

La cytométrie en flux en immunologie

I Introduction :

Origine de la CEF :

Il s'agit d'une technique assez récente dont le développement s'est accentué ces 15 dernières années

- 1934 : applicable aux cellules hématopoïétiques (comptage)
- 1941 : développement des techniques d'Ac couplés
- 1960 : développement des premiers cytomètres

Définition :

La cytométrie en flux (CMF) est la technique incontournable en immunologie. En effet, chaque résultat nécessite l'utilisation préalable de cette technique. Il s'agit de l'étude précise des cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres, sont analysées **une par une** en défilant à **grande vitesse** (plus de 30 km/h) devant une **source lumineuse : un laser**.

Principe général de fonctionnement :

- **Propulsion** des cellules une à une à grande vitesse dans un **flux hydrostatique**
- Passage devant une **source lumineuse** (laser)
- **Récupération de la fluorescence** issue d'un **immuno marquage** préalable (technique type ELISA)

Cette technique est particulièrement adaptée aux cellules en suspension et donc à l'analyse des **liquides biologiques** : sang, LBA, ascite, épanchement pleural, LCR, aspiration médullaire ... Mais elle permet également d'analyser des cellules tissulaires après une étape enzymatique de **dissociation**.

Intérêt :

Cette technique rapide permet une caractérisation :

- **individuelle** de chaque cellule
- **quantitative** : intérêt statistique
- **qualitative et multiparamétrique** (divers marqueurs de surface) : morphologie de la cellule et phénotypage

Cliniquement parlant, le principal **intérêt** est le **suivi de l'état immunitaire des patients**, dont surtout :

- le suivi des LT CD4+ dans le SIDA
- le suivi des patients immuno déprimés
- le suivi des infections graves
- le suivi des maladies inflammatoires chroniques : MICI, SPA, PR ...
- le suivi des maladies auto immunes : DID, SEP ...
- le suivi au décours de traitement

La CMF permet alors d'obtenir les **% de chaque type cellulaire du SI**, grâce aux divers **Ag de surface** qu'elles possèdent. Elle aide alors au **diagnostic** et au **traitement**.

II Les immuno marquages :

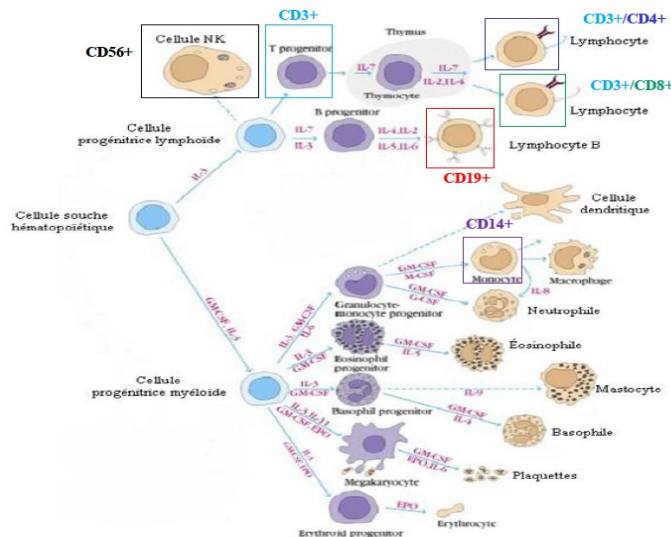
A Quelques rappels sur les cellules du sang :

Dans le sang, toutes les cellules sont issues de la différenciation d'une seule et même **CSH**. Cette dernière se différencie sous l'influence de divers facteurs de croissance, dont les **IL**. On distingue 2 types de différenciations :

- La différenciation **lymphoïde** donnant les **LT** et **LB**
- La différenciation **myéloïde** donnant **tous les autres types cellulaires** :
 1. GR
 2. megacaryocytes
 3. PNB, PNE, PNN ...

B Les principaux types cellulaires et leurs marqueurs :

L'intérêt de la cytométrie est d'identifier tous les types cellulaires précédemment évoqués. En effet, chacun d'eux possède des **Ag membranaires** qui seront marqués en **immuno marquage** (Ac couplés à des fluorochromes).



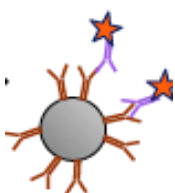
Les types cellulaires avec les marqueurs les plus importants sont :

Marqueur	Ac anti CD3	Ac anti CD4	Ac anti CD8	Ac anti CD19	Ac anti CD14
Type cellulaire	LT	LTh	LCT	LB	Monocyte macrophage DC

C Les immunomarquages :

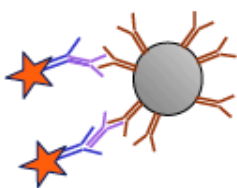
1) Immunomarquage direct et indirect :

On distingue 2 types d'immunomarquage :



Direct

L'immunomarquage **direct** par utilisation d'Ac dirigés contre les Ag **directement** couplés à des fluorochromes



Indirect

L'immunomarquage **indirect** par utilisation d' :

1. **Ac primaires** dirigés contre les Ag
2. **Ac secondaires** dirigés contre les Ac primaires couplés à un **fluorochrome**.

NB : Il existe également des variantes utilisant des *Ac primaires couplés à de la biotine* et des *Ac secondaires couplés à de la streptavidine*.

2) Les fluorochromes, supports de l'étude multiparamétrique :

Aujourd'hui, on réalise une véritable **étude multiparamétrique** afin d'obtenir une analyse complète. En effet, on peut utiliser un Ac couplé à un fluorochrome émetteur d'une longueur d'onde différente pour chaque type de population. On pourra ainsi obtenir des **cellules multimarquées**.

Exemple : Un LT peut être marqué avec :

1. Un Ac couplé à un fluorochrome **vert** reconnaissant le **CD3**
2. Un Ac couplé à un fluorochrome **rouge** reconnaissant le **CD4**
3. Un Ac couplé à un fluorochrome **bleu** reconnaissant le **CD8**

Ce multi marquage permet de distinguer les **différentes sous populations**.

On retiendra les 2 fluorochromes suivants :

- Le **FITC = fluoerescine** colorant en **vert**
- Le **PE = fico érythryne** colorant en **rouge**

3) Les autres supports de l'immunomarquage :

Si un immuno marquage est le plus souvent réalisé à l'aide de fluorochromes, il existe également d'autres outils :

1. Les intercalants de l'ADN : Ils sont utilisés en CMF, non pas dans un but de phénotypage, mais pour visualiser les **différentes phases du cycle cellulaire**.
2. Les sondes cytoplasmiques : elles changent de couleur en fonction des **concentrations calciques**. Elles sont donc utilisées pour **visualiser les flux calciques**.

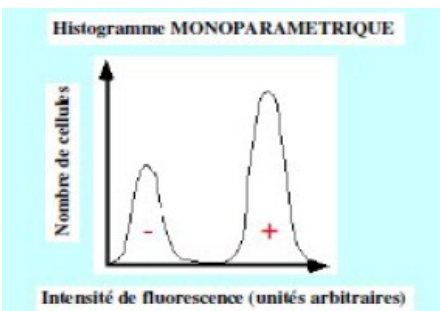
4) La présentation des données :

a) La représentation monoparamétrique :

Dans la représentation **monoparamétrique** des données, on représente :

- en ordonnée : le **nombre** de cellules
- en abscisse : l'**intensité de fluorescence**

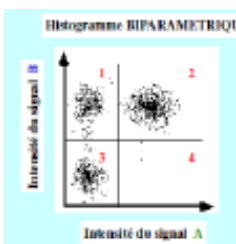
Exemple : Le plus souvent, on obtient un histogramme avec 2 courbes.



- Le 1^{er} pic représente une fluorescence très **faible/nulle**. Les cellules n'ont PAS été marquées et sont donc **non porteuses de l'Ag recherché**.

- La 2^{ème} pic représente une intensité **majorée** de fluorescence. Les cellules ont été marquées et sont donc **porteuses de l'Ag recherché**.

b) La représentation biparamétrique :



Dans la représentation **biparamétrique**, on représente 2 signaux de fluorescence l'un par rapport à l'autre. On obtient des **nuages de points** et chaque point représente une **cellule**. On pourra alors déterminer si les cellules sont :

- **négatives** = non porteuses de l'Ag de surface recherché
- **simples positives** = porteuses de l'un des deux Ag de surface recherché et lequel
- **doubles positives** = porteuses des deux Ag de surface recherchés

c) La représentation multiparamétrique et ses limites :

Il peut également exister des **représentations 3D** et des représentations utilisant plus de 2/3 marqueurs. En effet, *plus on augmente le nombre de marqueurs à détecter et plus on sera précis dans la population à déterminer*. Il existe donc une véritable **politique inflationniste** concernant le nombre de marqueurs utilisés. Il en va d'une identification cellulaire la plus précise possible. Actuellement, le maximum est de **17 couleurs** utilisées simultanément.

Mais, quelques difficultés/limites s'imposent à nous :

- disposer de **fluorochromes différents** dont les spectres ne se chevauchent pas
- **les phénomènes de compensation** : En effet, lorsqu'on utilise plusieurs fluorochromes ensemble, il existe des **chevauchements de spectres**, à l'origine de « faux positifs ». Certaines cellules apparaîtront positives pour les 2 marqueurs alors qu'elles ne sont réellement positives que pour un seul.

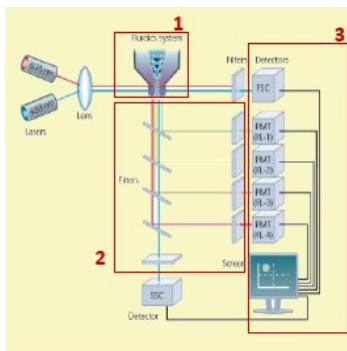
Pour pallier ce problème, il faut **retrancher** ces débordements de spectre, ce, en utilisant la formule suivante : **FL2 - % FL1**. On obtient alors un *résultat corrigé sans cellules doublement marquées*.

Aujourd'hui, dans les appareils nouvelle génération, a également été **augmenté le nombre de lasers**. Ce sont ces derniers qui permettent ensuite de multiplier le nombre de fluorochromes. Ainsi, dans un appareil de CMF, on retrouve :

- **Le laser de référence** émettant à **488 nm**, retrouvé de manière basale dans tous les cytomètres
- **+/- d'autres laser** émettant dans d'autres longueurs d'onde. Le plus souvent, un cytomètre en possède **3** et, pour les plus performants : **5-7**. L'intérêt est qu'on peut utiliser plus de fluorochromes simultanément.

III La composition d'un cytomètre :

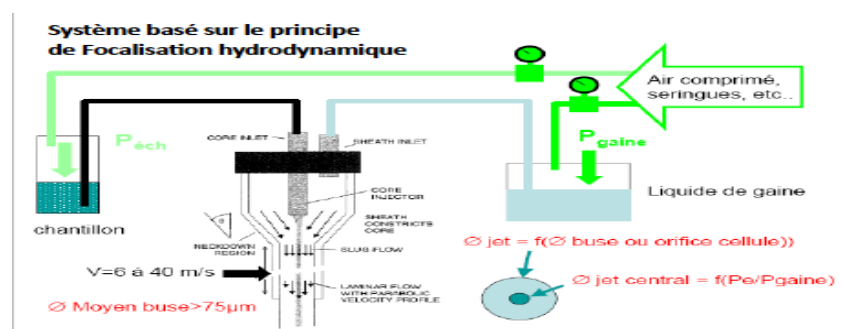
Globalement, un cytomètre est constitué de 3 systèmes :



1. un système **fluidique**
2. un système **optique**
3. un système **électronique**

A Le système fluidique :

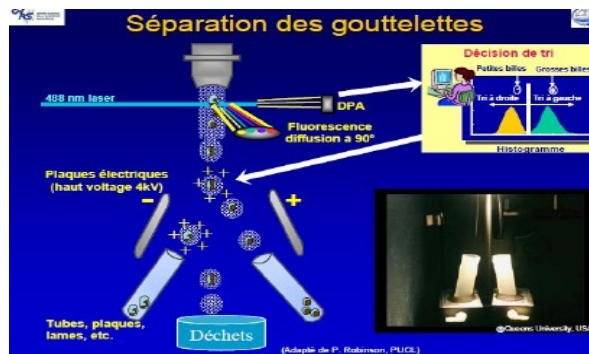
Le système fluidique est un système basé sur le principe de focalisation hydrodynamique. Il s'agit d'un **flux laminaire** qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser.



Système fluidique

Le principe est le suivant :

- On fait circuler dans l'appareil un **liquide de gaine** et l'**échantillon**.
- Le liquide de gaine rentre dans le flow cell. Il est en **surpression** par rapport à l'échantillon.
- **L'échantillon est donc comprimé** : il y a création d'une veine liquide dont les parois sont constituées par le liquide de gaine.
- Cet échantillon est tellement comprimé que le **diamètre du flux est très étroit** : il ne permet le passage que **d'une cellule à la fois**



Variante du système fluide : le trieur cellulaire

Il existe une **variante** utilisée dans le domaine de la **recherche** (et non en routine), lorsqu'on souhaite caractériser des populations précises. Il s'agit d'un **trieur de cellules**. Son fonctionnement est sensiblement le même que celui évoqué précédemment, mais le flux n'est pas obtenu grâce à un liquide de gaine, mais grâce à des **US**. Ces derniers, en un certain temps, transforment le flux cellulaire en petites gouttelettes. Ensuite, le trieur calcule le temps qui a été nécessaire à cette transformation. Enfin, une **impulsion de charge** est émise en fonction de phénotype de la cellule :

- si elle est **positive** pour le marqueur recherché, une impulsion **positive** est émise, la goutte migre **d'un côté**
- si elle est **négative** pour le marqueur recherché, une impulsion **négative** est émise, la goutte migre **de l'autre côté**

Cette technique de tri permet de trier

- classiquement **2 populations différentes**.
- jusqu'à **4 populations** en faisant varier l'intensité de la charge.

Ensuite, on peut compléter en réalisant un **tri en plaque** et obtenir uniquement des **cellules 100% positives** pour le marqueur.

B Le systèmes optique :

1) Les divers types de filtres :

Le système optique est constitué d'un ensemble de filtres et de miroirs acheminant la fluorescence sur le détecteur grâce à des **lasers** pointant sur le flow cell. Ensuite, la fluorescence est récupérée à 90° avant d'être envoyée sur le **banc optique**. Il y a plusieurs types de filtres :

- Les DM x SP : Ce sont des miroirs **dichromiques**, filtres **passé bas**. Comme les miroirs sans teint, ils laissent passer toutes les longueurs $< x \text{ nm}$ et réfléchissent les longueurs d'ondes $> x \text{ nm}$.
- Les DM x LM : Ce sont des miroirs **dichromiques**, filtres **passé haut**. Ils agissent donc de *manière inverse*.
- Les filtres passé bande : Ils se trouvent juste **devant les détecteurs** et permettent la **toute dernière sélection**. Ils sélectionnent la *longueur d'onde du fluorochrome recherché*.
Exemple : le filtre 661/16 laissent passer les longueurs d'ondes de 661nm +/- 16 nm.

2) diffusion lumineuse et visualisation de la morphologie cellulaire :

On peut également visualiser la **morphologie** des cellules grâce à des phénomènes de **diffusion lumineuse**. En effet, sur le banc optique, il y a 2 filtres :

1. **Le Foward scatter ou FSC** : il fait un angle d'environ **180°** avec le flow cell. La lumière diffractée est donc collectée sous un **petit angle (1-10°)**. Le signal est relatif à la **taille** de la cellule.
2. **Le Side scatter ou SSC** : il fait un angle de 90° avec le flow cell et est centré autour de la longueur d'onde **488 nm**. Ainsi, la lumière est collectée à **90° par rapport au laser**. Le signal recueilli par ce filtre est relatif à la **granularité** de la cellule.

On étudie ensuite ces paramètres et donc la morphologie de la cellule, en réalisant un diagramme avec en :

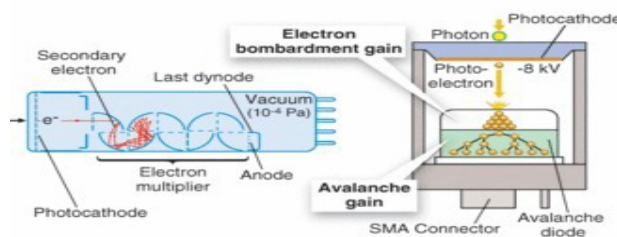
- **abscisse** : le signal recueilli par le **SSC**
- **ordonnée** : le signal recueilli par le **FSC**

Le profil du diagramme nous permet d'identifier les diverses populations. Ici, on distingue clairement **3 populations** en fonction des signaux recueillis :

Signal FSC	Signal SSC	Type cellulaire	Diagramme
Faible → petit	Faible → réfringent	Lymphocytes	
Moyen	Moyen	Monocytes	
Fort → gros	Fort → granuleux	Granulocytes Macrophages	

NB : Avant le recueil du signal était basé sur le principe de la réfraction. Aujourd'hui, le recueil du signal est basé sur la **réflexion**, ce qui permet de **minimiser les pertes de lumière**. Les optiques sont organisées en **octogone**.

C Le système électronique :



Le système électronique

Le système électronique est un système constitué de **photomultiplicateurs (=PTM)** et d'une **fibre optique**. D'une manière empirique, il s'agit d'une « sorte d'échelle » où le **photon** est transformé en **electrons**. En effet, lorsqu'une cellule passe :

- le PTM émet la **fluorescence** → émission d'un **nombre variable de photons**
- en fonction du nombre de photons → Transformation en **électrons**, donc émission d'un **signal électrique gaussien**.
- Répartition de l'intensité du signal sur une **échelle de 1024 bit**. *Plus la fluorescence est importante, plus la variable attribuée par l'ordinateur sur l'échelle 1024 est importante et inversement.*
- Ensuite l'ordinateur les « ordonne » dans des cases
- Obtention d'une **association des fluorescences** de chaque cellule et des **histogrammes** déjà décrits

En fonctionnement **bi paramétrique**, le principe reste le même. On réalisera alors de la même manière le **cumul des points pour les 2 marqueurs différents**.

II Les applications :

A Le comptage des LT pour le suivi des infections HIV et greffes :

1) Le principe :

La plus courante des applications de la CMF est le **comptage de LT** pour le suivi des infections type HIV (LT CD4+...) ou des greffes. On prélève 50 à 100 µL de sang, puis on réalise également un diagramme FSC / SSC et on utilise les marqueurs suivants :

Marqueur	Ac anti CD3	Ac anti CD4	Ac anti CD8	CD19	Ac anti CD14/15	Ac anti CD16
Type cellulaire	LT	LTh	LCT	LB	Monocyte macrophage DC	PNN

Ainsi, on obtient, avec une très petite quantité de sang, **les % de chaque population présente**. Les **avantages** de cette technique sont :

- intérêt **statistique**
- technique **rapide** : 3 min d'analyse
- technique **multiparamétrique** donc **précise**. En effet, si on n'utilisait que le CD3, on ne pourrait distinguer les LT et le monocytes. L'utilisation des Ac anti CD4 permet d'éliminer les monocytes CD4+ mais CD3-.

2) Les résultats :

Sur un sujet **sain**, les résultats **attendus** sont :

- LTCD4 : 66%
- LTCD8 : 33%
- Rapport CD4/CD8 : 2/3 à 1/3

Mais, le plus souvent, nous sommes souvent confrontés à des situations **atypiques** et à l'observation de **sous types de populations cellulaire rares**, chez des personnes par forcément malades :

- LT :
 1. CD4 +
 2. CD8 + low < 2% (fluorescence moindre mais bien présente).
- LT :
 1. CD8 +
 2. CD4 + low < 3%
- LT (plus cytotoxiques que les LT CD8 classiques)
 1. CD8 +
 2. CD56 +

Souvent, *l'un des marqueurs est moins représenté que l'autre*. Le **rôle**, l'aspect **pathologique / physiologique** de ces populations cellulaires n'est pas encore clairement défini, d'où l'intérêt en recherche de l'utilisation du tri cellulaire.

3) Particularités du CD3 :

Le **TCR** et le **CD3**, « prolongement intra cellulaire du TCR » sont constitués de plusieurs chaînes :

- **αβ** : **majoritaires** (> 90%) et reconnaissant les **peptides**. On y distingue plusieurs régions
 1. **une région variable V** dévolue à la reconnaissance du peptide. Dans certaines pathologies, il peut être intéressant de déterminer le **% de LT possédant cette partie V donnée**. Nous disposons aujourd'hui de 20 à 30 Ac disponibles pour l'identification de la partie variable de la chaîne β. exemple : LTCD4 et maladie de Sézari)
 2. **une région constante C**

- $\gamma\delta$, CD4-, CD8+, CD56+/-, **minoritaires dans le sang** mais surtout présents au niveau des **muqueuses**. Ils reconnaissent les **glycolipides bactériens, fongiques et tumoraux**. Ce marqueur est alors intéressant dans certaines pathologies comme *l'asthme, les MCI, infections à CMV*. En effet, le taux de $\gamma\delta$ augmente considérablement dans les muqueuses, d'où l'intérêt diagnostic.

B Applications diagnostiques et pronostiques des hémopathies malignes

L'application de la CMF au **diagnostic et au pronostic des hémopathies malignes** est la 2ème application la plus importante de la CMF.

Prenons pour exemple la LLC :

La **LLC** est l'hémopathie maligne la plus fréquente du sujet âgé. On suit régulièrement l'évolution du taux de **CD38**, marqueur basique de la CSH et le taux de **CD19**. En effet, il existe une *corrélation négative entre le taux de ces 2 marqueurs et le pronostic de la LLC* : lorsque la LLC dégénère et devient de mauvais pronostic

- la population de **LB CD19** devient **positive**
- le taux de **CD38** **augmente**

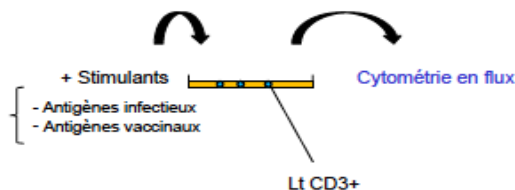
On ne sert pas que de la CMF pour le **pronostic**. En effet, la CMF fonctionne en accord avec d'autres techniques : visualisation d'anomalies cytogénétiques ... Finalement, on peut dire que :

- le **diagnostic** se fait par hémogramme et phénotypage (CMF +++)
- L'**orientation des décisions thérapeutiques** se fait ensuite en fonction des marqueurs prédictifs de l'évolution de la maladie : CD19 et CD38.

C Les tests fonctionnels :

Cette application de la CMF est un peu moins importante.

1) Le test d'activation in vitro :



Le test d'activation in vitro permet d'étudier le niveau d'activation in vitro des LT CD3. Le principe est le suivant :

- On met les **LT en culture**
- On ajoute des **stimulants**, c'est à dire des Ag infectieux ou vaccinaux
- On observe la **réponse** des LT CD3

Ceci permet de déterminer s'il y a **réponse déficitaire / accrue**. Il ne faut pas oublier qu'un LT CD3 circulant est inactif. Il sera activé en fonction de la stimulation par une CD, des cytokines, des Ag ... Une fois **activé**, il acquiert le **CD25** et le **CD69**. L'intérêt est ici d'*identifier quel type de population lymphocytaire répond à tel ou tel Ag*, ce, en fonction des marqueurs qui apparaissent.

NB : Environ **2% des LT CD4** présente toujours ces marqueurs : **CD4+**, **CD25+**, **CD127+**, **FOXP3+**. Ce sont les **LT régulateurs suppresseurs**. Ces cellules permettent la production de cytokines immunosuppressives et la tolérance immunitaire face à une grossesse, des tumeurs, des greffes ... Ce sont donc elles qui permettent de ne pas rejeter le fœtus mais également la tumeur.

Il y a une recherche très importante sur ces cellules et sur la manière dont on pourrait **adapter leur % en fonction de la situation** :

- augmenter le % en présence d'une tumeur
- diminuer le % en cas de greffe

2) Le kit de dosage des cytokines :

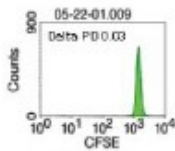
Le kit de dosage des cytokines est une nouvelle application de la CEF apparentée à l'ELISA. Elle permet de doser des molécules en suspension (cytokines) à partir d'un faible volume (< 50 µL) de sang. Pour ce faire, on utilise des **billes recouvertes chacune d'un Ac de capture**. On dose alors simultanément plusieurs molécules et on révèle à l'aide d'Ac secondaires fluorescents.

Il existe sur le marché des kits permettant de déterminer le **profil Th1/ Th2** des cellules. Les divers profils de cytokines dirigent la **différenciation de la CSH**.

D Les tests de prolifération au CFSE :

Les tests de prolifération au CFSE sont surtout utilisés sur les **LTCD3**, notamment dans le cadre de tests de transformations lymphoblastiques. En effet un LT se divise **6-8 fois en moins de 10 jours**. En cas de **problème**, la division s'arrête.

Principe :



Profil

- On utilise des colorants du cytoplasme : le **CFSE**, mis à incuber avec une cellule.
- Premier passage dans le cytomètre : toute la population présente une **homogénéité de fluorescence**.
- On remet en **culture**. Les résultats obtenus ensuite dépendent d'une éventuelle **anomalie** :

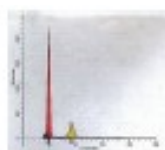
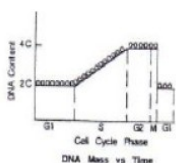
Aucune anomalie	Anomalie de la division
- division des cellules - dilution du colorant dans le cytoplasme - présence de pics de fluorescences de plus en plus petits à chaque division	- pas de division cellulaire - pas de dilution du colorant - persistance du pic initial
<p>A flow cytometry histogram with 'Counts' on the y-axis (0 to 800) and 'CFSE' on the x-axis (log scale from 10⁰ to 10⁴). Multiple peaks of decreasing intensity are visible at 10¹, 10², 10³, and 10⁴. The plot is titled '05-22-01.002 Delta PD 0.05'.</p> <p style="text-align: center;">Profil</p>	<p>A flow cytometry histogram with 'Counts' on the y-axis (0 to 200) and 'CFSE' on the x-axis (log scale from 10⁰ to 10⁴). A single large peak is visible at approximately 10³. The plot is titled '05-22-01.007 Delta PD 0.12'.</p> <p style="text-align: center;">Profil</p>

E L'analyse du cycle cellulaire :

Cette application de la CMF sort légèrement du cadre de l'immunologie. Cette **analyse du cycle** peut être appliquée au **cancer du sein** notamment. C'est ici que la CMF est utilisée pour analyser des éléments non en suspension initialement.

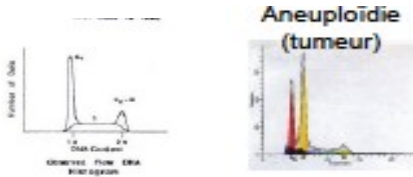
Principe :

On analyse le cycle cellulaire en utilisant les **marqueurs de l'ADN** (colorants intercalants). Ainsi, *plus la quantité d'ADN est importante et plus le signal est important*. On obtient donc, au cours d'un cycle normal, le diagramme suivant :



- un premier pic : phase **G0-G1**
- une augmentation de l'intensité : **synthèse** = phase R
- un 2ème pic : **G2-M**

Dans certaines **pathologies** on peut obtenir des **profils de cycles cellulaires anormaux**. On parle d'**aneuploidie**, au sein d'une tumeur +++ :



L'apparition d'un **pic surnuméraire** correspond à des cellules se divisant mal possédant une quantité d'ADN supplémentaire. Cette **aneuploidie** a une valeur **pronostique**. En effet, *plus y a de l'aneuploidie et plus le pronostic vital est engagé*. Cela peut aussi servir à **orienter le diagnostic**.

F Étude du phénotype MDR en clinique :

Certains patients et certains lymphomes agressifs présentent une résistance à quasiment tous les chimiothérapies : on parle de **phénotype MDR**. Ces cellules cancéreuses deviennent **résistantes** car elles présentent à leur surface *des pompes capables de faire ressortir tous les agents pharmacologiques utilisés*.

On mesure la présence de ce phénotype MDR en utilisant un colorant cytoplasmique : la **rhodamine 123**. On distingue plusieurs cas de figure :

- Lorsque *l'intensité de rhodamine diminue*, cela signifie qu'elle a été effluée. La cellule possède le **phénotype MDR**
- La Rhodamine 123 a pénétré et quelques jours plus tard *l'intensité est toujours la même*. La cellule ne possède **PAS de phénotype MDR**
- Des **situations intermédiaires** existent également

Dans le cadre de la recherche, on peut travailler grâce à ces techniques sur le **criblage de nouvelles thérapies** qui seraient capables de contre carter / bloquer ce phénotype MDR. Il existe des **inhibiteurs de ces pompes** assez efficaces.

G Mort cellulaire en CMF :

On distingue **2 types de morts cellulaires** :

- **L'apoptose** : **mort cellulaire programmée**, elle participe au *développement embryonnaire* et au *maintient de l'homéostasie* cellulaire et tissulaire.
- **La nécrose** : **mort cellulaire induite**

En recherche, l'apoptose est particulièrement intéressante. En effet, son **dérèglement** peut entraîner des pathologies :

- l'apoptose **suractivée** est à l'origine de maladies neuro dégénératives, d'ischémies-reperfusions, de désordres immunitaires etc. etc.
- l'apoptose **inhibée** participe à la transformation cancéreuse et au développement de désordres immunitaires (MAI) ...

A **chaque étape** de l'apoptose correspond une **technique de CMF** :

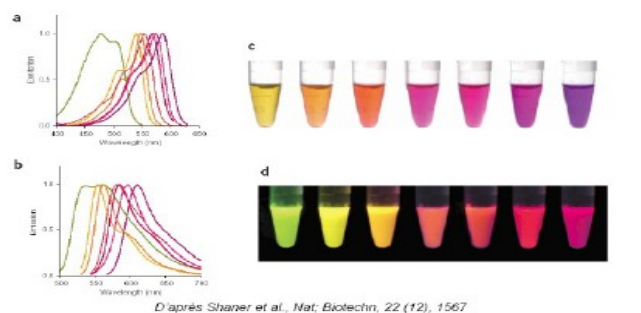
Étape de l'apoptose	Technique en CMF associée
- Activation du système Fas – Fas L ou des cytokines	- Comptage des Rc impliqués → sur expression ?
- Démantèlement de la mitochondrie par réduction de son potentiel	- Utilisation de colorants pénétrant dans la mitochondrie → baisse de la fluorescence ?
- Activation de la cascade des caspases	- RAS
- Exposition de la Phosphatidyl sérine	- étude de l'annexine V/7AAD
- Changements morphologiques	- identification sur le SSC VS FSC

- Fragmentation de l'ADN	- Utilisation d'intercalants de l'ADN → présence d'un pic sub G1 en amont du pic Go/G1?
--------------------------	---

NB :Le pic sub G1 en amont du pic Go/G1 correspond à des cellules apoptosés et à l'ADN fragmenté qui prend beaucoup moins le marquage.

H Le Green Fluorescent Protein = GFP

La GFP est une protéine fluorescente issue de la méduse, émettant dans le vert. On modifie génétiquement des cellules en associant **l'expression de la GFP à l'expression d'une protéine particulière** afin de connaître le rôle de celle-ci et donc du transgène associé. On ne sélectionne alors que les cellules **fluorescentes**. On les **purifie**, puis et on réalise d'autres expériences à partir de cette base. On pourra même l'utiliser *in vivo* pour faire des **modèles de souris qui fluorescent GFP**.



Aujourd'hui, elles sont de plus en plus utilisées et il existe toute une gamme de protéines dérivées de la GFP sur le marché. Elles ont été créées à partir de mutations de la GFP.

Conclusion : avantages/limites de la CMF

La CMF permet :

- une analyse **qualitative ET quantitative**
- une analyse **multiparamétrique** sur une même cellule. Il faudra donc faire attention au **phénomène de compensation**.
- Un **tri « stérile »** puis une remise en culture

Concernant la **quantification**, il n'existe pas d'étalon internationaux de fluorescence, d'où une *comparaison difficile des résultats entre les pays*. De plus, l'étude statistique des histogrammes générés par les logiciels de cytométrie est difficile.

En clinique, cette technique est de plus en plus utilisée en **immunologie**, mais aussi en **cancérologie**. Elle tend à s'étendre à **toutes les disciplines**.