

## PHÉNOTYPAGE LMMC

**Stratégie de fenêtrage par exclusion pour l'identification  
et la quantification relative des sous-populations monocytaires circulantes**

*Instructions pour utilisateurs BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*



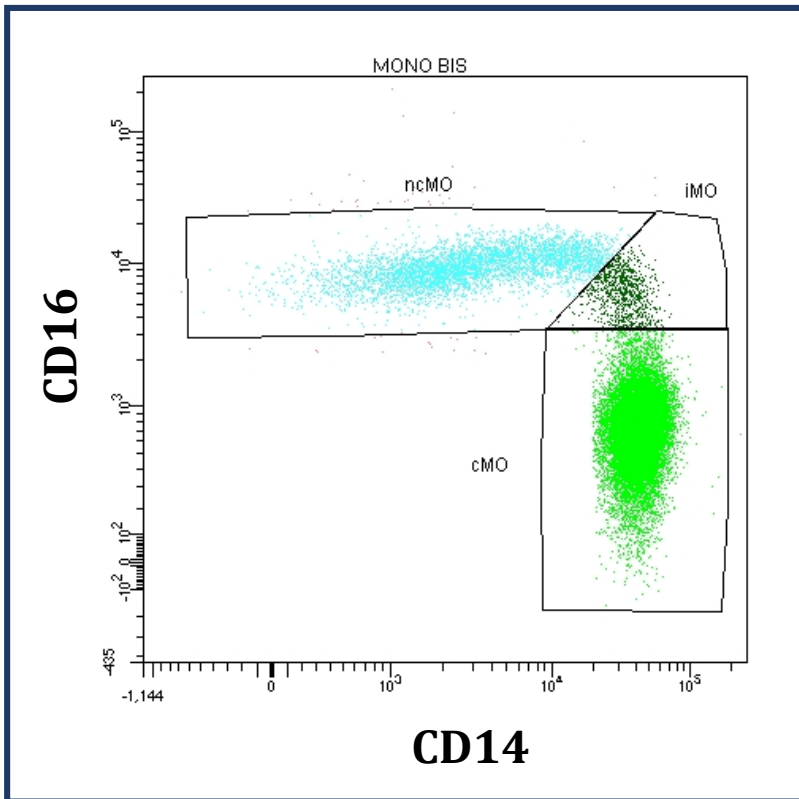
**Pr ORIANNE WAGNER-BALLON**

Département d'Hématologie et Immunologie biologiques — Hôpital Henri Mondor — Créteil

**Dr DOROTHÉE SELIMOGLU-BUET**

INSERM UMR1170, Université Paris-Sud — Gustave Roussy — Villejuif

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

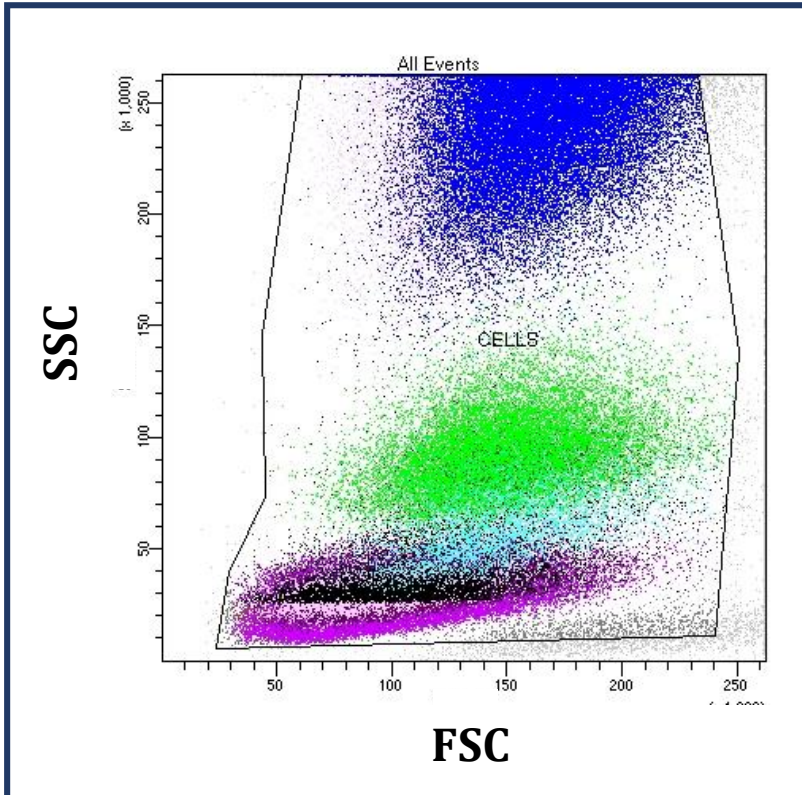


## Stratégie de fenêtrage par exclusion

L'objet de cette stratégie de fenêtrage est **d'isoler les monocytes** au sein du sang périphérique pour **quantifier les 3 sous-populations monocytaires** [**monocytes classiques (MO1 ou cMO)**, **monocytes intermédiaires (MO2 ou iMO)** et **monocytes non classiques (MO3 ou ncMO)**] en **excluant les autres populations circulantes** qui pourraient se superposer aux MO3, notamment les cellules NK.

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

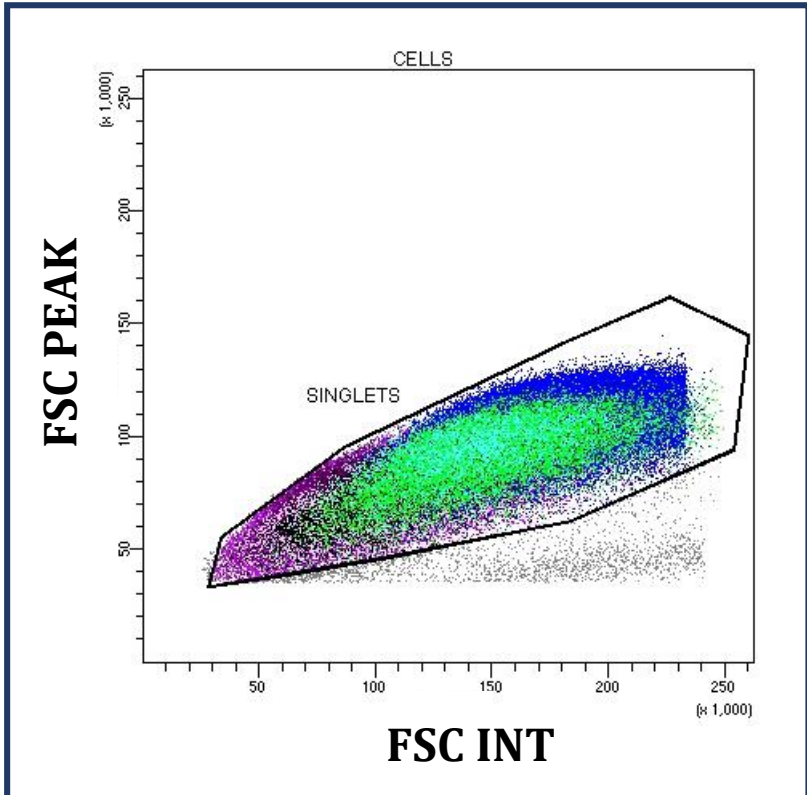


1) **Sélectionner les cellules vivantes** en excluant les débris cellulaires sur les paramètres morphologiques.

***Faire attention à ajuster le réglage du paramètre SSC de façon à discriminer au mieux les lymphocytes (et plus particulièrement les cellules NK) et les monocytes***

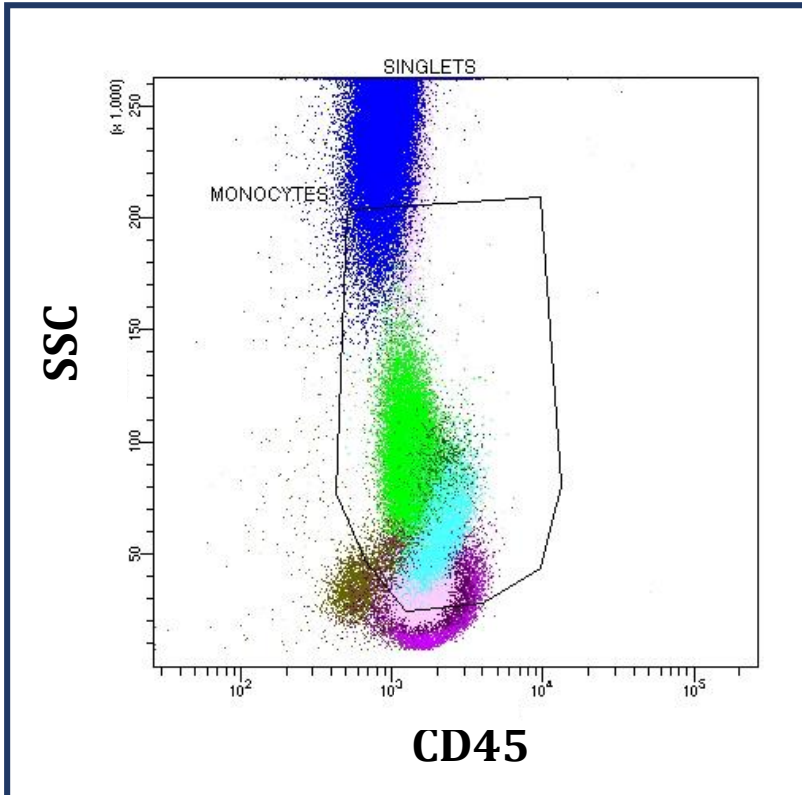
*(les polynucléaires ne sont pas pris en compte dans l'analyse et peuvent être éliminés).*

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*



**2) Sélectionner ensuite les singulets.**

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

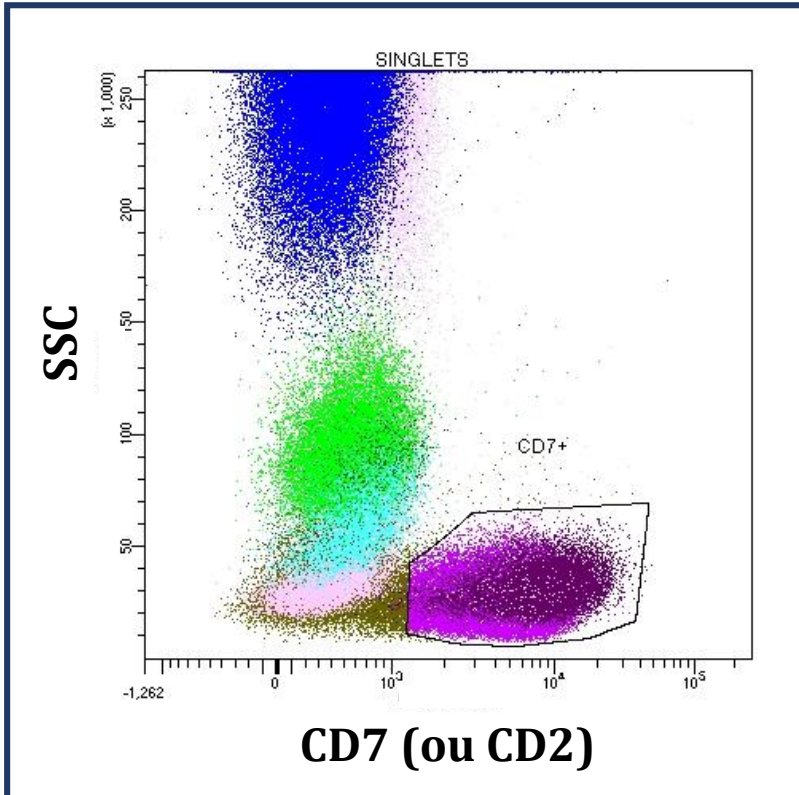


3) Sélectionner grossièrement les monocytes définis comme les cellules  $CD45^{\text{fort}}/SSC^{\text{int}}$ .

*Faire attention à ne pas exclure les cellules exprimant fortement le CD45 (correspondant aux M02 et M03) et les cellules de faible structure (correspondant aux M03 qui se superposent aux cellules NK). En pratique, la fenêtre doit être large à droite et en bas !*

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

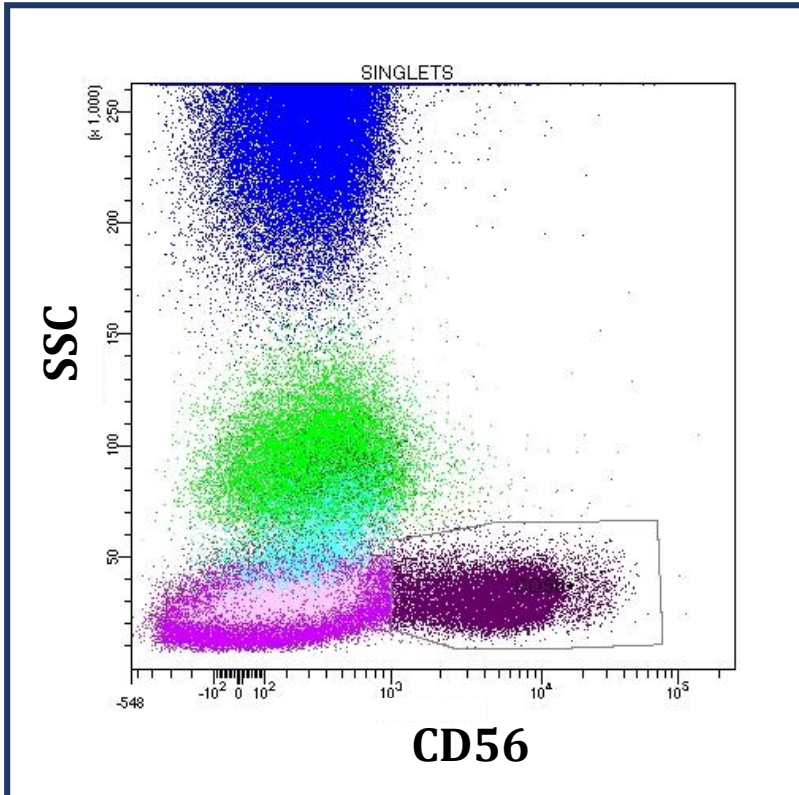


4) Exclure les **lymphocytes T** définis comme les cellules **CD7<sup>+</sup>SSC<sup>faible</sup>** ou **CD2<sup>+</sup>SSC<sup>faible</sup>** ou **CD2<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>SSC<sup>faible</sup>** (qui se superposent avec les **M03 CD14<sup>faible</sup> à negCD16<sup>+</sup>** sur un histogramme biparamétrique CD14/CD16).

*Remarque: il est possible d'utiliser le CD2 ou le CD7 voire d'utiliser les 2 anticorps pour une exclusion optimale des lymphocytes T et des cellules NK !*

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

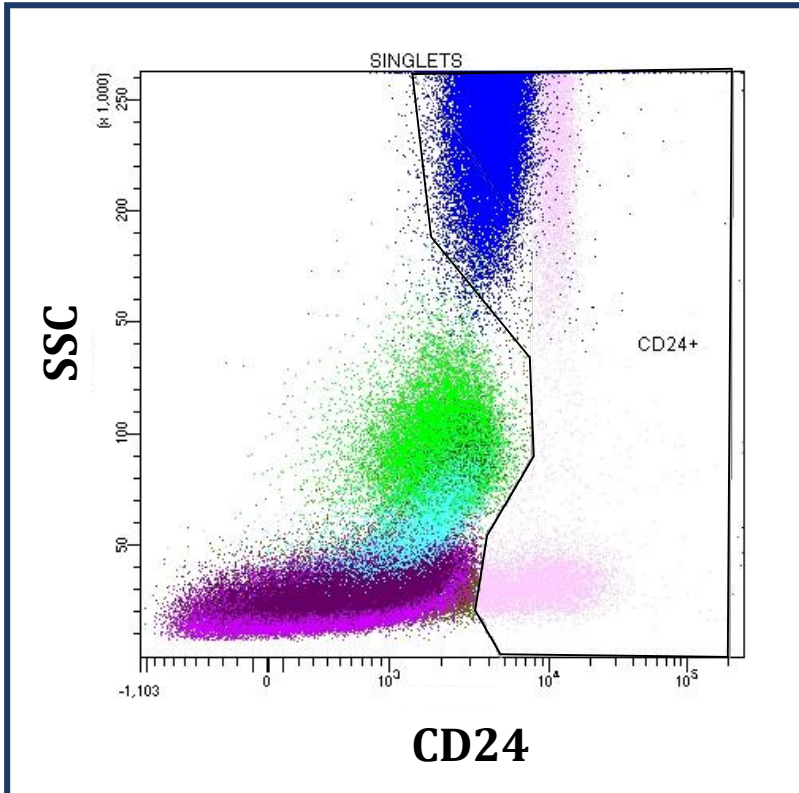


5) **Exclure les cellules NK (les 2 populations  $CD56^{fort}$  et  $CD56^{faible}$ ) définies comme les cellules  $CD56^{+}SSC^{faible}$  (qui se superposent avec les **M03**  $CD14^{faible}$  à  $neg$   $CD16^{+}$  sur un histogramme biparamétrique CD14/CD16).**

***Remarque: Faire attention à ne pas exclure les monocytes qui peuvent exprimer le CD56 dans certaines situations pathologiques comme la LMMC ou les monocytoses réactionnelles !***

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

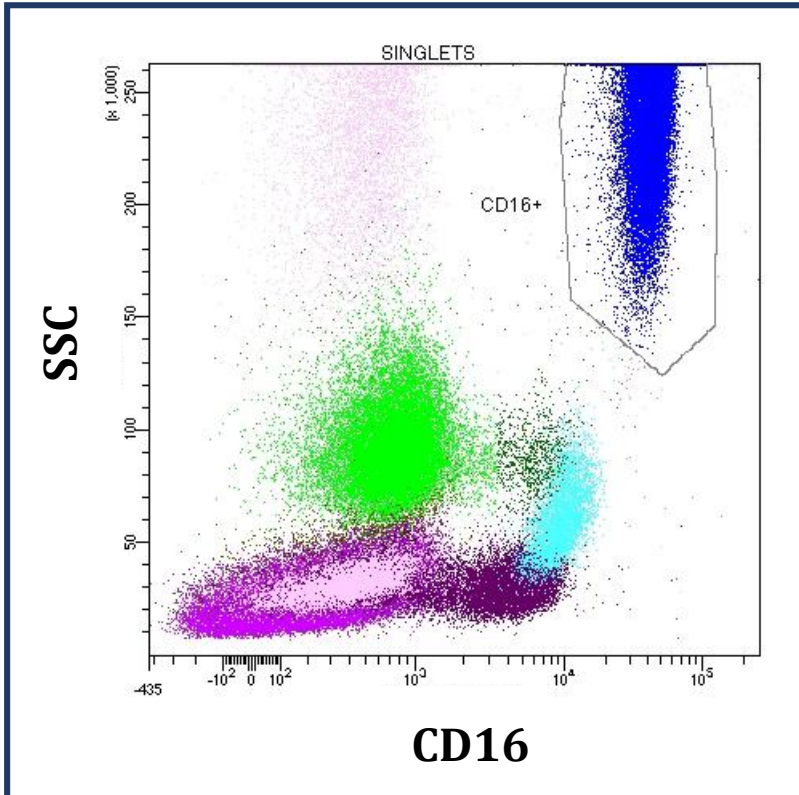


6) Exclure les **lymphocytes B** définies comme les cellules **CD24<sup>+</sup>SSC<sup>faible</sup>** ainsi que les **granuleux matures et immatures** définis comme les cellules **CD24<sup>+</sup>SSC<sup>int à fort</sup>**.

*Remarque:* Les **polynucléaires neutrophiles** **CD16<sup>fort</sup>** apparaissant sur cet histogramme en bleu foncé sont donc exclus sur l'expression du CD24 !

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*

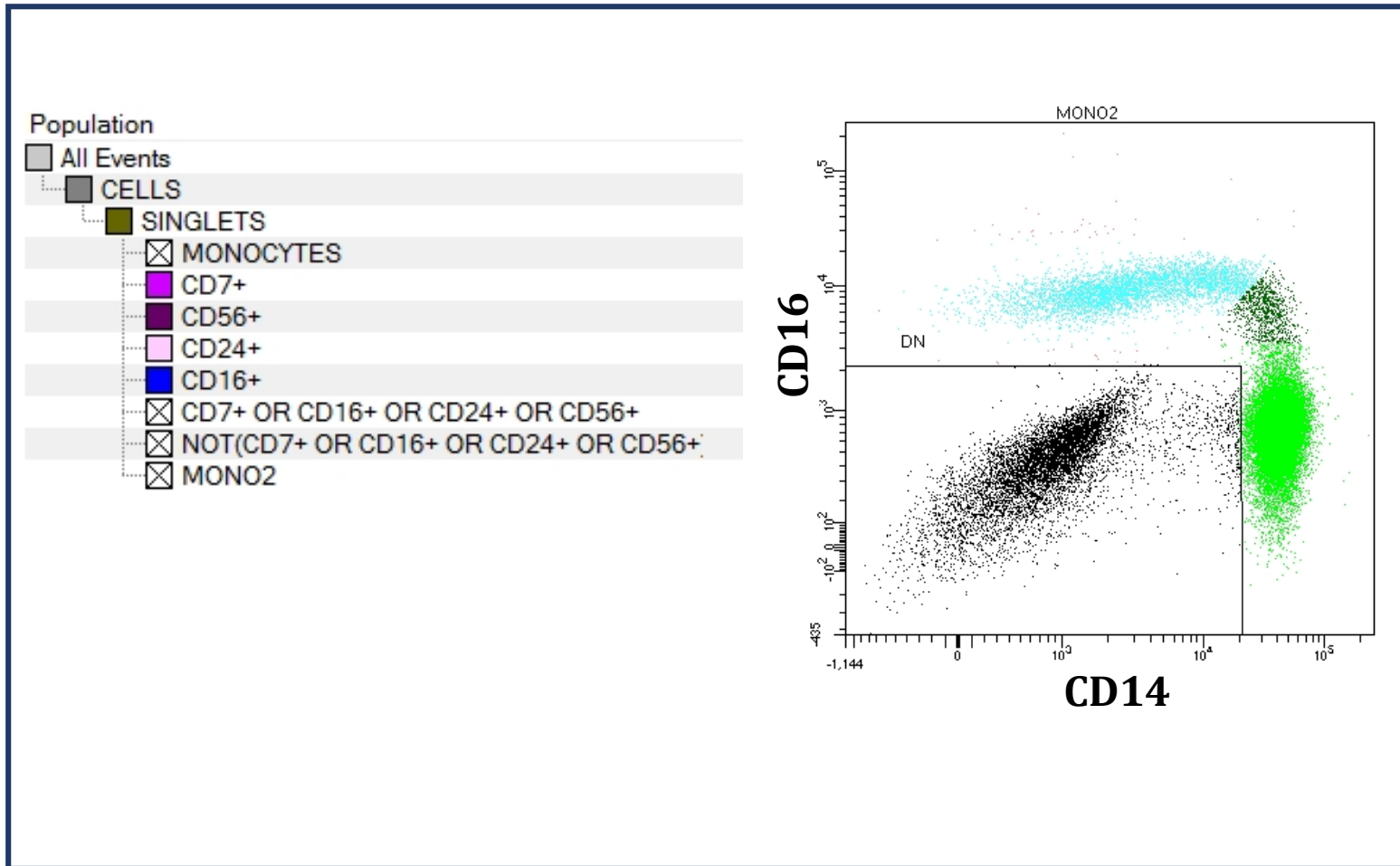


7) Enfin, vérifier sur l'histogramme CD16/SSC la présence de **polynucléaires neutrophiles** résiduels qui n'auraient pas été sélectionnés sur l'expression du CD24 (étape précédente) et retirer si besoin les cellules **CD16<sup>fort</sup>**.

*Remarque: Il est préférable, à l'usage, de laisser par défaut la fenêtre « CD16+ » à droite de l'histogramme et de ne la déplacer qu'en cas de nécessité d'exclure des polynucléaires résiduels !*

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*



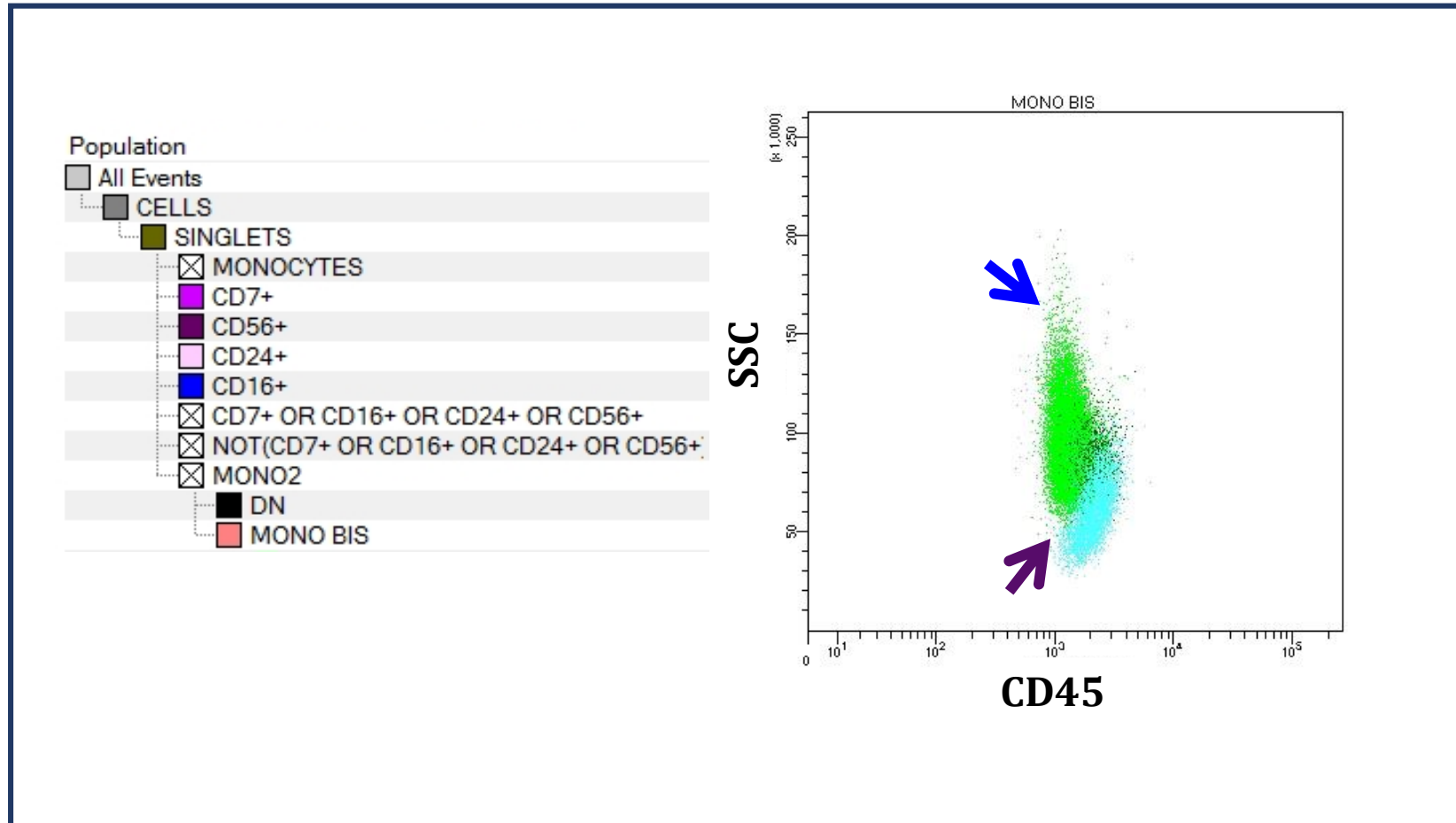
8) Utiliser la hiérarchie de population ci-contre afin d'exclure les cellules CD7<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> de la gate « MONOCYTES » et créer la gate « MONO2 ».

Ensuite, sélectionner les cellules résiduelles double négatives CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup> cells (DN) (qui correspondent principalement à des polynucléaires basophiles et à des cellules NK qui n'auraient pas été précédemment exclues).

**Remarque: En cas de LMMC, veiller à ne pas exclure les MO1 qui peuvent exprimer plus faiblement le CD14 !**

# CYTHEM-LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*



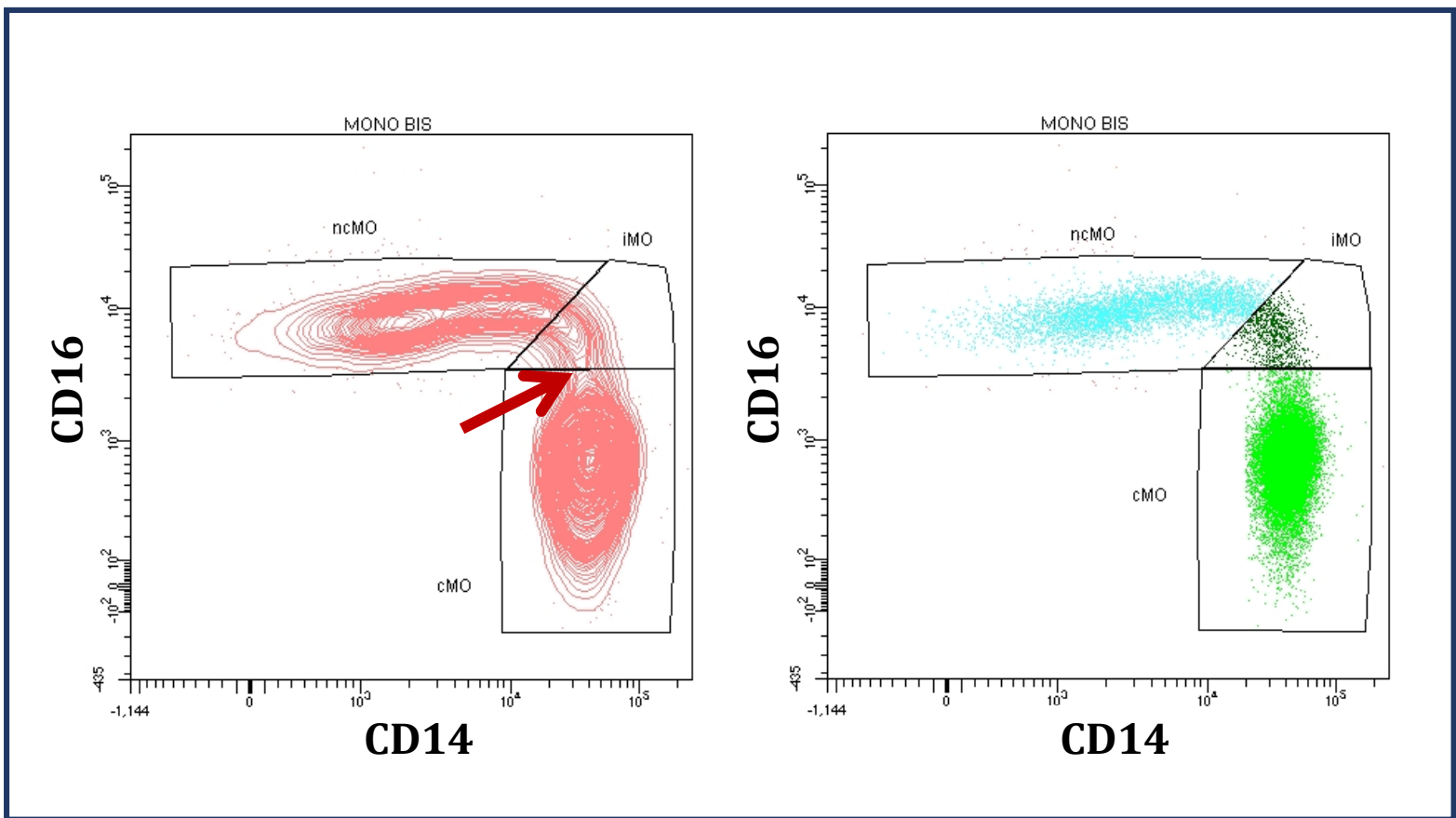
9) Utiliser la hiérarchie de population ci-contre afin d'exclure les cellules résiduelles « DN » de la *gate* « MONO2 » et créer la *gate* « MONO BIS ».

Puis vérifier attentivement la sélection des populations monocytaires sur un histogramme CD45/SSC, et particulièrement si les granuleux (flèche bleue) et les cellules NK (flèche violette) ont été correctement exclus.

→ Si besoin, affiner la stratégie d'exclusion en reprenant les histogrammes précédents.

# CYTHEM-LMMC

BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)



10) Finalement, séparer les monocytes sélectionnés par la *gate* « MONO BIS » en **monocytes classiques CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (MO1 ou cMO)**, monocytes intermédiaires CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (MO2 ou iMO) et **monocytes non classiques CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> (MO3 ou ncMO)**.

*Remarque: Utiliser la représentation en « contour plot » pour un fenêtrage optimal de la sous-population monocyttaire MO1 en utilisant la vallée (flèche)!*

Vérifier que la somme des 3 sous-populations monocytaires est >99,5% pour valider le fenêtrage.

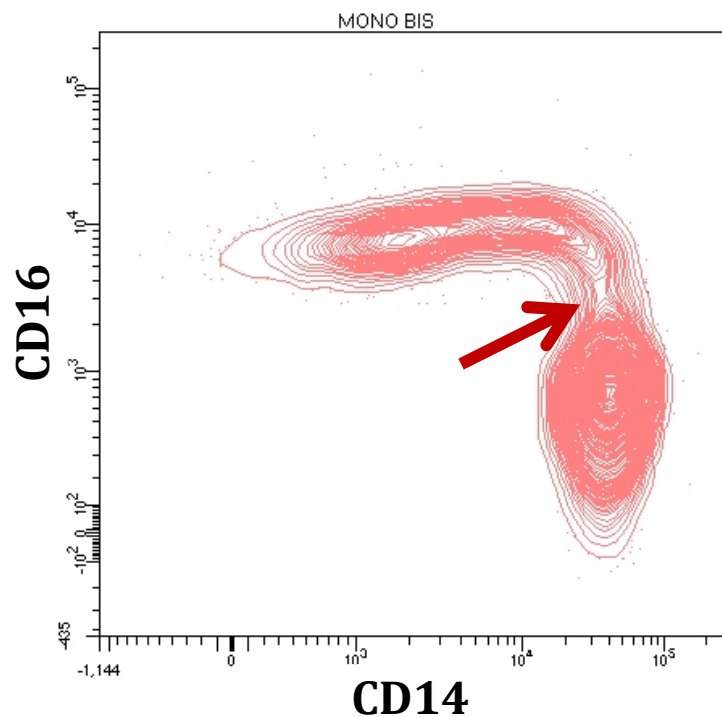
Population	%Parent
cMO	79.5
iMO	3.5
ncMO	16.8
cMO OR iMO OR ncMO	99.8

# CYTHEM-LMMC

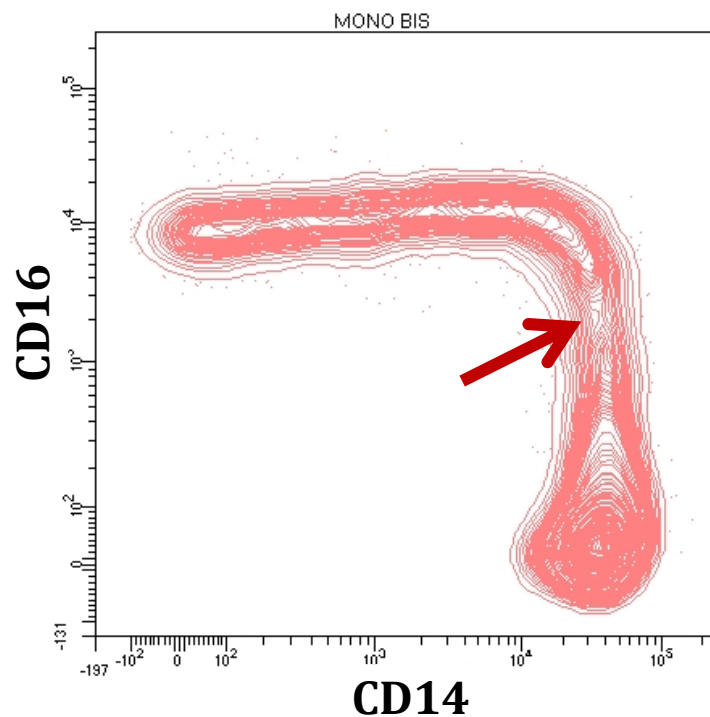
## EFFET DE LA PROCÉDURE DE LAVAGE

BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)

Sans lavage



Après lavage



**Eviter absolument le lavage des cellules après le marquage +++**

**Travailler en protocole “Lyse-no wash”**

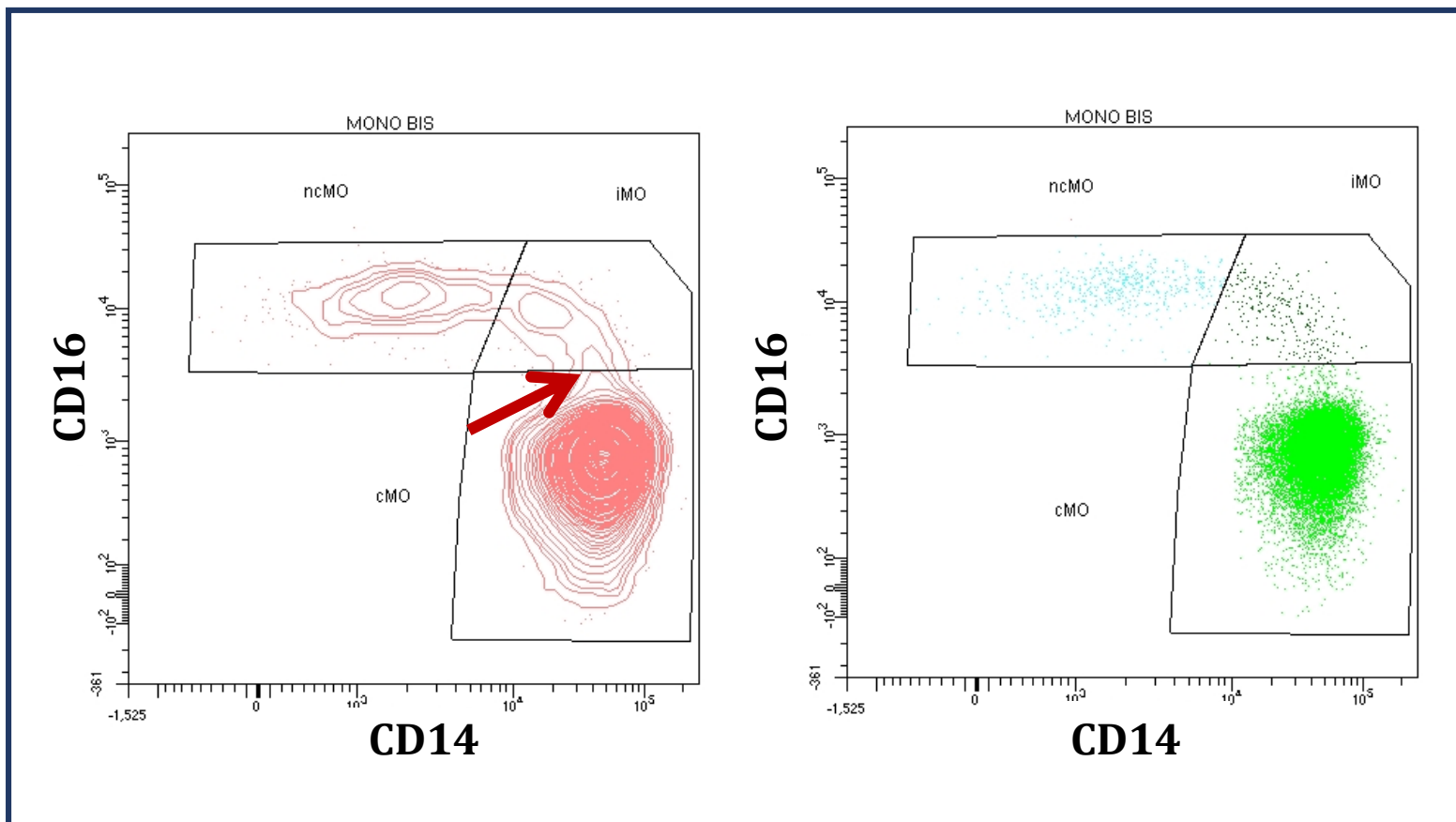
*Remarque: le pourcentage des MO1 est resté similaire après la procédure de lavage (patient présenté sur la diapositive précédente) mais la séparation des MO1 et MO2 est moins évidente – données en cours de publication*

Population	#Events	%Parent
cMO	21,289	79.8
iMO	948	3.6
ncMO	4,422	16.6

# CYTHEM-LMMC

## EXEMPLE D'UN PATIENT ATTEINT DE LMMC

*BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)*



Profil typique de répartition des sous-populations monocytaires chez un patient atteint de LMMC avec une accumulation de monocytes classiques (**MO1** >94%).

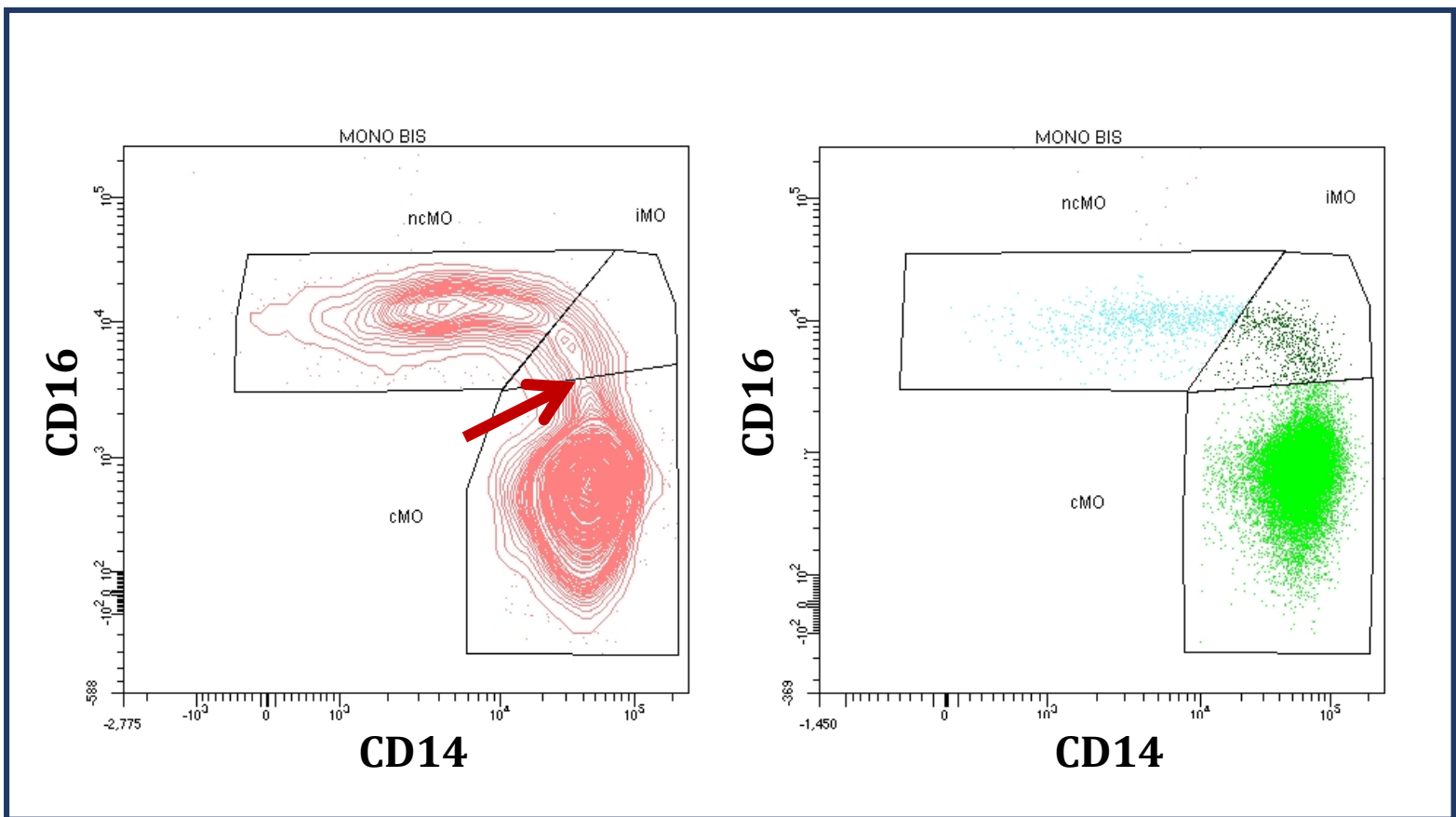
*Remarque: Utiliser la représentation en « contour plot » pour un fenêtrage optimal de la sous-population monocyttaire MO1 en utilisant la vallée (flèche)!*

	cMO	96.5
	iMO	1.2
	ncMO	2.3
	cMO OR iMO OR ncMO	100.0

# CYTHEM-LMMC

## EXEMPLE D'UN SUJET ÂGÉ CONTRÔLE

BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)



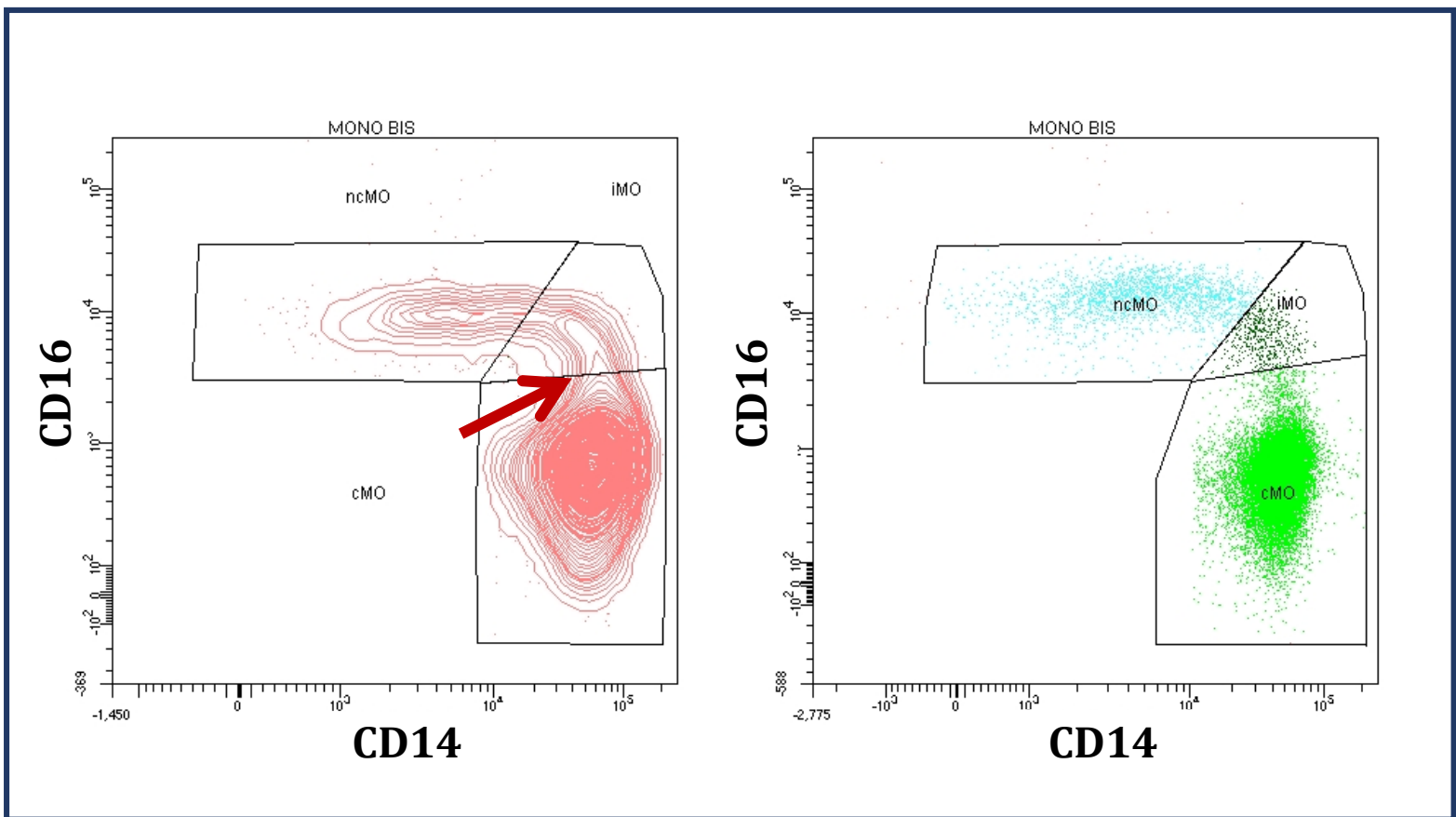
Profil normal de répartition des sous-populations monocytaires chez un sujet âgé contrôle sans accumulation relative de monocytes classiques (**MO1** < 94%).

*Remarque: Utiliser la représentation en « contour plot » pour un fenêtrage optimal de la sous-population monocyttaire MO1 en utilisant la vallée (flèche)!*

■ cMO	93.5
■ iMO	2.9
■ ncMO	3.5
☒ cMO OR iMO OR ncMO	99.9

## EXEMPLE D'UN PATIENT ATTEINT DE MONOCYTOSE RÉACTIONNELLE

BD FACSCanto™ II (BD Life Sciences)



Profil normal de répartition des sous-populations monocytaires chez un patient atteint de monocytose réactionnelle sans accumulation relative de monocytes classiques (**MO1**<94%).

*Remarque: Utiliser la représentation en « contour plot » pour un fenêtrage optimal de la sous-population monocyttaire MO1 en utilisant la vallée (flèche)!*

■ cMO	89.0
■ iMO	2.2
■ ncMO	8.7
⊠ cMO OR iMO OR ncMO	99.9