

# UTILISATION DU PLEIN CHAMP ZEISS

Mettre en marche le contrôleur de température	2
Mettre en marche le système de contrôle du CO2	3
Allumage du système	4
Présentation du matériel	5
Commandes du microscope et de la lampe	6
Démarrer Zen / Observation aux oculaires	8
Faire une image en transmission avec la caméra Couleur	9
Faire une image avec la caméra Noir/Blanc	11
Faire une série d'image en Z	12
Faire une série d'image dans le temps	14
Multi-positions	15
Faire une mosaïque	16
Outils graphiques	22
Enregistrement des images et des paramètres	23
Eteindre le système	24
Eteindre le système de contrôle du CO2 et température	25

# Mettre en marche le contrôleur de température

Il est important d'allumer la température au moins 30 minutes avant le début de la séance. Une fois votre échantillon en place sur le microscope et vos positions à acquérir enregistrées, pour éviter une perte de focus importante, il faut attendre 1 heure et refaire le focus de vos positions

1. Allumer le contrôleur de température en appuyant sur le bouton rouge.



2. Choisir la température à (affichée en vert) avec les boutons haut (+) et bas (-).

La température actuelle apparait en rouge.

# Mettre en marche le système de contrôle du CO2

1. ouvrir les bouteilles d'air comprimé (détendeur argenté) et de CO2 (détendeur doré) dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.





2. allumer le contrôleur de CO<sub>2</sub> (brique rouge).



3. Tourner la valve du détendeur à air (argenté) dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'à obtenir 1 bar en sortie (manomètre de droite).





4. clipper le tuyau cristal vert relié à la sortie du contrôleur CO<sub>2</sub> (MAIN out) sur la réserve d'eau de l'incubateur du microscope.



5. placer la chambre à CO<sub>2</sub> sur le porte échantillon.



# Allumage du système

1. Allumer le bloc multiprises sur l'étagère à gauche. Cela allume la lampe pour la fluorescence en même temps.



2. Allumer le PC, utiliser la session « IJM ».

#### Présentation du matériel

Microscope inversé Zeiss Axio Observer motorisé Une caméra Noir/Blanc Orca Flash 4 LT (taille pixel  $6.5*6.5~\mu m$ ) 2048\*2048 pixels Une caméra couleur Axiocam HRc (taille pixel  $6.45*6.45~\mu m$ ) 1024\*1024 pixels Platine motorisée en XY Boitier de LED CoolLED pE-300white pour la fluorescence Possibilité de contraste de phase et de DIC en transmission

#### Filtres disponibles:

excitation	dichroïque	émission	fluo	
BP 335 - 383	BS 395	BP 420 - 470	DAPI	
BP 424 - 448	BS 455	BP 460 - 500	CFP	
BP 450 - 490	BS 495	BP 500 - 550	GFP	
BP 538 - 562	BS 570	BP 570 - 640	DsRed	
BP 625 - 655	BS 660	BP 665 - 715	CY5	

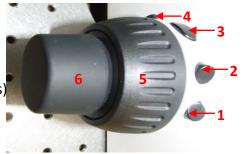
#### Objectifs disponibles:

Objectives (ref Zeiss)	Туре	Immersi on	Numerical Aperture	Cover glass	Free Working Distance (µm)	Relative brightness	DIC	Number	
EC Plan-NEOFLUAR <b>5x</b> /0,16 Ph1 (420331-9911)	Plan-Neofluar	Dry	0,16	0,17	18500	5,2	I	5-1	
Plan-Apochromat <b>10x</b> /0,45 Ph1 (420641-9910)	Plan Apochromatic	Dry	0,45	0,17	2000	10,3	II	10-1	
Plan-Apochromat <b>20x</b> /0.8 (420650-9901)	Plan Apochromatic	Dry	0,8	0,17	550	8,2	II	20-1	Sur l'étagèi On the she
LD Plan-NEOFLUAR <b>20x</b> /0,4 Ph2 Korr (421351-9970)	Plan-Neofluar	Dry	0,4	0-1,5	7900 (0,75)	2	II	20-2	Sur l'étagèr On the shel
LD LCI Plan-Apochromat <b>25x</b> /0.8 Imm Corr DIC (420852-9870)	Plan Apochromatic	Oil	0,8	0 - 0,17	570	5,2	II	25-1	
Plan-Apochromat <b>40x</b> /1.3 Oil DIC (420762-9800)	Plan Apochromatic	Oil	1,3	0,17	210	5,4	III	40-1	
Plan-Neofluar <b>40x</b> /0,6 LD (421360-9970)	Plan-Neofluar	Dry	0,6	0 - 1,5	2900	1,1	II	40-5	Sur l'étagèr On the shel
LD Plan-NEOFLUAR <b>40x</b> /0,6 Ph2 Korr (421361-9970)	Plan-Neofluar	Dry	0,6	0 - 1,5	2900 (0,75)	1,1	II	40-6	Sur l'étagèr On the shel
Plan-Apochromat <b>63x</b> /1.4 Oil DIC (420782-9900)	Plan Apochromatic	Oil	1,4	0,17	190	2,5	III	63-1	
Plan-Apochromat <b>100x</b> /1.4 Oil DIC (420792-9900)	Plan Apochromatic	Oil	1,4	0,17	190	1	III	100-1	

# Commandes du microscope et de la lampe

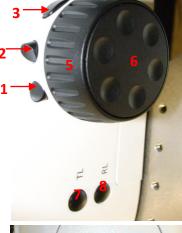
#### Côté gauche

- 1. Baisser la tourelle des objectifs à sa position la plus basse.
- 2. Remonter l'objectif à la position de travail.
- 3. Ouvrir/Fermer le shutter de fluorescence.
- 4. Changement de cube filtres pour la fluorescence (2 boutons)
- 5. Vis macrométrique.
- 6. Vis micrométrique.



#### Côté droit

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



#### **Face avant**

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



#### Le Joystick

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 différents onglets permettant de :

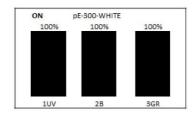
- 3. Choisir l'objectif « Objectives ».
- 4. Choisir le bloc filtres pour la fluo « Reflector ».
- 5. Ajouter/enlever une lentille 1,5x « Optovar ».
- 6. Affichage de la transmission BF, contraste de phase ou DIC.
- 7. Taille du diaphragme d'ouverture
- 8. Puissance de la lampe halogène

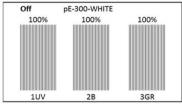


#### La LED pour la fluorescence

La lampe pour la fluorescence est composée de 3 LEDs.

- 1. La première est pour le DAPI
- 2. La seconde pour le GFP
- 3. La troisième pour le mCherry et Cy5.
- 4. Sélectionner les LED à utiliser avec les boutons « select ».
- 5. Appuyer sur le bouton On/Off pour allumer les LEDs.
- 6. Ajuster la puissance de chacune des LED « +/- ».
- 7. Eteindre les LEDs « On/Off » quand vous ne les utilisez pas, pour augmenter leur durée de vie.





Diode allumées (noires)

Diodes éteintes (grises)



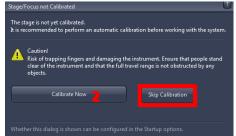
# **Démarrer Zen / Observation aux oculaires**

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



2. La calibration n'est nécessaire que si vous utilisez des plaques multi-puits ou si vous

souhaitez retrouver des positions d'une expérience antérieures.



- 3. Sélectionnez l'onglet « Locate ».
- 4. « HAL » permet d'observer en transmission.

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

- 5. « DAPI » permet d'observer la fluorescence bleue.
- 6. « CFP » permet d'observer en cyan.
- 7. « GFP » permet d'observer en vert.
- 8. « *DsRed* » permet d'observer en orange-rouge.
- 9. « Cy5 » permet d'observer en rouge lointain.
- 10. « *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.

# Faire une image en transmission avec la caméra Couleur

#### **Acquisition en transmission**

Procéder d'abord au réglage de l'éclairage de Köhler, contraste de phase ou contraste de Nomarski sur le microscope (voir panneaux affichés dans la pièce).

Sélectionner « BF », « PH » ou « DIC » sur l'écran TFT.

- 1. Cliquer sur l'onglet « Acquisition ».
- 2. Choisir le mode « TL Camera couleur ».
- 3. Ouvrir le menu « Channels ».
- 4. Cocher la ligne « TL Brightfield ».
- 5. Faites un « Live ».
- 6. Régler le temps d'exposition automatiquement en cliquant sur « *Set Exposure* »

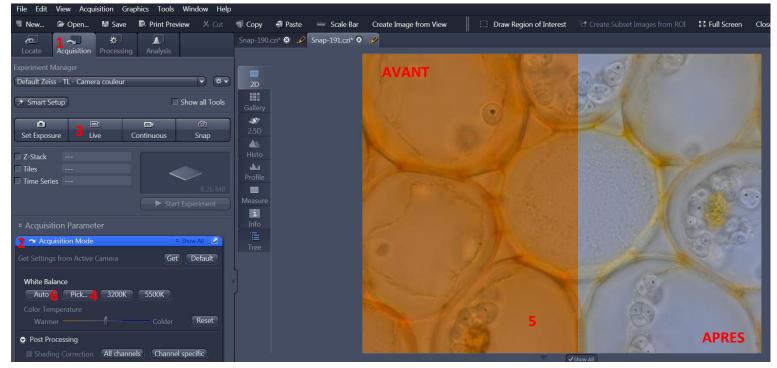
#### OU

- 7. Fixer manuellement le temps d'exposition.
- 8. Cliquer sur « *Snap* » pour prendre l'image.



#### Régler la balance du blanc

Le réglage de la balance du blanc « *White Balance* » permet de définir, dans une image en transmission, le blanc de référence de votre échantillon.



- 1. Aller dans l'onglet « Acquisition ».
- 2. Ouvrir le menu « Acquisition Mode ».
- 3. Faire un « Live ».
- 4. Cliquer sur « Pick. . . », un petit stylet apparait alors à la place de votre flèche.
- 5. Choisir une zone de votre image qui devrait être complètement blanche et cliquer dessus. La correction se fait alors automatiquement.
- 6. Le mode « *Auto* » permet de corriger la balance du blanc de manière automatique, de préférence sur un champ sans échantillon.

# Faire une image avec la caméra Noir/Blanc

Procéder d'abord au réglage de l'éclairage de Köhler, contraste de phase ou contraste de Nomarski sur le microscope (voir panneaux affichés dans la pièce).

Sélectionner « BF », « PH » ou « DIC » sur l'écran TFT.

- 1. Cliquer sur l'onglet « Acquisition ».
- 2. Choisir le mode « Fluo + TL Camera N&B ».
- 3. Ouvrir le menu « Channels ».
- 4. Cocher la/les ligne(s) correspondants à vos fluorophores.
- 5. Sélectionner un seul canal (en gris clair).
- 6. Faire un « Live ».
- 7. Régler le temps d'exposition automatiquement en cliquant sur « *Set Exposure* »

#### OU

- 8. Fixer manuellement le temps d'exposition.
- 9. Recommencer pour chaque canal désiré.
- 10. Cliquer sur « *Snap* » pour prendre l'image des canaux cochés.



## Faire une série d'image en Z

#### **Acquisition du stack**

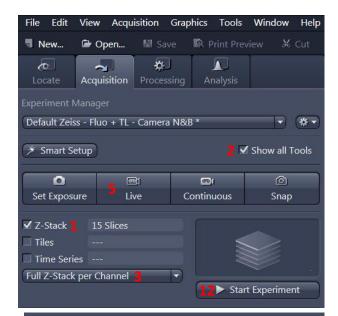
- 1. Cocher « Z-Stack ».
- 2. Cocher « Show all Tools ».
- 3. Choisir la séquence d'acquisition lorsque vous êtes en multicouleurs : faire un stack entier en une couleur puis passer au canal suivant « Full Z-Stack per Channel » ou tous les canaux à chaque plan « All Channels per Slices ».

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

- 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

#### OU

- 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* ».





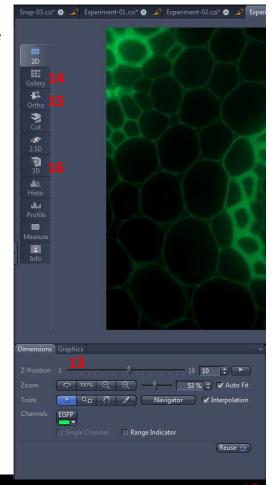


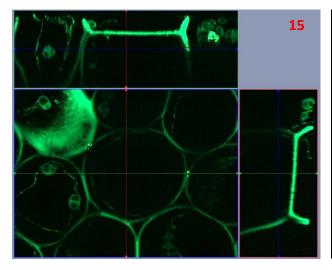
#### Visualiser le stack

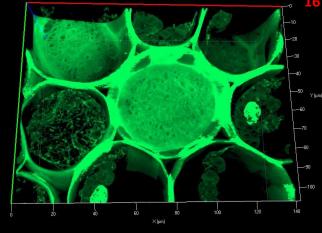
A la fin de votre acquisition, votre stack est affiché au centre de l'interface ZEN.

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.







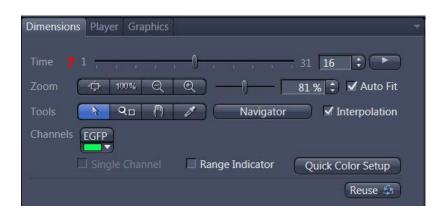
# Faire une série d'image dans le temps

- 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.
- 5. 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**

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.

Acquisition Mode

Focus Strategy

Local Focus Surface

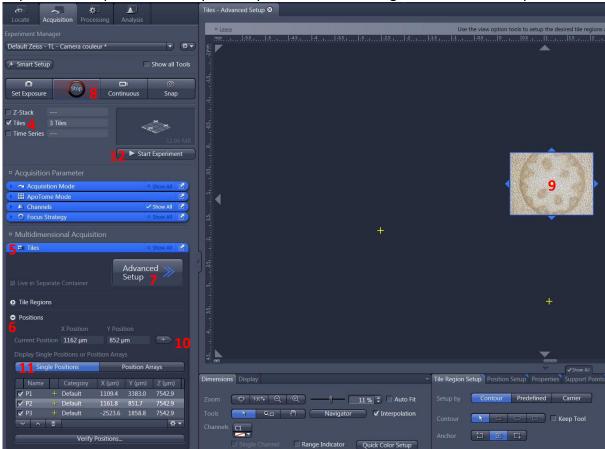
Reference Channel

Fixed Z-Position

Focus Surface

-

- 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.

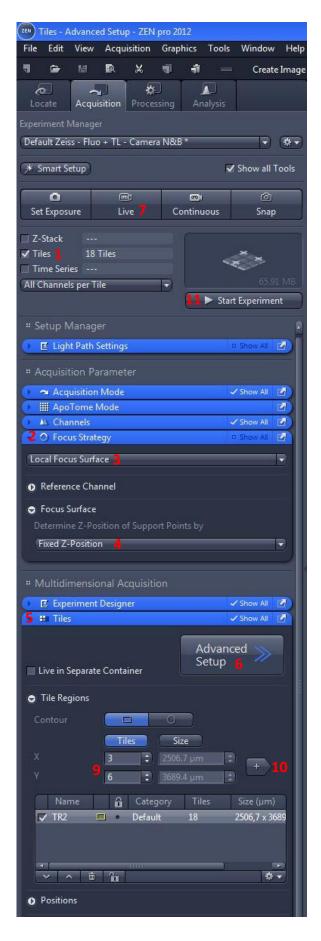


- 11. Dans l'onglet « *Single Positions* », vous pouvez voir la liste des coordonnées de toutes les positions que vous avez enregistrées.
- 12. Cliquer sur « *Start Experiment* ». Il est possible de faire du multiposition sur différents formats de plaque de puits. Demander conseil aux ingénieurs de la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



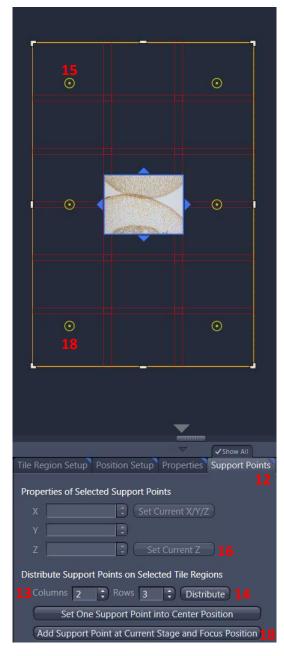
#### **Correction du focus**

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.

#### ΟU

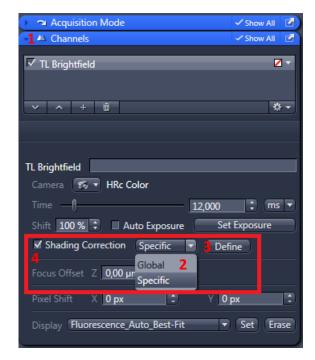
- 17. Double-cliquer à l'endroit où vous voulez enregistrez le Z sur votre mosaïque. Faire le focus.
- 18. Cliquer sur « *Add Support Point at Current Stage and Focus position* », un point jaune apparaît.
- 19. Répéter la procédure sur au moins cinq positions.
- 20. Cliquer sur « *Star Experiment* »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



#### Correction de shading en live

Pendant que vous réglez vos paramètres d'exposition, il est possible de corriger les effets d'ombres en live.

- 1. Cliquer sur l'onglet « Channels ».
- 2. Il faut se placer sur une zone sans échantillon. Choisir le mode de correction global.
- 3. Cliquer sur « Define ».
- 4. L'option shading correction se coche automatiquement.



#### Finalisation de la mosaïque en fluorescence et transmission en live

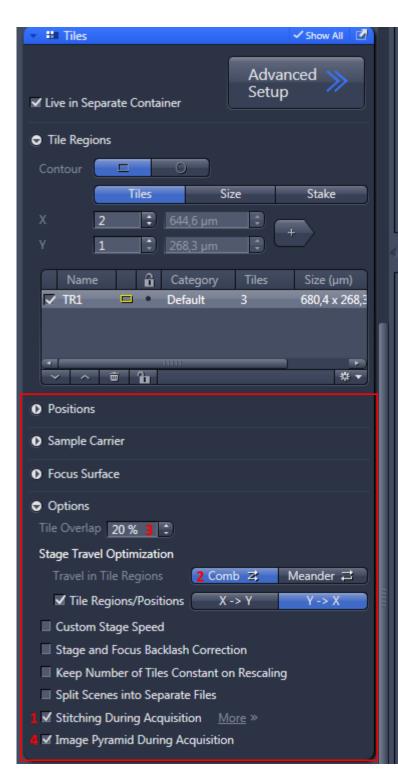
Il est possible de finaliser la mosaïque en même temps que l'acquisition.

Dans le menu « Tiles » dans la rubrique « Options » :

- 1. Cocher « Stitching During Acquisition »
- Dans la sous-rubrique « Stage Travel Optimization » sélectionner « Comb »
- 3. Mettre le « Tile Overlap » à 20%
- Selectionner « Image Pyramid During Acquisition ». Cette option permet de visualiser plus rapidement la reconstruction au fur et à mesure de l'acquisition.

À la fin de l'acquisition la mosaïque sera reconstruite automatiquement.

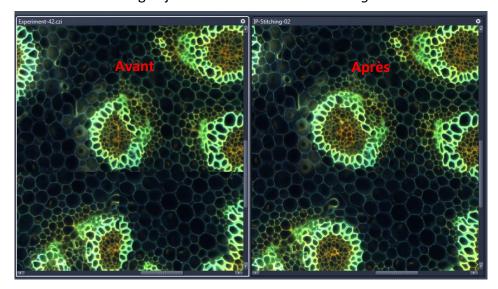
Si cette option donne de mauvais résultats, il est alors préférable de décocher cette option et de faire la finalisation de la mosaïque après l'acquisition (voir la page suivante).



#### 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 « *Stichina* ».
- 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 correct, 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 ».







# Finalisation de la mosaïque en transmission après 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. Cliquer sur « Fuse Tiles ».

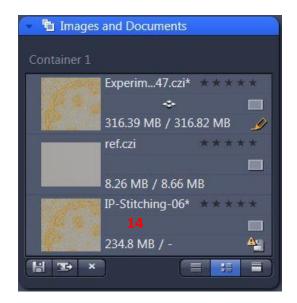
Vous pouvez utiliser deux modes différents pour la correction de l'ombrage.

Faire une correction automatique par calcul:

- 9. Cocher « *Correct Shading* » pour homogénéiser le fond de l'image.
- 10. Sélectionner le mode « Automatic » pour faire une correction automatique par calcul.

OU

- 10. Sélectionner « *Reference* » pour faire une correction avec une image de référence (méthode plus efficace):
- 11. Dans « Input », une deuxième fenêtre vide s'ouvre
- 12. Sélectionner l'image de référence qui doit être un « *Snap* » de votre lamelle sans aucun élément dans le champ, échantillon et poussières.
- 13. Cliquer sur « Apply ».
- 14. L'image Finale apparait dans la colonne de droite "Images and Documents » et se nomme « IP-Stitching ».



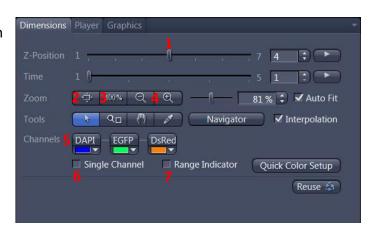




# **Outils graphiques**

#### Dans l'onglet « Dimensions »

- 1. 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.



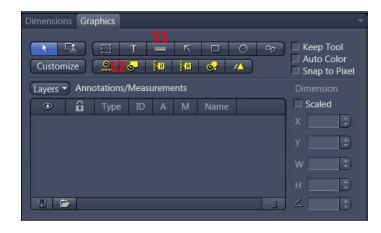
Dans l'onglet « *Display* » se trouve les options de contraste.

- 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

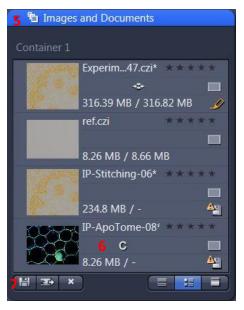
#### Sauver votre configuration expérimentale

- 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.



## Sauver les images acquises avec la caméra noir et blanc

- 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.



# Sauver les images acquises avec la caméra couleur

Il est nécessaire d'exporter les données acquises avec la caméra couleur

pour les utiliser sous un logiciel autre que ZEN.

- 10. Cliquer sur File puis Export ou Ctrl+6.
- 11. L'onglet « Parameters » s'ouvre.
- 12. Choisir l'export en format « TIFF ».
- 13. Ne pas cocher « Convert to 8 bit ».
- 14. Ne pas compresser « None ».
- 15. Cocher « Original Data ».
- 16. Choisir le dossier d'export dans le dossier « *Users* » disque J.
- 17. Décocher « Create folder ».
- 18. Cliquer sur « Apply ».



# **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 bloc multiprise.

# Eteindre le système de contrôle du CO2 et température

- 1. Eteindre le contrôleur de température en appuyant sur le bouton rouge
- 330
- 2. Enlever la chambre à CO<sub>2</sub> du porte échantillon et la poser sur la table anti-vibration pour éviter de casser la vitre.



3. Déclipser le tuyau cristal vert relié à la sortie du contrôleur CO<sub>2</sub> (MAIN out) sur la réserve d'eau de l'incubateur du microscope.



4. Eteindre le contrôleur de CO<sub>2</sub> (brique rouge).



5. Tourner la valve du détendeur à air (argenté) dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.



6. Fermer les bouteilles d'air comprimé (détendeur argenté) et de CO2 (détendeur doré) dans le sens des aiguilles d'une montre.



