



Instruction	I_PHIV_MIC_0008
Utilisation de l'automate Zeiss 880	D 10/07/2020

Objet	Guide d'utilisation de l'automate Zeiss 880 couplé au vibratome Microm		
Destinataire (s)	MRI users		
Responsables	RESP MRI PHIV		
Historique des modifications			
<i>Auteur</i>	<i>Numéro de version</i>	<i>Date de modification</i>	<i>Modifications</i>
Lartaud	B	05/09/2016	Traitement Zen, ImageJ
	C	25/01/2017	Simplification
	D	17/04/2020	Nouvelle barre d'outils pour le traitement des images

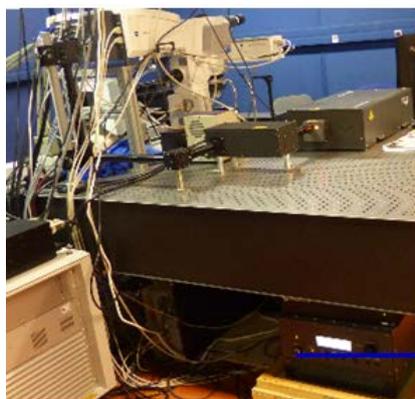
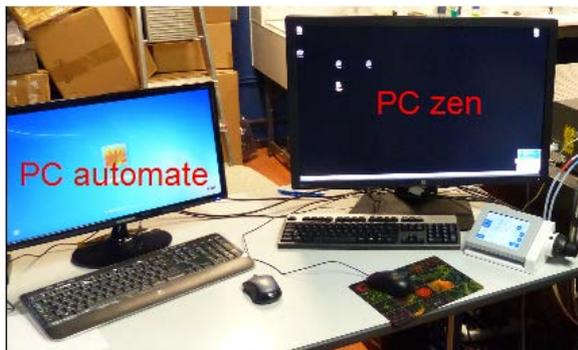
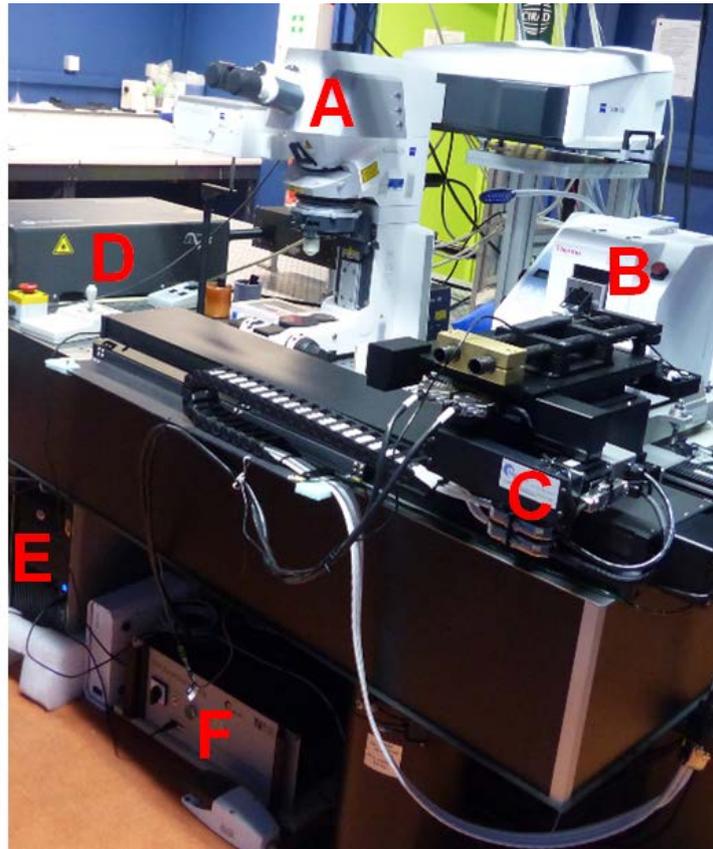
Sommaire

1. [Description du système](#)
2. [Procédure d'allumage](#)
3. [Chargement](#)
 - [Préparation des échantillons](#)
 - [Mise en place dans le bac](#)
4. [Vibratome:](#)
 - [Réglages de coupe](#)
 - [Fenêtre de coupe](#)
 - [Hauteur](#)
5. [Microscope:](#)
 - [Trouver l'échantillon](#)
 - [Paramètres d'imagerie](#)
 - [Automatisation](#)
 - [Réglage du Z-Stack](#)
 - [Mosaïque](#)
 - [Autosave](#)
 - [Réglages des triggers communication avec l'automate](#)
 - [Automatisation avec Experiment Disigner](#)
 - [Lancement de l'acquisition](#)
6. [Arrêt](#)
7. [Images :](#)
 - [Traitement zen](#)
 - [Traitement ImageJ](#)

Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Lartaud		

1. Description du système

A	Microscope Zeiss 880
B	Vibratome
C	Automate
D	Laser Chameleon
E	Ordinateur Zeiss
F	Controle automate

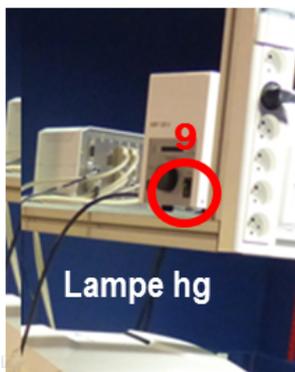
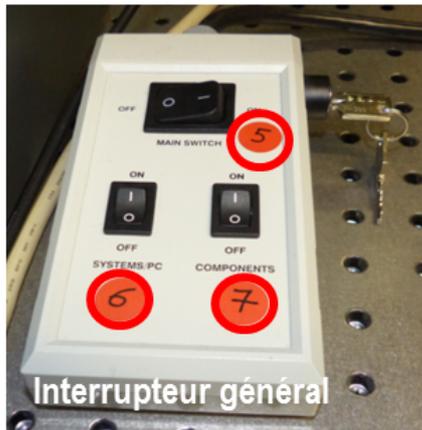


Clé du laser multiphoton



Lampe fluo

2. Procédure d'allumage



ALLUMAGE

- 1 Allumer l'ordinateur (1)
L'alimentation platine (2)
Le contrôleur de l'automate (3)
Armer le contrôleur (4)
 - 2 Se connecter PC Zen
« Login + mot de passe MRI »
Se connecter PC automate
« mot de passe: admin »
 - 3 Allumer le microscope avec l'interrupteur général (5)
le bouton de gauche (system PC) (6)
le bouton de droite (components) (7)
Lancer Zen Black
- Start System


- 4 Pour une utilisation en multiphoton
mettre le laser Coherent en marche, en
tournant la clé sur ON (8)
 - 5 Si nécessaire
Allumer la lampe fluo, boîtier sur
l'étagère (9)

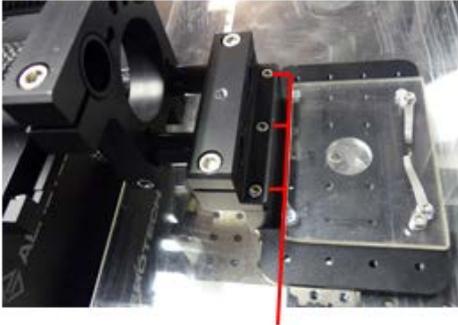


Utilisation de l'automate Zeiss 880

3. Chargement

Pour une observation sur lame utiliser le plateau après démontage de la cuve et de la webcam

Support sur plateau



Vis de blocage

Sur le PC automate : Lancer Zen Extension NEce



La platine doit être en position de chargement, si ce n'est pas le cas, reportez-vous au manuel utilisateur. Le système va s'initialiser, merci de vérifier que rien ne gêne la course et armer le système.

Ok

Initialisation en cours...

Initialisation effectuée

Ok

Microscopie
uniquement

Automatisation

Type de support utilisé



Support avec immersion
1 bloc

Mise en place de l'automatisation

1. Chargement

2. Vibratome

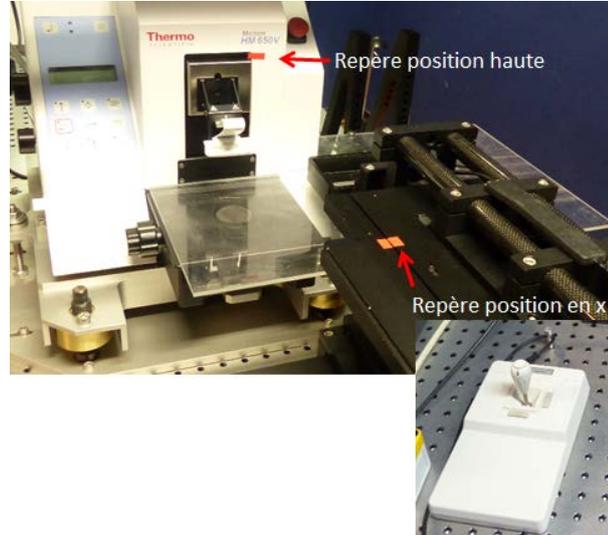
60

durée d'une coupe (seconde)

3. Microscope

Utilisation de l'automate Zeiss 880

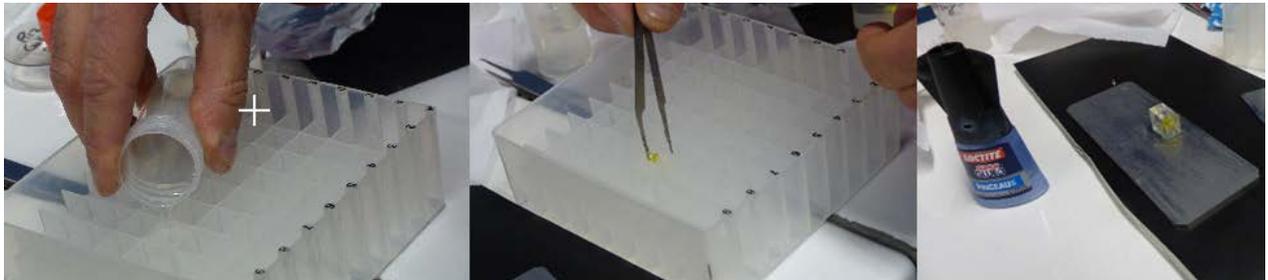
allumage du vibratome à l'arrière de celui-ci
 mettre la tête du vibratome sur le repère de position haute
 mettre la platine sur le repère de position en x avec le joystick



Préparation des échantillons

Couler dans l'agarose de 3 à 5% (1g pour 20ml)

Technique racine de riz : feuille d'agarose coulée à plat, découpée, mise en place en diagonale dans un moule cubique pour couler le reste du bloc.



Mise en place dans le bac

Coller le bloc sur la plaque métallique en décalé coté microscope pour laisser la place au doigt (**voir photo**) à visser pour maintenir la plaque. Remplir d'eau jusqu'au niveau webcam immergée



Utilisation de l'automate Zeiss 880

Monter l'objectif en position haute



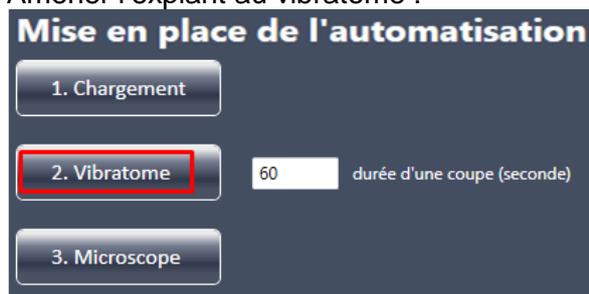
Réglage de l'alignement de l'explant et l'objectif :

Amener l'explant au microscope :

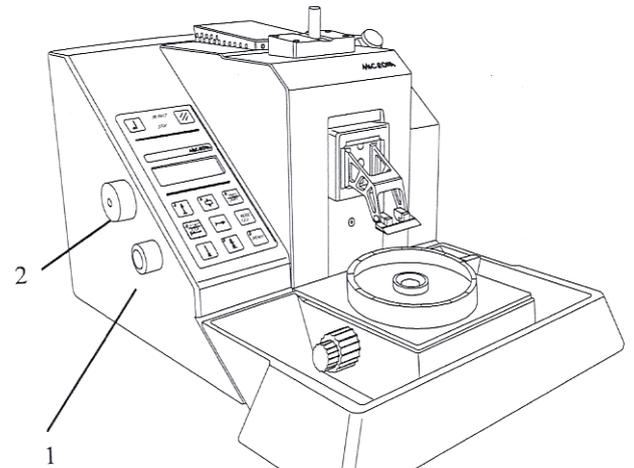


Réglage de l'alignement avec le joystick

Amener l'explant au vibratome :



4. Vibratome: ([Instructions PHIV](#))



Mettre une nouvelle lame à chaque manip importante
Vérifier l'angle de la lame

Définition de la fenêtre de coupe.

Le vibratome ne peut être utilisé manuellement : il faut définir une fenêtre de coupe. Si ce n'est pas fait, dès que vous lancez une coupe avec le bouton START, il utilise la fenêtre de coupe précédente.

Étapes	Affichage	Touches de réglage
Appuyer une première fois sur le bouton  pour régler la position de départ	Fenêtre 1	Positionner la lame avant l'échantillon avec les boutons  pour avancer et  pour reculer
Appuyer une deuxième fois sur le bouton  pour valider la position de départ et pour régler la position de fin	Fenêtre 2	Positionner la lame juste après l'échantillon avec les boutons  pour avancer et  pour reculer
Appuyer une troisième fois sur le bouton  pour valider le réglage		

**Utilisation de l'automate Zeiss 880****Positionnement de la hauteur de la lame.**

Le déplacement en "Z" se fait grâce aux boutons suivants :



La lame remonte. Si on appuie longtemps, elle va se remettre dans sa position "home" (la diode rouge est alors allumée)



La lame descend, tant qu'on appuie sur le bouton

La lame descend par à coup, de la valeur de l'épaisseur d'une coupe (valeur sélectionnée sur le panneau, **epai**).

Réglages de coupe

Bouton 1. Réglage de la vitesse de coupe. Peut se modifier même lorsque l'appareil est en train de couper.

Bouton 2. Réglage des autres paramètres. Lorsque l'on appuie sur le bouton cela permet de sélectionner la colonne des paramètres dans le panneau de contrôle (positionnement des cases noires à gauche ou à droite).

Lorsque l'on tourne ce bouton, cela modifie les valeurs du paramètre sélectionné

➤ **Vérifier que le bouton  est désactivé (diode éteinte)**

- Choisir le paramètre à régler en appuyant sur le bouton latéral 2 : épaisseur de coupe (EPAI) ou épaisseur de dégrossissage (PROG).
- Régler la valeur (donnée en μm) de l'épaisseur en tournant le bouton latéral 2

Réglage de la fréquence de coupe :

- Appuyer sur le bouton  du panneau de contrôle. La diode doit être allumée.
- Vérifier que sur le panneau de contrôle, freq est écrit en majuscule (FREQ). Si ce n'était pas le cas, appuyer sur le bouton latéral 2
- Régler la valeur en tournant le bouton latéral 2 (de 30 à 100 Hz)

Conseil. Généralement réglée sur 40.

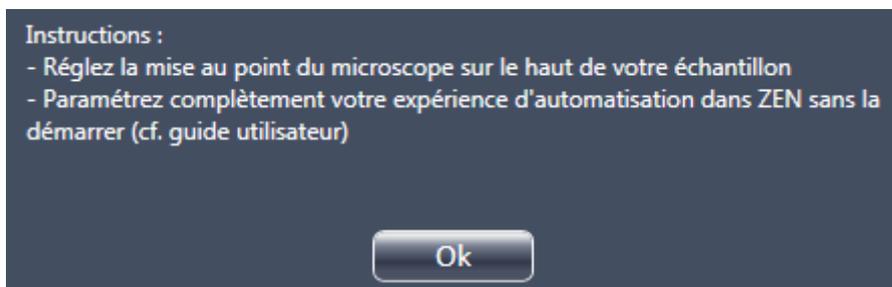
Réglage de l'amplitude de coupe

- Appuyer sur le bouton  du panneau de contrôle. La diode doit être allumée.
- Appuyer sur le bouton latéral 2. Sur le panneau de contrôle, Ampl doit être écrit en majuscule (AMPL).
- Régler la valeur en tournant le bouton latéral 2 (de 0.1 à 1.2 mm par incrément de 0.1 mm)

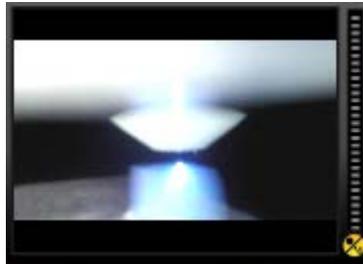
Conseil. Généralement réglée sur la valeur de 0.8 mm

**Utilisation de l'automate Zeiss 880****5. Microscope:**

Trouver l'échantillon :



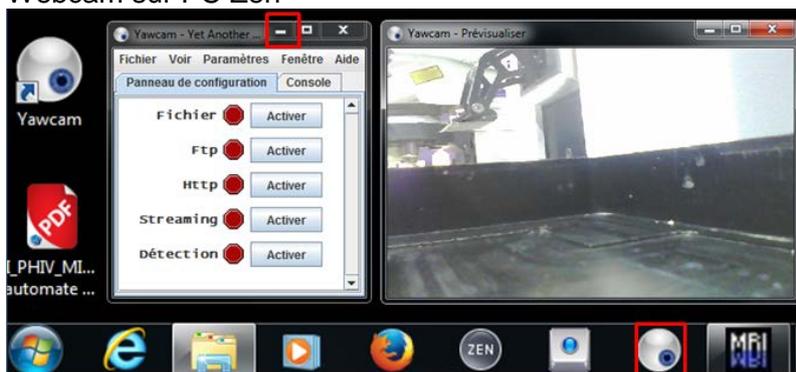
Baisser l'objectif sans toucher le bloc (réglages en z) en contrôlant à la webcam
Jusqu'à la distance de travail d'environ 2mm



Mettre un laser visible en Live pour voir l'ombre de l'explant
Réduire cette ombre en réglant le x,y de la platine
Trouver la position haute de l'explant

Autres possibilités : avec un allumage via la fluo ou lumière blanche rasante et en regardant aux oculaires.

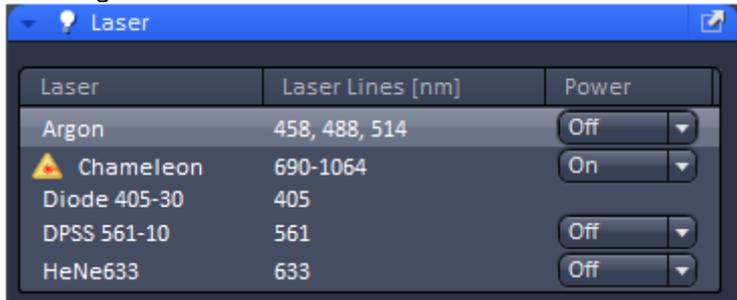
Webcam sur PC Zen



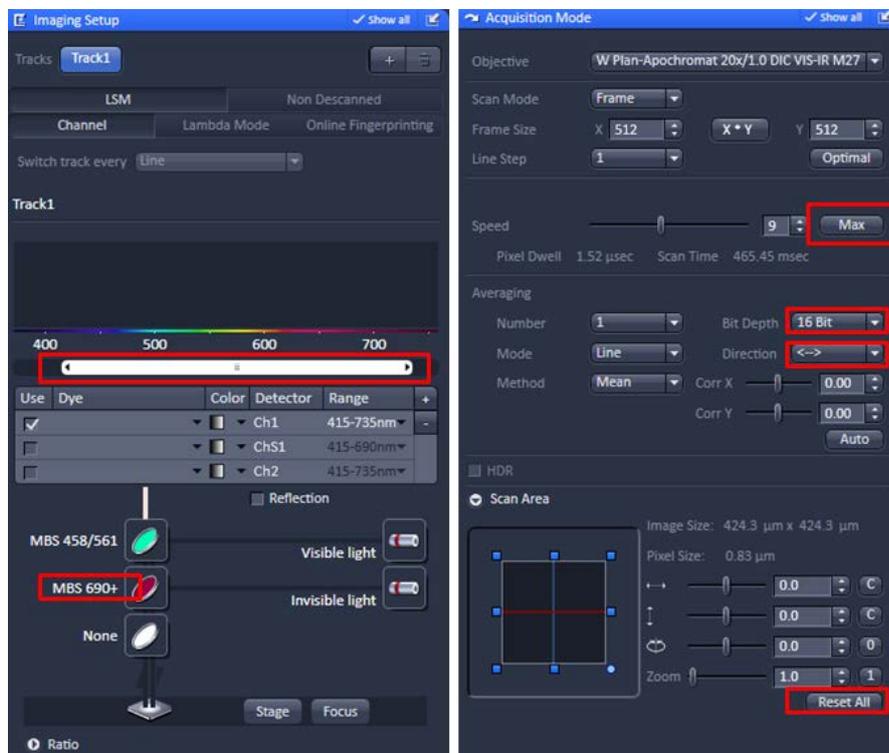
Utilisation de l'automate Zeiss 880

Réglages des paramètres d'imagerie : (Mode d'emploi Zen)

Allumage des lasers



Paramètres d'imagerie et acquisition

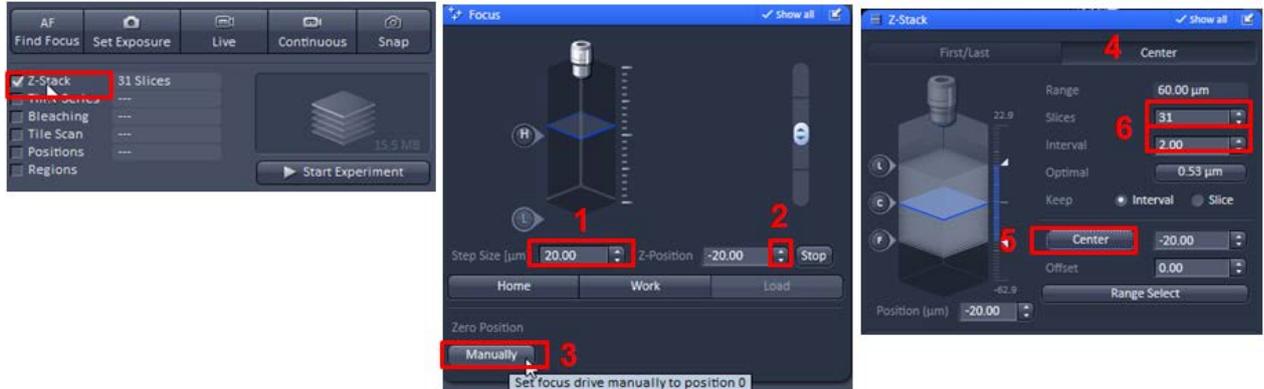


Mise en place (ou non) du miroir pour l'utilisation du NDD BiG (scotch rouge si le filtre est présent)



Automatisation

Réglage du Z-Stack



Sur la première bonne image en z :

1 Régler le pas en z de la moitié de l'épaisseur de la coupe au vibratome 20 μ m

2 Descendre d'un pas $\rightarrow z=-20\mu$ m

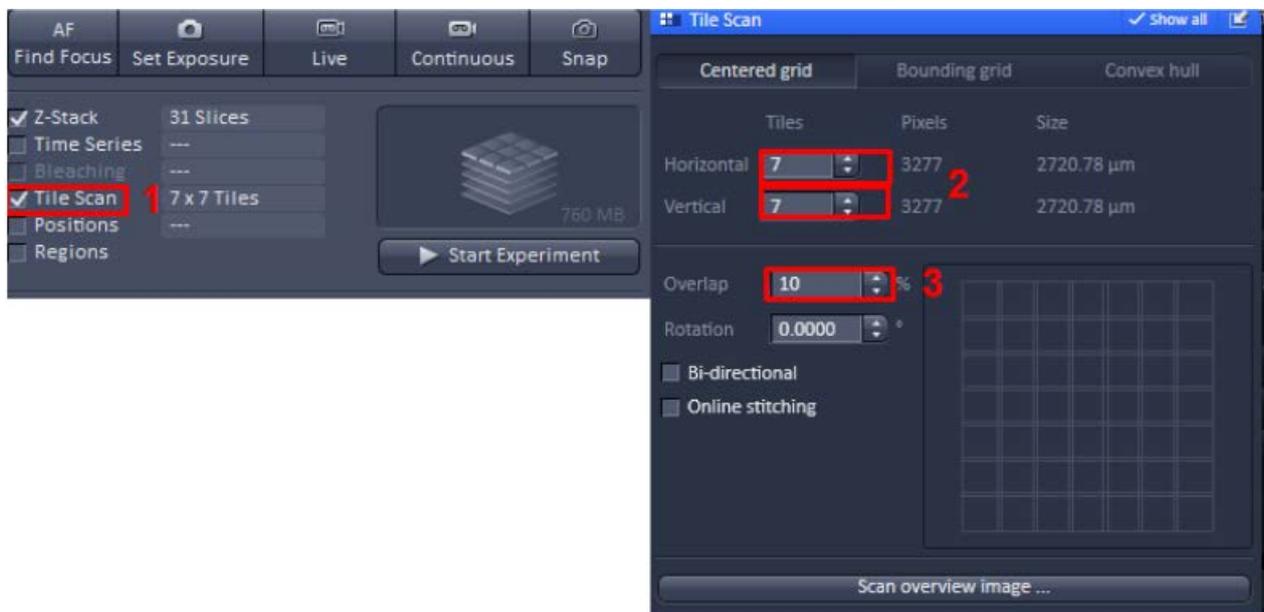
3 Mettre manuellement le z à la position 0

4 Onglet Center

5 Centrer le Z stack

6 Réglages des paramètres du Z stack : Nombre de coupes et Intervalles pour un obtenir une épaisseur de Z stack supérieure à l'épaisseur de coupe au vibratome

Mosaïque :

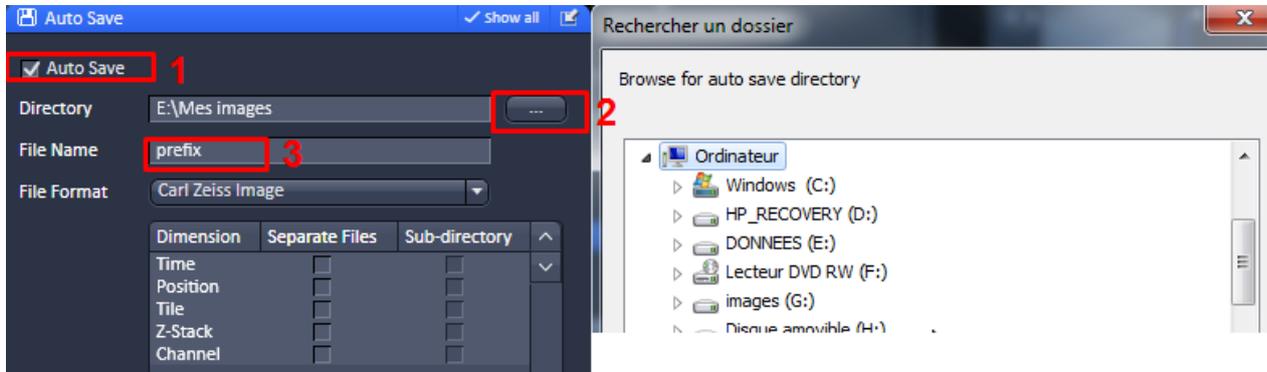


1 Cocher *Tile Scan*

2 Nombre d'images en horizontal et vertical

3 Mettre à 10% le recouvrement

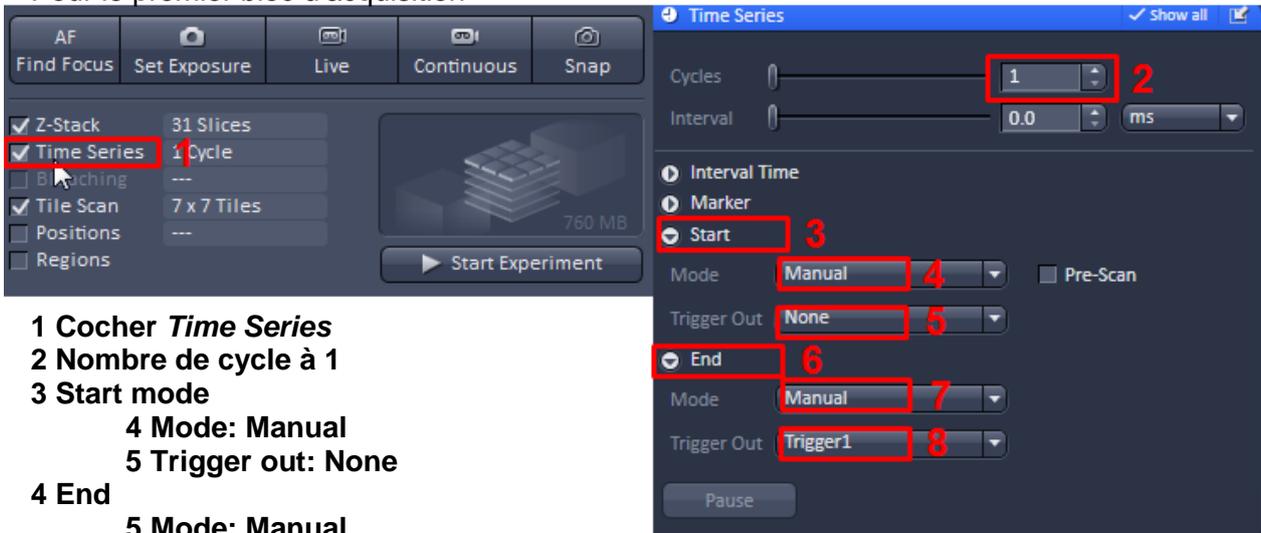
Autosave



- 1 Cocher *Autosave*
- 2 Choix de l'emplacement
- 3 Choix du préfix pour nommer les fichiers

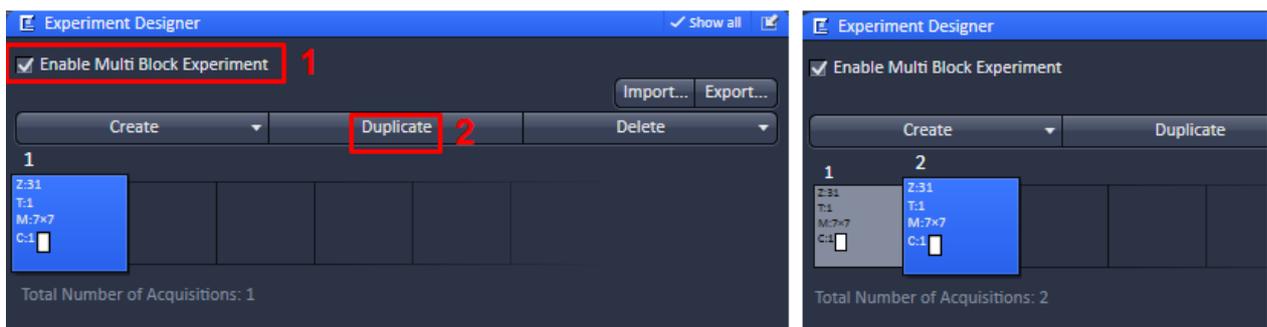
Réglages des triggers communication avec l'automate

Pour le premier bloc d'acquisition



- 1 Cocher *Time Series*
- 2 Nombre de cycle à 1
- 3 Start mode
 - 4 Mode: Manual
 - 5 Trigger out: None
- 4 End
 - 5 Mode: Manual
 - 6 Trigger Out: Trigger1

Automatisation avec Experiment Designer



- 1 Cocher *Enable Multi Block*



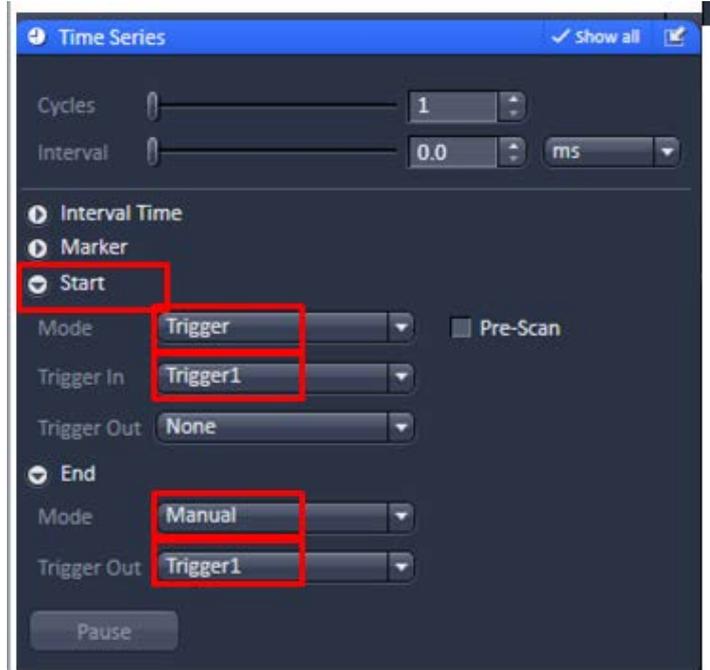
Utilisation de l'automate Zeiss 880

2 Dupliquer le Block 1

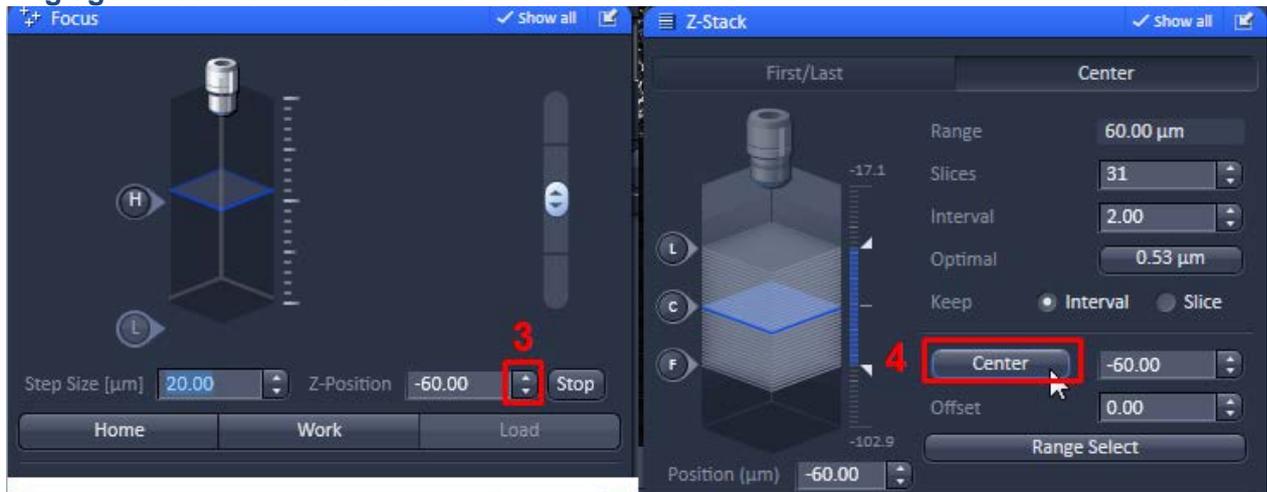
Réglages des triggers communication avec l'automate

Pour le deuxième bloc d'acquisition

Start Mode: Trigger
Trigger in: Trigger1
End Mode : Manual
Trigger Out : Trigger1



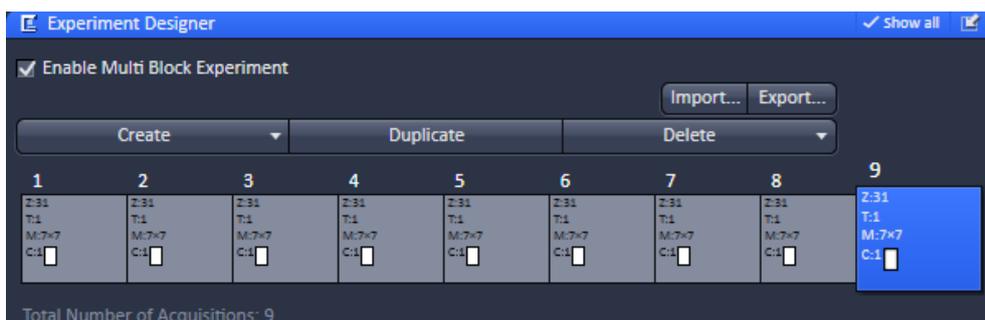
Réglage du centre du z stack



3 Régler le pas (épaisseur de coupe du vibratome) et descendre de 1 pas

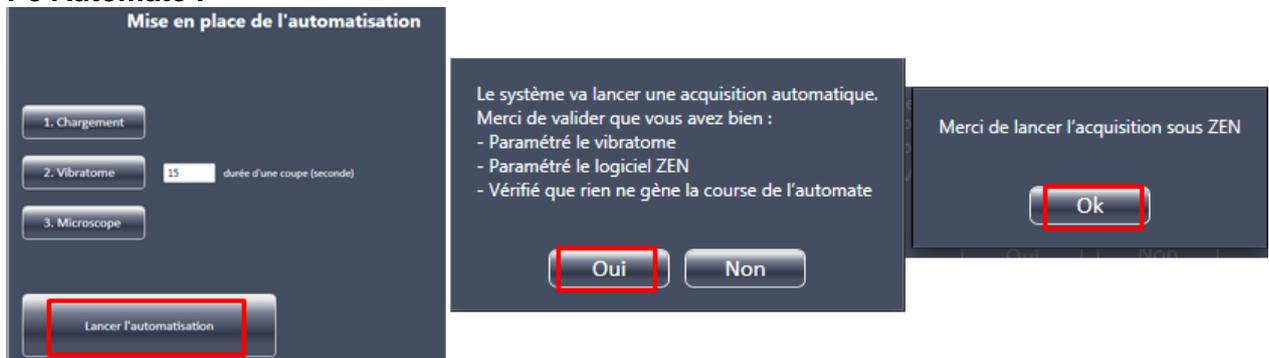
4 Centrer

Dupliquer le nouveau bloc et régler à nouveau le centre du z stack

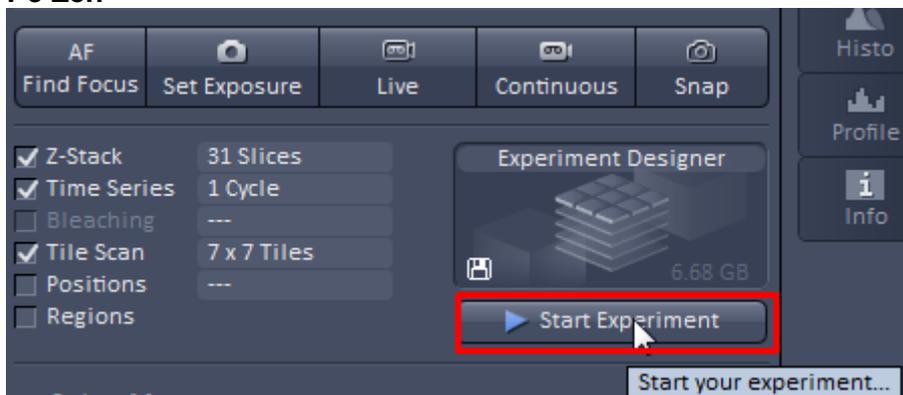


Lancement de l'acquisition :

Pc Automate :



Pc Zen



Suivi des cycles sur le Pc Automate



Pour arrêter avant la fin cliquer sur stop dans Zen quand l'acquisition est active
Ce n'est plus possible si le système est en attente d'un signal du vibratome

Pour un arrêt d'urgence appuyer sur le bouton coup de poing

6. Arrêt du système

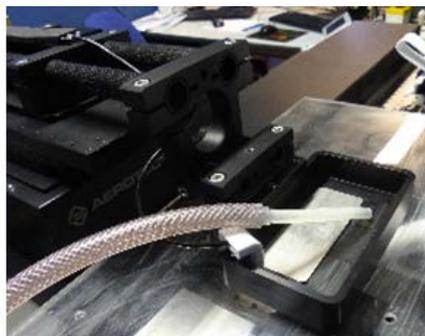


EXTINCTION

- 1 Éteindre les lasers s'il n'y a personne après vous (laser Coherent à 800).
Si laser Argon allumé, le mettre sur off dans ZEN puis attendre 5 mn avant de fermer ZEN pour qu'il refroidisse.
- 2 PC Zen : Quitter le programme ainsi que la session
PC automate : Arrêter Windows
- 3 Mettre le laser Chameleon en stand by (clé sur générateur) (8). Laisser le système de refroidissement du laser sur RUN.
- 4 Éteindre les boutons
Components (7)
System PC (6)
l'interrupteur général (5)
Le contrôleur de l'automate (3)
L'alimentation platine (2)
- 5 Éteindre la lampe fluo (9)
- 6 Vider et rincer le bac (vider le réservoir de vidange) et **nettoyer les objectifs**



Pompe vidange





Instruction	I_PHIV_MIC_0008
Utilisation de l'automate Zeiss 880	D 10/07/2020

7. Images

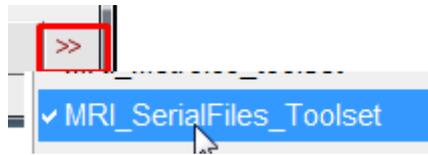
Traitement Stitching dans Zen Black

Utilisation de l'automate Zeiss 880

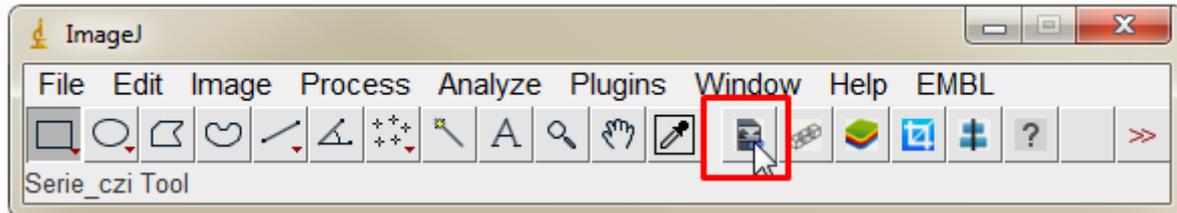


Traitement ImageJ

Barre d'outils MRI_SerialFiles_Toolset

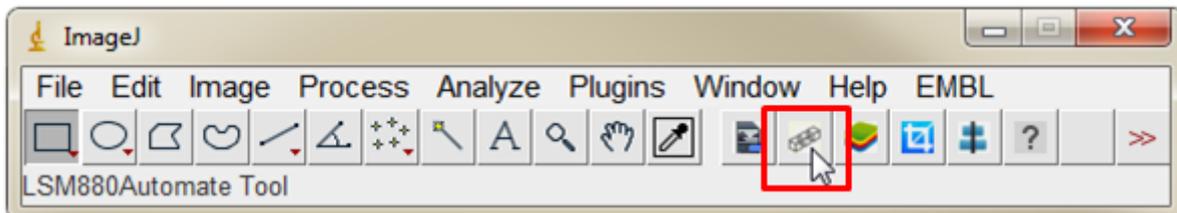


Outil czi_import

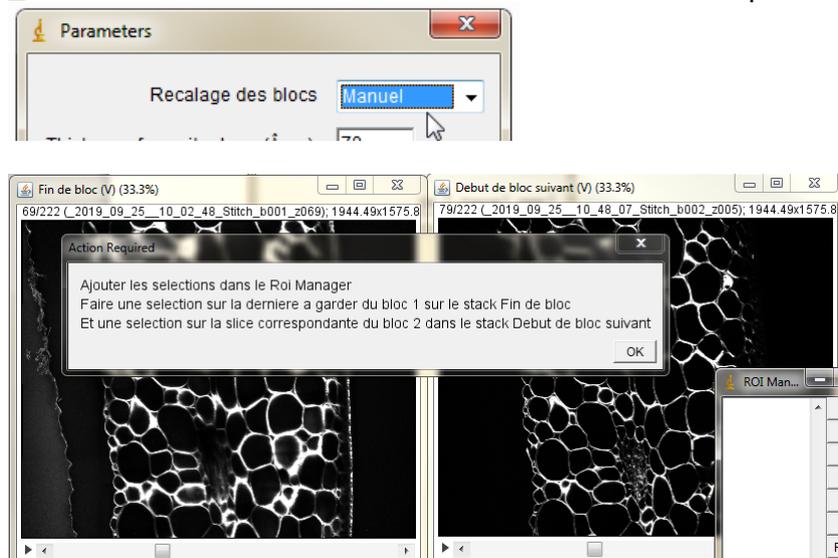


Permet d'ouvrir et sauvegarder une série de fichiers en une séquence de fichiers tiff
 _ en inversant le stack
 _ en labellisant les images avec les noms de fichiers + _c_z_t_b (_b pour blocs)
 _ en redimensionnant les images via Canvas Size si elles ne sont pas de même taille en xy
 _ en alignant les blocs en fonction des positions en xy des infos
 _ en gardant les informations z t c lut (infos czi + infos positions inscrites dans le premier fichier de la séquence)

Outil LSM880Automate

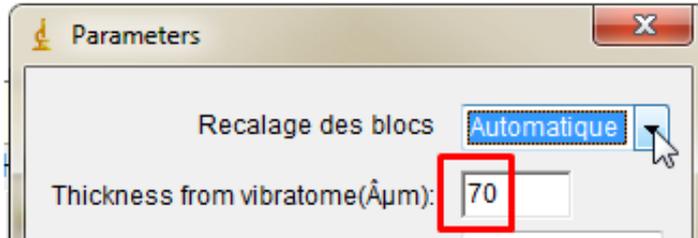


Pour mettre bout à bout les séries de blocs en z
 _ en manuel en choisissant dernière slice d'un bloc et le premier du bloc suivant

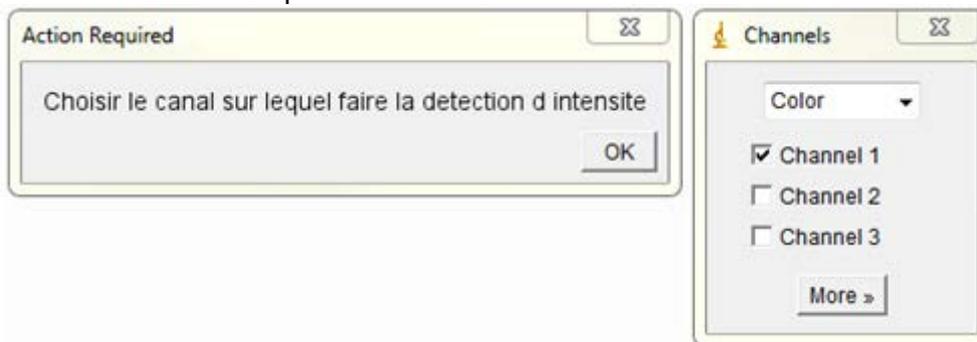


Utilisation de l'automate Zeiss 880

_ en automatique avec un calcul de la première slice par l'intensité max et le nombre de slices en fonction du pas en z et de l'épaisseur coupée au vibratome, Possibilité de correction de l'intensité via le plugin Bleach Correction, une correction du contraste (% de pixel saturés) et du Gamma

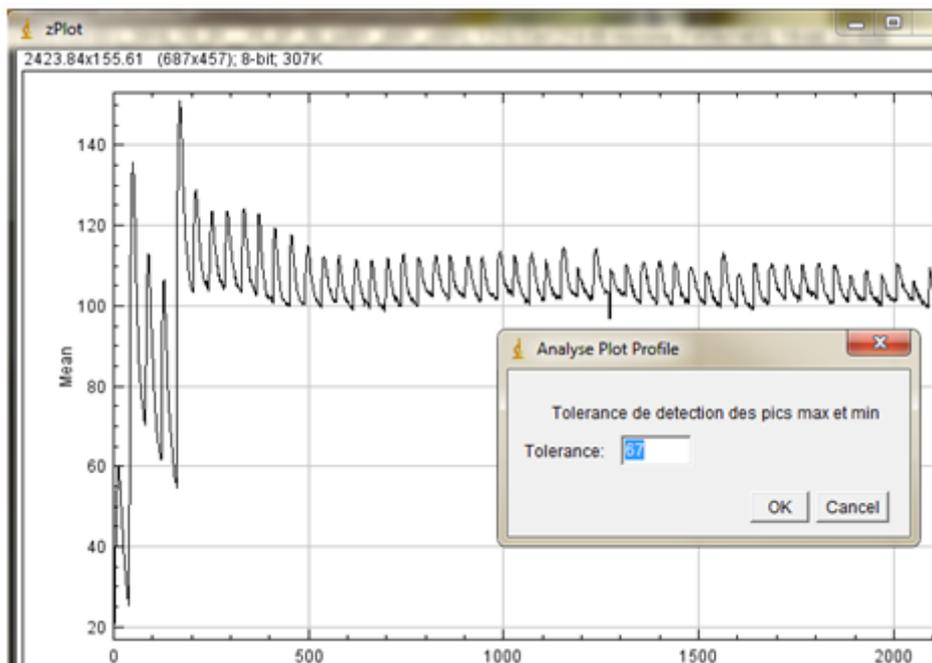


Choix du canal sur lequel se fera le calcul des intensités

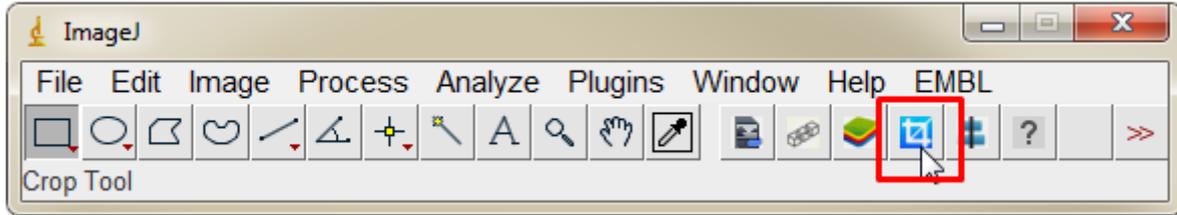


Plot Profile des intensités

Avec le réglage de la Tolerance pour la détection des pics max et min

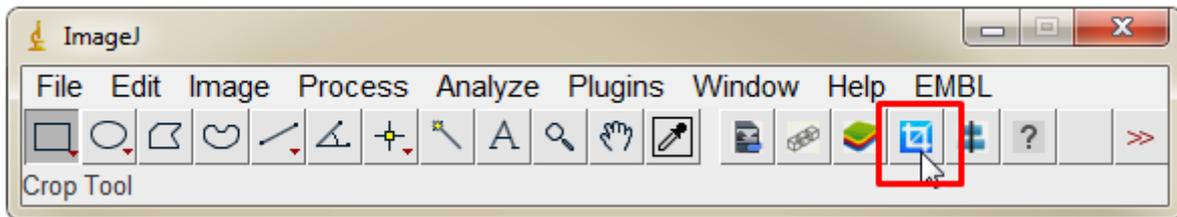


Outil Virtual_stack



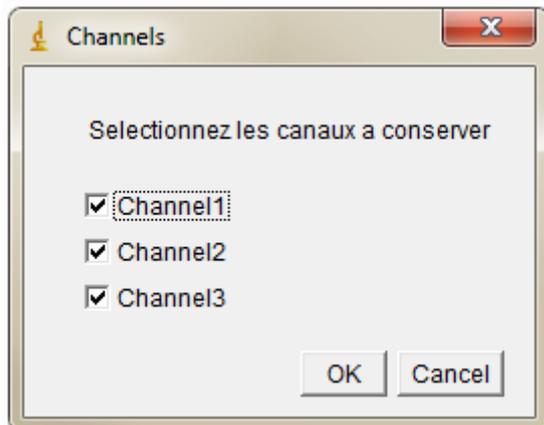
Permet d'ouvrir en stack ou hyperstack virtuel une séquence de fichiers images
 les czt(bloc) sont recherchés dans les labels
 les infos czi pour la calibration et les lut

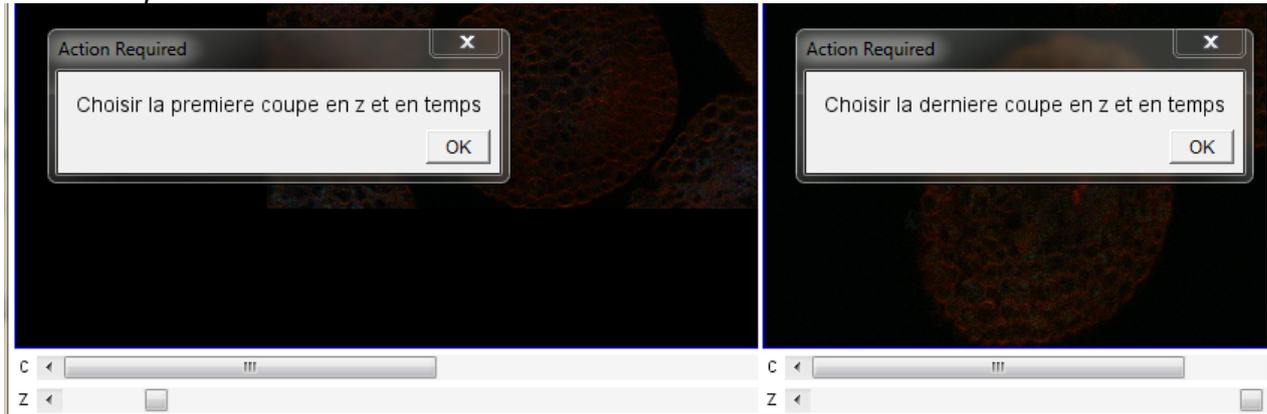
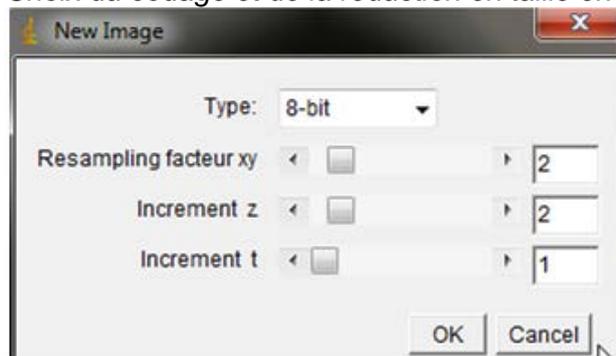
Outil Crop



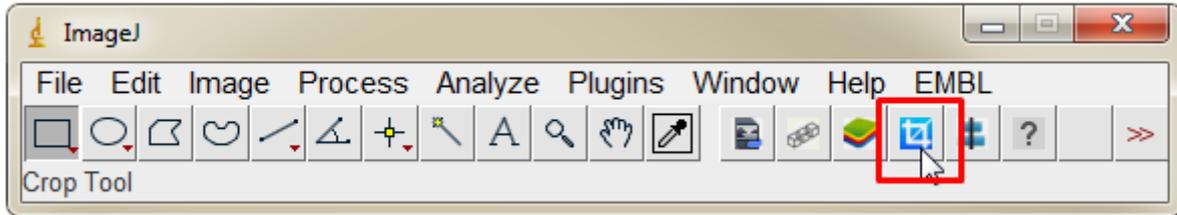
permet de réduire une séquence dans toutes les dimensions xy z c pour ajuster à la RAM
 pour c on peut choisir de conserver que certains canaux
 pour z on peut choisir la première et dernière slice à garder ainsi qu'un intervalle
 entre slices
 pour le codage on peut passer en 8-bit
 pour xy on peut faire une sélection a garder et réduire la résolution d'un certain
 facteur

Choix des canaux



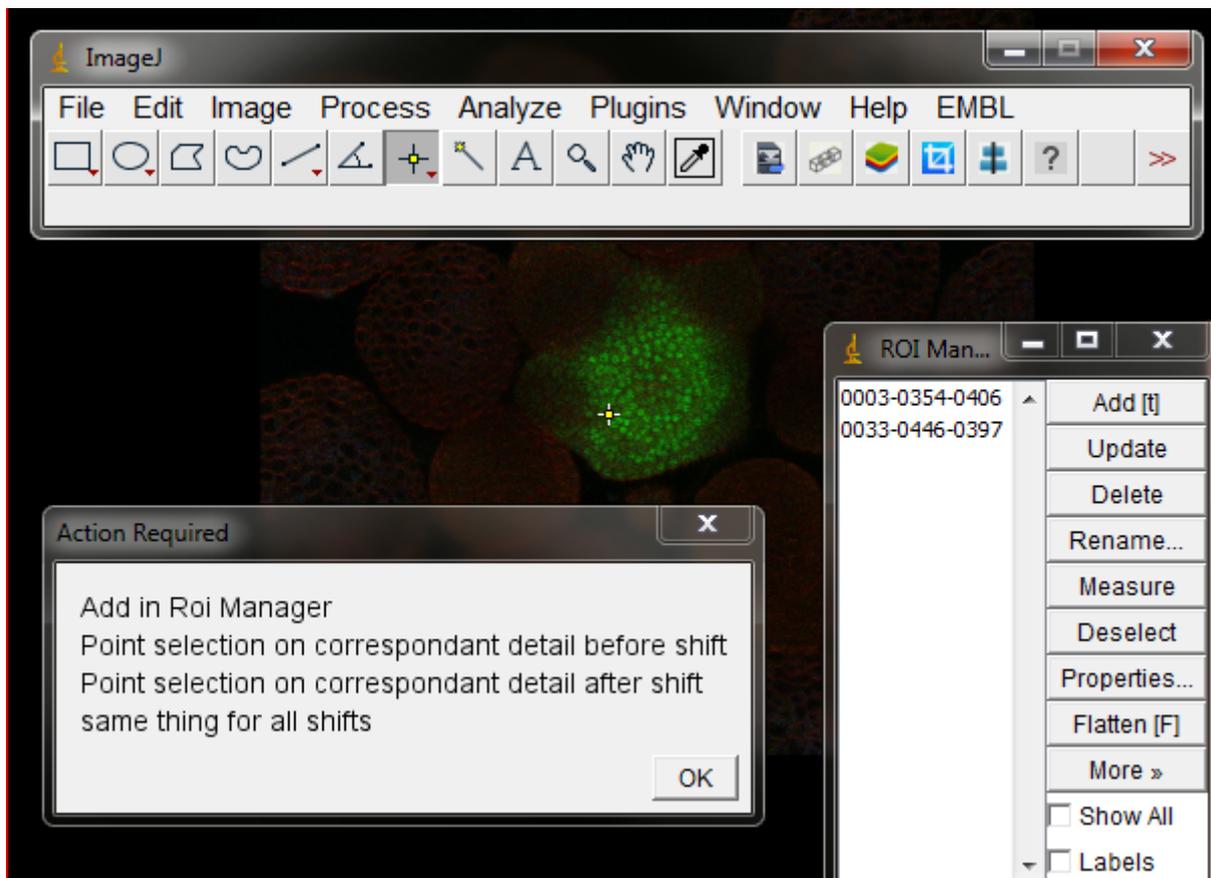
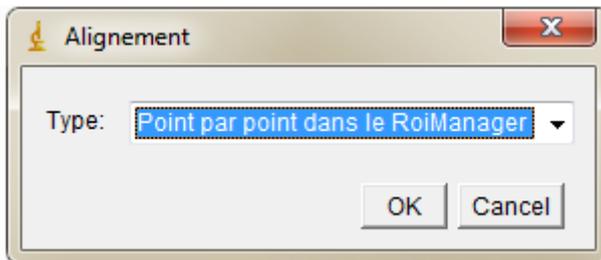
Utilisation de l'automate Zeiss 880*Choix des positions**Choix de la zone d'intérêt**Choix du codage et de la réduction en taille en xy ou intervalles z**Calcul de la taille de l'image obtenue*

Outil Aligne



Permet de réaligner un Stack ou Hyperstack Virtuel

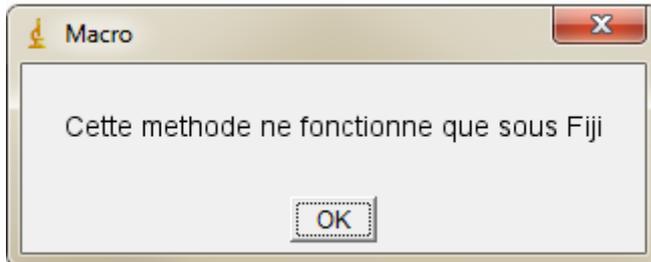
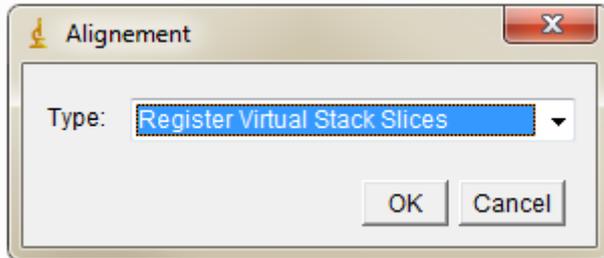
- en manuel : paires de landmarks (points) à mettre dans le ROI Manager. Ce sont les repères le décalages entre 2 slices pour le calcul de la translation



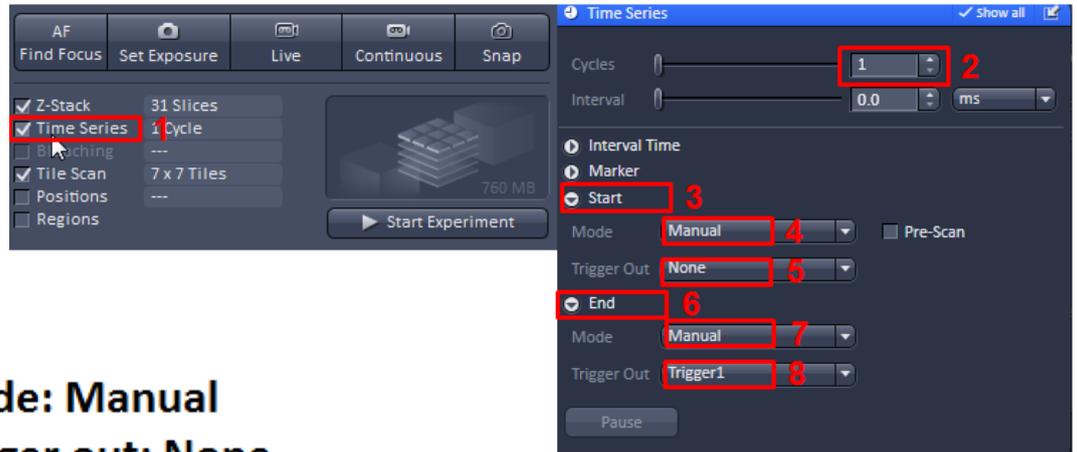


Instruction	I_PHIV_MIC_0008 D 10/07/2020
Utilisation de l'automate Zeiss 880	

- en automatique via Register Virtual Stack plugin de Fiji pour les Hyperstack le réalignement se fait avec un premier passage pour aligner une série de référence et ensuite cette transformation est appliquée à toutes les séries



Réglages des triggers communication avec l'automate Pour le premier bloc d'acquisition



- Start mode

Mode: Manual
Trigger out: None

- End

Mode: Manual
Trigger Out: Trigger1

Réglages des triggers communication avec l'automate Pour le deuxième bloc d'acquisition et les suivants

- Start mode

Mode: Trigger
Trigger in: Trigger1
Trigger out: None

- End

Mode: Manual
Trigger Out: Trigger1

