

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):
    - Cytométre
    - 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

CYTOMETRIE EN FLUX

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):

   Cytométre
   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				Intervalles de référence	Antériorité
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

Cytométre (analyseur)



Trieur à haute vitesse (Trieur)



Qu'est ce que la cytométrie en flux?



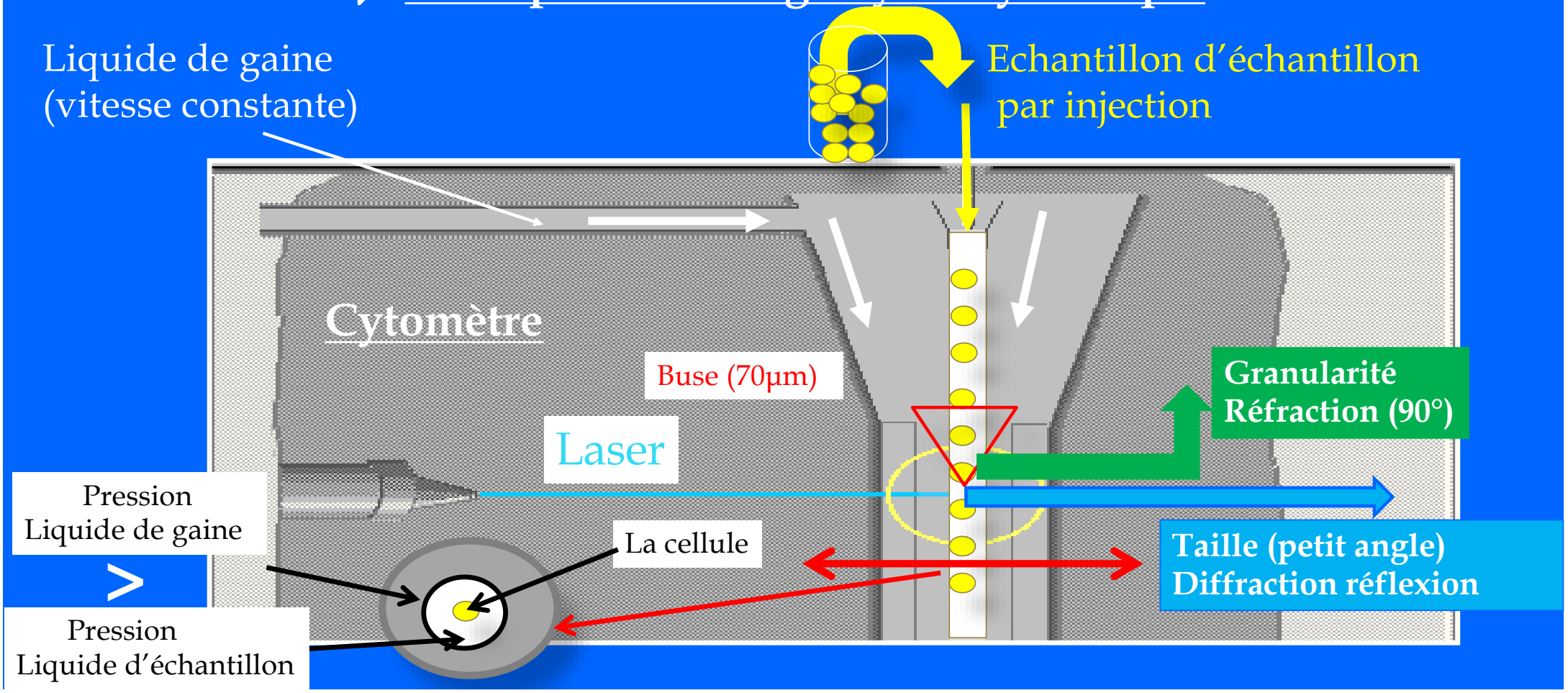
C'est une technologie permettant la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule.

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.

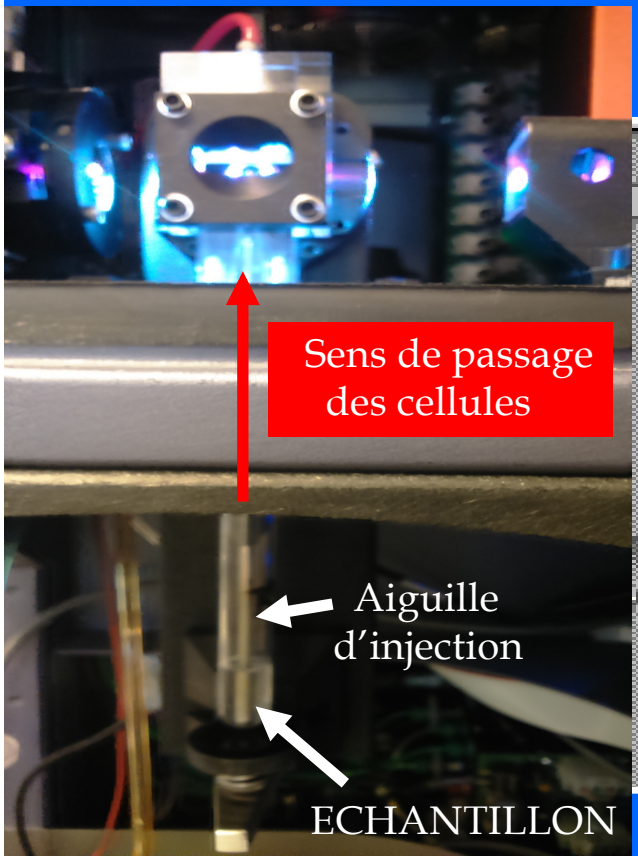
Comment analyser toutes les cellules dans un mélange hétérogène?

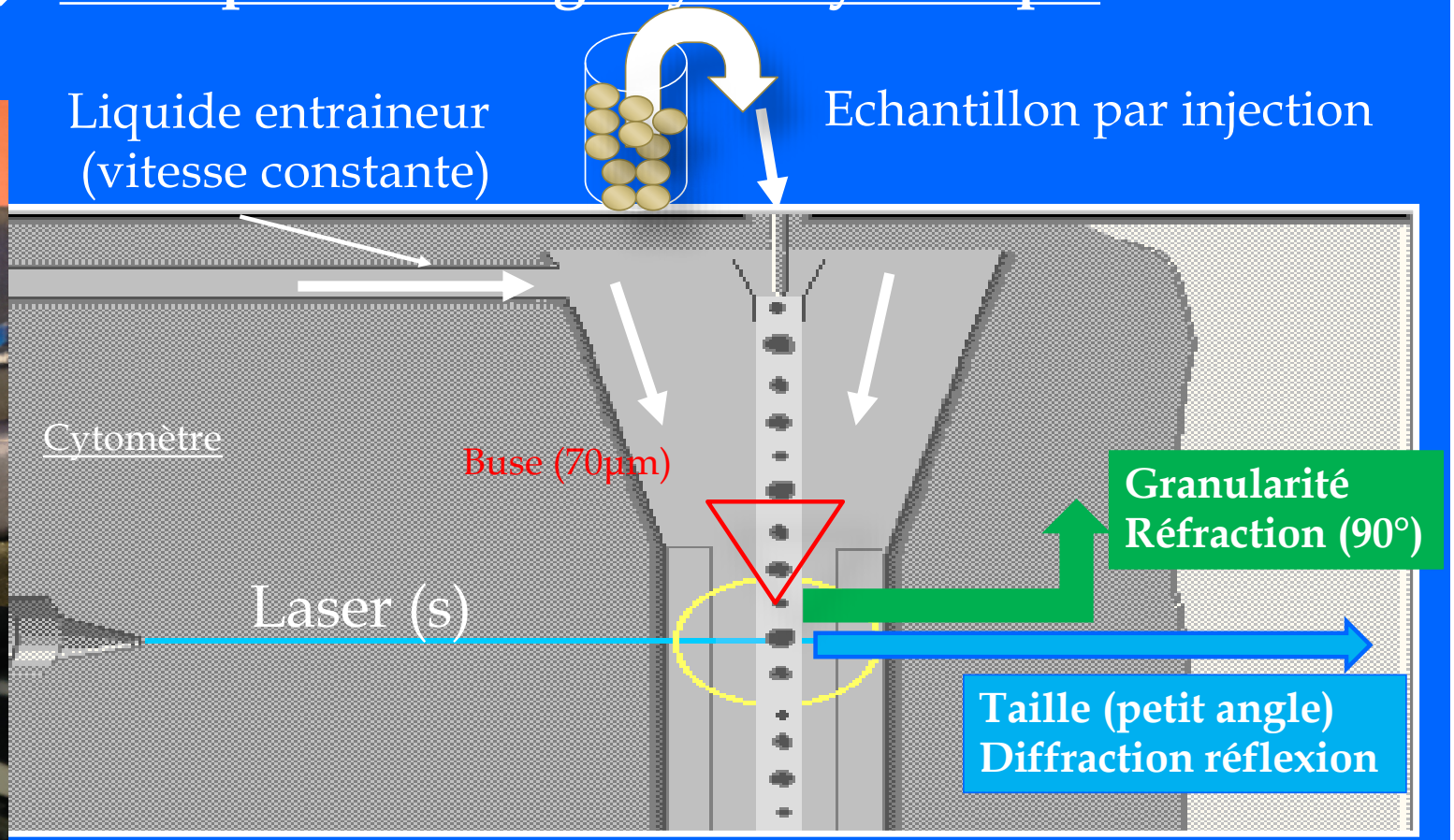
Principe du centrage hydrodynamique



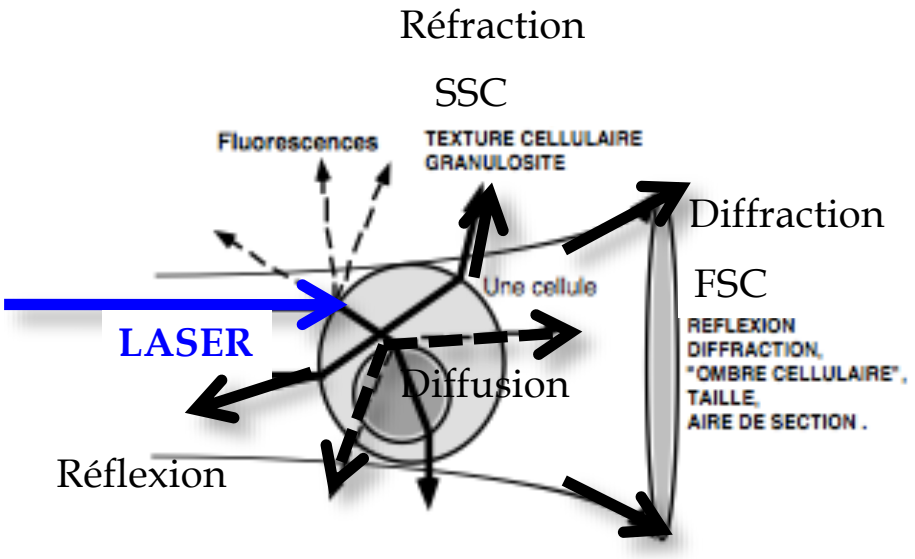
Comment analyser toutes les cellules dans un mélange hétérogène?

Principe du centrage hydrodynamique

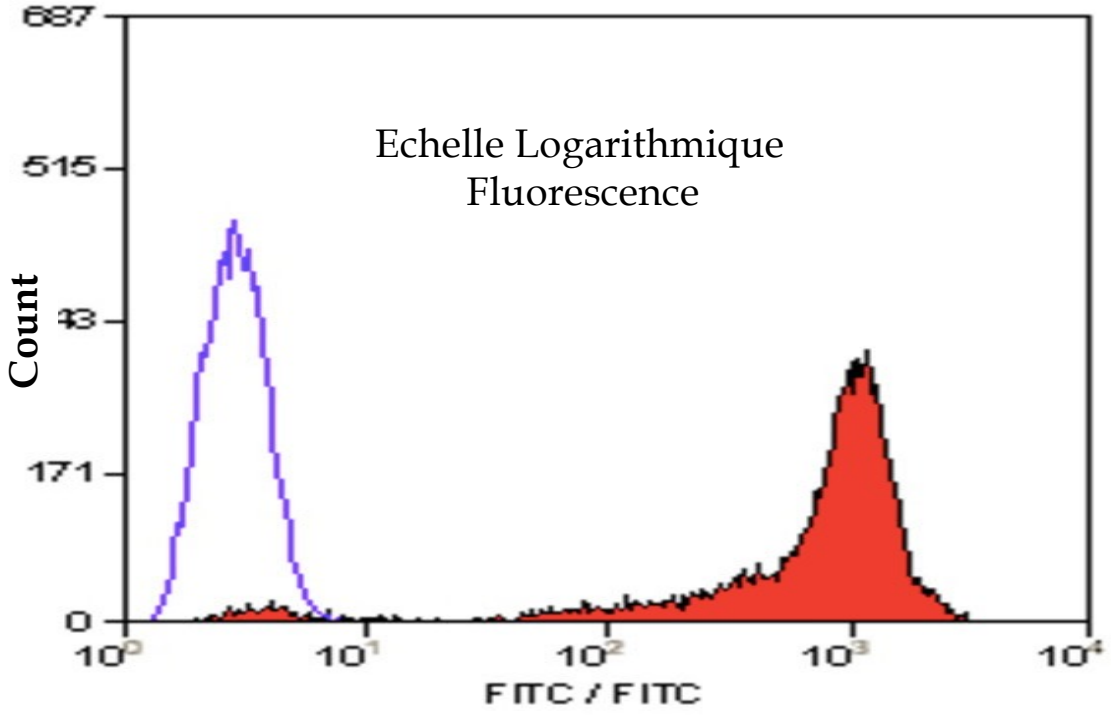




Représentation graphique de l 'échantillon

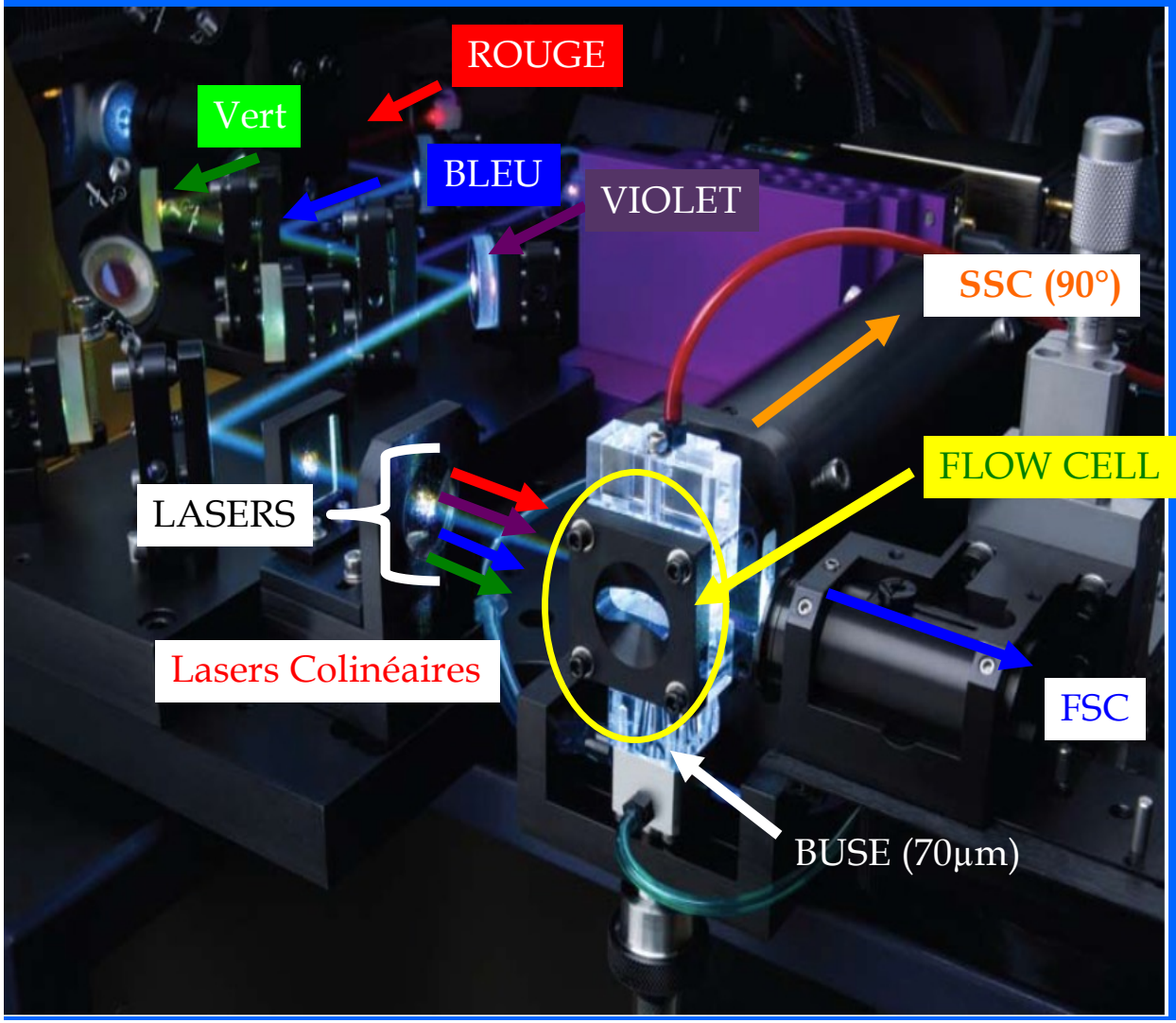


HISTOGRAMME

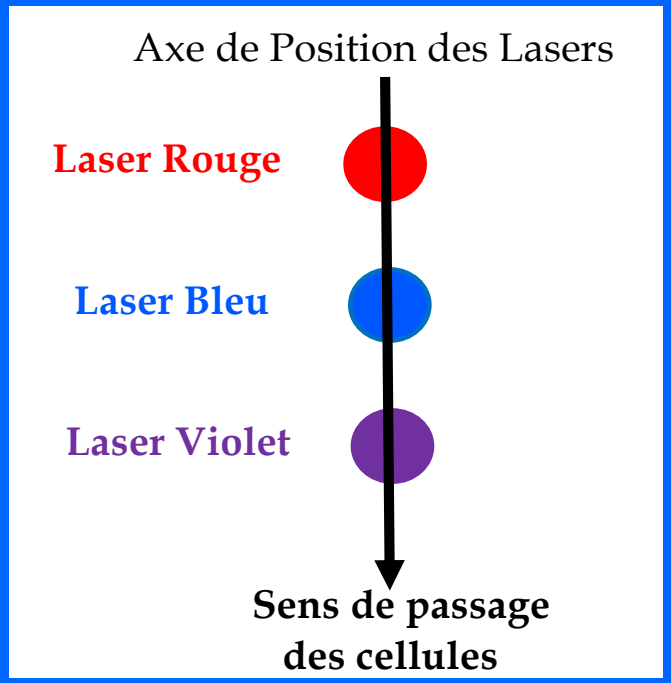


SANG TOTAL

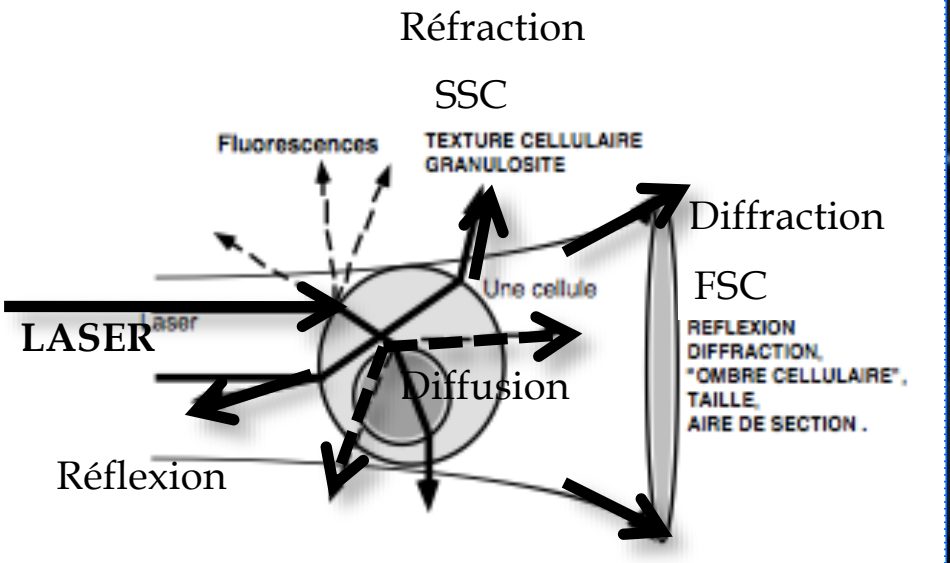
FLOW CELL (Chambre de lecture)



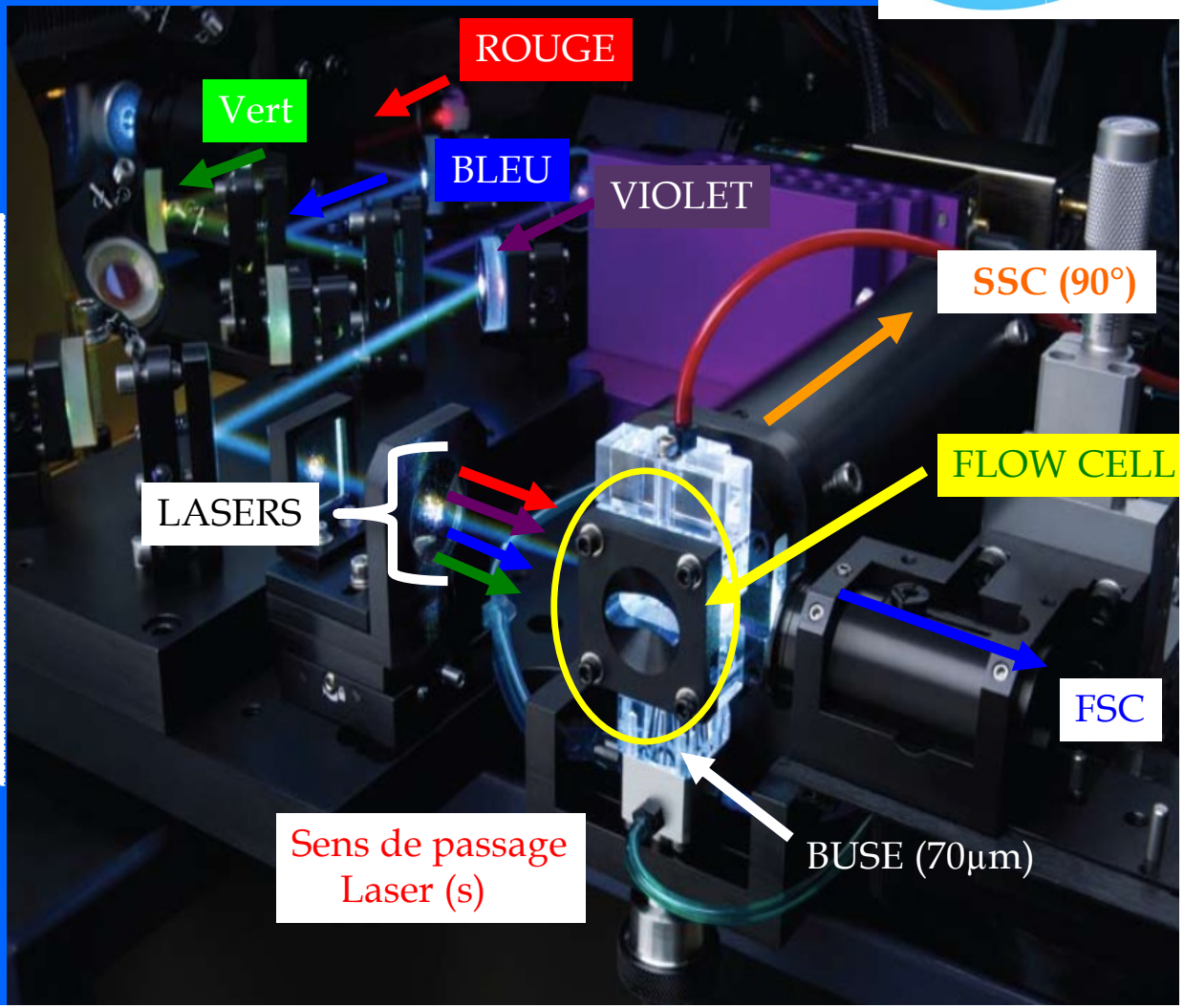
Lasers Colinéaires



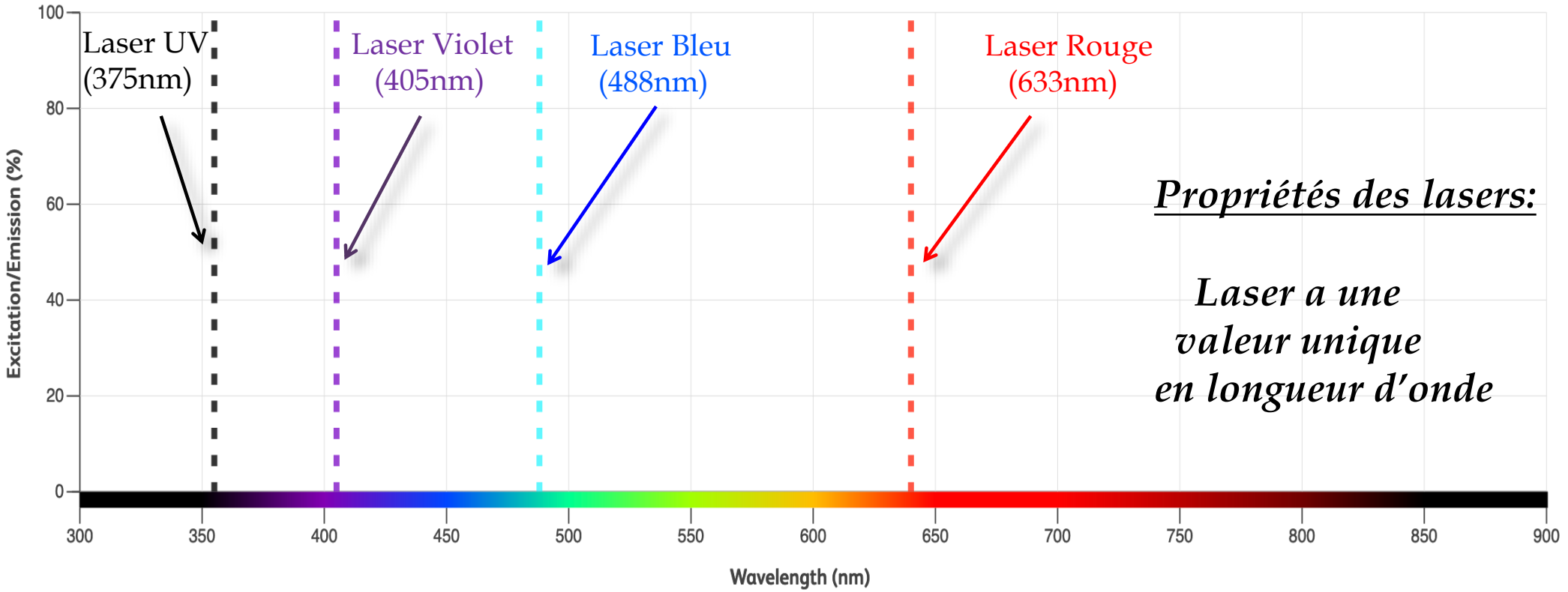
FLOW CELL (Chambre de lecture)



FSC = Forward Side Scatter
SSC = Side Scatter



SPECTRE D'EMISSION et D'ABSORPTION de DIVERS FLUORCHROMES



Propriétés des lasers:

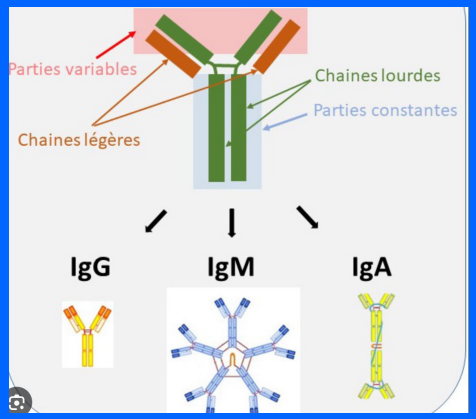
Laser a une valeur unique en longueur d'onde

SPECTRE DU VISIBLE (300 à 900 nm)

Immunotypage des cellules en cytométrie en flux

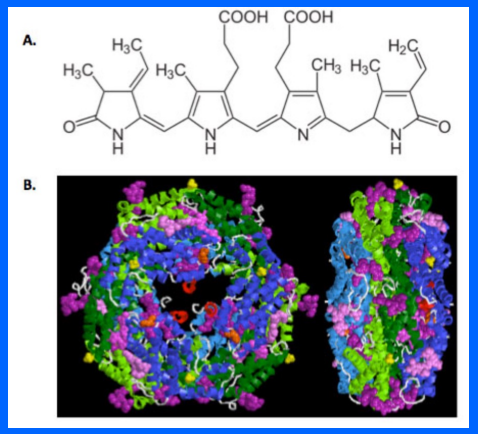
Anticorps couplés à des Fluorochromes

Anticorps



3 types Anticorps (Ac)

Fluorochromes



LASER

Flacons Cytométrie



Divers Fluorochromes

Immunotypage des cellules en cytométrie en flux

Grand nombre de Combinaisons Anticorps couplés à des Fluorochromes

CD3 = Antigène spécifique des lymphocytes T

Flacons Cytométrie



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)

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)

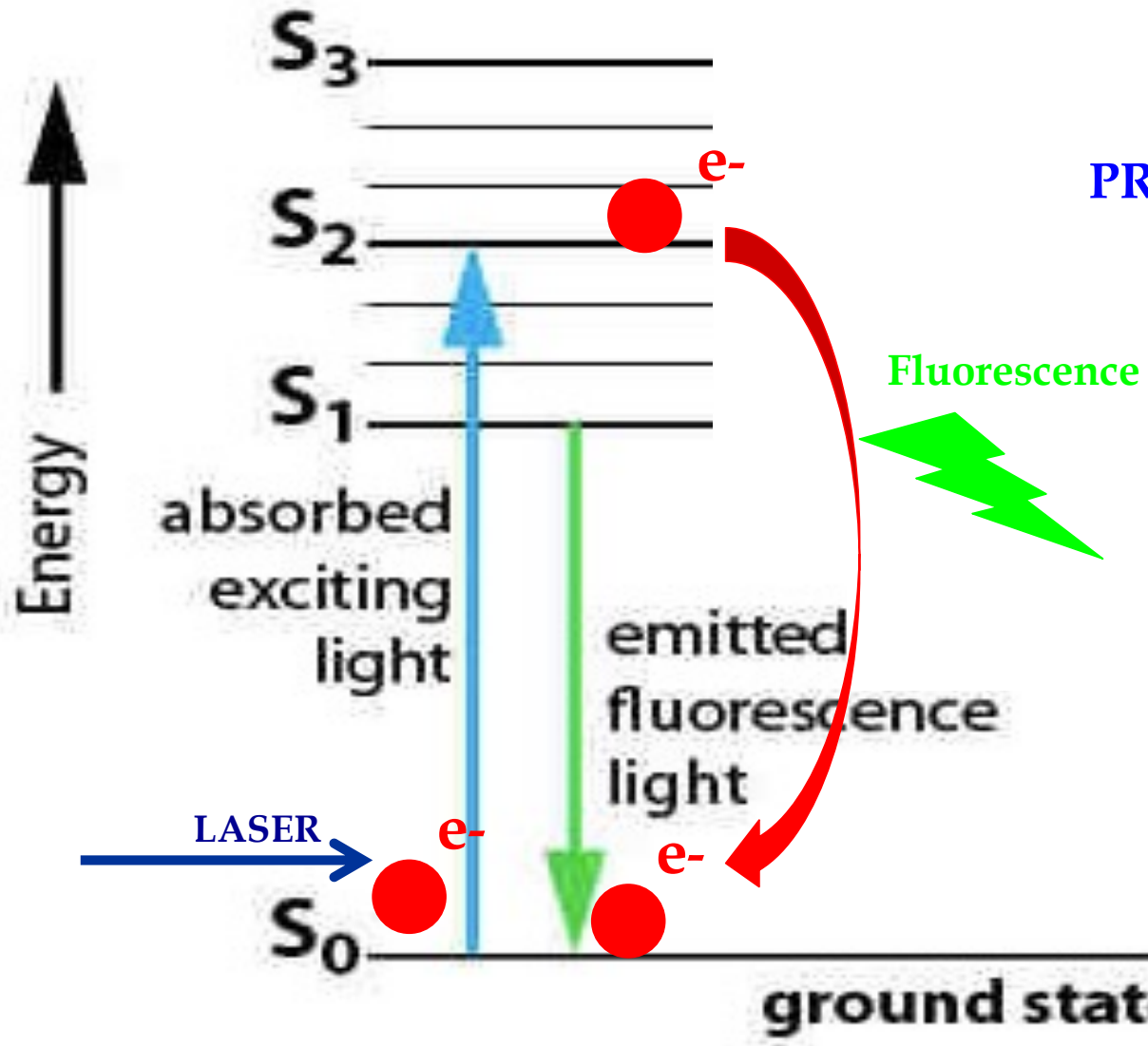
2) **Fluorochromes conjugués à un tandem:**
   Anticorps couplés directement à un couple de deux fluorochromes (Pe-Cy5, APC-Cy7)

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

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

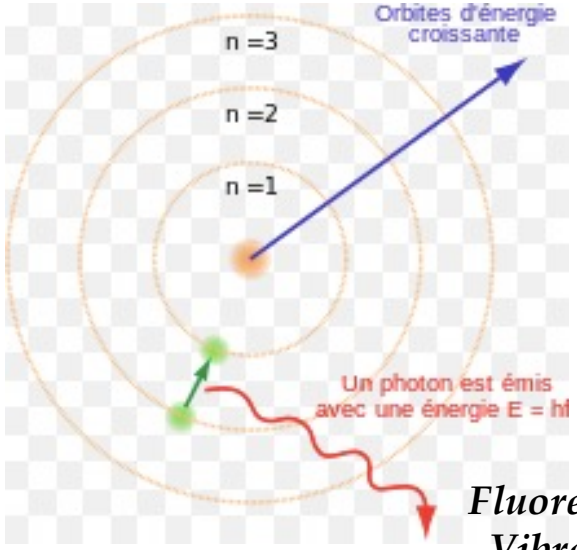
5) **Fluorochromes rapporteurs:** Protéines fluorescentes (Green Protein Fluorescent)

DIAGRAMME DE JABLONSKI



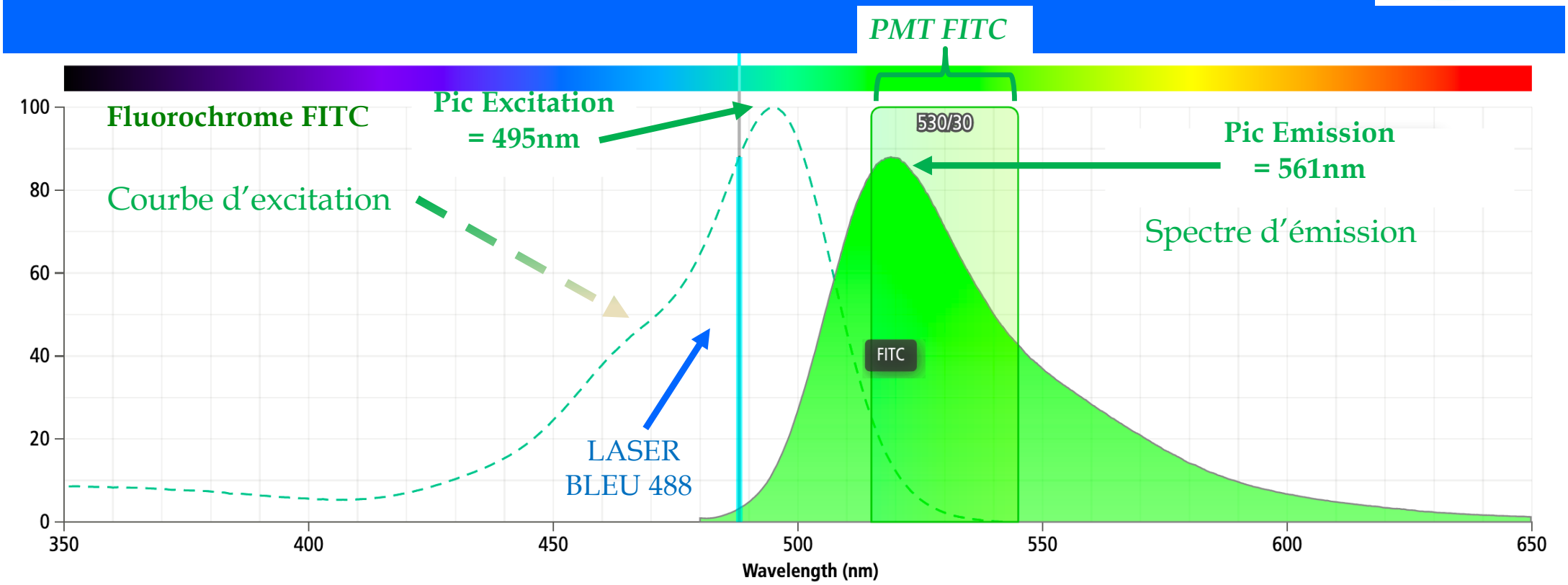
PRINCIPE DE FLUORESCENCE

Fluorescence



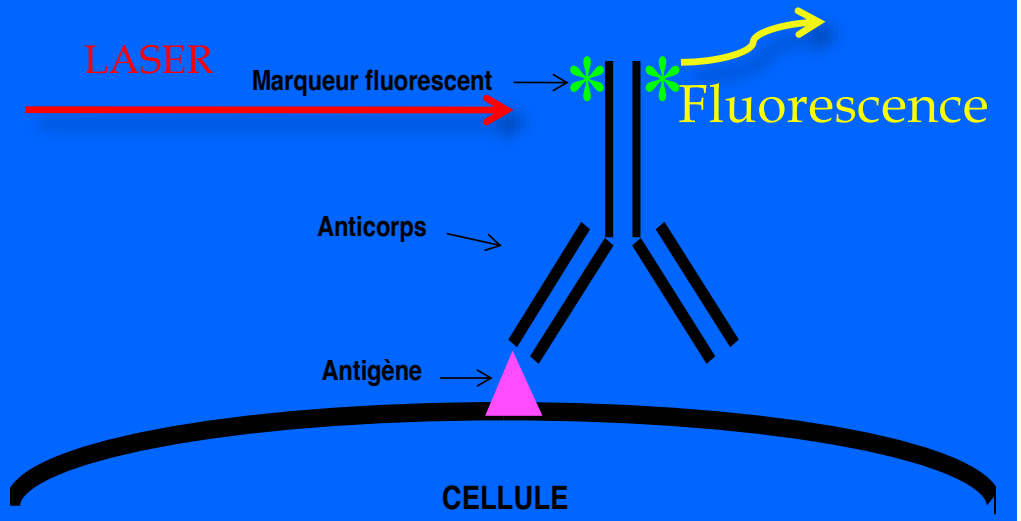
Fluorescence
Vibration
Chaleur

SPECTRE D'UN FLUOROCHROME



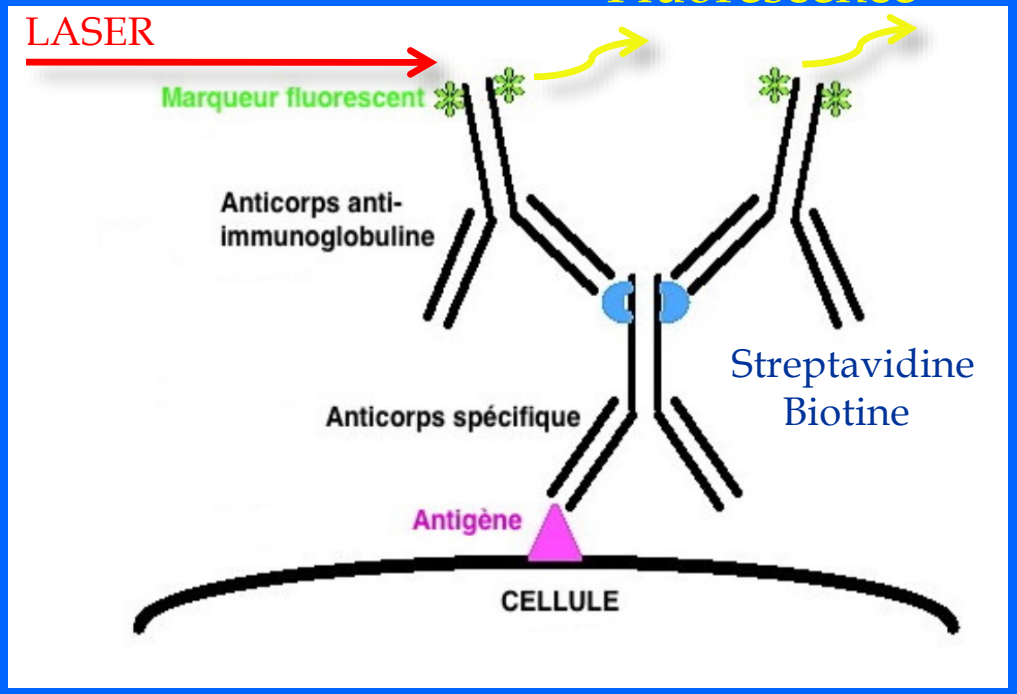
Longueur d'onde d'émission plus grande que la courbe d'excitation, mais d'énergie plus faible

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



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

DIRECT



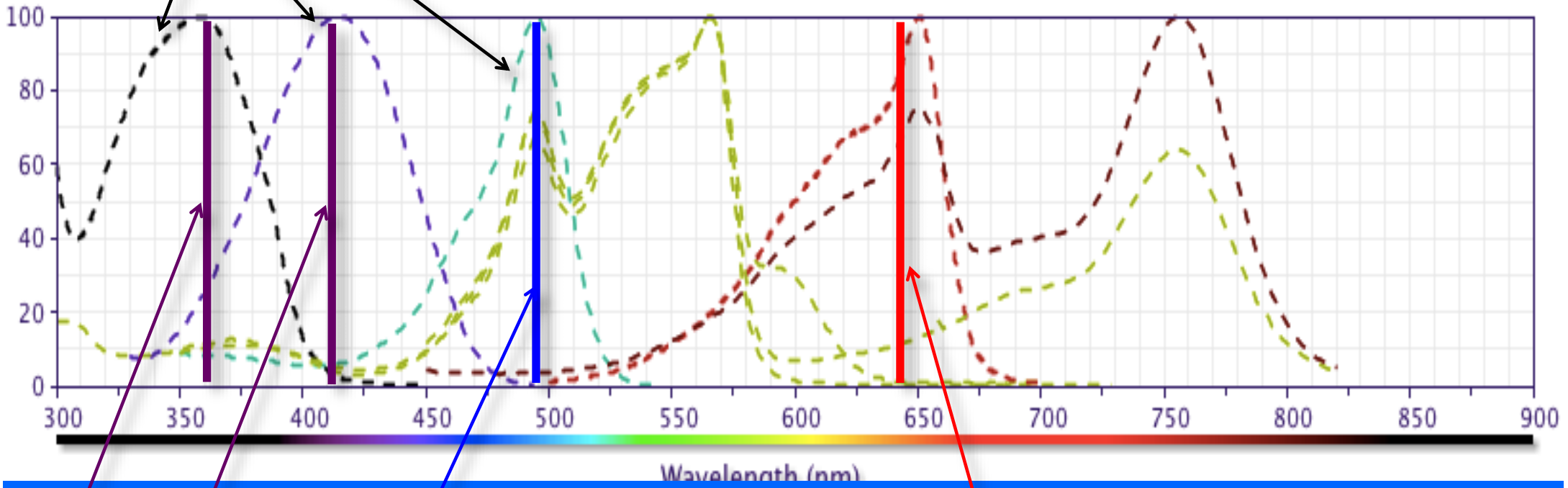
Amplification du signal et du bruit de fond
Peu d'antigènes

INDIRECT

IMMUNOMARQUAGE ASSOCIE A UNE FLUORESCENCE

SPECTRE D'EMISSION et D'ABSORPTION de DIVERS FLUORCHROMES

Courbes d'excitation correspondant à 8 fluorochromes différents



Laser UV (375nm)

Laser Violet (405nm)

Laser Bleu (488nm)

Laser Rouge (633nm)

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

PRINCIPAUX FLUOROCHROMES UTILISES en CYTOMETRIE

Fluorochromes

	Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)*	Em-Max (nm)	Numéros des canaux de fluorescence dans un cytométre
Hoescht 3342	**Hoechst 33342**	Blue	350	355, 375	461	
BD V421	**Brilliant Violet 421**	Blue	407	405	421	
BD V450	**BD Horizon V450**	Blue	404	405	448	
Pacific Blue	**Pacific Blue™**	Blue	401	405	452	
BD V500	**BD Horizon V500**	Green	415	405	500	
	AmCyan	Green	457	405	491	
	Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519	
FITC	**FITC**	Green	494	488	519	FL1
PE	**PE**	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578	FL2
	BD Horizon PE-CF594	Orange	496, 564	488, 532, 561	612	
IP	**PI**	Orange	351	488, 532, 561	617	FL2 /FL3
7-AAD	**7-AAD**	Red	543	488, 532, 561	647	FL3
APC	**APC†**	Red	650	633, 635, 640	660	FL4
	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-Cy5.5	**PerCP-Cy™5.5**	Far Red	482	488, 532	695	FL4
	Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719	
Pe-Cy7	**PE-Cy™7**	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785	FL5
APC-Cy7	**APC-Cy7**	Infrared	650	633, 635, 640	785	
	BD APC-H7	Infrared	650	633, 635, 640	785	

Phénotype Cellulaire et Cluster de différenciation (CD)

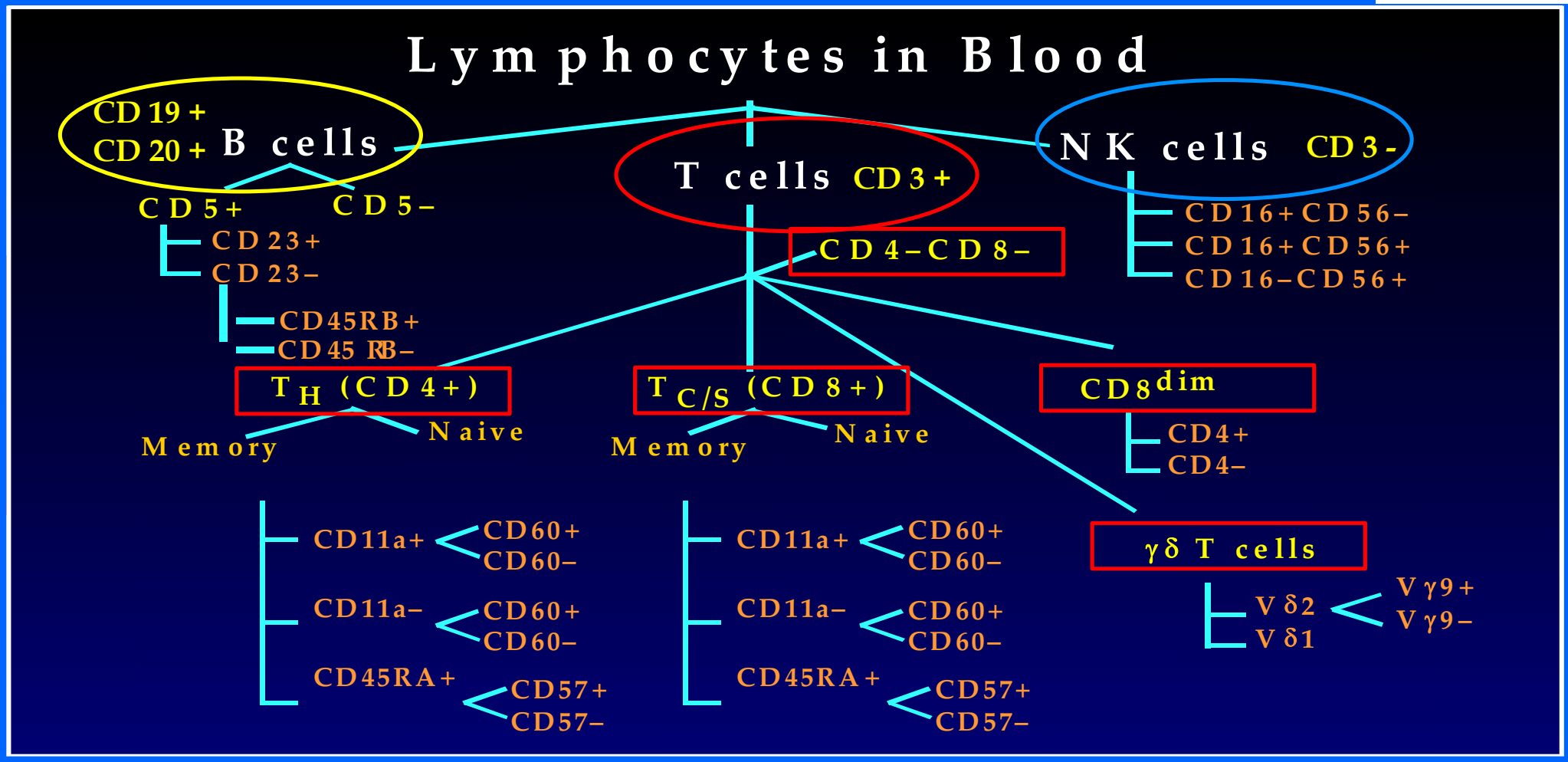
- Toutes les cellules possèdent des antigènes de surface qui peuvent être reconnus par des anticorps.
- Les cellules expriment différents antigènes suivant leur maturité et leur lignage
- Ces différents antigènes vont donc aider à les caractériser:
  - déterminer le type cellulaire
  - et le stade de 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

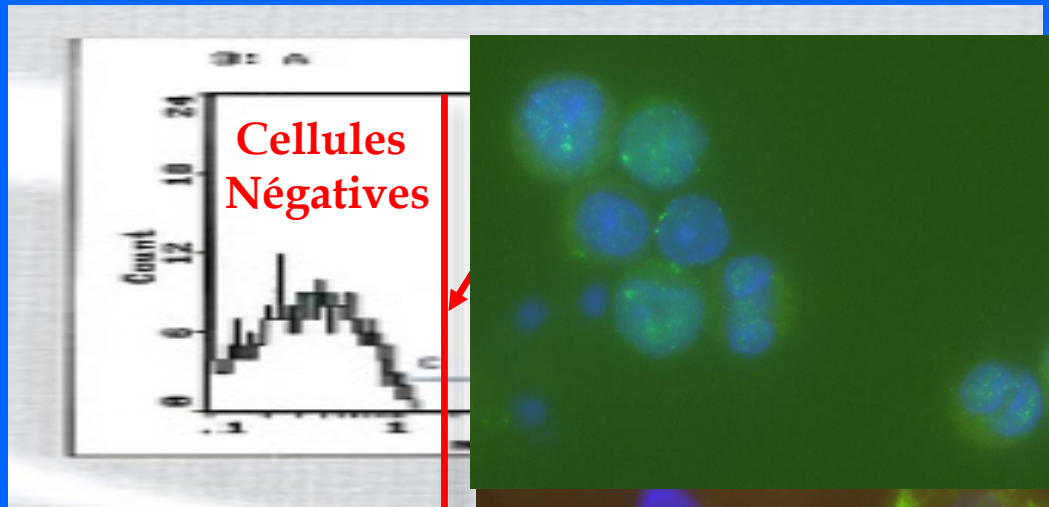
	Key Antigens-Human		Key Antigens-Human
T Cell 	CD3 CD4 CD8	**Monocyte** 	CD33
B Cell 	CD19 CD20	**Granulocyt** 	CD66b
Dendritic C 	CD11c CD123	**Platelet** 	CD41 CD61 CD62
NK Cell 	CD56	**Erythrocyte** 	CD235a
Stem Cell 	CD34	**Endothelial** 	CD146
Macropha 	CD14	**Epithelial** 	CD326

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



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

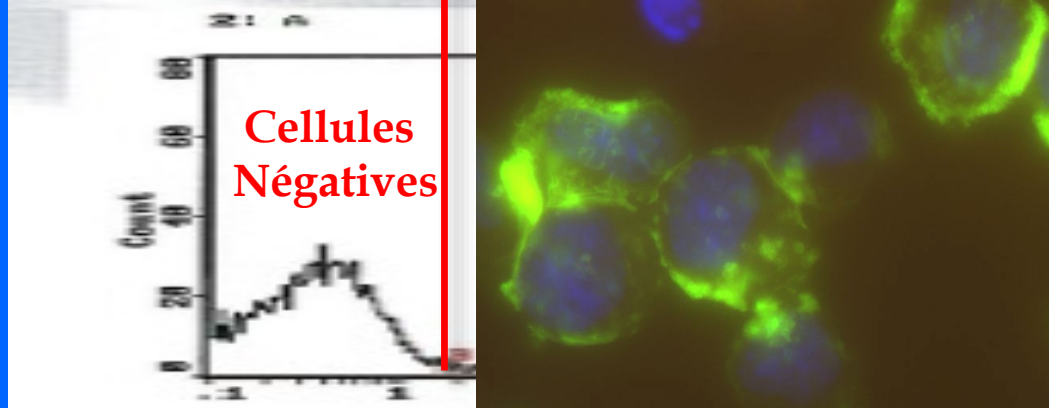
Tube Négatif





FITC non spécifique
ôle FITC

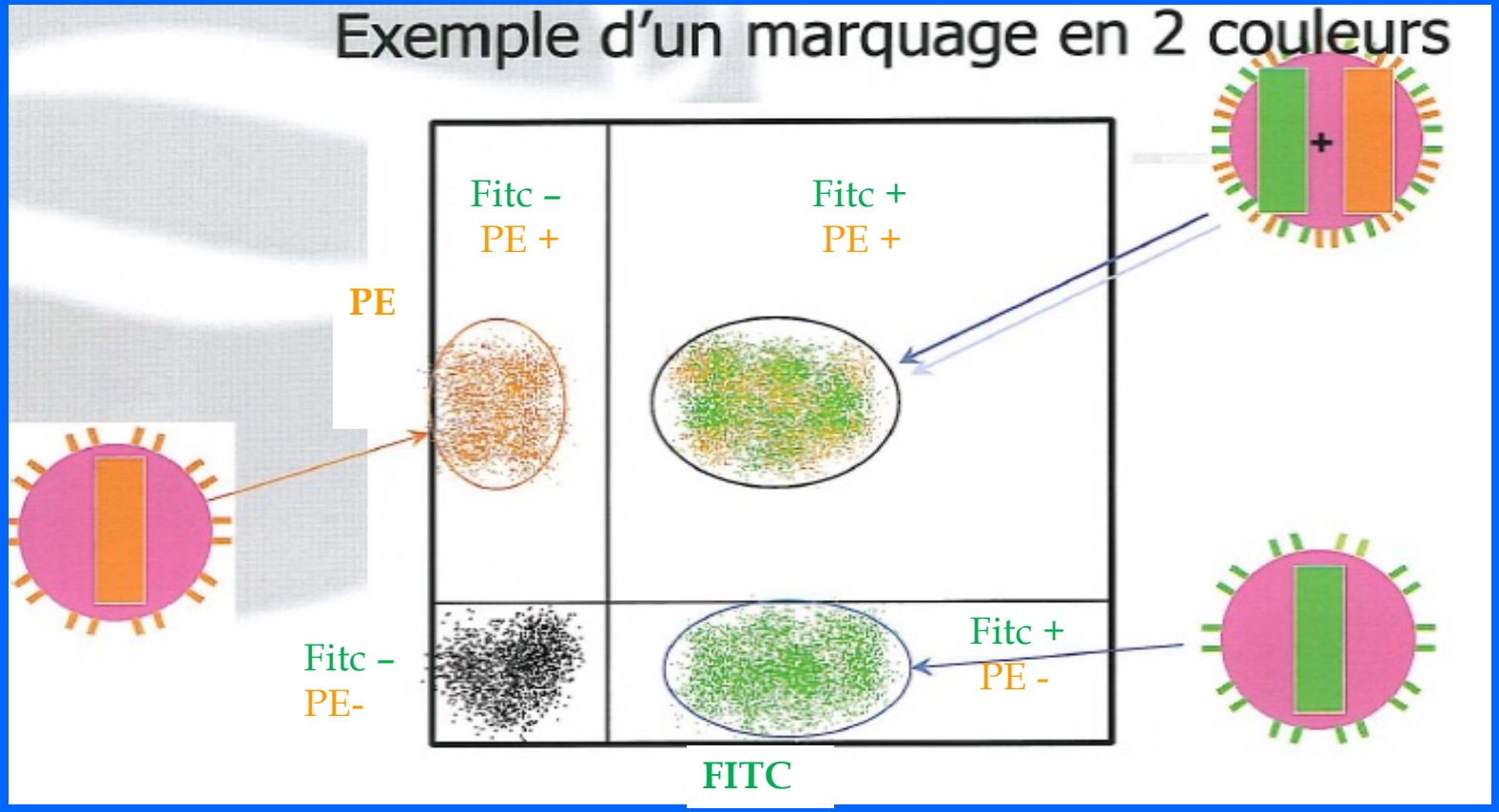
Tube Positif



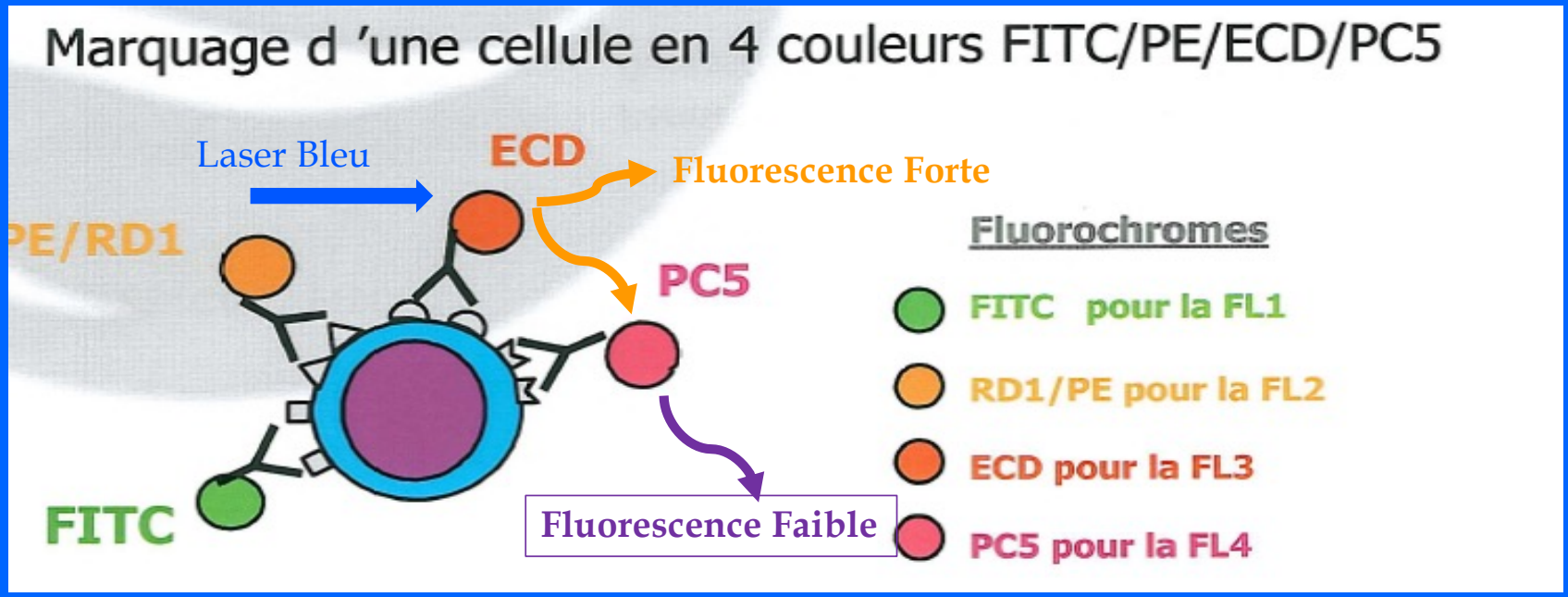


D8 FITC

Représentation graphique Bi-Paramétrique
Deux fluorochromes



MULTIMARQUAGES D'UNE CELLULE

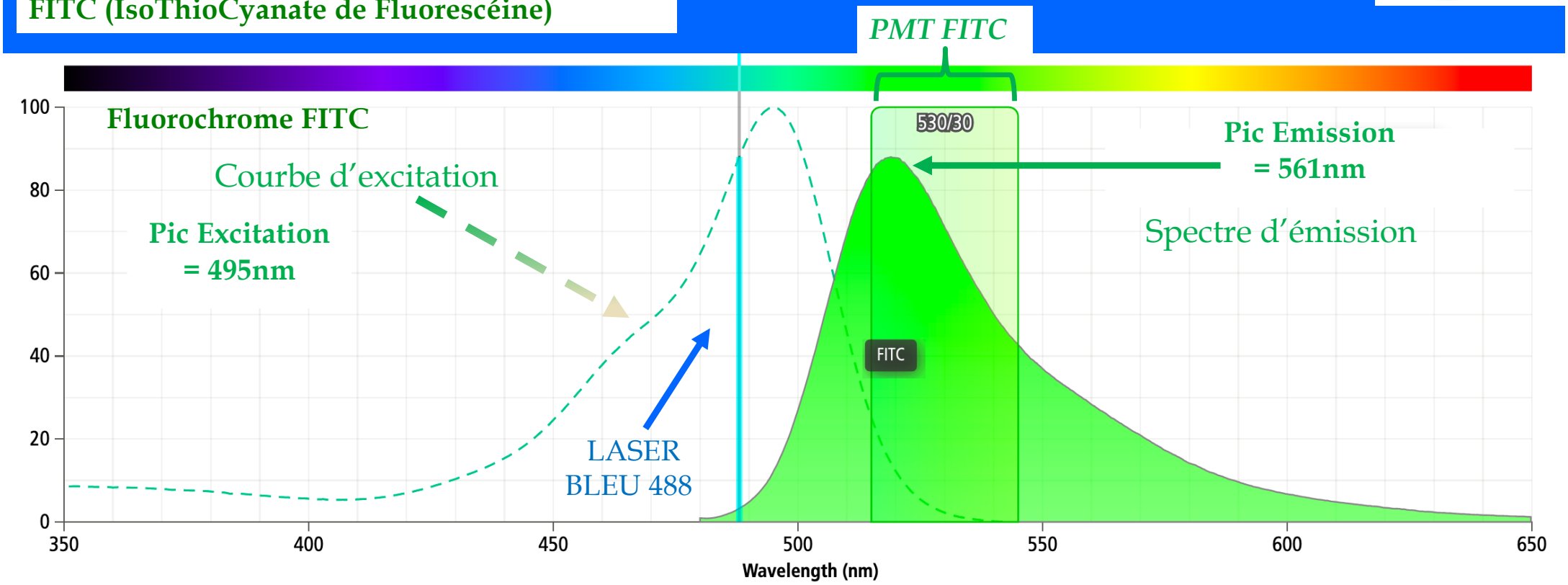


Problèmes:

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

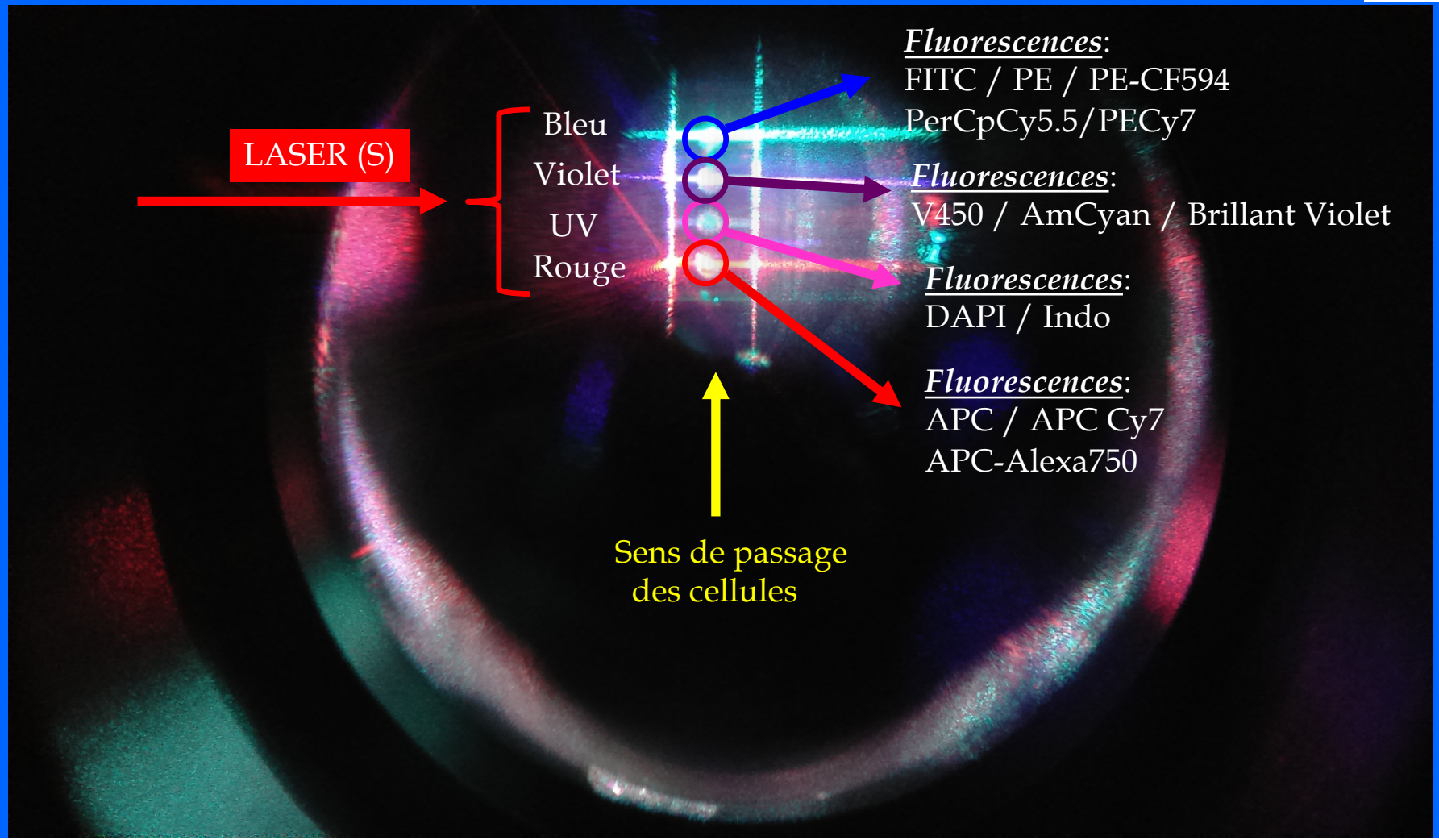
SPECTRE D'UN FLUOROCHROME

FITC (IsoThioCyanate de Fluorescéine)

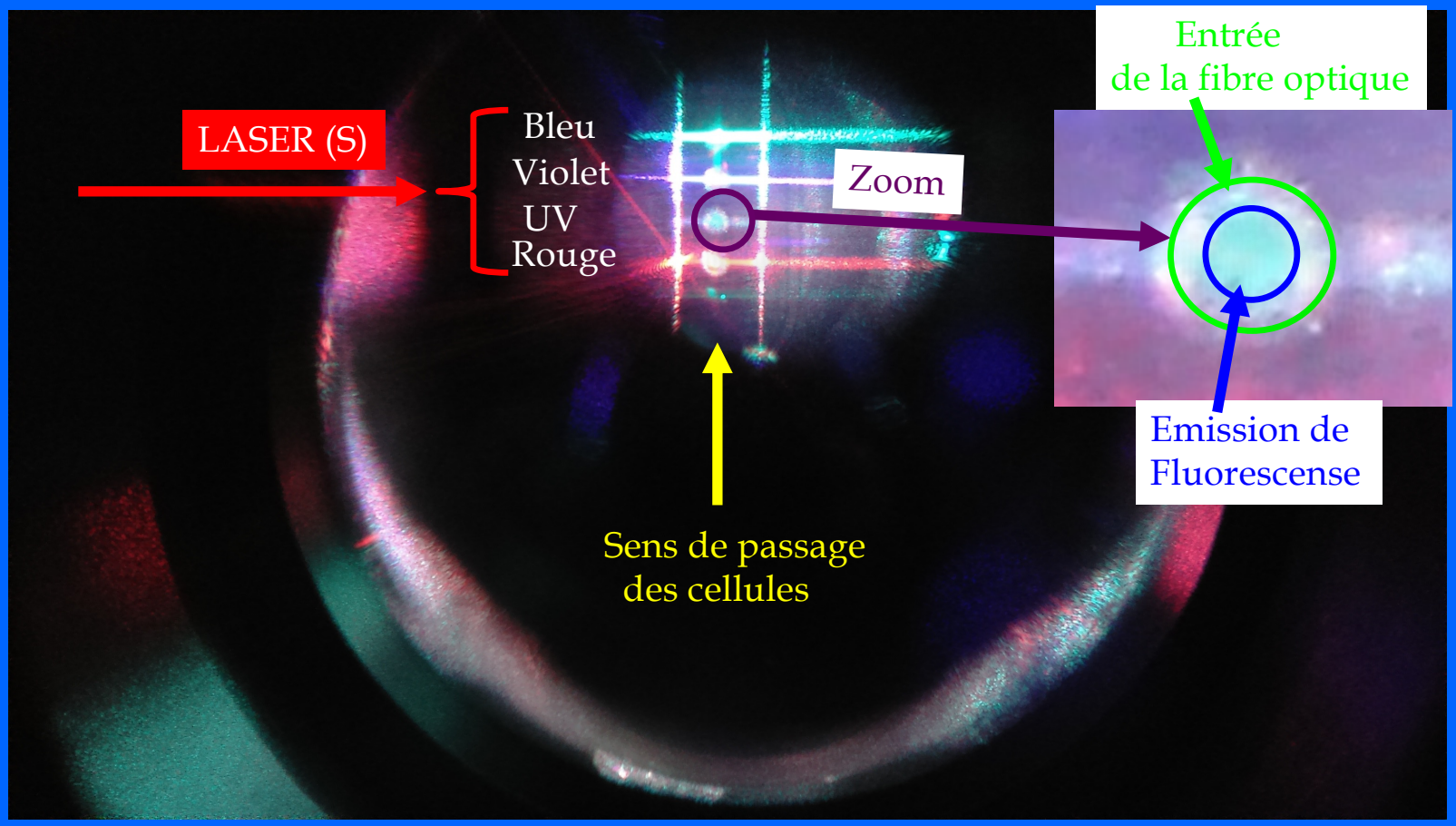


La fluorescence émisse sera détecter par le PhotoMultiplicaTeur (PMT)

FLOW CELL (Chambre de lecture)



FLOW CELL (Chambre de lecture)



SYSTEME OPTIQUE = FILTRE + PMT

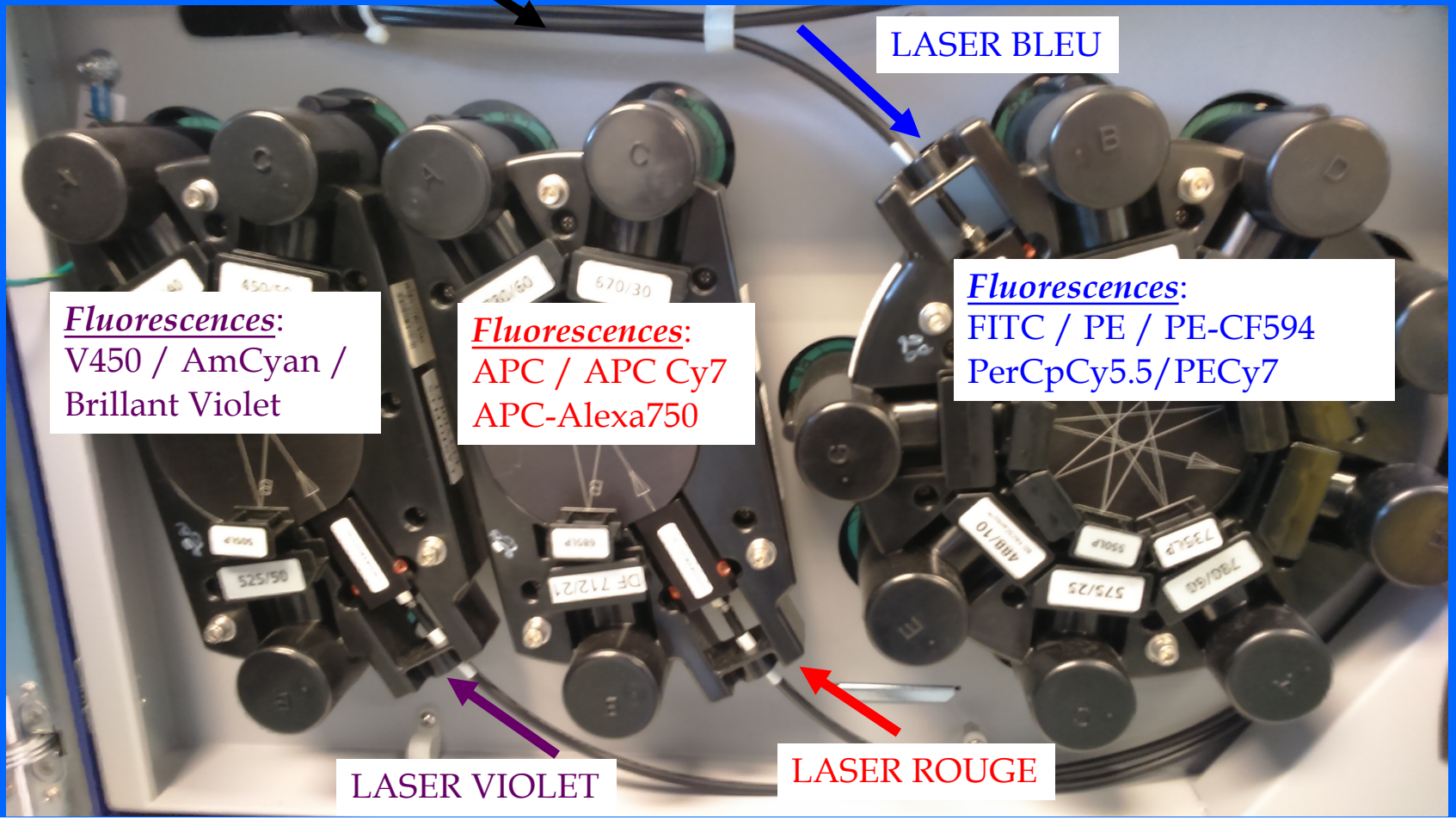


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)

LASER BLEU

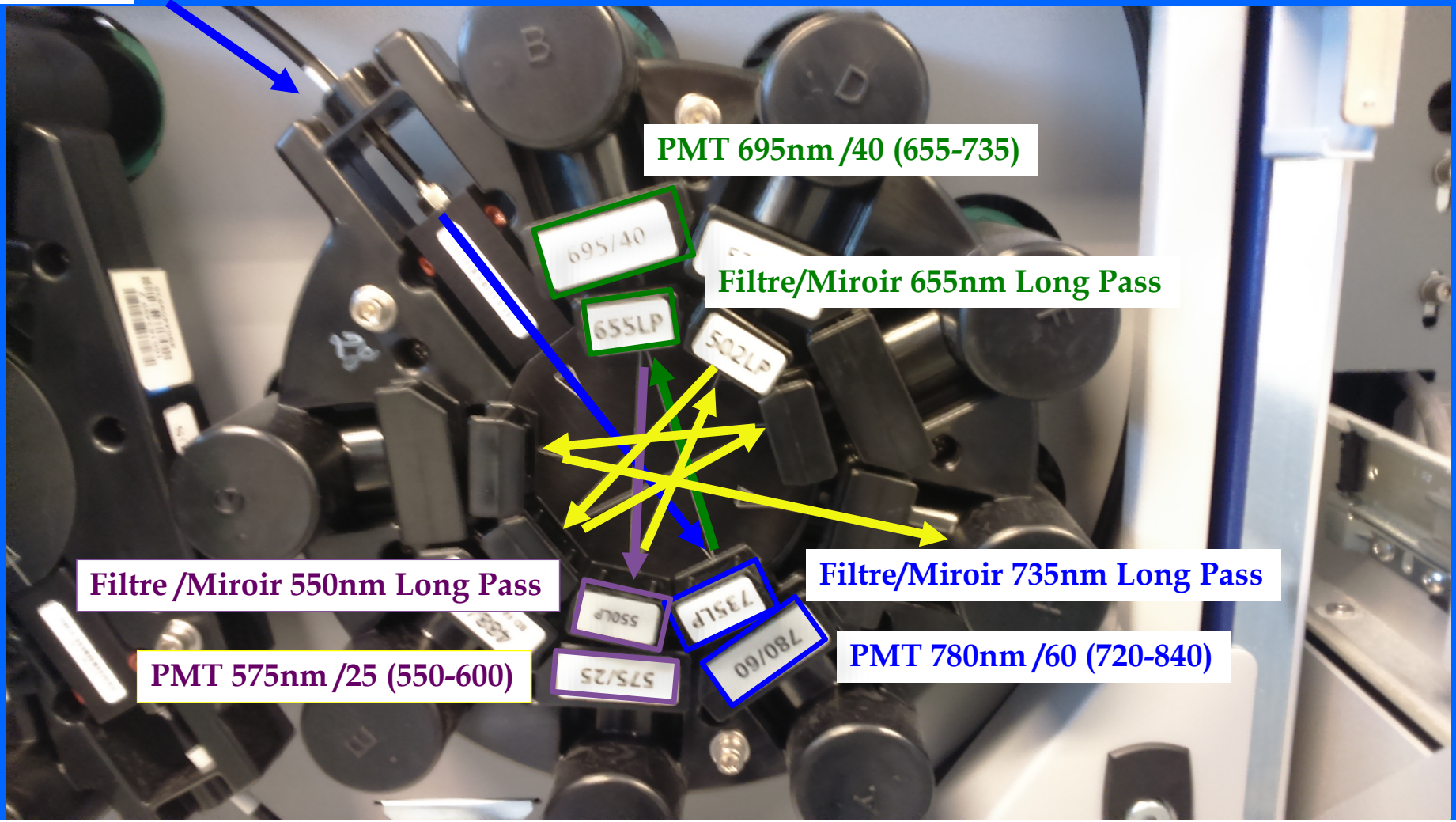
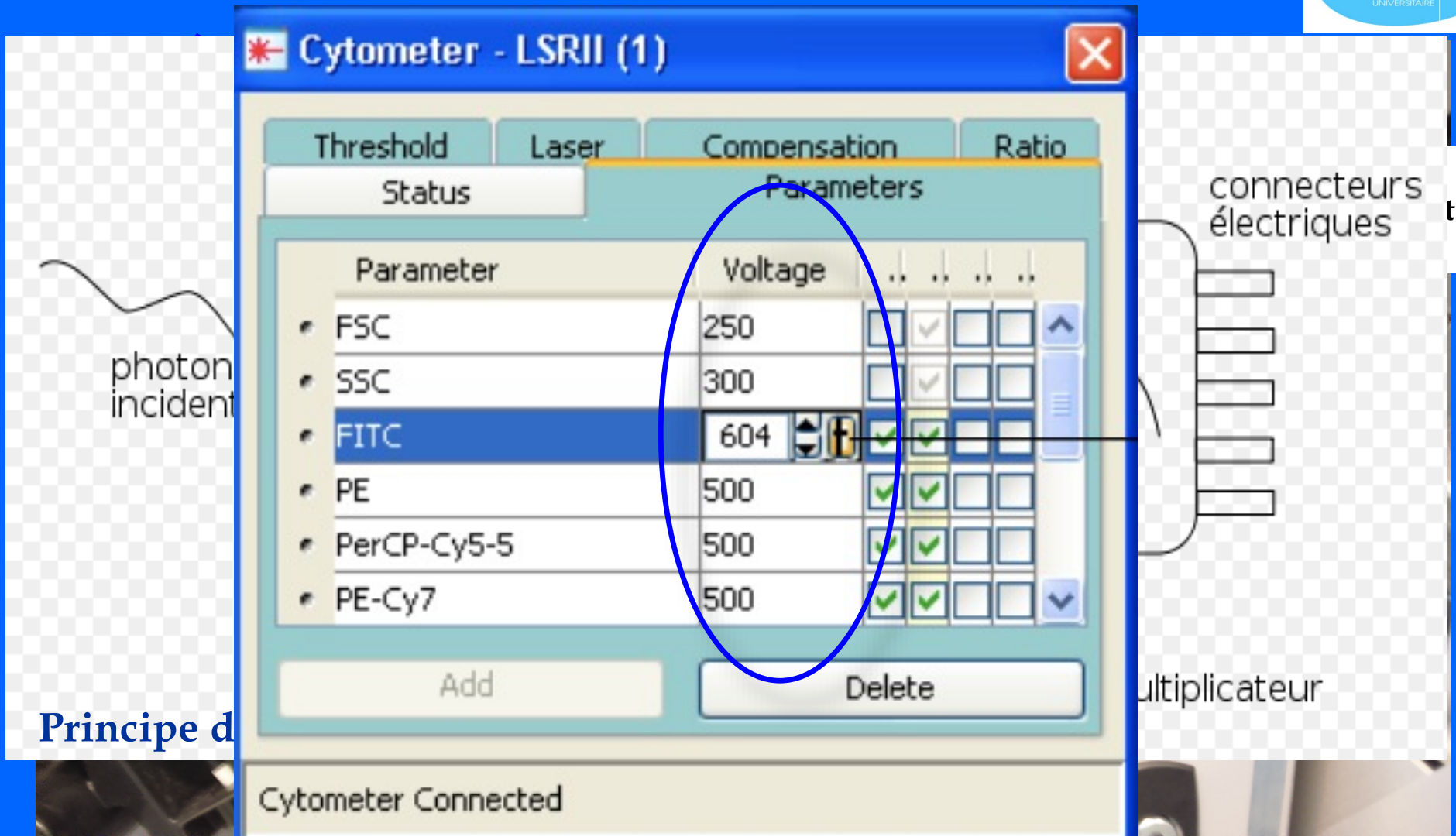
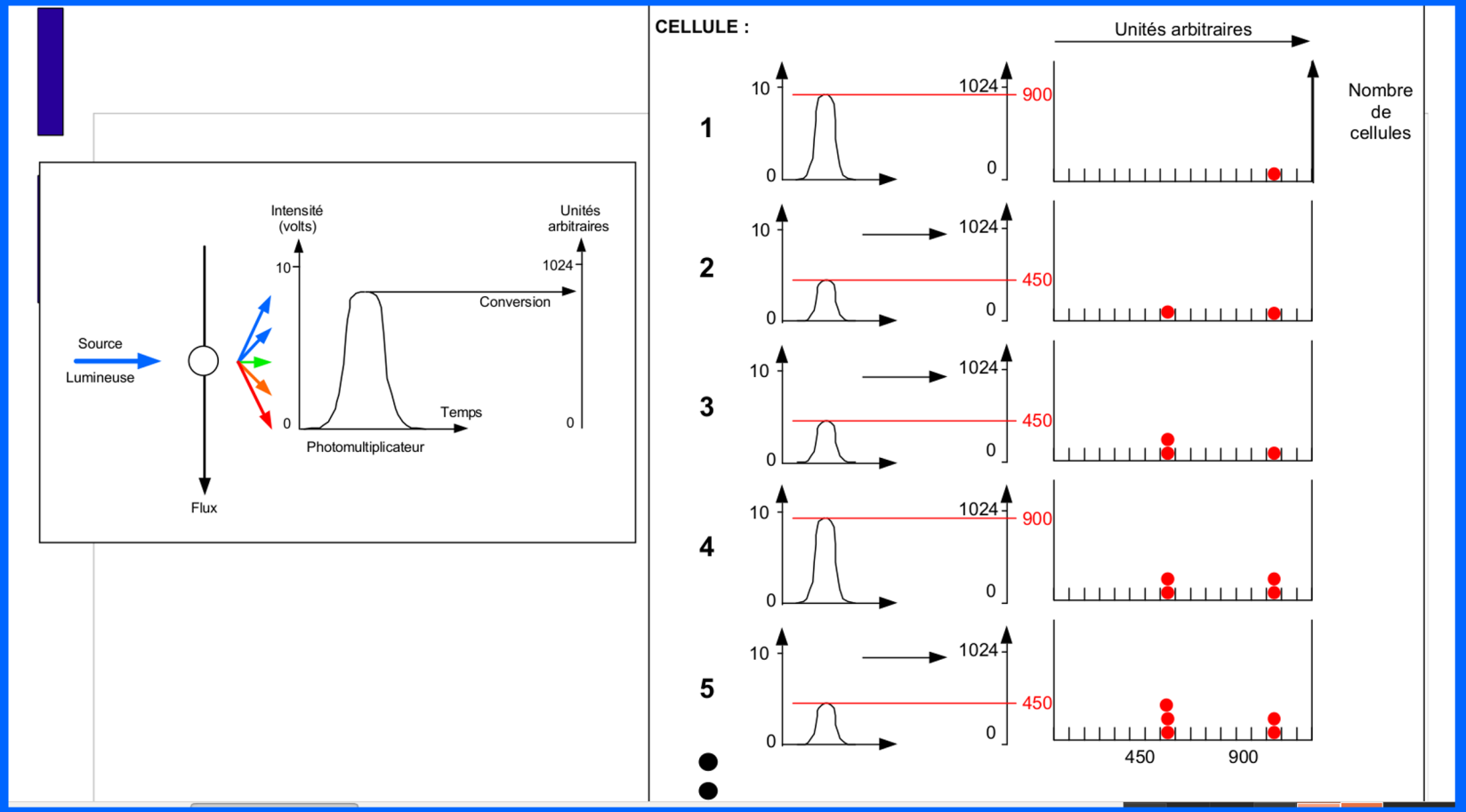


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)



Conversion des signaux



Transformation du signal optique en numérique

Etape 1

LASER

CELL

Fluorescence

Etape 2

TOUTES les Fluorescences

Miroir Dichroïque

Filtre Long Pass

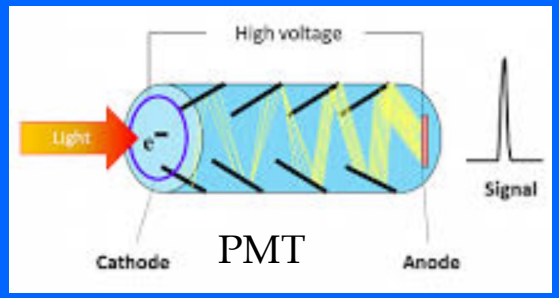
Une Seule Fluorescence

Etape 3

PhotoMultiPlicateur (Voltage)

Fluorescence

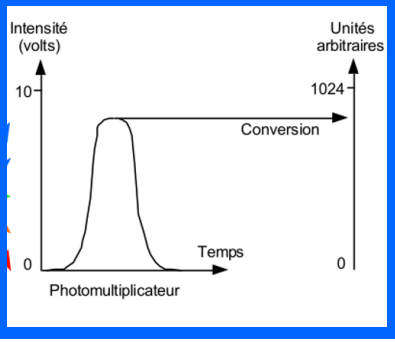
Photons



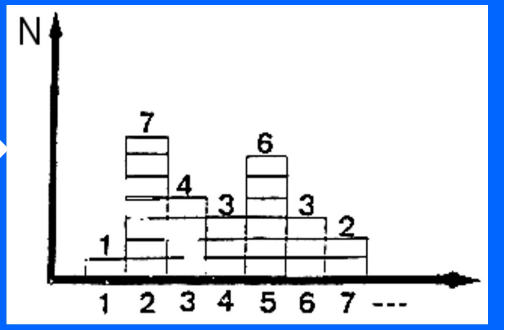
PMT

Etape 4

Intensité électrique en fonction du temps

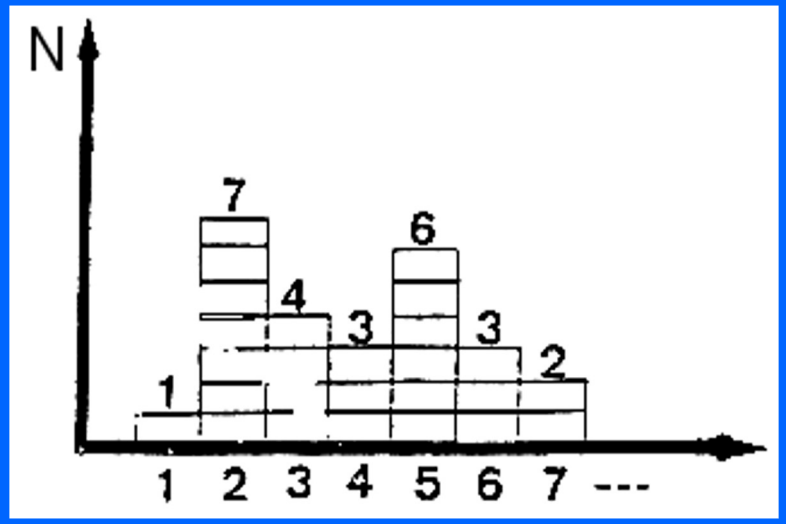


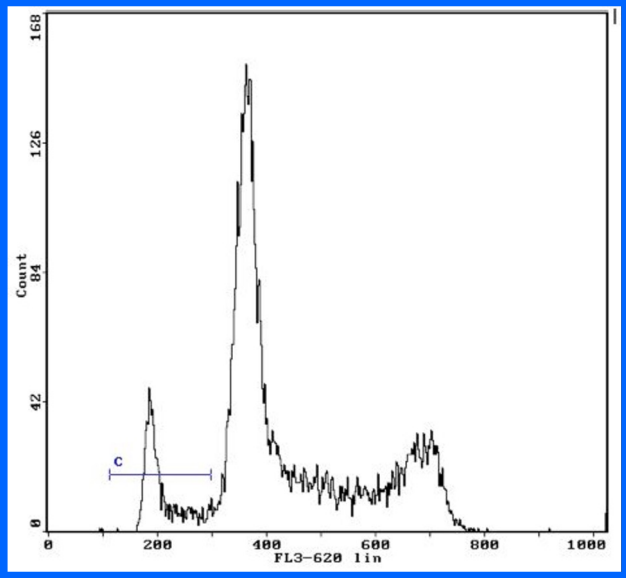
Fréquence d'intensité



Conversion des signaux

Nombre d'évènements (cellules)/canal





Intensité du paramètrede 0 à 1024

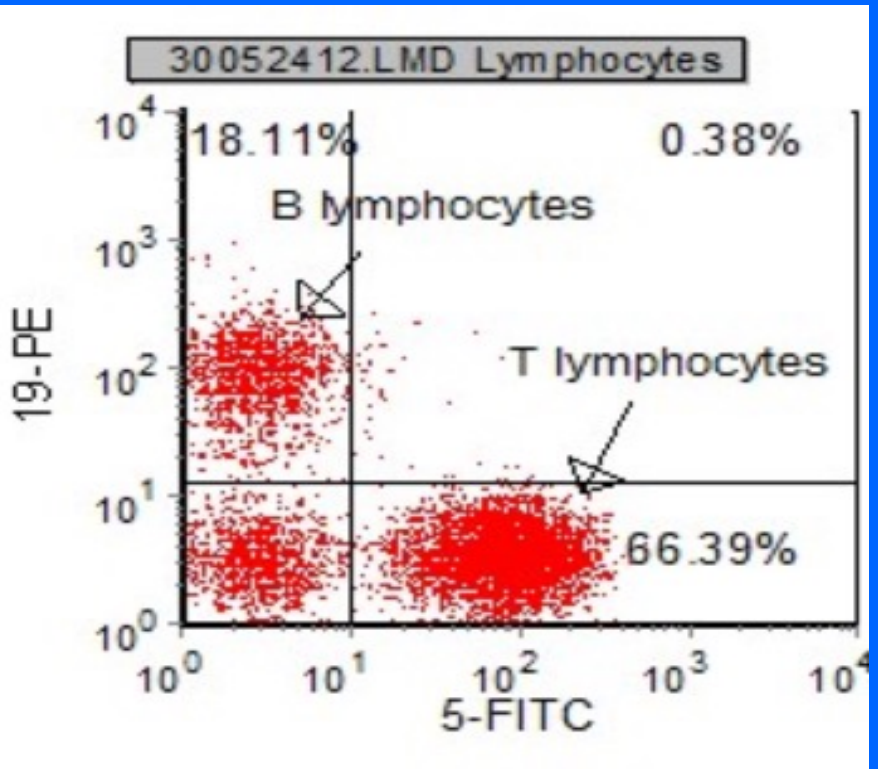
Fréquence

Histogramme

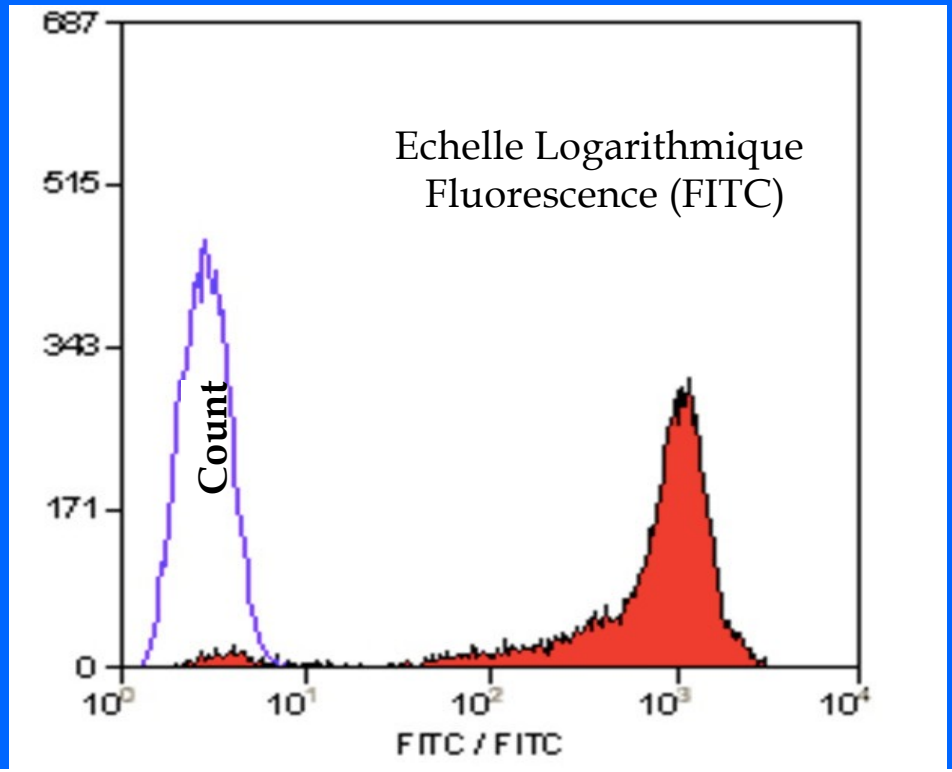
Représentation Mono et Biparamétrique

IMMUNOPHENOTYPAGE DE SANG TOTAL

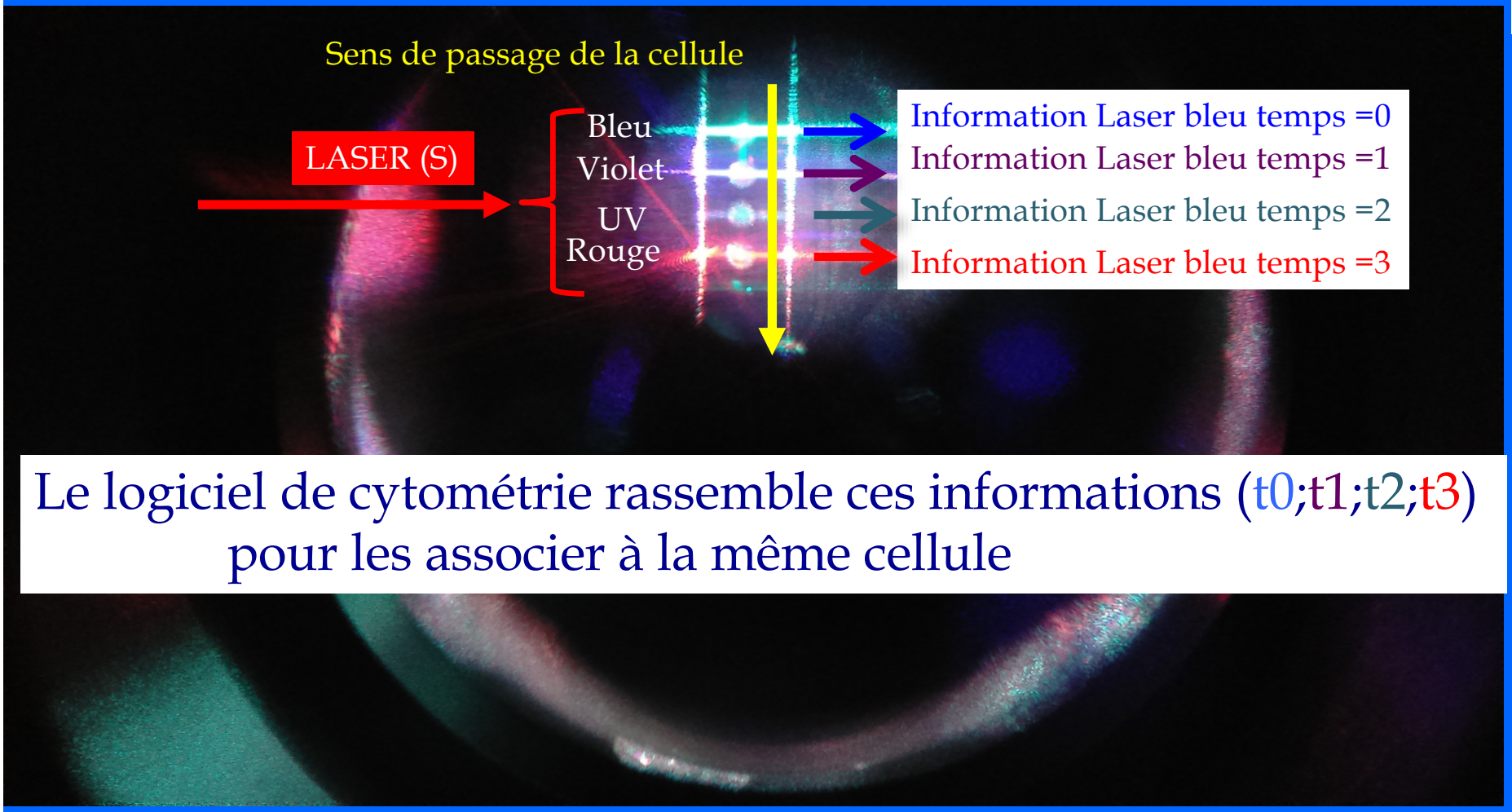
DOT PLOT (Bi-Paramétrique)



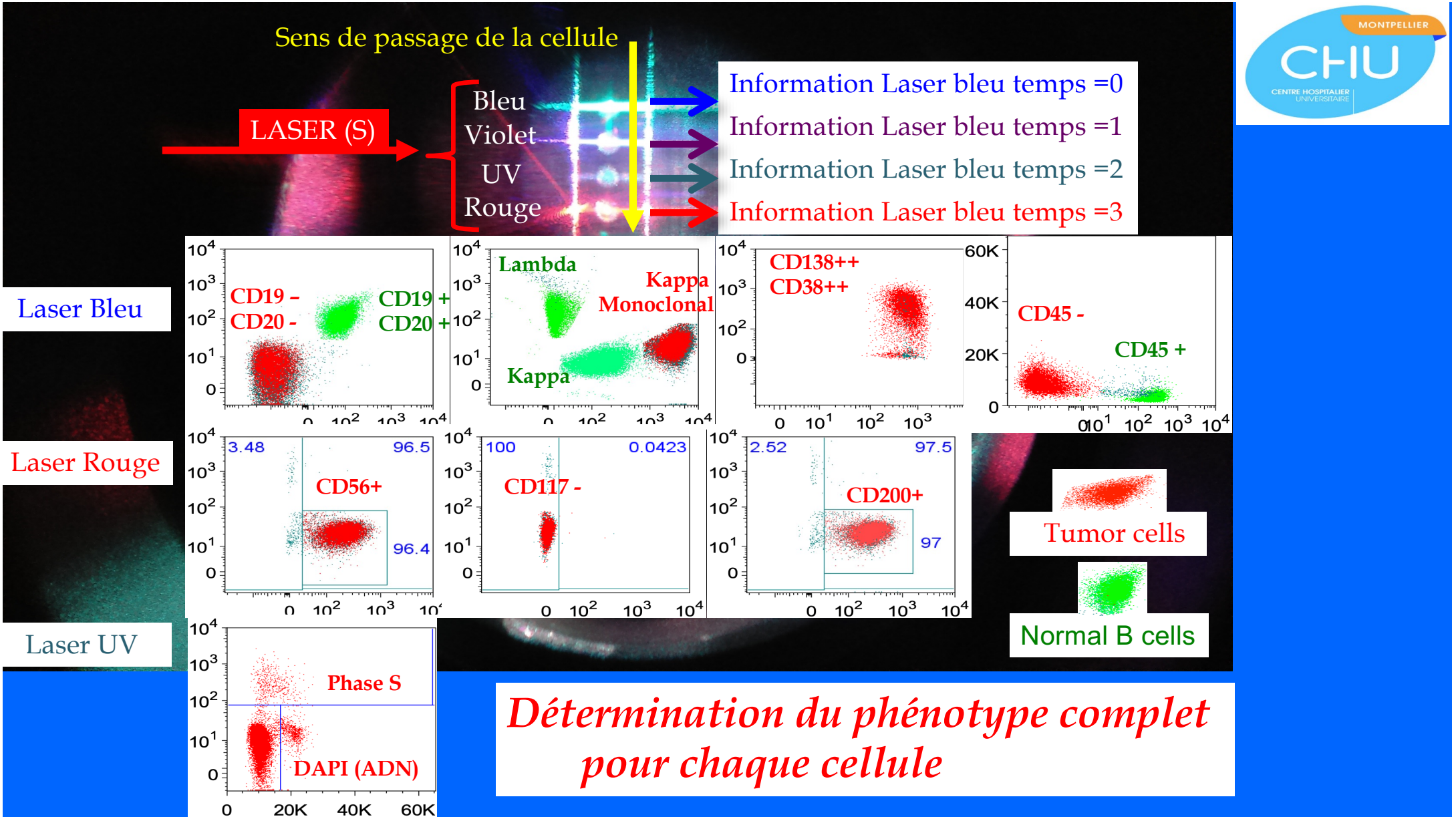
HISTOGRAMME (Monoparamétrique)



DELAI DE LASER



Le logiciel de cytométrie rassemble ces informations (t0;t1;t2;t3)
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
CD19 –
CD20 -
CD19 +
CD20 +
Lambda
Kappa
Monoclonal
Kappa
CD138++
CD38++
CD45 -
CD45 +
3.48
96.5
CD56+
96.4
100
0.0423
CD117 -
2.52
97.5
CD200+
97
Tumor cells
Normal B cells
Phase S
DAPI (ADN)
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)**



Intervalles de référence — Antériorité

HEMATOLOGIE

Giga / Litre

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)

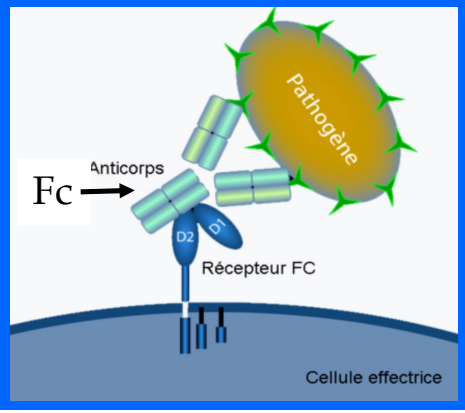
1 Giga (1.10°6 cellules) / Tube ⟶ Tube contrôle / tube test

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

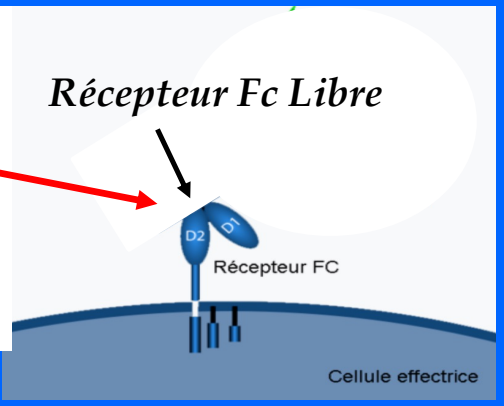
Réponse Immunologique



Problème

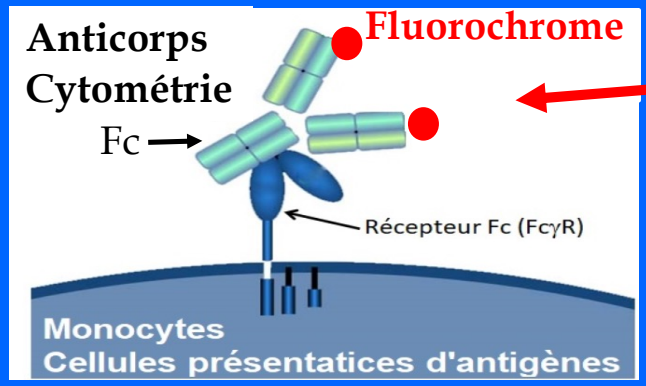
Risque de faux positifs (fluorescence positive) via la fixation de la partie Fc non spécifique des anticorps de cytométrie

Echantillon de Sang



Saturation des Récepteurs Fc

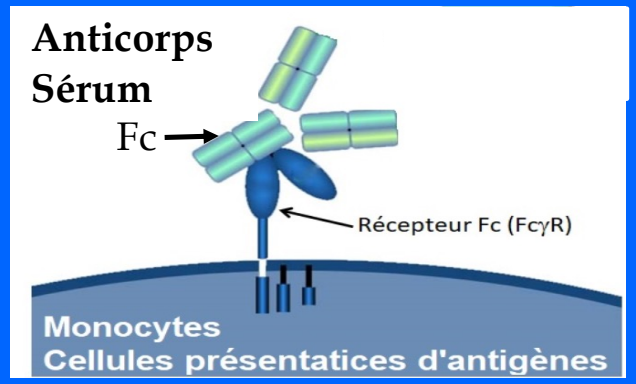
Saturation des récepteurs Fc avec les anticorps « naturels » présents dans le sérum
= éviter les fixations non spécifiques de la partie Fc des anticorps de cytométrie
(Eviter les Faux positifs)



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)

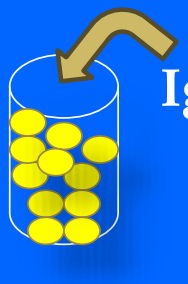
Exemple 1: *IgG1 Fitc anti-antigène A*

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***

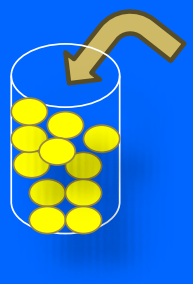
Immunophénotypage en Cytométrie = Marquage CD3 FITC

Tube contrôle
1. 10°6 cellules



IgG1 FITC

Tube test
1. 10°6 cellules



IgG1 CD3 FITC

➡ Saturation Récepteur Fc :
Incubation PBS / Sérum 10% pendant 10 minutes à +4°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 cytométre = 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. 10°6 cellules

Tube test
1. 10°6 cellules

Saturation Récepteur Fc

Tube contrôle

Tube test

Immunomarquage

Anticorps Isotype IgG1 PE



Tube contrôle

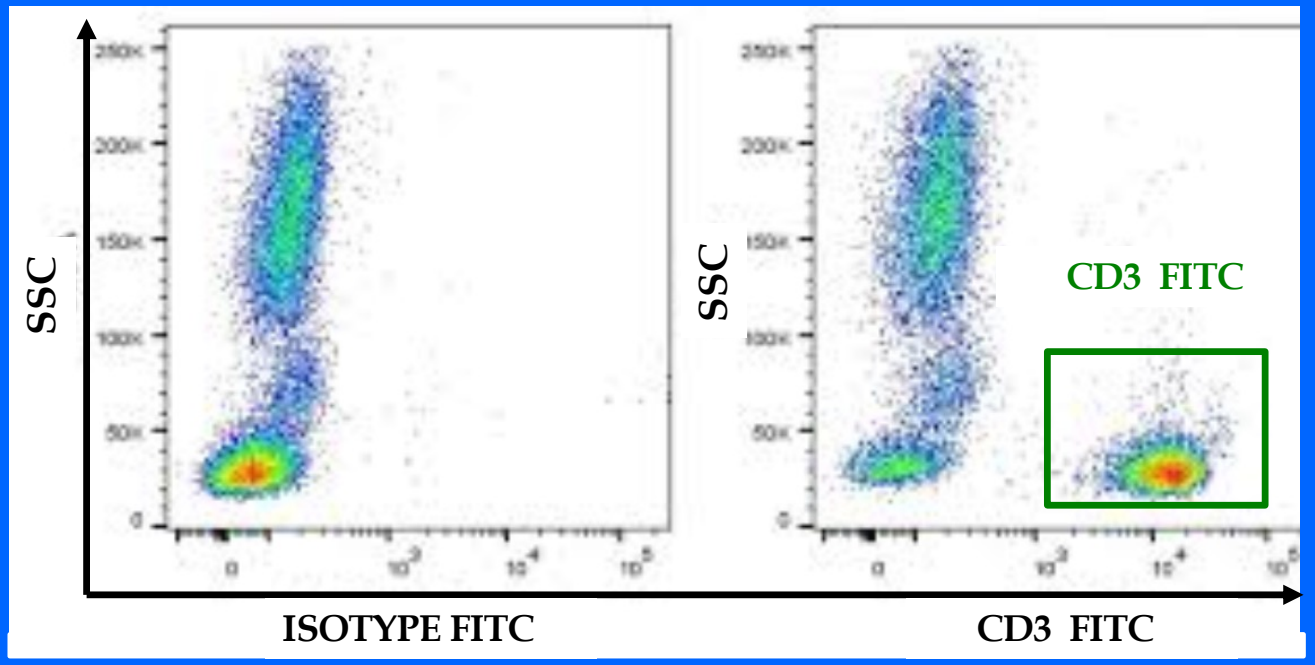
Tube test



Anticorps IgG1 CD3 PE

Immunophénotypage en Cytométrie = Marquage CD3 FITC

Immunophénotypage MonoMarquage (1 seul fluorochrome)



Protocole immunophénotypage MonoMarquage (1 couleur)

1) Configuration Cytométre:

* 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 cytométre

6) Analyse:

* Interprétation des résultats

CONCLUSIONS (Partie 1)

- Cytométrie : système fluidique ≠ Microscopie
- Principe hydrofocalisation (cellules sur une seule ligne)
- Lasers (longueur d'onde unique) du cytométre
- Fluorochromes : courbe excitation propre à chaque molécule
- Courbe Emission 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

CYTOMETRIE EN FLUX

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 multicouleurs ?

Problèmatique liées aux spectre d'émission des fluorochromes

Problématique:

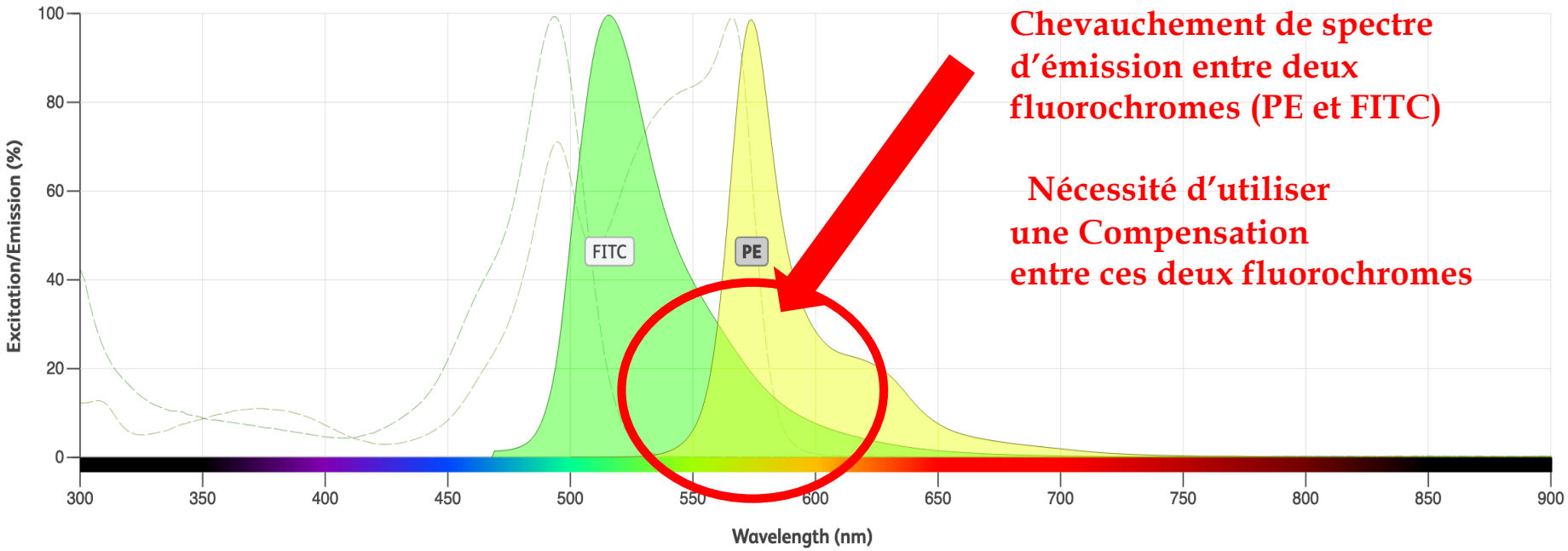
Les émissions de fluorescence générés par l'excitation des lasers sur les fluorochromes couplés aux anticorps peuvent engendrer des superpositions de spectre d'émission fluorescent créant des faux positifs.

On ne peut pas utiliser le cytométre 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 ?

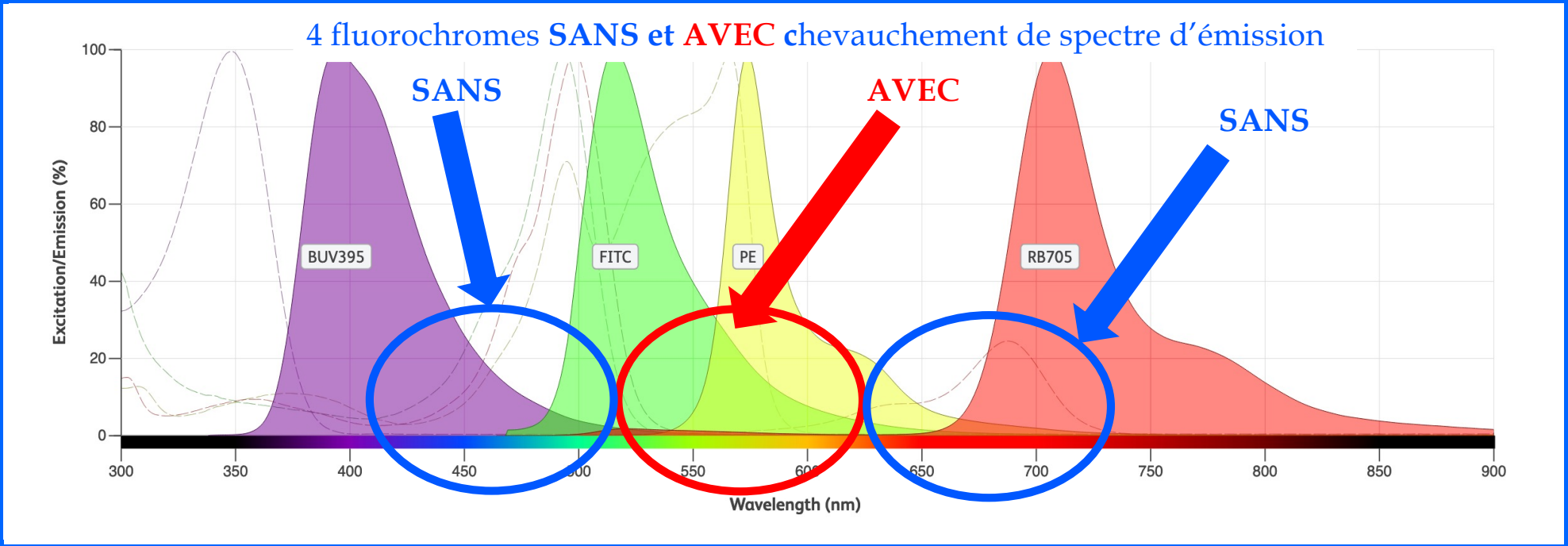
2 fluorochromes **AVEC** Chevauchement de spectre d'émission
Obligation de réaliser une compensation



Chevauchement de spectre d'émission entre deux fluorochromes (PE et FITC)

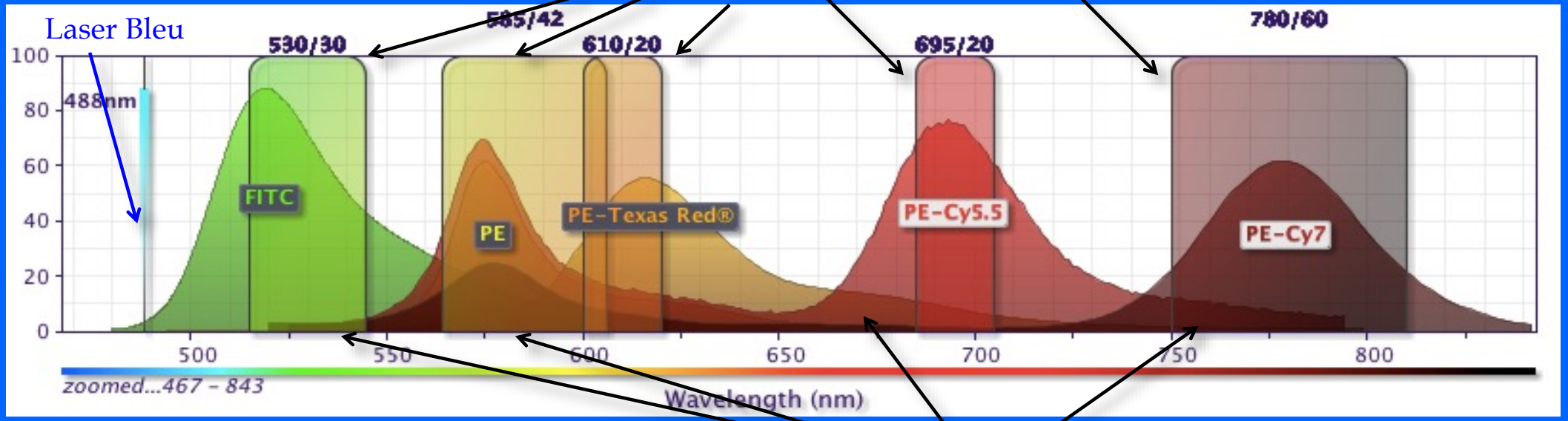
Nécessité d'utiliser une Compensation entre ces deux fluorochromes

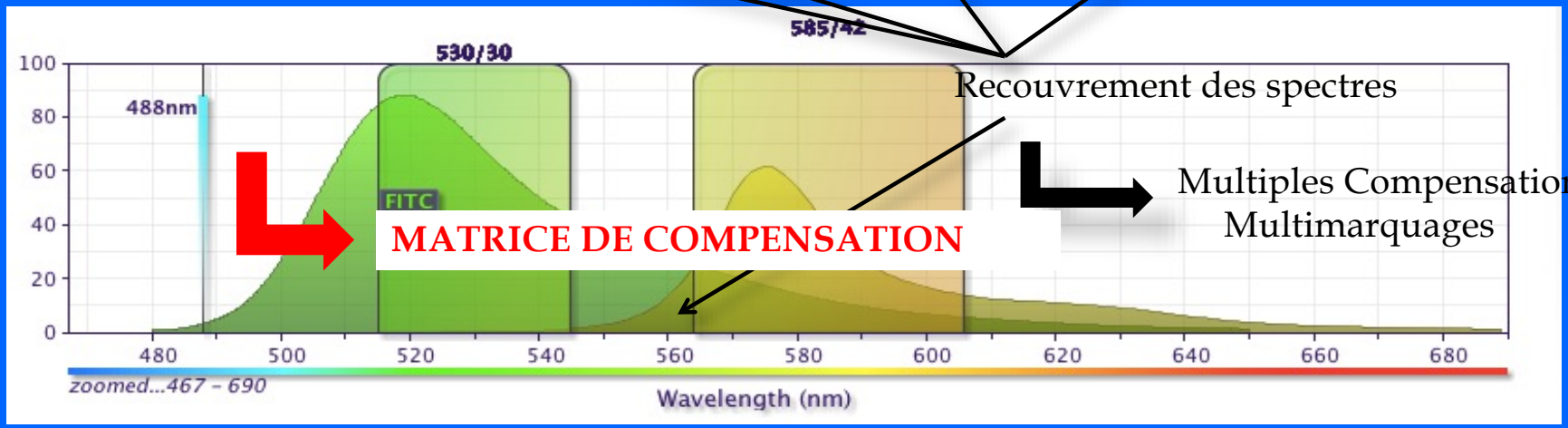
COMPENSATION : Quand et Pourquoi ?



RECOUVREMENT DES SPECTRES D' EMISSION de DIVERS FLUORCHROMES

CAPTEUR = Filtre + PMT





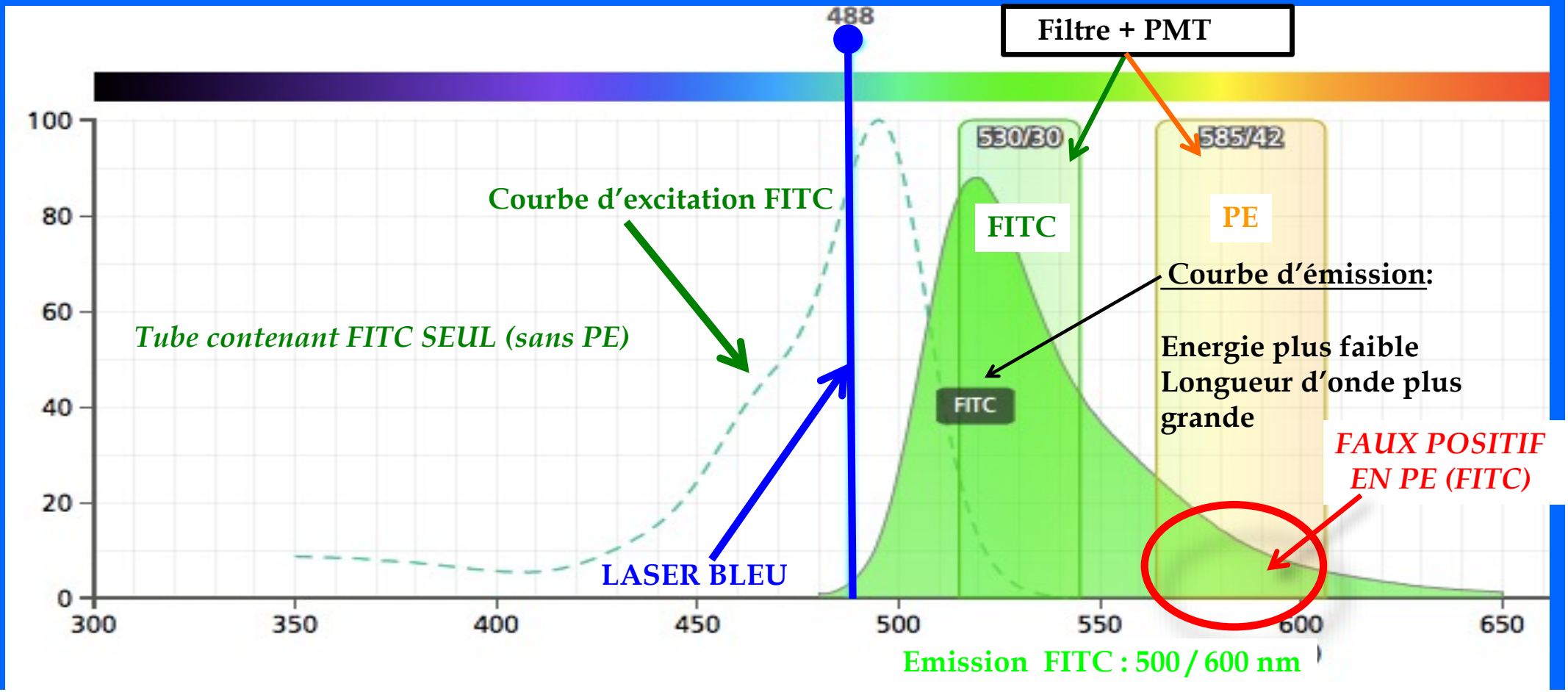
Recouvrement des spectres

MATRICE DE COMPENSATION

Multiples Compensations
Multimarquages

PRINCIPE DE RECOUVREMENT DES SPECTRES DE FLUORESCENCE

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



PRINCIPE DE FLUORESCENCE:

LASER → EXCITATION → EMISSION → CAPTEUR

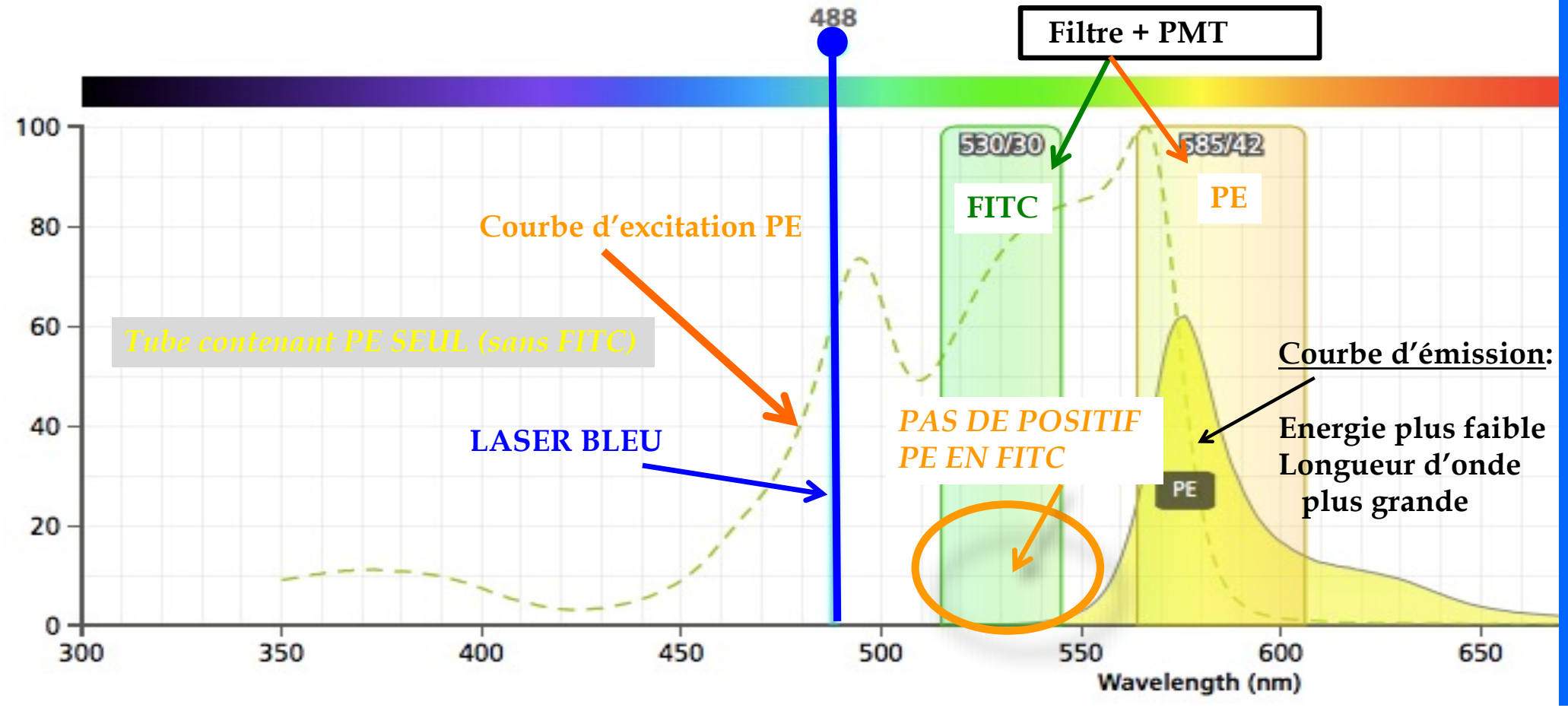
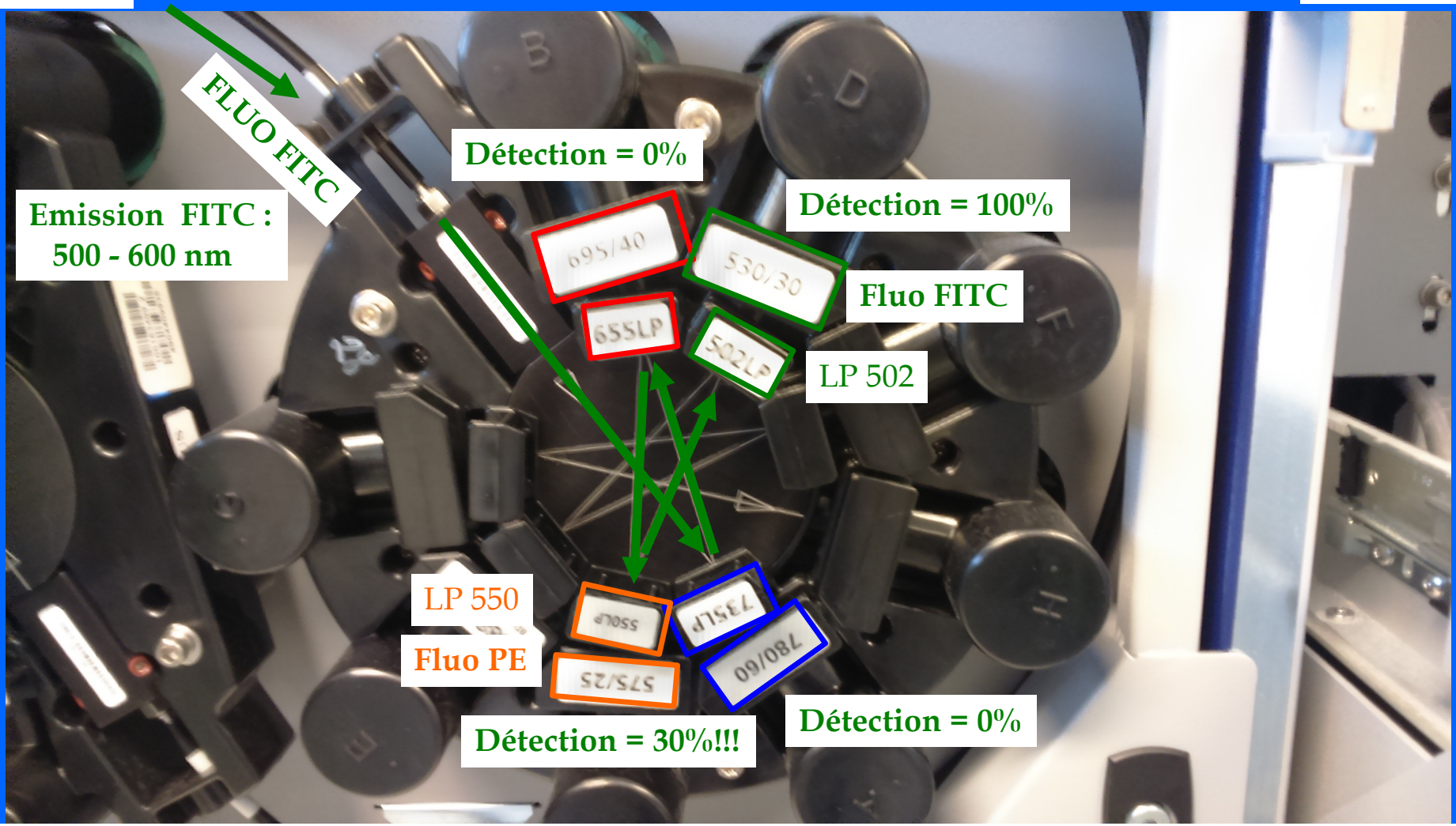
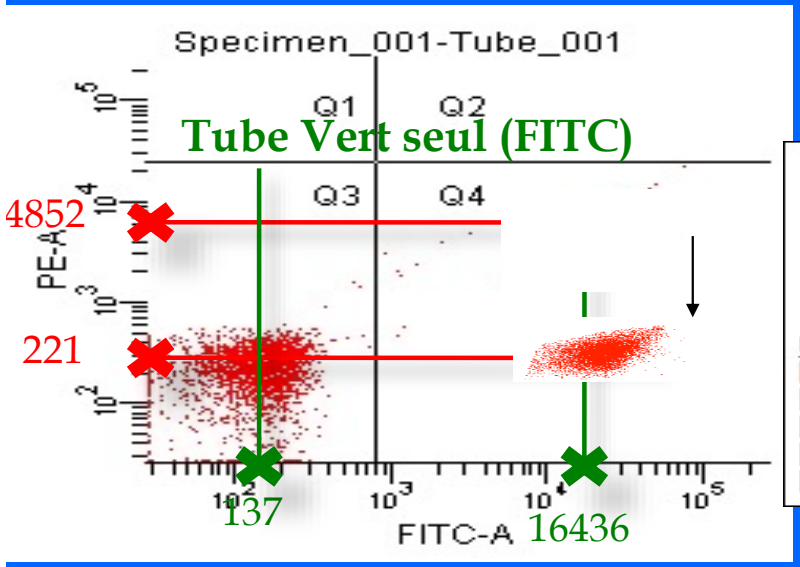


PHOTO MULTIPLCATEUR (PMT)

LASER BLEU



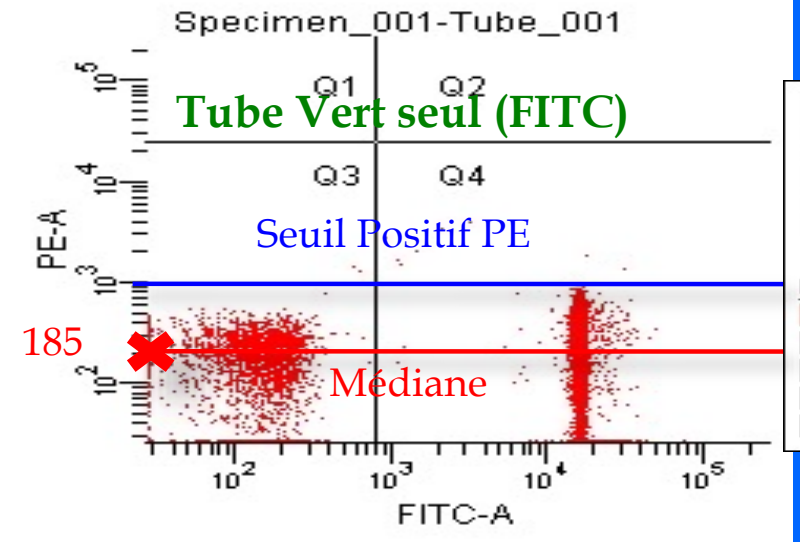
METHODE DES MEDIANES (COMPENSATION)



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



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

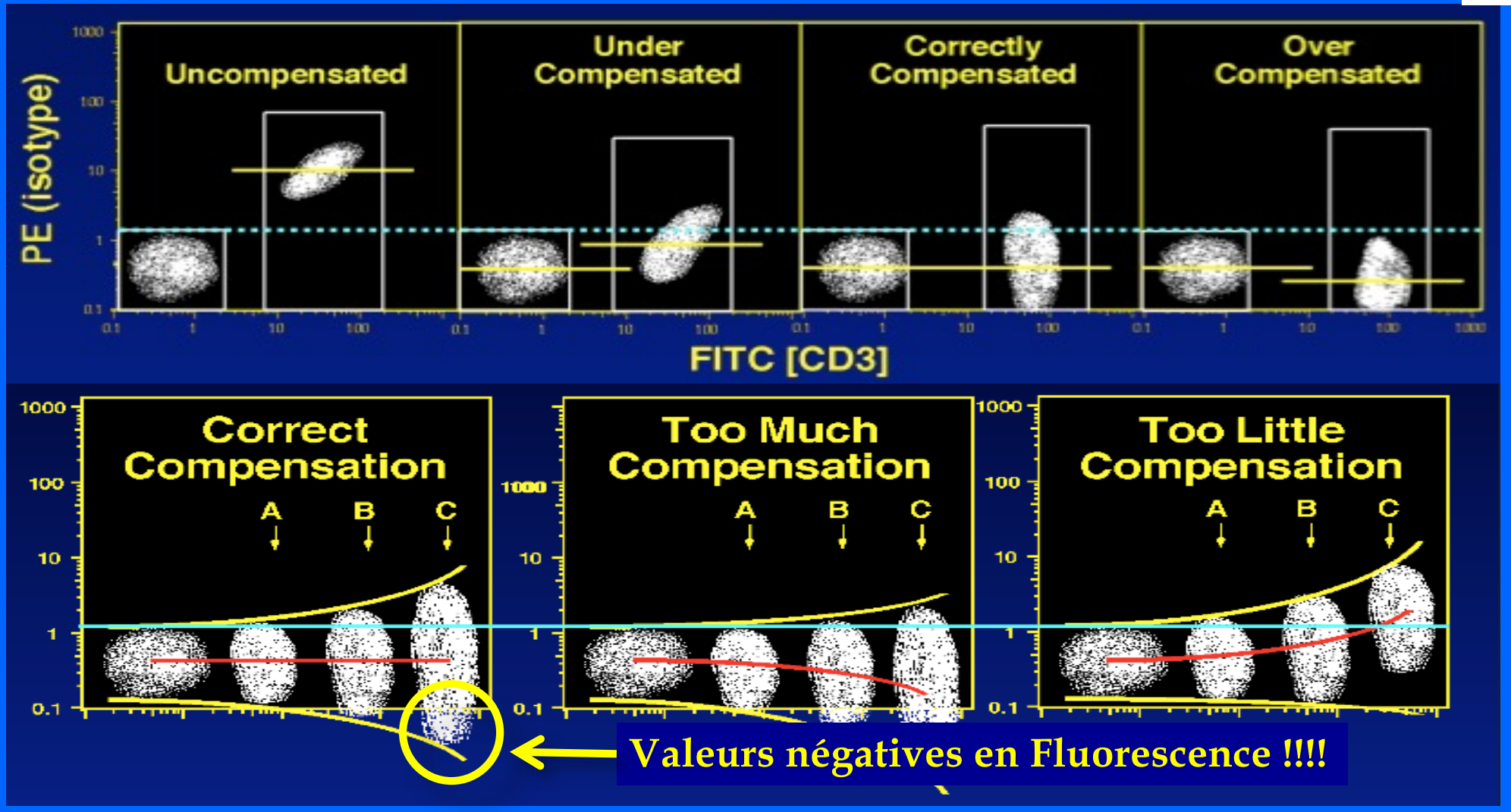
Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
P1	16,123	184	187
Q1	####	####	####
Q2	####	####	####
Q3	137	184	49
Q4	16,436	185	212

AVEC COMPENSATION
30 % Fitc dans Pe

$$\frac{\text{Median PE + (4852) – Median PE – (221)}}{\text{Median Fitc + (16436) – Median Fitc – (137)}} \times 100$$

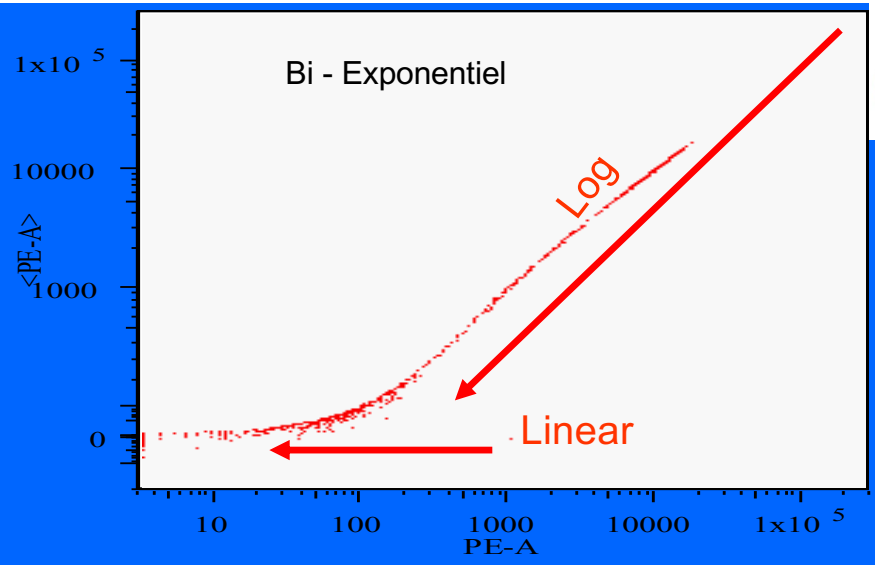
Manuellement

Conséquences de la méthode de compensation par la médiane

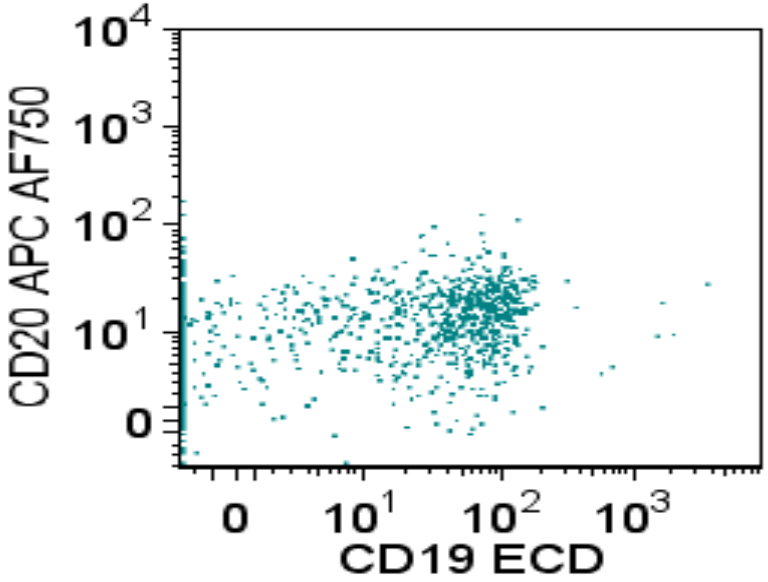


Utilisation du bi-exponentiel pour les populations proches du zéro

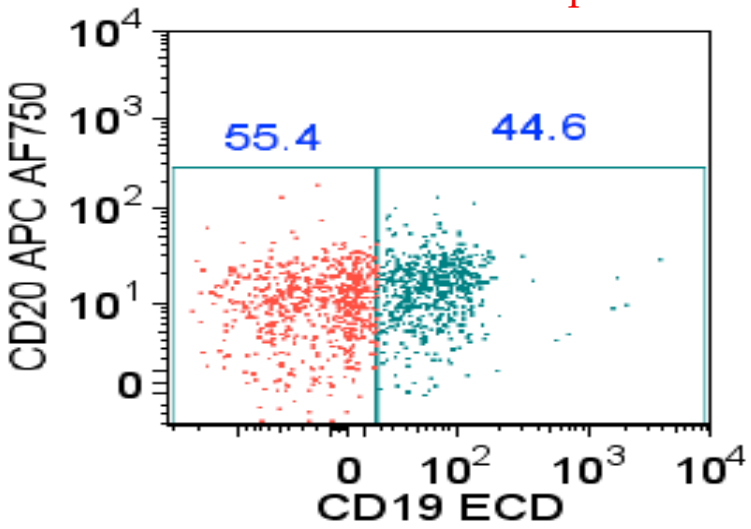
Biexponential function: $f(x) = a\, e^{bx} - c\, e^{-d}$



ECHELLE LOG

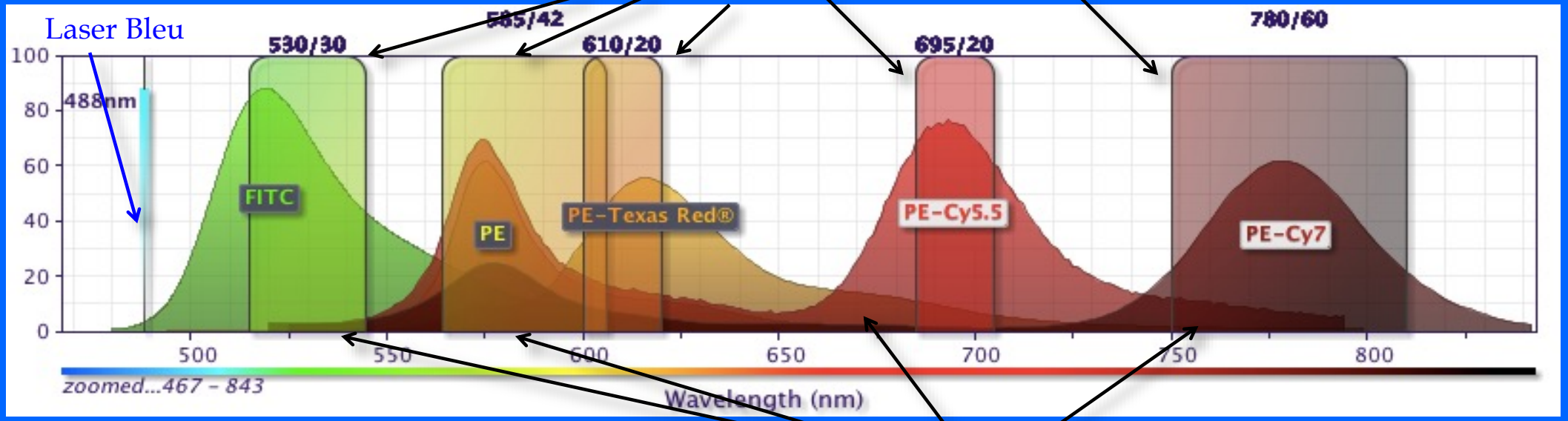


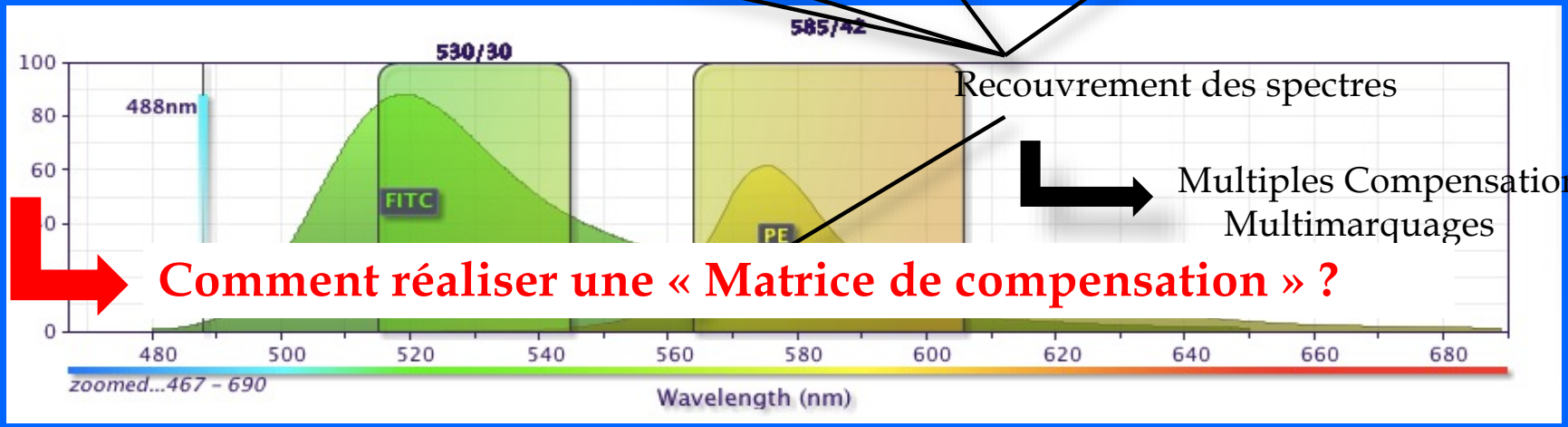
Transformation en bi-exponentiel



RECOUVREMENT DES SPECTRES D' EMISSION de DIVERS FLUORCHROMES

CAPTEUR = Filtre + PMT





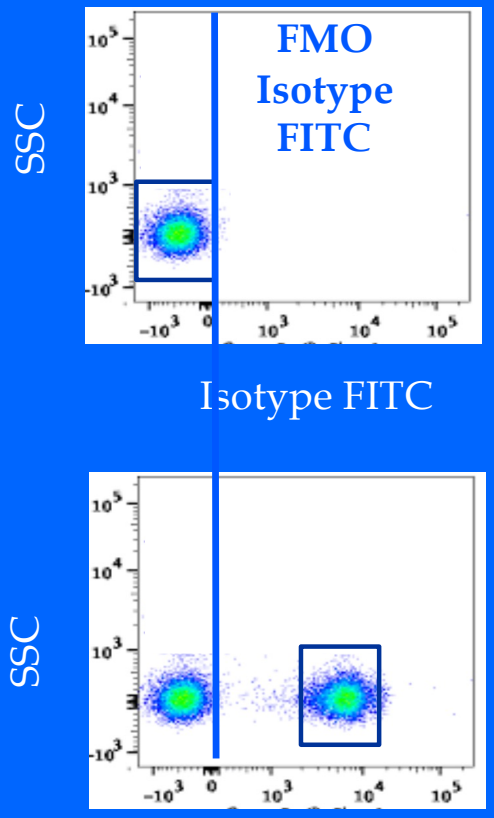
Recouvrement des spectres

Multiples Compensations
Multimarquages

Comment réaliser une « Matrice de compensation » ?

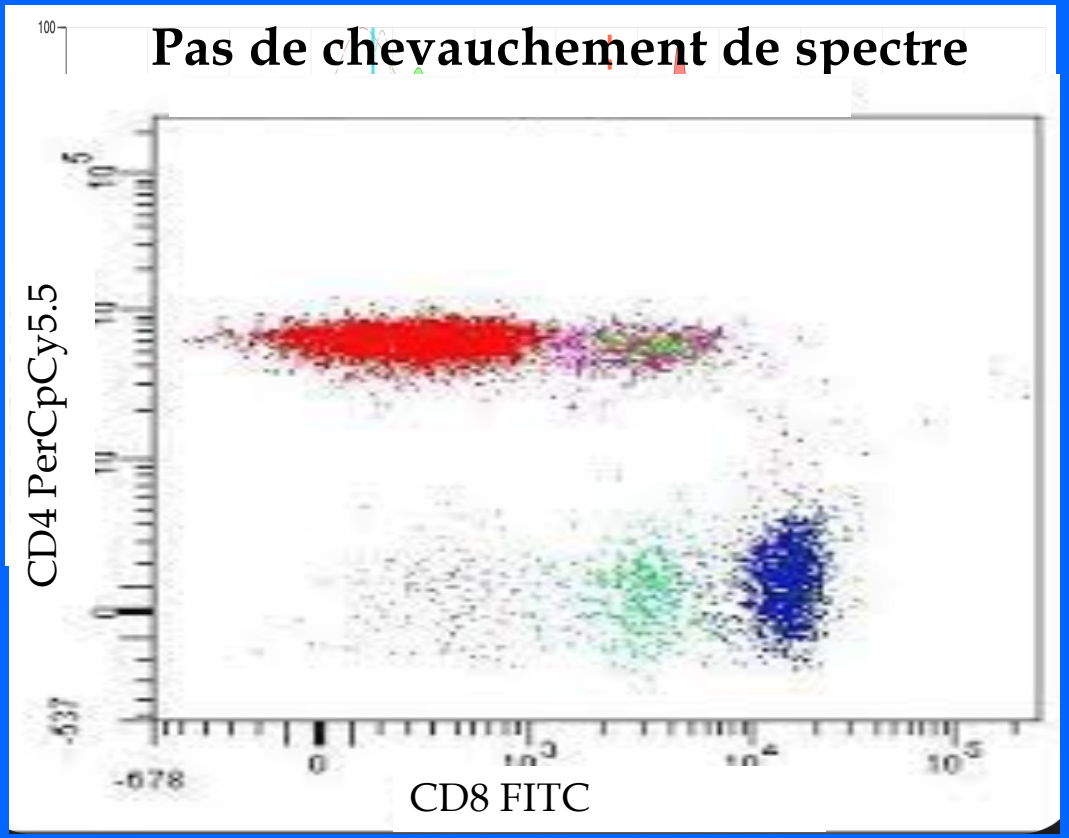
Problématique des chevauchement des spectres d'émission lors des analyses en cytométrie en flux

Cas d'un Monomarquage FITC seul



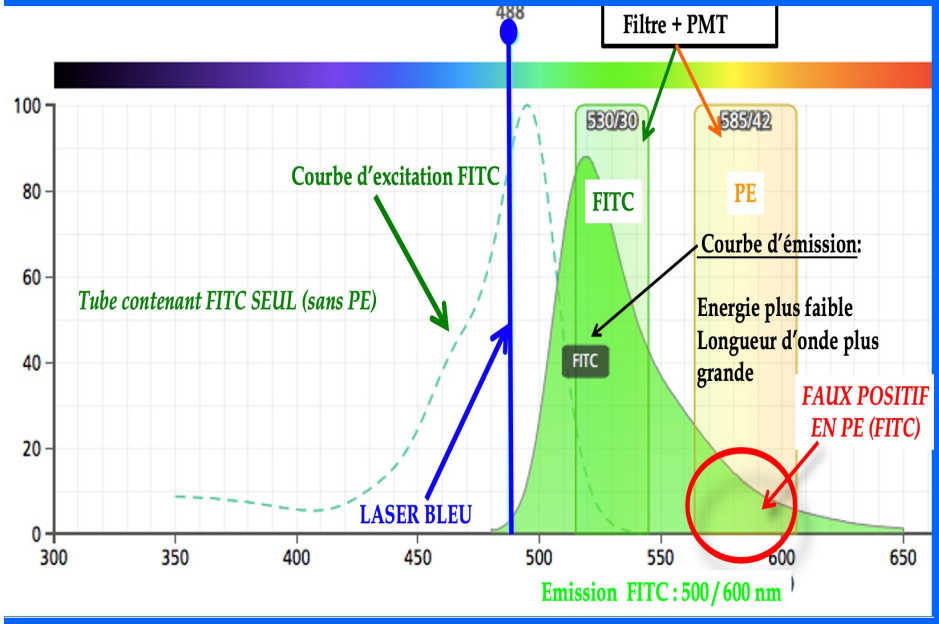
Pas de compensation nécessaire

Cas d'un Double marquage FITC et PerCPCy5.5

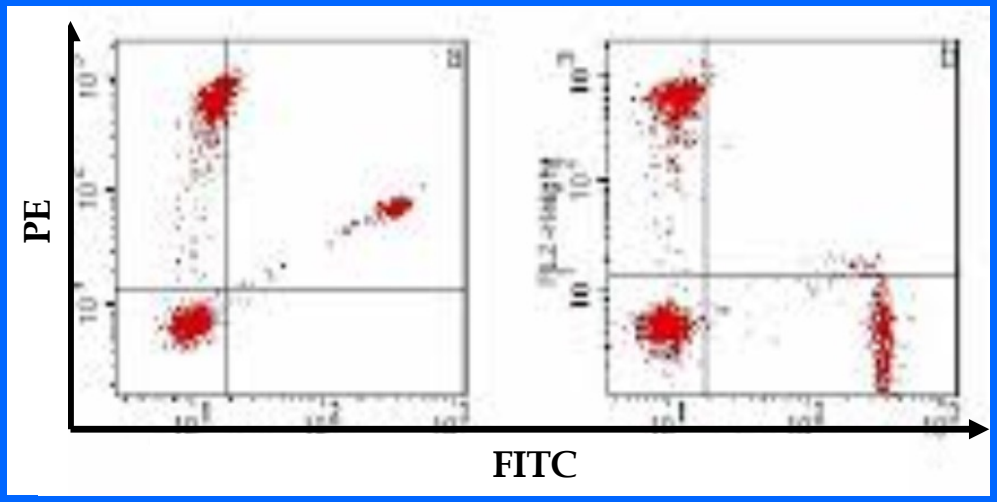


Pas de compensation nécessaire

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



Cas d'un Double marquage FITC et PE



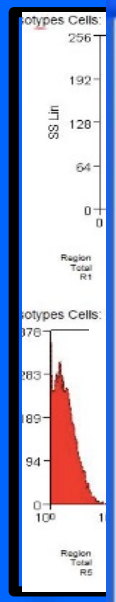
SANS compensation

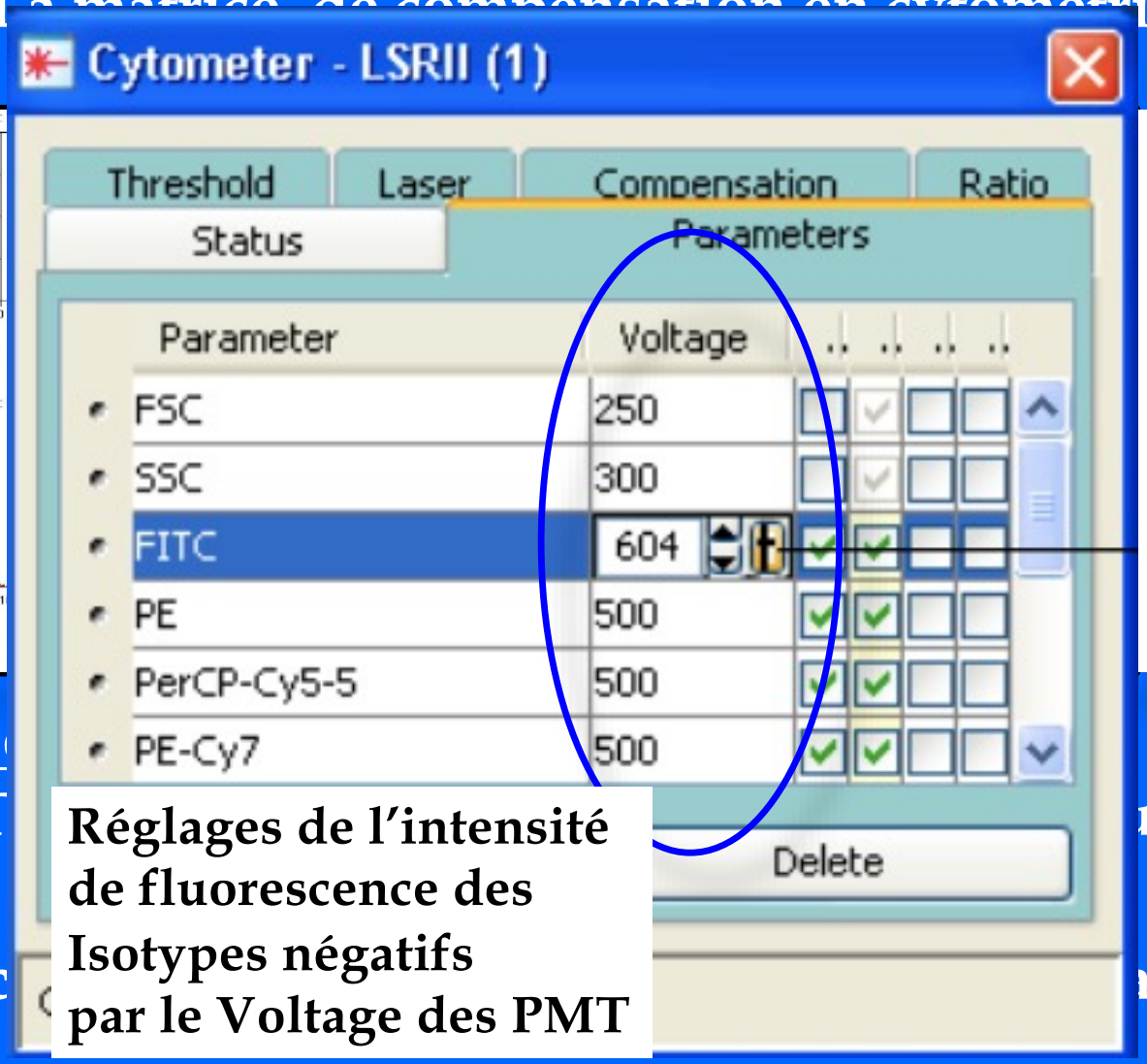
AVEC compensation

Problème de chevauchement de spectre → Obligation d'une compensation

La matrice de compensation en cytométrie en flux

Tube Contrôle





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

Tube c

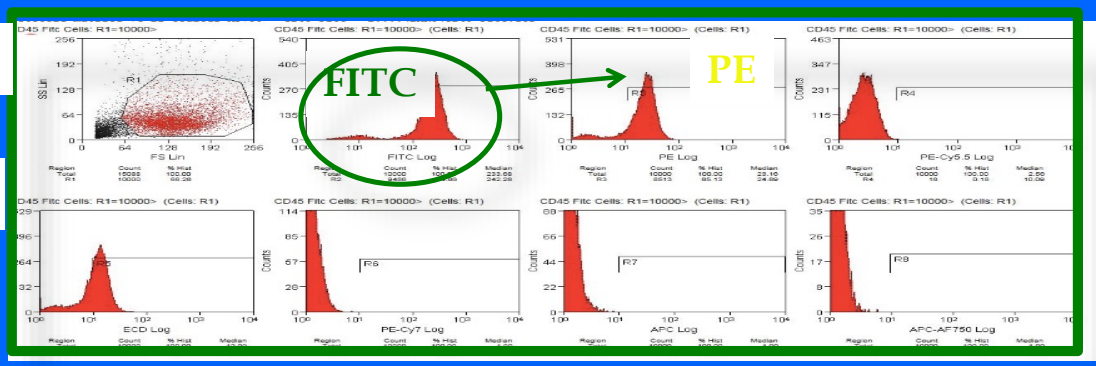
T **us les fluorochromes**

Tube c **ans la première décade**

La matrice de compensation en cytométrie en flux

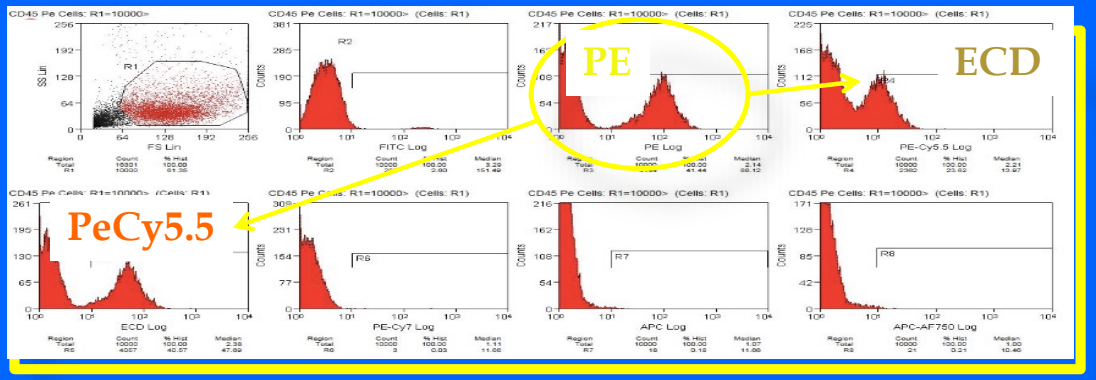
Tube FITC

Tube Fitc + seul



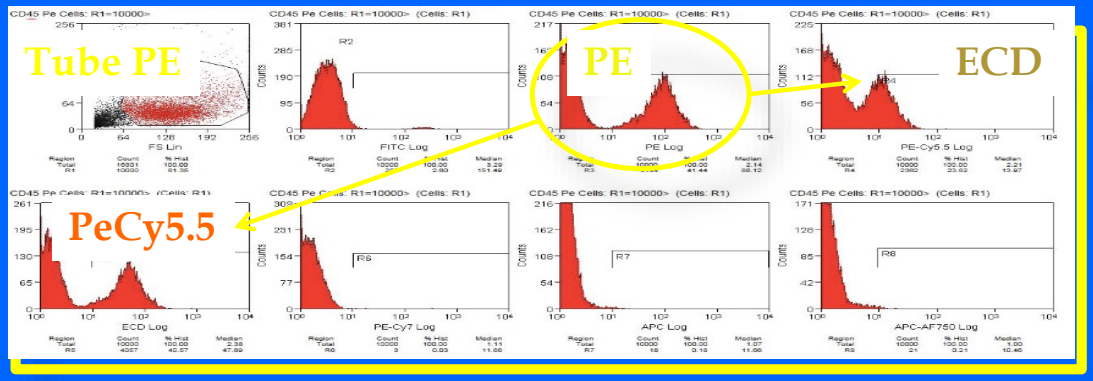
Tube PE

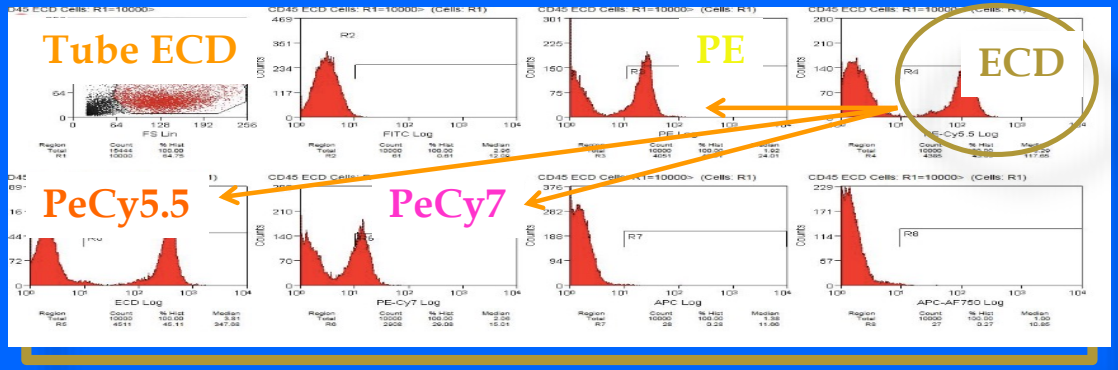
Tube PE + seul



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

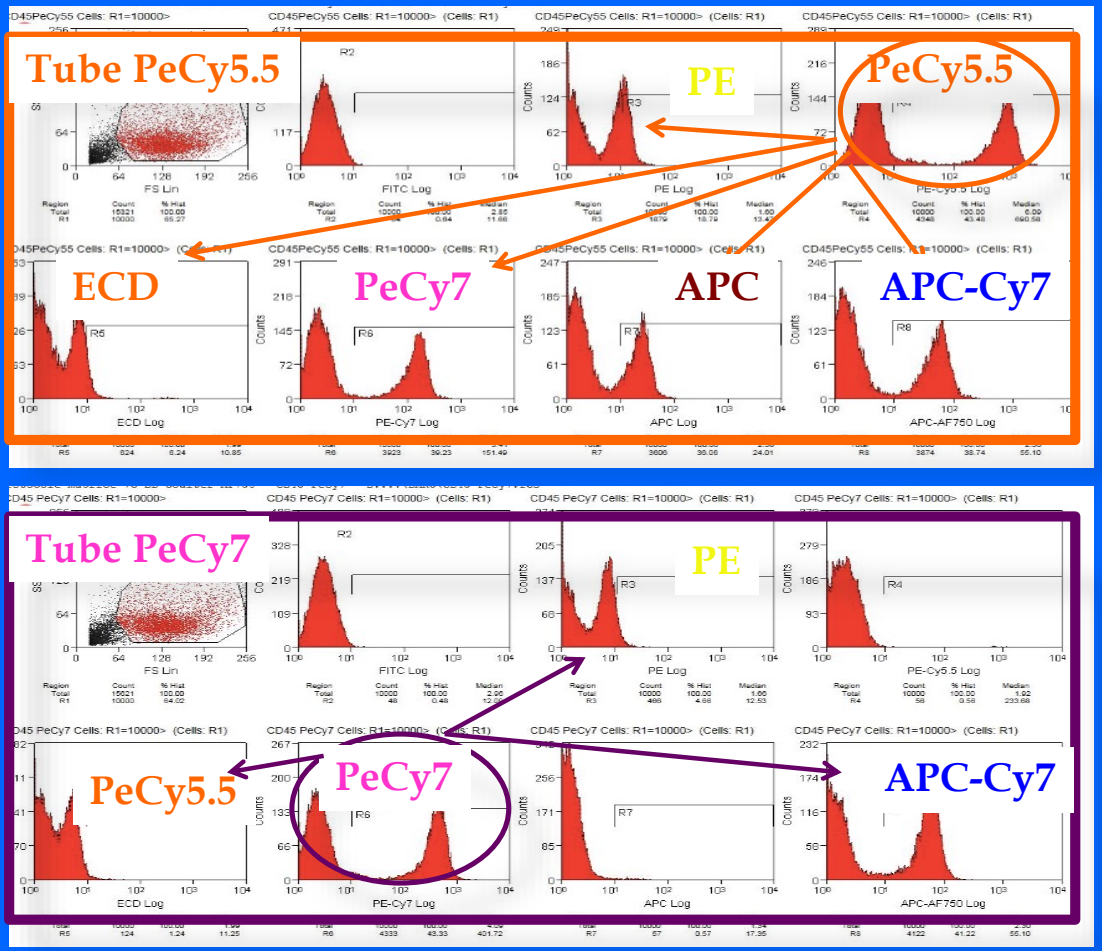
La matrice de compensation en cytométrie en flux





SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

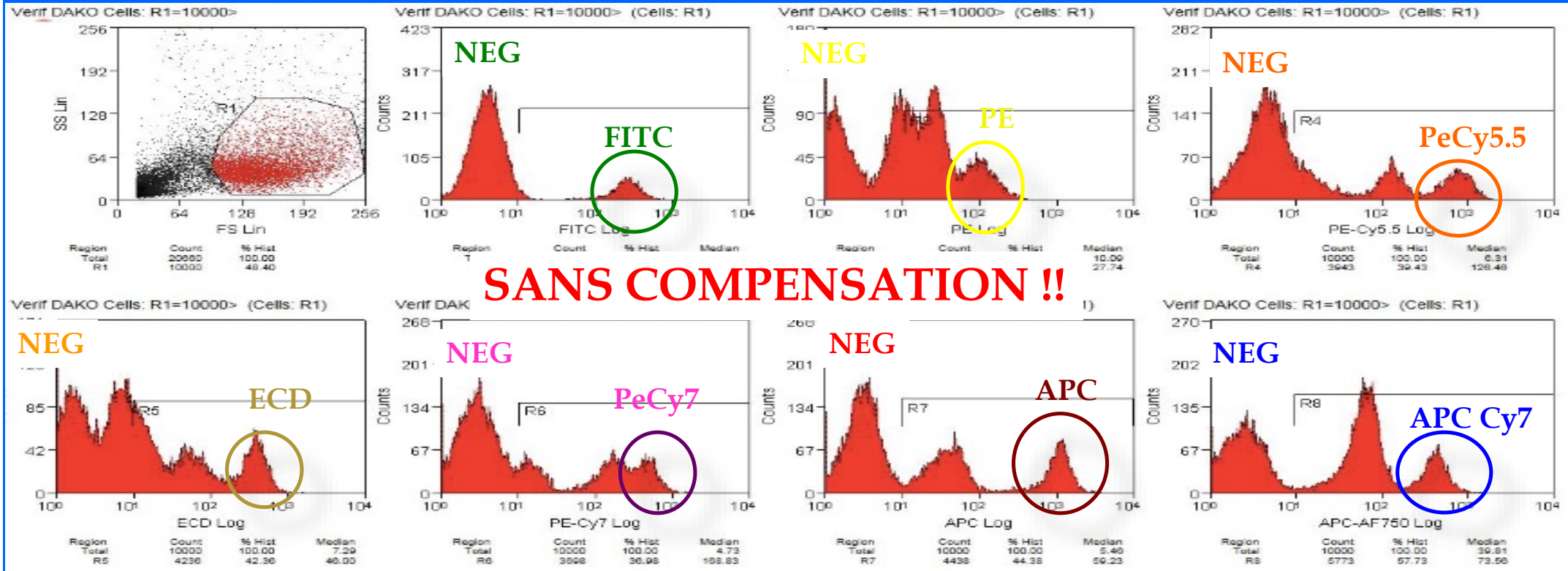
La matrice de compensation en cytométrie en flux



SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

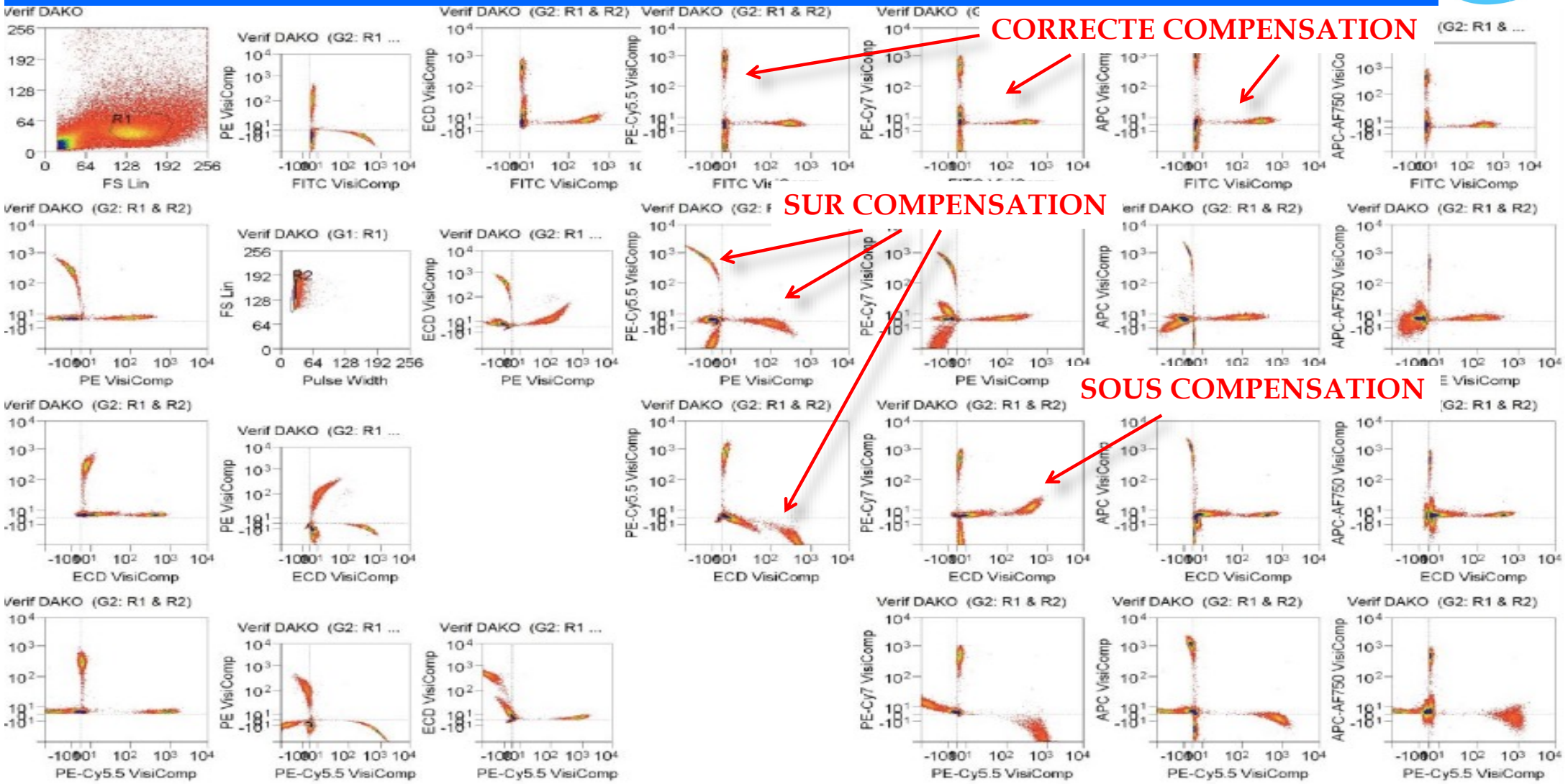
La matrice de compensation en cytométrie en flux

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

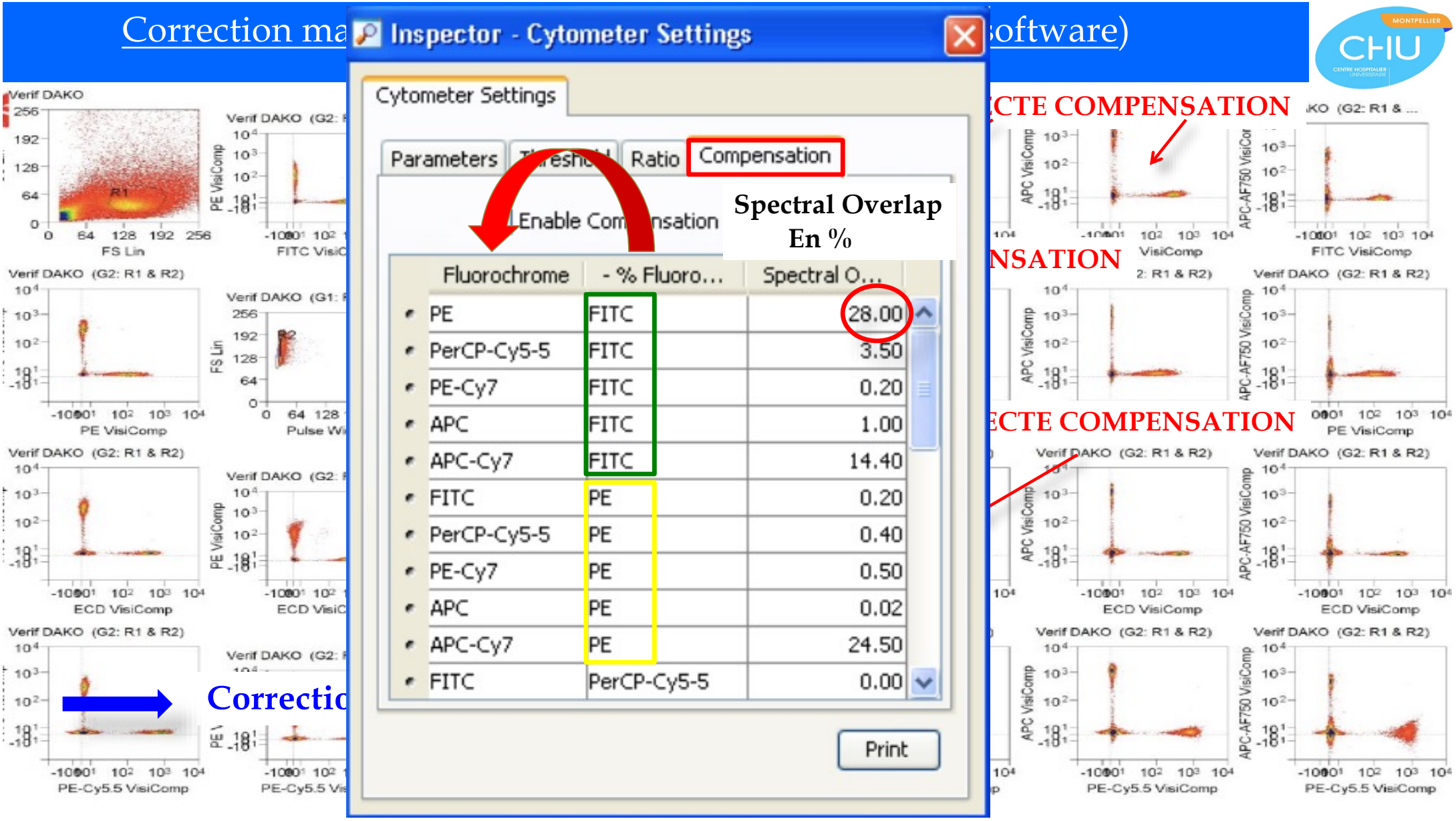


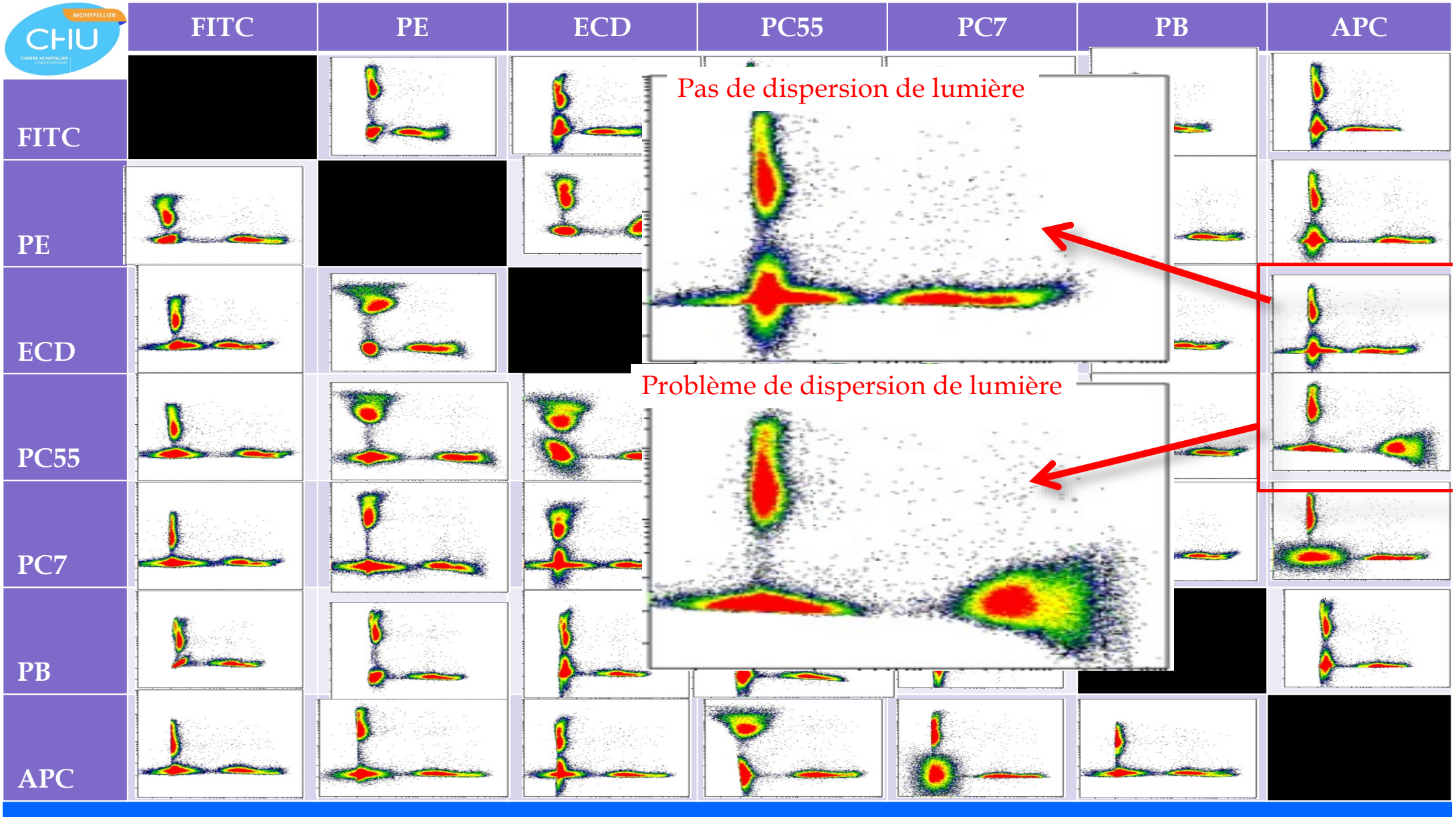
SANS TOUCHER AUX VOLTAGES DES FLUORESCENCES

Calcul automatique de la matrice de compensation (software)



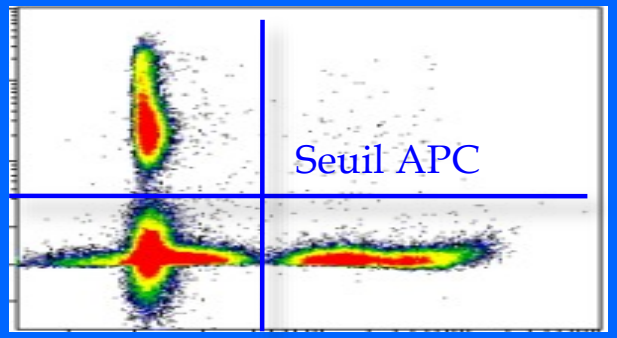
Correction ma… …oftware)



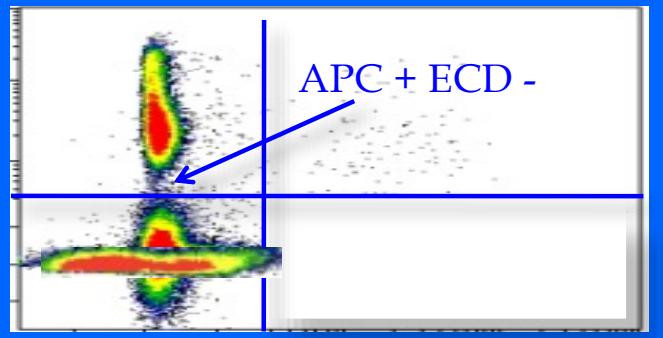

FITC
PE
ECD
PC55
PC7
PB
APC
Pas de dispersion de lumière
Problème de dispersion de lumière

Problème lié à la dispersion de lumière « effet trompette »

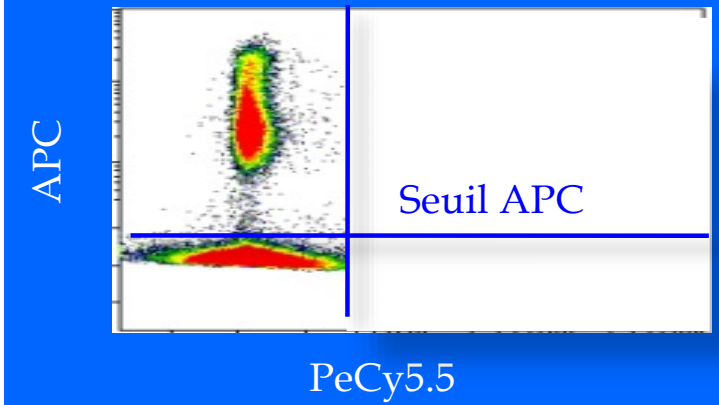
MATRICE



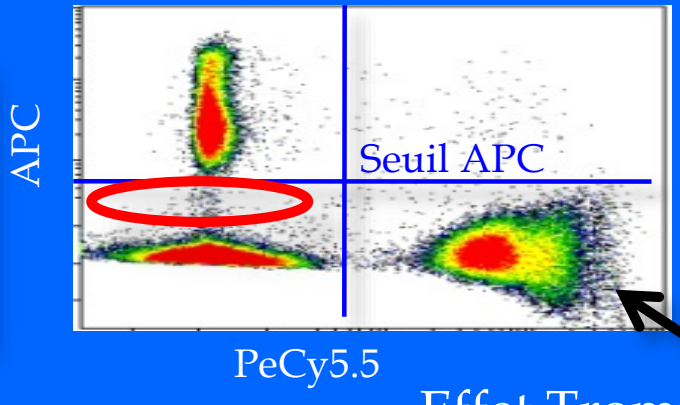
CELLULES



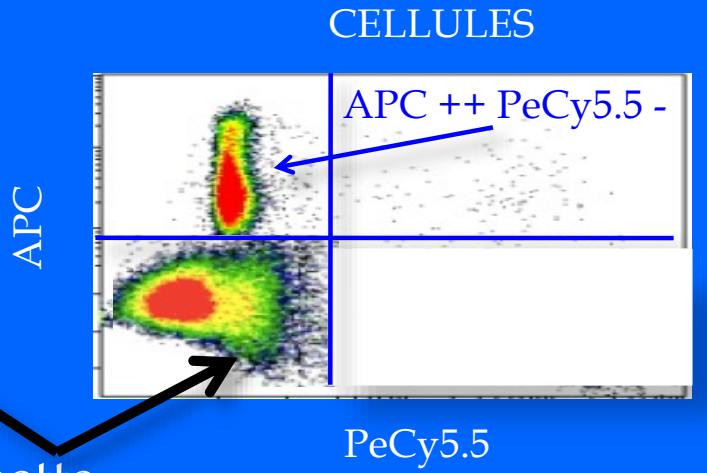
MATRICE



MATRICE

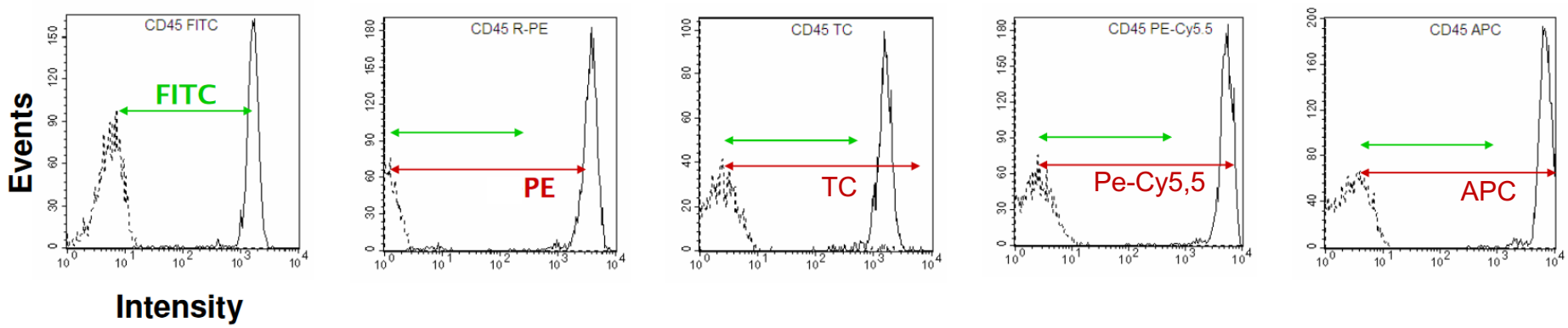


CELLULES



« Effet Trompette »

Choix des couleurs (fluorochromes) associès aux Ac



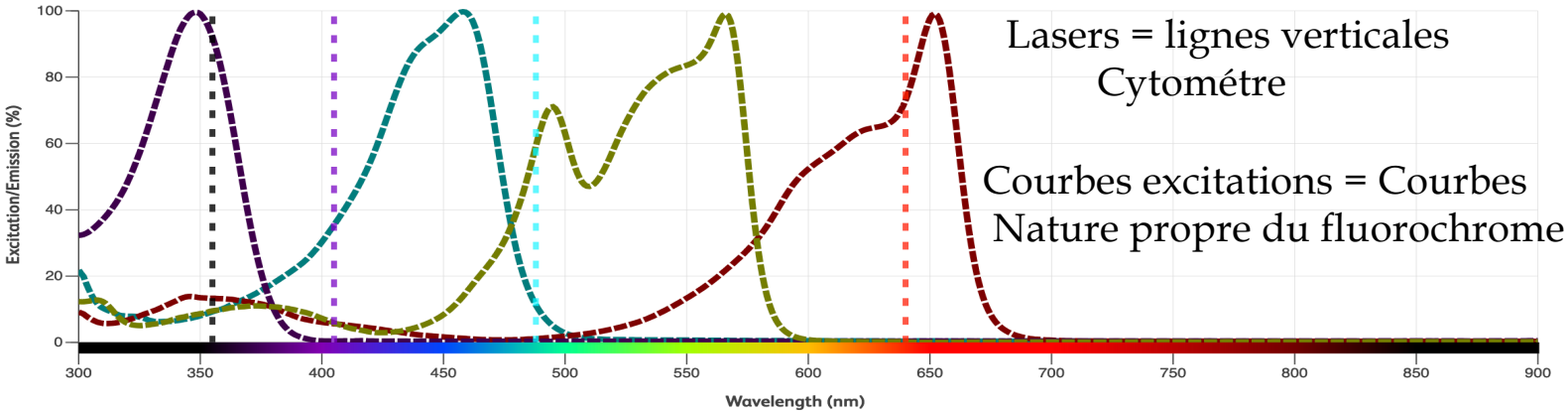
Staining Index = SI

Ratio = MFI Positive – MFI Negative / 2 Standard Deviation Negative

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

Choix des couleurs en fonction du rendement quantique

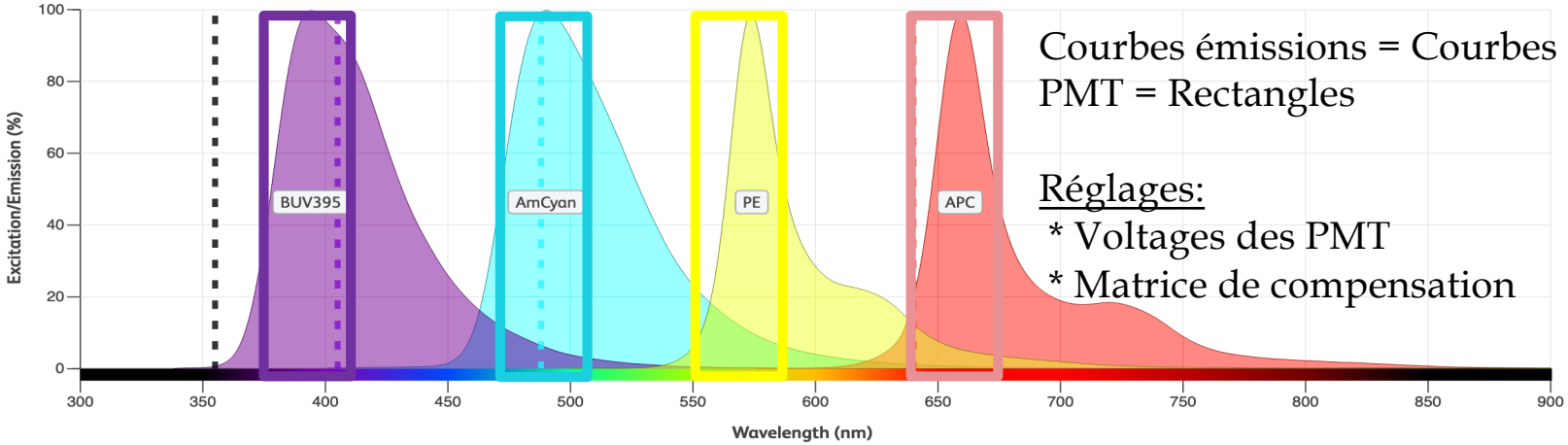
Différence entre Excitation et Emission



Lasers = lignes verticales
Cytométre

Courbes excitations = Courbes
Nature propre du fluorochrome

Partie Excitation



Courbes émissions = Courbes
PMT = Rectangles

<u>Réglages:</u>
* Voltages des PMT
* Matrice de compensation

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 cytométre***

   ⇒ ***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
CD19 CD20 =Lymphocytes B } **(20 à 40%)**
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 d'un Panel en Cytométrie

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 cytométre**
- **Rendement quantique**

Laser Bleu	Laser Violet	Laser Rouge
CD45 FITC (Faible)	CD3 BV450 (Moyen)	CD16 APC (Fort)
CD138 PE (Fort)	CD19 AmCyan (Moyen)	CD20 APC-Cy7 (Moyen)
CD14 PeCy7 (Fort)		
CD56 Pe-CF594 (Fort)		
CD15 PerCpCy5.5 (Moyen)		

Panel de 9 couleurs:

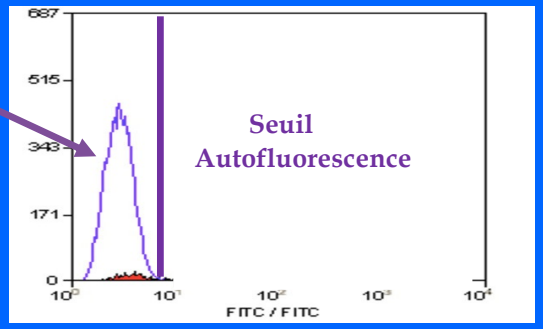
Laser Bleu =	CD45 Fitc	CD138 Pe	CD14 Pe-Cy7	CD56 Pe-CF594	CD15 PerCp-Cy5.5
Laser Violet =	CD3 BV650	CD19 AmCyan			
Laser Rouge =	CD16 APC	CD20 APC-Cy7			

SIMPLE MARQUAGE EN CYTOMETRIE

Exemple d'un simple marquage CD4 Fitc

LASER

AUTOFLUORESCENCE



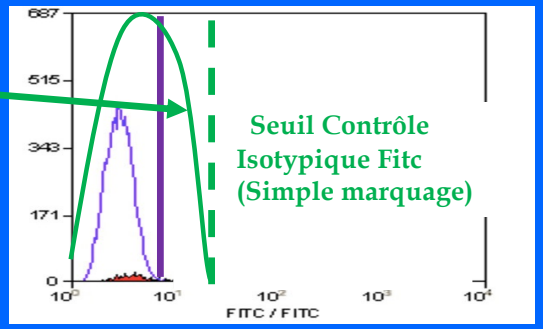
LASER

IgG1Fitc

IgG1Fitc

IgG1Fitc

Contrôle Isotypique
IgG1 Fitc



LASER

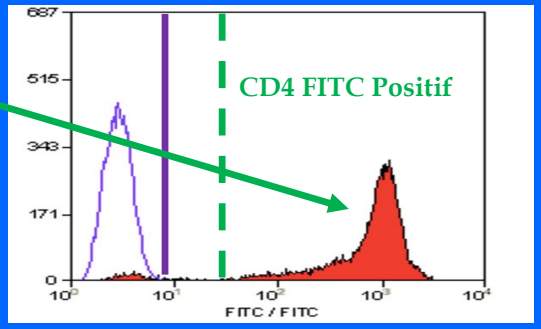
IgG1Anti
CD4 Fitc

IgG1 Anti CD4 Fitc

IgG1 Anti CD4 Fitc

IgG1 Anti CD4 Fitc

MFI = Mean Fluorescence Intensity
RFI = Ratio Fluoresence Intensity

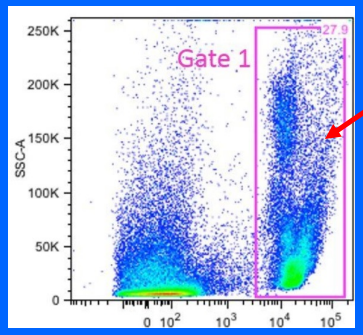


MULTI-MARQUAGE EN CYTOMETRIE

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

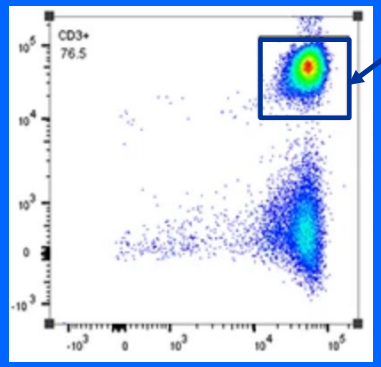
CD45 Pe-Cy7 = marqueur de tous les leucocytes
CD3 APC = marqueur de lymphocytes T
CD4 Fitc = marqueur spécifique des lymphocytes T
Isotype Contrôle FITC = FMO

Sang Total



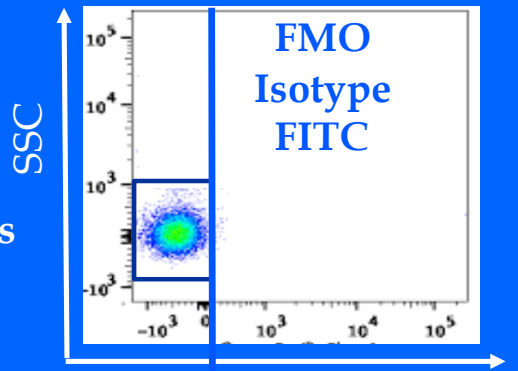
CD45+ Leucocytes

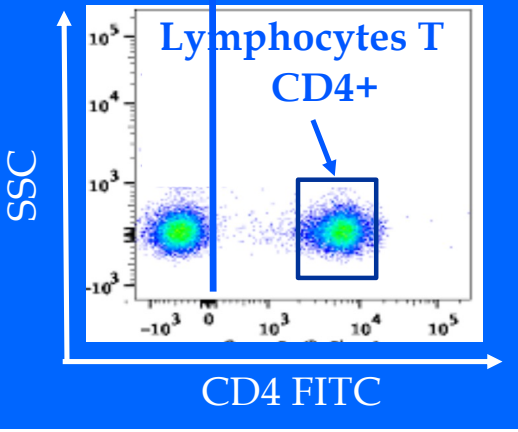
CD45+



CD3+ Lymphocytes

Lymphocytes T CD3+





Mélange CD45+ / CD45-

Mélange CD3+ / CD3-

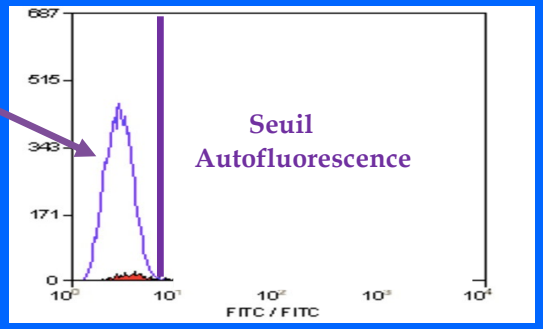
Pas de FMO = plusieurs populations cellulaires différentes

MULTI-MARQUAGE EN CYTOMETRIE

Exemple d'un marquage CD4 Fitc dans un multimarquage

LASER

AUTOFLUORESCENCE



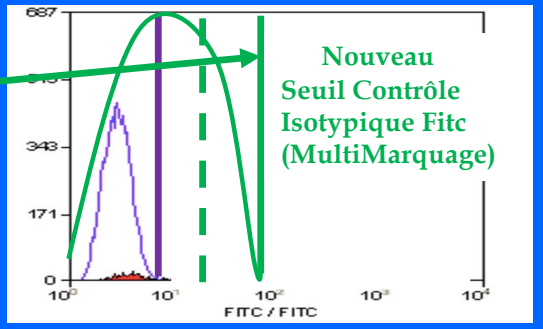
CD 3APC

IgG1 Isotype Fitc

FMO

LASER

Contrôle Isotypique
IgG1 Fitc



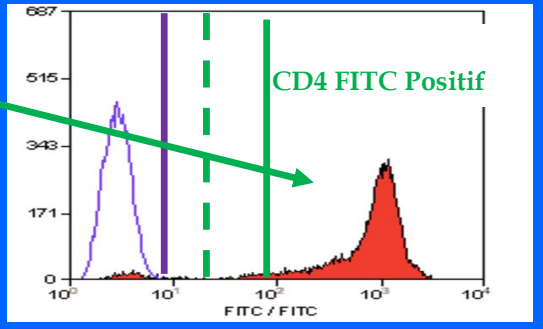
CD45 PeCy7

CD3 APC

IgG1 Anti CD4 Fitc

LASER

IgG1 Anti CD4 Fitc



CD45 PeCy7

Protocole immunophénotypage Multicouleurs (7 couleurs)

1) Configuration Cytométre:

* 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 cytométre

6) Analyse:

* Interprétation des résultats

Protocole d'un immunophénotypage avec plusieurs fluorochromes

Sang périphérique → **Comptage de la concentration cellulaire**





Saturation Récepteur Fc

Tube FMO
(Tube Contrôle)

Tube Multicouleurs
(Tube Test)

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





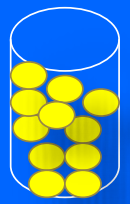
IgG1 CD3 PE
CD45 BV421, CD38 PeCy5.5
CD19 PECF594, CD20 APC,
CD4 FITC, CD8 PeCy7

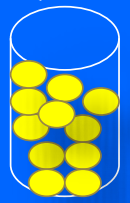
Tube Multicouleurs

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 fluororescence)
- 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