

TechOzyme - juillet 2017

Utilisez les bons contrôles dans vos expériences de cytométrie en flux pour éviter les artéfacts et mieux discriminer les populations

Une des inquiétudes récurrentes en cytométrie en flux est la capacité de discriminer de manière fiable les populations cellulaires positives et négatives. Cette capacité est fréquemment perturbée par de la fluorescence bruit de fond générée par des cellules marquées par l'anticorps de manière aspécifique ou par d'autres particules comme des débris.

Ce TechOzyme décrit l'ensemble des contrôles à intégrer dans les protocoles pour assurer des marquages fiables, une interprétation des données facilitée et reproductible et donc une meilleure discrimination entre les populations positives et négatives.

Sommaire

- [Contrôles biologiques](#)
- [Isotypes contrôles - Fc Blocking – FMO](#)
- [Cellules contrôle Veri-Cells™](#)
- [Questions fréquemment posées](#)
- [Le saviez-vous ?](#)

Contrôles biologiques

Qualité des échantillons (cellules)

La qualité de la suspension cellulaire utilisée dans l'expérience de cytométrie en flux influe sur la facilité des analyses. Si l'échantillon n'est pas suffisamment homogène et présente des cellules agglomérées, il est plus difficile de distinguer les cellules d'intérêt, compliquant l'analyse. De plus, des clusters de cellules peuvent obstruer la tubulure du cytomètre. Les 3 points ci-dessous permettent de préparer un échantillon optimal pour obtenir des données plus faciles à analyser.

- **Utiliser un échantillon le plus pur possible**

Si on part de sang périphérique pour une étude future des PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique), le choix du tube de prélèvement de sang total est la première étape cruciale. Les techniques classiques de séparation sont longues, fastidieuses et nécessitent de manipuler le sang. Nous conseillons d'utiliser les tubes CPT™ qui permettent de collecter et de séparer rapidement (en 20 minutes) les PBMC en une étape à partir du même tube de prélèvement. Le prélèvement est sécurisé (aucune manipulation directe du sang et [bouchon sécurisé BD Hemogard™](#)) et standardisé (tubes stériles en verre BD Vacutainer® contenant un

anticoagulant - [citrate de sodium ou héparine de sodium](#), un séparateur de plasma et un gradient de densité - solution de FICOLL™ Hypaque™). Il n'y a aucun [risque de contamination des PBMC par les neutrophiles et érythrocytes, car les PBMC forment un anneau au-dessus du séparateur de plasma et sont isolées physiquement des autres éléments du sang.](#)

[En savoir plus sur les tubes CPT™](#)

- **Compter correctement les cellules en amont**

Une fois que la suspension cellulaire est prête, il est nécessaire de compter les cellules pour s'assurer de disposer d'une quantité suffisante pour l'expérience. Il faut aussi compter les cellules avant et après le marquage pour vérifier s'il y a eu perte de cellules. Si l'on n'est pas suffisamment vigilant, on peut perdre jusqu'à 30% de cellules à chaque étape de centrifugation. Ces comptages de cellules sont donc essentiels pour les applications en aval. Le comptage peut se faire manuellement avec un hématimètre en plastique de type [C-Chip](#), avec un compteur automatisé de type [Cellometer®](#) ou encore par cytométrie (avec de l'iodure de propidium ou un marqueur de viabilité).

- **Eviter l'agglomération des cellules**

L'étape ultime dans la préparation d'un échantillon de qualité est de s'assurer que les cellules ne sont pas agrégées. Les causes d'agrégation des cellules sont diverses.

- Des cellules mortes peuvent libérer de l'ADN dans le milieu. Cet ADN se comporte comme du ruban adhésif en rassemblant les cellules. On recommande d'ajouter de la DNase à l'échantillon pour minimiser cet effet.
- Les cations calcium et magnésium peuvent aussi induire l'agglomération des cellules. Il faut donc un tampon de marquage avec du PBS Ca²⁺ et Mg²⁺-free et supplémenté avec de l'EDTA 1mM.
- Si les cellules sont centrifugées à une vitesse excessive, elles peuvent aussi s'agglomérer.

Contrôles d'auto-fluorescence (ou contrôle non marqué)

Les cellules, comme les additifs aux milieux de culture, présentent des taux variables de fluorescence intrinsèque. Cette auto-fluorescence est due à certains composants cellulaires comme le NADH, les riboflavines, les cofacteurs métaboliques ou encore certaines structures biologiques comme les mitochondries et les lysosomes. Ces molécules, étant plus facilement excitées par de faibles longueurs d'onde (lasers UV, violet et bleu), émettent une fluorescence sur une large plage de longueur d'onde (entre 300 et 600 nm), générant un chevauchement spectral avec d'autres fluorophores très utilisés comme le Pacific Blue, le PE, le BV421™ et le FITC. La sensibilité de résolution dans les canaux de détection respectifs de ces fluorophores est alors impactée.

Les lignées cellulaires myéloïdes sont particulièrement auto-fluorescentes. Les granulocytes présentent plus d'auto-fluorescence que les lymphocytes.

Les cellules stimulées ont tendance à être plus actives sur le plan métabolique et produisent davantage de protéines auto-fluorescentes, de vitamines et de cofacteurs.

Pour évaluer le niveau d'auto-fluorescence interférant dans le canal d'intérêt, on utilise un échantillon contrôle non marqué avec les mêmes réglages que pour les échantillons expérimentaux.

L'auto-fluorescence ne présente pas de large déplacement de Stokes (c'est à dire de différence en nanomètres entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission). Les fluorophores dits « tandems » peuvent alors s'avérer utiles dans la résolution de populations à partir d'échantillons cellulaires hautement auto-fluorescents. Si nécessaire, ces tandems peuvent donc être pris en considération pour optimiser la construction d'un panel.

Contrôles de stimulation

Les contrôles de stimulation sont utiles quand les échantillons testés sont stimulés ou soumis à un traitement. Le niveau de bruit de fond peut varier quand on stimule les échantillons, affectant potentiellement la résolution des populations. Par exemple, une stimulation au PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) peut entraîner une diminution de l'expression CD4 en surface des cellules T. Parallèlement, le traitement peut aussi augmenter le niveau d'auto-fluorescence. Des stratégies de « gating » alternatives doivent alors être utilisées (c'est à dire CD3+, CD8-, CD56) ou CD4 peut être détecté au niveau intracellulaire. Dans d'autres cas, la comparaison entre les échantillons stimulés et le niveau basal d'expression des contrôles non stimulés peut aider. Les contrôles non stimulés permettent de définir les « gates » et de mieux analyser le taux de régulation positive de la cible.

Contrôles de viabilité

Les contrôles de viabilité sont nécessaires pour exclure des analyses les cellules mortes et les débris, car ces derniers peuvent être marqués non spécifiquement par les anticorps et aussi exprimer l'antigène. Le signal généré est alors non spécifique car il ne correspond pas aux cellules vivantes. En d'autres termes, les cellules mortes peuvent au hasard capturer tous les anticorps dans le panel et être considérées comme cellules positives. Il existe plusieurs types de marqueurs de viabilité. Parmi eux, on peut citer l'iodure de propidium, le DAPI et le 7-AAD, des colorants imperméants. Ils se lient de manière réversible à l'ADN des cellules mortes uniquement, les cellules vivantes étant imperméables à ces marqueurs. La fixation à l'ADN étant réversible, ils ne peuvent pas être utilisés dans une population de cellules fixées et perméabilisées.

La solution dans ce cas est l'utilisation des **marqueurs de viabilité dits « fixable » ou Zombies**. Les **Zombies** sont des colorants fluorescents qui se fixent irréversiblement aux groupements amines des protéines et non à l'ADN. Les cellules vivantes excluent ces colorants et sont donc uniquement marquées à leur surface. Au contraire, les cellules mortes laissent pénétrer ces colorants dans leur cytoplasme générant un marquage de surface et cytoplasmique. Après traitement avec l'un des marqueurs Zombie, les cellules mortes, beaucoup plus brillantes se différencient facilement des cellules vivantes. La fixation des Zombies aux protéines étant irréversible, il est possible de différencier les cellules mortes des cellules vivantes même dans une population de cellules fixées. Les Zombies sont donc particulièrement utilisés dans les études impliquant les cytokines et les facteurs de transcription, nécessitant au préalable la fixation et la perméabilisation des cellules.

[Lire le TechOzyme sur les différents outils permettant de contrôler la viabilité des cellules en cytométrie en flux](#)

Isotypes contrôles - Fc Blocking - FMO

Isotypes contrôles : évaluer le niveau de marquage non-spécifique de l'anticorps. Le terme « isotype » fait référence à la variation génétique dans les chaînes lourde et légère composant un anticorps. Chez les mammifères, il existe 9 isotypes de chaînes lourdes et 2 isotypes de chaînes légères. Chaque anticorps a donc un isotype spécifique. Les isotypes peuvent avoir différentes affinités de liaison non spécifiques aux cellules et se lier aussi non spécifiquement à des cibles intracellulaires. L'évaluation de la liaison aspécifique des anticorps (plus précisément isotype de l'anticorps) est réalisée à l'aide d'isotypes contrôles (ou contrôles négatifs) et facilite la discrimination entre les cellules positives et les cellules négatives.

En pratique, on marque les cellules avec un anticorps dit « irrelevante » (c'est à dire non pertinent de la cible d'intérêt contre laquelle l'anticorps d'intérêt est dirigé). Cet anticorps a le même isotype et est couplé au même fluorochrome que l'anticorps d'intérêt. Il permet d'identifier la liaison non spécifique causée par l'isotype de l'anticorps d'intérêt. Les cellules marquées par l'isotype doivent être exclues puisqu'elles représentent la liaison non spécifique des cellules.

Dans toute expérience de cytométrie en flux, l'isotype contrôle ajouté sera donc idéalement de même isotype (même chaîne lourde IgA, IgD, IgE, IgG, ou IgM et même chaîne légère, kappa ou lambda) et conjugué au même fluorochrome que l'anticorps spécifique. Il doit également être utilisé à la même concentration que l'anticorps spécifique.

Les isotypes contrôle restent les contrôles négatifs les plus répandus pour évaluer le niveau de marquage non-spécifique dans les expériences de cytométrie en flux.

Fc Blocking : blocage des récepteurs Fc pour éviter les faux positifs. Les récepteurs Fc sont exprimés sur la plupart des cellules immunitaires comme les granulocytes, cellules B, monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Du fait de leur tendance à se lier à la fraction Fc des anticorps, ils peuvent générer des faux positifs dans les analyses. Pour éviter ce phénomène, il est recommandé d'utiliser une solution de blocage des récepteurs Fc comme le [Human TruStain FcX™ # BLE422301](#) ou le [TruStain FcX™ \(anti-mouse CD16/32\) # BLE101319](#). Pratiquement, on incube une dizaine de minutes les cellules avec ces solutions avant le marquage.

- **Le Mouse TruStain FcX™** est un anticorps (clone 93) spécifiquement dirigé contre CD16 (FcγRIII) et CD32 (FcγRII) via sa portion Fab. Pour bloquer les récepteurs Fc, on recommande de pré-incuber pendant 5-10 minutes sur glace les cellules avec le Mouse TruStain FcX™.

- **Le Human TruStain FcX™** correspond à des immunoglobulines IgG humaines qui se lient aux récepteurs Fc via la portion Fc de l'immunoglobuline. Malgré l'occupation de ces récepteurs, les marquages en cytométrie en flux avec des anticorps anti-récepteur Fc, comme l'anti-human CD16 (clone 3G8), CD32 (clone FUN-2) et CD64 (clone 10.1) restent possibles.

FMO : identifier l'impact du chevauchement spectral

Le contrôle FMO (Fluorescence Minus One) est particulièrement important si l'antigène d'intérêt est faiblement exprimé (événements rares) ou dans le contexte d'un panel multi-couleurs où les nuages de points sont étalés. Il permet d'identifier et de voir les effets du recouvrement spectral des différents fluorochromes dans le panel. Le chevauchement spectral peut réduire la sensibilité des mesures dans le canal d'intérêt. Le FMO est donc critique pour

placer correctement les « gates » et ainsi faciliter et discriminer correctement la population positive.

Dans une expérience comportant des marqueurs intracellulaires ou des marqueurs de signalisation, il peut y avoir une expression basale de cytokines et/ou de phosphoprotéines. Il faut alors inclure un contrôle FMO pour déterminer le niveau basal de cette activité.

Le contrôle FMO est réalisé en marquant les cellules d'intérêt avec tous les fluorochromes du panel (tous les anticorps), sauf celui qui est mesuré (sauf un anticorps, d'où le nom Fluorescence Minus One). Ainsi, toute fuite liée à ce fluorochrome dans le canal d'intérêt est correctement identifiée.

Cellules contrôle Veri-Cells™

Les Veri-Cells™ sont des cellules lyophilisées préparées à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique humain. Elles permettent de valider la cohérence entre les lots d'anticorps et aussi de valider la configuration du cytomètre. Elles peuvent aussi servir de contrôle positif. Elles peuvent donc être utilisées au quotidien comme contrôles fiables en cytométrie en flux pour garantir la reproductibilité des résultats dans des études longitudinales.

Il existe plusieurs versions de Veri-Cells™. Les [Veri-Cells™ CD4-Low PBMC](#) sont spécifiquement formulées pour contenir moins de cellules CD4+ pour être plus représentatives des cellules observées chez des patients CD4 immunodéficients. Contrairement aux [Veri-Cells™ PBMC](#) et aux Veri-Cells™ CD4-Low PBMC, les [Veri-Cells™ leucocytes](#) contiennent les populations de neutrophiles et d'éosinophiles. Ces cellules peuvent donc être utilisées comme contrôle ou comme matériel de référence pour suivre l'expression des marqueurs des granulocytes comme le CD15 et le CD16.

Les Veri-Cells™ présentent une très grande stabilité à long terme (pré et post-reconstitution) et un profil identique à celui de cellules fraîchement isolées. Elles ont été validées avec le kit [LEGENDScreen™ Human Cell Screening \(PE\)](#) et elles sont positives pour la détection de plus de 150 marqueurs de surface. Des facteurs de transcription comme FOXP3 et Helios ont aussi été testés sur les cellules Veri-Cells™ PBMC avec le True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set. L'expression de plus de 100 marqueurs de surface a également été validée sur les Veri-Cells™ leucocytes. Le marquage des marqueurs de surface est identique entre des leucocytes frais et les Veri-Cells™ leucocytes.

[En savoir plus sur le kit LEGENDScreen™ Human Cell Screening \(PE\)](#)

Questions fréquemment posées

- 1. Puis-je utiliser un anticorps spécifique et son isotype contrôle venant de fournisseurs différents ?**

Il est recommandé de se procurer l'anticorps spécifique et l'isotype contrôle correspondant chez un même fournisseur car le ratio F/P (Fluorophore/Protéine) peut différer selon les fournisseurs. De plus, pour les fluorochromes les plus gros comme le PE ou l'APC, le ratio F/P est généralement de 1/1 (en raison de la taille de ces fluorochromes). Par contre, le ratio F/P pour le FITC ou les marqueurs de type Alexa, de plus petite taille, est très variable d'un fournisseur à l'autre.

Est-il toujours nécessaire d'inclure un isotype contrôle ?

Pour certaines expériences, il est inutile d'inclure un isotype contrôle comme par exemple, la discrimination des cellules CD4 ou CD8 positives dans un échantillon de sang de souris lysé.

Peut-on utiliser les isotypes contrôles pour définir les « gates » ?

Quand les fluorochromes utilisés dans un panel présentent un chevauchement spectral, il est préférable d'utiliser le contrôle FMO plutôt qu'un isotype contrôle. Dans le contrôle FMO, tous les anticorps sont inclus sauf celui suspecté de générer un recouvrement spectral.

Le saviez-vous ?

1. Comment minimiser la liaison aspécifique ?

Pour réduire la liaison non spécifique, il faut titrer les anticorps, c'est à dire identifier leur concentration optimale d'utilisation. A cette concentration optimale, le ratio signal/bruit de fond est le meilleur. Si trop d'anticorps sont utilisés, la liaison non spécifique et donc le bruit de fond augmente. Si l'on n'utilise pas assez d'anticorps, le signal est réduit et cela réduit aussi la capacité à détecter les cellules d'intérêt. La sensibilité est dans ce cas moindre.

Pourquoi est-il recommandé de compter les cellules au début de l'expérience de marquage et aussi à la fin ?

Tout le long de l'expérience de marquage, les cellules sont séparées et lavées. Durant ces étapes, des cellules sont perdues. Donc, avant de passer ses cellules au cytomètre, il est impératif de connaître le nombre de cellules. Cela permet notamment de vérifier qu'il y a assez de cellules. Par exemple, si la population d'intérêt représente 0.01 % de la population totale et qu'il y a seulement 100.000 cellules dans le tube, seulement 10 cellules au maximum seront mesurées.

Comment procéder pour obtenir des cellules non agglomérées avant de les passer au cytomètre ?

En cytométrie, on recommande des suspensions de cellules isolées. Pour s'assurer que les cellules ne s'agglomèrent pas, il faut les filtrer avant leur passage sur le cytomètre. En cas de doute, il est possible d'observer l'échantillon au microscope.