

## MICROSCOPE LIGHSHEET BESSEL 2-PHOTON GUIDE D'UTILISATION

par Ariane Gouin & Arnaud Mercier  
pour DCCLab

### Table des matières

<b>1 Acquisition de données</b>	<b>1</b>
1.1 Préparer le laser . . . . .	1
1.2 Allumer le laser . . . . .	2
1.3 Ajuster le faisceau laser . . . . .	3
1.4 Lancer le logiciel d'acquisition . . . . .	8
1.5 Aligner la caméra par rapport au faisceau laser . . . . .	9
1.6 Saisir les paramètres de scan du faisceau . . . . .	15
1.7 Préparer l'échantillon . . . . .	16
1.8 Installer l'échantillon sur le microscope . . . . .	17
1.9 Saisir les paramètres de scan 3D . . . . .	18
1.10 Lancer l'acquisition de données . . . . .	19
<b>2 Procédure de fermeture du lab</b>	<b>20</b>
<b>3 Traitement et visualisation des données</b>	<b>21</b>
3.1 Stitching . . . . .	21
3.2 Visualisation 3D . . . . .	22
<b>A Protocole - Remplacer l'eau des chillers</b>	<b>24</b>

### 1 Acquisition de données

#### 1.1 Préparer le laser

\* \* \* Si le laser est déjà en Standby, passer tout de suite à la section [1.2](#). \* \* \*

1. À l'arrière du *contrôleur Verdi* (voir figure [1](#), mettre l'interrupteur sur *On*).



Figure 1 – Contrôleur du Verdi

2. Sur chaque refroidisseur (voir figure 2, peser sur le bouton *Run/Standby*. Le message *Standby Mode* devrait être remplacé par la valeur de la température.



Figure 2 – Refroidisseurs : l'un contrôle le Verdi, l'autre le Mira et le RegA

3. Peser sur le bouton *Menu/Select*. À l'aide des boutons *Menu Up* et *Menu Down*, aller dans ??. À l'aide de la roulette, ajuster la puissance à 17 W. vérifier que le 'LBO' est sur 'heating'.
4. Revenir à l'accueil avec le bouton *Menu Exit*. Attendre que la puissance affichée se stabilise à 17 W.

## 1.2 Allumer le laser

1. Sur le *contrôleur du Verdi* (voir figure 1), tourner la clé de *Standby* à *On*.
2. Attendre que le laser se stabilise (environ 2-3 heures).
3. Mettre des lunettes de sécurité : OD4 pour une longueur d'onde de 790 nm.  
Note : Le laser est pulsé et de puissance de plus de 1 W. Il est de classe 4.

4. Vérifier que les deux refroidisseurs (voir figure 2) sont environ à 18-19°C. Si non, remettre à la bonne température à l'aide des boutons *flèches*.
5. Vérifier s'il y a de l'eau sur la table optique. Si oui, nettoyer le dégât d'eau et remplacer l'eau des refroidisseurs comme expliqué à l'Annexe A.
6. Sur le *contrôleur du Verdi* (voir figure 1), appuyer sur le bouton *Shutter Open*.
7. Vérifier que les lumières *AC On*, *Laser Emission* et *Shutter Open* sont allumées.
8. Vérifier que la *puissance* est d'environ 17 W. Attendre que le *courant* soit d'environ 44 A. Si ces conditions ne sont pas atteintes, remettre la clé sur *Standby*, attendre 1 minute et recommencer à partir de l'étape 1.

### 1.3 Ajuster le faisceau laser

1. Si présent, retirer le *beam dump* (voir figure 3) placé à la sortie du RegA.

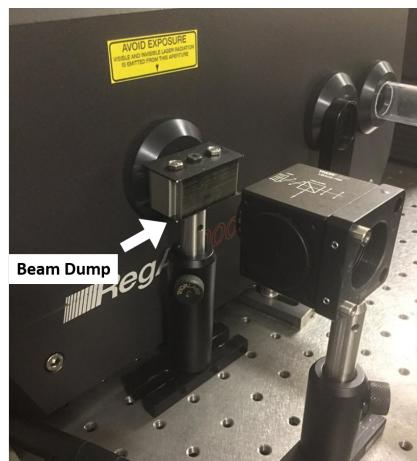


Figure 3 – Beam Dump

2. Tel que montré à la figure 4, placer le *capteur du puissancemètre* après le *diviseur de puissance*.

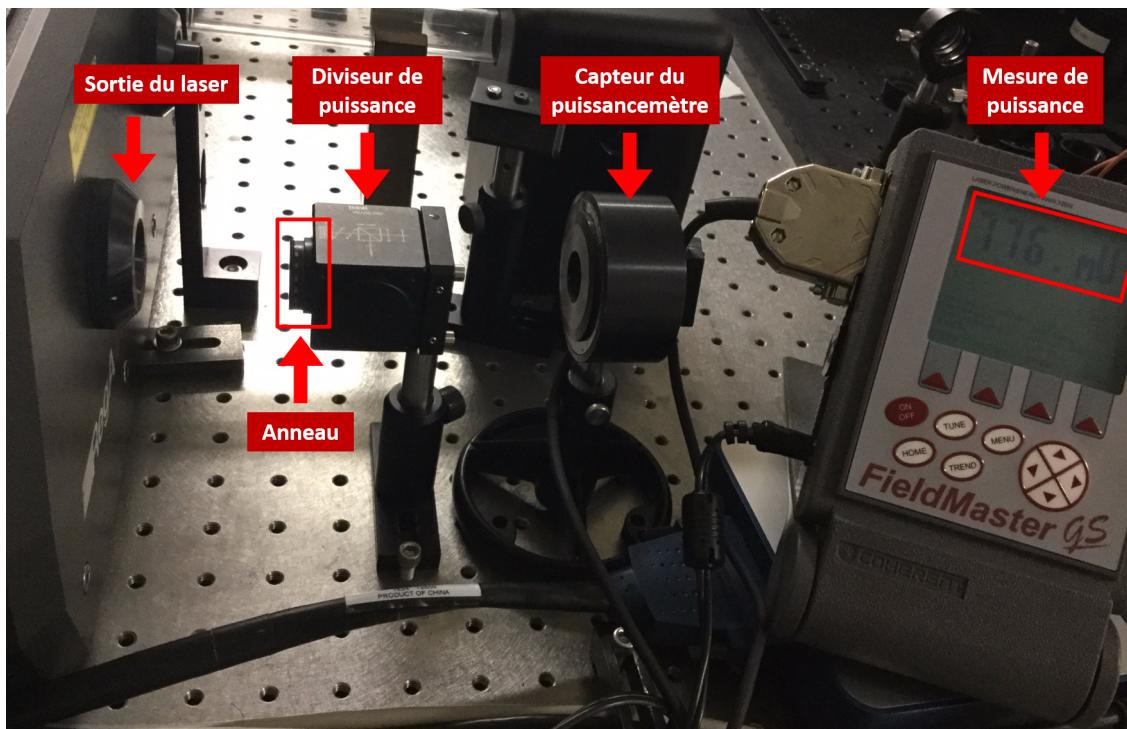


Figure 4 – Mesure de la puissance du laser

3. Tourner l'*anneau* du *diviseur de puissance* afin d'obtenir une puissance d'environ 750-900 W. Attention : Le faisceau laser qui sort du RegA ne doit pas revenir sur lui-même. Par conséquent, le *diviseur de puissance* ne doit pas être parfaitement à 90 degrés de la sortie du RegA mais plutôt légèrement tourné (environ 3 degrés) pour que la réflexion soit dirigée ailleurs. On peut le tourner après avoir desserré la vis située sur son pied.
4. Retirer le *capteur* du trajet optique.

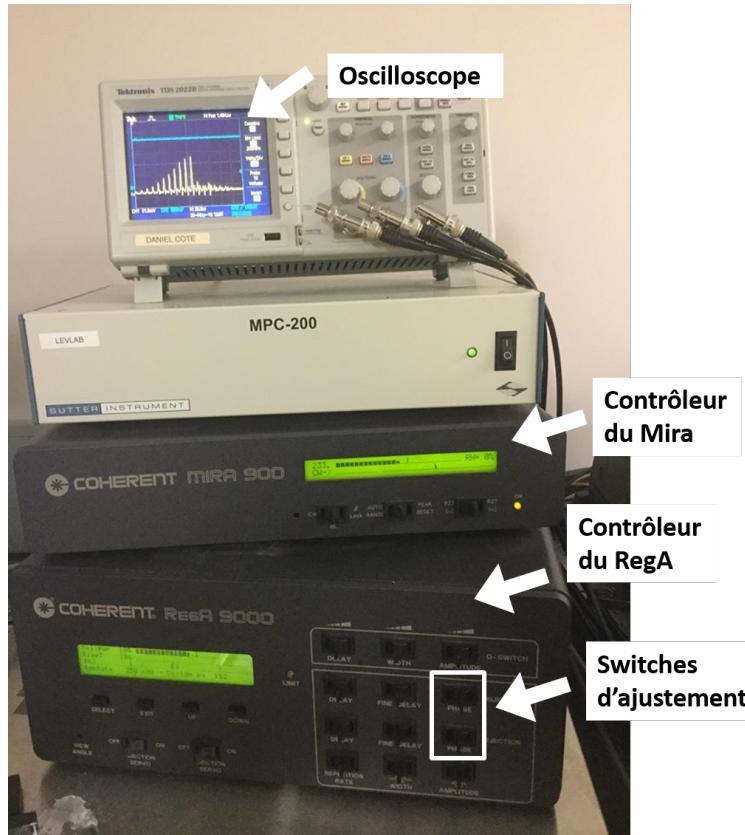


Figure 5 – Contrôleurs

5. Sur le *contrôleur du Mira* (voir figure 5), mettre la bascule de gauche sur *ML*.
6. Sur le *contrôleur du Mira*, vérifier que le taux d'humidité (RH) est entre 0% et 5%. Si non, augmenter le flux d'azote fourni au système, i.e. :

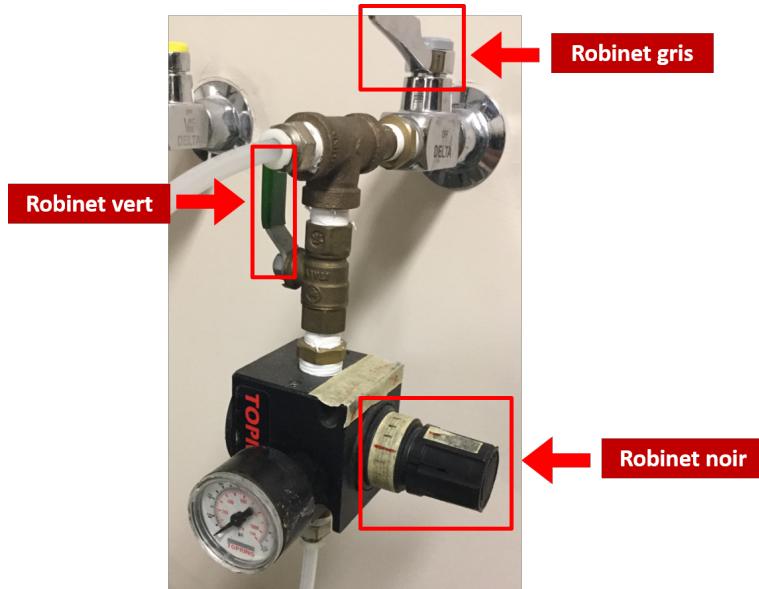


Figure 6 – Alimentation d'azote

- L'alimentation d'azote se trouve sur le mur juste à côté de la porte d'entrée du laboratoire.

- Vérifier que le *robinet gris* et le *robinet vert* sont positionnés comme sur la figure 6.
  - Tourner le *robinet noir*, "suffisamment pour entendre le jet quand on approche son oreille et qu'on prête attention, mais le son ne doit pas non plus être trop fort" <sup>1</sup>.
  - Une fois le pourcentage d'humidité rétabli, remettre le *robinet noir* à sa position initiale.
  - Si le pourcentage d'humidité demeure élevé, il se peut qu'il y ait une fuite dans le système. Demander l'aide d'un ingénieur/physicien ou d'un superviseur.
7. Sur le *contrôleur du RegA*, vérifier que la fréquence des impulsions (Rep. Rate) est d'environ 250-260 kHz.
8. Sur l'*oscilloscope*, vérifier que le signal a une forme semblable à ce qui est montré à la figure 7. Les chiffres ne sont pas importants.

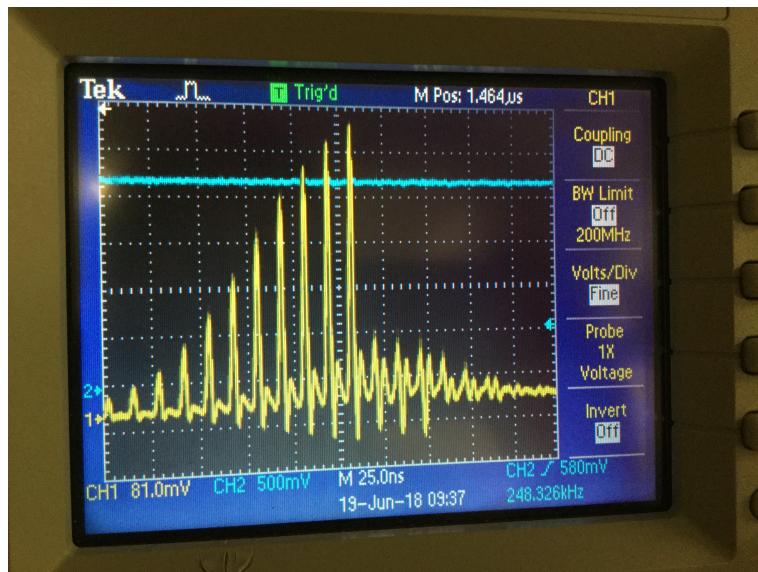


Figure 7 – Signal du laser à l'oscilloscope

- Si non, demander l'aide d'un ingénieur/physicien ou d'un superviseur.
9. Maximiser la stabilité du signal en ajustant les *switches* (voir figure 5). Il ne devrait pas être nécessaire de toucher aux autres boutons des contrôleurs.
  10. A l'aide d'une carte infrarouge, vérifier que le faisceau laser a la forme d'un cercle plein à l'*emplacement A* et d'un anneau à l'*emplacement B* (voir figure 8).

---

1. François Côté, 2018

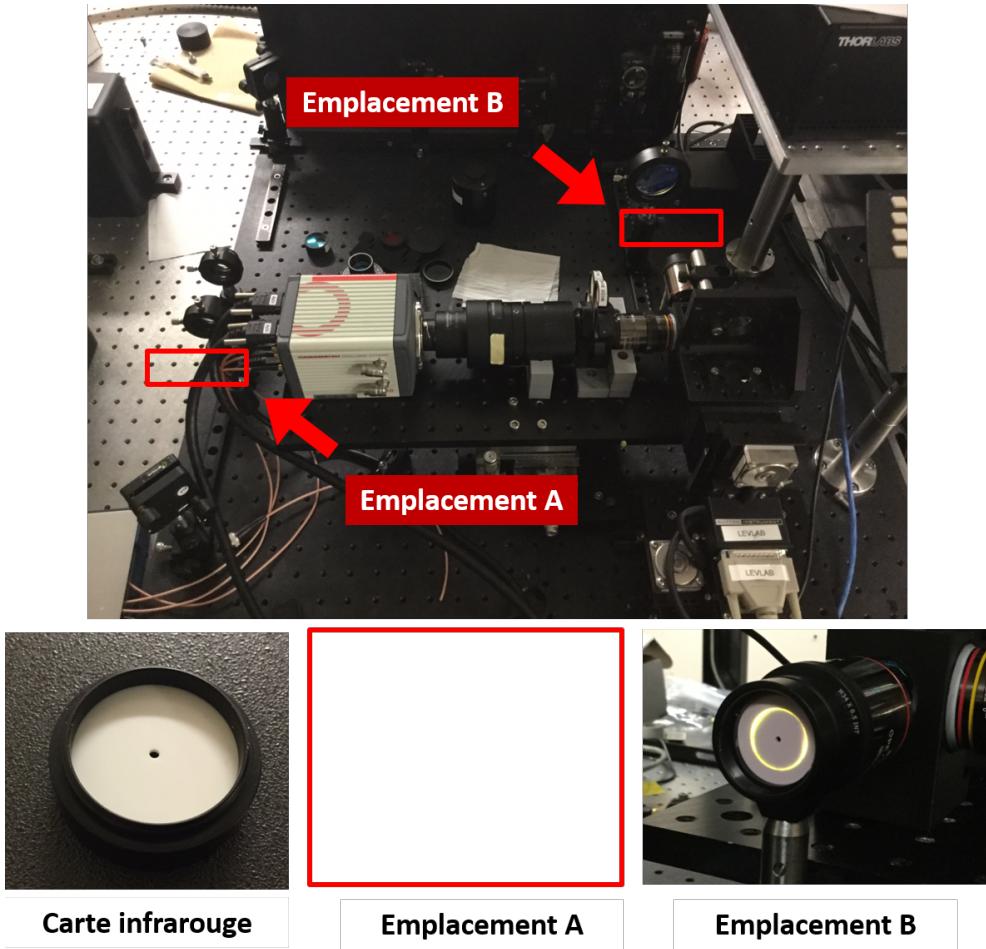


Figure 8 – Carte infrarouge

Si non, il se peut que le trajet optique soit désaligné. Demander l'aide d'un ingénieur/physicien ou d'un superviseur.

- Sur le *contrôleur du Mira*, vérifier que le laser n'a pas de composante continue (CW = continuous wave). Sur la ligne 'Cw->' se trouvent des points '...', un ou plusieurs carrés '' et une seule barre 'I' comme montré à la figure 9.

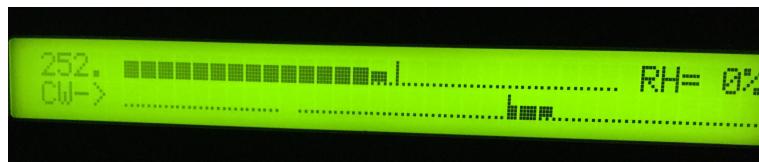


Figure 9 – Composante continue du laser

Ajuster l'alignement afin d'avoir un seul carré à droite de la barre. Pour ce faire, tourner les vis identifiées à la figure 10 : celles du *RegA* d'abord, puis celles du *Mira* si nécessaire.



Figure 10 – Alignement interne du *RegA* et du *Mira*

Le faisceau laser, pompé par le *Verdi*, passe à travers le *Mira* puis le *RegA*. Les vis sur chacun modifient l'orientation des miroirs à l'intérieur, changeant ainsi l'alignement du laser à la sortie.

#### 1.4 Lancer le logiciel d'acquisition

1. Allumer la caméra : mettre l'interrupteur *Power* de *Off* à *On* (voir figure 11).

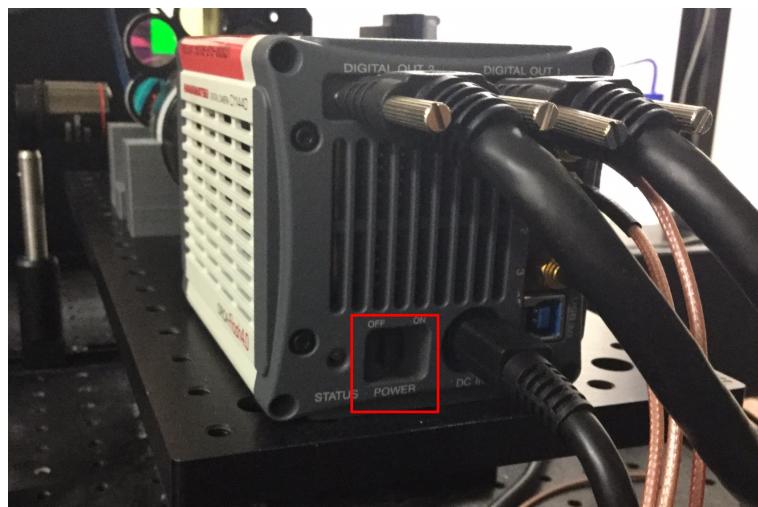


Figure 11 – Interrupteur de la caméra

2. Ouvrir l'ordinateur Mac.
3. Entrer dans le compte *dcclab* avec le mot de passe *microscope*.

- Ouvrir le logiciel *Umoco* (voir figure 12). Il y a un raccourci dans la barre de tâches et un autre sur le bureau.



Figure 12 – Raccourci du logiciel *Umoco*

- Sur l'interface d'accueil (voir figure 18), cliquer sur *Camera*. Il est possible que le bouton *Camera* ne soit pas encore disponible : il suffit d'attendre quelques minutes, le temps que le logiciel *Umoco* détecte la caméra.
- Mettre *Sensor mode* sur *Area*.

## 1.5 Aligner la caméra par rapport au faisceau laser

- Tourner la *roulette de filtres* et sélectionner le *Alexa 594* (voir figure 13).

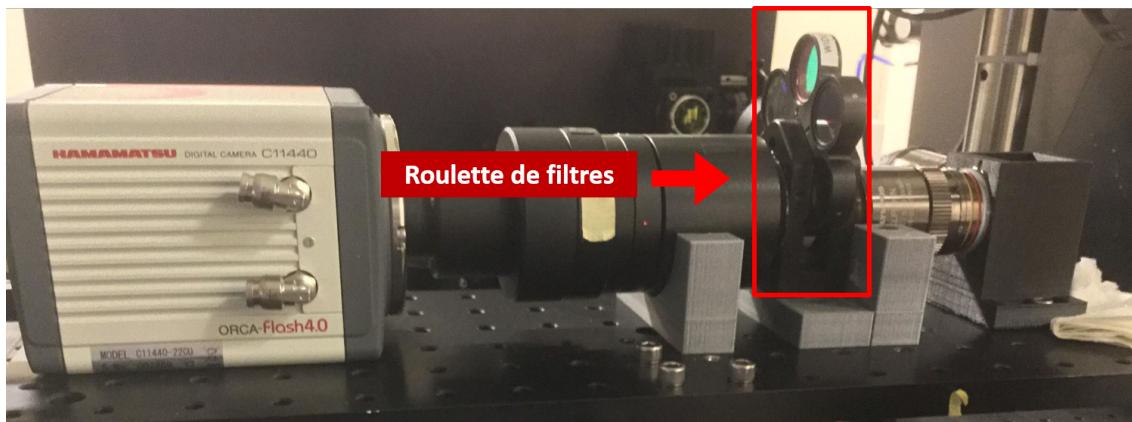


Figure 13 – Roulette de filtres

**Wide beam** Pour tout le spectre.

**Alexa 488** Pour le GFP.

**Alexa 568** Pour un fluorophore excité à 568 nm.

**Alexa 594** Pour un fluorophore excité à 594 nm.

- Remplir la *chambre* du liquide approprié<sup>2</sup>. En mettre assez pour submerger l'objectif; ne pas trop en mettre au point où la chambre déborderait une fois la cuvette ajoutée (voir figure 14).

---

2. Le liquide de la chambre doit avoir le même indice de réfraction que l'échantillon (et que la solution dans laquelle beigne l'échantillon). Par exemple, pour un cerveau soumis à la méthode *Clarity*, on peut utiliser du glycérol ( $n=1.47$ ). Pour la méthode *Idisco*, on peut utiliser de l'Éthyl cinnamate ( $n=1.52$ ). [Attention : Puisque l'Éthyl cinnamate a une structure moléculaire très semblable à celle du plastique, il a tendance à fuir de la chambre et à s'infiltrer dans l'objectif, ce qui finit par l'endommager grandement à long terme.]

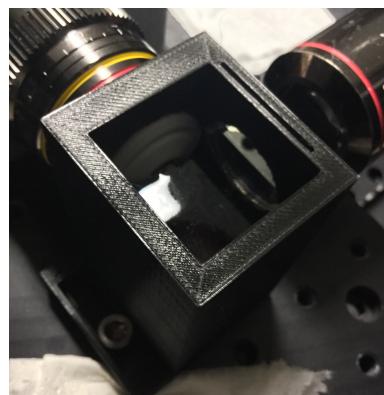


Figure 14 – Chambre : niveau de liquide

3. Sortir la cuvette de *solution fluorescente* (voir figure 15).

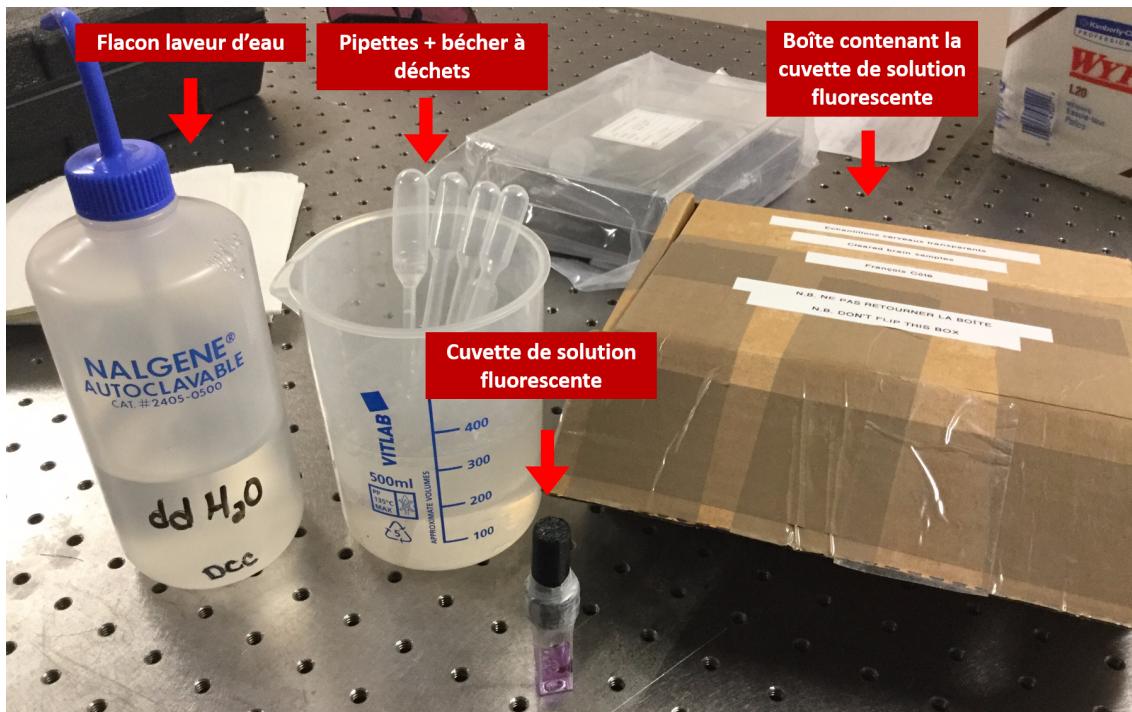


Figure 15 – Substances à utiliser pour l'alignement de la caméra

4. Insérer cette cuvette dans le trou au bout du *support amovible* (voir figure 16). Serrer la *vis noire*.

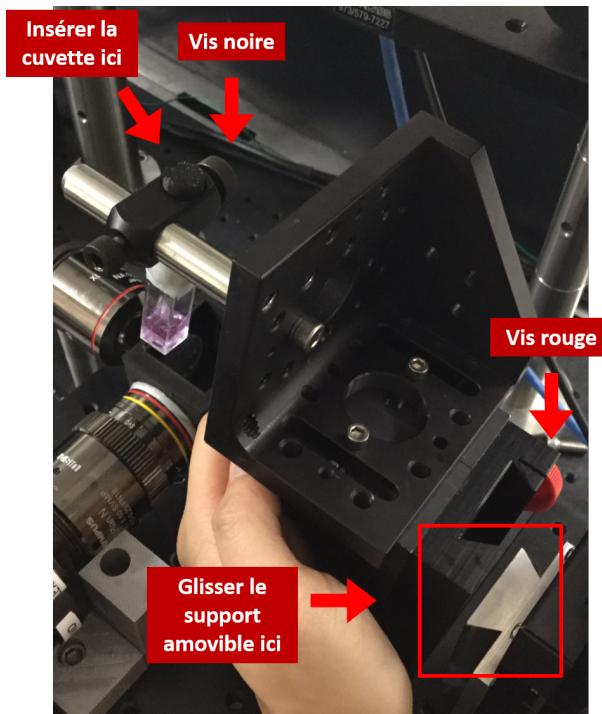


Figure 16 – Support amovible

5. Faire glisser le *support amovible* sur la *base motorisée*. Serrer la *vis rouge*.
6. A l'aide des *roulettes* (voir figure 17), ajuster la position de l'échantillon.  
But : Voir une ligne fluorescente traverser la cuvette quand on regarde directement à l'oeil.

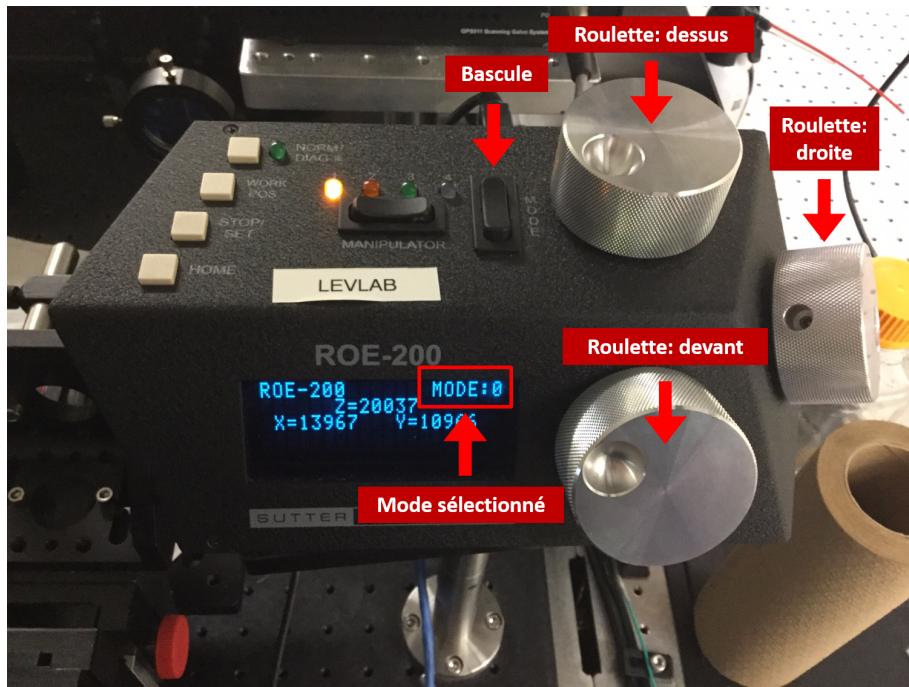


Figure 17 – Roulettes de la base motorisée

**Roulette : dessus** Déplacement vertical. Sens horaire = vers le bas.

**Roulette : droite** Déplacement droite-gauche. Sens horaire = vers la droite.

**Roulette : devant** Déplacement avant-arrière. Sens horaire = vers l'avant.

\*\*\* Les directions sont données selon le point de vue de la photo.

**Mode** Le mode va de 0 à 9. 0 = grands déplacements, 9 = petits déplacements.  
On peut changer de mode en utilisant la *bascule*.

7. Sur l'interface d'accueil (voir figure 18), cliquer sur *Start Preview* (bouton jaune).

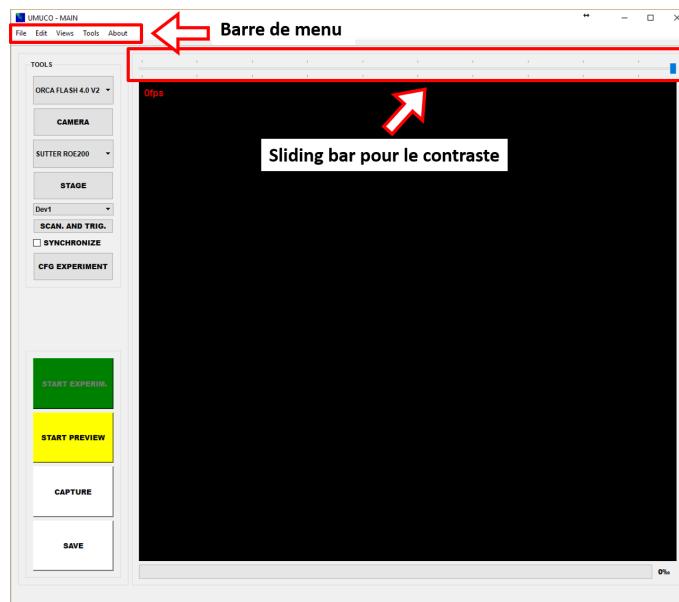


Figure 18 – Interface du logiciel : accueil

8. Cliquer sur *Scan. and Trig.* (6e bouton).
9. Cliquer sur le menu déroulant indiqué à la figure 19. Sélectionner l'option '-'. Cliquer sur X pour fermer la fenêtre.

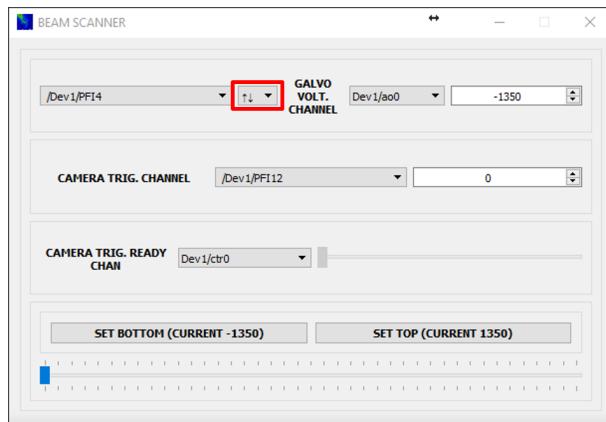


Figure 19 – Fenêtre pop-up de *Scan. and Trig.*.

10. Sur l'interface d'accueil (voir figure 18), ajuster le contraste avec la *sliding bar*. Vers la gauche = plus de contraste.  
But : Voir du signal à l'écran, i.e. voir des picots de couleur.

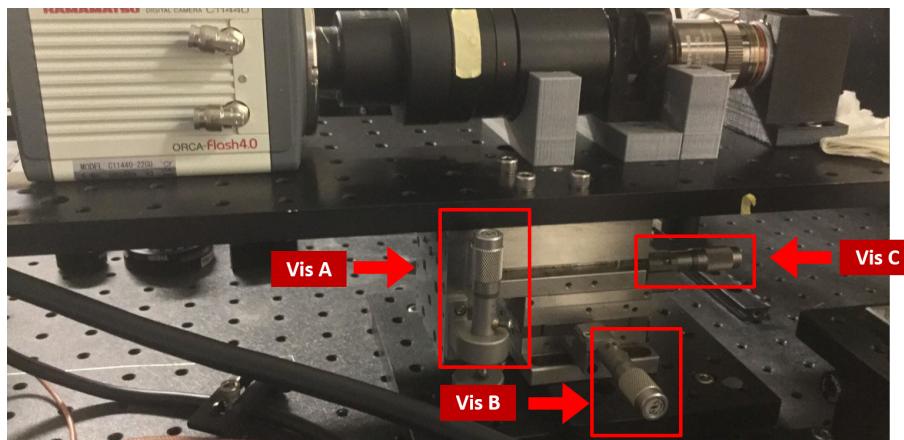


Figure 20 – Vis d'ajustement du plateau de la caméra

**Vis A** Déplacement vertical. Sens horaire = monter.

**Vis B** Déplacement horizontal. Sens horaire = bouger vers la gauche.

**Vis C** Déplacement en profondeur. Sens horaire = reculer.

\*\*\* Les directions sont données selon le point de vue de la caméra (et non de la photo).

11. Ajuster la position verticale de la caméra à l'aide de la *vis A* (voir figure 20).  
But : Voir la ligne de fluorescence. La centrer verticalement à l'écran.
12. Ajuster la position horizontale de la caméra à l'aide de la *vis B*.  
But : Obtenir l'intensité la plus uniforme possible le long de la position horizontale.
13. Ajuster la position en profondeur de la caméra à l'aide la *vis C*.  
But : Avoir la ligne de fluorescence au focus, i.e. avoir la ligne la plus nette/fine possible.

14. S'aider des outils d'alignement : Dans la *barre de menu* de l'interface logiciel (voir figure 18), cliquer sur *Tools* et sur *Alignment tools*.

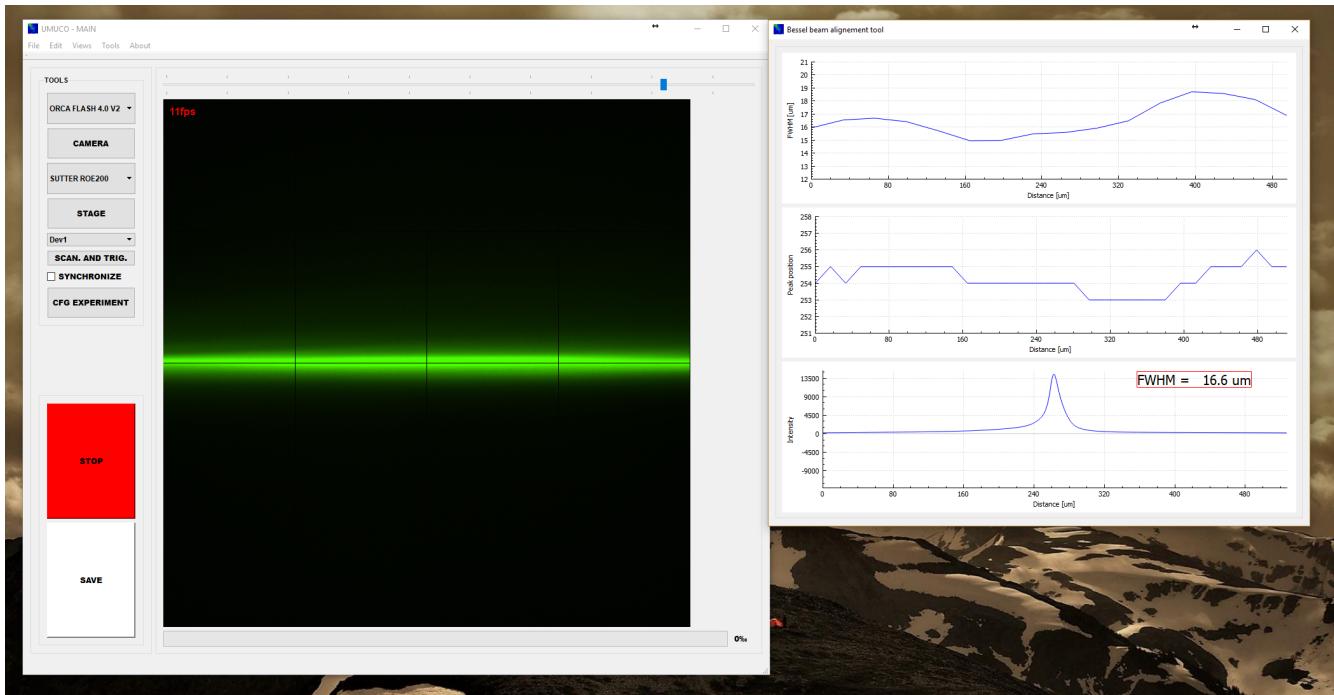


Figure 21 – Outils d'alignement

**FWHM against Distance** montre la largeur à mi-hauteur du profil d'intensité selon la position axiale (i.e. le long du faisceau). But : avoir une fonction constante. On peut ajuster en tournant la vis *B*.

**Peak Position against Distance** montre la position verticale du pic d'intensité selon la position axiale (i.e. le long du faisceau). Autrement dit, on voit si le faisceau est droit/parallèle horizontalement par rapport à la caméra. But : avoir une fonction constante. On peut ajuster en tournant la vis du bas du miroir présenté à la figure 22.

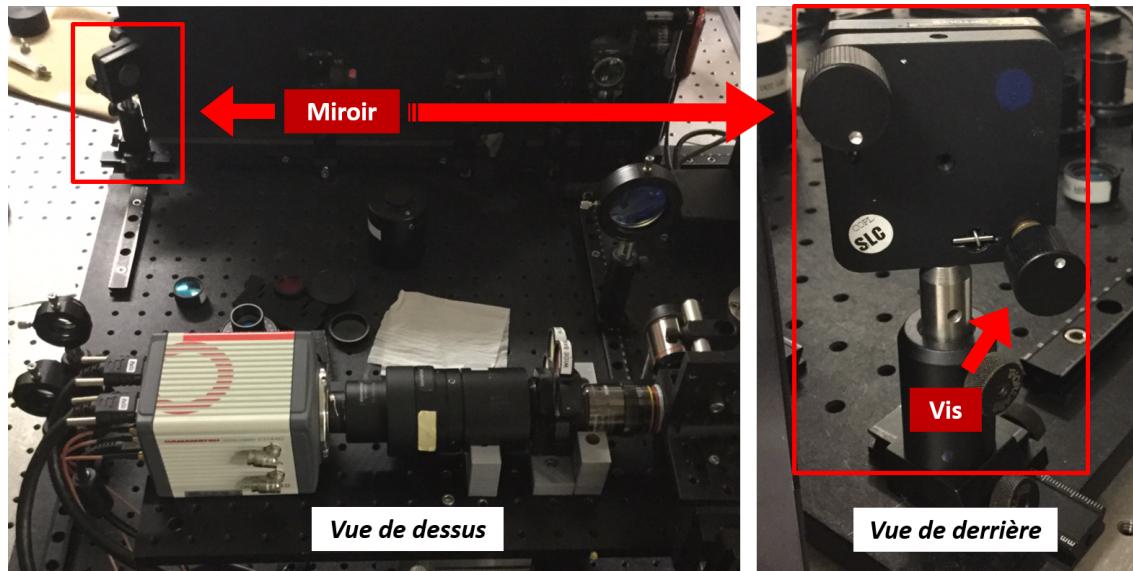


Figure 22 – Miroir à ajuster

**Intensity against Distance** montre l'intensité selon la position verticale. Autrement dit, on voit le profil d'intensité du faisceau. But : avoir le pic le plus symétrique et étroit possible. La valeur du FWHM (largeur à mi-hauteur) de la courbe sur le graphique est également affichée ; on veut le chiffre le plus petit. On peut ajuster en utilisant les vis *B* et *C*.

15. Cliquer sur X pour fermer la fenêtre d'outils d'alignement.

## 1.6 Saisir les paramètres de scan du faisceau

1. Cliquer sur *Scan. and Trig.* (6e bouton).
2. Cliquer sur le menu déroulant indiqué à la figure 19. Sélectionner l'option ' $\uparrow\downarrow$ '.
3. Au besoin, ajuster le contraste.
4. Taper '1000' à l'endroit indiqué à la figure 23. Cette valeur correspond au courant envoyé au galvanomètre. Cliquer sur *Set Top (current #####)*. Il devrait y avoir un bande noir en haut de l'écran.

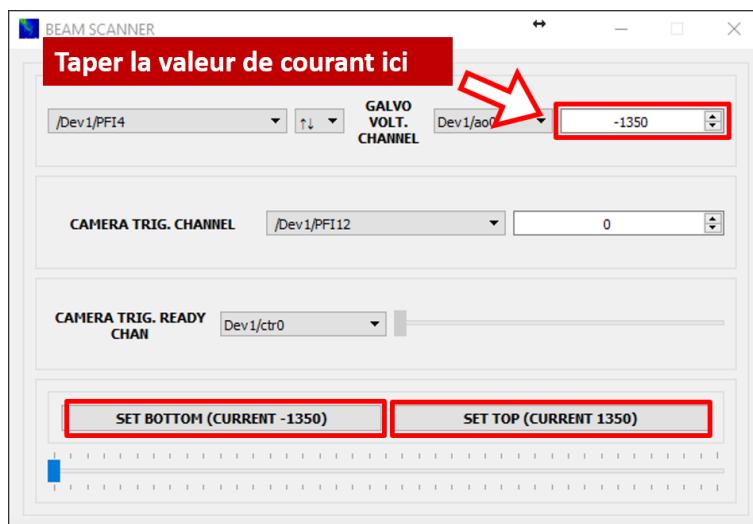


Figure 23 – Fenêtre pop-up *Scan. and. Trig.*

5. Taper '1100' et cliquer sur *Set Top (current 1000)*. Noter que la bande noire est plus étroite.
6. Répéter l'étape précédente jusqu'à ce que la bande noire disparaisse. On veut que la bande lumineuse se rende jusqu'au rebord de l'écran sans toutefois trop dépasser. Trop dépasser entraîne une perte de puissance (i.e. fluorescence non captée par la caméra) et une acquisition de données plus longue. La valeur du courant est normalement entre 1200 et 1400.
7. Sélectionner la limite inférieure de courant de la même façon que la limite supérieure vient d'être sélectionnée. Taper la valeur dans la même boîte. Attention : la valeur est négative ; elle est normalement entre -1400 et -1200. Utiliser le bouton *Set Bottom (current #####)*.
8. Cliquer sur X pour fermer la fenêtre.

## 1.7 Préparer l'échantillon

\* \* \* Local F-6451 \* \* \*

1. Tiroir du haut : sortir le contenant en plastique identifié *Stock imagerie Lightsheet*.
2. Prendre une cuvette propre.
3. Sortir avec soin l'échantillon de son contenant d'origine et le placer dans le fond de la cuvette.
4. Si nécessaire, stabiliser l'échantillon (voir figure 24).

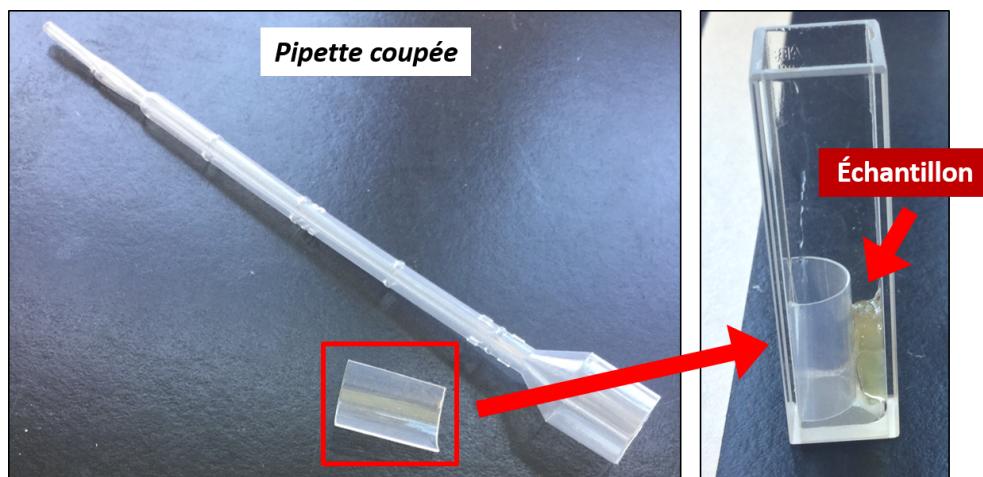


Figure 24 – Exemple de stabilisation de l'échantillon dans la cuvette

Ici, on a une tranche de mésencéphale. On coupe une pipette et on insère le morceau de plastique courbé dans la cuvette.

5. Verser la solution du contenant d'origine dans la cuvette.
6. Vérifier si l'échantillon est complètement immergé. Si non, ajouter de la solution (même que celle utilisée pour le dernier traitement de la méthode de clarification).
7. Vérifier qu'il n'y a pas de bulles, de corps étrangers ou autres dans la cuvette.
8. Mettre le bouchon et sceller avec de la parafilm (voir figure 25).

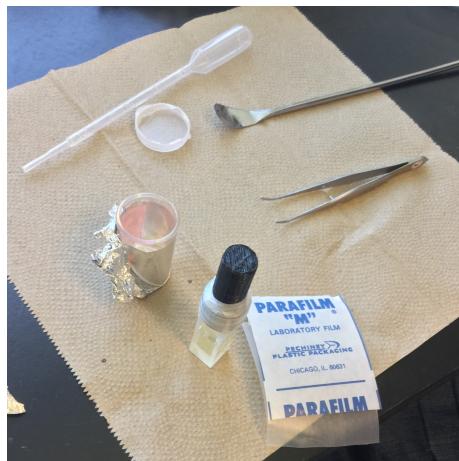


Figure 25 – Préparation de la cuvette

## 1.8 Installer l'échantillon sur le microscope

1. Retirer la cuvette de liquide fluorescent. L'essuyer avec soin.
2. Répéter les étapes [4](#) à [6](#) de la section [1.5](#) avec la cuvette contenant l'échantillon à imager.  
Note : Avant d'installer l'échantillon sur le microscope, bien étudier sa forme et l'orientation à laquelle on le place par rapport au montage. Ces observations seront très utiles lorsqu'il sera temps de *Saisir les paramètres de scan 3D*.
3. Changer le filtre (voir figure [13](#)) si nécessaire.
4. Mettre la couverture noire comme sur la figure [26](#). Attention : La couverture ne doit pas se retrouver sur le parcours du laser !

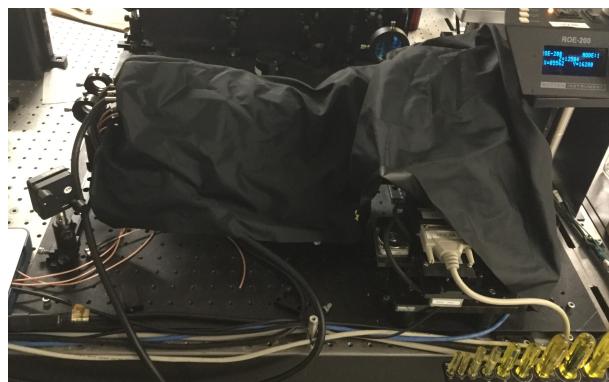


Figure 26 – Couverture sur le montage

5. Cliquer sur *Scan. and Trig.* (6e bouton).
6. Cliquer sur le menu déroulant indiqué à la figure [19](#). Sélectionner l'option '-'. Cliquer sur X pour fermer la fenêtre.
7. Au besoin, ajuster le contraste ou le temps d'exposition (interface d'accueil (voir figure [18](#) → *Camera -> Exposure*)).
8. Ajuster la position en profondeur de la caméra à l'aide la *vis C* (voir figure [20](#)).  
But : Avoir la ligne de fluorescence au focus, i.e. avoir la ligne la plus nette/fine possible.
9. Utiliser les outils d'alignement si nécessaire.
10. Remettre à l'option ' $\uparrow\downarrow$ '.

## 1.9 Saisir les paramètres de scan 3D

1. Sur l'interface d'accueil (voir figure 18), cliquer sur *CFG Experiment* (7e bouton).
2. Tourner la *roulette de devant* (voir figure 17) dans le sens antihoraire jusqu'à atteindre le rebord de l'échantillon, i.e. perdre du signal de fluorescence à l'écran. Il s'agit d'un extremum local mais peut-être pas de l'extremum global.
3. En se souvenant des observations notées à l'étape 2, tourner un peu la *roulette du dessus*, puis réajuster la *roulette de devant* pour retrouver l'extremum local. Le but est d'avoir la valeur la plus petite possible pour la *roulette de devant*. Les valeurs des roulettes sont affichées comme sur la figure 17. Itérer jusqu'à retrouver l'extremum global.
4. Refaire le même processus, mais en ajustant la *roulette de devant* par rapport à la *roulette de droite*.
5. Une fois la valeur minimale trouvée, cliquer sur *Width LO* (voir figure 27).

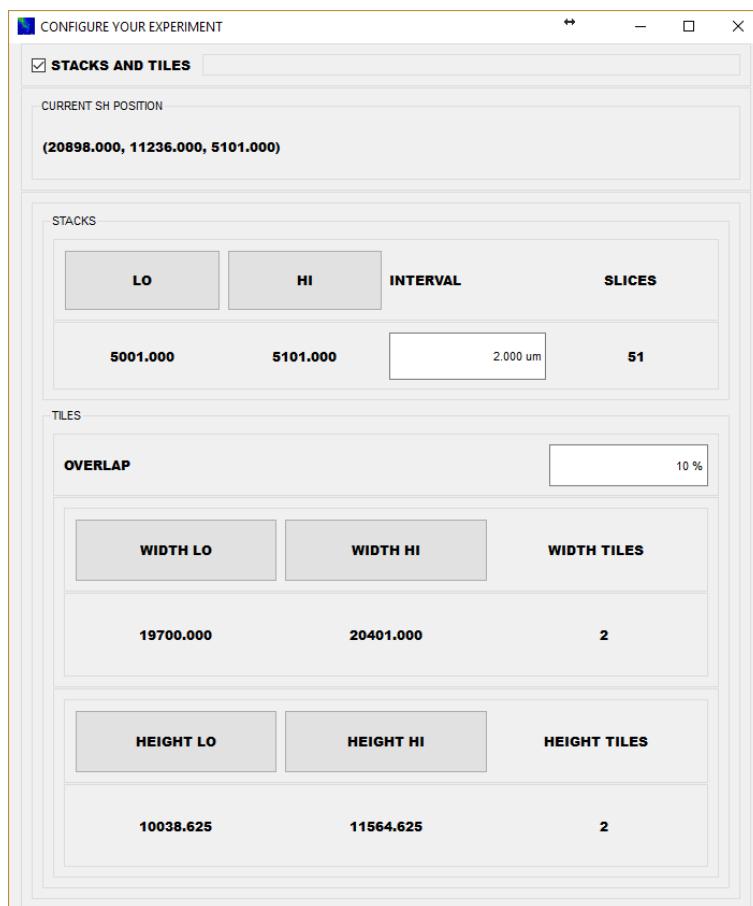


Figure 27 – Fenêtre pop-up de *CFG Experiment*

6. Refaire les étapes 2 à 5 en suivant l'ordre suivant :

- Pour *Width HI* : *roulette de devant* p/r à *roulette de dessus*, puis p/r à *roulette de droite*
- Pour *Height LO* : *roulette de dessus* p/r à *roulette de devant*, puis p/r à *roulette de droite*
- Pour *Height HI* : *roulette de dessus* p/r à *roulette de devant*, puis p/r à *roulette de droite*

\*\*\* Les valeurs choisies pour chaque extremum sont gardées en mémoire et affichées sous leur bouton respectif.

7. Mettre la *roulette de devant* sur la valeur calculée de la façon suivante :

$$\text{roulette de devant} = \frac{\text{valeur de Width HI} - \text{valeur de Width LO}}{2} + \text{valeur de Width LO}$$

8. Mettre la *roulette du dessus* sur la valeur calculée de la façon suivante :

$$\text{roulette du dessus} = \frac{\text{valeur de Height HI} - \text{valeur de Height LO}}{2} + \text{valeur de Height LO}$$

9. Tourner la *roulette de droite* (voir figure 17) dans le sens antihoraire jusqu'à atteindre le rebord de l'échantillon, i.e. perdre du signal de fluorescence à l'écran. Cliquer sur *LO*.

10. Tourner la *roulette de droite* dans le sens horaire jusqu'à atteindre le rebord de l'échantillon, i.e. perdre du signal de fluorescence à l'écran. Cliquer sur *HI*.

11. Vérifier que l'intervalle entre chaque stack est de 2.000 um (par défaut) ou plus.

12. Vérifier que le pourcentage d'overlap est entre 10% (par défaut) et 20%.

13. Cliquer sur X pour fermer la fenêtre.

## 1.10 Lancer l'acquisition de données

1. Sur l'interface d'accueil (voir figure 18), cliquer sur *Camera*.
2. Sélectionner le *Binning* voulu : 1 = image plus précise, acquisition plus lente. 4 = image moins précise, acquisition plus rapide.
3. Définir l'*Exposure* voulu : valeur plus grande = plus de signal détecté par la caméra, acquisition plus lente. Toujours choisir une valeur de 80 ms ou plus.
4. Cliquer sur X pour fermer la fenêtre.
5. Cliquer sur *Stop* (bouton rouge).
6. Cliquer sur *Start Experim..*

L'acquisition prend un certain temps, dépendamment de la grosseur de l'échantillon et des paramètres de scan choisis. Un cerveau complet de souris peut prendre jusqu'à 10 heures. Pour évaluer le temps d'acquisition :

$$\text{durée de l'acquisition} = \text{nb de slices} \cdot \text{nb de width tiles} \cdot \text{nb de height tiles} \cdot \text{temps d'exposition}$$

Les trois premiers paramètres se retrouvent dans *CFG Experiment*. Le dernier paramètre se retrouve dans *Camera* à *Exposure*.

De plus, il se peut que l'erreur montrée à la figure 28 se produise. Normalement, le problème se règle par lui-même. Cependant, si la fenêtre demeure affichée plus de 15 secondes, il faut éteindre le contrôleur du sutter ROE-200 (voir figure 29), attendre quelques secondes et le rallumer.

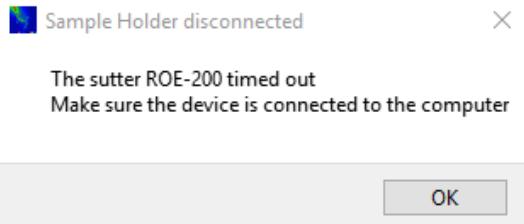


Figure 28 – Message d’erreur du *sutter*

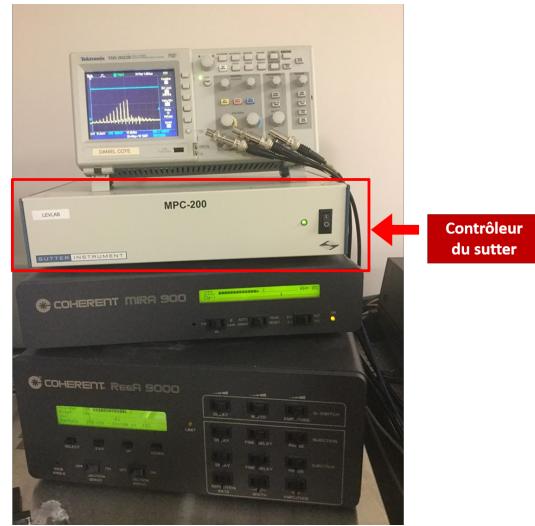


Figure 29 – Contrôleur du *sutter*

## 2 Procédure de fermeture du lab

1. Replacer le *beam dump* devant la sortie du laser (voir figure 3).
2. Sur le *contrôleur du Verdi*, peser sur le bouton *Shutter Open* (voir figure 1). On peut maintenant enlever les lunettes de sécurité.
3. Sur l’interface d’accueil du logiciel *Umoco*, cliquer sur X. Confirmer l’arrêt du logiciel *Umoco*.
4. Éteindre la caméra : mettre l’interrupteur *Power* de *On* à *Off* (voir figure 11).
  

\*\*\* Si vous avez d’autres échantillons à imager dans les prochains jours, passez tout de suite à l’étape 12. Puisque l’ouverture complète du laser peut être longue, on peut le laisser à *On* quelques jours consécutifs. Il faut alors laisser la lumière rouge d’avertissement allumée. \*\*\*

  
5. Tourner la clé de *On* à *Standby* sur le *contrôleur du Verdi* (voir figure 1).
6. Sur le *contrôleur du Verdi*, mettre le ‘LBO’ sur l’état ‘cooling’. Attendre que la puissance affichée tombe à 0 W.
7. Vérifier que tuyaux sortant du Verdi ne sont plus chauds au toucher.
8. Sur chaque refroidisseur (voir figure 2), peser sur le bouton *Run/Standby*. Le message *Standby Mode* devrait s’afficher.
9. Derrière le *contrôleur du Verdi*, mettre la bascule sur *Off*.
10. Sur le *contrôleur du Mira* (voir figure 5), mettre la bascule de gauche sur *CW*.
11. Éteindre la lumière rouge d’avertissement grâce à l’interrupteur FIGURE.
12. Retirer la cuvette contenant l’échantillon.
13. Retirer le liquide de la chambre à l’aide d’une pipette. Ce liquide est généralement réutilisable et peut être conservé dans un contenant à part.
14. Rincer l’intérieur de la chambre à l’aide d’un flacon laveur d’eau (voir figure 15).
15. A l’aide d’une autre pipette, transvider les restants de liquides dans le bêcher à déchets.
16. Répéter les deux dernières étapes si nécessaire.

17. Prendre un papier optique (voir figure 30). Le plier jusqu'à grandeur voulue. Prendre soin de ne jamais toucher la partie du papier optique qui entrera en contact avec l'objectif.



Figure 30 – Papier optique

18. Passer doucement le papier sur l'objectif, et ce, une seule fois (pas d'aller-retour). Ne pas mettre de pression. Jeter le papier.  
 19. Répéter les deux dernières étapes si nécessaire. Ne jamais utiliser deux fois le même papier optique.  
 20. Au besoin, mettre des gants et utiliser un peu d'éthanol avec le papier optique.  
 21. Remettre l'échantillon dans son contenant d'origine.  
 22. Mettre des gants. Nettoyer la cuvette avec de l'éthanol.  
 23. Si la cuvette est en verre : Laisser sécher à l'air libre. Ne pas essuyer.

### 3 Traitement et visualisation des données

#### 3.1 Stitching

Une fois l'acquisition terminée, le fichier de données se trouve dans le répertoire déterminé à la section 1.10. Afin de 'stitcher' (assembler les tuiles) les données, il faut ouvrir l'application MATLAB se trouvant dans la barre de tâches.

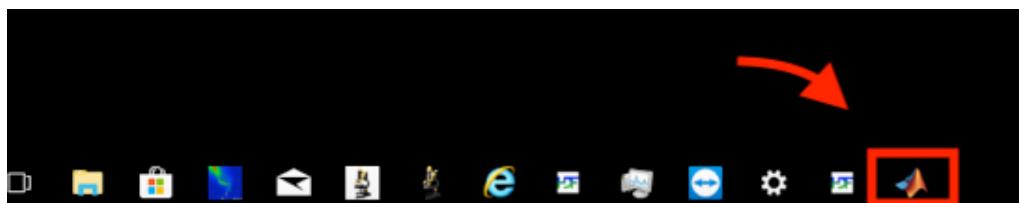


Figure 31 – Ouvrir MATLAB

Une fois MATLAB ouvert, assurez-vous que vous êtes bien dans le répertoire 'LightsheetUtilities', comme à la figure 32.

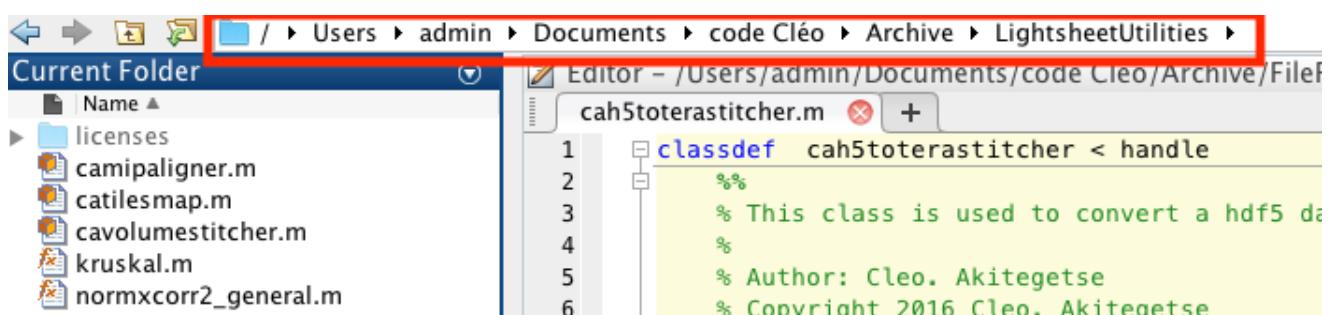


Figure 32 – Répertoire LightsheetsUtilities

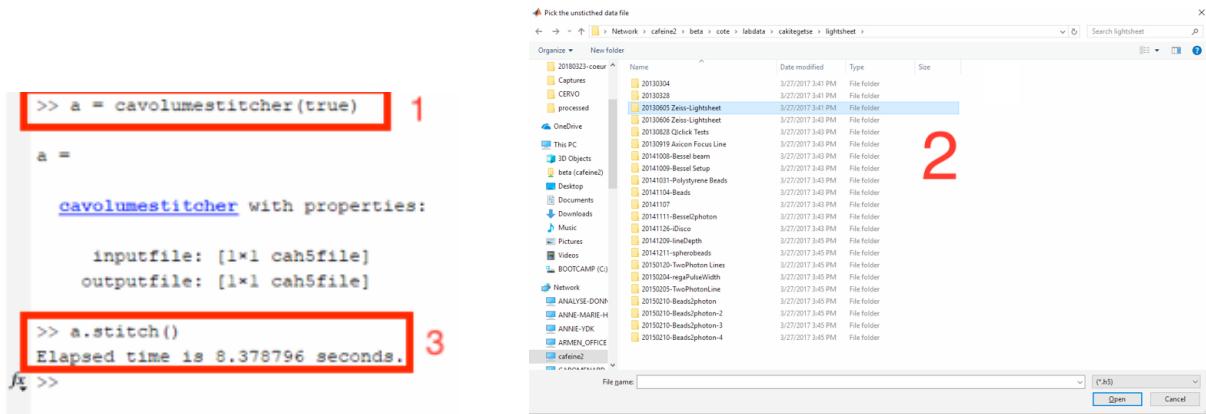


Figure 33 – Les 3 étapes pour 'stitcher' les données

Exécutez la commande suivante (1) dans la fenêtre de commande de MATLAB.

```
>> a = cavolumestitcher(true)
```

Comme illustré à la figure 33, une fenêtre apparaîtra afin que l'utilisateur puisse sélectionner les données qu'il aimerait 'stitcher'. Une fois le fichier sélectionné, les informations sur celui s'afficheront dans la fenêtre de commande. Afin de terminer le traitement des données, l'utilisateur doit entrez la commande suivante (3) :

```
>> a.stitch()
```

Cette opération peut être longue dépendamment de la grosseur du fichier. Une barre de progression sera affichée à l'écran. Le fichier créé par cette dernière étape sera enregistré dans le même répertoire que le fichier d'origine contenant les données non traitées.

### 3.2 Visualisation 3D

Afin de visualiser les données, ouvrez l'application 'Vaa3D' se trouvant dans la barre de tâches.

**\*\*\*Attention ! Assurez vous qu'aucun fichier temporaire du genre 'vmap.bin' se trouve dans le répertoire dans lequel se trouve le fichier que vous désirez ouvrir. En présence d'un tel fichier, supprimez-le. \*\*\***



Figure 34 – Ouvrir Vaa3D

Une fois l'application en ouverte, lancez le plugin TeraFly en suivant les étapes de la figure 35.

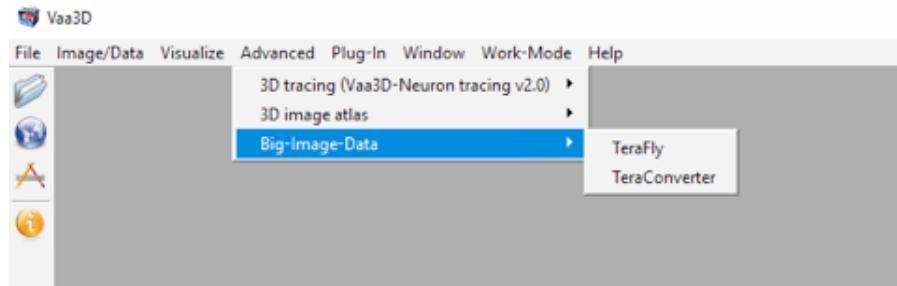


Figure 35 – Ouverture du plugin TeraFly

À partir de TeraFly, vous pouvez ouvrir le fichier que vous venez de traiter en suivant les étapes de la figure 36.

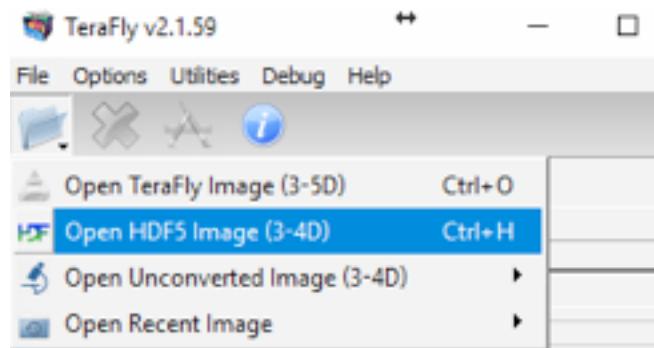


Figure 36 – Ouverture de fichier via TeraFly

Les données seront visibles sous forme d'un volume. Il est possible de naviguer dans le volume et d'agrandir certaine section.

## A Protocole - Remplacer l'eau des chillers

**N.B. Prévoir un seau pour vider les conduits et le chiller pour ne pas inonder le laboratoire. Traitement à effectuer tous les 3 mois.**

### Remplacer l'eau des conduits

Remplacer l'eau du chiller ne suffit pas à retirer toute l'eau du système. De l'eau s'est également accumulée dans les conduits des cavités laser et il faut les vider.

1. Éteindre le laser si ce n'est pas déjà fait
2. Éteindre le chiller
3. Retirer les tuyaux et les déposer dans un contenant pour recueillir l'eau des conduits
4. Vider le chiller de son eau
5. Mettre 400 ml d'eau doublement distillée (très important de mettre l'eau désionisée et déminéralisée)
6. Reconnecter le tout et rallumer le chiller
7. Laisser tourner l'eau pendant une dizaine de minutes
8. Répéter 1-2 fois

### Produit anticorrosif

Le produit anticorrosif provient de la compagnie "OptiTemp". Le produit est OptiShield Plus. C'est un produit spécifiquement fait pour protéger les circuits d'eau fermés de la corrosion. Il protège des contaminants que contiennent l'aluminium, le bronze, le cuivre et tout type de métaux si ceux-ci sont présents dans le circuit. Une photo mise à la fin du document donne une description du produit.

1. Prendre environ 40 ml du produit anticorrosif
2. Ajouter 400 ml d'eau désionisée et déminéralisée (doublement distillé)
3. Remplir le chiller avec la solution
4. Allumer le chiller et laisser remplir les tuyaux de la solution
5. Ajouter le reste de la solution s'il en reste (le niveau d'eau a diminué pour remplir les conduits de la cavité laser)

