

DES de Biologie Médicale
Enseignement d'Immunologie



ET05
Cytométrie en flux

Phnom Penh
Septembre 2009

Michelle Rosenzweig
Service de Biothérapies/UPMC CNRS
UMR7211 INSERM U959
Pitié-Salpêtrière - Paris - France
michelle.rosenzweig@upmc.fr

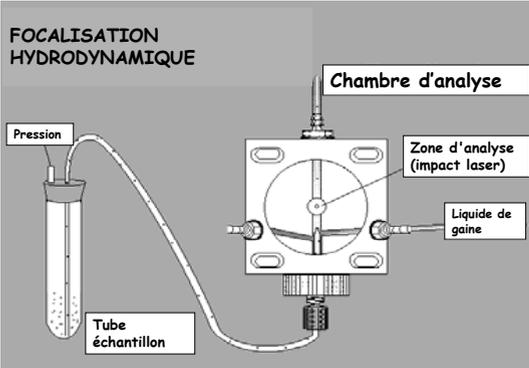
CYTOMETRIE EN FLUX

Définition : la cytométrie en flux est un outil qui permet de caractériser les éléments d'une suspension cellulaire et/ou particulaire monodispersée entraînés par un flux liquide sous-pression".

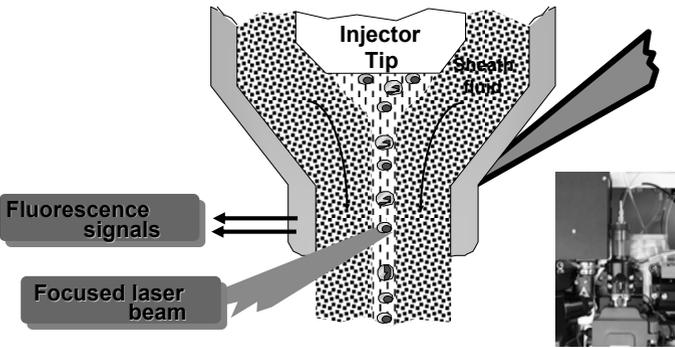
Par extension, la cytofluorométrie en flux est un outil qui offre en plus la possibilité d'analyser l'émission de fluorescence de ces cellules ou particules.

Permet le groupement en sous-populations homogènes des cellules d'une population hétérogène.

CYTOMETRIE EN FLUX: LE PRINCIPE

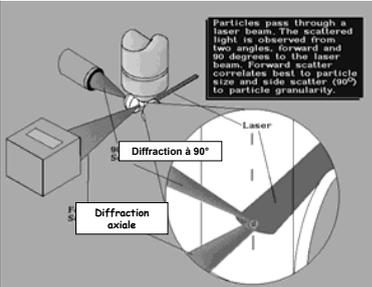


La chambre d'analyse= Flow cell



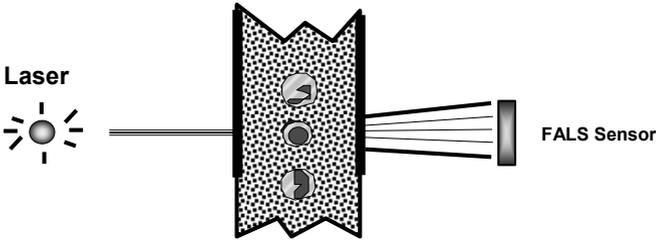
CYTOMETRIE EN FLUX: LE PRINCIPE

DIFFRACTION LASER

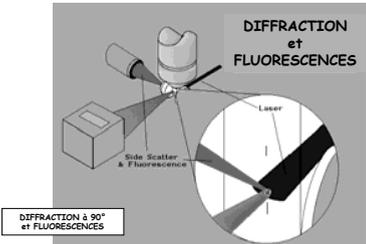


- Chaque événement passant devant le faisceau laser va diffracter de la lumière laser, et l'on mesure :
- dans l'axe : image de la taille des cellules (FS= Forward Scatter)
- à 90° : image de la structure des cellules (SS= Side Scatter)

Forward Angle Light Scatter
Mesure la taille des cellules

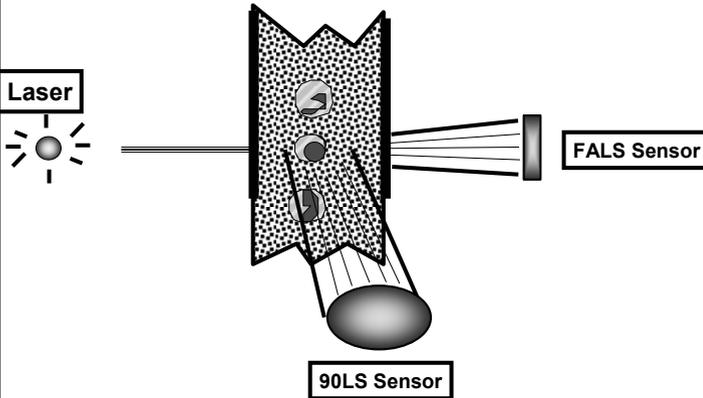


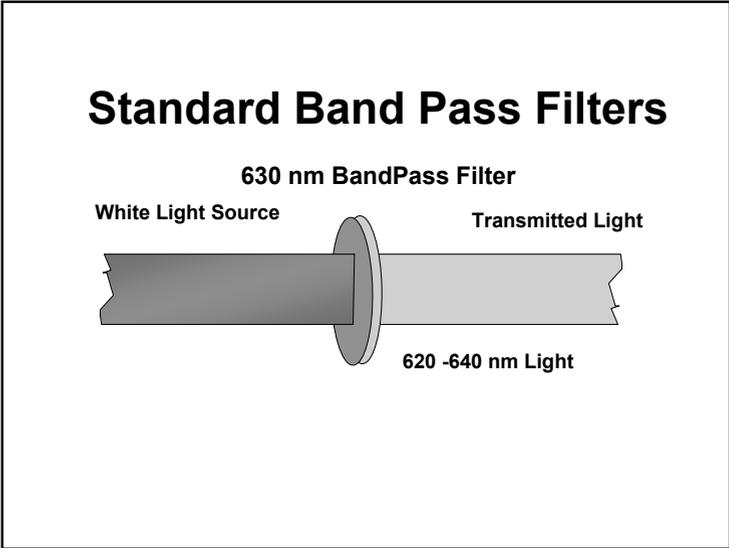
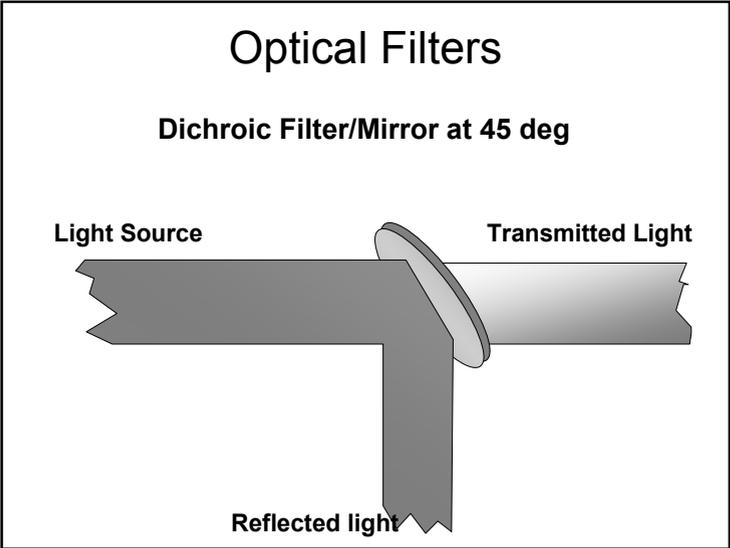
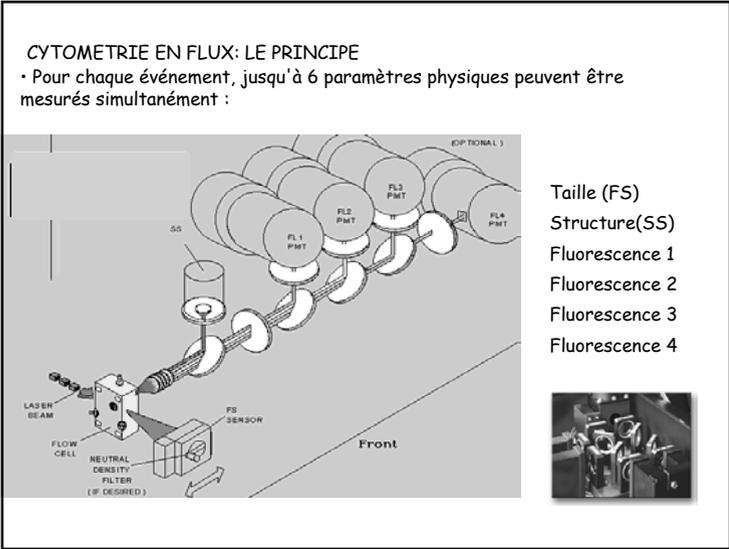
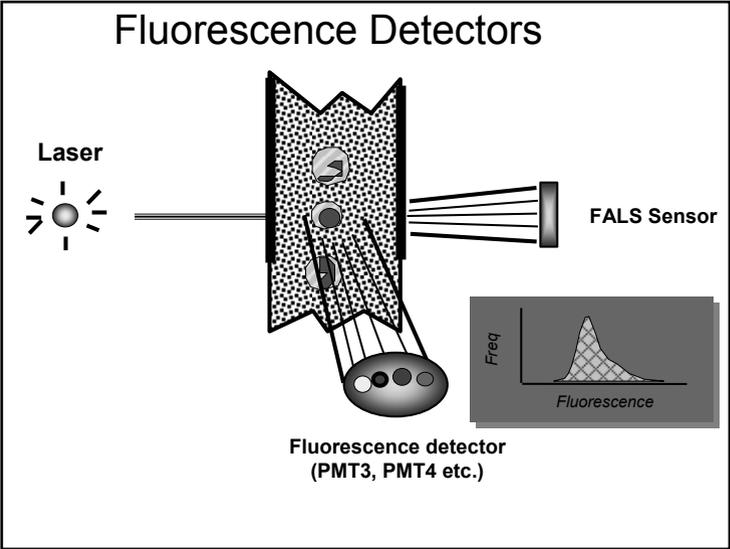
CYTOMETRIE EN FLUX
LE PRINCIPE

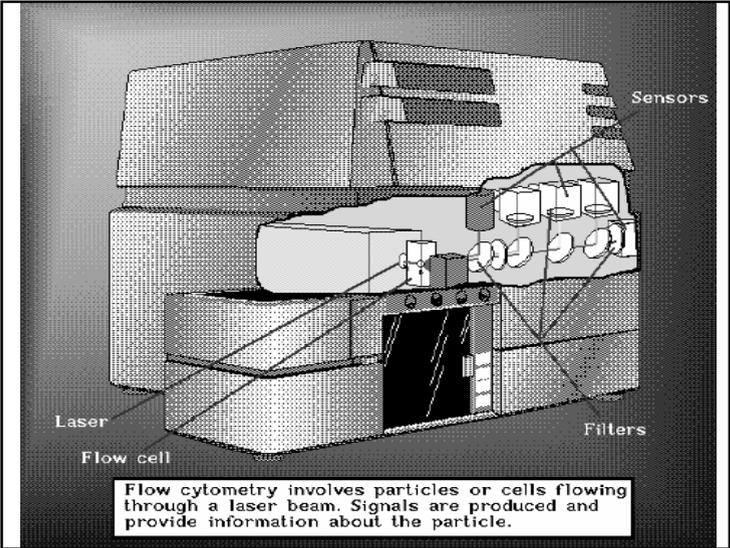
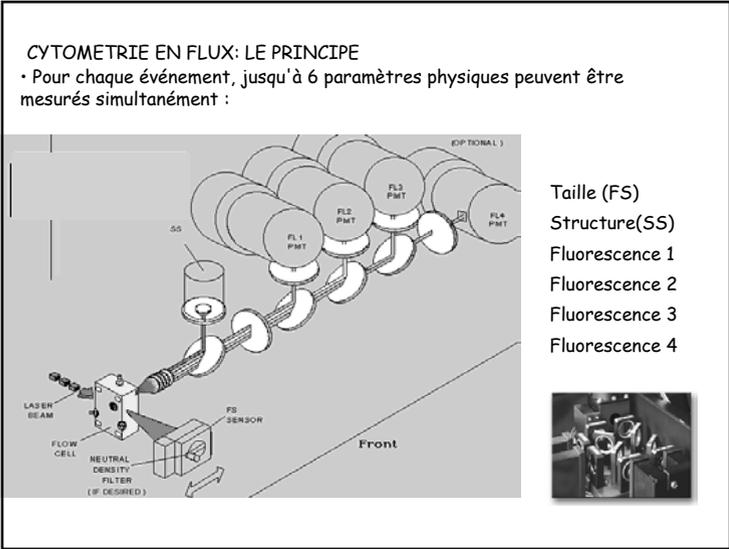
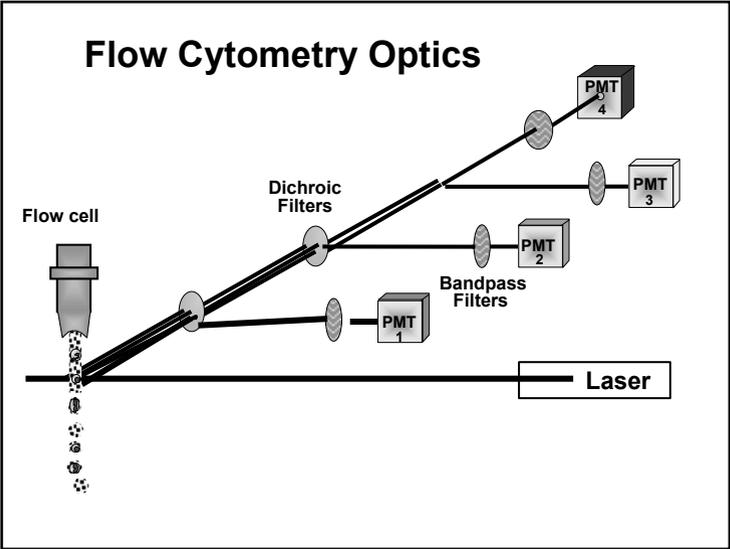


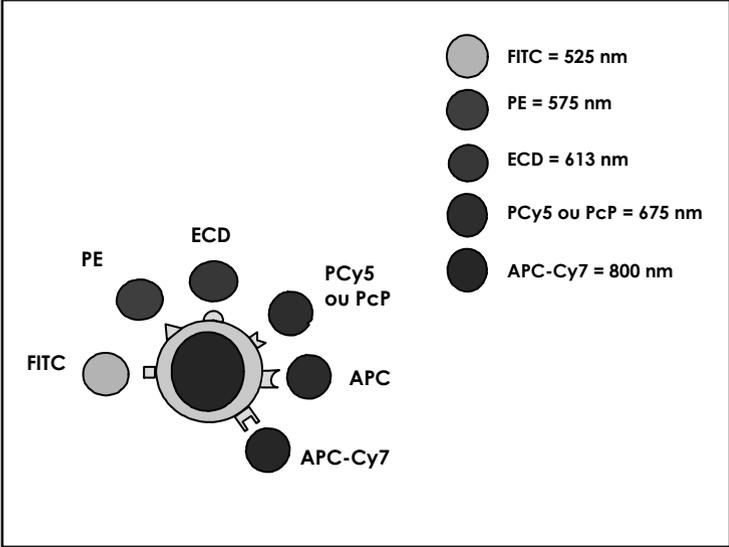
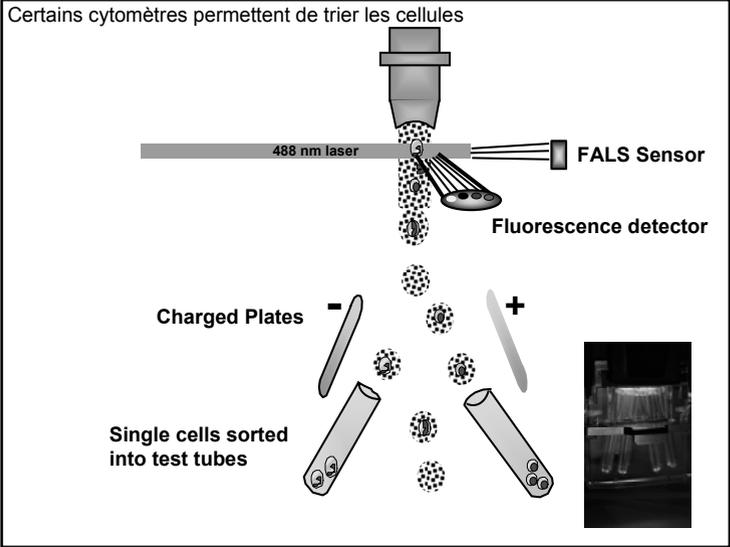
- Chaque événement passant devant le faisceau laser peut aussi émettre la fluorescence, qui sera mesurée à 90° .

90 Degree Light Scatter= Side Scatter
Mesure la granulométrie des cellules





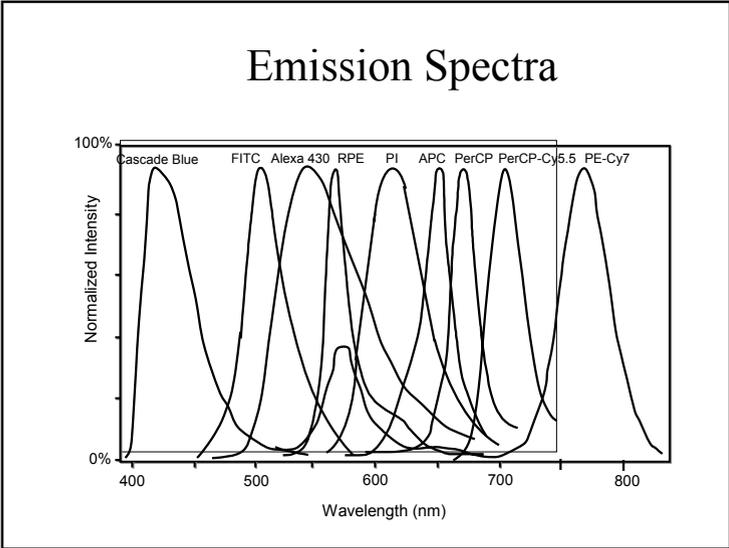




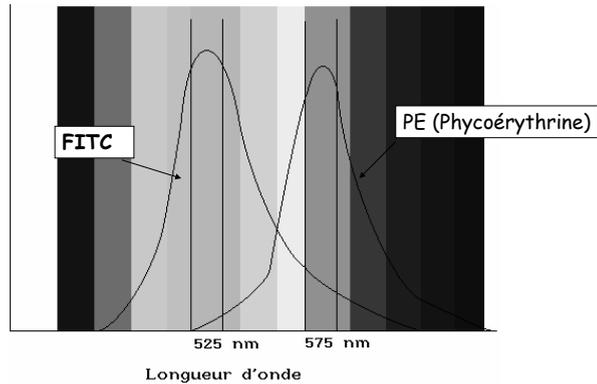
Choix de fluorochromes pour immuno-marquages multiples

- longueur d'onde d'excitation et longueur d'onde d'émission

1 seul laser : argon 488 nm			
Fluorescence 1	FITC (525 nm)		
Fluorescence 2	PE (575 nm)		
Fluorescence 3	PE-TexasRed (ECD) (613 nm)		
Fluorescence 4	PE-Cyanine 5 (675 nm) ou PerCP (680 nm)		
2 lasers : Argon 488 nm Hélium-Néon 633 nm			
Fluorescence 1	FITC (525 nm)	Fluorescence 4	APC (675 nm)
Fluorescence 2	PE (575 nm)		ou TexasRed
Fluorescence 3	PE-Cyanine 5 (675 nm) ou PerCP (680 nm)		ou Cyanine 5
		Fluorescence 5	APC-Cy7 (≈800 nm)

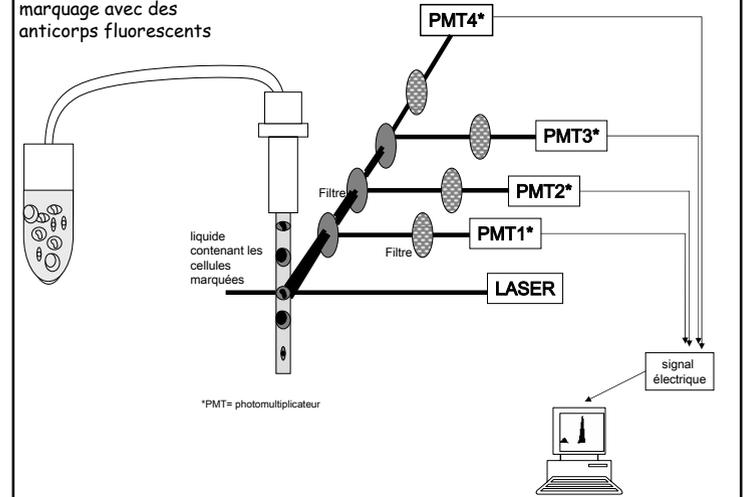


Spectres d'émission de fluorochromes: la compensation



Le réglage de la compensation est indispensable à cause du chevauchement des spectre d'émission des fluorochromes

suspension cellulaire après marquage avec des anticorps fluorescents



LA CYTOMETRIE DE FLUX: APPLICATIONS

- Molécules membranaires, intracellulaires, ADN, ARN...
- Sang, moelle, autres liquides biologiques, tissus...
- En Immunologie
 - Numération des lymphocytes CD4 et CD8
 - Etude des sous populations lymphocytaires: déficits immunitaires, suivi de greffe de moelle osseuse
 - Immunophénotypage des hémopathies malignes chroniques (LLC, LNH), aigüés (LAL B, LAL T, LAM)
 - Etude des fonctions lymphocytaires
 - Flux calcique
 - Cytokines
 - Cycle cellulaire
 - Prolifération cellulaire
 - ...

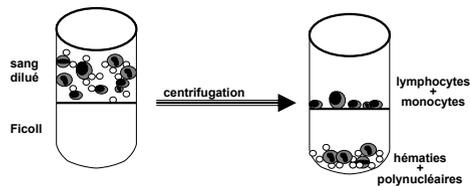
CYTOMETRIE EN FLUX: les applications

L'IMMUNOPHENOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE a pour but d'identifier les différentes sous populations de lymphocytes dans le sang, la moëlle, ou après sélection des cellules mononucléées (Ficoll)

1) MARQUAGE SUR SANG TOTAL

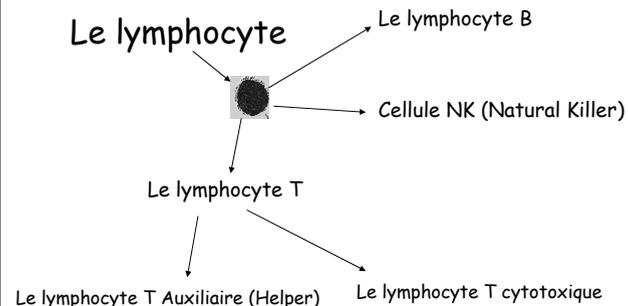
- 50-100 μ l de sang total recueilli sur anticoagulant
- 5, 10 ou 20 μ l du ou des anticorps conjugués
- 15-30 min d'incubation à l'abri de la lumière
- lyse des globules rouges
- \pm lavage
- analyse au cytomètre

2) MARQUAGE APRES SEPARATION DES CELLULES MONONUCLEES SUR FICOLL

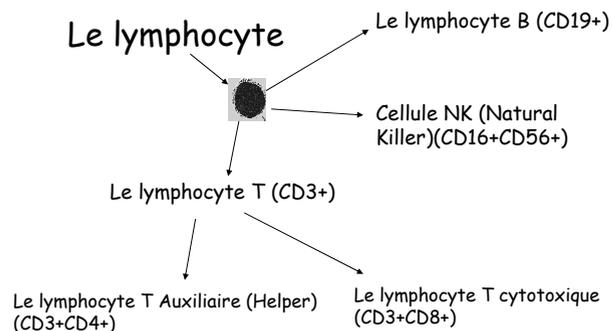


- Numération cellulaire (5 10⁵ cellules/100µl)
- 5, 10 ou 20 µl du ou des anticorps conjugués à un fluorochrome
- 15-30 min d'incubation à l'abri de la lumière
- lavage et re-suspension dans du tampon
- analyse au cytomètre

CYTOMETRIE EN FLUX



CYTOMETRIE EN FLUX



Le choix des anticorps?

Nomenclature: CD = cluster de différenciation

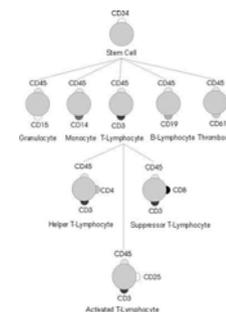
Un CD définit une molécule qui sera reconnue par des anticorps monoclonaux. Les CD permettent de distinguer des lignées, des stades de différenciation, une spécialisation fonctionnelle ...

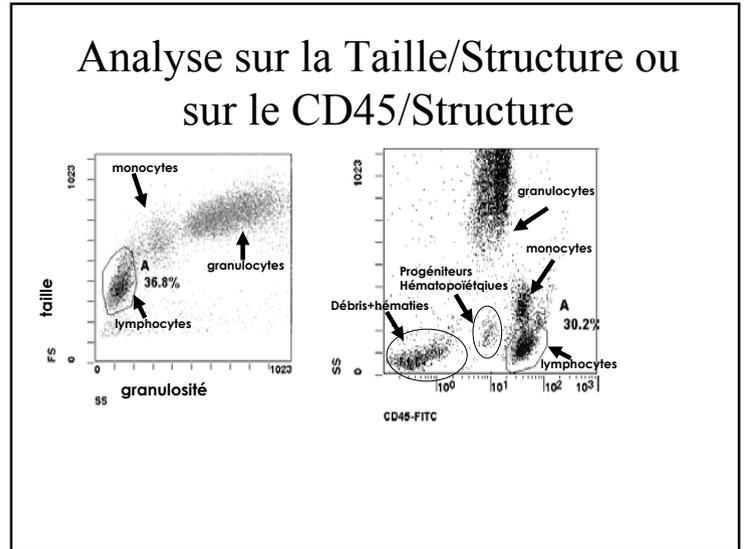
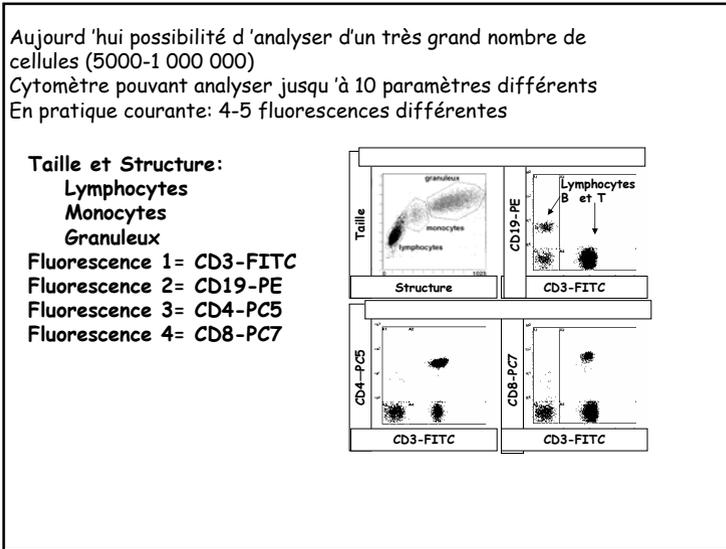
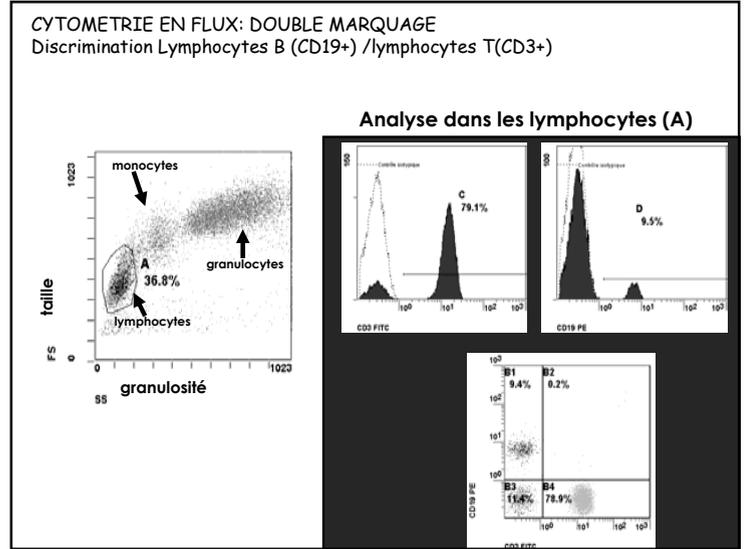
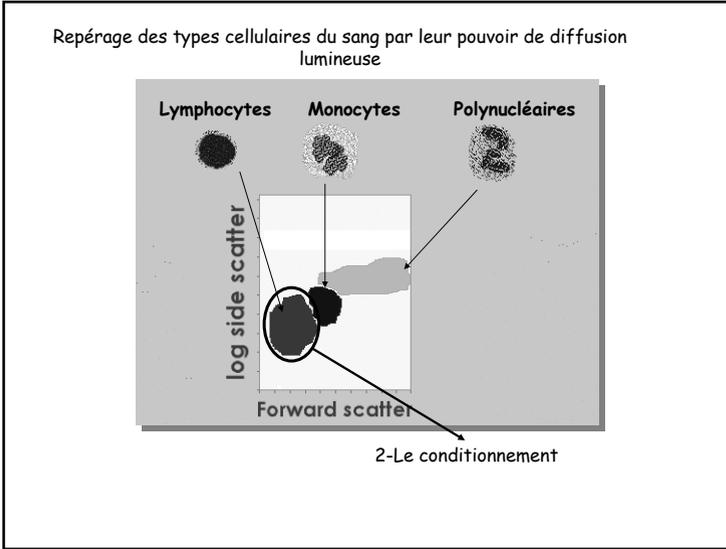
Marqueurs de lignées: (parfois aussi retrouvés sur sous population d'autres lignées)

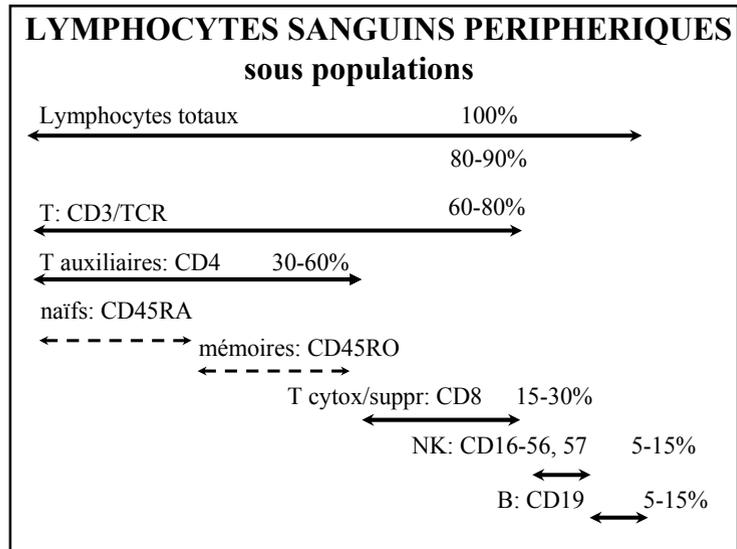
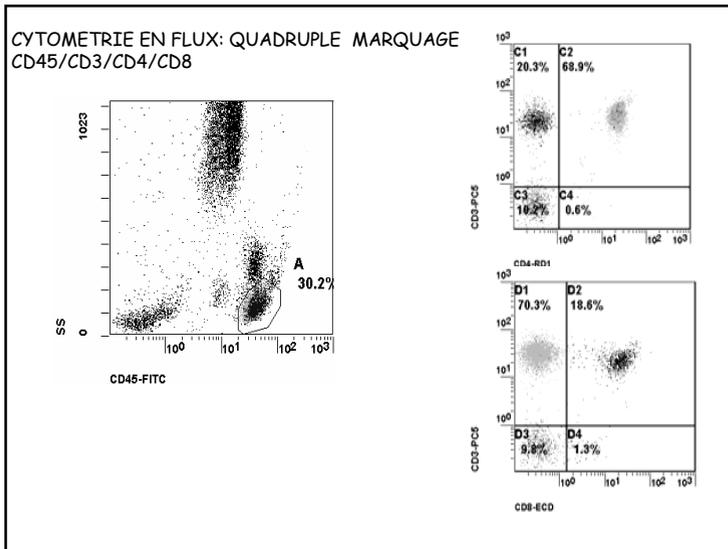
- Lignée T : CD2, CD3, CD5, CD7, CD4, CD8
- Lignée B : CD19, CD20, CD22, CD24
- Lignée NK: CD16, CD56
- Lignée myéloïde: CD13, CD33, CD117
- Lignée granuleuses: CD15, CD16, CD66
- Lignée monocyttaire: CD11c, CD14, CD36CD68
- Lignée érythrocytaire: (CD235, CD71, CD36)
- Lignée plaquettaire: CD41, CD42, CD61

Stades de différenciation:

- LT naifs: CD45RA, CD62L
- LT mémoires: CD45RO
- Cellules immatures: CD34
- Plasmocytres: CD38, CD138
- Molécules d'adhésion: CD11b, CD11c, CD54, CD58
- Molécules de costimulation: CD40, CD80, CD86
- Marqueurs d'activation: CD25, CD69, CD71







Numération des phénotypes lymphocytaires en valeur absolue par mm³ de sang

1^{ère} méthode :

Multiplication des pourcentages obtenus en CMF par les chiffres de la NFS.

2^e méthode :

Calibration du cytomètre pour une acquisition pendant un temps fixe, de telle sorte qu'un volume constant de sang soit pris en compte par la machine.

3^e méthode :

Adjonction, à chaque échantillon, d'une quantité connue de billes fluorescentes facilement repérables. Le logiciel donnera automatiquement le nombre de cellules comptées, rapporté au nombre de billes et donc au volume.

APPLICATION

Numération des Lymphocytes T CD4 et CD8

1. Sang total (50-100µl)

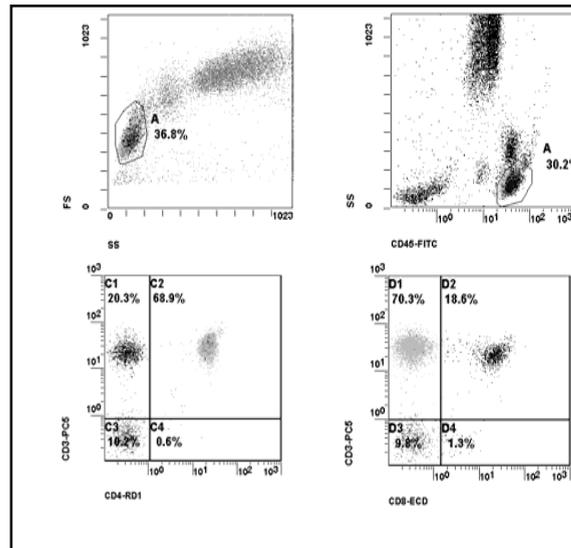
2. Marquage (10-15min)

Incubation avec les anticorps couplés à un fluorochrome

3. Lyse des hématies+ fixation

4. Analyse

10 000 cellules/1-3 min



•Les résultats sont exprimés en pourcentage de lymphocytes et peuvent être transformés en nombre de cellules/µl de sang à partir de la NFS

$$\frac{\text{CMF}}{\% \text{ de CD / lymphocytes}} = \frac{\text{NFS}}{\text{GB} \times \% \text{Lymphocytes}}$$

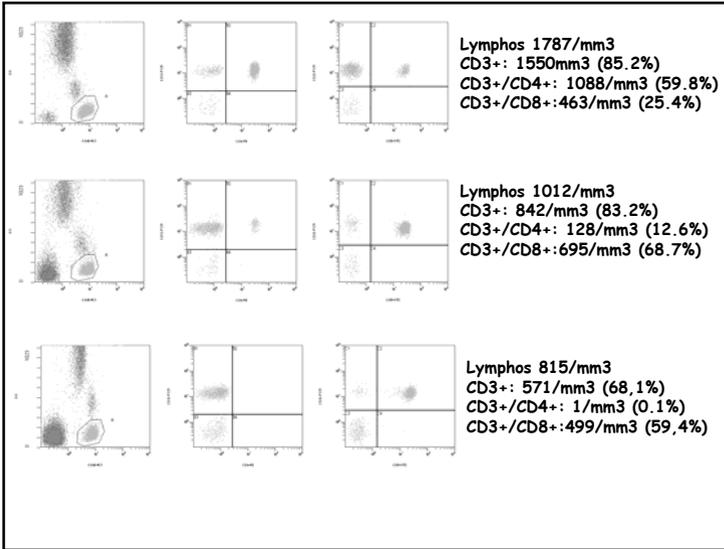
$$\frac{\text{CD}/\mu\text{l}}{\text{GB} \times \% \text{Lymphocytes} \times \% \text{ de CD}}$$

Ou

•Mesure de la valeur absolue par l'addition de de billes fluorescentes dont la quantité est connue

$$\text{CD}/\mu\text{l} = \frac{\text{Nb CD}}{\text{Nb de billes}} \times \frac{\text{Nb de billes}}{\text{ml de sang}}$$

Normes		
Lymphocytes	32±8	1700-4000/mm ³
LT:		
CD3	75±5%	1500±300/mm ³
CD4	45±7%	900±200/mm ³
CD8	31±6%	50±200/mm ³
	CD4/CD8 > 0.9	
LB:		
CD19	15±2	300±60/mm ³
NK		
CD16+/CD56+	12±4	250±100/mm ³



APPLICATION

Analyse quantitative et/ou qualitative des populations cellulaires

- sang
- moelle
- autres liquides biologiques

Phénotypage des sous populations lymphocytaires

Diagnostic d'un déficit immunitaire

Reconstitution immunitaire après greffe de moelle

Caractérisation d'une hémopathie maligne chronique ou aigue

Prolifération lymphoïde chronique (LNH, LLC)

Leucémie Aiguë Lymphoblastique ou Myeloblastique

Tutorial

- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>