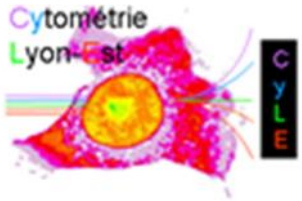
CRCL CENTRE DE RECHERCHE EN CANCÉROLOGIE DE LYON



Cytométrie en Flux
Formation théorique

Priscillia Battiston-Montagne
Priscillia.battiston-montagne@lyon.unicancer.fr – 04 78 78 29 12
Thibault ANDRIEU
Thibault.andrieu@lyon.unicancer.fr
Christophe VANBELLE
Christophe.vanbelle@lyon.unicancer.fr

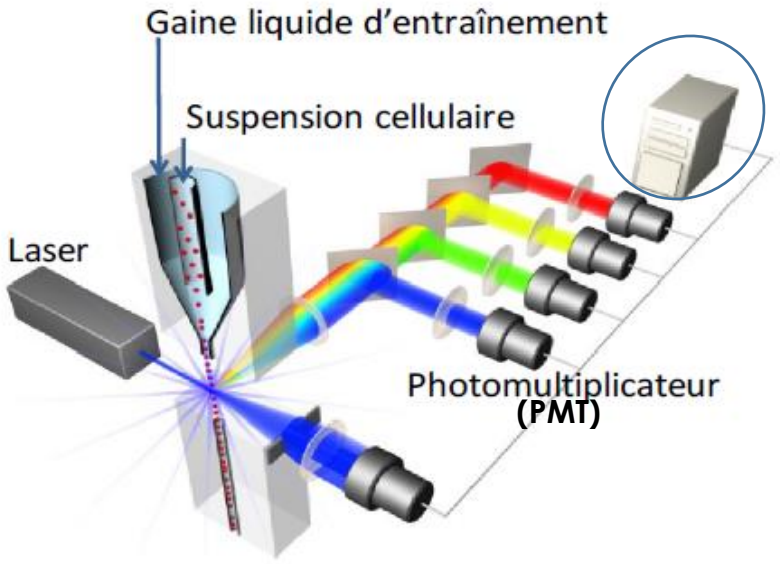
16/03/2021

Notions abordées pendant la formation

- **La fluidique**
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules

- **L'optique**
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise

- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en sigr électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



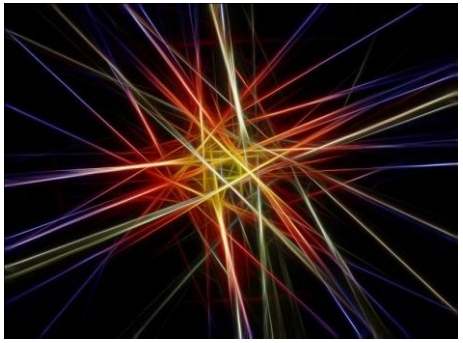
Pause

- **La Compensation**
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques

- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Cytométrie : Définition

Technique basée sur la diffusion de la lumière et la mesure de la fluorescence associée à une cellule, permettant sa caractérisation

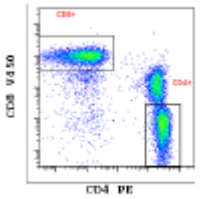


Cytométrie : Les avantages

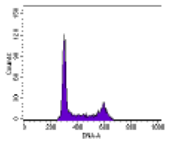
- Analyse quantitative (absorbance + émission comptées sur 4 ordres)
- Sensibilité de détection
- Rapidité (1000 à 10000 cellules par seconde)
- Robustesse statistique
- Analyse simultanée de plusieurs paramètres
- 2 types : analyse et analyse + tri

Cytométrie : Les applications

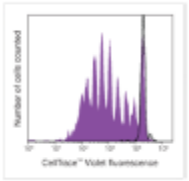
- Immuno-phénotypages cellulaires



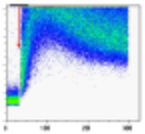
- Cycle cellulaire



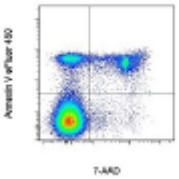
- Prolifération cellulaire



- Flux calcique



- Mesure de l'apoptose

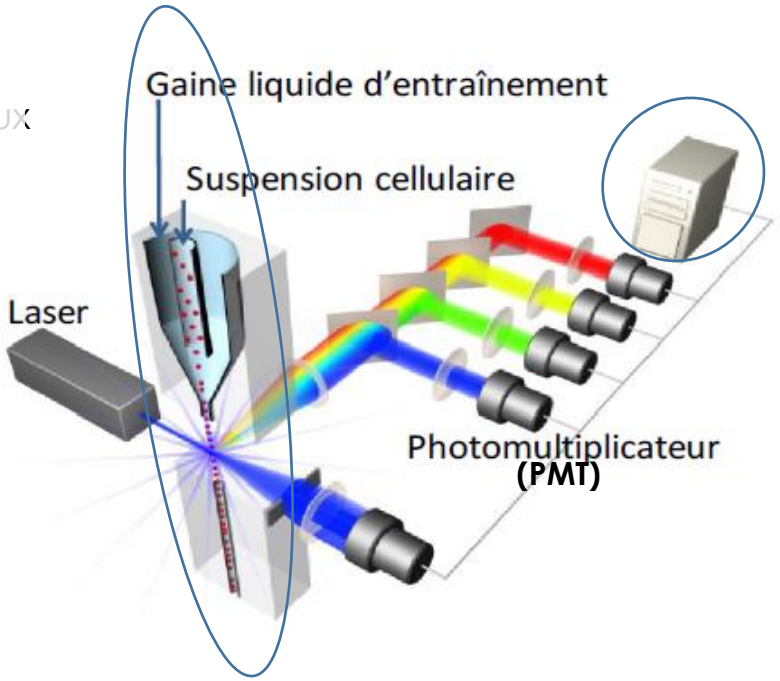


Notions abordées pendant la formation

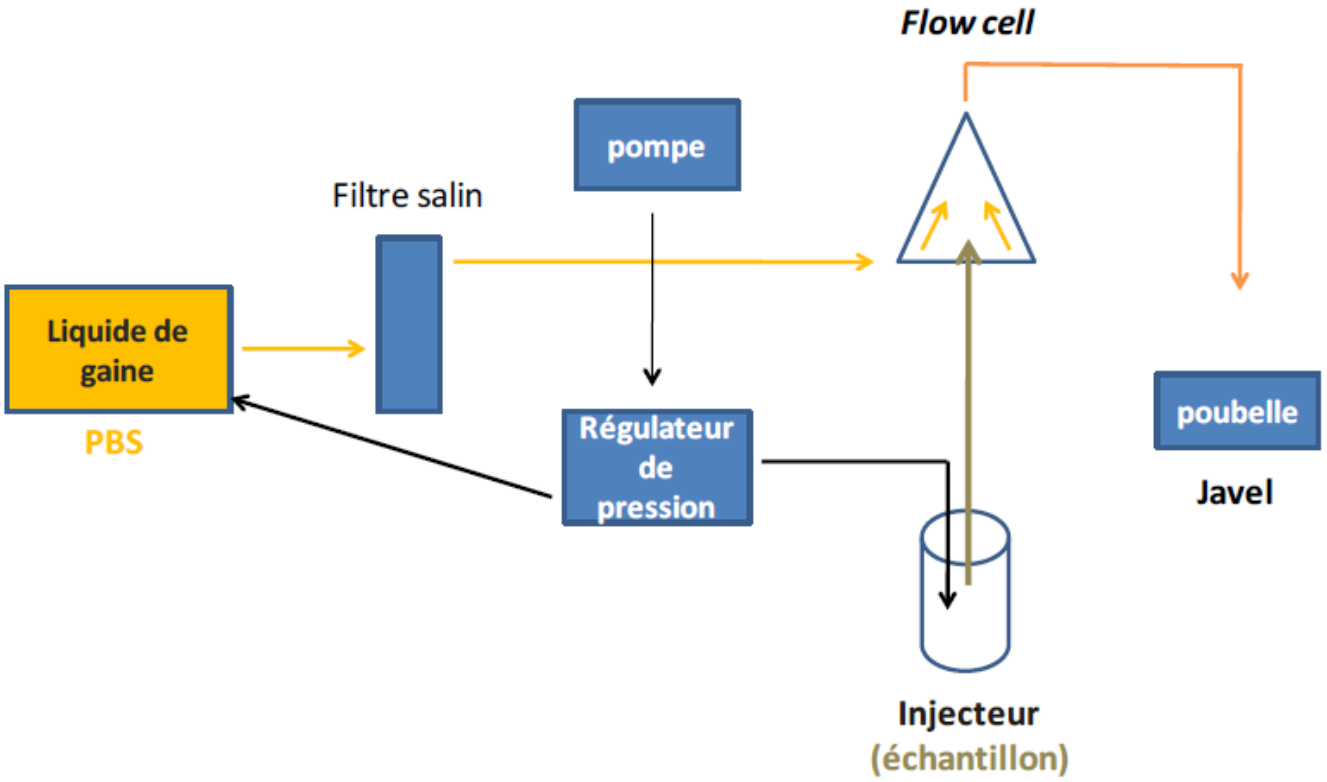
- **La fluidique**
  - ✓ **Délivre un courant constant de liquide de gaine**
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- **L'optique**
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

Pause

- **La Compensation**
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel



La fluidique : Généralités

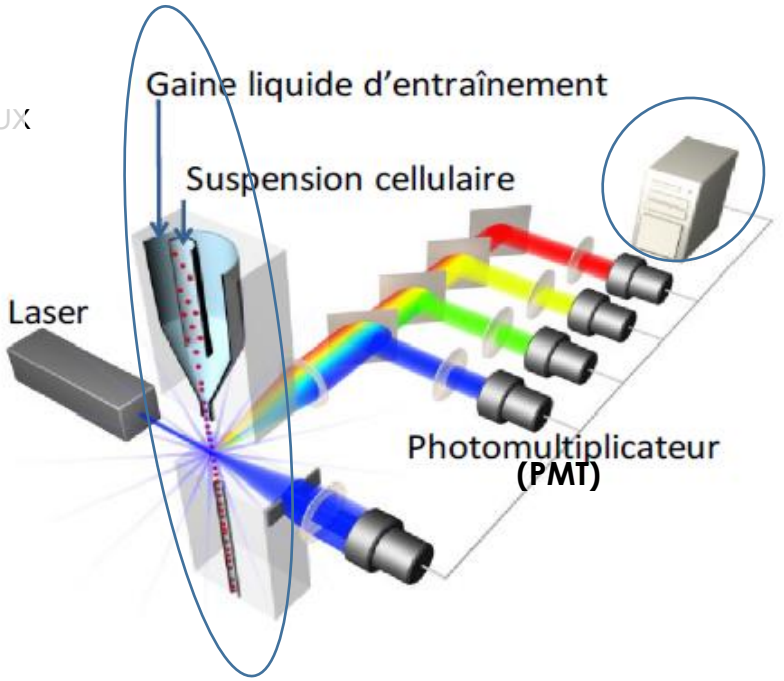


Notions abordées pendant la formation

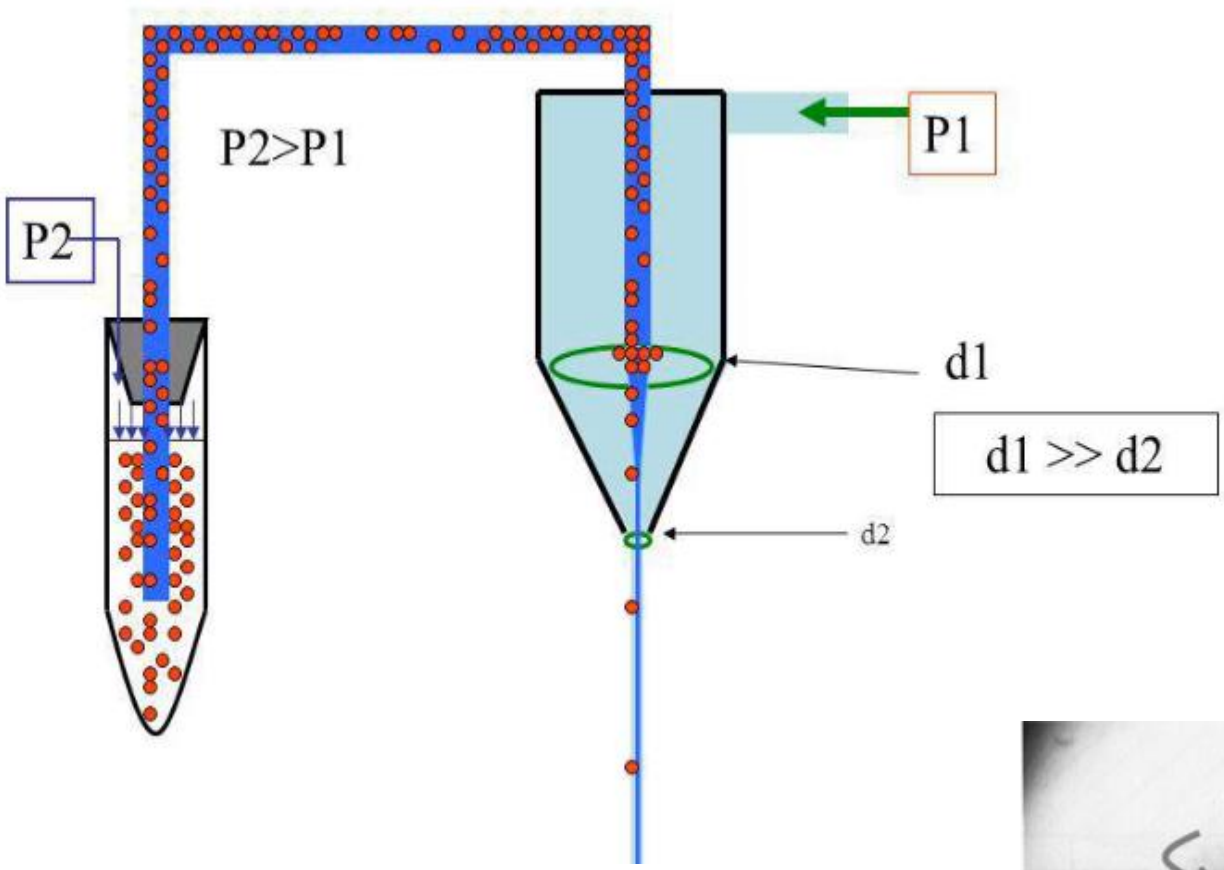
- **La fluidique**
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ **Transporte, organise et focalise l'échantillon**
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- **L'optique**
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

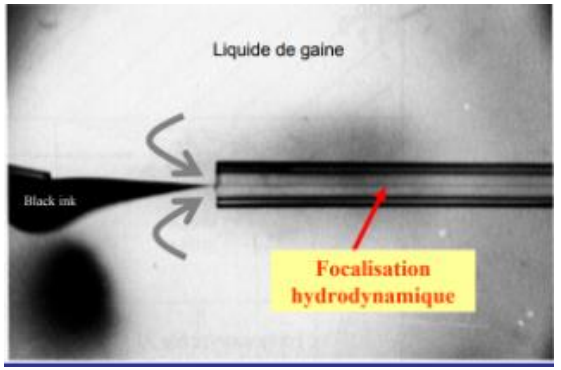
Pause

- **La Compensation**
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel



La fluidique : L'hydrofocalisation



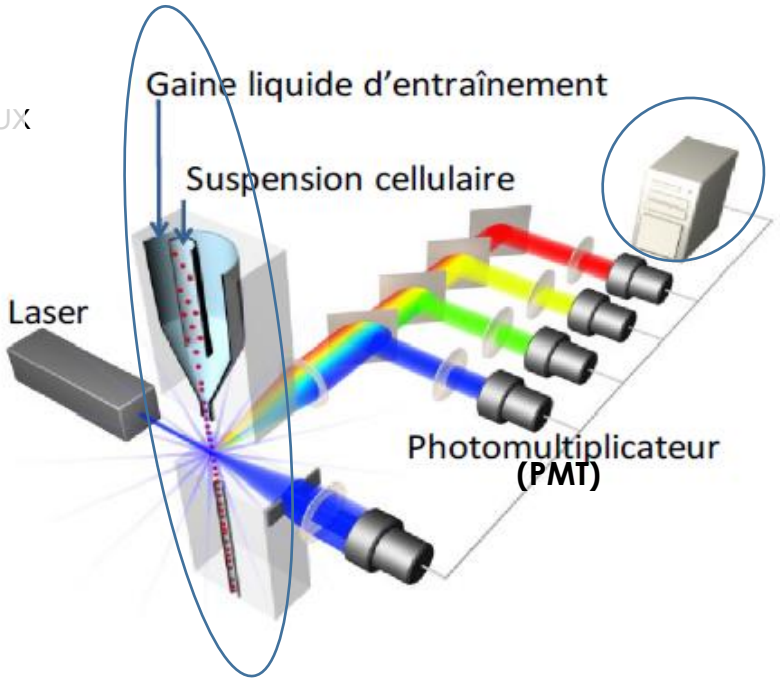


Notions abordées pendant la formation

- **La fluidique**
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ **Régule la vitesse de passage des cellules**
- **L'optique**
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

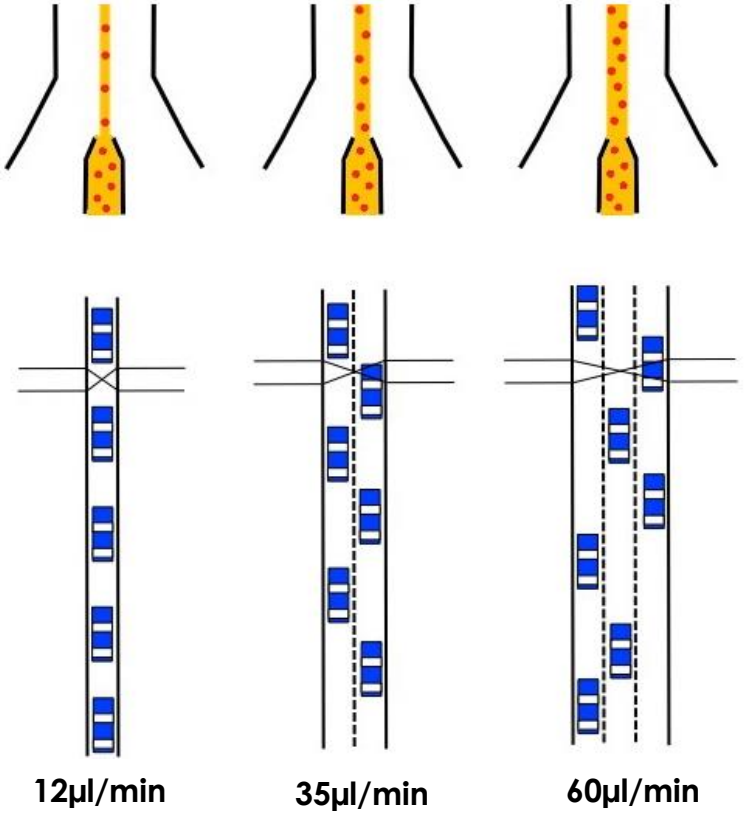
Pause

- **La Compensation**
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

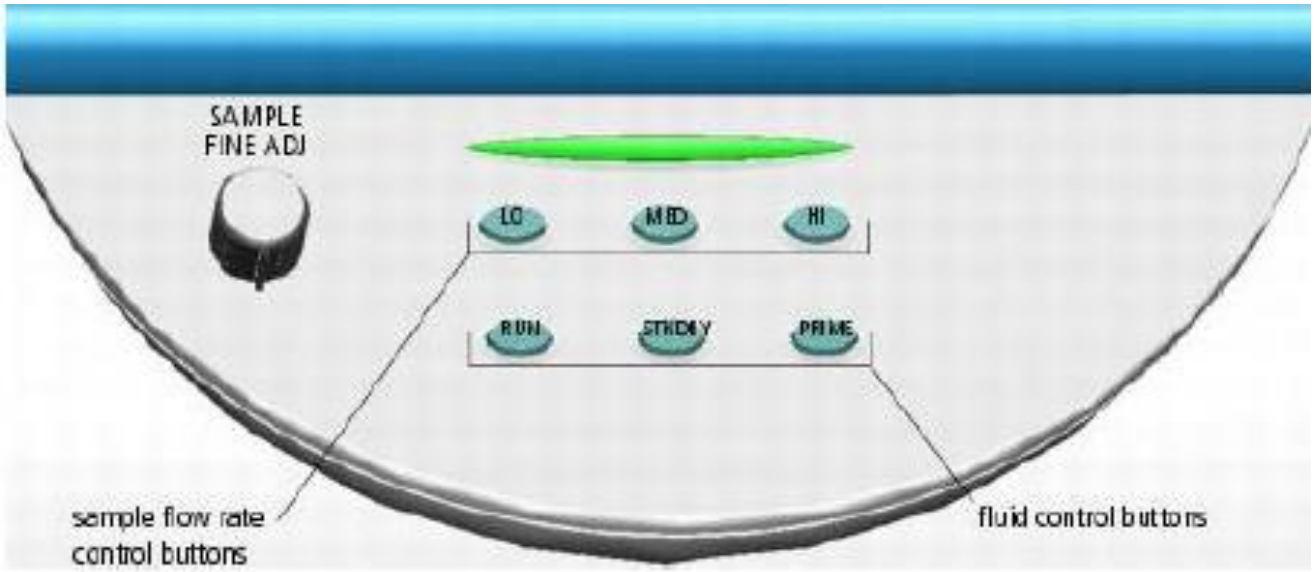


La fluidique : Vitesse de passage

Entrainement de l'échantillon :



La fluidique : La panneau de contrôle



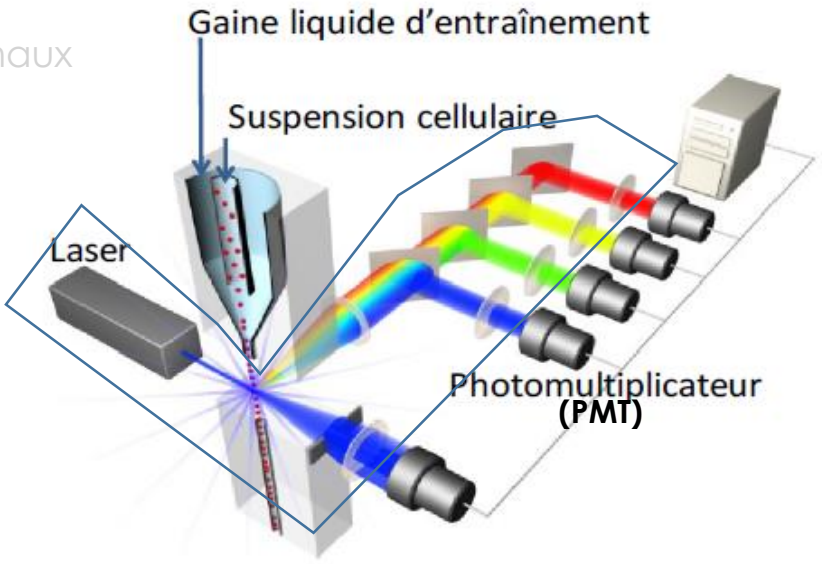
- **Différent sur le FACSCanto II**
- **Run – Standby – Prime**
- **Trois « FlowRates » : 12 – 35 – 60 µL/min**
- **Ajustement additionnel au « FlowRate » de 50 à 200%**

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules

- **L'optique**
  - ✓ **Focalise la lumière d'excitation**
  - ✓ Collecte la lumière émise

- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



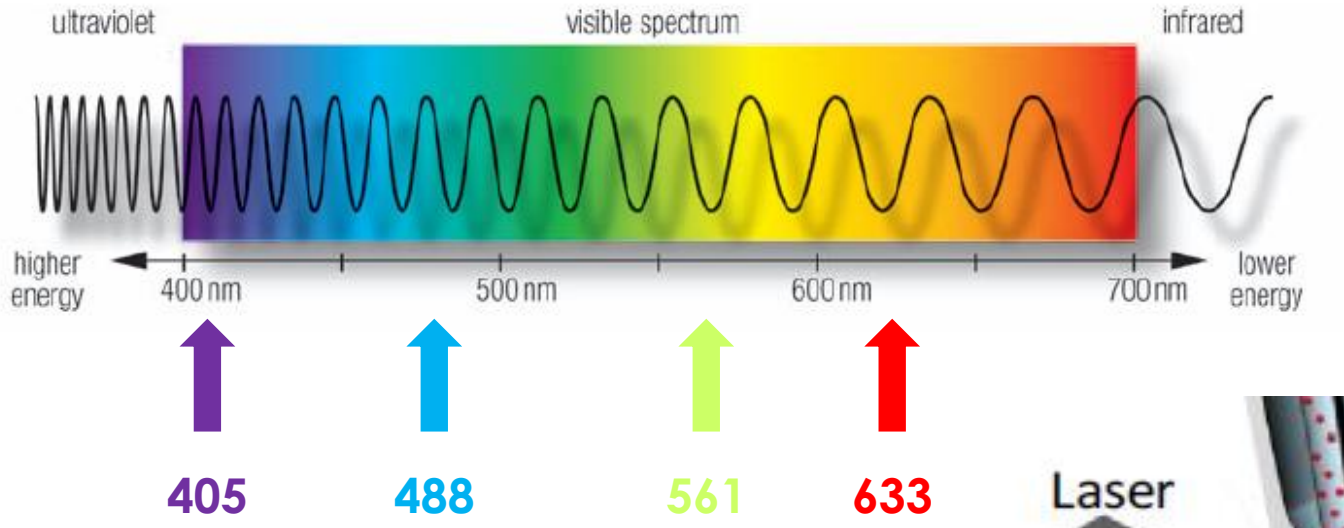
Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques

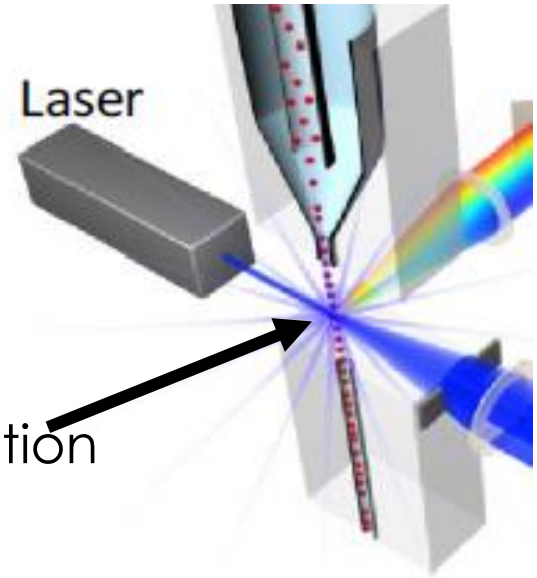
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

L'optique : Les lasers

Les différents lasers d'excitation



405 **488** **561** **633**

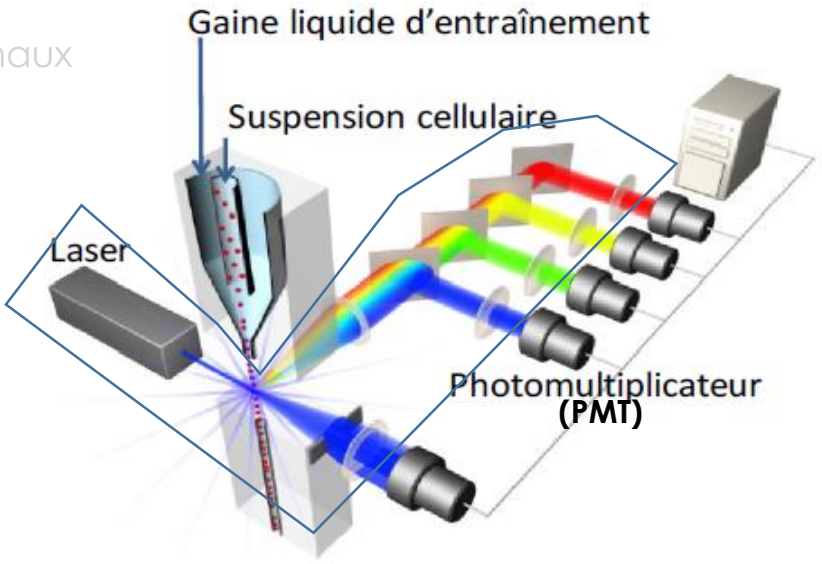


Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules

- **L'optique**
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ **Collecte la lumière émise**

- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques

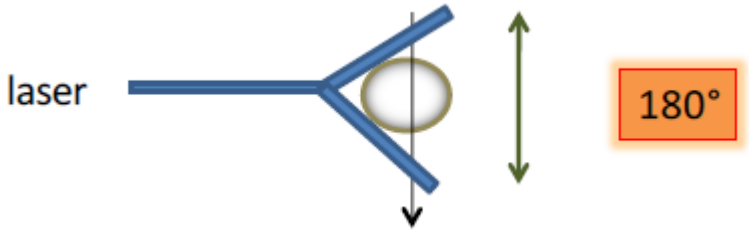
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

L'optique : Les paramètres mesurés

Les paramètres analysés : PHYSIQUE

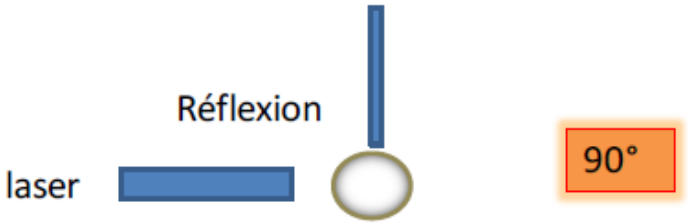
✓ **Fsc Forward Scatter : TAILLE**

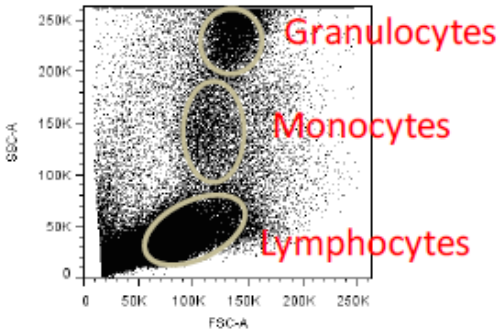
Provient de la diffraction à petit angle des cellules lors de leur passage devant le laser bleu



✓ **Ssc Side Scatter : GRANULOSITE**

Provient de la réflexion du laser bleu, fonction de la complexité/densité de la cellule

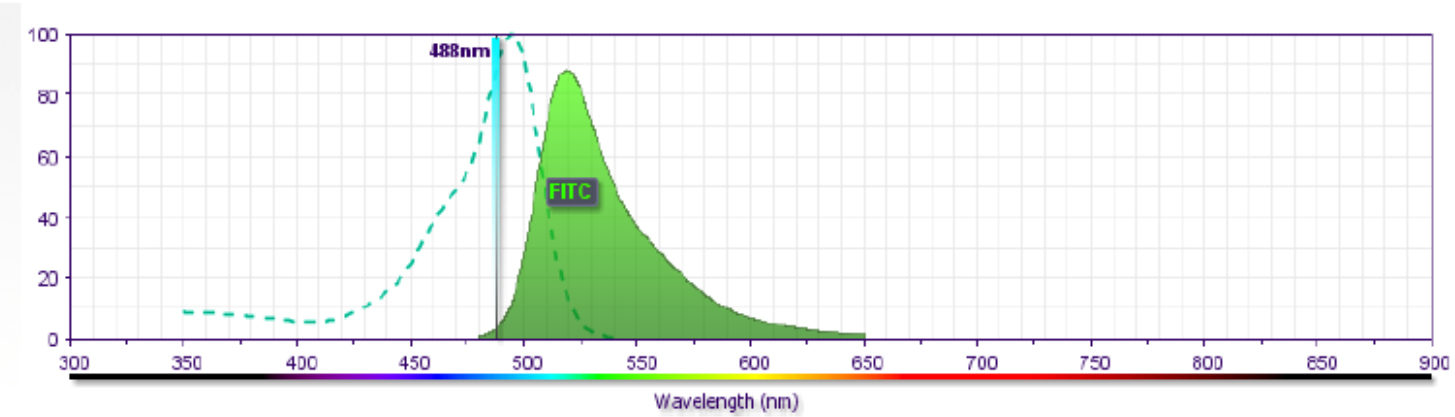




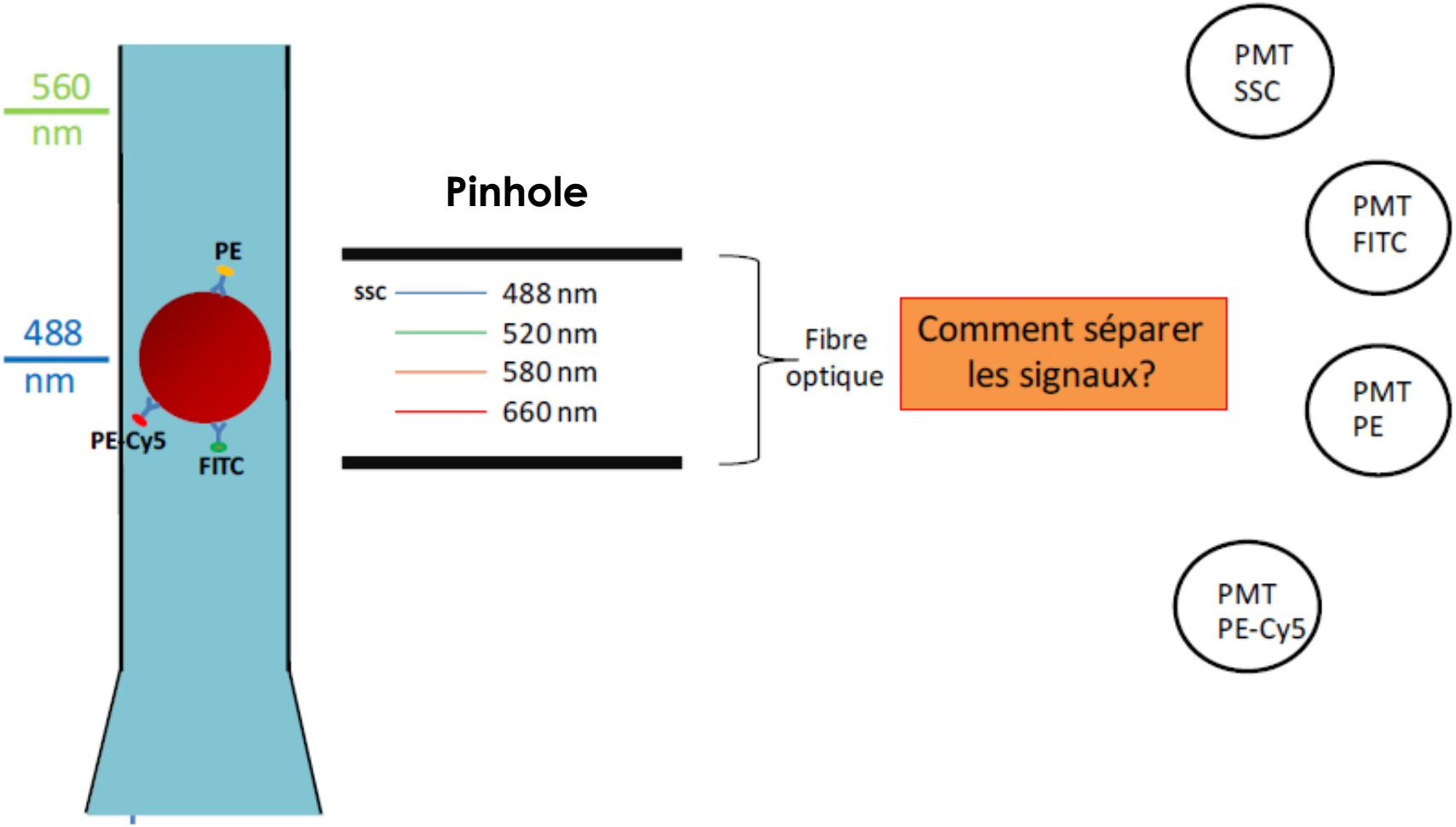
L'optique : Les paramètres mesurés

Les paramètres analysés : FLUORESCENCE

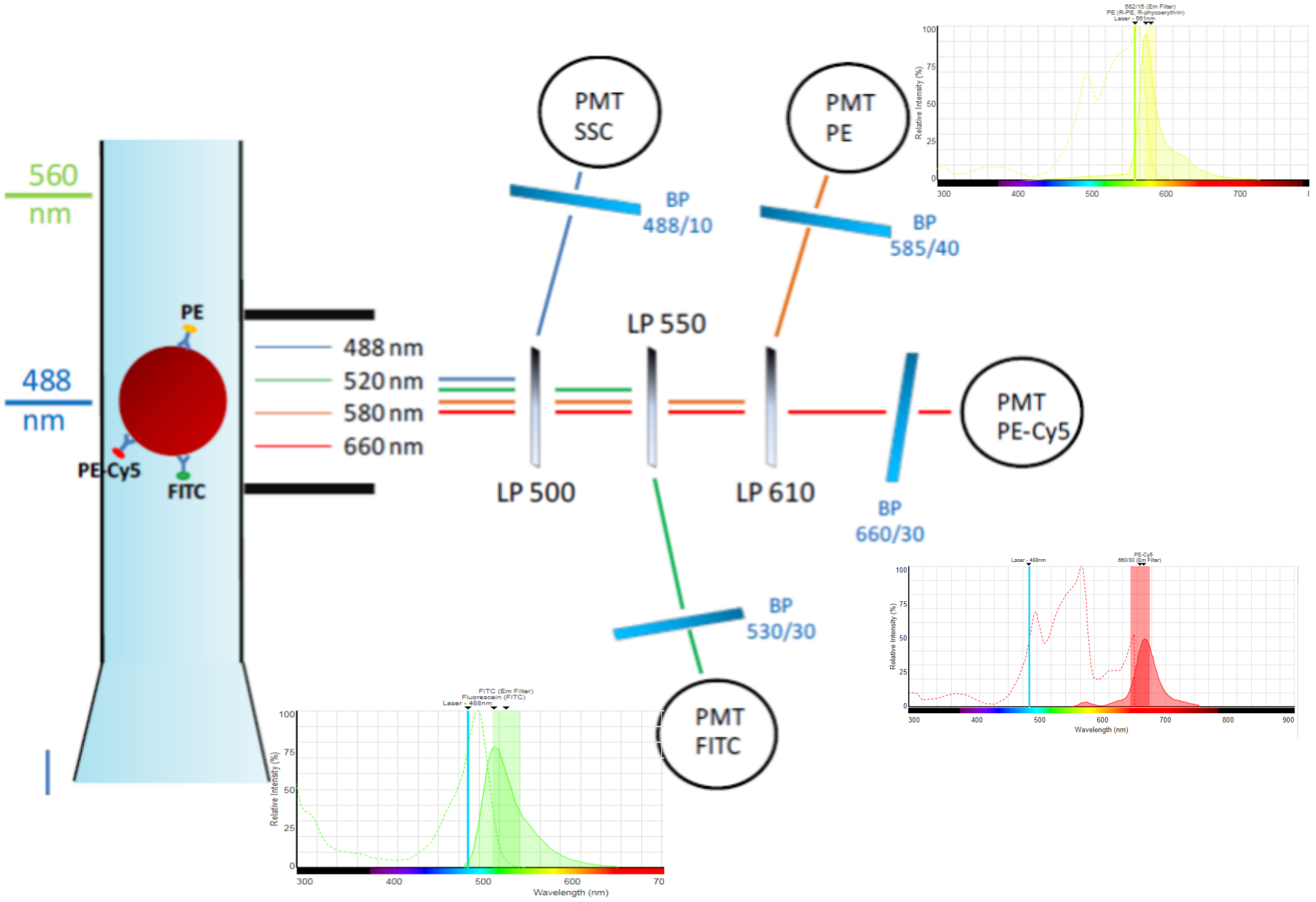
90°



L'optique : La collecte des signaux



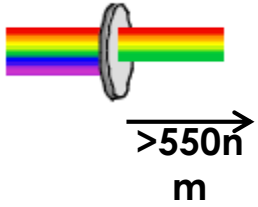
L'optique : Notions sur les filtres



L'optique : Notions sur les filtres

Les filtres

Long Pass (LP)



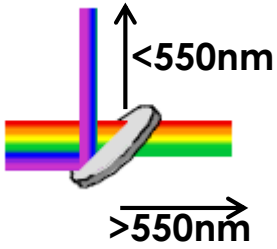
550 Long Pass (550LP)

Band Pass (BP)

600/100 Band Pass (600/100)

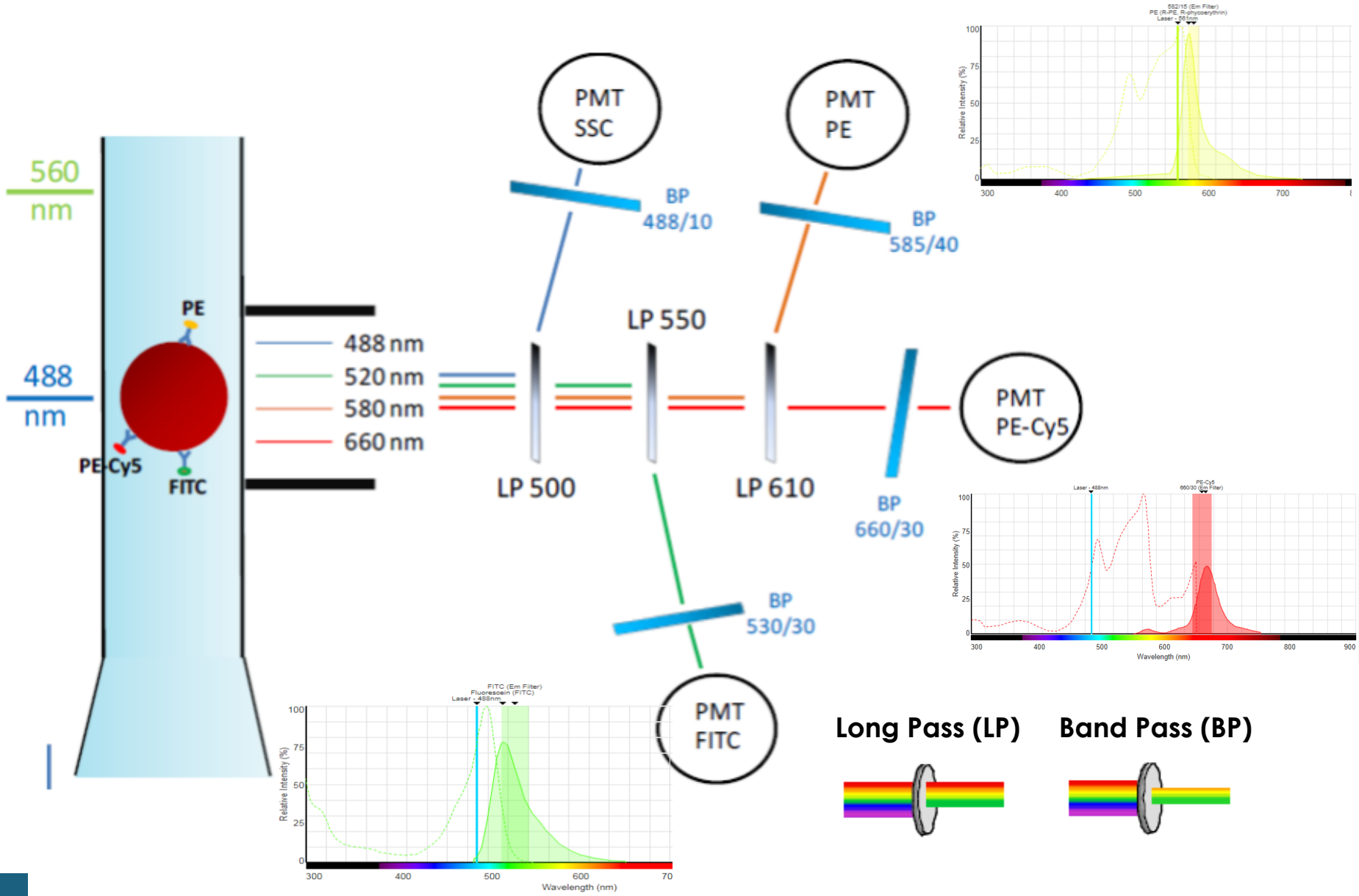
Le miroir dichroïque Long Pass

Long Pass (550nm)

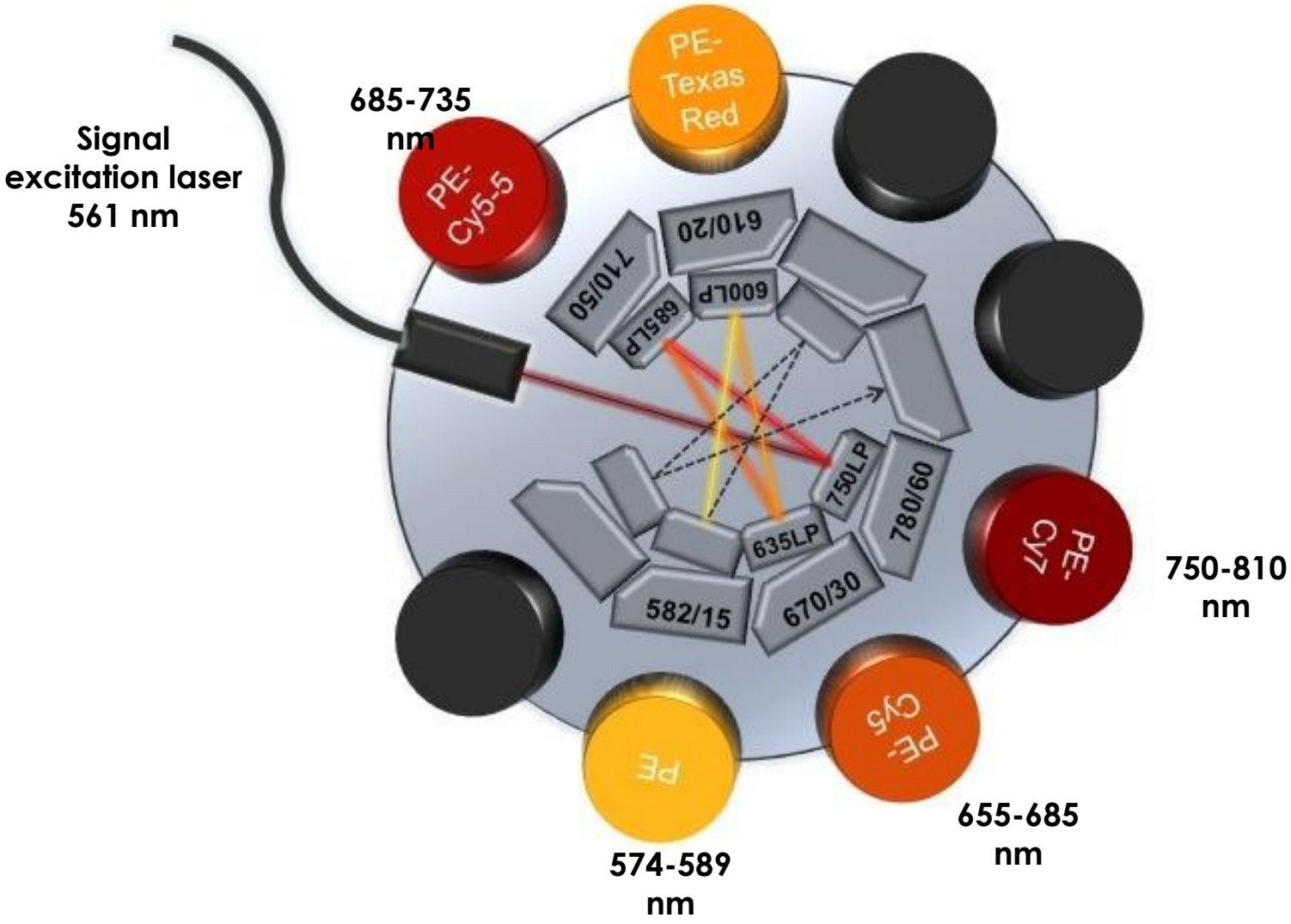


550 Long Pass (550LP)

L'optique : Notions sur les filtres

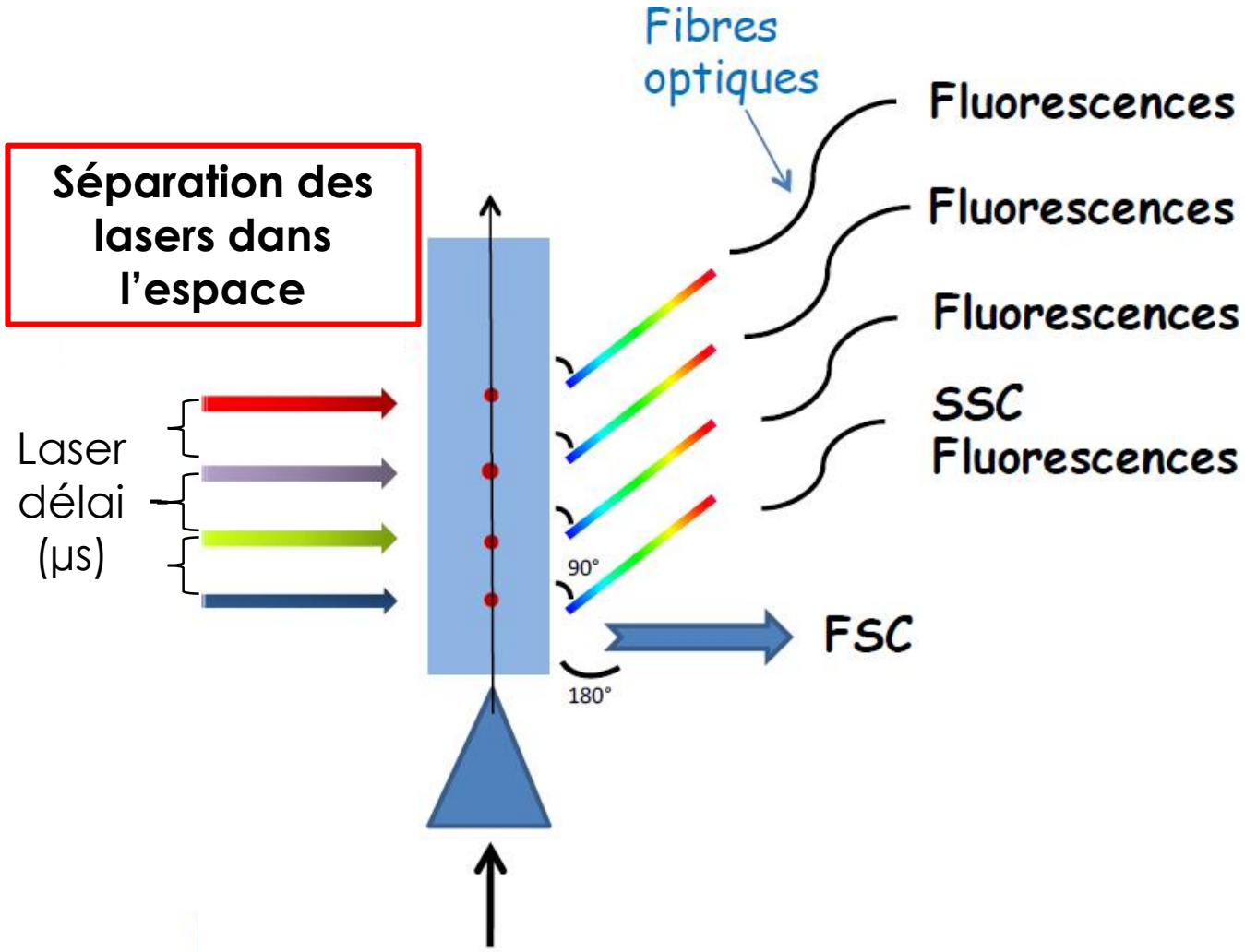


Exemple de configuration

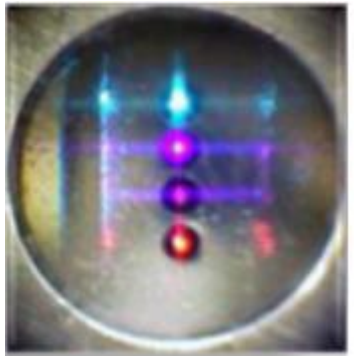


L'optique : Multi-lasers

Séparation des lasers dans l'espace

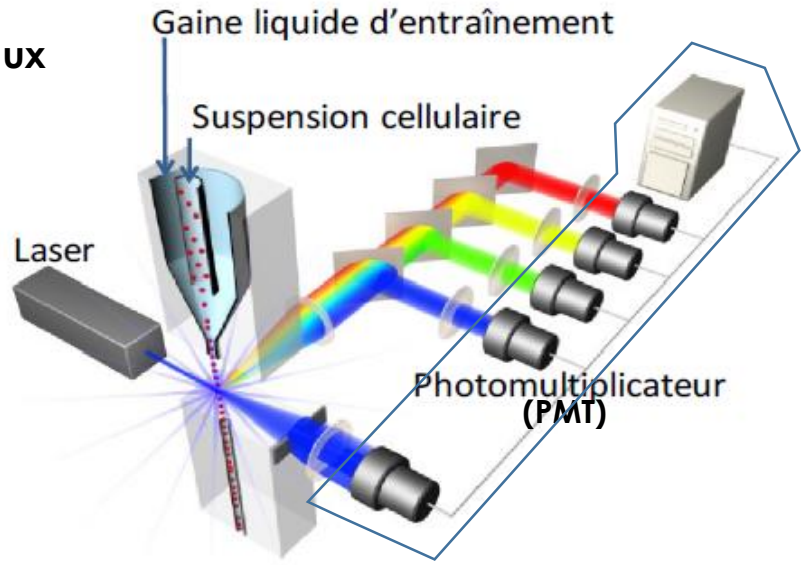


Collecte de la lumière indépendamment pour chacun des lasers



Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ **Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique**
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



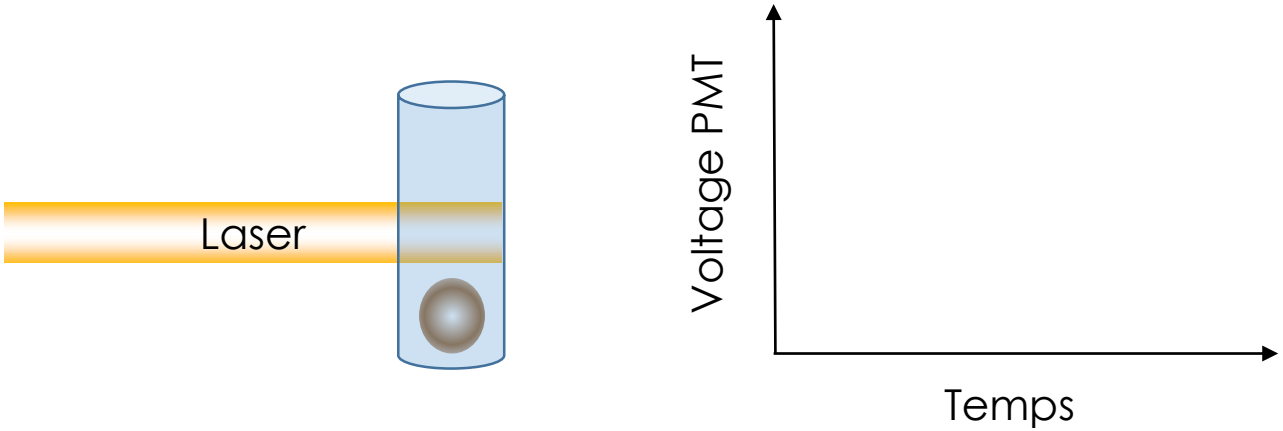
Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Nature du signal enregistré

Le PMT convertit le nombre de photons émis en courant électrique

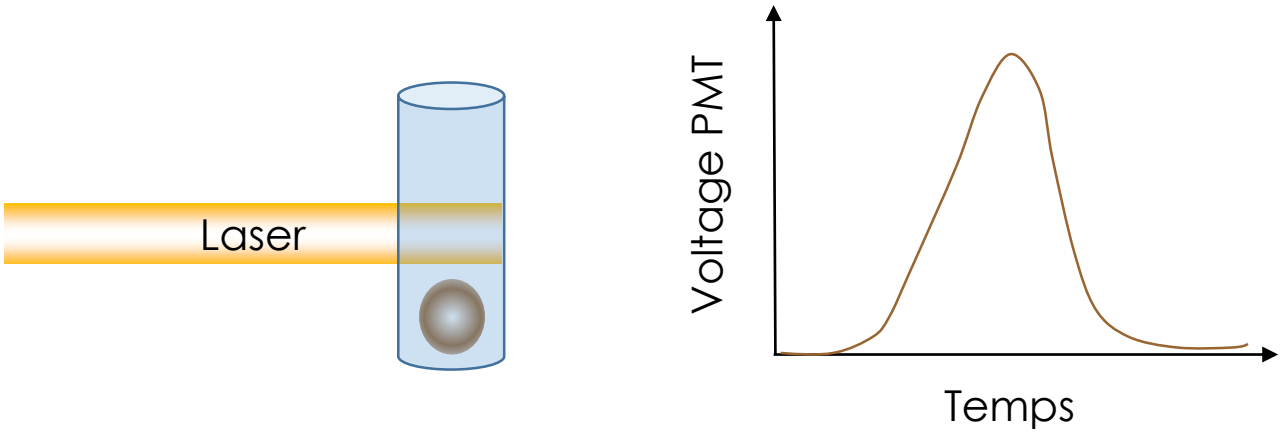
Le signal enregistré est un « pulse » correspondant à la mesure du voltage du PMT en fonction du temps



Nature du signal enregistré

Le PMT convertit le nombre de photons émis en courant électrique

Le signal enregistré est un « pulse » correspondant à la mesure du voltage du PMT en fonction du temps



PMT -> signal analogique à digitaliser pour analyse logiciel
-> notion de nombre de canaux

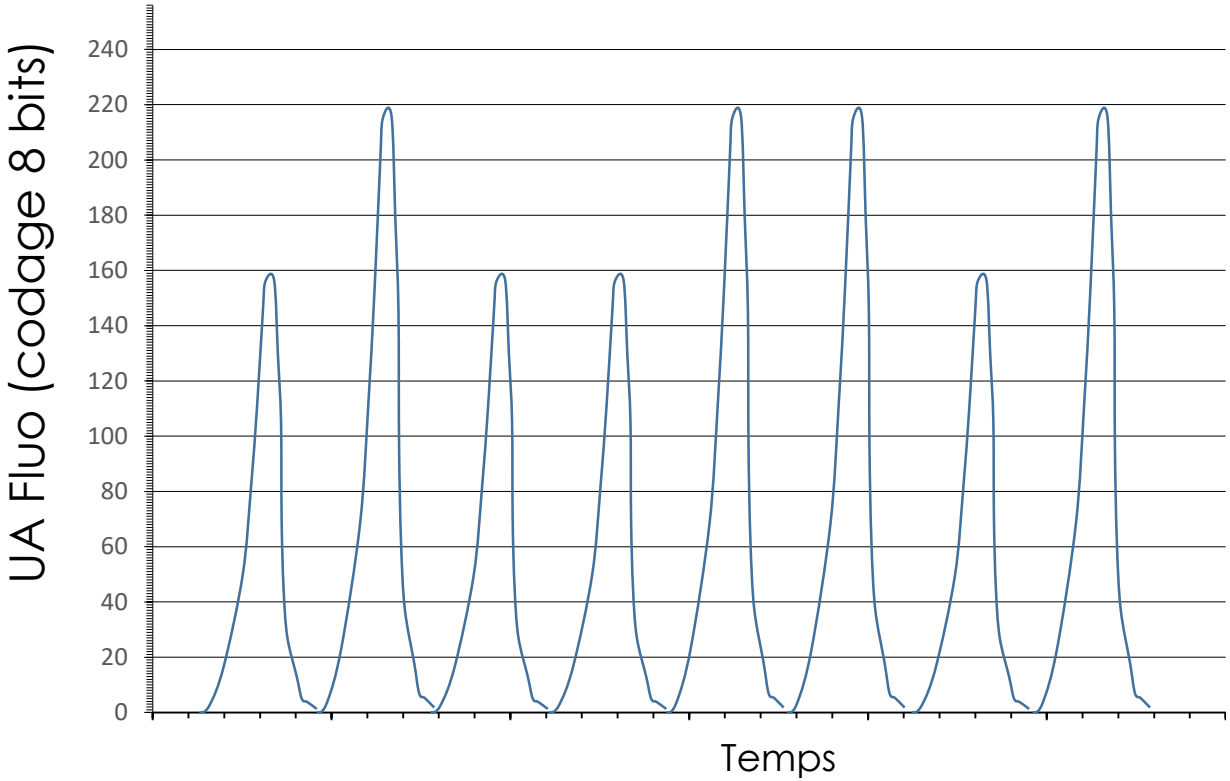
L'électronique : L'analyse du pulse

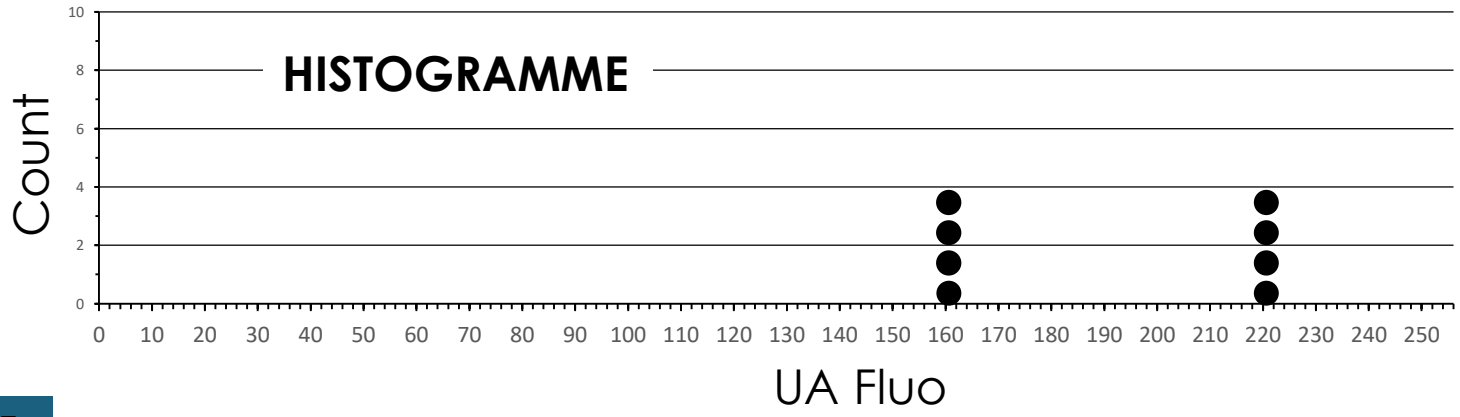
Quantification du « pulse » de voltage

- **H eight : valeur maximale digitalisée**

- **A rea : somme intégrée de toutes les mesures de « Height »**
- **W idth : proportionnelle au temps mis par la cellule pour passer devant le laser**

Création des histogrammes

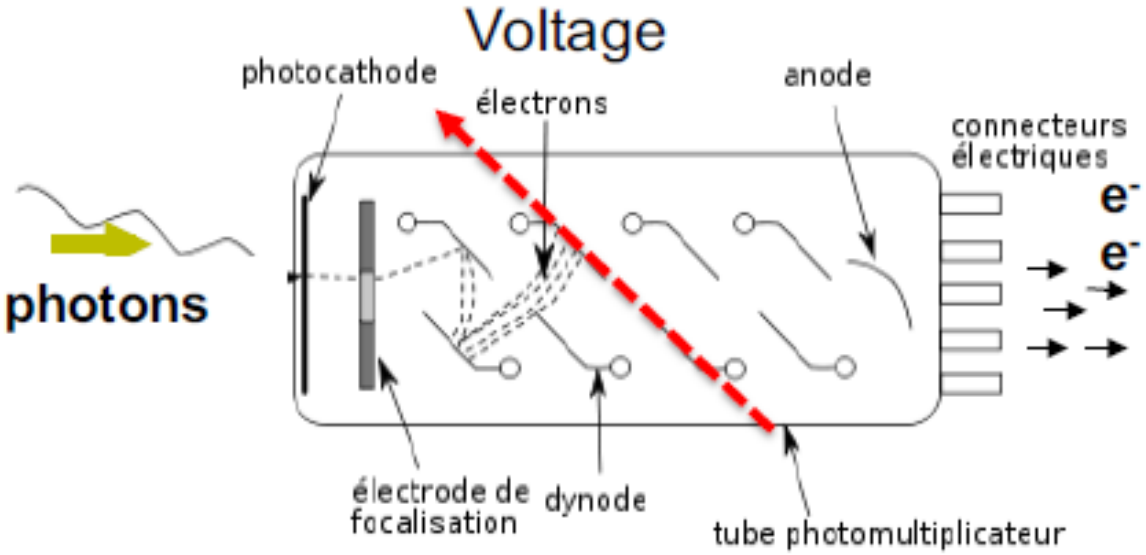


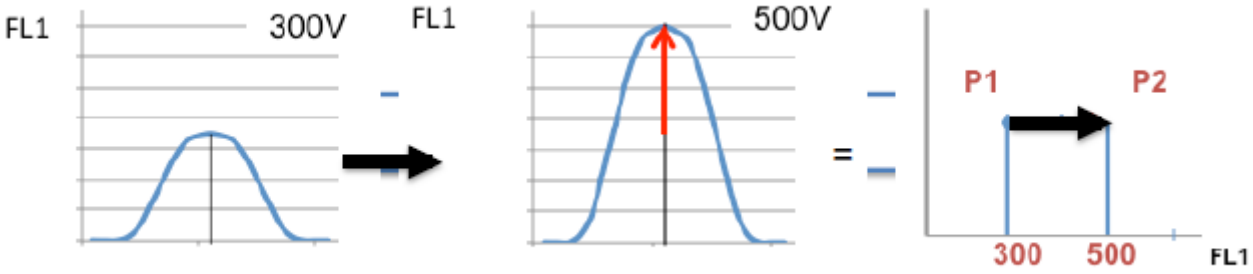


L'électronique : L'amplification

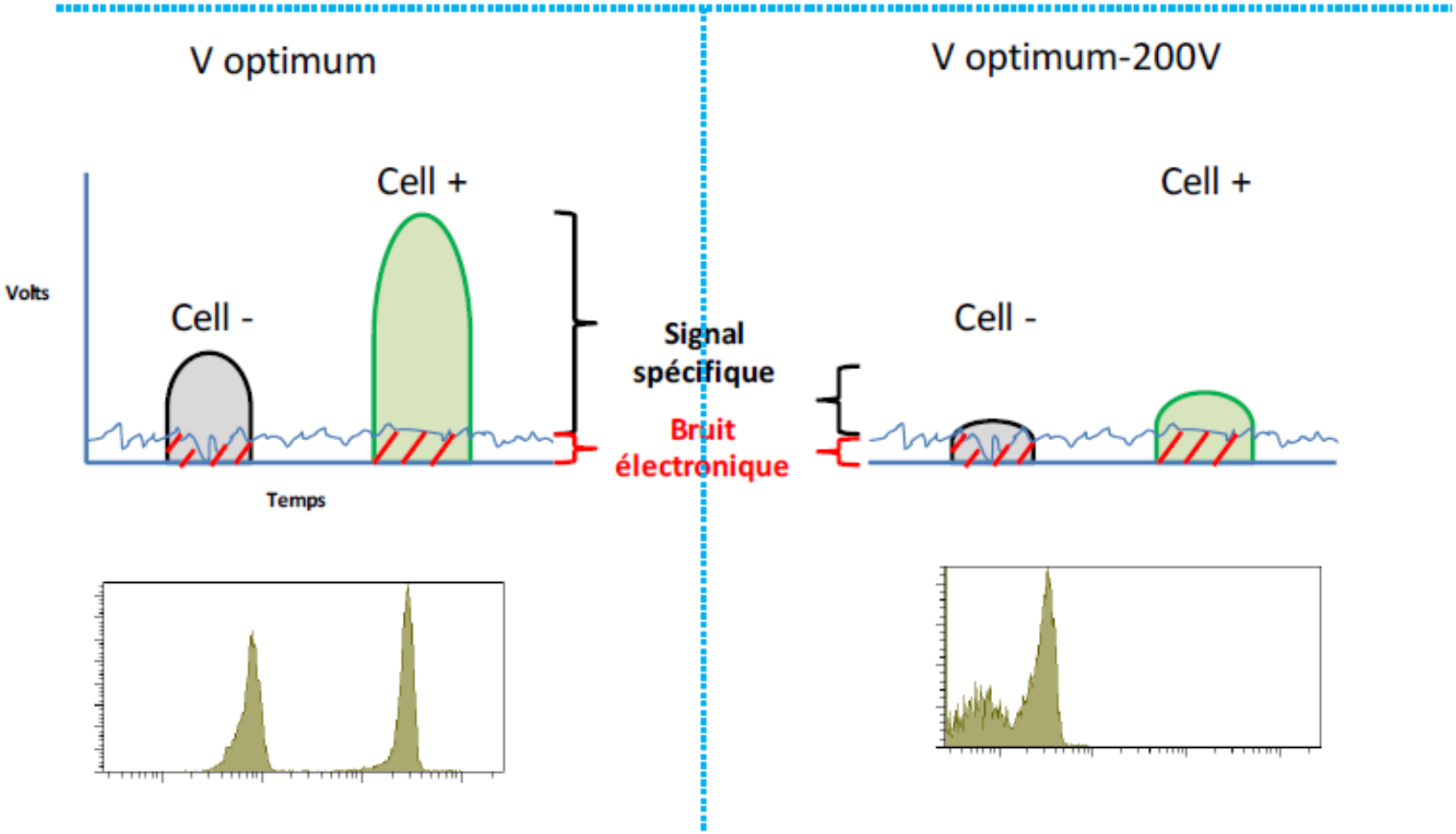
Amplification de l'impulsion pour un évènement identique

Le voltage appliqué aux PMT

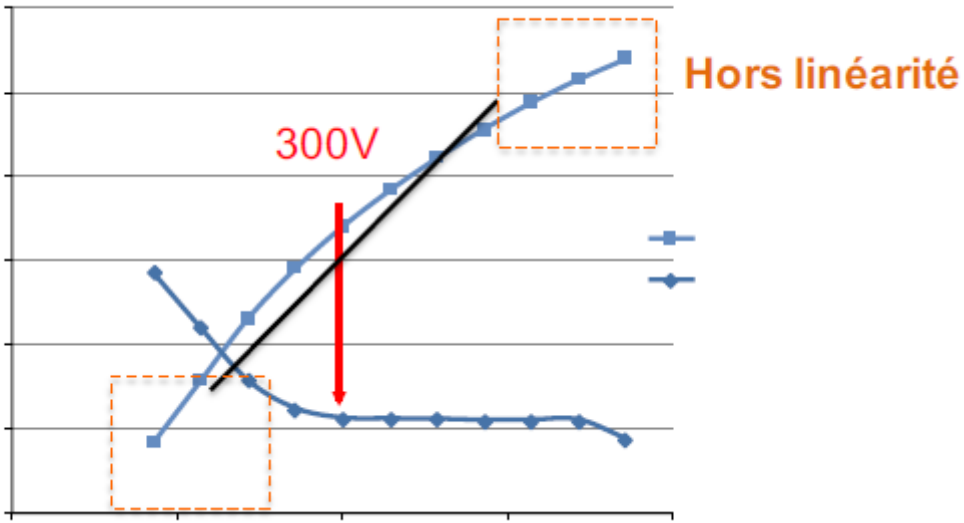


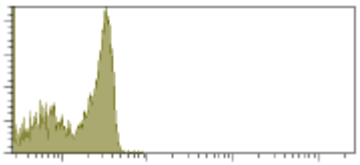


L'électronique : L'amplification

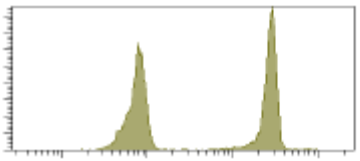


L'électronique : Les PMT optimaux





PMT opt.



L'électronique : La « List Mode Data »

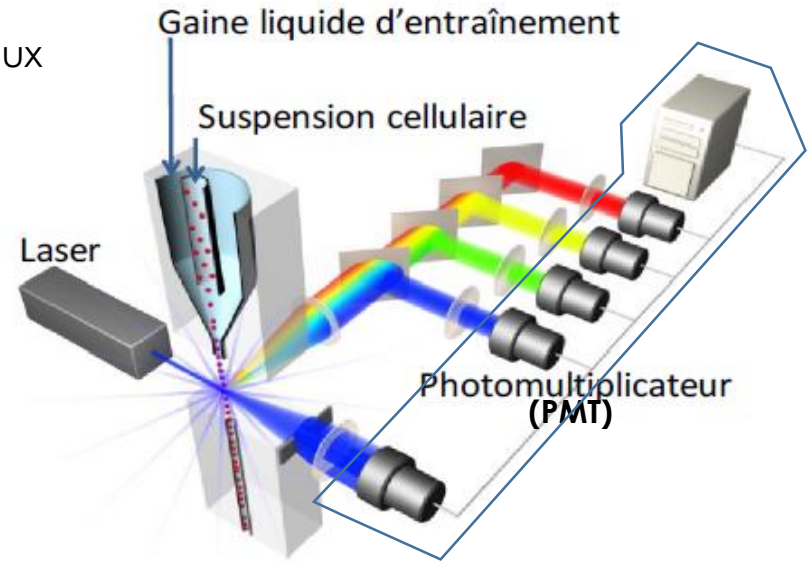
Stockage des données : le List Mode Data

A chaque cellule est associée une valeur dans le paramètre de fluorescence mesuré

Cellule Analysée	Fsc – A	Ssc – A	FITC – A	PE – A	APC - A
1	119	65	10	30	200
2	120	52	2324	2456	254
3	156	200	1821	2554	225
…					

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ **Affiche des graphiques de données**
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



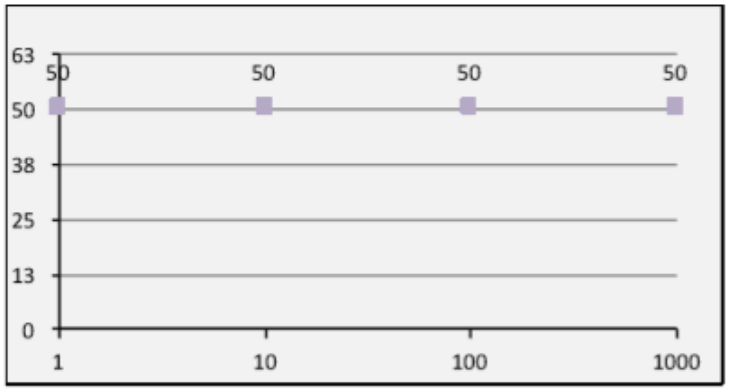
Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

L'affichage des données

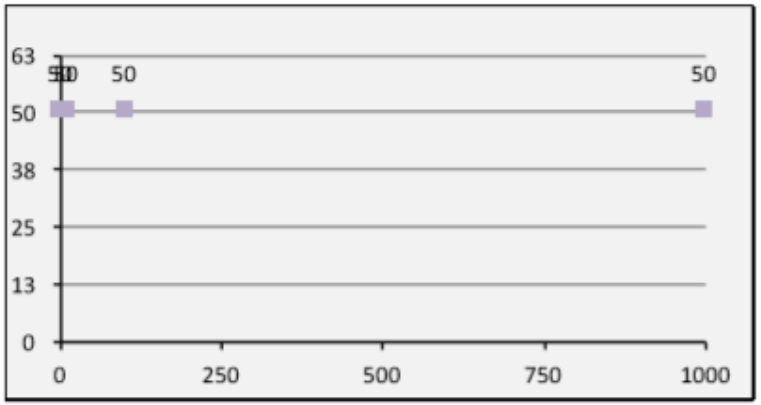
Les échelles de mesure de l'intensité de fluorescence en cytométrie :

Logarithmique



Visualisation des intensités élevées
Etalement des valeurs basses
Compression des valeurs hautes
<u>Paramètres de fluorescence</u>

Linéaire



Visualisation des faibles intensités
Etalement des valeurs hautes
Compression des valeurs basses
<u>Paramètres : FSC, SSC, fluo pour cycle cellulaire</u>

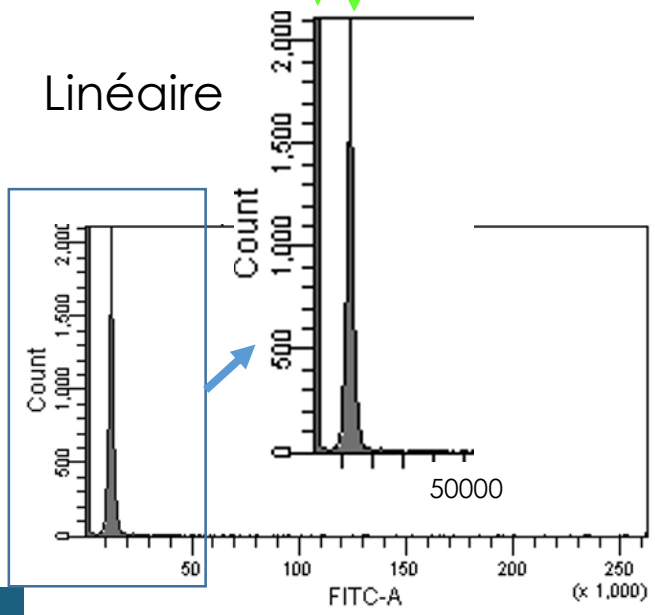
Représentation mono-paramétrique

A chaque cellule est associée une valeur dans le paramètre de fluorescence mesuré

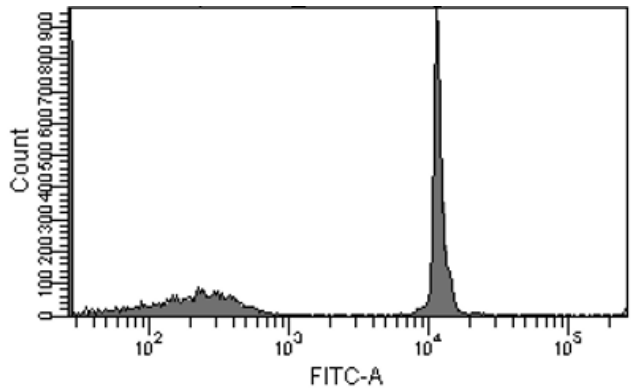
Cellule Analysée	Fsc – A	Ssc – A	FITC – A	PE – A	APC – A
1	119	65	2324	2456	200
2	120	52	100	150	254
3	156	200	1821	2554	225
…					

V U

Linéaire



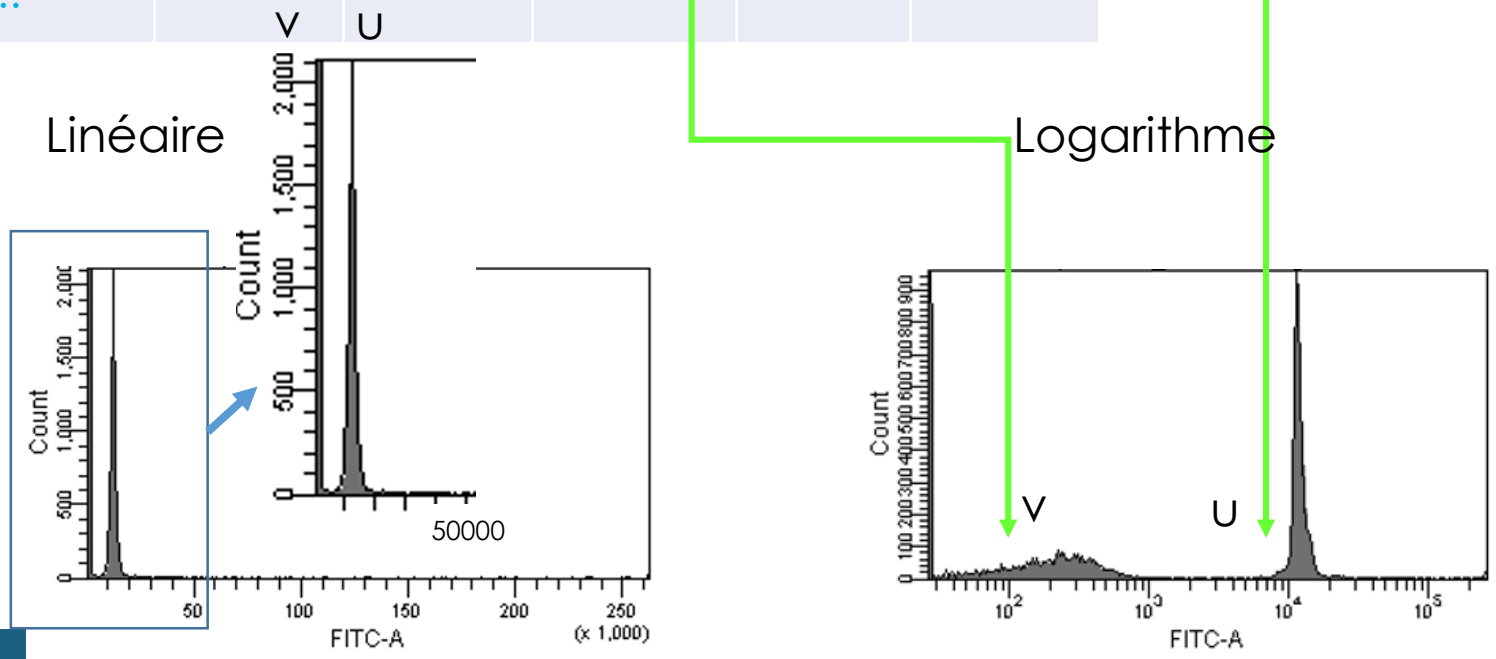
Logarithme



Représentation mono-paramétrique

A chaque cellule est associée une valeur dans le paramètre de fluorescence mesuré

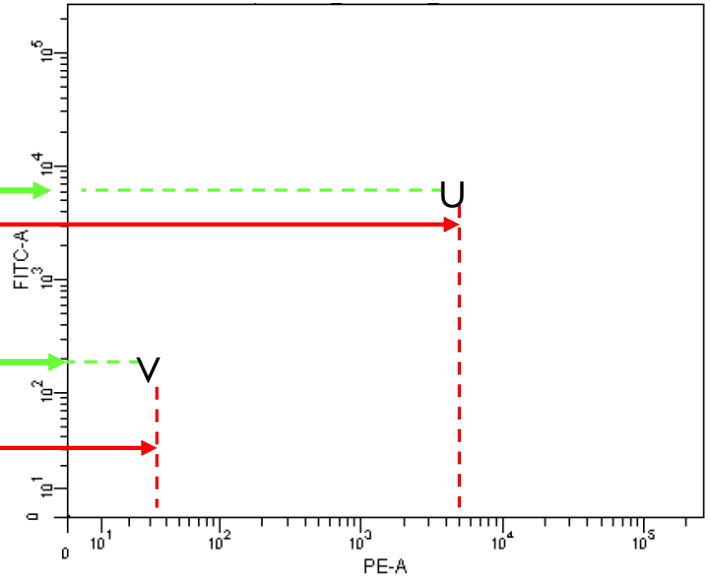
Cellule Analysée	Fsc – H	Ssc – H	FITC – A	PE – A	APC – A
1	119	65	2324	2456	200
2	120	52	100	150	254
3	156	200	1821	2554	225
…					

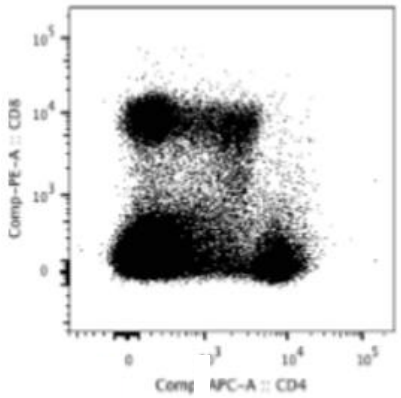


Représentation bi-paramétrique

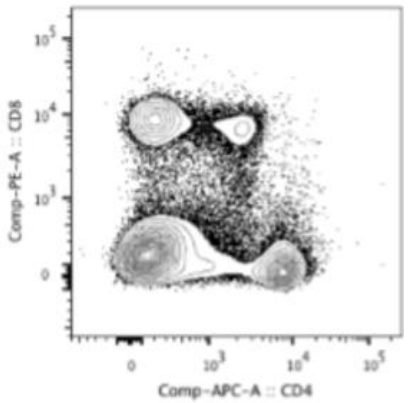
A chaque cellule est associée une valeur dans le paramètre de fluorescence mesuré

Cellule Analysée	Fsc – A	Ssc – A	FITC – A	PE – A	APC – A
1	119	65	2324	2456	200
2	120	52	100	150	254
3	156	200	1821	2554	225
…					

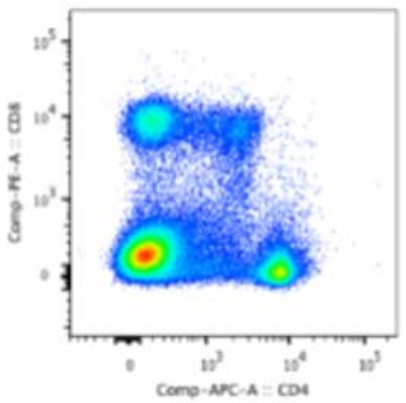




Pas de notion de densité
DOT PLOT



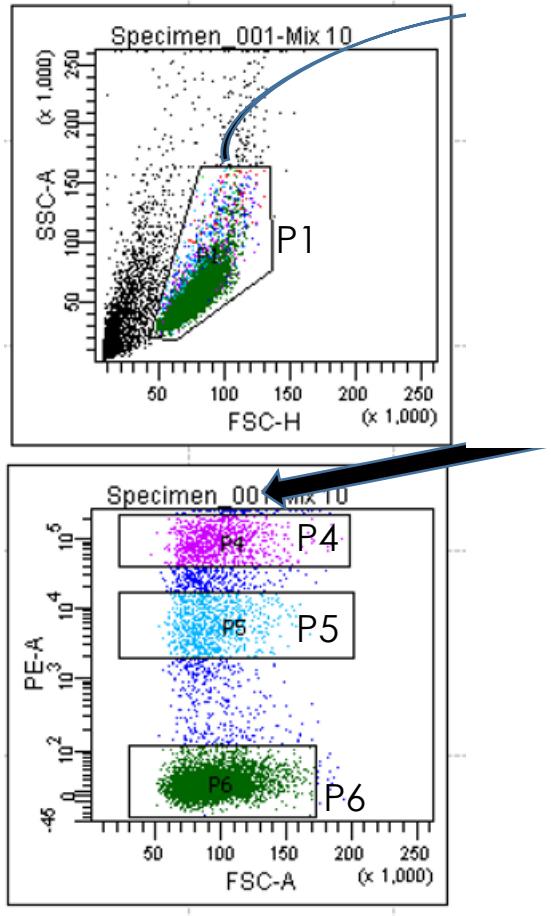
Densité par courbe de niveau
CONTOUR PLOT



Densité par pseudocouleur
PSEUDOCOLOR PLOT

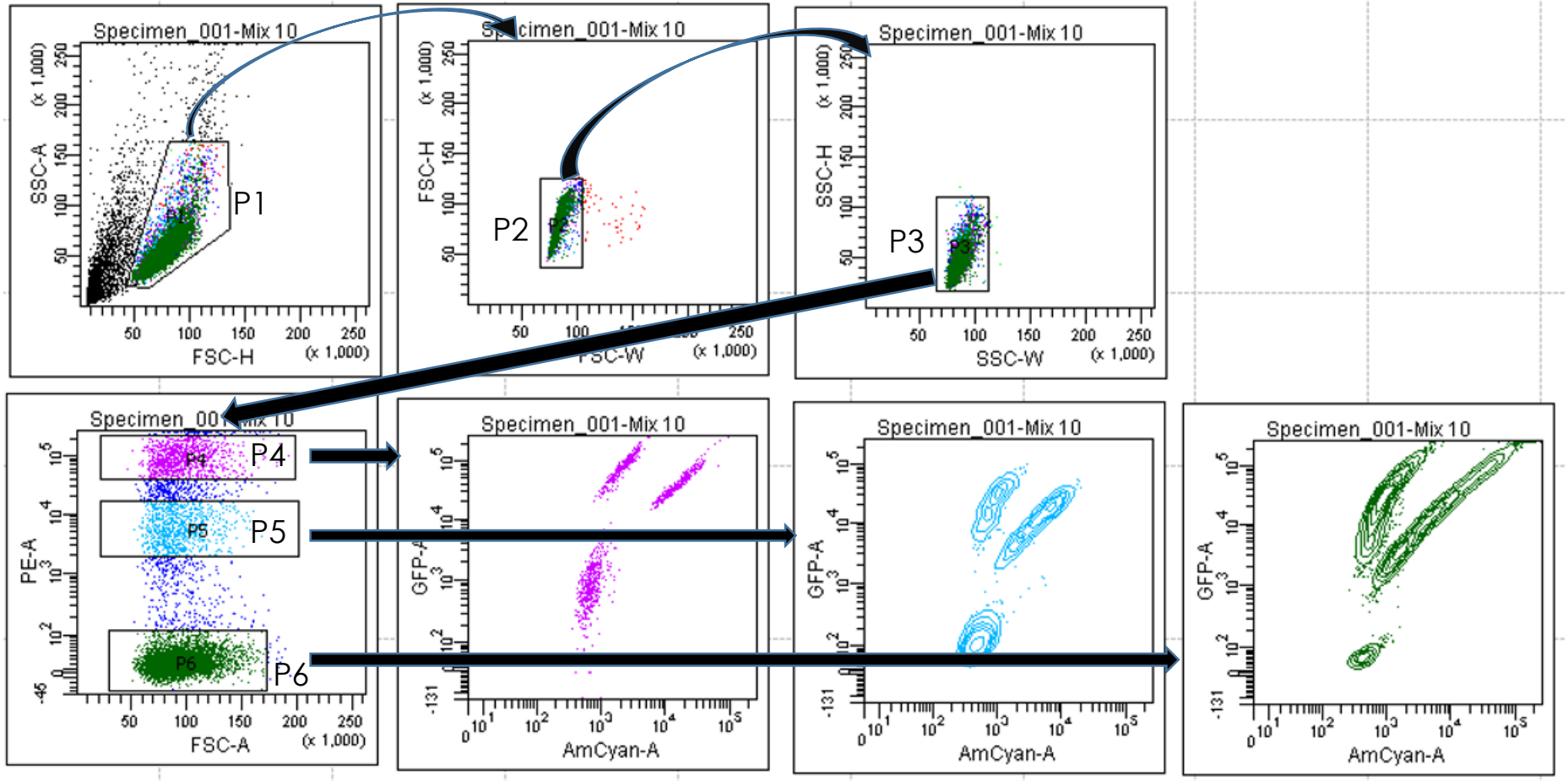
Le fenêtrage ou « gating »

Permettent de sélectionner des régions et sous-groupes de manière à restreindre l'analyse à des signaux provenant des cellules d'intérêt



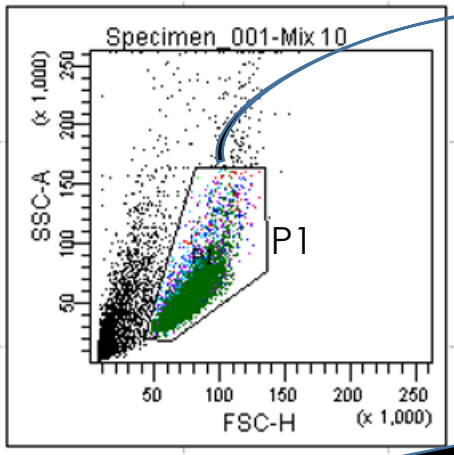
Le fenêtrage ou « gating »

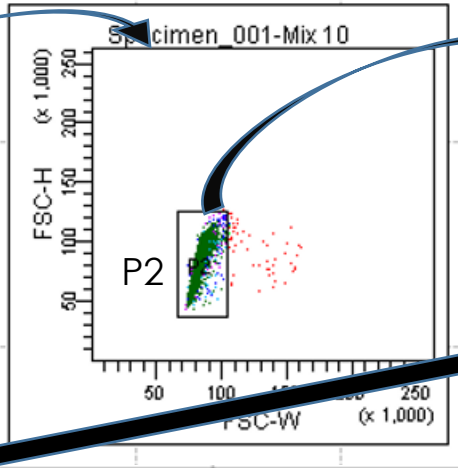
Permettent de sélectionner des régions et sous-groupes de manière à restreindre l'analyse à des signaux provenant des cellules d'intérêt

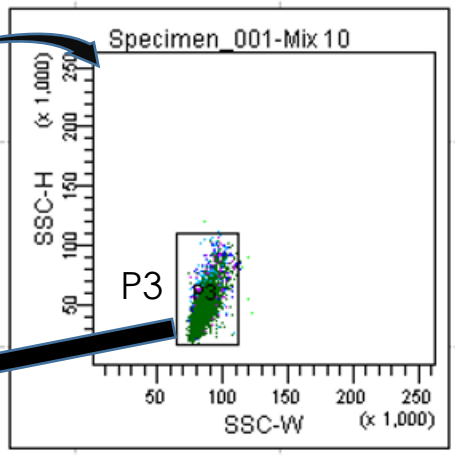


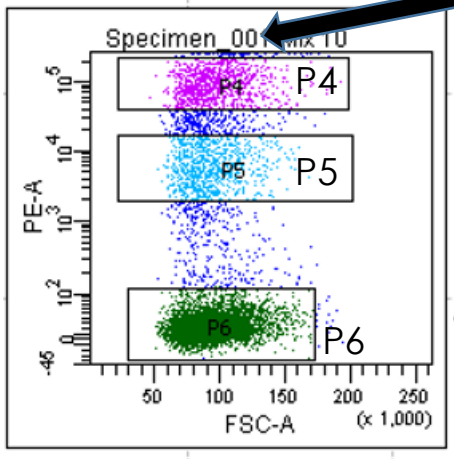
Le fenêtrage ou « gating »

Permettent de sélectionner des régions et sous-groupes de manière à restreindre l'analyse à des signaux provenant des cellules d'intérêt







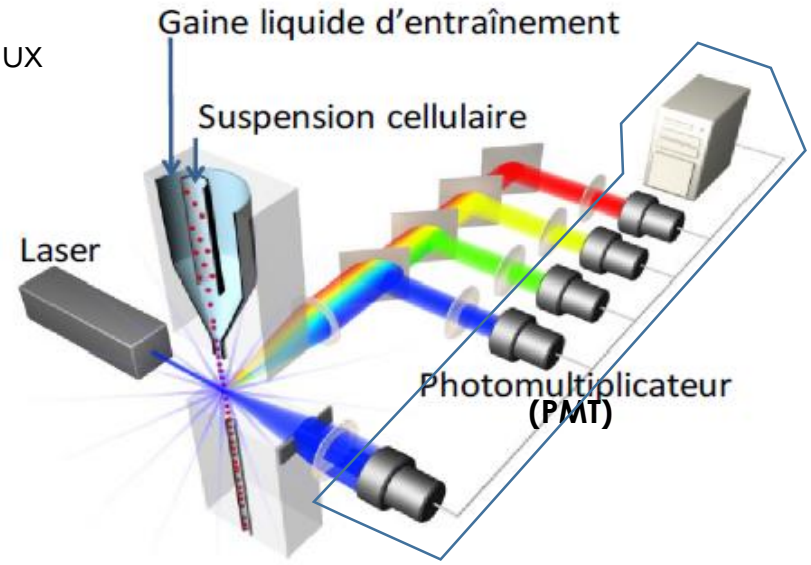


Tube: Mix 10

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	7,350	73.5	73.5
P2	7,292	99.2	72.9
P3	7,286	99.9	72.9
P4	1,049	14.4	10.5
P5	850	11.7	8.5
P6	4,635	63.6	46.4

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ **Permet d'éliminer des évènements indésirables**
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

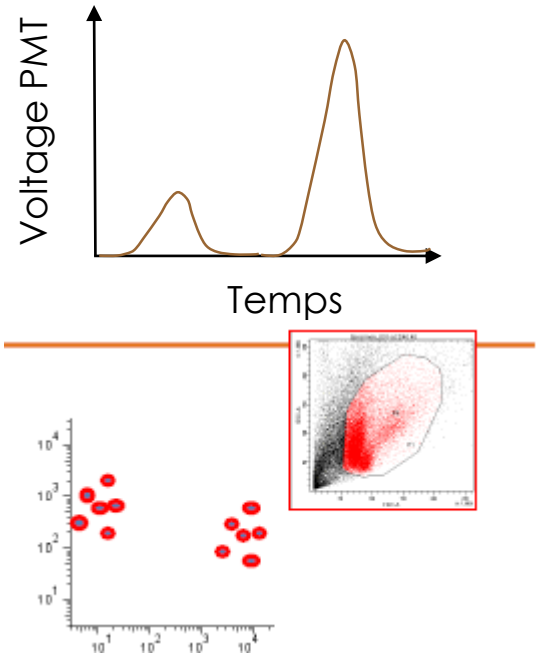


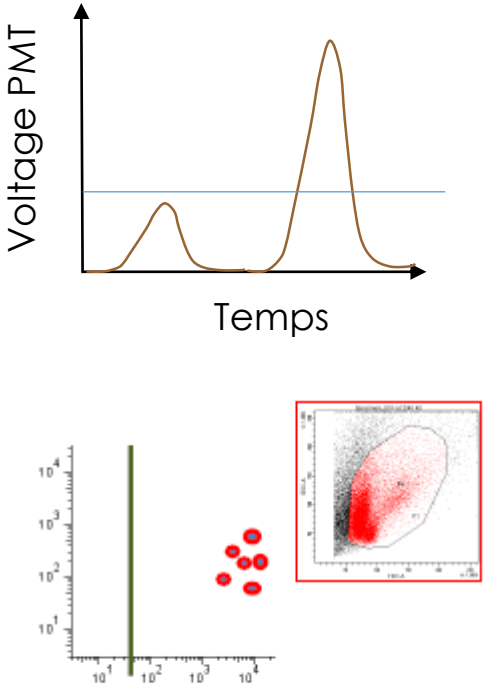
Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

L'électronique : Le seuil ou « threshold »

La notion de seuil (Threshold)



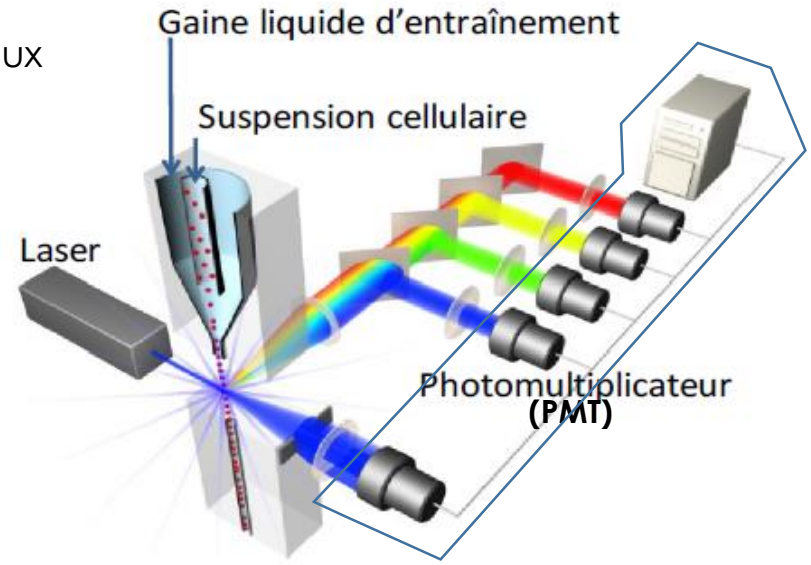


- **Généralement posé sur le paramètre de taille (Fsc)**
- **Permet de diminuer le nombre d'évènements acquis et sans intérêt**
- **La taille du fichier diminuée, l'analyse est plus rapide**

Le paramètre de taille étant le déclencheur de l'analyse, tout évènement inférieur au seuil ne sera pas listé

Notions abordées pendant la formation

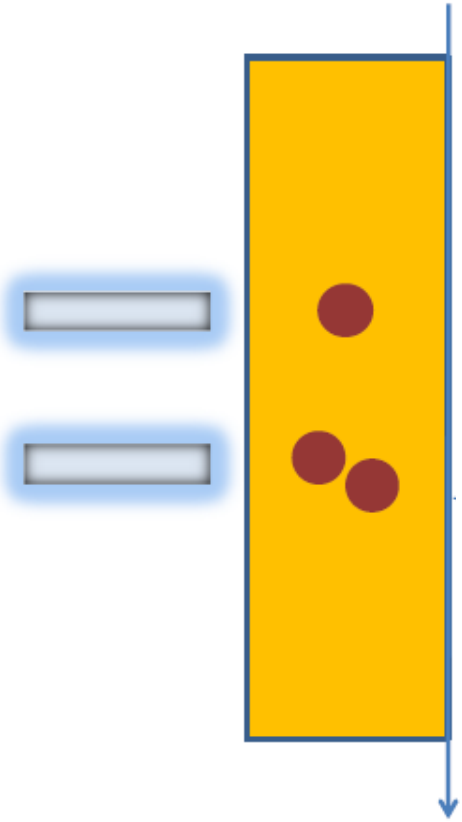
- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ **Permet d'éliminer les doublets**
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

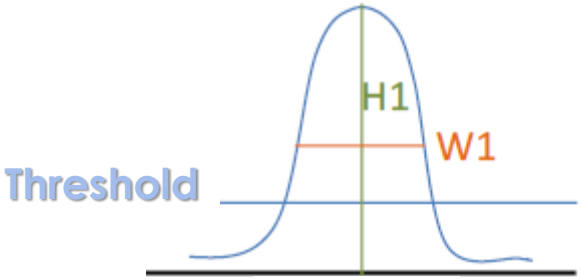


Pause

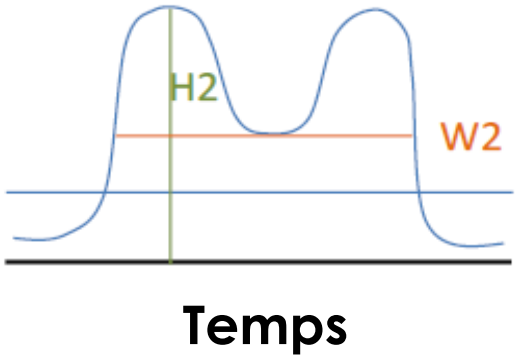
- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

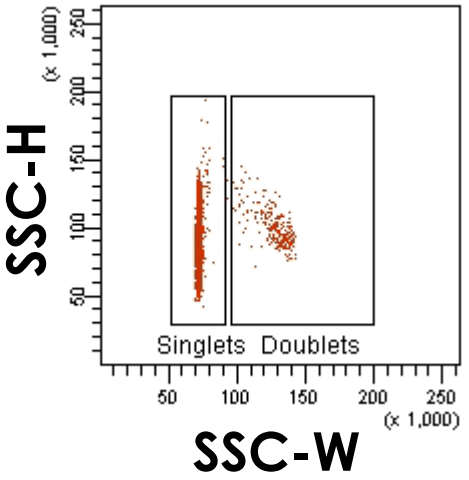
L'électronique : Les doublets





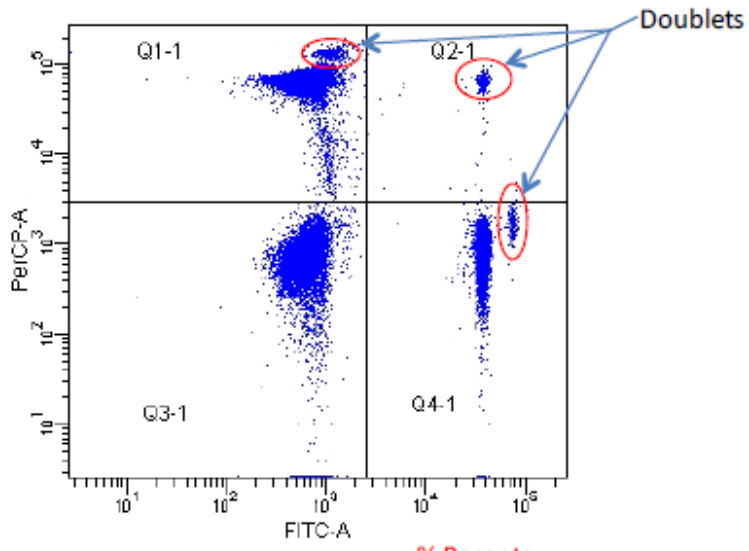
H1 ~ H2
W1 < W2





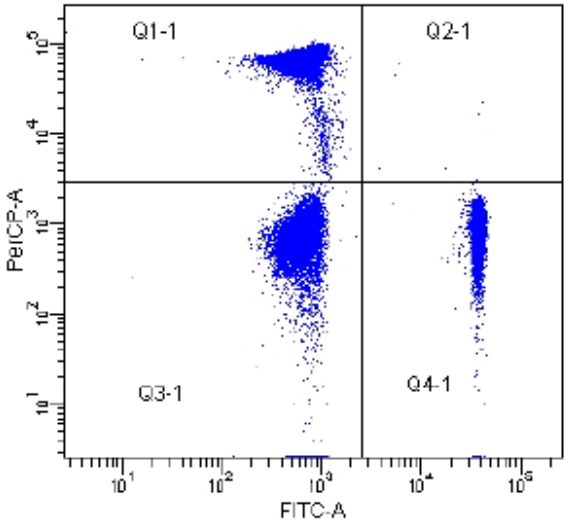
L'électronique : les doublets

Avec doublets



		% Parents
Q1-1	11,476	46.8
Q2-1	292	1.2
Q3-1	7,103	28.9
Q4-1	5,675	23.1

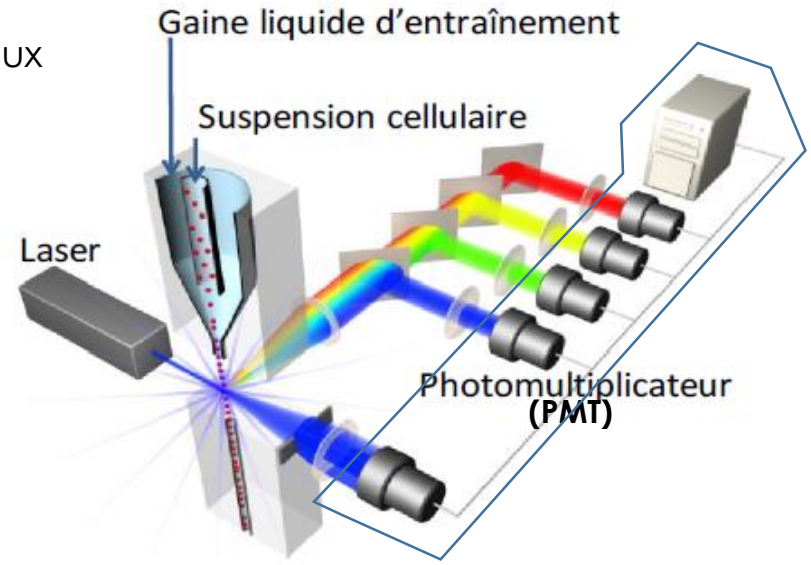
Sans doublets



Q1-1	10,974	46.9
Q2-1	8	0.0
Q3-1	6,962	29.8
Q4-1	5,456	23.3

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets



Pause

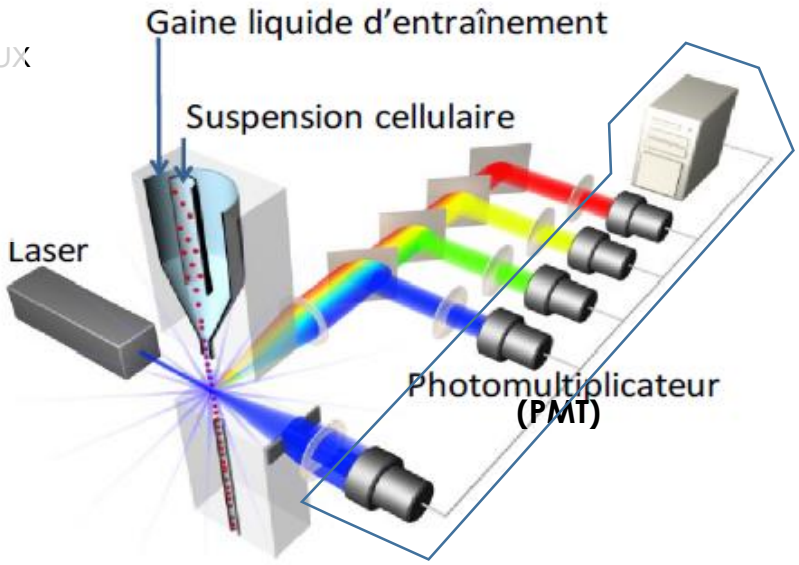
- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Les cytomètres de la plateforme

	LSRFortessa	LSRFortessa HTS	Aurora (Cytek)	FACSCantoII	FACSARIA II	Biorad S3e
Paramètres	18 + 2	16 + 2	Spectral	9 + 2	17 + 2	4 + 2
Lasers	4 lasers décalés	4 lasers décalés	5 lasers décalés	3 Lasers décalés	5 lasers décalés	2 lasers colinéaires

Notions abordées pendant la formation

- **La fluidique**
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- **L'optique**
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- **L'électronique - Informatique**
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

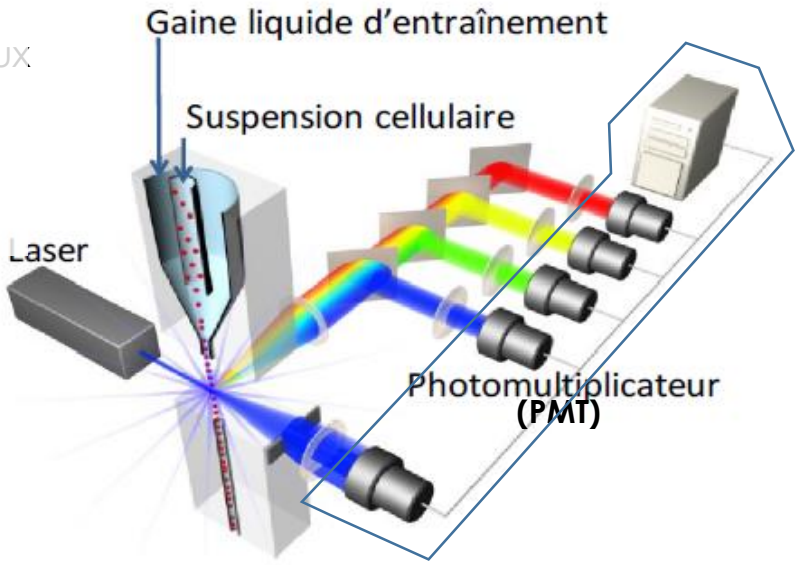


Pause

- **La Compensation**
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Notions abordées pendant la formation

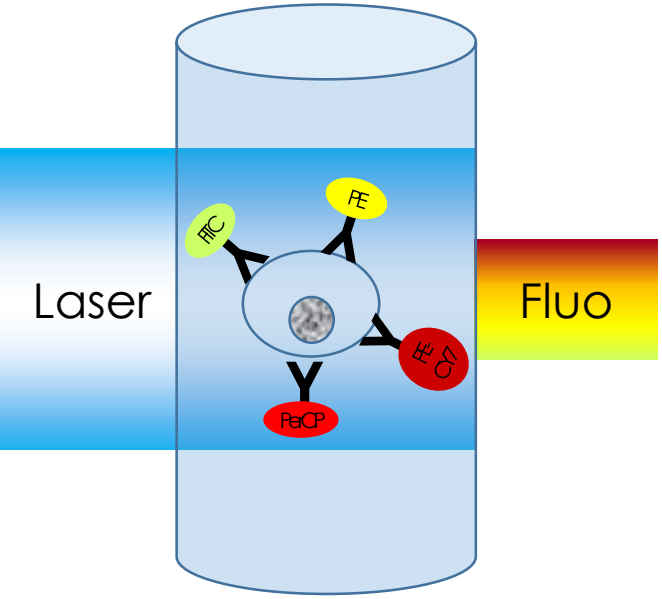
- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

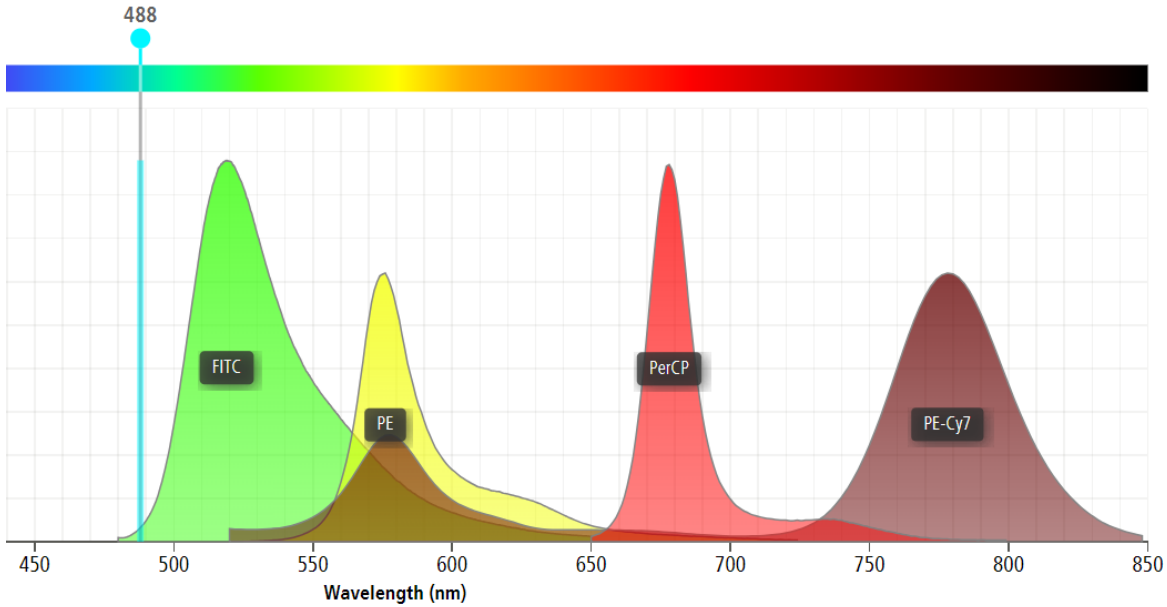


Pause

- **La Compensation**
  - ✓ **Principes**
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Compensations : Principes

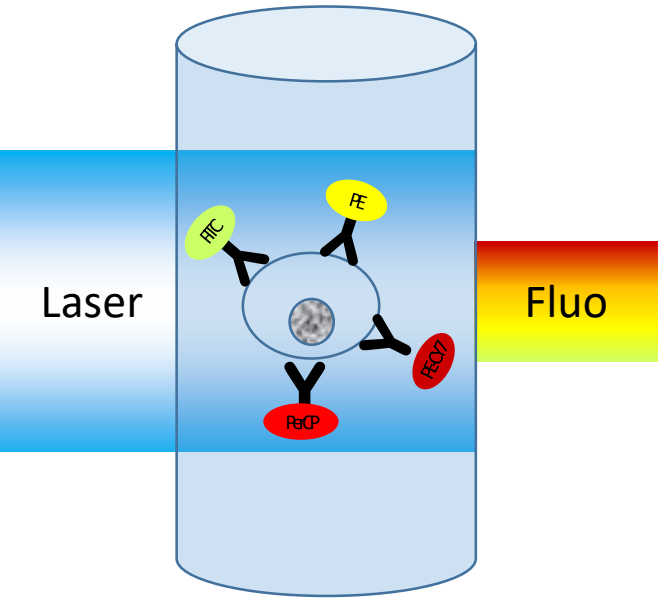


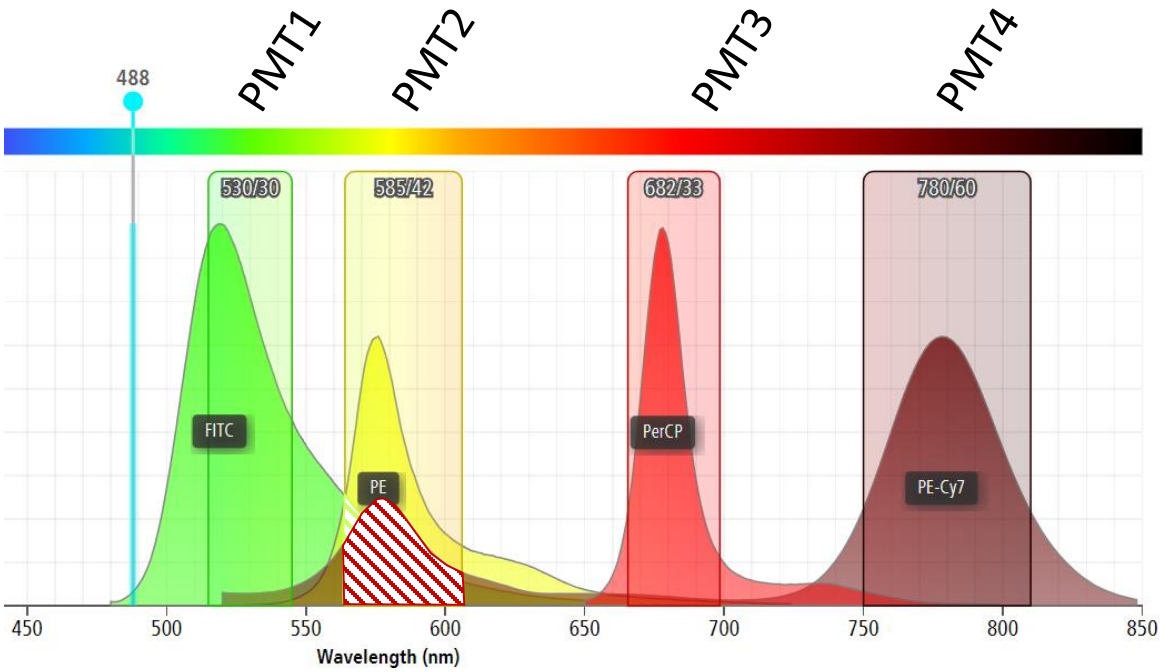


Tous les maxima d'émission sont bien isolés

Y-a-t-il du recouvrement spectral ?

Compensations : Principes

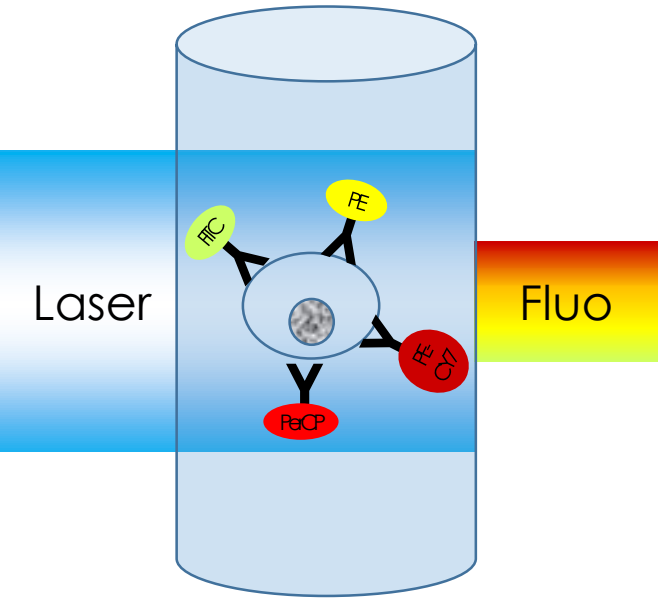


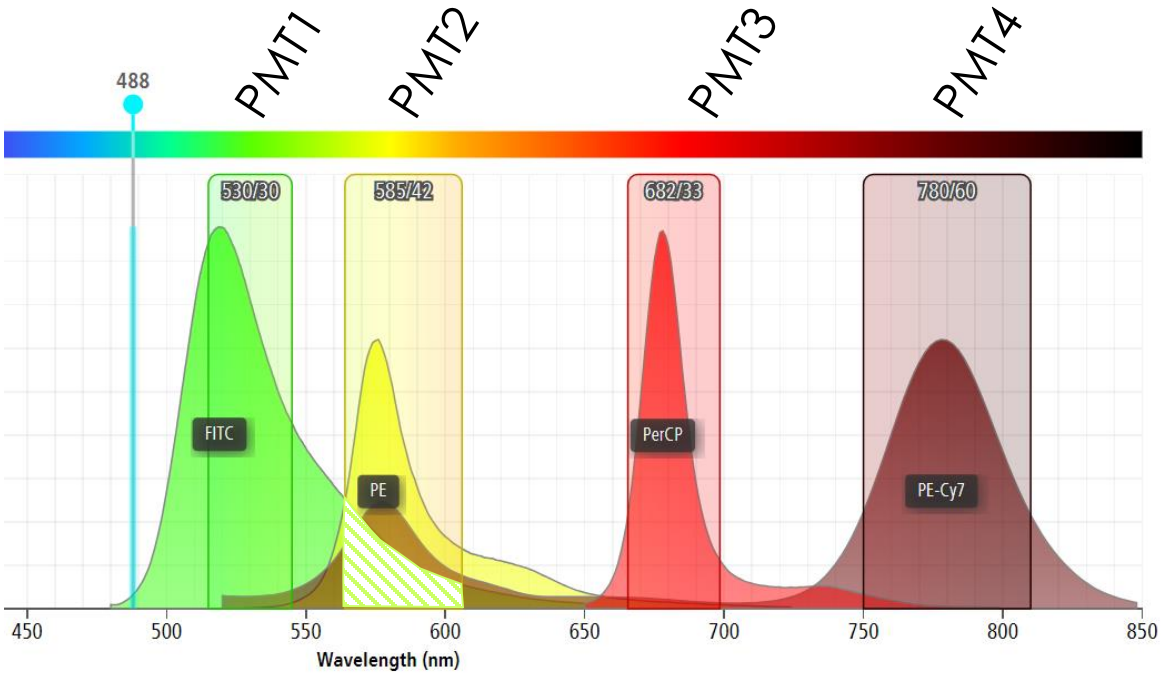


Recouvrement spectral sur PE

$$PMT_{PE} = Fluo_{PE} + Fluo_{FITC} + Fluo_{PE\text{-}Cy7}$$

Compensations : Principes





Fluo $_{FITC\ PMT2}$ = % $_{Comp\ FITC\text{-}PE}$ x Fluo $_{FITC\ PMT1}$

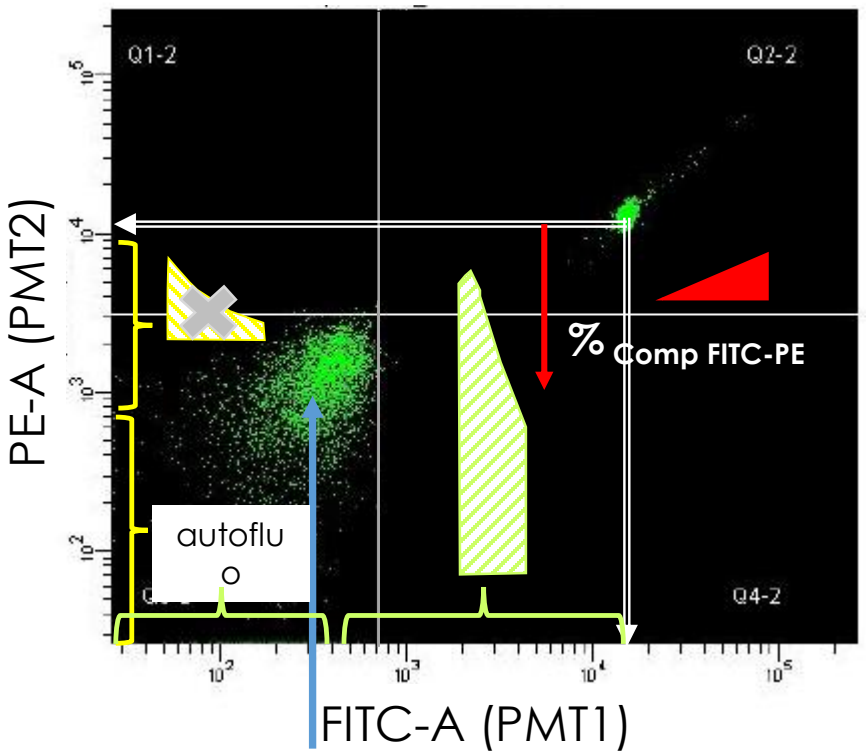
Comment déterminer ce % de compensation ?

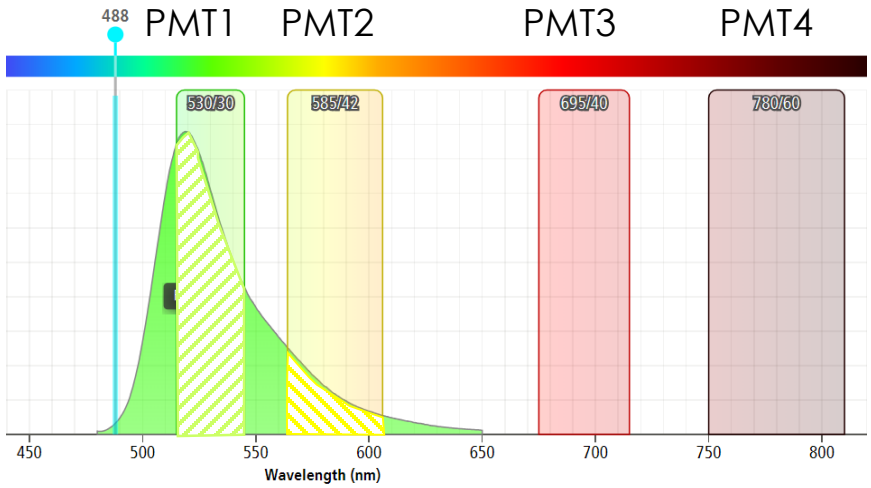
-> A partir de l'échantillon non marqué et du monomarquage FITC

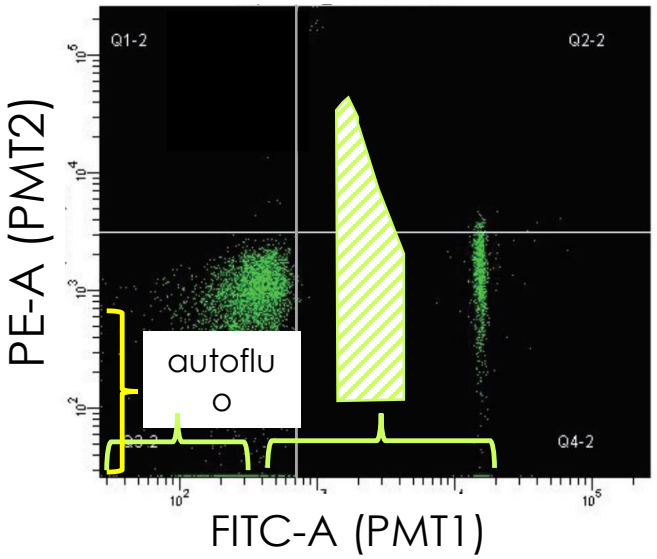
Compensations : Principes

Fluo FITC **PMT2** = % Comp FITC-PE x **Fluo** FITC **PMT1**

Monomarquage FITC

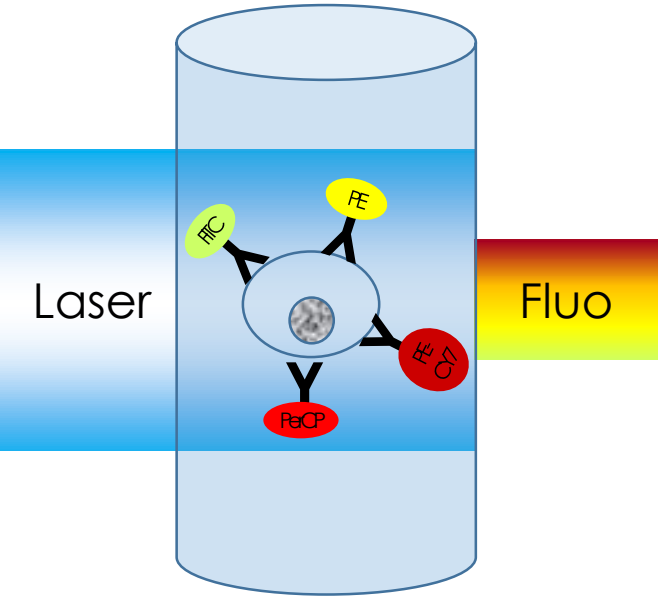


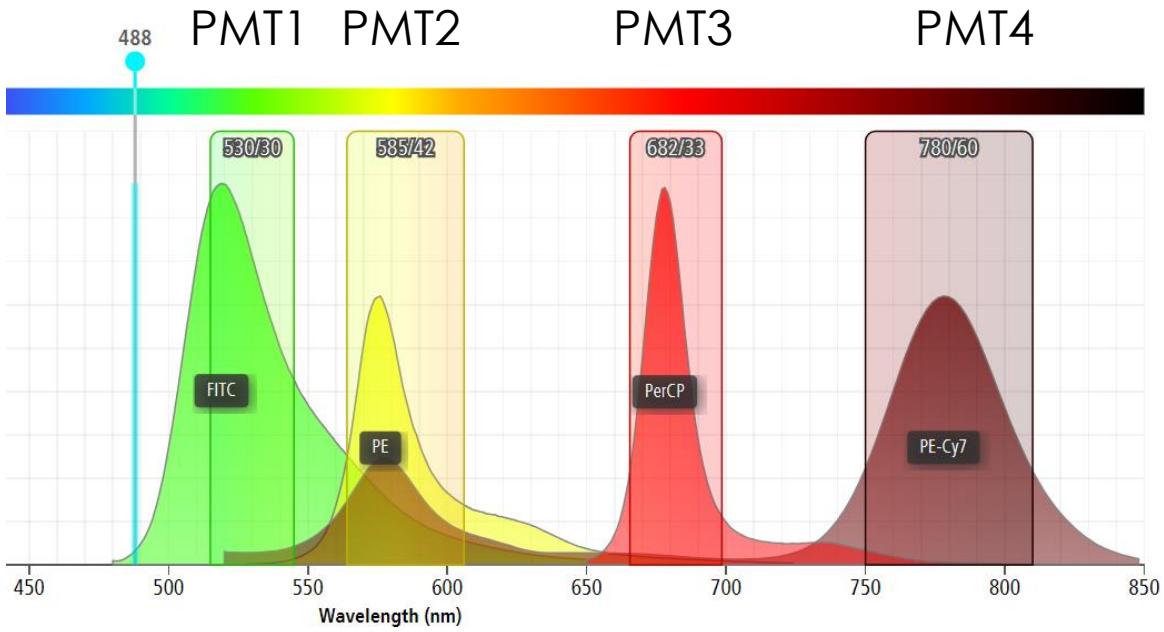




Toutes les cellules ne sont pas FITC pos
-> autofluorescence : neg fluo PE et FITC

Compensations : Principes





Cytometer - LSRFortessa (1)

Status | Parameters | Threshold | Laser | Compensation | Ratio

Enable Compensation

Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
PE	FITC	
PerCP	FITC	
PE-Cy7		
FITC		
PerCP		
PE-Cy7	PE	
FITC	PerCP	
PE	PerCP	
PE-Cy7	PerCP	
FITC	PE-Cy7	
PE	PE-Cy7	
PerCP	PE-Cy7	

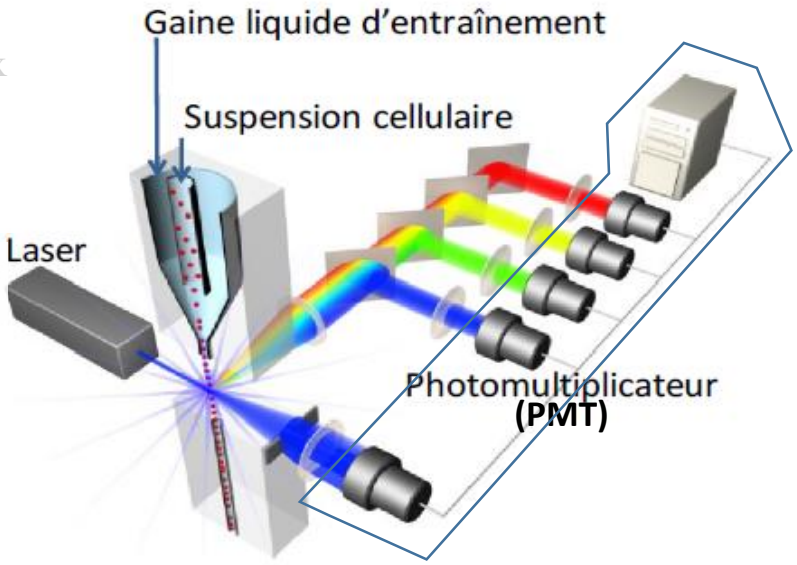
MATRICE DE COMPENSATION 4 COULEURS

Notions abordées pendant la formation

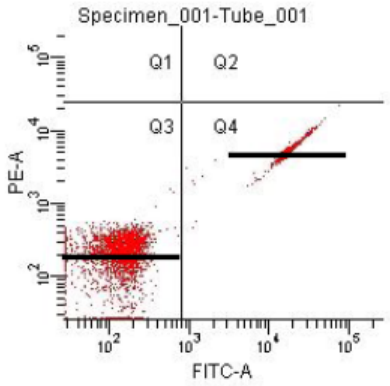
- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument

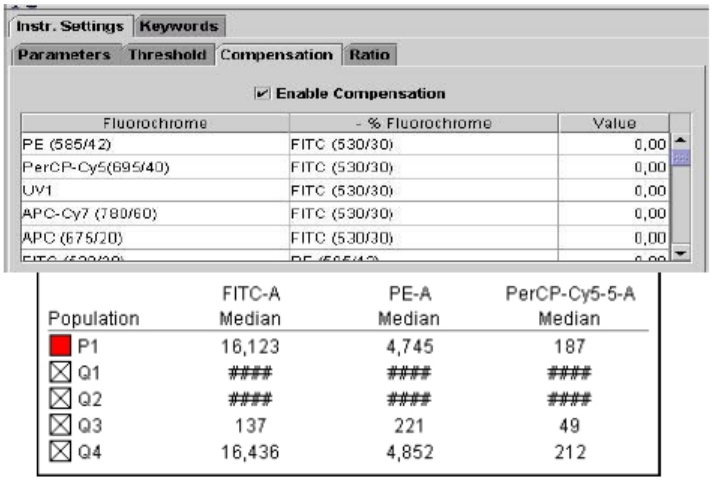
Pause

- **La Compensation**
  - ✓ Principes
  - ✓ **Méthodes**
  - ✓ Bonnes pratiques
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel



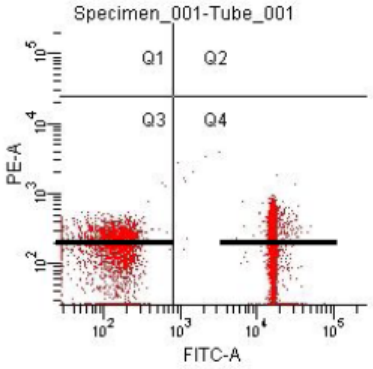
Compensations manuelles : Médianes de fluorescence

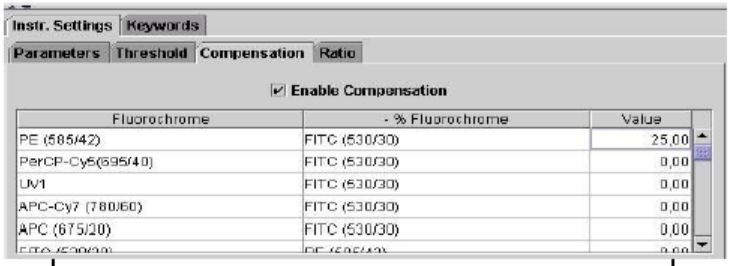




Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
P1	16,123	4,745	187
Q1	####	####	####
Q2	####	####	####
Q3	137	221	49
Q4	16,436	4,852	212

- La compensation correcte est terminée lorsque la population compensée, positive devient la même que celle négative



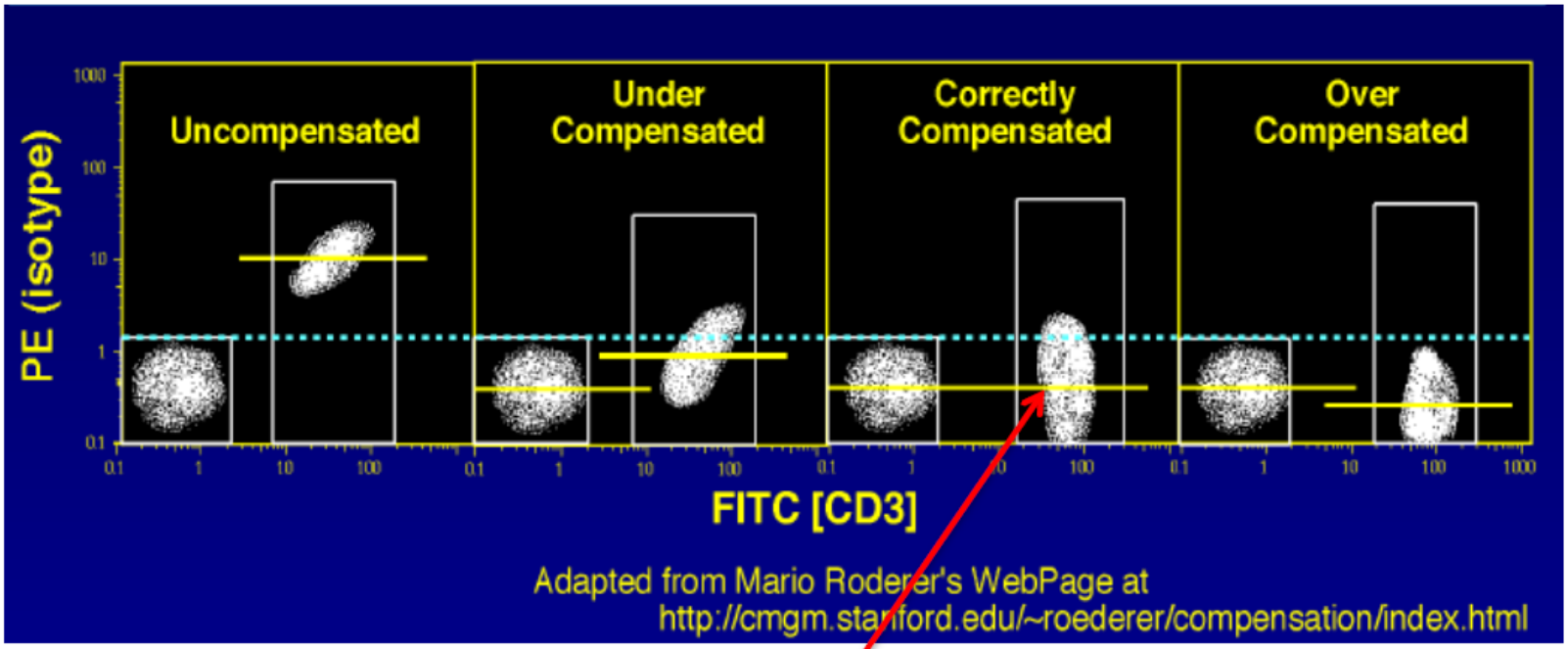


Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median
P1	16,123	184	187
Q1	####	####	####
Q2	####	####	####
Q3	137	184	49
Q4	16,436	185	212

Compensations manuelles : Médianes de fluorescence

Population	FITC-A Median	PE-A Median
P1	16,123	184
Q1	####	####
Q2	####	####
Q3	137	184
Q4	16,436	185

Population	FITC-A Median	PE-A Median
P1	16,123	-24
Q1	562	1,249
Q2	10,470	1,127
Q3	135	181
Q4	16,437	-97



- conséquence de la compensation: étalement de la population

Compensation automatique : calcul des % par la méthode des pentes

Compensations : Méthodes des pentes

Calcul automatique, via l'informatique

<u>Les contraintes</u> :

Echantillon sans marquage

1 échantillon mono-marqué par fluorochrome utilisé

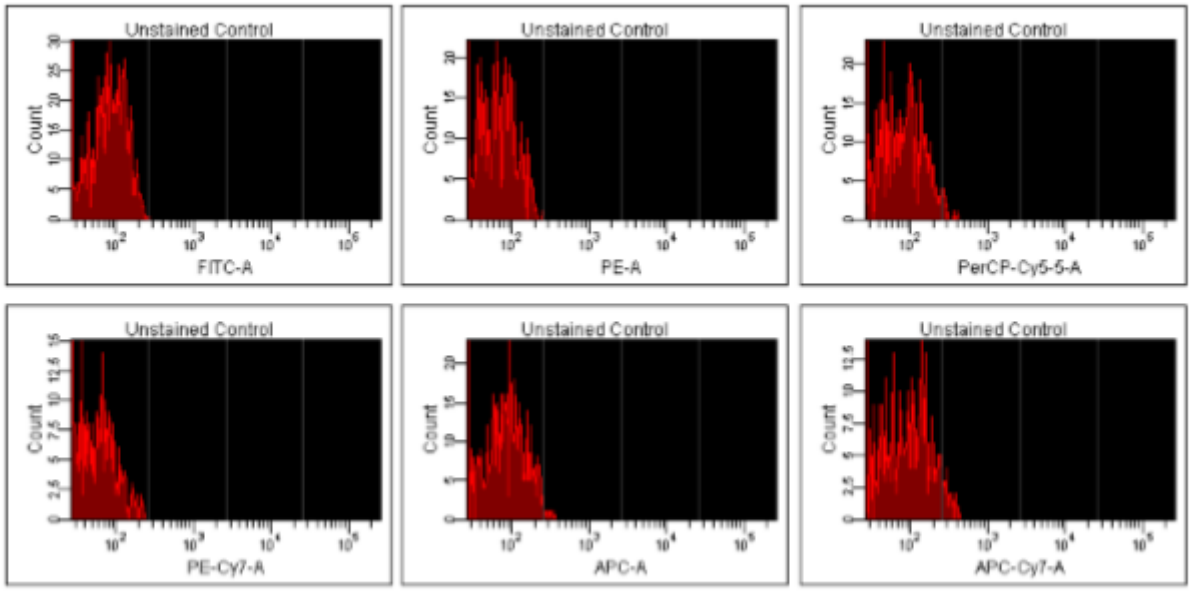
Compensations : Méthode des pentes

✓ **Le calcul des compensations en automatique**

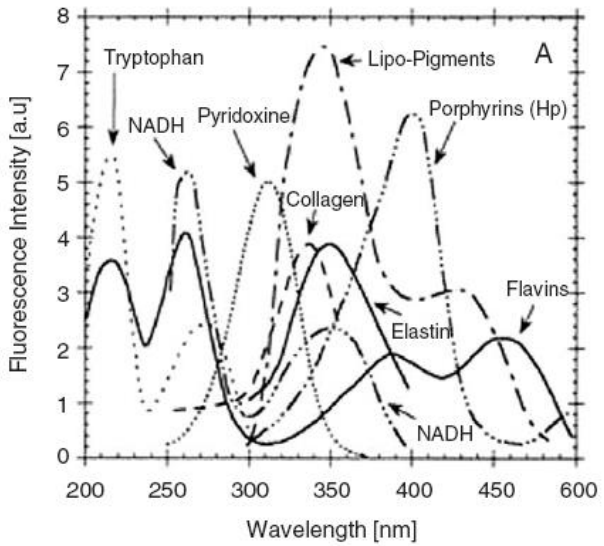
Le tube négatif :

Réglage des voltages pour les paramètres de morphologie : FSC - SSC

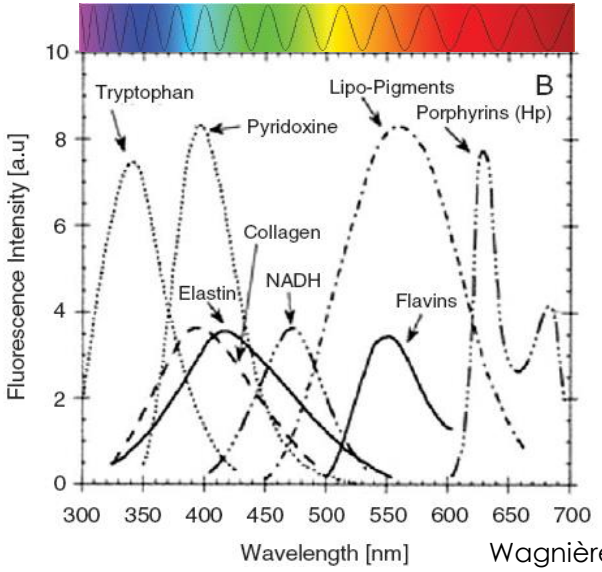
Optimisation des PMT de fluorescence



Autofluorescence



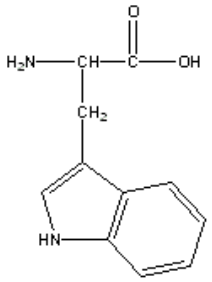
Spectres d'excitation



Wagnières et al (1998)

Spectres d'émission

Acide aminé :



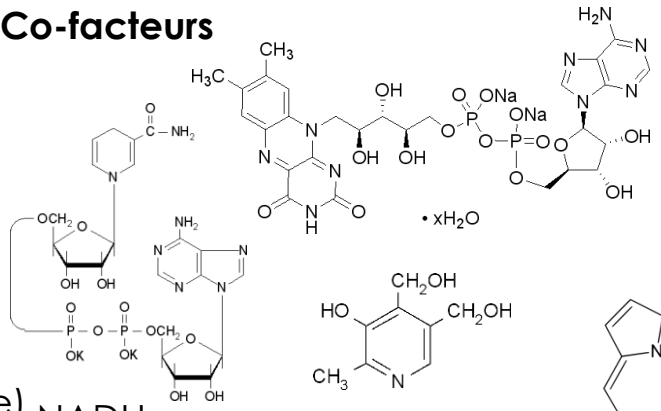
Trp (W)

Protéines
- Collagène :
- Elastine

→ **matrice extracellulaire**

Pigments
- Lipopigment (neurone)

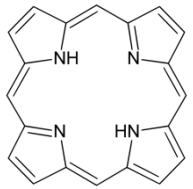
Co-facteurs



NADH

Pyridoxine
(vitamine B6)

Flavines:
- FAD (Vit B2)
- flavine MonoNuclétide
- flavine liée (His/Cys)
- flavoprotéine



Porphyrine
→ **+ Fer = hème**

Compensations : Méthode des pentes

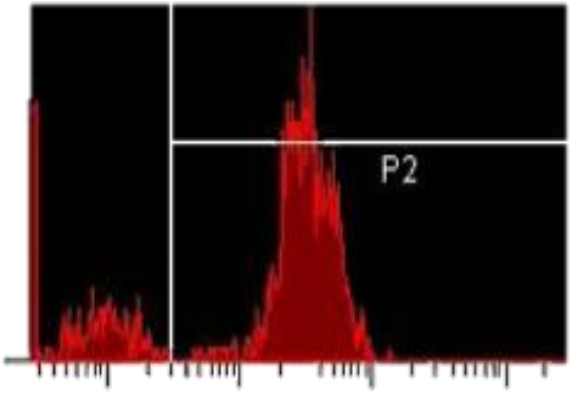
✓ **Le calcul des compensations en automatique**

Les simples marquages :

Enregistrement de tous les échantillons simplement marqués

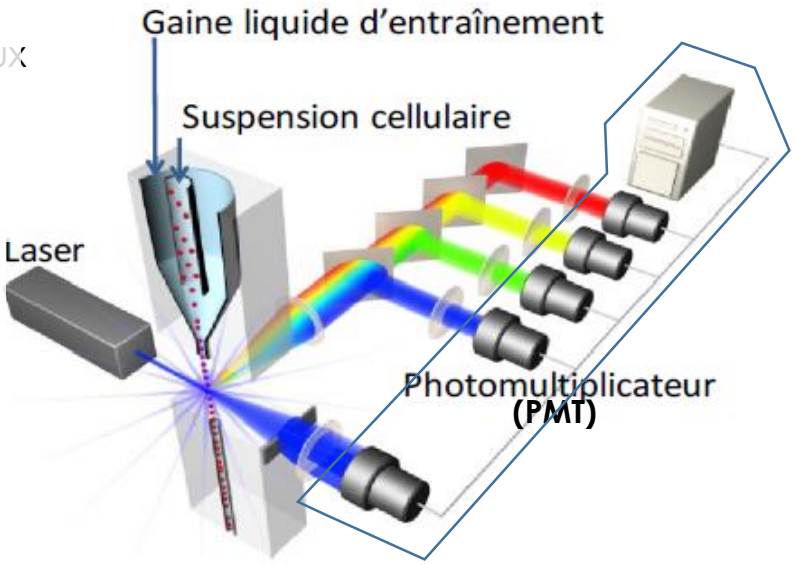
Placement du curseur P2 sur les cellules positives

Calcul automatique des compensations



Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ **Bonnes pratiques**
- Monter une expérience multiparamétrique
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Compensations : Les bonnes pratiques

Le couple anticorps-fluorochrome utilisé pour les compensations doit être strictement identique à celui utilisé sur les échantillons

L'anticorps doit être titré

Utilisation des cellules mono - marquées pour les compensations

ou

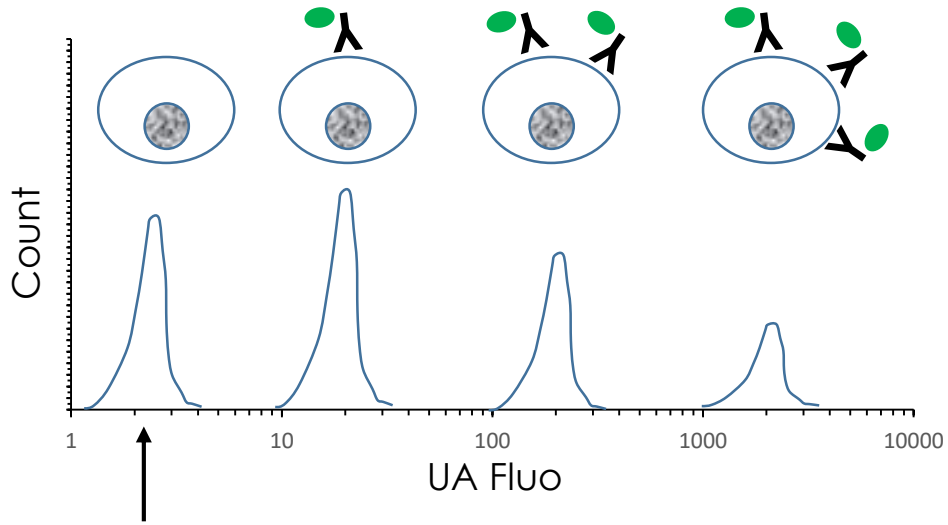
Utilisation de billes de compensation

Ne JAMAIS utiliser 2 anticorps différents lus dans le même canal pour les compensations et les échantillons (ex : GFP et FITC)

Les sondes de fluorescence : Stoechiométrie

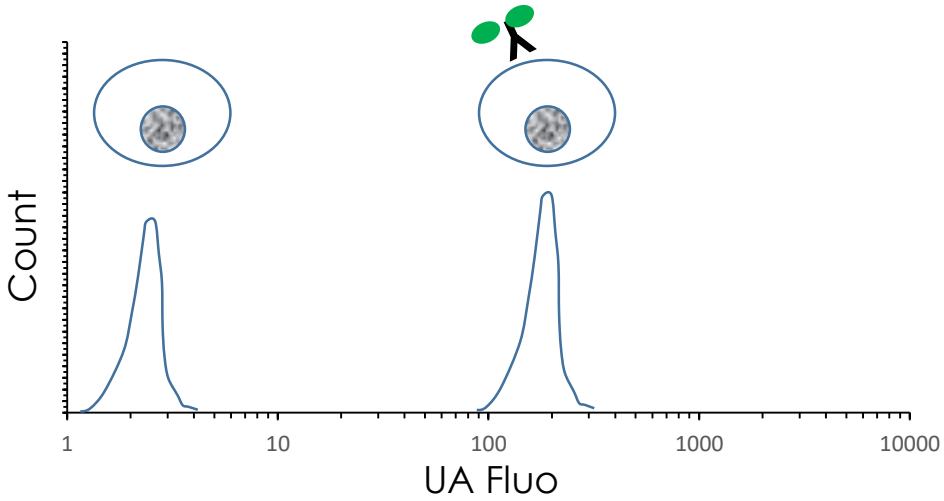
L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de site de fixation et donc de fluorochromes

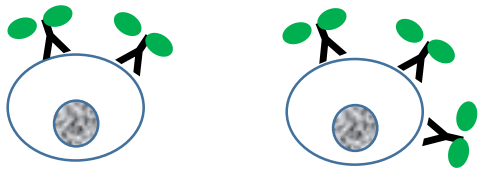
Lot A d'AC-FITC (1:1)



Autofluorescence

Lot B d'AC-FITC (1:2)





Hors gamme de détection

Compensations : Les bonnes pratiques

Utilisation des cellules :

L 'intensité de fluorescence des simples marquages doit être au moins aussi forte que dans les échantillons

Dans la mesure du possible il est toujours préférable de faire les mono-marquages sur les cellules

Utilisation de billes de compensation :

Peu de cellules sont nécessaires (seulement pour l'ajustement des PMT)
L'Ag est faiblement représenté

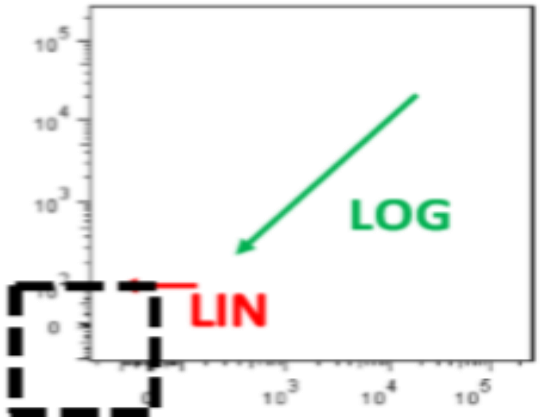
Les billes donnent l'intensité maximale de fluorescence que le couple anticorps-fluorochrome peut donner

Les billes de compensation donnent la juste compensation - Attention à la surcompensation!

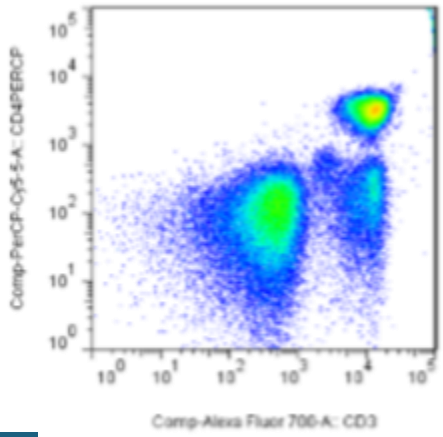
Affichage bi-exponentiel des compensations

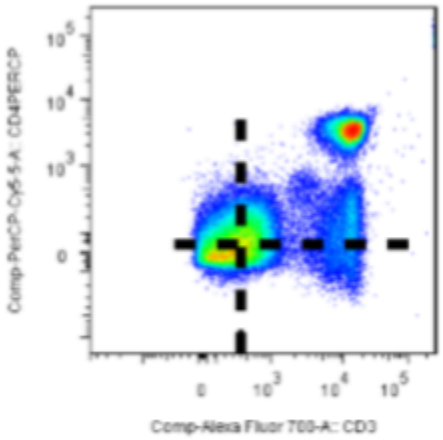
L'affichage des données compensées et le contrôle de la combinaison :

L'échelle bi-exponentielle :



Echelle biexponentielle





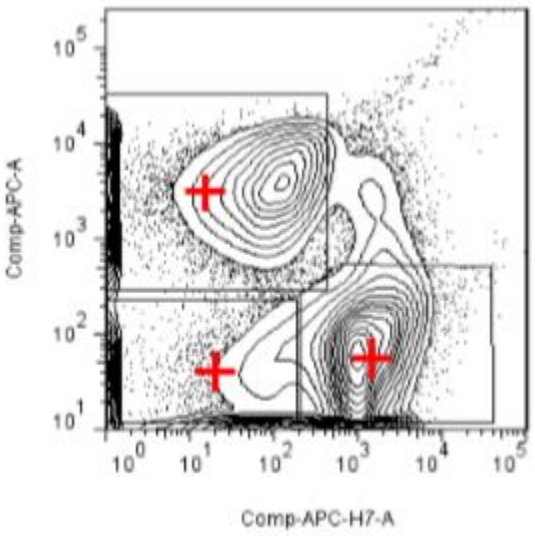
Les populations sont bien visibles et continues

Affichage bi-exponentiel des compensations

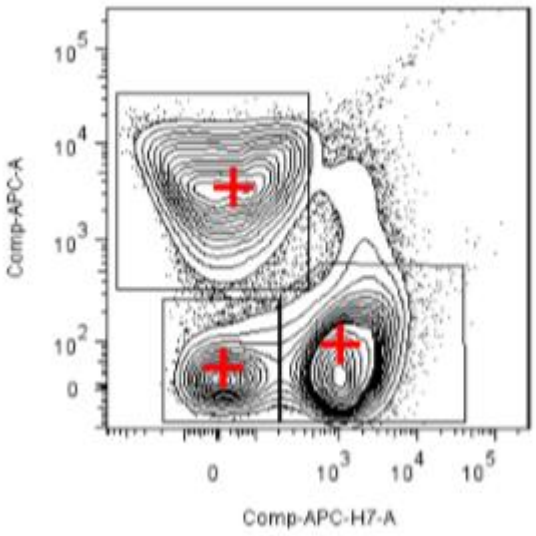
L'affichage des données compensées et le contrôle de la combinaison :

Visualisation des données compensées :

Echelle LOG



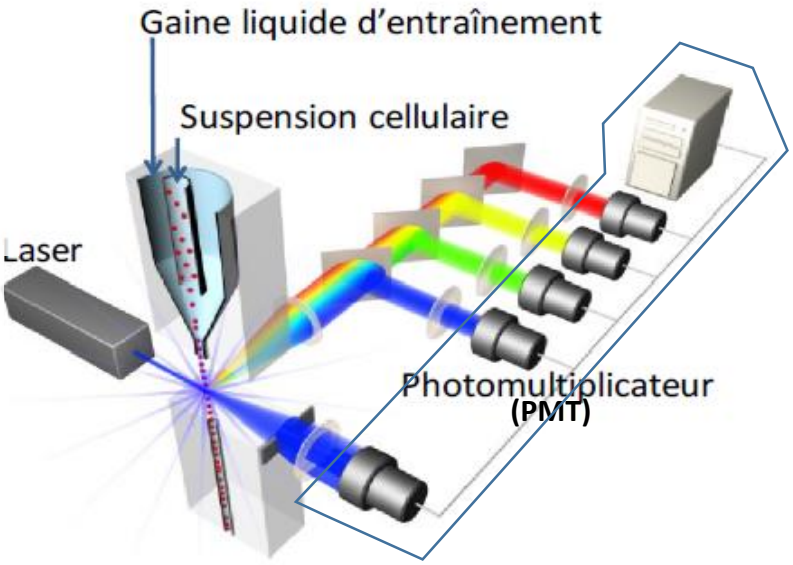
Echelle Bi-Expo



L'affichage Bi-exponentiel améliore la visualisation des centres des populations

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ **Choisir les fluorochromes**
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

Choisir les fluorochromes

Définir la question. Connaître son système biologique.

Echantillon vivant ou fixé/perméabilisé ?

Vivant = marqueur viabilité IP, DAPI, Hoecsht, 7-AAD

Type de fixation : PF, PFA
Perméabilisation (intracellulaire) : saponine, triton…

Sondes couplées à des anticorps

Sondes ciblant fonction/structure cellulaire

Sondes exprimées par les cellules (gène rapporteur)

Sensibilité sonde = brillance (stain index). L'efficacité d'excitation x l'efficacité d'émission

Connaître la concentration de ses cibles

Si nbre de copie de la cible -/+ : sonde brillante (stain index ++)
Si nbre de copie de la cible +/++ : possibilité sonde peu brillante (stain index +)

Sondes de fluorescence couplées à des anticorps

✓ **Petites molécules : FITC, Cy5, Cy7, Alexa488/555/568/633/647, Pacific Blue…**

Avantages **: Petits (FITC = 389 Da ; Cy5 = 792 Da)**
Faciles à coupler à des anticorps grâce à leurs radicaux libres
Grande stabilité

✓ **Protéines : PE, APC, PerCP, AmCyan**

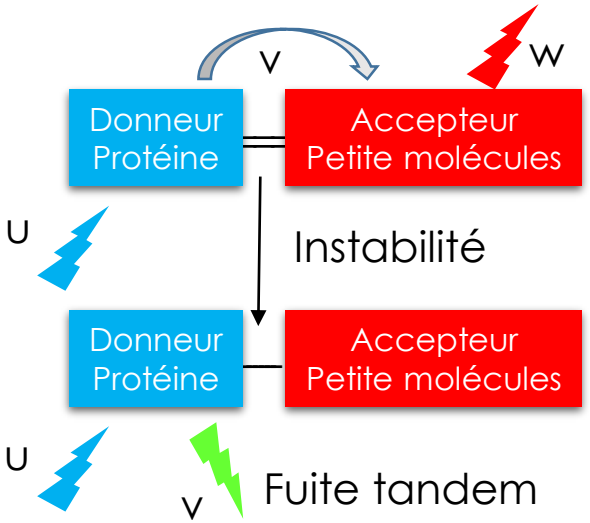
Avantages **: Grande stabilité**
Fluorescence très brillante pour l'APC et le PE

Inconvénients **: Haut poids moléculaire (PE = 220 kDa, APC = 120kDa)**
Chimie difficile pour le couplage

✓ **Les tandems : PE-Cy5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC-Cy7**

Avantages **: Obtention de nouveaux fluorochromes**

Inconvénients **: Faible stabilité**
Sensibles à la lumière et à la fixation



- Toujours une fraction de tandem non-fonctionnelle
- Cette fraction évolue avec le temps : VERIFIER

✓ **Les nanocristaux QDot**

Avantages **: Très stable et très brillant**
Faible recouvrement spectral

Inconvénients **: Taille 20-30nm**
Spectre d'excitation large

Sondes ciblant fonction/structure cellulaire

✓ **Viabilité cellulaire : intercalant ADN marque cellules membranes plasmiques perforées**

DAPI, Hoechst non vital, PI, 7-AAD, Zombies…

✓ **Activité calcique**

INDO-1

✓ **Stress Oxydatif**

DCFDA, CellROx, DHE

✓ **Potentiel rédox mitochondrie**

JC-1

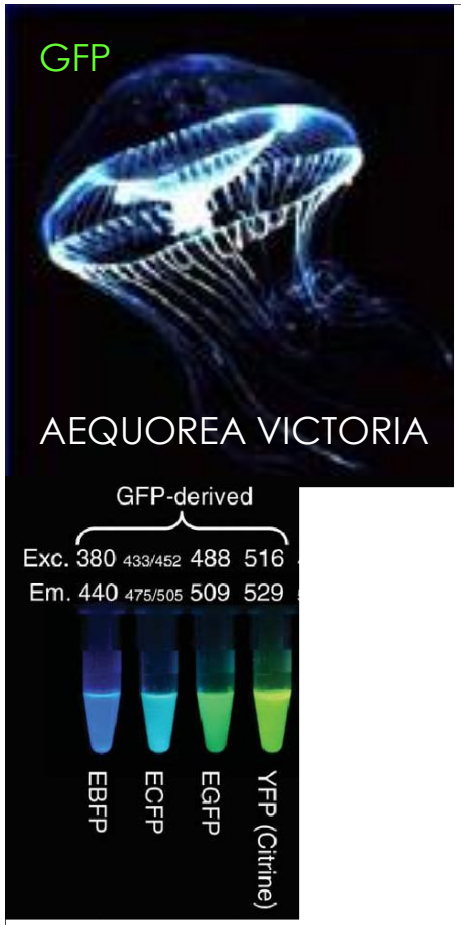
✓ **Apoptose**

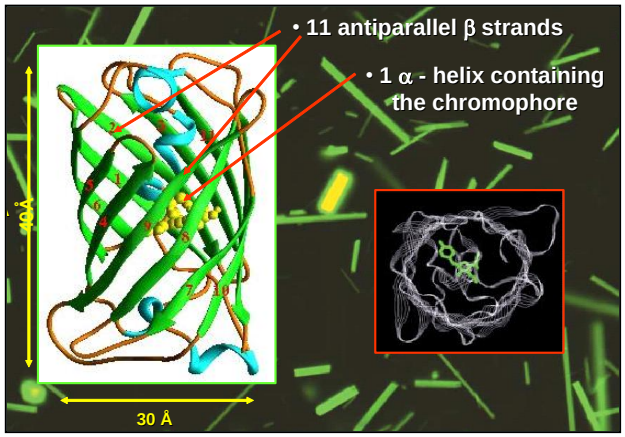
Annexine V, Caspase, TUNEL

✓ **Prolifération cellulaire**

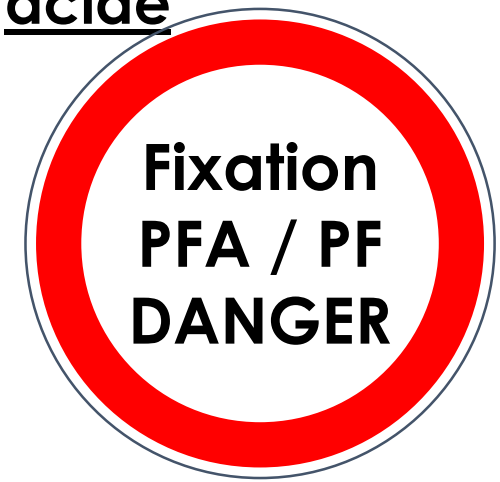
BrdU, EDU, CFSE

Sondes de fluorescence : Protéines fluorescentes rapportrices





Fluorescence détruite par pH acide

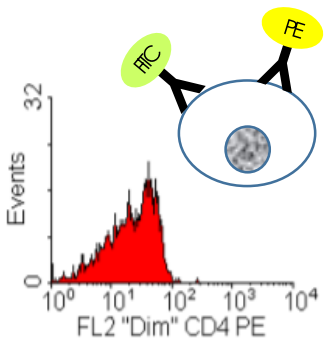


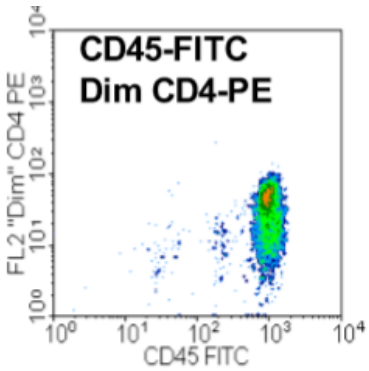
Solution fixateur pH neutre → papier pH

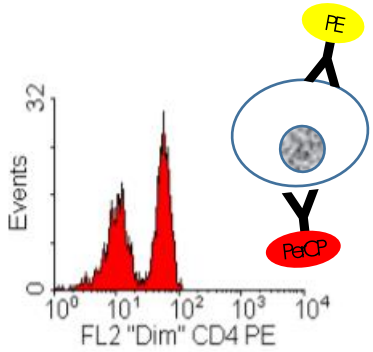
Impact du fluorochrome sur la résolution

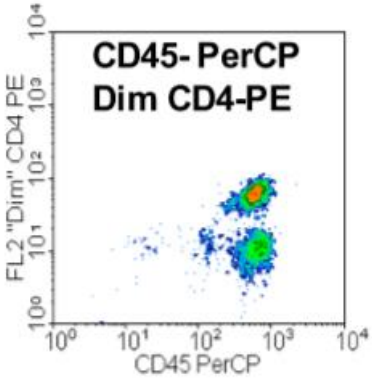
Effet de l'étalement ou « spreading error » des compensations

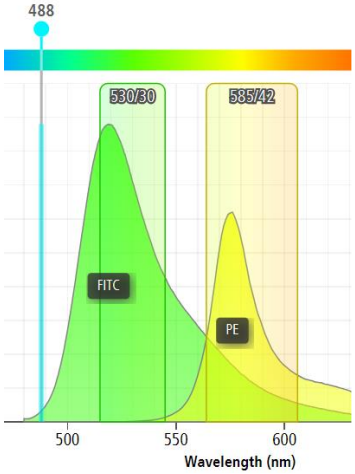
- **Cas des populations négatives sur un double marquage**

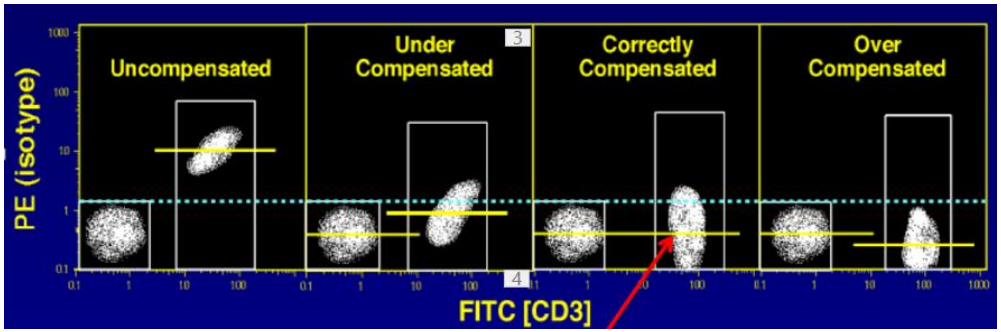












Etalement de la population

Monter une expérience mutliparamétrique : Mode d'emploi

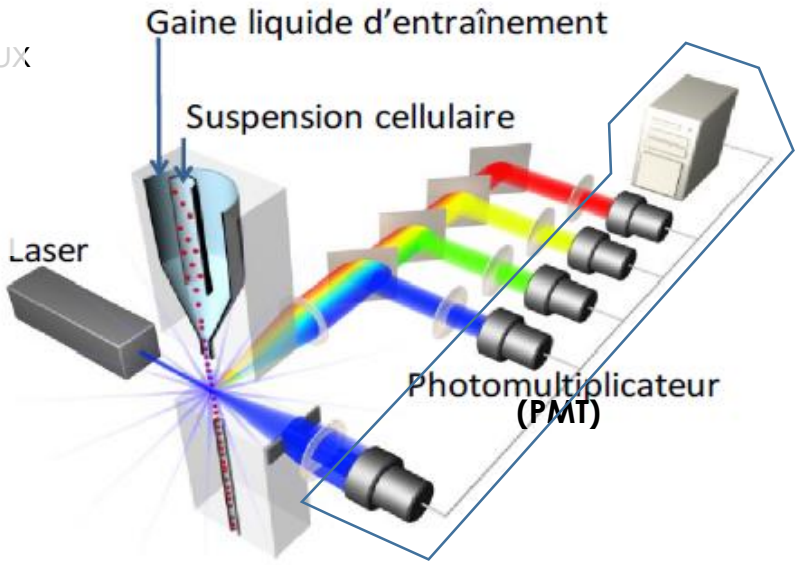
1. Choisir ses fluorochromes

Les meilleures combinaisons de couleurs :

6 couleurs	8 couleurs	10 couleurs	Additionnels
FITC or Alexa 488	FITC or Alexa 488	FITC or Alexa 488	FITC or Alexa 488
PE	PE	PE	PE
		PE-Texas Red or PE-Alexa 610	PE-Texas Red or PE-Alexa 610
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
APC or Alexa 647	APC or Alexa 647	APC or Alexa 647	APC or Alexa 647
		Alexa 680 or 700	Alexa 680 or 700
APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7
	AmCyan	AmCyan	AmCyan
	Pacific Blue	Pacific Blue	Pacific Blue
			Q-dot 655, 705…

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



Pause

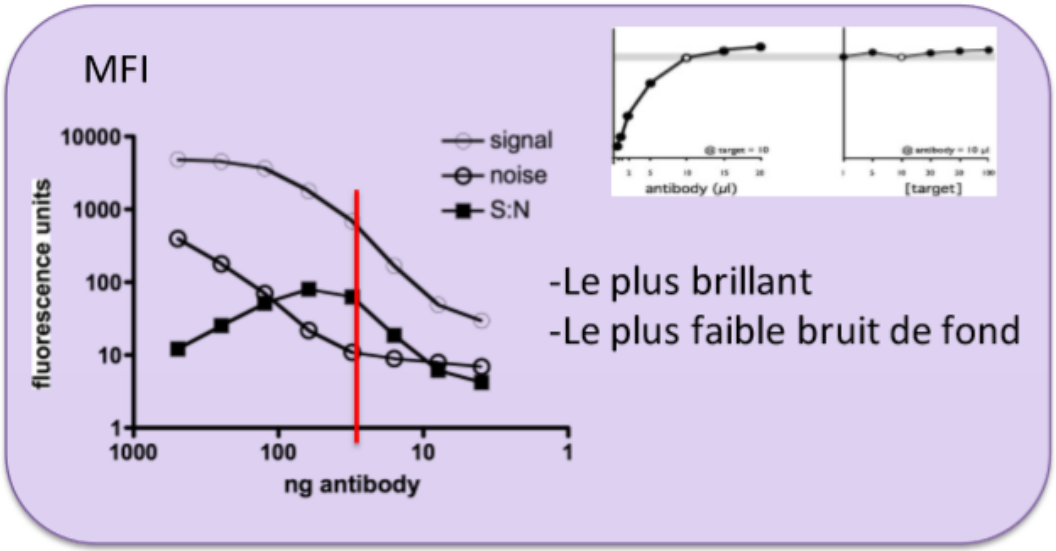
- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ **Titrer les anticorps**
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ Valider son panel

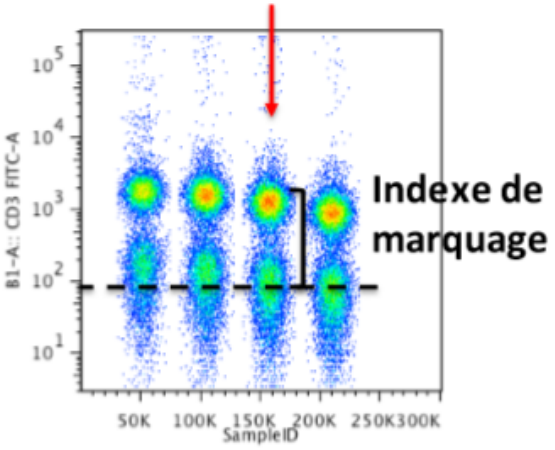
Monter une expérience multiparmétrique : Mode d'emploi

2, Titrer ses anticorps

L'optimisation des signaux permet une meilleure résolution

Une concentration trop forte en anticorps engendre une perte de résolution et des problèmes de compensation (signaux hors échelle)

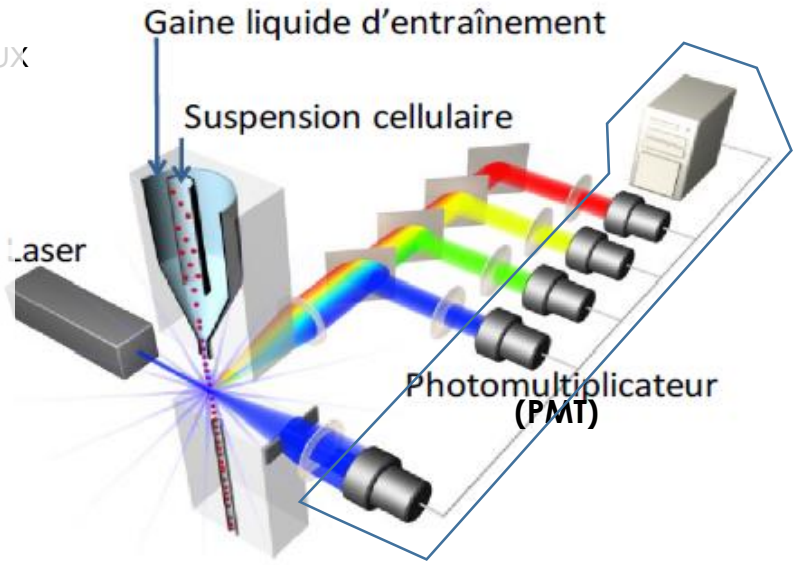




j Baijer Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 72B:8–13 (2007)

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



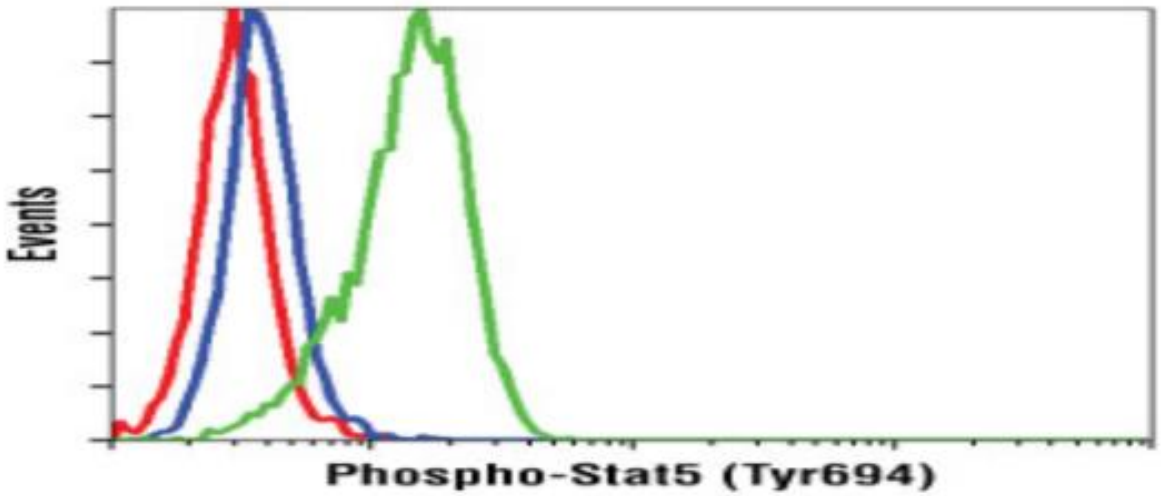
Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques
- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ **Prévoir les contrôles**
  - ✓ Valider son panel

Monter une expérience multi-paramétrique : Mode d'emploi

3, Prévoir ses contrôles

Les contrôles Isotypiques :



Même espèce

Même isotype (IgG, 1a, 2a…)

Même fluorochrome

Seul le fragment Fab est différent : l'anticorps ne doit pas se fixer de manière spécifique

Monter une expérience multi-paramétrique : Mode d'emploi

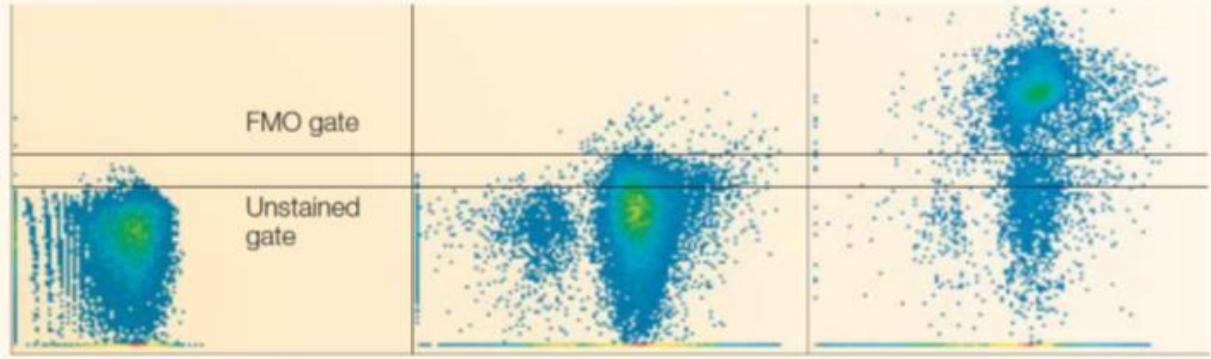
3, Prévoir ses contrôles

Les contrôles Fluorescence Minus One (FMO) :

a

Fluorochrome	Unstained control	FMO control	Test stain
FITC	–	CD3	CD3
PE	–	–	CD4
Cy5PE	–	CD8	CD8
Cy7PE	–	CD45RO	CD45RO

b

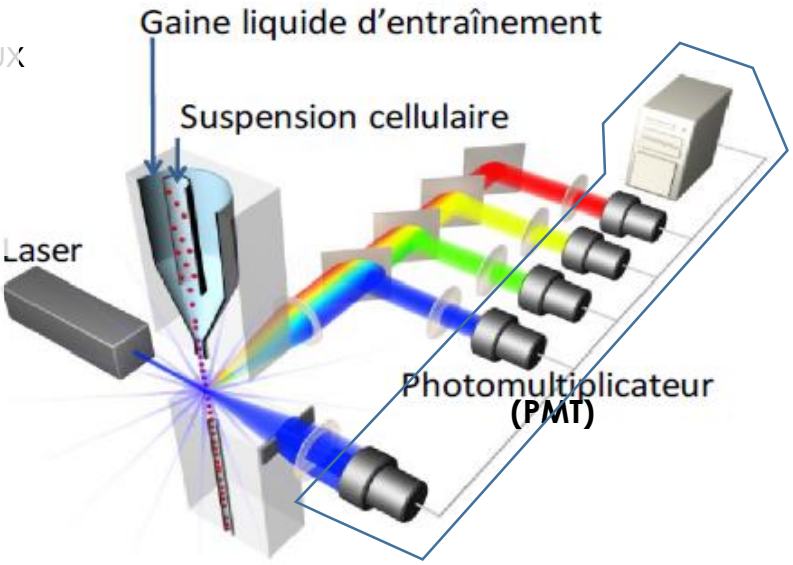


L'ensemble des fluorochromes, SAUF celui testé

Déterminer la limite de positivité d'un marqueur, tenant compte des recouvrements spectraux créés par les autres fluorochromes

Notions abordées pendant la formation

- La fluidique
  - ✓ Délivre un courant constant de liquide de gaine
  - ✓ Transporte, organise et focalise l'échantillon
  - ✓ Régule la vitesse de passage des cellules
- L'optique
  - ✓ Focalise la lumière d'excitation
  - ✓ Collecte la lumière émise
- L'électronique - Informatique
  - ✓ Convertit et amplifie les signaux optiques en signaux électriques analysables par l'informatique
  - ✓ Affiche des graphiques de données
  - ✓ Permet d'éliminer des évènements indésirables
  - ✓ Permet d'éliminer les doublets
  - ✓ Contrôle les réglages de l'instrument



Pause

- La Compensation
  - ✓ Principes
  - ✓ Méthodes
  - ✓ Bonnes pratiques

- **Monter une expérience multiparamétrique**
  - ✓ Choisir les fluorochromes
  - ✓ Titrer les anticorps
  - ✓ Prévoir les contrôles
  - ✓ **Valider son panel**

MERCI

Inserm
La science pour la santé
From science to health

Université Claude Bernard
Lyon 1

cnrs

CENTRE
DE LUTTE
CONTRE LE CANCER
LEON
BERARD

HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON