

PATY Lilian
CHOURIA Emna
CHEN Xiangdong

Promotion 138



Projet Scientifique en Équipe

Construction d'un microscope à
nappe laser pour observation
d'une puppe de drosophile

Méthodes et protocoles

Table des matières

<u>I. Système optique.....</u>	<u>2</u>
1. Matériel.....	2
2. Mise en place du système optique	2
<u>II. Alignement du laser.....</u>	<u>4</u>
<u>III. Culture de drosophiles.....</u>	<u>4</u>
1. Choix des lignées.....	4
2. Cycle de vie de la drosophile	5
3. Matériel.....	5
4. Protocole pour la culture.....	6
<u>IV. Montage des pupes de drosophiles dans le système optique.....</u>	<u>7</u>
1. Méthode choisie.....	7
2. Matériel.....	8
3. Protocole de préparation des échantillons.....	8
<u>V. Acquisition et traitement d'images.....</u>	<u>9</u>
1. Acquisition d'images avec HCLImage Live	9
2. Obtention d'images 3D plan par plan sur ImageJ	10

I. Système optique

1. Matériel

Pour notre montage, nous nous sommes grandement inspirés du modèle proposé par OpenSPIM, plateforme en libre accès qui propose un guide très complet pour les membres de la communauté scientifique désireux de monter leur propre système de microscopie à nappe de lumière. La liste du matériel conseillé par OpenSPIM est disponible sur cette page : https://openspim.org/Table_of_parts.

Voici les principaux éléments que nous avons utilisé :

- 1/2" (Ø12.7 mm) SM05-Mounted Frosted Glass **Alignment Disk** w/Ø1 mm Hole, Thorlabs, 29,52€
- Metric optical breadboard
(https://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=159&pn=MB3045/M#1996)
- 2x f=60 mm, Ø1" Achromatic Doublet, SM1-Threaded Mount, ARC: 400-700 nm (Thorlabs, 2x 96,40€)
- 1x f=30 mm, Ø1" Achromatic Doublet, SM1-Threaded Mount, ARC: 400-700 nm (Thorlabs, 2x 103,28€)
- **Ø1" (Ø25.4 mm) Cylindrical Achromat**, $f = 50$ mm, ARC: 350 - 700 nm (Thorlabs, 369,85 €)
- Water dipping **objective lens** (10x/NA=0.3) (Olympus, UMPLFLN 10xW, 1 105 €)
- Water dipping **objective lens** (20x/NA=0.5) (Olympus, UMPLFLN 20xW, 1 996 €)
- Hamamatsu ORCA-Flash4.0 LT Digital Camera
- Laser Oxxius LBX-488 (wavelength 488 nm, 100 mW :
<https://www.oxxius.com/products/low-noise-lasers/>)
- 2 single-band bandpass filters, around 488 nm and 520 nm (Semrock, 2x 345 €, <https://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF02-472/30-25>, <https://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF01-520/35-25>)

En plus de ces éléments principaux, nous avons également utilisé de nombreux éléments Thorlabs de base (vis, pieds, etc). Le matériel nécessaire pour monter les échantillons biologiques et les translater est détaillé dans la partie sur le montage des pupes.

2. Mise en place du système optique

Le schéma optique du montage est présenté en figure 1 :

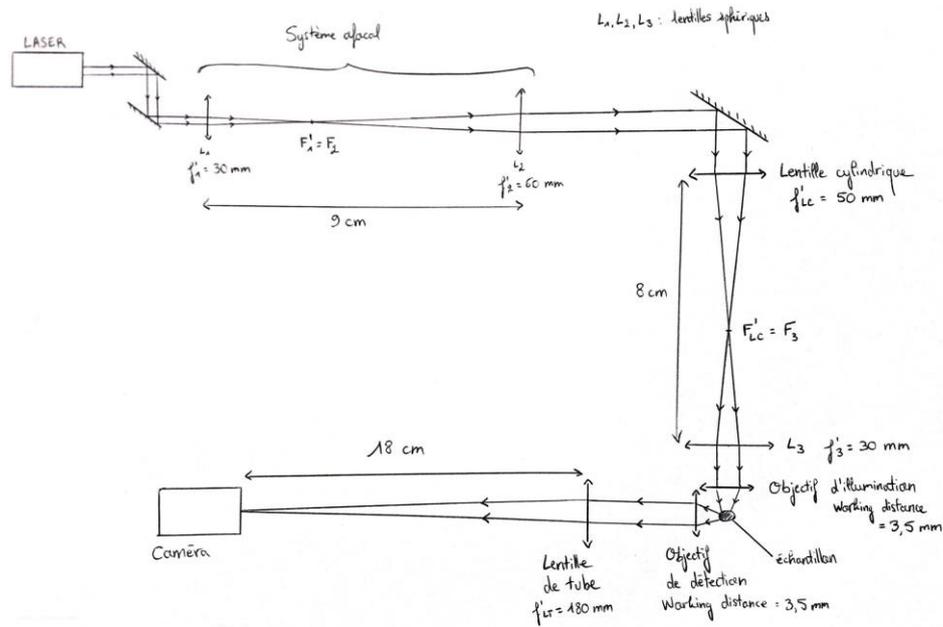


Figure 1 - Schéma optique du montage

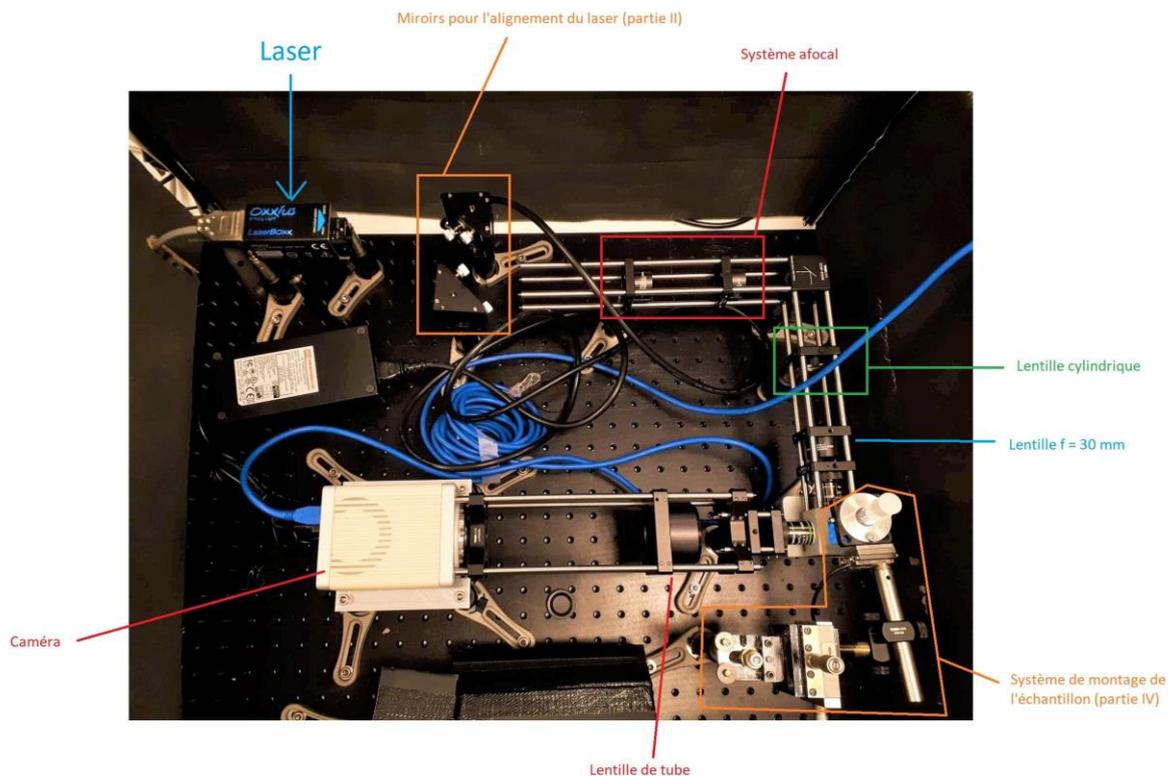


Figure 2 - Photo du montage vu du dessus

Pour distinguer le signal fluorescent du bruit lumineux ambiant, il est important d'isoler tout le système optique. Pour cela, nous avons entouré notre système d'un cadre de carton noir, et nous avons également recouvert la cage qui entoure le chemin optique de carton noir.

II. Alignement du laser

Tous les éléments du système optique sont alignés à l'aide d'une cage constituée de tiges métalliques (https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4124). Il faut ensuite que le faisceau laser soit bien aligné avec cette cage : le moindre petit décalage par rapport au centre des lentilles peut dévier le faisceau, et cette déviation se fera d'autant plus ressentir à grande distance, et nous avons besoin que tout le faisceau rentre bien au centre de la lentille cylindrique et de l'objectif pour former une belle nappe laser avec un maximum de signal.

Le matériel nécessaire à l'alignement du laser est le suivant :

- deux miroirs à inclinaison réglable (Thorlabs)
- une cible d'alignement
(https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=7296, Cage Alignment Plates, ces cibles peuvent être posées sur la cage métallique)

Placer la cible vers la fin du montage optique. Déplacer le faisceau à l'aide des miroirs pour atteindre le centre de la cible : un miroir sert à se déplacer verticalement, et l'autre horizontalement. Toujours utiliser le même miroir pour le déplacement vertical, de même pour le déplacement horizontal. Ramener la cible au début du montage, et aligner le faisceau au centre. Remettre la cible en fin de montage, régler, et continuer à aligner le laser en alternant début et fin de montage jusqu'à ce qu'un réglage au début du montage ne fasse plus bouger le faisceau en dehors du centre de la cible en fin de montage. Le faisceau laser est alors correctement aligné.

III. Culture de drosophiles

1. Choix des lignées

Pour obtenir un maximum de signal, nous nous sommes tournés vers des lignées de drosophiles exprimant la GFP de manière ubiquitaire, c'est-à-dire couplée à des protéines exprimées dans de nombreuses cellules et en grande quantité, indépendamment du stade de développement, comme les protéines d'adhérence, la tubuline, la myosine ou encore l'actine.

La base de données couramment utilisée est FlyBase : <http://flybase.org/>

Nos lignées nous ont été fournies par un laboratoire de l'Institut Pasteur, que nous remercions pour leur aide : <https://research.pasteur.fr/fr/team/cell-death-and-epithelial-homeostasis/> (contact : Léo Valon).

Les lignées utilisées pour mettre en application notre montage sont les suivantes :

- sqh-utABD::GFP/Cyo ; sqh-MoesABD::mCherry/TM6b
(sqh → regulatory light chain of the nonmuscle type 2 myosin)

- endo-Ecad::GFP (KI) , ubi-H2A::mRFP /Cyo
(GFP sur la cadhérine E)

2. Cycle de vie de la drosophile

La durée de vie et le cycle de reproduction de la *mouche du vinaigre* (*Drosophila melanogaster*) dépend de la température. La figure ci-dessous présente le cycle de reproduction de la drosophile à 25°C.

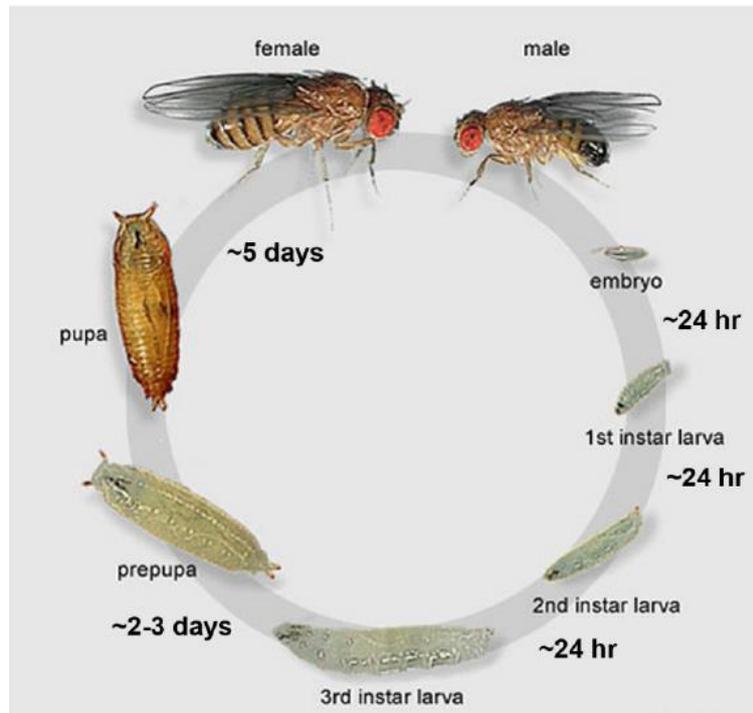


Figure 3 - Cycle de reproduction de *D. melanogaster* à 25°C ^[1]

Pour mettre en application notre montage, nous avons choisi le stade pupal, qui présente l'avantage d'être immobile, facilement prélevable dans le tube de culture (voir protocole) et facilement manipulable.

3. Matériel

Le matériel pour la culture des drosophiles nous a été fourni par le Laboratoire de Plasticité du Cerveau (ESPCI, contact : Alice Pavlowsky) :

- tubes de culture en verre, avec bouchons en mousse
- milieu de culture

Nos cultures ont été réalisées à température ambiante, mais pour plus de contrôle sur le temps du cycle de reproduction, on peut placer les tubes dans un incubateur (18 à 25-30°C selon la durée des cycles souhaitée).

Protocole pour la préparation du milieu de culture :

Matériel nécessaire (pour 30 L de milieu) :

- 500 mL d'éthanol technique (absolu, 99,99°)
- 100 g de 4-hydroxybenzoate de méthyle (antifongique)
- 30 L d'eau
- 2 kg de farine de maïs (Limagrain Céréales Ingrédients, westhove maize H1)
- 1,8 kg de levure de bière Springaline BA10/0 BioSpringer
- 260 g d'agar-agar en poudre (VWR, référence : 20768.361)

Instructions :

- Dissoudre l'antifongique dans l'éthanol dans un grand bécher.
- Mettre 30 L d'eau chaude dans une marmite. Laisser chauffer sans agitation jusqu'à 80°C.
- Sous agitation vigoureuse et en maintenant une température élevée, mélanger dans l'ordre dans la marmite : la farine de maïs, la levure de bière, et enfin l'agar-agar. Couvrir et maintenir l'agitation pendant 5 minutes.
- Ajouter lentement le mélange éthanol-antifongique.
- Couvrir et agiter pendant 25 minutes, toujours à température élevée.
- Répartir dans les tubes, sur une hauteur de 2,5 à 3 cm.

4. Protocole pour la culture

Introduire des drosophiles dans un tube contenant du milieu de culture au fond. Quelques jours après, les drosophiles auront pondu dans le milieu. Les drosophiles consomment peu à peu le milieu : pour entretenir la culture, il faut procéder au repiquage (à faire tous les 2 à 5 jours selon la température). Le protocole pour repiquer la culture est le suivant :

1. Préparer le tube à repiquer et un nouveau tube contenant du milieu.
2. Tapoter le tube contenant les drosophiles sur la table pour faire tomber les mouches au fond.
3. Ouvrir le tube et transférer rapidement les drosophiles dans le tube neuf (superposer les deux tubes et tapoter pour faire tomber les drosophiles dans le nouveau tube).
4. Refermer les deux tubes.
5. Bien noter la date de repiquage sur le nouveau tube, ainsi que la référence de la lignée de drosophiles.

Dans le premier tube, des larves vont se développer dans le milieu, monter sur les parois et passer au stade pupal, pour enfin donner des adultes. Lorsque les tubes deviennent anciens, il ne reste plus beaucoup de milieu : ces tubes sont alors jetés (si ce sont des tubes en verre, ils peuvent être récupérés après passage à l'autoclave, dans ce cas il faut bien penser à retirer les étiquettes en papier).



Figure 4 - Tubes de culture avec des pupes accrochées sur les parois

Nous remercions le LPC pour l'aide apportée dans ce projet, pour le prêt du matériel et la mise à disposition d'espace dans leur laboratoire pour nos manipulations.

IV. Montage des pupes de drosophiles dans le système optique

1. Méthode choisie

Nous avons choisi d'utiliser des objectifs à immersion dans l'eau, et de suspendre les pupes à imager dans un gel d'agarose, lui-même immergé dans l'eau. A l'aide d'une seringue, on fait pendre un petit cylindre d'agarose contenant la puce, et ce cylindre est immergé dans l'eau.

La seringue est reliée à trois platines de translations, permettant de se déplacer selon les 3 axes x, y, z. Les platines pour les axes x et y sont contrôlées manuellement, mais la platine de translation selon z (pour obtenir des plans à différentes profondeurs de l'échantillon) est une platine piézo-électrique qui se contrôle plus finement grâce à un contrôleur électronique, et qui peut également être contrôlée depuis un ordinateur. Dans notre méthode, c'est bien l'échantillon qui se déplace, et non les objectifs.

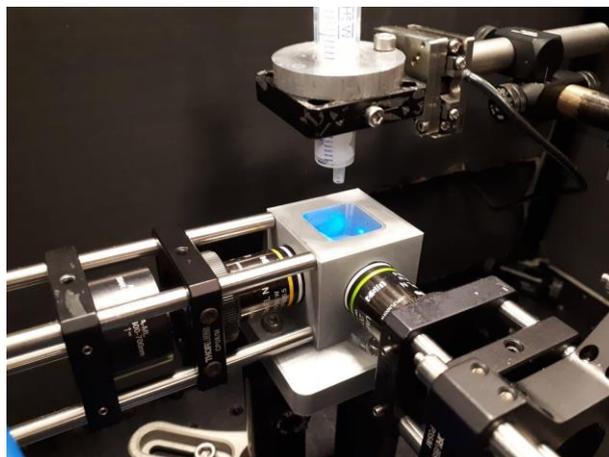


Figure 5 - Système de montage des échantillons. Les objectifs à immersion sont insérés dans une cuve remplie d'eau. La platine de translation visible ici est la platine PD1/M contrôlable finement par ordinateur.

2. Matériel

La chambre d'immersion de l'échantillon est une pièce que nous avons imprimé en 3D, en utilisant le fichier 3D proposé sur OpenSPIM. Le polymère que nous avons utilisé est l'acide polylactique. Ce polymère pose quelques problèmes d'étanchéité. Il est possible d'imperméabiliser la surface en la lissant à l'aide d'acétone. Le reste du matériel nécessaire au montage d'échantillons est le suivant :

- 2 joints toriques 20 mm x 3 mm (<https://lelebeck.de/1006.htm>, référence 1164, 10 centimes l'unité)
- seringue en plastique (l'idéal est d'utiliser un capillaire en verre avec piston : <https://www.drummondsci.com/capillary-micropipettes/wiretrol-i/>, à condition que l'échantillon soit suffisamment petit)
- deux platines de translation manuelles
- une platine de translation contrôlable par ordinateur : 20 mm Linear Stage with Piezoelectric Inertia Drive (https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_ID=12991, référence PD1/M)
- Contrôleur : K-Cube™ Controllers for Piezo Inertia Stages (même adresse Thorlabs, référence KIM001)
- Agarose à bas point de fusion (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9045?lang=fr®ion=FR>)

3. Protocole de préparation des échantillons

Les étapes pour préparer et monter un échantillon dans le montage est le suivant :

1. Préparer une solution d'agarose à 3% en masse dans de l'eau. Attention, si vous décidez d'observer un autre stade que la pupe, par exemple des larves qui ne sont pas protégées par une cuticule, il faut remplacer l'eau par une solution physiologique pour éviter tout choc osmotique qui dégraderait l'échantillon. Si la solution d'agarose est préparée à l'avance, elle va se gélifier à température ambiante. Il faut donc la faire fondre (au bain-marie) car la solution d'agarose doit être liquide dans un premier temps pour inclure une pupe à l'intérieur.
2. Prélever délicatement une pupe sur la paroi d'un tube de culture avec une petite pince, et la déposer dans une boîte de Pétri.
3. Déposer quelques gouttes de la solution d'agarose sur la pupe.
4. Rapidement (avant que l'agarose ne gélifie !), aspirer la pupe dans l'agarose avec la seringue. Il faut essayer de faire en sorte que la pupe soit bien entourée d'agarose au-dessus d'elle et en-dessous.

5. Attendre que l'agarose gélifie dans la seringue (1 ou 2 minutes).
6. Une fois l'agarose gélifiée, pousser la seringue de manière à faire pendre un petit cylindre d'agarose à son extrémité.
7. Remplir la cuve du montage d'eau. Fixer la seringue préparée au système de translation, et immerger le cylindre d'agarose dans l'eau. Positionner ce cylindre avec l'échantillon dans le faisceau d'excitation.

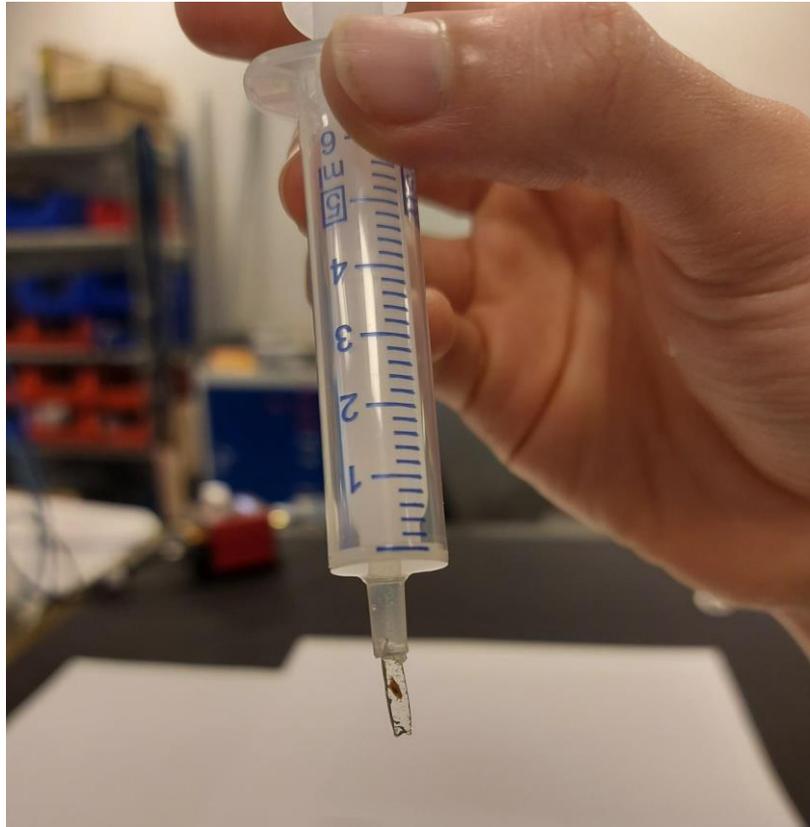


Figure 6 - Puce montée dans de l'agarose, suspendue à une seringue

V. Acquisition et traitement d'images

1. Acquisition d'images avec HCLImage Live

L'acquisition d'images avec la caméra Hamamatsu ORCA-Flash4.0 LT Digital Camera se fait avec le logiciel (payant) HCLImage Live (<https://hcimage.com/hcimage-overview/hcimage-live/>). La caméra est reliée par un câble USB à l'ordinateur. Il faut ensuite sélectionner la caméra sur le logiciel, dans l'onglet "Capture" (s'il ne s'affiche pas, cliquer sur "View" puis cocher "Capture pane"). On peut alors lancer l'acquisition en live, et faire des captures d'images depuis cet onglet "Capture". La fenêtre "Image Display" permet de voir l'acquisition en live et de régler certains paramètres tels que le contraste.

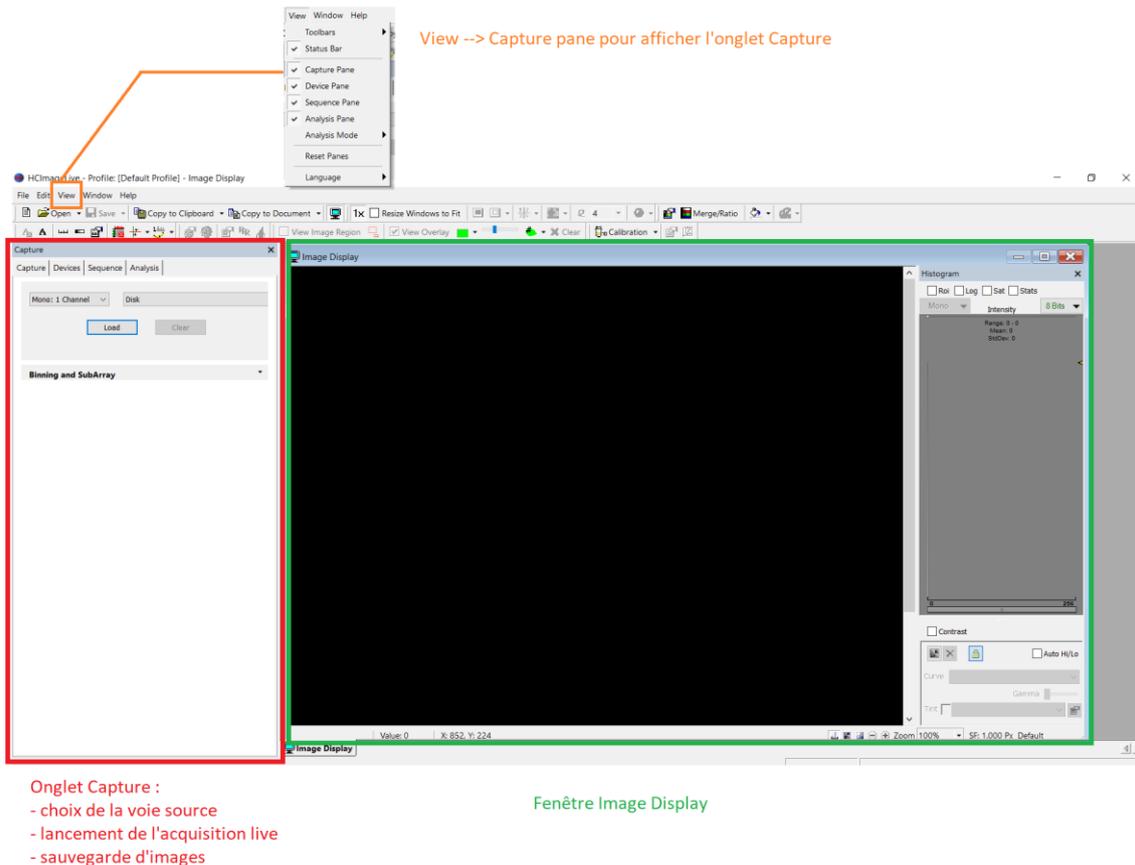


Figure 7 - Logiciel d'acquisition d'images HCLImage Live

2. Obtention d'images 3D plan par plan sur ImageJ

Ces images peuvent ensuite être traitées sur le logiciel (gratuit) ImageJ (ou sa version "étendue" Fiji : <https://imagej.net/Fiji>). On peut par exemple jouer sur le contraste des images, ou facilement mesurer des distances une fois l'échelle renseignée. La principale utilisation que nous avons faite de Fiji est la reconstitution d'images 3D plan par plan.

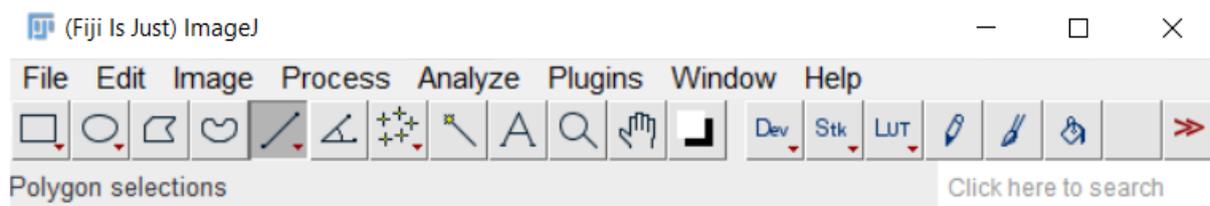


Figure 8 - Interface du logiciel Fiji

Pour obtenir une image 3D à partir d'une séquence d'acquisition de plans régulièrement espacés :

1. Ouvrir la séquence d'images : File → Import → Image sequence. Ouvrir la première image d'un dossier, et indiquer le nombre d'images à ouvrir. On obtient alors un "stack" avec les images de la séquence, que l'on peut faire défiler.

2. Régler l'échelle : Analyze → Set scale.
3. Projection 3D du stack : Image → Stacks → 3D project. Une fenêtre s'ouvre avec plusieurs paramètres réglables. Il est notamment important d'indiquer l'espacement entre les plans. On peut également régler différents paramètres de contraste, d'opacité, etc. Pour une projection 3D entière, choisir : Initial angle = 0 degrees, Total rotation = 360 degrees. L'incrément d'angle de rotation détermine le nombre d'images que va construire le logiciel (et donc le temps que cela va prendre !). Par exemple, un incrément de 10° pour une projection sur 360° nécessitera la construction de 36 images. Pour obtenir une vraie reconstruction 3D et non simplement une superposition de plans espacés par du vide, il faut cocher la case "Interpolate" (cela demande un plus long temps de calcul).

Références

^[1] MAYNARD Jason Christopher, *Identification of Essential Functions of GRP94 in Metazoan Growth Control and Epithelial Homeostasis*, Department of Cell Biology, Duke University, 2009.