

LA BIBLE DU  
BIPHOTON BRUKER  
ULTIMA 2P PLUS



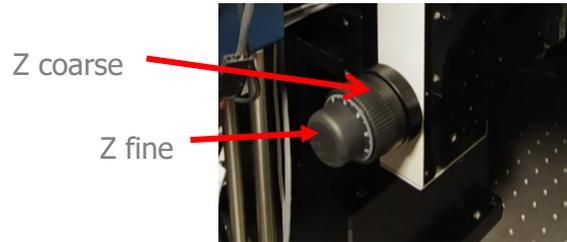
# Table des matières

<b>ALLUMAGE DU 2P+</b> .....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
<b>DEPLACEMENT XYZ</b> .....	<b>4</b>
<b>PRESENTATION DU LOGICIEL « PRAIREVIEW »</b> .....	<b>5</b>
<b>OBSERVATION AUX OCULAIRES DIGITAUX</b> .....	<b>6</b>
<b>PASSAGE DES OCULAIRES AU LOGICIEL</b> .....	<b>8</b>
<b>CHARGER UNE CONFIGURATION</b> .....	<b>10</b>
<b>REGLER LES PARAMETRES D'ACQUISITION</b> .....	<b>11</b>
<b>ACQUISITION D'UNE IMAGE SIMPLE</b> .....	<b>13</b>
<b>ACQUISITION EN Z</b> .....	<b>16</b>
A.    MODE Z-FOCUS : Z DU MICROSCOPE.....	16
B.    MODE Z-PIEZO : Z DE L'OBJECTIF.....	16
<b>TIME LAPSE</b> .....	<b>19</b>
A.    1 POSITIONS 2D.....	19
B.    MULTI POSITIONS 2D : METHODE 1.....	19
C.    MULTI POSITIONS 2D : METHODE 2.....	20
D.    1 POSITION 3D .....	20
E.    MULTIPOSITIONS 3D : MEME Z ENTRE LES POSITIONS (METHODE 1).....	21
F.    MULTIPOSITIONS 3D : MEME Z ENTRE LES POSITIONS (METHODE 2).....	22
G.    MULTIPOSITIONS 3D : Z VARIABLE ENTRE LES POSITIONS.....	23
<b>ATLAS IMAGING</b> .....	<b>24</b>
A.    PREVIEW DE L'ÉCHANTILLON .....	24
B.    MOSAÏQUES 2D.....	24
C.    MOSAÏQUES 3D : Z IDENTIQUE .....	25
D.    MOSAÏQUES 3D : Z VARIABLE .....	25
<b>OPTOGENETIQUE</b> .....	<b>26</b>
<b>SAUVEGARDE PROJETS</b> .....	<b>27</b>
<b>EXTINCTION DU SYSTEME</b> .....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
<b>ANNEXES</b> .....	<b>29</b>
E.    PRESENTATION DU LOGICIEL DU CONTROLE DES LASERS « CHAMELEON DISCOVERY GUI » .....	29
A.    XY STAGE.....	30
B.    T-SERIES.....	31
C.    COMPENSATION LASER EN Z .....	35
D.    ATLAS IMAGING.....	38
E.    ALIGNEMENT DES LASERS .....	41
1. <i>Laser accordable : galvo</i> .....	42
2. <i>Laser accordable : résonnant</i> .....	44
3. <i>Laser fixe 1040 : photoactivation</i> .....	46
F.    CALIBRATION 1040 POUR PHOTOACTIVATION.....	49



## Déplacement xyz

- Molette de contrôle du z du microscope appelé « z focus » sur le logiciel



- Molettes de contrôle x y z
  - Tourne vers + : descend vers l'échantillon
  - Tourne vers - : on s'éloigne de l'échantillon

- Contrôle du z possible avec la molette de la souris mais dépendant du z sélectionné sur logiciel



Déplacement xyz :

- LED rouge allumée : lent
- LED rouge éteinte : rapide



Moteurs des molettes :

- LED rouge allumée : activés
- LED rouge éteinte : éteints

Déplacement xy avec un pas défini

Déplacement xy par pourcentage de champ de vue

Déplacement z avec un pas défini

Stage Control

X = 0.16 | Y = -0.16  
Z = 0.03, -46.74

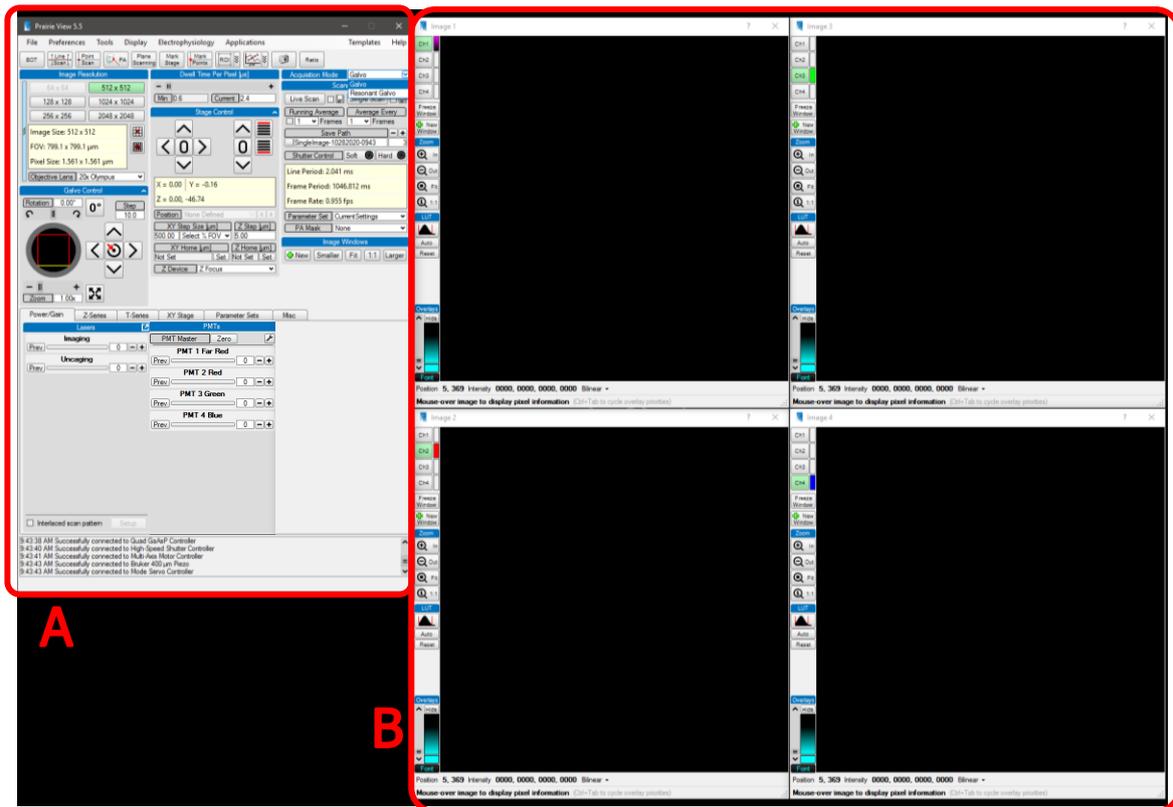
Position: None Defined

XY Step Size [µm]: 319.64 | Z Step [µm]: 5.00

XY Home [µm]: Not Set | Z Home [µm]: Not Set

Z Device: Bruker 400 µm Piezo

# Présentation du logiciel « PraireView »



Le logiciel se divise en deux parties principales :

- A : Réglages des paramètres d'acquisition
- B : Affichage de l'image / des images

## A-IMAGE RESOLUTION

Format de l'image  
Taille de l'image  
Champ de vue  
Taille des pixels  
Choix de l'objectif

## B-GALVO CONTROL

Rotation de l'image  
Déplacement platine  
Zone imagée  
Facteur de zoom

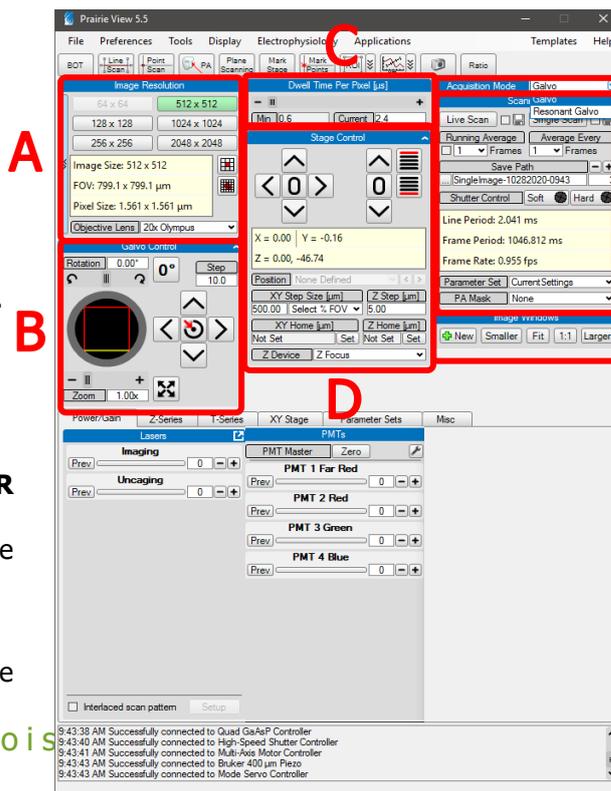
## C-DWELL TIME PER PIXEL

Temps passé par le laser sur chaque pixel

## D-STAGE CONTROL

Temps passé par le laser sur chaque pixel

Lhorane Lobjois



## E-ACQUISITION MODE

Sélection du laser galvo ou laser résonnant

## F-SCAN GALVO

Paramètres d'acquisition en LIVE et de Single Image.

Chemin de sauvegarde des images

Choix des configurations pré-faites.

## G-IMAGE WINDOWS

Gestion des fenêtres de visualisation de l'échantillon

## Observation aux oculaires digitaux

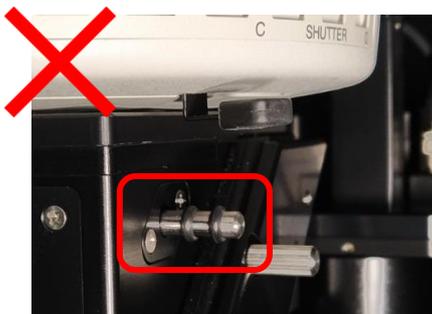
- Positionner l'échantillon **!\ Objectif à immersion à EAU**
- A gauche du microscope, allumer la lampe LED en tournant le bouton vers la droite et pour faire varier l'intensité.



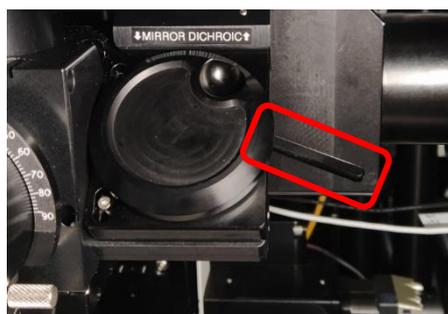
- Choisir le cube filtre vert (n°4) ou rouge (n°3)



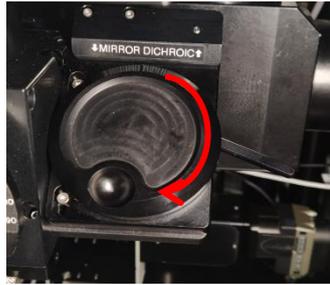
- Mettre la tirette en métal en position OUT (vers l'extérieur)



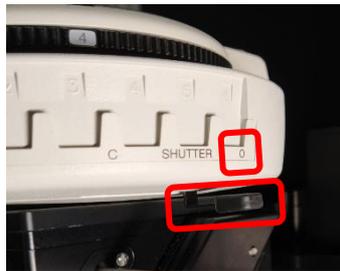
- Lever la languette noire



- Positionner le miroir en pivotant vers la droite



- Rabattre la languette noire pour fixer la position
- Ouvrir le shutter en bougeant la glissière noire vers le « O »



- Observation de l'échantillon sur le petit écran

## Passage des oculaires au logiciel

- Fermer le shutter en bougeant la glissière noire vers le « C »



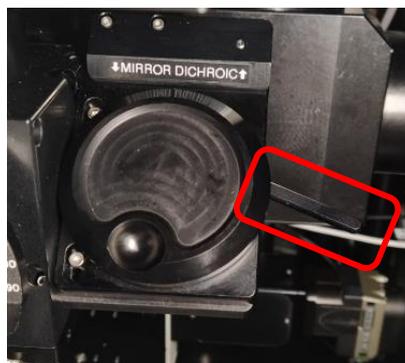
- Eteindre la lampe LED en tournant le bouton vers la gauche jusqu'au clic



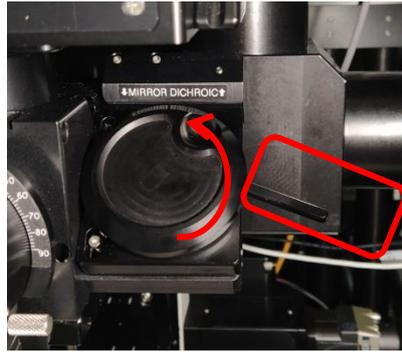
- Mettre la tirette en métal en position IN (vers l'intérieur)



- Lever la languette noire



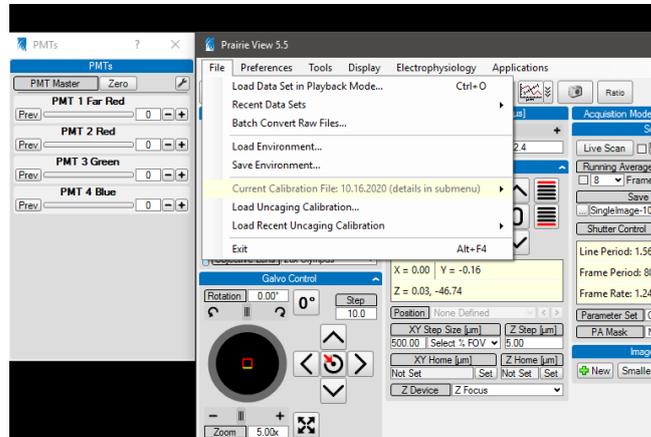
- Positionner vers le dichroïque en pivotant vers la gauche



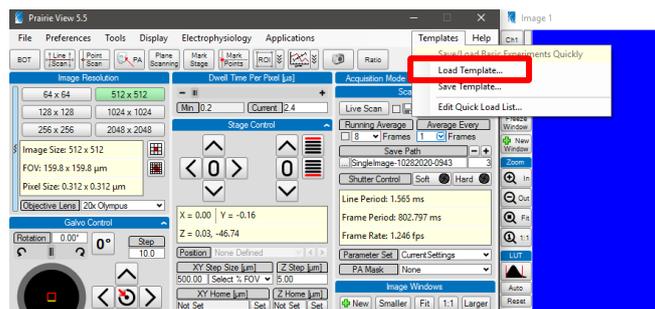
- Rabattre la languette noire vers le bas pour valider la position
- Passage sur le logiciel

## Charger une configuration

Dans la fenêtre Acquisition, cliquer sur *Fichier* puis *Load Environment* pour charger une configuration. Une nouvelle fenêtre s'ouvre. Sélectionner le fichier d'acquisition d'intérêt qui est format « .env ». Puis *Ouvrir*. Et l'environnement se charge tel qu'il l'était à l'acquisition choisie.



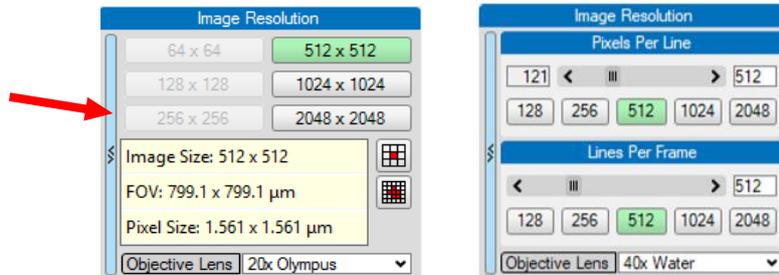
Pour charger une configuration type de démarrage, cliquer sur *Template*, puis *Load template*. Aller ensuite dans le disque E: Raw Data, dossier CONFIG, choisir celle d'intérêt et cliquer sur *Ouvrir*.



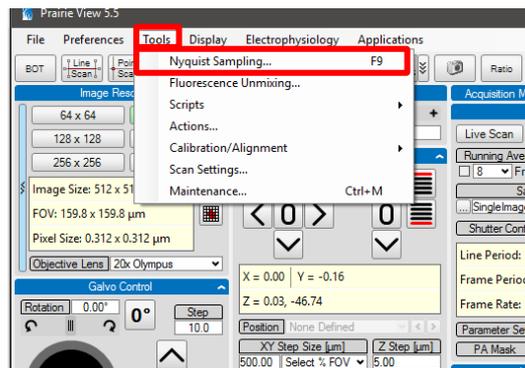
La différence entre template et environnement est le nombre de paramètres chargés. Il y en a moins dans template.

## Régler les paramètres d'acquisition

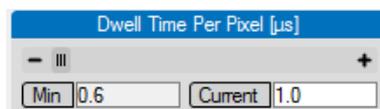
- Le format de l'image :
  - Prédéfini : en cliquant sur les formats indiqués
  - Manuellement : en cliquant sur la petite barre bleue à gauche pour afficher l'onglet, puis taper le nombre de pixels par lignes sur la partie haute, et le nombre de lignes par images en bas.



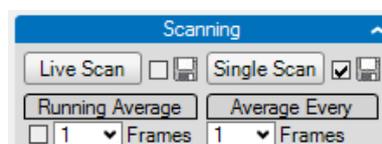
Au 20x, l'échantillonnage optimal est de 1024x1024. Si besoin, pour ajuster automatiquement au bon échantillonnage, il existe un bouton « magique ». Pour cela, aller dans *Tools*, puis cliquer sur *Nyquist Sampling*. Automatiquement, le format de l'image s'adaptera. Il peut également y avoir un zoom d'ajouté pour respecter l'échantillonnage.



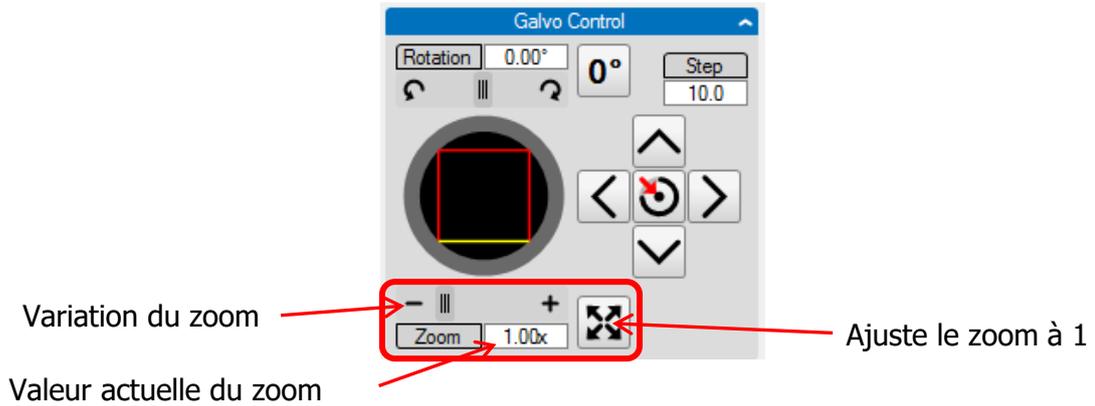
- La vitesse d'acquisition ne se règle que dans la box « dwell time » qui correspond au temps passé par pixel. Plus le chiffre est grand plus le temps passé sur chaque pixel sera long. En général, à 1, cela fonctionne bien.



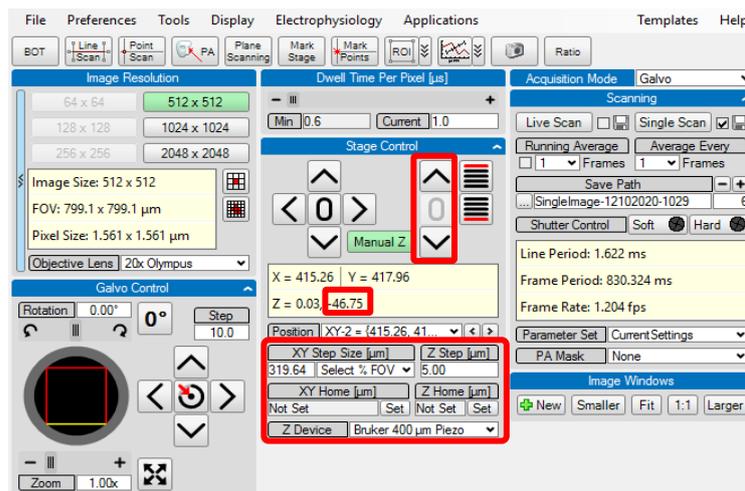
- Le moyennage : choisir la valeur souhaitée pour le moyennage par frame.
  - En LIVE : sélectionner la valeur sous « Running Average » **ET** cocher la case à gauche
  - Pour l'acquisition : sélectionner la valeur sous « Average Every ».



- Le zoom : réglage du zoom par l'échelle ou manuellement

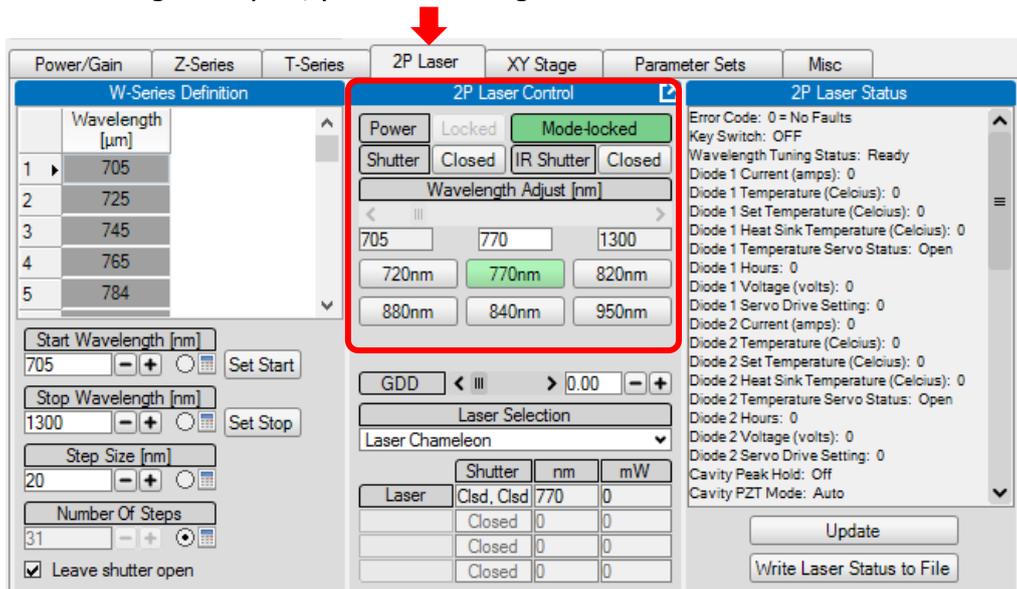


- Ajuster le z-piezo au milieu de sa course : c'est-à-dire à 200µm. Pour cela, sélectionner le z-piezo au niveau du Device dans l'onglet Z Series. Puis taper 200 dans Z step. Enfin, cliquer une fois que la flèche du haut puis une fois sur la flèche du bas. Vérifier que le piezo est bien à 200µm sur le deuxième chiffre.



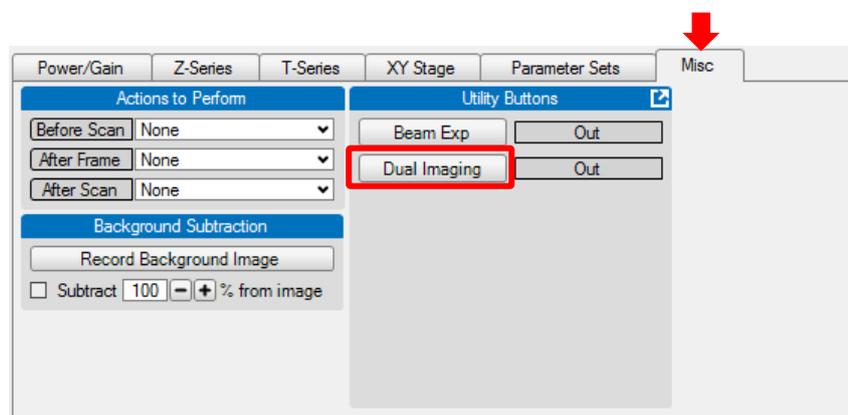
## Acquisition d'une image simple

- Aller dans l'onglet 2P plus, puis le sous onglet 2P Laser

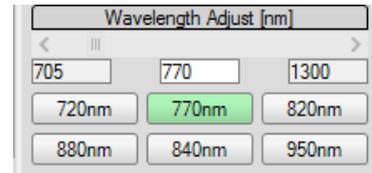


- Vérifier que le laser sélectionné dans *Laser selection* est « Laser Chameleon »
- Vérifier que le laser est prêt :
  - Si oui : Mode-locked en vert
  - Sinon : Not Mode-locked en rouge
- Cliquer sur le bouton *Closed* pour ouvrir le ou les shutters nécessaires :
  - Shutter : pour le laser accordable
  - IR Shutter : pour le laser fixe à 1040

Pour utiliser les deux lasers simultanément pour faire de l'imagerie, aller dans l'onglet Misc. Pour activer le dual imaging : IN doit être visible, sinon OUT pour la photoactivation. Avant de faire l'une ou l'autre technique (photoactivation ou dual imaging), vérifier quelle est la configuration actuelle du microscope. Sur la partie droite de la boîte noire du microscope se trouve les deux techniques. Celle qui est en place, est celle qui a la gommette verte. Si vous souhaitez utiliser l'autre méthode, merci de nous en faire part avant de commencer.

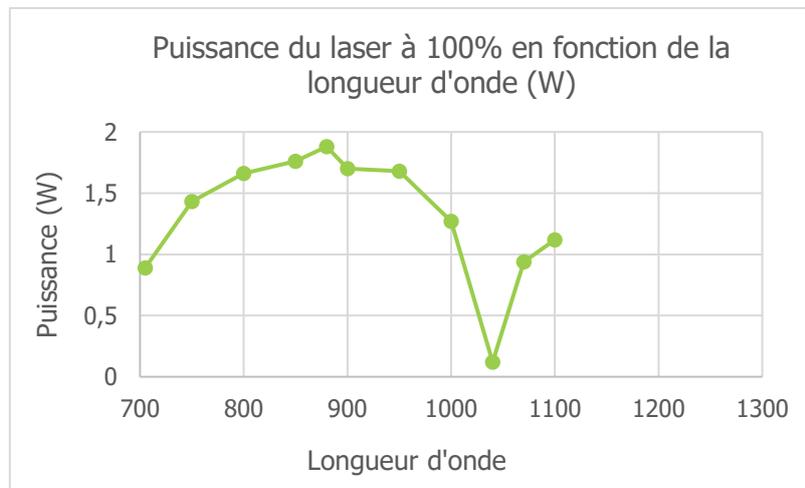
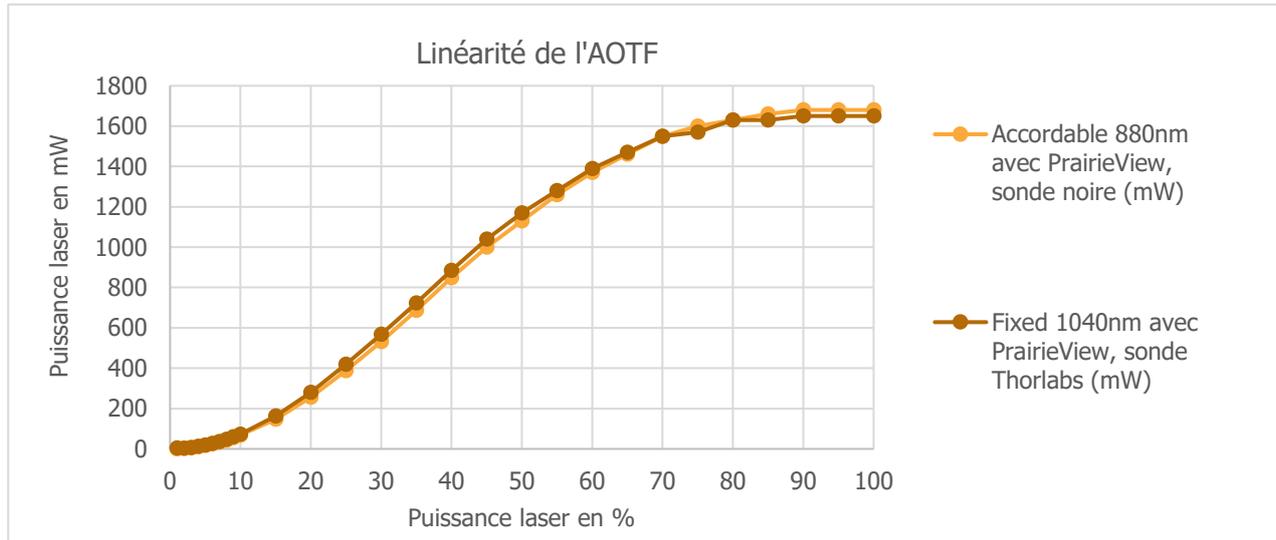


- Régler la longueur d'onde d'excitation
  - Soit en mettant la longueur d'onde voulue
  - Soit en cliquant sur une valeur prédéfinie



Ensuite, aller dans l'onglet « Power/Gain » :

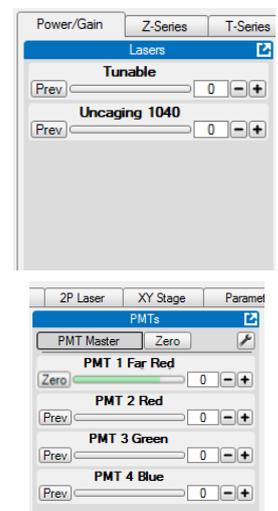
- Dans le sous onglet Laser, régler la puissance du laser *Tunable* pour commencer à 20. L'échelle va de 0 à 1000 en sachant que 1000 correspond à 100% de puissance laser.



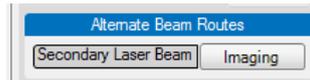
Pour modifier les valeurs, plusieurs possibilités :

- En tapant la valeur directement dans la case blanche
- En bougeant le curseur avec la souris
- En cliquant sur + et - : incrémentation de 1 en 1
- En cliquant sur la partie grisée de l'échelle : incrémentation de 10 en 10

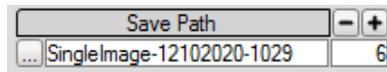
- Dans le sous onglet PMTs, mettre les PMTs d'intérêt à 600



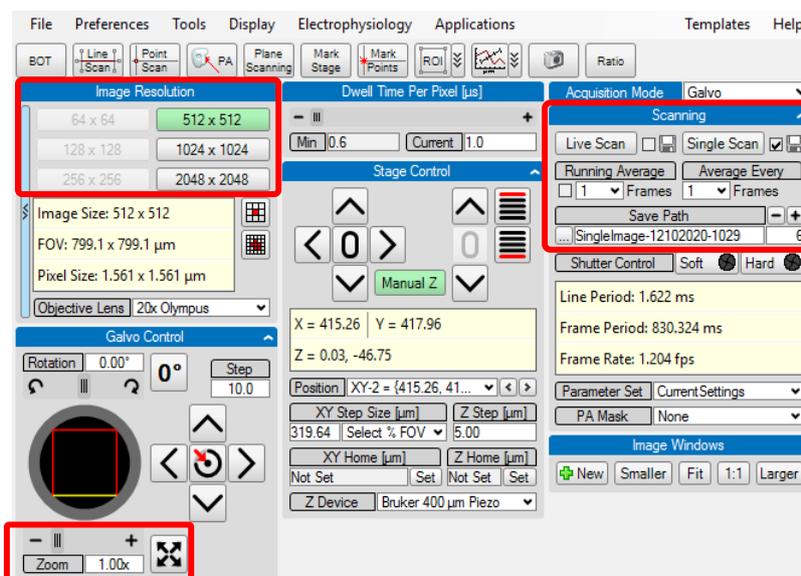
- Vérifier que « Imaging » est visible dans le sous onglet *Alternate Beam Routes*



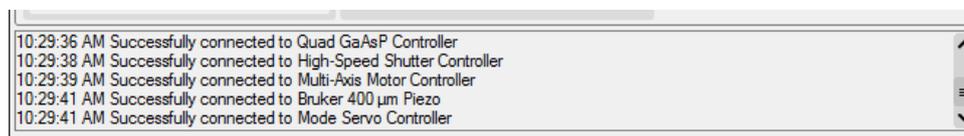
- Choisir le dossier d'enregistrement en cliquant sur les trois petits points à côté de *Single Image* en haut à droite. L'enregistrement se fait dans le disque E: Raw Data, dans le dossier de son équipe, puis son dossier nominatif. S'il n'existe pas, le créer.



- Cliquer sur *Live scan*
- Régler les paramètres d'acquisitions : comme présenté plus tôt
  - Format d'image : généralement 512\*512
  - Zoom : 1
  - Ajuster la puissance laser et/ou le gain des PMTs
  - Moyennage
- Cliquer sur *Stop Scan* pour arrêter le LIVE.
- Cliquer sur *Single Scan* pour acquérir une image 2D qui sera sauvée automatiquement.



- Vérification du bon enregistrement dans la partie inférieure du logiciel qui regroupe l'ensemble des actions effectuées.



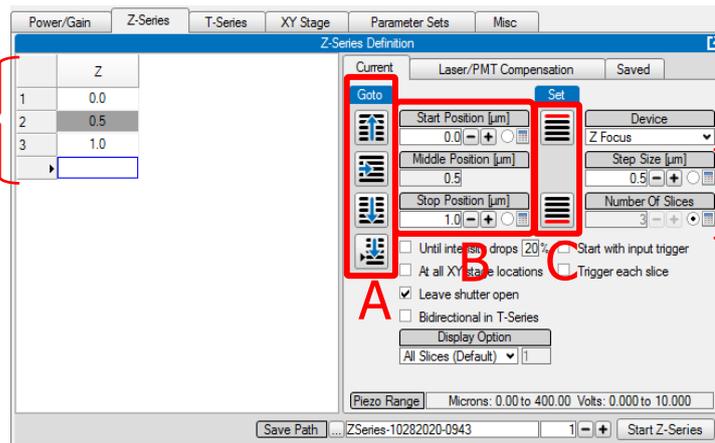
## Acquisition en z

Représentation du z, slice par slice

A : **Aller à** la position haute, centrale ou basse

B : Valeur de la position haute, centrale et basse

C : **Définir** la position haute et basse



Choix du mode z normal ou z piezo

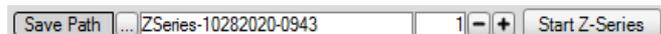
Réglage du pas du z ou du nombre de slices

### a. Mode z-focus : z du microscope

- Panneau Z-series
- Choisir le z-focus dans Device

/!\ Ne pas modifier le choix du z device dans la partie *Stage Control*

- Passer en LIVE
- Déplacement en z pour définir le premier plan.
- Par défaut, le pas en z pour le déplacement de l'objectif est de 5µm par 5µm
- Valider la position haute en cliquant sur ce bouton 
- Déplacement en z pour définir le dernier plan
- Valider la position basse en cliquant sur ce bouton 
- Choisir les paramètres d'acquisition en z soit en choisissant un step size ou un nombre de plans à réaliser. Le step size respectant l'échantillonnage est de 0.5µm.
- Cocher « Leave shutter open ».
- Renommer le fichier
- Mettre l'incrémentation à 1
- Cliquer sur *Start z-series*

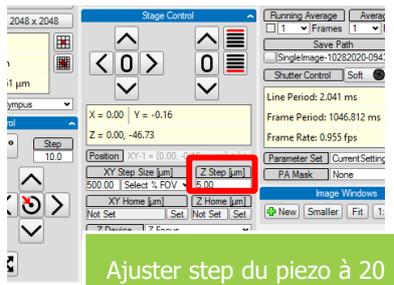


### b. Mode Z-piezo : z de l'objectif

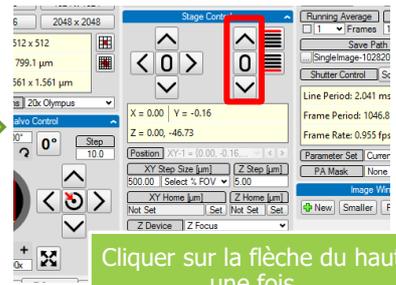
Pour utiliser ce piezo, il faut impérativement que la position initiale du piezo soit à 200µm afin d'avoir une course entre -200 et +200µm. Si cela n'a pas été fait au démarrage du système avant d'avoir mis l'échantillon en place, il faut se mettre en LIVE, défocaliser en surface avec la molette Z sur la table. Puis mettre le z-step à 30µm et descendre le piezo à l'aide de la flèche vers le bas. Répétez cet enchainement jusqu'à atteindre 200µm avec le piezo. (Cf. *Régler les paramètres d'acquisition*)



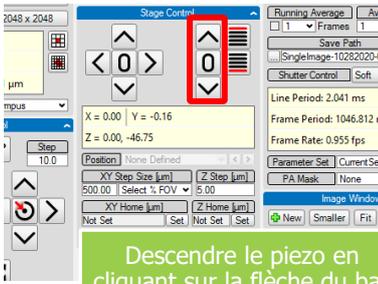
Molette Z : défocalisation en surface



Ajuster step du piezo à 20



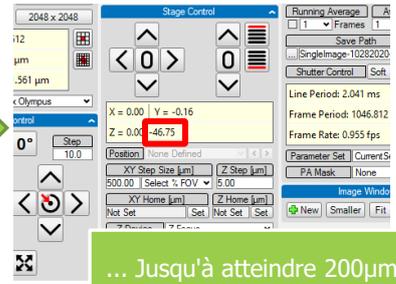
Cliquer sur la flèche du haut une fois



Descendre le piezo en cliquant sur la flèche du bas



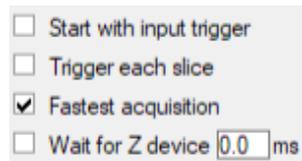
Molette Z



... Jusqu'à atteindre 200µm

- Panneau Z-series
- Choisir le z piezo dans Device
- Passer en LIVE
- Déplacer le piezo pour régler le premier plan
- Valider la position en cliquant sur ce bouton 
- Déplacement en z pour définir le dernier plan
- Valider la position en cliquant sur ce bouton 
- Choisir les paramètres d'acquisition en z soit en choisissant un z-step ou un nombre de plans à réaliser. Le z-step respectant l'échantillonnage est de 0.5µm.
- Cocher « Leave shutter open ».
  
- Choisir le mode d'acquisition du z : normal, fastest ou intermédiaire.
  - **Normal** : laisser les paramètres tel quel qu'en z-focus.
  - **Intermédiaire** : cocher la ligne *fastest* puis cocher la ligne « wait for z device » et mettre la valeur 0.2 ms. L'inconvénient est le piezo ne contrôlera pas qu'il est à la bonne position avant d'acquérir chaque plan. Pratique si on ne veut pas passer en laser résonnant. C'est le plus avantageux.
  - **Fastest** : cocher la ligne *fastest* puis cliquer sur le bouton *calibrate*. Dans ce cas, le piezo va calculer comment il va réaliser l'acquisition au plus rapide en ayant contrôlé chaque position. !\ le temps maximum pour réaliser le z doit être inférieur à 4,6 secondes. Pour cela il peut être envisageable : d'augmenter le z-step, diminuer

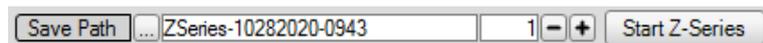
l'average, diminuer le format d'acquisition, passer en scanner résonnant, faire une ROI par exemple. Il est presque indispensable d'être en laser résonant.



A screenshot of a software dialog box with four options:

- Start with input trigger
- Trigger each slice
- Fastest acquisition
- Wait for Z device  ms

- Renommer le fichier
- Mettre l'incrémentation à 1
- Cliquer sur *Start z-series*



A screenshot of a file path field and a button:

Save Path ... ZSeries-10282020-0943 1 - + Start Z-Series

## Time lapse

### a. 1 positions 2D

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur une position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le z est sauvegardé, le zoom aussi si *Save Optical Zoom* est coché
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner la position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Image Sequence*
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Cocher la case dans la colonne *Max Speed*

Cycle Type	#Reps	Period [s]	Max Speed	Duration [s]	Resource Selection	Photo-activation	BOT	External Trigger	Triggers Before Starting	Synchronize with Voltage Recording	Synchronize with Mark Points	Synchronize with Voltage Output
XY	---	---	---	---	XY-1 (X=Z)	None	---	---	---	---	---	---
Images	5	0.60582	<input type="checkbox"/>	3.02910	---	None	<input type="checkbox"/> No Trigger	---	0	None	<input type="checkbox"/> None	<input type="checkbox"/> None

- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Start T-series*

### b. Multi positions 2D : méthode 1

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur la première position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le focus est sauvegardé
  - Si *Save Optical Zoom* est coché : le zoom est également sauvegardé
- Faire de même pour les autres positions.
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner une position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Image Sequence*
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Cocher la case dans la colonne *Max Speed*
- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner une autre position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Image Sequence*
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Cocher la case dans la colonne *Max Speed*

- Ajouter autant de lignes *Stage position* suivi de ligne *Image sequence* que de positions voulues

Cycle Type	# Repts	Period [s]	Max Speed	Duration [s]	Resource Selection	Photo-activation	BOT	External Trigger	Triggers Before Starting	Synchronize with Voltage Recording	Synchronize with Mark Points	Synchronize with Voltage Output
XY	---	---	---	---	XY-1 (X=-2)	None	---	---	---	---	---	---
Images	5	0.60582	<input type="checkbox"/>	3.02910	---	None	<input type="checkbox"/> No Trigger	---	0	None	None	None
XY	---	---	---	---	XY-2 (X=-2)	None	---	---	---	---	---	---
Images	5	0.60582	<input type="checkbox"/>	3.02910	---	None	<input type="checkbox"/> No Trigger	---	0	None	None	None

- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Start T-series*

### c. Multi positions 2D : méthode 2

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur la première position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le focus est sauvegardé
  - Si *Save Optical Zoom* est coché : le zoom est également sauvegardé
- Faire de même pour les autres positions.
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Cliquer sur *Image Sequence*
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Cocher la case dans la colonne *Max Speed*
- Cocher « Run at XY Stage Position »
- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Start T-series*

### d. 1 position 3D

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur une position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le z est sauvegardé, le zoom aussi si *Save Optical Zoom* est coché
- Aller dans l'onglet « Z-series »
- Choisir le z-focus ou le z-piezo dans Device (cf. Z-series)
- Passer en LIVE
- Déplacement en z pour définir le premier plan. Par défaut, le pas en z pour le déplacement est de 5µm par 5µm
- Valider la position haute en cliquant sur ce bouton 
- Déplacement en z pour définir le dernier plan
- Valider la position basse en cliquant sur ce bouton 
- Choisir les paramètres d'acquisition en z soit en choisissant un z-step ou un nombre de plans à réaliser. Le z-step respectant l'échantillonnage est de 0.7µm.

- Régler les paramètres d'acquisition de l'image
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner une position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Z-series*
- Sélectionner un z enregistré ou le z actuellement défini dans l'onglet Z-series
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Si mode z-piezo : cocher la case dans la colonne *Max Speed*
- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner une autre position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Z-series*
- Sélectionner un z enregistré ou le z actuellement défini dans l'onglet Z-series
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Si mode z-piezo : cocher la case dans la colonne *Max Speed*

Cycle Type	# Reps	Period [s]	Max Speed	Duration [s]	Resource Selection	Photo-activation	BOT	External Trigger	Triggers Before Starting	Synchronize with Voltage Recording	Synchronize with Mark Points	Synchronize with Voltage Output
XY	---	---	---	---	XY-1 (X=2)	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---
Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None
XY	---	---	---	---	XY-2 (X=2)	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---
Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None

- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Start T-series*

### e. Multipositions 3D : même z entre les positions (Methode 1)

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur la première position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le z est sauvegardé, le zoom aussi si *Save Optical Zoom* est coché
- Faire de même pour les autres positions.
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Aller dans l'onglet « Z-series »
- Choisir le z-focus ou le z-piezo dans Device (cf. Z-series)
- Passer en LIVE
- Déplacement en z pour définir le premier plan. Par défaut, le pas en z pour le déplacement est de 5µm par 5µm
- Valider la position haute en cliquant sur ce bouton 
- Déplacement en z pour définir le dernier plan
- Valider la position basse en cliquant sur ce bouton 
- Choisir les paramètres d'acquisition en z soit en choisissant un z-step ou un nombre de plans à réaliser. Le z-step respectant l'échantillonnage est de 0.5µm.
- Régler les paramètres d'acquisition de l'image
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »

- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner une position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Z-series*
- Sélectionner un z enregistré ou le z défini dans l'onglet Z-series nommé « Current »
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Si mode z-piezo : cocher la case dans la colonne *Max Speed*

	Cycle Type	# Reps	Period [s]	Max Speed	Duration [s]	Resource Selection	Photo-activation	BOT	External Trigger	Triggers Before Starting	Synchronize with Voltage Recording	Synchronize with Mark Points	Synchronize with Voltage Output
	XY	---	---	---	---	XY-1 [X=-2]	None			---	---	---	---
	Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None
	XY	---	---	---	---	XY-2 [X=-2]	None			---	---	---	---
	Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None

- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Start T-series*

## f. Multipositions 3D : même z entre les positions (Méthode 2)

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur la première position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le z est sauvegardé, le zoom aussi si *Save Optical Zoom* est coché
- Faire de même pour les autres positions.
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Aller dans l'onglet « Z-series »
- Choisir le z-focus ou le z-piezo dans Device (cf. Z-series)
- Passer en LIVE
- Déplacement en z pour définir le premier plan. Par défaut, le pas en z pour le déplacement est de 5µm par 5µm
- Valider la position haute en cliquant sur ce bouton 
- Déplacement en z pour définir le dernier plan
- Valider la position basse en cliquant sur ce bouton 
- Choisir les paramètres d'acquisition en z soit en choisissant un z-step ou un nombre de plans à réaliser. Le z-step respectant l'échantillonnage est de 0.5µm.
- Régler les paramètres d'acquisition de l'image
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Cliquer sur *Z-series*
- Sélectionner un z enregistré ou le z défini dans l'onglet Z-series nommé « Current »
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Si mode z-piezo : cocher la case dans la colonne *Max Speed*
- Cocher « Run at all XY Stage Positions »
- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde

- Cliquer sur *Start T-series*

### g. Multipositions 3D : z variable entre les positions

- Aller dans l'onglet « XY Stage »
- Se déplacer sur la première position d'intérêt en LIVE
- Régler les paramètres d'acquisition
- Cliquer sur *Add Position* : le focus et le zoom sont sauvés si *Save Optical Zoom* est coché
- Faire de même pour les autres positions.
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Aller dans l'onglet « Z-series »
- Choisir le z-focus ou le z-piezo dans Device (cf. Z-series)
- Passer en LIVE
- Déplacement en z pour définir le premier plan. Par défaut, le pas en z pour le déplacement est de 5µm par 5µm
- Valider la position haute en cliquant sur ce bouton 
- Déplacement en z pour définir le dernier plan
- Valider la position basse en cliquant sur ce bouton 
- Choisir les paramètres d'acquisition en z soit en choisissant un z-step ou un nombre de plans à réaliser. Le z-step respectant l'échantillonnage est de 0.7µm.
- Réaliser un z pour chaque position en les sauvegardant.
- Régler les paramètres d'acquisition de l'image
- Aller ensuite dans l'onglet « T-series »
- Cliquer sur *Stage position*
- Sélectionner une position précédemment enregistrée
- Cliquer sur *Z-series*
- Sélectionner un z enregistré lié à la position d'intérêt
- Définir
  - Soit un nombre de répétition/nombre d'images dans la colonne *#Reps*
  - Soit une durée en secondes dans la colonne *Duration*.
- Si mode z-piezo : cocher la case dans la colonne *Max Speed*

	Cycle Type	#Reps	Period [s]	Max Speed	Duration [s]	Resource Selection	Photo-activation	BOT	External Trigger	Triggers Before Starting	Synchronize with Voltage Recording	Synchronize with Mark Points	Synchronize with Voltage Output
	XY	---	---	---	---	XY-1 (X=2)	None	---	---	---	---	---	---
	Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None
	XY	---	---	---	---	XY-2 (X=2)	None	---	---	---	---	---	---
	Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None

- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Start T-series*

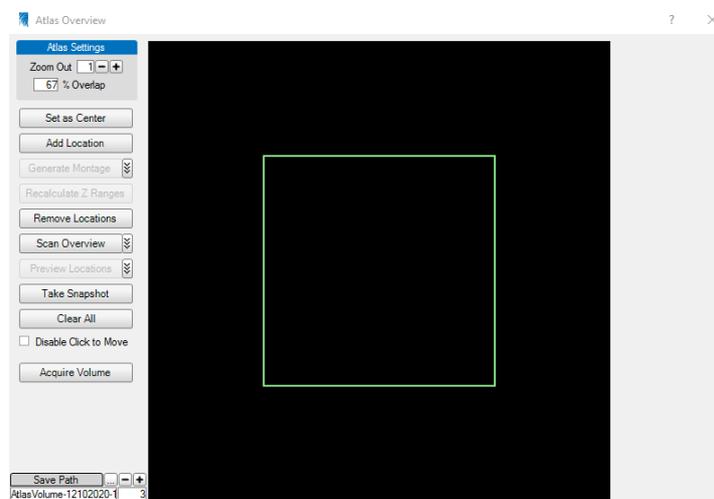
# Atlas Imaging

## a. Preview de l'échantillon

- Cliquer sur « Applications »
- Cliquer sur « Atlas imaging » : deux fenêtres s'ouvrent
  - Atlas Overview : pour les acquisitions de mosaïques 2D
  - Atlas Image : pour les acquisitions de mosaïques 3D
- Se déplacer sur l'échantillon jusqu'à une position plutôt centrale en LIVE
- Ajuster le z
- Stop LIVE
- Cliquer sur *Set as center*
- Ajuster le *Zoom out* : suivant la taille de preview voulue (Cf. Atlas imaging)
- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Scan Overview*

## b. Mosaïques 2D

- Cliquer sur « Applications »
- Cliquer sur « Atlas imaging » : deux fenêtres s'ouvrent
  - Atlas Overview : pour les acquisitions de mosaïques 2D
  - Atlas Image : pour les acquisitions de mosaïques 3D
- Se déplacer sur l'échantillon jusqu'à une position, ajuster le z et cliquer sur *Add location*
- Répéter cette étape jusqu'à avoir les positions d'intérêt, par exemple le contour de l'échantillon
- Mettre le pourcentage d'overlay à 15%
- Cliquer ensuite sur *Generate Montage*
- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Acquire Volume*



### c. Mosaïques 3D : Z identique

- Cliquer sur « Applications »
- Cliquer sur » Atlas imaging » : deux fenêtres s'ouvrent
  - Atlas Overview : pour les acquisitions de mosaïques 2D
  - Atlas Image : pour les acquisitions de mosaïques 3D
- Se déplacer sur l'échantillon jusqu'à une position
- Ajuster le z jusqu'à la position haute
- Cliquer sur *Set Z Top*
- Ajuster le z jusqu'à la position basse
- Cliquer sur *Set Z Bottom*
- Choisir le pas en z dans *Step size* en haut à droite, par défaut : 0.5µm
- Cliquer sur *Add location* pour ajouter d'autres positions : en avoir au moins 2.
- Mettre le pourcentage d'overlay à 15%
- Cliquer ensuite sur *Generate Montage*
- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Acquire Volume*

### d. Mosaïques 3D : Z variable

- Cliquer sur « Applications »
- Cliquer sur » Atlas imaging » : deux fenêtres s'ouvrent
  - Atlas Overview : pour les acquisitions de mosaïques 2D
  - Atlas Image : pour les acquisitions de mosaïques 3D
- Se déplacer sur l'échantillon jusqu'à une position
- Ajuster le z jusqu'à la position haute
- Cliquer sur *Set Z Top*
- Ajuster le z jusqu'à la position basse
- Cliquer sur *Set Z Bottom*
- Choisir le pas en z dans *Step size* en haut à droite, par défaut : 0.5µm
- Cliquer sur *Add location* pour ajouter la position
- ???
- Mettre le pourcentage d'overlay à 15%
- Cliquer ensuite sur *Generate Montage*
- Renommer le fichier
- Vérifier l'emplacement de la sauvegarde
- Cliquer sur *Acquire Volume*

# Optogénétique

## Sauvegarde projets

- Cliquer sur les trois petits points à côté des noms de fichiers
- Aller dans le disque E:Raw Data
- Choisir le dossier avec son nom ou le créer s'il n'y est pas
- Créer si nécessaire un dossier supplémentaire pour sauver les acquisitions du jour
- Valider le dossier d'enregistrement

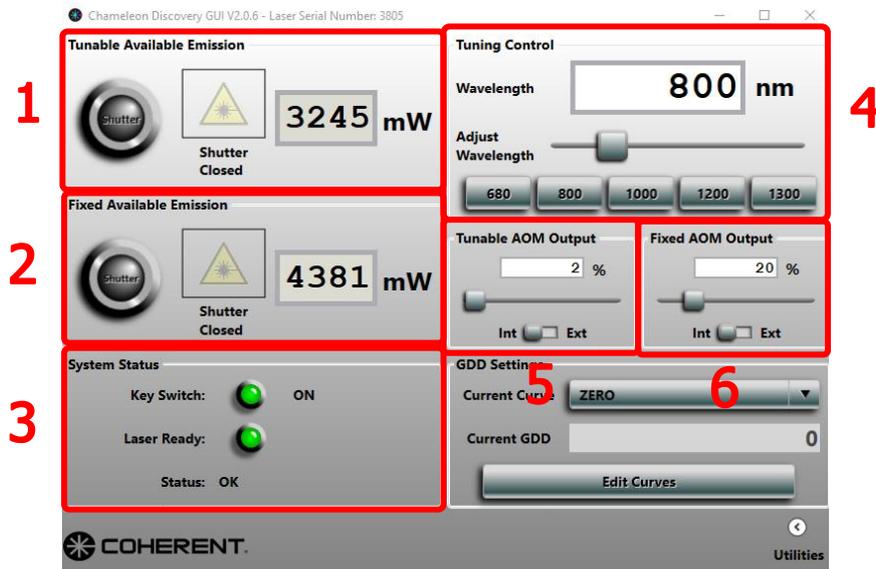
*Pensez à les récupérer rapidement car le disque arrive vite à saturation*

*Aucun transfert n'est effectué sur le serveur data\_plat !*



## Annexes

### e. Présentation du logiciel du contrôle des lasers « Chameleon Discovery GUI »



- 1- Panneau de **contrôle du shutter du laser accordable** (680 – 1340) et visualisation de la puissance en sortie de cavité
  - Shutter fermé : icône grisé
  - Shutter ouvert : icône coloré
- 2- Panneau de **contrôle du shutter du laser fixe** (1040) et visualisation de la puissance en sortie de cavité
  - Shutter fermé : icône grisé
  - Shutter ouvert : icône coloré
- 3- Panneau de visualisation du **statut du laser** :
  - Position de la clé :
    - Si elle est sur « Laser Enable » : diode verte et ON
    - Si elle est sur « Stand-by » : diode éteinte
  - Laser prêt :
    - S'il n'est pas prêt car il est en train de chauffer : diode orange clignotante
    - S'il est prêt : diode verte
- 4- Panneau de **contrôle de la longueur d'onde** :
  - Manuellement en tapant la valeur dans le carré blanc
  - En ajustant avec le curseur
  - En cliquant sur les valeurs pré-rentrées
- 5- Panneau de **contrôle de la puissance du laser accordable : doit être sur EXT**
  - Manuellement en tapant la valeur dans le carré blanc
  - En ajustant avec le curseur
- 6- Panneau de **contrôle de la puissance de laser fixe : doit être sur EXT**
  - Manuellement en tapant la valeur dans le carré blanc
  - En ajustant avec le curseur



## a. XY Stage

Ajouter la position  
Supprimer la position sélectionnée

Supprimer toutes les positions

Se rendre à la position

	X [µm]	Y [µm]	Z [µm]	Optical Zoom	Focus Lock Offset
1	0.00	-0.16	0.00, -46.74	---	---

## b. T-Series

L'onglet T-Series donne aux utilisateurs la possibilité de générer une série d'images et de données en utilisant différents paramètres, régions d'intérêt (ROI), positions XY, Z-Series, photo-activation, triggers externes, etc. La variété des options permet à l'utilisateur d'optimiser un ensemble complexe de paramètres expérimentaux pour l'acquisition de données.

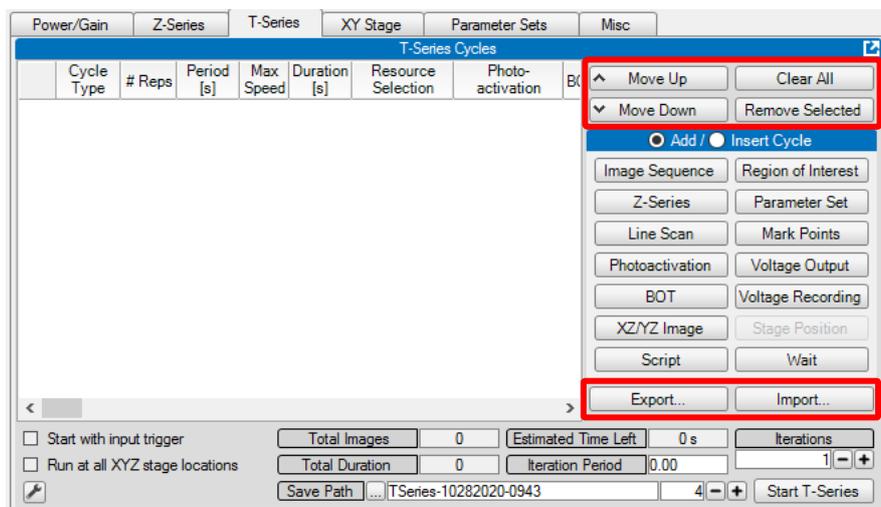
Colonnes de la grille du T-series :

- **Cycle type** : décrit la fonction qui à exécuter (Image Sequence par exemple)
- **#Reps** : nombre de répétition de la ligne avant de passer à la suivante
- **Period [s]** : est le temps qui s'écoule entre le début des répétitions successives. Ce temps n'inclut pas les mouvements moteurs dans une série Z.
- **Max speed** : permet d'acquérir les images en continu. Pour un z, c'est uniquement lorsque le z-piezo est mis en place dans Device.
- **Duration** : est le temps minimum nécessaire pour acquérir la ou les images de la ligne, tel que calculé par Prairie View. C'est dans cette case qu'on définit si on souhaite une répétition de « ... » secondes de la ligne.
- **Resource selection** : permet de sélectionner la condition actuellement dans le logiciel ou une condition enregistrée.
- **Photoactivation** : permet de faire une photoactivation comme définie dans l'onglet photoactivation
- **Brightness Over Time (BOT)** : permet d'enregistrer l'intensité dans le temps de l'image ou zone(s) définie(s) conjointement au type de fonction.
- **External Trigger** : permet à l'utilisateur de déclencher des acquisitions au cours d'un cycle.
- **Triggers before starting** : Si le nombre dans la colonne Triggers Before Starting est 0, les expériences insérées commenceront au début du cycle. En entrant une valeur non nulle dans la colonne Triggers Before Starting, l'utilisateur peut déterminer un nombre de frames à compter avant de commencer la ligne sur lequel c'est mis. Par exemple, l'utilisateur peut créer une ligne Image Sequence avec 100 répétitions dans #Reps, fixer le nombre de triggers before starting à 10, et synchroniser avec une expérience Mark Points. Cela permet à l'utilisateur de collecter 10 images comme base de référence avant de commencer l'expérience des Mark Points puis de faire 100 images.
- **Synchronize with voltage recording / Synchronize with mark points / Synchronize with voltage output** : permet de synchroniser les expériences définies dans les onglets respectifs en même temps que la fonction qui sera effectuée.

T-Series Cycles													
Cycle Type	# Reps	Period [s]	Max Speed	Duration [s]	Resource Selection	Photo-activation	BOT	External Trigger	Triggers Before Starting	Synchronize with Voltage Recording	Synchronize with Mark Points	Synchronize with Voltage Output	
Images	5	0.60582	<input type="checkbox"/>	3.02910	---	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None	
Z-Series	1	1.21164	---	1.21164	Current	None	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None	
PA	1	0.12506	<input type="checkbox"/>	0.12506	---	Current	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None	
BOT	50	0.60582	<input type="checkbox"/>	30.2910	---	None	<input checked="" type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	None	None	
XZ/YZ	1	0.00118	<input type="checkbox"/>	0.00118	Current	---	<input type="checkbox"/>	No Trigger	0	None	---	None	
ROI	---	---	---	---	Region 1	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---	
Paramet	---	---	---	---	920_Res_2	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---	
Script	---	---	---	---	None:SetSt	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---	
Wait	---	30	---	30	---	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---	
Mark	---	---	---	N/A	Current	None	<input type="checkbox"/>	---	---	None	---	None	
V Out	---	---	---	499.997	Current	None	<input type="checkbox"/>	---	---	None	None	---	
V Rec	---	---	---	0.06	Current	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	None	None	
XY	---	---	---	---	XY-1 (X=2)	None	<input type="checkbox"/>	---	---	---	---	---	

Boutons sur le côté droit :

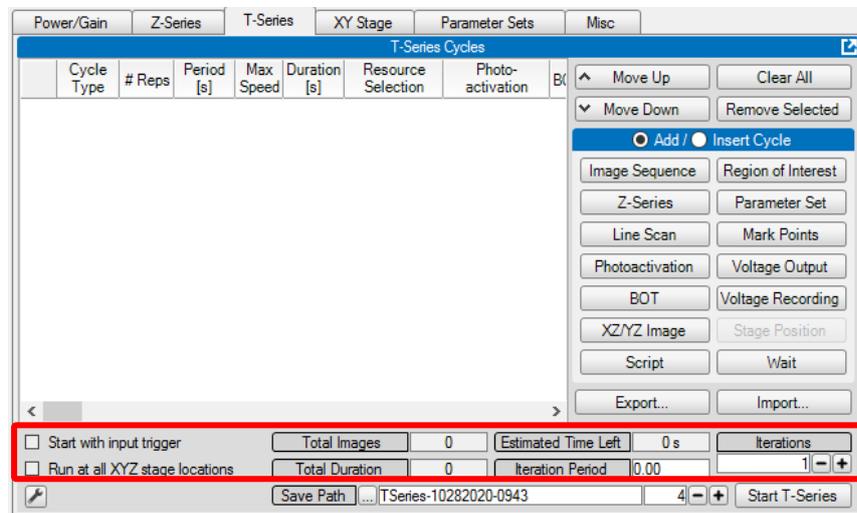
- **Move up** : permet de déplacer la ligne sélectionnée vers le bas dans la grille pour permettre de réorganiser une expérience sans avoir à supprimer et recréer des lignes
- **Move down** : permet de déplacer la ligne sélectionnée vers le haut dans la grille pour permettre de réorganiser une expérience sans avoir à supprimer et recréer des lignes
- **Clear all** : permet de supprimer toutes les lignes
- **Remove selected** : permet de supprimer uniquement la ligne sélectionnée
- **Export** : permet d'enregistrer un fichier d'environnement du T-series afin de pouvoir le réimporter ultérieurement
- **Import** : permet d'ouvrir une boîte de dialogue de chargement de fichier dans laquelle un fichier d'environnement peut être sélectionné, l'ouverture du fichier permet de charger uniquement la partie du Tseries du fichier d'environnement



Boutons en dessous de la grille du T-series :

- **Start with input trigger** : permet de démarrer la série T avec un déclencheur externe au lieu de démarrer immédiatement après avoir appuyé sur le bouton Start
- **Run at all XYZ stage locations** : permet d'exécuter l'ensemble des lignes du T-series à toutes les positions enregistrées dans l'onglet « XY stage » au lieu de devoir ajouter des Zseries et dans des Images Sequences à chaque ligne *Stage Position*.
- Le **bouton en forme de clé à molette** ouvre la boîte de dialogue des préférences de la série T qui offre un certain nombre d'options supplémentaires pour modifier la façon dont une série T est exécutée.
- **Total images** : affiche le nombre total d'images dans la série T actuelle.
- **Estimated Time Left** : est conçu pour inclure le temps que le système ne scanne pas. Cette valeur s'actualisera au cours de l'expérience à mesure que le système obtiendra plus d'informations sur la synchronisation inter-cycle et inter-image.
- **Iterations** : nombre de répétitions du T-series tel qu'il est défini.
- **Iteration period** : temps en secondes entre deux itérations consécutives

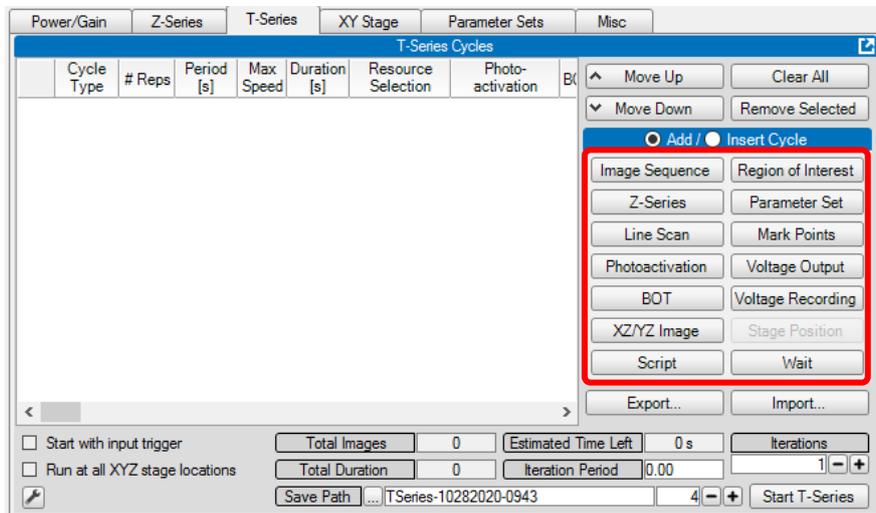
- **Total Duration** : est le temps total de balayage de toutes les lignes définies dans le T-series. C'est le temps qu'on regarde pour connaître approximativement la durée totale de l'expérience. Les expériences de Mark Points, Voltage Recording, and Voltage Output ne sont pas compris dans le temps indiqué, bien qu'ils puissent influencer la durée de l'expérience. Les temps de mouvement du moteur ne sont pas non plus inclus.



Boutons sur le côté droit :

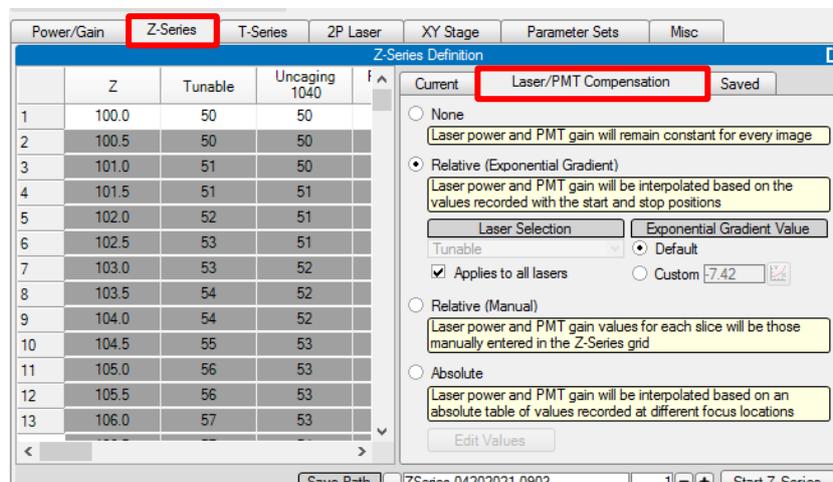
- **Image Sequence** : Permet l'acquisition d'une simple image 2D incluant la ROI, le moyennage et les paramètres actuels.
- **Z series** : Permet l'acquisition d'une pile d'images en z en sélectionnant le z défini dans l'onglet *Z-series* ou un z enregistré.
- **Photoactivation ou PA** : Applique un masque de photoactivation préalablement défini à une seule image 2D. Il faut sélectionner le masque souhaité dans le menu déroulant de la colonne Photoactivation.
- **Bot** : Enregistre l'intensité dans le temps suivant les motifs et canaux définis.
- **Stage Position** : Permet à la platine de se positionner à une position en la sélectionnant dans la colonne Sélection des ressources. Elle(s) doit ou doivent être préalablement enregistrées dans l'onglet XY Stage. Doit être suivi par une acquisition.
- **Region of Interest** : S'appliquera à toutes les lignes suivantes. Sélectionnez la ROI précédemment enregistrée dans la liste déroulante de sélection des ressources. Doit être suivi par une acquisition.
- **Parameter set** : S'appliquera à toutes les lignes suivantes. Sélectionnez l'ensemble de paramètres défini précédemment dans le menu déroulant de sélection des ressources. Doit être suivi par une acquisition.
- **Wait** : Permet à l'utilisateur de spécifier un délai avant la prochaine ligne. Entrez le nombre de secondes à attendre dans la colonne Période. S'il est en dernier, il ne se fera pas.
- **Mark point** : Insère une ligne qui exécute une expérience définie dans le dialogue Mark Point. Choisissez celle d'intérêt dans la liste déroulante de la colonne Sélection des ressources.
- **Voltage Output** : Insère une ligne qui exécute une expérience définie dans la boîte de dialogue Voltage Output. Choisissez celle actuellement définie ou une enregistrée dans la liste déroulante de la colonne Sélection des ressources.

- **Voltage recording** : Insère une ligne qui exécute une expérience définie dans la boîte de dialogue Voltage Output. Choisissez celle actuellement définie ou une enregistrée dans la liste déroulante de la colonne Sélection des ressources.
- **XZ/XY Stage** : Effectue un balayage XZ/YZ. Il faut sélectionner le balayage XZ/YZ actuel ou celui enregistré dans la colonne Sélection des ressources.



## c. Compensation laser en z

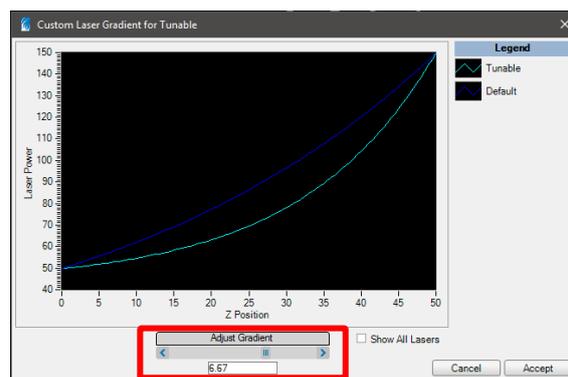
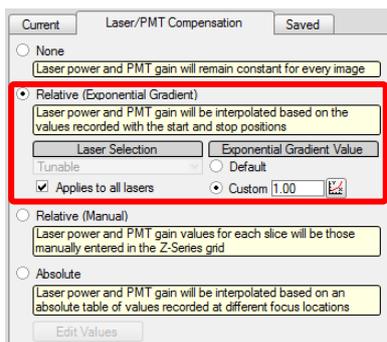
Pour ajouter une compensation laser à un z stack, il faut aller dans l'onglet Zseries, puis le sous onglet *Laser Compensation*.



### ➤ Compensation relative : gradient exponentiel

La compensation relative du laser utilise un gradient exponentiel pour augmenter ou diminuer la puissance du laser en fonction du z stack.

Le gradient de compensation peut être appliqué à l'ensemble des lasers (accordable et fixe), ou par laser. Pour que la compensation relative soit appliquée à tous les lasers, il faut cocher « Applies to all lasers », sinon la décocher et sélectionner le(s) laser(s) d'intérêt(s). Par contre, il est important de noter que les gains des PMTs seront incrémentés de manière linéaire.



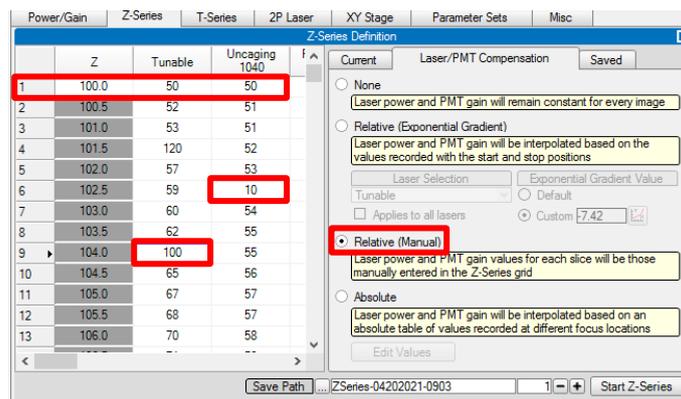
Il est également possible de modifier la valeur du gradient personnalisé pour gérer la vitesse à laquelle la puissance augmente à mesure que la profondeur de l'échantillon augmente. Pour afficher le graphique de la puissance du laser en fonction de la profondeur tout en configurant la valeur du gradient, cliquez sur le bouton graphique à côté de la zone de texte « Custom ». Mais en utilisant une valeur de gradient personnalisée à 0, la puissance variera de manière linéaire. Une valeur de gradient positive augmentera tardivement la puissance par rapport à la profondeur. À l'inverse, une valeur négative augmentera rapidement la puissance par rapport à la profondeur.

Ces méthodes d'interpolation utilisent les puissances laser et les gains des PMT enregistrés avec les positions de départ et de fin (qui peuvent être modifiées en tapant de nouvelles valeurs la première ou dernière ligne du tableau).

➤ **Compensation relative : manuelle**

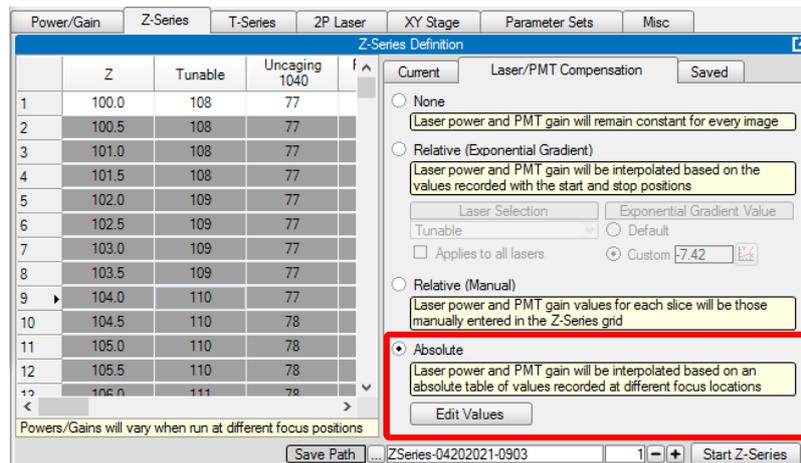
La compensation manuelle conserve les puissances/gains déjà présents dans la table, mais permet de modifier à la main chaque cellule individuellement sans interpoler entre ces valeurs.

Le fait de passer d'un mode de compensation à l'autre efface toutes les modifications apportées en mode manuel.



➤ **Compensation absolue**

La compensation absolue interpole, ou extrapole, les puissances laser et les gains PMT de manière linéaire sur la base d'un tableau de valeurs.



Le tableau de compensation absolue est accessible en cliquant sur le bouton « Edit Values ». Il permet de contrôler n'importe quel(s) laser(s) et/ou PMTs en cochant ceux d'intérêt. Ceux qui ne sont pas sélectionnés conserveront leurs valeurs actuelles et ne varieront pas au cours de l'acquisition.

Pour nettoyer le tableau dans sa totalité, il faut cliquer sur « Clear All ».

Pour ajouter des lignes au tableau, c'est aussi simple que de créer un z stack. Il suffit pour cela de venir à la position haute du z stack, ajuster les paramètres de puissances laser et/ou gain des PMTs. Ensuite, il faut cliquer sur « Add ». Et une ligne est ajoutée dans le tableau incluant les différentes données préalablement sélectionnées y compris la position en z. Il est possible d'ajouter autant de lignes que nécessaire, il n'y a pas de limite.

Pour modifier une ligne, il ne faut pas faire « Update Position » car cela induit une erreur au niveau des positions enregistrées. A la place, il vaut mieux sélectionner la ligne, cliquer sur « Remove Selection ». Ajuster la position en z et/ou les paramètres avant de cliquer sur « Add ». Dans ce cas, l'ancienne ligne a été supprimé et une nouvelle a été ajoutée avec les nouvelles valeurs.

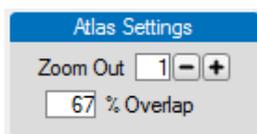
Enfin, pour valider l'ensemble des positions avec les réglages, il faut penser à cliquer sur « Apply ».



## d. Atlas Imaging

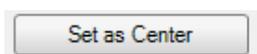
La fenêtre "Atlas Overview" présente une cartographie de la position actuelle par rapport aux positions précédentes. En outre, elle indique l'emplacement des positions précédemment enregistrées pour faire référence au positionnement relatif du champ de vision actuel.

- En cliquant n'importe où dans cette fenêtre Atlas Overview, on déplace la platine de telle sorte que le champ de visualisation se retrouve centré au niveau du curseur de la souris. Si la taille de l'aperçu n'est pas suffisante, le champ de vision est automatiquement

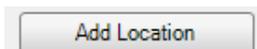


redimensionné pour inclure la nouvelle position. La taille de la fenêtre d'aperçu peut également être définie à l'aide du **Zoom Out** située dans le coin supérieur gauche de la fenêtre. Il permet de régler sa taille manuellement de manière à ce qu'elle corresponde au double du nombre de champs de vision correspondants. Si le chiffre 2 est noté : alors il y aura 2 champs de vision de part et d'autres du champ central.

- **Set as Center** : prendra la position en cours de la platine et la placera au centre de la fenêtre Atlas Overview. Peut être utile pour faire une Scan Overview par la suite.



- **Add Location** : permet d'enregistrer la position actuelle pour une future acquisition. Lorsque vous appuyez sur ce bouton, l'image actuelle est placée de façon permanente dans la fenêtre d'aperçu et est entourée d'un rectangle et d'un numéro. On la retrouve également dans l'onglet « XY Stage ». Utilisez ce bouton pour soit acquérir des positions d'intérêts soit définir le contour de l'échantillon ou la zone d'intérêt.

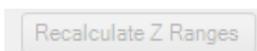


- **Generate Montage** : permet de calculer et d'afficher une grille avec l'ensemble des positions nécessaires pour couvrir la zone définie par les positions enregistrées. Avant d'appuyer sur ce bouton, le % d'overlay doit être de 15%. Lors du calcul de la grille, une interpolation linéaire du Z est prise en compte lorsque que ce dernier est ajusté entre plusieurs positions (en 2D et 3D). Deux types de montage peuvent être générés à l'aide du menu déroulant :

- Raster : les positions sont définies de gauche à droite dans chaque ligne.
- Snake : les positions alternent entre de directions comme un serpent



- **Recalculate Z Ranges** : est utilisé pour recalculer la série Z à n'importe quelle position délimitée par un carré rouge. Cette fonction est généralement utilisée après qu'un montage ait été généré et qu'une modification du z ou des positions ait eu lieu.

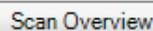


- **Remove Locations** : permet de supprimer un champ du montage. Lorsque vous appuyez sur ce bouton, il apparaît en vert pour indiquer que le mode suppression est actif. À ce stade, tout champ sur lequel on clique sera supprimé. Ce changement sera représenté par l'effacement du rectangle rouge autour de la position. Cette fonctionnalité peut être utilisée pour supprimer les champs qui ne contiennent pas d'informations utiles. Cliquez à nouveau sur le bouton pour quitter le mode de suppression.

- **Scan Overview** : permet d'acquérir l'ensemble de la fenêtre Atlas Overview en utilisant un



motif serpent. Cela permet d'obtenir un aperçu rapide de la zone. À côté du bouton se trouve un petit menu déroulant qui permet de choisir d'enregistrer ou non cette overview. Si l'option

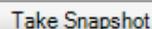


de sauvegarde est cochée, un nouveau dossier sera créé avec le texte "Overview" dans le nom où les images seront sauvegardées.

- **Preview Locations** : sera activée lorsqu'au moins une position sera définie. En cliquant sur ce bouton, les moteurs X et Y se dirigeront vers toutes les positions définies, sans modifier la position Z, et prendront une image. Cette image sera ajoutée de façon permanente à la fenêtre Atlas Overview. Cette méthode est destinée à obtenir une « simple tranche » avant acquisition. Là encore, un bouton plus petit se trouve à côté et contient un menu déroulant permettant de choisir de sauvegarder ou non les données acquises. Si l'option de sauvegarde est cochée, un nouveau dossier sera créé avec le texte "Preview" dans le nom.



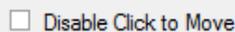
- **Take Snapshot** prend une image dans Atlas Overview des données actuelles et ouvre une fenêtre pour les enregistrer au format tiff. Cette fonction est utile pour avoir une référence.



- **Clear All** supprimera tout ce qui est dans l'Atlas Overview. Ce bouton ne doit être utilisé que pour "recommencer" lors de l'utilisation d'Atlas Imaging.

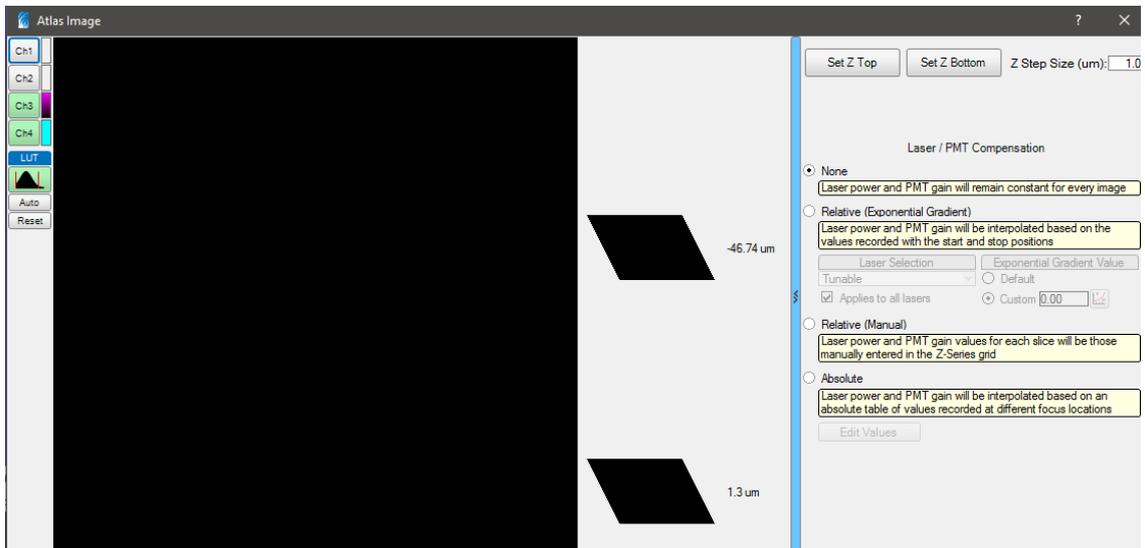
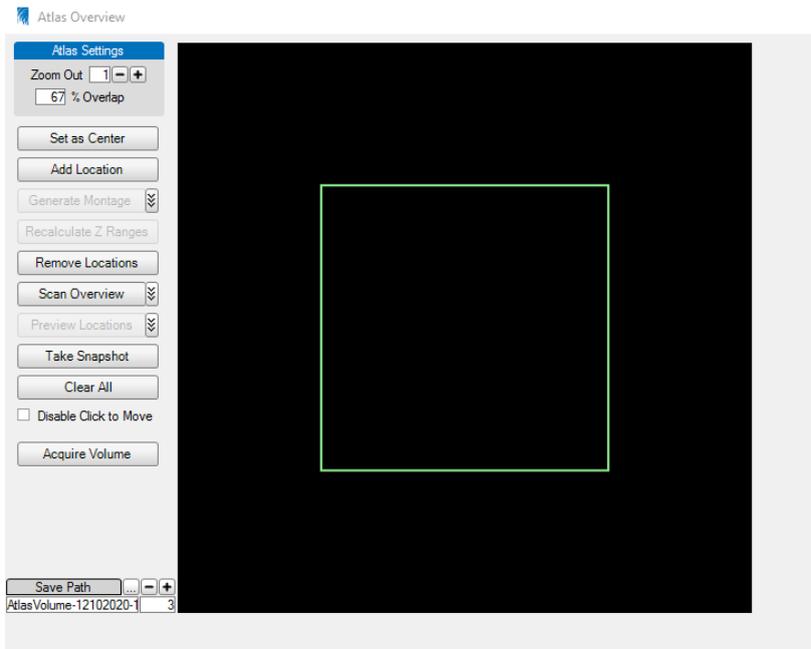


- Cocher le bouton "**Click to Move**" empêche la platine de bouger par un clic.



- **Acquire Volume** est utilisé pour effectuer une acquisition du volume défini. La platine se déplace de position en position en effectuant le Z-series associé à chaque position. Si aucun Z-serie n'a été déterminé, une seule image sera prise à chaque position. Les données résultantes seront enregistrées dans le chemin de sauvegarde actuel sous le répertoire Atlas Volume.

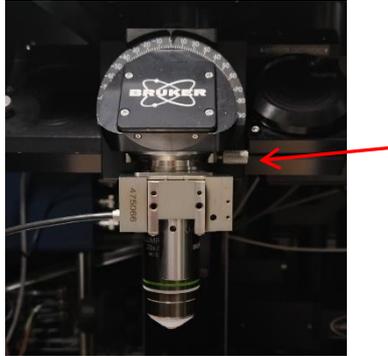




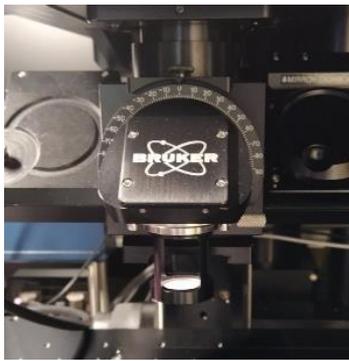
## e. Alignement des lasers

Il faut que la procédure d'allumage du système ait été préalablement réalisée avant de faire l'alignement. Pensez également à mettre les lunettes de protection.

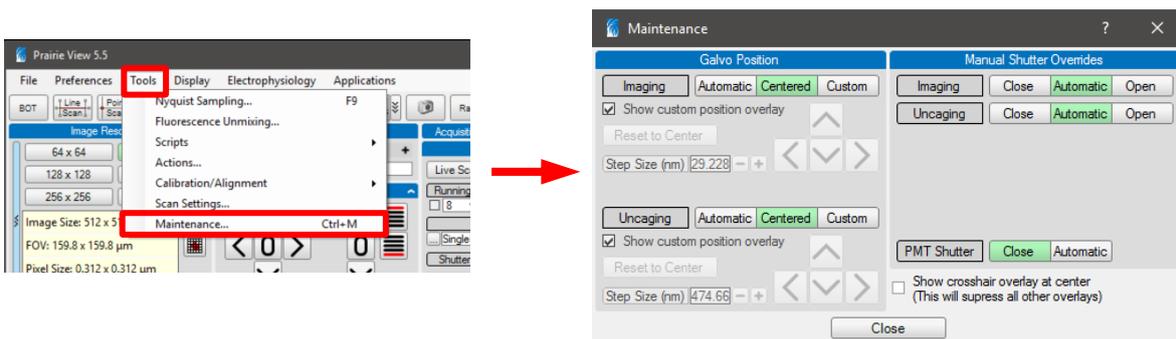
- Retirer délicatement l'objectif et son module piezo en desserrant la vis.



- Place la grande cible à la place de l'objectif

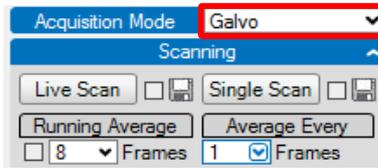


- Dans Prairie, aller dans « Tools » puis « Maintenance » et une nouvelle petite fenêtre s'ouvre

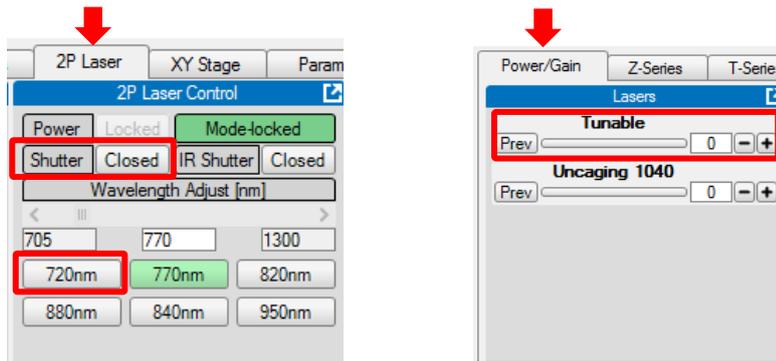


## 1. Laser accordable : galvo

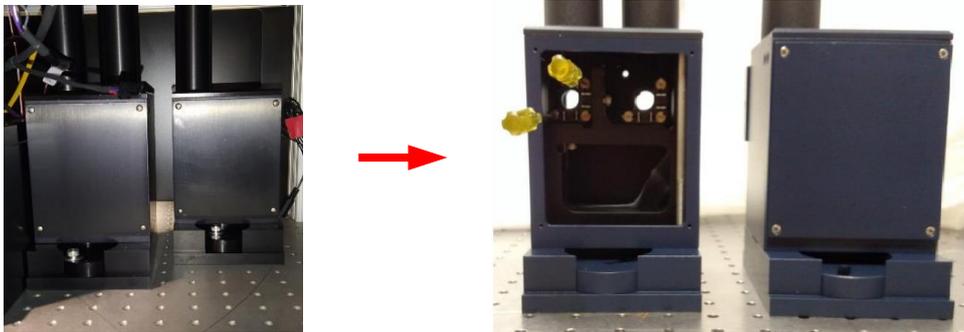
- Choisir le mode « Galvo » dans Prairie, en haut à droite



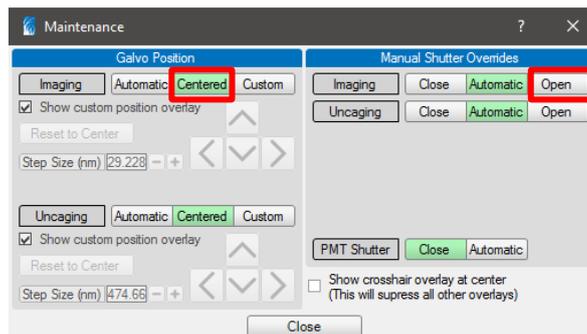
- Ajuster la longueur d'onde à 720nm
- Ouvrir le shutter de la cavité laser dans l'onglet *2P Laser* en cliquant sur « Open »
- Mettre la puissance du laser accordable à 20 dans l'onglet *Power/Gain*



- En bas à droite du microscope, se trouve deux mini tourelles. Dévissez uniquement celle de gauche.



- Dans la fenêtre maintenance,
  - Dans l'onglet *Galvo Position* : cliquer sur « Centered » au niveau de Imaging
  - Dans l'onglet *Manual Shutter Overrides* : cliquer sur « Open » au niveau de Imaging



- Regarder où le point lumineux apparaît sur la mire. Si besoin, augmentez la puissance du laser progressivement.



Au centre : super



Dans le cercle intermédiaire : moyen



Dans le cercle extérieur : pas bon du tout

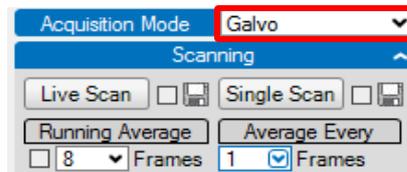
- Pour ajuster la position du laser et la remettre au centre, faites pivoter doucement l'une des deux vis. La position bouge en diagonale dans l'un ou l'autre centre. ATTENTION NE JAMAIS TOUCHER A LA VIS CENTRALE.



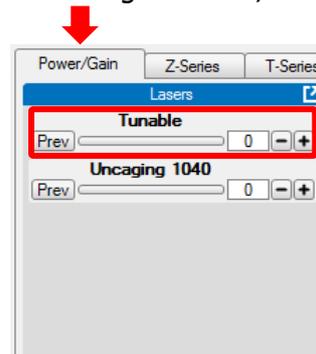
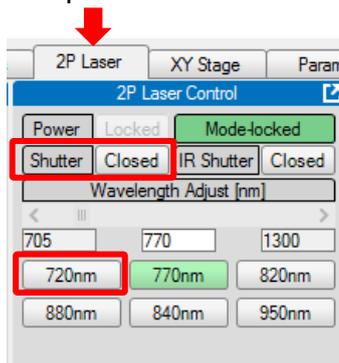
- Une fois correctement centrée :
  - Dans la fenêtre maintenance, onglet *Manual Shutter Overrides* : cliquer sur « Automatic » au niveau de Imaging
  - Mettre la puissance du laser à 0
  - Fermer le shutter du laser dans l'onglet 2P Laser
  - Refermer la trappe de la mini tourelle
  - Retirer la mire d'alignement
  - Remettre l'objectif en place

## 2. Laser accordable : résonnant

- Choisir le mode résonnant dans Prairie, en haut à droite



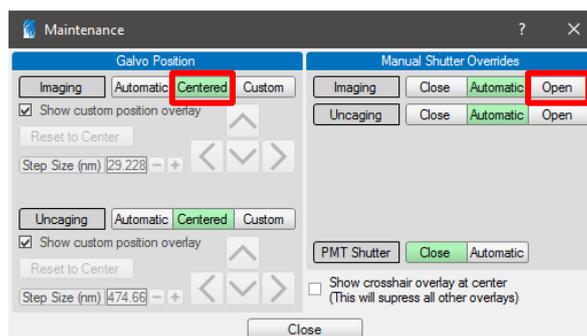
- Ajuster la longueur d'onde à 720nm
- Ouvrir le shutter de la cavité laser dans l'onglet *2P Laser* en cliquant sur « Open »
- Mettre la puissance du laser accordable à 20 dans l'onglet *Power/Gain*



- En bas à droite du microscope, se trouve deux mini tourelles. Dévissez uniquement celle de droite.



- Dans la fenêtre maintenance,
  - Dans l'onglet *Galvo Position* : cliquer sur « Centered » au niveau de Imaging
  - Dans l'onglet *Manual Shutter Overrides* : cliquer sur « Open » au niveau de Imaging



- Regarder où le point lumineux apparaît sur la mire. Si besoin, augmentez la puissance du laser progressivement.



Au centre : super



Dans le cercle intermédiaire : moyen



Dans le cercle extérieur : pas bon du tout

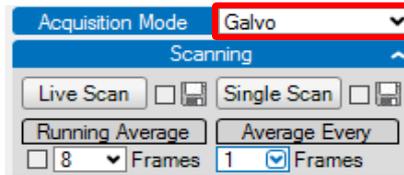
- Pour ajuster la position du laser et la remettre au centre, faites pivoter doucement l'une des deux vis. La position bouge en diagonale dans l'un ou l'autre centre. ATTENTION NE JAMAIS TOUCHER A LA VIS CENTRALE.



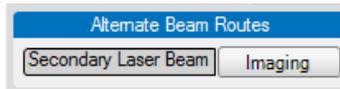
- Une fois correctement centrée :
  - Dans la fenêtre maintenance, onglet *Manual Shutter Overrides* : cliquer sur « Automatic » au niveau de Imaging
  - Mettre la puissance du laser à 0
  - Fermer le shutter du laser dans l'onglet 2P Laser
  - Refermer la trappe de la mini tourelle
  - Retirer la mire d'alignement
  - Remettre l'objectif en place

### 3. Laser fixe 1040 : photoactivation

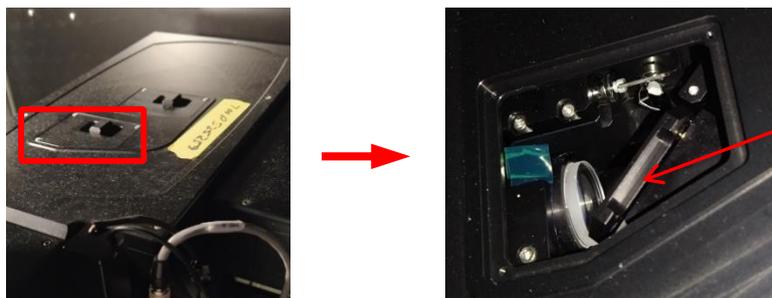
- Choisir le mode « Galvo » dans Prairie, en haut à droite



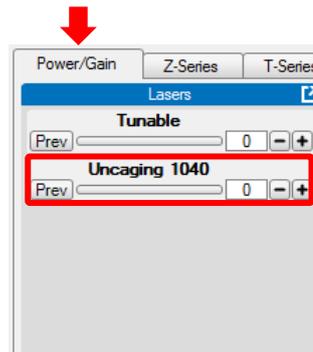
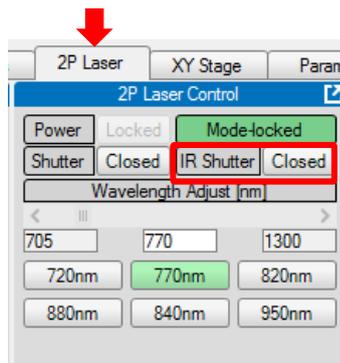
- Dans l'onglet *Power/Gain*, cliquer sur le bouton au niveau de *Secondary Laser Beam* pour mettre le trajet optique du 1040 comme photoactivation et non pas en dual imaging.



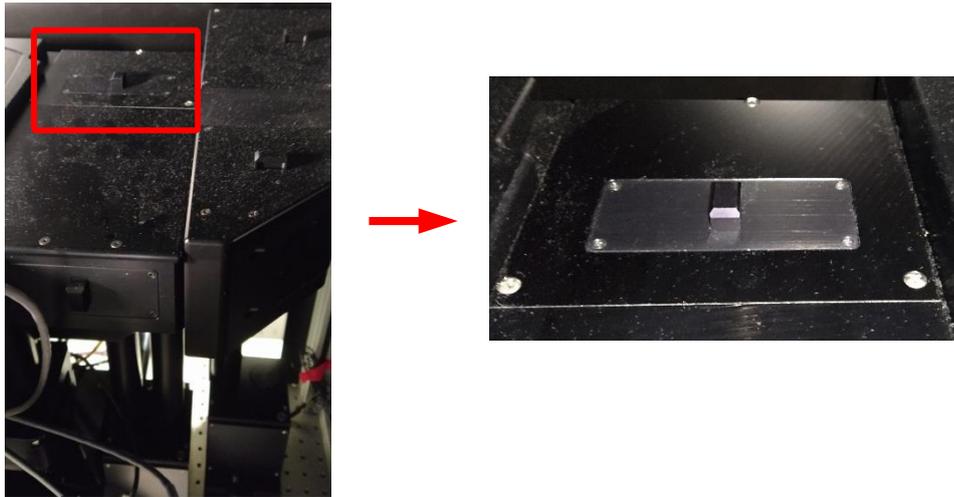
- Au-dessus du microscope, dévissez la petite trappe qui se trouve au plus près de soi avec un petit cruciforme. Mettre la dichroïque 1040 (miroir aimanté) pour que la 1040 puisse passer en mode photoactivation. Tout dépend de la configuration dans laquelle est le microscope.



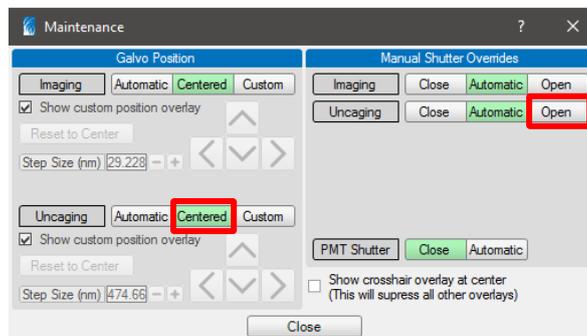
- Ouvrir le shutter de la cavité laser du 1040 dans l'onglet *2P Laser* en cliquant sur « Open »
- Mettre la puissance du laser fixe 1040 à 20 dans l'onglet *Power/Gain*



- En haut du microscope, dévissez la trappe centrale



- Dans la fenêtre maintenance,
  - Dans l'onglet *Galvo Position* : cliquer sur « Centered » au niveau de Uncaging
  - Dans l'onglet *Manual Shutter Overrides* : cliquer sur « Open » au niveau de Uncaging



- Regarder où le point lumineux apparaît sur la mire. Si besoin, augmentez la puissance du laser progressivement.



- Pour ajuster la position du laser et la remettre au centre, faites pivoter doucement l'une des deux vis. La position bouge en diagonale dans l'un ou l'autre centre. ATTENTION NE JAMAIS TOUCHER A LA VIS CENTRALE.

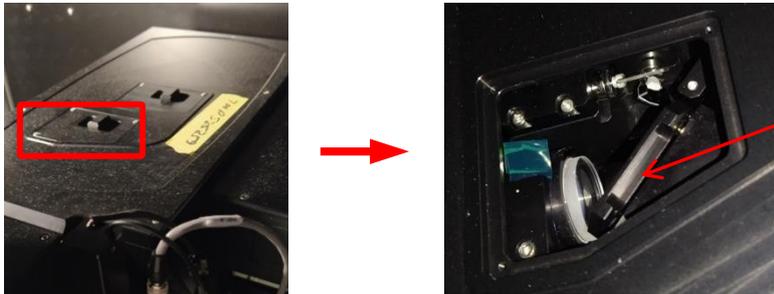


- Une fois correctement centrée :
  - Dans la fenêtre maintenance, onglet *Manual Shutter Overrides* : cliquer sur « Automatic » au niveau de Uncaging
  - Mettre la puissance du laser à 0
  - Fermer le shutter du laser dans l'onglet 2P Laser
  - Refermer la trappe de la mini tourelle
  - Retirer la mire d'alignement
  - Remettre l'objectif en place

## f. Calibration 1040 pour photoactivation

Avant de lancer une expérience de photoactivation, il faut calibrer le laser 1040 pour être certain que là où le laser tapera sera là où l'on veut photoactiver.

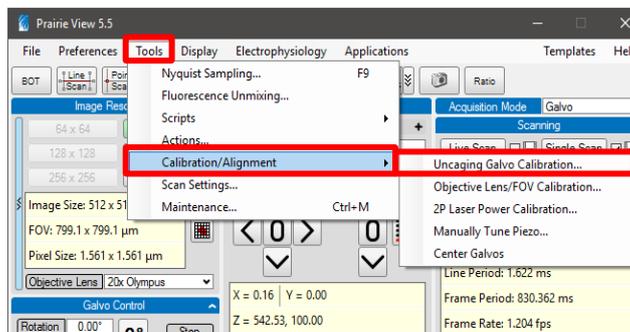
Tout d'abord, il faut mettre le système en configuration de photoactivation. Pour cela, il faut mettre le dichroïque nommé « 1040 » dans la tête et retirer celui servant au dual imaging.



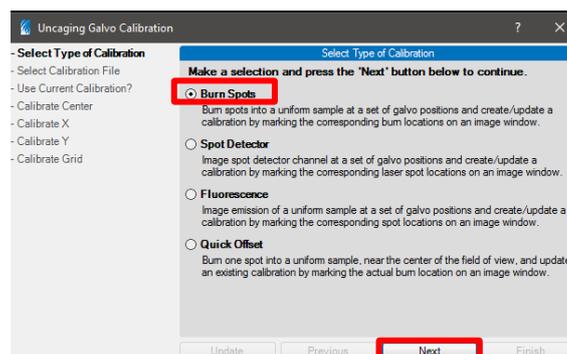
Comme échantillon : utiliser une lame chroma rouge. Faire la mise au point au oculaires en cherchant le plan en z le plus intense. Il faudra diminuer l'intensité de la lampe presque au minimum pour saturer le moins possible et voir le « dit » focus.

Ensuite, dans Prairie, il faut se mettre à 800nm avec le laser accordable pour voir un signal car la 1040 ne servira qu'à photoactiver et non plus à imager. Une puissance entre 20 et 30 pour l'accordable est suffisant. Il faut ensuite ajuster le focus en live en cherchant la position où l'intensité est la plus intense.

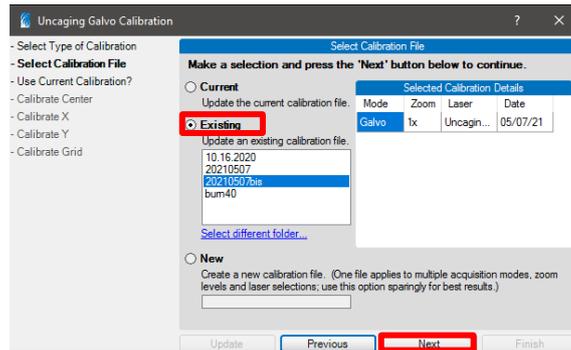
Puis, il faut aller dans *Tools*, puis *Calibration/Alignment* et enfin *Uncaging Galvo Calibration*.



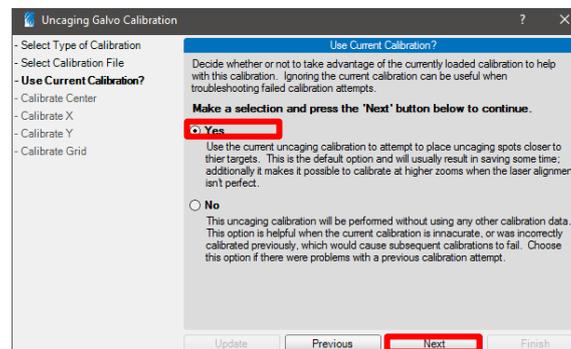
La fenêtre ci-après apparaît. Il faut sélectionner « Burn Spot ».



Puis sélectionner « Existing » et le plus récent fichier à mettre à jour. Cliquer sur « Next ».



Cliquer ensuite sur Yes avant de faire Next. Sauf si la précédente calibration a présenté des problèmes. En sélectionnant « No », cela permet de repartir de zéro.



Pour calibrer, il faut penser à mettre une valeur de puissance laser en bas à gauche de la fenêtre ainsi qu'un temps en ms. En cliquant sur Update (en Live ou pas), cela permet d'observer le burn point et d'augmenter ou réduire les paramètres de puissance et durée. Si le point n'est pas visible au niveau de la croix, alors il faut augmenter la puissance pour commencer et ensuite la durée. Si des bulles sont créées, il faut essayer de diminuer l'une/l'autre pour réduire l'impact.

Une fois le burn point calibré en terme de puissance et durée, il faut ajuster sa position par rapport à la croix. En effet, le burn point doit être au niveau de la croix. Pour modifier la position de la croix, il suffit de déplacer la croix là où le burn point se trouve.

Une fois terminée, cliquer sur Next.

