

# UTILISATION DU SPINNING DISK CSU-X1 T°AMBIANTE

Allumage du système	2
Commandes du microscope et de la lampe	3
Faire une image en single camera	4
Faire une image en Dual camera	5
Faire une série d'image en Z	6
Faire une série d'image dans le temps	8
Multi-positions	9
Faire une mosaïque	10
Outils graphiques	13
Enregistrement des images et des paramètres	14
Eteindre le système	14

# Allumage du système

1. allumer les 3 blocs multiprises sur la table du microscope.

2. allumez le PC, utilisez la session « IJM ».

# 3. Désactiver la sécurité

o Obser

- 4. Démarrer le logiciel « ZEN » en cliquant sur l'icône située sur le bureau.
- 5. Sélectionnez l'onglet « Locate ».
- 6. « *BF*» permet d'observer en transmission.

Si vous voulez observer en contraste de phase ou en DIC, après avoir cliqué sur « BF » il suffit de sélectionner « PH » ou « DIC » sur l'écran TFT.

- 7. « DAPI » permet d'observer la fluorescence bleue.
- 8. « *GFP* » permet d'observer en vert.
- 9. « *DsRed* » permet d'observer en orange-rouge.
- 10. « *Cy5* » permet d'observer en rouge lointain.
- 11. « Lights off » ferme le shutter en lumière transmise ou en fluorescence.

Dans le cas d'une observation en lumière transmise, contraste de phase et contraste interférentiel de Nomarski (DIC), il est très important de procéder à des réglages sur le statif du microscope!

Reportez-vous aux panneaux affichés dans la pièce du microscope.



5 DAPI

Light Off





4 BF

# Commandes du microscope et de la lampe

# Côté droit

- 1. Baisser la tourelle des objectifs en position la plus basse.
- 2. Remonter l'objectif à la position de travail.
- 3. Vis macrométrique.
- 4. Vis micrométrique.
- 5. Ouvrir/Fermer le shutter en transmission « TL ».
- 6. Ouvrir/Fermer le shutter en fluorescence « RL ».

# Face avant

7. Réglage de l'intensité lumineuse avec la molette.



Déplacer la platine motorisée en X et Y. Maintenez le bouton enfoncé pour un déplacement rapide.

# L'écran tactile

- 1. Ouvrir / Fermer le shutter de transmission.
- 2. Ouvrir / Fermer le shutter de fluorescence.

Dans la rubrique « *Microscope* », dans le menu « *Control* », il existe différentes onglets permettant de :

- 3. Choisir l'objectif « Objectives ».
- 4. Choisir le bloc filtres pour la fluo « Reflector ».
- 5. Ajouter/enlever une lentille 1,5x « Optovar ».
- 6. Affichage de la transmission BF, contraste de phase ou DIC.
- 7. Taille du diaphragme d'ouverture
- 8. Puissance de la lampe halogène









# Faire une image en single camera

#### 1. Activer la sécurité



- 2. Cliquer sur l'onglet « Acquisition ».
- 3. Choisir le mode « single cam ».
- 4. Ouvrir le menu « Channels ».
- 5. Cocher la/les ligne(s) correspondants à vos fluorophores
- 6. sélectionner un seul canal (en gris clair).
- 7. fixer la puissance du laser désiré
- 8. Faites un « *Live* ».
- 9. Fixer manuellement le temps d'exposition.
- 10. Recommencer pour chaque canal désiré.
- 11. Cliquer sur « *Snap* » pour prendre l'image des canaux cochés.

ر Locate	<b>2</b> -	Processing	Analysis	
Default Exper	iment - Singl	e cam_405_48	8_561_638 *	<u>,</u>
	up			🎄 Reuse
AF Find Focus	Set Exposure	Live 8	ा Continuou	s Snap
<ul> <li>Z-Stack</li> <li>Tiles</li> <li>Time Series</li> </ul>	  s		Start	8 MB
<ul> <li>Experiment</li> <li>Auto Save</li> <li>Automatio</li> </ul>	t Regions n	Exp Au	periment Desi tomated Imag	gner ge Export
🕨 🖪 Imagi	ng Setup		~	Show All 📝
<ul> <li>Acquisition</li> <li>→ Acqui</li> <li>▲ Acqui</li> <li>▲ Channel</li> </ul>	on Paramete isition Mode nels	er	~	Show All
✓ Track1	WF 🔫	🖌 DAPI		Ref. 🗖 🔻
🔓 🗸 Track2	WF 🔫	✓ EGFP		•
✓ Track3	WF 🔻	🖌 DsRed		_ ▼
✓ Track4	WF 🔻	✓ Cy5		
Track5	WF ▼	Bright		<b>■</b> ▼
		cos nel.		
Track2	e 501	asers		
- ginseen	405	users.		0.0%
	405 0	0		
7	488	0		k0.0 % +
	561			0.0 % 🔤
	638 🛛 🗌			0.0 % 🛟
EGFP				
Camera	Fusio	on left		<b>15</b> -
Exposure	🔲 A	uto Exposure	Set	Exposure
Time	9 —		150.0000	🗘 ms 🔻
	Shift	30 % 🛟		
Shading	C Spe	orrection cific		Define
Focus Offs	set Z 0	.00 µm	• 6	
Pixel Shift	X 0	рх	Υ 0 рх	•
Display Se	tting Def	ault		

# Faire une image en Dual camera

1. Activer la sécurité



- 2. Cliquer sur l'onglet « Acquisition ».
- 3. Choisir le mode « Dual Cam ».
- 4. Ouvrir le menu « Channels ».
- 5. Cocher la ligne correspondant à vos fluorophores.
- 6. fixer la puissance des lasers désirés
- 7. Faire un « *Live* ».
- 8. Fixer manuellement le temps d'exposition.
- 9. Cliquer sur « *Snap* » pour prendre l'image

Locate Acquis	sition Processing	Analysis				
Default Experiment - Dual Cam 488_561 ; 488_638 * 🤰 🔹 🏘 👻						
* Smart Setup						
AF	o <mark>,</mark> 📼	<b>D</b> )				
Find Focus Set E	xposure 🖌 Live	Continuou	is Snap			
Z-Stack						
Time Series			00:00:19s			
Evperiment Pegis		eriment Deci	coperiment			
Auto Save		tomated Ima	ge Export			
Automation						
Acquisition	Mode		Show All			
4 🔺 Channels		~	Show All			
Track1 WF	▼ <b>GFP_1</b>	488)	Ref. 🗖 🔻			
Track2 WF	DsRed (S	i61)				
	Cy5 (638	)				
× ^ +	💼 Focus Ref.		* -			
Track1	SD I					
Lightsource	SD Lasers		0.0%			
405			80.0 %			
488		0				
561	0					
<u> </u>	0					
EGFP						
Camera	Fusion left	_				
Exposure	Auto Exposure	Se	t Exposure			
	Shift 30 % 🛟	130.000				
Shading	Correction		Define			
	Specific	•				
Focus Offset	Z 0.00 µm	e 6				
Pixel Shift	Х 0 рх	Y 0 px	:			
Display Setting	Default		P			
DsRed						
Camera	Fusion top		<u>18</u>			
Exposure	Auto Exposure	Se	t Exposure			
lime	Shift 100 % 🗧	150.000	🗘 ms 🔻			
Shading	Correction		Define			
	Specific	•				
Focus Offset	Z 0.00 µm	• 6				
Pixel Shift	Х 0 рх	Y 0 px	•			

# Faire une série d'image en Z

#### Acquisition du stack

- 1. Cocher « Z-Stack ».
- 2. Cocher « Show all Tools ».
- Choisir la séquence d'acquisition lorsque vous êtes en multicouleurs : faire un stack entier en une couleur puis passer au canal suivant « Full Z-Stack per Channel » ou tous les canaux à chaque plan « All Channels per Slices ».

Il existe deux modes d'acquisition : la première définit les bornes inférieures et supérieures du stack, la deuxième définit le centre du stack.

- 4. Dans le menu « Z-Stack » cliquer sur l'onglet « First/Last »
- 5. Cliquer sur « Live ».
- 6. Cliquer sur « *Set First* » pour définir le début du stack puis « *Set Last* » pour la fin

#### ΟU

- 4. Dans le menu « *Z-Stack* » cliquer sur l'onglet « *Center* ».
- 5. Cliquer sur « Live ».
- 6. Définir le centre de votre stack en cliquant sur « *Center* ».
- 7. « *Interval* » doit être coché pour garantir que la valeur choisie restera fixe.
- 8. Entrer la valeur en µm de l'intervalle souhaité.
- Pour choisir une résolution optimale cliquer sur la distance indiquée à côté de la mention
   *« Optimal »*.
- 10. La taille du stack est indiquée dans « Range ».
- 11. Le nombre de coupes peut être modifié dans « *Slices* ».
- 12. Lancer l'acquisition en cliquant sur « *Start Experiment* ».





#### Multidimensional Acquisition



Page 6 sur 14

### Visualiser le stack

A la fin de votre acquisition, votre stack est affiché au centre de l'interface ZEN.

Dans l'onglet « Dimensions » :

- 13. Pour se déplacer dans le stack, il suffit de bouger le curseur du « *Z-Position* ».
- 14. Le mode « *Gallery* » affiche l'ensemble des images composant le stack.
- 15. Le mode « *Ortho* » permet d'avoir une vue en coupe de votre stack.
- 16. Le mode « *3D* » permet d'avoir une visualisation en volume de votre stack.





# Faire une série d'image dans le temps

- 1. Cocher « Time Series ».
- 2. Ouvrir le menu « Time Series ».
- 3. Définir l'intervalle de temps entre deux images.
- 4. Choisir le nombre de cycle ou la durée d'acquisition.
- Remarque : la durée d'un stack Z ou mosaïque doit être incluse dans la durée de l'intervalle de temps. Vous pouvez le mesurer en cliquant sur « *Measure Speed* », la valeur s'affichera dans la rubrique « *Interval* ».
- 6. Pour pouvoir faire une acquisition avec un intervalle de temps minimal, cocher « *Use Camera Streaming if Possible* ».

A la fin de votre acquisition, votre série est affichée au centre de l'interface ZEN.

7. Dans l'onglet « *Dimensions* » vous pouvez faire défiler votre série en bougeant le curseur de la rubrique « *Time* »





# **Multi-positions**

- 1. Cocher « *Tiles* ».
- 2. Ouvrir le menu « Tiles ».
- 3. Ouvrir la rubrique « Positions ».
- 4. Cliquer sur « *Advanced Setup* » pour afficher l'espace dans lequel vous allez définir vos différentes positions.
- 5. Cliquer sur « Live ».
- 6. Double cliquer, au niveau de l'espace de navigation, à l'endroit où vous voulez acquérir une image ou déplacez-vous avec la manette.
- 7. Une fois positionné, cliquer sur la flèche au niveau de la rubrique « *Positions* ». Répéter cette opération à chaque fois que vous voulez enregistrer une nouvelle position.

![](_page_8_Figure_8.jpeg)

- 8. Dans l'onglet « *Single Positions* », vous pouvez voir la liste des coordonnées de toutes les positions que vous avez enregistrées.
- Cliquer sur « Start Experiment ».
   Il est possible de faire de la multiposition sur différents formats de plaque de puits.
   Demander conseil aux ingénieurs de la plateforme.

# Faire une mosaïque

#### Acquisition de la mosaïque

- 1. Cocher « *Tiles* ».
- 2. Ouvrir le menu « Focus Strategy ».
- 3. Choisir l'option « Local Focus Surface ».
- 4. Sélectionner « Fixed Z-position ».
- 5. Ouvrir le menu « Tiles ».
- 6. Cliquer « Advanced Setup ».
- 7. Cliquer sur « *Live* ».
- Au centre de l'interface du software, l'espace de navigation s'affiche. Double-cliquer sur la position souhaitée pour placer la mosaïque ou la déplacer avec la manette.
- Dans le menu « *Tile Regions* », cliquer sur « *Tiles* » et entrer les dimensions de votre mosaïque. Celle-ci prendra comme centre la position actuelle.
- 10. Cliquer sur « + », la mosaïque se dessine alors sur l'espace de navigation.
- 11. Cliquer sur « *Start Experiment* » pour lancer l'acquisition.

ZEN T	iles - A	Advance	ed Setup - ZEN	pro 2012				
File	Edit	View	Acquisition	Graphic	s To	ols	Window	Help
5		ਿ		-	สั		Create	Image
-	-		 	a		W		
(d)	20 rate	Acqui	sition Droce	scing	Analy	cie.		
LUC	-010	Acqui	Sidon Proce	ssing	Anoly	513		
Experi	iment l	Manage						
Defa	ult Zei	ss - Fluc	o + TL - Camer	ra N&B *				*-
(+ 5	mart S	etun					Show all T	ools
( <u>/</u> ~ J	inuic 9	ciup				100		0013
	0	ľ	<b>(</b> )		<b></b>		Ó	
Set	Expos	ure	7 Live	Cont	tinuou	s	Snap	
-								
Z-	Stack							
	es ma Car	18	Thes			N.	<u> </u>	
	hanne	le por Ti	le	-			65.91	
Aire	manne	is per ri			1	Start I	Evnerimen	+
						June	spennen	<u> </u>
₩ Se	etup N	Manage						2
×.	🗉 Ligł	nt Path S	Settings			D	Show All	
:: A	cauisi	tion Pa	irameter					
			Mada				Shaw All	
		Tome	Mode					
	L Cha	nnels	noue			1	Show All	7
2	) Foc	us Strate	eqv				Show All	
	1.5		1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 - 1999 -					
LOG	cal Foc	us suna	ice				5	
•	Referer	nce Cha	nnel					
	Focus	Surface						
De	termir	ne 7-Po	sition of Supp	ort Points	hv			
	ived 7	Dositio	o ann an	one n'onnes	~)			
	IACU Z	T OSICIO					-	
-								
* N	lultidi	mensic	onal Acquisiti	ion				
() -	🗉 Exp	eriment	Designer			1	Show All	
-5	Tile	S				1	Show All (	
					Adv	anco	d	
1000					Setu	ip	" <i>]</i> )	
	ive in	Separate	e Container					
•	Tile Re	gions						
C.				Ô.				
					-			
. v.			9 files	Size		725		
<u></u>				2500.7	μm		+ 10	
Ŷ			6 🗘	3689.4	μm			
ſ	Na	me	Gate	gory	Tiles		Size (µm)	
5	7 TR2		🗖 🔹 Defau	lt 1	18	2	506,7 x 36	39
		. 1	0					
	* *	~   _					**	
0	Positio	ns						

#### **Correction du focus**

Il y a deux manières de corriger le focus sur l'ensemble de la mosaïque. A faire avant de lancer l'acquisition.

- 12. Cliquer sur « *Support Points* » sous l'espace de navigation.
- 13. Entrer le nombre de positions où le focus sera corrigé.
- 14. Cliquer sur « Distribute ».
- 15. Des points jaunes se distribuent sur la mosaïque.
- Cliquer sur un point jaune, faire un « *Live* », régler le focus et cliquer sur « *Set Current Z* » pour l'enregistrer. Recommencer pour chacun des points.

#### ΟU

- 17. Double-cliquer à l'endroit où vous voulez enregistrez le Z sur votre mosaïque. Faire le focus.
- 18. Cliquer sur « *Add Support Point at Current Stage and Focus position*», un point jaune apparaît.
- 19. Répéter la procédure sur au moins cinq positions.
- 20. Cliquer sur « *Star Experiment* » pour lancer l'acquisition.

![](_page_10_Figure_12.jpeg)

#### Finalisation de la mosaïque en fluorescence après l'acquisition

Pour cette étape, l'option « Online Stitching » (voir la page précédente) devait être décochée pendant l'acquisition.

- 1. Cliquer sur l'onglet « Processing ».
- 2. Cliquer sur « Single ».
- 3. Ouvrir le menu « Method ».
- 4. Aller dans la rubrique « *Geometric* » et sélectionner « *Stiching* ».
- 5. Ouvrir le menu « *Input* » et sélectionner la mosaïque.
- 6. Ouvrir le menu « Parameters ».
- 7. Cliquer sur « *New Output* ».
- 8. Cocher « Fuse Tiles ».
- Si l'ombrage n'est pas correcte, cocher « Correct Shading » et sélectionner le mode « Automatic ».
   Si vous avez acquis plusieurs couleurs (canaux) ou une série en Z :
- 10. Ouvrir le menu « Select dimension reference for stitching ».
- 11. Cliquer sur « *All by reference* » et choisir le canal de référence pour la reconstruction en cliquant dessus.
- 12. choisir le plan en Z de référence.
- 13. Cliquer enfin sur « Apply ».
- 14. L'image ajustée se nomme « IP- Stitching ».

![](_page_11_Figure_16.jpeg)

Locate	Acquisition	rocessing	Analysis	
Function: St	titching			
2 Single	Batch	13	Apply	
Method	3			
Recently use	d			
Stitching		_	_	_
Search		_	_	
Hist	ogram Equaliza	ition		
⊿ 📂 Geo	ometric			
Z-Si	innei Alignmen tack Alignment			
4 Stite	ching			
Ima	ge Overlay			
Min	ror			
Paramet	ters 6			🗸 Show All
	Inplace		New Outpu	t
8 🗹 Fuse 1	files			
9 🔲 Corre	ct Shading 🛛 🗛	utomatic		-
1 🕤 🗢 Select	dimension refe	erence for stil	ching	
				0
Chann				
11 All by	reference	Reference or	nly All indi	
Brigh	EGFP	Red		0
All by	reference			
12 —	· · 0	i n n	7 4	: •
🗢 Param	eters			
			N	lo
	al Overlap 📃	0		5 % ‡
Max Sh	ift —	-0		10 % 🛟
			Best O	ptimized
	Optimizer		Be	est
_				
Def	aults	∽ Reset	Re	⊶ ≥do
- Input	5			D Show All
Experimen	t-03.czi			
10 an	d <b>8*</b> ►			

# **Outils graphiques**

Dans l'onglet « Dimensions »

- Afficher l'image d'une position en Z ou en temps de la série en entrant son numéro ou en bougeant le curseur correspondant.
- 2. Ajuster l'image à la taille de l'écran.
- 3. Ajuster la taille des pixels de l'image à la taille des pixels de l'écran.
- 4. Agrandir ou rétrécir l'image.
- 5. Afficher/Cacher une couleur (channel) à l'écran.
- 6. Voir un seul canal à la fois.
- 7. Affichage des niveaux de gris et de la saturation.

![](_page_12_Figure_9.jpeg)

Display Multiple Channels Spline Mode All Auto Min/Max Best Fit 2.00 0.01 All T+Z \* \* Reset Black 0 3 Gamma 1.00 0.45 1.0 White 4096 0

![](_page_12_Figure_11.jpeg)

Dans l'onglet « *Display* » se trouve les options de contraste.

- 8. Choisir la couleur à modifier ou « *All* » pour toute les modifier.
- 9. Ajuster le contraste automatiquement.
- 10. Réinitialiser le contraste.

Dans l'onglet « *Graphics* » se trouve les options d'annotation.

- 11. Afficher la barre d'échelle.
- 12. Afficher le temps.

# Enregistrement des images et des paramètres

#### Sauver votre configuration expérimentale

- 1. Cliquer sur le logo paramètres.
- 2. Sélectionner « Save As ».
- 3. Renommer votre configuration et l'enregistrer.
- 4. Pour recharger les paramètres, ouvrir le menu déroulant sous « *Experiment Manager* » et sélectionner votre configuration.

![](_page_13_Picture_6.jpeg)

![](_page_13_Picture_7.jpeg)

- 5. Toutes les images de la session sont affichées dans la colonne de droite « *Images and Documents* ».
- 6. Pour enregistrer, double-cliquer sur l'image à enregistrer.
- 7. Cliquer sur la petite disquette.
- 8. Nommer vos images.
- 9. Enregistrer les images dans le dossier « *Users* » du disque J.

Créer un dossier à la date ainsi qu'à votre nom.

![](_page_13_Picture_14.jpeg)

# **Eteindre le système**

- 1. Baisser les objectifs, nettoyer les objectifs sur le dessus et sur les côtés avec le papier adapté.
- 2. Sortir du logiciel « ZEN ».
- 3. Transférer vos données sur votre disque dur.

#### Vérifier le planning de réservation. S'il n'y a personne après vous :

- 4. Eteindre le PC.
- 5. Eteindre le microscope sur le côté gauche.
- 6. Eteindre les blocs multipriseS.