



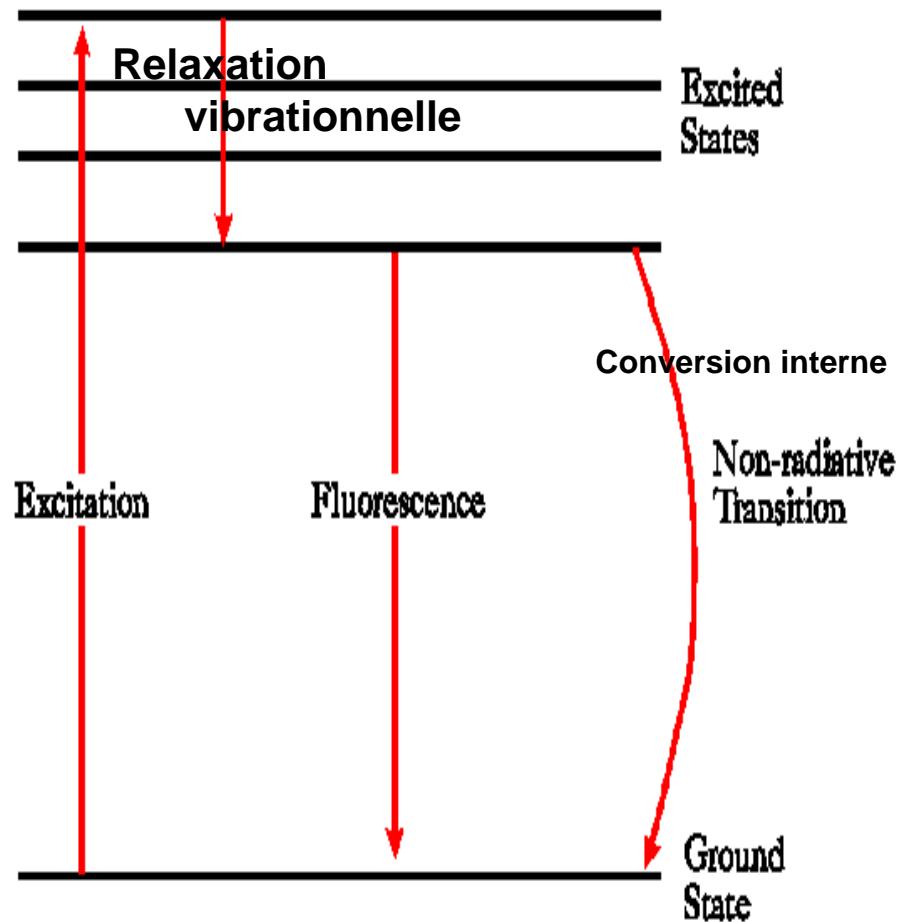
Simplify • Automate • Innovate

Compensations – Fuites optiques

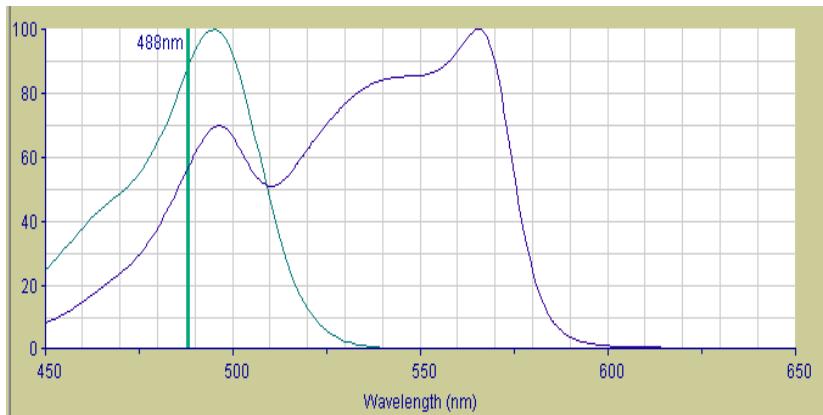
Benoit Dupont
Application Specialist Western Europe
Beckman Coulter France

Fluorescence

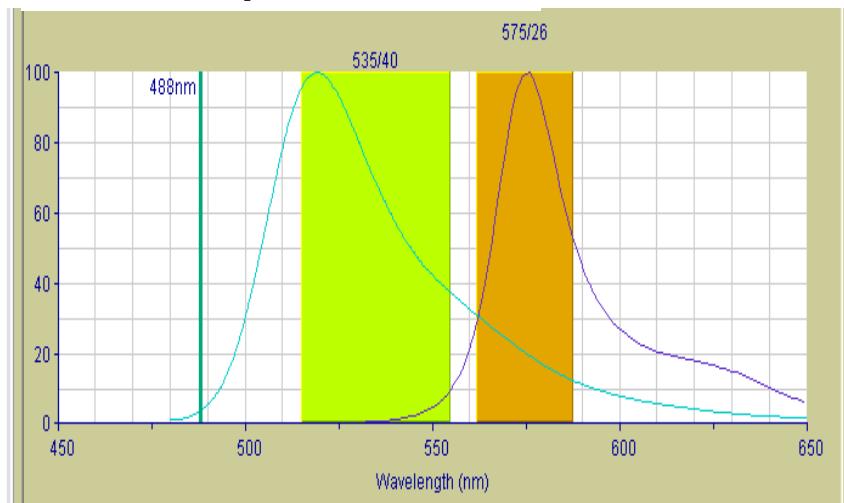
Diagramme de Jablonski



Exitation spectrum



Emission spectrum

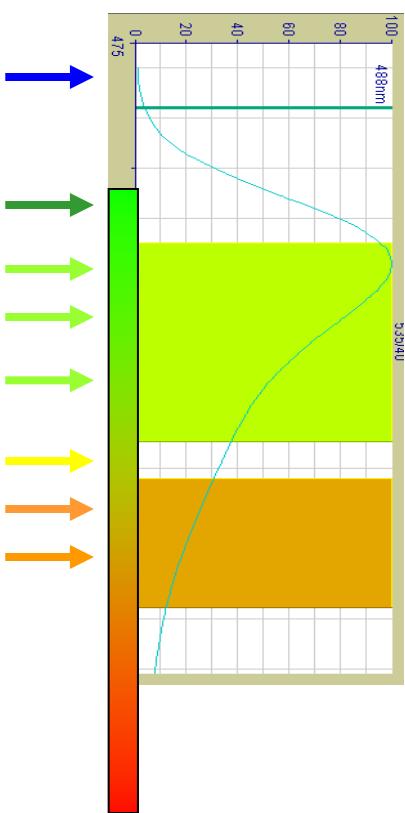


Wave lenght

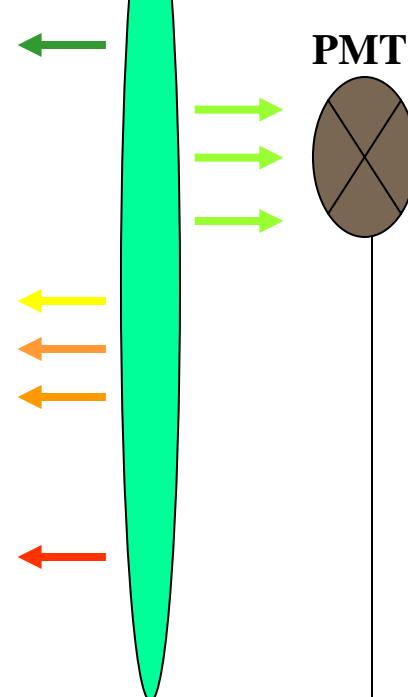
Que se passe t'il au niveau des filtres

Pourquoi la FITC est-elle détectée dans le canal RPE ?

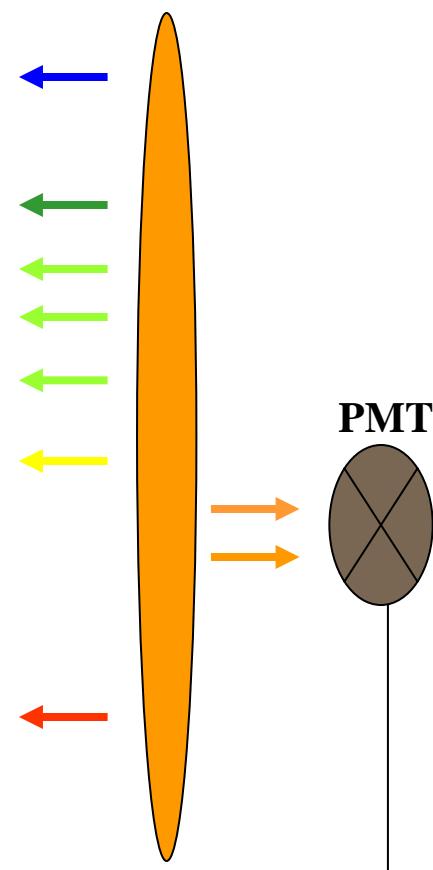
Particule FITC



Filtre FITC

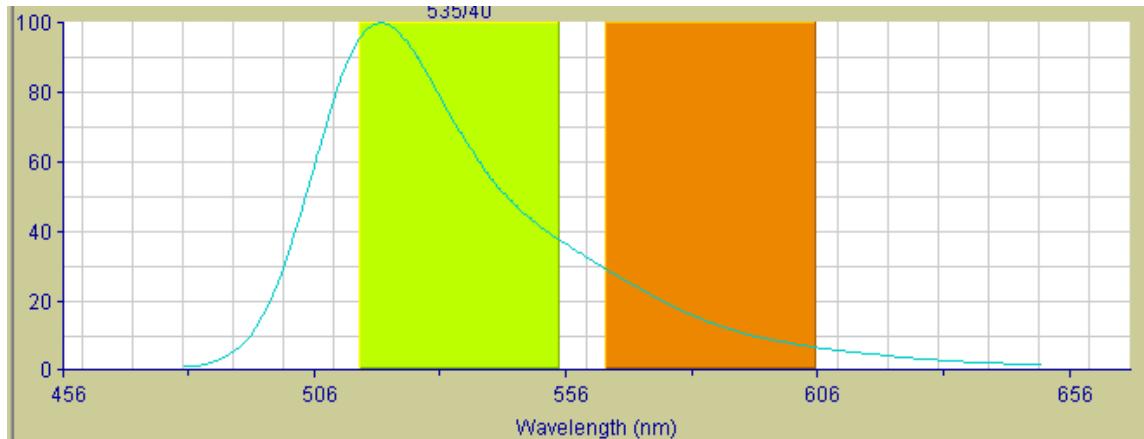


Filtre RPE



$1 \times e^-$
 $9 \times e^-$

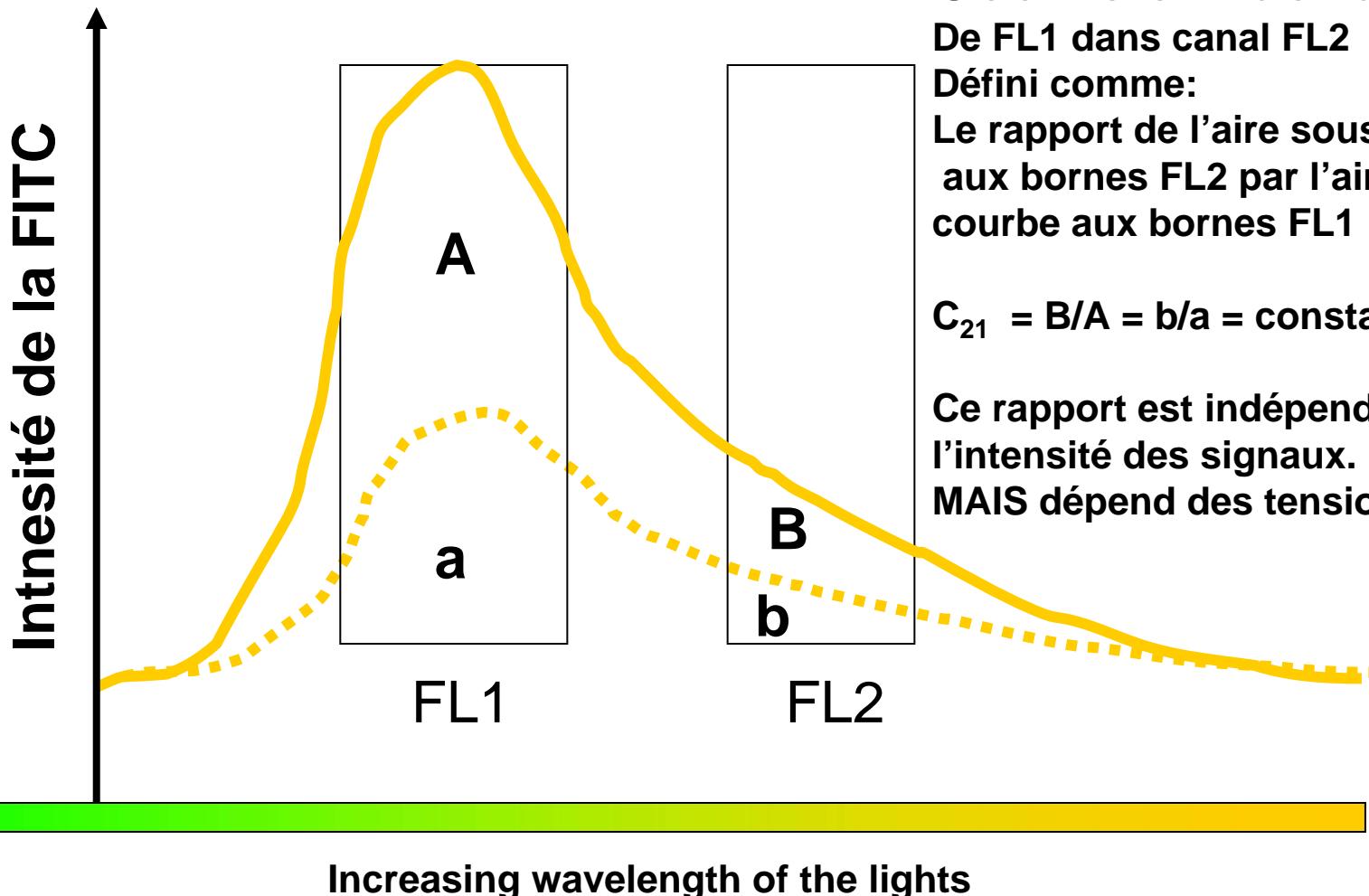
1. Normalisation :



- $FL1_{\text{mesuré}} = \alpha \cdot FITC_{\text{spectre}}$
- $FL2_{\text{mesuré}} = \gamma \cdot FITC_{\text{spectre}}$
- Posons $\alpha \cdot FITC_{\text{spectre}} = FITC_{\text{pure}}$
- $\Rightarrow FL1_{\text{mesuré}} = FITC_{\text{pure}}$
- $\Rightarrow FL2_{\text{mesuré}} = \gamma \cdot FITC_{\text{spectre}} = \gamma / \alpha \cdot FITC_{\text{pure}} = C_{21} \cdot FITC_{\text{pure}}$

- $FL1_{\text{mesuré}} = 100\% FITC_{\text{pure}}$
- $FL2_{\text{mesuré}} = C_{21} \cdot FITC_{\text{pure}} = 20\% FITC_{\text{pure}}$
- Nous ferons de même pour toutes les autres fluorescences

Coefficient de fuite



Coefficient de fuite

De FL1 dans canal FL2

Défini comme:

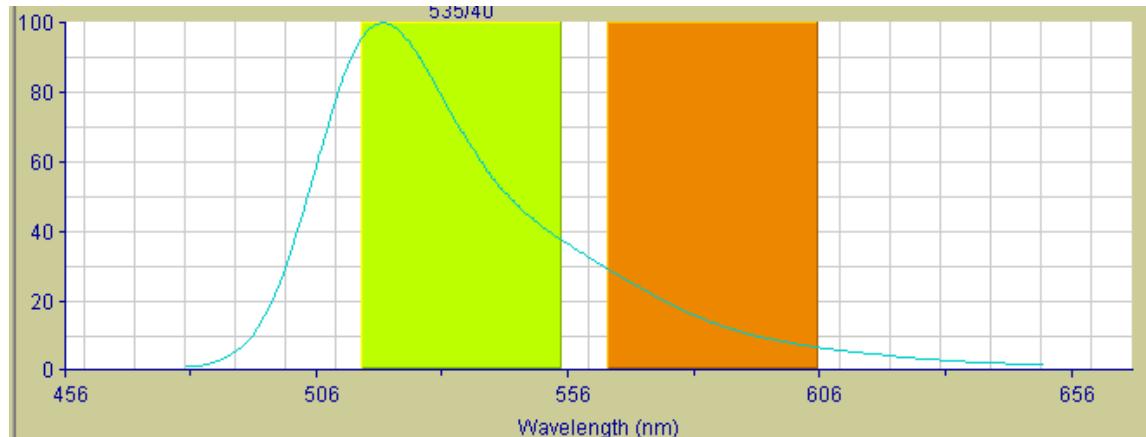
Le rapport de l'aire sous la courbe aux bornes FL2 par l'aire sous la courbe aux bornes FL1

$$C_{21} = B/A = b/a = \text{constant}$$

Ce rapport est indépendant de l'intensité des signaux.

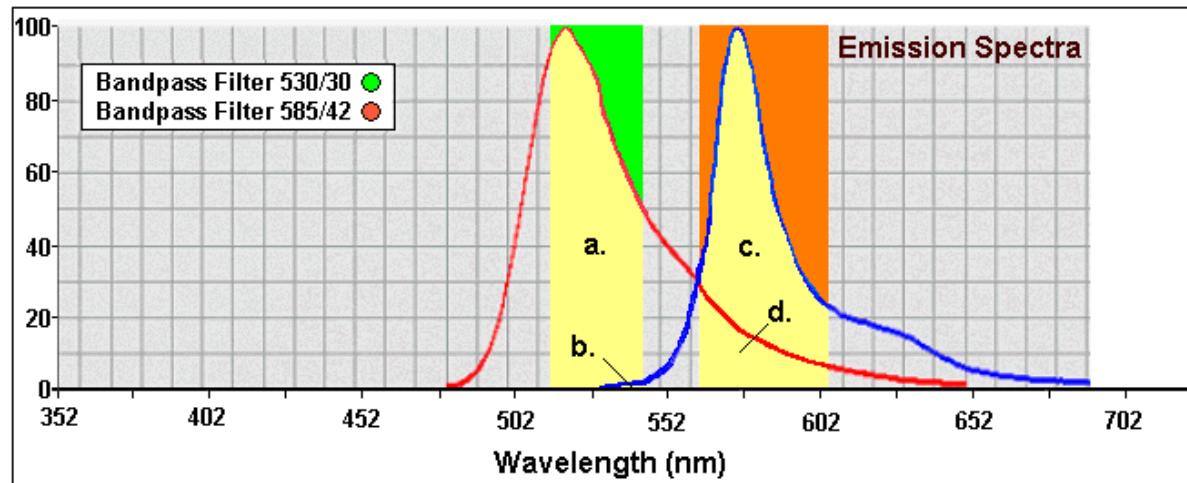
MAIS dépend des tensions aux PMT

1. Normalisation :



- La quantité de fluorescence de FITC reçue au détecteur FL1 est d'environ 50% de la quantité totale du spectre de fluorescence FITC
- La quantité de fluorescence de FITC reçue au détecteur FL2 est d'environ 10% de la quantité totale du spectre de fluorescence FITC
- Nous normaliserons à 100%, la quantité de fluorescence FITC reçue au détecteur FL1 que nous nommerons **FITCpure**. Donc, FITCpure = 100% et la quantité de FITC reçue dans le canal FL2 vaut 20% de FITCpure.
- Nous nommerons **fuite optique** de la FITC dans le canal PE, cette quantité de FITC reçue dans le canal FL2 et sera représentée par le coefficient **C₂₁**
- FL1mesuré = 100% FITCpure
- FL2mesuré = **C₂₁** × FITCpure = 20% × FITCpure
- Nous ferons de même pour toutes les autres fluorescences

2. Système lorsque deux fluorochromes sont utilisés



- $FL1_{\text{mesuré}} = a + b = FITC_{\text{pure}} + C_{12} \cdot RPE_{\text{pure}}$
- $FL2_{\text{mesuré}} = c + d = RPE_{\text{pure}} + C_{21} \cdot FITC_{\text{pure}}$
- Avec C_{12} : facteur de la fuite optique du fluorochrome 2 dans canal 1
- Et C_{21} : facteur de la fuite optique du fluorochrome 1 dans canal 2
- **Comment déterminer les valeurs de $FITC_{\text{pure}}$ et RPE_{pure} à partir de $FL1_{\text{mesuré}}$ et de $FL2_{\text{mesuré}}$?**

2.1 Détermination des valeurs de FITCpure et RPEpure à partir de FL1mesuré et de FL2 mesuré

- $RPEpure = FL2mesuré - C_{21} \cdot FITCpure$ équation (1)
- $FITCpure = FL1mesuré - C_{12} \cdot RPEpure$
- On obtient après remplacement de FITCpure dans l'équation (1):
 - $RPEpure = (FL2mesuré - C_{21} \cdot FL1mesuré) \cdot 1/(1 - C_{12} \cdot C_{21})$
- On procède de la même façon pour calculer FITCpure
 - $FITCpure = FL1mesuré - C_{12} [(FL2mesuré - C_{21} \cdot FL1mesuré) \cdot 1/(1 - C_{12} \cdot C_{21})]$
- ? Détermination des facteurs C_{12} et C_{21} ?

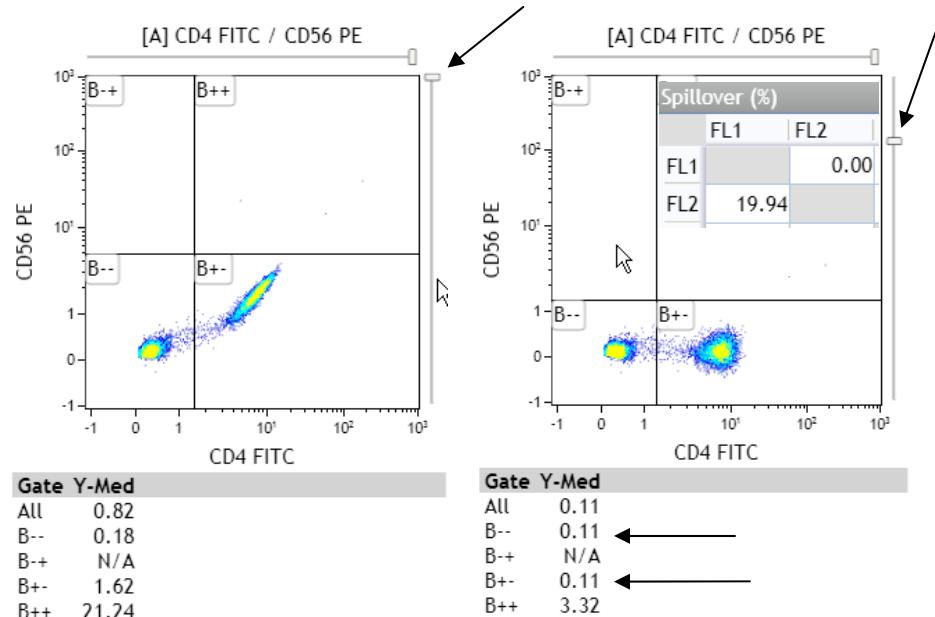
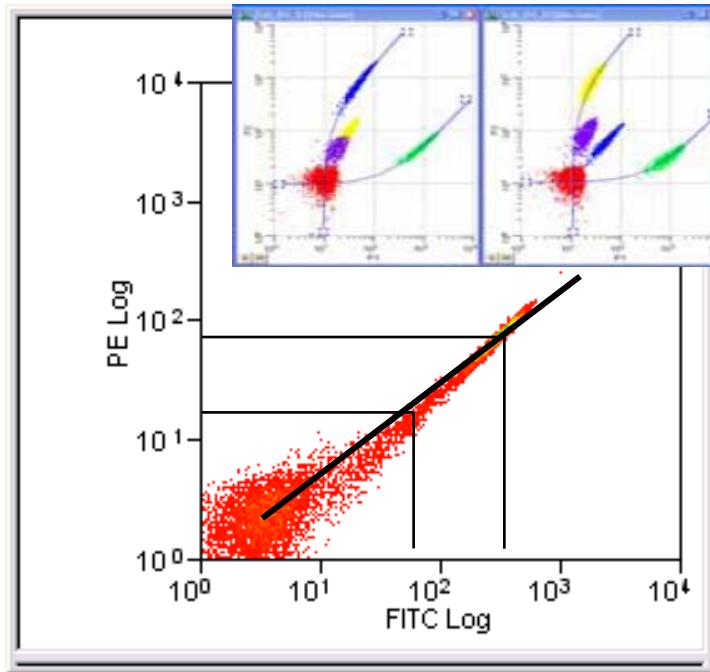
N.B. FITC_{pure} correspond au paramètre compensé de la FITC càd FL_{1comp}

2.2. Détermination des facteurs Cij pour une utilisation de 2 fluorochromes (FITC, RPE).

- Pour déterminer les facteurs Cij (pourcentages de compensation), on doit analyser chaque fluorochrome individuellement càd créer n.(n-1) plots

2.2.1 Tube contenant de la FITC seule – détermination de C₂₁

- Détermination de la fuite optique de FITC (FL₁) dans le canal FL₂ (C₂₁) :



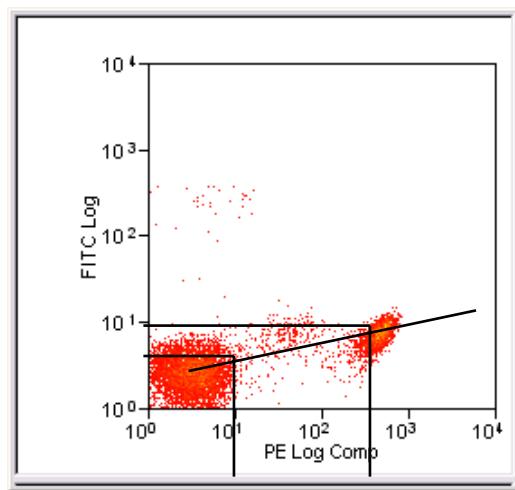
$$C_{21} = (Y_{\max} - Y_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$$

2.2. Détermination des facteurs Cij pour une utilisation de 2 fluorochromes (FITC, RPE).

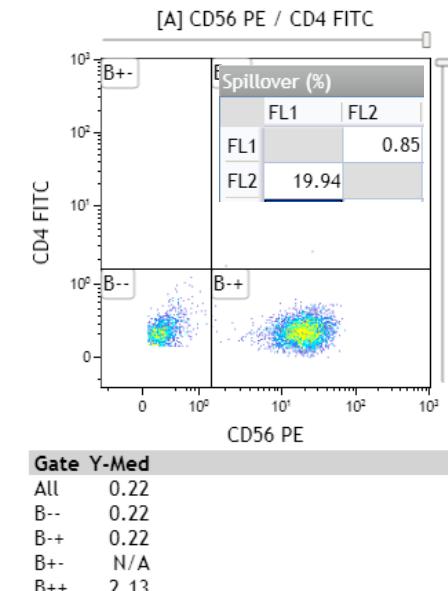
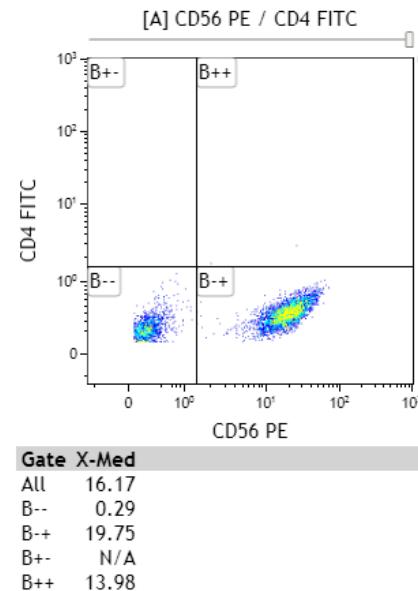
- Pour déterminer les facteurs Cij (pourcentages de compensation), on doit analyser chaque fluorochrome individuellement.

- 2.2.2 Tube contenant de la RPE seule – détermination de C12**

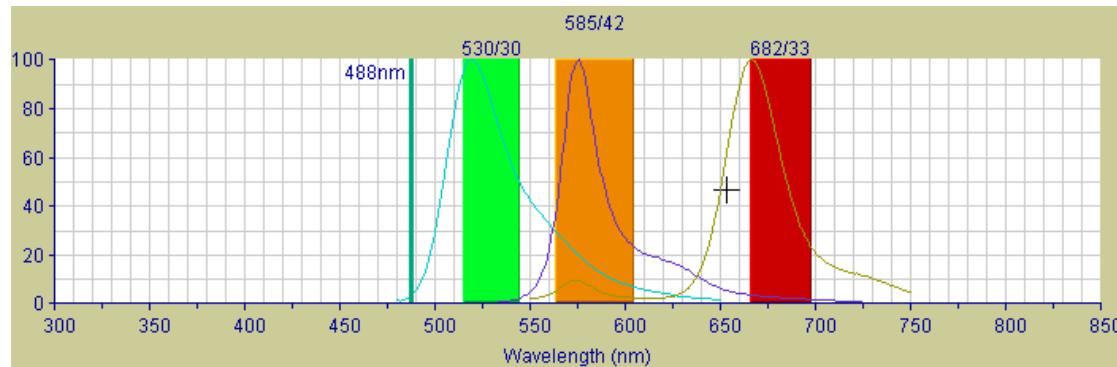
- Détermination de la fuite optique de RPE (FL2) dans le canal FL1 (C_{12}) :



$$C_{12} = (Y_{\max} - Y_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$$



3. Systèmes d'équation pour une utilisation de 3 fluorochromes



Le système d'équation (1) caractérisant les valeurs détectées par l'instrument de FL_1 , FL_2 et FL_3 pour une utilisation de trois fluorochromes FITC, RPE et RPE-Cy5. :

$$\begin{aligned}
 FL_{1\text{mesuré}} &= FL_1 = FITC_{\text{pure}} + C_{12} \cdot RPE_{\text{pure}} + C_{13} \cdot RPE-\text{Cy5}_{\text{pure}} \\
 FL_{2\text{mesuré}} &= FL_2 = C_{21} \cdot FITC_{\text{pure}} + RPE_{\text{pure}} + C_{23} \cdot RPE-\text{Cy5}_{\text{pure}} \\
 FL_{3\text{mesuré}} &= FL_3 = C_{31} \cdot FITC_{\text{pure}} + C_{32} \cdot RPE_{\text{pure}} + RPE-\text{Cy5}_{\text{pure}}
 \end{aligned}$$

Où C_{ij} est la contribution du fluorochrome j dans le canal FL_i

- On peut aussi écrire :

$$\begin{pmatrix} FL_1 \\ FL_2 \\ FL_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & C_{12} & C_{13} \\ C_{21} & 1 & C_{23} \\ C_{31} & C_{32} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} FITC_{\text{pure}} \\ RPE_{\text{pure}} \\ RPE-\text{Cy5}_{\text{pure}} \end{pmatrix}$$
équation 1

3.2 Le système d 'équation donnant les valeurs correctes de FITC, RPE et RPE-Cy5 après compensation est donné par (voir rappel calcul matriciel) :

On sait par le calcul matriciel que :

Si $A = B \times C$ alors $C = B^{-1} \times A$

Avec $B^{-1} = 1/\det B \times \text{Adj } B$

Ou $\text{Adj } B = \text{matrice transposée des cofacteurs de } B$

Et $\det B = \sum_{j=1}^n b_{1j} \text{ Cof}_{1j}$ (règle de Laplace pour calcul du det par rapport ligne 1)

$$\begin{pmatrix} FITC_{pure} \\ RPE_{pure} \\ RPE-Cy5_{pure} \end{pmatrix} = \frac{1}{\det C} \begin{pmatrix} 1 - C_{23} \cdot C_{32} & -(C_{12} - C_{13} \cdot C_{32}) & C_{23} \cdot C_{12} - C_{13} \\ -(C_{21} - C_{23} \cdot C_{31}) & 1 - C_{13} \cdot C_{31} & -(C_{23} - C_{13} \cdot C_{21}) \\ C_{21} \cdot C_{32} - C_{31} & -(C_{32} - C_{12} \cdot C_{31}) & 1 - C_{12} \cdot C_{21} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} FL_1 \\ FL_2 \\ FL_3 \end{pmatrix} \quad \text{Équation 2}$$

On obtient donc les valeurs « compensées » de FL_1 , de FL_2 et de FL_3 :

$$FL_{1comp} = FITC_{pure} = 1/\det C [(1 - C_{23} \cdot C_{32}) \cdot FL_1 - (C_{12} - C_{13} \cdot C_{32}) \cdot FL_2 + (C_{23} \cdot C_{12} - C_{13}) \cdot FL_3]$$

$$FL_{2comp} = RPE_{pure} = 1/\det C [-(C_{21} - C_{23} \cdot C_{31}) \cdot FL_1 - (1 - C_{13} \cdot C_{31}) \cdot FL_2 - (C_{23} - C_{13} \cdot C_{21}) \cdot FL_3]$$

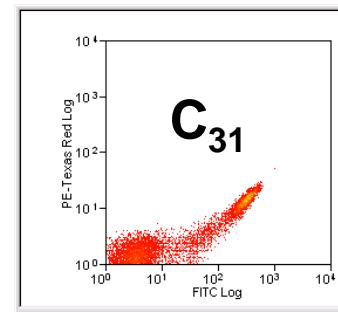
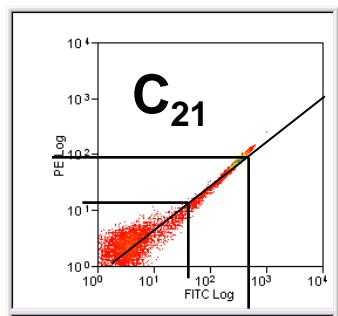
$$FL_{3comp} = RPE-Cy5_{pure} = 1/\det C [C_{21} \cdot C_{32} - C_{31}) \cdot FL_1 - (C_{32} - C_{12} \cdot C_{31}) \cdot FL_2 + (1 - C_{12} \cdot C_{21}) \cdot FL_3]$$

4. Détermination des facteurs Cij pour une utilisation de 3 fluorochromes (FITC, RPE, RPE-Cy5).

- Pour déterminer les facteurs Cij (pourcentages de compensation), on doit analyser chaque fluorochrome individuellement càd créer n.(n-1) plots
- **4.1 Tube contenant de la FITC seule – détermination de C₂₁, C₃₁**
 - En effet, en passant le tube contenant de la FITC seule alors les facteurs C₁₂, C₃₂, C₁₃ et C₂₃ sont nuls et l'équation (1) devient :

$$\begin{pmatrix} FL_1 \\ FL_2 \\ FL_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ C_{21} & 0 & 0 \\ C_{31} & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} FITCpure \\ RPEpure \\ RPE - Cy5pure \end{pmatrix}$$

$$\begin{aligned} FL_{1\text{mesuré}} &= FITC_{\text{pure}} \\ FL_{2\text{mesuré}} &= C_{21} \cdot FITC_{\text{pure}} \\ FL_{3\text{mesuré}} &= C_{31} \cdot FITC_{\text{pure}} \end{aligned}$$



$$C_{21} = (Y_{\max} - Y_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$$

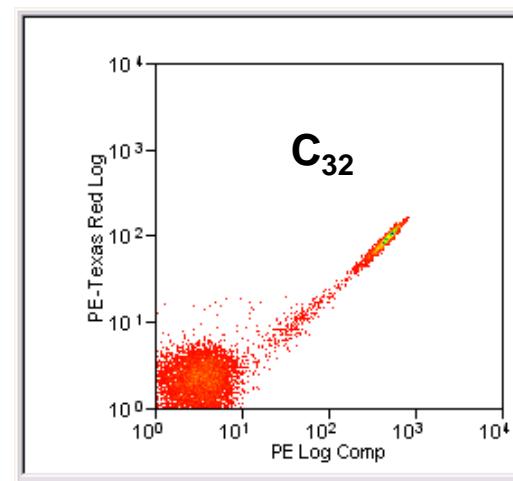
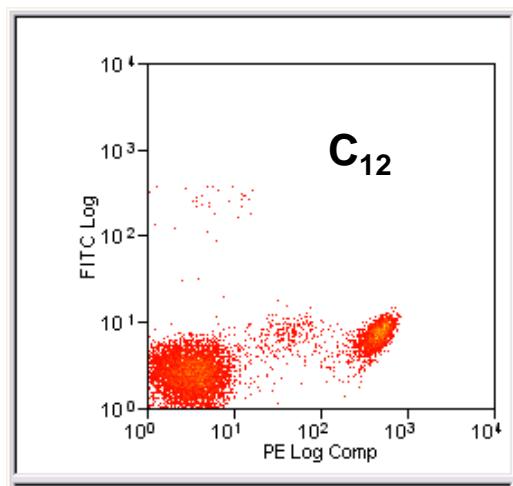
4. Détermination des facteurs C_{ij} pour une utilisation de 3 fluorochromes (FITC, RPE, RPE-Cy5).

- 4.2. Tube contenant de la RPE seule – détermination de C_{12} et C_{32}

Si l'on passe le tube RPE seul alors les facteurs C_{13} , C_{21} , C_{23} et C_{31} sont nuls et l'équation (1) devient :

$$\begin{pmatrix} FL_1 \\ FL_2 \\ FL_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & C_{12} & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & C_{32} & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} FITCpure \\ RPEpure \\ RPE-Cy5pure \end{pmatrix}$$

$$\begin{aligned} FL_{1\text{mesuré}} &= C_{12} \cdot RPE_{\text{pure}} \\ FL_{2\text{mesuré}} &= RPE_{\text{pure}} \\ FL_{3\text{mesuré}} &= C_{32} \cdot RPE_{\text{pure}} \end{aligned}$$



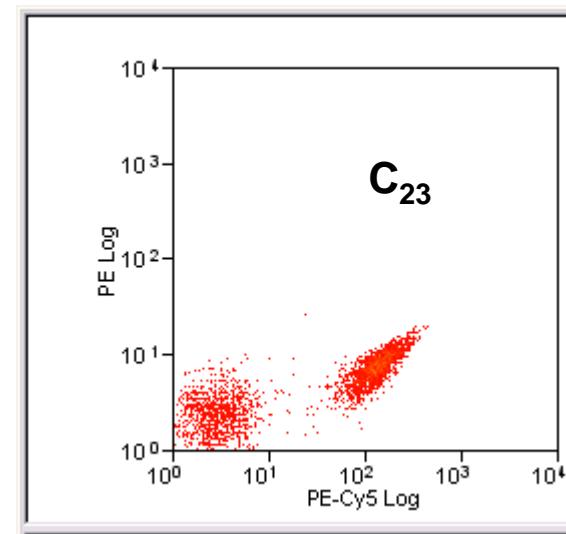
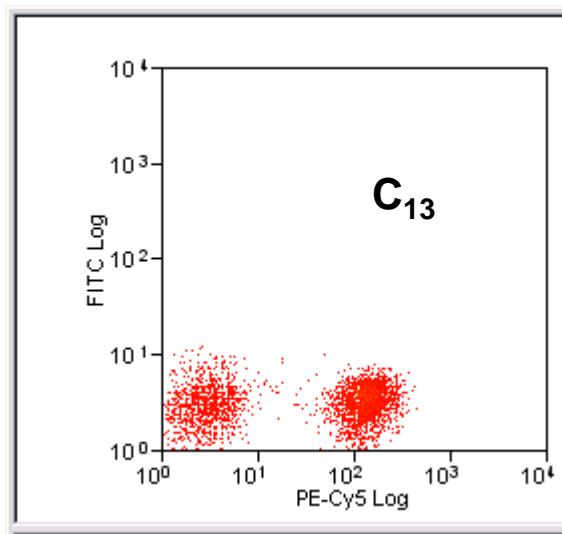
4. Détermination des facteurs C_{ij} pour une utilisation de 3 fluorochromes (FITC, RPE, RPE-Cy5).

■ 4.3. RPE-Cy5 seule détermination de C_{13} et C_{23}

Si l'on passe le tube RPE-Cy5 seul alors les facteurs C_{12} , C_{21} , C_{31} et C_{32} sont nuls et l'équation (1) devient :

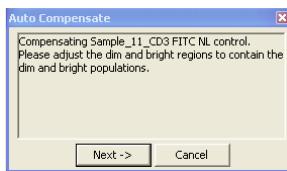
$$\begin{pmatrix} FL_1 \\ FL_2 \\ FL_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & C_{13} \\ 0 & 0 & C_{23} \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} FITCpure \\ RPEpure \\ RPE - Cy5 pure \end{pmatrix}$$

$$\begin{aligned} FL_{1\text{mesuré}} &= C_{13} \cdot RPE\text{-Cy5}_{\text{pure}} \\ FL_{2\text{mesuré}} &= C_{23} \cdot RPE\text{-Cy5}_{\text{pure}} \\ FL_{3\text{mesuré}} &= RPE\text{-Cy5}_{\text{pure}} \end{aligned}$$

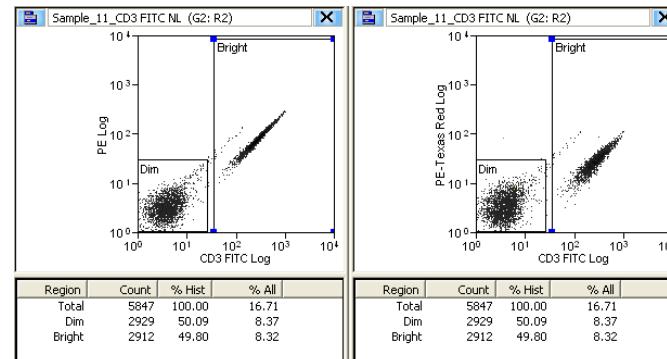


4. Détermination des facteurs Cij pour une utilisation de 3 fluorochromes (FITC, RPE, RPE-Cy5).

- En pratique, comment ça marche ?
 - Pas de panique, les logiciels font tout ce travail pour vous !
 - Exemple : logiciel Summit 4.3.02 :
 - Fonction Autocompensate... à partir des tubes monomarqués en biparamétriques



Auto-Comp provides a fast user defined semi-automatic (Wizard) approach to compensation



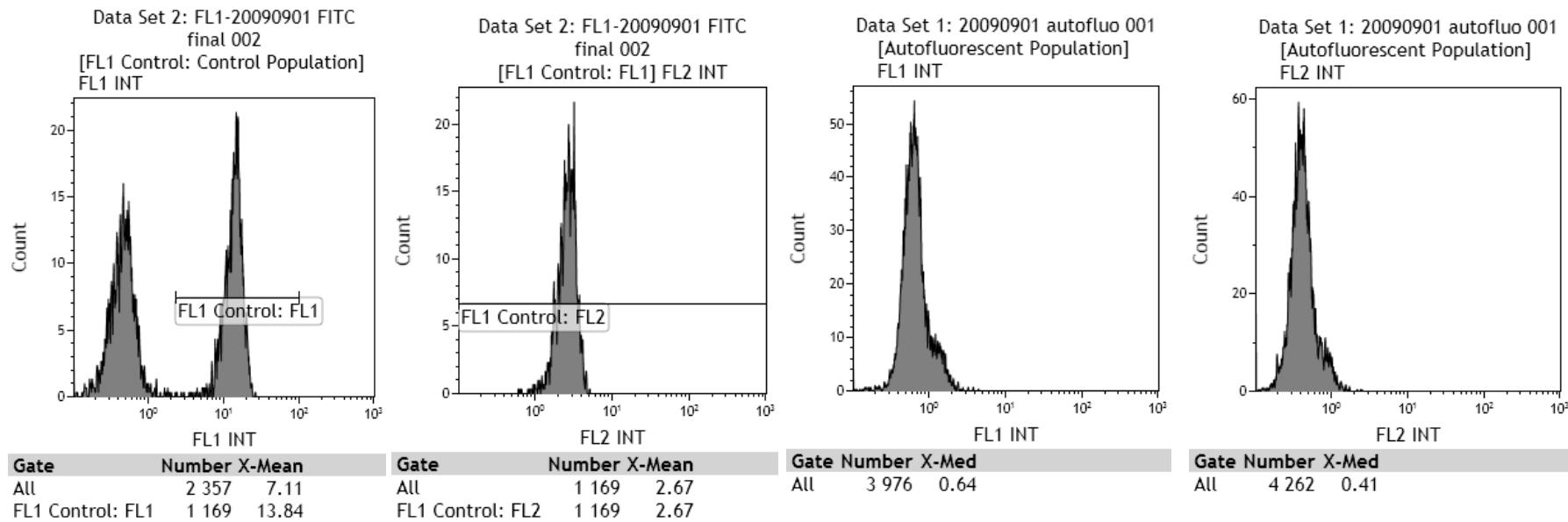
$$C_{21} = (\langle Y \rangle_{\text{Bright}} - \langle Y \rangle_{\text{dim}}) / (\langle X \rangle_{\text{Bright}} - \langle X \rangle_{\text{Dim}})$$

Record it

Parameter	CD4 FITC Log	CD56 PE Log	CD3 PE-Texas ...	CD19 PE-Cy55 ...	CD5 PE-Cy7 Log	CD45 PB Log	CD8 APC Log	CD16 APC-Cy7 ...
CD4 FI...	100.0000	0.6979	0.3091	0.1702	0.1543	0.0000	0.0214	0.2551
CD56 P...	25.8209	100.0000	22.4885	8.6935	11.5873	0.0000	0.0082	0.2094
CD3 PE...	4.2718	18.1266	100.0000	1.1348	2.0061	0.0000	0.0000	0.0000
CD19 P...	0.0000	1.9407	19.2586	100.0000	0.5300	0.0000	0.1000	0.0000
CD5 PE...	0.0000	0.4346	5.7627	55.3899	100.0000	0.0000	0.0000	0.7639
CD45 P...	0.5120	0.0499	0.1830	0.0000	0.0839	100.0000	0.0382	0.3348
CD8 AP...	0.0000	0.0348	0.2511	12.1800	0.1304	0.0000	100.0000	41.9400
CD16 A...	0.0000	0.0000	0.0000	14.5744	5.5509	0.0000	3.0976	100.0000

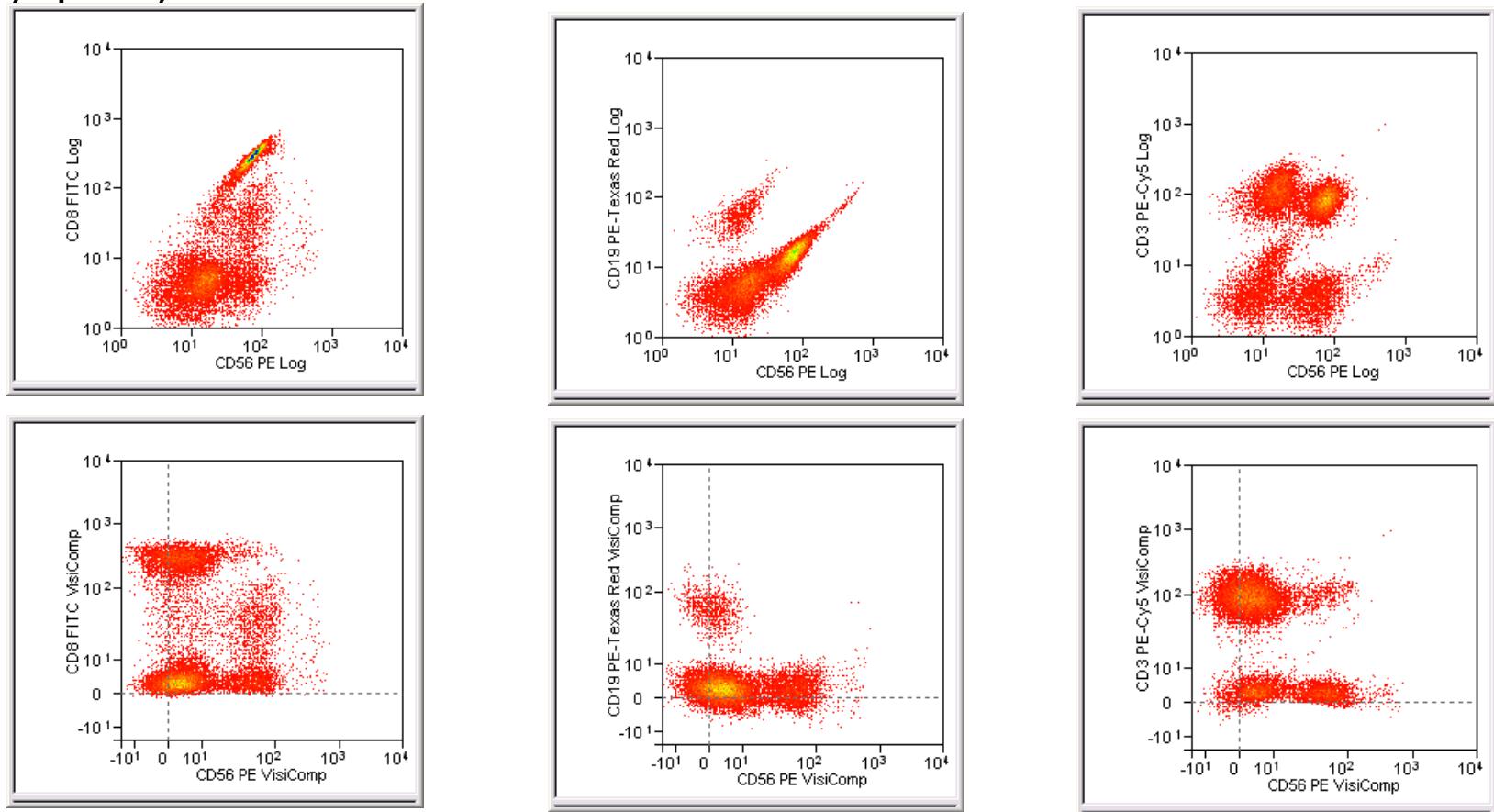
4. Détermination des facteurs Cij pour une utilisation de 3 fluorochromes (FITC, RPE, RPE-Cy5).

- En pratique, comment ça marche ?
 - Logiciel Gallios :
 - Fonction Autoscheduler... Calcul de la matrice à partir des histogrammes des tubes monomarqués.
 - Logiciel Kaluza :
 - Fonction Add Selected to new compensation. Calcul de la matrice à partir des histogrammes des tubes monomarqués et du vecteur d'Autofluorescences



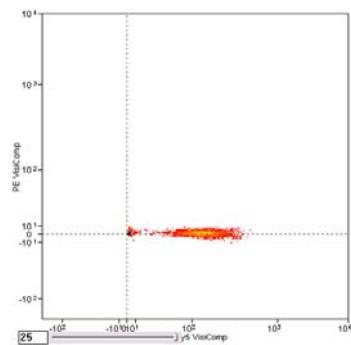
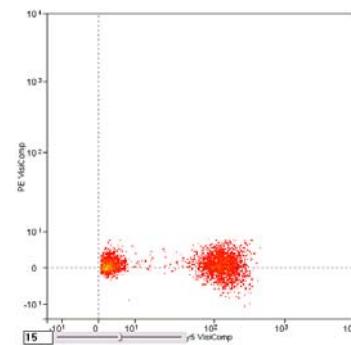
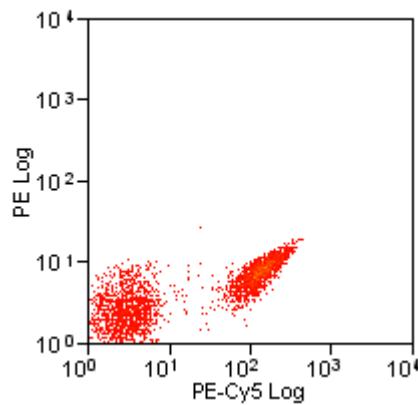
5. Résultats

Après avoir déterminé tous les facteurs C_{ij} , le logiciel calculera l'inverse de la matrice des Coefficients de fuite automatiquement pour donner directement les valeurs compensées (FITCpure, RPEpure, RPE-Cy5pure).

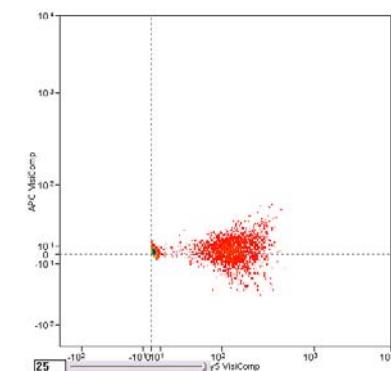
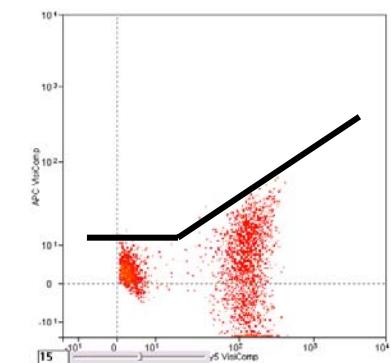
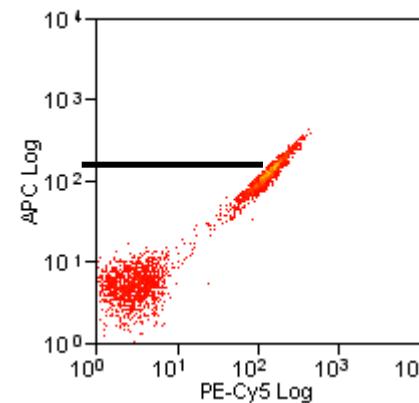


6. Distribution des données après compensation

- L'étalement de la distribution du signal après compensation est proportionnelle à la racine carrée du signal dans le canal où a lieu la fuite (La cytométrie en Flux, Xavier Ronot & all, Lavoisier-2006, p73, p420)



~ sqrt (Intensité signal de fuite)



Attention : Placement des seuils = discrimination entre cellules négatives et positives -> FMO

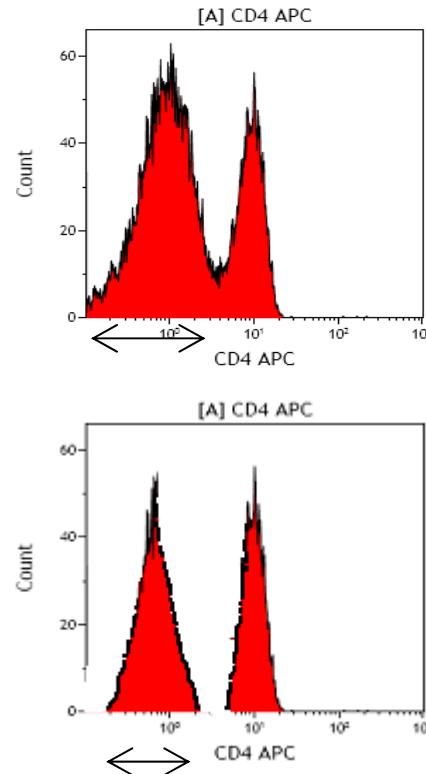
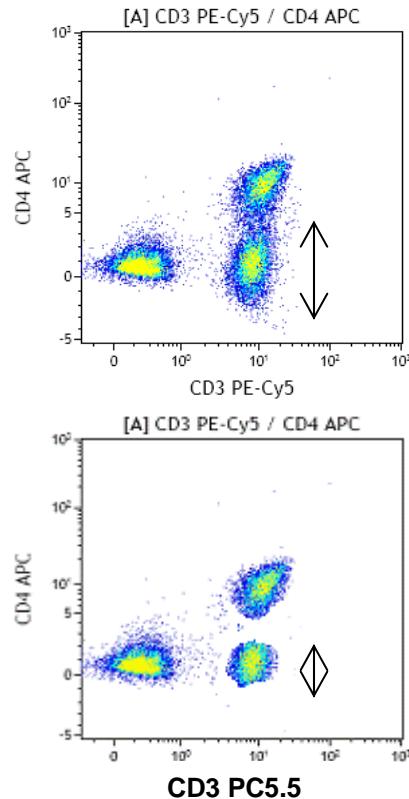
Tubes nécessaires pour marquage 6 couleurs : tubes réglages, tubes comp, tubes FMO, tube 6 couleurs



	Iso FITC	Iso RPE	Iso ECD	Iso PC5.5	Iso APC	Iso APC A750	FITC	RPE	ECD	PC5.5	APC	APC A750
T1 PMT	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
T2 FITC comp		✓	✓	✓	✓	✓	✓					
T3 RPE comp	✓		✓	✓	✓	✓		✓				
T4 ECD comp	✓	✓		✓	✓				✓			
T5 PC5.5 comp	✓	✓	✓			✓				✓		
T6 APC comp	✓	✓	✓	✓		✓					✓	
T7 APC A750comp	✓	✓	✓	✓	✓							✓
T8 Verification							✓	✓	✓	✓	✓	✓
T9 FMO FITC	✓							✓	✓	✓	✓	✓
T10 FMO RPE		✓					✓		✓	✓	✓	✓
T11 FMO ECD			✓				✓	✓		✓	✓	✓
T12 FMO PC5.5				✓			✓	✓	✓		✓	✓
T13 FMO APC					✓		✓	✓	✓	✓		✓
T14 FMO APC A750						✓	✓	✓	✓	✓	✓	

6. Distribution des données après compensation

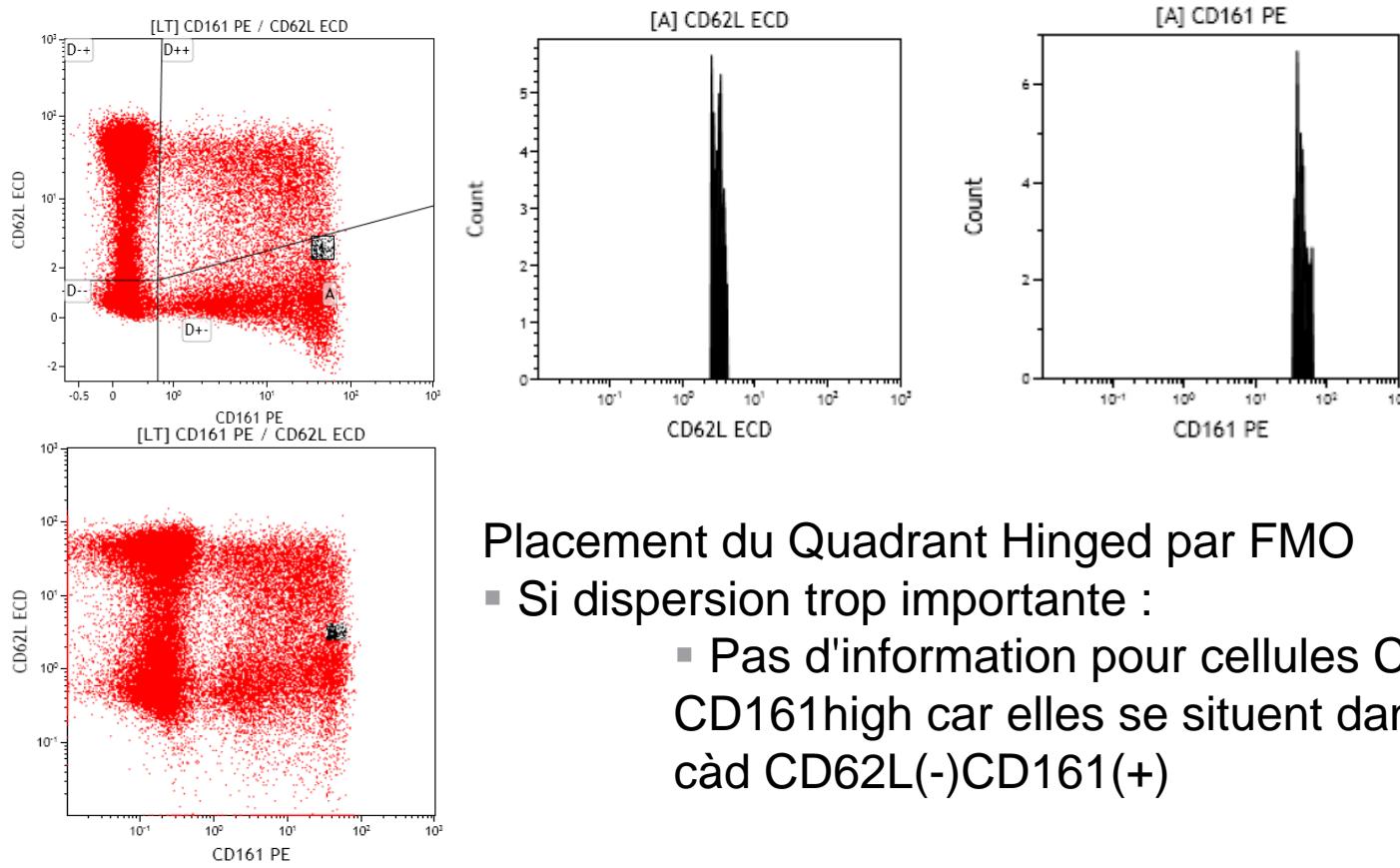
- Impact de l'étalement de la distribution du signal après compensation sur les données
 - Diminution du Facteur de Séparation entre pop(-) et pop(+) sur canal de fuite



Avec FS = $\langle \text{pop}(+) \rangle - \langle \text{pop}(-) \rangle / \text{SQRT} [\text{SD}^2 \text{pop}(+) + \text{SD}^2 \text{pop}(-)]$

6. Distribution des données après compensation

- Impact de l'étalement de la distribution du signal après compensation sur les données
 - Perte d'information pour les cellules dim sur canal de fuite



Placement du Quadrant Hinged par FMO

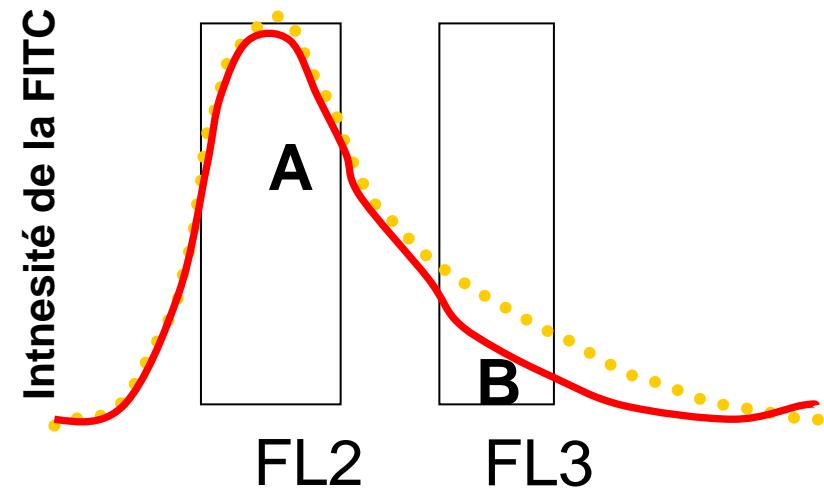
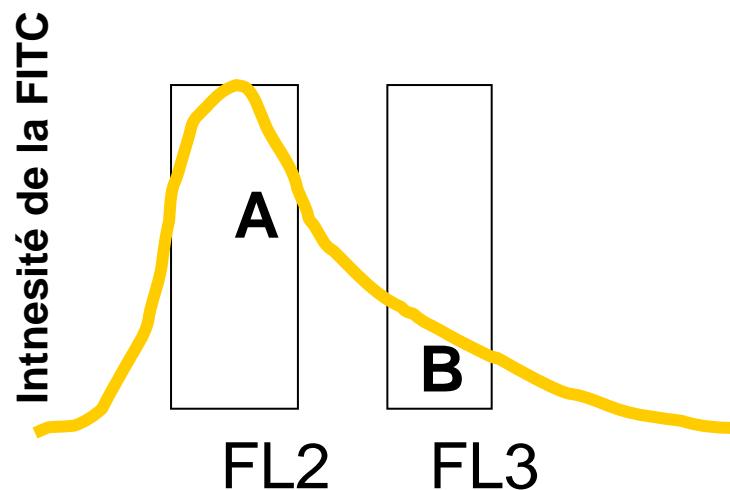
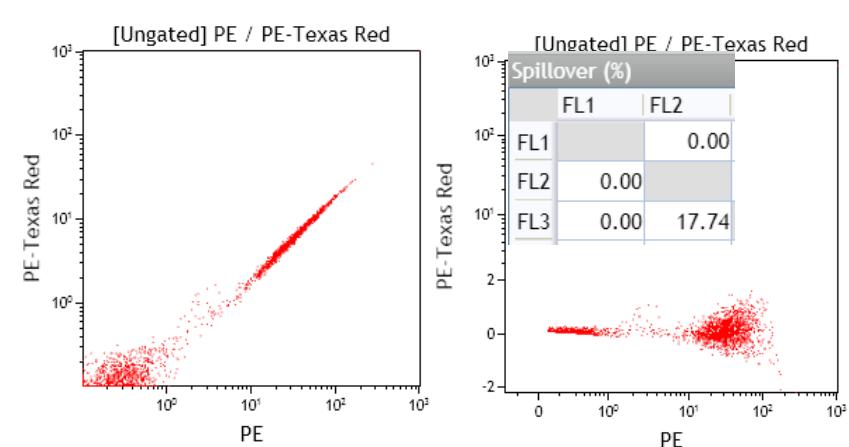
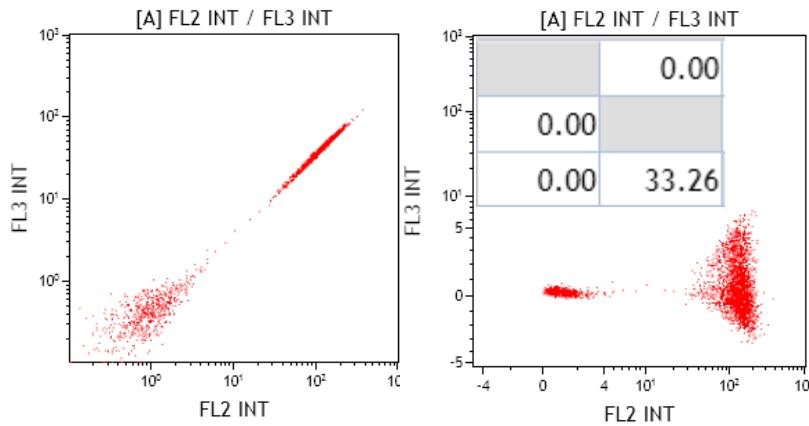
- Si dispersion trop importante :
 - Pas d'information pour cellules CD62Ldim CD161high car elles se situent dans la dispersion càd CD62L(-)CD161(+)

7. Cas de figure

- **Cas où les anticorps d'intérêt marquent les cellules suffisamment fort**
 - Préparer les N + 1 tubes reprenant cellules mono-marquées par les différents anticorps d'intérêt et le tube contenant les cellules non marquées
- **Cas où les anticorps d'intérêt ne sont pas conjugués à des tandems et ne marquent pas suffisamment fort les cellules pour pouvoir être utilisées pour le réglage des compensations.**
 - Préparer les N + 1 tubes reprenant cellules mono-marquées par les différents anticorps d'intérêt et le tube contenant les cellules non marquées. **Pour les anticorps d'intérêt trop faiblement exprimés, on utilisera un marqueur fortement exprimé (CD8) conjugué avec le même fluorochrome que l'anticorps d'intérêt**
- **Cas où les anticorps d'intérêt sont conjugués à des tandems et ne marquent pas suffisamment fort les cellules pour pouvoir être utilisées pour le réglage des compensations.**
 - Préparer les N + 1 tubes reprenant **les billes ‘capture’** (Spherotech COMPtrol CM IgP-30-2K) mono-marquées par les différents fluorochromes **et** des cellules non marquées ainsi que le tube contenant les cellules non marquées

8. Comment réduire le facteur de fuite C_{ij}

- Régler les voltages aux PMT de façon optimales



Bibliographie



Simplify • Automate • Innovate

- La cytométrie en Flux, Xavier Ronot & all, Lavoisier-2006
- Roederer et all, A new Logicle Display Method Avoids Deceptive Effects of Logarithmic scaling for low signals and compensation data, Cytometry Part A 69A 541-551 (2006)
- Leonore A. Herzenberg, Interpreting flow cytometry data : a guide for the perplex, Nature Immunology, vol 7, number 7, july 2006
- **Wood, 9 color and 10 color Flow Cytometry, Arch Pathol Lab Med, vol130, May 2006**
- Pazer HL, Swanson LA: Modern Methods for Statistical Analysis. Intext Educational Publishers, Scranton, PA, 1972.
- **Roederer, M., 1997b. Compensation in flow cytometry: a perspective. <http://www.drmr.com/compensation>.**
- Roederer M: Spectral compensation for flow cytometry: Visual artifacts, limitations, and caveats. Cytometry 45:194-205, 2001.
- Roederer M, DeRosa S, Gerstein R, Anderson MT, Bigos M, Stovel RT, Nozaki T, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. Cytometry 1997;29:328:339.
- Roederer M, Murphy R. Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts. Cytometry 1986;7:558-565.
- Roederer M. Compensation. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PN, Dressler LG, Rabinovitch PS, Stewart CC, Tanke HJ, Wheless LL, editors. Current protocols in cytometry. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1999.
- Schwartz A, Iglesias N, Fernandez-Rebollet E: Flow cytometry performance survey. Flow Cytometry Standards Forum 2:4-6, 1990.
- Shapiro HM: Practical flow cytometry, 2nd ed, Alan R. Liss/Wiley-Liss, New York, 1988, pp. 211-265.
- Shapiro HM, Perlmutter NG, Stein PG: A flow cytometer designed for fluorescence calibration. Cytometry 33:280-287, 1998.
- Steen HR: Noise, sensitivity, and resolution of flow cytometers. Cytometry 13:822-830, 1992.
- Stewart CC, Stewart SJ: Four color compensation. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 38:161-175, 1999.
- Wood JCS, Hoffman RA: Evaluating fluorescence sensitivity on flow cytometers: An overview. Cytometry 33:256-259, 1998.
- Wood JCS: Fundamental flow cytometer properties governing sensitivity and resolution. Cytometry 33:260-267, 1998.
- Zilmer NA, Godavarti M, Rodriguez JJ, Yopp TA, Lambert GM, Galbraith DW: Flow cytometric analysis using digital signal processing. Cytometry 20:102-117, 1995.