

# CYTOMETRIE EN FLUX

H. ELLEUCH ZGHAL

Centre Régional du Transfusion Sanguin , Sfax

## 1 / INTRODUCTION – DEFINITION

La cytométrie en flux remplace progressivement, dans les laboratoires d'immuno-hématologie le microscope à fluorescence pour effectuer rapidement des analyses sur un grand nombre de cellules en suspension.

La cytométrie en flux est l'étude d'une suspension monocellulaire, colorée par un fluorochrome, circulant dans une veine liquide et passant devant un rayon lumineux ( source laser le plus souvent) grâce à un système optique étudiant la lumière transmise et la lumière diffractée et ou re-émise par un fluorochrome ( immunofluorescence).

## 2 / DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Nous prenons, comme exemple de description, l'appareil Coulter XL. Cet appareil est composé de trois parties :

- Le cytomètre : permet le passage physique de l'échantillon dans la flow cell ou chambre d'analyse et le recueil des signaux lumineux de diffraction et de fluorescence.
- La poste informatique : gère l'ensemble des signaux issus du cytomètre et permet le traitement des données.
- Alimentation pneumatique et électrique : renferme les alimentations électriques du laser et du cytomètre ainsi que le compresseur nécessaire aux circuits pneumatiques. (Fig 1)

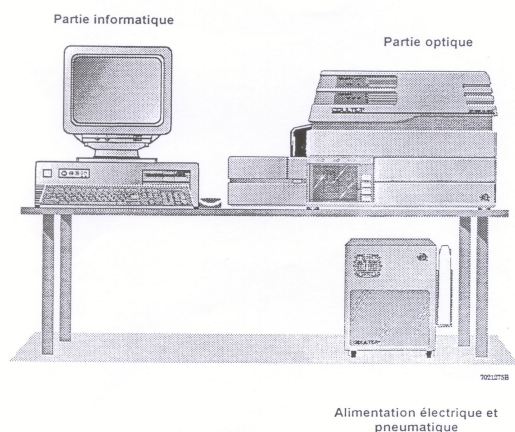


Fig 1 : Cytométrie en flux Coulter EPIX XL

Le cytomètre comprend :

- Une source lumineuse monochromatique laser : laser Argon qui constitue la source d'excitation à 488 nm (raie bleue).
- Une chambre d'analyse ou Flow cell, dans laquelle passe l'échantillon analysé et où les cellules sont illuminées par le faisceau laser (Fig 2).

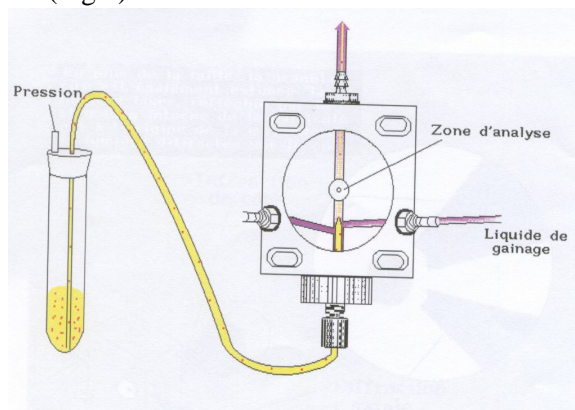


Fig 2 : Chambre d'analyse

- Des détecteurs de taille et de structure qui mesurent la lumière déviée ou diffusée émise par les cellules lors du passage dans le faisceau laser (Fig 3).

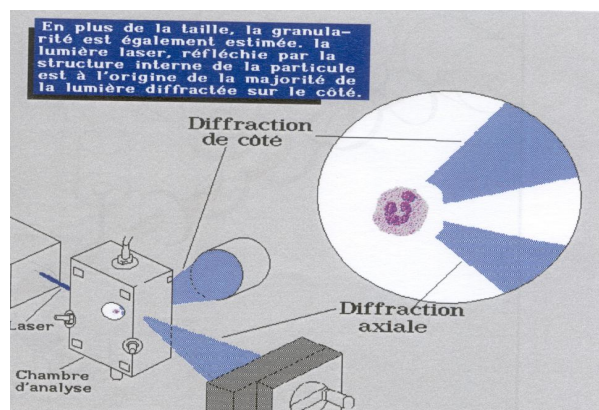
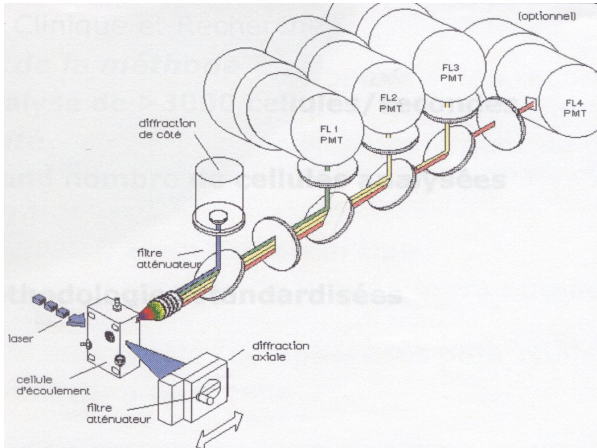


Fig 3 : Lumière diffusée vers l'avant et à 90 degrés

- Des détecteurs de fluorescence qui mesurent les fluorescences émises par les cellules lors du passage dans le faisceau laser. ( Fig 4 )



**Fig 4 : Détection de la fluorescence**

**\* Chambre d'analyse**

La suspension de cellules préalablement marquées est injectée au centre du liquide de veine par une aiguille de 200 µm de diamètre interne. Le flux des cellules est entraîné par la veine liquide dont le diamètre diminue progressivement pour atteindre 20 µm. Les éléments s'alignent les uns derrière les autres et défilent à une vitesse de passage imposée par la vitesse du liquide de veine. Le passage du diamètre du flux d'échantillon de 200µm à un diamètre de 20 µm s'appelle l'hydrofocalisation.

**\* Analyse de la lumière diffusée vers l'avant : (Forward Scatter : FS)**

Sous l'effet de l'excitation lumineuse du faisceau laser, la cellule diffuse une partie de la lumière reçue dans toutes les directions. La lumière diffractée vers l'avant, c'est à dire dans l'axe optique, est proportionnelle à la taille de la cellule. Il s'agit du signal FS. Ce signal est mesuré par un détecteur appelé photodiode qui convertit l'énergie lumineuse en énergie électrique.

**\* Analyse de la lumière diffusée à 90 degrés ou aux grands angles ( side Scatter : SS)**

Il s'agit de la lumière du laser qui pénètre à l'intérieur de la cellule et qui est réfractée dans un milieu transparent comme le cytoplasme. Ce phénomène de réfraction ou réflexion, dans certains cas, dépend des propriétés intrinsèques de la cellule comme le cytoplasme, la présence de granulations plus ou moins abondantes et du rapport nucléocytoplasmique. Ce signal est mesuré par une photodiode.

**\* Analyse de la fluorescence**

La cellule est marquée par un fluorochrome. Celui-ci absorbe l'énergie lumineuse fournie par le laser

et en restitue une partie sous forme d'émission de photons de longueur d'onde caractéristique du fluorochrome. Les signaux de fluorescence, bien qu'émis dans toutes les directions, sont mesurés à 90 degrés par des détecteurs spéciaux : les photomultiplicateurs dont le rôle principal est d'amplifier les photons reçus.

En multiple marquage, il est nécessaire de séparer les signaux entre eux pour les mesurer individuellement. Pour cela, il existe des filtres interférentiels, inclinés à 45 degrés, appelés miroirs dichroïques, qui laissent passer par transmission chaque longueur d'onde vers son détecteur respectif.

**3 / LES FLUOROCROMES**

Un fluorochrome est une molécule qui, à l'état de repos, a la propriété d'absorber l'énergie émise par une source lumineuse pour faire passer les électrons de ses atomes d'une sous couche A à une autre sous couche B supérieure, correspondant à un état d'excitation.

Les longueurs d'ondes qui sont absorbées constituent le **spectre d'excitation** d'une molécule. Le retour de ces électrons à leur couche initiale s'accompagne d'une libération d'énergie caractérisée par l'émission de photons. C'est la **fluorescence**. Les longueurs d'ondes d'émission de ces photons sont une propriété de chaque molécule fluorescente, et elles dépendent des atomes de la molécule. Les longueurs d'ondes émises par une molécule constituent son **spectre d'émission**.

En pratique, la longueur d'onde d'excitation des fluorochromes utilisés en CMF est optimale à 488 nm et la source est un laser Argon.

Les caractéristiques des fluorochromes permettent une analyse en triple et en quadruple marquage en configuration mono-laser argon émettant à 488nm.

FLUOROCROMES	SOURCE LASER	EXCITATION/ ABSORPTION	EMISSON
<b>ADN</b>			
Iodure de Propidium	Argon	342-514nm	615 nm(orange)
Bromure d'Éthidium	Argon	342-514nm	315 nm(orange)
<b>ARN</b>			
Acridine orange	Argon	480-550nm	570-600 nm(orange)
Thiazol orange	Argon	480-550nm	550-600 nm( orange)
<b>Protéines ou membranes</b>			
<b>ITC:</b> Isothiocyanate de Fluorescéine	Argon	488nm	525 (vert)
<b>PE:</b> Phycocérythrine	Argon	488 nm	575 (orange)
<b>ECD:</b> Energy Coupled Dye	Argon	488 nm	610(rouge)
<b>PC5 ou PE(C)5:</b> allophycocyanine	Argon	488 nm	675 (rouge profond)

#### 4 / ANALYSE DES CELLULES EN CYTOMETRIE

Le principe de l'analyse des cellules en CMF est basé sur la réaction d'immunofluorescence. Cette réaction associe la spécificité des anticorps monoclonaux et les propriétés des fluorochromes. Elle constitue une méthode de choix pour la révélation d'antigènes cellulaires. Les techniques de marquage sont de deux types :

- L'immunofluorescence directe où l'anticorps employé est conjugué directement à un fluorochrome.
- L'immunofluorescence indirecte où l'anticorps engagé dans la réaction est révélé par un deuxième anticorps lui-même fluorescent. Cette technique s'effectue en deux étapes :
  - interaction antigène - 1<sup>er</sup> anticorps
  - interaction 1<sup>er</sup> anticorps - 2<sup>ème</sup> anticorps (conjugué fluorescent)

##### 4-1/ Etude des antigènes membranaires :

Les antigènes membranaires peuvent être étudiés sur :

- des cellules du sang ou de la moelle osseuse isolées sur gradient de densité (Ficoll)
- des cellules du sang ou de la moelle osseuse après lyse des globules rouges
- des cellules de lavage broncho-alvéolaire

Le marquage sur sang total est une technique simplifiée plus adaptée à la routine et aux grandes séries d'échantillons. Elle implique une lyse des globules rouges par un réactif de lyse.

##### 4-2/ Détection des antigènes intracellulaires :

Cette détection nécessite une perméabilisation préalable des cellules afin d'assurer l'entrée des réactifs impliqués dans la réaction d'immunofluorescence. L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que certains antigènes peuvent être détectés au stade intracytoplasmique le plus précoce de la différenciation tel que le CD3 dans les LAL de type T et le CD22 dans les LAL de type pré-B.

#### 5 / LES DIFFERENTES APPLICATIONS DE LA CMF

##### 5-1 / Immunophénotypage

Une des applications cliniques la plus courante de la cytométrie en flux est la détermination des antigènes cellulaires. Il s'agit de l'immunophénotypage des cellules normales et pathologiques.

L'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques des classes de différenciation (CD) des leucocytes humains va permettre la reconnaissance d'un certain nombre de populations cellulaires. A

ce jour plus que 200 CD ont été définies. Certaines sont restreintes à des lignées, d'autres correspondent à des stades de différenciation ou à des aspects fonctionnels. On dispose d'anticorps qui reconnaissent :

- Des lignées cellulaires: lymphocytes T, lymphocytes B, cellules Natural Killers (NK), cellules Myéloïdes, Monocytes et Macrophages, depuis la cellule souche jusqu'à la cellule mature...
- Des marqueurs d'adhésion ou d'activation des récepteurs de cytokines
- Des populations fonctionnellement définies: cellules cytotoxiques, sécrétrices, auxiliaires, suppressives, mémoires...

##### 5-1-1/Diagnostic et classification des proliférations hématopoïétiques

La CMF est très utile pour la classification des tumeurs hématopoïétiques impliquant le sang, la moelle, des fluides corporels ou les autres tissus puisque les lignées cellulaires et les marqueurs de différenciation ont été très intensivement étudiés dans ces tumeurs.

##### 5-1-1-1 / PHENOTYPAGE DES LEUCEMIES :

Le phénotypage des leucémies aiguës est délicat. Il peut être effectué à partir d'un prélèvement de moelle osseuse ou à partir d'un prélèvement sanguin. Certaines leucémies peuvent être attribuées à des lignées de type T ou à des lignées de type B, d'autres appartiennent à des lignées myéloblastiques ou monocytaires. Dans certains cas, peuvent apparaître des leucémies multiphénotypiques présentant des marqueurs appartenant à plusieurs lignées, phénotypes que l'on ne retrouve habituellement pas sur des cellules normales. Dans d'autres cas, une absence totale de marqueurs de lignées cellulaires peut faire conclure à une leucémie de type indifférenciée.

L'analyse d'une LAL de la lignée B doit comporter au minimum l'usage du CD19, CD20, CD22 éventuellement complétée par la recherche de chaîne  $\mu$  intracytoplasmique, de CD22 intracytoplasmique et de l'expression d'immunoglobulines de membrane.

Des marqueurs membranaires de la lignée T sont majeurs pour définir une prolifération lymphoblastique de type T : le CD2, CD5, CD7 et la recherche de l'expression intracytoplasmique du CD3

La prolifération de la lignée myéloïde peut être identifiée par le CD13, CD14, CD15, CD33, Myéloperoxydase, CD68 ainsi que le CD41, CD42, CD61 (lignée plaquettaire) et la Glycophorine A (CD235) et B (CD236) (lignée érythroïde) .

### **5-1-1-2 PHENOTYPAGE DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS:**

Le phénotypage des syndromes lymphoprolifératifs est devenue indispensable.

Une gamme élargie d'anticorps est nécessaire pour ce phénotypage. La première étape consiste à identifier la lignée cellulaire en cause (prolifération B ou T ou à NK). La deuxième étape consiste à utiliser des marqueurs plus spécifiques (voir tableau)

	LLC	LF	LM	LPL	LTR	LSLV
CD 19	+	+	+	+	+	+
IG S	+	++	++	+++	++	++
CD 5	+	-	+	±	-	±
FMC 7	-	+	+	+	+	+
CD 25	-	-	-	±	+	-
CD 10	-	+	-	-	-	-
CD 11c	-	-	-	-	+	-
CD 79B	-	+	+	+	±	+
CD 23	+	-	-	-	-	-

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LF : lymphome folliculaire

LM : lymphome du manteau

LPL : leucémie à prolymphocytes

LTr : leucémie à tricholeucocytes

LSLV : lymphome splénique à lymphocytes villeux

#### **5-1-1-3 / Maladie résiduelle :**

Le concept de « maladie résiduelle » désigne habituellement l'identification, à l'aide de techniques sensibles, des cellules pathologiques chez un patient en rémission complète clinique. La détection de rares cellules de LAL CD 10+ dans le sang périphérique par CMF a été un modèle initial d'une technique qui est applicable potentiellement à d'autres.

Les essais de détection précoce de rechutes de tumeurs malignes par analyse des marqueurs cellulaires ont été focalisés au niveau du sang périphérique ou de la moelle, puisque ces tissus sont faciles à récupérer et à étudier en simple suspension cellulaire en CMF.

#### **5-1-2 / Numération des cellules CD34+ dans le cadre de la greffe de moelle**

En clinique, les greffes de cellules souches hématopoïétiques font partie de l'arsenal thérapeutique mis à la disposition des hématologistes et des oncologistes. Initialement, les allogreffes de moelle osseuse (MO)

représentaient la quasi-totalité des greffes réalisées et, depuis plusieurs années, les greffes de cellules souches périphériques ( auto ou allogreffes ) constituent la très grande majorité des cas. D'ailleurs, la prise de greffe de cellules souches est encore plus rapide avec des progéniteurs du sang périphérique. Les protocoles de mobilisation et d'obtention de ces cellules font largement appel à la cytométrie.

Le marqueur CD34 peut prédire la capacité de régénération à partir des cellules souches hématopoïétiques. On sait actuellement qu'un

« bon » greffon de moelle contient 3 à 5 10<sup>6</sup> cellules CD34+ par kg de receveur.

Pour la numération des progéniteurs hématopoïétiques, on utilise souvent un Ac anti-CD45 et un Ac monoclonal spécifique anti-CD34. L'utilisation de billes de valeurs absolues permet d'établir la numération précise et non le pourcentage.

#### **5-1-3 / Diagnostic des états immunodéficients**

##### *5-1-3-1 / Déficiences immunitaires congénitales :*

L'exploration des cellules immunocompétentes spécifiques et non spécifiques comporte des analyses immunophénotypiques (sous-populations, molécules d'adhésion, marqueurs d'activation...) et des tests fonctionnels (prolifération cellulaire in vitro, sécrétion d'immunoglobulines ou d'interleukines, phagocytose, activité NK ...)

##### *5-1-3- / Etats immunodéficients acquis (infection par le virus VIH) :*

Le VIH a pour cible le récepteur CD4 des lymphocytes CD4+ conduisant à un déficit immunitaire acquis par destruction de ces cellules. La déplétion progressive constante des lymphocytes T CD4+, (tant en pourcentage qu'en nombre absolu) a été clairement associée à la gravité de la maladie liée au VIH. Les personnes séronégatives tendent à avoir une numération de base de lymphocytes T CD4+ qui se maintient à long terme sans grande fluctuation. Dès les six mois qui suivent la séroconversion, le nombre de CD4+ chute et, dans une période de deux ans, 30 à 50 % du nombre initial de lymphocytes T CD4+ sont détruits. Un grand nombre de personnes séropositives asymptomatiques conservent pendant de nombreuses années des niveaux stables d'environ 600/mm<sup>3</sup>. Une diminution rapide du nombre de lymphocytes T CD4+ est un signe pronostique défavorable et peut annoncer l'apparition d'infections opportunistes. Après le diagnostic du sida, le nombre de lymphocytes T

CD4+ reste très faible et peut chuter à des niveaux non mesurables avant le décès. La population de lymphocytes CD8 cytotoxiques est fréquemment augmentée en nombre absolu dans le stade initial de l'infection par le VIH.

Le pourcentage de lymphocytes T CD4+, le nombre absolu de lymphocytes T CD4+ et le rapport CD4+/CD8+ ont tous une excellente valeur pronostique pour la prédiction du sida et sont fortement corrélés entre eux.

#### 5-1-4 / Phénotype cellulaire dans le LBA (lavage broncho-alvéolaire)

Certaines pathologies comme les sarcoïdoses et les alvéolites allergiques peuvent présenter des tableaux cliniques relativement proches ne permettant pas un diagnostic précis alors que la thérapie ne sera pas du tout la même. Le phénotypage du liquide broncho-alvéolaire sera alors un précieux outil de diagnostic

- L'augmentation du pourcentage de lymphocytes CD4 ou augmentation du rapport CD4/CD8 oriente vers une sarcoïdose.
- L'augmentation du pourcentage des lymphocytes CD8 ou diminution du rapport CD4/CD8 oriente vers une alvéolite allergique.
- Une hyperlymphocytose CD8 s'observe dans l'infection par le VIH

#### 5-1-5 / Phénotypage HLA B 27

Le phénotype HLA B27 est souvent associé à la spondylarthrite ankylosante. La technique de microlymphocytotoxicité est longue, utilise des Ac polyclonaux qui produisent des réactions croisées avec d'autres antigènes. En cytométrie de flux, tous ces inconvénients sont effacés : pas de réactions croisées, l'interprétation ne peut pas porter à discussion et les résultats obtenus peuvent être exprimés quantitativement.

#### 5-1-6 / Glycoprotéines plaquettaires

La CMF est capable d'identifier les protéines de surface des plaquettes. Les déficits en glycoprotéines plaquettaires ont été identifiés dans deux maladies fonctionnelles congénitales des plaquettes : la gpIIb/IIIa ( CD41 ) dans la thrombasthénie de Glanzman et la gpIb ( CD42) dans la maladie de Bernard-Soulier.

#### 5-2 / La numération des réticulocytes

Les réticulocytes sont des globules rouges qui ont été mis en circulation depuis moins de un à deux jours. Leur numération est un des tests les plus utiles pour le diagnostic de l'anémie. Le pourcentage normal de réticulocytes est seulement

de 0,5 à 1,5 % et ainsi, pour une précision satisfaisante, il faut compter au moins 1000 cellules. Ce qui prend beaucoup de temps, s'il est fait manuellement.

La numération des réticulocytes peut se faire par CMF utilisant le plus souvent le thiazole orange (émission à 530 nm), mais également l'acridine orange comme marqueur de l'ARN.

#### 5-3 / Le cycle cellulaire et la CMF

La CMF permet d'étudier les différentes phases du cycle cellulaire dans les tumeurs pour juger de leur potentiel de prolifération et détecter la présence éventuelle de clones cellulaires à contenu anormal en matériel génétique.

On distingue classiquement dans un cycle cellulaire 4 phases, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M, en relation avec l'état fonctionnel des cellules et leur contenu en matériel génétique (ADN) (Fig 5).

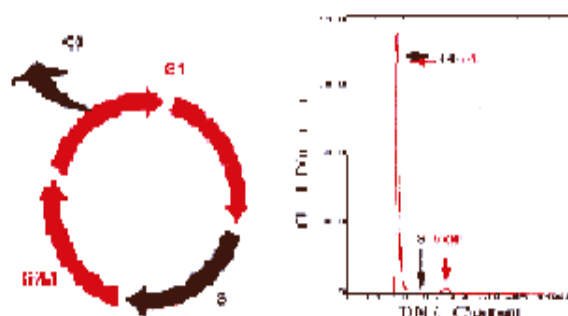


Fig 5 : Rappel du cycle cellulaire

- Pendant la phase G<sub>1</sub>, la cellule effectue les tâches spécifiques pour lesquelles elle a été programmée tout en conservant un stock de matériel génétique stable (2n).
- Au cours de la phase S, la cellule duplique son matériel génétique et le contenu en ADN du noyau cellulaire passe d'une valeur 2n à une valeur 4n en fin de phase.
- Au cours de la phase G<sub>2</sub>, la cellule, dont le noyau renferme une quantité d'ADN de 4n synthétise les molécules protéiques qui vont lui être indispensables au cours de la phase M.
- La phase M ou phase de mitose, correspond essentiellement à une étape d'hypercondensation de l'ADN sous forme de chromosomes puis à un stade de scission de la cellule initiale en deux cellules filles, qui renferment chacune une quantité 2n de matériel génétique.

En plus de ces 4 phases propres à la cellule cyclante, on distingue la phase dite  $G_0$  au cours de laquelle la cellule a un taux fixe d'ADN à  $2n$ .

Cette phase correspond à un état post-mitotique, hors cycle, transitoire ou permanent. Les cellules en  $G_0$  transitoire peuvent être des cellules souches ou des cellules différenciées recrutables, restées capables de proliférer. Les cellules en  $G_0$  permanent sont des cellules souvent actives du point de vue de leur synthèse protéique et de leur activité spécifique, mais devenues incapable de proliférer.

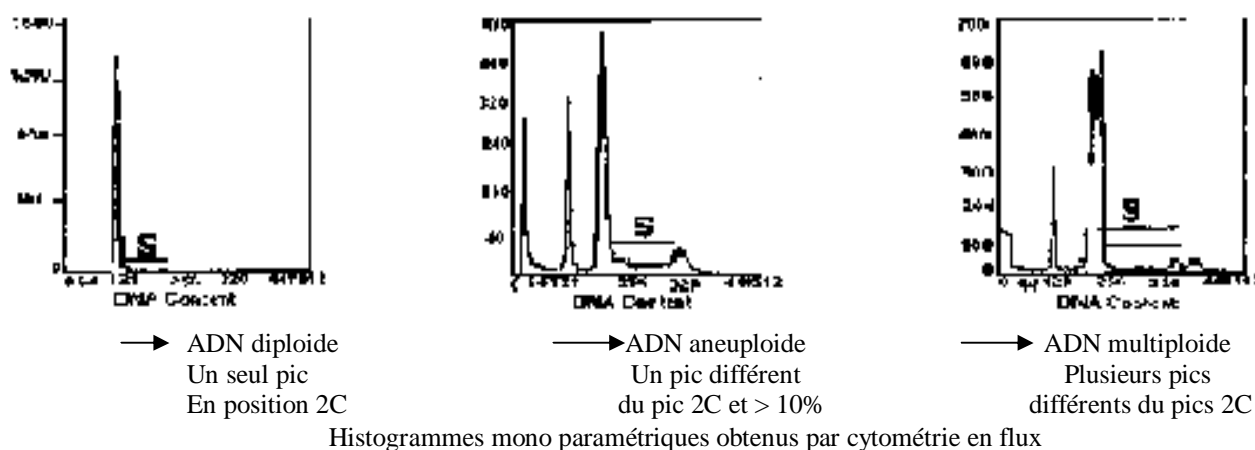
En cytométrie en flux, la technique de coloration utilise l'iodure de propidium qui va s'intercaler entre les brins d'ADN. Et donc la CMF met en évidence trois phases qui sont communément appelées :  $G_0/G_1$ , S,  $G_2 + M$ .

Un histogramme de cycle cellulaire de cellules normales possède des caractéristiques bien

connues. Dans les grandes lignes on peut citer principalement :

- Une prolifération relativement faible, donc la partie correspondant à la phase S et à la phase  $G_2+M$  est très peu importante par rapport au pic représenté par les cellules en phase  $G_0/G_1$ .
- Une seule population et donc un seul pic de cellules en  $G_0/G_1$ .

L'interprétation d'un cycle cellulaire en CMF doit se faire avec soin. Dans un premier temps, on peut tirer de l'histogramme obtenu des renseignements d'ordre qualitatif : présence d'une ou plusieurs populations, ploïdie du ou des pics  $G_0/G_1$  par rapport à un étalon interne ou externe, population en phase S importante ou non, et des renseignements d'ordre quantitatif : pourcentage de chacune des populations, pourcentage des différentes phases du cycle cellulaire pour chacune des populations (Fig 6).



**Fig 6 : Détermination de l'ADN ploïdie et de la phase S**

#### 5-4 / Contrôle des préparations déleucocytées

La déleucocytation des produits sanguins labiles (concentré de globules rouges CGR, concentré de plaquettes standard CPS, concentré de plaquettes d'aphérese CPA) permet de minimiser au maximum les risques de transmission virale, principalement les virus intraleucocytaires, ainsi que de prévenir l'alloimmunisation anti-HLA. Le contrôle de qualité de cette déleucocytation était difficile car uniquement réalisable par comptage manuel. La CMF nous apporte une réponse intéressante vu sa rapidité et sa précision. Les leucocytes résiduels sont marqués à l'iodure de propidium après traitement par détergent, permettant la pénétration de celui-ci à l'intérieur de la cellule, et RNase pour éliminer l'ARN réticulocyttaire et plaquettaire. L'utilisation des billes autofluorescentes de concentration connue nous permet de calculer le nombre de globules blancs par  $\mu\text{l}$  et donc déduire le nombre total de leucocytes résiduels dans le produit sanguin analysé.

#### 5-5 / Le Tri cellulaire

Le tri cellulaire est la possibilité de séparer physiquement différentes sous-populations cellulaires. Les cellules sont triées selon les propriétés observées lors de l'analyse. Les particules qui présentent un intérêt sont chargées électriquement, déviées à la sortie par un champ électrique et collectées dans deux tubes (les positives d'un côté et les négatives de l'autre). Les particules non chargées sont éliminées.

Le tri permet d'obtenir une population homogène de cellules dans un état de pureté qui permet leur remise en culture et maintient leurs principales caractéristiques

#### 6 / CONCLUSION

La CMF a plusieurs avantages :

- Détection et quantification de nombreuses sous populations cellulaires simultanément
- Comptage des centaines de fois plus vite que pour les techniques manuelles d'immunofluorescence
- Reproductibilité des résultats et bonne sensibilité
- Quantification précise de l'intensité du signal permettant le Tri cellulaire

Cette CMF présente, cependant, des limites :

- Coût élevé
- Exigence de formation suffisante des utilisateurs
- Possible production de résultats non désirés si l'opérateur récolte un signal de fluorescence d'une population non concernée.

#### Références:

- 1 - **BOVAL B.** : Cytométrie en flux : applications en médecine transfusionnelle. *Transf Clin Biol* 2000 ; 7 Suppl 1 : 63-8
- 2 - Guide d'utilisation Coulter EPIX XL
- 3 - **KUNKL A.** : Flow cytometric immunophenotyping of HIV infected subjects and quality control. *Purdue cytometry CD-ROM Series*, volume 3
- 4 - **LACOMBE F.** : La cytométrie en flux en hématologie. *Hématologie Albert Najmann*. Tome II: 674-675
- 5 - **LEES O.** : Immunophénotypage : apport de la cytométrie à la biologie clinique.
- 6 - **LEES O., VUILLIER F.** : Analyses d'antigènes cellulaires. Pge 55-90  
*Revue Française des laboratoires* 2000 ; 327 : 91-101
- 7 - **METEZEAU P., MIGLIERINA R., RTINAUD M.H.** : La cytométrie en flux, Ed PULIM, 1994