

## Informations concernant les tris cellulaires au CR-HMR

### Contact:

Frédéric Duval, Ph.D

Anne-Marie Aubin, M.Sc.

Email: [cytometrie.crhmr.cemtl@ssss.gouv.qc.ca](mailto:cytometrie.crhmr.cemtl@ssss.gouv.qc.ca)

Téléphone: 514-252-3521

### Équipement:

La plateforme de cytométrie en flux du CR-HMR comporte deux trieurs cellulaires, opérés par les employés et 5 analyseurs mis à disposition des usagers ayant reçu leur formation pratique. En plus d'effectuer la maintenance et le contrôle qualité des instruments, la plateforme propose des formations et vous accompagne à tous les niveaux, soit de la conception expérimentale à l'analyse des données.



Le BDFACSAriaIII et le Cytek Aurora CS sont tous deux des trieurs de cellules à jet d'air. Essentiellement, en utilisant la technique de focalisation hydrodynamique, ces instruments alignent les cellules, contenues dans un échantillon, les unes à la suite des autres. Par la suite, ces cellules, marquées avec des fluorochromes, seront frappées par des lasers permettant d'identifier les cellules d'intérêt. Le flux continu transportant les cellules de

l'échantillon sort ensuite par l'orifice d'une buse. Simultanément, un transducteur fait vibrer la buse à une fréquence précise, provoquant la fragmentation du flux en petites gouttelettes contenant chacune des cellules. Les gouttelettes contenant les cellules d'intérêt sont ensuite redirigées à l'aide d'un champ électromagnétique vers les tubes de collecte, tandis que celles contenant des cellules indésirables sont dirigées vers le réservoir à déchets.

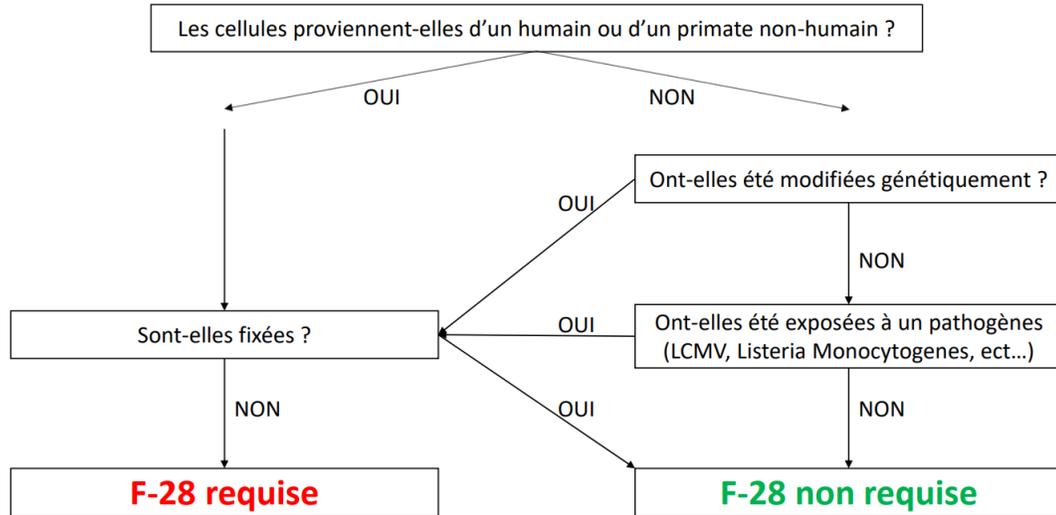
Si vous souhaitez obtenir plus d'informations sur la cytométrie en flux et plus particulièrement sur le tri cellulaire, veuillez suivre ce lien : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.202170126>.

## **Comment planifier une expérience de tri cellulaire**

- Il est crucial de s'assurer que la suspension cellulaire à trier soit exempte d'agrégats. Avant le tri, cette suspension devrait être analysée sur n'importe quel analyseur sans provoquer d'instabilité fluïdique. La préparation de l'échantillon est donc essentielle pour garantir le succès du processus. En optimisant cette préparation, non seulement le tri sera plus rapide, mais l'efficacité sera également accrue, permettant d'obtenir une pureté maximale des cellules triées, c'est-à-dire que les cellules d'intérêt seront isolées sans contamination.
- Il est primordial de créer un panel de fluorochromes vous permettant d'identifier clairement les populations d'intérêt.
- Identifier tous les contrôles qui seront nécessaires au succès du tri cellulaire. (Non-marqué, simplement-marqués et si nécessaire, Fluorescence moins un (FMO) qui signifie que chaque tube contient tous les fluorochromes utilisés lors de l'expérience moins un fluorochrome qui diffère d'un tube à l'autre.
- Estimez le temps dont vous aurez besoin pour trier le nombre souhaité de cellules d'intérêt.
- Si vous devez trier des cellules potentiellement infectées (voir schéma ci-bas), assurez-vous d'obtenir l'approbation de notre comité biorisques en remplissant le formulaire F-28 disponible sur le logiciel Nagano.

## Ai-je besoin de remplir une F-28 pour mon tri ?

TRI CELLULAIRE D'ÉCHANTILLONS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX



- Avant de procéder à la véritable expérience, il est fortement recommandé de faire des tests afin d'évaluer votre panel de fluorochromes, la qualité de vos échantillons, les puretés (la présence de contaminants dans les populations d'intérêt) et l'état de santé de vos cellules après le tri.

## **Informations à fournir aux employés effectuant le tri cellulaire**

Merci de nous faire parvenir les informations suivantes, le plus tôt possible, avant la date officielle du tri cellulaire.

- Assurez-vous de renommer ce fichier comme suit : (ANNÉE/MM/JJ)\_Le nom de votre laboratoire\_Le nom de votre panel
- Nom du laboratoire :
- Nom de l'utilisateur :
- Les cellules à trier sont-elles d'origine humaine ou ont-elles déjà été dans un niveau de confinement 2 (NC2) ? Si vous n'êtes pas sûr, contactez-nous. Si oui, avez-vous déjà rempli le formulaire F-28 ?
  - Si oui, veuillez svp indiquer l'identificateur F-28:
  - Si non, merci de remplir le formulaire « F-28 Tri cellulaire d'échantillons potentiellement infectieux » disponible sur le logiciel Nagano.
- Quel est le type de cellules à trier ? (S'agit-il d'une lignée cellulaire, de splénocytes, de thymocytes, de cellules transduites, etc?)
- Quelle buse souhaitez-vous utiliser ? (Les employés de la plateforme peuvent vous aider à répondre à cette question en fonction de la taille de vos cellules.)
- Combien de cellules à trier allez-vous apporter ?
- Dans votre échantillon, quelle est la proportion (en pourcentage) de la ou des population(s) que vous souhaitez trier ?
- Pour chaque population à trier, combien de cellules souhaitez-vous obtenir à la fin du tri ?
- Quel sera votre panel de fluorochromes ?
- Quelle stratégie d'identification de la ou des population(s) d'intérêt sera appliquée ? Les marqueurs de viabilité sont fortement recommandés.
- Quel type de tube de récolte sera utilisé ? (1.5 ml, 5 ml ou 15 ml)
- Souhaitez-vous que l'on vérifie la pureté des populations de cellules triées. Si oui, nous devons prélever 500 cellules par populations triées.
- Quand souhaitez-vous trier (Date (JJ/MM/ANNÉE) ? À quelle heure ?

## **Informations que vous devez savoir**

### ➤ **Les contrôles**

Fournir des contrôles appropriés est crucial pour obtenir les meilleures données compensées et bien identifier vos populations d'intérêt. Voici une liste non-exhaustive de contrôles appropriés :

- Échantillon non-marqué dans lequel aucune molécule fluorescente n'est présente (ex: sans GFP et sans fluorochrome).
- Contrôles simplement marqués. Si vous utilisez plusieurs fluorochromes dans votre cocktail, vous devez apporter des contrôles simplement marqués pour tous les fluorochromes inclus dans votre panel. (Ex: si votre panel contient du FITC, de l'APC et de l'APC-Cy7, merci d'apporter un tube contenant que du FITC, un autre contenant uniquement de l'APC et finalement, un tube contenant que de l'APC-Cy7). Veuillez svp vous assurer que vous pouvez acquérir au moins 2 000 événements positifs pour chaque contrôle simplement marqué.
- Facultatif : Les FMOs peuvent être utiles si l'identification de vos populations d'intérêt est difficile à effectuer. C'est-à-dire lorsque les populations positives et négatives sont difficilement dissociables l'une de l'autre ou si vous avez besoin d'être très précis, d'une expérience à l'autre, dans la manière dont vous identifier vos populations d'intérêt. (Ex : si votre panel contient du FITC, de l'APC et de l'APC-Cy7, le FMO FITC que vous allez apporter contiendra tous les autres fluorochromes de votre panel à l'exception du FITC soit uniquement de l'APC et de l'APC-Cy7, le FMO APC sera composé de FITC et d'APC-Cy7 et finalement le FMO APC-Cy7 contiendra du FITC et de l'APC). Les FMOs peuvent aussi servir à s'assurer que les valeurs de compensations sont optimales et de corriger les potentiels valeurs sous-optimales.
- Facultatif : Autres conditions expérimentales telles que stimulées / non-stimulées, transfection simulée et etc.

**Si votre tri doit être fait en condition stérile, merci d'apporter des contrôles stériles.**

### ➤ **Les échantillons**

- Le ou les échantillon(s) à trier doi(ven)t être concentré(s) à :
  - 40 millions de cellules par ml pour la buse de 70 uM.
  - 15 millions de cellules par ml pour la buse de 85 uM.
  - 5 millions de cellules par ml pour la buse de 100 uM.
  - 3 millions de cellules par ml pour la buse de 130 uM. (Cette buse est uniquement disponible pour le trieur Cytex Aurora CS).

- Les échantillons doivent toujours être filtrés à l'aide d'un filtre contenant des pores de 70 microns, et ce, juste avant de débiter le tri. Des filtres supplémentaires doivent être apportés advenant le cas où il serait nécessaire de refiltrer l'échantillon au cours du tri en raison de la formation d'agrégats.
- Les échantillons doivent être apportés dans des tubes FACS de 5 ml.

➤ **Tampon pour le tri cellulaire**

Les cellules à trier doivent idéalement être remises en suspension dans :

- Du PBS (sans Ca/Mg ; pH 7,0/7,4) avec ou sans FBS (2% max) + HEPES pH7,0 (10-25 mM) pour les échantillons idéaux.
- Du PBS (sans Ca/Mg ; pH 7,0/7,4) avec ou sans FBS (2% max) + HEPES pH7.0 (10-25mM) + EDTA 5mM ou 0.5% pour les échantillons collants/cellules adhérentes.
- Du PBS (sans Ca/Mg ; pH 7,0/7,4) avec ou sans FBS (2% max) + HEPES pH7.0 (10-25mM) + BSA 0.1-1% + DNase-I (sans ARNase) (10U/ml ou 25ug/ml) avec MgCL2 (1-5mM) pour les échantillons contenant de nombreuses cellules mortes.
- HBSS avec Ca/Mg sans rouge de phénol + FBS-HI (Sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 1 %) pour les cellules lymphoïdes.

Veillez svp apporter un tube contenant du tampon de tri supplémentaire au cas où nous aurions besoin de diluer vos échantillons. Dans le cas contraire, du PBS 1X stérile sera utilisé.

➤ **Tube ou plaque de collection**

Plusieurs choix possibles :

- **Eppendorf 1.5 ml ou 2 ml.** Il est fortement recommandé d'utiliser ceux dont les bouchons se visent sur l'eppendorf ; si vous prévoyez trier 3 à 4 populations simultanément avec des eppendorfs dont les bouchons ne se visent pas, svp couper les bouchons avant de venir trier. Ajouter au moins 200 uL de tampon de collecte dans vos eppendorfs. Cette option est disponible seulement pour la collection de moins de 500 000 cellules. Il est possible de trier simultanément jusqu'à 4 populations sur le BDFACSAria III et jusqu'à 6 populations sur le Cyttek Aurora CS. Les eppendorfs peuvent être réfrigérés à 4C pendant le tri.
- **Tubes 5 ml** stériles en polypropylène. Ajouter au moins 500 uL de tampon de collecte dans vos tubes 5 ml si vous prévoyez trier 3,5 à 4 millions de cellules ou moins. Il est possible de trier simultanément jusqu'à 4 populations sur le BDFACSAria III et

jusqu'à 6 populations sur le Cytek Aurora CS. Les tubes de collection peuvent être réfrigérés à 4C pendant le tri.

- **Tubes Falcon de 15 ml.** Ajouter au minimum 1 ml de tampon de collecte dans vos tubes 15 ml si vous prévoyez trier plus de 3,5 millions de cellules. Il est possible de trier un maximum de 2 populations simultanément. Les tubes de collecte peuvent être réfrigérés à 4C pendant le tri, mais ce, uniquement avec le Cytek Aurora CS. (Cette option de réfrigération n'est pas disponible avec le trieur BDFACSAria III.)
- **Les plaques de culture** peuvent être utilisées pour trier une ou plusieurs cellules par puits. Veuillez communiquer avec nous avant le jour du tri.

Veuillez svp apporter des tubes ou des plaques de collecte supplémentaires, advenant le cas où vous collectez plusieurs cellules et qu'un changement de tubes soit nécessaire.

Dispositifs de collection	BDFACSAria III	Cytek Aurora CS
<b>Eppendorfs 1.5 ml ou 2ml</b>	4 voies réfrigérées	6 voies réfrigérées
<b>Tubes 5 ml</b>	4 voies réfrigérées	6 voies réfrigérées
<b>Tubes 15 ml</b>	2 voies non-réfrigérées	2 voies réfrigérées
<b>Plaques de culture</b>	Tous types de plaques de culture standard réfrigérées	Tous types de plaques de culture standard réfrigérées incluant P384

#### ➤ **Milieux de collection**

C'est à votre convenance, voici quelques suggestions :

- FBS pur (pour les cellules fragiles ou celles qui retournent en culture après le tri)
- PBS (de préférence avec FBS)
- Milieu de culture
- Tryzol (dans ce cas, veuillez nous contacter, puisque nous devons prendre en considération les volumes pour ne pas altérer l'efficacité du tryzol.)

Veuillez svp apporter un tube supplémentaire contenant votre milieu de collection advenant le cas que nous devons préparer plus de tubes de collection en raison d'un grand nombre de cellules triées.

➤ **Choix de buses pouvant être utilisé pour le tri cellulaire**

Voici un tableau pouvant nous aider à déterminer quelle buse il serait préférable d'utiliser lors du tri.

Buses	70 uM	85 uM	100 uM	130 uM (seulement sur le Cytex Aurora CS)
<b>Types de cellules pouvant être triées avec cette buse</b>	-Splénocytes -Thymocytes -PBMC -Sang -Moelle osseuse	-Lignées cellulaires dérivées de cellules B et T -Cellules souches embryonnaires -Cellules délicates dérivées de la rate, du thymus ou de la moelle osseuse	-Cellules endothéliales -Lignées cellulaires adhérentes -Cellules ayant récemment été transfectées -Cellules de grandes tailles et délicates -Cellules primaires en culture -Cellules souches -Cellules souches trophoblastiques	-Cellules de grandes tailles et fragiles
<b>Pression (PSI)</b>	70	45	22	8
<b>Concentration de l'échantillon à trier</b>	40 millions de cellules / ml	15 millions de cellules / ml	5 millions de cellules / ml	3 millions de cellules / ml
<b>Volume minimal de l'échantillon à trier par tubes 5 ml</b>	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
<b>Volume maximal de l'échantillon à trier par tubes 5ml</b>	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml
<b>Vitesse maximale de tri</b>	20 000 cellules / sec	11 000 cellules / sec	3 000 cellules / sec	2 000 cellules / sec
<b>Volume des gouttelettes</b>	1.3 nL	3.4 nL	5 nL	7 nL
<b>Diamètre maximale des cellules à trier</b>	14 nm	17 nm	20 nm	> 20 nm

➤ **Temps de tri**

Le temps que prendra un tri dépend de deux facteurs principaux :

- La buse utilisée lors du tri :

- Buse de 70 uM: environ 70 millions de cellules triées par heure
- Buse de 85 uM: environ 25 millions de cellules triées par heure
- Buse de 100 uM: environ 10 millions de cellules triées par heure
- Buse de 130 uM: environ 5 millions de cellules triées par heure

- Le nombre de cellules qui doivent passer dans l'appareil pour vous permettre d'obtenir suffisamment de cellules d'intérêt.

Veillez svp noter que la vitesse à laquelle nous pouvons trier (nombre de cellules par heure) dépend aussi de la qualité de l'échantillon. Pour les échantillons contenant des cellules collantes, beaucoup de cellules mortes ou des cellules ayant tendance à former des agrégats, la vitesse de tri peut être réduite de 5 fois voire plus. C'est pourquoi la préparation des échantillons est cruciale et le fait de filtrer les échantillons au travers un filtre de 70 microns est essentiel.

➤ **Pureté attendue**

À la suite du tri, la pureté devrait être supérieure à 97 % si le panel est bien conçu et si la qualité de l'échantillon est idéale lors de l'utilisation du masque de pureté : par défaut. La pureté peut être améliorée jusqu'à 100 % lorsque l'on trie avec le masque de pureté : cellules uniques. Lorsque l'on vise une pureté plus élevée, le logiciel devient plus strict, déviant les gouttelettes dans le tube de collecte uniquement lorsque aucune autre cellule indésirable n'est à proximité immédiate des cellules d'intérêt. Par conséquent, la recherche d'une pureté accrue diminuera le nombre de cellules d'intérêt triées, car de nombreuses cellules d'intérêt finiront dans les déchets en raison de leur proximité avec des cellules indésirables. En d'autres termes, le taux de récupération sera diminué. Lors de l'utilisation du masque de pureté par défaut, qui atteint généralement au moins 97 % de pureté, nous estimons qu'environ 10 % des événements entraînent le rejet d'une cellule d'intérêt en raison de la présence d'une cellule indésirable à proximité. Cependant, cette évaluation dépend de divers facteurs tels que la concentration des cellules, le débit utilisé et la qualité de l'échantillon, et pourrait être bien supérieure aux 10 % mentionnés ici.

Une petite quantité des cellules triées (généralement 500) peut être prélevée afin de vérifier la pureté.

### ➤ **Contrôle qualité des instruments**

Offrir le meilleur service de cytométrie possible implique de calibrer les instruments et de contrôler leurs bons fonctionnements :

- Analyseurs et trieurs :

Les méthodes préconisées par les fabricants de cytomètres sont appliquées quotidiennement en utilisant leurs billes de calibration.

- Trieurs

La technique Rmax, qui permet d'évaluer l'efficacité du tri cellulaire grâce à la capture du flux central contenant les cellules non-déviées, ainsi que d'autres méthodes recommandées par les compagnies qui vendent les cytomètres (accudrop, etc...), sont régulièrement employées. Ces méthodes permettent de garantir que la survie, la pureté ainsi que le taux de récupération des cellules suivant le tri atteignent systématiquement les normes les plus élevées possibles. Le taux de récupération étant le nombre de cellules d'intérêt ayant réellement été triées par rapport au nombre total de cellules d'intérêt présent dans l'échantillon.

### ➤ **Stérilité**

Le tri de cellules, au CR-HMR, se déroule dans un environnement aseptique, mais non stérile. Nous recommandons d'ajouter des antibiotiques lors de la culture des cellules triées. Prendre note que nos trieurs sont toutefois nettoyés quotidiennement.