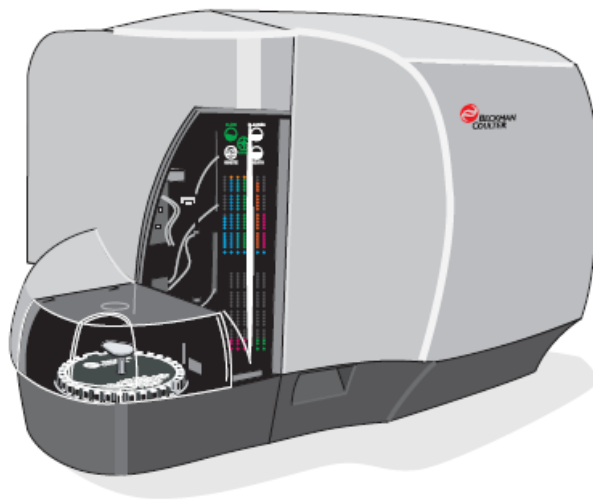


Gallios-Navios SoftwareTM

Procédure de création d'un nouveau protocole



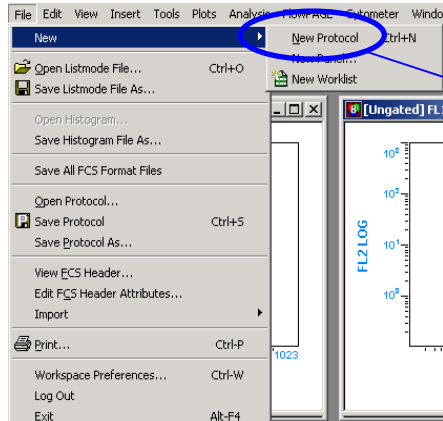
*Marketing Beckman Coulter France
Version A - Mars 2010*



Un **protocole** est un ensemble de conditions d'acquisition pré-définies et qui permet de présenter les données d'acquisition sous une forme exploitable pour rendre facilement des résultats. C'est également un « masque » vide composé de paramètres d'acquisition, d'histogrammes mono ou biparamétriques, de régions, de gates, de statistiques, et de réglages (discriminant, volts, gains, compensations).

1) Choix du menu « New Protocole »

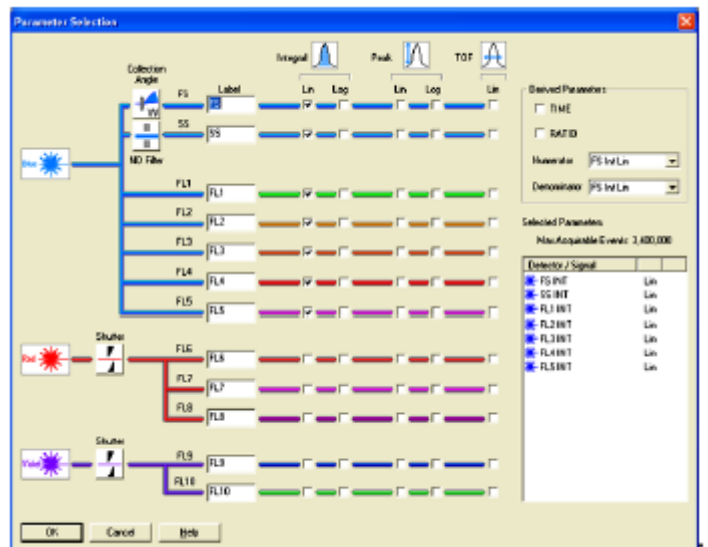
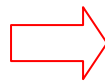
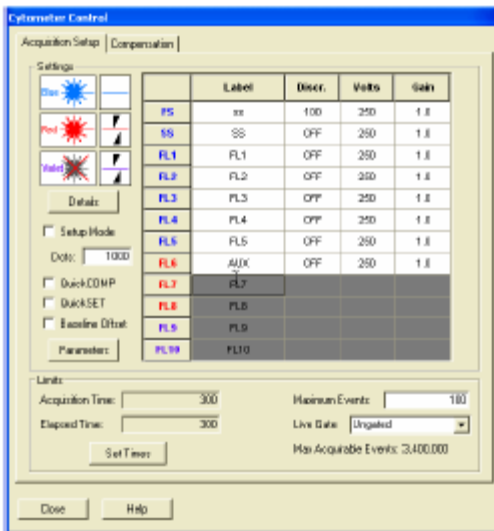
Ce menu permet de créer un nouveau protocole à partir d'un protocole par défaut comprenant simplement un histogramme FS/SS et où les compensations sont à 0.



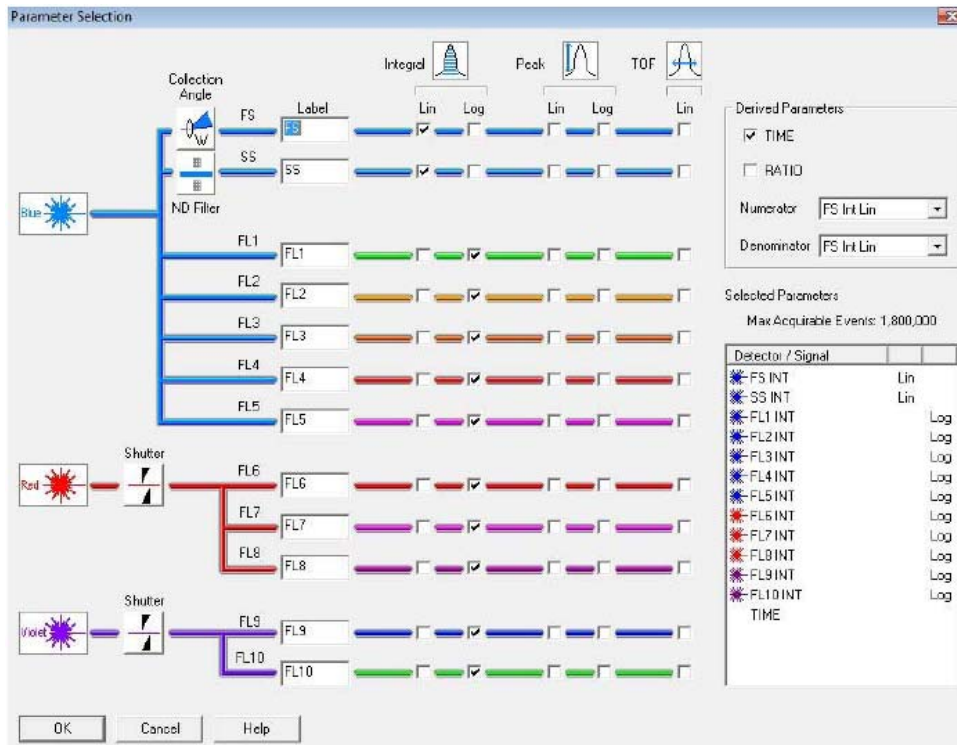
Menu permettant de créer un **nouveau protocole.**

2) Choix des paramètres d'acquisition

Cliquez sur l'icône « Cytometer Control » :



Cliquez ensuite sur le bouton « Parameters » et cliquez dans l'ordre sur chaque ligne de paramètre sur la case Lin ou Log (en général, FS et SS sont choisis en Lin et les fluorescences en Log pour une manipulation sur des lymphocytes) :



A titre d'exemple, pour la création d'un protocole 2 couleurs, il faut sélectionner FS et SS en linéaire et FL1 et FL2 en Log.

Cliquez sur les icones des « shutters » (obturateurs) que vous n'utilisez pas. Dans ce cas précis, vous n'utilisez que le laser bleu donc cliquez sur les lasers rouge et violet pour qu'ils se ferment.

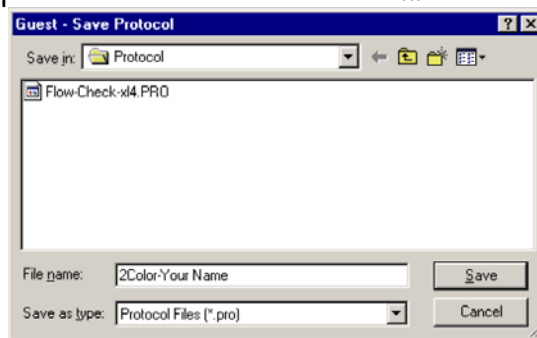


Pour chaque détecteur, 3 signaux peuvent être mesurés : le signal Intégral (Lin ou Log), le signal Peak (Lin ou Log) et/ou le TOF (Time Of Flight en Lin uniquement). Le temps et le ratio sont également des paramètres sélectionnables.

Il est possible de sélectionner jusqu'à 16 paramètres simultanément (la sélection de Lin et Log simultanément ne compte que pour un paramètre).

Attention : il est important de cocher les paramètres dans l'ordre logique (FS, SS, FL1, FL2, FL3, FL4, FL5 puis éventuellement AUX) et, le cas échéant, de les remettre dans l'ordre par un glisser-déplacer dans la liste « Selected Signal », car cela conditionne l'affectation des paramètres dans l'Acquisition Manager. Ainsi, si la FS est en 1ère position de la liste, le paramètre P1 de l'Acquisition Manager correspondra à la FS. Respecter cet ordre permet ensuite de rejouer n'importe quel listmode dans un protocole sans avoir des problèmes d'affectation différente de paramètres.

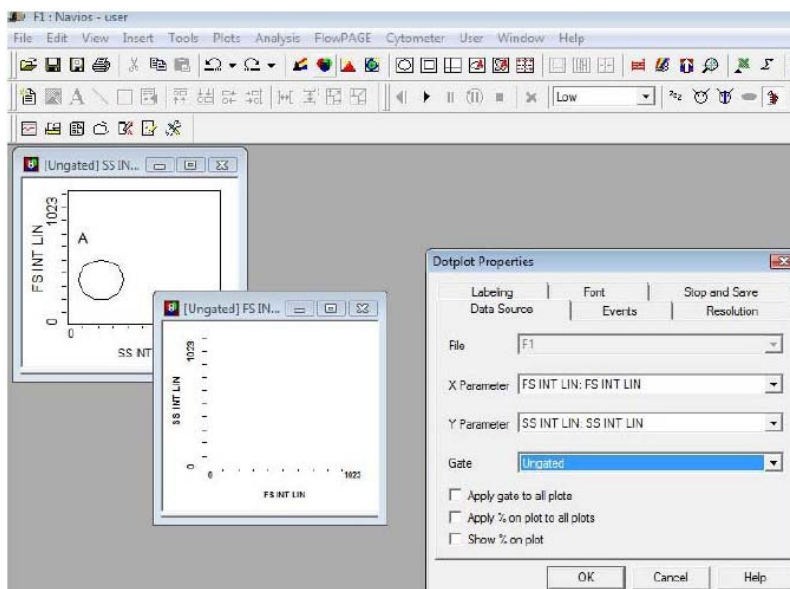
Un message s'affiche indiquant que les paramètres ont été modifiés et il faut alors sauvegarder le protocole sous un nouveau nom.



3) Création d'histogrammes bi et monoparamétrique

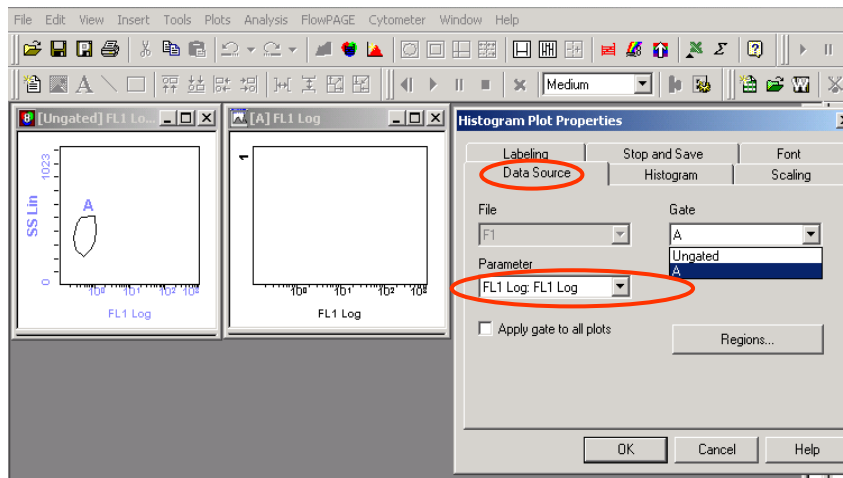


Créez le dot plot FS/SS en cliquant sur l'icône Dot plot

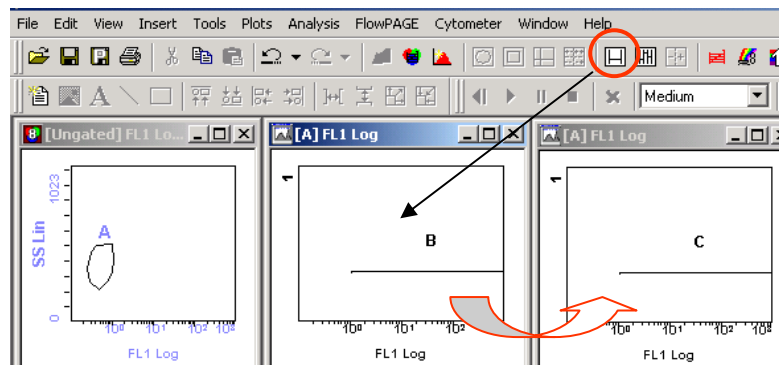


Créez un histogramme monoparamétrique en cliquant sur l'icône
Utilisez ensuite le raccourci clavier CTRL+D pour dupliquer l'histogramme monoparamétrique FL1 Log "gaté" sur A : un 2^e histogramme FL1 Log apparaît. Changez le paramètre de l'axe des

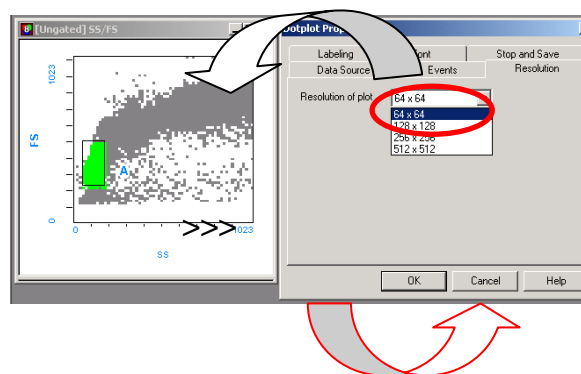
abscisses FL1 Log en cliquant sur la liste des Paramètres puis en choisissant FL2 Log dans la liste proposée .



Créez la région linéaire B sur l'histogramme FL1 Log et faites un glisser-déplacer de l'histogramme FL1 Log vers FL2 Log pour copier-coller le curseur linéaire (C dans cet exemple).




Choisissez les conditions de résolution, d'affichage des évènements (et éventuellement les conditions de stop) propre à chaque histogramme en plaçant la souris sous l'axe des abscisses pour faire apparaître les chevrons sous l'histogramme, puis en sélectionnant l'onglet souhaité (« Résolution » dans l'exemple ci-dessous) puis les conditions voulues.



Pour agencer les histogrammes de manière intuitive, vous pouvez utiliser la fonction « Window » puis « Tile Special » pour décider du positionnement des histogrammes sur

l'espace bureau avec les retours à la ligne voulus ↵ (prenez juste la précaution de ne pas afficher les statistiques pour effectuer le « Tile Special »).

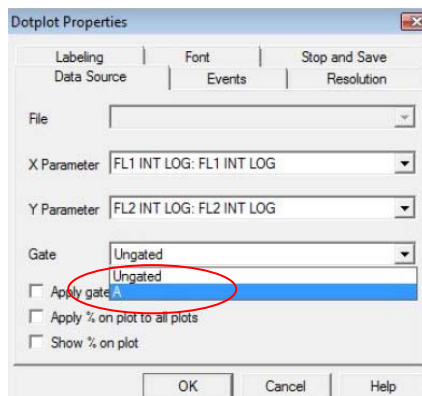
4) Création des régions et des gates


Sélectionnez l'histogramme FS/SS et cliquez sur l'icône .

Cliquez plusieurs fois autour des lymphocytes pour les entourer (chaque clic crée un point) et effectuez le dernier clic au niveau du point de départ de la région. Le logiciel nomme automatiquement cette région A.

Si nécessaire, renommez la région A en double cliquant sur A et appelez-la par exemple « Lymphos ». Vous pouvez également sélectionner la région et effectuer un clic gauche pour avoir accès à la boîte « Region properties » et renommer la région.

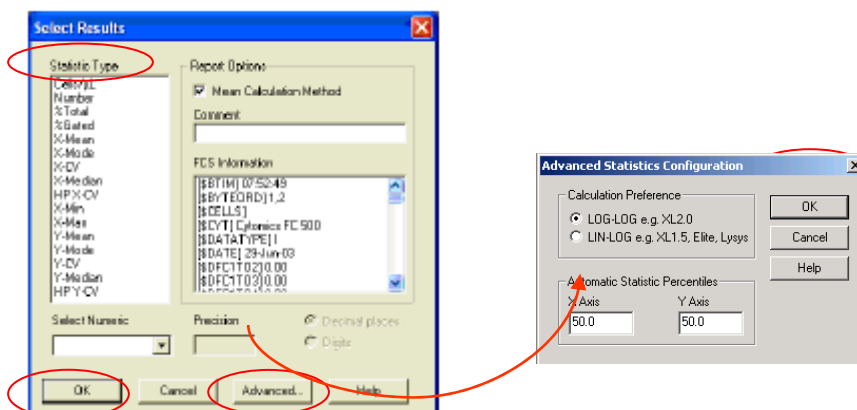
Faites apparaître les chevrons " >>> " en plaçant la souris sous l'axe des abscisses (ou effectuez un clic droit sur l'histogramme pour avoir accès au « Format Plot ») et cliquez sur l'onglet Data Source et choisissez A dans la liste des "gates".



Pour l'histogramme biparamétrique FL1 Log/FL2 Log, cliquez sur l'icône  puis dans l'histogramme concerné : des quad stats apparaissent ; bougez-les comme souhaité et cliquez pour les figer à l'endroit souhaité. La région quadratique sera automatiquement nommée B1 à B4.

5) Choix des statistiques

Pour choisir les statistiques que vous voulez faire apparaître à l'écran, cliquez sur l'icône des statistiques « Σ » présente dans la barre d'outils, et sélectionnez les statistiques souhaitées.




Rappel sur quelques statistiques :

- **Number** : nombre d'évènements comptés pendant le temps d'acquisition.
- **% Gated** : % d'évènements contenus dans la région par rapport au nombre d'évènements "gatés" (ex : les lymphocytes).
- **X Mean** : moyenne d'intensité de fluorescence. Le mode de calcul de cette moyenne en Lin-Log ou Log-Log peut être choisi grâce au Bouton « Advanced ». Par défaut, le mode de calcul activé est Log-Log, ce qui est le mode le plus facilement utilisé.

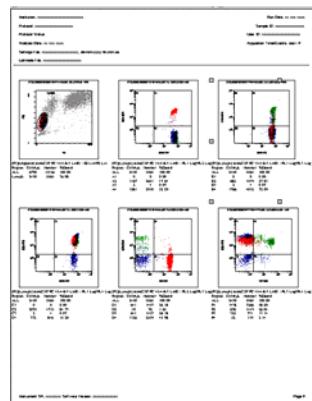
6) Création de la Flowpage



Pour créer une nouvelle FlowPAGE, choisissez Insert / Blank FlowPAGE, ou cliquez sur l'icône

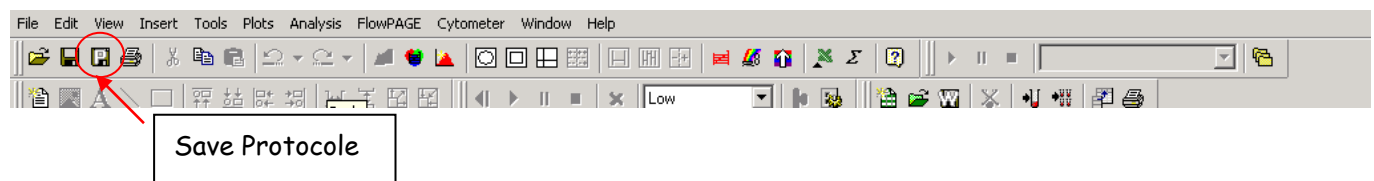
« New flowpage »  . Une nouvelle page apparaît à l'écran.

Déplacez les histogrammes par un simple glisser/déplacer depuis l'espace de travail de CXP vers la Flowpage (ou utilisez **Insert / Flowpage Plot**). Le Legend Plot et le FCS Information Plot peuvent également être insérés comme n'importe quel histogramme.



Exemple de Flowpage

A chaque nouvelle information ajoutée, effectuez ensuite une sauvegarde du protocole en cliquant sur l'icône ci-dessous :



7) Paramétrage du cytomètre

Sélectionnez l'option « Set up mode » et « QuickSet » de la boîte « Cytometer Control et assurez-vous que l'option « Baseline Offset » n'est pas sélectionnée.

Placez le discriminator à 100 sur le paramètre FS (tous les autres paramètres seront par défaut en off).

The screenshot shows the 'Cytometer Control' window with the 'Acquisition Setup' tab selected. The 'Settings' section includes checkboxes for 'Setup Mode', 'QuickCOMP', 'QuickSET', and 'Baseline Offset'. A table lists parameters from FS to FL10 with their respective 'Discr.' values. The 'Limits' section contains input fields for 'Acquisition Time' and 'Elapsed Time', both set to 300. A 'Set Times' button is located below these fields.

	Label	Discr.	Volts	Gain
FS	FS	100	250	1.0
SS	SS	OFF	250	1.0
FL1	FL1	OFF	250	1.0
FL2	FL2	OFF	250	1.0
FL3	FL3	OFF	250	1.0
FL4	FL4	OFF	250	1.0
FL5	FL5	OFF	250	1.0
FL6	FL6	OFF	250	1.0
FL7	FL7	OFF	250	1.0
FL8	FL8	OFF	250	1.0
FL9	FL9	OFF	250	1.0
FL10	FL10	OFF	250	1.0

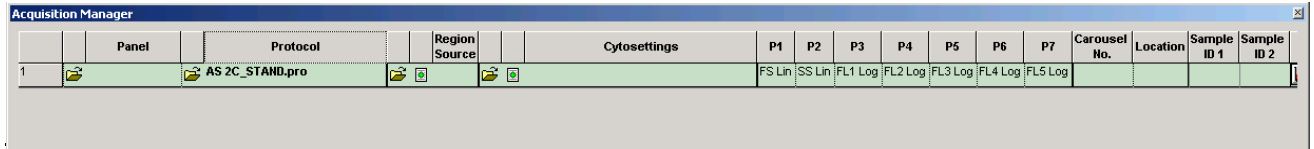
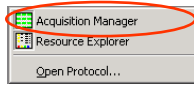
Callout boxes below the screenshot are labeled: QuickSet, Setup Mode, and Discriminator.

Cliquez sur le bouton « Set Times » et renseignez les champs « Acquisition Time(s) » et « Elapsed Time(s) ».

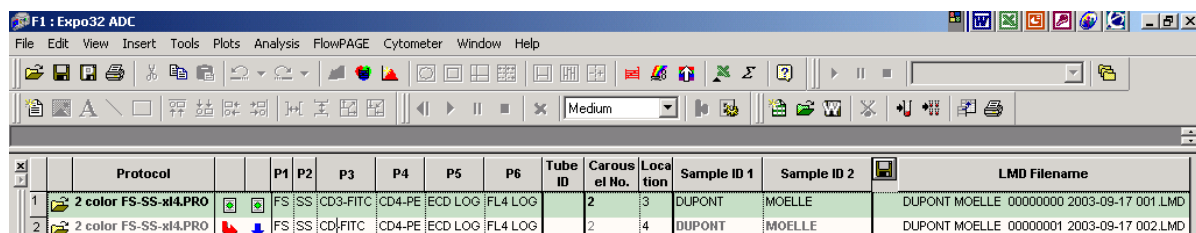
The screenshot shows the 'Cytometer Control' window with the 'Set Times' button circled in red. A secondary dialog box titled 'Set Acquisition / Elapsed Time' is open, showing input fields for 'Acquisition Time (s)' and 'Elapsed Time (s)', both set to 300. The dialog box also contains 'OK', 'Cancel', and 'Help' buttons.

8) Mise en place de l'Acquisition Manager

Faites un clic droit sur le bureau pour faire apparaître « l'Acquisition Manager ».



Affichez dans les colonnes P1, P2 ... les noms des marqueurs du tube à passer afin que ceux-ci apparaissent sous les axes des histogrammes lors du passage du tube :



9) Mise en place des réglages

- Réglage de gains et de volts

Faites varier les gains et les voltages de FS/SS de manière à visualiser les cellules d'intérêt (pour cela, contrôler l'intensité des signaux sur la face avant-gauche du Gallios).

Utilisez les ascenseurs intuitifs de la fonction Quickset sur les paramètres FL1 Log et FL2 Log pour ajuster les voltages.

Ajustez également le discriminant pour éliminer un maximum de débris tout en préservant la population d'intérêt (si le message « Data Rate warning » s'affiche, c'est que le discriminant est mal ajusté et qu'un nombre trop important de débris est acquis).

Pour effectuer ce type de réglages, il est possible d'utiliser les **contrôles isotypiques monomarqués dans chaque couleur**, de même isotype, même gamme et même fournisseur. Par exemple, pour un marquage en 5 couleurs :

Tube 1	Cellules + IgG1-FITC gamme IOTest (si le marqueur final est un IgG1 IOTest)
Tube 2	Cellules + IgG2a-PE gamme Cyto Stat (si le marqueur final est une IgG2a Cyto Stat)
Tube 3	Cellules + IgG1-ECD
Tube 4	Cellules + IgG1-PC5
Tube 5	Cellules + IgG1-PC7

L'autre possibilité est de travailler directement sur les **marqueurs positifs**, à condition qu'ils soient des marqueurs **spécifiques et fortement exprimés** de la population d'intérêt, avec un

taux important de cellules négatives ; pour les lymphocytes, le CD4 convient puisque 60% des lymphocytes sont négatifs pour le marqueur considéré :

Tube 1	Cellules + CD4-FITC
Tube 2	Cellules + CD4-PE
Tube 3	Cellules + CD4-ECD
Tube 4	Cellules + CD4-PC5
Tube 5	Cellules + CD4-PC7

Dans ce cas, il ne faut pas tenir compte du pic de cellules positives et jouer sur les voltages de chaque fluorescence de manière à amener les pics de cellules négatives dans la 1^{ère} décade.

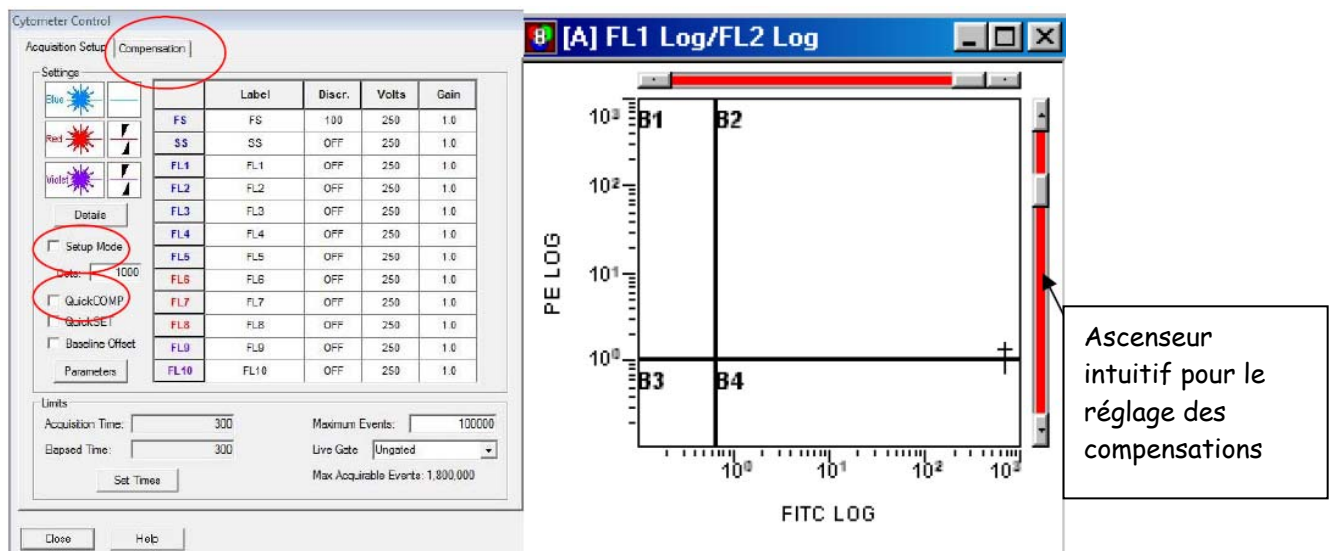
Réglages des compensations :

Les compensations peuvent être réglées en utilisant :

- la **méthode manuelle** pour des réglages simples (2 ou 3 couleurs) à l'aide d'un marqueur fort spécifique de la population d'intérêt :

Tube 1	Cellules + CD8-FITC/CTRL-PE/CTRL-ECD
Tube 2	Cellules + CTRL-FITC/CD8-PE/CTRL-ECD
Tube 3	Cellules + CTRL-FITC/CTRL-PE/CD8-ECD

- la **méthode ADC semi-automatique** à l'aide des CD45 dans chaque couleur (se reporter alors au chapitre sur l'ADC)



Ajustez la valeur FL2-%FL1 pour le tube marqué uniquement en FITC

Ajustez la valeur FL1-%FL2 pour le tube marqué uniquement en PE

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
FL1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL2	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL3	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL4	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL5	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0
FL7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0
FL8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0
FL9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0
FL10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

Select the column which contains the Fluorochrome creating spectral overlap in the PMT (row).

Clear All

Close Help

Une fois les réglages effectués, effectuez ensuite une sauvegarde du protocole en cliquant sur l'icône ci-dessous :

File Edit View Insert Tools Plots Analysis FlowPAGE Cytometer Window Help

Save Protocole

