

Vous souhaitez comparez l'intensité de vos marquages ?

Juste « à l'œil » ou via un logiciel ?

Ce tutoriel est pour vous !

Introduction

Réaliser une mesure d'intensité implique:

- Le choix d'un système d'imagerie (+ la compréhension de ses avantages & limites)
- Une préparation méticuleuse de l'échantillon (compatible avec la problématique & le système choisi) incluant les contrôles nécessaires
- Un réglage précautionneux des paramètres d'acquisition
- Une visualisation & quantification adéquates des images

Même si ce tutoriel comporte plusieurs informations importantes, la liste n'est évidemment pas exhaustive : n'hésitez pas à nous contacter lors de l'élaboration de votre projet.

Systeme d'imagerie

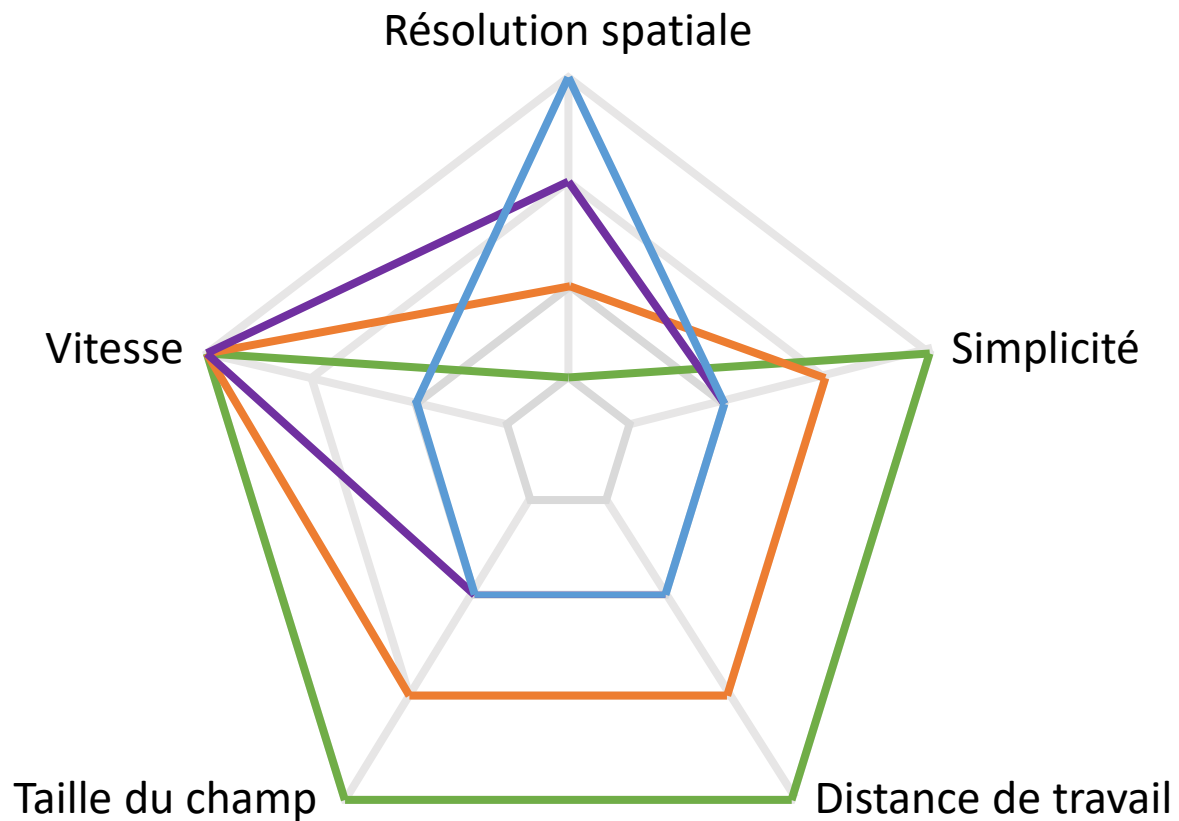
Systeme d'imagerie | choix

Son choix dépend notamment :

- Du degré d'automatisation nécessaire
- Des résolutions spatiale et temporelle (cadence d'acquisition) à atteindre
- De l'intensité et la photostabilité des fluorochromes
- De la surface et l'épaisseur de la zone à imager
- De la profondeur à laquelle cette zone se trouve
- De la durée d'acquisition
- Du besoin de photomanipuler l'échantillon (photoconversion, photoactivation, décaageage,...)
- De la sensibilité de l'échantillon (notamment à la phototoxicité)

Systeme d'imagerie | compromis

Tout est souvent une histoire de compromis...



Stéréomicroscopie (loupe)

Microscopie champ large

Microscopie confocale à balayage par point

Microscopie confocale à disque rotatif (spinning disk)

Systeme d'imagerie | conseils

▪ Attention au temps de chauffe

- Certaines sources d'excitation (ex : laser Argon) n'atteignent leur puissance nominale qu'après une certaine durée (typiquement > 30 mins)
- L'acquisition des images ne devra se faire qu'après cette durée
- Ceci permettra de s'assurer que la puissance de la source est maximale & stable

▪ Croiser les conditions

- Si vous avez plusieurs conditions, faites l'acquisition de 10 images de la première, puis 10 de la seconde, puis 10 de la première, etc...
- Evitez de faire les 20 images de la première puis les 20 de la deuxième
- Ceci vous permet
 - De détecter les dérives
 - De comparer les conditions entre elles même s'il y a des variations (valable que si l'amplitude et la vitesse des variations ne sont pas trop importantes)

Préparation de l'échantillon

Préparation de l'échantillon | supports & montage

- **Support & montage** (lames, plaques multi-puits, boîtes de pétri, chambres de culture Labteck/Ibidi)
 - Il dépend de plusieurs paramètres comme :
 - L'expérience à réaliser (vivant, fixé, nombreuses conditions ou pas, volume de l'échantillon, perfusion, ...)
 - Les systèmes disponibles : les machines ne peuvent en général pas accueillir tous les types supports
 - Les types de contrastes à implémenter (contraste de phase, DIC), notamment en lumière blanche
 - La qualité d'image recherchée (optimale avec lamelles en verre, moins bonne avec fonds en plastique)
 - Si vous travaillez avec un montage lame/lamelle
 - Attention à l'épaisseur des lamelles : les objectifs dédiés à l'imagerie sur lamelle de verre exigent que la lamelle de verre ait une épaisseur précise, généralement de 0.17 mm (les lamelles sont généralement notée #1.5)



Préparation de l'échantillon | supports & montage

- Si vous travaillez avec des boîtes avec fond en plastique (de l'ordre du millimètre d'épaisseur)

- Assurez-vous que des objectifs compatibles soient disponibles
- Assurez-vous de ne pas avoir besoin du DIC (incompatible avec plastique)

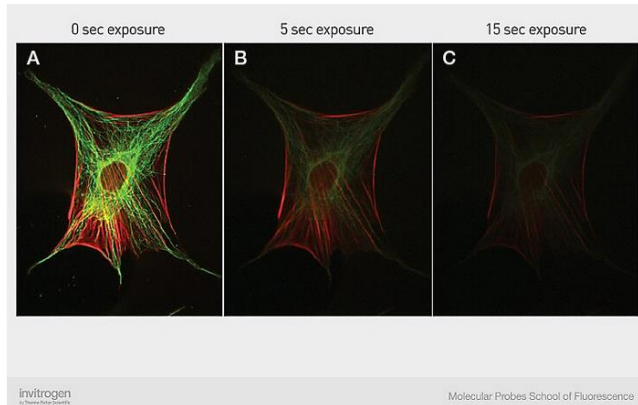


- Si vous imagez des échantillons fixés

- Choisissez un milieu de montage avec anti-fading (molécule limitant la photodestruction des fluorochromes) optimisé pour les fluorochromes à imager
- Testez si possible plusieurs milieux (polymérisant ou pas) et étudiez la déformation de l'échantillon qu'ils engendrent (ex. collapsing des cellules)
- Utilisez des milieux de montage non périmés (notamment si vous observez des phénomènes de photoconversion comme l'observation de l'image du noyau dans le canal vert)
- Changez de milieu de montage si cette photoconversion persiste avec un milieu neuf
- Si vous travaillez sur lame/lamelle, utilisez préférentiellement un milieu dont l'indice de réfraction est proche du verre (1.518)

Préparation de l'échantillon | supports & montage

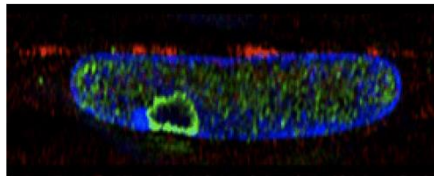
- Exemple de photobleaching (photodestruction définitive des fluorochromes)



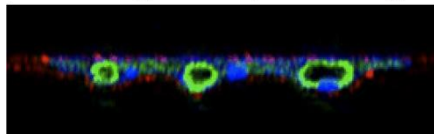
Imagerie et quantification d'intensité compromises

- Exemple de collapsing causé par un milieu de montage inadéquat

Vectashield® (non hardening)



ProLong™ Gold (hardening)



3D-SIM Andreas Maiser
(LMU Munich)

Mesures morphométrique et d'intensité compromises

Préparation de l'échantillon

- Si vous observez des échantillons vivants dans du milieu de culture
 - Assurez-vous que le milieu de culture tamponnera sur toute la durée de l'acquisition et/ou que le système d'imagerie choisi pourra réguler les paramètres environnementaux
 - Attention à l'autofluorescence de l'indicateur de pH (ex : rouge de phénol)
 - Si les marquages sont faibles, cette autofluorescence peut perturber la mesure d'intensité
 - Si c'est le cas, utilisez des milieux sans indicateur de pH
- Si vous devez interagir avec vos échantillons pendant l'acquisition (ex : perfusion de milieu)
 - Assurez-vous de l'espace disponible autour du système pour installer le matériel
 - Si vous devez perfuser des liquides, assurez-vous que ces derniers puissent atteindre la même température que l'échantillon avant perfusion



Préparation de l'échantillon | marquages

Lors de l'étape de marquage

- ❑ Utilisez strictement le même protocole pour tous les échantillons à comparer
- ❑ Utilisez les mêmes réactifs (lots d'anticorps primaire & secondaire, détergent, PBS)
- ❑ Effectuez les marquages de tous les échantillons simultanément, par le même manipulateur
- ❑ Dupliquez les conditions pour avoir plusieurs échantillons de chaque
- ❑ Optimisez chaque étape pour obtenir le meilleur échantillon (le traitement d'images aide mais ne fait pas de miracles)

Préparation de l'échantillon | contrôles

- ❑ Ils sont cruciaux pour
 - Régler le système d'acquisition
 - Permettre une comparaison sûre de l'intensité des échantillons
 - Estimer/corriger le biais s'il existe

- ❑ Si vous faites des immunomarquages
 1. Préparez des échantillons sans marquage (autofluorescence)
 2. Préparez les échantillons marqués pour tous les épitopes (lame à quantifier)
 3. Préparez les échantillons mono-marqués (1 anticorps primaire à la fois + son secondaire)
 4. Préparez des échantillons avec les anticorps secondaires seuls (aspécificité du secondaire)
 5. Si vous pouvez, préparez un échantillon avec anticorps primaire et secondaire mais où l'épitope reconnu par le primaire est absent (échantillon KO, contrôle négatif le plus précis)

Préparation de l'échantillon | contrôles

1. Echantillons sans marquage

- On vérifie le niveau d'autofluorescence de l'échantillon à différentes longueurs d'onde
- Si ce niveau est élevé on choisit la zone spectrale où il est le plus faible (généralement vers le rouge, rouge lointain)

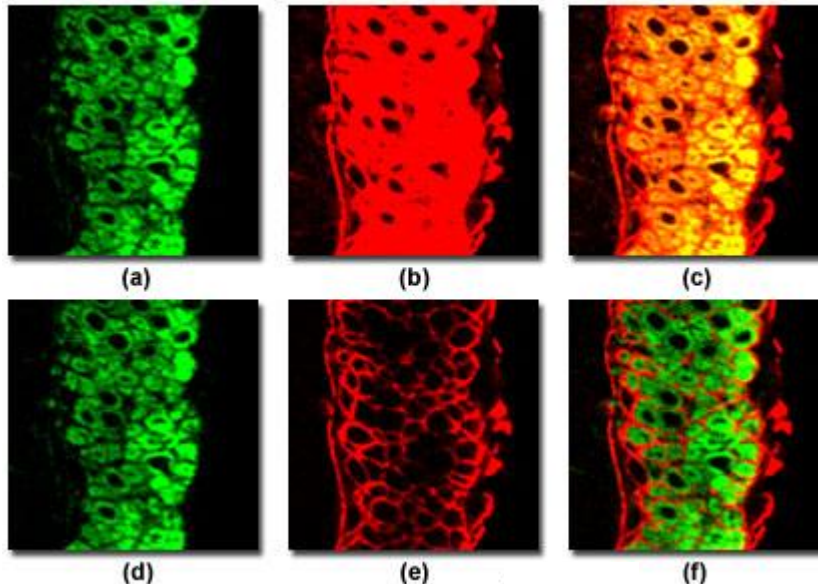
2. Echantillons marqués pour tous les épitopes

- C'est l'échantillon à quantifier
- On l'utilise pour régler les paramètres d'intensité (puissance d'excitation, sensibilité de détection, temps d'exposition)
- Le but est d'obtenir la meilleure dynamique d'image (rapport signal/bruit)

Préparation de l'échantillon | contrôles

3. Echantillons mono-marqués

- Comme ils ne contiennent qu'un marquage à la fois on les utilise pour vérifier que le réglage du 2. est spécifique spectralement
- Seul le canal concerné doit donner une image, les autres doivent rester noirs



En a) le réglage est bon, en b) nous détectons le signal rouge et la fuite du vert ce qui donne en c) une colocalisation surestimée (beaucoup de jaune)

En a) et b) le réglage est bon, la fuite du vert n'existe plus et c) montre une image fidèle de la réalité

Préparation de l'échantillon | contrôles

4. Echantillons avec les anticorps secondaires seuls

- Permet de tester la spécificité du secondaire
- On compare cette image à celle de l'autofluorescence 1.
 - Si identique, le secondaire est spécifique
 - Si le signal est plus fort, alors une optimisation doit être réalisée au niveau du secondaire (rinçage, concentration, ...)

5. Echantillon protéine KO

- Permet de tester la spécificité du primaire
- On compare cette image à 4.
 - Si identique, le primaire est spécifique
 - Si le signal est plus fort, alors la spécificité du primaire n'est pas optimale

Paramètres d'acquisition

Paramètres d'acquisition

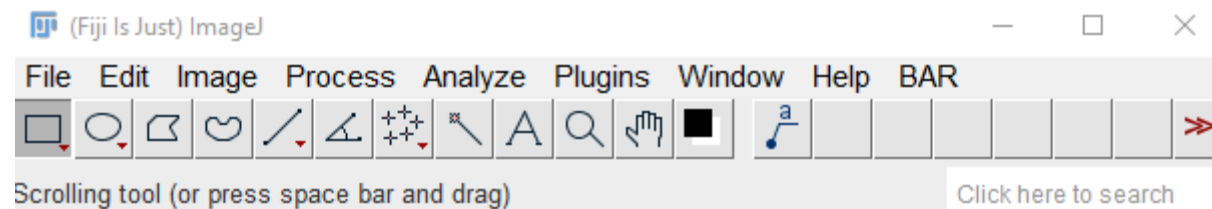
- ❑ Il est important d'optimiser les paramètres d'acquisition pour :
 - Visualiser les structures d'intérêt
 - Obtenir les images avec la meilleure dynamique (rapport signal sur bruit)
 - Eviter / limiter la saturation (quantification et morphométrie impossibles)
 - Utiliser des puissances d'excitation compatibles avec l'expérience (limiter la phototoxicité si échantillon vivant, éviter le photobleaching sinon quantification d'intensité faussée, ...)
 - Optimiser le nombre d'images à acquérir pour obtenir l'information recherchée (échantillonnages spatial et temporel)
- ❑ Puis de sauvegarder (backup possible) ces paramètres et d'utiliser strictement les mêmes pour tous les échantillons à comparer.

Attention à l'auto-exposition (s'adapte à chaque échantillon, intensités non comparables)

Visualisation & quantification

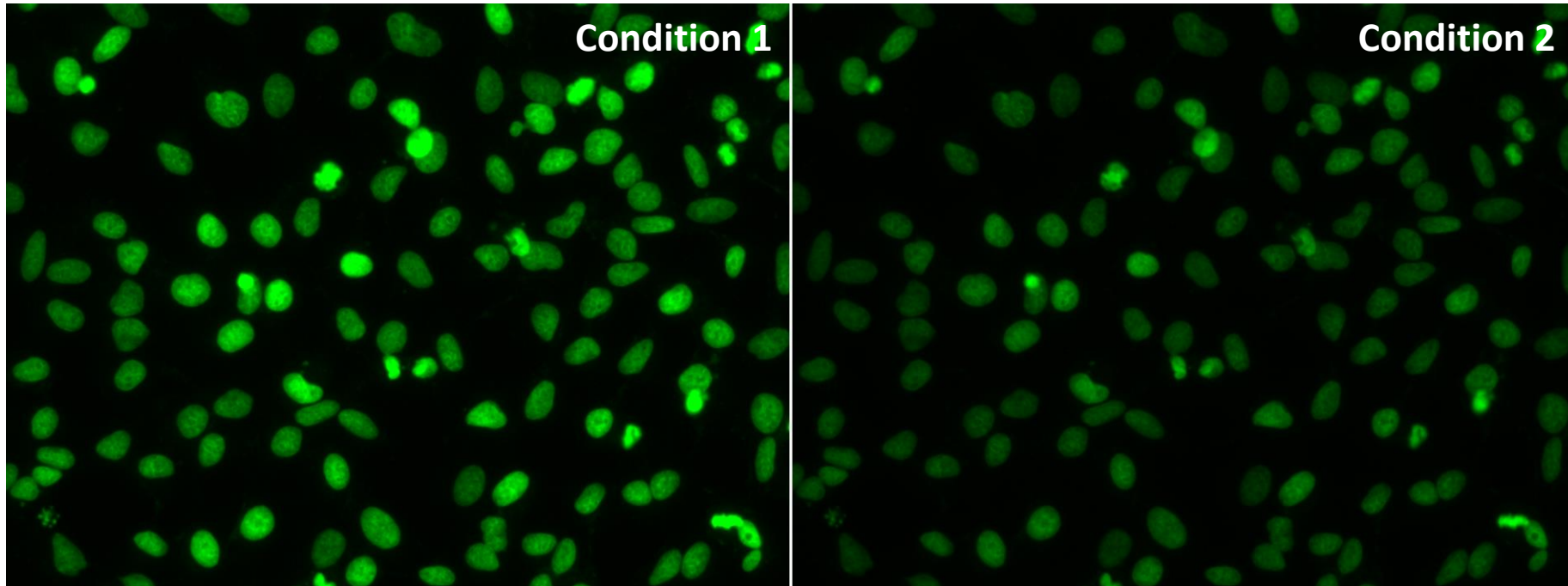
Visualisation & quantification

- ❑ Par comparaison d'intensité entre plusieurs conditions on peut entendre :
 - Une quantification stricte entre ces conditions
 - Une semi-quantification (observations à l'œil, p.e. pour voir quel anticorps est le plus efficace)
- ❑ Dans tous les cas on commence par optimiser la préparation et l'acquisition des échantillons (cf. diapositives précédentes)
- ❑ Ensuite il faut utiliser correctement les outils de visualisation et de traitement d'images : nous utiliserons ici le freeware Fiji (ImageJ)



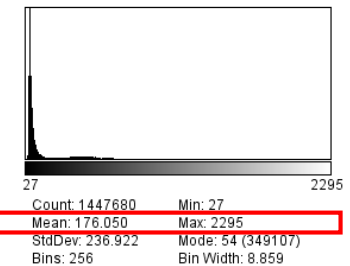
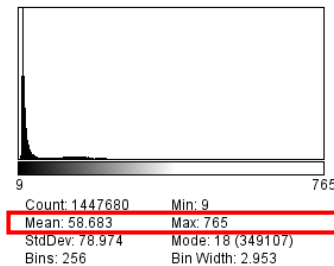
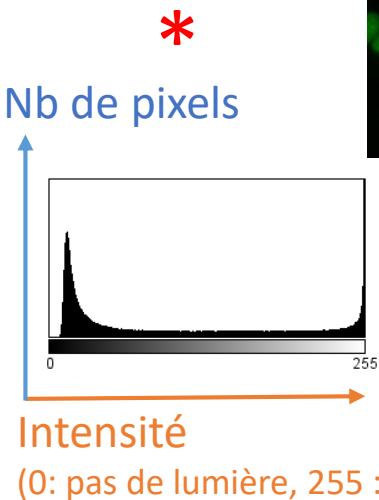
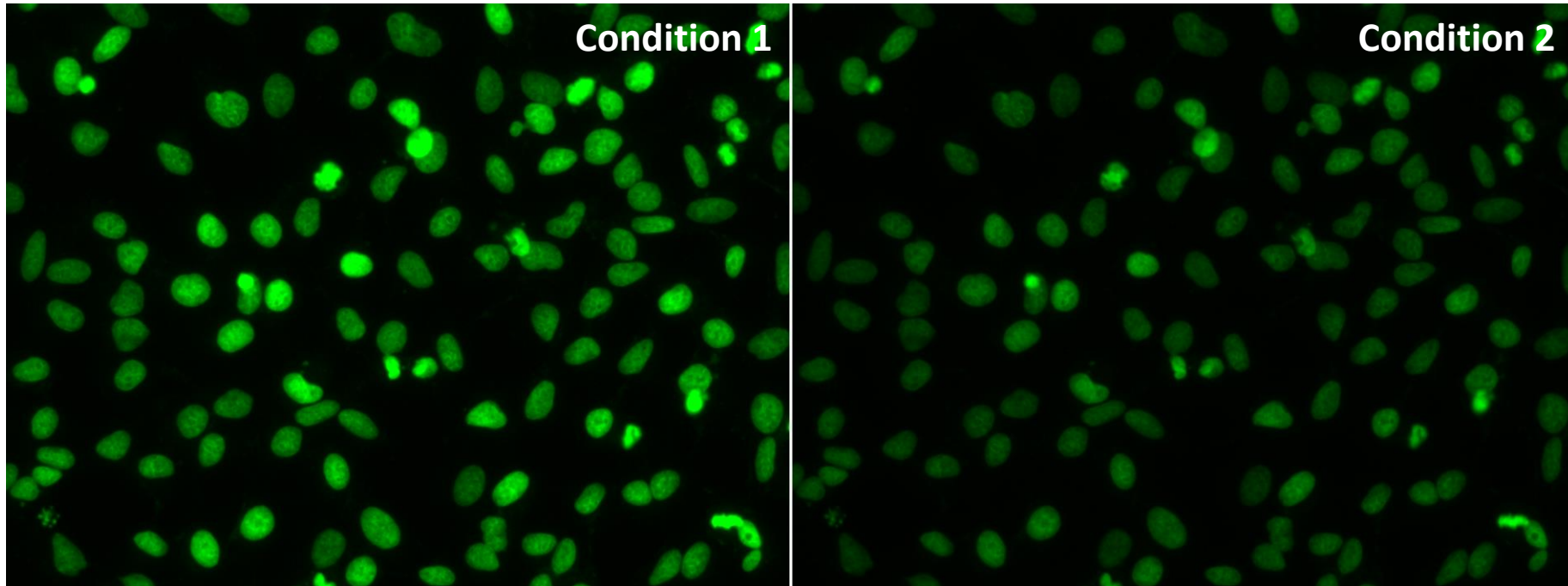
Visualisation & quantification | exemple

L'image condition 1 semble plus intense que condition 2



Visualisation & quantification | exemple

Pourtant l'histogramme de distribution* des intensités montre l'inverse



Visualisation & quantification | exemple

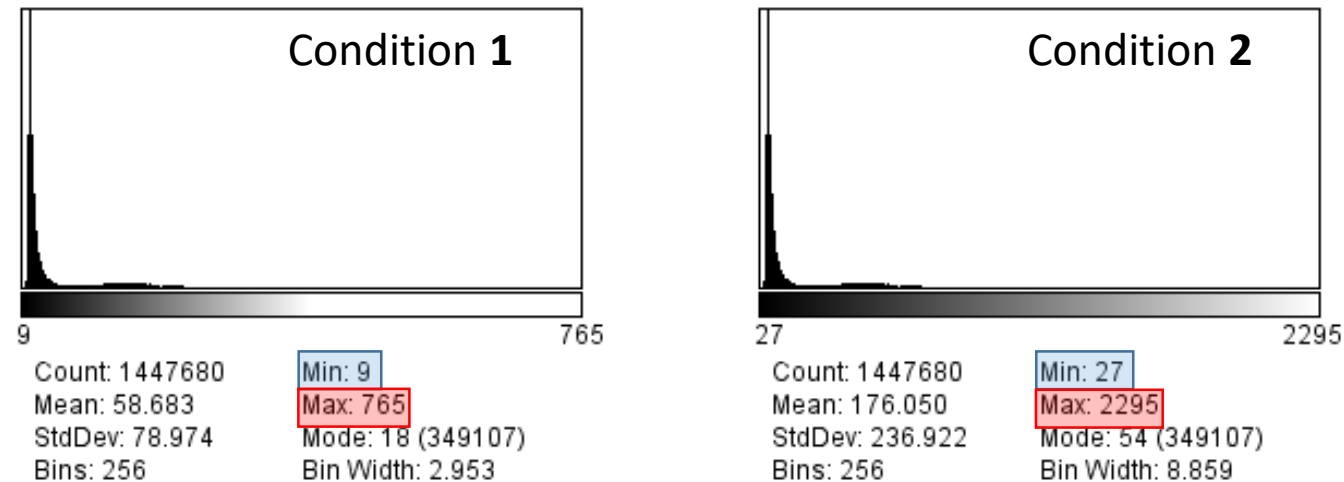
- ❑ En fait les images ont une dynamique de 16 bits
- ❑ Les intensités sont donc échantillonnées sur 2^{16} (65536) niveaux
 - 0 : pas de signal
 - 65535 : pixel saturé
- ❑ La grande majorité des écrans d'ordinateurs fonctionne en 8 bits
- ❑ Les intensités sont donc affichées sur 2^8 (256) niveaux
 - 0 : pas de signal
 - 255 : pixel saturé
- ❑ Le logiciel de visualisation doit donc convertir les images pour les afficher : 16 vers 8 bits

Visualisation & quantification | exemple

- ❑ Si cette conversion est identique pour toutes les images, aucun problème
- ❑ Sinon la conversion peut différer entre 2 images et la comparaison visuelle devient impossible
- ❑ L'utilisateur peut alors être trompé
- ❑ C'est ce qui se passe dans l'exemple précédent
 - La condition 2 apparaît moins intense
 - Alors que l'histogramme qui quantifie l'intensité de chaque pixel de l'image nous montre l'inverse
- ❑ Il faut donc forcer le logiciel à faire une conversion identique pour les 2 conditions

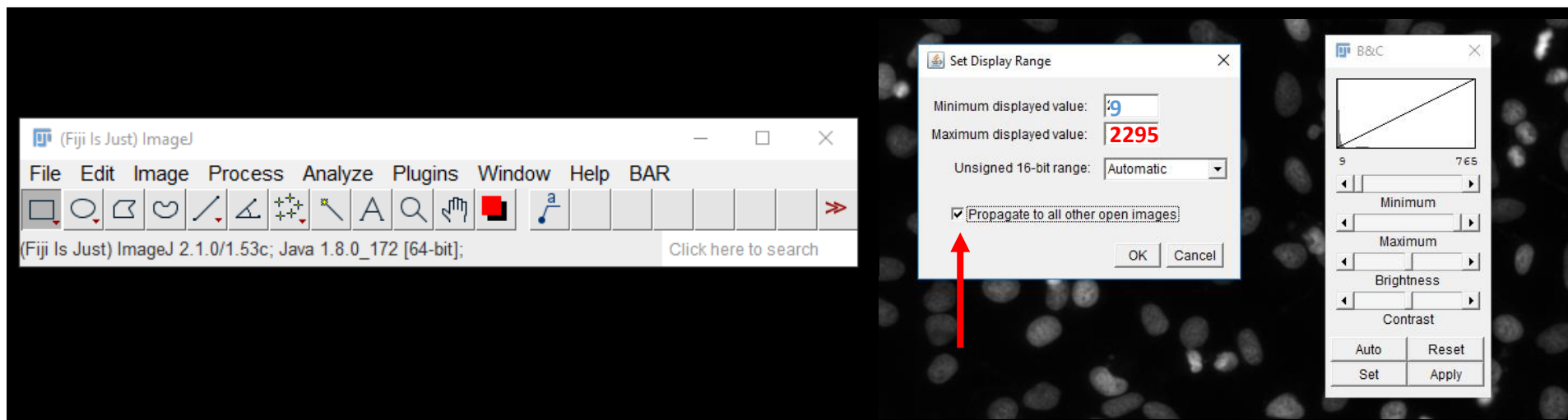
Visualisation & quantification | exemple

- Grâce à l'histogramme de distribution
 - On récupère la valeur **minimale** d'intensité des 2 images
 - Condition 1 : **9**
 - Condition 2 : 27
 - On récupère la valeur **maximale** d'intensité des 2 images
 - Condition 1 : 765
 - Condition 2 : **2295**

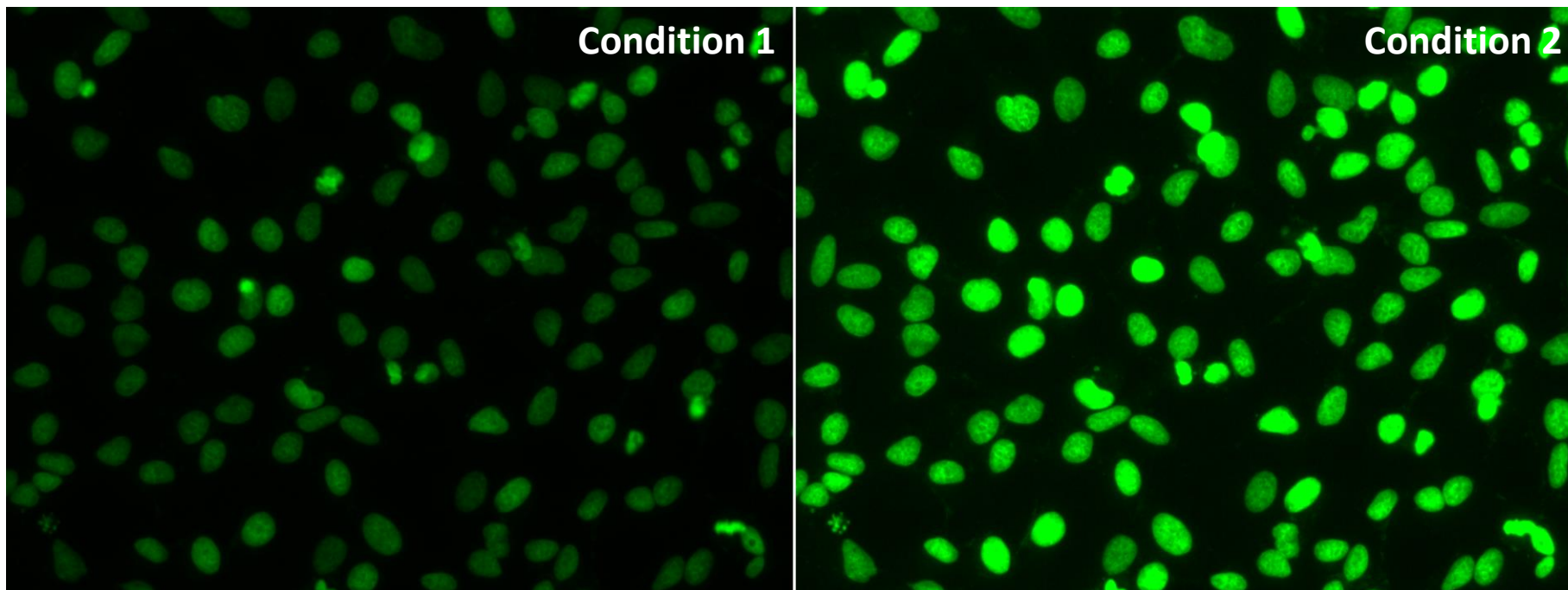


Visualisation & quantification | exemple

- ❑ Puis on force Fiji/ImageJ à afficher les images de la même manière
 - Le **9** en 0
 - Le **2295** en 255
- ❑ En utilisant la fonction Image/Adjust/Brightness & Contrast
- ❑ Et en forçant les valeurs basse et haute à être identiques pour toutes les images ouvertes



Visualisation & quantification | exemple



Count: 1447680 Min: 9
Mean: 58.683 Max: 765
StdDev: 78.974 Mode: 18 (349107)
Bins: 256 Bin Width: 2.953



Count: 1447680 Min: 27
Mean: 176.050 Max: 2295
StdDev: 236.922 Mode: 54 (349107)
Bins: 256 Bin Width: 8.859

Visualisation & quantification | exemple

- ❑ La conversion effectuée par le logiciel est maintenant identique pour les 2 conditions
- ❑ L'affichage est maintenant correct et le visuel reflète bien l'histogramme

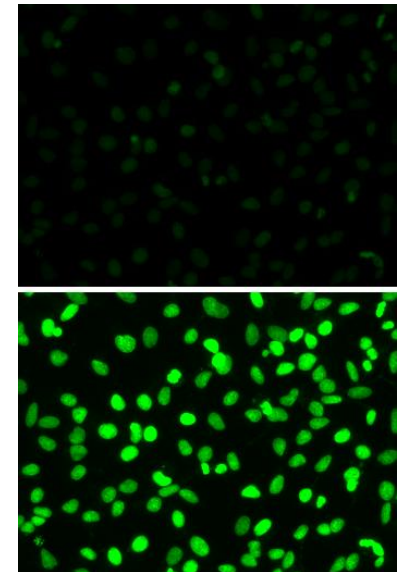
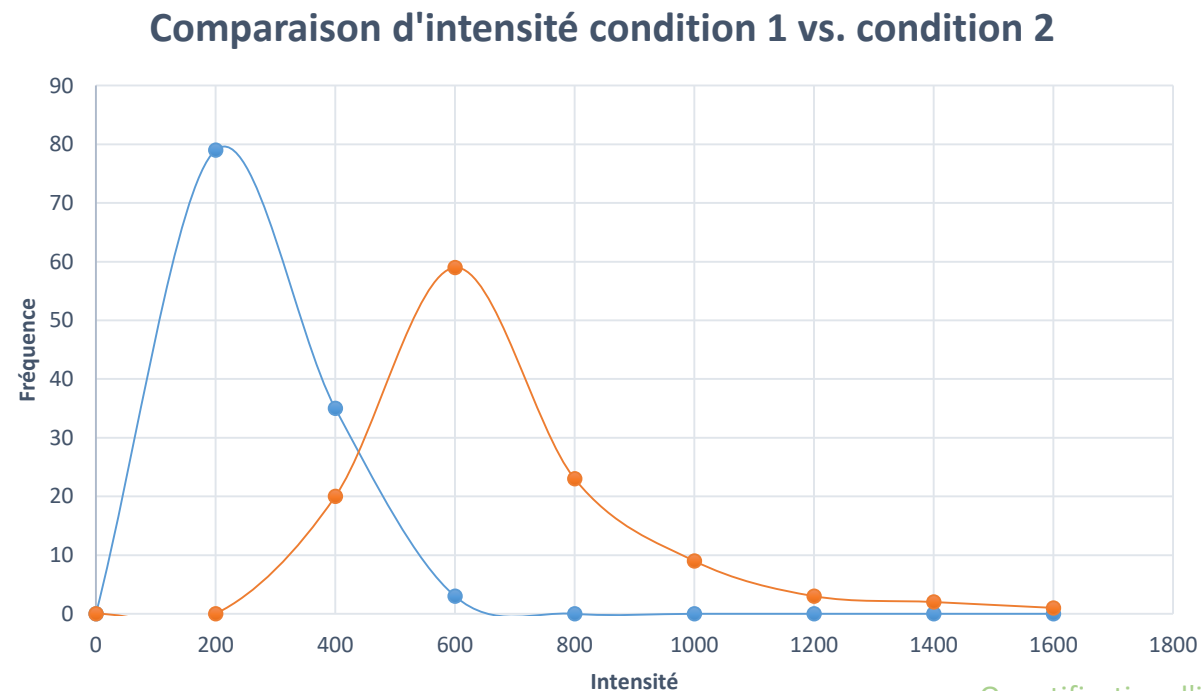
Attention à ceci et à toutes les options vous permettant de régler automatiquement l'affichage (`autodisplay`, `autoscaling`).

Elles peuvent être utiles mais il faut comprendre ce que l'on fait.

Visualisation & quantification | exemple

- ❑ Ensuite nous soustrayons le bruit de l'image pour chaque condition
- ❑ Nous segmentons les noyaux (identification automatique)
- ❑ Nous mesurons l'intensité pour chacun d'entre eux, nous calculons les moyennes et affichons les distributions d'intensité

| | Condition 1 | Condition 2 |
|--------------------|-------------|-------------|
| Intensité moyenne | 188.273821 | 564.821308 |
| Intensité minimale | 104.774 | 314.321 |
| Intensité maximale | 494.258 | 1482.773 |



Conclusion

Conclusion

- ❑ Si ce n'est pas déjà le cas, considérez ces quelques conseils lors de vos expériences de comparaison d'intensités
- ❑ Nous vous avons présenté quelques points importants à prendre en compte
- ❑ Mais comme précisé au début du tutoriel, nous n'avons pas été exhaustifs
- ❑ Donc le message à retenir est...

Venez discuter de vos projets avec nous avant de commencer.