A013-Comparing multicolor Single-Molecule Localization Microscopy strategies: Application to the neuronal cytoskeleton

Christophe Leterrier (christophe.leterrier@univ-amu.fr) Karoline Friedl (karoline.friedl@etu.univ-amu.fr)

Abstract : Pathology in neurons often goes hand in hand with the loss of cell structures that facilitate plasticity and compound transport. Furthermore, the requirements for these scaffolds are quite peculiar: on the one hand, the architecture of neurons must be stably maintained, on the other hand neurons have to allow for cellular plasticity and flexibility. In the NeuroCyto team, we are particularly interested in the organization and functions of axonal actin. The actin cytoskeleton is likely to provide both structural stability and plasticity to the exquisite arborization of axons. Single-Molecule Localization Microscopy (SMLM) has been instrumental in revealing new axonal actin structures such as periodic submembrane actin rings as well as intra-axonal actin hotspots and trails. Multicolor SMLM colocalizes actin with other components of the cytoskeleton with sub-diffraction precision, elucidating their structural and functional interplay. We are interested in using SMLM to look at multiple markers within thin biological objects such as neuronal axons and dendrites. However, obtaining multicolor images with the best resolution and quality remains challenging. The aim of the workshop will be to compare three different strategies for 2-color SMLM:

- Sequential detection of fluorophores with different excitation/emission spectra (i.e. CF568/AF647 in the red and far-red spectrum, respectively)
- Sequential detection of different targets through DNA-PAINT with imagers coupled to the same fluorophore
- Spectral unmixing of fluorophores with close excitation/emission spectra (AF647/CF680).

This workshop will show the participants how to use 3D multicolor Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) on the example of the nanoscale architecture of the axonal cytoskeleton; they will discover the strength and requirements of the three different multicolor approaches possible on this setup.

Keywords : cytoskeleton, SMLM, 3D-STORM, DAISY, DNA-PAINT, axon, neuron, multiplexing, colocalization

***

A014-Deconvolution 3D

Ferréol Soulez (ferreol.soulez@univ-lyon1.fr) Daniel Sage (daniel.sage@epfl.ch)

Abstract : Le but de la déconvolution est de compenser numériquement le flou introduit par le microscope. En microscopie 3D, la déconvolution permet d'améliorer les images sur plusieurs points:
- en améliorant la résolution (axiale en particulier),
- en diminuant le bruit (en particulier à faible flux),
- en améliorant le contraste.

Cela fait de la déconvolution un outil précieux pour améliorer les post traitements comme la segmentation.

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

Il sera en 4 parties:
- une brève description théorique,
- les points importants pour une déconvolution réussie: conditions d'acquisition
- comment avoir une bonne PSF
- illustration des méthodes classiques avec le plugin DeconvolutionLab2 sur des données simulées et réelles

- dans le cas où la PSF n'est pas connue nous guiderons les utilisateurs dans l'utilisation de plugins de déconvolution aveugle ou myope

Keywords Deconvolution, Deconvolution aveugle

***

A015-Deep learning sans se salir les doigts (1/2)

David Rousseau (david.rousseau@univ-angers.fr)
Pejman Rasti (pejman.rasti@univ-angers.fr)

Abstract : In this workshop we will introduce the basics of deep learning and illustrate them practically with examples in bioimaging. Hands on will be provided with software environments which do not require specific computing configuration nor programming skills.
Example will include classification of images and segmentation of objects in images. After this workshop you will be able to run deep learning for your own application and will be able to push forward to more advanced skills.

Keywords : deep learning

A016-Deep bar à images

David Rousseau (david.rousseau@univ-angers.fr)
Pejman Rasti (pejman.rasti@univ-angers.fr)

Abstract
* Vous avez un jeu d'images annoté. Vous avez un problème de classification d'images, de reconnaissance d'objet, segmentation, de débruitage d'image, de superrésolution ...
Venez tester les méthodes de deep learning les plus avancées sur une machine puissante.
* Vous ne disposez pas de données annotées mais seulement de données, nous vous montrons comment réaliser une annotation.

Keywords : Deep learning

***

A018-Obtenir la PSF d'un système de microscopie de fluorescence

Emmanuel Soubies (emmanuel.soubies@irit.fr)
Daniel Sage (daniel.sage@epfl.ch)

Abstract : En microscopie de fluorescence à haute résolution 3D, les techniques numériques jouent un rôle crucial, que ce soit pour la déconvolution, la microscopie à illumination structurée (SIM) ou la microscopie par localisation de molécules (SMLM). Tous ces problèmes de reconstruction/restauration computationnelle nécessitent une très bonne connaissance de la réponse du système qui est principalement encodée dans la fonction d'étalement du point (i.e. point-spread function PSF). En effet, il est essentiel d'être en mesure d'obtenir une bonne estimation de la PSF afin d'assurer une reconstruction fidèle à l'échantillon observé. En pratique, il y a deux écoles: ceux qui font confiance à une PSF théorique calculée à partir des paramètres optiques, et ceux qui préfèrent une PSF expérimentale estimée à partir d'acquisitions de microbilles fluorescentes.
Dans ce contexte, cet atelier a pour objectif de présenter aux participants l'importance de la PSF pour les algorithmes de reconstruction ainsi que les différentes façons d'obtenir des PSF théoriques et expérimentales (i.e., à partir de microbilles fluorescentes). Les participants seront formés à l'utilisation d'outils open-source (sous-forme de plugins ImageJ) leur permettant de réaliser cette tâche.

Keywords : Estimation PSF, microscopie de fluorescence, microbilles, imagerie computationnelle

***