



CYTOMETRIE EN FLUX PRINCIPES ET APPLICATIONS MYELOME MULTIPLE

BUT Montpellier



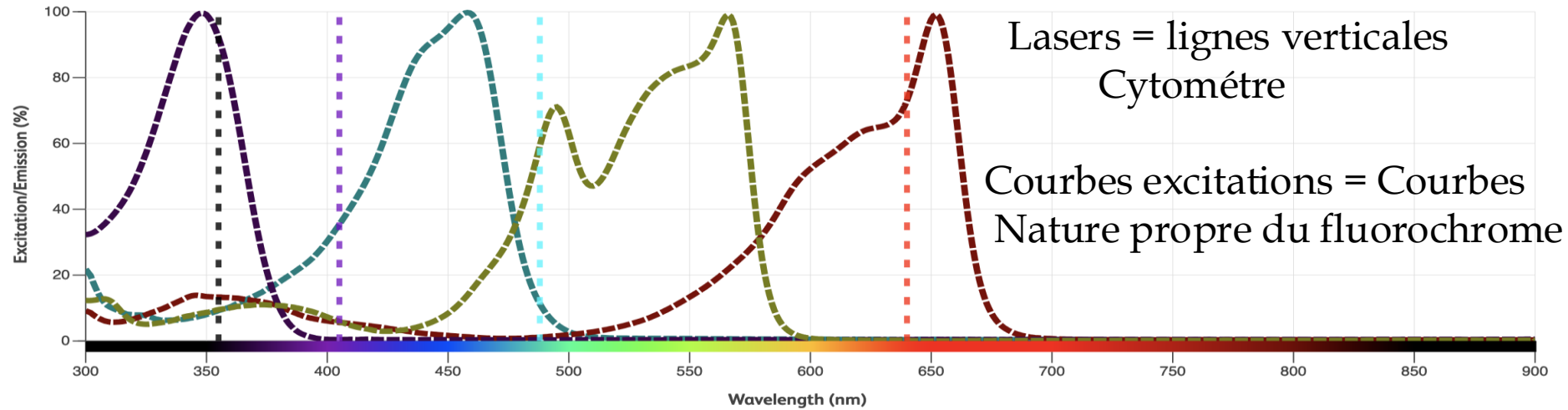
*Guilhem REQUIRAND (Ingénieur hospitalier)
Laboratoire Suivi des Thérapies Innovantes*

2. Conséquences du multimarquages en cytométrie en flux:

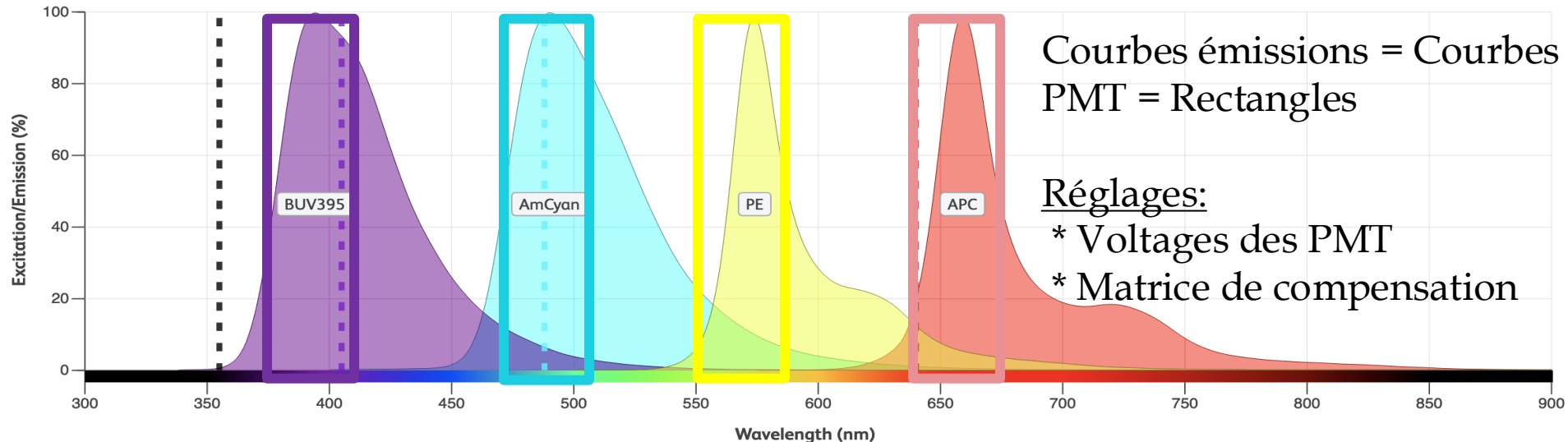
- Compensation par la méthode des médianes
- Elaboration d'une matrice de compensation
- Fluorescence Minus One (FMO)
- Bi-exponentiel
- Dispersion de la lumière
- Elimination des doublets

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

Différence entre Excitation et Emission



Partie
Excitation



Partie
Emission

Problématique liées aux spectre d'émission des fluorochromes

Problématique:

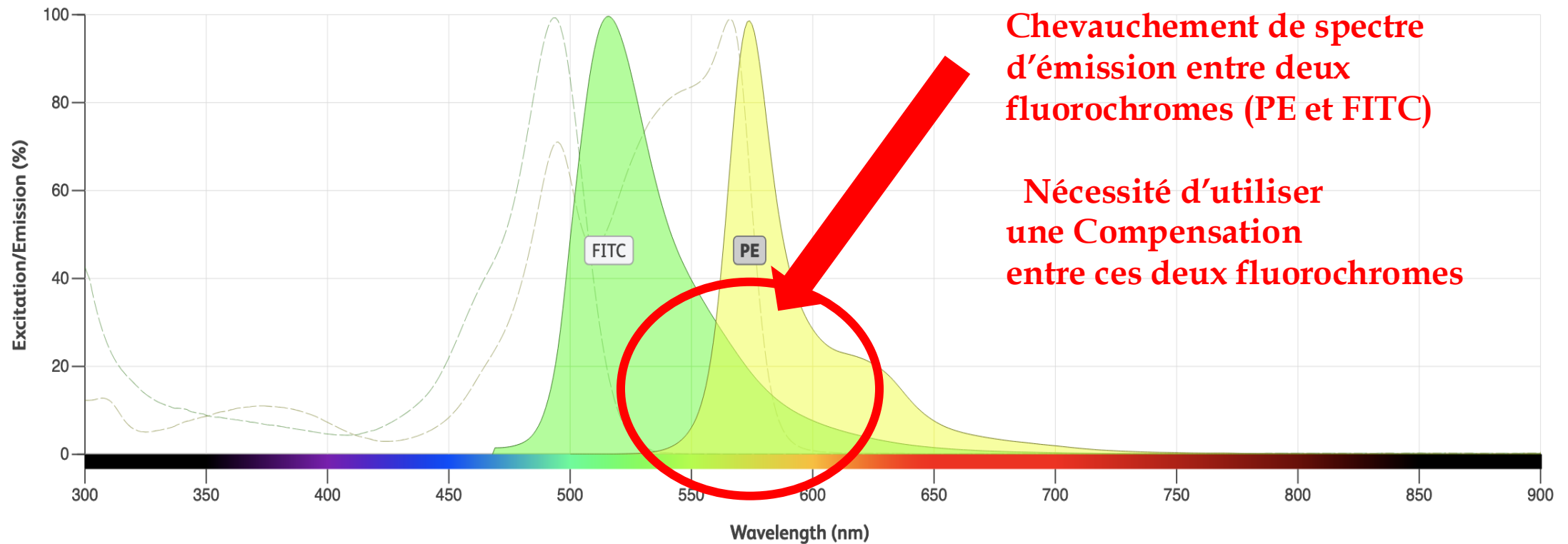
Les émissions de fluorescence générés par l'excitation des lasers sur les fluorochromes couplés aux anticorps peuvent engendrer des superpositions de spectre d'émission fluorescent créant des faux positifs.

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

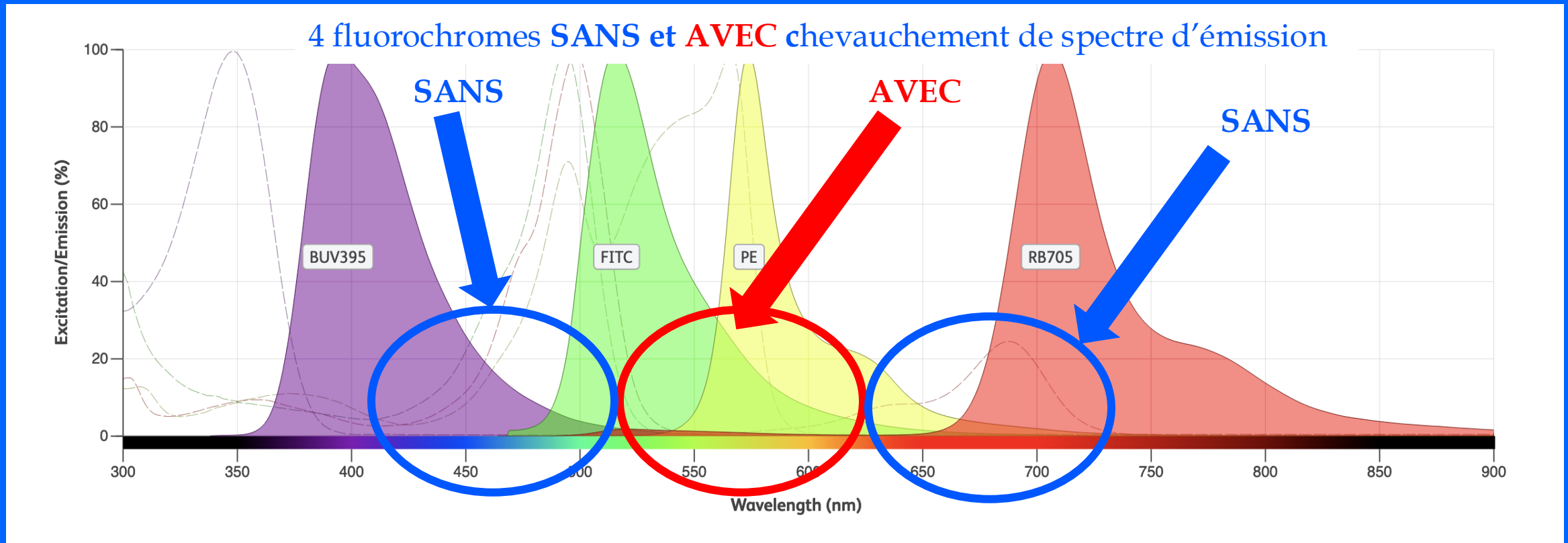
Pour cela, il faut créer une « matrice de compensation » comprenant tous les spectres d'émission de tous les fluorochromes utilisés pour l'analyse.

COMPENSATION : Quand et Pourquoi ?

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

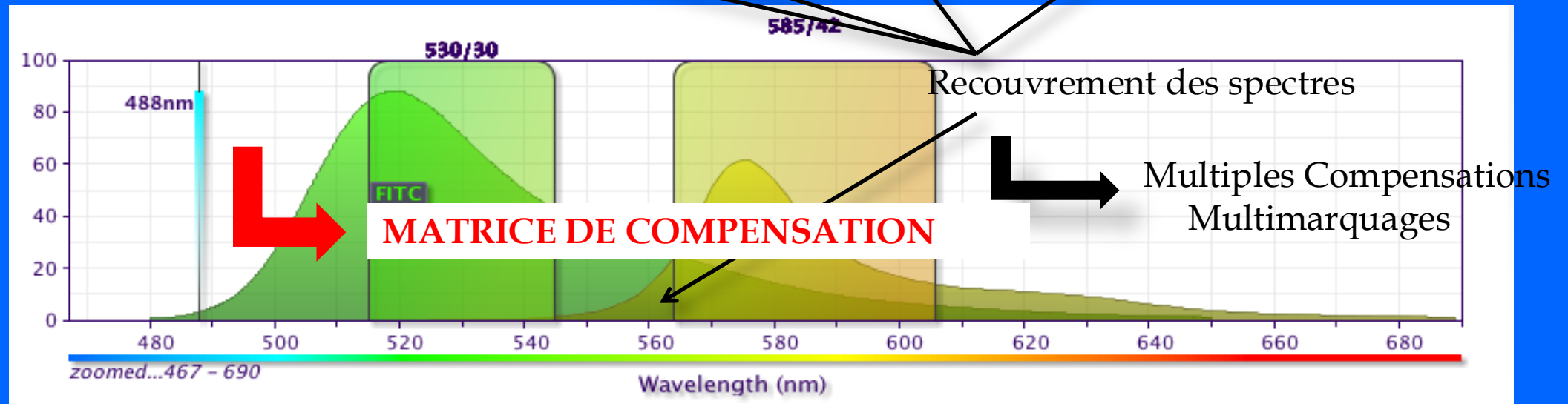
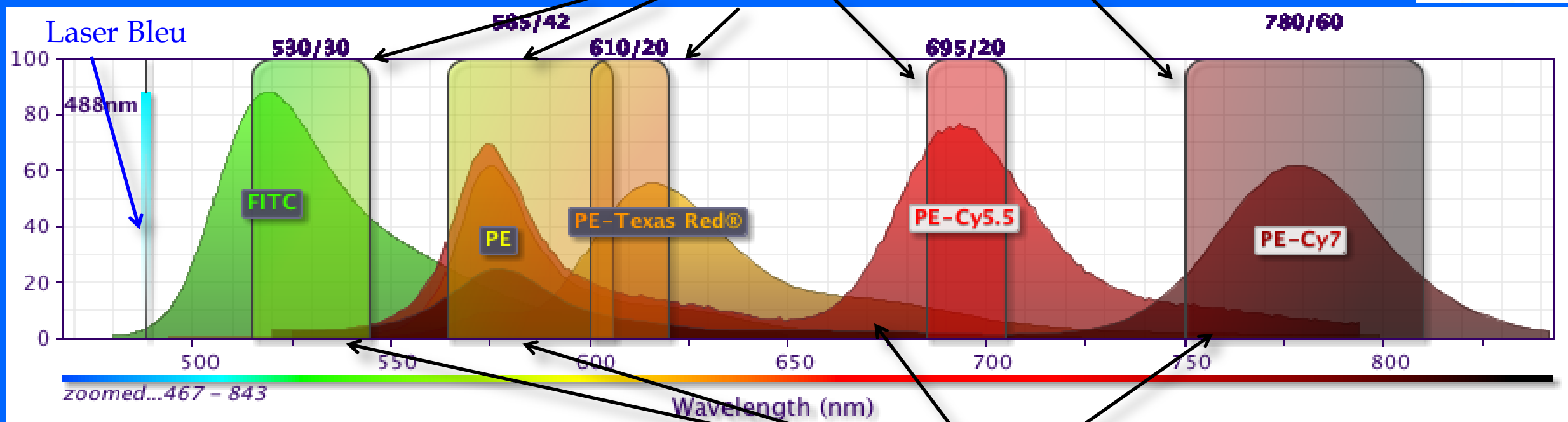


COMPENSATION : Quand et Pourquoi ?



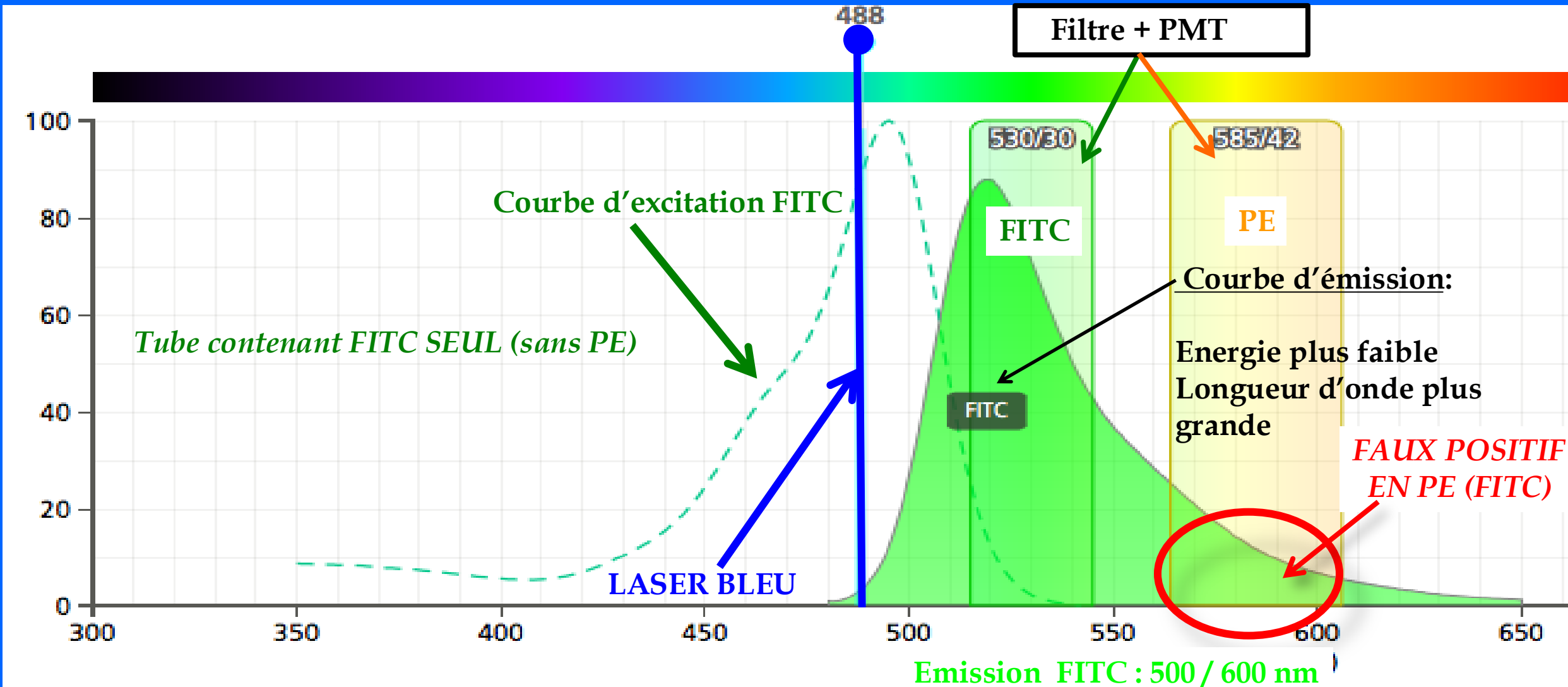
RECOUVREMENT DES SPECTRES D'EMISSION de DIVERS FLUORCHROMES

CAPTEUR = Filtre + PMT



PRINCIPE DE RECOUVREMENT DES SPECTRES DE FLUORESCENCE

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



PRINCIPE DE FLUORESCENCE:

LASER → EXCITATION → EMISSION → CAPTEUR

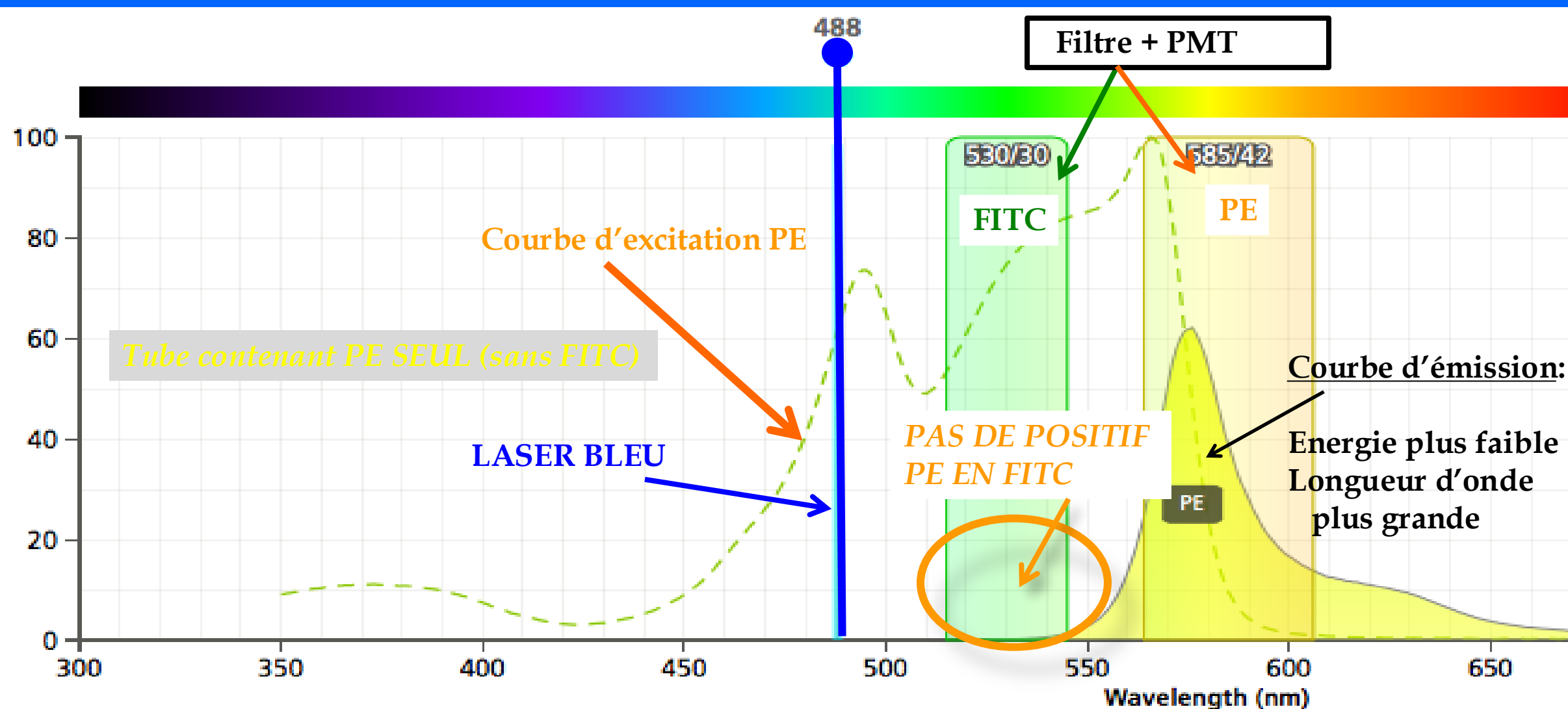
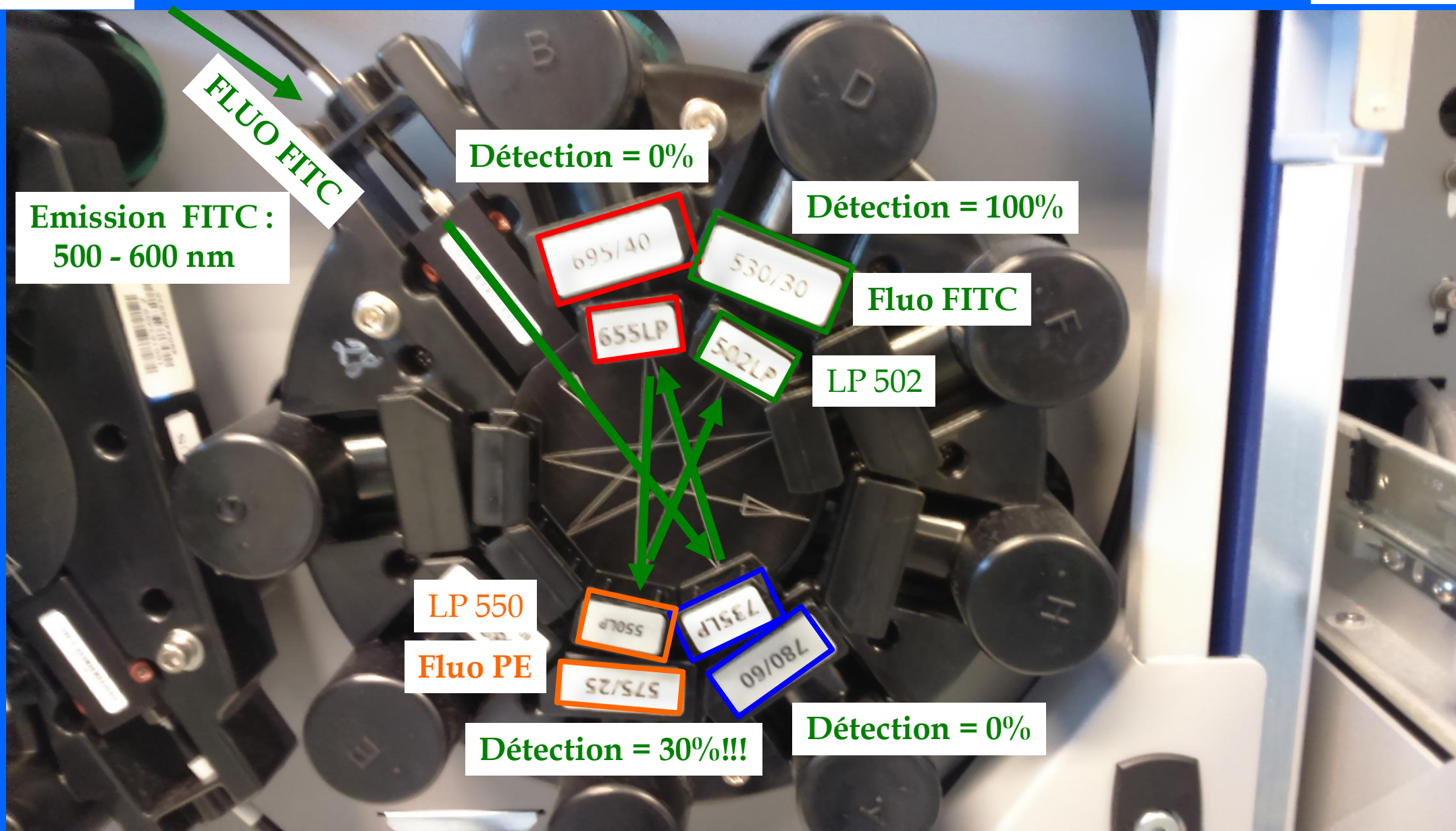
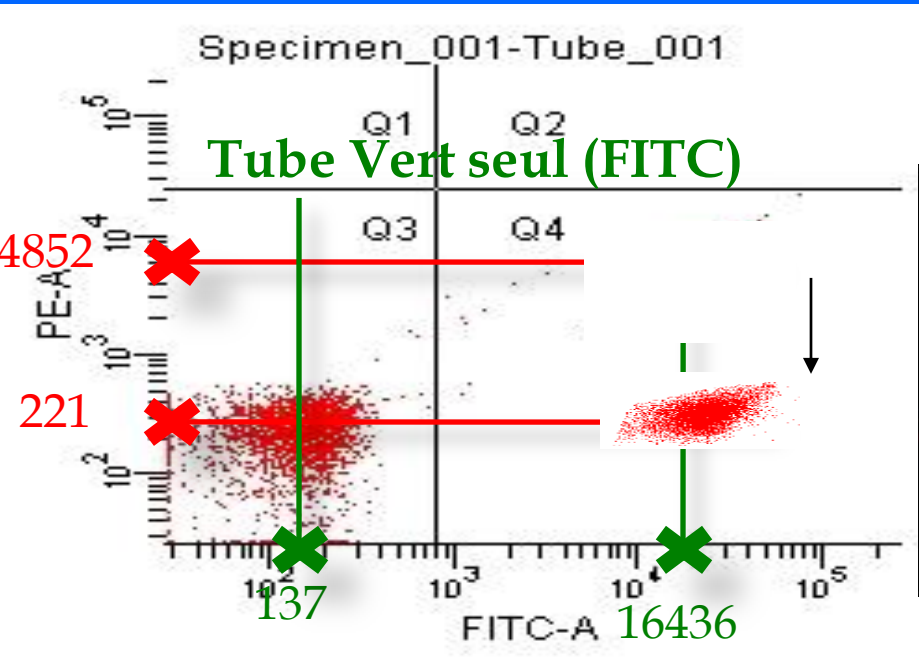


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)

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

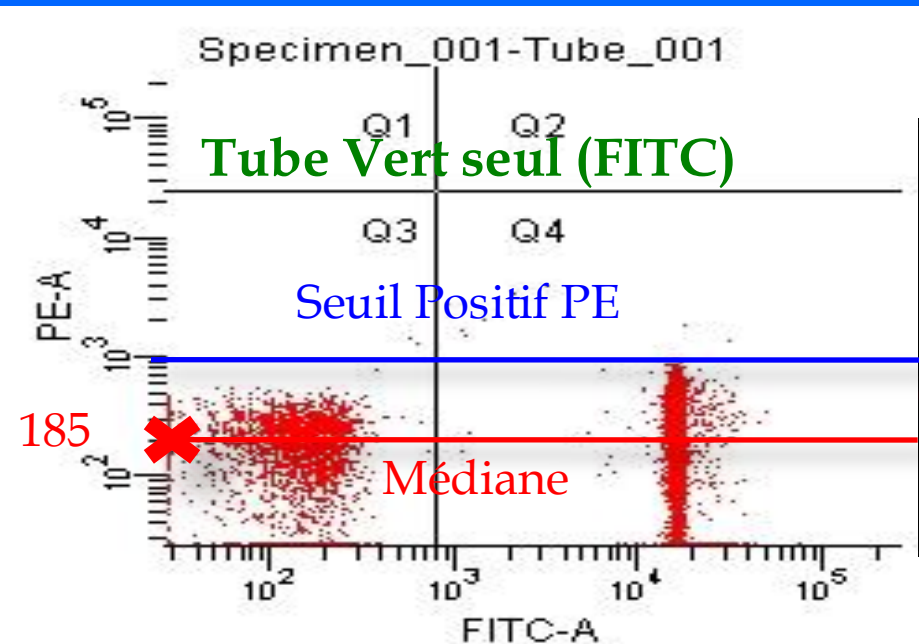
Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
■ P1	16,123	4,745	187
☐ Q1	####	####	####
☐ Q2	####	####	####
☐ Q3	137	221	49
☐ Q4	16,436	4,852	212

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

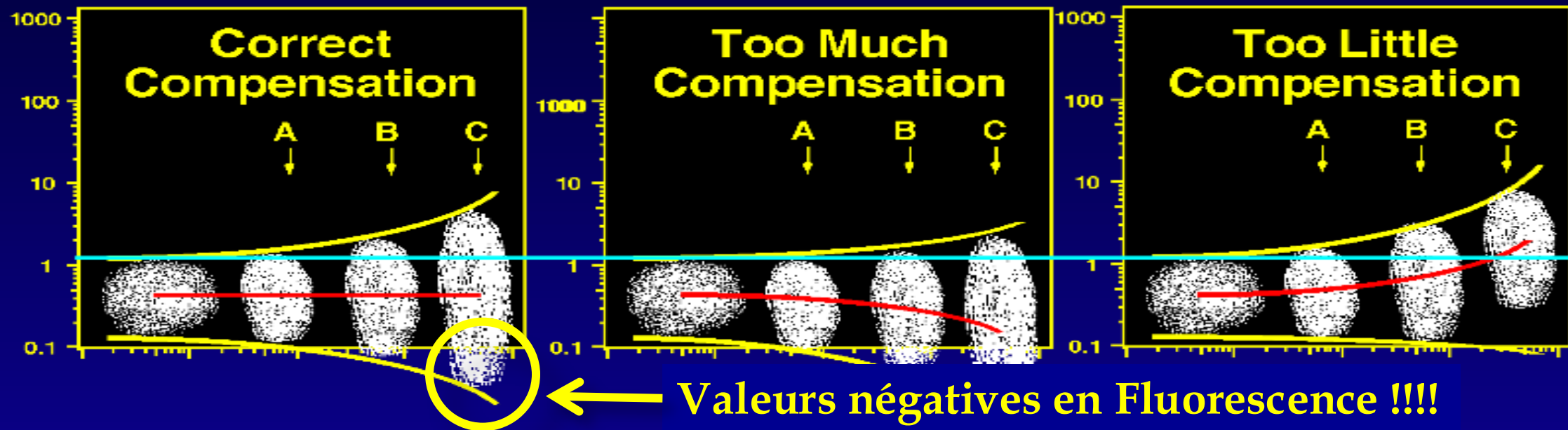
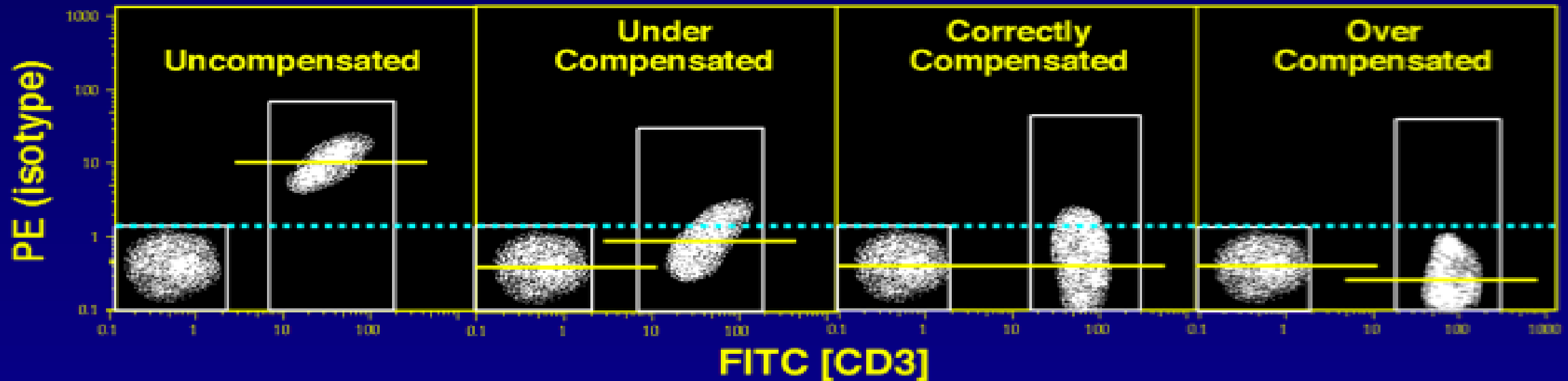
Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
■ P1	16,123	184	187
☐ Q1	####	####	####
☐ Q2	####	####	####
☐ Q3	137	184	49
☐ Q4	16,436	185	212

AVEC
COMPENSATION
30 % Fitc dans Pe



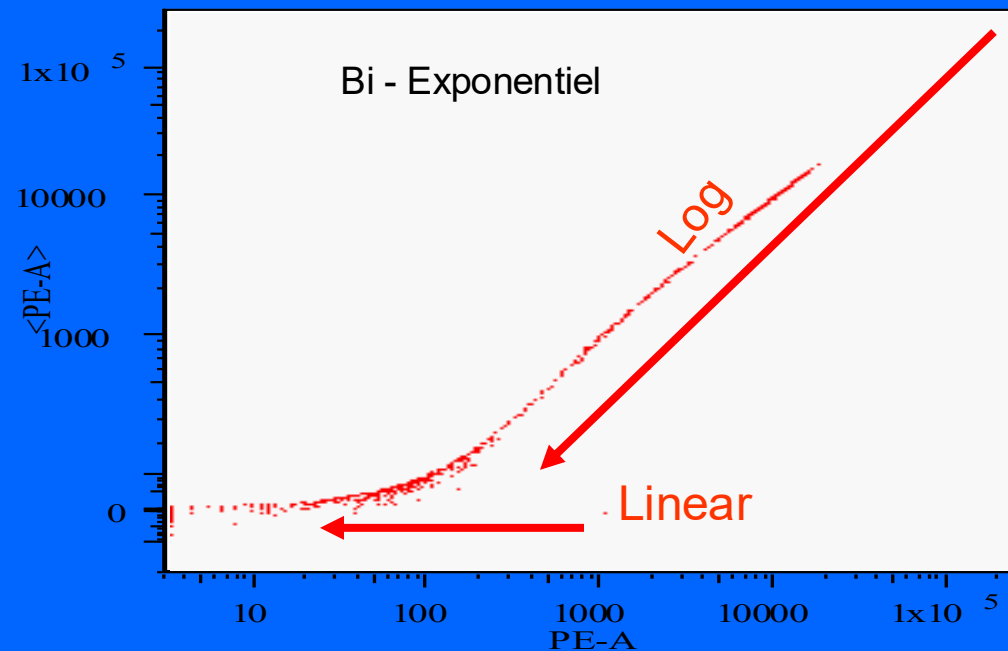
Manuellement

Conséquences de la méthode de compensation par la médiane

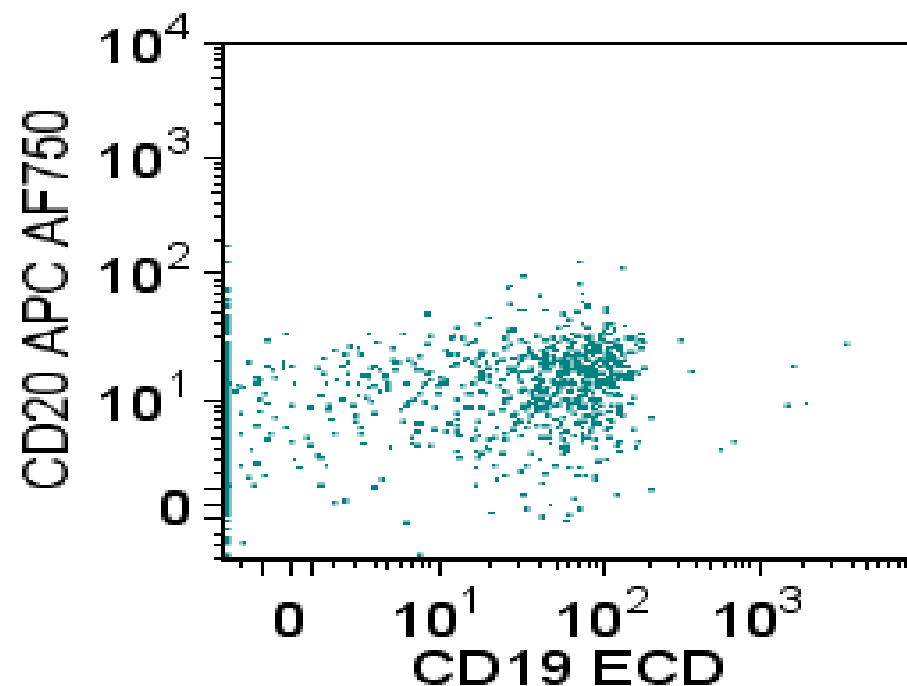


Utilisation du bi-exponentiel pour les populations proches du zéro

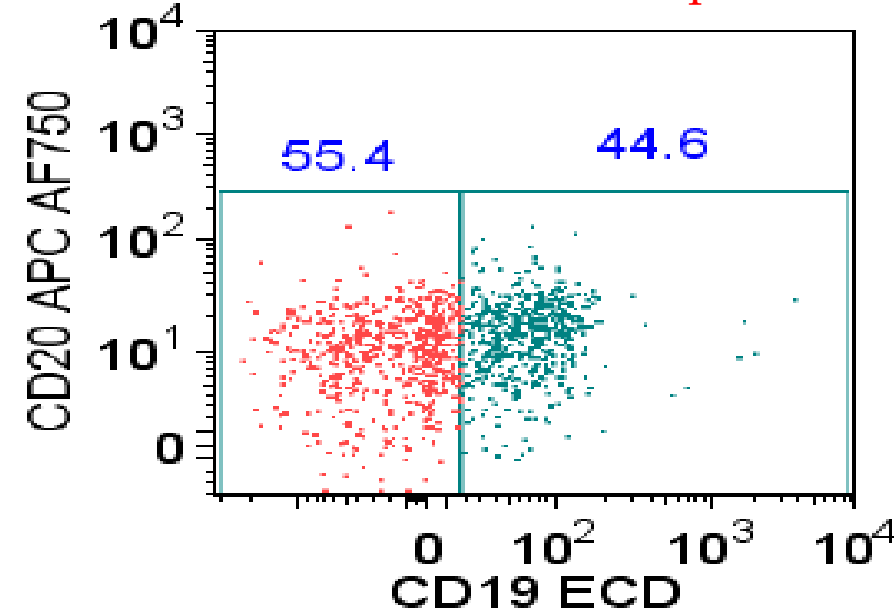
Biexponential function: $f(x) = a e^{bx} - c e^{-d}$



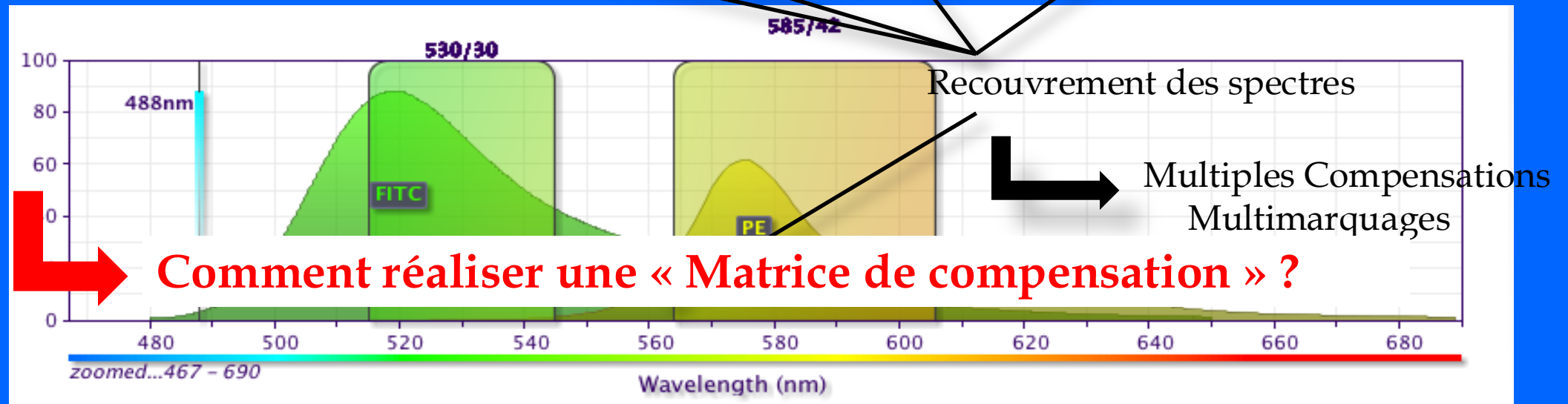
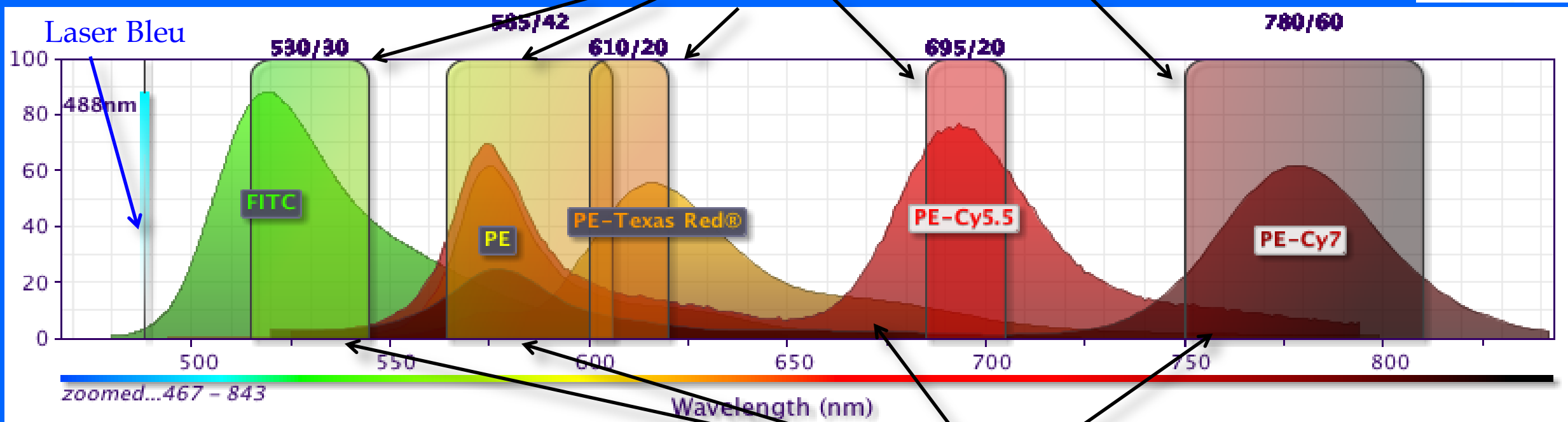
ECHELLE LOG



Transformation en bi-exponentiel

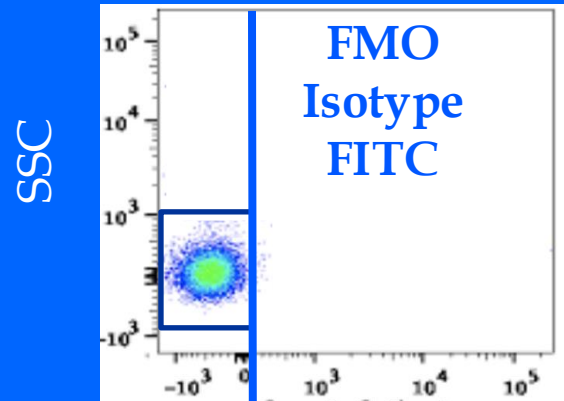


CAPTEUR = Filtre + PMT



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

Cas d'un Monomarquage FITC seul

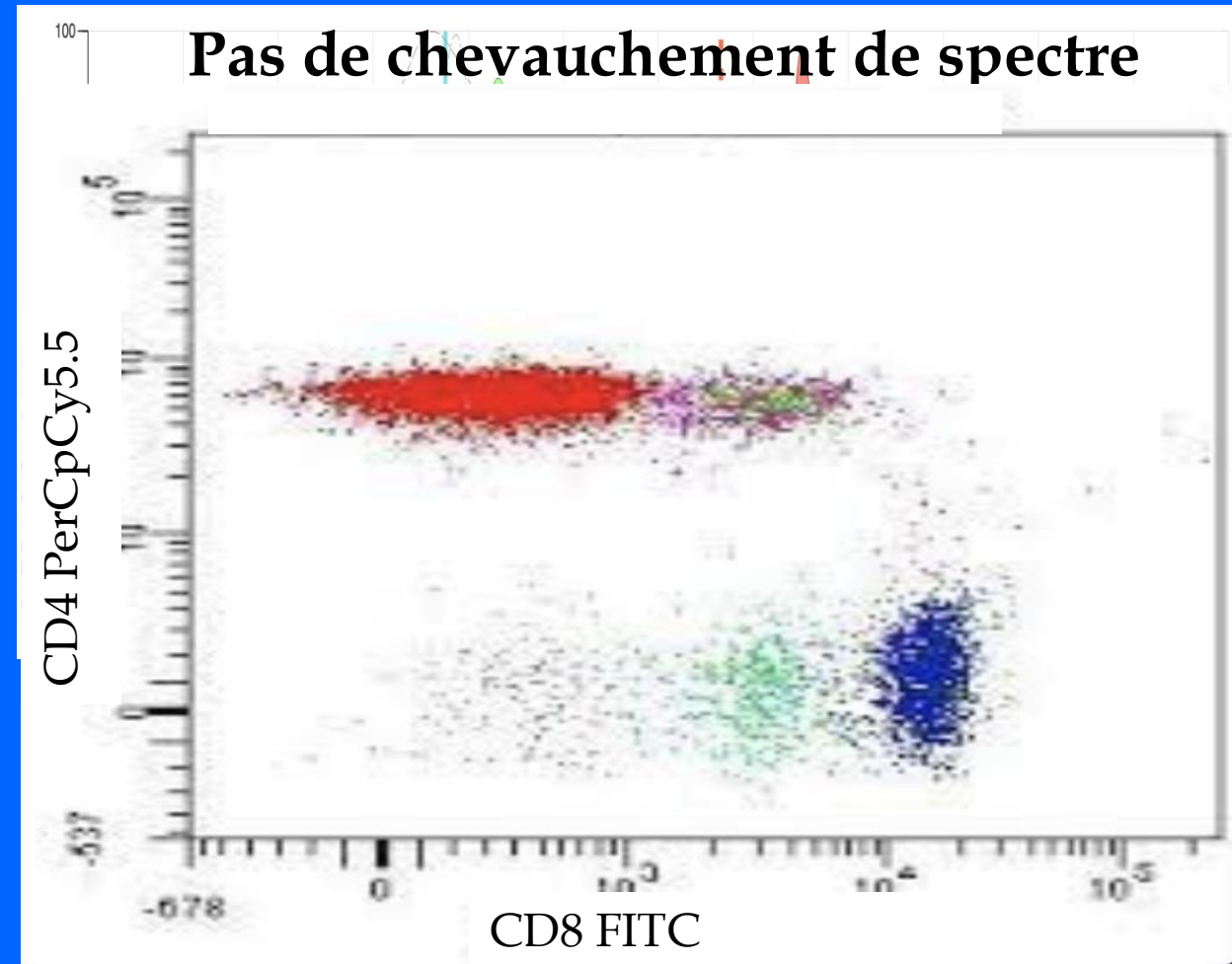


Isotype FITC

CD4 FITC

Pas de compensation nécessaire

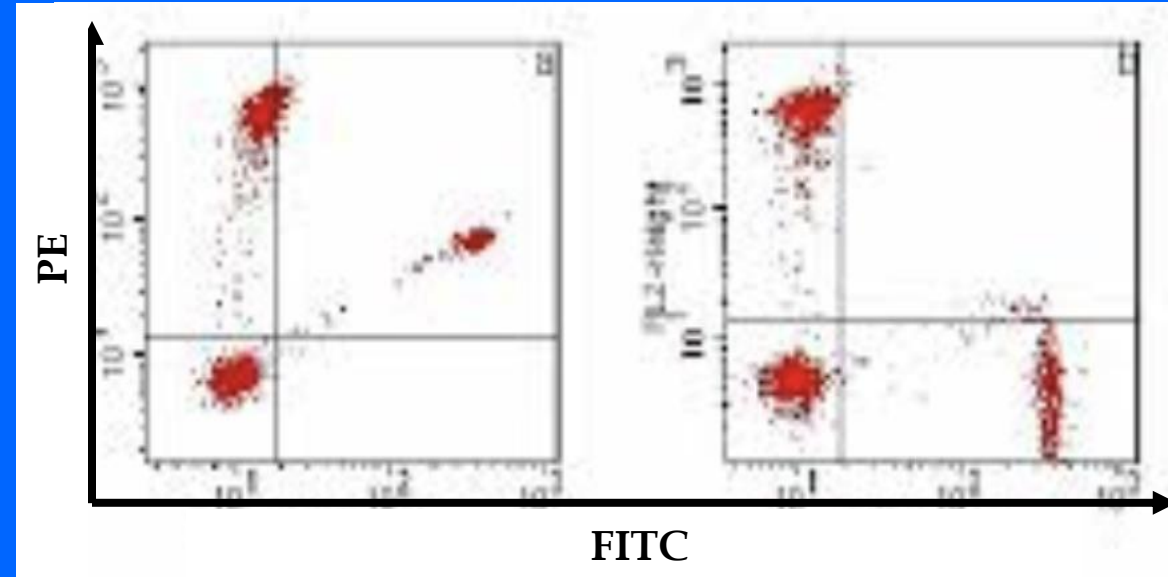
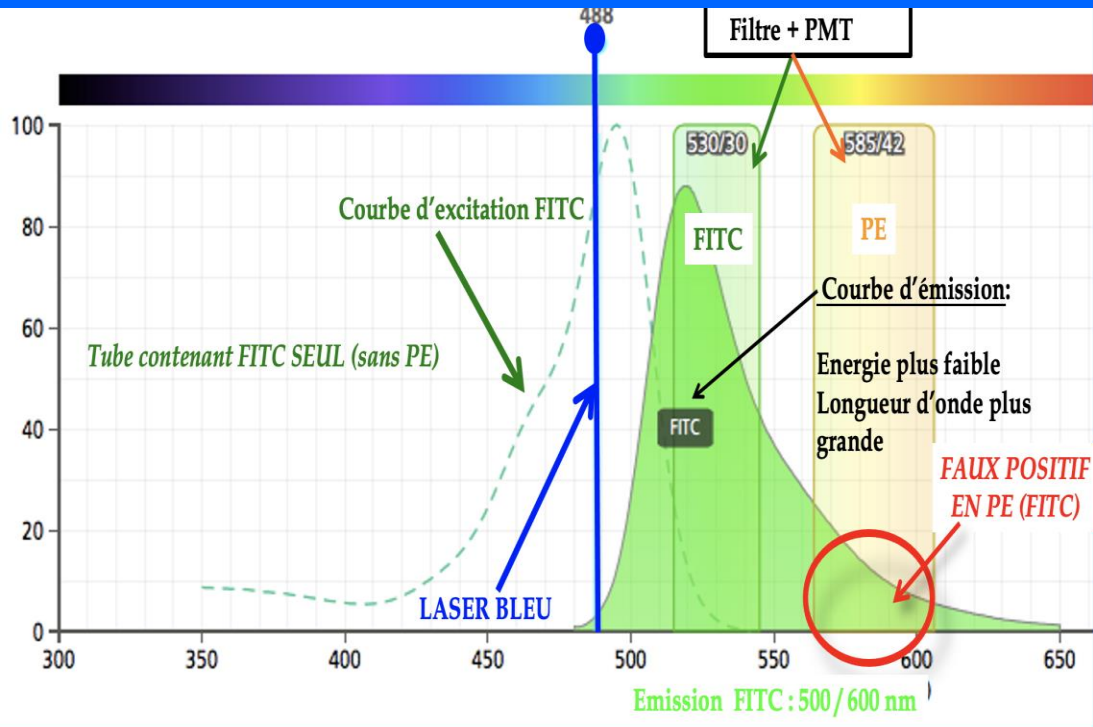
Cas d'un Double marquage FITC et PerCpCy5.5



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

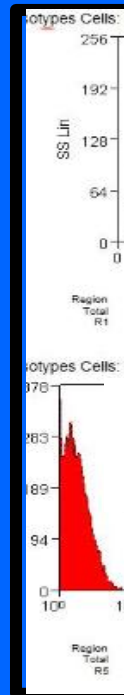
Problème de chevauchement de spectre



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

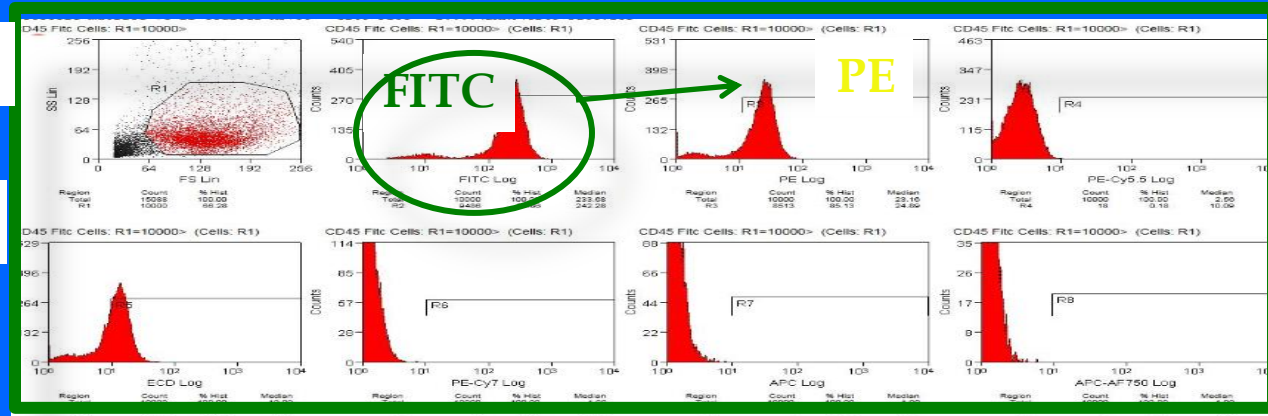
as les fluorochromes

ans la première décade

La matrice de compensation en cytométrie en flux

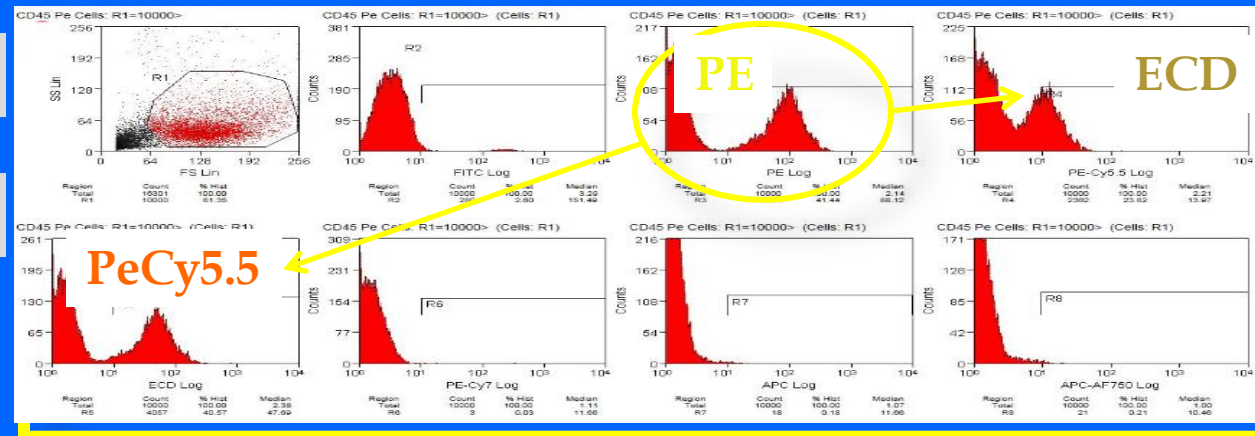
Tube FITC

Tube Fitc + seul



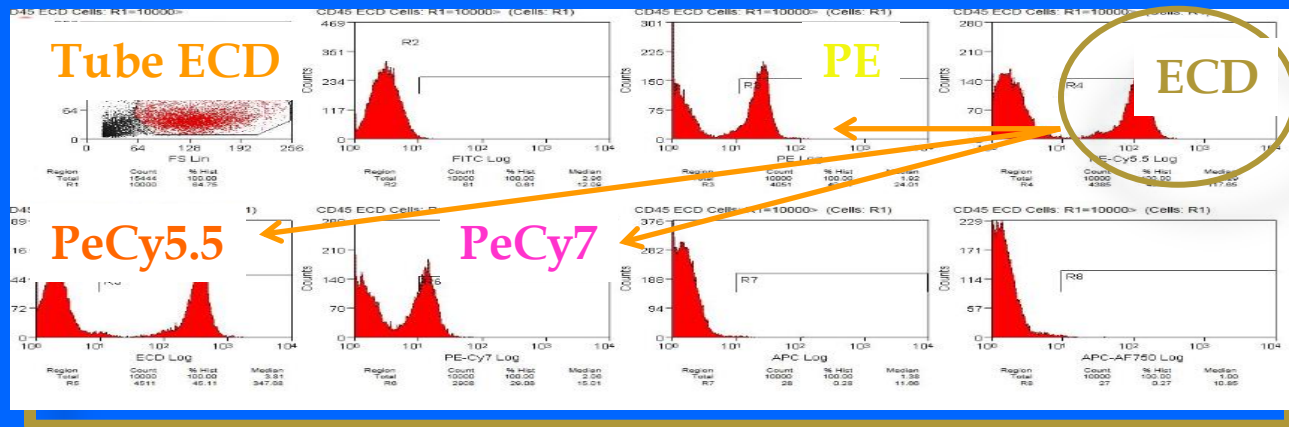
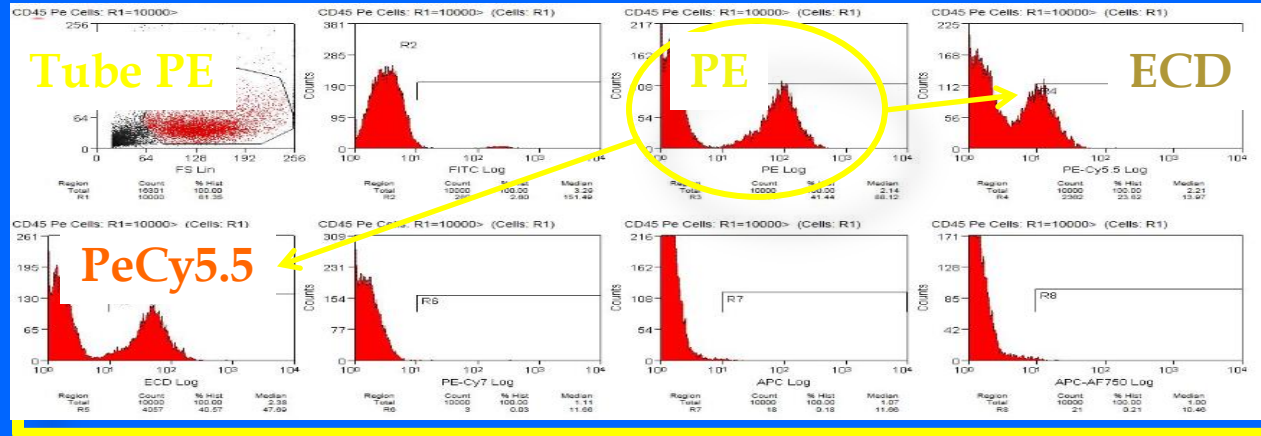
Tube PE

Tube PE + seul



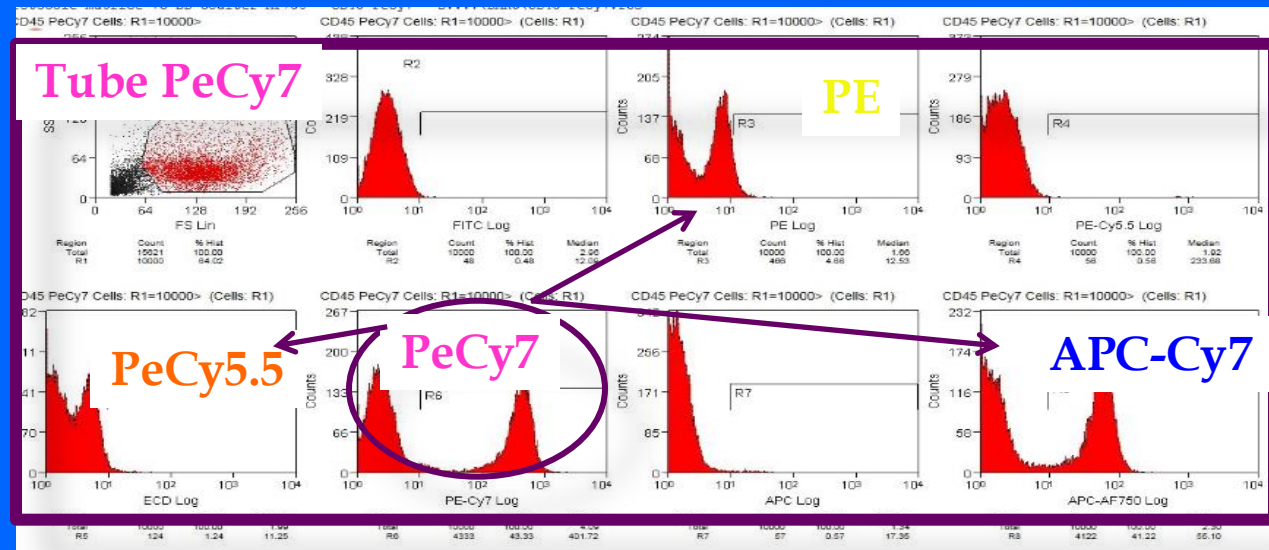
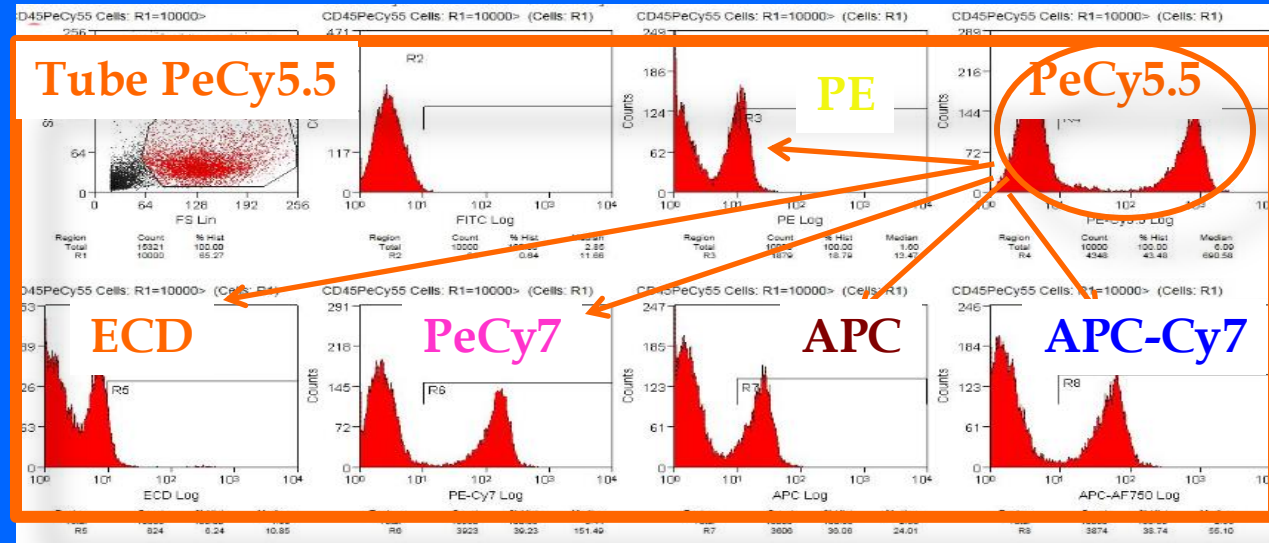
SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

La matrice de compensation en cytométrie en flux



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

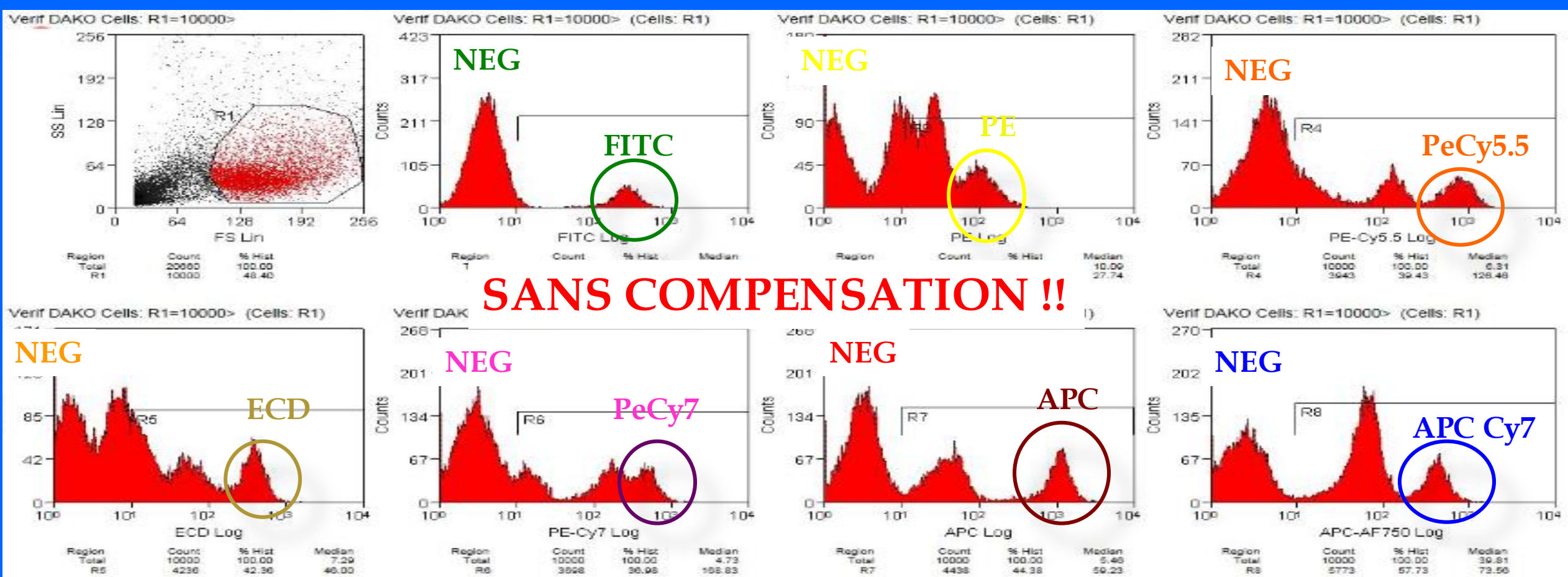
La matrice de compensation en cytométrie en flux



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

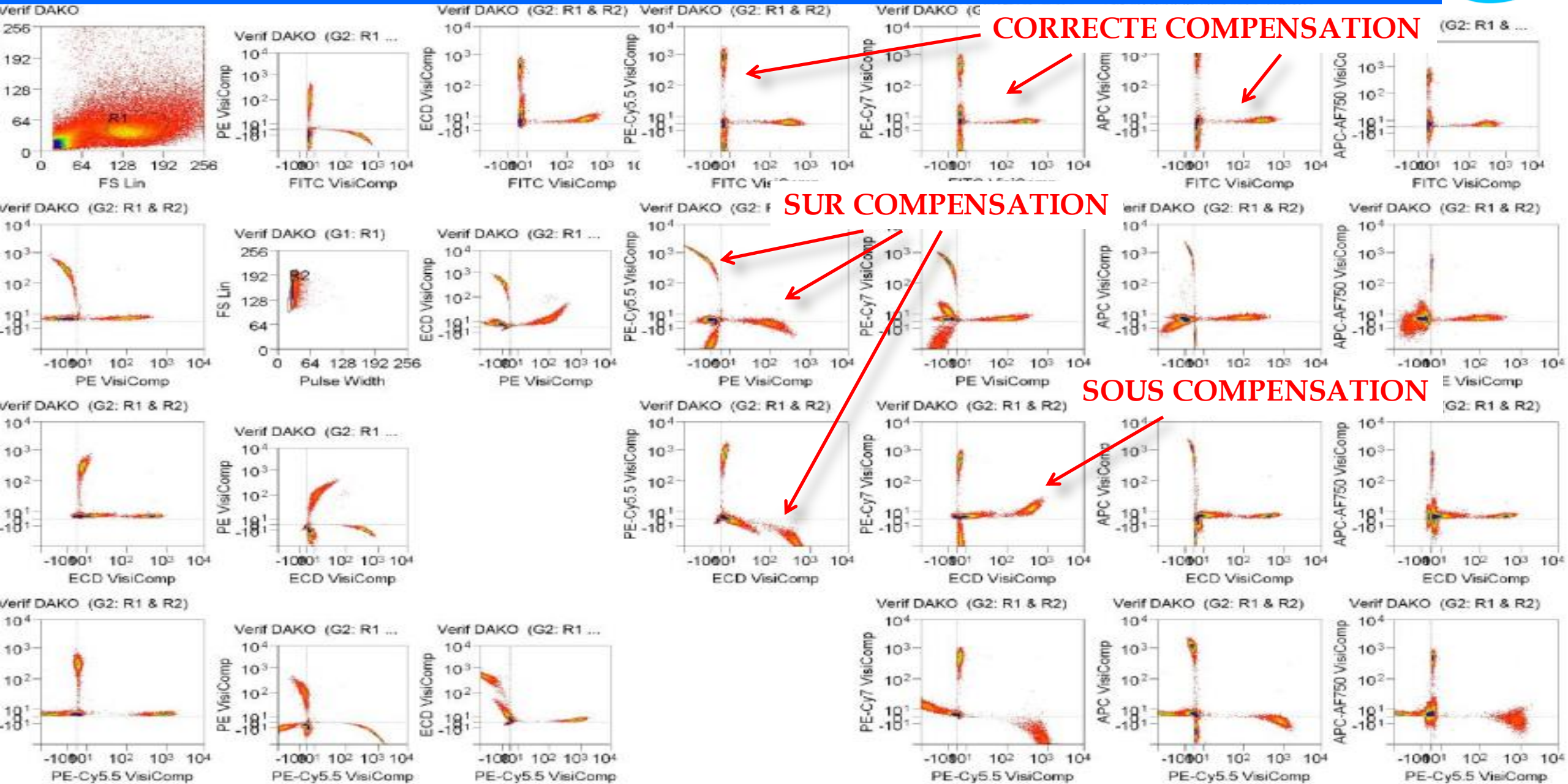
La matrice de compensation en cytométrie en flux

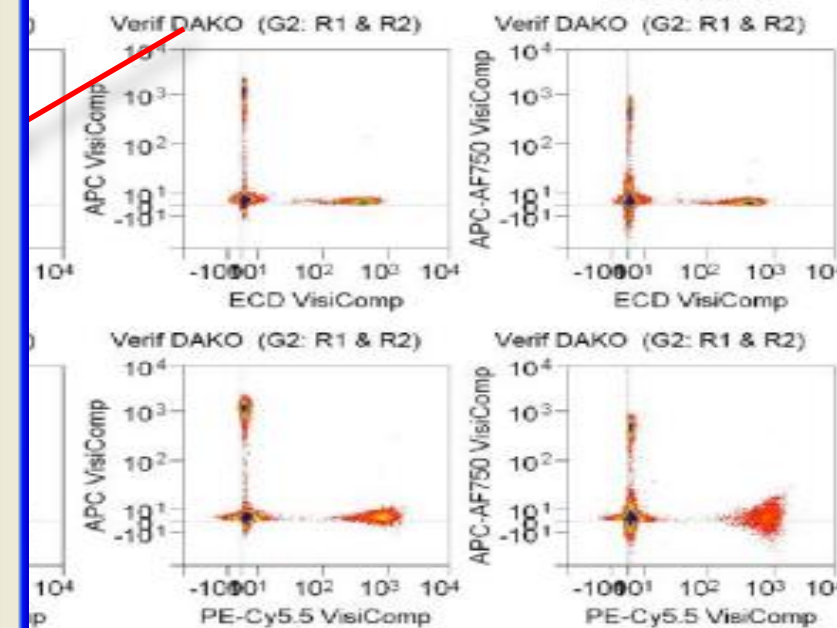
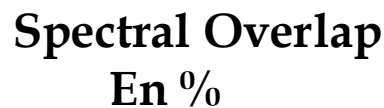
Tube MultiCouleurs (7C): Mélange tous les négatifs et tous les positifs dans un même tube

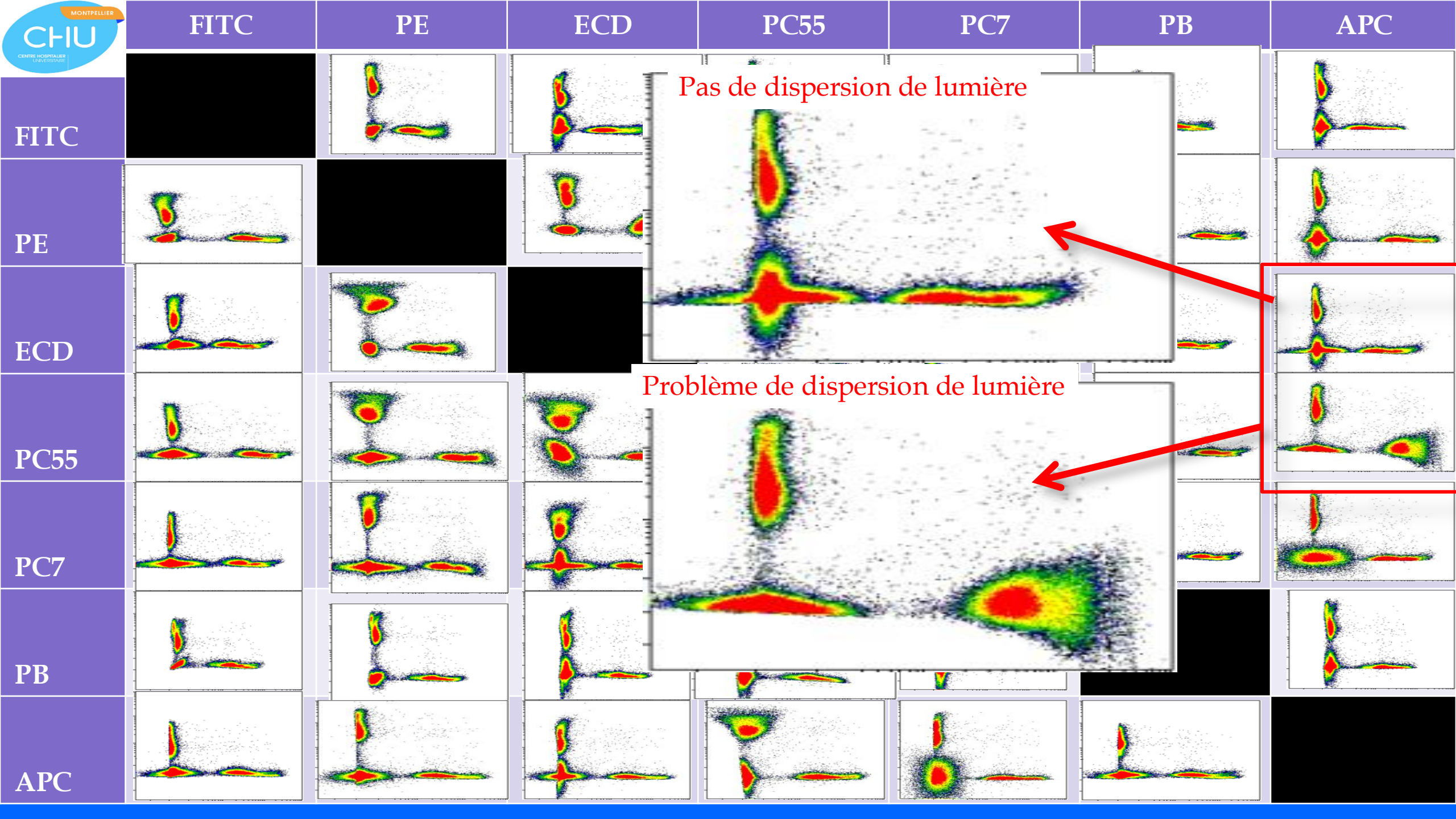


SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

CHU
CENTRE HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE

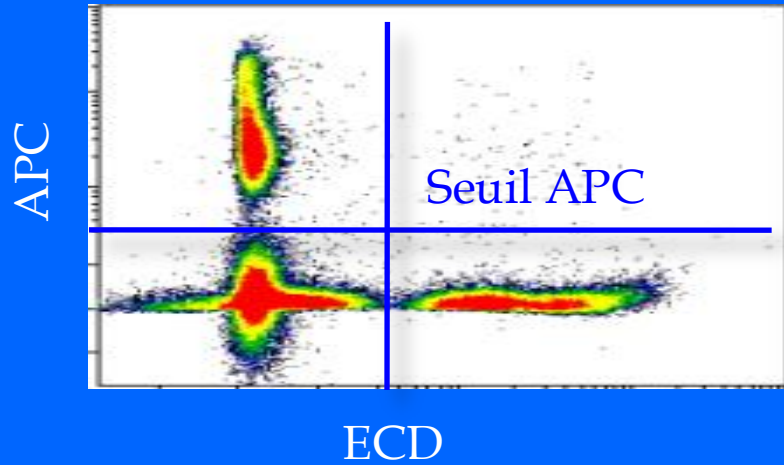




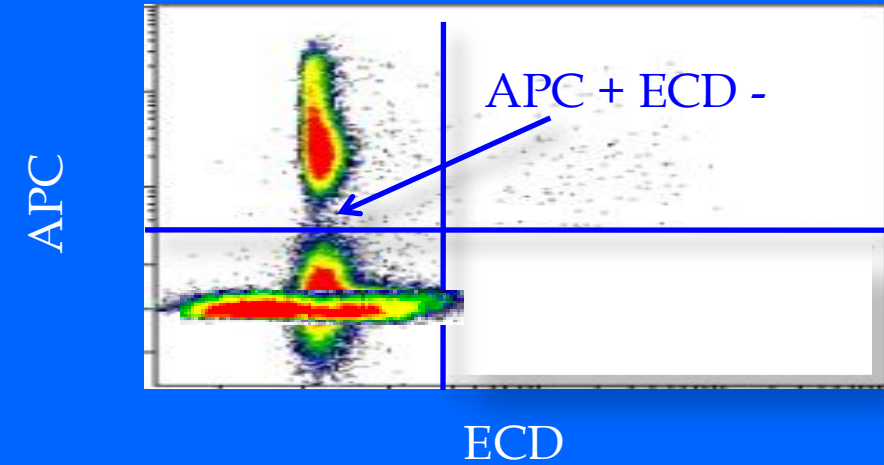


Problème lié à la dispersion de lumière « effet trompette »

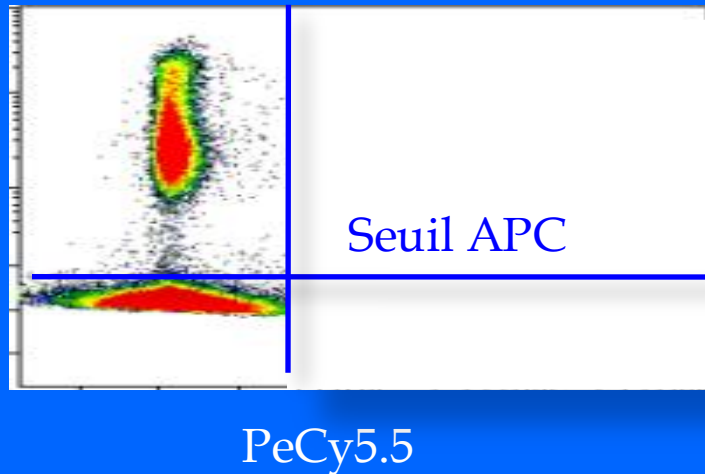
MATRICE



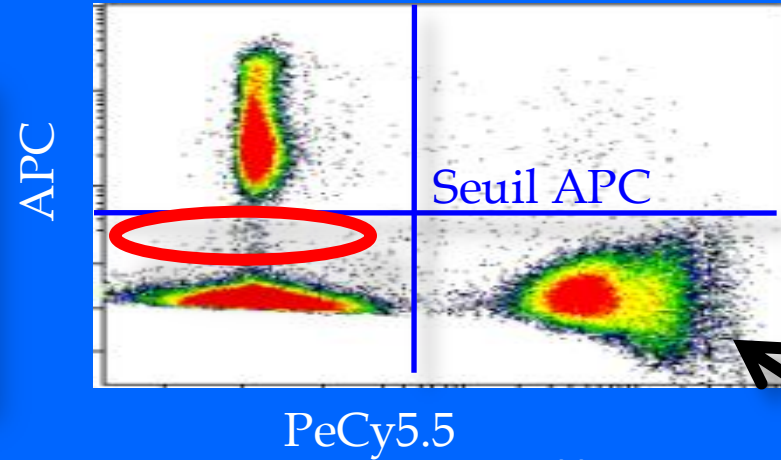
CELLULES



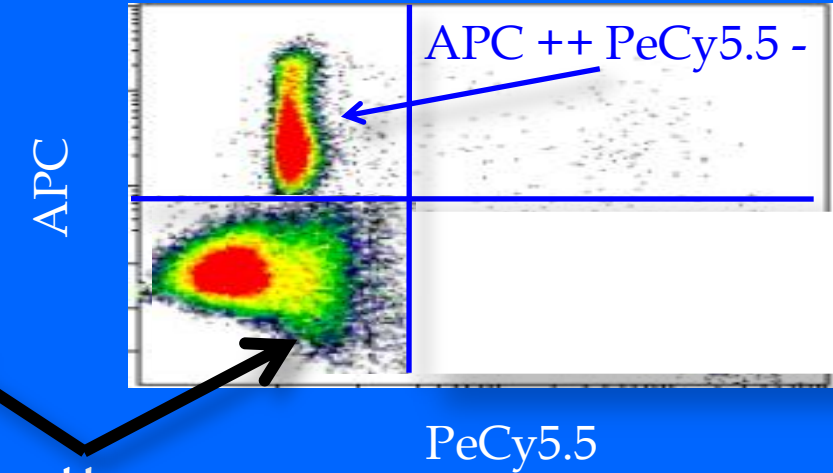
MATRICE



MATRICE

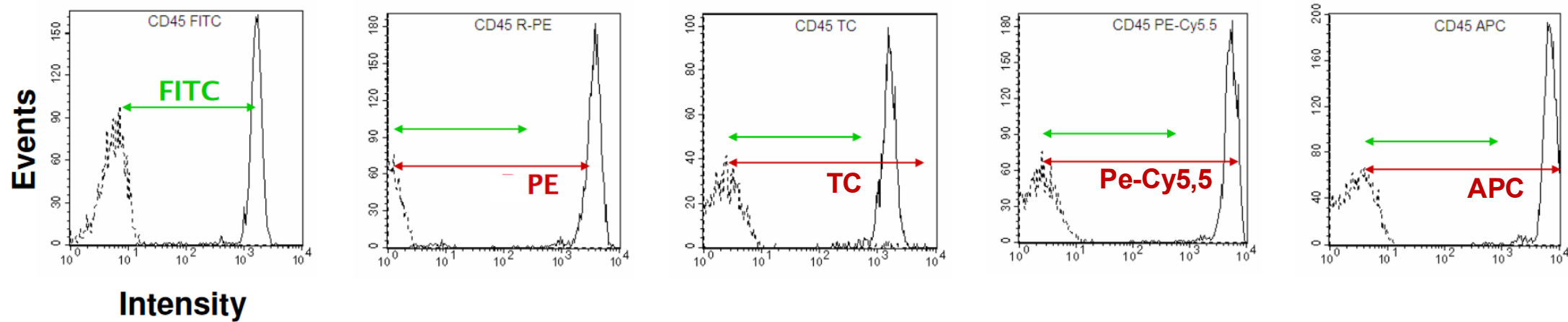


CELLULES



« 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

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)

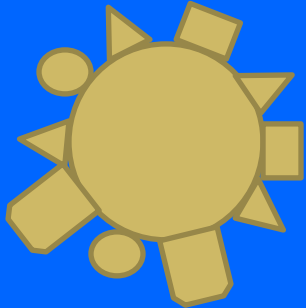
Panel de 9 couleurs:

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			

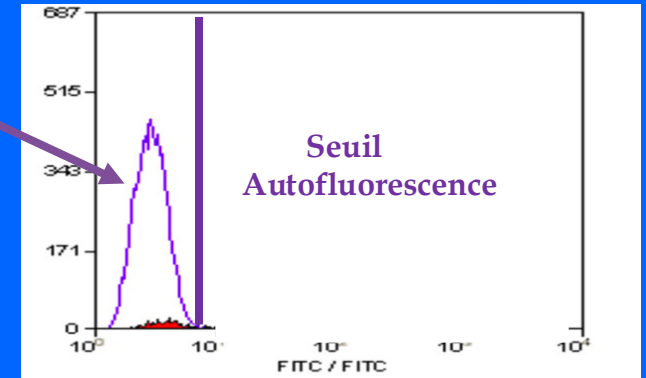
SIMPLE MARQUAGE EN CYTOMETRIE

Exemple d'un simple marquage CD4 Fitc

LASER

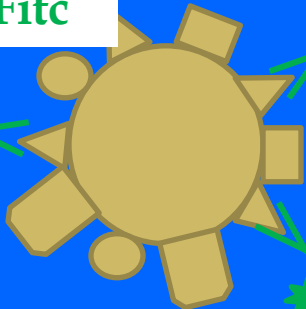


AUTOFLUORESCENCE



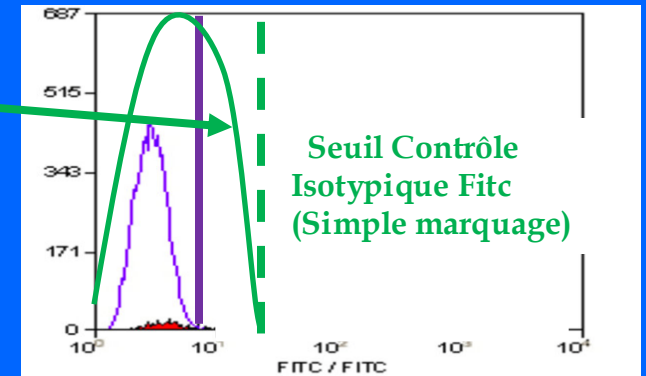
LASER

IgG1Fitc

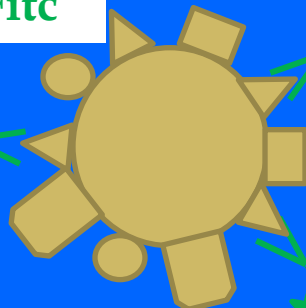


IgG1Fitc

Contrôle Isotypique
IgG1 Fitc



IgG1Anti
CD4 Fitc

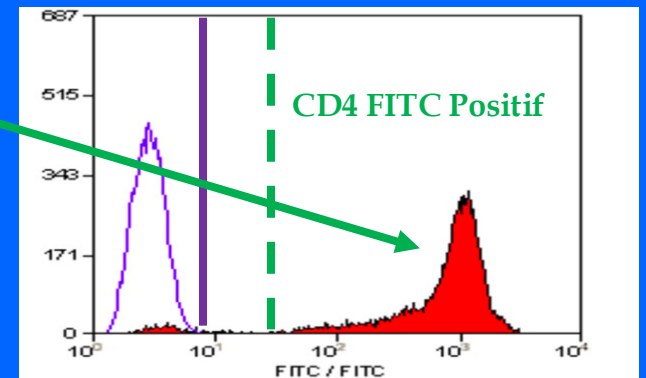


IgG1 Anti CD4 Fitc

IgG1 Anti CD4 Fitc

MFI = Mean Fluorescence Intensity
RFI = Ratio Fluorescence Intensity

IgG1 Anti CD4 Fitc



MULTI-MARQUAGE EN CYTOMETRIE

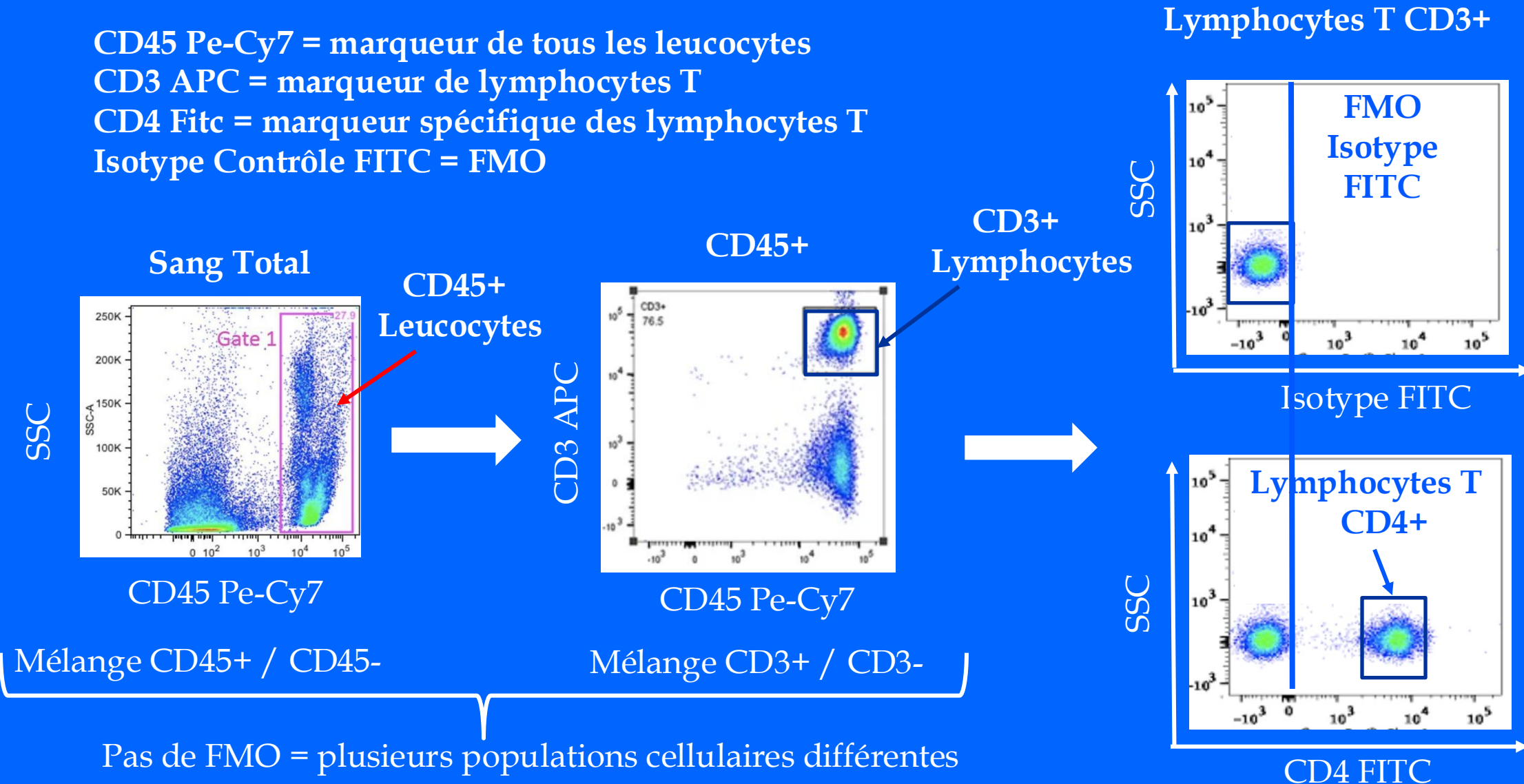
Exemple d'un Multi-Marquage CD4 Fitc dans un panel 3 couleurs:

CD45 Pe-Cy7 = marqueur de tous les leucocytes

CD3 APC = marqueur de lymphocytes T

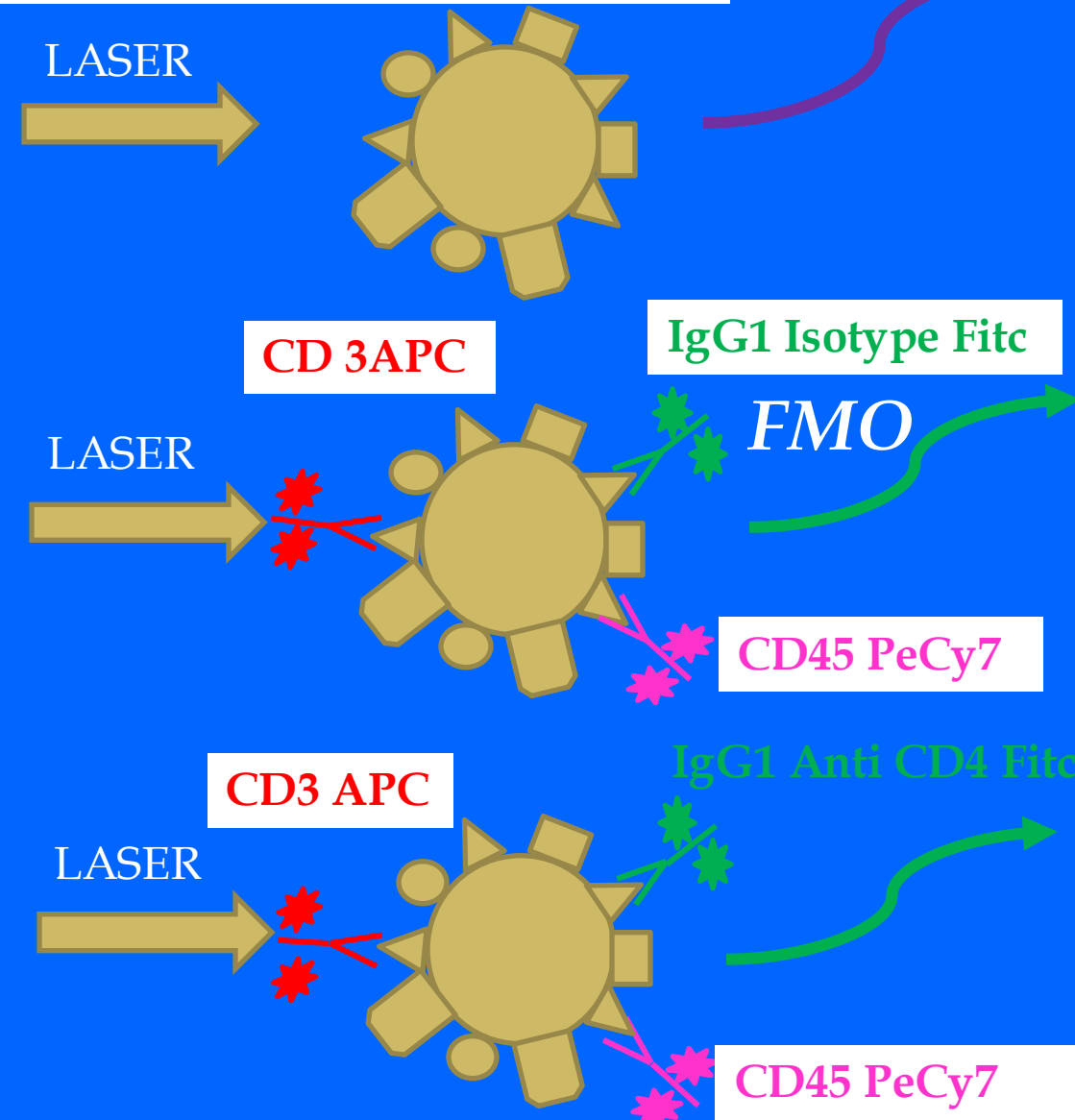
CD4 Fitc = marqueur spécifique des lymphocytes T

Isotype Contrôle FITC = FMO

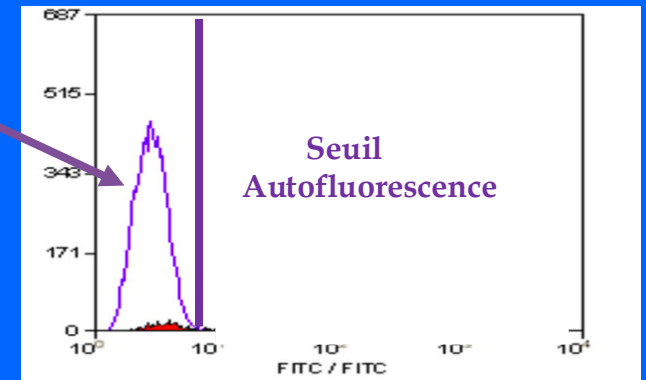


MULTI-MARQUAGE EN CYTOMETRIE

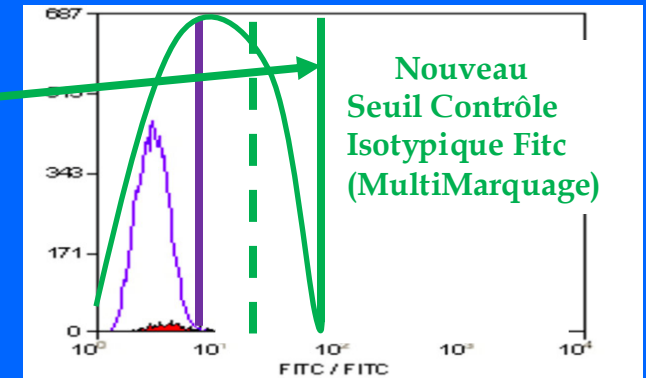
Exemple d'un marquage CD4 Fitc dans un multimarquage



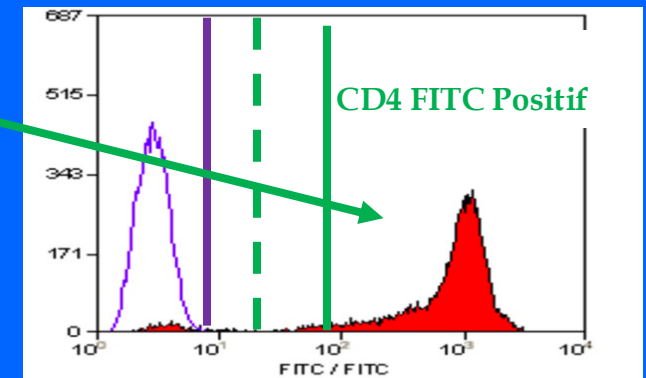
AUTOFLUORESCENCE



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

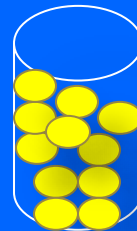


SANG

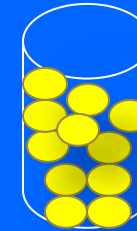


SERUM

Tube FMO
(Tube Contrôle)



Tube Multicouleurs
(Tube Test)

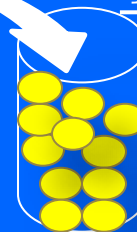


Saturation Récepteur Fc

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

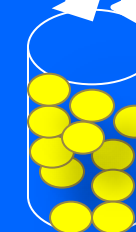


IgG1 CD3 PE

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



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