

TUTORIAL VIDEO-MICROSCOPE

Merci à la plateforme de Jussieu pour le modèle de document.

TUTORIAL VIDEO-MICROSCOPE	1
Préparation du système.....	2
Installation du piezzo et des objectifs.....	2
Initialisation de la platine XY.....	2
Installation et mise en route de la chambre d'incubation	3
Arrivée CO₂.....	4
Allumage du système	5
Acquisitions	8
<i>Acquisition mono-couleur mono-plan sans timelapse</i>	8
Acquisition mono-couleur en Z et dans le temps.	11
Acquisition mono-couleur en Z sans temps.....	17
Acquisition multi-couleurs.....	22
Balayage d'une série de champs	25
Visualisation des acquisitions multiparamétriques	28

Préparation du système

Installation du piezzo et des objectifs

La tourelle comprend 6 emplacements pour objectif mais on ne peut utiliser qu'un seul objectif avec le piezzo.

- Epaisseur échantillon < 100µm : Piezzo 100 (course totale =100 µm, précision 10 nm)

La précision du piezzo n'a aucun rapport avec la résolution en z du système, pour toute question n'hésitez pas à vous adresser aux ingénieurs de la plate-forme.

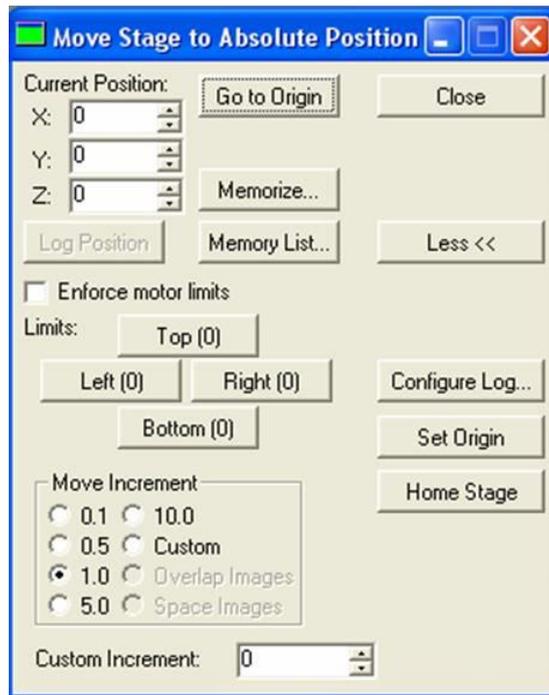
Un piezzo est un périphérique fragile, n'hésitez pas à vous adresser à un des ingénieurs de la plate-forme en cas de doute.

Initialisation de la platine XY

1. Baisser la tourelle d'objectifs à fond.
2. Basculer la potence transmission en arrière.

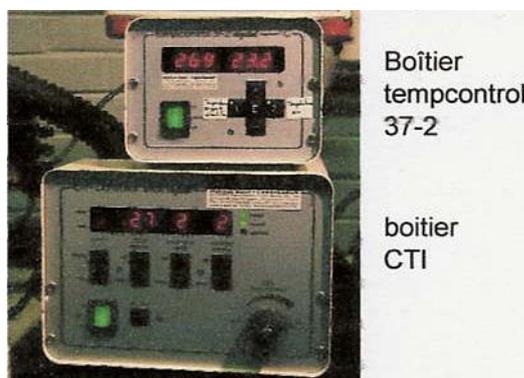
L'oubli de la tourelle, ou de la potence lors de l'initialisation de la platine a des conséquences dramatiques pour l'objectif en place. (Rayure de la lentille supérieure)

3. Dans Metamorph: « device/stage/move stage to absolute position ».
4. Cliquer sur « home stage » et attendre que la platine se cale dans le coin au fond à gauche. La platine XYZ est alors en position 0, 0, 0.
5. Appuyer sur « Set Origin » pour que cette position (coin gauche) soit reconnue comme la position d'origine. Si l'initiation a été effectuée avec succès, lorsque vous déplacez la platine avec le joystick les valeurs de « current position X,Y » évoluent en temps réel.



Installation et mise en route de la chambre d'incubation

1. Installer la platine chauffante noire sur la platine du microscope. Si nécessaire brancher le câble à l'arrière du boîtier 37-2 et le visser.
2. Installer le support de lamelle ou de boîte de Petri contenant l'échantillon dans le support chauffant.
3. Allumer le boîtier de température (tempcontrol 37-2) et de régulation du CO₂ (CTI controler) (boutons verts). La température affichée est la température réelle.



4. Pour modifier les valeurs de consignes de température appuyez sur les boutons "1" (ou "2" : 1 indique les valeurs de température pour le support et 2 indique les valeurs de la température de l'air (dans la chambre)).

- Appuyer une première fois sur "1" (ou "2"): montre si le chauffage est ON ou OFF. Pour passer de l'un a l'autre appuyez sur +.
- Appuyer une deuxième fois : montre la température de consigne (température désirée). Utilisez les boutons + et - pour régler cette température de consigne.
- Appuyez une troisième fois : montre la température réelle.

Arrivée CO₂

1. Ouvrir la vanne de CO₂ (sur le mur derrière le microscope).



2. Réglage pression de consigne CO₂ :

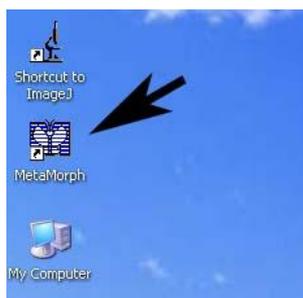
- Boîtier CTI (régulation CO₂): une pression sur display bascule l'affichage soit sur la pression de CO₂ de consigne (nom), soit sur la pression réelle (real). Avec « CO₂ set point up/down » régler la consigne de pression de CO₂ à 5%.
- Une pression sur « valve » met en route l'ouverture automatique de la valve d'arrivée CO₂. Le voyant rouge devient vert quand la valve s'ouvre (avec un bruit sec caractéristique). Si la pression réelle ne monte pas, vérifier que la vanne est ON, que les tuyaux sont bien branchés et que la pression en sortie de bouteille est d'environ 1 bar.
- Vérifier la pression CO₂ quelques minutes après le début de la perfusion.

Allumage du système

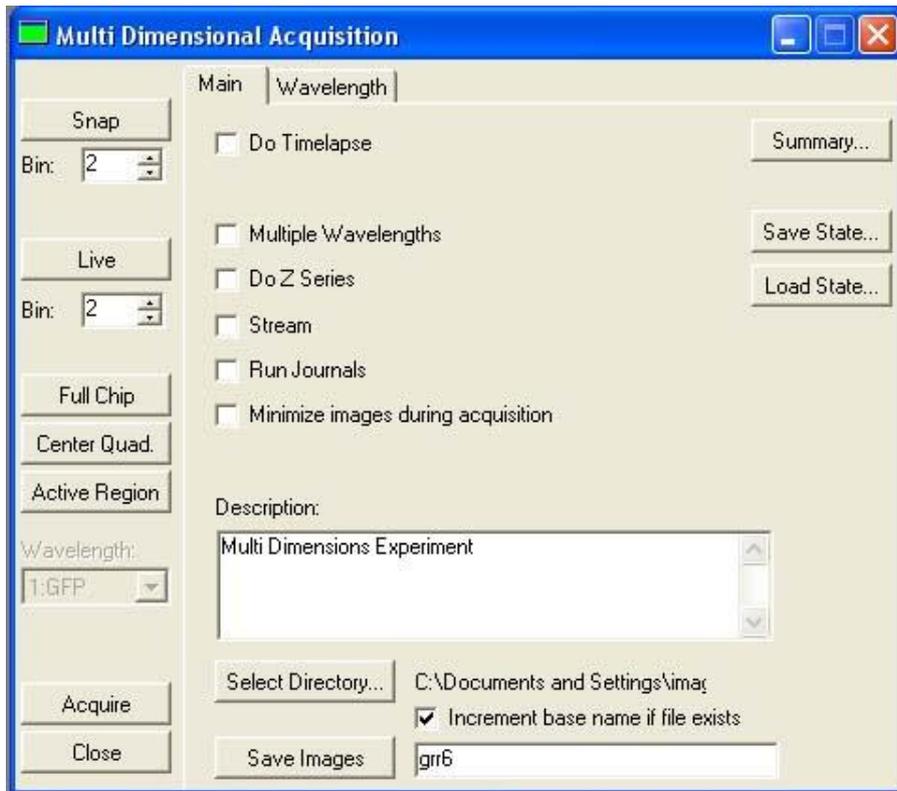
1. Eteindre le PC
2. Allumer les alimentations de la lampe à fluorescence (Optoscan power supply et Lamp power supply)

ATTENTION : la lampe doit être allumée en premier et éteinte en dernier.

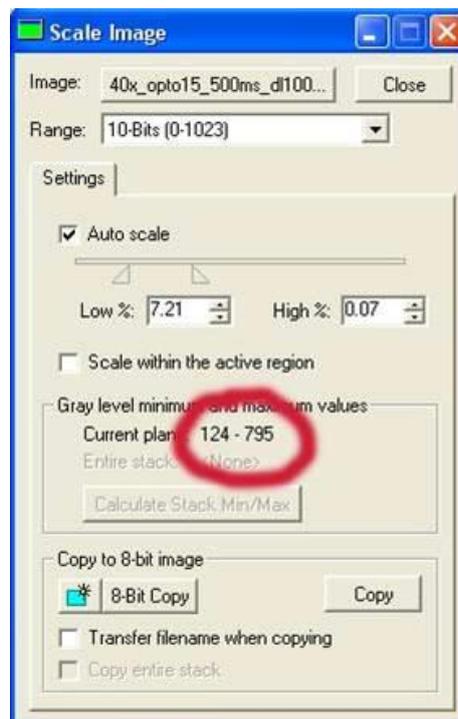
3. Allumez le piezzo à l'arrière du boîtier piezzo, la platine motorisée, le boîtier de commande du shutter de transmission au niveau du boîtier MAC5000 situé à l'arrière du microscope sur l'étagère), la caméra (boîtier noir), le microscope (à droite du microscope).
Si besoin mettez en place la thermostatisation et la régulation de CO2 (**Cf mise en place**)
4. Allumer le PC
5. « Loggez » vous dans « Frédérique
6. Lancez Metamorph.



7. Lancer la boîte " Apps/Multidimensionnal Acquisition" :



8. Afficher la boîte "Display/Scale Image"



Mise en place de l'échantillon, positionnement de l'optovar

1. Vérifier que l'objectif en place est celui dont vous avez besoin (sinon adressez vous à un des ingénieurs de la plate-forme).
2. Mettre en place l'échantillon en utilisant le support universel (sans oublier l'huile pour les objectifs à huile !!)

Passage du système en mode oculaire-transmission

1. Vérifiez que la roue située sur le côté gauche du microscope est en position caméra (flèche) ou oculaire (rond) et au besoin la tourner (délicatement !!).
2. Mettez la **roue de filtres** manuellement sur une position choisie.

Passage du système en mode oculaires-fluorescence

3. Vérifiez que la roue située sur le côté gauche du microscope est en position oculaire (rond) et au besoin la tourner (délicatement !!).
1. Ouvrir le **shutter de fluorescence** ou de transmission grâce au logiciel : appuyer correspondant à la couleur choisie sur les onglets à gauche de l'écran.

Pensez à fermer le shutter de fluorescence quand vous n'observez pas votre échantillon afin de le préserver du photoblanchiment.

Passage du système en mode acquisition

1. Basculez (doucelement !!) la **roue** située sur le côté gauche du microscope en position caméra (flèche)

Acquisitions

Acquisition mono-couleur mono-plan sans timelapse

1. Ouvrir la boîte "Apps/ Multi Dimensional Acquisition".
2. Dans l'onglet "Main" décochez tout.
3. Sélectionnez le nom de vos données et leur emplacement pour l'enregistrement : *users* / « *année* » / « *mois en cours* » / « *jour de la manip* » / « *dossier à votre nom* ».
4. Selon l'objectif utilisé définissez le binning approprié

Objectif **100X** : binning de **2**,

Objectif **63X** : binning de **1**,

Objectif **40X** : binning de **1**,

Objectif **10X** : binning de **1**,



5. Dans l'onglet "*Wavelength*" choisir le fluorophore à imager et le temps d'exposition (entre 20 et 500ms).

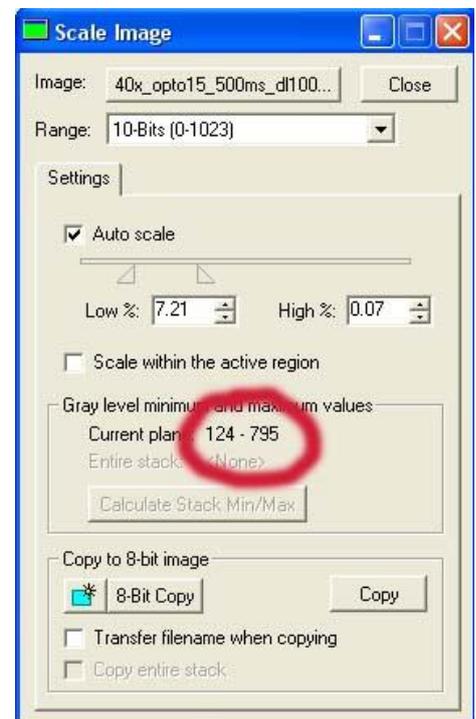


6. Cliquer sur "Snap" pour faire une image de ce fluorophore.
7. Ouvrir le menu "Display/ Scale Image". Ce menu donne la dynamique de l'image.

Le maximum de l'image ne doit jamais atteindre 4095. Plus la dynamique de l'image (différence entre intensité maximum et intensité minimum) (dans cet exemple : $795-124=671$ niveaux) meilleur est l'image.

Remarques :

- Si la dynamique de l'image est trop faible, augmenter le temps d'acquisition.
- Plus on éclaire un échantillon, plus on le détruit. Pour choisir le bon compromis, n'hésitez pas à demander conseil à un ingénieur de la plate-forme.



Il est possible d'acquérir qu'une partie du champ en définissant une région d'intérêt

- Choisir une forme
- Dans le menu "Apps/ Multi Dimensional Acquisition" cliquer sur "Active Region".
- Cliquer sur "Live" ou "Snap" pour avoir l'image votre zone d'intérêt.



Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

- Pour revenir région entière cliquez sur "*full chip*".

16. Cliquer sur "*Snap*".

17. Cliquez sur "Save Image" pour sauvegarder vos données en format .tif.

Acquisition mono-couleur en Z et dans le temps.

1. Ouvrir la boîte "Apps/ Multi Dimensional Acquisition".
2. Dans l'onglet "Main" cochez "Time Lapse".

RMQ : le mode "Stream" permet de faire des acquisitions plus rapides mais elles seront moins bien résolues (cf "Mode **Rapide**").

3. Sélectionnez le nom de vos données et leur emplacement pour l'enregistrement : *users* / « *année* » / « *mois en cours* » / « *jour de la manip* » / « *dossier à votre nom* ».
4. Selon l'objectif utilisé définissez le binning approprié

Objectif **100X** : binning de **2**,

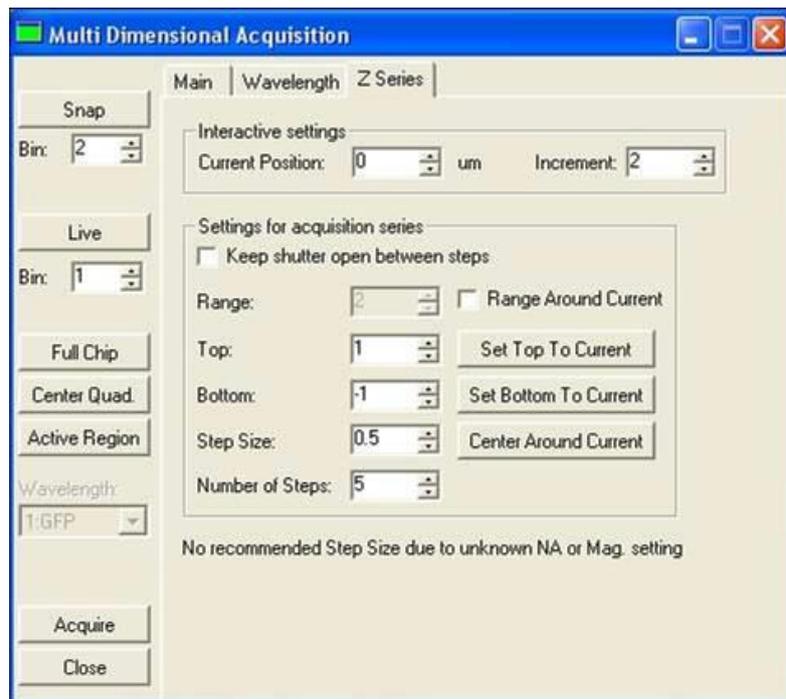
Objectif **63X** : binning de **1**,

Objectif **40X** : binning de **1**,

Objectif **20X** : binning de **1**,



5. Vérifier la configuration du piezzo et au besoin la rétablir.
 1. Ouvrir l'onglet "Z series".



2 possibilités s'offrent à vous pour imager un stack : choisir le haut et la bas de la zone à imager ou centrer le stack sur un plan et définir le nombre de plans.

Choisir le haut et le bas de la zone à imager

2. Choisir "Acquire Wavelength Set at Each Z" ou "Acquire Z Series for One Wavelength at a Time". La deuxième solution ne nécessitant pas de changement de filtres entre chaque image, l'acquisition sera plus rapide.
3. Se mettre en mode live pour repérer la structure à imager.
4. Vérifiez que "Current Position" est à 0 (sinon cf 7.)
5. Choisir le haut de votre stack en vous déplaçant grâce aux flèches de la case "Current Position".



6. Dès que vous avez repéré une position validez là en cliquant sur "Set Top To Current".



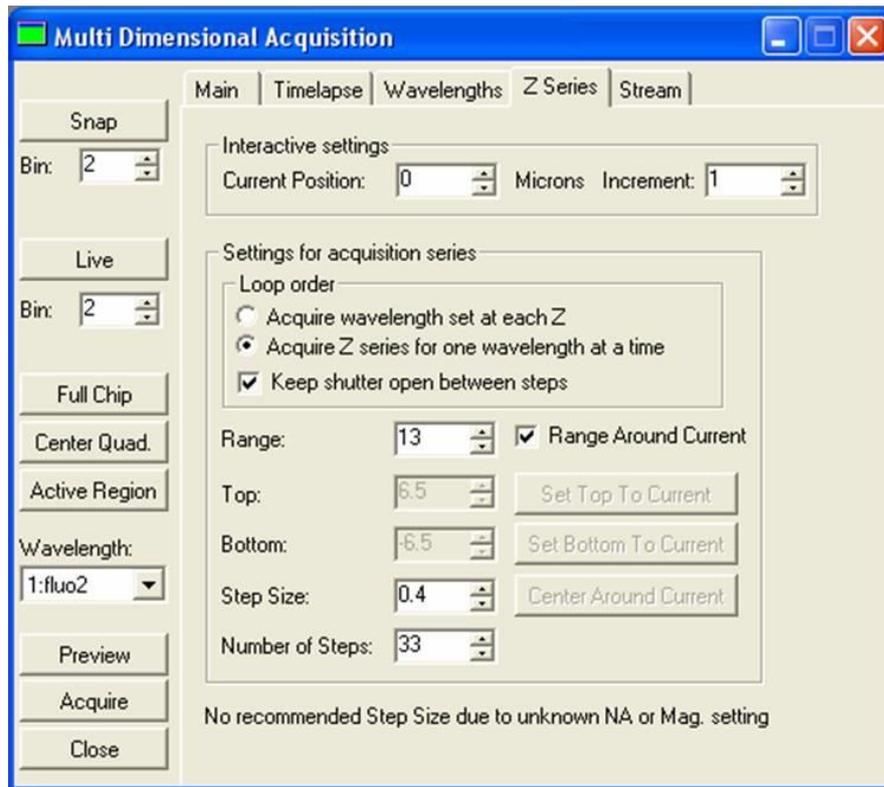
7. Procéder de façon identique pour définir la limite inférieure de la région d'acquisition (cliquez sur "*Set Bottom to Current*").
8. Choisir le "*Step Size*". Il dépend de l'objectif utilisé. Il est important de bien choisir cette distance entre deux coupes en vue de faire des reconstructions 3D ou de déconvoluer vos images

Si vous travaillez au **100x** ou au **63x à huile** (NA : 1.4) vous devez échantillonner à **0.2 μm**
Si vous utilisez un **40 à huile** vous devez échantillonner à **0,3 μm**

9. Cliquer sur "*Acquire*"
10. Cliquez sur "*Save Image*" pour sauvegarder vos données.

Centrer le stack sur un plan

13. Choisir "*Acquire Wavelength Set at Each Z*" ou "*Acquire Z Series for One Wavelength at a Time*". La deuxième solution ne nécessitant pas de changement de filtres entre chaque image, l'acquisition sera plus rapide.
14. Se mettre en mode live pour repérer la structure à imager.
15. Vérifiez que "*Current Position*" est à 0 (sinon cf 7.)
16. Cochez "*Range Around Current*". Le stack sera centré sur le plan actuel (ou sur le plan renvoyé par l'autofocus ou sur celui déterminé à chaque position lors d'une acquisition multi-champs)



17. Choisissez le "Step Size" et le nombre de coupes ("Number of Step") ou l'épaisseur d'échantillon ("Range") que vous souhaitez acquérir. Il est très important de bien choisir le "step size" en vue de faire des reconstructions 3D ou de déconvoluer vos images. Il dépend de l'objectif que vous utilisez. Les valeurs optimales sont les suivantes :

Si vous travaillez au **100x** ou au **63x à huile** (NA : 1.4) vous devez échantillonner à **0.2 μm**
 Si vous utilisez un **40 à huile** vous devez échantillonner à **0,3 μm**

18. Cliquer sur "Acquire".
19. Cliquez sur "Save Image" pour sauvegarder vos données.
6. Dans l'onglet "Wavelength" choisir le fluorophore à imager et le temps d'exposition (entre 20 et 500ms).
7. Cliquer sur "acquire" pour faire une image de ce fluorophore.
8. Ouvrir le menu "Display/ Scale Image". Ce menu donne la dynamique de l'image.

Le maximum de l'image ne doit jamais atteindre 4095. Plus la dynamique de l'image (différence entre intensité maximum et intensité minimum) (dans cet exemple : $795-124=671$ niveaux) meilleur est l'image.

Remarques :

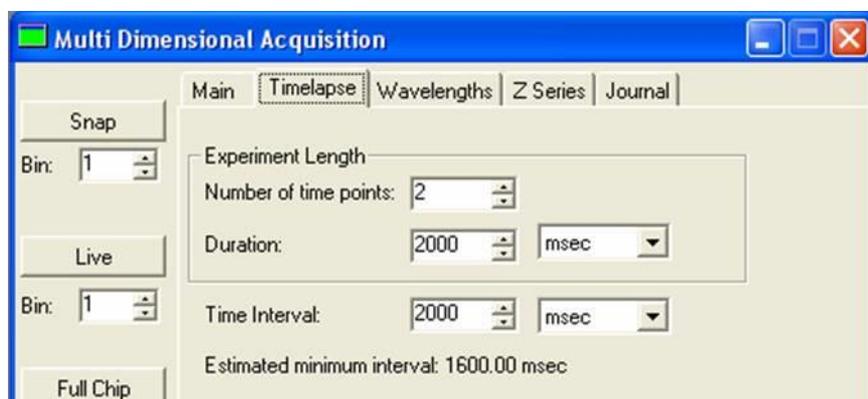
- Si la dynamique de l'image est trop faible, augmenter le temps d'acquisition.
- Plus on éclaire un échantillon, plus on le détruit. Pour choisir le bon compromis, n'hésitez pas à demander conseil à un ingénieur de la plate-forme.

Il est possible d'acquérir qu'une partie du champ en définissant une région d'intérêt

- Choisir une forme
- Dans le menu "Apps/ Multi Dimensional Acquisition" cliquer sur "Active Region".
- Cliquer sur "Live" ou "Snap" pour avoir l'image votre zone d'intérêt.
- Pour revenir en région entière cliquez sur "full chip".



9. Dans l'onglet "Timelapse" choisissez l'intervalle entre 2 points de temps (Time Interval), le nombre de points de temps (nombre d'images) ou la durée totale de l'acquisition (duration).



18. La sauvegarde est automatique dans le mode "Timelapse" vérifiez que vous avez bien choisi l'emplacement de vos données.

19. Cliquer sur "Acquire"
Le stack est en format stk.

Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

Mode Rapide

Vous pouvez augmenter la cadence des acquisitions en choisissant le mode "Stream" au détriment de la résolution.

1. Dans l'onglet "*Main*" cochez "*Stream*" en plus des autres paramètres.
2. Cochez "*Stream*" en haut de l'onglet "*Wavelength*".



3. Dans l'onglet "*Stream*" cochez "*Stream Time*" et déterminez le temps d'exposition dans "*Stream Exposure Time*".

Acquisition mono-couleur en Z sans temps

10. Ouvrir la boîte "Apps/ Multi Dimensional Acquisition".

11. Dans l'onglet "Main" cochez "Time Lapse".

RMQ : le mode "Stream" permet de faire des acquisitions plus rapides mais elles seront moins bien résolues (cf "Mode **Rapide**").

12. Sélectionnez le nom de vos données et leur emplacement pour l'enregistrement : *users* / « année » / « mois en cours » / « jour de la manip » / « dossier à votre nom ».

13. Selon l'objectif utilisé définissez le binning approprié

Objectif **100X** : binning de **2**,

Objectif **63X** : binning de **1**,

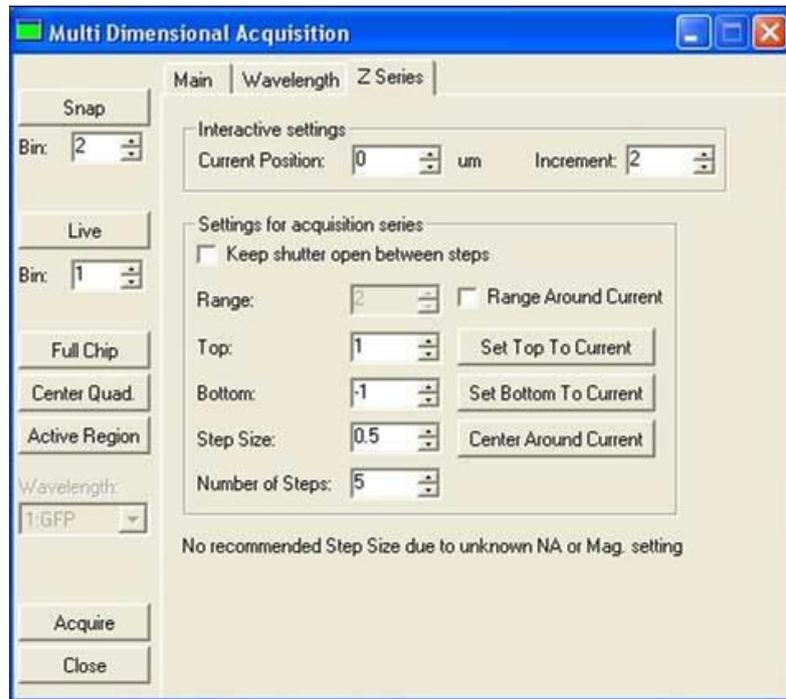
Objectif **40X** : binning de **1**,

Objectif **20X** : binning de **1**,



14. Vérifier la configuration du piezzo et au besoin la rétablir.

11. Ouvrir l'onglet "Z series".



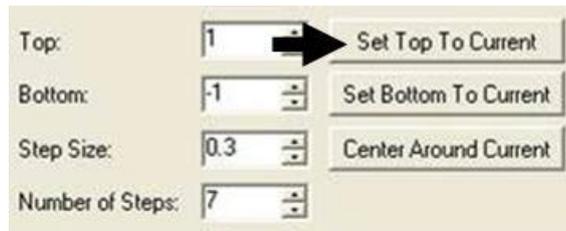
2 possibilités s'offrent à vous pour imager un stack : choisir le haut et la bas de la zone à imager ou centrer le stack sur un plan et définir le nombre de plans.

Choisir le haut et le bas de la zone à imager

12. Choisir "Acquire Wavelength Set at Each Z" ou "Acquire Z Series for One Wavelength at a Time". La deuxième solution ne nécessitant pas de changement de filtres entre chaque image, l'acquisition sera plus rapide.
13. Se mettre en mode live pour repérer la structure à imager.
14. Vérifiez que "Current Position" est à 0 (sinon cf 7.)
15. Choisir le haut de votre stack en vous déplaçant grâce aux flèches de la case "Current Position".



16. Dès que vous avez repéré une position validez là en cliquant sur "Set Top To Current".



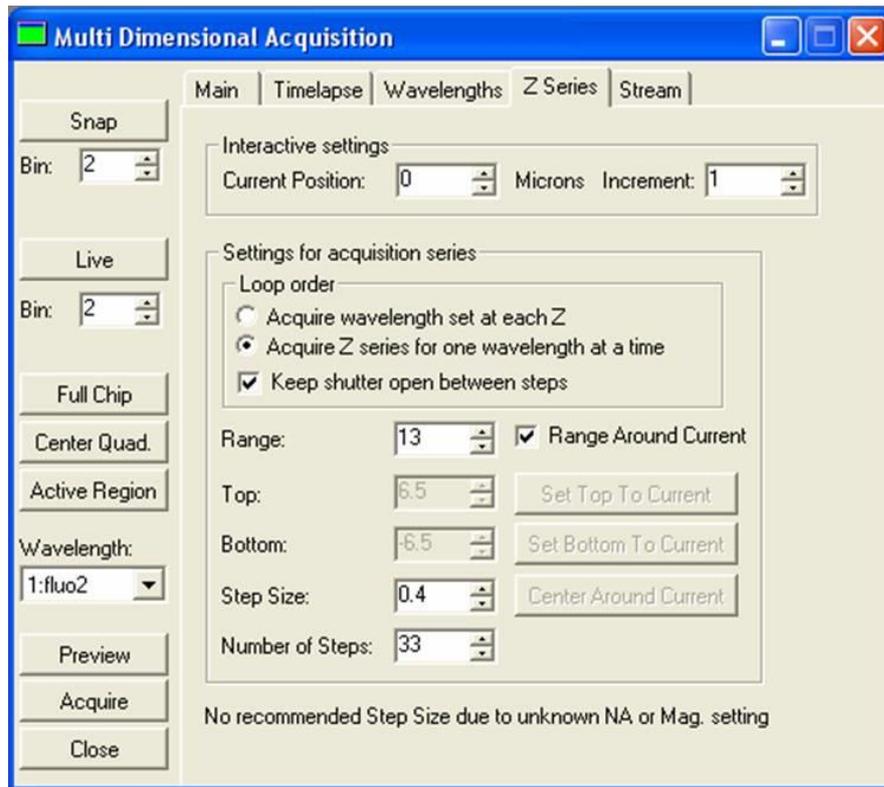
17. Procéder de façon identique pour définir la limite inférieure de la région d'acquisition (cliquez sur "*Set Bottom to Current*").
18. Choisir le "*Step Size*". Il dépend de l'objectif utilisé. Il est important de bien choisir cette distance entre deux coupes en vue de faire des reconstructions 3D ou de déconvoluer vos images

Si vous travaillez au **100x** ou au **63x à huile** (NA : 1.4) vous devez échantillonner à **0.2 μm**
 Si vous utilisez un **40 à huile** vous devez échantillonner à **0,3 μm**

19. Cliquer sur "*Acquire*"
20. Cliquez sur "*Save Image*" pour sauvegarder vos données.

Centrer le stack sur un plan

20. Choisir "*Acquire Wavelength Set at Each Z*" ou "*Acquire Z Series for One Wavelength at a Time*". La deuxième solution ne nécessitant pas de changement de filtres entre chaque image, l'acquisition sera plus rapide.
21. Se mettre en mode live pour repérer la structure à imager.
22. Vérifiez que "*Current Position*" est à 0 (sinon cf 7.)
23. Cochez "*Range Around Current*". Le stack sera centré sur le plan actuel (ou sur le plan renvoyé par l'autofocus ou sur celui déterminé à chaque position lors d'une acquisition multi-champs)



24. Choisissez le "Step Size" et le nombre de coupes ("Number of Step") ou l'épaisseur d'échantillon ("Range") que vous souhaitez acquérir. Il est très important de bien choisir le "step size" en vue de faire des reconstructions 3D ou de déconvoluer vos images. Il dépend de l'objectif que vous utilisez. Les valeurs optimales sont les suivantes :

Si vous travaillez au **100x** ou au **63x à huile** (NA : 1.4) vous devez échantillonner à **0.2 µm**
 Si vous utilisez un **40 à huile** vous devez échantillonner à **0,3 µm**

25. Cliquer sur "Acquire".
26. Cliquez sur "Save Image" pour sauvegarder vos données.
15. Dans l'onglet "Wavelength" choisir le fluorophore à imager et le temps d'exposition (entre 20 et 500ms).
16. Cliquer sur "acquire" pour faire une image de ce fluorophore.
17. Ouvrir le menu "Display/ Scale Image". Ce menu donne la dynamique de l'image.

Le maximum de l'image ne doit jamais atteindre 4095. Plus la dynamique de l'image (différence entre intensité maximum et intensité minimum) (dans cet exemple : $795-124=671$ niveaux) meilleur est l'image.

Remarques :

- Si la dynamique de l'image est trop faible, augmenter le temps d'acquisition.
- Plus on éclaire un échantillon, plus on le détruit. Pour choisir le bon compromis, n'hésitez pas à demander conseil à un ingénieur de la plate-forme.

Il est possible d'acquérir qu'une partie du champ en définissant une région d'intérêt

- Choisir une forme
- Dans le menu "*Apps/ Multi Dimensional Acquisition*" cliquer sur "*Active Region*".
- Cliquer sur "*Live*" ou "*Snap*" pour avoir l'image votre zone d'intérêt.
- Pour revenir en région entière cliquez sur "*full chip*".



Acquisition multi-couleurs

1. Ouvrir la boîte "Apps/ Multi Dimensional Acquisition".

2. Dans l'onglet "Main" cochez "Multiple Wavelength"

RMQ : le mode "Stream" permet de faire des acquisitions plus rapides mais elles seront moins bien résolues (cf "**Mode Rapide**").

3. Sélectionnez le nom de vos données et leur emplacement pour l'enregistrement : users / « année » / « mois en cours » / « jour de la manip » / « dossier à votre nom ».

4. Selon l'objectif utilisé définissez le binning approprié

Objectif **100X** : binning de **2**,

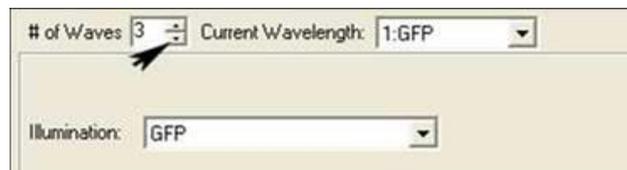
Objectif **63X** : binning de **1**,

Objectif **40X** : binning de **1**,

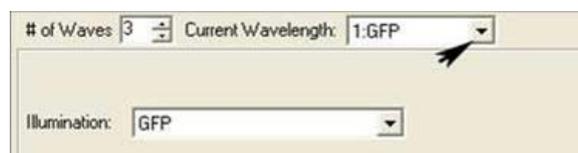
Objectif **20X** : binning de **1**,



5. Dans l'onglet "Wavelength" choisir le nombre de fluorophores à imager.



6. Dans la boîte "Current Wavelength" du même onglet choisir : 1, sans tenir compte du nom du fluorophore qui suit.



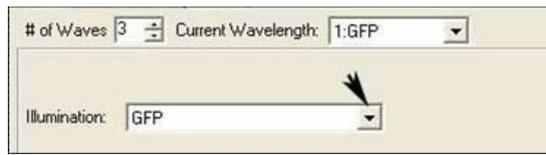
7. Dans la boîte "illumination" choisir le premier fluorophore d'intérêt (GFP, DsRed, Cy5) et le temps d'exposition voulu pour ce fluorophore.

Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

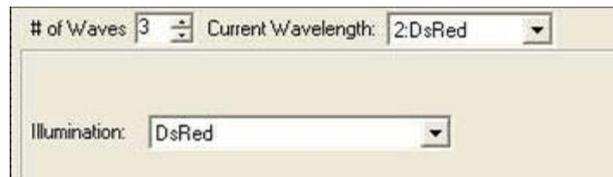
Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01



8. Dans la boîte "*Current Wavelength*" du même onglet choisir : 2, sans tenir compte du nom du fluorophore qui suit et dans la boîte "*Illumination*" choisir le deuxième fluorophore d'intérêt (GFP, DsRED, Cy5) et le temps d'exposition correspondant. Idem s'il existe un autre fluorophore.



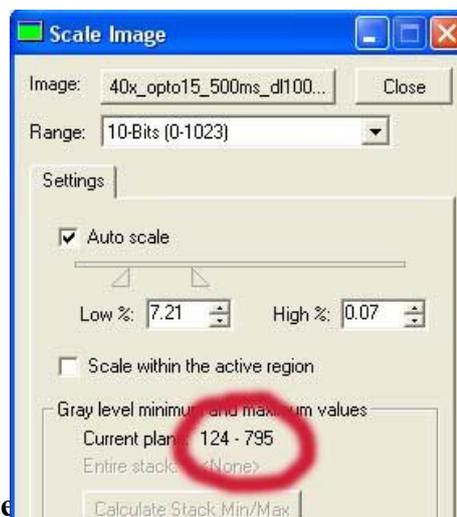
RMQ : Votre acquisition se fera selon l'ordre que vous avez choisit et avec le temps d'exposition indiqué pour chaque fluorochrome.

9. Cliquer sur "*Snap*" pour faire une image de chaque fluorophore.
10. Ouvrir le menu "*Display/ Scale Image*". Ce menu donne la dynamique de l'image.

Le maximum de l'image ne doit jamais atteindre 4095. Plus la dynamique de l'image (différence entre intensité maximum et intensité minimum) (dans cet exemple : $795-124=671$ niveaux) meilleur est l'image.

Remarques :

- Si la dynamique de l'image est trop faible, augmenter le temps d'acquisition.
- Plus on éclaire un échantillon, plus on le détruit. Pour choisir le bon compromis, n'hésitez pas à demander conseil à un ingénieur de la plate-forme.



Il est possible d'acquérir qu'une partie du champ en définissant une région d'intérêt

- Choisir une forme
- Dans le menu "*Apps/ Multi Dimensional Acquisition*" cliquer sur "*Active Region*".
- Cliquer sur "*Live*" ou "*Snap*" pour avoir l'image votre zone d'intérêt.
- Pour revenir région entière cliquez sur "*full chip*".



11. Cliquer sur "*Acquire*"

12. Cliquez sur "*Save Image*" pour sauvegarder vos données.

Balayage d'une série de champs

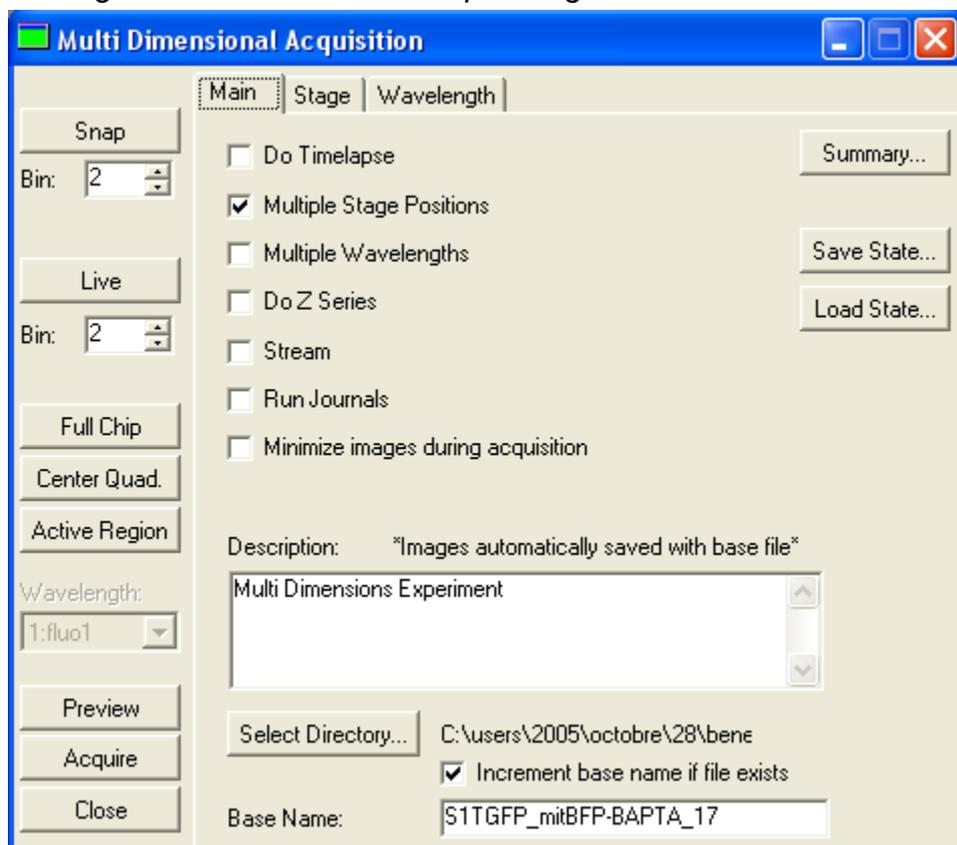
Cette possibilité s'ajoute à tout type d'acquisition: un ou plusieurs fluorochromes (mono ou multi-couleurs), un ou plusieurs plans (mono ou multi-plans), avec ou sans timelapse.

Les réglages à effectuer pour chaque combinaison de ces paramètres sont expliqués précédemment (cf *table des matières* en première page du tutorial).

Il est préférable de choisir des positions peu éloignées les unes des autres.

Voici maintenant les explications pour le repérage des positions des différents champs que vous voulez imager.

1. Ouvrir le menu "Apps/ Multi Dimensional Acquisition".
2. Dans l'onglet " Main " cochez "Multiple Stage Positions".

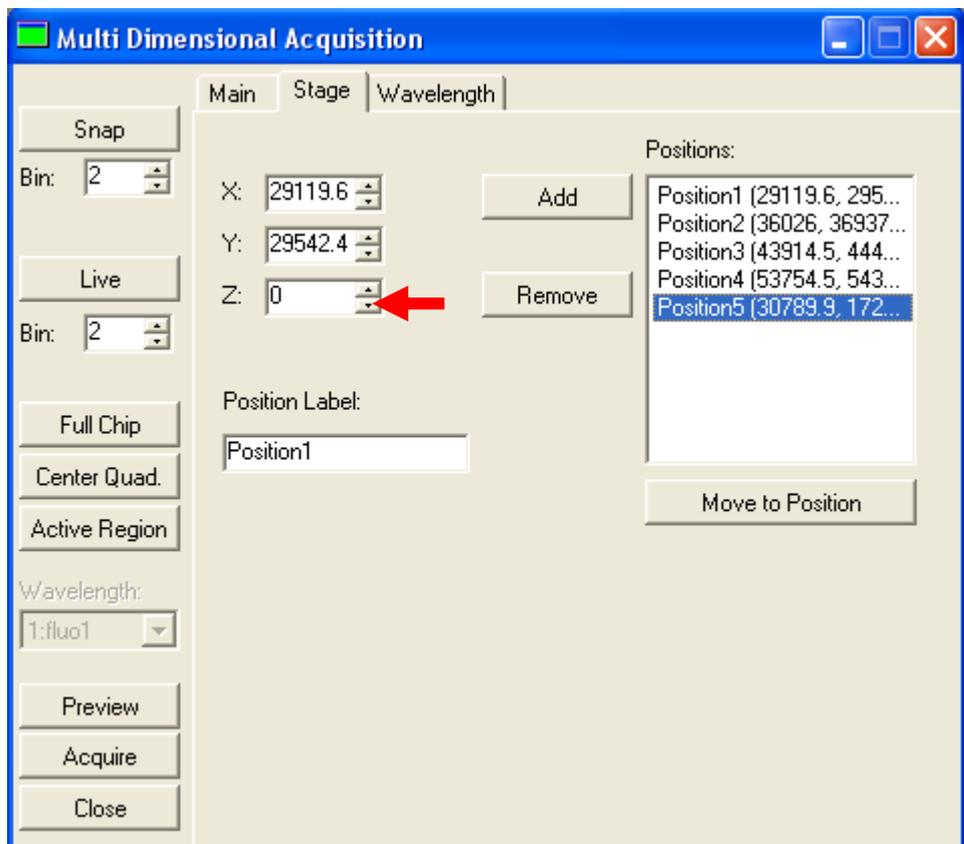


3. Sélectionner le nom des données et leur emplacement pour l'enregistrement : *users / « année » / « mois en cours » / « jour de la manip » / « dossier à votre nom »*.
RMQ : La sauvegarde est automatique.

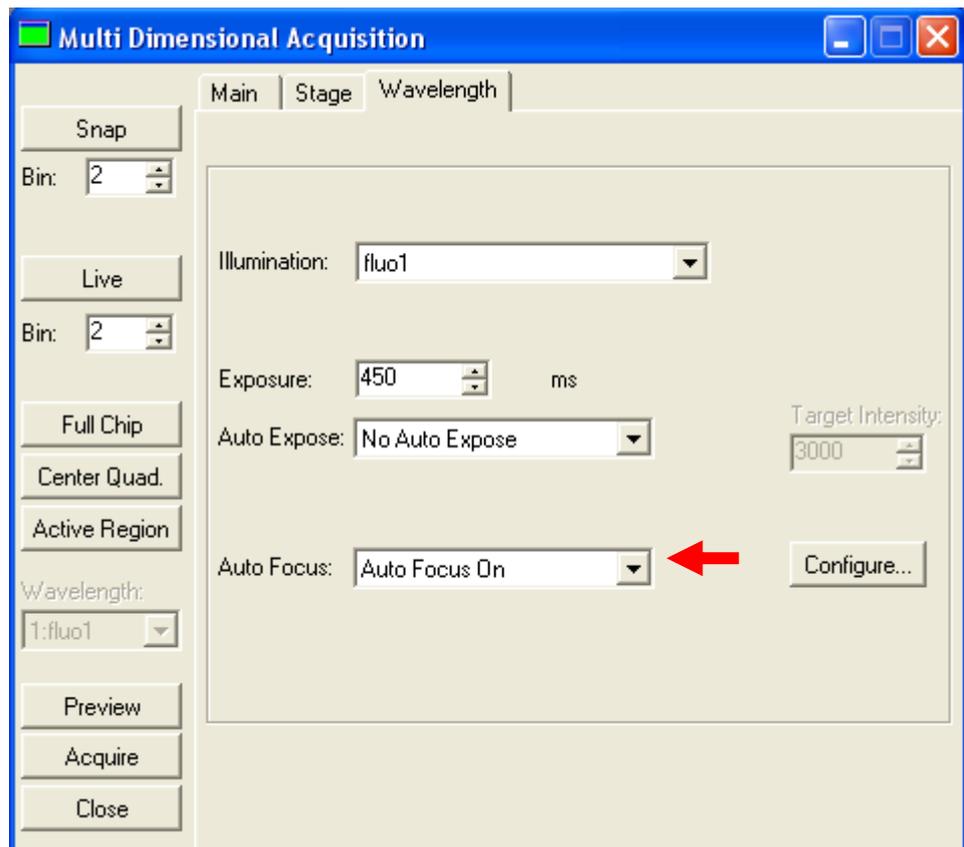
4. Mettez vous en "Live".
5. Choisir un champ grâce au joystick
6. Dans l'onglet " Stage ", mettez au point grâce au piezzo (flèches après l'encadré Z) et validez votre position en cliquant sur " Add". Pour supprimer une position, sélectionnez la et cliquez sur " Remove".

Vous ne devez absolument plus modifier la mise au point sur le microscope. Vous devez impérativement utiliser le piezzo pour ajuster la mise au point selon les positions.

Vous pouvez sélectionner jusqu'à 20 positions avec le joystick.



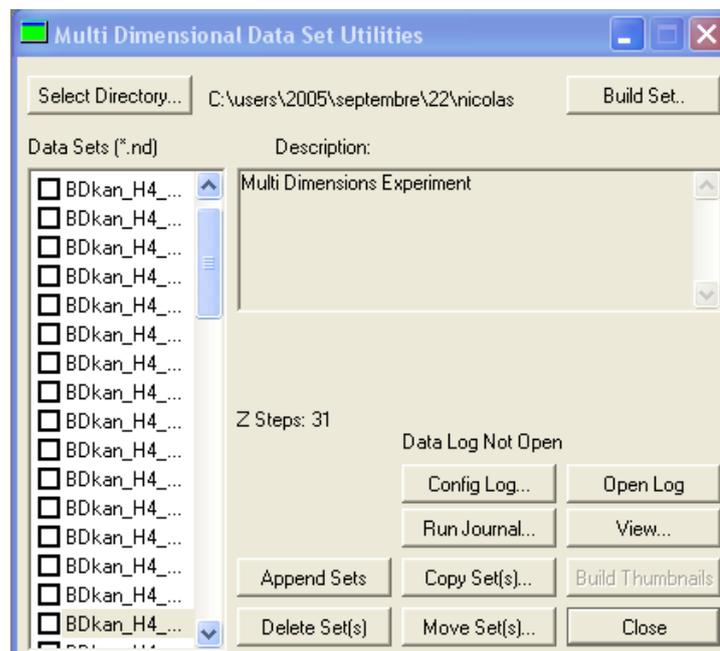
RMQ : Vous pouvez aussi choisir l'option « *Autofocus* » dans le menu « *Wavelength* ». A ce moment là le focus sera fait à chaque plan et à chaque position.



7. Cliquer sur "Acquire"
Le stack est en format stk.

Visualisation des acquisitions multiparamétriques

1. Ouvrir le menu "Apps/ Review Multi Dimensional data/Select Base File". La fenêtre "Multi Dimensional Data Set Utilities" s'ouvre automatiquement : choisissez le dossier que vous voulez visionner.
2. Allez dans "Select Directory" pour sélectionner l'acquisition que vous voulez visionner.
3. Dans "Data Set" cochez une image ou un stack et cliquez sur "View" pour afficher son contenu à l'écran.



4. Dans "Wavelengths" choisissez les longueurs d'onde que vous voulez.
5. Chaque image du stack est représentée dans un tableau selon sa position en Z et dans le temps. Les curseurs Z et Time permettent de visualiser les images une à une ou de les faire défiler.
Pour créer le stack correspondant à un plan ou à un point de temps, faites un clic droit sur le numéro du plan ou du point de temps et cliquez sur "Load Images".
Vous pouvez aussi cliquer sur "Select Best Focus" puis sur "Load Images". Metamorph fera un stack avec le meilleur focus pour chaque points de temps.

