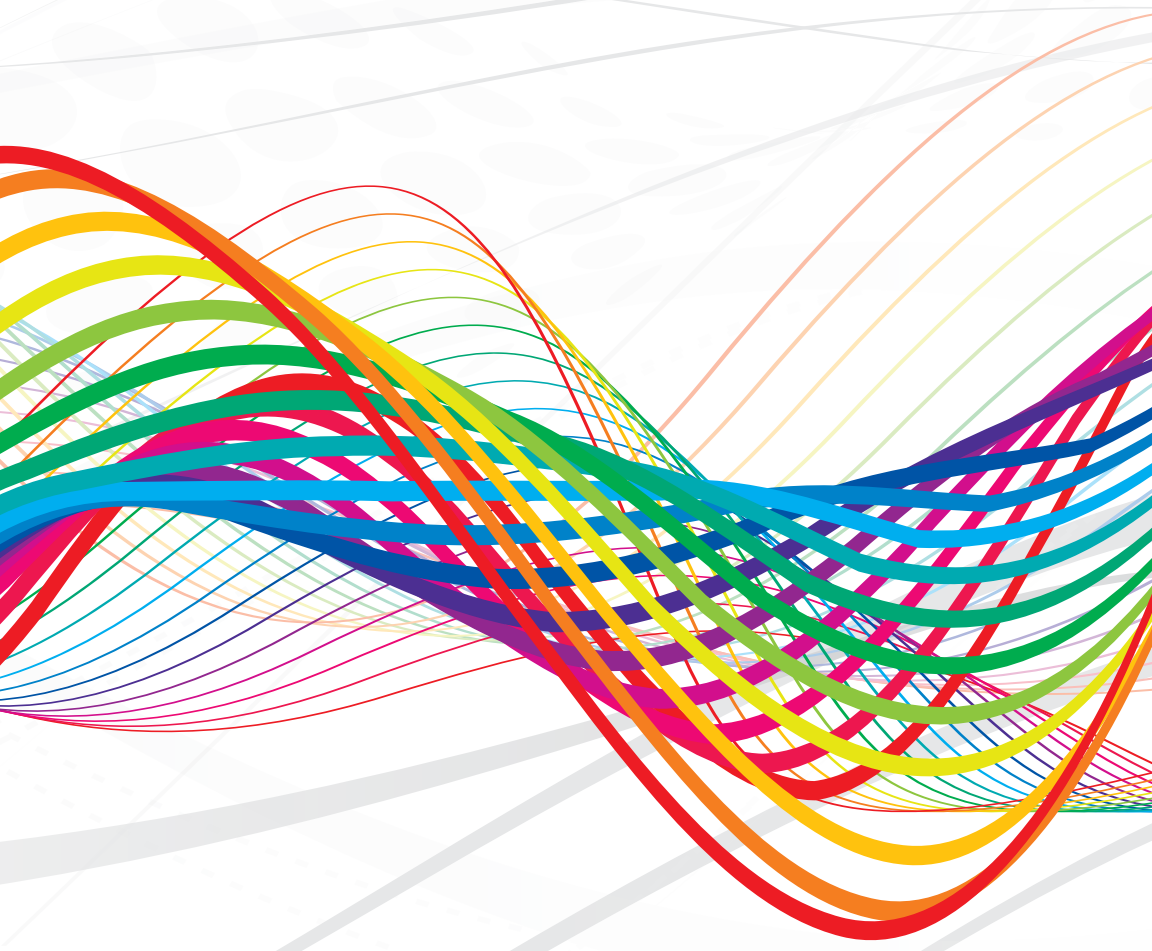




**Bangs Laboratories, Inc.**

RESSOURCES DE CYTOMÉTRIE EN FLUX



## À PROPOS DE BANGS LABORATORIES, INC.

---

Chez Bangs Labs, nous travaillons dans le domaine des microsphères depuis plus de 25 ans. Au cours des années, nous avons eu le plaisir de rejoindre la communauté de la cytométrie en flux avec notre acquisition de Flow Cytometry Standards Corporation (FCSC).

Nous sommes fiers de continuer une tradition de produits innovants pour la validation, le contrôle de qualité et la normalisation des instruments, et de mettre notre expertise au service du développement et de la fabrication de normes spécialisées pour les fabricants d'instruments et les développeurs d'essais.

## IMPLANTATIONS

---

Bangs est une filiale à 100 % de Polysciences, Inc. Présents dans le monde entier, nous sommes prêts à répondre à vos besoins mondiaux.

### **Bangs Laboratories, Inc.**

9025 Technology Drive  
Fishers, IN 46038-2886  
info@bangslabs.com

### **Polysciences, Inc.**

400 Valley Road  
Warrington, PA 18976  
info@polysciences.com

### **Polysciences Europe GmbH**

Badener Str. 13  
69493 Hirschberg an der Bergstrasse, Allemagne  
info@polysciences.de

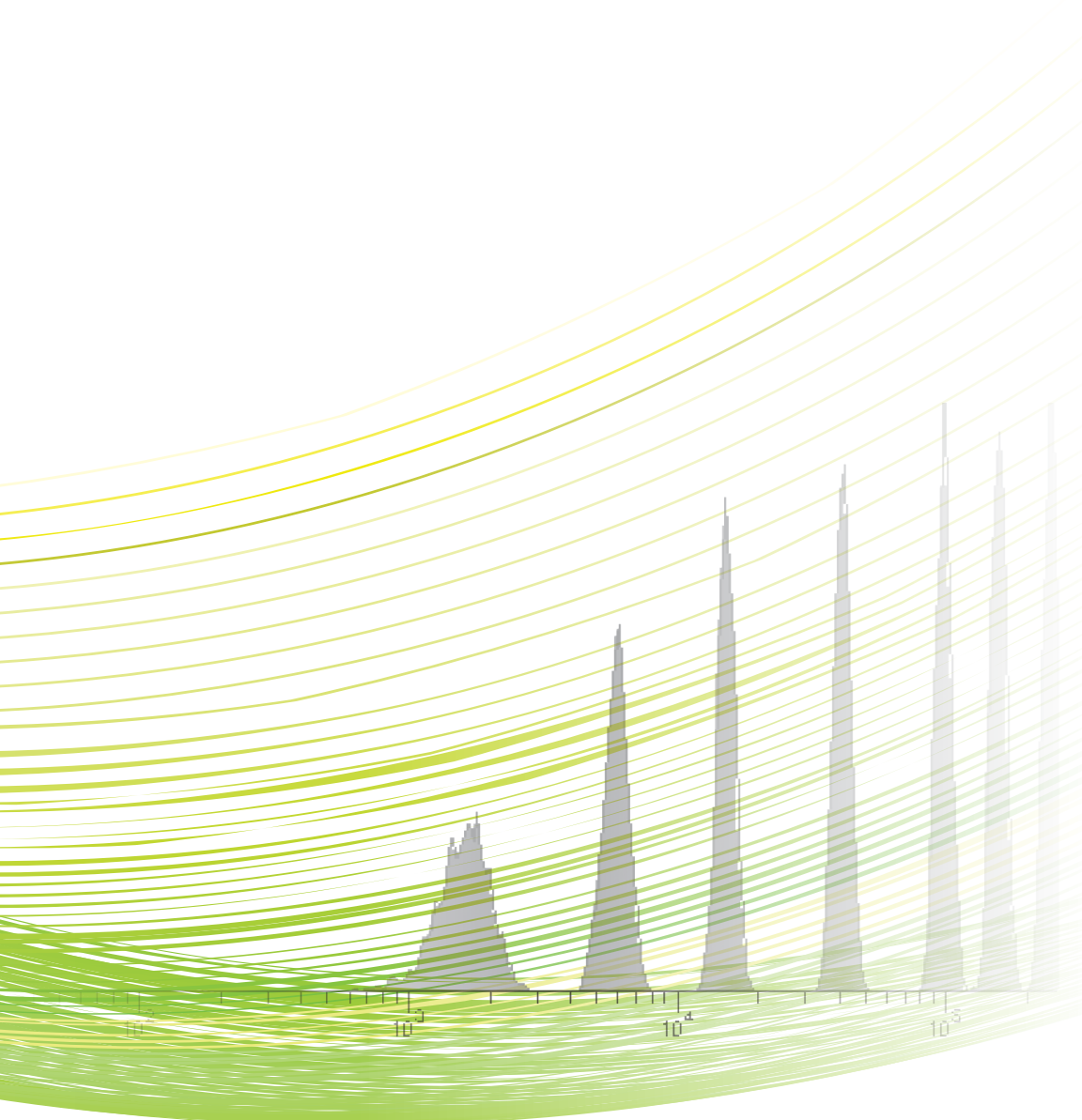
### **Polysciences Asia Pacific, Inc.**

2F-1, 207 DunHua N. Rd.  
10595 Taipei, Taiwan  
info@polysciences.tw

## CERTIFICATIONS ISO

---

Les laboratoires Bangs ont été certifiés par American Management Technology, Inc. comme ayant démontré que notre système de gestion de la qualité est conforme à la norme **ISO 13485:2016** pour la production, le traitement et la distribution de microsphères et produits connexes.

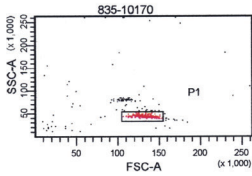




Les données peuvent être affichées dans un format simple ou multiparamétrique avec des statistiques associées, conformément au diagramme de points à double paramètre typique (FSC/SSC) et à l'histogramme de fluorescence à un paramètre de la *Figure 3*.

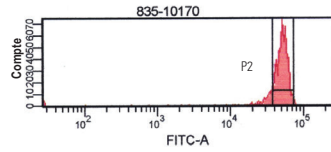
**Figure 3 :**

**3a.** Diagramme de points FSC/SSC avec la population de singulets ciblés et les statistiques associées :



Population	%Parent	Médiane FSC-A	CV FSC-A	Médiane SSC-A	CV SSC-A
■ P1	86,0	134,829	5,5	43,436	4,4

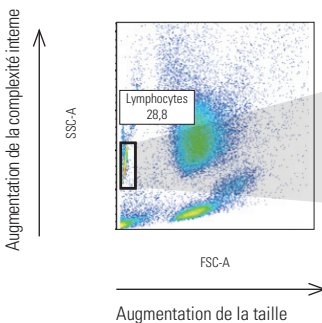
**3b.** Histogramme de fluorescence (FITC) de singulets provenant de la cible FSC/SSC illustrée en 3a.



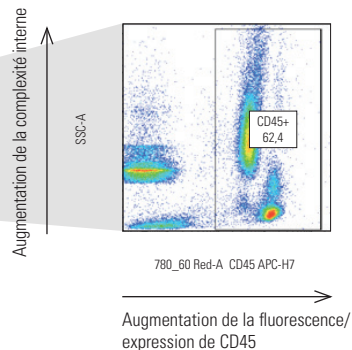
Population	Médiane FITC-A	CV FITC-A
☒ P2	52,178	14,5

Bien que les cellules non colorées donnent des schémas de diffusion caractéristiques facilement identifiables dans un diagramme en points FSC/SSC (*Figure 4a*), les rapporteurs et les colorants fluorescents sont utilisés individuellement ou en combinaison pour fournir des informations spécifiques sur l'expression de divers marqueurs de surface ou intracellulaires, de l'état métabolique, de l'intégrité de la membrane, etc. Dans un exemple classique d'immunophénotypage, la *figure 4b* démontre l'exclusion des granulocytes et des monocytes et l'analyse de lymphocytes exprimant le CD45 colorés avec un anticorps anti-CD45-APC-Cy™7.

**Figure 4a :** Diagramme de points FSC/SSC de leucocytes non colorés (sang total RBC lysé)



**Figure 4b :** Représentation graphique SSC/APC-Cy™7 par points fluorés de lymphocytes CD45+ colorés



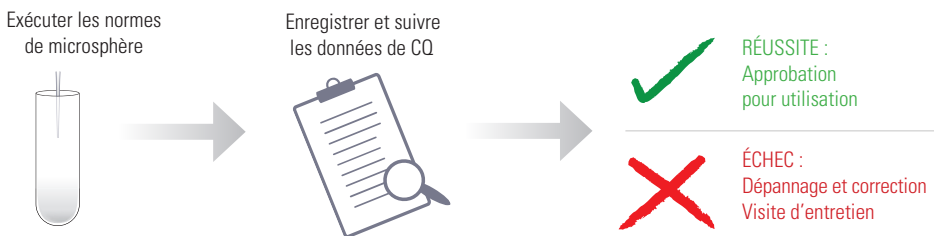
## QUALIFICATION DES INSTRUMENTS ET CQ

Dans le secteur des sciences de la vie, les instruments d'analyse sont largement utilisés pour prendre des décisions en matière de recherche, de fabrication et, dans le cas d'applications cliniques, de soins aux patients. Étant donné qu'il s'agit d'un travail important qui exige des données précises, fiables et pertinentes, les instruments doivent être soigneusement sélectionnés, qualifiés et leurs capacités vérifiées tout au long de leur vie active. La qualification est un processus complet qui vise à garantir que chaque instrument répond aux capacités attendues et est adapté à l'utilisation envisagée. Elle comporte des tests de performance approfondis qui, une fois réalisés, serviront de base aux programmes continus de CQ d'instrument et de compétences.

Après la qualification, le programme de contrôle de qualité d'instrument vise à fournir une image précise de l'état de l'instrument et à garantir la fiabilité des données obtenues. Les tests de contrôle qualité spécifiques doivent être pertinents en termes de type et de fréquence par rapport au travail exécuté, ainsi que l'historique de maintenance et d'entretien. S'il s'avère que certains composants ou sous-systèmes sont moins stables, ceux-ci peuvent justifier une surveillance plus rigoureuse.

Chaque journée doit commencer par une vérification générale du système indiquant que les sous-systèmes et les composants fonctionnent. Des tests supplémentaires devraient alors être effectués pour répondre à l'utilisation spécifique de l'instrument. En particulier, un contrôle de qualité plus strict est requis pour les essais quantitatifs.

**Figure 5 :** processus CQ

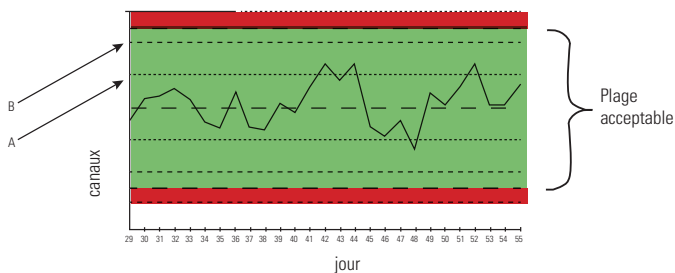


**Figure 6 :** Exemple de programme de contrôle qualité basique pour un cytomètre à 2 lasers

Fréquence	Code produit et catalogue	Objectif	Couverture	Données
Quotidienne	Spectre complet (n°885) ou CQ Quantum (n°725)	Vérification de base du système ; Vérification de l'alignement laser	Tous les lasers/ détecteurs	Valeurs de canal de graphique; Enregistrement des CV
Quotidienne pour quantitatif	Quantum MESF (voir page 14)	Exécuté à des PMT spécifiques pour des analyses d'expression quantitative : Linéarité, résolution, seuil de détection, alignement	détecteur spécifique	Confirmer la résolution ; enregistrer la linéarité ; Seuil de détection de graphique et CV
Quotidienne pour quantitatif ; ou hebdomadaire	CQ Quantum (n°725)	Pour les analyses qualitatives ; linéarité, résolution, seuil de détection, alignement	Tous les lasers/ détecteurs	Confirmer la résolution ; enregistrer la linéarité ; Seuil de détection de graphique et CV
Hebdomadaire	Norme de délai (n°830)	Vérification du délai	Délai entre le laser 1 (488 nm) et le laser 2 (635 nm)	Confirmer le délai

Un programme basique tel que celui de la *Figure 7* assure la surveillance de l'ensemble du système, c'est-à-dire l'optique (lasers, détecteurs, alignement de cellules de flux), la fluïdique (observation des débits, confirmation de la temporisation) et l'informatique associée. L'enregistrement des valeurs de certains paramètres dans les diagrammes de Levey Jennings peut facilement confirmer une performance satisfaisante ou aider à identifier les erreurs aléatoires (bruit électronique, bulles d'air, etc.) et les erreurs systémiques (biais, changements et tendances dus aux fluctuations de température) détérioration du laser, désalignement, etc.) afin que des mesures correctives puissent être prises. Des seuils peuvent être développés pour une surveillance attentive (A) ou intervention (B), *figure 7*.

**Figure 7 :** Exemple de graphique de Levey Jennings pour un seul canal de fluorescence



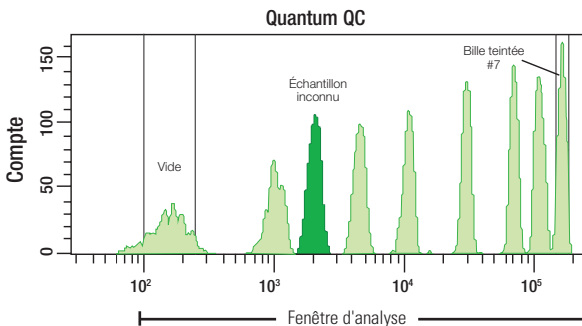
1. Green CL, Brown L, Stewart JJ, Xu Y, Litwin V, McCloskey TW. (2011) Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: I instrumentation. *J Immunol Methods*; 363(2):104-119.
2. Perfetto SP, Ambrozak D, Nguyen R, Chattopadhyay P, Roederer M. (2012) Quality assurance for polychromatic flow cytometry using a suite of calibration beads. *Nature Protocols*; 7(12):2067-2079.
3. Turner KL. *Instrument Qualification, QC and Standardization. The Latex Course, September 2012.*
4. *United States Pharmacopeia, Chapter <1058>, Analytical Instrument Qualification, Rockville, USA, 2008.*

## CONFIGURATION STANDARDISÉE DES INSTRUMENTS

Bien que la nature extrêmement sensible des cytomètres de flux permette l'analyse de particules microscopiques (ou plus petites) et faiblement fluorescentes, elle les rend également sensible aux changements les plus subtils dans les échantillons de cellules, le fonctionnement des instruments et l'environnement de laboratoire. Pour ces raisons, il est impératif que la configuration et les conditions de fonctionnement de l'instrument soient normalisées autant que possible et que des matériaux de référence appropriés soient utilisés pour les tests et les analyses.

L'utilisation de billes de référence peut améliorer les différences de distance, d'échelle relative et d'unités de rapport, ainsi que les fluctuations quotidiennes dues au bruit électronique, à la température ambiante et à l'humidité. Par exemple, un CQ Quantum™ peut être utilisé pour configurer tous les détecteurs en positionnant un pic spécifique à une valeur de canal cible pertinente.

**Figure 8 :** Utilisez le CQ Quantum™ pour définir la fenêtre d'analyse, c'est-à-dire les limites supérieure et inférieure de fluorescence.

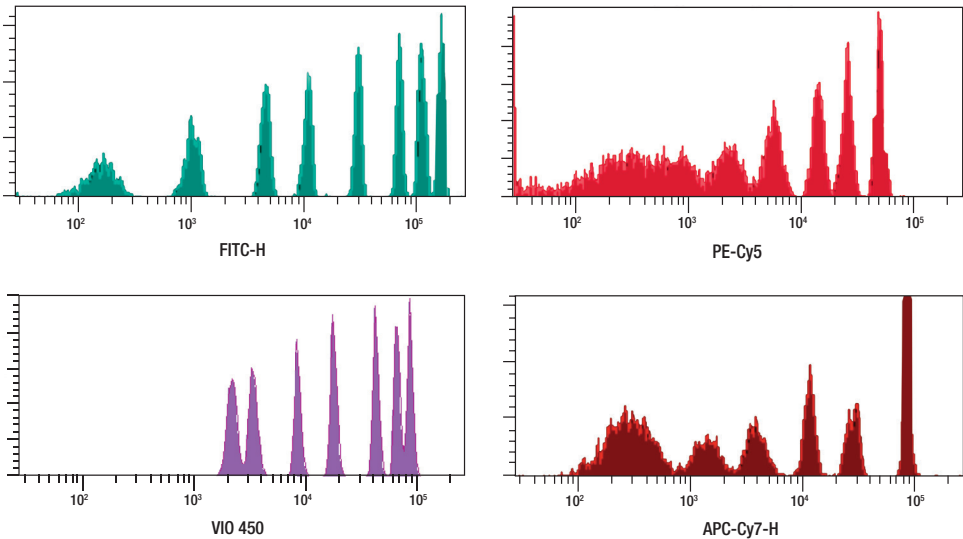




**Tableau 2 :** Produits pour la configuration des instruments

Numéro de catalogue	PDS	Nom	Nb billes	Fluorescence
725	725	CQ Quantum™	8	Spectre complet + vide
885	885	Full Spectrum™	1	Spectre complet
512, 515, 518, 521	510	Right Reference Standards	1-3	FITC, PE, PE-Cy™5 ou APC
Voir tableau 5	890	Fluorescence Reference Standards	1	Voir page 13

**Figure \* :** Histogrammes CQ Quantum™



1. Purvis N, Stelzer G. (1998) Multi-platform, multi-site instrumentation and reagent standardization. *Cytometry*; 33(2):156-65.

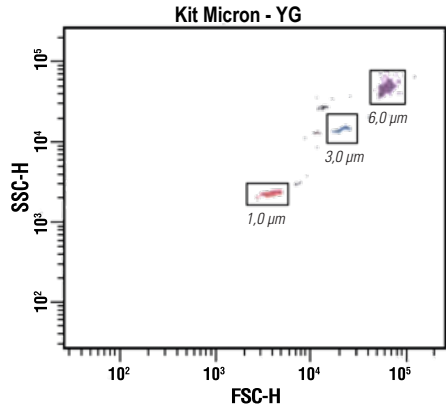
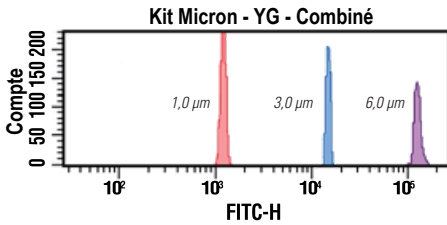
**VOIR LA SECTION COMPENSATION (PAGE 10) POUR LA CONFIGURATION RELATIVE À LA COMPENSATION** 

## CONFIGURATION D'INSTRUMENT : PETITES PARTICULES

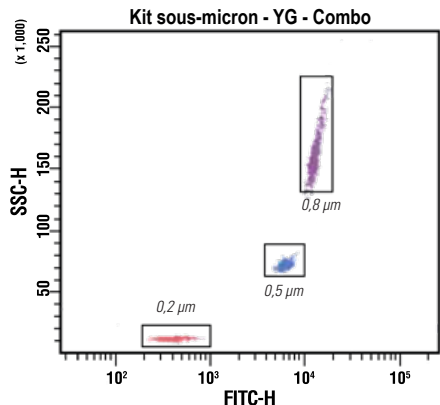
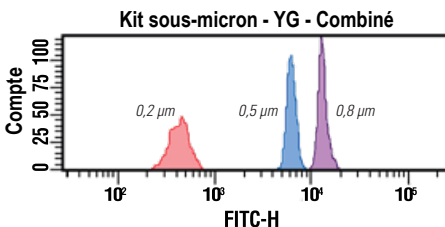
Les applications actuelles de cytométrie en flux vont au-delà de l'analyse des lymphocytes et poussent les cytomètres jusqu'à leurs limites de détection de la taille des particules et de la fluorescence. Les analyses de petites particules, y compris les microparticules, microvésicules ou espèces microbiennes dérivées des plaquettes et de l'endothélium, nécessitent des processus modifiés et une configuration d'instrument spécialisée. Nos kits d'étalonnage fluorescents à petites billes peuvent vous aider à :

- déterminer la limite de détection de taille d'un instrument ;
- évaluer les particules de fond et mettre au point des procédés préparatoires modifiés (p. ex. filtration des fluides)
- calibrage de petites particules
- affiner les réglages de l'instrument (seuil, PMT, extension de fenêtre)

**Figure 10 :** Kit d'étalonnage de billes micron - Paramètres LSRII FSC  
log 10 - Seuil 200  
FSC log 536 - Seuil 200  
SSC log 247 - Seuil 200  
FITC log 346 - Seuil 200

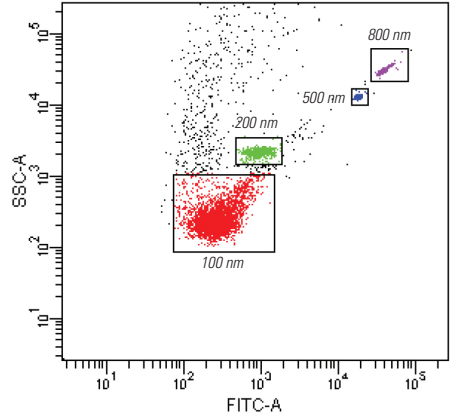
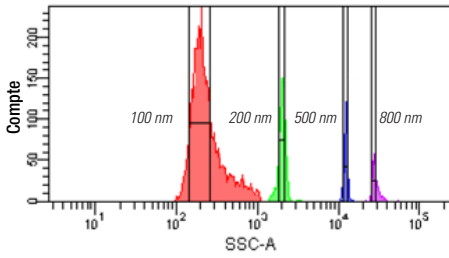


**Figure 11 :** Kit d'étalonnage de billes sous-micron - Paramètres LSRII  
FSC log 500 - Seuil 200  
SSC log 494 - Seuil 200  
FITC log 587 - Seuil 200



**Figure 12 :** Kits d'étalonnage nano-billes (100 nm) et sous-micron - Paramètres BD FACSCanto II

SSC log 500 - Seuil 200  
 FITC log 650 - Seuil 300  
 Extension fenêtre Événements 2.0 : 5000



**Tableau 3 :** Kits d'étalonnage petites billes

Numéro de catalogue	PDS	Nom	Diamètres nominaux
833	832	Kits d'étalonnage billes micron	1,0 µm, 3,0 µm, 6,0 µm
832	832	Kits d'étalonnage billes sous-micron	0,2 µm, 0,5 µm, 0,8 µm
834	834	Kit d'étalonnage nano-bille	50 nm, 100 nm

1. Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR. (2016) Fluorescence triggering: a general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry*; 89(2):184-95.
2. Kong F, Zhang L, Wang H, Yuan G, Guo A, Li Q, Chen Z. (2015) Impact of collection, isolation and storage methodology of circulating microvesicles on flow cytometric analysis. *Exp Ther Med*; 10(6):2093-2101.

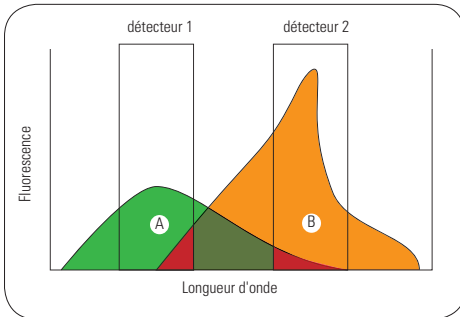
## CONFIGURATION D'INSTRUMENT : COMPENSATION

En raison de la nature du cytomètre (détection sensible, ensembles de filtres spécifiques) et des fluorophores eux-mêmes (larges bandes d'émission), la fluorescence déborde généralement dans des régions situées au-delà de celles couvertes par le détecteur prévu. Le report le plus prononcé a tendance à se faire dans les plus grandes longueurs d'ondes (c'est-à-dire qu'il est décalé vers le rouge), bien qu'il soit souvent observé dans une moindre mesure à des longueurs d'ondes plus courtes.

Les analyses multicolores nécessitent la correction du chevauchement spectral pour chaque fluorochrome et détecteur. La compensation est réalisée en soustrayant électroniquement le pourcentage de signal de fluorescence équivalent au report.

Une compensation adéquate nécessite des matériaux de référence représentant les combinaisons *réelles* de cellules colorées avec des fluorophores. Bangs propose à la fois des microsphères et des microsphères appariées aux fluorophores avec groupes de capture Abs ou fonctionnels pour le marquage avec des fluorophores réactifs ou des conjugués anticorps fluorescents. La figure 14 illustre l'utilisation des normes de microsphère pour développer une matrice de compensation.

**Figure 13 :** Report de fluorescence



À l'aide de la compensation, la fluorescence de report est « soustraite » électroniquement des détecteurs non intentionnels afin que le signal mesuré soit aussi pur que possible. Cette figure illustre le transfert du fluorophore A dans le détecteur fluorophore B, ainsi que le transfert du fluor B dans le détecteur fluor A. Une matrice de compensation pourrait être :

Fluor A – 2% Fluor B

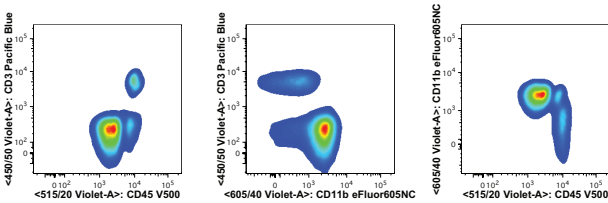
Fluor B – 1% Fluor A

**Tableau 4 :** Produits norme de compensation

Numéro de catalogue	PDS	Produit	Liants
820	820	Norme de compensation FITC/PE	Pré-étiqueté avec FITC/PE
Voir page 13	890	Fluorescence Reference Standards	Pré-étiqueté avec fluor désigné page 13
550-552, 556	850	Normes de compensation Simply Cellular®	IgG de souris, de rat ou d'humain, comme indiqué
835	835, 850	Anti-souris Simply Cellular® pour laser violet	IgG de souris
553-554	854	Protéine A, billes de liaison anticorps protéine G Billes liantes	Voir PDS 854 pour les affinités IgG
450-451	853	Normes de compensation de colorant de viabilité	Colorants réactifs aux amines

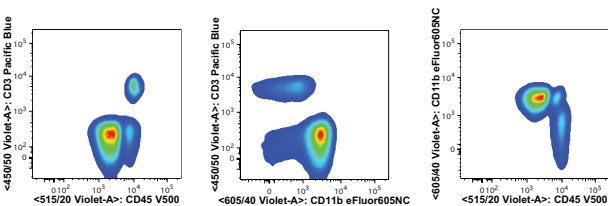
**Figure 14 :** Matrice de compensation - la bille IgG anti-souris *Simply Cellular®* pour laser violet produit des données comparables lorsque comparées à des cellules.

Compensé avec : Billes colorées violettes



Détecteurs	Valeur (%)
515/20 Violet - 450/50 Violet	32,6
605/40 Violet - 450/50 Violet	3,06
450/50 Violet - 515/20 Violet	7,42
605/40 Violet - 515/20 Violet	33,51
450/50 Violet - 605/40 Violet	0,05
515/20 Violet - 605/40 Violet	0,05

Compensé avec : Cellules colorées



Détecteurs	Valeur (%)
515/20 Violet - 450/50 Violet	31,93
605/40 Violet - 450/50 Violet	0,00
450/50 Violet - 515/20 Violet	6,86
605/40 Violet - 515/20 Violet	32,06
450/50 Violet - 605/40 Violet	0,16
515/20 Violet - 605/40 Violet	0,09

1. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA, Roederer M. (2006) Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods*; 313(1-2):199-208.
2. Turner K, Isaiah S, Schretzenmair R, Tijerina J, Bantly A. (2011) Novel compensation standard for the violet laser. *CYTO*, Baltimore, MD, May 21-25, 2011. ([www.bangslabs.com](http://www.bangslabs.com))

## PREPARATION D'ECHANTILLON STANDARDISÉ

---

L'immunophénotypage classique implique une préparation assez simple des échantillons. Après le prélèvement de l'échantillon de sang, il peut y avoir une étape d'appauvrissement ou d'enrichissement (par exemple par centrifugation par densité, lyse des GR, particules magnétiques revêtues d'anticorps [par exemple des particules anti-leucocytes BioMag®]), en plus de la fixation et de la coloration. Bien que les étapes spécifiques puissent être routinières, la préparation des échantillons doit être soigneusement conçue et normalisée en tant que processus cellulaires, l'expression de certains marqueurs, la viabilité des cellules, la numération des microvésicules et la distribution de la taille peuvent être sensibles à la température, aux fixateurs, aux agents de lyse, etc. Les changements des conditions de manipulation ou de stockage peuvent entraîner des modifications des échantillons et des données résultantes.

En tant que note supplémentaire sur la préparation des échantillons, la sélection des fluorophores est un facteur important, dans lequel les marqueurs à faible expression sont marqués avec des fluorochromes lumineux et ceux qui expriment à des niveaux élevés sont marqués avec des rapporteurs plus sombres. La taille du rapporteur fluorescent doit également être prise en compte dans le contexte d'effets stériques potentiels (par exemple, PE MW 260,000 ; FITC MW 389), stabilité, liaison non spécifique et chevauchement spectral. (Voir tableau 5)

1. Aasebo E, Mjaavatten O, Maudel M, Farag Y, Selheim F, Berven F, Bruserud O, Hernandez-Valladares. (2016) Freezing effects on the acute myeloid leukemia cell proteome and phosphoproteome revealed using optimal quantitative workflows. *J Prote. Mics*; Epub Apr. 20.
2. Stewart JC, Villasmil ML, Frampton MW. (2007) Changes in fluorescence intensity of selected leukocyte surface markers following fixation. *Cytometry A*; 71:379-385.
3. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, Ethridge S, Palini A, Vogt R, Waxdal M, Fleisher T, Noguchi PD, Marti GE. (1992) Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry*; 13(1):68-74.
4. Kong F, Zhang L, Wang H, Tuan G, Guo A, Li Q, Chen Z. (2015) Impact of collection, isolation and storage methodology of circulating microvesicles on flow cytometric analysis. *Exp Ther Med*; 10(6):2093 - 2101.
5. Edinger M. *Multicolor Flow Cytometry: Principles of Panel Design*. BD Biosciences.
6. Maecker H, Trotter J. *Selecting Reagents for Multicolor Flow Cytometry*, Application Note. BD Biosciences, 2009.

Les normes de référence de fluorescence à une couleur sont marquées avec des fluorochromes spécifiques pour présenter les mêmes caractéristiques spectrales que les cellules marquées. Elles peuvent être utilisés pour contrôler un chemin spécifique du système optique, optimiser les jeux de filtres pour les fluorophores et établir une valeur de canal cible spécifique au test pour la configuration de l'instrument.

#### Spectre visible



**Tableau 5 :** Produits de spectre de référence de fluorescence

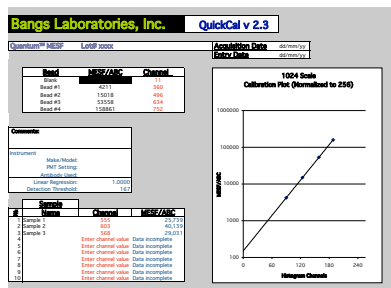
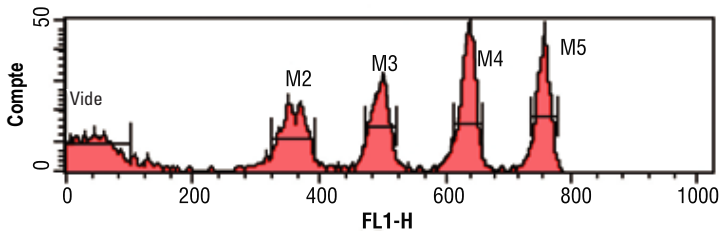
Numéro de catalogue	Description	MW	Excitation (nm)	Émission (nm)	Objectif
890	Certified Blank™				référence
897	Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
886	Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugué
887	Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugué
901	Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugué
914	APC-Cy™7	104k	650	767	conjugué
898	Chlorophylle ( <i>a + b</i> )	8014 (a) 907 (b)	430,453	642,662	pigment végétal
895	Cy™5	792	649	666	conjugué
906	DAPI	277	350	470	DNA (A-T)
913	Far-Out Red	-	475,590	663	référence
891	Fluorescéine	389	495	519	conjugué
894	Hoechst 33342	616	346	375,390	dsDNA
916	Pacific Blue™	339	410	455	conjugué
899	PE (R-Phycoérythrine)	240k	480, 565	578	conjugué
908	PE-Cy™5	240k	480,565,650	670	conjugué
889	PE-Cy™7	240k	480	767	conjugué
909	PE-TR	240k	480,565,650	670	conjugué
892	Iodure de propidium	668	536	617	intercalateur ADN
905	T.M. Rhodamine (TRITC, TAMRA)	430	557	576	conjugué
893	Texas Red® (Sulforhodamine)	625	589	615	conjugué
915	Violet Laser (Glacial Blue)	-	360	450	référence

## ESSAIS QUALITATIFS ET QUANTITATIFS

De nombreux essais d'immunophénotypage sont de nature qualitative. Pour ces types d'études, les cellules sont colorées pour un certain marqueur et le décalage d'une population non colorée est utilisé pour déterminer l'expression relative (faible, moyenne, élevée) ou la présence du marqueur en général (positivité). Dans ces types d'études, les normes de billes peuvent être utilisées pour définir la fenêtre d'analyse et servir de points de référence pour la comparaison des résultats. (voir page 6-7).

Certaines applications nécessitent une véritable quantification des marqueurs de surface cellulaire, des protéines intracellulaires, etc., comme dans les essais pharmaceutiques déterminant les changements dans les niveaux d'expression ou la distribution des marqueurs cellulaires en réponse à l'administration d'un médicament particulier. Pour ces types d'études d'expression, des kits tels que Quantum™ MESF et Quantum™ Simply Cellular® (QSC) permettent la quantification du signal de fluorescence, et par extension, la détermination de l'anticorps se liant au marqueur de surface ou protéine exprimée. Pour en savoir plus sur ces systèmes, consultez notre littérature sur la cytométrie quantitative à fluorescence.

Figure 15 : Histogramme Quantum MESF et modèle d'analyse QuickCal





**Tableau 6 :** Produits de cytométrie quantitative

<b>Numéro de catalogue</b>	<b>Description</b>	<b>Fluorophore</b>	<b>MW</b>
821	Quantum MESF Pacific Blue™	Pacific Blue™	274,13
488	Quantum MESF Alexa Fluor® 488	Alexa Fluor® 488	643
555, 555p	Quantum MESF FITC-5	FITC	389
827	Quantum MESF R-PE	PE	240k
828	Quantum MESF PE-Cy™5	PE-Cy™5	240k
822	Quantum MESF Cy™5	Cy™5	792
647	Quantum MESF Alexa Fluor® 647	Alexa Fluor® 647	1300
823	Quantum MESF APC	APC	104k
<b>Numéro de catalogue</b>	<b>Description</b>	<b>Anticorps de capture</b>	<b>Liants</b>
815	QSC anti-souris IgG (Fc)	anti-souris IgG (spécifique Fc)	Souris mAb (Fc)
816	QSC anti-rat IgG (Fc)	anti-rat IgG (spécifique Fc)	Rat mAb (Fc)
817	QSC anti-humain IgG (Fc)	anti-humain IgG (spécifique Fc)	Humain mAb (Fc)

1. Maecker HT, Trotter J. (2006) *Flow cytometry controls, instrument setup and the determination of positivity. Cytometry; 69A:1037-1042.*
2. Randlev B, Huang L-C, Watatsu M, Marcus M, Lin A, Shih S-J. (2010) *Validation of a quantitative flow cytometer assay for monitoring HER-2/neu expression level in cell-based cancer immunotherapy products. Biologicals; 38(2):249-259.*



Les commandes peuvent être passées par téléphone (317-570-7020 ou 800-387-0672), par fax (317-570-7034), par le site Web ou par courrier électronique (info@bangslabs.com). Si vous préférez, vous pouvez également passer commande directement auprès de l'un de nos distributeurs. En termes de moyens de paiement, les commandes peuvent être passées en utilisant un bon de commande ou une carte de crédit (Visa ou MasterCard). Le paiement doit être en dollars américains par chèque (chèque) tiré sur une banque américaine ou par virement bancaire.

### **Quelques autres produits pouvant vous intéresser :**

**Analyse de cycle de cellule**

**Analyse de microparticule**

**Estimation de taille**

**Normes d'imagerie**

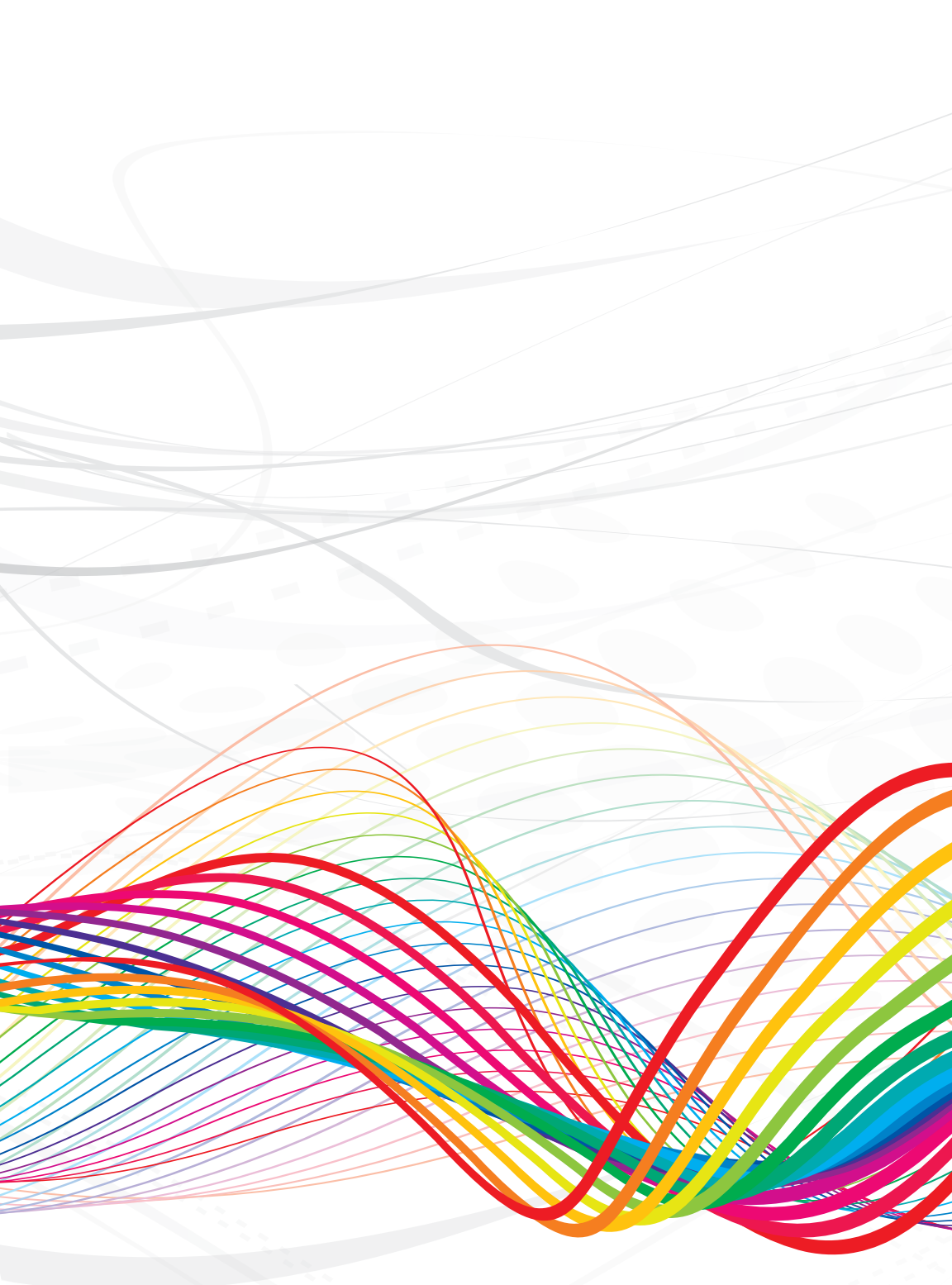
**Normes de viabilité de cellule**

**Normes de concentration**

**Nous sommes là pour vous aider, n'hésitez pas à nous contacter.**

©2014-2019 Printed 2019 r.9





**Bangs Laboratories, Inc.**

9025 Technology Dr. • Fishers, IN 46038-2886

800.387.0672 • 317.570.7020 • [www.bangslabs.com](http://www.bangslabs.com)