



LABORATOIRE D'IMAGERIE OPTIQUE ET MOLÉCULAIRE

**Guide d'utilisation du Light-Sheet
(version non-définitive)**

En date du 10 mai 2020

Pierre GIRARD-COLLINS

Directeur du projet : Frédéric LESAGE
Superviseur : Paul-James MARCHAND

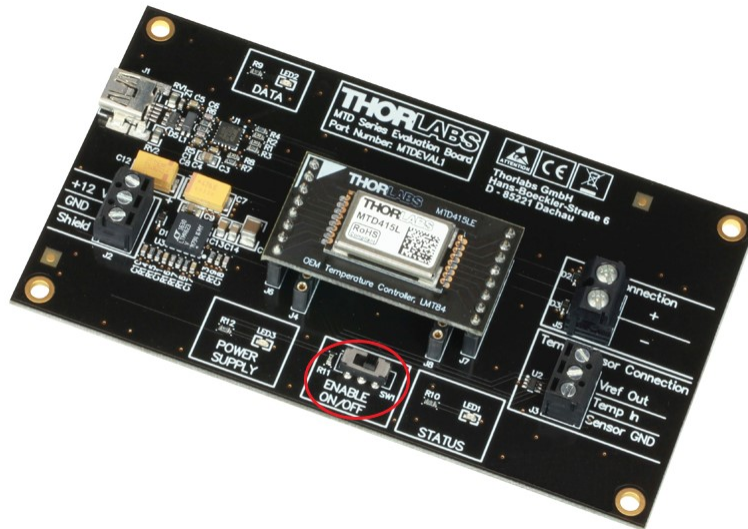
Polytechnique Montréal

Table des matières

1	Mise en marche du système	1
2	Mise en marche du logiciel	2
3	Survol de l'interface graphique	4
3.1	Onglet <i>Motion</i>	4
3.2	Onglet <i>ETL And Galvos Parameters</i>	5
3.3	Onglet <i>Lasers Parameters</i>	6
3.4	Panneau inférieur	6
4	Annexe : Description des signaux des ETLs et des galvos	8

1 Mise en marche du système

1. Allumer l'interrupteur de la barre d'alimentation. Du bruit devrait se faire entendre, ce sont les ETLs.
2. Allumer l'interrupteur sur la carte de chaque laser, une lumière verte devrait apparaître.

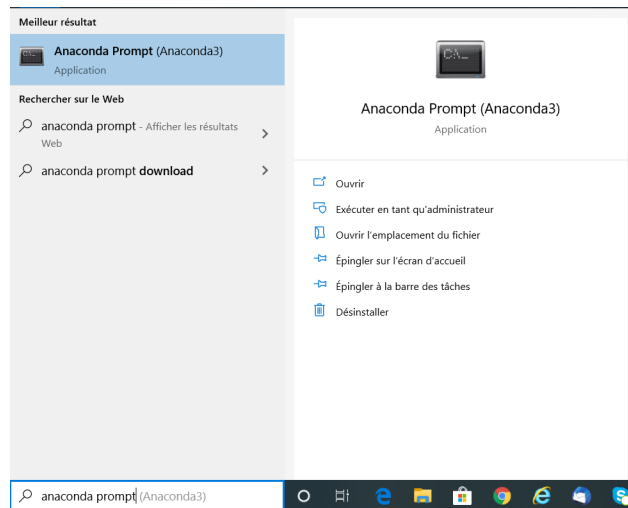


3. Allumer l'interrupteur derrière la carte d'acquisition USB (celle qui se trouve en arrière de la caméra) reliant les lasers. **Attention, en l'allumant, une petite décharge laser sortira des fibres dans le système optique.**
4. Allumer l'interrupteur de la caméra.

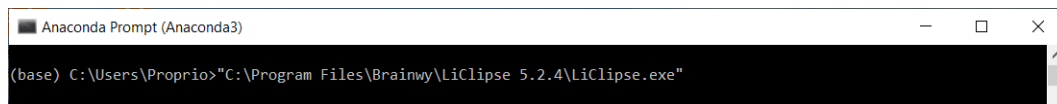


2 Mise en marche du logiciel

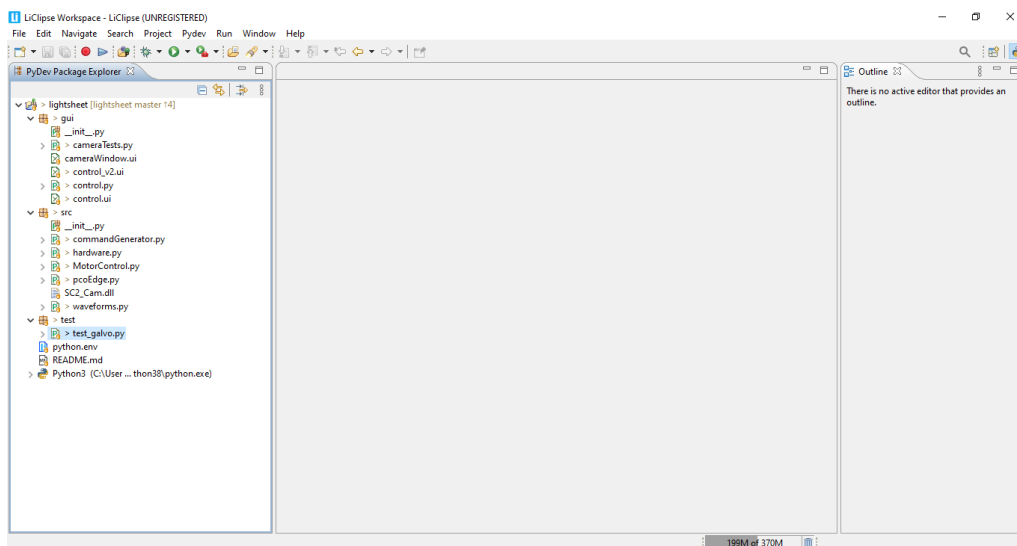
1. Se connecter à l'utilisateur *liomlight* avec le mot de passe : *lightsheet*.
2. Ouvrir *Anaconda Prompt* via la barre de recherche Windows.



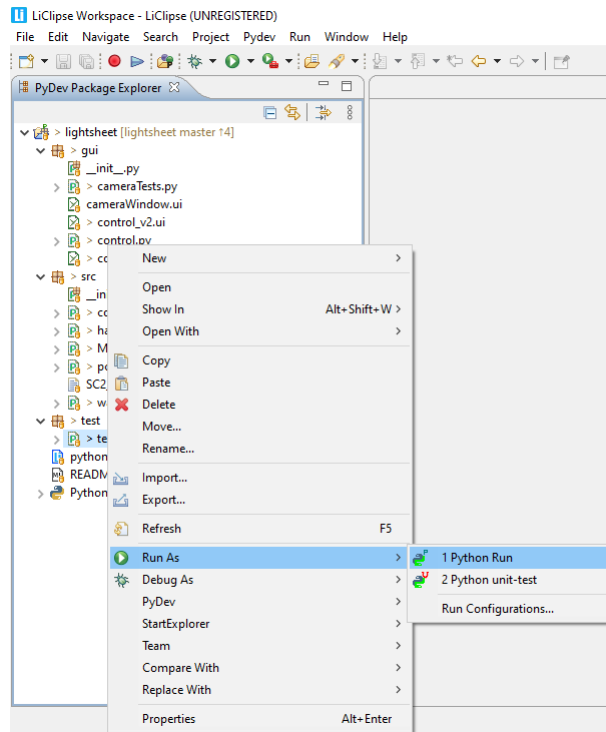
3. Entrer la commande : "C :\Program Files\Brainwy\LiClipse 5.2.4\LiClipse.exe"



L'environnement de travail du programme apparaît. Dans la fenêtre de gauche on voit l'arborescence des fichiers du projet. En cliquant sur un fichier, son contenu s'affiche dans la fenêtre centrale où on peut modifier son code.



4. Faire un click droit sur le fichier `test_galvo.py`, sélectionner *Run as*, puis *1 Python Run*.

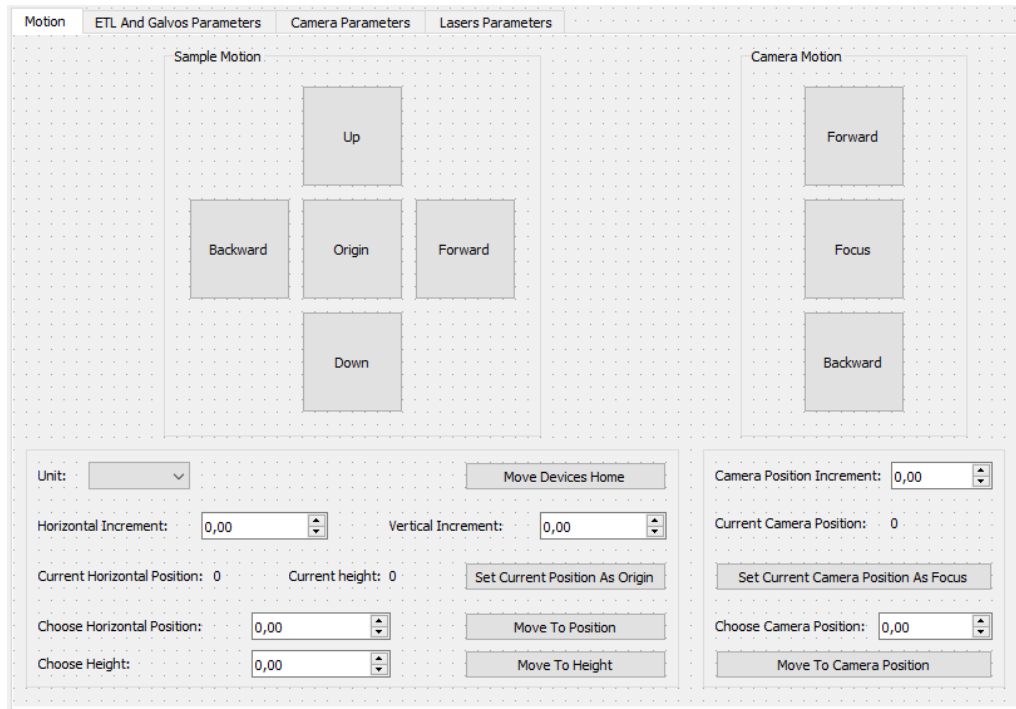


3 Survol de l'interface graphique

Après avoir suivi les étapes précédentes, l'interface utilisateur du programme est supposé s'afficher. La première fenêtre permet d'afficher les images de la caméra, on peut la déplacer pour voir la seconde qui présente les fonctionnalités du logiciel. L'interface n'est pas définitif, on y décrira les fonctionnalités d'intérêt à l'étape où est rendu le développement du projet.

3.1 Onglet *Motion*

En arrivant sur la seconde fenêtre, on voit deux panneaux. Le panneau supérieur comporte plusieurs onglets. Le premier onglet, *Motion*, traite des mouvements physiques du système.



À gauche on retrouve les boutons et paramètres pour faire bouger l'échantillon, le tableau 1 en fait le résumé.

Bouton, paramètre	Description
Up, Down	Déplacement vertical selon l'incrément spécifié
Forward, Backward	Déplacement horizontal selon l'incrément spécifié
Origin	Déplace l'échantillon à la position d'origine
Unit	Sélectionne l'unité de distance désirée pour les déplacements
Horizontal/Vertical Increment	Spécifie l'incrément des boutons <i>Forward</i> , <i>Backward</i> , <i>Up</i> et <i>Down</i>
Current Horizontal Position/Height	Affiche les positions horizontale et verticale actuelles de l'échantillon
Set Current Position As Origin	Enregistre la position actuelle en tant que position d'origine
Choose Horizontal Position/Height	Spécifie les positions horizontale et verticale exactes à atteindre
Move To Position/Height	Déplace l'échantillon aux positions spécifiées

Tableau 1 – Résumé des fonctionnalités pour les mouvements de l'échantillon

Le bouton *Move Devices Home* n'a pas d'intérêt et sera retiré ultérieurement. À droite, on a les fonctionnalités pour les mouvements de la caméra qui sont les mêmes que pour ceux de l'échantillon, la caméra se déplaçant uniquement horizontalement et *Focus* étant analogue à *Origin*.

Dans la version la plus récente (pas illustrée ici), un panneau supplémentaire positionné à côté de *Sample Motion* permet de définir des limites horizontales au mouvement de l'échantillon pour ne pas qu'il se cogne sur la cuvette en verre lors des déplacements avec les autres commandes.

3.2 Onglet *ETL And Galvos Parameters*

Le second onglet permet d'ajuster les paramètres des signaux des ETLs (Electrical Tunable Lens) et des galvos (galvanomètres). Ce sont les paramètres qui permettent de modifier les signaux électriques qu'on leur envoie.

Cet onglet est un peu désuet, il comporte beaucoup de paramètres qui n'existent plus pour générer les signaux dans la version finale du microscope. Le panneau *Optimized parameters* disparaîtra complètement. Seules les commandes spécifiées dans le tableau 2 seront conservées¹. En général, l'utilisateur ne devrait pas avoir à modifier ces paramètres dans la version finale du système, mais ils peuvent être utiles pour calibrer les signaux si on décide d'utiliser une autre longueur d'onde.

Bouton, paramètre	Description
ETL Step	Spécifie le pas du point focal des ETLs
Amplitude	Spécifie l'amplitude du signal
Offset	Décale tout le signal par la valeur sélectionnée
Sample Rate	Spécifie la fréquence d'échantillonnage des signaux
Default Parameters	Restaure les valeurs par défaut du système

Tableau 2 – Résumé des paramètres importants de l'onglet des ETLs et des Galvos

Le paramètre *ETL Step* correspond à l'incrément des points focaux des ETLs. Il constitue le nombre de colonnes de pixel de la caméra dont les points focaux vont se déplacer. Les paramètres *Amplitude* font varier la surface balayée dans l'échantillon. En augmentant l'amplitude des galvos, on balaie une plus grande hauteur, et en augmentant l'amplitude des ETLs, on balaie sur une plus grande largeur. Les paramètres

1. Il est conseillé de lire en premier l'annexe sur la description des signaux des ETLs et des galvos pour mieux comprendre l'utilité de ces paramètres

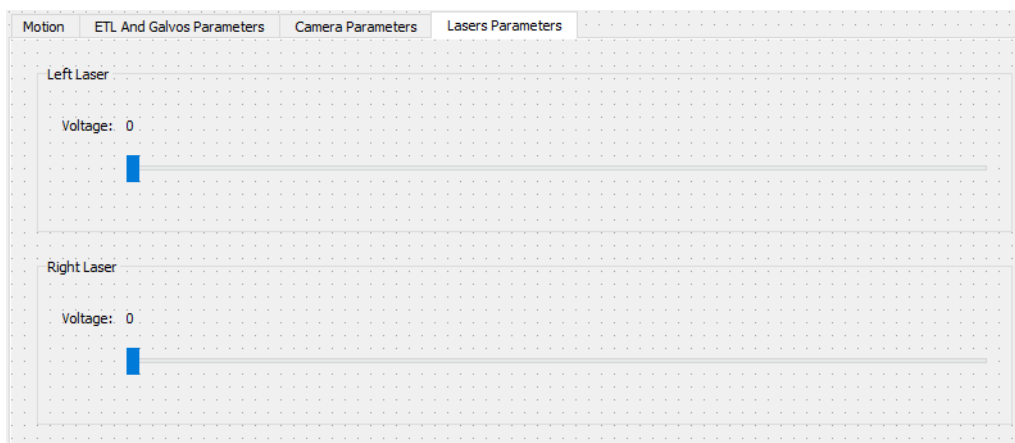
Offset permettent de définir la position où les signaux vont commencer leur balayage (en hauteur pour les galvos et sur la largeur pour les ETLs). Ces paramètres sont spécifiés en terme de voltage.

Attention, il est important pour les ETLs que $Amplitude + offset \leq 5V$, le voltage permis étant de 0V à 5V pour ne pas endommager l'instrument. Pour les moteurs, les limites sont de $-10V \leq Amplitude + offset \leq 10V$ qui sont largement supérieures à ce qui est nécessaire pour balayer l'échantillon. Ces contraintes seront traitées automatiquement par le logiciel dans la version finale pour ne pas que l'utilisateur ait à s'en soucier.

3.3 Onglet *Lasers Parameters*

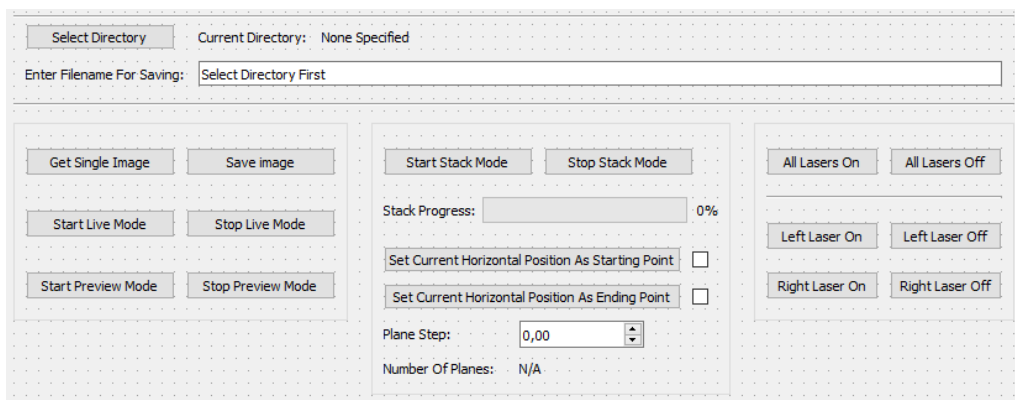
Le troisième onglet, *Camera Parameters*, sera supprimé. La façon dont la caméra acquiert les images dans la version finale fait en sorte que l'utilisateur n'aura pas à y spécifier de paramètres.

Lasers Parameters est le dernier onglet du panneau supérieur. Les curseurs font varier la tension appliquée à chaque laser jusqu'à la limite permise pour modifier leur puissance en sortie.



3.4 Panneau inférieur

Le panneau inférieur concerne les modes d'acquisition d'images du logiciel. Il y en a quatre : *Single Image*, *Live Mode*, *Preview Mode* et *Stack Mode*.



Commençons par *Preview Mode*. Ici, l'utilisateur contrôle manuellement la position des points focaux en hauteur (galvos) et en largeur (ETLs) des lasers. Pour varier ces positions, l'utilisateur doit faire varier les paramètres *Amplitude* dans l'onglet *ETL And Galvos Parameters* du panneau supérieur. Il peut aussi bouger la position de l'échantillon et de la caméra pour imager à différents plans avec les commandes de l'onglet *Motion*.

Ensuite, *Live Mode* permet de visualiser les images qu'on obtient avec les rampes qu'on envoie au système. Il permet de modifier les paramètres des signaux et de voir leur résultat avant de procéder à l'enregistrement des images avec les deux prochains modes. Les paramètres ajustables sont *Amplitude* et *Offset* dans l'onglet *ETL And Galvos Parameters*. Attention de remettre *Amplitude* à la valeur souhaitée si on a utilisé le *Preview Mode* avant. On peut encore bouger l'échantillon et la caméra avec l'onglet *Motion*.

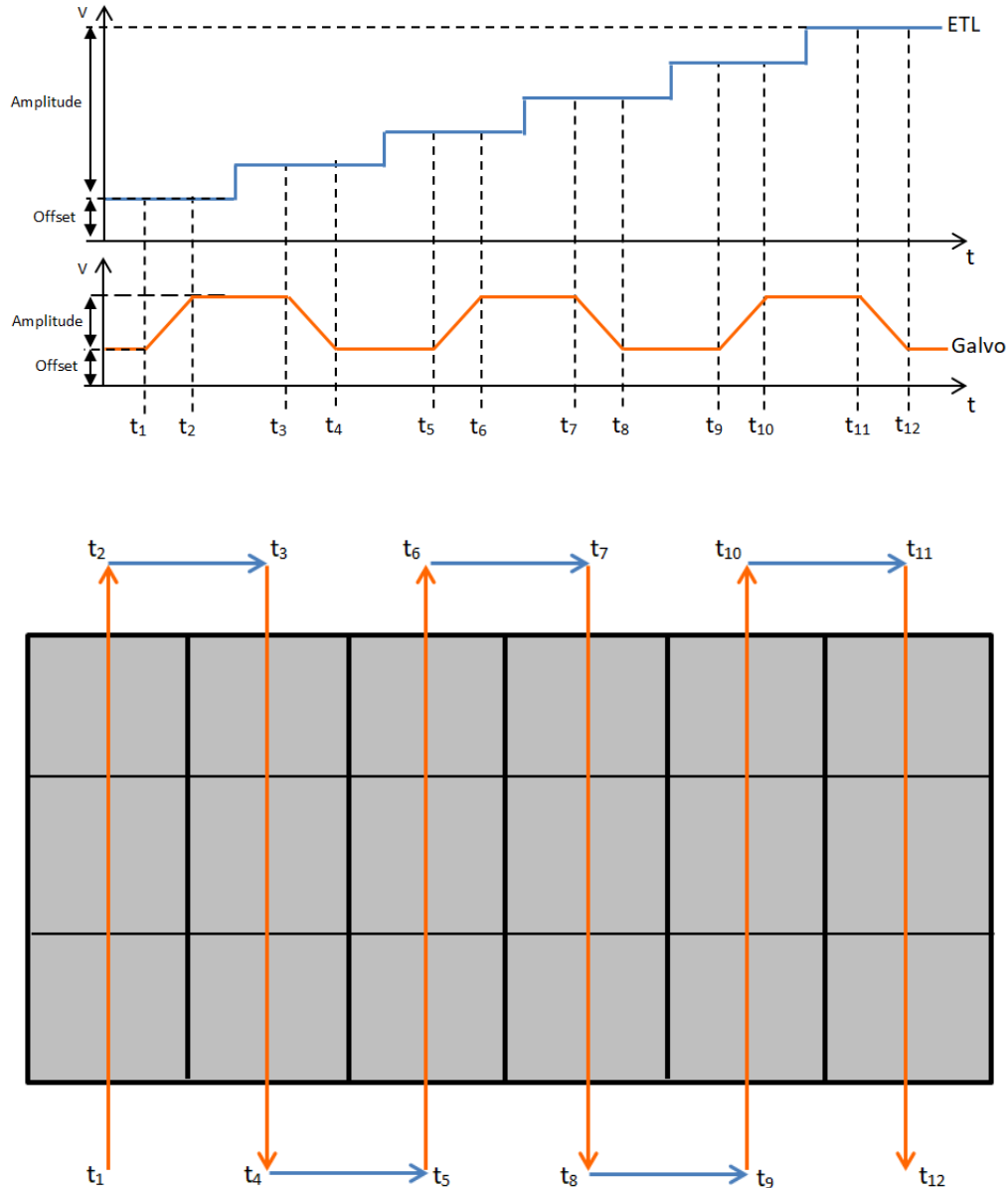
Single Image permet d'enregistrer une image d'un seul plan de l'échantillon. On obtient l'image avec *Get Single Image*, et si elle est satisfaisante, on peut la sauvegarder avec *Save Image*. Pour la sauvegarde, le logiciel va demander d'entrer le répertoire où placer l'image avec *Select Directory* et d'inscrire le nom du fichier à la ligne *Enter Filename For Saving*.

Finalement, *Stack Mode* permet la sauvegarde de volumes 3D. En premier temps, l'utilisateur doit définir les limites du volume. IL doit déplacer l'échantillon horizontalement aux bornes du volume désiré et appuyer sur *Set Current Horizontal Position As Starting Point* ou *Set Current Horizontal Position As Ending Point* à chaque frontière pour définir la position actuelle comme une limite. Le carré à côté du bouton sera coché lorsque la position sera reconnue par le logiciel. *Plane Step* définit la distance en microns entre chaque plan imagé, après quoi *Number Of Planes* indique le nombre de plans qui seront acquis durant le *Stack Mode*. Il faut également spécifier l'emplacement de la sauvegarde et le nom du fichier. À noter qu'il ne sera pas possible de modifier les paramètres des signaux une fois le *Stack Mode* enclenché.

La dernière section permet de sélectionner quels lasers seront allumés. Il est important de les allumer si on veut voir des images, surtout pour l'acquisition en *Stack Mode* qui est onéreux en temps. En général, on choisira *All Lasers On*. Les options *Left Laser On* et *Right Laser On* sont surtout utiles pour allumer un laser à la fois lors de la calibration des signaux, ou alternativement pour visualiser l'effet d'un seul laser à la fois.

4 Annexe : Description des signaux des ETLs et des galvos

Le Light-Sheet fait de la microscopie de fluorescence. Pour avoir le plus grand signal de fluorescence, il faut concentrer l'énergie du laser en un point qui correspond au point focal. À cet effet, pour acquérir une image, il faut balayer le point focal sur l'ensemble du plan. On visualise ci-dessous le mécanisme pour y arriver. En haut, les signaux, appelés rampes, des ETLs et des Galvos sont schématisés avec les paramètres *Amplitude* et *Offset* indiqués. En bas, on illustre le parcours du point focal tel que capté par la caméra. Pour simplifier, on considère une caméra de 6 colonnes comportant 3 pixels chacune avec un *ETL Step* de 1, soit un incrément du point focal d'une colonne à la fois.



Le principe est le suivant : les galvos balaient le point focal en hauteur (flèches orangées), puis les ETLs déplacent le point focal (flèches bleues) pour faire un autre balayage des galvos en sens inverse, et ainsi de suite. Les galvos permettent de sonder la hauteur rapidement, alors que les ETLs le font pour la largeur plus lentement. Notons que la caméra récolte les photons de fluorescence uniquement lors des balayages des galvos et s'éteint lors des flèches bleues. Aussi, *ETL Step* est déterminé par la grosseur du point focal qui

s'étend généralement sur plusieurs colonnes.

On remarque deux particularités : il y a une pause entre deux balayages consécutifs des galvos pour le changement de la focale et ce changement s'effectue en dehors du plan capté par la caméra.

Le premier s'explique par le phénomène de Gibbs. Lorsqu'un signal présente une discontinuité, comme ici avec la rampe en forme d'escalier des ETLs, des fluctuations du signal apparaissent autour. La pause permet alors de stabiliser le signal des ETLs pour que la focale n'oscille pas lors du prochain balayage.

La seconde sert à ne pas contaminer l'acquisition de la caméra. Si le changement de focale se faisait dans le plan de la caméra, le signal de fluorescence généré pourrait venir contaminer le signal reçu lors du prochain balayage. Cependant, la fluorescence est un phénomène très rapide et il est possible que la contamination associée ne soit pas significative ou même absente. On évitera tout de même cette contribution indésirable en modifiant la focale hors du plan d'imagerie.

En réalité, on aura un laser de chaque côté de l'échantillon pour éviter les effets d'ombrage qui apparaissent si on en utilise juste un. L'effet d'ombrage apparaît lorsqu'une zone dans l'échantillon diminue de façon notable l'intensité transmise. On compense cet effet avec un second laser qui va venir éclairer en sens opposé. Les points focaux des lasers sont alors superposés, ce qui a aussi l'avantage d'augmenter l'intensité du point focal, i.e. le signal de fluorescence.

Comme, ces deux lasers sont de part et d'autre du plan d'imagerie, leurs rampes seront différentes. Une ETL aura une rampe en forme d'escalier ascendant, et l'autre descendant pour confondre leurs points focaux.

Le schéma ci-dessous montre l'allure de l'ensemble des rampes. Les signaux des galvos associés à chaque laser ont la même forme pour que les focales restent superposées lors des balayages verticaux. Les paramètres *Amplitude* et *Offset* peuvent varier d'une rampe à l'autre

