

Comprendre la cytométrie en flux

Understanding Flow Cytometry

L. Zafrani · G. Monneret · pour la Commission de Recherche Translationnelle de la SRLF

Reçu le 24 septembre 2017 ; accepté le 11 octobre 2017
© SRLF et Lavoisier SAS 2017

Comment ça marche

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode d'analyse qui permet, à grande vitesse (i.e., plusieurs milliers d'événements par seconde), de caractériser et compter des cellules (ou des particules) en suspension dans un flux liquidien. L'interaction de ces éléments avec la lumière émise par une ou plusieurs sources lumineuses (lasers en général) permet de caractériser les cellules selon différents critères tels que la taille ou la granularité, détectés grâce à la diffusion de la lumière, ou l'expression de molécules de surface (souvent nommées CD pour *cluster of differentiation*) généralement révélées par un composé fluorescent couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre le CD d'intérêt. Il est également possible de détecter, après perméabilisation, des molécules intracellulaires. Ainsi, la CMF permet de mesurer individuellement (i.e., pour une cellule donnée) et simultanément plusieurs paramètres sur chaque cellule au sein d'une population hétérogène. Les éléments cellulaires doivent être en suspension pour être analysés par CMF (sang, liquide de ponction...). L'analyse de tissus cellulaires est possible, ceux-ci doivent alors être préalablement dissociés pour être mis secondairement en suspension.

Pour l'analyse d'un échantillon de sang total par exemple, les globules rouges doivent être dans un premier temps lysés à l'aide d'un tampon de lyse. Les cellules sont centrifugées une

première fois puis incubées avec l'anticorps d'intérêt à 4°C à l'abri de la lumière pendant une durée de 15-30 minutes. Un tampon spécifique est ajouté pour arrêter la réaction et la suspension cellulaire est centrifugée. Deux à trois lavages sont ensuite effectués avant l'analyse. Pour un marquage de surface, la durée d'expérimentation est en général d'environ 1h.

Un cytomètre de flux comporte plusieurs systèmes :

- un système fluide pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser. Les cellules en suspension sont introduites dans une veine liquide sous pression (liquide de gaine) qui aura pour effet d'aligner et espacer les cellules en vue de l'analyse ;
- un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs) ;
- un système électronique pour convertir les signaux optiques (photons) en des signaux électroniques (volts). Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs, afin d'être amplifiés, numérisés et stockés dans un ordinateur ;
- un système informatique pour visualiser ces signaux.

Le principe général est schématisé sur la Figure 1. La longueur d'onde d'un laser permet d'exciter 4 à 5 fluorochromes qui auront des spectres d'émission différents. En général, les cytomètres disposent de trois lasers ce qui offre, en plus de l'information sur la taille et la granularité, la possibilité d'obtenir simultanément une dizaine de paramètres pour une cellule donnée.

Il est à noter que certains cytomètres dédiés à la recherche possèdent une dizaine de lasers et permettent l'analyse simultanée de plus de 30 paramètres. Afin de limiter l'inconvénient des chevauchements de spectres optiques issus de multiples sources lumineuses, de nouvelles approches par cytométrie de masse ont émergé. Les anticorps de détection sont alors couplés à un métal (isotopes de transition naturellement absents dans les produits biologiques). Les cellules sont analysées dans un flux liquidien identique à la CMF mais la révélation des marquages se fait par spectrométrie

L. Zafrani (✉)
Service de réanimation médicale, hôpital Saint-Louis,
1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France
e-mail : lara.zafrani@aphp.fr

Assistance Publique des Hôpitaux de Paris,
université Paris Diderot, 75006 Paris, France

G. Monneret
Laboratoire d'immunologie,
hôpital Édouard Herriot, hospices civils de Lyon,
69000 Lyon, France

pour la Commission de Recherche Translationnelle de la SRLF
48 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

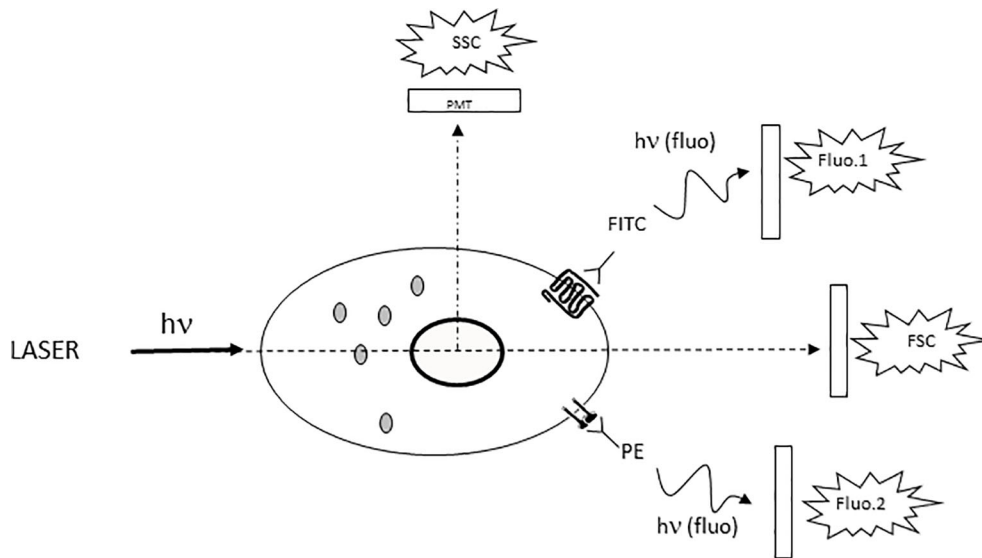


Fig. 1 Principe général de la cytométrie en flux. Les cellules en suspension dans un flux liquidien passent une à une dans un faisceau laser. La diffusion physique de la lumière émise par la source lumineuse est dépendante de la taille et de la granularité cellulaire (contenu en granule, structure plus ou moins segmentée du noyau). La diffusion dans l'axe de la source lumineuse (*forward scatter*, FSC) renseigne sur la taille, la diffusion à 90°C (*side scatter*, SSC) renseigne sur la granularité ou structure (voir Fig. 2 – histogramme taille / structure). La lumière du laser va également exciter des fluorochromes préalablement couplés à des anticorps monoclonaux capables de reconnaître et fixer certaines protéines. Sachant que les fluorochromes réémettent la lumière à différentes longueurs d'onde (loi de Stoke), un même laser peut activer jusqu'à cinq fluorochromes qui donneront cinq informations différentes. Ici, un laser à 488 nm active la fluoescéine (FITC, émission à 520 nm), couplée à un anticorps identifiant un récepteur membranaire, et la phycoérythrine (PE, émission à 580 nm) couplée à un anticorps identifiant une intégrine. Un système de filtre optique et de photomultiplicateur va permettre de collecter la lumière propre à chaque fluorochrome et de la quantifier. Il sera alors possible d'évaluer si une molécule est présente à la surface de telle ou telle cellule et également de donner l'intensité de son expression (Fig. 4). En cas d'absence de la molécule, aucun anticorps monoclonal ne se fixe et il n'y a donc pas de signal fluorescent correspondant (voir Fig. 5, avant stimulation, pas de détection de TNF). $h\nu$ représente l'énergie du photon (en Joules) où h est la constante de Planck et ν la fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon considéré. PMT : photomultiplicateur

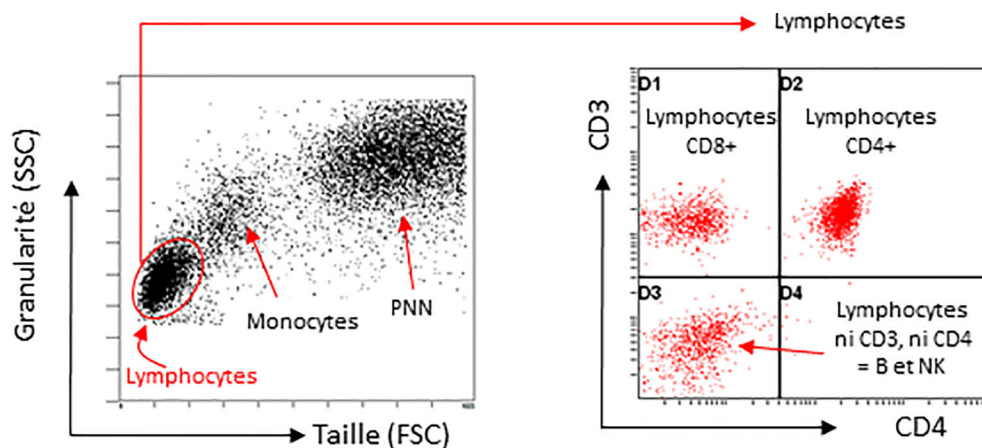


Fig. 2 Identification des sous-populations lymphocytaires T. Sur l'histogramme taille / structure, un premier fenêtrage permet d'isoler les lymphocytes des monocytes et des neutrophiles. Sur les lymphocytes ainsi sélectionnés, grâce à des anticorps anti-CD3 et anti-CD4, il est ensuite possible d'identifier les lymphocytes CD4+ (qui doivent être positifs à la fois pour le CD3 et le CD4 – quadrant en haut à droite). Par défaut d'expression du CD4, les cellules CD3+ sont alors identifiées comme les lymphocytes CD8+ (quadrant en haut à gauche). Par défaut d'expression du CD4 et du CD3, sont alors identifiés les lymphocytes B et NK (quadrant en bas à gauche) qui n'expriment aucun de ces marqueurs

de masse. Cet outil de recherche permet une analyse simultanée de plus de 40 paramètres.

Représentation graphique des résultats

Lors d'une analyse en CMF, plusieurs histogrammes peuvent être créés :

- l'histogramme FSC (*Forward Scatter*) (taille) / SSC (*Side Scatter*) (granularité) : les cellules sont réparties selon leur granularité (lumière diffusée à 90°) et leur taille (lumière déviée dans l'axe du laser). La fluorescence émise par les cellules n'est pas prise en compte (Figs 1, 2) ;
- l'histogramme monoparamétrique (FSC, SSC ou fluorescence) : il donne une information sur un paramètre unique pour une population donnée. En ordonnée est représenté le nombre de cellules et en abscisse l'intensité de fluorescence (Fig. 3) ;
- l'histogramme biparamétrique : sont représentés deux signaux (FSC, SSC ou fluorescence) l'un par rapport à l'autre. On obtient des nuages de points, chaque point représentant une cellule. On pourra alors déterminer les cellules négatives/simples positives/doubles positives (Figs 2, 3).

Indications cliniques validées

- Compte cellulaire : nombre de cellules par unité de volume. Par exemple : la numération des lymphocytes CD4+ pour le suivi des patients VIH+ ;

- quantification au sein d'une population cellulaire d'un pourcentage de cellules exprimant un marqueur donné. Par exemple : % de lymphocyte CD4+ parmi les lymphocytes T ;
- quantification de l'expression d'un marqueur sur l'ensemble d'une sous-population. Par exemple : ADN pour évaluation du cycle cellulaire (cancérologie) ;
- détection de la présence anormale d'un cluster de différenciation dans une population cellulaire (typage des leucémies / lymphomes, applications en oncohématologie) ;
- tests fonctionnels ex vivo : expression d'une molécule de surface après activation (test d'activation des basophiles pour allergie au curare), quantification intracellulaire de cytokines après activation (déficits immunitaires) ;
- tri cellulaire. L'analyse et l'identification des cellules d'intérêt se fait grâce à la CMF qui est couplée à un système de tri électromagnétique des cellules en sortie de fluide. Un appareil de tri cellulaire se nomme en anglais *fluorescence-activated cell sorter* (FACS), acronyme souvent improprement utilisé pour parler de CMF.

Exemples d'utilisation en recherche appliquée à la réanimation

Dysfonction lymphocytaire T au cours du sepsis : rôle des lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ CD127 faible (Fig. 3)

Le sepsis s'accompagne d'une dysfonction lymphocytaire T avec une augmentation de l'apoptose lymphocytaire et une augmentation du pourcentage de lymphocytes T régulateurs

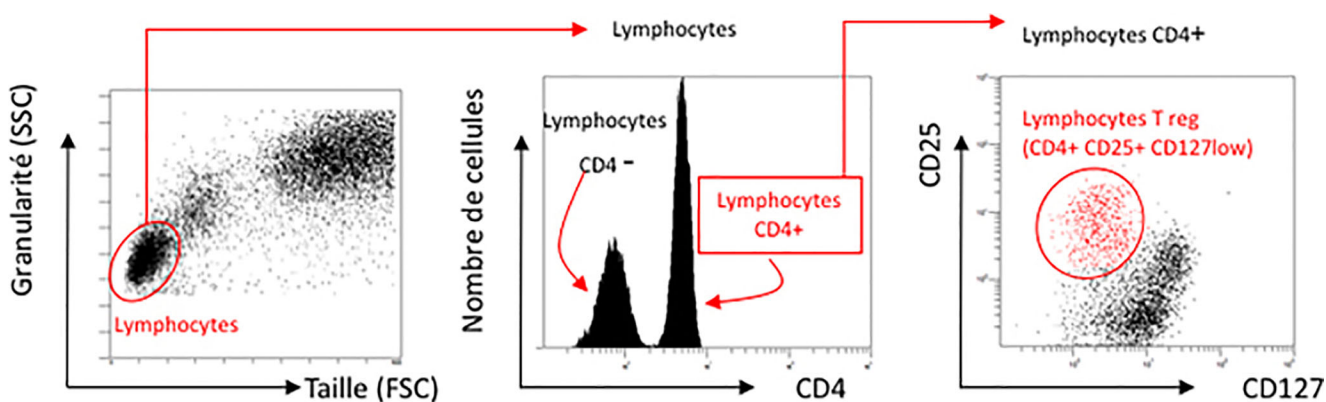


Fig. 3 Identification des lymphocytes T régulateurs (Treg). Sur l'histogramme taille / structure, un premier fenêtrage permet d'isoler les lymphocytes des monocytes et des neutrophiles. Sur les lymphocytes ainsi sélectionnés, grâce à des anticorps anti-CD4, il est ensuite possible d'identifier les lymphocytes CD4+ (histogramme monoparamétrique montrant une population n'exprimant pas CD4 – pic de gauche – et une population exprimant CD4 à droite). Sur les cellules CD4+, l'expression de CD127 et CD25 est ensuite évaluée. Les Treg expriment faiblement CD127 et fortement CD25 fort (en rouge). Au final, les cellules CD4+CD25+CD127 faible sont identifiées, elles correspondent au phénotype décrit pour les Treg [1]

(Treg) CD4+ CD25+ CD127 faible [1]. Les lymphocytes Treg jouent un rôle central dans le contrôle des réponses immunitaires innées et adaptatives et le pourcentage de ces lymphocytes semble fortement corrélé au pronostic des patients septiques.

Dysfonction monocytaire au cours du sepsis : analyse de l'expression de HLA-DR (Fig. 4)

Au cours du sepsis, la réponse pro-inflammatoire s'accompagne de mécanismes compensateurs anti-inflammatoires qui induisent une immunodépression avec entre autres, une anergie monocytaire avec altération de la présentation de l'antigène par les monocytes, via une diminution de l'ex-

pression à leur surface de l'*human leucocyte antigen* (HLA-DR) [2].

L'expression monocyttaire de HLA-DR a ainsi été associée à l'immunodépression post-sepsis et au risque d'infection nosocomiale [3-5].

Ainsi, sa mesure se fait en CMF en associant un marquage des monocytes par un anticorps anti-CD14 à un marquage anti-HLA-DR. Sur les cellules positives pour le CD14, il est donc ensuite possible d'analyser le marquage HLA-DR. Les résultats peuvent être exprimés :

- en pourcentage de monocytes HLA-DR positifs sur l'ensemble de la population monocyttaire. Le seuil de positivité sera défini à partir d'un contrôle isotypique ;

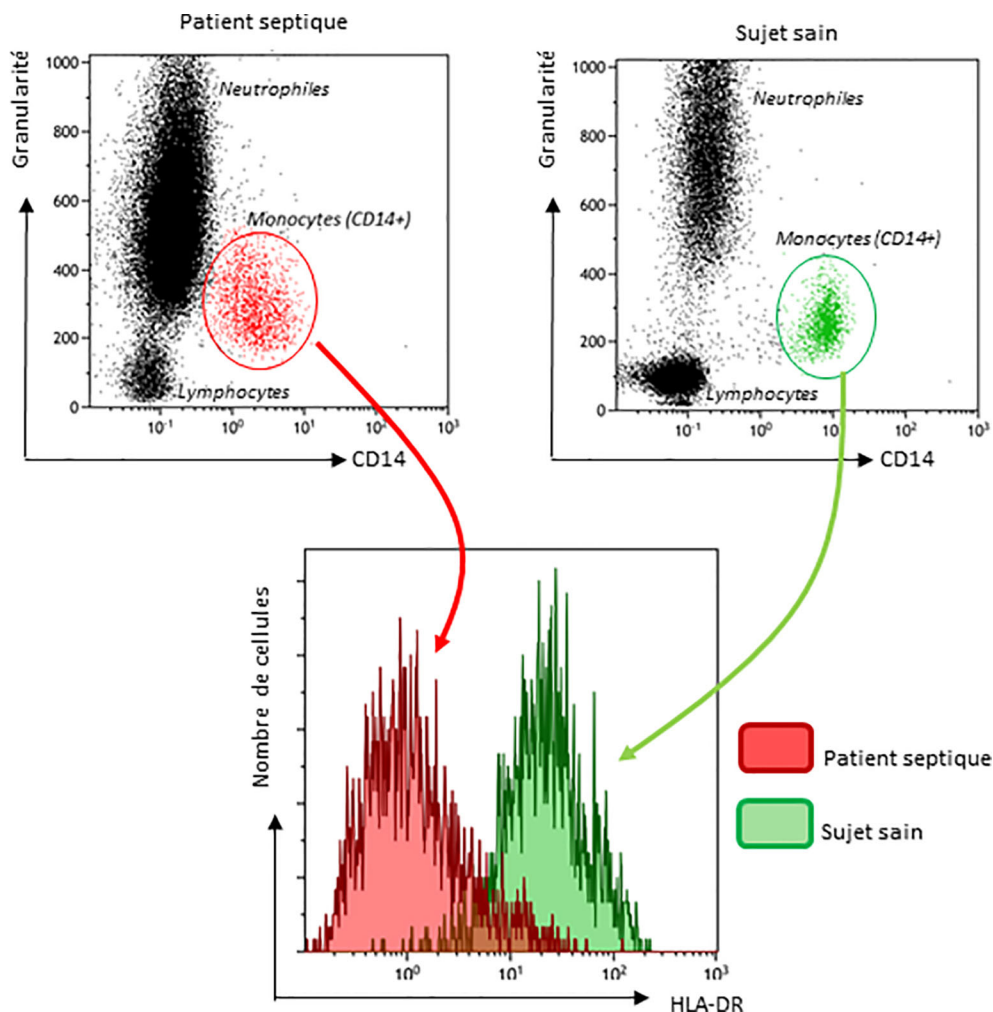


Fig. 4 Exemples représentatifs de l'expression des molécules HLA-DR à la surface des monocytes (mHLA-DR) évaluée par cytométrie en flux. Parmi les leucocytes, les monocytes sont identifiés grâce à leur granulométrie et à l'expression positive de CD14 (histogrammes du haut chez un sujet sain et un patient septique). Sur ces cellules, le niveau de mHLA-DR est déterminé (en intensité de fluorescence, histogramme du bas). Il est aisé de constater que l'expression du sujet sain (en vert) est beaucoup plus forte que celle du patient septique (en rouge). Il est possible de transformer l'intensité moyenne de fluorescence d'une population donnée (ici les monocytes) en nombre d'anticorps fixé par cellules (ABC : *antibody bound per cell*). En utilisant des billes calibrées en intensité de fluorescence, il est alors possible de standardiser les résultats entre différents laboratoires [7]

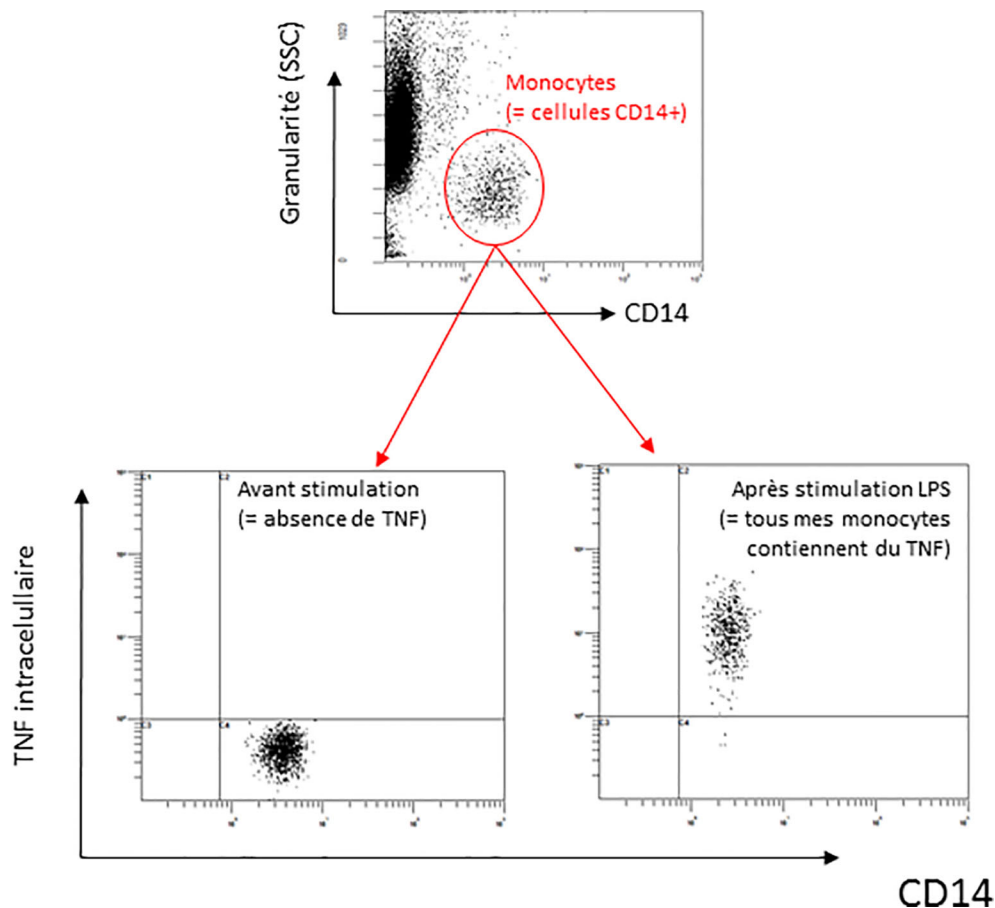


Fig. 5 Exemple représentatif d'un test fonctionnel incluant la détection de molécules intracellulaires: production de TNF dans les monocytes en réponse à une stimulation par du lipopolysaccharide (LPS). Parmi les leucocytes, les monocytes sont identifiés grâce à leur granularité et à l'expression positive de CD14 (histogramme du haut, même principe que dans la Fig. 4). Sur ces cellules, le niveau de TNF est déterminé après deux heures d'incubation avec du LPS. Chez un sujet sain, il est aisé de constater qu'en absence de stimulation, les monocytes ne synthétisent pas de TNF (histogramme en bas à gauche) alors qu'après stimulation, l'ensemble des monocytes expriment fortement le marquage révélant la production de TNF [6]

- en moyenne d'intensité de fluorescence (*mean of fluorescence intensities* [MFI]) par rapport à la population totale monocytaire, ce qui reflète la densité de HLA-DR par cellules.

Pour information, une analyse du marquage HLA-DR en CMF coûte 12 à 15 euros.

Altération fonctionnelle de monocytes au cours du sepsis : détection intracellulaire du *tumor necrosis factor* (TNF) après stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) (Fig. 5)

Pour mesurer l'altération fonctionnelle des monocytes au cours du sepsis, une autre approche est la mesure du TNF produit par les monocytes en réponse au LPS en CMF (détection du TNF intracellulaire). Ainsi, l'augmentation

du TNF intracellulaire dans les monocytes en réponse au LPS est atténuée chez les patients septiques et corrélée à l'expression d'HLA-DR [6]. Sur les cellules positives pour le CD14, il est donc ensuite possible d'analyser le marquage TNF intracellulaire. Le marquage intracellulaire nécessite une perméabilisation des cellules.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

1. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohé J, Lepape A, Ayala A, Monneret G, (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35: 678-686

2. Monneret G, Venet F, (2016) Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 90: 376–386
3. Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Fainvre V, Boval B, Payen D, (2009) Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 37: 2746–2752
4. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P, (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32: 1175–1183
5. Venet F, Lepape A, Monneret G, (2011) Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care Lond Engl* 15: 231
6. Monneret G, Demaret J, Gossez M, Reverdiau E, Malergue F, Rimmelé T, Venet F, (2017) Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations. *Shock Augusta Ga* 47: 318–322
7. Demaret J, Walencik A, Jacob MC, Timsit JF, Venet F, Lepape A, Monneret G, (2013) Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom* 84: 59–62