Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Mars 2013
Mise à jour : Mars 2022

Mode d'emploi

Microscope confocal Leica SP8 STED

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

Infinity
INSTITUT TOULOUSAIN DES MALADIES INFECTIEUSES ET INFLAMMATOIRES

GENOTOUL TRI

Sommaire - Contents

1 *Allumage du système - System start-up*

2 *Fonctionnement du statif - How the stand works*

3 Observation aux oculaires - *Observation using eyepieces*

5 Contrôles manuels - *Manual controllers*

5 Réglage du Köhler - *Köhler adjustment*

7 *Présentation du software - Software presentation*

8 Menu Acquisition - *Acquisition tab*

9 Réglage excitation / émission - *Excitation and emission settings*

10 *Acquisition d'une image - Image acquisition*

10 Charger une configuration - *Load a predefined configuration*

11 Récupérer les paramètres de son image - Load your image parameters

12 Régler les paramètres d'acquisition - *Adjust acquisition parameters*

18 Image en multicouleur - *Multicolor imaging*

19 Image en transmission - *Brighfield imaging*

20 Comparaison d'intensité - *Intensity comparison*

20 *Acquisition d'une pile d'image - Z-stack acquisition*

20 Pile d'images sans compensation (classique) - *Z-stack without compensation (classic)*

22 Pile d'images avec compensation - *Z-stack with compensation*

24 *Multiposition et mosaïques - multiposition and tiles*

24 Multipositions (Mark and Find)

26 Mosaiques - *Tile scan imaging*

27 *Fin de la session - End of the session*

27 Sauvegarde des images - *Data backup*

28 Extinction du système - *Shutdown the system*

31 *Récapitulatif des étapes - Step summary*

32 *Module STED - STED module*



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

Allumage du système - System start-up

1 Allumer la lampe à fluorescence - *Turn on the fluorescence light*

2 Allumer le contrôleur CTR6500 - *Turn on the CTR6500 controller*



3 Sous le bureau, mettre en position « ON » le bouton "Scanner Power" puis "Laser power" - *Under the desk, turn on the 'Scanner power' button, then the 'Laser power' button*



4 Tourner la clé vers la droite (la diode s'allume de couleur orange) - *Turn the key to the right (the LED lights up orange)*

5 Attendre que la platine ait terminé son déplacement - *Wait until the stage has finished moving*

6 Si PC éteint, rallumer le PC : ouvrir la session « TCS user » - *If the PC is switched off, switch the PC on: open the "TCS user" session*

7 Sur le bureau, ouvrir le logiciel : LAS X - *On the desktop, run the software: LAS X*

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 Lors du démarrage du logiciel, une première fenêtre apparait - *When the software starts, a first window appears* :



9 Vérifier que "STED" est "OFF" puis cliquez sur OK – *Make sure that "STED" is "OFF" then click on OK button*

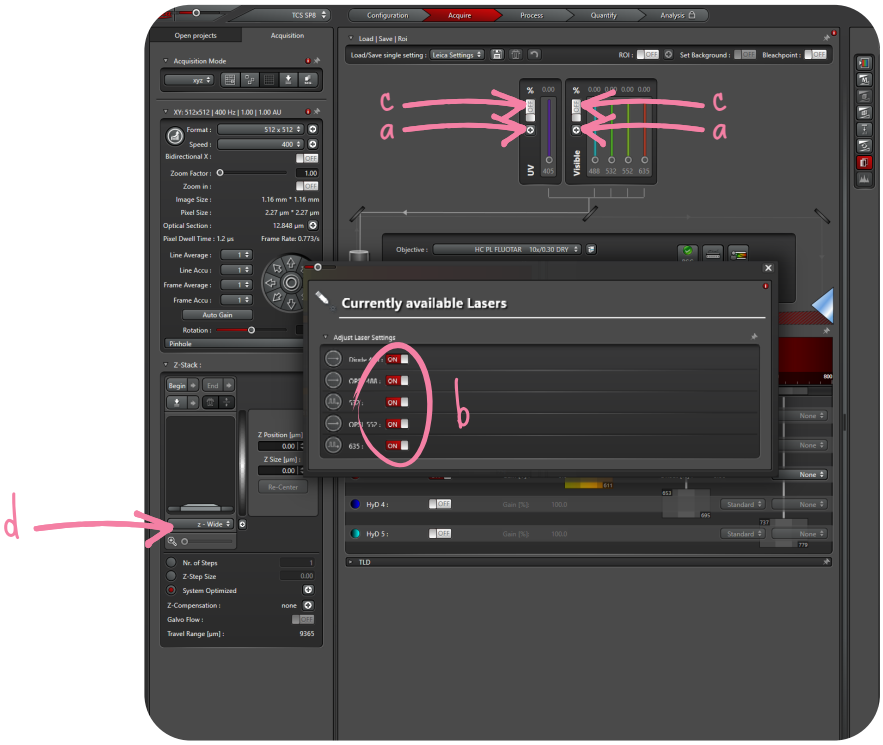
10 Une fois le soft allumé, activer les lasers - *When the software is running, activate the lasers*:

a Cliquer sur le « + » pour ouvrir la fenêtre des lasers - *Click on the "+" to open the laser window*

b Mettre chaque laser sur « ON » - *Turn each laser to 'ON'*

c Cliquer sur le bouton "ON" au-dessus du + pour ouvrir le shutter des lasers - *Click on the "ON" button above the "+" to open the laser shutter*

d Enfin dans l'onglet « Z-Stack » choisir la platine « Z-Wide » - *Lastly, in the "Z-Stack" tab, select the "Z-Wide" stage*



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

Fonctionnement du statif - *How the stand works*

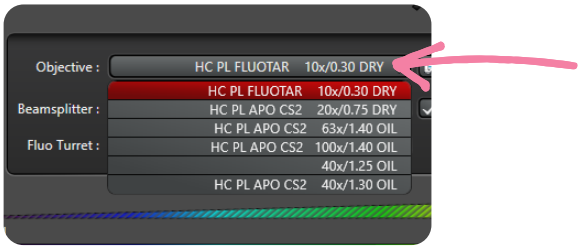
Observation aux oculaires - *Observation using eyepieces*

Plusieurs objectifs sont présents sur le SP8 - *Various objectives are available on the SP8 :*

- 10x ON 0.3 DRY
- 20x ON 0.75 DRY
- 40x ON 1.25 **OIL**
- 40x ON 1.3 **OIL**
- 63x ON 1.4 **OIL**
- 100x ON 1.4 **OIL** : dédié au STED uniquement – *Only dedicated to STED experiments*

1 Pour commencer, vérifiez que vos lames soient propres et sans condensation - *First, check that your slides are clean and condensation-free*

2 Choisir un objectif sur le logiciel – *Choose an objective on the software*



3 Placer votre lame sur l'insert et ajuster le support à la lame - *Put your slide on the holder and fit the strips to the slide*

4 Sur le statif – *On the stand :*

a **En lumière transmise – *In brighfield :***

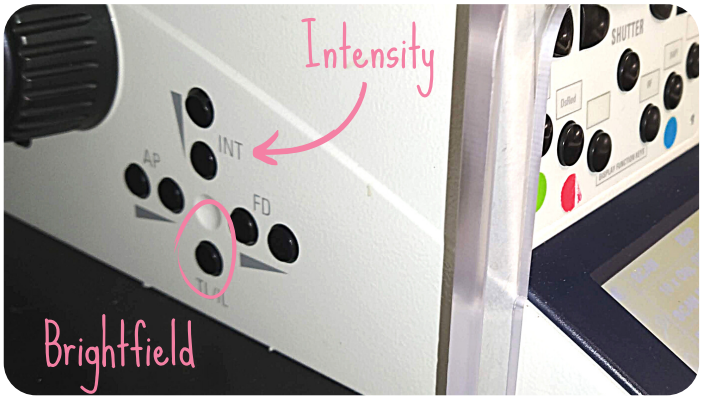
i Cliquer sur le bouton « TL / IL » en bas, côté gauche du statif – *Click on the button 'TL / IL' on the bottom, left*

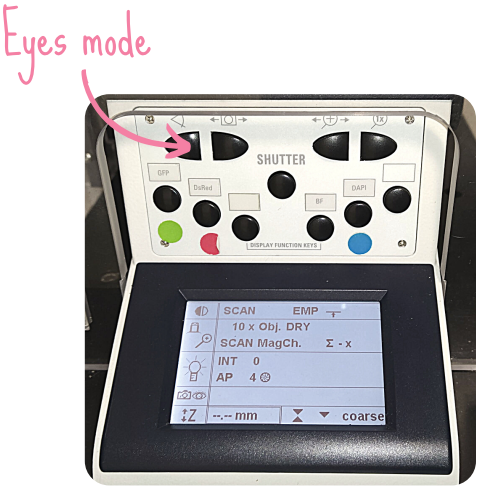
Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan
Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr
Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr
Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01

ii Cliquer sur le bouton avec l'icône d'un œil pour voir aux oculaires - *Click on the button with the eye symbol to see on the eyepieces*

iii Réglage de l'intensité à l'aide des boutons « INT » - *Adjust the intensity with the "INT" buttons*

iv Faire la mise au point de l'échantillon aux oculaires - *Focus on the sample on the eyepieces*





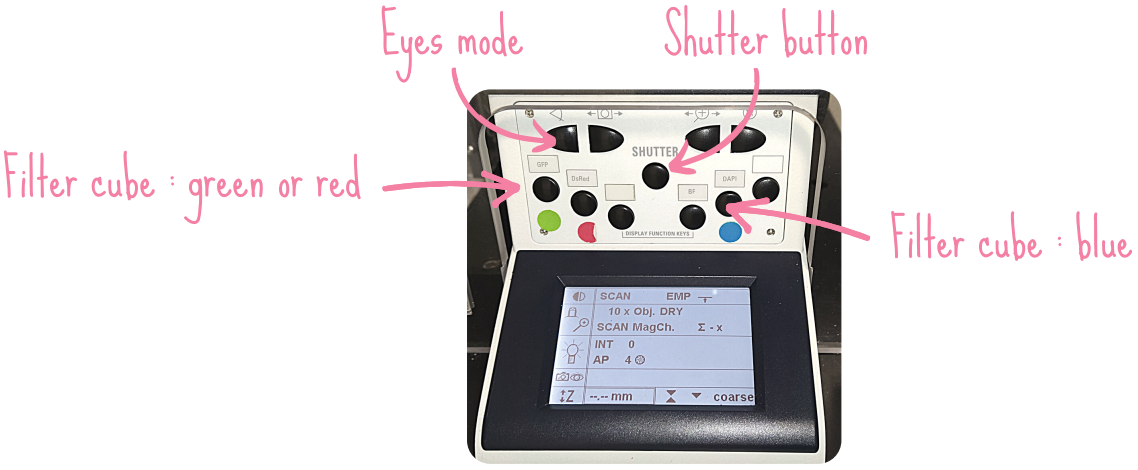
b En fluorescence – *In fluorescence mode :*

i Choisir le cube filtre : dapi, vert, ou rouge. Il n'y a pas de cube pour le rouge lointain car il n'est pas visible aux yeux - *Select the filter cube : dapi, green, red. There is no cube for the far red because it is not visible to the eyes*

ii Cliquer sur le bouton avec l'icône d'un œil pour voir aux oculaires - *Click on the button with the eye symbol to see on the eyepieces*

iii Appuyer sur le bouton « Shutter » pour laisser passer la lumière - *Press the "Shutter" button to let the light through*

iv Faire la mise au point de l'échantillon aux oculaires - *Focus on the sample on the eyepieces*



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

Contrôles manuels - *Hand operated controls*

Pour vous déplacer en x, y et z, utilisez le joystick - *To navigate in x, y and z, use the joystick* :

1 Déplacement en y - *Move in y*

2 Déplacement en x - Move in x

3 Déplacement en z (mise au point) - *Move in z (focus)*

4 Réglage de la vitesse de déplacement en z - *Adjustment of the z-movement speed*

5 Réglage de la vitesse de déplacement en xy - *Adjustment of the xy-movement speed*



Réglage du Köhler - *Köhler adjustment*

Ce réglage permet d'ajuster le contraste et avoir une illumination homogène. Il se fait sur chaque objectif. Et il se fait uniquement pour une acquisition en transmission.

This procedure allows you to adjust the contrast and have a homogeneous illumination. It is done on each objective. It is only done for brighfield imaging.

1 Faire la mise au point sur l'échantillon - *Focus on the sample*

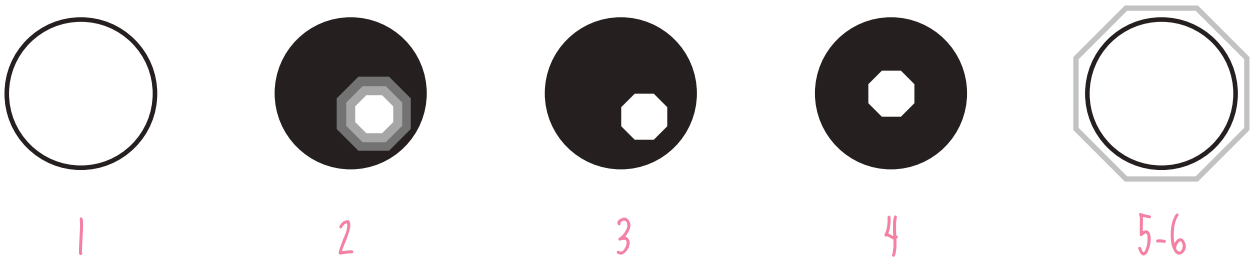
2 Fermer le diaphragme de champ - *Close the field diaphragm (FD)*

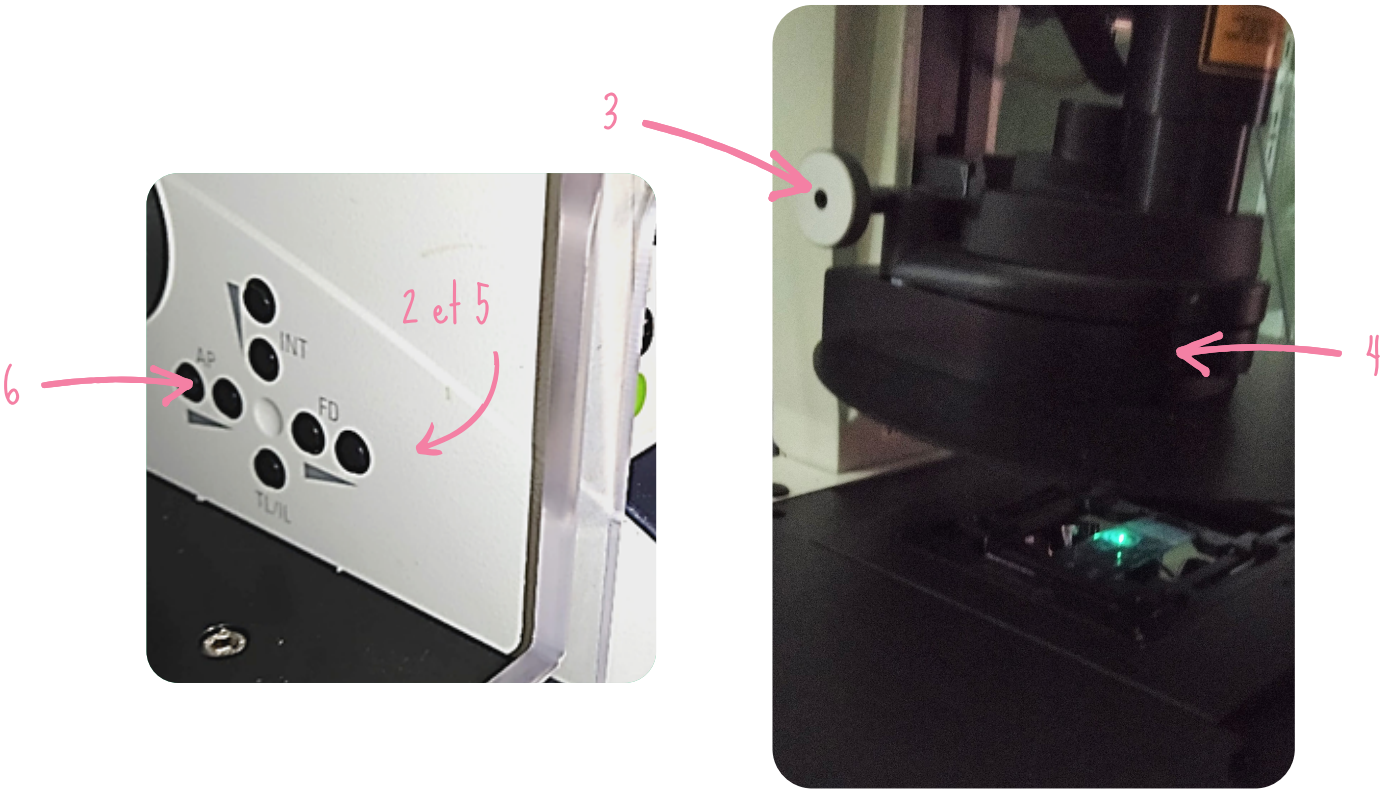
3 Régler la hauteur du condenseur jusqu'à voir les bords du diaphragme net - *Adjust the height of the condenser until the edges of the diaphragm are clearly defined.*

4 A l'aide des vis, centrer le diaphragme - *With the screws, centre the diaphragm.*

5 Elargir le diaphragme juste assez pour faire disparaître les bords - *Open the diaphragm just enough to make the edges disappear*

6 Ajuster le diaphragme d'ouverture - *Adjust the aperture diaphragm*





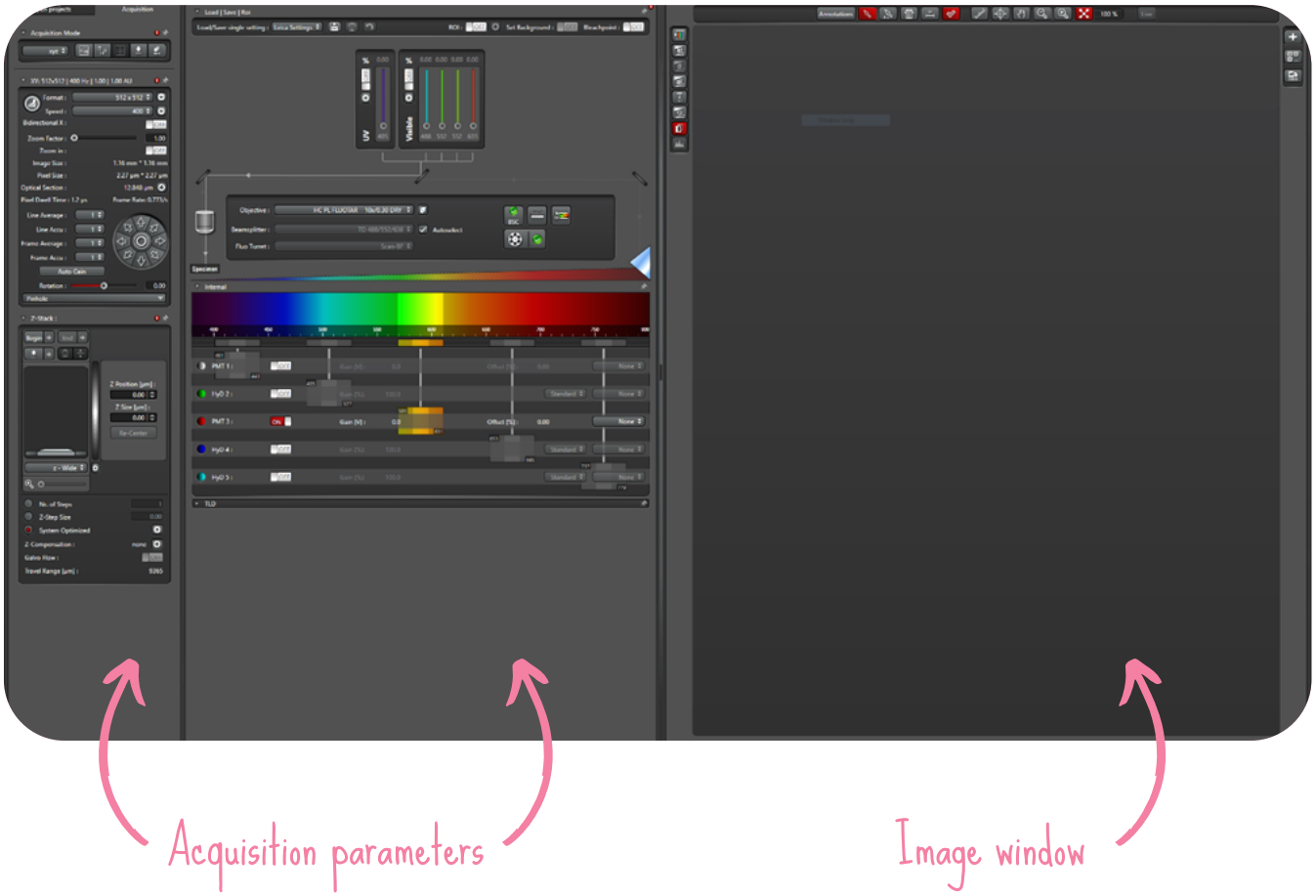
Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan
Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr
Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr
Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01

Présentation du software - *Software presentation*

L'interface du logiciel LasX se divise en deux parties principales - *The LasX software interface is divided into two main parts :*

A Réglages des paramètres d'acquisition - *Acquisition parameters*

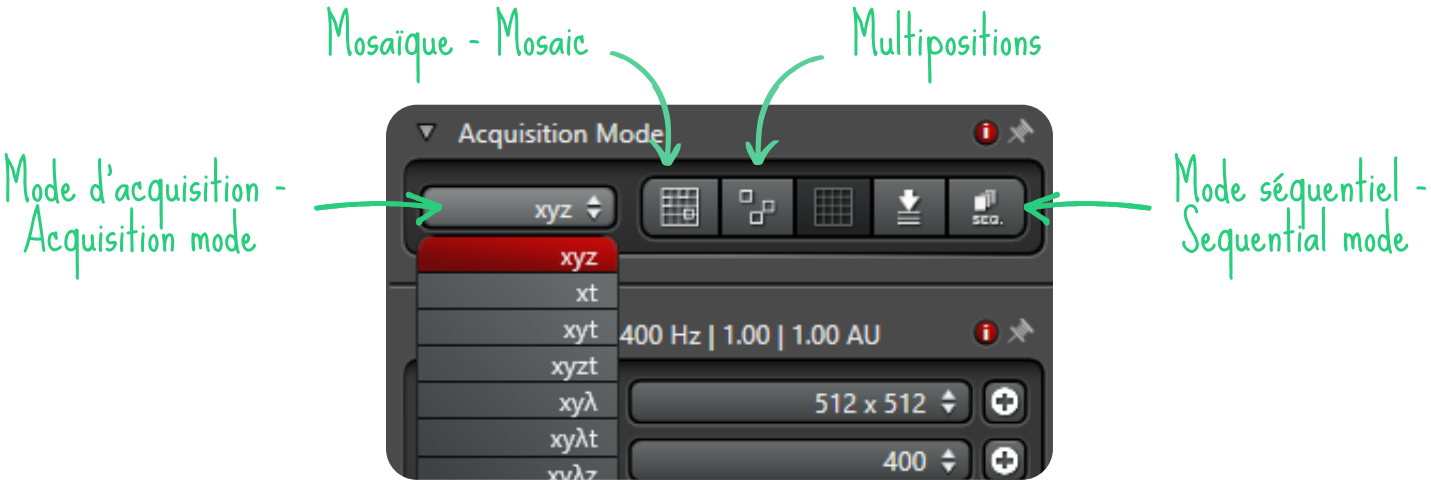
B Affichage de l'image - *Image viewer*



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 d'acquisition, de la gauche vers la droite - *Acquisition mode, from left to right* :

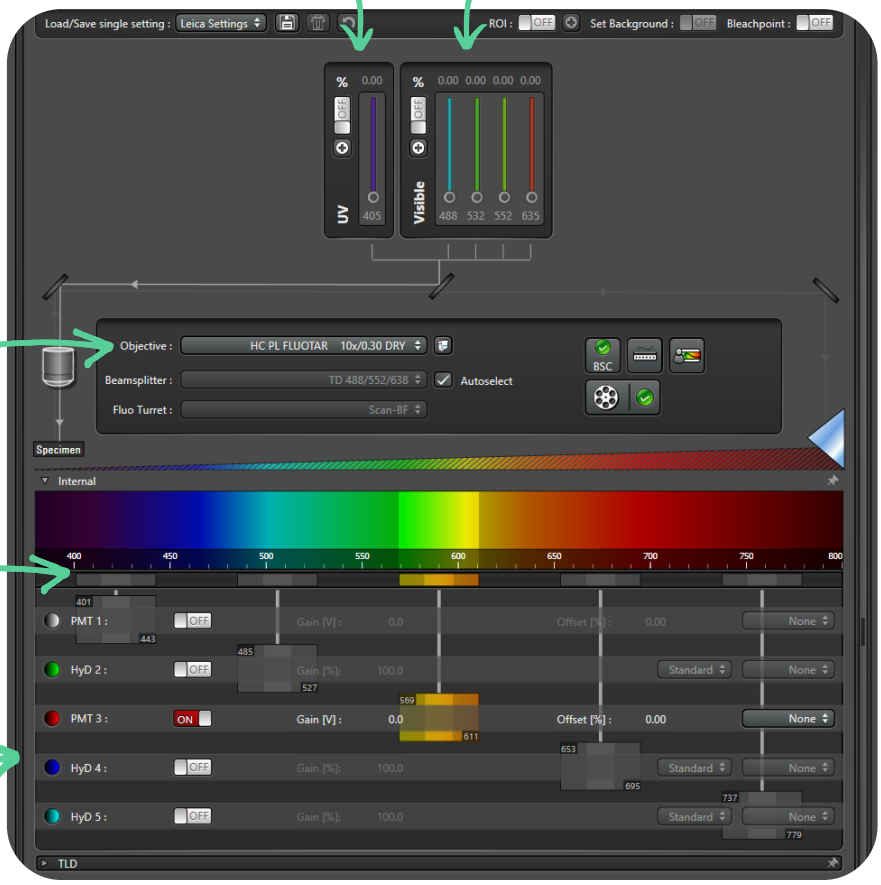
- Différents modes d'acquisition possible : XYZ, XYT, XYλ… Par défaut : XYZ – *Various acquisition mode possible : XYZ, XYT, XYλ. By default is on XYZ.*
- Mosaïque - *Mosaic / Tiles*
- Multiposition - *Multiposition*
- Ne pas toucher - *Not available*
- Ne pas toucher - *Not avalaible*
- Mode séquentiel pour le multicouleur – *Sequential mode for multicolor acquisition*



Réglage de l'excitation et l'émission - *Excitation and emission settings* :

Laser UV - UV laser

Laser visible - Visible laser



Objectif - Objective

Fenêtre de détection - Emission window

Choix du détecteurs (PMT, HyD) - Detectors choice (PMT, HyD)

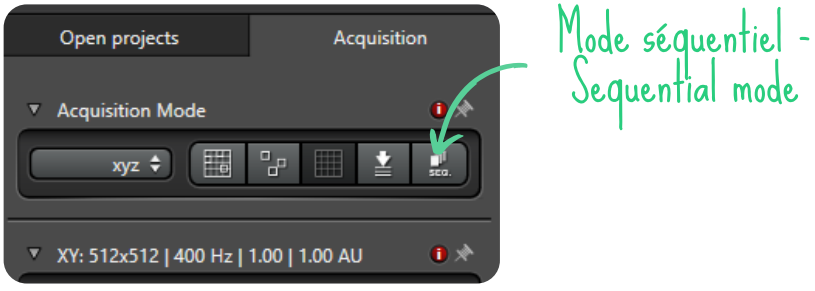
Acquisition d'une image - *Image acquisition*

Charger une configuration - *Load a predefined configuration*

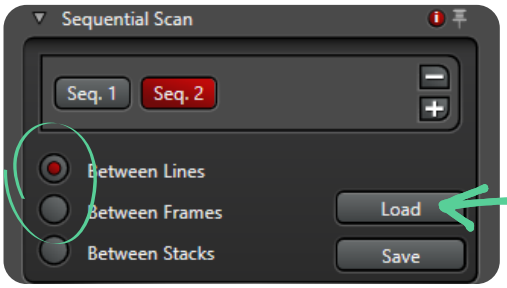
1. Dans Acquisition Mode, cliquez sur le bouton Seq - *In Acquisition Mode, click on the Seq button*
2. Un nouvel onglet apparaît : Sequential Scan - *A new tab appears: Sequential Scan*
3. Cliquez sur le bouton Load - *Click on the "Load" button*
4. Choisissez la configuration qui vous convient - *Choose the configuration that fits your needs*
5. Choisir le mode de scan - *Choose the scan mode*
   - **a** Between Lines
   - **b** Between Frames

"Between Lines" permettra de voir simultanément tous les canaux. Le basculement d'un canal à un autre pendant le balayage se fait toutes les lignes. En Live, on peut voir et donc régler tous les canaux en même temps.
*"**Between Lines**" will allow to see all channels simultaneously. The switching from one channel to another during the scan is done every line. In Live mode, all channels can be viewed and adjusted at the same time.*

Between Frames" montrera les canaux l'un après l'autre. Le basculement pendant le balayage se fait tous les frames. Attention : en Live, en Between Frames, on ne voit qu'un seul canal à la fois.
*"**Between Frames**" will show the channels one by one. The switching during the scan is done every frame. Please note: In Live, in Between Frames, only one channel is shown at a time.*



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



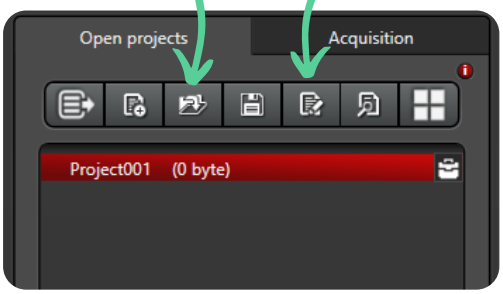
Charger une configuration - Load a configuration

Récupérer les réglages de son image - *Retrieve the settings of your image*

1. Cliquez sur l'onglet *"Open projects"* - *Click on the "Open project" tab*
2. Cliquez sur le 3e icône pour ouvrir un projet - *Click on the 3rd icon to open a projet*
3. Sélectionner le projet qui vous convient - *Choose the project that fits your needs*
4. Choisissez l'image que vous souhaitez réutiliser - *Choose the image you want to re-use*
5. Cliquez sur le 5e icône pour appliquer les paramètres - *Click on the 5th icon to apply the settings*
6. Fermez le projet que vous aviez ouvert. Ne pas faire "supprimer" - *Close the projet you opened for that. Do not "delete"*

Ouvrir un projet - Open a project

Appliquer paramètres - Apply the settings



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

Régler les paramètres d'acquisition - *Adjust acquisition parameters*



La dynamique d'image - *Image dynamic* :

L'image a une dynamique définie par un nombre de bits. Ce nombre équivaut au niveaux de gris (NG). Par exemple, pour 8 bits, on aura 255 NG. Zéro étant le noir et la valeur maximale étant le blanc.
The image has a dynamic range defined by a number of bits. This number corresponds to the grey levels (GL). For example, an 8-bit image will have 255 GLs. Zero represents black and the maximum value represents white.

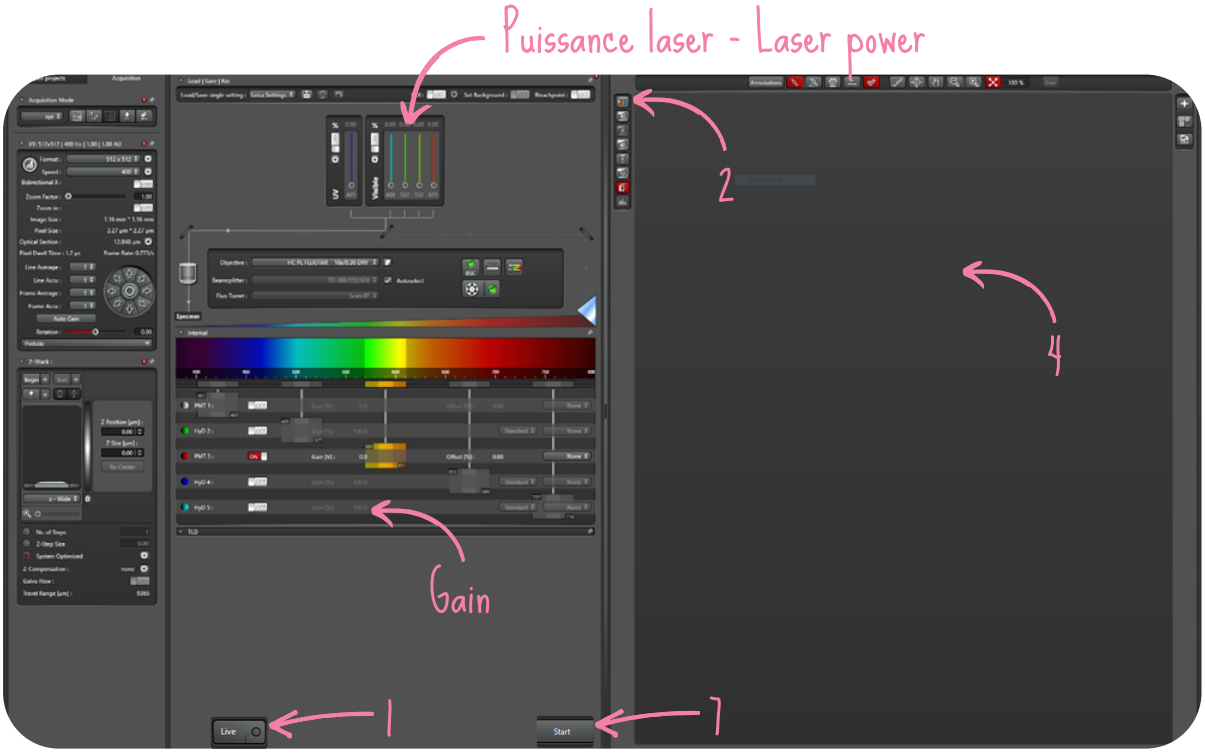
Pourquoi régler la dynamique - *Why set the dynamic* ?

Pour avoir un bon rapport signal sur bruit. C'est à dire qu'avec un bon réglage, il est plus facile de distinguer le signal d'intérêt du bruit de fond.
To have a good signal to noise ratio. This means that with a good setting, it is easier to distinguish the signal of interest from the background noise.

Comment ajuster la dynamique - *How to adjust the dynamic* ?

En jouant sur deux paramètres : **le gain et/ou la puissance laser**. Il va falloir aller se régler en limite de saturation, donc attention à ne pas saturer sur les zones d'intérêts.
*By changing two parameters: **the gain and/or the laser power**. It will be necessary to reach the saturation limit, so be careful to not saturate the interest regions.*

1. Cliquez sur le bouton Live - *Click on the Live button*
2. Se mettre en fausse couleur : vert=zéro, bleu=saturation - *Putting on a false colour : green=zero and blue=saturation*
3. Ajuster le z pour être sur le plan le plus intense - *Adjust the z to be on the brightest plane*
4. Cliquez sur l'image correspondante, elle doit être entourée en blanc - *Click on the related image, she should be circled in white*
5. Ajuster le gain et/ou la puissance laser jusqu'à voir des pixels bleus par chaque canal - *Adjust the gain and/or laser power until you see blue pixels for each channel*
6. Diminuer légèrement pour les voir disparaître. Attention à vérifier les plans si vous faites un z-stack - *Decrease slightly to see them disappear. Be careful to check the other plans if you are doing a z-stack*
7. Cliquez sur Start pour prendre une image - *Click on Start to acquire an image*





- **Comment ajuster le gain des détecteurs - *How to adjust the detector gain ?***

  - Sur les PMT - *On the PMT :*

    Inférieur à 500V: faible amplification du signal - *Under 500V: low signal amplification*

    Entre 500 et 800V : bonne gamme - *Between 500V and 800V : good range*

    Supérieur à 800V : augmentation du bruit - *Above 800V : noise increasing*

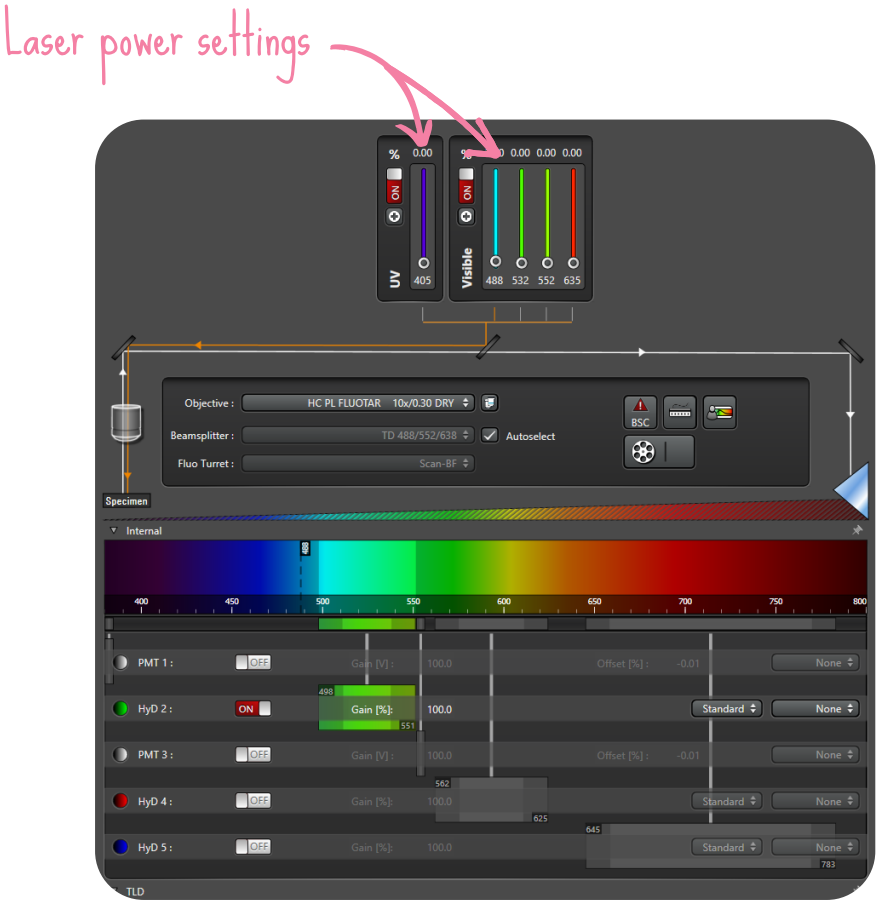
  - Sur les Hybrides (HyD) - *On the hybrid (HyD) :*

    A 100% : réglage optimal - *At 100% : optimal settings*

    Supérieur à 100% : augmentation du bruit - *Above 100% : noise increasing*

Comment ajuster la puissance laser - *How to adjust the laser power ?*

La puissance se règle dans le logiciel. Il faut sélectionner la séquence correspondante dans l'onglet "Sequential scan".
The power is set in the software. The corresponding sequence can be selected in the "Sequential scan" tab



Le réglage du gain et de la puissance laser sont à faire pour chaque canal.
The gain and laser power settings should be adjusted for each channel

L'amélioration de l'image (pas en Live) - *Image improvement (not in Live)* :

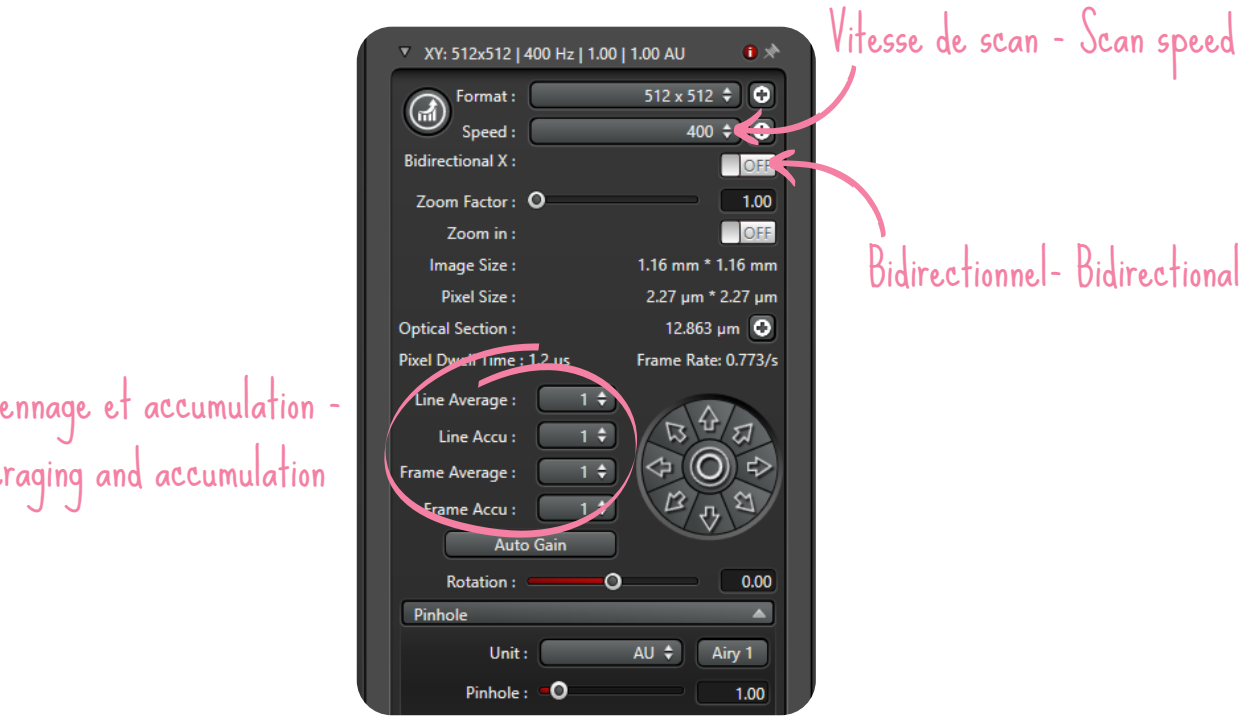
- **Vitesse de scan (en Hz)** : correspond à la fréquence de balayage c'est à dire au temps passée par pixel. Par défaut : 400Hz ou 600Hz. *Scan speed (in Hz): corresponds to the scan frequency, i.e. the time per pixel or pixel dwell time. By default: 400Hz or 600Hz.*

- **Offset** : permet d'ajuster le zéro du détecteur, en moyenne -0.2. Uniquement sur les PMTs. *Offset is used to adjust the detector zero, usually -0.2. Only available on PMTs.*

- **Moyennage** : correspond à la moyenne des passages du laser pour améliorer le rapport signal sur bruit. Ca permet de lisser le signal. Il peut être fait par ligne (plus rapide) ou par frame. *Averaging : is the mean of the laser passes to improve the signal to noise ratio. This smoothes the signal. It can be done by line (faster) or by frame.*

- **Accumulation** : correspond à la somme des passages du laser pour amplifier davantage le signal mais aussi le bruit. *Accumulation : is the sum of the laser passes to further amplify the signal but also the noise.*

- **Bidirectionnel** : pour gagner du temps au balayage en cliquant sur le bouton "bidirectional z". *Bidirectional : to save time when scanning by clicking on the "bidirectinal z" button*







Ces réglages sont à utiliser à bon escient. Il n'est pas toujours utile de mettre beaucoup de moyennage... *These settings should be used judiciously. It is not always useful to put a lot of averaging...*

La résolution de l'image - *Image résolution* :

La résolution maximale théorique est définie par le théorème de Shannon-Nyquist qui dit que la taille d'un pixel doit être 2.3 fois inférieur à la valeur de résolution. Les valeurs et formules sont sur un tableau affiché dans la salle actuelle. Elle dépend de l'objectif.
The theoretical best resolution is defined by the Shannon-Nyquist theorem which says that the size of a pixel must be 2.3 times smaller than the resolution value. The values and formulas are on a table displayed in the current room. She depends on the objective.

Sous-échantillonné : on perd en résolution - *Subsampled : loss of resolution*
Bon échantillonnage : on a une bonne résolution - *Good sampling : good resolution*
Sur-échantillonné : on use le fluorochrome et on risque de bleacher sans gagner en résolution - *Oversampled : the fluorochrome is worn out and there is a risk of bleaching without any gain in resolution*

Avec l'objectif 20X et en 512x512, il ne faut pas dépasser le zoom de 6.
Avec l'objectif 63X et en 512x512, il ne faut pas dépasser le zoom de 4.

Comment jouer sur la résolution ? *How to play on the resolution ?*

Format de l'image - *Image size*

Augmenter le nombre de pixel : signifie que les pixels seront plus petits donc meilleure résolution pour une taille d'image donnée - *Increasing the number of pixels: means that the pixels will be smaller and thus better resolution for a fixed image size*

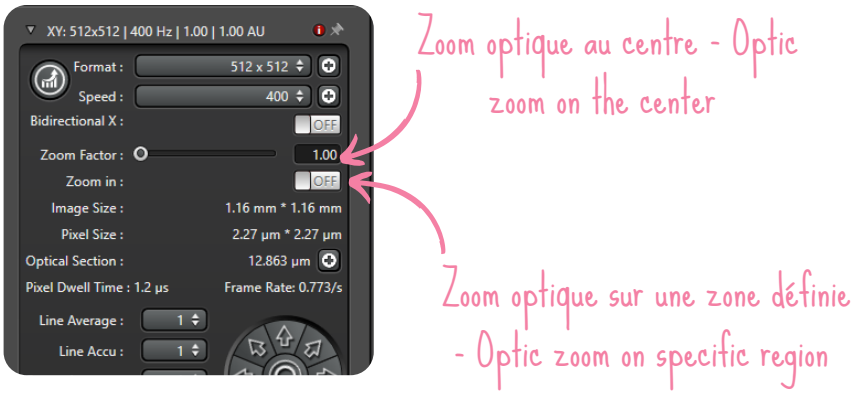
Diminuer le nombre de pixel : signifie que les pixels seront plus gros donc moins bonne résolution pour une taille d'image donnée - *Decreasing the number of pixels: means that the pixels will be bigger and thus the resolution will be lower for a fixed image size*



Appliquer un zoom optique - *Add a optic zoom*

Augmenter le optic zoom : signifie que le champ d'observation sera plus petit donc des pixels plus petits pour un nombre de pixels fixe. *Increasing the optic zoom: means that the field of view will be smaller thus smaller pixels, for a fixed number of pixels.*

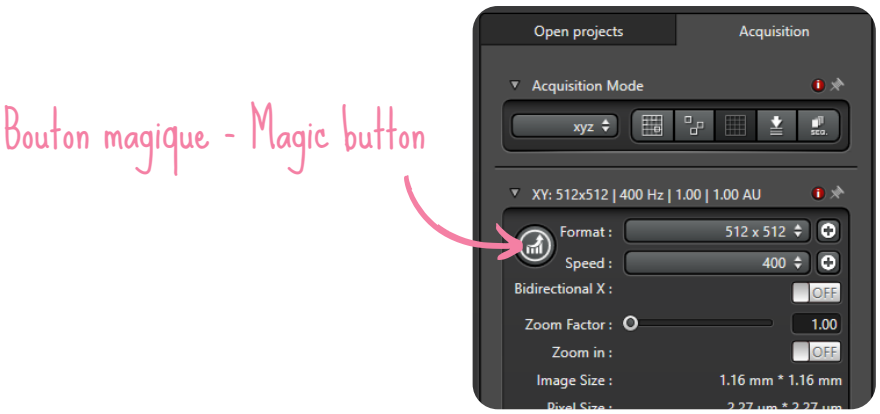
Diminuer le optic zoom : signifie que le champ d'observation sera plus grand donc des pixels plus gros pour un nombre de pixels fixe. *Decreasing the optic zoom: means that the field of view will be bigger thus bigger pixels, for a fixed number of pixels.*



Le zoom qui est appliqué sur l'image est un zoom optique et pas numérique.
The zoom that is applied to the image is optical and not digital

Bouton magique - *Magic button*

En fonction du zoom, le logiciel choisira le nombre de pixels à mettre dans l'image pour avoir la meilleure résolution. *Depending on the zoom, the software will choose the number of pixels to put in the image to get the best resolution.*



Etre en résolution maximale théorique n'est pas forcément nécessaire. Tout dépend du projet. Et qui dit pleins de pixels, dit une image plus lourde et plus longue à acquérir.
It is not always necessary to have the maximum theoretical resolution. It depends on the project. And full of pixels means a bigger image longer to acquire .

Acquérir une image multicouleur - *Acquire an multicolor image*

1 Faire la mise au point aux oculaires (p.3-4) - *Focus the sample on the eyepieces (p.3-4)*

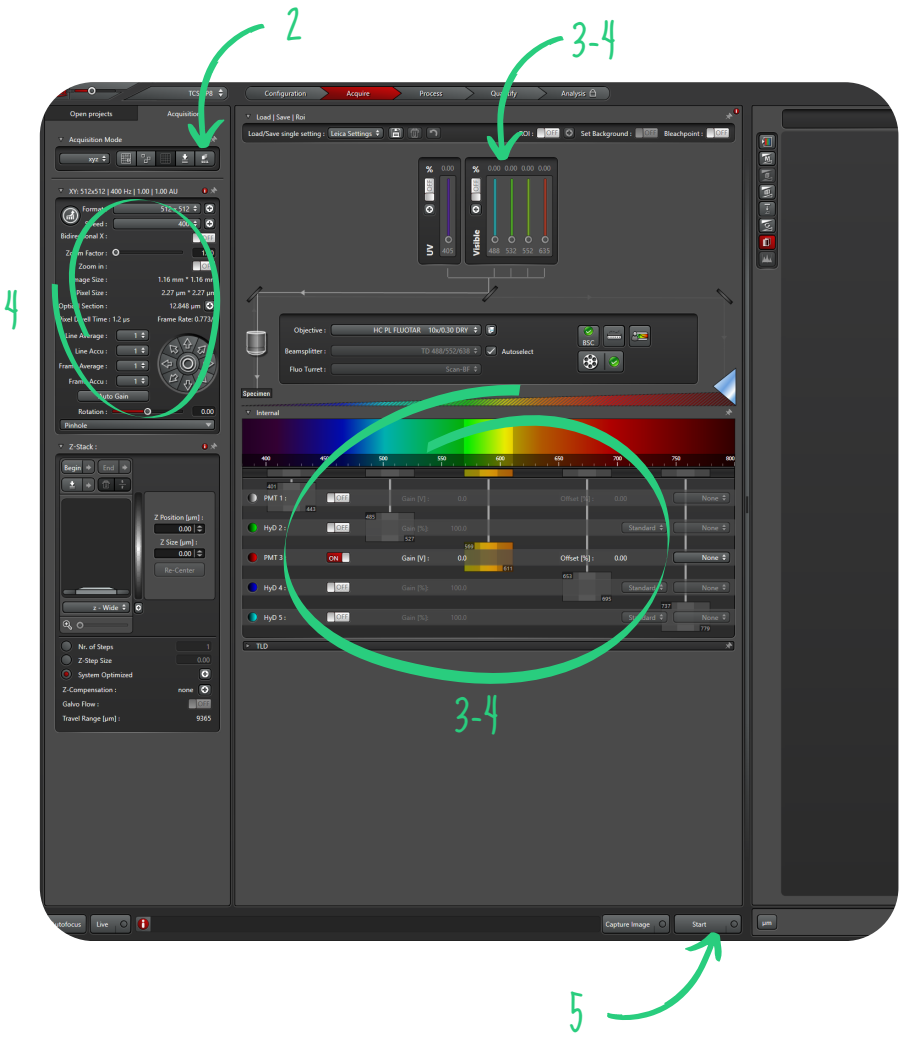
2 Cliquer sur le bouton 'Seq' et ouvrir autant de séquences de couleurs ou charger une configuration (p.12-13) - *Click on the 'Seq' button and open as many sequences as colours OR load a predefinied configuration (p.12-13)*

3 Régler les différentes séquences (excitation, détecteurs, etc.) (p.11-12) - *Set the different sequences (excitation, detectors, etc.) (p.11-12)*

4 Régler les paramètres d'acquisition (gain, puissance laser, moyennage, résolution...) (p.14-19) - *Adjust the acquisition parameters (gain, laser power, averaging, resolution, etc.) (p.14- 19)*

5 Cliquer sur Start pour acquérir l'image - *Click on Start button to acquire an image*

6 Sauvegarder le projet (p. 28) - *Save the project (p. 28)*



Acquérir une image en transmission - *Acquire a brighfield image*

1 Faire la mise au point aux oculaires (p. 3-4) - *Focus the sample on the eyepieces (p. 3-4)*

La transmission est simultanément acquise avec un canal fluo : la source laser est commune (puissance et longueur d'onde).
The transmission is simultaneously acquired with a fluorescent channel: the laser source is common (power and wavelength).

2 Ouvrir une configuration qui a "Trans" dans le nom - *Open a configuration that includes 'Trans' in the name*

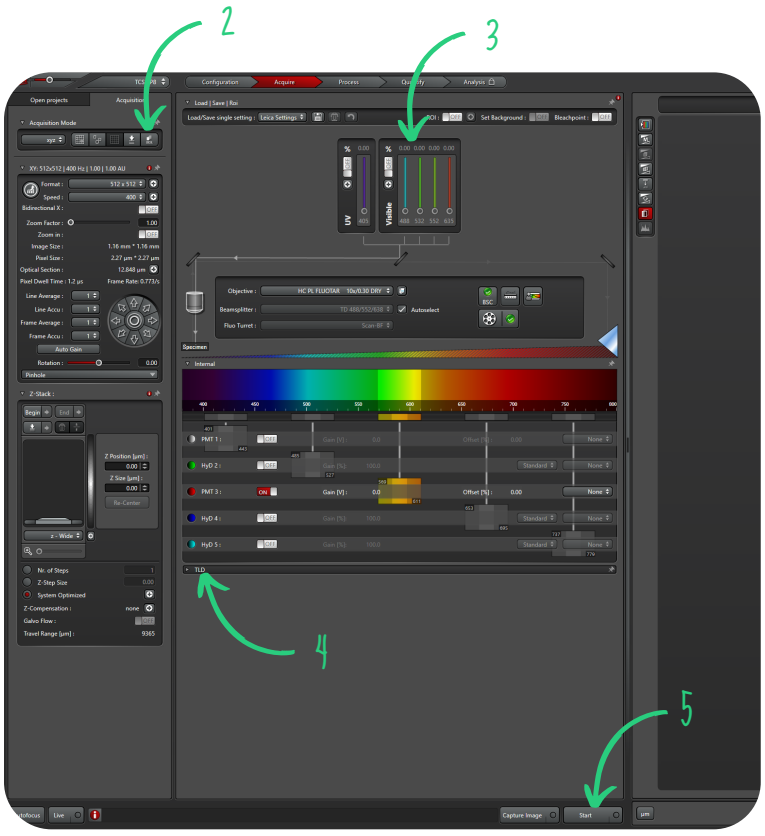
3 Régler en premier : la puissance du laser sur la fluorescence (p.14) - *Set first the power laser on fluorescence channel (p.14)*

4 Régler en premier : la puissance du laser sur la fluorescence et le gain du détecteur sélectionné (p.14) - *Set first the power laser on fluorescence channel and the gain of the chosen detector (p.14)*

5 Ajuster le gain du PMT de la transmission sur le logiciel ou les boutons de réglages - *Adjusting the PMT gain of the transmission on the software or the control buttons*

6 Cliquer sur Start pour acquérir l'image - *Click on Start button to acquire an image*

7 Sauvegarder le projet (p. 28) - *Save the project (p. 28)*



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

Comparaison d'intensité - *Intensity comparison*

Si vous souhaitez faire une étude d'intensité sur vos images, faites d'abord vos réglages (laser, gain) sur l'échantillon le plus brillant et gardez ces paramètres pour acquérir les images suivantes. Ainsi, les autres échantillons ne seront pas saturés. De même, les améliorations d'images (contraste par exemple) doivent d'abord être faites sur l'image la plus brillante puis appliquer de la même manière sur les autres images.

If you want to do an intensity analysis on your images, first adjust your settings (laser, gain) on the brightest sample and keep these settings to acquire the following images. This way, the other samples will not be saturated. In the same way, image enhancements (averaging for example) should be made on the brightest image first and then applied in the same method to the other images.

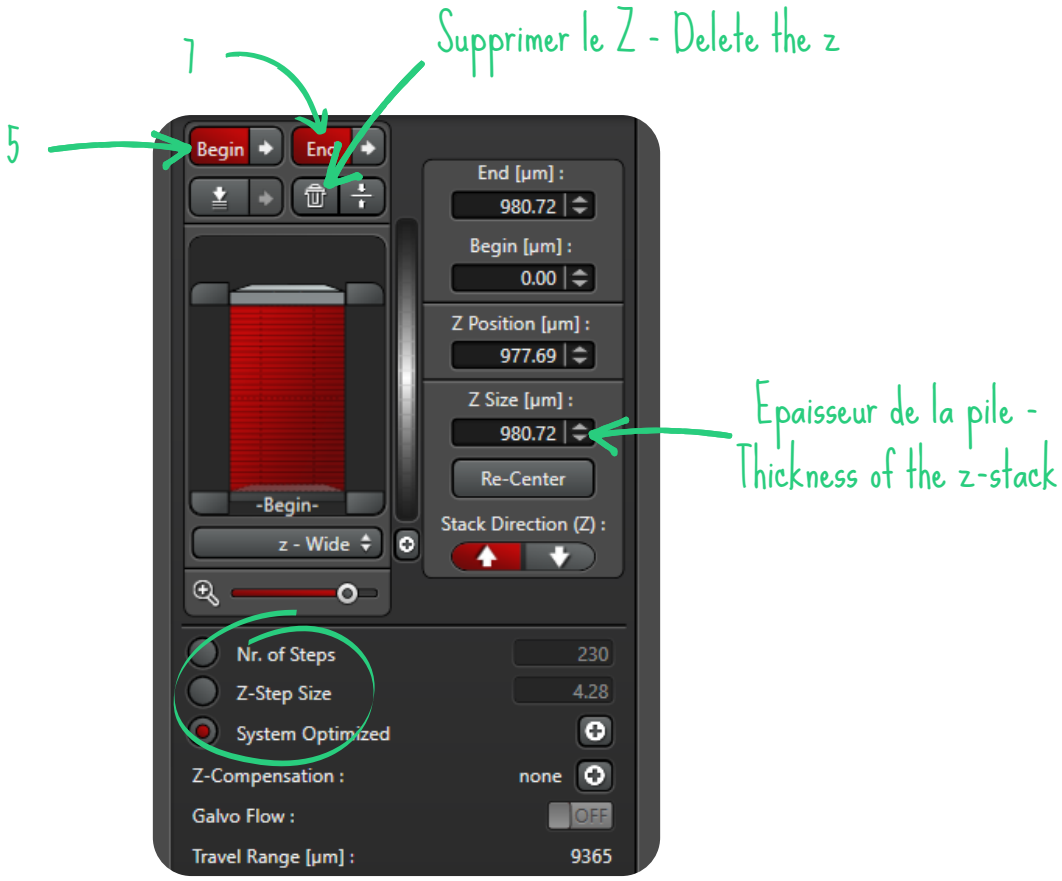
Acquérir une pile d'images - Acquire a Z-stack

Pile d'images sans compensation - *Z-stack without compensation*

1. Dans Acquisition Mode, vérifier qu'on est en XYZ - *In Acquisition Mode tab, check that we are in XYZ*
2. Allez dans l'onglet Z-stack qui est en bas à gauche - *Go to the Z-stack tab at the bottom left*
3. Cliquer sur Live - *Click on Live*
4. Déplacez-vous en z à l'aide du joystick ou du bouton du panel pour déterminer le 1er plan - *Move in z with the joystick or the panel button to determine the first plane*
5. Cliquez sur "Begin" dans Z-stack - *Click on 'Begin' button in Z-stack tab*
6. Déplacez-vous en z à l'aide du joystick ou du bouton du panel pour déterminer le dernier plan - *Move in z with the joystick or the panel button to determine the last plane*
7. Cliquez sur "End" dans Z-stack - *Click on 'End' button in Z-stack tab*
8. Déterminez le nombre de plans à acquérir ou l'intervalle entre les plans. pour avoir un échantillonnage selon Nyquist, sélectionnez "System optimized" - *Set the number of plans to be acquired or the interval between plans. To have Nyquist sampling, select "System optimized".*

9 Se mettre en fausse couleur et chercher pour chaque canal dans le z s'il y a un plan plus lumineux que celui sur lequel les réglages ont été précédemment faits. S'il a de la saturation, ajuster les réglages - *Switch to false colour and search for each channel in the z if there is a brighter plane than the one on which the settings were previously set. If there is saturation, adjust the settings*

10 Cliquez sur Start pour lancer l'acquisition - *Click on 'Start' to launch the acquisition*



Si vous ne souhaitez plus réaliser de Z-stack mais seulement acquérir une image dans un seul plan, cliquez sur le bouton représentant une poubelle. Cela effacera les bornes de du Z-stack. Le bouton "Capture Image" permet de prendre une image du plan actuel même si un z-stack est configuré.

If you do not want to do another Z-stack but only acquire an image in a single plane, click on the bin button. This will clear the Z-stack limits. The "Capture Image" button allows you to take an image of the current plane even if a z-stack is already configured

Pile d'images avec compensation - *Z-stack with compensation*

Cette fonction de compensation peut être utilisée lors d'une acquisition d'un Z-Stack pour compenser les variations de brillance dans l'épaisseur de l'échantillon. Ceci peut se faire de 2 façons - *This compensation function can be used during a Z-Stack acquisition to adjust for brightness variations in the sample thickness. This can be done in two manners: :*

- Via l'intensité du laser "Excitation gain" - *By laser intensity 'Excitation gain'*
- Via le gain du détecteur "Detector gain" - *By the 'detector gain'*

Ces méthodes peuvent être ou non combinées l'une avec l'autre suivant plusieurs conditions - *These methods can be combined or not with each other depends on conditions :*

- 1 seule séquence ou plusieurs séquence en "between stack" : combinaison possible - *1 unique sequence or multiple sequences "between stack": possible combination*
- Plusieurs séquence en "between lines" : combinaison pas possible - *Multiple sequences in 'Between Lines' : no combination*



Comment faire la compensation en z - *How to do a compensation in z ?*

1 Régler les paramètres d'acquisition (p.10) - *Set the image parameters (p.10)*

2 Définir les bornes de la pile d'images avec "Begin" et "End" en Live (p.15) - *Set the limits with 'Begin' and 'End' button in Live (p.15)*

3 Sélectionner le mode de scan : "Between Stack"- *Select the scan mode : 'Between Stack'*

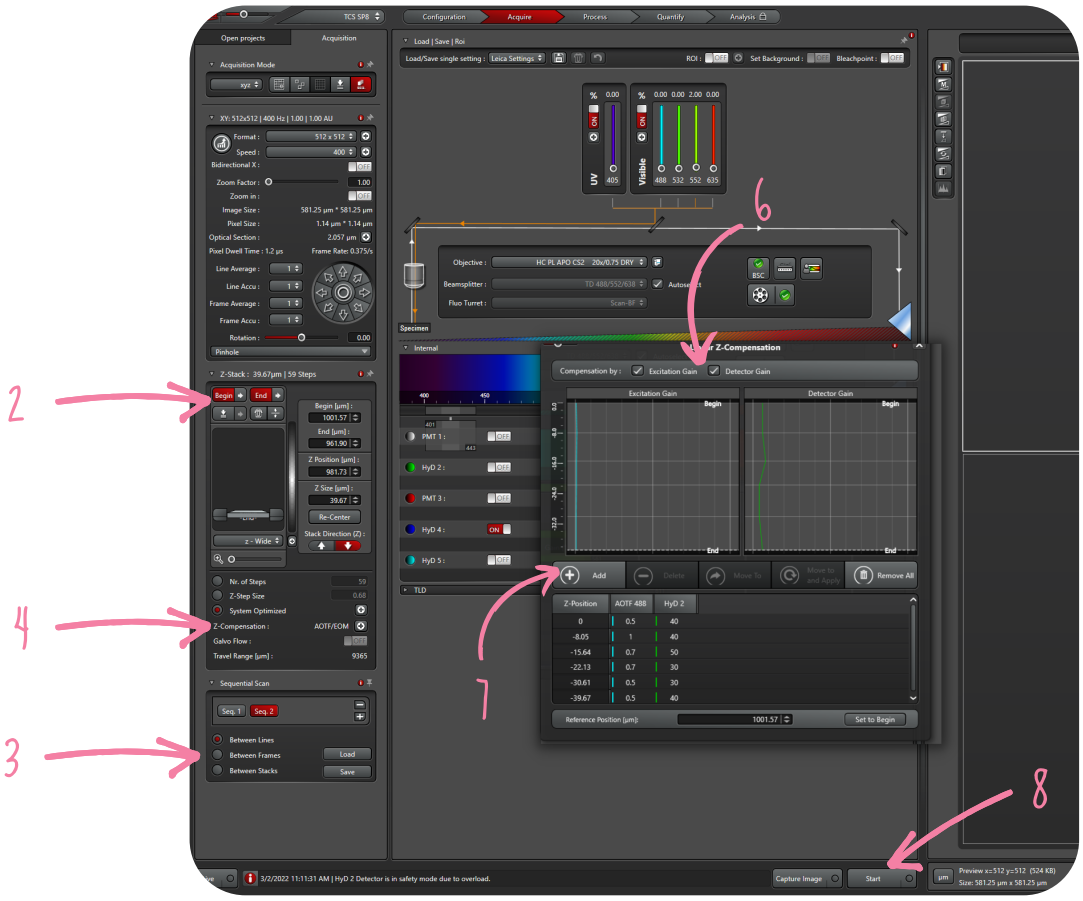
4 Cliquer sur le "+" au niveau de Z-compensation dans l'onglet Z-Stack - *Click on the '+' next to Z-compensation in Z-stack tab*

5 Une nouvelle fenêtre s'affiche - *A new window appears*

6 Choisir les paramètres de compensation : gain et/ou puissance laser - *Choose the compensation parameters : gain and/or power laser*

7 Ajuster le gain et/ou laser à différents plans du z-stack et cliquer sur "Add" à chaque fois - *Adjust the gain and/or laser at different planes of the z-stack and click "Add" each time*

8 Cliquer sur Start pour lancer l'acquisition - *Click on Start to launch the experiment*



Multipositions et mosaïques
Multipositions and tiles scan

Acquisition en multipositions 2D - *2D Multiposition imaging*

1 Régler les paramètres d'acquisition (p.10) - *Set the image parameters (p.10)*

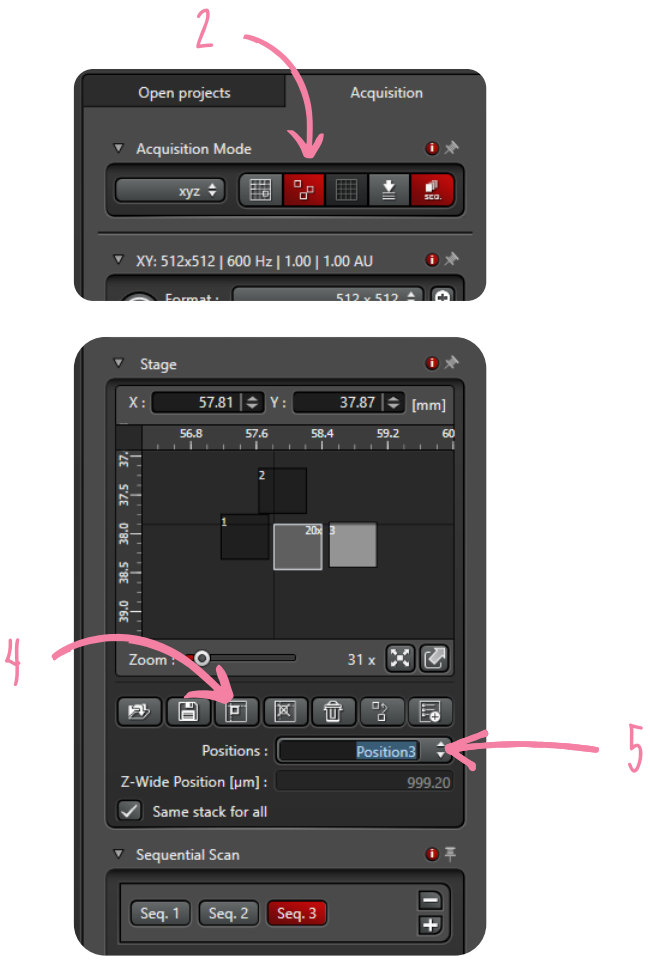
2 Dans Acquisition Mode, cliquez sur le 2e icône - *In Acquisition Mode tab, click on the 2nd icon*

3 Se déplacer avec le joystick pour choisir une position (xy et z) - *Move with the joystick to select a position (xy and z)*

4 Valider la position - *Confirm the position*

5 Si besoin, renommer la position - *If necessary, rename the position*

6 Cliquer sur Start pour lancer l'acquisition - *Click on Start to launch the acquisition*



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

Multiposition combiné à un z-stack - *Multiposition imaging combined with z-stack*

1 Régler les paramètres d'acquisition (p.10) - *Set the image parameters (p.10)*

2 Dans Acquisition Mode, se mettre en xyz et cliquez sur le 2e icône - *In Acquisition Mode tab, check we are in xyz and click on the 2nd icon*

3 Se déplacer pour choisir une position (xy et z) - *Move to select a position (xy and z)*

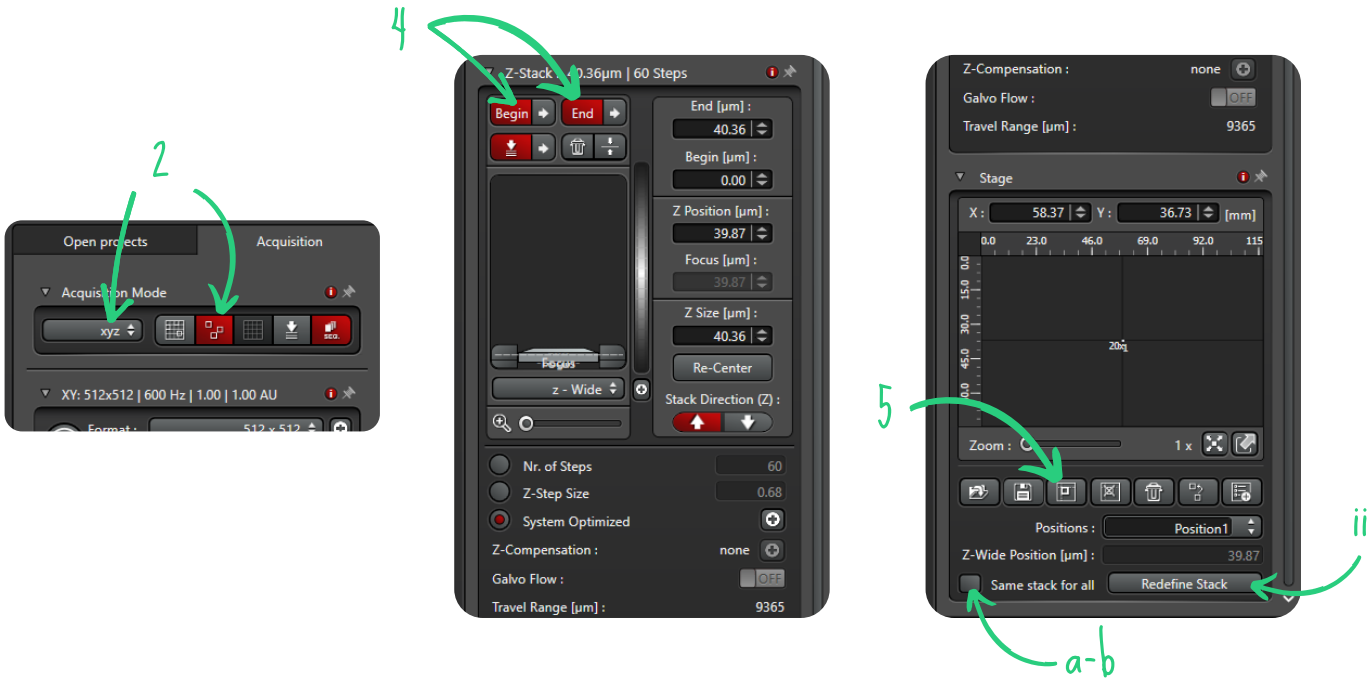
4 Définir les bornes du z-stack avec les boutons "Begin" et "End" (p.15) - *Define the limits of the z-stack with the "Begin" and "End" buttons (p.15)*

5 Dans l'onglet "Stage", validez la position - *On the "Stage" tab, confirm the position*

6 Si besoin, renommer la position - *If necessary, rename the position*

- **a** Si même z pour toutes les positions, cocher la case "Same stack for all" - *If same z for all positions, tick the "Same stack for all" box*
- **b** Si z différents pour chaque position, décocher la case "Same stack for all" - *If same z for all positions, tick the "Same stack for all" box*
  - **i** Choisir les bornes du z-stack avec begin et end - *If same z for all positions, tick the "Same stack for all" box*
  - **ii** Cliquez sur "Redefine stack" - *Click on 'Redefine stack' button*
  - **ii** Faire ces étapes pour chaque position - *Do these steps for each position*

7 Cliquer sur Start pour lancer l'acquisition - *Click on Start to launch the acquisition*



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

Mosaïque - *Tile scan imaging*

1 Régler les paramètres d'acquisition (p.10) - *Set the image parameters (p.10)*

2 Dans Acquisition Mode, se mettre en xyz et cliquez sur le le icône - *In Acquisition Mode tab, check we are in xyz and click on the 1st icon*

3 Dans l'onglet "Stage", deux possibilités - *In 'Tile scan' tab, two possibilities :*

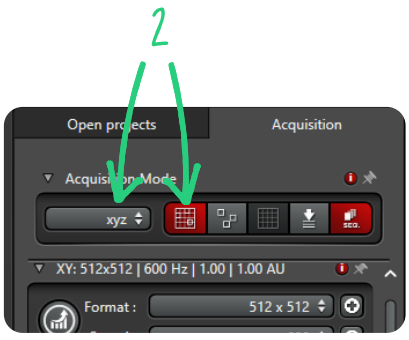
- **a** Définir le nombre de tuiles à acquérir (2x2 ou 2x3 etc.) - *Define the number of tiles you want to acquire (2x2 or 2x3 etc.)*
- **b** Valider des positions pour créer la mosaïque - *Confirm positions to create the mosaic.*

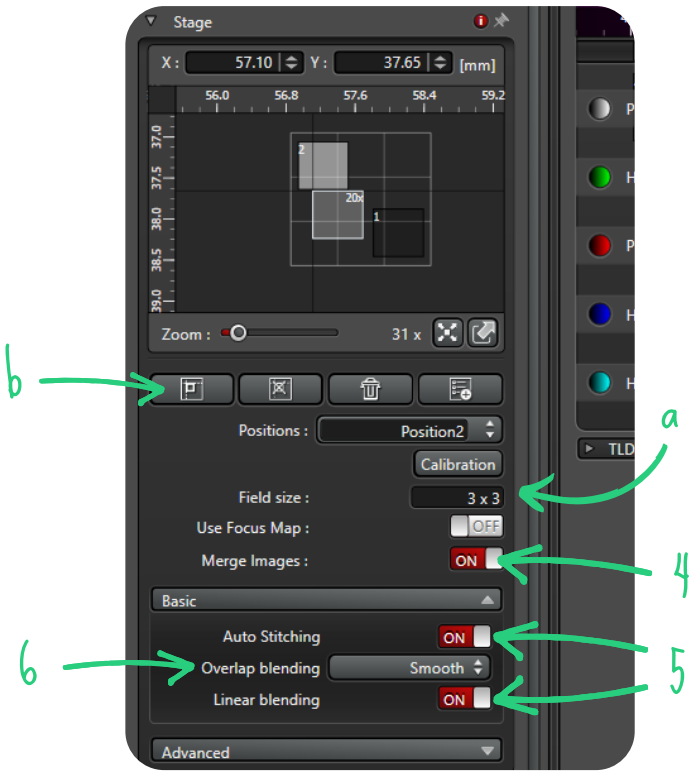
4 Activer "Merge Images" - *Enable "Merge Images"*

5 Dans "Basic", activer "Auto stitching" et "Linear Blending" - *In 'Basic' tab, enable 'auto stitching' and 'linear blending'*

6 Dans "Basic", utiliser la méthode "Statistical" dans "Overlap Blending" - *In Basic' tab, use the 'Statiscal' method in 'Overlap blending'*

7 Cliquez sur Start pour lancer l'acquisition - *Click on Start to launch the acquisition*





Fin de session - *End of the session*

Sauvegarde des données - *Data saving*

1 Aller dans l'onglet "Open project" (p.10) - *Go to "Open project" tab (p.10)*

2 Chaque image est automatiquement placées dans un "project". Elles peuvent être renommées par un clic droit dessus puis "Rename" - *Each image is automatically placed in a "project". They can be renamed by a right click on them and then "Rename"*

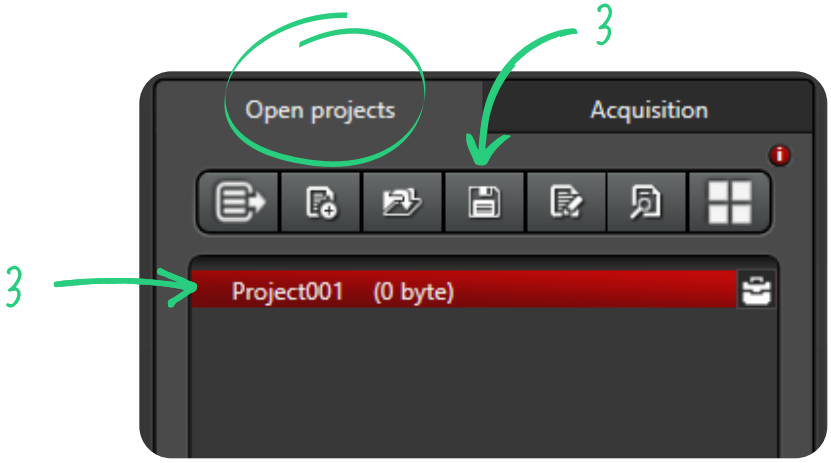
3 Sauvegarder le projet en faisant un clic droit puis "Save project" ou cliquez sur la disquette - *Save the project by doing a right click and then " Save project " or click on the floppy disk*

4 Enregistrez-le dans "Data >> Data >> Nom d'équipe >> Votre dossier nominatif (Le créer s'il n'existe pas) - *Save it in "Data >> Data >> Team name >> Your name folder (Create it if it doesn't exist)*

Toute image acquise au SP8 doit être sauvegardée dans son format .lif d'origine pour conserver les métadonnées. Vous pourrez ensuite les sauvegarder en .tif mais pas en .jpg (qui compresse les images)

-

Every image acquired on SP8 should be saved in its original .lif format to preserve the metadata. You can then save them as .tif but not as .jpg (which compresses the images)



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

Extinction du système - *System shutdown*

Quand vous êtes le dernier utilisateur la journée - *When you are the last user of the day*

1 Nettoyer les objectifs 40x et 63x utilisés avec du Kimtech et de l'éthanol - *Clean used 40x and 63x objectives with Kimtech and ethanol*

2 Baisser la tourelle d'objectif au maximum - *Turn the objective turret as low as possible*

3 Sauvegarder vos acquisitions (p. 27) - *Save your data (p. 27)*

4 Dans le logiciel, mettre sur "OFF" chaque laser en cliquant sur le "+" - *In the software, turn off each lasers by clicking on '+'*

5 Dans le logiciel, mettre sur "OFF" les shutters des lasers - *In the software, switch the laser shutters to ' OFF '*



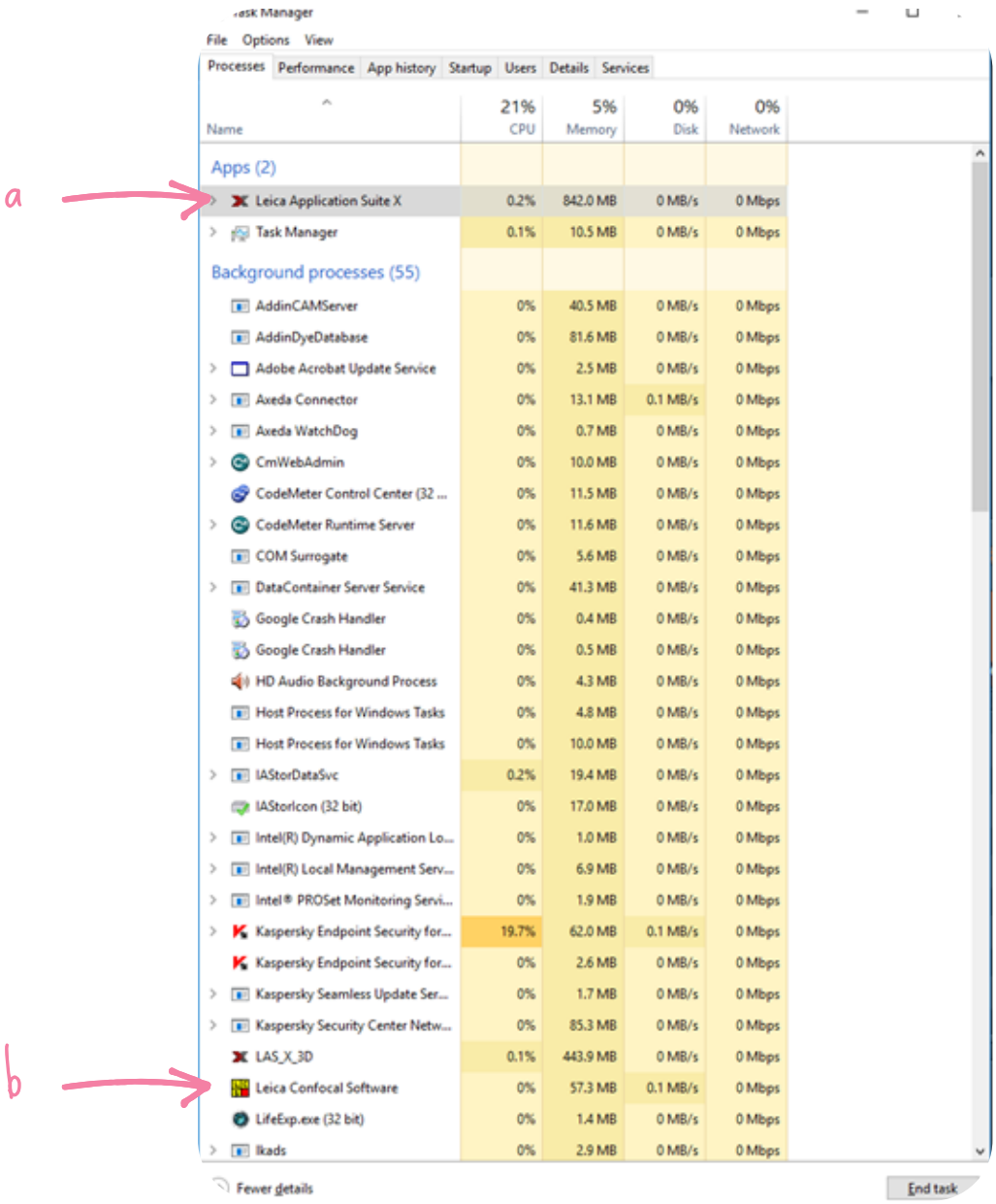
Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan
Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr
Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr
Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01

6 Fermer le logiciel - *Close the software*

7 Quand la fermeture du logiciel plante, ouvrir le gestionnaire de tâche - *When shutting down the software does not work, open the task manager*

a Sélectionner "Leica Application Suite X" et cliquez sur "End Task" - *Select "LAS Application Software" and click on "End Task".*

b Sélectionner "Leica Confocal Software" et cliquez sur "End Task" - *Select "Leica Confocal Software" and click on "End Task".*



Ne pas éteindre l'ordinateur - *Do not turn off the pc*

8 Sous le bureau, tourner la clé vers la gauche. Le voyant lumineux orange s'éteint - *Under the desk, turn the key to the left. The orange indicator light switches off*

9 Sous le bureau, mettre les deux interrupteurs sur OFF : Laser power PUIS Scanner power - *Under the desk, turn the two buttons to OFF*

10 Sur le bureau, éteindre le contrôleur CTR6500 - *On the desk, turn off the CTR6500 controller*

11 Sur le bureau, éteindre la lampe à fluorescence - *On the desk, turn off the fluorescence lamp*





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

Rappels - *Reminders*

- Nettoyer les objectifs à immersion (40x et 63x) et l'insert de la platine avec du Kimtech et de l'alcool en fin de séance - *Clean the immersion objectives (40x and 63x) and the stage support with Kimtech and alcohol at the end of the session*
- Récupérer vos data sur le serveur Data_Plat dès le lendemain - *Retrieve your data from the Data_Plat server the next day*
- Pensez à supprimer régulièrement vos anciennes données de l'ordinateur et du serveur - *Remember to regularly delete your old data from the computer and server*
- Si un problème se produit, même le plus petit qui soit, prévenez-nous - *If a problem occurs, even a minor one, please, let us know*

Récapitulatif des étapes - Overview of the steps

1. Allumer le microscope en suivant la procédure (p.1) - *Turn on the system by following the process (p.1)*
2. Positionner l'échantillon sur le porte-objet - *Put the sample on the specimen holder*
3. Observer l'échantillon aux oculaires (p.3) - *Focus on the sample with the eyepieces (p.3)*
4. Passez ensuite sur le logiciel (p.7) - *Then switch to the software (p.7)*
5. Ouvrir une configuration pré-définie ou charger une ancienne image pour appliquer les paramètres (p.10) - *Open a pre-defined configuration or load an old image to apply the settings (p.10)*
6. Choisir son mode d'acquisition : une image, un z-stack, une mosaïque... - *Choose your acquisition mode: an image, a z-stack, a mosaic...*
7. Sauvegarder ses données (p.27) - *Save your data (p.27)*
8. Fin de session : nettoyer les objectifs à immersion, abaisser la tourelle d'objectifs - *End of session: clean immersion objectives, lower the objective turret*
9. Si vous êtes le dernier utilisateur, éteindre le système en suivant la procédure (p.28) - *If you are the last user, switch off the system by following the procedure (p.28)*

Mode d'emploi

Module STED

Sommaire - Contents

33 *Installation et allumage du système - System start-up* and install

35 *Réglages des paramètres* - Parameters settings

35 Acquisition 2D à une couleur - *2D colour imaging*

35 Réglages - *Settings*

38 Alignement du STED - *STED alignment*

39 Amélioration de la déplétion - *Improvement of depletion*

40 Réglage pour STED multicouleurs - *Settings for multicolour STED*

41 Réglage pour STED 3D - *Settings for 3D STED*

43 *Charger une configuration - Load a configuration*

43 *Extinction du système - System shutdown*

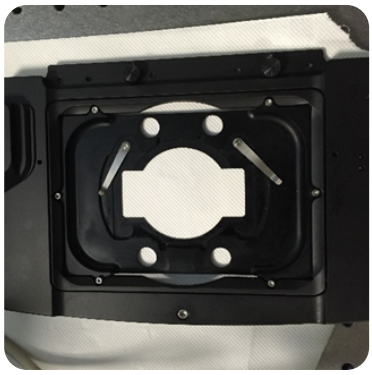


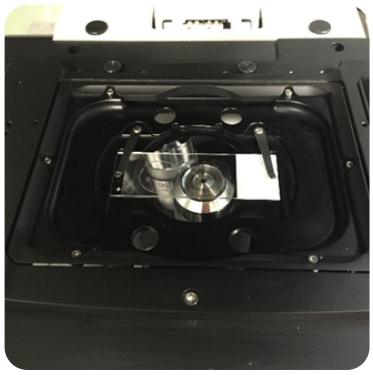
Installation et allumage - *Install and ignition*

1 Positionner la sur-platine galvanométrique (posée à droite) à l'aide des deux vis noires incluses dans la sur-platine et la clé allène qui se trouve dans le tiroir haut du rack STED - *Turn on the system by following the process (p.1)*

Ne pas utiliser l'insert à mâchoire variable mais l'insert à mâchoire fixe
- Do not use the variable clamp insert but the fixed clamp insert.

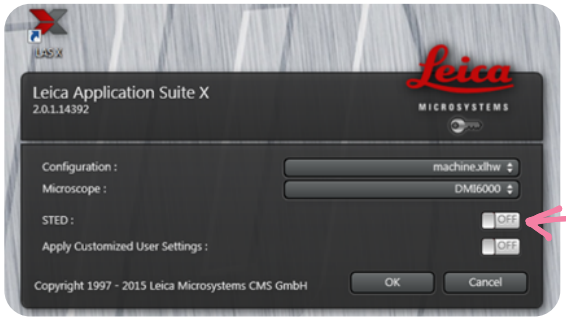
2 Mettre toutes les vis - *Put all screws in place*





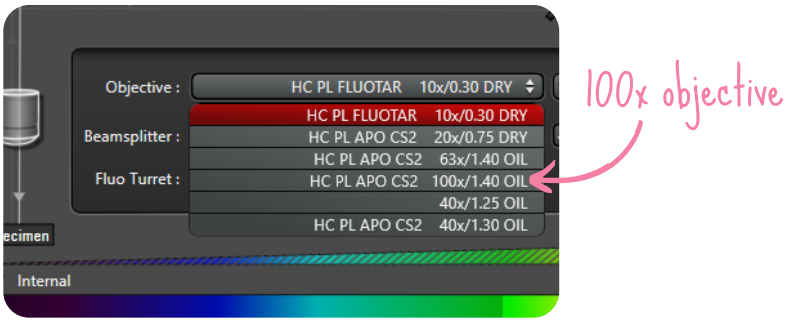
3 Allumer le microscope en suivant la procédure (p.1) - *Turn on the system by following the process (p.1)*

Pensez à mettre sur "ON" le mode STED à l'ouverture du logiciel -
Remember to put on "ON" the STED mode when opening the software



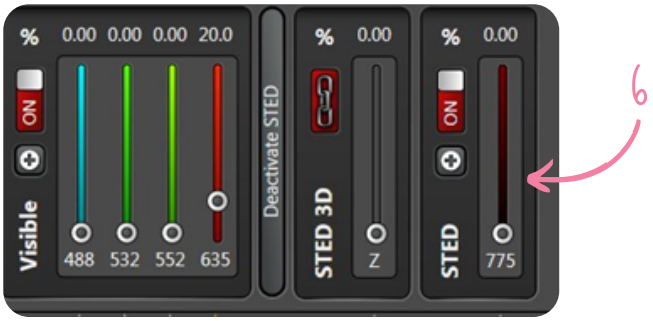
Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan
Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr
Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr
Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01

4 Sélectionnez l'objectif 100x sinon l'onglet STED ne sera pas activé - *Select the 100x objective otherwise the STED tab will not be activated*



5 Visser l'objectif 100x sur le revolver d'objectifs - *Screw the 100x objective onto the objective revolver*

6 Allumez tous les lasers et mettre le laser STED à 100% de sa puissance - *Turn on all lasers and set the STED laser to 100% power*



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

Acquisition 2D à une couleur - *2D single colour acquisition*

Régler les différents canaux avant de procéder à l'alignement du STED - *Adjusting the different channels before aligning the STED*

Réglages - *Settings*

En général on crée un canal confocal et un canal STED avec acquisition en Between Lines pour chaque couleur. Il est préférable de travailler en Between Lines qu'en Between Frame car sinon il peut y avoir une dérive en Z entre chaque image - *In general, a confocal channel and a STED channel are created with a Between Lines acquisition for each colour. It is better to work in Between Lines than in Between Frame because otherwise there can be a drift in Z between each image.*

- **Détection :** la fenêtre de détection ne doit pas dépasser une valeur supérieure à 750 nm car sinon on récupère de la fluorescence parasite qui provient de la raie de déplétion 775 nm. En mode STED, le gain du détecteur hybride doit être compris entre 10 et 100. Au-delà, il y a apparition de bruit surtout au-delà de 300
  Detection *: the detection window must not exceed a value greater than 750 nm, otherwise unwanted fluorescence from the 775 nm depletion line will be recovered. In STED mode, the gain of the hybrid detector must be between 10 and 100. Above this value, noise appears, especially above 300*



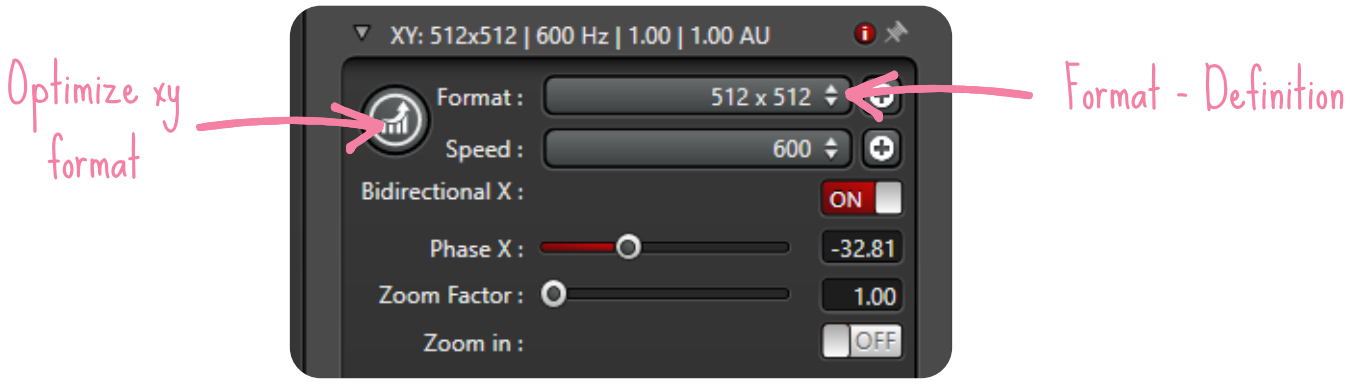
Taille de l'image (format) : pour une acquisition en ligne, la taille de pixel doit être la même pour l'image confocal et pour l'image STED. La taille du pixel dépend de la puissance du STED mais aussi de ce que l'on veut observer. La résolution du STED est au mieux de 40 à 50 nm donc la taille de pixels doit être de 20 nm selon le critère de Nyquist. Pour régler la taille du pixel, activer le shutter du STED et monter la puissance jusqu'à obtenir un pixel de 20 nm en cliquant sur le bouton Optimize xy format.

Image size (format): *for an acquisition in line, the pixel size must be the same for the confocal image and for the STED image. The pixel size depends on the power of the STED but also on what you want to observe. The resolution of the STED is at best 40 to 50 nm, so the pixel size should be 20 nm according to the Nyquist criterion. To adjust the pixel size, activate the STED shutter and increase the power until a 20 nm pixel is obtained by clicking on the Optimize xy format button.*

.....

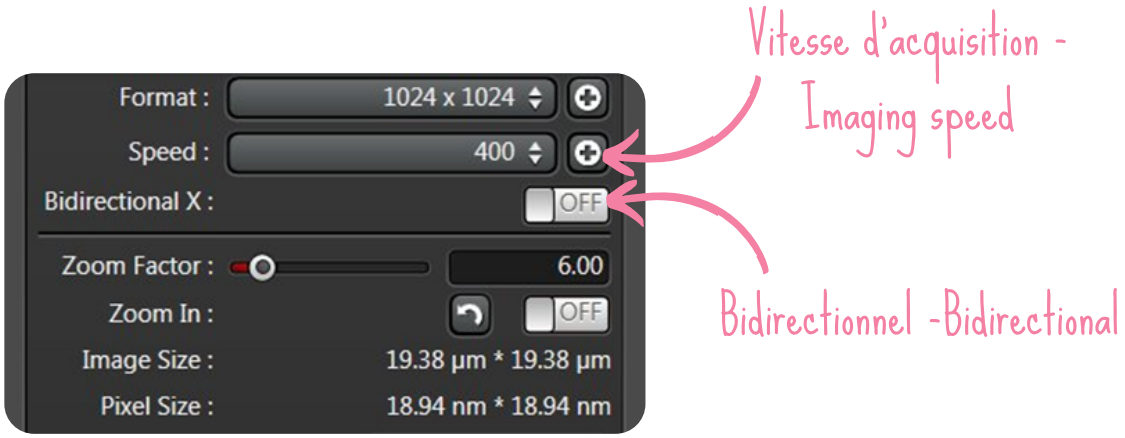
Définition : Au-delà d'une définition de 1024x1024 la vitesse de scan est telle que l'image est bruitée. Pour s'affranchir de cela il faut zoomer à cinq ou six fois afin d'être proche de 1024 par 1024 pixels en STED. Au-delà de 1024*1024, il faut diminuer la vitesse de balayage ou moyenner davantage.

Definition: *above a definition of 1024x1024 the scanning speed is such that the image is noisy. To get rid of this, you need to zoom in five or six times in order to get close to 1024 by 1024 pixels in STED. Beyond 1024*1024, the scan speed must be reduced or averaged further.*



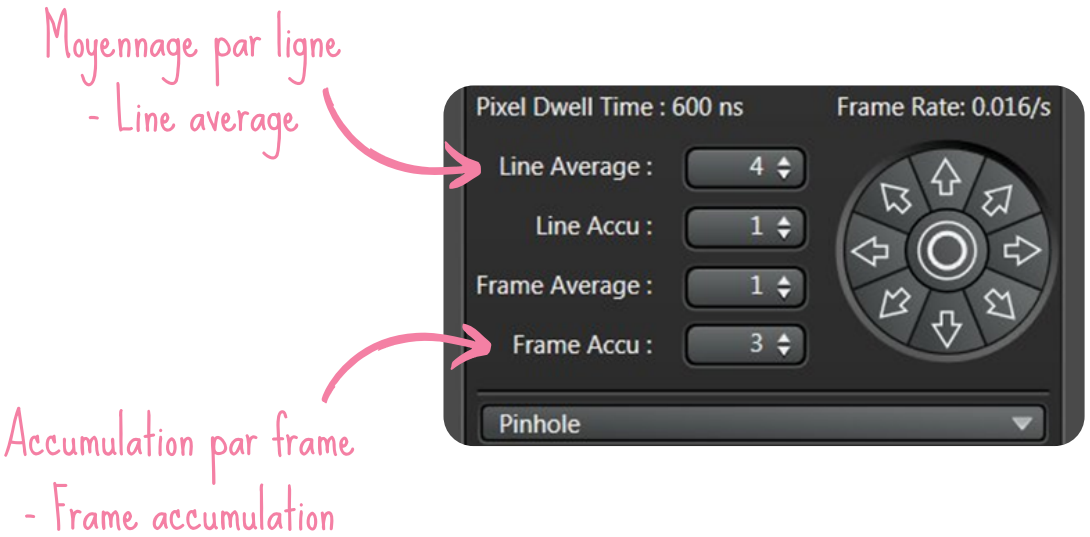
Vitesse d'acquisition et direction: Plus la vitesse d'acquisition de l'image est lente, meilleur sera le rapport signal/ bruit. La vitesse habituellement choisie est de 400 Hz. On évitera le bi-directionnel, à tester.

Acquisition speed and direction: *The slower the image acquisition speed, the better the signal to noise ratio. The usual speed chosen is 400 Hz. Bi-directional should be avoided, to be tested.*

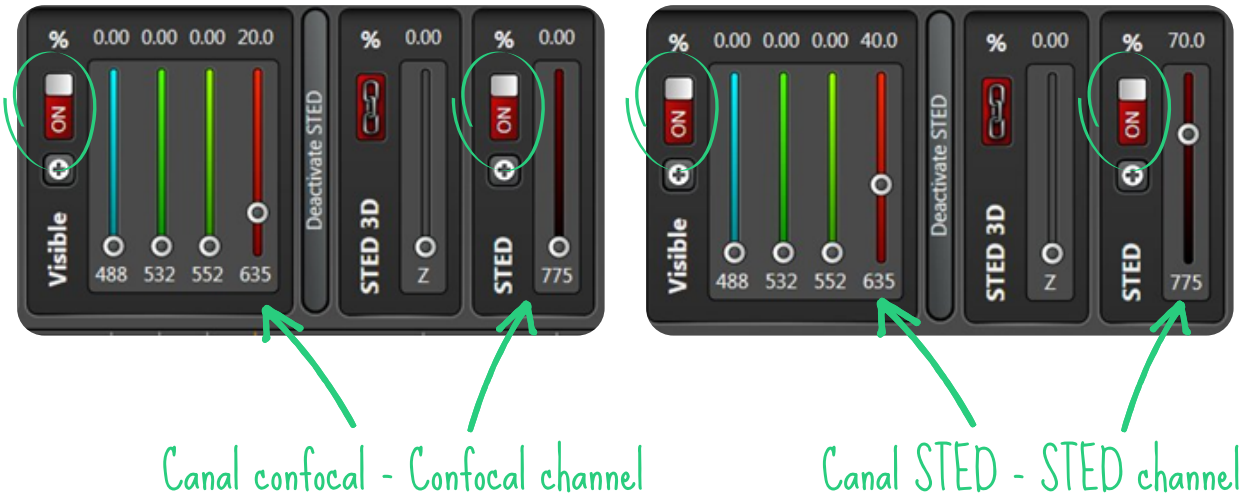


Moyennage : On peut démarrer avec un moyennage de trois en ligne et trois accumulations en Frame. En effet, mieux vaut accumuler une information déjà moyennée. Il faut accumuler le signal car en STED, il y a une déplétion donc une perte de signal. De ce fait, pour le canal confocal, il faut diviser la puissance du laser par le nombre d'accumulation, pour ne pas saturer l'HyD.

Averaging: *You can start with an averaging of three in a row and three accumulations in a frame. Indeed, it is better to accumulate information that has already been averaged. It is necessary to accumulate the signal because in STED, there is a depletion and therefore a loss of signal. For this reason, for the confocal channel, the laser power must be divided by the number of accumulations, to avoid saturating the HyD.*



Pour les deux canaux, le shutter du laser de déplétion doit être ouvert, mais la puissance du laser de déplétion doit être sur zéro dans le canal confocal.
For both channels, the depletion laser shutter must be open, but the depletion laser power must be set to zero in the confocal channel.



Alignement du laser STED - *STED laser alignment*

1 Une fois ces réglages réalisés, faire tourner la **procédure d'alignement** dans l'onglet réglages STED "align Beam". Un alignement suffit sauf en cas de soucis. On peut alors la faire tourner plusieurs fois. Si la procédure échoue, il faut mesurer la puissance du laser STED en sortie de revolver d'objectifs, en mode Point Bleach, et obtenir dans l'idéal 300 mW.
Once these settings have been made, run the alignment procedure in the STED settings tab "align Beam". One alignment is enough unless there are problems. It can then be run several times. If the procedure fails, measure the power of the STED laser at the output of the objective revolver, in Point Bleach mode, and ideally obtain 300 mW.

2 Pour démarrer : avec un fluorochrome rouge, régler la puissance sur 70 % et avec un fluorochrome dans l'infrarouge régler la puissance sur 30 % - *To begin : with a red fluorochrome, set the power to 70%, and with an infrared fluorochrome set the power to 30%.*

3 Faire une image confocal et STED - *Make a confocal and STED image*

Amélioration de la déplétion - *Improvement of depletion*

1 Réaligner le STED - *Realign the STED*

2 Optimiser la puissance de déplétion - *Optimising depletion power*

3 Optimiser la puissance de déplétion - *Optimising depletion power*

a Mettre un moyennage de 16 sans accumulation et lancer une acquisition - *Put an averaging of 16 without accumulation and launch an acquisition*

b Au cours de l'acquisition, à partir de 30%, augmenter la puissance de déplétion de 20 % en 20 % jusqu'à 100 % et observer l'amélioration de la déplétion sur l'image - *During the acquisition, start at 30% and increase the depletion power by 20% to 100% and observe the improvement of the depletion on the image*

c Observer sur l'image confocale si le Fluorochrome a été photo-blanchi ou non - *Observe on the confocal image if the fluorochrome was photobleached or not*

Ne jamais commencer avec un laser à 0% de déplétion il n'y aura pas de notch filter et des stries apparaîtront sur l'image.
Never start with a 0% depletion laser as there will be no notch filter and streaks will appear on the image.

Optimiser le délai entre le pulse d'excitation et le pulse de déplétion - *Optimise the delay between the excitation pulse and the depletion pulse*

Les diodes d'excitation sont pulsés (600 picosecondes) pour un problème de cout de laser. De plus cela permet d'obtenir une puissante crête intéressante pour l'excitation et de "gater" grâce au détecteur sur la durée de vie des fluorochromes, ceci lorsque l'on a un STED continu. Et ainsi d'éliminer les temps de vie trop long ou trop court (autofluorescence, réflexion du laser sur l'échantillon...), ce qui aura pour effet d'augmenter la résolution

The excitation diodes are pulsed (600 picoseconds) to reduce laser costs. In addition, this makes it possible to obtain a powerful peak for the excitation and to "gat" thanks to the detector on the lifetime of the fluorochromes, this when one has a continuous STED. This allows to eliminate too long or too short lifetimes (autofluorescence, reflection of the laser on the sample...), which will increase the resolution

Dans notre cas, le laser STED est pulsé lui aussi (un pulse tous les 600 psec). Or la déplétion est meilleure lorsque le fluorochrome est à l'état excité en phase de conversion interne. *In our case, the STED laser is also pulsed (one pulse every 600 psec). Depletion is better when the fluorochrome is in an excited state during the internal conversion phase.*

- Quelques femtoseconde pour l'exciter - *A few femtoseconds to excite it*
- Quelques pico seconde de conversion interne - *A few pico seconds of internal conversion*
- Puis quelques nanosecondes à l'état excité avant émission de fluorescence - *Then a few nanoseconds in the excited state before fluorescence emission*

On va donc décaler la déplétion de l'excitation de quelques dizaines de picosecondes afin de les dépléter pendant leur période d'état excité. Cela correspond à un "gating" intrinsèque. *We will therefore shift the depletion of the excitation by a few dozen picoseconds in order to deplete them during their excited state. This corresponds to intrinsic gating.*



De même qu'en moyennage de 16 sans accumulation, faire varier le délai de 50 psec en 50 psec. Choisir une valeur pour laquelle la déplétion est maximale. *As in 2/ averaging 16 without accumulation, vary the delay from 50 psec to 50 psec. Choose a value for which the depletion is maximum.*

Acquisition STED multicouleur - *Multicolour STED acquisition*

Même procédure que pour une couleur, mais avec 4 canaux. Le problème va être le passage entre les couleurs. Cela va nécessiter une séparation spectrale post-acquisition dans l'onglet "process". *Same procedure as for one colour, but with 4 channels. The problem will be the transition between the colours. This will require a post-acquisition spectral separation in the "process" tab*

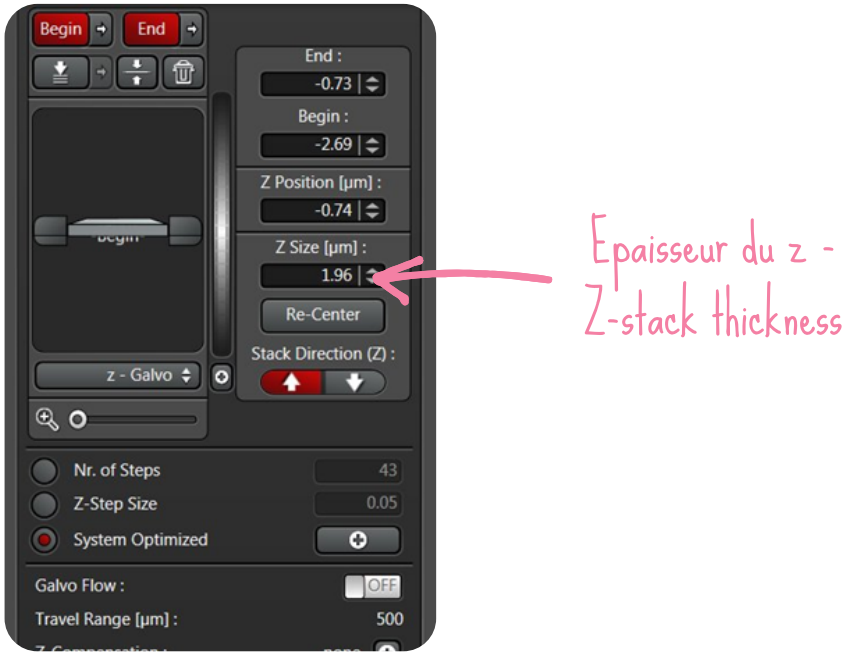
Acquisition STED 3D - *3D STED imaging*

Résolution : au maximum on peut obtenir 50 nm en Z à 100 % du laser STED en 3D. Le meilleur compromis pour une résolution homogène en XYZ est obtenue à 65 % du STED en Z : 130 nm XYZ et 130 nm en Z.

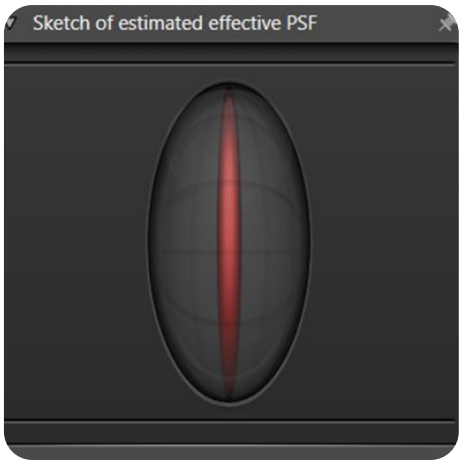
Resolution: at most 50 nm in Z can be obtained at 100% of the STED laser in 3D. The best compromise for homogeneous resolution in XYZ is obtained at 65% of the STED in Z: 130 nm XYZ and 130 nm in Z.

Dès que l'on active la déplétion Z le Pinhole se ferme automatiquement pour éliminer les résidus de fluorescence autour du spot de déplétion. Par exemple en Z le pas échantillonnage en Z est diminué à 40 nm pour 100% de déplétion en Z. Ne pas faire un stack de + de 2 microns d'épaisseur. Vu que la résolution en XY diminue, l'échantillonnage peut-être fixé aux alentours de 35 nm.

As soon as Z depletion is activated, the pinhole closes automatically to eliminate the fluorescence residues around the depletion spot. For example, in Z the Z-sampling pitch is reduced to 40 nm for 100% Z-depletion. Do not make the stack over 2 microns thick. As the resolution in XY decreases, the sampling can be fixed around 35 nm.



Dans Acquisition mode, on peut visualiser la PSF en fonction des paramètres lasers choisi - *In Acquisition mode, the PSF can be viewed as a function of the selected laser parameters :*



Remarques - *Notes* :

- Il est normal que certains objets disparaissent par rapport à l'image de 2D, car la tranche en Z est plus fine - *It is normal that some objects disappear compared to the 2D image, because the Z-slice is thinner.*

- En 3D une lamelle H est réellement un pré requis. Plus on s'éloigne de la lamelle moins bonne est la résolution - *In 3D, an H-coverslip is an absolute necessity.The further away from the coverslip, the worse the resolution.*

- Le problème en 3D est souvent - *The problem in 3D is often* :

  - La dérive en Z au cours du stack. Bien contrôler la température et le flux d'air au-dessus du microscope - *The Z-drift during the stack. Keep the temperature and air flow over the microscope under control.*

  - Le photo blanchiment du à la répétition des acquisitions lors du stack. Ne pas dépasser un moyennage de trois - Photo whitening due to repeated acquisitions during stacking. Do not exceed an averaging of three.

Charger une configuration - *Load a configuration*

1. Dans Acquisition Mode, cliquez sur le bouton Seq - *In Acquisition Mode, click on the Seq button*
2. Un nouvel onglet apparaît : Sequential Scan - *A new tab appears: Sequential Scan*
3. Cliquez sur le bouton Load - *Click on the "Load" button*
4. Choisissez la configuration qui vous convient (Aberrior Star 635, Abberior STAR 580, ATTO-647N, Alexa 647) - *Choose the configuration that fits your needs (Aberrior Star 635, Abberior STAR 580, ATTO-647N, Alexa 647)*
5. Choisir le mode de scan - *Choose the scan mode*
   a. Between Lines
   b. Between Frames

Extinction du système - *System shutdown*

1. Voir les étapes p.30 - *See the steps on p.30*
2. Dévisser l'objectif 100x et le remettre dans sa boite dans le tiroir STED - *Remove the 100x objective and put it back in its box in the STED rack*
3. Dévisser délicatement la sur-platine Galvo et la positionner sur les deux rouleaux de scotch sur le meuble de gauche - *Carefully unscrew the Galvo insert and place it on the two rolls of tape on the left-hand table*