

Applications de la Cytométrie en Flux

RECHERCHE BIOLOGIQUE et CLINIQUE

Aude Barani

Plateforme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie - **PRECYM** - UMS2196

COM (OSU), Case 901, Bât. TPR1 (F-G)

163 Av. de Luminy, 13288 Marseille cedex 9

Tel : (+33) 4.91.82.91.14

aude.barani@univmed.fr

www.com.univ-mrs/PRECYM

Applications de la Cytométrie en Flux

Routine

Immunophénotypages (immunologie, hématologie)

Expressions quantitatives (Surface, intracellulaire)

Quantification du contenu en ADN (cancérologie, cytogénétique)

Cycle cellulaire

Viabilité

Recherche

Caryotype

Flux Calcique

Stress Oxydatif

PH intracellulaire et potentiel de membrane

Fluidité membranaire

Apoptose

Cycle cellulaire, prolifération

Les fluorochromes utilisés

Spécifiques d'un organite ou d'un composé cellulaire

1-Ions

Indicateurs de Ca^{2+} ratiométrique	UV	Indo 1	Ex 351	Em 475	Em 400 ^(+ Ca²⁺)
		Fura 2	Ex 340 Ex 380 ^(+ Ca²⁺)	Em 510	
	Vis	Fluo 3	Ex 488	Em 525	

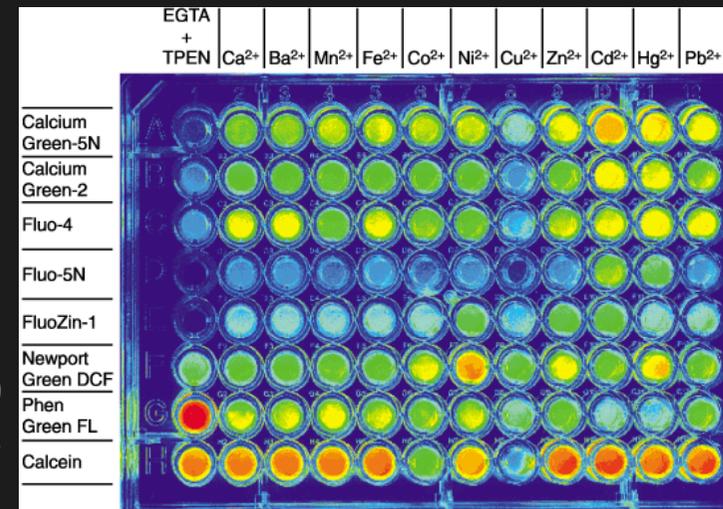
Indicateurs de Mg^{2+} UV Mag-Fura2, Mag-Indo1... Vis Mag-Fluo4...

Indicateurs de Zn^{2+} UV FuraZin1, IndoZin1 Vis FluoZin2....

Autres Indicateurs d'ions métalliques

Intensité de fluorescence
haute = rouge > orange > jaune > verte > bleu = faible

FLA3000G laser scanner (Fuji Photo Film Co.)
 λ_{ex} 473 nm λ_{em} 520 nm



Indicateurs de Na^+ , K^+ , Cl^-

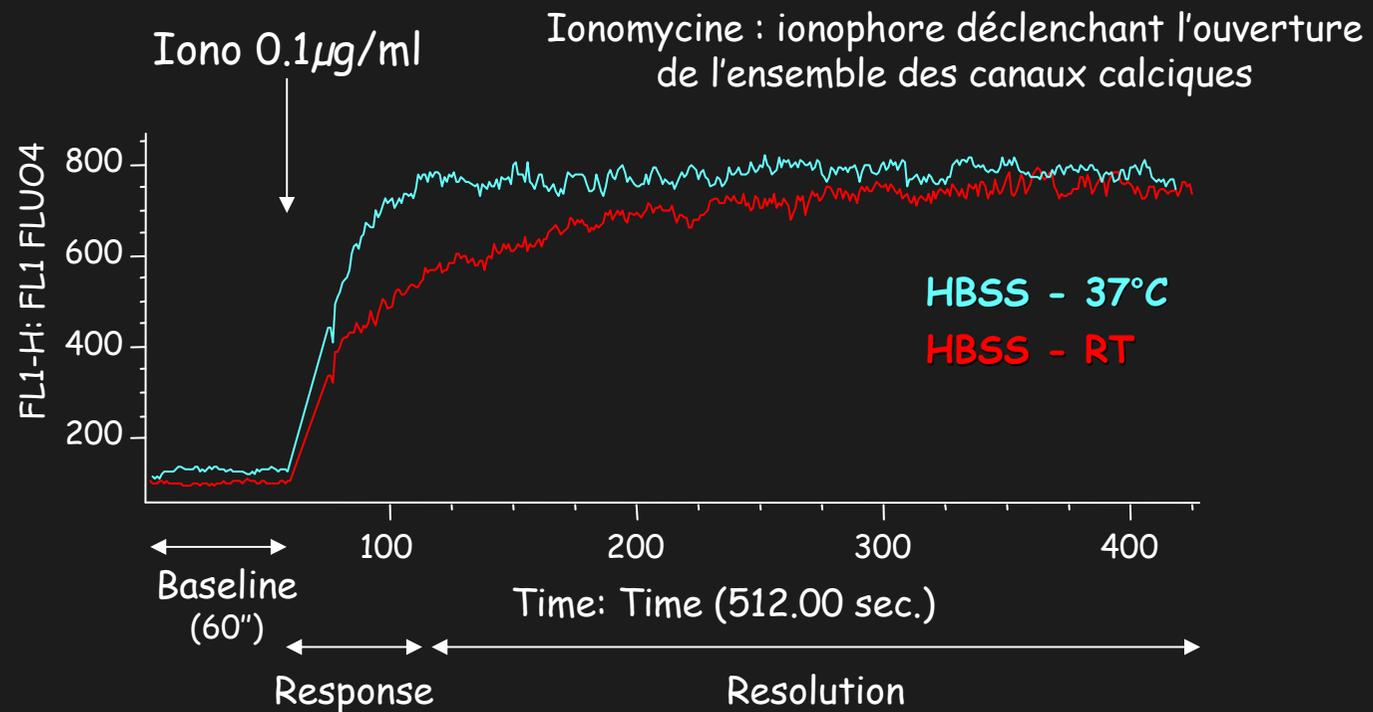
Le flux calcique

Marquage de cellules T primaires avec du Fluo4

Fluorochrome perméant, λ_{ex} . 494nm, λ_{em} . 516nm ; laser 488nm, FL1

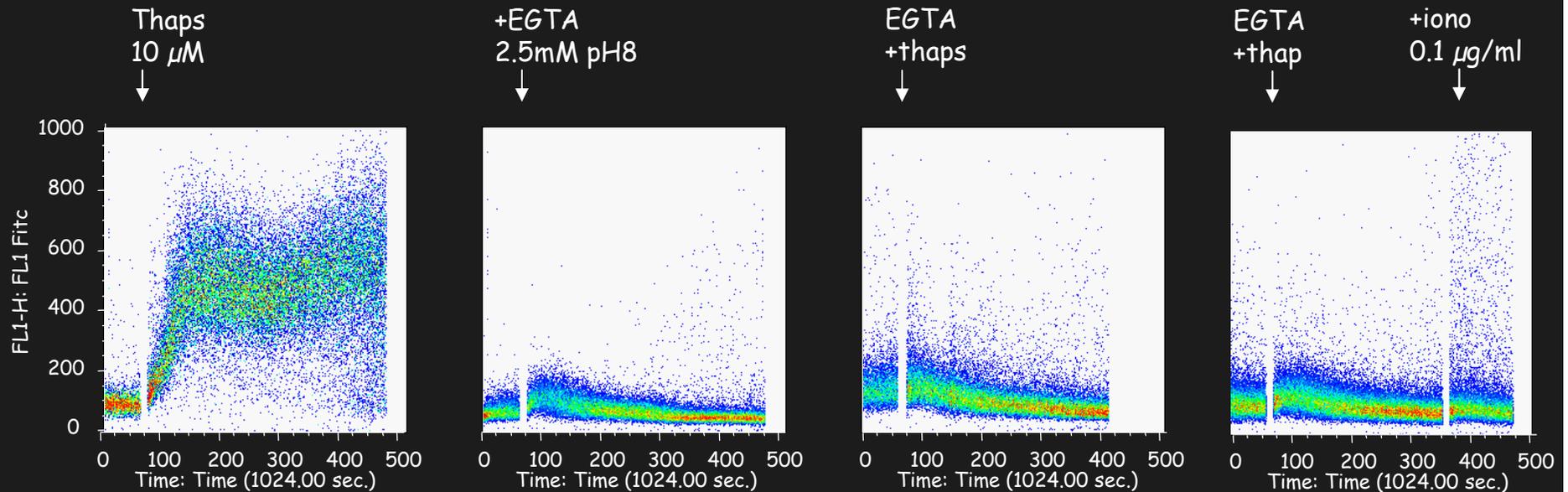
Non ratiométrique : Intensité de fluorescence varie avec $[Ca^{2+}]_{lié}$

Contrôle positif : mesure du calcium présent dans le milieu



Le flux calcique

Autres contrôles : mesure du calcium présent dans le milieu



Thapsigargine

relargue tout
[Ca²⁺]_i

EGTA

Chélateur
Pas de [Ca²⁺]_e libre

Pas de Ca²⁺_{ext} libre

Détection du [Ca²⁺]_i

Détection du [Ca²⁺]_i

[Ca²⁺]_i et [Ca²⁺]_e
restant

Le mieux étant bien sur de ne pas mettre de Ca²⁺ dans le milieu pour caractériser l'intra!!

Le flux calcique

Pour augmenter la sensibilité

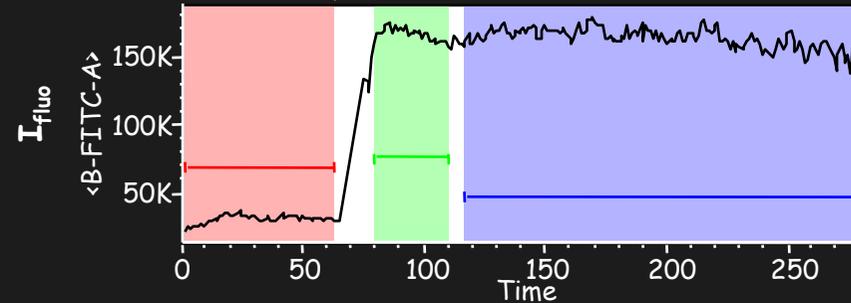
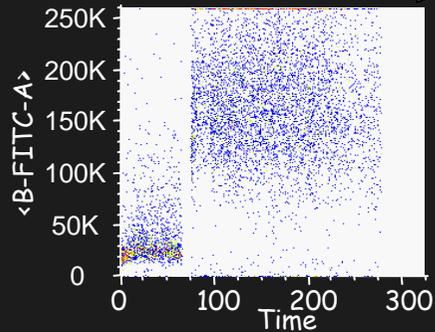
FlowJo

Médiane d' I_{fluo}

Iono 0.1 $\mu\text{g/ml}$

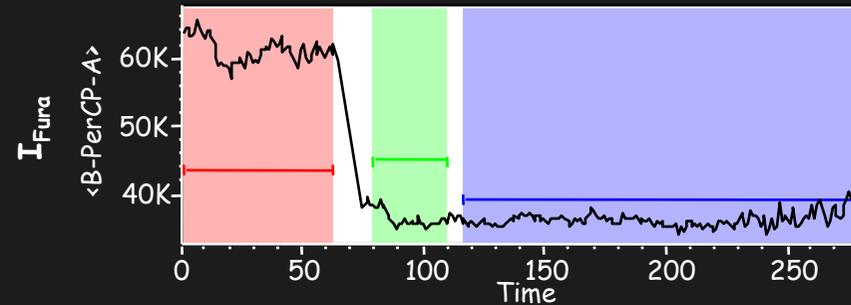
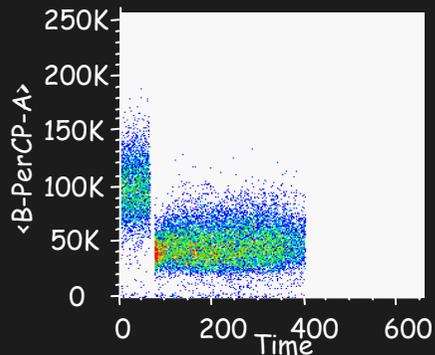
Fluo-4
(488nm)

↗ Ca^{2+} lié

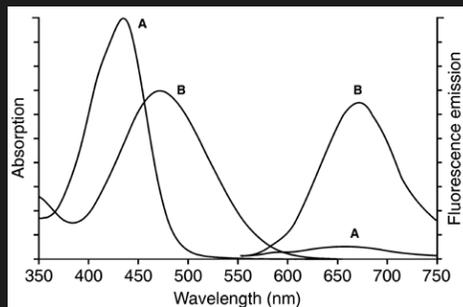


Fura red
(488nm)

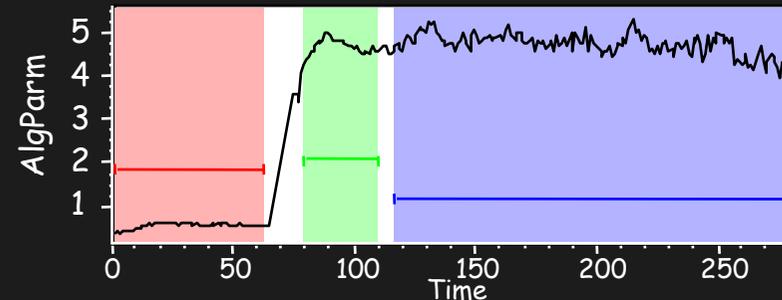
↘ Ca^{2+} lié



Ratio
amplifie les
variations



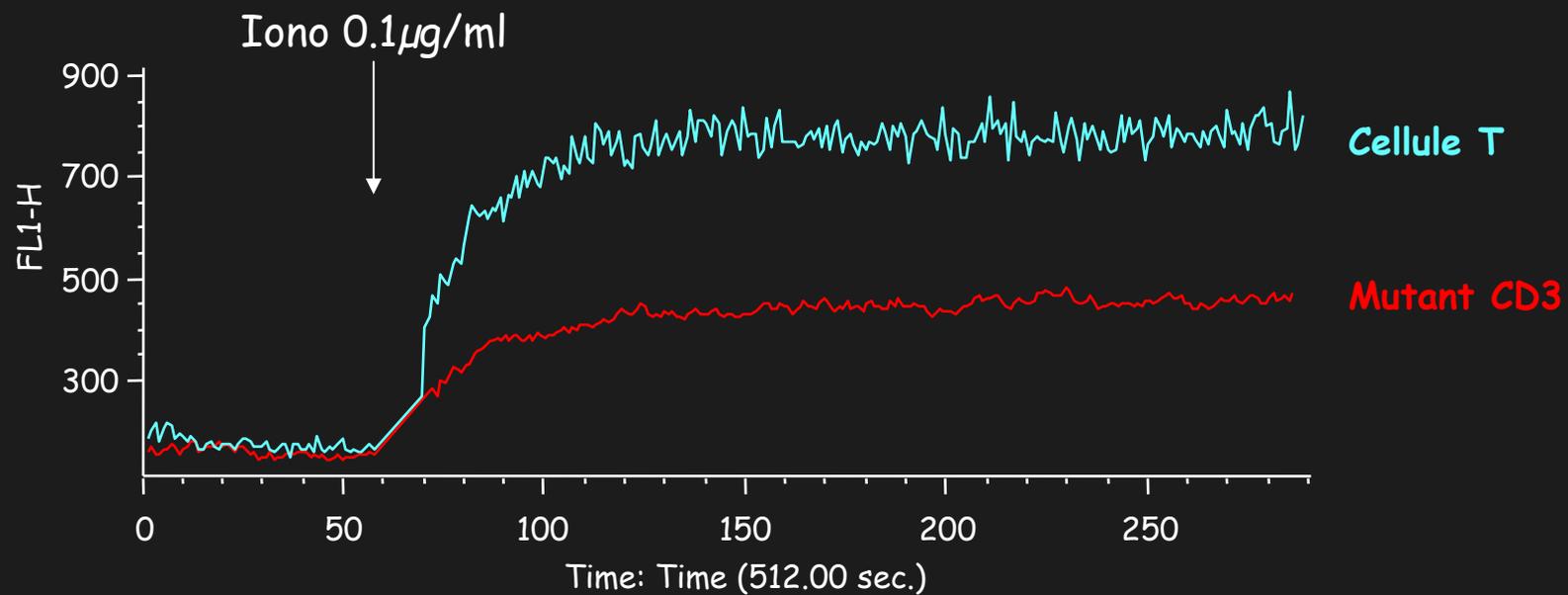
Ratio I_{fluo}/I_{fura}



Le flux calcique

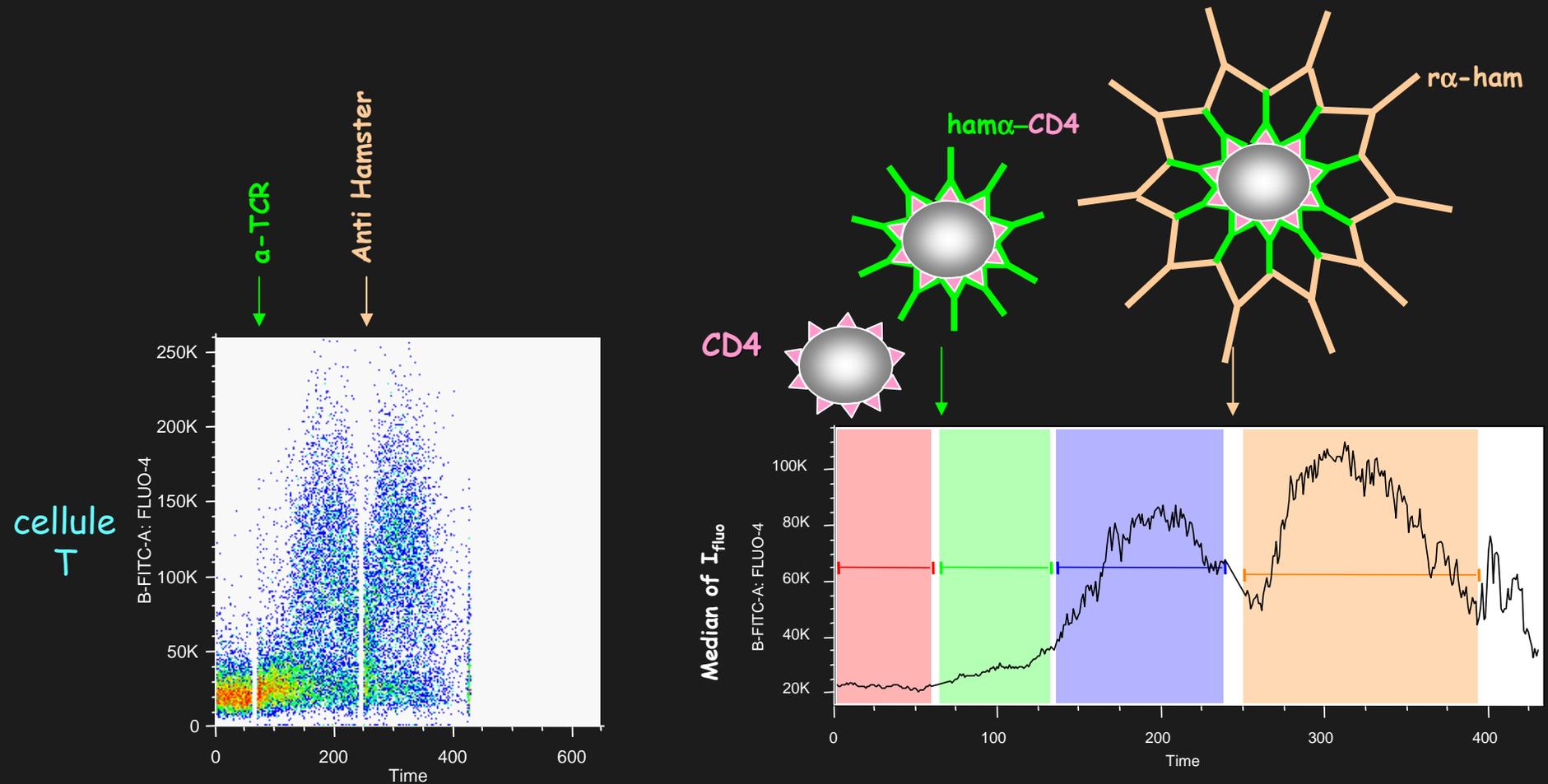
Caractérisation d'un mutant CD3

Effet d'une délétion partielle d'une voie de transduction (CD3)



Le flux calcique

Potentialisation de la réponse calcique : "crosslinking" d'anticorps



Les fluorochromes utilisés

2-Acides Nucléiques

Perméants :

- marquage de cellules non fixées

Imperméants :

- marquage de cellules fixées
- identification des cellules mortes

Colorants classiques : Intercalants

Bromure d'Ethidium *imperméant*

Iodure de Propidium *imperméant*

Acridine Orange **ADN/ARN** *perméant*

Bases A-T

DAPI *semi-perméant, ADN*

Hoechst(s) *perméant, ADN*

Bases C-G

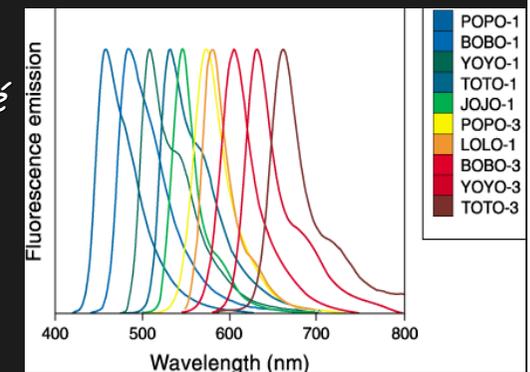
7-amino-actinomycinD (7AAD) *peu perméant, ADN*

Colorants cyanines : **SYTOX** (bleu, vert orange) *imperméant*

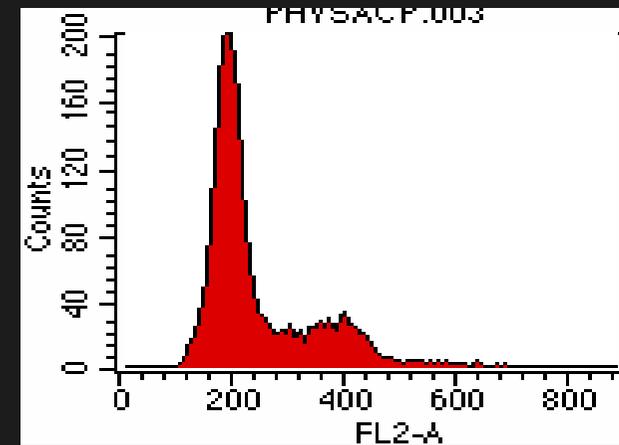
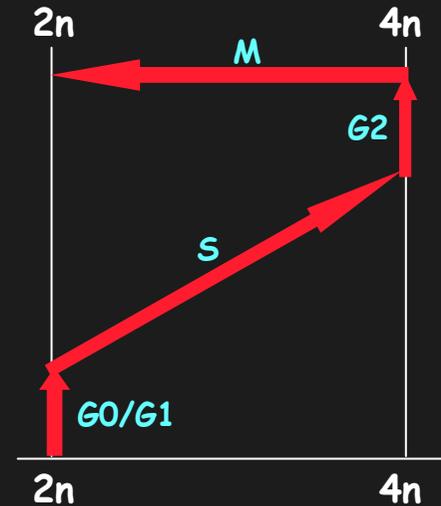
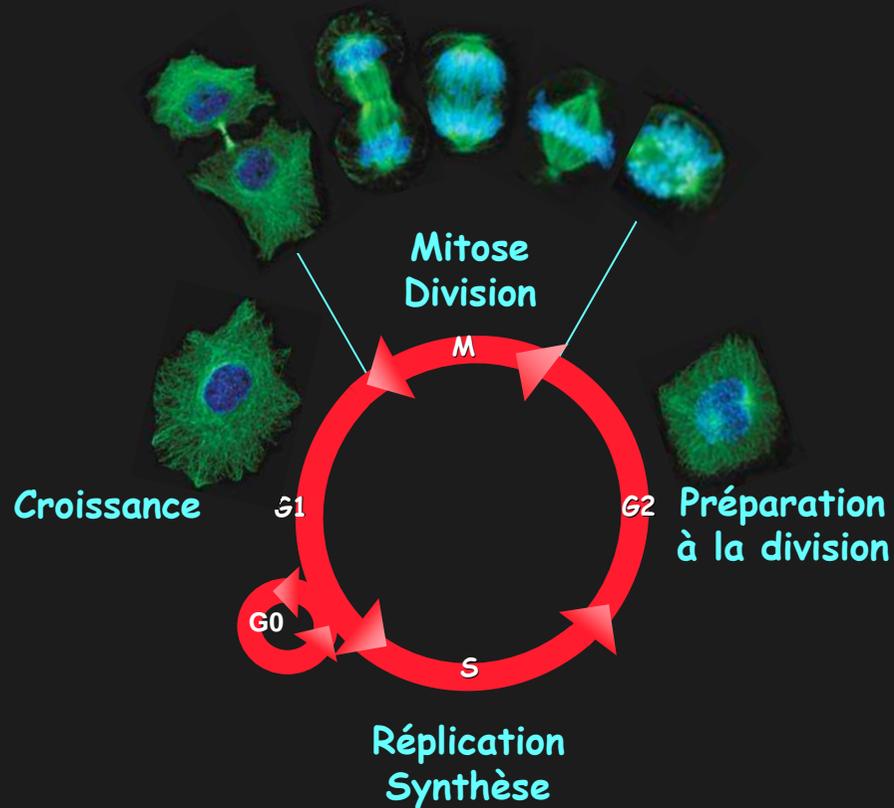
Dimers Cyanine *imperméant, très haute affinité*

SYTO Cyanine *perméant*

Ces familles deux familles de colorants couvrent l'ensemble des spectres d'excitation et d'émission



Cycle cellulaire et prolifération



Cycle cellulaire

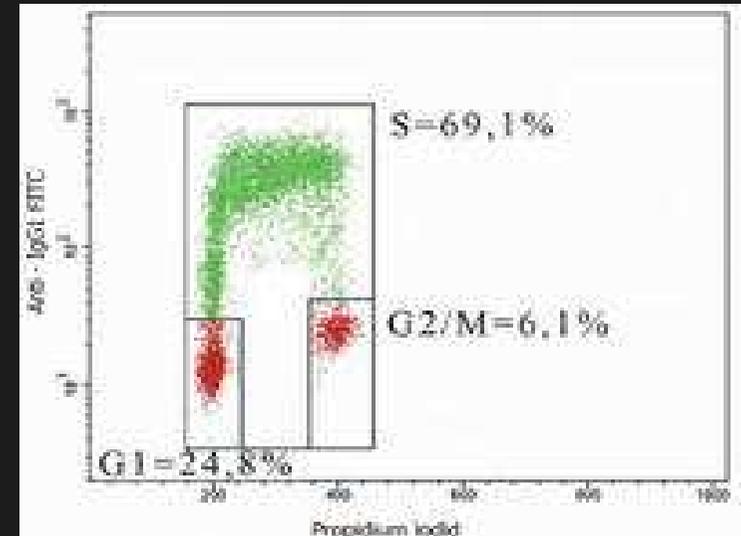
Analyse en cytométrie en flux de l'incorporation de 5-bromodeoxyuridin (BrdU)

Lignée leucémie lymphoblastique aigüe humaine

Incubation avec le BrdU

Détection de l'incorporation avec un anti-BrdU-FITC

Ajout Iodure de Propidium pour l'analyse du cycle



Seules les cellules en phase S auront incorporé le BrdU

Ainsi on peut individualiser les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S, G2/M)

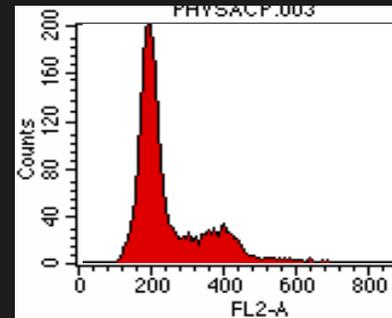
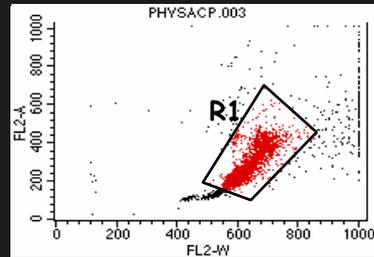
Cycle cellulaire

Analyse du cycle cellulaire avec l'Iodure de Propidium (PI, laser 488nm, FL3)

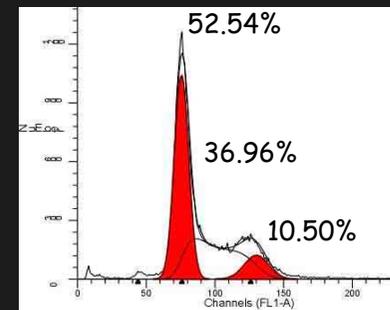
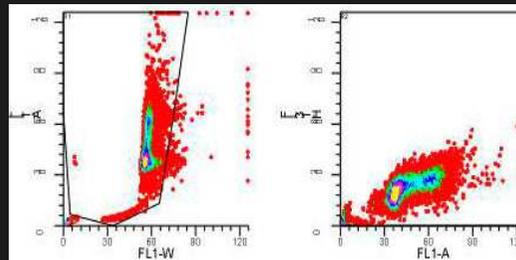
Marquage **PI**

L6E9

(lignée musculaire)



Analyse (ModFit 3.0) du marquage PI des L6E9



Sync Wizard Model

File: Physea_002.002
Date acquired: 16-Jun-0
Date analyzed: 30-Jan-2001

G0G1:
52.54 % Mean: 75.66
CV: 6.78 %

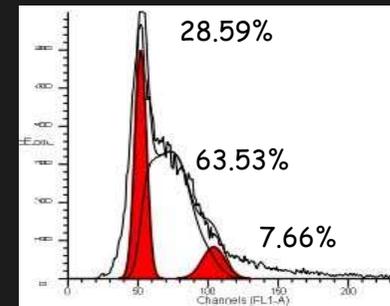
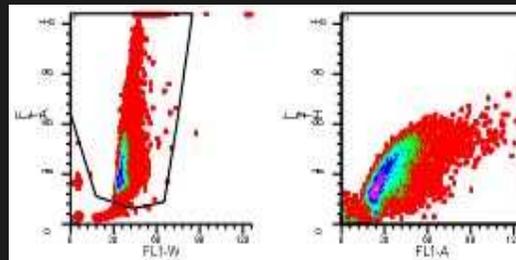
G2M:
10.50 % Mean: 130.13
G2/G1: 1.72

S-Phase:
36.96 % Mean: 100.84

Compartment 1: 15.45 %
Compartment 2: 11.18 %
Compartment 3: 10.33 %

Modeled Events: 25528
RCS: 7.058

Analyse (ModFit 3.0) du marquage PI de Myoblastes



Sync Wizard Model

File: Physadw_005
Date acquired: 7-Jun-0
Date analyzed: 30-Jan-2001

G0G1:
28.59 % Mean: 52.00
CV: 7.89 %

G2M:
7.66 % Mean: 104.00
G2/G1: 2.00

S-Phase:
63.53 % Mean: 73.65

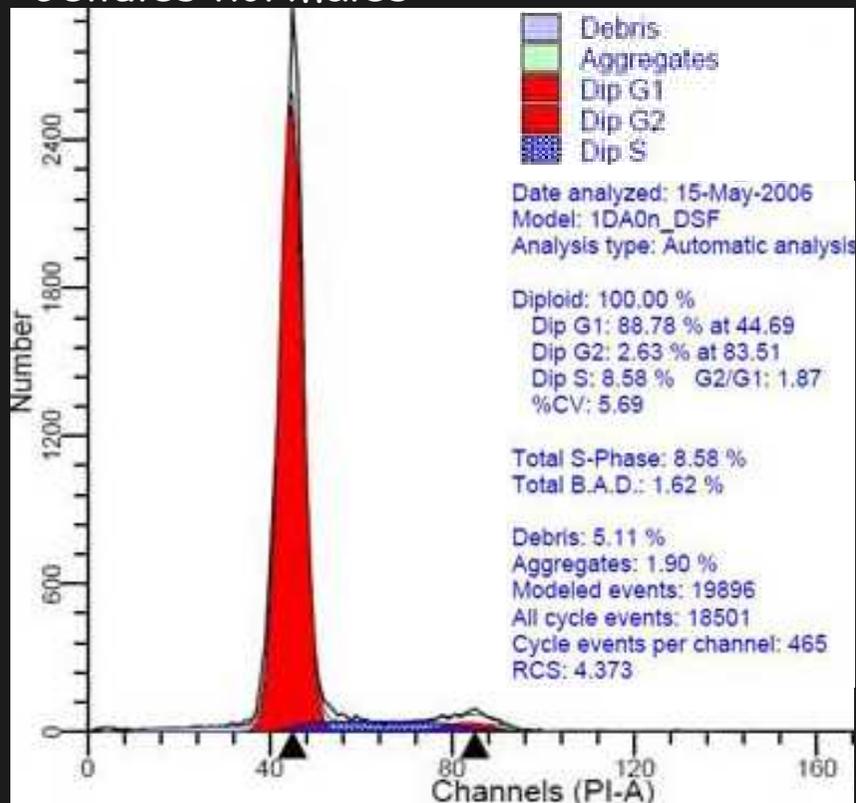
Compartment 1: 25.91 %
Compartment 2: 28.50 %
Compartment 3: 5.12 %

Modeled Events: 21059
RCS: 18.975

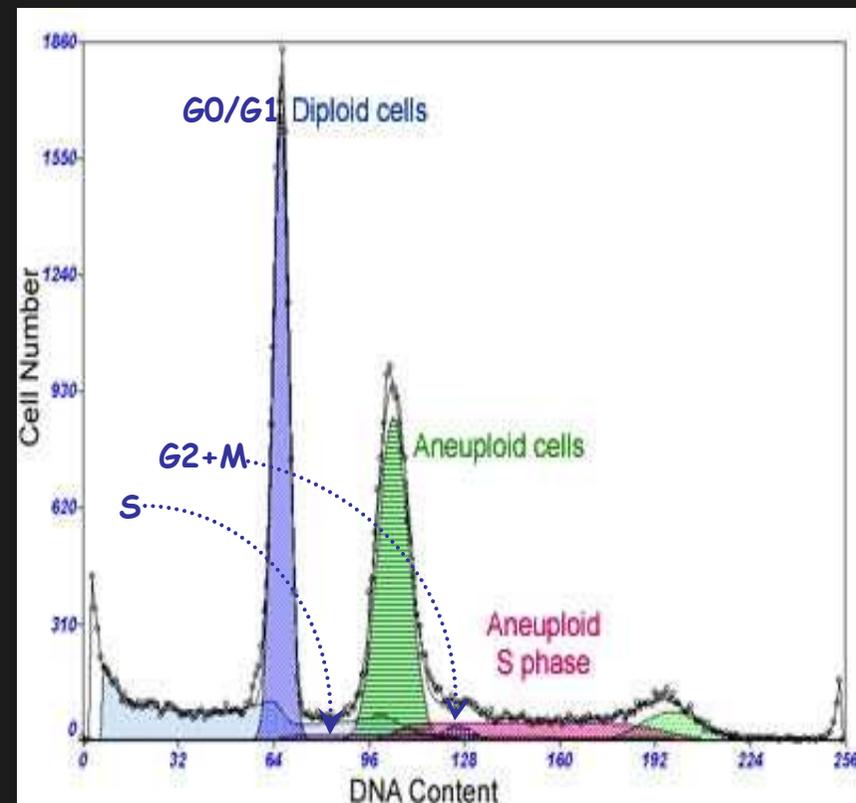
Analyses de cycles cellulaires

Anomalies du cycle cellulaire, détermination de la ploïdie

Cellules normales



Cellules tumorales



Analyses de cycles cellulaires

Contenu en ADN de plantes analysé en cytométrie en flux

Medicago truncatula (luzerne tronquée)

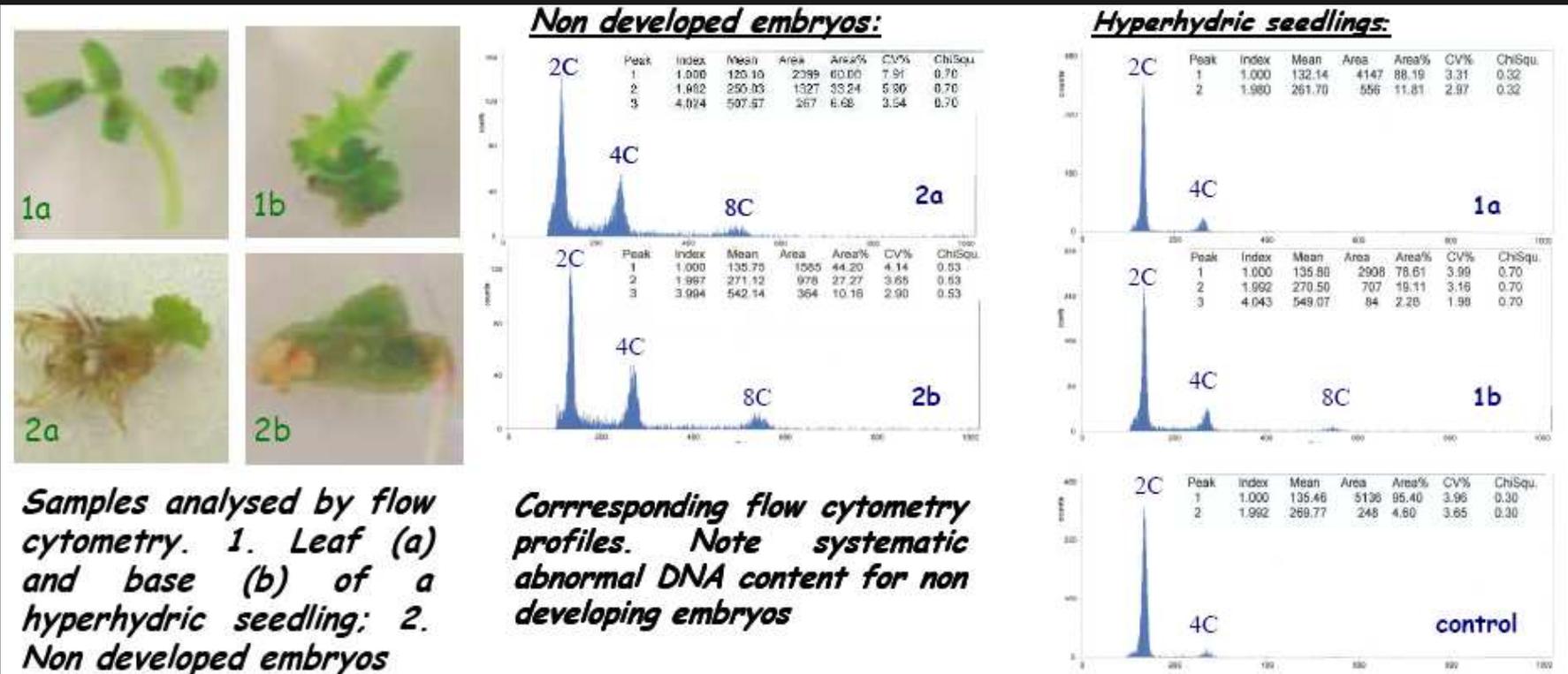


Figure 8. Flow cytometry profiles of non-developing hyperhydric plantlets (1a, 1b), somatic embryos (2a, 2b) and a seedling (control) of *M. truncatula* A-17.

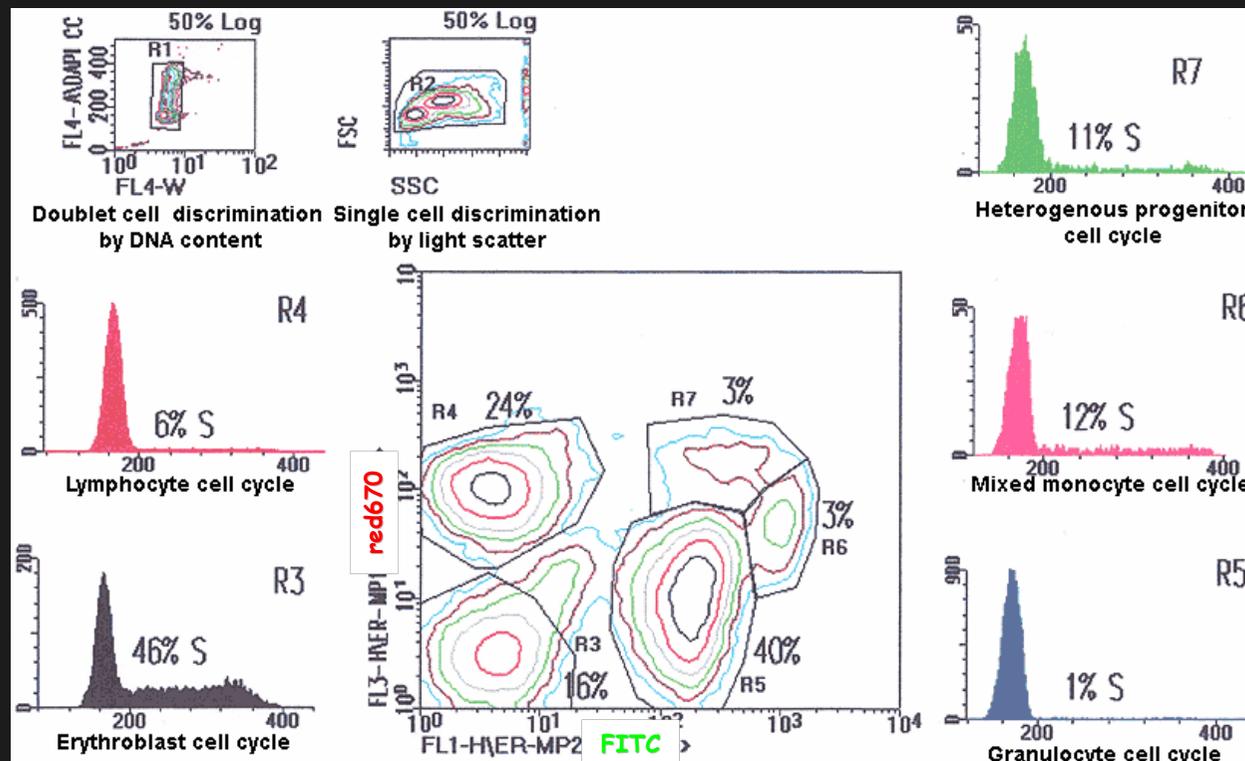
Cycle cellulaire

Analyse du cycle cellulaire dans la moelle osseuse de souris

Population hétérogène marquée avec des anticorps **ERMP12** (CD34like) et **ERMP20** (CD59like)

→ identification de 5 sous-populations

↳ marquage DAPI pour évaluer leur contenu en ADN



Exclusion des doublets (réalisée sur le DAPI)
Sélection sur la base de la taille (FSC) et complexité (SSC)

Cycle cellulaire

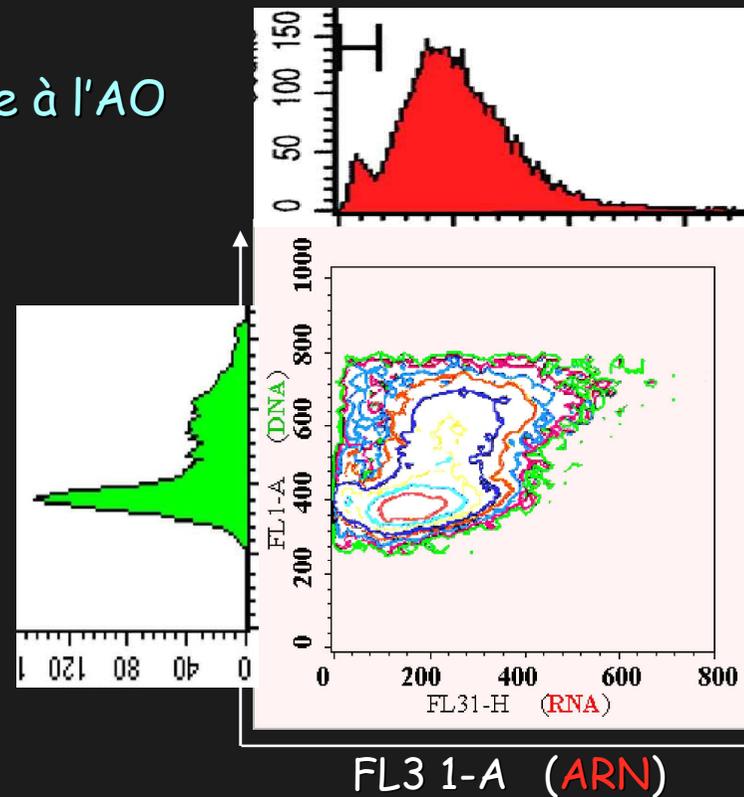
Analyse du cycle cellulaire avec l'Acridine Orange (laser 488nm)

Permet l'analyse simultanée du contenu en ADN et en ARN des cellules:

intercalé à l'**ADN** ⇒ signal fluorescent **vert (FL1)**
fixé à l'**ARN** ⇒ signal fluorescent **rouge (FL2)**

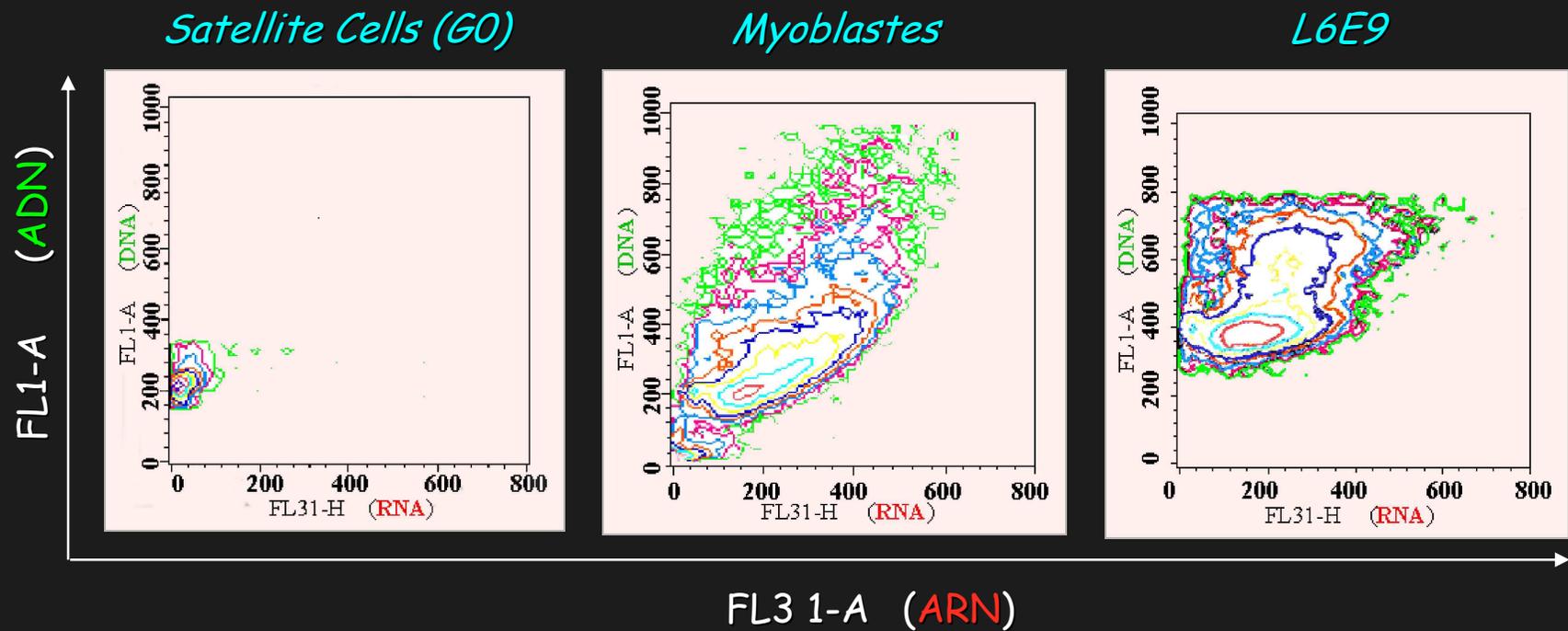
Profils de marquage à l'AO

L6E9



Cycle cellulaire

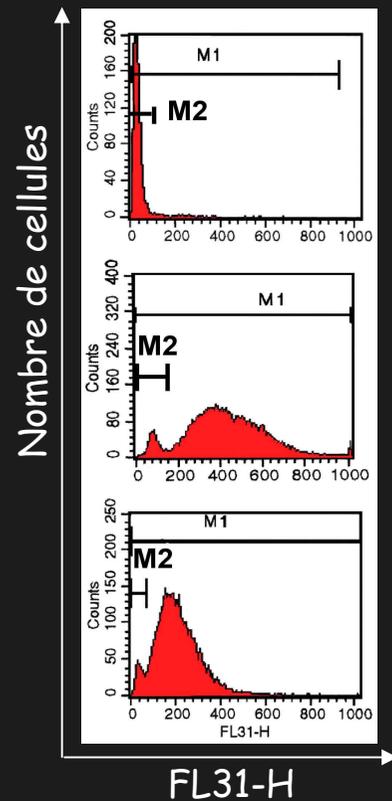
Profils de marquage à l'AO



Cycle cellulaire

Acridine Orange = Discrimination cellules quiescentes (G0) / cellules en prolifération (G1)

Analyse des signaux **ARN**



RNA content

39 ± 6

SCs

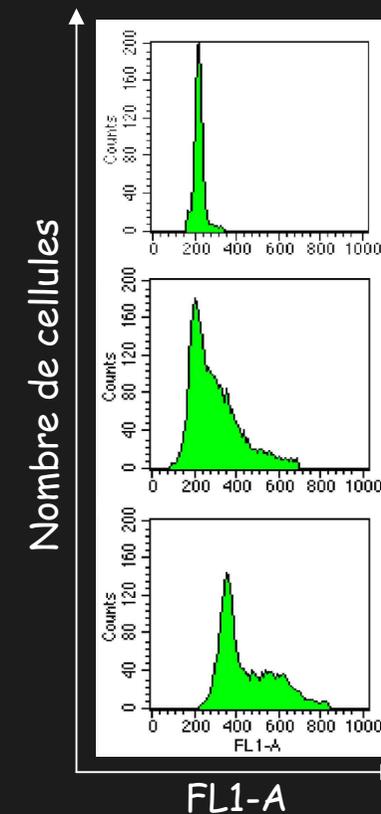
234 ± 56

Myoblastes

175 ± 14

L6E9

Analyse des signaux **ADN**



Quiescence ⇔ activité transcriptionnelle peu importante
=> un faible contenu en ARN est discriminant

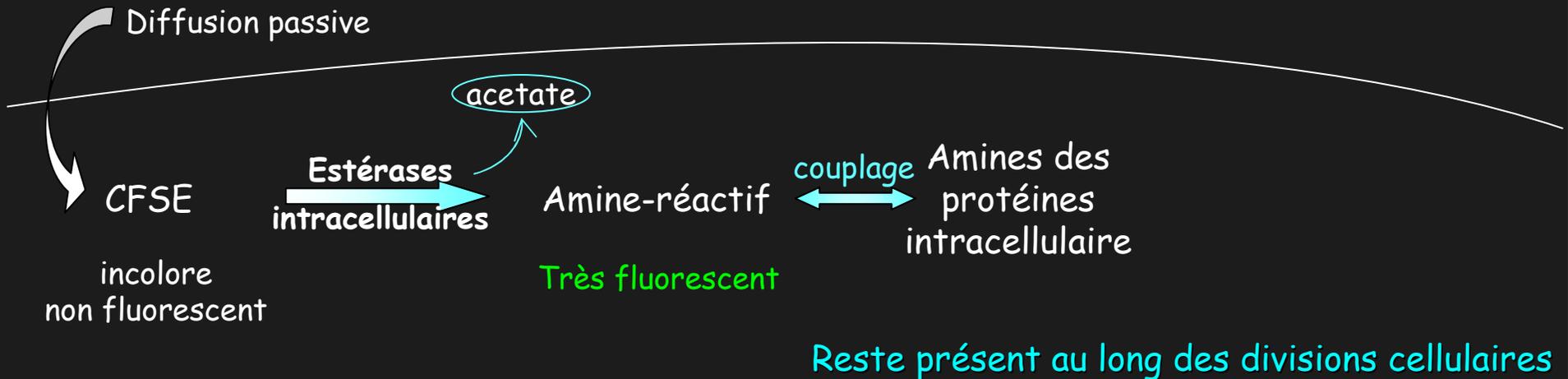
SCs ont un faible contenu en ARN => cellules quiescentes (G0) en fin d'extraction

Suivi de la prolifération cellulaire : marquage au CFSE

CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester (ou CFDA SE)

Caractéristiques du fluorochrome **Famille des traceurs**

- fluorescence (λ ex. 495nm, λ em. 525nm), laser 488nm, FL1
- peu cytotoxique
- stable à long terme
- utilisable *in vitro* et *in vivo*

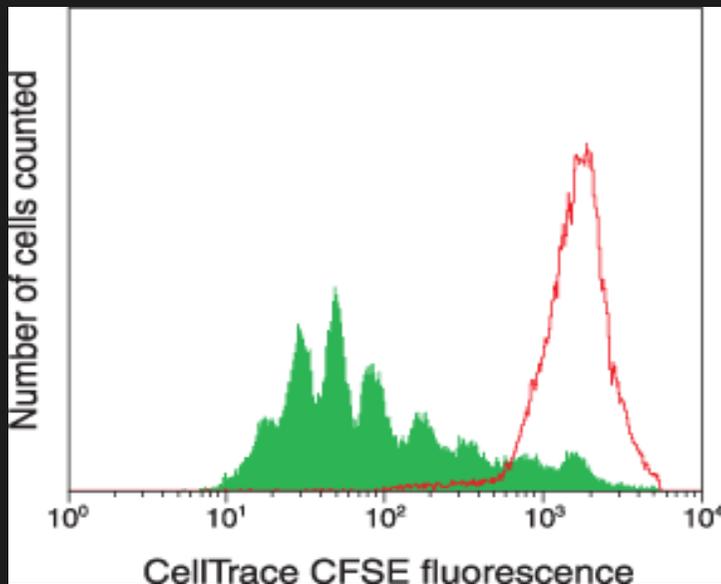


Distribution équivalente de la fluorescence cytoplasme entre les cellules filles

Analyse du marquage au CFSE

Suivi de la prolifération au cours du temps

Suivi de la prolifération lymphocytaire dans le sang périphérique humain



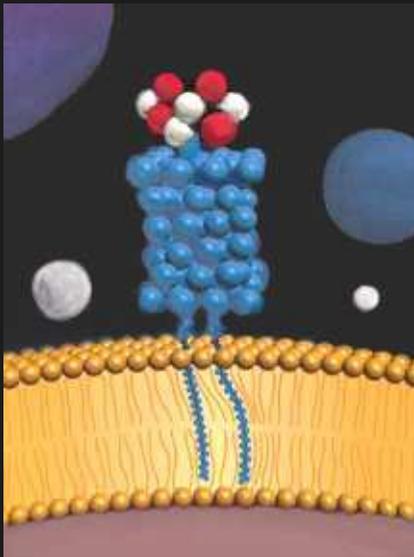
■ **J0** : cellules arrêtée en génération parentale (mitomycin)

Stimulation de la prolifération (phytohemagglutinin)

■ **J5** : pics représentant les générations successives

Suivi de la prolifération cellulaire : marquage membranaire au PKH26

PKHs : Fluorochromes s'intercalant dans les lipides des membranes cellulaires

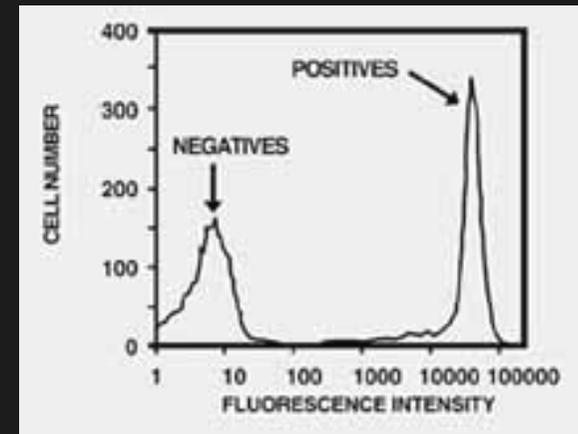


Caractéristiques du PKH 26

- fluorescence rouge (λ ex. 551nm, λ em. 567nm)
- demi-vie *in vivo* (>100 jours)
- peu cytotoxique
- stable à long terme

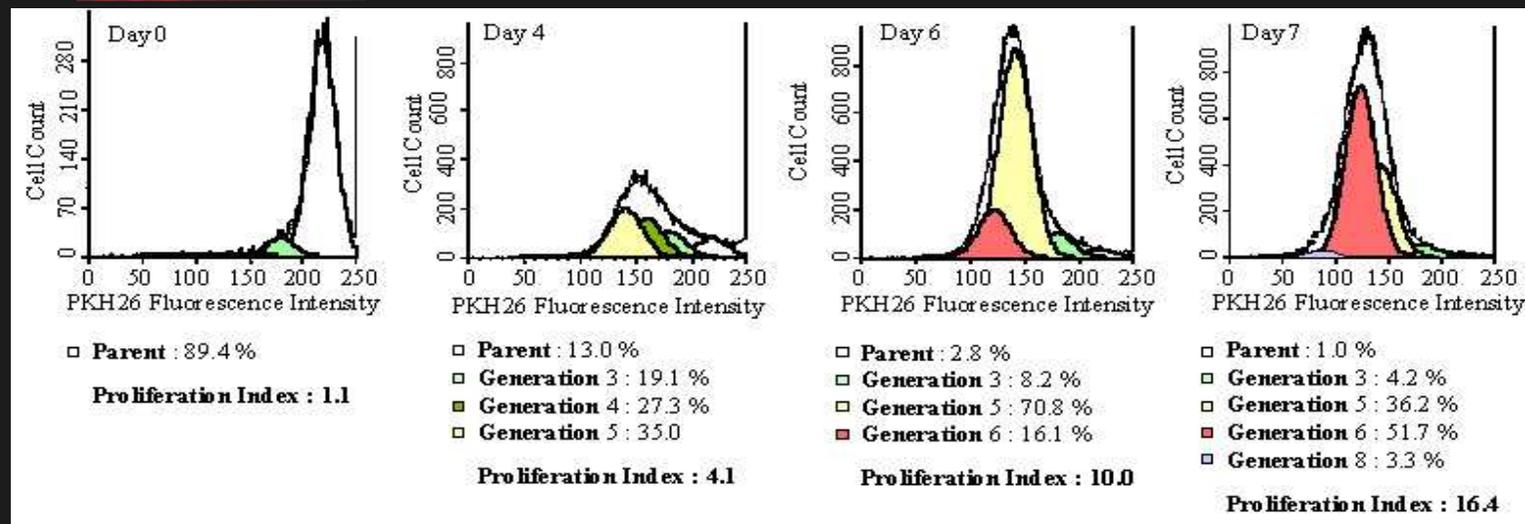
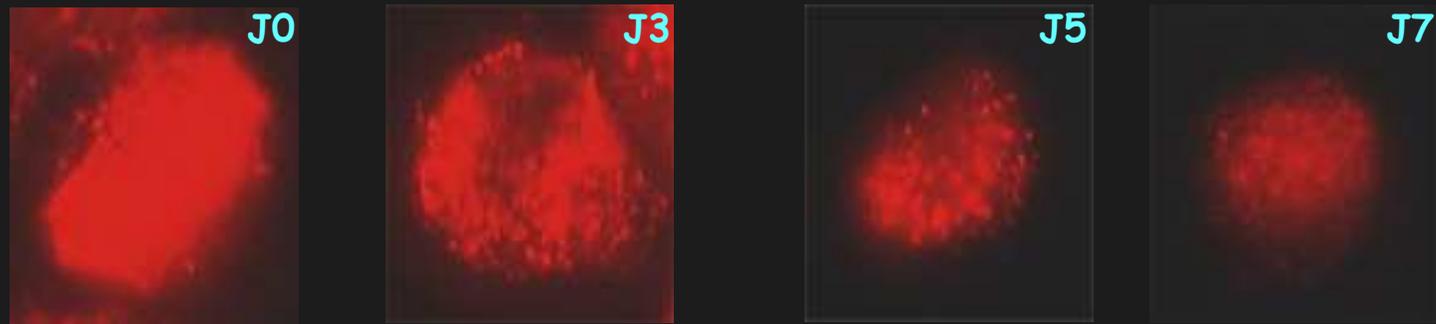


Utilisable *in vitro* et
in vivo



⇒ Mesure de la prolifération de sous-populations cellulaires
distinctes, présentes dans une population hétérogène

Analyse du marquage au PKH26



Indice de Prolifération (PI) ↔ Expansion totale de la population initiale.

↳ Activité proliférative de la population cellulaire totale

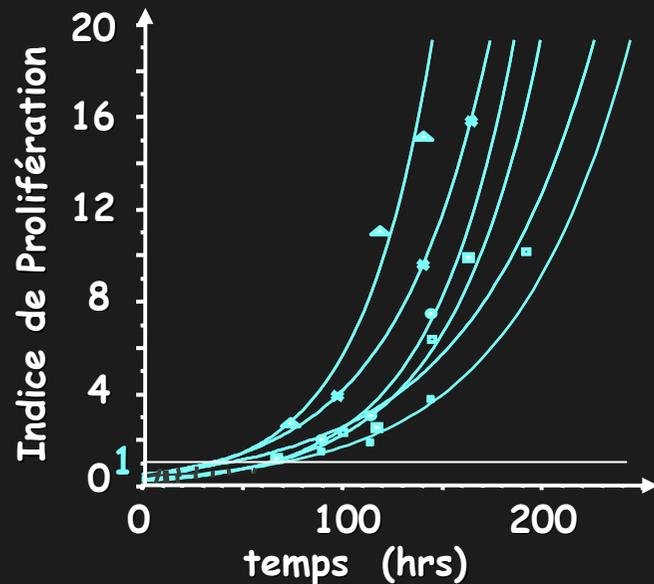
Facteur multiplicatif de la population cellulaire

Suivi de l'indice de prolifération au cours du temps

Calcul des paramètres cinétiques de la prolifération de cellules en culture

Analyse du marquage au PKH26

Calcul des paramètres cinétiques de la prolifération des mdc en culture



$$A_k = A_0 \times PI \quad \text{et} \quad A_t = A_0 \times 2^k$$

k = nombre de générations

A_0 = nombre initial de cellules

A_k = somme des aires de chaque génération

Temps de Latence : temps correspondant à $PI = 1$

Temps de Génération T : $A_t = A_0 \times 2^k$

$$k = \ln PI / \ln 2$$

$$T = t / k$$

Animaux	Latence (heures)	Temps de Génération (heures)
L6E9	64.9 ± 8.1	34.8 ± 2.3
Jeune	22.2 ± 5.9	36.5 ± 3.2
Adulte	49.0 ± 6.5 *	34.0 ± 2.8
Vieux	40.0 ± 7.9 †	28.0 ± 2.2 ‡

* : $P < 0.05$, différent des jeunes ‡ : $P = 0.05$, différent des jeunes et des adultes (contraste)

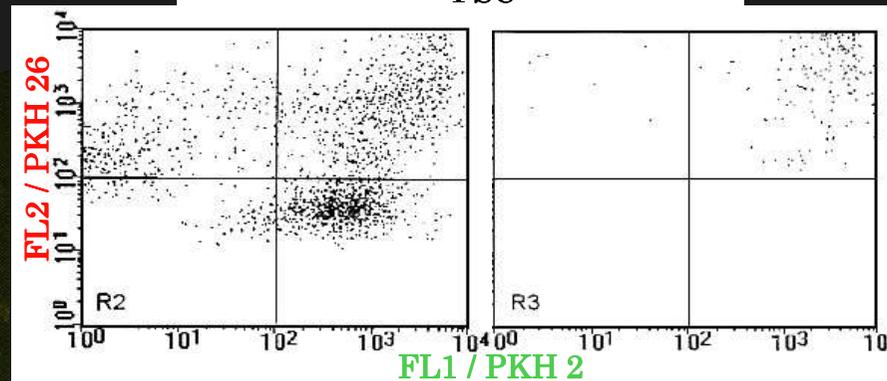
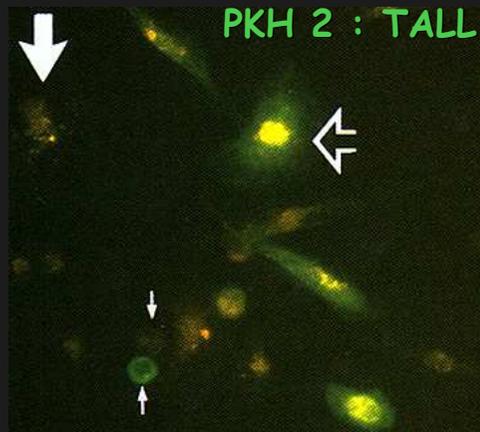
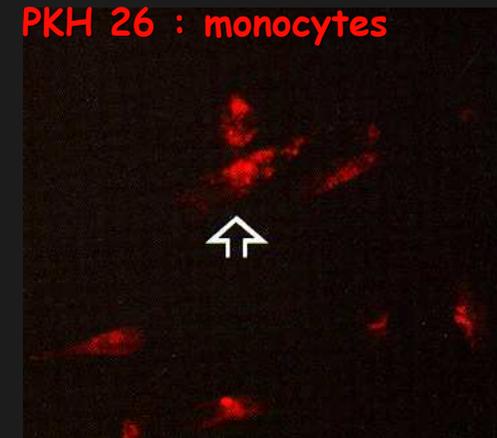
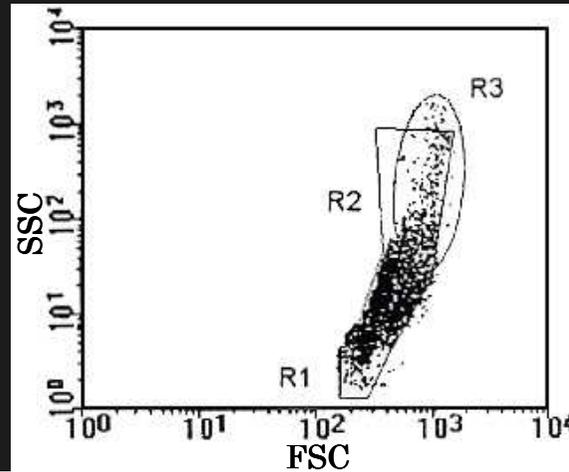
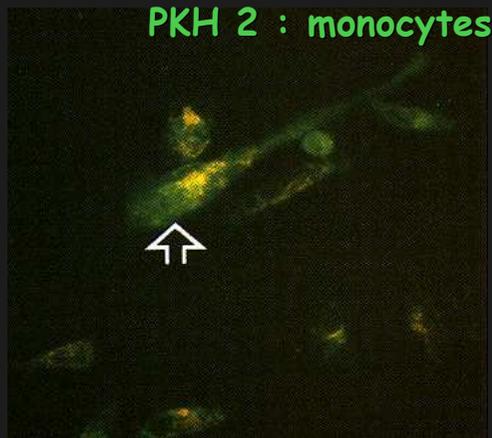
† : $P < 0.08$, différent des jeunes

PKH et fusion cellulaire

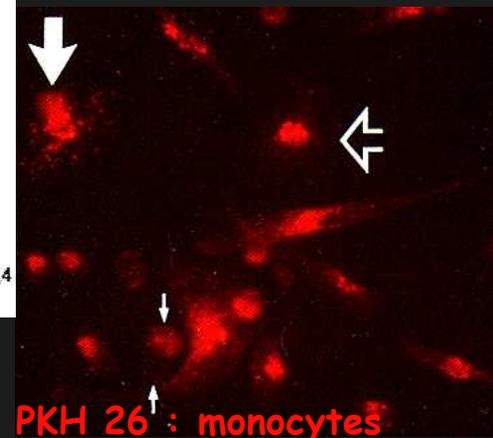
Fusion monocytes-cellules tumorales : une cause de métastase

En présence de milieu conditionné (Con-A)

Fusion des Monocytes : Multinucleated Giant Cells (MGC)



Fusion TALL / monocytes : Hybrides



Autres utilisations de colorants membranaires

Migration cellulaire & interactions cell.-cell. dans le maintien de l'homéostasie normale
(*Hendrikx et al., Exp Hematol 1996, 24:129-140 ; Tomasetto et al., J Cell Biol 1993, 122:157-167*)

Optimisation de thérapies basées sur la cellules (*Verfaillie et al., Blood 1995, 86:2137-2145*)

Cytotoxicité médiée par la cellule (*Hatam et al., Cytometry 1994, 16:59-68*)

Localisation, migration, interactions et communications cellulaires
(*Hugo et al., Nature 1992, 360:679-682, Lansdrop et al., Exp Hematol 1993, 21:1321-1337*)

Les fluorochromes utilisés

3-Mitochondries spécifiques

MitoTracker : Vert, orange, rouge et infrarouge *Fixables, sélectifs des mitochondries, perméants*

Rhodamine 123 *cationique, perméante, séquestrée dans les mitochondries actives. Ne fixe pas le RE*

Carbocyanines **DioC₆(3)** colore les mitochondries + RS

Masse mitochondriale : Fluorochrome s'accumulant quelque soit le potentiel de membrane

MitoFluor (Green, Red589) *Non-Fixables, sélectifs des mitochondries*

MitoTracker (Red580, Deep red 633)

Nonyl Acridine Orange

4-Senseurs de pH

Sensibles au potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) Indicateurs de pH

RedoxSensor Red CC-1

JC-1 monomère (faible $\Delta\Psi$) \rightleftharpoons **JC-1** agrégé ($\uparrow \Delta\Psi$) *Mesure de ratio*

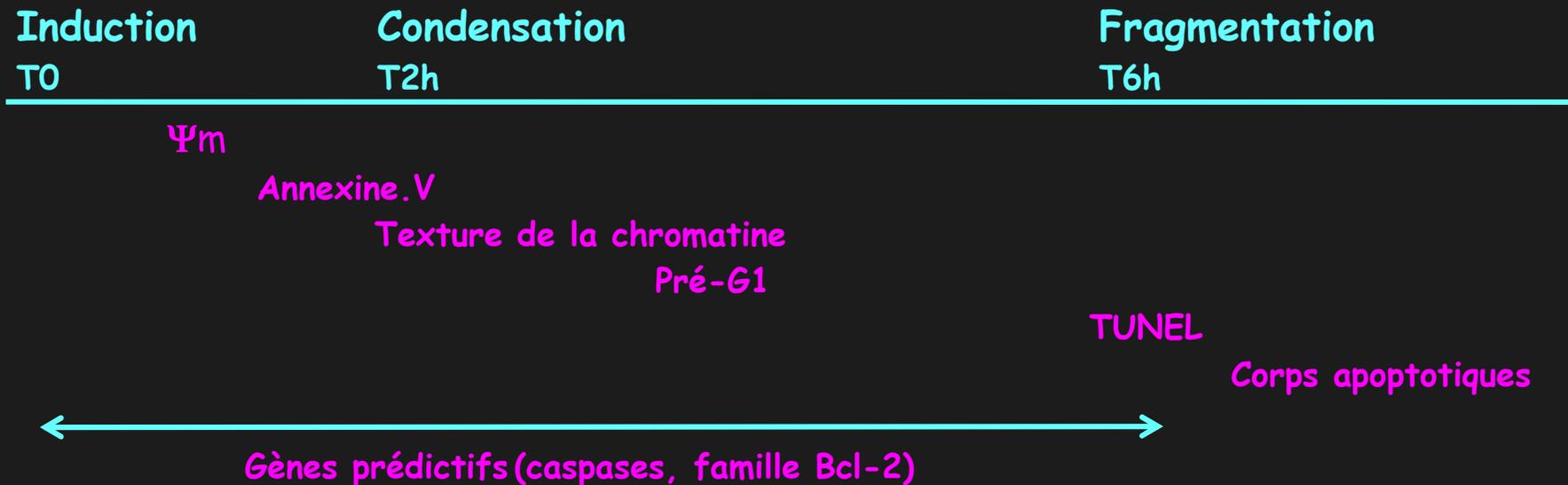
SNARF-1 Ex **488** Em **580** acide Em **<620** basique

Sensibles aux compartiment acides

Lysosensor acidotropiques : accumulent dans les organelles acides

Les grandes étapes du déroulement de l'Apoptose

Déroulement de modifications caractéristiques



Mise en évidence des différentes étapes du processus

DiOC6 ⇔ chute précoce du potentiel membranaire mitochondrial

Annexine.V ⇔ altérations de la membrane plasmique (stade précoce-intermédiaire)

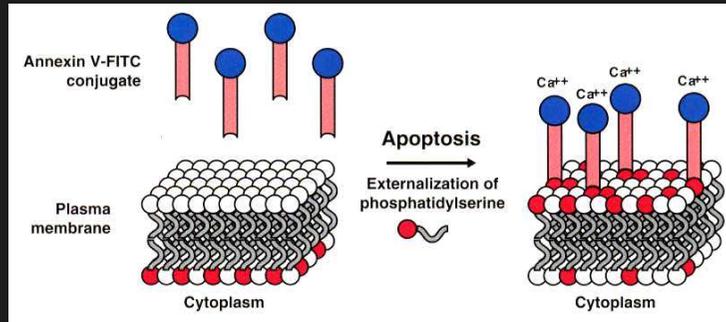
TUNEL ⇔ fragmentation internucléosomale de l'ADN (stade tardif)

Caspase-3 : Expression des formes précurseur et activée

Activité protéolytique (substrats fluorogènes mimant le site de clivage)

Annexine V

Détection des altérations de la membrane plasmique



Phospholipides anioniques
 Phospholipides neutres

Annexine V

protéine Ca^{2+} dépendante
forte affinité pour résidus PS

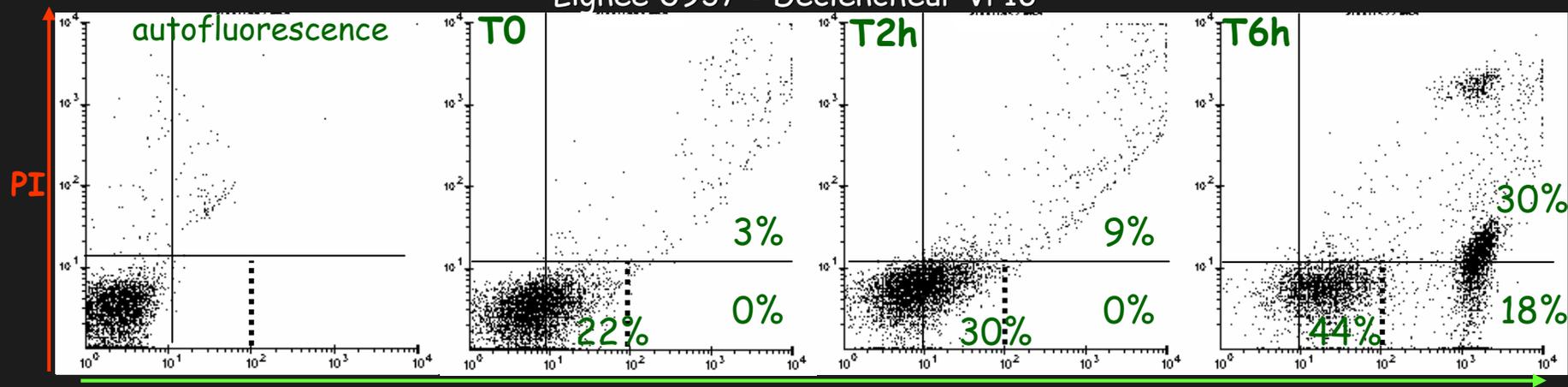
Distribution des phospholipides

Cellule normale : asymétrique

Cellule apoptotique : translocation PS à l'extérieure
(stade précoce-intermédiaire)

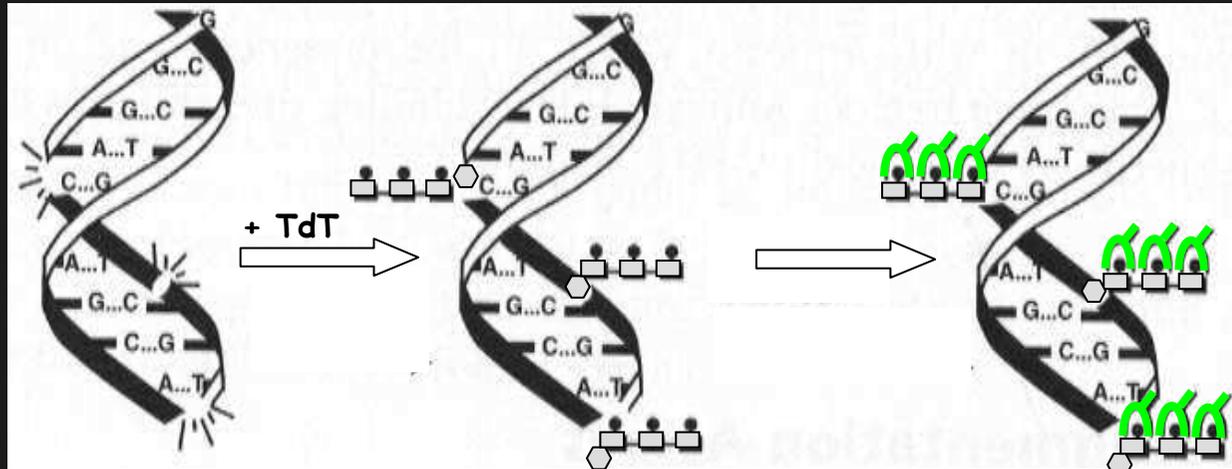
Cellules	AnnexineV	PI
Normales	-	-
Apoptotiques	+	-
Nécrotiques	+	+

Lignée U937 - Déclencheur VP16



Annexine.V-FITC

TUNEL

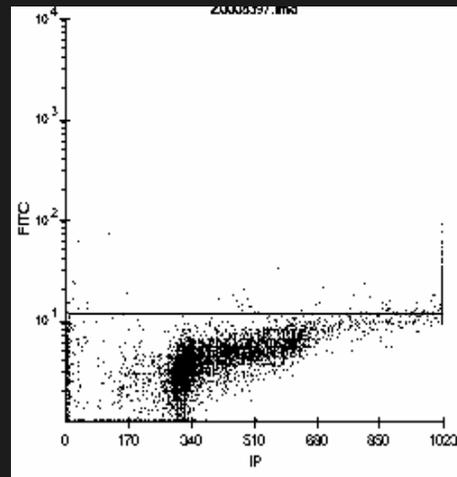


ADN fragmenté

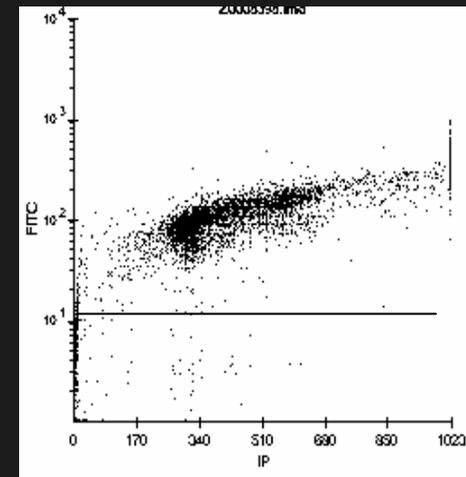
+ TdT
Addition de dUTP biotinylés aux extrémités 3'OH libres de l'ADN

+ streptavidine-FITC

Technique TUNEL:
les témoins

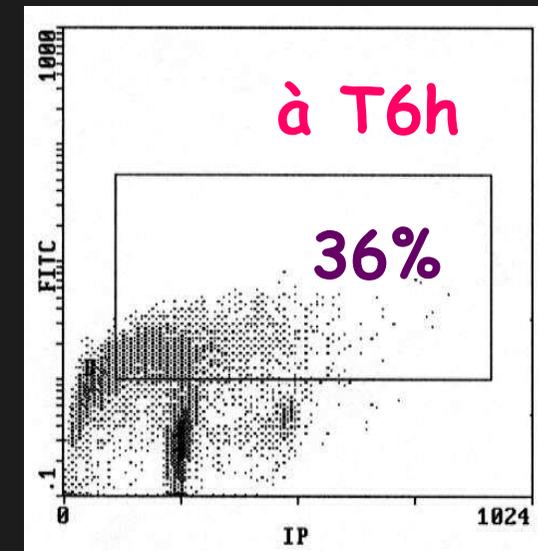
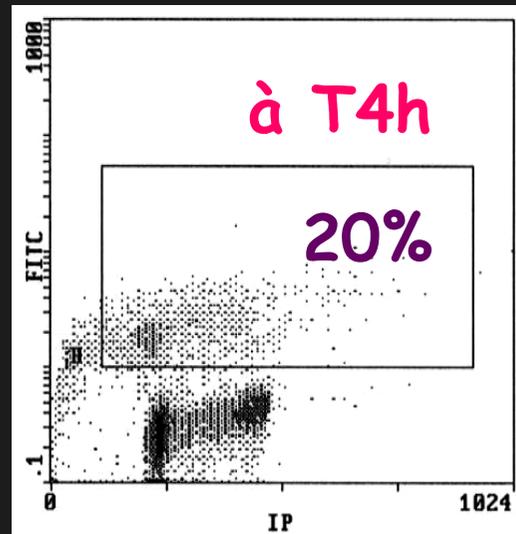
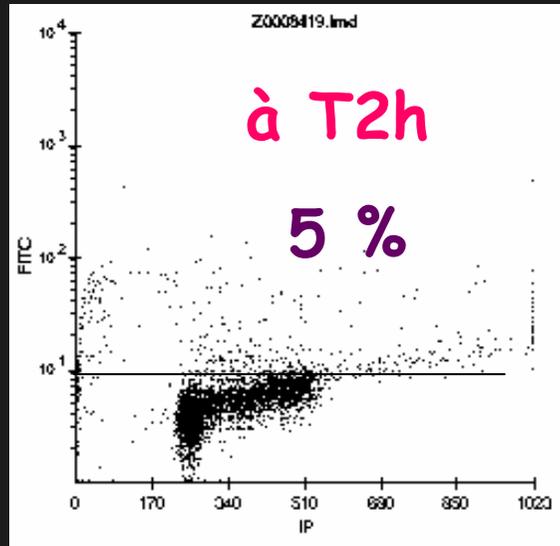
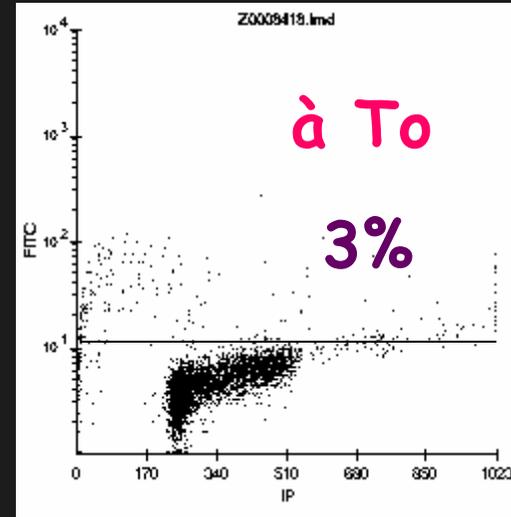
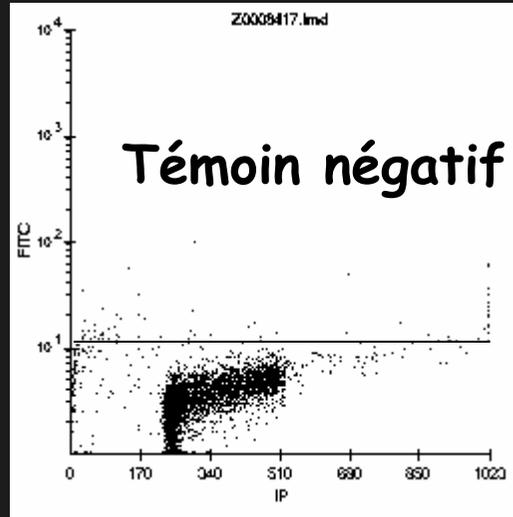


Témoin (-) : sans TdT
+ dUTP biotinylés
+ streptavidine.FITC



Témoin (+) : addition de DNase
+ TdT
+ dUTP biotinylés
+ streptavidine.FITC

Modèle U937 ± VP16 : cytogrammes de TUNEL

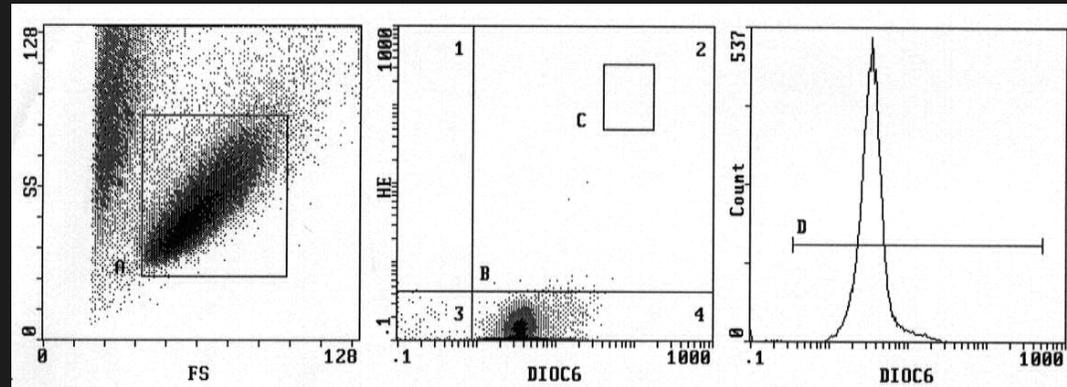


Apoptose

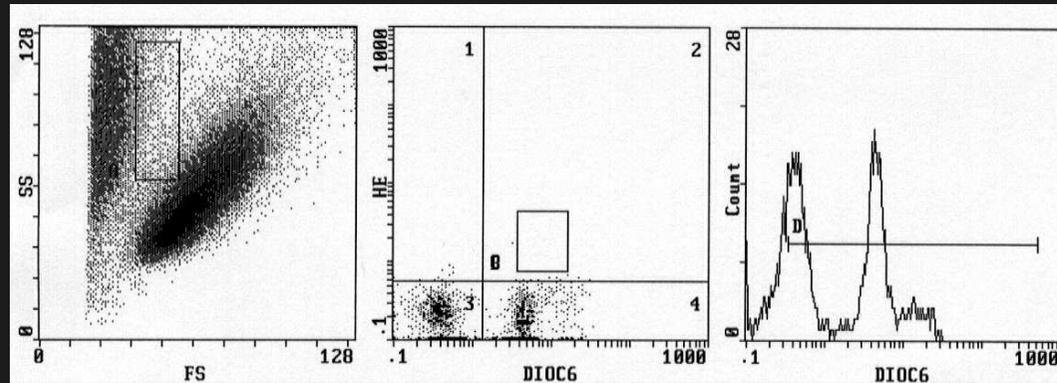
Potentiel membranaire mitochondrial (DIOC6)

Modèle U937 ± VP16 - T4h

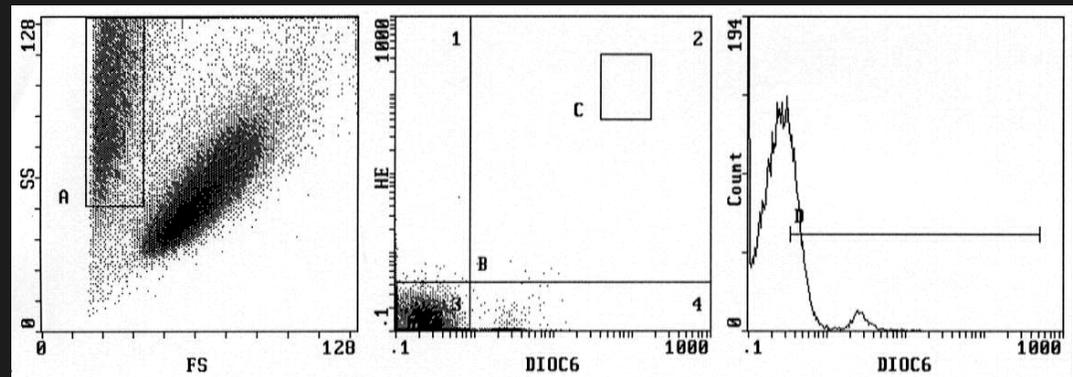
1) Cellules viables



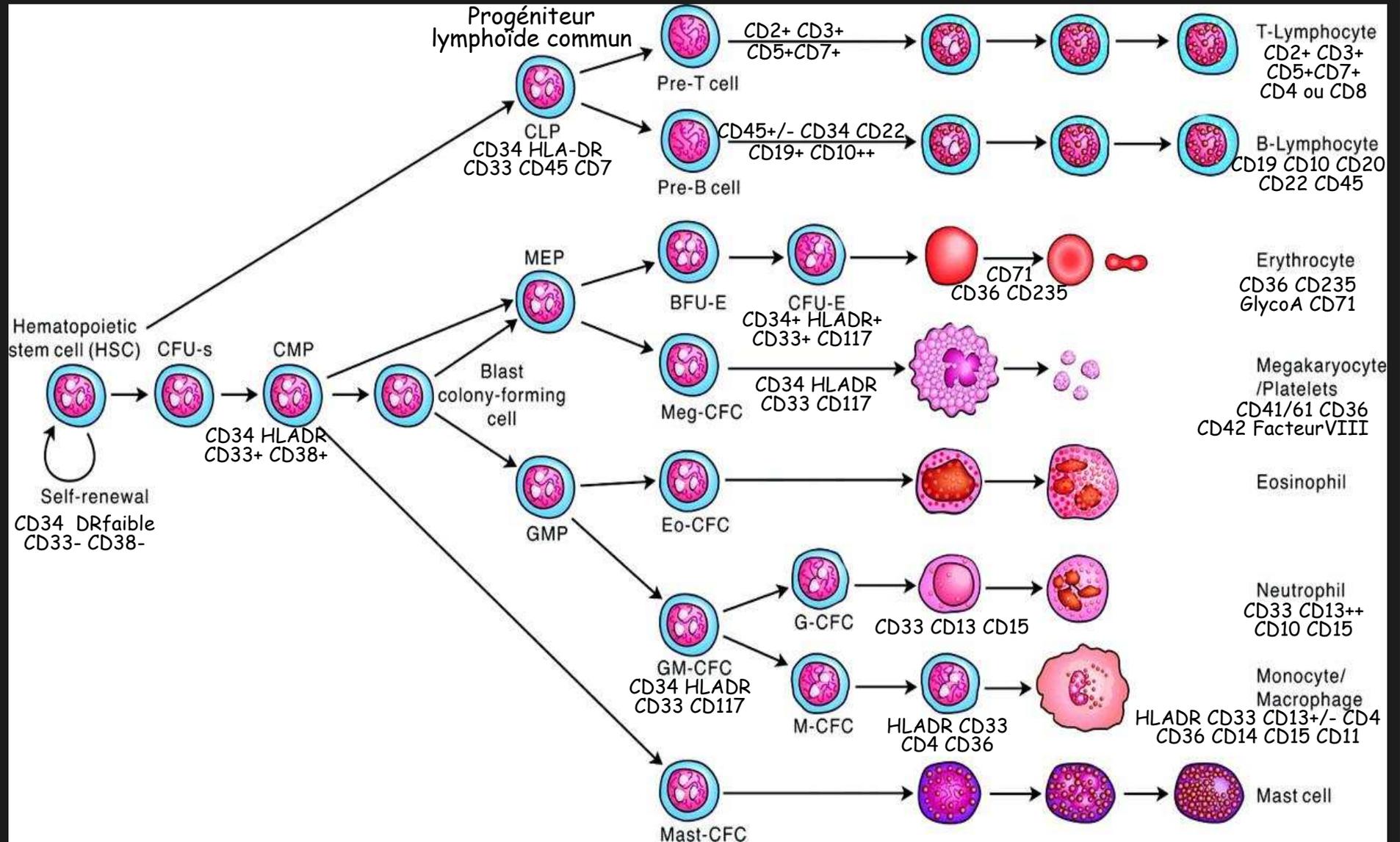
2) Cellules en cours d'apoptose



3) Cellules apoptotiques



Clusters de différenciation des cellules hématopoïétiques



Analyses multicouleurs

Mise en évidence des cellules Natural Killer (NK)

D'origine lymphocytaire

Interviennent dans les réponses anti-virales et anti-tumorales

Elles sont classiquement définies comme NK1.1+ CD3-

3 sous-groupes identifiés sur la base de l'expression CD27/CD11b :

CD11b-/CD27+ (immature) CD11b+/CD27+ (mature) CD11b+/CD27- (senescent)

(Hayakawa et al, J Immunol 2006)

Rate de souris

Traitement à la collagénase (enrichissement cellules dendritiques/macrophages)

Lyse des globules rouges

Marquage 8 couleurs

Laser 488nm (Bleu)

Ly6C-FITC, NK1.1-PE CD11b PercP-Cy5.5, CD27-biotin (+Strepta PE-Cy7)

Laser 405nm (Violet)

Violet viability dye (Vivid), B220 (Pacific Orange)

Laser 633nm (Rouge)

CD127-Alexa647, CD3-CD19 APC-Cy7

Multicouleurs

Les cellules Natural Killer (NK)

A partir d'une population hétérogène complexe

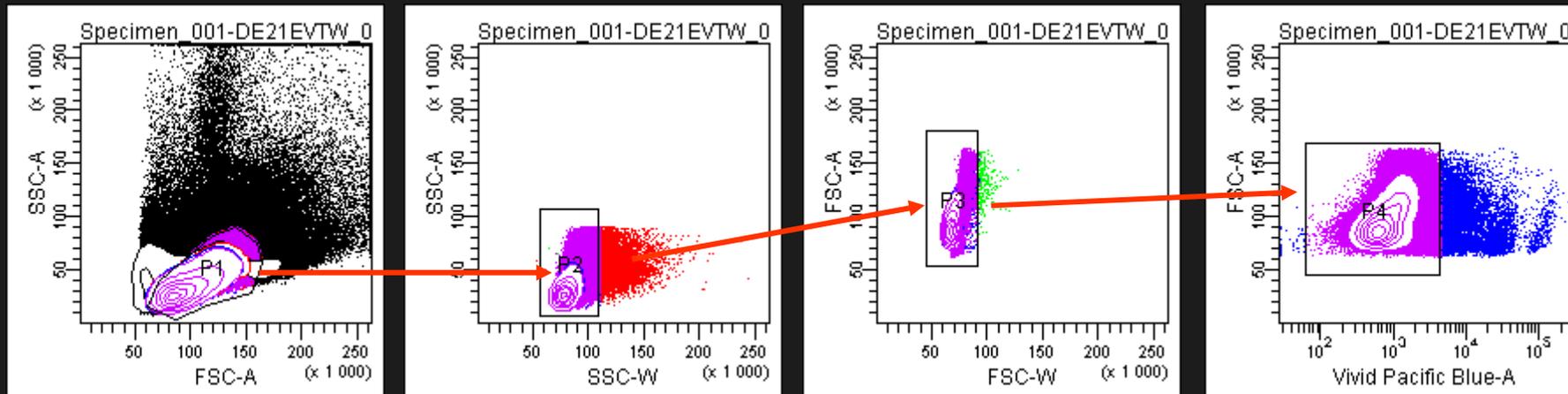
Exclusion des doublets sur les paramètres

Sélection des cellules vivantes

de taille

de complexité

viabilité

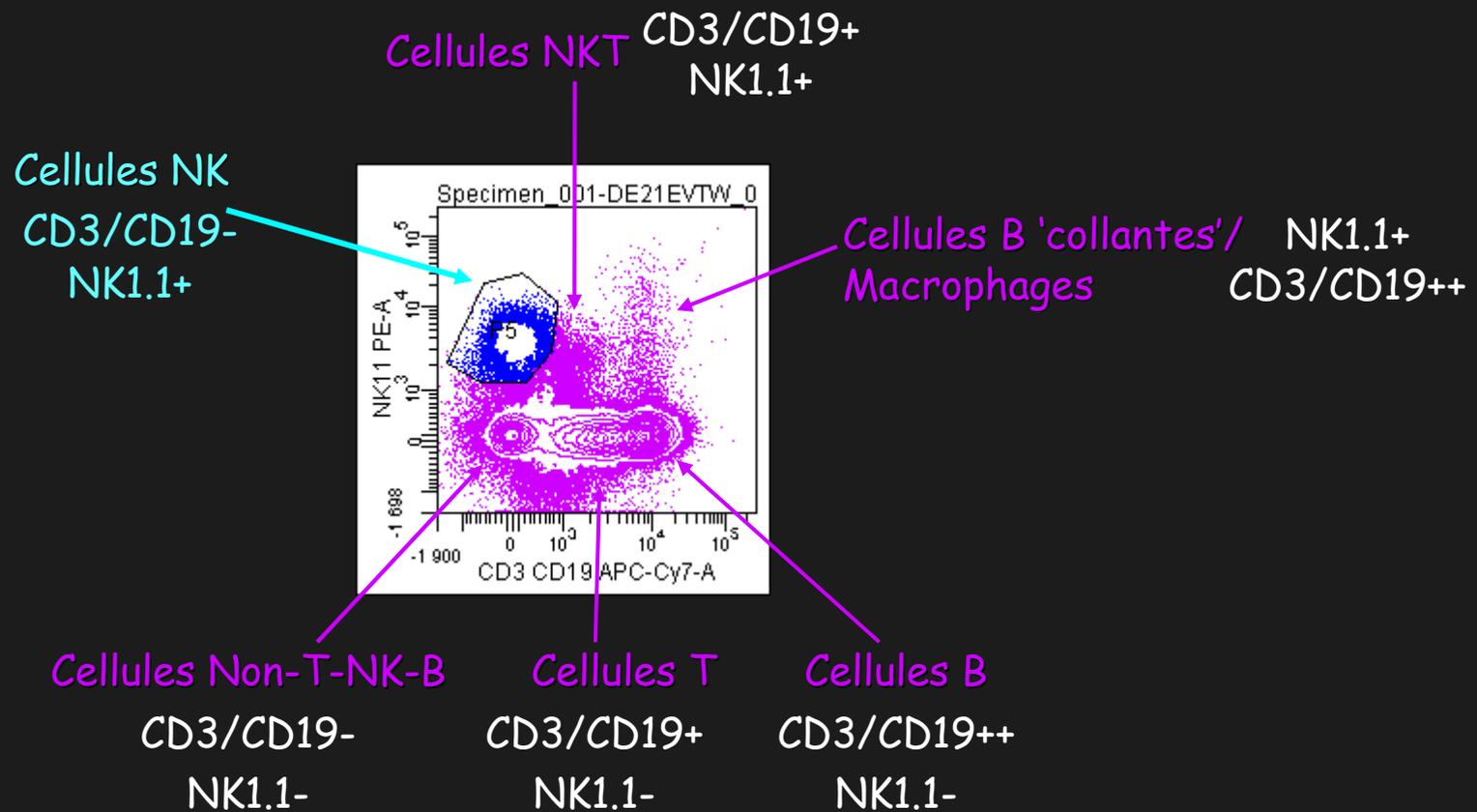


Tube: DE21EVTW_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	350 825		100,0
P1	273 924	78,1	78,1
P2	267 216	97,6	76,2
P3	266 983	99,9	76,1
P4	255 831	95,8	72,9

Les cellules Natural Killer (NK)

A partir de la population hétérogène dont on a exclu les doublets et les cellules mortes,
Analyse du marquage NK spécifique NK1.1+ CD3- CD19-



Multicouleurs

Les cellules Natural Killer (NK)

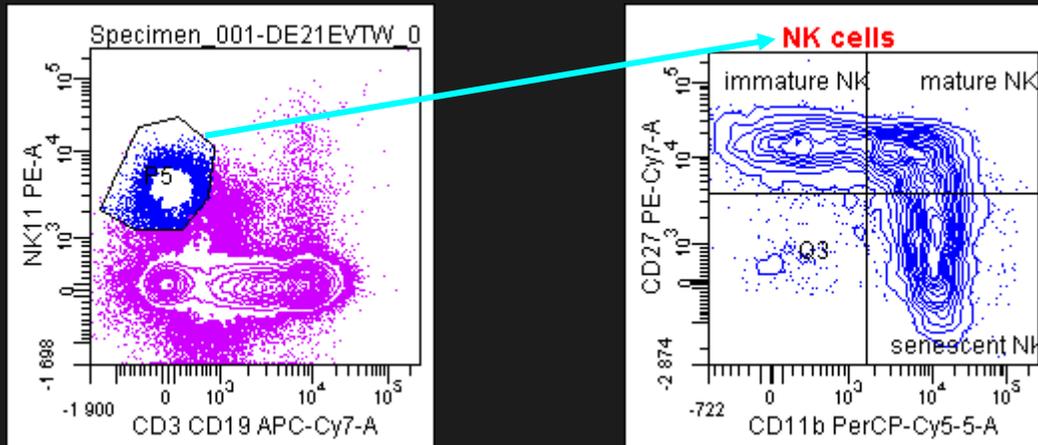
Identification des sous-groupes de cellules NK sur la base de l'expression **CD27/CD11b**

CD11b-/CD27+ (immature)

CD11b+/CD27+ (mature)

CD11b+/CD27- (senescent)

Hayakawa et al, J Immunol 2006)



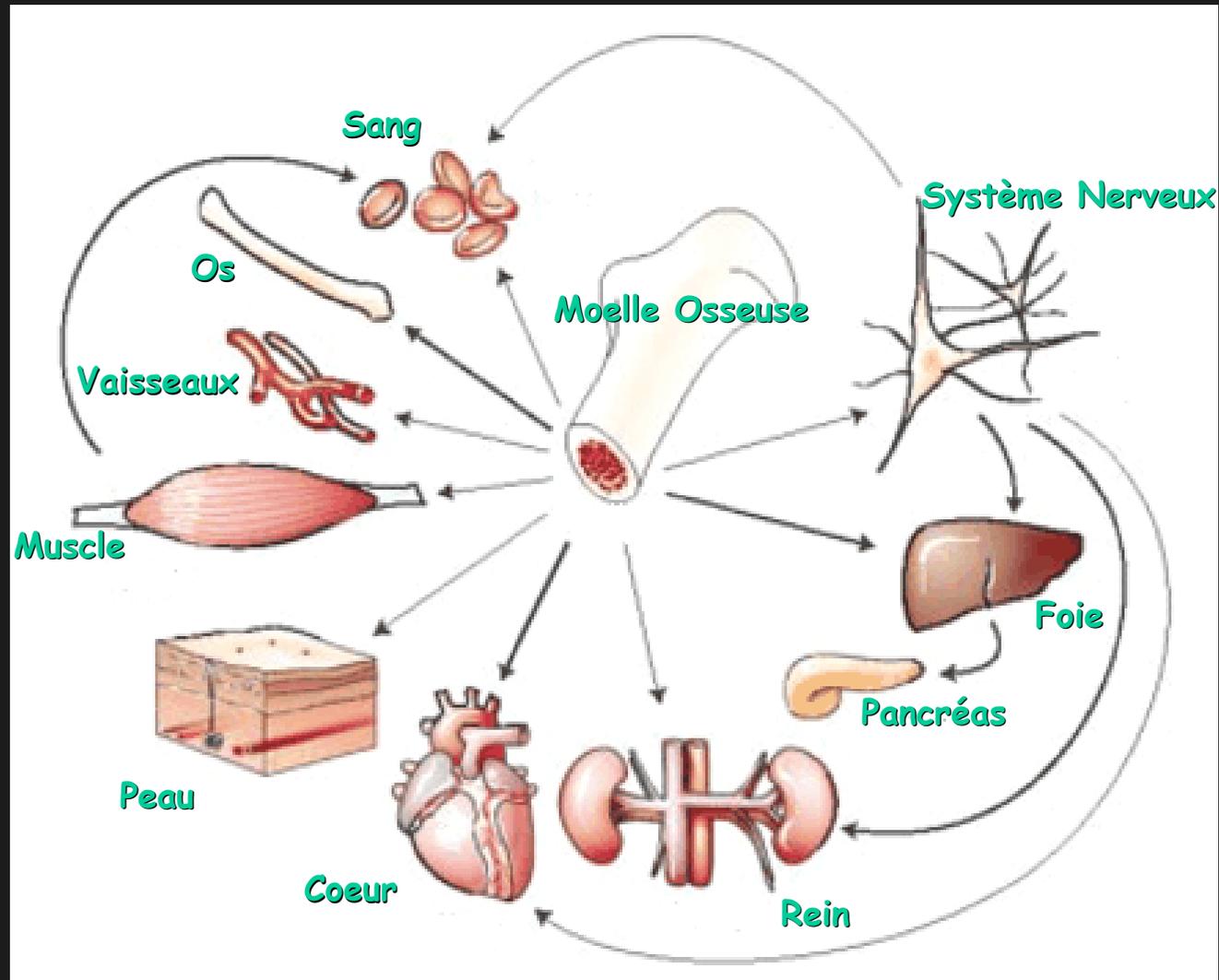
Tube: DE21EVTW_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	350 825		100,0
P1	274 877	78,4	78,4
P2	269 473	98,0	76,8
P3	269 286	99,9	76,8
P4	257 028	95,4	73,3
P5	6 025	2,3	1,7
Q1	1 322	21,9	0,4
Q2	1 970	32,7	0,6
Q3	183	3,0	0,1
Q4	2 550	42,3	0,7

La majorité des cellules NK de la rate sont en différenciation terminale ou sénescentes

Cette population représente un **évènement rare** : indispensable de réaliser des **acquisitions suffisantes** pour avoir des **représentations statistiques correctes**

CELLULES SOUCHES



Les cellules souches sont des **cellules multipotentes** : elles pourraient être chez l'adulte une **source** cellulaire permettant la **reconstruction de multiples tissus**

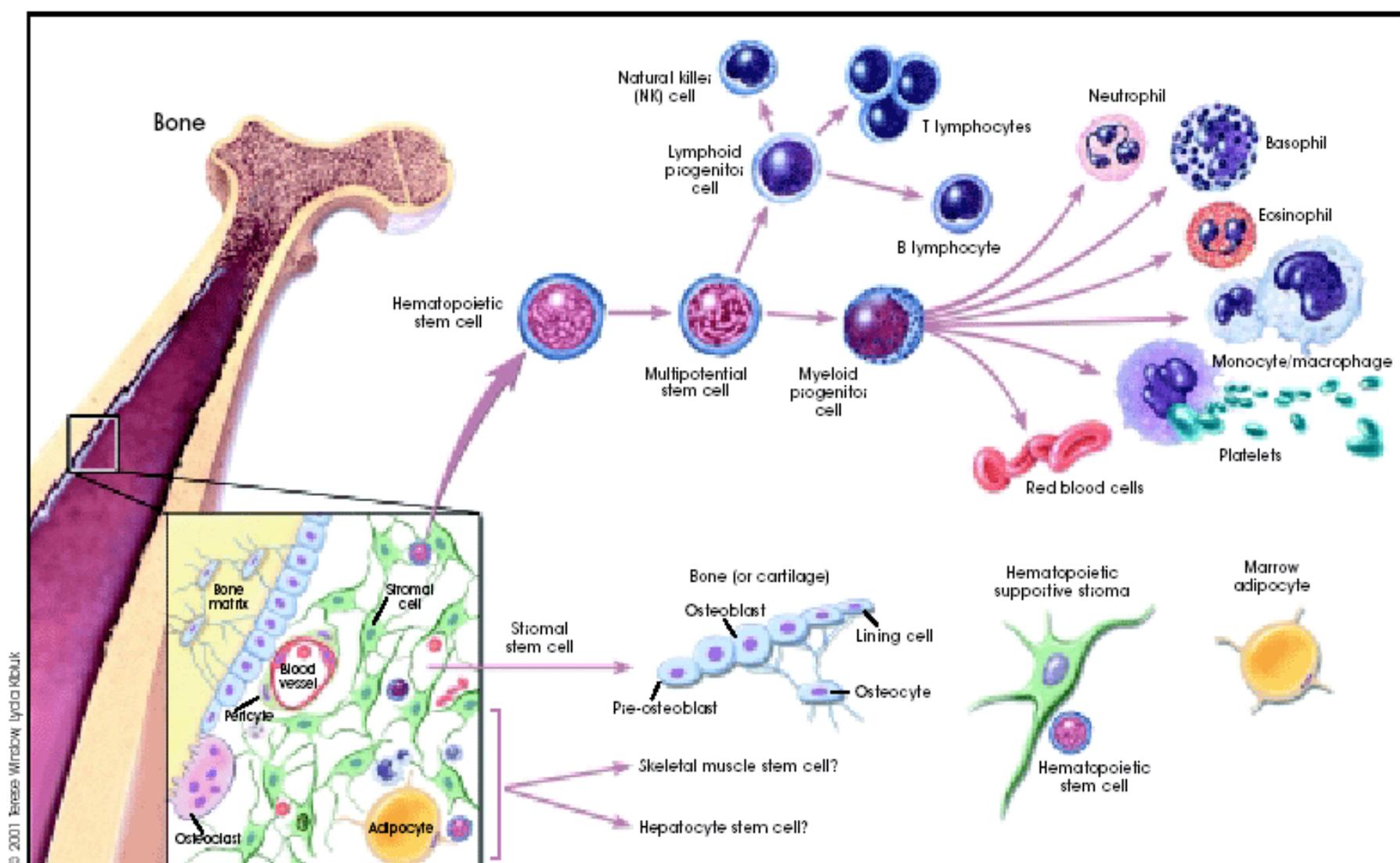


Figure 4.3. Hematopoietic and Stromal Stem Cell Differentiation.

Mise en évidence des SP

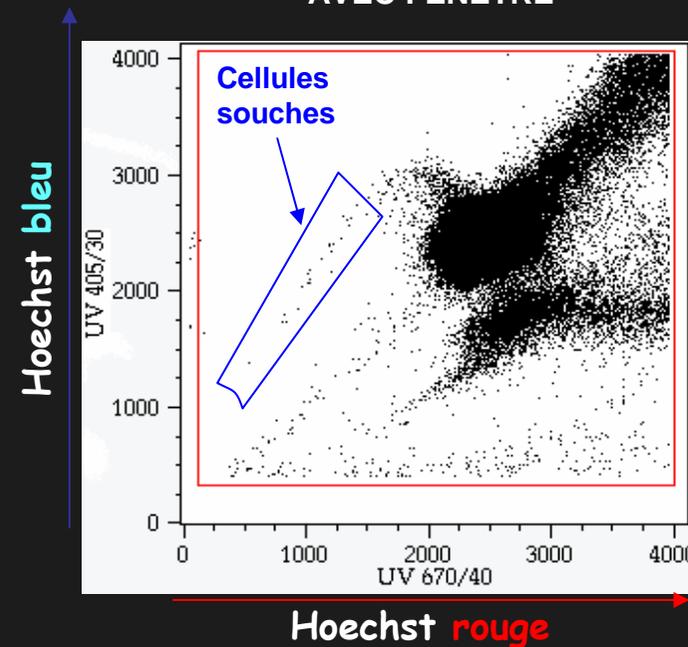
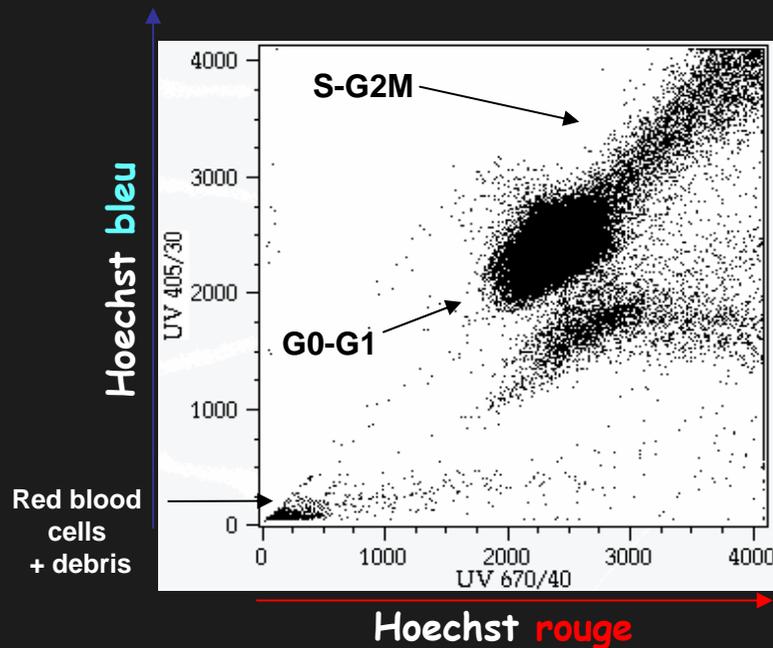
Mise en évidence des SP (moelle osseuse de souris)

Marquage au Hoechst 33342 (laser UV ou violet) Ré-émission : **bleu** ET **rouge**

Représentation bidimensionnelle

Acquisition: 100 000 évènements dans la fenêtre d'analyse PI-

AVEC PI
AVEC FENETRE



Détection : capables d'effluer le Hoechst 33342
Possibilité de typer ces cellules sur le premier laser

Mise en évidence des SP

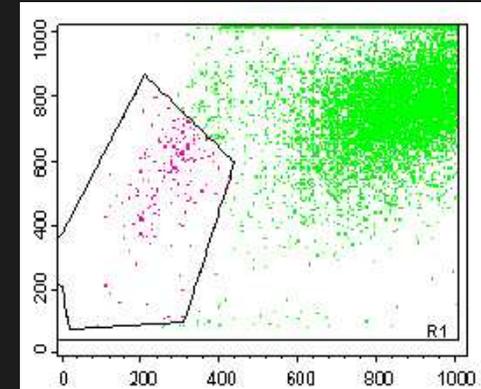
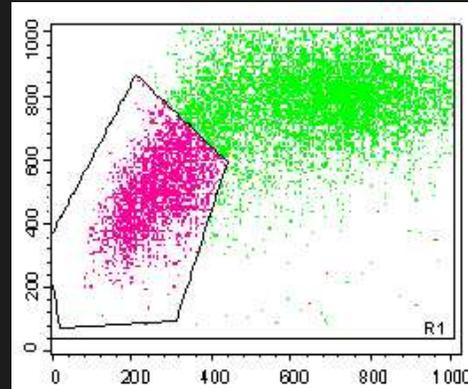
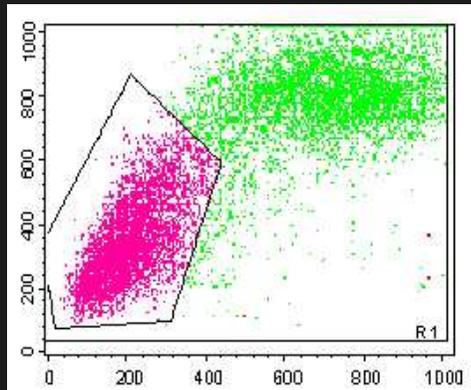
Mise en évidence de l'efflux

A549 (ABCG2++) (canaux responsables de l'efflux)

+ PI

+ PI + Cyclo A

+ PI + Vérapamil

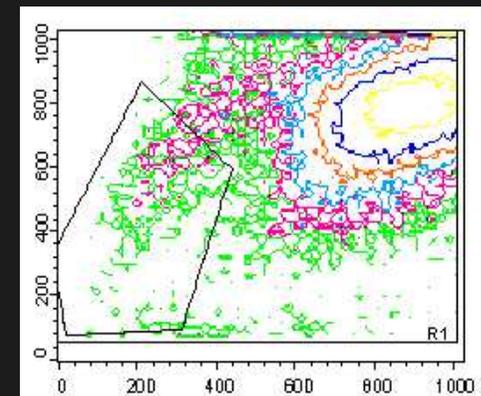
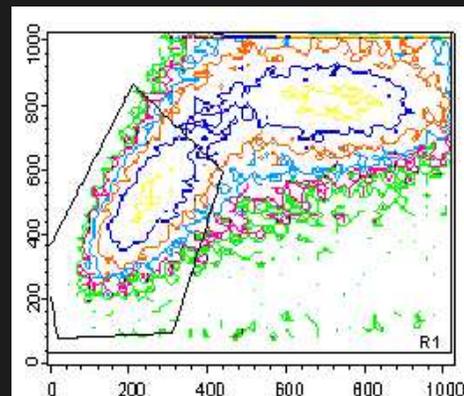
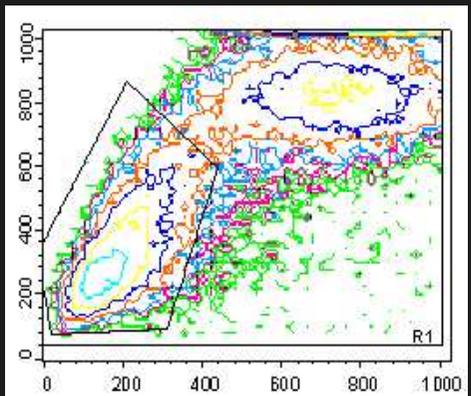


Region	% Gated	X Geo Mean
R1	100.00	377.42
R2	47.73	193.32

Region	% Gated	X Geo Mean
R1	100.00	515.95
R2	25.64	256.54

Region	% Gated	X Geo Mean
R1	100.00	799.71
R2	1.94	255.94

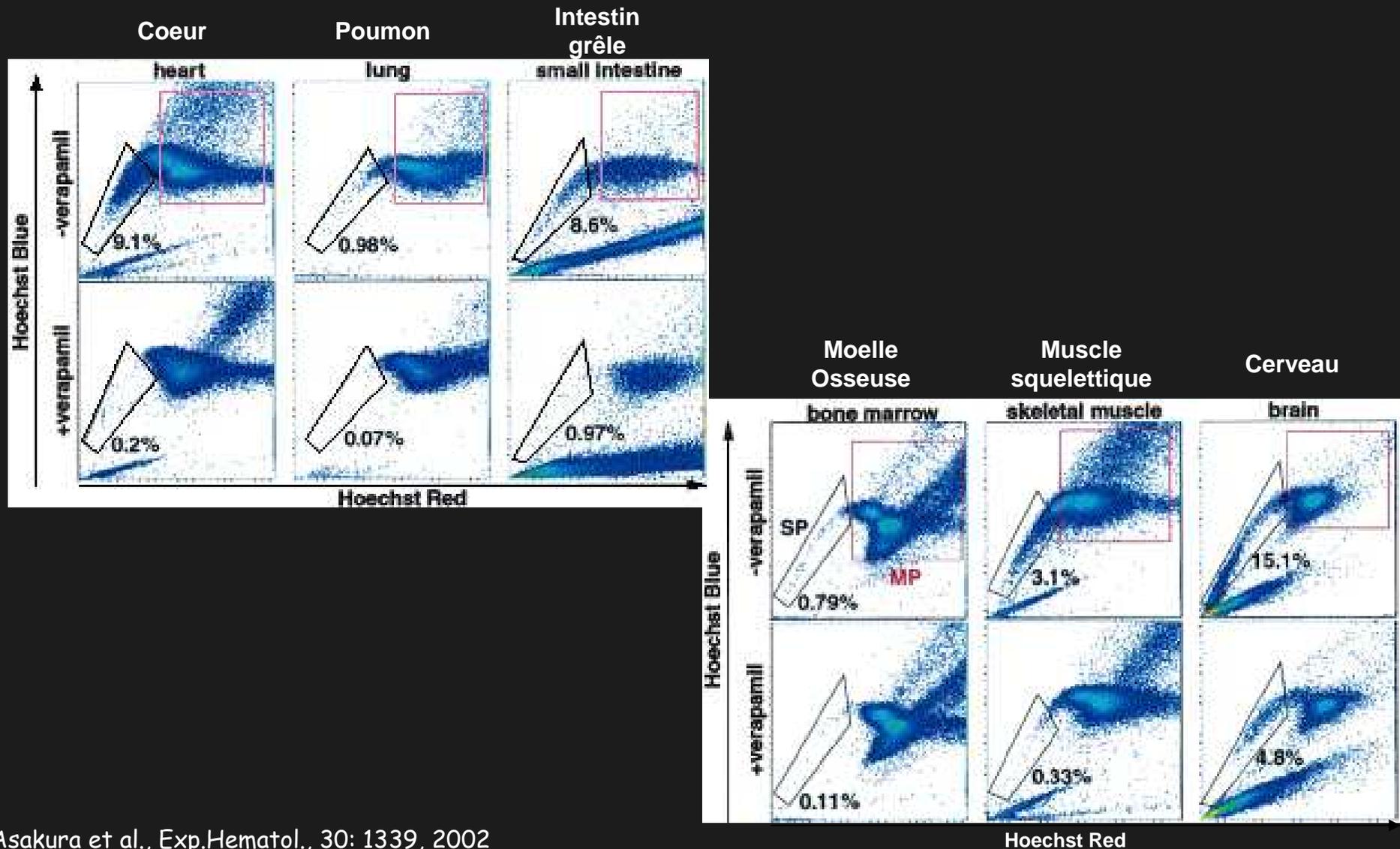
Hoechst Bleu



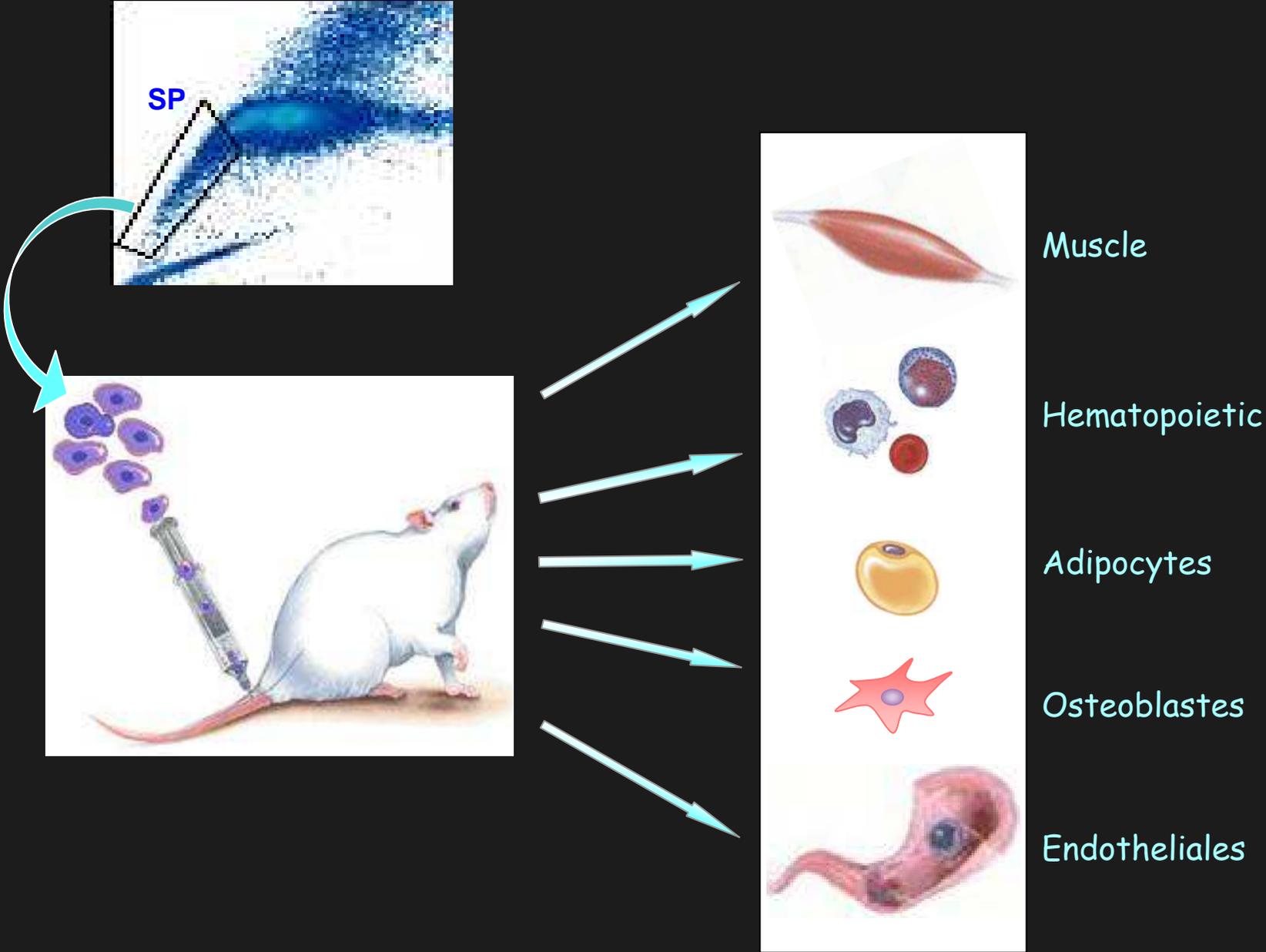
Hoechst Rouge

Mise en évidence des SP

Les cellules SP ont été mises en évidence dans de multiples tissus chez l'adulte



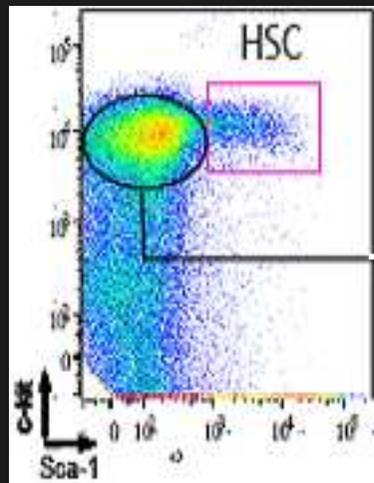
Cellules souches



Cellules
Souches

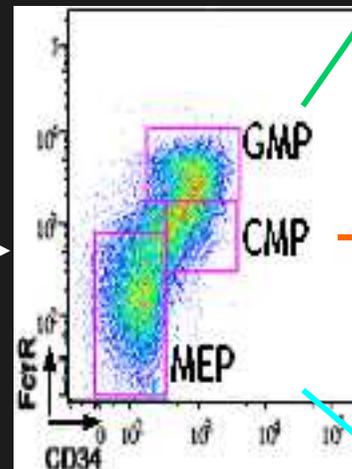
Mise en évidence de cellules souches murines

Cellules souches et
progéniteurs

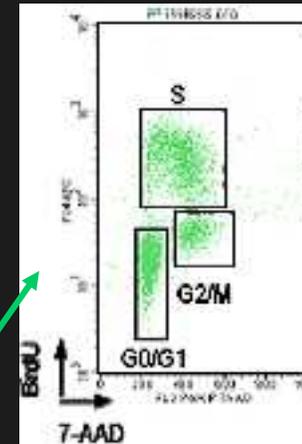


(Lin-)

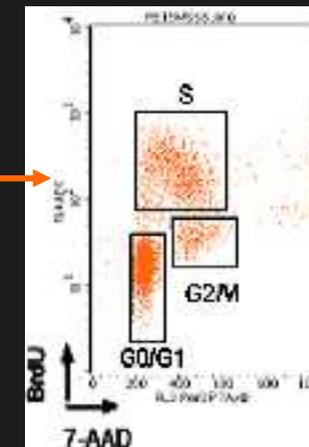
Progéniteurs
myéloïdes



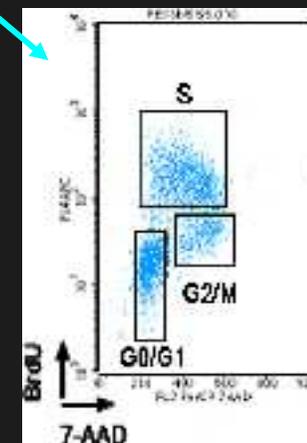
Lin-/Sca-/c-Kit+



Eosinophiles
Neutrophiles
Macrophages
Monocytes

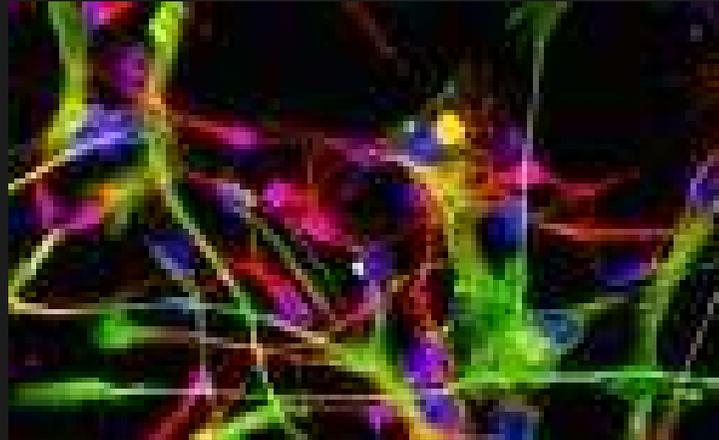


Lymphocytes
T et B



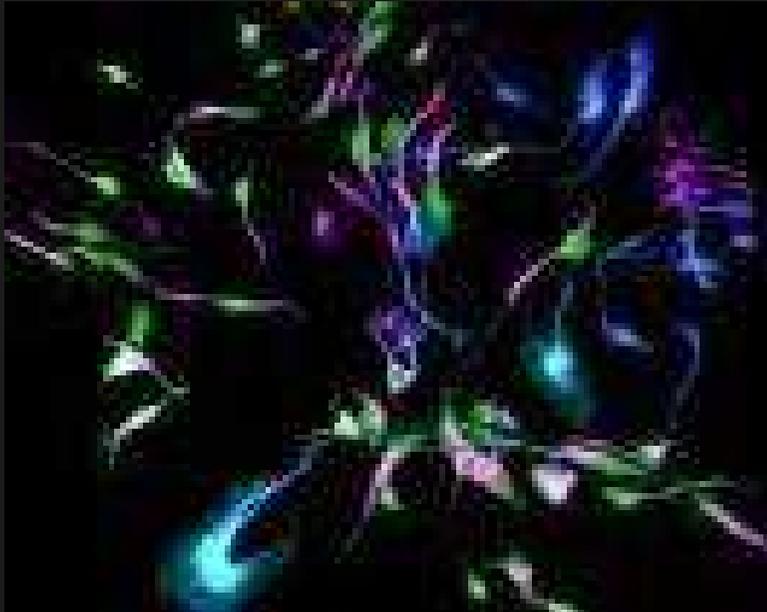
Plaquettes /
Mégacaryocytes
Globules Rouges

Maintenant, c'est à vous....

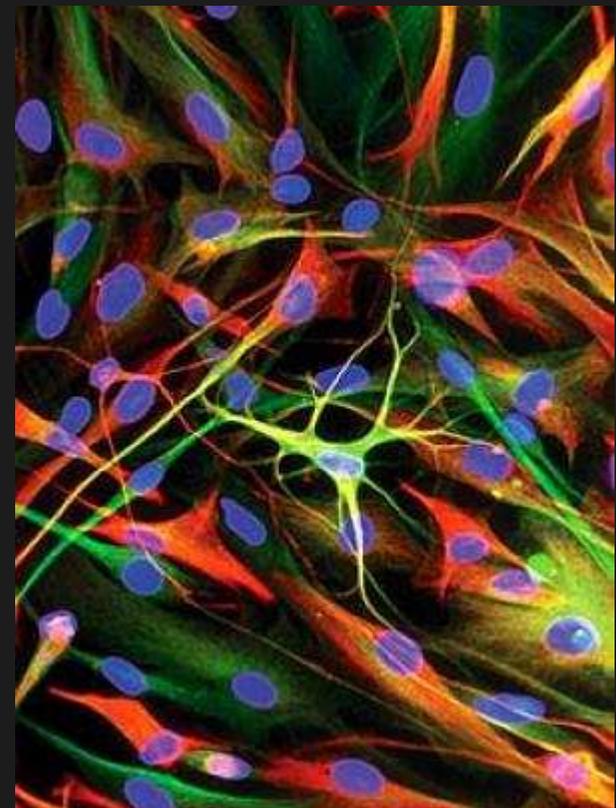


Cellules souches du cerveau responsables de tumeurs

Cellules souches neurales transgéniques



www.princeton.edu/~artofsci/gallery/images/47.jpg



<http://www.sciencedaily.com/images/2004/11/041118111035.jpg>

