

A flow cytometry plot showing a large population of cells with a diagonal band of cells. The band is color-coded with a rainbow gradient from blue to red. The plot is overlaid with two purple text boxes.

# **Module: Immunogénétique**

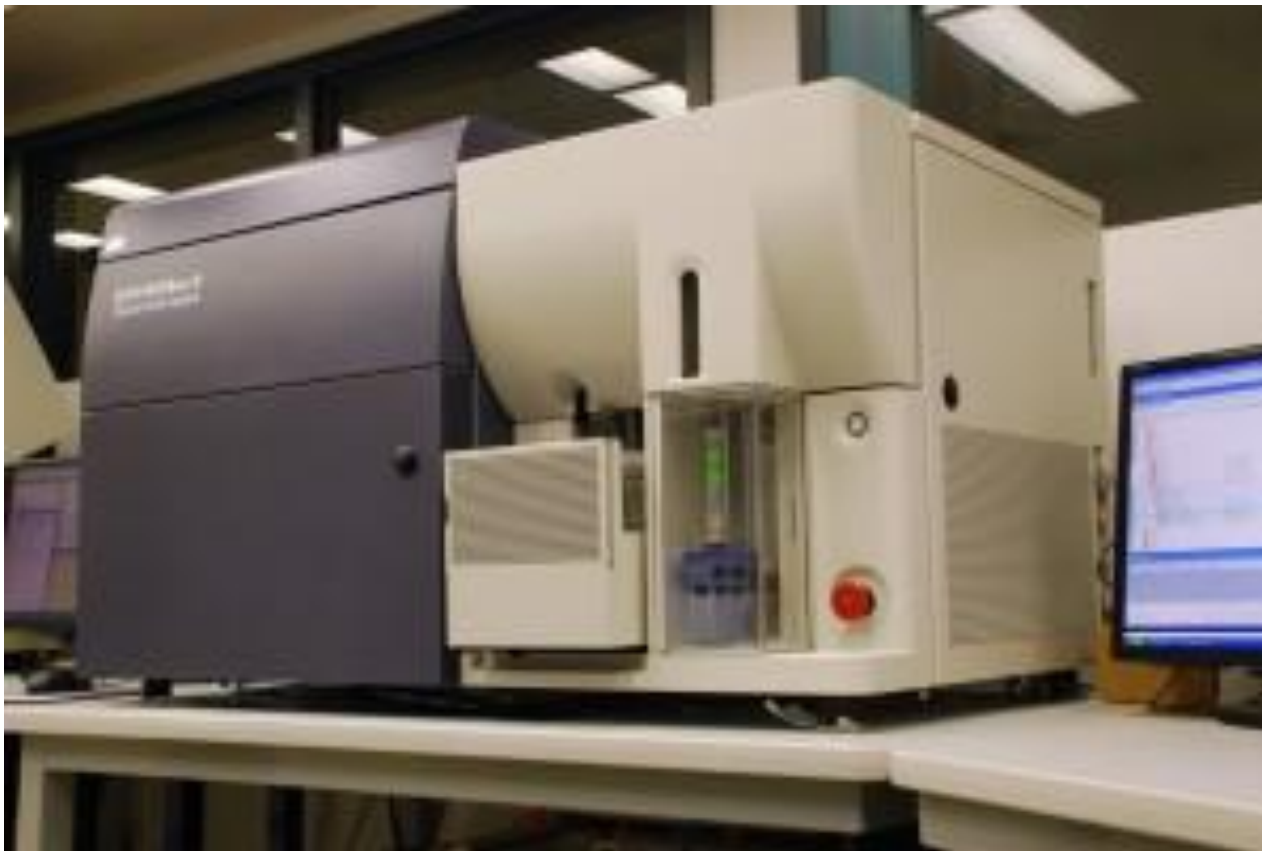
## **TD 3 Cytométrie en Flux**

**Enseignante : MOULAOUI KENZA**

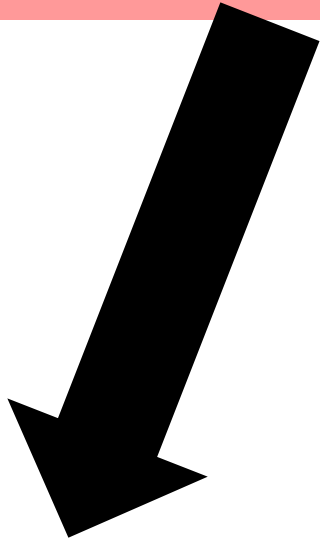
**M1 GFA**  
**Année universitaire 2019-2020**

# I. Qu'est ce que la Cytométrie en flux?

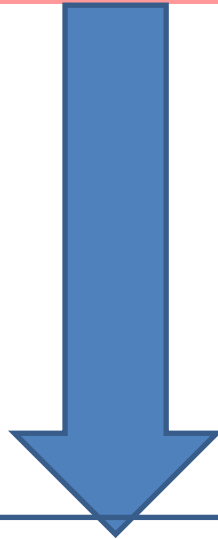
C'est une technologie incontournable en immunologie, qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une particule (cellule) en suspension. Ces cellules alignées les unes derrière les autres analysées une par une à grande vitesse (plus de 30 km/h) en défilant devant une source lumineuse (laser).



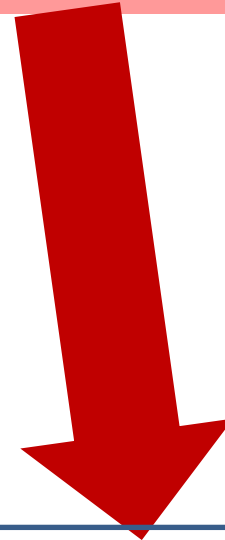
# CytoMétrie en Flux



**Cellule**



**Mesure**



**Fluide**



**Etude précise de *cellules isolées entraînées par un flux liquidien.***



**Caractérisation :**

- Individuelle,
- Quantitative,
- Qualitative,
- Fonctionnelle de particules en suspension dans un liquide.

## II. Définition de la Cytométrie en Flux

La Cytométrie en flux est une technologie qui nous permet de **mesurer** simultanément de multiples **caractéristiques physiques** d'une cellule.

Elle est adaptée à toute population cellulaire dans un milieu liquide pouvant être rendue fluorescente de façon spécifique.

Le Cytomètre **enregistre le comportement** de la cellule quand celle-ci passe devant le laser en mesurant:

**1-La diffusion de la lumière incidente.**

**2- L'émission de la fluorescence**

### **III. Principe de la cytometrie en Flux**

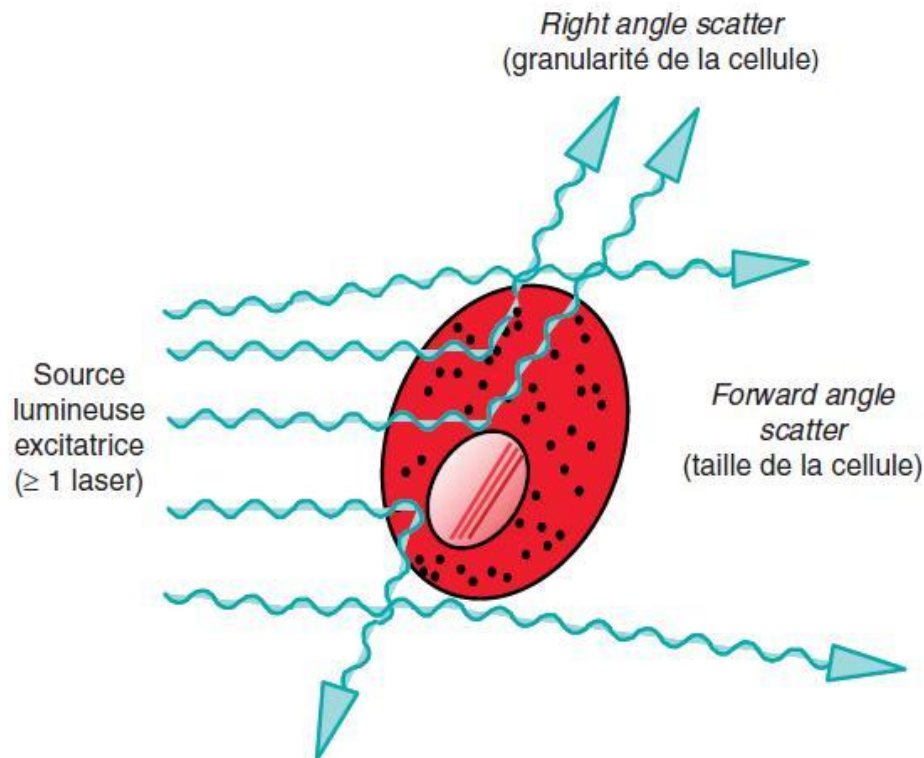
- L'échantillon est injecté dans une gaine de liquide dont le flux est laminaire et continu.
- Les fluorochromes fixés au niveau des cellules sont excités par un rayon laser.
- La fluorescence émise après excitation est détectée au niveau de photomultiplicateurs.
- Les signaux électriques sont transformés en données analogiques qui sont analysées au niveau du système informatique.

## **IV. Que sait faire un Cytomètre en flux?**

- ❖ Compter des cellules en suspension
- ❖ Mesurer la lumière diffusée mais aussi la fluorescence d'une cellule, ou de marqueurs cellulaires
- ❖ Trier des cellules individuelles pour des analyses ultérieures
- ❖ Séparer les cellules vivantes et mortes

## V. Quelles informations sur la cellule ?

- ❑ Sa taille relative (FSC) (diffusion de la lumière dans l'axe)
- ❑ Sa granularité ou complexité interne (Side Scatter = SSC)
- ❑ Son intensité de fluorescence (en fonction des fluorochromes)





## VI. Pour fonctionner un Cytomètre en flux nécessite une combinaison de

- ✓ Fluidique: Pour introduire et canaliser les cellules.
- ✓ Optique: Une source d'excitation et de récupération des signaux.
- ✓ Electronique: Pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur.



## **VII. Un Cytomètre est une combinaison de 3 différents systèmes**

### **□ Système fluide :**

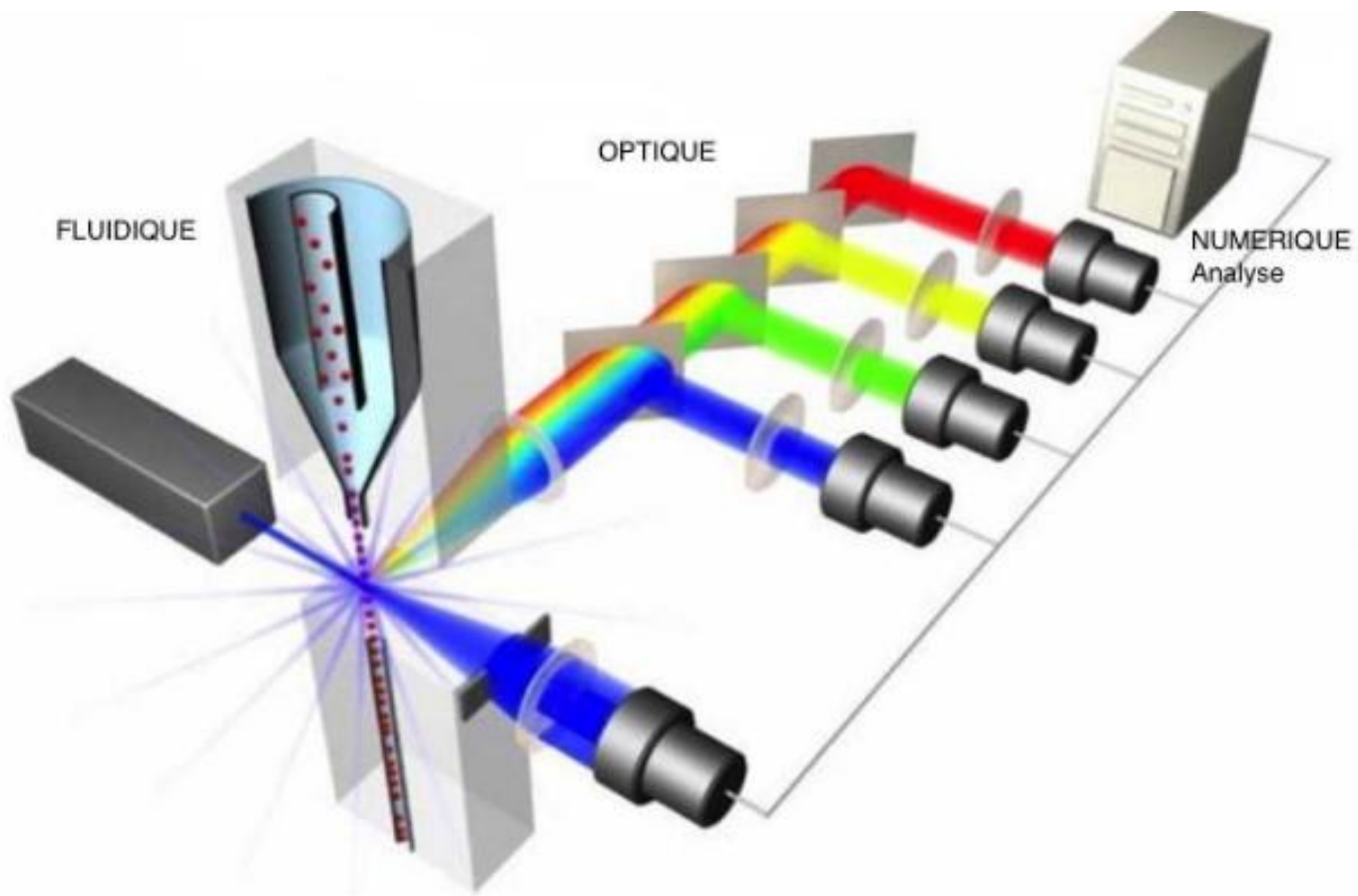
Flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser.

### **□ Système optique :**

Rayon laser et différents filtres qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes appropriées.

### **□ Système électronique :**

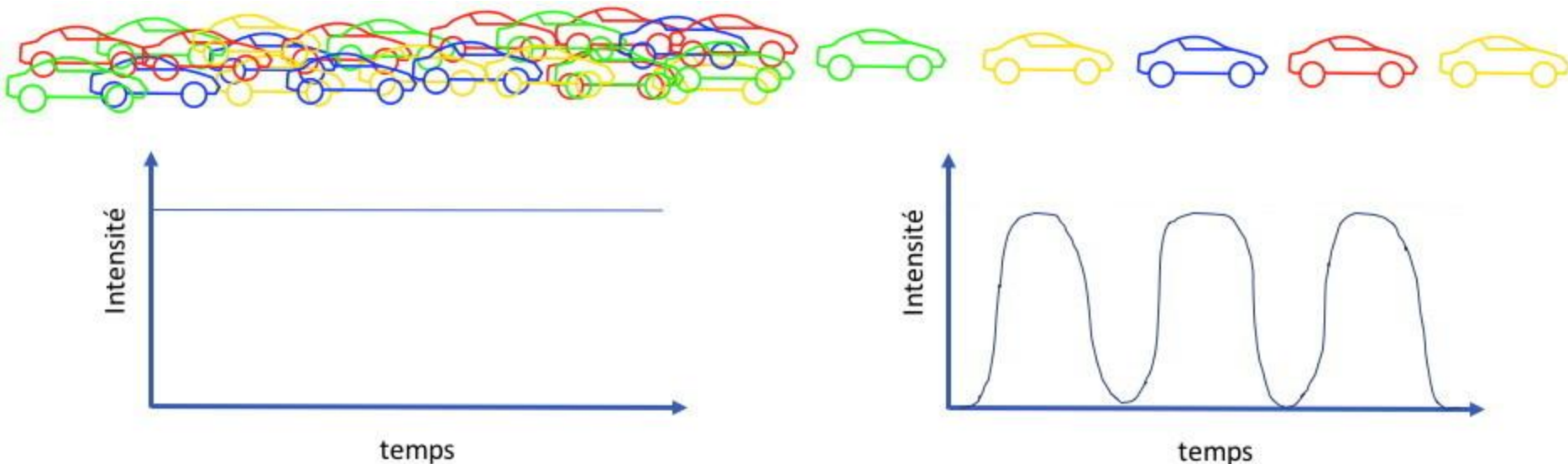
Conversion des signaux optiques en signaux électroniques et numérisation pour analyse informatique (Figure A)



**Figure A : Principe simplifié d'un cytomètre en flux**

## VIII. Le Centrage Hydrodynamique

Imaginez devoir compter, sur une autoroute avec de très nombreuses voies, les véhicules de différentes couleurs (Figure en bas). Si la circulation est chargée et toutes les voies utilisées, il vous sera impossible d'effectuer cette tâche. Pour y parvenir, vous devez canaliser les véhicules sur une seule voie et, ainsi, il vous sera possible d'effectuer une analyse précise du nombre de véhicules de chaque couleur



Dans un Cytomètre en flux il faut procéder de la même façon. Les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres (au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon) afin d'être excitées une par une avec le faisceau lumineux. Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide échantillon et ainsi aligne les cellules au centre du jet (Figure A).

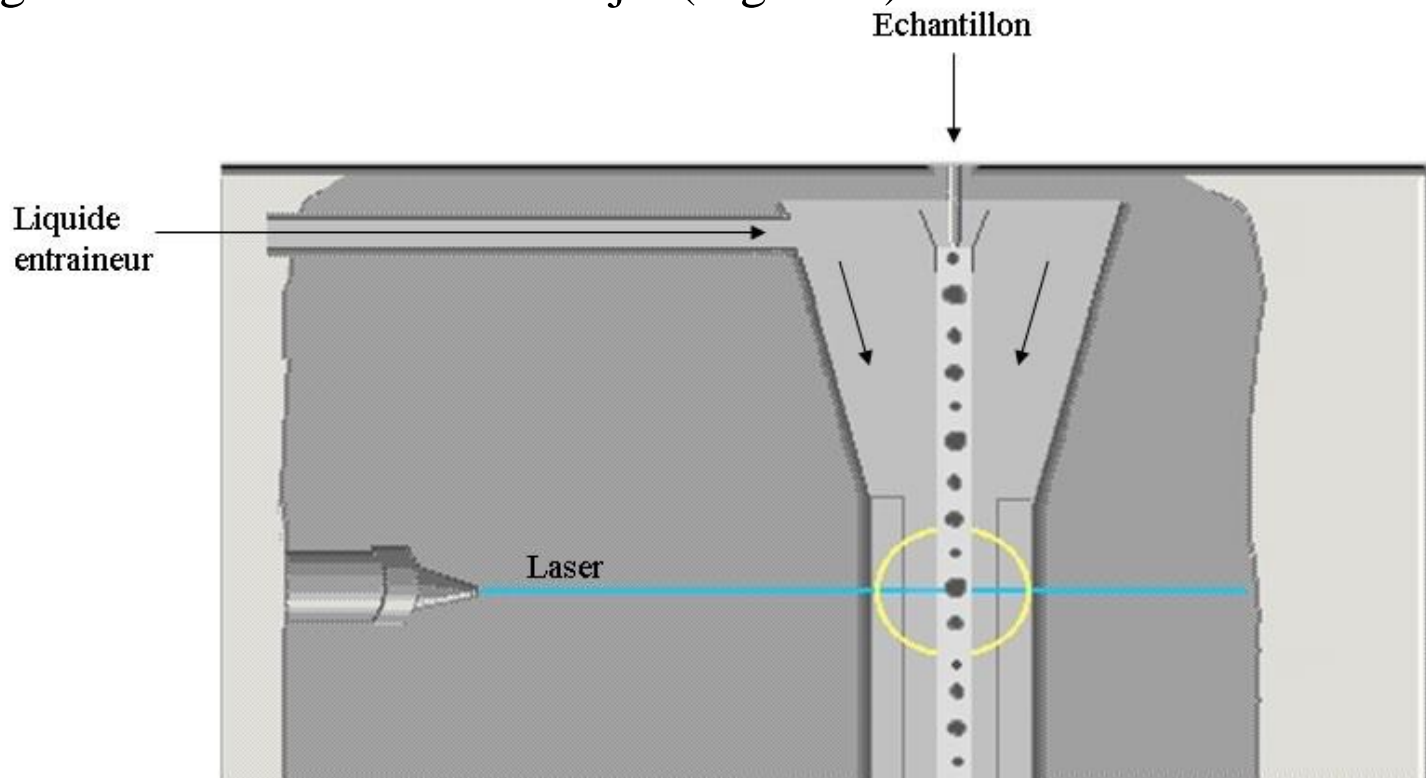


Figure A : Principe du centrage hydrodynamique

## **IX. Marquage des cellules**

Le Fluorochromes qui est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

C'est possible de faire plusieurs utilisation Ac couplés à un fluorochrome émetteur d'une longueur d'onde différente pour chaque type de population, on vas obtenir de cellules multimarquées.

Lors du passage dans le Cytomètre, les différents laser excitent ces fluorochromes qui s'excitent et émettent dans des couleurs différentes, c'est pour faire la distinction des différentes sous populations lymphocytaires..

- Exemple de lymphocytes T marqués par plusieurs fluorochromes :

1 Ac couplé à un fluorochrome vert reconnaissant le CD3

1 Ac couplé à un fluorochrome rouge reconnaissant le CD4

1 Ac couplé à un fluorochrome bleu reconnaissant le CD8

## **X. Immunofluorescence pour la Caractérisation des sous-Populations Cellulaires**

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la Cytométrie en Flux. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

L'association de l'immunofluorescence et de la cytométrie en flux est devenue un élément essentiel dans l'étude des systèmes biologiques, surtout dans la discrimination entre cellules d'une population hétérogène.

En effet, l'utilisation des anticorps monoclonaux (AcM), dirigés contre des composants spécifiques, permet de distinguer des sous-populations lymphocytaires. Ces dernières années, l'identification et la caractérisation des antigènes de surface des lymphocytes a progressé très rapidement. Cependant, il n'existe pas d'AcM pouvant reconnaître à lui seul une cellule particulière pourvue de certaines fonctions. Cette limitation a conduit les utilisateurs de la technique d'immunofluorescence à passer des simples aux multiples marquages en utilisant des combinaisons d'AcM révélés par des fluorochromes différents. Par rapport aux investigations initiales réalisées au microscope, la cytométrie en flux apporte en plus la quantification à l'échelon cellulaire individuel du nombre de sites reconnus et la possibilité de trier ces cellules selon l'intensité de leur marquage en vue d'études fonctionnelles ultérieures. Enfin elle peut se combiner à l'analyse d'autres paramètres (cycle cellulaire) et donc nous informer sur l'état fonctionnel des cellules.



# XI. Applications de la cytométrie en flux

## □ Routine :

- Immunophénotypage (exemple en hématologie)
- Quantification du contenu en ADN (cancérologie, ...)
- Cycle cellulaire
- Viabilité (test MTT)

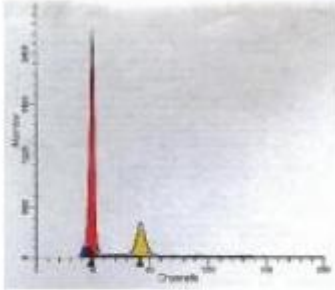
## □ Recherche :

- Caryotype
- Flux ioniques
- Stress Oxydatif
- Fluidité membranaire
- Cycle cellulaire, prolifération, apoptose

# 1. Application légèrement hors du cadre de l'immunologie

Utilisée notamment en cancérologie (ex : cancer du sein) , pour parfois analyser des cellules initialement non en suspension.

Normal



**Principe = analyse du cycle cellulaire grâce à des marqueurs de l'ADN (colorants intercalant) + il y a d'ADN + la coloration est importante.**

**Résultats :**

Phase G0-G1= 1er pic. (n chromosomes)

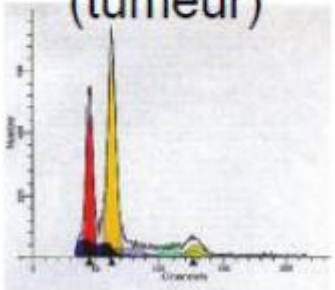
Phase S = augmentation de l'intensité du fait de la synthèse d'ADN (2n chromosomes).

Phases G2-M = 2ème pic.

**Pathologies :**

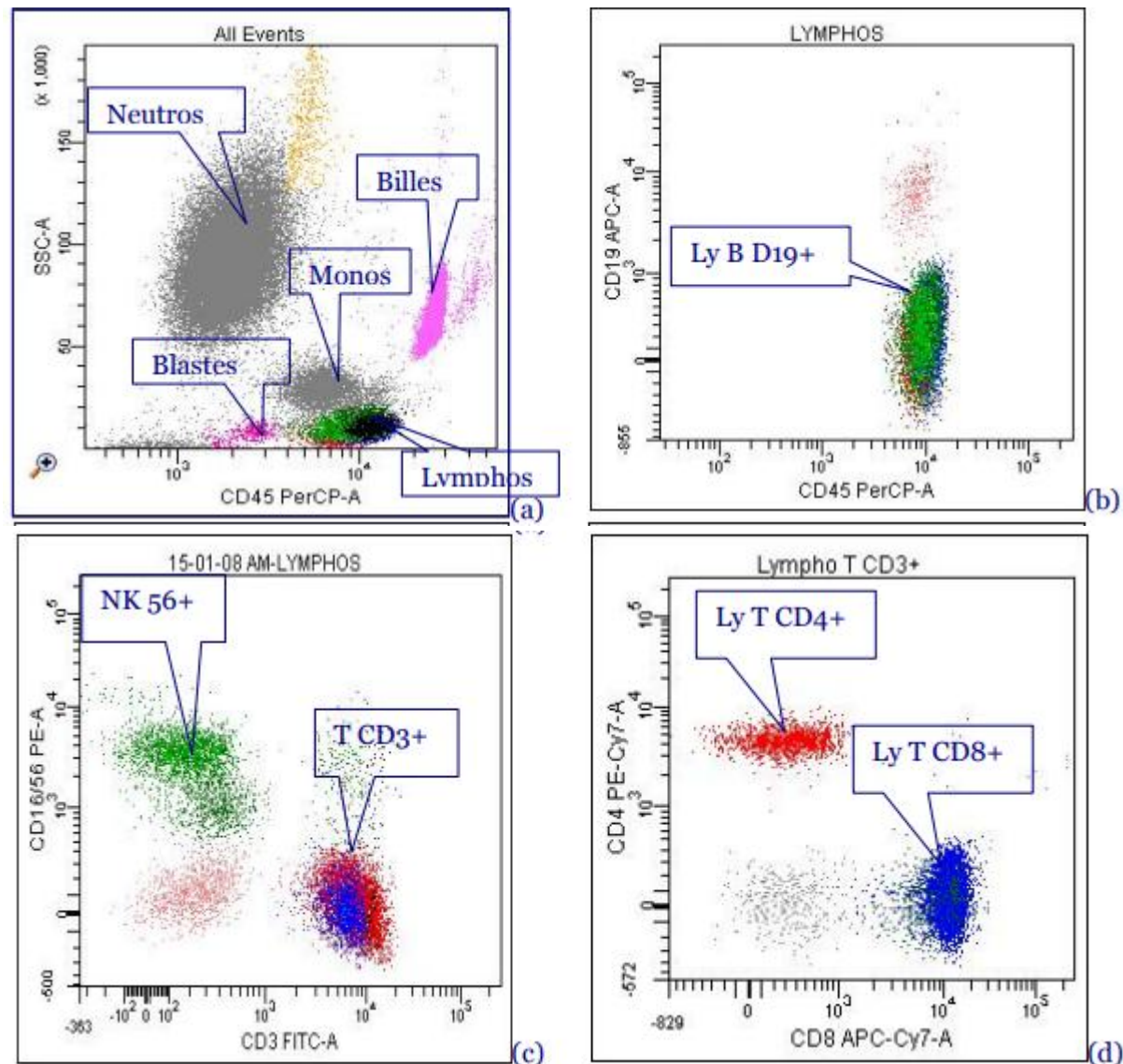
Cycles cellulaires anormaux.

Aneuploïdie  
(tumeur)



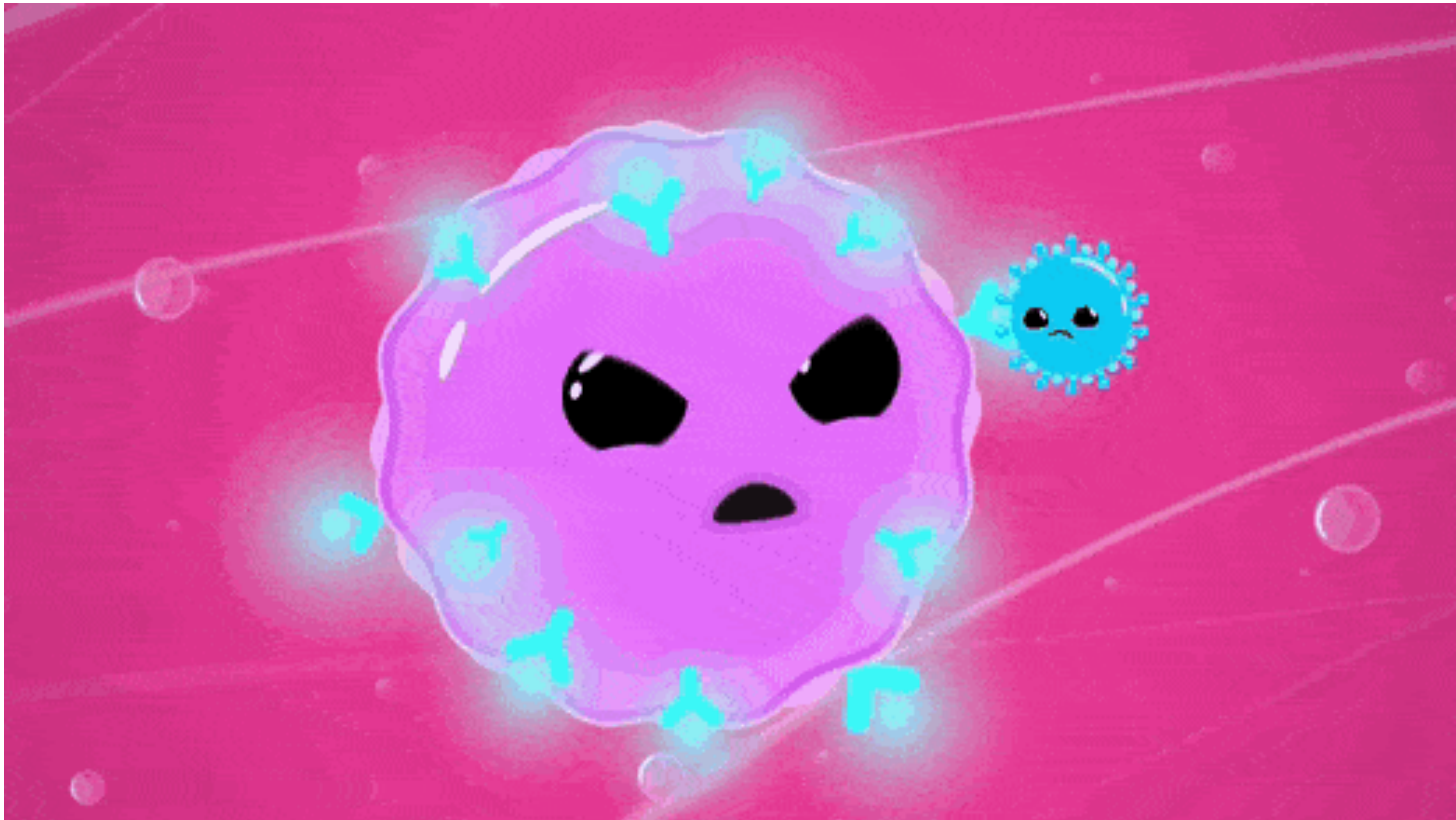
## **2. Comptage des Lymphocytes dans le suivi des infections HIV et des greffes**

L'application la plus courante dans les laboratoires d'Immunologie est le compte des lymphocytes T (Figure B) notamment pour le suivi des infections à HIV ou de greffes. La technique est relativement simple et très robuste. Brièvement, un échantillon (50 à 100  $\mu$ l) de sang est prélevé du tube, incubé avec des anticorps qui identifient les lymphocytes T CD4+ qui expriment les CD3 et CD4. Il est possible d'ajouter dans la même analyse un marqueur pour les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B (CD19 ou CD20), les lymphocytes NK (CD56) voire les CD16 (neutrophiles) et le CD14 ou CD15 (monocytes). Enfin, le CD45 (qui marque tous les leucocytes) est souvent utilisé pour mieux démarquer le signal du bruit de fond.



**Figure B:** Séméiologie typique d'analyse lymphocytaire. (a) distribution des leucocytes; (b) sélection des lymphocytes B (CD19+); (c) sélection des lymphocytes T (CD3+) et des NK (CD3-CD56+); (d) sélection des sous populations lymphocytaires T CD4+ ou T CD8+.

La Cytométrie en flux est la méthode la plus fiable de comptage des lymphocytes T. Elle est rapide : maximum 30 minutes de préparation pour une à trois minutes d'analyse. L'utilisation simultanée de plusieurs paramètres permet une identification très précise des cellules comptées.



## **XII. L'immense avantage de la méthode par rapport à d'autre consiste en deux points**

- ❑ Contrairement à la microscope optique à fluorescence, la cytométrie permet d'analyser un très grand nombre de cellules ;
- ❑ Contrairement aux techniques de biologie moléculaire, qui permettent de travailler sur un ensemble de cellules, la cytométrie permet d'établir des paramètres cellule par cellule.

