

# Cytométrie et suivi des populations de cellules immunitaires

D'après [http://accs.ens-lyon.fr/accs/ressources/immunité-et-vaccination/enseigner/ressources-logicielles/logiciel-cytometrie/index\\_html#flu](http://accs.ens-lyon.fr/accs/ressources/immunité-et-vaccination/enseigner/ressources-logicielles/logiciel-cytometrie/index_html#flu)

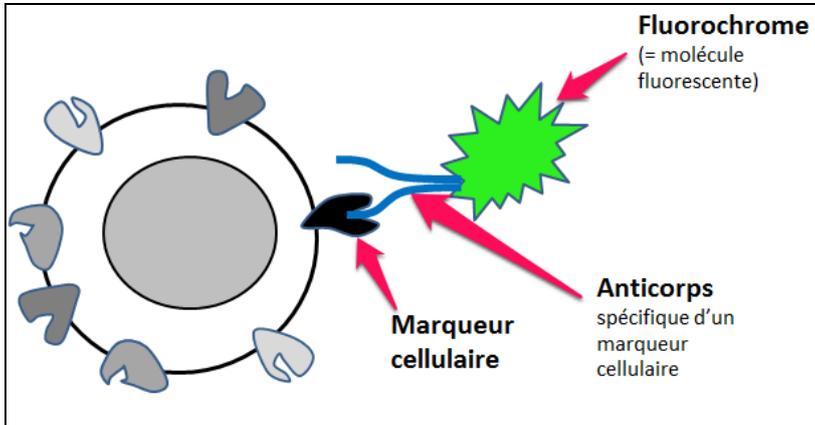
## 1. LES BASES DE LA CYTOMÉTRIE

### • Le principe

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative, de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser.

**En immunologie, la cytométrie en flux est une technique incontournable d'analyse phénotypique de populations cellulaires.**

### • Ce que la cytométrie mesure ...



Protocole d'utilisation d'un fluorochrome en vue de repérer la présence d'un marqueur membranaire en surface d'une cellule

- La **taille** et la **granularité** sont des paramètres mesurables en permanence.

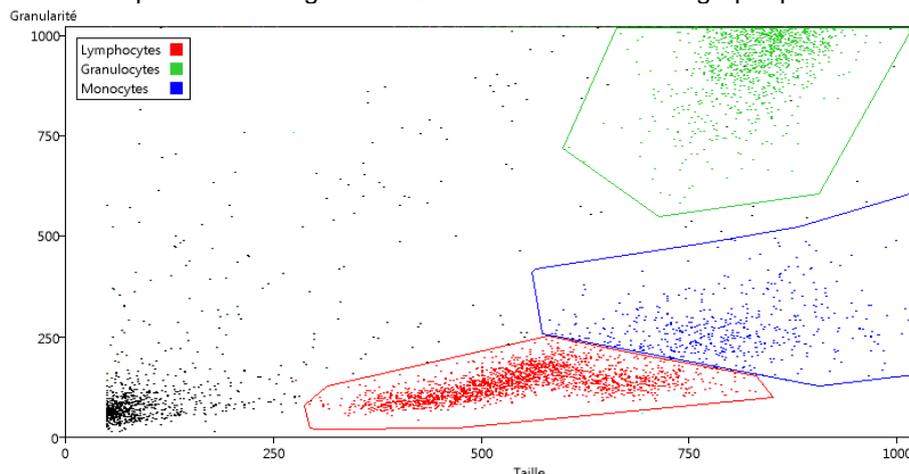
- De nombreux marqueurs (CD = clusters de différenciation) permettent de spécifier les différents types cellulaires. Pour les mettre en évidence, on utilise des anticorps anti-CD associés à une molécule fluorescente (fluorochrome). Il s'agit alors de mesurer la **fluorescence** des cellules.

## 2. LE LOGICIEL CYTOMETRIE

### • Prise en main avec des données morphologiques (taille et granularité)

- Faire **Fichier/Ouvrir** puis choisir le fichier **SuiviSida.fcs**. Le fichier se charge et le graphique par défaut s'ouvre automatiquement. La première série de données concerne un individu sain. Le graphique représente la taille des cellules « en fonction de » leur granularité (qui correspond plus ou moins à leur complexité). **Chaque point représente une ou plusieurs cellules ayant les mêmes caractéristiques** suivant ces deux paramètres. En bas à gauche se trouvent les débris cellulaires et les hématies qui n'ont pas été éliminées. Ensuite viennent des **petites cellules non granuleuses**, qui sont les **lymphocytes**, puis des **cellules plus grosses et un peu plus granuleuses** (les **monocytes**) et enfin vers le haut à droite de **grosses cellules granuleuses** qui doivent correspondre aux **granulocytes**.

- Pour délimiter ces groupes sur le graphique, il faut utiliser le menu **Catégorie/Délimiter** sur le graphique (dans la fenêtre du graphique). Cliquer sur les angles du polygone de délimitation. **Terminer** en cliquant avec le **bouton droit** de la souris. Le polygone est alors fermé et le nom de la catégorie est demandé. Dès que l'on a délimité une catégorie, l'affichage des couleurs correspond aux catégories délimitées et on obtient le graphique suivant :



Un isolement informatique des sous-populations (menu « **restreindre à la catégorie** ») peut se faire afin de permettre une étude plus spécifique de chacune d'elles.

### • Utilisation des données de fluorescence

On admettra que **seule une fluorescence supérieure à 10 est significative de la présence du marqueur recherché.**

La quantité de lumière émise par les fluorochromes associés aux anticorps donne une mesure de la quantité de molécule-cible (marqueur CD) présente à la surface des cellules.

Par exemple :

- Le marqueur CD3 est caractéristique des lymphocytes T. Pour repérer les lymphocytes T sur un échantillon, on peut demander « CD3 » comme paramètre 1 et « Histogramme » comme paramètre 2. On obtiendra l'histogramme du nombre de cellules en fonction de leur quantité de CD3.

- Parmi les lymphocytes T, il existe deux sous-populations : les LTCD4, qui possèdent le marqueur CD4, et les LTCD8, qui possèdent le marqueur CD8. **Pour repérer la sous-population souhaitée, bien réfléchir au paramétrage approprié.**