
IMAGESTREAM X – PHENOCAN APPLICATIONS ET INTÉGRATION DANS LE PÔLE DE RECHERCHE LYONNAIS

« Il n'y a plus UNE cytométrie mais DES cytométries »

- Cytométrie en flux
- Cytométrie d'images
- Cytométrie de masses

L'apport des équipements **Phenocan** ont augmenté qualitativement l'offre du pôle de cytométrie Lyonnais

INTEGRATION de l'IMAGESTREAMX (AMNIS) DANS LE POLE LYONNAIS

Structure d'accueil
Tour CERVI



Plateau technique AniRA-Cytométrie

US8/UMS 3444/SFR Gerland Biosciences



RAQ : Patricia Barbot
patricia.barbot@inserm.fr

ORGANIGRAMME OPERATIONNEL DU PLATEAU TECHNIQUE AniRA-CYTOMETRIE

THIBAUT ANDRIEU 100%

SFR GERLAND/INSERM

thibault.andrieu@inserm.fr

04 37 28 23 32 / 24 22



SEBASTIEN DUSSURGEY 100%

SFR GERLAND/INSERM

sebastien.dussurgey@inserm.fr



CELINE COUTURIER 30%

SFR GERLAND/BIOASTER

celine.couturier@inserm.fr

celine.couturier@bioaster.com



DELPHINE LESTRADE 80%

SFR GERLAND/BIOASTER

delphine.lestrade@inserm.fr

delphine.lestrade@bioaster.com

CONSEIL SCIENTIFIQUE

- Brian B Rudkin
- Els Verhoyen
- Thierry Defrance
- Thierry Walzer
- Christophe Arpin

ANALYSEURS



Référent
L2



TRIEURS



Référent
L2



IMAGESTREAM X



Référent

CyTOF



Référent

Correspondants pour les équipements de cytométrie délocalisés : ENS, Lyon SUD, UCBL

KARINE RUEL
SFR GERLAND
karine.ruel@inserm.fr

VERONIQUE BARATEAU
SFR GERLAND/ENS
veronique.barateau@ens-lyon.fr

SANDRINE MOURADIAN
SFR GERLAND/ENS
sandrine.mouradian@ens-lyon.fr

Didier NEGRE
SFR GERLAND/ENS
didier.negre@ens-lyon.fr



IMAGESTREAM X (ISX)

ERGONOMIE DU PLATEAU TECHNIQUE PRINCIPAL DE CYTOMETRIE ET INTEGRATION DE L'IMAGESTREAM X

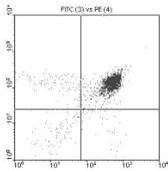
Imagestream X



Station de traitement des données

APPORT DE LA CYTOMETRIE D'IMAGE (IMAGESTREAM X)

Cytométrie

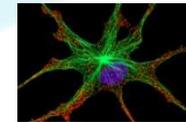


Instrument
interdisciplinaire

Imagerie en flux



Microscopie



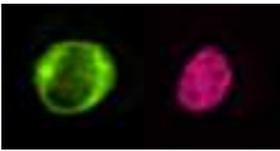
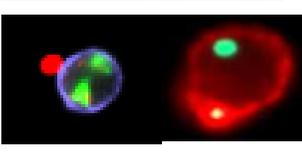
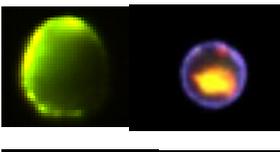
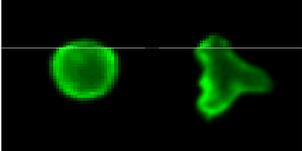
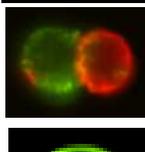
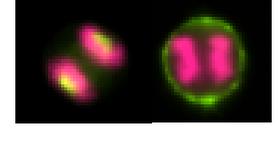
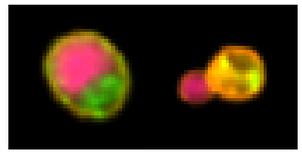
Acquisition rapide

Quantification numérique d'image

Analyse de populations rares

Analyse statistique sur un grand nombre de cellules

APPLICATIONS : Microbiologie, Immunologie, Parasitologie....

	ETUDES	EXEMPLES
	Signalisation cellulaire	Translocation NFkB , Localisation
	Internalisation et phagocytose	Internalisation, phagocytose de bactéries par des monocytes
	Colocalisation intracellulaire	Colocalisation de ligands avec les lysosomes
	Etude de forme	Differentiation cellulaire
	Interaction entre cellules	Formation de synapse
	Mort cellulaire et autophagie	Apoptose, fragmentation nucléaire, Activation caspase3
	Cycle cellulaire et mitose	Classification morphologique des phases de mitose
	Cellules souches	Différenciation erythrocytaire

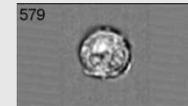
CONFIGURATION SELECTIONNEE DE L'IMASTREAM X - PHENOCAN

- ❖ **4 lasers:** - Violet (405nm)
- Bleu (488nm)
- Vert (561 nm)
- Rouge (642nm)



- ❖ **12 paramètres simultanés:**

2 x « brightfields »

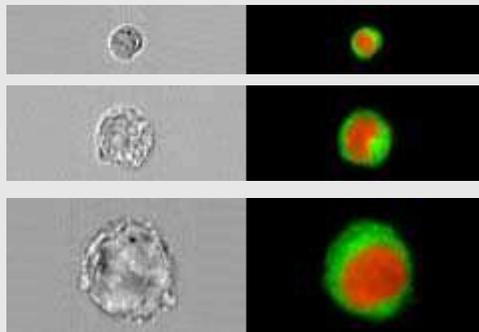


1 «darkfield » Ssc



9 fluorescences

❖ **3 tailles d'objectifs**



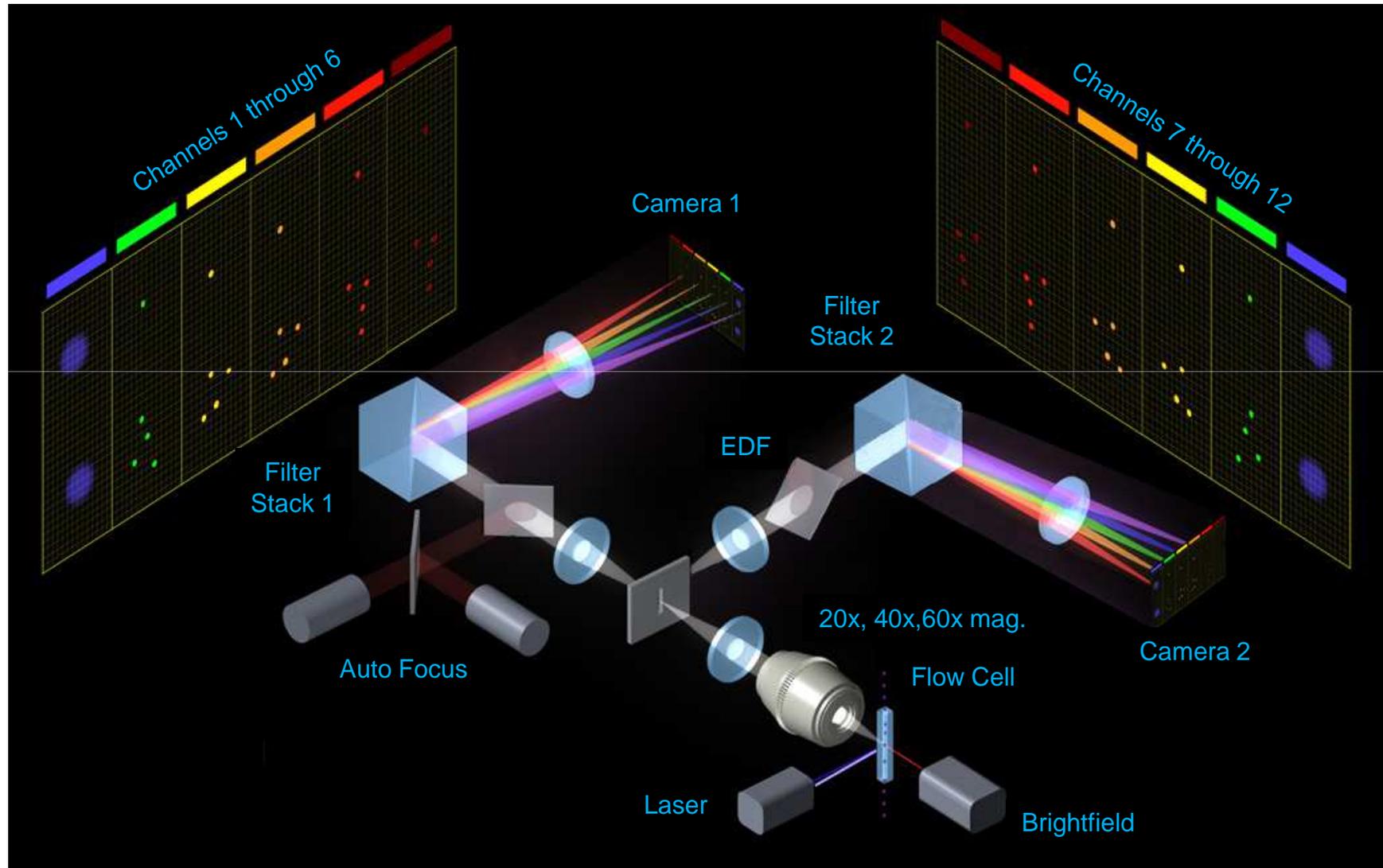
x20 (1 μm /pixel)

x40 (0.5 μm /pixel)

x60 (0.33 μm /pixel)

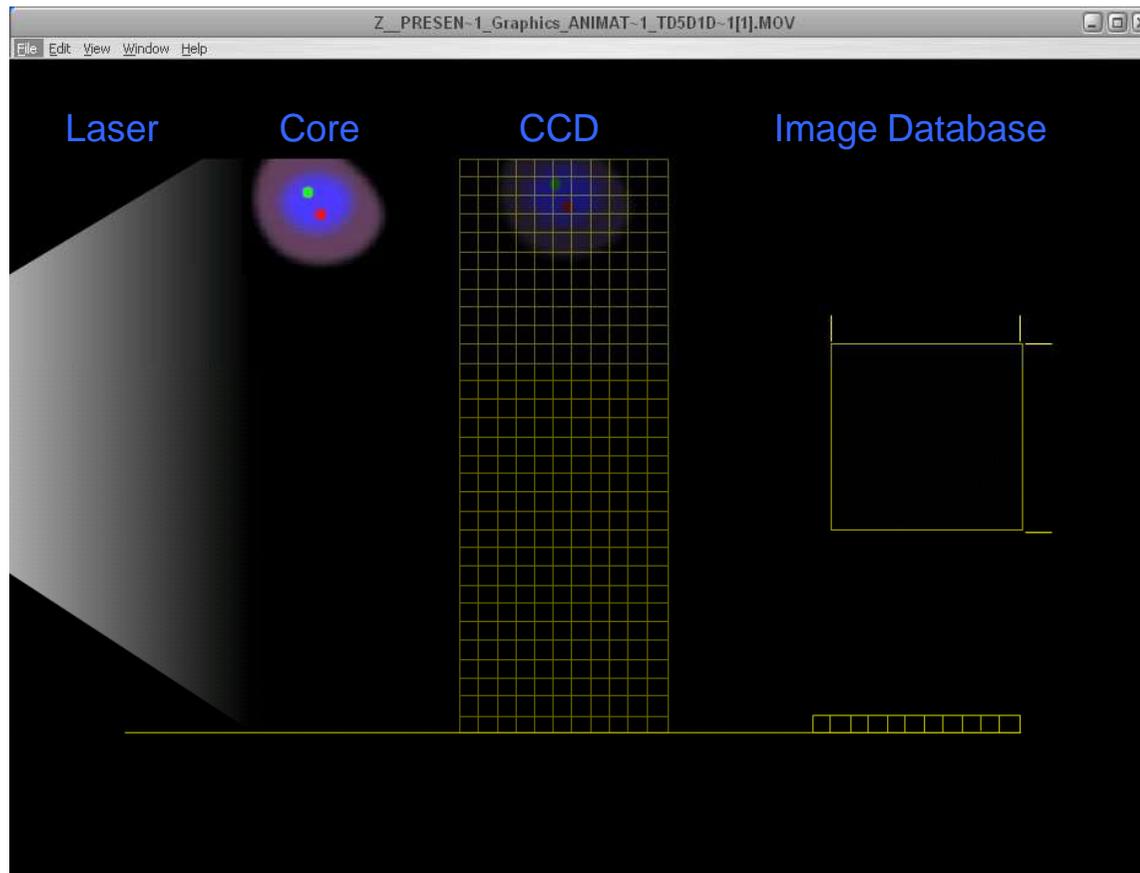
❖ **Module d'extention de champs « Extended Depth of Field » (EDF)**

BANC OPTIQUE: SCHEMA GENERAL



BANC OPTIQUE: INTEGRATION DU SIGNAL

Principe d'intégration du signal de fluorescence ou "Time Delay Integration"



CAMERA - TDI CCD

- Fluorescence recueillie durant toute la durée de passage devant le détecteur
- La lumière est détectée sur la première ligne de pixels, puis transférée au pixel situé au dessous en synchronisation avec la vitesse de passage de la cellule
- L'intensité lumineuse est intégrée sur toute la hauteur du détecteur

Augmentation de la sensibilité en conservant une image nette

Augmentation du débit= perte de sensibilité

PREPARATION DES ECHANTILLONS ET ACQUISITION DES DONNEES

➤ Préparation des échantillons

- ✓ Similaire à la cytométrie
- ✓ Simple marquage (compensation)
- ✓ Passage en eppendorf 1.5 ml, 20µl/échantillons
- ✓ Concentration cellulaire: 10-100 M/ml

➤ Acquisition des données

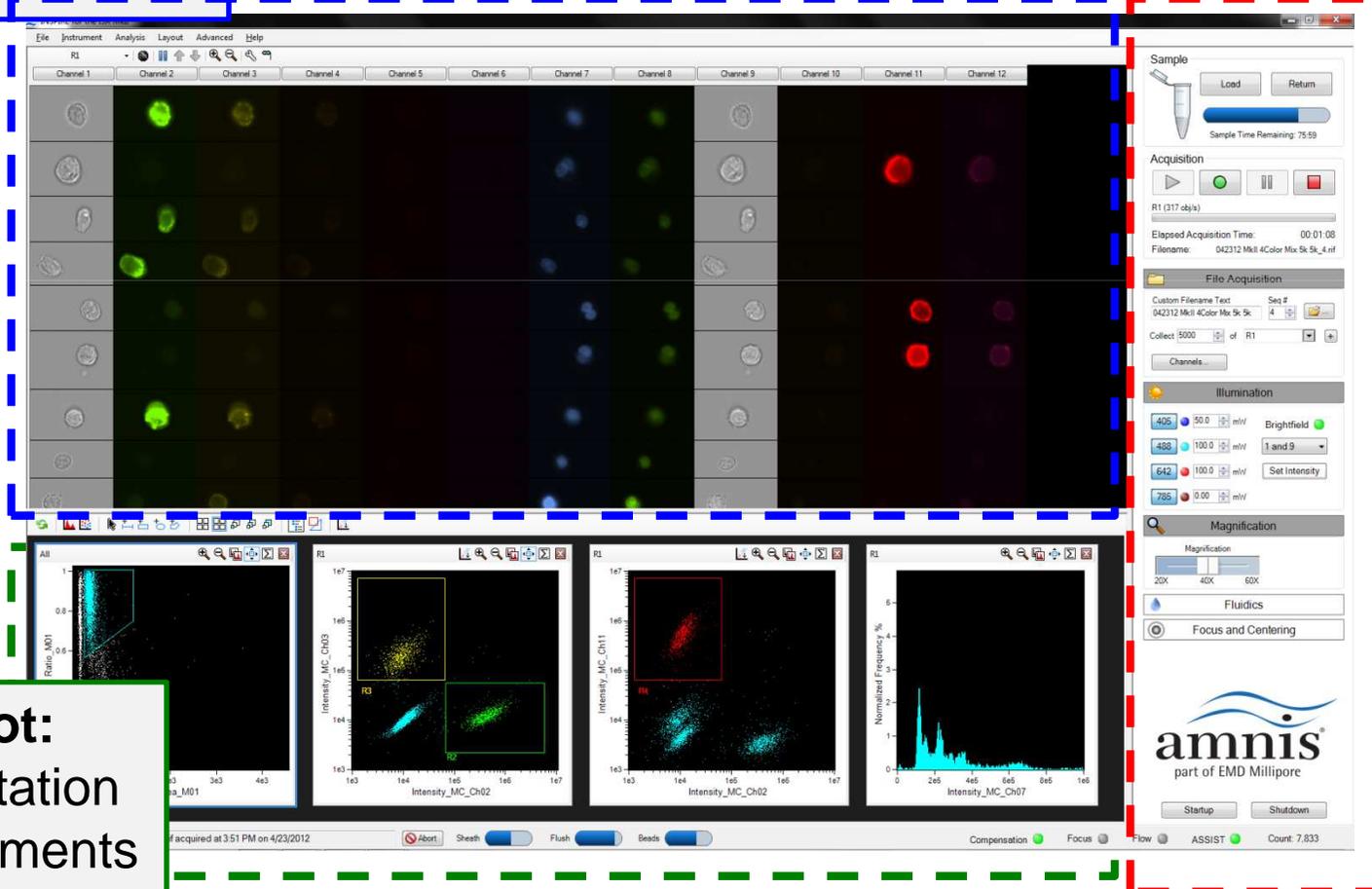
- ✓ Logiciel Inspire
- ✓ 1 000 evts/sec maximum (moyenne de 5 min par tubes)
- ✓ Compensation automatique
- ✓ Simple d'utilisation

ACQUISITION DES DONNEES

Logiciel d'acquisition : **INSPIRE**

Galerie d'images:
Affichage en temps
réel

**Contrôle de
l'instrument:**

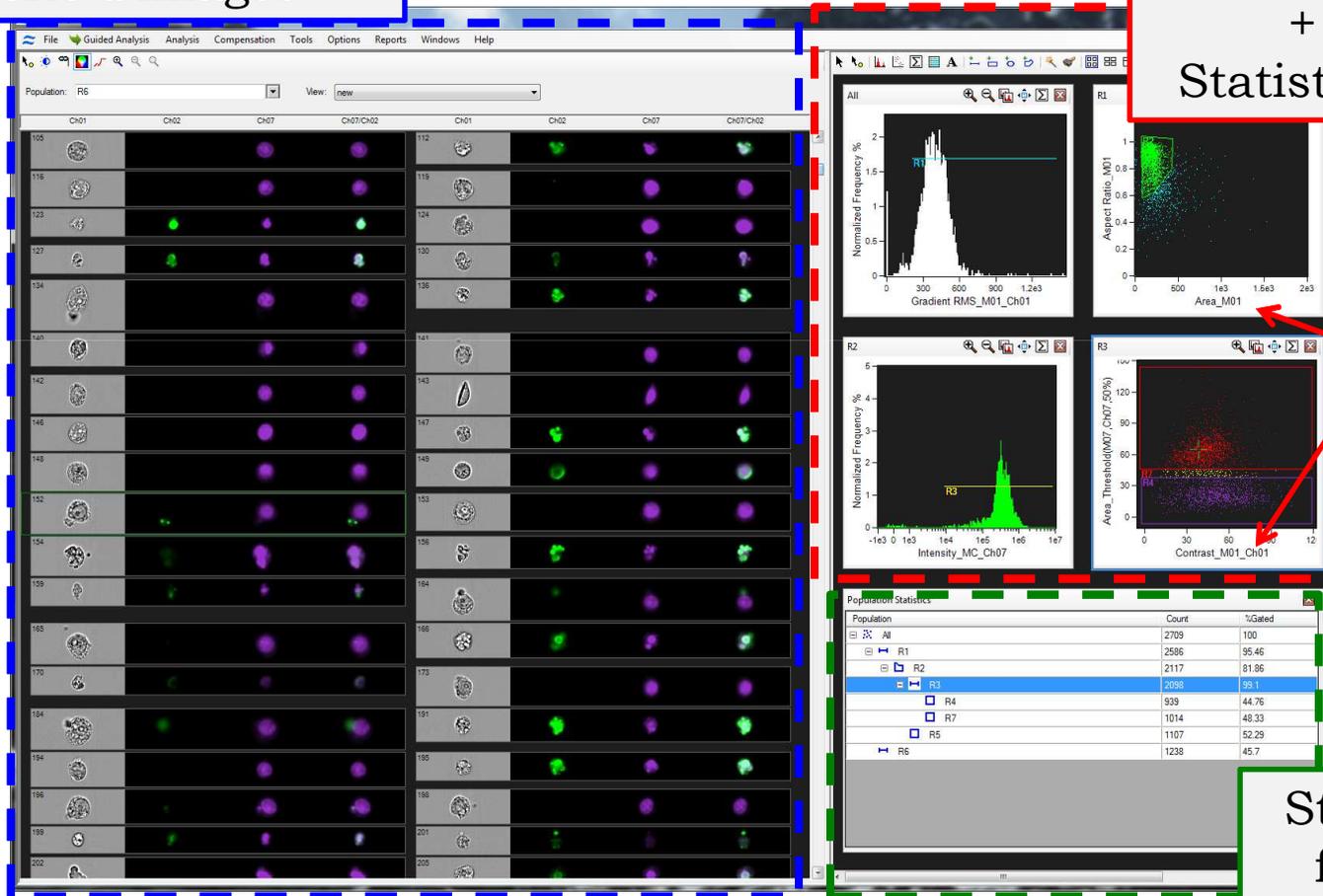


Dot plot:
Incrémentation
des événements
en temps réel

ANALYSE DES DONNEES 1/3

Logiciel d'analyse: IDEAS

Galerie d'images



Graphique
+
Statistique

Paramètres
de
quantification
des images

Stratégie de
fenêtrage

ANALYSE DES DONNEES 2/3

LISTE NON EXHAUSTIVE DES PARAMETRES DE QUANTIFICATION DES IMAGES

TAILLES (en microns)

Aire, Diamètre, Longueur ...

FORMES

Circularité, « Shape Ratio » ...

LOCALISATION (coordonnées X,Y)

Centroides XY ...

TEXTURE:
mesure des variation d'intensité locales

Comptage de spots, Gradient RMS ...

INTENSITE de signal

Intensité, Moy. Pixel, Intensité des spots....

COMPARAISON

Similarité, « Brigh Detail Similiraity » ...

ANALYSE DES DONNEES 3/3

WIZARD : UN OUTIL D'ANALYSE ASSISTEE

Select the wizard to use for analysis:

	Open File	Creates a template to facilitate analysis.
	Display Properties	Automatically sets image display properties.
	Begin Analysis	Identifies single, focused, fluorescent positive cells.
	Feature Finder	Assists the user in picking relevant features for separating populations. The file must contain members of each population.
	Apoptosis	Creates an analysis template for identifying apoptotic events based on brightfield and nuclear morphology.
	Cell Cycle - Mitosis	Creates an analysis template that distinguishes mitotic and apoptotic events.
	Co-localization	Creates an analysis template for measuring the co-localization of two probes on, in, or between cells in your sample.
	Internalization	Creates an analysis template for measuring the internalization of a probe.
	Nuclear Localization	Creates an analysis template for measuring the nuclear localization of a probe.
	Shape Change	Creates an analysis template for measuring circular morphology.
	Spot	Creates an analysis template for measuring texture based on spot counting.

ANALYSE DES DONNEES 3/3

WIZARD : UN OUTIL D'ANALYSE ASSISTEE

Select the wizard to use for analysis:

	Open File	Creates a template to facilitate analysis.
	Display Properties	Automatically sets image display properties.
	Begin Analysis	Identifies single, focused, fluorescent positive cells.
	Feature Finder	Assists the user in picking relevant features for separating populations. The file must contain members of each population.
	Apoptosis	Creates an analysis template for identifying apoptotic events based on brightfield and nuclear morphology.
	Cell Cycle - Mitosis	Creates an analysis template that distinguishes mitotic and apoptotic events.
	Co-localization	Creates an analysis template for measuring the co-localization of two probes on, in, or between cells in your sample.
	Internalization	Creates an analysis template for measuring the internalization of a probe.
	Nuclear Localization	Creates an analysis template for measuring the nuclear localization of a probe.
	Shape Change	Creates an analysis template for measuring circular morphology.
	Spot	Creates an analysis template for measuring texture based on spot counting.

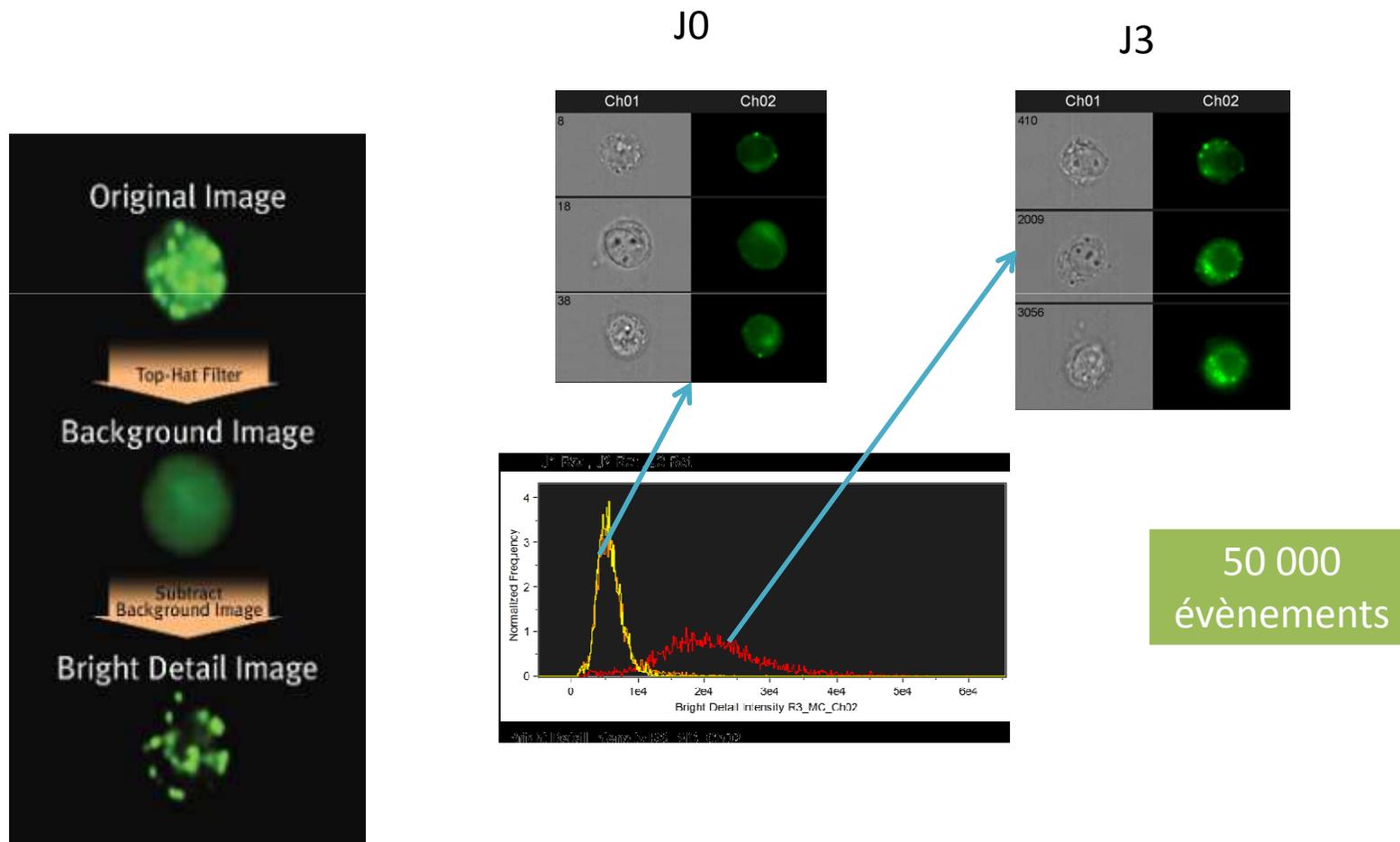
« non supervisé » : détecteur de paramètres



EXEMPLES D'APPLICATIONS

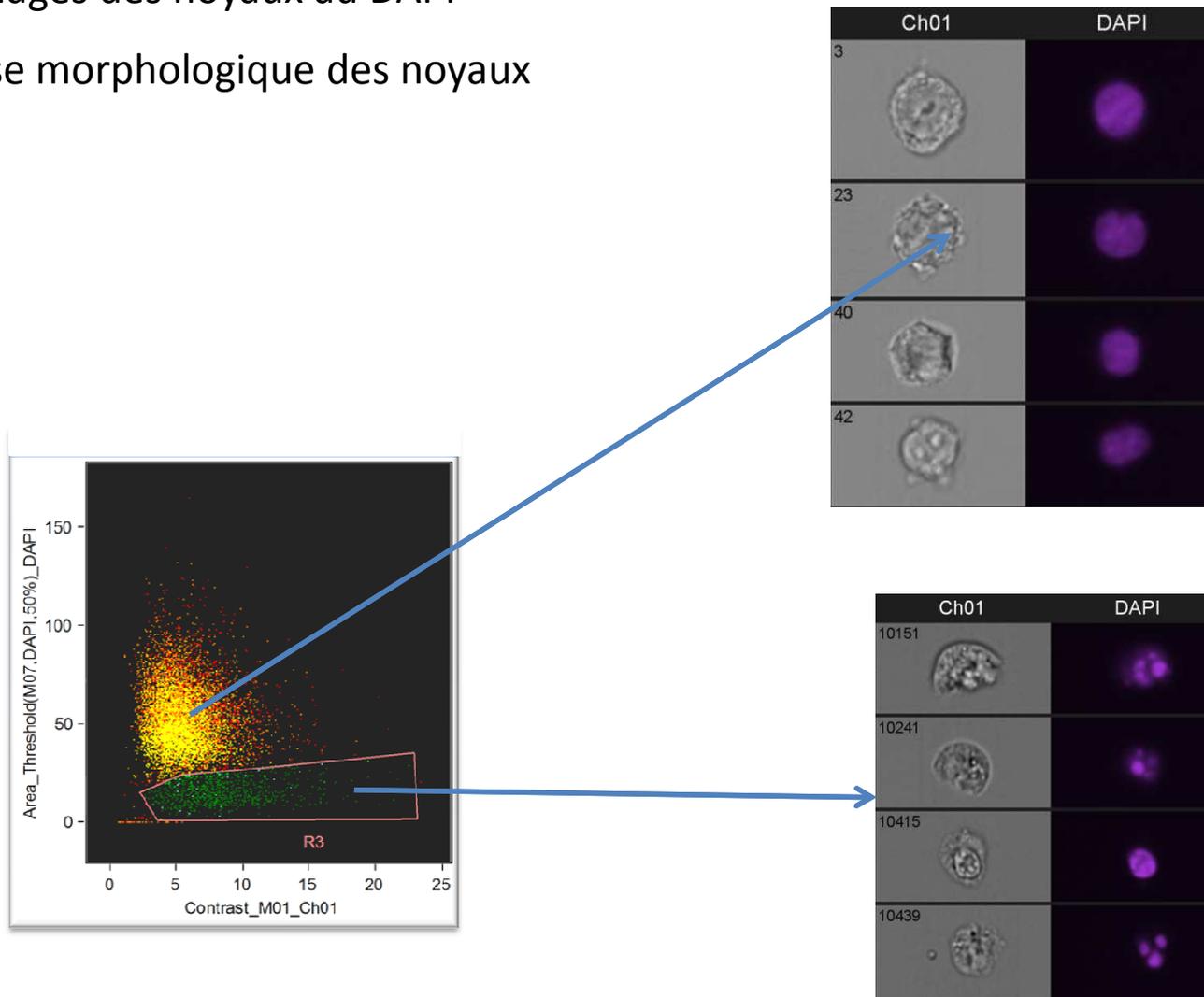
AUTOPHAGIE

- ❖ Quantification de la LC3-GFP
- ❖ Problème: forme soluble et lipidique



MESURE DE LA FRAGMENTATION NUCLEAIRE

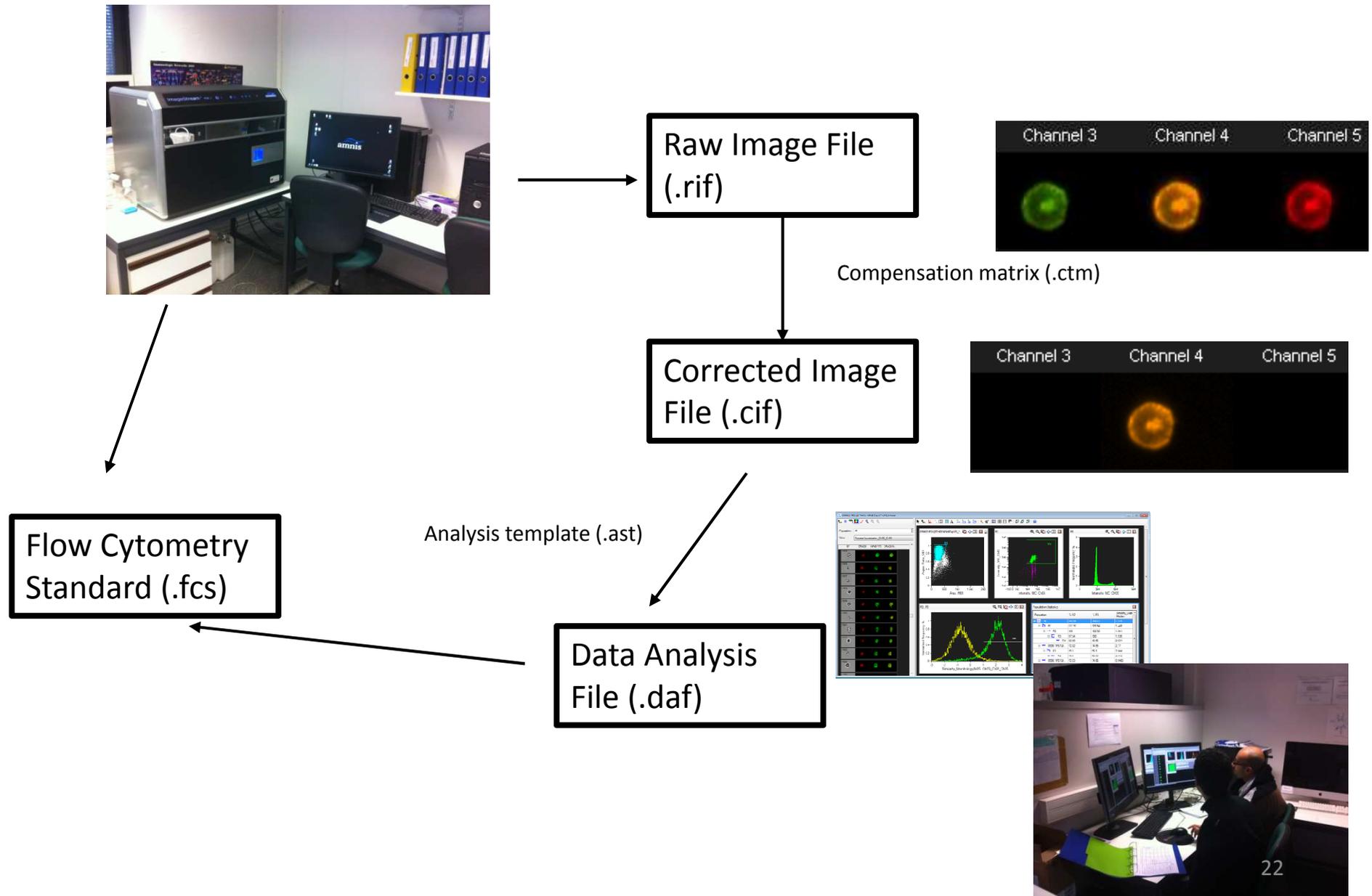
- ❖ Marquages des noyaux au DAPI
- ❖ Analyse morphologique des noyaux





GESTION DES DONNEES

DONNEES GENEREES



GESTION DES DONNEES: Importance de la taille des données générées

Cytométrie en flux

10 paramètres de fluorescence

50 000 évènements

10 échantillons

100 Mo

Cytométrie d'images

4 paramètres / images

50 000 évènements

10 échantillons

10Go

GESTION DES DONNEES : mise en place d'un serveur avec accès VPN (Virtual Private Network)

Navigateur web

https://.....accès depuis l'extérieur (labo...)

Identifiant
Mot de passe →

Utilisé pour le transfert uniquement & avec quota

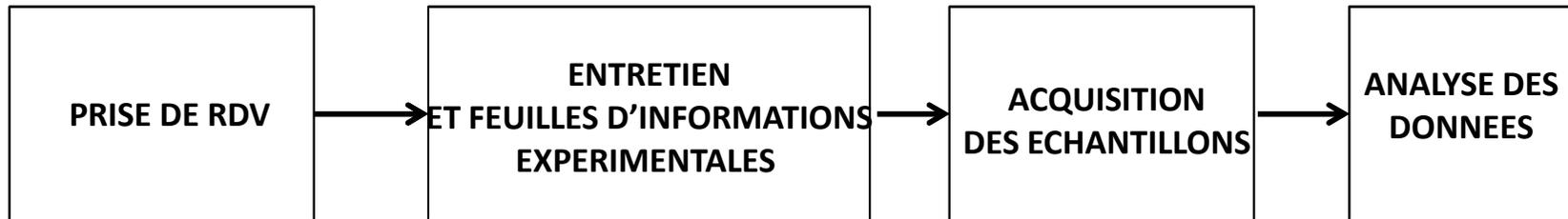
Crédit : Pascal George RRI RA

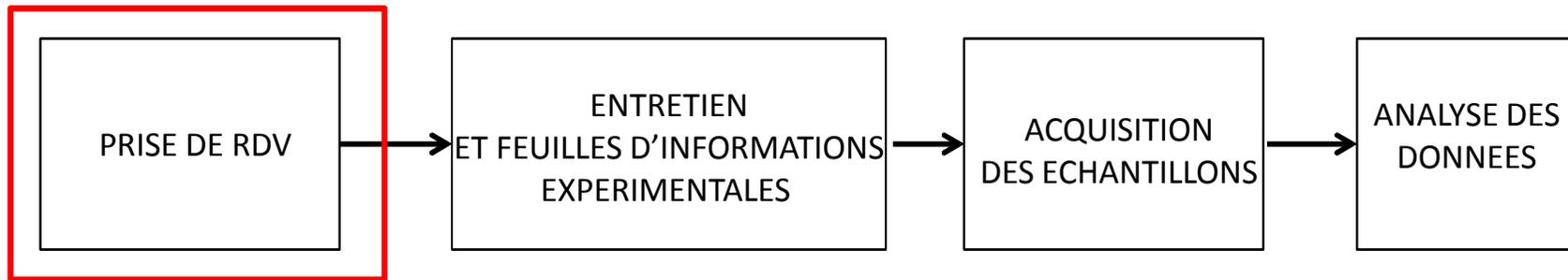
Pydio Community - Free non supported version © C. du Jeu 2008-2013 - http://pydio.io/



UTILISATION DE L'ISX

PROCESSUS D'UTILISATION DE L'ISX





Demande de RDV auprès des membres du plateau technique de cytométrie



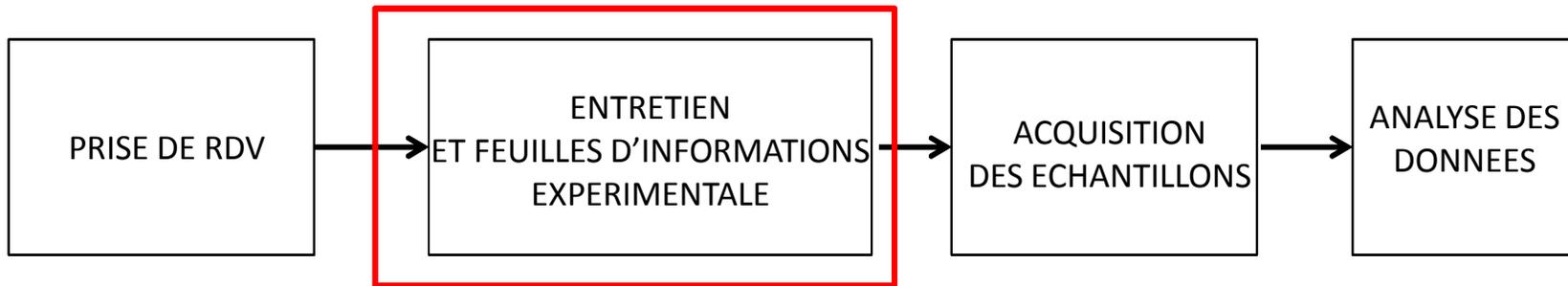
sebastien.dussurgey@inserm.fr

thibault.andrieu@inserm.fr



04 37 28 23 32

04 37 28 24 22



ImageStream Experimental Evaluation Worksheet

Name: *BRUC FRANK*
 Lab: *Cell*
 E-mail: *bruce.frank@imgsc.com*
 Phone: *04 37276457*

This document will help you define your ImageStream evaluation experiment and help us guide your sample preparation and produce satisfactory results.

The ImageStreamX is a high resolution high speed automated microscope that numerically quantifies cellular morphology and the intensity, location and co-location of fluorescent probes within tens of thousands of cells per sample. The ImageStream system can be equipped with 20x, 40x and 60x objectives to accommodate a wide range of microscopy experiments. It can also be equipped with optics that image the entire cell simultaneously in focus for accurate spot counting. The technology thus provides a wide range of objective and statistically robust microscopy applications. Please answer the following questions related to the experiment you plan to try on the instrument.

The type of application I wish to try (x all that apply):

Translocation of signaling molecules	<input checked="" type="checkbox"/>
Molecular co-localization	<input checked="" type="checkbox"/>
Internalization / Phagocytosis	<input checked="" type="checkbox"/>
Sub-cellular localization / Polarization	<input checked="" type="checkbox"/>
Conjugate analysis / Cell fusion	<input type="checkbox"/>
Apoptosis / Necrosis	<input type="checkbox"/>
Autophagy	<input type="checkbox"/>
Morphology-based cell classification	<input type="checkbox"/>
Shape change	<input type="checkbox"/>
Spot counting	<input type="checkbox"/>
Cell cycle / Mitosis	<input type="checkbox"/>
Flow confirmation / Artifact rejection	<input type="checkbox"/>
Other (please describe):	<input type="checkbox"/>

These ImageStream features are important for my application (x all that apply):

Numerical quantification of images	<input checked="" type="checkbox"/>
Automated image collection	<input type="checkbox"/>
Large sample sizes and population statistics	<input type="checkbox"/>
Time event analysis by microscopy	<input checked="" type="checkbox"/>
Other (please describe):	<input type="checkbox"/>

1



ImageStream MKII Data Acquisition Form

Title: *BCR functionality on T3 Heavy Plasma Cells*

Run date: *13-12-13* Run by:
 Researcher: *B. Frank* Institution:
 Phone: *04 37276457* E-mail:

Purpose and expected results: *Assess the functionality of BCR on T3 Heavy Plasma Cell through the monitoring of co-localization of Bcr and IgM.*

Describe gating strategy: *1) Focused Gate 2) Single Events.*

Cell Type: *Human Plasma Cell* Conc (x10⁶/ml): *1.0-10* Run Buffer: *PSS*

Treatment:

Ch	Band	Fluorochrome	Target	Notes
1	435-490	Brightfield	Morphology	
2	492-560	APC		
3	560-595	PE		
4	595-640			
5	640-745	Prop		
6	745-780	SSC	Granularity	
7	435-605	RV 488		
8	595-570			
9	570-595	Brightfield	Morphology	
10	595-640			
11	640-745	APC		
12	745-780			

File	Description	# of events
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

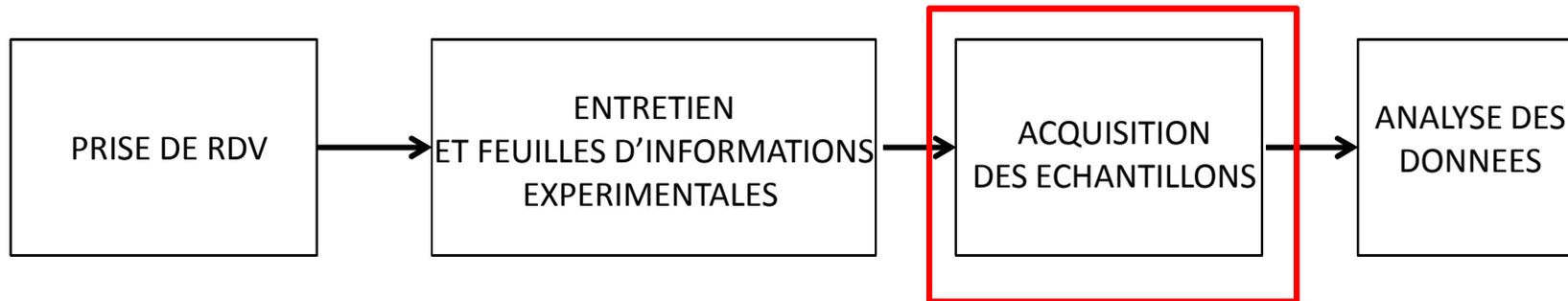
Notes: *Note expected subpopulation frequencies*

Collection Information:

Instrument:	400/375 power:	488 power:	561 power:
568 power:	755 power:	Mag:	EGF:
INSPIRE:	Speed:	Cone diameter: 10um	Velocity: 55 % Beads: 10%
Squash:	Collection Population:		

11/22/2013

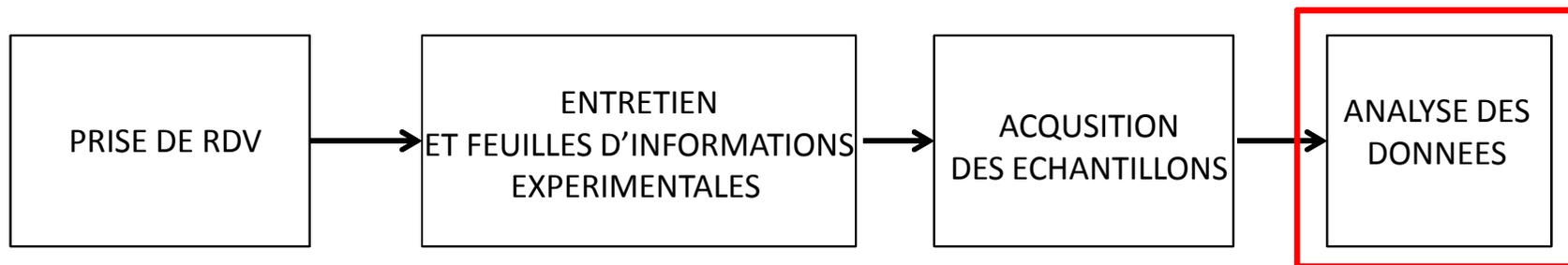
- Description technique de l'expérience : adaptée à l'ISX ?
- Discussion sur l'optimisation de la préparation des échantillons



-Par l'un des membres du plateau technique

-Par l'utilisateur après formation





-Par l'un des membres du plateau technique

-Par l'utilisateur : remise d'IDEAS, après formation



-Possibilité de collaboration avec le plateau, dans le cadre d'un projet long

Merci de votre attention