



Université Catholique d'Afrique Centrale

Centre Supérieur des Sciences de la Santé

COURS DE CYTOMETRIE

Par:

Dr. LEOPOLD GUSTAVE LEHMAN

Immuno-parasitologue MSc, Dr. Rer. Nat.

Site Web: www.ured-douala.com

E-mail: iblehman@yahoo.fr

Avril 2011

I. HISTORIQUE

- En 1934 Moldavan, à Montréal, conçoit le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique.

- En 1949, W. Coulter met au point un appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par variation de résistivité du courant liquidien.

- En 1953, Crosland-Taylor utilise un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire (système décrits par Reynolds en 1883).

- En 1965, Kamensky permet une avancée supplémentaire en permettant l'analyse des constituants cellulaires.

- Dan villa en 1969 utilise le laser comme source lumineuse car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation, et une stabilité du chromatisme.

- Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Le développement simultané d'appareillages commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en Flux (CMF). L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes. Ainsi, cette technique permet de faire simultanément l'analyse quantitative de plusieurs paramètres sur des éléments en suspension : cellules, levures, bactéries ou constituant cellulaires (noyaux, mitochondries, chloroplastes, chromosome). Un grand nombre d'éléments peuvent être analysés ce qui apporte précision et représentativité aux résultats.

II. LA FLUORESCENCE

II.1. DEFINITION

La fluorescence est une propriété de certaines molécules, capables d'absorber une radiation de longueur d'onde donnée et de ré-émettre, après un bref intervalle de temps, une radiation de longueur d'onde plus élevée. C'est autrement dit un phénomène chimique, mettant en jeu des transitions électroniques entre deux niveaux d'énergie superficiels, et déclenchée par autre chose que la simple chaleur, ce qui la différencie de l'incandescence. Elle se déroule en 3 étapes successives décrivant des niveaux d'énergie différents (figure1):

- **Etape 1:** absorption de l'énergie lumineuse par les atomes de la molécule. On a alors passage de l'état fondamental à l'état excité.
- **Etape 2:** l'état excité (de courte période) est suivi de la relaxation au cours de laquelle une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur et de transfert d'énergie entre molécules.
- **Etape 3:** retour à l'état fondamental par émission lumineuse de longueur d'onde plus élevée (moins énergétique) que la longueur d'onde d'excitation.

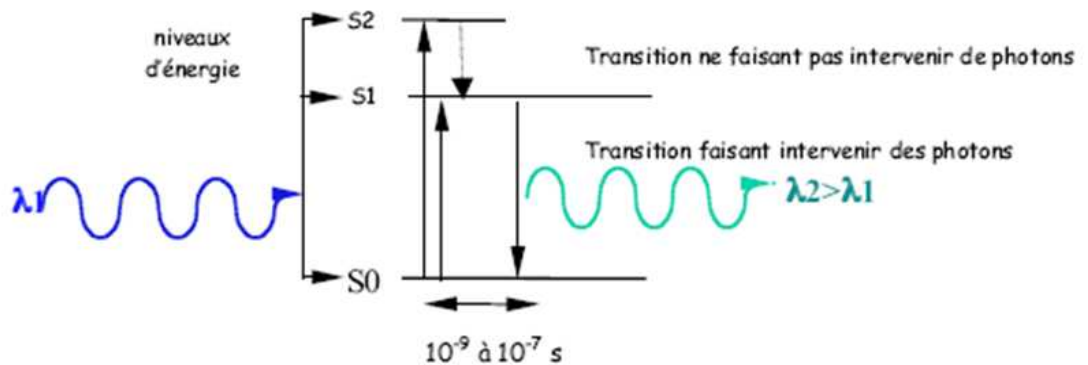


Figure 1: Niveaux d'énergie au cours de la fluorescence.

II.2. PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE

De nombreuses molécules (*fluorophores* ou *fluorochromes*) sont capables d'absorber des photons, et d'augmenter leur énergie d'agitation: la lumière est alors convertie en chaleur. Voir (tableau 1).

II.3. LES FLUOROCHROMES

II.3.1. DEFINITION

Ce sont des molécules ont la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer, généralement avec une énergie plus basse (une longueur d'onde plus grande). Ces molécules fluorescentes sont de taille et de nature chimiques diverse ; certaines sont suffisamment petites pour être conjuguées à d'autre molécules (comme dans le cas des anticorps couplés à un fluorochromes); d'autres ne sont fluorescentes que dans certains états de chélation (marqueurs fluorescents vitaux, qui ne sont fluorescent que complexé à l'ADN). On cite :

- les petites molécules chimiques: FITC (Fluoresceine isothiocyanate) , Cy5, Cy7, Alexa.
- les protéines: PE (Phycoerythrine), APC, PerCP
- les tandems: PE-Cy5, PE-Cy5.5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC-Cy7
- les quantum dot

II.3.2. REGLES POUR CHOISIR LES FLUOROCHROMES

Pour sélectionner un fluorochrome, il faut s'assurer que

- * le spectre d'excitation est compatible avec l'équipement laser du cytomètre ;
- * les spectres d'émission sont non chevauchants ;
- * associer le fluorochrome le plus fort au marqueur antigénique le plus faiblement exprimé.

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie

Colorant	Liaison/Fonction	λ Ex. *	λ Em. @	Réf. §
Hoechst 33342	ADN (bases A-T)	365	402	1
DAPI	ADN (bases A-T)	357	451	23
Chromomycine A3	ADN (bases G-C)	420	560	37
Iodure de Propidium	ADN (intercalant)	370, 560	631	2
Bromure d'Ethidium	ADN (intercalant)	370, 530	622	12
Acridine Orange	ARN/ADN	492/492	527/630	9
Thioflavine	ARN (ADN)	422	487	32
FITC	Protéines	490	543	5
Phycoérythrine R	Protéines	565	578	20
Allophycocyanine	Protéines	642	660	24
Rouge Texas	Protéines	579	604	35
Pyronine Y	Potentiel mitochondrial	545	566	7
Rhodamine 123	Potentiel mitochondrial	494	523	6
BCECF-AM	pH	488	530	29
SNARF-1	pH	488	580/630	42
INDO-1-AM	Ca ²⁺	331	405/480	26
Fluo-3	Ca ²⁺	488	530	43

* : longueur d'onde d'excitation ; @ : longueur d'onde d'émission ; § : références.

II.3.3. PRINCIPE DE COMPENSATION DE FLUORESCENCE

Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés simultanément en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des 2 signaux de fluorescence. Sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais pas en orange (PE), est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des 2 fluorescences. Le système de compensation permet de soustraire artificiellement et électroniquement la fluorescence orange parasite qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC ou les fluorescences artéfactuelles sur les autres PMT.

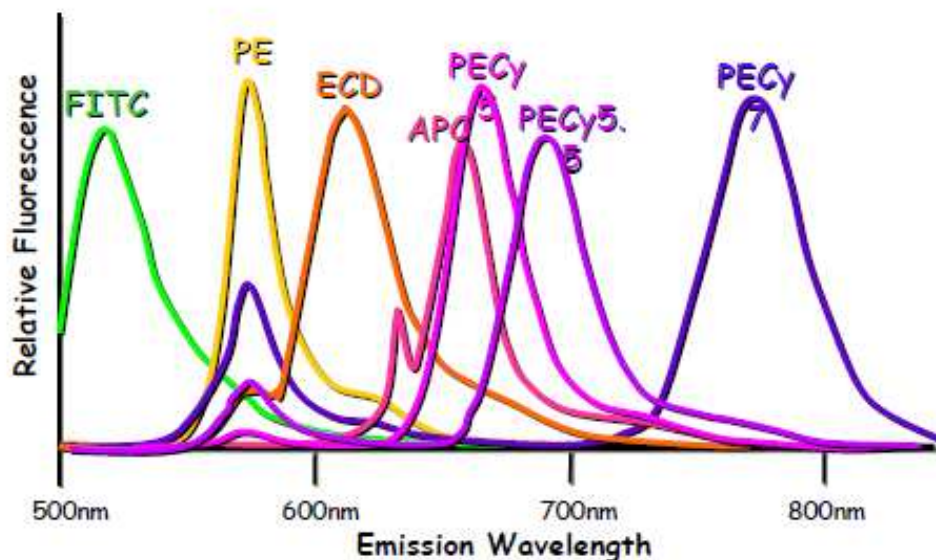


Figure 3: Phénomène de compensation des fluorochromes.

III. LA CYTOMETRIE DE FLUX

III.1. DEFINITION

La cytométrie en flux décrit une technique d'analyse de routine des cellules ou particules biologiques en suspension qui traversent une cellule de mesure les unes après

les autres. Un ou plusieurs lasers excitent chaque particule ainsi injectées. Si les particules ont été marquées avec une ou plusieurs fluorochromes, la source lumineuse excite ceux-ci et nous informe sur certains aspects biologiques supplémentaires

Le cytomètre mesure la lumière de fluorescence et la lumière diffusé. Grâce à des phénomènes de diffusion lumineuse, il caractérise les cellules selon :

- la taille (dans l'axe du laser)
- la granularité (à 90° du laser)
- la fluorescence

III.2. LES PRINCIPES TECHNIQUES DE LA CYTOMETRIE DE FLUX

Pour fonctionner un cytomètre de flux nécessite une combinaison de :

- fluide pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser;
- optique qui se compose du ou des lasers et d'un système de filtres pour exciter, récupérer et amplifier les différents signaux émis ;
- électronique pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser ;
- informatique pour visualiser ces signaux.

Les échantillons cellulaires doivent être mis en suspension pour pouvoir être analysés. L'analyse du sang ne pose aucun problème les cellules étant déjà en suspension. Par contre les tissus cellulaires doivent être dissociés et les agrégats éliminés afin de pouvoir être analysés.

III.2.1. Le système fluide (figure 6)

Les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure (figure 4) ou un étroit flux laminaire et alignées les unes derrière les autres (au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon) afin d'être excitées par un ou plusieurs faisceau lumineux : c'est le centrage hydrodynamique (figure 5). Il utilise un régulateur de pression d'air qui assure la stabilité des opérations, l'alimentation en liquide de gaine et l'injection de l'échantillon dans la cellule de mesure. Cet ensemble permet de cibler les particules sur le point d'impact du laser.

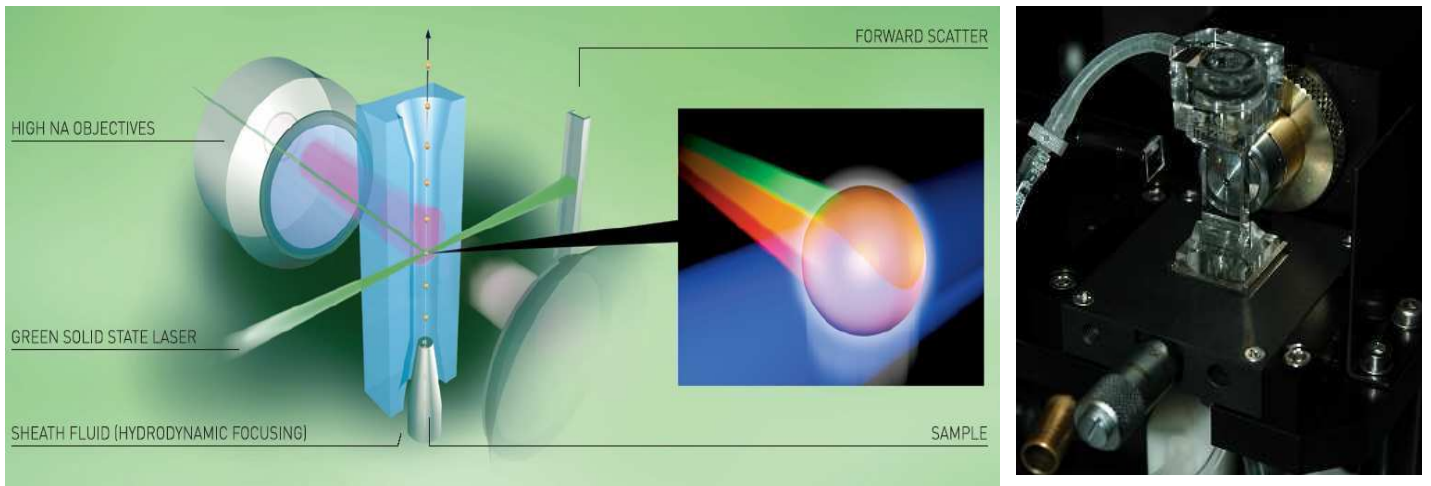


Figure 4 : la cellule de mesure, élément principal du cytomètre de flux.

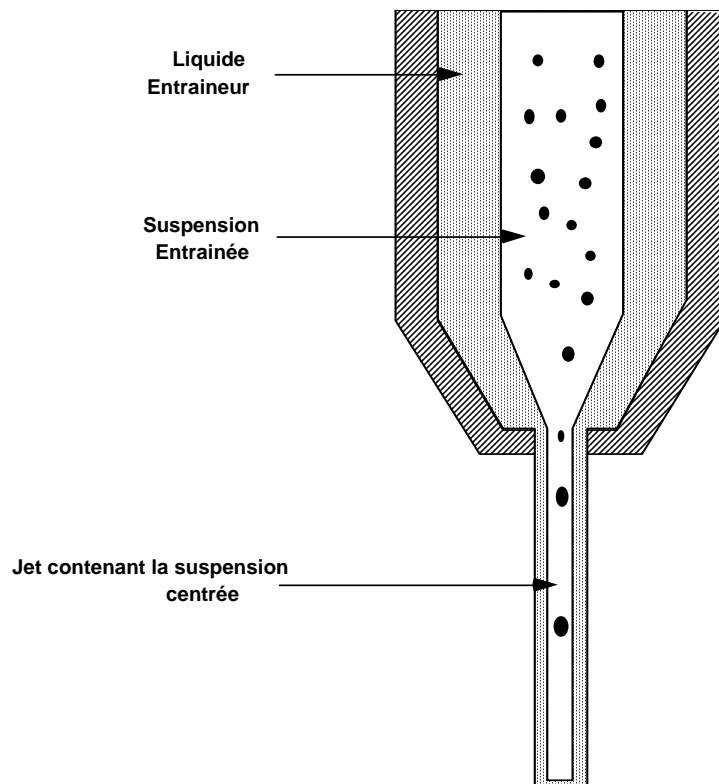


Figure 5: Principe du centrage hydrodynamique.

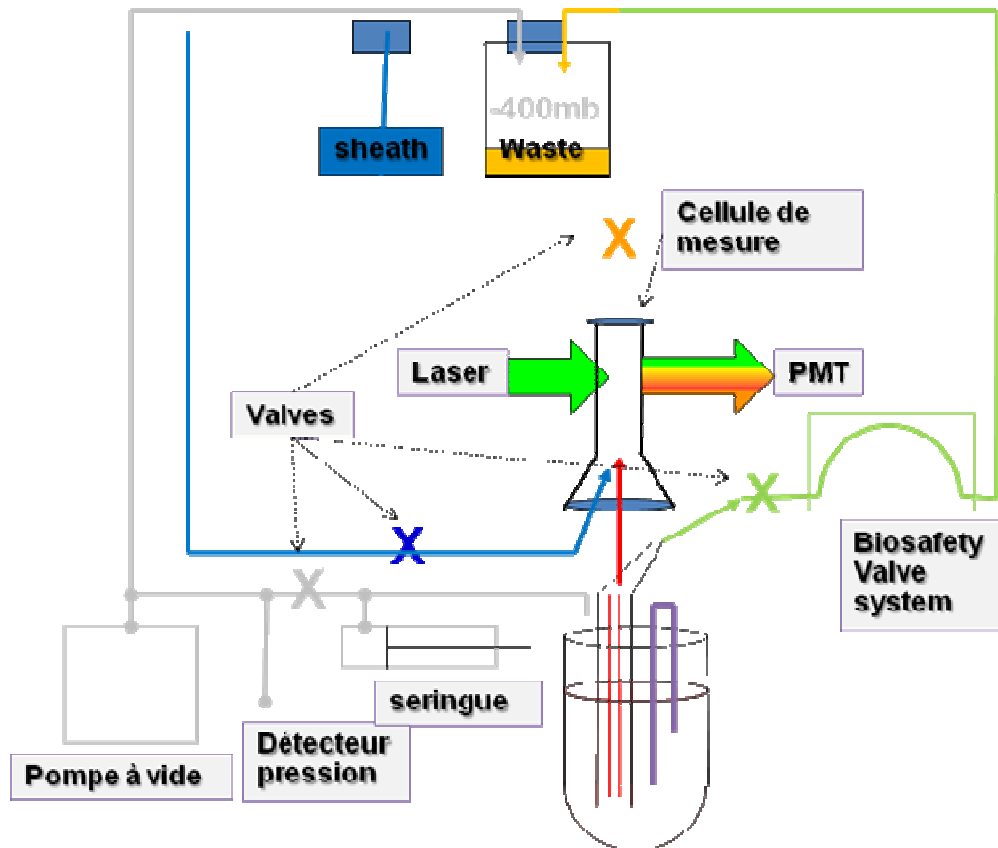


Figure 6: Schéma d'un système fluide de cytomètre en flux.

III.2.2. Le système optique (figure 7)

a) Source d'énergie

Il est nécessaire de focaliser une source lumineuse sur les cellules qui doit permettre une illumination des colorants à une longueur d'onde proche de leur maximum d'excitation.

Deux types de sources sont actuellement utilisés:

- Les *lasers*. Chacun permettra d'émettre une lumière monochromatique, capable d'exciter une série de fluorochromes. Les lasers ont des spectres d'émission discontinus. Il existe différents lasers : par exemple, les lasers à ions d'argon permettent d'exciter entre autres la fluorescéine, la phycoérythrine, l'iodure de propidium à 488 nm ainsi que dans l'U.V
- Les *lampes* à vapeur de mercure ou au xénon sont aussi utilisées. La focalisation est moindre que dans le cas du laser, mais le spectre est assez large et leur coût est limité.

b) Canaux ou paramètres optiques

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs dichroïques et de filtres (figure 8). Il existe trois types de canaux :

- canal « taille » (FSC « Foward Scatter Channel »)
- canal « structure » (SSC « Side Scatter Channel »)
- canal « fluorescence » (FL1, FL2, FL3...)

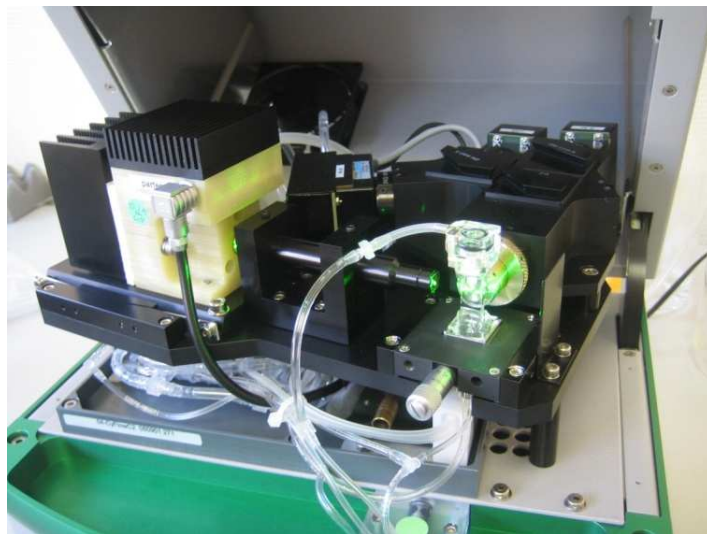


Figure 7 : Banc optique d'un cytomètre de flux. (3 paramètres + laser vert)

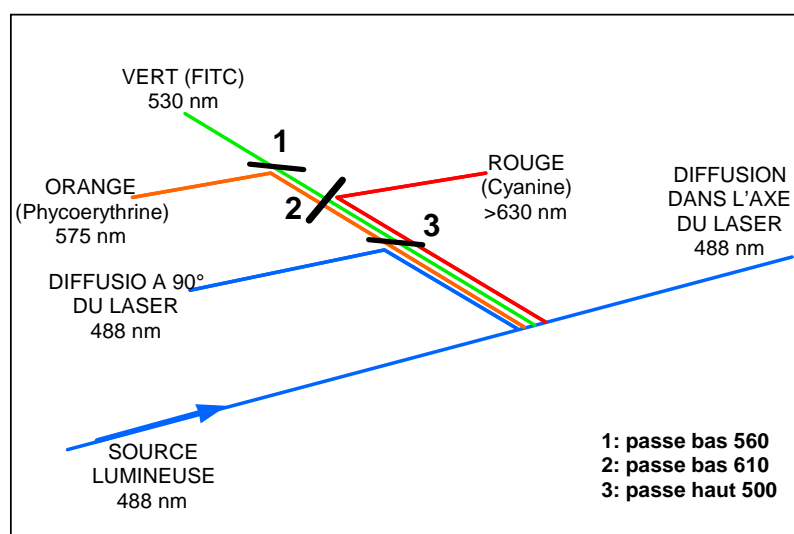


Figure 8 : Exemple de trajet optique dans un cytomètre en flux.

c) Détecteurs

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur **PMT** (plus sensible et utilisé pour les signaux faibles) ou une photodiode **PD** (sensibilité plus faible, utilisé pour les signaux forts : taille). Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires.

III.2.3. Le système électronique (figure 9)

Les signaux optiques sont convertis en signaux électriques par les photomultiplicateurs (PMT). Les PMT sont des capteurs optiques capables de détecter de très petites quantités de lumière et de le retranscrire en signal électrique, numérique ou analogique selon le cytomètre. Ils vont donc traduire l'intensité de la lumière qui leur parvient.



Fig.14: Controller card

Figure 9: Carte électronique.

III.2.4. Le système informatique

Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont stockées par l'informatique dans des supports divers (figures 10 et 11) et présentées sur les écrans des cytomètres sous forme d'**histogrammes** (1 paramètre) où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules ou de **cytogrammes** (2 paramètres).

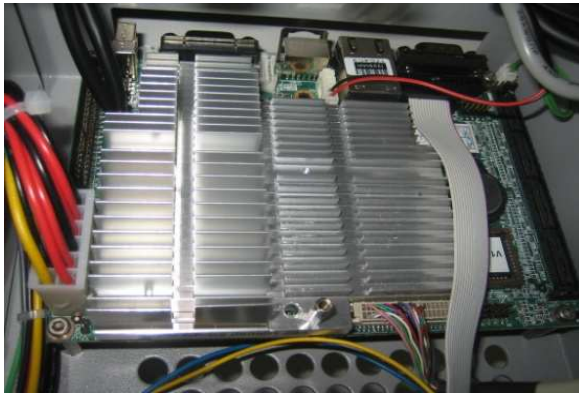


Figure 10 : Support de l'informatique.



Figure 11 : Support de mémoire: disque dur.

III.3. LES SIGNAUX RECUEILLIS

Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires (tableau 2).

III.3.1. La lumière diffusée

La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule. Si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille et la viabilité cellulaire.

Sous un angle de 90°, la mesure correspond à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique). L'utilisation simultanée de ces deux paramètres permet de distinguer, dans un sang périphérique par exemple, les plaquettes, les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires.

III.3. 2. La lumière absorbée

Cette mesure évolue proportionnellement au diamètre de la cellule (supposée sphérique) et à l'indice d'absorption des constituants cellulaires.

III.3. 3. La fluorescence émise

Cette fluorescence peut être spontanée, mais le plus souvent, elle est apportée à la cellule par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du LASER et réemet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée.

Tableau 2 : Signification des principaux signaux obtenus en cytométrie en flux

PARAMETRE	SIGNIFICATION	UTILISATION
Diffusion de la lumière aux petits angles	Proportionnel au diamètre cellulaire	Identification morphologique des cellules
Diffusion de la lumière à angle droit	Proportionnel au contenu cellulaire	Identification morphologique des cellules
Fluorescences	Proportionnelles à l'intensité de marquage	Marqueurs cellulaires, ADN, ARN, fonctions cellulaires...

III.4. PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE

La CMF consiste à analyser les *signaux optiques* ou *physiques* émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un *laser* ou d'une *lampe*. Les signaux séparés par *des filtres optiques* sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Ce procédé d'analyse « cellule par cellule » est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde (figure 12).

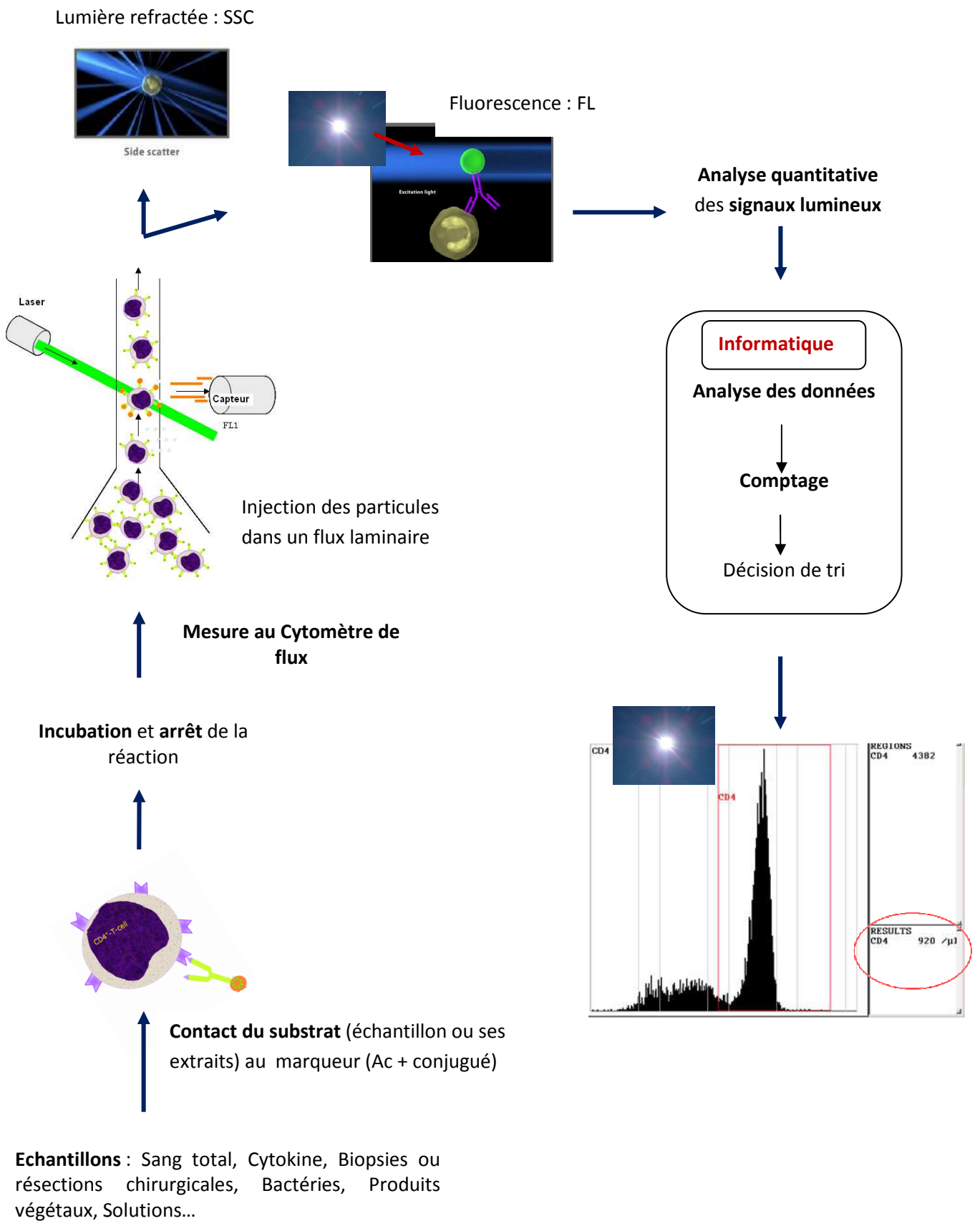


Figure 12: Schéma général de l'analyse en Cytométrie de flux.

III.5. PRESENTATION DES RESULTATS (figure 13)

Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont stockées par l'informatique et présentées sur les écrans des cytomètres sous deux formes :

- des histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules (figure 10).
- des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.

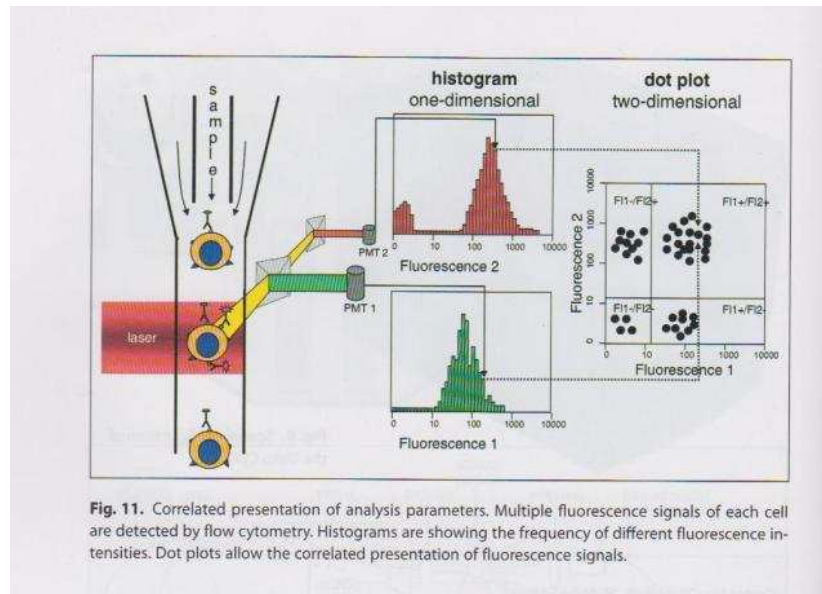


Figure 13 : Présentation des résultats.

III.5.1. La représentation graphique (figure 14).

Elle représente la fluorescence relative par rapport au nombre d'évènements

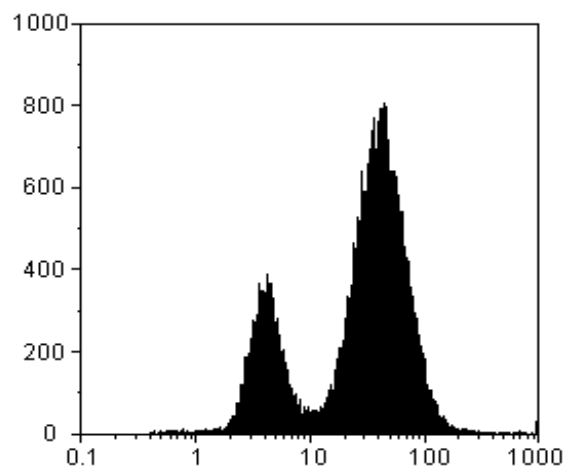


Figure 14 : Représentation graphique d'un histogramme.

III.5.2. La représentation de la taille et de la granulosité « Dot Plot » (figure 15)

Pour chaque cellule qui passe, sa taille est analysée par rapport à sa granulosité. C'est un bon moyen de détecter un petit nombre d'évènements dont les populations sont clairement séparées.

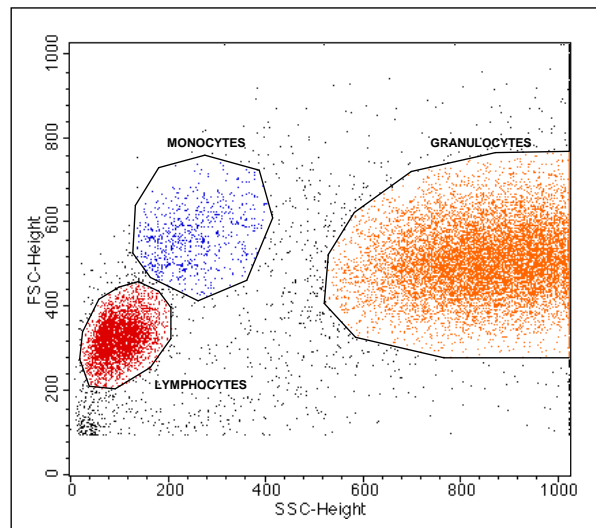


Figure 15: Représentation de la taille et de la granulosité.

III.5.3 La représentation de la densité relative des évènements « Density Plot » (figure 16)

Cette représentation simule une représentation en 3D où le troisième paramètre est le nombre d'évènements. Cela permet à l'utilisateur, de mettre en évidence une population discrète.

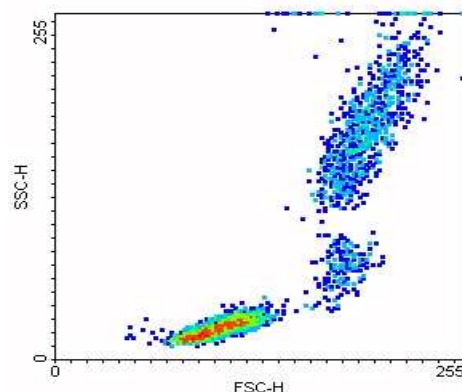


Figure 16 : Représentation de la densité relative des évènements.

III.5.4. La représentation des contours « Contour Plot » (figure 17)

Il s'agit là d'une autre représentation en 2 dimensions de populations dont le nombre d'évènements est similaire.

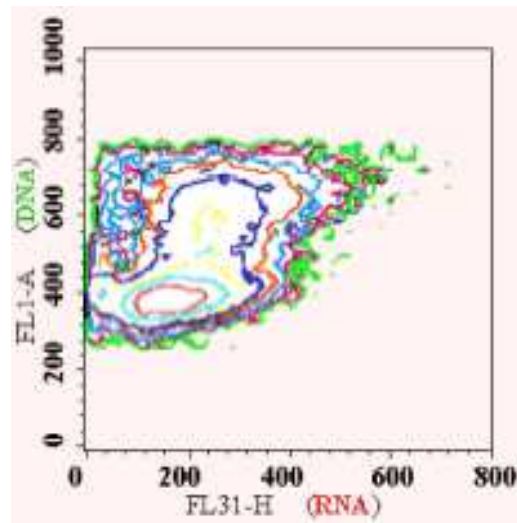


Figure 17 : Représentation des contours.

III.5.5. L'histogramme tridimensionnel (figure 18)

Il est obtenu à partir d'un biparamétrique auquel on ajoute une troisième dimension représentant le nombre de cellules. Il permet d'avoir une idée de la proportion des différentes catégories de cellules les unes par rapport aux autres.

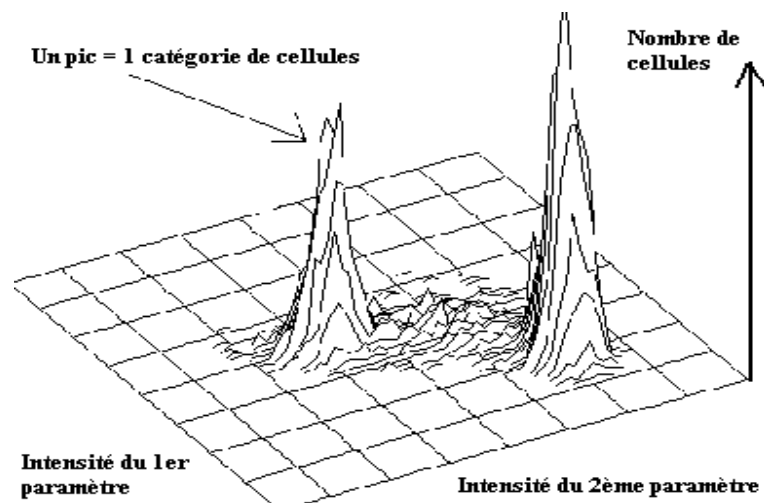


Figure 18 : Représentation des résultats en 3 dimensions.

III.5. LOGICIELS

Il existe plusieurs logiciels d'acquisition et d'analyse en cytométrie en flux. On cite par exemple le *Cyview*, le *Cellquest*, le *Flomax*. Les logiciels permettent donc l'acquisition (réglages des compensations...), l'analyse (pourcentages des populations et comparaison des résultats) et la mise en forme des informations obtenues (date, heure, informations relatives à l'échantillon). Ils permettent de faire apparaître des « fenêtres » dont la forme est propre à chacun (figure 19).

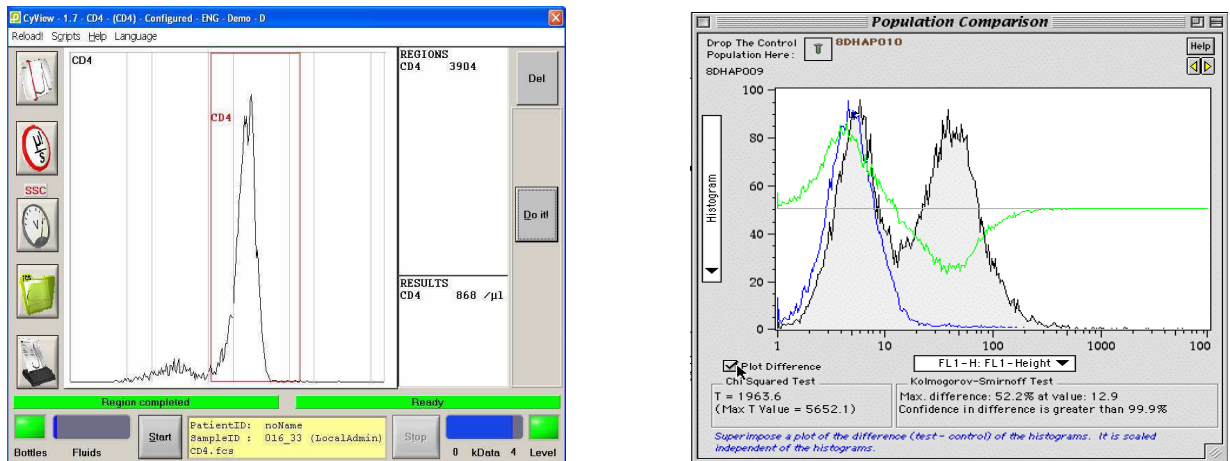


Figure 19 : Exemples de fenêtres d'analyse des résultats.

IV. APPLICATIONS ET METHODOLOGIES DE LA CYTOMETRIE DE FLUX

- Applications en routine
 - Immunophénotypage : (hématologie, immunologie)
 - Expression quantitative d'antigènes de surface ou intracellulaire ;
 - Quantification de l'ADN (cancérologie, cytogénétique) ;
 - Etude du cycle cellulaire ;
- Applications en recherche
 - Caryotype en flux ;
 - Flux calcique ;
 - pH intracellulaire ;
 - Fluidité membranaire ;
 - Mesure du stress oxydatif

IV.1. IMMUNOPHENOTYPAGE

IV.1.2. Hématologie

Les cellules du sang diffèrent par leur taille et structure. Certaines applications sont maintenant utilisées pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections et concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

La numération réticulocytaire : c'est le reflet de l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse. Elle est une étape fondamentale du diagnostic étiologique des anémies, de l'évaluation de la réponse aux traitements et du suivi des patients aplasiques ou après greffe de moelle osseuse. Ici, l'ARN ribosomal des réticulocytes est mis en évidence par un fluorochrome, le thiazole orange, qui traverse les membranes cellulaires et se fixe sur les bases des acides nucléiques. La population de globules rouges est identifiée grâce aux mesures de la lumière diffusée à 0° (*forward scatter*) et à 90° (*side scatter*). La fluorescence émise par l'ARN ribosomal est détectée et quantifiée par l'appareil sur le canal de lecture FL1, correspondant à la détection d'une fluorescence verte.

Leucémie : l'analyse de la population de lymphocytes du sang périphérique chez des patients atteints de leucémie. On va définir le rapport CD4/CD8 chez ces patients pour avoir une indication de la gravité de la leucémie. On effectue un marquage des cellules avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8.

Hémostase : la CMF permet également un *monitoring* biologique des traitements antiplaquettaires, avec l'avantage comparativement à l'agrégométrie d'être spécifique d'une molécule (anti-GPIIb/IIIa ou thiéno-pyridine), alors même que les patients sont traités par des associations d'antiplaquettaires. La cytométrie a d'autres applications, dont l'étude des plaquettes réticulées, le diagnostic des thrombopathies de sécrétion, le diagnostic des thrombopénies induites par l'héparine et l'étude des voies de signalisation.

IV.1.3. Immunologie

L'immunologie utilise la CMF pour la détection ou l'identification des sous-types des cellules impliquées dans l'immunité. En effet, l'utilisation des anticorps monoclonaux (AcM), dirigés contre des composants membranaires spécifiques, permet de distinguer des sous-populations lymphocytaires. Ces dernières années, l'identification et la caractérisation des antigènes (Ag) de surface des lymphocytes a progressé très

rapidement. Il s'agit en routine des antigènes CD3 (lymphocytes T), CD4 (T Helper), CD8 (T Supressor), CD57 (Natural Killer), HLA DR (complexe majeur d'histocompatibilité) et CD25 (récepteur de IL2). Les cellules de l'immunité peuvent être différenciées par certains marqueurs de surface identifiables par fixation d'anticorps couplé à un fluorochrome.

Pneumopathie alvéolo-interstitielles : le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est une méthode largement utilisée pour identifier l'alvéolite dans diverses affections respiratoires et principalement dans les maladies interstitielles pulmonaires (figure 20). La CMF permet le phénotypage immunologique des sous-groupes de lymphocytes et de monocytes et l'identification de microorganismes ainsi que l'évaluation quantitative du contenu en ADN des cellules tumorales. Cette technique demande à être validée mais constitue un complément utile de l'analyse des liquides de LBA et présente un intérêt particulier en immunopathologie pulmonaire et dans le suivi des manifestations respiratoires après greffe de poumon.

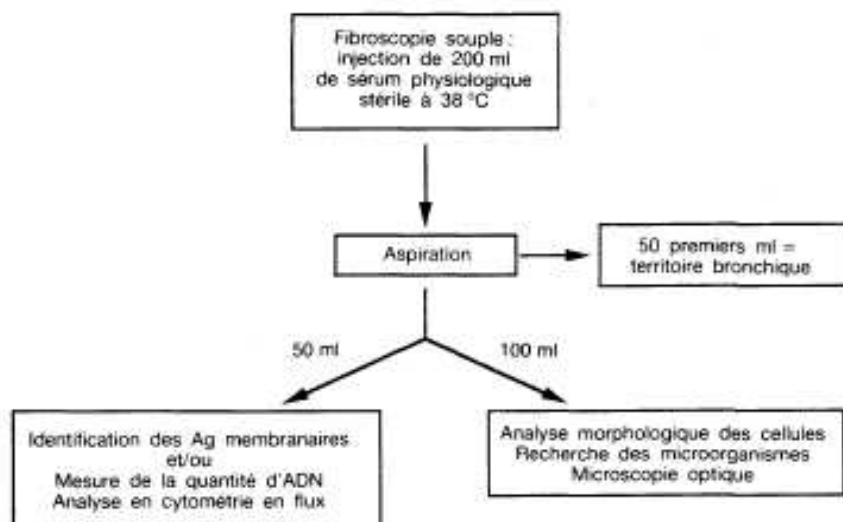


Figure 20 :

Principe de préparation d'un prélèvement pour une étude cytologique et cytométrique

Pathologies infectieuses

- ***Infection à VIH/SIDA*** : le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) est une maladie transmissible causée par le rétrovirus HIV = human immunodeficiency virus. La

maladie progresse durant une période variant de 6 mois à plus de 5 ans. La progression de la maladie est caractérisée par l'accentuation d'un syndrome immunodéficitaire. Le phénomène central de la maladie est l'atteinte sélective des cellules TH CD4+ (lymphocytes T Helper qui porte le marqueur de surface CD4). Le virus a un tropisme pour ces cellules et son effet cytopathogène entraîne la mort cellulaire. La CMF permet l'analyse quantitative des sous-populations de lymphocytes T : les CD4+ et les CD8+ à l'aide d'anticorps monoclonaux. (figure 21).

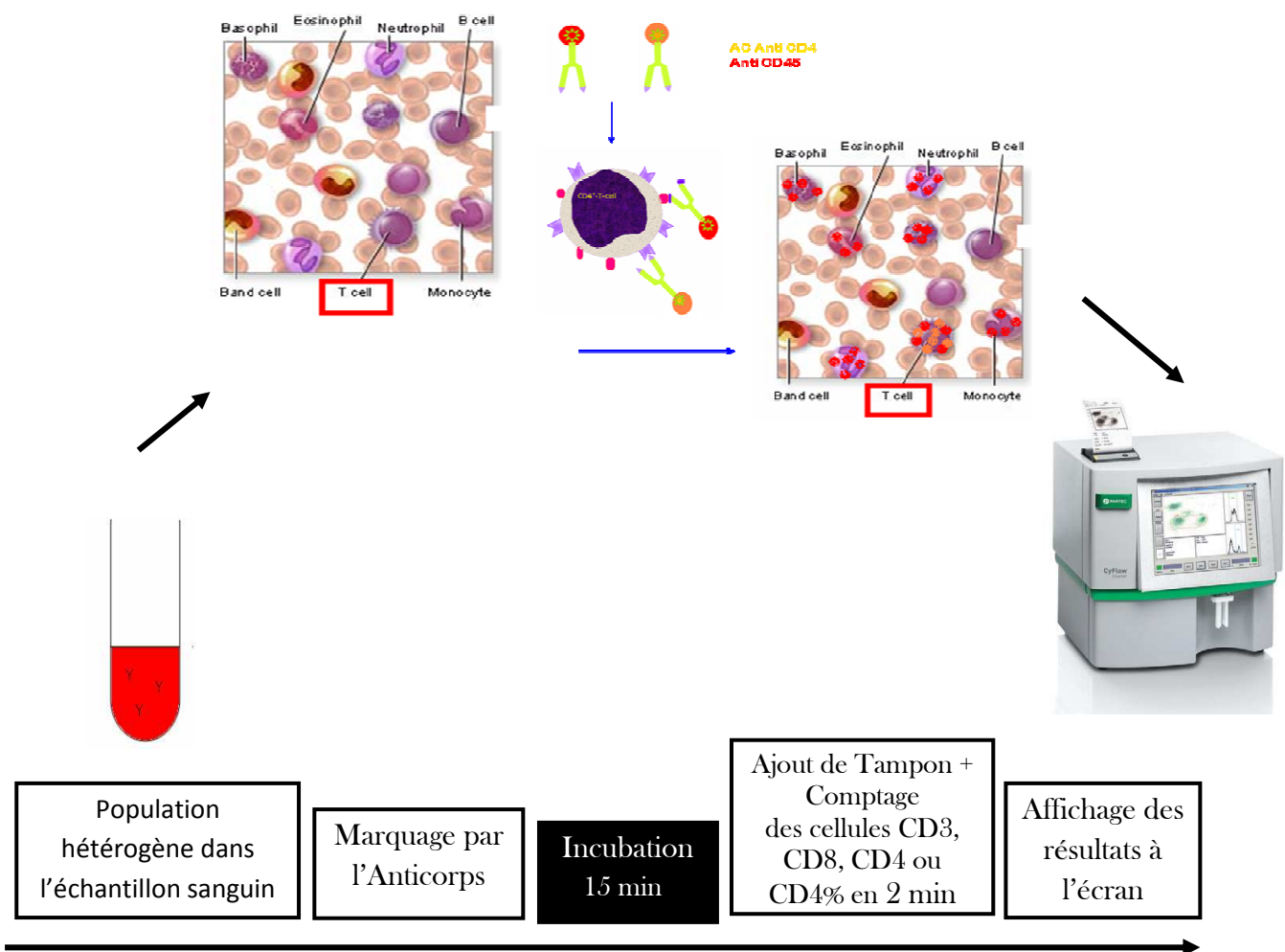


Figure 21: Exemple d'un typage lymphocytaire sur cytomètre de flux.

- **Infection à cytomégalovirus** : la mise en évidence de l'antigène précoce du germe dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire par CMF est possible très tôt après l'infection (in vitro, la cytométrie détecte cet antigène sur culture de fibroblastes 30 mn

après l'adsorption virale) et avec une sensibilité meilleure que l'immunofluorescence microscopique ou que la culture cellulaire (recherche de l'effet cytopathogène qui nécessite une production virale).

- ***Infection à *Pneumocystis Carinii**** : la CMF permet non seulement l'identification des kystes et trophozoïtes mais aussi leur quantification et l'appréciation de leur viabilité (les organismes intacts ne laissent pas pénétrer l'iodure de propidium et l'intégrité membranaire et bien corrélée à la viabilité cellulaire).

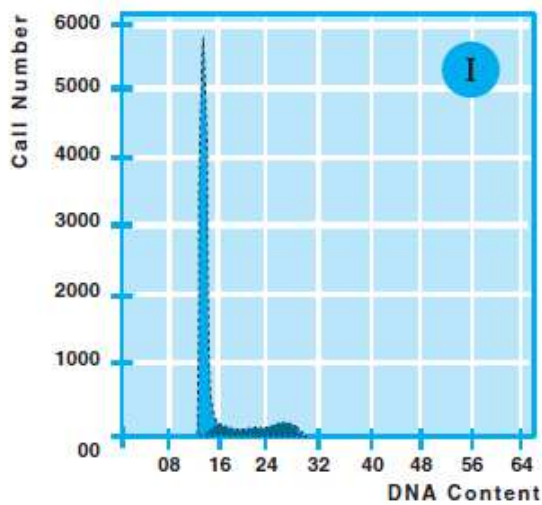
- ***Physiopathologie de l'Asthme*** : le phénotype des lymphocytes alvéolaires semble différent chez l'asthmatique par rapport au sujet normal : augmentation du nombre de lymphocytes T CD3+ exprimant les antigènes CD25 et HLA-DR (antigènes témoignant d'une activation cellulaire). De plus cette activation paraît étendue aux lymphocytes T CD4 et T CD8 dans l'asthme non allergique alors qu'elle serait limitée aux T CD4 dans l'asthme allergique.

IV.2. QUANTIFICATION DE L'ADN

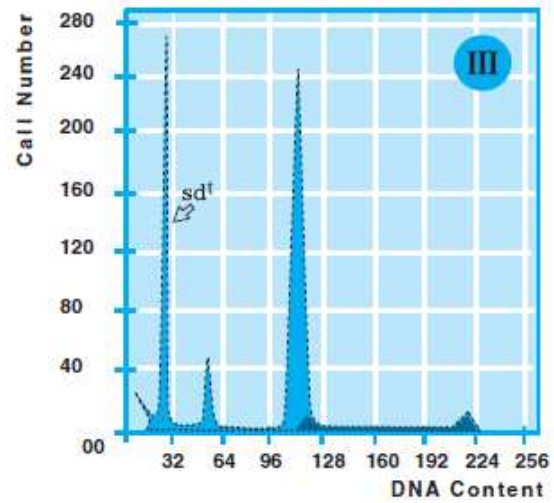
IV.2.1. Cancérologie

Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale. Jusqu'aux années 70, les principaux éléments utilisés pour établir un pronostic de l'évolution des cancers du sein étaient d'ordre clinique (essentiellement la taille de la tumeur) et histologique (le type et le grade de Scarff, Bloom et Richardson). Depuis lors, les nombreuses études menées sur la biologie du cancer ont permis la mise en évidence de nombreux facteurs permettant d'affiner le diagnostic et le pronostic. Au cours des dernières années, beaucoup de travaux ont été consacrés à la CMF. Ils ont fait état de plusieurs constatations; parmi les plus importantes nous citerons la corrélation entre le taux de la prolifération de la tumeur (mesuré par le pourcentage des cellules en phase S) et l'agressivité de la tumeur. Il est important de caractériser la cellule carcinomateuse à l'aide de la cytométrie en définissant chacune des quatre catégories d'anomalies du contenu en ADN : Diploïde, Aneuploïde, Tétraploïde et Multiploïde (figure 22). Ce qui facilitera par la même occasion l'interprétation, et l'exploitation des résultats par le clinicien. Comme la fréquence des anomalies de l'ADN peut atteindre 90 % dans les tumeurs du sein, elle permet donc le diagnostic de la

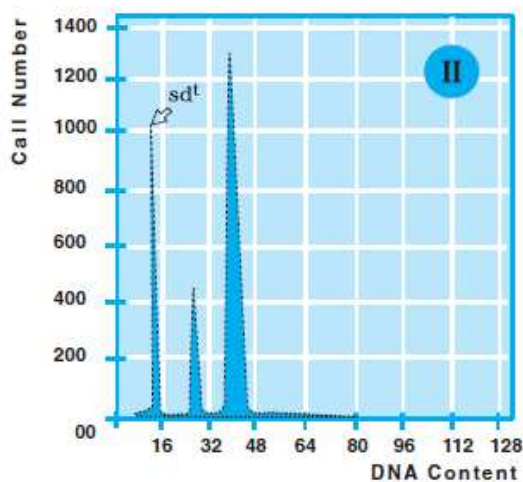
majorité des cancers. En illustration: quand la tumeur est diploïde, elle se distingue en général par une phase de prolifération plus élevée (généralement supérieure à 5%).



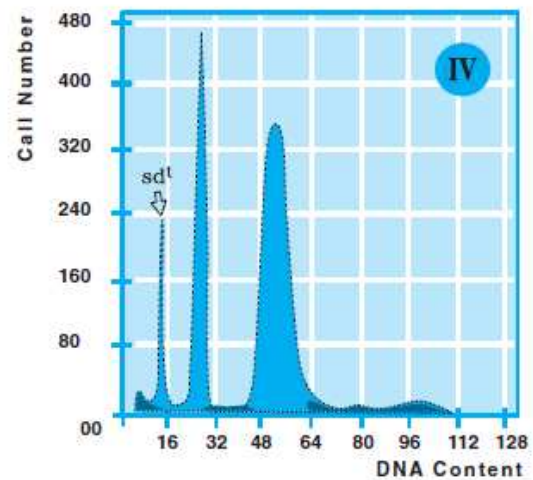
Type I: Diploïde avec un index d'ADN de 1.00 et une phase S < ou > à 5 %



Type III: Tétraploïde avec un index d'ADN compris entre 1.90 et 2.10.



Type II: Aneuploïde avec un index d'ADN entre 1.00 et 1.90 ou supérieur à 2.10.



Type IV : Multiploïde avec plus de deux index d'ADN différents de 1.00.

Figure 22: Profils cytométriques typiques obtenus après analyse des tumeurs de sein. Le premier pic en partant de la gauche des profils II, III et IV correspond au standard interne (globules rouges de poulets).

IV.2. 2. Hybridation génomique comparative (CGH)

On peut obtenir un caryotype par cytométrie de flux à partir de l'ADN d'un tissu (figure 23). L'ADN à analyser est extrait et marqué par un fluorochrome vert par exemple (fluoresceine). De l'ADN normal de référence est marqué par un fluorochrome rouge (rhodamine). Les 2 ADN sont hybridés avec des chromosomes en métaphase normaux colorés par le DAPI. Les chromosomes sont sélectionnés et analysés l'un après l'autre. La fluorescence rouge est enregistrée puis la fluorescence verte avec les mêmes paramètres. Un programme informatique fait l'analyse comparative des 2 intensités et donne un résultat graphique. Les déviations significatives permettent de détecter des délétions et des amplifications d'une zone d'un chromosome donné.

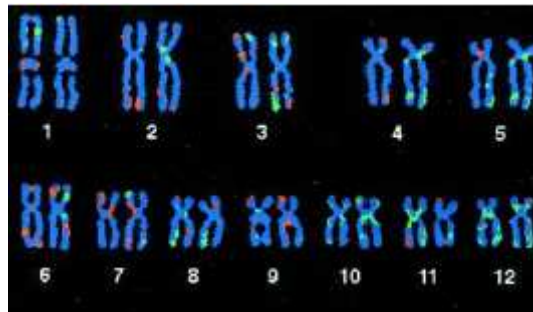


Figure 23 : Caryotype.

IV.3. L'ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est-à-dire l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques qui sont responsables de la prolifération cellulaire. La mesure du cycle cellulaire par des méthodes classiques de cytométrie de flux divise le cycle en 3 phases :

- G0/G1 = phase d'activation des cellules,
- S = phase de synthèse de l'ADN,
- G2/M phase de mitose.

La CMF permet de déterminer la distribution des cellules dans le cycle cellulaire: les cellules contenant 2N chromosomes d'ADN sont les cellules en G1 et les cellules non proliférantes. Les cellules contenant 4N chromosomes d'ADN sont en G2 ou en mitose. Entre ces 2 valeurs, on trouve les cellules en phase S. on a pu classer les tissus normaux en 3 catégories:

- les tissus à prolifération rapide (moelle osseuse, muqueuse gastrique, ovaire, testicule, peau)
- les tissus à prolifération lente (poumon, foie, rein, glandes endocrines, endothélium)
- les tissus qui ne prolifèrent pas (muscle, os, cartilage, nerf).

Cette classification a un intérêt clinique important : les effets toxiques de la chimiothérapie et de la radiothérapie sont beaucoup plus marqués sur les tissus à prolifération rapide. La plupart des applications qui concernent le cycle cellulaire n'utilisent qu'un seul paramètre, le contenu en ADN (figure). Des programmes mathématiques calculent les différentes phases.

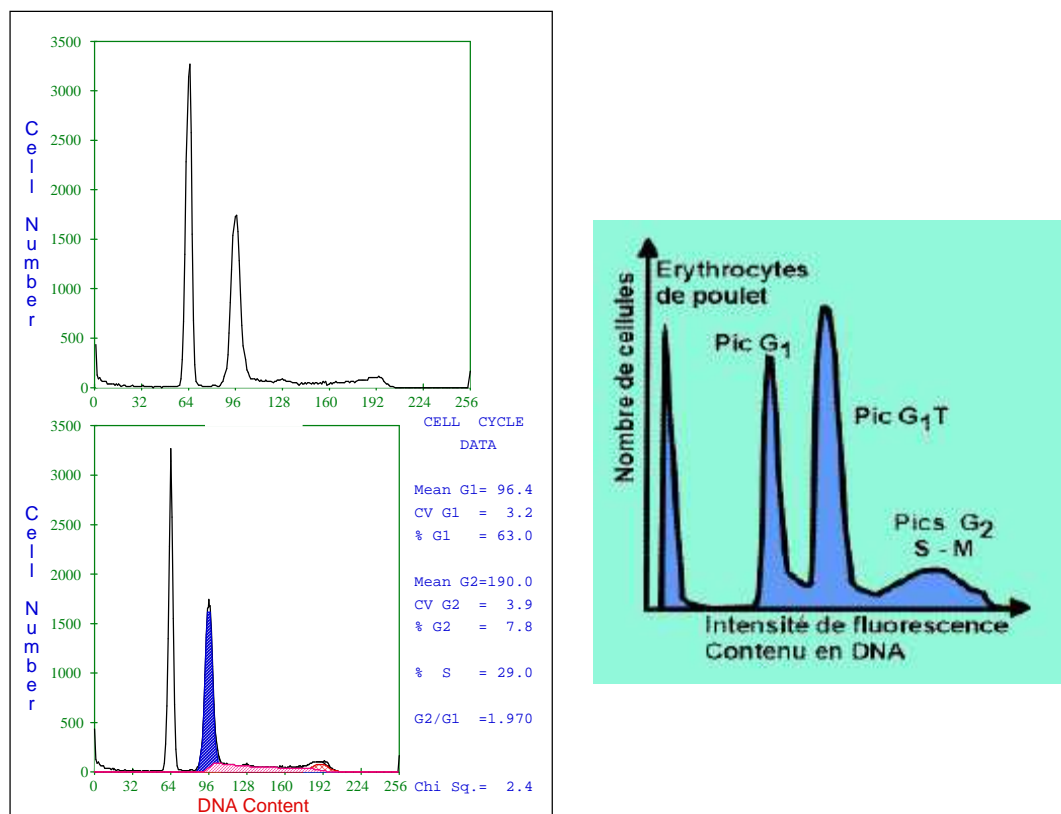
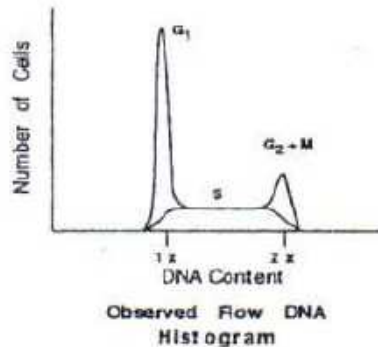
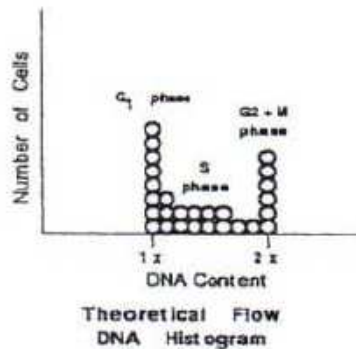
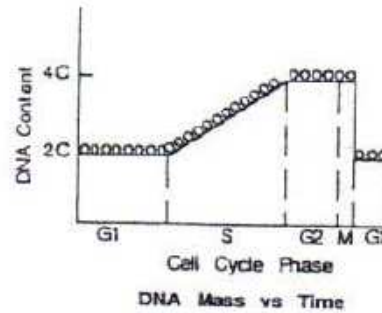
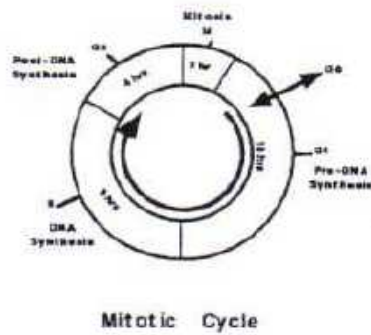


Figure 24: Analyse du cycle cellulaire d'une lignée tumorale.

Les principales applications concernent la *pharmacologie* : Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues (drogues antimétabolites, immunothérapie).



Marquage à l'iodure de propidium (em:540 nm; ex: 625 nm), un colorant des acides nucléiques

IV.4. OCEANOGRAPHIE

La CMF est une méthode de routine pour compter les différentes populations du picoplancton photosynthétique sur la base de la fluorescence des pigments tels que la chlorophylle. Après marquage des échantillons avec des marqueurs de l'ADN tels que le SYBR-Green, on peut aussi énumérer bactéries et virus

IV.5. PHYSIOLOGIE ANIMALE ET VEGETALE

Certains cytomètres sont conçus pour mesurer le contenu en ADN des noyaux cellulaires intacts, extraits de plantes ou d'animaux, par marquage fluorescent de l'ADN à l'aide de fluorochromes tels que l'iodure de propidium ou le DAPI. C'est le cas du CyFlow® Ploidy Analyser est un cytomètre en flux compact (Partec GmbH, Allemagne). Les applications principales concernent l'analyse de ploïdie elle-même: haploïdie / dihaploïdie (plantes), hybrides (plantes, poissons, coquillages), tétraploïdie (plantes), triploïdes (plantes, huîtres, crevettes), anisoploïdie (plantes), polysomatie, ex. endopolyploïdie ou endoreduplication (plantes), allopolyploïdie, aneuploïdie ex. addition

et délétion et plantes chimères (cultures *in-vitro*) ; ainsi que la détermination de taille de génome en écologie, détermination de variations spécifiques d'ADN (plantes), taxonomie, création de bases de données d'ADN (plantes), tri de chromosomes, effets de substances génotoxiques (plantes), détermination de caractéristiques physiologiques ou agronomiques, détermination du sexe (plantes, bétail, spermés).

Principe de la technique: les méthodes d'analyse de la teneur en ADN nucléaire à l'aide de la cytométrie en flux ont été mises au point à l'origine pour les cellules humaines (figure 26). Dans les années 80, elles ont été adaptées à l'analyse des cellules végétales. Elles reposent sur l'utilisation de fluorochromes spécifiques à l'ADN et sur l'analyse de l'intensité relative de la fluorescence des noyaux marqués. La teneur en ADN des noyaux étant en relation avec le degré de ploïdie, la détermination de la teneur en ADN à l'aide de la CMF peut remplacer le comptage des chromosomes et les autres méthodes traditionnelles de détermination du degré de ploïdie.

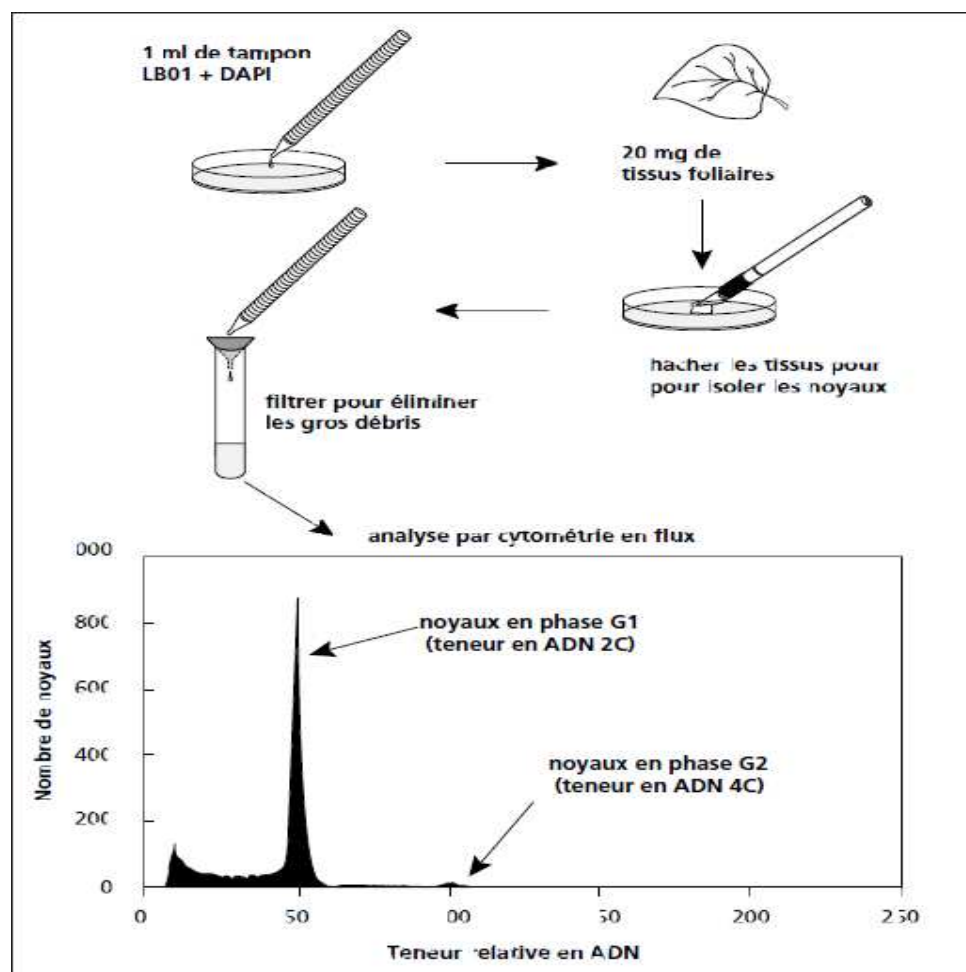


Figure 26 : Schéma de la procédure d'analyse du degré de ploïdie des *Musa* (bananier) grâce à la CMF.

IV.6. APPLICATIONS EN VIROLOGIE CLINIQUE

L'introduction en virologie des techniques de quantification par génétique moléculaire, d'adaptation plus aisée pour la majorité des laboratoires, explique largement ce manque de développement de la CMF. On assiste toutefois, si l'on en juge par l'accroissement net de publications dans ce domaine, à un regain d'intérêt pour la cytométrie en virologie clinique depuis 1997.

- *Détection d'antigènes viraux*

La détection d'antigènes viraux représente le champ d'application le plus fréquent de la cytométrie en virologie clinique [1]. Ses applications sont, potentiellement au moins, toutes celles où la réaction d'immunofluorescence est utilisée pour la quantification des antigènes viraux en activité de routine. Il est possible de rechercher les antigènes viraux dans les prélèvements, soit après leur mise en culture, soit directement au sein de l'échantillon. Il a ainsi été proposé des protocoles visant à quantifier l'antigène p24 ou la protéine Rev au sein des lymphocytes infectés par le VIH ou certains antigènes du CMV dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire. Très récemment, la cytométrie a été appliquée à la quantification d'antigènes du rotavirus, après mise en culture rapide de prélèvements de selles. Enfin, il a été montré qu'elle peut être utilisée pour rechercher certains antigènes du CMV directement dans les polynucléaires de sujets présentant des infections actives. Une comparaison de la détermination de l'antigénémie pp65 par cytométrie avec la lecture en microscopie optique, traditionnellement utilisée pour cette recherche, vient de montrer que les deux approches présentent un seuil de détection similaire. L'appréciation du nombre absolu de polynucléaires exprimant l'antigène recherché n'est pas similaire entre les deux méthodes (le seuil de détection en cytométrie de flux, déterminé à 0,05 %, correspond à une antigénémie comprise entre 1 et 10 cellules positives sur lame). Cela illustre très bien les différences entre la vision humaine et la lecture par le cytomètre, qui permet une détection plus sensible des faibles densités antigéniques et analyse chaque cellule individuellement.

L'utilisation de la CMF pour l'évaluation de la résistance de souches d'*Herpesviridae* aux antiviraux est une des applications qui fait l'objet d'un nombre croissant de publications, concernant en particulier le CMV, l'herpès virus humain 6, le virus varicelle-zona ou Herpès simplex virus 1. La cytométrie apparaît comme une alternative

intéressante à l'évaluation classique des profils de résistances phénotypiques par les essais de réductions des plages, permettant une lecture beaucoup moins fastidieuse et plus objective. Ces premières études soulignent l'importance du choix de l'antigène cible utilisé pour évaluer la CI50.

- ***Détection des acides nucléiques viraux***

L'utilisation conjointe de la CMF et de techniques de génétique moléculaire est assez récente. Plusieurs formats ont été développés et appliqués à la recherche de génomes viraux, dans lesquels la cytométrie est utilisée pour révéler des hybridations *in situ* (techniques Fish) ou des PCR *in situ*. Les données publiées à ce jour dans la littérature concernent essentiellement le VIH [25, 26] ou l'EBV [27], sans application directe à un diagnostic de routine.

- ***Dosage des anticorps***

La quantification d'anticorps dirigés contre des virus par cytométrie a été décrite dès la fin des années 1980, notamment pour les *Herpes viridae* et pour le VIH. Ces méthodes n'ont pas trouvé d'applications réelles dans les laboratoires de routine, en raison de la facilité d'utilisation des techniques Elisa.

- ***Les virus de l'océan*** : l'adaptation de la technique de cytométrie en flux à l'étude de ces virus a permis d'obtenir des comptages précis de ces particules, après marquage de leur contenu en acides nucléiques. Les scientifiques ont ainsi mis en évidence deux populations distinctes de virus, qui pourraient affecter l'une les eucaryotes, l'autre les bactéries. Cette technique va ainsi permettre une meilleure connaissance de la répartition et du rôle de ces virus dans les océans.

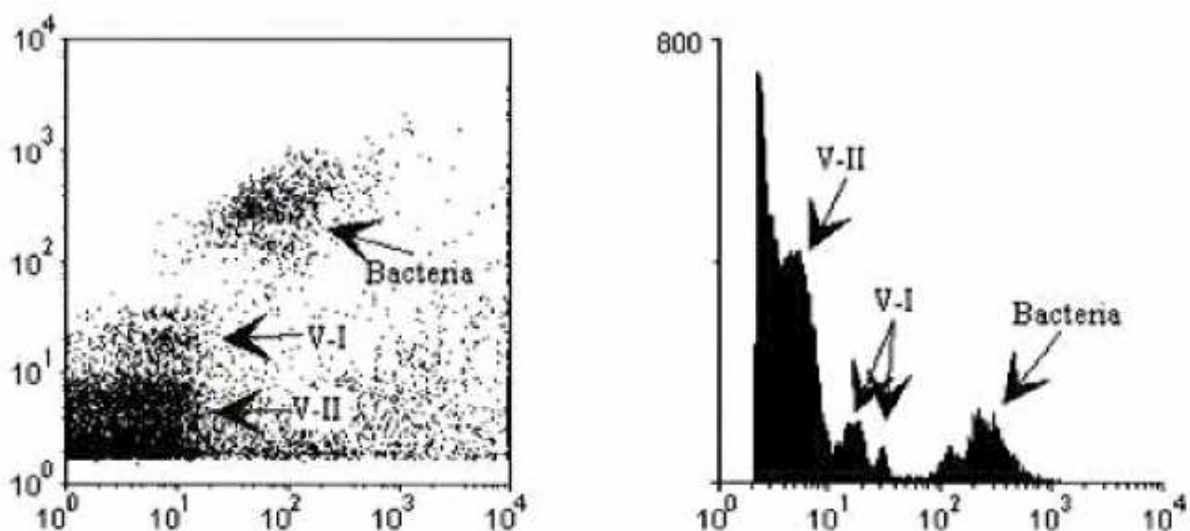


Figure 27 : Histogrammes de bactéries et virus de l'océan à la CMF.

IV.7. APPLICATIONS EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE

Les analyses microbiologiques sont classiquement effectuées selon des méthodes consistant à incuber un échantillon du produit à analyser dans un milieu de culture favorisant le développement des microorganismes présents dans ce produit. L'étude et le dénombrement des microorganismes qui s'y sont développés après plusieurs jours d'incubation en fournissent le résultat (figure 28). Cette méthode n'est pas adaptée pour des produits frais qui doivent être mis rapidement sur le marché en raison d'une durée de vie courte, parfois même inférieure aux délais nécessaires à ce type d'analyse. Plus généralement, la demande des industries agroalimentaires pour des méthodes courtes, fiables et peu coûteuses est très forte. L'automatisation de ces procédures permet d'obtenir des résultats en quelques minutes au lieu des 2 à 14 jours avec les cultures sur boîte de Pétri, et avec une sensibilité largement supérieure.

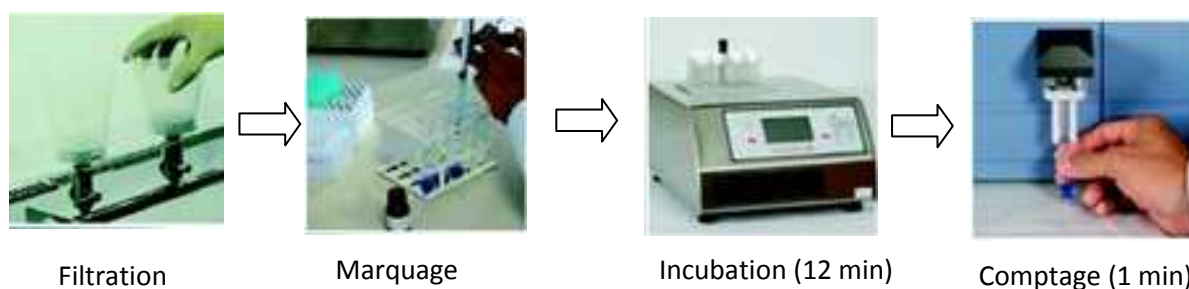


Figure 28 : Cytométrie de flux appliquée à l'agroalimentaire.

Cette méthode permet de rechercher, outre la flore totale d'un aliment, les bactéries *Escherichia coli*, *Salmonella* ou *Listeria*, avec possibilité d'intervenir aussi bien sur les matières premières que sur des produits finis ou en cours de fabrication. Elle vise à déterminer, à l'instar d'une microbiologie prédictive, quelle sera la qualité microbiologique d'un produit au moment de sa date limite de consommation, à partir des analyses effectuées juste après sa fabrication

IV.8. APPLICATIONS EN INDUSTRIE BRASSICOLE

La CMF permet une approche révolutionnaire du suivi microbiologique des vins à tous les stades de la vinification. Les applications déjà fonctionnelles et validées par plusieurs laboratoires sont :

- Le contrôle des moûts :
- Le suivi des fermentations alcooliques
- Le suivi d'élevage
- La préparation à la mise en bouteille

V. PRINCIPAUX AVANTAGES DE LA CYTOMETRIE DE FLUX

Ce qui distingue la CMF des autres techniques analytiques et préparatives est qu'elle réunit les cinq caractéristiques essentielles suivantes : analyse quantitative, sensibilité de détection, rapidité, analyse multiparamétrique cellule par cellule, tri.

- *L'analyse quantitative* : C'est un atout majeur par rapport à la microscopie optique courante que de pouvoir quantifier les paramètres observés. En effet, au microscope, il est difficile de classer des cellules en plus de quatre catégories selon leur fluorescence : « négative », « faible », « moyenne », « forte ». Un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier rigoureusement chaque critère optique sur une gamme de 1 à 10 000 unités arbitraires de fluorescence. Mais le nombre de paramètres intervenant dans toute analyse de CMF (réglages optiques, fluorochromes, marqueurs) impose, dans le cadre d'une quantification absolue, l'utilisation de standards calibrés (billes fluorescentes par exemple).

- **Sensibilité de détection** : En immunofluorescence, il est possible de discerner du bruit de fond une population de cellules lymphoïdes portant environ 1 000 déterminants antigéniques par cellule.

- **Vitesse d'acquisition** : la vitesse moyenne d'analyse d'un cytomètre est de 1 000 cellules par seconde bien qu'il soit possible, sur les appareils modernes, d'analyser de manière fiable jusqu'à 10 000 événements par seconde sur plusieurs paramètres. En quelques secondes, la signification statistique du comptage est bien supérieure à celle obtenue classiquement par un microscope optique, même pour une souspopulation de cellules très minoritaires.

- **L'analyse simultanée de plusieurs paramètres** : la CMF offre la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs paramètres, ce qui permet de mesurer, par exemple, deux ou trois paramètres simultanés sur une population lymphocytaire du sang ou de la moelle [8]. Aucune autre méthode, qu'elle soit physico-chimique (centrifugation en gradient, élutriation) ou immunologique (panning, colonnes, rosettes) n'offre cette polyvalence.

- **Le tri** : les cellules peuvent être isolées avec des taux de pureté supérieurs à 99 %. Ces cellules peuvent être remises en culture. La grande pureté des populations triées par CMF ne peut donc être obtenue qu'au prix d'une sérieuse limitation du nombre de cellules recueillies et d'une surveillance constante lors de la séparation.

III.7. Inconvénients

- Les cellules doivent être en suspension ;
- le nombre de cellules doit être de l'ordre de quelques centaines de milliers au minimum ;
- On ne dispose pas d'image des cellules analysées ;
- l'analyse étant qu'à un unique instant donné, on ne peut pas faire de véritable étude cinétique portant sur une même cellule.