

1.1/

La participation budgétaire des équipes au fonctionnement du plateau

Ex. Lors de la rédaction des projets

Présentation des consommations et budgets sur 2017-2020 (maintenance/consommable) SUR FOND COMMUN

Année	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Consommables	561,84	981,85	2778,86	1072,59	XXX	XXX
Maintenances Leica	10091	10090,65	6281,65	8768,85	7799,5	8033,35
Autres maintenances	0	1993	0	2286,6	900?	900?
TOTAL	10652,84	13065,5	9060,51	12128,04	8699,5	8933,35

Déménagement

Exemple de frais de maintenance pour confocal SP8 à l'IJPB : 20 000 / an, avec remise 20%

Maintient du fonctionnement sur le fond commun?

*comment définit-on cette participation? Communication sur son utilisation ? montant fixe ou proportionnel à l'estimation du temps d'activité au sein du plateau BIOGER? (modèle plateau BM?). Accès aux plateformes extérieures?

*qu'en est-il si l'ingé plateau

- nécessite d'une formation pour l'utilisation du matériel?
- Participation à des congrès (MiFoBio)?

Equipe	Insérer le nom de l'équipe
Demandeur	Insérer le nom de la personne souhaitant une collaboration avec le plateau
Objectif de la demande	Décrire la question scientifique
Contexte de la demande	Décrire le contexte de la demande (révision d'un papier/fin de contrat- deadline à préciser s'il y en a un, nouveau projet, projet en cours)
Date de la demande	Mettre la date où la demande sera présentée au comité de pilotage (mois et année)
Période souhaitée	Indiquer la période idéalement souhaitée
Durée prévisionnelle	Indiquer le temps estimé
Projet associé	Indiquer si le plateau a été mentionné dans une demande de financement. Et si oui laquelle.

Détails du projet (~1/2 -1 page) Ou Présentation (jusqu'à ~5 pages pptx)	Décrire le projet. Indiquer le titre général et détailler les techniques en imagerie/cytologie souhaitée. Préciser si les techniques mentionnées sont établies ou des mises au point sont nécessaires à faire.
---	--

Matériel/personnels prévu par l'équipe	Indiquer le matériel mis à disposition/achat prévu par l'équipe pour le projet
Achats à envisager	Si une personne de l'équipe va contribuer à la formation de l'ingénieur (ex. préparation de plantes infectées) ou/et participer au projet.
Budget prévu (oui/non)	Colorants/réactifs/anticorps (etc...) pour la préparation de l'échantillon déjà choisi, disponibles ou nécessité d'achat.
Equipement(s) plateforme BIOGER	Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d'être utilisé
Accès plateforme extérieur	Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d'être utilisé, et nom/lieu de la plateforme
Budget prévu (oui/non)	

Proposition d'une liste de matériels qui pourront être demandés dans les ANR :

***qui ne dépassent pas 20 K€**

Exemple de liste

Détecteur HyD pour microscope confocal: 17 000 euros (à voir si compatible avec SPE, nouveau confocal?)

un détecteur de type est déjà disponible mais un deuxième permettrait de faire de l'imagerie très sensible en deux couleurs simultanée. La technologie hybride HyD est une combinaison de PMT (type GaAsP) et d'APD (diode avalanche) qui offre une très haute sensibilité ainsi qu'une plus grande dynamique.

Objectif Plan Apochromat 63X à eau : 10 000

Objectif important pour l'observation du vivant.

Logiciel ZEN FCS + cubes de filtres adaptés : 16 000 euros:

permet de réaliser des expériences de Fluorescence Correlated Spectroscopy sur le confocal Zeiss, afin de mesurer les dynamiques de molécules fluorescentes.

Laser HeNe 543 : 6 000 euros

mRFP, mPlum, mCherry, Alexa 594, Texas Red.

Laser Argon 5 raies : 13 000 euros

Ce laser comprend la raie 488 utilisée pour la GFP ainsi que la 514 pour la YFP.

Une batterie d'onduleur : 1 200 euros

Les onduleurs nous permettent de protéger les microscopes confocaux contre les aléas électriques. C'est un boîtier placé en interface entre le réseau électrique (branché sur le secteur) et les matériels à protéger

Un onduleur 10kVA : 4 000 euros

permet d'onduler la pièce cytogénétique et de protéger l'ensemble des pièces optiques de la pièce (et les ordinateurs) contre les microcoupures, les chutes de tensions et de permettre de quitter les sessions proprement en cas de coupure de courant.

Un cube séparateur d'ondes: 2000 euros :

avec BP 580-640 pour réaliser des expériences d'anisotropie de fluorescence sur marqueurs fluorescents rouges

1.2/

La priorisation sur les
investissements/renouvellements
/réparations des matériels

*Caméra couleur actuellement **défaillant** sur loupe L2. (environ 5k-7k euros)
+Changement de caméra peut impliquer changement d'ordinateur car TOUS les microscopes et caméras du plateau NE SONT PAS sur Win10

ex confocal SPE frais ordi total 8 950 euros

ex épifluo DM5500B, 2000 euros

A moyen terme

*Source fluorescence souhaitable de changer pour question de sécurité (source à gaz de mercure en milieu confiné) + avantage LED: stabilité (environ 4k euros)

*Reflexion sur passage à des logiciels de pilotage comme MetamMorph ? micromanager ? indépendant des changement de système windows (expérience à Curie ou IPGG ou certaines lignes à SOLEIL)

*Investissement sur motorisation du microscope à fluorescence pour automatisation ou faire des acquisitions en mosaïque ou time laps :

-option time laps Leica 1762 euros

-option mosaïque Leica 4000 euros

2/

**BILAN Plateau cytologie – imagerie
2019/2020**

Aménagement du plateau cytologie-imagerie

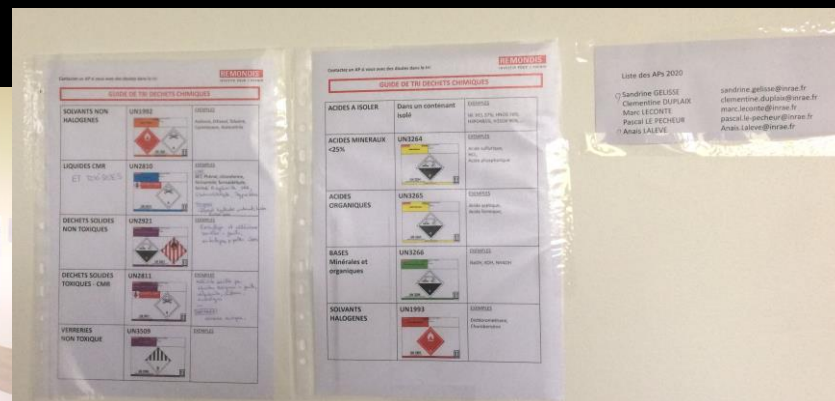
Mise en place d'une pompe à vide avec nanomètre:

- expérience sous sorbone possible
- contrôle de la pression et +/- de la vitesse
- fixation échantillons biologiques, ChiP?



Affichage pour orienter les utilisateurs pour le tri des déchets

- FDS (serveur unité)
- Guide des tri (locaux-intranet)



Remise en route du vibratome :

- utilisation possible après formation par un agent plateau
- Formation appareil 30min mais suivi avant et après par agent plateau pour la préparation des échantillons

Tri des équipements utilisables ou à recycler/jeter

- plateau R+1 ok
- soute poudre colorant > accessible R+1
- archive : pièces de microscopes
- L2 cyto : collection J.S.



Mise à jour et modification - communication : visibilité interne et externe

- du site internet/intranet BIOGER et site Université Paris-Saclay
- des dossiers sur le serveur de l'unité

Plug in labs Université Paris-Saclay

Rechercher par mots-clés | Rechercher par domaines d'innovations | Aide et accompagnement | Créer un compte

Plateforme technologique

Demande de modification | Imprimer

PLATEAU DE CYTOLOGIE - MICROSCOPIE (UMR BIOGER)

0_Organisation_generale	01/07/2020 10:27	Dossier de fichiers
1_Inventaire_appareillage_produits	28/08/2020 10:21	Dossier de fichiers
2_Appareillages_procedures	30/06/2020 12:09	Dossier de fichiers
3_Protocoles_CYTO	07/07/2020 09:35	Dossier de fichiers
5_Presentations	12/06/2020 12:39	Dossier de fichiers
6_CR_Comite_pilotage	07/09/2020 12:25	Dossier de fichiers
7_biblio	03/07/2018 14:35	Dossier de fichiers

Cytologie et microscope

Le plateau cytologie et microscopie de BIOGER a été créé dans le but d'apporter un soutien de proximité aux équipes de l'unité.

Composition du plateau :

Kaori Sakai
01 30 81 45 95
kaori.sakai@inrae.fr

Richard O'Connell
01 30 81 45 82
richard.oconnell@inrae.fr

Activité au sein du plateau :

Fungal protein localisation

Localisation at the root of *Bid133* (Histo-1000), a transcription factor regulating biotic and abiotic stress, a biotic secondary metabolite

Bid133

Phenotypic analyses

Morphogenesis of mutant, spore germination (hyphae blue staining) and hyphal growth (cell wall staining with calcofluor white)

Bid133

Immunolocalisation

Immunofluorescence labelling (FITC, green) of effector protein, CHL2, on the surface of biotrophic hyphae of *Colletotrichum*. Wheat Germ lectin labelling (TRITC, red) of micrographs, hyphae *Colletotrichum*

Plant Defense reactions

Callose papillae deposited by epidermal cells at *Colletotrichum* penetration sites. Stained with aniline blue fluorescence

Colletotrichum

Effector localisation in plant compartment

Tobacco epidermal leaf cells infiltrated with *A. longum* and expressing AvrLys-7 effector without signal peptide fused to an eGFP reporter gene

72 hpi. Nucleus cytoplasmic localisation

A. longum

Sample preparation & Instruments

Our samples undergo different processing (discoloration, clearing, fixation, embedding, sectioning by ultramicrotome or vibratome) are possible. Observations realized with Leica DM5500 Fluorescence, Leica confocal TCS SP5 or Leica fluorescence stereomicroscopes

All species

Adaptation/ Evolution

In vitro evolution of *Aspergillus niger*. Comparison of growth rate between an ancestor (EGFP tag) and the evolved strain (500 generations). Stained with Calcofluor white

Aspergillus niger

Monitoring the infection process

Infection of grape berries by *B. cinerea* under noble rot conditions in grey mold conditions. 800-1000 strains infecting grape berry cells

B. cinerea

Lien externe : Université Paris-Saclay Plug in lab

Conseils et accompagnements

Cytologie

- *Test de colorants (RL, ECCP – TD, EGIP)
- *Partage d'information sur les colorants disponibles (BIOGER)

Imagerie

- *Analyse d'image, automatisation (JFD, ECCP)
- *Analyse d'image, semi-automatisation, comptage (EG, EPLM)
- *Analyse d'image, proposition d'outil segmentation, FreeD (AJ, EPLM)
- *Conseil acquisition (AG, ECCP - FB, EPLM)
- *Transfert de données (BIOGER)

Microscopie

- *Utilisation microscope/caméra/logiciel (NV/VL/JN, EPLM)
- *Construction lignée transgénique fluo et compatibilité avec appareillage (JFD, ECCP)
- *Orientation appareillage, proposition d'outils (EG, EPLM – NT, EPLM)
- *Procédures CoVID (BIOGER)

Accès plateforme extérieur

- *Confocal avec détecteur hybride plus sensible que PMT sur confocal BIOGER (HC, ECCP)
- *Plateforme cytologie pour préparation d'échantillon dans paraffine (FB, EPLM)

Formations

Formation utilisateurs – interne

Confocal :

ROC, HC (ECCP)

Microscope fluorescent DM5500B:
VL (EPLM)

Users	DM5500B	Confocal
Yohann Petit	x	x
Francoise Blaise		x
Jean-Felix	x	x
Anne-Lise Boixel	x	
Pascal Le pêcheur	x	
Sabine Fillinger	x	
Anais Pitarch	x	
Elise Gay	x	
Jessica Soyer	x	
Nacera (M2 Isabelle)		x
Isabelle Fudal		x
Huyen Chu	x	x
Richard Oconnel	x	x
Aude GK	x	

Formation agent plateau

Interne

-Ultramicrotome et préparation d'échantillons (ROC)

Externe

-ANF, CNRS : Transmission du savoir faire

*retour : sensibilisation des nouveaux arrivants

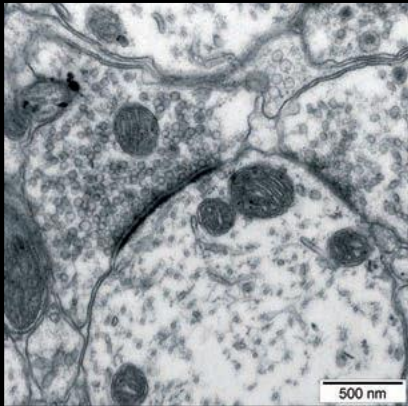
-Plateforme de Gif-sur-Yvettes : MET et préparation d'échantillons pour la microscopie électronique (demande en cours). Confirmé en 10-2020.

-Superresolution (Orsay, demande validée)

*prochain déverrouillage technologique

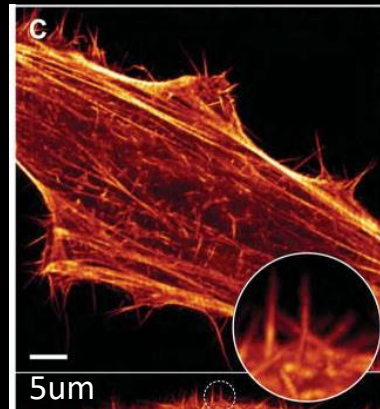
Electron Microscopy

Transmission Electron Microscopy Ultrastructure



Resolution: electron size
but :
No fluorescence
No dynamic
Limit of staining tools
(no fusion protein)

Super Resolution Between confocal and TEM (actin, tubulin)

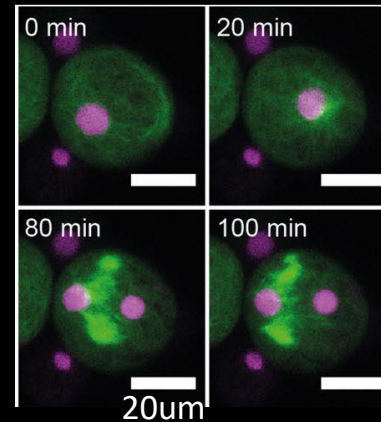


Resolution : 50nm in x, y, z axis
Fluorescence, Ph, DIC
z-stack, numerical zoom
But:
Dynamic is more difficult
Technics for probes/sample/set
up preparation is required

**Hot topic, more and more
commercial devices**

Optical Microscopy

Confocal Tiny structure in 3D



Resolution : 0,2μm in xy axis
0,4μm in z axis, spectral (lambda)
Fluorescence, Ph, DIC
Dynamic
z-stack, numerical zoom

Wide Field / Fluorescence (video microscope)



Resolution : xy 0,2μm but in z is
the thickness of sample
Fluorescence, Ph, DIC
Dynamic
but :
No z-stack (need deconvolution)
Single frame (no zoom)

**More and more « home
made » set up : cameras
(micromanager, metamorph)**

Activités - projets

Assurance de la qualité des matériels mis à disposition

*Révision des pipettes du plateau – pour la cytologie en particulier



*Gestion de la maintenance des microscopes classiques

*Gestion et négociation de la maintenance des microscopes sous contrat Leica (confocal et épifluorescence)

Assurer la bonne pratique des appareillages et hygiène

*Rédaction des protocoles d'utilisation en français et anglais

*Format quick guide (L2, DM5500B) pour pique de rappel chez les utilisateurs déjà formés

Veille technologique

-Liste de diffusion cytobioger

-Webinar réseaux microscopistes et analystes en bioimagerie

Test vibratome (éviter conservation à long terme)

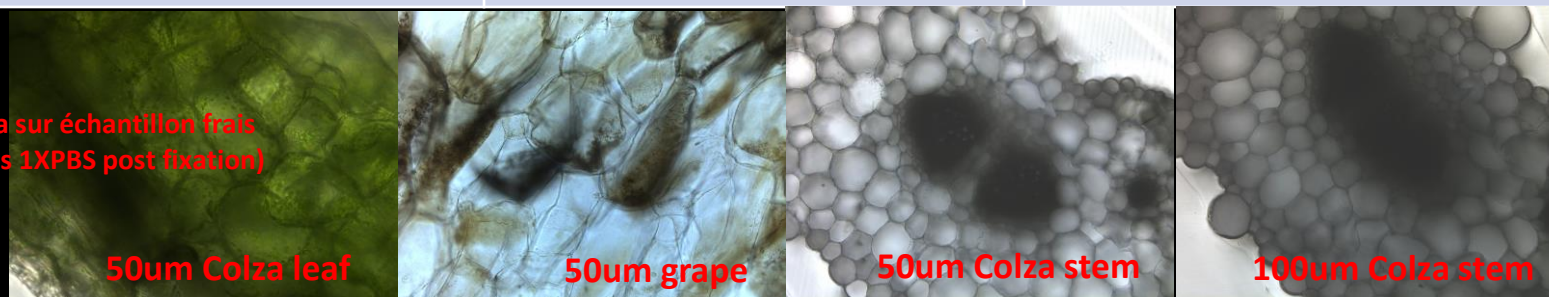
Préparation de l'échantillon modifié et simplifié. 30min.

Test d'optimisation : épaisseur / vitesse de coupe

Vitesse / Epaisseur	50um	100um
V6 vitesse optimum	Dépend de la rigidité (si échantillons frais ou pas)	OK mais épaisseur pas toujours compatible avec microscopie

Blé : OK

Feuille Colza sur échantillon frais
(5 jours dans 1XPBS post fixation)



Mise au point d'inclusion des échantillons dans la résine (conservation à long terme) :

Temps de préparation minimum 1 semaine.

-Résine pour M. électronique: 2 type de résine.

Test en cours : si bonne inclusion, facilité de coupe.

-LR white : compatible avec immunohistologie, moins toxique

A envisager

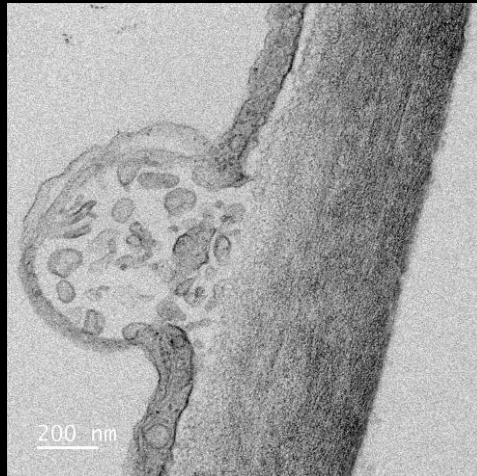
-Paraffine : compatible avec immunohistologie, pas toxique et facile à manipuler.
(manip prévu avec FB, EPLM)

-Wax (ECCP) : pour protéine sensible à la température

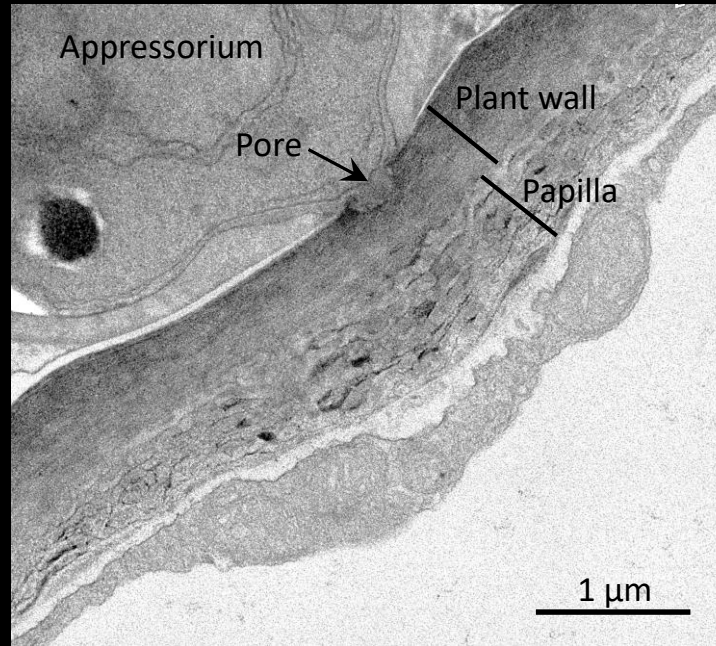
BILAN Projet sge1

First trial (in Bioger and CNRS TEM platform)

Plant MVB fusing with plasma membrane (uninfected epidermal cell)



In planta: Col0 – Δ sge1, 4dpi
Chemical fixation



Pas de résultat scientifique à présenter car nécessite d'autres acquisition au MET (Gif sur Yvettes), processus ralenti par CoVID car accès retreint.

Néanmoins ce projet à permis un apprentissage de l'ensemble de l'expérience MET :

- fixation / enrobage
- coupe ultramicrotome
- préparation d'échantillons pour la MET
- Coloration MET (Gif) / MET (Gif)

Séminaires et « réseautage »

Interne

- * Présentation parcours Kaori SAKAI 2019

Externe

- * Journée Réseau d'Imagerie Paris-Saclay (RIC)

- * Journée Réseau des microscopistes de l'INRAE (Rmui)

- * Journée SPE

Réunion reporté à 2021

- * Journée MIV plant (Versailles) : microscopie « home made » et microfluidique, invité

- * MiFoBio : réunion microscopiste + entreprise bisannuel, comité d'organisation

- * RIC Paris-Saclay : journée plateau/platforme – entreprises de Saclay, représentant BIOGER

Perspectives et autres activités prévu courant 2021:

- Rédaction de projet pour demande de financement d'un nouveau confocal
- Préparation du déménagement Saclay

3/ Divers

nouveaux arrivants/formations,
recueil de souhaits/suggestions