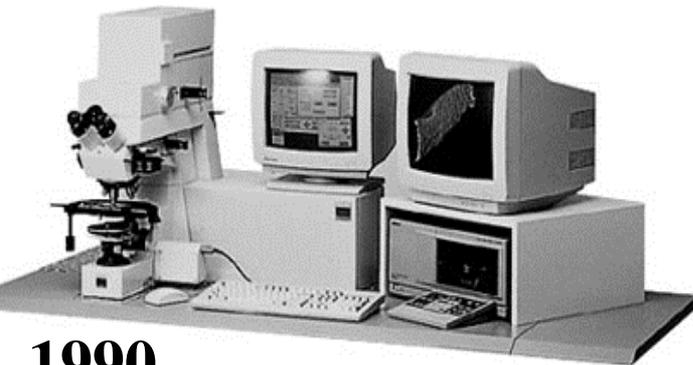
**Minsky, 1957
(principe)**



1982



1988



1990



2001

SP2



2005

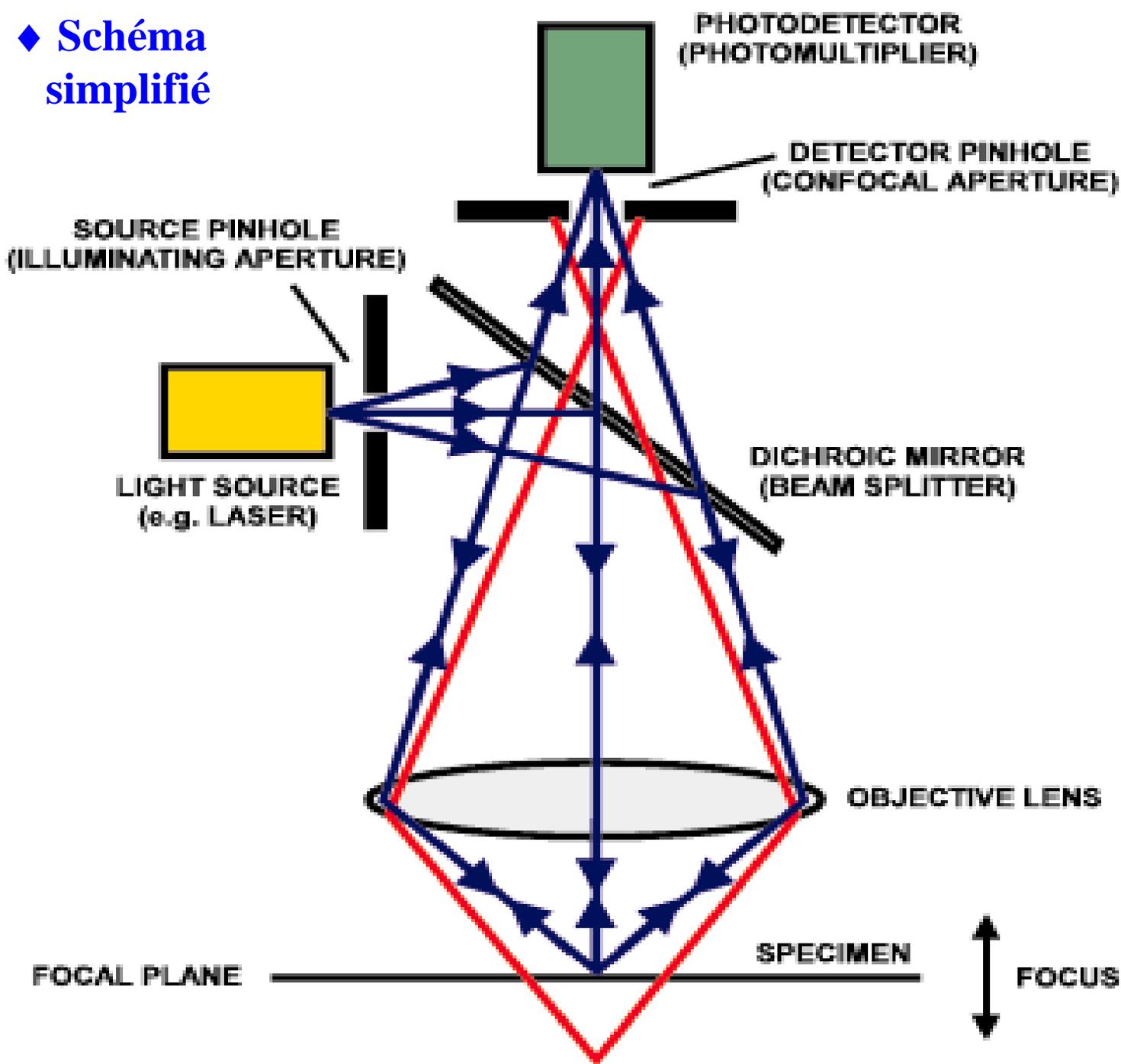
SP5

Juillet 2012



SP8

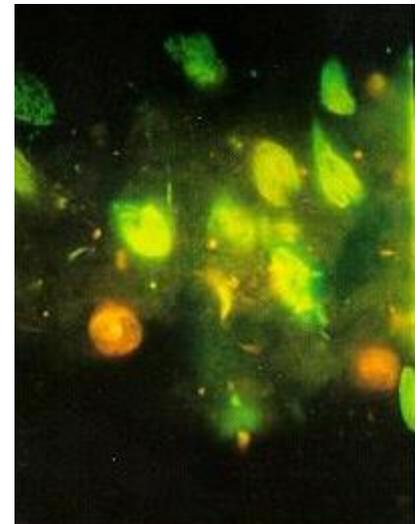
◆ Schéma simplifié



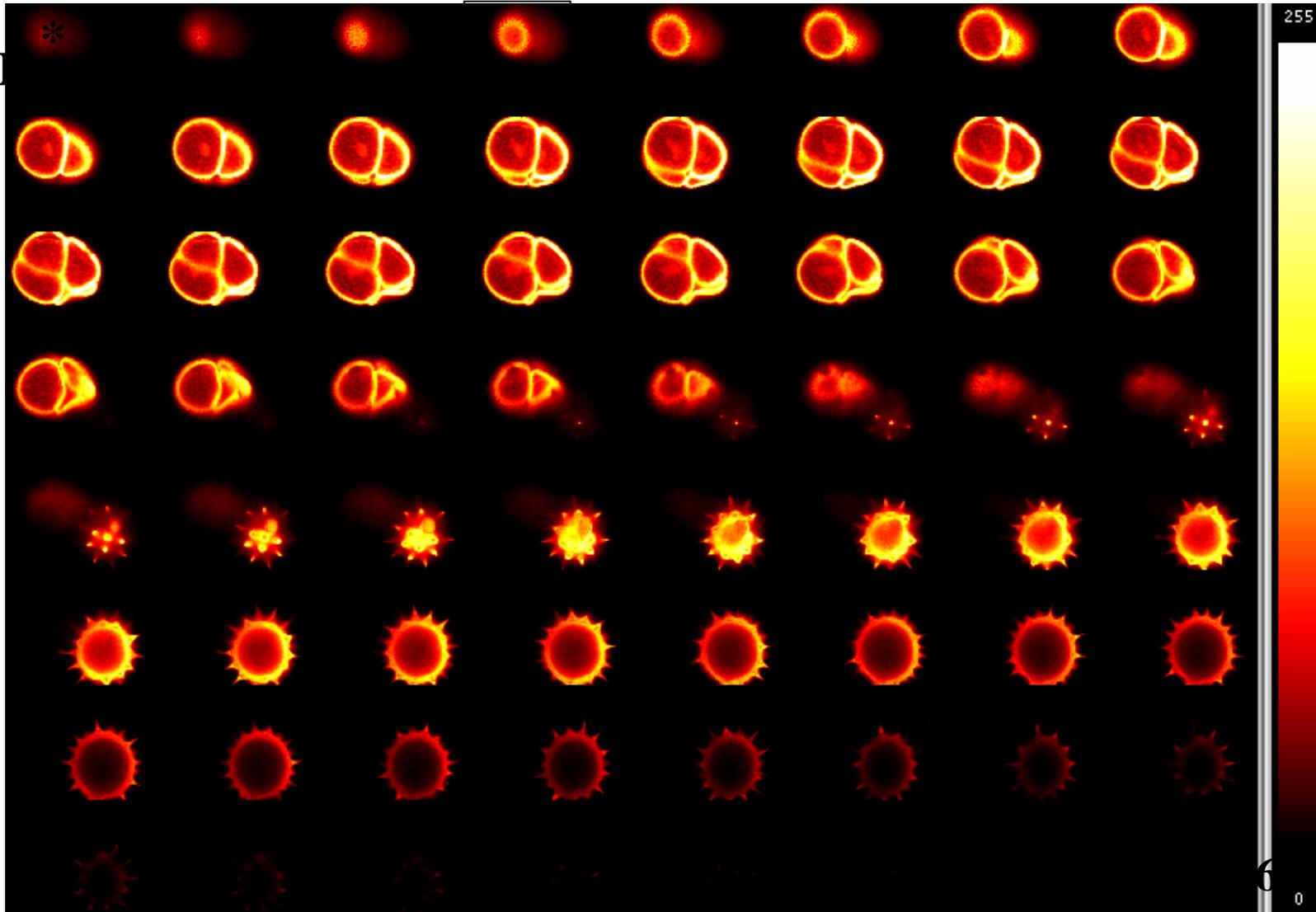
non confocal



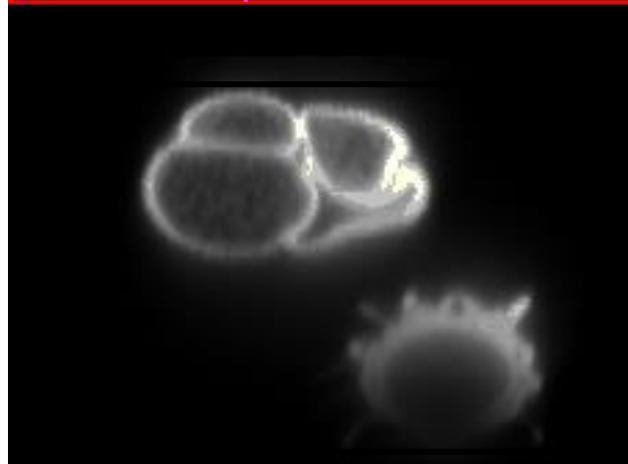
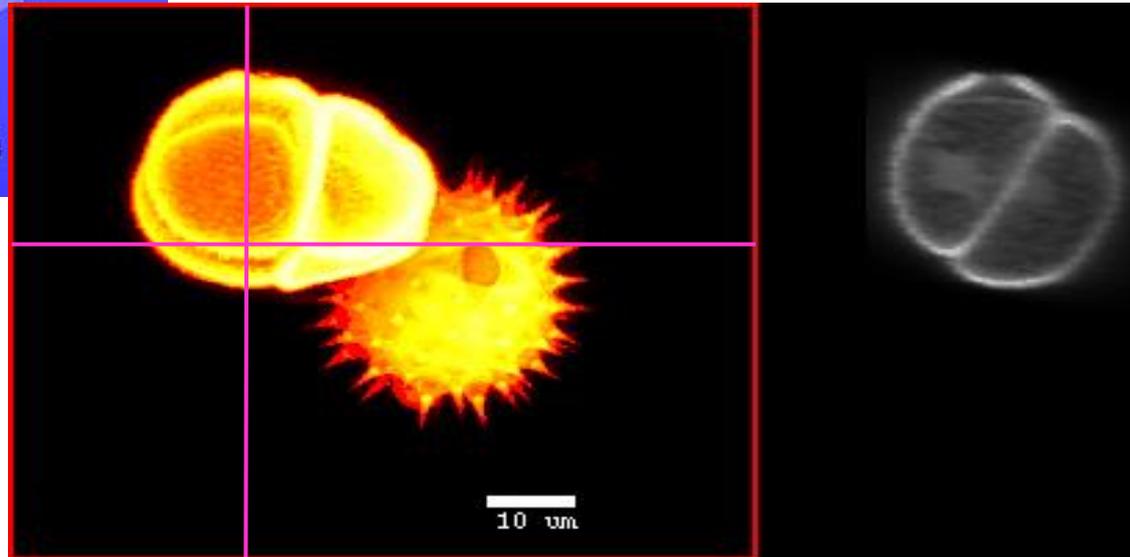
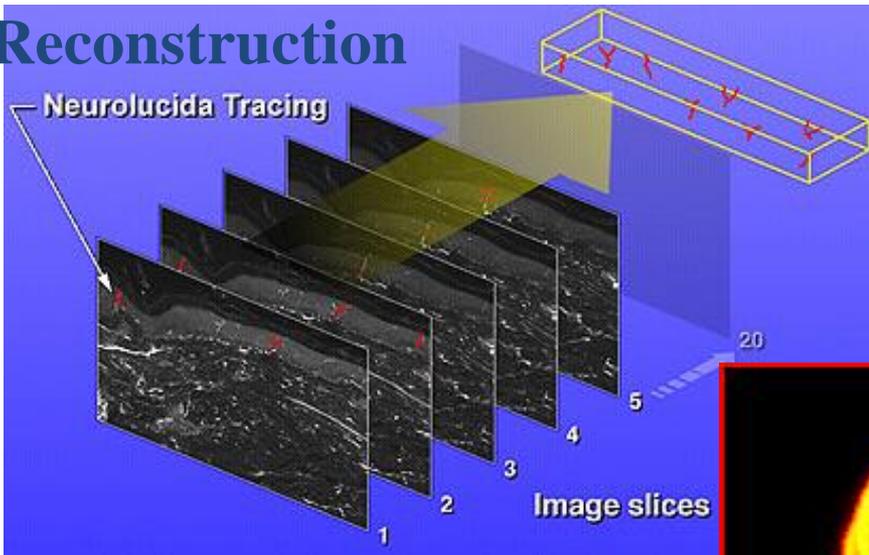
confocal



◆ **Résultat: Le CLSM permet de réaliser des sections optiques dans un échantillon fluorescent ou réfléchissant**



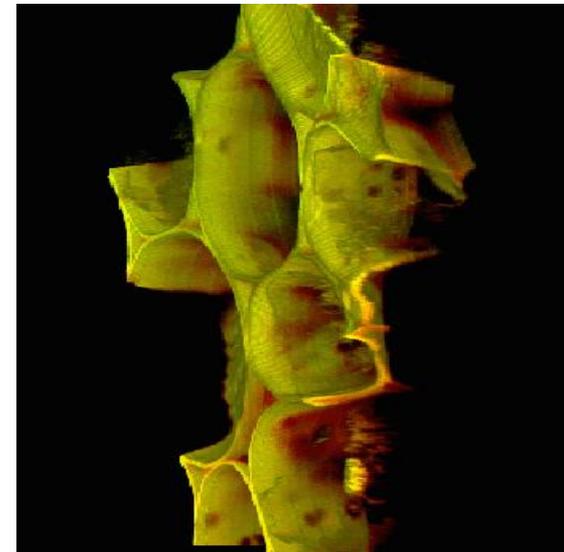
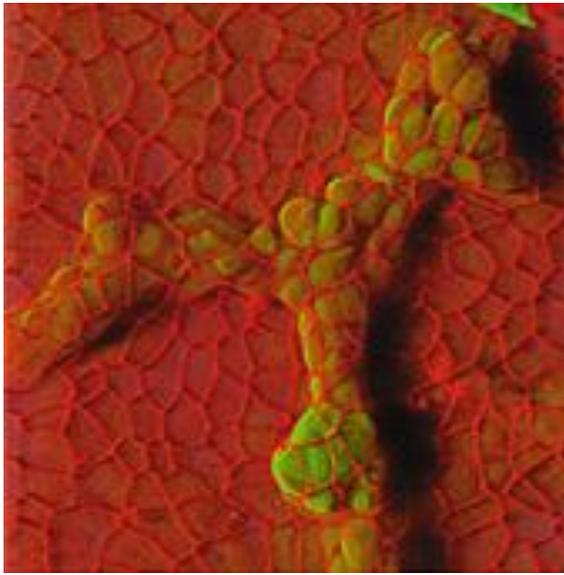
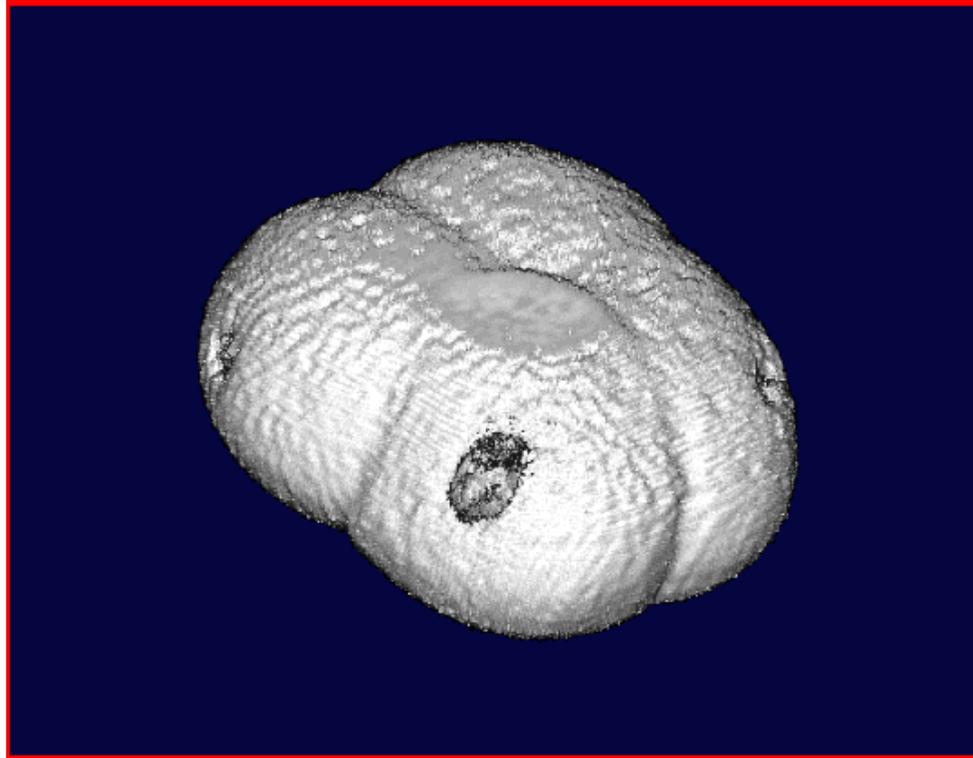
◆ Reconstruction



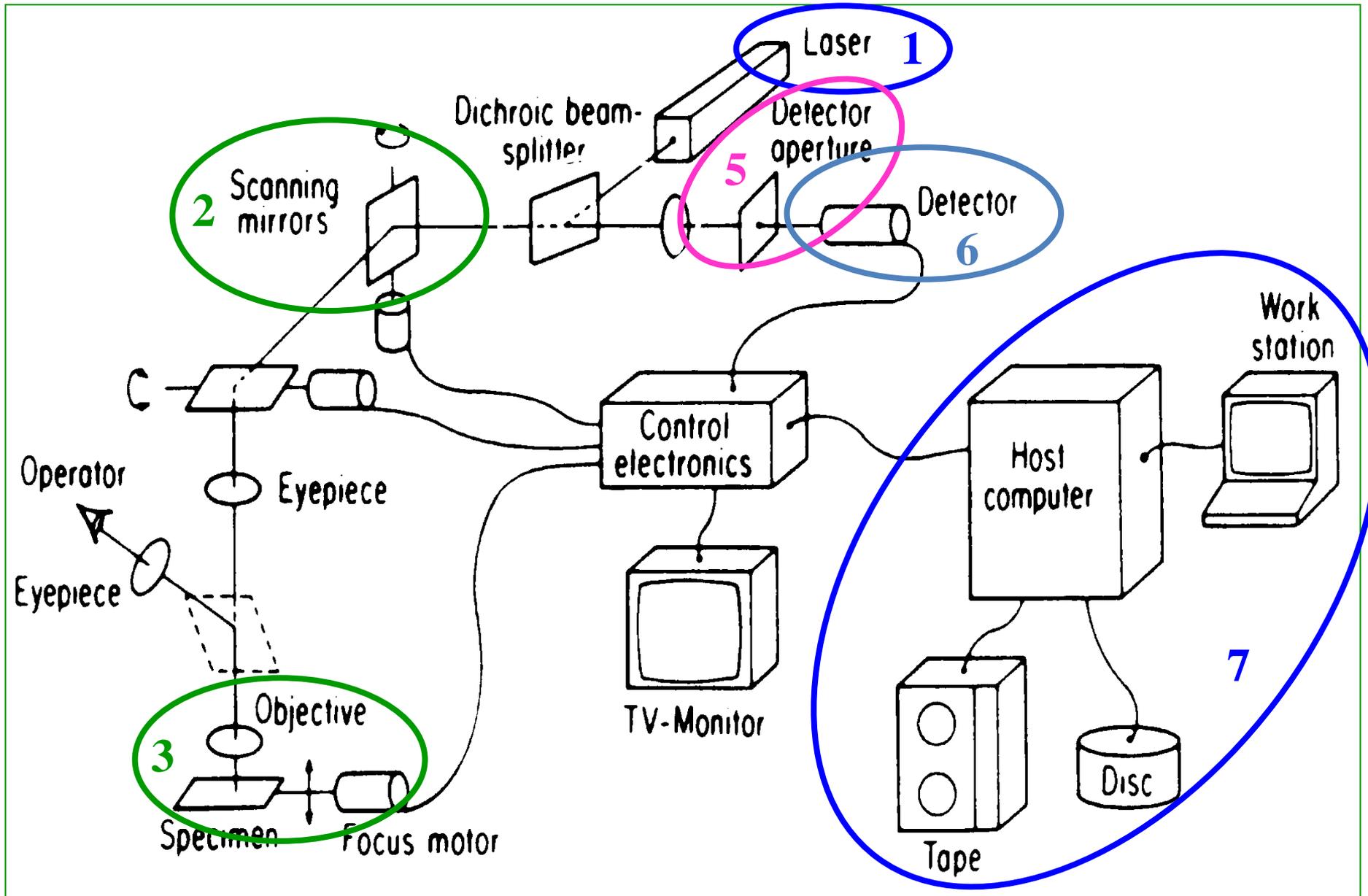
Z image 1
- Z image
56 ≈ 50 μm

La compilation de l'ensemble des sections permet une analyse XY, XZ et YZ de l'objet

◆ **Reconstruction: ces sections permettent de réaliser des animations de l'objet**



5. ➤ Les différents éléments d'un CLSM



5. ➤ Les lasers

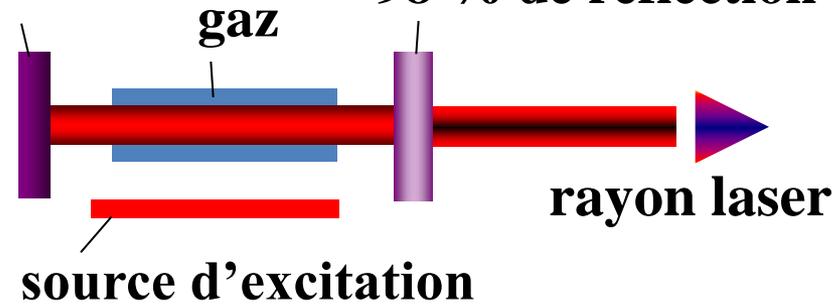
Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

miroir 1:

100 % de réflexion

miroir 2:

98 % de réflexion



laser

lampe

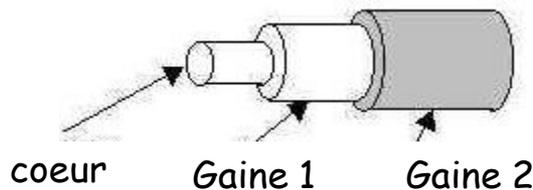
Caractéristiques:

- monochromatique
- composition du gaz influence la λ des raies d'émission

Exemples de lasers

Coût
d'utilisation

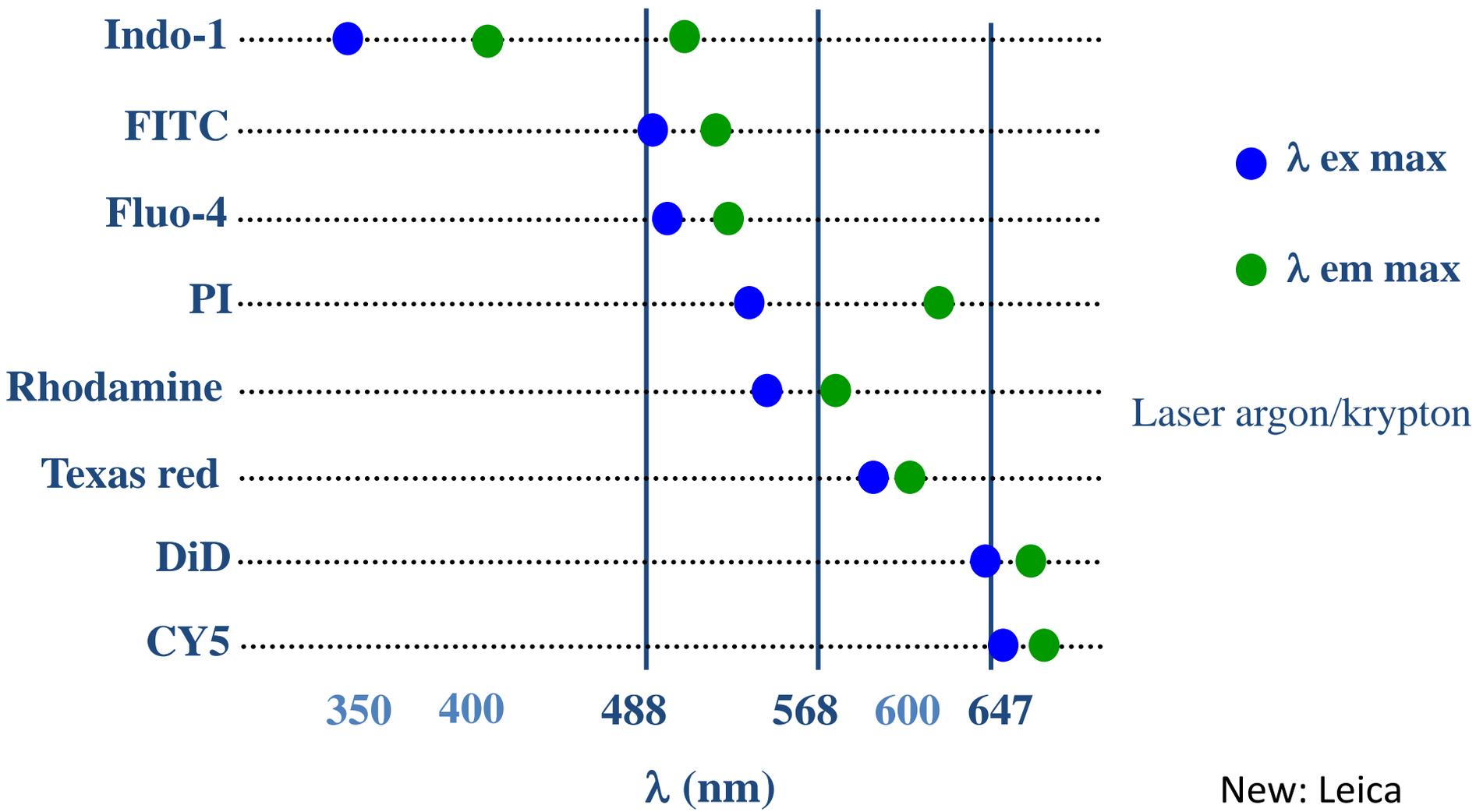
- argon laser (350 nm)
- argon/krypton laser (488, 567, 649 nm)
- hélium/néon laser (633 nm)



fibres optiques (10 à 100 μ m) jouent le rôle de pinhole:
permet d'obtenir une source lumineuse ponctuelle.

Le choix des lasers

Qu'elles seront vos applications?



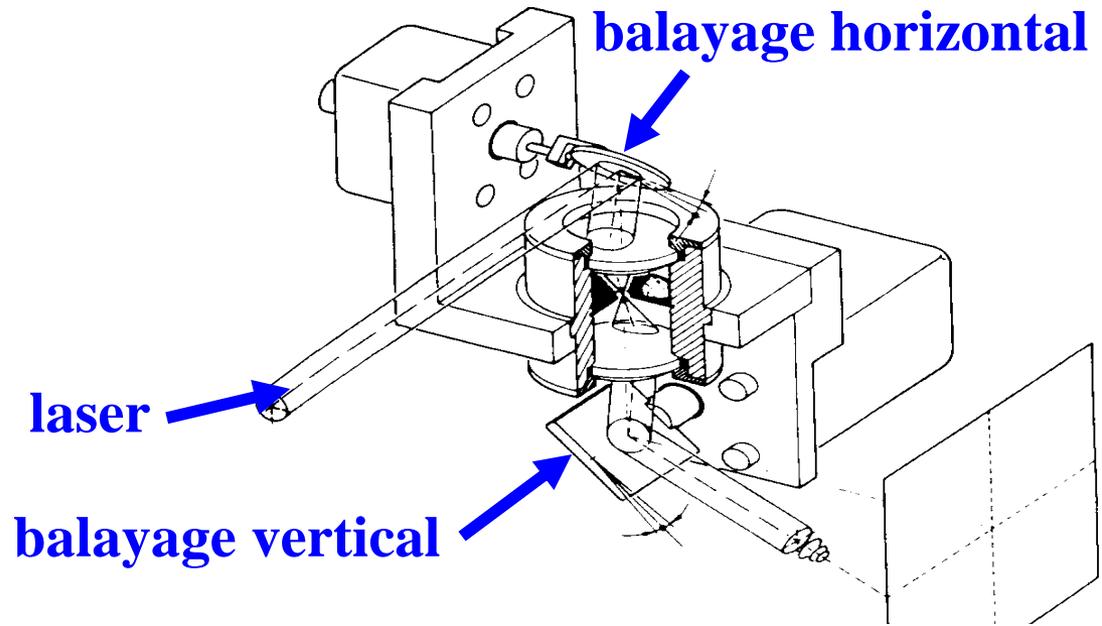
AOTF: Acousto-optical tunable filter for confocal microscopy
Individual line attenuation

New: Leica
White laser
accordable : 470 à 670 nm

5. ➤ Les systèmes de balayage

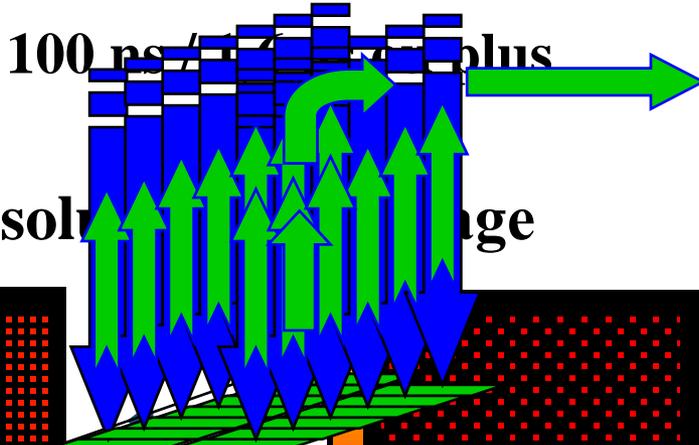
Vitesse ↓

- ◆ moteur pas à pas
- ◆ galvanomètres
- ◆ AOD

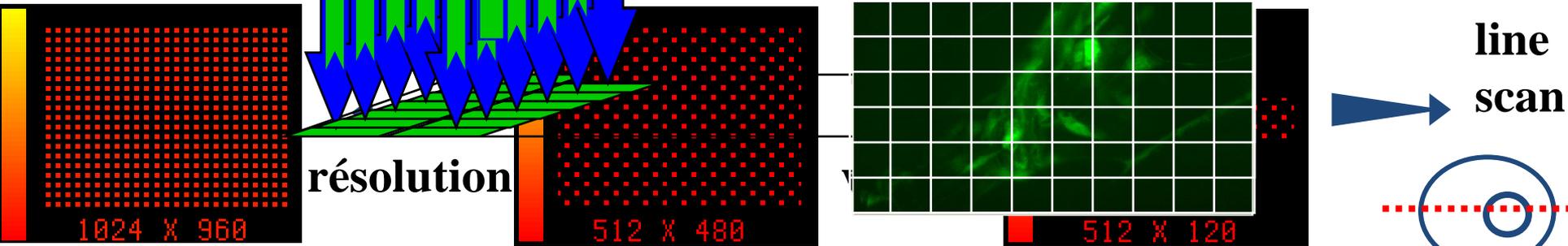


La vitesse dépend

1/ du temps d'excitation de chaque point

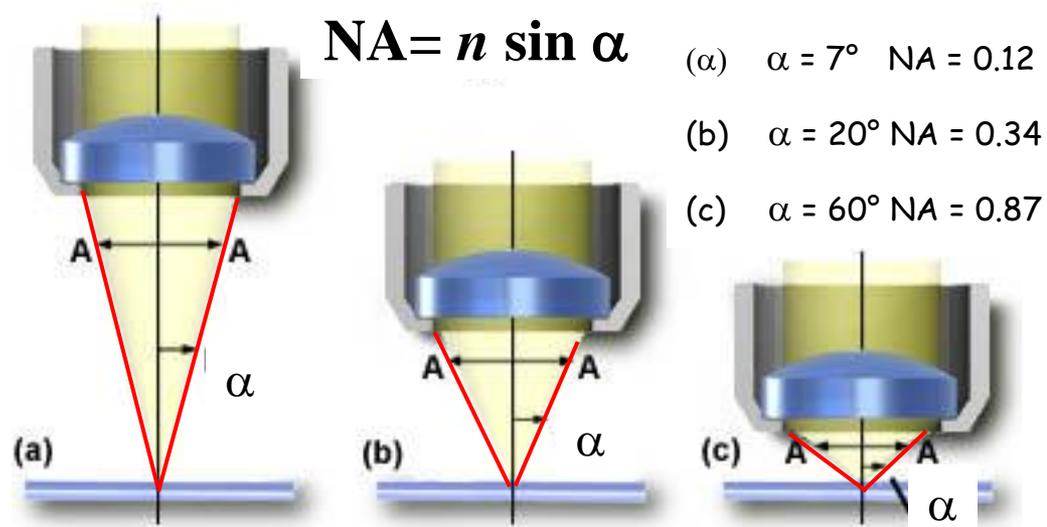
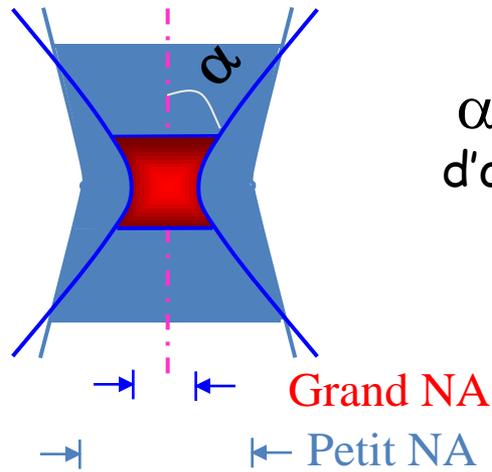


2/ de la résolution



5. ➤ Les objectifs

◆ La résolution axiale



(n = indice de réfraction du milieu entre objectif et échantillon)
Si le milieu est de l'air : $NA < 0.95$

Section optique (μm) de différents objectifs sur un CLSM Biorad RC600

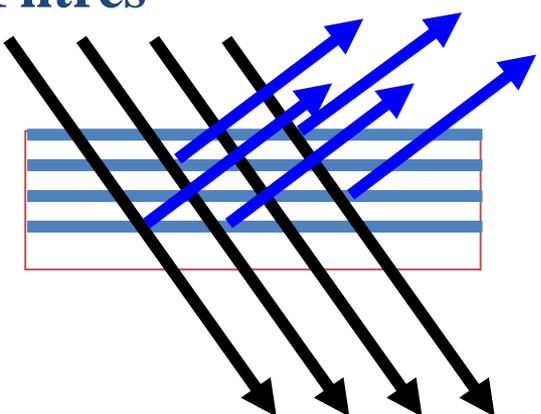
Objectif		Pinhole	
grossissement	NA	1 mm	7 mm
60×	1.4	0.4 μm	1.9
40×	1.3	0.6	3.3
40×	0.55	1.4	4.3
25×	0.80	1.4	7.8
4×	0.20	20.0	100

60× NA 1.4,
DT=170 μm

25× NA 0.8,
DT=660 μm

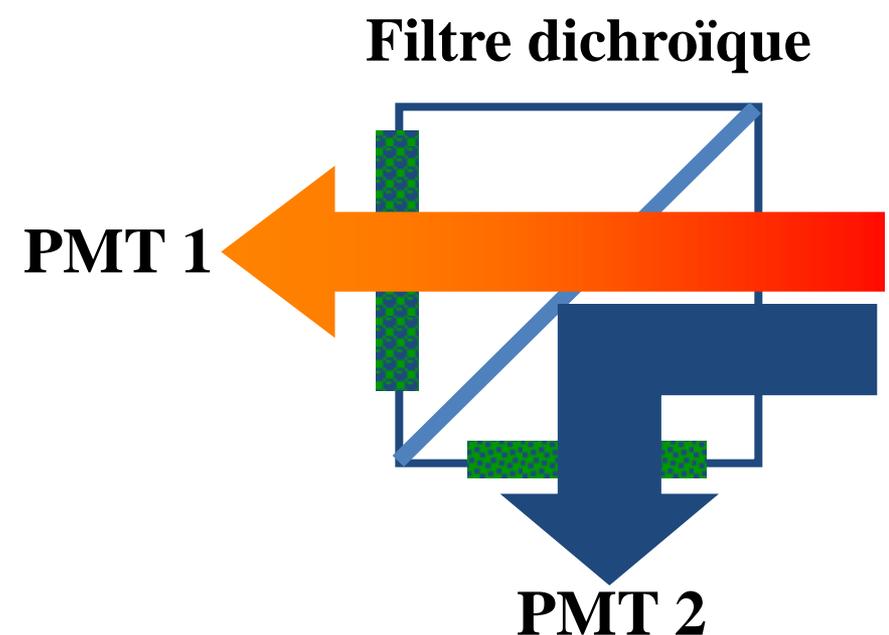
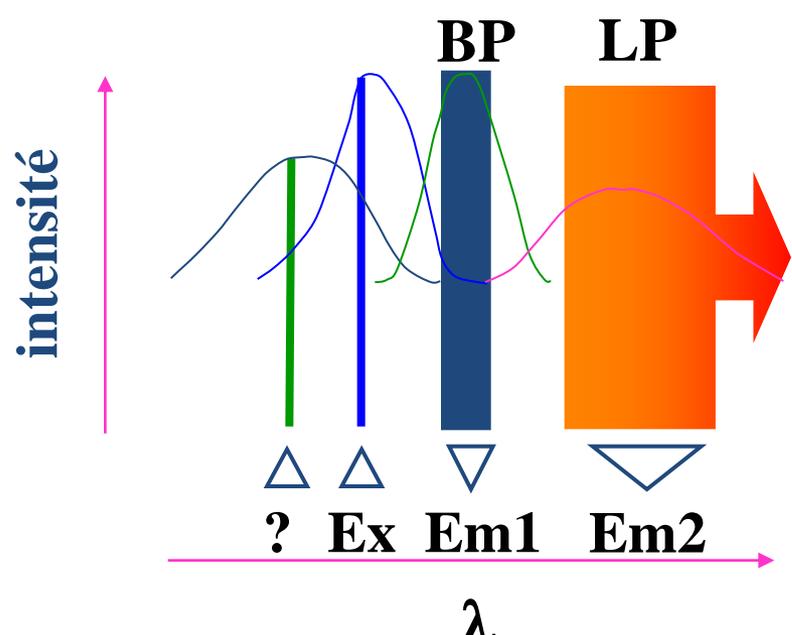
5. Les filtres d'arrêt

◆ Filtres

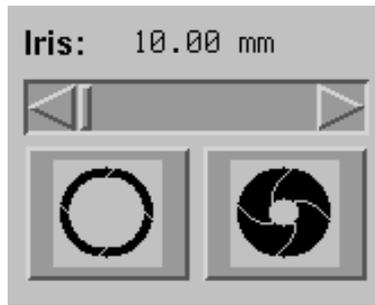


<http://www.omegafilters.com>

◆ Les différents types de filtres



5. ➤ Le pinhole

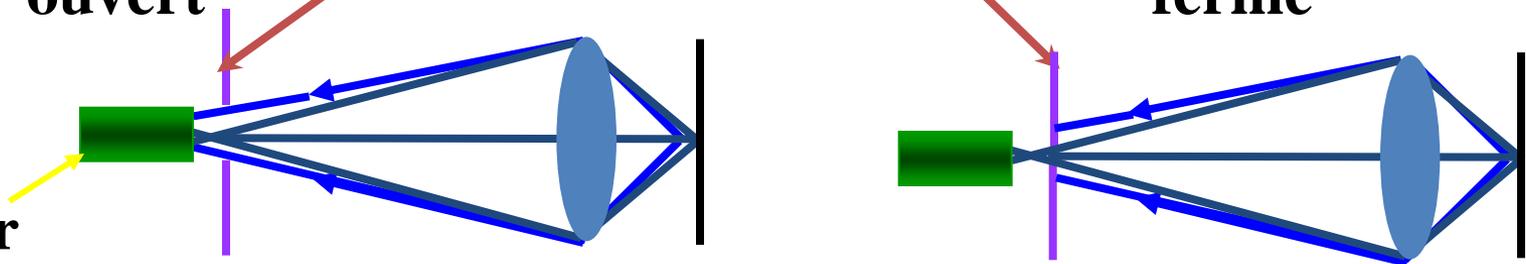


trou d'épingle
pinhole

ouvert

fermé

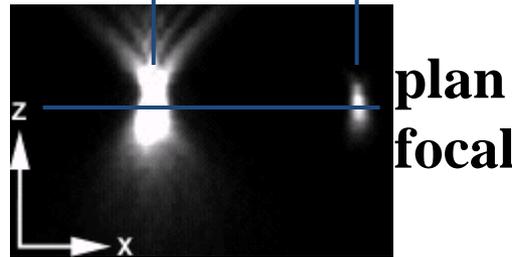
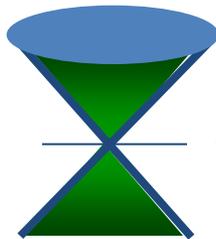
détecteur



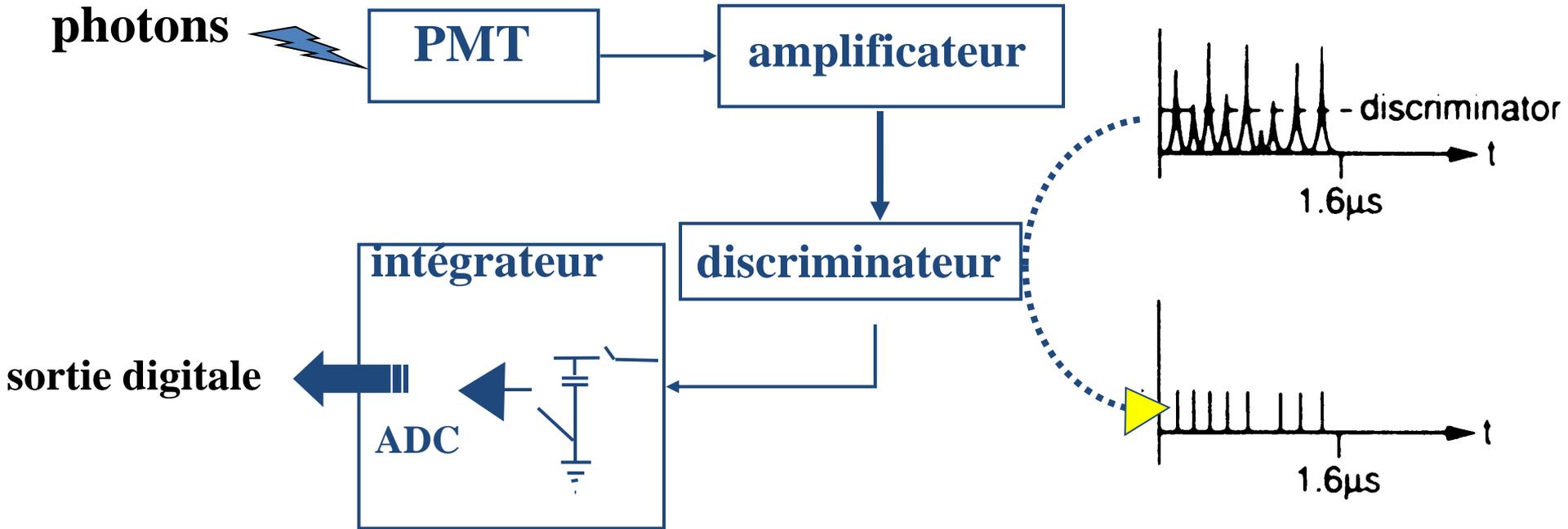
pinhole

ouvert

fermé

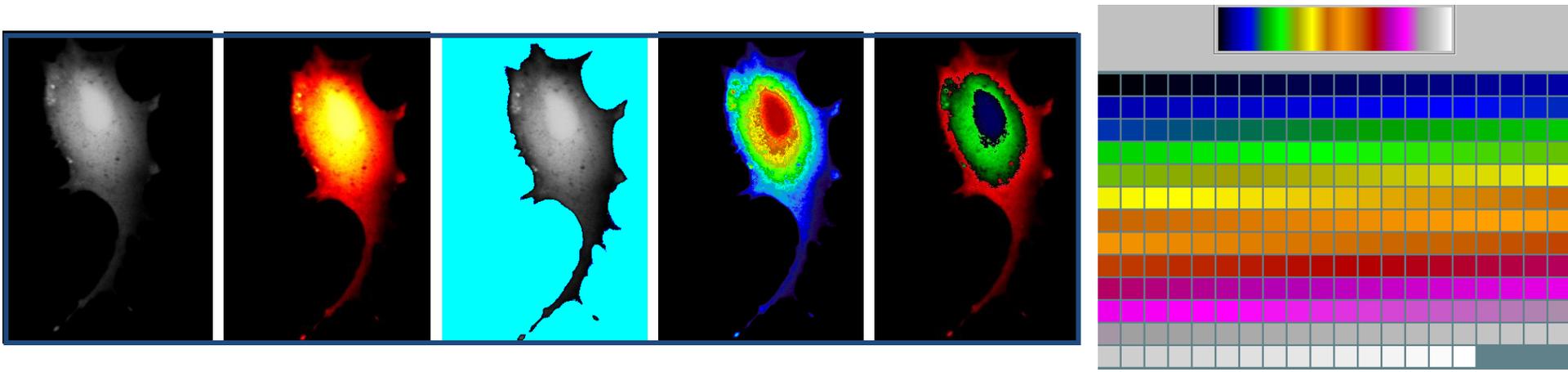


5. ➤ Les détecteurs



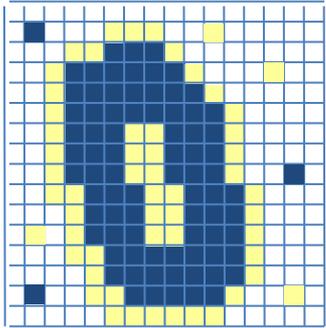
5. ➤ L'informatique

- L'image est composée de pixels = éléments de base de l'image
L'information est placée sur une grille avec une adresse et peut être représentée à l'écran
- Chaque pixel est codé en bit: binary digit
 - ◆ 1 (2^1) bit possède 2 tons qui sont blanc ou noir.
 - ◆ 8 bits (2^8 tons = 256 niveaux de gris).
- L'image peut ensuite être convertie en fausses couleurs

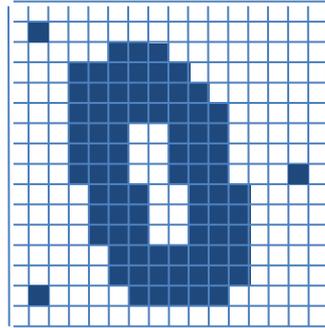


5. ➤ L'informatique

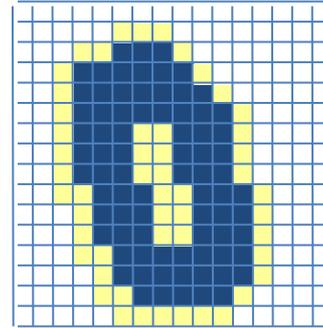
- Il est possible d'appliquer des filtres



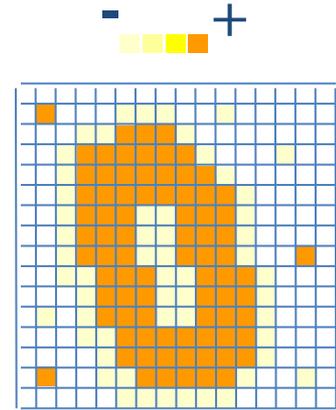
original



segmentation



réduction bruit
de fond

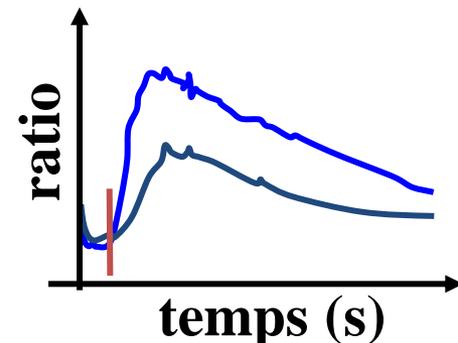
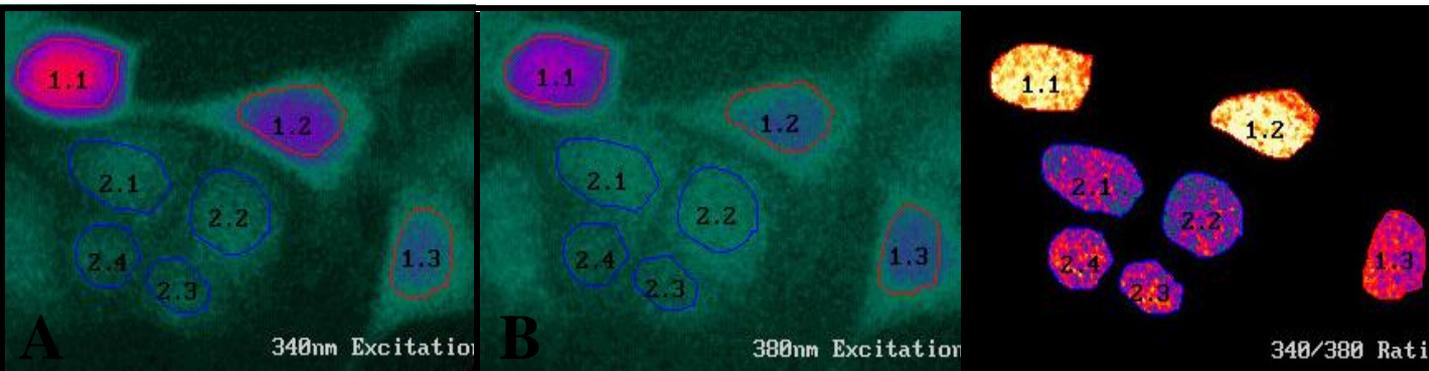


étirement de
l'échelle

- Il est possible de réaliser des opérations sur les images

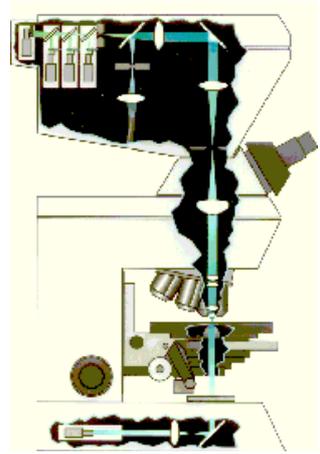
Réaliser le ratio: diviser deux images

$$\text{image A} \div \text{image B} = \text{image C}$$

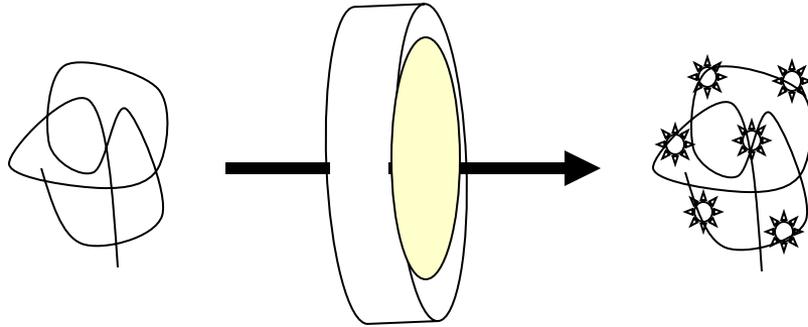


5. ➤ L'informatique

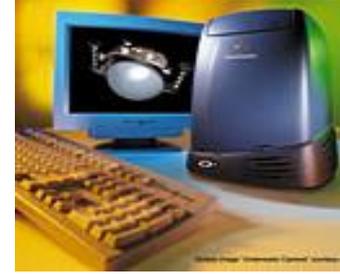
La déconvolution



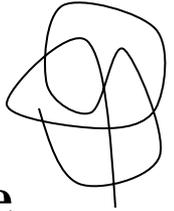
$$\text{Image} = \text{objet} \times \text{PSF}$$



PSF: Point Spread Function



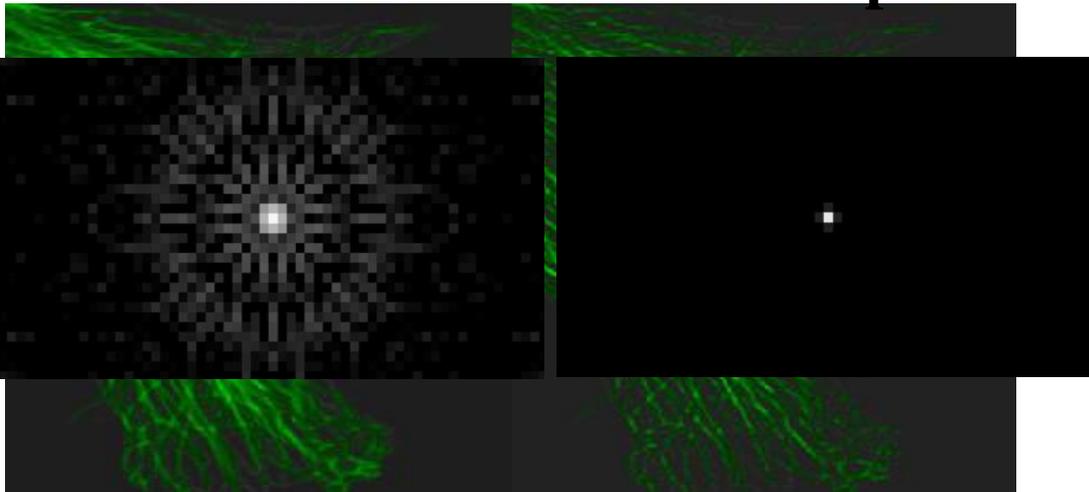
$$\text{Image désirée} = \text{image mesurée} (\times 1) \text{ PSF}$$



La déconvolution a pour objectif de supprimer par calcul mathématique la déformation de l'information

avant

après

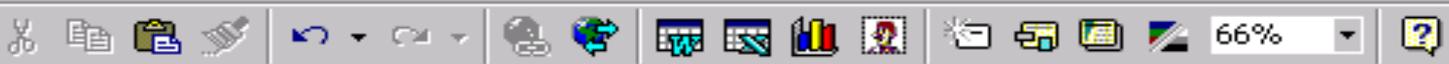


La déconvolution pour améliorer la qualité des images confocales

5. Informatique 3: Présentation résultats

- [deacours1 sur 2]

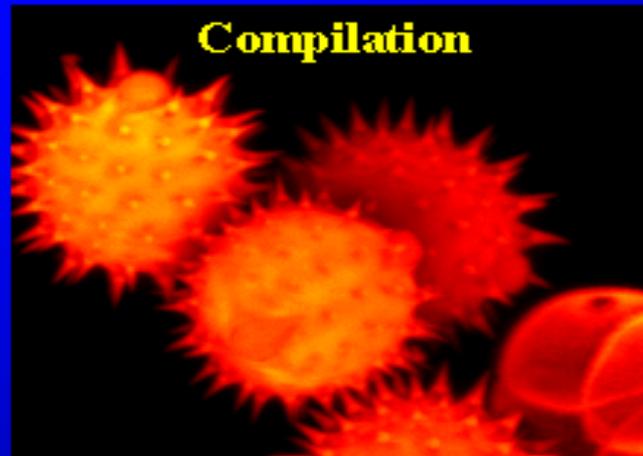
Image Insertion Format Outils Diaporama Fenêtre ?



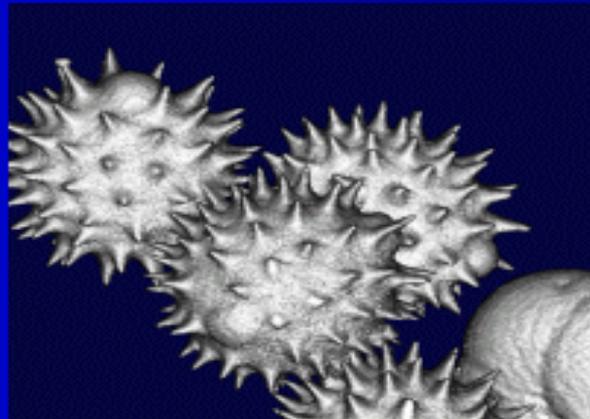
◆ Possibilités d'études d'images 3D

Grains de pollen

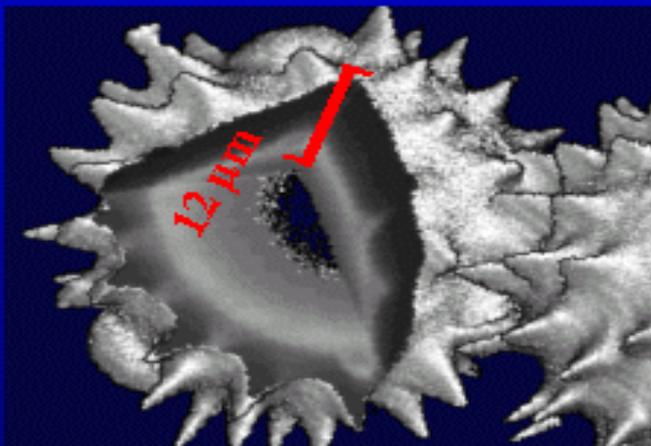
Compilation



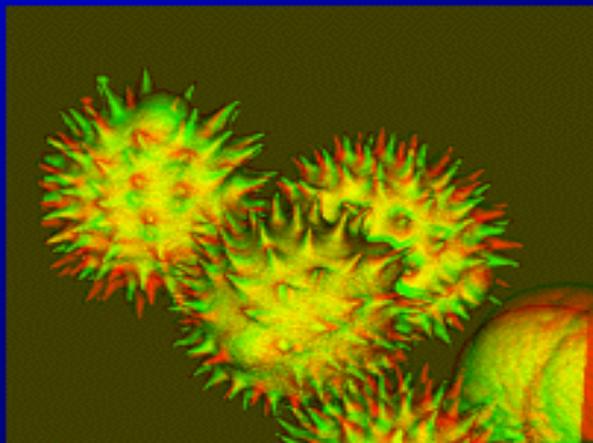
Extraction des contours



Sections et mesures



Images stéréo



Le microscope d'un système confocal

Microscopes: droit et inversé



DMRXA2

Equipement:

- lampe visible + UV
- filtres (DAPI, FITC, TR)
- motorisation
- surplatine Z
- détecteur de lumière transmise + DIC



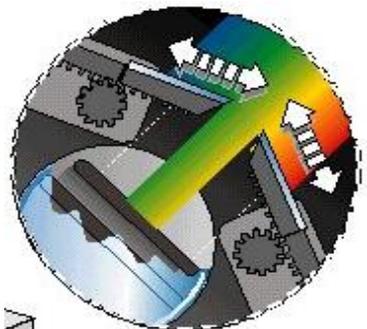
DMIRE2

Objectifs



- X10 multi-immersion NA 0.40
- X16 multi-immersion NA 0.50
- X25 huile NA 0.75
- X40 huile NA 1.25/0.75
- X63 huile NA 1.32/0.60
- X63 eau avec bague correctrice
- X100 huile NA 1.4/0.70

La tête confocale



fente spectrale

PMT

lentille astigmatique

objectif

prisme

fente confocale

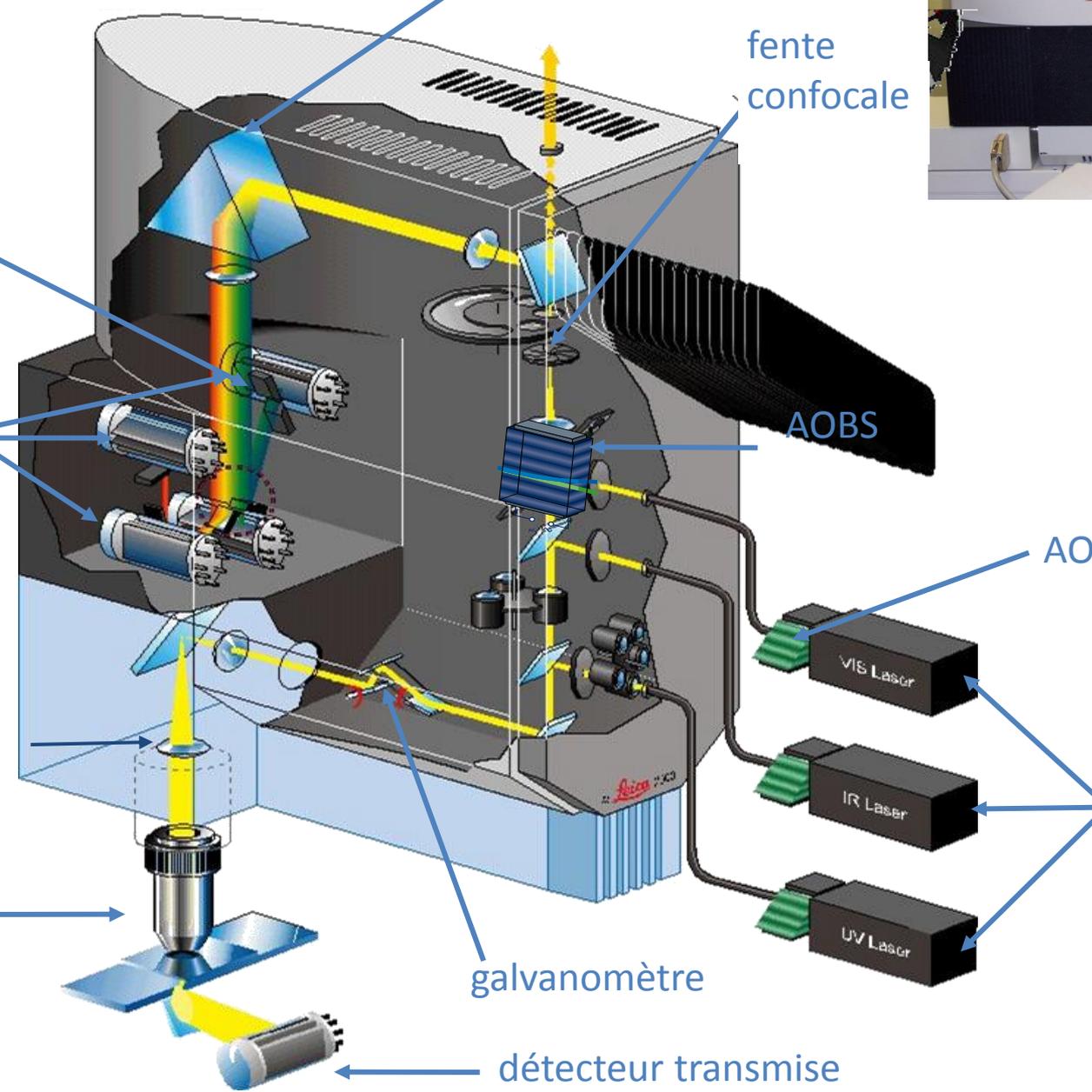
AOBS

AOTF

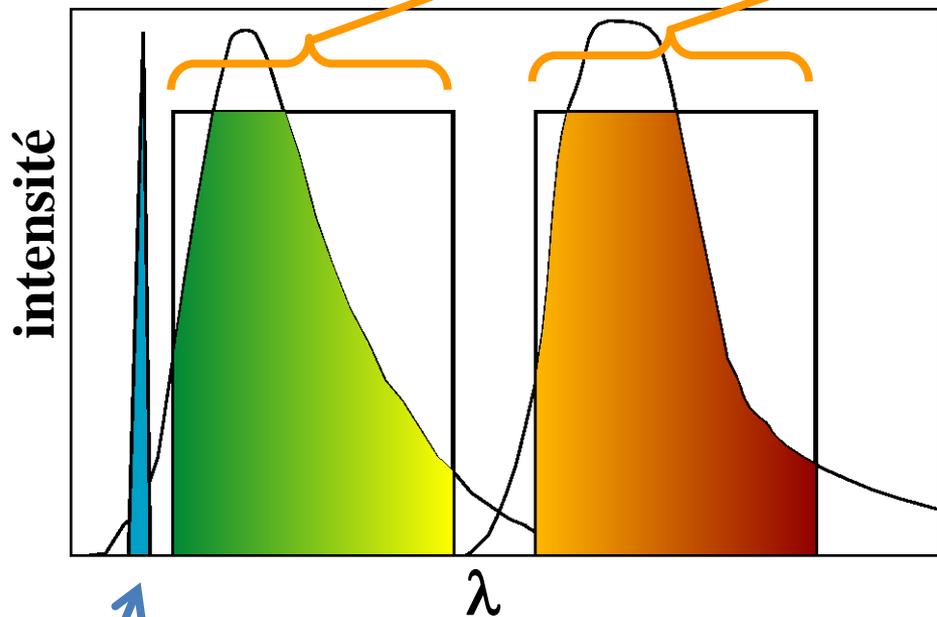
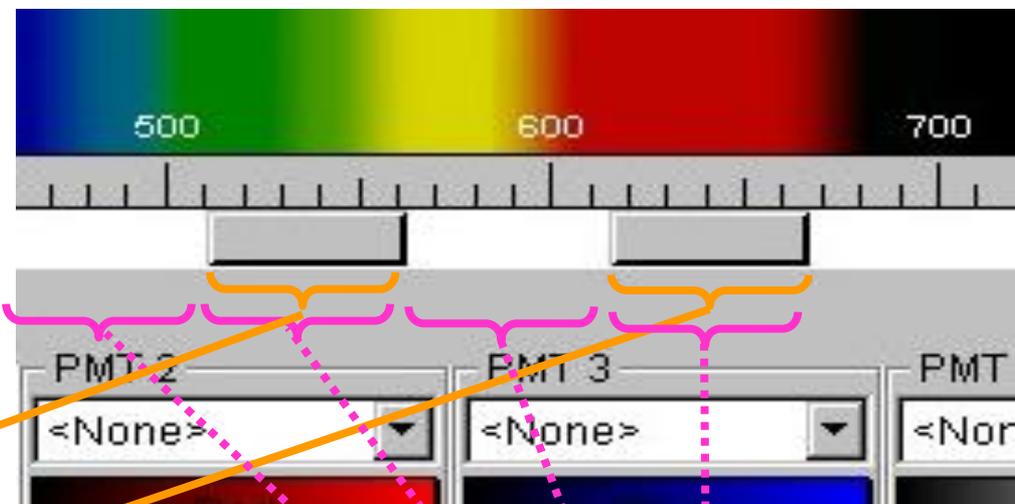
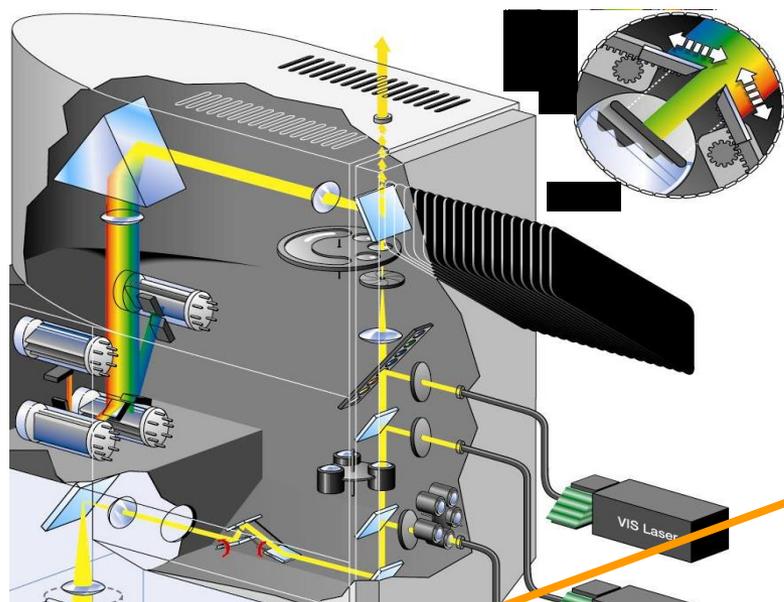
lasers

galvanomètre

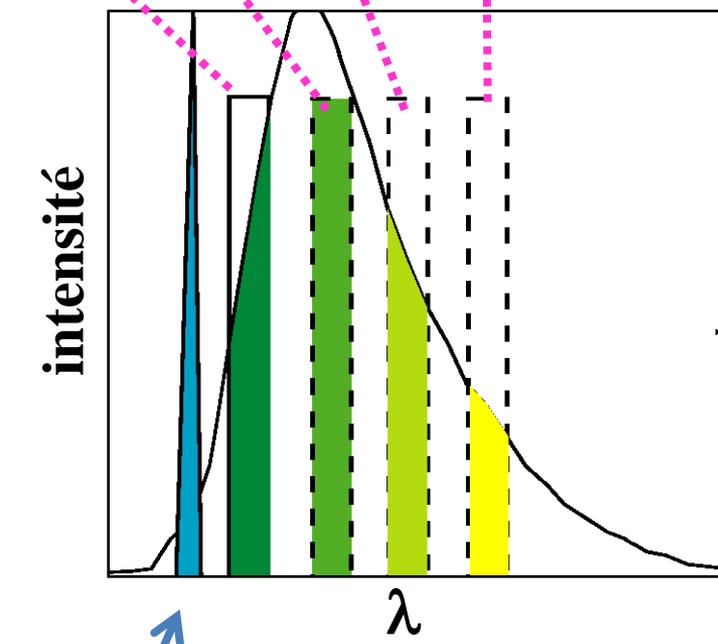
détecteur transmise



Les filtres pour la collecte de la fluorescence



double marquage

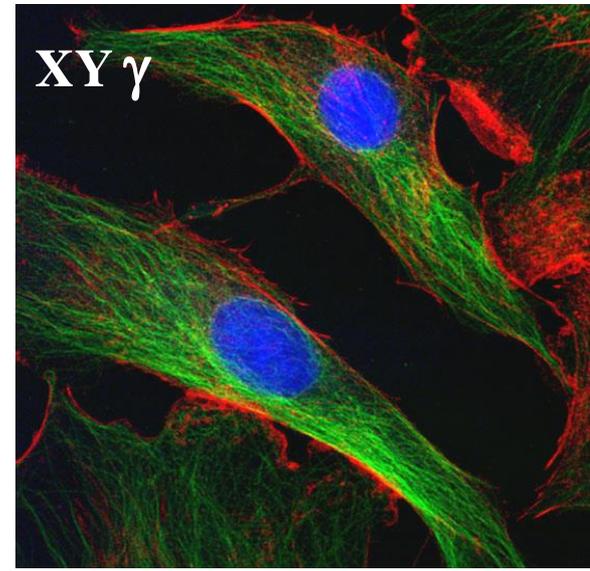
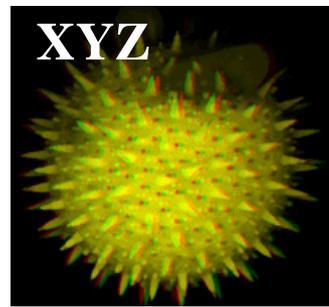
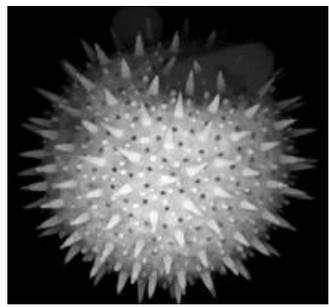
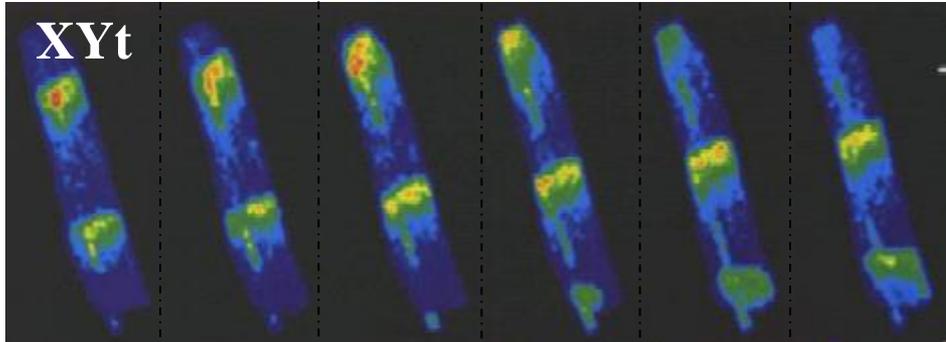


spectre

Les options de scan

Vitesse	Résolution
800 lignes / s	512 × 1 pixels
25 images / s	512 × 32 pixels
3 images / s	512 × 512 pixels
20 s / image	4096 × 4096 pixels

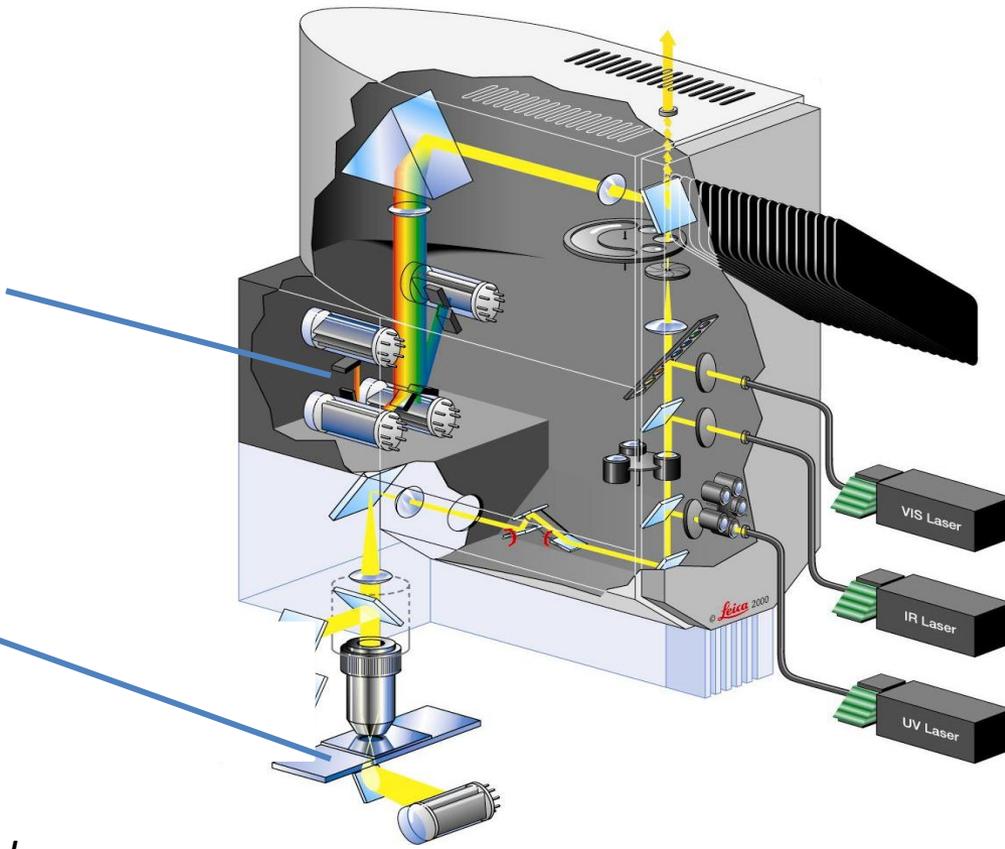
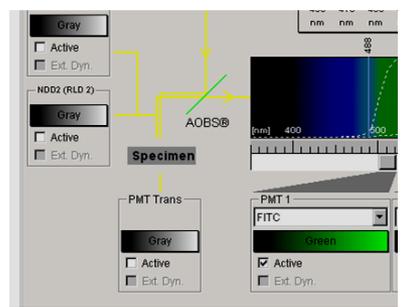
- Scans
- XY,
- Xyt
- XYZ
- XYZt
- XYγ



Les combinaisons possibles

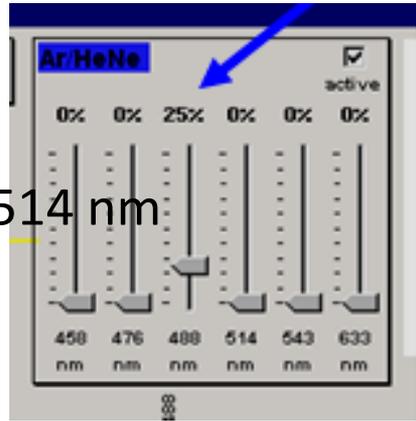
1/ Les détecteurs

- détecteurs de fluorescence
- détecteur de lumière transmise (DIC)



2/ Les lasers pour l'excitation des fluorochromes

- 1 diode laser: - 405 (Dapi)
- 1 laser Argon: - 458 (Dapi), 476, - 488 (FITC, Fluo-3, GFP, SNARF) et 514 nm
- 3 lasers Hélium-Néon: - 543 nm (Texas Red, Cy3, PI) - 594 (Texas Red, Alexa 594) - 633 nm (Cy5, lumière transmise)



L'interface de pilotage du confocal

The screenshot shows the Leica Confocal Software interface. At the top, there is a menu bar (File, View, Macro, Tools, Window, Help) and a toolbar with icons for New, Open, Save, All, Print, Help, and Browse. The main window is titled "Beam Path Setting: FITC-TRITC (Leica)".

Annotations in blue text with arrows point to various parts of the interface:

- lasers**: Points to the "Ar/HeNe" laser control panel, which includes intensity sliders for 458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm, and 633 nm.
- filtres**: Points to the filter selection area, showing options like FITC, TRITC, and others.
- PMT**: Points to the PMT 1 and PMT 2 settings, where FITC and TRITC are selected.
- fente confocale**: Points to the "Pinh" (pinhole) control in the bottom toolbar.
- Time laps**: Points to the "Time" button in the bottom toolbar.
- vitesse et résolution**: Points to the "Speed" and "Format" buttons in the bottom toolbar.
- Z**: Points to the "Z-Scan" button in the bottom toolbar.

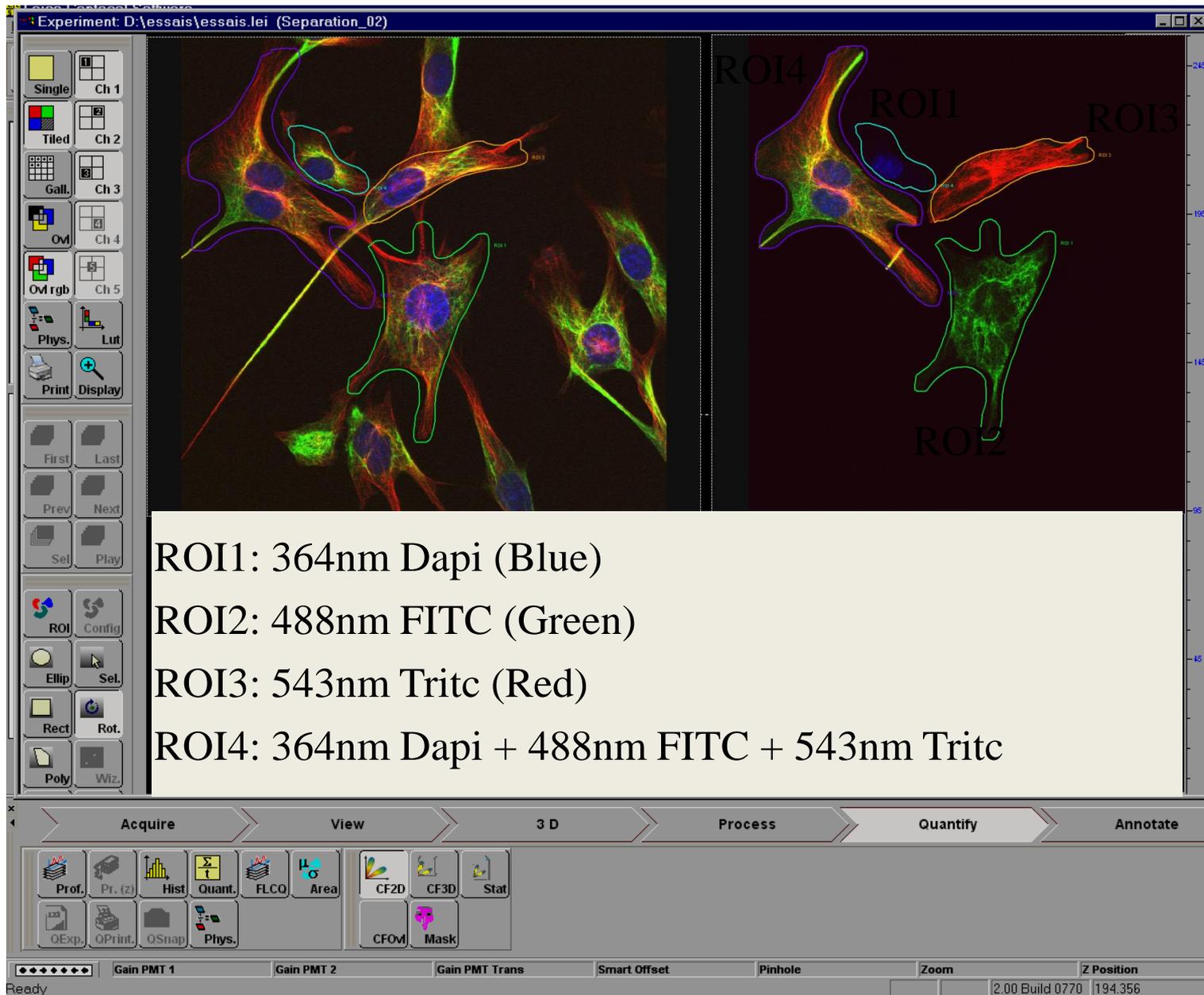
The interface also features a "Specimen" section with "NDD1 (RLD 1)" and "NDD2 (RLD 2)" settings, a "Specimen" label, and a "PMT Trans" section. A central graph shows a spectral response curve with a peak around 500 nm. On the right, a "Parameters" panel lists various settings like "Institute Username", "Scan xyz", "Form 512 *", "Secti 6", "Imag 600.0 μ", "Imag 600.0 μ", "Voxel 1.17 μ", "Av. Li 16", "Av. F 1", "Z/Y P 0.02 μ", "Zwid 19591 μ", "Gain 806 V", "Gain 644 V", "Gain 0 V", "Gain 0 V", "Offse 0", "Offse 0", "Offse 0", "Beam Beam Exp", "Zoom 1.00", "Obje PL FL", and "Pinh 1.00 air".

At the bottom, there is a navigation bar with tabs for "Acquire", "View", "3 D", "Process", "Quantify", and "Annotate". The "Acquire" tab is active, showing a toolbar with buttons for "Beam", "Mode", "Bit", "Expan.", "Pinh", "Zoom", "Li. A.", "Begin", "Series", "End", "Sect", "Series", "Time", "Apply", "MicCtrl", "Phys.", "Time", "z-Scan", "Config", "Apply", and "Step".

The status bar at the very bottom shows "Ready" and "2.00 Build 0770 194.356".

La partie analyse 2D

Etudes de multimarquage



ROI1: 364nm Dapi (Blue)

ROI2: 488nm FITC (Green)

ROI3: 543nm Tritc (Red)

ROI4: 364nm Dapi + 488nm FITC + 543nm Tritc

Acquire View 3 D Process Quantify Annotate

Prof. Pr. (z) Hist Quant. FLCQ Area CF2D CF3D Stat

QExp. QPrint. QSnap Phys. CFovl Mask

Gain PMT 1 Gain PMT 2 Gain PMT Trans Smart Offset Pinhole Zoom Z Position

Ready 2.00 Build 0770 194.356

6. Applications en microscopie confocale: exemples, protocoles et précautions



Tissus fixés



Tranches vivantes



Cellules en cultures

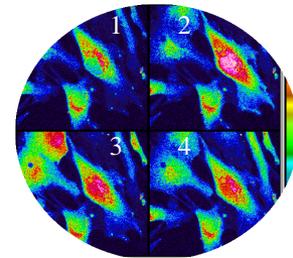
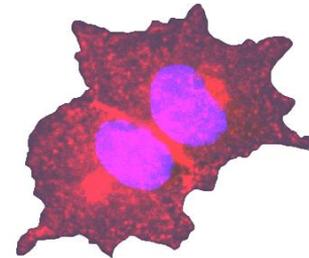
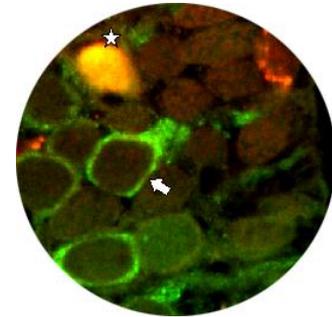
Préparation des échantillons



Marquage des échantillons



Acquisitions & traitement

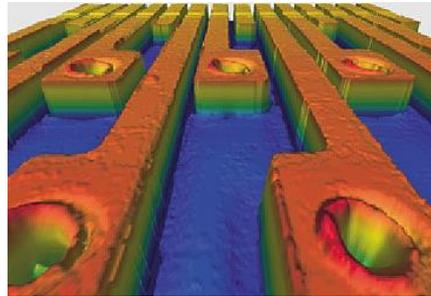


1. La lumière réfléchie

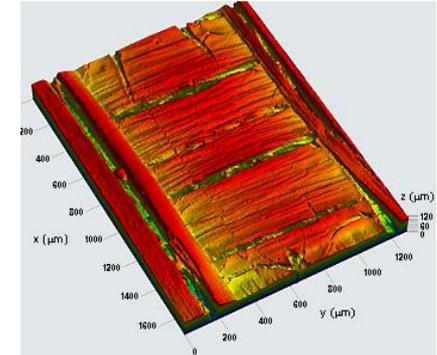
◆ **contrôle qualité en physique:** analyse topographique de surfaces



Circuits imprimés



Fibres synthétiques



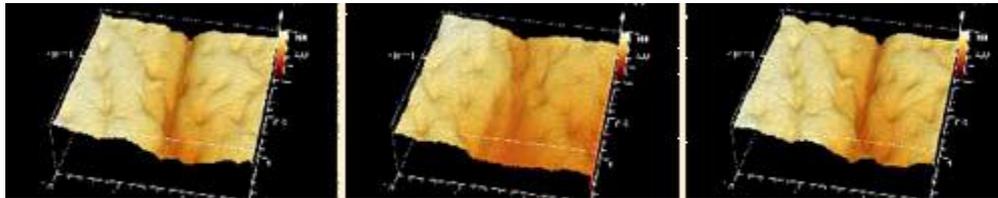
◆ **en biologie**

0

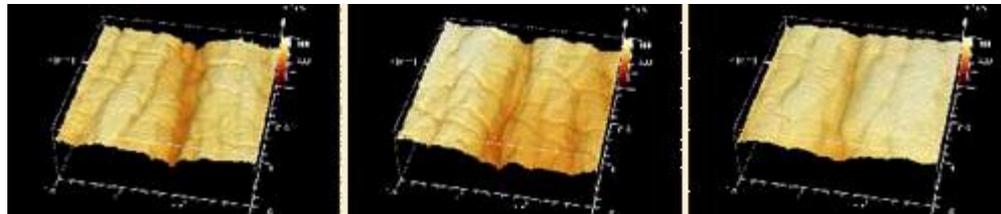
15

30 jours de traitement

Placebo



crème



élasticité de la peau

2. Les études immunohistochimiques

Préparation des coupes

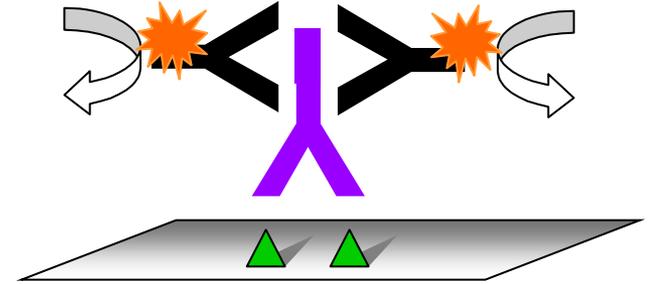
- ◆ **anesthésier les animaux**
- ◆ **perfuser et fixer les animaux**
- ◆ **post-fixer les tissus**
- ◆ **incuber les tissus dans des bains de saccharose**
- ◆ **inclure les tissus dans une résine hydrophile d'enrobage et les congeler**
- ◆ **stocker les tissus à -80 °c**
- ◆ **réaliser des coupes de tissus à l'aide d'un cryotome**
- ◆ **stocker les coupes à 4°C**



2. Les études immunohistochimiques

L'immunofluorescence indirecte

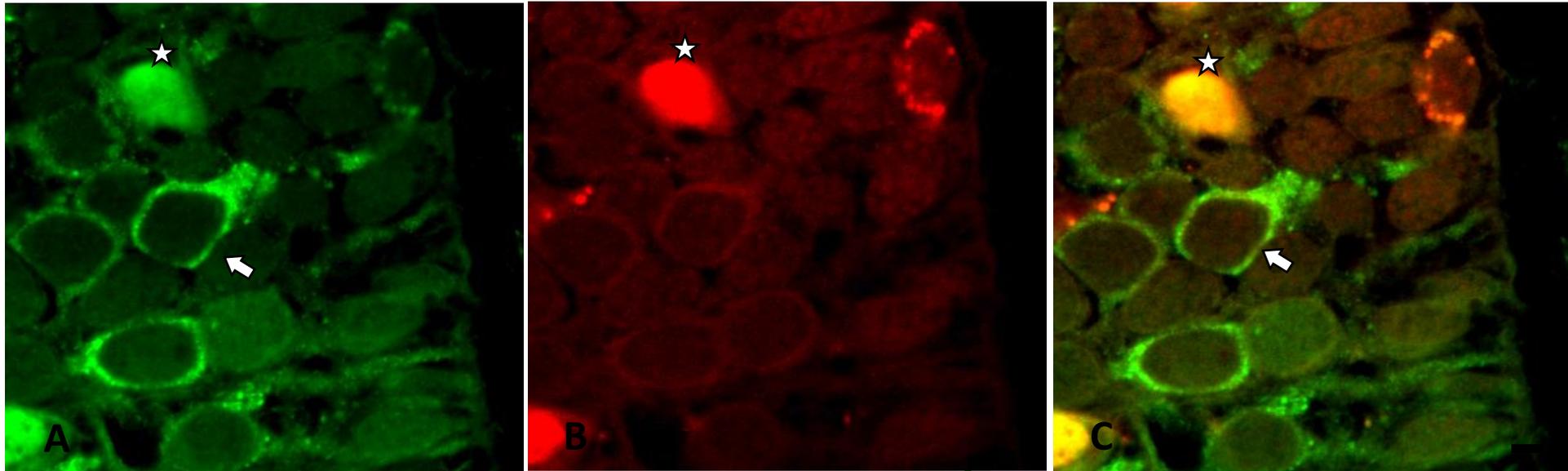
- ◆ 1 nuit 4°c avec 1^{er} anticorps
- ◆ rinçages
- ◆ 1 h 30 à 20°c dans obscurité avec 2nd anticorps
couplé à un fluorochrome
- ◆ rinçages
- ◆ montage des lames en milieu PBS-glycérol
- ◆ observation des lames en microscopie à fluorescence classique
- ◆ acquisitions sur un microscope confocal à balayage laser



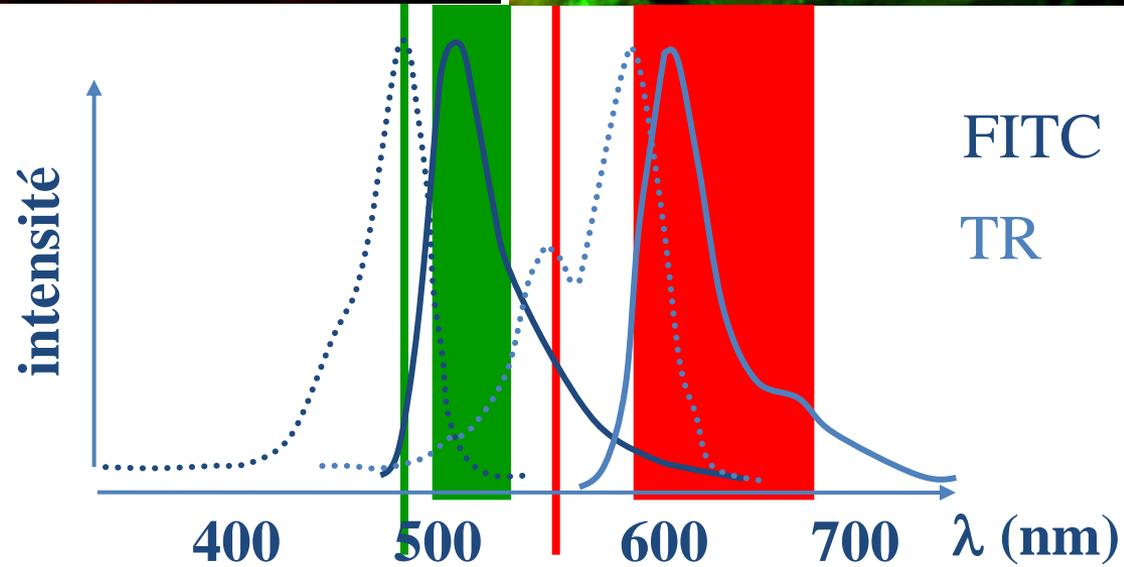
2. Les études immunohistochimiques

Etudes en double marquage: recherche de collocalisations

en vert: marquage FITC; en rouge: marquage texas red



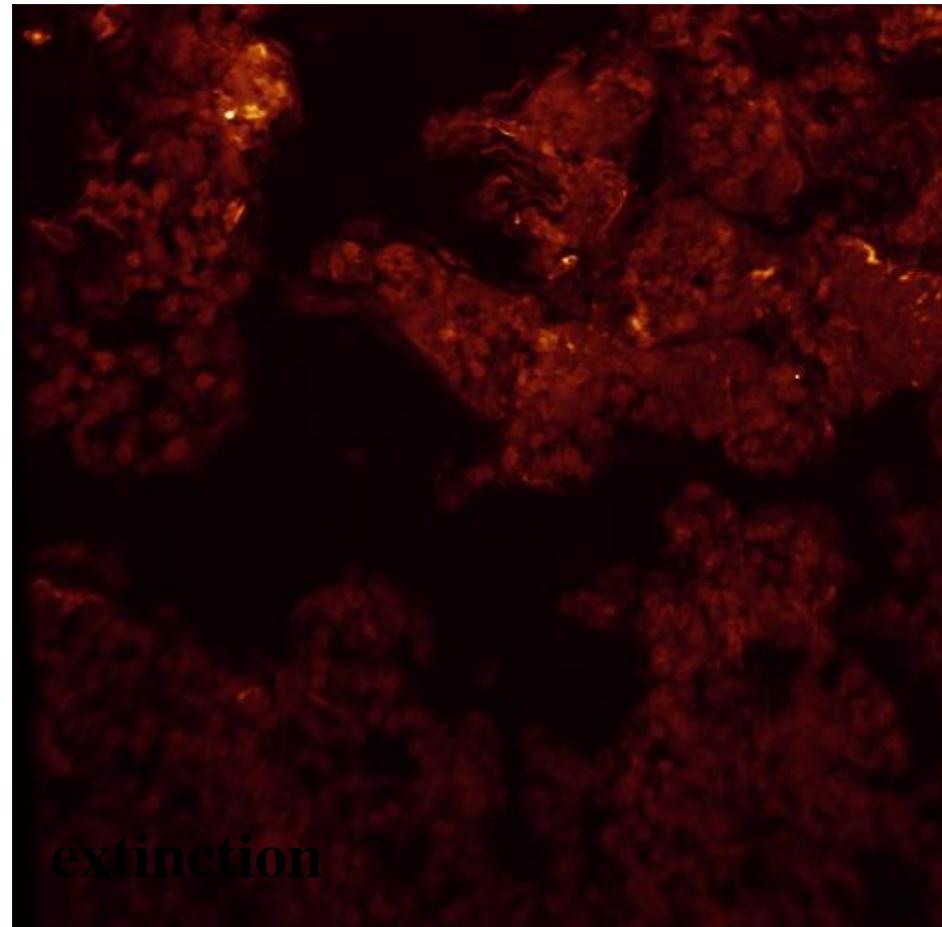
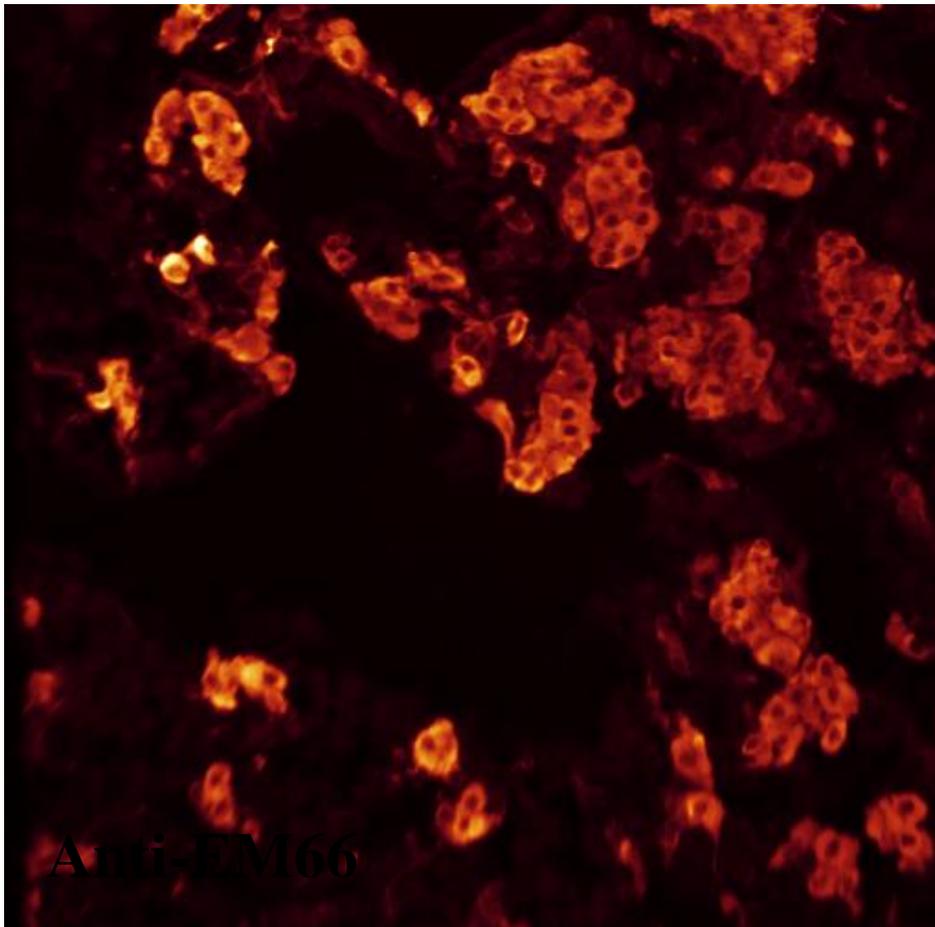
- enzyme et son substrat
- transmetteur et récepteur



2. Les études immunohistochimiques

Précautions

◆ Les expériences d'extinction

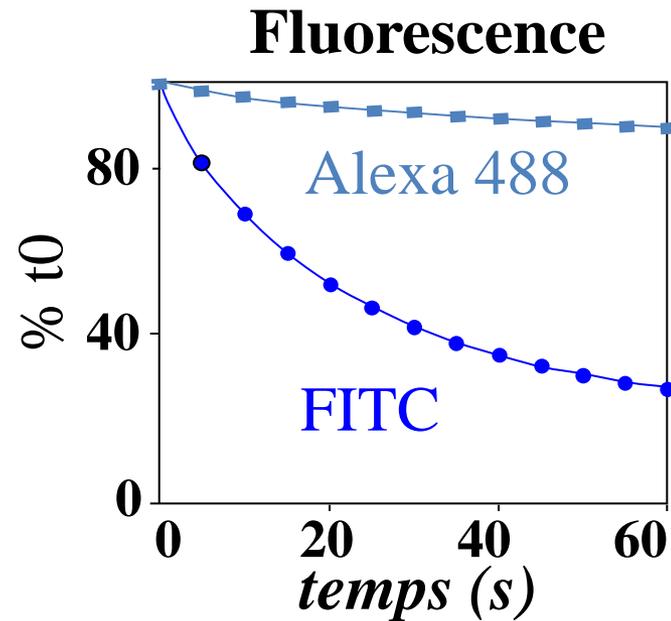
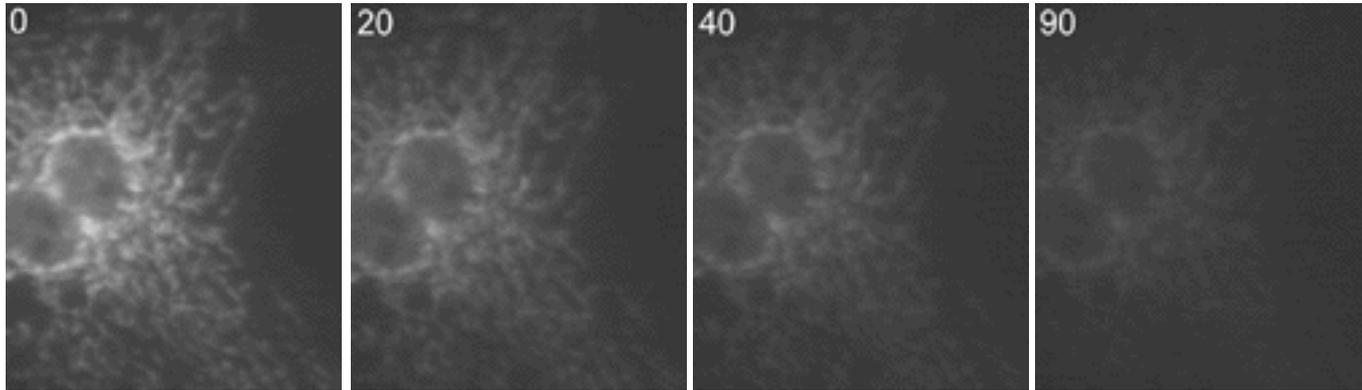


◆ Suppression du premier AC

2. Les études immunohistochimiques

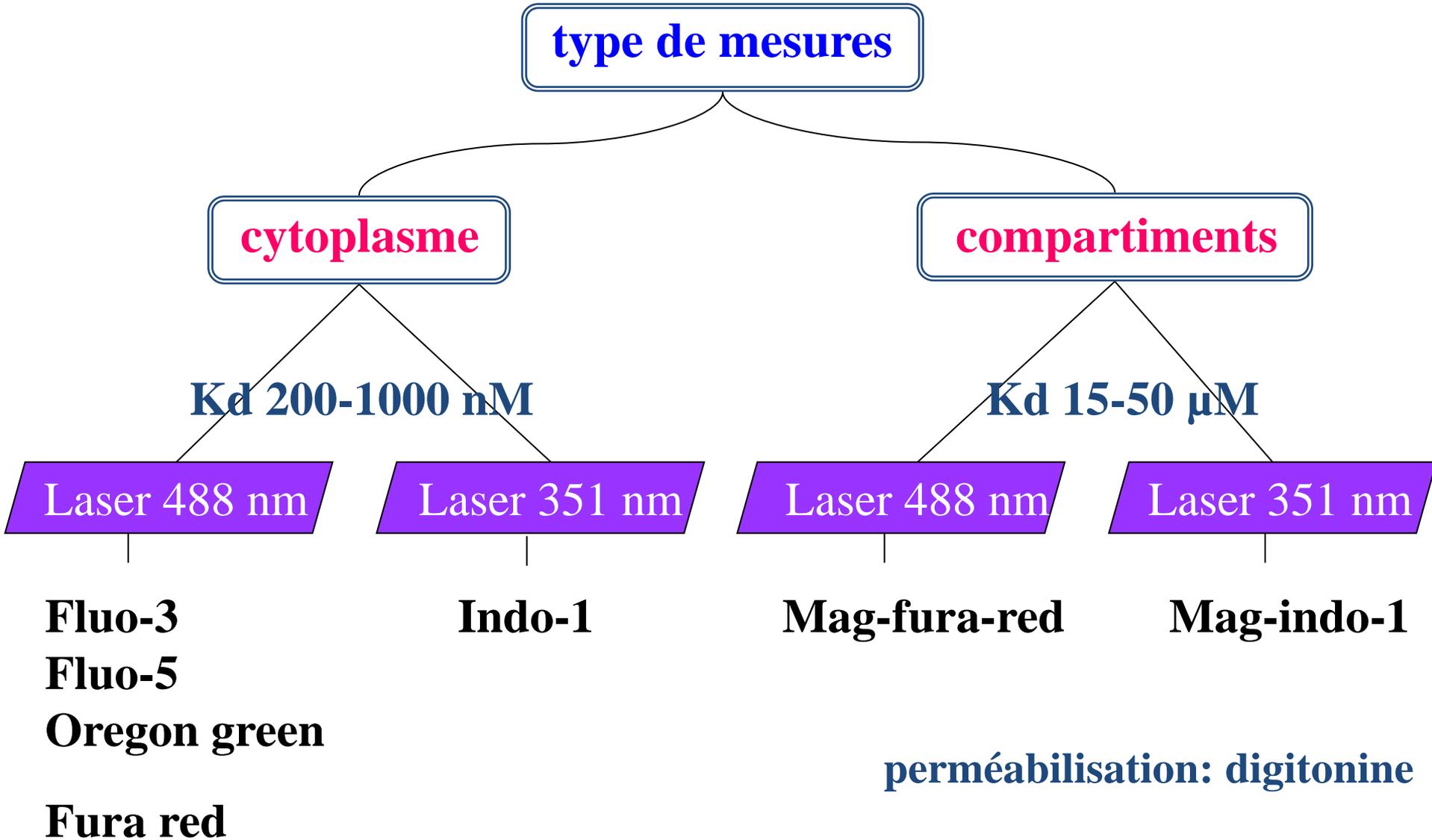
Précautions

◆ Le photobleaching



3. La visualisation des flux calciques

◆ Choisir la sonde appropriée

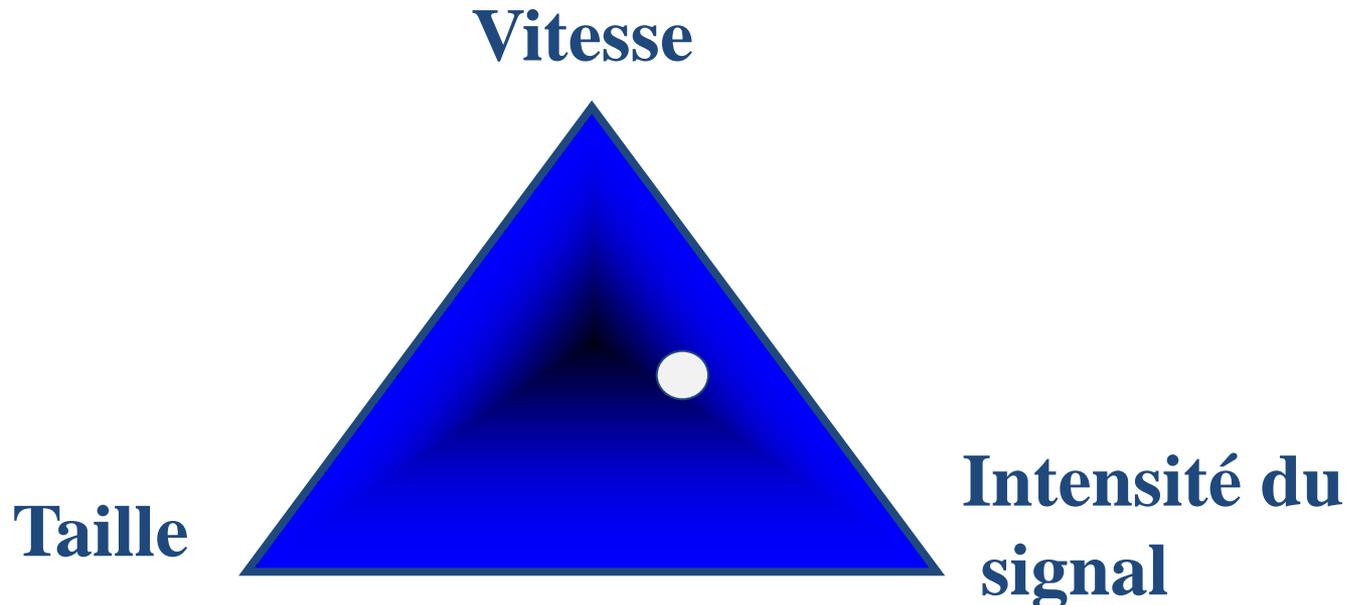


3. La visualisation des flux calciques 2

◆ Charge des cellules

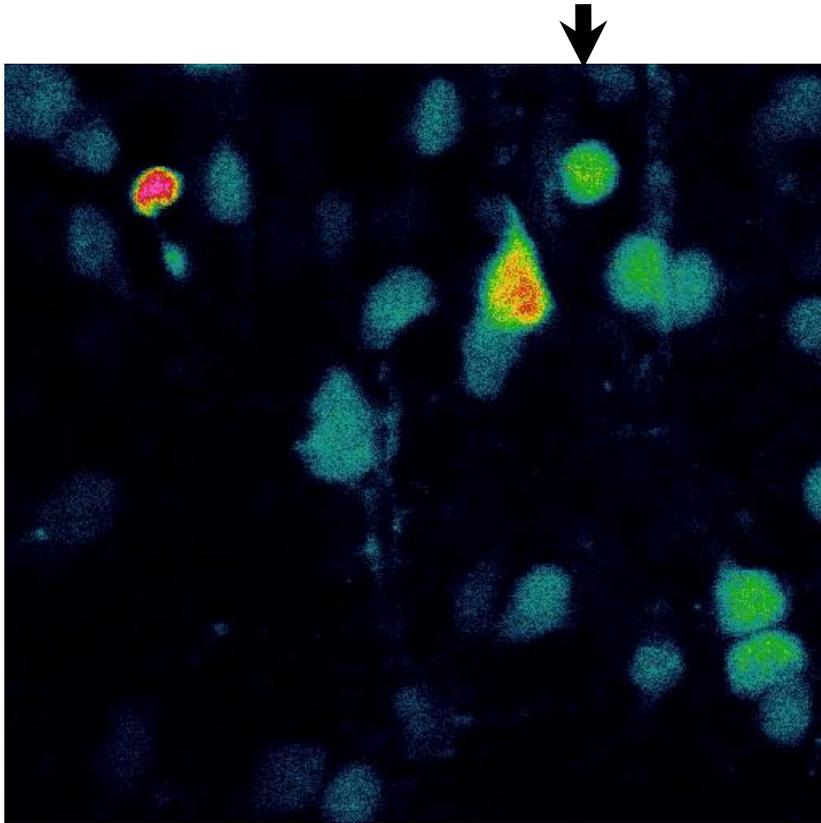
- sonde 1-5 μM dans 1 ml de Krebs-Ringer
+ pluronic F-127, SVF
- incubation 15 à 60 min; température 20 à 37 °C
- rinçage 10 min pour déstérifier la sonde

◆ Préparer l'acquisition



3. La visualisation des flux calciques 8

Acquisition d'oscillations spontanées sur tranche de cervelet (durée réelle: 1 min)

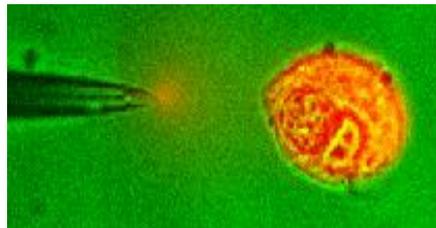


Avec la sonde Fluo-4

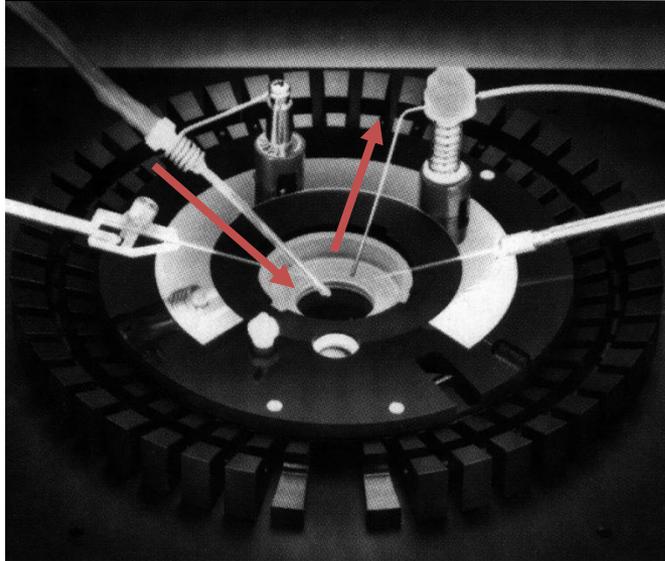
(λ_{ex} : 485 nm, λ_{em} : 513 nm)



microinjection



3. La visualisation des flux calciques 9



- chauffage
- perfusion des produits

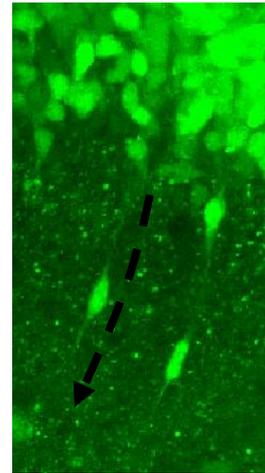
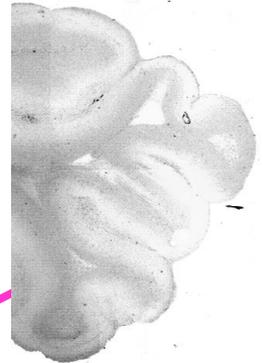
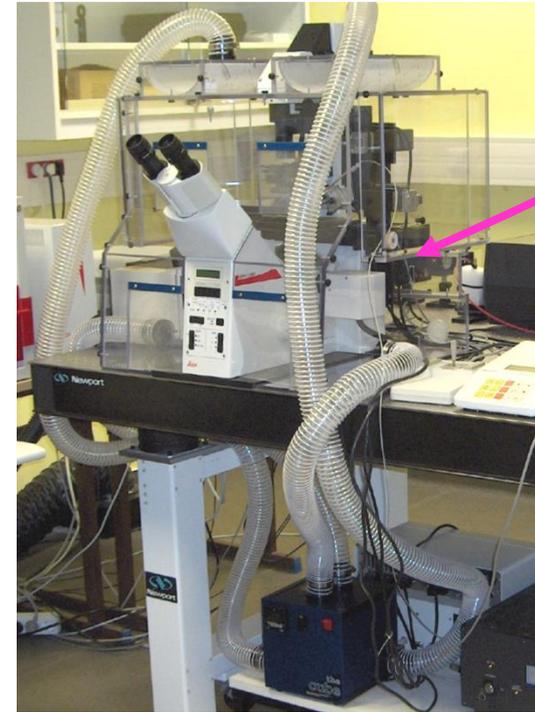
4. Les études de migration cellulaires 1

◆ Accessoires

- vibratome
- microincubateur

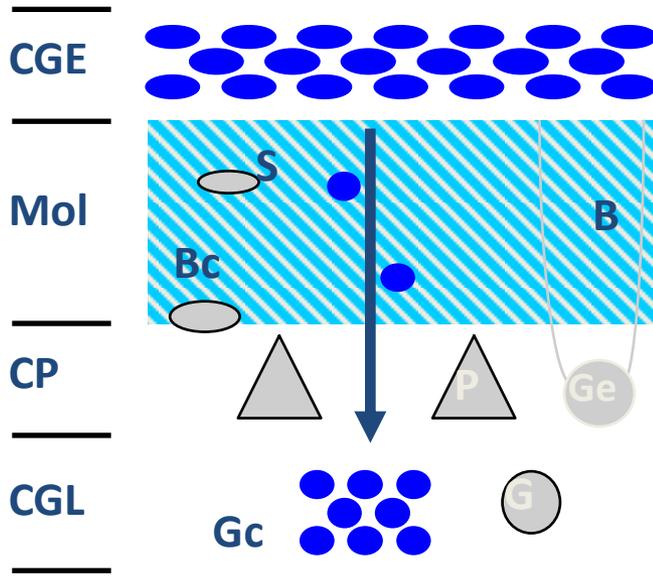
◆ Marquage des cellules

- incuber les tranches en présence de DiI (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) pdt 3 min
- rincer 2 fois
- laisser 2 à 4 h dans l'incubateur pour laisser diffuser
- placer les tranches sur le CLSM et faire 1 acquisition / 15 min

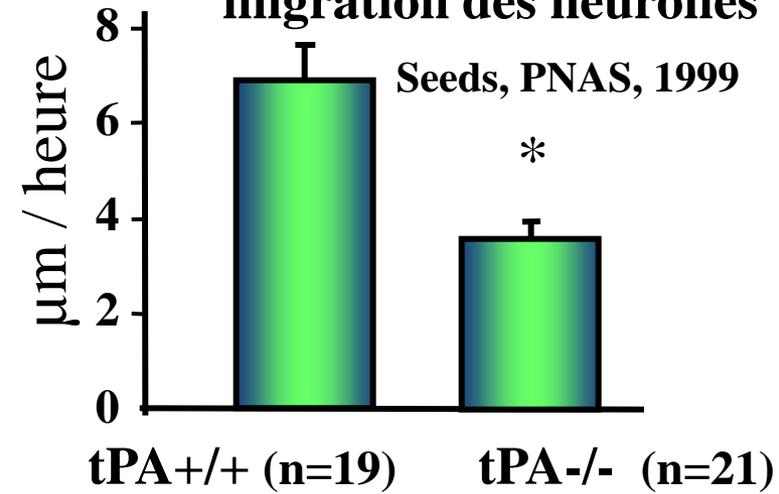


4. Les études de migration cellulaires

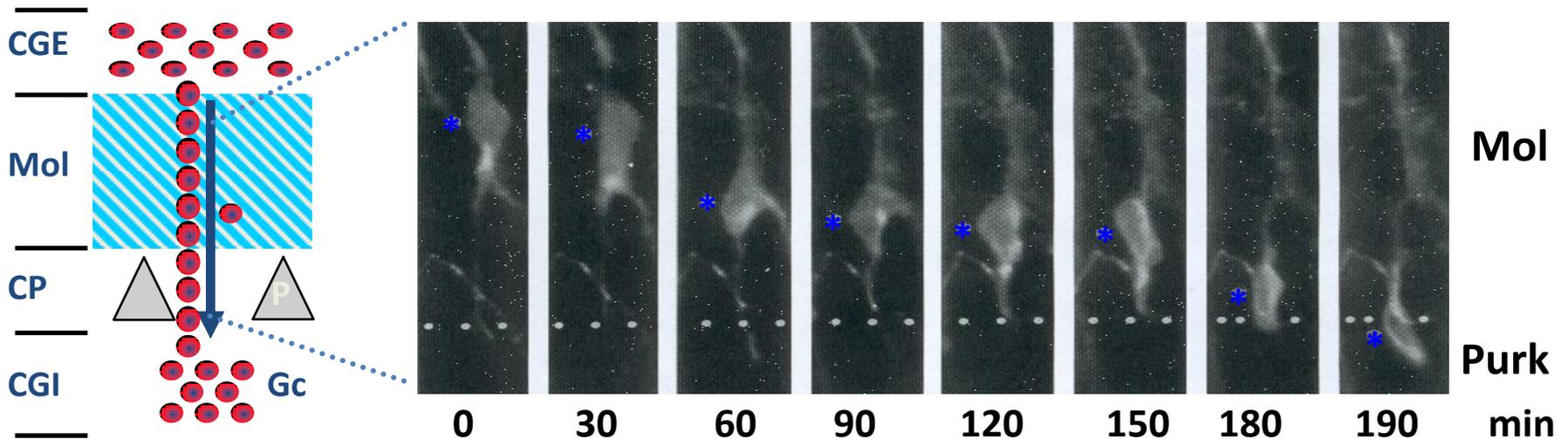
◆ Modèle de développement du cortex cérébelleux



Ex: implication du tPA dans la migration des neurones

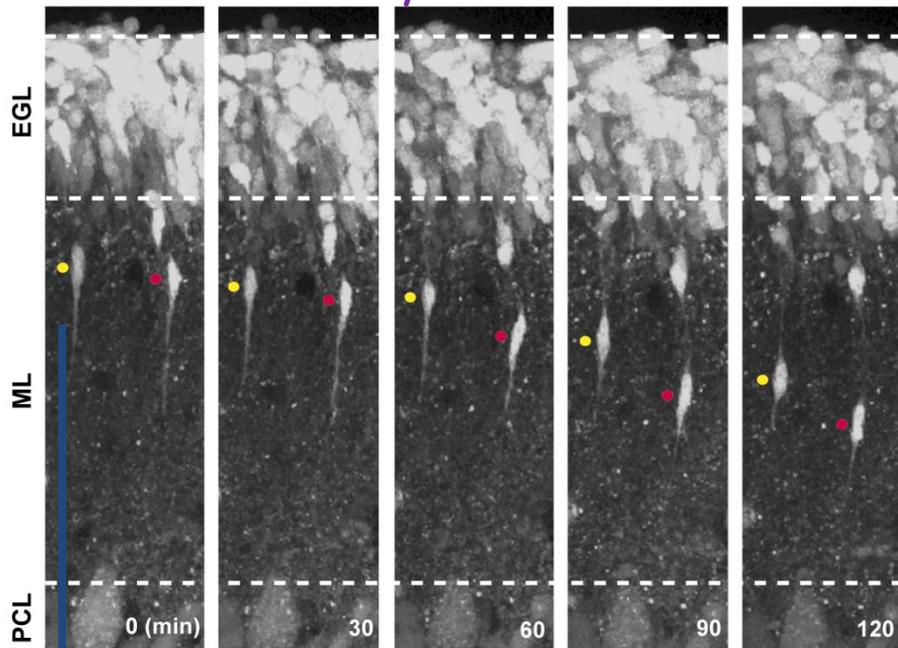


◆ Migration sur tranches en cultures

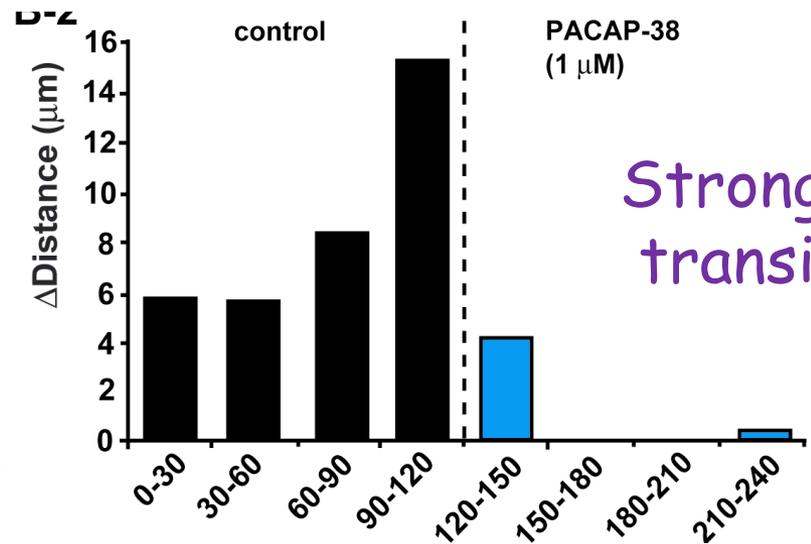
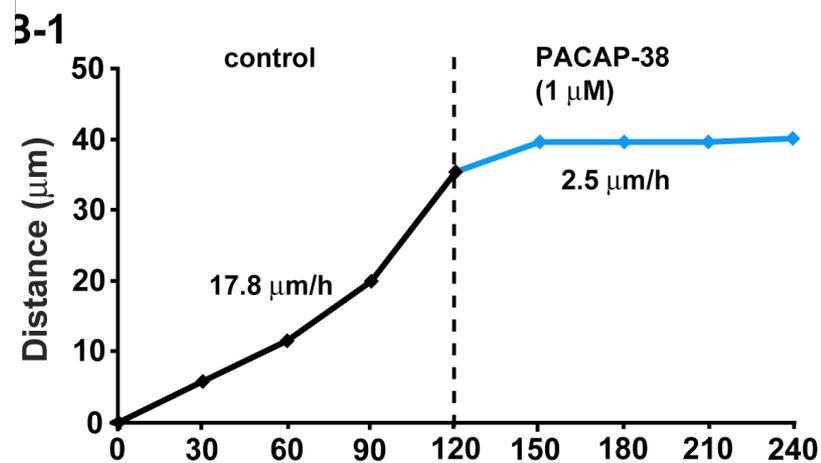
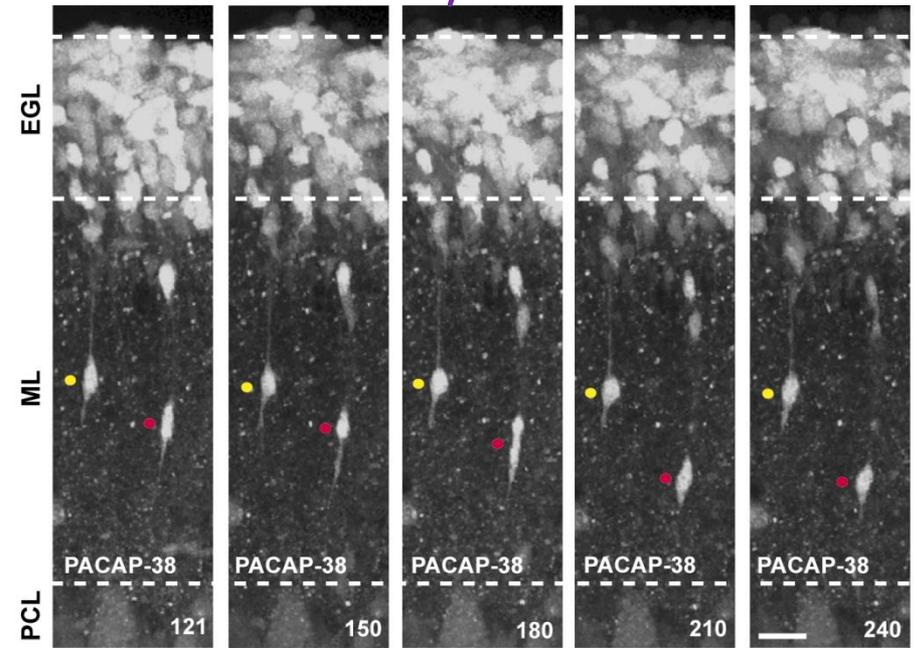


◆ Effet du neuropeptide PACAP sur la migration

$V = 17.8 \mu\text{m/h}$

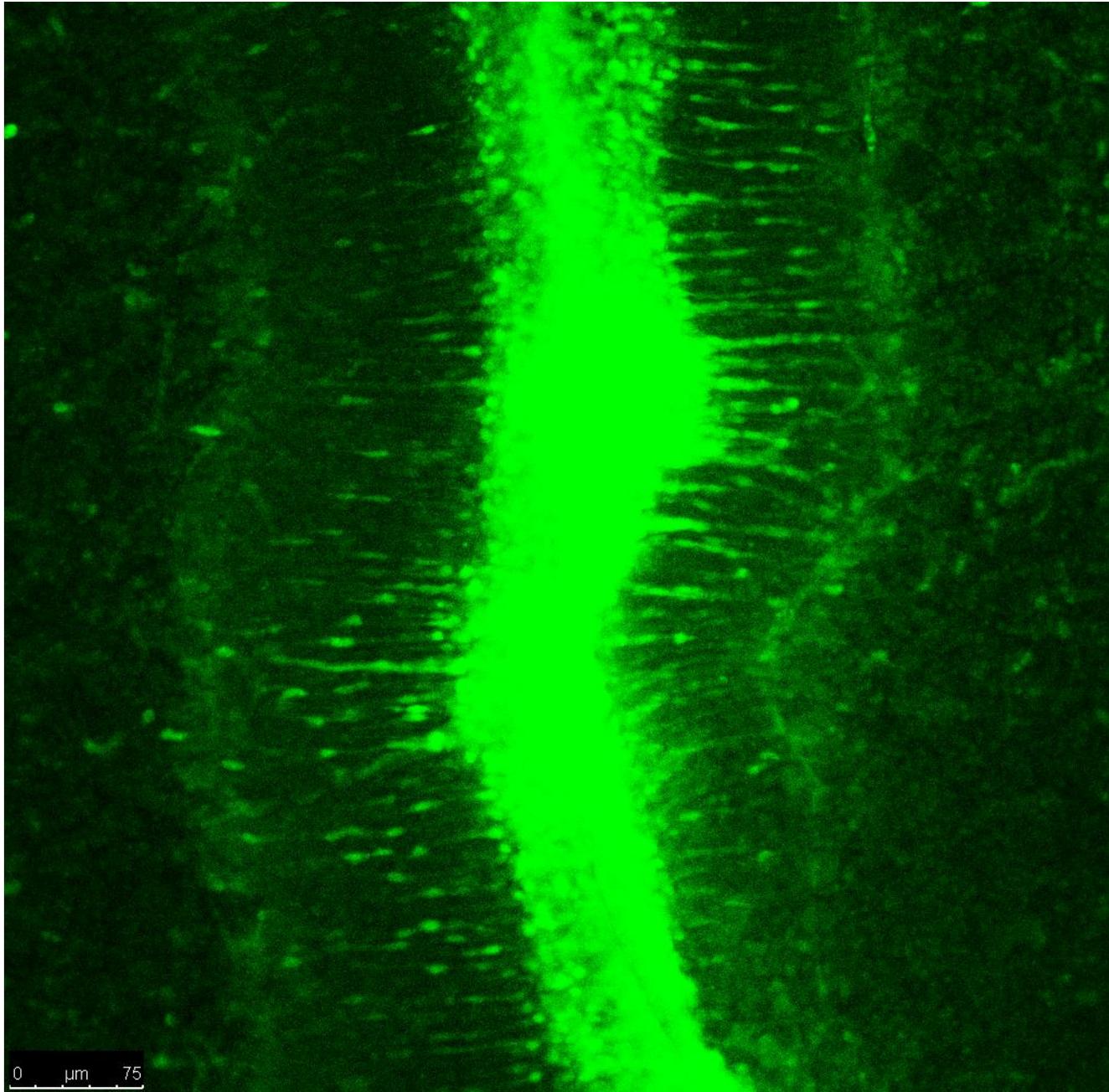


$V = 2.45 \mu\text{m/h}$



Strong but transient

◆ Migration des neurones

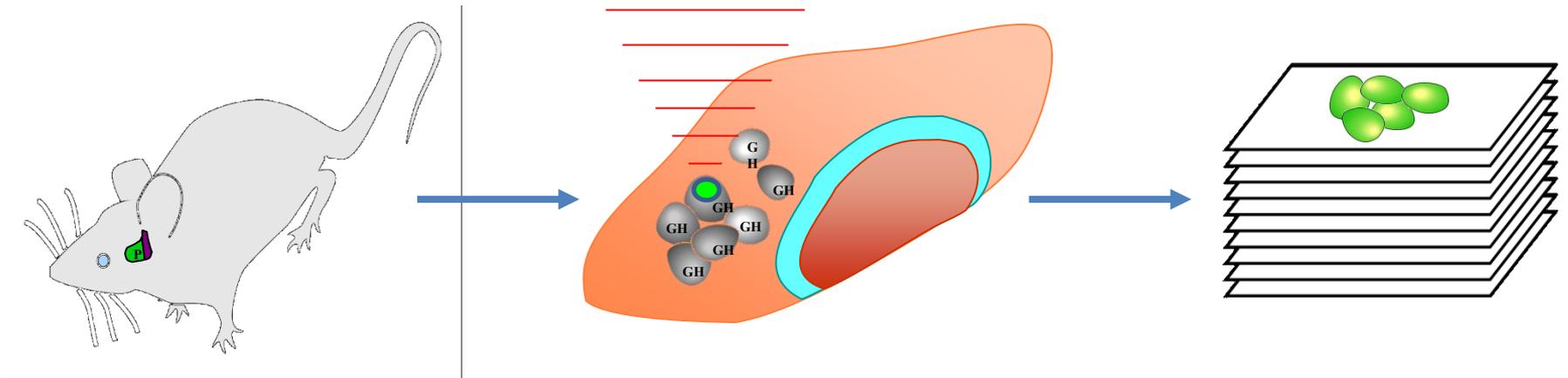


5. Organisation des cellules dans l'hypophyse: acquisition

**GH-eGFP
transgenic mice**

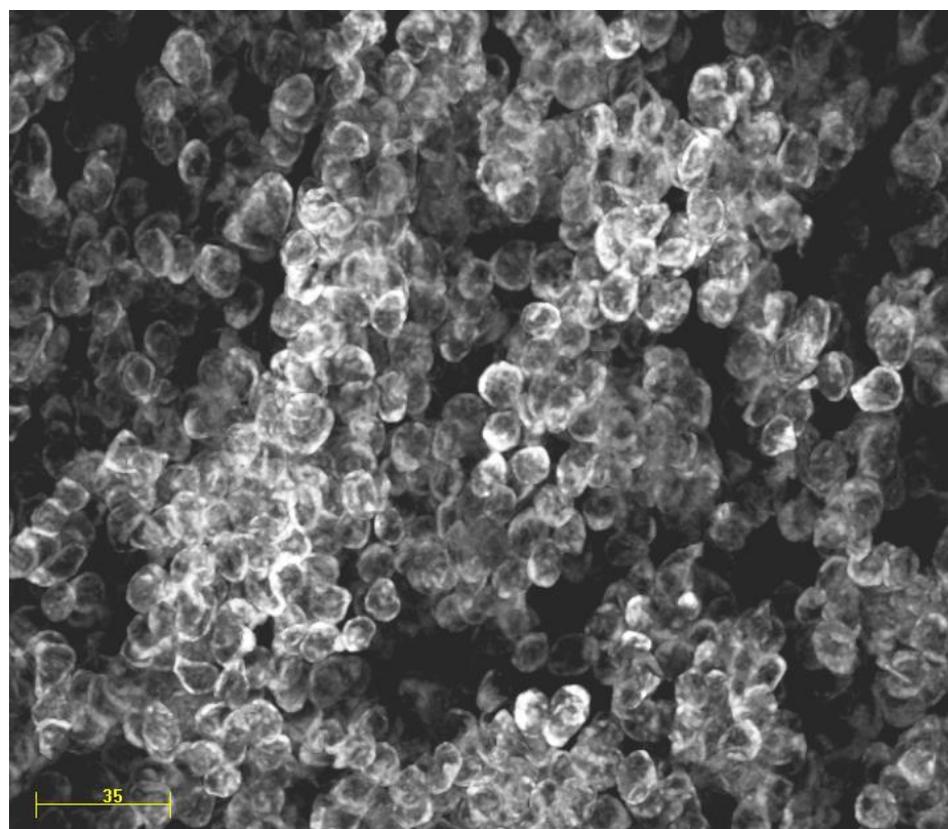
**Confocal
excitation microscopy**

**Image deconvolution
+ 3D reconstruction**

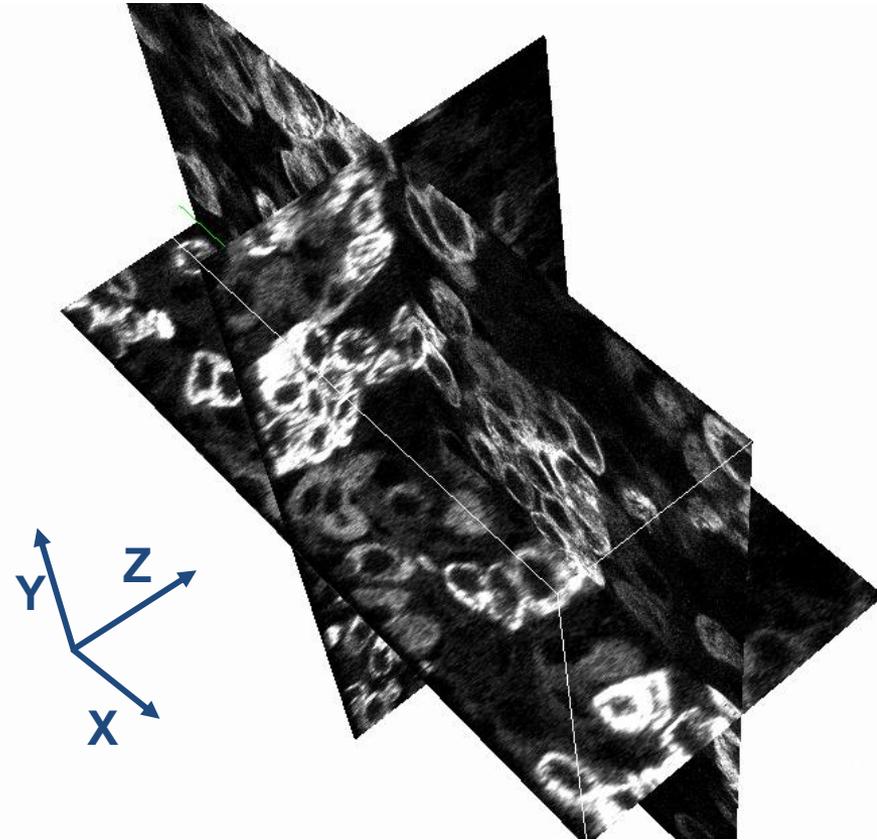


Confocal et 2 photons

5. Organisation des cellules dans l'hypophyse: reconstruction GH-eGFP

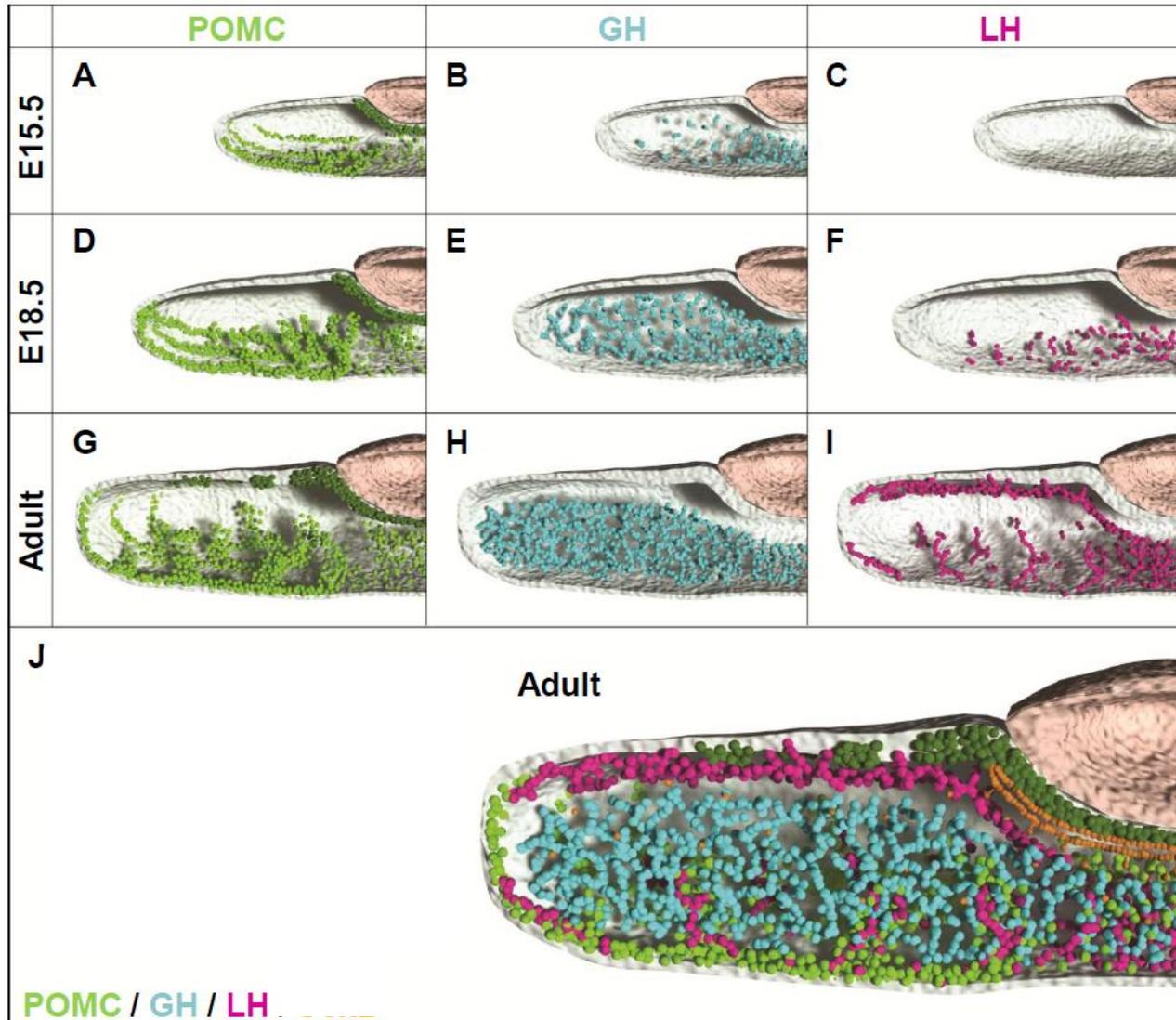


3D image stack (70 μm)
60-day-old GH-eGFP male



Cellules GH-eGFP forment un réseau 3-D dans l'antéhypophyse

5. Organisation des cellules dans l'hypophyse

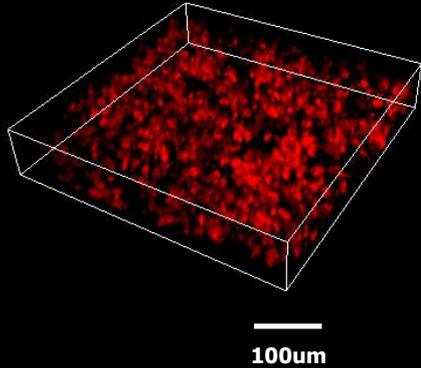


Pro-opiomelanocortin
Growth hormone
Luteinizing hormone

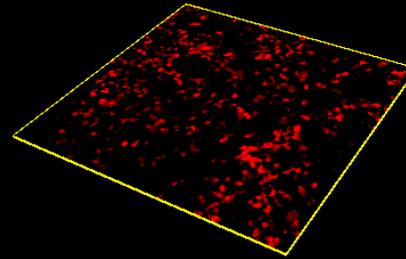
6. Etude de l'organisation en réseau des cellules à PRL

1) Acquire 3D reconstruction

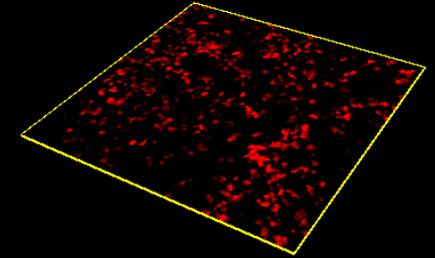
Acute pituitary slice prep.



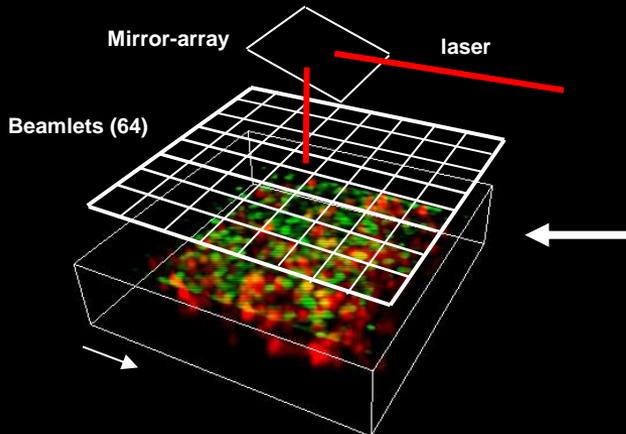
2) Select optical recording plane



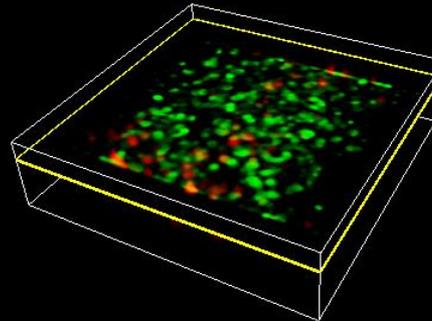
3) Precisely identify position of cells



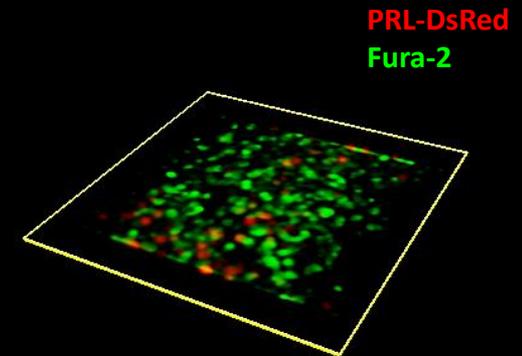
6) Assess Ca²⁺ signals



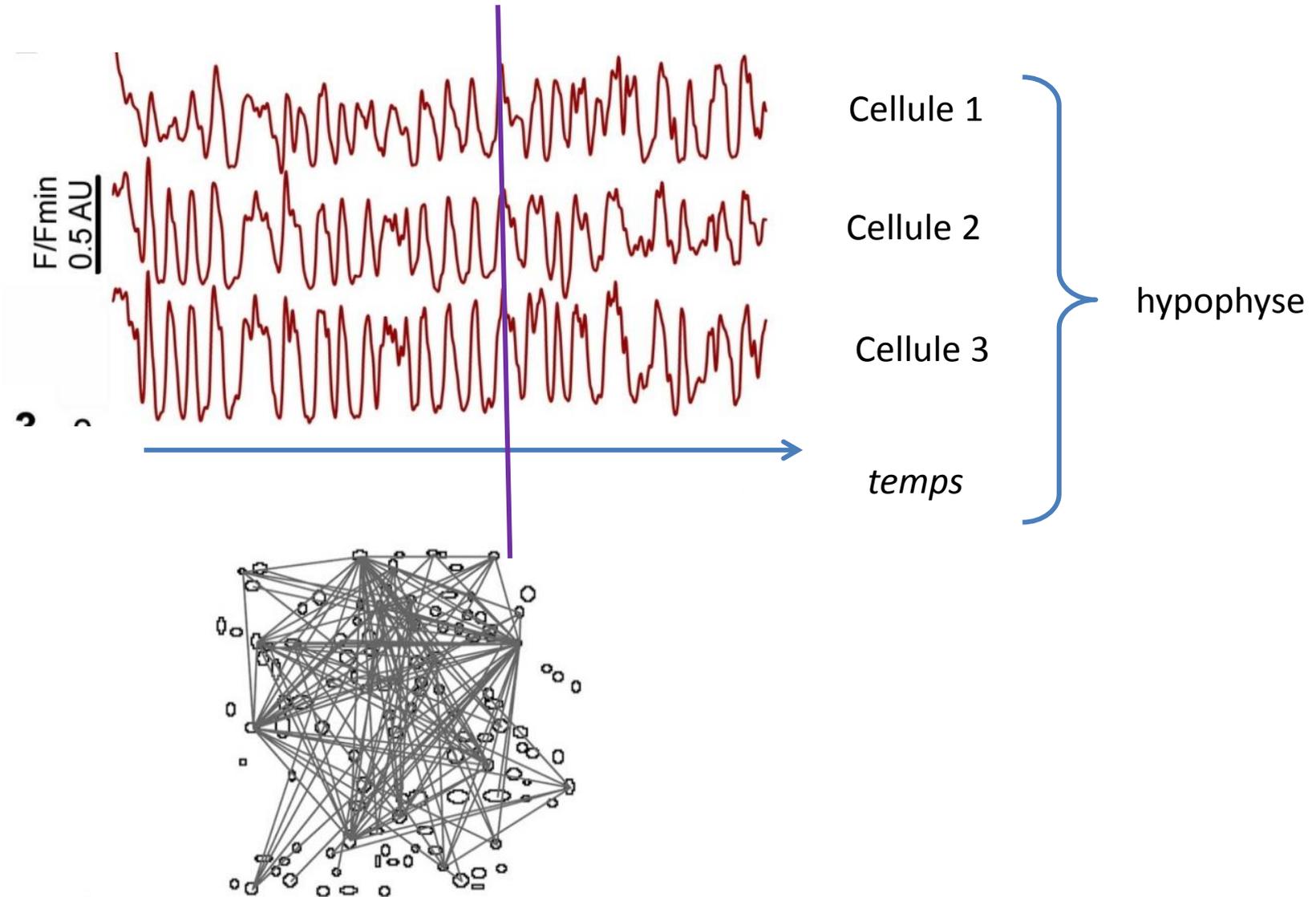
5) Place cells in population



4) Load cells with Ca²⁺- indicator



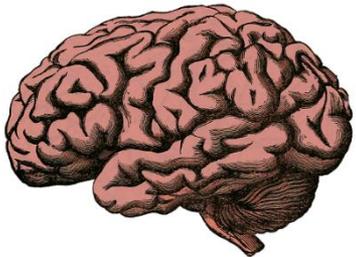
6. Etude de l'organisation en réseau des cellules à PRL



7. Comment voir un cerveau entier: microscopie feuille de lumière

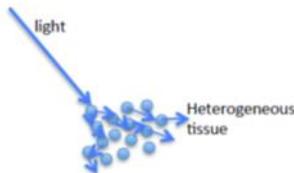
La « transparisation » des échantillons pour aller plus en profondeur

Beaucoup de tissus biologiques ne sont pas transparents



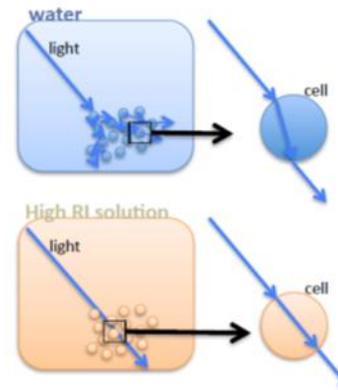
Pourquoi ?

Light scattering



Light scattering accounts for 99% of lost Transmission in biological tissues

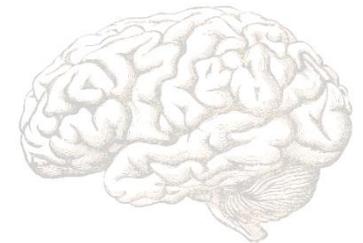
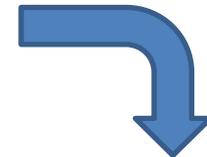
Refraction Index Homogenization



Refraction index of:

- Phospholipids : about 1.45
- Proteins : 1.52-1.56

Protocoles de « transparisation »

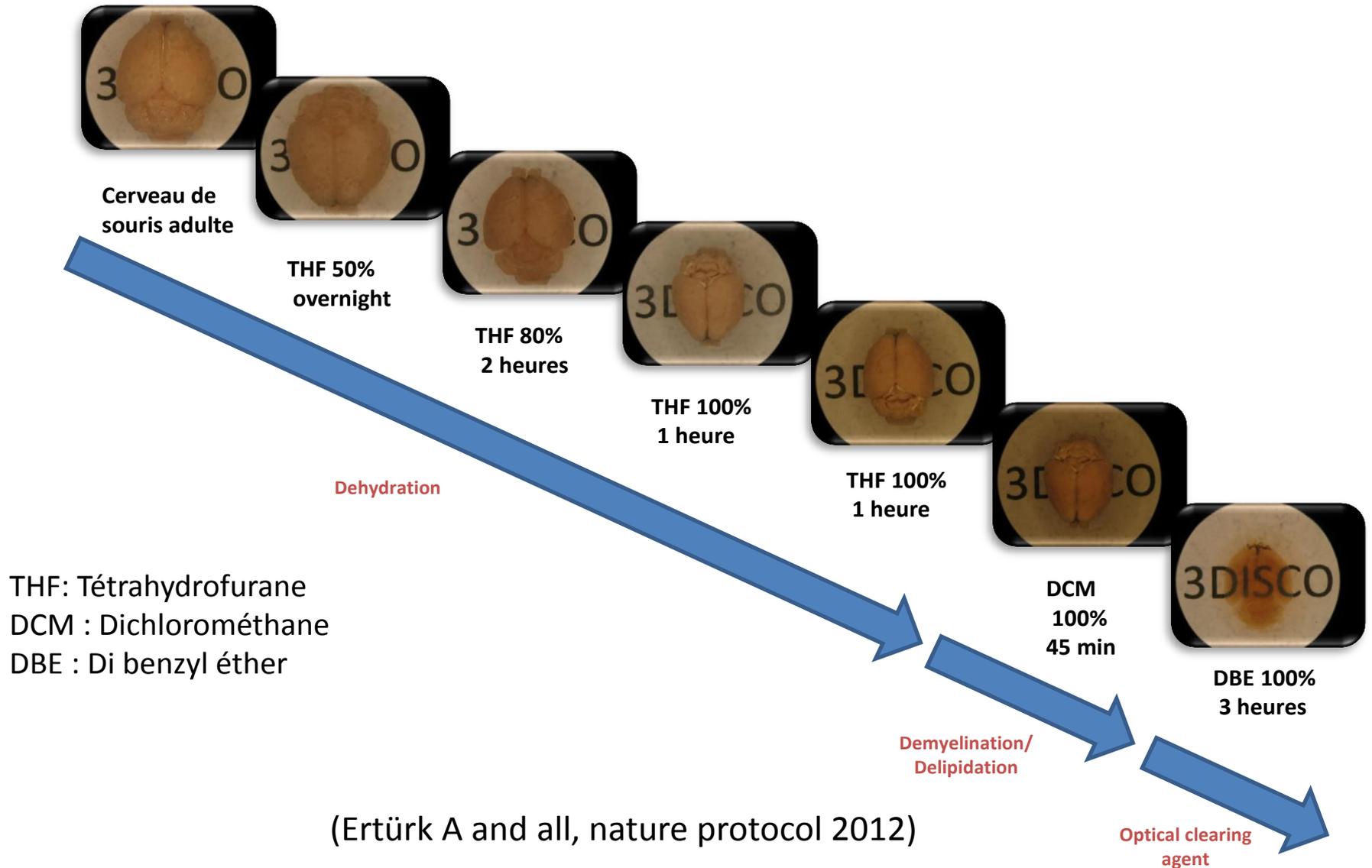


Tissus biologiques transparents

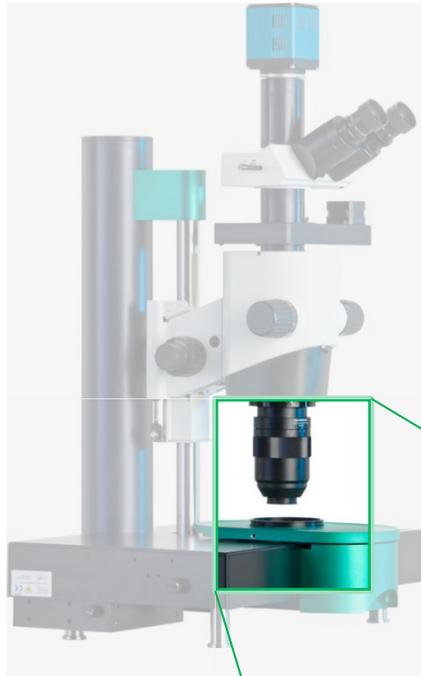
Quelques protocoles de transparisation : avantages et inconvénients

Protocole de clearing	Bleaching de la fluorescence native (GFP)	Taille de l'échantillon		Toxicité	Temps maximum pour obtenir le clearing
		réduction	expansion		
3Disco (Ertürk A, nature protocol 2012)	+++	+++		++	2 jours
Clarity (Chung K, nature 2013)	---		+++	+++	4 semaines
Cubic (Susaki E, Cell 2014)	---		+	+	2 semaines
iDisco+ (Renier N, Cell 2016)	+++++	0	0	++	2 jours
SeeDB (Ke M, nature neuroscience 2013)	---		+	---	1 semaine
BABB (Ahnfelt-Ronne J, J of histochemistry and cytochemistry, 2007)	+++	++		++	2 jours
ClearT (Kuwajima T, Development 2013)	---	0	0	+++	2 jours

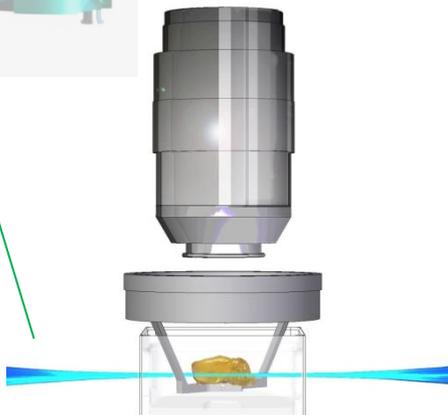
Protocole de « transparisation » 3Disco



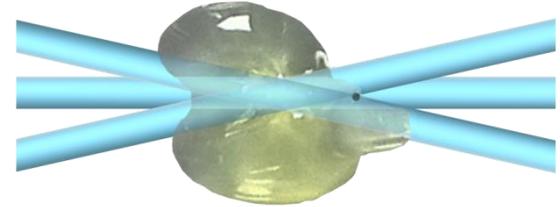
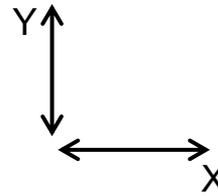
Ultramicroscope : Microscopie à feuille de lumière pour l'imagerie des échantillons transparents



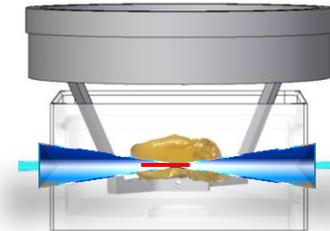
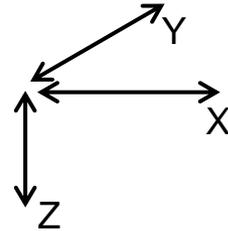
Feuille de lumière



Réservoir pour milieu d'imagerie



Ultramicroscope
Triple feuille de lumière



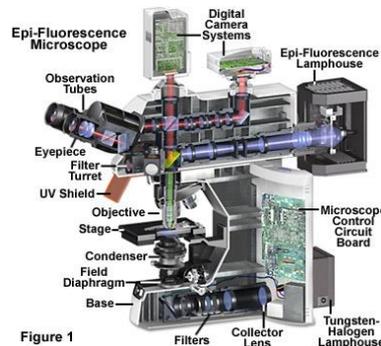
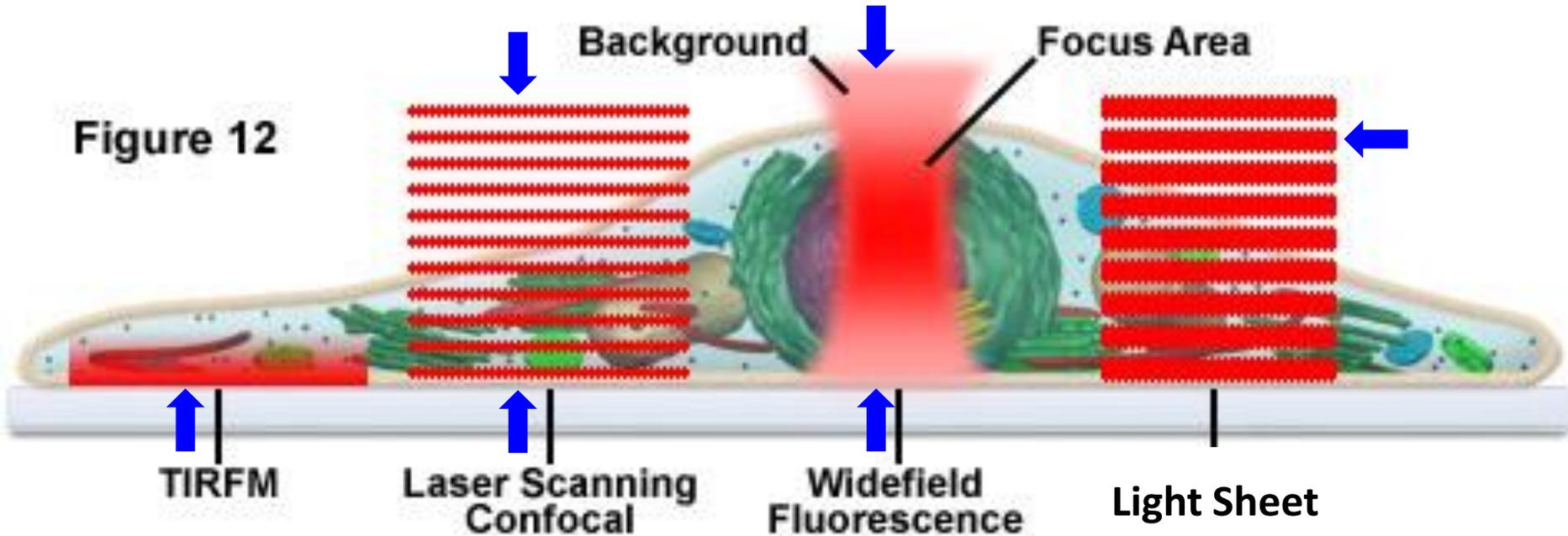
dynamic
horizontal
focusing

Feuille versus CLSM:
Acquisition rapide
Pas de résolution subcellulaire

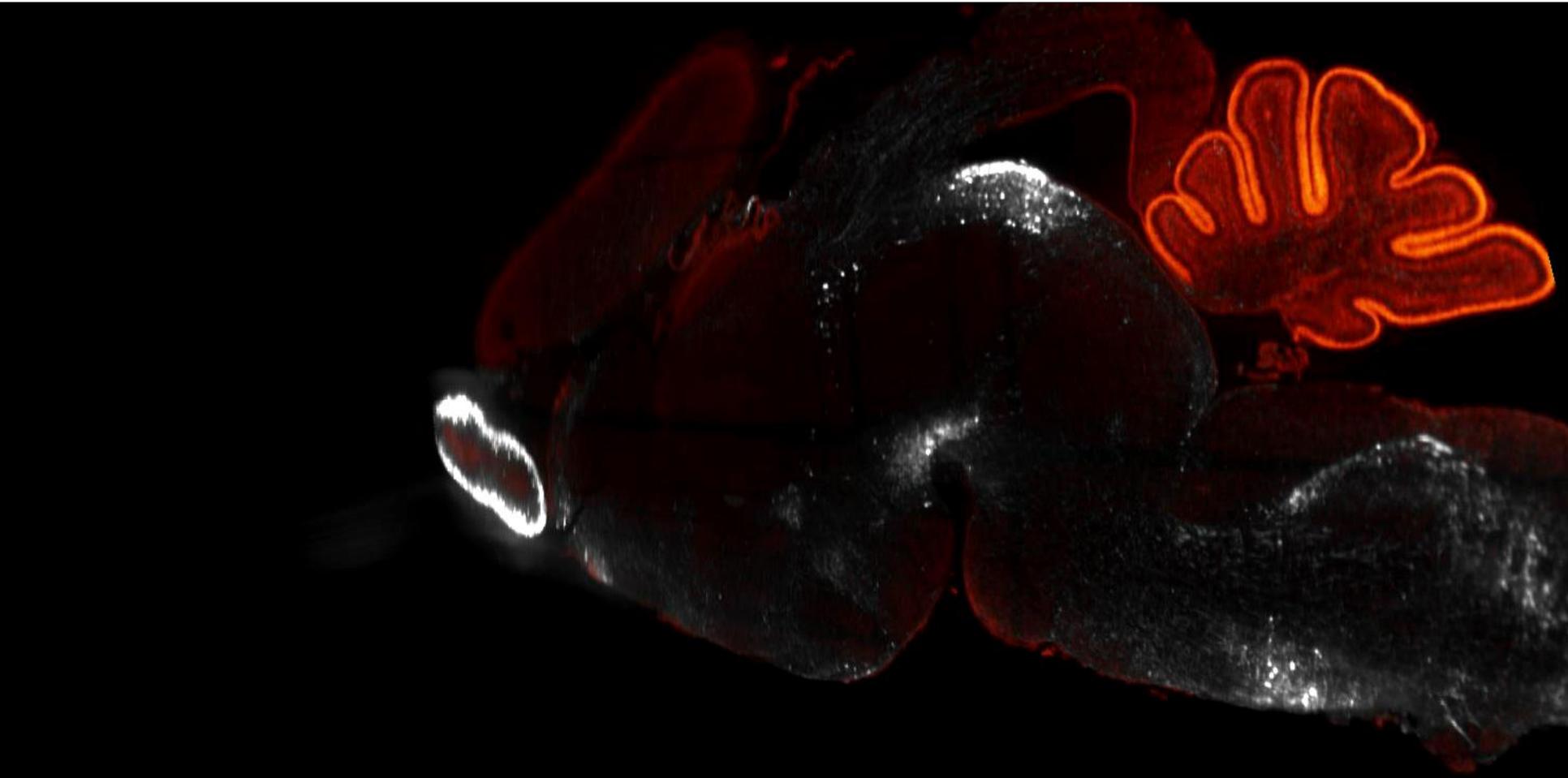
Les différents modes de microscopie en fluorescence

Fluorescence Imaging Modes in Live-Cell Microscopy

Figure 12



Cartographie de la Tyrosine Hydroxylase dans le cerveau de souris P5



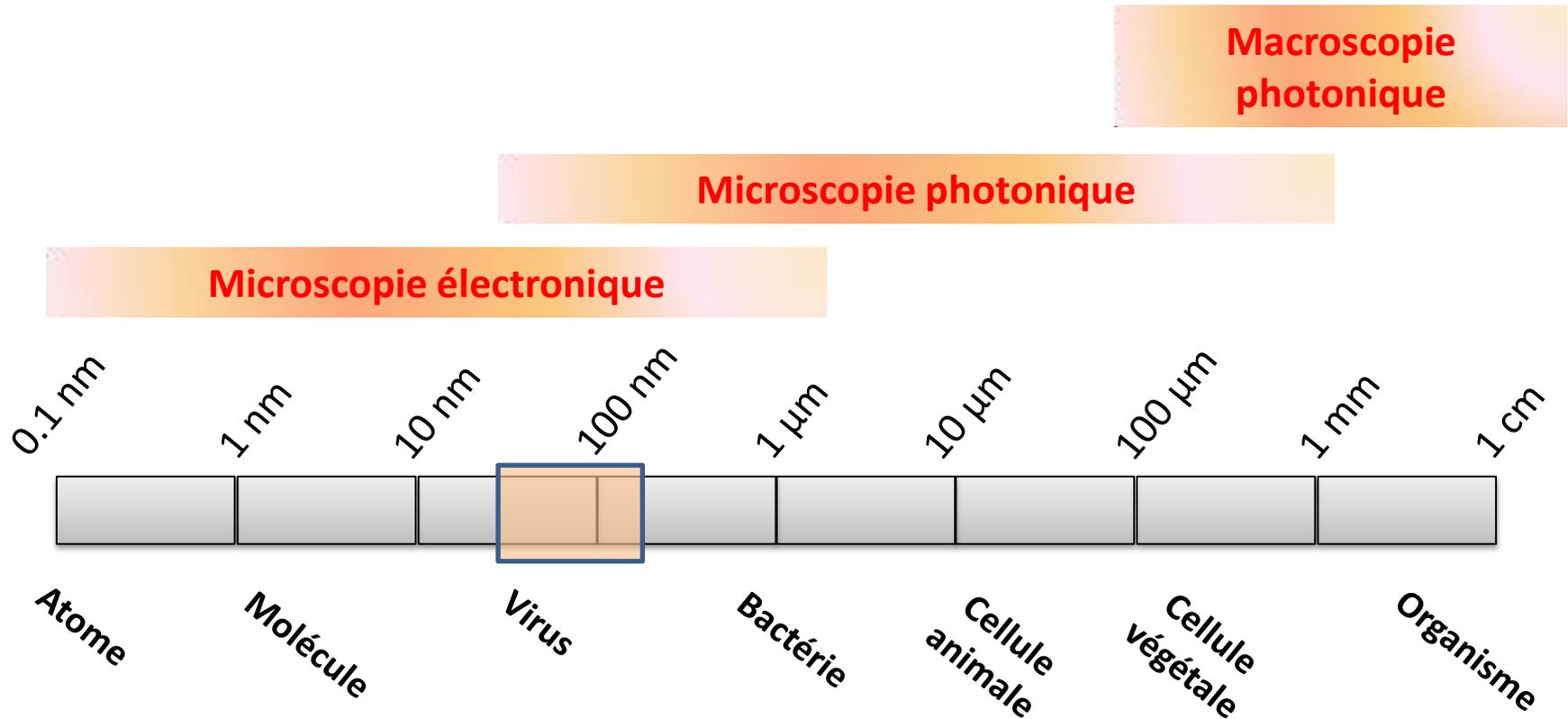
8. Haute résolution: pour dépasser les limites de résolution des systèmes optiques classiques



Leica SP5 STED

STED

- Beyond the limits of optic microscopy

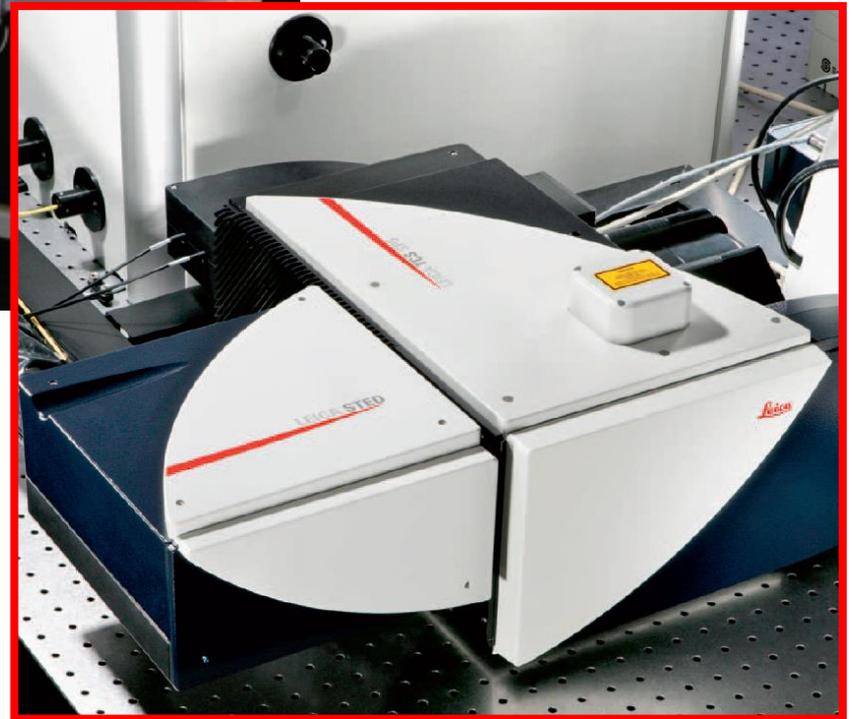
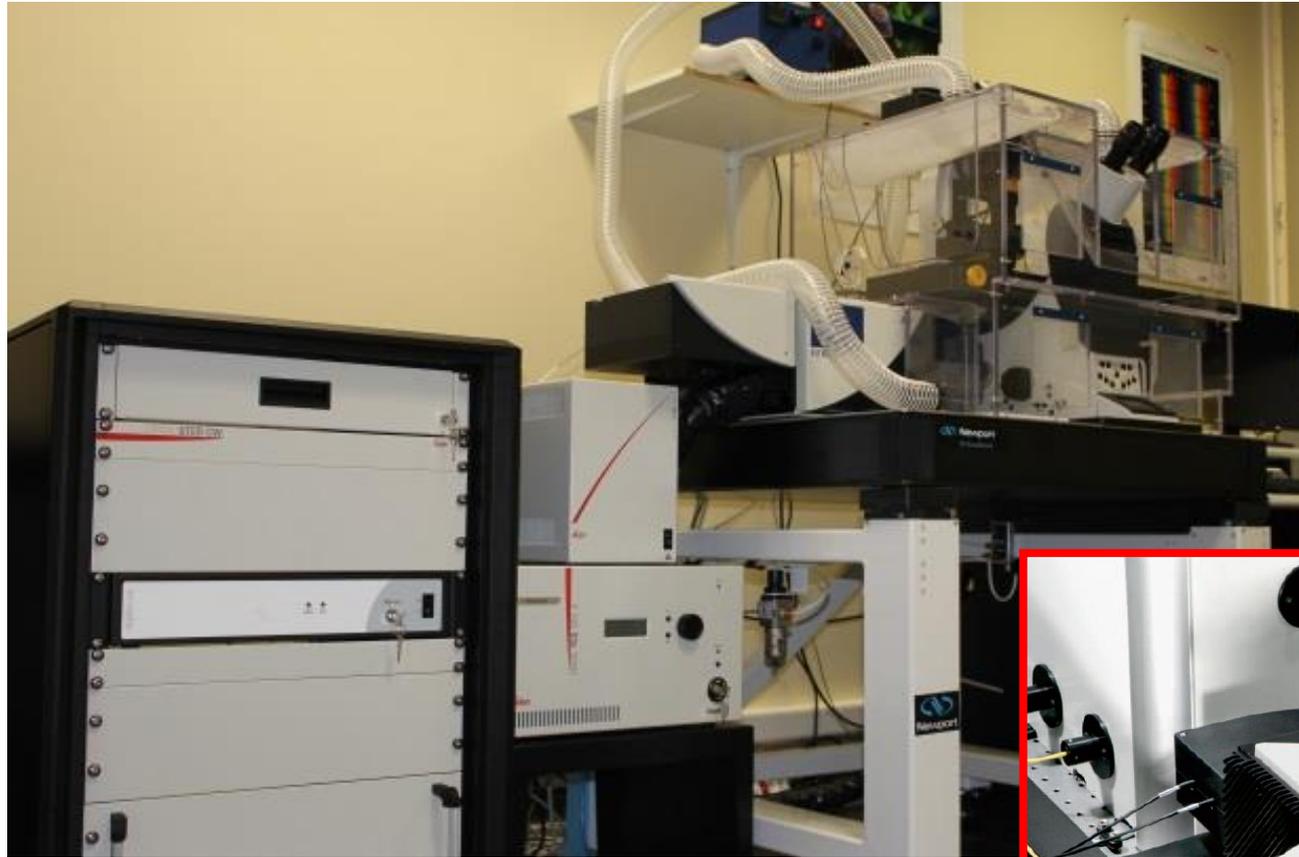


STED (Stimulated Emission Depletion)

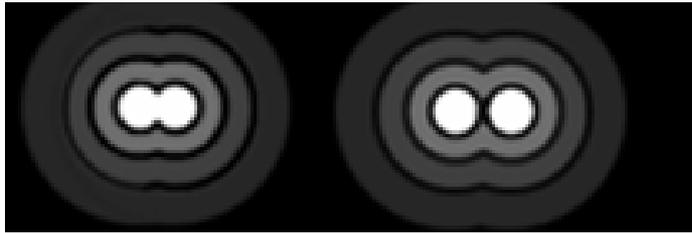
PALM (Photo-Activated Localization Microscopy)

STORM (StochasTic Optical Reconstruction Microscopy)

Equipment STED



STED: principle in 2000



Standard PSF
Laser 1



+

Donut Depletion
Laser 2

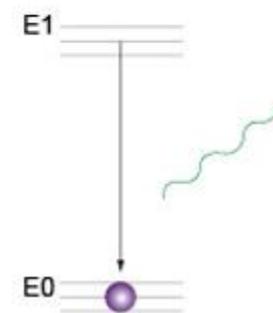
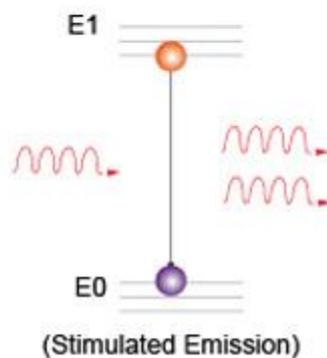
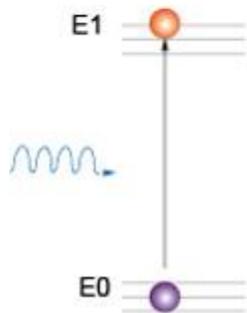
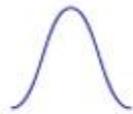


=

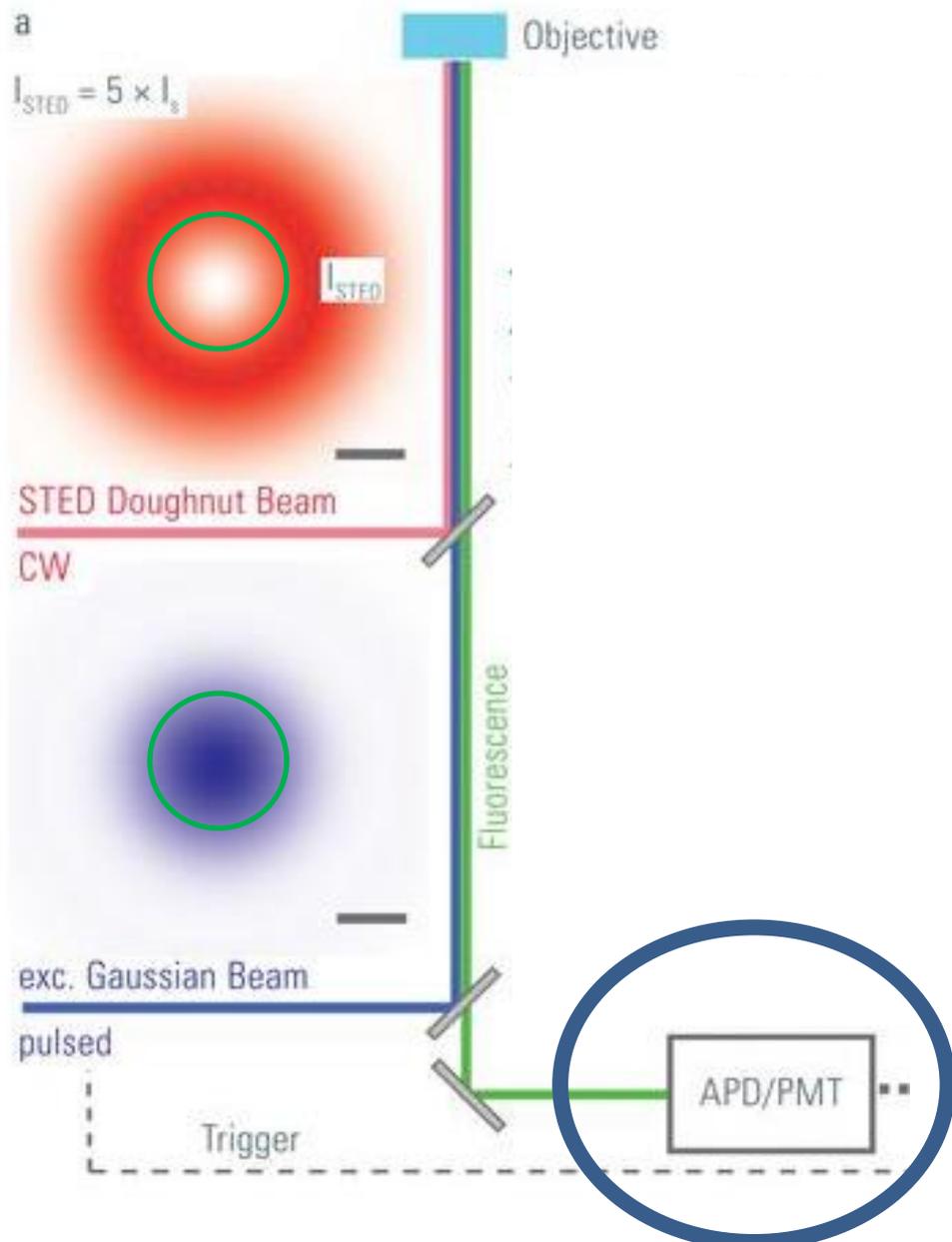
Suppresses outer
PSF



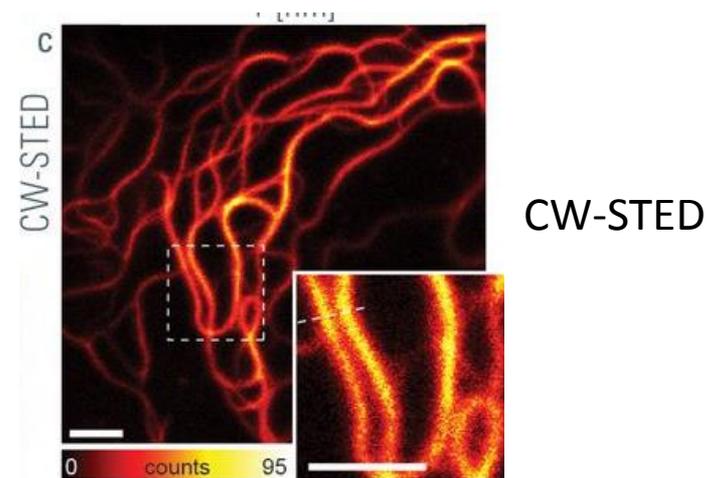
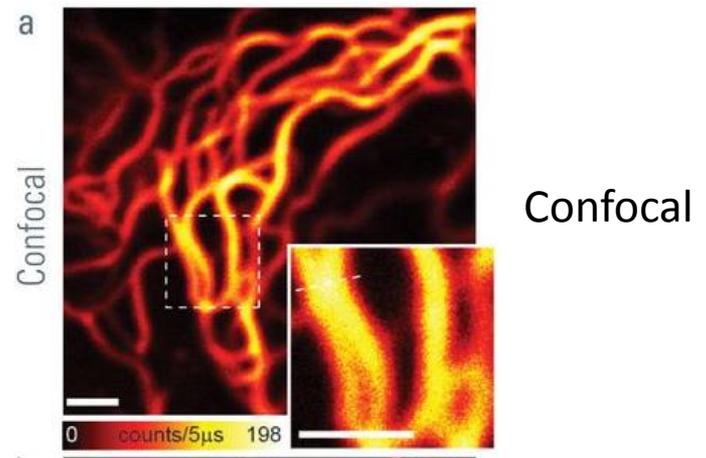
Effective PSF
Fluorescence



CW-STED



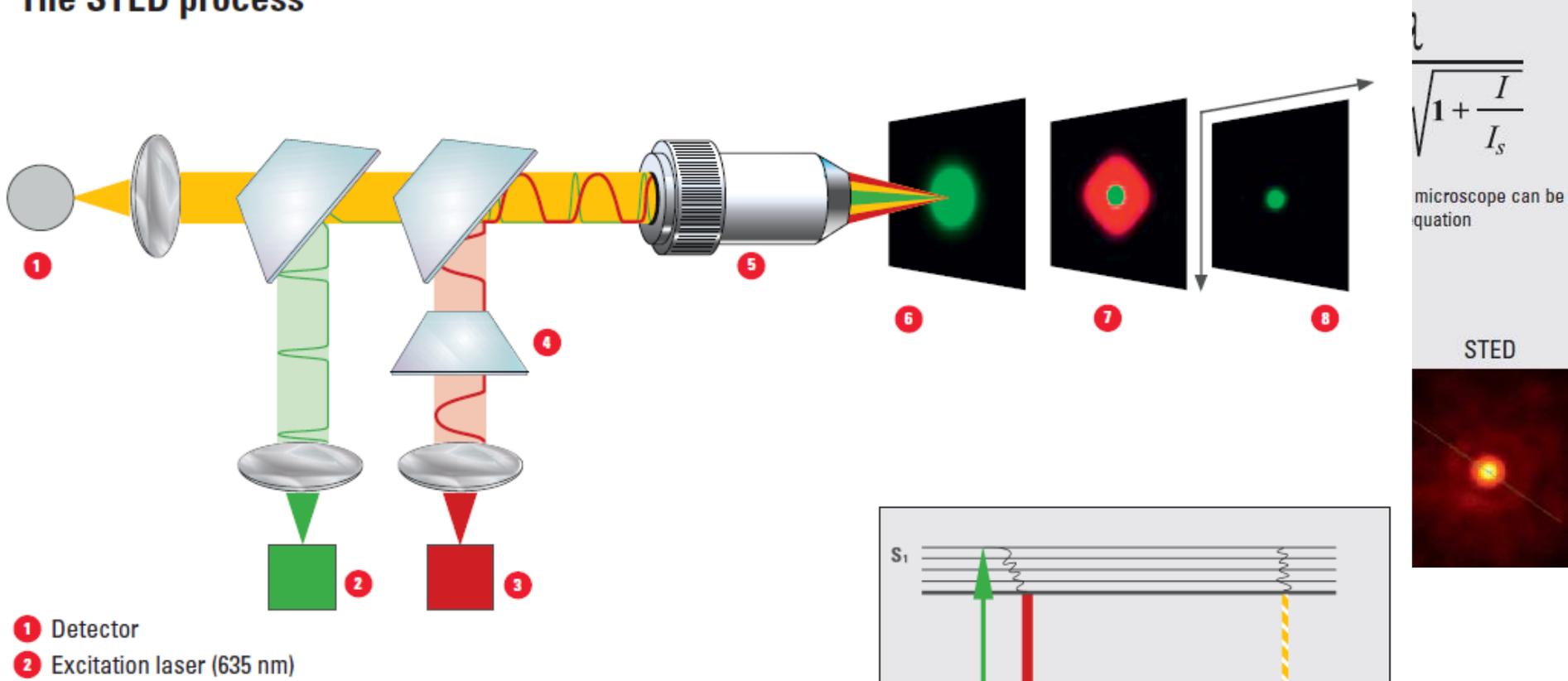
CW-STED: continuous wave lasers



Les nouvelles possibilités pour améliorer la résolution

Stimulated Emission Depletion (STED): Résolution d'environ 100 nm (60 nm en gSTED)

The STED process



Cle. diminuer le spot de fluorescence. Pour cela, le fluorophore dans l'échantillon est excité par un pulse laser à 635 nm (vert). Chaque pulse est suivi par un pulse de lumière rouge lointain polarisé perpendiculairement (728-850 nm = pulse STED). Cela induit une déplétion du fluorochrome excité avant qu'il ne quitte son état excité pour émettre de la fluorescence. Pour des raison physiques dues à l'aspect 'doughnut' du PSF, la déplétion se fait uniquement dans la partie externe du spot alors que la partie interne n'est pas affectée.



$\lambda \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}$

microscope can be quation

STED

Le STED

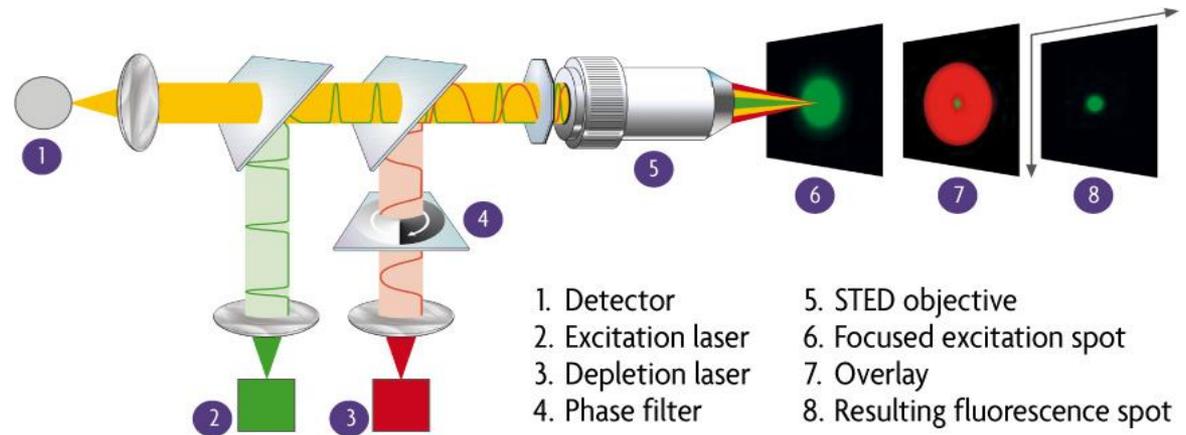
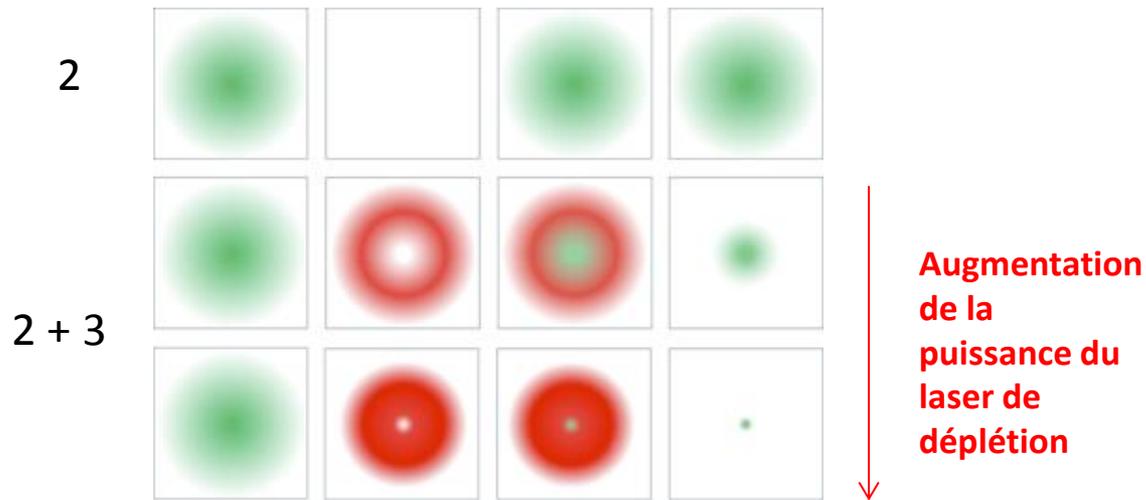


Diagram of the Leica TCS STED microscopy. The basis of STED microscopy is the coupling of the excitation laser with the STED depletion laser, resulting in the doughnut-shaped depletion. The two perfectly aligned laser systems minimize the size of the fluorescence spot, overcoming the resolution-limiting effects of diffraction.



Attention : utilisation de fluorochromes « verts - jaunes » uniquement, ne sont pas tous sensibles à la déplétion!

Green fluorophores (excitation 488 or 514nm) :

- BD Horizon V500 (Becton Dickinson)
- Abberior STAR 440SX (Abberior)
- ATTO 488 (Sigma-Aldrich)
- Dylight488 (Thermo Scientific)
- Alexa488 (Invitrogen)
- Oregon Green (Invitrogen)
- Chromeo488/505 (Active Motif)
- FITC

Fluorescent proteins (for live-imaging)

(excitation 488nm or 514nm) :

- YFP/citrine/venus: OK
- GFP (not ever)
- but also organic dyes

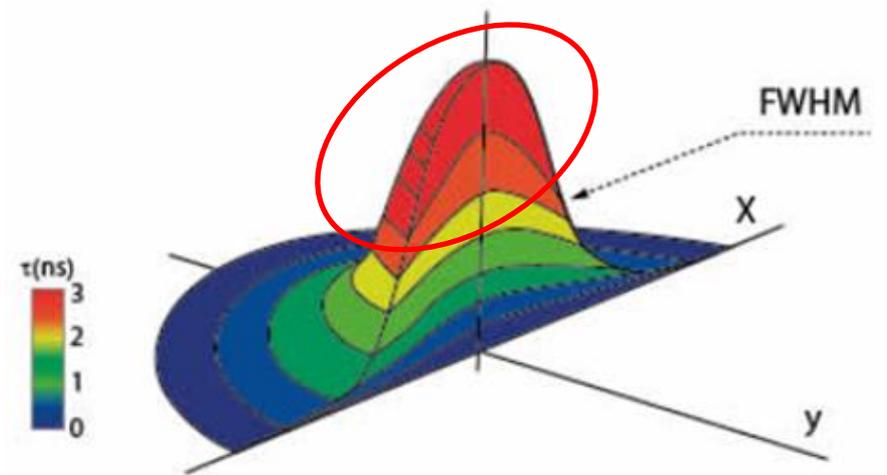
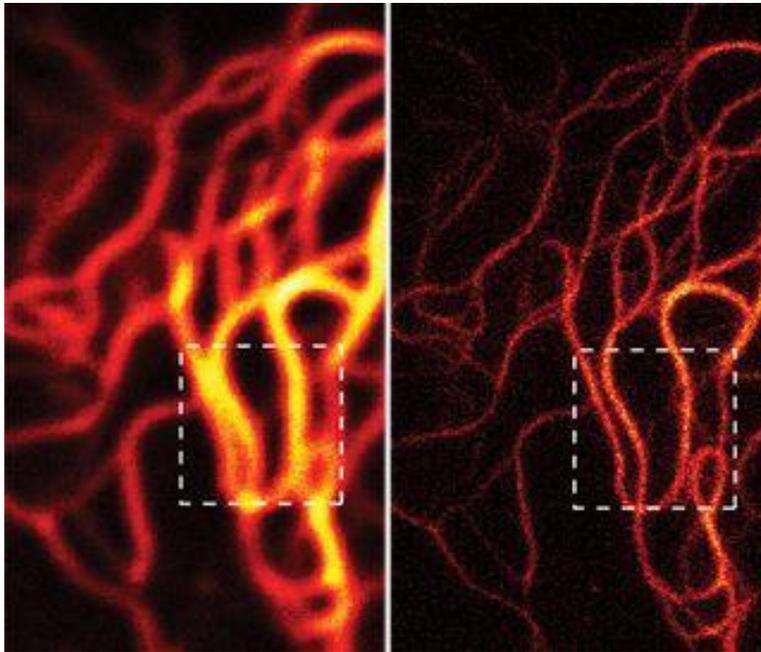
CW-STED vs Gated-STED

CW-STED: continuous wave lasers

gSTED : gated fluorescence detection

CW-STED

gSTED



Lifetime distribution of a fluorophore in the focal spot of a CW-STED microscope.

Long-living states (red) are located at the center whereas short living (blue) are at the periphery

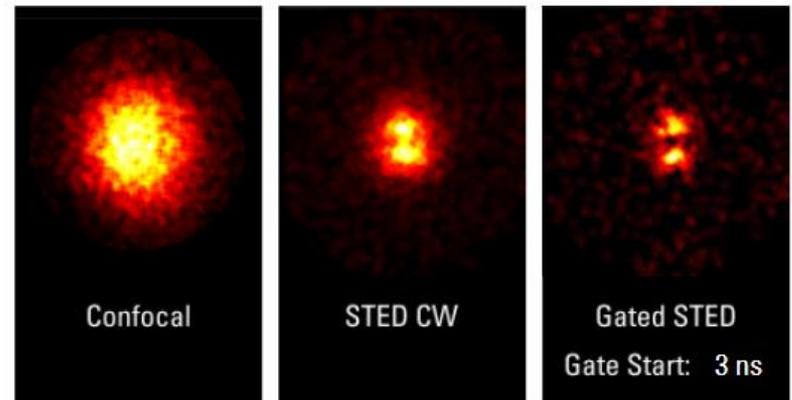
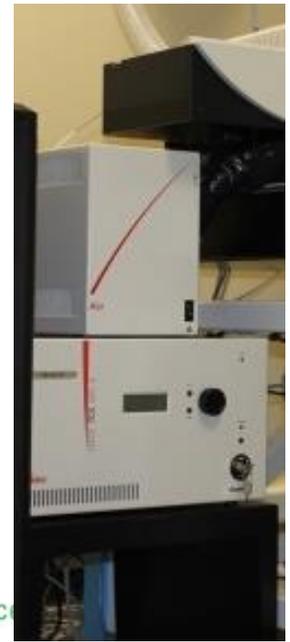
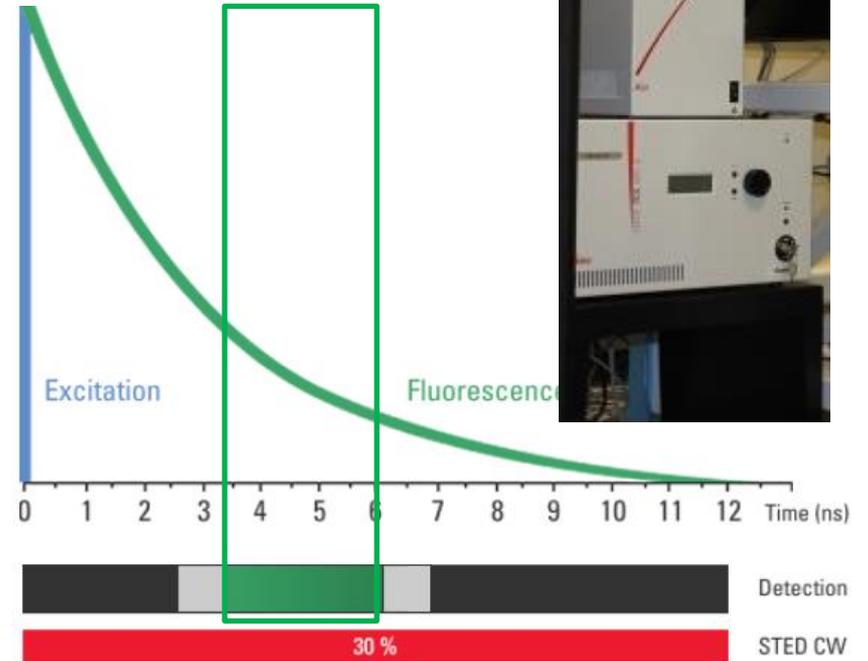
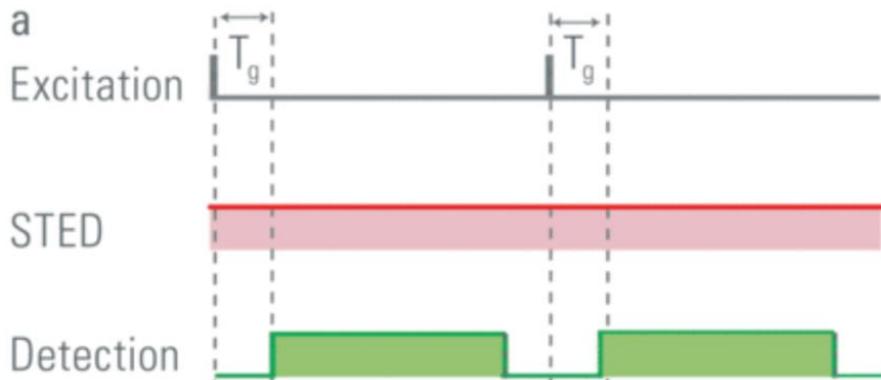
Gated-STED to improve resolution

Pulse excitation

Start collect fluorescence after 3 ns

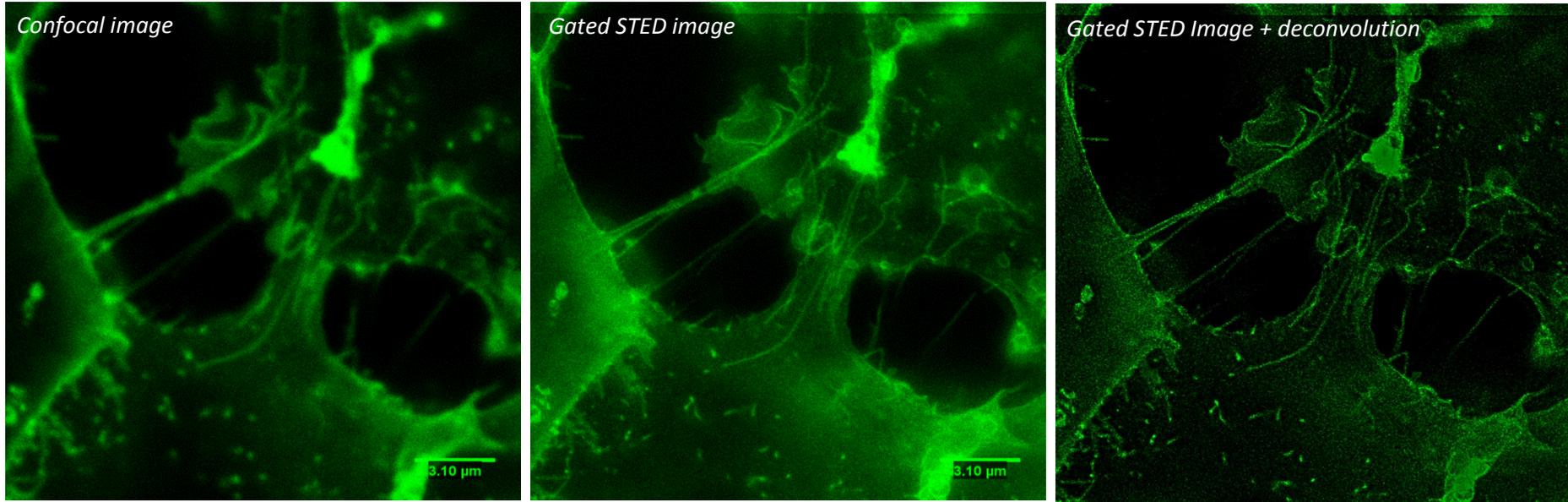
= improve X 2 the resolution

Smaller details can be observed

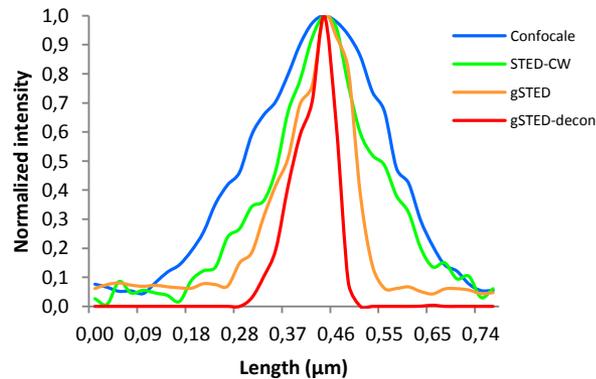


- Traitement des images : Déconvolution avec le logiciel Huygens

Scientific Volume Imaging



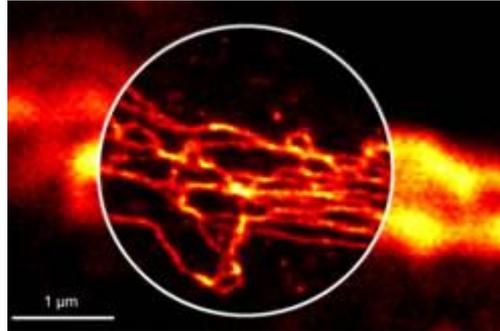
nanotubes



Résolutions mesurées :

- Image confocale : 250 nm
- Image STED : 120 nm
- Image g-STED : 90 nm
- Image g-STED déconvoluée : 80 nm

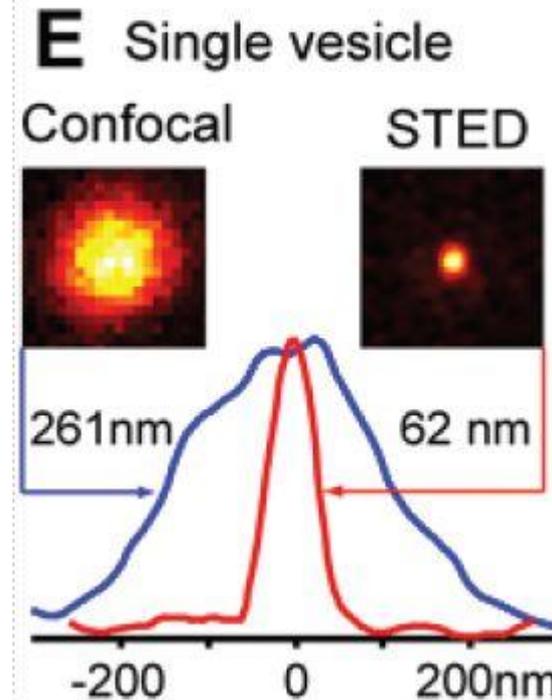
Images STED versus confocale de la vimentine



The vimentin network of a neuron imaged under confocal (outer) and nanoscale resolution STED (inner part) modalities. The STED image reveals single filaments which appear in the confocal reference as blurs

Images STED de vésicules *in vitro*

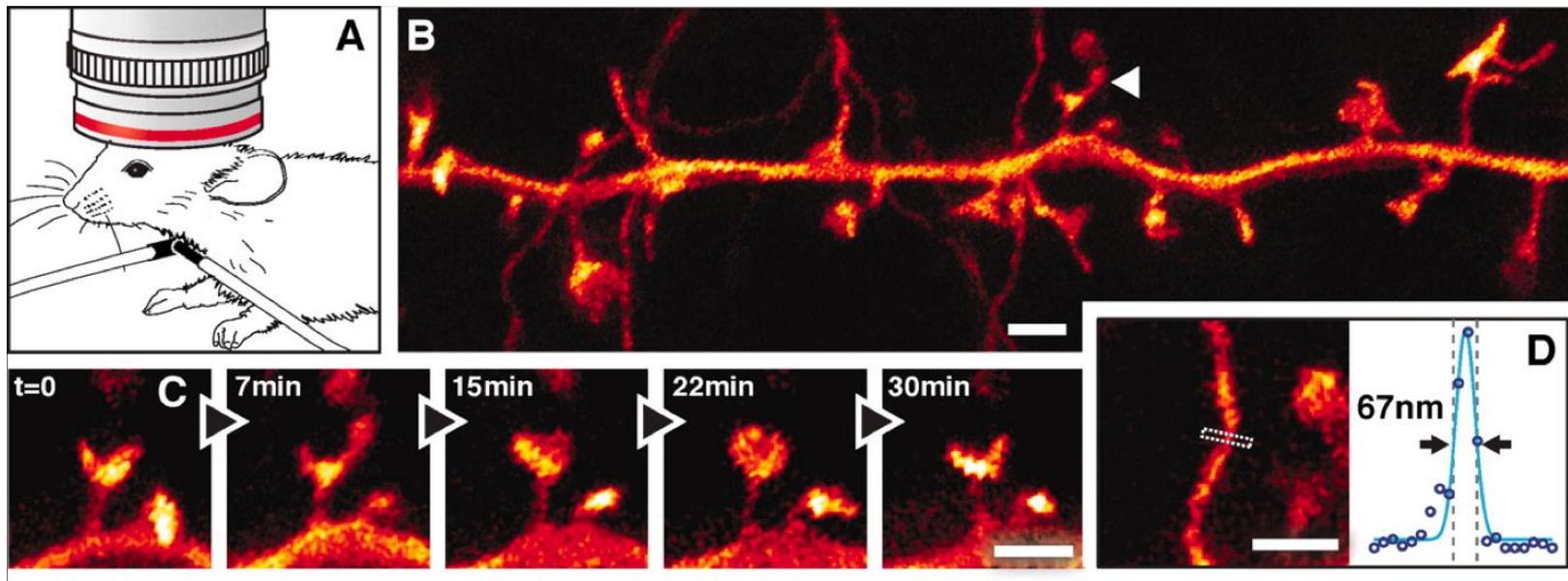
Real-time STED to visualize vesicle dynamics



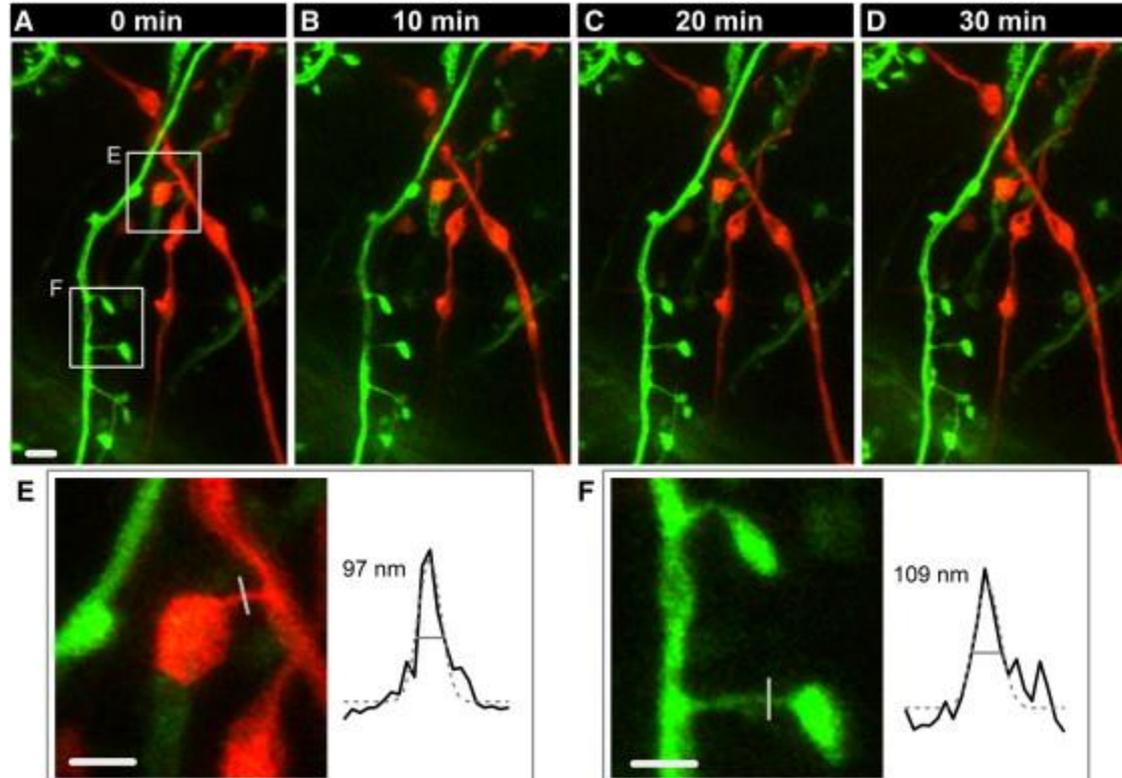
28 frames per second at 62nm resolution (well below the diffraction limit of 260 nm for light of the wavelength used)!

Images STED de neurones *in vivo*

STED microscopy of a mouse's brain, focusing on one thin layer of the somatosensory cortex. The neurons are labelled with yellow fluorescent protein. (A) Anesthetized mouse under the objective lens. (B) A section of dendritic and axonal neural structures (C) time sequence showing physical changes in one small area of the section shown in B, over 30 minutes. Scale bars =1 μm . (S Berning et al. Science 2012;335:551-551).



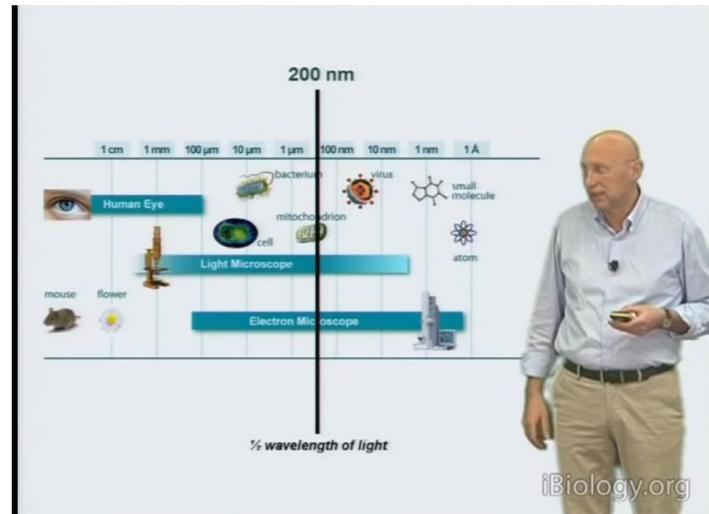
Images STED 2 couleurs



Get further information online



Video
Online



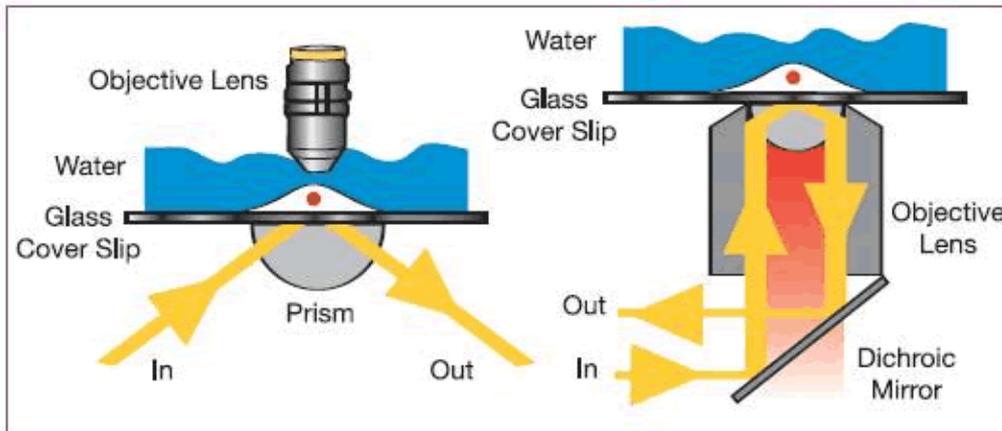
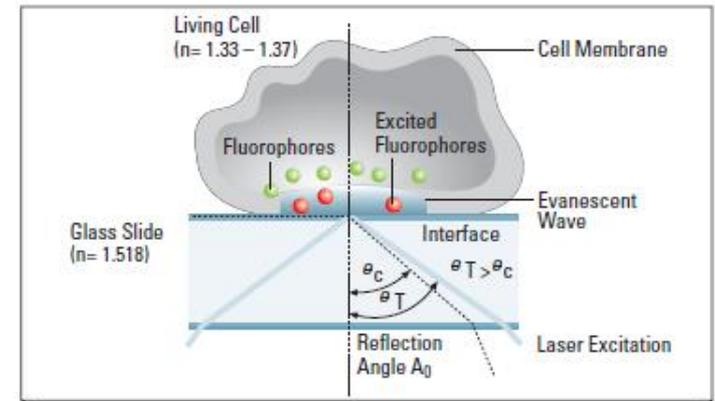
Stefan Hell, nobel Prize in 2014 in Chemistry ‘for the development of super-resolved fluorescence microscopy’, together with the American physicists Eric Betzig and William E. Moerner.

9. Haute résolution pour les observations à l'interface avec la lamelle

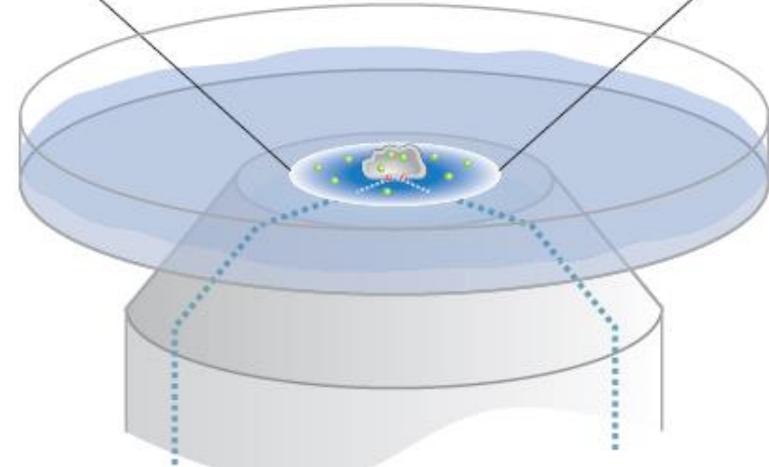
Microscope à onde évanescente ou TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*)



- source d'excitation = laser
- objectif à grande ouverture numérique
- caméra CCD (15 images / sec)
- distance de pénétration de l'onde = 50 à 200 nm



Prism-type TIRFM (LHS) and objective-type TIRFM (RHS)



Les différents modes de microscopie en fluorescence

Fluorescence Imaging Modes in Live-Cell Microscopy

Figure 12

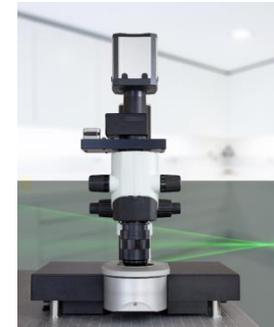
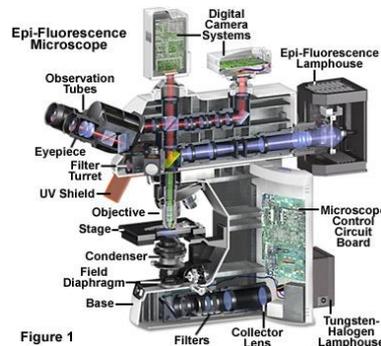
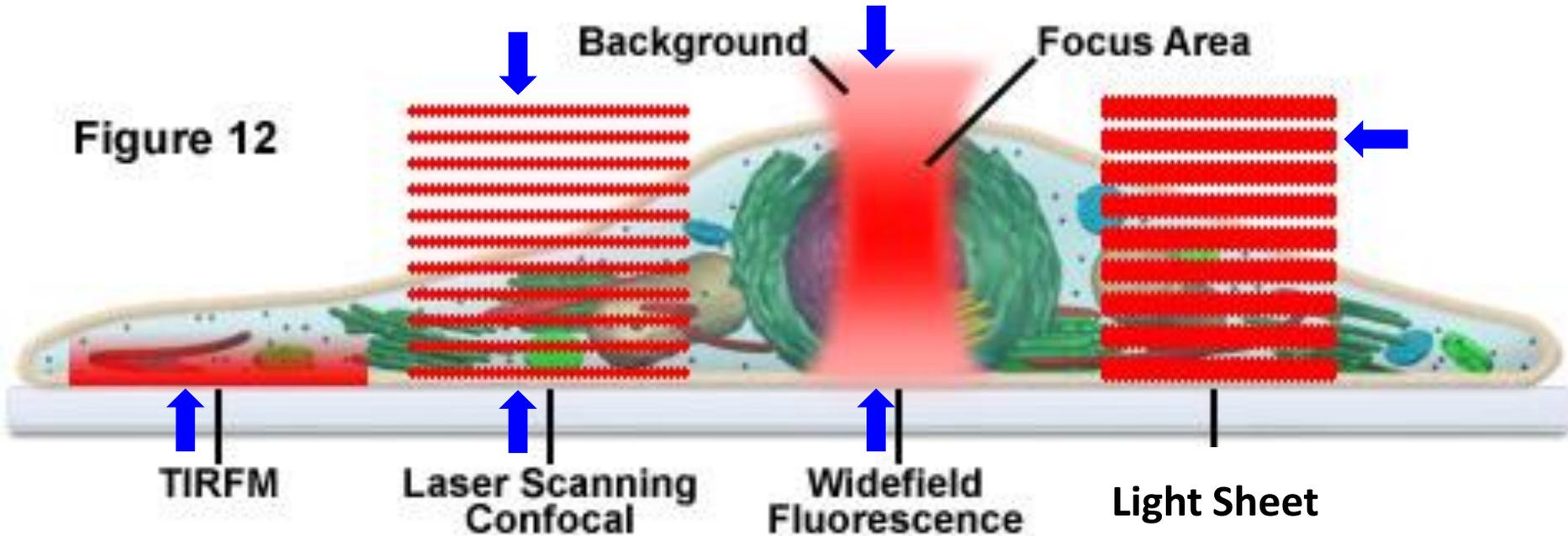


Figure 1

9. Exemple d'application: étude de l'exocytose

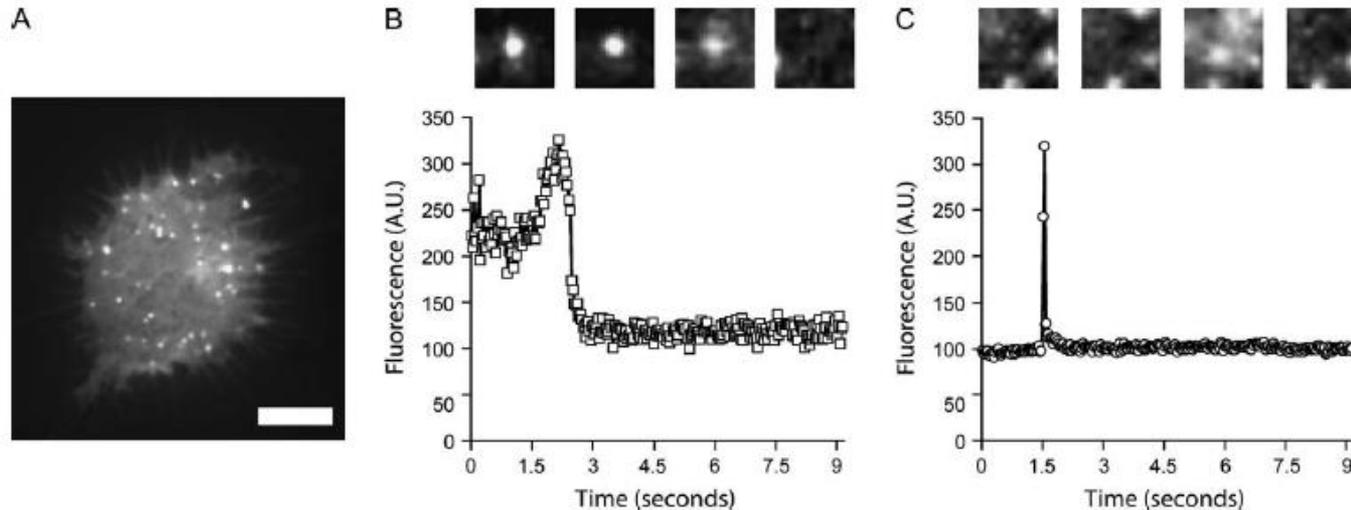
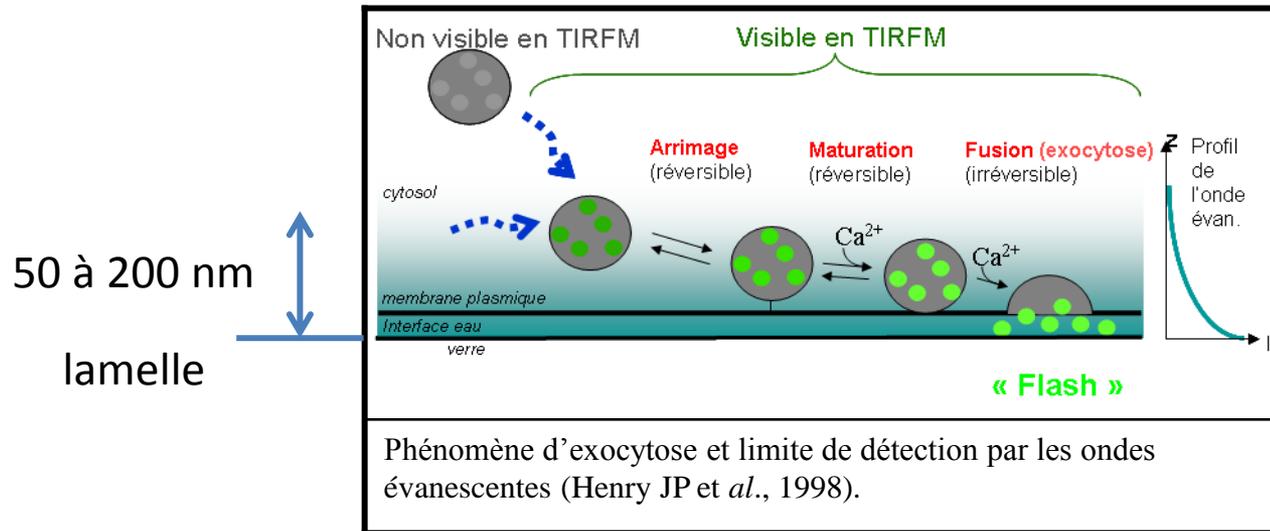


Figure 3: Examples of the fusion of a predocked vesicles and crash fusion of a vesicle not previously visible in the TIRF field.
 A) Embryonic chromaffin cell infected with Semliki Forest virus expressing neuropeptide Y fused to Venus. See Toonen et al. (4) for details. Bar: 5 µm. B) Fusion of a stably docked vesicle upon membrane depolarization using 60 mM KCl (black bar). Images were acquired at 30 Hz. C) Vesicle fusion occurring from a vesicle that was not predocked at the plasma membrane (i.e. was not present in the evanescent field up to 33 milliseconds before fusion). Data were kindly provided by Dr Ruud F. Toonen.

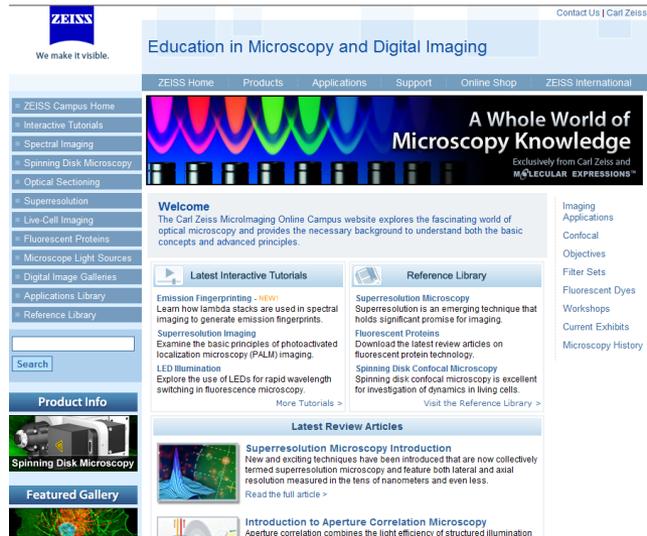
3. ➤ Pour en savoir plus



<http://www.microscopyu.com>



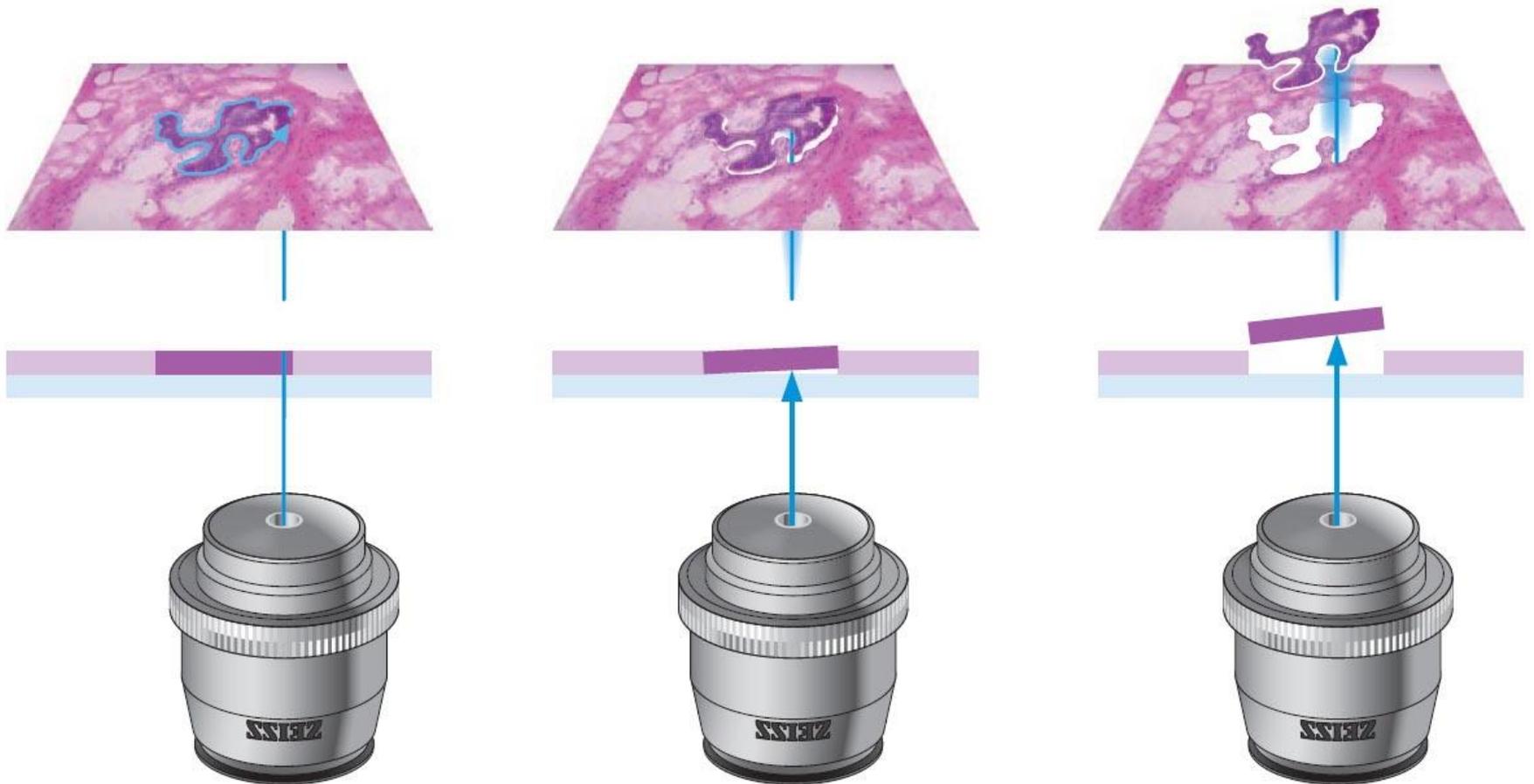
<http://www.olympusmicro.com/>

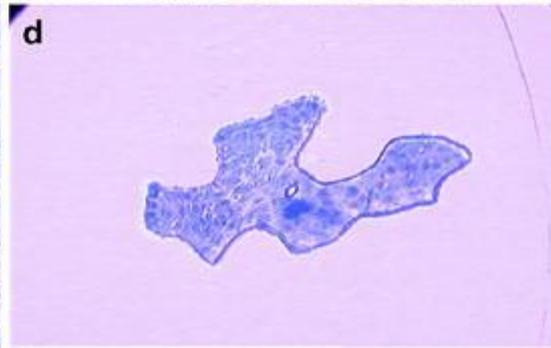
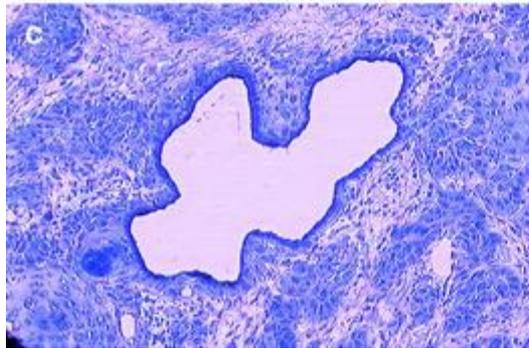
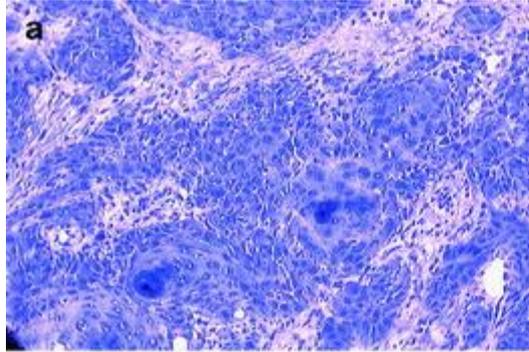


<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>

La microdissection laser

Principe de la microdissection laser





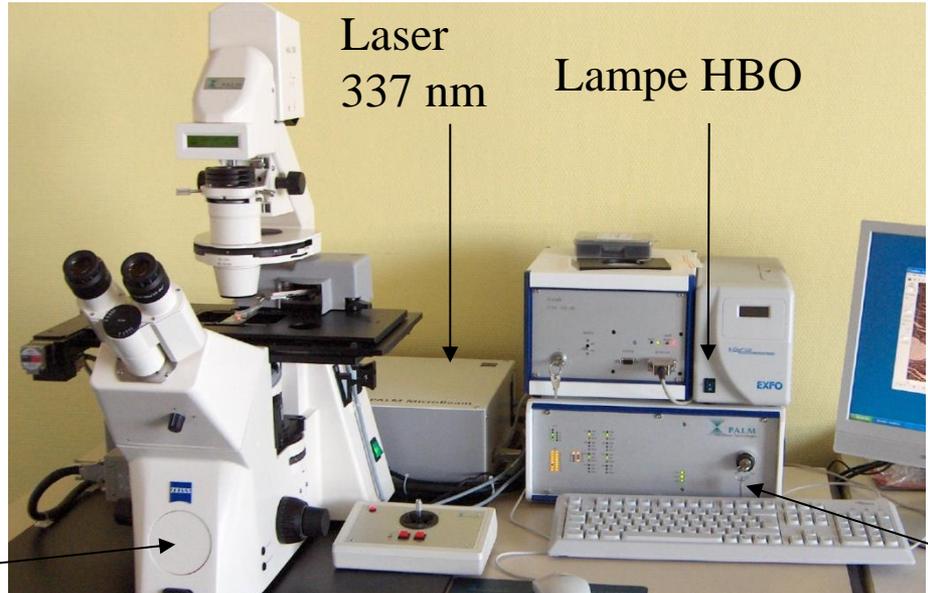
Les microdissecteurs laser

LMD 6500 & 7000

Arcturus XT microdissection



Systeme PALM-Zeiss



Microscope AX 200

Laser
337 nm

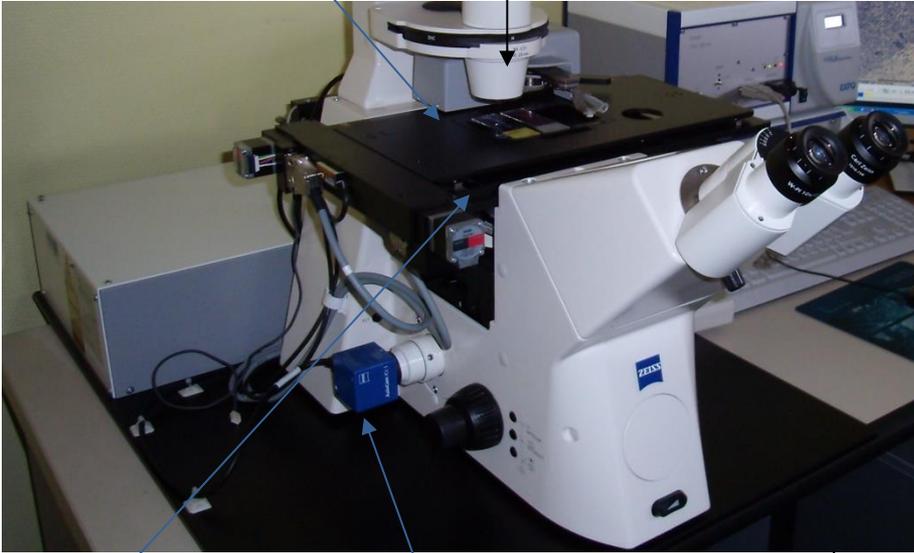
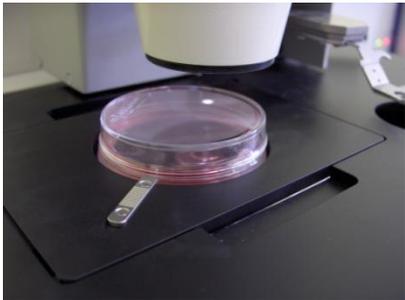
Lampe HBO

Interrupteur du
systeme

La microdissection laser

Insert 3 lames

Porte-tube



Objectifs

Caméra numérique couleur

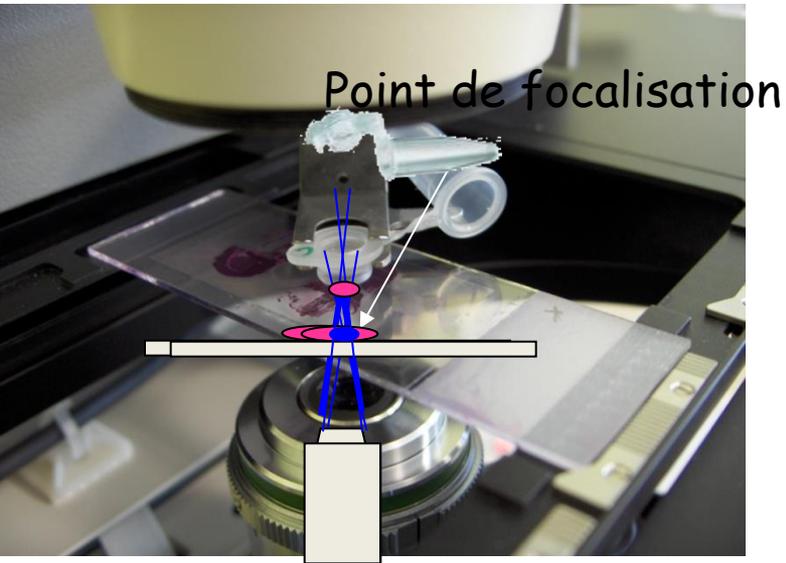
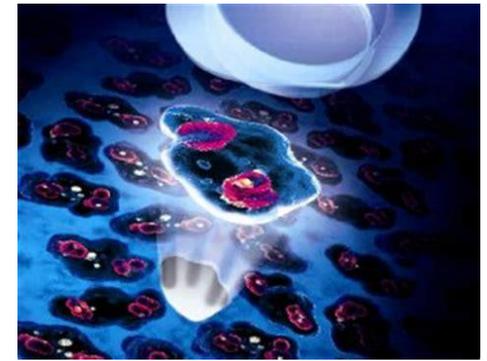
Joystick

Objectifs X5/0.25, X20/0.40, X40/0.6, X63/0.75

La microdissection laser

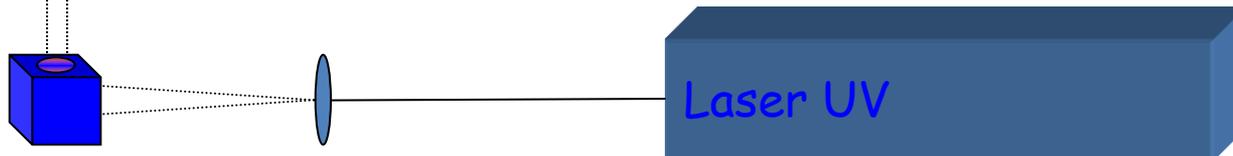
Principe :

Défocalisation du laser permettant le catapultage

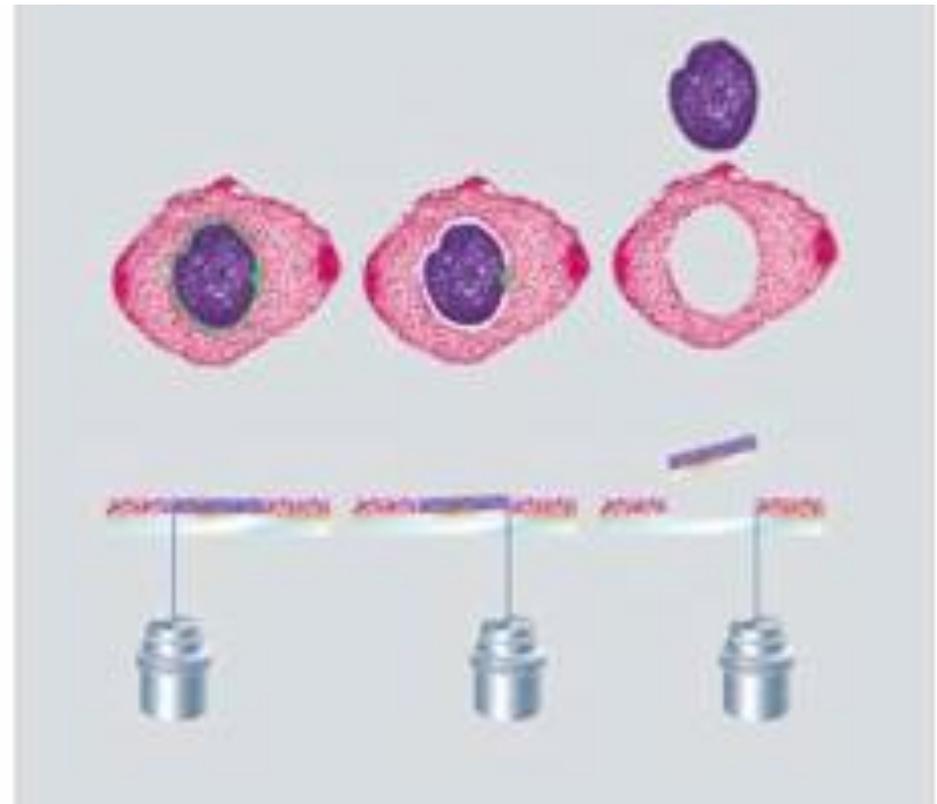
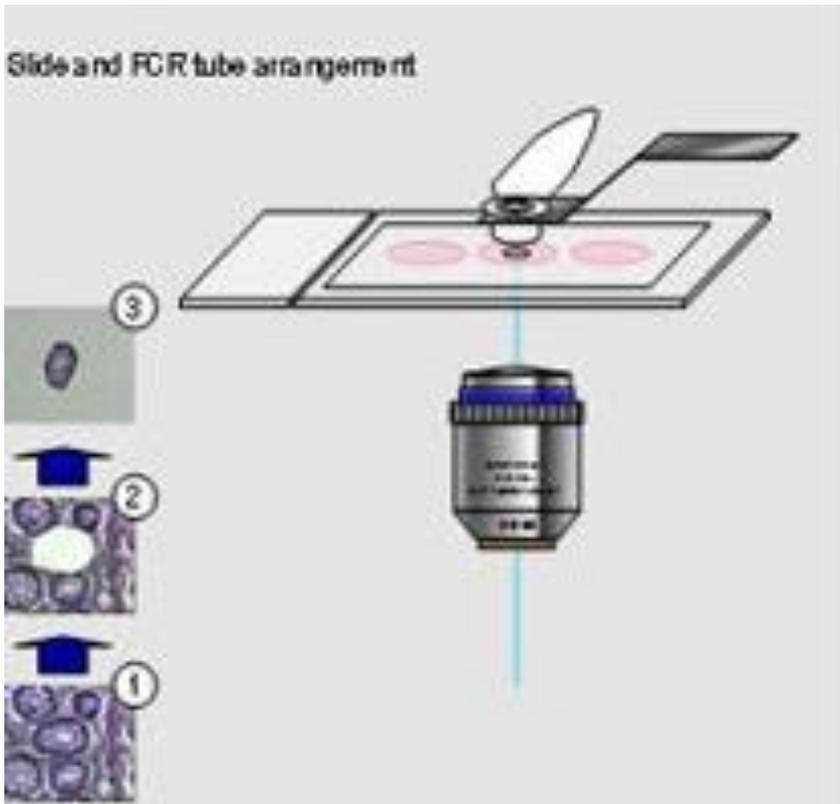


découpe dépend de :

- Laser (focalisation, énergie)
- l'objectif (ouverture numérique de l'objectif employé)
- la position de focalisation du laser
- (la vitesse)
- préparation et des propriétés d'absorption du matériel à prélever = nature et épaisseur du tissu

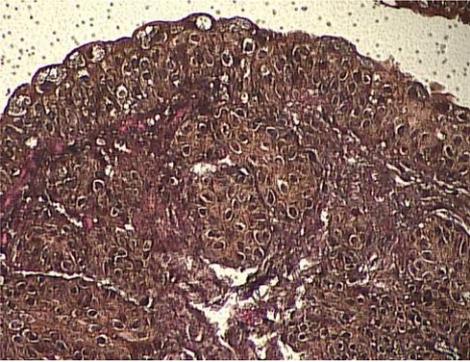


Catapultage par défocalisation du laser



La microdissection laser

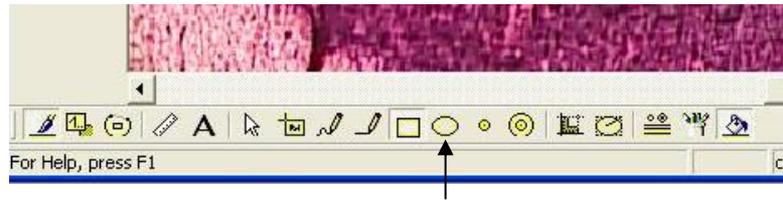
Tissu X20



dessiner la zone



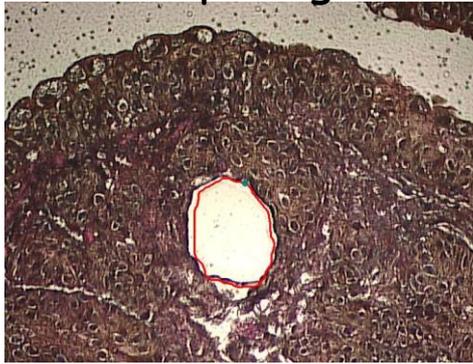
Découpe avec l'objectif X20



découpe



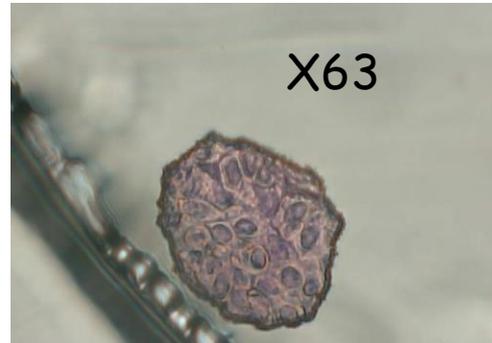
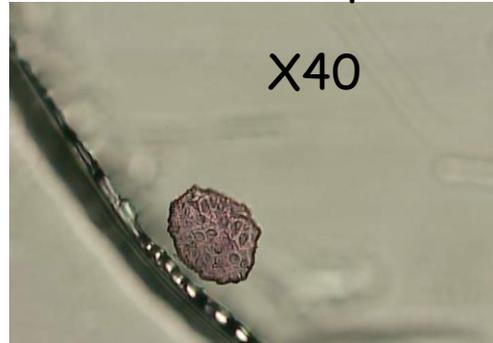
catapultage



Mode de découpe
+ catapultage
« Close, cut et auto LPC »

La platine se déplace afin de réaliser la découpe

récupération du tissu



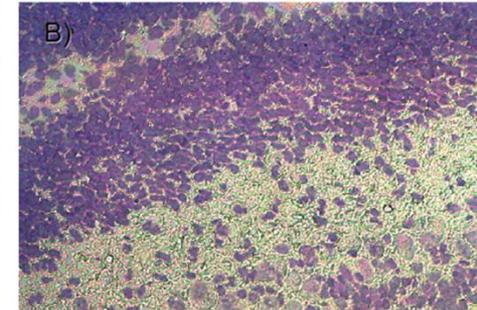
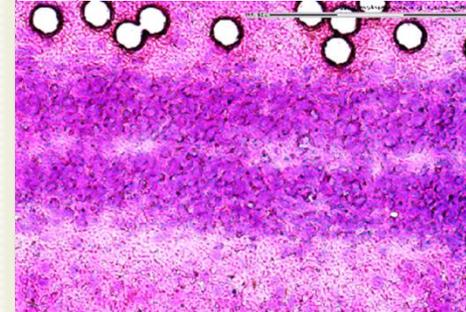
Attention de bien vérifier que l'on catapulte bien dans la goutte !



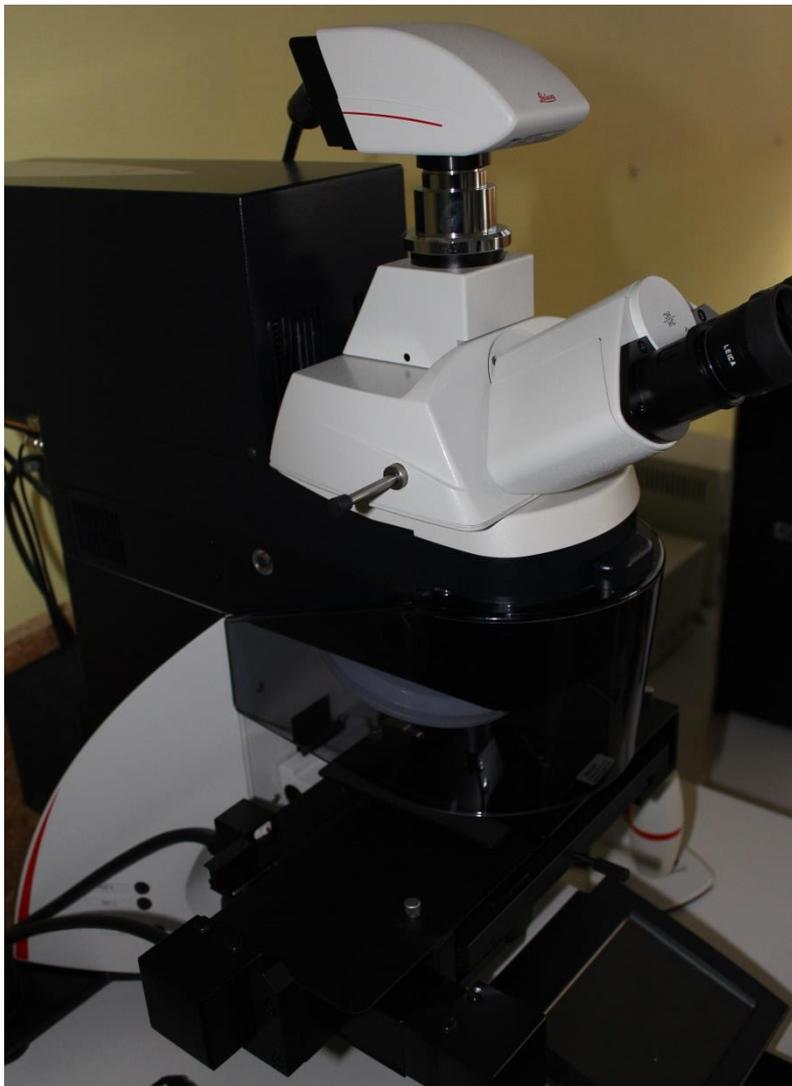
La microdissection laser

Zone – cellule - chromosome

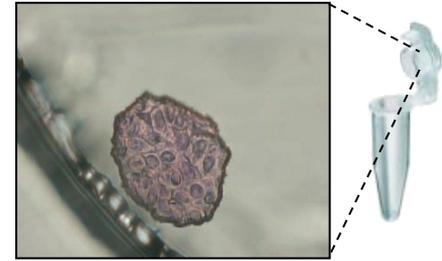
Colorations



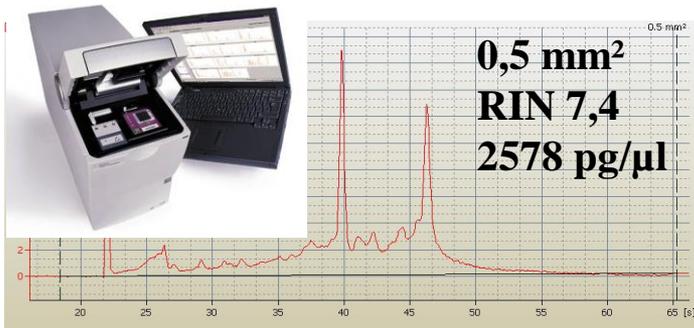
LMD 7000



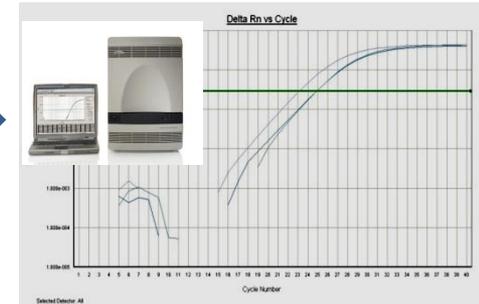
Le workflow de la microdissection laser



ARN + kits spécifiques
(micro quant)



+ SMARTer
Pico cDNA
synthesis

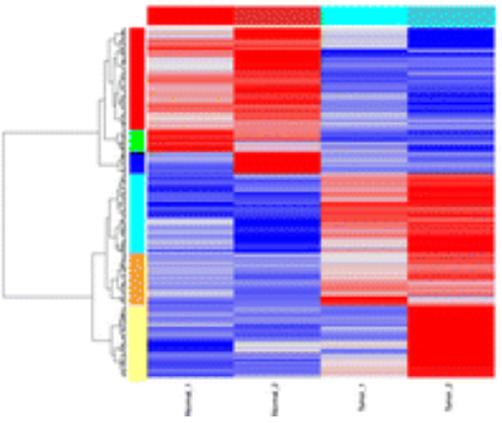
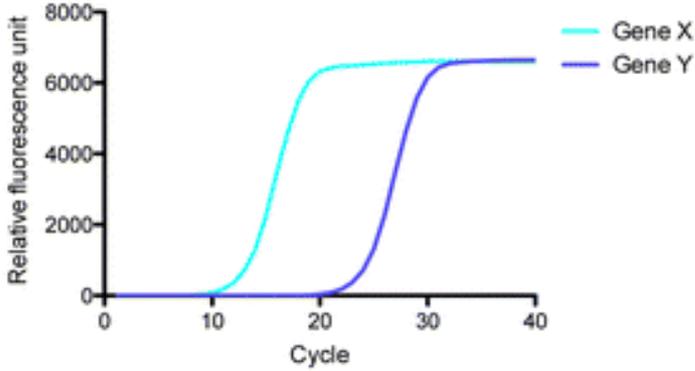
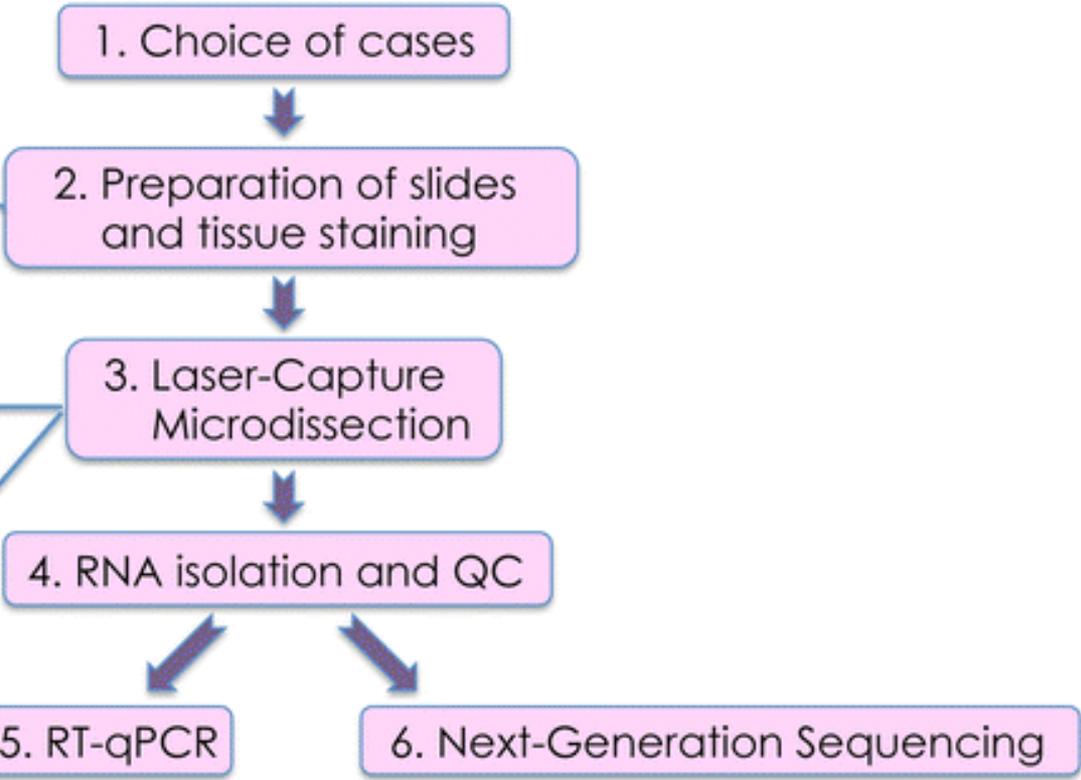
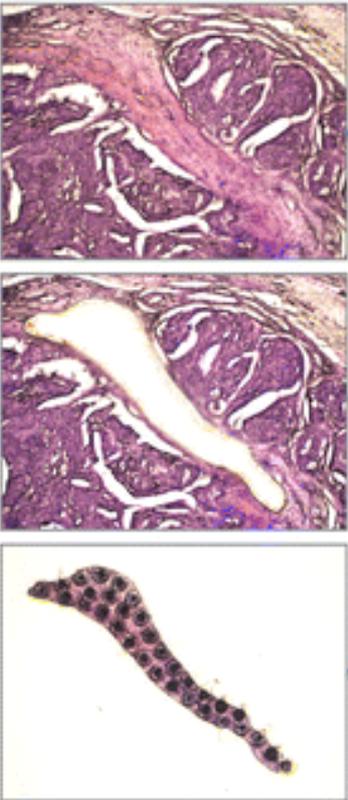


Protein

spectrométrie
de masse



Le workflow de la microdissection laser

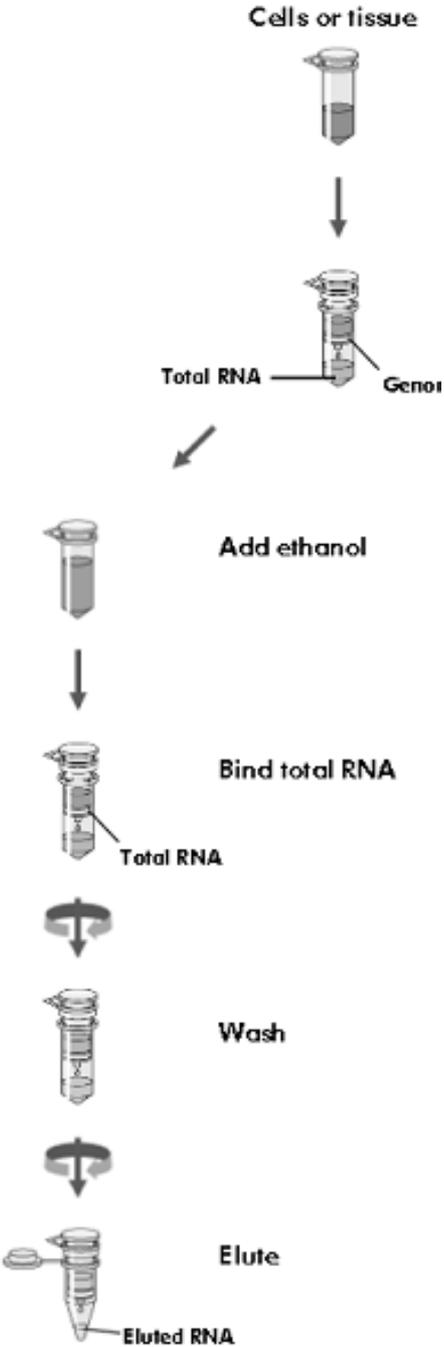
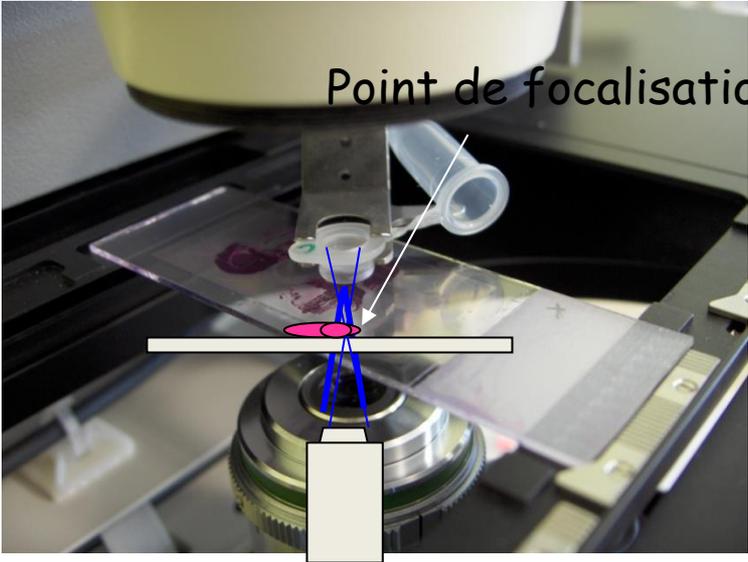


Mise au point des conditions de microdissection laser

Colorants	Découpe	Catapultage	Qualité ARN	Efficacité Q-PCR
Non coloré Non deshydraté	10 à 20 μm	10 à 20 μm +/-	-	-
Non coloré Deshydraté	10 à 40 μm	10 à 40 μm	+++	+++
Bleu de toluidine	10 à 60 μm	10 à 60 μm	+/-	-
Crésyl violet	10 à 60 μm	10 à 60 μm	+++	+
Hématoxyline Eosine	10 à 60 μm	10 à 60 μm	+++	++

Extraction ARN

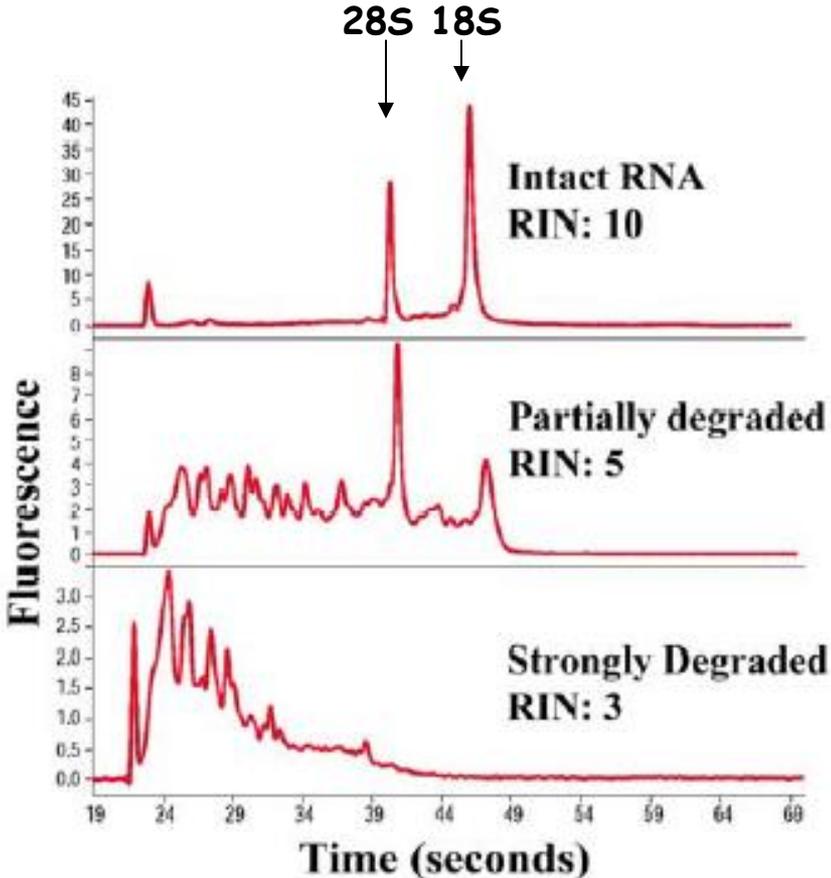
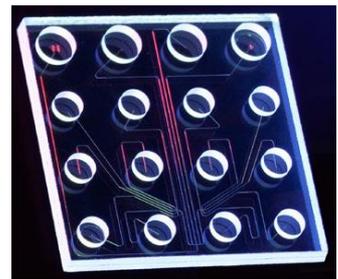
- Qiagen Rneasy micro kit



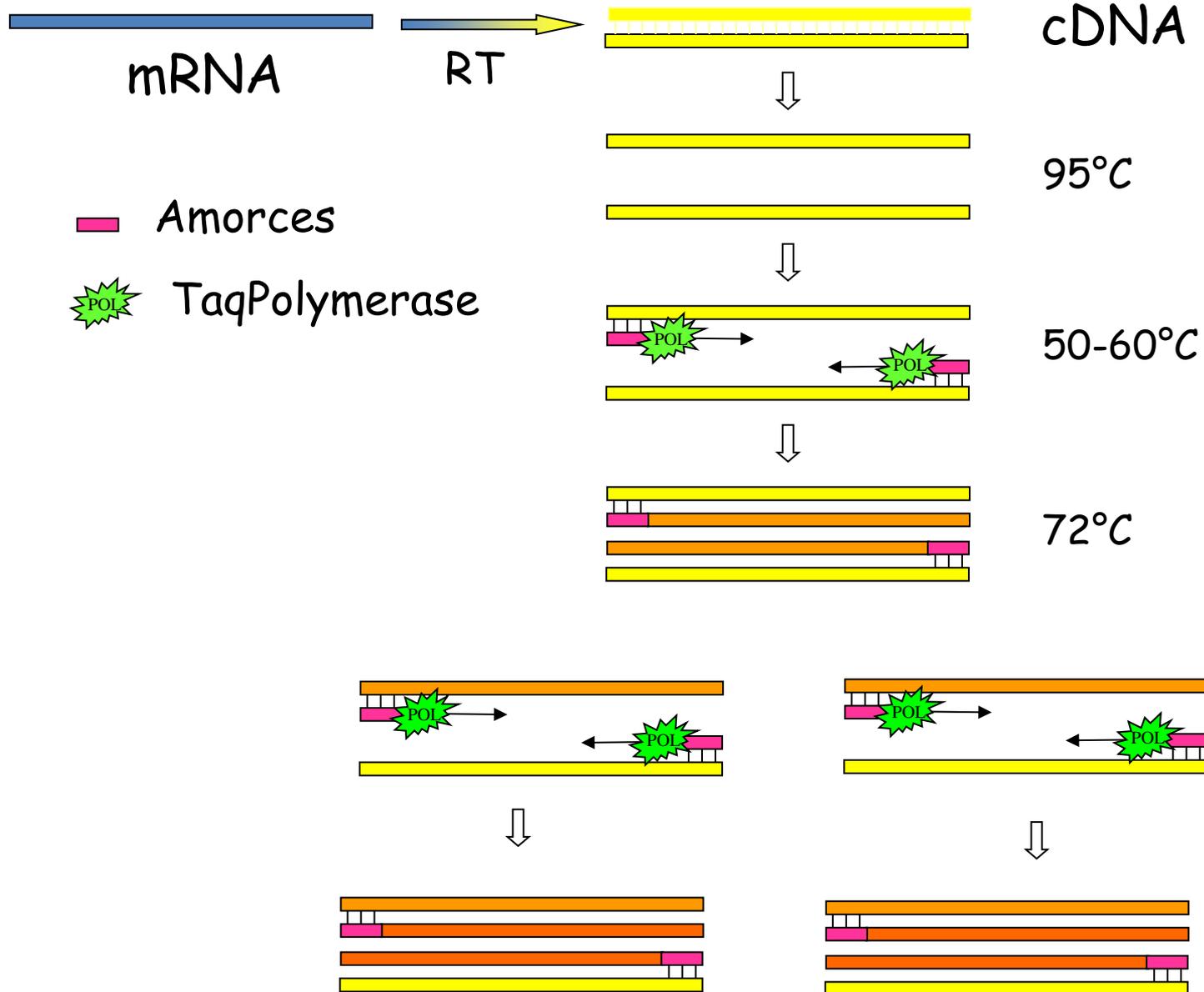
Intégrité des ARN ?



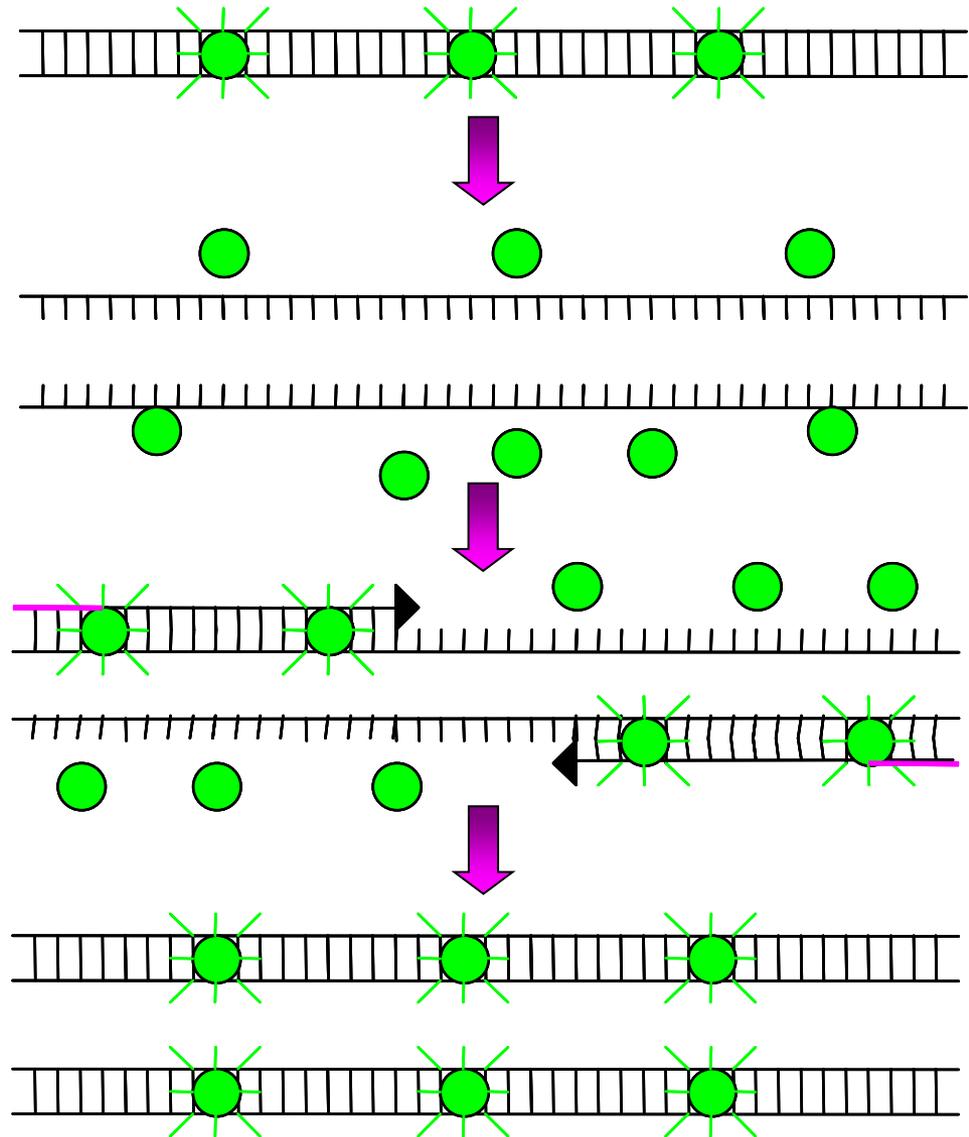
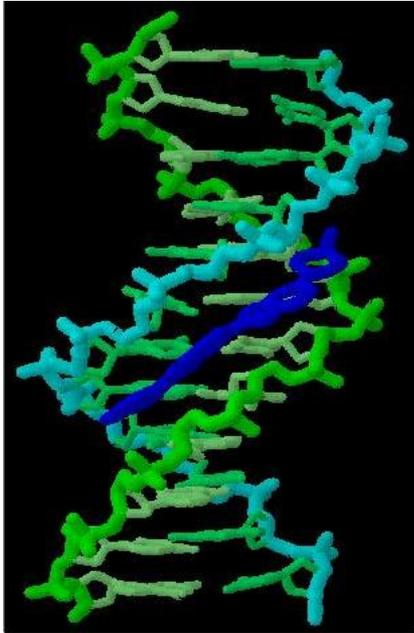
RNA quality



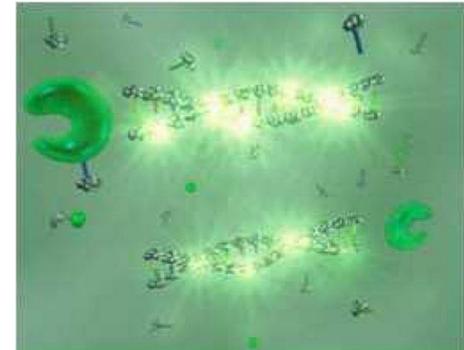
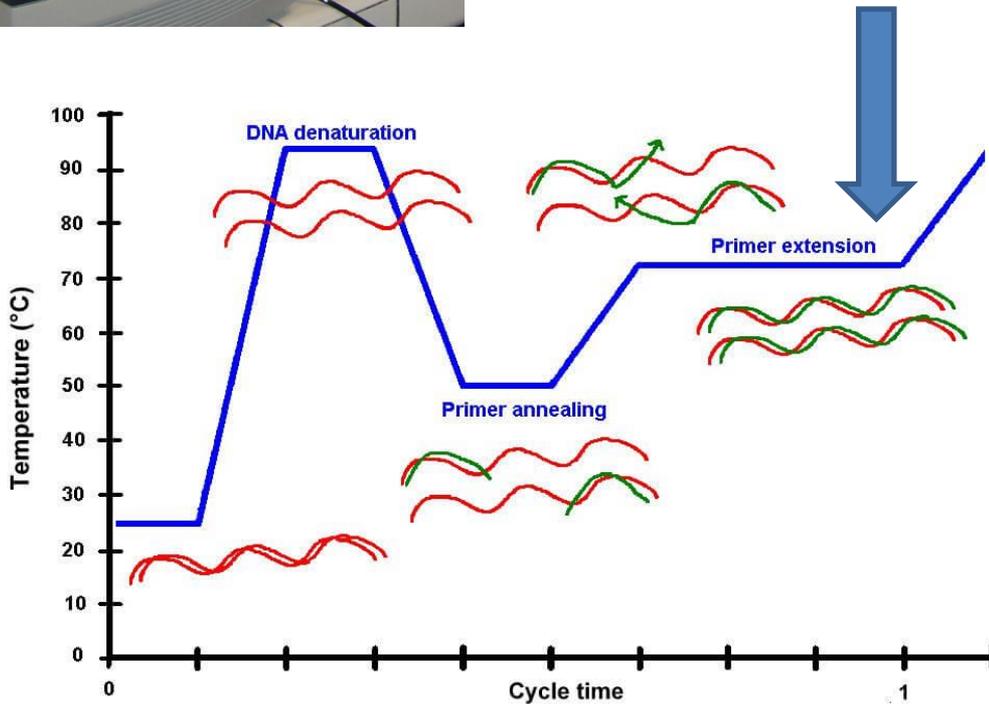
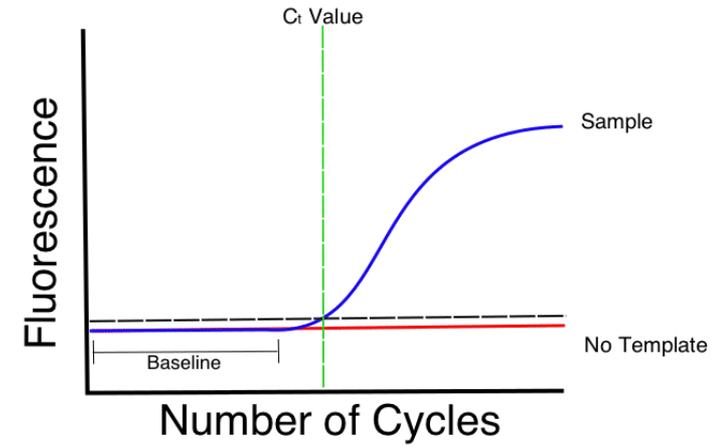
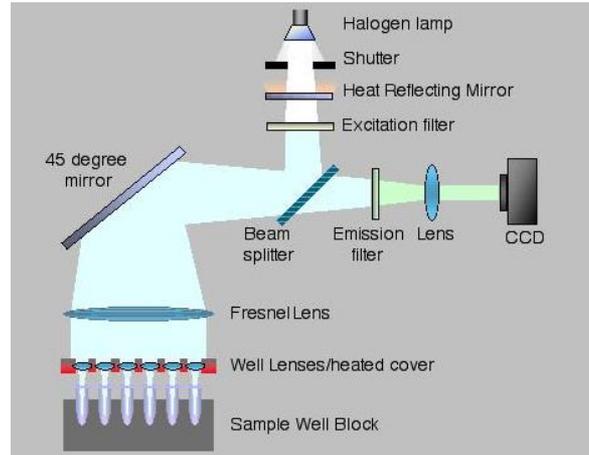
Principe de la PCR



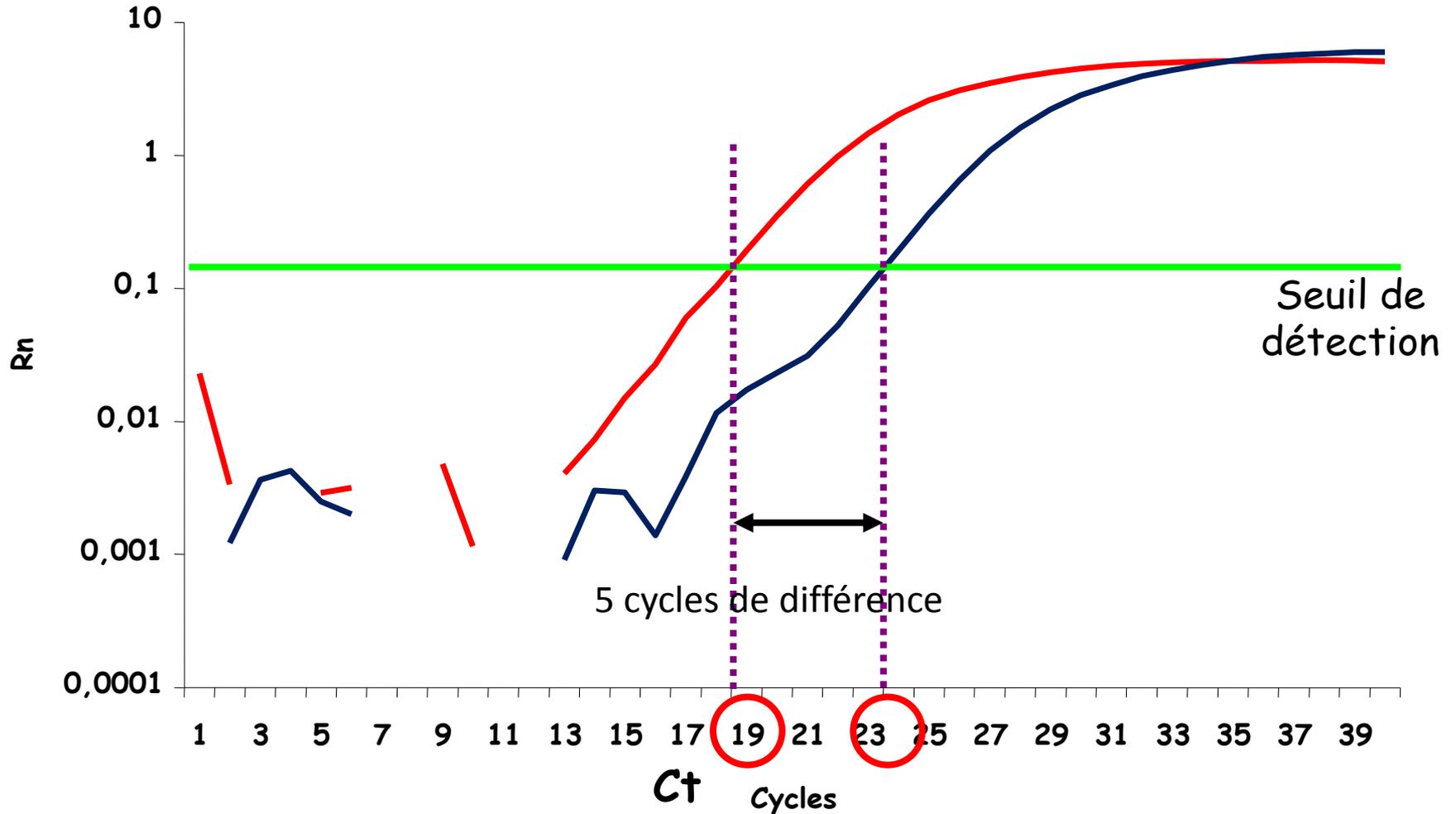
Principe Q-PCR: chimie sybr green



Principe Q-PCR: chimie sybr green

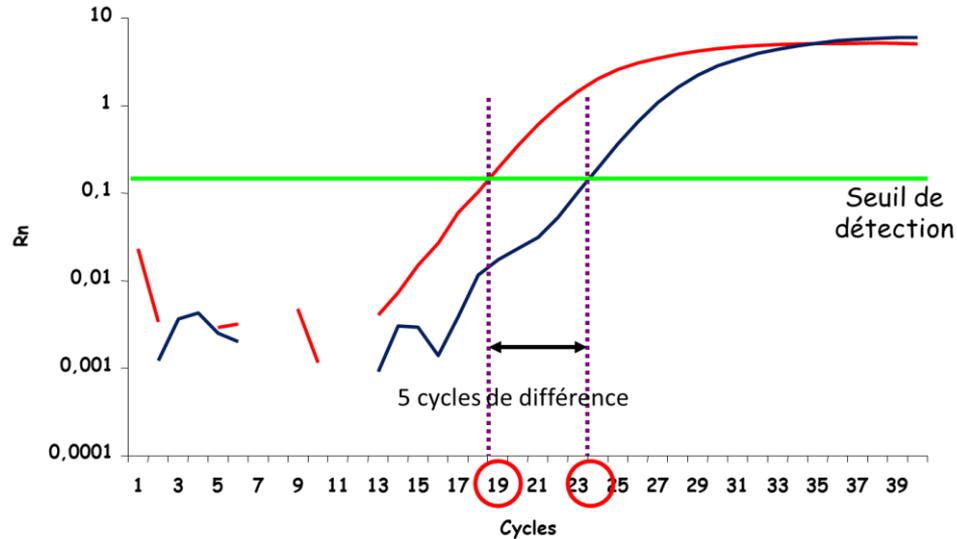


Quantification de la quantité de messagers



Principe Q-PCR: chimie sybr green

Quantification de la quantité de messagers



★ 5 cycles de différence

↪ Quantité multipliée par 2 à chaque cycle

↪ 2^5 (32) fois plus d'ARNm dans le rouge que dans le jaune

Amplification cDNA Protocole SMARTer Pico PCR

cDNA Synthesis Kit - Clontech Cat. No. 634928

First-Strand cDNA Synthesis (reverse transcriptase)

Column Purification of cDNA using NucleoSpin (éliminer les nucléotides non incorporés et les petits fragments d'ADNc (<0,1 kb))

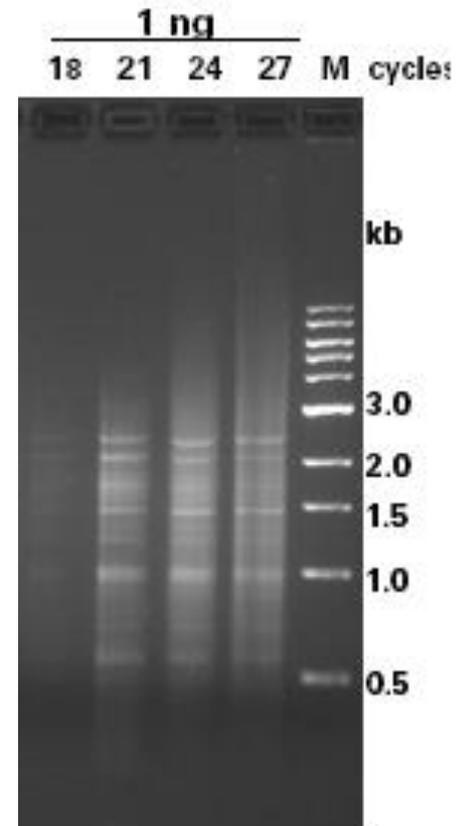
cDNA Amplification by LD PCR (phase d'optimisation du nombre de cycles)

PCR Clean-Up (mesure nanodrop : objectif obtenir 1 à 2 µg d'ADNc après purification)

Table II: Guidelines for Setting Up PCR Reactions

Total RNA (ng)	Volume of Diluted ss cDNA* for PCR (µl)	Volume of H ₂ O (µl)	Typical Optimal No. of PCR Cycles*
1000	2.5	77.5	18-20
250	10	70	18-20
100	25	55	18-20
50	40	40	18-20
20	80	none	19-21
5	80	none	21-23
1	80	none	24-27

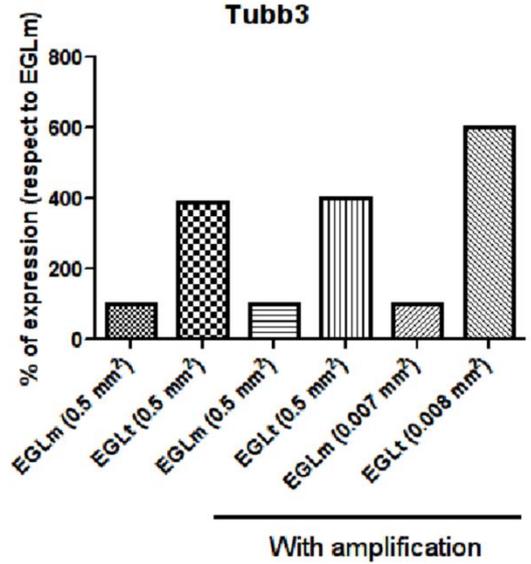
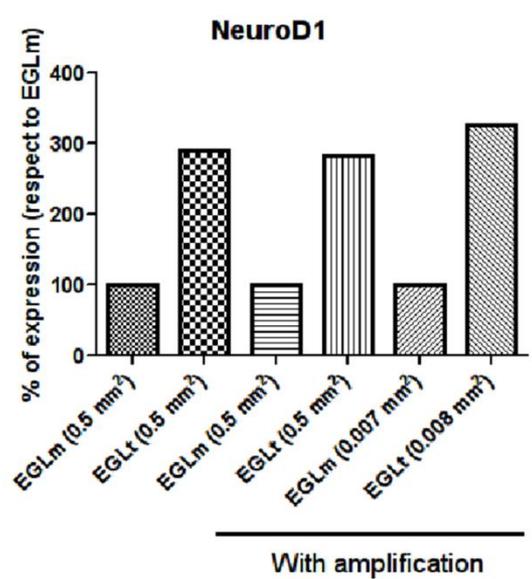
Plateau obtenu à partir de 27 cycles pour 1 ng d'ARN total de foie de souris avec un smear qui apparaît ensuite dans les hauts poids moléculaires. Le nombre de cycles optimal est donc de 24 pour 1 ng



Exemples de données près amplification

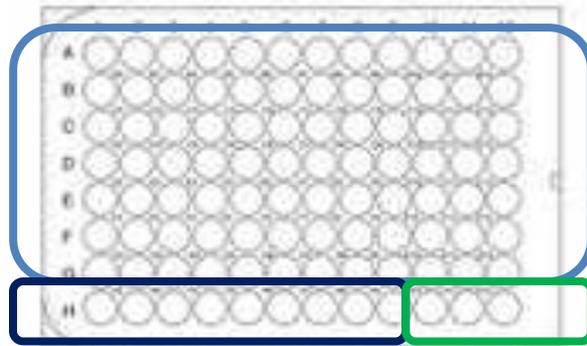
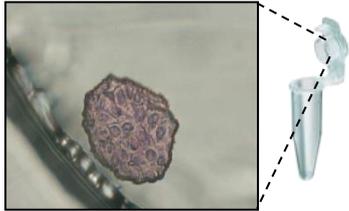
Layer microdissected	RNA (ng)	Amplification	cDNA (ng)
EGLm (0,50 mm ²)	13,5	→	300
EGLt (0,54 mm ²)	8,5	→	205
EGLm (0,0074 mm ²)	0,2 (aprox.)	→	395
EGLt (0,0083 mm ²)	0,15 (aprox.)	→	165

} ≈ 100 cellules

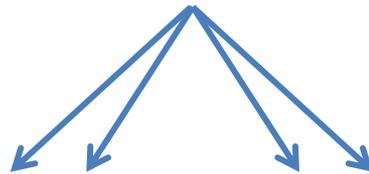


The expression profile of Neurogenic differentiation 1 (NeuroD1) and tubulin beta 3 (Tubb3) is maintained in the cDNA amplification of a big area of microdissected tissue (0,5 mm²). A) Quantity of RNA before the RT-PCR and the quantity of cDNA after the amplification protocol (18 PCR cycles for an area of 0.5 mm² and 21 PCR cycles for an area of 0,007 mm²). B) qPCR of the non amplified and amplified cDNA of the microdissected granule cells was analysed using GAPDH as a reference gene.

Couplage microdissection laser et Q-PCR au débit



X 4



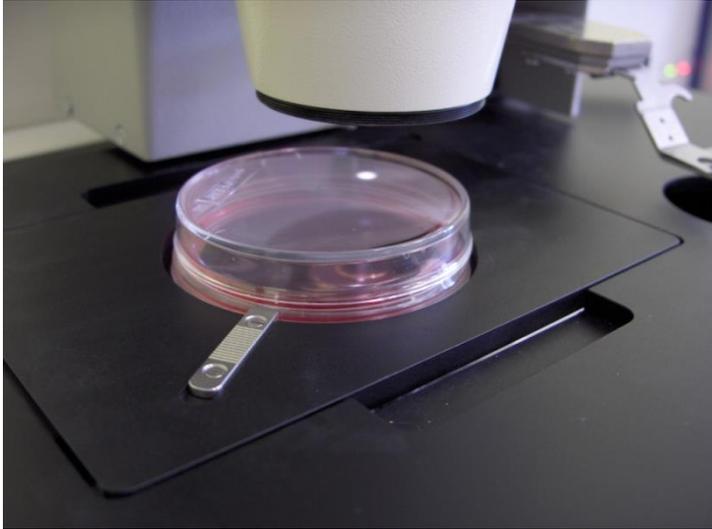
Exemples de panels disponibles:

- Stress oxydatif rat & souris
- Cycle cellulaire rat
- Ischémie souris
- Inflammation souris
- Angiogénèse souris

...

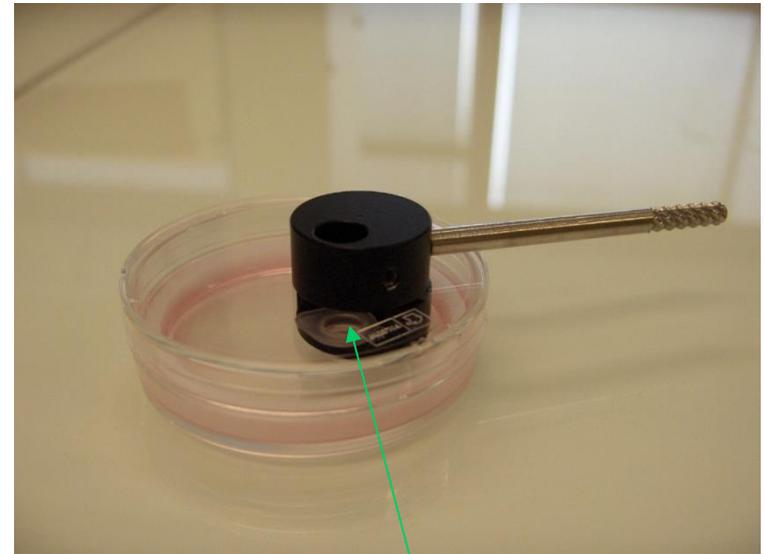
Cellules en culture

Destruction de cellules ou clonage



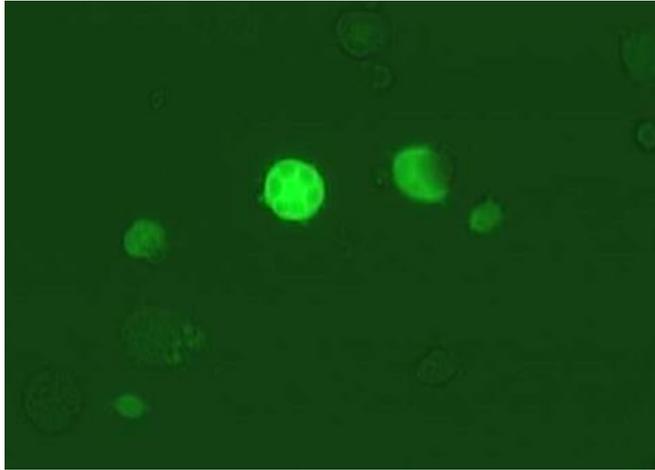
Support suitable for
cultured cell

PALM or
classical Dishes can be used

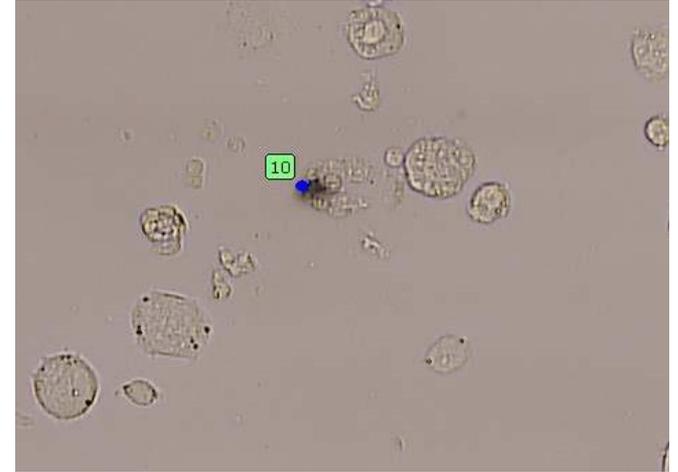


Cells are
harvested in
cap after
capatulting

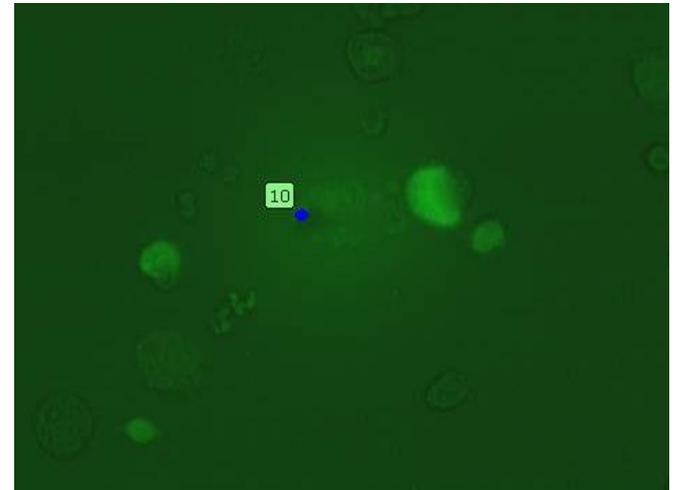
Cellules en culture



→
Laser pulse



Transmitted light



Fluorescence light (green)

Quelques points importants

- Morphologie du tissu
- Coloration
- Préservation des ARN
- Kits d'amplification...

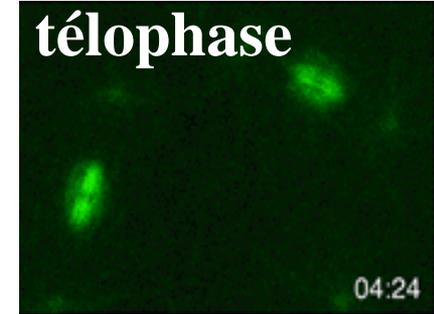
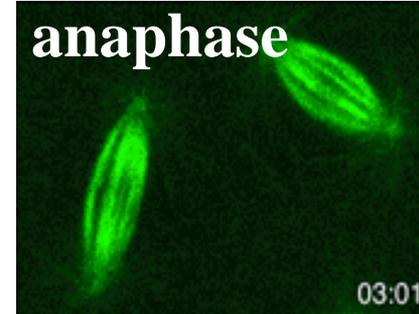
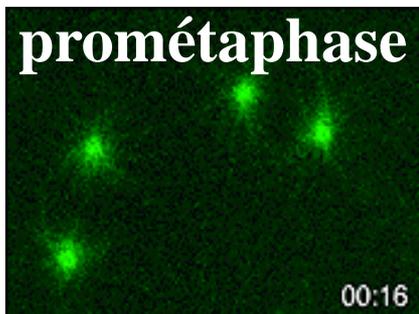
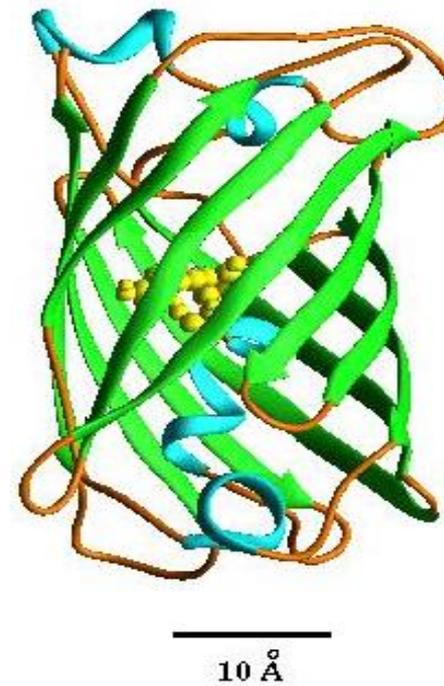
Les F-techniques

1. Etude de l'expression de la GFP

- ◆ protéine naturellement fluorescente
- ◆ protéine résistante au photo blanchiment
- ◆ petite taille (238 aa)
- ◆ λ_{ex} et λ_{em} proches du FITC
- ◆ méthode non-invasive



Variants

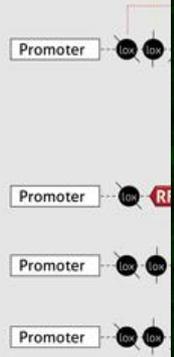


1. Etude de l'expression de la GFP

Les sou

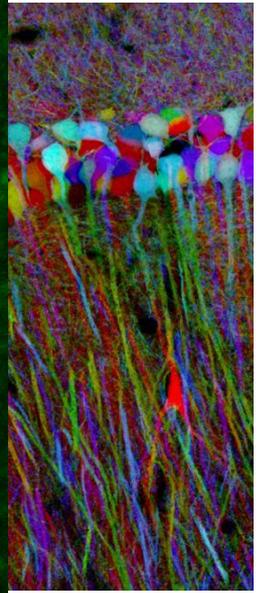
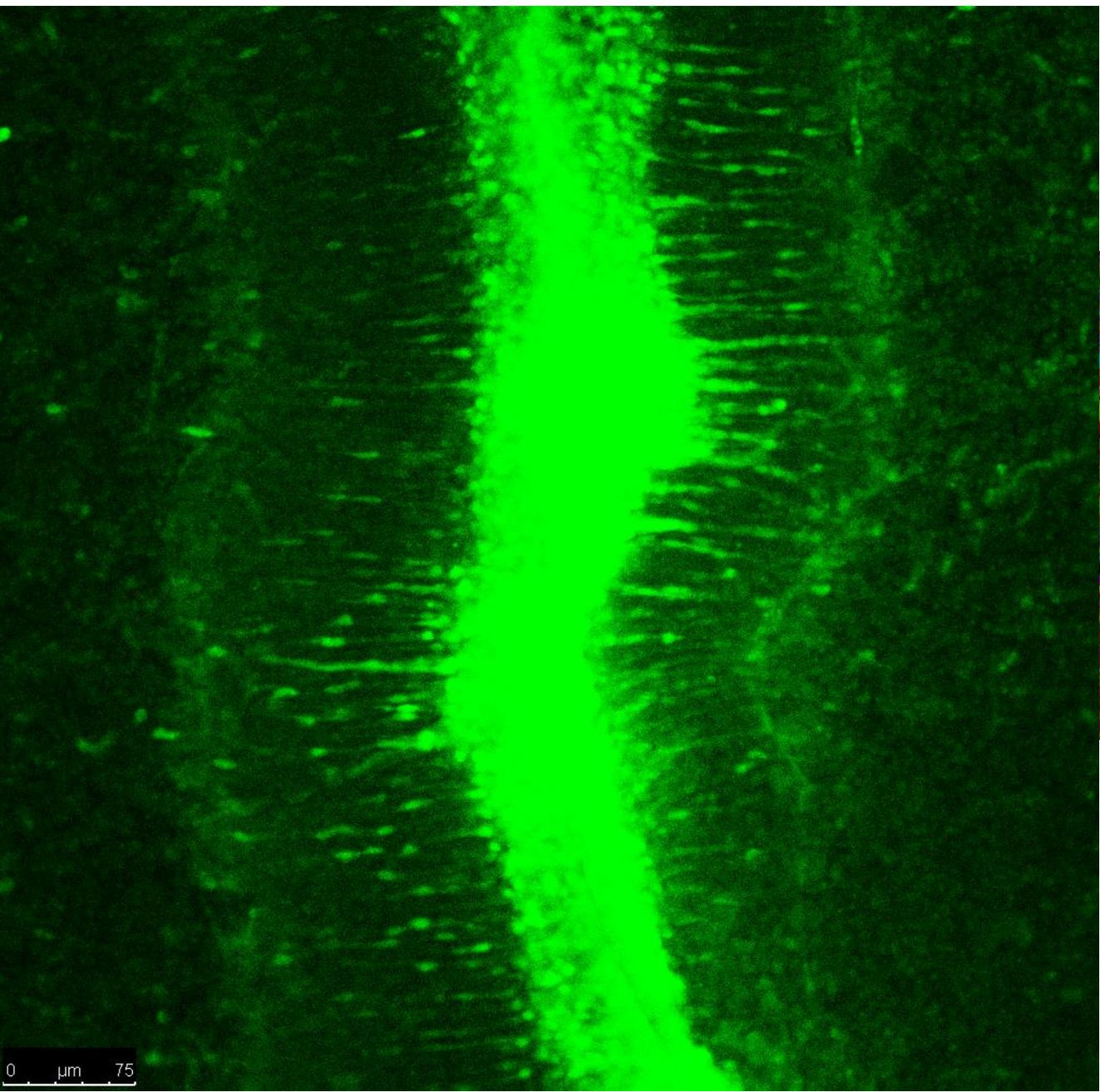
◆ Expr

Basic Genetic

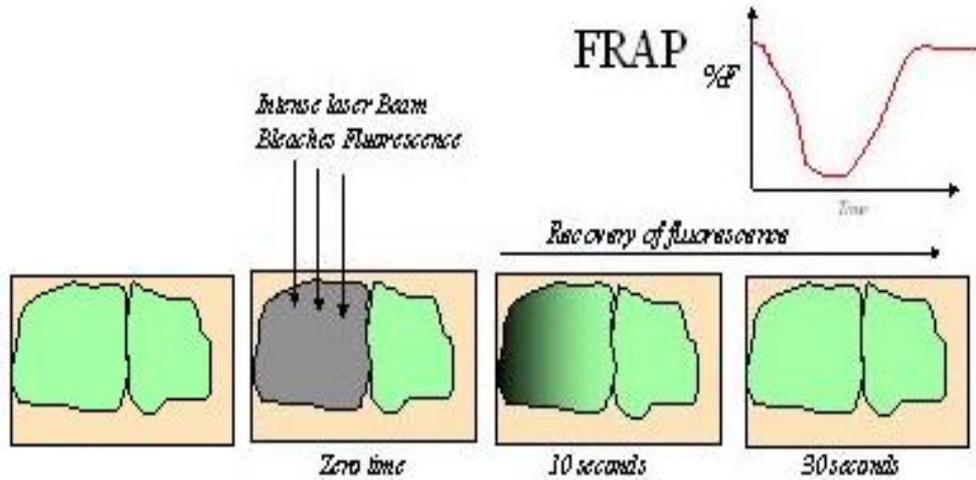


Building Br

Three copies of the g



2. ➤ Le FRAP



Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) with Green Fluorescent Protein

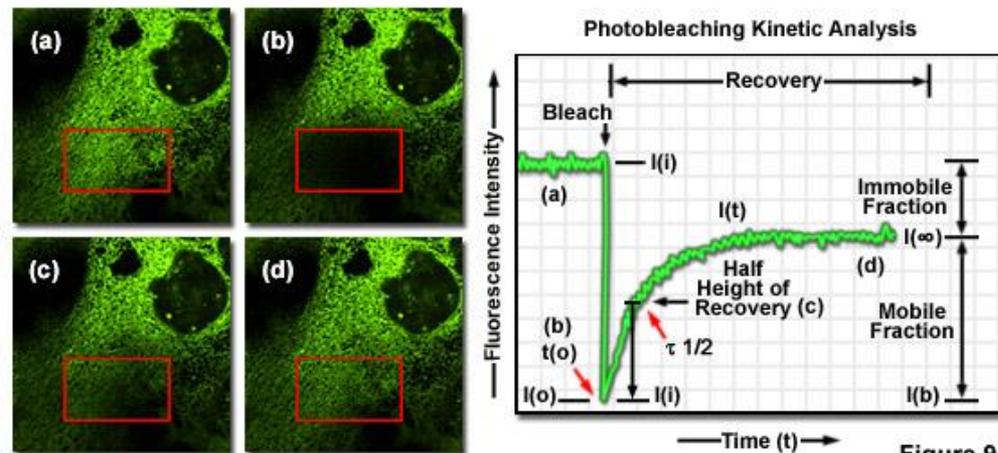
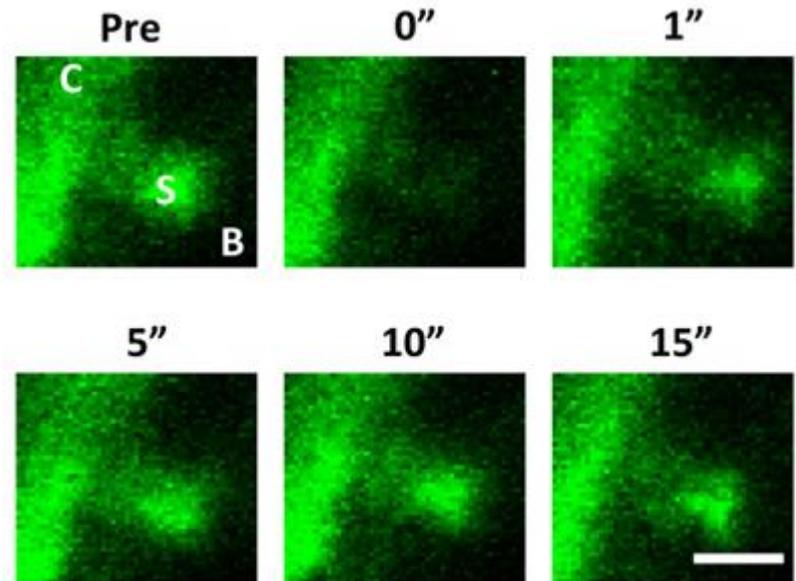


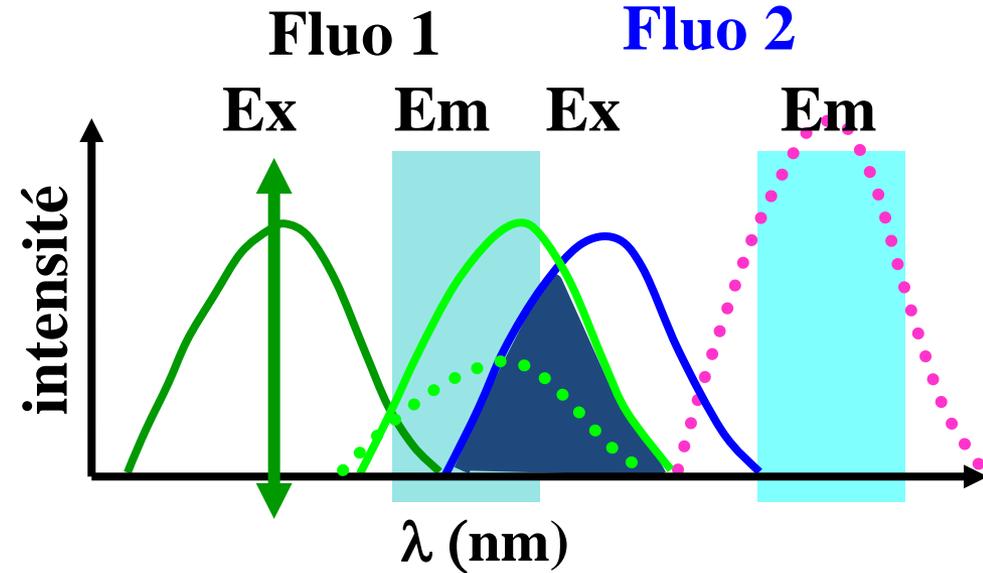
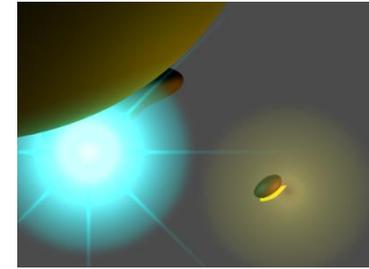
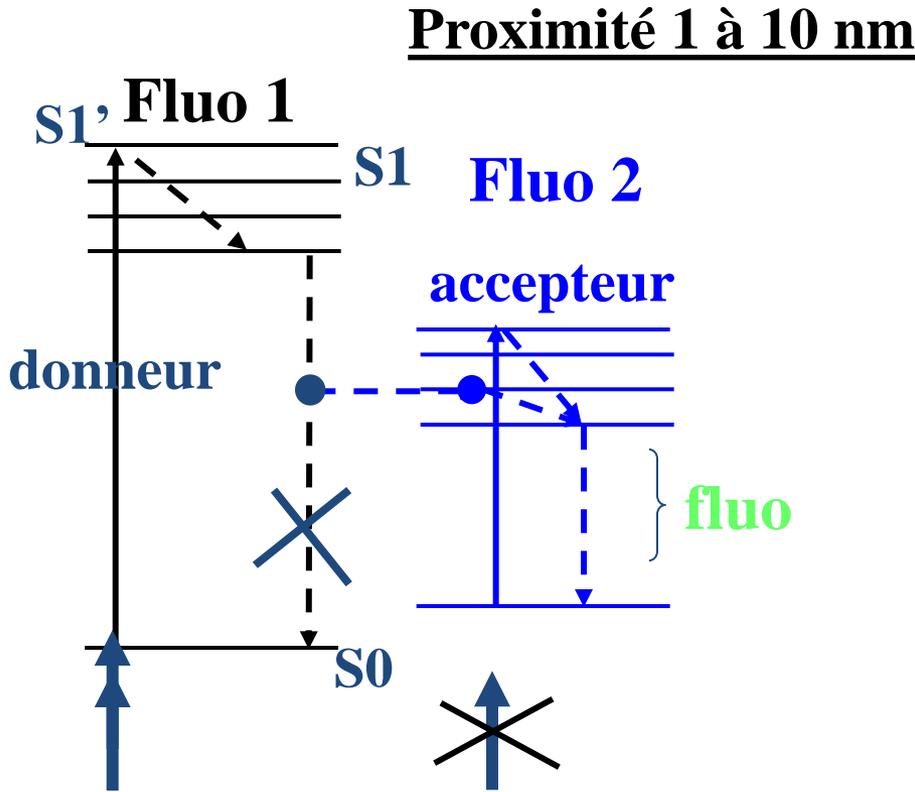
Figure 9



FRAP of Fluorescence Tagged Proteins in Dendritic Spines of Cultured Hippocampal Neurons

3. ➤ Recherche d'associations par le FRET

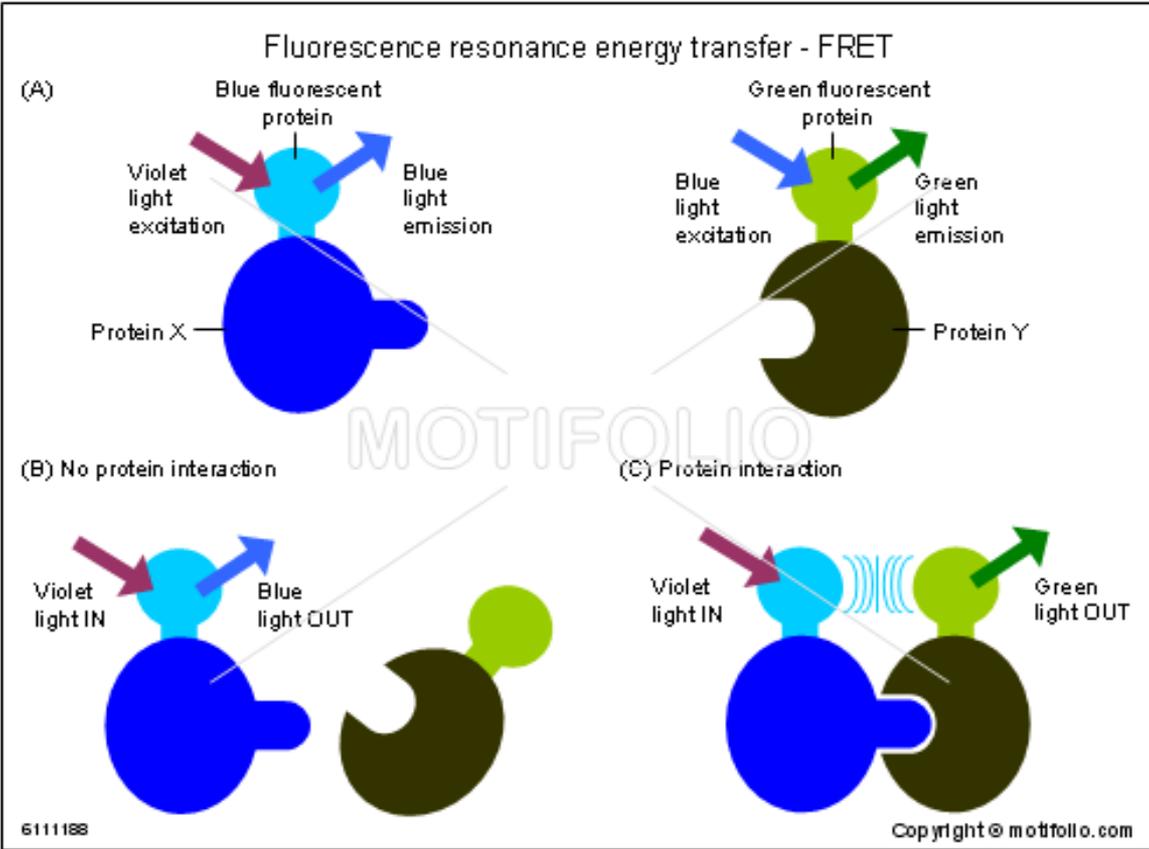
◆ Principe



◆ Applications

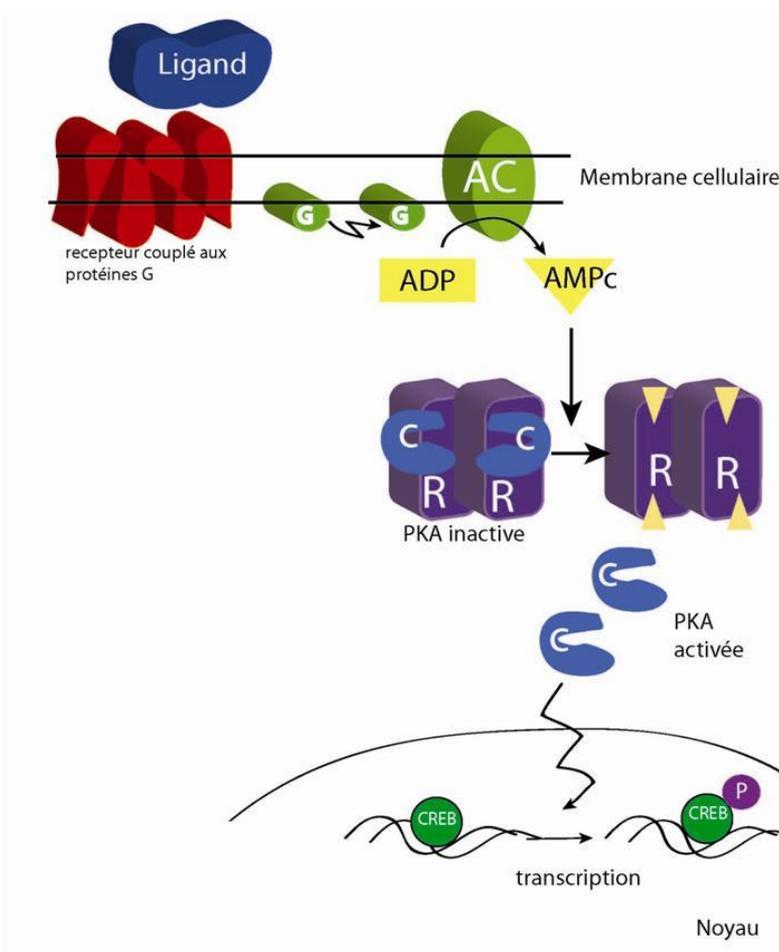
Intéraction ligand / récepteur ou formation dimères (Bcl-2/Bax) :
- protéines de fusion BFP/YFP

3. ➤ Recherche d'associations par le FRET

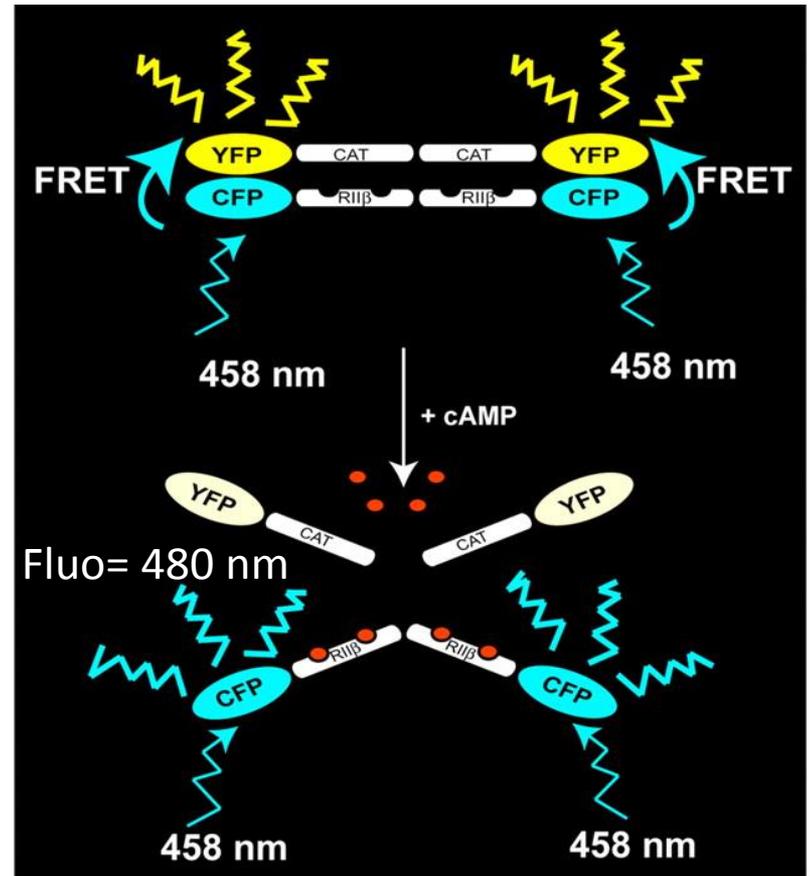


3. ➤ Recherche d'associations par le FRET

Mesure AMPC

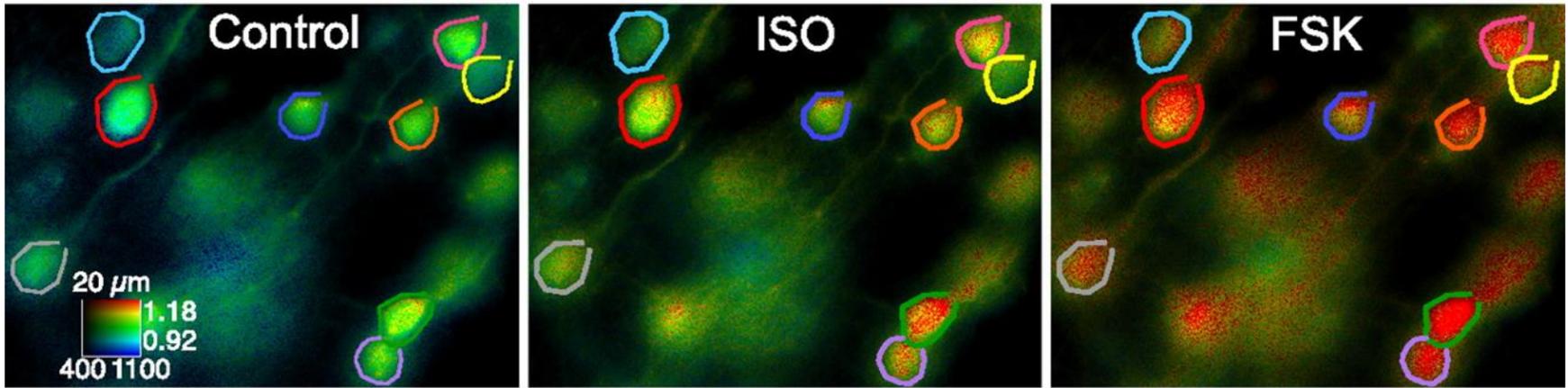


Fluo= 535 nm

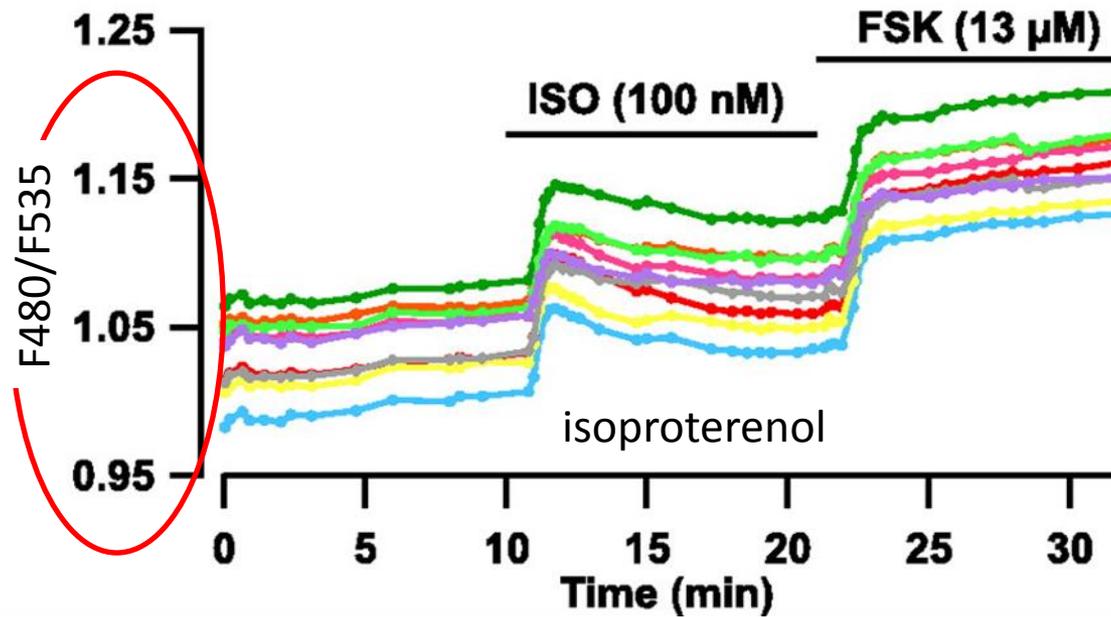


β -adrenergic receptor stimulation activates PKA in the parietal cortex.

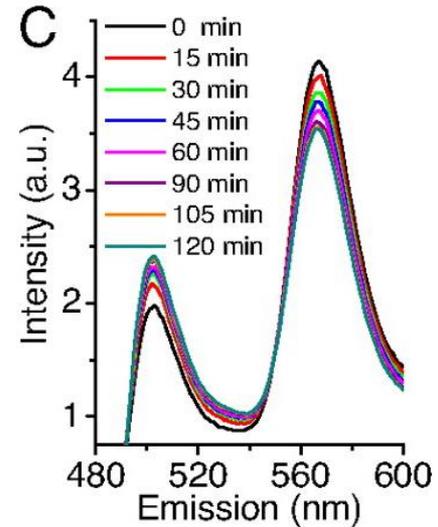
A



B



C



VI. Informations complémentaires

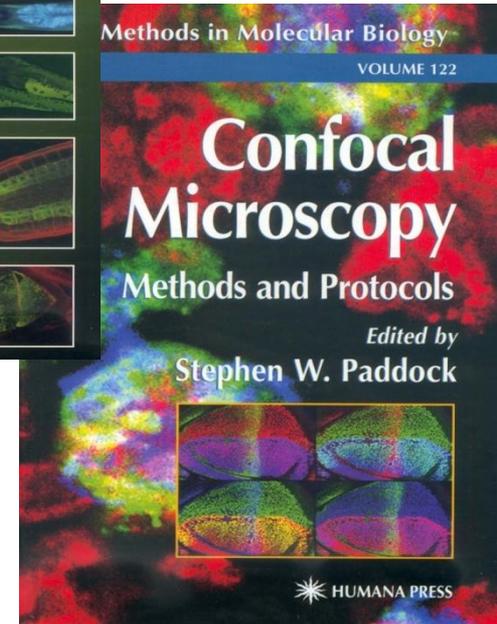
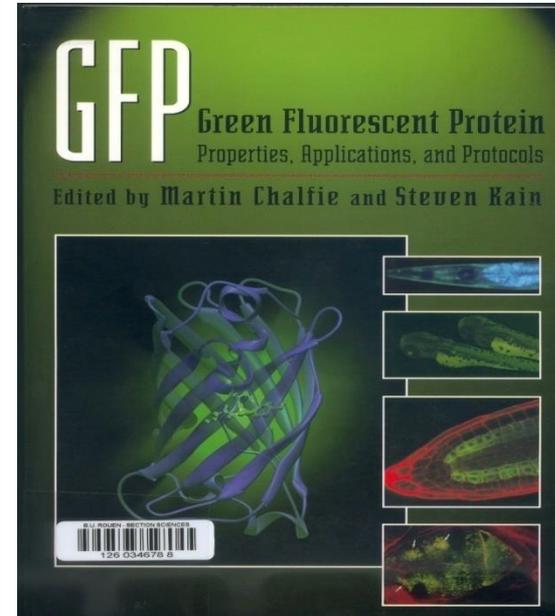
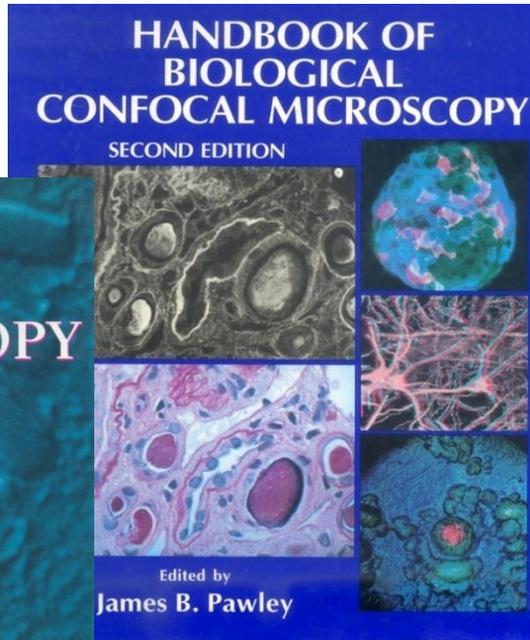
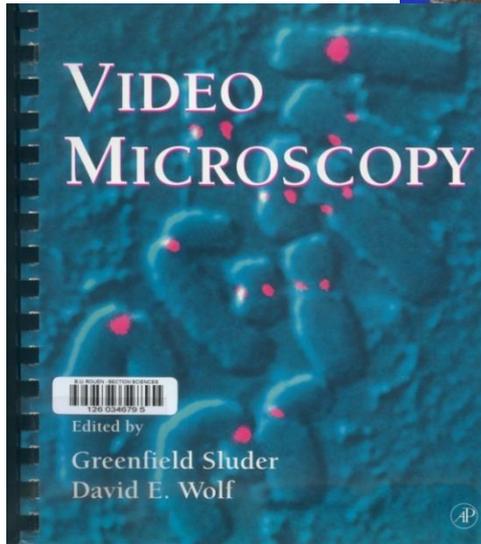


Plate Forme et bibliothèque UFR des Sciences

- L'imagerie par Christian Cognard dans Biofutur n°180 juillet-août 1998
- Handbook of Confocal Microscopy, par James B. Pawley, plenum press - NY and London
- Confocal microscopy, methods and protocols, par Stephen W. Paddock, Humana press - Totowa

Internet

- Molecular probes (sondes fluorescentes + tutorials): <http://probes.invitrogen.com>
- Molecular dynamics: www.mdyn.com/application_notes/applications.htm
- Leica (constructeur): www.leica.com
- Zeiss (constructeur): www.zeiss.com
- ~~Bio-Rad (constructeur): www.bio-rad.com~~
- Nikon (constructeur): www.nikousa.com
- Olympus (constructeur): www.olympus.com
- PerkinElmer (constructeur): www.wallac.fi

