

# Megamix

Billes de réglage des cytomètres pour analyse des microparticules

Trousse de 50 Tests

Réf. 7801



## 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 faible 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, située à 0,5 µm pour un compromis optimal entre prise en compte des MP et exclusion du bruit de fond.

Le réactif Megamix permet de définir de façon standardisée la zone d'analyse des MP entre 0,5 et 1 µm et d'assurer la stabilité des réglages.

### 2 PRINCIPE

Le Megamix est un mélange de billes fluorescentes de diamètres variés couvrant la zone de tailles des MP (0,5 et 0,9 µm) et des plaquettes (0,9 et 3 µm).

L'acquisition de ces billes selon le mode opératoire suivant permet le réglage du cytomètre pour la prise en compte d'une zone de taille constante et des comptages de MP reproductibles.

Le Megamix favorise aussi le transfert du protocole et des réglages sur d'autres cytomètres et garantit la stabilité de réponse dans le temps.

Limitation: certains cytomètres d'ancienne génération ne présentent pas la résolution suffisante en FS pour être utilisés de façon standardisée pour le comptage des MP. Ceci se traduit par une discrimination sur FS insuffisante entre les billes 0,5 et 0,9 µm (absence de vallée dans la Fig. 4).

### 3 REACTIF FOURNI

1 flacon de 25 mL de billes.

Le Megamix se compose d'un mélange de billes de diamètres sélectionnés : 0,5 µm, 0,9 µm et 3 µm.

### 4 MATERIELS AUXILIAIRES NECESSAIRES NON FOURNIS

- Cytomètre.
- Agitateur de type vortex.
- Tubes de cytométrie (identiques à ceux utilisés pour l'analyse des MP; empoussièrément limité).
- Pipettes ajustables 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

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

Note : le réactif doit être à température ambiante.

#### 6.1 Préparation des billes

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

#### 6.2 Réglages initiaux du cytomètre

Pour effectuer l'acquisition des billes Megamix, 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, créer :

- un cytogramme FL1 Log x SS Log (density plot) et trois régions rectangulaires A, B et C (Fig.1)
- un cytogramme FL1 Log x FL2 Log et une région rectangulaire D (Fig.2)
- un histogramme FL3 Log x count (Fig.3)
- un histogramme FS Log x count conditionné sur la gate "A or B" et un curseur E (Fig.4)
- un cytogramme SS Log x FS Log, une autogate F et une région rectangulaire "MP" (Fig.5).

Effectuer les réglages suivants :

- Gains élevés sur FS et SS
- Durée d'analyse : au moins 1 minute
- Vitesse d'analyse : la plus faible disponible.

L'analyse ci-après a été réalisée sur cytomètre Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Les suggestions de réglages ci-dessous s'appliquent à ce type d'instrument et doivent être optimisés pour chaque appareil :

- gain SS à 10
- gain FS à 10
- PMTv FS entre 150 et 200 volts

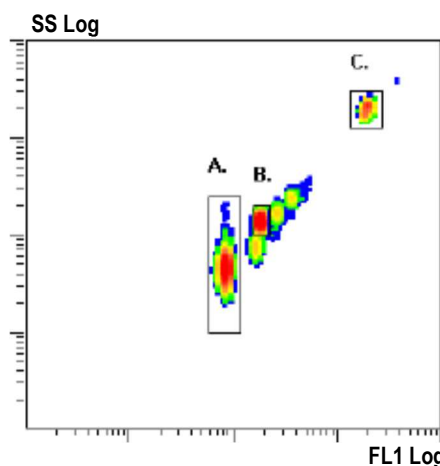
#### 6.2.1 Réglage des PMT FL1 et PMT SS (Fig.1)

- Procéder à l'acquisition du tube de billes Megamix.
- Sélectionner un **discriminant 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 3 régions "A", "B" et "C" sur chacune des populations majoritaires de singlets de billes. Attention à ne prendre que le nuage dense des billes de 0,9 µm correspondant aux singlets.
- Régler le PMT FL1 de façon à positionner la bille de 3 µm en début de 4<sup>ème</sup> décade (MFI ~ 200 u.a).
- Régler le PMT SS de façon à positionner la bille de 3 µm en début de 4<sup>ème</sup> décade (MFI ~ 200 u.a).

Fig.1 : Réglage du PMT FL1 et PMT SS



Région A : billes de 0,5 µm

Région B : billes de 0,9 µm

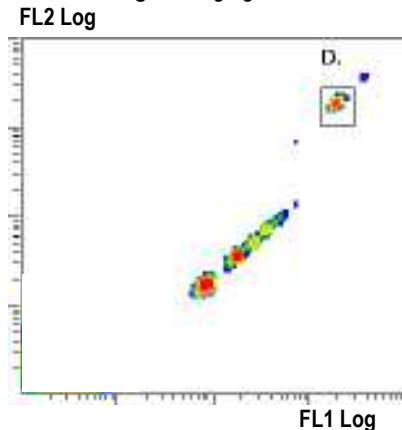
Région C : billes de 3 µm

### 6.2.2 Réglage du PMT FL2 (Fig.2)

Sur le cytogramme FL1 Log x FL2 Log :

- Positionner la région "D" autour de la population de singlets de billes de 3 µm.
- Régler le PMT FL2 de façon à positionner la bille de 3 µm en début de 4<sup>ème</sup> décade (MFI ~ 200 u.a).

Fig.2 : Réglage du PMT FL2

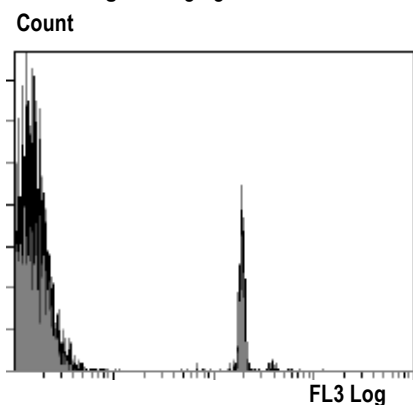


### 6.2.3 Réglage du PMT FL3 (Fig.3)

Sur l'histogramme FL3 Log x Count :

- Régler le PMT FL3 de façon à positionner le pic de la bille de 3 µm en fin de 2<sup>ème</sup> décade ou en début de 3<sup>ème</sup> décade.

Fig.3 : Réglage du PMT FL3



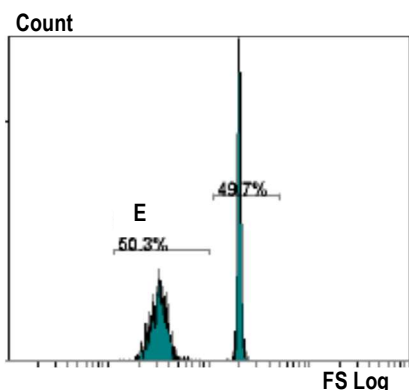
### 6.2.4 Réglage du PMT FS (Fig.4)

- Passer le discriminant sur le FS, seuil = 1.

- Sur l'histogramme FS LOG x Count conditionné sur les singlets de billes 0,5 µm et 0,9 µm (gate "A" ou "B"), optimiser le PMT FS de façon à obtenir 50 % de billes de 0,5 µm (région E). Pour diminuer le pourcentage de 0,5 µm, baisser le PMT FS, et inversement.

Une fourchette de 48 à 52 % est acceptable.

Fig.4 : Réglage du PMT FS

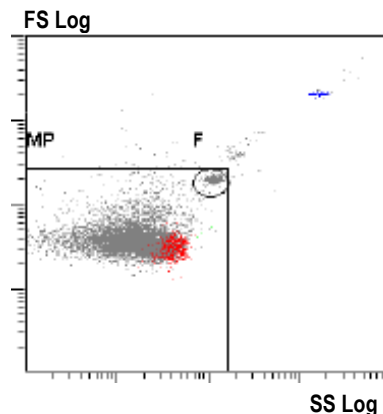


### 6.2.5 Définition de la zone d'analyse des MP (Fig.5)

La partie inférieure de la zone d'analyse des MP est définie par le seuil (ici FS = 1), qui ne permet d'acquérir que les particules d'au moins 0,5 µm (ce réglage a été effectué au paragraphe 6.2.4).

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 "F" autour des billes de 0,9 µm (sensibilité maximale) puis ajuster la "gate MP" qui va tangenter le haut et le côté droit de l'autogate "F".

Fig.5 : Gate MP



### 6.3 Analyse du Megamix en routine

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

- Vérifier que les billes sont positionnées dans les régions pré-établies (A, B et C). Dans le cas contraire, régler le PMT FL1 et/ou SS afin d'y parvenir.
- Vérifier sur l'histogramme FS LOG x Count, que le pourcentage de billes 0,5 µm obtenu est proche de 50 % (région E : 48-52 %). Dans le cas contraire, modifier le PMT FS.
- Vérifier que la "gate 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.

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

Suite à un marquage Annexine V-FITC/CD41-PE et aux réglages de compensation de fluorescence, voici un exemple d'analyse de PMP.

Fig.6a : TMP (MP totales) conditionné sur la gate "MP"

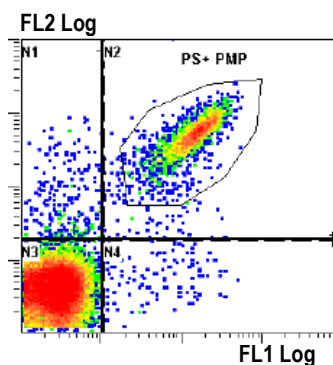
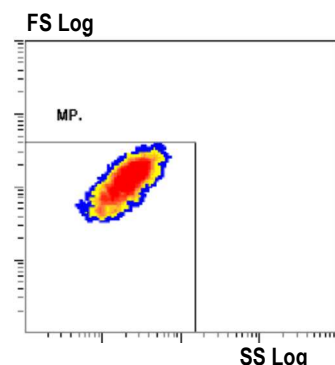


Fig.6b : PS+ PMP distribution en taille



### REFERENCES

- Robert S et al, J Thromb Haemost. 2009, 7: 190-197.
- Lacroix R et al, J Thromb Haemost. 2010, 8: 2571-4.
- Robert S et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32(4):1054-8.
- Poncelet P et al, Transf Apher Sci 2015, 53(2):110-26.

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