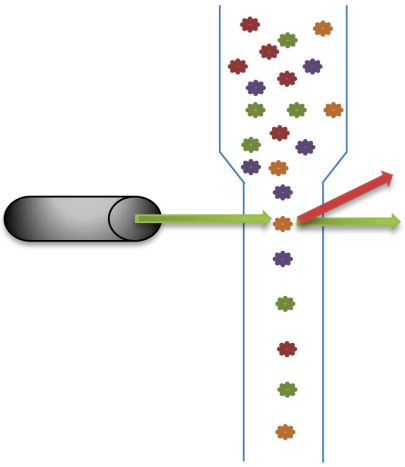
Cytométrie de flux

Technique récente (15ans) qui permet l'analyse une par une de cellules **isolées** et **en suspension** entraînées dans un **flux liquide à grande vitesse** et défilant devant **une source lumineuse** (laser). C'est une technique rapide permettant une caractérisation :

- Individuelle de chaque cellule
- Quantitative (analyse de million de cellules)
- Qualitative et Multiparamétrique (morphologie cellulaire et phénotypage)

Principe



- On injecte un liquide pour créer une « veine liquide » → Création flux laminaire permettant aux cellules en suspension de passer une à une devant un laser
- Les cellules passent devant un laser
- Récupération de la fluorescence émise par les cellules marquées
- Analyse des résultats à l'ordinateur

Fluorescence : marquage préalable des cellules étudiées

1) Immunomarquage direct = Ac directement couplé à un fluorochrome

2) Immunomarquage indirect = utilisation de 2 Ac
- Ac primaire anti-antigène cellulaire
- Ac secondaire anti-Ac primaire couplé à un fluorochrome

Deux fluorochromes importants : FITC (fluorescéine) → vert, EP (phycoérythrine) → rouge

3) Sonde d'acide nucléique, intercalant de l'ADN pour visualiser les différentes phases du cycle cellulaire

4) Sonde calcique pour visualiser les flux calcique

5) Création d'une protéine hybrides. Association du gène de la GFP (fluorochrome) au gène de la protéine cible. Formation d'un transgène qui exprimera la protéine hybride.

La **cytométrie polychromatique** c'est l'utilisation de plusieurs marqueurs pour une identification cellulaire la plus précise

Système optique

Trajet optique jalonné par deux filtres :
1) Miroirs dichroïques passe bas et passe haut pour dévier la trajectoire et séparer les différentes longueurs d'onde
2) Filtres bande passe, devant le détecteur, qui améliorent la spécificité de la longueur d'onde

Système électronique

Le photon est capté par le photomultiplicateur qui engendre un signal électrique

Présentation des résultats

1) Présentation monoparamétrique
Histogramme avec 2 courbes
Ordonné = nombre de cellules
Abscisse = intensité de fluorescence

2) Présentation biparamétrique
Représentation de **2 intensités** de fluorescence l'une par rapport à l'autre par un nuage de points (chaque point correspond à une cellule)

3) Présentation multiparamétrique en 3D

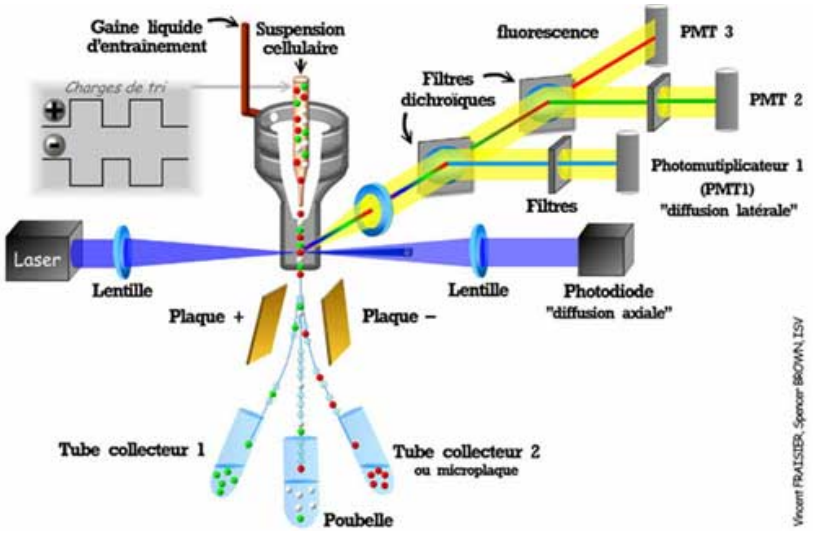
Applications

1) Pour la recherche fondamentale

a) Trieur cellulaire

But : Permet de récupérer une population précise de cellules

Principe : En fonction de l'analyse de la fluorescence (analyse du phénotype), le flux liquidien soumis à un piezo électrique se transforme en gouttelettes (avec 1 cellule) fines chargées + ou – . Deux plaques électriques l'une + l'autre – permettra de récupérer les gouttelettes dans différents collecteurs



b) Analyse du cycle cellulaire

Analyse du cycle cellulaire grâce à des **marqueurs de l'ADN** (coloration intercalant)
Utiliser en cancérologie

c) Test d'activation in vitro

Etudie le **niveau d'action** in vitro des lymphocytes CD3+ (= lymphocytes T) après l'ajout d'un **stimulus infectieux ou vaccinal.**

d) Kit de dosage des cytokines

Dosage de molécules en suspension (ex : cytokines) à partir d'un faible volume de sang. Permettant de déterminer le profil immunologique Th1/Th2.

Principe :

- Billes recouvertes d'Ac de capture
- Dosage simultané de plusieurs molécules en suspension
- Révélation via des Ac secondaires fluorescents

e) Test de prolifération au CFSE

Etude de la **division cellulaire** des LT.

Principe :
1) Incubation cellulaire en présence de CFSE (colorant cytoplasmique)
2) 1er passage dans le cytomètre
3) Remise en culture
4) Nouveaux passages

Résultats :

- Aucune anomalie : division cellulaire normale avec dilution du colorant → Les pic de fluorescence sont de + en + petit
- Anomalie de la division : Pas de division cellulaire → persistance du pic initial

f) Mort cellulaire en cytométrie de flux

Identifier à quel **stade de l'apoptose** se trouve l'anomalie qui **bloque** ou **suractive** les voies apoptotiques.
But : Comprendre la physiopathologie du **dérèglement apoptotique** et développer des **thérapies ciblées**

2) Applications cliniques : Suivi de l'état immunitaire des patients

a) Comptage des LT dans le suivi des infections HIV et des greffes

But : séparer les différentes populations de leucocytes en fonctions de leurs marqueurs :
CD3 : LT (progéniteurs)
CD4 : LT helper
CD8 : LT cytotoxique
CD19 : LB
CD14-15 : Monocytes/ macrophages + CD
CD16 : PNN
→ Obtention du % de chaque population

b) Applications diagnostiques, pronostiques et de suivi des **hémopathies malignes**

Ex : **Leucémie Lymphoïde Chronique** → marqueur d'intérêt **CD38 sur les LB**. LB CD38+ quasi inexistant chez les patients sains mais présents chez les patients atteints de LLC.

c) Etude du phénotype MDR (multi Drug Resistant) en clinique

En cas de résistante des cellules cancéreuse aux **chimiothérapies**.

Principe : Coloration des cellules cancéreuses à la **rhodamine**

Résultats

- Intensité de couleur diminue → rhodamine efflué (cellule résistante)
- Intensité constante → Pas de phénotypage MDR