

UTILISATION DU FACScan

Pour un réglage correct de l'appareil, différents tubes sont nécessaires en plus des échantillons à analyser :

- un tube contrôle de cellules non marquées (pour régler la sensibilité en fonction du bruit de fond)
- à partir de deux fluorescences, un tube simplement marqué pour chaque fluorescence (réglage des compensations)

1. VERIFICATION 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 FACFlow®
- 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. REDEMARRER L'ORDINATEUR

4. ENTRER LE LOGGING ET LE MOT DE PASSE

5. CREER UN REPERTOIRE POUR LES DONNEES COLLECTEES

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 CELLQUEST

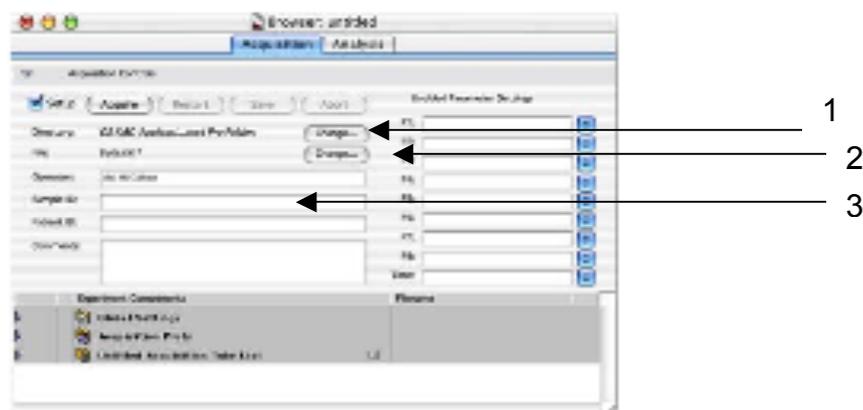
- *Pour ouvrir un protocole existant:*
BD application/CellQuestPro Folder/Samples Files puis choisir le protocole
- *Pour réaliser un nouveau protocole:*
Double cliquer sur l'icône CellQuest : une page vierge "untitled experimental document" apparaît.

7. CONNEXION AU CYTOMETRE

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)
(Vérifier que le "Prefix" est "Custom Prefix" et que le "Suffix" est "File count")
 - pour donner un nom particulier à chaque échantillon, entrer le nom désiré dans le cadre "Sample ID" avant de passer le tube (3)



8. PREPARATION 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)
 - ❖ "Compensation" (cette fenêtre permet le réglage des compensations) - à ne faire apparaître que si au moins 2 fluorescences
- 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 double marquage: FSC-H, SSC-H, FL1, FL2)

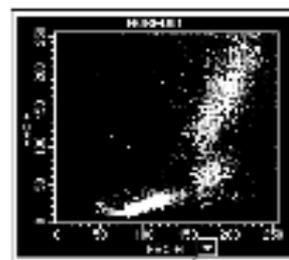
9. CREATION D'UN PROTOCOLE

- Créer un *Dot Plot* SSC/FSC en utilisant l'icône "Dot Plot" de la palette
- Sélectionner le *Dot Plot* en cliquant sur le cadre blanc autour de ce dernier, une fenêtre «Inspector» apparaît. Dans cette fenêtre, choisir le «Plot type» : «Acquisition»
- Pour choisir quelles données seront représentées en abscisse ou en ordonnée, cliquer sur le nom qui apparaît en légende (ex. FSC), une liste de toutes les données apparaît, choisir la bonne
- De la même manière, créer un *Dot Plot* pour chaque combinaison de fluorescence. Par exemple, pour un triple marquage (FL1, FL2, FL3), créer un *Dot Plot* FL1/FL2, un *Dot Plot* FL2/FL3 et un *Dot Plot* FL1/FL3
- Pour un simple marquage ou pour visualiser chaque fluorescence indépendamment, créer un histogramme : cliquer sur l'icône "histogramme" de la palette puis dessiner l'histogramme à la taille voulue

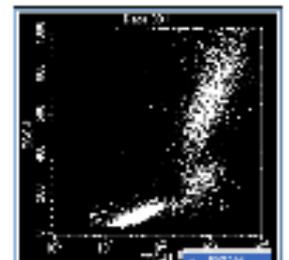
(L'histogramme représente le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence)



← Dot plot



pop-up cursor



pop-up menu



← Histogramme

10. REGLAGES DU CYTOMETRE

Avant de pouvoir collecter des données, il est nécessaire de régler différents éléments :

- ❑ les détecteurs et photomultiplicateurs
- ❑ le seuil de détection
- ❑ les compensations de fluorescence (uniquement à partir de deux fluorescences)

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 ("*Threshold*", "*Detector amp*" et "*Compensation*").

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

Pour effectuer de nouveaux réglages :

10.1. Réglage du seuil

Un seuil sera appliqué à FSC pour permettre de ne pas tenir compte des débris dans l'analyse.

Vérifier que la case "*FSC-H*" est cochée et entrer une valeur de 52. Cette valeur pourra être ajusté en fonction du type d'échantillon à analyser

10.2. Réglage des voltages

Généralement, FSC et SSC sont en mode linéaire et FL1, FL2, FL3 en mode logarithmique.

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)

Pour régler les voltages, passer du mode "*STANDBY*" à "*RUN*" puis placer le tube contrôle de cellules non marquées

⚠ Bien «vortexer» avant de passer chaque tube

Cliquer sur "*Acquire*" dans la fenêtre "*Acquisition control*" pour démarrer l'acquisition de données.

Régler les voltages de FSC et SSC de façon à ce que la population d'intérêt se trouve dans l'échelle du *Dot plot* SSC/FSC :

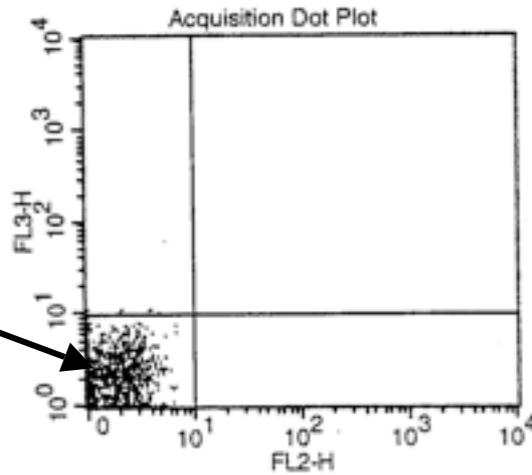
En général, FSC est réglé à E0 (pour des cellules d'environ 10µm) -(E03 est utilisé pour les plus petites cellules tandis que E-1 est utilisé pour les plus grosses cellules; E00, E01, E02 sont des réglages intermédiaires)

Si les cellules sont trop hautes, diminuer le voltage «SSC» ; au contraire, si les cellules sont trop basses, augmenter le voltage « SSC »

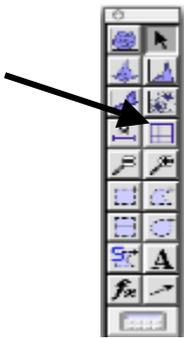
Ajuster le seuil grâce à la fenêtre "*Threshold*" pour faire disparaître du bruit de fond ou faire apparaître une population de petites cellules.

Régler les voltages de FL1, FL2, FL3 : par exemple pour un double marquage FL1/FL2, régler les voltages de façon à ce que la population (=négative) soit située

Population négative



dans le coin inférieur gauche du *Dot plot* FL1/FL2 . Si les cellules sont trop hautes ou trop à droite, diminuer le voltage de la fluorescence correspondante; au contraire, si les cellules sont "collées" à l'axe des abscisses ou des ordonnées, augmenter le voltage de la fluorescence correspondante.



Pour faire apparaître un cadran délimitant les cellules négatives des cellules positives, cliquer sur l'icône cadran de la palette puis dessiner le cadran aux dimensions voulues

Pour un simple marquage, le réglage de la fluorescence est effectué à partir de l'histogramme : passer le tube de la même manière puis régler la fluorescence de manière à ce que le pic de cellules négatives se trouve à gauche du graphique. Pour placer un curseur indiquant le seuil de négativité choisi, choisir l'icône curseur dans la palette puis dessiner le curseur à la taille désirée.



Pour enregistrer le contrôle négatif, 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)

10.3. Réglages des compensations

Par exemple pour un double marquage FL1/FL2 :

Cocher la case "Setup" de la fenêtre "Acquisition control"

Passer en vitesse lente (position "LO" bouton sur le cytomètre)

Placer le tube simplement marqué FL1  Bien «vortexer» avant de passer chaque tube

Cliquer sur "Acquire"

Cet échantillon ne devrait émettre normalement qu'un signal FL1. Si on observe une positivité en FL2, retirer un pourcentage de FL1 dans FL2 (deuxième ligne de la fenêtre "compensation") jusqu'à obtenir un signal simplement positif FL1. La population ne doit pas être "collée" à l'axe (=surcompensation), si c'est le cas, diminuer le pourcentage de FL1 retiré à FL2

Pour enregistrer l'acquisition, 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)
Cocher la case "Setup" de la fenêtre "Acquisition control"
Passer en vitesse lente (position "LO" bouton sur le cytomètre)
Placer le tube simplement marqué FL2  **Bien «vortexer» avant de passer chaque tube**
Cliquer sur "Acquire"
Cet échantillon ne devrait émettre normalement qu'un signal FL2. Si on observe une positivité FL1, retirer un pourcentage de FL1 dans FL2 (première ligne de la fenêtre "compensation") jusqu'à obtenir un signal simplement positif FL2. La population ne doit pas être "collée" à l'axe (=surcompensation), si c'est le cas, diminuer le pourcentage de FL2 retiré à FL1
Pour enregistrer l'acquisition, 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)
Rq. : Pour visualiser l'effet des réglages sur le positionnement des cellules sur le *Dot plot*, cliquer sur "Pause" puis sur "Restart" dans la fenêtre "Acquisition control")

11. 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

12. QUITTER CELLQUEST

Fermer toutes les fenêtres
En fermant la page «*Experimental document*», une fenêtre de sauvegarde apparaît ; si un nouveau protocole a été créé, choisir «Save» pour pouvoir réutiliser le protocole lors d'analyses ultérieures sinon choisir «Don't save»

13. 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"
Pour enregistrer les données sur clé USB, insérer la clé, faire glisser le dossier du jour depuis l'ordinateur vers la clé. Pour retirer la clé en toute sécurité, la faire glisser jusqu'à la corbeille.
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 FACsFlow (cf. 1/)