

# Cytométrie en flux

## I. Définition

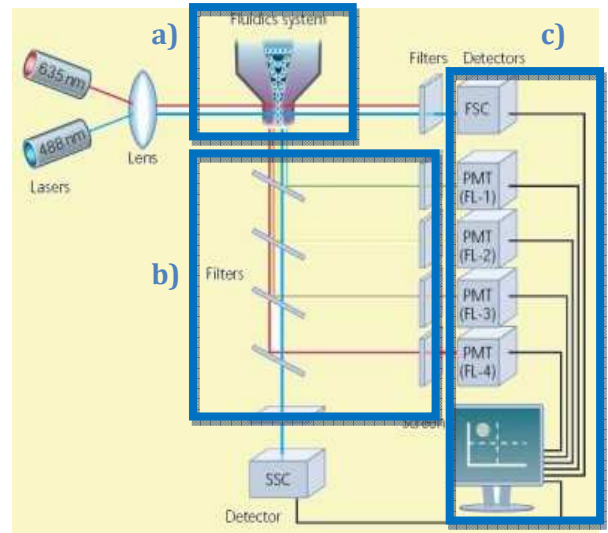
La cytométrie en flux permet l'étude précise de C isolées entraînées les unes derrière les autres dans un flux liquide et analysées une par une en défilant à grande vitesse (plus de 30Km/h) devant une source lumineuse (laser).

L'intérêt est la rapidité qui permet une caractérisation :

- **Individuelle** de chaque cellule
- **Quantitative** (intérêt statistique)
- **Qualitative** (morphologie de la cellule et phénotypage)

## II. Composition du cytomètre

Globalement on a un système qui permet l'étude de l'échantillon (une seule cellule) à travers ses caractéristiques optiques.

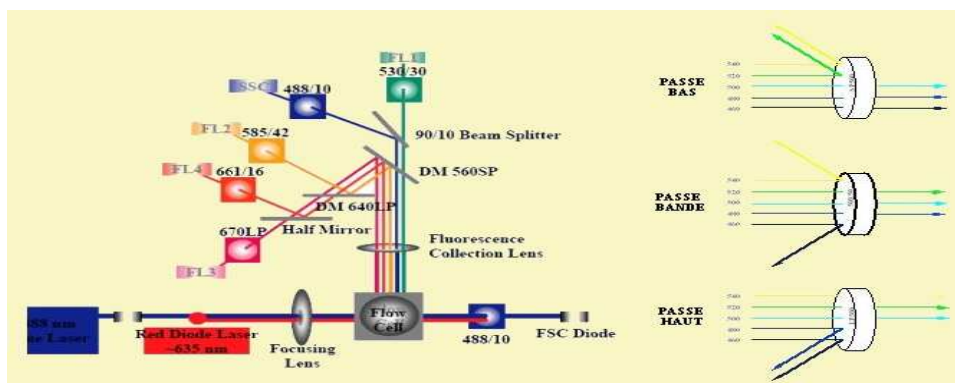


### a) Système fluidique

Il permet la focalisation hydrodynamique en créant un **flux laminaire** qui oblige les cellules en suspension à passer **une à une devant le laser**. NB : le prof est passé très vite sur la planche de ce système, le mécanisme hydrodynamique n'est pas à savoir, il faut juste comprendre l'intérêt.

### b) Système optique

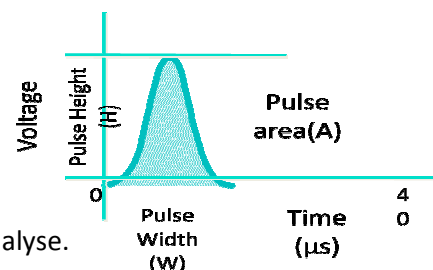
C'est le système central, le plus important. Il y a un ensemble de miroirs qui vont soit laisser passer soit réfléchir les rayons suivant leur  $\lambda$ , ce qui permet de séparer les excitations. Il y a des miroirs passe-bas (laisse passer les  $\lambda$  basses), passe-haut et passe-bande (certaine gamme de  $\lambda$ ).



### c) Système électronique

Il permet la conversion des signaux optiques en signaux électriques par les PMT (photomultiplicateurs). En fonction du temps de passage devant le laser, un signal électrique gaussien est enregistré. L'étude des paramètres de ce signal (notamment l'aire sous la courbe) nous informe sur la taille de la cellule.

L'ensemble des données est récupéré par informatique, grâce à un logiciel d'analyse.



### III. Paramètres utilisés & Représentation

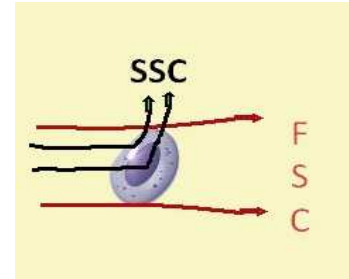
La représentation des résultats se fait sous forme de graphique dans lequel chaque point correspond à l'enregistrement des données cytométriques d'une seule cellule.

#### a) Morphologie de la cellule par mesure des phénomènes de diffusion lumineuse :

2 paramètres qui ne font pas intervenir d'immunomarquage de la cellule nous permettent déjà d'identifier des familles de cellules suivant leur **taille** et leur **granularité**.

- **Forward Scatter (FSC)** : la lumière diffractée est collectée sous un petit angle (1 à 10°). Le signal est relatif à la **taille de la cellule**.

- **Side Scatter (SSC)** : la lumière est collectée à 90° de l'axe du laser. Le signal est relatif à la **granularité de la cellule** (densité).



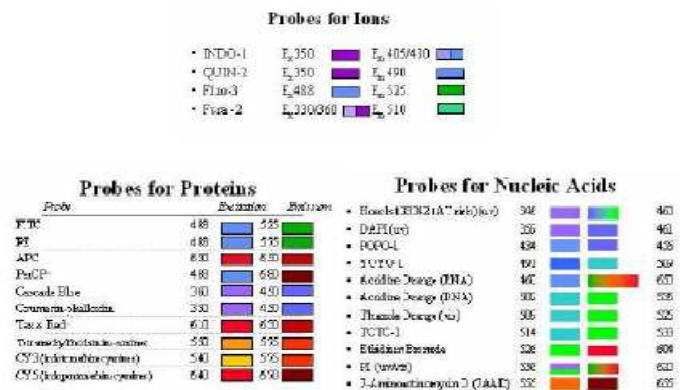
#### b) Mesure de signaux de fluorescences

Ce 2<sup>ème</sup> type de mesure fait intervenir les **phénomènes d'excitation/fluorescence**. On a à disposition tout une gamme de fluorochromes qui possèdent des spectres d'excitation et d'émission caractéristiques.

Si l'on couple l'un de ces fluorochromes (FL1, FL2...etc) à un anticorps spécifique d'un antigène que l'on recherche dans notre population de cellules étudiées, on va pouvoir identifier chacune des cellules en possession de l'antigène.

Les sondes fluorescentes les plus connus sont **ces sondes protéiques (FITC et PE)**.

Il existe aussi de **sondes ioniques** qui permettent de mesurer des flux ioniques (car la fluorescence est fonction de la concentration ionique)



Les cytomètres permettent même des **analyses multiparamétriques** en utilisant plusieurs fluorochromes (jusqu'à 17) et donc plusieurs sources lumineuses d'excitation.

Cependant, il peut y avoir des phénomènes de recouvrement des spectres d'émission donc il existe des **systèmes de compensation** qui vont permettre d'éliminer les signaux issus de mauvais fluorochromes. D'où l'importance du choix des fluorochromes.

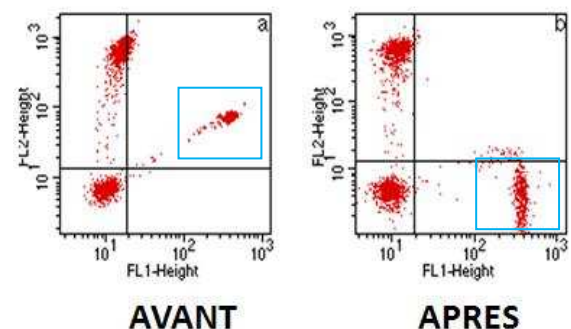
Sur la photo ci-contre on voit une population de cellule qui est FL1 et FL2 positive. Or après compensation (en utilisant des formules comme FL2 - %FL1) on se rend compte que cette population n'est en fait que FL1 positive !

NB : la ligne horizontale caractérise le seuil de positivité FL2 tandis que la ligne verticale caractérise le seuil de positivité FL1.

On a donc 4 zones :

FL1-/FL2+ FL1+/FL2+

FL1-/FL2- FL1+/FL2-



FL2 - %FL1

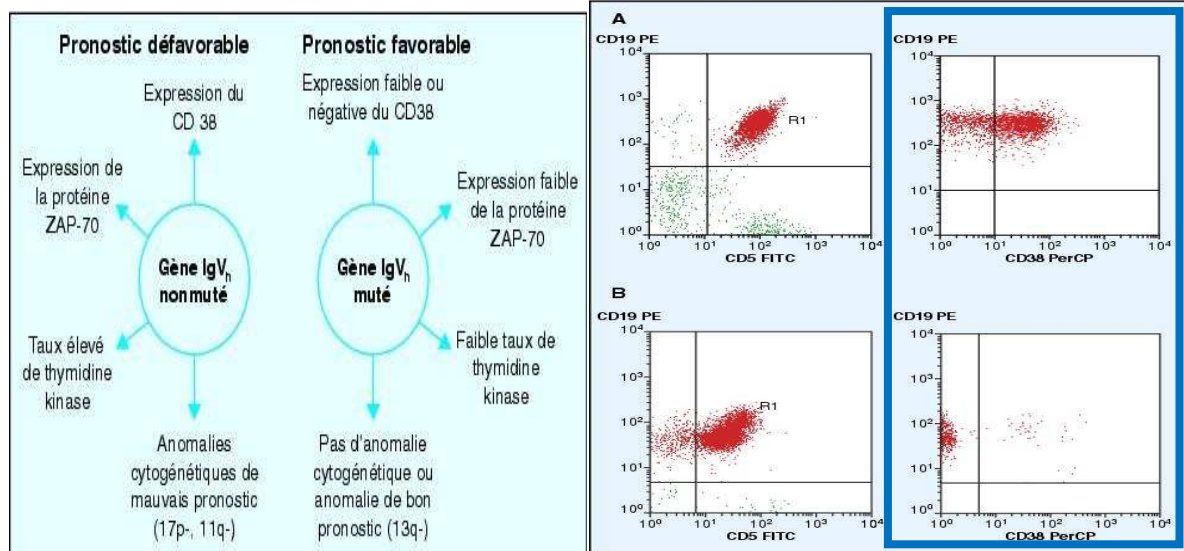
## IV. Applications

Les applications sont multiples, de l'ordre de la routine ou de la recherche.

### a) Immunophénotypage

Il est basé sur le principe du couplage du fluorochrome sur un AC spécifique d'un AG.

Dans la leucémie lymphoïde chronique, le pronostic dépend des sous-populations qui prolifèrent. On a donc des sous-groupes de maladies, de pronostic différents.



On recherche, avec un fluorochrome PerCP couplé à un AC spécifique, la surexpression (ou non) de l'antigène CD38. Sur les 2 tests de droite, si l'on regarde en abscisse on peut voir :

- en haut, une population qui est CD38 positive (gène non-muté), entraînant un diagnostic défavorable.
- en bas, une population CD38 négative (gène muté), donnant le diagnostic favorable.

### b) Le phénotypage MDR

Cette fois on s'intéresse au phénotype MDR que l'on retrouve dans les cancers du sein. Ce phénotype correspond à la présence d'une pompe au sein de la cellule cancéreuse qui augmente l'efflux ionique. Ici, on met nos cellules dans une solution fluorescente de Rhodamine 123 et on recherche la présence de Rho123 cellulaire grâce à la cytométrie. On obtient :

	MDR hétérozygote (Cas n°1)	MDR négatif (Cas n°2)	MDR homozygote (Cas n°3)
Présence de la pompe	+/-	--	++
Rho123 ds les cellules :			
- avec verapamil (ICA, bloqueur de pompe)	++	++	++
- sans verapamil	--	++	-/+ (car pompes nbeuses)

Si l'on part de l'hypothèse **cancer = « pompe MDR » = absence de Rho123 cellulaire**, grâce à la cytométrie on peut donc voir l'activité des pompes (en présence ou non d'inhibiteur) et en déduire le phénotype MDR (ainsi que le génotype si l'on s'attache au quantitatif).

NB : en plus de cela, on peut mesurer l'efficacité des inhibiteurs (vérapamil) par cette mesure de la rétention de rhodamine.

#### Etude du phénotype MDR en clinique

CD3+ CD56+ non-Hodgkin's lymphomas with an aggressive behavior related to multidrug resistance.  
Drénou, B ; Blood, 1997

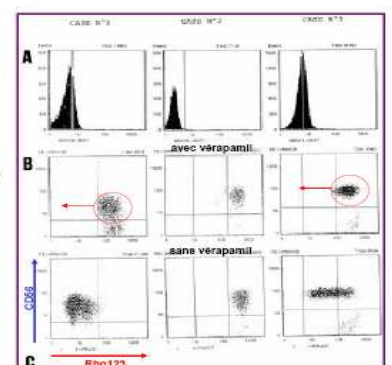


Figure 4. MDR expression. (A) Rho123 expression on human cells in the three cases according to MDR1 status. Vertical axis shows the level of the isotype control IgG2A. RU: Effect of Rho123 on cell fluorescence after 30 min of incubation at 37°C. (B) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (C) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (D) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (E) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (F) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (G) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (H) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (I) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (J) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (K) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (L) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (M) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (N) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (O) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (P) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (Q) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (R) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (S) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (T) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (U) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (V) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (W) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (X) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (Y) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C. (Z) Rho123 expression on cells after incubation with verapamil at 37°C.

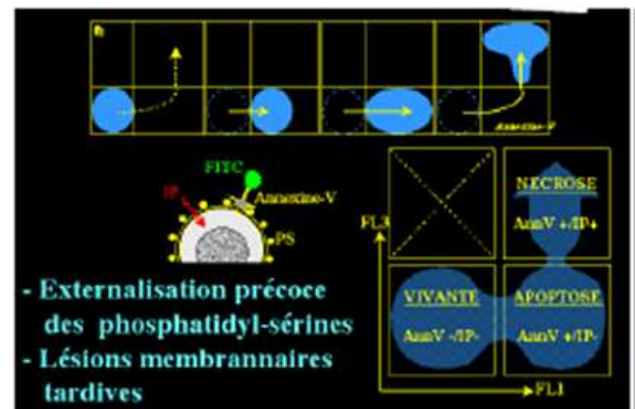
### c) Kit de dosage de cytokines

Constitué de multiples fluorochromes couplés aux AC spécifiques des cytokines, ce kit permet de réaliser un dosage rapide de molécules en suspension et donc de déterminer le profil TH1 ou TH2 d'une cellule T par la révélation de l'ensemble des cytokines de son environnement.

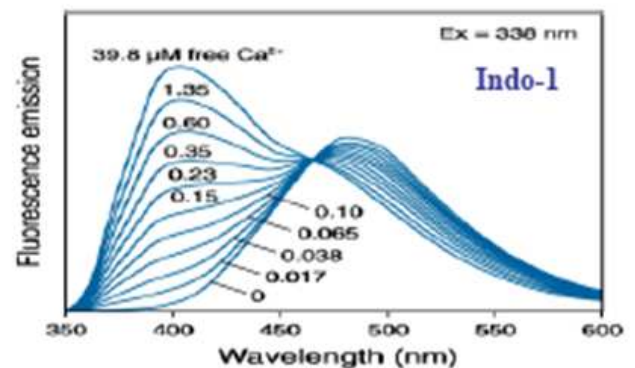
### d) Analyse de l'apoptose

L'apoptose met en jeu différents acteurs au cours de différentes phases. La cytométrie en flux, permet de suivre cette évolution en s'intéressant :

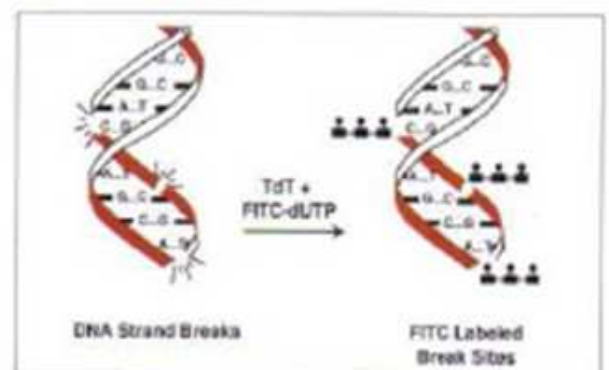
- aux **récepteurs apoptotiques**
- à la **concentration en Cyt C et APAF-1** +++
- au **potention mitochondrial**
- à l'activation des **caspases**
- aux **changements morphologiques**....
- à l'**exposition de la phosphatidyl-sérine** en utilisant une analyse bi-paramétrique composée de l'**Annexine V** qui se fixe à la PS + un colorant vital, le **7-AAD** qui ne se fixe que lorsque la cellule entre en apoptose et non en nécrose +++ (voir planche apoptose précoce)



- à l'**augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire** grâce par exemple à la sonde Fluo-3(ou Indo-1) spécifique du  $\text{Ca}^{2+}$  et qui a un spectre variable en fonction des concentrations.



- à la **fragmentation de l'ADN** (pic sub-G1) en utilisant la **méthode TUNEL** qui consiste à incorporer dans l'ADN des nucléotides couplés à un fluorochrome. (on obtient des fragments d'ADN fluorescents caractérisant l'apoptose tardive) +++





### e) Etude du stress oxydant :

Grâce à une enzyme particulière (**la DCF**) qui devient fluorescente (verte) après contact avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  on peut doser les formes d'oxygènes libres.

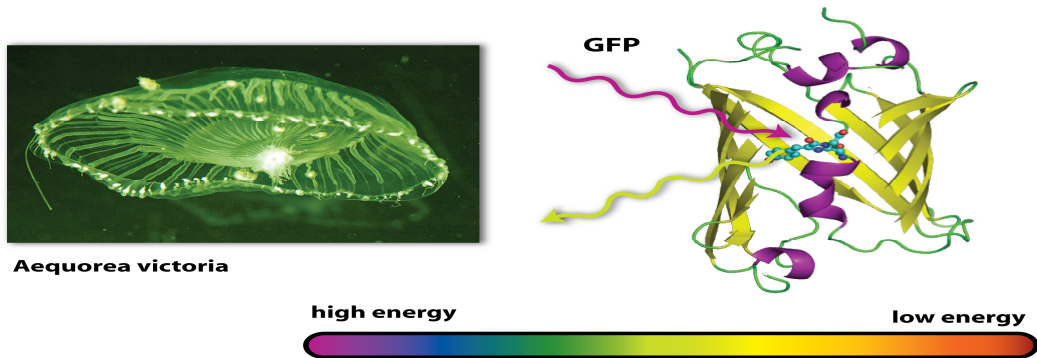
De plus, la **production de ROS** est aussi dosable. Lié au stress oxydant et entraînant l'apoptose, on remarque que cette production est fortement diminuée dans les cellules cancéreuses.

### f) Analyse du cycle cellulaire

La cytométrie la permet en suivant :

- l'évolution de la quantité d'ADN (en marquant les acides nucléiques à l'iodure de propidium)
- les enzymes caractéristiques des différentes phases du cycle cellulaire (Cycline, Pyronine Y), on peut déterminer par cytométrie les phases cellulaires.
- des marqueurs de surface spécifiques de certaines phases (comme le Ki 67 et la phase G1)

### g) En recherche, la Green Fluorescent Protein (GFP) et les autres protéines fluorescentes :



La GFP est une protéine fluorescente issue de la méduse. Cette protéine est utilisée en génie génétique : en fusionnant sa séquence codante avec un autre gène qu'on veut étudier, on peut arriver à exprimer la fluorescence dans la protéine codée par le gène en question. Ceci ressemble à un immunomarquage, mais au lieu de créer une fluorescence annexe à la structure que l'on veut révéler, on insère directement dans sa séquence la capacité de fluorescence...

Il existe d'autres protéines fluorescentes qui ne possèdent pas le même spectre d'émission.

### h) Le Tri cellulaire

En formant au niveau du système fluide des fines gouttelettes (1 goutte = 1 cellule) on peut effectuer un tri cellulaire en soumettant notre flux à un champ électrique qui va dévier chacune des gouttes en fonction des paramètres sélectionnés.

## V. Avantages et limites de la cytométrie

### Avantages

- Analyse qualitative et quantitative
- Analyse multiparamétrique sur une même C (mais attention à la compensation !)
- Possibilité de trier stérilement et de remettre en culture
- Logiciel d'analyse simplifié

### Limites

- Absence d'étalons internationaux de fluorescence → comparaison difficile
- Étude statistique difficile des histogrammes générés par les logiciels de cytométrie