*Merci à tous ceux qui ont contribué à l’écriture de ce protocole v. 210729*

**Analyse des données de cytométrie avec le logiciel CytExpert**

*Stations d’analyse « Cyto» (CRC 4867)*

|  |
| --- |
| *Ceci n’est point un mode d’emploi, mais juste un aide mémoire pour ceux qui ont reçu la formation sur cet appareil.* |

*Veillez noter, que vous pouvez télécharger du site de la plateforme*

*-* ***les textes de Matériels et Méthodes*** *pour vos articles et les modes d'emplois des appareils*

*- une version gratuite de logiciel d’analyse*

[*https://plateforme-cytometrie.med.usherbrooke.ca/documents/CytExpert%202.0%20Setup.exe*](https://plateforme-cytometrie.med.usherbrooke.ca/documents/CytExpert%202.0%20Setup.exe)

1. Allumer la station d’analyse
2. User name : ***Perfect User***  visitor1: (pour \ choisir ENG US et peser sur )
3. Ouvrir le programme **CytExpert**.
4. Aller dans «**File**», → «**Open Experiment**».
5. Choisir l’expérience désirée ( fichier de format **.xit**)
6. Vue d’ensemble de la morphologie des cellules : **FSC-H / SSC-H** réglé sur «All Events»
	* Double clic sur le plot : une fenêtre («**Plot Property**») apparaitra.
	* Cliquer sur **X Axis Default** puis sur **Y Axis Default**.
	* Cliquez sur **Log** pour les deux axes.
	* Z**oomer**, en utilisant
7. Vue détaillé de la morphologie des cellules : **FSC-A / SSC-A** réglé sur «All Events»
8. Faire les réglages de base (cf. l’étape 6), mais mettre les axes en **Lin**.
9. Faire apparaitre les 0 sur les deux axes afin de voir tous les évènements
10. Limiter l’affichage à un nombre d’évènements permettant le choix avisé des populations : Menu **Settings** → **Events display setting** → **Display.** Rentrer 100 (ou autre) percent of events acquired. Ou choisir p. ex 25 000 évènements dans « Display first »,
11. 100% Show apparait sur tous les graphiques en bas à gauche
12. Adapter le type de présentation : clic droit → « Plot type », puis soit sur :
	* « Dot plot » : Pour voir tous les évènements (cellules)
	* « Contour plot » / « Density » -- indépendantes du nombre d’évènements



1. Sélectionner les cellules à analyser en créant une «gate» (p.ex Lasso, Polygon )
2. CHAQUE FOIS QUE VOUS CRÉEZ ou BOUGEZ UNE GATE , FAIRE LE CLIC DROIT SUR LA GATE

**APPLY TO ALL TUBES** *(ou to tubes désirés).*

1. Nommer la population d’intérêt (p. ex : *cells*) et en choisir la couleur ( clic droit sur la «gate»)
2. Allez sur le graphique **FSC-A/H** / **SSC-W**idth qui permet de distinguer les doublets.
3. Faire les réglages de base (cf. l’étape 3)
4. Créer une «gate» dans ce graphique pour sélectionner votre population et éliminer les doublets.

**APPLY TO ALL TUBES**

1. Afin de parfaire votre sélection des populations utilisez les axes affichants un quotient des paramètres : FSC A/H ; FSC-A/SSC-A  etc (interchanger ces axes).

Pour créer de tels paramètres : Settings → Set Customized Parameter. Choisir l’opération désirée, puis lui attribuer un nom. Choisir «All Tubes»

1. Fenêtre SSC-W / Temps

Créer des « Clamp » afin d’éliminer toutes les périodes où l’acquisition de l’échantillon semble avoir été perturbée. (p.ex au début de l’acquisition l’appareil aspire d’un coup 40 μL avec le surplus de succion. Ceci peut grandement altérer la précision l’acquisition).

Le cas échéant changer l’affichage de dot-plot FCS-A/SSC-A à « non Clamp »

1. Une fois que vous avez bien sélectionné votre population, il s’agit de s’amuser avec les fluochromes.
2. Pour le contrôle négatif amener toutes les populations au 0 visible sur l’axe des y sans trop écraser les populations (échelle biexponentielle)
3. N’oubliez pas les réglages de base des graphiques ainsi que de sélectionner la bonne «gate» pour les graphiques de fluochromes. Il est plus facile d’analyser les fluochromes avec l’axe des x en FSC-A. De plus, les histogrammes peuvent vous aider à mieux comprendre la situation. Une compensation peut être nécessaire.
4. Cliquer sur Export All Sample to CSV File…
5. Cliquer sur Batch Export to PDF file…

**Création d’une matrice de compensation**

1. Open model de compensation vide (p.ex. Comp30.xit)
2. Save as Comp\_xxyyzz
3. Importer premier couleur .fcs (right click) \*--- cf le tableau de correspondance
4. Gater sur les billes dans FSC/SSC + zoom
5. Importer le reste des échantillons de billes, puis le tube des cellules non-marqués C
6. Gater sur les cellules dans FSC/SSC + zoom
7. Ajuster l’échelle pour histogramme des billes afin de visualiser les pics et placer les « Auto line segments » pour délimiter les 2 pics : pos et neg
8. Gater sur unstain+pic
9. Cliquer sur « Compensation matrix »
10. Setting compensation → calculation
11. Passer en revue les colonnes afin de vérifier que tout est logique. Cliquer « Save as matrix »

**Application de la compensation sur le jeu de donnée de l’expérience**

1. Ouvrir l’expérience « File » → « Open Experiment »
2. « Compensation matrix » → Importer la matrice & convert based…
3. Dans le tableau de compensation vérifier que « Area and Height in sync” soit coché
4. Vérifier les chiffres pour être sûr que c’est la bonne matrice qui a été ouverte.
5. Cliquer sur « Apply to… » et appliquer la compensation sur tous les échantillons
6. Passer en revue les billes pour s’assurer que la matrice a bien fonctionnée.
7. Vérifier le contrôle (unstained) - pour s’assurer qu’il n’y a pas de changements suite à la compensation
8. Vérifier l’étalon (cellules normales) pour s’assurer qu’il n’y a pas de changements dans la distribution des populations suite à la compensation

*Exceptionnellement réajuster la compensation à l’aide du sigle : Faire « Apply to all ». La nécessité de correction manuel n’est pas un bon signe.*

**Analyse du jeu de donnée**

1. Ouvrir le modèle créé lors de la mise en place de la stratégie de gating.
2. Il est utile de toujours garder un échantillon étalon provenant d’une expérience précédente et qui était parfait en guise de comparaison etc.
3. Importer les données à analyser.
4. Nombre d’évènements peut être réglé sur 100% au besoin.
5. Zoomer sur les populations et choisir la meilleure visualisation : « Dot plot » « Pseudo » ou autre
6. Dans « Plot property », cliquer sur « Custom ». Les valeurs vont alors pouvoir être entrées manuellement.
7. « Bring population to front » permet de mettre en avant la population de la couleur désirée.

**Exclure les débris pour l’analyse dans Cytexpert**

1. Ouvrir le modèle créé lors de la mise en place de stratégie de gating.
2. Importer les données à analyser.
3. Faire une gate sur les cellules que l’on désire conserver (e.g PBMC) en excluant les débris.
4. Apply to all.
5. Vérifier que la gate est au bon endroit pour chacun des tubes.
6. Cliquer sur « File » et puis « Export FCS File ».
7. Sélectionner les tubes dans lesquels on veut enlever les débris.
8. Choisir la population désirée (e.g PBMC)
* FCS 3.0
* Path : à l’endroit désiré (e.g votre dossier)
1. Cliquer sur « Next ».
2. Cliquer sur « Étalon unstained ».
3. Cliquer sur « File » puis « Import FCS File » et sélectionner tous les tubes qui sont unstained dans l’ordre désiré.
4. Cliquer sur « Étalon stained ».
5. Cliquer sur « File » puis « Import FCS File » et sélectionner tous les tubes qui sont stained dans l’ordre désiré.

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*+

**Analyse des données de cytométrie avec le logiciel ModFit**

1. Ouvrir le logiciel ModFit.
2. Ouvrir le fichier FSC contenant les échantillons de l’expérience désirée et sélectionner le tube 1.
3. Ajuster les axes du graphique avec les paramètres désirés. Pour les ajuster, faire un clic droit sur le graph et sélectionner « Edit properties ».

Paramètres pour le cycle cellulaire :

X : SSC-Width

Y : PI\_PC5.5H

1. Ajouter une gate et la modifier pour sélectionner la population. Pour ce faire, cliquer d’abord dans la boîte (gate) nouvellement créée. Ensuite, la forme de la gate peut être modifiée.
2. Choisir modèle.

Pour le cycle cellulaire : → Cell cycle → Diploid → Cocher : Peak G2 visible.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **➤➤ 375** | **“BV510”***525/40* | *• DAPI*• Brilliant Violet 480• Brilliant Violet 510 | • BUV496 • Pacific Orange  | • StarBright Violet 515 • VioGreen |
| **“BV711”***712/25* | • Brilliant Violet 711 |  |  |
| **➤➤****405** | **“DAPI”***450/45* | • Alexa Fluor 405 • Brilliant Violet 421• Brilliant Violet 480• CF405M • CF405S | • DyLight 405 • eFluor 450 • Pacific Blue • Pacific Green• RayBright Violet 450 | • StarBright Violet 440• SuperBright 436• V450• VioBlue• violetFluor 450 |
| **“BV605”***610/20* | • Brilliant Violet 605  | • Pacific Orange • Qdot 605 | • StarBright Violet 610• SuperBright 600 |
| **“BV785”***780/60* | • Brilliant Violet 750• Brilliant Violet 785 | • Brilliant Violet 786 | • SuperBright 780 |
| **➤➤****488** | **“FITC”***525/40* | • Alexa Fluor 488 • Alexa Fluor 532 • BB515 • CF488A  | • CoraLite 488 • DyLight 488 • FITC • Fluorescein  | • KIRAVIA Blue 520• RayBright Blue 488 • Spark Blue 550• Vio515• VioBright 515 |
| **“PE”***575/26* | • PE • Alexa Fluor 532  | • Cy3  | • Spark Blue 550 |
| **“ECD”***610/20* | • ECD• NovaBlue 610 / 30S • PE-Alexa 610 • PE-ATTO 594  | • PE-CF594 • PE-Dazzle 594 • PE-DyLight 594  | • PE-eFluor 610 • PE-Texas Red • PE-Vio615 |
| **“PC5.5”***690/50* | • BB700 • PE-Alexa 647 • PE-Cy5 • PE-Cy5.5  | • PE-Fire 700 • PerCP • PerCP-Cy5.5 • PerCP-eFluor 710  | • PerCP-Vio700 • StarBright Blue 700 • Tri-Color |
| **“PC7”***780/60* | • PE-Alexa 750  | • PE-Cy7 | • PE-Vio770 |
| **➤➤****638** | **“APC”***660/20* | • Alexa Fluor 647 • Alexa Fluor 660 • APC • CF640R • CF647  | • Cy5 • DyLight 633 • DyLight 650 • DyLight 680 • eFluor 660  | • iFluor 647 • Janelia Fluor 646 • RayBright Red 647 • Tri-Color • Vio667 |
| **“APC-A700”***712/25* | • Alexa Fluor 660 • Alexa Fluor 680 • Alexa Fluor 700  | • APC-Alexa 700 • APC-R700 • Cy5.5  | • DyLight 680 • Tri-Color  |
| **“APC-A750”***780/60* | • Alexa Fluor 750 • APC-Alexa 750 • APC-Cy7  | • APC-eFluor 780 • APC-Fire 750 • APC-Fire 810  | • APC-H7 • APC-Vio770 |