



## UTILISATION DU MICROSCOPE CONFOCAL LEICA SP8

MISE EN MARCHÉ DU SYSTÈME .....	2
LANCEMENT DU LOGICIEL LAS X .....	3
PRINCIPE DE CRÉATION D'UNE CONFIGURATION D'ACQUISITION .....	4
CONFIGURATION DES BOUTONS DE RÉGLAGE.....	5
PRÉSENTATION DU STATIF DMI6000B .....	6
ACQUÉRIR UN SIMPLE MARQUAGE, SUR UN SEUL PLAN .....	8
ACQUÉRIR UNE SÉRIE Z (PLUSIEURS PLANS, UNE SEULE COULEUR) .....	9
ACQUÉRIR PLUSIEURS COULEURS SIMULTANÉMENT (AVEC OU SANS SÉRIE Z) .....	10
ACQUÉRIR PLUSIEURS MARQUAGES SÉQUENTIELLEMENT (AVEC OU SANS SÉRIE Z) .....	12
ACQUÉRIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE .....	13
ACQUÉRIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES .....	15
VISUALISATION DES IMAGES ACQUISES.....	15
ECHANTILLONNAGE SPATIAL .....	17
POUR ACQUÉRIR PLUS VITE !.....	18
QUANTIFICATION DE SIGNAL.....	19
GESTION DES IMAGES.....	20
EXPORT DES IMAGES EN .TIFF.....	21
MISE HORS TENSION DU SYSTÈME .....	22

## MISE EN MARCHE DU SYSTEME

I- Allumez la lampe à fluorescence (bouton Power + vis Intensity sur un point blanc)



II -Au niveau du poste de commande :



1. Mettre en marche la station de travail TCS (bouton vert *PC Microscope*) : le système d'exploitation démarre automatiquement. Le microscope, la platine motorisée XY, le PC et l'écran s'allument.

Utilisez la session Windows **TCS User** (pas de mot de passe)

2. Allumer la tête confocale (bouton vert *Scanner Power*).

3. Mettre les lasers sous tension (bouton vert *Laser Power*).

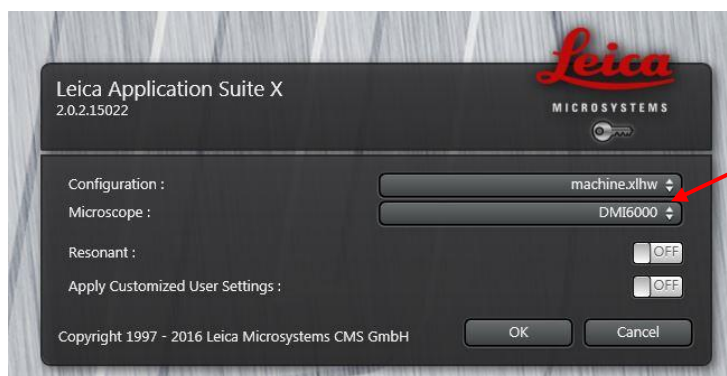
4. Allumer les lasers (tourner la clef *Laser Emission* sur ON-1). L'allumage définitif des lasers se fait via le logiciel (voir le chapitre suivant).

## LANCEMENT DU LOGICIEL LAS X

1. Démarrer le logiciel en cliquant sur l'icône LAS X sur le bureau.
2. Vérifier que « DMI6000 » et « Machine » sont bien indiqués sur la fenêtre et cliquer sur « OK ».



1

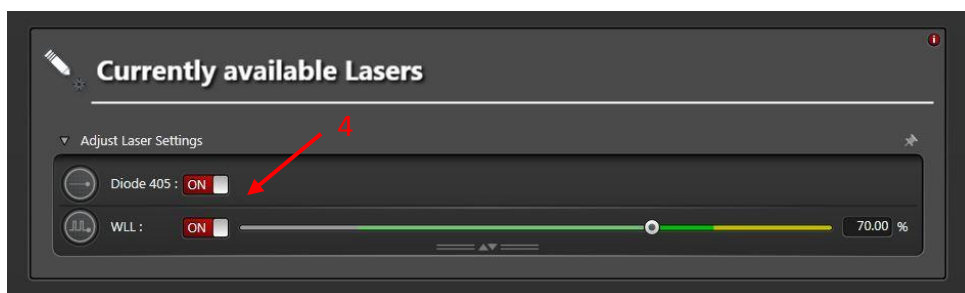


2

3. Mettre en marche les lasers :

Dans l'onglet *Configuration* → *Laser Config*, allumer les lasers dont vous avez besoin.

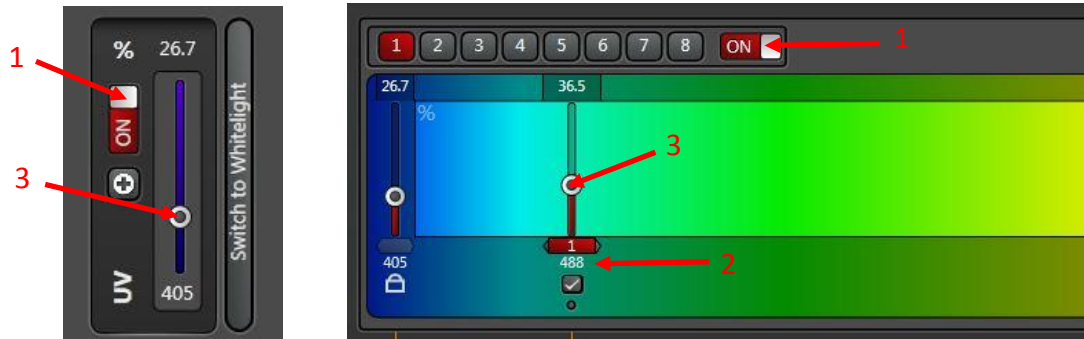
Le laser blanc WLL doit être utilisé à une puissance de 70%. Il peut être utilisé à une puissance plus importante lors d'expérience de photoblanchiment (FRAP...)



4

## PRINCIPE DE CREATION D'UNE CONFIGURATION D'ACQUISITION

1. Activer l'AOTF UV et/ou WLL
2. Pour le WLL, indiquer la longueur d'onde d'excitation et l'activer.
3. Régler les puissances de sortie d'AOTF de chacune des raies choisies.

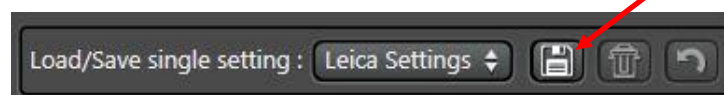


4. Activer les PMTs (détecteurs) dont vous avez besoin.
5. Dans la liste déroulante, choisir le spectre d'émission de votre fluorochrome.
6. Sélectionner la couleur à appliquer au PMT.
7. Déterminer la largeur des fenêtres spectrales pour chacun des PMTs.



8. Vérifier l'ouverture du *Pinhole* : cliquer sur *Airy 1*.

9. Une fois tous les paramètres modifiés, enregistrez votre configuration : cliquer sur *Save* dans le module *Load/Save single setting*.



N.B : Il est aussi possible de recharger des paramètres d'acquisition en ouvrant une image et en cliquant sur *Apply Properties*

## CONFIGURATION DES BOUTONS DE REGLAGE

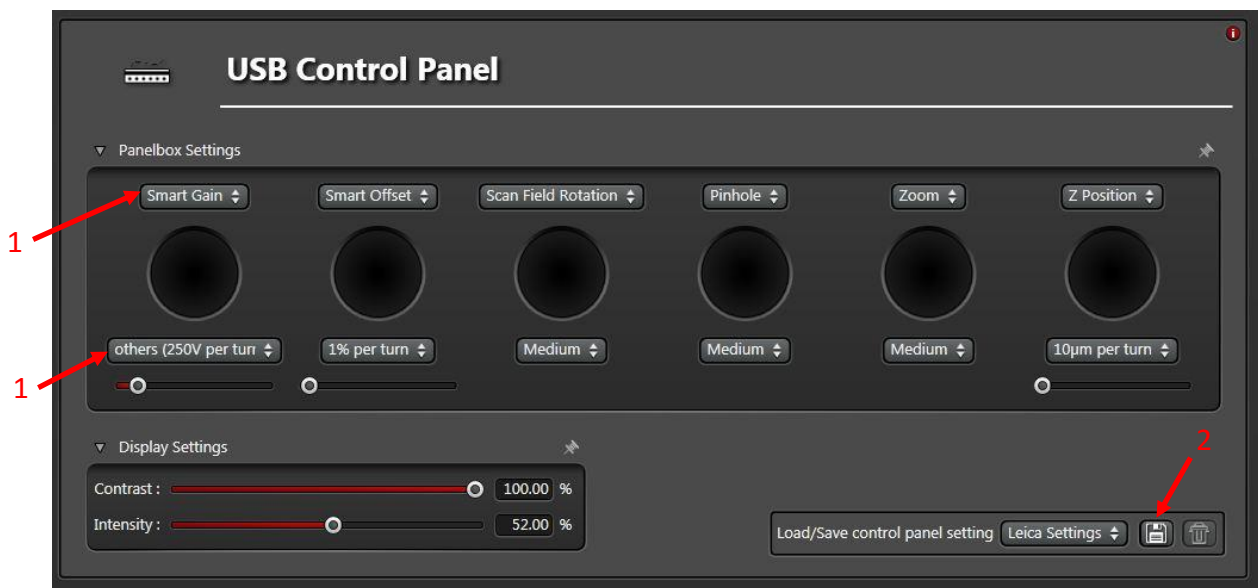
La fonction ainsi que la valeur associée est affichée au-dessus de chaque bouton.  
Pour chaque bouton, vous pouvez modifier sa fonction et sa sensibilité.

Pour modifier un bouton, deux possibilités :

- Dans la fenêtre principale, cliquez sur Control Panel.
- ou : dans le menu Configuration, cliquer sur Ctrl Panel.



OU



1. Sélectionner le bouton à modifier puis choisir dans les 2 menus déroulants la fonction et la sensibilité à appliquer.
2. Vous pouvez enregistrer votre panel de boutons : cliquez sur *Save* en bas à droite et donnez un nom à votre panel. Lors de votre prochaine session, vous pouvez le charger en le sélectionnant dans la liste déroulante.

Les deux petits boutons noirs à la gauche des boutons du panel servent à

- lancer un scan en mode Live (droite)
- sélectionner un PMT à l'écran lorsque le mode Smart Gain est actif (gauche).

### Quelques astuces :

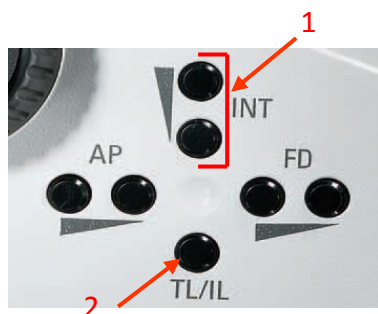
- Pour le réglage du gain et de l'offset des PMTs, utiliser la fonction *Smart Gain* et *Smart Offset* qui vous permettront de régler le gain et l'offset de tous les PMTs. Pour sélectionner le PMT à modifier, cliquer sur l'image correspondante (elle doit être entourée de pointillés blancs).
- Désactivez les boutons dont la fonction vous est inutile : il existe une position vide tout en haut de la liste déroulante.

## PRESENTATION DU STATIF DMI6000B

Le statif DMI6000B est entièrement motorisé.

Seules sont décrites ci-dessous les fonctions les plus couramment utilisées.

### SUR LE COTE GAUCHE :

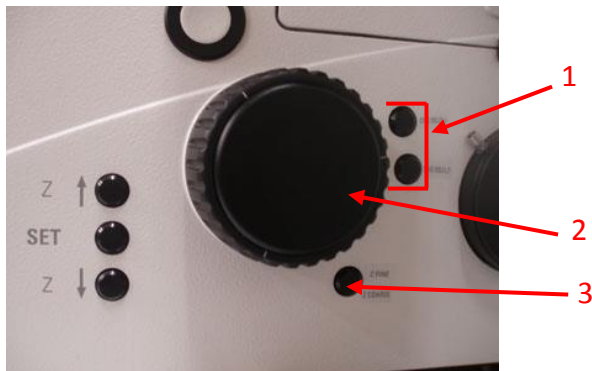


1- Réglage de l'intensité lumineuse en lumière blanche ou en fluorescence suivant le mode utilisé lors du réglage.

2- Passage du mode réfléchi (fluo) au mode transmis (lumière blanche).

3- Vis de mise au point.

### SUR LE COTE DROIT :



1- Changement d'objectif (bouton du haut pour un grossissement supérieur, bouton du bas pour un grossissement inférieur).

2- Vis de mise au point.

3- Modification du type d'immersion de l'objectif.

### EN FACADE :

1- Choix du bloc filtre de fluorescence.

2- Ouverture/fermeture du shutter de fluo

3- 100% de lumière vers les oculaires

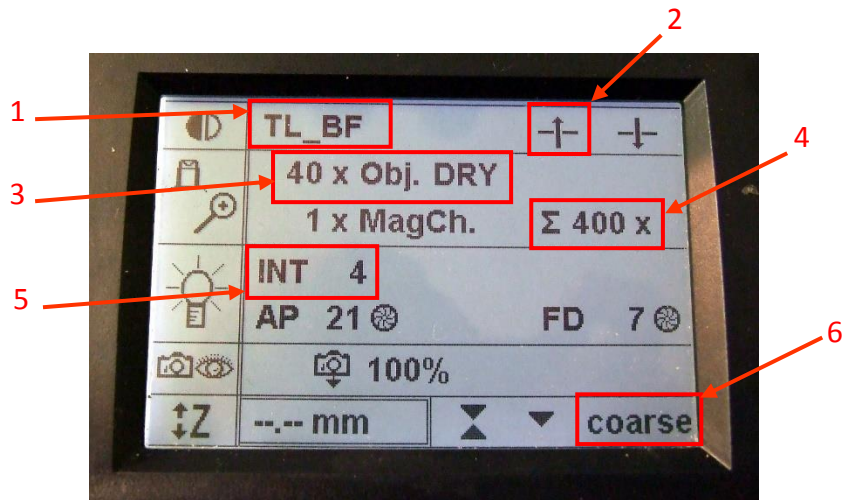
4- Switch Oculaires/tête confocale





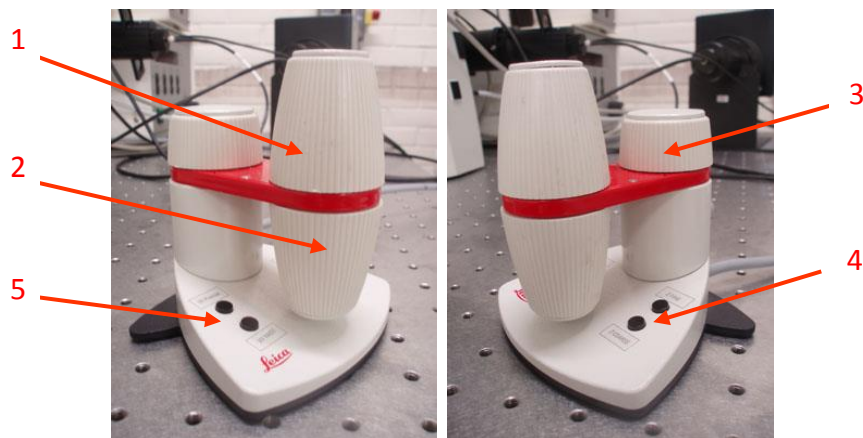
## ECRAN :

1. Type d'illumination (fluo : fluorescence, TL\_BF : lumière blanche)
2. Shutter fluo ouvert/fermé
3. Objectif en place
4. Grandissement final avec prise en compte des oculaires
5. Intensité de la source de lumière (blanche ou fluorescence)
6. Vitesse de déplacement des objectifs (Coarse = rapide, Fine = lent)



## JOYSTICK :

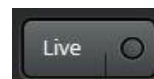
1. Déplacement en Y.
2. Déplacement en X.
3. Réglage de la mise au point (Z).
4. Touches pour réglage de la vitesse du déplacement en Z (Z Fine/Z Coarse)
5. Touches de réglage de la vitesse de déplacement en XY (XY Slow/ XY Fast)



## ACQUERIR UN SIMPLE MARQUAGE, SUR UN SEUL PLAN

1. Disposer la lame sur le microscope, faire la mise au point et choisir un champ.
2. Remettre droite la tête du microscope.
3. Fermer le shutter de fluorescence.

4. Lancer le scan en cliquant sur le bouton *Live* (en bas d'écran).



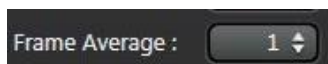
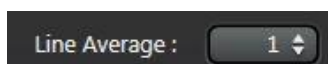
5. Sélectionner une configuration *Leica* ou *User* dans la liste des macros.

6. Cliquer sur l'icône *Q-LUT* pour visualiser l'image en fausses couleurs (écran de droite)  
Les points bleus représentent les pixels saturés (niveau 255), les points verts l'absence de signal (niveau 0).

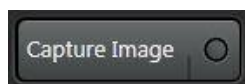


7. Se déplacer en Z pour trouver le plan d'intérêt (bouton Z position).
8. Modifier le zoom et le format d'image de façon à échantillonner correctement l'image (voir page 17)
9. Ajuster la dynamique de l'image : ajuster le gain et l'offset de manière à obtenir quelques pixels bleus (saturation) sur la zone d'intérêt de l'image et des pixels verts à l'extérieur de votre échantillon (absence de signal).

10. Appliquer un average



11. Cliquer sur *Capture Image* pour acquérir l'image (en bas d'écran).

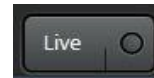


12. Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire (voir p20)



## ACQUERIR UNE SERIE Z (PLUSIEURS PLANS, UNE SEULE COULEUR)

1. Disposer la lame sur le microscope, faire la mise au point et choisir un champ.
2. Remettre droite la tête du microscope.
3. Fermer le shutter de fluorescence.
4. Lancer le scan en cliquant sur le bouton *Live* (en bas d'écran).



Procéder de la même façon que dans le paragraphe *Acquérir une image (un seul plan, une seule couleur)* pour faire les réglages de dynamique d'image en prenant soin de les réaliser dans le plan le plus intense.

Sélectionner le mode **XYZ** dans le menu déroulant en haut à gauche de la fenêtre

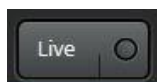
5. Ouvrir le panneau *Z-stack*.

Il y a 2 façons d'acquérir un Z-Stack :

a)- En mode *Live*, ajuster le Z de façon à être au plus proche de la lamelle (sens inverse des aiguilles d'une montre). Cliquer sur *Begin* pour marquer la position de départ

Ajuster à nouveau le Z de façon à être le plus éloigné de la lamelle (sens des aiguilles d'une montre). Cliquez sur *End* pour marquer la position de fin.

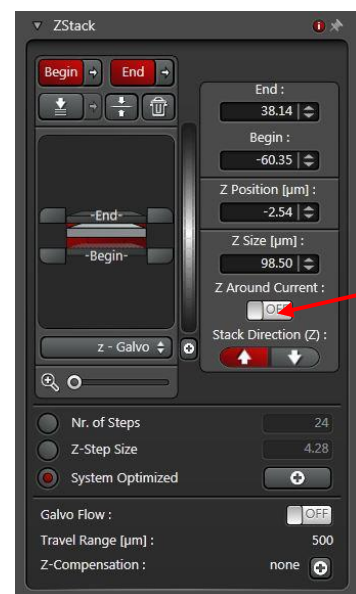
b)- En mode *Live*, ajuster le Z de façon à se placer au milieu de l'échantillon. Cliquer sur *Z Around Current* et entrer la valeur de Z size voulue. Par exemple, pour un Z size de 20µm, l'acquisition se fera autour de la position enregistrée + ou - 10µm.



5 a)



6



5 b)

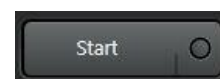
6. Sélectionner *Z-step size* et entrer la valeur de la distance entre chaque coupe (en fonction de l'échantillonnage axial optimal (voir page 17)).

7. Modifier le zoom et le format d'image de façon à échantillonner correctement l'image (voir page 17)

8. Appliquer un average



9. Lancer l'acquisition de la série Z avec l'icône *Start* (en bas d'écran).



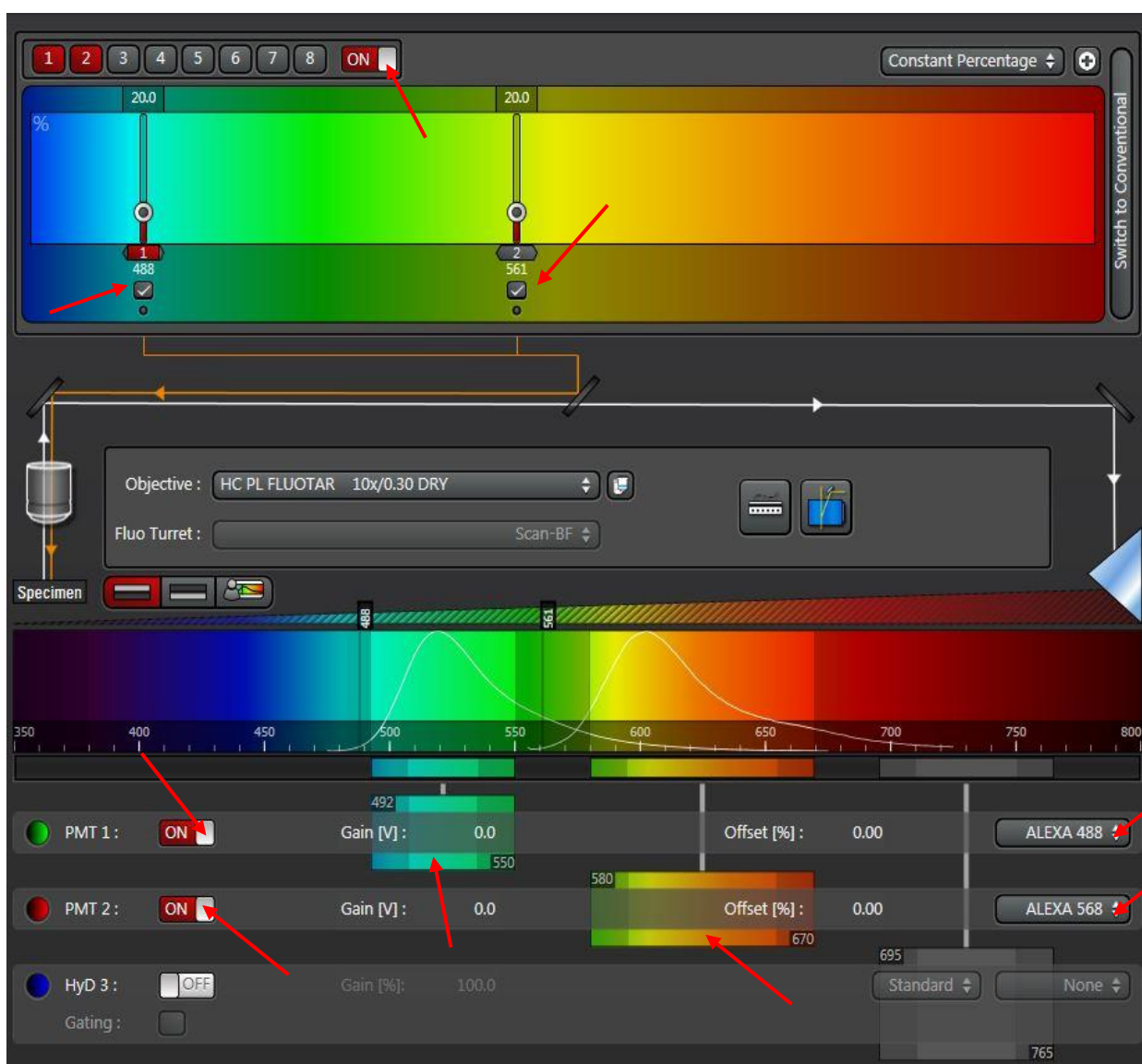
10. Renommer le fichier et sauvegarder le répertoire (voir p20).

## ACQUERIR PLUSIEURS COULEURS SIMULTANEMENT (Avec ou sans série Z)

1. Disposer la lame sur le microscope, faire la mise au point et choisir un champ.
2. Remettre droite la tête du microscope
3. Fermer le shutter de fluorescence.
4. Lancer le scan en cliquant sur le bouton *Live* (en bas d'écran).



5. Procéder de la même façon que pour un simple marquage : créer une configuration dans laquelle les raies lasers utiles sont activées, et activer autant de PMTs nécessaires.



6. Pour chacun des PMTs, ajuster le gain et l'offset de manière à obtenir quelques pixels bleus (saturation) sur la zone d'intérêt de l'image et des pixels verts à l'extérieur de votre échantillon (absence de signal).

Attention à vérifier les éventuels débordements d'un canal dans l'autre :

Exemple d'un co-marquage Alexa488 + Alexa568 : Excitation à 488 nm (pour l'A488) et à 561 nm (pour l'A568), acquisition de l'image de l'A488 dans le PMT1 et de l'image de l'A568 dans le PMT2.

1. Au niveau de l'AOTF WLL, mettre à 0% la raie possédant la longueur d'onde la plus grande (ici 561 nm) en laissant les 2 PMTs activés.

2. En mode *Live* faire les réglages pour le marquage A488 (PMT1) : puissance laser minimum, gain et offset, de façon à ce qu'il n'y ait pas de débordement dans le PMT2.

3. S'il subsiste une image de l'A488 dans le PMT2, plusieurs possibilités combinables :

- Diminuer la puissance laser de la raie à 488nm
- Diminuer le gain du PMT2 jusqu'à disparition du signal A488.
- Eloigner de la raie à 561nm la borne gauche de la fenêtre spectrale du PMT2

4. Activer la raie à 561 nm et modifier son intensité de façon à obtenir une image dans le PMT2, sans augmenter le gain du PMT2.

S'il est impossible de supprimer les débordements, vous devez obligatoirement travailler en mode séquentiel (voir page 12)

N'hésitez pas à demander conseil aux ingénieurs de la plate-forme !!

5. Modifier le zoom et le format d'image de façon à échantillonner correctement l'image (voir page 17)

7. Appliquer un average.



8. Eventuellement, enregistrer les positions de début et de fin d'une série Z ainsi que le nombre de sections (voir page 18)

9. Lancer l'acquisition avec *Capture image* pour un seul plan ou *Start* pour une série Z.



10. Renommer le fichier et sauver le répertoire (voir page 20).

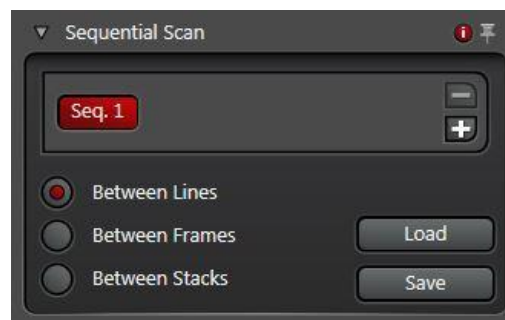
## ACQUERIR PLUSIEURS MARQUAGES SEQUENTIELLEMENT (Avec ou sans série Z)

1. Disposer la lame sur le microscope, faire la mise au point et choisir un champ.
2. Remettre droite la tête du microscope
3. Fermer le shutter de fluorescence.

4. Cliquer sur l'icône Seq.



Un bloc *Sequential Scan* s'ouvre. Par défaut, il n'y a qu'une seule séquence de scan créée.



5. Pour paramétrer correctement une acquisition séquentielle :
  - activer toutes les raies laser et tous les PMTs utiles. Positionner également les bandes passantes de chaque PMT.
  - Ajouter une nouvelle séquence en cliquant sur le bouton +, la séquence précédente servira alors de modèle à la nouvelle. Ajouter autant de séquence que nécessaire.



- Cliquer sur *Seq.1* et désactiver ce qui est inutile à la 1<sup>ère</sup> séquence.
- Passer sur le *Seq.2*, et désactiver/activer les lasers/PMTs utiles à la *Seq.2*
- Procéder ainsi pour chaque séquence de scan.

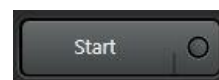
En procédant ainsi, les bandes passantes des PMTs sont positionnées de façon identique dans toutes les séquences. L'acquisition sera plus rapide puisque qu'elle ne nécessitera pas de modifier la position des fentes spectrales.

6. Choisir le mode d'acquisition le plus approprié entre les modes suivant :
- Between lines : pour acquérir une ligne avec une macro, puis la même ligne avec une autre macro avant de passer à la ligne suivante. **Dans ce mode, les fenêtres spectrales de toutes les macros doivent être identiques. A n'utiliser seulement qu'en vivant !**
  - Between frames : pour acquérir un plan, ou un plan d'un stack avec les différentes macros avant de passer au plan suivant. Mode conseillé pour l'acquisition de séries Z en vue d'une étude de colocalisation.
  - Between stacks : pour acquérir un stack entier avec une macro, puis le même stack avec une autre macro.
7. Faire les réglages de dynamique pour chaque séquence de scan, en prenant soin de les réaliser dans le plan le plus intense si vous faites l'acquisition d'une série Z (*Live* en bas d'écran).
8. Eventuellement, paramétrer une série Z (voir page 9).
10. Modifier le zoom et le format d'image de façon à échantillonner correctement l'image (voir page 17)

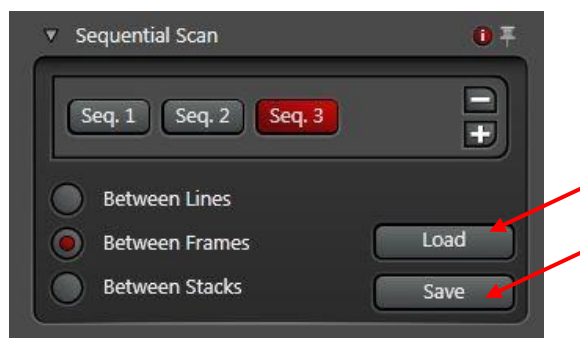
11. Appliquer un average.



9. Lancer l'acquisition en cliquant sur le bouton *Start*.



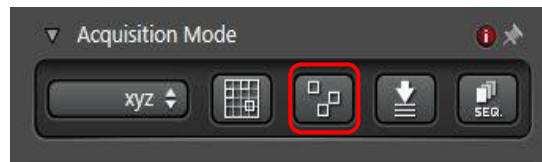
10. Pour sauvegarder les paramètres d'acquisition séquentielle, cliquer sur *Save*. Ces paramètres peuvent rechargés en cliquant sur *Load*.



## ACQUERIR PLUSIEURS POSITIONS DE PLATINE

N.B : La platine XY motorisée doit être initialisée au lancement du logiciel pour pouvoir effectuer ce type d'acquisition.

1. Cliquer sur l'icône « Mark and Find ».



2. La fenêtre Mark & Find apparaît :

1. Loader des positions sauvegardées
2. Enregistrer les positions créées
3. Ajout d'une position
4. Suppression de la position sélectionnée
5. Suppression de toutes les positions
6. Remplacement d'une position
7. Accès aux paramètres de calibration
8. Liste des positions enregistrées



3. Chercher un champ d'intérêt, se placer dans le bon plan, puis cliquer sur



4. Recommencer de la même façon pour enregistrer toutes les positions.

REMARQUE : Pour acquérir une série Z pour chaque position, il y a 2 possibilités :

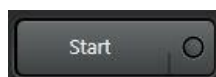
- **Acquérir la même série Z pour toutes les positions.** Dans ce cas :

- a). Cocher la case *Same stack for all*
- b). Définir les conditions de la série Z : *Begin, End* (ou *Z Around Current*) et *Z step size*
- c). Enregistrer toutes les positions

- **Acquérir une série Z différente pour chaque position.** Dans ce cas :

- a). Décocher la case *Same stack for all*
- a). Se placer sur la 1<sup>ère</sup> position.
- b). Définir les conditions d'acquisition de la série Z : *Begin, End* (ou *Z Around Current*) et *Z step size*
- c). Enregistrer la position.
- d). Recommencer de façon identique pour toutes les positions à enregistrer.

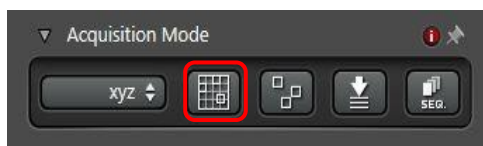
5. Lancer l'acquisition en cliquant sur *Start*



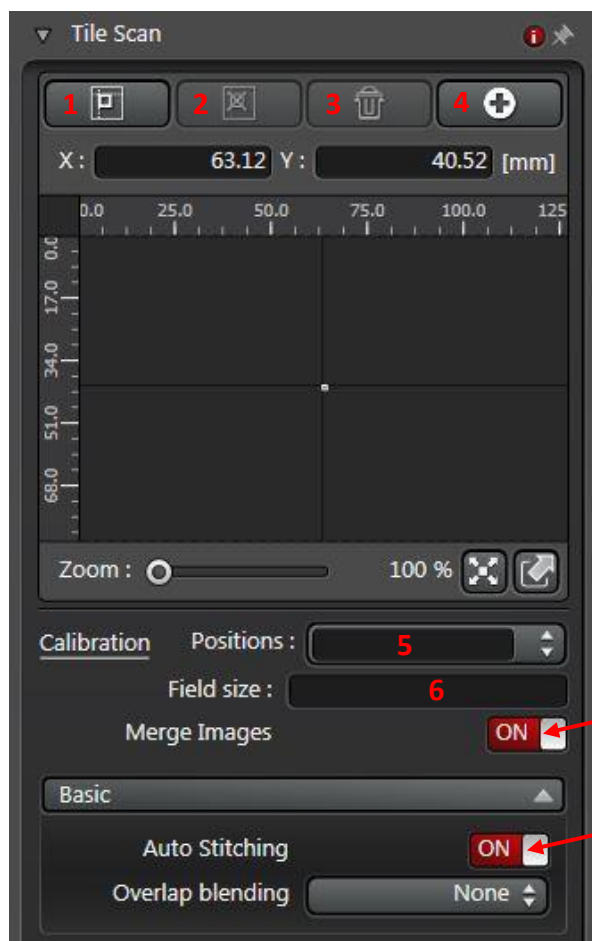
## ACQUERIR UNE MOSAÏQUE D'IMAGES

N.B : La platine XY motorisée doit être initialisée au lancement du logiciel pour pouvoir effectuer ce type d'acquisition.

1. Cliquer sur l'icône *Tile Scan*.



2. La fenêtre suivante apparaît :



1. Enregistrement d'une position
2. Suppression de la position sélectionnée
3. Suppression de toutes les positions
4. Accès aux paramètres de calibration
5. Visualisation des positions enregistrées
6. Taille du champ scanné (en nb d'images)

Activer les options *Merge Images* et *Auto-Stitching*

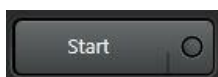
L'acquisition d'une image mosaïque se fait en enregistrant la position du coin « supérieur gauche » puis la position du coin « inférieur droit ». Le logiciel calcule automatiquement le nombre d'images à effectuer pour scanner tout le champ.

3. Chercher un champ d'intérêt, se placer dans le bon plan, puis définir la position de début de mosaïque en cliquant sur



4. Procéder de la même façon pour enregistrer la position de fin de mosaïque.

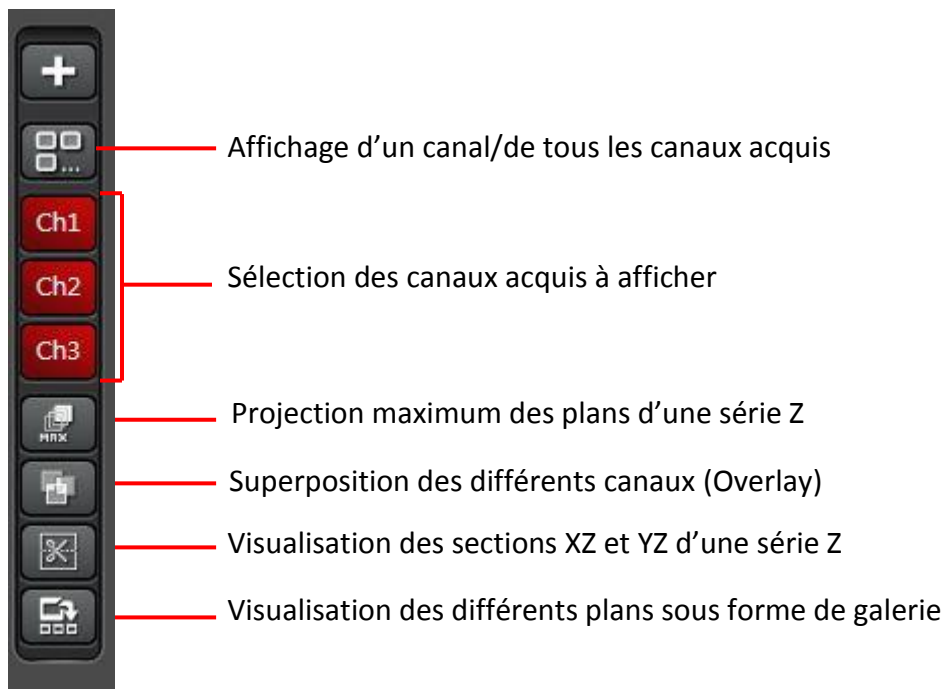
5. Lancer l'acquisition en cliquant sur Start.





## VISUALISATION DES IMAGES ACQUISES

A droite de l'image, différents icônes vous permettent d'accéder aux différents modes de visualisation de vos datas.



## ECHANTILLONNAGE SPATIAL

- **Echantillonnage latéral :**

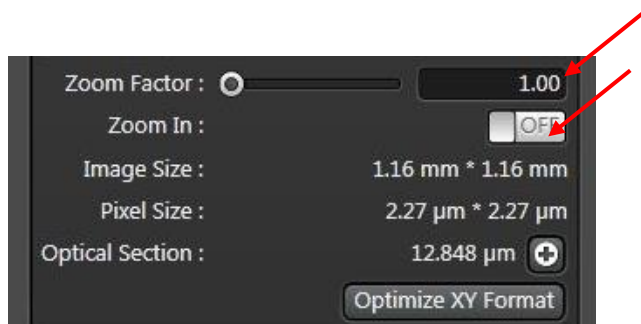
Pour que vos images soient bien échantillonnées, la taille du pixel de l'image doit être égale à la moitié de la résolution en XY de l'objectif utilisé (critère de Nyquist).

Par exemple au 63x, et pour un fluorochrome du type GFP, la résolution latérale théorique de l'objectif est de 180 nm. Une image bien échantillonnée doit donc avoir des pixels de 90 nm. Au-dessus de cette valeur, l'image est sous-échantillonnée ; en dessous, elle est sur-échantillonnée.

Pour modifier la taille des pixels dans l'image, il faut **modifier le zoom** et/ou **le format de l'image**.

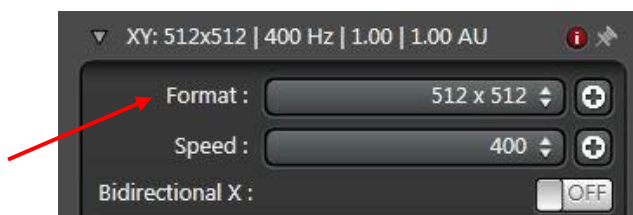
**Pour faire un zoom**, 3 possibilités :

- \* Appliquer le zoom souhaité en faisant varier le *Zoom factor*
- \* Activer le *Zoom in*, et dessiner la zone à zoomer sur l'image.
- \* Zoomer en utilisant le bouton *Zoom*



**Pour modifier le format de l'image :**

Dans le menu déroulant *Format*, sélectionner une taille d'image plus grande (1024\*1024, ...)



**Astuce :**

L'échantillonnage latéral dépend du nombre de pixels sur 1 ligne. Pour gagner en résolution sans perdre en rapidité d'acquisition, il faut augmenter le nombre de pixel en X et conserver le même nombre de pixel en Y. Ainsi, pour une même résolution, une image 1024\*1024 sera acquise en 2.578 sec et une image 1024\*512 en 1.293 sec.

- **Echantillonnage axial :**

De la même façon, lorsque vous effectuez une série Z, l'intervalle entre 2 coupes optiques doit être fixé en fonction de la résolution axiale théorique de l'objectif.

Selon le critère de Nyquist, l'intervalle entre 2 coupes doit être égal à la moitié de la résolution en XZ de l'objectif utilisé.

Par exemple au 63x, et pour un fluorochrome du type GFP, la résolution axiale théorique de l'objectif est de 640nm. L'intervalle optimum entre 2 coupes optiques est donc de 320 nm. Au-dessus de cette valeur, le volume est sous-échantillonné ; en dessous, il est sur-échantillonné.

En cas de demande de visualisation 3D, il est indispensable de se placer aux échantillonnages latéral et axial optimums.

**Vous trouverez les valeurs idéales de taille des pixels et d'intervalle entre 2 coupes optiques dans le tableau affiché dans la pièce du confocal.**

N'hésitez pas à demander conseil aux ingénieurs de la plate-forme !!

## POUR ACQUERIR PLUS VITE

### Mode bidirectionnel :

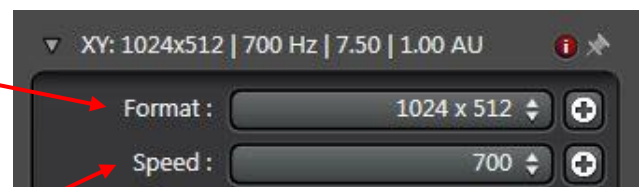
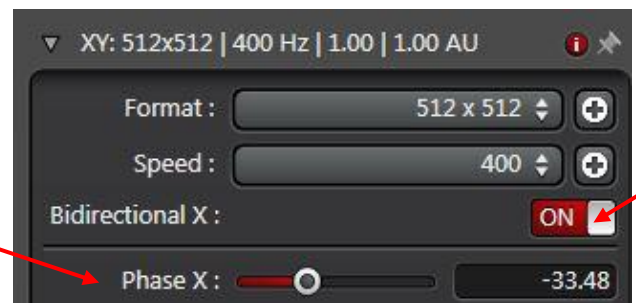
1. Activer le mode bidirectionnel.
2. Vérifier en *Live* que la *Phase* soit bien réglée

### Modifier le format d'image :

La vitesse d'acquisition d'une image dépend du nombre de lignes qu'elle contient. Pour gagner en vitesse sans perdre en résolution, il faut diminuer le nombre de ligne (Y) et conserver le même nombre de pixel en X.

### Augmenter la vitesse de balayage :

La vitesse indiquée dans *Speed* correspond au nombre de lignes scannées en 1 seconde. Cette vitesse peut être augmentée sans perte de signal, toutefois, un zoom est automatiquement appliqué pour des vitesses supérieures ou égales à 700 Hz.



## QUANTIFICATION DE SIGNAL

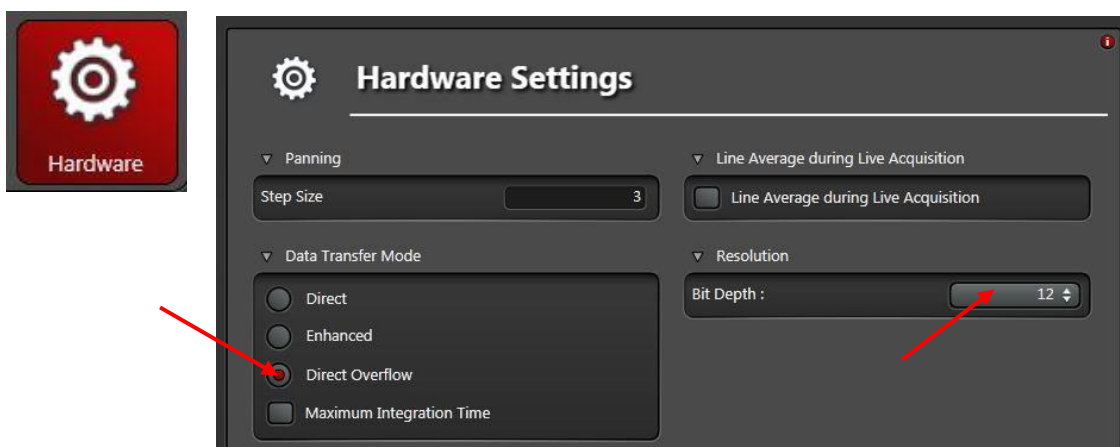
Pour quantifier un signal de fluorescence, les différentes conditions d'expérience doivent être acquises avec les mêmes conditions d'acquisition (même puissance laser, même gain et Offset).

Dans la mesure du possible, les conditions d'acquisition doivent être paramétrées sur l'échantillon dont le signal de fluorescence est le plus intense. De cette façon, les autres échantillons n'atteindront pas la saturation.

Attention, avant de réaliser les acquisitions, il faut :

Dans le menu Configuration/Hardware Settings/Resolution, sélectionner « 12bits » dans le menu déroulant.

Dans le menu Configuration/ Hardware Settings /Data Transfert Mode, sélectionner « Direct Overflow »



Régler les conditions d'acquisition (Gain, Offset et puissance laser), voir page 8.

Sans modifier les conditions d'acquisition, passer tous les échantillons.

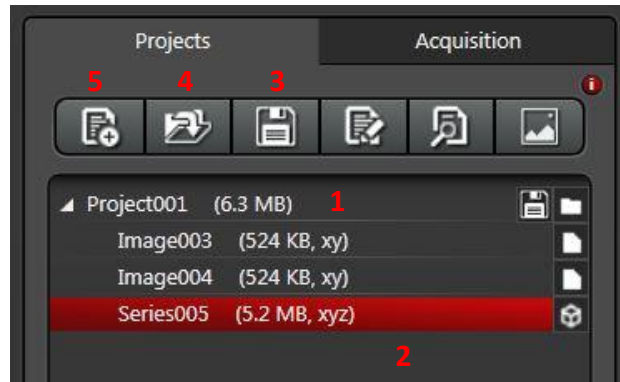
**N'hésitez pas à demander conseil aux ingénieurs de la plate-forme !!**

## GESTION DES IMAGES

La fenêtre de gestion des images se trouve dans l'onglet *Projects* situé sur l'écran de gauche.

A chaque fois que vous effectuez une acquisition d'une série Z ou d'une image, le logiciel l'indique dans cette fenêtre.

Un dossier *Project001* est créé automatiquement à l'ouverture du logiciel, dans lequel seront mises les images acquises.



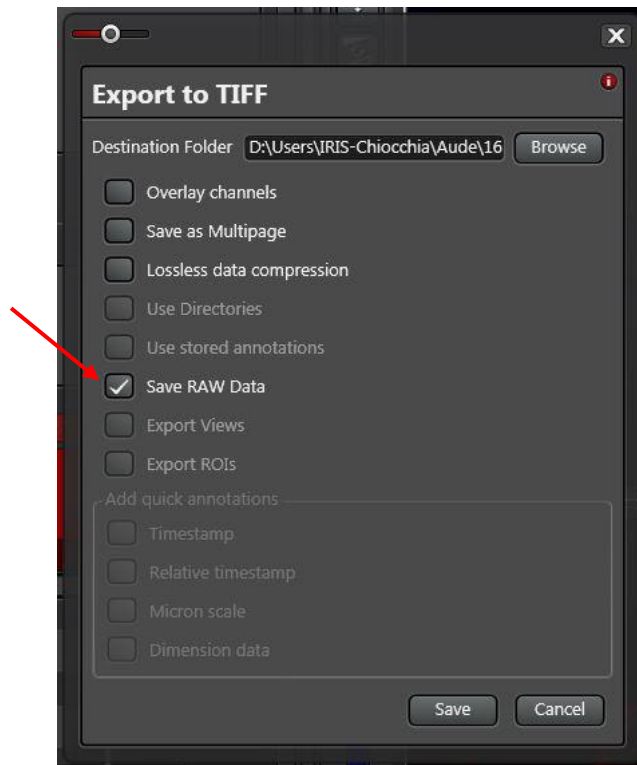
1. Renommer le projet (clic droit, *Rename*)
2. Renommer les images (clic droit, *Rename*)
3. Cliquer sur l'icône *Save*.  
La première fois que le projet est sauvé, une boîte de dialogue "*Save as*" s'affiche.
  - Remonter dans l'arborescence : D:\Users\Année\Mois\Jour\Dossier à votre nom
  - Valider en cliquant sur *Save*Pour sauver toutes les autres images réalisées par la suite, les renommer, et cliquer sur l'icône *Save*. Une fois sauvé, la disquette disparaît à côté du nom du projet
4. Pour ouvrir un dossier déjà existant : cliquer sur l'icône *Open*.
5. Pour créer un nouveau dossier, cliquer sur l'icône *New*. Il est conseillé de créer un *Project* par condition d'expérience

## EXPORT DES IMAGES EN .TIFF

Le dossier *Project* est sauvegardé en format .lif. Ce format d'image est utilisable sous Fiji ou ImageJ.

Pour récupérer les données en format .tif, il faut les exporter. Pour cela, faire un clic droit sur le dossier à exporter puis sélectionner *Export "..."/ As Tiff...*

Dans la fenêtre *Export to TIFF*, cocher *Save RAW Data*.



NB :

- Il est fortement conseillé de conserver les dossiers en .lif afin de pouvoir accéder aux paramètres d'acquisition ultérieurement.

## MISE HORS TENSION DU SYSTEME

Vérifier sur le planning en ligne si le système est réservé après votre session.

• **Si le système est réservé après votre séance ou dans les 2h qui suivent, vous ne devez pas l'éteindre complètement, mais procéder de la façon suivante :**

1. Vérifier que toutes les données sont bien sauvegardées
2. Fermer le logiciel LAS AF (menu *File* → *Exit*).
3. Transférer ou graver les données et les supprimer du disque dur.
4. Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).
5. **Baisser les objectifs.**

• **Si le système n'est pas utilisé après vous, vous devez l'éteindre complètement.**

1. Vérifier que toutes les données sont bien sauvegardées
2. Eteindre les lasers (Menu *Configuration* → *Laser*) : décocher tous les lasers allumés
3. Fermer l'application LAS AF (menu *File* → *Exit*).
4. Eteindre l'ordinateur (sélectionner dans la barre d'outils *Start* → *Shutdown*)
5. Mettre les lasers hors tension (au niveau du poste de commande, remettre la clef *Laser Emission* sur Off).
6. Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés).
7. **Baisser les objectifs.**
8. Eteindre la station de travail TCS (bouton vert *PC Microscope*).
9. Eteindre la tête confocale (bouton vert *Scanner Power*)
10. Eteindre la lampe à fluorescence.