

We're better together

Comment préparer et réaliser un multimarquage?

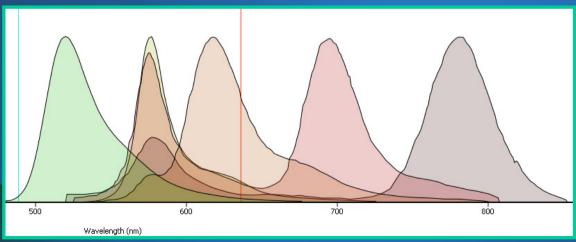
Jaen Olivier, PhD
ojaen@beckmancoulter.com
Cellular Analysis application specialist
Beckman Coulter France

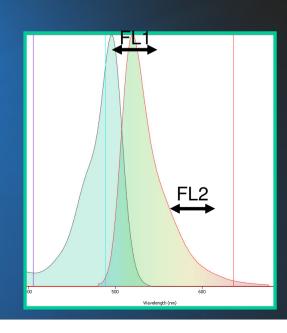


Introduction

- La cytométrie multi-couleurs (>4) prend de plus en plus d'importance dans les analyses en cancérologie (Hadrup SR, *Nat Methods*, 2009;6:520-8), en immunologie (Perfetto SP et col, *Nat Rev Immunol*, 2004;4:648-55), en hématologie (Craig FE et col, *Blood*, 2008;111:3941-67)...
- A partir du moment ou l'échantillon est rendu mono dispersé, lumineux
- Interrogations physiologiques (Heimbeck I et col, Cytometry, 2010;77A:823-30) et physiopathologiques (Kostense S et col, Blood, 2002;99:2505-11), autour du phénotype cellulaire (Expression CDx); mais aussi autour de leurs fonctionnalités (dégranulation, apoptose, activation caspases, potentiel mitochondrial, dérivés actifs de l'oxygène, sécrétion cytokines, prolifération)
- L'augmentation du nombre de couleurs est rendue aisée grâce au développement simultané de nouveaux cytomètres, de nouveaux fluorochromes et de nouveaux logiciels
- Cette multiplicité de couleurs requiert des compensations de fluorescence inter-fluorochromes

Cas de 5 fluorochromes



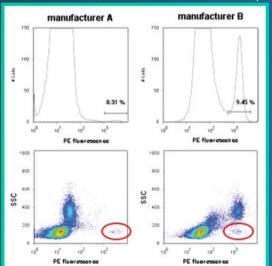


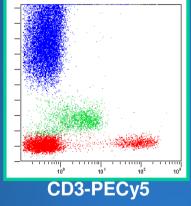


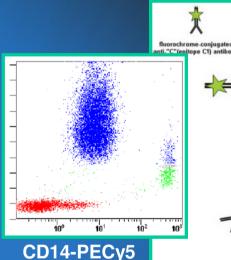
Introduction

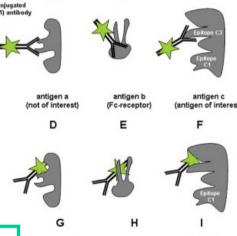
- Les compensations peuvent engendrer une diminution de la sensibilité d'un détecteur et réduire la capacité de mesure d'un signal faible (Maecker HT, Cytometry, 2004; 62A:169:173)
- De plus, en multi-couleur, il y a plus de risques de fixation non spécifiques des fluorochromes; ex : Cyanine et Alexa sur les cellules B, monocytes et cellules myeloïdes (Baumgarth N et col, *J Immunol Meth*, 2000;243:77-97; Hulspas R et col, *Cytometry*, 2009;76B:355-64; Internal Observations, Beckman Coulter Inc)

• Fixations non spécifiques sous différentes formes (Hulspas R et col, *Cytometry*, 2009;76B:355-64; Internal Observations, Beckman Coulter Inc)

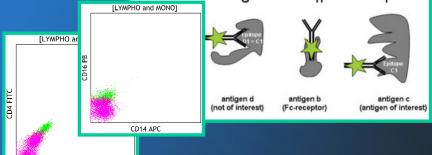








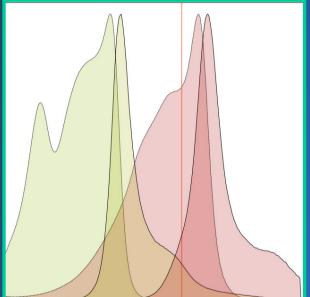
- Différence d'auto-fluorescence entre les différentes populations en fonction des excitations et longueur d'ondes mesurées, granules, culture (Monici M et col, *Biotechnol Annu Rev*, 2005;11:227-56)
- Possibilité réduire par DTT, bleu trypan, crystal violet, galactopyranoside (Hulspas R et col, *Cytometry*, 2009;76B:355-64)

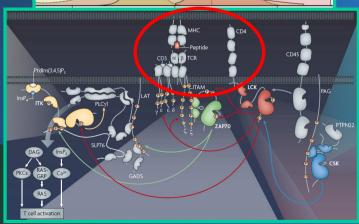


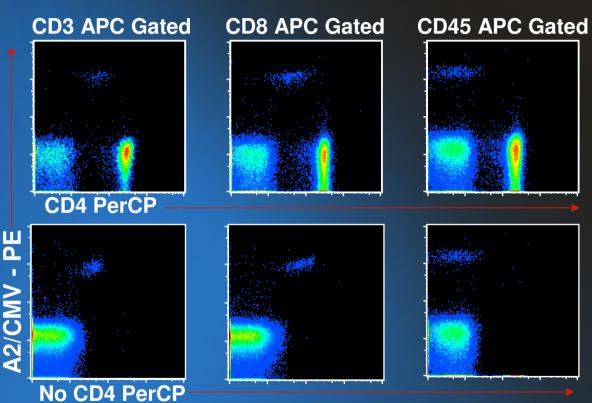


Introduction

• Risque de FRET à cause de la proximité des antigènes (Sakeenah Hicks, Chris Ibegbu, John Altman, February 19, 2002)







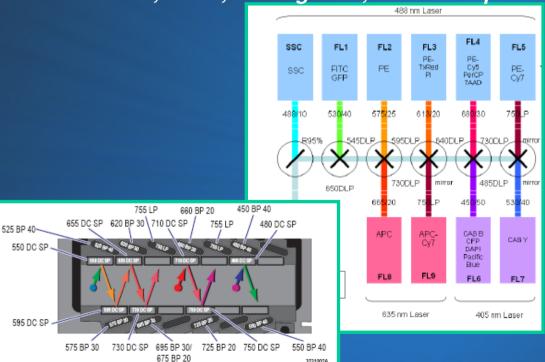
• Encombrement stérique, absence de marquage

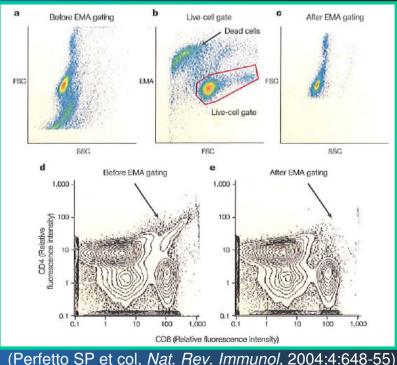
Image extraite poster, Joseph Lin et Arthur Weiss, Nat Rev Immunol



- Quelle est la question posée?
- Liste d'antigènes que l'on veut suivre, marqueur gating?
- Quel instrument : caractéristiques lasers, banc optique
- Liste des fluorochromes
- Quel échantillon, préparation?
- Fréquence populations recherchées? Nombre évènements

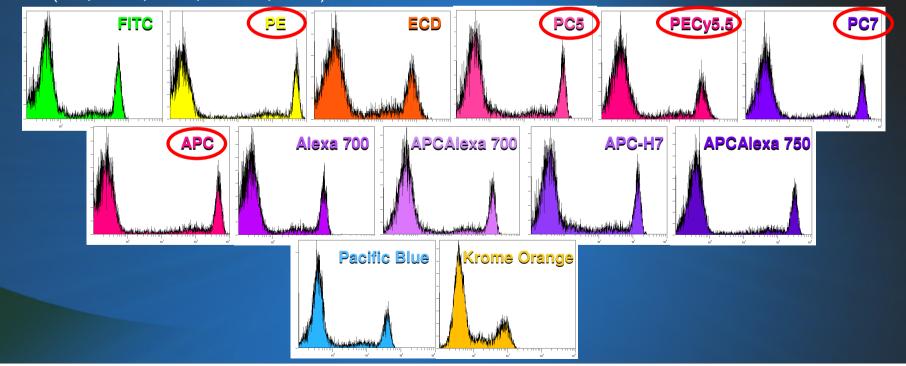
 Ajout marqueur viabilité (7-AAD, IP, EMA, autre) si f<1% totale, si activées, inhibées, Ficoll, décongelées, traitement pouvant induire la mort cellulaire







- Liste antigènes/fluorochromes
- Classement (Mahnke Y et Roederer M, Clin Lab Med, 2007,27:469-87)
 - ✓ Antigènes primaires : marqueurs connus, forts, constants, bimodaux (ex : CD3, CD19)
 - ✓ Antigènes secondaires : marqueurs connus, +/- forts, continuum (ex : CD45R0, CD38)
 - ✓ Antigènes tertiaires : marqueurs inconnus, faibles, peu représenté (ex : CD25, CCR, CXCR)
- Se procurer le maximum d'anticorps dirigés contre Antigène primaire, un peu moins pour antigènes secondaires et ceux disponibles pour les tertiaires
- Commencer par choisir les fluorochromes les plus brillants pour les antigènes tertiaires (PE, APC, PC5, PC5.5, PC7)





- Exemple : Identification Lymphocytes Treg dans les biopsies et les sang périphériques de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde
- Q : Y-a-t-il des différences de fréquence et de fonction de Treg, chez des patients traités par la molécule X, et des patients traités par Y?
- Machine Gallios 10 couleurs 3 lasers
- Cellules rares sang, et biopsie, décongelées, activées : marqueur de viabilité 7-AAD FL4
- Phénotype: CD3+CD4+CD25+CD127^{low} foxp3+CD279+/-CD45R0+/- CD45RA+/- IL10+/-TGFβ+/-
- Faire un tableau marqueurs vs fluorochromes disponibles
- Association antigènes tertiaires avec les anticorps couplés aux fluorochromes les plus brillants ex : IL10-PE ou APC/TGFβ-PE ou APC/CD279-PE ou AlexaFluor647 ou PC7
 - ✓ Bilan des places libres : FL3-7-8-9-10
- Association antigènes secondaires avec Acs
- Ex: CD25FITC/ECD/AA700/AA750/PB-CD127FITC/AA700-CD45RAFITC/PB/ECD/AA750-CD45R0FITC/ECD
 - ✓ Bilan des places libres : FL8-10
- Association antigènes primaires avec Acs CD3 AA750 ou KrO CD4 KrO ou AA750
 - ✓ Possibilité de DUMP Channel avec 7AAD exclusion des cellules CD3+/ CD4- TCD8 et NKT ajout CD8PC5 et CD56PC5



• Tube première intention :

CD25FITC/IL10-PE/CD45R0-ECD/7AAD+CD8-PC5+CD56-PC5/CD279-PC7/TGFβ-APC/CD127-AA700/CD3-AA750/CD45RA-PB/CD4-KrO

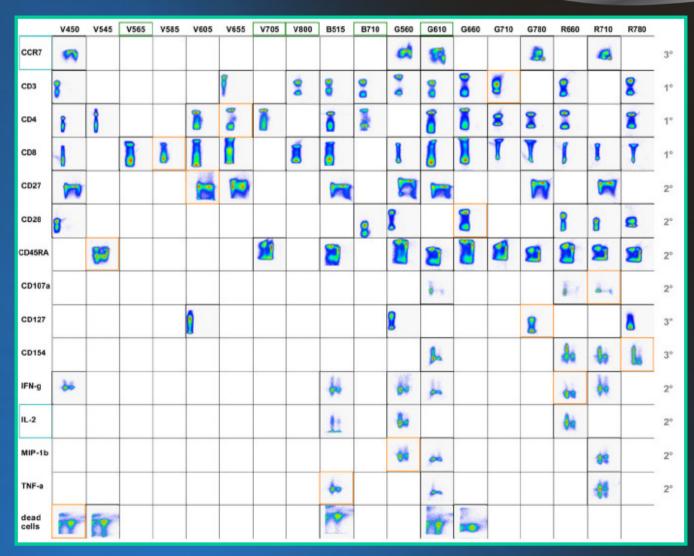
- Choix premières intentions doivent être réalisés selon le phénotype que l'on cherche
 - ✓ ce que l'on doit voir
 - ✓ ce qui est co-exprimé
 - ✓ les intensités de fluorescences relatives, éviter marqueur dim avec un marqueur fort qui fuit beaucoup dans le canal du marqueur dim
 - ✓ les fuites des fluorochromes
 - √ les caractéristiques des <u>machines</u>
- Procurer vous les marqueurs primaires et secondaires dans plusieurs couplages, ils pourront servir aux compensations, apporteront la souplesse aux futurs manips
- Validation technique
- Une fois les anticorps réunis, réaliser des mono-marqués sur un échantillon représentatif (ou positif) de ce que vous voulez analyser en multi-couleur, afin d'apprécier sa qualité :
 - ✓ Ecart Neg/Pos
 - ✓ Accrochage non spécifique
 - ✓ Fuite
 - ✓ Réaliser une titration (la dilution : <u>Ratio de MFI Pos/Neg</u>est le meilleur ou Stain Index)
 - ✓ Représenter les données dans un tableau Marqueur vs détecteur



Approche Empirique : la pratique

Choisir les couplages:

- -Tertiaire vers primaire
- -Meilleure séparation
- -Moins d'accrochage possible
- -Utilisation de marqueurs de gating pour antigène rare/peu de cellules+
- -Possibilité d'identifier plusieurs candidats qui vont générer différentes combinaison de tubes à tester
- -Possibilité d'optimisation...

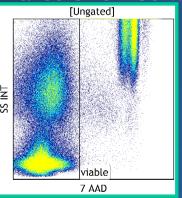


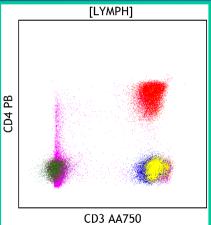
(Mahnke Y et Roederer M, Clin Lab Med, 2007,27:469-87)

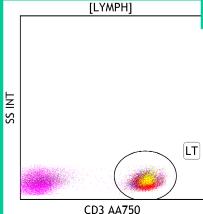


Approche Empirique : la pratique

- Test des combinaisons sélectionnées
- Incuber cellules avec anticorps/marqueur viab connus (les primaires)
- Ex: 7-AAD/CD3-AA750/CD4-KrO et 7-AAD/CD3-KrO/CD4-AA750 et même chose avec CD8-PC5 +/- CD56-PC5



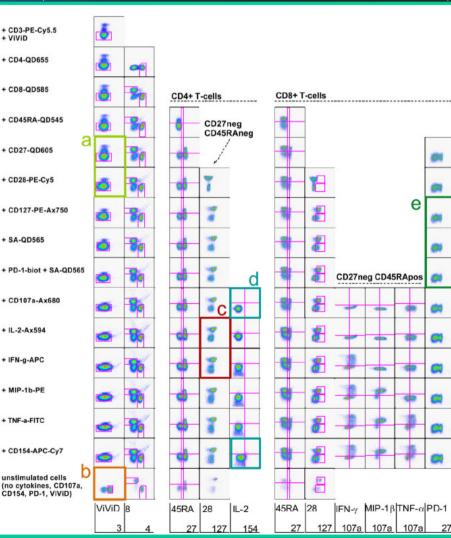




Ajout des anticorps dans ordre de gating

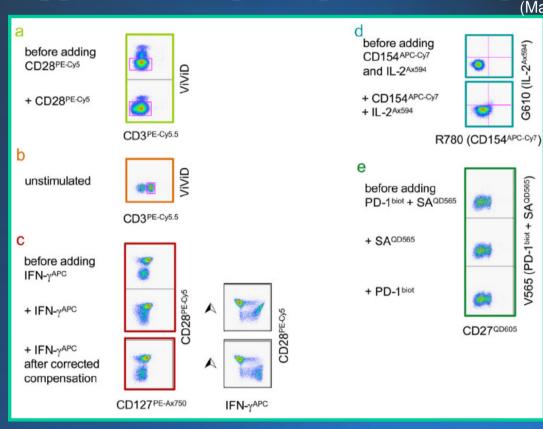
Possibilité de tester les alternatifs au fur et à mesure de la création

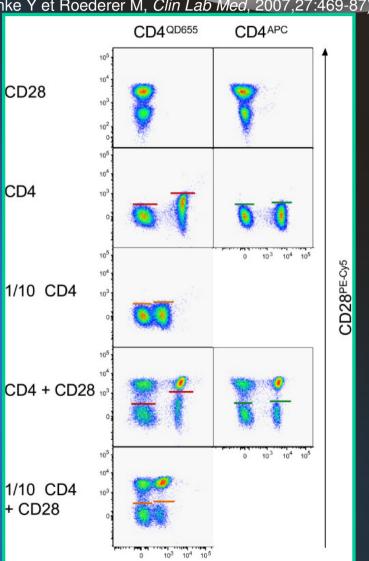
(Mahnke Y et Roederer M, Clin Lab Med, 2007,27:469-87)





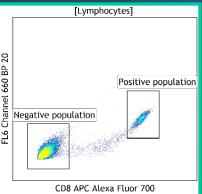
Approche Empirique : les problèmes (Mahnke Y et Roederer M, Clin Lab Med, 2007,27:469-87)



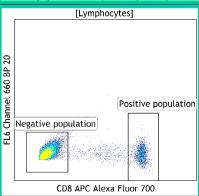




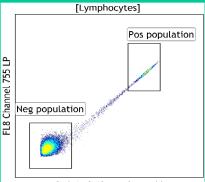
Approche Empirique : la sensibilité



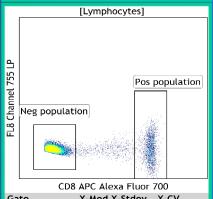
| CD8 APC Alexa Fluor 700 | | | | | |
|-------------------------|-------|----------|-------|--|--|
| Gate | X-Med | X-Stdev | X-CV | | |
| All | 0,25 | 13,77 28 | 35,20 | | |
| Negative population | 0,22 | 0,16 | 51,41 | | |
| Positive population | 45,64 | 9,51 | 20,72 | | |
| Gate | Y-Med | Y-Stdev | Y-CV | | |
| All | 0,20 | 0,61 14 | 49,27 | | |
| Negative population | 0,18 | 0,15 | 59,01 | | |
| Positive population | 2,12 | 0,46 | 21,45 | | |



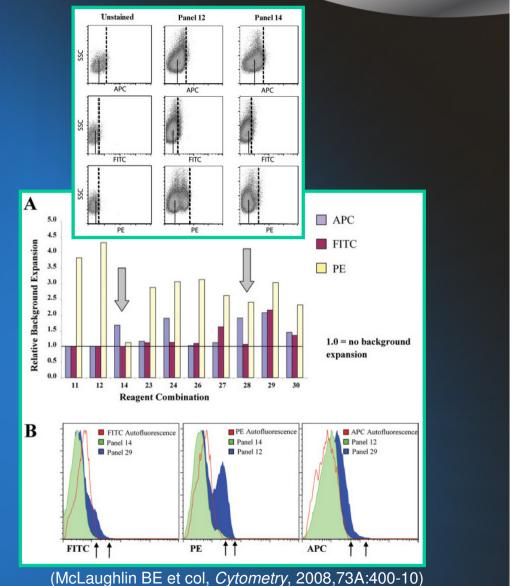
| CD8 AP | CD8 APC Alexa Fluor 700 | | | | | | |
|---------------------|-------------------------|---------|--------|--|--|--|--|
| Gate | X-Med | X-Stdev | X-CV | | | | |
| All | 0,25 | 13,77 | 285,20 | | | | |
| Negative population | 0,22 | 0,15 | 60,08 | | | | |
| Positive population | 45,65 | 9,47 | 20,62 | | | | |
| Gate | Y-Med | Y-Stdev | Y-CV | | | | |
| All | 0,17 | 0,20 | 96,65 | | | | |
| Negative population | 0,17 | 0,14 | 69,74 | | | | |
| Positive population | 0,17 | 0,24 | 133,48 | | | | |



| CD8 APC Alexa Fluor 700 | | | | | |
|-------------------------|---|--|--|--|--|
| X-Med | X-Stdev X-CV | | | | |
| 0,25 | 13,77 285,20 | | | | |
| 0,22 | 0,15 60,88 | | | | |
| 45,44 | 10,17 22,41 | | | | |
| Y-Med | Y-Stdev Y-CV | | | | |
| 0,29 | 8,03 271,97 | | | | |
| 0,27 | 0,14 47,14 | | | | |
| 26,64 | 5,99 22,54 | | | | |
| | X-Med 0,25 0,22 45,44 Y-Med 0,29 0,27 | X-Med X-Stdev X-CV 0,25 13,77 285,20 0,22 0,15 60,88 45,44 10,17 22,41 Y-Med Y-Stdev Y-CV 0,29 8,03 271,97 0,27 0,14 47,14 | | | |



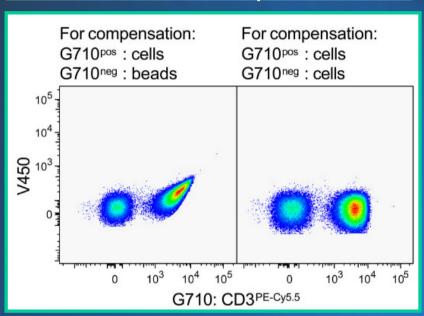
| CD8 APC Alexa Fluor 700 | | | | | | |
|-------------------------|-------|--------------|--|--|--|--|
| Gate | X-Med | X-Stdev X-CV | | | | |
| All | 0,25 | 13,77 285,20 | | | | |
| Neg population | 0,22 | 0,15 60,88 | | | | |
| Pos population | 45,59 | 9,67 21,12 | | | | |
| Gate | Y-Med | Y-Stdev Y-CV | | | | |
| All | 0,13 | 0,29 204,41 | | | | |
| Neg population | 0,13 | 0,13 94,48 | | | | |
| Pos population | 0,13 | 0,81 537,52 | | | | |



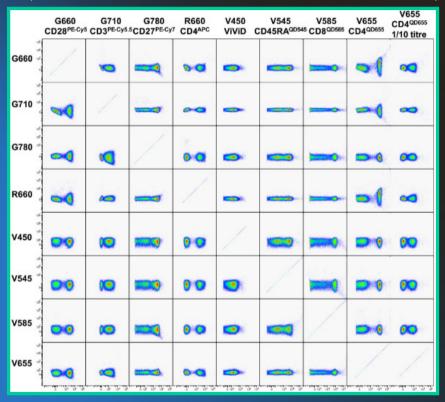


Le test : pensez aux contrôles

Contrôle des compensations



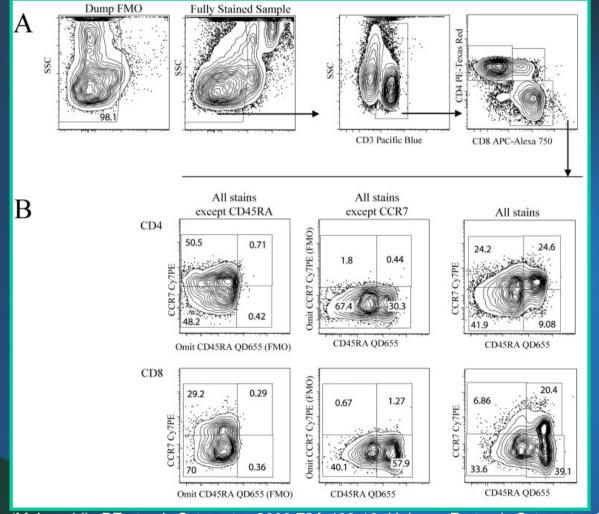
(Mahnke Y et Roederer M, Clin Lab Med, 2007,27:469-87)

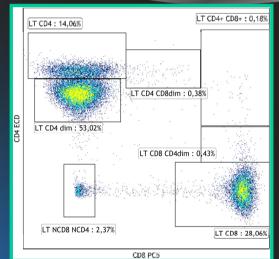


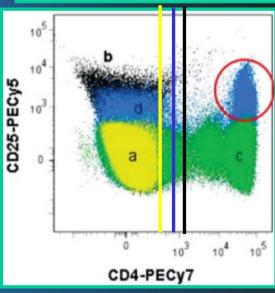


Le test : pensez aux contrôles

Placement des seuils de positivités : FMO





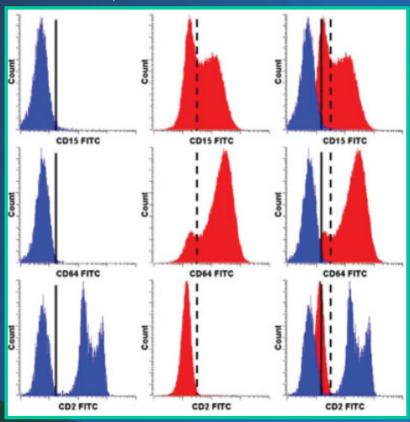


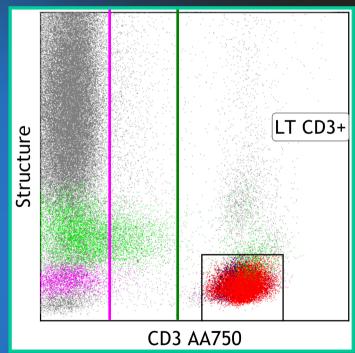
(McLaughlin BE et col, Cytometry, 2008,73A:400-10; Hulspas R et col, Cytometry, 2009;76B:355-64)



Le test : pensez aux témoins

 <u>Témoin négatif interne</u>: cellules qui n'expriment pas le marqueur, mais qui ont la même auto fluorescence et accrochage que celle d'intérêt (sauf si minimisé)



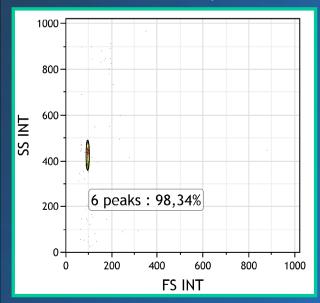


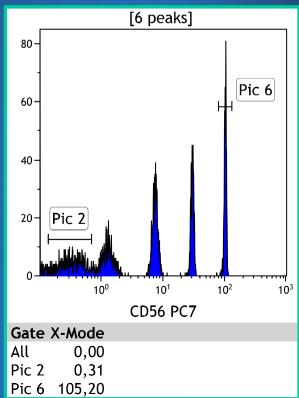
(Hulspas R et col, *Cytometry*, 2009;76B:355-64)

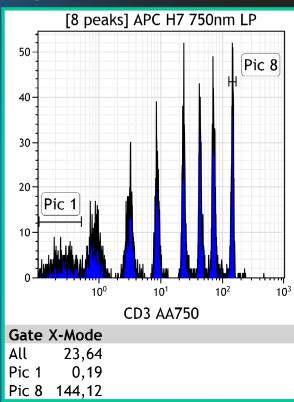


Repères pour le cytomètre

- Une fois les réglages réalisés, penser à prendre des repères de setting pour le cytomètre, ne pas appliquer de compensations
- Ex: passage des billes 6 peak (A79017), 8 peak (A71145) et FlowSet Pro (A63492) transferts de protocoles et standardiser dans le temps



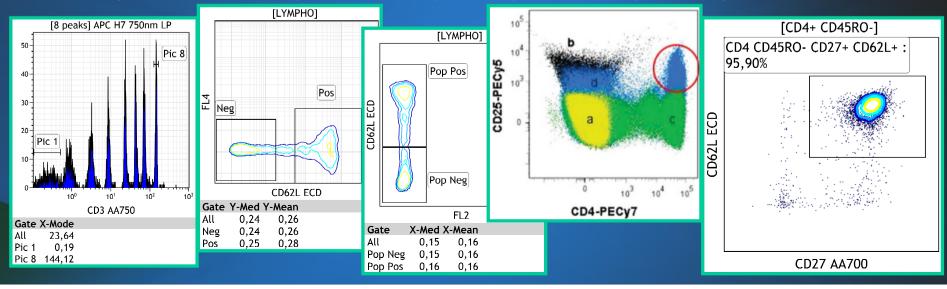






Les étapes de la manip

- Passage des billes de contrôle qualité (ex : FlowCheck Pro)
- Passage des billes de vérification des settings (ex : 6 peak)
- Passage des monomarqués pour vérification des compensations et ou réajustement en ré-analyse (attention au conditionnement, utilisation autre du même fournisseur)
- Passage des tubes FMO (positionnement seuils et gates)
- Passage des témoins positifs et négatifs de la manip
- Passage des échantillons à explorer
- Récupérer les data, puis ré-analyse depuis votre post déporté





Remarques

Three Lot Comparison of PC5

Emission Wavelength (nm)

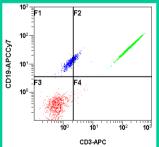
Finished Tandem Dye

Tandem variable d'un lot à un autre

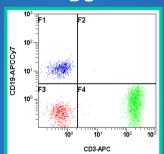


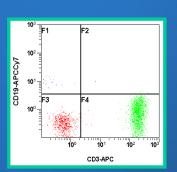


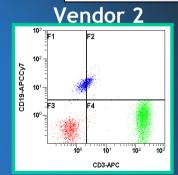
Couplage optimisé pour réduire les fuites



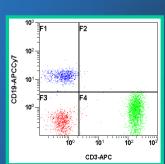
| Compensation Matrix | | | | | | |
|---------------------|-----|-----|-----|------|------|--|
| | FL1 | FL2 | FL3 | FL4 | FL5 | |
| FL1 | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| FL2 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| FL3 | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | |
| FL4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 10.2 | |
| FL5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.1 | | |







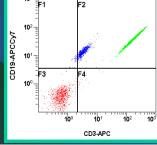
Fluorescence Intensity



Faire une compensation pour chacun des fournisseurs

-Lot # 3021-101 -Lot # 1828-47

| V | endor | · 2 |
|--------------------|-------|-----|
| 10 ³ F1 | F2 | |

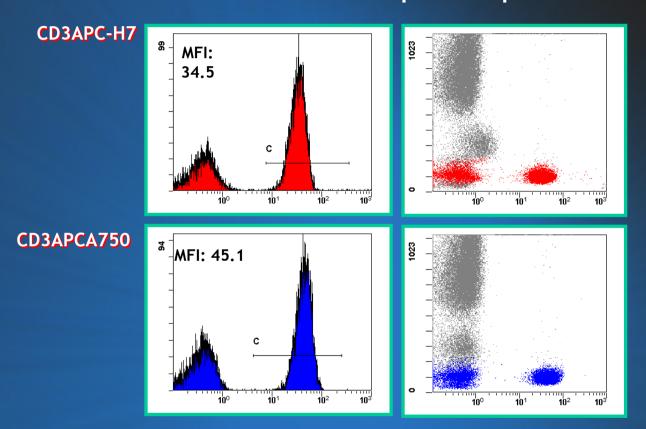


| Compensation Matrix | | | | | | |
|---------------------|-----|-----|-----|------|------|--|
| | FL1 | FL2 | FL3 | FL4 | FL5 | |
| FL1 | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| FL2 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| FL3 | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | |
| FL4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 20.5 | |
| FL5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.1 | | |
| | | | | | | |



Remarques

Problèmes de fixation non spécifique

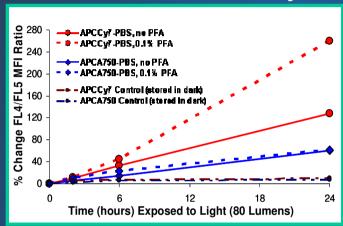


Possibilité de neutraliser par ajout de sérum, FcBlock

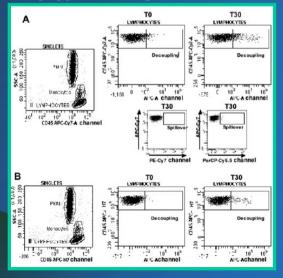


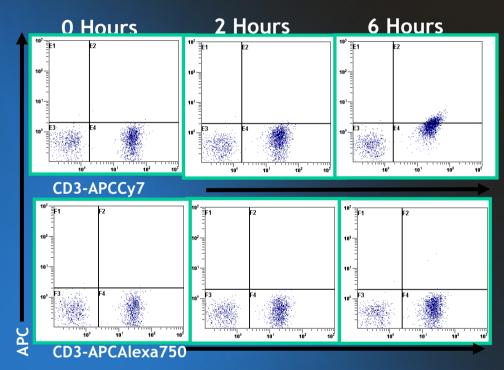
Remarques

Attention à l'APC-Cy7



Et à l'APC-H7





Dégradation de l'APC-Cy7 et H7 par réaction enzymatique d'origine cellulaire...

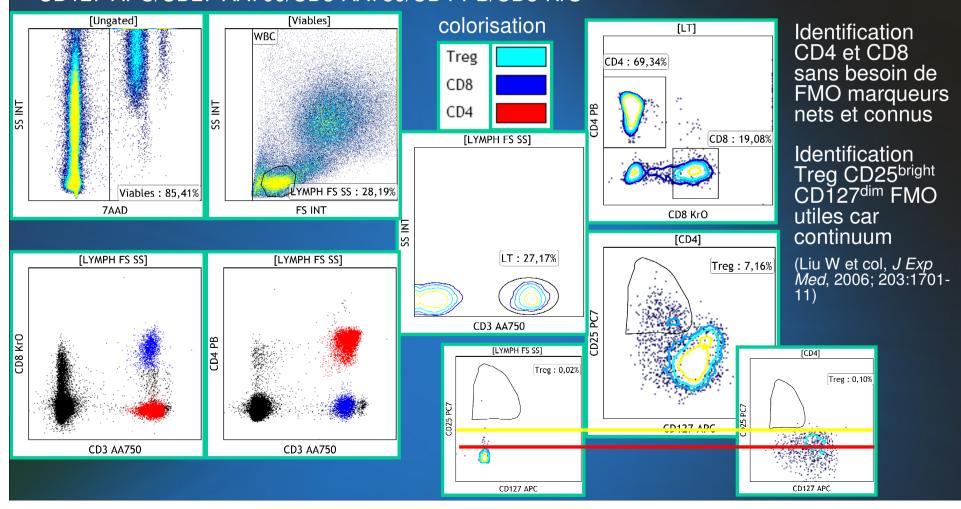
(Le Roy C et col, *Cytometry*, 2009;75A:882-90)



Un exemple 10 couleurs

• Réalisation d'un tube pour rechercher des Treg et l'état naïf mémoire des lymphocytes T : CD45R0-FITC/CD45RA-PE/CD62L-ECD/7AAD/CD25-PC7

CD127-APC/CD27-AA700/CD3-AA750/CD4-PB/CD8-KrO

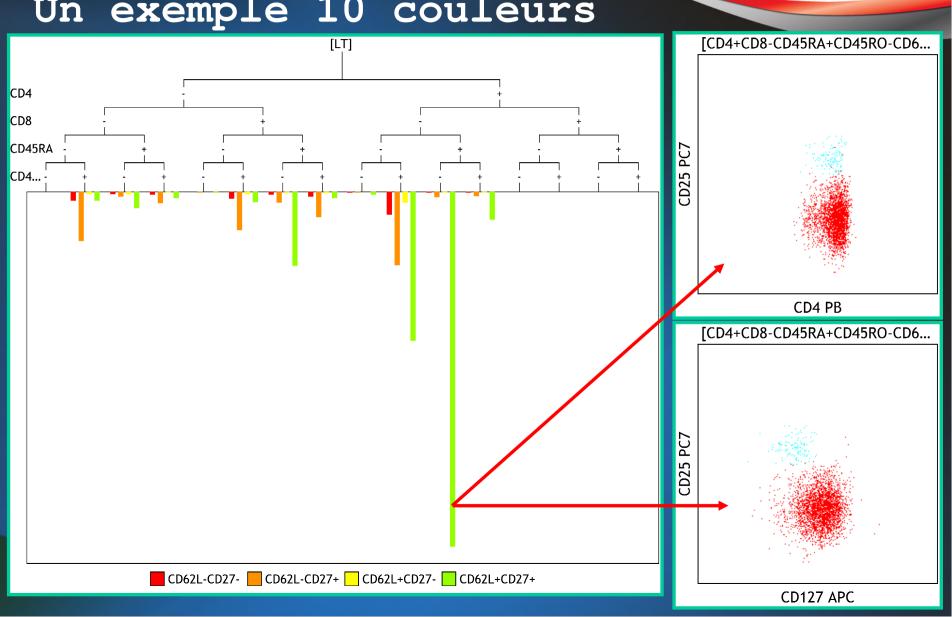




We're better together Un exemple 10 couleurs [CD8] [CD4] [Treg] Naïfs: 44,47% Naiifs: 20,76% [LT] Naïfs: 49,69% CD45 RA PE CD45 RA PE CD45 RA PE Mémoires: 45,58% Mémoires : 20,31% Mémoires : 29,16% CD4 PB CD45 RO FITC CD45 RO FITC CD45 RO FITC [Naïfs] [Naïfs] [Naïfs] CD27-CD62L CD27+ CD62L+ : Naïfs: CD45RA+/R0-CD27-CD62L CD27+ CD62L+ : CD27-CD62L CD27+ CD62L+ : +: N/A 97,70% +: 0.14% 86.46% +:0,04% 98.92% CD62L+ CD27+ (Chattopadhyay et col, Current Prot Immunol, 2005; 12.12.1-15) CD62L ECD CD27-CD27-CD27-CD62L-: N/ CD27+ CD62L-CD62L- : CD27+ CD62L-: CD62L-CD27+ CD62L-: 2,30% 0,97% 2,74% 10,67% 0,07% CD27 AA700 [Mémoires] [Mémoires] [Mémoires] CD27 AA700 CD27 AA700 CD27+ CD62L+ : CD27-CD62L CD27-CD62L CD27+ CD62L+ : CD27-CD62L CD27+ CD62L+ : +:2,62% 70,68% +:3,80% 50,49% +: 2.44% 14,63% CD27-CD27-CD27-CD27+ CD62L-: CD62L-: CD62L-: CD27+ CD62L-: CD62L- : CD27+ CD62L-: 2,09% 24.61% 11,30% 34,41% 11,11% 71,82% CD27 AA700 CD27 AA700 CD27 AA700



Un exemple 10 couleurs



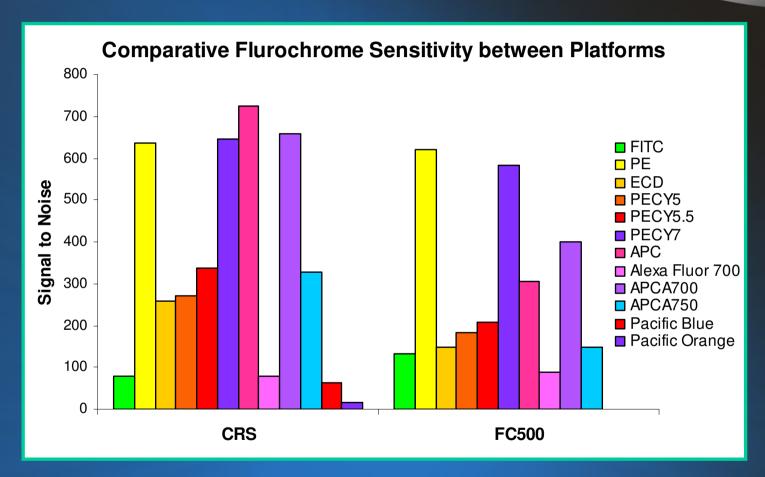


Conclusion

- Multi-couleur n'est pas compliqué si on est prudent et rigoureux
- Méthodologie onéreuse qui peut être simplifiée avec l'acquisition d'expérience
- Gain de temps et d'argent si utilisation d'anticorps de qualité
- Toujours vérifier l'instrument, et les compensations
- Si compensation énorme entre deux détecteurs, pensez à jouer avec les sensibilités
- Penser aux contrôles, éviter le tube contrôle isotypique pour placement des seuils, internes, FMO.
- Témoin négatifs et positifs dans l'expérience comme dans la mise au point
- Outils de ré-analyse dans logiciel comme le Tree Plot ou prism pour rechercher des populations (Perfetto S P et col, Nat Rev Immunol, 2004;4:648-55)



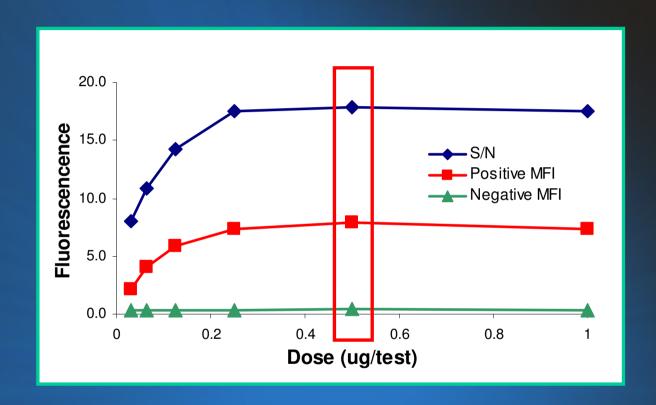
Sensibilité est machine dépendante



Comparaison séparation cellules CD8- et CD8+



Titration anticorps

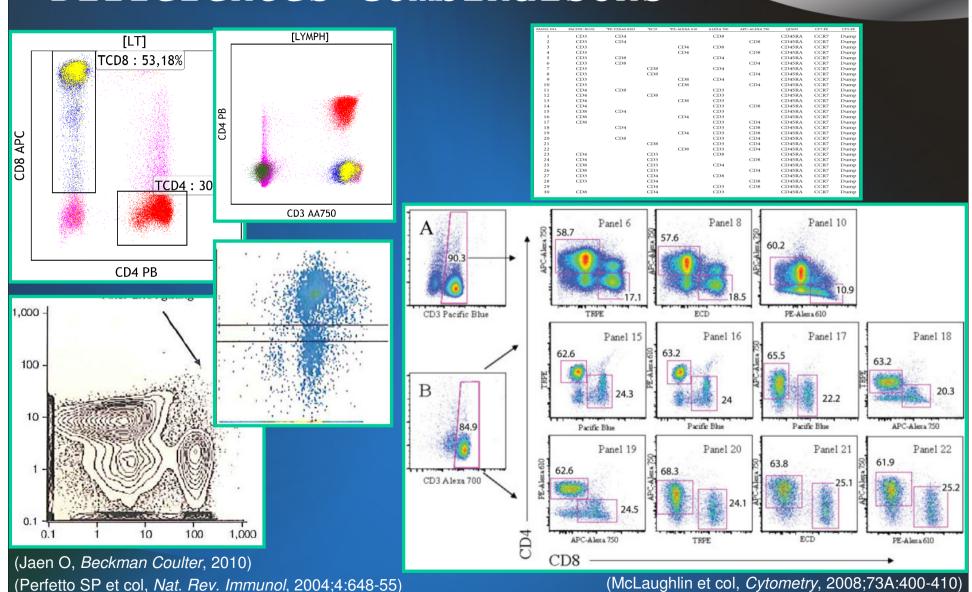


Choix de la dose/volume à saturation

Ne pas vouloir être trop restrictif si soupçon d'une augmentation importante de l'expression

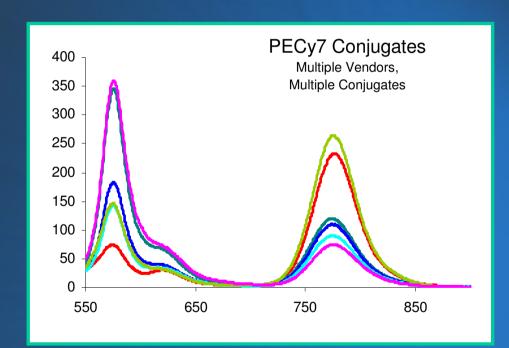


Différentes combinaisons





Variabilité des couplages



Finished Tandem Dye Three Lot Comparison of PC5

