



Plateau technique de Cytométrie en Flux - URCACyt

-

Plateforme Santé

CHARTE D'UTILISATION

Table des matières

I.	Le plateau technique de cytométrie en flux	4
1.	Les missions du plateau.....	4
2.	Le personnel du plateau	5
a.	Responsables	5
b.	Personnel du plateau.....	5
3.	Le comité scientifique et technique utilisateurs (CoS)	5
4.	Les locaux	6
5.	Les instruments disponibles	6
II.	Le fonctionnement.....	8
1.	L'accès au plateau	8
2.	L'inscription	9
3.	L'offre de service et d'expertise	9
4.	L'autonomie et l'assistance	10
5.	La réservation.....	10
6.	L'annulation.....	11
7.	Les formations	11
8.	Publications et communications	12
9.	La tarification.....	12
10.	La facturation.....	13
11.	La préparation cellulaire.....	13
12.	Les consommables et réactifs	16
III.	Les règles d'utilisation des cytomètres	16
1.	Les règles générales d'utilisation des cytomètres	16
2.	Règles particulières à l'utilisation d'un cytomètre analyseur	16
3.	Règles particulières à l'utilisation du cytomètre analyseur-trieur.....	17
4.	Règles à suivre pour le stockage des données et l'analyse des résultats	17
IV.	Règles d'hygiène et de sécurité - Prévention des risques biologiques.....	18
1.	Les principes généraux de sécurité	18
2.	Les règles et mesures d'hygiène et de sécurité	19

3. Gestion et évacuation des déchets solides et liquides19

Annexe 1 : Fiche Projet

Annexe 2 : Demande d'autorisation pour travail en dehors des horaires d'ouverture

Cette charte définit :

- les engagements du plateau technique,
- les règles de base que tout utilisateur du plateau technique doit respecter,
- le fonctionnement général du plateau technique.

Cette charte est consultable sur le site internet du plateau : <http://www.univ-reims.fr/URCACyt>

I. Le plateau technique de cytométrie en flux

Le plateau technique de cytométrie en flux de l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCACyt) est intégré dans la plateforme Santé de l'URCA. Son activité est régie par un comité scientifique et technique utilisateurs (CoS) qui se réunit pour définir les règles liées à l'administration du plateau technique.

1. Les missions du plateau

Les missions du plateau sont les suivantes :

- Tri cellulaire en conditions biologiques de tout type de cellules dans n'importe quel support: tube de 1,5 mL à 15 mL ou plaques multi puits (6, 24, 48, 96 et 384 puits). Les tris sont effectués dans des conditions optimisant la viabilité cellulaire permettant ultérieurement des études fonctionnelles ou moléculaires ou des analyses biochimiques ou cytogénétiques.
- Contrôle de qualité et maintenance des instruments.
- Formation des utilisateurs : les utilisateurs sont formés pour devenir autonomes sur l'ensemble des analyseurs du plateau. La formation se compose de deux modules, un module théorique et un module pratique sur un analyseur. L'utilisateur débutant est ensuite assisté au démarrage de ses propres expériences.
- Conseil et assistance pour la mise en œuvre des protocoles de cytométrie, pour l'analyse de données et le tri cellulaire.
- Evaluation des nouvelles technologies d'analyse et tri cellulaire permettant de maintenir au meilleur niveau le plateau technique de cytométrie en flux.
- Développement et optimisation des analyseurs et des trieurs : modification des instruments pour une détection optimale des sondes et protéines fluorescentes.

2. Le personnel du plateau

a. Responsables

Scientifique : **Richard LE NAOUR**, Bureau A3044, 3^{ième} étage, Bâtiment A, Pôle Santé

Téléphone : 33 (0)3 26 91 81 44

Fax : 33 (0)3 26 91 34 89

Mail : richard.lenaour@univ-reims.fr

Scientifique, technique et administratif : **Sandra AUDONNET**, IR, Bureau A3040, 3^{ième} étage, Bâtiment A, Pôle Santé

Téléphone : 33 (0)3 26 91 86 22

Fax : 33 (0)3 26 91 34 89

Mail : sandra.audonnet@univ-reims.fr

b. Personnel du plateau

Ingénieur de Recherche : **Sandra AUDONNET**

3. Le comité scientifique et technique utilisateurs (CoS)

Le plateau technique de cytométrie est placé sous la responsabilité d'un comité scientifique et technique utilisateurs, composé d'experts scientifiques et techniques qui se réunissent régulièrement. Sont membres de ce conseil :

- Le coordinateur de la Plateforme Santé (COFIL) : **Prénom Nom, Unité de rattachement, fonction dans le comité, mail (à préciser)**
- Un utilisateur régulier du plateau par laboratoire utilisant les équipements
 - **Fatma BERRI** – Suppléant Anne-Laure LEBREIL – EA 4684 – Virologie Médicale et Moléculaire (CardioVir)
 - **Sylvie BRASSART-PASCO** (Site Pôle Santé) et **Stéphanie SALESSE-CAMEROT** (Site Moulin de la Housse) – UMR CNRS – URCA 7369 – Matrice extracellulaire et dynamique cellulaire (MEDyC)

- **Valérian DORMOY** – Suppléante Christelle CORAUX – Inserm UMRS 1250 – Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire (P3Cell)
- **Sandie ESCOTTE-BINET** – Suppléant Dominique AUBERT – EA 7510 – Epidémiologie et circulation des parasites dans les environnements (ESCAPE)
- **Halima KERDJOUDJ** – Suppléant Frédéric VELARD – EA 4691 – Biomatériaux et inflammation en site osseux (BIOS)
- **Richard LE NAOUR** – Suppléant Sébastien LE JAN – EA 7509 – Immuno-Régulation dans les Maladies Auto-immunes, Inflammatoires et le Cancer (IRMAIC)
- **Damien RIOULT** – Suppléant Stéphane BETOULLE – UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH – Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO) et MOBICYTE
- **Claire TOURNOIS-HIRZEL** – Suppléant Floriane OSZUST – EA 3801 – Hémostase et remodelage vasculaire post-ischémie (HERVI)
- Le responsable scientifique du plateau technique
 - **Richard LE NAOUR**
- Le personnel BIATSS affecté au plateau technique
 - **Sandra AUDONNET**

4. Les locaux

Le plateau technique de cytométrie est situé porte A3093, 3^{ème} étage, Bâtiment A, Pôle Santé, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex. D'une surface totale d'environ 30 m², le plateau technique de cytométrie est séparé en 2 parties :

- Une pièce équipée d'un analyseur, d'un analyseur-trieur et d'un réfrigérateur.
- Une pièce équipée d'un PSM et d'un poste d'analyse.

5. Les instruments disponibles

Le plateau technique de cytométrie dispose de plusieurs instruments :

- Un cytomètre analyseur LSRFortessa (BD Biosciences) :

4 lasers (405 nm, 488 nm, 561 nm et 640 nm)

2 paramètres de morphologie (taille et granulosité)

13 paramètres de fluorescence

- ✓ Pour le laser 405 nm : 450 ± 25 , 525 ± 25 , 610 ± 10 / 660 ± 10 / 710 ± 25 / 780 ± 30 .
- ✓ Pour le laser 488 nm : 530 ± 15 , 710 ± 25 .
- ✓ Pour le laser 561 nm : 586 ± 7.5 , 610 ± 10 , 670 ± 15 , 710 ± 25 , 780 ± 30 .
- ✓ Pour le laser 640 nm : 670 ± 7 , 730 ± 22.5 , 780 ± 30 .

Logiciel d'acquisition : BD FACSDiva v8



- Un cytomètre analyseur-trieur FACSria IIu (BD Biosciences) :

3 lasers (407 nm, 488 nm et 633 nm)

2 paramètres de morphologie (taille et granulosité)

9 paramètres de fluorescence

- ✓ Pour le laser 407 nm : 530 ± 15 , 575 ± 13 , 610 ± 10 , 695 ± 20 , 780 ± 30 .
- ✓ Pour le laser 488 nm : 530 ± 15 , 710 ± 25 .
- ✓ Pour le laser 633 nm : 660 ± 10 , 780 ± 30 .

Logiciel d'acquisition : BD FACSDiva v8



La configuration optique standard en réception, des deux instruments, est modifiable en fonction des besoins et des filtres et bandes passantes dont dispose URCACyt.

- Un poste d'analyse autonome :

Ce poste est dédié au traitement des données et est équipé des logiciels :

- ✓ BD FACSDiva v8 (BD Biosciences)
- ✓ FlowJo (TreeStar)
- ✓ Flowlogic (Miltenyi Biotec)

- ✓ FCAP Array (BD Biosciences)
- ✓ ModFIT LT (Verity)
- ✓ CellQuest (BD Biosciences)

II. Le fonctionnement

1. L'accès au plateau

Le plateau est ouvert du **lundi** au **vendredi** de **8h40** à **17h30**.

Les rendez-vous avec prestations sont pris sans interruption entre 9h15 et 17h00. Le plateau sera fermé pendant les jours fériés et lors des congés de la responsable technique.

Les appareils du plateau sont ouverts aux utilisateurs suivants :

- Utilisateurs locaux : SFR CAP Santé, SFR Condorcet, Institut Jean Godinot, CHU
- Utilisateurs académiques extérieurs
- Utilisateurs Industriels

Des tarifications différentes sont proposées à ces différents utilisateurs (cf. section II.8). Tout utilisateur doit être connu du personnel du plateau, auprès duquel il se sera préalablement inscrit (cf. section II.2).

Seuls les utilisateurs autonomes sont autorisés à utiliser les cytomètres sans l'assistance du personnel du plateau technique. Une liste des utilisateurs autonomes est définie et validée par le responsable scientifique et le responsable technique. Le fonctionnement du plateau technique est soumis à des procédures définies par les responsables et le CoS pour l'ensemble des cytomètres, dans le respect des Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) et des règles d'utilisation des appareils. Tout contrevenant prend le risque de se voir interdire l'accès au plateau technique.

L'accès aux utilisateurs autonomes en dehors des horaires d'ouverture du plateau sera soumis à validation et signature de l'Annexe 2 par le directeur d'unité de l'utilisateur.

2. L'inscription

Les nouveaux utilisateurs doivent, dans un premier temps, se faire connaître auprès du responsable technique du plateau technique, puis **prendre un rendez-vous** pour discuter de leur projet. Pour préparer au mieux cet entretien, une Fiche Projet (Annexe 1) sera **à compléter et à renvoyer avant la date du rendez-vous**.

Après validation du projet et avant toute utilisation du plateau technique, l'utilisateur devra avoir pris connaissance de la Charte d'utilisation du plateau technique et rempli et signé la Fiche Projet (Annexe 1). La fiche Projet (Annexe 1) devra également être signée par le chef d'équipe de l'utilisateur ou le directeur d'unité et le responsable du plateau technique. Les documents sont à renvoyer par mail ou à rendre directement au responsable technique du plateau.

Des conventions de collaboration ou des contrats types devront être négociés et signés avant le démarrage des projets pour les prestations avec préparation d'échantillons, recherche et développement collaboratif ou pour des prestations qui seront payées par des financements non gérés par l'URCA (CNRS, INSERM, CHU...).

La charte d'utilisation du plateau technique peut être modifiée. Les utilisateurs en sont informés par e-mail. Les modifications prendront effets après validation par le CoS.

3. L'offre de service et d'expertise

Le plateau est en mesure de proposer plusieurs services.

- **Temps machine**

Les équipements sont mis à la disposition du demandeur après une formation et un accompagnement dans l'utilisation de ces équipements. Les utilisateurs sont responsables de leurs analyses. Autonomie préalable nécessaire.

- **Prestation sans préparation d'échantillons**

Le responsable technique du plateau réalise la prestation comprenant l'analyse et/ou le tri sans traitement préalable de l'échantillon. Seul l'ajout de réactif pré-analyse pourra être réalisé.

- **Expertises**

Le plateau propose conseils et expertises à chaque étape des études menées, pouvant aller de la stratégie d'échantillonnages à l'interprétation des résultats.

- **Prestations avec préparation d'échantillons, recherche et développement collaboratif**

Des contrats de partenariat et de collaboration seront établis pour la réalisation de projets qui nécessitent une mise au point importante :

- prestation avec traitement préalable de l'échantillon (préparation et/ou exposition)
- le développement des nouvelles analyses ou tests spécifiques
- le développement de techniques innovantes ou de nouvelles applications

- **Enseignement et formation continue**

Le personnel du plateau dispense des formations continues sur le cytomètre analyseur et peut intervenir dans les maquettes d'enseignement.

4. L'autonomie et l'assistance

L'**acquisition des échantillons** est faite soit en autonomie par l'utilisateur déclaré autonome par le personnel du plateau technique soit avec assistance. Sont qualifiés «utilisateurs autonomes» les utilisateurs qui ont reçu une formation préalable à la cytométrie, aux précautions d'utilisation des cytomètres, aux précautions de manipulation de matériel biologique, aux protocoles de préparation cellulaire, au mode de transport des échantillons et dont l'autonomie a été validée par le responsable du plateau technique.

5. La réservation

La réservation est obligatoire et se fait uniquement en contactant le personnel du plateau technique par e-mail (sandra.audonnet@univ-reims.fr) ou par téléphone (au 33 (0)3 26 91 86 22) en précisant :

- le type d'activité prévue : analyse ou tri
- autonomie ou avec assistance

- la quantité de tubes à acquérir pour l'analyse ou le nombre de cellules totales prévu pour un tri
- l'heure(s) de réservation demandée(s)

Après validation, le créneau sera réservé. **Le créneau minimum réservé est de 1 heure pour les cytomètres analyseurs et d'une demi-journée pour le cytomètre trieur.**

Pour le bon fonctionnement du plateau technique, il est important que les utilisateurs soient ponctuels à leur rendez-vous. En cas de retard d'un utilisateur, le rendez-vous se terminera à l'heure initialement prévue lors de la réservation afin de ne pas léser l'utilisateur suivant.

Lors de la réservation, les utilisateurs s'engagent à fournir toutes informations relatives aux risques liés aux échantillons qu'ils apportent sur le plateau technique.

6. L'annulation

En cas d'annulation, il est impératif de prévenir le personnel du plateau technique, 24h à l'avance. **Toute réservation non utilisée et non annulée, sera facturée.**

7. Les formations

Pour l'analyseur **LSRFortessa**, des sessions de formation payantes (cf. II.8.) sont organisées par le personnel du plateau en fonction des demandes des unités utilisatrices (Fiche Projet). La formation se déroule sur 2,5 jours et se compose de deux modules, un module théorique et un module pratique sur l'analyseur. L'utilisateur est ensuite assisté au démarrage de ses propres expériences.

Les doctorants pourront obtenir, après validation de leur formation (attestation remise par le personnel du plateau), des ECTS (European Credits Transfer System) auprès de leur Ecole Doctorale (4 ECTS auprès de l'Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé).

Pour le trieur **FACSAria II**, les utilisateurs désireux d'acquérir une autonomie doivent tout d'abord suivre une formation spécifique auprès de BD Biosciences. Suite à un complément de formation auprès du personnel du plateau, ils pourront être validés «autonomes» par les responsables. Pour plus d'information, contacter le responsable technique du plateau.

8. Publications et communications

Pour valoriser l'activité du plateau technique et favoriser son développement, il est important que son activité soit explicitement reconnue. Lorsque la prestation du plateau technique consiste uniquement en une assistance et à l'accès aux équipements, le plateau technique est cité dans la section " Acknowledgements/Remerciements" de toute publication, communication écrite et/ou orale. En cas d'implication importante du personnel du plateau dans la mise au point, l'obtention, l'analyse et la mise en forme des résultats de cytométrie en flux, l'association de la personne impliquée comme co-auteur dans les publications, communications écrites et/ou orales devra être discutée. Sur ce dernier point, l'avis du CoS pourra être requis en cas de désaccord. **Dans tous les cas, une copie de la publication/communication devra être envoyée au responsable technique du plateau technique.**

9. La tarification

Les **coûts de fonctionnement** du plateau technique sont établis et validés par le Service des Activités Industrielles et Commerciales (SAIC) de l'Université et par le CoS. Les tarifs sont réajustés une fois par an. **Les tarifs ci-dessous n'incluent pas les frais de personnel environné.** Ceux-ci seront appliqués pour les prestations impliquant le personnel du plateau et en dehors d'un contexte de collaboration.

COÛTS €/h			
	Académique URCA	Académique hors URCA	Industriel
FACS Ariallu Trieur	43	72	238
FACS Ariallu analyseur	40	66	224
LSR Fortessa	34	56	201
	Pas de TVA *	TVA	TVA
	Pas de frais de gestion *	Fais de gestion 10%	Fais de gestion 10%

* TVA et frais de gestion dans le cas où les financements ne sont pas gérés par l'URCA (CNRS, INSERM, CHU...). Une convention et/ou un devis doit être établi dans ces conditions.

Le **coût de la formation** pour le LSRFortessa est de **250 €** (uniquement pour les étudiants et le personnel URCA). Cette formation inclus la formation théorique et pratique ainsi qu'une assistance pendant les **trois premières heures d'utilisation** effectives de l'instrument.

10. La facturation

La facturation est établie deux fois par an. Elle est envoyée aux laboratoires utilisateurs au mois de Juillet pour les utilisations du premier semestre de l'année en cours et au mois de Janvier de l'année suivante pour les utilisations du second semestre de l'année en cours.

- Règles de facturation pour les analyseurs
 - Un minimum de 1 h d'utilisation sera facturé par période réservée.
 - Toute réservation non utilisée et non annulée 24h à l'avance, sera facturée pour la durée totale de la réservation.

- Règles de facturation pour le trieur
 - Un minimum de 2 h d'utilisation sera facturé par période réservée.
 - Toute réservation non utilisée et non annulée, 24h à l'avance, sera facturée pour la durée totale de la réservation.
 - Tout retard dû à un problème matériel ne sera pas facturé.

Attention, les prestations de cytométrie ne peuvent être payées avec des fonds de la Région Champagne Ardenne et des Fonds Européens de Développement Régional (FEDER) puisque ces deux entités ont participé à l'acquisition de l'ensemble des appareils du plateau technique.

11. La préparation cellulaire

La cytométrie en flux est une technique qui s'applique aux cellules ou éléments en suspension; les utilisateurs doivent donc :

- prendre les précautions nécessaires lors de la préparation de leurs échantillons (dissociation, filtration, le cas échéant addition de BSA 3%, EDTA, DNase ...) afin

d'éviter la formation d'agrégats. Les échantillons peuvent être filtrés sur place (PSM...).

- venir avec tous les témoins « exploitables » pour effectuer les réglages et mesures :
 - Témoin sans marquage (inutile dans le cas de l'analyse du cycle cellulaire) → réglages des paramètres
 - Témoin simple marquage pour chaque fluorochrome utilisé (en cas de marquages multiples) → réglage des compensations.
 - Isotype(s) contrôle(s) (en cas de marquage avec un anticorps) → vérification de la spécificité du marquage.
 - FMO (au-delà de 2 à 3 marquages) = tous les marqueurs sauf un → validation des régions.
 - MOCK dans le cas de transfection
 - Contrôle positif (lignée, stimulation...)
 - Anticorps secondaire seul dans le cas de marquages indirects
 - ...
- L'utilisateur fournit également le milieu adéquat pour le recueil des cellules triées.

Ne seront acceptés sur le site même du plateau technique que la filtration extemporanée des échantillons destinés au tri et l'ajout extemporané de réactifs. Pour cela un PSM ainsi qu'un réfrigérateur seront mis à disposition des utilisateurs.

Les appareils ne se trouvant pas dans un lieu confiné, seuls des échantillons sans risque biologique associé (classe 1) peuvent être analysés et triés sans traitement particulier.

- Règles de passage des échantillons pour les analyseurs :
 - Cellules sans risque biologique associé : PAS D'OBLIGATION DE FIXATION
 - Cellules avec un risque biologique associé : FIXATION OBLIGATOIRE (avec minimum de 1 % de paraformaldéhyde de grade histologique (sans méthanol)).
 - cellules provenant de **matériels biologiques d'origine humaine ou simienne**

- cellules provenant de **matériels infectés ou modifiés de niveau L2 ou L3** (VIH, VIS, TB, VHB, VHC, VHD, LCMV, SARS, HTLV...)
- **micro-organismes de niveau L2 ou L3** (bactéries, parasites ...)

Les cellules fixées doivent ensuite être remises en suspension en PBS 1X avant le passage sur le cytomètre. Aucun échantillon en suspension dans du paraformaldéhyde ne doit être acquis sur le cytomètre.

- Règles de passage des échantillons pour le trieur :

Le principe du tri cellulaire sur trieur repose sur la génération d'aérosols où chaque microgouttelette contient une ou plusieurs cellules. Les débits peuvent atteindre jusqu'à 80 000 gouttes par seconde. Des situations incidentelles dues à des bouchages de l'appareil génèrent de larges aérosols qui brumisent dans l'environnement proche de l'appareil. Dans ces conditions, **le tri d'échantillon avec un risque biologique associé est STRICTEMENT interdit.**

Les échantillons de classe 2 et de classe 3 doivent être déclarés au moment de la réservation et ne pourront être manipulés au niveau du plateau technique que dans les conditions décrites ci-dessus. En cas de doute et en attente d'une information précise sur les échantillons, le personnel du plateau technique se réserve le droit d'interdire l'accès du plateau technique.

Un cahier de prévention sur les risques biologiques a été réalisé par le CNRS (site ci-dessous) et pourra aider toute personne concernée par ces risques à les identifier, les évaluer et définir des mesures de prévention adaptées.

<http://www.dgdr.cnrs.fr/SST/CNPS/guides/doc/risquebio/Guide%20risques%20biologiques-Edition%20mai%202017.pdf>

L'utilisateur s'engage à posséder tous les documents réglementaires qui autorisent l'utilisation de ses échantillons, notamment les agréments OGM ou les autorisations et consentements des patients pour les prélèvements humains, ainsi que les sérologies (VIH, VHB...).

12. Les consommables et réactifs

Les utilisateurs doivent acheter leurs propres consommables et réactifs. Certains réactifs d'usage courant en cytométrie en flux (tubes, filtres cellulaires, marqueurs de viabilité, billes de compensation...) sont disponibles sur le plateau. Ils seront facturés, soit à l'unité soit sous forme d'aliquotes, à prix coutant HT.

III. Les règles d'utilisation des cytomètres

1. Les règles générales d'utilisation des cytomètres

Les utilisateurs s'engagent à :

- Suivre scrupuleusement les procédures d'utilisation disponibles près de chaque appareil.
- Signaler obligatoirement tout incident au personnel du plateau technique. La personne inscrite au créneau de réservation sera tenue responsable en cas de problème lié à une utilisation incorrecte pendant cette période.
- Laisser les équipements et accessoires propres et rangés après chaque utilisation ; le plateau technique assure la maintenance générale des appareils mais chaque utilisateur est tenu de respecter les conditions d'utilisation (notamment lavages, remplissage et vidange des réservoirs de l'appareil) prévues dans la procédure d'utilisation de chaque appareil. Ce temps fait partie du temps décompté d'utilisation de l'appareil.

Il est rigoureusement interdit d'intervenir techniquement sur les cytomètres.

2. Règles particulières à l'utilisation d'un cytomètre analyseur

Les échantillons, destinés à l'analyseur, doivent être obligatoirement fixés, sauf si l'analyse en cytométrie nécessite l'utilisation de cellules vivantes.

En fin d'utilisation du cytomètre, l'utilisateur doit remplir le registre d'activité situé à côté de l'appareil.

Un utilisateur sera considéré autonome, uniquement après avoir validé sa formation auprès du responsable technique du plateau de cytométrie.

3. Règles particulières à l'utilisation du cytomètre analyseur-trieur

Les échantillons à acquérir sur le trieur doivent être préparés «stérilement». Voici une liste non exhaustive à suivre pour préparer vos échantillons stérilement :

- Les tissus doivent être manipulés sous hotte dès que possible.
- Les réactifs utilisés doivent être stériles, c'est-à-dire ouverts sous hotte uniquement.
- Les consommables et outils utilisés pour la préparation des échantillons doivent être stériles (tubes, cônes...).
- Les outils utilisés lors de la préparation des échantillons doivent être stériles (pipette, pipetaid...), c'est-à-dire préalablement nettoyés avec un détergent.
- Les tubes doivent toujours être bien fermés avant d'être extrait de la hotte. Faites spécialement attention s'il s'agit de tubes 12x75mm spécifiques pour le FACS car il y a 2 crans de fermeture.
- Evitez de mélanger vos cellules par inversion car le liquide en contact avec le bouchon aura plus de chance d'être contaminé.
- Les échantillons seront systématiquement filtrés extemporanément.

Si l'utilisateur observe une contamination dans une culture de cellules ayant été triées sur le plateau technique il est obligatoire d'en informer le personnel du plateau technique le plus rapidement possible. La marche à suivre est la suivante :

- Contacter le plateau technique au plus vite pour nous informer du type de contamination.
- Le plateau technique enverra un mail pour prévenir les utilisateurs d'une contamination.
- En cas de contamination avérée du trieur, l'activité du plateau technique sera arrêtée pour décontamination pendant plusieurs jours.

4. Règles à suivre pour le stockage des données et l'analyse des résultats

Les cytomètres sont réservés à l'acquisition des données. Il est interdit de stocker des données sur les disques durs des cytomètres. Celles-ci peuvent être régulièrement effacées sans

préavis. **Aucune connexion par les ports USB** n'est autorisée. Pour récupérer les données, deux possibilités :

- Demander au **responsable du plateau** de transmettre les données (par mail, clés USB, ou CD-ROM) ;
- Placer vos données sur le serveur **NAS Cytométrie** et les récupérer de votre poste de travail (ceci nécessite que vous ayez un poste informatique connecté sur le réseau de l'URCA).

IV. Règles d'hygiène et de sécurité - Prévention des risques biologiques

1. Les principes généraux de sécurité

L'accès à l'utilisation autonome des cytomètres est strictement réservé aux utilisateurs formés par le personnel du plateau technique. Le personnel doit avoir préalablement validé cet accès. Le respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire est de rigueur. Le transport des échantillons des laboratoires vers le plateau technique doit se faire dans des boîtes de transport fermées adaptées. Tout nouvel utilisateur autonome recevra les consignes générales de sécurité relatives au plateau technique et devra signer un cahier de suivi de la formation sécurité, signifiant qu'il a reçu les consignes et s'engage à les respecter.

Un registre de santé et sécurité au travail est disponible sur le plateau technique. Tout agent ou usager du plateau technique peut y consigner des observations relatives à la prévention des risques professionnels et à l'amélioration des conditions de travail. Vous devez prévenir le responsable du plateau technique, de tout problème/risque d'hygiène et de sécurité observé. Les numéros d'urgence de la faculté et les consignes de sécurité du bâtiment de la faculté sont affichées dans les locaux du plateau technique. Aucun échantillon ne doit se trouver dans le laboratoire en dehors du temps d'acquisition des résultats.

2. Les règles et mesures d'hygiène et de sécurité

Aucune préparation cellulaire ne doit être réalisée sur le plateau technique. Le plateau technique est strictement réservé à l'acquisition et à la ré-analyse des échantillons. Seule l'addition extemporanée de colorants vitaux est autorisée dans des conditions strictes de manipulation des cellules vivantes.

Les utilisateurs ne doivent laisser aucun matériel usagé à jeter sur le plateau technique. Les règles d'évacuation des déchets définies dans la charte doivent être respectées (cf section IV.3).

Tous les utilisateurs doivent porter l'équipement de protection individuel approprié à la manipulation de leurs échantillons : blouse(s), gants, masque, lunettes...

Le port de gants est INTERDIT sur TOUS les systèmes informatiques du plateau technique.

La cytométrie fait appel à l'utilisation de lasers de classe 3 émettant dans le visible pouvant entraîner une destruction irréversible de la rétine et donc une perte totale de la vision. Il est de ce fait interdit pour l'utilisateur :

- d'ouvrir les capots des appareils. En cas de problème, contacter immédiatement le responsable du plateau technique.
- d'entrer dans les salles du plateau technique lors de la maintenance des appareils.

3. Gestion et évacuation des déchets solides et liquides

Les déchets solides non contaminés (papier, essuie-tout ...) sont à jeter dans les poubelles à papier. Les déchets solides contaminés (essuie-tout, cônes, gants...) sont à jeter dans les poubelles jaunes. Les déchets liquides sont à jeter dans les bidons prévus à cet effet. Les réservoirs de liquides usagés des cytomètres et leur contenu sont exposés à la javel pendant 30 minutes au minimum puis transférés dans des bidons d'élimination de déchets hermétiquement fermés avant leur élimination. Aucun déchet ne doit être vidé à l'évier. Aucun échantillon ne sera stocké ou éliminé par le plateau.

FICHE PROJET

N° de projet : _____

INFORMATIONS ADMINISTRATIVES

Demandeur

Nom, Prénom :

 :

@ :

Statut :

Utilisateur

Nom, Prénom :

 :

@ :

Statut :

Laboratoire/Unité :

Laboratoire académique rattaché à l'URCA

Laboratoire académique hors URCA

Autre (Industriel, Privé,...)

Gestion financière

Nom, Prénom :

 :

@ :

Type de crédit mobilisé :

Adresse de facturation :

PROJET

Description et objectif du projet :

Nom du projet et type de financement :

Date de début de projet souhaité :

Durée du projet envisagée :

FORMATION PREALABLE EN CYTOMETRIE

Formation préalable de l'utilisateur en CMF : OUI – NON₍₁₎

A reçu une formation par le personnel du plateau technique sur :

LSRFortessa (analyseur) : OUI - NON₍₁₎

OBJET DE LA DEMANDE

Temps machine (analyse – tri₍₁₎)

Prestations sans préparation d'échantillons (analyse – tri₍₁₎)

Prestations avec préparation d'échantillons (analyse – tri₍₁₎)

Expertises (analyse – tri₍₁₎)

Recherche et développement collaboratif (analyse – tri₍₁₎)

Formation continue (LSRFortessa uniquement)

ECHANTILLONS

Type

Origine (humain, souris, rat...) :

Nature (cellules, tissus, bactéries, levures, autre...) :

Culture primaire : oui, organe : non

Lignée cellulaire : oui, nom : non

Cellules adhérentes : oui, méthode de décollement : non

% de viabilité cellulaire :

Fixation : oui, méthode : non, raison

Transformation / transgène / infection :

Risque biologique : oui non

Nom du pathogène, virus, transgène :

Classification : I II III (NB : si II ou III, fixation impérative)

Précautions particulières :

Procédure de désactivation :

Marquage

Application :

Types de marquage (surface, intracellulaire ...) :

Nombre de paramètres de fluorescence et $\lambda_{ext}/\lambda_{em}$:

Nom, référence et fournisseur de l'anticorps et fluorochrome envisagé et quantité utilisée par marquage :

Nombre d'échantillons :
Contrôles :

Tri

Taille des cellules :
Nombre de populations à trier (4 max.) :
Nombre d'évènements par population souhaité :
Type de recueil (tube, plaque culture, lame microscope ...) :
Précautions particulières (stérilité, température,...) :
Priorité de tri (pureté, rendement, clonage...) :

Je soussigné(e), Mme, Mr (utilisateur) certifie avoir lu la charte d'utilisation du Plateau technique de cytométrie en flux et m'engage à en respecter les règles.

Date et signature de l'utilisateur :

Le /.... /....


Date et signature du demandeur (chef d'équipe ou directeur d'unité) :

Le /.... /....

Date et signature du responsable du plateau technique :

Le /.... /....

Demande d'autorisation pour travail en dehors des horaires d'ouverture A faire parvenir 48 h au préalable	Date de la demande :
--	-------------------------------

Horaires d'ouverture du plateau : Du lundi au vendredi : de 8h40 à 17h30 Le samedi, dimanche, jours fériés et congés du responsable technique du plateau : Fermé		Les situations de travailleur isolé du fait de son poste de travail (locaux géographiquement isolés ou personne travaillant seule dans un atelier mécanique, une animalerie, une chambre froide, ...) nécessitent de mettre en œuvre des mesures compensatoires permettant de porter secours rapidement à l'agent en cas d'accident ou de malaise.
---	---	--

Objet de la demande d'autorisation pour venir travailler en dehors des heures d'ouverture du plateau :

Organisation de l'alerte et des secours :

 Accompagné par un collègue ou vacataire de plus de 3 mois de présence dans l'unité
 Nom :

Nom du responsable de laboratoire, chef de service ou composante :

Autorise
 N'autorise pas.

Nom et n° de Téléphone de la personne à contacter en cas d'urgence :

Consignes complémentaires à respecter :

Je soussigné,m'engage :

- 1 - à ce que la situation de travail isolé en dehors des heures d'ouverture du plateau reste exceptionnelle et soit dûment justifiée car la responsabilité du directeur de l'unité est engagée.
- 2 - à prendre connaissance et à respecter les consignes de sécurité et d'évacuation, ainsi que le règlement intérieur du plateau.
- 3 - à ne pas permettre ou faciliter l'accès du plateau à toute autre personne non autorisée.
- 4 - à signaler tout problème ou anomalie constatée sur le plateau

Date et Signature du demandeur :	Visa de la Direction de l'unité