|  |  |
| --- | --- |
|  | **Plateforme de Cytométrie et d’Imagerie de Masse (CIM)** |
| **FICHE PROJET - HELIOS** |

**Titre du projet : Date :**

Coordonnées du porteur

Nom :

Email :

Nº de téléphone :

Coordonnées du gestionnaire

Nom :

Email :

Nº de téléphone :

Laboratoire (Intitulé complet, Département, Equipe)

-

Expérimentateur de l’étude

Nom :

Email :

Nº de téléphone :

**Description du projet :**

**Financement du projet :**

 **Acquis**[ ]  **Demande en cours**[ ]

*Préciser la nature des fonds* :

*Contraintes de dépense des fonds :*

**Nature de la demande** : Collaboration (\*) [ ]  Prestation de service [ ]

*(\*) La collaboration implique le partage de propriété intellectuelle. Le personnel CIM devra donc apparaître en tant qu’auteur dans toute publication.*

**INFORMATIONS IMPORTANTES**

Les informations contenues dans cette fiche peuvent être définies lors d’un premier contact entre la plateforme et les principaux interlocuteurs du projet.

Le protocole de préparation des échantillons, lorsqu’il n’est pas réalisé par la plateforme, doit être validé par le personnel de la plateforme. Un test de faisabilité peut être demandé. Les règles d’utilisation et de préparation des échantillons sont rappelées en annexe.

La plateforme sauvegarde les données brutes, cependant il est fortement conseillé de faire ses propres sauvegardes. La plateforme ne saurait être tenue responsable en cas de pertes de données.

**DETAILS DE LA DEMANDE**

Type d’étude : prospective [ ]  rétrospective [ ]

Nombre de cellules par échantillon (estimation) :

Origine : souris [ ]  humain [ ]  autres [ ]  *préciser* :

Nature des échantillons :

Echantillons acquis : oui [ ]  non [ ]

Prestations expérimentales souhaitées :

Couplage (cibles non disponibles en format couplé) : oui [ ]  non [ ]

Validation/Titration du panel : oui [ ]  non [ ]

Marquage des échantillons : oui [ ]  non [ ]

Si oui, marquages intracellulaires : oui [ ]  non [ ]

Acquisition :

Nombre minimum de cellules à acquérir :

Panel de marquage :

Format des Résultats

Raw data [ ]

Analyse des données validées [ ]  *préciser*:

**Réservé au Comité de Pilotage**

Date :

Avis du comité :

Commentaires :

**ANNEXE - Règles concernant la préparation des échantillons pour le cytomètre de masse (HELIOS)**

Deux paramètres sont essentiels pour permettre une qualité de marquage optimale en cytométrie de masse : l’absence d’agrégats et débris cellulaires et l’absence de contamination externe en métaux. Les règles ci-dessous sont donc à respecter scrupuleusement.

Afin de limiter la présence d’agrégat et de débris cellulaires il vous est demandé de :

* Prendre les précautions nécessaires lors de la préparation des échantillons afin d’éviter la formation d’agrégats (dissociation des cellules, EDTA, filtration, etc). Des tests préalables pour les cellules issues de tissus sont exigés afin d’évaluer la faisabilité du projet.
* La concentration de la suspension finale à acquérir doit être proche de 106 cellules/ml. Une concentration trop importante en cellules peut endommager le détecteur et/ou boucher les tubulures. L’utilisateur, s’il effectue lui-même ses marquages, s’engage donc à effectuer un comptage précis de ses échantillons et à le communiquer à la plateforme avant l’acquisition.

Afin de limiter au maximum les contaminations externes de vos échantillons :

* Vous devrez utiliser le Staining Buffer (SB) de Fluidigm pour tout lavage de vos cellules (le PBS no Ca+ no Mg+ est aussi toléré).
* Aucun tube ne doit être autoclavé lors des marquages
* Utiliser autant que possible du matériel en polypropylène
* Ne pas utiliser de seringue avec un joint noir
* Après fixation les cellules seront centrifugées à 800G

Afin de maximiser votre qualité de marquage et votre rendement cellulaire il vous est vivement recommandé les étapes suivantes :

* Titrer tous vos anticorps (0,5 - 1 - 1,5ug/3millions de cellules)
* Prévoir des FMO si besoin (à discuter au préalable avec le personnel CIM)
* Vérifier la viabilité des cellules par un marquage des échantillons au Cis-Platine
* Fixer les échantillons sur une nuit après le marquage dans une solution d’Iridium + MaxPar Fix and Perm Buffer de Fluidigm (ou Iridium + PFA 2%) à 4°C (une fixation sur 1h à RT est tolérée si le passage au cytomètre intervient immédiatement après).
* Réaliser 1 lavage dans 2 volumes de SB ou PBS sans Ca+ ni Mg+ après la fixation (soit ajout de 2mL de SB pour 1mL de suspension fixée)
* Réaliser un comptage des cellules juste avant le dernier lavage
* Apporter vos échantillons culotés dans une boîte de transport fermée dans un volume résiduel de tampon.
* Réaliser 1 lavage en eau sur la plateforme juste avant le passage de l’échantillon dans l’HELIOS.
* Après re-suspension en eau, ajouter les billes de standardisation, puis filtrer votre échantillon extemporanément sur des filtres de 40um avant le passage sur l’HELIOS.

Avant le passage 50000 cellules de chaque échantillon seront lysées avec 100uL d’HCL afin d’évaluer la contamination en iode, barium et plomb. Toute valeur supérieure à 500000 Dual Count d’un de ces éléments provoquera un refus de passage de votre échantillon contaminé.

Tout problème rencontré sur la plateforme sera notifié par email au responsable d’équipe et au porteur de projet en fin de journée.