

Megamix-Plus FSC

Billes de réglage des cytomètres pour analyse des microparticules

Trousse de 50 Tests

Réf. 7802



A usage de Recherche Uniquement

1 INTRODUCTION

Les microparticules biologiques ("MP") sont des vésicules d'origine cellulaire de taille hétérogène comprise entre 0,1 et 1 μm . Du fait de leur petite taille, l'analyse des MP réclame des conditions de travail proches de la limite de sensibilité en taille des cytomètres. La standardisation des comptages de MP requiert la maîtrise de cette limite pour un compromis optimal entre prise en compte des MP et exclusion du bruit de fond. Avec l'arrivée des dernières générations d'instruments, cette limite a été repoussée de 0,5 à 0,3 μm - éq.^* (réf.1).

L'expérience acquise grâce au Megamix a montré que les instruments ne se comportent pas tous de la même façon en terme de scatter : certains sont optimisés pour l'utilisation du Forward Scatter (FS ou FSC), par ex. Beckman-Coulter (BC) Gallios/Navios alors que d'autres sont optimisés pour l'utilisation du Side Scatter (SS ou SSC), par ex. Becton-Dickinson FACS et LSRs (réf.2). Megamix-Plus FSC est adapté pour l'utilisation de cytomètres optimisés en FSC.

* μm équivalent-bille, unité arbitraire utilisée pour rappeler que la cytométrie en flux ne donne pas la taille absolue des MP mais uniquement des points de référence pour leur analyse (réf.1).

2 PRINCIPE

Le Megamix-Plus FSC est un mélange de billes fluorescentes de diamètres variés couvrant la zone de tailles théorique des MP (0,1 à 1 μm). L'acquisition de ces billes selon le mode opératoire décrit ci-après permet le réglage du cytomètre pour la prise en compte d'une zone de taille constante (0,3 - 1 μm - éq.) et des comptages de MP reproductibles. Le ratio numérique intrinsèque de 2:1 entre la population de billes de 0,3 μm et celle de 0,5 μm permet le réglage fin d'un seuil FSC pour les instruments qui ne fournissent qu'un réglage discontinu (ex. BC Gallios). Enfin, le Megamix-Plus FSC permet de vérifier la stabilité de réponse dans le temps d'un instrument et favorise le transfert du protocole et des réglages de scatter sur d'autres cytomètres.

Limitation : des cytomètres utilisant un design optique différent pour la collecte du signal en scatter peuvent ne pas fournir de résolution suffisante en FSC pour être utilisés de façon standardisée pour le comptage des MP. Cela se traduit par une discrimination insuffisante en FSC entre les billes de 0,3 et 0,5 μm (absence de vallée sur la Fig.3). Certains instruments donnent de meilleurs résultats en utilisant le SSC comme paramètre de taille et de seuil. Pour ces instruments, la standardisation des comptages de MP se fera plutôt en utilisant le Megamix-Plus SSC (réf. 7803) qui est optimisé pour l'utilisation du SSC et qui permet d'obtenir des comptes similaires de MP tout en utilisant des billes de référence différentes (réf.2).

3 REACTIF FOURNI

1 flacon de 25 mL de billes.

Le Megamix-Plus FSC est un mélange de billes de diamètre : 0,1 μm - 0,3 μm - 0,5 μm et 0,9 μm .

4 MATERIELS AUXILIAIRES NECESSAIRES NON FOURNIS

- Cytomètre optimisé en FS (ex. BC Gallios/Navios).
- Agitateur de type Vortex.
- Tubes de cytométrie (identiques à ceux recommandés pour l'analyse des MP : polypropylène, empoussièrément et adsorption limités).
- Pipette ajustable à embout jetable (500 μL).

5 RECONSTITUTION ET CONSERVATION DU REACTIF

Conservé à 2-8 °C sous son état d'origine, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Ne pas congeler.

Le réactif est prêt à l'emploi. Bien vortexer avant utilisation (10 secondes).

Stabilité après ouverture : jusqu'à la date de péremption indiquée, à 2-8 °C, en dehors de toute contamination.

6 MODE OPERATOIRE

Le réactif doit être à température ambiante.

Il est recommandé de procéder à l'acquisition des billes Megamix-Plus FSC avant chaque série d'analyses de MP.

6.1 Préparation des billes

Prendre un tube de cytométrie et pipeter **500 μL** de réactif Megamix-Plus FSC après avoir **vortexé le flacon pendant au moins 10 secondes.**

6.2 Réglages initiaux du cytomètre

Pour effectuer l'acquisition des billes Megamix-Plus FSC, se rapporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant.

Avant l'analyse, homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

Dans le cadre du protocole d'acquisition cytométrique, effectuer les réglages suivants :

- Echelle : Log
- Durée d'analyse : 1 à 2 minutes
- Vitesse d'analyse : la plus faible disponible (position "LOW", soit environ 10-15 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Puis créer :

- un cytogramme FL1 Log x SS Log ("density-plot") et quatre régions rectangulaires A, B, C et D (Fig.1)
- un histogramme FS Log x count conditionné par la gate booléenne "A or B or C" (Fig.2)
- un histogramme FS Log x count conditionné par la gate booléenne "B or C" et deux curseurs E et F (Figs 3 et 4)
- un cytogramme SS Log x FS Log, une "autogate G" et une région rectangulaire "MP" (Fig.5).

L'analyse ci-après a été réalisée sur cytomètre Gallios. Les réglages suggérés ci-dessous s'appliquent à ce type d'instrument et doivent être optimisés pour chaque appareil :

- Paramètre : sélectionner le signal intégral ("XX INT") pour tous les paramètres
- FS : option W^2
- gain SS à 7,5 et PMTv vers 600v
- gain FS à 20 et PMTv vers 440v (ce réglage peut varier fortement pour le réglage fin du seuil, voir § 6.2.3)
- gain FL1 à 1 et PMTv vers 520v

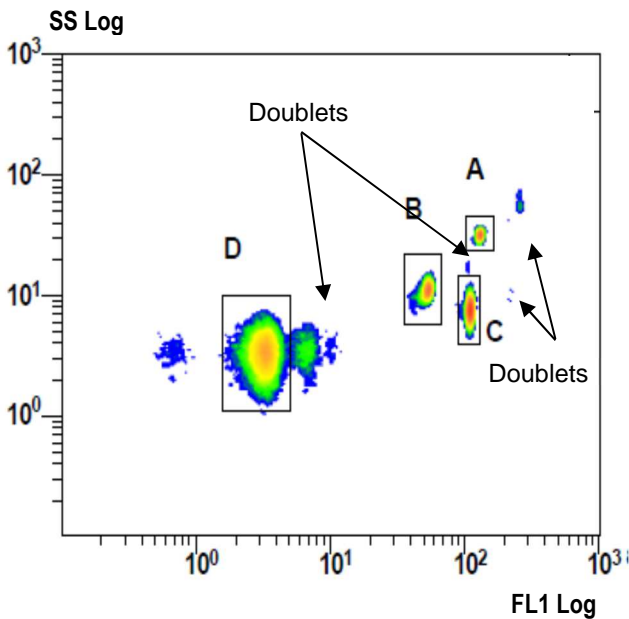
6.2.1 Réglage des PMT FL1 et PMT SS (Fig.1)

- Procéder à l'acquisition du tube de billes Megamix-Plus FSC.
- Sélectionner un discriminant/threshold sur FL1, seuil = 1 pour ne prendre en compte que les éléments FL1+ et limiter ainsi le bruit de fond.

Sur le cytogramme FL1 Log x SS Log :

- Positionner les 4 régions "A", "B", "C" et "D" sur chacune des populations majoritaires de singlets de billes. Attention à ne prendre que le nuage dense des billes correspondant aux singlets et éviter les doublets.
- Régler le PMT FL1 de façon à positionner la bille de 0,9 µm en début de 4^{ème} décade FL1 (MFI ~ 100 à 200 u.a).
- Régler le PMT SS de façon à positionner la bille de 0,9 µm en milieu de 3^{ème} décade SS (MFI ~ 30 à 40 u.a).

Fig.1 : Réglage du PMT FL1 et PMT SS



Région A : billes de 0,9µm Région B : billes de 0,5µm
Région C : billes de 0,3µm Région D : billes de 0,1µm

Vérifier que le nombre d'événements de la région C (singlets de 0,3 µm) est le double du nombre d'événements de la région B (singlets de 0,5 µm) : ratio 0,3/0,5 µm acceptable entre 1,7 et 2,7.

Si le ratio 0,3/0,5 µm est en dehors de cette zone, voir le § 8 : Causes d'erreur.

Option : Réglage des autres PMT de fluorescence (Fig.2)

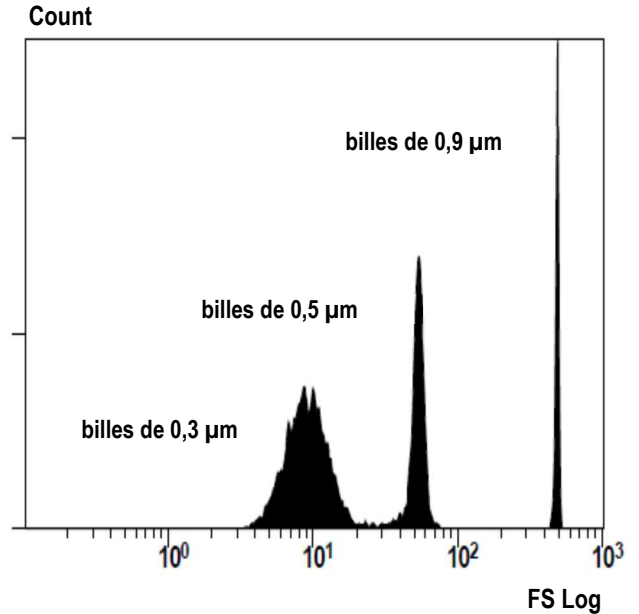
Seulement 3 paramètres (FS, SS et FL1-FITC) sont nécessaires pour analyser le Megamix-Plus FSC. Des paramètres additionnels (FL2, FL3 ...FL9...) peuvent être nécessaires pour l'analyse des MP immunomarquées et des billes de comptage. Ils devront être optimisés avec des échantillons biologiques (voir Fig.6 et réf.1) et des billes de comptage.

Note : Du fait de la nécessité d'utiliser des réglages très forts en scatter pour l'analyse des MP, le diamètre de ces billes de comptage ne doit pas excéder 7 µm (ex. MP-Count Beads, Réf. BioCytex 7804, voir Fig. 7).

6.2.2 Evaluation de la résolution en FS (Figs 2 et 3)

- Sur l'histogramme FS LOG x Count conditionné sur les singlets de billes de 0,3 , 0,5 et 0,9 µm (gate "A or B or C"), vérifier que 3 pics individuels peuvent être discriminés. Un chevauchement de la bille de 0,3 µm sur la 0,5 µm suggère une trop faible résolution en FS empêchant une analyse standardisée des MP.
- Option : la résolution sur le paramètre FS peut être mesurée par un paramètre numérique (voir § 7).

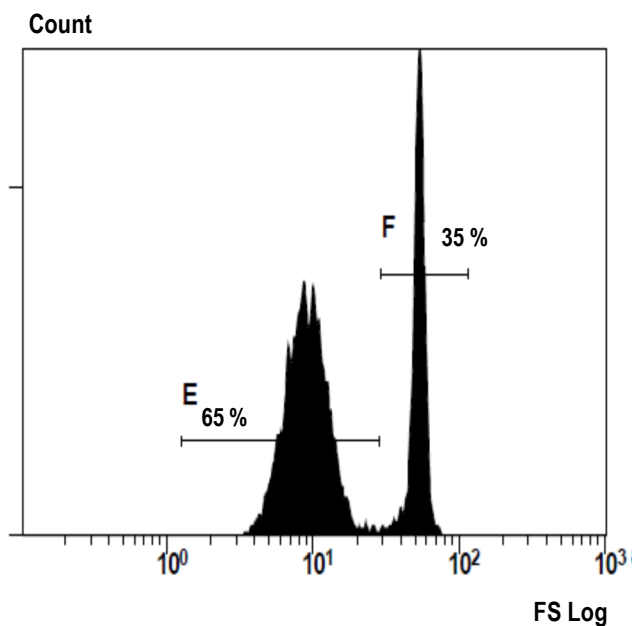
Fig.2 : Distribution des billes en FS



- Sur l'histogramme FS LOG x Count conditionné sur les singlets de billes de 0,3 et 0,5 µm (gate "B or C"), vérifier que le ratio de billes 0,3/0,5 µm est proche de 2. Cela correspond à un pourcentage d'environ 68% dans la région E (une fourchette de 63 à 73% est acceptable) et donc d'environ 32% dans la région complémentaire F (avec E + F = 100%).

A ce stade, il est recommandé d'enregistrer l'analyse en format électronique (ex. "Mgx+ FSC sFL1 xxx.LMD"). Cela permettra de suivre le comportement de l'instrument dans le temps (voir option ci-dessus) et d'obtenir plus facilement un soutien technique en cas de besoin.

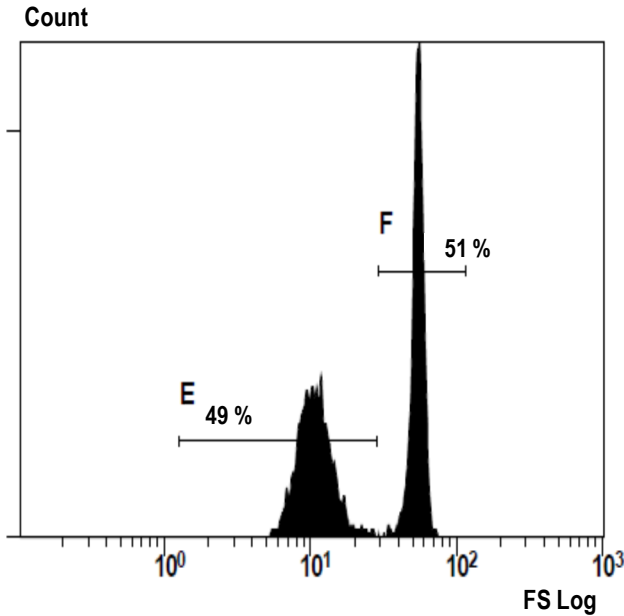
Fig.3 : Ratio 0,3/0,5 µm en seuil FL1



6.2.3 Réglage du PMT FS (Fig.4)

- Procéder à nouveau à l'acquisition du tube de billes Megamix-Plus FSC.
- **Passer le discriminant sur le FS, seuil ~ 8** (6 à 10, à optimiser).
- Sur l'histogramme FS LOG x Count conditionné sur les singlets de billes de 0,3 et 0,5 μm (gate "B or C"), optimiser le PMTv FS de façon à **obtenir 50 % de billes de 0,3 μm** (région E) et donc 50 % de billes de 0,5 μm (région F). Une fourchette de 48 à 52 % est acceptable. Pour diminuer le pourcentage de 0,3 μm , baisser le PMTv FS, et inversement.

Fig.4 : Ratio 0,3/0,5 μm en seuil FS



6.2.4 Définition de la zone d'analyse "MP" (Fig.5)

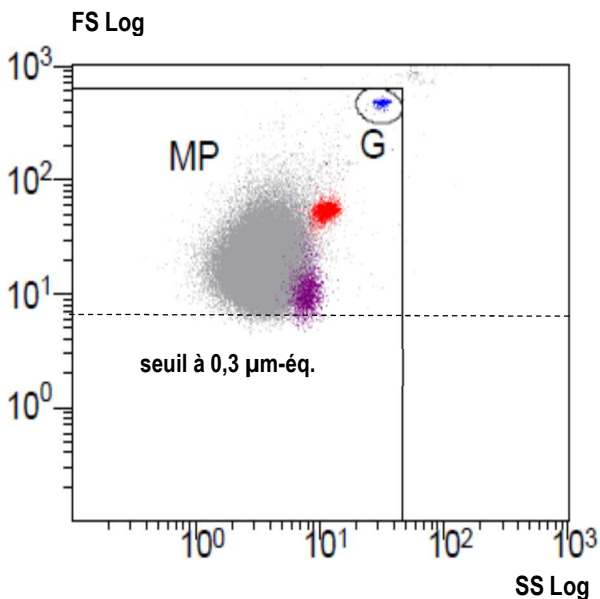
La partie inférieure de la zone d'analyse des MP est définie par le seuil en FS (illustré par le pointillé horizontal) qui ne permet d'acquérir que les particules d'au moins 0,3 μm - eq. (réglage effectué au § 6.2.3).

La partie supérieure est définie par la fin du nuage de billes de 0,9 μm . Ainsi, sur le cytogramme SS Log x FS Log, positionner "l'autogate G" autour des billes de 0,9 μm (sensibilité maximale, "0.11") puis ajuster la "gate MP" qui va tangenter le haut et le côté droit de "l'autogate G".

Pour d'autres instruments/software, l'autogate peut être remplacée par un contour plot en "densité Log".

Fig.5 : Zone d'analyse "MP"

Bleu : billes de 0,9 μm Rouge : billes de 0,5 μm
Violet : billes de 0,3 μm Gris : bruit de fond



6.3 Analyse du Megamix-Plus FSC en routine

Le protocole d'acquisition étant créé (cf. paragraphe 6.2), procéder à l'acquisition du tube de billes Megamix-Plus FSC.

- En seuil FL1, vérifier que les billes sont positionnées dans les régions pré-établies (A, B, C et D). Dans le cas contraire, régler le PMT FL1 et/ou SS afin d'y parvenir. Option : enregistrer le fichier électronique.

- En seuil FS, vérifier sur l'histogramme FS LOG x Count, que le pourcentage de billes 0,3 μm obtenu est proche de 50 % (région E : 48-52 %). Dans le cas contraire, modifier le PMT FS.

- Vérifier que la zone d'analyse "MP" est toujours correctement positionnée. Dans le cas contraire, réajuster son positionnement.

Après ces 3 vérifications, le réglage du cytomètre est optimal et permet une acquisition standardisée des MP au dessus de 0.3 μm - eq.

6.4 Exemple de marquage de MP plaquettaires : PMP (Figs 6)

L'exemple d'analyse de PMP ci-dessous a été réalisé sur plasma sans plaquette suite à un marquage Annexine V-FITC / CD41-PE et aux réglages de compensation de fluorescence appropriés. Les figures 6 illustrent la présence de 2 sous-populations de MP :

- les "large PMP" qui présentent les intensités les plus fortes en marquages Annexine V et CD41 ainsi qu'en double scatter,
- les "small PMP" qui présentent les niveaux les plus faibles en scatter et en fluorescences (réf.1).

La séparation entre ces 2 sous-populations de MP en FS est généralement proche de 0,5 μm - eq. , comme illustré par la région AC (niveau bas en FS = médiane des billes de 0,5 μm) sur la Fig.6d.

Fig.6a : "Density plot" des TMP (MP totales) conditionné sur la région MP

Sous populations de PMP dans le cadran en haut à droite

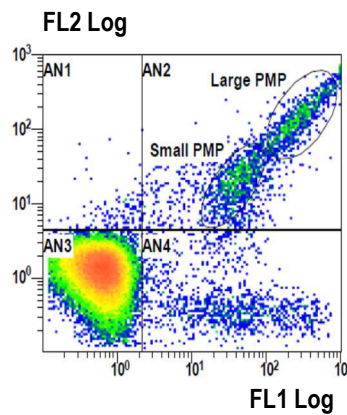


Fig.6c : "Color dot-plot" des TMP conditionné sur la région MP

Bleu : "small PMP" Rouge : "large PMP" Gris : bruit de fond et événements non PMP

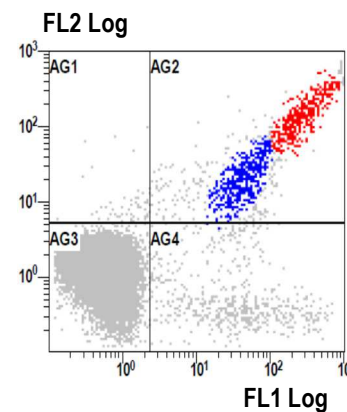


Fig.6b : "Density plot" des PMP Distribution en taille des PMP du cadran haut et droit de la Fig.6a

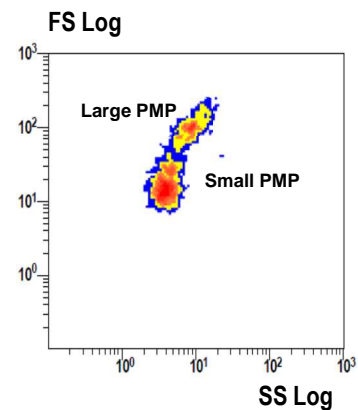


Fig.6d : "Color dot-plot" des PMP Distribution en taille.

Bleu : "small PMP" Rouge : "large PMP"

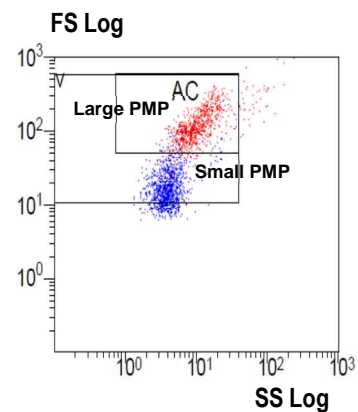
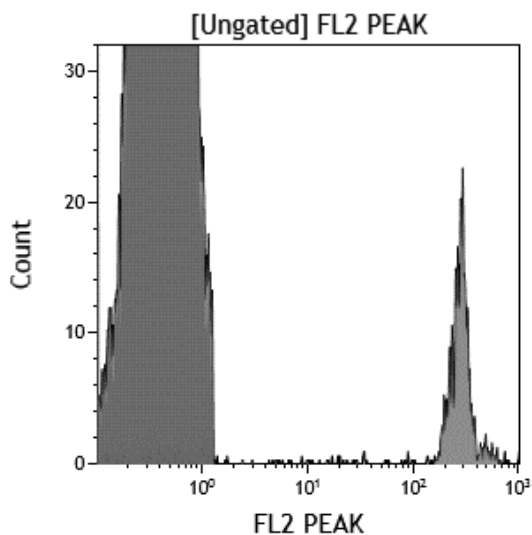


Fig.7 : Billes de comptage MP-Count Beads (FL2 ungated)



- vérifier que l'instrument ne rate pas les billes de 0,9 µm qui sont les plus grosses et les plus brillantes dans le mélange. Dans ce cas, les billes de 0,9 µm réapparaîtront progressivement lors de l'augmentation du seuil FS (ou FL1). Bien que ce type d'artéfact sur le seuil n'arrive pas sur BC Gallios, il a été rencontré ponctuellement sur d'autres instruments récents.

Si vous utilisez des tubes en polystyrène (ex. Falcon 4 mL FACS tubes), vérifier que la suspension de billes ne reste pas plus de 30 minutes en attente dans ce tube (risque de disparition différentielle des billes qui collent aux parois du tube).

REFERENCES

- 1) Robert S et al, Artheroscler Thromb Vasc Biol, 2012; 32: 1054-58.
- 2) Poncelet P et al, Transf Apher Sci 2015,53(2):110-26.
- 3) Poncelet P et al, Cytometry A. 2016;89(2):148-58.
- 4) Cointe S et al, J Thromb Haemost 2016, 14: 1-7.

7 Suivi de la résolution FS

La résolution sur le paramètre FS peut être mesurée par un paramètre numérique appelé Index de Séparation ou S.I. (adapté de la réf.3). Cela permet un suivi de l'instrument (ex. représentation de Levy-Jennings) et/ou des comparaisons inter-instruments.

$S.I._{0.5-0.3} = [Md_{0.5 \mu m} - Md_{0.3 \mu m}] / [SD_{0.5 \mu m} + SD_{0.3 \mu m}]$ où :
 $Md_{0.5 \mu m}$ = Médiane FS des billes de 0,5 µm (billes de 0,3 µm, resp.)
 $SD_{0.5 \mu m}$ = Déviation Standard FS des billes de 0,5 µm (billes de 0,3 µm, resp.)

$S.I._{0.5-0.3}$ est normalement situé dans des valeurs de 3 à 8 u.a. * sur un BC Gallios/Navios. Une valeur en dessous de 3 est le signe d'une résolution FS inacceptable et devrait entraîner une demande de S.A.V dédié aux microparticules avec un nettoyage et un réaligement de l'optique, auprès de Beckman-Coulter.

* Cette zone de valeurs est à définir pour tout autre instrument.

$S.I._{0.9-0.5} = [Md_{0.9 \mu m} - Md_{0.5 \mu m}] / [SD_{0.9 \mu m} + SD_{0.5 \mu m}]$
 Cet index a été décrit pour les cytomètres de la génération précédente (type BC FC500) avec l'utilisation du Megamix (réf. 7801). $S.I._{0.9-0.5}$ est normalement situé entre 25 et 35 u.a. sur un BC Gallios/Navios dont la résolution FS est optimale.

8 Causes d'erreur

Si le ratio est inférieur à 1,7 :

- vérifier que les populations de billes ont été correctement assignées sur la base de l'aspect typique illustré à la Fig.1, avec les billes de 0,3 µm localisées entre les billes de 0,5 µm et de 0,9 µm en FL1 (aspect typique du Megamix-Plus FSC).

Si le ratio est supérieur à 2,7 :

- vérifier que les populations de billes ont été correctement assignées, en se basant sur l'aspect typique du Megamix-Plus FSC illustré à la Fig.1. Une erreur classique serait d'assigner aux singlets de 0,5 µm et de 0,9 µm les singlets et doublets de 0,9 µm respectivement.
- vérifier que le réglage FL1 (seuil et PMTv) n'induit pas une coupe dans le nuage des billes 0,5 µm. Dans ce cas, (seuil FL1 trop fort ou PMTv FL1 trop faible) les billes de 0,1 µm ne seront pas visibles et le ratio 0,5µm/0,9µm sera << 2 (perte des billes de 0,5 µm).

BIOCYTEX
140 ch. DE L'ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE
TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71

Version Avril 2017