

UTILISATION DU FACScan POUR L'ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE

1 Vérification des niveaux

Avant de commencer l'acquisition, vérifier que le bidon de liquide de gaine est suffisamment rempli et que la poubelle n'est pas pleine.

Pour remplir le bidon de liquide de gaine :

- Enlever la pression en poussant l'interrupteur vers le bas
- Débrancher les tuyaux qui relient le bidon à l'appareil
- Remplir le bidon avec du liquide FACSTFlow®
- Replacer le bidon et rebrancher les fils
- Remettre la pression

Si la poubelle est pleine, placer un bidon vide à la place du bidon plein.

2 Allumer le FACScan

L'indication « NOT READY » apparaît : l'appareil chauffe. Quand il est prêt, l'indication « STANDBY » apparaît.

3 Redémarrer l'ordinateur

4 Entrer le logging et le mot de passe

5 Créer un répertoire pour les données collectées

Pour les utilisateurs ayant un répertoire nominatif, choisir ce répertoire dans «*FACScan DATA*» et y créer un nouveau dossier. Ce dossier devra être nommé de la façon suivante : « NOM AAAA-MM-JJ » (le nom étant celui de la personne réalisant l'analyse).

Pour les nouveaux utilisateurs :

- Créer un répertoire personnel : dans « FACScan DATA », dans «*Fichier*» choisir «*Nouveau dossier*» et donner son nom au répertoire nouvellement créé
- Créer par la suite de la même manière dans ce répertoire personnel un répertoire qui contiendra les analyses de la journée. Ce répertoire devra être nommé de la façon suivante : « NOM AAAA-MM-JJ » (le nom étant celui de la personne réalisant l'analyse)

NB : ne pas utiliser de « / » pour écrire la date

6 Ouvrir un protocole de cycle cellulaire

Cliquer sur l'icône « *Experimental document* »

Choisir un protocole adapté selon l'analyse à réaliser (par exemple pour une étude avec l'iodure de propidium choisir «*Cycle IP*»)

7 Connecter au cytomètre

Dans le menu «*Acquire*», cliquer sur «*Connect to cytometer*»

Deux fenêtres apparaissent :

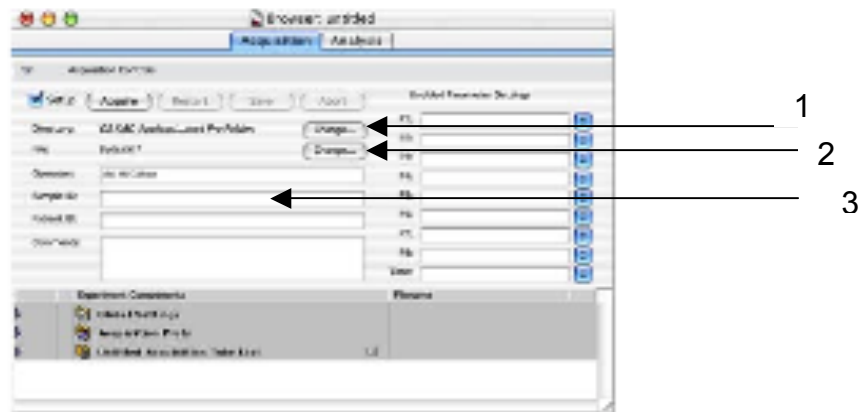
❖ "*Acquisition control*" qui sera utilisée pour lancer et arrêter l'acquisition de données

❖ "*Browser*" ; cette fenêtre permet de choisir :

⇒ l'emplacement des données sauvegardées dans le disque dur de l'ordinateur cliquer sur «*Change directory*» et choisir le répertoire créé précédemment (1)

⇒ le nom des fichiers : cliquer sur «*Change file*» et dans «*custom prefix*», écrire le nom des dossiers (par exemple :NOM AAAA-MM-JJ). Ce nom sera suivi d'un chiffre correspondant à l'ordre de passage des tubes (2)

⇒ pour donner un nom particulier à chaque échantillon, entrer le nom désiré dans le cadre «*Sample ID*» avant de passer le tube (3)



8 Préparation de l'acquisition

Cette étape représente l'ouverture de différentes fenêtres qui seront utiles pour réaliser tous les réglages du cytomètre

⇒ Dans le menu "*Cytometer*", cliquer sur:

- ❖ "Detectors/Amps" (cette fenêtre permet le réglage des voltages)
 - ❖ "Threshold" (cette fenêtre permet de fixer un seuil à partir duquel les éléments seront analysés)
- ⇒ Dans le menu "Acquire", cliquer sur "Counters" (cette fenêtre permettra de visualiser le nombre de cellules analysées)
- ⇒ Dans le menu "Acquire", cliquer sur "Acquisition and storage" pour choisir le nombre de cellules à analyser et les paramètres à sauvegarder
- Choisir le nombre d'événements à analyser en entrant ce nombre dans la case "Acquisition will stop when"
 - Cliquer sur "Parameters Saved..." et choisir les paramètres à sauver (par exemple pour un cycle cellulaire avec l'IP, choisir FL2-H, FL2-W et FL2-A)

9 Réglages du cytomètre

Pour récupérer des réglages effectués lors de précédentes acquisitions, cliquer sur "Instrument setting" dans le menu "Cytometer", cliquer sur «Open» et sélectionner le fichier correspondant au réglage désiré, les réglages changent dans la fenêtre "Instrument setting"

Cliquer sur "Set" pour appliquer ces réglages à l'analyse du jour. Les réglages apparaissent dans les différentes fenêtres ("Treshold", "Detector amp" et "Compensation").

Cliquer sur "Done" pour fermer la fenêtre «Instrument setting»

Pour effectuer de nouveaux réglages :

9.1 Réglage du seuil

Pour l'étude du cycle cellulaire avec l'IP, on applique le seuil à FL2 (cocher la case FL2-H dans la fenêtre «Threshold»)

9.2 Réglages des voltages

Dans la fenêtre «Detectors /Amps»:

Cocher la case «DDM» en bas de la fenêtre

Sélectionner le paramètre du cycle cellulaire dans «DDM param.» : FL2 pour IP

Pour du cycle cellulaire, tous les paramètres sont observés en mode linéaire (vérifier que ce réglage est correct)

Pour effectuer les réglages, cocher la case "setup" de la fenêtre "Acquisition control" et passer les cellules en vitesse lente (bouton sur "LO " sur le cytomètre)

Passer du mode "STANDBY" à "RUN"

Placer le tube contrôle  **Bien «vortexer» avant de passer chaque tube**

Régler le voltage *FL2* (pour l'IP) de manière à ce que la population de cellules se trouve dans l'échelle du *Dot plot*

Replacer le cadre de la région autour de la population pour observer cette dernière au niveau de l'histogramme


Pour enregistrer le contrôle, cliquer sur "Pause" puis "Abort" dans la fenêtre "Acquisition control". Décocher "Setup" et cliquer sur "Acquire"

Passer en vitesse rapide (position "HI" bouton sur le cytomètre)

10 Acquisition

Vérifier que la case "Setup" n'est pas cochée pour permettre l'enregistrement

Pour donner un nom à l'échantillon, écrire ce nom dans la case "Sample ID" de la fenêtre "Browser"

Placer le tube à analyser et cliquer sur "Acquire"  **Bien «vortexer» avant de passer chaque tube**

L'acquisition s'arrête automatiquement une fois que le nombre d'événements choisi a été analysé

Opérer de même pour chaque tube

11 Quitter CellQuest

Fermer toutes les fenêtres

En fermant la page «*Experimental document*», une fenêtre de sauvegarde apparaît, choisir «*Don't save*»

12 Arrêt de l'appareil

Passer un tube contenant de la javel pendant 10 minutes

Passer un tube contenant de l'eau pendant 10 minutes (ne pas enlever ce tube à la fin de la manipulation)

Tourner le bouton du cytomètre sur "Standby"

Déconnecter le compte utilisateur (Dans «*My Program*» choisir «*Quit My program*»)

Si personne d'autre ne doit se servir du cytomètre, éteindre ce dernier, sinon, laisser en "Standby"

Remplir le réservoir de FACSFlo (cf. 1/)

Remarque : S'il est impossible d'effectuer les réglages, il s'agit d'une mauvaise communication entre l'ordinateur et le cytomètre. Dans ce cas là, éteindre et redémarrer tout.