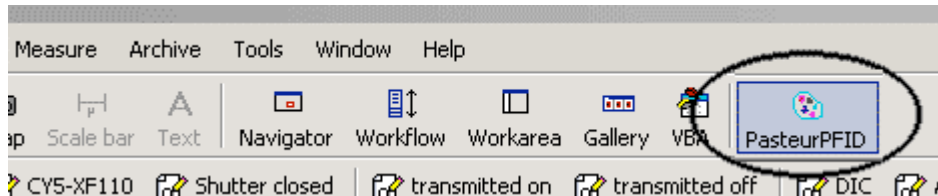


# Utilisation d'Axiovision avec Apotome avec ou sans Apotome sur le microscope droit

Ouverture du logiciel: Si nécessaire ouvrir la barre d'outils spécifique PasteurPFID



Attention ce microscope comporte deux caméras pilotées par le même logiciel Axiovision:

- \_ 1 caméra Axiocam MRm (noir et blanc) pour les acquisitions en fluorescence et transmission avec ou sans apotome.
- \_ 1 caméra Axiocam HRc (couleur) pour les acquisitions à partir d'échantillons d'histologie ou d'immuno histochimie.

## Onglet Microscope :

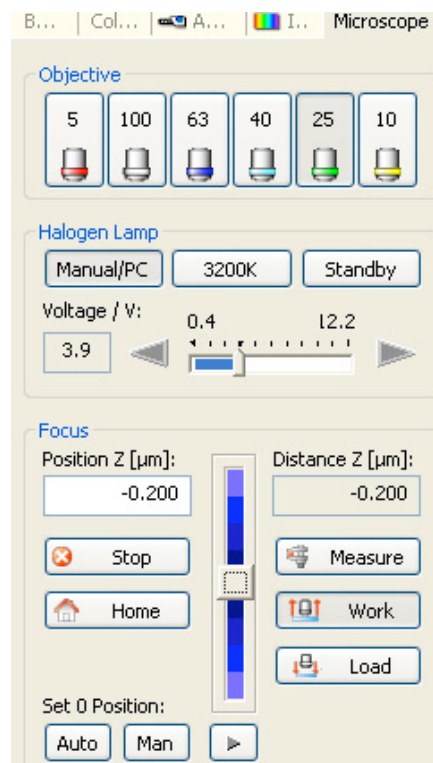
### Objective:

Possibilité de changer les objectifs.

Transmitted Light Lamp:= lumière transmise.  
Cliquer Manual/PC =>allumage de la lampe ;il est possible d'ajuster le voltage avec les flèches.  
Pour éteindre recliquer sur Manual/PC.

### Focus:

Permet de vérifier la communication entre le microscope et Axiovision.



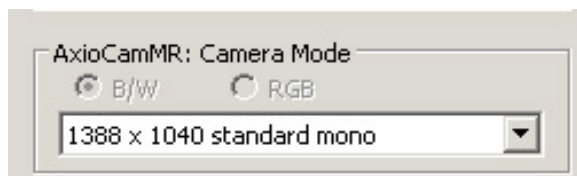
## Onglet BW-Camera:



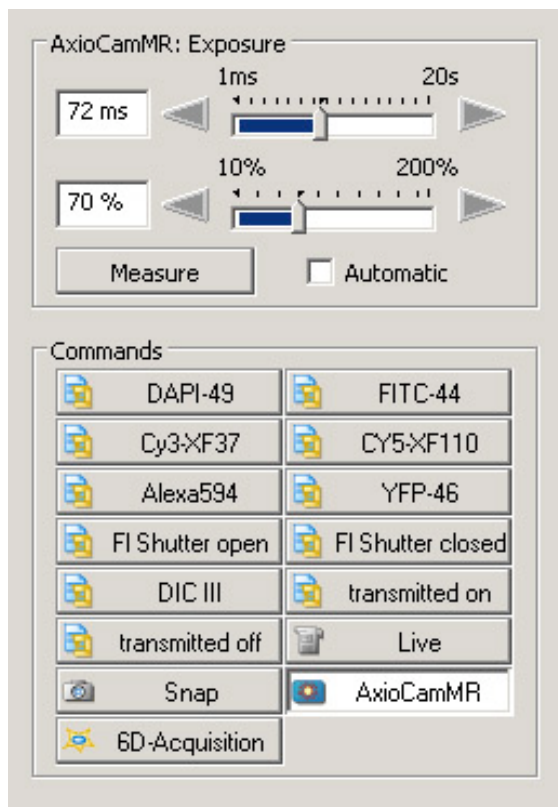
Nécessaire pour travailler en Champ Large à Epifluorescence (Wide field) ou avec l'Apotome.

\_ Sélectionner la camera AxioCam en cliquant sur l'icône correspondante, tout en en bas de cet onglet.

\_ Sélection de la taille de numérisation maximale (1388\*1040 standard mono), sauf cas particulier.



\_ **6D-Acquisition** permet d'avoir accès au menu multidimensionnel acquisition.



### Exposure: Measure

En cliquant sur ce bouton, la caméra propose un temps d'exposition automatique ou manuel.

Le pourcentage sélectionné à situer entre 50% et 70% correspond au pourcentage de saturation du capteur utilisé pour le calcul du temps d'exposition.

*Ne sélectionnez pas le mode automatique, préférez le mode manuel préférable pour la préservation de la fluorescence.*

### Commands:

- Commandes des différents réflecteurs de fluo, de l'obturateur fluo (FI-Shutter Off).
- Commandes de la lampe halogène avec diverses positions du condenseur (pour phase ou contraste interférentiel) et l'obturateur de lumière transmise On/Off.
- *Live* sert à recadrer ou refocaliser, à définir un temps d'exposition..
- *Snap* permet de prendre une image fluo ou en lumière transmise en niveau de gris avec le temps d'exposition prédéfini.

### Frame:

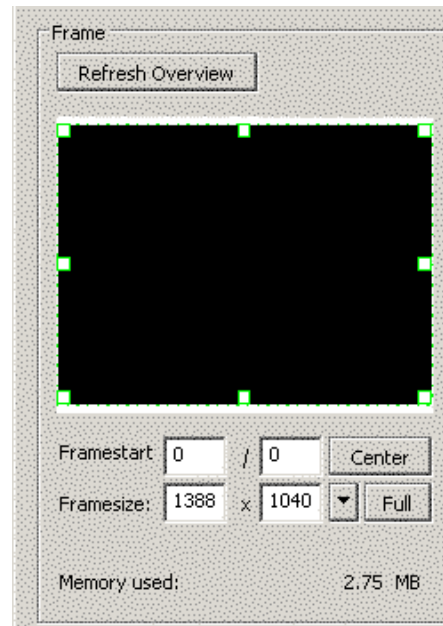
Permet de sélectionner une région d'intérêt pour limiter le champ à acquérir.  
Pour cela, ouvrir une image *Live* avec le réflecteur fluo le plus utile ou la lumière transmise.

Sélectionner un temps d'exposition.

Cliquer **Refresh Overview** => apparition de l'image "Live" dans le cadre noir.

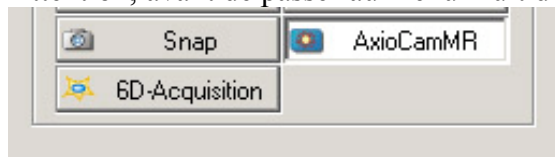
Fermer l'obturateur.

Sélectionner une partie d'écran à numériser avec les poignées dans la fenêtre Frame.  
Pour revenir à la taille maximale cliquer sur **Full** ou **Last**.



### 6D Acquisition => Menu d'acquisitions multidimensionnelles :

Attention, avant de passer au menu multidimensionnel acquisition, refermez l'image *Live*.



### Onglet Experiment :

Permet de charger une configuration déjà sauvegardée pour travailler en multi fluorescence +/- contraste interférentiel ou contraste de phase.

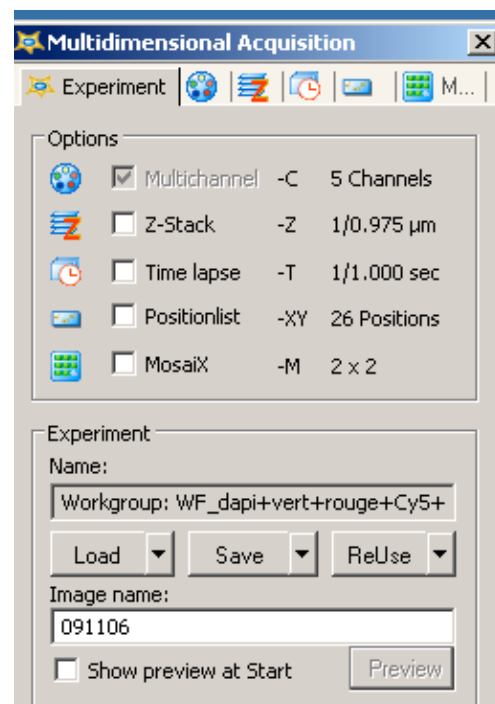
**Load**

Sélectionner une configuration dans Workgroup (non modifiable à la fermeture) ou User.

**ReUse**

Permet d'importer une configuration à partir d'un fichier Zvi précédent.

Show preview at start est utile pour les "timelapses".



### Onglet Multi-canaux:

- Pour désactiver, momentanément, un canal cliquer avec le clic droit de la souris dans l'onglet de couleur en haut de la page concernée. Il sera possible éventuellement, d'un clic, de le réactiver sans être obligé de recharger la configuration.

- Changez le *Dye*, en utilisant la liste, seulement si vous voulez ensuite utiliser le module de Déconvolution d'Axiomvision.

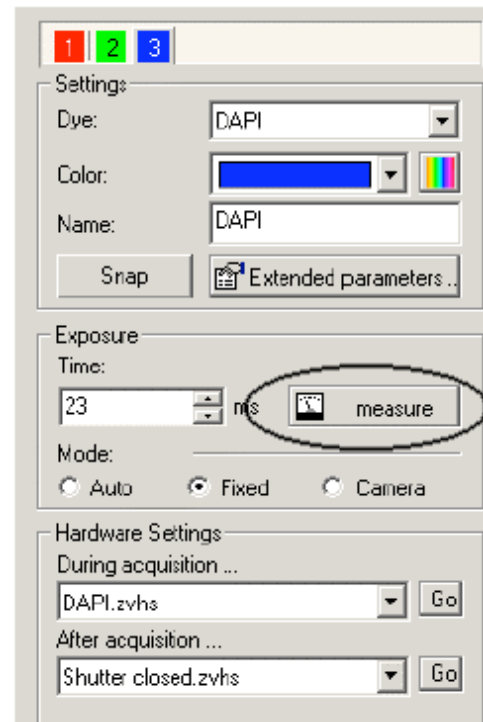
- Vous pouvez changer *Name* avant acquisition pour chaque canal.

- Vous pouvez également modifier la couleur *Color* avant acquisition.

- Pour chaque canal, **Measure** permet d'ouvrir une fenêtre de mesure de temps d'exposition, spécifique.

Si le temps affiché est convenable cliquer "OK" en bas de la fenêtre Live pour l'appliquer. (la sursaturation sur une zone de l'image en mode apotome donne en tranche optique une zone illisible juste à l'endroit de la saturation).

La fonction **Snap** permet, après une acquisition multi canaux, de changer les paramètres de temps d'exposition sur un canal et d'acquérir un nouveau plan ou stack sans refaire toute la série.



### Fenêtre Live (sous-menu Measure):

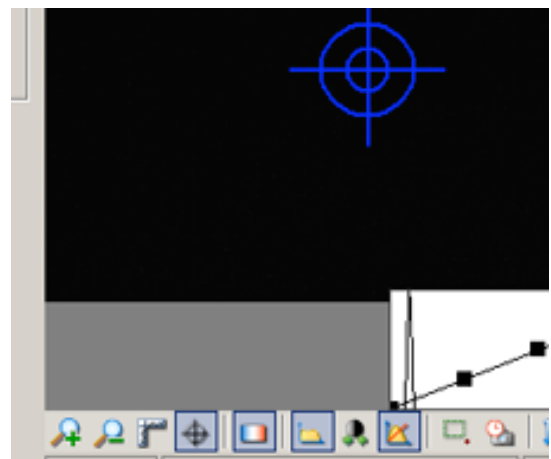
Pour un calcul de temps d'exposition plus efficace activez les icônes suivantes en bas de la fenêtre Live:

- Le drapeau français permet de visualiser en rouge la sursaturation en cas de temps d'exposition trop élevé.

- Le premier histogramme permet d'afficher directement la courbe des pixels de l'image Live.

- L'histogramme barré d'une diagonale rouge permet d'afficher linéairement le signal détecté

- L'icône ROI rectangle vert permet de sélectionner une région d'intérêt pour une mesure de temps d'exposition mieux adapté.



## Onglet Z stack:

Utiliser la fonction Start/Stop en règle générale (Center seulement pour certains échantillons).

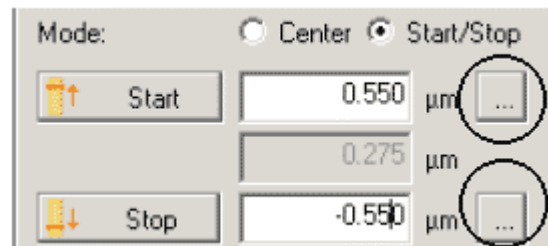
- Choisir une fluo dans la fenêtre C (multi canaux) en cliquant sur le canal correspondant .

- Cliquer sur le petit bouton à droite de Start => apparition d'une fenêtre Live.

Les boutons de focus du microscope permettent de sélectionner le premier plan puis cliquer sur OK dans la fenêtre Live cela définit la position "Start".

- Cliquer sur le bouton du bas et de même définir la position "Stop".

- Ajuster le nombre de plans à acquérir en cliquant *Optimal-Distance* puis réajuster le nombre de plans en fonction de votre expérience.



- Pour une acquisition plus rapide n'utiliser pas la fonction **All channel per Slice** sauf si les échantillons risquent de bouger légèrement entre deux plans.

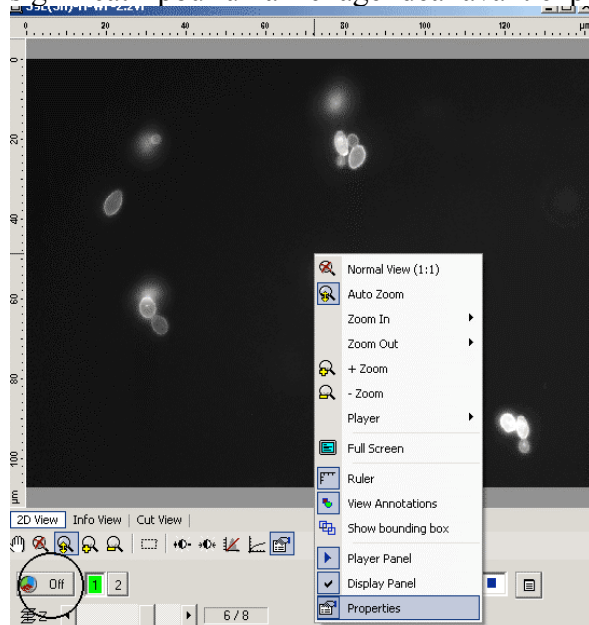
## Acquisition:

Quand tous les paramètres sont sélectionnés cliquer **Start** en bas de la fenêtre pour lancer l'acquisition.

Les images acquises en niveau de gris apparaissent, dans un premier temps, superposées en couleur en reprenant le code des différents canaux activés dans la fenêtre ci-dessus, mais elles doivent être améliorées à l'affichage avant l'exportation.

**Sauvegarde** d'abord en format Zvi Zeiss dans votre Silo ou dans l'espace Silo2\_PFIID\_unité, puis exportation plus tard, en format Tiff, Jpeg....

Améliorez vos images après acquisition en sélectionnant le plan le plus lumineux ou le plus significatif pour un affichage idéal avant exportation.



Dans l'image acquise, le clic droit de la souris permet de sélectionner un menu contextuel (*Properties*); cela permet de visualiser les pixels de l'image et d'en modifier l'affichage.

- Se mettre en niveau de gris en mettant l'onglet couleur de l'image sur **OFF**..
- Pour chaque canal cliquer sur Min-Max dans la fenêtre de propriétés cela suffit en général en Epifluorescence normale pour optimiser l'image..

### Display Properties :

L'affichage en mode *Log* donne une courbe plus lisible.

Quand le diagramme est trop resserré sur le côté gauche vers 0 il est possible de restreindre l'affichage à 0\_1023 ou même à 0\_255 (clic dans la boîte pour accéder aux autres possibilités).

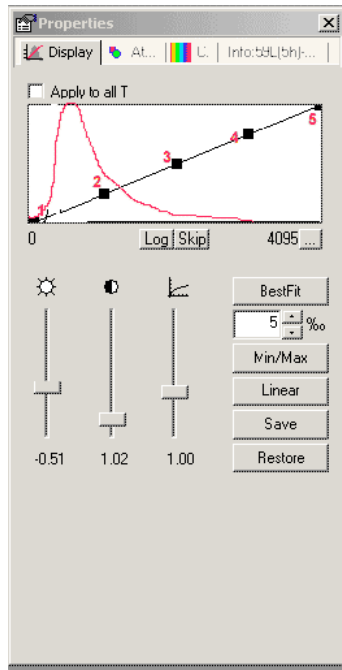
**Min/Max** affiche les pixels depuis le plus faible du diagramme jusqu'au plus fort.

Le curseur 1 agit sur la zone la plus noire de l'image, il se positionne sur le Minimum..

Le curseur 5 se positionne sur le Maximum, il agit sur les pixels les plus lumineux, activé vers la gauche => pixels plus lumineux accentués, vers la droite, action inverse.

Les 2 et 4 jouent sur la courbe Gamma., en tirant légèrement ce curseur

vers le bas on peut augmenter l'affichage de la fluorescence faible.



*Comparaison de deux images acquises avec le même temps d'exposition:*

Afficher correctement la première image pour le canal à comparer.

**Save** Save permet d'enregistrer des valeurs de luminosité, brillance et gamma pour la fluorescence concernée sur une image.

d'appliquer ensuite les mêmes valeurs au moyen de **Restore** dans une autre image prise avec le même temps d'exposition.

### Utilisation de l'Apotome :

- Pousser le bras d'Apotome dans le trajet de la fluorescence sur le côté du microscope.
- => Au moment de l'acquisition, numérisation de 3 images, l'algorithme est appliqué directement et le résultat visualisé sur l'écran est une tranche optique.
- Les fonctions basiques sont les mêmes que pour le Wide field, mais vous ne pouvez pas acquérir des images sursaturées donc mesurez précautionneusement le temps d'exposition.

*Pendant les réglages du temps d'exposition pour chaque canal afficher la page spécifique Apotome dans la barre d'outils PasteurPFID ; il est ainsi possible de vérifier que tous les paramètres d'acquisition Apotome sont correctement sélectionnés. (Voir plus loin l'onglet Apotome).*



## Onglet Apotome:

### Apotome Live Mode:

la grille doit être visible pour éviter un rafraîchissement trop lent de l'image.

### Apotome Acquisition Mode:

Optical Sectioning : actif.

### Apotome Filter:

Off par défaut.

**Weak** peut donner un meilleur résultat sur certains échantillons, laissant apparaître des petites lignes résiduelles en mode apotome.

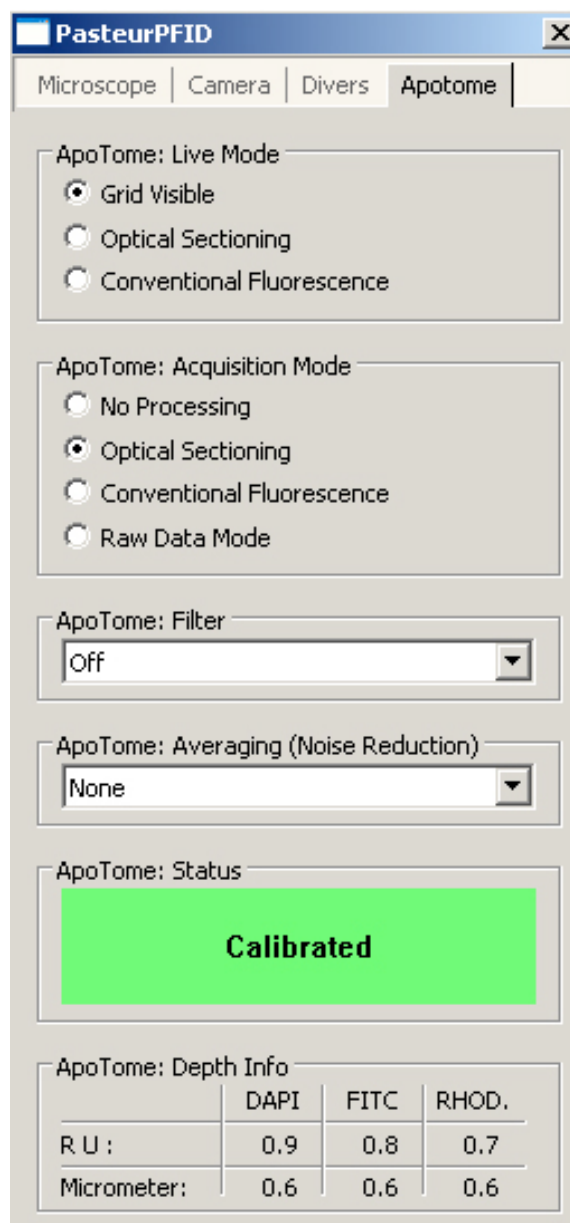
### Apotome Averaging (Noise Reduction):

multiplie le temps d'acquisition d'une tranche optique par le facteur sélectionné ; cette fonction est plutôt réservée aux préparations très fluorescentes car le temps d'exposition d'une tranche optique est multiplié par le facteur sélectionné.

**Apotome Status:** En cas d'apparition d'une non calibration de grille rectangle rouge il est nécessaire de recalibrer la grille car l'algorithme ne fonctionnerait pas (contacter l'équipe du PFID).

### Apotome Depth Info:

en fonction de l'objectif et de la grille valeur donnée pour une tranche optique, cette valeur n'est pas modifiable et est donnée à titre indicatif



**Apotome Grid :** La grande grille High (PH) est impérativement utilisée quelque soit l'objectif même si le logiciel recommande de la changer pour une petite (PL ou Low).