



**Plateau technique d'imagerie  
cellulaire du CPTP-Purpan**



Janvier 2012

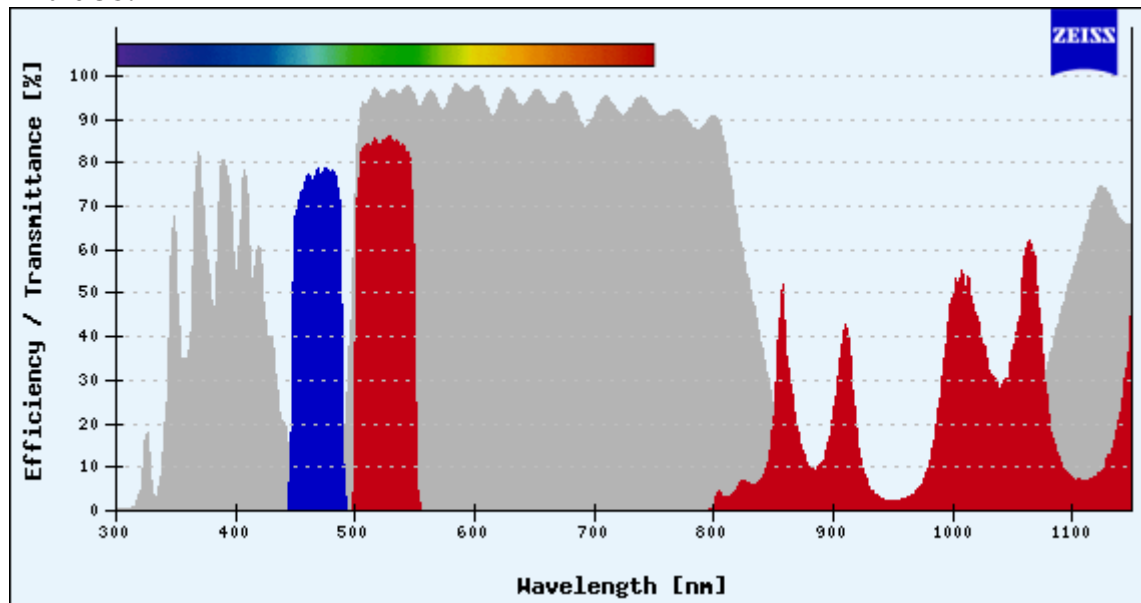
## Mode d'emploi Microscope Confocal Zeiss LSM 710



## Fiche matériel Zeiss 710



Type de microscope	Zeiss Axiomager (statif inversé)
Type de Brûleur	lampe X-cite 100 Watt
Shutter de fluorescence	oui
Filtres de fluorescence présents	<b>Cube n°1 : FSet49wf</b> <b>Cube n°2 : FSet38wf</b> <b>Cube n°3 : FSet43wf</b>
LASERS	Diode 405 nm Argon raies 458, 477, 488 et 514 nm Diode 561 nm Diode 633nm
Objectifs pour observation en fluorescence	20 X Plan Apo ON 0.8 DIC 63X Pl- Apo ON 1,4 oil DIC
Objectifs pour observation en contraste interférentiel (DIC)	Tous sauf 10X
Platine de déplacement	Motorisée x/y par joystick précision 1 µm
Déplacement en Z	Automatique avec le logiciel
Changement d'objectifs	Platine galvanométrique
Facteur de grossissement du tube	Motorisé 1X
Chambre CO2	Oui
Thermorégulateur	Oui
Détecteur	Un détecteur Spectral QUASAR (réseau et fente) Et 2 PMT spectraux (réseau et fente)
Acquisition	Images multi-marquages en séquentiel 2D à 5D 10 couleurs possibles
Logiciel d'acquisition	Zeiss ZEN Reconstruction de volumes 3D, projections, quantification,
Système d'exploitation	Windows VISTA

**Filtre 38:**

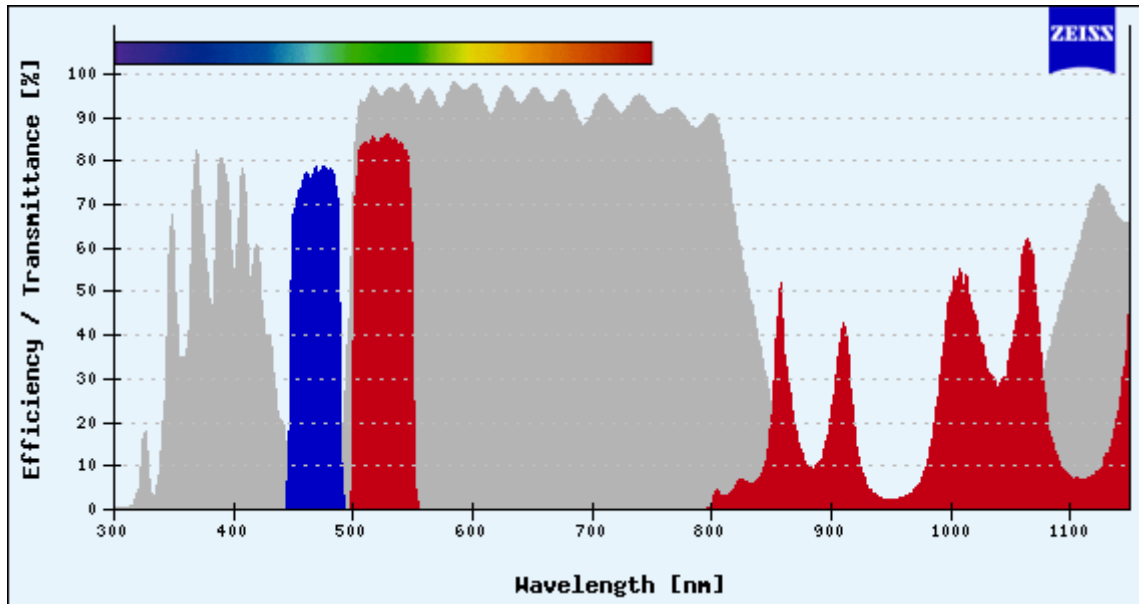
Excitation: BP 470/40

Beam Splitter: FT495

Emission: BP 525/50

Fluorochromes: 5-Carboxyfluorescein (5-FAM) 5-FAM (5-Carboxyfluorescein) Acridine Orange, both DNA & RNA Acridine Yellow Alexa Fluor 488™ Astrazon Orange R Auramine Aurophosphine Cy2™ DiO (DiOC18(3)) EGFP FITC FITC Antibody Fluo-3 Fluo-4 Fluorescein (FITC) Fluoro-Emerald GFP (S65T) GFP red shifted (rsGFP) GFP wild type, non-UV excitation (wtGFP) Lyso Tracker Blue-White Mitotracker Green FM Oregon Green 488-X Oregon Green™ 488 Oregon Green™ 500 PKH67 rsGFP S65A S65C S65L S65T sgGFP™ (super glow GFP) SYTO 13 SYTO 18

**Filtre 43:**



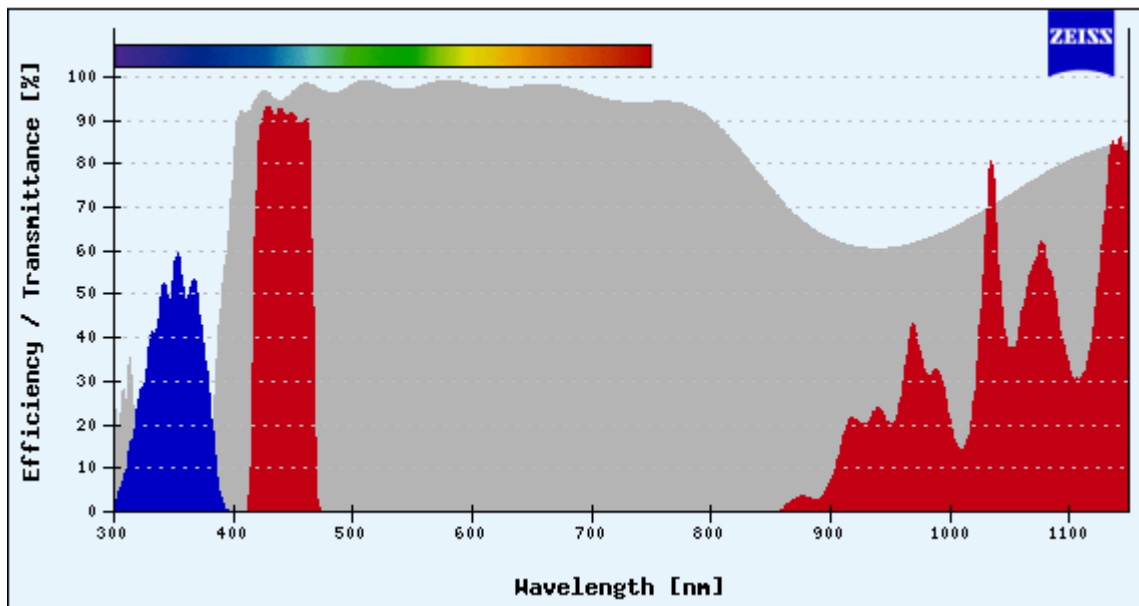
Excitation: BP 445/25

Beam Splitter: FT570

Emission: BP 605/70

Fluorochromes: DsRed (Red Fluorescent Protein) Ethidium Bromide Fluor Ruby Magdala Red (Phloxin B) Phloxin B (Magdala Red) Rhodamine B Rhodamine BB Rhodamine B 200 R-phycoerithrin (PE) Sevron Brilliant Red B Xylene Orange

#### FilterSet 49



Excitation: G365

Beam Splitter: FT395

Emission: BP 445/50

Fluorochromes: 1,8-ANS (1-Anilidonaphthalene-8-sulfonic acid); 1-Anilidonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS); 6,8-Difluoro-7-hydroxy-4-methylcoumarin pH 9.0; 7-Amino-4-

methylcoumarin pH 7.0; 7-Hydroxy-4-methylcoumarin; 7-Hydroxy-4-methylcoumarin pH 9.0; Alexa 350; AMCA conjugate; Amino Coumarin; BFP (Blue Fluorescent Protein); Cascade Blue; Coumarin; DAPI; DAPI-DNA; DyLight 350; Hoechst 33258; Hoechst 33258-DNA; Hoechst 33342; Indo-1 Ca<sup>2+</sup>; Indo-1, Ca free; Indo-1, Ca saturated; LysoSensor Blue; LysoSensor ; Blue pH 5.0; LysoSensor Yellow pH 9.0; LysoTracker Blue; Marina Blue

**Plateau technique d'imagerie cellulaire du CPTP-Purpan**

Sophie Allart - [sophie.allart@inserm.fr](mailto:sophie.allart@inserm.fr) – Astrid Canivet – [astrid.canivet@inserm.fr](mailto:astrid.canivet@inserm.fr)

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

## Allumage du système

Appuyer sur les 3 interrupteurs 0/I du boîtier MAIN SWITCH (les deux petits puis le gros).  
Allumer l'ordinateur au niveau de l'Unité Centrale.

Si vous désirez utiliser le **LASER Argon (488)**, tournez l'interrupteur à clé sur la position 1 sur le "gros" boîtier LASOS. Après 10 minutes, actionnez sur le petit boîtier LASOS (*photo*) le commutateur STANDBY pour basculer du mode « standby » (commutateur en position BASSE) au mode « laser run » (commutateur en position HAUTE)

---

ATTENTION : si le commutateur reste en standby, une partie du faisceau passe. Bien penser à basculer le commutateur en haut avant de lancer une acquisition.

---



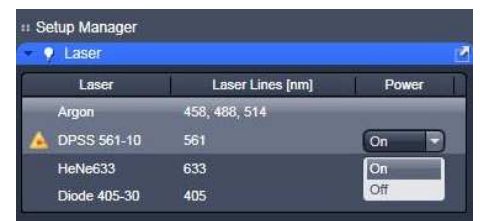
Démarrer le logiciel Zen en cliquant sur l'icône sur le bureau.



En cliquant sur **Start System**, le programme s'initialise pour pouvoir acquérir de nouvelles images et faire de l'analyse d'images.

**Image Processing** permet seulement l'analyse d'images sur des images déjà acquises.

Si vous avez besoin d'utiliser la raie d'excitation 561nm, n'oubliez pas de la mettre sur ON dans l'onglet Laser.



Laser	Laser Lines [nm]	Power
Argon	458, 488, 514	
DPSS 561-10	561	On
HeNe633	633	On
Diode 405-30	405	Off

**N.B:** Pour l'analyse d'image, il existe une version offline de Zen gratuite pour les PC à télécharger sur le site de Zeiss.

## Observation des échantillons aux oculaires



Allez dans *Ocular* (1) et cliquez sur *Offline*(2).  
Choisissez l'objectif (5) et en fonction du marquage à observer le cube (6). Allumez la lampe fluo (7) ou la lumière blanche (3) pour faire de la transmission.

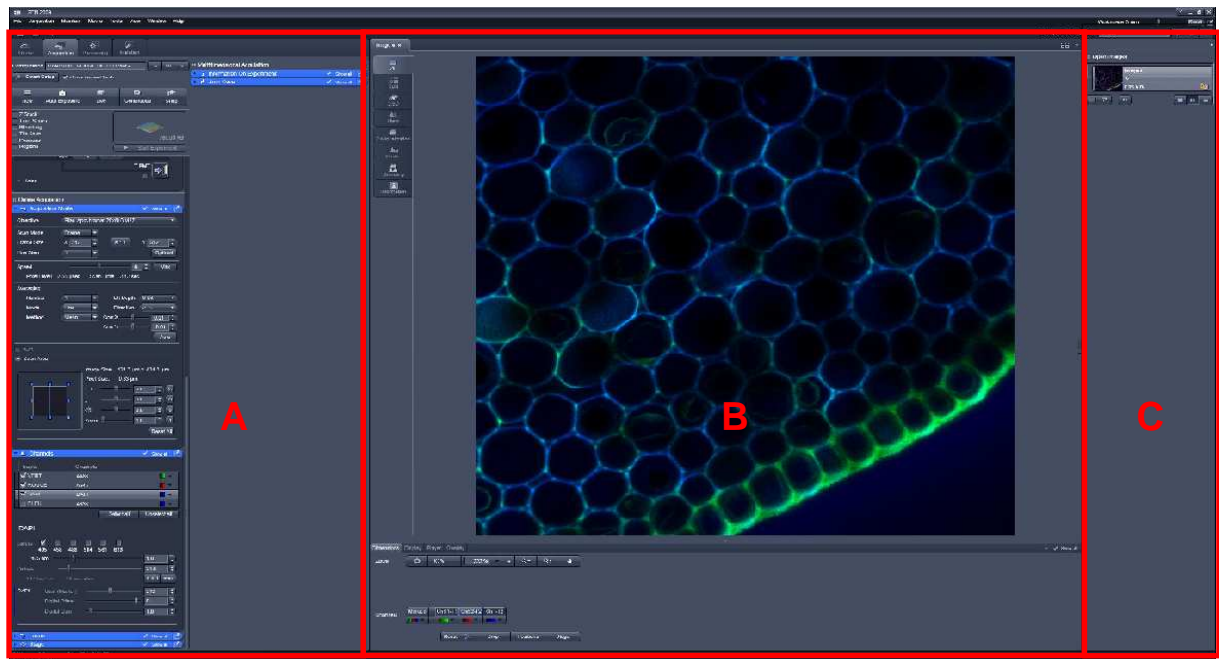
Vous pouvez aussi piloter le microscope à partir de l'écran TFT pour faire des observations aux oculaires.

## Présentation du software

L'interface du programme Zen se divise en trois parties principales:

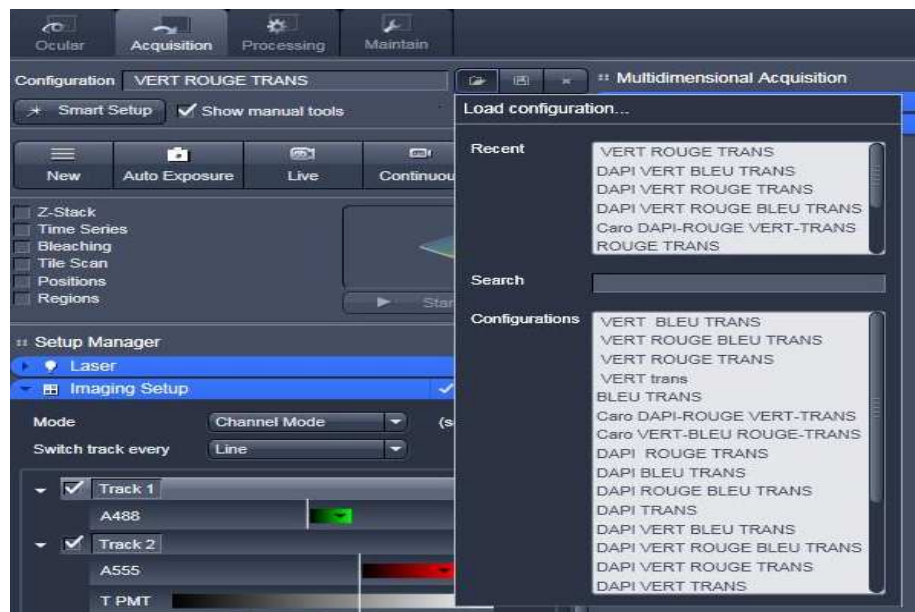
- A: Réglages des paramètres d'acquisition
- B: Affichage de l'image
- C: Images acquises





## Charger une configuration

Ouvrir dans *Configuration* et choisir la configuration qui vous convient selon vos marquages. Le microscope va automatiquement sélectionner pour chaque marquage l'excitation et l'émission. Il n'y a rien à modifier dans les onglets *Lasers*, *Imaging Setup* et *Light Path*.



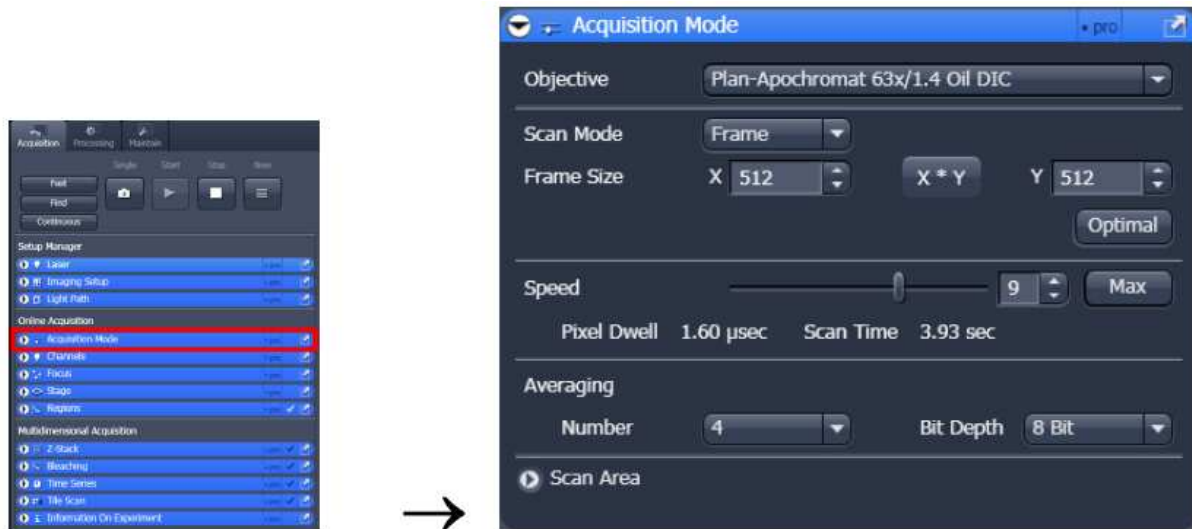
## Régler les paramètres pour l'acquisition

### Plateau technique d'imagerie cellulaire du CPTP-Purpan

Sophie Allart - [sophie.allart@inserm.fr](mailto:sophie.allart@inserm.fr) – Astrid Canivet – [astrid.canivet@inserm.fr](mailto:astrid.canivet@inserm.fr)

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01



Allez dans *Acquisition Mode*.

**Taille de l'image:** Choisissez la taille de votre image (classiquement on fait du 512 x 512 pixels).

En cliquant sur le bouton *Optimal*, on obtient la dimension en pixels idéale de l'image. Il ne sert à rien d'avoir un nombre de pixels plus important que le nombre optimal (cf échantillonnage spatial).

**Vitesse d'acquisition:** Plus la vitesse d'acquisition de l'image est lente, meilleure sera le rapport signal/ bruit. La vitesse habituellement choisie est de 8.

**Moyennage:** Si le rapport signal/bruit n'est pas suffisant, on peut faire une moyenne. Avec un échantillon vivant, le mode ligne est le plus approprié.

**Dynamique de l'image:** Pour des images destinées à être publiées ou pour être analysées par la suite (quantification, colocalisation par exemple), l'image doit être acquise en 12 bits (4096 niveaux de gris). Sinon, une acquisition en 8 bits suffit (256 niveaux de gris).

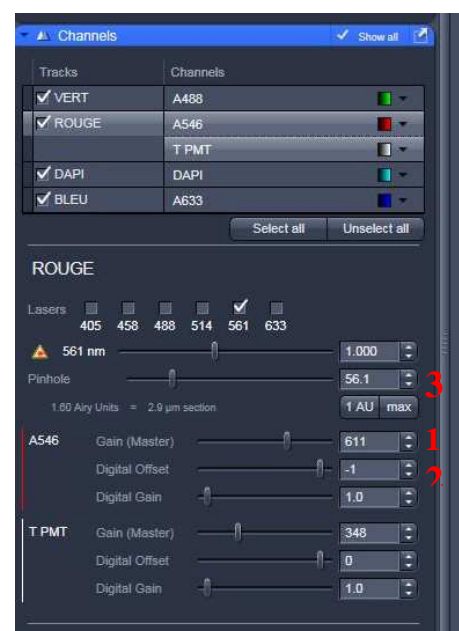
**Direction:** Afin de gagner du temps, acquérir l'image en balayage bidirectionnel.

## Acquisition de l'image

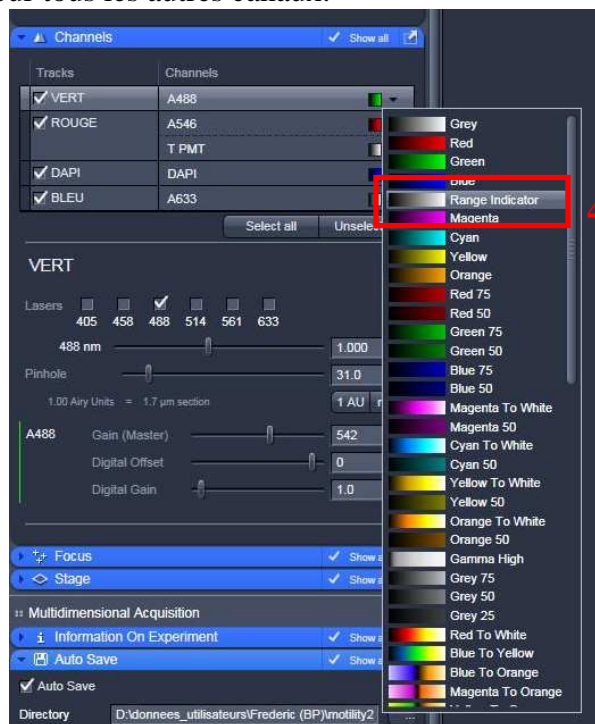
Allez dans *Channels*

Sélectionnez le canal vert et cliquez sur une unité Airy (*I AU*) (1) afin de régler l'ouverture du pinhole de façon optimale.

Pour chaque canal, mettre le gain (master) à 500. Se mettre en fausse couleur (dans *Channels*, range indicator-4) et démarrer le scan en mode continu sur une couleur. Régler le gain (2) (entre 500 et 1000) et le laser (3) afin d'être le plus proche de la saturation sans pour autant avoir des pixels saturés (qui sont rouges. Les pixels à zéro sont en bleu). Régler l'Offset de façon à obtenir un mélange de



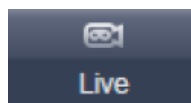
pixels bleus et noirs dans le fond. De manière générale, une valeur de 0 ou -1 est optimale. Faire la même chose pour tous les autres canaux.



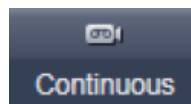
Quand deux canaux utilisent le PMT spectral (ChS), ils ont le même gain. Il faudra alors le régler sur le gain le plus faible et ensuite jouer sur le laser pour obtenir une bonne image.

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

### Scanner l'image:

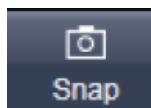


Cliquez sur *Live* pour scanner en continu (utile pour trouver ou changer le focus)



Cliquez sur *Continuous* pour scanner en continu avec la vitesse de scan choisie.

Cliquez sur *Stop* pour arrêter le scan



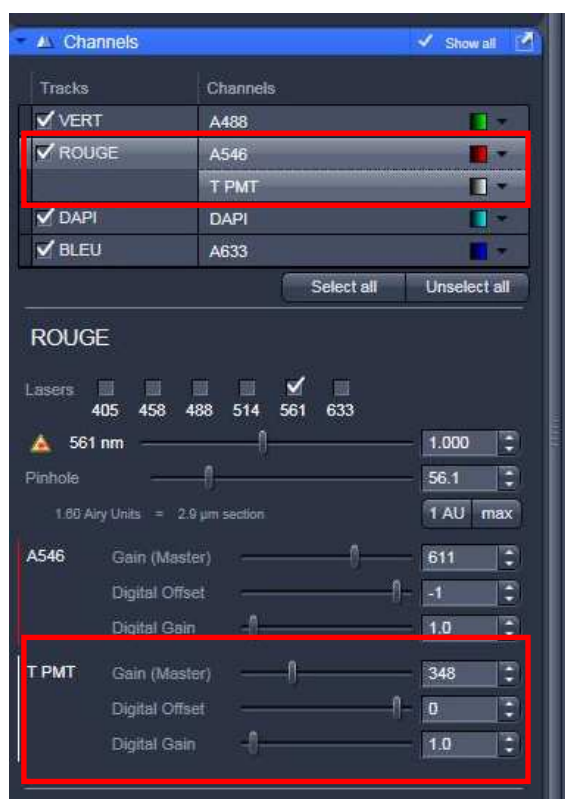
Cliquez sur *Snap* pour acquérir une seule image

### Acquérir une image en transmission

Pour acquérir en transmission, sélectionnez une configuration avec Trans.



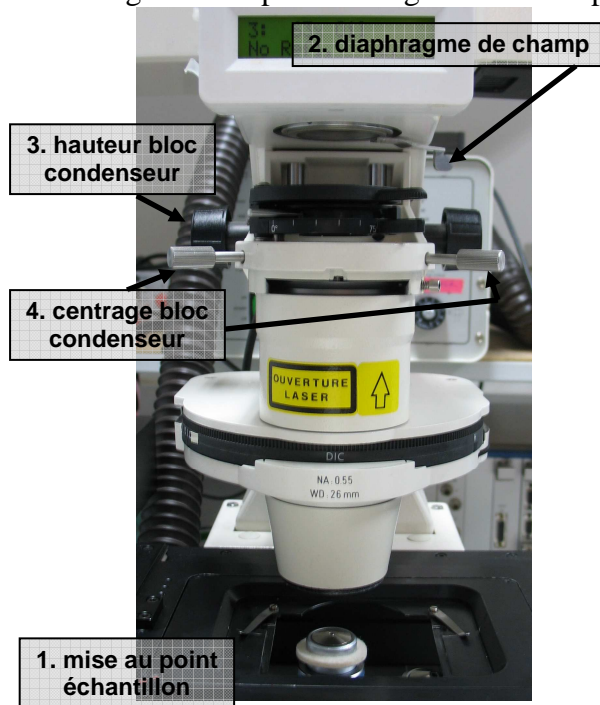
On peut voir dans *Light Path* que le PMT de la transmission est coché (T-PMT).



Dans *Channels*, réglez le gain du PMT de la transmission. La transmission est acquise simultanément avec un canal fluo: la source d'excitation (le laser) est donc commune et sa valeur est la même pour le canal fluo et pour le canal de la transmission. Il faut donc jouer sur le gain pour obtenir une bonne image.

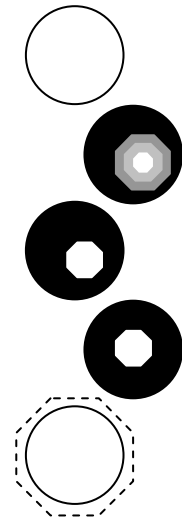
Le réglage de Koehler doit être fait lorsque l'on souhaite faire de la transmission afin d'obtenir une image de meilleure qualité.

Il est à régler sur le plus faible grossissement puis à re-régler à chaque changement d'objectif.



En **mode oculaire** :

- Faire la mise au point sur l'échantillon
- Fermer à fond le diaphragme de champ
- Régler la hauteur du bloc condenseur jusqu'à voir les bords du diaphragme net
- Centrer le diaphragme à l'aide des vis argentées.
- Elargir le diaphragme juste assez pour faire disparaître les bords.

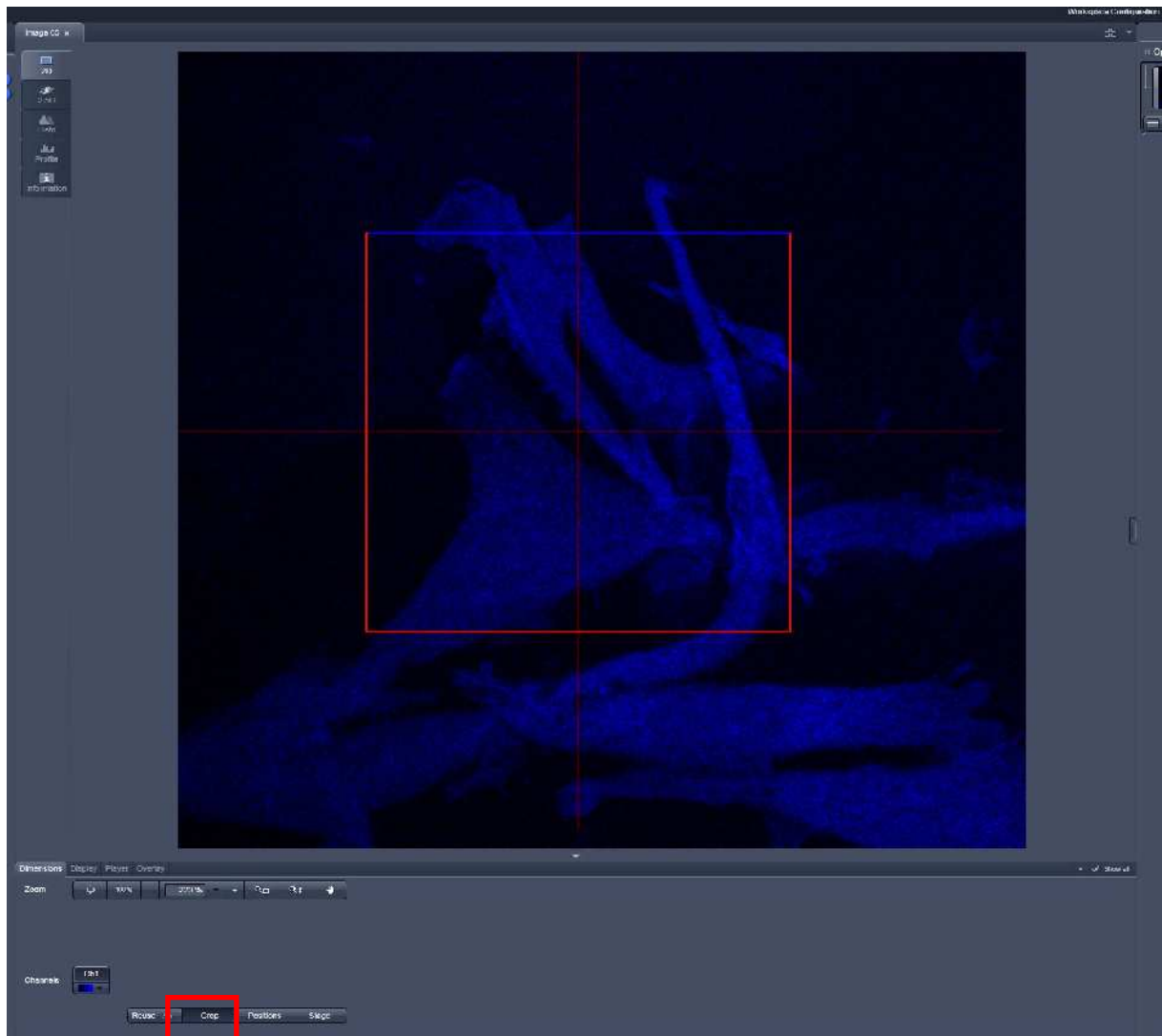


## Zoom

Vous pouvez directement zoomer sur la zone de votre choix en arrêtant le LIVE puis en cliquant sur CROP sous l'image. Un cadre apparaît sur l'image, la ligne bleue représente le haut de l'image qui sera formée. Vous pouvez déplacer, faire une rotation, agrandir ou rétrécir le cadre, puis faire LIVE ou SNAP pour acquérir.

Par défaut, lorsque l'on utilise le Crop, on a un zoom de 2.





Dans *Scan Area*, vous pouvez voir et changer vos paramètres de zoom.



### Echantillonnage spatial

- La résolution dépend de l'objectif :  $r = \frac{0.4 \lambda}{ON}$

- La taille du pixel est ajustable. Selon le théorème de Nyquist, l'échantillonnage idéal doit être de  $\frac{r}{2.3}$

<b>Objectif</b>	<b>20X</b>	<b>63X</b>
<b>ON</b>	0.8	1.4
<b>r (à 543 nm)</b>	271.5 nm	155 nm
<b>Echantillonnage idéal</b>	118 nm	67.5 nm
<b>Taille du pixel (512x512) Zoom =1</b>	830nm	260 nm
<b>Taille du pixel (512x512) Zoom=3</b>	280 nm	90 nm
<b>Taille du pixel (512x512) Zoom=5</b>	170 nm	
<b>Taille du pixel (1024x1024) Zoom=1</b>	420 nm	130 nm
<b>Taille du pixel (1024x1024) Zoom=2</b>	210 nm	70 nm
<b>Taille du pixel (1024x1024) Zoom=3</b>	140 nm	

- Si on sur-échantillonne trop, on use le fluorophore et on bleache, sans gagner en résolution qui est limitée par l'objectif. Quand je zoome, je sur-échantillonne.
- Si on sous-échantillonne, on perd en résolution.

Avec l'objectif 20X et en 512x512 il ne faut pas dépasser le zoom de 5.  
Avec l'objectif 63X et en 512x512 il ne faut pas dépasser le zoom de 3.

### **Faire une pile d'images**

Cochez *Zstack*. Dans le menu *Multi Dimensional Acquisition* la pile d'image peut s'acquérir de deux façons: le mode *First/Last* permet de fixer les limites de la pile alors qu'avec le mode *Center*, c'est le centre de la pile qui est fixé.

- *First/Last*: Cliquer sur *Live* ou *Continuous*, déplacez-vous en *Z* à l'aide de la vis micrométrique et déterminez le premier et le dernier plan en cliquant sur *Set First* et *Set Last*. Vous pouvez déterminer vous-même le nombre d'images à acquérir ou l'intervalle entre chaque image. Pour obtenir de meilleurs résultats, cliquez sur le bouton à côté d'*Optimal* pour avoir un intervalle entre deux images qui respecte le théorème de Nyquist.

- *Center*: Cliquer sur *Live* ou *Continuous*, déplacez-vous en *Z* à l'aide de la vis micrométrique et déterminez le centre de votre pile. Déterminez le nombre d'images à faire et l'intervalle entre chaque ( l'intervalle le plus adéquat étant celui proposé par le bouton *Optimal*).

Afin de ne pas avoir de saturation, se mettre en fausse couleur et chercher pour chaque canal séparément en navigant en *z* s'il y a un plan plus lumineux que celui sur lequel les réglages ont été précédemment faits.

### **Faire des acquisitions au cours du temps**

Cochez *Time Series* et choisissez le nombre de cycles et l'intervalle entre chaque.

Pour ne pas perdre les données si un problème se produit au cours de l'acquisition, faire une sauvegarde automatique (cf Sauvegarde).

Pour mettre en place le système de régulation de la température et de l'O<sub>2</sub>, se référer au chapitre Régulation.

### **Faire une Mosaïque**

Cochez *Tile Scan*. Déterminez le nombre de lignes et de colonnes de votre mosaïque.

Lors de la sauvegarde de l'acquisition, une seule image représentant la mosaïque sera sauvegardée et non pas toutes les tuiles séparées.

### **Acquérir des multipositions**

Cochez *Positions*. Déplacez-vous pour trouver la position souhaitée et cliquez sur *Add*. Répéter jusqu'à avoir toutes les positions souhaitées.

### **Faire une multiposition au cours du temps avec une pile d'images**

Il faut tout d'abord se mettre en mode *Center* pour faire la pile d'images. Il faut ensuite aller dans *Positions* et cliquer sur *Add* lorsque vous êtes en *x*, *y* et en *z* sur la position souhaitée. Ajustez le nombre de cycles et l'intervalle entre chaque comme vous le souhaitez.



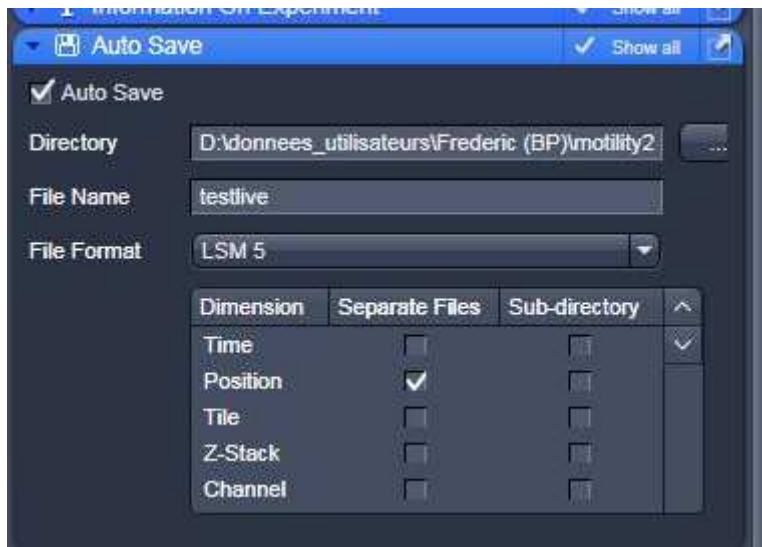
## Sauvegarde

Sélectionnez une image et faites un clic droit dessus puis *Save*.

Toute image acquise sur le LSM 710 doit être sauvegardée en format .lsm afin de conserver les méta données. Vous pouvez ensuite sauvegarder en .tif mais PAS en Jpeg (qui compresse donc perd des informations).

Les images 2D non sauvegardées sont automatiquement écrasées par le programme au scanning suivant (mais pas les images 3D).

Lorsque vous faites des acquisitions au cours du temps, il est important de faire une sauvegarde automatique pour éviter que vos données soient perdues si un problème de se produit. Pour cela, cochez Auto Save.



## Extinction du système

Lorsque vous êtes le dernier utilisateur de la journée:

Nettoyez l'objectif à huile avec de l'alcool et du papier Kimtech.

Baisser la tourelle d'objectif.

Mettez tout d'abord le commutateur en STANDBY sur position basse, puis sur le boîtier LASOS tournez l'interrupteur à clé sur la position 0. Patientez jusqu'à l'arrêt du ventilateur du laser argon.

Pendant ce temps, éteindre le laser 561 nm dans la fenêtre déroulante lasers dans le logiciel. Cliquer sur le bouton File dans le menu principal (Main) puis sur le bouton Exit, pour quitter le logiciel Zen. Fermez toutes les applications.

**ATTENDRE 10 secondes** et arrêtez l'ordinateur.

Quand le ventilateur du laser argon s'est arrêté, appuyer sur les 3 interrupteurs 0/I du boîtier MAIN SWITCH en position 0 (les 2 petits puis le gros).

Ne pas toucher le commutateur du boîtier de la lampe X-cite.

Remettre le cache-microscope en tissu bleu sur le microscope.

Bien fermer la porte de la pièce en partant !

## **Rappels**

Nettoyer les objectifs à immersion utilisés avec un Kimwipes et de l'alcool à la fin de la séance.

Ne pas réserver une session de plus de deux heures pour des échantillons fixés et quatre heures pour des échantillons vivants.

Récupérer le plus rapidement possible les données après acquisitions (nettoyage mensuel de l'ordinateur).

Si un problème se produit, remplir les fiches d'anomalie présentes à côté de l'ordinateur et signaler le problème à un responsable.