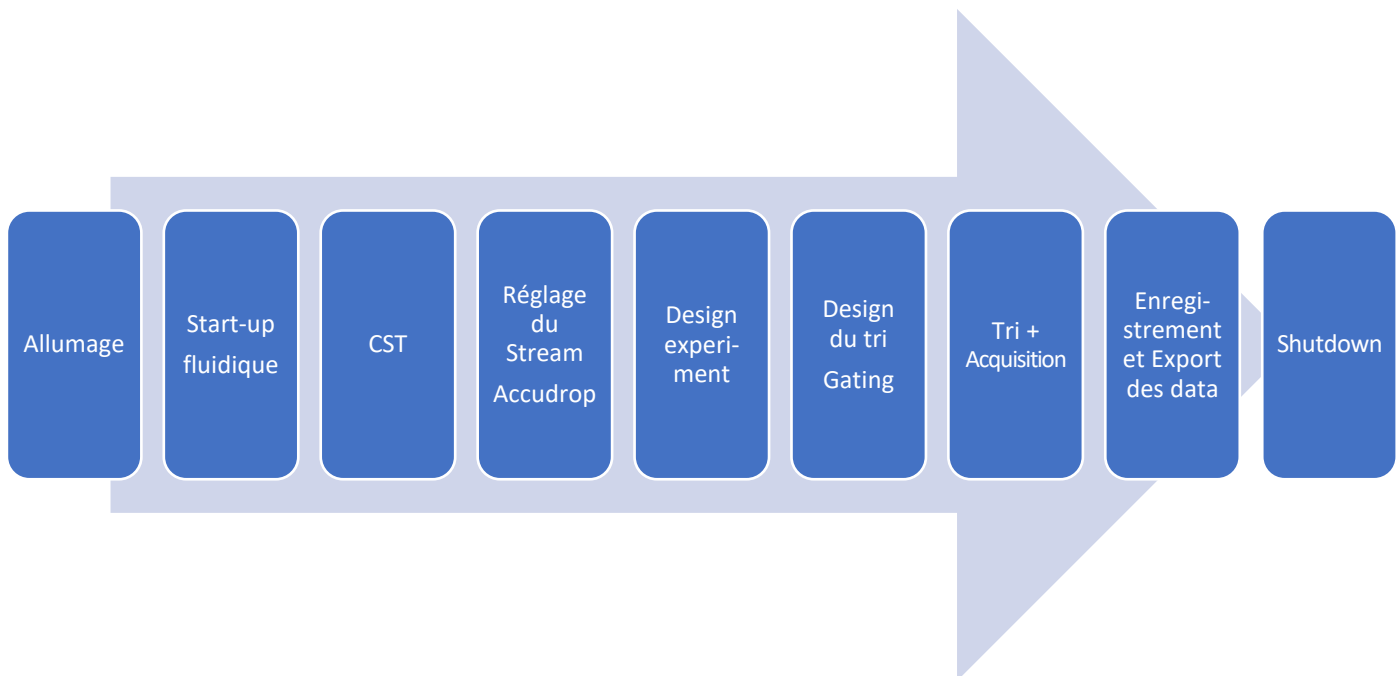


Plan

CARACTERISTIQUES DE L'APPAREIL ET RESERVATION	2
ALLUMAGE.....	5
START-UP	6
CHECH SETUP AND TRACKING (CST).....	8
ACCUDROP.....	9
SHUT-DOWN.....	10
CONSEILS D'UTILISATION.....	11



CARACTERISTIQUES DE L'APPAREIL ET RESERVATION

1- BANC OPTIQUE

LASER	CHANNEL	FILTER	ALEXA FLUOR	BD	Thermo	DYLIGHT	eFluor	MILTENYI	Qdot	TANDEM	OTHER
405	VIOLET	F 450/50	AF405	BV421, V450	SB436	DyLight405	eFluor 450	VioBlue			DAPI, Pacific blue, LD-V
		E 510/50	LP502	BV510, V500, BV480, BV415			eFluor506	VioGreen	525		KO, Pacific-Orange, Pacific Green, Amcyan
		D 610/20	LP600	BV605	SB600				605		
		C 670/30	LP640	BV650	SB645				655		
		B 710/50	LP655	BV711	SB702				705		
		A 780/60	LP750	BV785, BC786	SB780				800		
488	BLUE	B 530/30	LP502	AF488	BB515	DyLight488		VioBright FITC			FITC, GFP, YFP, Amcyan
		A 695/40	LP655	BB700				PerCP-Vio700		PerCP-Cy5,5, PerCP-eFluor710	PerCP
561	GREEN	E 582/15		AF555, AF561							PE
		D 610/20	LP600	AF594, AF568		DyLight594		PE-Vio615		PE-Texas red, PE-AF610, PE-EF610, PE-CF594	Texas red, PI
		C 670/14	LP630							PE-Cy5, PE-AF647	7AAD
		B 710/50	LP685					PerCP-Vio700		PE-Cy5,5 PE-AF700	
		A 780/60	LP735					PE-Vio770		PE-Cy7, PE-AF750	
635	RED	C 660/20		AF647, AF660		DyLight650	eFluor 660				APC, Cy5
		B 730/45	LP690	AF 680, AF700		DyLight680					Cy5,5
		A 780/60	LP755	AF750		DyLight755		APC-Vio770		APC-Cy7, APC-eFluor780	APC-eFluor 780, LD NIIR

2- RESERVATION

1. Rendez-vous sur votre espace personnel de l'UVSQ : <https://www.personnels.uvsq.fr/> avec vos identifiants 4/4 de messagerie
2. Cliquer sur Mes applis / Icone RESA



3. Ou directement : <http://redmine2.dsi.uvsq.fr/resa/Web/schedule.php>
4. Sélectionner « PLATEFORME IMAGERIE ET CYTOMETRIE »

RESERVATION DE RESSOURCES DIVERSES

PLATEFORME IMAGERIE & CYTOMETRIE

Sélectionner une catégorie de ressource

14/03/2022 - 20/03/2022

Tableau de Bord Mon Compte Planning Responsables Rapports Helpdesk Aide Déconnexion

Reservable Non Reservable Réserve Mes Réservations Participant En attente Passé Restreint

Filter de Ressources

- Tout
- Capacité Minimale
- Type de Ressources
- Tout -
- Filtrer
- Supprimer le Filtre

Calendar grid showing resources and reservations for 14/03/2022 to 20/03/2022.

5. Une fois votre formation « utilisateur autonome » effectuée, vous aurez accès à la réservation de l'ARIA III. Pour créer une réservation, cliquer sur le créneau souhaité. Une nouvelle fenêtre s'affiche :

RESERVATION DE RESSOURCES DIVERSES

Créer une nouvelle réservation

(anne-laure.raveu@uvsq.fr) Modifier

Ressources Modifier

-FACS ARIA III

Début 14/03/2022 16:00 Fin 14/03/2022 16:30

Durée de la réservation : 0 jours 0 heures 30 minutes

Répétition Aucune

Libellé de la réservation

CYMAGES - Anne-Laure

Description de la réservation

Liste des participants

Ajouter name or email Utilisateurs Groupes

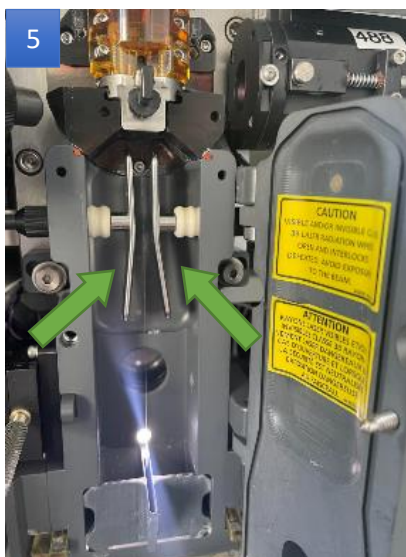
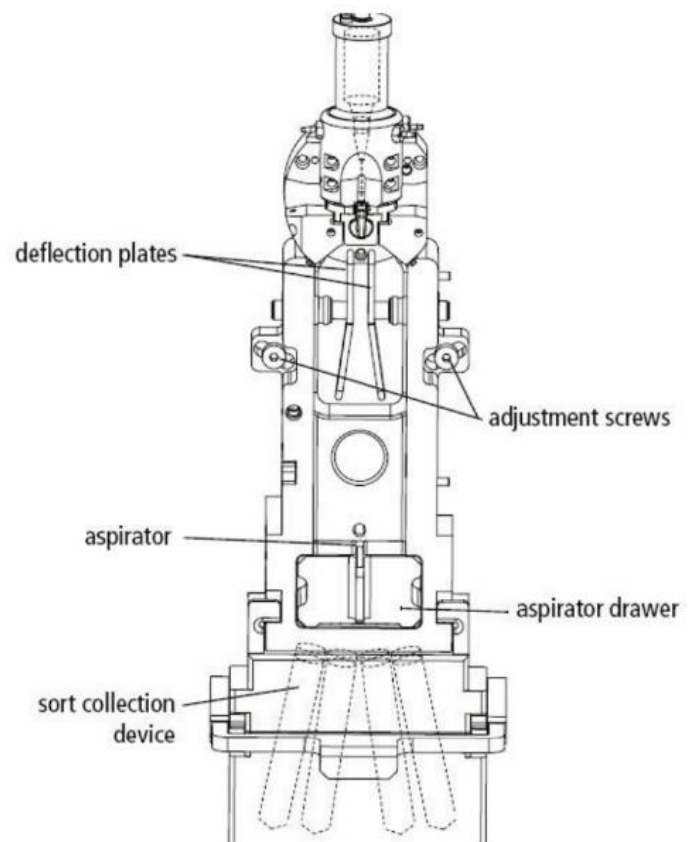
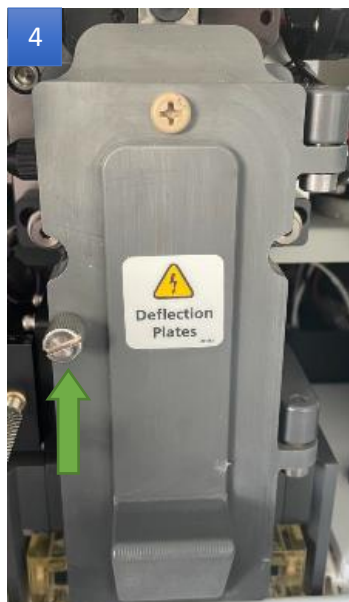
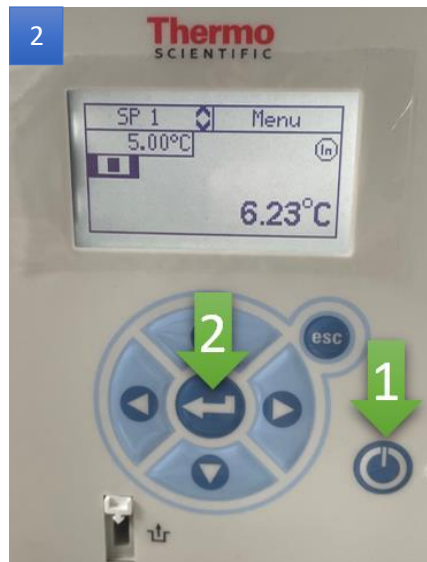
Invités

Ajouter name or email Utilisateurs Groupes

Autoriser des participants à se joindre


Annuler Créer



6. Compléter le **libellé de la réservation** en ajoutant votre **nom et votre équipe**. Préciser la date, le créneau horaire et la ressource (l'appareil choisit).
7. Cliquer sur créer pour valider la réservation
8. Vous pouvez **modifier ou annuler votre réservation** jusqu'à la seconde précédent votre créneau. Pour cela cliquer sur votre créneau, modifier votre créneau selon votre besoin et enregistrer. Pour supprimer votre réservation cliquer sur votre réservation puis sur « Plus » et Effacer.



ALLUMAGE

1. Allumer l'ARIA III : bouton vert côté gauche de l'appareil
2. Allumer si besoin le système de refroidissement

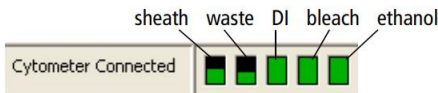
a. Bouton 

b. Bouton  → Signe  apparaît

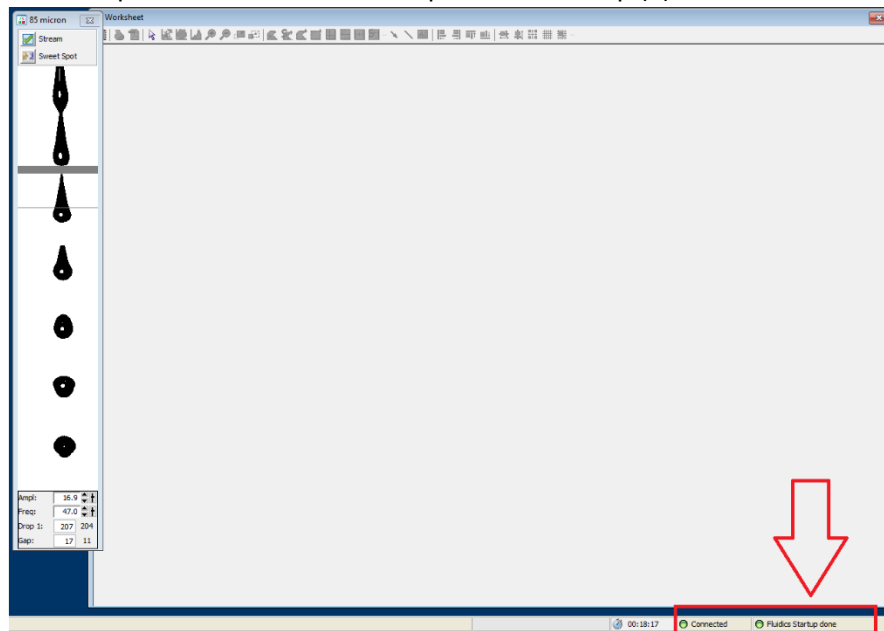
3. Soulever le capot de façade
4. Ouvrir le boîtier gris « Déflexion plates »
5. Nettoyer les déflecteurs :
 - a. Les retirer à l'aide de l'outil noir (sur le portoir tube)
 - b. Les nettoyer avec de l'isopropanol + sopalin
 - c. Bien les reclipser à fond
6. Allumer l'ordinateur
 - a. Boutons ON PC/écrans
 - b. CTL/ALT/Suppr
 - c. Attendre 1 minute l'initialisation de la carte réseau
 - d. Cliquer sur BD FACS Diva Software

User : Badmin

Mot de passe BDIS#1\$\$
 - e. User : Choisir son équipe
 - f. Attendre connexion (≈ 1 minute)
7. Vérifier niveaux de la fluïdique

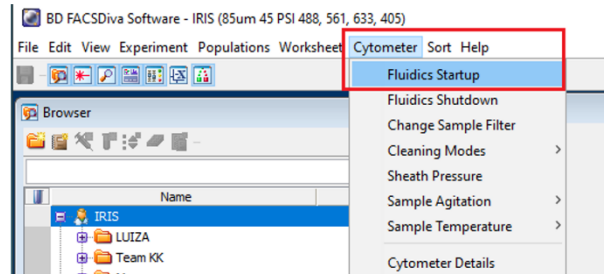


- 8.
9. Regarder état de la machine :
 - Si Fluidic Shutdown done → faire un Startup complet (3)
 - Si Startup done → passer directement à l'étape 4.b du startup (3)

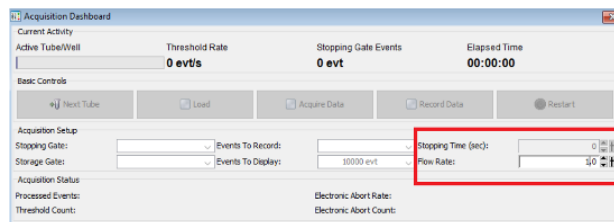


START-UP

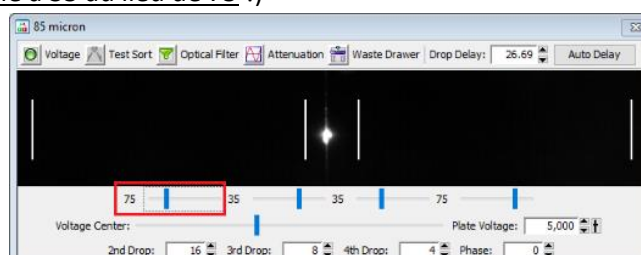
- Vérifier que la configuration est celle souhaitée (taille de la nozzle : 70, 85, 100...)
 - Onglet Cytometer/ View configuration/ Choisir la configuration souhaitée puis fermer le module CST pour revenir dans DIVA
 - Onglet Sort/sort SETUP/menu déroulant/Cliquer sur la taille de la nozzle souhaitée
- Si Start-up done : Commencer directement à l'étape 4.b**
- Cliquer sur Cytometer/Fluidics start-up

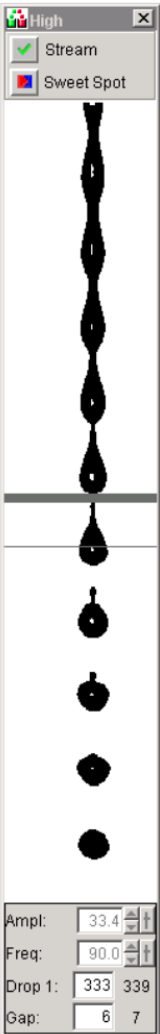


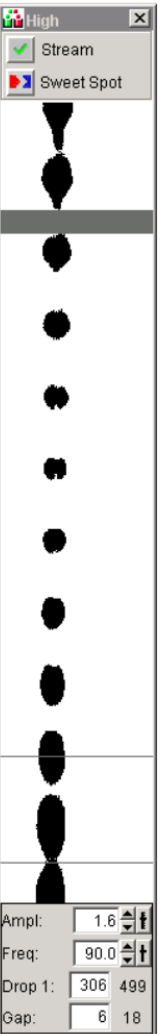




- Suivre les étapes indiquées :
 - Brancher la fluidique :
 - Déplacer la tubulure bleue du tank d'alcool vers le tank de Sheath fluid
 - Faire la même chose avec la tubulure Jaune
 - Cliquer sur Done. Le Startup est lancé, une barre de progression apparait.
 - Enlever la close Nozzle
 - Placer la buse d'intérêt (sur le portoir). Attention au sens « top » précisé sur la buse
- Vérifier **FLOW RATE =1**



- Allumer le Stream
 - Vérifier que le tank de Sheath fluid est bien fermé (il se dévisse souvent à l'allumage du stream)**
 - Vérifier que le jet est centré dans l'aspirateur poubelle
 - Si cela n'est pas le cas, éteindre le Stream puis essayer de replacer correctement et ou de changer la buse. Si le jet est toujours sur le côté, appeler quelqu'un de la plateforme pour le recentrer.
 - Inspecter l'image du stream : 2 gouttes consécutives et pas plus de 2-3 satellites, dits rapides. Ils doivent être réabsorbés. Si l'image n'est pas correcte, vérifier la **position de la nozzle, sa propreté. La changer si besoin.**
 - Attendre la stabilisation du stream (>15 minutes)**
- Vérifier le réglage des 4 canaux de tri : 75 - 35 - 35 - 75 pour la buse 85.5
(Souvent canal de gauche à 35 au lieu de 75 !)



 <p>Ampl: 33.4 Freq: 90.0 Drop 1: 333 339 Gap: 6 7</p>	<p>Abnormal Stream Image</p>	 <p>Ampl: 8.6 Freq: 90.0 Drop 1: 306 71 Gap: 6 30</p>	 <p>Ampl: 31.2 Freq: 90.0 Drop 1: 256 138 Gap: 6 5</p>	 <p>Ampl: 1.6 Freq: 90.0 Drop 1: 306 499 Gap: 6 18</p>	 <p>Ampl: 44.6 Freq: 90.0 Drop 1: 306 485 Gap: 6 27</p>	 <p>Ampl: 80.0 Freq: 90.0 Drop 1: 306 0 Gap: 6 0</p>
<p>Normal stream image</p>		<p>Nozzle inserted improperly</p>	<p>Nozzle inserted improperly or orifice off center</p>	<p>Partial clog</p>	<p>Wet or dirty strobe lens</p>	<p>Attenuation on at the wrong pressure</p>
	<p>Possible Causes</p>	<p>Remove the nozzle and re-insert it.</p>	<p>Remove the nozzle, adjust the opening, and re-insert it.</p>	<p>Remove the nozzle, clean it, and re-insert it.</p>	<p>Clean the lens as described in the user's guide.</p>	<p>Turn off attenuation in the Side Stream window.</p>

CHECH SETUP AND TRACKING (CST)

Les CST permettent de garantir un appareil fiable dans le temps. Ils permettent de vérifier la stabilité du banc optique mais aussi le calcul de l'area scaling et des lasers delay qui dépendent des lasers mais aussi du bon fonctionnement de la fluidique. Une modification de ces paramètres permet d'identifier par exemple, s'il y a un bouchage temporaire, des saletés sur/dans la flow cell qui peuvent altérer la puissance des lasers et la qualité de votre tri.

1. Cytometer / CST
2. Attendre que le module se connecte
3. Vérifier que la Cytometer configuration est la bonne (taille de nozzle) sinon cliquer sur Select configuration, sélectionner la bonne, cliquer sur set configuration, une fenêtre d'alerte apparaît cliquer sur OK, puis encore OK pour fermer la fenêtre configuration.
4. Vérifier le Lot ID (lot de billes, écrit sur le tube).
5. Mettre un tube avec 350µL de PBS + 1 goutte de billes CST (se conserve au maximum une semaine à 4°C à l'abri de la lumière). Noter sur le tube N°lot + date.
6. Lancer le check performance : cliquer sur Run puis sur OK
7. A la fin du check performance, cliquer sur « View Report » et contrôler le rapport de contrôle qualité
 - Δ PMT ne soient pas > à 50
 - CV de FITC (blue), APC (rouge), Cascade blue (violet), DAPI (UV) pas >6% (Coefficient de variation des billes pour les PMT les plus énergétiques de chaque laser ne soit pas >6%)
 - Lasers delays ne doivent pas avoir variés fortement par rapport à ceux obtenus lors de la baseline
8. Fermer CST et revenir sur DIVA
9. Une fenêtre apparaît :

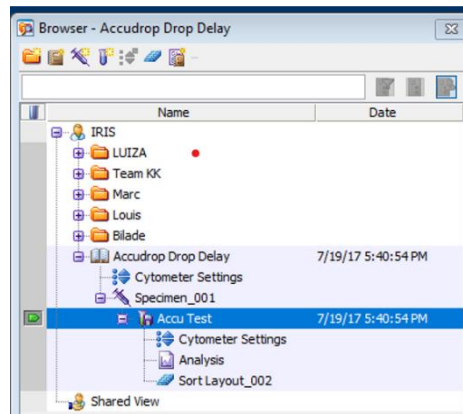


- Si le rapport du check performance est « **Passed** » : cliquer sur **Use CST settings**
- Si le rapport n'est pas bon : cliquer sur Keep current settings et contacter un responsable

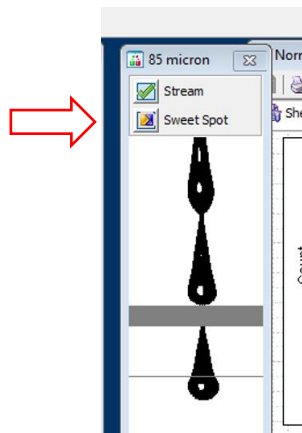
10. Ranger le tube avec son capuchon au frigo

ACCUDROP

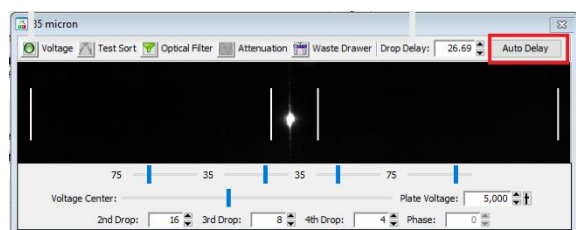
1. Billes Accudrop dans le frigo, étagère porte CYMAGES
→ 1 goutte dans 1 ml de PBS + date sur le tube. A refaire chaque semaine



2. Double cliquer sur le dossier « Accu Drop delay »/Specimen 001/ Accu Test (→livre ouvert)
3. Cliquer sur la flèche devant « Accu Test ». Elle doit devenir verte
4. Double cliquer sur « Sort Layout 002 » pour ouvrir la fenêtre de sort
5. Vortexer les billes, placer le tube dans le trieur
6. Mettre **le Flow rate à 1**
7. Bloquer le Sweet Spot



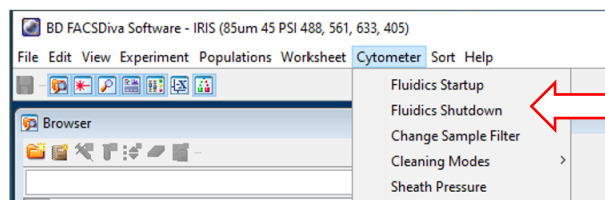
8. Sélectionner le tube Accu Test (double clic, la flèche doit être verte)
9. Cliquer sur Load/Sort/Canceled
10. Augmenter le flow rate progressivement jusqu'à obtenir environ 1 000 evts/sec (entre 800 et 1200)
11. Cliquer sur Auto delay/Start Run (x2 si message en rouge)



12. Attention vérifier le volume restant au fur et à mesure
13. Noter le Delay sur le cahier
14. Cliquer sur Exit / Sort /Unload
15. Remettre le tube avec son capuchon au frigo

SHUTDOWN

1. Préparer 3 tubes contenant respectivement 3 ml de:
 - A = Clean solution
 - B = Rinse solution
 - C = Eau MilliQ
2. Passer chaque tubes 5 minutes à un Flow rate de 5
3. Arrêter le Stream
4. Vérifier le planning de la semaine de l'ARIA III :
 - ➔ Si quelqu'un est après vous dans la journée : laisser l'appareil allumé et **prévenir la personne suivante**
 - ➔ Si personne ne passe après vous dans la journée mais que l'appareil est réservé un jour dans la semaine ne pas faire de Fluidic Shut down. Passer directement à l'étape 5.d. et faire le **cleaning Flow cell** (5.g)
 - ➔ Si personne n'est après vous le jour même ou le reste de la semaine : effectuer le **Fluidics ShutDown**
5. Fluidics Shutdown
 - a. Vérifier que le tank d'alcool 70% est rempli (environ 3 cycles de Fluidics Shutdown par Tank)
 - b. Cliquer sur Cytometer/Fluidics Shutdown. Suivre les étapes indiquées



- c. Déplacer les tubulures sur le tank d'alcool
- d. Retirer la nozzle et la remettre dans son tube avec du C (eau MilliQ)
- e. Remettre la close nozzle
- f. Laisser le tube de C
- g. Si short shut down faire un **cleaning Flow cell**
 - Placer le tube de C rempli au moins à moitié
 - Cliquer sur Cytometer/Cleaning Mode/Cleaning Flowcell
 - Le tube monte et redescends ➔ Ok
- h. Cliquer sur File/Quit
- i. Eteindre PC + écrans
- j. Eteindre l'appareil (Bouton vert + Système de refroidissement si allumé)
- k. Vider la poubelle
 - ➔ Si cellules humaines : dans le bidon déchets chimiques prévu à cet effet
 - ➔ Si cellules animales : vider dans l'évier
 - ➔ **Remettre un fond de javel** dans la poubelle (Flacon sur la paillasse CYMAGES)
- l. Dépressuriser et remplir le tank de FACS Flow jusqu'au trait

CONSEILS D'UTILISATION

1- SUSPENSION CELLULAIRE

- **Filtration obligatoire** de votre suspension cellulaire sur filtre 35 ou 100 µm
Reference Falcon : Cells strainer 352235
- **Concentration optimale** : 10 à 15 millions de cellules par ml en PBS ou PBS + **max 2% SVF**
Max 20 millions de cellules par ml et éviter de descendre en dessous de 10 millions par ml pour un temps de tri optimisé. En moyenne l'idéal est de se mettre à 6000/7000 évènements/sec à un flow rate de 2. Cela correspond à une concentration autour de 10 millions de cellules par ml.

2- GATING

- Stratégie de gating à optimiser car seulement **12 gates possibles**
- Jamais de gates chevauchantes pour les cellules à trier. Un espace doit être maintenues entre les gates sous peine d'avoir un tri non fiable des deux populations.
- Jamais de gate de tri en dessous de 0. Si marquage faible après les compensations, augmenter les PMT pour le canal concerné et refaire les compensations.

3- PARAMETRES DE TRI

- Taille de la buse : La taille de la cellule ne doit pas dépasser un cinquième du diamètre de la buse
- Passer ses échantillons à un **Flow rate compris entre 1 et 3**. Le nombre d'évènements doit être **inférieur à 10 000 evts/sec**. Si il est plus élevé, risque de bouchage et un tri moins efficace. Pour cela vous pouvez :
 - a. Diluer vos échantillons si le nombre d'evt/sec est supérieur à 10 000 evts/sec même à un flow rate de 1
 - b. Centrifuger vos échantillons et les re-suspendre dans un volume inferieur si vous avez un nombre d'evts/sec insuffisant à un flow rate de 3.
- Choisir les voies centrales pour les populations majoritaires : limite les contaminations des populations minoritaires
- Vous pouvez réaliser vos tris en 2 ou 4 voies. Si vous utilisez le 4 voies le réglage optimal est le « 4 ways purity »
- Le tri est possible en tubes de 15ml, 5ml, Eppendorf 1.5 ml et en plaque.
- Toujours disposer du liquide dans vos tubes de collection. A définir en fonction de ce que vous ferez ensuite de vos cellules. Par exemple du milieu de culture avec SVF si vous prévoyez de la culture, du PBS ou du tampon de lyse si vous extrayez directement l'ARN ensuite. Pour que le tri soit moins traumatisant (tri long), vous pouvez pré-coatés vos tubes de collection avec du SVF.
- La chambre de tri peut être thermostatée à la température souhaitée grâce au système de refroidissement (à brancher lors de l'allumage de l'ARIA). Le tube d'échantillon également (Cytometer/Sample Temperature)

