

Utilisation du microscope à fluorescence

1 Description du microscope

1.1 Éléments principaux

Le modèle du microscope droit Prior Scientific est "OpenStand" [\[doc\]](#). Il est composé des éléments suivants (figure 1) :

- Source lumineuse et boîtier de contrôle (voir section 1.2)
- Cube avec set de filtres excitation / miroir dichroïque / émission (voir section 1.3)
- Objectif (voir section 1.4)
- Couvercle adapté à l'objectif
- Plaque chauffante avec contrôleur et anneau chauffant pour l'objectif (voir section 1.5)
- Platine de translation horizontale et verticale H101A ProScan (Prior) [\[doc\]](#), avec boîtier de contrôle et joystick
- CMOS Caméra Moment (Teledyne Photometrics) [\[doc\]](#)

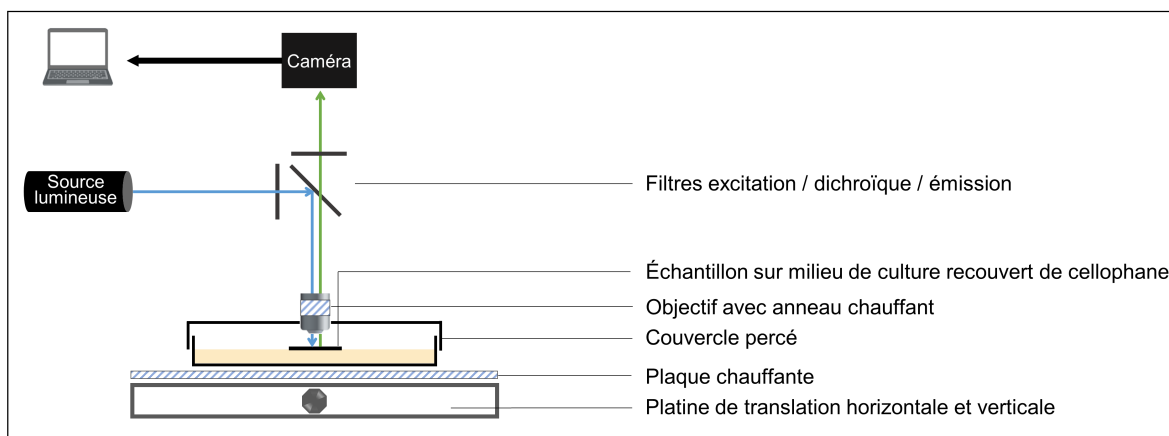


Figure 1 – Schématisation du dispositif d'observation en fluorescence

1.2 Sources lumineuses

Trois sources lumineuses pE-100 (CoolLED) [\[doc\]](#), avec leur boîtier de contrôle sont disponibles :

- UVs - 365 nm
- bleu - 470 nm

– jaune - 565 nm

L'intensité de l'éclairage peut être modifiée sur le boîtier de contrôle (flèches). La source lumineuse peut être activée automatiquement lorsque la caméra fonctionne en reliant cette dernière au boîtier de contrôle de la source (câble rose).

Deux sources lumineuses peuvent être montées simultanément sur le microscope à l'aide d'un pE-Combiners (CoolLED) [\[doc\]](#). Pour changer les sources montées sur le combineur, elles doivent être dévissées. Il faut également changer le boîtier de contrôle, car chacun est associé à une longueur d'onde spécifique.

1.3 Filtres optiques

Les sets de 3 filtres Semrock (excitation, dichroïque, émission) sont montés sur des cubes Thorlabs DFM1T3 [\[doc\]](#). Les filtres d'excitation et d'émission doivent être correctement orientés dans le cube, en respectant les flèches sur les filtres indiquant la direction de la lumière. Le miroir dichroïque doit également être correctement placé ; des tutoriels d'assemblage sont disponibles [\[ici\]](#).

Le cube contenant le set de filtres doit être bien placé sur le microscope en respectant la notation UP qui doit être vers le haut.

Les sets de filtres Semrock disponibles sont les suivants :

Simple bande :

- Bleu
DAPI-5060C-000, S-000624 [\[doc\]](#)
Excitation : 350-400 nm
Émission : 415-480 nm
- Rouge
LF561/LP-C-000, S-000901 [\[doc\]](#)
Excitation : 550-570 nm
Émission : 570-900 nm

Double bande :

- Vert et rouge (figure [2](#))
GFP/DsRed-A-000, S-000780 [\[doc\]](#)
Excitation : 450-490 et 540-570 nm
Émission : 495-525 et 580-680 nm
- Vert et bleu (figure [3](#))
DA/FI-A-000, S-000726 [\[doc\]](#)
Excitation : 380-395 et 465-495 nm
Émission : 415-450 et 510-550 nm

1.4 Objectifs

Deux objectifs Zeiss sont disponibles (grossissements $\times 10$ et $\times 63$) :

- Objectif N-Achroplan 10x/0,25 M27 [\[doc\]](#)
Résolution : 0,45 $\mu\text{m}/\text{px}$.



Figure 2 – Vert et rouge

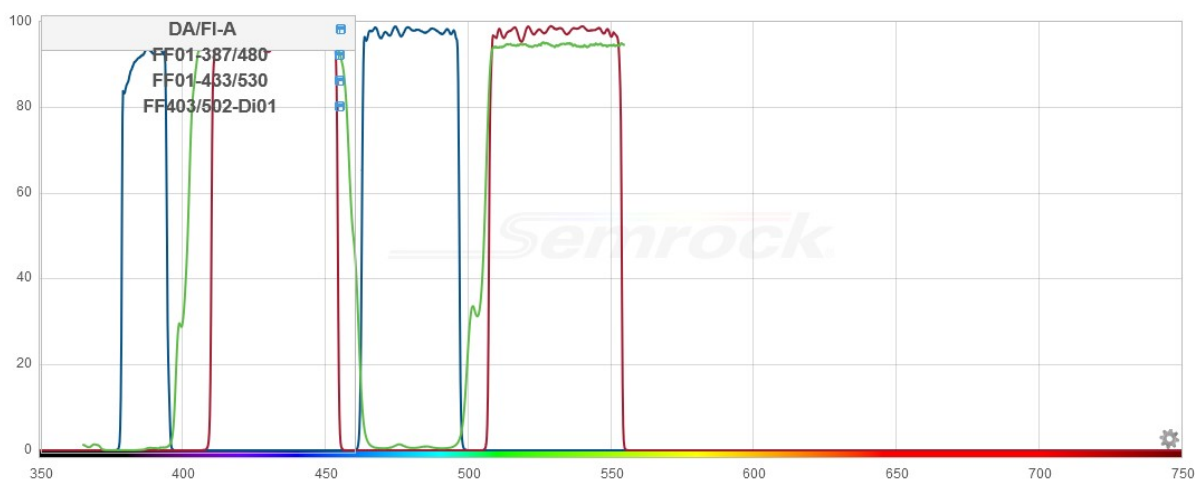


Figure 3 – Vert et bleu

- Objective N-Achroplan 63x/0.95 CG=0 M27 [\[doc\]](#)
Résolution : 0,072 $\mu\text{m}/\text{px}$.

Ils sont adaptés pour une utilisation sans lamelle. L'objectif peut être dévissé pour le remplacer par un autre.

1.5 Plaque chauffante

Le microscope dispose d'une plaque chauffante H601-Flat avec contrôleur H401-T-Controller et anneau chauffant pour l'objectif (Okolab) [\[doc\]](#).

Dans les paramètres du contrôleur, il est possible de choisir d'utiliser uniquement la plaque chauffante ou l'anneau, ou bien les deux simultanément (Settings > Devices > Type). La plaque chauffante monte rapidement en température, mais l'anneau chauffant est plus lent, afin de ne pas endommager l'objectif. La vitesse de montée en température peut être réglée dans les paramètres (Settings > Device > Ramp rate). Il faut donc prévoir d'allumer l'appareil bien avant l'observation.

Le voyant jaune indique que l'appareil est en train de chauffer, et le voyant vert signifie que la température demandée est atteinte et stabilisée.

2 Utilisation du microscope

2.1 Mise en marche

- Allumer la diode de la multi-prise.
- Si l'anneau chauffant est nécessaire, prévoir d'allumer le dispositif chauffant environ 2h avant l'observation. Une température de l'anneau autour de 35°C semble efficace pour éviter la condensation sur l'objectif.
- Brancher la caméra.
- Allumer le boîtier de contrôle ProScanIII.
- Ouvrir le logiciel Micro-Manager.
- Placer l'échantillon sous l'objectif, avec éventuellement le couvercle à fixer au niveau de l'objectif.

2.2 Logiciel Micro-Manager

Les paramètres à modifier avec le logiciel sont :

- Cliquer sur **Live** pour visualiser l'échantillon. Attention, si la source lumineuse est allumée, l'éclairage fluorescent va se déclencher lorsque le **Live** est activé. Il faut débrancher la source lumineuse si on souhaite faire une première mise au point en lumière blanche.
- Le temps d'exposition : **Exposure [ms]**. Une valeur autour de 100 ms est adaptée pour l'observation en champ clair.
- La position de l'objectif en z : cliquer sur l'icône "double flèche" dans **Stage**. Dans la fenêtre **Stage Control**, on peut régler une vitesse de déplacement rapide (double flèche) et une lente (simple flèche). Attention, attendre que le déplacement soit terminé avant de cliquer à nouveau. On peut également déplacer l'objectif à l'aide du joystick en faisant tourner les molettes latérales. La valeur de z est indiquée sur la fenêtre **Stage Control**, et également sur l'écran du joystick (appuyer sur le bouton en haut à gauche). La fenêtre **Stage Control** permet également de se déplacer en x et y , mais il est plus pratique d'utiliser le joystick.
- Pour enregistrer une image, cliquer sur la disquette en bas à droite de la fenêtre d'observation.

2.3 Multiacquisition

Il est possible d'enregistrer automatiquement des séries d'images à l'aide de Micro-Manager en cliquant sur **Multi-D Acq.** Dans la fenêtre **Multi-Dimensional Acquisition**, plusieurs paramètres peuvent être cochés.

- **Time Points** pour enregistrer des images successives.
- **Multi Positions (XY)** pour prendre plusieurs images dans le plan à assembler. Pour cela, cliquer sur **Edit Position List** puis sur **Create Grid**. Renseigner la valeur de **Overlap** et de la résolution (**Pixel Size**, voir section 1.4). Choisir la taille de l'image finale voulue à l'aide du +, puis cliquer sur **Center Here**. Fermer la fenêtre **Edit Position List**.
- **Z-Stacks (Slices)** pour enregistrer des images à différentes hauteurs.
- **Save Images** pour enregistrer directement les séries d'images dans le dossier choisi.

3 Marqueurs fluorescents

Les fluorochromes suivants ont été testés avec le microscope :

- Calcofluor White (septa et paroi)
Set de filtres simple bande bleu
Concentration : 0,05 %
A ajouter en goutte sur le mycélium
- GFP, souche mutante MCM1-GFP (noyaux)
Set de filtres double bande vert et rouge
- FM4-64 (SPK, septa, endosomes et vacuoles) [\[doc\]](#)
Set de filtres simple bande rouge
Concentration : entre 10 et 50 μM
A ajouter en goutte sur le mycélium
- 2-NBDG (analogue du glucose marqué) [\[doc\]](#)
Set de filtres double bande vert et rouge
Concentration : 200 μM
A ajouter au milieu de croissance