

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce document décrit les modes opératoires pour vérifier et entretenir les équipements de microscopie photonique de la PF d'imagerie TRI.

SUIVI DES MODIFICATIONS

Date	Indice	Nature modification
15.02.09	01	Création
21.07.10	02	Verification <i>a minima</i>
06.01.14	03	Modification suite reunion metrologie
01.07.14	04	Integration maintenance spectroscopie fluo

Rédigé par : A.Le Ru 	Validé par: C.Pouzet 
---	---

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

SOMMAIRE

A- MICROSCOPIE FLUO

A.1. Vérification calibration :

- a. Calibration Surplatine Z
 - α . Calibration surplatine Z / piezzo
 - β . reproductibilité du déplacement en Z
- b. Alignement du système par psf et calcul des résolutions latérale et axiale pour comparaison avec l'année de référence.
- c. Alignement couleur (laser et filtres de fluorescence)
 - α . Monophoton
 - β . Multiphoton sur laser continu
- d. Comparaison de facteur de zoom
- e. Homogénéité du champ
- f. Vérification AOTF 01
- g. Intensité de laser

A.2. Maintenance :

- a. Préventive :
 - α - Remplacement et remplissage du réservoir d'eau du laser multiphoton
 - β - Nettoyage système :
 - Nettoyage lentille frontale caméra
 - Nettoyage statif et environnement de travail
 - δ - Changement lampe :
 - Lampe EL6000
 - Lampe à vapeur de mercure
 - ε - Alignement des pinholes
 - ξ - Alignement du miroir de scan
- b. Curative

B. SPECTROSCOPIE FLUO

B.1. Vérification /calibration :

- a. spectrophotometre
- b. spectrofluorimetre
- c. durée de vie
- d. anisotropie

B.2. Maintenance :

- a. Nettoyage des systemes
- b. Changement lampes

	Mode Opératoire	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

A. MICROSCOPIE FLUO

1. Vérification calibration :

Cf *tableau fréquence maintenance photonique* pour la liste des vérifications et entretien à effectuer a minima en fonction des équipements. La réalisation d'éventuels tests supplémentaires pour certains matériels sont à la discrétion des responsables de ces matériels

Analyse des images sous ImageJ (national Institute of Health,USA,
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

Echantillonnage :

Les valeurs d'échantillonnage optimaux correspondent à 1/ 2,3 fois les valeurs de résolutions calculées d'après le théorème de Nyquist soit :

pour les microscopes confocaux :

$$XY = \frac{0.46 \times \lambda_{em}}{ON \times 2,3}$$

$$Z = \frac{1.4 \times \lambda_{em} \times n \text{ milieu d'immersion}}{ON^2 \times 2,3}$$

Pour les microscopes champ large :

$$XY = \frac{0.61 \times \lambda_{em}}{ON \times 2,3}$$

$$Z = \frac{2 \times \lambda_{em} \times n \text{ milieu d'immersion}}{ON^2 \times 2,3}$$

n air :1

n glycérol: 1.473

n oil: 1.518

n eau: 1.33

Références matériel :

Tetraspeck, diamètre 0.1 μm , T7284 ou T -7279, Molecular Probes

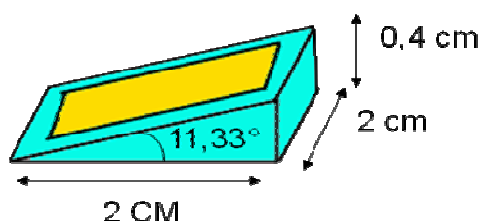
Billes PS-Speck, diamètre 0.17 μm , P7220, Molecular Probes.

Bille Focal Check, diamètre 15 μm , F7220, Molecular Probes.

Calibration Surplatine Z

α . Calibration Surplatine Z

Mode opératoire: cf ppt de Brice **encore en cours de test.**

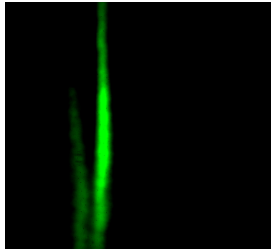


- Platine calibrée en XY

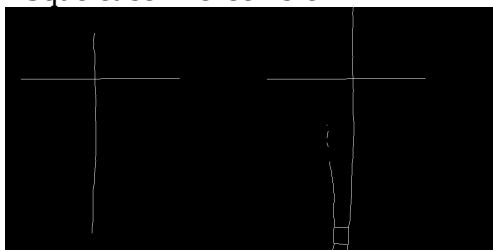
- Se mettre sur un laser en réflexion

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

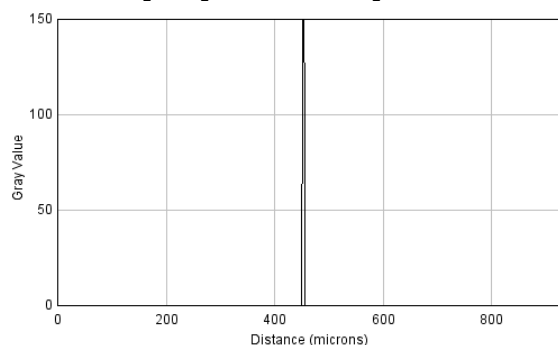
- Acquisition d'un stack Z pas définie par la machine
- Sur le Stack obtenu dans imageJ



- Seuillez pour obtenir un masque binaire
- Remplissez les trous
- Squeletisez l'ensemble



- Faire un plot profile sur la position 1 et sur la dernière



- Mesurez la distance entre la première et la dernière ligne du stack
- Distance entre les deux lignes de 75 µm

Angle de 11,33 °

$\tan(11,33) = X(\text{déplacement en Z}) / \text{distance}$

$X = \text{distance} \times \tan(11,33^\circ) = 15,02 \text{ µm}$ parcouru (au lieu de 16 µm)

78 slices demandé avec un pas de 0.2 µm

Soit $15,02/77 = 0.195$ de pas de déplacement erreur de 0.195-0.209 soit 13 nm (tolérance constructeur 17-20 nm)

β. Reproductibilité du déplacement en Z

- Avec lame micrométrique, en configuration « réflexion ». Acquisition timelapse d'un champ de lame micrométrique pendant 10 minutes sans average, en limite de saturation, à fort objectif.
- Projection par maximum d'intensité du stack et comparaison avec image d'origine pour voir s'il existe un déplacement des lignes de l'image correspondant à un déplacement en XY de la platine ou un élargissement des lignes de l'image correspondant à une perte de focus.

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

Dérive en XY = $0 \pm$ résolution latéral

Dérive en Z : largeur de la ligne = $0 \pm$ résolution latéral

Alignement du système par psf et calcul des résolutions latérale et axiale pour comparaison avec l'année de référence.

Cf documentation plugin metroloJ/ Chapter 2 : Generate PSF report

Analyse par plugin metroloJ du freeware ImageJ (national Institute of Health,USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

- psf pour observation de la forme de la psf
- calcul de la résolution et comparaison / à l'année précédente

Valeur : la dérive doit être <10% sinon entrer en contact avec le SAV

Année de référence pour les psf : réaliser la mesure juste après la visite de maintenance préventive.

Seuil de validation : $psf < 2 \times$ valeur théorique

Alignement couleur (laser et filtres de fluorescence)

Monophoton :

- Acquisition séquentielle vert-rouge-rouge lointain d'un plan sur une bille Focal Check, au diamètre maximum avec le plus grand objectif apochromatique et à l'échantillonnage axial optimal.
- Détermination du centre de masse de chaque bille
- Comparaison des coordonnées de ces 3 cercles

Validation : la distance entre les différents centres de masse doit être inférieure à l'échantillonnage latéral de la résolution réelle mesurée

OU

Cf documentation plugin metroloJ/ Chapter 3 : Generate co-alignement report

Analyse par plugin metroloJ du freeware ImageJ (national Institute of Health,USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

Multiphoton sur laser continu :

Mise en place de la mire, vérification du centrage des lasers continus et biphoton

OU

- Allumage des lasers continus et biphotos
- Mise en place d'un miroir sur le support d'échantillon
- Réflexion des lasers continus et biphoton en même temps sur miroir
- Comparaison de la position des faisceaux continus et biphoton sur l'écran.

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

OU

Analyseur de faisceau

Comparaison de facteur de zoom

- Acquisition d'image de lame micrométrique pour comparer le champ couvert par un objectif.
- Faire l'image au plus petit et au plus grand objectif, zoom 1, format 512 X 512 pixels.
- Mesurer en micron la taille de l'image
- Comparer avec les valeurs données par le logiciel.
- Refaire le test en zoom 3.

Validation : valeur donnée par le logiciel = valeur mesurée au pixel près.

Homogénéité du champ

- Utiliser solution fluorescente « stabilo » mélangé à l'alcool.
- Acquisition d'une image plein champ à tous les objectifs plans, en limite de saturation.
- Traçage d'une ligne diagonale sur l'image et observation des valeurs d'intensité (plot profile).

Validation : détermination de la taille de champ pour laquelle écart entre maxima et minima <15%

Vérification AOTF

- Acquisition timelapse d'un champ sur une lame de calibration de fluorescence ou un miroir avec des objectif plan et à tous les objectifs pendant 10 minutes sans average au plus petit objectif, en limite de saturation.
- Recherche des intensités minimum et maximum de l'image dans le timelapse.

La variation entre le maxima et le minima de l'intensité moyenne des images doit être inférieure à 8% (données constructeur).

Intensité de laser

- Acquisition d'une image plein champ au plus faible objectif, en limite de saturation format 512 X 512 pixels, vitesse de scan de 400Hz, avec tous les PMT, à un % d'intensité de laser fixe.
- Comparaison de la valeur de chaque PMT nécessaire pour faire arriver en limite de saturation sur les images avec les valeurs de PMT des tests précédents pour vérifier qu'il n'y ait pas de déclinaison de l'intensité des lasers au cours du temps.

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

La déclinaison ne doit pas dépasser 15%.

OU

Mesure de l'intensité de chaque laser au puissance-mètre **en sortie objectif** intensité d'excitation du laser de 50%.

- Comparaison des valeurs entre plusieurs maintenances.

La déclinaison ne doit pas dépasser 15%.

2. Maintenance :

a. Préventive :

Réalisée dans le cadre d'un contrat de maintenance ou par le personnel PF
(cf *tableau fréquence maintenance photonique*)

α- Remplacement et remplissage du réservoir d'eau du laser multiphoton

- Extinction du chiller et de l'alimentation du laser multiphoton
- Ouvrir le robinet pour récupérer l'eau du réservoir dans un récipient
- Fermer le robinet
- Retirer le bouchon du réservoir
- Remplir le réservoir avec de l'eau du robinet (eau distillée déconseillée)
- Allumer le chiller et l'alimentation du laser multiphoton

β- Nettoyage système :

Nettoyage lentille frontale caméra

- Extinction caméra
- Dévissage de la vis de fixation de la caméra au statif du microscope
- Retrait de la caméra
- Dévisage de la monture C
- Dépoussiérage de la lentille par soufflage grâce à une bombe d'air comprimée
- Remontage de la monture C, mise en place et fixation de la caméra sur le statif allumage caméra, acquisition de contrôle
- Si insuffisant nettoyage de la lentille frontale de la caméra par passage d'un papier optique du centre de la lentille vers le bord
- Remontage et contrôle
- Si insuffisant nettoyage de la lentille frontale de la caméra par passage d'un papier optique imbibé d'eau distillée du centre de la lentille vers le bord
- Remontage de la monture C, mise en place et fixation de la caméra sur le statif allumage caméra, acquisition de contrôle.

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

Nettoyage statif et environnement de travail

Passage d'un papier absorbant imbibé d'éthanol 70° sur le statif pour retirer les traces d'huile

δ- Changement lampe :

Lampe EL6000

Remplacement toutes les 1000 ou 1500 heures d'utilisation.

Cf la notice d'installation du fournisseur de la lampe

Le remplacement ne doit être fait que sur un système froid et avec des gants

Le système doit être débranché

Lampe à vapeur de mercure

Remplacement entre 300 et 400 heures.

Le remplacement ne doit être fait que sur un système froid et avec des gants

Le système doit être débranché

Se référer au manuel constructeur du microscope selon la puissance de la lampe (103W ou 50W).

ε- Alignement des pinholes

Alignement toutes les 300h.

Se référer au manuel constructeur du microscope (Zeiss...)

ξ- Alignement du miroir de scan

Aligner le miroir de scan dans le module « maintenant » et « scan mirror »

Cliquer sur Align.

b. Curative :

Suite à un dysfonctionnement, contacter le SAV. Les coordonnées et contact SAV sont sur les fiches matériels.

Enregistrement du suivi sur fiche anomalie.

Intervention dans le cadre de contrat de maintenance ou non

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

B. SPECTROSCOPIE :

B1. Vérification / calibration :

1.1. Spectrophotomètre

Calibration en intensité et en longueur d'onde

L'appareil possède ces systèmes de calibration en interne

Les procédures de calibration sont décrites dans le manuel, pages 36-37, section 2.2.6

2.2.6 Correction de la longueur d'ondes et correction standard des spectrophotomètres à balayage

1.2. Spectrofluorimètre

Calibration du pointé en longueur d'onde à l'émission

Utilisation d'une lampe à vapeurs de mercure basse pression positionnée dans le support échantillon. Mesure du spectre d'émission de la lampe et comparaison aux données fabricant.



1.3. Durée de vie

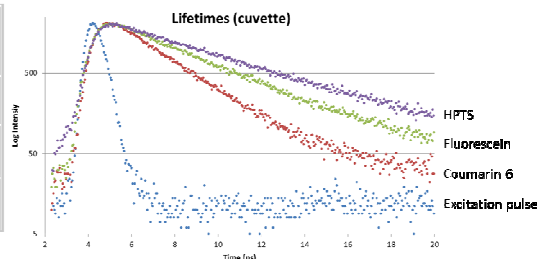
Mesures de composés standards de durée de vie connue

Anal. Chem. 2007, 79, 2137–2149

Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy

Fluorophore	Lifetime [ns]	Solvent	Excitation max [nm]	Emission max [nm]
Coumarin 6	2.5	Ethanol	460	505
Fluorescein	4.0	PR pH 7.5	495	517
HPTS	5.4	PB pH 7.8	454	511

From ISS website



1.4. Anisotropie

Mesure de la rampe de température

	Mode Opérateur	Indice : 04
	Maintenance Photonique	

Un thermomètre digital (Omaga avec sonde plongeante) est placé dans une cuve remplie d'eau (avec le couvercle usiné pour cette mesure) et la température de consigne logiciel est comparée à la température effectivement lue.

B2. Maintenance :

2.1. Nettoyage systèmes :

S'applique à tous les appareils

- Nettoyage compartiment échantillon
- Remplacement liquide bain thermostaté
- Suppression des fichiers temporaires de mesures

2.2. Changement lampes :

Spectrophotomètre

- Lampe Deutérium à remplacer à 20000 h
- Lampe halogène à remplacer quand elle ne fonctionne plus

Spectrofluorimètre

- Lampe Xénon à remplacer toutes les 2000 h (vérifier compteur horaire)

Anisotropie

- Lampe à remplacer toutes les 200 h (vérifier compteur horaire)
- Voir manuel Leica lamp Housing EBQ 100

