

TP cytométrie

Analyses des données du marquage des échantillons de PBMC (témoin et patients)

Objectif du TP : Analyser les sous-populations de lymphocytes T (LT) du sang chez un individu sain (témoin) et deux patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), à partir de données obtenues par cytométrie en flux.

Rappels :

1/ Présentation de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux (aussi appelée FACS pour « *fluorescence activated cell sorting* ») est une technique qui permet de caractériser les éléments d'une suspension de cellules et/ou de particules monodispersées. Les particules ou cellules sont mises en file par un flux de liquide sous pression et entraînées une à une dans une chambre d'analyse où elles sont illuminées par un faisceau laser (figure 1). En plus des propriétés physiques des cellules ou particules (taille et granulosité cellulaire), la cytométrie en flux permet d'analyser la fluorescence émise par ces éléments. Il est actuellement possible d'analyser simultanément et quantitativement jusqu'à 18 paramètres sur chaque cellule ou particule. Un cytomètre en flux peut analyser plusieurs milliers d'évènements par seconde, ce qui permet de réaliser des études sur des populations cellulaires rares et d'obtenir des données statistiquement représentatives. Certains analyseurs trieurs permettent de séparer physiquement les éléments analysés en fonction de paramètres choisis et d'isoler les populations d'intérêts pour des expériences ultérieures.

Le principe général de la méthode est schématisé sur la figure 1. La suspension cellulaire est aspirée, puis injectée au centre d'une gaine liquide qui génère un flux laminaire. Ce flux aligne les cellules et les entraîne de manière à les faire passer une à une devant les faisceaux d'un ou plusieurs lasers, dont l'un émet une lumière de 488 nm.

La lumière réémise par les cellules est analysée selon deux critères :

- **Les propriétés physiques de la cellule** : la lumière à 488 nm diffusée dans l'axe (Forward Scatter, FSC) renseigne sur la taille relative de la cellule, tandis que la lumière à 488 nm diffusée à 90° (Side Scatter, SSC), renseigne sur leur granulosité.
- **L'association à des fluorochromes**. Toutes les fluorescences réémises sont filtrées à l'aide de miroirs dichroïques et de filtres passe-bande, pour les diriger vers des détecteurs photomultiplicateurs spécifiques, qui les convertissent en signal électrique.

Ces signaux sont ensuite traités informatiquement pour permettre une mise en forme des résultats. A chaque cellule/événement seront associées les mesures pour les différents paramètres analysés.

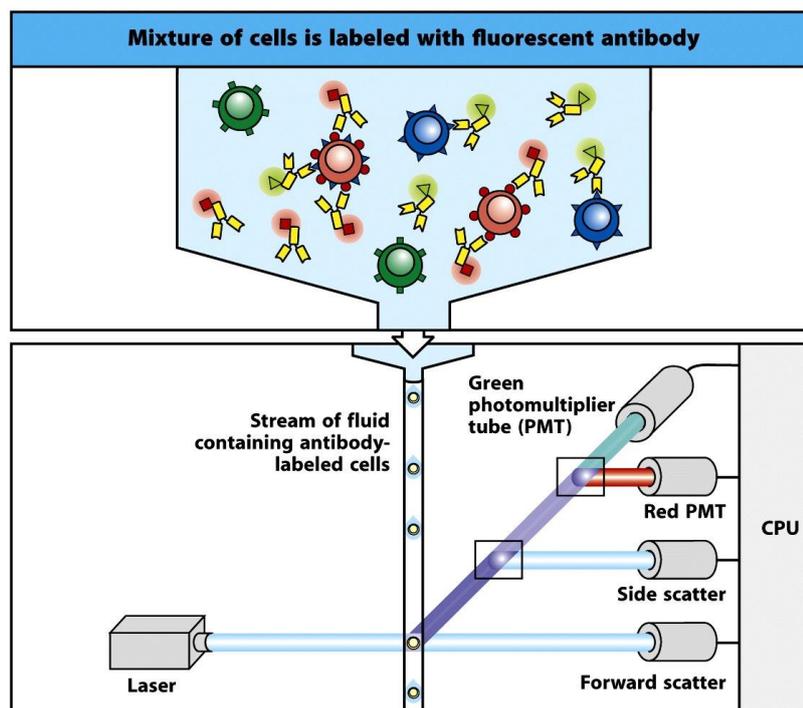


Figure A-26 part 1 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Figure 1 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre analyseur.

2/ Application de la cytométrie en flux à l'analyse de l'évolution clinique chez des patients infectés par le VIH (identification et numération des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ et étude de leur état d'activation en fonction de l'expression de CD45RO)

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie transmissible causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce virus infecte les LT CD4⁺, ce qui conduit à l'élimination progressive de ces cellules. Le stade SIDA est caractérisé par l'apparition chez les patients, d'infections opportunistes, des infections usuellement contrôlées par un sujet dont le système immunitaire est fonctionnel. En absence de traitement, le stade SIDA est généralement atteint 10 à 15 années après la primo-infection. Il se caractérise notamment par une concentration de LT CD4⁺ inférieure à 200 cellules / mm³ dans le sang circulant (voir figure 2 et tableau 1).

Tableau 1 : Valeurs indicatives des concentrations de LT CD4⁺ circulants chez le patient porteur du VIH selon le stade clinique

Stade	Valeurs moyennes (cellules / mm ³)
Asymptomatique	> 430
Intermédiaire	200 à 430
SIDA	< 200

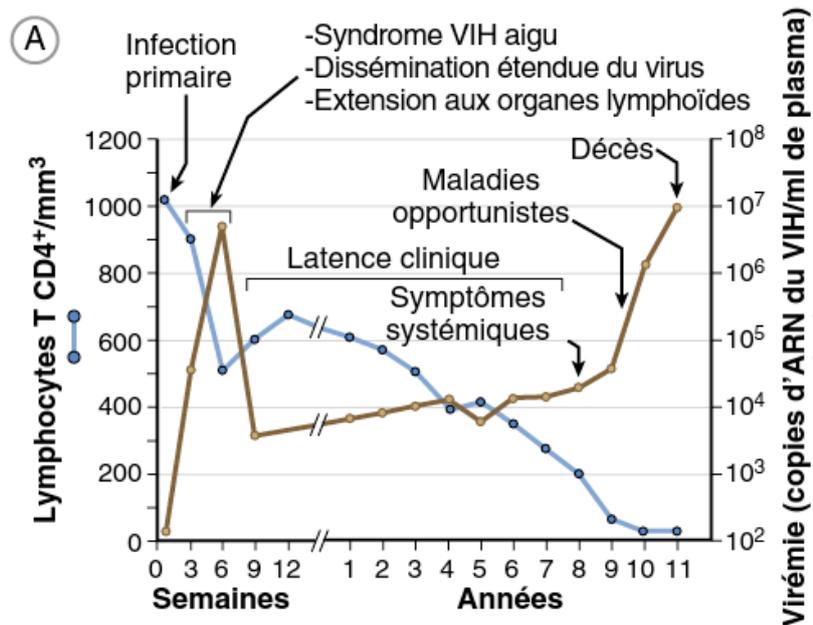


Figure 2 : Évolution clinique de l'infection par le VIH. Suite à l'infection, une virémie plasmatique élevée est détectable précocement, parfois accompagnée de symptômes pseudo-grippaux. Le virus se dissémine dans les organes lymphoïdes, mais la virémie plasmatique devient très faible à la suite de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Cependant, le virus n'est pas éliminé complètement il reste actif mais contrôlé. Durant cette phase de latence clinique (plusieurs années), le nombre de LT CD4⁺ diminue constamment. Au fur et à mesure que le nombre de LT CD4⁺ diminue, le risque d'infections et d'autres manifestations cliniques du sida augmente (*issu de l'ouvrage : Les bases de l'Immunologie fondamentale et clinique, Abbas et Lichtman ; figure initiale de Pantaleo G, Graziosi C et Fauci A. N Engl J Med 1993 ; 328 : 327–335*).

La cytométrie en flux est utilisée en clinique pour l'analyse quantitative des LT CD4⁺ dans le sang des patients porteurs du VIH. Pour cela, les cellules sanguines sont marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de marqueurs (protéines) membranaires exprimés spécifiquement par les populations lymphocytaires T, notamment CD3, CD4 et CD8. Dans le cas présent, un prélèvement de sang a été réalisé chez un sujet sain et deux patients ; leurs leucocytes mononucléés, **PBMC** (pour *peripheral blood mononuclear cells*), comprenant principalement des monocytes et lymphocytes, ont été isolés par centrifugation sur un gradient de Ficoll® (densité 1,085 g/ml). Les PBMC ont ensuite été marqués par incubation avec une préparations de 4 anticorps (tableau 2). Ensuite les cellules ont été fixées puis passées au cytomètre. Les résultats ont été enregistrés dans les **fichiers nommés Témoin 1, Patient 1, et Patient 2**. Vous allez analyser ces données à l'aide du logiciel Flowing afin de déterminer le stade de l'infection chez les patients.

Tableau 2 : Anticorps utilisés dans l'expérience

Spécificité de l'anticorps	Fluorochrome	Population cellulaire marquée
CD3	PerCP-Cy5-5	Lymphocytes T
CD4	Alexa Fluor 700	Lymphocytes T CD4 ⁺
CD8	APC-Cy7	Lymphocytes T CD8 ⁺
CD45RO	BD Horizon PE CF594	Lymphocytes T activés

La concentration des cellules sanguines mononucléées du sang de chaque patient a été calculée lors d'un examen de numération formule sanguine (NFS) et elle est reportée dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Numération des cellules sanguines mononucléées (PBMC) chez les sujets étudiés

Sujet	Concentration (cellules / mm ³)
Témoin 1	6220
Patient 1	3280
Patient 2	6057

Tableau 4 : Valeurs usuelles des concentrations de LT circulants chez les sujets sains

Population	Valeurs usuelles (cellules/ mm ³)
Lymphocytes T	1000 à 4000
Lymphocytes T CD4 ⁺	800 à 3000
Lymphocytes T CD8 ⁺	400 à 1600
Rapport LT CD4 ⁺ /LT CD8 ⁺	1 à 2,3

3/Analyse des données obtenues pour le témoin (23 étapes)

Utiliser la [Session Windows](#) !

- 1) Télécharger le logiciel : **Flowing software** → choisir "install".
<http://flowingsoftware.btk.fi/index.php?page=1>
- 2) **Téléchargez les fichiers** pour l'analyse. Ils se trouvent dans eCampus → télécharger les trois fichiers **dans le même dossier** (automatiquement dans « telechargements »).
- 3) Décompressé le dossier. Gardez le dossier décompressé et éliminez le dossier compressé.

Analyse des cellules, PBMC

- 4) Ouvrir Flowing software. Sélectionner **Create** → **visualization tool** → **density plot** (representation SSC, FCS).
- 5) Aller dans **File** (menu du bas) → **Open FCS** → sélectionner le dossier contenant les données à analyser, puis le fichier « **témoin** ». Le *density plot* doit afficher **SSC-A vs. FSC-A**, le nom du fichier analysé est indiqué en haut (figure 3).
- 6) **Clic droit** sur le density plot → **create new region** → dessiner avec le curseur un périmètre (région d'intérêt ou *gate*) entourant le nuage de points représentant les cellules analysées (un clic dans chaque sommet). La population d'évènements collée à l'axe inférieur à gauche est considérée comme de débris cellulaires (reste d'hématies lysés, ...). (Figure 3)
- 7) Au niveau de la fenêtre « **Populations** » qui est à droite de l'écran → sélectionner « **R-1** » et le **renommer** en **PBMC**. (Figure 3)
- 8) **Clic droit** sur fenêtre du *density plot* → **statistics**. Ne garder que « *Events* » et « *% total* ». Pour cela, clic sur le rectangle de *statistics* et décocher une par une les options indésirées (Mean, GeoMean, etc). (Figure 3)

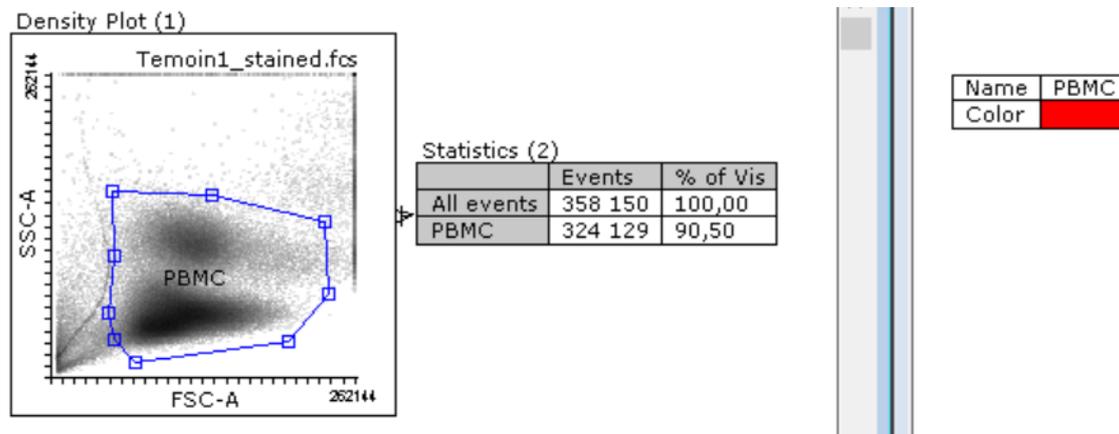


Figure 3 : *Density plot* SSC-A vs. FSC-A pour l'échantillon Temoin1. La région tracée en bleu entoure les deux grandes populations cellulaires attendues et exclut le débris cellulaire.

Lymphocytes CD3+

- 9) Créer un autre *density plot* (voir point 3). Il sera vide.
- 10) Sélectionner le premier *density plot* que vous avez créé (*density plot 1*). **Clic gauche** sur le **trait rouge** qui apparaît en dessous du carré et **l'entraîner avec le curseur** jusqu'au *density plot 2* qui est vide.
- 11) Pour obtenir la **représentation SSC-A vs. CD3** → **clic sur l'axe** des abscisses du *density plot 2* et sélectionner **CD3** au lieu de FSC.
- 12) **Clic droit** sur le *density plot 2* → **show population** → sélectionner **PBMC** (cellules mononuclées).
- 13) **Create new region** (point 5) **pour les Lymphocytes CD3+**. (Attention à n'inclure que des lymphocytes et parmi eux les CD3+). **Renommer** la population **R-2** en **CD3** (voir point 6) et générer les **statistiques** correspondantes (point 7).
- 14) Dans la fenêtre « Populations » à droite sélectionner **PBMC**, tirer le **trait rouge** vers « CD3+ » et choisir « **AND** ».

Parmi les PBMC quel est le pourcentage de lymphocytes CD3+ ? Information à reporter dans le compte rendu, point 8.

Lymphocytes T CD4+ et CD8+

- 15) Dans un troisième *density plot* (*density plot 3*) représenter les paramètres **CD4 vs. CD8** avec visualisation limitée à la population PBMC AND CD3 (points 10 à 12) :
Clic droit sur le *density plot 3* → **show quadrant**
Dans quels quadrants ici attendez-vous de cellules ? Répondez à la question 5 du compte rendu.
- 16) Générer les **statistiques** correspondantes (point 8).
- 17) **Create a new region** pour la population cellulaire CD4+ (point 6). Attention il faut déborder au-delà de l'axe du graphe. **Renommer** la population en CD3+CD4+ (voir point 7).

Parmi les lymphocytes CD3+ quel est le pourcentage de lymphocytes CD4+ (CD3+CD4+) et de lymphocytes CD8+ (CD3+CD8+) ? Information à reporter dans les questions 6 et 8 du compte rendu.

- 18) Sauvegarder l'analyse (**File** du menu plus haut ! → **Save as portable**) dans le même dossier que les fichiers de données.

Lymphocytes T CD4+ CD45RO+

- 19) Sélectionner **Create** → **visualization tool** → **histogramme** (représentation Nb cellules en fonction de la fluorescence).
- 20) Visualiser la population **PBMC and CD3+ and CD4+** (voir point 14). Analyser l'expression du marqueur **CD45RO**. Puis **clic droit** sur l'histogramme → **create new region** → dessiner un intervalle sur la population CD45RO positive. Obtenir les **statistiques** comme précédemment, laisser la **colonne Mean** qui informe la moyenne de fluorescence des cellules marquées par l'anticorps anti-CD45RO (couplée au cytochrome PE-CF594).

Parmi les lymphocytes CD3+CD4+ quel est :

- *Le pourcentage de lymphocytes CD45RO+ ?*
- *L'intensité moyenne de fluorescence du marquage de CD45RO dans cette population positive ? Informations à reporter dans le compte rendu, question 11.*

- 21) Sauvegarder l'analyse (**File** du menu plus haut ! → **Save**)
- 22) Faites **une prise d'écran** avec l'intégralité des graphiques et statistiques et avec la colonne des populations créées.
- 23) **Dans un nouveau fichier**, répéter la même analyse pour les Patient 1 et 2.
Informations à reporter dans le compte rendu.

Pour téléchargement logiciel et une vidéo tutorial du logiciel flowing :

<http://flowingsoftware.btk.fi/index.php?page=1>