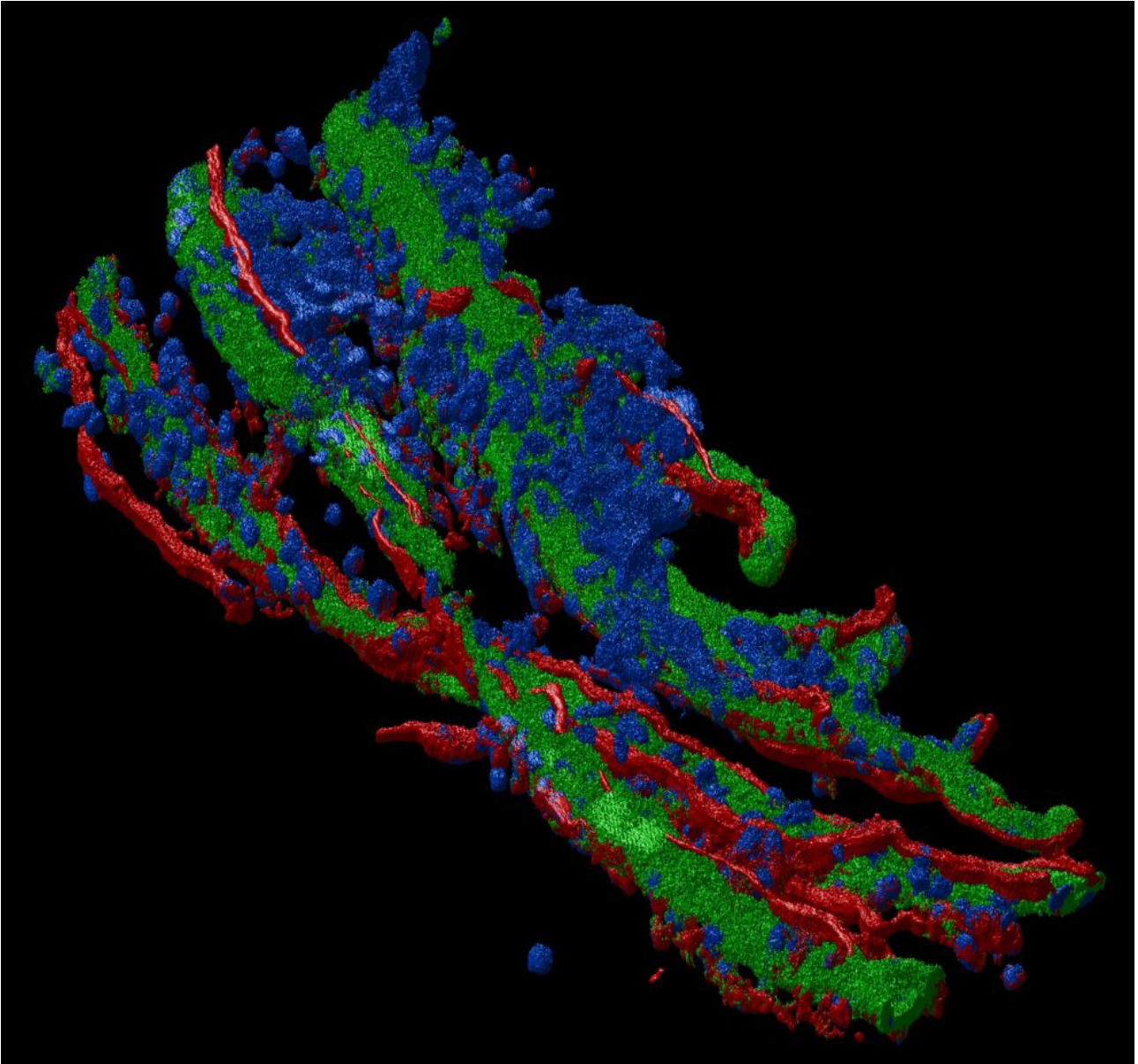


Manuel d'utilisation du microscope confocal Leica TCS SP5 de l'IAL



1- Sécurité, Hygiène & Ergonomie

1-1 Les sources de lumière

Le système confocal SP5 utilise des sources de lumière délivrant des éclairagements intenses. Il est donc important de se comporter avec prudence à l'égard de ces sources lumineuses.

Le microscope utilise une source de lumière UV-Visible basée sur une ampoule à haute-pressure de type Metal-Halide. Même si le risque est faible, celle-ci peut exploser accidentellement et libérer des vapeurs de mercure.

Si une explosion intervient en cours d'utilisation avec extinction de la lampe à fluorescence alors : le plus rapidement possible :

- 1 – couper le contact de la lampe pour éliminer tout risque d'incendie ;
- 2 – tourner la clé des lasers pour qu'ils se refroidissent ;
- 3 – couper la climatisation en ouvrant le petit boîtier situé à droite de la porte d'entrée en sortant, et en mettant le petit bouton du haut sur off ;
- 4 – sortir de la pièce, la verrouiller et coller immédiatement dessus un message interdisant l'accès de la pièce sous aucun prétexte ;
- 5 – prévenir le responsable du confocal et l'assistant de prévention de l'unité ;
- 6 – inscrire l'incident dans le registre hygiène et sécurité de l'unité.

Le confocal utilise des Lasers continus.

Type de laser	Puissance maximale dans le plan focal		Puissance en usage normal	
Diode 405	< 7mW	Classe 3B	< 1mW	Classe 3R
Ar	< 50mW		< 3mW	
DPSS 561	< 12mW		< 5mW	
HeNe 633	< 5mW		< 2mW	



A puissance maximale, toutes ces sources laser sont de **classe 3B** – "Lasers de puissance inférieure à 500mW dans la gamme de longueurs d'onde comprise entre 400nm et 700 nm → **La vision directe même très brève est toujours dangereuse** ; les lumières réfléchies ou diffusées sont généralement sans danger ; pas ou peu de risques au niveau cutané."

En usage normal les puissances effectives sont celles de lasers de la **classe 3R** – "Lasers de puissance inférieure à 5mW dans la gamme de longueurs d'onde comprise entre 400nm et 700nm → Exposition accidentelle très brève généralement sans conséquence, mais **exposition de plus de 10 secondes toujours dangereuse**."

En règle absolue : ne jamais fixer du regard un des points lumineux du système quel qu'il soit.

Quand cela est nécessaire, se limiter à un rapide coup d'œil le plus loin possible de l'axe optique du système.

1-2 Le nettoyage des oculaires

Lorsqu'on arrive sur le microscope confocal prendre une minute pour nettoyer avec un mouchoir en papier légèrement imbibé d'alcool :

- 1) les bonnettes d'oculaires (le petit cercle de plastique ou de caoutchouc qui entoure la lentille frontale de l'oculaire). Il est rappelé que pour une observation correcte il faut que les pommettes soient en contact avec les bonnettes. D'où cette simple recommandation hygiénique.
- 2) Par la même occasion nettoyer la lentille frontale de l'oculaire. Cela évite d'avoir des "mouches volantes" dans le champ de vision.

1-3 Le nettoyage de la platine

De la même manière il est recommandé de nettoyer à l'alcool la platine porte-lame car on sait rarement quel matériel biologique celle-ci a supporté précédemment. C'est le moment pour vérifier que l'objectif qu'on va utiliser est bien propre.

1-4 Le réglage des oculaires

Il faut ajuster l'écartement inter-pupillaire des oculaires et, de même, il est vivement conseillé de régler les oculaires ou, au minimum, de mettre ceux-ci en position neutre (voir Réglages du microscope - p.12).

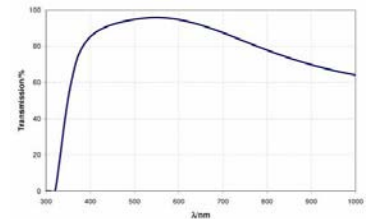
2 – Caractéristiques importantes du système

2-1 Le microscope

Le microscope confocal Leica de type SP5-AOBS est installé sur un **microscope inversé DMI6000** entièrement motorisé et piloté par informatique.

2-1-1 Les objectifs

- **10x / 0,30 HCX PL FLUOTAR Dry** (11506505)
 - **Sans immersion**
 - Dist. de travail : 11,0mm
 - Champ maximal : 1550x1550µm (confocal)



Longueur d'onde d'excitation	Résolution xy max. 1AU $r \approx 0,5\lambda_{ex} / NA *$	Taille optimale du pixel	Résolution z max. 1AU $r \approx 2\lambda_{ex} / NA^2 **$	Pas d'échantillonnage optimale en z
405nm	675nm	293nm	9,00µm	3,91µm
458nm	763nm	332nm	10,17µm	4,42µm
476nm	793nm	345nm	10,57µm	4,59µm
488nm	813nm	353nm	10,85µm	4,72µm
496nm	827nm	360nm	11,03µm	4,80µm
514nm	857nm	373nm	11,44µm	4,97µm
561nm	935nm	407nm	12,48µm	5,42µm
633nm	1,055µm	459nm	14,08µm	6,12µm

* cette valeur diffère légèrement de la résolution xy maximale théorique de $0,46\lambda_{ex}/NA$ mais est plus proche d'une valeur réelle (trou d'aiguille=1AU).

** une des formulation de la résolution maximale théorique en z.

- **20x / 0,70 PL APO** Multi-imm (oil-glyc-coveg:0,17-w(water salted)-0(water) (11506514)
 - **Lamelle couvre objet 0,17mm obligatoire**
 - → **immersion à huile** (bague tournée au max dans le sens inverse des aiguilles d'une montre) – Dist. de travail : 0,17mm
 - → **immersion glycérol** (bague légèrement tournée dans le sens des aiguilles d'une montre) – Dist. de travail ~ 0,20mm
 - → **immersion à eau** (bague tournée au max dans le sens des aiguilles d'une montre) – Dist. de travail : 0,26mm
 - Champ maximal : 775x775µm (confocal)



Longueur d'onde d'excitation	Résolution xy max. 1AU $r \approx 0,5\lambda_{ex} / NA$	Taille optimale du pixel	Résolution z max. 1AU $r \approx 2\lambda_{ex} / NA^2$	Pas d'échantillonnage optimale en z
405nm	289nm	126nm	1,66µm	721nm
458nm	327nm	142nm	1,87µm	813nm
476nm	340nm	148nm	1,94µm	840nm
488nm	349nm	152nm	1,98µm	864nm
496nm	354nm	154nm	2,03µm	882nm
514nm	367nm	156nm	2,10µm	913nm
561nm	401nm	174nm	2,28µm	994nm
633nm	452nm	196nm	2,59µm	1,12µm

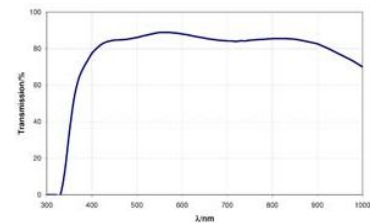
Soit des résolutions 2,3 fois meilleures que celles du 10x !

- **40x / 0,75 HCX PL Fluotar Dry (11506144)** (en test - ne restera peut-être pas sur le système)
 - **Lamelle couvre objet 0,17mm obligatoire**
 - **Sans immersion**
 - Dist. de travail : 0,40mm
 - Champ maximal : 387,5x387,5µm

Longueur d'onde d'excitation	Résolution xy max. 1AU $r \approx 0,5\lambda_{\text{ex}} / \text{NA}$	Taille optimale du pixel	Résolution z max. 1AU $r \approx 2\lambda_{\text{ex}} / \text{NA}^2$	Pas d'échantillonnage optimale en z
405nm	270nm	117nm	1,44µm	626nm
458nm	305nm	133nm	1,63µm	708nm
476nm	317nm	138nm	1,68µm	733nm
488nm	325nm	141nm	1,73µm	752nm
496nm	331nm	144nm	1,76µm	764nm
514nm	343nm	149nm	1,83µm	796nm
561nm	374nm	163nm	2,02µm	870nm
633nm	422nm	183nm	2,26µm	982nm

Soit des résolutions quasiment identiques à celles du 20x.

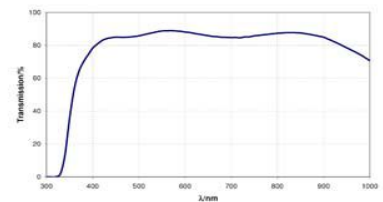
- **40x / 1,25-0,75 HCX PL APO Oil (11506253)**
 - **Lamelle couvre objet 0,17mm obligatoire**
 - **Immersion à huile**
 - Dist. de travail : 0,1mm
 - Champ maximal : 387,5x387,5µm



Longueur d'onde d'excitation	Résolution xy max. 1AU $r \approx 0,5\lambda_{\text{ex}} / \text{NA}$	Taille optimale du pixel	Résolution z max. 1AU $r \approx 2\lambda_{\text{ex}} / \text{NA}^2$	Pas d'échantillonnage optimale en z
405nm	162nm	70nm	519nm	225nm
458nm	183nm	80nm	586nm	255nm
476nm	190nm	83nm	609nm	265nm
488nm	195nm	85nm	625nm	272nm
496nm	198nm	86nm	635nm	276nm
514nm	206nm	90nm	659nm	286nm
561nm	224nm	97nm	719nm	312nm
633nm	253nm	110nm	811nm	352nm

Soit des résolutions 4,15 fois meilleures que celle du 10x et 1,78 fois meilleures que celles du 20x (à ouverture maximale de 1,25)

- **63x / 1,40-0,60 HCX PL APO Oil (11506192)**
 - **Lamelle couvre objet 0,17mm obligatoire**
 - **Immersion à huile**
 - Dist. de travail : 0,1mm
 - Champ maximal : 246x246µm (confocal)



Longueur d'onde d'excitation	Résolution xy max. 1AU $r \approx 0,5\lambda_{\text{ex}} / \text{NA}$	Taille optimale du pixel	Résolution z max. 1AU $r \approx 2\lambda_{\text{ex}} / \text{NA}^2$	Pas d'échantillonnage optimale en z
405nm	145nm	63nm	413nm	179nm
458nm	164nm	71nm	467nm	203nm
476nm	170nm	74nm	486nm	211nm
488nm	174nm	76nm	499nm	217nm
496nm	177nm	77nm	506nm	220nm
514nm	184nm	80nm	525nm	228nm
561nm	200nm	87nm	573nm	249nm
633nm	226nm	98nm	646nm	281nm

Soit des résolutions 4,6 fois meilleures que celle du 10x , 2 fois meilleures que celles du 20x (en immersion à huile et ouverture maximale de 1,25) et seulement 1,1 fois meilleures que celles du 40x

- **100x /1,40 HCX PL APO Oil** (11506038)
- **Lamelle couvre objet 0,17mm obligatoire**
- **immersion à huile**
- Dist. de travail : 0,09mm
- Champ maximal : 155x155µm (confocal)

Cet objectif offre des résolutions identiques à celles du 63x !

2-1-2 Le condenseur

Il s'agit d'un modèle S28 qui fournit une ouverture numérique de 0,55 avec une distance de travail minimale de 28mm. Il convient pour les grossissements de 1.25x à 100x.

La tourelle du condenseur est motorisée pour ses éléments optiques avec :

- 4 gros orifices pour prismes, arrêt DF, BF, anneaux PH
- 3 petits orifices pour BF, anneaux PH

Le diaphragme d'ouverture est également motorisé.

2-1-3 La platine

Elle est composée :

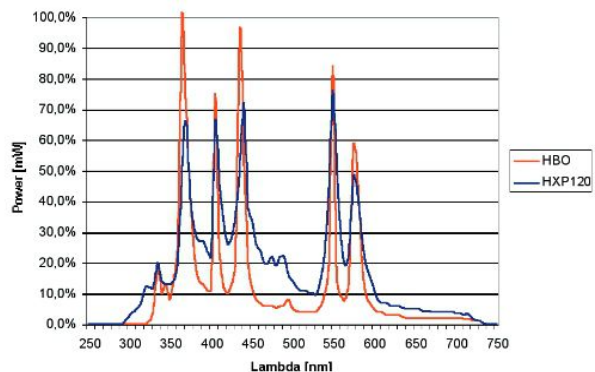
- d'une platine motorisée XY permettant d'acquérir une mosaïque d'images afin de reconstituer une vue élargie des échantillons, ou d'imager différentes positions d'un échantillon avec la possibilité de se repositionner sur ces points au cours d'un time-lapse.
- d'une sur-platine garantissant des déplacements rapides et un positionnement en Z (Z-galvo) précis (précision de 40 nm sur une épaisseur de 1.5 mm). Cette sur-platine peut être équipée de différents portoirs : pour lame, boîte de pétri, plaque à puits et chambre de culture.

L'ensemble du statif est placé dans un incubateur avec régulation de température et circulation de CO₂.

2-1-4 L'excitation de fluorescence

Elle est assurée par une source de lumière fibrée Leica EL 6000 dont les principaux avantages sont :

- pas d'alignement nécessaire
- pas d'échauffement de la préparation
- durée de vie >2000h
- une intensité légèrement plus forte que les lampes HBO dans le canal FITC/eGFP
- cinq niveaux d'atténuation mécaniques : 0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100%



Les domaines spectraux d'observation sont déterminés par 3 cubes filtres différents :

- combinaison filtres A (exc. 340-380/ dichr. 400 / émission LP 425) pour le Dapi ou le Hoechst.
- combinaison filtres I3 (exc. 450-490/ dichr. 510 / émission LP 515) pour la FITC, l'Alexa 488, l'eGFP, etc.
- combinaison filtres N2.1 (exc. 515-560/ dichr. 580 / émission LP 590) pour la TRITC, la Cyanine 3, les Alexa 546, 555 et 568, etc.

2-2 Le système confocal

Les sources d'excitation laser sont les suivantes :

- diode **405 nm** (<7mW dans le plan focal)
- laser Argon **458, 476, 488, 496, 514 nm** (<50mW dans le plan focal)
- diode DPSS **561 nm** (<12mW dans le plan focal)
- laser He/Ne **633 nm** (<5mW dans le plan focal)

Pour l'émission de fluorescence, un dispositif AOBS (Acousto Optical Beam Splitter) permet de sélectionner très finement la gamme de longueurs d'onde imagée et remplace les filtres dichroïques. De ce fait, il n'y a plus de distorsions de l'intensité du signal telles que celles engendrées par l'utilisation des dichroïques.

4 canaux en fluorescence de 400 à 800 nm et **1 canal en transmission** (Brightfield, DIC)

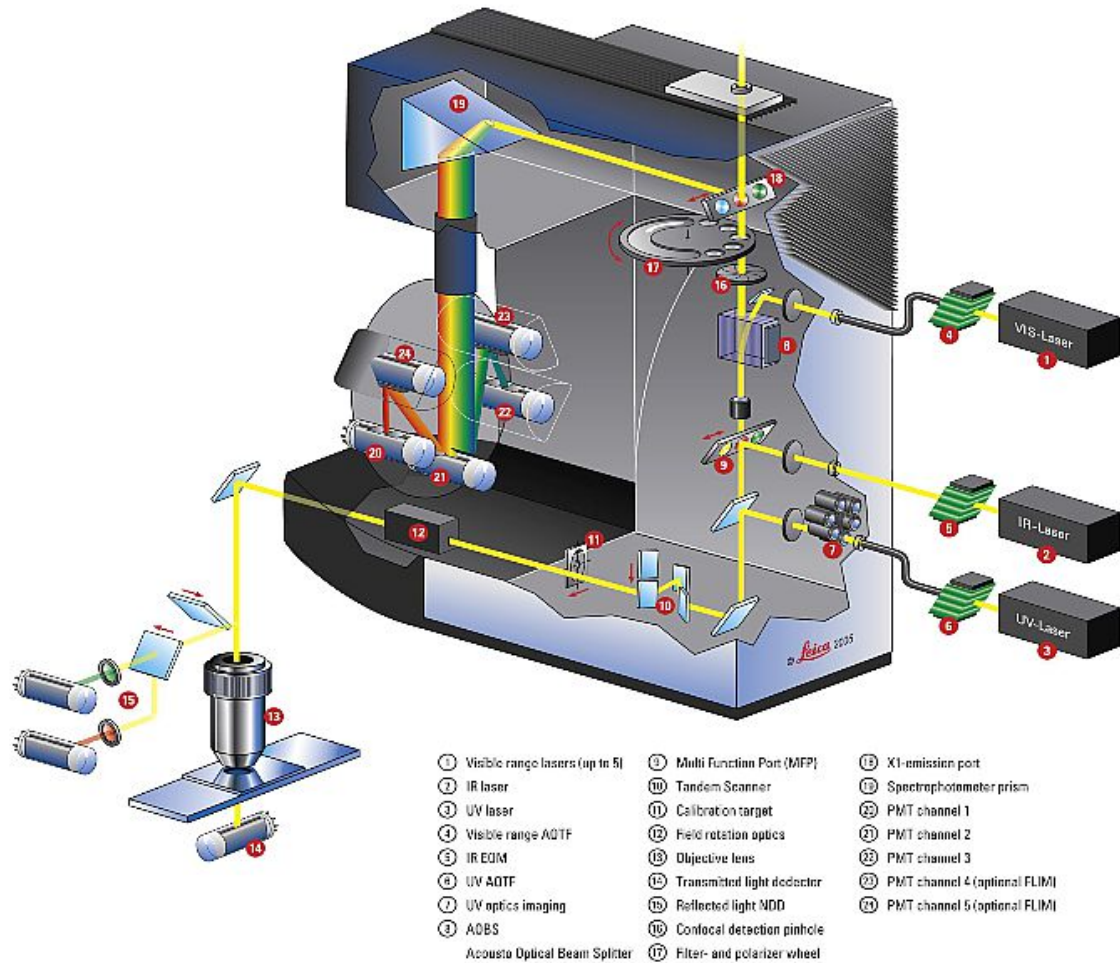
Modes d'acquisition : xyz – xzy – xt – xyt – xzt – xzyt – xyλ – xzλ – xyλz – xyλt – xzλt – xyzλt

Définition des images : jusqu'à 8192²

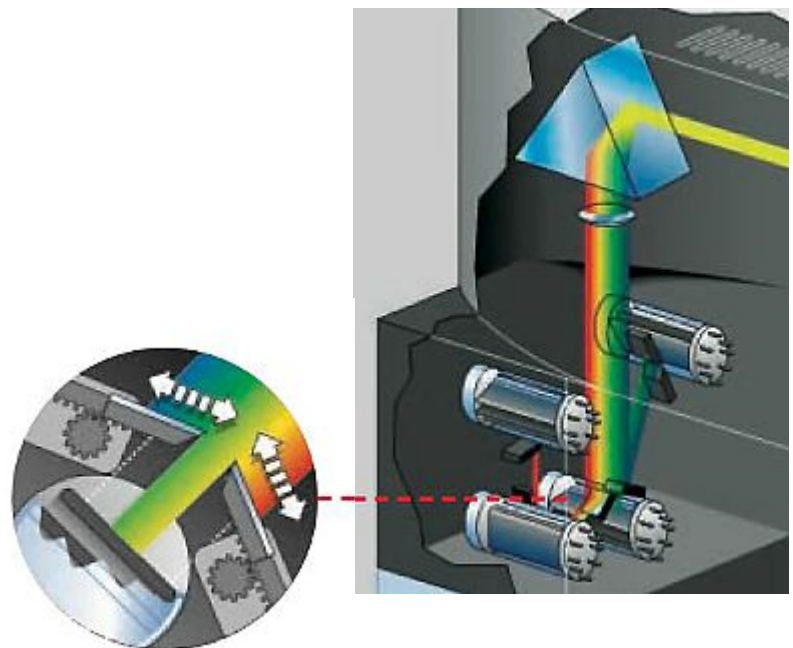
Dynamique des images : 8, 12 ou 16bits

Vitesses d'acquisition : 10Hz (=10 lignes par seconde) – 100Hz – 200Hz – 400Hz (défaut – zoom min 1) – 700Hz (zoom min 2,5) – 1000Hz (zoom min 2,5) - jusqu'à 1400Hz (zoom min 6)

Vue schématique du système confocal
(sur un microscope droit)



Dispositif de détection spectrale



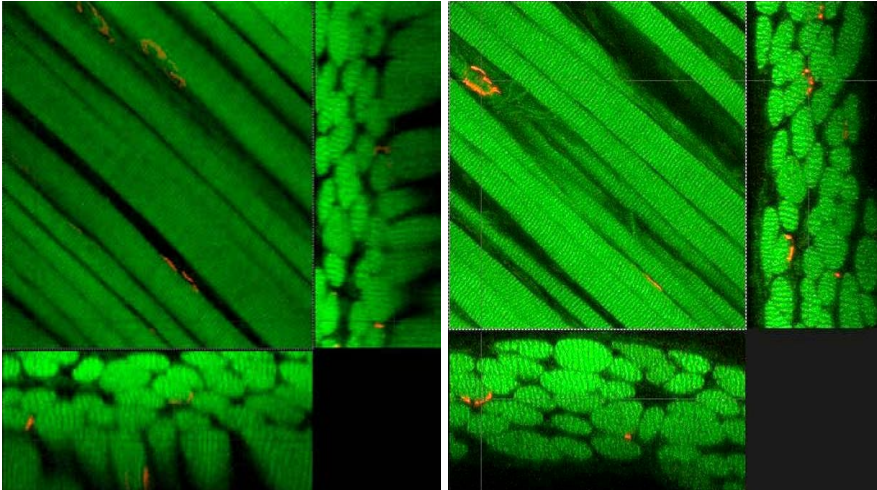
3 - Le plan expérimental

Les caractéristiques énumérées dans le chapitre précédent sont destinées à faciliter l'élaboration d'un plan expérimental.

3-1 Choix de l'objectif : Il faut faire particulièrement attention à la résolution maximale ; est-elle compatible avec le questionnement ?

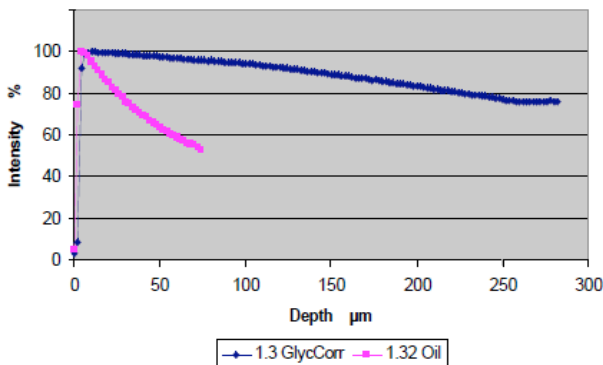
Si on travaille sur des objets épais, il faut faire également attention à la distance minimale de travail.

Note - Il peut être intéressant d'utiliser l'objectif 20x qui offre une distance de travail supérieure à 0,20mm et surtout qui peut être utilisé avec une **immersion glycérol** – Ce milieu d'immersion a un indice de réfraction de 1,466 (ou de 1,45 en mélange 80/20) qui est plus proche de celui de milieux de montages comme le Mowiol ou le Vectashield, avec pour conséquence moins de déformation spatiale, chromatique et sphérique (voir A5 – Milieu de montage vs milieu d'immersion - p.42)



Les deux images ci-contre montrent des fibres musculaires GFP montées dans du glycérol 80/20 et imagées sur environ 100µm d'épaisseur.

A gauche avec un objectif PL APO 63x1.32 immersion à huile et à droite avec un objectif PL APO 63x1.32 immersion glycérol. On voit clairement la forte déformation en profondeur de l'objectif à immersion à huile causée par la différence d'indice entre le milieu de montage (RI ~1,45) et le milieu d'immersion (RI ~1,52).



Par ailleurs les objectifs à immersion glycérol montrent une meilleure capacité à imagier en profondeur. Ainsi les deux courbes ci-contre ont été obtenues en scannant un solution 10µM de fluorescéine dans un mélange glycérol 80/20. On voit clairement la bien meilleure pénétration en profondeur de la configuration glycérol (1,3 GlyCorr) par rapport à la configuration huile (1,32 oil).

3-2 Choix des fluorochromes

Il faut bien faire attention aux raies d'excitation disponibles (405, 458, 476, 488, 496, 514, 561 et 633nm) car elles vont conditionner les choix des fluorochromes. On peut considérer que pour la plupart des fluorochromes organiques le rendement de fluorescence chute trop fortement si on s'écarte de plus de 30nm - en plus ou en moins - par rapport au maximum d'excitabilité.

Dans la mesure du possible il faut choisir les fluorochromes en fonction de leur longueur d'onde d'excitation mise en rapport avec les structures qu'on souhaite observer. La résolution est environ 1,4 fois moins bonne entre un fluorochrome excitable à 458nm et un fluorochrome excitable à 633nm. Ainsi il faut essayer de **réserver le fluorochrome excitable à la plus courte longueur d'onde pour les détails les plus fins**.

3-3 Choix du support de préparation

La lamelle en verre, le milieu de montage et, si nécessaire, le milieu d'immersion font partie intégrante du système optique. **A l'exception du 10x tous les objectifs du système nécessitent une lamelle en verre de 0,17mm entre l'objet et l'objectif.** De même, **à l'exception du 10x et du 40x/0,75 tous doivent être utilisés avec un liquide d'immersion.** Les plastiques (fond de boîte de pétri, plaques et lames à puits, etc) n'ont pas les propriétés optiques permettant de faire une imagerie confocale correcte. Qui plus est, les lames plastiques se déforment lorsqu'elles sont illuminées (déformations continues et aléatoires) ce qui rend difficile toute acquisition confocale sur ces supports.

La sur-platine du microscope peut être équipée de supports spécifiques pour les boîtes de pétri (à fond de lamelle de verre), pour les chambres de cultures et pour les plaques à puits (à fond de lamelle de verre).

Pour l'installation de ces supports, faire appel au responsable du microscope.

3-4 Choix de l'échantillonnage spatial

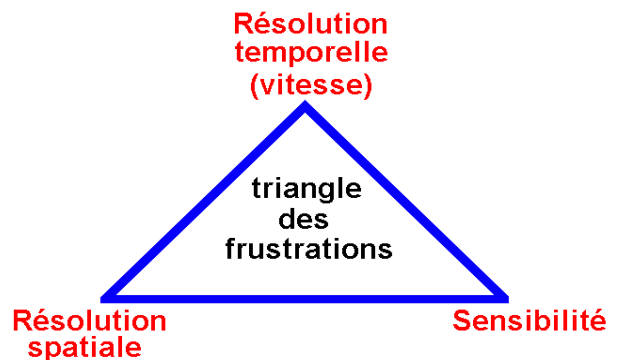
Il faut savoir à quelle fin sont destinées les images : documents de travail, documents destinés à l'analyse ou documents pour publication, et, en fonction, adapter la qualité d'imagerie (le temps d'acquisition). C'est là qu'intervient le triangle des frustrations : la résolution ne peut être obtenue qu'au détriment de la vitesse et de la sensibilité, la sensibilité ne peut être obtenue qu'au détriment des résolutions spatiale et temporelle et la vitesse ne peut être obtenue qu'au détriment de la résolution spatiale et de la sensibilité.

Par défaut le système se configure à une définition d'image de 512x512 pixels en xy.

Ce paramétrage est à réserver pour des images de travail qui seront difficilement exploitables pour une publication.

La plupart des éditeurs demandent au minimum des images en 300dpi (dot per inch) ce qui signifie qu'une image acquise en 512x512 ne sera publiée qu'au format maximal de 1,7x1,7inches soit 4,32x4,32cm alors qu'une image en 1024x1024 pourra atteindre la taille de 8,64x8,64cm.

En conséquence, pour une publication, toujours opter pour une définition d'image supérieure ou égale à 1024x1024.



Maintenant, si on veut obtenir une **image parfaitement échantillonnée en xy** il faut impérativement respecter la **règle de Nyquist** (échantillonnage d'un signal sinusoïdal).

Pour simplifier **les dimensions du voxel doivent être égales à la résolution divisée par un facteur 2,3**. Pour cela se reporter aux colonnes "taille optimale du pixel" et "pas d'échantillonnage en z" des tableaux de résolutions des différents objectifs présentés au début de ce manuel.

Par exemple pour un 40x/1,25 avec une excitation à 488nm la taille du pixel devra être de 85nm. Comme le champ imagé en mode confocal pour cet objectif est de 387,5x387,5µm, il faudrait théoriquement une définition d'image de 4559x4559 pixels (387,5/0,085). On le voit, on est largement au-dessus du format minimum de 1024X1024 pixels préconisé ci-dessus.

En fait cette définition optimale est à réserver pour les images destinées à une analyse spatiale ou pour celles comportant des éléments très fins à résoudre : fibres du cytosquelette, membranes, etc.

La même règle va s'appliquer pour le "stacking". Cette fois-ci il faut choisir un "step" égal à l'épaisseur de la coupe optique/2,3. Dans la mesure où l'acquisition en z est par essence destinée à une analyse tridimensionnelle, le respect de la règle de Nyquist est quasi impératif. On peut à la rigueur utiliser un facteur 2 au lieu de 2,3.

Le respect de ces règles a plusieurs conséquences :

- tout d'abord la taille des fichiers informatiques peut devenir très importante ;
- mais surtout le temps d'acquisition des images peut également se rallonger considérablement. Attention donc au fait que l'imagerie confocale peut prendre beaucoup de temps.

3-5 Choix de la dynamique d'image

Par défaut celle-ci est de 8bits (256 niveaux de gris). C'est très largement suffisant pour une imagerie conventionnelle destinée à l'illustration (l'œil humain discrimine environ 60 niveaux de gris). Par contre, pour des images destinées à des analyses informatiques il peut être nécessaires d'opter pour des dynamiques supérieures : 12 bits (4096 niveaux de gris), voire 16 bits (65536 niveaux de gris) mais attention alors à la taille des fichiers. Il faut savoir également qu'encore aujourd'hui beaucoup de logiciels d'imagerie n'acceptent pas de travailler avec ces dynamiques et, s'ils le font, il faut avoir la puissance machine suffisante ...

3-6 Choix de la résolution temporelle

Le système est parfaitement adapté pour réaliser des acquisitions du type Time-Lapse. Toutefois comme cela a été signalé plus haut la vitesse d'acquisition des images (résolution temporelle) est directement liée à la résolution spatiale. De plus à partir d'une certaine vitesse d'acquisition la sensibilité du système va également être impactée avec une dégradation du rapport signal/bruit.

3-7 Choix du mode de scan

Selon votre problématique il y a plusieurs choix possibles :

- modes spatiaux : **xyz, xzy**
- modes temporels : **xt, xyt, xzt, xyzt, xzyt**
- modes spectraux : **xyλ, xzλ, xyλz**
- modes mixtes temporels et spectraux : **xyλt, xzλt, xyλt**

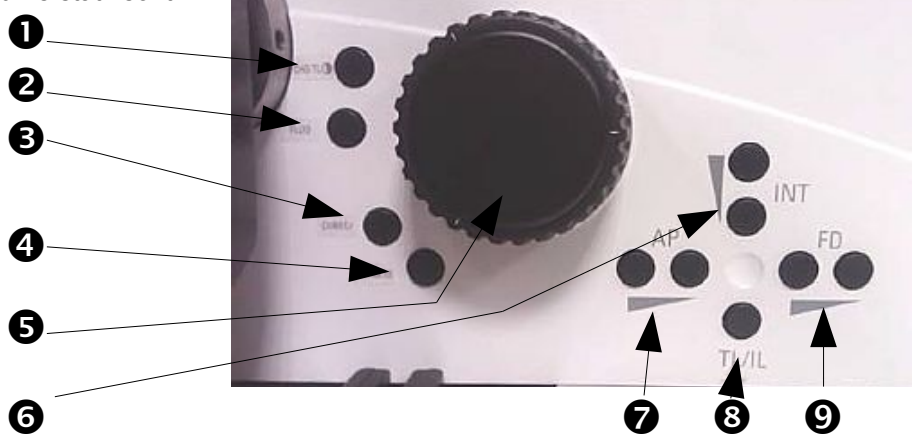
4 - Utilisation du microscope à fluorescence DMI 6000B

Le statif DMI6000B est entièrement motorisé. Il est mis en route avec l'ensemble du système confocal.

4-1 Description des commandes

Les commandes positionnées sur le statif sont :

- sur le coté gauche



Le bouton **1 Chg TL** permet de choisir le mode de contraste en lumière transmise **TL**. Il y a 3 possibilités :

- lumière transmise neutre
- contraste interférentiel DIC
- lumière transmise polarisée

Le bouton **2 Fluo** permet le passage en mode fluorescence sur le microscope

Le bouton **3 Cube** permet de sélectionner le cube filtre et donc le canal de fluorescence en mode non-confocal : Dapi, FITC ou TRITC

Le bouton **4 Chg Cs** provoque l'extinction de la fluorescence ou de la lumière blanche transmise et le passage en mode confocal

Le bouton **5** permet d'ajuster la mise au point

Les 2 boutons **6 INT** permettent d'augmenter ou de diminuer l'intensité lumineuse en lumière transmise **TL** et en **Fluo**

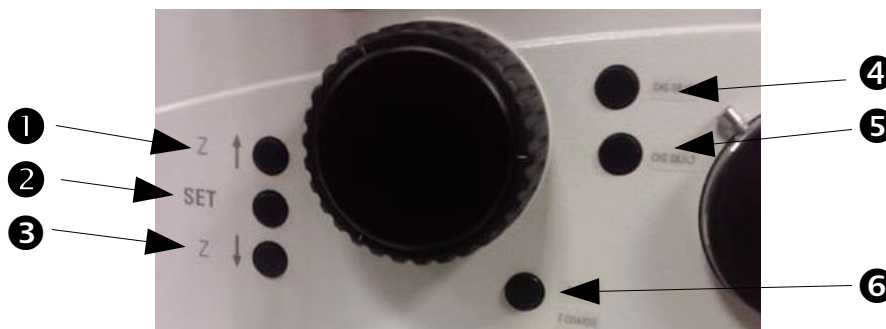
Les 2 boutons **7 AP** permettent d'augmenter ou de diminuer le diamètre du diaphragme d'ouverture **AP** (Aperture)

Le bouton **8 TL/IL** permet de basculer entre le mode lumière transmise **TL** et le mode fluorescence **IL**

Les 2 boutons **9 FD** permettent de modifier le diaphragme de champ (**Field Diaph.**) avec successivement différentes tailles de diaphragmes rectangulaires, puis circulaires.

- sur le côté droit

! Attention : ces boutons ne sont à utiliser qu'avec d'extrêmes précautions



Le bouton **1 Z↑** déplace l'objectif en position haute / mise au point (usage très déconseillé!)

- Le bouton **2** SET + Z↑ enregistre la position de mise au point - SET + Z↓ enregistre la position basse
- Le bouton **3** Z↓ déplace l'objectif en position basse
- Le bouton **4** Chg Obj ↻ change l'objectif dans le sens des aiguilles d'une montre
- Le bouton **5** Chg Obj ↺ change l'objectif dans le sens inverse des aiguilles d'une montre
- Le bouton **6** non actif

- en façade
Boutons de commande



- Le bouton **1** permet de sélectionner le cube filtre **I3** pour des fluorochromes tels que la FITC, l'Alexa 488, l'eGFP, etc
- Le bouton **2** permet de sélectionner le cube filtre **N2I** pour des fluorochromes tels que la TRITC, les Alexa 546, 555, 568, la Cy3, etc
- Le bouton **3** permet de sélectionner le cube filtre **A4** pour des fluorochromes tels que le Dapi ou les Hoechst.
- Le bouton **4** active ou désactive l'éclairage de la lame.

Écran d'affichage

- La première ligne** indique :
- le mode d'imagerie
 - SCAN → confocal
 - FLUO>DIC → contraste DIC en fluorescence
 - Le cube filtre (**A4** : Dapi / **I3** : A488 / **N2I** : TRITC)
 - et l'état du shutter :
 - fermé
 - ou ouvert

	FLUO>DIC	
	40x Obj. IMM	
	1.5x MagCh.	Σ 600x
	INT 100% B G	↔-1 ↔-2
	AP 33	FD 30
	80%	20%
	- 0.55 mm	coarse

- La deuxième ligne** indique le type d'objectif et s'il s'agit d'un objectif à immersion **IMM** ou à sec **DRY**.
- La troisième ligne** indique si un changeur de grossissement mécanique est présent et le facteur de grandissement de l'image **Σ** qui en résulte.
- La quatrième ligne** indique l'intensité d'éclairage **INT**.
- La cinquième ligne** indique le taux d'ouverture des diaphragmes d'ouverture **AP** et de champ **FD**.
- La sixième ligne** indique le pourcentage de lumière orientée vers les oculaires ou vers d'autres sorties comme la sortie caméra.
- La septième ligne** indique :
- la position en mm de l'objectif par rapport au niveau de mise au point si celui-ci a été défini au préalable, sinon par rapport au niveau qu'il avait au moment du démarrage du système (?) ; si une butée basse a été définie ou non, et si l'ajustement est en mode rapide **coarse** ou fin **fine**.

4-2 Réglages du microscope

– Réglage des oculaires

Ce réglage est indispensable avant toute utilisation prolongée du microscope.

Après avoir soigneusement nettoyé les oculaires à l'alcool (voir Hygiène & Sécurité) :

- 1 – régler l'écartement des oculaires ;
- 2 – mettre les deux oculaires en position neutre. Pour cela tourner le manchon mobile de chaque oculaire de manière à ce que son bord inférieur laisse juste apparaître le **cercle argenté** qui marque la position neutre ;
- 3 – regarder avec l'œil gauche par l'oculaire gauche et faire la mise au point sur un détail précis de la préparation ;
- 4 – fermer ensuite l'œil gauche et regarder avec l'œil droit ; ajuster la netteté du détail choisi en faisant tourner le manchon de l'oculaire droit **sans toucher à la mise au point par déplacement de la platine !**

Ce réglage qui prend deux minutes limite la fatigue oculaire liée à l'observation et cette impression désagréable que la préparation bouge d'avant en arrière.

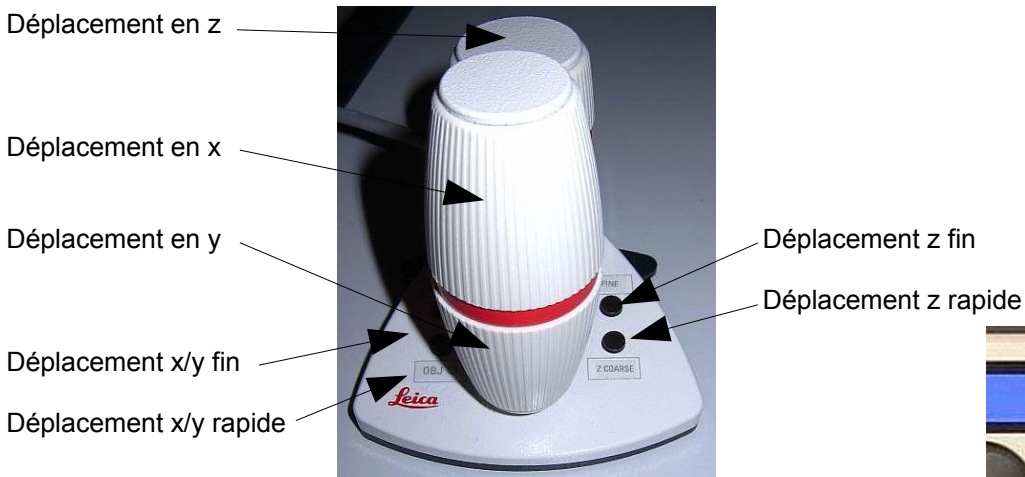


– Réglage de Köhler

Pour le DMI6000B le condenseur S28 est pré-réglé et ne nécessite normalement pas la réalisation d'un tel réglage. Il peut toutefois arriver qu'un ré-ajustement soit nécessaire mais il ne peut être réalisé par les utilisateurs eux-mêmes.

4-3 Déplacement de la platine

La platine est entièrement motorisée et ne peut donc être déplacée qu'après la mise en route du système. Elle est activée principalement à l'aide du Joystick "Smartmove".



Le déplacement en z fin est également réalisable avec le bouton "Z Position" du "Panel Box". L'usage de cette commande est vivement recommandé en mode confocal.



5 - Mise en marche du système

1 – Sur le panneau de commande situé à droite sous le plan de travail de la station informatique, allumer le bouton **1** – "PC/Microscope".

Le microscope se met en marche et l'ordinateur s'initialise. Attendre que s'affiche la fenêtre de login.

2 – Se connecter en utilisant le nom d'utilisateur "TCS User". Aucun mot de passe n'est nécessaire.

3 – Un fois le bureau Windows affiché, allumer le bouton **2** – "Scanner power".

4 – Allumer le bouton **3** - "Laser Power". Les alimentations et ventilateurs démarrent.

5 – Tourner la clé **4** – "Laser Emission" en position **ON** pour connecter les lasers



Avant la mise en route du logiciel de contrôle LAS AF s'assurer que l'objectif en place est en position basse. La manière la plus rapide pour cela consiste à appuyer sur le bouton Z↓ situé sur le côté droit de la base du statif. Si l'objectif est en position haute la platine peut venir le heurter au moment de l'initialisation car elle va se déplacer et passer au-dessus. Il y a alors un grand risque pour que l'objectif autant que la platine soient endommagés.

6 – Démarrer le logiciel en cliquant sur l'icône LAS AF.



7 – Pendant le démarrage le système renvoie une première question : "Check configuration machine"

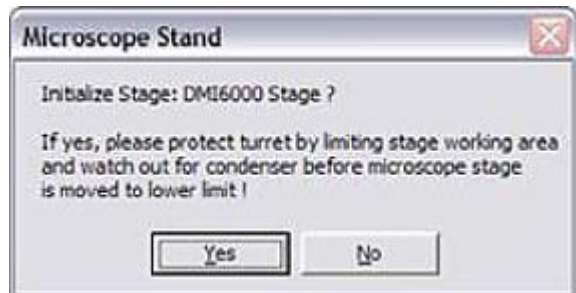
→ Cliquer sur OK.



Ne jamais cliquer sur configuration ou microscope stand !

8 – Après quelques instants le système pose une seconde question : "Initialize Stage : DMI6000 Stage ?"

- Si on a besoin des fonctions de positionnement en xy de la platine (Mosaïque - **Tile Scan**, positions enregistrées - **Mark and Find**, etc), alors vérifier que l'objectif est en position basse en appuyant sur la touche Z↓ située sur le côté droit de la base du statif, puis **cliquer sur Yes**. La platine va alors se déplacer sur ses axes pour s'initialiser.



- Si on n'a pas besoin de ces fonctions, ce qui est le cas le plus fréquent, **cliquer sur No**.

- De même s'il faut redémarrer le système après un crash et qu'on ne veut pas perdre des positions enregistrées **cliquer sur No**

9 – Attendre la fin du lancement du logiciel

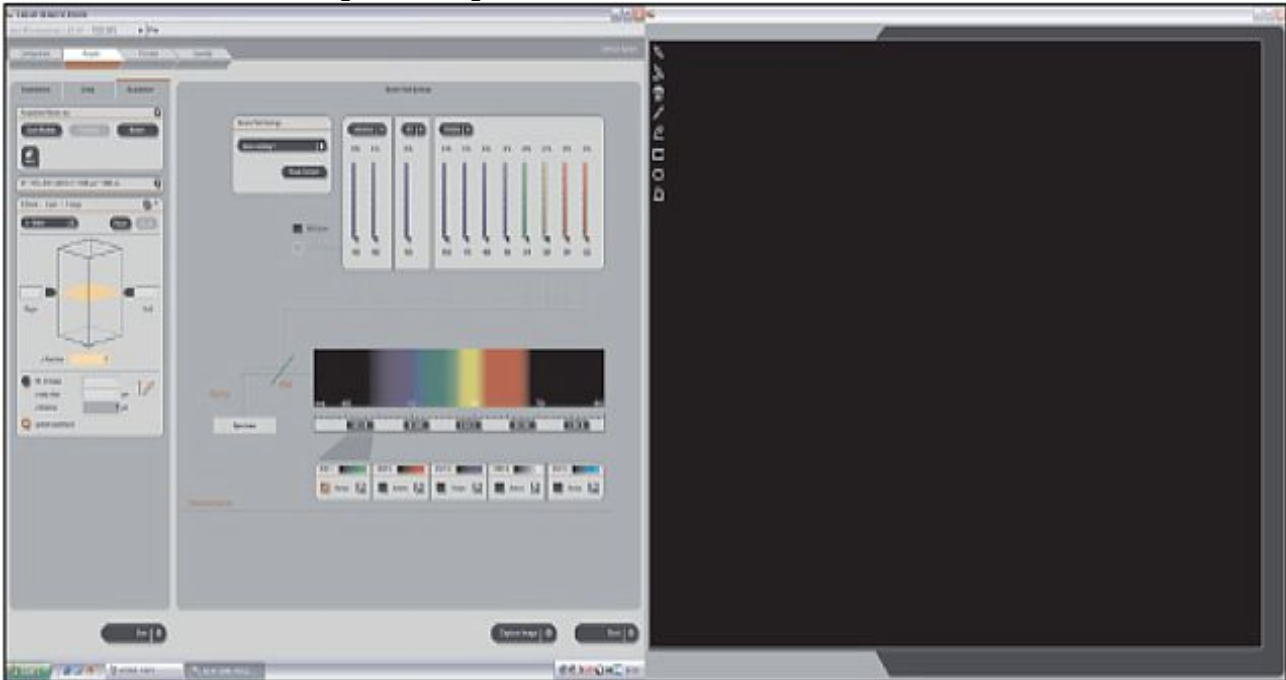
10 – Allumer la lampe fluo.

6 - Configuration du système

L'interface utilisateur s'ouvre sur deux fenêtres contiguës.

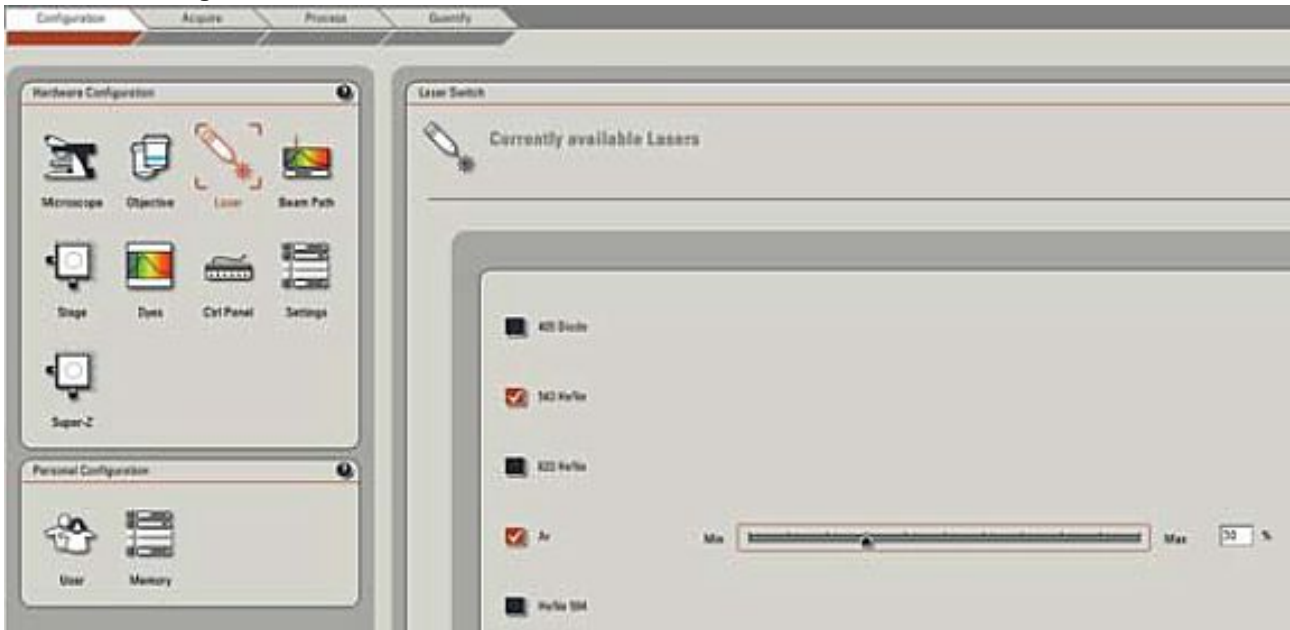
A gauche un ensemble de panneaux destinés à définir la configuration, à paramétrer les acquisitions, à paramétrer les traitements des images et à quantifier.

A droite une fenêtre d'affichage des images.



6-1 Choix et allumage des lasers

Cliquer sur l'onglet "Configuration" (en haut à gauche) puis cliquer sur l'icône "Laser" dans la fenêtre Hardware configuration. La fenêtre suivante s'ouvre.



Ne démarrer que les lasers utiles en cochant les cases correspondantes.

Pour rappel :

405 Diode → exc. **405nm** (Dapi, Hoechst, ...)

Ar → excS. **458** (Atto 465,...), **476, 488** (Alexa 488, eGFP, FITC,...), **496, 514 nm**

DPSS 561 → exc. **561nm** (TRITC, Cy3, Alexa556/555/568,...)

He/Ne 633 → exc. **633Nm** (Alexa 633/635/647, Cy5, SiRHoechst,...)

Pour le laser Argon (Ar) positionner la puissance entre 20 et 30% - Ne pas travailler à moins de 5% et plus de 50%. Se rappeler que moins il y a de puissance en excitation, moins il y a de bleaching de la préparation.

6-2 Choix de la dynamique d'image

Généralement le système est configuré en 8bits (256 niveaux de gris). Il a été signalé plus haut qu'une telle dynamique d'image est très largement suffisante pour une imagerie conventionnelle destinée à l'illustration. Par contre, pour des images destinées à des analyses informatiques il peut être nécessaire d'opter pour des dynamiques supérieures : 12 bits (4096 niveaux de gris), voire 16 bits (65536 niveaux de gris). Pour cela, toujours dans la fenêtre "**Hardware configuration**", cliquer sur l'icône "**Settings**", puis dans le panel "**Resolution**" sélectionner dans la petite fenêtre "**Bit Depth**" la nouvelle dynamique. Mais encore une fois attention à la taille des fichiers.

6-3 Choix de l'objectif

- Cliquer sur l'onglet "**Acquire**" dans la barre supérieure.

- Puis dans le panneau "**beam path settings**", cliquer sur "**objective**"

- Dans la liste déroulante choisir l'objectif

Rappel :

10x/0,3 sans immersion

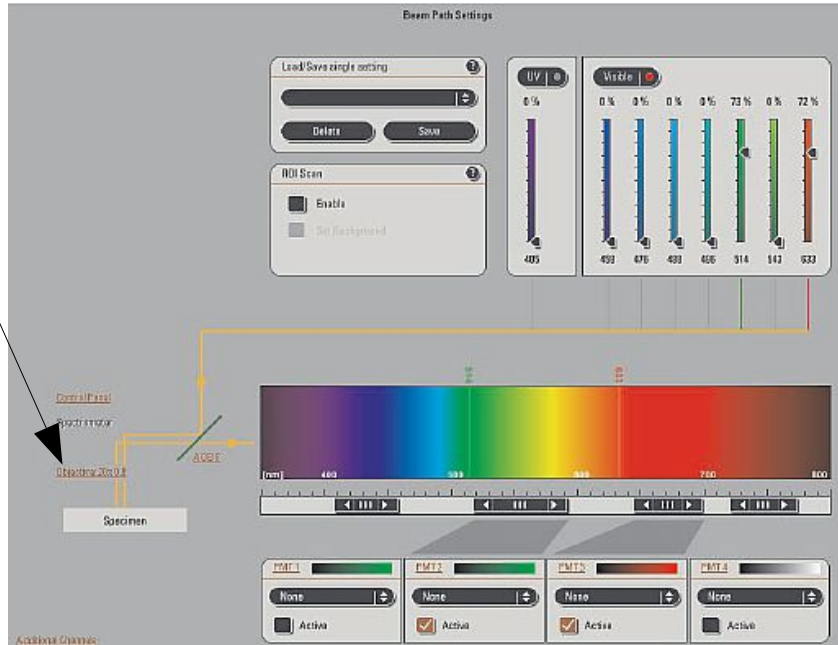
20x/0,7 multi-immersion (voir p.7)

40x/0,75 sans immersion

40x/1,25-0,75 immersion à huile

63x/1,4-0,60 immersion à huile

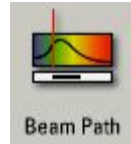
100x/1,4 immersion à huile



6-4 Correction UV

- Pour les objectifs 63x et 100x il est nécessaire de positionner dans le trajet optique une lentille de correction pour les images UV (excitation 405nm).

Pour cela, cliquer de nouveau sur l'onglet "**Configuration**" dans la barre supérieure gauche, puis sur l'icône "**Beam Path**", et dans le cadre "**Filter Wheel**", sélectionner "**UV Lens 63x/1,4oil**". Pour les plus faibles grossissements il est conseillé de soustraire cette lentille de correction.



6-5 Configuration de l'excitation et de l'émission

6-5-1 Première méthode

La solution la plus simple consiste à ouvrir la fenêtre "**Load/Save single setting**" située dans le panneau de droite "**Beam Path Settings**" et à utiliser une des configurations pré-enregistrées par Leica, ou celle que vous aurez vous même enregistrée dans les "**User Settings**" lors d'une précédente séance de travail (voir p.23) et qui apparaîtra alors dans la liste déroulante ci-contre sous la rubrique "**User Settings**".

6-5-2 Deuxième méthode

On peut aussi rappeler la configuration d'une imagerie préalablement enregistrée. Pour cela :

- Cliquer sur l'onglet "**Acquire**" dans la barre supérieure, puis sur l'onglet "**Experiments**".

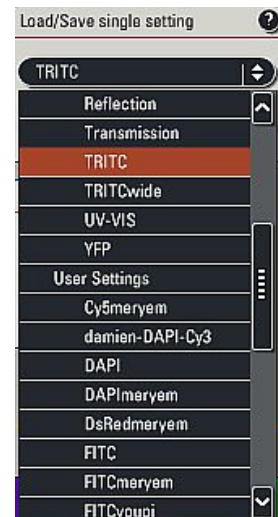
- Ouvrir alors le fichier .lif où se trouve l'image dont on veut ré-utiliser le paramétrage (attention cela peut prendre quelques secondes – le chargement est visualisable par une barre de progression qui s'ouvre en bas).

- Faire un clic-droit sur l'identifiant de cette image.

- Dans le menu déroulant qui s'est ouvert, cliquer sur "**Properties of "....."**".

- Enfin, dans la fenêtre "**Experiment Data**" qui s'est ouverte, cliquer sur l'onglet "**Apply Settings**" situé en bas à gauche.

Note – Dans ces deux procédures, les paramètres d'excitation et d'émission sont ré-activés ainsi que les facteurs de moyennage ou d'accumulation de chaque canal. Si certains lasers ne sont pas allumés le système propose leur activation. Par contre, **le choix de l'objectif et les paramètres de scan : échantillonnage xy et z, taille du pinhole ne sont pas repris.**



6-5-3 Troisième méthode


Pour créer une nouvelle configuration, il peut être intéressant de repartir d'une configuration existante et de la modifier en ajoutant (ou supprimant) un ou plusieurs canaux en suivant le paramétrage expliqué ci-dessous dans la quatrième méthode.

6-5-4 Quatrième méthode

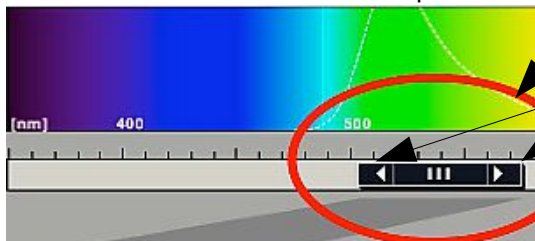
On peut créer une toute nouvelle configuration en définissant tous les paramètres. La méthodologie qui est indiquée ci-dessous est la plus simple.

Avant tout, cliquer sur l'onglet "Acquire" dans la barre supérieure, puis sur l'onglet "Acquisition".

- Dans le cas d'un canal unique :

- Dans la première box "Acquisition Mode" définir le mode de scan. Par défaut il est en mode **xyz** 
- pour l'instant rester sur le mode **xyz**
- Aller dans la fenêtre de droite "Beam Path Settings"
- Suivre maintenant le trajet de la lumière et tout d'abord activer **UV** ou **Visible** en fonction de la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome, en cochant la case correspondante.
- Activer la raie laser en augmentant le curseur de la puissance d'excitation. On démarre généralement autour de 20%. Le trajet de la lumière est maintenant matérialisé dans le diagramme situé juste en-dessous et la raie d'excitation est inscrite sur le spectre total.
- Par défaut, le PMT 2 est activé. On peut en changer en activant la case à cocher "Active" du PMT choisi.
- Si le fluorochrome est présent dans la "Dye database" le sélectionner dans la fenêtre ci-contre.

Le spectre d'émission du fluorochrome apparaît alors au niveau des couleurs du visible tandis qu'une fenêtre pré-définie apparaît en-dessous.



- On peut modifier cette fenêtre en faisant glisser les extrémités du "slider". Si les fenêtres des autres canaux gênent, on peut les déplacer pour avoir plus de largeur possible.
- Si le fluorochrome n'est pas présent dans la "Dye database" définir une fenêtre spectrale autour du pic d'émission du fluorochrome.

Note – La limite inférieure de détection doit toujours

être située à au moins une quinzaine de nanomètres au-dessus de la longueur d'onde d'excitation. En-dessous, on risque de récupérer un fort signal de réflexion.

Note – Il est possible de rajouter un fluorochrome dans la "Dye database" – Voir Ap.3 p43.

- Enfin, cliquer sur la fenêtre située à côté du label "PMTn" et choisir la couleur à attribuer à ce canal.

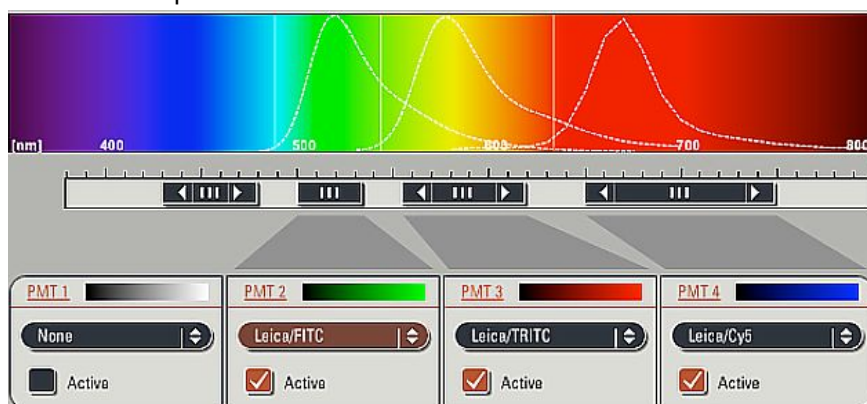
- Dans le cas d'une acquisition dans plusieurs canaux :

- Les premiers pas sont les mêmes que précédemment mais dans la fenêtre de droite "Beam Path Settings" activer toutes les raies d'excitation des différents canaux en augmentant les curseurs des raies d'excitation correspondantes. Ne pas oublier de cocher UV et/ou visible si nécessaire.

- Activer autant de PMT que canaux.

- De la même manière que précédemment, pour chaque PMT sélectionner un fluorochrome.

Par exemple : pour un triple marquage FITC/TRITC/Cy5 on obtient le diagramme spectral ci-contre.



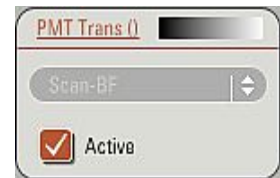
6-5-5 Ajout d'un canal en lumière transmise.

Que ce soit en mode canal unique ou multi, il est possible d'ajouter une détection en lumière transmise.

Pour cela :

- Activer le "PMT Trans ()" en cochant la case "Active"

- Puis dans la case située au dessus choisir le mode de contraste :
Scan-BF → image en lumière transmise conventionnelle ;
Scan-DIC → image en contraste interférentiel de Nomarski ;
Scan-DIC Pol → non disponible sur le système.



6-5-6 et configuration de l'AOBS

En cliquant sur **AOBS**, une fenêtre s'ouvre avec pour les différentes excitations programmées les options choisies : **Fluorescence**, **Reflection** et **Enhanced dynamics**. En fluorescence, en activant le mode **Enhanced dynamics** on supprime toute lumière d'excitation réfléchi. C'est la configuration par défaut.

Note : le mode "**Enhanced dynamics**" ne peut être activé que pour 4 raies d'excitation.

Le mode "**Reflection**" est destiné à autoriser une imagerie en mode réflexion (voir A1 p.40)



6-6 Configuration de l'acquisition

6-6-1 Mode simultané vs mode séquentiel

Par défaut, le système est configuré en mode simultané (case "**seq**" non cochée). Dans la fenêtre "**Acquisition Mode**" on passe en mode séquentiel en cliquant sur la case "**seq**".



En mono-canal, on peut activer ou non le mode séquentiel cela n'aura aucune importance.

Par contre, en mode multi-canal, **il est vivement conseillé de choisir l'acquisition séquentielle**.

Note – Dans le mode simultané (case seq décochée) toutes les lignes lasers sélectionnées s'illuminent en même temps avec pour conséquence un risque important de "cross-talk" entre les différents canaux de détection. Ce mode est à utiliser uniquement dans le cas où une acquisition rapide est absolument nécessaire ou, à la rigueur, dans le cas de fluorochromes ayant des spectres d'excitation et d'émission très largement séparés spectralement.

Dans le mode séquentiel, les excitations laser s'illuminent les unes après les autres. On élimine ainsi une grande part du "cross-talk" d'excitation. Par contre ce mode est d'autant plus lent qu'il y a de canaux sélectionnés.

Si le mode séquentiel est activé, une nouvelle boîte "**Sequential Scan**" s'ouvre en bas de la colonne de gauche.

Il faut ajouter autant de scans qu'il y a de canaux (le canal transmission n'est pas à prendre en compte !).

Cocher l'option "between frames".

Note – Dans l'option "**between frames**", toute l'image sera d'abord acquise dans le canal 1, puis dans le canal 2, etc. **Ce mode est à privilégier**.

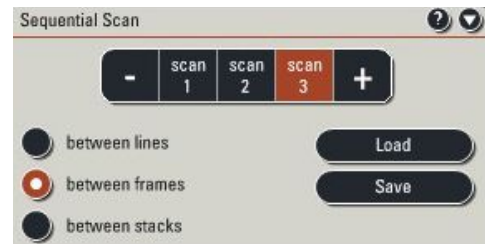
Dans l'option "**between lines**", le système va lire séquentiellement la première ligne dans le canal 1, puis dans le canal 2, etc, puis la seconde ligne dans le canal 1, puis dans le canal 2, etc - Ce mode n'est pas conseillé car il est légèrement plus lent que le précédent et surtout il est plus malaisé d'effectuer les réglages.

L'option "**between stacks**" est quasi anecdotique et est très fortement déconseillée notamment en raison des erreurs de repositionnement en z.

A ce stade, tous les canaux ajoutés ont la même configuration avec toutes les fenêtres actives.

Il suffit désormais d'individualiser chaque canal en désactivant les fenêtres des canaux voisins et les raies laser correspondantes.

On dispose ainsi d'une configuration personnalisée cohérente et faisant apparaître tous les spectres d'émission sur le panneau de contrôle.



6-6-2 Choix de l'échantillonnage xy

Au démarrage du logiciel, la deuxième "box" de la colonne de gauche est réduite. Cliquer sur la petite flèche en haut à droite pour l'ouvrir.

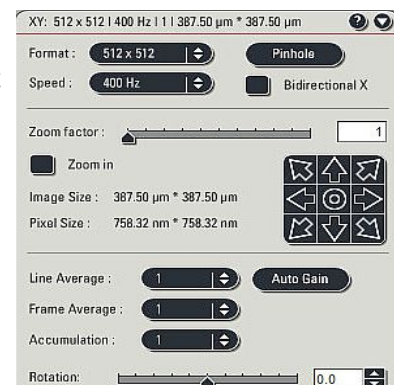


Les paramètres par défaut apparaissent dans la première ligne :

- la définition de l'image "**Format**" est de 512x512 pixels ;
- la vitesse de scan "**Speed**" est de 400Hz ;
- le zoom est à 1 d'où un champ d'acquisition de $n\mu\text{m} \times n\mu\text{m}$;

Bien que n'apparaissant pas dans la première ligne :

- le diamètre du pinhole est également fixé par défaut à 1 Airy Unit → meilleure résolution ;



- la dynamique de l'image est de 8bits (256 niveaux de gris).

Ces paramètres sont à réserver pour des images de travail qui seront difficilement exploitables pour une publication.

Comme cela a déjà été expliqué plus haut dans le chapitre concernant le plan expérimental, **pour une publication, il faut toujours opter pour une définition d'image supérieure ou égale au 1024x1024.**

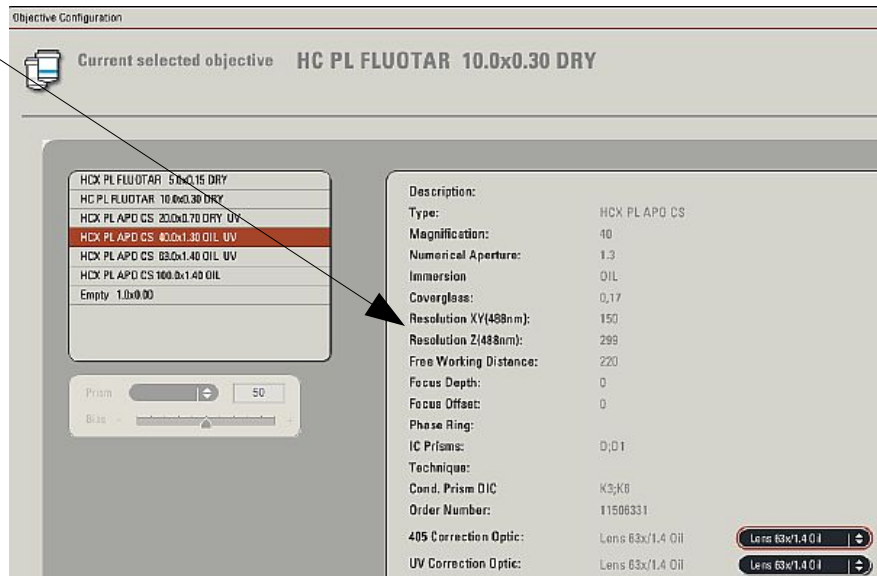
Pour obtenir une **image parfaitement échantillonnée en xy** il faut respecter la **règle de Nyquist** (échantillonnage d'un signal sinusoïdal).

Pour simplifier, **la taille du pixel doit être égale à la résolution divisée par un facteur 2,3.** Pour cela il suffit soit de se reporter aux colonnes "**taille optimale du pixel**" et "**pas d'échantillonnage en z**" des tableaux de résolutions des différents objectifs présentés au début de ce manuel soit en cliquant sur l'onglet "**Configuration**", puis sur "**Objectif**" et en pointant sur l'objectif utilisé on fait apparaître les paramètres de celui-ci et notamment les résolutions en xy et en z (exc. 488nm).

Note - les valeurs des tableaux présentés pour chaque objectif, au début du manuel sont des valeurs **réalistes et non théoriques**. Elles sont donc un peu moins bonnes que celles indiquées par le système.

En fait cette définition optimale est à réserver pour les images destinées à une analyse spatiale ou, pour celles comportant des éléments très fins à résoudre : fibres du cytosquelette, membranes, etc.

Pour atteindre la définition optimale sans trop augmenter le temps d'acquisition on peut choisir de rétrécir le champ d'acquisition en adoptant un facteur de zoom.



Ainsi, *a contrario*, le facteur de zoom optimal peut être calculé pour une définition d'image de 1024x1024.

objectif	excitation		
	405nm	488nm	633nm
10x/0,3	x5,17	x4,29	x3,33
20x/0,7	x6,00	x4,98	x3,86
40x/1,25	x5,40	x4,45	x3,44
63x/1,4	x3,81	x3,16	x2,45
100x/1,4	x2,40	x1,99	x1,54

Note - Attention il y a des limites au zooming !

Tout d'abord à partir d'un certain facteur de zoom la définition optimale des images va conduire à des images de plus en plus pixelisées.

Mais surtout **pour les forts grossissements, le risque de blanchiment des fluorochromes devient très important** car le spot d'éclairage confocal (qui a alors une taille bien supérieure à celle du pixel) va rester quasi stationnaire sur la zone imagée.

6-6-3 Choix de la vitesse de scan

On a vu que, par défaut, la vitesse de scan "**Speed**" est de 400Hz.

Dans la plupart des cas c'est un bon choix. Toutefois il faut savoir qu'on peut améliorer le rapport signal/bruit en diminuant la vitesse de scan car le tube photo-multiplieur peut alors accumuler plus de photons (voir tableau suivant), ce qui réalise un moyennage du signal et réduit le bruit de fond quantique (Poisson shot noise) avec au final une amélioration du rapport signal/bruit.

Par contre en ralentissant la vitesse de scan on augmente le taux de blanchiment et pour des cellules vivantes on accroît les risques de photo-toxicité.

Le système permet de monter à des vitesses supérieures mais cela se fait en imposant un facteur de zoom minimum (voir tableau suivant). Bien sûr cela se fait au détriment du temps d'accumulation et avec une détérioration du rapport signal/bruit.

Fréquence	temps de scan /ligne en s	temps d'accumulation		zoom imposé
		max	min (µs)	
10Hz	0,1	84,9	49,7	1x
100Hz	0,01	8,49	4,97	1x
200hz	0,05	4,24	2,48	1x
400hz	0,025	2,12	1,24	1x
700hz	0,0014	1,21	0,71	2,5x
800Hz	0,00125	1,06	0,62	2,5x
1000Hz	0,001	0,849	0,497	2,5x
1400Hz	0,0007	0,606	0,355	6,0x

On peut également augmenter la vitesse de scan en utilisant un scan bidirectionnel mais il faut pour cela procéder à un ajustement de phase qui nécessite un étalonnage préalable avec une lame de phase (à réaliser par l'ingénieur responsable). **Ce mode de scan n'est à envisager que pour l'acquisition de phénomènes très rapides** (ondes calciques par exemple).

6-6-4 Choix du taux de moyennage ou d'accumulation

Les tubes photomultiplicateurs qui enregistrent le signal sont sujet à un bruit de fond électronique aléatoire. En relisant les pixels une nouvelle fois il est très peu probable qu'un signal de bruit apparaisse sur le même pixel. Ainsi si on fait la moyenne entre les deux valeurs, le bruit va diminuer. On peut montrer que **l'amélioration du rapport signal/bruit est proportionnelle à la racine carrée du taux de moyennage**. Ainsi un moyennage de 4 conduit à un doublement du rapport signal/bruit et il faut monter à un moyennage de 9 pour avoir un triplement de ce rapport. Cependant **le moyennage présente deux inconvénients** :

- il ralentit d'autant la vitesse d'acquisition ;
- il augmente d'autant le risque de blanchiment des fluorochromes.

Il existe deux modes de moyennage : le **mode "line"** où chaque ligne est relue n fois et le **mode "frame"** où chaque image est relue n fois. La différence entre les deux modes est très faible mais le **mode "line"** est très légèrement plus rapide. Il est également plus facile à gérer en terme de visualisation.

En règle générale un **moyennage de 4 en mode "line"** est un choix satisfaisant.

On peut également réaliser une **accumulation**. Dans ce cas chaque pixel est lu n fois et le signal sommé. Cela peut-être réalisé en mode **"line"** ou en mode **"frame"**.

Cette accumulation permet de détecter des signaux très faibles mais la sommation va se faire en accumulant également le bruit de fond avec en plus les mêmes inconvénients que le moyennage. On obtient donc des images très bruitées et c'est pourquoi ce mode d'acquisition est très rarement utilisé.

Les deux modes peuvent être combinés : on peut moyennner chaque ligne et accumuler chaque frame ou accumuler chaque ligne et moyennner chaque frame. Par contre il est impossible moyennner et accumuler chaque ligne ou chaque frame.

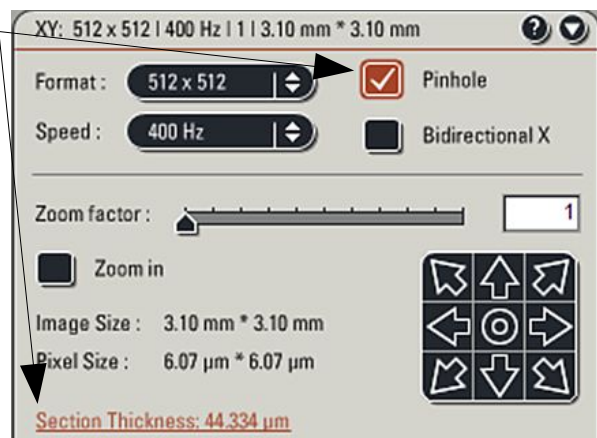
6-6-5 Réglage du trou d'aiguille ou "pinhole"

On a vu plus haut que, par défaut, le logiciel configure le diamètre du **"pinhole"** à 1 "Airy Unit" ce qui offre la meilleure résolution. Cela détermine également **l'épaisseur de la coupe optique**. Ainsi en cliquant sur la case **"pinhole"** on fait apparaître en rouge cette valeur.

Il peut être intéressant d'augmenter le diamètre du trou d'aiguille et par conséquent l'épaisseur de la coupe dans diverses situations :

- dans le cas d'une image mono-plan, pour avoir vision plus complète des structures, ou, si le signal est faible et qu'on ne veut, ou ne peut, pas jouer sur les autres paramètres ;
- dans le cas d'une acquisition en "stack" pour un objet très épais, cela permet de diminuer le nombre de coupes nécessaires.

Plus rarement, on peut être amené à adopter un diamètre de trou d'aiguille plus petit que la valeur par défaut, principalement pour améliorer l'échantillonnage en z. Toutefois, il faut savoir qu'en dessous de la valeur par défaut de 1 Airy unit, la diminution d'épaisseur ne varie plus linéairement avec le diamètre. Ainsi, on ne peut obtenir une réduction d'épaisseur sensible qu'au prix d'une réduction drastique du diamètre. Or, cela se fait au détriment de l'intensité du signal qui varie proportionnellement au carré du diamètre.



7 - Réglages de l'acquisition

On peut maintenant régler l'excitation et la détection du ou des canaux qui ont été configurés précédemment.

7-1 En mode simultané

Il faut tout d'abord aller dans le panneau de droite et vérifier la puissance des différentes raies lasers utilisées pour l'excitation.

Note - Pour la raie 405nm (marquages Dapi ou Hoechst) une puissance de 12,5% (deuxième graduation) est généralement suffisante.

Pour les autres raies démarrer à une puissance d'environ 20%.

Puis en bas de la fenêtre générale cliquer sur la case "Live".



Une fenêtre image s'ouvre sur la droite avec autant de compartiments qu'il y a de canaux. Cliquer sur le premier carré en haut à gauche (il correspond au canal ayant la plus courte longueur d'onde de la configuration) et tourner le bouton de gauche "Smart Gain" du Panel box.



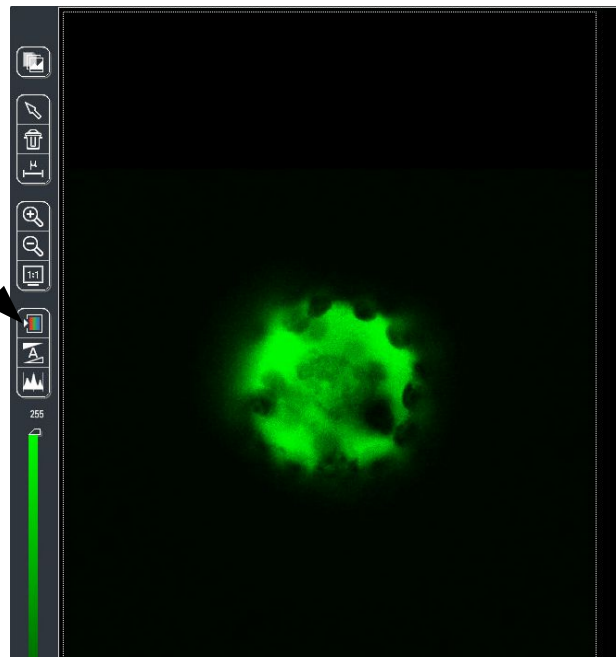
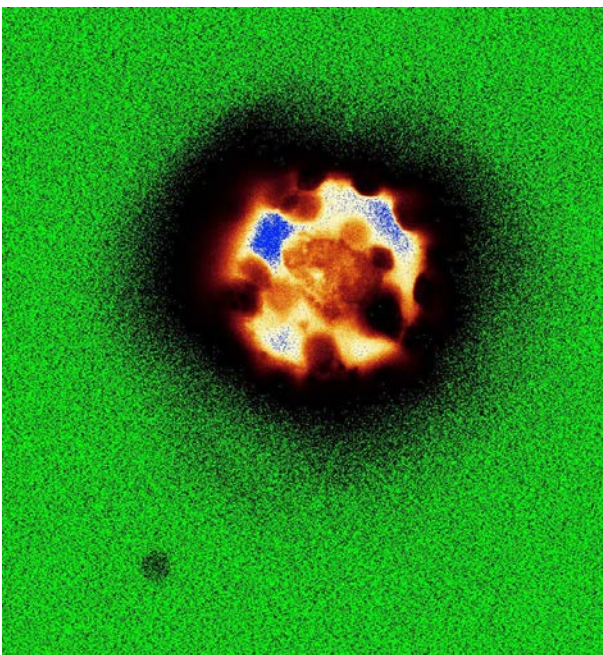
Augmenter le gain jusqu'à faire apparaître l'image de l'objet.

Explorer les différents niveaux de l'objet à imager à l'aide du bouton "Z position" et se positionner à celui où le signal est maximum.

Idéalement toutes les intensités de signal émises par l'objet doivent être rendues par un niveau de gris dans l'image et s'échelonner sur l'ensemble de la dynamique sélectionnée (par exemple de 0 à 255 en 8bits)..

Pour aider à optimiser cette dynamique on peut activer la "LUT Glow Over&Under".

Note – Les LUT (Look-Up Table) sont des palettes de fausses couleurs.



Une image en fausses couleurs est désormais affichée avec :

- en bleu les pixels codés à l'intensité maximale (255 en 8bits) ;
- en vert les pixels codés à l'intensité 0 ;
- et dans des nuances allant du blanc au noir en passant par des nuances d'orange les intensités intermédiaires.

Pour obtenir une bonne dynamique on doit **d'abord régler le seuil de détection** avec le deuxième bouton "Smart Offseet" du Panel box. Pour cela baisser fortement le Gain et régler l'Offset de manière à faire

apparaître une surface verte pointillée de noir dans toutes les régions de l'image où se trouvent des structures. Le vert peut être uniforme si on est en dehors de toute structure.

Dans un second temps ré-augmenter le **gain** de telle manière qu'il n'y ait pas de grande surface bleue dans l'image. Si tel était le cas, cette région de l'image serait rendue par une intensité maximale sans qu'on puisse visualiser, en aucune manière, les structures sous-jacentes.

Note - Concernant le gain il est vivement conseillé de ne pas utiliser des gains trop élevés. Idéalement ils doivent restés inférieurs à 850. En effet des valeurs trop élevées dégradent fortement le rapport signal/bruit comme le montrent les images ci-contre (d'après R.M. Zucker & O.T. Price -Cytometry -2001) qui mettent clairement en évidence le rôle du gain (C et D) et du moyennage (D,E,F).

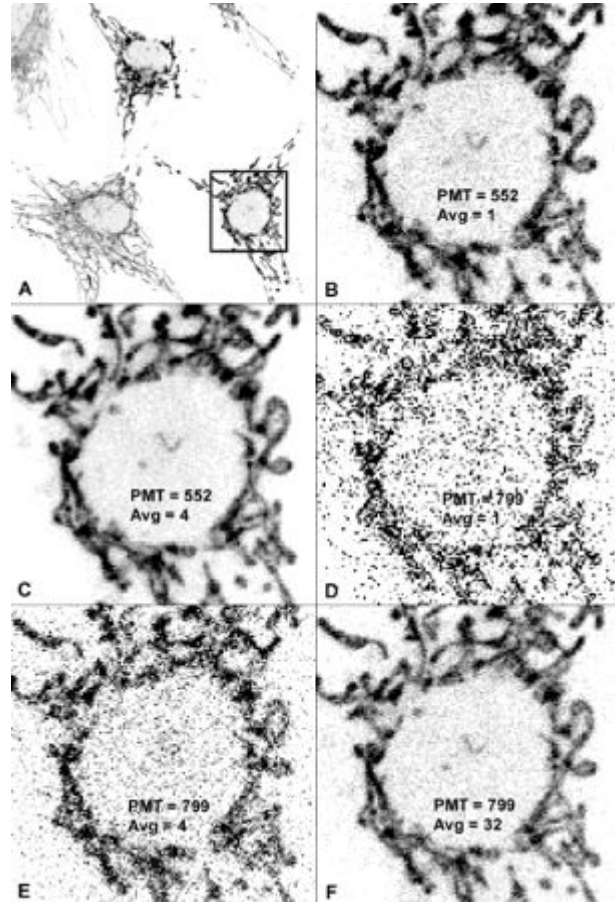
Si le signal n'est pas assez fort il est donc préférable d'augmenter la puissance d'excitation de la ligne plutôt que le gain.

Attention toutefois au blanchiment ! En augmentant cette puissance on augmente fortement le risque de photo-blanchiment notamment avec les courtes longueurs d'ondes.

En mode simultané **attention également au Cross-talk** entre les canaux. En augmentant la puissance d'excitation des canaux de plus courte longueur d'onde, on accroît le taux de cross-talk dans les canaux décalés vers le rouge.

Rappel – On a vu plus haut qu'on peut améliorer le rapport signal/bruit en ralentissant la vitesse de scan .

Après avoir régler le premier canal on peut répéter l'opération sur les autres canaux successivement.

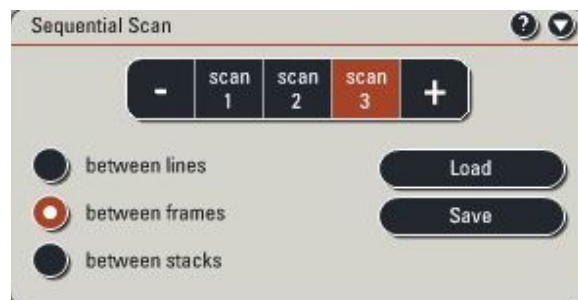


7-2 En mode séquentiel

Aller dans la fenêtre "**sequential scan**" et cliquer sur le premier canal. Puis cliquer sur la case "**Live**". Cette fois-ci un seul cadre apparaît dans la zone image (sauf si le canal Trans a été activé).

Réaliser les réglages de la même manière que pour le mode simultané.

Puis, renouveler l'opération pour chaque canal après l'avoir sélectionné dans la fenêtre "**sequential scan**".



7-3 Recadrage de l'image

C'est aussi le moment pour recadrer l'image.

7-3-1 Zoom

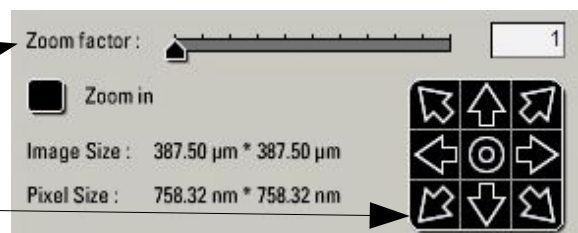
Il existe plusieurs possibilités pour zoomer :

- tout d'abord on peut appliquer un facteur de zoom dans la zone centrale du panneau de configuration.

On réalise ainsi un **zoom centré**.

Celui-ci peut être décalé en utilisant le panneau de déplacement situé juste en dessous.

Un clic dans la zone centrale de ce panneau recentre le zoom.



- On peut obtenir le même résultat en utilisant le bouton **Zoom** du "Panel box".

Là encore le zoom sera centré et il pourra être déplacé de la même manière que précédemment.

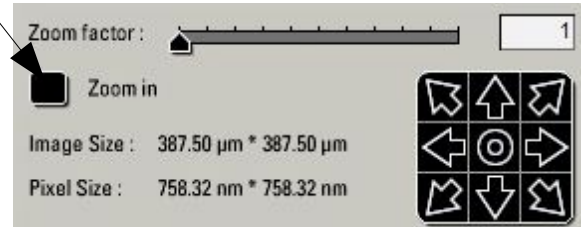
- Enfin, on peut activer la case à cocher "**Zoom in**".

Dans la zone image, il faut alors dessiner un cadre autour de la région d'intérêt.

Un champ carré ayant comme côté la plus grande

dimension du cadre dessiné est alors pris comme zoom.

Il est également possible de le déplacer comme précédemment.



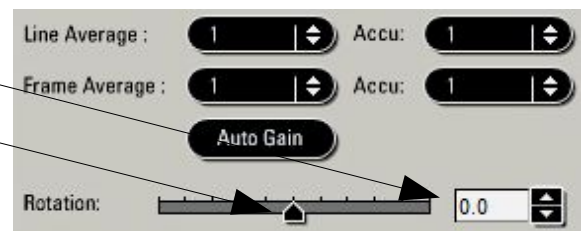
Note – Attention en réalisant un zoom vous allez modifier l'échantillonnage spatial de votre image (voir 6-5-2 Choix de l'échantillonnage xy – p.17)

7-3-2 Rotation

On peut réaliser une rotation du champ image zoomé ou non. Là encore plusieurs possibilités.

- Tout d'abord en indiquant numériquement un angle de rotation positif ou négatif dans la fenêtre **Rotation** située dans le bas du panneau de configuration, ou en déplaçant le curseur situé juste à gauche.

- On peut également obtenir le même résultat en agissant sur le bouton "**Scan Field Rotat**" du "Panel box".



Tout est désormais prêt pour l'acquisition des images.

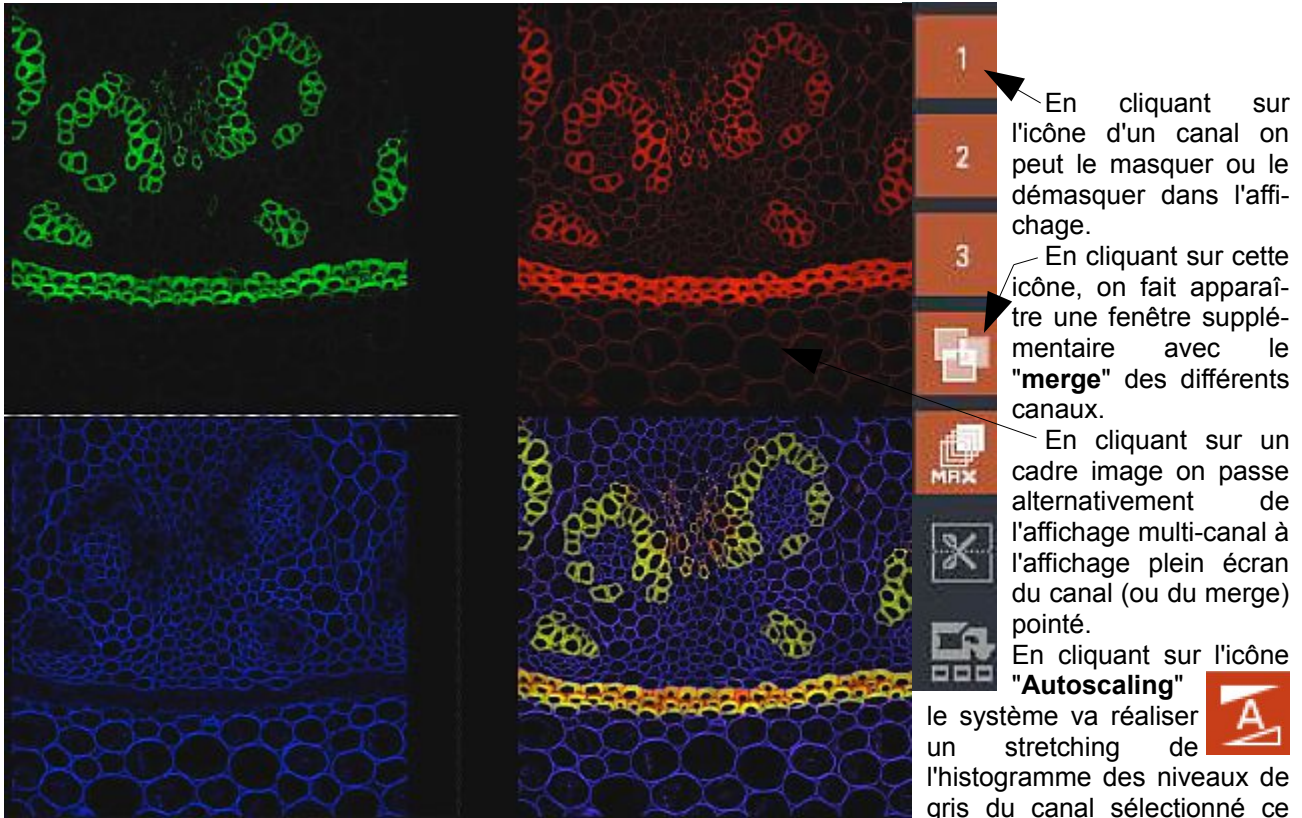
8 – Acquisition des images

8-1 Plan unique

Il suffit de cliquer sur la touche "Start" située dans la barre inférieure.

Note : en mode *simultané* on obtient le même résultat avec la touche "Capture image". Par contre en mode *séquentiel* cette touche ne permet d'acquérir que l'image du canal actif.

Si l'image comporte plusieurs canaux, chaque canal apparaît dans le carré correspondant de la zone image.



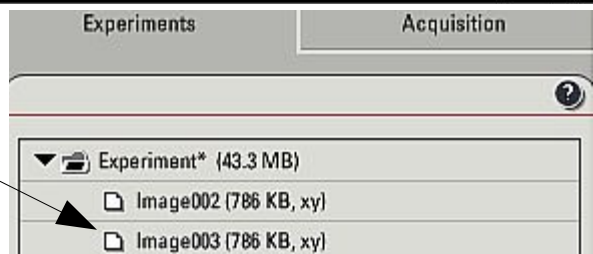
qui offre un meilleur contraste. On revient au contraste de l'acquisition en re-cliquant sur l'icône ou en cliquant sur le bouton "Reset" de la fonction histogramme.

En cliquant sur l'icône "Histogram" pendant l'acquisition le système affiche l'histogramme de fréquence des niveaux de gris et on peut alors optimiser la dynamique du canal sélectionné de façon contrôlée. On peut seuiliser haut et bas en jouant sur les extrémités du slider horizontal et modifier la gamma avec le slider vertical à droite.

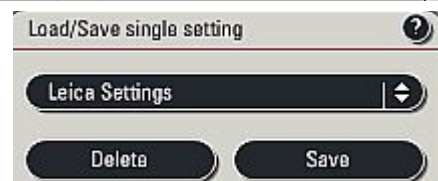
Offline, il est possible d'avoir un "Autoscaling" qui s'applique à l'ensemble des séries z ou t.



L'image est désormais enregistrée en mémoire tampon. Elle apparaît dans l'onglet "Experiments". Il est vivement recommandé de renommer les images au fur et à mesure des acquisitions de façon à pouvoir facilement les identifier. Pour cela il suffit de faire un clic droit sur la ligne correspondant à l'image et de choisir "Rename Imagexxx". **Attention : chaque image doit avoir un nom différent.**



C'est aussi le bon moment pour sauvegarder une configuration type. Pour cela cliquer sur la fenêtre "Load/Save single setting" puis sur "Save" et dans la fenêtre qui s'est ouverte nommer cette configuration. Elle sera stockée dans les "User settings".



8-2 Série en z

8-2-1 Définir les limites

Ouvrir le panneau "Z-Stack".

Note - En mode multi-canal séquentiel, choisir de préférence le fluorochrome le plus stable ou celui qui va englober le plus largement les structures (de ce point de vue le canal Dapi/Hoechst n'est généralement pas approprié).

- En mode multi-canal simultané, il n'y a pas le choix, tous les canaux seront excités.

Puis activer le mode "Live"



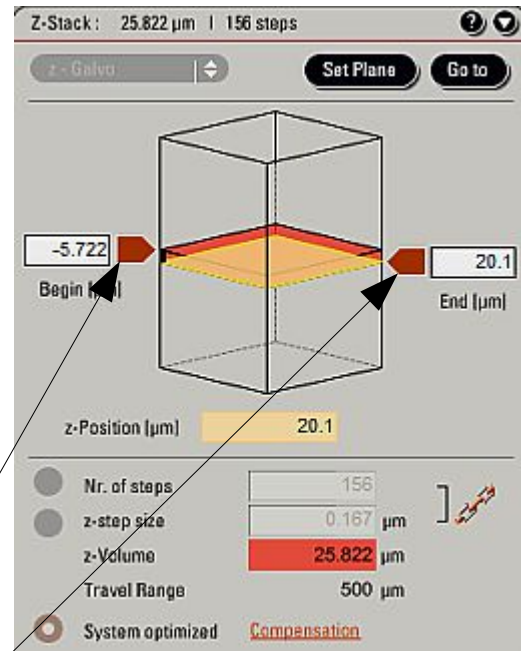
A l'aide du bouton "Z-Position" du "Panel box", régler le focus en tournant le bouton dans le sens des aiguilles d'une montre, ce qui rapproche l'objectif de la lamelle, ce qui revient à imaginer la partie la plus profonde de l'objet. **Faire attention que l'objectif ne vienne pas buter sur la lamelle !**

Cliquer sur la flèche "Begin" qui passe du noir à l'orange tandis que s'affiche dans la

fenêtre la position en z.

Puis tourner le bouton "Z-Position" dans le sens inverse des aiguilles d'une montre pour déterminer le focus de la partie haute de l'objet et cliquer sur la flèche "End". Vérifier que la valeur affichée dans la fenêtre correspond bien à celle affichée sur l'écran du "panel box". Sinon re-cliquer sur la flèche jusqu'à ce que celle-ci soit activée en orange avec la bonne valeur. **Ne pas oublier d'interrompre le "Live"**.

La hauteur du volume imagé apparaît dans la fenêtre "z-volume".



8-2-2 Réglage éventuel de la compensation

Le système permet de compenser des variations de signal en fonction de la profondeur (problèmes de pénétration des AC, problèmes d'opacité, etc), en réalisant des interpolations linéaires du gain des détecteurs (PMT), de la puissance d'excitation (AOTF) ou des deux.

Note - La double compensation n'est pas possible en mode séquentiel.

Pour réaliser cette compensation ouvrir la fenêtre "Z-compensation" en cliquant sur Compensation en bas du panneau "Z-Stack"

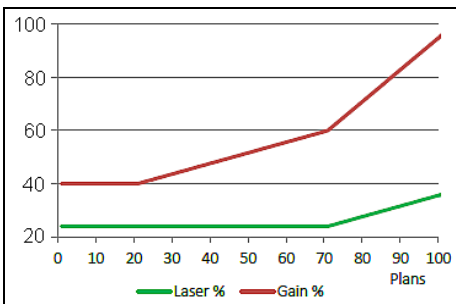
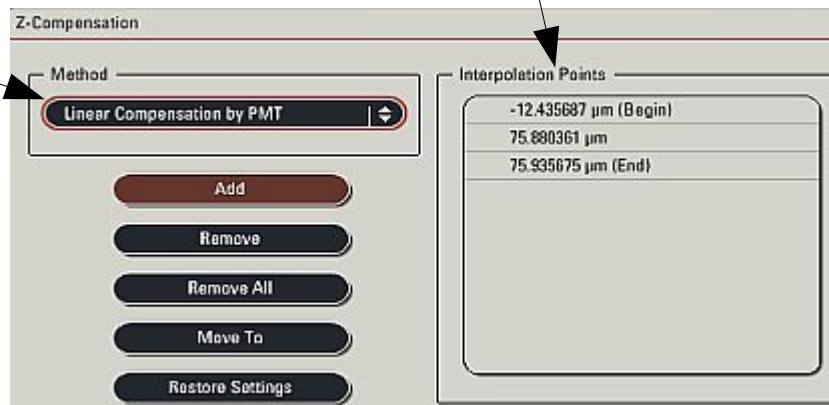
Les bornes "Begin" et "End" doivent apparaître dans la partie "Interpolation Points".

Choisir le(s) mode(s) de compensation dans la fenêtre "Method".

Se positionner sur "End" puis cliquer sur "Move To" puis activer le mode "Live" et faire les réglages pour optimiser le signal en fonction de la méthode choisie.

Puis se positionner sur "Begin" et procéder de la même façon que précédemment.

Il est possible d'insérer des points intermédiaires.



Ainsi le gain et/ou l'excitation vont varier linéairement entre les différents points qui auront été définis.

Cette procédure est assez lourde à mettre en œuvre mais elle peut être très utile pour les objets épais.

Note - Il est également possible de réaliser une compensation par traitement d'images a posteriori, notamment pour corriger des effets de bleaching.

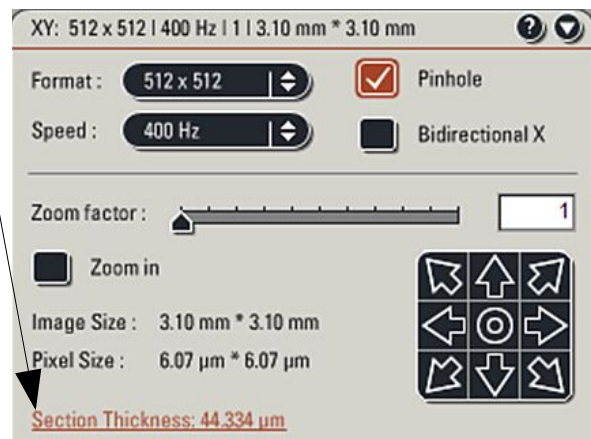
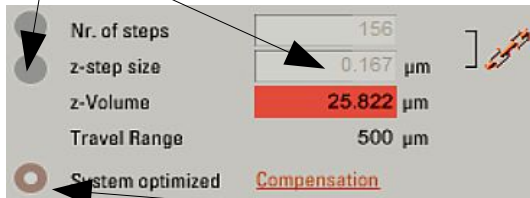
8-2-3 Réglage de l'échantillonnage en z

Pour cela il existe plusieurs possibilités.

Première méthode - D'abord se reporter à la deuxième fenêtre où, si la case "Pinhole" est cochée, apparaît en rouge l'épaisseur des coupes optiques en fonction du paramétrage adopté.

En divisant cette valeur par 2,3 (ou au moins par 2) on obtient la valeur du pas d'échantillonnage ou "z-step size".

Il faut maintenant entrer cette valeur dans la case "z-step size" du panneau "Z-Stack".



Le nombre de plans est immédiatement calculé et apparaît dans la fenêtre "Nr. of steps" (il faut parfois cliquer dans cette fenêtre pour que la valeur apparaisse). La machine va également légèrement ajuster le "z-step size" en fonction des bornes "Begin" et "End".

Deuxième méthode – On peut également cliquer sur l'option "System optimized". Dans ce cas le système va faire automatiquement le même calcul que précédemment mais il va également modifier l'échantillonnage en xy en tenant compte de tous les paramètres et de manière à respecter le critère de Nyquist. Comme cela a été signalé plus haut, cela peut conduire à des images de très grande définition avec pour conséquence des temps d'acquisition très longs. **Cette méthode n'est donc pas recommandée.**

Troisième méthode – On peut également choisir de faire un nombre de coupes déterminé (par ex. toujours le même nombre) en entrant ce nombre dans la fenêtre "Nr. of steps".

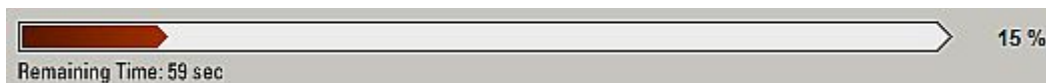
Si des bornes "Begin" et "End" ont été définies le système va alors calculer un "z-step size" mais celui-ci ne sera pas forcément conforme à l'échantillonnage optimal. **Cette méthode est donc également déconseillée.**

8-2-4 Acquisition d'une série z

Une fois paramétré l'échantillonnage spatial il faut lancer l'acquisition en appuyant sur la touche "Start" en bas de l'écran.



L'acquisition démarre et une barre de progression apparaît en bas.

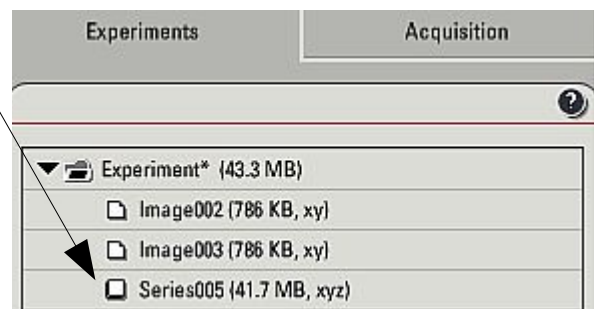


On a aussi une estimation du temps total d'acquisition de la pile d'images. Attention s'il y a de nombreux plans l'estimation de durée sera revue à la hausse au cours de l'acquisition.

Ce n'est que lorsque cette barre a disparu de l'écran que l'acquisition est terminée.

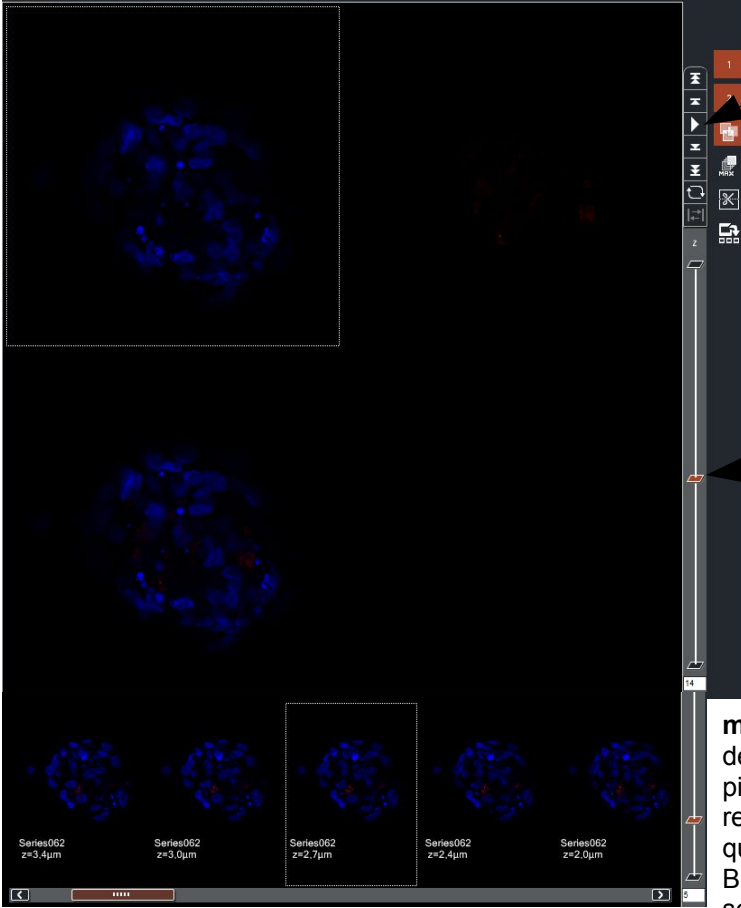
Note - Si on interrompt la saisie en cours de progression, celle-ci comporte uniquement les images acquises. Cependant en mode séquentiel multi-canal si l'interruption advient avant l'acquisition du dernier canal, une image incomplète est alors enregistrée.


La série des images est désormais enregistrée en mémoire tampon. Elle apparaît dans l'onglet "Experiments" avec l'en-tête provisoire "Serie00n". Comme pour les images, il est vivement recommandé de renommer les séries au fur et à mesure des acquisitions de façon à pouvoir facilement les identifier. La procédure est la même que pour les images : un clic droit sur la ligne correspondant à la série, puis "Rename Seriexxx". **Attention : là aussi chaque série doit avoir un nom différent.**





8-2-5 Visualisation rapide d'une série z

On dispose de plusieurs modes de visualisation des séries z.






En premier lieu on peut faire défiler successivement les images de la série en activant la touche . Les images défilent une fois de la première à la dernière.

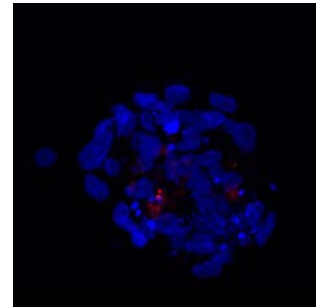
Si la case  est activée, le défilement persiste en continu toujours de la première à la dernière image.

Si c'est la case  qui est cochée, le défilement se fait en continu de la première à la dernière image puis retour.

Il est également possible de se déplacer manuellement dans la pile d'image en utilisant le curseur du z-slider vertical.

Enfin, on peut faire apparaître les différents plans sous forme de galerie en activant la touche  et en se déplaçant dans la pile avec la  barre de défilement située juste en dessous.

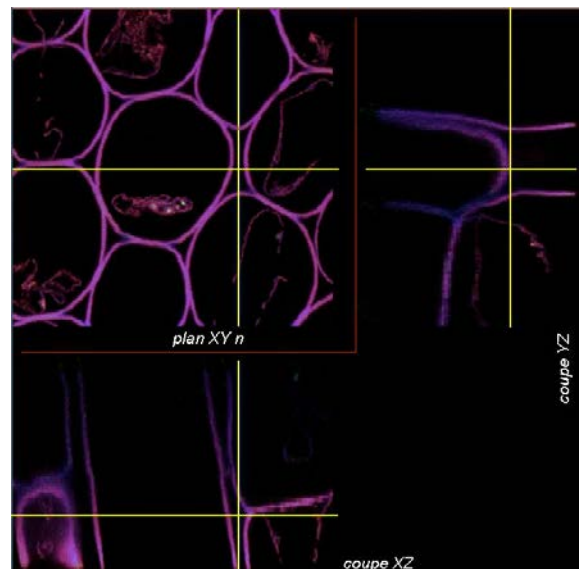
En cliquant sur l'icône  le système va réaliser une projection de type MIP (**Maximum Intensity Projection**) avec l'ensemble des images de la pile pour les différents canaux ainsi que pour le merge. Bien sûr on peut sélectionner ou désélectionner les canaux affichés.



Enfin en cliquant sur l'icône  on fait apparaître les coupes orthogonales xz, en  bas, et yz, sur le côté. Chacune correspond avec les primitives visualisées sur l'image xy et centrées sur la crosshair.

Un clic droit sur l'un des champs images ouvre une fenêtre qui permet de faire disparaître la crosshair correspondante: "**Hide Crosshair**", ce qui est préférable pour la lisibilité des coupes orthogonales. Cette fenêtre permet également modifier le ratio xy/z. Une valeur supérieure à 1 est souvent intéressante pour une bonne lecture des coupes orthogonales. Un simple clic sur un champ permet de réactiver la crosshair.

Ces modes de visualisation des séries z sont les seules accessibles sur l'ordinateur pilotant le confocal.



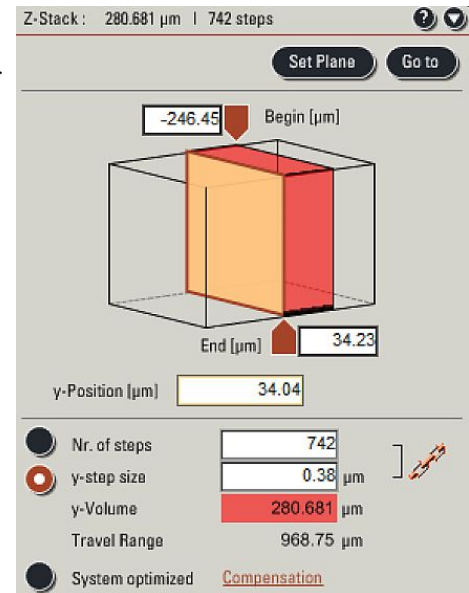
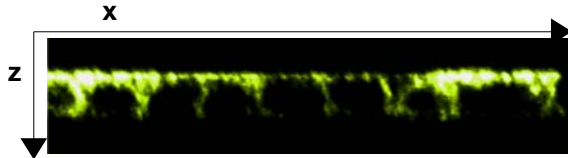
8-2-6 Acquisition d'une série xzy

Une autre possibilité pour obtenir des coupes **xz**

- Sélectionner le **mode XZY**, puis en **"Live"** faire la mise au point sur le plan le plus intense et réaliser les réglages.
- Toujours en mode **"Live"** positionner la ligne blanche pointillée au niveau désiré pour la coupe (éventuellement réaliser une rotation du champ pour un axe plus ou moins diagonal).
- Ouvrir le panneau **"Z-Stack"** et éventuellement définir des bornes **"Begin"** et **"End"** en **Y** et fixer un pas **"y- step size"**.

Note – En l'absence de bornes la coupe xz n'a qu'un seul pixel de largeur, c'est pourquoi il est souvent intéressant de l'élargir légèrement en fixant des bornes en Y.

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



8-3 Acquisition de série temporelles - "Time Lapse"

Les principaux modes d'acquisition temporels sont :

- xt → scan une ligne / t
- xyt → scan un plan / t
- xyzt → scan une série z / t

Mais on peut également utiliser des modes xzxt, xyzt, xzxt et xzxt.

Il faut commencer par configurer le système en mode d'acquisition non temporel comme cela a été vu dans les chapitres précédents.

Une fois cette configuration réalisée sélectionner le mode temporel correspondant dans **"Acquisition Mode"**.

La sélection d'un mode temporel ouvre une fenêtre supplémentaire **"t"**.

La première ligne **"Time interval"** permet de définir l'intervalle de temps entre deux images ou deux stacks avec :

- soit un **temps fixé** en remplissant les cases ;
- soit un **intervalle minimum** tenant compte du temps de scan des images (ou séries d'images) en cochant **"Minimize"**.

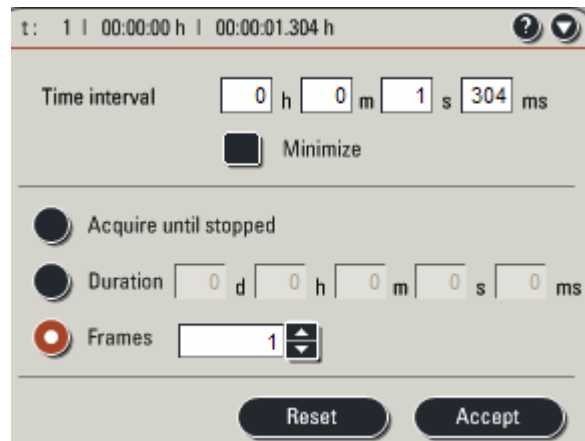
La partie basse de la fenêtre va permettre de définir la durée totale de l'acquisition :

- soit **"Acquire until stopped"** pour une durée indéfinie qui ne sera interrompue que par un stop manuel de l'acquisition ;
- soit **"Duration"** pour une durée d'acquisition définie en remplissant les cases ;
- soit **"Frames"** avec le nombre d'images (ou de séries d'images) que l'on souhaite enregistrer.

Cliquer sur **"Accept"** valide le paramétrage qui va être pris en compte lors de l'activation de la touche **"Start"**.

Note – Les acquisitions de séries temporelles peuvent nécessiter l'utilisation des dispositifs d'incubation. Ces procédures seront détaillées en appendice au manuel.

Note – Il est possible d'exporter les séries temporelles au format film .avi (Voir enregistrement de la session p.38).



8-4 Imagerie spectrale

Le système de détection du SP5 est composé d'un prisme qui disperse la lumière d'émission laquelle est ensuite dirigée sur une (ou plusieurs) fenêtre dont la largeur est ajustée par motorisation. C'est ce qui permet de définir le domaine "spectrale" d'émission imagé dans les techniques précédentes.

Mais cette motorisation permet également de réaliser un balayage de fente, c'est à dire d'analyser la lumière d'émission au travers d'une fenêtre spectrale "glissante" du bleu vers le rouge. La largeur de bande minimale de cette fenêtre est de 5nm avec un pas de décalage (vers le rouge) de 3nm minimum. Il est ainsi possible d'obtenir un spectre d'émission pour chaque voxel.

Les applications sont multiples :

- analyse spectrale
- caractérisation d'un signal d'auto-fluorescence
- soustraction d'un signal d'auto fluorescence
- séparation spectrale de fluorescences très rapprochées
- imagerie hyper-spectrale

Les modes $xy\lambda$ – $xz\lambda$ – $xyz\lambda$ – $xy\lambda t$ – $xz\lambda t$ – $xyz\lambda t$ sont utilisables.

8-4-1 Obtention d'une image spectrale

- Sélectionner le **mode $xy\lambda$** .

- Dans la fenêtre " **λ -Scan Range Properties**" qui s'est ouverte, choisir d'abord un détecteur.

- Puis fixer les limites inférieure et supérieure du domaine spectral qui sera analysé. Le système renvoie cette valeur dans "**Total Detection Range**".

- Définir ensuite la largeur spectrale de la fenêtre "glissante" dans la fenêtre "**Detection Band Width**".

Note - Attention ! Plus cette largeur est faible moins le détecteur reçoit de photons. Il est donc conseillé de ne pas descendre en dessous d'une valeur de 10nm.

Il est également conseillé d'ouvrir le pinhole de manière à recueillir plus de lumière.

- Définir ensuite un pas d'échantillonnage dans la case " **λ -Detection Stepsize**". Ici le critère de Nyquist ne s'applique pas et on peut donc se contenter d'un léger recouvrement avec un pas inférieur de 2nm par rapport à la taille de la fenêtre.

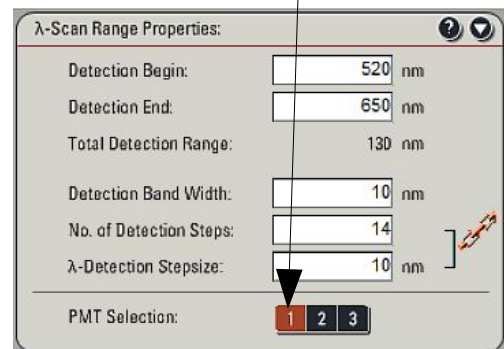
- En cliquant dans la fenêtre "**No. of Detection Steps**" le système renvoie le nombre de pas et corrige éventuellement la valeur de ce pas pour s'ajuster à la largeur totale du domaine spectral à analyser.

- Choisir une fenêtre proche du maximum supposé du spectre d'émission du fluorochrome et comme pour une acquisition standard régler puissance laser et gain en mode "**Live**".

Note - Attention ! Le signal ne doit jamais être saturé dans aucune fenêtre.

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

Une série d'images de toutes les fenêtres spectrales, est enregistrée.



8-4-2 Obtention d'un spectre d'émission

Pour analyser les spectres présents dans cette image, aller dans l'onglet "**Process**" (barre de menu en haut à gauche), puis dans "**Dye separation**", puis "**Spectral**".

Chercher avec la crosshair une région présentant un spectre bien caractéristique (un seul pic bien marqué).

Note - si la crosshair n'est pas visible dans l'image, elle peut être activée en cliquant sur le bouton dans la barre outils de l'image.



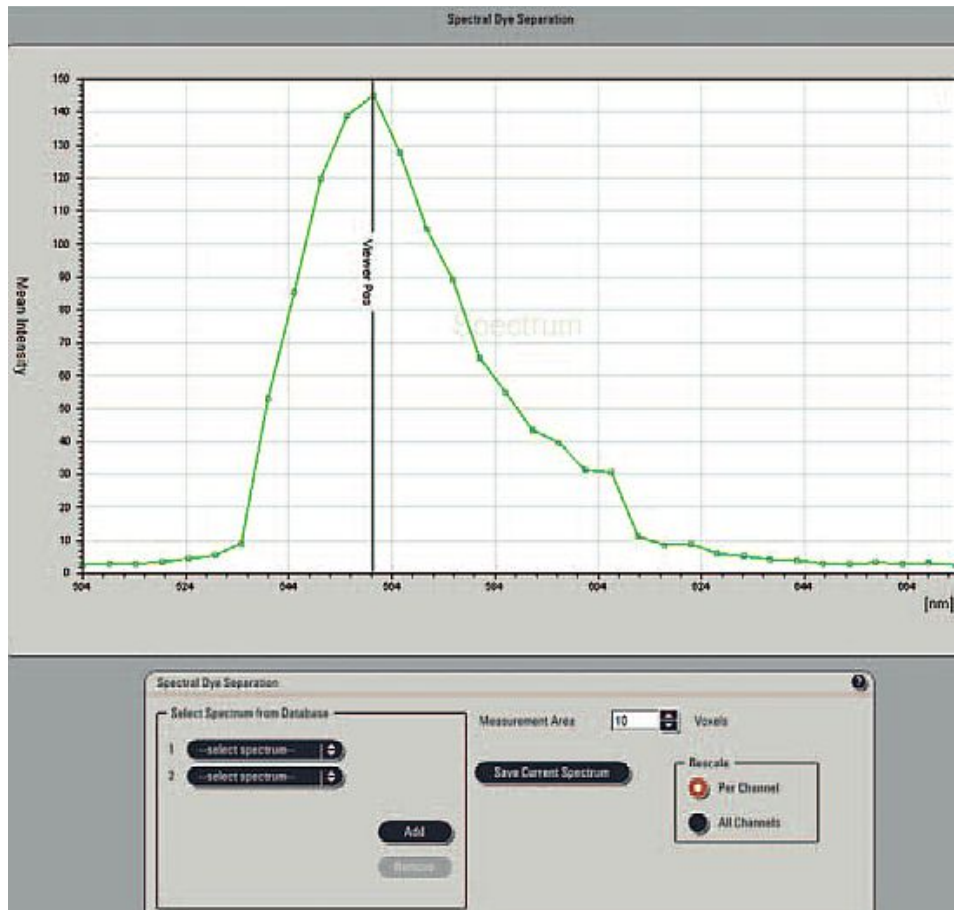
On peut élargir la région pour laquelle le spectre va être affiché soit en indiquant une taille en voxels dans la fenêtre "**Measurement Area**", soit en dessinant une ROI.

En augmentant le nombre de voxels pris en compte, cela permet d'obtenir un spectre "moyenné" plus représentatif du spectre d'émission. Cependant, il ne faut pas non plus que la ROI soit trop grande car elle risque alors d'intégrer plusieurs composantes spectrales.

Le spectre est affiché automatiquement.

Il est conseillé de normaliser l'affichage. Pour cela faire un clic droit sur l'axe des Y ("**Mean intensities**"), puis dans la fenêtre qui s'est ouverte choisir "**Normalize**".

Un clic droit dans la fenêtre donne aussi accès à des possibilités d'exportation du spectre en mode image (.Tif ou .Jpg) ou en mode données (Excel).



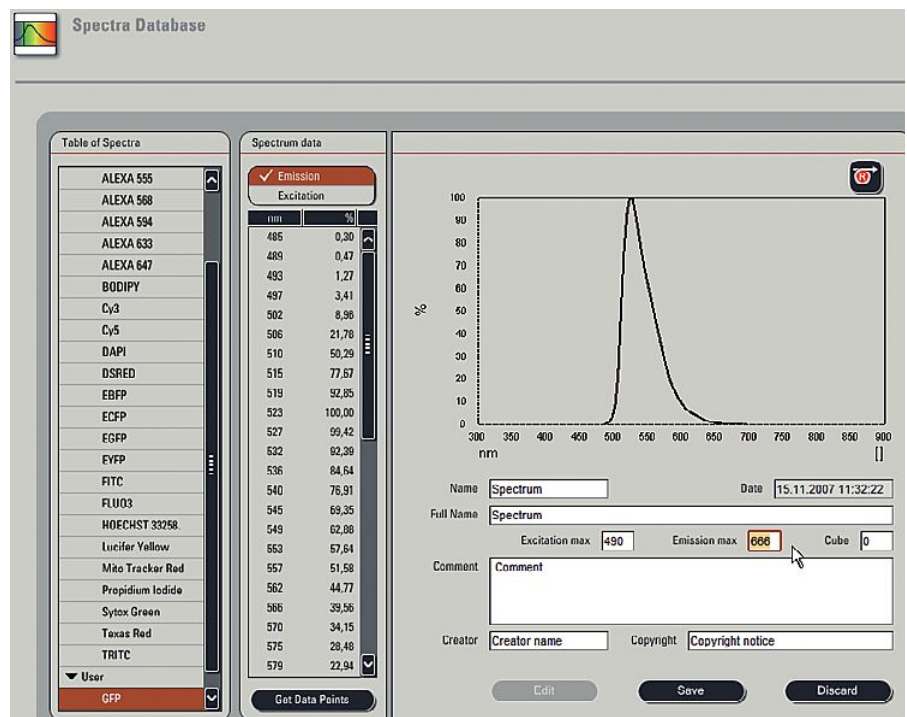
Le spectre peut également être sauvegardé dans la base de données spectrales "**Spectra Database**" du système en cliquant sur "**Save Current Spectrum**" ce qui ouvre la fenêtre ci-contre.

Remplir les différentes cases, nommer le spectre et le sauvegarder.

Celui-ci est désormais enregistré et se trouve dans la section "**User**" de la table des spectres.

Il pourra être rappelé ultérieurement.

Note - Pour obtenir de bons spectres de référence il est préférable d'utiliser des préparations mono-marquées.



8-4-3 Séparation spectrale de fluorochromes – "Linear unmixing"

Une fois les spectres de référence sauvegardés, il est possible d'extraire d'une image spectrale la contribution de différents fluorochromes. Cet outil est très puissant et il permet de séparer des fluorochromes très proches spectralement.

Pour cela aller dans l'onglet "**Process**" (barre de menu en haut à gauche), puis dans "**Dye separation**", puis "**Spectral**".

Dans le panneau de gauche de la fenêtre "**Spectral Dye Separation**", sélectionner les différents spectres présents dans l'image.

Il peut s'agir de spectres de référence de la base Leica ou de spectres acquis par l'utilisateur.

On peut ajouter plus de deux spectres en cliquant sur **Add**.

Dans le panneau "**Rescale**", choisir la méthode de ré-échantillonnage de l'image.

- Dans l'option "**Per Channel**" tous les canaux ont leur dynamique étendue au maximum. Cette option fournit une image plus brillante mais qui n'est plus représentative de la réalité en terme d'intensités relatives et qui ne peut être quantifiée.

- Dans l'option "**All Channels**" tous les canaux ont leur dynamique étendue en proportion par rapport à celle du canal le plus fort dont la dynamique est maximalisée.

Appuyer sur "**Apply**".

Une nouvelle image est affichée avec autant de canaux que de spectres sélectionnés avec pour chacun la contribution spectrale correspondante.

Note – Il peut être nécessaire de ré-affecter les couleurs des différents canaux.

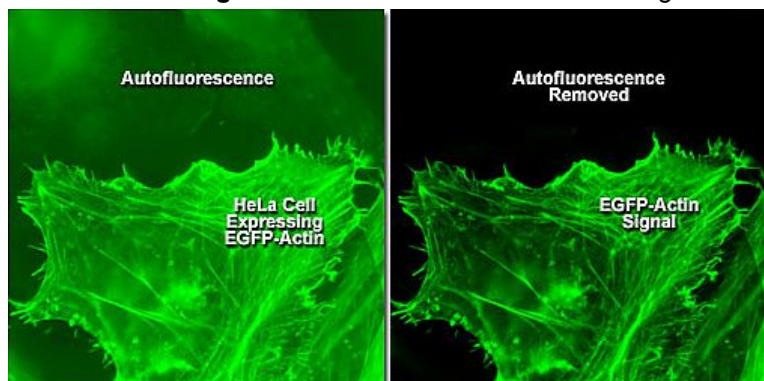
8-4-4 Détection/suppression d'autofluorescence

Une des applications de l'imagerie spectrale va résider dans la caractérisation du signal d'autofluorescence.

En plaçant la crosshair dans une zone de l'image spectrale dont le signal peut être suspecté d'être dû à une autofluorescence, il est possible d'enregistrer le spectre correspondant comme s'il s'agissait d'un fluorochrome. On va soumettre l'image à un "**linear unmixing**" entre le ou les fluorochromes imagés et le spectre de l'autofluorescence.

On peut ainsi isoler le signal d'autofluorescence (il est alors conseillé d'utiliser un ré-échantillonnage "**Per Channel**" de manière à obtenir une image d'autofluorescence avec une bonne dynamique).

On peut aussi choisir d'éteindre le canal d'autofluorescence pour nettoyer le signal d'intérêt, comme dans l'exemple ci-contre (d'après Zeiss Campus – M.E. Dickinson & M.W. Davidson).

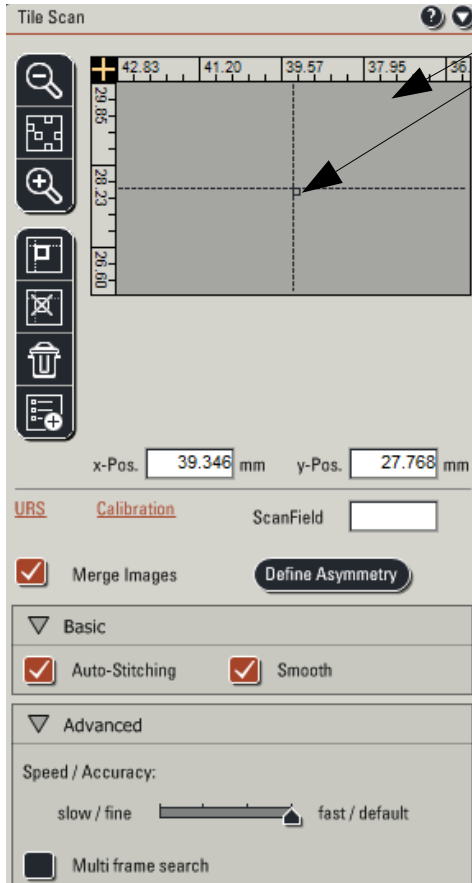


D'autres applications vont, au contraire, s'attacher à caractériser les signaux d'autofluorescence et leurs éventuelles variations spectrales.

8-5 Acquisition d'une mosaïque d'images - "Tile-Scan"


En tout premier lieu il faut avoir initialisé la platine lors du lancement du logiciel (voir chapitre 5 alinéa 8 – p.13) : lors du démarrage du système répondre **Yes** à la seconde question : **"Initialize Stage : DMI6000 Stage ?"** **mais uniquement après avoir vérifié que l'objectif est en position basse** en appuyant sur la touche **Z↓** située sur le côté droit de la base du statif.

Lorsque la platine est initialisée, aller dans l'onglet **"Acquisition"**, et cliquer sur l'icône **"Tile Scan"** ; la fenêtre suivante s'ouvre.





Le champ gris visualise l'espace de déplacement de la platine.
Le carré central le champ de l'image

L'icône  visualise toutes les positions enregistrées.

Un clic sur l'icône  permet d'enregistrer la position de la platine.

Un clic sur l'icône  supprime la position sélectionnée.

Un clic sur l'icône  supprime toutes les positions enregistrées.

Un clic sur l'icône  ouvre la fenêtre **"Stage configuration"**.

8-5-1 Configuration de l'acquisition

Comme le but de l'acquisition en mosaïque est essentiellement d'imager une structure de grande taille, on est souvent amené à utiliser un objectif de faible grandissement comme le 10x. Si c'est le cas, en l'absence de zoom les coins de chaque champ peuvent apparaître moins lumineux que la zone centrale, et cela se remarque très fortement lorsque les images sont recombinaées dans la mosaïque. Pour éviter ce problème il est conseillé d'affecter un facteur de zoom d'au moins 1,75.

Le choix du 10x n'est pas obligatoire. Il est possible d'imager la même mosaïque avec des objectifs plus puissants, de meilleure luminosité et de meilleure résolution. Cela prendra juste plus de temps et la taille informatique de la mosaïque sera d'autant plus grande. Attention à ce que cela reste gérable par les stations de traitement d'image à disposition !

Le choix de l'objectif ayant été déterminé, sélectionner, autant que possible, une région où, le ou les signaux sont les plus intenses et réaliser les réglages habituels.

S'il s'agit d'une acquisition spatiale choisir une région où l'épaisseur de l'objet est maximale et déterminer les bornes supérieure et inférieure de stacking. Puis se repositionner sur un plan où le signal est fort mais sans plus toucher aux réglages de gain et d'offset.

Dans le panneau **"Basic"**, il est conseillé de toujours cocher la case **"Auto-Stitching"**. Par contre pour la case **"Smooth"** il est préférable de ne la cocher qu'au moment des tests de calibration.

Dans le panneau **"Advanced"** il est conseillé de positionner la vitesse de déplacement de la platine sur **Slow/fine** pour obtenir une bonne précision dans les positionnements.

8-5-2 Calibration de la mosaïque

Si aucune rotation n'est activée, alors la mosaïque se fera de façon orthogonale à l'orientation de la lame porte-objet. Toutefois il peut y avoir un petit défaut d'orthogonalité. Pour corriger ce problème cliquer sur **"Calibration"** ce qui ouvre la fenêtre ci-contre.

Suivre alors la procédure détaillée à gauche.

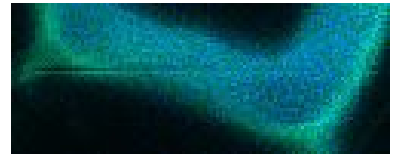
Dans un premier temps cliquer sur le bouton **"Live"** au bas de la fenêtre et repérer dans le champ un point caractéristique.



Dans le champ de prévisualisation apparaît un ligne de référence en pointillés. À l'aide de la souris, la déplacer en bordure du point repéré précédemment. Zoomer éventuellement en vérifiant bien que le point caractéristique reste visible. Puis à l'aide du joystick "smartmove" réaliser de petites translations suivant l'axe x en mode fin. Le point caractéristique doit se déplacer parallèlement à la ligne de référence. S'il s'en écarte, ajuster la rotation (1° ou 2° max) à l'aide du curseur situé sous la fenêtre de prévisualisation jusqu'à ce que le déplacement soit bien parallèle.

Ramener le zoom au facteur choisi.

Puis cliquer sur l'onglet "Run Test" et sur "Run Test" en bas de la fenêtre. Le système réalise une mosaïque réduite 2x2. Vérifier que celle-ci ne présente pas d'anomalies de recouvrement telle que celle de l'image ci-contre.




Adjust

1. Click the Live button, then use the smart move to find an obvious area of the specimen.
2. Click 'Set parameters' if you want to change Merge default settings or Overlay.
3. Click the Run Test button to perform a Tile scan for testing

Set parameters

Si de telles anisotropies apparaissent, cliquer sur "Set parameters" dans le panneau de gauche pour accéder à la fenêtre "Stage configuration".

On peut également accéder à cette fenêtre en cliquant sur l'icône  de la fenêtre "Tile Scan".

Stage Configuration

Delay after moving with mouse: 0.5 s

Orientation of stage axes: X Y

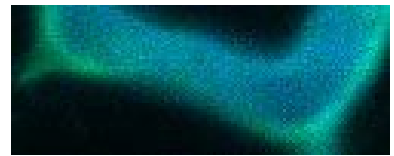
Mark & Find: Stack Reference Point Restore Z-Wide Begin / End Focus

Tile Scan: Set overlap sizes to: X: 10.0 % Y: 10.0 %

Tile Scan: Set merge settings to: Factory Smooth Custom Multi frame search Flip X Auto-Stitching Flip Y Swap XY


Dans le panneau "Tile Scan Set overlap size to", augmenter le pourcentage de recouvrement possible pour le tiling puis re-cliquer sur le bouton "Run Test" pour visualiser le résultat ; renouveler les ajustements jusqu'à obtenir une image sans anomalie de recouvrement.

Il se peut, également que les images de ne se disposent pas dans le bon ordre. Il faut alors modifier les paramètres de Merge dans le panneau "Tile Scan Set merge settings to" en bas à droite. En l'absence de rotation les options "Factory" ou "Custom" en cochant "Flip Y" et "Swap XY" fournissent une mosaïque correctement ordonnée. Pour d'autres rotations il faut éventuellement modifier les paramètres de "Custom".




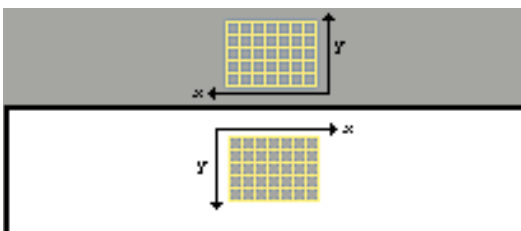
Re-cliquer sur l'icône  pour fermer la fenêtre.

8-5-3 Définition du champ de la mosaïque

Recherche d'abord l'objet aux oculaires du microscope. Puis passer en mode Live et, à l'aide du joystick, chercher la position de début de la mosaïque. Puis cliquer sur l'icône .

De même chercher la position de fin de la mosaïque (position en diagonale) et re-cliquer sur l'icône .

Si l'icône  est activée la matrice de la mosaïque est automatiquement calculée par le système et affichée ainsi que la position actuelle. La matrice peut être modifiée dans le champ "ScanField" en ajoutant ou soustrayant des lignes ou des colonnes.



Matrice écran

Lame vue de dessus sur la platine

Tile Scan

25.7 28.3 30.8 33.4 36

37.2 39.8 42.4 45.0

x-Pos. 51.037 mm y-Pos. 50.393 mm

ScanField 7 x 5

Merge Images

Enfin, avant de lancer l'acquisition, il faut choisir si la mosaïque doit être sauvegardée dans son ensemble comme une seule image ou comme une série d'images de chaque champ.

Dans la première option, il faut cocher la case "**Merge Images**" et, dans ce cas, il est conseillé de cocher les cases "**Auto-Stitching**" et "**Smooth**" pour obtenir une mosaïque sans discontinuités entre les différents éléments.

De plus s'il s'agit d'une acquisition en z il est conseillé de cocher la case "**Multi frame search**" du panneau "**Advanced**". Ainsi, les fonctions "**Auto stitching**" et/ou "**Smooth**" seront appliquées à toutes les sections en x, y et z ce qui offre une meilleure qualité de stitching. Dans ce cas, le temps de calcul de la reconstitution est plus long que si seulement les cases "**Auto-Stitching**" et "**Smooth**" ont été cochées.

Si on préfère, les différentes images de la mosaïque peuvent être enregistrées séparément en cochant la case "**Keep Raw Images**". La mosaïque peut alors être reconstituée ultérieurement en utilisant la fonction **Process** → **Mosaic Merge** du logiciel, ou bien en utilisant d'autres logiciels.

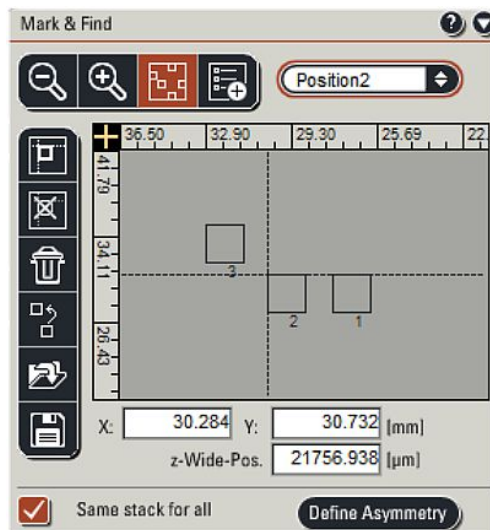
Cliquer sur "**Start**" pour lancer l'acquisition.

Si l'option "**Merge Images**" a été choisie, les images de chaque champ sont affichées au cours de l'acquisition, puis seule l'image finale est affichée après la reconstruction.


8-6 Imager des positions multiples – "Mark & Find"

Comme pour les mosaïques, **en tout premier lieu il faut avoir initialisé la platine lors du lancement du logiciel** (voir chapitre 5 alinéa 8 – p.13) : lors du démarrage du système répondre **Yes** à la seconde question : "**Initialize Stage : DMI6000 Stage ?**" **mais uniquement après avoir vérifié que l'objectif est en position basse** en appuyant sur la touche **Z↓** située sur le côté droit de la base du statif.


Lorsque la platine est initialisée, aller dans l'onglet "**Acquisition**", et cliquer sur l'icône "**Mark & Find**" ; la fenêtre suivante s'ouvre.




L'icône  visualise toutes les positions enregistrées.


Un clic sur l'icône  ouvre la fenêtre "**Stage configuration**".

La fenêtre  liste toutes positions enregistrées en affichant dans la partie basse les coordonnées.

Un clic sur l'icône  permet d'enregistrer la position de la platine.

Un clic sur l'icône  supprime la position sélectionnée.

Un clic sur l'icône  supprime toutes les positions enregistrées.

L'icône  permet de redéfinir une position sélectionnée dans la liste.


Les mêmes paramètres de stacking (begin, end et Step size) peuvent être appliquées pour toutes les positions en cochant "**Same stack for all**". Si cette case n'est pas cochée, il faut pour chaque position, définir les paramètres et les enregistrer à chaque fois en appuyant sur "**Apply Stack**".

Le grand intérêt de la fonction "**Mark & Find**" réside dans la possibilité d'enregistrer quasi-simultanément plusieurs séries temporelles soit en mode **xyt**, soit en mode **xyzt** sans avoir à décaler plusieurs sessions et sans le risque que les conditions de chacune ne soient pas exactement les mêmes.



Dans le cas de série temporelles, pour définir le timing des acquisitions, il faut impérativement prendre en compte le temps total d'obtention des différentes images ou des différents stacks en cliquant sur "**Minimize**" puis ajouter au temps affiché autant d'intervalles de quelques secondes qu'il y a de positions, pour permettre les déplacements de la platine.

Cliquer sur "**Start**" pour lancer les acquisitions.

9 – Les fonctions autofocus

Le système est équipé d'un dispositif d'autofocus digital "**Best Focus**" qui peut être activé en cliquant sur la touche  dans le panneau "**Acquisition Mode**".

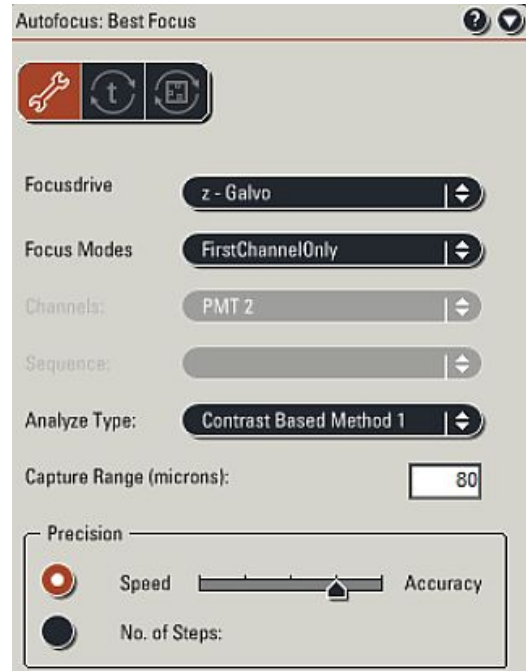
Attention n'activer cette touche qu'en connaissance de cause car cela peut avoir des conséquences fâcheuses pour la préparation et les objectifs !

La fenêtre "**Autofocus : Best Focus**" s'ouvre. Si le système est configuré en mode **t** ou en mode **Mark & Find** les boutons  ou  seront actifs respectivement.

Le premier cadre "**Focusdrive**" indique z-galvo qui est le seul dispositif de mise au point du système.

Le second cadre "**Focus Modes**" indique la méthode utilisée pour réaliser le focus automatique. Par défaut c'est le mode "**FirstChannelOnly**" qui est activé. Dans ce mode, le système recherche plusieurs fois pendant l'acquisition le meilleur niveau de mise au point en utilisant le premier canal de détection **PMT1**.

Dans l'autre option "**Select Channel for Refocusing**" le système recherche une seule fois le meilleur plan de mise au point au début de l'acquisition et dans le canal indiqué juste en dessous en spécifiant dans "**Channels**" le **PMT** à prendre en compte ou bien, dans le cas d'une acquisition séquentielle, en spécifiant dans "**Sequence**" avec quel **Scan** doit se faire le focus.



Il faut ensuite indiquer quelle méthode d'analyse va être utilisée par le système.

- "**Noise base method**" bien adaptée pour l'imagerie *in vivo*, pour une imagerie présentant faible brillance et faible contraste.
- "**Contrast based Method 1**" bien adaptée pour les images présentant un fort contraste et qui fonctionne bien avec la fluorescence.
- "**Contrast based Method 2**" plus particulièrement adaptée pour l'imagerie en fond clair. Attention la lamelle doit être particulièrement propre et la préparation dépourvue de particules au risque de voir le focus se fixer sur ces artefacts.
- "**Intensity Based Method**" qui détermine le plan d'intensité maximale en mode fluorescence.

Puis préciser dans le champ "**Capture Range**" la profondeur en microns sur laquelle va s'effectuer la recherche de focus.

Note – Pour protéger l'objectif et la préparation la profondeur maximale programmable est limitée à la moitié de la distance de travail de l'objectif.

Enfin, dans le panneau "**Precision**" on va pouvoir ajuster la qualité de la recherche de focus soit en choisissant entre "**Speed**" rapide mais peu précise et "**Accuracy**" plus lente mais plus précise, soit en indiquant dans "**No. of Steps**" le nombre de pas de la recherche dans le "**Capture Range**" défini précédemment.



Pour lancer la recherche d'autofocus cliquer sur le bouton "**Best focus**" situé en bas à gauche de la fenêtre principale.



Si le système a été configuré en mode "**Time lapse**" une fenêtre s'ouvre en cliquant sur le bouton .



Dans l'option "**First cycle only**", la recherche de focus n'est réalisée qu'une seule fois lors du premier cycle.

Dans l'option "**Every cycle**", la recherche est effectuée préalablement à chaque cycle.

Dans l'option "**Every** n "**th cycle**", la recherche est réalisée tous les n cycles.

De même, si le système a été configuré en mode "Mark & Find", en cliquant sur le bouton on ouvre la fenêtre suivante.



Dans l'option "**First position only**", la recherche de focus n'est réalisée qu'une seule fois à la première position.

Dans l'option "**Every position**", la recherche est effectuée après chaque positionnement.

Dans l'option "**Every** n **th position**", la recherche est réalisée tous les n positions.

10 - Quelques outils

Disponibles sur le poste confocal en cliquant sur l'onglet "**Tools**".

Tous les traitements qui suivent créent un nouveau fichier sans que l'original ne soit modifié.

10-1 Edit

10-1-1 Crop

Cet outil va permettre de réaliser une sélection dans une imagerie enregistrée.

On peut ainsi sélectionner une région d'intérêt (ROI) d'un plan image ou d'une série d'images en z, t ou λ , changer les limites d'une série en z, t ou λ , réduire le nombre de canaux d'un plan image ou d'une série en z, t ou λ .

10-1-2 Resize

Cet outil permet de ré-échantillonner la taille des images soit en terme de définition des images, soit en terme de dynamique des images (8, 12, 16bits).

10-1-3 Combine

Cette fonction permet de combiner deux images ou séries d'images **selon des critères mathématiques** : somme, différence, produit, ratio, moyenne, minimum et maximum.

10-1-4 Shading

10-1-5 Merge

Cette fonction permet de combiner deux images ou séries d'images acquises individuellement dans une nouvelle image ou série d'image à deux canaux.

10-1-6 Mosaic merge

Cet outil permet de réaliser un "**stitching**" *a posteriori* d'images acquises en mode "**Tile scan**" et sauvegardées individuellement pour créer une mosaïque.

10-1-7 Image alignment

Avec cet outil, il est possible de réaligner deux canaux qui présentent un shift systématique de quelques pixels (par exemple dû à une anomalie chromatique).

10-2 Adjust sharpness

10-2-1 Sharpness

Cet outil applique un filtrage linéaire sharpness à une image ou une série d'images.

10-2-2 Phase

Cet outil permet de recaler des images ou séries d'images acquises en mode bidirectionnel et présentant un décalage de ligne.

10-2-3 Colors

Ici on va pouvoir ajuster le contraste, la brillance et le gamma des images pour chaque canal ou pour tous les canaux simultanément soit en mode manuel soit en mode automatique → **Autocontrast**. On peut également réaliser une inversion de couleur → **Invert intensity**.

10-2-4 HSL/HSV colors

Fonction non disponible

10-2-5 Background

Cette fonction permet d'obtenir des images modifiées par un seuillage bas manuel.

10-2-4 Baseline

Cet outil permet d'obtenir des images modifiées par un seuillage bas automatique soit sur la base de la valeur minimale des niveaux de gris, soit sur la base de la valeur moyenne des niveaux de gris, soit enfin en éliminant les faibles niveaux de gris les plus fréquents. Cette dernière option est appelée "**Eliminate autofluorescence**" mais même si elle élimine ce qui correspond le plus souvent à du signal d'autofluorescence, elle peut tout aussi bien effacer du signal significatif mais de faible intensité. Avec cet outil il est possible de rétablir la dynamique d'image sur une échelle complète (8, 12 ou 16bits) en réalisant un stretching de l'histogramme des niveaux de gris restants.

10-3 Noise reduction

Attention : ces traitements d'images doivent impérativement être signalés dans les articles car ils modifient les données.

10-3-1 Median

Les images vont être traitées avec un filtre non-linéaire qui va adoucir l'image (diminution du bruit) tout en préservant les contours. Il peut être de taille ajustable sous la forme d'une matrice 2D pour les images plan ou 3D pour l'imagerie volumique. Le filtre median est souvent intéressant pour traiter les images Dapi en contre-marquage nucléaire : meilleure lisibilité.

10-3-1 Blur

Les images vont être traitées avec un filtre linéaire de floutage qui adoucit l'image mais ne préserve pas les contours. Ce traitement ne présente quasiment aucun intérêt en tant que tel.

10-4 Segmentation

10-4-1 Tresholding

Cet outil permet de réaliser un seuillage bas (comme avec l'outil Background) mais aussi un seuillage haut. Il va permettre également d'obtenir des images binaires pour lesquelles tout ce qui est entre les seuils définis apparaît en blanc et tout ce qui est en dehors apparaît en noir. La binarisation permet notamment d'isoler des objets pour une analyse d'image.

10-4-2 Morphological filters

Cette fonction est complémentaire de la précédente. Elle permet d'appliquer aux images binarisées des filtres morphologiques de taille ajustable pour la 2D ou la 3D.

Erosion : qui réduit la taille des objets et supprime les plus petits.

Dilatation : qui élargit la taille des objets et comble les petits "trous".

Open : qui combine d'abord une érosion suivie d'une dilatation. La taille des objets est plus ou moins respectée mais les plus petits sont supprimés.

Close : qui combine d'abord une dilatation suivie d'une érosion. La taille des objets est plus ou moins respectée mais les petits "trous" sont supprimés.

10-5 Dye separation

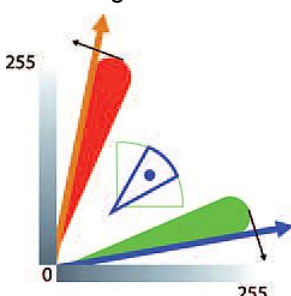
10-5-1 Automatic

Cette technique n'est pas basée sur l'imagerie spectrale.

Elle est surtout utile lorsqu'il existe un crosstalk entre les fluorochromes imagés et donc plus particulièrement, dans le cas d'**images obtenues en mode simultané**.

Elle est basée sur une analyse en cluster des diagrammes de dispersion. En présence de crosstalk entre les canaux les nuages de dispersion se rapprochent de la diagonale. Le traitement mathématique va donc translater ces nuages vers les axes x et y, respectivement. Simultanément les nuages vont être déplacés vers l'origine de manière à réduire le signal de bruit de fond.

Dans l'option "**weak**" le nuage sera juste translaté de manière à ce que sa bordure soit adjacente à l'axe correspondant.

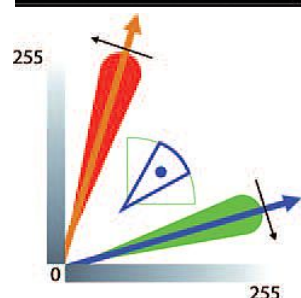
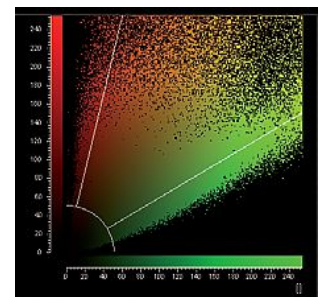


← "**Weak**"

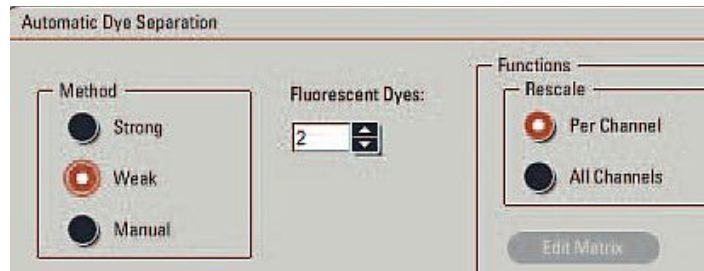
"**Strong**" →

Dans l'option "**Strong**" c'est l'axe du nuage qui va être amené à coïncider avec l'axe correspondant. De ce fait cette option peut conduire à une perte d'information d'où l'intérêt du preview pour tester l'effet de ce traitement.

Pour plus de détails consulter le lien suivant : https://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP5%20II/Application%20Notes/Dye%20Finder-AppLetter_30.EN.pdf



Le système affiche automatiquement le nombre de fluorochromes imagés dans la fenêtre "**Fluorescent Dyes**" → ne pas modifier ! Choisir la méthode de séparation : "**Weak**" ou "**Strong**" selon que le crosstalk est faible ou fort. Dans le panneau "**Rescale**", choisir la méthode de ré-échantillonnage de l'image (voir p.30).



Pour rappel :

- Dans l'option "**Per Channel**" tous les canaux ont leur dynamique étendue au maximum. Cette option fournit une image plus brillante mais qui n'est plus représentative de la réalité en terme d'intensités relatives et qui ne peut être quantifiée.
- Dans l'option "**All Channels**" tous les canaux ont leur dynamique étendue en proportion par rapport à celle du canal le plus fort dont la dynamique est maximisée.

Tester le traitement en cliquant sur Preview.

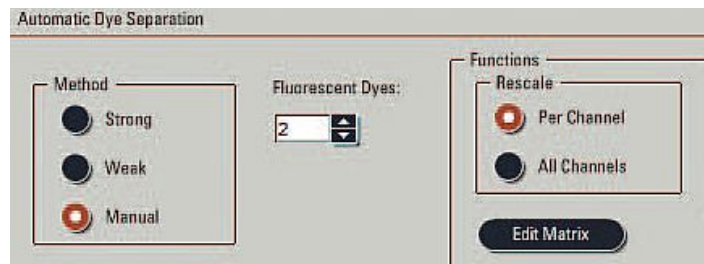


Une fois les options déterminées cliquer sur "**Apply**" pour obtenir l'image traitée.

10-5-2 Channel

Dans cette option la même fenêtre est affichée mais la case "**Manuel**" est activée et la case "**Edit Matrix**" est active. Cliquer sur cette case fait apparaître une fenêtre "**Edit Matrix**" avec un champ "**Matrix**".

Matrix		
	Ch1	Ch2
Dye1	1	0,3
Dye2	0,1	1



On va affecter ici des **coefficients estimés de crosstalk**. Par exemple ici on considère que 30% du signal du canal 1 passe dans le canal 2 et que 10% du signal du canal 2 passe dans le canal 1. Comme il s'agit de coefficients estimés il est très utile

de tester le traitement avec des previews.

Une fois les coefficients déterminés il est possible de sauvegarder cette matrice pour la ré-utiliser pour d'autres images ayant la même configuration de fluorochromes.



En l'absence de fonction d'analyse de colocalisation sur cette machine, la détermination des coefficients de crosstalk est très arbitraire et par conséquent l'utilisation de cette technique doit resté exceptionnel.

10-5-3 Spectral

Pour cette technique se reporter au chapitre 8-4-3 p.30.

10-6 Topological

10-6-1 Topo filter

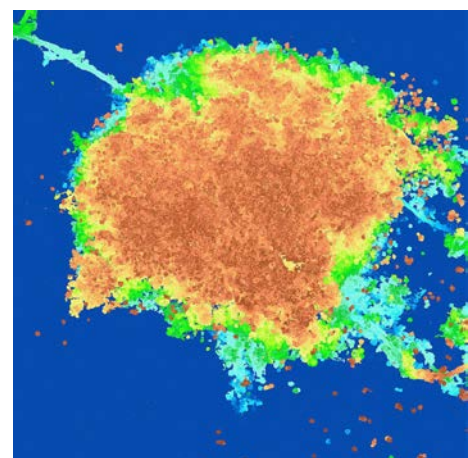
Cette fonction va permettre de visualiser les différents niveaux z d'un stack à l'aide d'un codage couleur en fonction de la profondeur de l'image projetée en mode "**Maximum Intensity Projection**" ou en mode "**Center of mass**". Le niveau le plus bas est codé en bleu et le plus élevé en rouge comme dans l'exemple ci-contre, mais ce codage peut-être inversé en cochant la case "**Inv**".

Cette fonction n'est intéressante que pour des stacks présentant un rapport xy/z élevé.

En général ce mode de visualisation n'est réalisé que sur un seul canal mais il peut être parfois intéressant de l'utiliser sur le merge.

10-6-2 Topo 3D view

Fonction non disponible



11 - Enregistrement de la session

On a vu que les images sont stockées au fur et à mesure dans un dossier "**Experiment (0)**" sous l'onglet "**Experiments**". Renommer ce dossier en faisant un clic droit sur le dossier puis "**Rename**".

Il est conseillé d'adopter une nomenclature simple avec une date : par exemple prénom-jmmaa.

Puis sauvegarder le dossier :

- une première fois sur le disque dur du confocal en faisant un clic droit sur le dossier puis "**Save (nom du dossier) As**" et en indiquant un emplacement sur le disque ;
- une seconde fois sur une clé usb en renouvelant l'opération précédente.

Recopier cette seconde copie sur un media de stockage de grande capacité de votre environnement informatique pour avoir une copie de sauvegarde. **Ne pas travailler sur cette copie.**

Les dossiers sont enregistrés au format **.lif** (leica image file). Ce format est à utiliser pour les sauvegardes car il permet de récupérer tous les paramètres des acquisitions.

Les fichiers .lif peuvent être lus avec le logiciel LAS AF Lite, Fiji/ImageJ (File→Import→Bio-Format), ICY, Huygens, Imaris, BioImageXD, etc.

Les fichiers peuvent également être exportés sous différents formats : .tif - .jpg - .avi.

Pour cela faire un clic droit sur l'image ou la séquence qui doit être exportée puis → export "....." as ...

12 - Pour les "Matériels et méthodes"

Dans les articles il convient de spécifier :

- le ou les objectifs utilisés comme suit : **63x /1,40-0,60 HCX PL APO** ;
- les fluorochromes utilisés et leur fournisseur ;
- le système confocal : **microscope confocal Leica TCS SP5 – Leica Microsystems** ;
- les techniques particulières d'acquisition : imagerie spectrale, mosaïque, time-lapse, etc ;
- tous les traitements d'images.

Les images sources .lif doivent pouvoir être envoyées aux reviewers s'ils en font la demande.

13 - Arrêt de la machine

→ S'il y a un utilisateur de programmé sur le planning dans les 2 heures suivantes, procéder à une mise en attente du système.

- 1 – Dans le panneau de configuration mettre le laser Argon à 0 mais **ne pas décocher les différents lasers** et **ne pas tourner la clé 4**.
- 2 – Éteindre la lampe fluo.
- 3 – Vérifier que les fichiers sont bien sauvegardés.
- 4 – Fermer le logiciel LAS AF.
- 5 – Vérifier qu'il n'y a plus de lame sur le microscope et, si nécessaire, que l'huile d'immersion sur l'objectif a bien été soigneusement nettoyée avec un papier doux imprégné d'alcool.

→ S'il n'y a pas d'utilisateur de programmé dans les 2 heures suivantes, procéder à une extinction totale du système.

- 1 – Tourner la clé 4 – "Laser Emission" en position **OFF** pour arrêter les lasers. **Il faut impérativement attendre que la ventilation ait cessé (entre 10 et 20 minutes) !**
- 2 – Éteindre la lampe fluo.
- 3 – Éteindre le bouton 3 - "Laser Power".
- 4 – Vérifier que les fichiers sont bien sauvegardés.
- 5 – Fermer le logiciel LAS AF.
- 6 – Éteindre le bouton 2 – "Scanner power".
- 7 – Fermer Windows.
- 8 – Éteindre le bouton 1 – "PC/Microscope".
- 9 – Vérifier qu'il n'y a plus de lame sur le microscope et, si nécessaire, que l'huile d'immersion sur l'objectif a bien été soigneusement nettoyée avec un papier doux imprégné d'alcool.

- **En cas de problème** ou s'il n'y a plus d'huile ou de papier merci de prévenir Philippe par mail : philippe.leclerc@inserm.fr
- S'il n'y a plus d'alcool, ne pas hésiter à remplir la pissette.
- Si la poubelle est pleine, ne pas hésiter à la vider.

A1 – Confocal en réflexion

Ce type de microscopie est plutôt anecdotique pour des biologistes cellulaires mais il peut être utile d'en connaître l'existence.

Dans ce mode d'imagerie on va utiliser non plus la fluorescence (ou la lumière transmise) mais la lumière d'excitation réfléchiée par un objet. Dans l'idéal on va ainsi obtenir une image de la surface de cet objet équivalente à celle qu'on peut obtenir avec un microscope électronique à balayage.

L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle peut être couplée avec l'imagerie confocale conventionnelle pour réaliser une imagerie corrélative entre structures de surface et marquage(s) fluorescent(s).

Il existe deux approches qui fournissent de bons résultats :

- l'une pour des objets "macroscopiques" qui peuvent être imagés au 10x, à sec et en l'absence de lamelle couvre objet (image ci-contre) ;

- l'autre pour des objets montés entre lame et lamelle et observables avec le 63x ou le 100x. Avec des objectifs intermédiaires (20x et 40x) la réflexion sur la lamelle couvre-objet perturbe souvent l'imagerie.

Dans les deux cas il faut tout d'abord choisir la longueur d'onde d'excitation pour la réflexion.

Il est préférable que ce soit un canal dépourvu de marquage fluorescent. Si possible il faut choisir une courte longueur d'onde : 458 ou 488nm pour avoir une bonne résolution. Mais attention il ne faut pas que cette excitation blanchisse la préparation si celle-ci est imagée simultanément en fluorescence. C'est pourquoi l'excitation à 405nm est à proscrire.

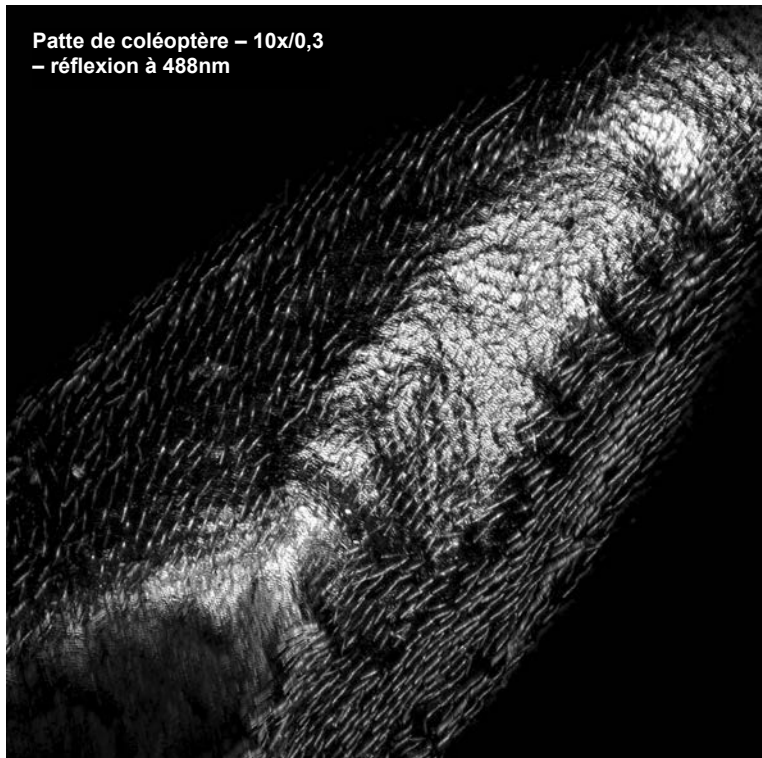
Avec les objectifs à fort grossissement on obtient parfois de meilleurs résultats avec des excitations à plus grande longueur d'onde.

Une fois sélectionnée la raie laser destinée à l'imagerie de réflexion, cliquer sur **AOBS** et dans la fenêtre qui s'est ouverte cocher la case "**Reflection**" pour cette raie.

Puis dans "**Beam Path Settings**" créer une fenêtre d'émission centrée sur la raie d'excitation (environ 10nm de part et d'autre) de manière à récupérer spécifiquement la lumière réfléchiée par l'objet.

Les autres réglages sont identiques à ceux d'une imagerie classique.

Les images obtenues sont confocales.



	476 nm	633 nm	0 nm
Fluorescence	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Reflection	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Enhanced dynamics	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

A2 – Live imaging



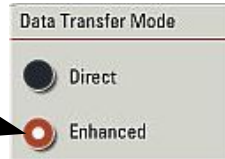
A3 – Mode Enhanced

Dans le cas d'échantillons présentant un signal faible, ou nécessitant une faible excitation pour éviter des phénomènes de bleaching ou de phototoxicité, il existe un mode spécifique qui doit être activé au moment de la configuration du système.

Pour cela aller dans l'onglet configuration puis cliquer sur l'icône "Settings"

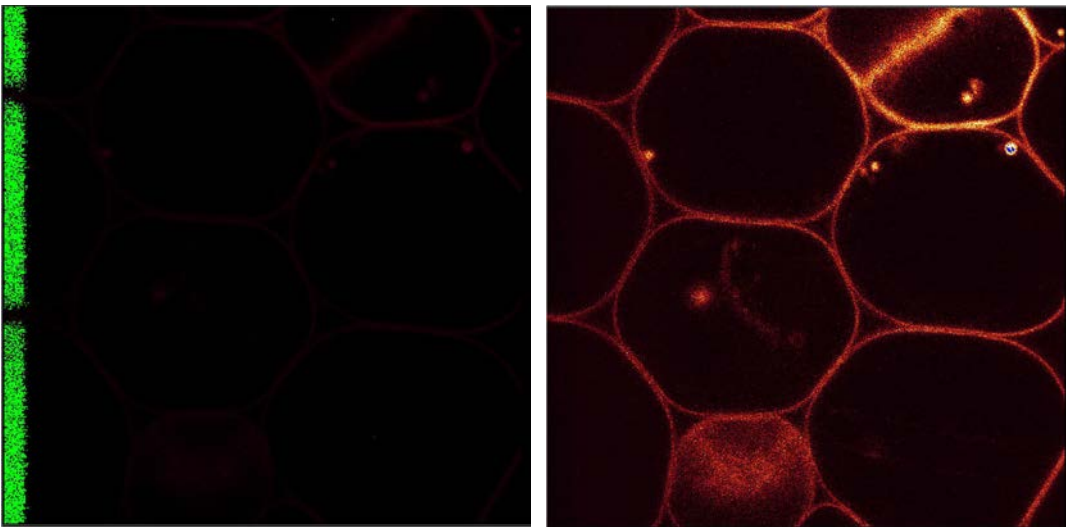


Dans le panneau "Data Transfer Mode" cliquer sur "Enhanced"



En mode transfert direct des données, les niveaux de gris de l'image sont directement proportionnels au signal enregistré par le PMT. C'est le mode qui doit être utilisé dans la quasi majorité des saisies.

En mode transfert "Enhanced", la réponse des PMT est modifiée pour amplifier les faibles niveaux de signal. **La réponse n'est plus directement proportionnelle.** Mais il ne s'agit pas d'un traitement *a posteriori*.



Les images ci-dessus (affichage en mode QLUT) montre l'effet sur un signal faible du mode "Enhanced" à droite. Les deux images ont été réalisées avec le même gain et le même offset.

Ne pas oublier de reconfigurer le système en "Mode Direct" en fin de session.

A4 – Ajout de fluorochrome dans la Dye database

Il est possible de rajouter le spectre d'un fluorochrome dans la Dye database à partir de bases spectrales disponibles sur internet. Une liste de sites – non exhaustive - est indiquée ci-dessous.

Il s'agit d'une procédure assez compliquée et **il est vivement recommandé de faire appel au responsable du confocal pour réaliser cette intégration.**

Pour cet exemple c'est la base spectrale de ThermoFisher qui est utilisée et comme fluorochrome le Dil.

Sur la page du viewer, sélectionner le **fluorophore**

dans la liste déroulante

puis décocher la case

Excitation. Seul le spectre

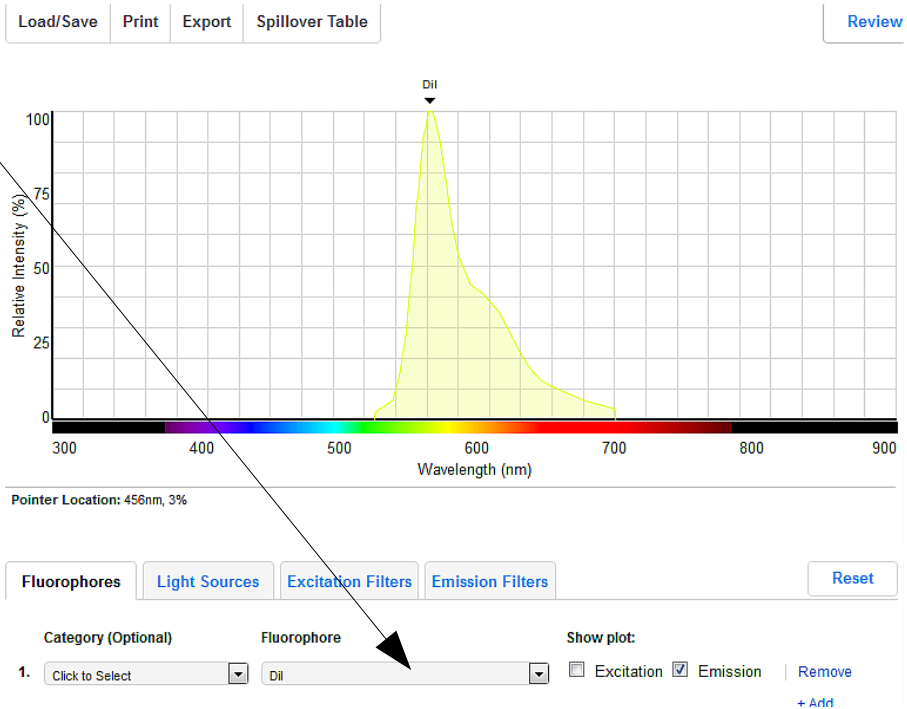
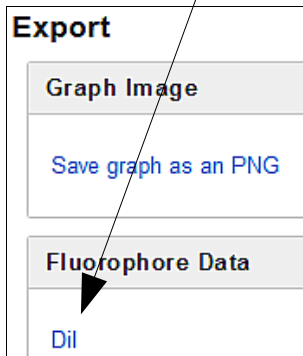
d'émission doit être affiché.

Dans la barre de menu supérieure cliquer sur **Export**.

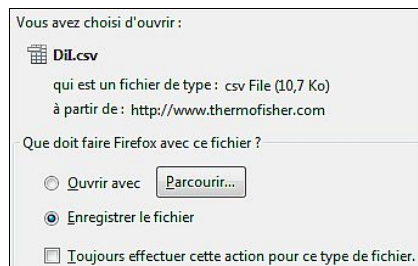
Dans la fenêtre qui s'est

ouverte, cliquer sur **Fluoro-**

phore Data → Dil



La fenêtre suivante s'ouvre. Choisir l'option **Enregistrer le fichier** → Dil.csv.



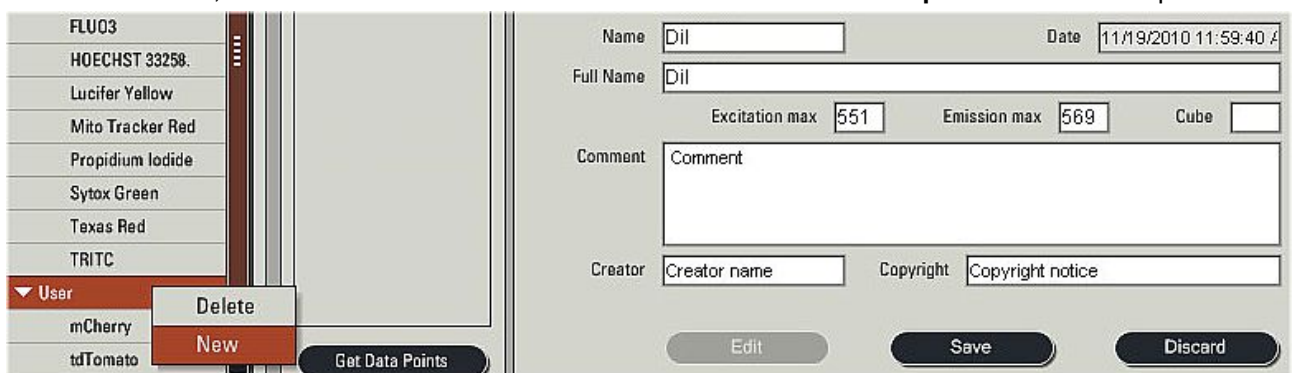
Puis ouvrir un tableur et ouvrir le fichier Dil.csv en vérifiant bien les critères d'importation et notamment le type de séparateur qui est la virgule pour les fichiers .csv.

Le tableau qui s'ouvre doit comporter 3 colonnes : la première avec les longueurs d'ondes, la seconde avec les intensités d'excitabilité normalisées à 100% et la troisième les intensités d'émission normalisées à 100%.

Dans le tableur prendre soin de noter la longueur d'onde pour laquelle l'excitabilité est à 100% - dans l'exemple du Dil : 551nm, et de même celle pour laquelle l'émission est à 100% - dans l'exemple du Dil : 569nm.

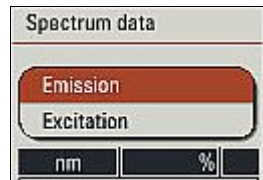
Puis sélectionner les colonnes 1 et 3 et les copier dans un Notepad afin de sauvegarder le fichier au format .txt → Dilem.txt

Ouvrir LAS AF et cliquer sur l'onglet "**Configuration**" puis sur l'icône "**Dyes**". Dans la liste se déplacer dans la section "**User**"; faire un clic-droit et sélectionner "**New**". Dans la fenêtre "**Spectrum data**" indiquer le nom

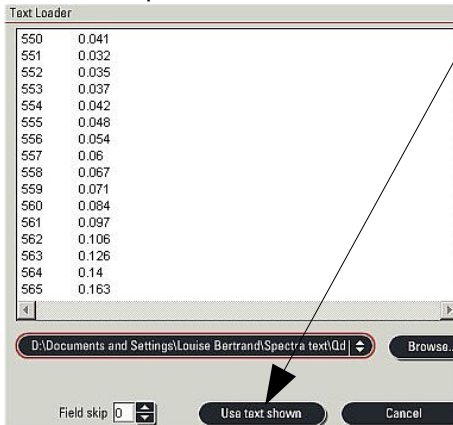


et l'abréviation du fluorochrome, puis les pics d'excitation – **Excitation max** et d'émission – **Emission max**. Dans "**Comment**" il peut être intéressant de spécifier l'origine des données spectrales – dans l'exemple ThermoFisher Spectraviewer, et le cube filtre ici N21.

Puis dans la colonne "Spectrum data" sélectionner "Emission" et cliquer en bas sur "Get Data Points".



La fenêtre "Text Loader" s'ouvre. Cliquer sur "Browse" et localiser le fichier .txt → dans l'exemple Dilem.txt - et l'ouvrir.



Puis cliquer sur "Use text shown" puis "Save" au bas de la fenêtre "Spectrum data".

Pour vérifier si le spectre a bien été enregistré, cliquer sur l'onglet "Acquire" puis dans la fenêtre "Beam Bath Settings" choisir un PMT et sélectionner le nouveau fluorochrome dans la section "User" de la "Dye Database". Le spectre d'émission doit s'afficher sur le spectre visible.

Il est possible de rentrer le spectre d'excitation de la même façon mais celui-ci ne sera visible que dans la fenêtre de la "Spectra Database".

Sites où peuvent être téléchargées des données spectrales :

- Institute of Analytical Chemistry at the Graz University of Technology in Austria – Fluorophores.org : <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/>
- Chroma Spectra-viewer : <https://www.chroma.com/spectra-viewer>
- Spectra Database University of Arizona : <http://www.spectra.arizona.edu/>
- ThermoFisher Fluorescence Spectraviewer : <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

A5 – Milieu de montage vs milieu d'immersion

Le tableau ci-dessous indique les milieux d'immersion les plus appropriés en fonction de l'indice de réfraction du milieu de montage de la préparation

Milieu de montage	indice de réfraction du milieu de montage	
Eau	1,33	} immersion eau
Crystal Mount	1,354	
Gel Mount	1,36	
Prolong Gold frais	1,39	
Fluoromount G	1,39	
Prolong Gold ~1jour	1,40	} immersion glycérol 80%
Ibidi Mounting	1,42-1,44	
Vectashield HardMount	1,44	
Prolong Gold ~4jours	1,44	
80% glycérol	1,45	} immersion glycérol pur
Vectashield	1,458	
Glycérol pur	1,466	
GlycerGel	1,44-1,47	
Clarion Mounting	1,473	
Euparal	1,481	} immersion huile
Mowiol	1,49	
Eukitt	1,491	
Safe Mount	1,49-1,5	
Bio Mount HM	1,5	
Huile de cèdre	1,515	
Huile Zeiss	1,515	
Huile N (Leica)	1,518	
CFM3 Citifluor	1,518	
Huile F (Leica)	1,52	
CFM 1 / CFM 2	1,52	
DPX	1,521	
DEPEX	1,529	
Baume du Canada	1,53	

Table des Matières

1 – Hygiène & Sécurité	2	8-2-4 Acquisition d'une série z	24
1-1 Les sources de lumière	2	8-2-5 Visualisation rapide d'une série z	25
1-2 Le nettoyage des oculaires	2	8-2-6 Acquisition d'une série xzy	26
1-3 Le nettoyage de la platine	2	8-3 Acquisition de série temporelles	
1-4 Le réglage des oculaires	2	- "Time Lapse"	26
2 – Caractéristiques importantes du système	3	8-4 Imagerie spectrale	27
2-1 Le microscope	3	8-4-1 Obtention d'une image spectrale	27
2-1-1 Les objectifs	3	8-4-2 Obtention d'une spectre d'émission	27
2-1-2 Le condenseur	5	8-4-3 Séparation spectrale de fluorochromes	29
2-1-3 La platine	5	8-4-4 Détection/suppression d'autofluorescence	29
2-1-4 L'excitation de fluorescence	5	8-5 Acquisition d'une mosaïque d'images	
2-2 Le système confocal	5	- "Tile-Scan"	30
3 – Le plan expérimental	7	8-5-1 Configuration de l'acquisition	30
3-1 Choix de l'objectif	7	8-5-2 Calibration de la mosaïque	30
3-2 Choix des fluorochromes	7	8-5-3 Définition du champ de la mosaïque	31
3-3 Choix du support des préparations	7	8-6 Imager des positions multiples	
3-4 Choix de l'échantillonnage spatial	8	"Mark & Find"	32
3-5 Choix de la dynamique d'image	8	9 – Les fonctions autofocus	33
3-6 Choix de la résolution temporelle	8	10- Quelques outils	34
3-7 Choix du mode de scan	8	10-1 Edit	34
4 – Utilisation du microscope DMI 6000B	9	10-1-1 Crop	34
4-1 Description des commandes	9	10-1-2 Resize	34
4-2 Réglages du microscope	11	10-1-3 Combine	34
4-3 Déplacement de la platine	11	10-1-4 Shading	34
5 – Mise en marche du système	12	10-1-5 Merge	34
6 – Configuration du système	13	10-1-6 Mosaic merge	34
6-1 Choix et allumage des lasers	13	10-1-7 Image alignment	34
6-2 Choix de la dynamique d'image	14	10-2 Adust sharpness	34
6-3 Choix de l'objectif	14	10-2-1 Sharpness	34
6-4 Correction UV	14	10-2-2 Phase	34
6-5 Configuration de l'excitation et de l'émission	14	10-2-3 Colors	34
6-5-1 Première méthode	14	10-2-4 HSL/HSV colors	34
6-5-2 Deuxième méthode	14	10-2-5 Background	34
6-5-3 Troisième méthode	15	10-2-6 Baseline	35
6-5-4 Quatrième méthode	15	10-3 Noise reduction	35
6-5-5 Ajout d'un canal en lumière transmise	15	10-3-1 Median	35
6-5-6 Configuration de l'AOBS	16	10-3-2 Blur	35
6-6 Configuration de l'acquisition	16	10-4 Segmentation	35
6-6-1 Mode simultané vs mode séquentiel	16	10-4-1 Tresholding	35
6-6-2 Choix de l'échantillonnage xy	16	10-4-2 Morphological filters	35
6-6-3 Choix de la vitesse de scan	17	10-5 Dye separation	35
6-6-4 Choix du taux de moyennage ou d'accumulation	18	10-5-1 Automatic	35
6-6-5 Réglage du trou d'aiguille ou "pinhole"	18	10-5-2 Channel	36
7 – Réglages de l'acquisition	19	10-5-3 Spectral	36
7-1 En mode simultané	19	10-6 Topological	36
7-2 En mode séquentiel	20	10-6-1 Topo filters	36
7-3 Recadrage de l'image	20	10-6-2 Topo 3D view	36
7-3-1 Zoom	20	11 – Enregistrement de la session	37
7-3-2 Rotation	21	12 – Pour les matériels et méthodes	37
8 – Acquisition des images	22	13 – Arrêt de la machine	38
8-1 Plan unique	22	A1 – Confocal en réflexion	39
8-2 Série en z	23	A2 – Live imaging	40
8-2-1 Définir les limites	23	A3 – Mode Enhanced	41
8-2-2 Réglage éventuel de la compensation	23	A4 – Ajout de fluorochrome dans la Dye database	42
8-2-3 Réglage de l'échantillonnage en z	24	A5 – Milieu de montage vs milieu d'immersion	42