

IV. APPLICATIONS ET METHODOLOGIES DE LA CYTOMETRIE DE FLUX

- Applications en routine
 - Immunophénotypage: (hématologie, immunologie);
 - Expression quantitative d'antigènes de surface ou intracellulaires;
 - 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 Suppressor), 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.

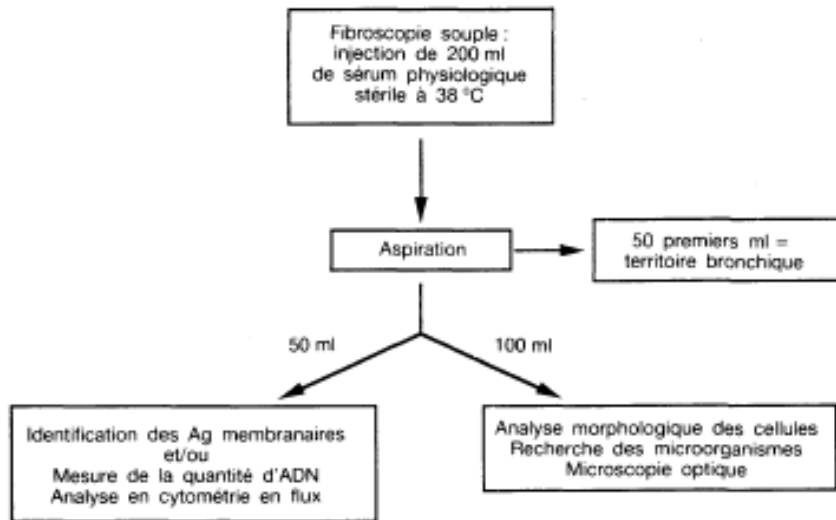


Figure 1
Principe de préparation d'un prélèvement pour une étude cytologique
et cytométrique

Figure 20 :

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 immunodéficientaire. 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).

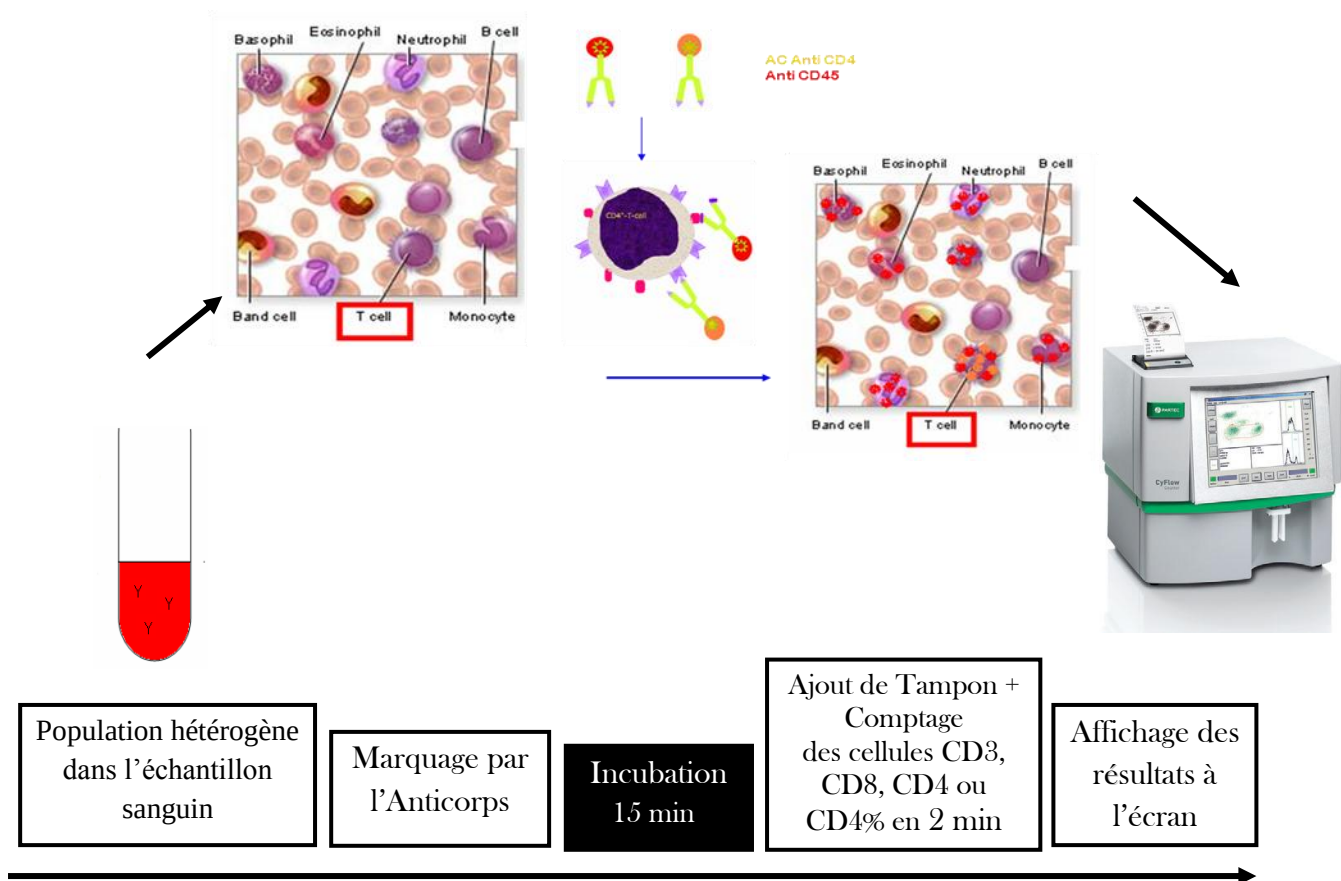


Figure 21: Exemple d'un typage lymphocytaire sur cytomètre de flux.

- **Infection à cytomégalo virus** : 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).

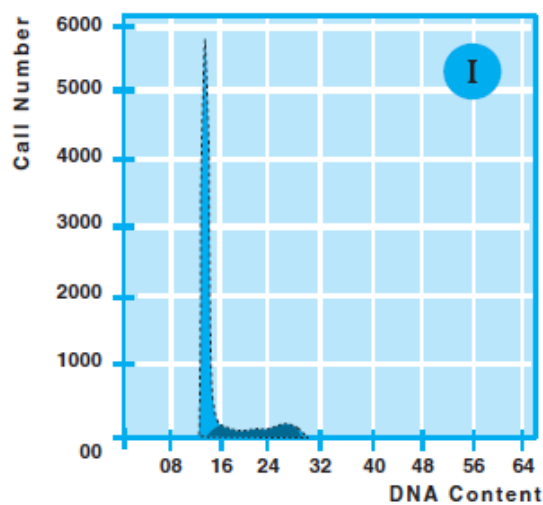
- **Physiopathologie de l'Asthme** : le phénotype des lymphocytes alvéolaires semble différent chez l'asthmatique par rapport au sujet normal: augmentation du nombre de lymphocytes T CD3+ exprimant les antigènes CD25 et HLA-DR (antigènes témoignant d'une activation cellulaire). De plus cette activation 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.

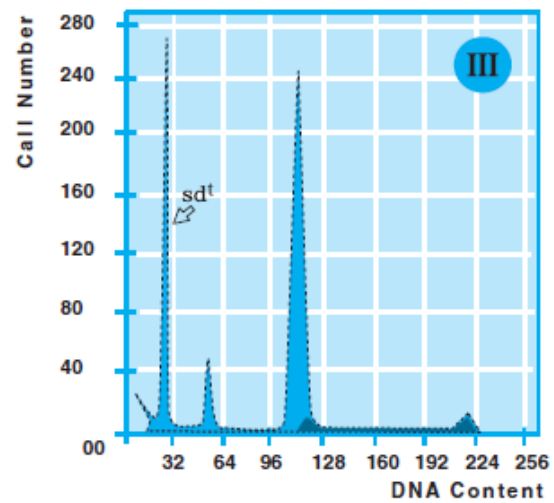
IV.2. QUANTIFICATION DE L'ADN

IV.2.1. Cancérologie

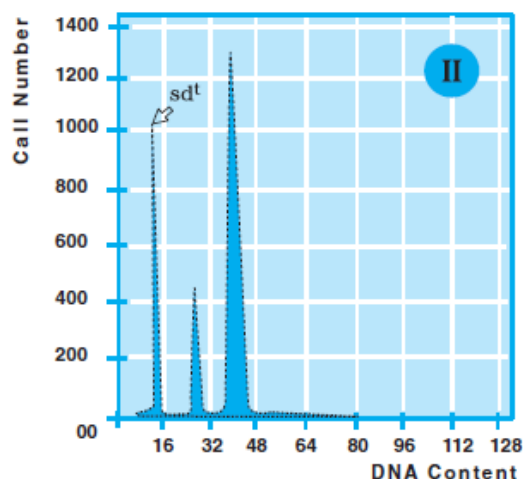
Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale. Jusqu'aux années 70, les principaux éléments utilisés pour établir un pronostic de l'évolution des cancers du sein étaient d'ordre clinique (essentiellement la taille de la tumeur) et 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%).



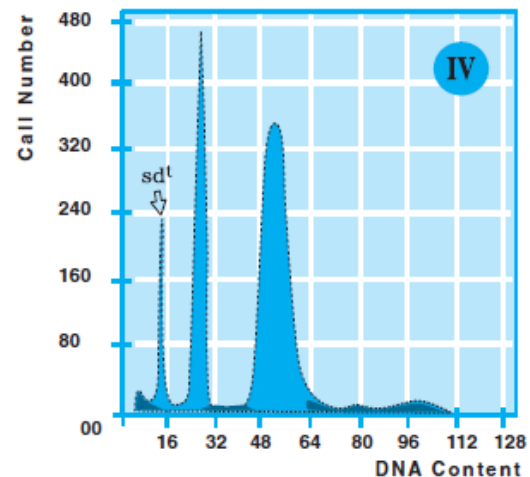
Type I: Diploïde avec un index d'ADN de 1.00 et une phase S < ou > à 5 %



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.

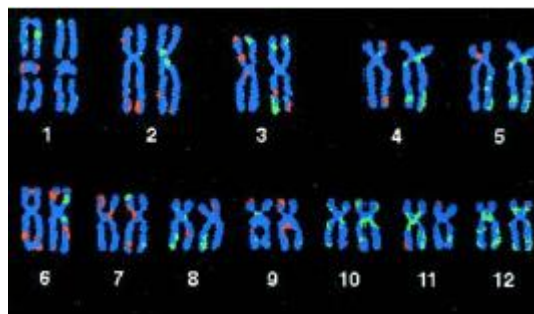


Figure 23 : Caryotype.

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 24). Des programmes mathématiques calculent les différentes phases.

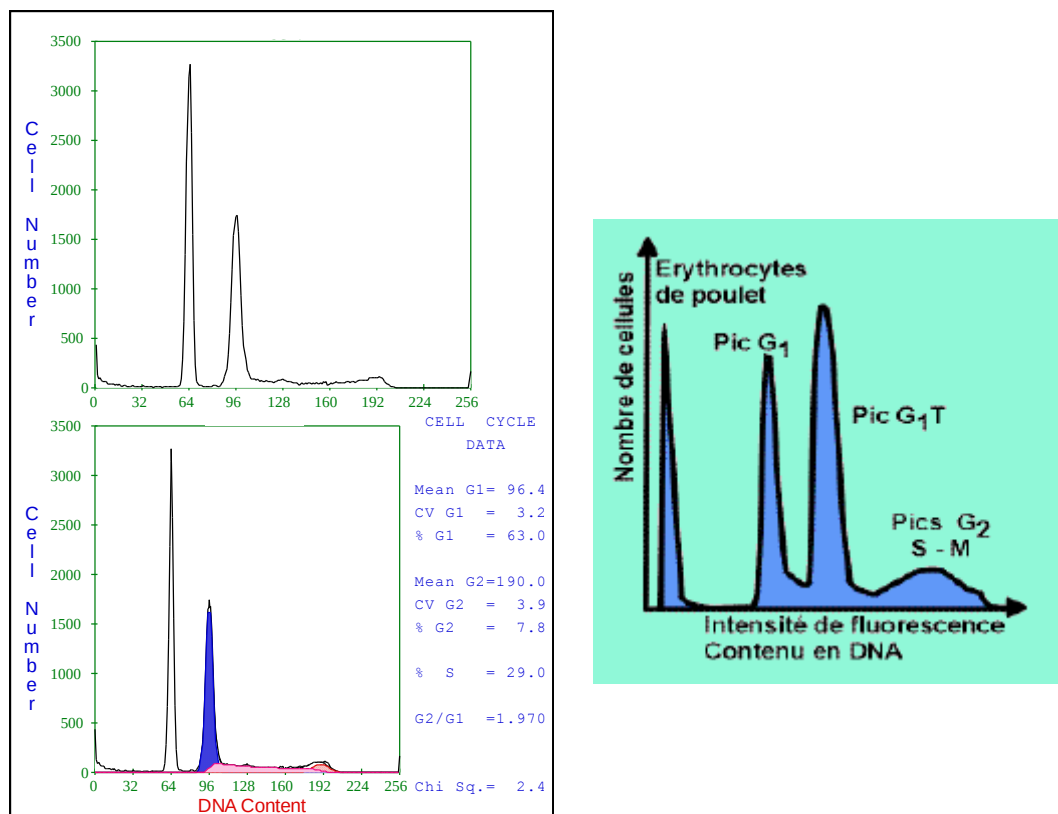
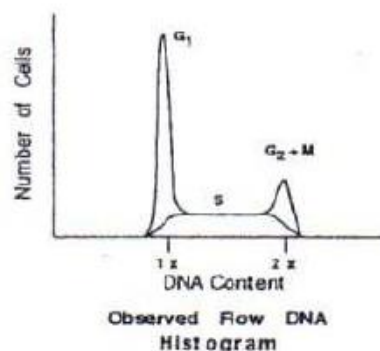
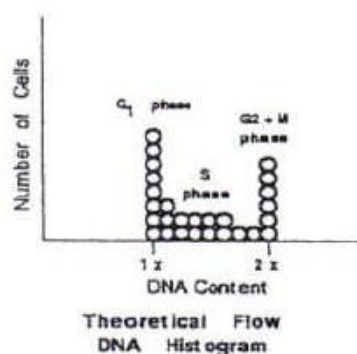
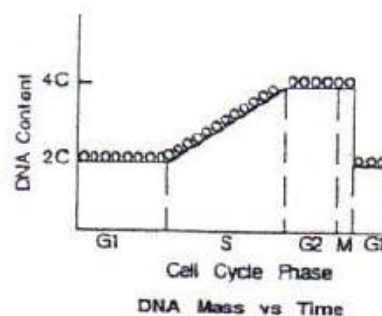
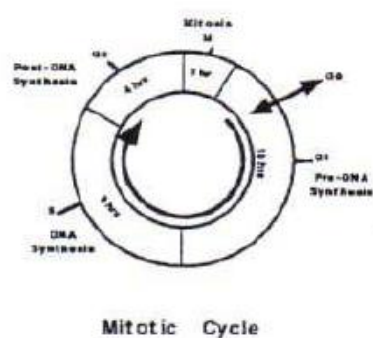


Figure 24: Analyse du cycle cellulaire d'une lignée tumorale.

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 antimitotiques, 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. PHYSIOLOGIES 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 / di-haploïdie (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, spermatozoïdes).

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.

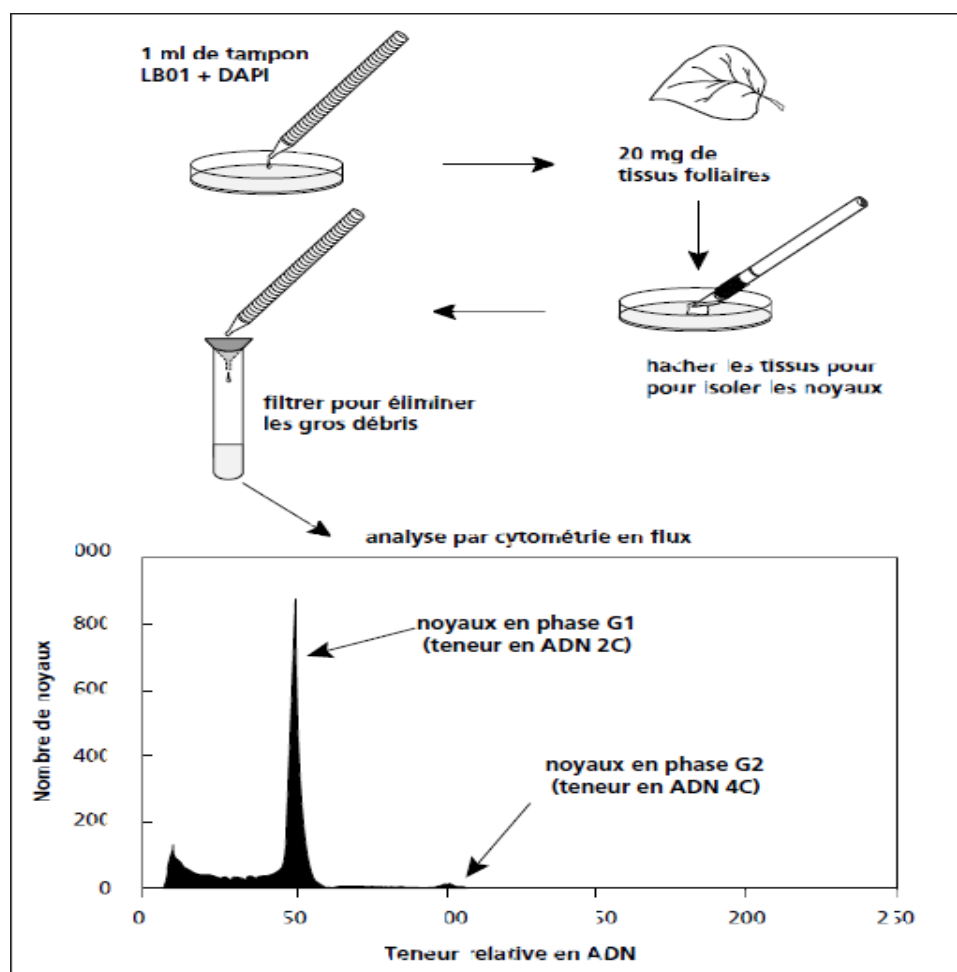


Figure 26 : Schéma de la procédure d'analyse du degré de ploïdie des *Musa* (bananier) grâce à la CMF.

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. 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 ou l'EBV, 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.

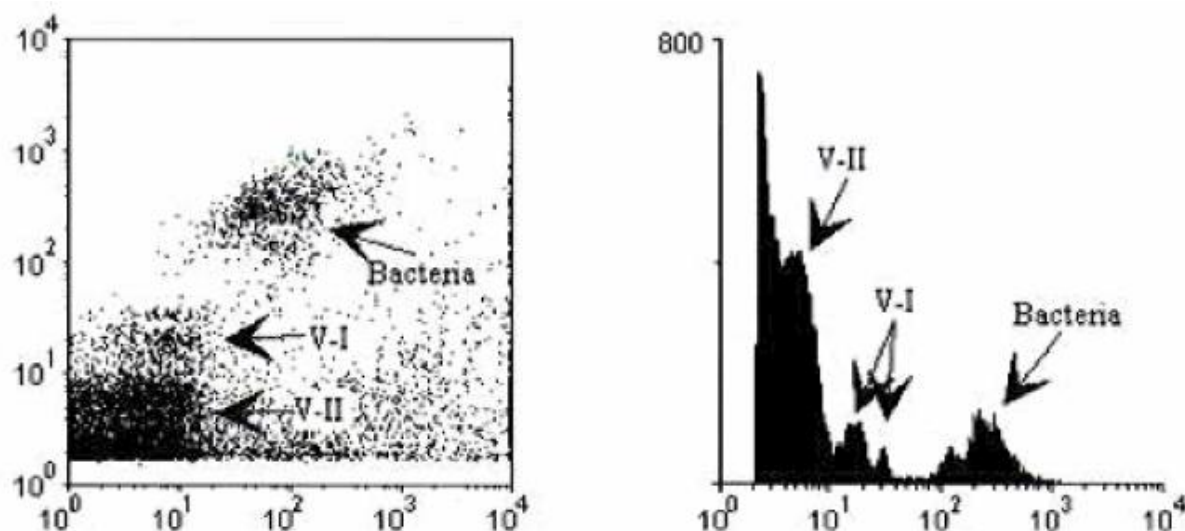


Figure 27 : Histogrammes de bactéries et virus de l'océan à la CMF.

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.

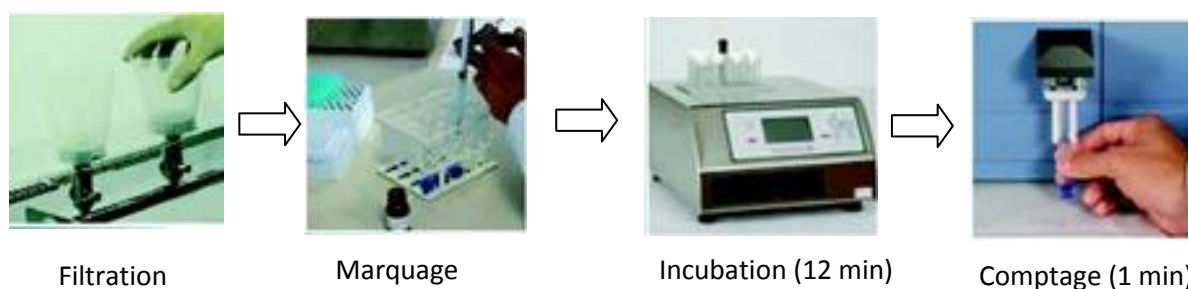


Figure 28 : Cytométrie de flux appliquée à l'agroalimentaire.

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 goûts;
- Le suivi des fermentations alcooliques;
- Le suivi d'élevage;
- La préparation à la mise en bouteille.