Dr Soraya Wuillème
Laboratoire d'hématologie Institut de Biologie CHU Nantes
Dr François Vergez
Laboratoire d'hématologie Institut universitaire du cancer de Toulouse
Pr Thomas Matthes
Service d'hématologie Département d'oncologie HUG Genève

PROTOCOLE PHENOTYPAGE MRD-MM POUR BD FACSCANTO™ II (BD LIFE SCIENCES)

MACROLYSE.

- Prélèvement de Moelle osseuse (MO) sur EDTA (environ 1à 2 mL).
- Analyse impérativement dans les 48h suivant le prélèvement, congélation proscrite.
- Enumérer la suspension de moelle osseuse avant de réaliser une macrolyse. Faire les calculs pour que le marquage se fasse sur **4.10⁶** à **5.10⁶** cellules/tube K/L
- Macrolyser 1 à 2 mL de moelle osseuse (volume de la Versalyse 10 fois supérieur au volume de la suspension cellulaire).
- Homogénéiser par retournement et incuber à température ambiante **pendant une durée inférieure à 10 minutes**.
- Reprendre le culot par **un volume FINAL de 200µL** de RPMI SVF 20%.
- Enumérer la suspension cellulaire macrolysée en préparant une dilution au 1/10ème de 20µL de suspension cellulaire macrolysée dans 180µL de PBS). Si le nombre de cellules est insuffisant : refaire une macrolyse.
- Faire les calculs pour que le marquage se fasse sur **5.10⁶** à **10.10⁶** cellules/tube K/L sous un volume inférieur ou égal à 50µL.

PROTOCOLE PHENOTYPAGE MRD-MM POUR BD FACSCANTO™ II (BD LIFE SCIENCES)

MARQUAGE DE SURFACE.

- Le marquage se fait sur 5.10^6 à 10.10^6 cellules/tube K/L sous un volume inférieur ou égal à 50µL.
- Ajouter les anticorps suivants .

CD45 PC5.5 10µL	CD19PC7 5µL	CD38 ME-FITC 6µL	CD138 BV421 2µL	CD56PE 2µL	CD27 BV510 10µL

- Incuber 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Agiter et compléter avec du PBS, centrifuger 5min à 400g et aspirer le surnageant.

MARQUAGE INTRA-CYTOPLASMIQUE.

- Ajouter 100µL de réactif A du kit IntraStain.
- Incuber 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Faire un lavage en PBS, 5min à 400g.
- Ajouter 100µL de réactif B du kit IntraStain.
- Ajouter les anticorps suivants .

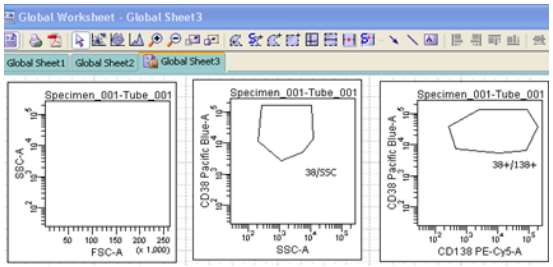
Kappa APC INTRA 5µL	Lambda APC-C750 INTRA 3µL

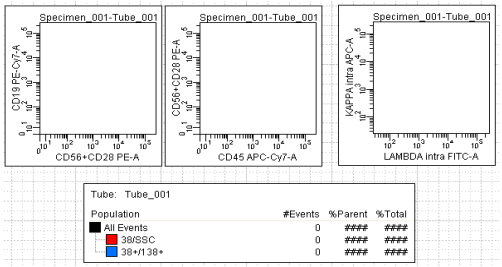
- Incuber 10min à température ambiante et à l'obscurité.
- Agiter et faire un lavage (en PBS, 5min à 400g).
- Remettre en suspension le culot cellulaire par au moins 400µL de PBS ou de formol 1% .

PROTOCOLE PHENOTYPAGE MRD-MM POUR BD FACSCANTO™ II (BD LIFE SCIENCES)

ACQUISITION.

- L'acquisition se fait sur l 'Experiment template ou nouvelle expérience.
- Appliquer les réglages (Cytometer setting) : choisir les réglages stockés suite à l'établissement de la matrice de compensation.
- SSC en mode logarithmique
- Ajustement du seuil sur le FSC et les tensions appliquées aux FSC et SSC: les Plasmocytes sont centrés sur l'axe SSC/CD38.
- Vérifier la position de la fenêtre 38+/138+ (=Plasmocytes) et dans Acquisition Dashboard, vérifier : Stopping Gate = 38+/138+/Storage Gate = all events/Events to record = 30 000 evt/ Flow Rate = Medium (la vitesse de passage ne doit pas dépasser 5000evt/s.)
- Vider l'intégralité du tube.





Se référer au protocole de réglage des billes RAINBOW.
Merci de nous communiquer votre lot actuel de billes RAINBOW afin que nous vous transmettions les valeurs cibles correspondantes !

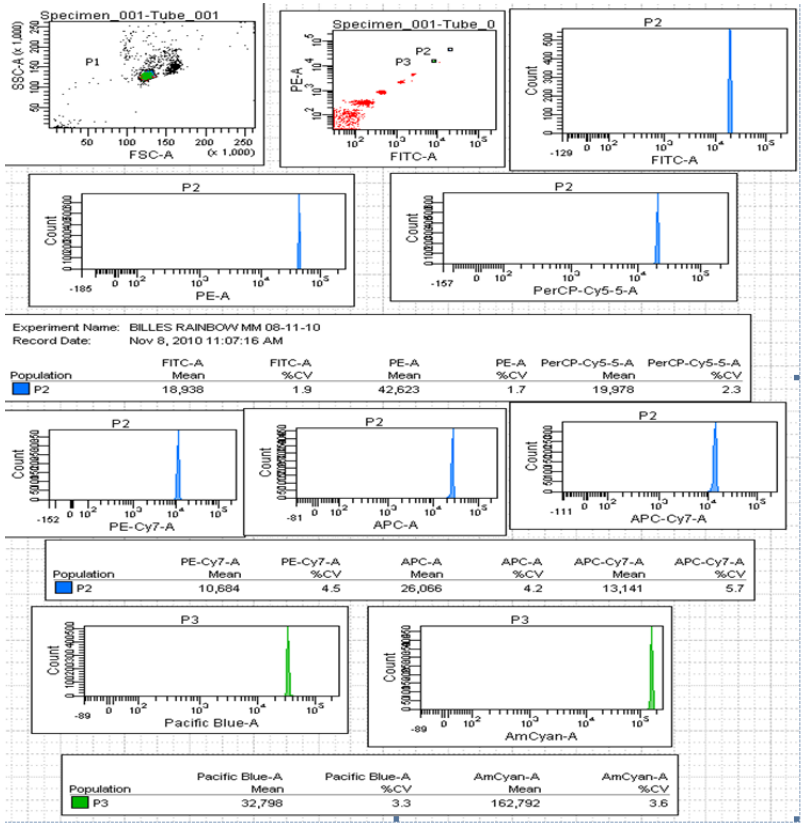
ANALYSE. SE REPORTER A LA STRATEGIE DE GATING

CREATION D'UNE MATRICE DE COMPENSATION MRD-MM POUR BD FACSCANTO™ II (BD LIFE SCIENCES)

AJUSTEMENT DES PMT.

- Diluer 10µL de billes Rainbow dans 250 µL d'eau distillée (numéro de lot: 3319908).
- Vortexer et passer les billes Rainbow en Low.
- Ajuster les PMT pour atteindre les MFI cibles Euroflow (tableau et figure).
- Stockage de 10000 events.
- Relever la tension appliquée aux PMT utilisés.

Fluorochrome	***Pic***	***MFI Cible***
FITC	P2	54874
PE	P2	93003
PerCP-Cy5.5	P2	228051
PE-Cy7	P2	30518
APC	P2	179171
APC-C750	P2	63025
BV421 - Pacific Blue	P3	192200
BV510	P3	163412

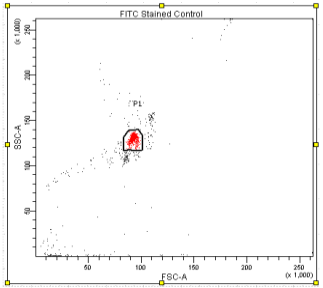


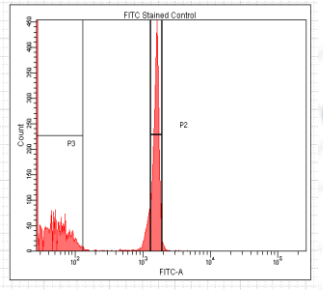
CREATION D'UNE MATRICE DE COMPENSATION MRD-MM POUR BD FACSCANTO™ II (BD LIFE SCIENCES)

CREATION D'UNE MATRICE DE COMPENSATION.

- Préparer les tubes et incuber 15 minute à température ambiante et à l'obscurité.
- Centrifuger 5minutes à 400g, aspirer le surnagent et ajouter 250µL de PBS.
- Ajuster la tension appliquée aux PMT avec les valeurs obtenues précédemment.
- Passer les billes en LOW.
- Placer la gate des billes sur tous les tubes et « ***''apply to all compensation control''*** »
- Stocker 10000 events.
- Positionner la P1 sur le SSC/FSC. Ce réajustement se fait sur des cellules et non billes.

tube	Volume Ac	Billes BD Compbeads Negative control + Anti-mouse Kappa
FITC	CD38 - 5µL	30µL + 30µL
PE	CD56 - 20µL	30µL + 30µL
PerCP C5.5	CD45 - 5µL	30µL + 30µL
PE-Cy 7	CD19 - 5µL	30µL + 30µL
APC	Kappa intra 5µL ou CD117 - 20µL	30µL + 30µL
APC-C750	CD81 - 5µL	30µL + 30µL
BV421	CD138 - 5 µL	30µL + 30µL
BV510	CD27 - 5 µL	30µL + 30µL



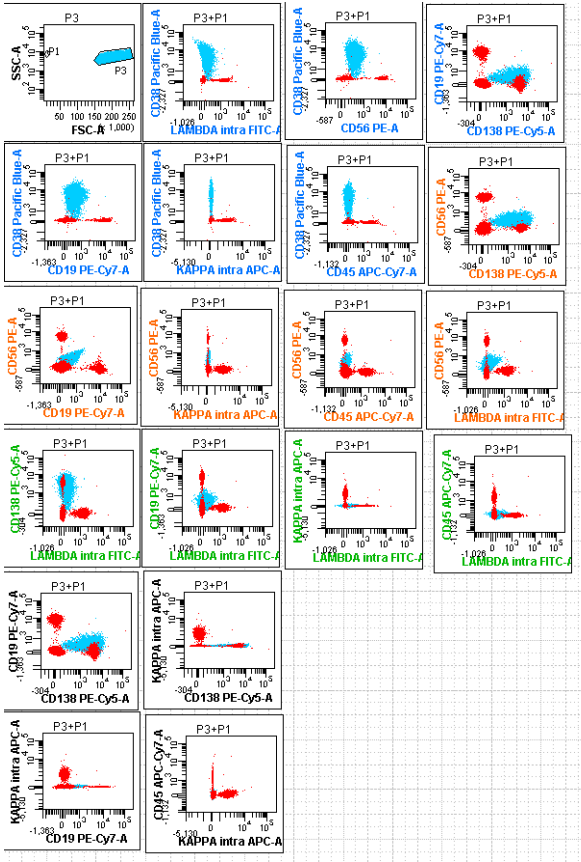


CREATION D'UNE MATRICE DE COMPENSATION MRD-MM POUR BD FACSCANTO™ II (BD LIFE SCIENCES)

CREATION D'UNE MATRICE DE COMPENSATION.

VERIFIER QUE LES REGLAGES SONT APPLIQUES A TOUS LES TUBES DE L'EXPERIENCE

Contrôler la matrice de compensation dans un tube multi-couleur.
Ajuster manuellement les compensations si besoin.



CytHem-MYELOME

- **REACTIFS.**

	Fournisseur	Référence	Clone	Conditionnemt nb de tests	Qté / test recommandée par le fabricant	Qté / point MRD	Qté/ 100points
CD38 FITC	Clinisciences	CYT-38F2	ME	50	5µL	6µLx2	4
CD 138 BV421	BD Biosciences	562935	MI15	50	5µL	2µLx2	2
CD45 PerCP Cy5.5	Ozyme	304028	HI30	100	5µL	10µLx2	4
CD19 PC7	Coulter	IM 3628	J4.119	100	10µL	5µLx2	1
CD56 PE	Clinisciences	CYT-56PE	C5.9	200	5µL	2µLx2	1
CD27 BV 510	Ozyme	BLE 302836	O323	100	5µL	10µLx2	4
Kappa APC	Dako	CO22201	Polyclonal	100	10µL	5µL	0.5
Lambda APC C750	Clinisciences	CYT-LAC750	Polyclonal	50	5-3µL	5-3µL	2
81 APC C C750	Clinisciences	CYT-81AC750	M38	50	5-3µL	10-6µL	4
117 APC	BD Biosciences	333233	104D2	100	5µL	5µL	1
Versalyse	Coulter	A09777		100	1ml	10ml	10
Kit intra stain	Dako	K2311		100	100µL	100µL	1