

Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Mars 2024

Mode d'emploi

Microscope MICA
Leica

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





Scannez-les - Try to scan them



Pour télécharger le
tutoriel sur votre
téléphone ou votre
tablette

To download the tutorial
on your phone / tablet

Pour se rendre sur le
site de réservation



To go on the booking
website

Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Simon Lachambre, Lhorane Lobjois, Sophie Allart

imagerie.infinity@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01



Sommaire - Contents

- 1 Fonctionnement du statif - *How the stand works***
- 2 Allumage du système - *System start-up***
- 5 Présentation du logiciel - *Software presentation***
- 6 Paramétrage de son projet d'acquisition - *Sample definition***
- 10 Réglage des paramètres - *Settings adjustments***
 - 10** Image en colorimétrie - *Histological image*
 - 11** Image en transmission - *Brighfield image*
 - 12** Image en fluorescence - *Fluorescence image*
- 14 Type d'images - *Images types***
 - 14** Image en 2D - *Single 2D image*
 - 14** Pile d'images - *Z-stack images*
 - 15** Mosaïque 2D - *2D tilescan*
 - 18** Mosaïque 3D - *3D tilescan*
- 20 Application d'anciens paramètres - *Load old settings***
- 20 Affichage les résultats - *Results visualisation***
- 21 Traitements d'image - *Image post-processing***
 - 21** Débruitage par Thunder - *Denoising with Thunder*
 - 23** Déconvolution - *Deconvolution*
- 24 Fin de session - *End of session***
- 25 Extinction du système - *System shut-down***





Fonctionnement du statif - *How the stand works*



➤ 3 portes échantillons disponibles - *3 sample holders available*



Mono lame - *Single Slide*



Multi lames - *4 slides holder*



Plaque à puits - *Well plate*

➤ Porte d'accès aux échantillons (uniquement si besoin) - *Sample access door (only if necessary)*



➤ Joystick de déplacement - *Movement joystick*



Vitesse de déplacement XY
- *XY movement speed*



Vitesse de déplacement Z
- *Z movement speed*



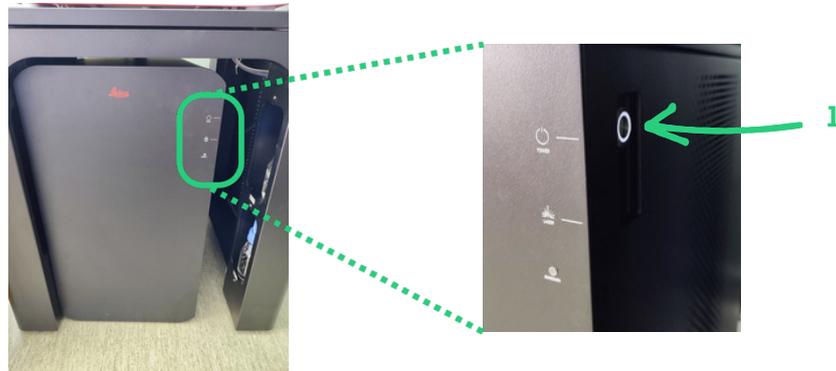
Allumage du système - System start-up



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

- 1.6x ON 0.05 WD 34mm **DRY**
- 10x ON 0.32 WD 11mm **DRY**
- 20x ON 0.75 WD 0.6mm **DRY**
- 63x ON 1.2 WD 0.2mm **WATER (auto-immersion)**

1 Appuyer sur le bouton POWER. La platine s'initialise toute seule.



2 Vérifier qu'il reste de l'eau dans la bouteille du haut



3 Sur le bureau : allumer le logiciel LAS X après quelques minutes.



Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Simon Lachambre, Lhorane Lobjois, Sophie Allart

imagerie.infinity@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01

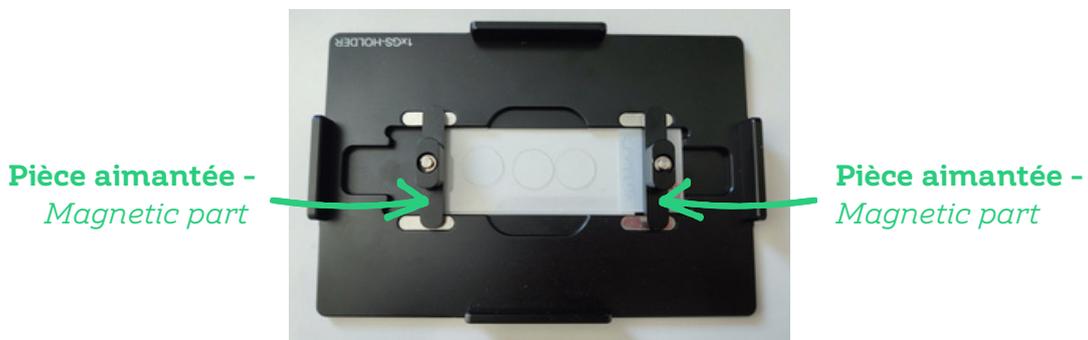
- 4 Appuyer sur le bouton OPEN pour ouvrir la porte du système - *Press the OPEN button to open the system door*



- 5 Soulever délicatement la porte (comme un coffre de voiture!) - *Gently lift the door (like a car boot!)*

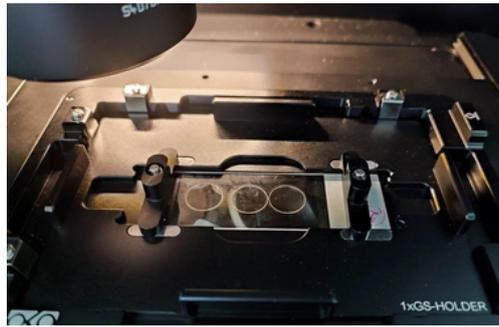


- 6 Positionnez votre échantillon sur le porte échantillon de votre choix (retournez la lame pour que la lamelle soit vers le bas!) - *Place your sample on the sample holder of your choice (turn the slide over so that the coverslip is facing downwards).*



Les pièces aimantées sont dans la boîte verte située sur le bureau. Ces pièces doivent être remise dedans quand elles ne sont pas utilisées !
- *The magnetic pieces are in the green box on the desk. They must be put back in when not in use!*

- 7 Positionnez le porte échantillon sur la platine - *Put the sample holder on the stage*

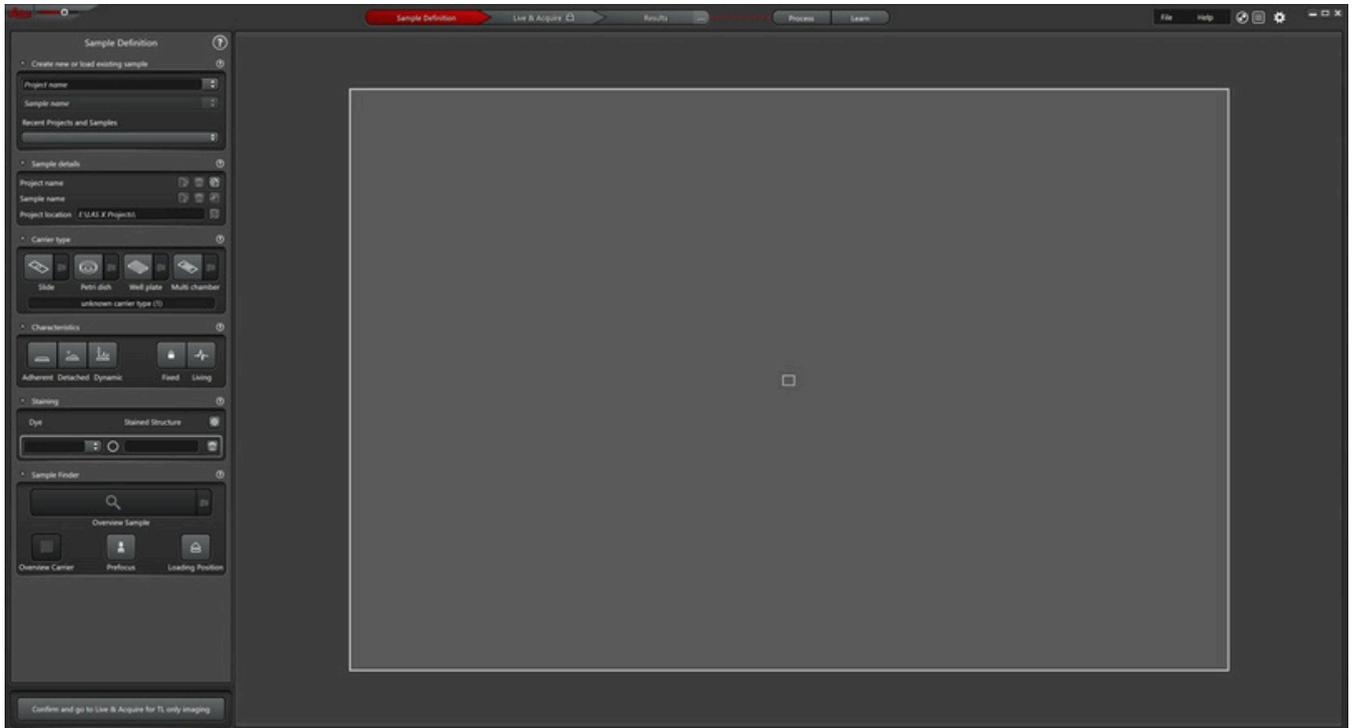


- 8 Fermer le coffre du système **délicatement** (pas comme un coffre de voiture !) - *Close the system box **gently** (not like a car boot!)*





1 2 3 4



Le logiciel se divise en 4 étapes - *The software is divided into 4 steps:*

- 1 Définition de l'échantillon - *Sample definition*
- 2 Réglage des paramètres d'acquisition - *Acquisition settings*
- 3 Affichage des résultats - *Results visualisation*
- 4 Traitements d'image - *Images post processing*



Paramétrage de son projet d'acquisition

- *Set your acquisition project*



Cette première étape consiste à gérer vos projets et les échantillons associés pour structurer et de restaurer facilement les données et les paramètres d'acquisition. - *This first step involves managing your projects and associated samples to structure and easily restore data and acquisition parameters.*

Un projet = 1 dossier d'acquisition = un ou plusieurs échantillons
Un échantillon = 1 configuration / panel de fluorochromes / 1 manip
One project = 1 acquisition file = one or more samples
One sample = 1 configuration / panel of fluorochromes / 1 manipulation

1 Définition du projet - *Project definition* :

- a Nouveau projet : saisissez un nom - *New project: enter a name*
- b Projet existant : soit par le menu déroulant, soit en tapant les premières lettres - *Existing project: either by using the drop-down menu or by typing the first few letters of the project.*

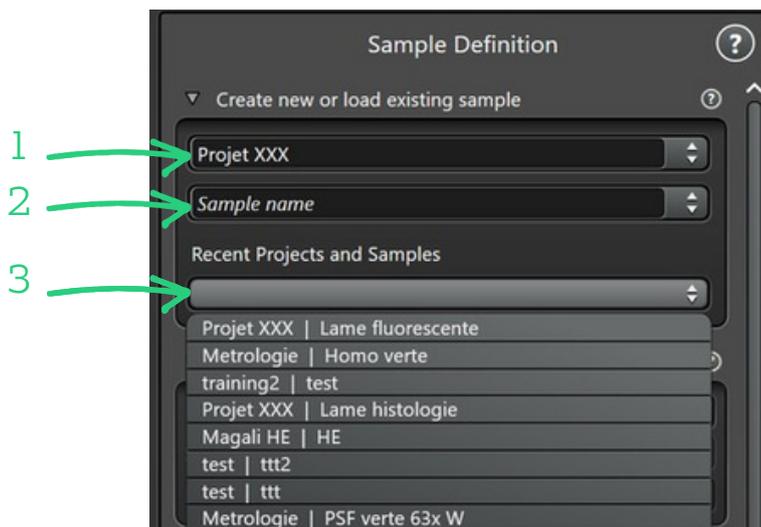
2 Définition de(s) échantillon(s) - *Sample definition* :

- a Nouvel échantillon : "create new" s'affiche et les paramètres d'acquisition sont à définir. Si c'est dans un projet existant, un nouveau dossier "projet xxx - sample" sera créé - *New sample: "create new" is displayed and the acquisition parameters are defined. If it is in an existing project, a new folder "project xxx - sample" will be created.*
- b Echantillon existant : "existing" s'affiche et les paramètres sont rechargés. Les nouvelles images seront ajoutés au projet. - *Existing sample: "existing" is displayed and the parameters are reloaded. The new images will be added to the project.*

Vous pouvez créer autant d'échantillons que vous le souhaitez au sein d'un même projet.
- *You can create as many samples as you like within a single project.*

Le nom final du dossier sera
AAAA_MM_JJ_hh_mm_ss--Projet XXX NomEchantillon

The final name of the file will be
YYYY_MM_DD_hh_mm_ss--Project XXX SampleName



3 Recent Projects and Samples : liste des 10 derniers projets ou échantillons utilisés -
Recent Projects and Samples: list of the last 10 projects or samples used.

4 Détails de l'échantillon - *Sample details*

- a** Project name : rappel du nom du projet défini - *Project name: reminder of the name of the defined project*
- b** Sample name : rappel du nom de l'échantillon défini - *Sample name: reminds you of the name of the defined sample*
- c** Project location : lieu de sauvegarde du projet - *Project location: where the project is stored*

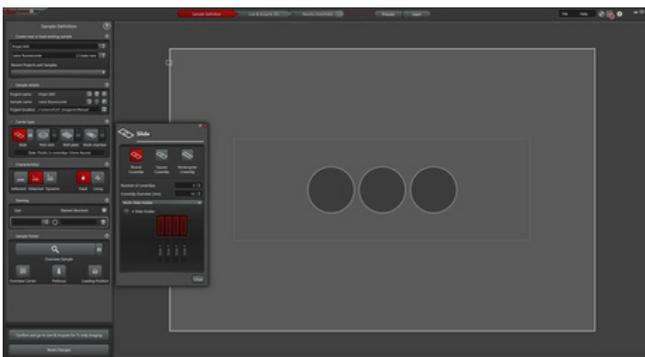


5 Carrier type : Sélectionner le type de support d'échantillon - *Carrier type* : Select the type of sample carrier

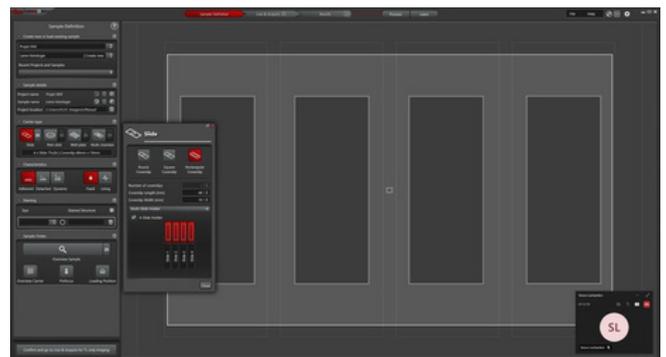


- a** Lame + lamelle : support 1 lame ou 4 lames (dans ce cas, cocher "4-Slides holder") - *Slide + coverslip: 1-slide or 4-slide holder (in this case, tick "4-Slides holder")*
- b** Plaque multipuits : choisir le nombre de puits avant d'ajuster la taille et la séparation des puits - *Multi-well plate: choose the number of wells before adjusting the size and separation of the wells*
- c** Lame avec insert multipuits - *Slide with multi-well insert*

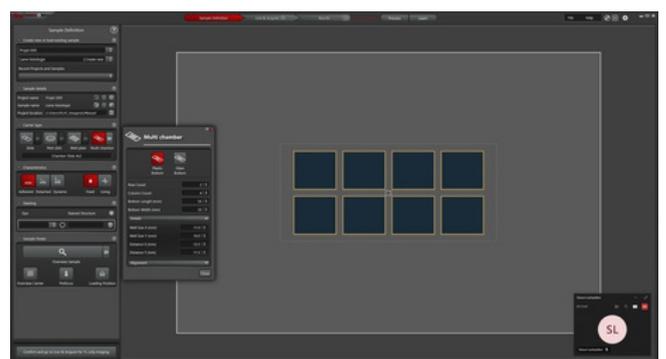
a. Une lame - *Single slide*



a. 4 lames - *4 slides*



b. Plaque multipuits - *Multiwell plate*

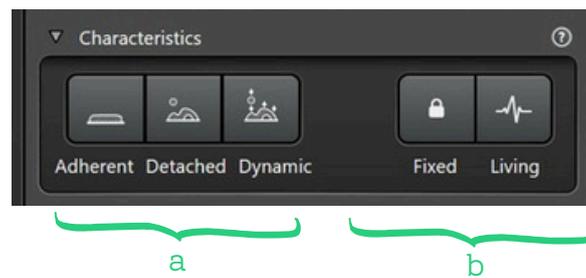


c. Lame avec insert - *Multiwell slide*

6 Charateristics : le type d'échantillon - *Sample type*

- a** Epaisseur de l'échantillon : adherent (=cellules), detached (cells or tissus fins), dynamics (tissus épais) - *Sample thickness: adherent (=cells), detached (thin tissue), dynamics (thick tissue)*

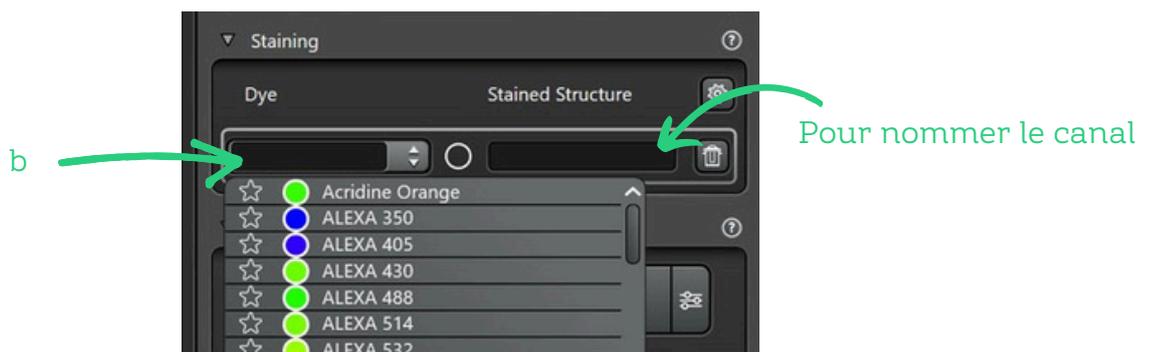
- b Fixé ou vivant - *Fixed or Alive*



7 Marquages - *Staining*

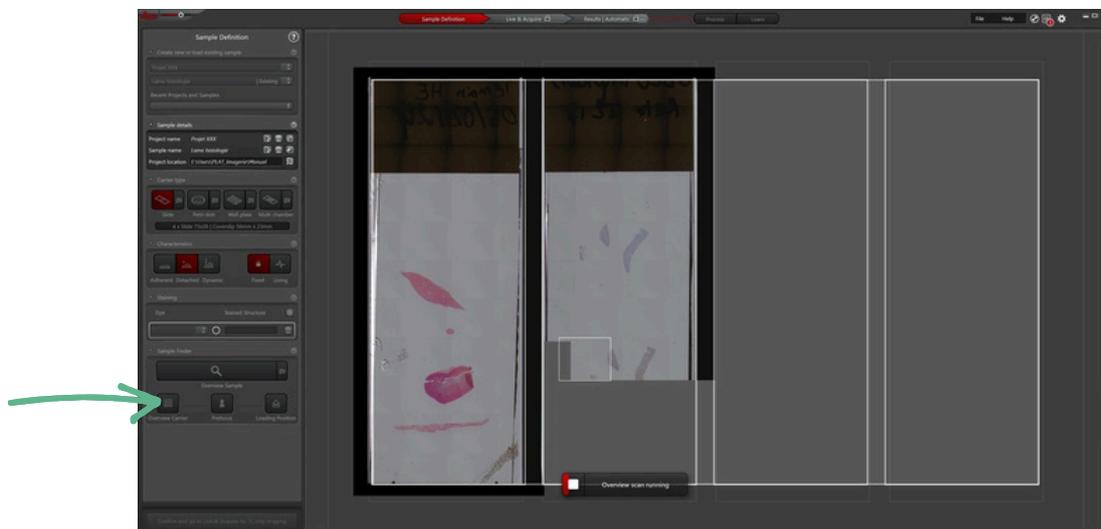
- a Si coloration histologique : laissez vide - *If histological staining: leave blank*
- b Si fluorescence : ajouter jusqu'à 4 marqueurs - *If fluorescence: add up to 4 markers*

Attention, il faut LE marqueur exact que vous avez utilisé et pas celui qui s'en rapproche
 - *Be careful, you need THE exact marker you used and not the one that comes closest to it.*



8 Sample finder : prévisualisation - preview

- a Lame entière : en cliquant sur Overview Carrier (scan au 1.6x en transmission) - *Whole slide: by clicking on Overview Carrier (scan at 1.6x transmission)*



Plateau technique d'imagerie cellulaire d'Infinity-Purpan

Simon Lachambre, Lhorane Lobjois, Sophie Allart

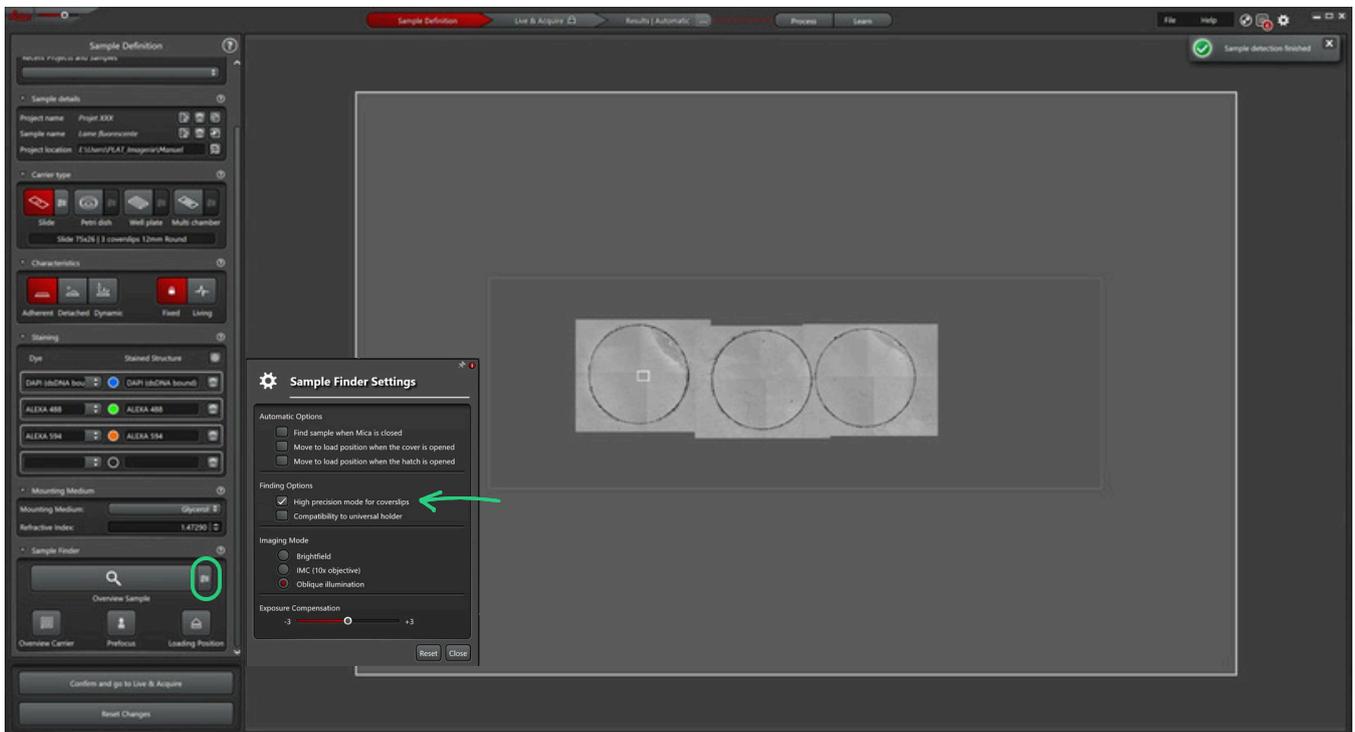
imagerie.infinity@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78 - 05. 31. 54. 79. 01

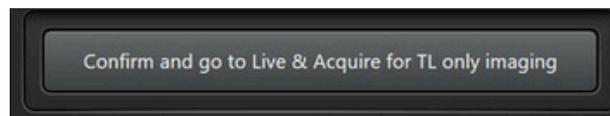
- b** Par lamelle : par réflexion d'un laser infrarouge - *By slide: by reflection of an infrared laser*

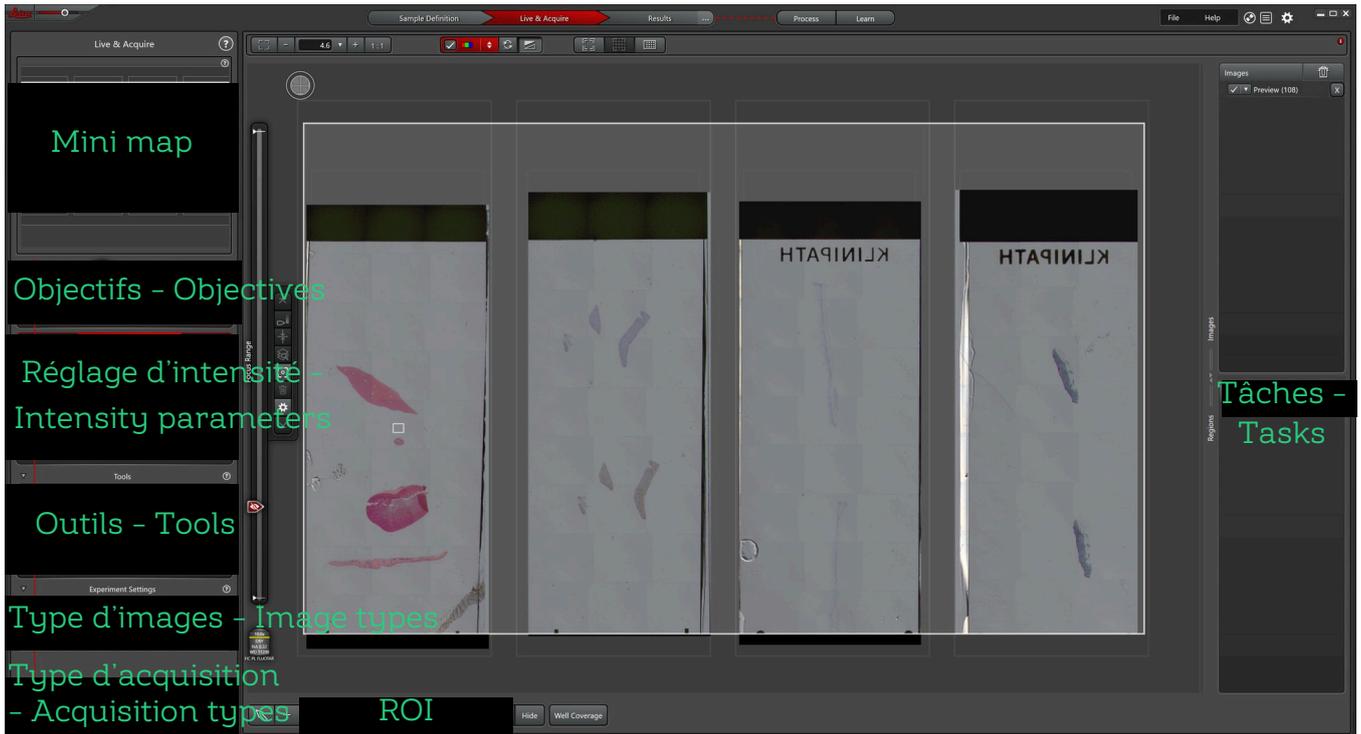
Attention, il faudra avoir indiqué le nombre de lamelles et leur diamètre dans "Carrier Type" (p.7) - Please note that the number of coverslip and their diameter must be indicated in "Carrier Type" (p.7).

- i** Cliquez sur l'icône à droite de "Overview Sample" - *Click on the icon to the right of "Overview Sample"*.
- ii** Cocher "high precision mode for coverslip" - *Tick "high precision mode for coverslip"*
- iii** Pour lancer : cliquer sur Overview sample - *To start : click on Overview sample*



- 9** Valider la prévisualisation en cliquant sur "Confirm and go to Live" - *Confirm the preview by clicking on "Confirm and go to Live"*.





- 1 Choisir un objectif parmi la liste en cliquant dessus - *Choose a objective from the list by clicking on it*



- 2 Se positionner sur l'échantillon - *Position on the sample*

Image en colorimétrie - *Histology images*

- 1 Dans Transmitted Light : cliquer sur TL puis LIVE - *In Transmitted Light: click on TL then LIVE*

Automatiquement : le logiciel adaptera les paramètres d'intensité –
Automatically: the software will adapt the intensity settings



- 2 Ajuster le focus (molette Z) ou utiliser l'autofocus - *Adjust focus (Z wheel) or use autofocus*



- 3 Si besoin d'ajuster l'intensité : cliquez sur OneTouch - *If you need to adjust the intensity: click on OneTouch*

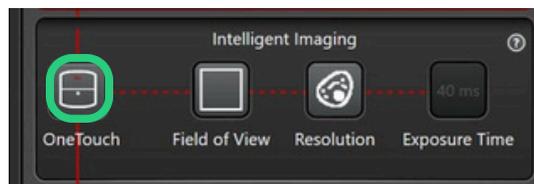
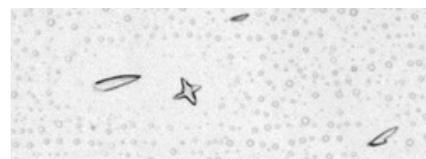
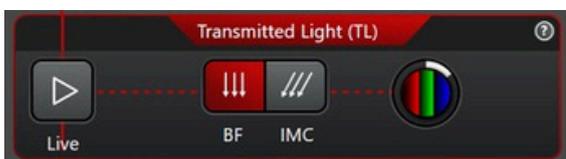


Image en transmission – Brighfield image

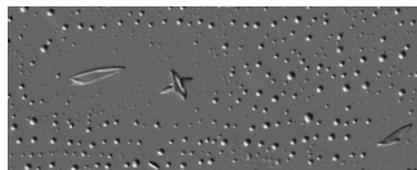
- 1 Dans Transmitted Light - *In Transmissited Light* :

Automatiquement : le logiciel adaptera les paramètres d'intensité –
Automatically: the software will adapt the intensity settings

- a Sans contraste : cliquer sur BF puis LIVE - *Without contrast: click on BF then LIVE*



- b** Avec contraste : cliquer sur IMC puis LIVE - *With contrast: click on IMC then LIVE*



- 2** Ajuster le focus (molette Z) ou utiliser l'autofocus - *Adjust focus (Z wheel) or use autofocus*



- 3** Si besoin d'ajuster l'intensité : cliquez sur OneTouch - *If you need to adjust the intensity: click on OneTouch*



Image en fluorescence

- 1** Dans Fluorescence settings 1 - *In Fluorescence settings 1 :*

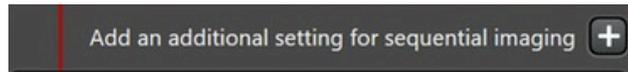
- a** Sur le **témoin positif** : cliquer sur LIVE - *On the positive control: click on LIVE*



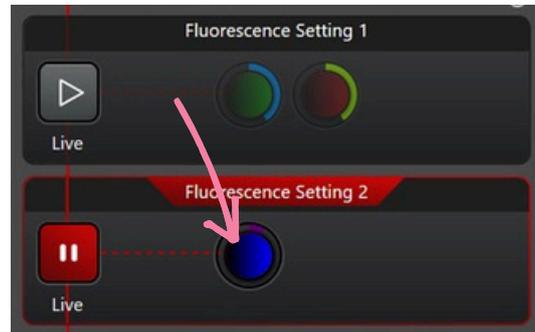
- b** Si besoin de séparer les canaux (jusqu'à 4) - *If necessary, separate channels (up to 4):*

En fluorescence, le logiciel réalise une compensation automatique des spectres des fluorochromes. Ca permet d'éviter les crosstalk. Dans le cas où les signaux ont une intensité très différentes, il faudra probablement les séparer dans différentes séquences. - *In fluorescence, the software automatically compensates using the spectra of the fluorochromes. This avoids crosstalk. If the signals have very different intensities, it will probably be necessary to separate them into different sequences.*

- i Cliquer sur le (+) - *Click on the (+)*



- ii Glisser déposer la pastille correspond au canal dans l'autre séquence - *Drag and drop the disc corresponding to the channel in the other sequence*

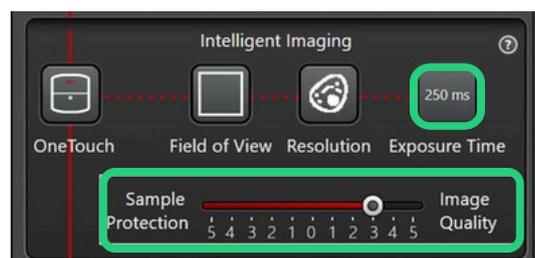


- 2 Ajuster le focus (molette Z) ou utiliser l'autofocus - *Adjust focus (Z wheel) or use autofocus*



- 3 Pour ajuster les paramètres d'intensité - *To adjust the intensity settings :*

- a Temps d'exposition** : cliquer pour afficher plusieurs temps prédéfinis, au choix. Possibilité d'en choisir un spécifique en cliquant sur "User Defined" - *Exposure time: click to display a selection of predefined times. You can choose another by clicking on "User Defined"*.
- b Sample Protection vs Image Quality** : sample protection va diminuer la puissance de la lampe pour protéger l'échantillon. Alors que Image Quality va augmenter la puissance de la lampe au détriment de l'échantillon. - *Sample Protection vs Image Quality: sample protection reduces the power of the lamp to protect the sample. Whereas Image Quality will increase lamp power to the detriment of the sample.*





Types d'images - Image types

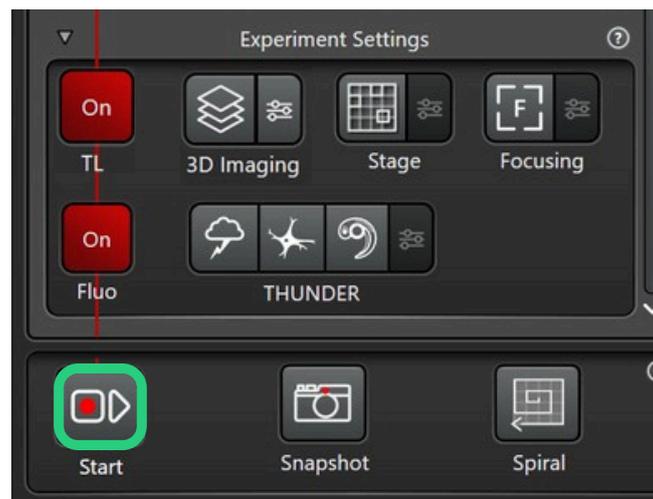


Image 2D - Single image

- 1 En fonction du besoin - *Depending on the need* :
 - a **Colorimétrie / Transmission** : Cliquer sur TL pour le passer en ON - *Colorimetry / Transmission: Click on TL to switch to ON*
 - b **Fluorescence** : Cliquer sur Fluo pour le passer en ON - *Fluorescence: Click on Fluo to switch to ON*

Dans Experiment Settings : les icônes en rouge seront utilisés pour l'acquisition.
Sinon ils sont gris. - *In Experiment Settings: the red icons will be used for acquisition. Otherwise they are grey.*

- 2 Décliquer le reste des icônes (doivent être gris) - *Unclick the rest of the icons (must be grey)*
- 3 Cliquer sur START - *Click on START*



Pile d'images - Z-stack

- 1 En fonction du besoin - *Depending on the need* :
 - a **Colorimétrie / Transmission** : Cliquer sur TL pour le passer en ON - *Colorimetry / Transmission: Click on TL to switch to ON*
 - b **Fluorescence** : Cliquer sur Fluo pour le passer en ON - *Fluorescence: Click on Fluo to switch to ON*

Dans Experiment Settings : les icônes en rouge seront utilisés pour l'acquisition.
Sinon ils sont gris. - *In Experiment Settings: the red icons will be used for acquisition. Otherwise they are grey.*

2 Cliquer sur "3D imaging" pour le passer en rouge et l'activer - *Click on "3D imaging" to turn it red and activate it*

3 Se déplacer en Z pour définir le 1er plan - *Move in Z to define the 1st plane*

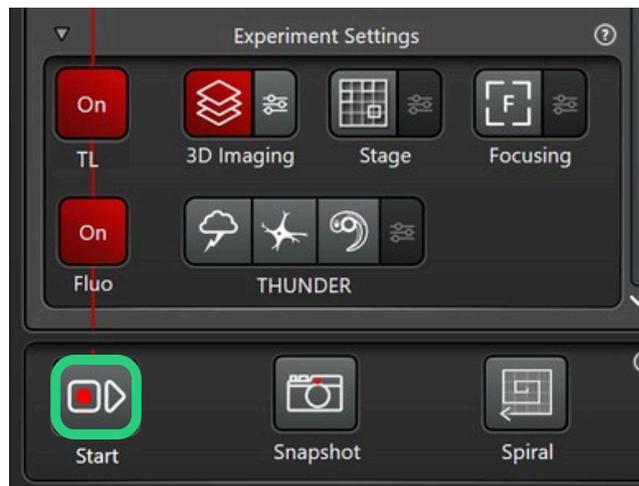
4 Cliquer sur ce bouton - *Click on* 

5 Se déplacer en Z pour définir le dernier plan - *Move in Z to define the last plane*

6 Cliquer sur ce bouton - *Click on* 

7 Régler les paramètres (Z-step size, nombre de plans etc.) du Z-stack en cliquant sur *Set the parameters (Z-step size, number of shots, etc.) for the Z-stack by clicking on* 

8 Cliquer sur START - *Click on START*



Il est possible de lancer un Z-stack automatique en cliquant sur . Il risque simplement de prendre "trop large" par rapport au besoin réel.

It is possible to run an automatic Z-stack by clicking on:  There is simply a risk that the Z-stack will be too large for your actual needs.

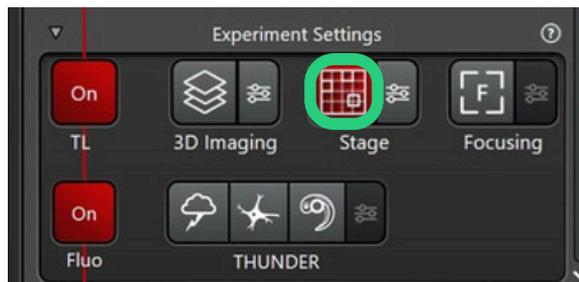
Mosaïque 2D

1 En fonction du besoin - *Depending on the need :*

a **Colorimétrie / Transmission** : Cliquer sur TL pour le passer en ON - *Colorimetry / Transmission: Click on TL to switch to ON*

b **Fluorescence** : Cliquer sur Fluo pour le passer en ON - *Fluorescence : Click on Fluo to switch to ON*

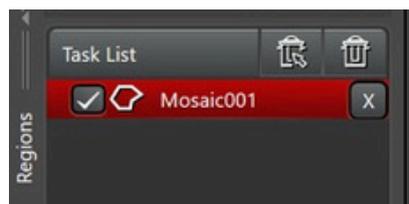
- 2 Cliquer sur "Stage" pour le passer en rouge et activer le mode mosaïque - *Click on "Stage" to turn it red and activate mosaic mode*



- 3 Dessiner les ROI en utilisant les outils disponibles (autant que vous le souhaitez) - *Draw up ROIs using the tools available (as many as you want)*



- 4 Renommer les ROI : à droite de l'écran, clic gauche sur la ROI puis "Rename Region" ou F2 - *Rename ROIs: on the right of the screen, left-click on the ROI then "Rename Region" or F2*



- 5 Créer des points de focus - *Create focus points*

- a Cliquer sur Focusing - *Click on Focusing*



- b Choisir "Focus Map" - *Choose "Focus Map"*
- c Sélectionner la quantité de points de focus (répartis entre toutes les mosaïques)
- d Compléter manuellement si nécessaire (clic gauche pour ajouter, maintien clic droit pour se déplacer sur l'écran) - *Select the number of focus points (distributed between all the mosaics)*
- e Choisir le canal sur lequel se base le focus - *Choosing the channel on which to focus*
- f Vérifier et, si besoin, ajuster le z de l'ensemble des points de focus - *Check and, if necessary, adjust the z of all the focus points.*

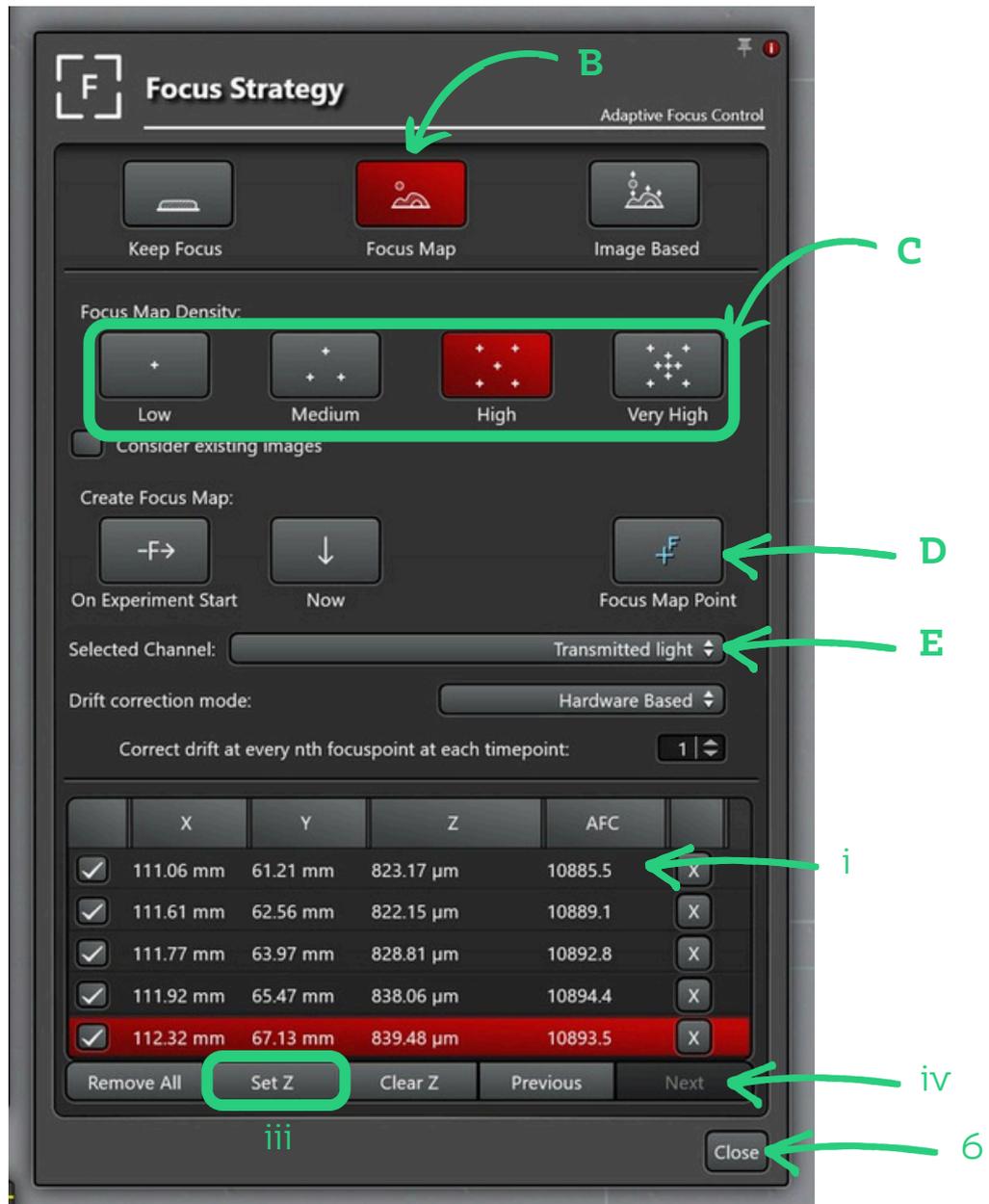
Cliquer sur le 1er point de la liste - *Click on the 1st point of the list*

i Ajuster le z - *Adjust the z*

ii Cliquer sur Set Z - *Click on "Set Z"*

v Cliquer sur Next - *Click on "Next"*

6 Cliquer sur Close - *Click on "Close"*

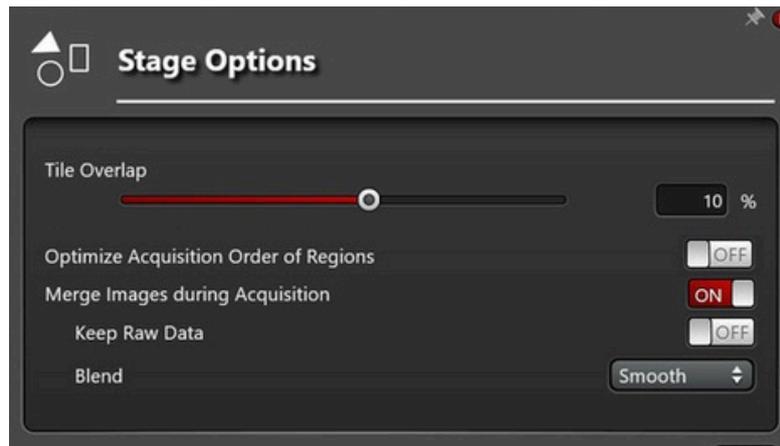


7 Ajuster les paramètres de la mosaïque - *Adjusting mosaic settings*

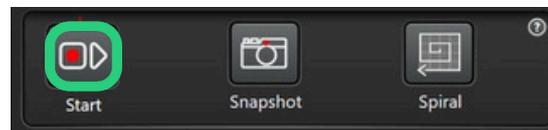


- a Passer en OFF - *Switch on OFF* : Optimize Acquisition Order of Regions
- b Si besoin de conserver l'image non mergée : passer en ON "Keep raw data" - *If you need to keep the unmerged image: switch to ON "Keep raw data"*.
Mettre Blend en mode "Statistical" - *Put Blend in "Statistical" mode*
- c

NE PAS TOUCHER A L'OVERLAP - DO NOT TOUCH THE OVERLAP



8 Cliquer sur START - *Click on START*



Mosaïque 3D

- 1 En fonction du besoin - *Depending on the need* :
 - a **Colorimétrie / Transmission** : Cliquer sur TL pour le passer en ON - *Colorimetry / Transmission: Click on TL to switch to ON*
 - b **Fluorescence** : Cliquer sur Fluo pour le passer en ON - *Fluorescence : Click on Fluo to switch to ON*
- 2 Réaliser une ou des mosaïques (p. 15) - *Create one or more mosaics (p.15)*
- 3 Réaliser une pile d'images (p. 14) - *Create a z-stack (p.14)*
- 4 Cliquer sur START - *Click on START*



Application d'anciens paramètres - Loading old settings



- 1 Réaliser l'étape de définition du projet - *Carrying out the sample definition (p.6)*
- 2 Cliquer sur chaque LIVE (indispensable!) - *Click on each LIVE (essential !)*
- 3 Cliquer sur "Tools" - *Click on "Tools"*
- 4 Cliquer sur "Relight" - *Click on "Relight"*

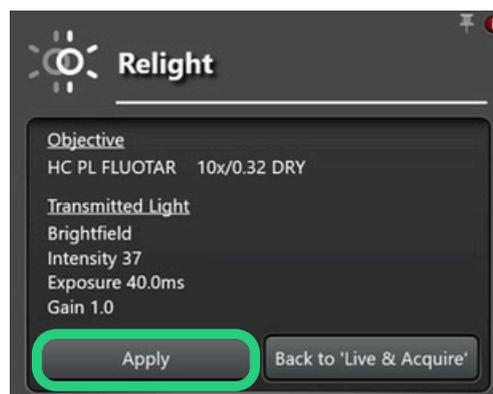


- 5 Ouvrir le projet .xlef qui contient l'image avec les réglages à récupérer - *Open the .xlef project containing the image with the settings to be recovered*
- 6 Sélectionner l'image d'intérêt - *Select the image of interest*



- 7 Cliquer sur Apply - *Click on Apply*

Attention, les réglages dépendent de l'objectif et les fluorochromes utilisés.
Note that the settings depend on the objective and the fluorochromes used.

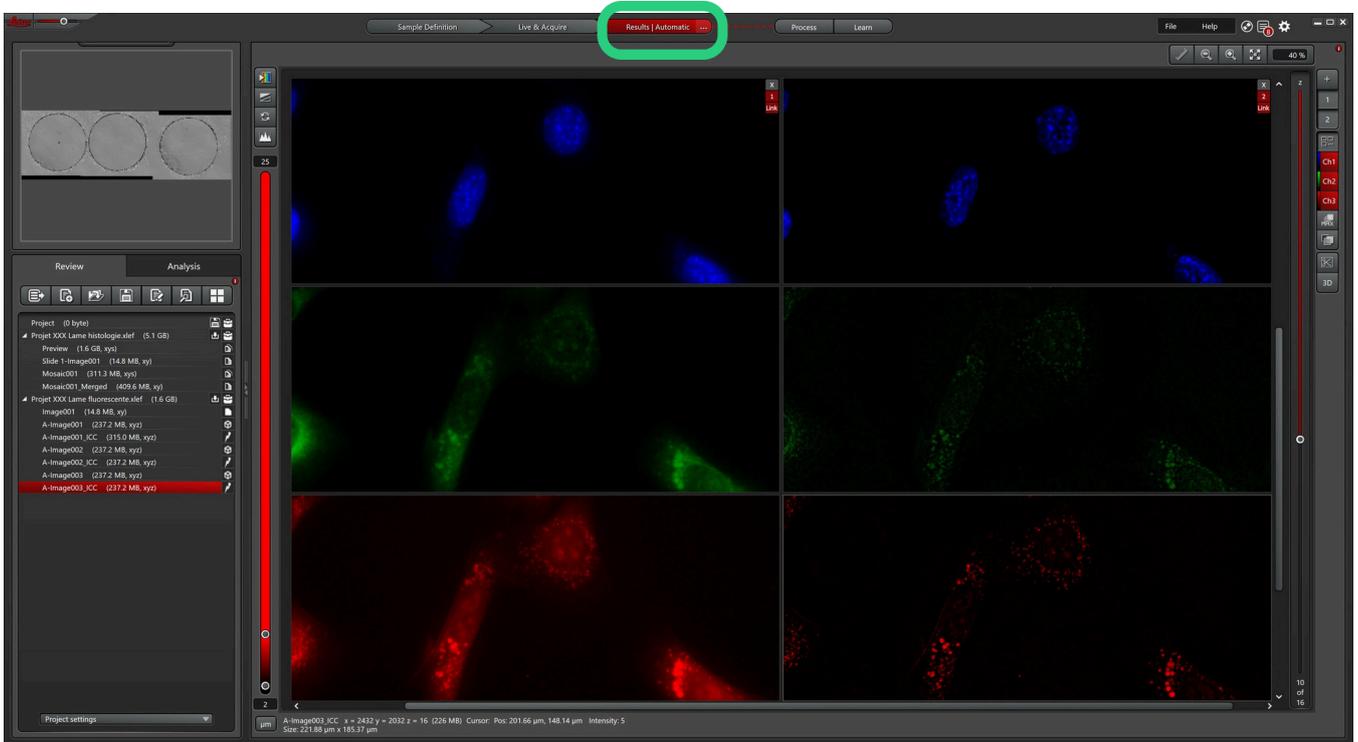




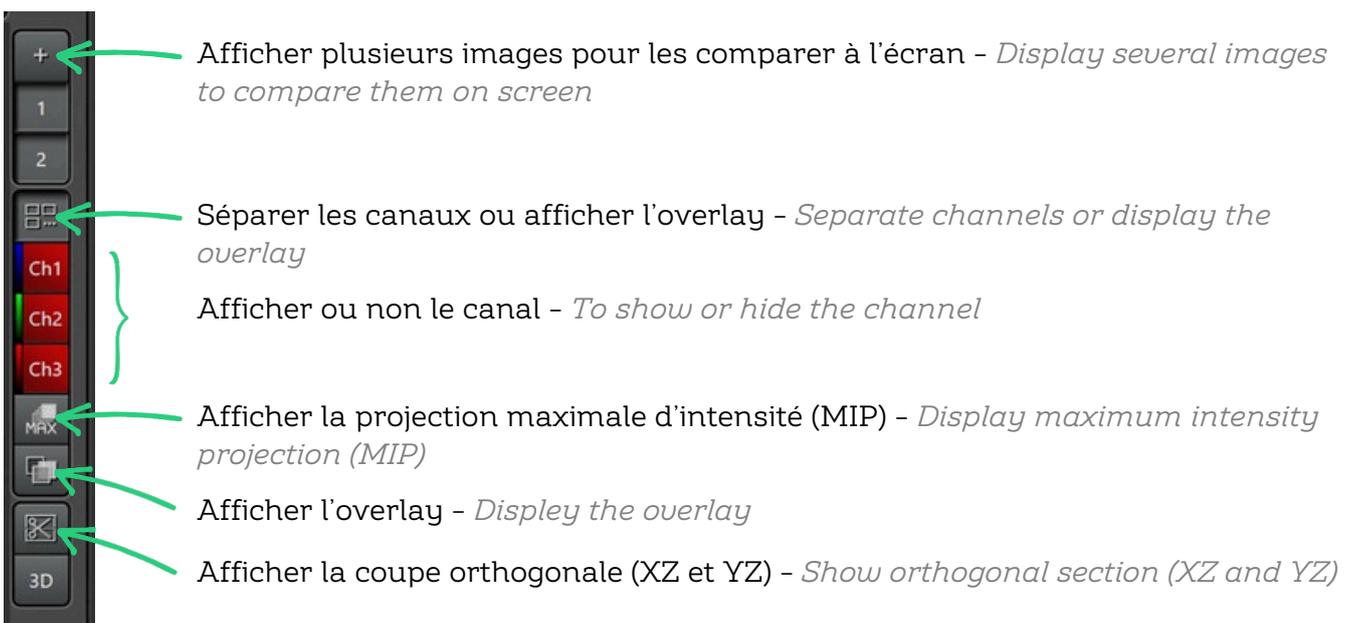
Affichage des résultats - Results visualisation



1 Cliquer sur l'onglet " Results | Automatic " - *Click on the "Results | Automatic" tab*



2 Cliquer sur une image (à droite) pour l'afficher - *Click on an image (right) to display it*

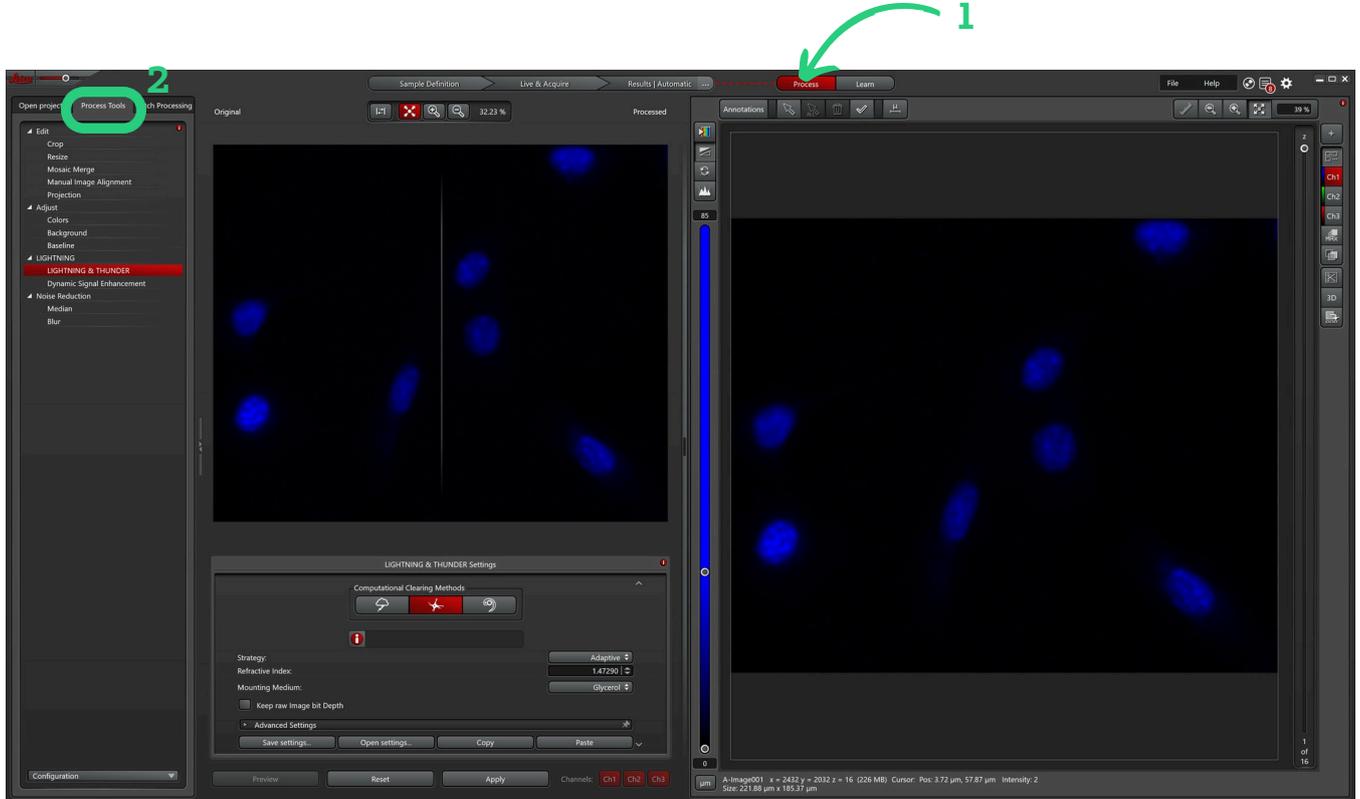




Traitements d'images - Image post-processing

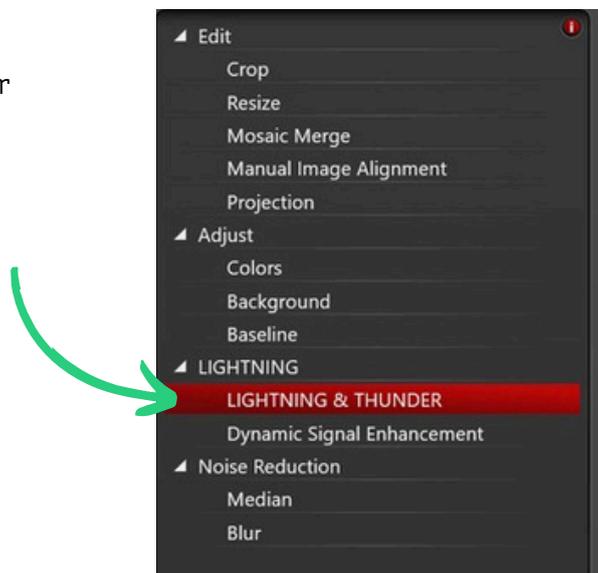


- 1 Cliquer sur l'onglet "Process" - *Click on "Process" tab*
- 2 Aller dans le sous onglet " Process Tools " - *Go to the "Process Tools" sub-tab*

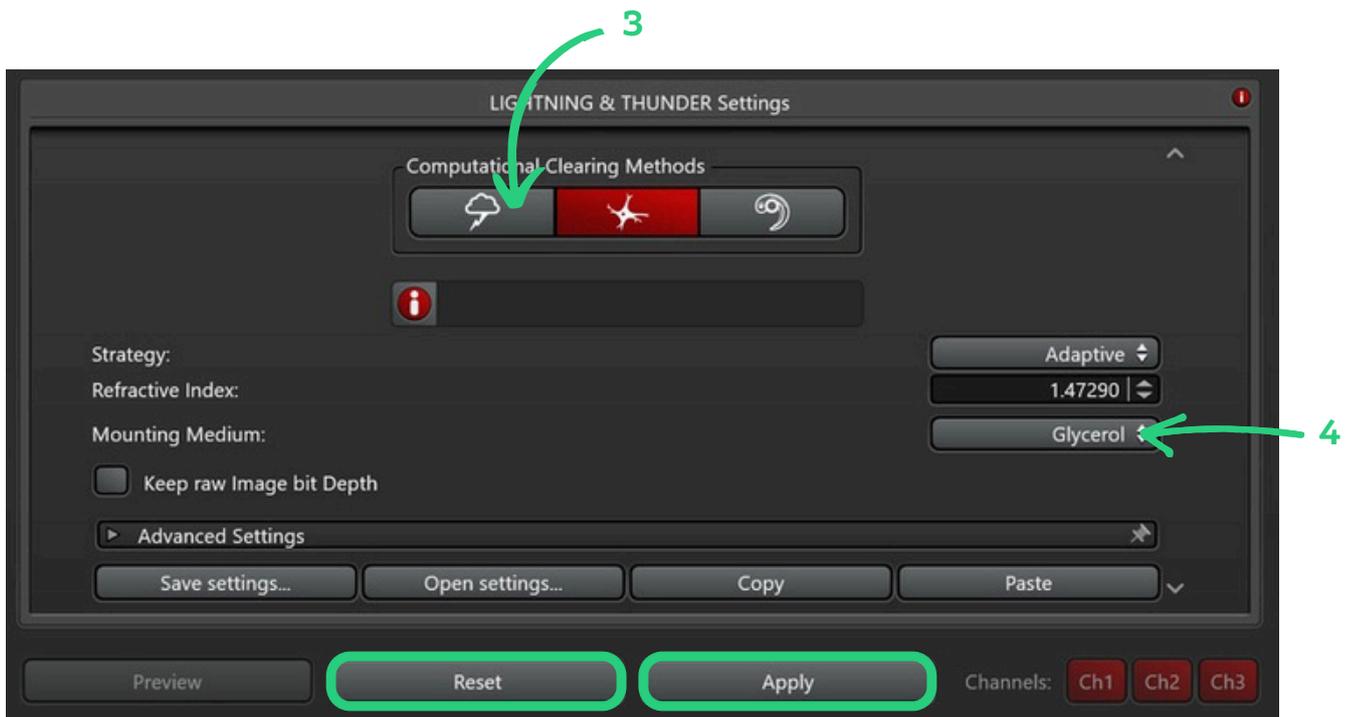


Débruitage par Thunder - Denoising with Thunder

- 1 Cliquer sur Lightning and Thunder
- *Click on Lightning and Thunder*



- 2 Dans "Open Project", choisir l'image à traiter - *In "Open Project", select the image to be processed*
- 3 Choisir le mode "Thunder" - *Choose Thunder mode*
- 4 Si z-stack, vérifier le milieu de montage - *If z-stack, check the mounting medium*
- 5 Cliquer sur Reset pour restaurer les paramètres par défaut - *Click on Reset to restore the default settings*
- 6 Cliquer sur Apply - *Click on Apply*



Il est possible de choisir d'appliquer le débruitage sur un seul ou plusieurs canaux en cliquant sur Advanced Settings, puis décocher les canaux non souhaités.
You can choose to apply denoising to one or more channels by clicking on Advanced Settings, then unchecking the channels you don't want.

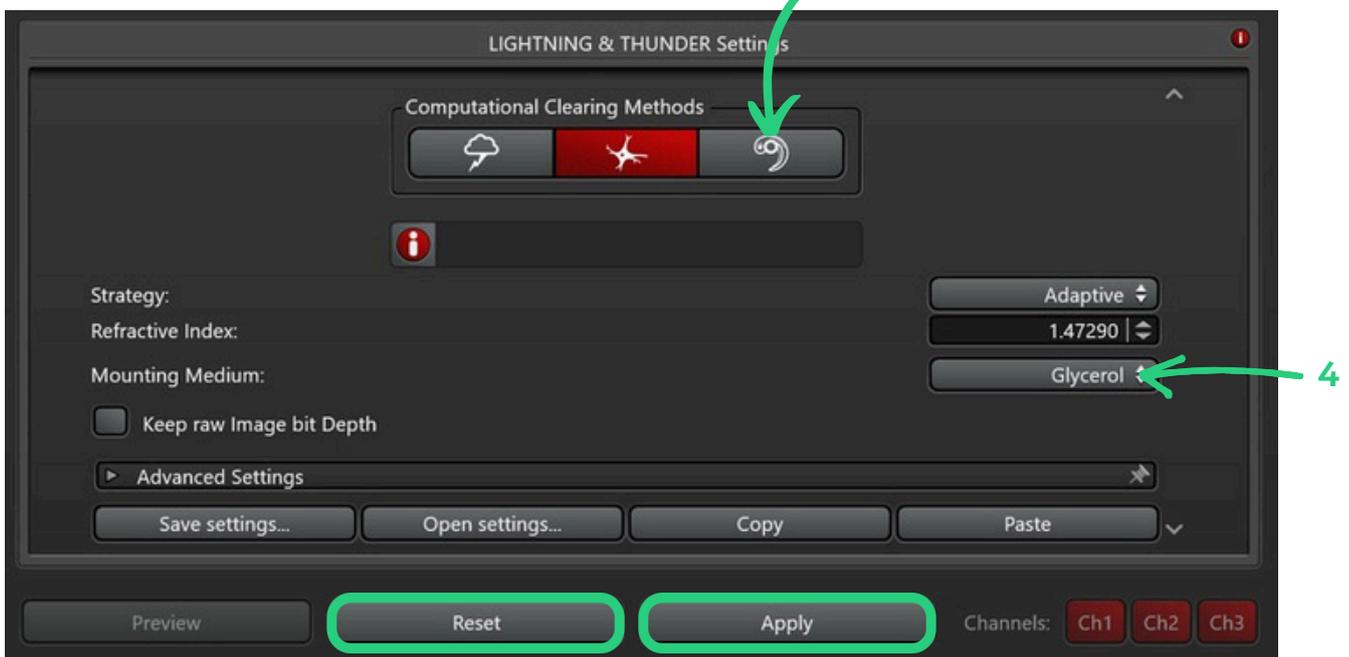
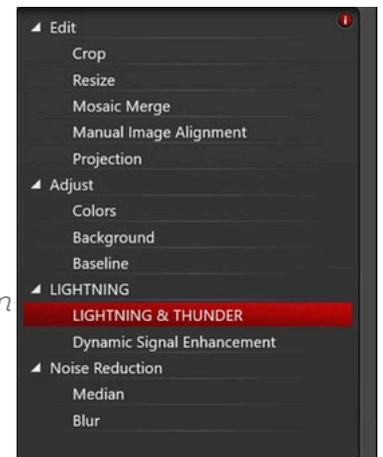
- 7 Dans Open Project, une nouvelle image est créée avec le suffixe "ICC" - *In Open Project, a new image is created with the suffix ICC*



Déconvolution - Deconvolution

Ce traitement se fait des images 3D uniquement. Il effectue un débruitage Thunder puis fera la déconvolution. - *This processing is carried out on 3D images only. It performs Thunder denoising and then deconvolution.*

- 1 Cliquer sur Lightning and Thunder - *Click on Lightning and Thunder*
- 2 Dans "Open Project", choisir l'image à traiter - *In "Open Project", select the image to be processed*
- 3 Choisir le mode Large Volume Computational Clearing - *Choose Large Volume Computational Clearing mode*
Vérifier le milieu de montage - *Check the mounting medium*
- 4 Cliquer sur Reset pour appliquer les paramètres par défaut - *Click on Reset to restore the default settings*
- 5 Cliquer sur Apply - *Click on Apply*
- 6



Il est possible de choisir d'appliquer la déconvolution sur un seul ou plusieurs channels en cliquant sur Advanced Settings, puis décocher les canaux non souhaités.
You can choose to apply deconvolution to one or more channels by clicking on Advanced Settings, then unchecking the channels you don't want.

- 7 Dans Open Project, une nouvelle image est créée avec le suffixe "LVCC" - *In Open Project, a new image is created with the suffix LVCC*



Fin de session - End of session



- 1 Retirer votre échantillon et ranger le support (+ pièces aimantées) dans la boîte verte - *Remove your sample and store the support (+ magnetic pieces) in the green box*
- 2 Fermer le coffre du système délicatement (pas comme un coffre de voiture !) - *Close the system box gently (not like a car boot!)*



- 3 Retourner dans l'onglet "Sample Definition" - *Return to the "Sample Definition" tab*
- 4 Clic droit sur "Overview sample" - *Right click on "Overview sample"*
- 5 Cliquer sur "Delete Overview Image" - *Click on "Delete Overview Image"*





Extinction du système - System shut-down



- 1** Suivre la procédure de fin de session (p. 24) - *Follow the end-of-session procedure (p. 24)*
- 2** Eteindre le logiciel et patientez jusqu'à son fermeture complète - *Turn off the software and wait until it is completely closed.*
- 3** Appuyer 3 à 5 seconde sur le bouton POWER jusqu'à extinction complète du bouton - *Press the POWER button for 3 to 5 seconds until the button is completely switch off.*

