

# UTILISATION DU MICROSCOPE CONFOCAL LEICA TCS SP5 AOBs TANDEM

DÉMARRAGE DES CONTRÔLEURS DE DE CO <sub>2</sub> ET DE TEMPÉRATURE .....	2
DÉMARRAGE DU SYSTEME .....	3
DÉMARRAGE DU LOGICIEL LAS AF .....	4
CONFIGURATION DES BOUTONS DU PANNEAU DE CONTRÔLE .....	6
QUANTIFICATION DU SIGNAL.....	8
FONCTIONS DU MICROSCOPE .....	9
ACQUÉRIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES SIMULTANÉMENT .....	12
ACQUÉRIR PLUSIEURS MARQUAGES SEQUENTIELLEMENT.....	15
ACQUÉRIR UNE SERIE Z .....	17
ACQUÉRIR UNE SERIE TEMPORELLE .....	18
ACQUÉRIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE .....	19
ACQUÉRIR UNE MOSAIQUE D'IMAGES.....	20
ACQUÉRIR DES IMAGES EN TRANSMISSION ET CONTRASTE DE NOMARSKI .....	21
OPTIONS DE VISUALISATION DES IMAGES.....	22
ÉCHANTILLONNAGE SPATIAL.....	23
ENREGISTREMENT DES IMAGES .....	25
ÉTEINDRE LE SYSTEME .....	26
ÉTEINDRE LES CONTRÔLEURS DE CO <sub>2</sub> ET DE TEMPÉRATURE .....	27

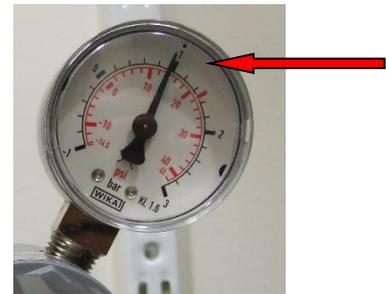
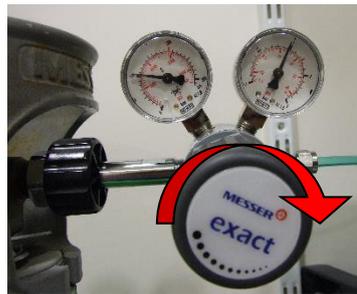
## DÉMARRAGE DES CONTRÔLEURS DE DE CO<sub>2</sub> ET DE TEMPÉRATURE

1- Pour démarrer le contrôleur de température (boîtier bleu), mettre l'interrupteur mural sur ON.



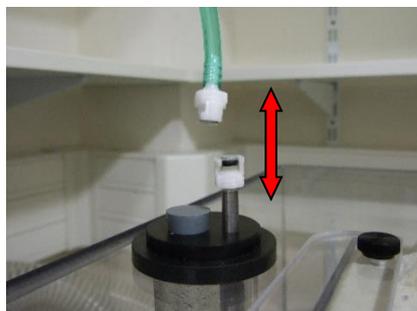
2- Pour utiliser le contrôleur de CO<sub>2</sub>, Ouvrir les bouteilles d'air comprimé (détendeur argenté) et de CO<sub>2</sub> (détendeur doré) dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.

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- Démarrer le contrôleur de CO<sub>2</sub> et brancher 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 la platine.



## DÉMARRAGE DU SYSTEME

I- Allumez la lampe à fluorescence.



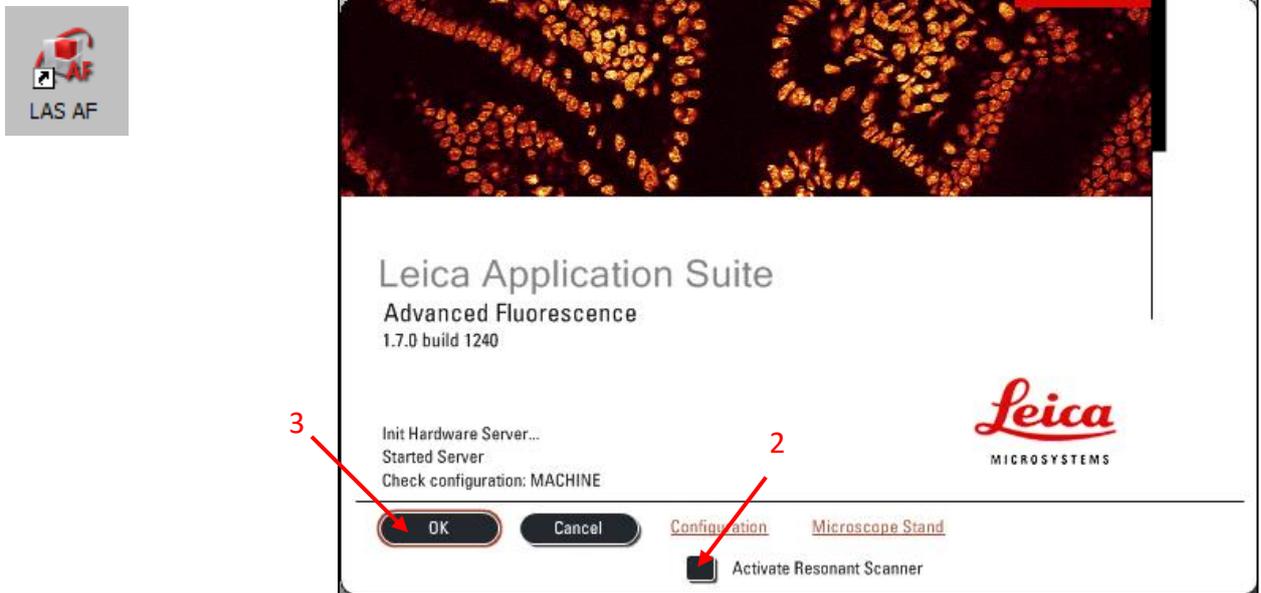
II -Au niveau du poste de commande :



- 1- Mettre en marche le PC et le microscope et les écrans (bouton vert *PC Microscope*).
- 2- Attendre impérativement que Windows démarre et affiche les sessions.
- 3- Allumer le scanner du confocal (bouton vert *Scanner Power*).
- 4- Mettre les lasers sous tension (bouton vert *Laser Power*).
- 5- Allumer les lasers (tourner la clef *Laser Emission* sur ON-1). L'allumage définitif des lasers se fait via le logiciel (voir le chapitre suivant).
- 6- Utilisez la session Windows **TCS User** (pas de mot de passe)

## DÉMARRAGE DU LOGICIEL LAS AF

1- Démarrer le logiciel en cliquant sur l'icône LAS AF sur le bureau.



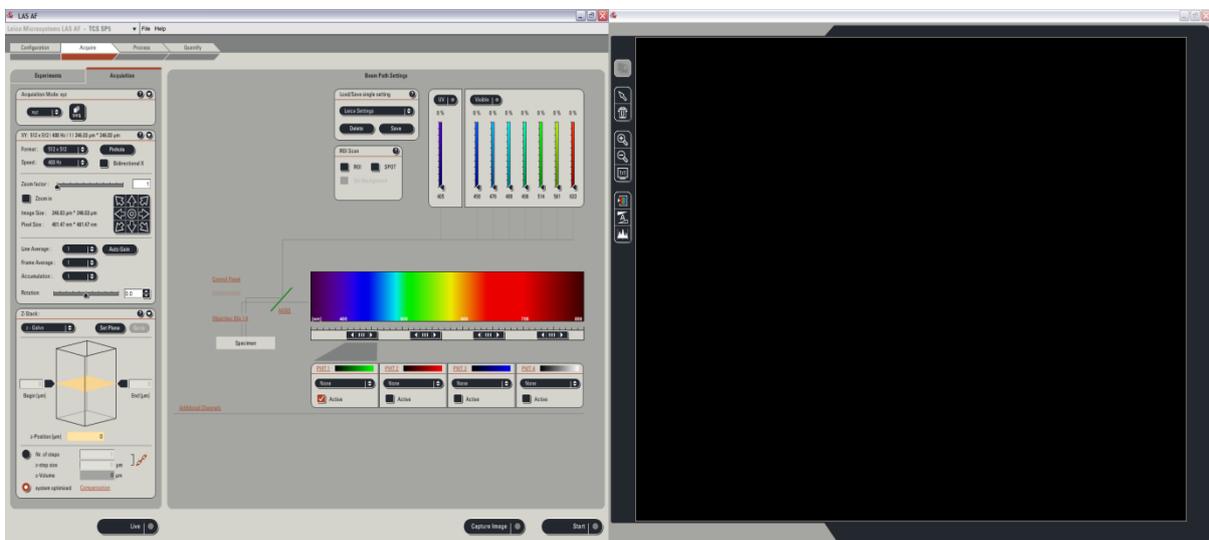
2- Si besoin, activer le mode résonant (8000Hz, mode rapide pour des applications vivant).

3- Démarrer le logiciel LAS AF en cliquant sur le bouton « OK ».

4- Répondre NON au message d'initialisation de la platine XY excepté dans le cas où vous souhaitez enregistrer des positions de platine ou acquérir des images mosaïques.

**NB : Si vous initialisez la platine, attention à baisser complètement les objectifs et à basculer la tête du microscope en arrière AVANT de répondre au message.**

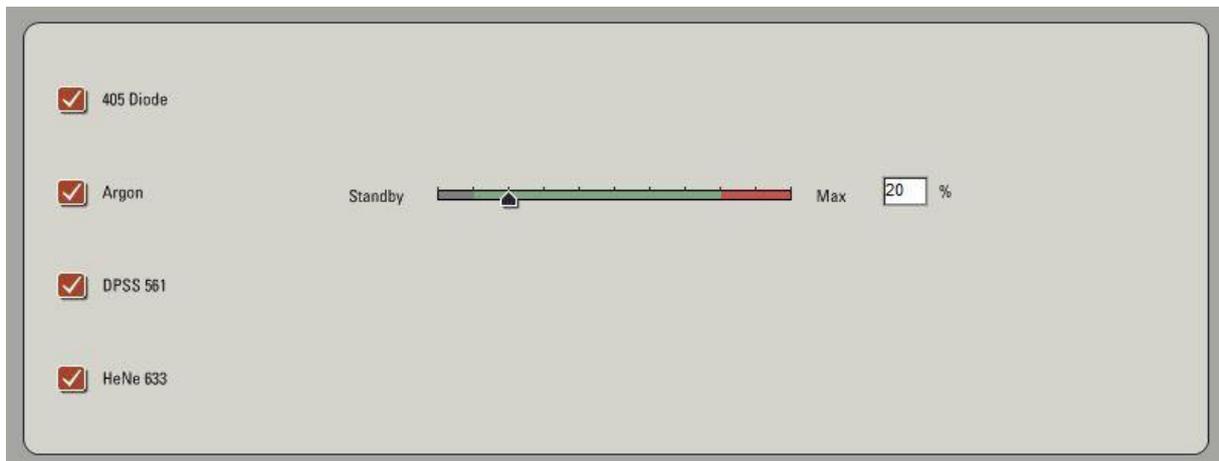
5- Le logiciel LAS AF se répartit sur les deux écrans : celui de gauche dédié aux réglages des acquisitions, celui de droite dédié à l'affichage des images.



6- Mettre en marche les lasers :  
Aller dans le menu *Configuration* → *Laser*



Allumez les lasers dont vous avez besoin en cochant les cases correspondantes.  
Le laser Argon doit être mis à une puissance d'environ 20%-30%. C'est suffisant dans la majorité des cas, mais peut être poussé au-delà lors d'une manip de FRAP. Ne jamais travailler avec une puissance laser inférieure à 10%.



7- Dans le panneau de configuration, vous pouvez également configurer les boutons du panneau de contrôle et régler les paramètres pour quantifier le signal (voir les chapitres correspondants).

## CONFIGURATION DES BOUTONS DU PANNEAU DE CONTRÔLE

Le panneau de contrôle se situe sous les écrans.

Chaque bouton possède une fonction programmable dont le nom est affiché au-dessus.

Il est possible de modifier la fonction et la sensibilité de chacun des boutons.

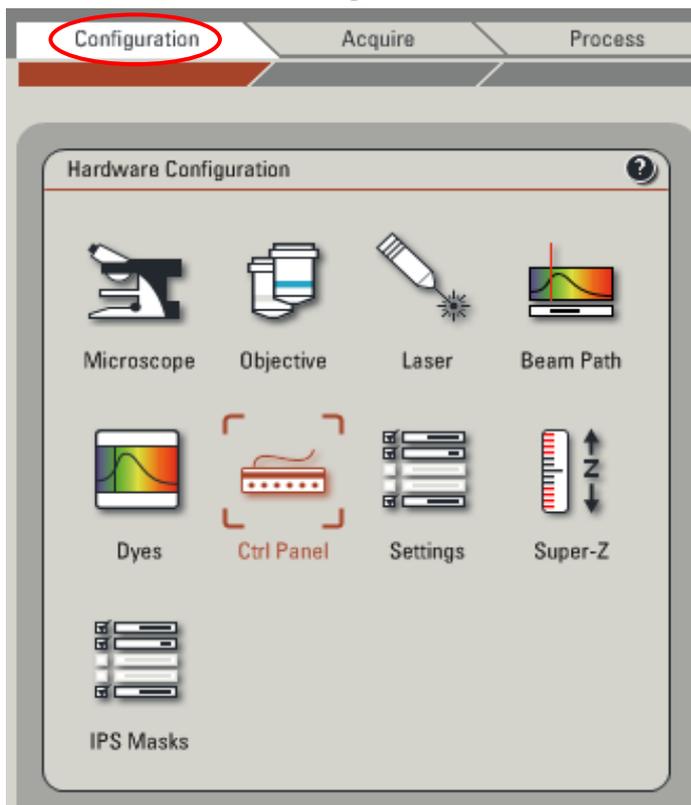


Pour modifier un bouton, aller dans le menu USB control Panel

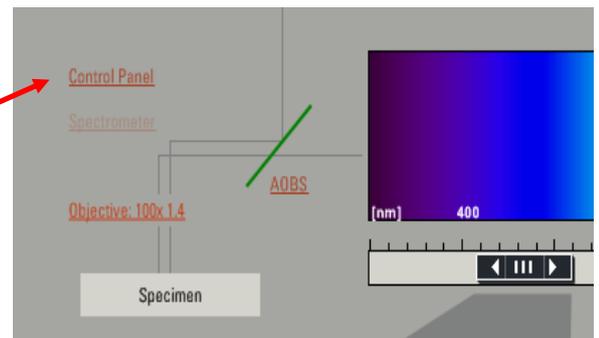
Soit en passant dans le menu Configuration → Ctrl Panel,

Soit dans le menu Acquire → Control Panel.

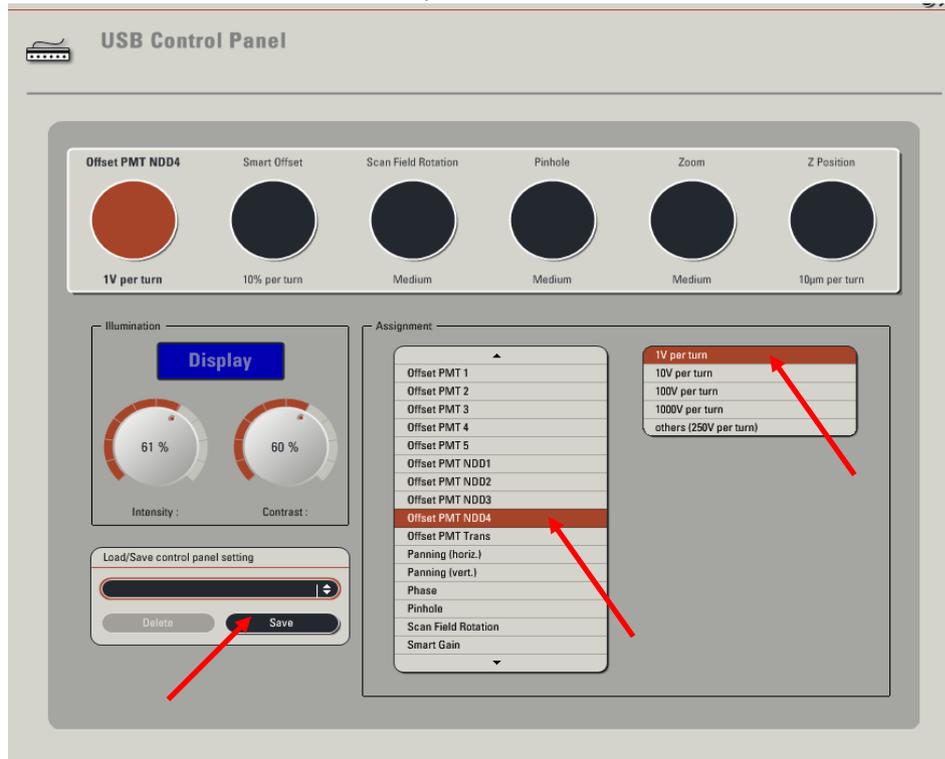
- ou : dans le menu Configuration → Ctrl Panel.



OU



Pour chacun des boutons, vous pouvez modifier sa fonction et sa sensibilité.



Sélectionner le bouton à modifier puis choisir dans les 2 menus déroulants la fonction et la sensibilité à appliquer.

Vous pouvez enregistrer votre panel de boutons : cliquez sur *Save* en bas à gauche et donnez un nom à votre panel. Lors de votre prochaine session, vous pouvez le charger en le sélectionnant dans la liste déroulante.

Les deux petits boutons noirs à la gauche des boutons du panel servent à

- lancer un scan en mode Live (droite)
- sélectionner un PMT à l'écran lorsque le mode Smart Gain est actif (gauche).

#### Quelques astuces :

- Pour le réglage du gain et de l'offset des PMTs, utiliser la fonction *Smart Gain* et *Smart Offset* qui vous permettront de régler le gain et l'offset de tous les PMTs. Pour sélectionner le PMT à modifier, cliquer sur l'image correspondante (elle doit être entourée de pointillés blancs).
- Désactivez les boutons dont la fonction vous est inutile : il existe une position vide tout en haut de la liste déroulante.

## QUANTIFICATION DU SIGNAL

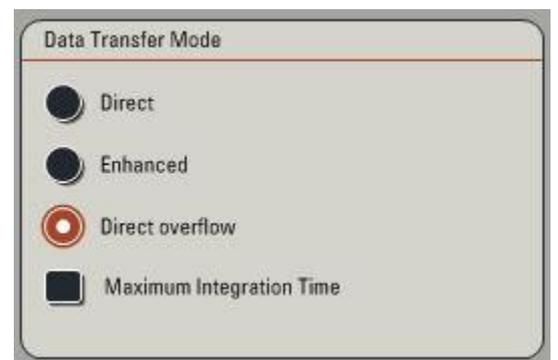
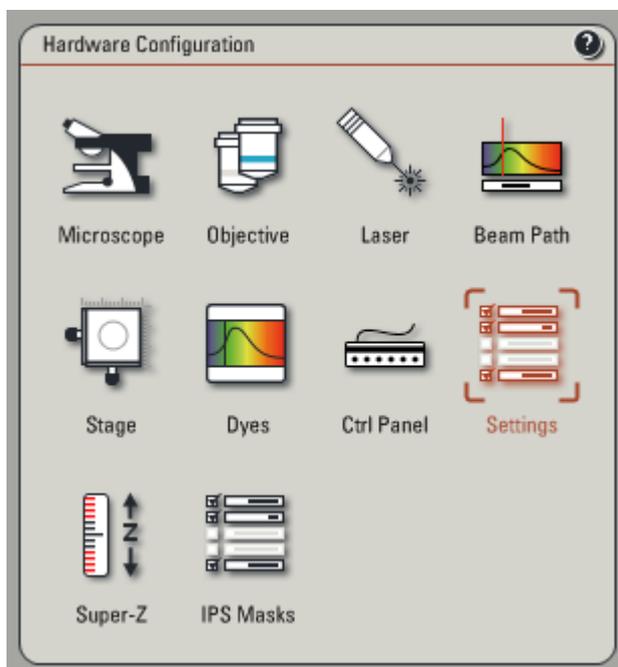
Pour quantifier un signal de fluorescence, les différentes conditions d'expérience doivent être acquises avec les mêmes conditions d'acquisition (même puissance laser, même gain et Offset).

Dans la mesure du possible, les conditions d'acquisition doivent être paramétrées sur l'échantillon dont le signal de fluorescence est le plus intense. De cette façon, les autres échantillons n'atteindront pas la saturation.

Attention, avant de réaliser les acquisitions, il faut :

Dans le menu *Configuration/Setting/Resolution*, sélectionner « 16bits » dans le menu déroulant

Dans le menu *Configuration/Setting/Data Transfer Mode*, sélectionner « Direct Overflow »



## FONCTIONS DU MICROSCOPE

### Sur le côté gauche



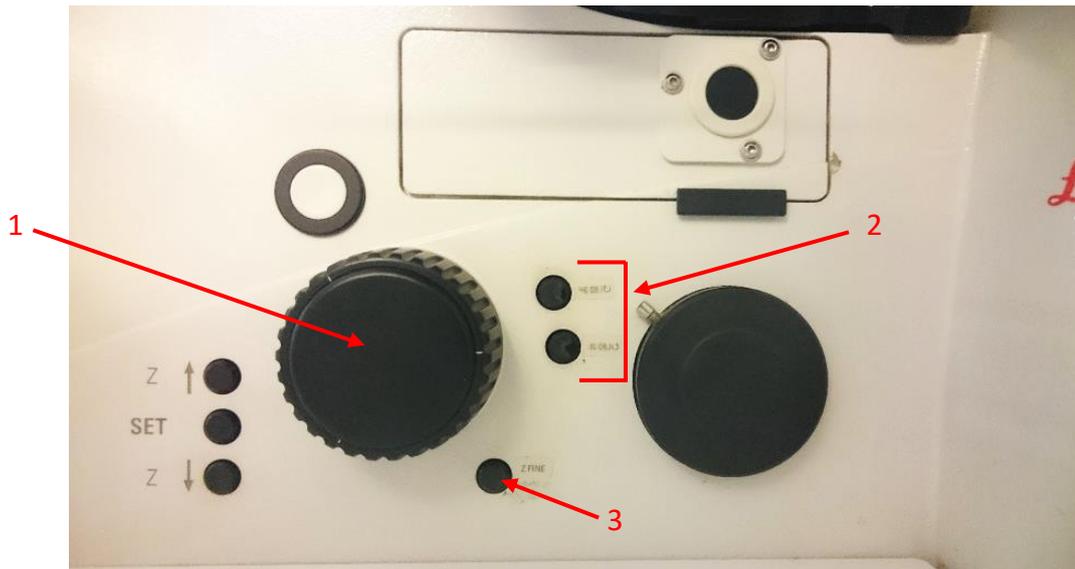
- 1- Réglage de l'intensité lumineuse en lumière blanche ou en fluorescence selon l'illumination en cours.
- 2- Réglage de la taille du diaphragme de champ en fluorescence.
- 3- Réglage de la taille du diaphragme d'ouverture en transmission.
- 4- Passage du mode transmission (TL) au mode Fluo (IL).
- 5- Vis de mise au point.
- 6- Choix du mode de contraste en lumière blanche (passe successivement en Lumière transmise / DIC / polariseur-analyseur seuls).

### En façade

- 1- Choix du bloc filtre de fluorescence.
- 2- Ouverture/fermeture du shutter de fluorescence.



## Sur le côté droit



1- Vis de mise au point.

2- Boutons pour changer d'objectif. Bouton du haut pour un objectif de grossissement supérieur, bouton du bas pour un objectif de grossissement inférieur.

3- Bouton pour utiliser les objectifs à air ou à immersion.

## Joystick

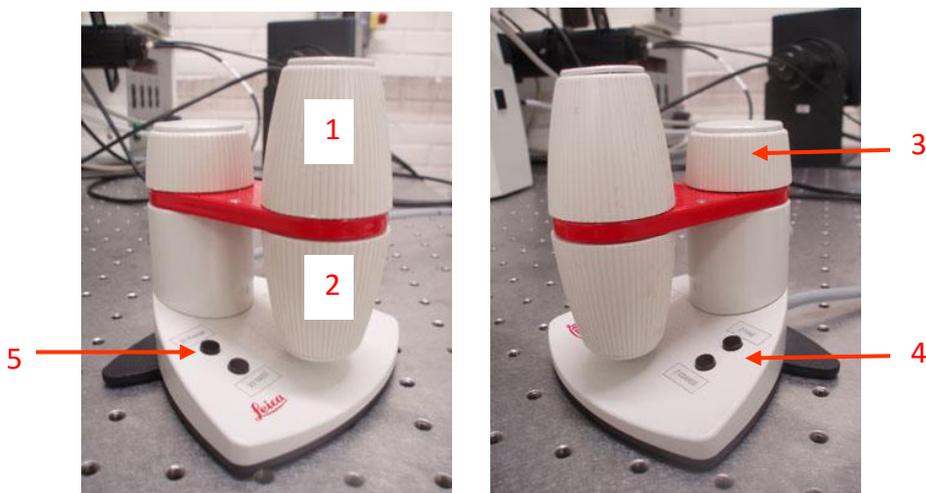
1- Vis de déplacement en Y.

2- Vis de déplacement en X.

3- Vis de mise au point.

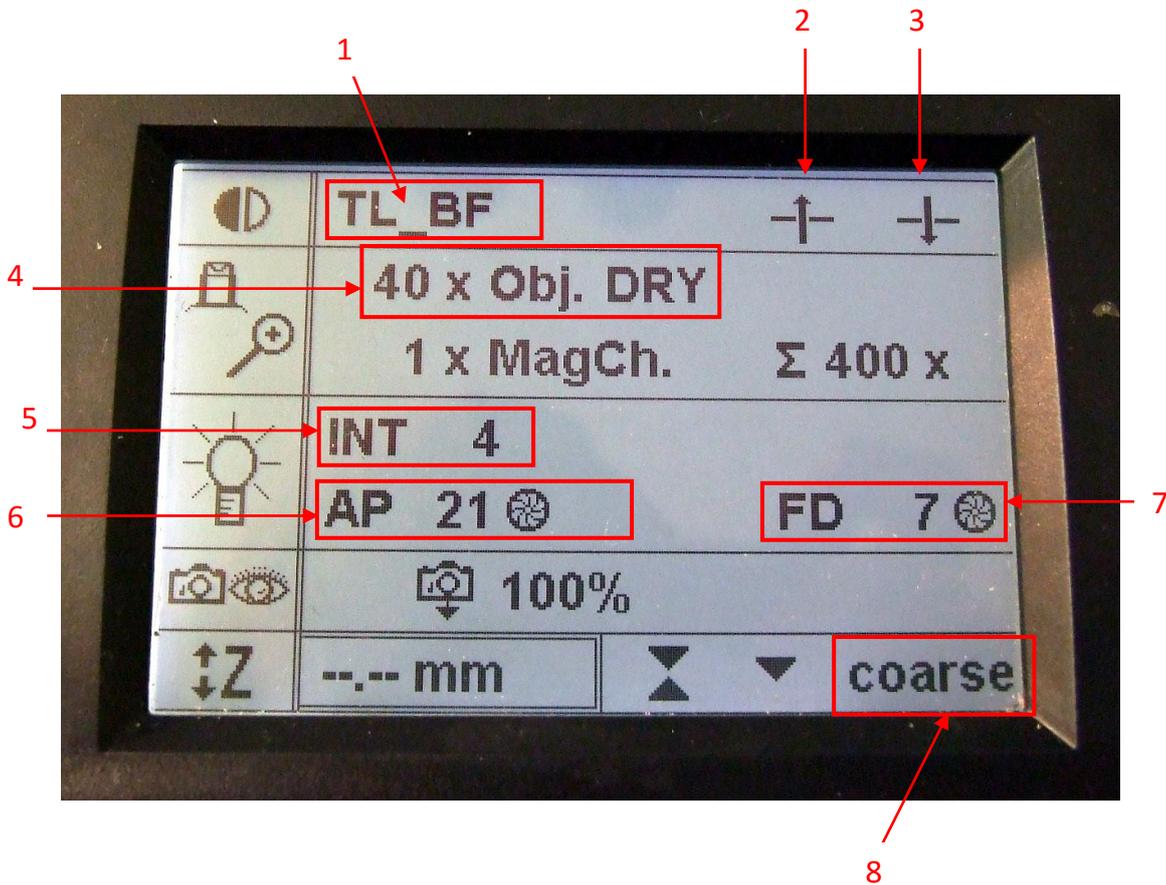
4- Boutons pour réglage de la vitesse du déplacement en Z (Z Fine/Z Coarse)

5- Boutons de réglage de la vitesse de déplacement en XY (XY Slow/ XY Fast)



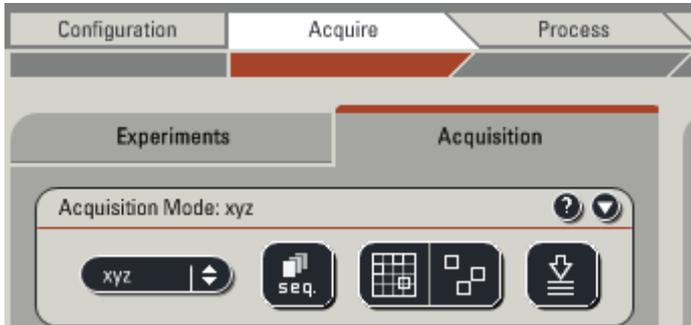
## Écran

- 1- Type d'illumination (fluo, TL:transmission, DIC, Pol:polariseur)
- 2- Shutter fluo ouvert/fermé
- 3- Shutter lumière transmise ouvert/fermé
- 4- Objectif utilisé.
- 5- Intensité de la lampe actuellement utilisée
- 6- Taille de l'ouverture du diaphragme d'ouverture
- 7- Taille de l'ouverture du diaphragme de champ
- 8- Vitesse de déplacement en Z de la crémaillère des objectifs (Coarse = rapide, Fine = lent)

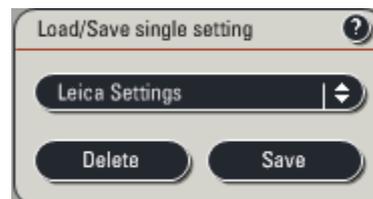
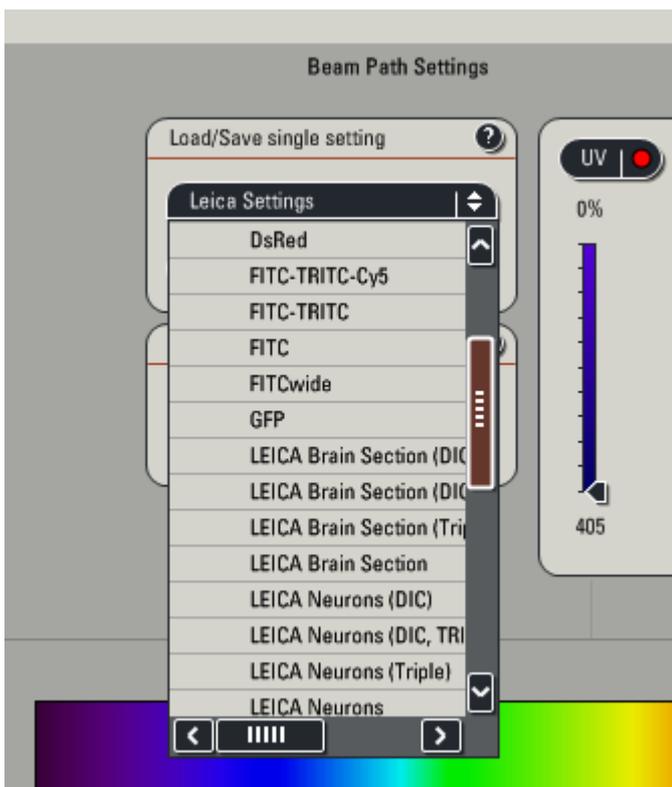


## ACQUÉRIR UN OU PLUSIEURS MARQUAGES SIMULTANÉMENT

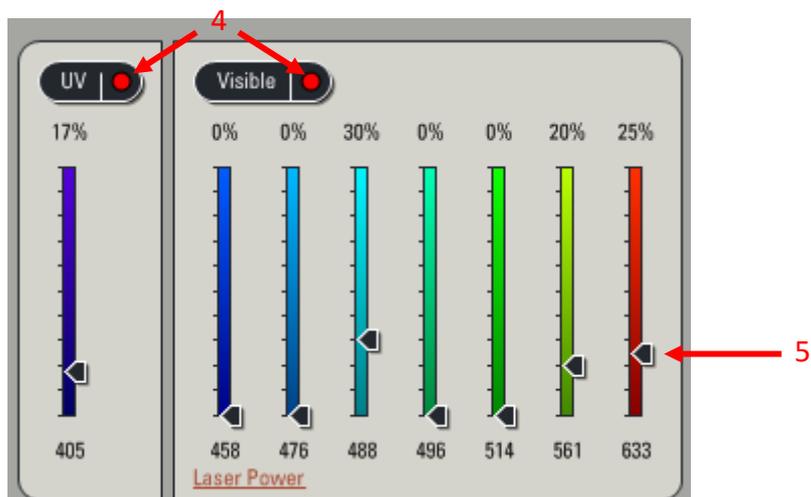
- 1- Installer votre échantillon sur le microscope, remettre le bras du microscope en position verticale et faire la mise au point à l'oculaire. Puis fermer le shutter de fluorescence.
- 2- Aller dans l'onglet *Acquire*. Choisir le mode d'acquisition *xyz* ou *xyzt* dans *Acquisition*



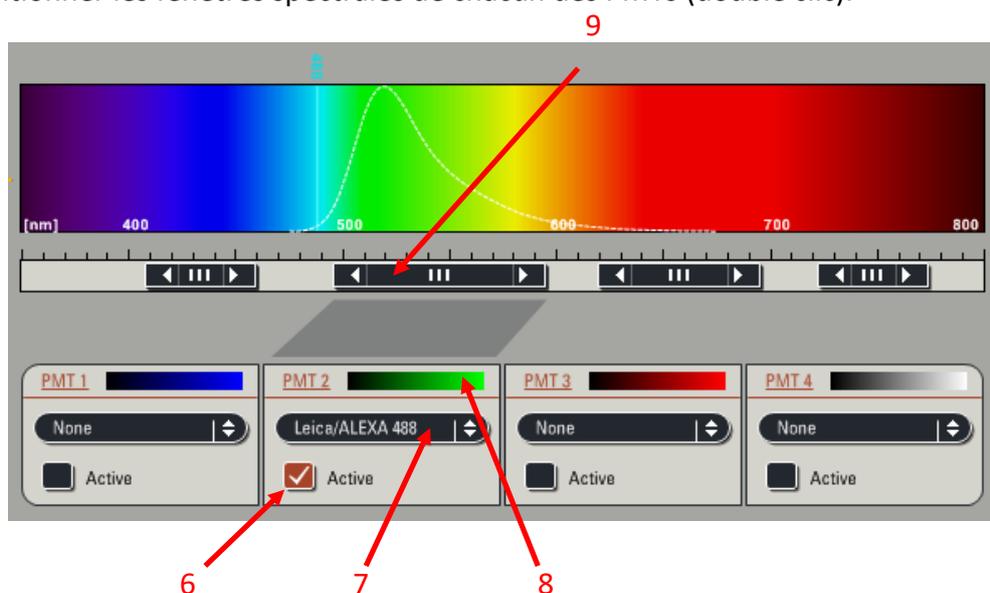
- 3- Charger une configuration préétablie dans le menu déroulant *Load/Save single settings* en sélectionnant une macro dans la liste. Vous pourrez la sauvegarder après l'avoir modifié en cliquant sur *Save*.



- 4- Activer (point en rouge) l'AOTF UV et visible pour pouvoir utiliser les raies laser dont vous avez besoin.
- 5- Régler les puissances de sortie d'AOTF de chacune des raies choisies.



- 6- Activer les détecteurs (PMTs) dont vous avez besoin.
- 7- Dans la liste déroulante, choisir les spectres d'émission de vos fluorochromes pour les afficher.
- 8- Sélectionner la couleur dans laquelle l'image sera affichée pour chacun des PMTs utilisé.
- 9- Positionner les fenêtres spectrales de chacun des PMTs (double clic).



- 10- Lancer une acquisition en cliquant sur le bouton *Live*.



- 11- Cliquer sur l'icône *Q-LUT* (écran de droite) pour visualiser l'image en couleurs de réglage. Les pixels saturés sont représentés en bleu et le niveau le plus bas en vert.



- 12- Sur le panneau de contrôle, régler le gain et l'offset avec les mollettes.

13- Régler la largeur du *Pinhole*.

Pour être dans les conditions confocales optimales, la valeur doit être à *Airy 1*.



14- Modifier le zoom et le format d'image de façon à échantillonner correctement l'image. (voir le chapitre correspondant.)

15- Cliquer sur *Capture Image* pour acquérir l'image.



16- Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire. (voir le chapitre correspondant.)

Si vous travaillez avec plusieurs marquages simultanément, vous devez vérifier les éventuels débordements des spectres d'émission des marquages dans les autres PMTs, en procédant comme suit :

- Ne garder que la raie laser du marquage à tester en mettant les autres raies à 0 %
- Laisser tous les PMTs activés avec leurs réglages de gain et Offset pour chacun des marquages.
- En mode *Live*, vérifier qu'il n'y a pas de passage de fluorescence non désirée dans les autres PMTs.

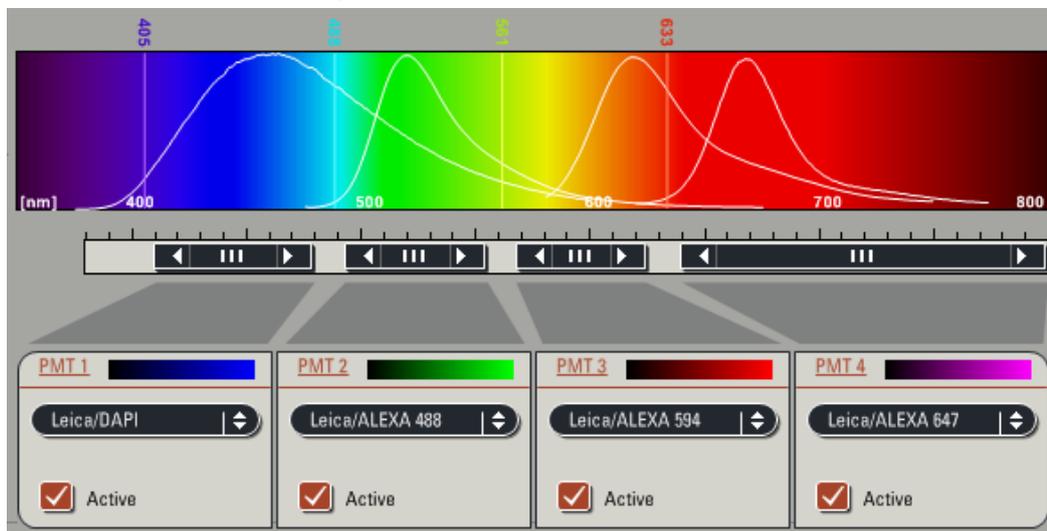
S'il y a de la fluorescence détectée dans les PMTs non désirés :

- Diminuer au maximum la puissance laser.
- Diminuer le gain des PMTs dans lesquels il y a du passage.
- Décaler le début de la fenêtre spectrale des PMTs dans lesquels il y a du passage.
- Recommencer pour chacun des fluorochromes à tester.

S'il est impossible de supprimer les débordements, vous devez obligatoirement travailler en mode séquentiel.

## ACQUÉRIR PLUSIEURS MARQUAGES SEQUENTIELLEMENT

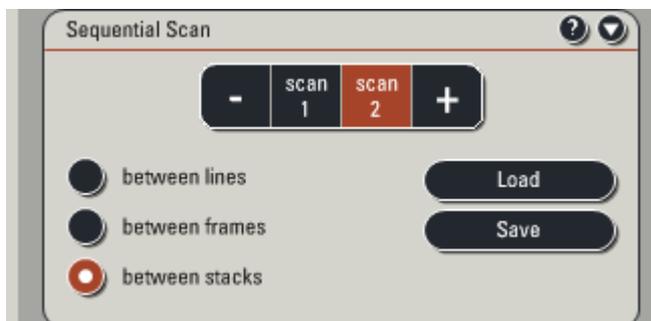
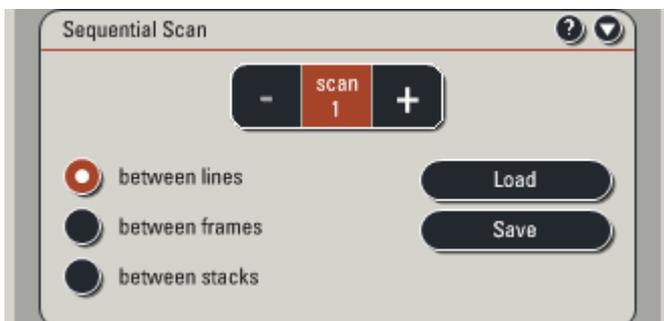
- 1- Reprendre toutes les étapes pour faire une acquisition simultanée.  
Activer toutes les raies laser et tous les PMTs que vous allez utiliser en même temps.  
Positionner les fenêtres spectrales de chacun des PMTs (double clic).



- 2- Cliquer sur le bouton *Seq.*



- 3- Le bloc *Sequential Scan* s'ouvre. Par défaut, il n'y a qu'une seule séquence de scan créée.



- 4- Ajouter une nouvelle séquence en cliquant sur le bouton *+*, la séquence précédente servira alors de modèle à la nouvelle. Ajouter autant de séquence que nécessaire.
- 5- Sélectionner *scan1* et désactiver les lasers et détecteurs inutiles à la 1<sup>ère</sup> séquence.
- 6- Procéder de même pour chaque *scan* de la séquence.  
En procédant ainsi, les bandes passantes des PMTs sont positionnées de façon identique dans toutes les séquences. L'acquisition sera donc plus rapide puisque qu'elle ne nécessitera pas de modifier la position des fenêtres spectrales.

7- Choisir le mode d'acquisition le plus approprié entre les modes suivant :

- Between lines : pour acquérir une ligne avec une macro, puis la même ligne avec une autre macro avant de passer à la ligne suivante. **Dans ce mode, les fenêtres spectrales de toutes les macros doivent être identiques. À n'utiliser que pour des acquisitions rapides.**
- Between frames : pour acquérir un plan, ou un plan d'un stack avec les différentes macros avant de passer au plan suivant. Mode conseillé pour l'acquisition de séries Z en vue d'une étude de colocalisation.
- Between stacks : pour acquérir un stack entier avec une macro, puis le même stack avec une autre macro. Mode le plus rapide.

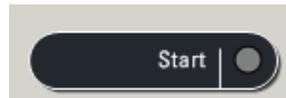
8- Lancer une acquisition en cliquant sur le bouton *Live*.

9- Régler la puissance laser, le gain et l'offset pour chaque *scan* de la séquence, en prenant soin de les réaliser dans le plan le plus intense si vous faites l'acquisition d'une série Z.

10- Vous pouvez faire des moyennes d'images différentes pour chacun des *scans*.



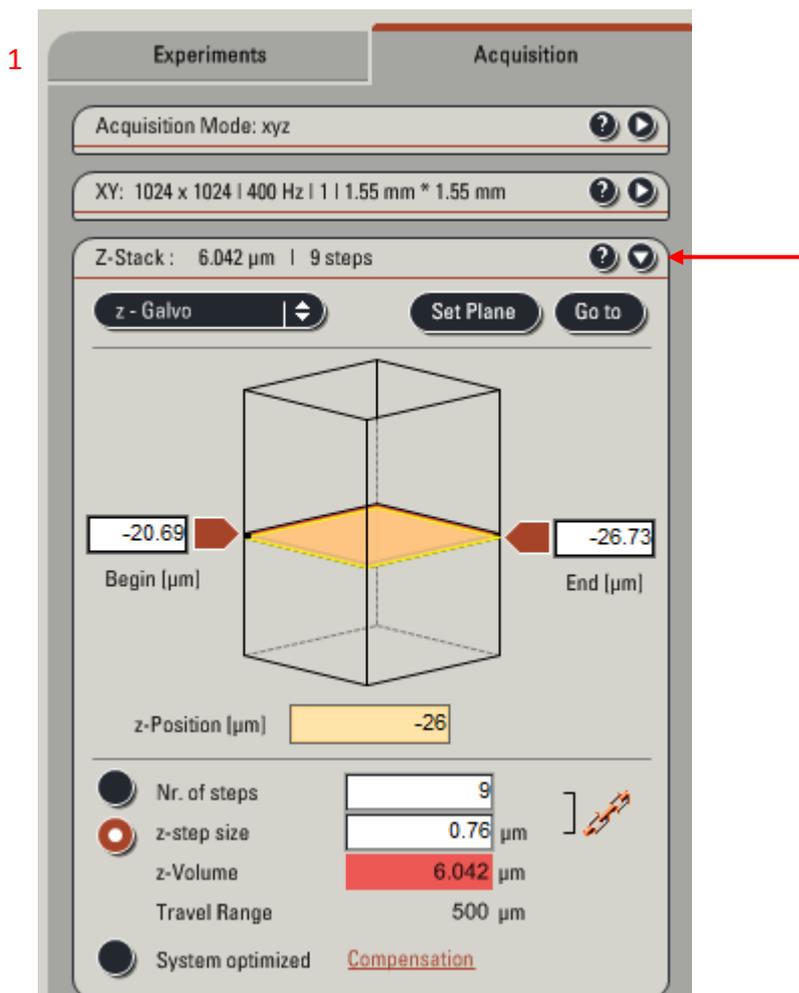
11- Lancer l'acquisition en cliquant sur le bouton *Start*.

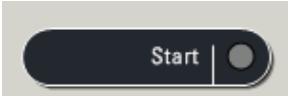


12- Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire. (voir le chapitre correspondant.)

## ACQUÉRIR UNE SERIE Z

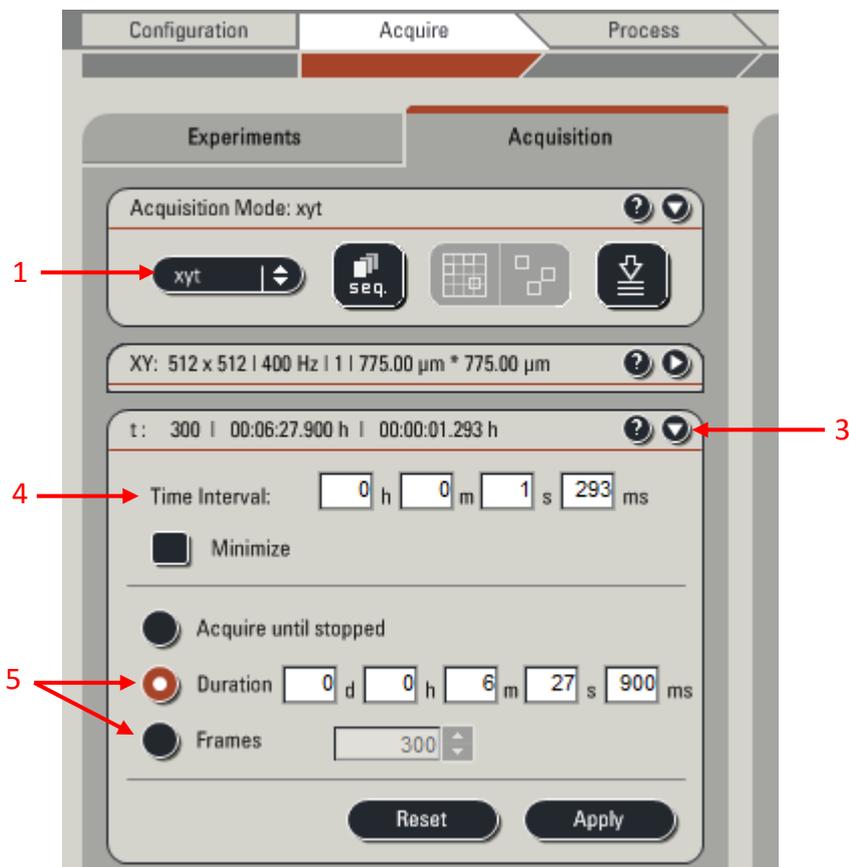
- 1- Choisir le mode *xyz* ou *xyzt* dans *Acquisition*.
- 2- Procéder de la même façon que dans le paragraphe *Acquérir une ou plusieurs couleurs* pour faire les réglages de gain et d'offset, en prenant soin de les réaliser **dans le plan le plus intense**.
- 3- Ouvrir le panneau *Z-stack*.  
En mode *Live*, ajuster le Z de façon à être au plus proche de la lamelle (sens inverse des aiguilles d'une montre) Cliquer sur *Begin* pour marquer la position de départ.



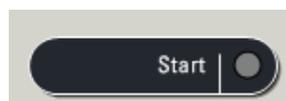
- 4- Ajuster à nouveau le Z de façon à être le plus éloigné de la lamelle. Cliquez sur *End* pour marquer la position de fin.
- 5- Cocher *z-step size* et entrer la valeur de la distance entre chaque coupe *Z-step size* en fonction de l'échantillon axial optimal. Ne pas utiliser le mode *system optimized*.
- 6- Lancer l'acquisition de la série Z avec l'icône *Start*.  

- 7- Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire.

## ACQUÉRIR UNE SERIE TEMPORELLE

- 1- Choisir le mode *xyt* ou *xyzt* dans *Acquisition*.
- 2- Procéder de la même façon que dans le paragraphe *Acquérir une ou plusieurs couleurs* pour faire les réglages de gain et d'offset.
- 3- Ouvrir le panneau *t* :



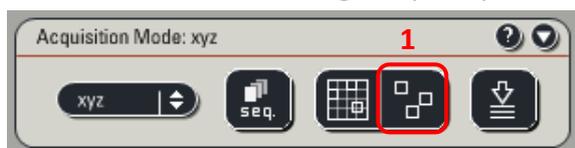
- 4- Choisir l'intervalle de temps entre chaque image (*Time Interval*).  
Cliquer sur *Minimize* pour choisir l'intervalle minimum en fonction des paramètres d'acquisition.
- 5- Choisir la durée (*Duration*) ou le nombre d'images nécessaires (*Frames*).
- 6- Lancer l'acquisition de la série temporelle avec l'icône *Start*.
- 7- Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire.



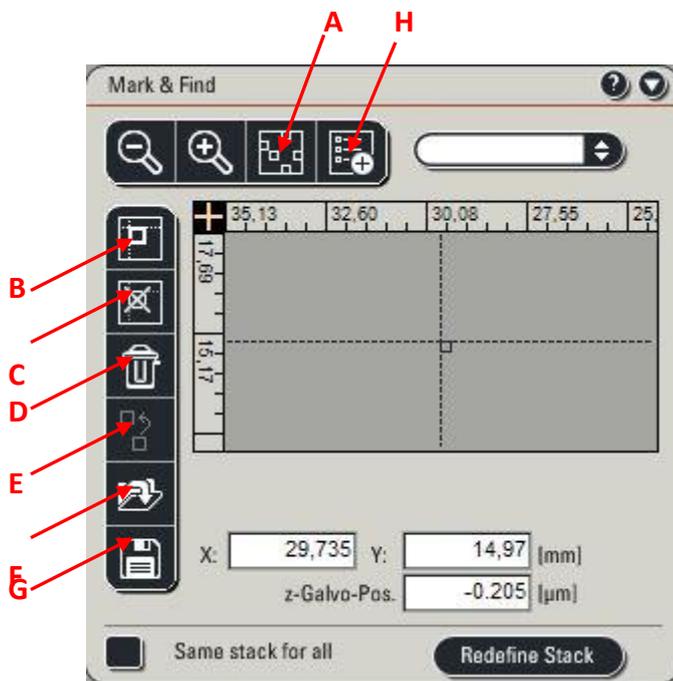
## ACQUÉRIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE

La platine XY motorisée doit être initialisée au lancement du logiciel pour pouvoir effectuer ce type d'acquisition.

1- Cliquer sur l'icône *Mark and Find*.



2- La fenêtre suivante apparaît :



- A. Visualisation des positions enregistrées
- B. Ajout d'une position
- C. Suppression de la position sélectionnée
- D. Suppression de toutes les positions
- E. Remplacement d'une position
- F. Charger des positions sauvegardées
- G. Enregistrer les positions créées
- H. Accès aux paramètres de calibration

3- Chercher un champ d'intérêt, se placer dans le bon plan, puis cliquer sur 

4- Recommencer de la même façon pour enregistrer toutes les positions.

REMARQUE : Pour acquérir une série Z pour chaque position, il y a 2 possibilités :

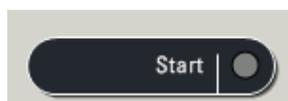
- **Acquérir la même série Z pour toutes les positions.** Dans ce cas :

- a). Définir les conditions de la série Z (*Begin*, *End* et *Z step size*)
- b). Enregistrer toutes les positions
- c). Cocher la case *Same Stack for all*

- **Acquérir une série Z différente pour chaque position.** Dans ce cas :

- a). Se placer sur le 1<sup>er</sup> champ d'intérêt.
- b). Définir les conditions d'acquisition de la série Z (*Begin*, *End* et *Z step*)
- c). Enregistrer la position.
- d). Recommencer de façon identique pour toutes les positions à enregistrer.

5- Lancer l'acquisition en cliquant sur *Start*.



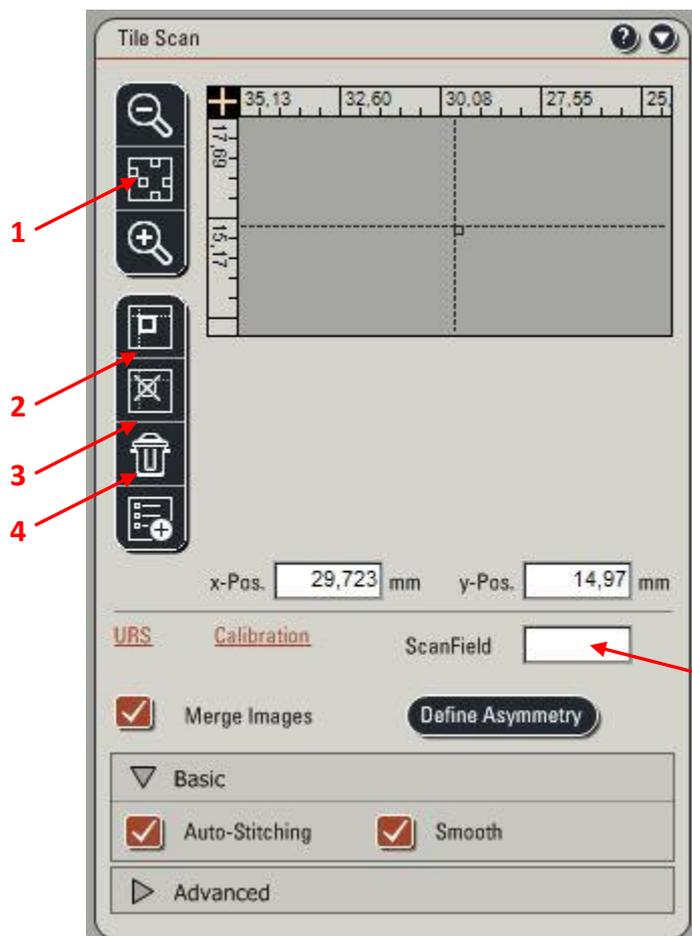
## ACQUÉRIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES

La platine XY motorisée doit être initialisée au lancement du logiciel pour pouvoir effectuer ce type d'acquisition.

1- Dans *Acquisition Mode : xyz*, Cliquer sur l'icône *Tile Scan*.



2- La fenêtre suivante apparaît :



1. Visualisation des positions enregistrées
2. Enregistrement d'une position
3. Suppression de la position sélectionnée
4. Suppression de toutes les positions
5. Taille du champ scanné (en nb d'images)

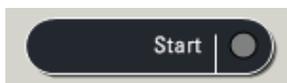
Laisser les cases *Merge Images*, *Auto-Stitching* et *Smooth* cochées.

L'acquisition d'une image mosaïque se fait en enregistrant la position du coin « supérieur gauche » puis la position du coin « inférieur droit ». Le logiciel calcule automatiquement le nombre d'images à effectuer pour scanner tout le champ.

3- Chercher un champ d'intérêt, se placer dans le bon plan, puis définir la position de début de mosaïque en cliquant sur 

4- Procéder de la même façon pour enregistrer la position de fin de mosaïque.

5- Lancer l'acquisition en cliquant sur *Start*.



## ACQUÉRIR DES IMAGES EN TRANSMISSION ET CONTRASTE DE NOMARSKI

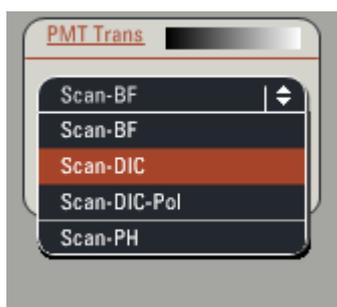
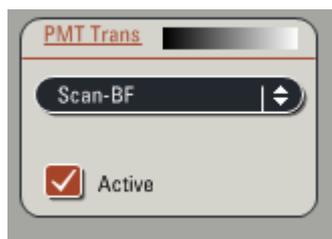
L'image en transmission ou en contraste de Nomarski est acquise grâce aux lasers utilisés pour la fluorescence, donc elle ne nécessite pas de temps d'acquisition supplémentaire et n'augmente pas le bleaching dû à l'acquisition.

1- Réaliser l'alignement de Köhler aux oculaires.

2- Sur le panneau *Beam Path Settings*, cocher *Additional Channels*.



3- Activer le PMT pour la transmission.



4- Dans la liste, sélectionner Scan-BF pour faire une image en transmission.

Ou Scan-DIC pour faire une image en contraste de Nomarski.

5- Utiliser de préférence le laser 488 nm pour faire les images en transmission et DIC.

6- Lancer un scan en *Live*. Après avoir réglé la puissance du laser pour la fluorescence, ajuster le gain, l'offset du PMT Trans.

7- Acquérir l'image en cliquant sur *Capture Image*.

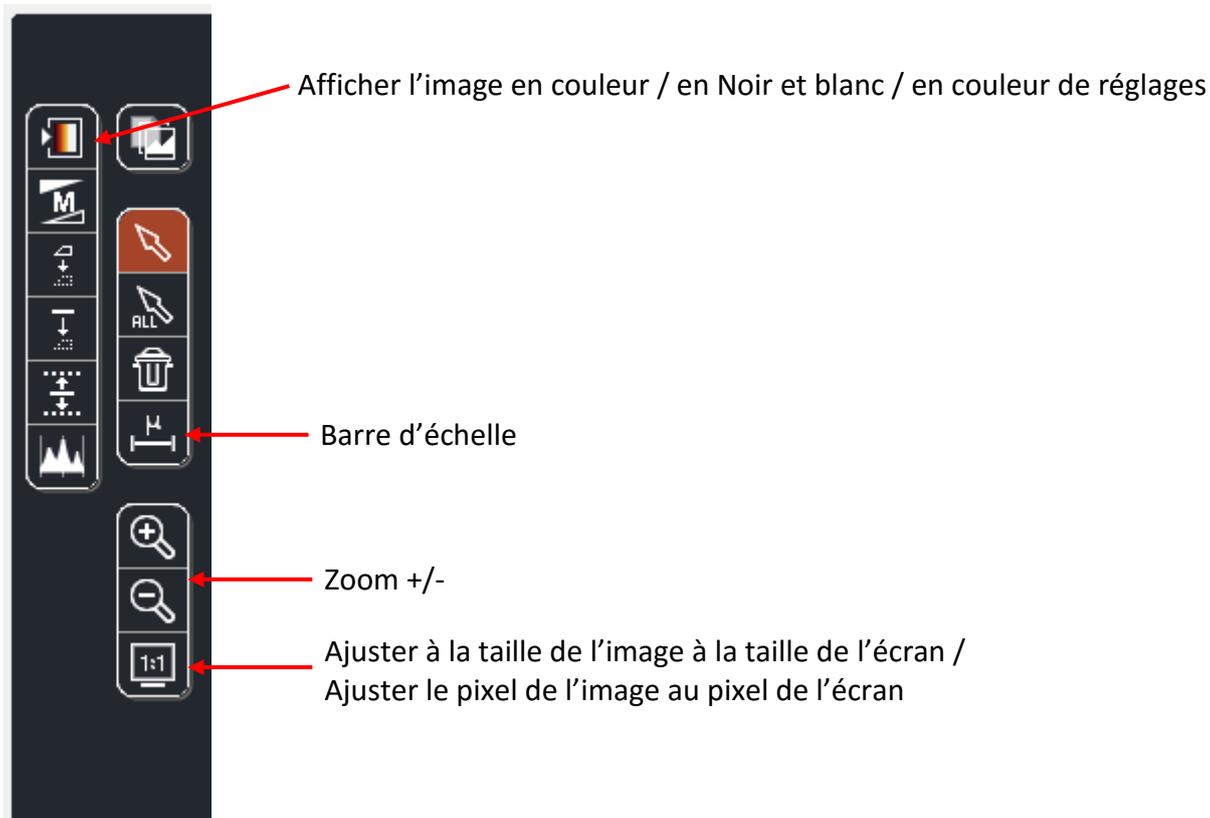


8- Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire. (voir le chapitre correspondant.)

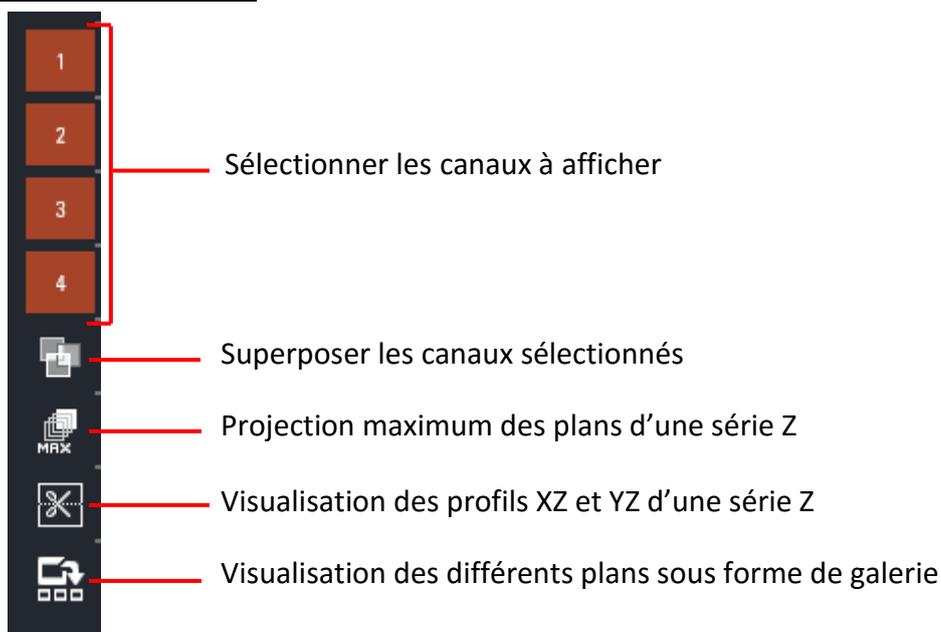
## OPTIONS DE VISUALISATION DES IMAGES

Sur l'écran de droite se trouve les icônes permettant de changer la visualisation des images.

À gauche de l'écran :



À droite de l'écran :



## ÉCHANTILLONNAGE SPATIAL

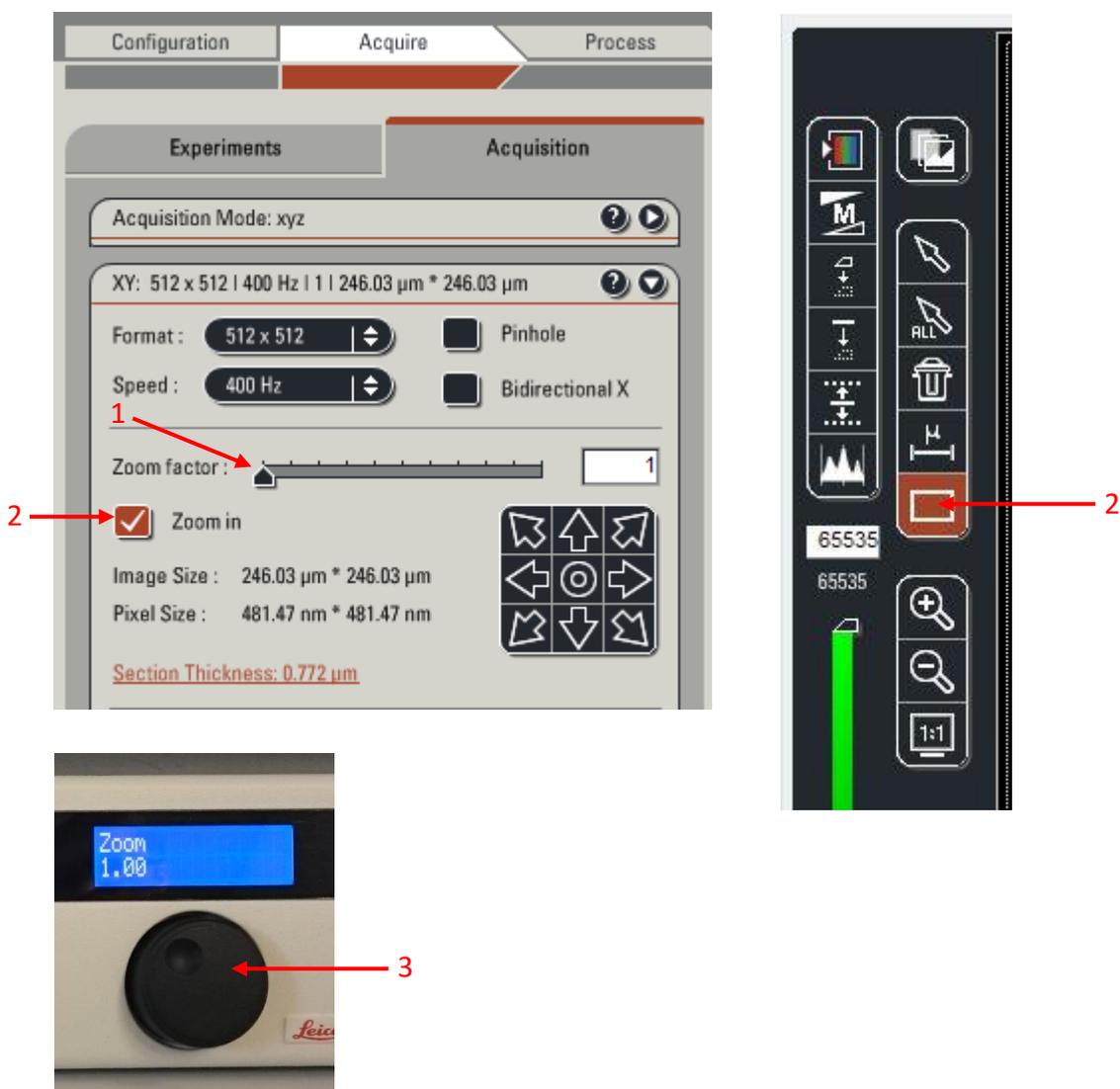
### Échantillonnage latéral :

Pour que vos images soient acquises avec le maximum de détails, la taille des pixels de l'image doit être égale à la moitié de la résolution en XY de l'objectif utilisé (critère de Nyquist). Vous pouvez consulter le tableau sur le mur pour connaître la résolution et la taille des pixels à acquérir pour chaque objectif en fonction des longueurs d'onde utilisées.

Pour modifier la taille des pixels dans l'image, il faut modifier le zoom et/ou le format de l'image dans le menu *Acquisition XY*.

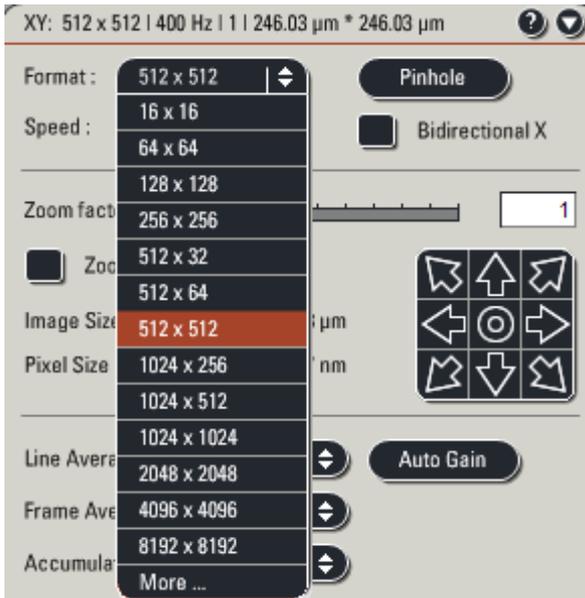
Pour faire un zoom, 3 possibilités :

- 1- Modifier le zoom avec le curseur *Zoom factor* dans *Acquisition XY*.
- 2- Cochez la case *Zoom in*, et sélectionne directement la zone sur l'image.
- 3- Zoomer en tournant la molette de *Zoom* sur le panneau de contrôle.



Pour modifier le format de l'image :

Dans le menu déroulant *Format*, sélectionner la taille d'image souhaitée.

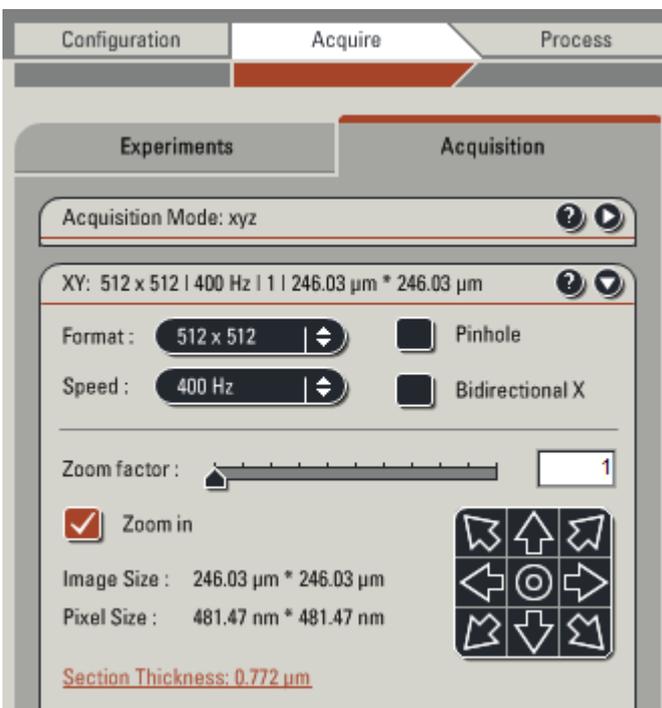


*Astuce :*

L'échantillonnage latéral dépend du nombre de pixels sur l'axe X. Pour garder une grande résolution et acquérir plus vite, il est possible de diminuer le nombre de pixel sur l'axe Y. Ainsi une image 1024\*512 sera acquise deux fois plus rapidement et avec la même résolution qu'une image 1024\*1024 mais avec un champ 2 fois plus petit.

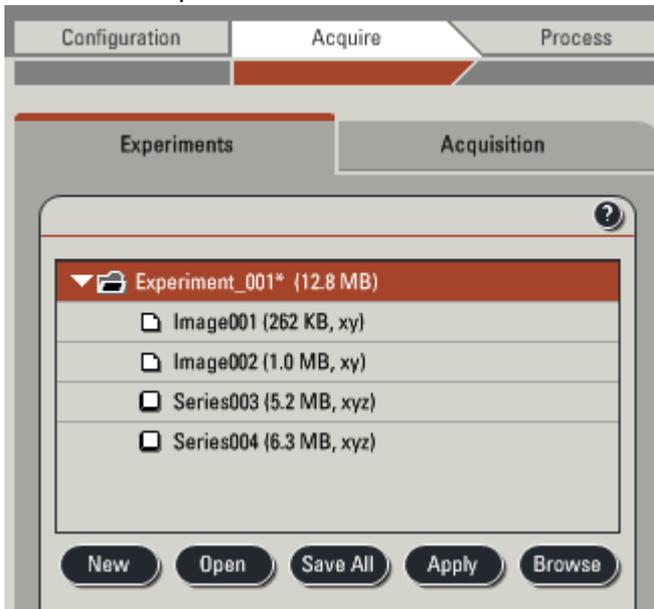
### Échantillonnage axial :

De la même façon, lorsque vous effectuez une série Z, l'intervalle entre 2 coupes optiques doit être fixé en fonction de la résolution axiale théorique de l'objectif et de la taille de pinhole choisi. Ainsi pour que vos images soient acquises avec le maximum de résolution en Z, il faut choisir un intervalle deux fois plus petit que l'épaisseur de la coupe optique (*Section Thickness*).



## ENREGISTREMENT DES IMAGES

La fenêtre de gestion des acquisitions se trouve dans l'onglet *Experiments* situé sur l'écran de gauche. Un fichier *Experiment* est créé automatiquement lors de l'acquisition de la première image. Il contiendra toutes les acquisitions ultérieures.



- 1- Vous pouvez renommer chacune de vos acquisitions (clic droit, *Rename*)
- 2- Pour sauver, cliquer sur le bouton *Save all*. La première fois que vous sauvez le fichier *Experiment*, choisir le chemin de sauvegarde dans (D:\Users\année\mois\date du jour\Nom de l'utilisateur). Renommer votre expérience.
- 3- Pour sauver toutes les autres images et séries Z réalisées par la suite, les renommer, et cliquer sur le bouton *Save all*.

Le dossier *Experiment* est sauvegardé en format .lif. Ce format est lisible par le logiciel Fiji, ImageJ et Icy avec le reader Bio-Format.

**Les données sont conservées sur le disque dur du système pendant 15 jours après leur acquisition, pensez à les transférer rapidement.**

## ÉTEINDRE LE 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 3h qui suivent, vous ne devez pas l'éteindre complètement, mais procéder de la façon suivante :**

- 1- Vérifier que toutes vos données sont sauvegardées.
- 2- Remettre le potentiomètre du laser Argon à la puissance minimale (menu *Configuration* → *Laser*).  
Ne pas décocher les lasers allumés.
- 3- Fermer le logiciel LAS AF (menu *File* → *Exit*).
- 4- Transférer vos données.
- 5- Fermer la session Windows (*Start* → *Log off*).
- 6- Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).
- 7- Baisser les objectifs.

- **Si le système n'est pas utilisé après vous, vous devez l'éteindre complètement.**

- 1- Vérifier que toutes vos données sont sauvegardées
- 2- Eteindre les lasers (Menu *Configuration* → *Laser*) : remettre le potentiomètre du laser Argon à la puissance minimale puis décocher tous les lasers allumés
- 3- Fermer le logiciel LAS AF (menu *File* → *Exit*).
- 4- Eteindre l'ordinateur.
- 5- Mettre les lasers hors tension (au niveau du poste de commande, remettre la clef *Laser Emission* sur Off). Le voyant indicateur d'émission laser s'éteint.
- 6- Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).
- 7- Baisser les objectifs.
- 8- Eteindre la station de travail TCS (bouton vert *PC Microscope*).
- 9- Eteindre le scanner (bouton vert *Scanner Power*)
- 10- Eteindre la lampe à fluorescence.
- 11- Au bout de 10 min, éteindre l'extraction d'air et l'alimentation des lasers (bouton vert *Laser Power*).

## ÉTEINDRE LES CONTRÔLEURS DE CO<sub>2</sub> ET DE TEMPÉRATURE

- 1- Enlever la chambre à CO<sub>2</sub> de la platine et la poser sur la table anti-vibration pour éviter de casser la vitre.
- 2- Débrancher 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.



- 3- Éteindre le contrôleur de CO<sub>2</sub> (brique rouge).



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



- 5- Fermer les bouteilles d'air comprimé (détendeur argenté) et de CO<sub>2</sub> (détendeur doré) dans le sens des aiguilles d'une montre.



- 6- Éteindre le contrôleur de température en appuyant sur l'interrupteur mural.