

# UTILISATION DU MICROSCOPE CONFOCAL ZEISS LSM 780

DEMARRAGE ET MISE EN MARCHE DU SYSTEME	2
LANCEMENT DU LOGICIEL ZEN	3
REGLAGES DU MODULE TEMPERATURE ET CO2	4
OBSERVATION AUX OCULAIRES	5
PRESENTATION DU STATIF	6
ACQUERIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES	7
ECHANTILLONNAGE SPATIAL (RESOLUTION DE L'IMAGE)	13
ACQUERIR UNE SERIE Z	14
ACQUERIR UNE SERIE TEMPORELLE	16
ACQUERIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES	17
ACQUERIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE	19
VISUALISATION DES IMAGES ACQUISES	20
QUANTIFICATION DE SIGNAL	21
ENREGISTREMENT DES IMAGES	22
MISE HORS TENSION DU SYSTEME	23

# DEMARRAGE ET MISE EN MARCHE DU SYSTEME

- 1. Allumer le bouton « MAIN SWITCH »
- 2. Allumer le bouton « SYSTEM PC »
- 3. Allumer le PC et démarrer la session « LSM USER »
- 4. Une fois la session Windows démarrée, allumer le bouton « COMPONENT »
- 5. Allumer la lampe fluorescente





Sur le boitier d'alimentation du laser Argon :

- 6. Vérifier que le bouton est sur « ON »
- 7. Tourner la clé Power sur « I »

### Sur le petit boitier laser :

6

- 8. Pousser le bouton vers le haut, position « LASER RUN »
- 9. Quand la LED verte est allumée (5 minutes après étape 7) tournez le potentiomètre à 9h, sans que la diode rouge ne s'allume.



## LANCEMENT DU LOGICIEL ZEN

1. Démarrer le logiciel en cliquant sur l'icône ZEN sur le bureau.



2. Choisir START SYSTEM pour accéder au menu d'acquisition.

Login ZEN 2012	<u> </u>
ZEN	
Laser Scanning Microscope LSM 710 / ConfoCor	
Start System	Image Processing

3. Le logiciel Zen se répartit en 3 parties: la gauche dédiée aux réglages des acquisitions, centrale pour l'affichage des images et celle de droite pour les images ouvertes.



## REGLAGES DU MODULE TEMPERATURE ET CO2

- 1. Ouvrir la fenêtre INCUBATOR.
- 2. Entrer la valeur de la température souhaitée et cocher.
- 3. Ouvrir la bouteille de CO2.
- 4. Entrer le pourcentage de CO<sub>2</sub> souhaité et cocher.

#### Attention!!!

A la fin de votre session, il faut impérativement décocher toutes les cases et fermer la bouteille de CO<sub>2</sub>!





# **OBSERVATION AUX OCULAIRES**

- 1. Choisir le 1<sup>er</sup> onglet LOCATE
- 2. Choisir l'objectif

En fonction du type d'illumination que vous observez, vous pouvez ensuite :

- 3. Allumer/éteindre/choisir l'intensité de la lampe en lumière transmise
- 4. Ouvrir/fermer le shutter pour la transmission
- 5. Choisir le filtre "NoneLSM"
- 6. Ouvrir le shutter de la lampe fluo, la petite diode bleue s'allume
- 7. Choisir le filtre correspondant à votre fluorescence
- 8. Ouvrir/Fermer le shutter pour la fluorescence
- 9. Régler l'intensité de la lampe fluo



## PRESENTATION DU STATIF

Sur le côté gauche :

- 1. Vis de mise au point
- 2. sans fonction
- 3. passage de camera à oculaire (Ne pas appuyer car non foctionnel)
- 4. Optovar 1x
- 5. Filtre de fluorescence précédent
- 6. Filtre de fluorescence suivant



Sur le côté droit :

- 1. Vis de mise au point
- 2. Mettre l'objectif en position basse pour installer votre échantillon
- 3. Mettre l'objectif en position de travail
- 4. sans fonction
- 5. Passer à un objectif de plus faible grossissement
- 6. Passer à un objectif de plus fort grandissement
- 7. Ouvrir/fermer le shutter de la lumière transmise
- 8. Ouvrir/fermer le shutter de la lampe fluo



## ACQUERIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES

- 1. Choisir l'onglet ACQUISITION
- 2. Cocher SHOW ALL TOOLS
- Dans la boite d'outils LASER activer le laser 561 et/ou 633 si vous en avez besoin (Power On)
- 4. Ouvrir SMART SETUP
- 5. Puis dans DYE sélectionner les différents fluorochromes et leur couleur respective.



Smart Setup Configure your experiment Dye 5 Color DAPI • • • EGFP • • • • mCherry • • • • + -

Laser Properties

6. Plusieurs méthodes sont proposées :

-FASTEST : permet d'acquérir les canaux simultanément ; c'est la méthode la plus rapide mais le passage d'une couleur dans le canal suivant (cross talk) est important.

-BEST SIGNAL : chaque canal est acquis séparément. C'est la méthode la plus lente mais qui limite le mieux le Cross talk.

-BEST COMPROMISE : compromis entre vitesse et réduction du Cross talk Exemple : le canal bleu et rouge sont acquis simultanément puis le canal vert est acquis seul.

-LINEAR UNMIXING : utilise la capacité spectrale du système pour séparer simultanément les différents fluorophores. Nécessite d'acquérir préalablement des échantillons marqués avec un seul fluorochrome. Voir le chapitre correspondant.

Remarques : Ces modes sont une base pour débuter la configuration. Ils ne sont pas toujours bien choisis par le soft par défaut. Vous devez les vérifier et pourrez les modifier par la suite.



- Dans la boite d'outils LIGHT PATH, chaque TRACK représente une séquence d'une ou plusieurs couleurs.
- Ajouter ou supprimer des séquences en appuyant sur +/-
- Adapter la détection des longueurs d'onde en bougeant la fenêtre pour chacun des canaux.
- 10. Ajouter ou supprimer des canaux avec +/pour chaque séquence.
- 11. Sélectionner si possible le même dichroïque pour chaque séquence, afin d'accélérer le passage d'une séquence à l'autre.
  Si vous n'avez pas besoin d'utiliser de

dichroïque pour une acquisition, il faut choisir le filtre « <u>Plate</u> ».

- 12. Activer le dichroïque 405 pour chaque séquence même si vous ne l'utilisez pas.
- 13. Cocher T-PMT pour acquérir des images en transmission sur l'une des séquences.



- 14. Dans la boite d'outils CHANNELS, régler le pinhole sur 1 AU (unité d'Airy) pour chacun des canaux afin de bénéficier du meilleur rapport résolution/signal
- 15. Mettre le GAIN (MASTER) à 550 pour chaque canal sauf T-PMT.
- 16. Mettre l'acquisition en LIVE.
- 17. Régler la puissance laser pour chaque canal
- 18. Vous pouvez augmenter le GAIN (MASTER) pour diminuer la puissance laser nécessaire mais le rapport signal/bruit diminuera.
- 19. Ne pas augmenter le DIGITAL GAIN sauf si le GAIN (MASTER) est déjà élevé.
- 20. Vous pouvez régler le DIGITAL OFFSET pour améliorer l'image en supprimant le bruit,
- 21. Pour faire les réglages du gain et de la puissance laser, il est recommandé d'utiliser la palette de couleur prévue à cet effet en cochant « Range Indicator ». Dans ce mode, les pixels saturés sont rouges et les pixels noirs sont bleus.



Zoom     Image: 100 / Image: Q     Image: Q				Graphics	Dimensions
Tools     Q□     Q↓     Interpolati       Channels     Ch1-T1     Ch2-T1     Ch51-T2		- 219 🗘	<u> </u>		Zoom
Channels Ch1-T1 Ch2-T1 ChS1-T2	ion	🖌 Interpolatio		Q□ Q‡ 🌯	Tools
				Ch1-T1 Ch2-T1 ChS1-T2	Channels
Single Channel 21 🗹 Range Indicator Quick Color Setup		Quick Color Setup	ige Indicator	🔄 Single Channel 21 🗸 Rai	

Track	s	Channels		
	rack 1	DAPI		
		mChe		
	rack 2	EGFP		<b>.</b> •
~	+ 👼		Select All	Unselect All
Frack Cor	nfiguration C	ç		🗁 🖁 🐨
Track 1 .asers	- LSM			
405	405 458 48 5 nm	38 514 561 	633	2.6 ‡
<u>à</u> 561	lnm ——	ß	1/	- 20
		Q.		2.0 +
Pinhole	-0	2		- 29.5
inhole 1.01 /	-()	.8 μm section	1	- 29.5 ‡
Pinhole 1.01 / DAPI	–1) Airy Units = 0 Gain (Maste	.8 µm section r)[	1	- 29.5 ‡
Pinhole 1.01 / DAPI	-Ŋ Airy Units = 0 Gain (Maste Digital Offse	.8 μm section r)[ t	)(	- 29.5 ÷
Pinhole 1.01 / DAPI	-∬ Airy Units = C Gain (Maste Digital Offse Digital Gain	ν 1.8 μm section r)[ t	) 0	29.5 29.5 4 1 AU max 550 10 1.0 29.5 1.0 29.5 1.0 29.5 1.0 29.5 1.0 29.5 1.0 29.5 1.0 29.5 20.5
Pinhole 1.01 / DAPI mChe	-∬ Airy Units = 0 Gain (Maste Digital Offse Digital Gain Gain (Maste	ν 1.8 μm section r)[ t r)[	)() ()	- 29.5 ÷ L4 1 AU max - 550 ÷ - 0 ÷; - 1.0 ÷
Pinhole 1.01 / DAPI mChe	-∬ Airy Units = 0 Gain (Maste Digital Offse Digital Gain Gain (Maste Digital Offse	v 1.8 μm section r)f tf r)f tf	)0 )0	29.5 29.5 4 1 AU max 550 10 1.0 550 1.0
Pinhole 1.01 / DAPI mChe	-Ŋ Airy Units = C Gain (Maste Digital Offse Digital Gain Gain (Maste Digital Offse Digital Gain	.8 μm section r) t r) t	) 0 0	29.5 29.5 4 1 AU max 550 10 1.0 550 1.0

- 22. Dans la boite d'outils ACQUISITION MODE choisir la résolution (attention à l'échantillonnage) voir p12
- 23. Se déplacer en Z pour trouver le plan d'intérêt grâce aux mollettes situées sur le côté du statif.
- 24. Choisir la vitesse de scan (plus elle est rapide, moins le rapport signal/bruit est bon)
- 25. Moyenner l'image (AVERAGING) si le rapport signal/bruit n'est pas satisfaisant. Si l'échantillon est fixé le mode Image est plus approprié. Si l'échantillon est vivant le mode Line est préférable. (Methode mean est recommandé)
- 26. Le mode bidirectionnel permet d'aller 2 fois plus vite mais doit être correctement réglé sur un échantillon très contrasté, le réglage de la phase (Corr X) est donc important.
- 27. Zoomer (attention au bleaching et à l'échantillonnage, voir p12)
- 28. Si besoin, déplacer la zone visible en zoom par rapport à la zone au zoom minimum.
- 29. Si besoin, faire une rotation de l'image
- 30. Vous pouvez faire la même chose en déplaçant, réduisant, tournant le cadre





31. Vous pouvez zoomer directement sur la zone de votre choix en arrêtant le LIVE puis en cliquant sur CROP sous l'image. Un cadre apparait sur l'image, la ligne bleue représente le haut de l'image qui sera formée. Vous pouvez déplacer, faire une rotation, agrandir ou rétrécir le cadre, puis faire LIVE ou SNAP.



- 32. Enregistrer votre configuration
- 33. Cliquer sur SNAP pour acquérir l'image
- 34. Vous pouvez réutiliser les paramètres d'une image acquise ultérieurement en sélectionnant l'image puis en cliquant sur REUSE.

ZEN ZEN 201	2				
File View	Acquisition	Maintain	Macro Wi	ndow	Help
۳.	H 43				
Locate	Acquisition	FCS	Processing	Mai	90 ntain
Experiment	Manager				
nicoT EB1-G	GFP sas4- 32	2	1		8 0
★ Smart Setup ✓ Show all Tools New					
AF	0			1	@ 33
Find Focus	Set Exposure	Live	Continuo	us	Snap



# ECHANTILLONNAGE SPATIAL (Résolution de l'image)

Pour que vos images soient à la résolution optimale, la taille du voxel de l'image doit être égale à la moitié de la résolution de l'objectif utilisé (critère de Nyquist). Sur un microscope confocal à balayage, la résolution latérale (en XY) est supérieure à la résolution axiale (en Z).

• <u>Résolution latérale</u> :

Choisir la taille du pixel en modifiant

- le zoom : plus le zoom est important, plus la taille du pixel de l'image est petit (page 10-11).
- 2. Puis l'échantillonnage de l'image (le nombre de pixels que contient votre image).
- 3. Pour choisir automatiquement la résolution maximum en fonction de l'objectif et du zoom, cliquer sur OPTIMAL.



Il est inutile d'avoir des pixels plus petits que la résolution optimale (sur-échantillonnage). En revanche vous pouvez sous échantillonner l'image afin d'augmenter la vitesse d'acquisition et diminuer le blanchiment de la fluorescence.

• <u>Résolution axiale</u> :

La résolution axiale est inversement proportionnelle à la taille du pinhole. Pour obtenir la résolution maximum de votre objectif, vous devez travailler avec le pinhole à la taille 1 Unité d'Airy (cliquer sur 1AU dans la boite d'outils CHANNELS).

- 4. Pour obtenir l'échantillonnage optimum en Z, en fonction du pinhole cliquer sur SMALLEST.
- 5. Pour acquérir un pas plus grand rentrer manuellement la valeur dans INTERVAL.

Si vous ne nécessitez pas de forte résolution, vous pouvez acquérir un pas plus grand en Z afin d'augmenter la vitesse d'acquisition et diminuer le blanchiment de la fluorescence.



## ACQUERIR UNE SERIE Z

1. Procéder de la même façon que dans le paragraphe ACQUERIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES pour faire les réglages, en prenant soin de les réaliser dans le plan le plus intense.

2. Cocher Z-STACK pour faire apparaitre la boite d'outils dans le menu MULTIDIMENTIONAL ACQUISITION.

#### Deux méthodes :

Pour les échantillons fins

3. Choisir l'onglet CENTER

4. faire la mise au point au centre de l'échantillon puis Cliquer sur CENTER

Pour les échantillons épais

5. Ou choisir l'onglet FIRST/LAST

6. Faire la mise au point sur l'extrémité côté lamelle puis cliquer sur SET FIRST

7. Faire la mise au point sur l'autre extrémité puis cliquer sur SET LAST

8. Choisir le pas entre deux coupes en cochant INTERVAL puis en écrivant l'intervalle en  $\mu$ m.

9. Vous pouvez faire un clic sur SMALLEST pour choisir automatiquement la résolution maximale en fonction de la taille du pinhole (cliquer préalablement sur 1AU dans la boite d'outils CHANNELS).







10. Si vous faites de la colocalisation de marqueurs, cliquer sur MATCH PINHOLE afin d'ajuster automatiquement la taille des pinholes et d'obtenir la même taille de voxels dans tout les canaux.

11. Pour régler l'ordre d'acquisition, dans LIGHT PATH aller dans SWITCH TRACK EVERY et choisir Z-STACK pour changer de canal après l'acquisition de la totalité du stack. Sinon, choisir FRAME pour faire tous les canaux à chaque niveau en Z.

12. Cliquer sur « Start Experiment » pour lancer l'acquisition.





Positions Regions 10.50 MB

Start Experiment

## ACQUERIR UNE SERIE TEMPORELLE

1. Procéder de la même façon que dans le paragraphe ACQUERIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES pour faire les réglages.

2. Cocher TIME SERIES pour faire apparaitre la boite d'outils dans le menu MULTIDIMENTIONAL ACQUISITION.

3. Choisir le nombre de cycle et l'intervalle entre chaque point de temps.

4. Cliquer sur START EXPERIMENT pour démarrer l'acquisition



Cycles —	0	50	-		
Interval —		3.0	•	min	-
<ul> <li>Interval Time</li> <li>Marker</li> <li>Start</li> <li>End</li> </ul>					
Pause					

## ACQUERIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES

- 1. Procéder de la même façon que dans le paragraphe ACQUERIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES pour faire les réglages.
- Cocher TILE SCAN pour faire apparaitre la boite d'outils dans le menu MULTIDIMENTIONAL ACQUISITION.
- 3. Il existe plusieurs options en mode TILE SCAN. Aller dans CENTERED GRID pour faire une mosaïque à partir du centre.
- 4. Choisir le nombre de lignes et de colonnes.
- 5. Laisser OVERLAP à 10%.
- 6. Cocher BI-DIRECTIONAL pour aller plus vite.
- 7. Cocher ONLINE STICHING et laisser le THRESHOLD à 0.10.
- Vous pouvez avoir un aperçu de votre mosaïque en cliquant sur SCAN OVERVIEW IMAGE. Vous pouvez choisir un objectif et un zoom différent de l'acquisition finale (il faut faire attention au passage d'objectifs à immersion huile à des objectif à sec).
- 9. Cliquer sur START EXPERIMENT pour démarrer l'acquisition.



Scan

Cancel

- 10. Pour faire une mosaïque incluant différents champs d'intérêts, aller dans l'option BOUNDING GRID.
- 11. Chercher les champs d'intérêts en LIVE et enregistrer leurs coordonnées en cliquant sur ADD. Pour effacer une position, sélectionner les coordonnées dans la liste et cliquer sur REMOVE. Pour tout supprimer, cliquer sur REMOVE ALL.
- 12. Les dimensions de votre mosaïque finale sont affichées.
- 13. Pour faire une mosaïque incluant différents champs d'intérêts sans acquérir les zones extérieures, aller dans l'option CONVEX HULL.
- 14. La procédure est exactement la même que celle de BOUNDING GRID.
- 15. La forme de votre champ d'acquisition est affichée sur le côté.
- 16. Cliquer sur START EXPERIMENT pour démarrer l'acquisition.



🔹 🏭 Tile Scar	l.		1	Show All 🛛 💆
Centered g		unding grid	13 Conv	ex hull
	es Pi	kels		
Horizontal 24	1 22	221	2928.47 µm	
Vertical 26	5 24	064	3171.35 µm	
Overlap	LO 🗘 %	Add	Remove	Remove all
Rotation	).4260 🛟 °		<u> </u>	
☑ Bi-direction	al			4
Online stitch	ning			
Threshold	).10 🛟			
			-u	
Marked pos	itions			
Number	x [μm]	y [µm]		
5	3538.250	9046.2	250	-
7	3507.750 4428.250	10464.	750 750	
8	4993.250	11117.	250	
			Load	Save
C	Scan ov	erview image	2	

# ACQUERIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE

- 1. Procéder de la même façon que dans le paragraphe ACQUERIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES pour faire les réglages.
- Cocher POSITIONS pour faire apparaitre la boite d'outils dans le menu MULTIDIMENTIONAL ACQUISITION.
- 3. Se placer à la position voulue puis dans l'onglet POSITION LIST cliquer sur ADD. Recommencer pour chaque position.
- Pour pouvoir faire des acquisitions au niveau des puits d'une plaque multi-puits, aller sur SAMPLE CARRIER.
- 5. Cliquer sur PROPERTIES et entrer les paramètres de votre plaque multi-puits.
- 6. Cliquer ensuite sur CALIBRATE pour prendre en compte ces paramètres.
- 7. Sélectionner alors les puits d'intérêt avec les boutons SELECT, SELECT ALL ou CLEAR ALL.
- Cocher OBJECTIVE LOWERED WHEN MOVING STAGE si vous voulez que l'objectif baisse à chaque déplacement. (Pour les objectifs à huile)
- 9. Cliquer sur START EXPERIMENT pour démarrer l'acquisition.
- 10. Une autre solution pour repérer ses champs d'intérêt est de faire une mosaïque rapide à basse résolution et de marquer les positions voulues sur l'image en cliquant sur POSITIONS. Les coordonnées s'enregistrent dans la POSITION LIST et vous pouvez lancer l'acquisition après avoir décoché TILE SCAN.

	Reuse 🎄	Crop	10Positions	Stage
--	---------	------	-------------	-------

ositions 2 legions	3 Positions	9 >	2.25 I Start Experiment
ultidimensio	nal Acquisition		
Positions			🗸 Show all
Posi	tion List	Sampl	e Carrier
Number	x (µm)	y (µm)	z (µm)
1	129.250	373.250	46.485
2	-541.500	1521.750	51.977
3	3792.500	-4799.750	44.516
Add 3	Remove	Remove All	Move to
Ecolus O			
-rocus O			



## VISUALISATION DES IMAGES ACQUISES

Sous l'image se situe un panneau permettant de sélectionner les canaux visibles à l'écran.

- cocher le nom (en blanc sur fond bleu) des canaux que vous souhaitez faire apparaitre à l'écran. Attention si tous les canaux sont décochés l'image apparait noire.
- 2. Zoom plein écran
- Zoom natif (pixel de l'image = pixel écran)
- 4. Zoomer / dézoomer sur une zone
- 5. Voir un plan en Z
- 6. Voir un point de temps
- 7. Voir une position
- 8. Cocher SINGLE CHANNEL pour voir les canaux séparément.
- 9. Cocher RANGE INDICATOR pour voir les couleurs de réglages afin d'éviter la saturation.
- 10. Voir tous les canaux superposés.
- 11. Voir tous les canaux séparés.
- 12. Voir toute la galerie d'image en fonction du temps, du focus ou de la longueur d'onde
- 13. Coupe orthogonale XZ et YZ
- 14. Coupe en 3D
- 15. Représentation 3D

Dimensions	Graphics	-
Z-Position	1 () 3 3	9
Time	1 [] 2 1 2	9
Position	1 ()	
Zoom		
Channels	Ch1-1 ChS1 Ch2	
	🛿 Single Channel 🛛 🧐 Range Indicator	
	Reuse 🏠 Crop Positio Stag	e

# 2D Split Gallery -Cut \$ 2.5D P) 40 ۲ 1.1 02 Co FRAP RICS Info

## QUANTIFICATION DE SIGNAL

Pour quantifier un signal de fluorescence, les différentes conditions d'expérience doivent être acquises avec les mêmes conditions d'acquisition (même puissance laser, même gain et Offset pour les PMTs). Si possible, les conditions d'acquisition doivent être réglées sur l'échantillon dont le signal de fluorescence est le plus intense. De cette façon, les autres échantillons n'atteindront pas la saturation.

- Pour plus de précision dans la mesure de la quantification, les images peuvent être acquises en 12 bits. Pour cela, Dans la boite d'outils ACQUISITION MODE, sélectionner BIT DEPTH 12bits.
- Régler les conditions d'acquisition (Gain, Offset et puissance laser) sur l'échantillon le plus intense en fluo,
- 3. Sans modifier les conditions d'acquisition, passer tous les échantillons.
- Dans le cas où un ou plusieurs échantillons saturent, il faut modifier seulement la valeur de gain du PMT. Les images pourront ensuite être corrigées grâce à la réalisation d'une gamme de PMT (intensité en fonction du voltage).

🔹 🛥 Acquisition	n Mode			🗸 Show All 🛛 🛃
Objective	Plan-Apc	chrom	at 63x/1.40 O	il DIC M27 🔫
Scan Mode	Frame			
Frame Size	X 1024	•	<b>X • Y</b>	Y 1024 🛟
Line Step	1			Highest
Speed		-0		1 Max
Pixel Dwell	1.27 µsec	Scar	1 Time 9.38	sec
Averaging				
Number	(1		Bit Depth	8 Bit 1 🔻
Mode	Line		Direction	>
Method	Mean			

Pour plus de précisions sur l'acquisition d'images en vue d'une quantification, n'hésitez pas à contacter les ingénieurs de la plateforme.

## ENREGISTREMENT DES IMAGES

Sélectionner une image puis sauvegarder en .lsm

FILE – SAVE dans le dossier USER/année/mois/jour/nom d'utilisateur.

Vous pouvez sélectionner toute les images acquises avec un clic droit sur la série d'images en haut à droite puis SELECT ALL et SAVE. Vous pouvez également les effacer en sélectionnant DELETE.

Vous pouvez sélectionner les images d'intérêt en cliquant dessus tout en maintenant la touche Ctrl.



# MISE HORS TENSION DU SYSTEME

### Attention!!!

Si vous avez utilisé le module de température et CO<sub>2</sub>, à la fin de votre session, il faut impérativement éteindre le système en décochant toutes les cases et fermer la bouteille de CO<sub>2</sub>!

Vérifier sur le planning en ligne si le système est réservé après votre session.

Si le système est réservé après votre séance ou dans les 4h qui suivent, vous ne devez pas l'éteindre complètement, mais procéder de la façon suivante :

- 1. Vérifier que toutes vos données sont bien sauvegardées.
- 2. Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).

Si le système n'est pas utilisé après vous, vous devez l'éteindre complètement :

- 1. Vérifier que toutes les données sont bien sauvegardées.
- 2. Fermer l'application ZEN (menu File  $\rightarrow$  Exit)
- 3. Eteindre l'ordinateur (sélectionner dans la barre d'outils START  $\rightarrow$  SHUTDOWN)
- 4. Sur le petit boitier, remettre le potentiomètre du laser Argon à la puissance minimale.
- 5. Sur le petit boitier, pousser le bouton vers le bas sur « IDLE POWER »
- 6. Sur le boitier d'alimentation du laser Argon, tourner la clef Power sur 0
- 7. Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).
- 8. Mettre les boutons SYSTEM PC et COMPONENTS sur 0
- 9. Eteindre la lampe à fluorescence.
- 10. Lorsque la ventilation du laser Argon est éteinte, mettre le bouton MAIN SWITCH sur 0.

8





9

