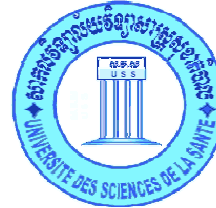


DES de Biologie Médicale Enseignement d'Immunologie



ET05

Cytométrie en flux

Phnom Penh
Septembre 2009

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

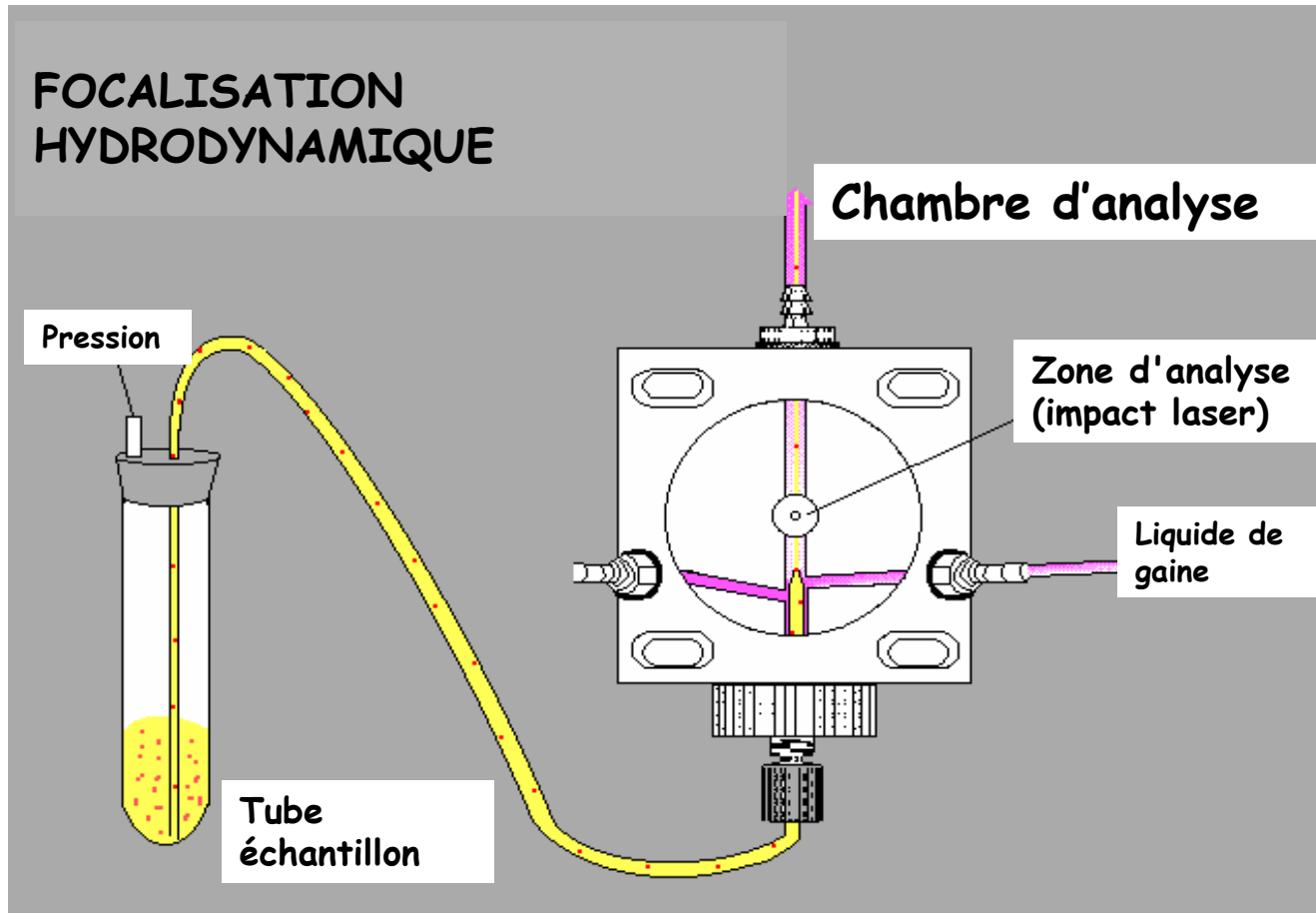
CYTOMETRIE EN FLUX

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

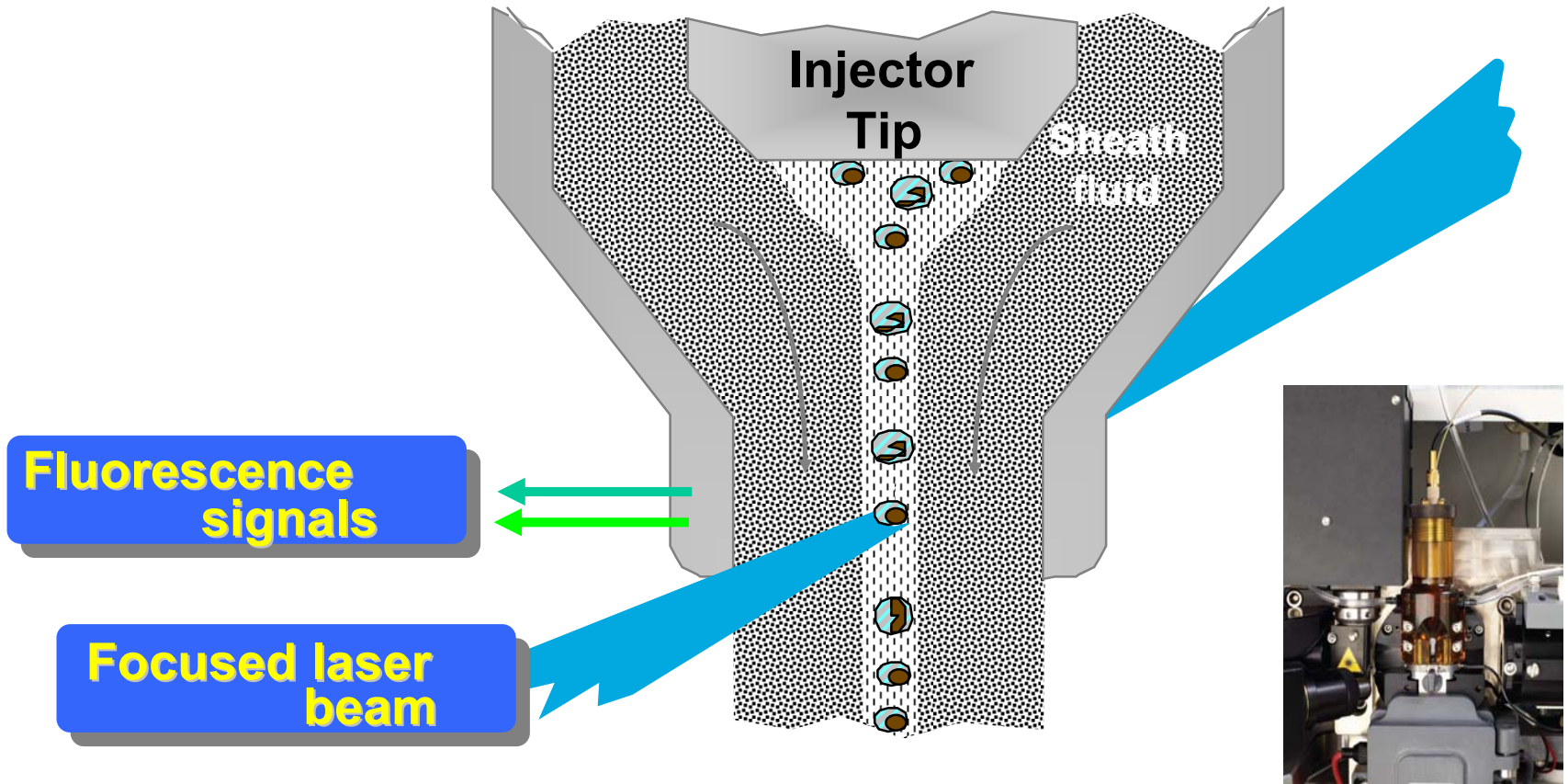
Par extension, la cyto**fluor**ométrie en flux est un outil qui offre en plus la possibilité d'analyser l'émission de fluorescence de ces cellules ou particules.

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

CYTOMETRIE EN FLUX: LE PRINCIPE

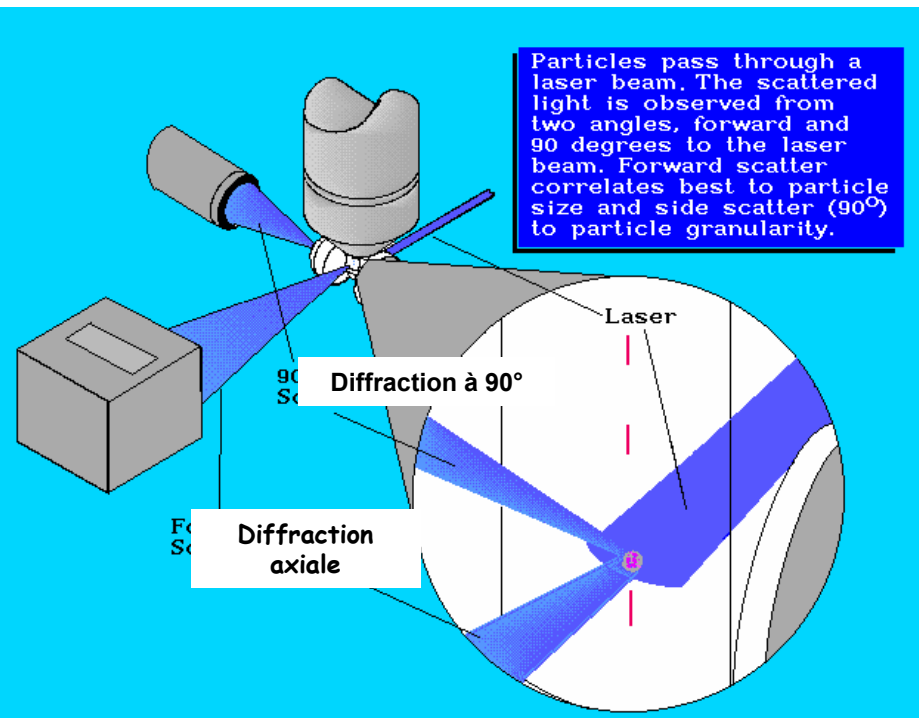


La chambre d'analyse= Flow cell



CYTOMETRIE EN FLUX: LE PRINCIPE

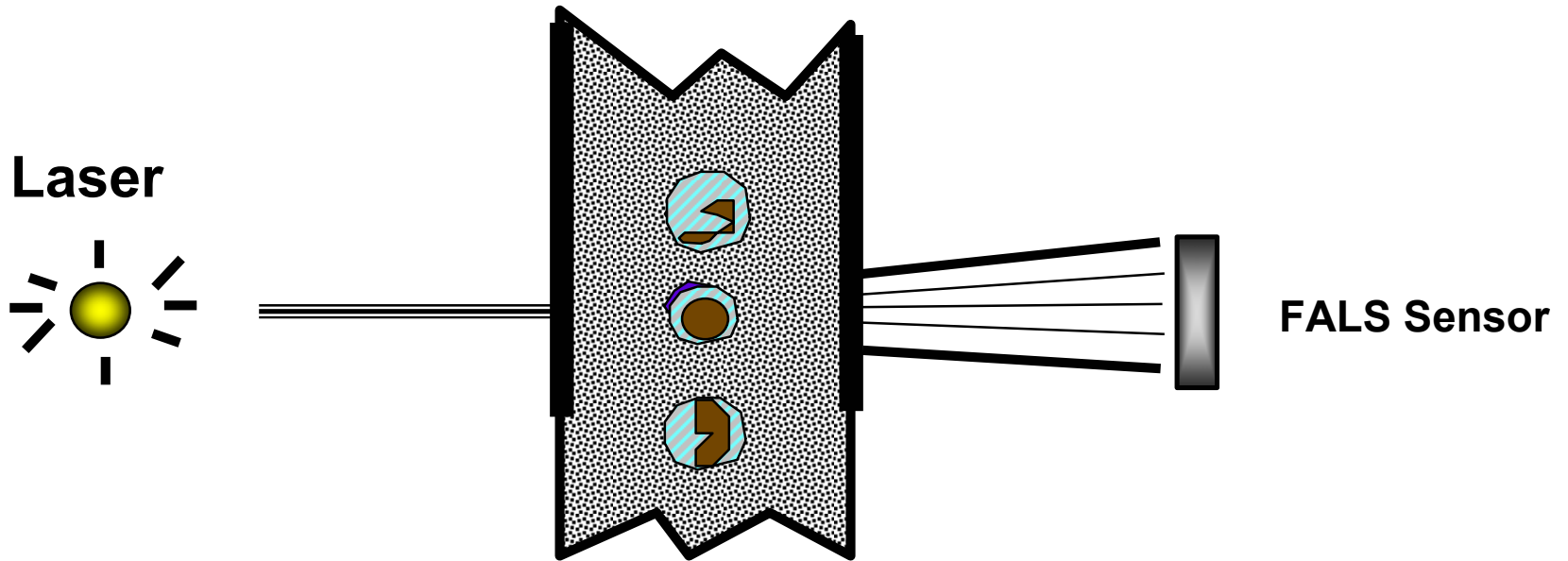
DIFFRACTION LASER



- 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)

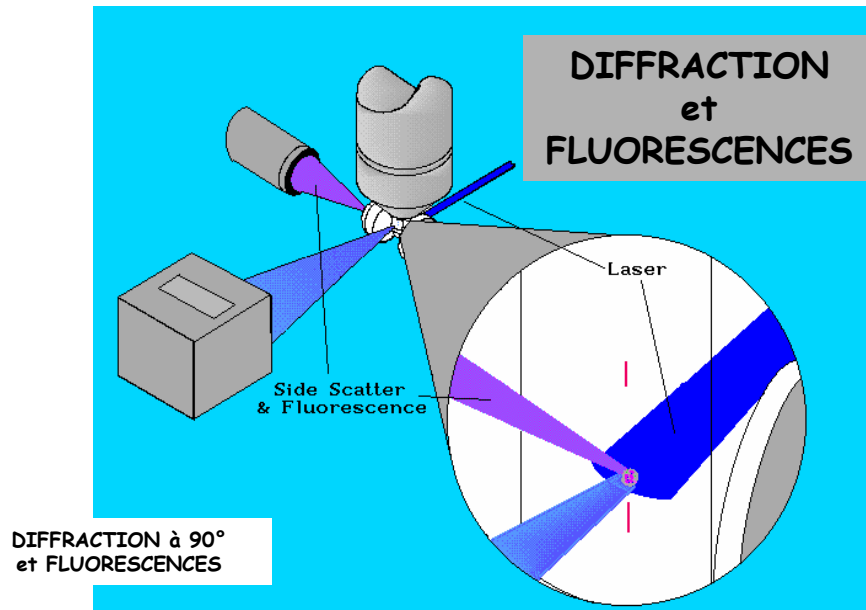
Forward Angle Light Scatter

Mesure la taille des cellules



CYTOMETRIE EN FLUX

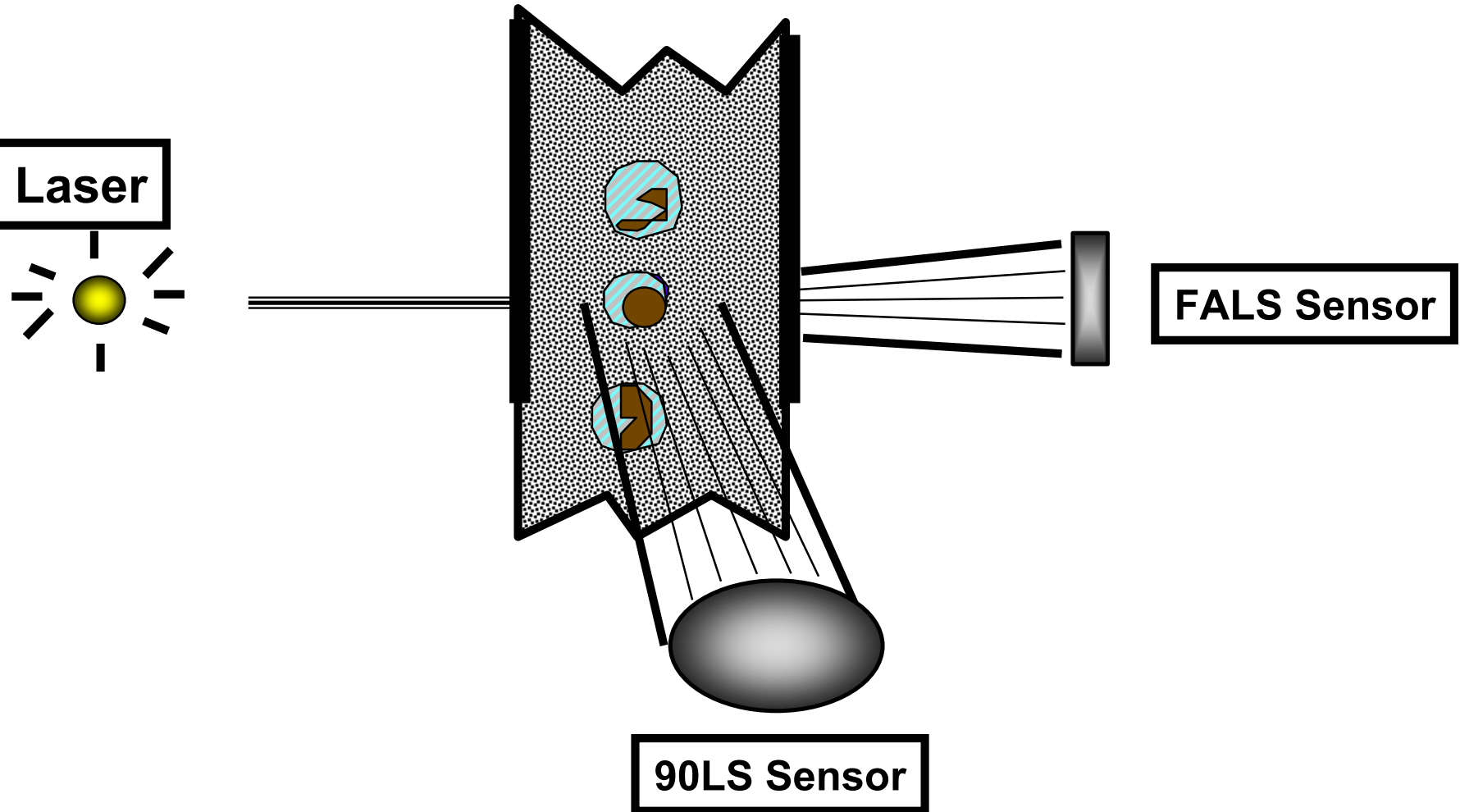
LE PRINCIPE



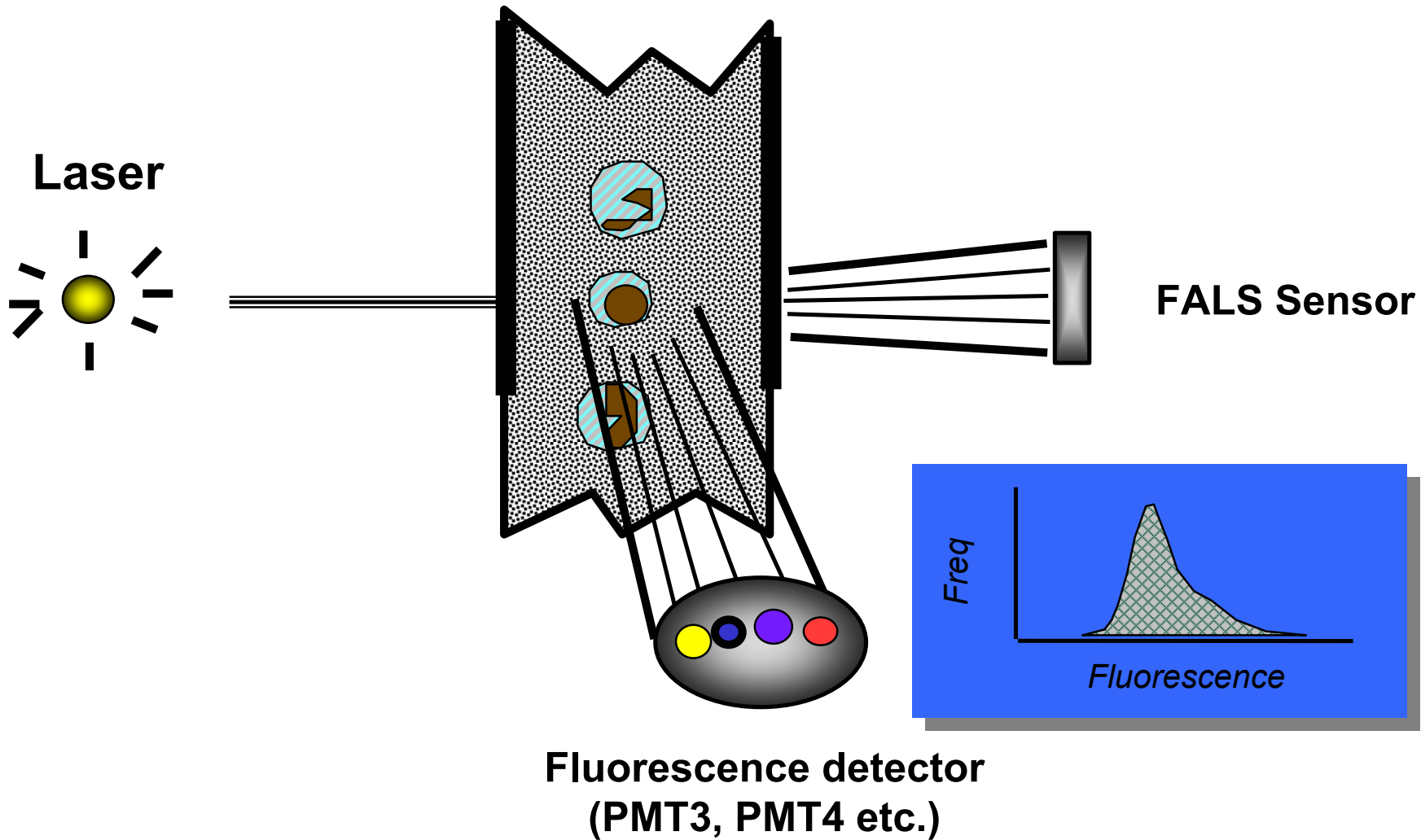
- Chaque évènement passant devant le faisceau laser peut aussi émettre de la fluorescence, qui sera mesurée à 90° .

90 Degree Light Scatter= Side Scatter

Mesure la granulosité des cellules

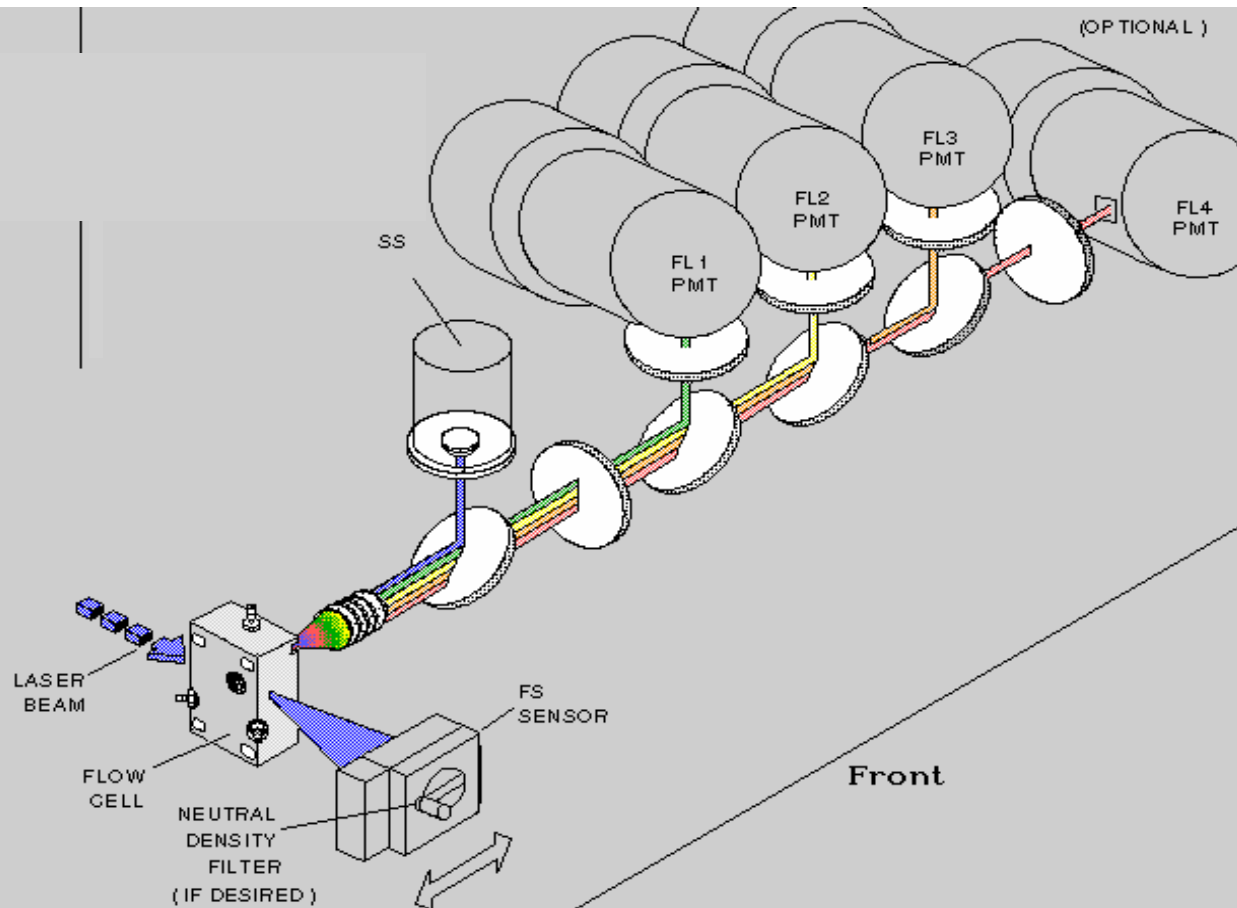


Fluorescence Detectors



CYTOMETRIE EN FLUX: LE PRINCIPE

- Pour chaque événement, jusqu'à 6 paramètres physiques peuvent être mesurés simultanément :



Taille (FS)

Structure(SS)

Fluorescence 1

Fluorescence 2

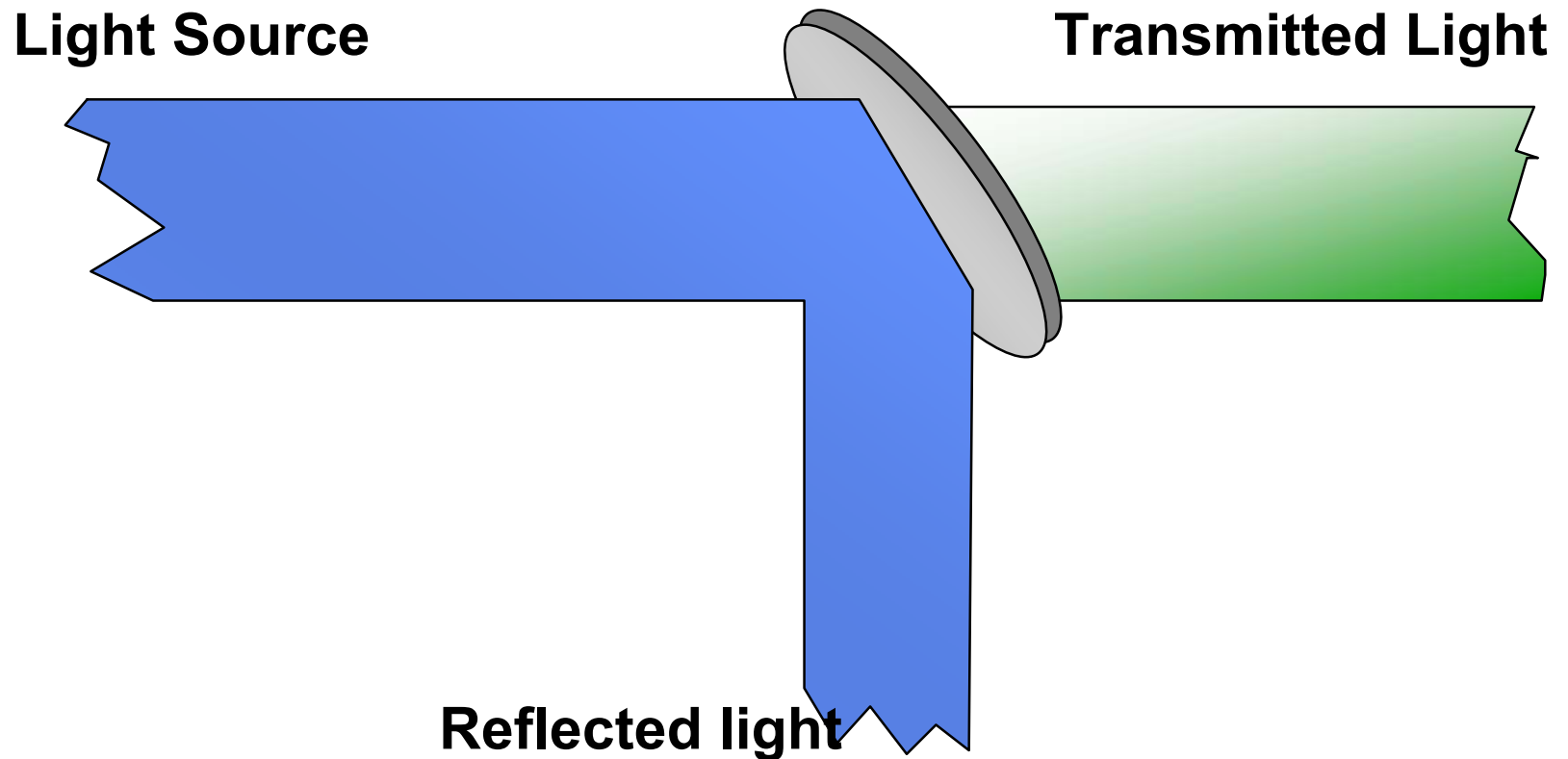
Fluorescence 3

Fluorescence 4



Optical Filters

Dichroic Filter/Mirror at 45 deg

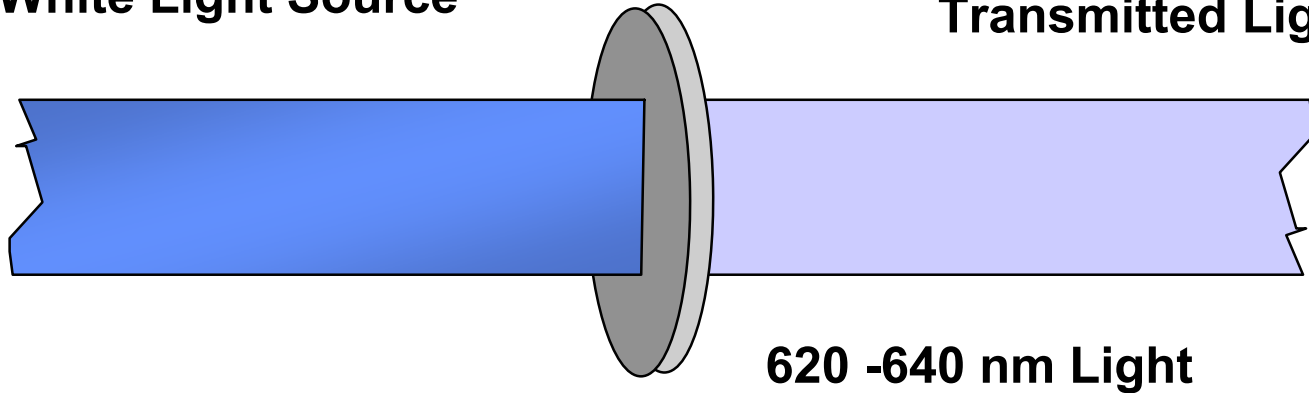


Standard Band Pass Filters

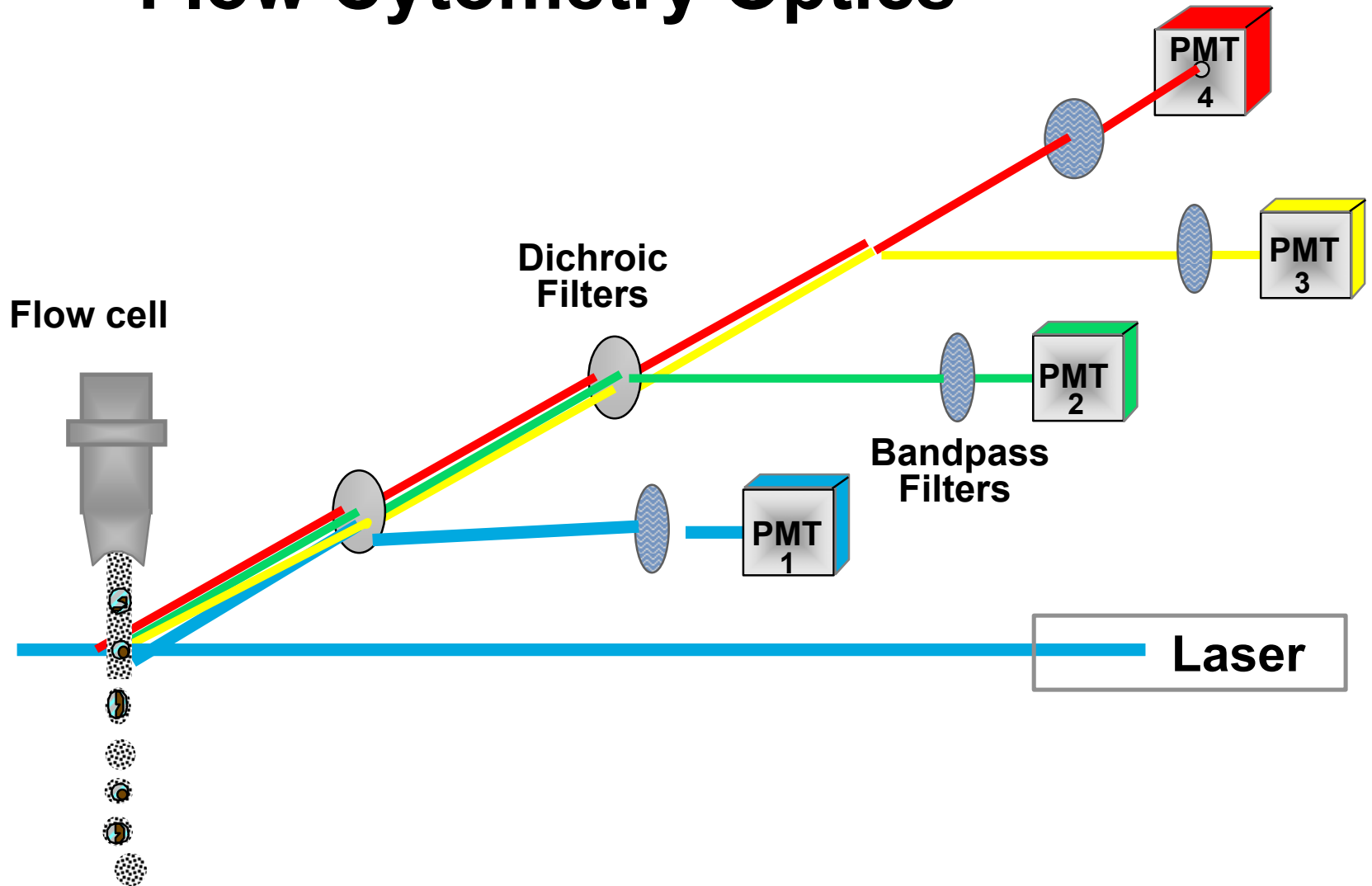
630 nm BandPass Filter

White Light Source

Transmitted Light

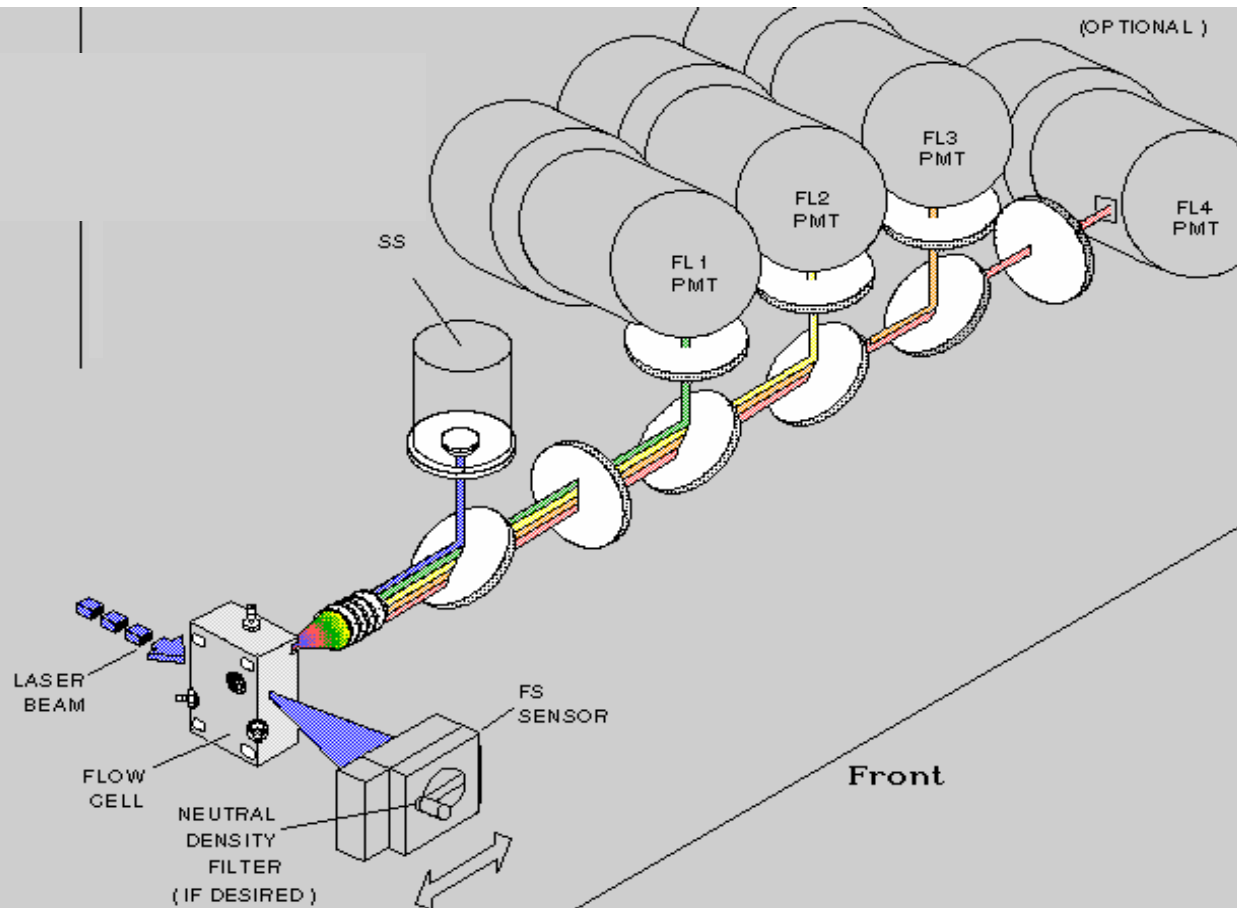


Flow Cytometry Optics



CYTOMETRIE EN FLUX: LE PRINCIPE

- Pour chaque événement, jusqu'à 6 paramètres physiques peuvent être mesurés simultanément :



Taille (FS)

Structure(SS)

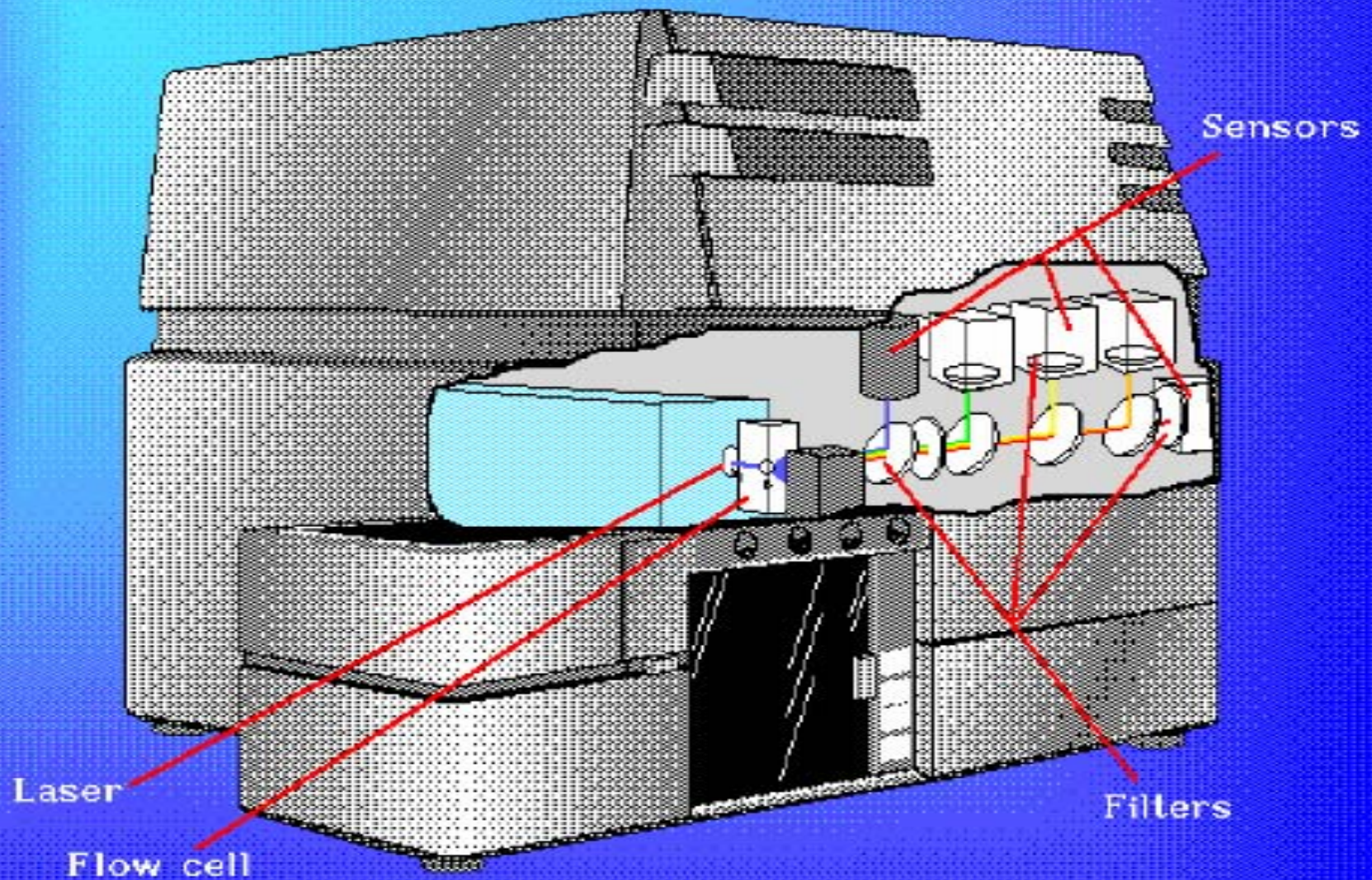
Fluorescence 1

Fluorescence 2

Fluorescence 3

Fluorescence 4

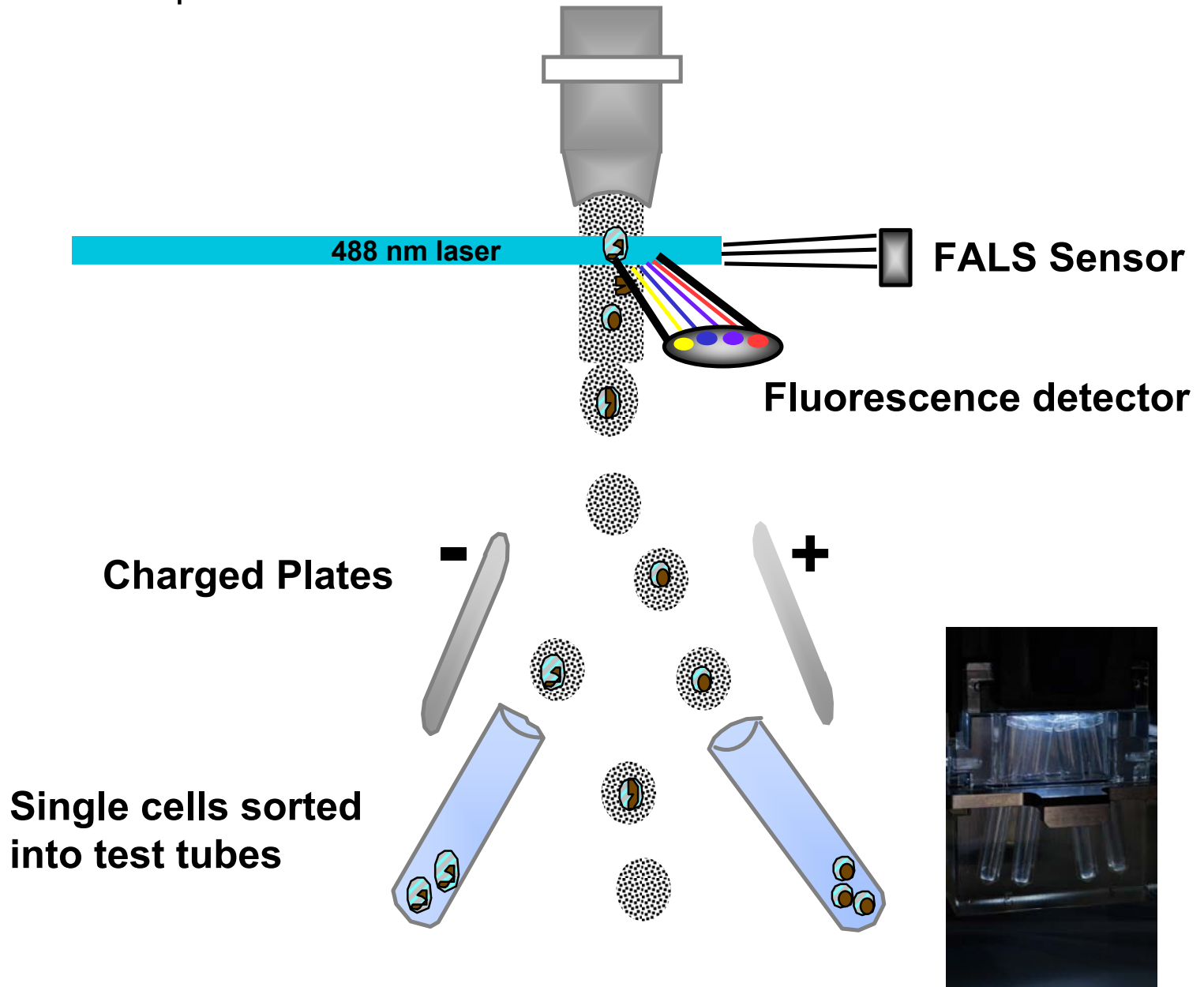


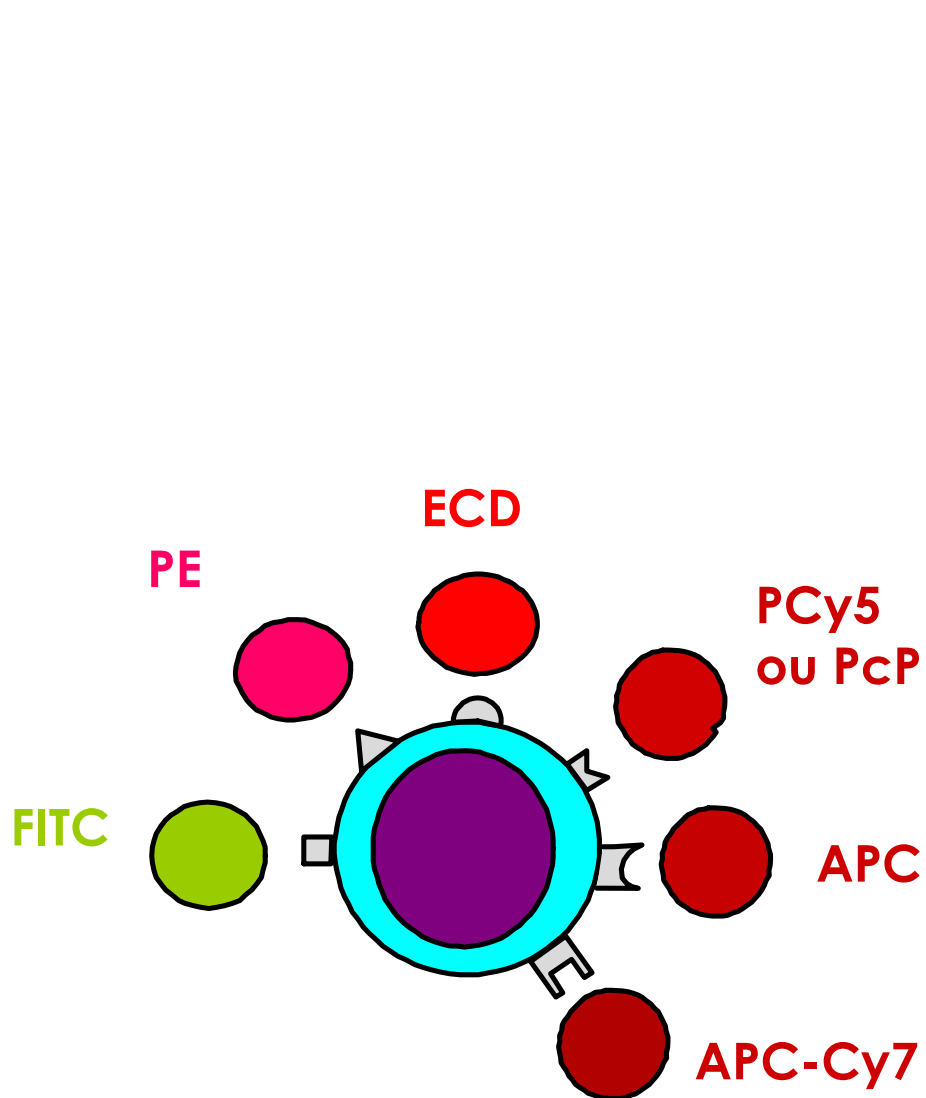


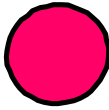
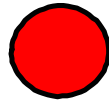
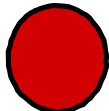
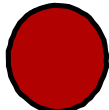
Flow cytometry involves particles or cells flowing through a laser beam. Signals are produced and provide information about the particle.



Certains cytomètres permettent de trier les cellules





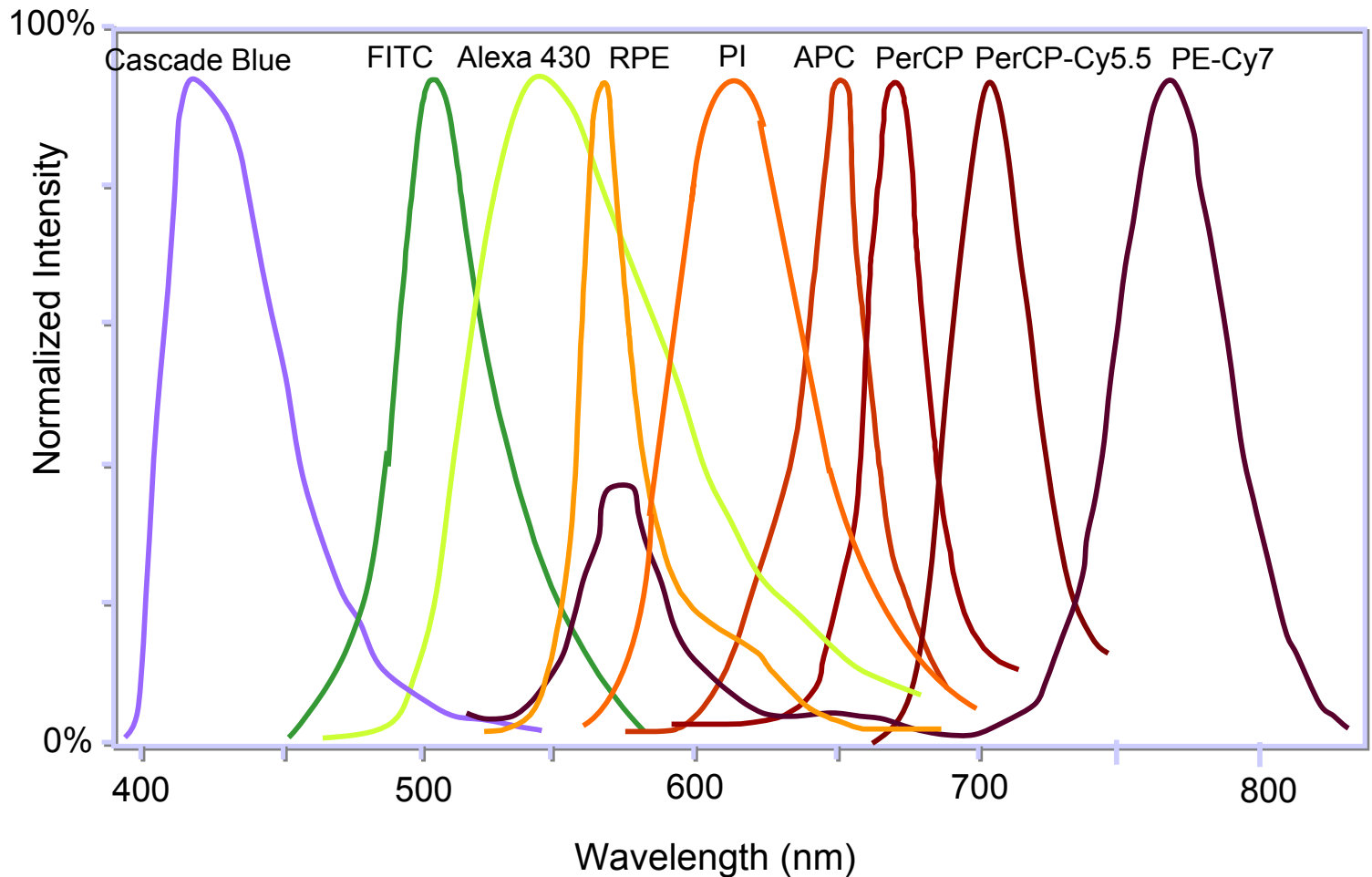
-  **FITC = 525 nm**
-  **PE = 575 nm**
-  **ECD = 613 nm**
-  **PCy5 ou PcP = 675 nm**
-  **APC-Cy7 = 800 nm**

Choix de fluorochromes pour immuno-marquages multiples

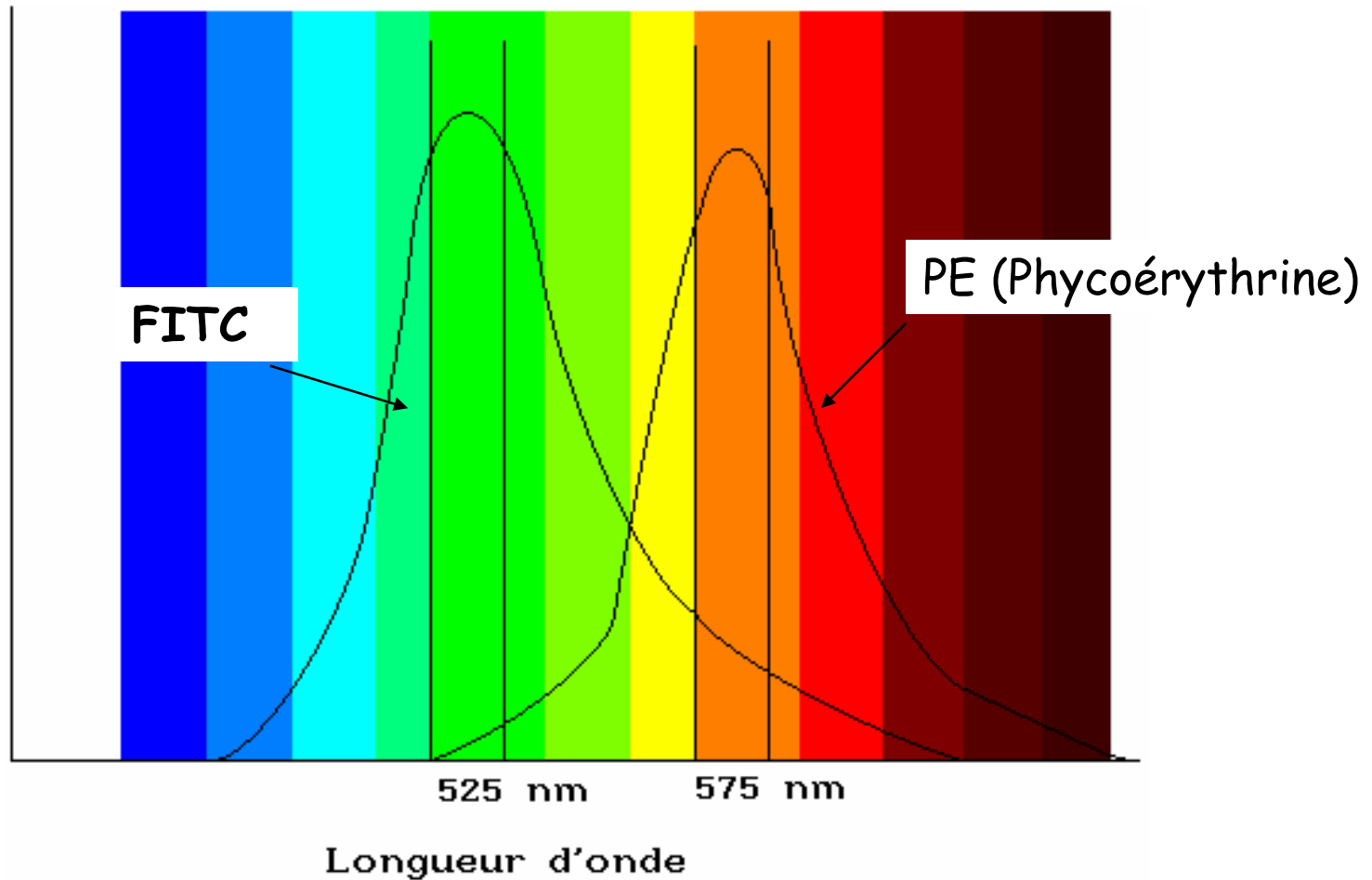
- longueur d 'onde d'excitation et longueur d 'onde d'émission

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 2	PE (575 nm)
Fluorescence 3	PE-Cyanine 5 (675 nm) ou PerCP (680 nm)
	Fluorescence 4 APC (675 nm) ou TexasRed ou Cyanine 5
	Fluorescence 5 APC-Cy7 (≈800 nm)

Emission Spectra

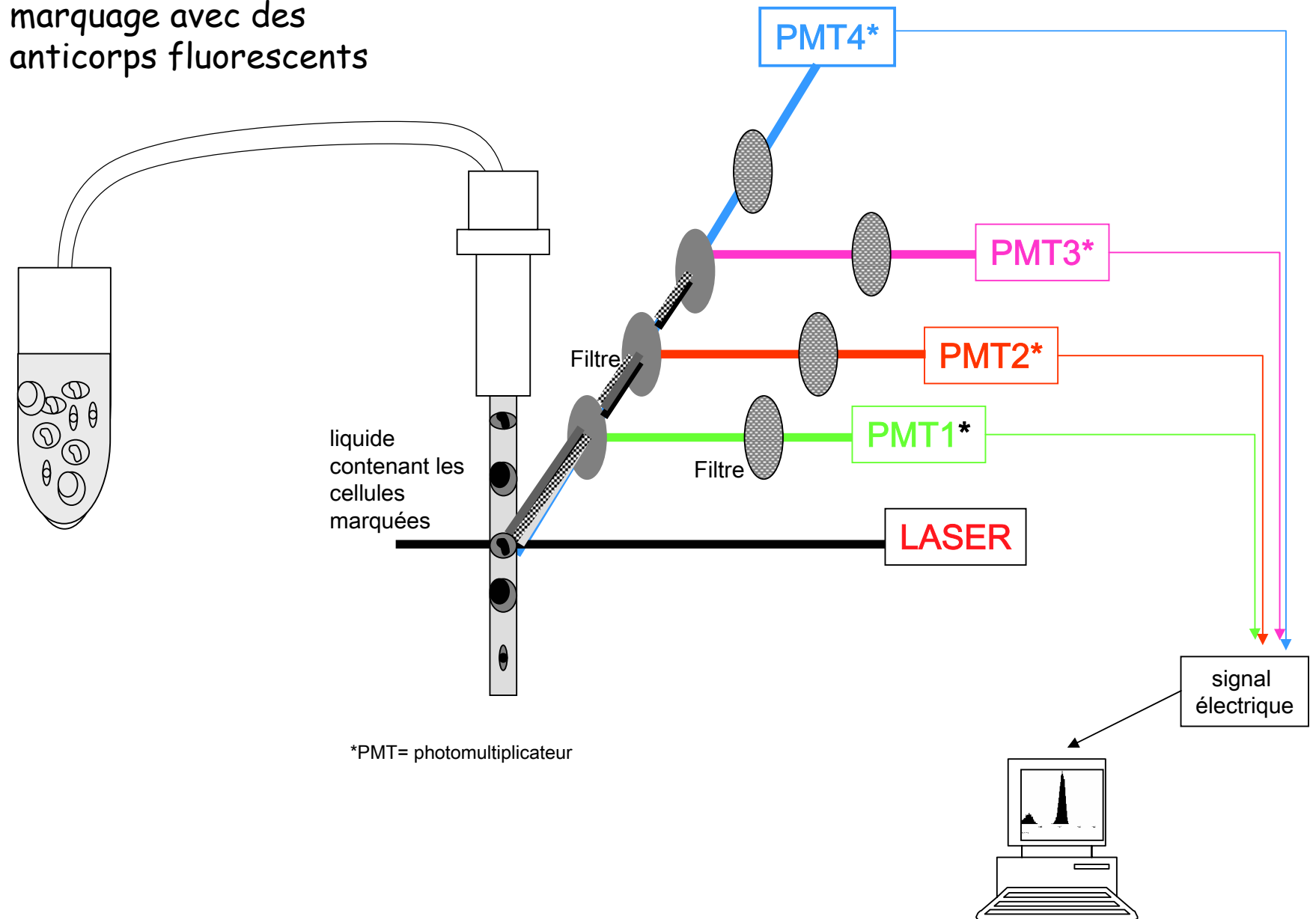


Spectres d'émission de fluorochromes: **la compensation**



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), aiguës (LAL B, LAL T, LAM)
 - Etude des fonctions lymphocytaires
 - Flux calcique
 - Cytokines
 - Cycle cellulaire
 - Prolifération cellulaire
 - ...

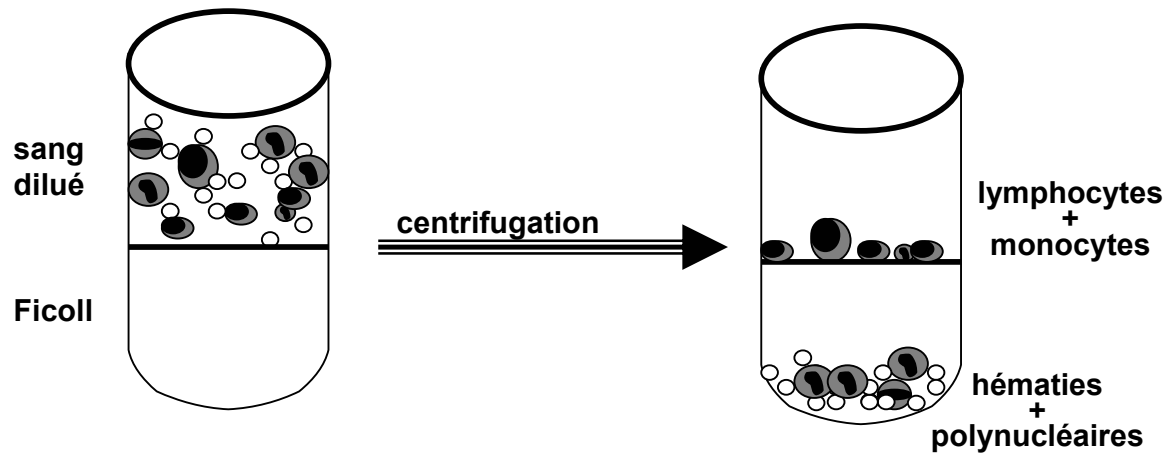
CYTOMETRIE EN FLUX: les applications

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

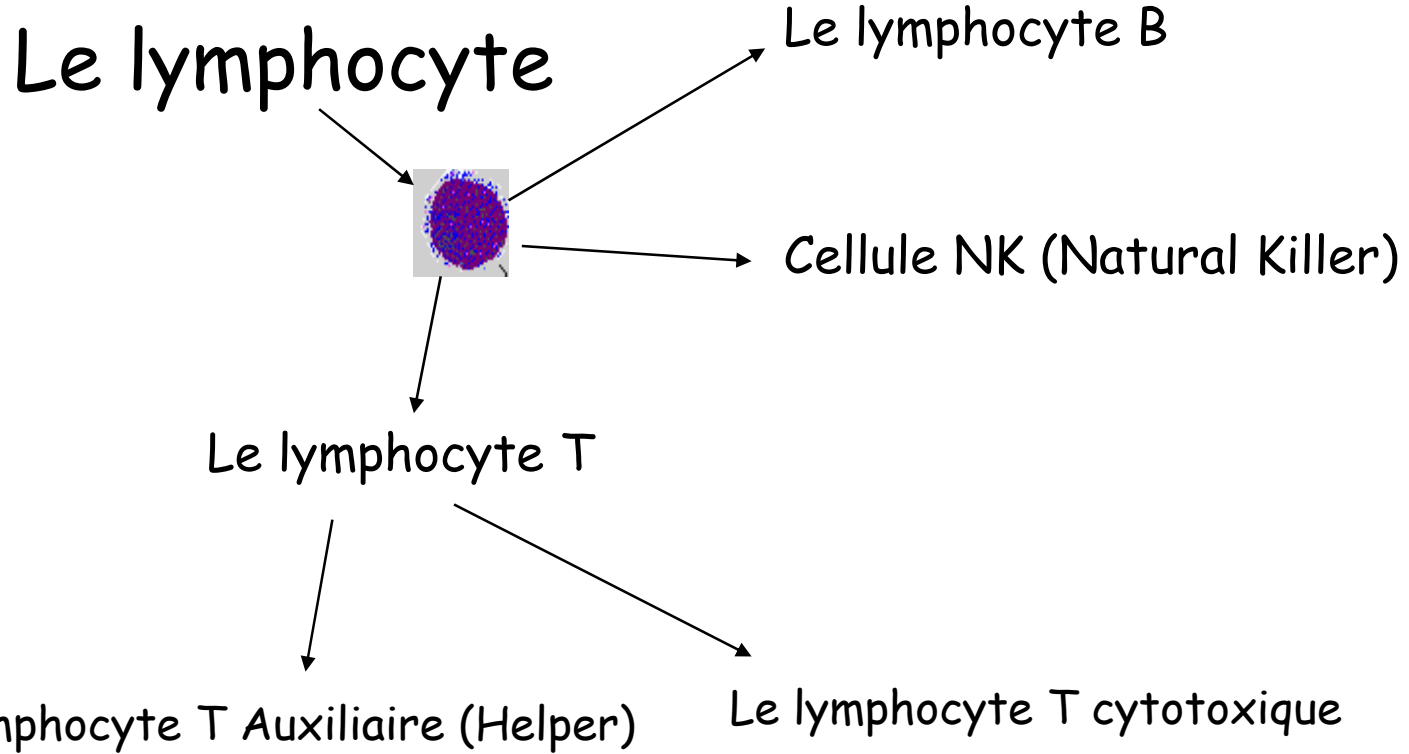
- 50-100 μ l de sang total recueilli sur anticoagulant
- 5, 10 ou 20 μ l du ou des anticorps conjugués
- 15-30 min d'incubation à l'abri de la lumière
- lyse des globules rouges
- $\pm$ lavage
- analyse au cytomètre

2) MARQUAGE APRES SEPARATION DES CELLULES MONONUCLEEES SUR FICOLL

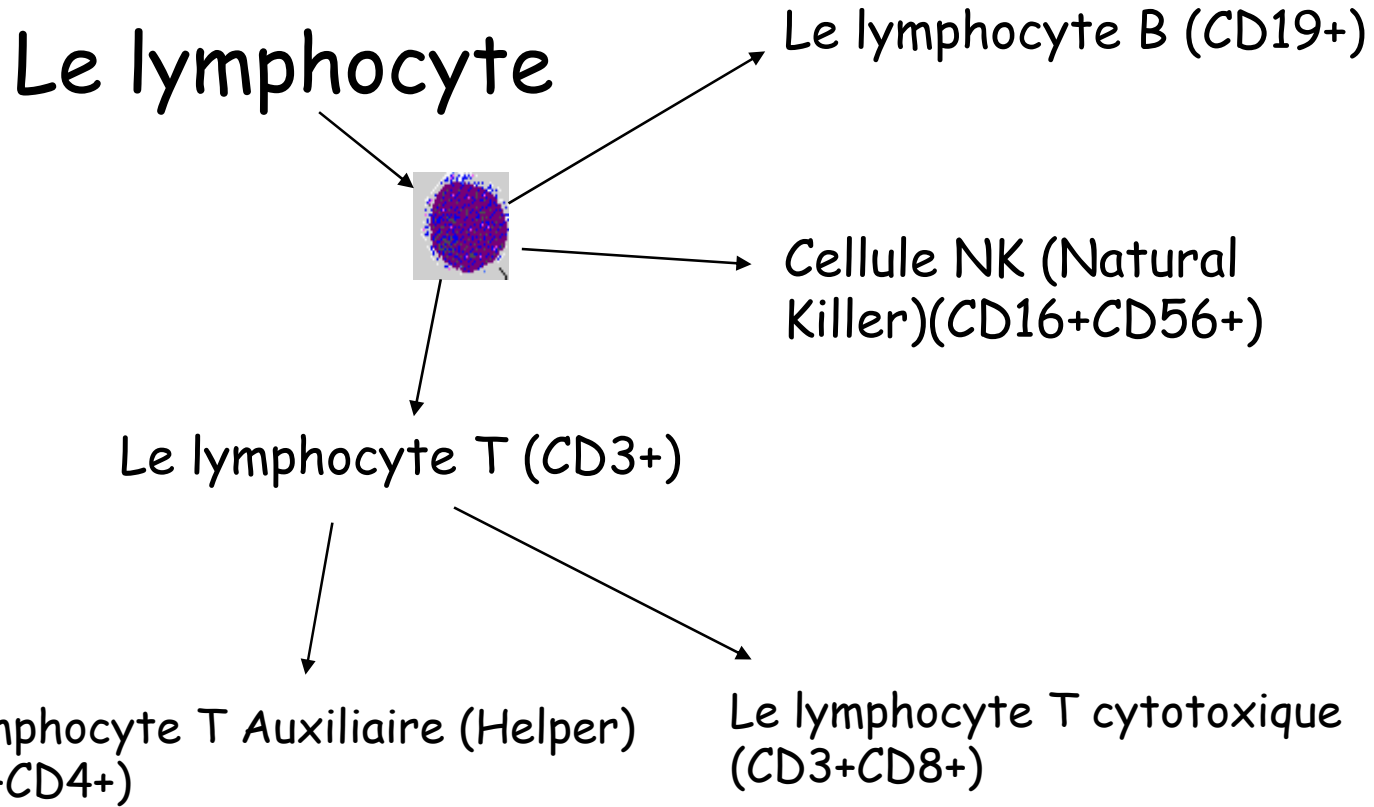


- Numération cellulaire (5×10^5 cellules/100 μ l)
- 5, 10 ou 20 μ l du ou des anticorps conjugués à un fluorochrome
- 15-30 min d'incubation à l'abri de la lumière
- lavage et re-suspension dans du tampon
- analyse au cytomètre

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 retrouvées 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 monocytaire: CD11c, CD14, CD36, CD68

Lignée érythrocytaire: (CD235, CD71, CD36)

Lignée plaquettaire: CD41, CD42, CD61

Stades de différenciation:

LT naïfs: CD45RA, CD62L

LT mémoires: CD45RO

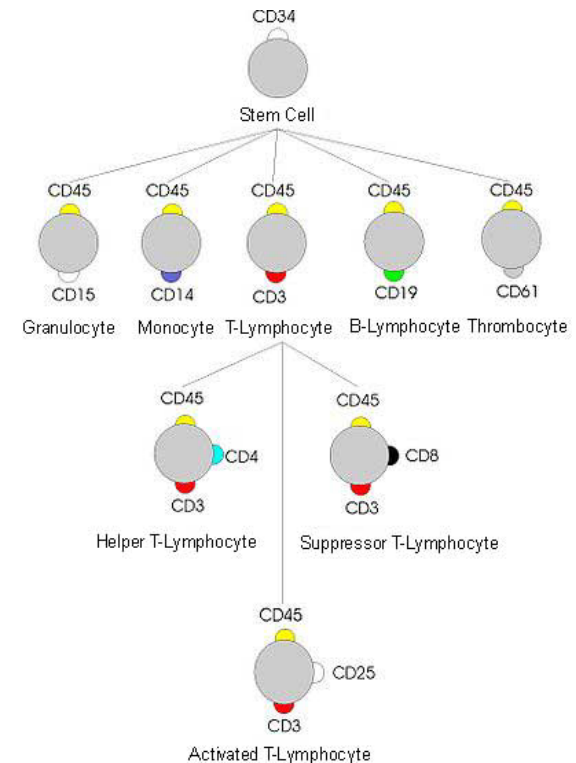
Cellules immatures: CD34

Plasmocytes: CD38, CD138

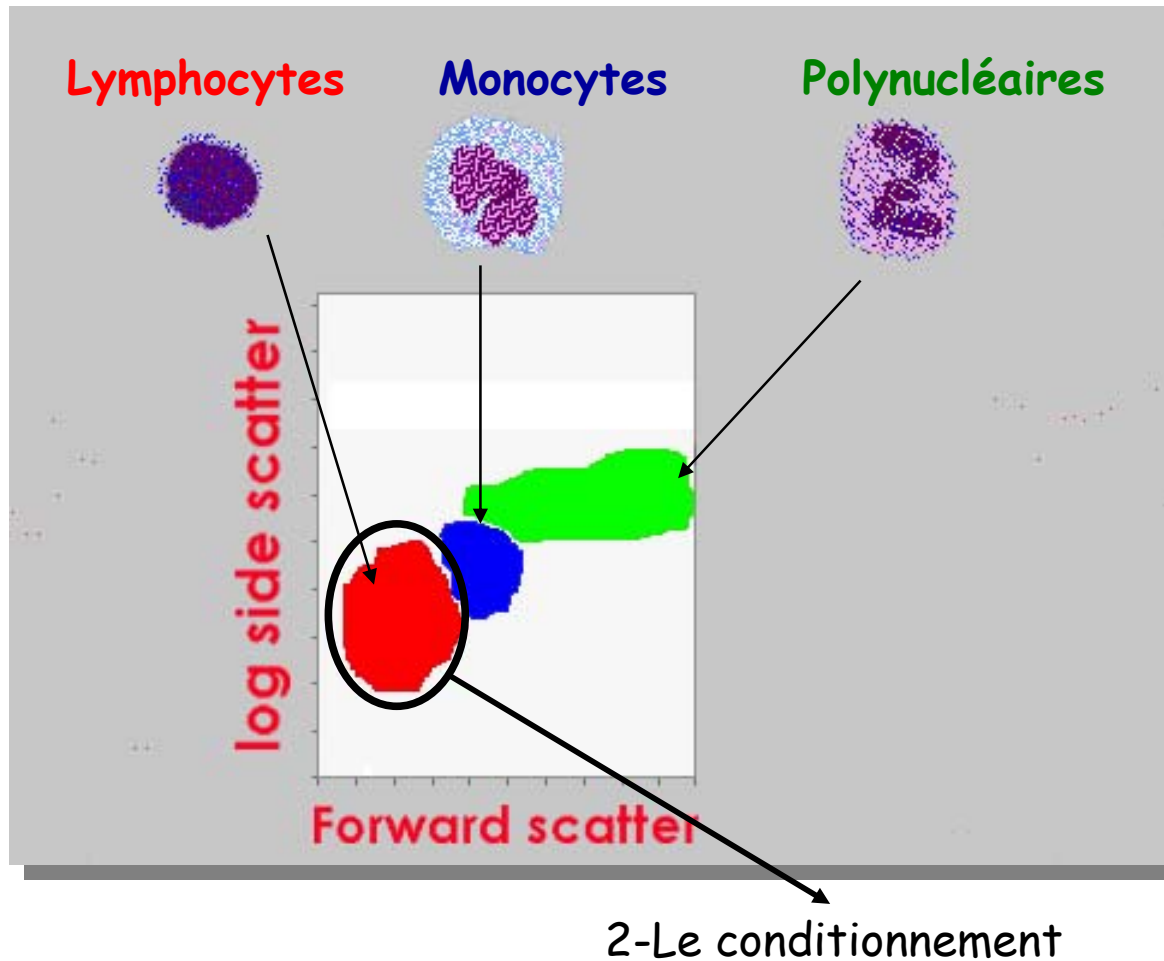
Molécules d'adhésion: CD11b, CD11c, CD54, CD58

Molécules de costimulation: CD40, CD80, CD86

Marqueurs d'activation: CD25, CD69, CD71



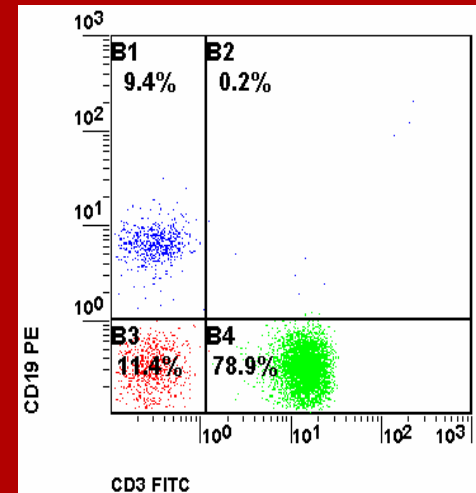
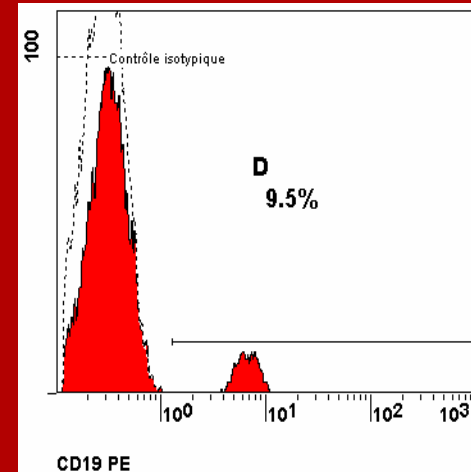
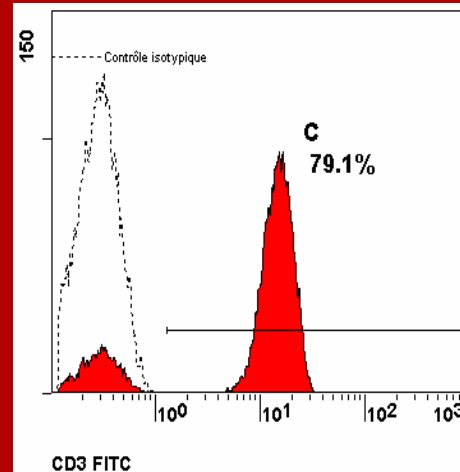
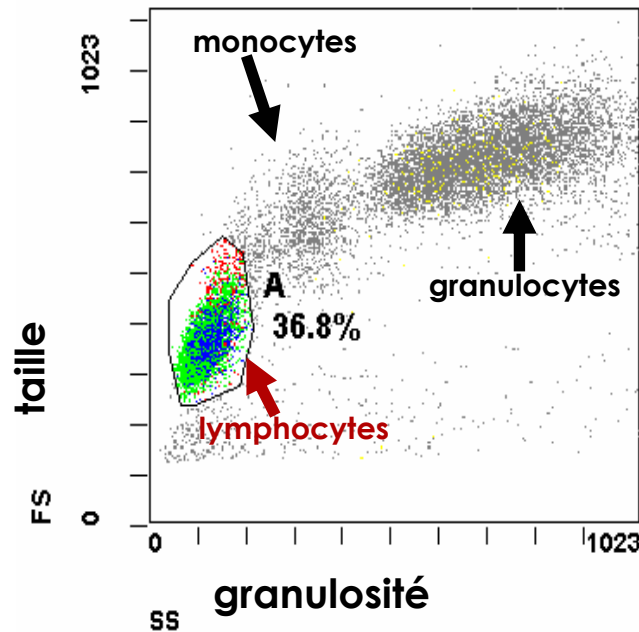
Repérage des types cellulaires du sang par leur pouvoir de diffusion lumineuse



CYTOMETRIE EN FLUX: DOUBLE MARQUAGE

Discrimination Lymphocytes B (CD19+) / lymphocytes T (CD3+)

Analyse dans les lymphocytes (A)



Aujourd'hui possibilité d'analyser d'un très grand nombre de cellules (5000-1 000 000)

Cytomètre pouvant analyser jusqu'à 10 paramètres différents

En pratique courante: 4-5 fluorescences différentes

Taille et Structure:

Lymphocytes

Monocytes

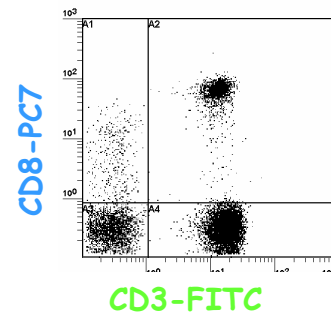
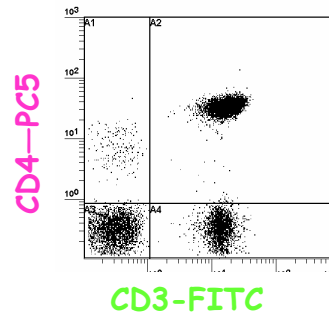
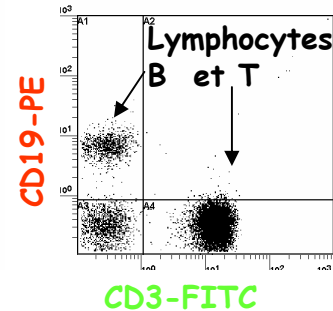
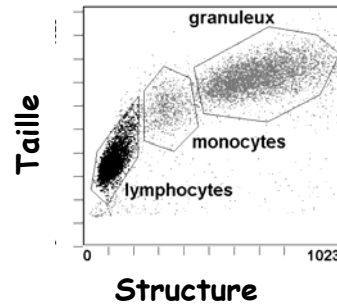
Granuleux

Fluorescence 1= CD3-FITC

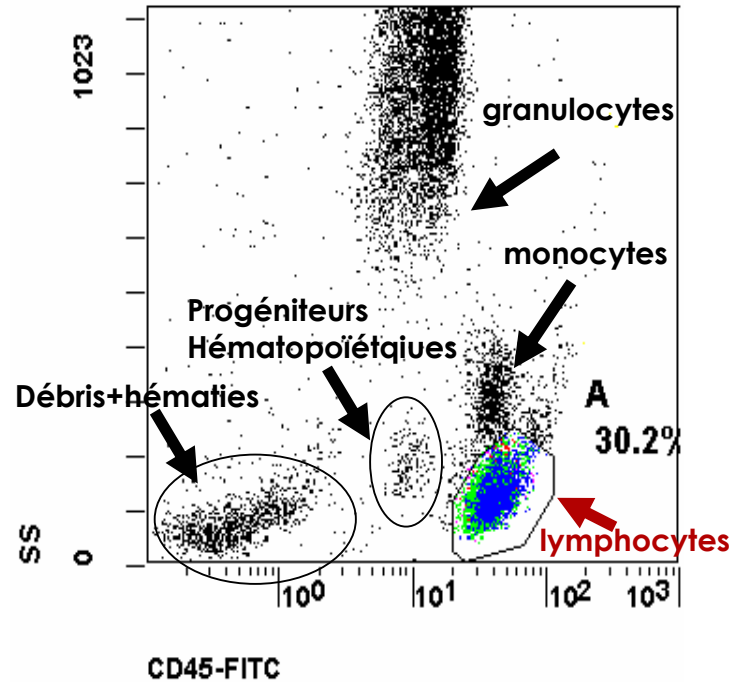
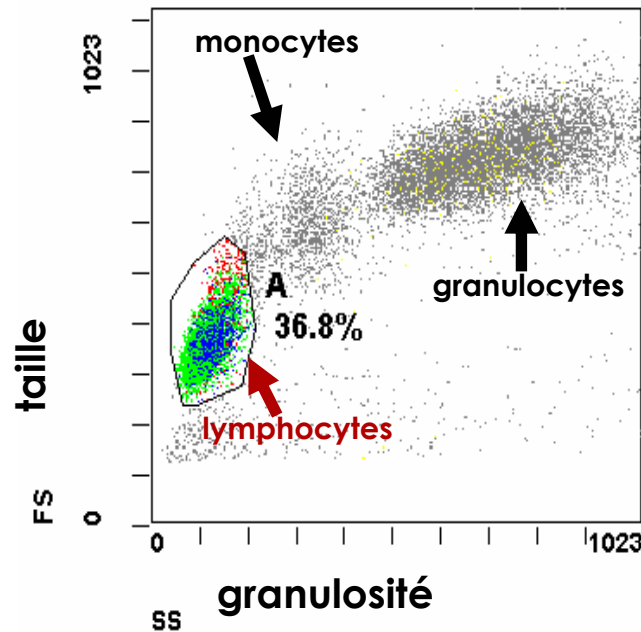
Fluorescence 2= CD19-PE

Fluorescence 3= CD4-PC5

Fluorescence 4= CD8-PC7

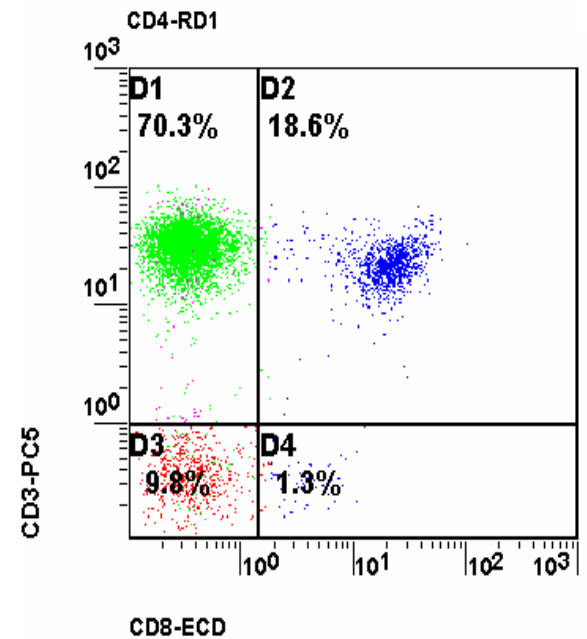
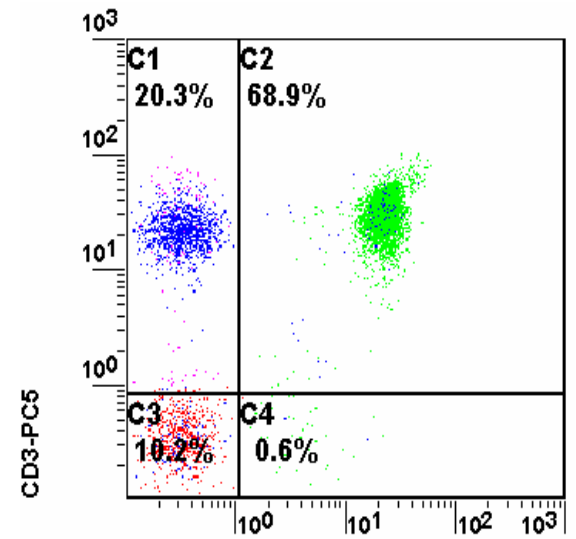
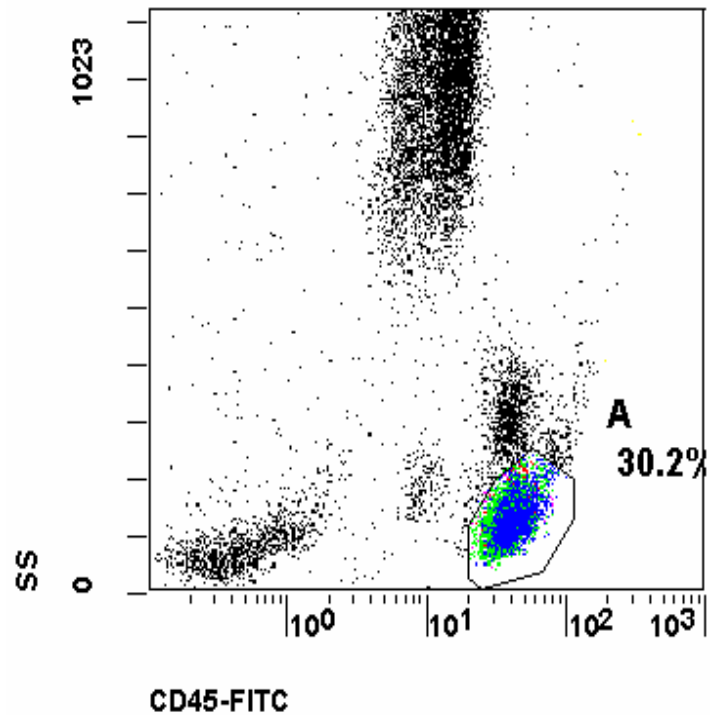


Analyse sur la Taille/Structure ou sur le CD45/Structure



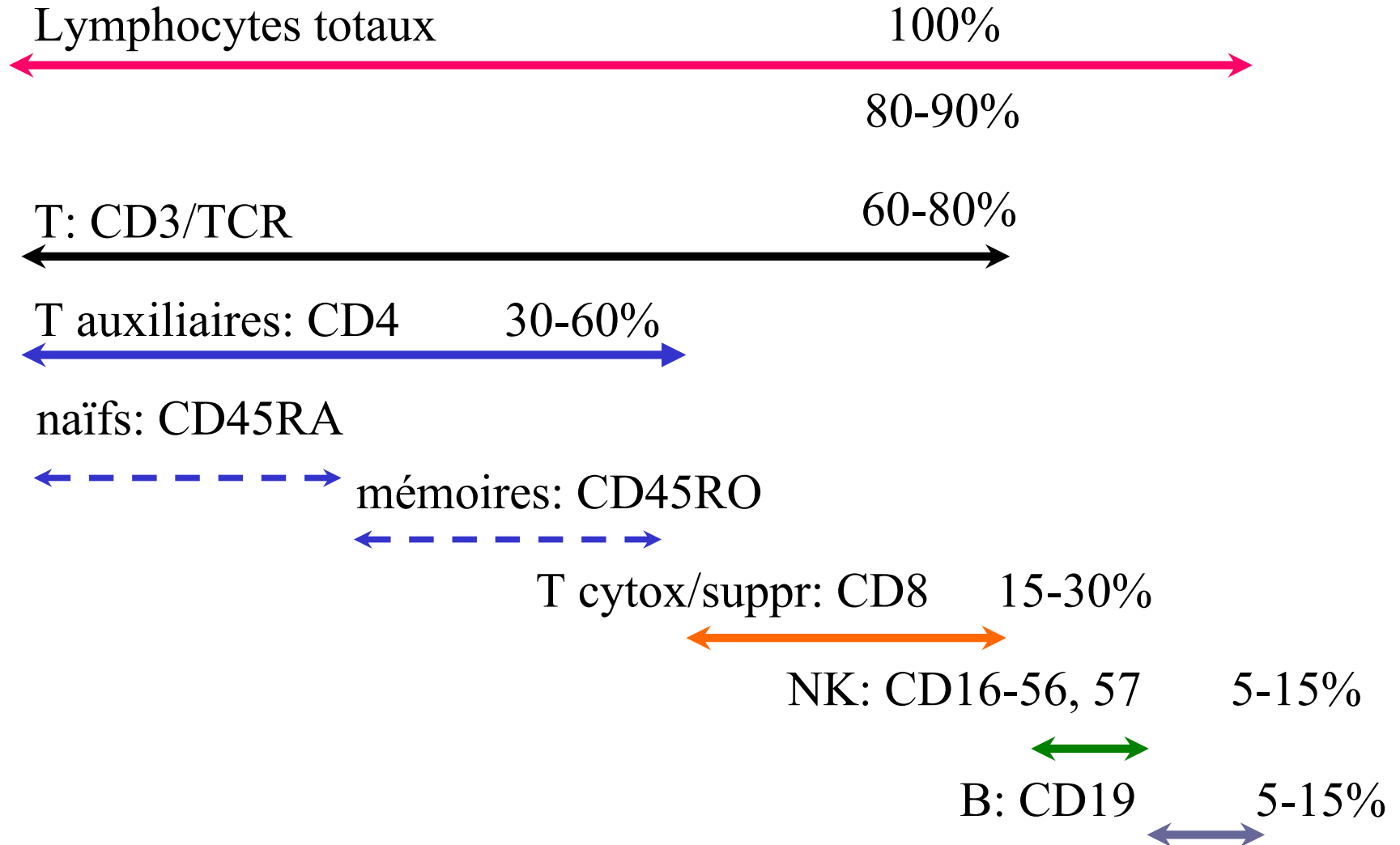
CYTOMETRIE EN FLUX: QUADRUPLE MARQUAGE

CD45/CD3/CD4/CD8



LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

sous populations



Numération des phénotypes lymphocytaires en valeur absolue par mm^3 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 auto-
matiquement 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 (50-100 μ l)

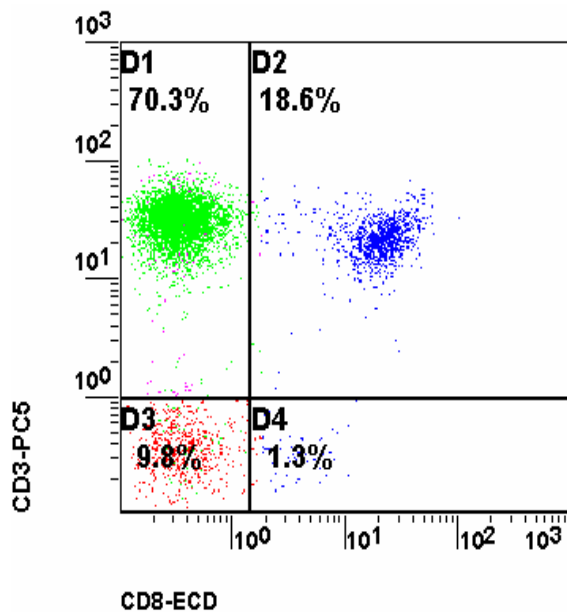
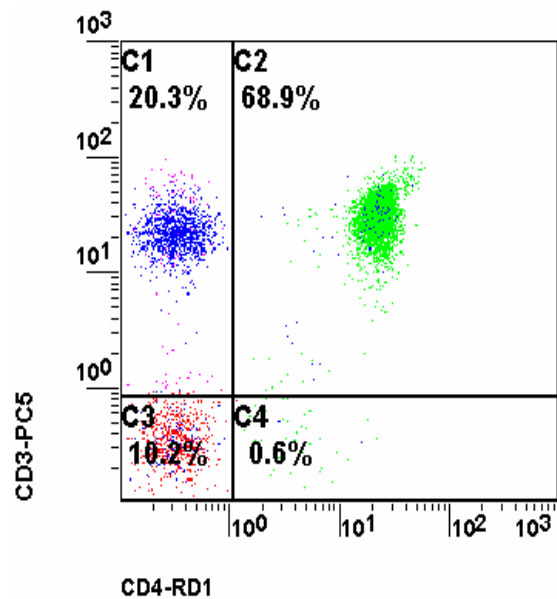
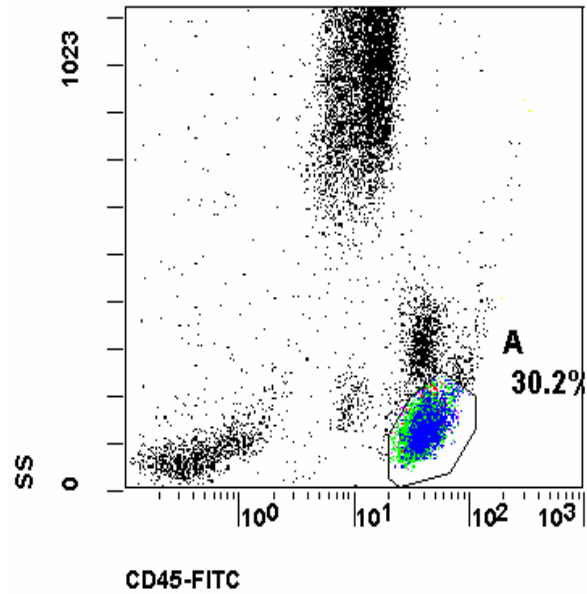
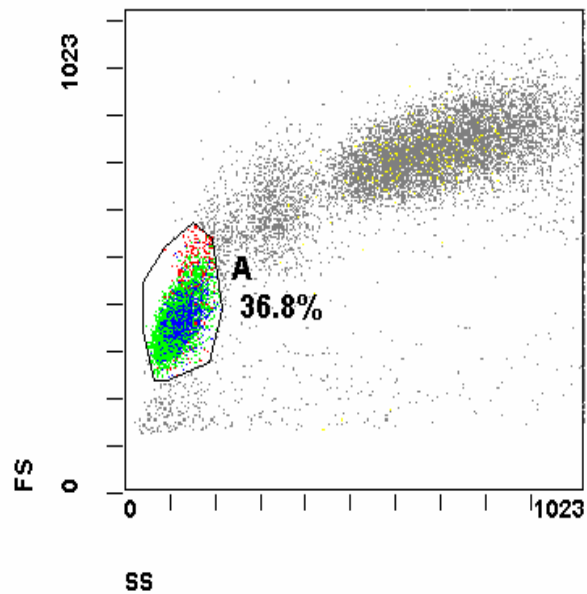
2. Marquage (10-15min)

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/ μ l de sang à partir de la NFS

CMF
% de CD / lymphocytes

NFS
GB x %Lymphocytes

$$\begin{array}{c} \text{CD}/\mu\text{l} \\ = \\ \text{GB} \times \% \text{Lymphocytes} \times \% \text{ de CD} \end{array}$$

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:

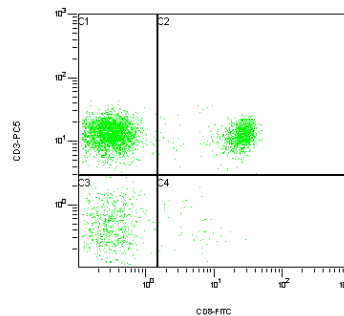
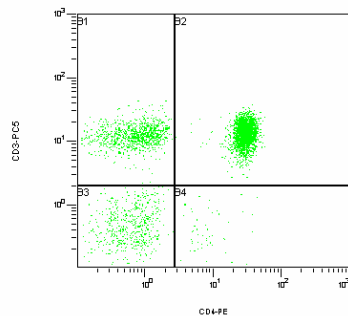
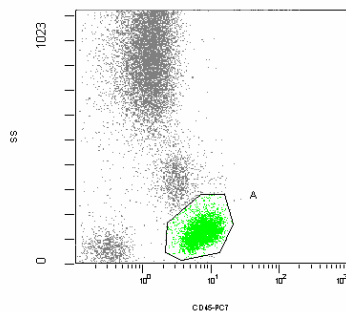
CD3	75±5%	1500±300/mm ³
CD4	45±7%	900±200/mm ³
CD8	31±6%	50±200/mm ³
CD4/CD8	> 0.9	

LB:

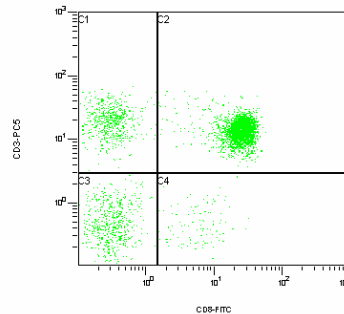
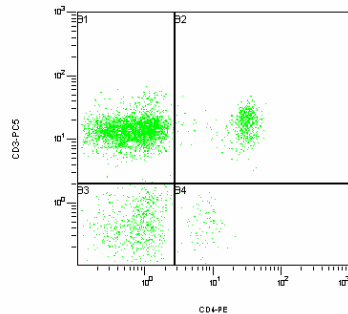
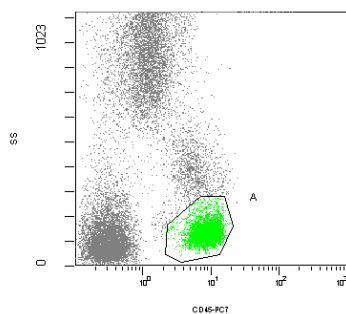
CD19	15±2	300±60/mm ³
------	------	------------------------

NK

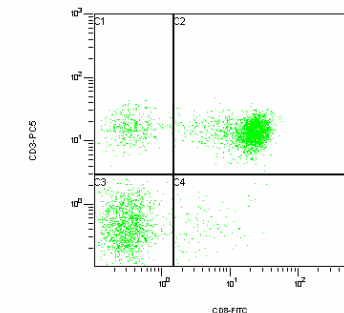
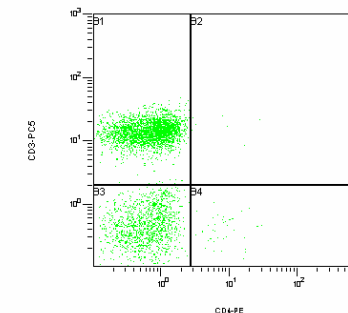
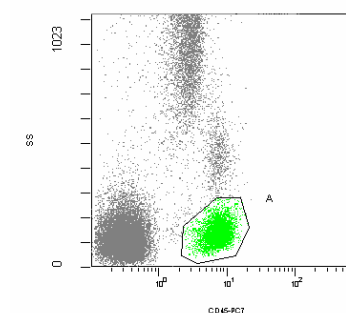
CD16+/CD56+	12±4	250±100/mm ³
-------------	------	-------------------------



Lymphos 1787/mm3
CD3+: 1550/mm3 (85.2%)
CD3+/CD4+: 1088/mm3 (59.8%)
CD3+/CD8+:463/mm3 (25.4%)



Lymphos 1012/mm3
CD3+: 842/mm3 (83.2%)
CD3+/CD4+: 128/mm3 (12.6%)
CD3+/CD8+:695/mm3 (68.7%)



Lymphos 815/mm3
CD3+: 571/mm3 (68,1%)
CD3+/CD4+: 1/mm3 (0.1%)
CD3+/CD8+:499/mm3 (59,4%)

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>