



CYTOMETRIE EN FLUX PRINCIPES ET APPLICATIONS MYELOME MULTIPLE

BUT Montpellier



*Guilhem REQUIRAND (Ingénieur hospitalier)
Laboratoire Suivi des Thérapies Innovantes*

CYTOMETRIE EN FLUX



1. Généralités (cytométrie):

Cytomètre

Hydrofocalisation

Protocoles de marquage

Fluorescence (excitation, émission)

Visualisation des résultats

Recouvrement de spectre

Optique

2. Conséquences du multimarquages en cytométrie en flux:

Compensation par la méthode des médianes

Elaboration d'une matrice de compensation

Fluorescence Minus One (FMO)

Bi-exponentiel

Dispersion de la lumière

Elimination des doublets

3. Strategy of Gating : Analyse et interprétation en cytométrie

4. Nouvelles technologies spectrales

3. Assurance Qualité en cytométrie

4. Applications :

ImmunoPhénotypage

Cycle cellulaire

Apoptose

Expression

Activité cellulaire

7. Application clinique:

Hémopathie maligne - Myélome Multiple

CYTOMETRIE EN FLUX



1. Généralités (cytométrie):

Cytomètre

Hydrofocalisation

Protocoles de marquage

Fluorescence (excitation, émission)

Visualisation des résultats

Recouvrement de spectre

Optique

OBJECTIF PRINCIPAL

Caractérisation les différentes populations dans un échantillon donné

Tube de sang périphérique ➡

Numération Formule Sanguine (NFS)



HEMATOLOGIE					Intervalle de référence	Antécédents
NUMERATION GLOBULAIRE (SIEMENS - Advia 2120 - Cytométrie en flux)						
Leucocytes	5,78	G/l			(4,00-10,00)	
Hématies	4,19	T/l			(3,00-5,00)	
Hémoglobine	13,6	g/dl			(11,5-16,0)	
Hématocrite	41,0	%			(30,0-47,0)	
V.G.M	98	fl			(80-100)	
T.G.M.H	32,3	pg			(27,0-32,0)	
C.C.M.H	33,1	g/dl			(30,0-36,0)	
FORMULE LEUCOCYTAIRE						
Polynucléaires neutrophiles	77,2	%	soit	4,46	G/l	(2,00-10,00)
Polynucléaires éosinophiles	2,7	%	soit	0,16	G/l	(<0,60)
Polynucléaires basophiles	1,4	%	soit	0,08	G/l	(0,00-0,20)
Lymphocytes	15,4	%	soit	0,89	G/l	(1,00-4,50)
Monocytes	2,0	%	soit	0,12	G/l	(0,20-1,00)

Intérêt de la cytométrie en flux

- 1) Permet d'analyser un grand nombre de cellules (précision de la mesure)
- 2) Permet de caractériser des sous-populations cellulaires (sous-populations lymphocytaires)
- 3) Détecter la présence de cellules rares (cellules souches)
- 4) Détection et caractérisation des cellules anormales (cellules cancéreuses)
- 5) Déterminer des antigènes membranaires, intra-cytoplasmiques et nucléaires
- 6) Calculer le taux de prolifération cellulaire (diverses phases du Cycle Cellulaire)
- 7) Déterminer la viabilité des cellules (apoptose)
- 8) Le tri cellulaire (cellules d'intérêt pures)

Caractéristiques de la cytométrie en flux

Cinq caractéristiques:

- 1) Analyse quantitative (atout majeur par rapport à la microscopie)
- 2) Sensibilité de détection
- 3) Vitesse d'acquisition (jusqu' à 30 000 cellules /seconde)
- 4) Analyse simultanée de plusieurs paramètres
- 5) Le tri cellulaire

DEUX GRANDS TYPES D'EQUIPEMENT EN CYTOMETRIE

Cytomètre
(analyseur)

BD LSRFortessa™ X-20
Special Order Product



Trieur à haute vitesse
(Trieur)

BD FACSAria III



Qu'est ce que la cytométrie en flux?



C'est une technologie permettant la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule.

Quelles sont les informations sur la cellule apportées par la cytométrie en flux ?

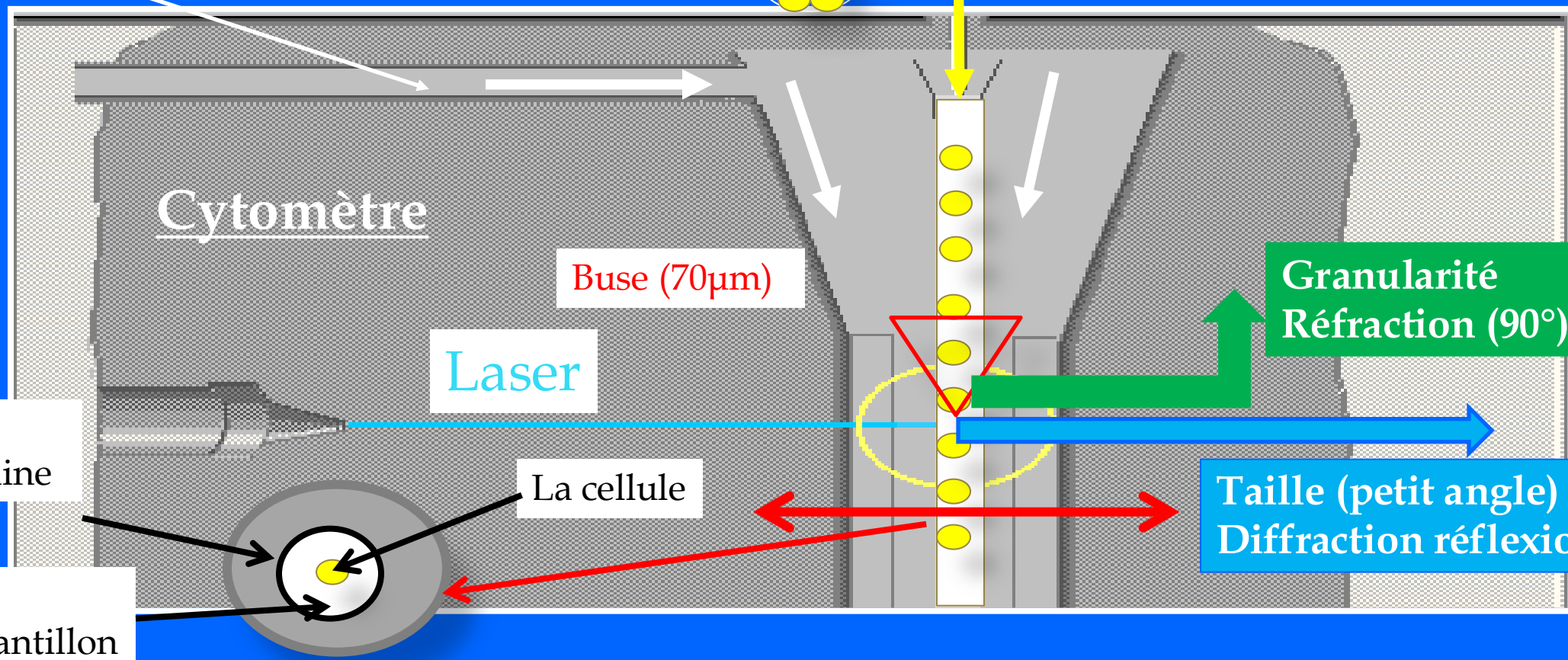
1. sa taille (Forward Scatter) = FSC
2. sa granularité (Side Scatter) = SSC
3. son ou ses marqueurs spécifiques associés à une ou plusieurs fluorescences.

Comment analyser toutes les cellules dans un mélange hétérogène?

Principe du centrage hydrodynamique

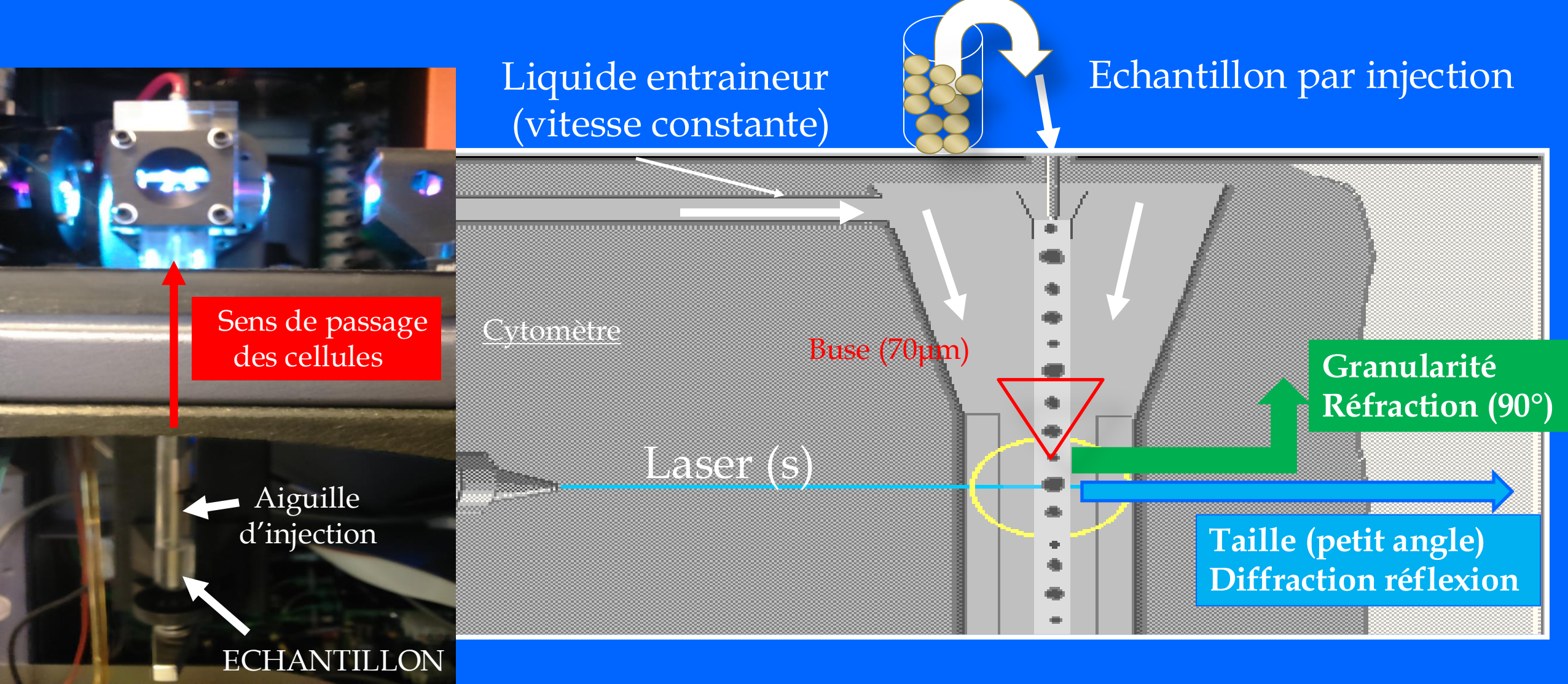
Liquide de gaine
(vitesse constante)

Echantillon d'échantillon
par injection



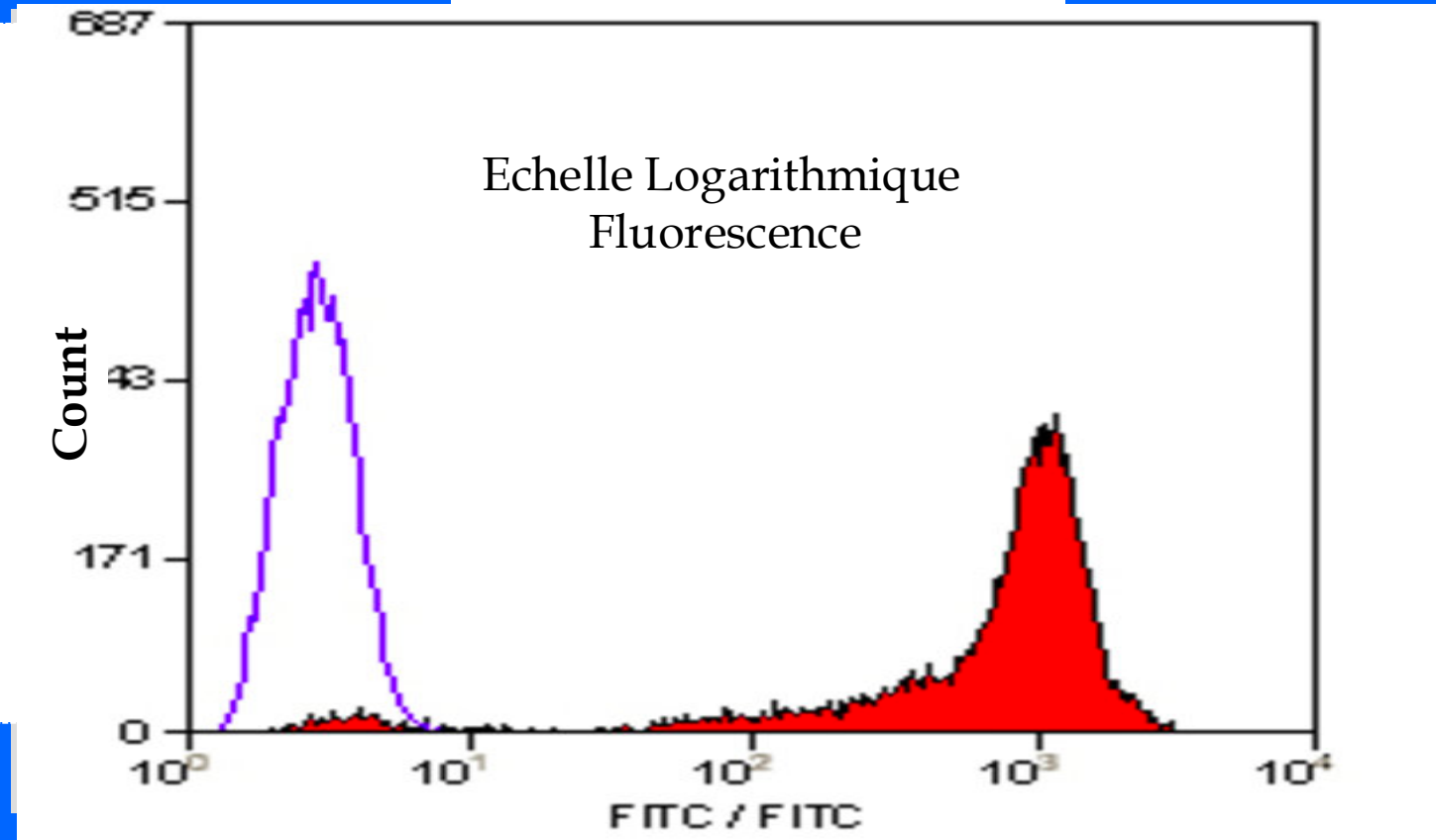
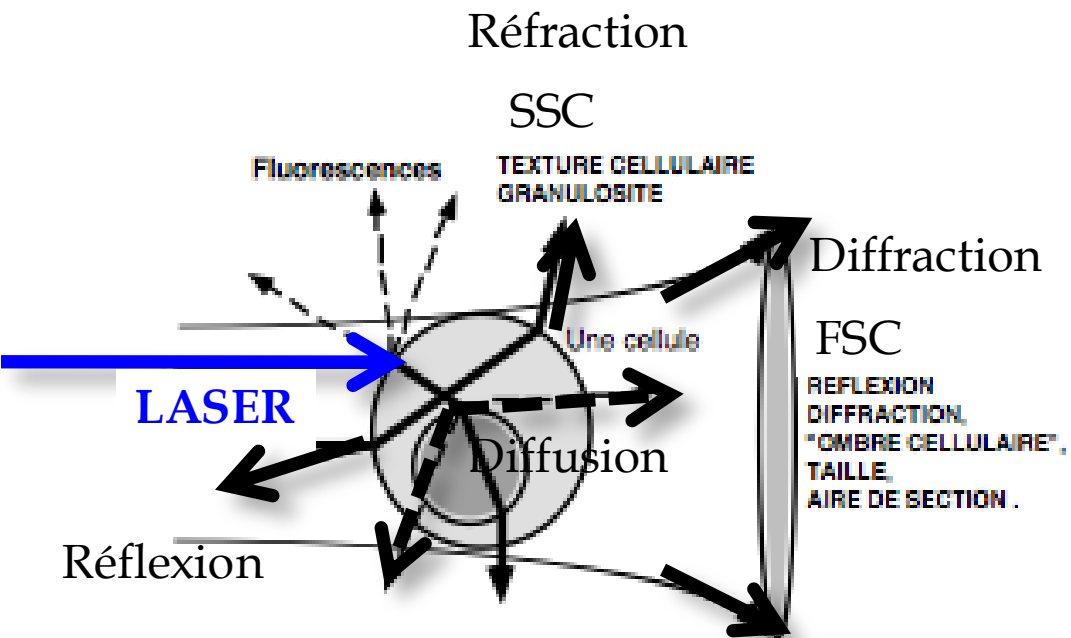
Comment analyser toutes les cellules dans un mélange hétérogène?

Principe du centrage hydrodynamique



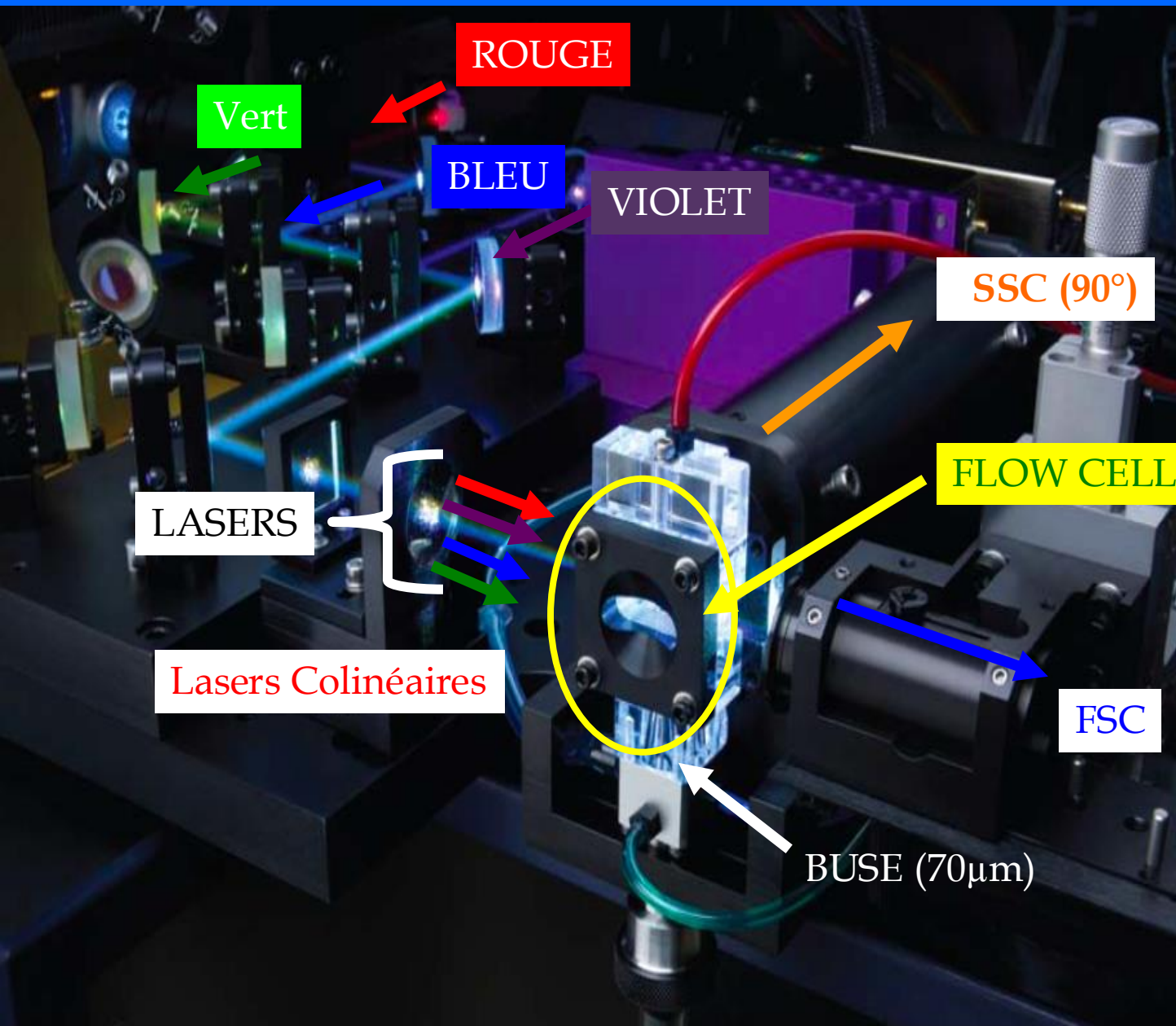
Représentation graphique de l'échantillon

HISTOGRAMME

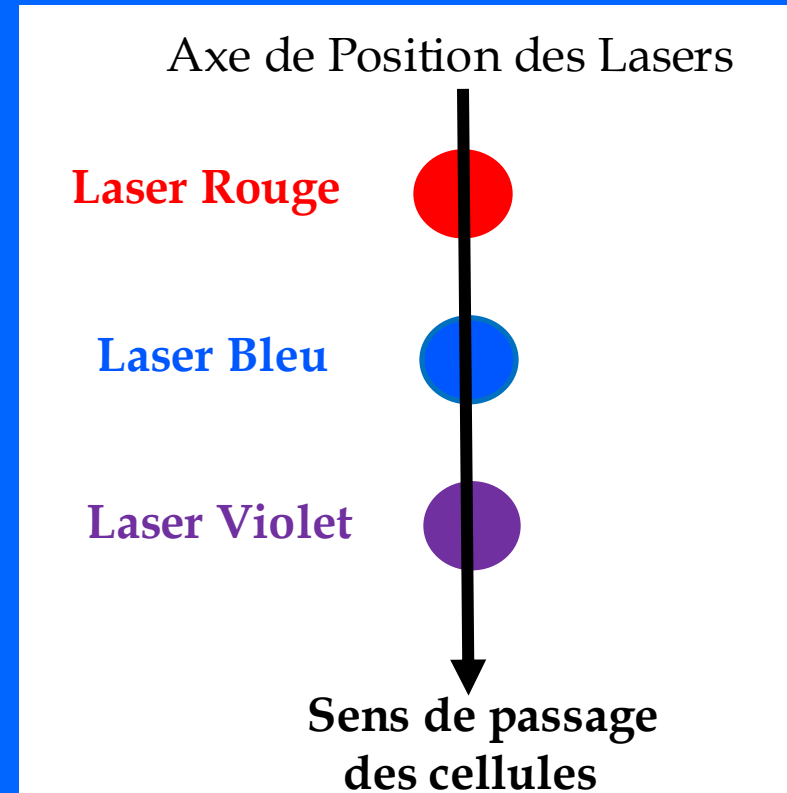


SANG TOTAL

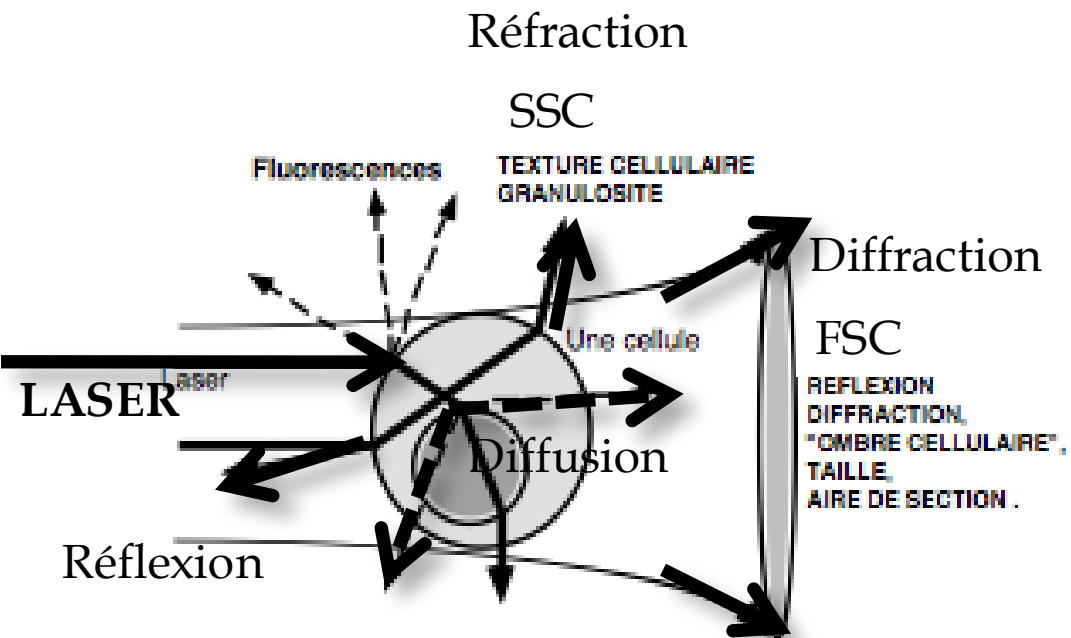
FLOW CELL (Chambre de lecture)



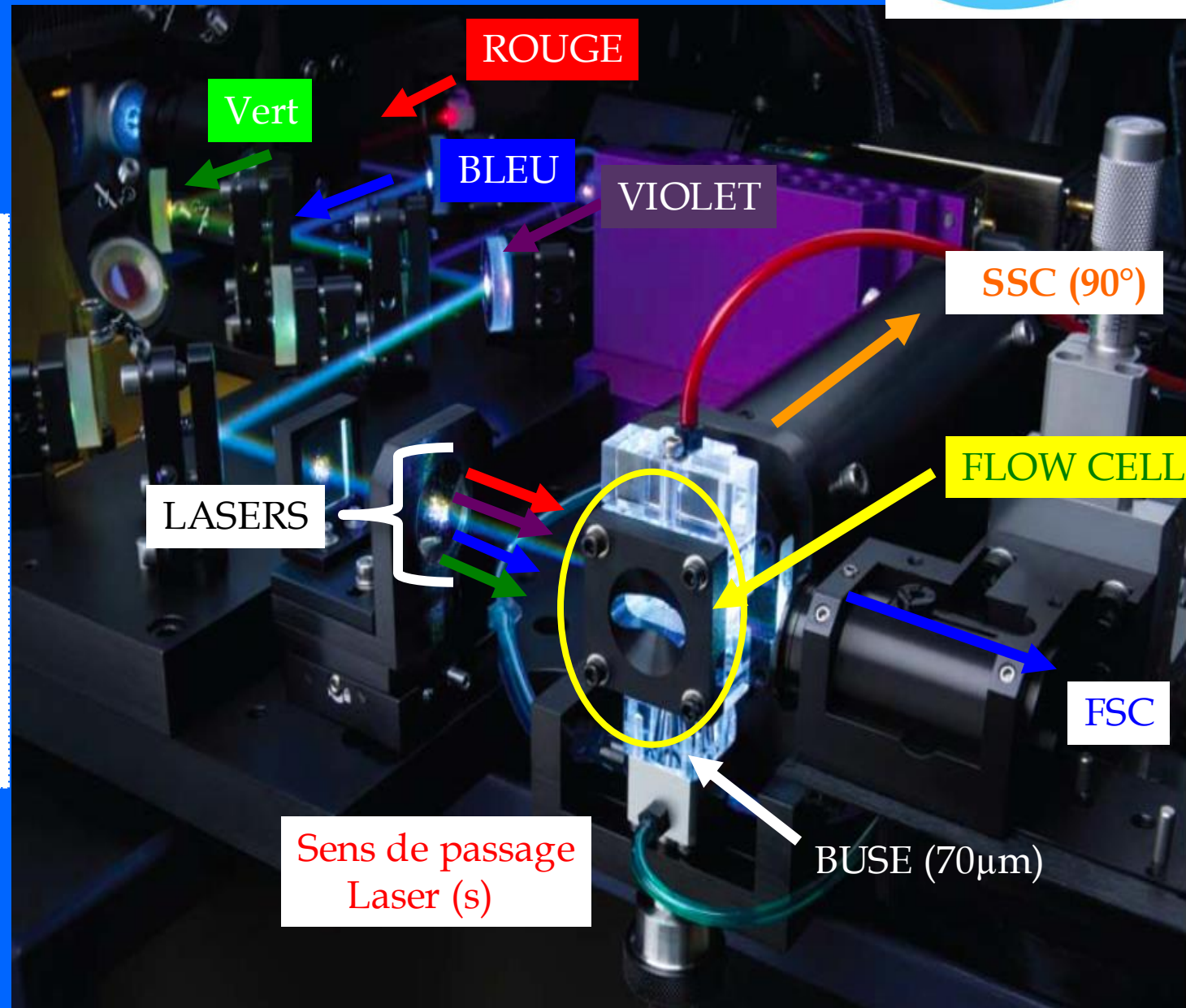
Lasers Colinéaires



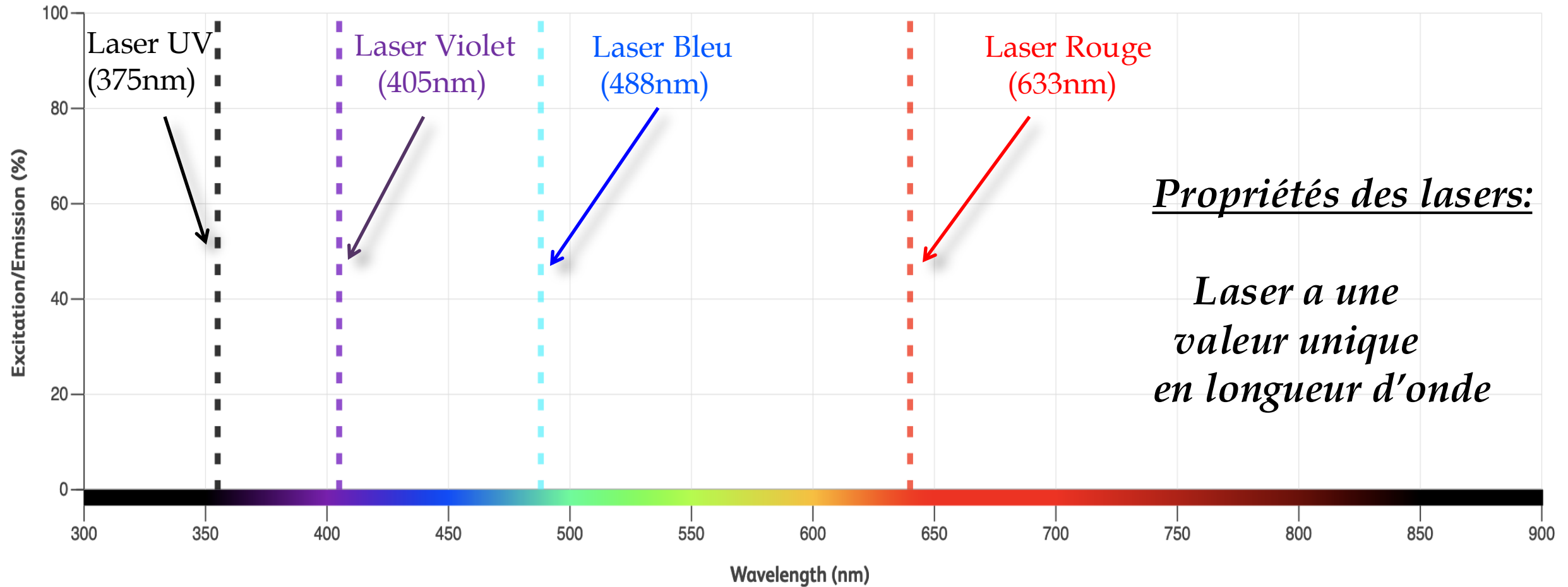
FLOW CELL (Chambre de lecture)



FSC = Forward Side Scatter
SSC = Side Scatter



SPECTRE D'EMISSION et D'ABSORPTION de DIVERS FLUORCHROMES

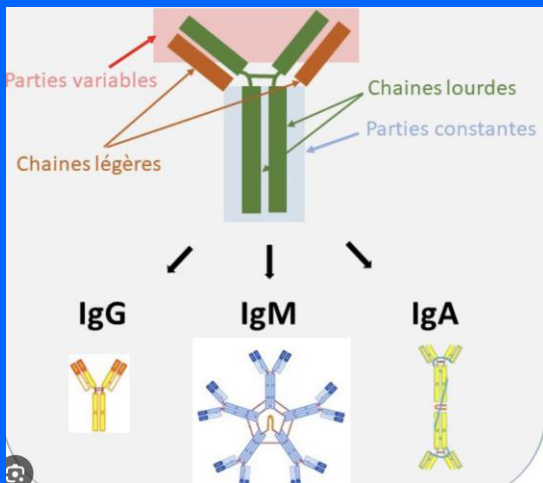


SPECTRE DU VISIBLE (300 à 900 nm)

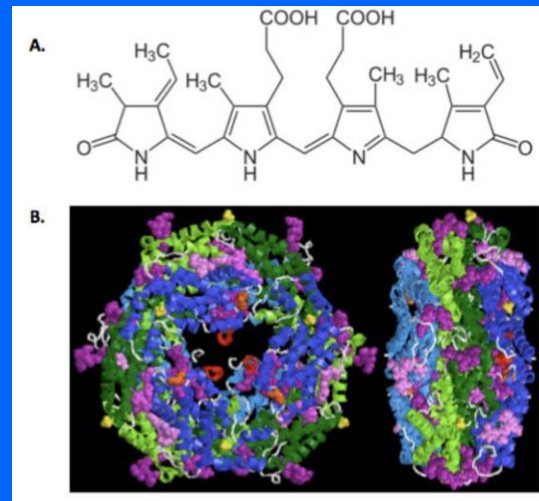
Immunotypage des cellules en cytométrie en flux

Anticorps couplés à des Fluorochromes

Anticorps



Fluorochromes



Flacons Cytométrie



Divers Fluorochromes

3 types Anticorps (Ac)

LASER

Immunotypage des cellules en cytométrie en flux

Grand nombre de Combinaisons Anticorps couplés à des Fluorochromes

CD3 = Antigène spécifique des lymphocytes T

IgG = PE, FITC, PerCpCy5.5, PeCy7, APC, Brillant Violet,

IgM = PE, FITC, PerCpCy5.5, PeCy7, APC, Brillant Violet,

IgA = PE, FITC, PerCpCy5.5, PeCy7, APC, Brillant Violet,

Exemple:



Anticorps anti CD3:

IgG1 Souris anti-humain couplé à un fluorochrome PE
(Antibody Mouse anti-Human IgG1 PE)

Flacons
Cytométrie



Les Fluorochromes

Définition: un fluorochrome est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation (laser)

1) Fluorochromes conjugués :

Anticorps couplés directement à un seul fluorochrome (PE, Fitc, APC)

2) Fluorochromes conjugués à un tandem:

Anticorps couplés directement à un couple de deux fluorochromes

(Pe-Cy5, APC-Cy7)

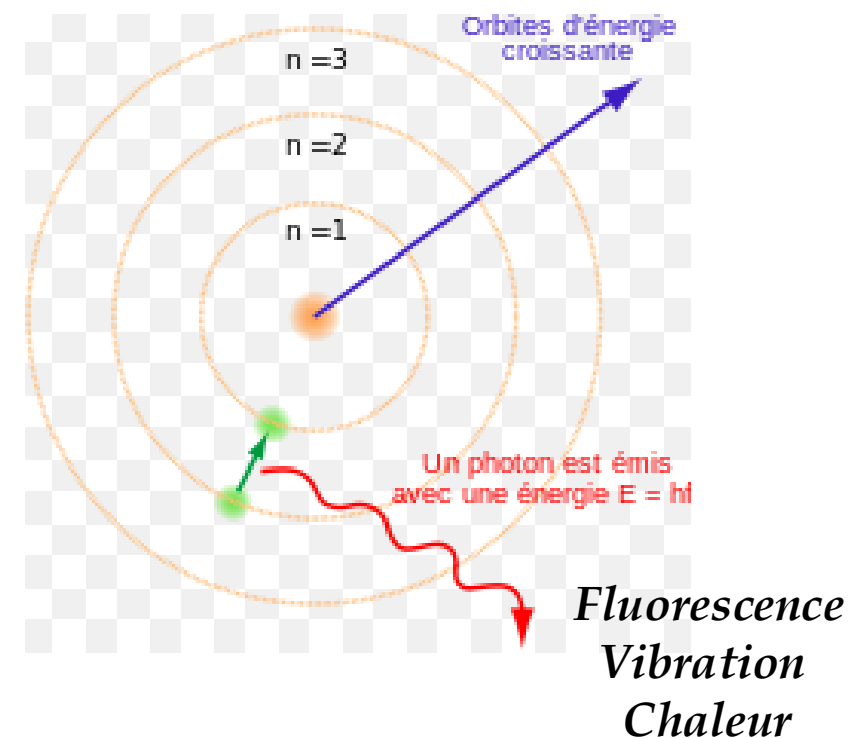
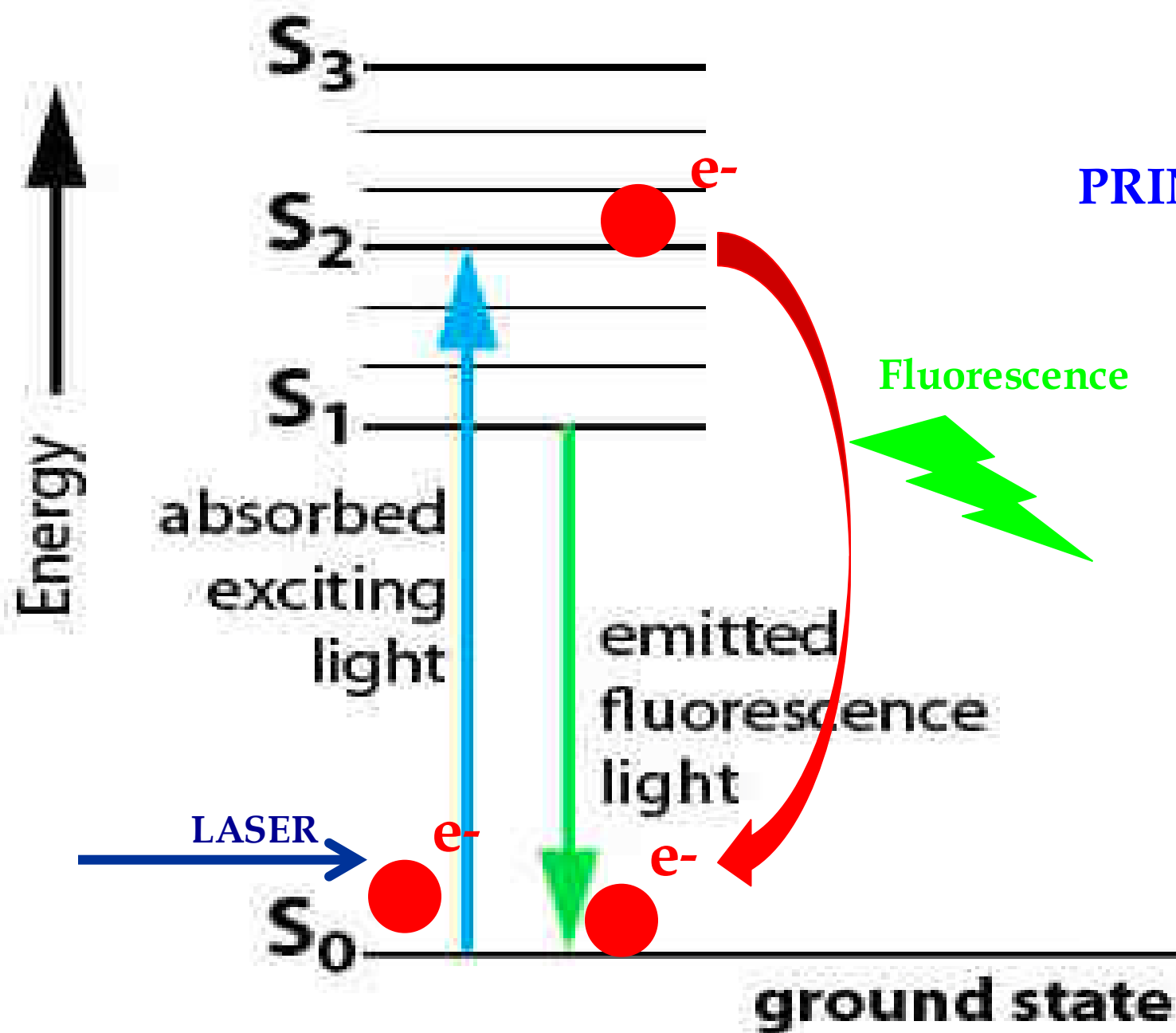
3) Fluorochromes Nucléiques: Marqueurs des acides nucléiques (Dapi, Hoescht, IP)

4) Fluorochromes de fonction : Marqueurs de fonctions cellulaires (Indo 1)

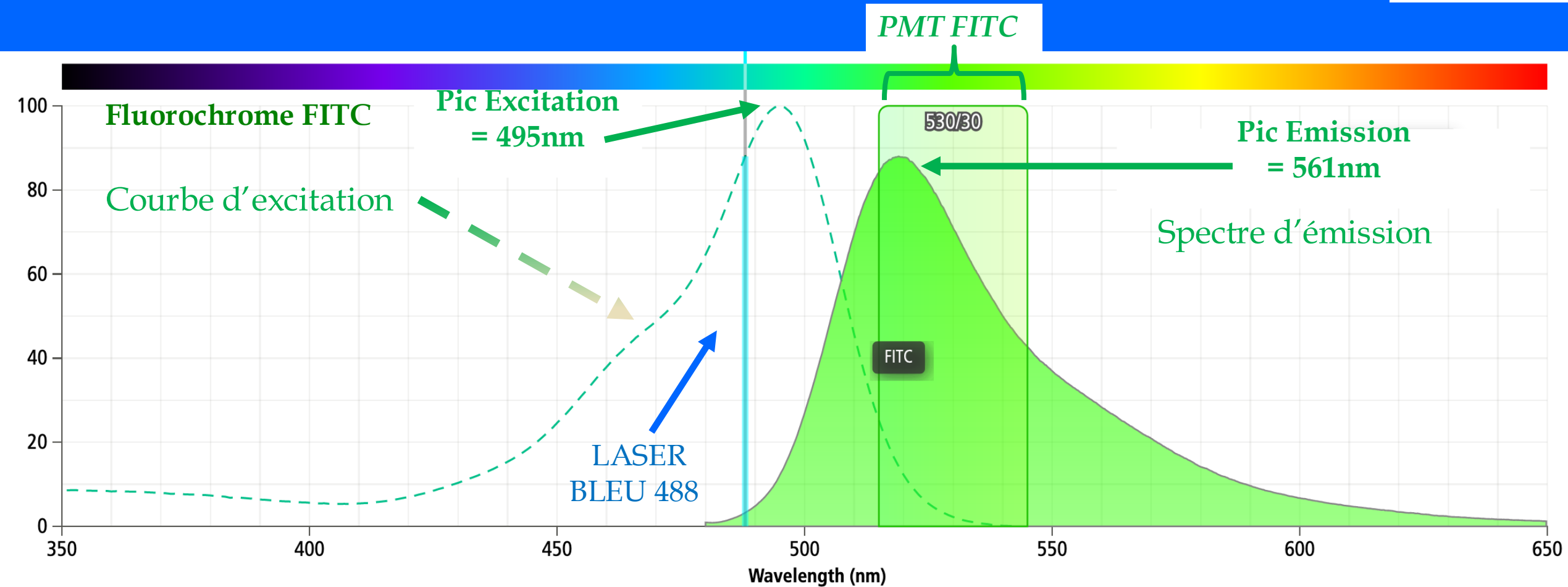
5) Fluorochromes rapporteurs: Protéines fluorescentes (Green Protein Fluorescent)

DIAGRAMME DE JABLONSKI

PRINCIPE DE FLUORESCENCE

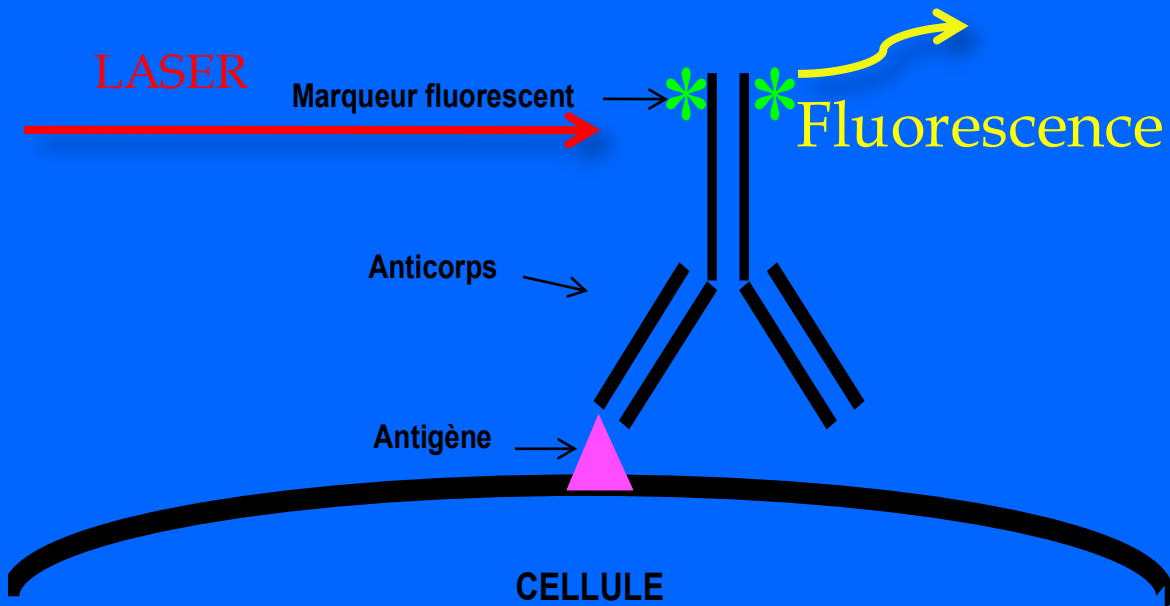


SPECTRE D'UN FLUOROCHROME



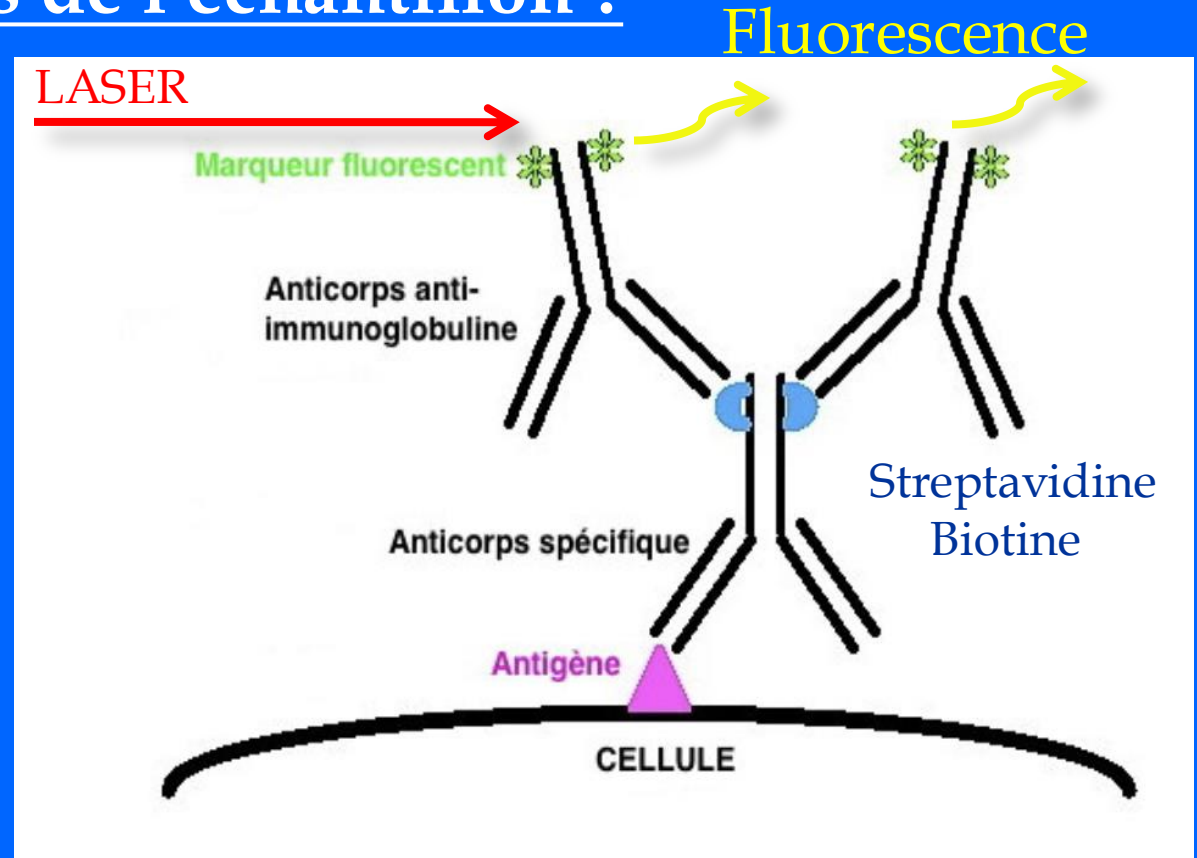
Longueur d'onde d'émission plus grande que la courbe d'excitation,
mais d'énergie plus faible

Comment caractériser les populations et sous-populations cellulaires de l'échantillon ?



Signal lié à un antigène membranaire
ou un intra-cytoplasmique
Besoin de nombreux antigènes
Peu de bruit de fond

DIRECT



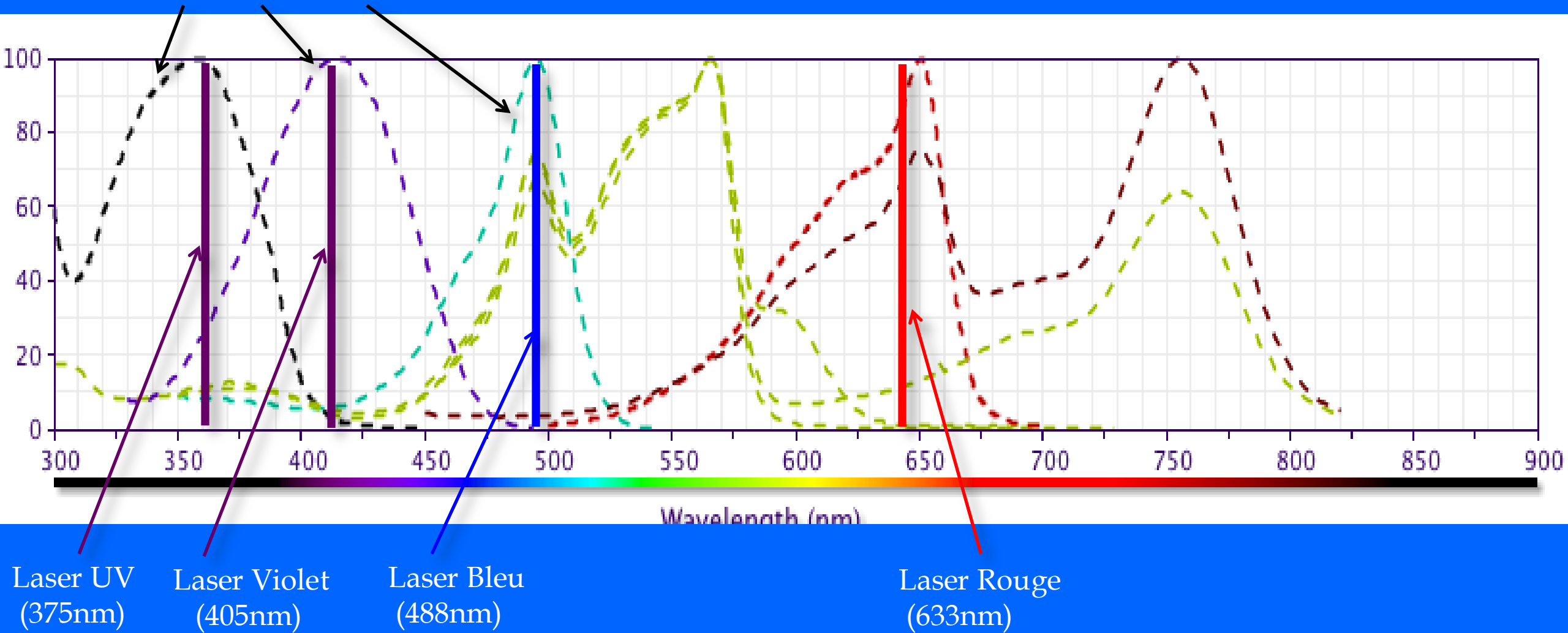
Amplification du signal et du bruit de fond
Peu d'antigènes

INDIRECT

IMMUNOMARQUAGE ASSOCIE A UNE FLUORESCENCE

SPECTRE D'EMISSION et D'ABSORPTION de DIVERS FLUORCHROMES

Courbes d'excitation correspondant à 8 fluorochromes différents



CYTOMETRE LASER FLUOROCHROME

FACSCanto II 3 lasers	Solid State	488	Green	FITC	Alexa Fluor® 488	
		Bleu	Yellow	PE		
			Orange	PE-Texas Red® ^b		
			Red	PerCP	PerCP-Cy5.5	
			Infrared	PE-Cy7		
	HeNe	633	Red	APC	Alexa Fluor® 647	
		Rouge	Far Red	Alexa Fluor® 700 ^b		
			Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7	
	Solid State ^b	405	Green	BD Horizon™ 500 ^b	AmCyan ^b	
		Violet	Blue	BD Horizon™ V450 ^b	Pacific Blue™ ^b	
FORTESSA 4 lasers	Solid State	488	Green	FITC	Alexa Fluor® 488	
		Bleu	Yellow	PE		
			Orange	PE-Texas Red®		
			Red	PerCP	PE-Cy5 ^a	PerCP-Cy5.5
			Infrared	PE-Cy7		
	Solid State	532 or 561	Yellow	PE		
		Vert	Orange	PE-Texas Red®		
			Red	PE-Cy5 ^a		
			Infrared	PE-Cy7		
	Solid State	640	Red	APC ^a	Alexa Fluor® 647	
		Rouge	Far Red	Alexa Fluor® 700		
			Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7	
	Solid State	405	Green	BD Horizon V500	AmCyan	
		Violet	Blue	BD Horizon V450	Pacific Blue™	

PRINCIPAUX FLUOROCHROMES UTILISES en CYTOMETRIE

Fluorochromes

Hoescht 3342
BD V421
BD V450
Pacific Blue
BD V500

FITC
PE

IP
7-AAD
APC

PerCp-Cy5.5

Pe-Cy7
APC-Cy7

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)*	Em-Max (nm)
Hoechst 33342	Blue	350	355, 375	461
Brilliant Violet 421	Blue	407	405	421
BD Horizon V450	Blue	404	405	448
Pacific Blue™	Blue	401	405	452
BD Horizon V500	Green	415	405	500
AmCyan	Green	457	405	491
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578
BD Horizon PE-CF594	Orange	496, 564	488, 532, 561	612
PI	Orange	351	488, 532, 561	617
7-AAD	Red	543	488, 532, 561	647
APC†	Red	650	633, 635, 640	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	633, 635, 640	668
PE-Cy™5†	Red	496, 564	488, 532, 561	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719
PE-Cy™7	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785
APC-Cy7	Infrared	650	633, 635, 640	785
BD APC-H7	Infrared	650	633, 635, 640	785

Numéros des canaux
de fluorescence
dans un cytomètre

FL1
FL2

FL2 / FL3
FL3
FL4

FL4

FL5

Phénotype Cellulaire et Cluster de différenciation (CD)

- Toutes les cellules possèdent des antigènes de surface qui peuvent être reconnus par des anticorps.
- Les cellules expriment différents antigènes suivant leur maturité et leur lignage
- Ces différents antigènes vont donc aider à les caractériser:
 - déterminer le type cellulaire
 - et le stade de maturation
- Ces antigènes sont appelés:
 - « **Cluster of Differentiation** » « **CD suivi d'un chiffre** »

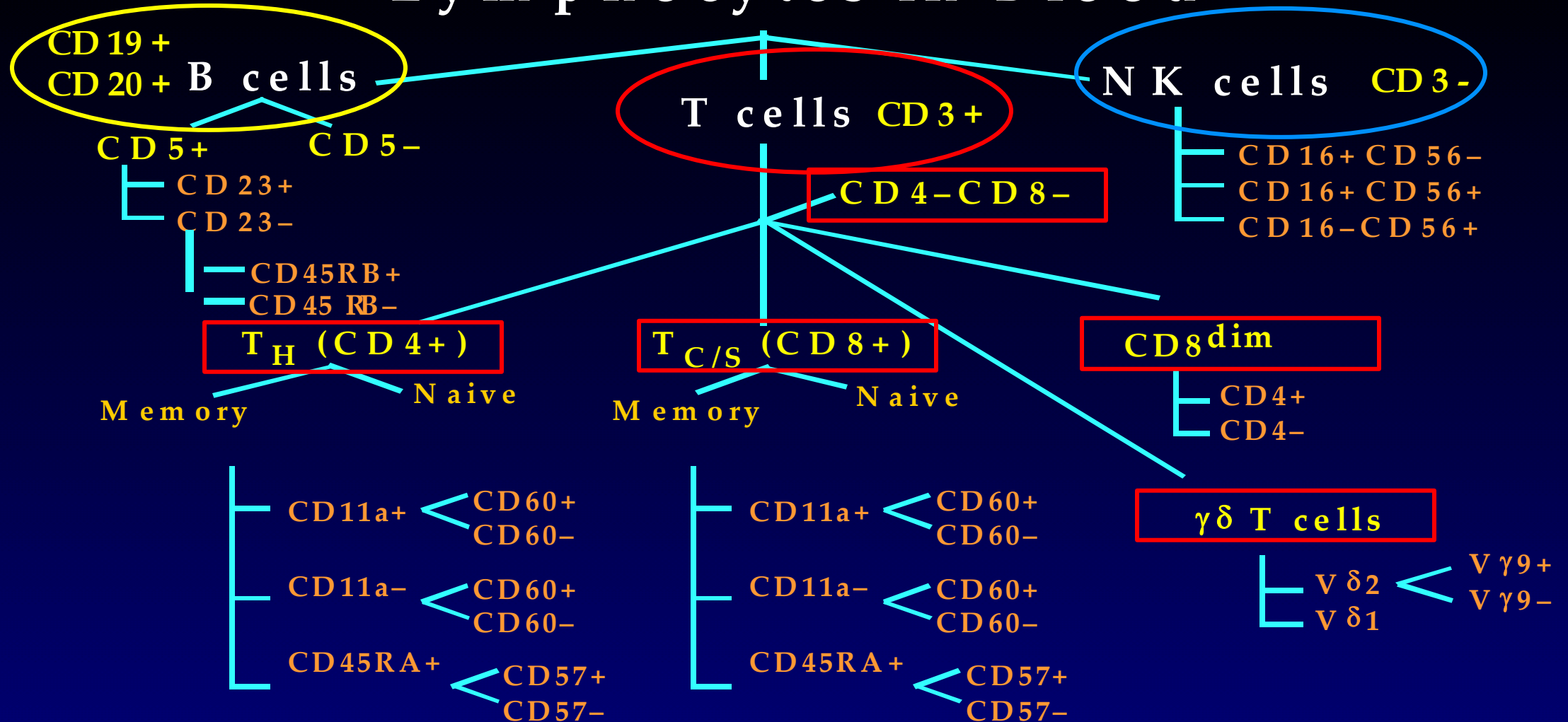
**International WorkShop and Conference
on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA)**

CLUSTER OF DIFFERENTIATION

		Key Antigens- Human			Key Antigens- Human
T Cell		CD3 CD4 CD8	Monocyte		CD33
B Cell		CD19 CD20	Granulocyte		CD66b
Dendritic Cell		CD11c CD123	Platelet		CD41 CD61 CD62
NK Cell		CD56	Erythrocyte		CD235a
Stem Cell		CD34	Endothelial		CD146
Macrophage		CD14	Epithelial		CD326

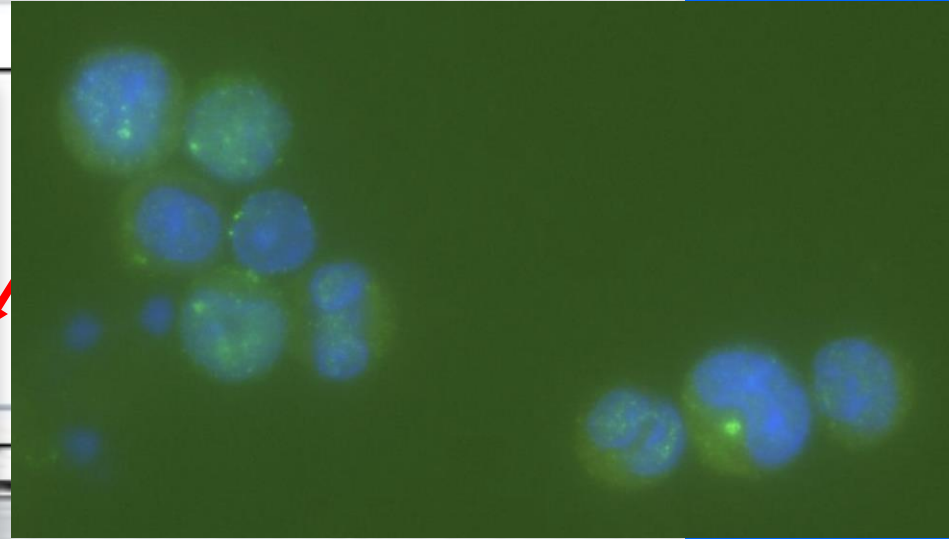
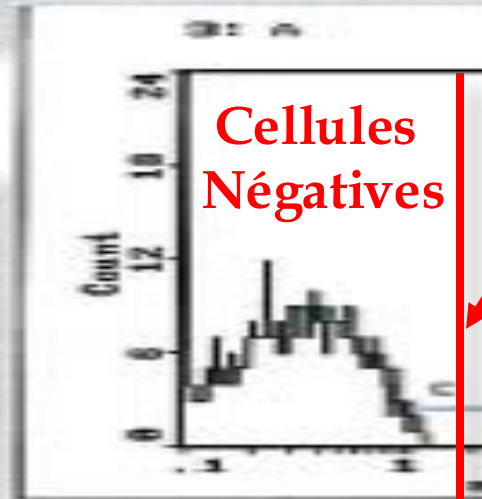
International WorkShop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA)

Lymphocytes in Blood

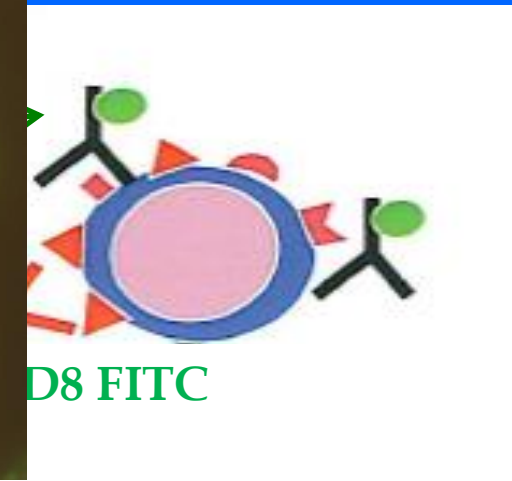
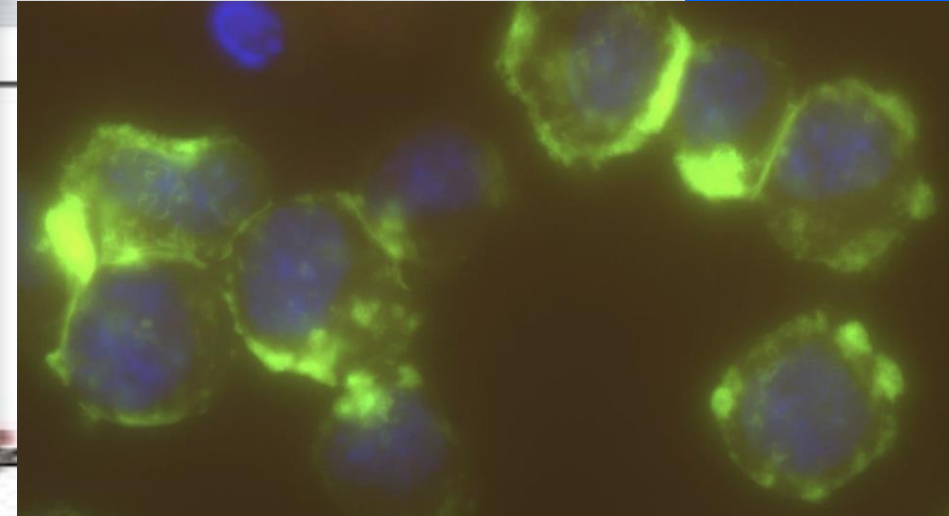
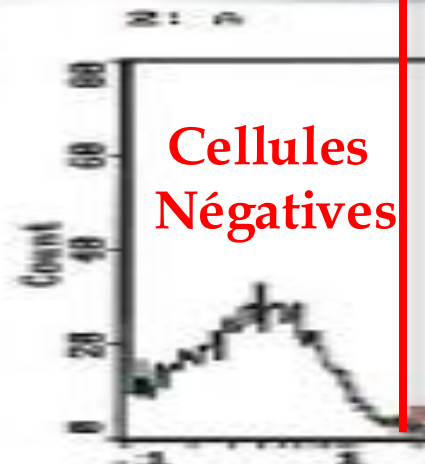


Représentation graphique Monoparamétrique (un simple marquage cellulaire avec un seul fluorochrome)

**Tube
Négatif**

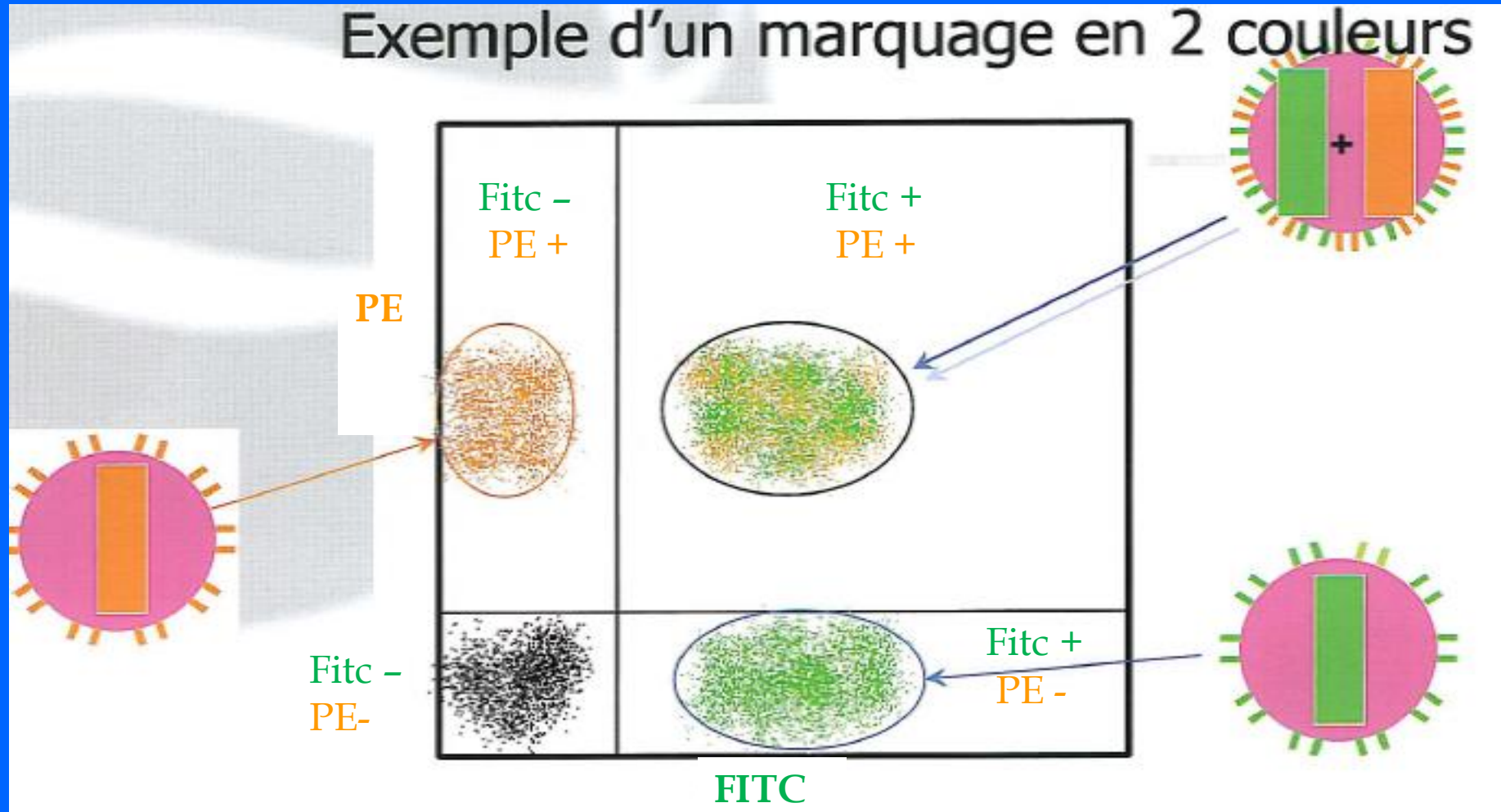


**Tube
Positif**

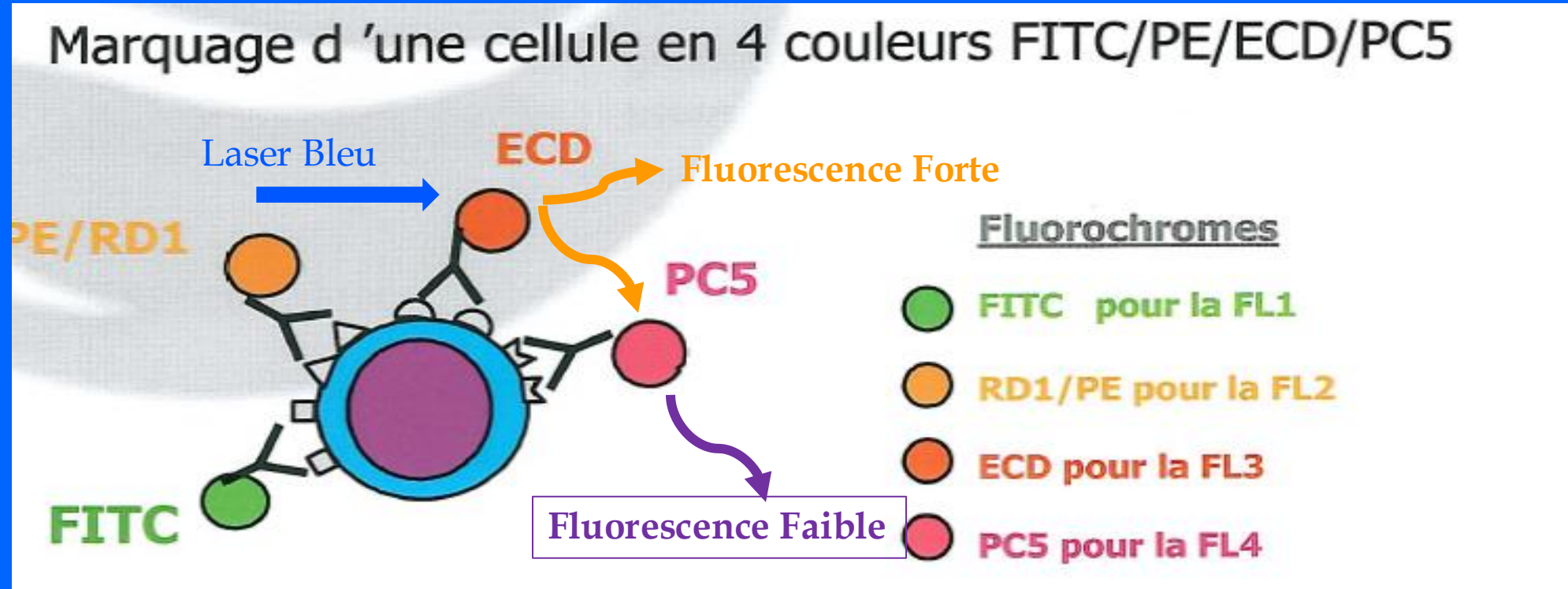


Représentation graphique Bi-Paramétrique

Deux fluorochromes



MULTIMARQUAGES D'UNE CELLULE

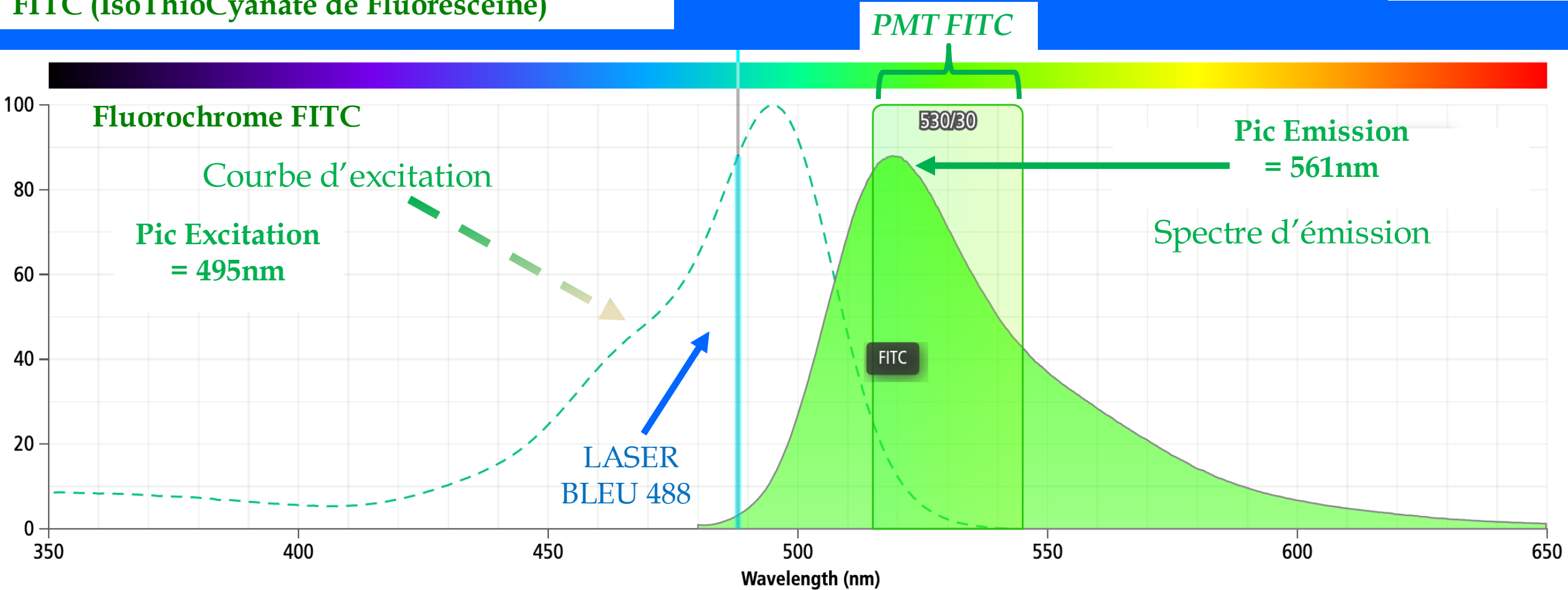


Problèmes:

- *Encombrement stérique (nombre d'anticorps maximum sur une cellule) = Faux Négatif
- *Possibilité de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) = Faux positif

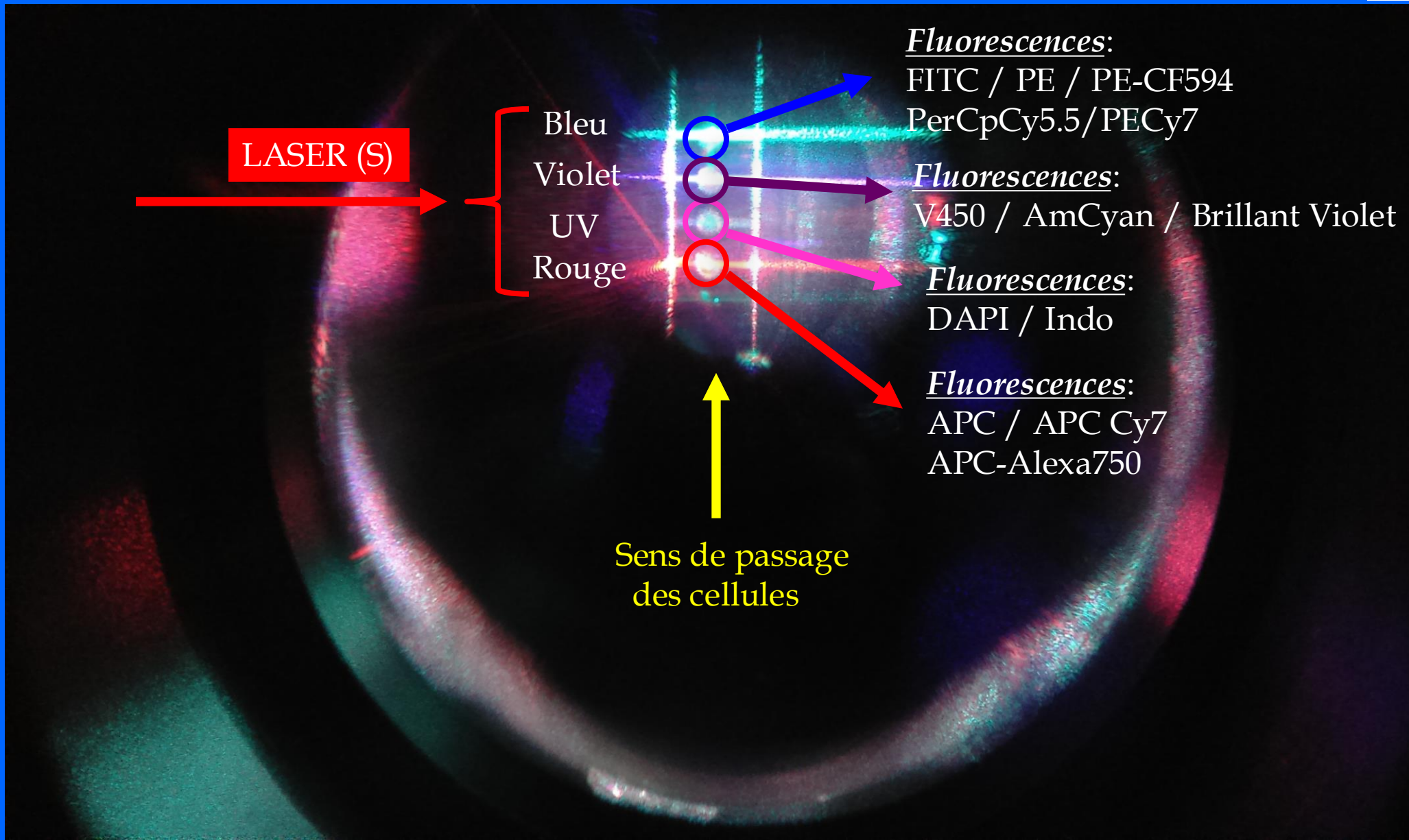
SPECTRE D'UN FLUOROCHROME

FITC (IsoThioCyanate de Fluorescéine)

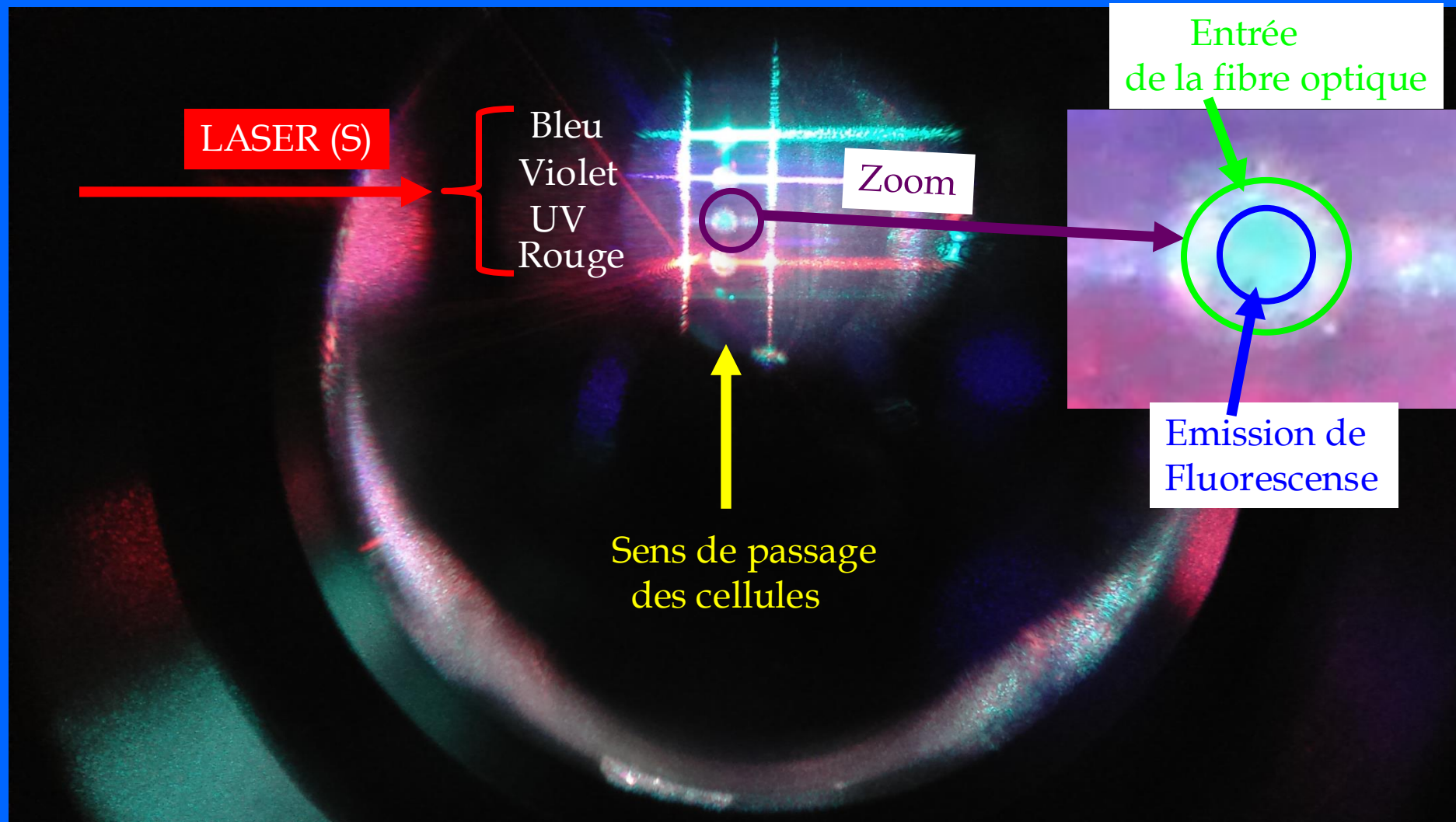


La fluorescence émise sera détecter par le PhotoMultiplicaTeur (PMT)

FLOW CELL (Chambre de lecture)



FLOW CELL (Chambre de lecture)



SYSTEME OPTIQUE = FILTRE + PMT

Fibres Optiques

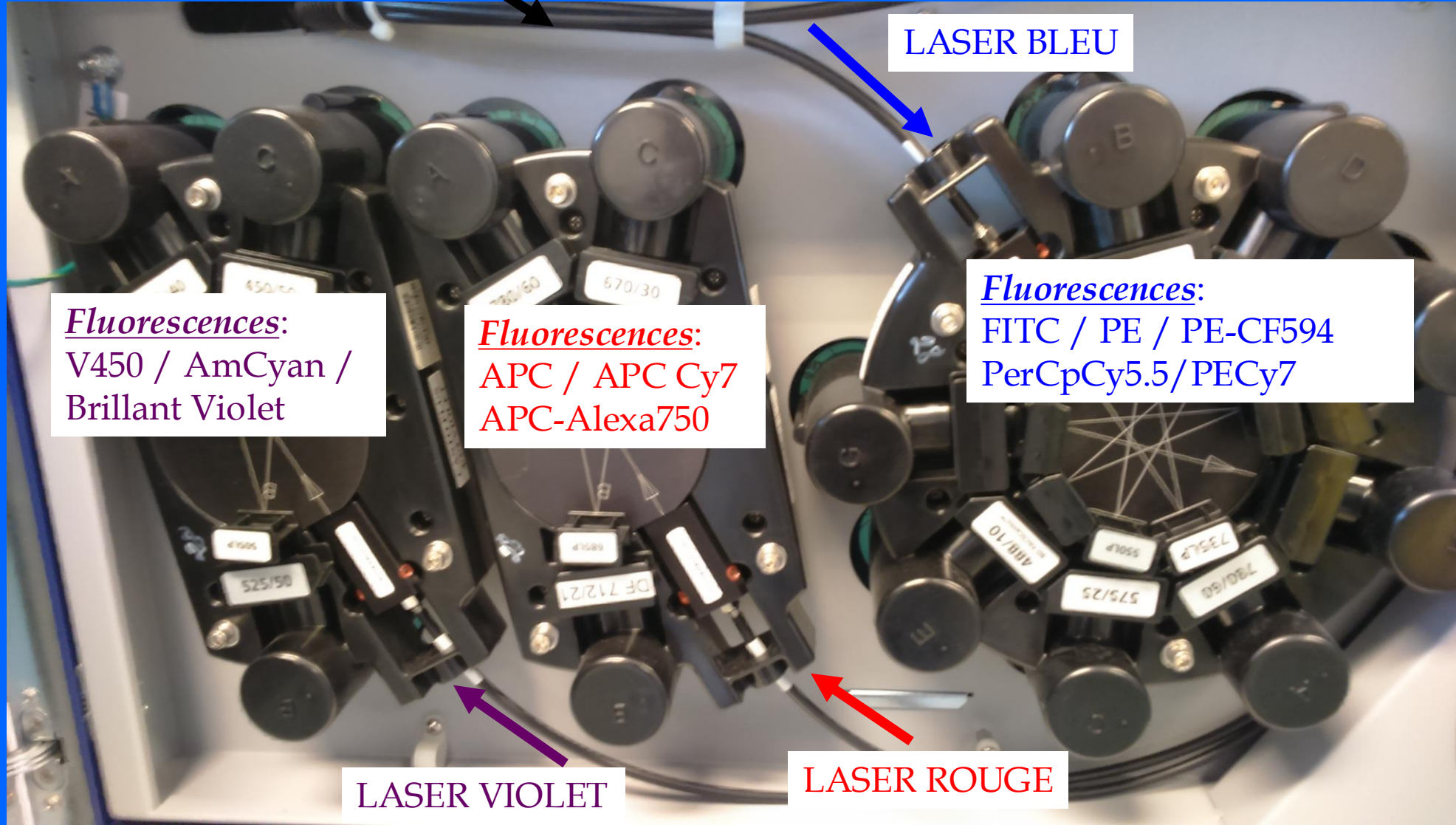


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)

LASER BLEU

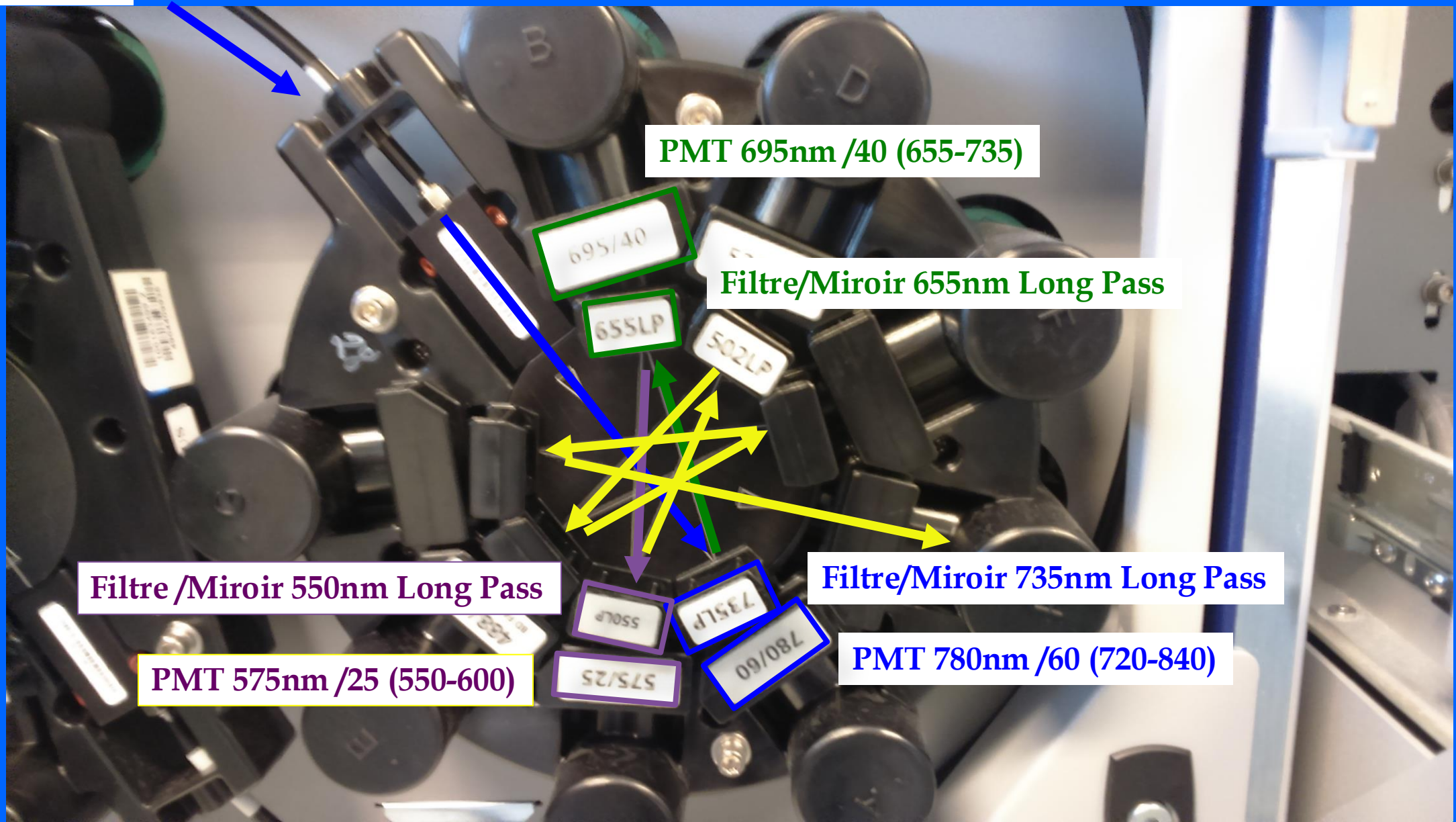
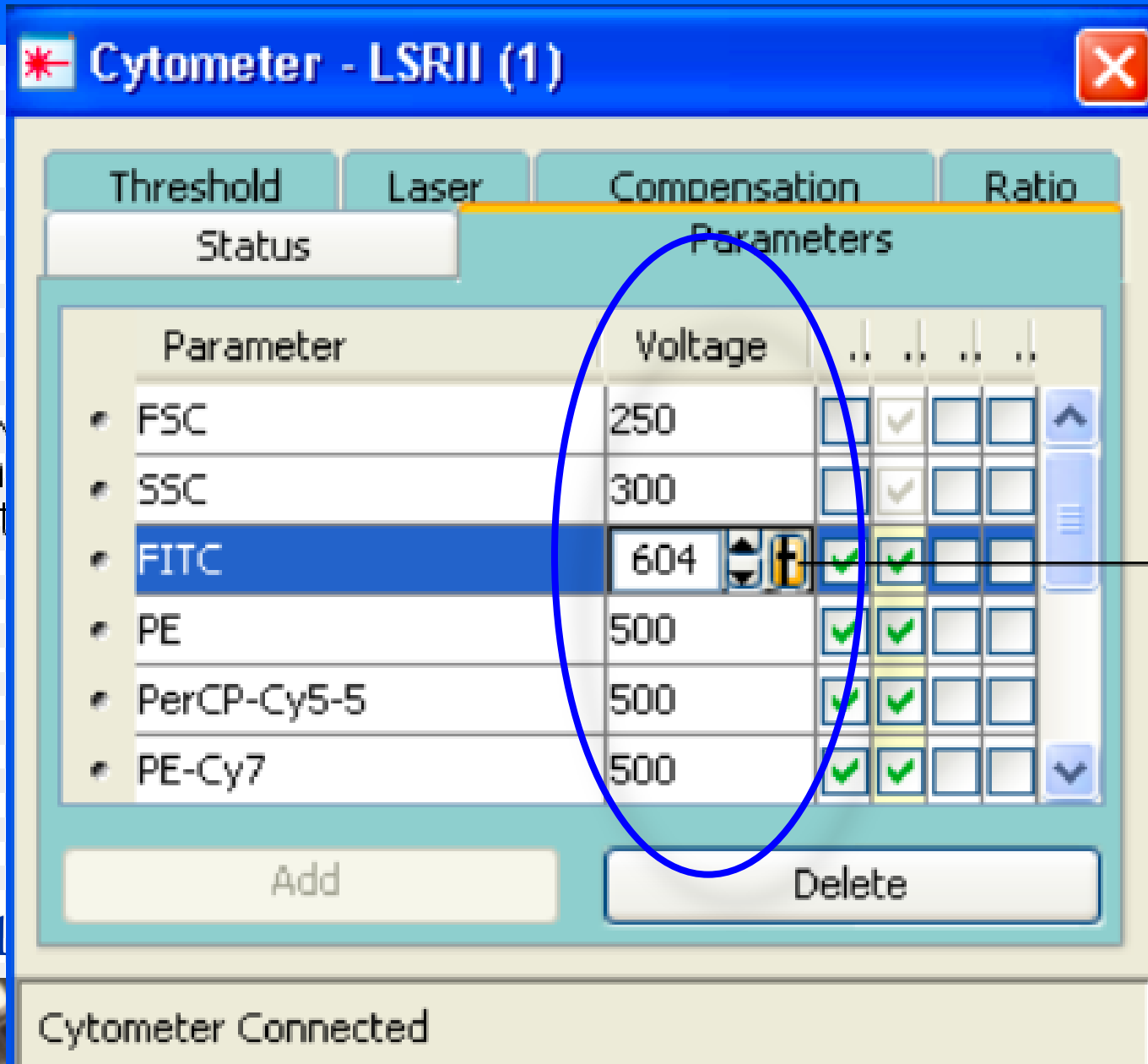


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)



photon
incident

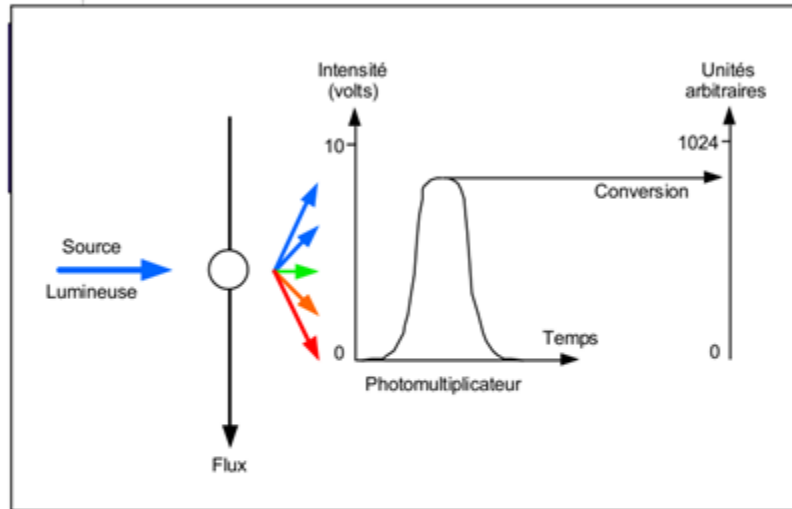
connecteurs
électriques

tentiel

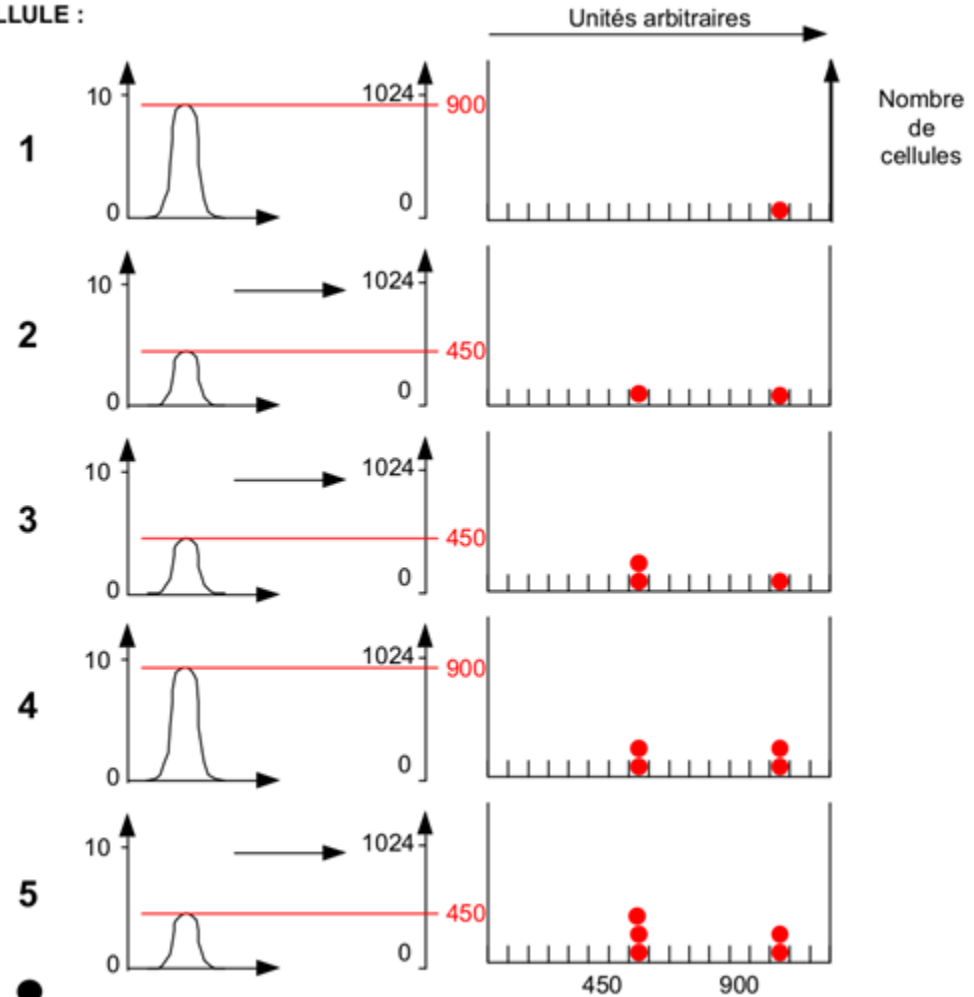
multiplificateur

Principe d

Conversion des signaux

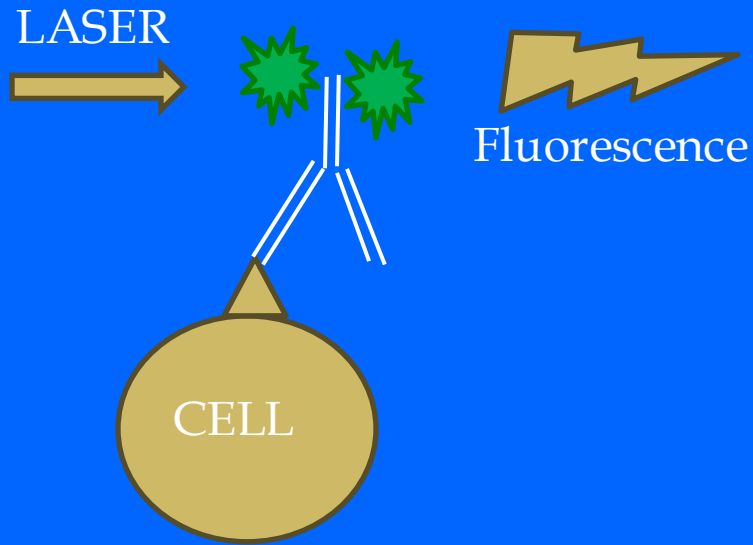


CELLULE :

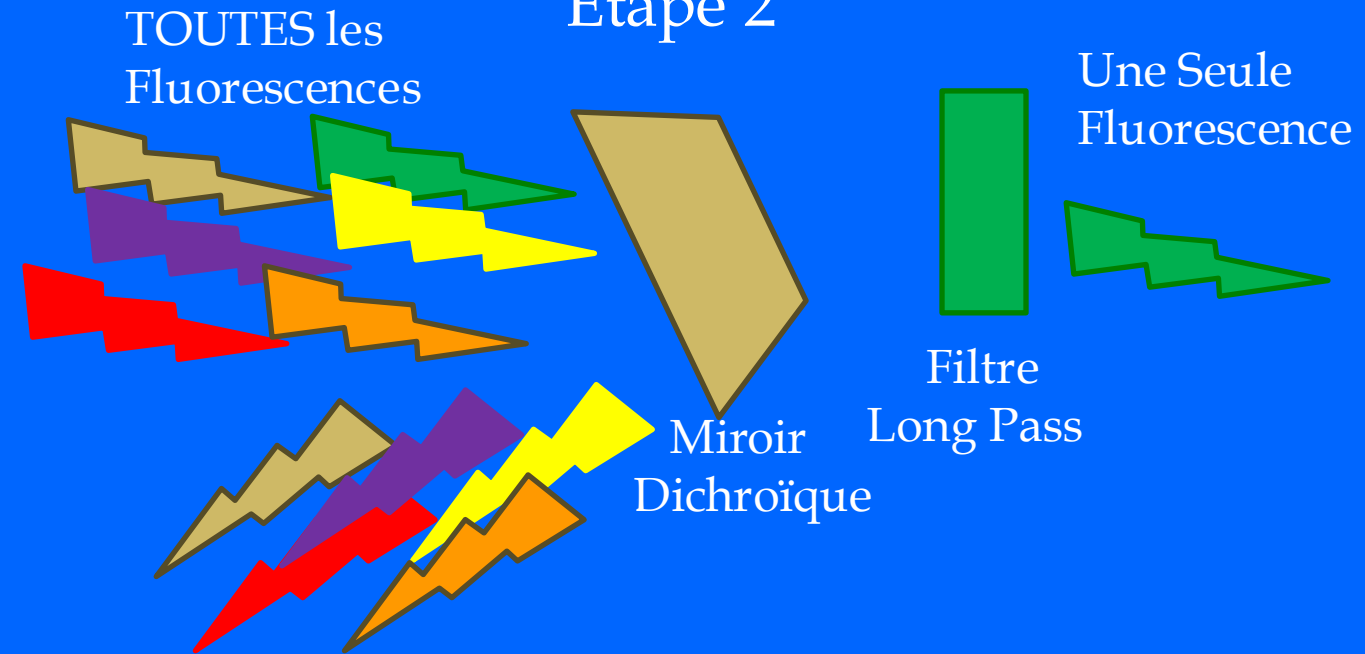


Transformation du signal optique en numérique

Etape 1



Etape 2

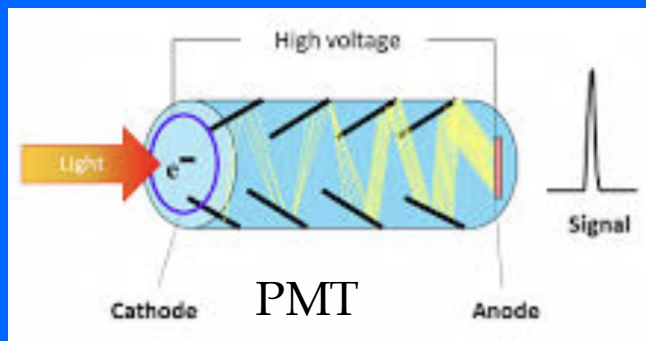


Etape 3

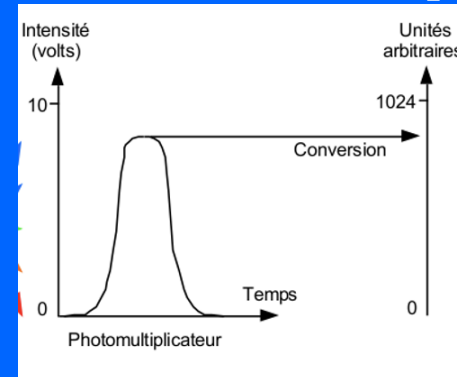
PhotoMultiPlicateur (Voltage)

Fluorescence

Photons

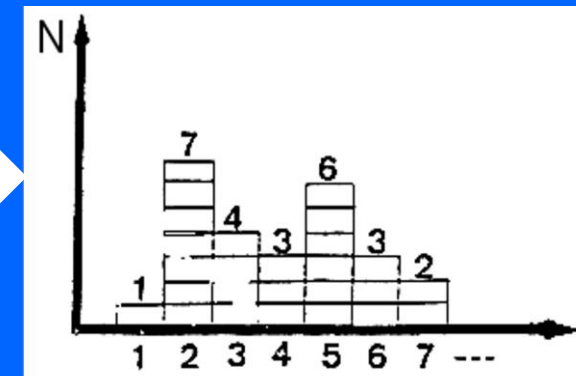


Intensité électrique
en fonction du temps



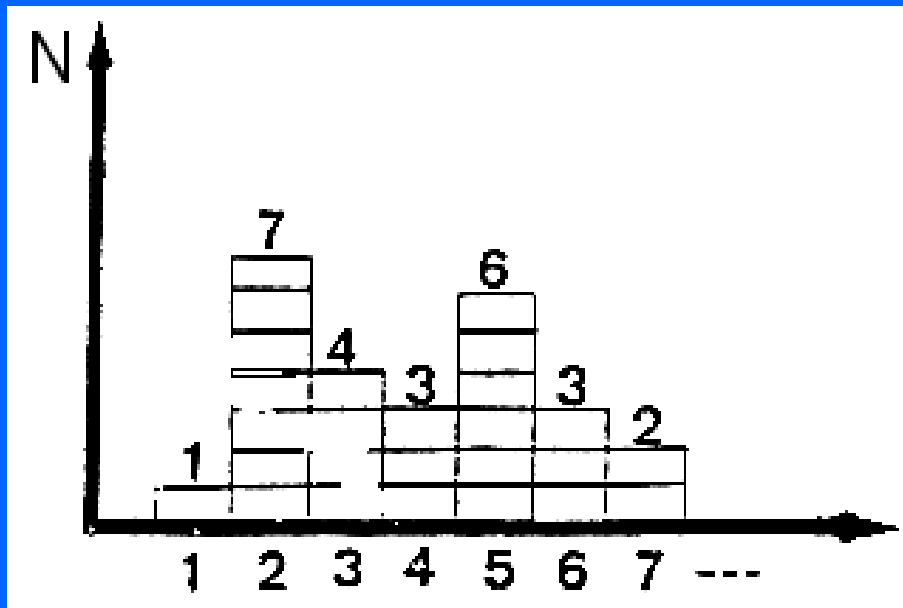
Etape 4

Fréquence d'intensité

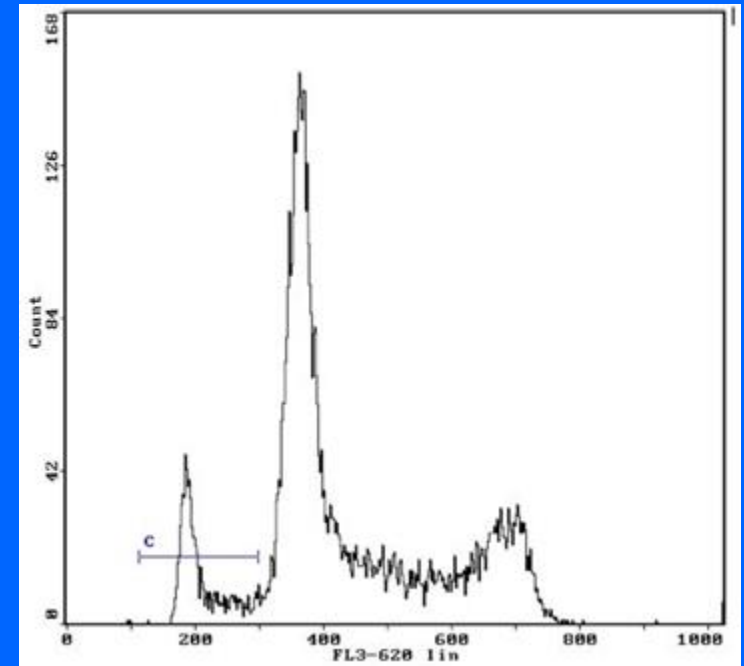


Conversion des signaux

Nombre d'évènements (cellules)/canal



Fréquence



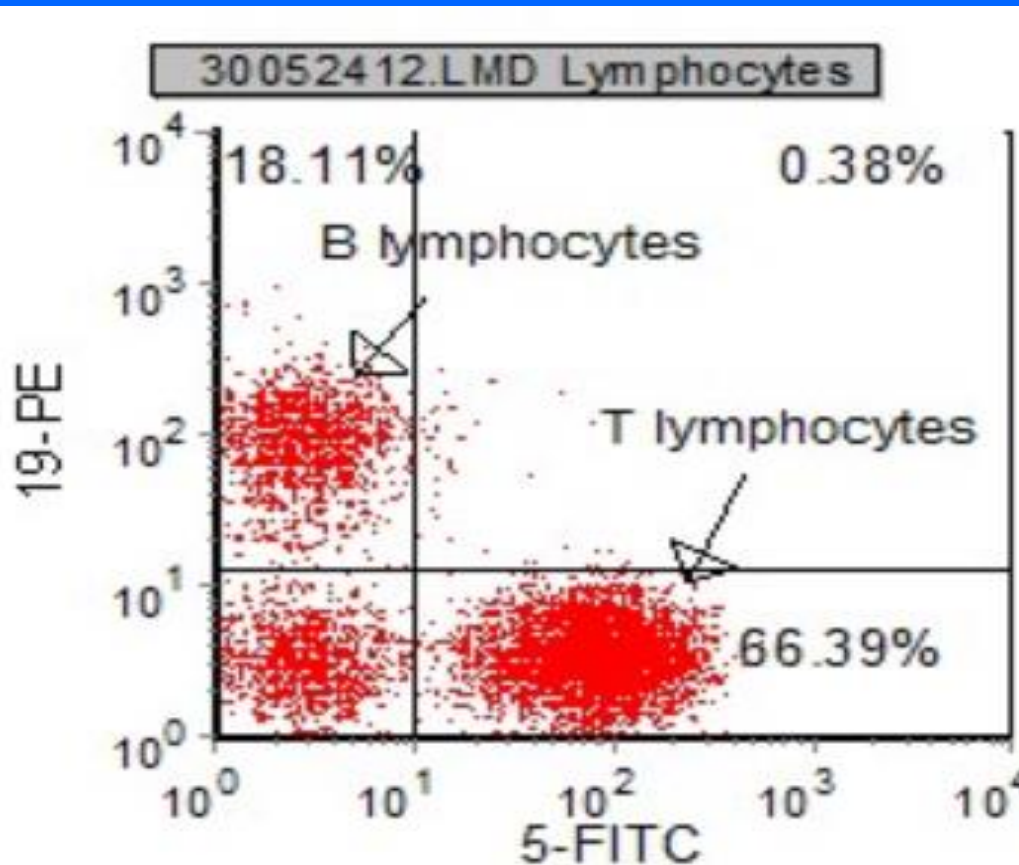
Intensité du paramètre de 0 à 1024

Histogramme

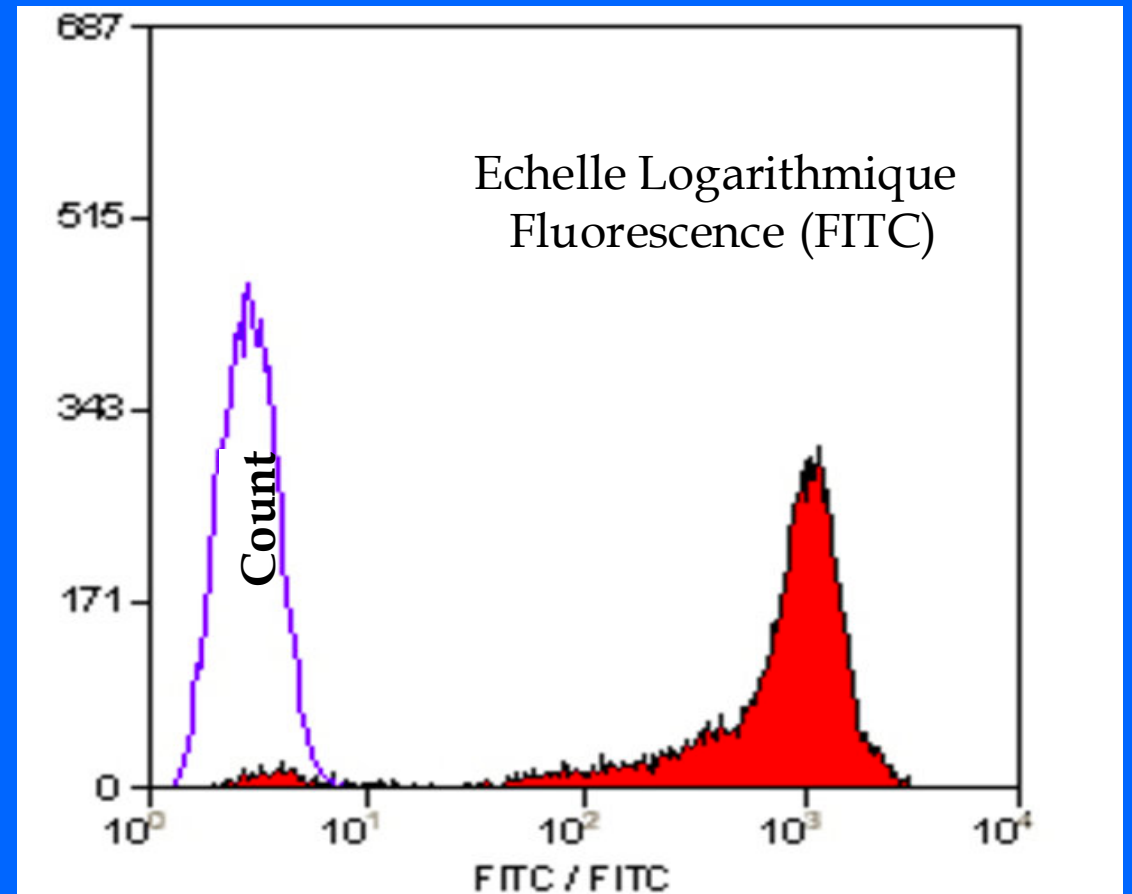
Représentation Mono et Biparamétrique

IMMUNOPHENOTYPAGE DE SANG TOTAL

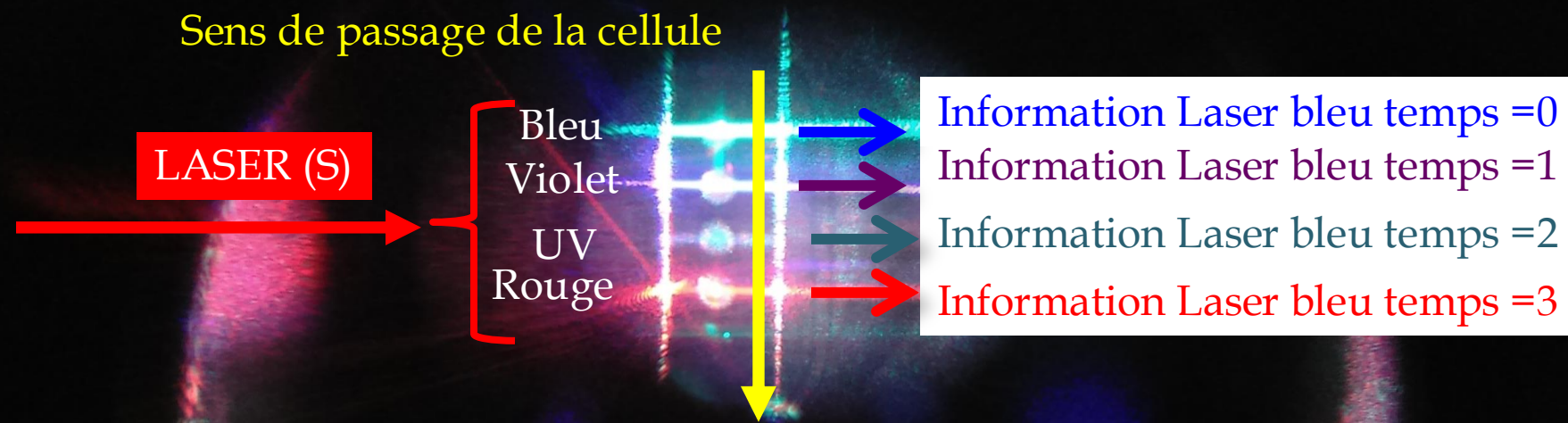
DOT PLOT (Bi-Paramétrique)



HISTOGRAMME (Monoparamétrique)



DELAI DE LASER



Le logiciel de cytométrie rassemble ces informations ($t_0; t_1; t_2; t_3$) pour les associer à la même cellule

Sens de passage de la cellule

LASER (S)

Bleu
Violet
UV
Rouge

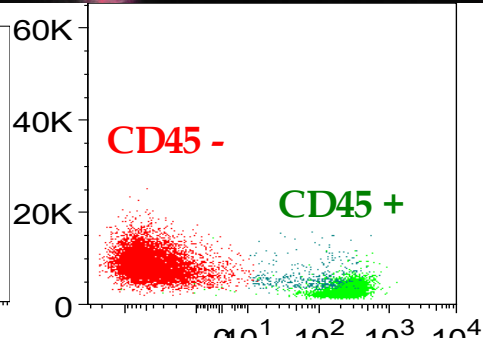
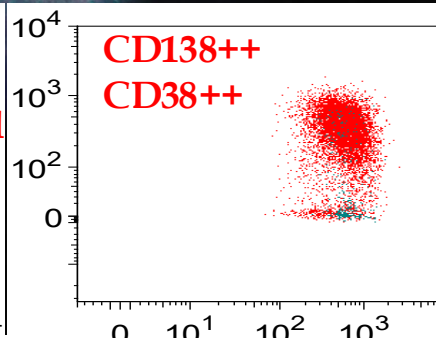
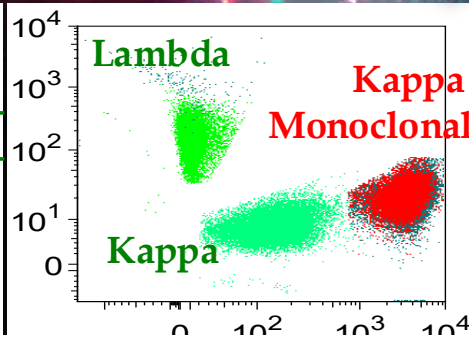
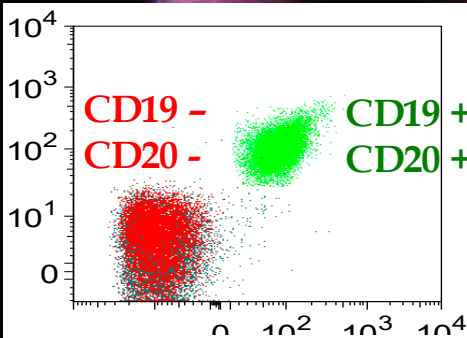
Information Laser bleu temps =0

Information Laser bleu temps =1

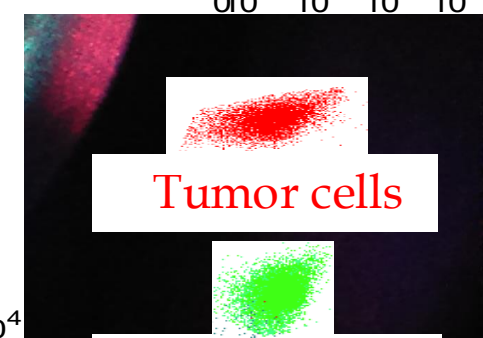
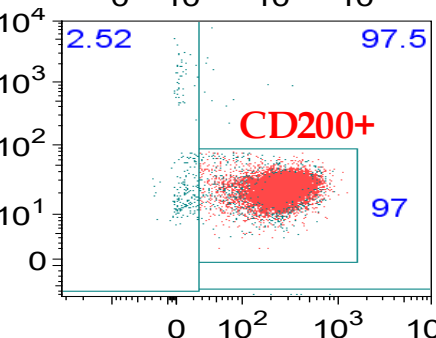
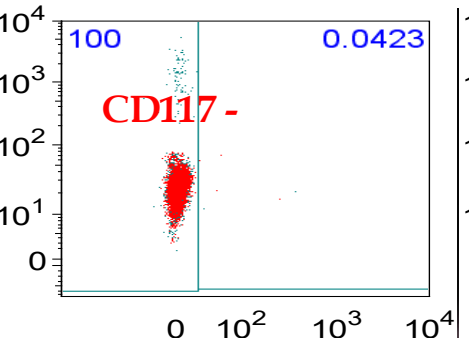
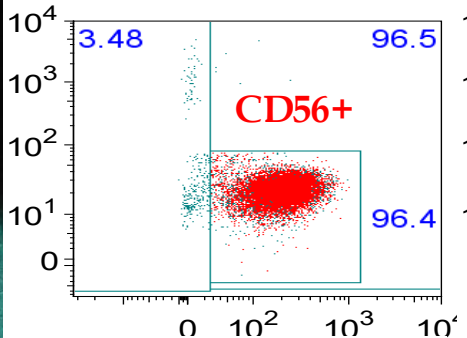
Information Laser bleu temps =2

Information Laser bleu temps =3

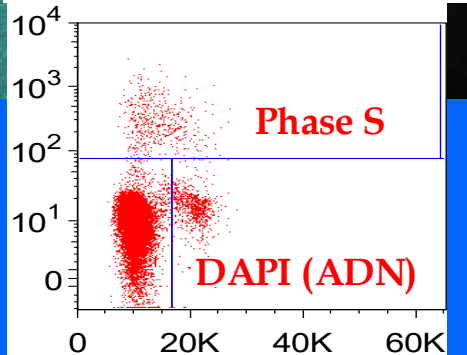
Laser Bleu



Laser Rouge



Laser UV



*Détermination du phénotype complet
pour chaque cellule*

ImmunoPhénotypage en Cytométrie en Flux

Evaluation des lymphocytes T (CD3) dans un échantillon de sang:

Tube de sang périphérique ➡



Numération Formule Sanguine (NFS)

HEMATOLOGIE					Intervalle de référence	Antécédents
NUMERATION GLOBULAIRE (SIEMENS - Advia 2120 - Cytométrie en flux)						
Leucocytes			5,78	G/l	(4,00-10,00)	
Hématies			4,19	T/l	(3,00-5,00)	
Hémoglobine			13,6	g/dl	(11,5-16,0)	
Hématocrite			41,0	%	(30,0-47,0)	
V.G.M			98	fl	(80-100)	
T.G.M.H			32,3	pg	(27,0-32,0)	
C.C.M.H			33,1	g/dl	(30,0-36,0)	
FORMULE LEUCOCYTAIRE						
Polynucléaires neutrophiles	77,2	%	soit	4,46	G/l	(2,00-10,00)
Polynucléaires éosinophiles	2,7	%	soit	0,16	G/l	(<0,60)
Polynucléaires basophiles	1,4	%	soit	0,08	G/l	(0,00-0,20)
Lymphocytes	15,4	%	soit	0,89	G/l	(1,00-4,50)
Monocytes	2,0	%	soit	0,12	G/l	(0,20-1,00)



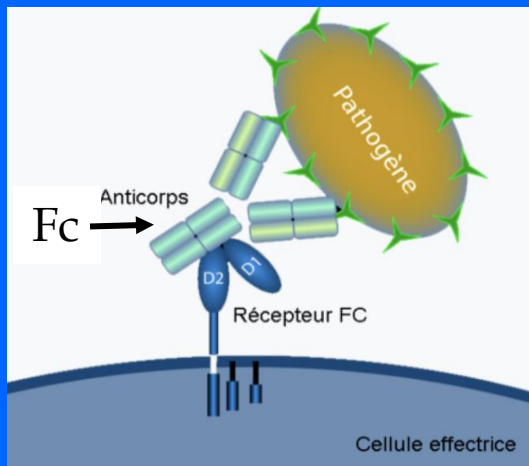
1 Giga (1.10⁶ cellules) / Tube ➡

Tube contrôle / tube test

Immunophénotypage en Cytométrie

- Les leucocytes du système immunitaire (Monocytes, lymphocytes B, NK, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes) présente à la surface de leurs membranes cellulaires une protéine transmembranaire (Récepteur Fc = Fragment cristallisable) contribuant aux fonctions protectrices.
- Récepteurs Fc se lient à la partie Fc des anticorps qui ont opsonisé (« enrobé ») les pathogènes, ce qui activent les cellules immunitaires dépendantes des anticorps

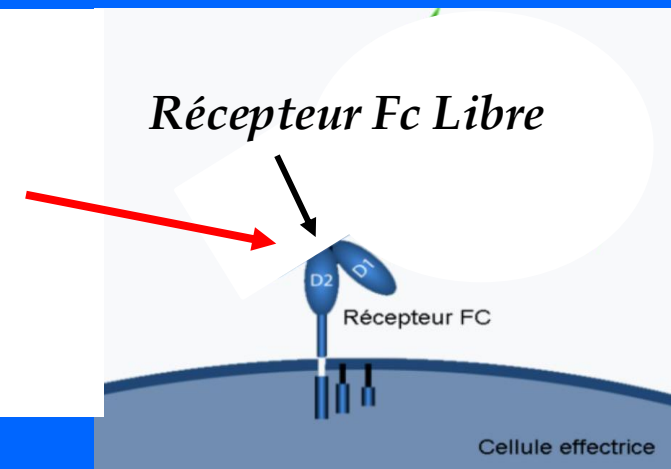
Réponse Immunologique



Problème

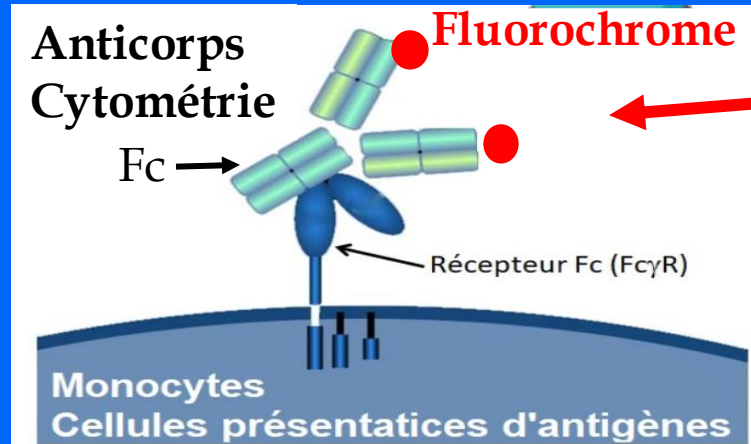
**Risque de faux positifs
(fluorescence positive)
via la fixation de la partie Fc
non spécifique des anticorps
de cytométrie**

Echantillon de Sang



Saturation des Récepteurs Fc

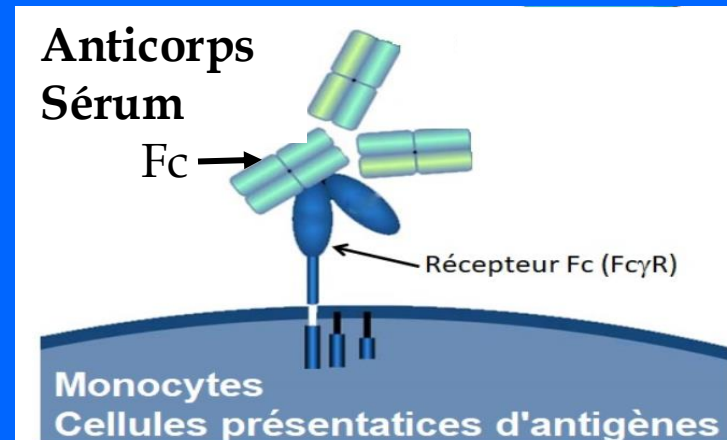
Saturation des récepteurs Fc avec les anticorps « naturels » présents dans le sérum
= éviter les fixations non spécifiques de la partie Fc des anticorps de cytométrie
(Eviter les Faux positifs)



**Situation
à éviter**

➡ Ajouter PBS / Sérum 10% (Anticorps naturels présent dans le sérum) aux cellules pendant 10 minutes à +4°C

Saturation des Récepteur Fc



Immunophénotypage (Notion d'Isotype)

➡ Tube contrôle:

Marquage anticorps Isotype couplé le même fluorochrome (Isotype Contrôle)

Isotype contrôle = anticorps NON Spécifique couplé avec le même fluorochrome et de même isotype que l'anticorps spécifique de l'antigène utilisé dans le tube test

Exemple 1: isotype IgG1 Fitc

Exemple 2: isotype IgG2a PE

➡ Tube test:

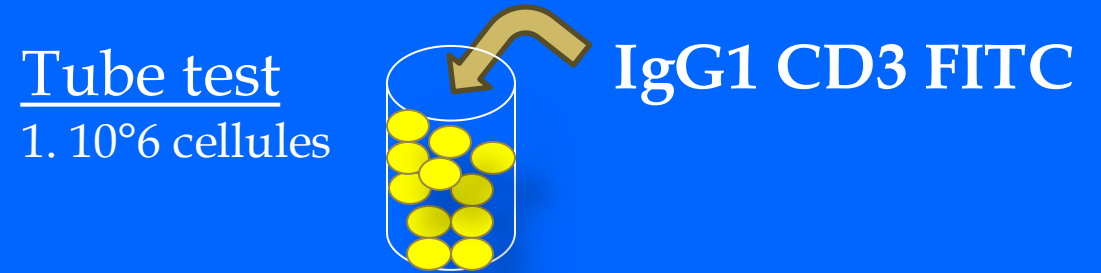
Marquage Anticorps couplé fluorochrome (Antigène Membranaire)

Exemple 1: IgG1 Fitc anti-antigène A

Exemple 2: IgG2a PE anti-antigène B

↳ *Utilisation du même isotype d'anticorps et le même fluorochrome dans le tube contrôle et dans le tube test*

Immunophénotypage en Cytométrie = Marquage CD3 FITC



- ➡ Saturation Récepteur Fc :
Incubation PBS / Sérum 10% pendant 10 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$
- ➡ ImmunoPhénotypage:
 - Tube contrôle: Ac Isotype Contrôle = IgG1 FITC
 - Tube Test: Ac IgG1 anti-CD3 FITC
- ➡ Lavage PBS: Enlever l'excès d'Anticorps non marqués = faux positifs
- ➡ Lecture / Enregistrement au cytomètre = Acquisition / Record
 - ↳ (Fichier cytométrie = FCS = Flow Cytometry Standard)

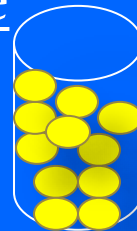
Protocole d'un immunophénotypage avec un seul fluorochrome

Sang périphérique

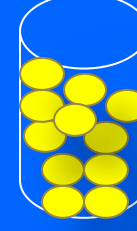


Comptage de la concentration cellulaire

Tube contrôle
1. 10⁶ cellules



Tube test
1. 10⁶ cellules

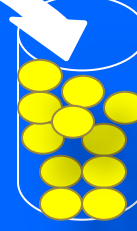


Saturation Récepteur Fc

Tube contrôle



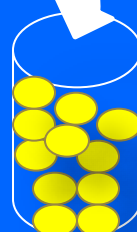
Tube test



Anticorps
Isotype
IgG1 PE



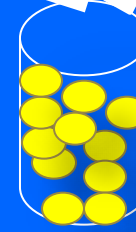
Tube contrôle



Anticorps
IgG1
CD3 PE



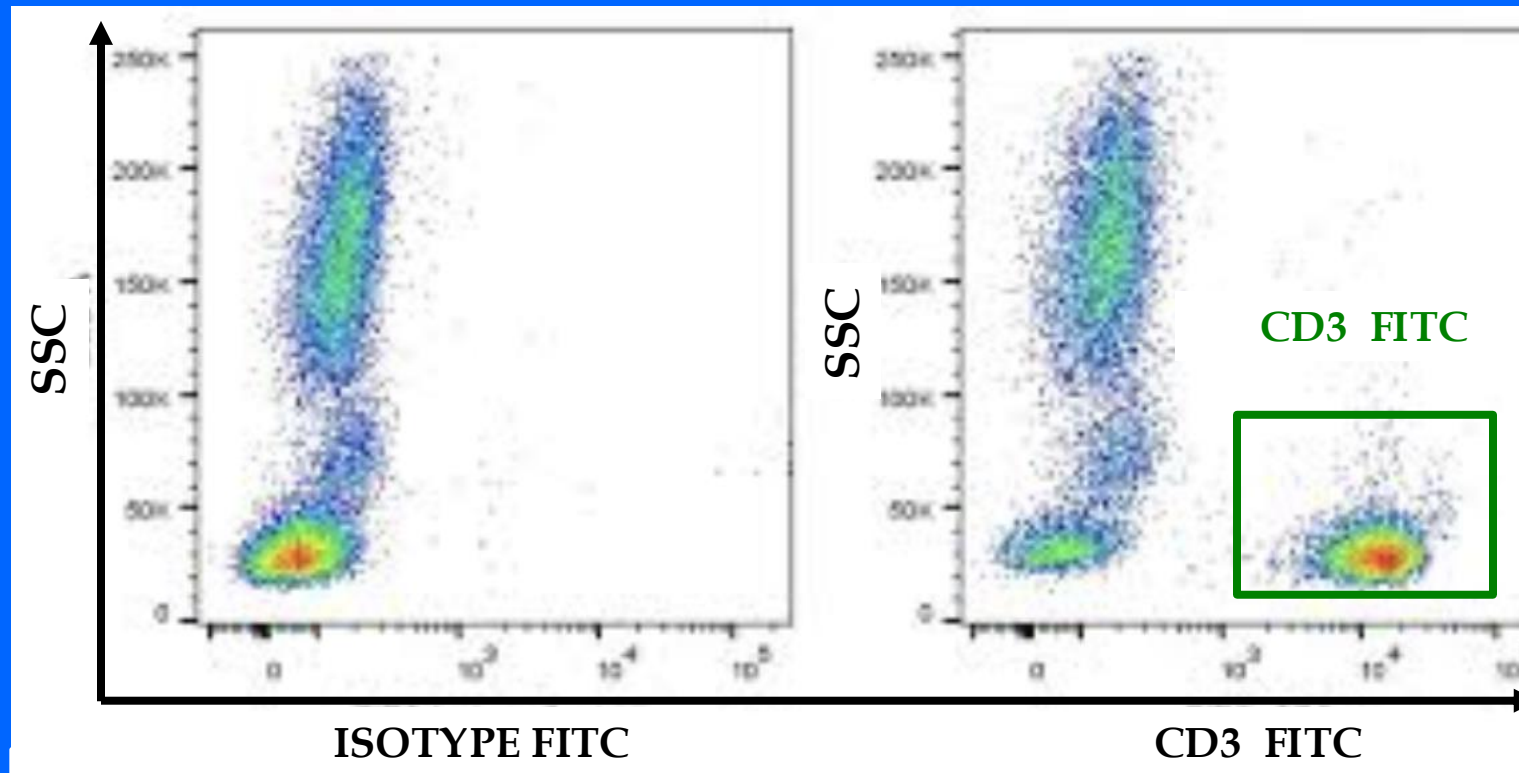
Tube test



Immunomarquage

Immunophénotypage en Cytométrie = Marquage CD3 FITC

Immunophénotypage MonoMarquage (1 seul fluorochrome)



Protocole immunophénotypage MonoMarquage (1 couleur)

1) Configuration Cytomètre:

- * Vérification de la présence des lasers correspondant aux courbes d'excitation du fluorochrome
- * Vérification de la présence des PMT correspondant aux courbes d'émission du fluorochrome

2) Saturation des récepteurs Fc:

- * Saturation par les anticorps présents naturellement dans le sérum

3) MonoMarquage:

- * Utiliser le même isotype Ig entre le tube contrôle et le tube test

5) Acquisition:

- * Passage des cellules dans le cytomètre

6) Analyse:

- * Interprétation des résultats

CONCLUSIONS (Partie 1)

- ▣ Cytométrie : système fluide ≠ Microscopie
- ▣ Principe hydrofocalisation (cellules sur une seule ligne)
- ▣ Lasers (longueur d'onde unique) du cytomètre
- ▣ Fluorochromes : courbe d'excitation propre à chaque molécule
- ▣ Courbe d'émission spécifique de chaque fluorochrome
- ▣ Système optique: Filtre + PMT + Miroir dichroïque
- ▣ Simple marquage 1 seul fluorochrome:
 - Saturer les récepteurs Fc des cellules
 - Même l'isotype des Ac entre le tube négatif et le tube positif
- ▣ Transformation du signal (photons) en « pulse » électrique, puis en numérisation
- ▣ Analyse quantitative et qualitative des populations cellulaires
- ▣ Représentation graphique en échelle linéaire des mesures physiques (FSC/SSC)
- ▣ Représentation Logarithmique pour les intensités de fluorescences

2. Conséquences du multimarquages en cytométrie en flux:

- Compensation par la méthode des médianes
- Elaboration d'une matrice de compensation
- Fluorescence Minus One (FMO)
- Bi-exponentiel
- Dispersion de la lumière
- Elimination des doublets

*Comment résoudre ces différents problèmes
afin de constituer un panel multicolore ?*

Problématique liées aux spectre d'émission des fluorochromes

Problématique:

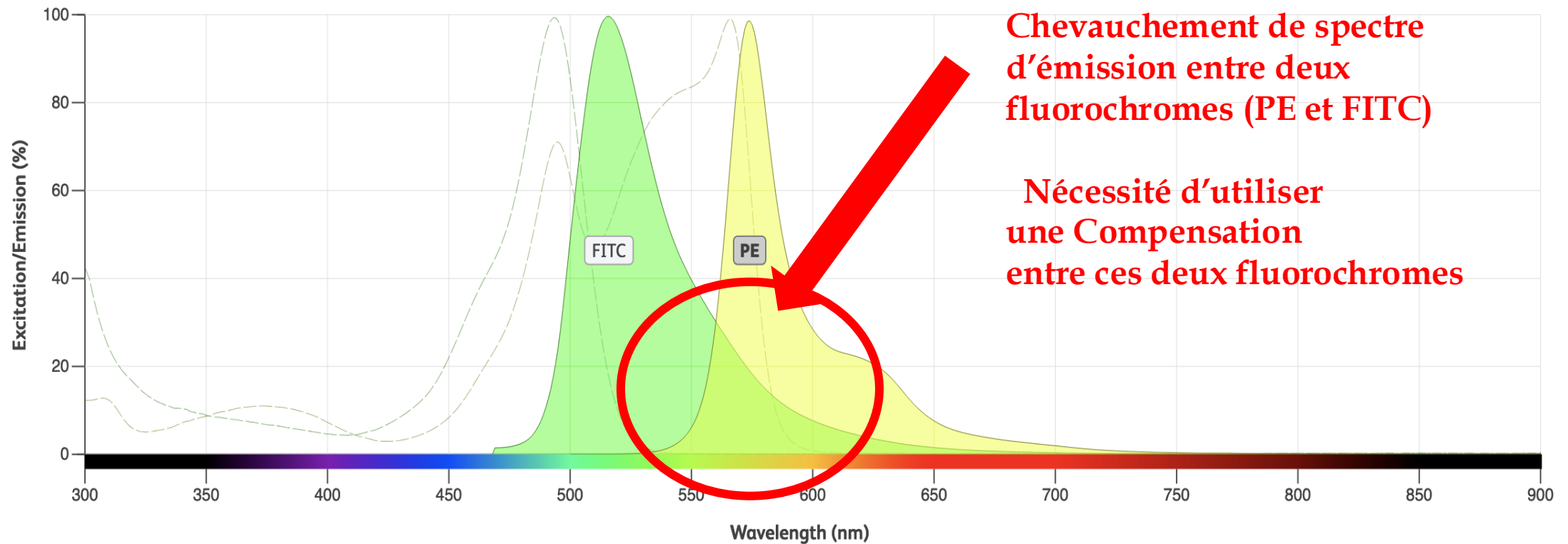
Les émissions de fluorescence générés par l'excitation des lasers sur les fluorochromes couplés aux anticorps peuvent engendrer des superpositions de spectre d'émission fluorescent créant des faux positifs.

On ne peut pas utiliser le cytomètre tant que ce problème de « chevauchement » de spectre d'émission n'est pas résolu AVANT toute analyse.

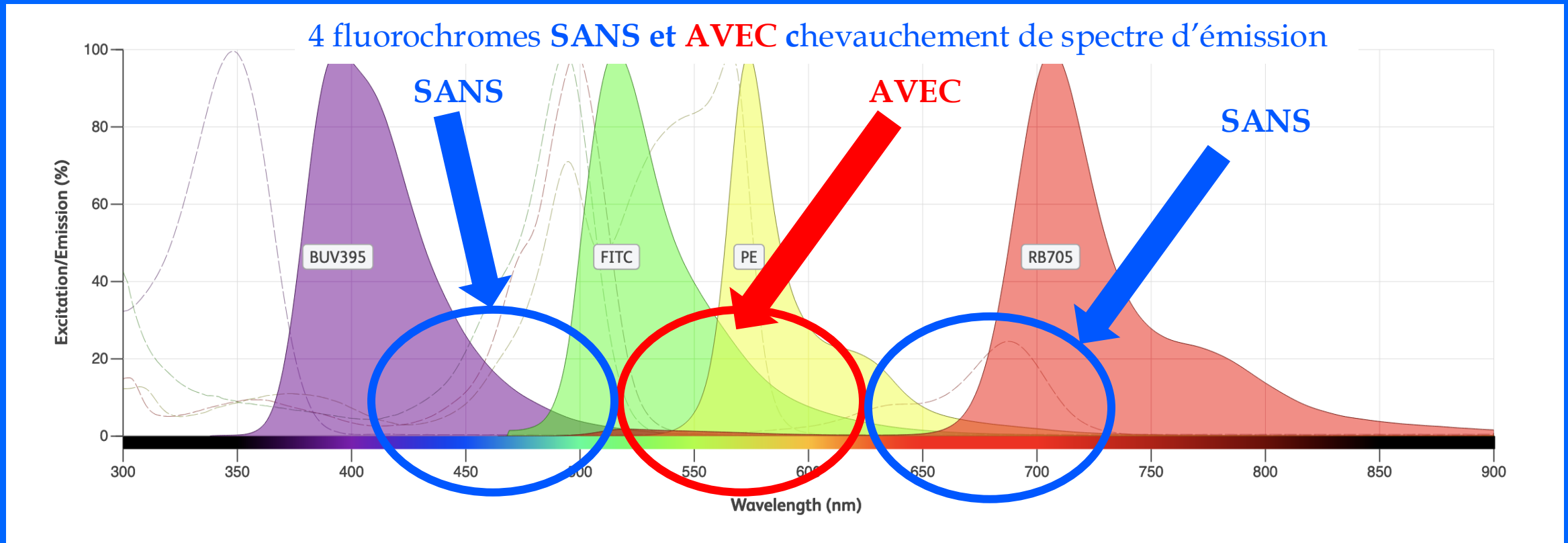
Pour cela, il faut créer une « matrice de compensation » comprenant tous les spectres d'émission de tous les fluorochromes utilisés pour l'analyse.

COMPENSATION : Quand et Pourquoi ?

2 fluorochromes **AVEC** Chevauchement de spectre d'émission
Obligation de réaliser une compensation

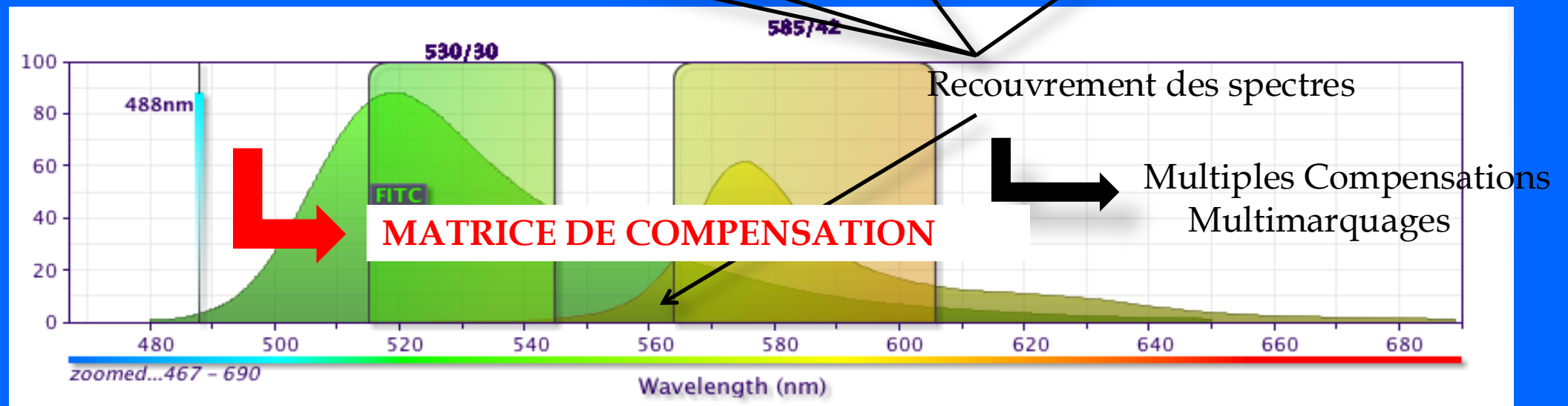
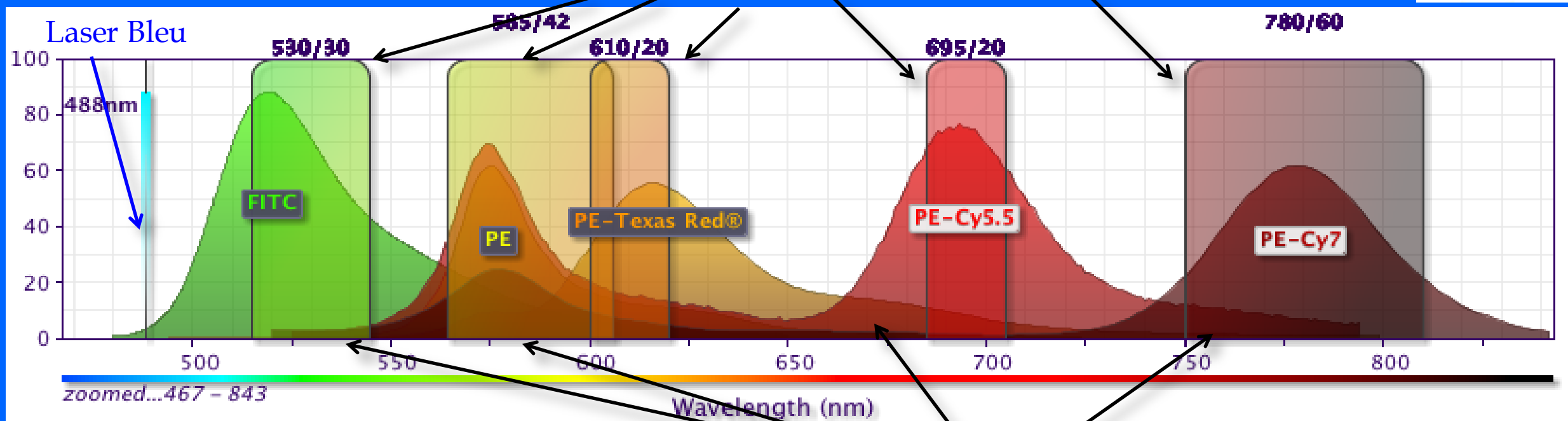


COMPENSATION : Quand et Pourquoi ?



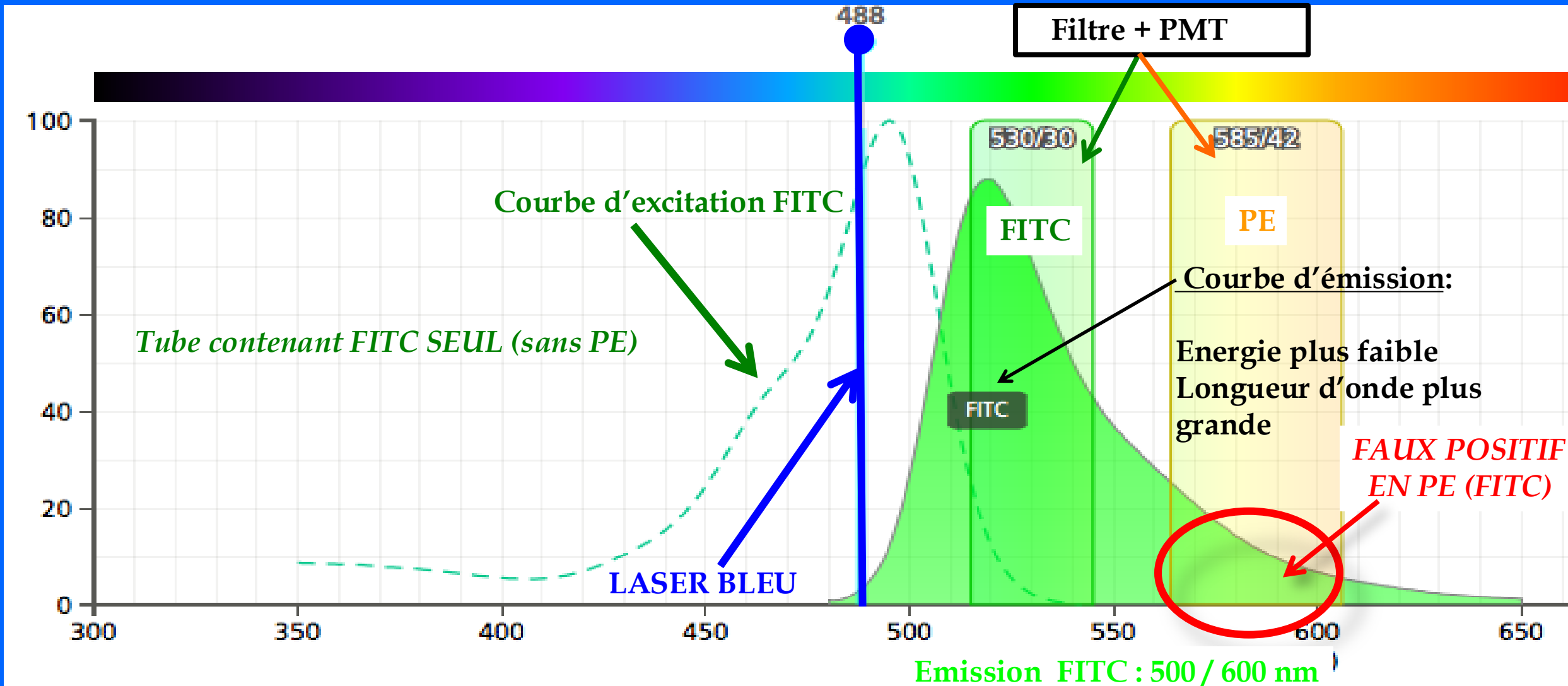
RECOUVREMENT DES SPECTRES D'EMISSION de DIVERS FLUORCHROMES

CAPTEUR = Filtre + PMT



PRINCIPE DE RECOUVREMENT DES SPECTRES DE FLUORESCENCE

LASER → EXCITATION → EMISSION → CAPTEUR (Filtre+PMT)



PRINCIPE DE FLUORESCENCE:

LASER → EXCITATION → EMISSION → CAPTEUR

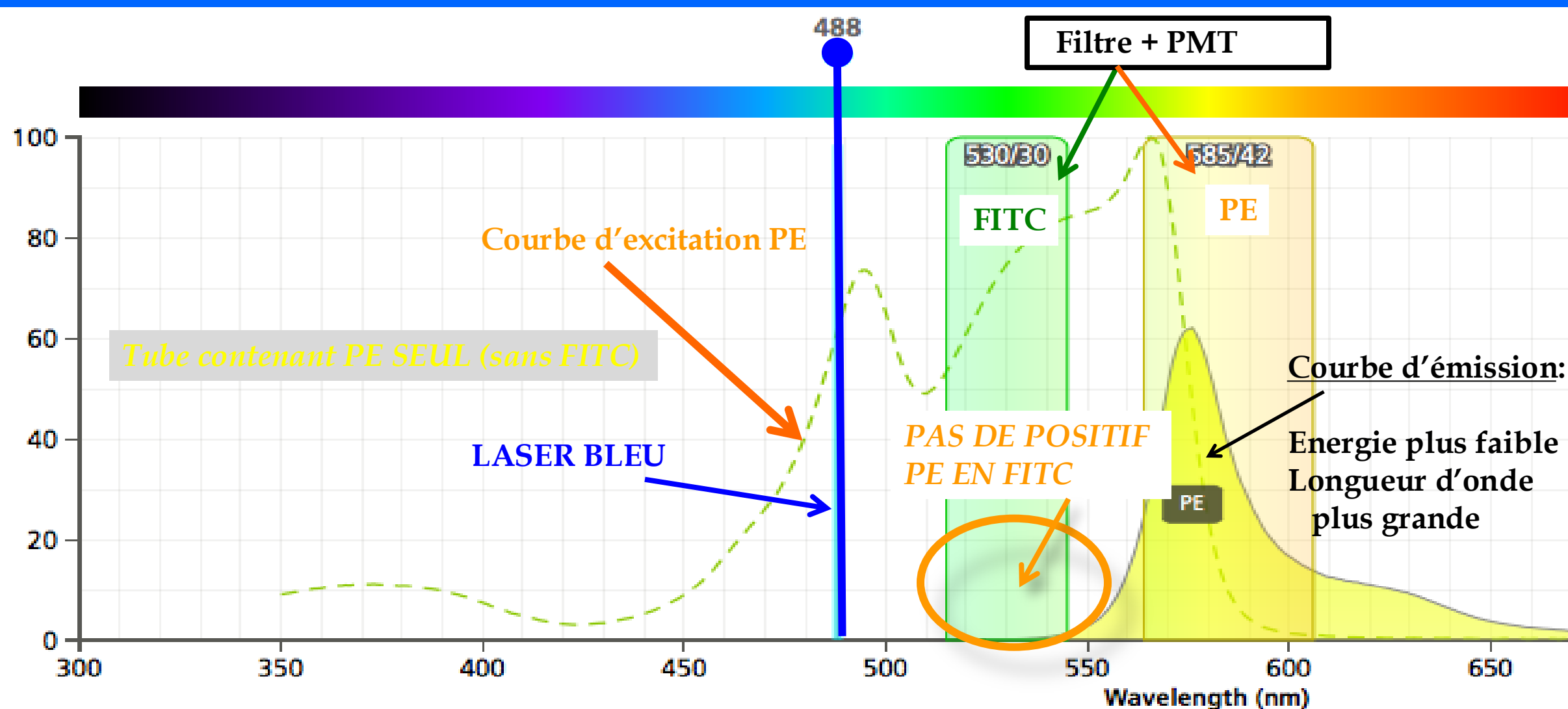
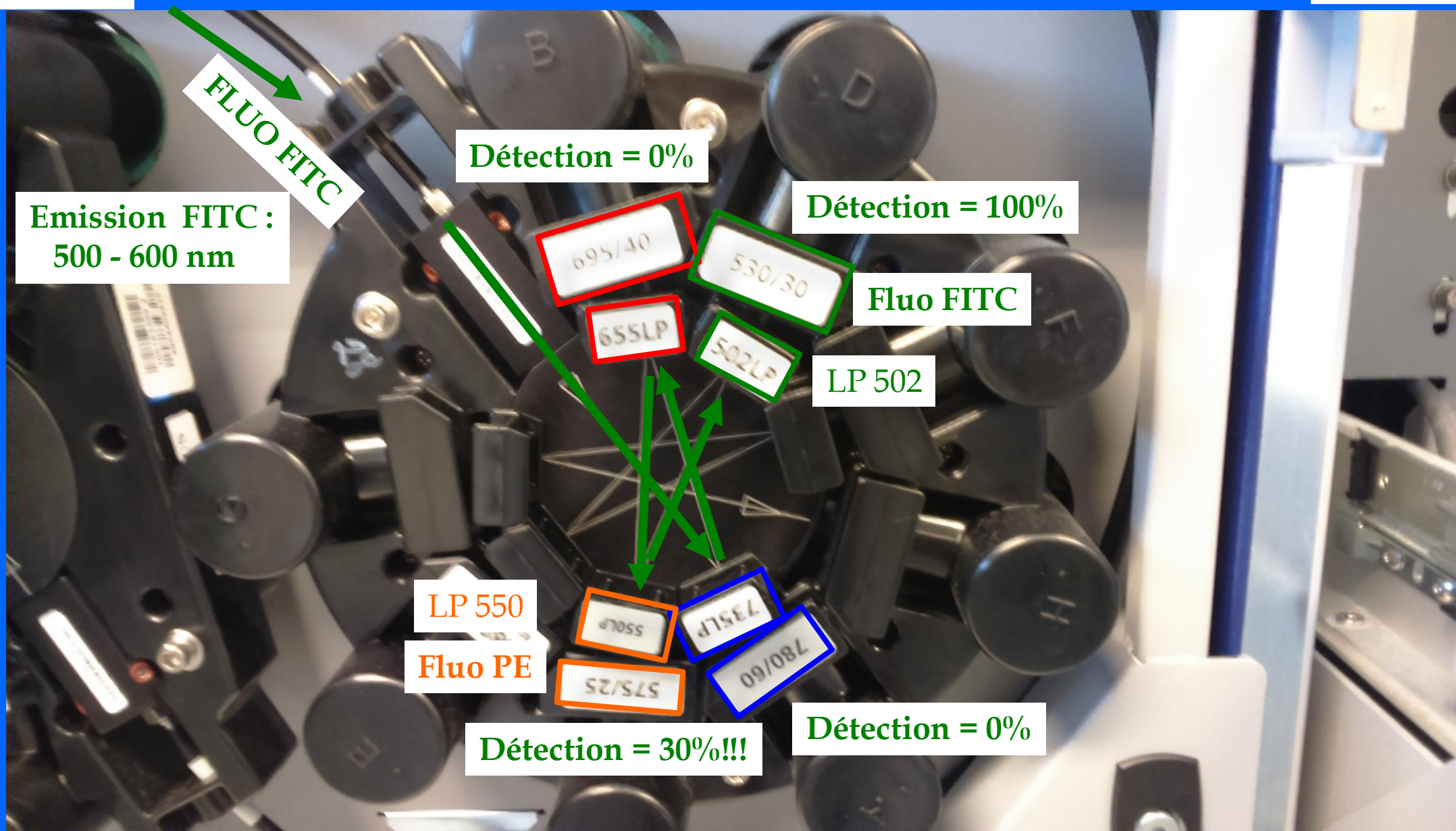
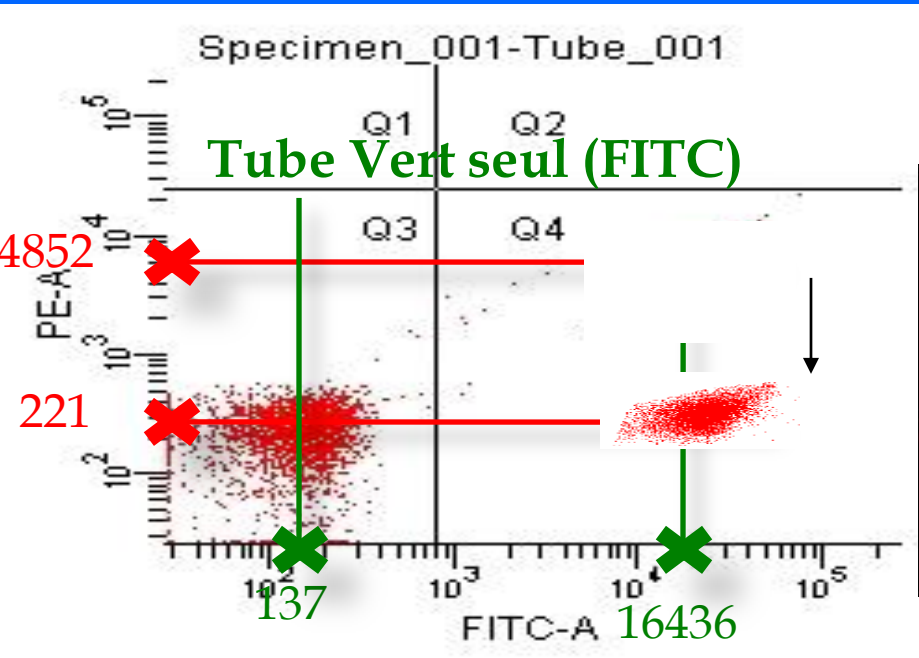


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)

LASER BLEU



METHODE DES MEDIANES (COMPENSATION)



Experiment Name: Experiment_014
Specimen Name: Specimen_001
Tube Name: Tube_001
Record Date: Dec 7, 2004 4:40:44 PM
\$OP: jeanpierre

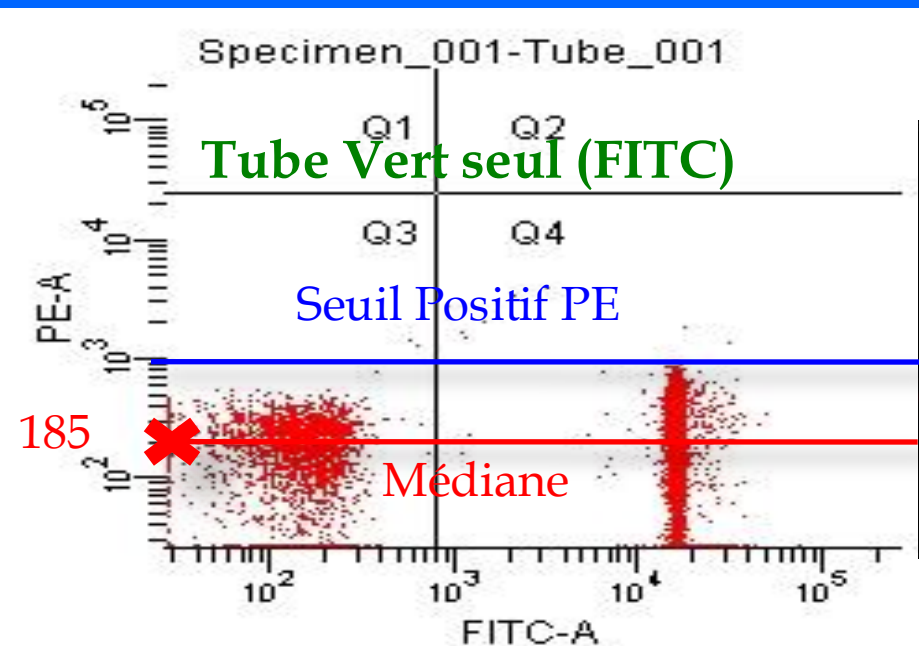
Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
P1	16,123	4,745	187
Q1	####	####	####
Q2	####	####	####
Q3	137	221	49
Q4	16,436	4,852	212

SANS
COMPENSATION

Median PE + (4852) – Median PE – (221)

Median Fitc + (16436) – Median Fitc – (137)

X 100



Experiment Name: Experiment_014
Specimen Name: Specimen_001
Tube Name: Tube_001
Record Date: Dec 7, 2004 4:40:44 PM
\$OP: jeanpierre

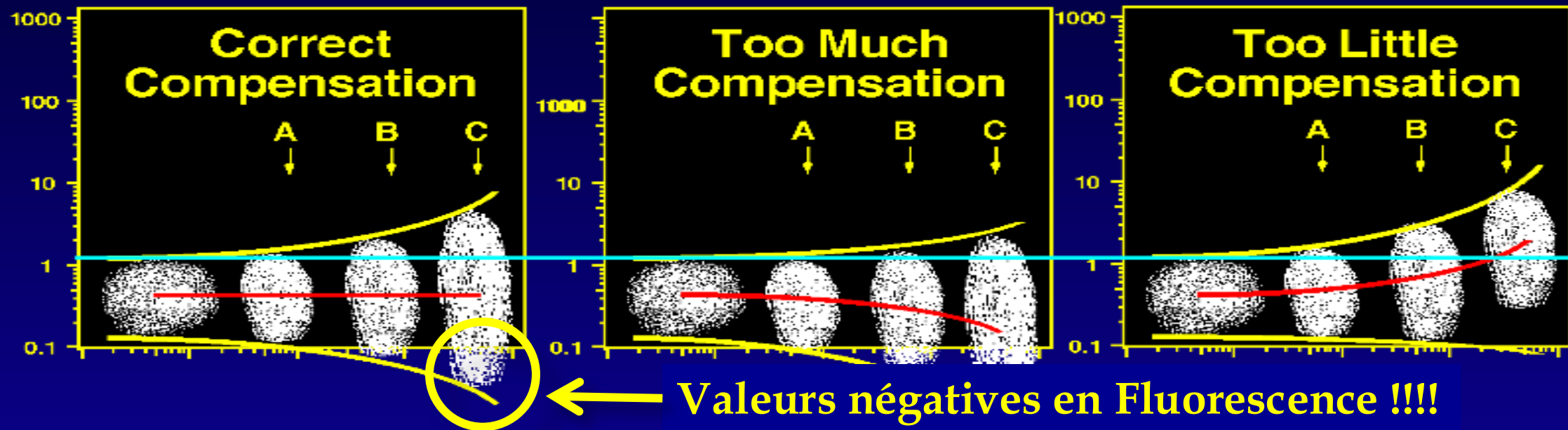
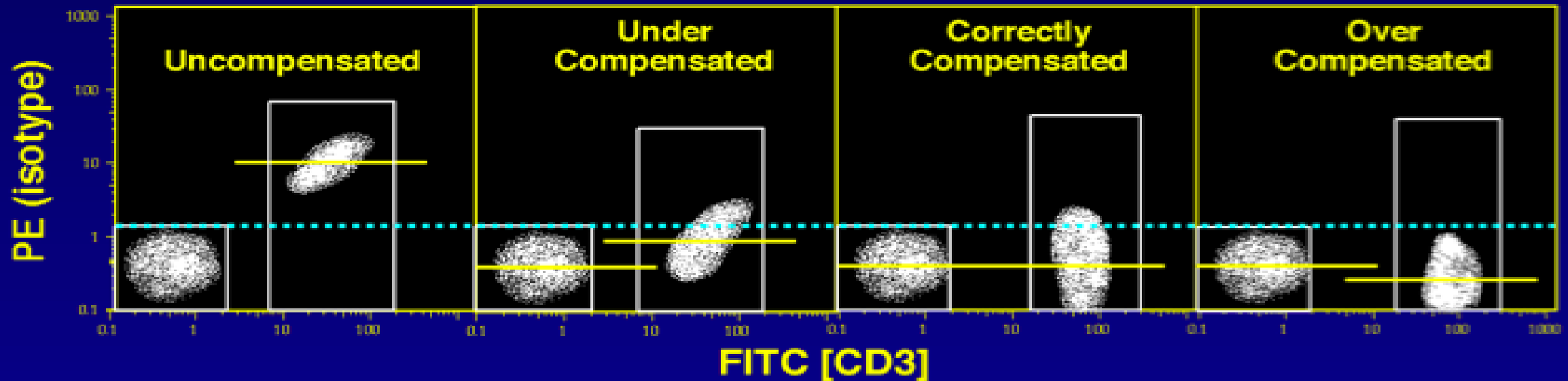
Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
P1	16,123	184	187
Q1	####	####	####
Q2	####	####	####
Q3	137	184	49
Q4	16,436	185	212

AVEC
COMPENSATION
30 % Fitc dans Pe



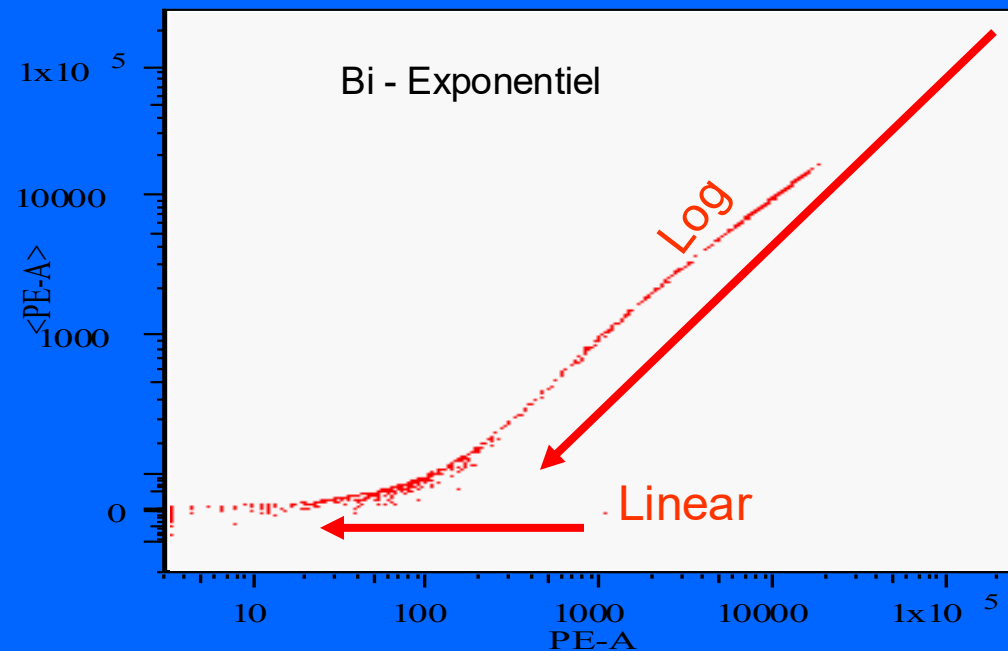
Manuellement

Conséquences de la méthode de compensation par la médiane

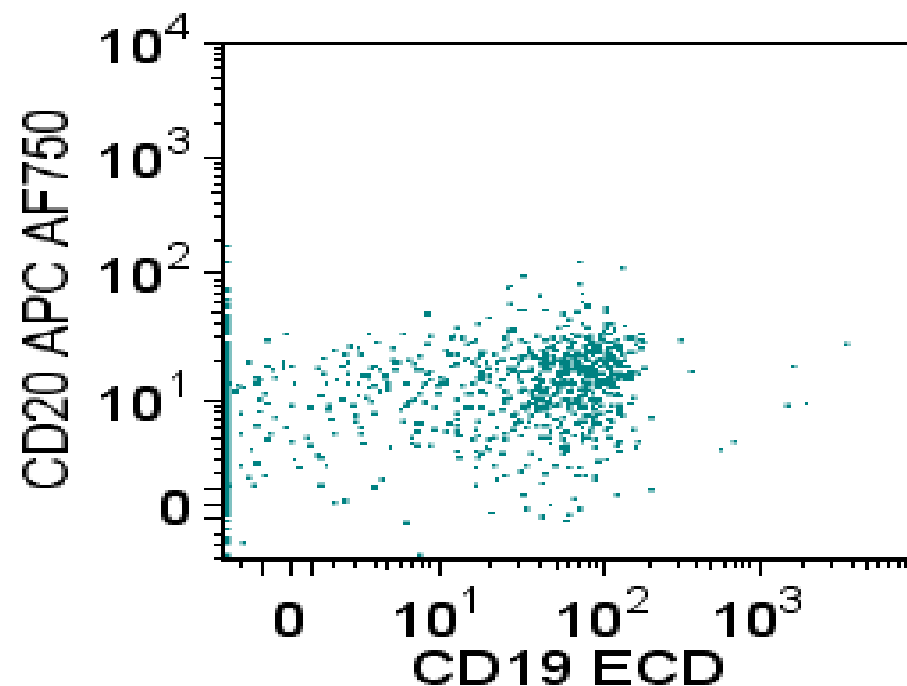


Utilisation du bi-exponentiel pour les populations proches du zéro

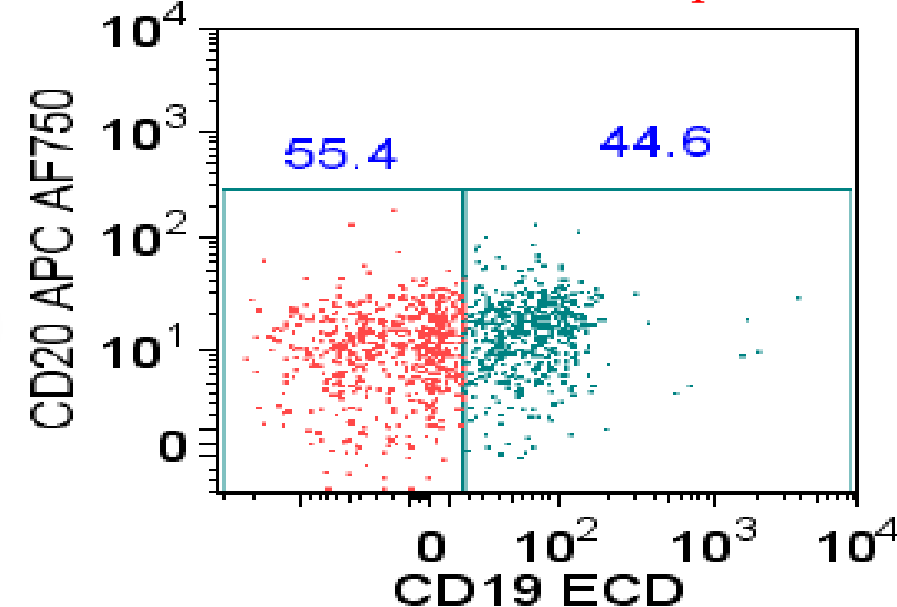
Biexponential function: $f(x) = a e^{bx} - c e^{-d}$



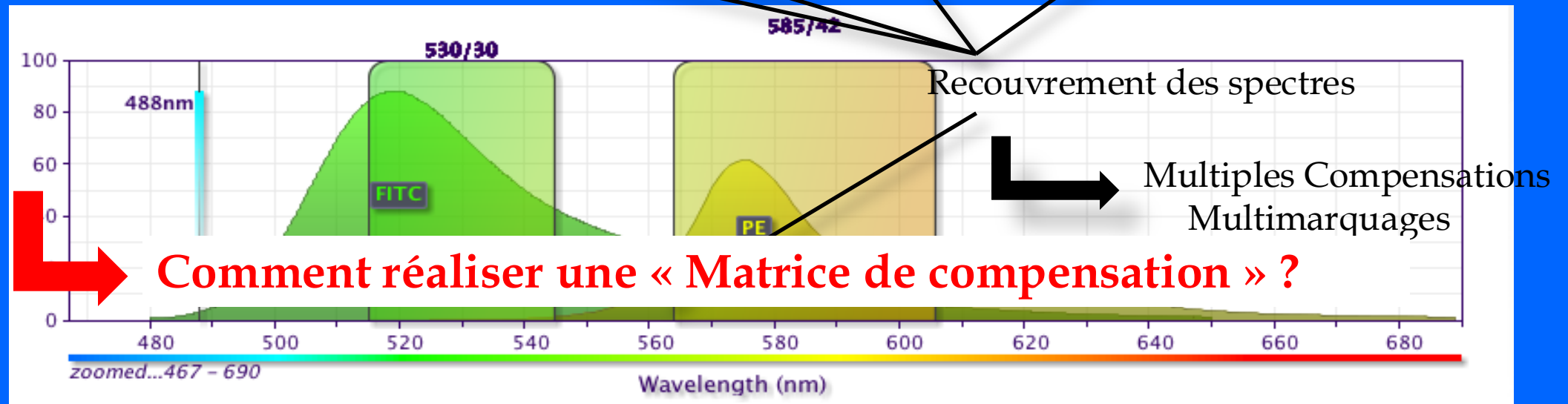
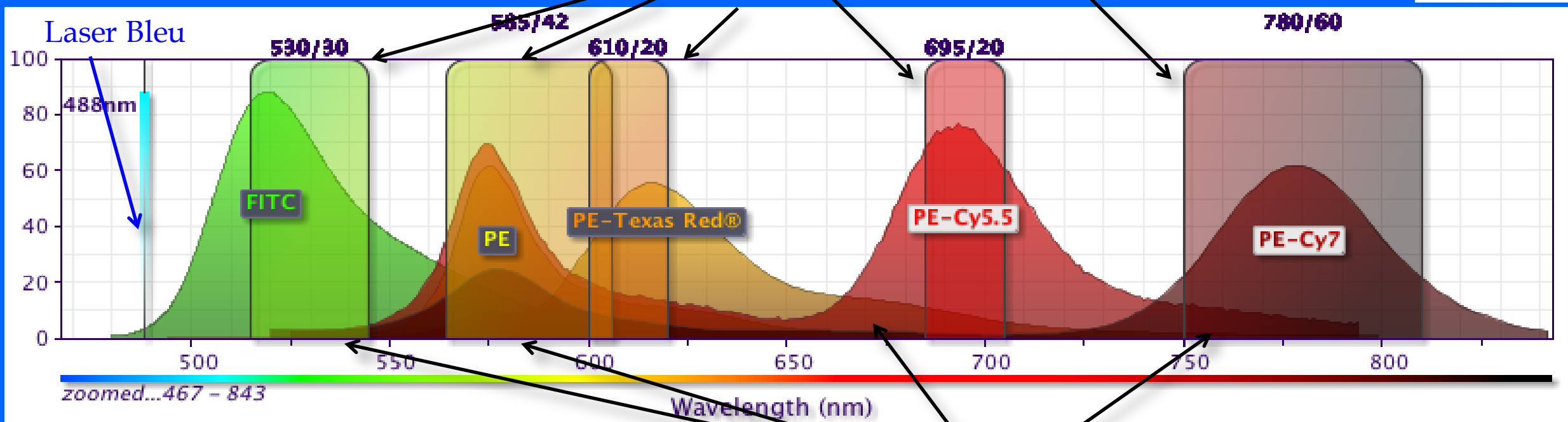
ECHELLE LOG



Transformation en bi-exponentiel

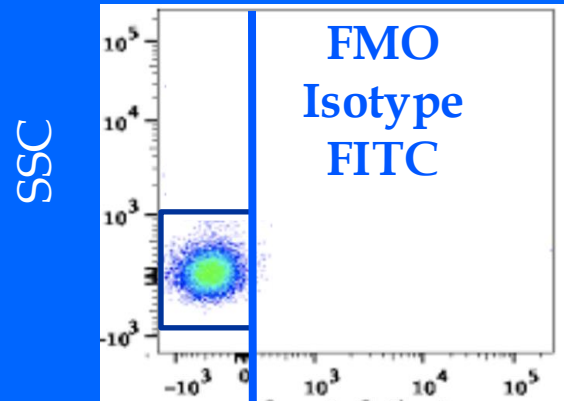


CAPTEUR = Filtre + PMT



Problématique des chevauchement des spectres d'émission lors des analyses en cytométrie en flux

Cas d'un Monomarquage FITC seul

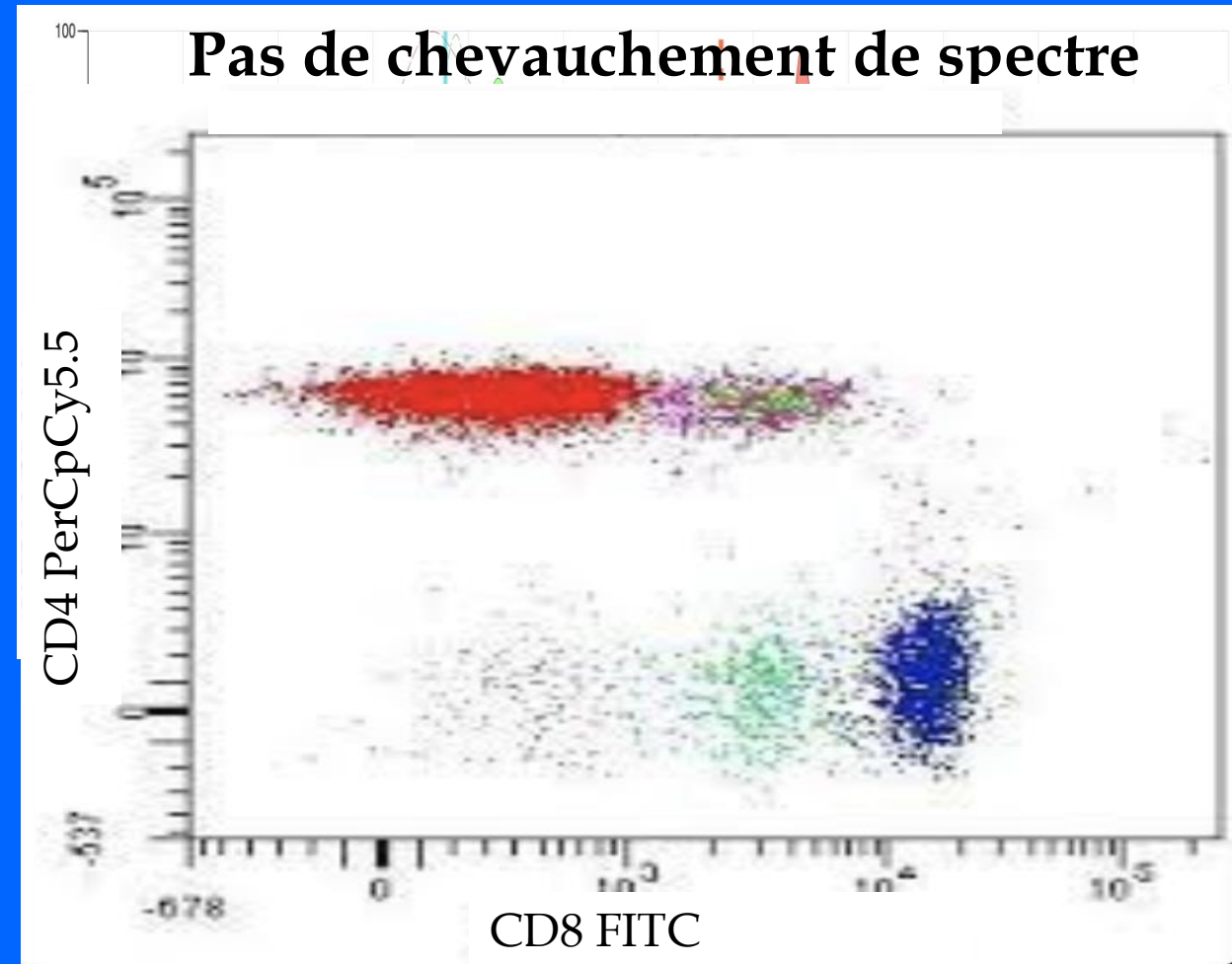


Isotype FITC

CD4 FITC

Pas de compensation nécessaire

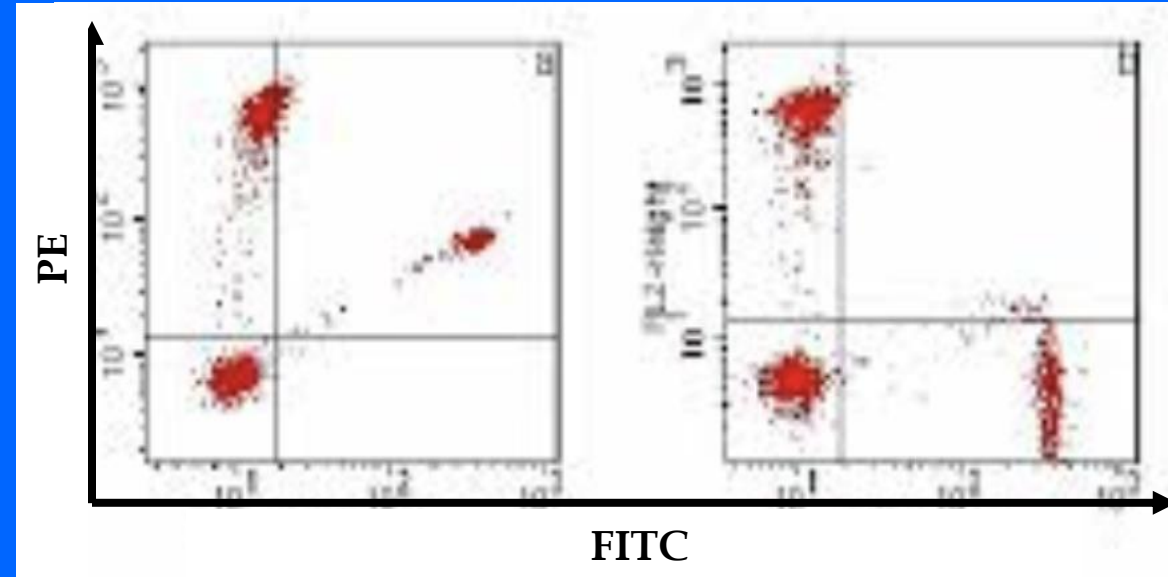
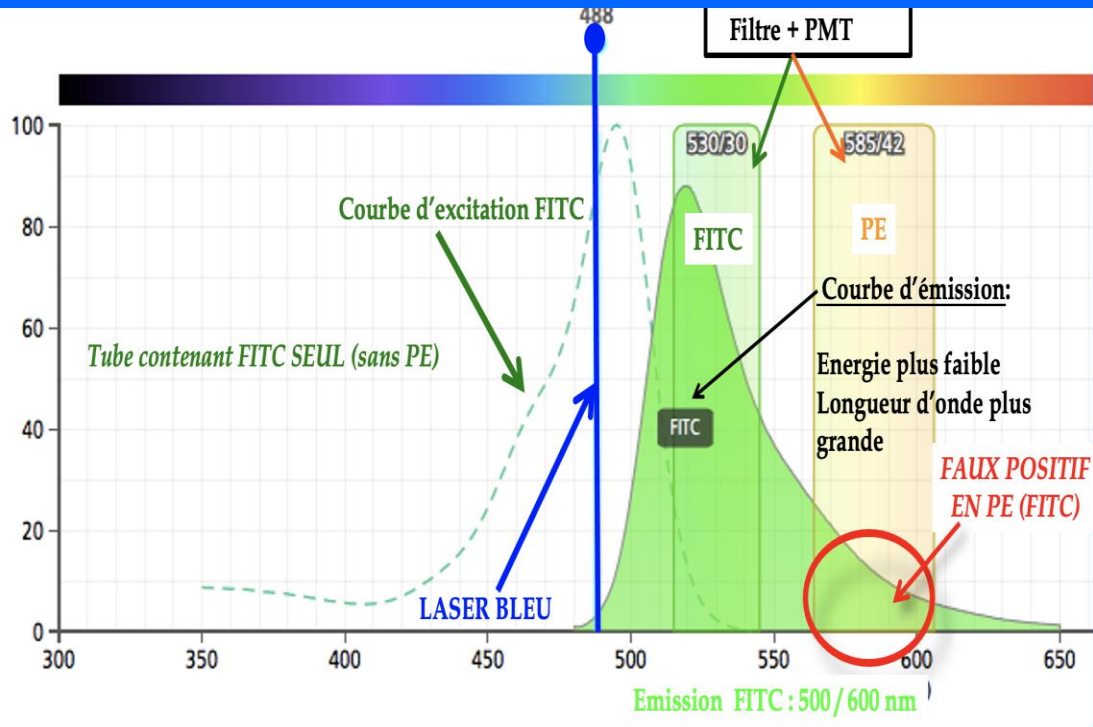
Cas d'un Double marquage FITC et PerCpCy5.5



Pas de compensation nécessaire

Problématique des chevauchement des spectres d'émission lors des analyses en cytométrie en flux

Cas d'un Double marquage FITC et PE



SANS compensation

AVEC compensation

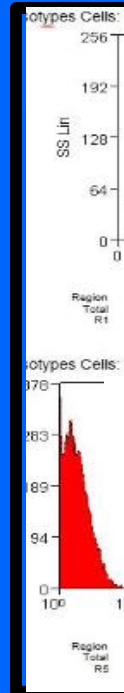
Problème de chevauchement de spectre



Obligation d'une compensation

La matrice de compensation en cytométrie en flux

Tube
Contrôle



Tube c

T

Tube c

Cytometer - LSRII (1)

Threshold Laser Compensation Ratio

Status Parameters

Parameter	Voltage				
FSC	250		✓		
SSC	300		✓		
FITC	604		✓	✓	
PE	500		✓	✓	
PerCP-Cy5-5	500		✓	✓	
PE-Cy7	500		✓	✓	

Delete

Réglages de l'intensité
de fluorescence des
Isotypes négatifs
par le Voltage des PMT

Matrice de compensation
pour 7 fluorochromes:

FITC
PE
ECD
PECy5.5
PeCy7
APC
APC-Cy7

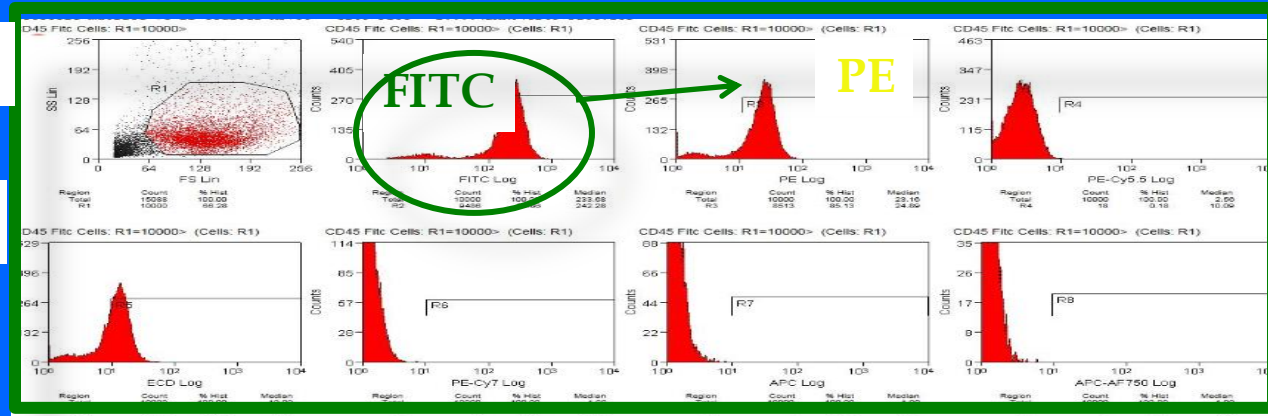
as les fluorochromes

ans la première décade

La matrice de compensation en cytométrie en flux

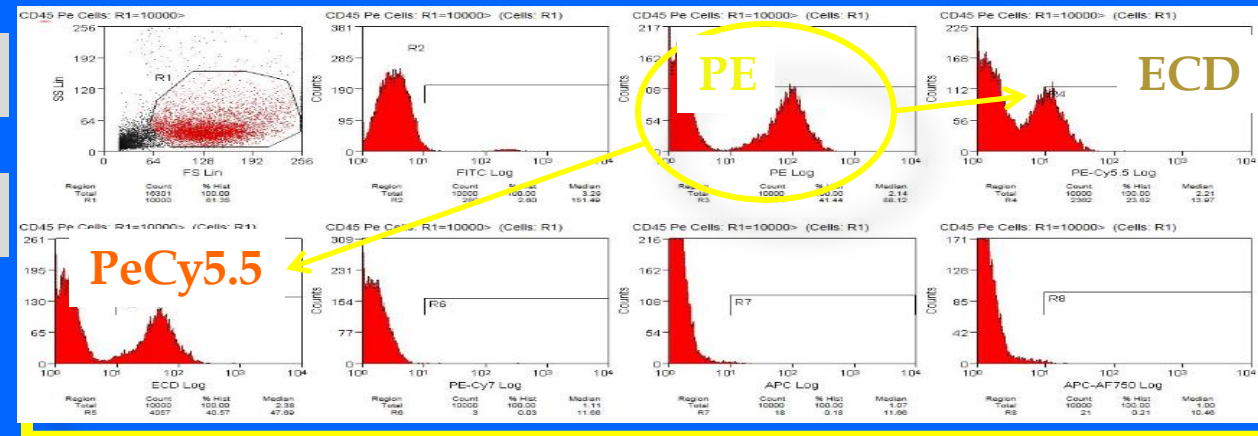
Tube FITC

Tube Fitc + seul



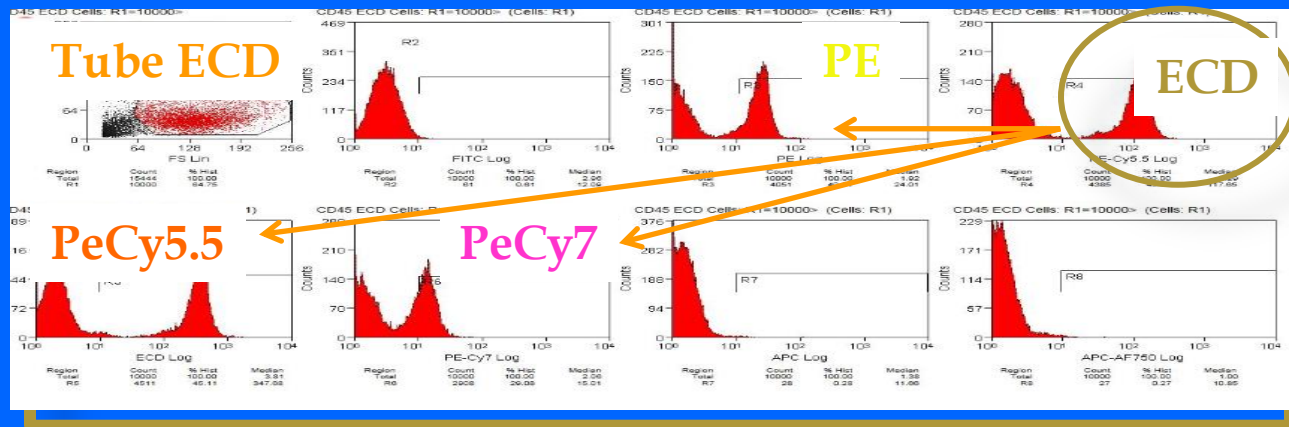
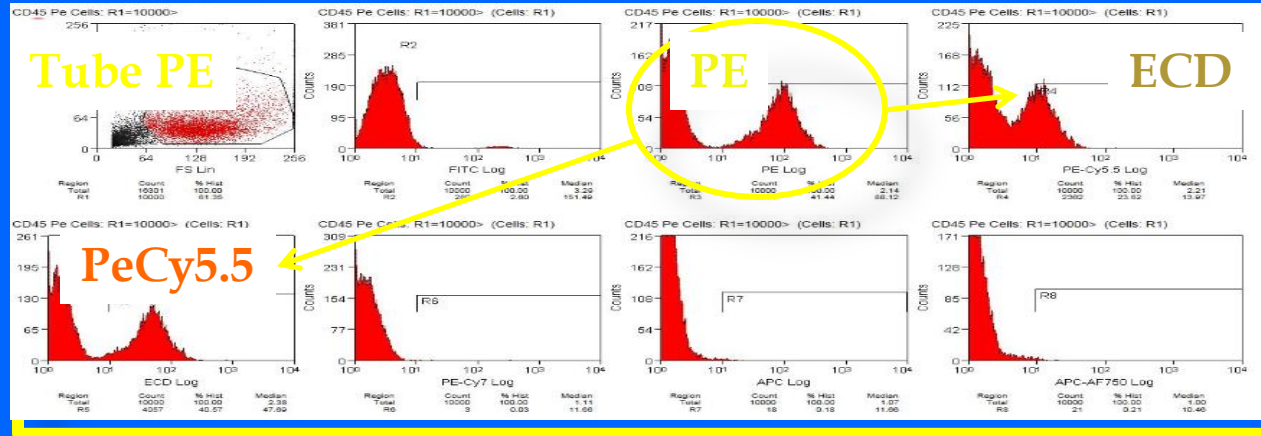
Tube PE

Tube PE + seul



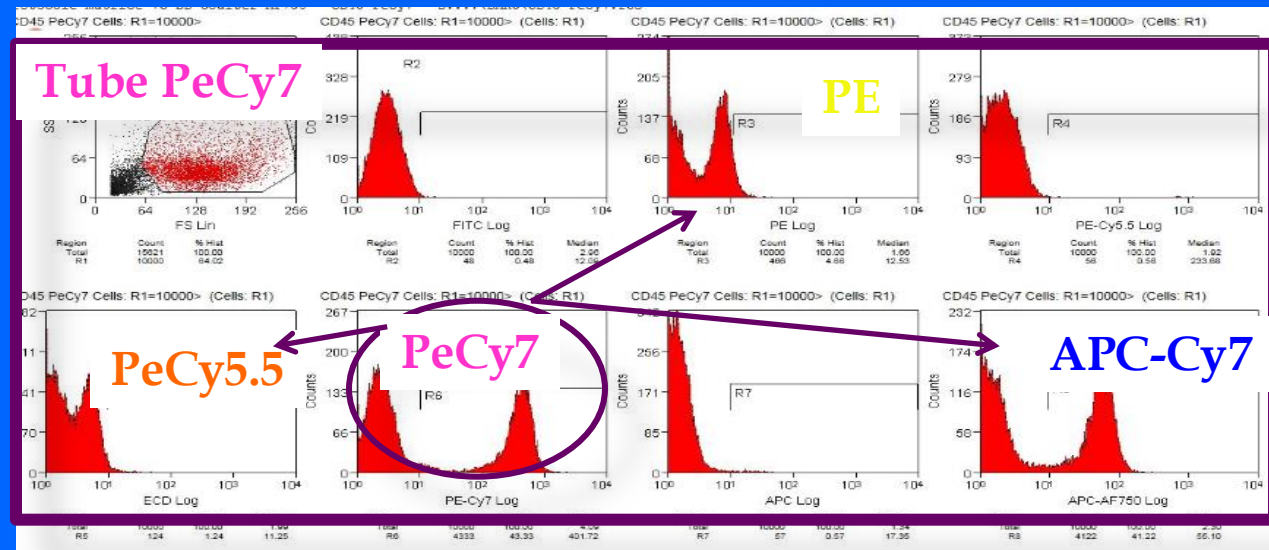
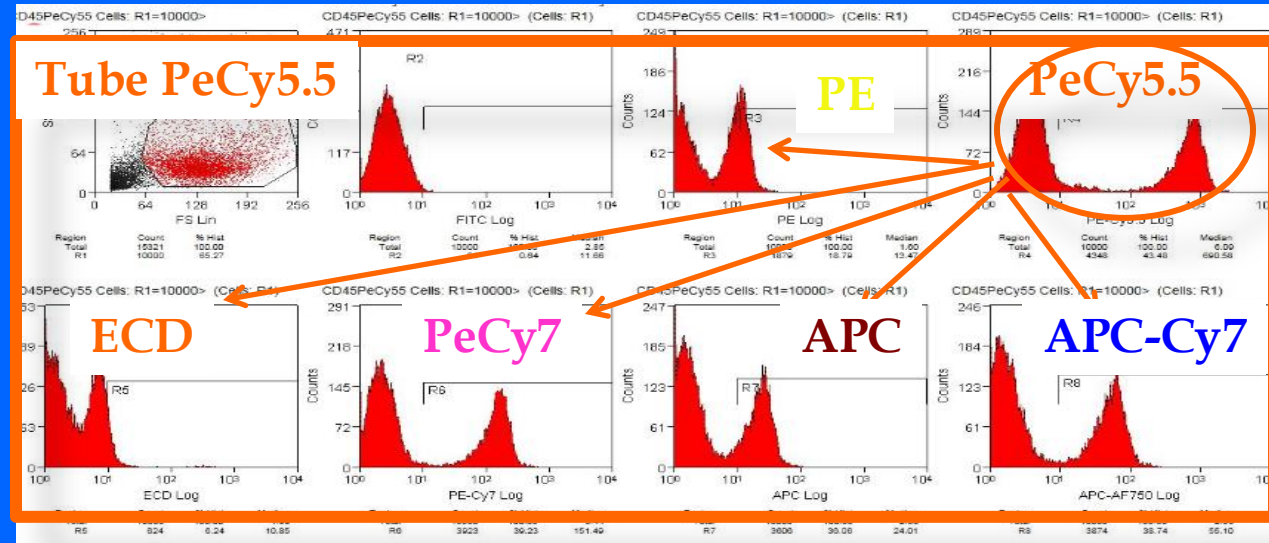
SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

La matrice de compensation en cytométrie en flux



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

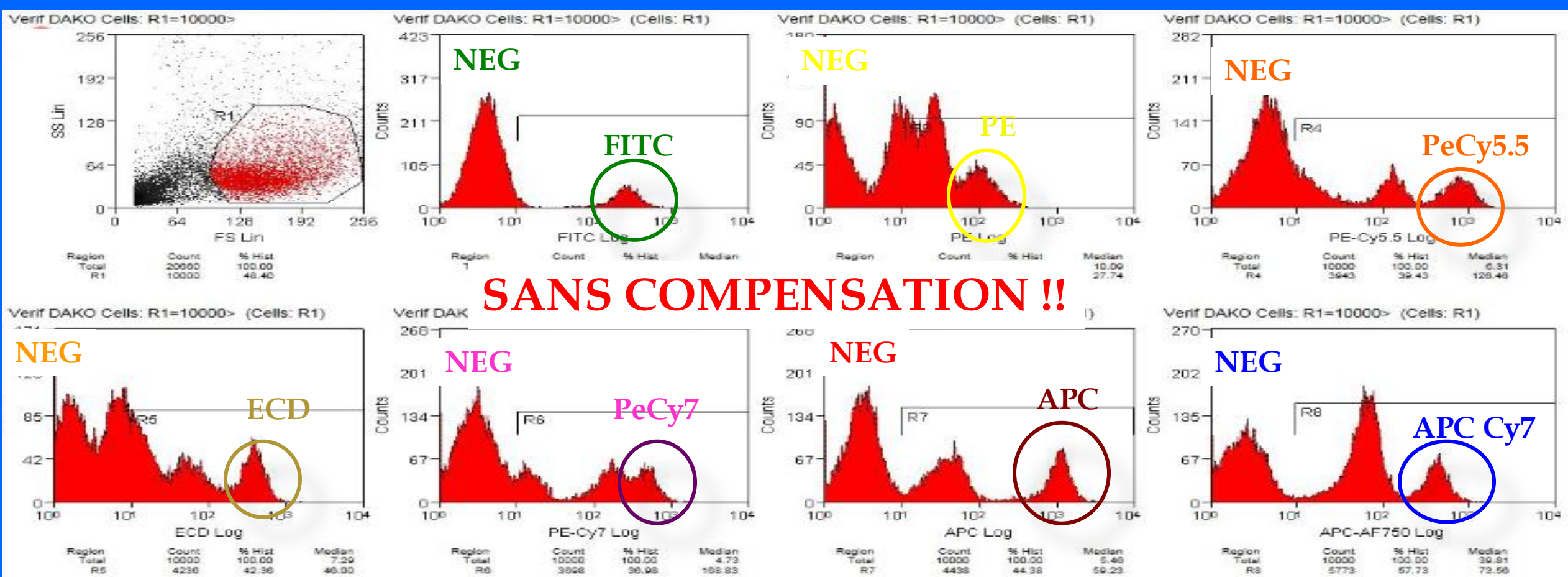
La matrice de compensation en cytométrie en flux



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

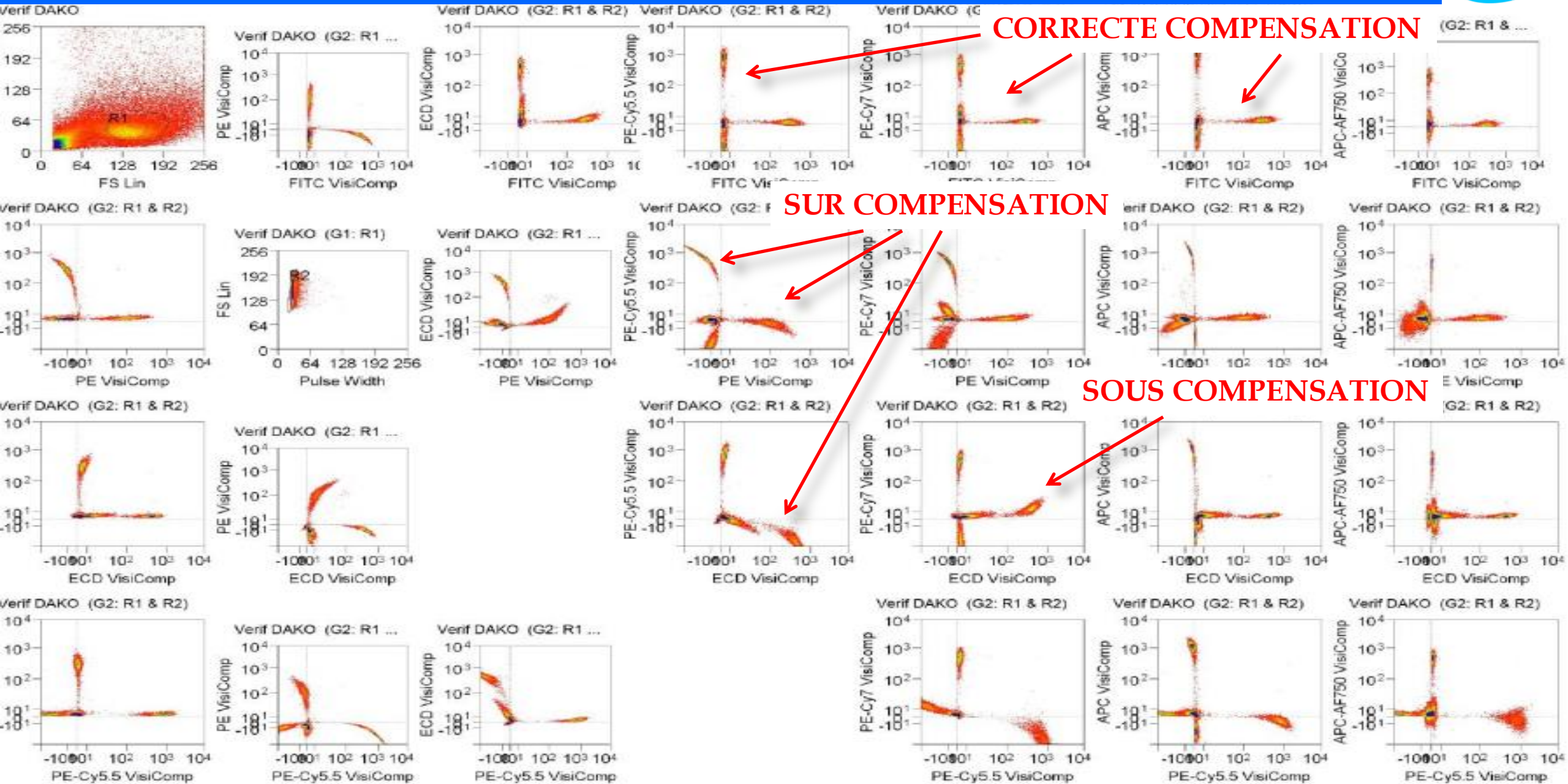
La matrice de compensation en cytométrie en flux

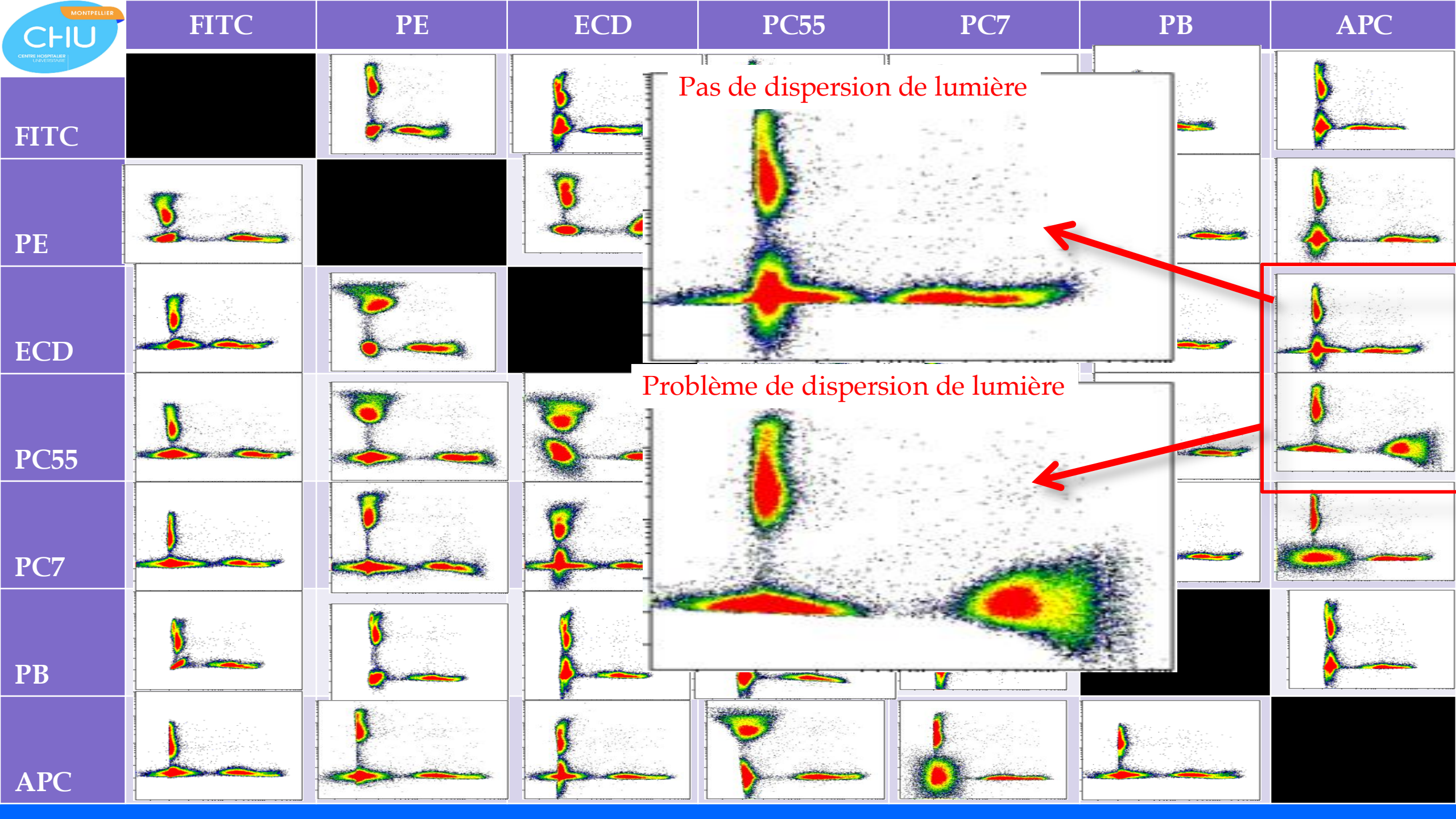
Tube MultiCouleurs (7C): Mélange tous les négatifs et tous les positifs dans un même tube



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

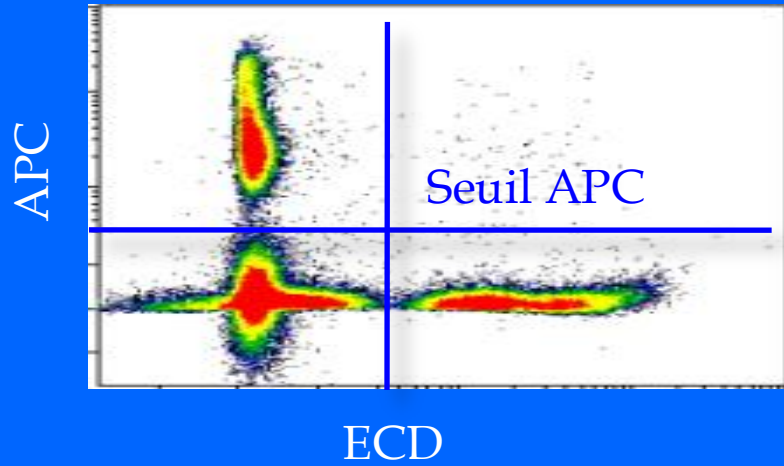
Calcul automatique de la matrice de compensation (software)



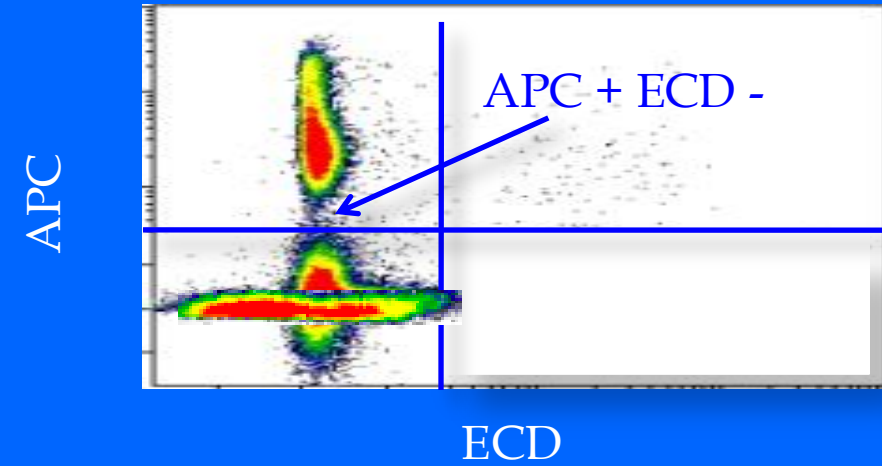


Problème lié à la dispersion de lumière « effet trompette »

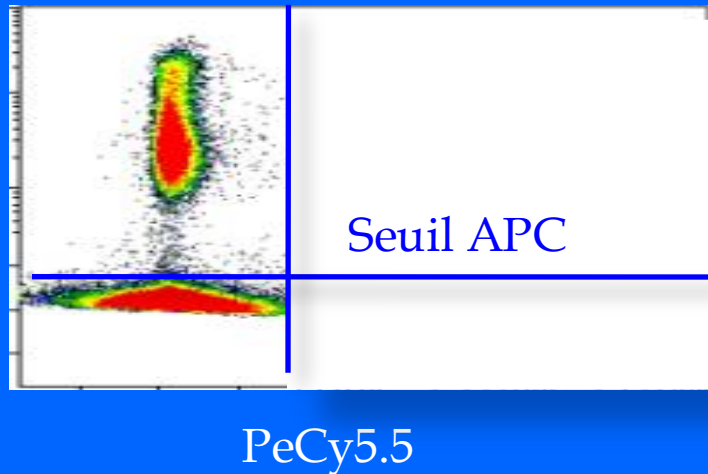
MATRICE



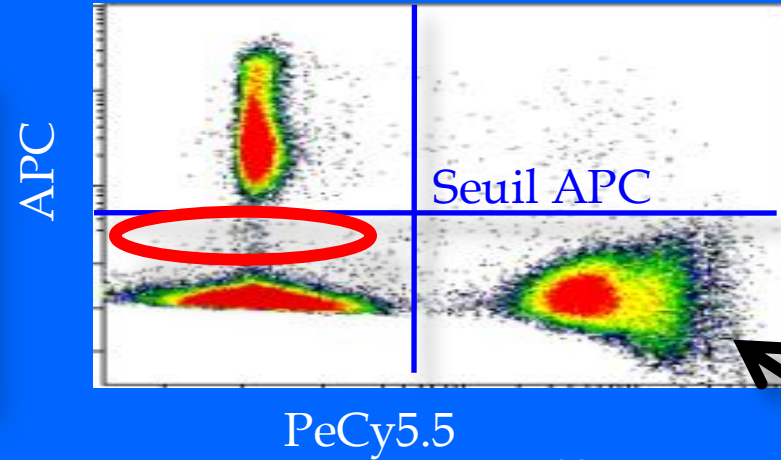
CELLULES



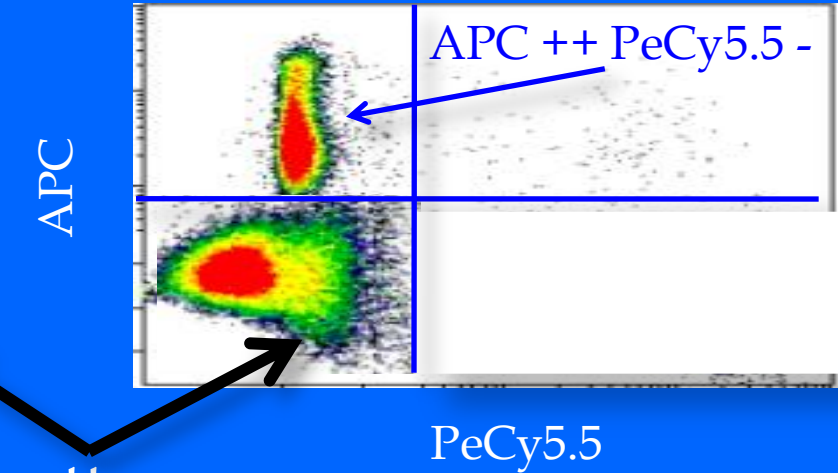
MATRICE



MATRICE

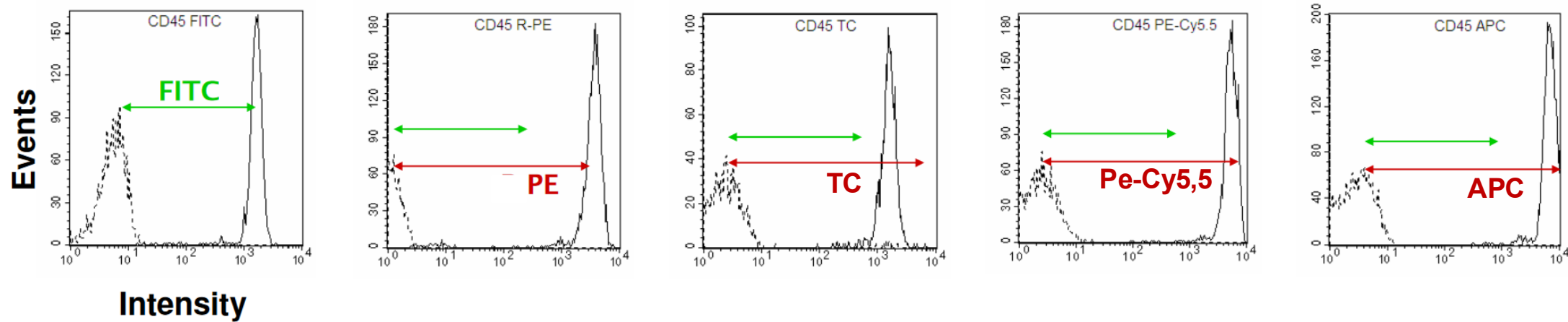


CELLULES



« Effet Trompette »

Choix des couleurs (fluorochromes) associées aux Ac



Staining Index = SI

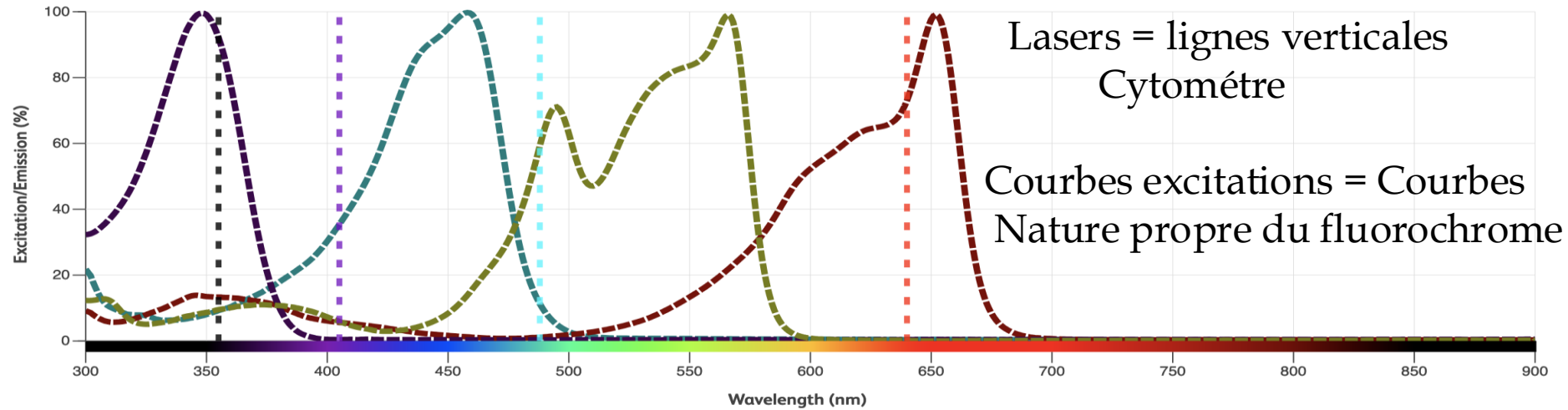
Ratio = $\frac{MFI\ Positive - MFI\ Negative}{2\ Standard\ Deviation\ Negative}$

APC > PE > PeCy5.5 > PeCy5.5 > TC > FITC

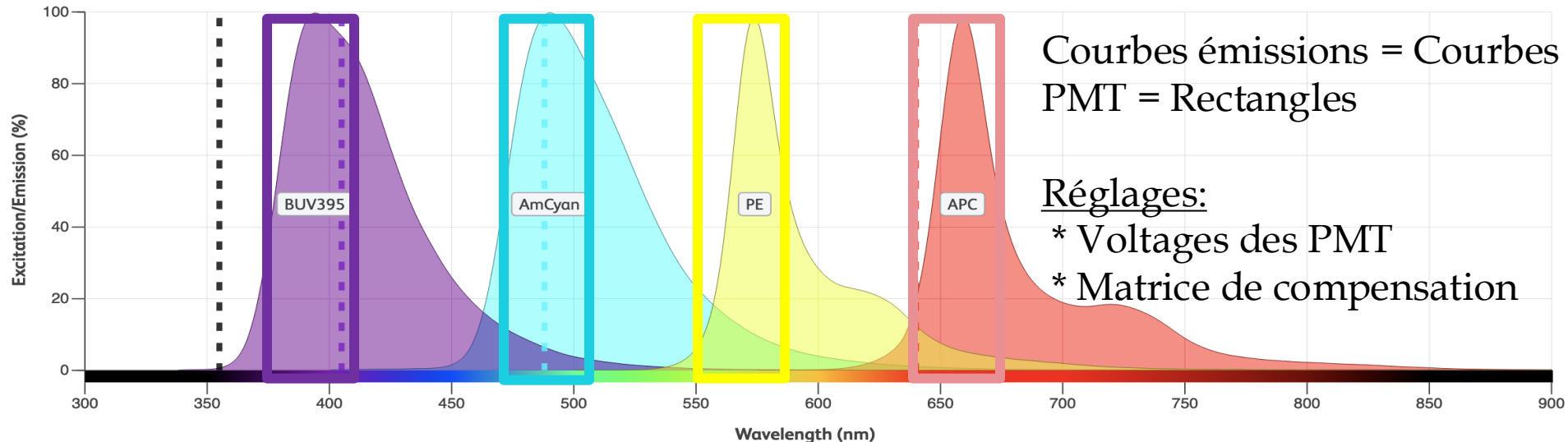


Choix des couleurs en fonction du rendement quantique

Différence entre Excitation et Emission



Partie
Excitation



Partie
Emission

PRINCIPE PANEL MULTICOULEURS CYTOMETRIE

PANEL = Choix des fluorochromes pour chaque antigène

1. Identification de la population cellulaire recherché au sein d'un échantillon (sang ou moelle):

- > *Pourcentage des diverses populations cellulaires au sein de l'échantillon*
- > *Nombre d'antigène cellulaire*
- > *Rendement quantique des Fluorochromes*
- > *Pourcentage et la dispersion de lumière lors de la compensation entre les fluorochromes*
- > *Lasers et PMT disponible du cytomètre*

 *Panel cytométrie = Panel pour chaque type d'analyse*

2. Rechercher les biomarqueurs spécifiques à l'intérieur de la population recherchée:

- > *Connaitre les antigènes spécifiques de la population recherchée*

3. Utilisation d'un Fluorescence Minus One « FMO »: « *Contrôle Négatif pour Multimarquage* »

FMO = mesure du niveau de fluorescence dans un canal donné apportée par tous les autres fluorescences ne portant pas l'antigène d'intérêt

Elaboration d'un Panel en Cytométrie

Liste des fluorochromes:

Laser Bleu (488 nm)

FITC / PE / PE-CF594
PerCpCy5.5/ PECy7

Laser Violet (405 nm)

Brillant Violet (V450)
Pacific Blue / AmCyan

Laser Rouge (633 nm)

APC / APC Cy7/
APC-Alexa750/ APC-H7

Rendement Quantique des fluorochromes:

Fluo Fort = PE PeCy7 PeCF594 APC

Fluo Moyen = PerCpCy5.5 AmCyan

Fluo Faible = FITC

Nombre d'Antigène présent sur une cellule:

+++ = Forte Présence

++ = Moyenne Présence

+ = Faible Présence

Liste des antigènes pour les leucocytes:

CD45 = Présent pour tous les leucocytes

% Populations Leucocytes Moelle osseuse:

CD15 = Granulocytes (45 à 70%)

CD3 = Lymphocytes T } (20 à 40%)

CD19 CD20 = Lymphocytes B }

CD14 = Monocytes (2 à 8%)

CD16 CD56 = Natural (0,5%)

CD138 = Plasmocytes (0,5%)

CD45 +++ = Présent pour tous les leucocytes

CD15 ++ = Granulocytes

CD3 ++ = Lymphocytes T

CD19 CD20 ++ = Lymphocytes B

CD14 ++ = Monocytes

CD16 CD56 + = Natural

CD138 +++ = Plasmocytes

Elaboration Panel de cytométrie pour caractériser chaque population au sein des leucocytes selon :

- Le pourcentage d'un antigène membranaire
- Le niveau d'expression d'un antigène
- Lasers du cytomètre
- Rendement quantique

Laser Bleu

CD45 FITC (Faible)
CD138 PE (Fort)
CD14 PeCy7 (Fort)
CD56 Pe-CF594 (Fort)
CD15 PerCpCy5.5 (Moyen)

Laser Violet

CD3 BV450 (Moyen)
CD19 AmCyan (Moyen)

Laser Rouge

CD16 APC (Fort)
CD20 APC-Cy7 (Moyen)

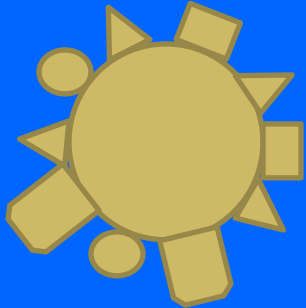
Panel de 9 couleurs:

Laser Bleu =	CD45 Fitc	CD138 Pe	CD14 Pe-Cy7	CD56 Pe-CF594	CD15 PerCp-Cy5.5
Laser Violet =	CD3 BV650	CD19 AmCyan			
Laser Rouge =	CD16 APC	CD20 APC-Cy7			

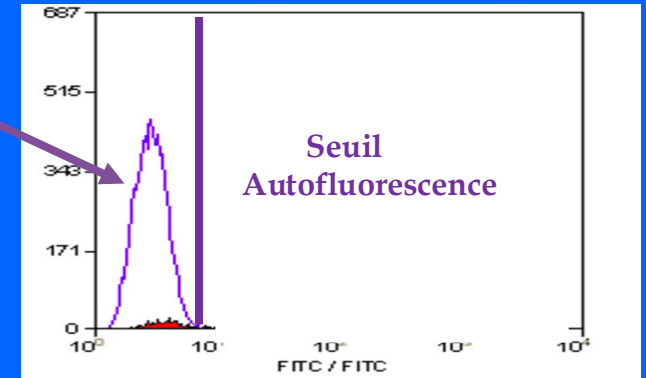
SIMPLE MARQUAGE EN CYTOMETRIE

Exemple d'un simple marquage CD4 Fitc

LASER

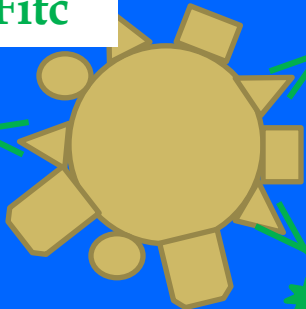


AUTOFLUORESCENCE



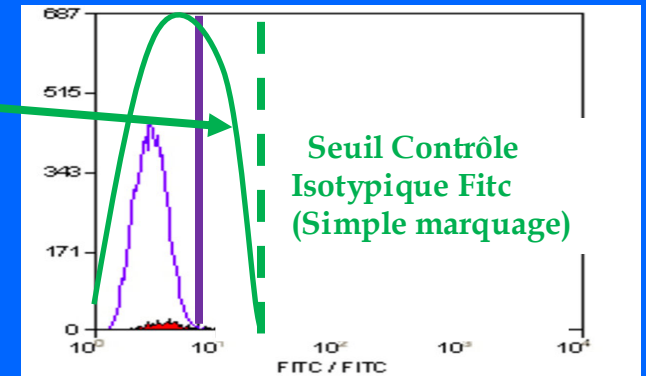
LASER

IgG1Fitc



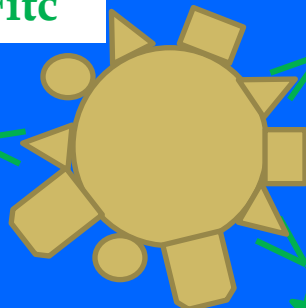
IgG1Fitc

Contrôle Isotypique
IgG1 Fitc



LASER

IgG1Anti
CD4 Fitc

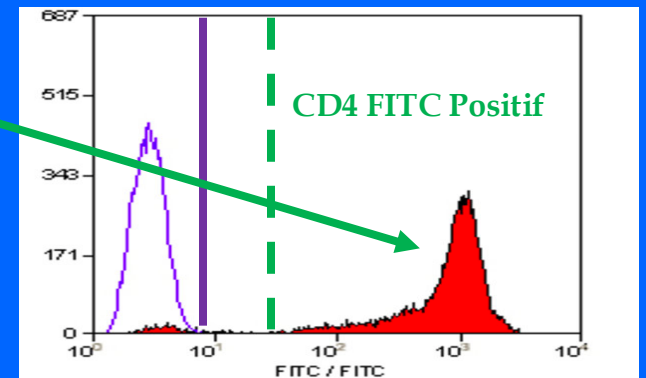


IgG1 Anti CD4 Fitc

IgG1 Anti CD4 Fitc

MFI = Mean Fluorescence Intensity
RFI = Ratio Fluorescence Intensity

IgG1 Anti CD4 Fitc



MULTI-MARQUAGE EN CYTOMETRIE

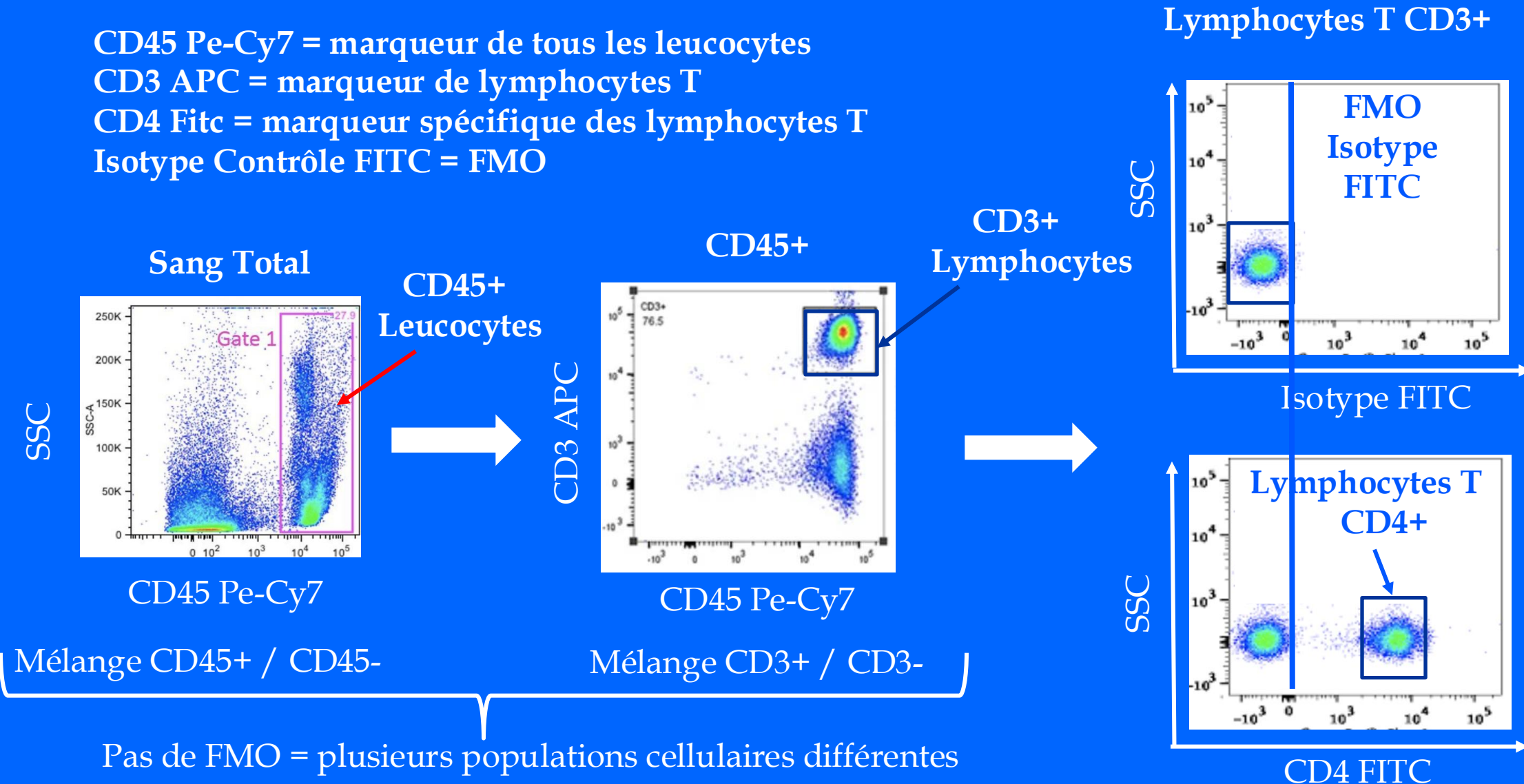
Exemple d'un Multi-Marquage CD4 Fitc dans un panel 3 couleurs:

CD45 Pe-Cy7 = marqueur de tous les leucocytes

CD3 APC = marqueur de lymphocytes T

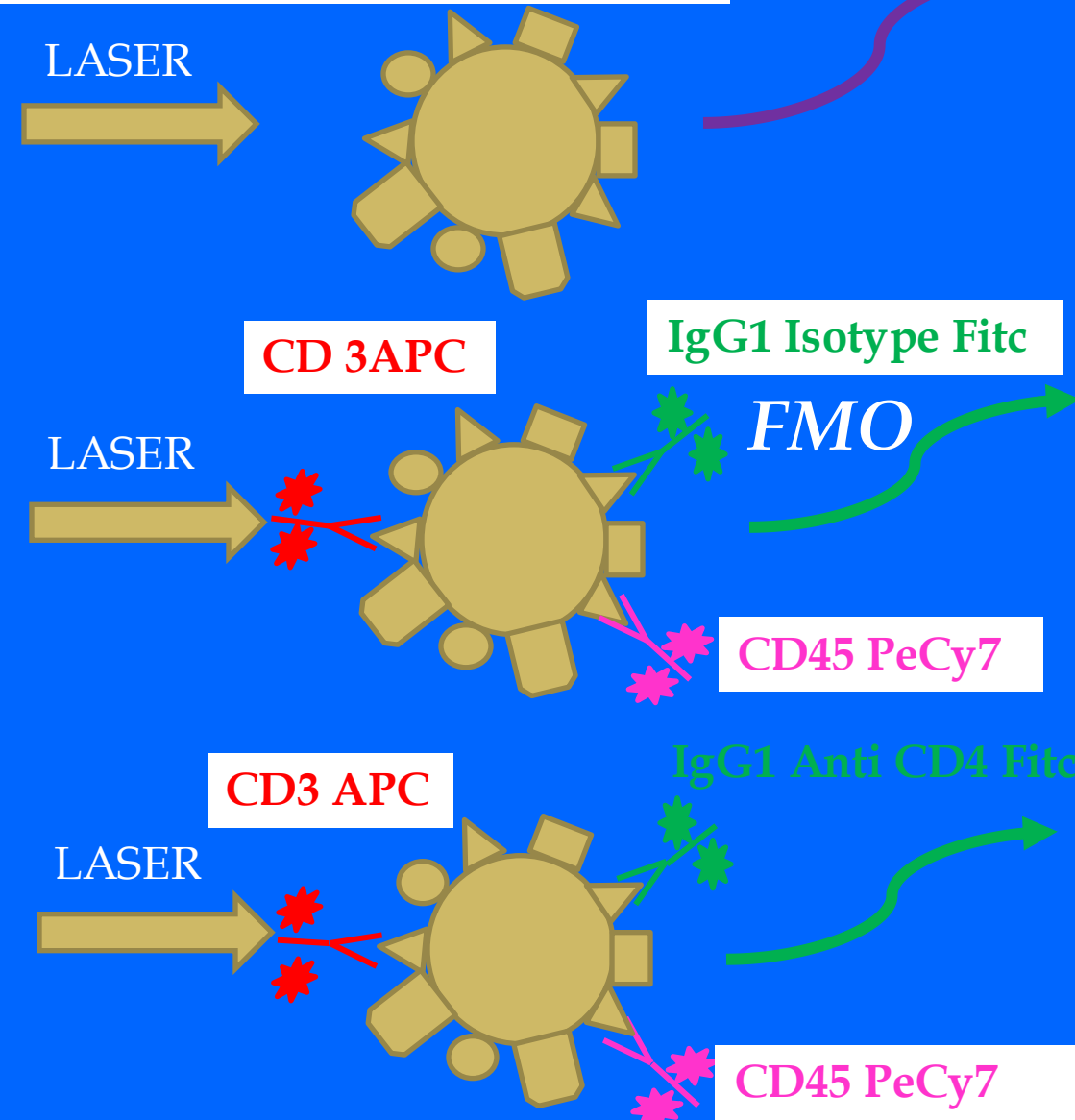
CD4 Fitc = marqueur spécifique des lymphocytes T

Isotype Contrôle FITC = FMO

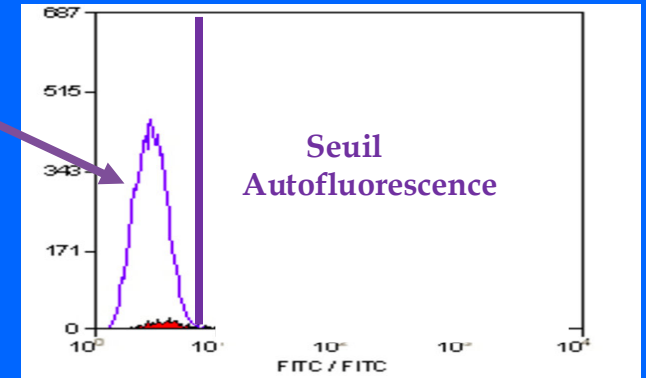


MULTI-MARQUAGE EN CYTOMETRIE

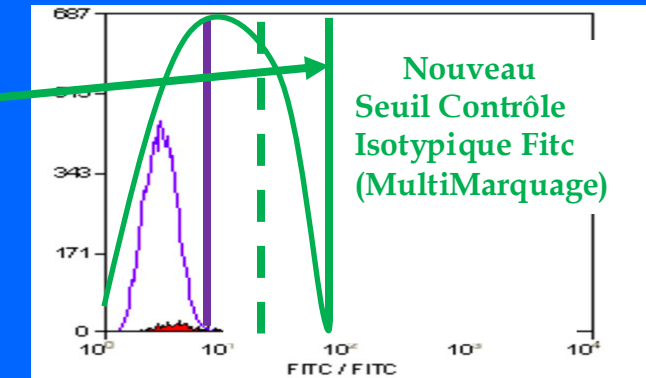
Exemple d'un marquage CD4 Fitc dans un multimarquage



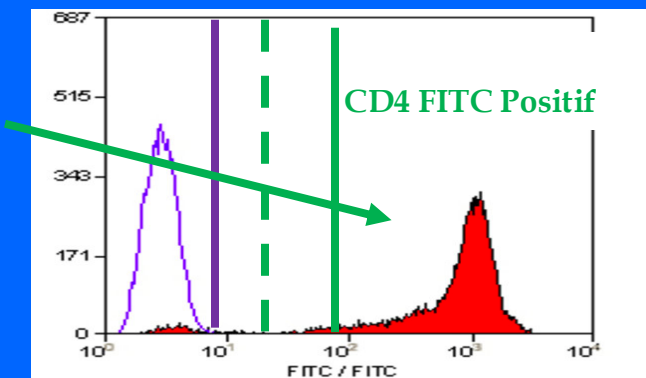
AUTOFLUORESCENCE



Contrôle Isotypique
IgG1 Fitc



IgG1 Anti CD4 Fitc



Protocole immunophénotypage Multicouleurs (7 couleurs)

1) Configuration Cytomètre:

- * Vérification de la présence des lasers correspondant aux courbes d'excitation aux fluorochromes
- * Vérification de la présence des PMT correspondant aux courbes d'émission des fluorochromes

2) Matrice de compensation:

- * Etablir une matrice de compensation correspondant aux fluorochromes de l'analyse
- * Associer cette matrice avec l'analyse

3) Panel Multicouleurs:

- * Choix des fluorochromes correspondant aux antigènes des cellules cibles (Bibliographie)

4) Multimarquage:

- * Réaliser le multimarquages (Tubes FMO et Multicouleurs)

5) Acquisition:

- * Passage des cellules dans le cytomètre

6) Analyse:

- * Interprétation des résultats

Protocole d'un immunophénotypage avec plusieurs fluorochromes

Sang périphérique → Comptage de la concentration cellulaire



Tube FMO
(Tube Contrôle)

Tube Multicouleurs
(Tube Test)

Saturation Récepteur Fc

Tube FMO

Tube Multicouleurs

Immunomarquage Multicouleurs

Tube FMO

Isotype contrôle IgG1 PE
CD45 BV421, CD38 PeCy5.5
CD19 PECF594, CD20 APC,
CD4 FITC, CD8 PeCy7

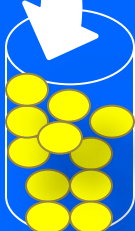


IgG1 CD3 PE

CD45 BV421, CD38 PeCy5.5
CD19 PECF594, CD20 APC,
CD4 FITC, CD8 PeCy7



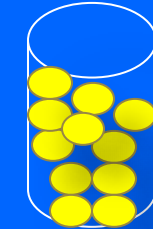
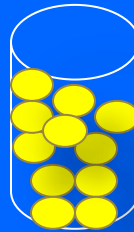
Tube Multicouleurs



Protocole d'un immunophénotypage avec plusieurs fluorochromes

Sang périphérique ➡ Détermination du nombre de lymphocytes T CD3

Tube FMO
(Tube Contrôle)
Isotype contrôle IgG1 PE



Tube Multicouleurs
(Tube Test)
IgG1 CD3 PE

Lymphocytes T :



Leucocytes CD45+



Lymphocytes (T et B)



Lymphocytes T = CD3+ / Lymphocytes B = CD38+ CD19+ CD20+



Lymphocytes T CD3 par rapport Isotype PE = FMO



Lymphocyte T = % Lymphocyte T CD4 et % Lymphocyte T CD8

CONCLUSIONS (Partie 2)

- ▣ Multimarquages (plusieurs fluorochromes):
 - Possibilité de chevauchement des spectres d'émissions
- ▣ Compensation manuelle entre 2 fluorochromes (médiane de fluorescence)
- ▣ Matrice de compensation si chevauchement entre plusieurs fluorochromes
- ▣ Rendement quantique différent selon les fluorochromes (+/- Brillants)
- ▣ Règles pour la constitution d'un panel :
 - Choix des fluorochromes associés aux anticorps de cytométrie
 - Distribution des antigènes sur les populations cellulaires
- ▣ Multimarquages: le tube négatif devient le tube « FMO »
 - = Fluorescence Minus One