

Plateforme ACOA (Analyse en Cytométrie des Organismes Aquatiques) de LIENSs

Fonctionnement et Règlement

Version 2,0, Aout 2020

Rédacteur : H. Agogué

Table des matières

1. Préambule	2
2. Organisation	2
3. Objectifs de la plateforme	3
4. Equipements analytiques et mesures réalisées	3
5. Conditions d'utilisation de la plateforme	3
6. Contrôle qualité	8
7. Gestion de la plateforme	8
Annexe I- Tarification interne (LIENSs et ULR) : Cytomètre en flux FACS CantoII	13

1. Préambule

La plateforme de cytométrie en flux, ACOA (Analyses en Cytométrie des Organismes Aquatiques) regroupe des équipements de cytométrie en flux couplés ou non à de l'imagerie. Elle est localisée dans le bâtiment ILE (Institut du Littoral et de l'Environnement ; 2^{ème} étage, salle 224) du laboratoire LIENSs (UMR7266), situé sur le campus de l'Université de La Rochelle. La plateforme ACOA a été créée à l'Université de La Rochelle fin 2010, lors de l'achat via des fonds régionaux et européens du cytomètre en flux, du cytomètre à imagerie et du recrutement de l'ingénieur d'étude CNRS responsable.

Cette structure est mise à la disposition des chercheurs et enseignants-chercheurs, des personnes en contrat à durée déterminée (type post-doctorat ou ATER), doctorants et stagiaires de l'unité 7266 mais également à la communauté scientifique académique nationale et internationale, aux collectivités territoriales et aux partenaires privés sur la base d'une collaboration scientifique ou à titre de prestation de services. La plateforme ACOA a aussi vocation à former les personnes qui souhaitent utiliser les approches de cytométrie dans leur recherche, afin que ces personnes aient les connaissances suffisantes pour pouvoir utiliser de façon autonome les différents équipements.

L'objectif de ce règlement est d'établir les principes qui doivent être respectés par l'ensemble des acteurs impliqués dans le fonctionnement et l'utilisation de la plateforme. En adhérant à ce règlement, toute personne collaborant avec la plateforme s'engage à respecter et/ou à faire respecter par les personnes sur lesquelles il a autorité ou dont il dirige le travail, l'ensemble des règles précisées ci-dessous.

2. Organisation

La Plateforme de cytométrie est gérée par 1 référente :

* Référent scientifique : Hélène Agogue, CR1 CNRS.

helene.agogue@univ-lr.fr

05.46.50.76.50

3. Objectifs de la plateforme

La plateforme ACOA a pour but de développer des protocoles standardisés en cytométrie en flux. Elle a pour rôle d'offrir des appareils de qualité, d'accompagner les chercheurs dans leurs analyses et leurs projets et de former les utilisateurs.

4. Equipements analytiques et mesures réalisées

4.1. Equipement de la plateforme ACOA

* **Cytomètre en flux FACS Cantoll** (BD Biosciences, Belgique) équipé de 3 lasers : bleu, rouge et violet.

- Quantification et caractérisation des virus de l'environnement (eau, sédiment)
- Quantification et caractérisation des procaryotes (eau, sédiment)
- Quantification et caractérisation du nano/picoplancton <10µm
- Quantification et caractérisation des activités de cellules eucaryotes

* **Cytomètre en flux à imagerie FlowCAM** (Fluid Imaging, Etats-Unis) équipé d'un laser vert et d'une caméra

- Quantification et caractérisation d'organismes planctoniques de taille supérieure à 15µm de l'environnement
- Quantification et caractérisation d'autres organismes de taille >15µm de type parasites, champignons,...

à Une description détaillée des équipements disponibles et de leurs performances est précisée dans l'annexe 1 "Equipements disponibles".

5. Conditions d'utilisation de la plateforme

Les appareils sont placés sous la responsabilité des responsables scientifique et technique de la plateforme. Celle-ci est ouverte (sous conditions, cf charte) à toutes les équipes des structures de recherches rattachées à l'Université de La Rochelle (ULR) mais également aux équipes extérieures (public ou privé) qui en ferait la demande (se rapprocher auprès des référents de la plateforme).

**La plateforme est ouverte du lundi au vendredi de 9h à 18h
sous condition de la présence d'un des deux responsables.**

Toutefois, en l'absence des responsables, les appareils resteront accessibles aux expérimentateurs ayant acquis des compétences suffisantes pour être autonome sur l'appareil.

5.1. Conditions d'accès

Dans le cadre d'un projet interne au laboratoire LIENSs et à l'ULR

- Sans restriction sauf contraintes détaillées aux § 5.3 et 5.4.

Dans le cadre d'une collaboration scientifique (= valorisation scientifique à terme)

- Obligation de collaboration avec un chercheur du laboratoire
- Nécessité de concordance avec les thématiques du laboratoire

Dans le cadre d'une prestation de service

- Si disponibilité des moyens humains et analytiques

Formation

La plateforme encourage fortement la formation des utilisateurs réguliers. Des sessions de formation gratuite (en interne LIENSs) sont proposées par le personnel technique référent. La durée de formation est variable suivant le type d'instrument et est adaptée en fonction des besoins de l'utilisateur (développement de protocoles ou analyses de routine). Les dates sont à définir avec les responsables, seuls habilités à réaliser les formations sur les instruments de la plateforme.

Une fois la formation suivie, l'utilisateur peut utiliser de manière autonome l'instrument sur lequel il a été formé. Il est donc important de planifier cette formation avant le début de toute expérimentation.

L'accès aux équipements n'est possible que sous réserve de leur disponibilité (cf. § 5.3.1), de la présence d'un responsable et du respect des règles d'utilisation de la plateforme (cf. § 5.4.3).

Tout utilisateur ne pourra avoir accès à la plateforme de cytométrie qu'après avoir suivi la formation, signé la charte d'utilisation et reconnu avoir lu ce règlement.

5.2. Rôle et responsabilités de l'équipe référente et des utilisateurs

5.2.1 Equipe référente :

De par la double compétence scientifique et technique, l'équipe référente est la plus à même de s'assurer de l'usage adéquat des équipements de la plateforme par rapport aux objectifs scientifiques associés. Elle a pour rôle de :

- * veiller à la qualité analytique du système, à sa maintenance et à son évolution.
- * conseiller les utilisateurs dans leurs démarches d'expérimentation en cytométrie en flux et sur le fonctionnement des appareils.
- * organiser les réservations des appareils.
- * faire une veille technologique et scientifique dans le domaine de la cytométrie en flux.

Le responsable de la plateforme ne pourra en aucune manière être tenu pour responsable d'une mauvaise utilisation des instruments par les utilisateurs habilités et donc en conséquence de la qualité des résultats obtenus.

La plateforme ne garantit pas la validité des résultats obtenus sur ses appareils. Elle fournit des résultats bruts (non interprétés) et sont sous la responsabilité de l'opérateur.

Les analyses de routine, hors collaboration, sont en aucun cas réalisées par le responsable technique de la plateforme, il peut cependant conseiller, assurer un suivi des expériences et aider à l'analyse et au traitement ainsi qu'à la validation des résultats

5.2.2. Utilisateurs :

Les matériels sont mis à disposition des utilisateurs qui ont l'obligation de respecter le règlement de la plateforme et les règles d'hygiène et de sécurité. En cas d'incident, les utilisateurs sont tenus d'en informer les responsables.

Tout utilisateur doit respecter les procédures de mise en route, d'utilisation et d'arrêt des appareils.

5.3. Priorités et plannings d'utilisation

5.3.1. Utilisation des équipements de la plateforme

Il est indispensable de réserver les appareillages de la plateforme (cytomètre FACS Cantoll et FlowCAM) dû à une forte activité à certaines périodes (projets, stages, ...). Il suffit de réserver sur l'intranet de l'ULR (ENT/Mes Outils / Emploi du Temps et Réservations / Objets / ILE / Cytomètre à imagerie FlowCAM OU Cytomètre en flux FACS Cantoll)

En cas de problème (urgence, inaccessibilité au fichier de réservation..), consulter l'équipe référente, mais les stagiaires DOIVENT passer par leur maître de stage pour faire les réservations.

-  La réservation implique l'engagement d'utilisation : il n'est pas correct vis à vis des autres utilisateurs de bloquer des appareils sans les utiliser. En cas d'abus, les réservations suivantes des utilisateurs en cause seront limitées d'office.**

5.3.2. Planning des analyses

Le principe du "premier arrivé – premier servi" s'applique mais avec de nombreuses contraintes qui sont gérées par l'équipe référente :

- * contraintes de disponibilité des personnes habilitées
- * contraintes techniques : dépendantes de la maintenance des appareils, du type d'échantillons analysés etc...
- * priorités : à certaines formations diplômantes (M2 en particulier), aux tests avant préparation de grosses séries, à certaines situations d'urgence (campagne de terrain)...

Attention : les formations diplômantes ne sont considérées comme prioritaires que si l'équipe référente a été avertie à l'avance (en fin d'année n pour un M2 en n+1 par exemple) du nombre (approximatif) d'échantillons à analyser et de la période d'obtention et d'analyses des échantillons.

5.4. Contraintes d'utilisation de la plateforme

Rappel : les chercheurs sont responsables des protocoles de préparation de leurs échantillons et donc de la conformité des échantillons quant à leurs passages et analyses par un des deux cytomètres en flux.

5.4.1. Hygiène, sécurité et bonnes pratiques de laboratoire

Chaque utilisateur est tenu de respecter les règles d'hygiène et de sécurité et des bonnes pratiques de laboratoires :

- * ne pas manger ni boire dans les locaux
- * porter une blouse et des gants lorsque nécessaire
- * respecter le tri sélectif réalisé au sein de la plateforme (déchets non contaminés, verres, déchets chimiques liquides, déchets biologiques, déchets CMR...)


Tout utilisateur doit informer le responsable technique de la dangerosité potentielle des échantillons (pathogènes, mutagènes, nocifs, produits chimiques,...) qui seront introduits dans les locaux avant toute expérimentation.

5.4.2. Usage du laboratoire

Un mode d'emploi complet et une fiche synthétique est présente à côté de chaque équipement : cytomètre en flux Cantoll et FlowCAM. Les protocoles et guides d'utilisation des équipements sont mis à disposition des utilisateurs sur demande auprès du responsable technique.

Un cahier de suivi d'expérience est disponible près de chaque équipement. Les utilisateurs doivent obligatoirement renseigner la date, le type d'analyses effectuées et la quantité d'échantillons à chaque séance.

Si un problème survient au cours des expérimentations, l'indiquer précisément sur le cahier de panne de l'instrument.

-  **Les utilisateurs (et les maîtres de stage/directeurs de thèse pour les stagiaires et doctorants) sont responsables de l'usage des équipements et de leur nettoyage après utilisation.**

M Un mauvais usage des équipements pouvant conduire à leur dégradation, ou le non-respect de l'obligation de nettoyage des équipements et accessoires utilisés, conduira à exclure les chercheurs, techniciens, doctorants ou stagiaires incriminés de l'utilisation de la plateforme.

5.4.3. Consommables et petits matériels

Tous les consommables liés à l'analyse en cytométrie de routine (tubes, marqueurs, billes de calibration, truecount) sont fournis par la plateforme, **à charge aux utilisateurs de signaler le besoin de renouvellement.**

Les petits matériels nécessaires (sonificateur, micro-centrifugeuse, vortex, boîtes de stockage d'échantillons, portoirs, tubes BD pour analyses, chambres de mesure du FlowCAM, ...) et le matériel H&S (gants) sont également fournis.

Les chambres de mesure du FlowCAM, qui sont des consommables, sont achetées par la plateforme. Leur coût est inclus dans la tarification des analyses de routine.

5.4.4. Valorisation des travaux

Tout utilisateur interne ou externe s'engage à reconnaître la plateforme pour les analyses effectuées sur les instruments.

* dans le cadre de collaboration interne ou externe qui ont impliqué le développement spécifique et/ou une participation intellectuelle et/ou technique spécifique de la part de l'un des responsables qui ont eu un impact significatif sur l'avancement des travaux : le(s) personnel(s) sera(seront) intégré(s) dans la liste des co-auteurs de publications, communications écrites et/ou orales.

* dans le cadre de prestation de service ou de travaux en interne n'ayant pas impliqué le personnel de la plateforme, la reconnaissance de la plateforme devra se traduire, dans les publications, par la mention « Data acquisition and analysis were performed on the cytometry platform of the LIENSs laboratory (UMR7266) dans le « Matériels et Méthodes » ; ou « The authors acknowledge the cytometry facility of the LIENSs laboratory » dans les remerciements.

En outre, le personnel de la plateforme s'engage à fournir les informations nécessaires à la rédaction des matériels et méthodes concernant les configurations des instruments utilisés.

Les publiants sont également tenus d'informer les responsables de la plateforme et de leurs fournir les références de la publication.

5.4.5. Confidentialité

Les données obtenues sont la propriété du laboratoire de recherche et/ou du chercheur qui mène l'expérimentation. Toute utilisation de ces données ; au titre de la plateforme, ne pourra se faire qu'après accord de l'utilisateur ou de son responsable.

5.4.6. Conservation des données

La conservation des données est sous la responsabilité de l'utilisateur, il est conseillé de les récupérer à la fin de l'expérience. Les données peuvent être récupérées via un disque dur, clé USB, ... **non fourni ET exempt de tout virus.**

Les données brutes ne sont pas archivées par la plateforme. Les disques durs des postes d'acquisition et d'analyse sont régulièrement nettoyés afin de garantir le bon fonctionnement des appareils.

6. Contrôle qualité

Les contrôles des appareils sont réalisés par l'équipe référente (calibration des bancs optiques, protocole de lavage long du cytomètre, ...).

La mesure du débit du cytomètre doit se faire quotidiennement par les utilisateurs du cytomètre. Les standards, billes de calibration de taille et de fluorescence devront être analysés en même temps que les échantillons.

Toutes les opérations d'analyse ou de maintenance sont consignées dans le cahier de suivi associé.

7. Gestion de la plateforme

La gestion quotidienne de la plateforme (plannings d'analyse et d'utilisation des équipements, prévision et suivi des commandes, maintenance des instruments) est assurée par l'équipe référente.

L'équipe référente gère aussi les demandes d'analyses de laboratoires extérieurs et prépare les devis avant prise en charge par les services administratifs et financiers du LIENSs, qui assure la gestion financière des deux entités dépensières de la plateforme ACOA (uniquement sur budget CNRS), une pour les crédits non reportables, une pour les crédits reportables.

L'équipe référente établit des bilans réguliers d'activités et de gestion, elle établit aussi le prix des analyses à partir des coûts des consommables et de la maintenance des appareils et réévalue ses tarifs annuellement.

7.1. Base de calcul du prix des analyses

Le coût effectif des analyses a été évalué selon le coût des consommables indispensables à l'expérience. Il varie selon le type de prestation : interne, externe publique, prestations privés.

Lorsqu'une collaboration est mise en place (intégration de la plateforme de cytométrie à un projet et donc intégration du responsable technique et/ou scientifique), la tarification interne est appliquée.

Le prix demandé (par type d'analyse) aux utilisateurs comprend :

- le coût de l'analyse elle-même (consommables, liquides de gaines, standards etc..),
- les tubes spécifiques à l'analyse,
- les marqueurs fluorescents,
- les consommables pour préparer les échantillons,
- la maintenance et la jouvence des équipements analytiques et des équipements de préparation,
- si besoin, la fourniture de l'azote liquide.

7.2. Prix des analyses

Ils sont établis en € HT, garantis pour chaque année civile et révisables chaque année en fonction du coût des produits.

Un devis précisera la nature et le coût des prestations ainsi que le délai de réalisation des analyses. Le demandeur devra le retourner signé, (ainsi que la charte d'utilisation de la plateforme pour un nouvel utilisateur) au responsable de la plateforme pour acceptation.

Ce coût d'analyse permet une bonne gestion logistique de la plateforme ACOA et l'alimentation d'une réserve pour une éventuelle panne sérieuse, toujours très coûteuse s'il faut une intervention du SAV du constructeur.

En cas de non-respect des présentes conditions générales d'utilisation, le responsable de la plateforme se verra dans l'obligation de retirer l'accès temporaire ou définitif aux utilisateurs.

Annexe 1 : Equipements disponibles

1- Caractéristiques techniques du cytomètre en Flux FACS Canto

Source d'excitation :

- * Laser bleu 20mW, 488nm
- * Laser rouge 17mW, 633nm
- * Laser violet 30mW, 405nm



Système optique :

- * chambre de mesure en quartz immergée dans un gel optique
- * alignement optique fixe
- * faisceaux lasers transmis par fibre optique
- * 10 paramètres : 8 fluorescences, SSC, FSC

Système BD Octagon™ :

- * Bloc optique de collecte des signaux émis après excitation par le laser à 488nm
- * 5 détecteurs dédiés à la mesure du SSC et de 4 fluorescences (FITC, PerCP, PE-Cy7,...)

Système BD Trigon™ :

- * bloc optique de collecte des signaux émis après excitation par le laser à 633nm à 2 détecteurs dédiés à la mesure de 2 fluorescences (APC, APC-Cy7,...)
- * bloc optique de collecte des signaux émis après excitation par le laser à 405nm à 2 détecteurs dédiés à la mesure de 2 fluorescences (AmCyan, Pacific Blue,...)

Système fluide :

Console fluide autonome incluant :

- * Buse de 70µm
- * 1 réservoir de liquide de gaine (FACS Flow™)
- * 1 réservoir déchets
- * 2 réservoirs de liquide de rinçage (FACS Rinse™ et FACS ShutDown™)
- * cycles automatiques programmables pour le démarrage, l'arrêt et les cycles de rinçage

rinçage

- * système autonome de production de pression et de vide
- * système secondaire de gestion fluide intégré au banc optique (supprime les variations de pressions liées au niveau de remplissage des réservoirs de liquide de gaine)
- * pression fluide 5PSI
- * débit échantillon : de 8µL/minute à 120µL/minute
- * cadence d'acquisition : > 10 000 événements par seconde

Système électronique :

- * permet l'acquisition simultanée de 10 paramètres dont 8 PMT de fluorescence
- * cartes électroniques numériques de traitement du signal au moyen de convertisseurs A/D (Analogique/Digital) et de DSP (Digital Signal Processor) à mesure de la hauteur, largeur et la surface de pics
- * amplification Lin et Log numérique sur 5 décades
- * résolution sur 266 144 canaux

Option carrousel :

- * passage jusqu'à 40 échantillons de façon automatisée
- * pré-programmation de la vitesse d'analyse, du temps analysé
- * rinçage du système entre chaque échantillon

Logiciel : BD FACS Diva : Fonctionne sous Windows XP

- * acquisition et analyses des données
- * comptes utilisateurs personnels
- * correction de chevauchement spectral automatisé
- * templates pour l'acquisition et l'analyse (Cytometer Setting & Global Worksheet)
- * analyse manuelle ou automatisée`
- * analyse d'évènements rares par des fenêtres d'analyse
- * exportation automatique des fichiers .FCS
- * base de données intégrée
- * affichage graphique bi-exponentiel

Le logiciel dispose d'une base de données fournissant une interface avec les dossiers, les expériences et les fichiers .FCS. Il rationalise la sauvegarde des données et contient une fonction d'archivage pour une exportation facile et à long terme des données

2- Caractéristiques techniques du FlowCAM

Avantages combinés d'instruments multiples : cytomètre en flux, microscope et détecteur de fluorescence

Particularités :

- * FlowCAM portable : possibilité de l'emporter sur le terrain
- * Imagerie numérique haute vitesse
- * taille des particules, comptage et forme
- * analyse globale en temps réel et individuelle des particules
- * détection de fluorescence pour une sélectivité supplémentaire
- * détection de diffusion idéale pour les faibles concentrations en particules
- * alimentation 220V / 12V



Système optique :

- * caméra CCD numérique couleur haute vitesse : jusqu'à 12 images / seconde
- * analyse, visualisation et caractérisation en temps réel des particules : taille, nombre et forme des particules
- * laser 532nm, 15mW
- * 3 voies de détection :
 - tube photomultiplicateur 600-700nm à détection de la fluorescence rouge (>650nm)
 - tube photomultiplicateur 550-600nm à détection de la fluorescence orange (575nm)
 - 1 voie de rétro diffusion lumineuse
- * objectifs : X2, X4, X10 et X20

Système fluïdique : 2 types de pompes associées

- * pompe péristaltique
- * pompe seringue avec différents 4 types de seringues de volume différent (0,5mL, 1,0mL, 5,0mL, 12,5mL, selon la FlowCell utilisée) à débit de 0,005mL/minute à 20mL/minute
- * Flow cell : 50 μ m, 100 μ m, 300 μ m, 600 μ m, 800 μ m, 2*2 μ m, 2*4 μ m à dépendant de la taille des particules à analyser : de 2 μ m à 2mm

Système électronique :

- * mesure les signaux des paramètres de fluorescence et/ou de diffusion de lumière
- * délivre ces informations au processeur
- * production des signaux de déclenchement générés lorsque des particules passantes ont une fluorescence suffisante ou sont dans le jeu de paramètres de diffusion de lumière

Logiciel Visual SpreadSheet

- * acquisition et analyses des données générées par le FlowCAM
- * plus de 40 paramètres différents mesurés sur les particules : longueur, largeur, forme,...
- * reconnaissance de modèles, classification et numérisation automatique basé sur un set d'apprentissage
- * données des particules et résumés statistiques exportés sur excel
- * archivage des vignettes des particules

2 modes d'analyse dont la différence principale réside dans la manière de déclencher l'acquisition de photo via la caméra.

- * Autoimage mode : numérisation des photos des particules à intervalle de temps régulier, indépendamment de la concentration des particules dans l'échantillon
- * Trigger mode : déclenchement de la caméra soit par une détection de la fluorescence « Fluorescence-triggered mode », soit par une détection de la diffusion latérale de la lumière « Side-scatter-triggered mode », soit une détection par la combinaison des 2.