Megamix-Plus SSC

Billes de réglage des cytomètres pour analyse des microparticules

Trousse de 50 Tests **Réf. 7803**

BioCytex

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 SSC est adapté pour l'utilisation de cytomètres optimisés en SSC (ex. BD FACS-Canto, -Verse, -Aria et LSR) et permet de définir de façon standardisée la zone d'analyse des MP et d'obtenir des comptes de MP comparables à ceux obtenus en FSC (0,3 - 1 µm-éq.).

* 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 SSC est un mélange de billes fluorescentes de diamètres variés couvrant la majorité de la zone de taille théorique des MP (0,1 à 1 µm) en utilisant le paramètre SSC comme paramètre de taille. 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 et des comptages de MP reproductibles. Etant donné que la position relative des MP biologiques et des billes en SSC est différente de celle obtenue en FSC, le Megamix-Plus SSC présente des billes de références de tailles différentes de celles fournies dans le Megamix-Plus FSC.

Enfin, le Megamix-Plus SSC 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 SSC pour être utilisés de façon standardisée pour le comptage des MP. Cela se traduit par une résolution insuffisante en SSC entre les billes de 0,16 et 0,20 µm (absence de vallée sur la Fig.2). Certains instruments donnent de meilleurs résultats en utilisant le FSC comme paramètre de taille et de seuil (BC Gallios/Navios). Pour ces instruments, la standardisation des comptages de MP se fera plutôt en utilisant le Megamix-Plus FSC (réf. 7802) qui est optimisé pour l'utilisation du FSC et qui permet d'obtenir des comptes similaires de MP bien qu'utilisant des billes de références différentes (réf.2).

Extension : certains cytomètres optimisés en SSC ont aussi une bonne résolution en FSC (ex. BD LSR Fortessa équipé d'un PMT sur le FSC; Stratedigm, …). Dans ce cas, les deux stratégies peuvent être appliquées en utilisant simultanément les Megamix-Plus FSC (réf. 7802) & Megamix-Plus SSC, donc fournissant un système composé de 7 billes de références, appelé Gigamix (voir réf.2 ou nous contacter pour un support technique).

3 REACTIF FOURNI

1 flacon de 25 mL de billes.

Le Megamix-Plus SSC est un mélange de billes de diamètres :
0,16 µm - 0,20 µm - 0,24 µm et 0,5 µm.

4 MATERIELS AUXILIAIRES NECESSAIRES NON FOURNIS

- Cytomètre optimisé en SSC (ex. BD FACS-Canto, -Verse, -Aria ou LSR). Pour d'autres modèles ou marques, veuillez nous contacter.
- Agitateur de type Vortex.
- Tubes de cytométrie (préférentiellement tubes en polypropylène, empoussièrement et adsorption limités si compatible avec le cytomètre).
- 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 (TA).

Il est recommandé de procéder à l'acquisition des billes Megamix-Plus SSC 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 SSC après avoir **vortexé le flacon pendant au moins 10 secondes.**

6.2 Création du protocole et réglages initiaux du cytomètre

Pour effectuer l'acquisition des billes Megamix-Plus SSC, 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.

L'analyse ci-après a été réalisée sur BD FACS CantoII équipé du software DIVA sur 5,5 décades (dont 4 montrées dans les Figs 1-5). Les réglages suggérés ci-dessous s'appliquent à ce type d'instrument et doivent être optimisés pour chaque appareil.

Procéder aux réglages suivants :

- Paramètres: sélectionner la hauteur du signal ("XXX-H") pour tous les paramètres.

Note : la hauteur du signal est obligatoire pour les paramètres de scatter et est recommandée (mais non obligatoire) pour les paramètres de fluorescence.

- Durée d'analyse : 1 à 2 minutes
- Vitesse d'analyse : la plus faible disponible (position "LOW", soit environ 10-15µL/min; dans certains cas la vitesse peut être augmentée si cela n'impacte pas la résolution en SSC).
- SSC : environ 600v
- FSC : environ 800v (ce réglage peut varier fortement en fonction de chaque instrument).
- FITC : environ 580v
- Echelle log pour tous les paramètres.

Option : FL3 (PI ou Per-CP) pour les billes de comptage et d'autres FLi pour le marquage des MP.

Pour le protocole d'acquisition du Megamix-Plus SSC, créer :

- un cytogramme FITC-H x SSC-H ("color dot-plot") et quatre régions rectangulaires P1 à P4 (Fig.1a)
- un histogramme SSC-H x count conditionné par la gate booléenne "P1 or P2 or P3 or P4" (Fig.2).
- un cytogramme FSC-H x SSC-H et une région rectangulaire "MP" (Figs 3-5).

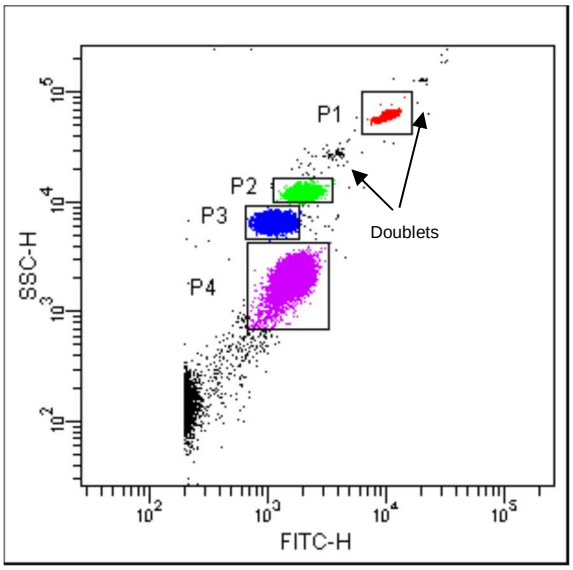
Des histogrammes et cytogrammes supplémentaires seront nécessaires pour l'analyse des MP (ex. Figs 5).

6.2.1 Réglage des voltages FITC et SSC (Figs 1)

- Procéder à l'acquisition du tube de billes Megamix-Plus SSC.
- Sélectionner un **seuil (threshold) sur FL1/FITC, seuil = 200 u.a.** pour ne prendre en compte que les éléments FL1+ et limiter ainsi le bruit de fond.

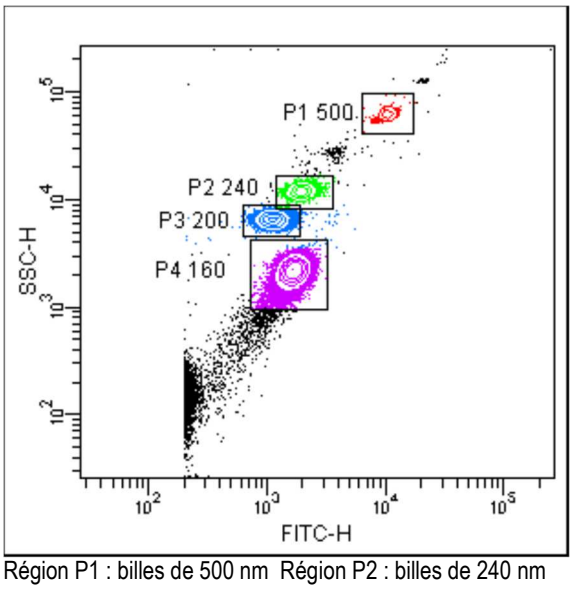
Sur le cytogramme FITC-H x SSC-H :
- Positionner les 4 régions " P1", "P2", "P3" et "P4" sur chacune des populations majoritaires de singlets de billes. Attention à ne prendre que le nuage dense des billes correspondant aux singlets et éviter les doublets. Par commodité, ajuster le "% shown events" pour optimiser la détection des singlets de billes. Autrement, l'utilisation d'un "contour graph" (ex. Fig.1b) peut aider à délimiter plus facilement chaque singlet de billes.
- Régler le voltage FL1/FITC de façon à positionner la bille de 0,5 µm en début de 5ème décade FL1 (~10 000 à 20 000 u.a).
- Régler le voltage SSC de façon à positionner la bille de 0,5 µm avant la fin de la 5ème décade (~ 50 000 à 80 000 u.a).

Fig.1a : Réglage des voltages FITC et SSC



Région P1: billes de 0,5 µm Région P2: billes de 0,24 µm
Région P3: billes de 0,2 µm Région P4: billes de 0,16 µm

Fig.1b : Réglage des voltages FITC et SSC (contour-plot)



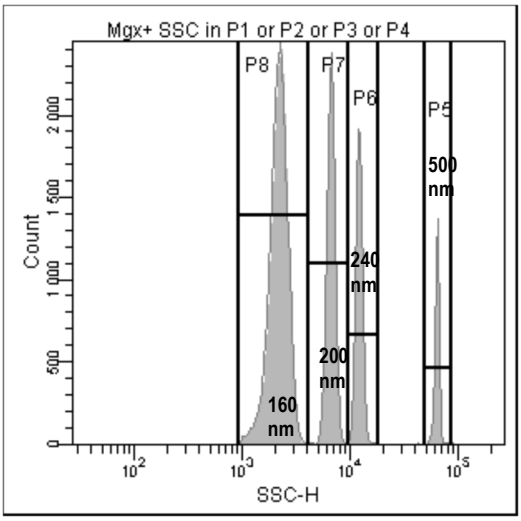
Région P1 : billes de 500 nm Région P2 : billes de 240 nm
Région P3 : billes de 200 nm Région P4 : billes de 160 nm

Option : Réglage des autres PMT de fluorescence
Seulement 3 paramètres (FSC, SSC et FL1-FITC) sont nécessaires pour analyser le Megamix-Plus SSC. 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.5 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).

6.2.2 Evaluation de la résolution en SSC et définition de la région MP (Fig.2)
- Sur l'histogramme SSC-H x Count conditionné sur les singlets de billes de 0,16 - 0,20 - 0,24 et 0,5 µm (région "P1 or P2 or P3 or P4"), vérifier que 4 pics individuels peuvent être discriminés. Un faible chevauchement de la bille de 0,2 µm sur la 0,24 µm est fréquent mais un chevauchement trop important des ces 2 pics et/ou un faible chevauchement de la 0,16 µm sur la 0,20 µm suggèrent une trop faible résolution en SSC empêchant une analyse standardisée des MP. Dans ce cas, contacter le S.A.V pour une optimisation du SSC et des fluorescences.

Option : la résolution sur le paramètre SSC peut être mesurée par un paramètre numérique (voir § 7).

Fig.2 : Distribution des billes en SSC



Population	#Events	%Parent	SSC-H Median	SSC-H SD
P5	4 023	7,1	64 145	2 868
P6	9 680	17,0	12 157	852
P7	14 062	24,8	6 604	570
P8	29 018	51,1	2 178	399

- Sur ce même histogramme SSC-H x Count, définir une région Pi pour chaque pic de billes et afficher les statistiques incluant #Events, %Parent, Median (option SD, voir §7).

Pour définir la région MP de façon standardisée, calculer la limite inférieure en échelle SSC selon la formule 1 et prendre comme limite supérieure la fin (ex. 99 percentile) du pic de la bille de 0,5 µm en SSC-H (environ $8x10^4$ u.a. dans l'exemple de la Fig.2). La fonction "Snap-to-interval gate" du software BD DIVA peut être aussi utilisée, générant automatiquement la fin du pic de la bille de 0,5 µm.

Formule 1: limite inférieure SSC-H = Md 0,16 + (0,3 x (Md 0,20 – Md 0,16))
Dans cet exemple :
limite inférieure SSC-H = 2 178 + (0,3 x (6 604 - 2 178)) ~ 3 500

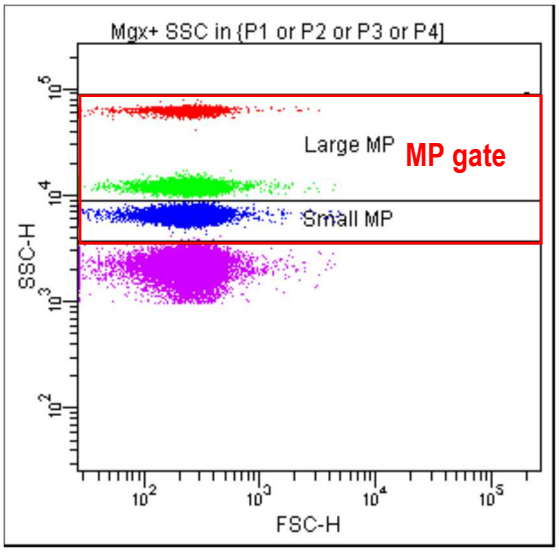
Cette région MP standardisée en SSC va mimer la région standardisée en FSC (0,3 à 1 µm-eq.) définie sur cytomètres BC Gallios/Navios et donc permettre des comparaisons de comptages de MP entre plateformes (réf. 1,2).

Option : En plus de la région MP totale, une différentiation supplémentaire entre les "small MP" et "large MP" (comme définie dans la réf.2 principalement pour les PMP) peut être effectuée en utilisant une limite intermédiaire comparable à la limite historique à 0,5 µm-eq FSC (réf.1). Cette limite (0,22 µm-éq. en SSC) se situe au centre de l'espace entre les pics de 0,20 et 0,24 µm (ex. $9x10^3$ u.a. dans les Figs 3 et 4).

A ce stade, il est recommandé d'enregistrer l'analyse en format électronique fcs 3.0 (ex. "Mgx+ SSC sFITCxxx.fcs"). Cela permettra de suivre le comportement de l'instrument dans le temps (voir § 7) et d'obtenir plus facilement un soutien technique en cas de besoin.

6.2.3 Positionnement des régions "MP" en double scatter (Fig.3)

Fig.3 : Positionnement des régions "MP"



Une fois les limites de(s) région(s) MP définie(s)/calculée(s) en SSC, le cytogramme FSC-H x SSC-H (Fig.3) peut être créé pour servir ultérieurement à l'analyse des MP.

La distribution en FSC-H des billes peut couvrir une partie assez variable de l'échelle puisque :
a) la variabilité de la résolution en FSC est une des caractéristiques de ce sous-groupe de cytomètres (instruments optimisés en SSC),
b) aucune condition n'est posée sur ce paramètre (non résolutif) pour l'analyse ultérieure des MP.

Optimiser les réglages FSC de façon à ce que les billes soient principalement situées dans les 3 ème et/ou 4ème décades en FSC (ex. de 10^2 à 10^3 u.a. comme indiqué dans les Figs 3 & 4, ou de 10^2 à 10^4 u.a., une distribution large qui peut être rencontrée sur certains instruments ayant une mauvaise résolution en FSC ou en utilisant une vitesse d'analyse élevée.

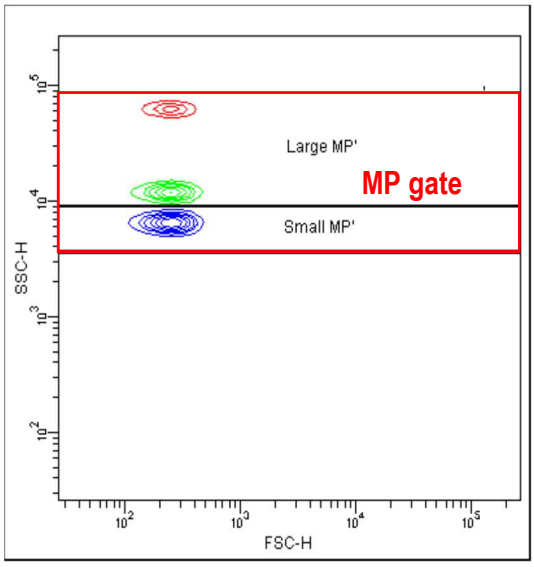
Au contraire, la distribution en FSC-H peut être plus réduite en cas d'utilisation de cytomètres optimisés aussi en FSC. Un décalage net en FSC entre la bille de 0,5 µm et les autres est alors visible.

6.2.4 Réglage du seuil en SSC
- Procéder à nouveau à l'acquisition du tube de billes Megamix-Plus SSC.
- **Passer le seuil sur le SSC**.

Note: la plupart des cytomètres optimisés en SSC permettent l'utilisation de plusieurs seuils combinés. Cette stratégie est difficile à standardiser et n'est pas recommandée ici. Sélectionner le seuil sur SSC uniquement.
Pour régler ce seuil en SSC-H, entrer la même valeur (u.a.) que celle calculée précédemment avec la formule 1.
L'analyse complète des MP sera restreinte aux événements (évts) avec des valeurs de SSC supérieures au seuil donc excluant les billes de 0,16 µm, comme illustré dans la Fig. 4.

A noter que l'exemple de la Fig. 4 ne montre pas beaucoup de bruit de fond en plus des billes sélectionnées (0,2 à 0,5 µm); ceci est dû au faible bruit de fond optique de cet appareil.
Ce n'est généralement pas le cas mais la limite inférieure en SSC proposée au § 6.2.2 permet de garder le bruit de fond à un niveau acceptable comme défini au § 6.3.

Fig.4 : Megamix-Plus SSC en seuil SSC (contour-plot)



6.3 Analyse du Megamix-Plus SSC en routine

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

- En seuil FL1/FITC seul, vérifier que les billes sont positionnées dans les régions pré-établies (P1 à P4, cf Figs 1). Dans le cas contraire, régler le voltage FL1 et/ou SSC afin d'y parvenir.

- Réactualiser les valeurs des limites de la région MP en utilisant la formule 1 (§ 6.2.2) ou vérifier simplement que les valeurs des Md n'ont pas changé.
Option : enregistrer le fichier électronique pour traçabilité.

- En positionnant le seuil SSC comme indiqué, vérifier le bruit de fond (BF) en utilisant de l'eau ultrapure (filtrée 0,1 µm) comme échantillon : si le nombre d'événements/sec. dépasse 50% de la capacité électronique de l'instrument (ex. > 2 500 évts/sec. pour un instrument capable d'analyser à vitesse maximale ~ 5 000 évts/sec.), l'instrument n'est pas dans des conditions appropriées pour une analyse "haute sensibilité" des MP.

Vous pouvez :

a) exclure toute origine fluidique : vérifier la propreté du liquide de gaine et des réservoirs, rincer le système fluidique avec précaution, vérifier l'absence de micro-bulles, (toujours utiliser du liquide de gaine à TA et non froid). Essayer à nouveau.
b) restreindre l'analyse des MP à une "sensibilité standard" en utilisant une valeur de seuil en SSC plus haute correspondant à la limite entre les "Large MP" et les "Small MP". Cette limite, décrite comme une option au § 6.2.2, est située en SSC entre les billes de 0,20 et 0,24 µm et correspond au seuil à 0,5 µm-eq. en FSC.
c) ou contacter votre S.A.V pour un nettoyage de l'optique (SSC et fluorescence).
Note : un fort bruit de fond sur le canal SSC peut venir de problème avec le gel optique de couplage et/ou d'un alignement optique non optimal.

Après ces 3 vérifications, le réglage du cytomètre est optimal et permet une acquisition standardisée des MP entre ~ 0,17 µm-éq. et 0,5 µm-éq. en SSC (zone équivalente à 0,3 - 1 µm-éq. en FSC).

6.4 Exemple de marquage de MP plaquettaires : PMP (Figs 5)

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 5 illustrent la présence de 2 sous-populations de MP appelées "large PMP" et "small PMP". La Fig.5a montre le dot-plot en double fluorescence conditionné sur la gate MP et colorisé selon les régions établies en SSC notées "Small MP" (cyan) et "Large MP" (rose) dans la fig.3.

A part un nombre important d'événements double négatifs (principalement du bruit de fond en Q3 Fig.5) et un petit nombre de MP AnnV+ / CD41- (en Q4), les "large PMP" (région P2 Fig.5a) présentent les niveaux de marquage en Annexine V et CD41 les plus forts et sont situés majoritairement dans la partie supérieure du dot plot en double scatter (points rouges fig.5b).

Les "Small PMP" (région P3 en fig.5a → points bleus en fig.5b) montrent les niveaux les plus faibles en scatter et en fluorescences.

La séparation entre ces 2 sous-populations de MP en SSC, illustrée par un trait horizontal dans les figs 3, 4 et 5b, est généralement proche de 0,22 µm-éq. (correspondant à 0,5 µm-éq. en FSC).

En Fig.5d, seules les PMP conditionnées par les régions P2 ou P3 (et colorisées en conséquence) sont montrées sur le contour-plot en double scatter illustrant la discrimination entre les "small" et "large" PMP.

Fig.5a : Color dot-plot de tous les évts conditionné par la région "MP"
Cyan : "Small MP" Rose : "Large MP"

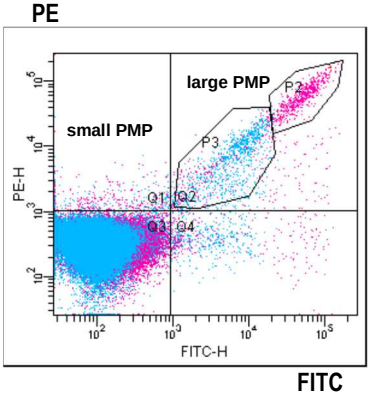


Fig.5b : Color dot-plot de tous les évts conditionnés par la région "MP"
Rouge : P2 Bleu : P3
Gris: BF & évts non PMP

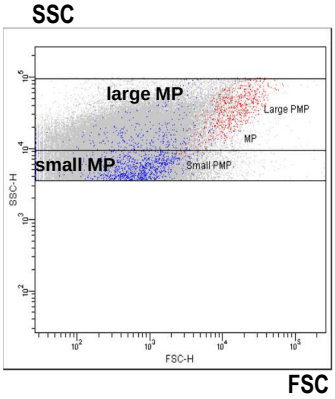


Fig.5c : Color dot-plot de tous les évts conditionnés par la région "MP"
Rouge : P2 Bleu : P3
Gris: BF & évts non PMP

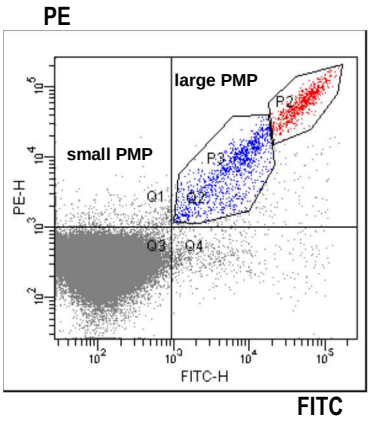
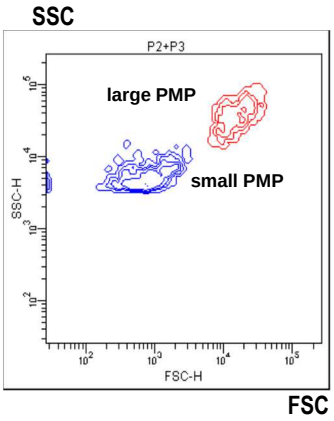


Fig.5d : Contour-plot colorisé des sous populations de PMP distribution en taille
Rouge : P2 Bleu : P3



Note : l'instrument utilisé ici pour l'analyse des PMP dispose d'une bonne résolution en FSC en plus d'une résolution appropriée en SSC. Donc la discrimination des sous populations de PMP en FSC peut ne pas être toujours aussi bonne que celle illustrée ici. En revanche, une discrimination identique en SSC doit être attendue.

7 Suivi de la résolution SSC

La résolution sur le paramètre SSC 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.

$S.I._{200\text{-}160} = [Md_{200} - Md_{160}] / [SD_{160} + SD_{200}]$ où :

Md_{200} = Médiane SSC des billes de 0,20 µm (billes de 0,16 µm, resp.)

SD_{200} = Déviation Standard SSC des billes de 0,20 µm (billes de 0,16 µm, resp.)

Dans l'exemple présent, $S.I._{200\text{-}160}$ = (6 604-2 178)/(570+399) ~ 4,6

$S.I._{200\text{-}160}$ est normalement situé dans des valeurs de 3 à 8 u.a. sur BD FACS et LSRs. Une valeur en dessous de 3 est le signe d'une résolution SSC inacceptable pour une analyse "haute sensibililté" des MP.

Cela devrait entraîner :

a) une analyse uniquement en "sensibilité standard" des MP ou

b) une demande de S.A.V dédié aux microparticules avec un nettoyage et un réalignement de l'optique, auprès du fabricant.

8 Causes d'erreur

Si vous utilisez des tubes en polystyrène (ex. tubes Falcon 4 mL FACS) et que la suspension de billes est restée plus d'une heure en attente dans ce tube, la quantité relative de chaque bille peut être différente de celle illustrée ici (risque de disparition différentielle des billes qui collent aux parois du tube). Vérifier que la quantité de chaque population de billes reste appropriée de façon à voir tous les pics des figs 1 & 2 puis suivre le reste du protocole. En cas de doute, prendre un nouvel aliquote de Megamix-Plus SSC.

REFERENCES

1) Robert S et al, Artherioscler 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.

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