

GUIDE D'UTILISATION NORTHERN LIGHTS 3L

Vous trouverez les principes de la cytométrie spectrale détaillés ici :

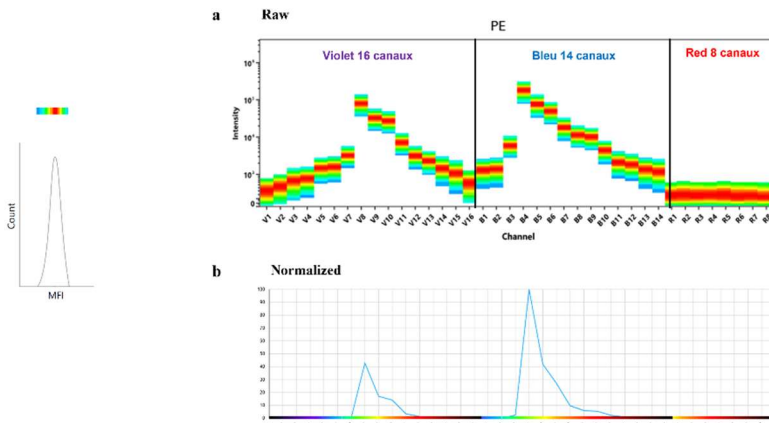
<https://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/CytometrieSpectrale.html>

1. Présentation de la machine

- Cytomètre spectral : Northern Lights 3 lasers
- 3 lasers : Violet, Blu, Red
- FSC : Photodiode, vSSC et bSSC : Avalanche PhotoDiode (APD)
- Fluorescences : 38 Avalanche PhotoDiode (APD)
- Fluidique : liquide de gaine (eau milli-Q), waste
- Logiciel : SpectroFlo 3.3.0

Laser	Channel	Center Wavelength (nm)	Bandwidth (nm)	Wavelength Start (nm)	Wavelength End (nm)
Violet	V1	428	15	420	435
	V2	443	15	436	451
	V3	458	15	451	466
	V4	473	15	466	481
	V5	508	17	498	518
	V6	525	17	516	533
	V7	542	17	533	550
	V8	581	17	571	590
	V9	598	20	588	608
	V10	615	20	605	625
	V11	664	27	651	678
	V12	692	28	678	706
	V13	720	29	706	735
	V14	750	30	735	765
	V15	780	30	765	795
	V16	812	34	795	829
Blue	B1	508	20	498	518
	B2	525	17	516	533
	B3	542	17	533	550
	B4	581	17	571	590
	B5	598	17	588	608
	B6	615	17	605	625
	B7	661	17	653	670
	B8	679	18	670	688
	B9	697	19	688	707
	B10	717	20	707	727
	B11	738	21	728	749
	B12	760	23	749	772
	B13	783	23	772	795
	B14	812	34	795	829
Red	R1	661	17	653	670
	R2	679	18	670	688
	R3	697	19	688	707
	R4	717	20	707	727
	R5	738	21	728	749
	R6	760	23	749	772
	R7	783	23	772	795
	R8	812	34	795	829

Un spectre d'émission est généré pour chaque fluorochrome. Chaque fluorochrome a donc une signature unique et la déconvolution (Unmixing) permet de calculer la contribution de chaque fluorochrome dans le spectre entier.



Exemple avec la signature PE

Exciting lasers:
V, B, R

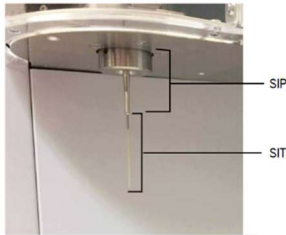
Canal d'émission maximale :
B4

Canaux d'émission secondaires :
V8

2. Procédure de mise en marche

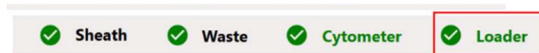
- a) **Se connecter à MRI** avec son login et mot de passe (chaque membre utilisateur d'une équipe doit avoir son propre compte MRI), sélectionnez le compte pour la facturation > cliquer sur ok
- b) **Mettre le Northern Lights sous tension** en appuyant sur le bouton principal situé sur la façade gauche de l'appareil.

Remarque : assurez-vous qu'un tube contenant 1 ml d'eau désionisée (DI) est chargé sur le SIP avant de lancer le logiciel SpectroFlo. Le tube est nécessaire pour le calibrage de profondeur de la SIT et pour le rinçage de la chambre d'analyse afin d'éliminer les bulles éventuelles.



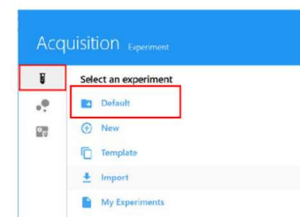
L'échantillon, contenu dans un tube standard de 12 x 75 mm, est introduit dans le cytomètre par le « sample injection tube » (SIT), située dans le « sample injection port » (SIP). Le tube à échantillon s'enclenche en dessous du SIP sans avoir besoin d'un support supplémentaire. La SIT s'étend en dehors du SIP lors de l'acquisition et se rétracte lorsque le cytomètre ne réalise pas d'acquisition.

- c) **Ouvrez le logiciel SpectroFlo** et connectez-vous en saisissant vos nom d'utilisateur et mot de passe puis en cliquant sur SIGN IN. La procédure d'initialisation du cytomètre commence alors. Le liquide de gaine circule dans les tubulures fluidiques pour éviter l'accumulation de sels et le système réalise un calibrage de profondeur de la SIT.
- d) **Sélectionnez Acquisition** dans le menu Get started
- e) **Vérifiez les indicateurs d'état** en bas à droite de l'écran :



- Liquide de gaine (eau milli-Q) : si insuffisant, le remplacer avec le bidon plein (un bidon d'eau plein est toujours disponible)
- Réservoir à déchets (waste) : si plein, le remplacer avec un bidon vide. Notez la date sur le bidon vide. Bidon plein : ajoutez 2 berlingots de javel et notez « + javel » et la date.

- f) Dans l'onglet Experiment, ouvrir une expérience par défaut, mettre un tube avec 3 ml d'eau milli-Q dans la SIP et faire une acquisition pendant 5 minutes à haut débit.



3. Contrôle qualité (QC) quotidien (Daily QC)

Exécutez le Daily QC à l'aide des billes SpectroFlo QC Beads avant l'acquisition d'échantillons pour vérifier que le cytomètre fonctionne de façon optimale.

Remarques : les billes sont excitées par tous les lasers et émettent de la fluorescence dans tous les canaux de détection. Lors du QC les paramètres sont ajustés pour tenir compte des variations de l'appareil d'un jour à l'autre. Les rCV et les gains sont mesurés et ajustés pour placer les billes à l'emplacement cible pour chaque détecteur. L'objectif est de toujours avoir des settings standardisés dans le temps. Le ratio de dérive est appliqué à tous les settings dans la bibliothèque ainsi qu'au Cytek Assay Settings (CAS).

Étapes :

- Préparez les billes SpectroFlo QC Beads : 1 goutte de billes dans 0,3 ml de solution de gaine (eau milli-Q)
- Sélectionnez QC & Setup dans le menu Get started
- Démarrez l'acquisition : chargez un tube de billes dans le SIP, sélectionnez Start pour commencer l'acquisition.



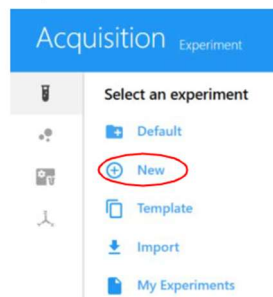
- Une fois l'enregistrement terminé (3min), un message s'affiche et un rapport (Daily QC Report) est disponible.

Daily QC Report						Laser Settings			
QC Status:	PASSED	Date:	October 30, 2023 - 10:05 AM			Laser	Laser Delay	Area Scaling Factor	
Cytometer Name:	Aurora	User:	Admin			Red	-19.68	1.09	
Serial Number:	S0144	Nozzle Size:	100 µm			Blue	0.00	1.21	
Configuration:	4-Laser-V16-B14-R8-YG10	Sheath Pressure:	38 PSI			Violet	20.93	1.16	
Software:	SpectroFloCS 1.0.7.1					YellowGreen	40.08	1.10	
QC Beads						FSC Area Scaling Factor: 1.21 Window Extension: 3			
Lot ID:	2005	Expiration Date:	December 31, 2026			Temperature:	24.4 °C		
Laser	Detector (nm)	Gain	Gain Change	Median (x1000)	% rCV	Status	Specifications		
Blue	FSC	421	72	1,911.3	0.98	✓	FSC	% rCV:	< 6 (Recommended)
Violet	SSC	486	150	2,006.3	4.27	✓	SSC-B	% rCV:	< 8 (Recommended)
Blue	SSC-B	527	141	1,986.7	4.39	✓	R3	% rCV:	< 6 (Recommended)
Violet	V1 (428)	302	67	466.1	2.92	✓	B3	% rCV:	< 6 (Recommended)
Violet	V2 (443)	370	79	1,080.7	2.98	✓	V3	% rCV:	< 6 (Recommended)
Violet	V3 (458)	347	70	1,226.7	2.98	✓	YG3	% rCV:	< 6 (Recommended)
Violet	V4 (473)	251	52	1,203.5	2.73	✓	All Channels	% Gain Change:	< 100 (Recommended)
Violet	V5 (508)	297	62	1,134.4	2.71	✓			
Violet	V6 (525)	295	61	837.4	2.81	✓			
Violet	V7 (542)	382	81	962.1	2.60	✓			
Violet	V8 (581)	629	114	1,029.8	1.97	✓			
Violet	V9 (598)	486	79	1,234.4	1.36	✓			
Violet	V10 (615)	508	77	2,152.9	2.10	✓			
Violet	V11 (664)	430	81	1,014.9	2.15	✓			
Violet	V12 (692)	364	75	517.8	2.43	✓			
Violet	V13 (720)	329	74	498.9	2.42	✓			
Violet	V14 (750)	475	115	1,248.6	4.71	✓			
Violet	V15 (780)	623	156	1,791.4	6.45	✓			
Violet	V16 (812)	457	120	1,330.8	8.73	✓			
Blue	B1 (508)	1,269	311	142.9	3.26	✓			
Blue	B2 (525)	672	158	134.9	2.92	✓			
Red	R7 (783)	583	159	1,254.2	8.76	✓			
Red	R8 (812)	397	131	897.9	15.15	✓			

4. Créer une nouvelle expérience

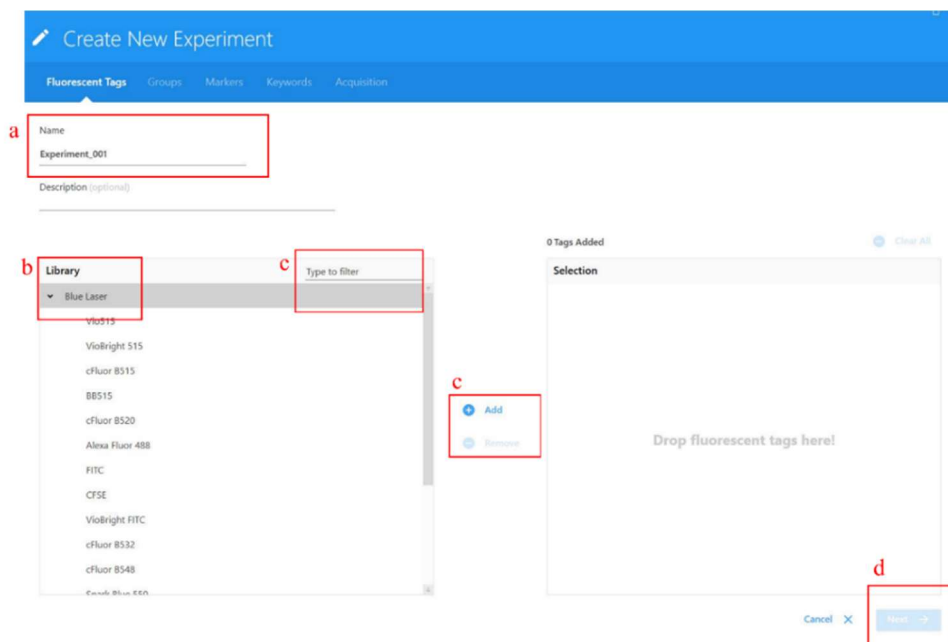
1. Create New experiment

Cliquez sur New dans le menu Acquisition Experiment. La page Create New Experiment s'affiche.

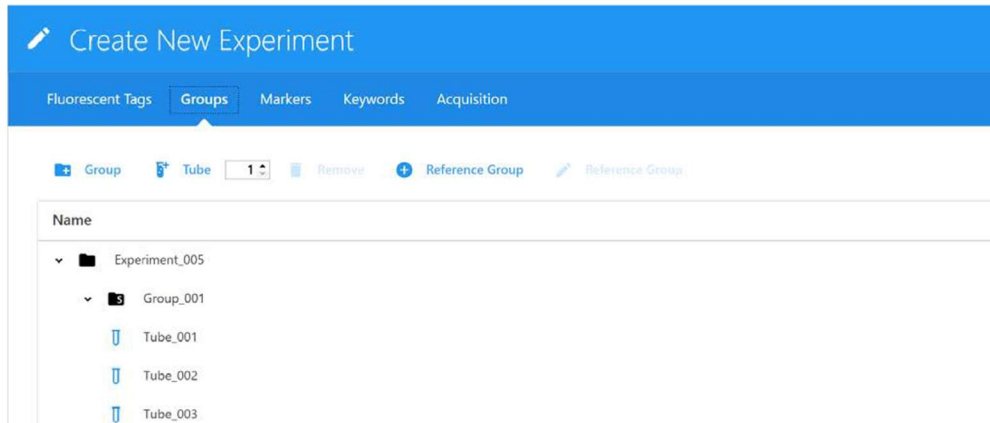


2. Nommer l'expérience et choisir les fluorochromes présents dans le panel

- Nommer l'expérience : NomUtilisateur, Date(année-mois-jour), fluorochromes. S'il s'agit d'un panel de plus de 3 couleurs, après le nom utilisateur et la date, notez juste le nombre de fluorochromes suivi par « C » (couleurs). Exemples : « Leccia 2023-11-13 FITC PE APC » ou « Leccia 2023-11-13 4C »
- Cliquez sur la flèche à gauche du nom du groupe (laser) dans le volet Library à gauche pour afficher la liste de fluorochromes correspondants.
- Sélectionnez les fluorochromes utilisés dans l'expérience et cliquez sur Add pour les ajouter à la liste de sélection à droite. Vous pouvez également faire un double clic sur le fluorochrome pour l'ajouter à la liste de sélection. Pour trouver rapidement un fluorochrome, saisissez son nom dans la zone de texte Type to filter. Une liste par défaut de fluorochromes pour chaque groupe est disponible dans la bibliothèque.
- Une fois que tous les fluorochromes ont été sélectionnés dans la liste de la Library, cliquez sur Next.



3. Créez des groupes d'échantillons en sélectionnant + Group. Ajoutez des tubes aux groupes.

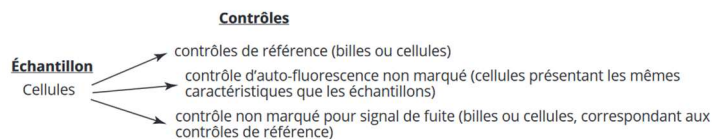


4. Créer les Reference controls en sélectionnant + Reference Group, ceci crée une liste de tubes de contrôles de référence pour chaque fluorochrome

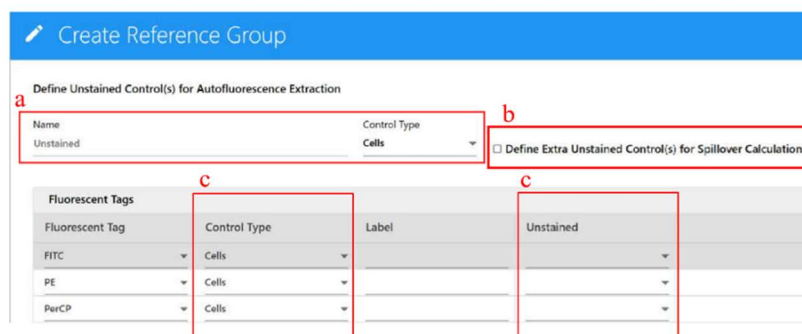
- a) Définissez un contrôle non marqué pour tenir compte de l'auto-fluorescence en sélectionnant le type de contrôle correspondant (billes ou cellules).

Remarque : le contrôle non marqué doit être du même type et préparé de la même manière que les échantillons, car cela garantira la précision de la déconvolution et de la quantification de l'auto-fluorescence. Idéalement, les contrôles de référence, le contrôle négatif et les échantillons sont tous du même type et préparés de la même manière.

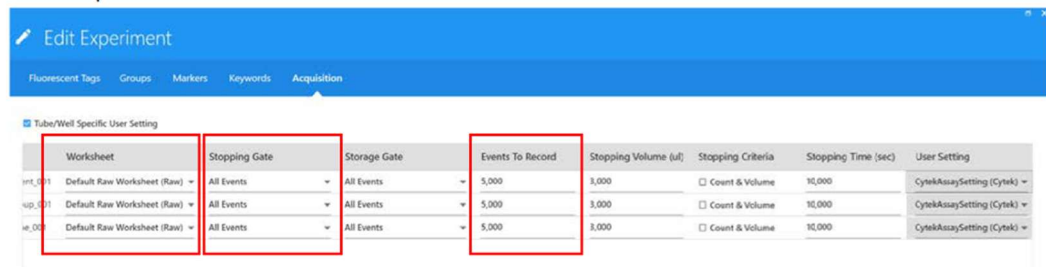
- b) Si les contrôles de référence sont d'un autre type que les échantillons et ne contiennent pas de population négative dans chaque tube (par exemple si les échantillons à tester sont des cellules et que les contrôles de référence sont des billes qui présentent toutes un seul pic positif), vous devrez utiliser un contrôle non marqué à part, du même type que les contrôles de référence, pour la correction du signal de fuite. Donc sélectionnez Define Extra Unstained Control(s) for Spillover Calculation pour vos contrôles de référence. Puis saisissez le nom et le type de ce contrôle non marqué supplémentaire.



- c) Sélectionnez le type de contrôle (billes ou cellules) pour les contrôles de référence mono-marqués (il est possible de faire des contrôles sur billes et sur cellules dans la même expérience). Cliquez sur Save.



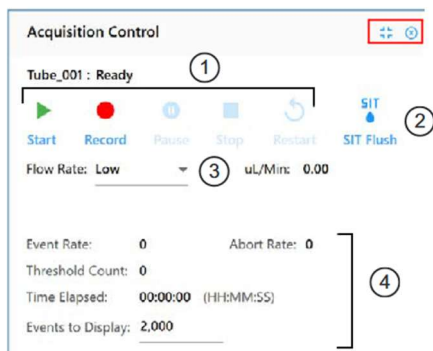
5. Sélectionnez les paramètres d'acquisition et la/les worksheets (feuilles de travail) :
- Sélectionnez Default Raw Worksheet (Feuille de travail brute par défaut) pour le groupe de référence et pour des groupes d'échantillons si vous projetez de réaliser une déconvolution après l'acquisition.
 - Sélectionnez Default Unmixed Worksheet ou une feuille de travail créée par l'utilisateur pour vos groupes d'échantillons si vous projetez de réaliser une déconvolution en direct.
 - Sélectionnez les valeurs suivantes : Stopping Gate, Events to Record et d'autres si nécessaire. L'acquisition s'arrête lorsque le premier des critères d'arrêt est atteint (temps, volume, nombre d'événements). Dans le cas des billes, nous vous recommandons de recueillir 5 000 événements individuels. Dans le cas des cellules, nous vous recommandons de recueillir un nombre d'événements allant de 10 000 à 20 000 pour la population souhaitée.
- Remarque : le nombre d'événements à acquérir dépend de la population cible. Par exemple, il peut être nécessaire d'acquérir 10 000 à 20 000 événements pour en obtenir 2 000 pour la population souhaitée. Environ 1 000 à 2 000 événements sont requis pour chacune des populations (négative et positive) de chaque contrôle pour obtenir une déconvolution précise.



- Une fois que la feuille de travail et les critères d'arrêt ont été définis, cliquez sur Save and Open pour ouvrir la nouvelle expérience. Pour apporter des modifications à l'expérience, cliquez sur Edit au-dessus de la hiérarchie groupe/tube.

5. Enregistrer les contrôles de références, unmixer et enregistrer les échantillons

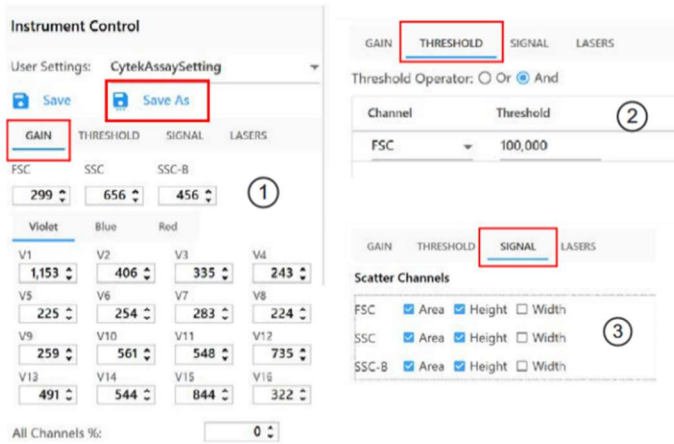
- Démarrer l'acquisition de l'échantillon non-marqué (Unstained) en cliquant sur Start.



Le volet Acquisition Control vous permet de :

- Démarrer, arrêter et de mettre en pause une acquisition, enregistrer les données et de redémarrer les compteurs d'acquisition.
- Réaliser un rinçage de la SIT
- Régler le débit d'acquisition : Low (Faible, 15 $\mu\text{l}/\text{min}$), Medium (Moyen, 30 $\mu\text{l}/\text{min}$) ou High (Élevé, 60 $\mu\text{l}/\text{min}$).

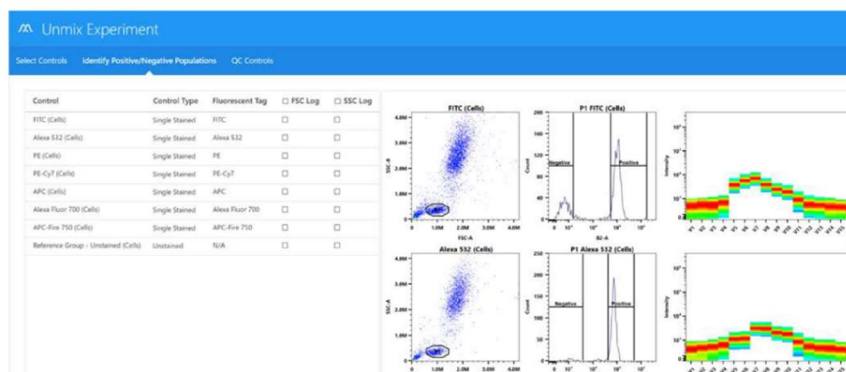
- Vérifiez que CytekAssaySetting est sélectionné, utilisez Instrument Controls pour ajuster les paramètres FSC et SSC de sorte que tous les événements soient à la bonne échelle. Cliquez sur Record.



Le volet Instrument Control vous permet d'optimiser vos User Settings : nous vous recommandons d'utiliser CytekAssaySetting comme point de départ. Ces paramètres fournissent la résolution optimale pour chaque canal. Lorsque vous utilisez CytekAssaySetting, vous ne devrez ajuster que les gains FSC, les gains SSC (1), et le Seuil (2). Utilisez l'onglet Signal pour sélectionner l'aire, la hauteur ou la largeur de chaque signal (3).

- Acquérir et enregistrer tous les contrôles. Si nécessaire, ajustez le même pourcentage de gain pour tous les lasers afin de maintenir la signature du fluorochrome.

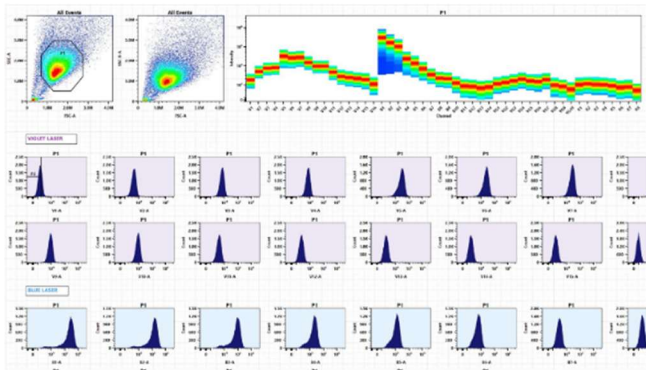
Important : pour enregistrer ces paramètres personnalisés, cliquez sur le bouton Save As dans le volet Instrument Control et donnez-lui un nouveau nom NomUtilisateur, Date(année-mois-jour), fluorochromes. S'il s'agit d'un panel de plus de 3 couleurs, après le nom utilisateur et la date, notez juste le nombre de fluorochrome suivi par « C » (couleurs). Exemples « Leccia 2023-11-3 FITC PE APC » ou « Leccia 2023-11-13 4C »
- Cliquez sur Unmix dans la barre d'outils en haut à gauche.
- Cochez Use control from experiment pour le Unstained control
- Cliquez sur Next
- Utilisez l'onglet Identify Positive/Negative Populations pour inclure les populations positives et négatives pour chaque fluorochrome dans le fenêtrage approprié.
 - Déplacez la région de fenêtrage sur le graphique FSC vs SSC à gauche pour inclure la population d'intérêt. Utilisez la touche Ctrl pour déplacer la région de fenêtrage sur tous les contrôles en même temps.
 - Déplacez le fenêtrage d'intervalle positif sur l'histogramme pour inclure la population marquée positive.
 - Déplacez le fenêtrage d'intervalle négatif pour inclure la population négative.
 - Déplacez le fenêtrage d'intervalle du tracé spectral à droite pour sélectionner le canal qui présente la fluorescence la plus intense. Ce canal est le canal d'émission maximale du fluorochrome en question.



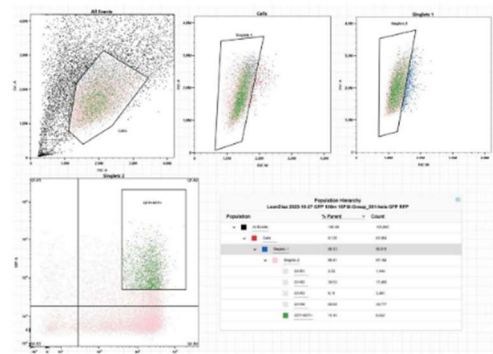
8. Utilisez l'onglet **QC Controls** pour vérifier la qualité de vos contrôles de référence. Cliquez sur View Similarity Index pour afficher les indices de similarité de chaque colorant par rapport à tous les autres colorants. Il est préférable d'utiliser des colorants avec un indice de similarité $\leq 0,98$.
9. Cliquez sur Live Unmixing.
10. La page d'Unmixing se ferme et l'expérience réapparaît. Une feuille de travail Unmixed s'ouvre pour visualiser les données déconvoluées.
11. Sélectionnez le tube à échantillon que vous souhaitez acquérir. La flèche verte indique que le tube est sélectionné.
12. Cliquez sur Start, puis sur Record.

Remarque : Pour chaque tube d'échantillon déconvolué, deux fichiers FCS sont générés, dont l'un est composé de données brutes et l'autre de données déconvoluées. Les données déconvoluées en direct peuvent être analysées dans des feuilles de travail déconvoluées qui diffèrent des feuilles de travail brutes en ce qu'elles ne présentent que les informations de fluorescence catégorisées selon les fluorochromes définis pour chaque expérience.

Raw data :
48 paramètres
+ FSC et SSC
visualisés dans une worksheet raw

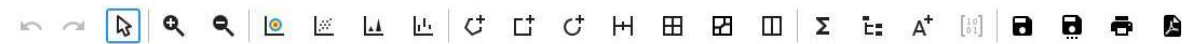


Ummixed data :
nombre de fluorochromes
+ FSC et SSC
visualisés dans une worksheet unmixed



6. Analyse des données unmixées

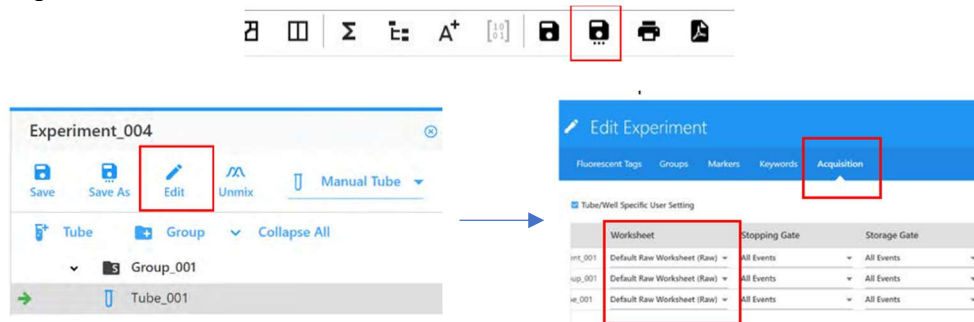
Une barre d'outils en haut de la zone de la feuille de travail vous permet de créer des graphiques, des fenêtrages, des statistiques, une hiérarchie des populations, d'annoter et d'enregistrer la feuille de travail, de l'imprimer ou de l'enregistrer au format PDF.



- **Graphiques :** quatre types de graphiques peuvent être créés dans la feuille de travail : dot plots, pseudocolor plots, histogrammes, spectral plots. Pour modifier les propriétés d'un graphique, faites un clic droit et sélectionnez Propriétés. Vous pouvez sélectionner le type de graphique, les paramètres, l'échelle, la couleur de fond et les marqueurs.
- **Fenêtrages :** les types de fenêtrage sont les suivants : rectangle, ellipse, polygone, intervalle, quadrants articulés, quadrants échelonnés (sélectionnez et faites glisser la poignée de décalage pour déplacer les limites des quadrants vers le haut ou le bas), binaire. Les propriétés des fenêtrages peuvent être modifiées en faisant un clic droit sur le fenêtrage. Vous pouvez changer le nom du fenêtrage, sa couleur et l'épaisseur des lignes de démarcation. Vous pouvez également choisir d'afficher le nombre et/ou le % d'événements parents dans le fenêtrage ainsi que les paramètres de fenêtrage.

- **Statistiques** : pour créer un tableau de statistiques, cliquez sur l'icône des statistiques dans la barre d'outils de la feuille de travail, puis cliquez sur la zone de la feuille de travail. Cochez la case Population à côté des populations dont vous souhaitez afficher les statistiques. Pour ajouter une variable statistique, sélectionnez-la dans la liste Statistics Variable. Sélectionnez le paramètre à ajouter pour cette variable. Plusieurs paramètres peuvent être sélectionnés en même temps.

Important : Une fois que vous avez créé votre page d'analyse à partir de la Default Unmixed Worksheet, pensez à la sauvegarder et la renommer en cliquant sur l'icône correspondant dans la barre d'outils et à l'associer à votre manip dans Edit > Acquisition.



7. A la fin de chaque session :

- 1) **Avant de fermer votre expérience**, pensez à sauvegarder : a) l'expérience b) votre unmixed worksheet c) vos instrument settings.

- 2) **Exportez et sauvegardez vos données**

Dans My Experiment faites clic droit sur le fichier correspondant > Exporter > Disque D > NL Analyseur > NL Analyseur 2025 > NL analyseur Export.

Important : Pensez à récupérer vos données avec l'utilisation d'un support externe (type clef USB ou Disque dur externe) ou les transférer dans votre dossier FileZilla et à les effacer du logiciel d'analyse ainsi que du disque D. Les données seront conservées un maximum de **1 mois** avant suppression sans avertissement préalable.

- 3) **Vérifier systématiquement sur le site de réservation de MRI si un autre créneau est encore réservé. Laisser la machine en veille ou l'éteindre selon les réservations.**

a. S'il n'y a pas de créneau réservé après vous et vous êtes donc le dernier utilisateur de la journée exécutez la procédure d'arrêt du système :

- o Dans l'onglet Cytometer, à partir du module Acquisition, sélectionnez Fluidics Shutdown
- o Chargez un tube contenant 3 ml de FACSClean sur le SIP et cliquez sur Continue.
- o Chargez un tube contenant 3 ml d'eau DI et cliquez sur Continue.
- o Chargez un tube contenant 3 ml de Contrad 70 à 50 % et cliquez sur Continue.
- o Chargez un tube contenant 3 ml d'eau DI et cliquez sur Continue.
- o Attendez que la procédure d'arrêt s'achève, puis cliquez sur Done.
- o Mettez le cytomètre hors tension en appuyant sur le bouton principal vert situé sur la façade gauche de l'appareil.
- o Quittez le logiciel SpectroFlo.
- o Sortir de votre session MRI (icône Logout sur le bureau)
- o Assurez-vous que la SIT est immergée dans de l'eau DI à l'issue de la procédure.
- o Laisser l'ordinateur allumé.

b. S'il y a un créneau réservé après vous :

- Sous l'onglet Cytomètre, cliquez sur Clean Flow Cell et suivez les instructions. Une fois le nettoyage de la Flow Cell terminé, laissez le tube d'eau sur la SIP pour l'utilisateur suivant.
- Sortir de votre session MRI (icône Logout sur le bureau)

