

UTILISATION DU MICROSCOPE CONFOCAL ZEISS LSM 980 AIRYSCAN 2

DEMARRAGE ET MISE EN MARCHÉ DU SYSTEME.....	2
MISE EN MARCHÉ TEMPERATURE ET CO ₂	3
OBSERVATION AUX OCULAIRES	4
PRESENTATION DU STATIF	5
ACQUISITION EN CONFOCAL	6
ACQUISITION EN AIRYSCAN 2	12
ECHANTILLONNAGE SPATIAL (RESOLUTION DE L'IMAGE)	18
ACQUERIR UNE SERIE Z	19
ACQUERIR UNE SERIE TEMPORELLE	21
ACQUERIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE.....	22
ACQUERIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES.....	23
CORRECTION DU FOCUS.....	24
VISUALISATION DES IMAGES ACQUISES	25
QUANTIFICATION DE SIGNAL.....	26
ENREGISTREMENT DES IMAGES.....	27
MISE HORS TENSION DU SYSTEME.....	28

DEMARRAGE ET MISE EN MARCHÉ DU SYSTEME

1. Allumer le bouton « Components »
2. Allumer le PC et démarrer la session « LSM USER »
3. Allumer la lampe fluorescente



4. Démarrer le logiciel en cliquant sur l'icône ZEN 2012 sur le bureau

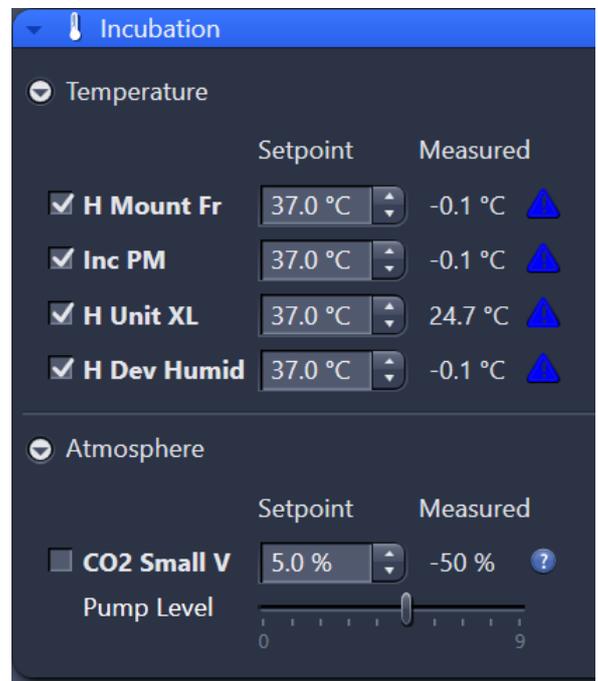


5. Choisir START SYSTEM pour accéder au menu d'acquisition.



MISE EN MARCHE TEMPERATURE ET CO2

1. Sur la partie droite du logiciel ZEN, activer la température et le CO2



2. Ouvrir la bouteille de CO2



OBSERVATION AUX OCULAIRES

1. Choisir le 1^{er} onglet LOCATE
 2. Choisir l'objectif
- En fonction du type d'illumination que vous observez, vous pouvez ensuite :
3. Sélectionner l'illumination souhaitée
 4. Ouvrir/fermer le shutter pour la transmission
 5. Ouvrir/fermer le shutter pour la fluo
 6. Choisir le filtre correspondant à votre fluorescence
 7. Régler l'intensité de la lampe fluo



PRESENTATION DU STATIF

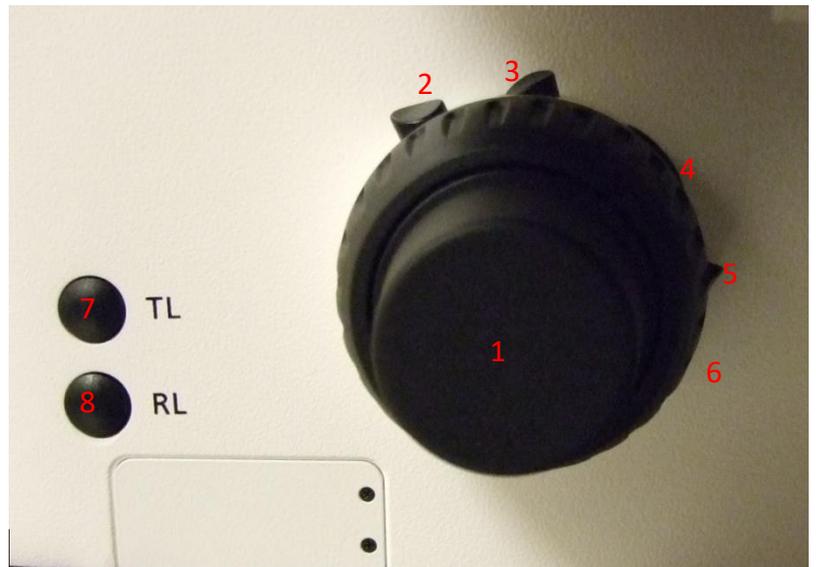
Sur le côté gauche :

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



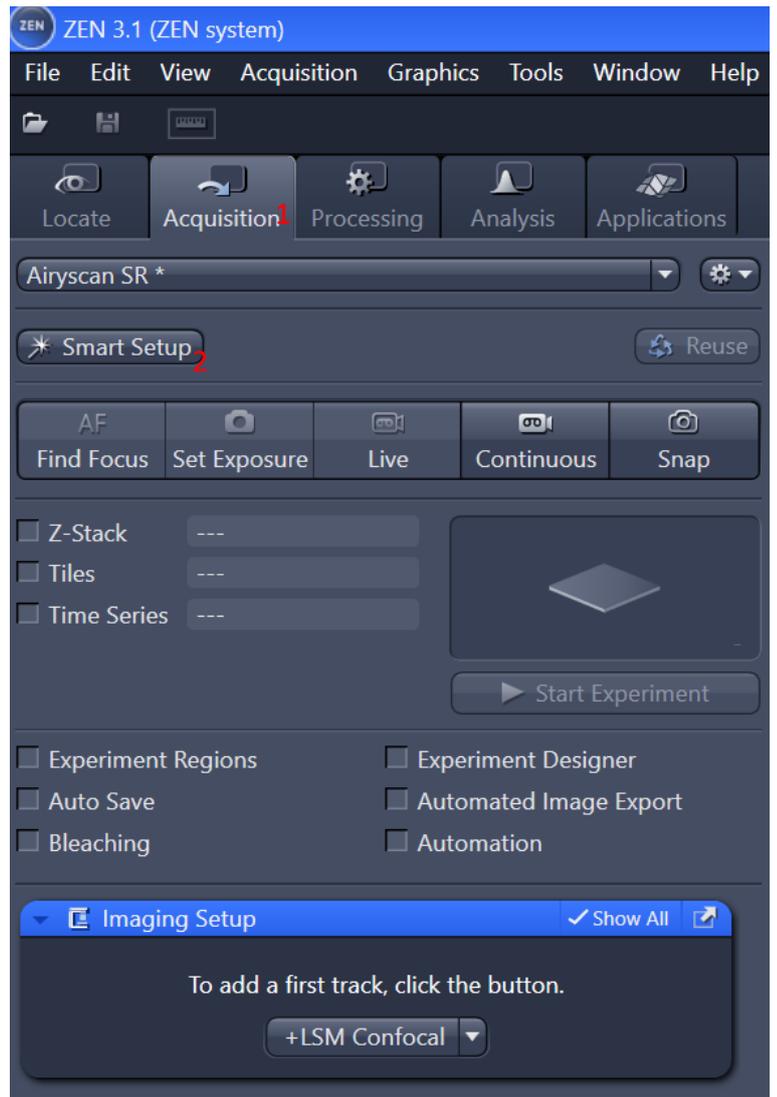
Sur le côté droit :

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 grossissement
7. Ouvrir/fermer le shutter de la lumière transmise
8. Ouvrir/fermer le shutter de la lampe fluo



ACQUISITION EN CONFOCAL

1. Choisir l'onglet ACQUISITION
2. Ouvrir SMART SETUP
3. Puis dans DYE sélectionner les différents fluorochromes et leur couleur respective.
4. Sélectionner « LSM »



5. Plusieurs méthodes sont proposées :

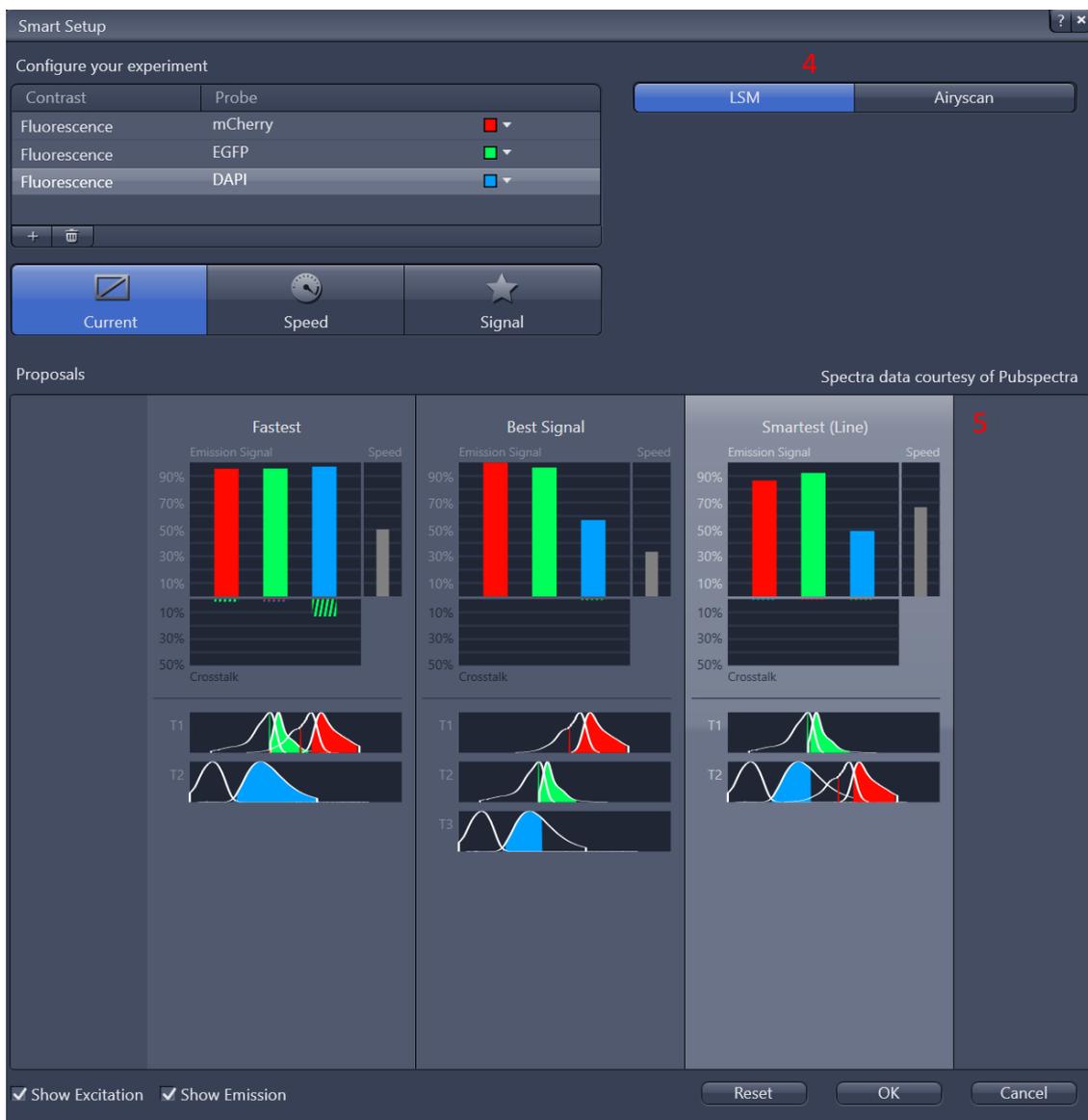
-FASTEST : permet d'acquérir les canaux simultanément ; c'est la méthode la plus rapide mais le passage d'une couleur dans le canal suivant (cross talk) est important.

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

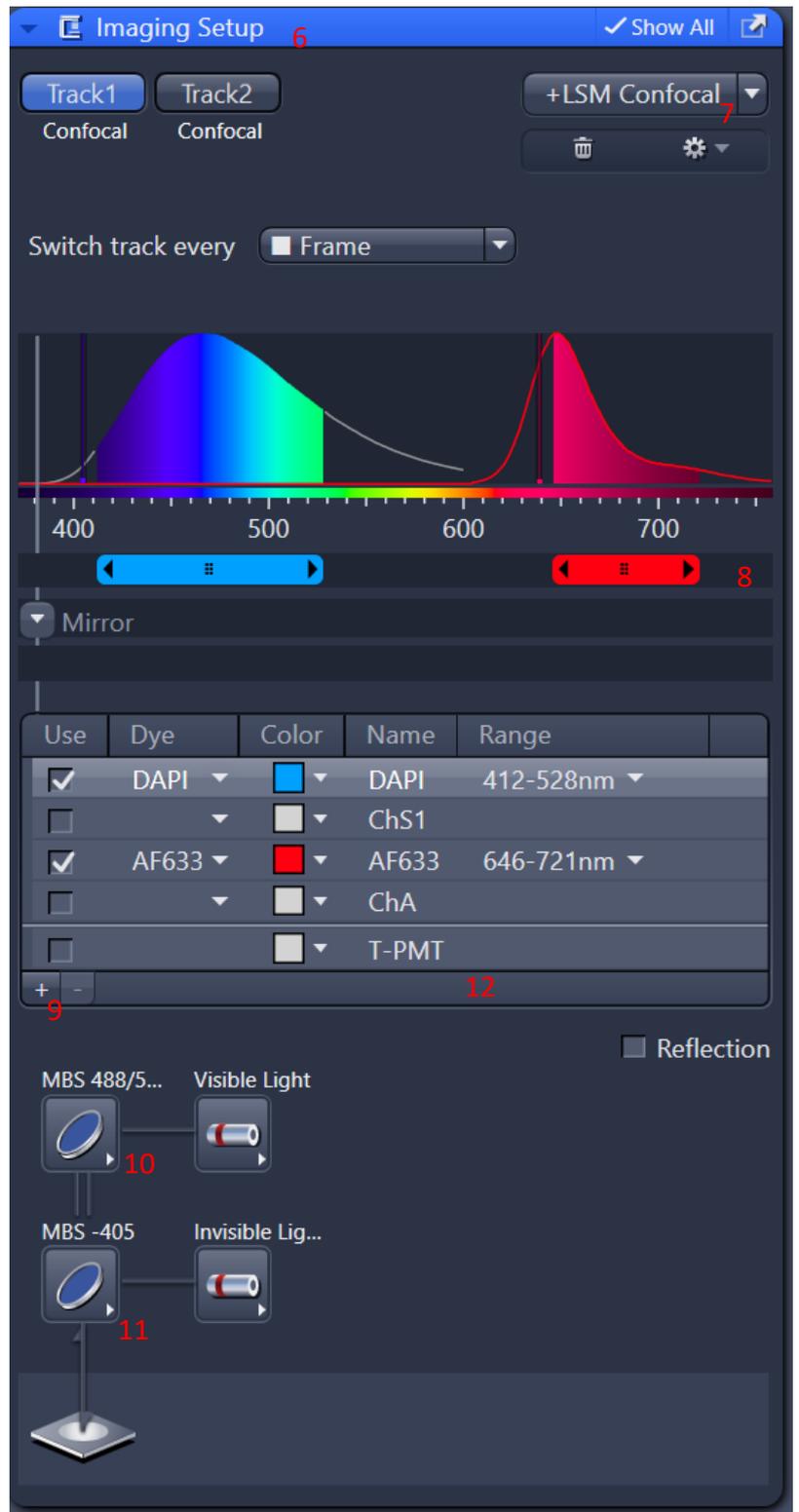
-SMARTTEST : compromis entre vitesse et réduction du Cross talk

Exemple : le canal bleu et rouge sont acquis simultanément puis le canal vert est acquis seul.

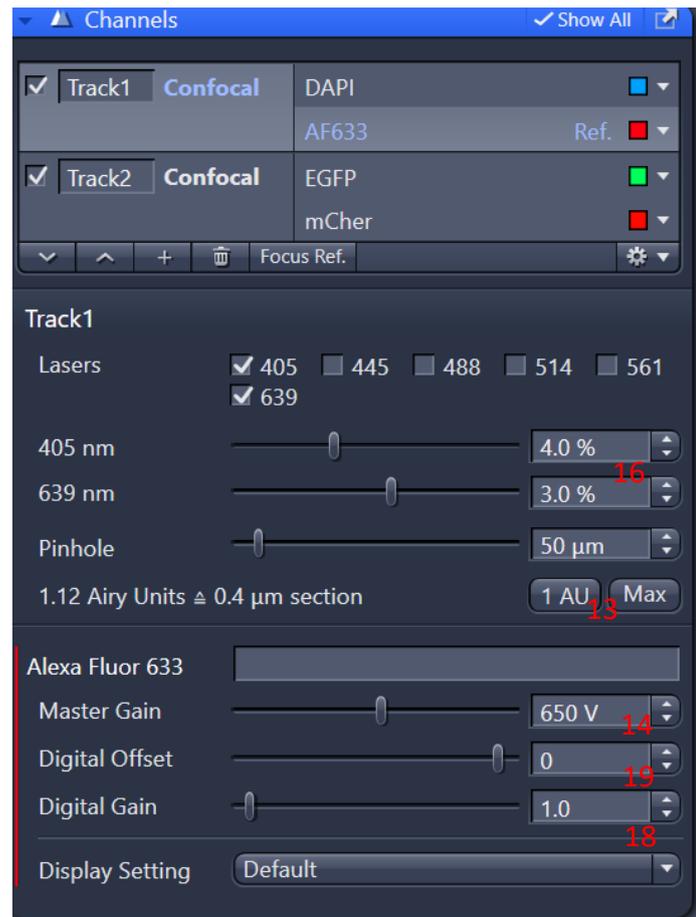
Remarques : Ces modes sont une base pour débiter la configuration. Ils ne sont pas toujours bien choisis par le soft par défaut. Vous devez les vérifier et pourrez les modifier par la suite.



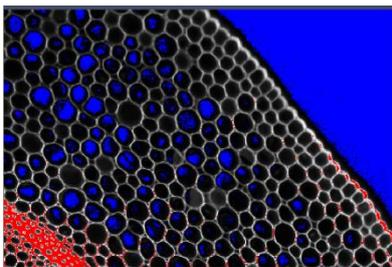
6. Dans la boîte d'outils IMAGING SETUP, chaque TRACK représente une séquence d'une ou plusieurs couleurs.
7. Ajouter ou supprimer des séquences en appuyant sur +LSM Confocal/-
8. Adapter la détection des longueurs d'onde en bougeant la fenêtre pour chacun des canaux.
9. Ajouter ou supprimer des canaux avec +/- pour chaque séquence.
10. 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 « Plate ».
11. Activer le dichroïque 405 pour chaque séquence même si vous ne l'utilisez pas.
12. Cocher T-PMT pour acquérir des images en transmission sur l'une des séquences.



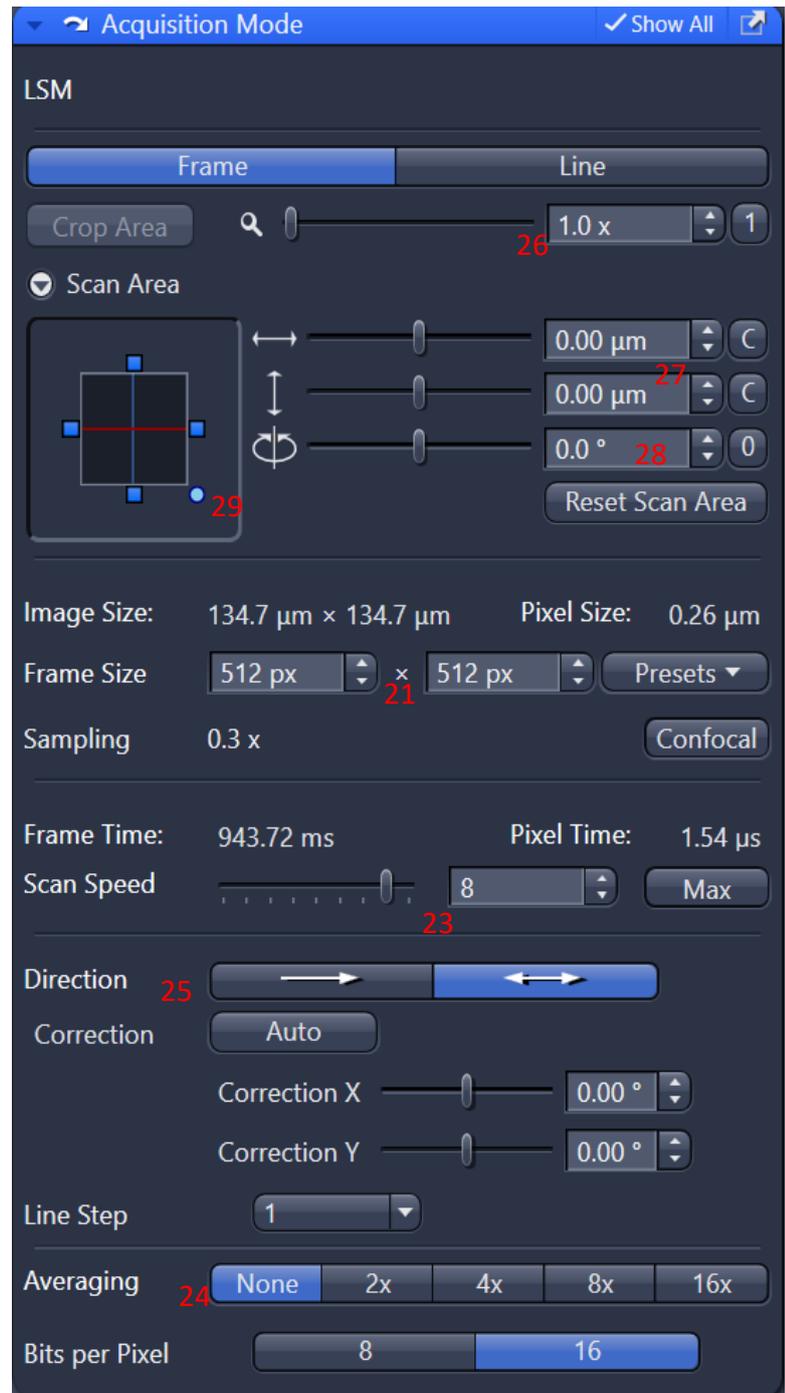
13. Dans la boîte d'outils CHANNELS, régler le pinhole sur 1 AU (unité d'Airy) pour chacun des canaux afin de bénéficier du meilleur rapport résolution/signal
14. Mettre le GAIN (MASTER) à 550 pour chaque canal sauf T-PMT.
15. Mettre l'acquisition en LIVE.
16. Régler la puissance laser pour chaque canal
17. Vous pouvez augmenter le GAIN (MASTER) pour diminuer la puissance laser nécessaire mais le rapport signal/bruit diminuera.
18. Ne pas augmenter le DIGITAL GAIN sauf si le GAIN (MASTER) est déjà élevé.
19. Vous pouvez régler le DIGITAL OFFSET pour améliorer l'image en supprimant le bruit,



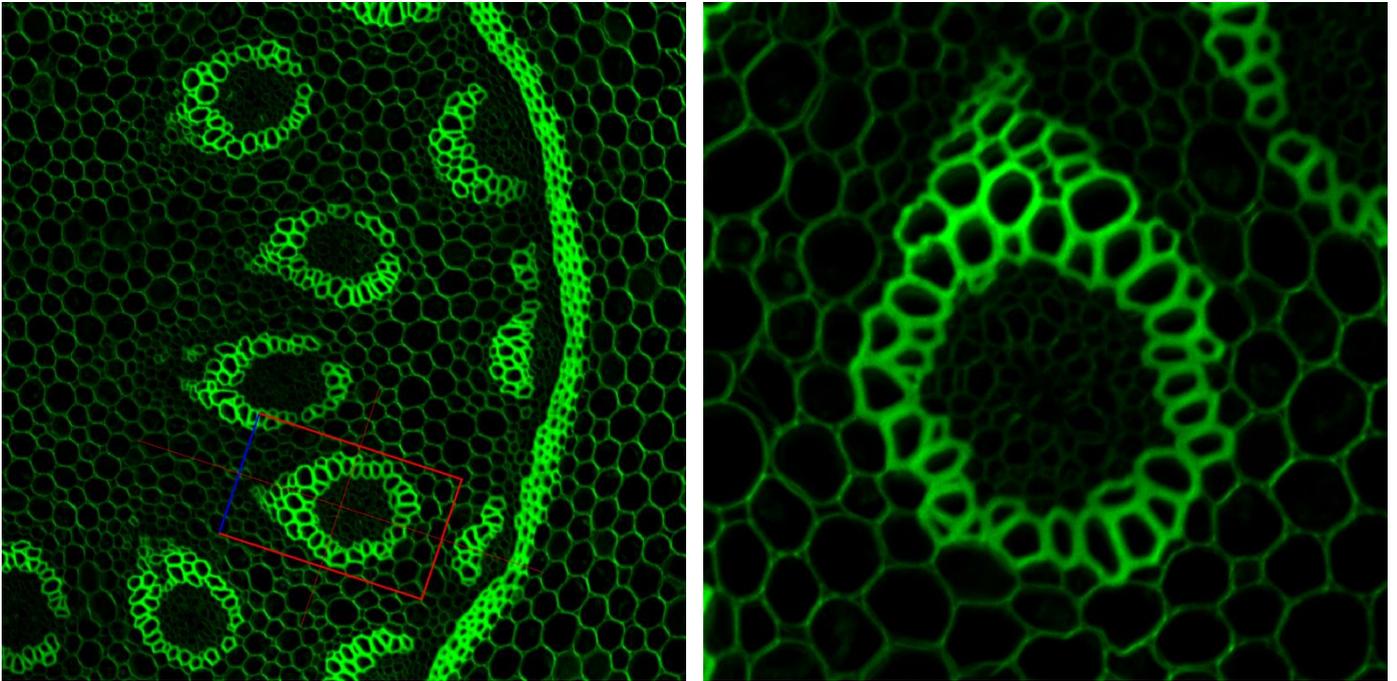
20. Pour faire les réglages du gain et de la puissance laser, il est recommandé d'utiliser la palette de couleur prévue à cet effet en cochant « Range Indicator ». Dans ce mode, les pixels saturés sont **rouges** et les pixels noirs sont **bleus**.



21. Dans la boîte d'outils ACQUISITION MODE choisir la résolution (attention à l'échantillonnage) voir p12
22. Se déplacer en Z pour trouver le plan d'intérêt grâce aux mollettes situées sur le côté du statif.
23. Choisir la vitesse de scan (plus elle est rapide, moins le rapport signal/bruit est bon)
24. 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)
25. 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.
26. Zoomer (attention au bleaching et à l'échantillonnage, voir p12)
27. Si besoin, déplacer la zone visible en zoom par rapport à la zone au zoom minimum.
28. Si besoin, faire une rotation de l'image
29. Vous pouvez faire la même chose en déplaçant, réduisant, tournant le cadre



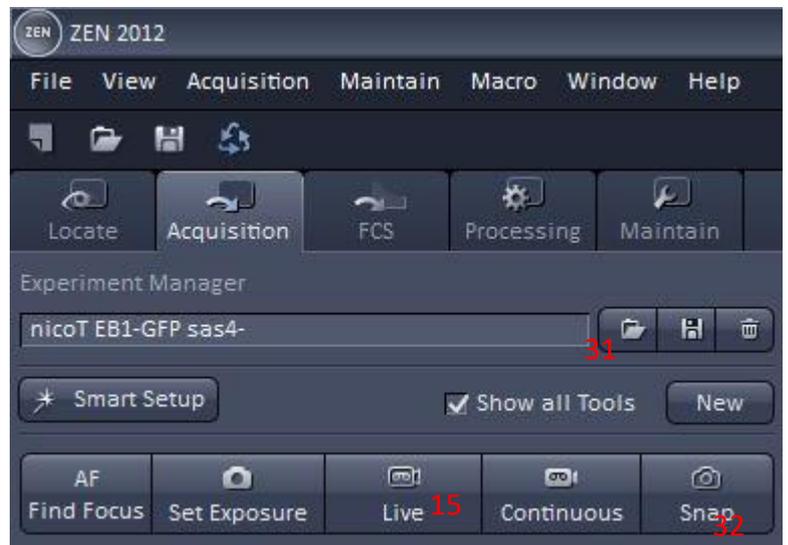
30. Vous pouvez zoomer directement sur la zone de votre choix en arrêtant le LIVE puis en cliquant sur CROP sous l'image. Un cadre apparaît sur l'image, la ligne bleue représente le haut de l'image qui sera formée. Vous pouvez déplacer, faire une rotation, agrandir ou rétrécir le cadre, puis faire LIVE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



31. Enregistrer votre configuration

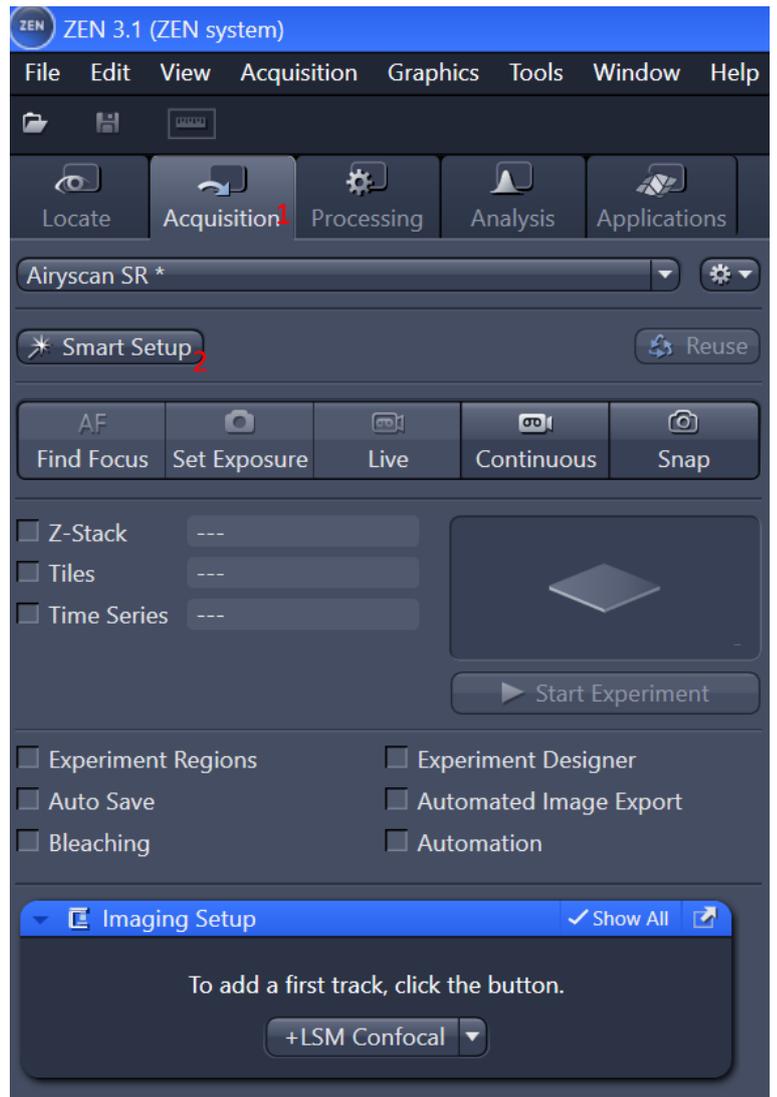
32. Cliquer sur SNAP pour acquérir l'image

33. Vous pouvez réutiliser les paramètres d'une image acquise ultérieurement en sélectionnant l'image puis en cliquant sur REUSE.



ACQUISITION EN AIRYSCAN 2

1. Choisir l'onglet ACQUISITION
2. Ouvrir SMART SETUP
3. Puis dans DYE sélectionner les différents fluorochromes et leur couleur respective.
4. Sélectionner « Airyscan »



5. Plusieurs options sont proposées :

-Resolution : permet d'acquérir avec la résolution optimale de l'Airyscan 2.

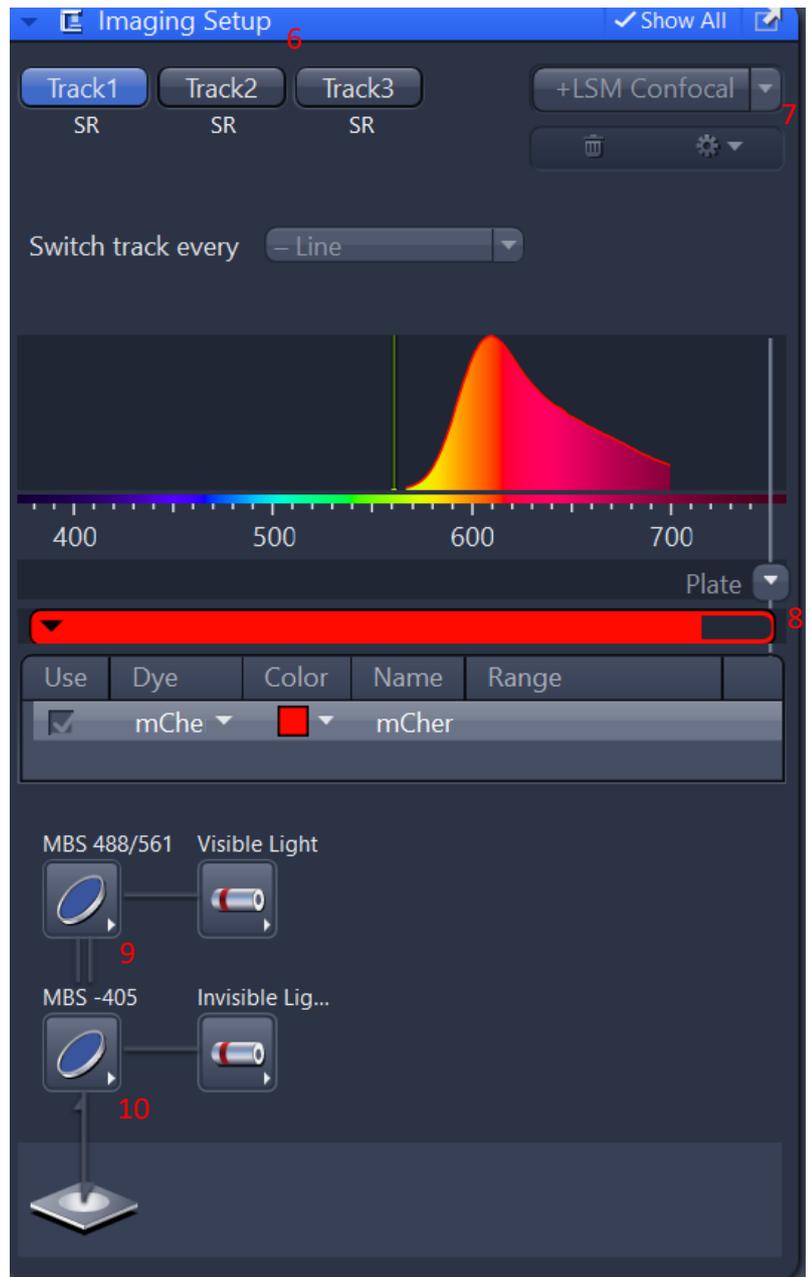
- SNR/ Sensitivity : Permet d'acquérir avec la résolution d'un confocal mais avec la sensibilité de l'Airyscan 2

-Speed : Permet d'acquérir en utilisant les modes fast (4Y ou 8Y) de l'Airyscan 2.

Remarques : On peut choisir des modes faisant le compromis entre les différentes options.



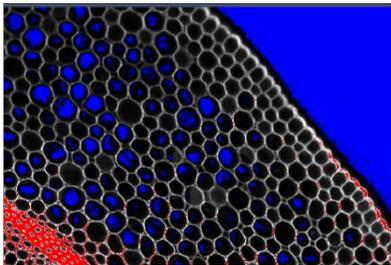
6. Dans la boîte d'outils IMAGING SETUP, chaque TRACK représente une séquence d'une ou plusieurs couleurs.
7. Ajouter ou supprimer des séquences en appuyant sur +SR/-
8. Vérifier/modifier les filtres sélectionnés pour l'acquisition pour chaque Track.
9. Sélectionner si possible le même dichroïque pour 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 « Plate ».
10. Activer le dichroïque 405 pour chaque séquence même si vous ne l'utilisez pas.



11. Commencer avec le GAIN (MASTER) à 650 pour chaque canal
12. Mettre l'acquisition en LIVE.
13. Régler la puissance laser pour chaque canal
14. Vous pouvez augmenter le GAIN (MASTER) pour diminuer la puissance laser nécessaire mais le rapport signal/bruit diminuera.
15. Ne pas augmenter le DIGITAL GAIN



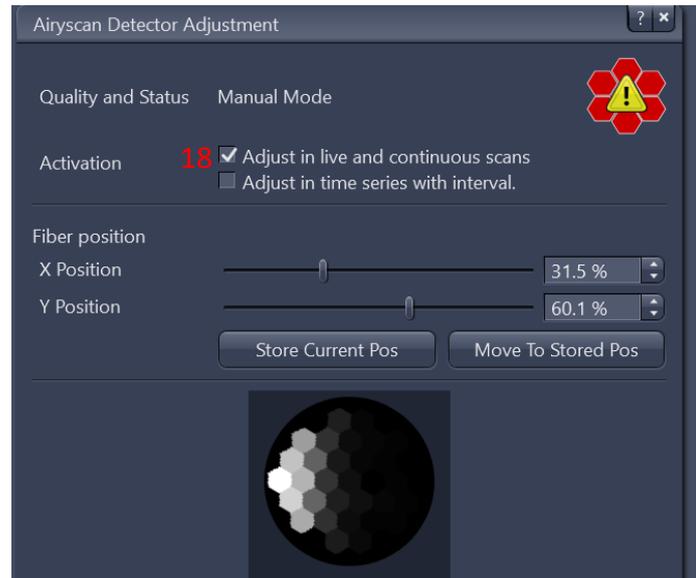
16. Pour faire les réglages du gain et de la puissance laser, il est recommandé d'utiliser la palette de couleur prévue à cet effet en cochant « Range Indicator ». Dans ce mode, les pixels saturés sont **rouges** et les pixels noirs sont **bleus**.



17. Calibrer les détecteurs de l'airyscan 2, commencer par sélectionner l'icône rouge des détecteurs



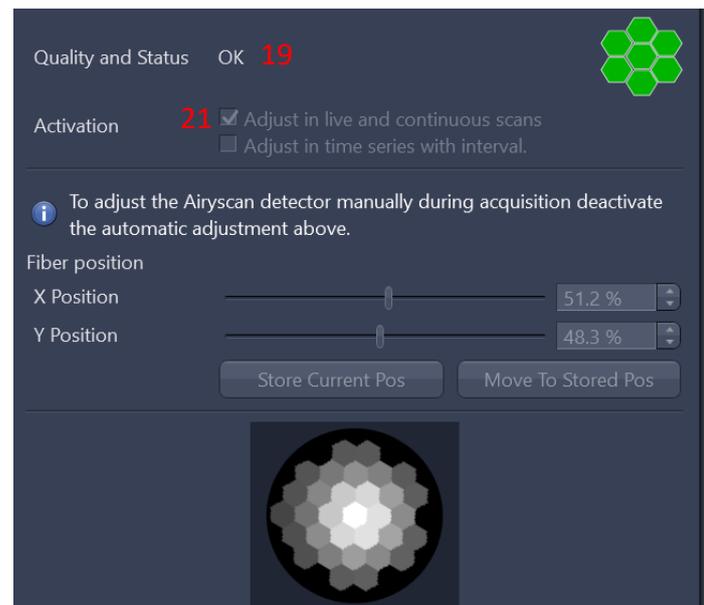
18. Sur le nouvel onglet, sélectionner « Adjust in live and continuous scans »



19. Faire « Live » ou « continuous scans ». Attendez jusqu'à ce que dans « quality and status » soit écrit « OK ».

20. Arrêter l'acquisition

21. Décocher « Adjust in live and continuous scans »



22. Dans la boîte d'outils ACQUISITION MODE choisir la résolution (attention à l'échantillonnage) voir p12

23. Sélectionner « Confocal » pour garder résolution optimale d'un confocal

24. Sélectionner « SR » pour garder une résolution optimale d'un airyscan

25. En mode Fast SR, Sélectionner le mode de vitesse dans le mode « Multiplex Acquisition » :

- SR-4Y : reso SR avec balayage 4 points en simultanés
- SR-8Y : reso SR avec balayage 8 points en simultanés
- CO-8Y : reso CO avec balayage 8 points en simultanés

26. Se déplacer en Z pour trouver le plan d'intérêt grâce aux mollettes situées sur le côté du statif.

27. Choisir la vitesse de scan (plus elle est rapide, moins le rapport signal/bruit est bon)

28. 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.

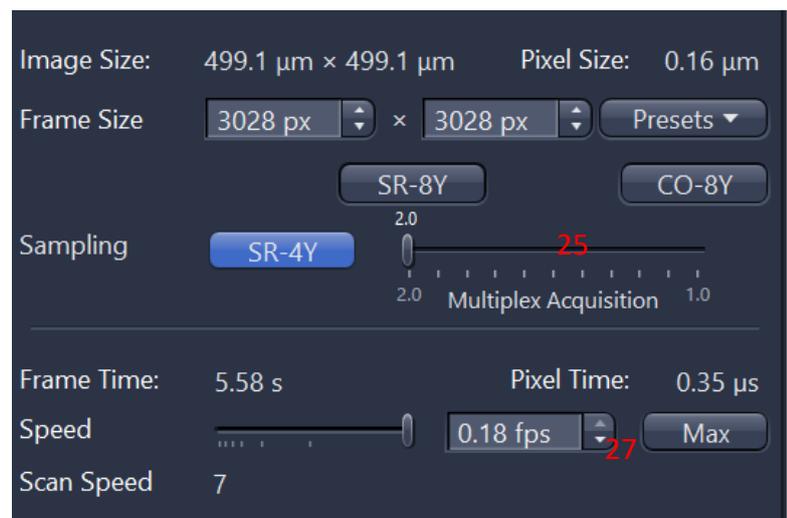
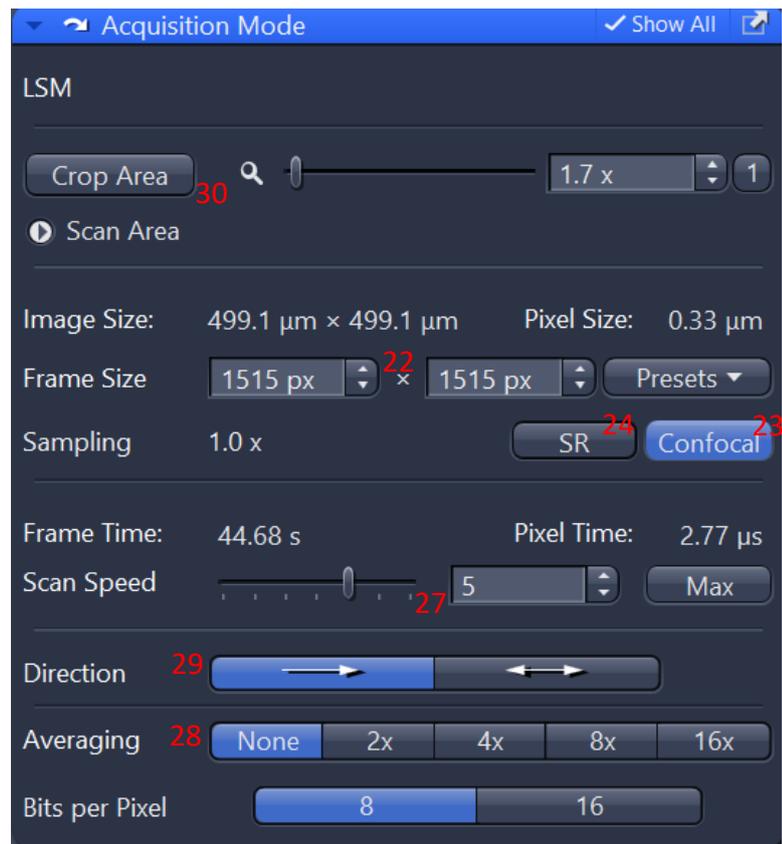
29. Le mode bidirectionnel permet d'aller 2 fois plus vite.

30. Zoomer (attention au bleaching et à l'échantillonnage, voir p12) et voir méthode dans « acquisition en confocal »

31. Enregistrer votre configuration

32. Cliquer sur SNAP pour acquérir l'image

33. Vous pouvez réutiliser les paramètres d'une image acquise ultérieurement en sélectionnant l'image puis en cliquant sur REUSE.



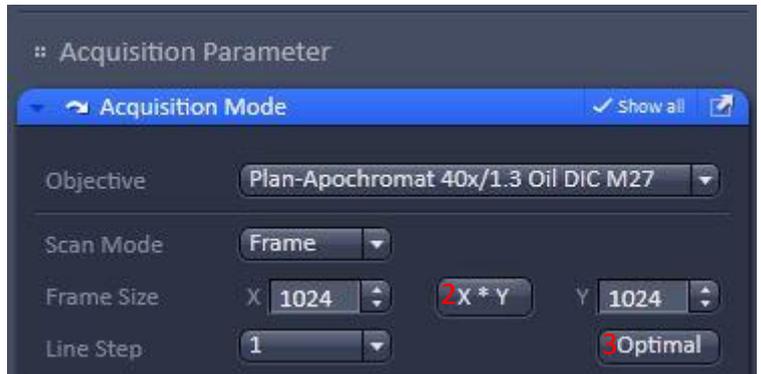
ECHANTILLONNAGE SPATIAL (Résolution de l'image)

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).

- Résolution latérale :

Choisir la taille du pixel en modifiant

1. -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.

- Résolution axiale :

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 boîte 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 apparaître la boîte d'outils dans le menu MULTIDIMENSIONAL 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

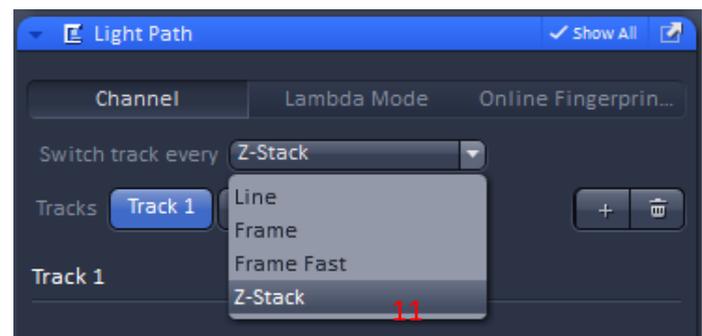
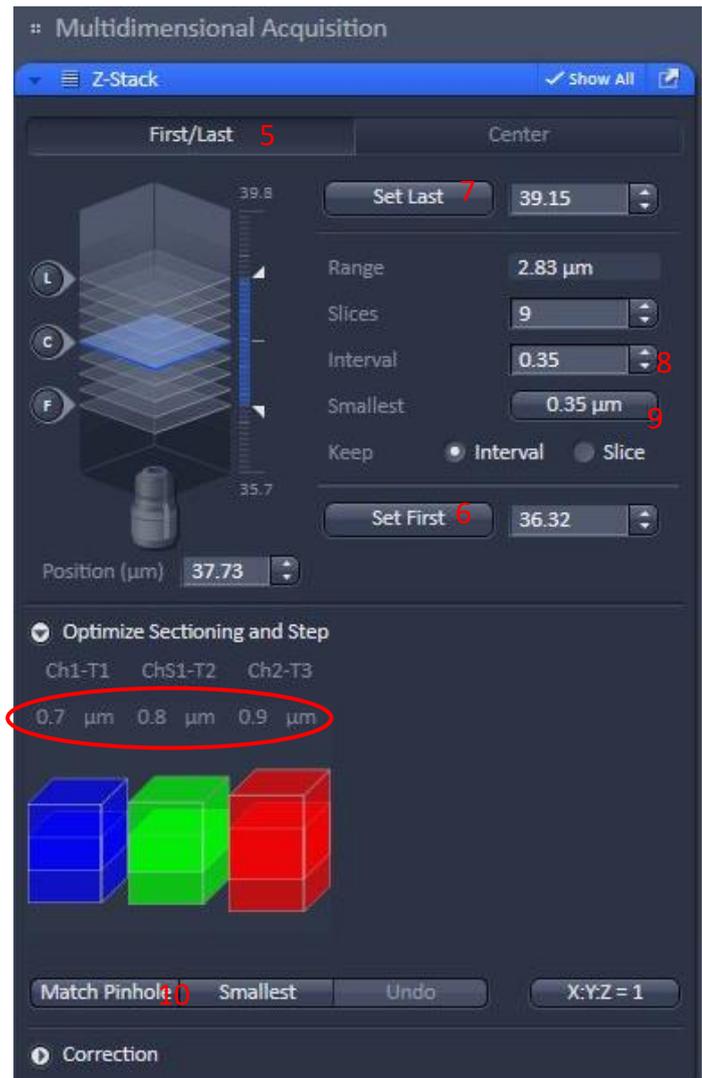
8. Choisir le pas entre deux coupes en cochant INTERVAL puis en écrivant l'intervalle en μm .

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 boîte 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 tous 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.



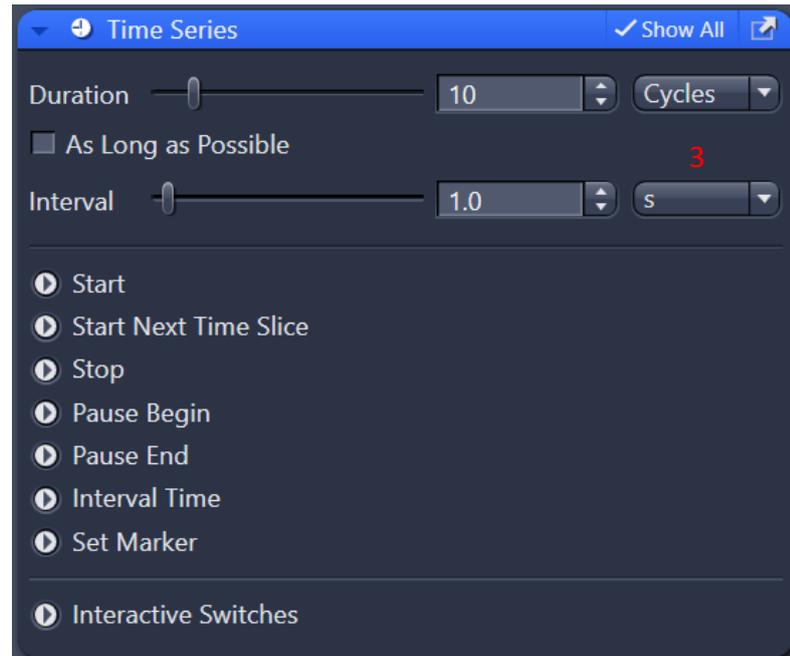
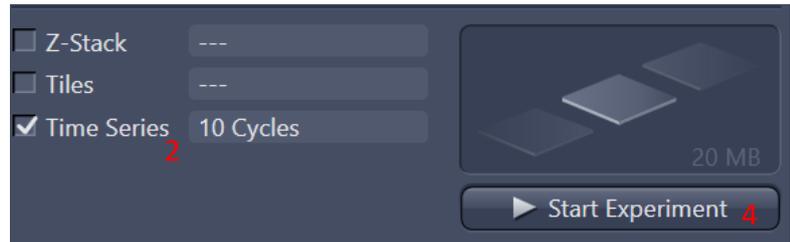
ACQUERIR UNE SERIE TEMPORELLE

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 apparaître la boîte d'outils dans le menu MULTIDIMENSIONAL ACQUISITION.

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

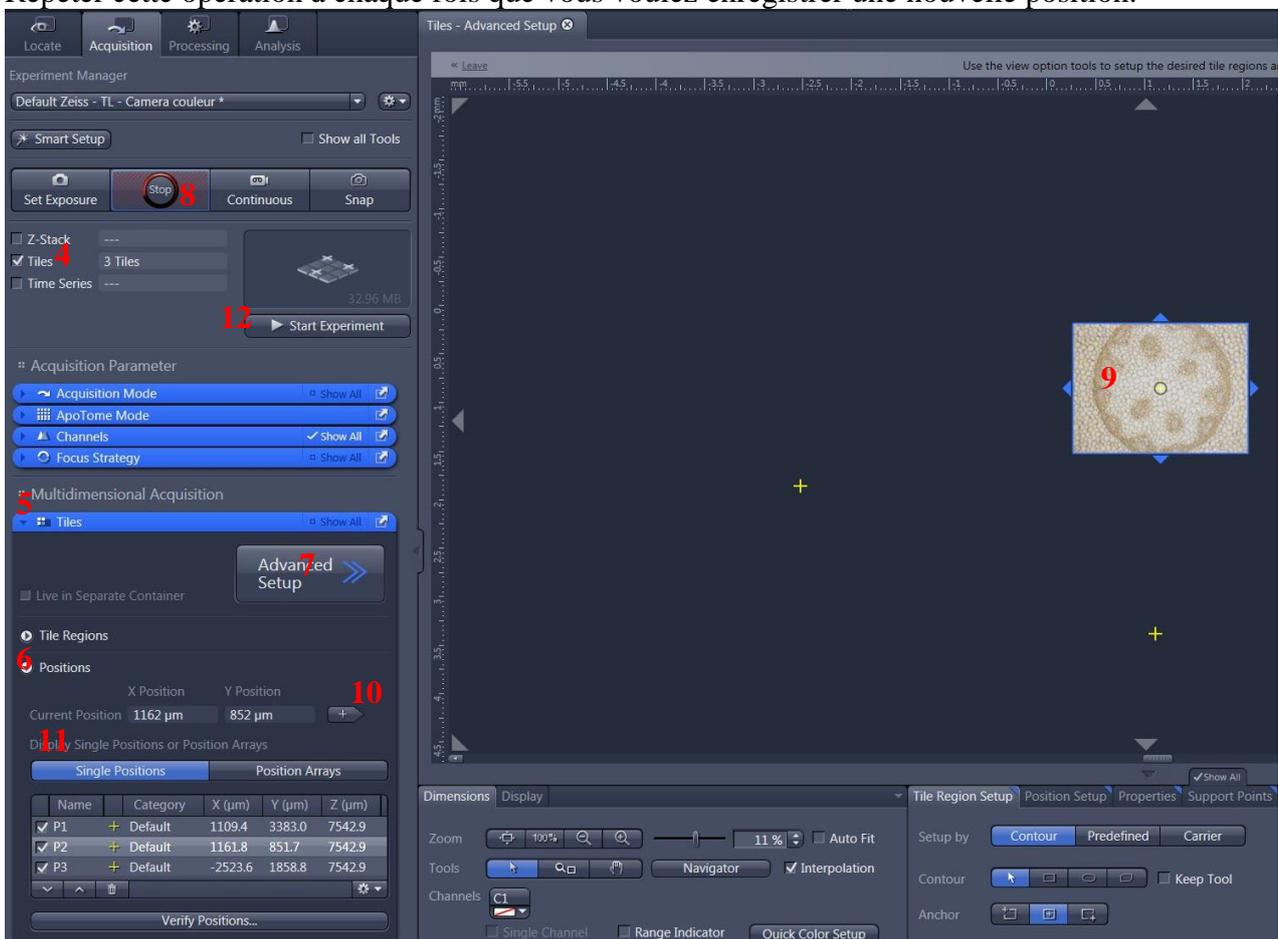
4. Cliquer sur START EXPERIMENT pour démarrer l'acquisition



ACQUERIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE

Pour que le software prenne en compte les coordonnées z de chaque position, il faut :

1. Ouvrir le menu « *Focus Strategy* ».
 2. Choisir l'option « *Local Focus Surface* ».
 3. Choisir l'option « *Fixed Z-position* ».
 4. Cocher « *Tiles* ».
 5. Ouvrir le menu « *Tiles* ».
 6. Ouvrir la rubrique « *Positions* ».
 7. Cliquer sur « *Advanced Setup* » pour afficher l'espace dans lequel vous allez définir vos différentes positions.
 8. Cliquer sur « *Live* ».
 9. Double cliquer, au niveau de l'espace de navigation, à l'endroit où vous voulez acquérir une image ou déplacez-vous avec la manette.
 10. 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.

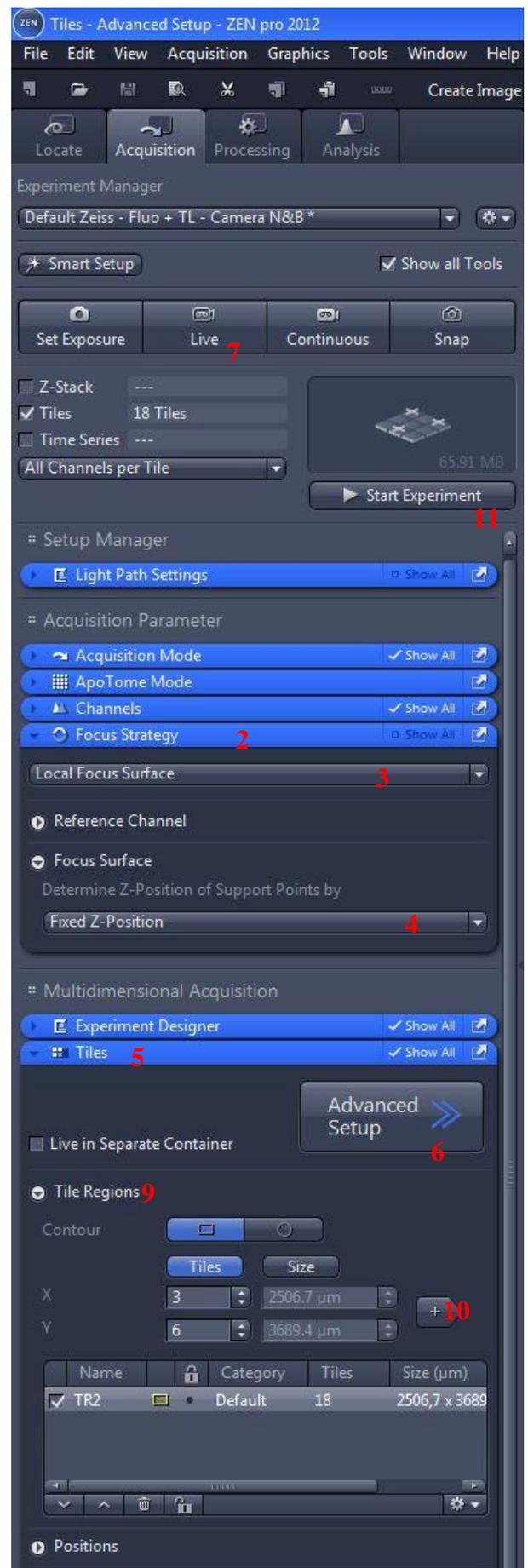


11. Dans l'onglet « *Single Positions* », vous pouvez voir la liste des coordonnées de toutes les positions que vous avez enregistrées.
 12. Cliquer sur « *Start Experiment* ».
- Il est possible de faire de la multiposition sur différents formats de plaque de puits.
Demander conseil aux ingénieurs de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

ACQUERIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES

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* ».
8. 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. **1**
9. 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.



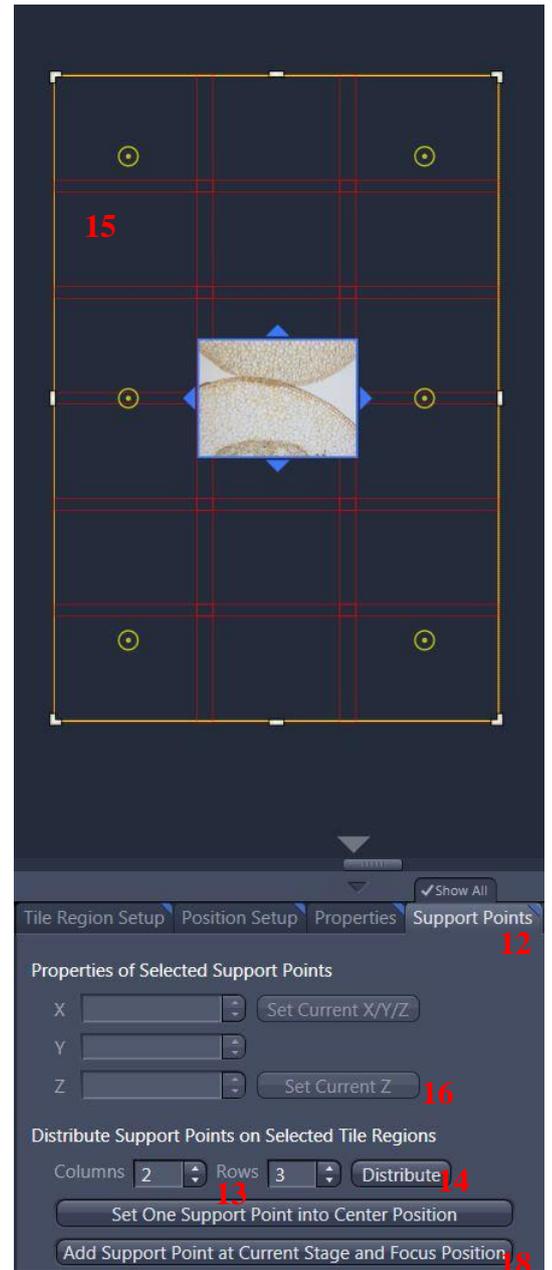
Correction du focus

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.
16. 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.

OU

17. Double-cliquer à l'endroit où vous voulez enregistrer 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.



VISUALISATION DES IMAGES ACQUISES

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

1. cocher le nom (en blanc sur fond bleu) des canaux que vous souhaitez faire apparaître à l'écran. Attention si tous les canaux sont décochés l'image apparaît noire.

2. Zoom plein écran

3. 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.

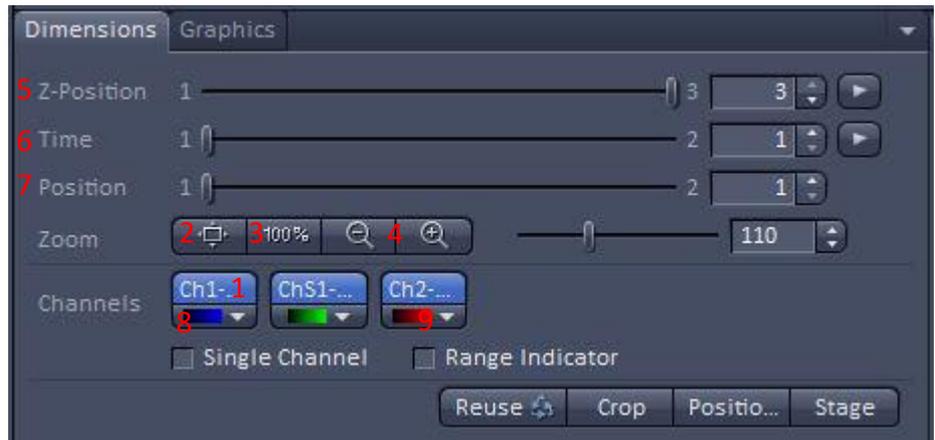
11. Voir tous les canaux séparés.

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

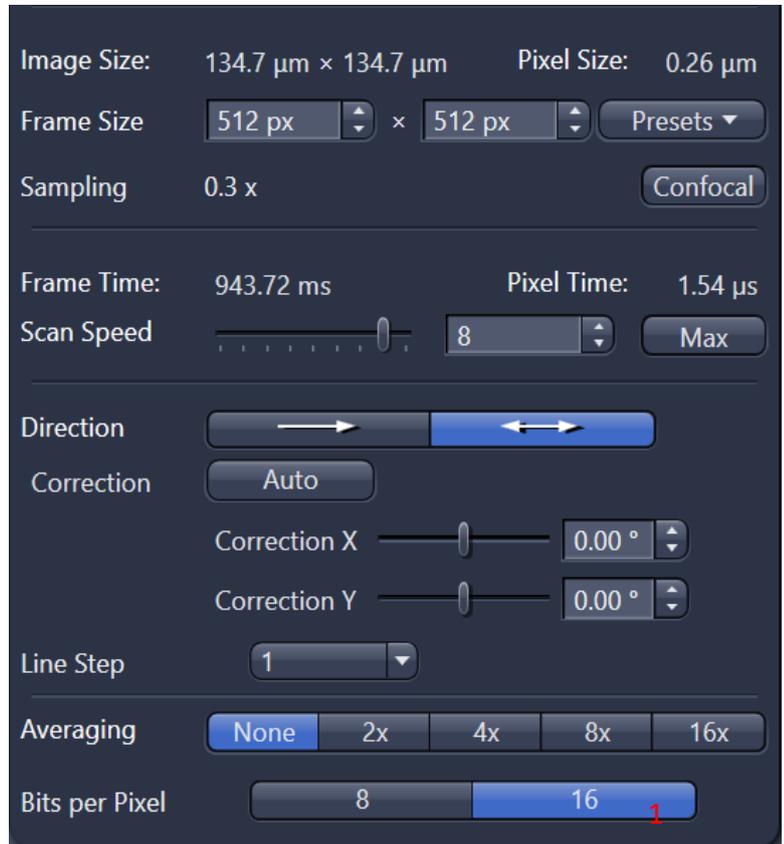


QUANTIFICATION DE SIGNAL

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.

1. Pour plus de précision dans la mesure de la quantification, les images peuvent être acquises en 16 bits. Pour cela, Dans la boîte d'outils ACQUISITION MODE, sélectionner BIT DEPTH 12bits.
2. 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.
4. 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).

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



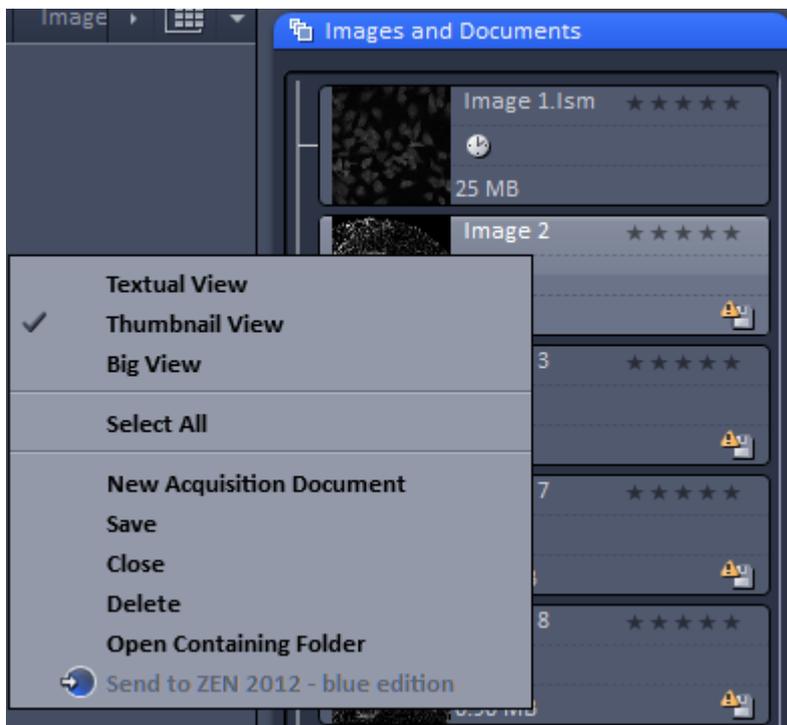
ENREGISTREMENT DES IMAGES

Sélectionner une image puis sauvegarder en .ism

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

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* → *Exit*)
3. Eteindre l'ordinateur (sélectionner dans la barre d'outils START → SHUTDOWN)
4. Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).
5. Eteindre la lampe à fluorescence.
6. Mettre les boutons sur 0