

Inserm

mio
Mediterranean Institute of Oceanography

Compensation

Adapté de Bruce Bagwell (Verity Software House, USA)

Gérald GREGORI (Ph.D, Chargé de recherche)

Mediterranean Institute of oceanography (M.I.O)
CNRS/IRD, Aix Marseille University, Toulon University
Case 901, Campus de Luminy, Bâtiment OCEANOMED
13288 Marseille cedex 9, France

<https://precym.mio.univ-amu.fr/>

-PRECYM

Observatoire des Sciences de l'Univers
INSTITUT D'ASTROPHYSIQUE

Cytométrie en Flux

Mesure (-métrie) des propriétés optiques de cellules (cyto-) transportées par un liquide vecteur (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse (le plus souvent un laser).

- La cytométrie en flux mesure :
 - La lumière diffusée par les cellules dans 2 directions (diffusion aux petits angles et à 90°)
 - La fluorescence produite par les cellules et induite par la source d'excitation lumineuse.
- La fluorescence peut être naturelle (autofluorescence) ou induite (colorants fluorescents - fluorochromes)
- Différence avec la spectrophotométrie : mesure la fraction de lumière absorbée ou transmise dans un volume d'échantillon (méthode globale).

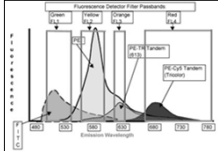
Spectres d'absorption et d'émission d'un composé organique

La fluorescence d'un composé organique est toujours spectrale.
Exemples de fluorochromes. (Practical Flow Cytometry, Third Edition, Howard M. Shapiro, P. 245).

Chaque fluorescence mesurée par un cytomètre en flux est spectrale, c'est à dire étalée sur une gamme de longueurs d'ondes (plusieurs nm).

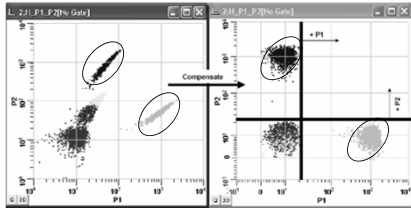
Que signifie « compensation » ?

- La compensation est le processus par lequel le débordement spectral de fluorescence provenant d'un fluorochrome autre que celui spécifié pour un détecteur donné est soustraite des signaux des autres détecteurs.
- Exemple : Le recouvrement entre les spectres de fluorescence du FITC et du PE signifie que des photons émis par le FITC (FL1) sont collectés par le détecteur du PE (FL2), et inversement.



La quantité de photons émis par le FITC qui «bave» dans le détecteur de PE doit être prise en considération c'est-à-dire compensée.

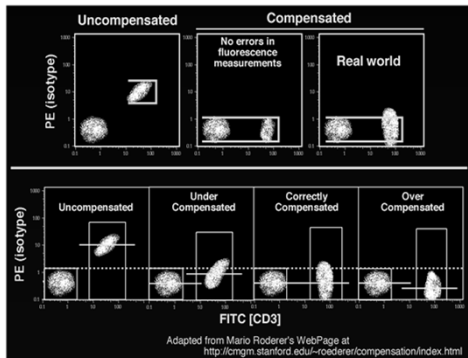
Avez-vous besoin de compensation ?



Pas nécessairement :

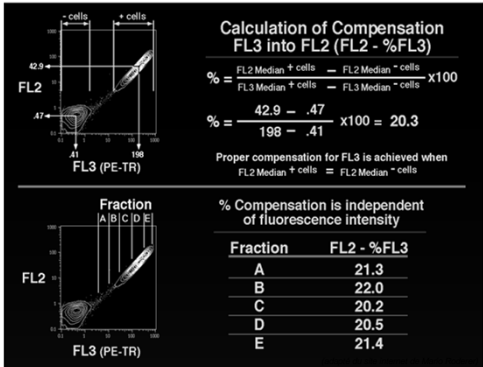
- Pour discriminer des groupes → La compensation n'est pas obligatoire
- Pour distinguer entre cellule positive et négative → Besoin de compensation

Est-ce que la compensation est correcte ?

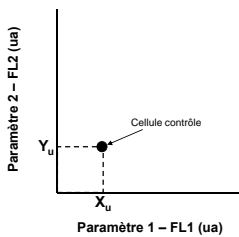


Adapted from Mario Roderer's WebPage at <http://cmgm.stanford.edu/~roederer/compensation/index.html>

Comment la compensation est-elle calculée?

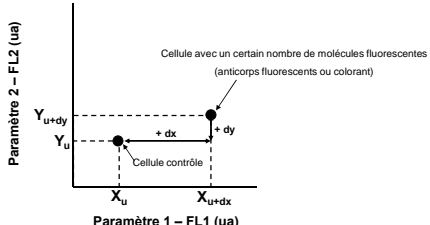


Contrôle (cellule non fluorescente)



Cytogramme théorique d'une cellule non marquée analysée par cytométrie en flux.
 Dans le repère défini par les 2 fluorescences mesurées, la cellule est positionnée selon ses coordonnées x et y.

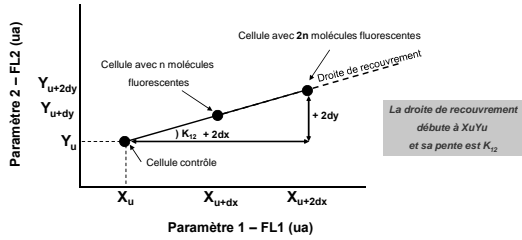
Débordement du signal (cross-over)



Exemple d'une cellule marquée par un colorant fluorescent qui émet principalement dans le Paramètre 1 (fluorescence verte) mais aussi dans le Paramètre 2 (fluorescence orange)

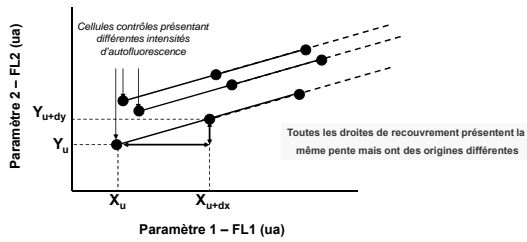
Nous assumons que les Paramètres 1 & 2 sont linéaires sur la gamme dynamique de fluorescence du colorant et qu'il n'y a pas de masquage de fluorescence (transfert d'énergie de fluorescence par résonance FRET).

Notion de recouvrement linéaire de fluorescence (cross-over trace line)



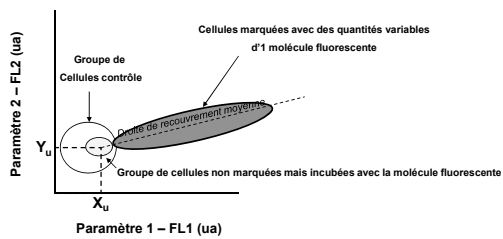
Exemple de cellules marquées par différentes quantités d'une molécule fluorescente qui émet principalement dans le vert (paramètre 1)

Généralisation à plusieurs cellules

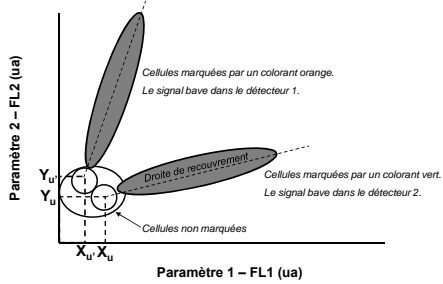


Exemple de cellules marquées par des quantités variables d'une même molécule qui émet principalement dans le vert (paramètre 1)

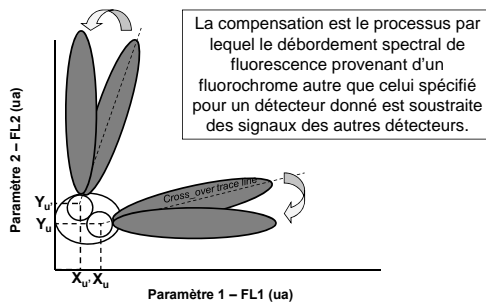
Généralisation à une population de cellules



Incubation de 2 populations avec 2 molécules fluorescentes



Compensation

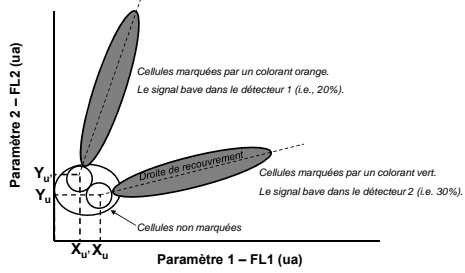


Il semble que chaque population subit une rotation autour d'un pivot défini par les cellules non marquées → Problème : ce point pivot n'est pas clairement défini.

Deux types de compensation

- Compensation matérielle (Hardware)
 - Pendant l'acquisition → Les données brutes sont modifiées (anciens cytomètres en flux).
- Compensation par le logiciel (Software)
 - La compensation est faite *a posteriori*, après l'acquisition → Les données brutes ne sont pas modifiées (nouvelles générations de cytomètres en flux)

Compensation matérielle (Hardware)



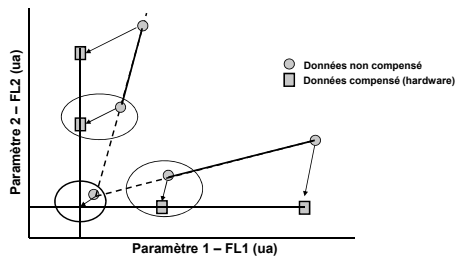
La compensation consiste à soustraire un certain % de signal à un autre signal:

$$I_{\text{comp paramètre 1}} = I_{\text{paramètre 1}} - 0.2 I_{\text{paramètre 2}}$$

$$I_{\text{comp paramètre 2}} = I_{\text{paramètre 2}} - 0.3 I_{\text{paramètre 1}}$$

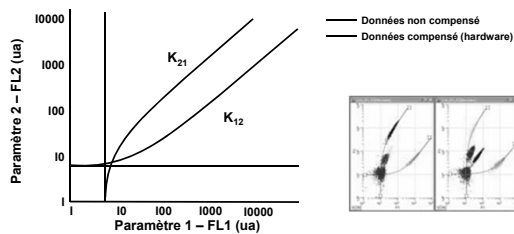


Géométrie de la compensation



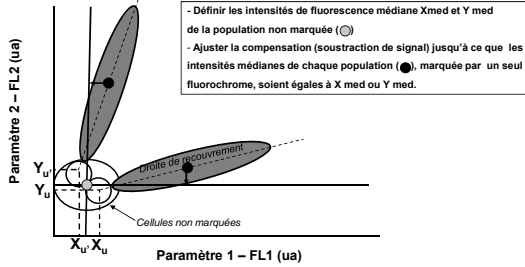
- La compensation aboutit à 2 droites orthogonales
- Les intensités sont décalées vers l'origine
- L'origine des lignes avant et après compensation n'est pas la même
- ➔ Il n'y a plus de pivot! La compensation n'est donc pas qu'une simple rotation.

Avec une échelle logarithmique



- En échelle logarithmique les droites de recouvrement deviennent des courbes,
- Elles redeviennent des droites après compensation (droites orthogonales)

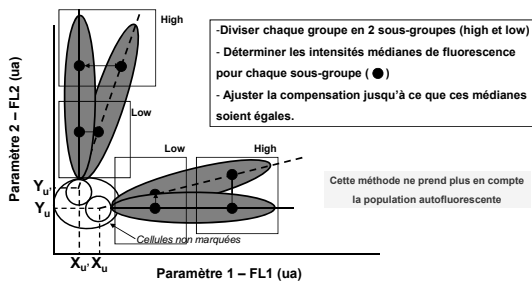
Compensation matérielle: une approche « incorrecte »



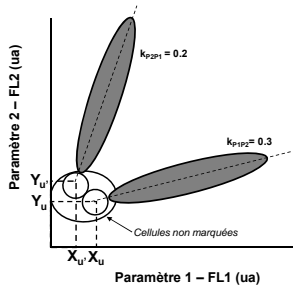
Principales sources d'erreur

- Le centre du groupe de cellules autofluorescentes n'est pas le point de pivot des droites de recouvrement (→ aboutit à une sous- ou sur-compensation)
- Le groupe de cellules autofluorescentes est le plus souvent localisé près de l'origine (première décade) là où le bruit électronique (pré-amp; ampli-log) est le plus important.

Une alternative : La technique « High-Low »



Compensation par logiciel



- 1- Estimation des pentes des droites de recouvrement :
 - . Technique High-Low (FloJo)
 - . Algorithme d'ajustement (WinList)

- 2- Création d'une matrice

$$K = \begin{pmatrix} 1 & k_{P1P2} \\ k_{P2P1} & 1 \end{pmatrix}$$

- 3- Inversion de la matrice $K \rightarrow K^{-1}$
 K^{-1} est la matrice de compensation

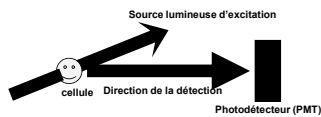
- 4- Multiplication par la matrice de compensation
 Paramètre compensé = Paramètre * K^{-1}

Avantage de la compensation par le logiciel

- Applicable à n'importe quel nombre de paramètres
- Peut être automatisée

Sources d'erreur qui affectent la compensation

- Erreur de comptage des photons collectés

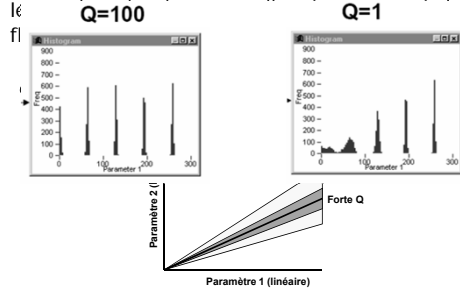


Le nombre « N » de photons collectés est un nombre fini.
 Le signal est stochastique et sa variance est soumise à la distribution de POISSON

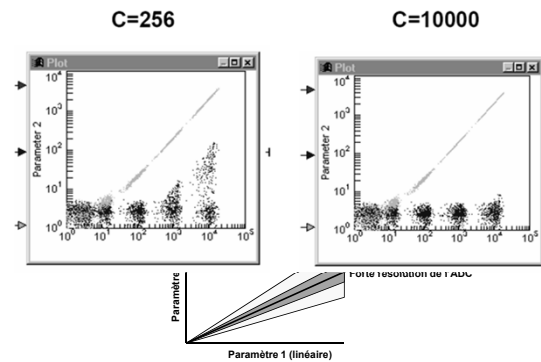
$$\text{L'erreur commise sur N est } \pm \sqrt{N}$$

Erreur de comptage (suite)

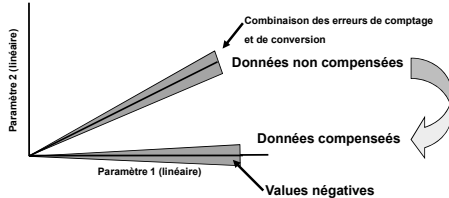
- Si l'efficacité d'un cytomètre (Q) est définie par



Erreurs induite par le convertisseur analogique-digital

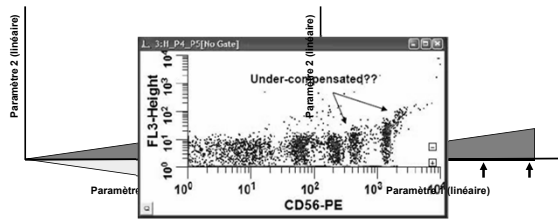


Influence de ces erreurs sur la compensation



- La combinaison des erreurs (de comptage et de conversion) crée une distribution symétrique de part et d'autre des droites de recouvrement.
- Quand la compensation est correcte la distribution devient symétrique par rapport aux axes.
- Ceci est un problème quand les données sont en échelle Log car il n'y a pas de valeur négative ou nulle.

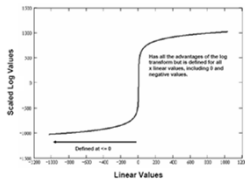
Conséquences avec l'échelle Log



- Les valeurs négatives sont ramenées à 0 → Les événements sont empilés sur l'axe
- Les événements s'accumulent sur l'axe (plus de discrimination possible)
- Les données semblent sous-compensées → sur-compensation.

Une solution à ce problème de représentation graphique

- Transformations Biexponentielle et HyperLog
 - Fonction sin hyperbolique connue sous le nom de bi-exponentielle (Moore and Parks , 2002).
 - Plus récemment, la transformation HyperLog (Bagwell, Verity Software House).
- Les 2 transformations ont des caractéristiques similaires (échelle log pour les fortes intensités, échelle linéaire au voisinage de l'origine, des données symétriques par rapport à 0.



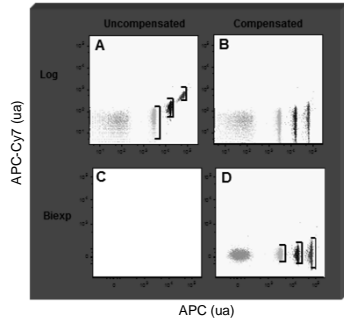
Transformation biexponentielle

- Fonction sinus hyperbolique:

$$\sinh(x) = (e^x - e^{-x})/2$$
- Généralisée en une fonction biexponentielle :

$$f(x) = a e^{bx} - c e^{-dx}$$

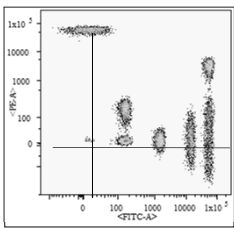
Affichage biexponentiel



Billes contenant 3 niveaux de fluorescence (APC)

Après transformation, les trois populations sont parfaitement alignées. Les événements ne sont plus empilés sur l'axe.

Résultats



- Echelle Log dans sa partie supérieure, linéaire dans sa partie inférieure, et symétrique par rapport à 0.
- Avec cette transformation l'ensemble du domaine linéaire des données peut être transformé, préservant la symétrie de la distribution des erreurs (valeurs négatives après compensation)
- Les événements ne sont plus empilés sur les axes
- Après compensation, chaque groupe apparaît homogène et continu (il n'y a plus de hiatus induit par l'empilement sur l'axe)

Conclusion

- La compensation est juste une façon visuelle de représenter les données afin de rendre leur analyse plus facile (cellule positive pour un fluorochrome, ou négative pour un autre)
- La compensation par le logiciel permet de ne pas modifier les données brutes, de réaliser la compensation après l'acquisition, voire de la réaliser plusieurs fois.
- La compensation ne permet pas de rattraper une mauvaise acquisition par le cytomètre car là les données brutes sont affectées
- Transformations HYPERLOG ou BIEXPONENTILLE ...à vous de choisir.
