

stage de formation
5 & 6 février 2015

atelier n° 5

La cytométrie en flux

Chloé Journo
Florence Lormières
Jean-François Madre

contact ✉ nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr
informations et ressources ✉ <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>

immunité
vaccination



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la
[Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale -
Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

La cytométrie en flux

Chloé Journo, ENS Lyon
Florence Lormières, ENS Lyon
Jean-François Madre, ENS Lyon IFÉ

2015-01-14

Résumé

Présentation de la technique de cytométrie en flux et de l'utilisation d'un logiciel pédagogique permettant d'exploiter les résultats à partir des fichiers fournis par les appareils (format standard .fcs).

Table des matières

Introduction à la technique de cytométrie en flux	1
Présentation du logiciel Cytométrie et de ses applications en immunologie	4
Identification et numération des leucocytes du sang	4
Evolution des population leucocytaires chez les patients atteints de SIDA	8
Suivi de la réponse immunitaire adaptative à l'infection par le virus de la grippe (données fournies par Katia Mayol).	11

Introduction à la technique de cytométrie en flux

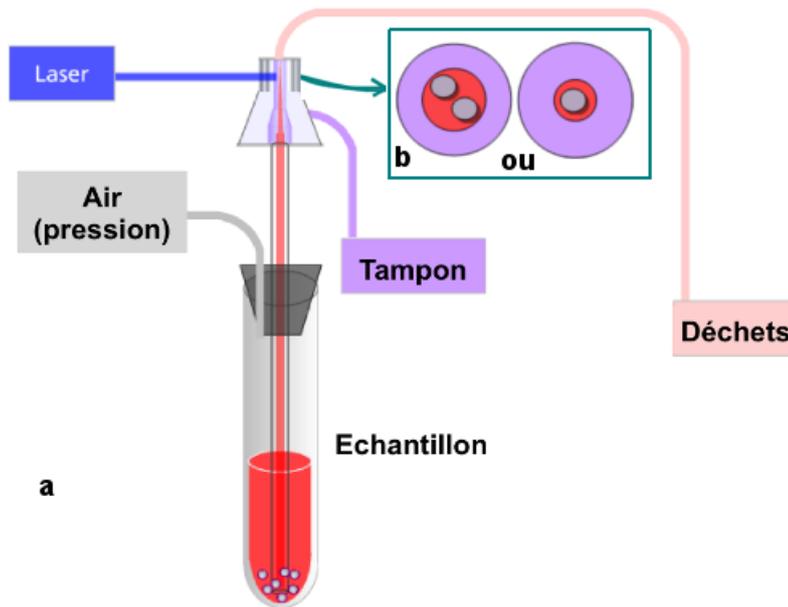
La cytométrie en flux ou FACS (fluorescence-assisted cell sorting) est une technique d'analyse de phénotype cellulaire assistée par ordinateur.

Figure 1. un cytomètre de flux : exemple de l'appareil FACSCalibur



Chaque cellule présente dans un échantillon donné (cellules isolées et mises en suspension) est analysée individuellement : la puissance de cette technique réside donc dans la possibilité d'analyser un grand nombre de cellules en un temps relativement court, conférant à la technique une robustesse statistique intéressante.

Figure 2. La circulation des fluides dans l'appareil et le trajet de la lumière.



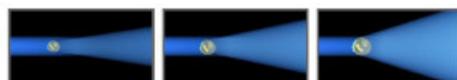
a - L'échantillon contenant la suspension cellulaire à analyser est fixé hermétiquement à une tige creuse sur l'appareil. De l'air est injecté dans le tube, forçant l'échantillon à remonter dans la tige. La colonne d'échantillon est alors gainée par une colonne de liquide tampon. L'échantillon passe ainsi dans la chambre de lecture où il est excité par un faisceau laser. Le gainage par le tampon (b - schéma en coupe transversale de la colonne d'échantillon) permet de forcer les cellules (en gris) à passer une par une dans la chambre de lecture (à gauche, diamètre de la colonne d'échantillon trop important, à droite, diamètre correct).

La cytométrie en flux permet d'analyser deux types de paramètres :

- les paramètres morphologiques, taille et granularité ;
- les paramètres de fluorescence, liés à l'utilisation de marqueurs fluorescents. Cette technique est en particulier utilisée pour analyser par immunodétection l'expression de marqueurs de surface caractéristiques de populations leucocytaires.

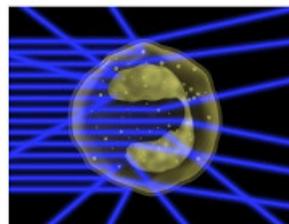
Figure 3. Analyse des paramètres morphologiques : taille et granularité.

➤ **Taille**



FSC
forward scatter

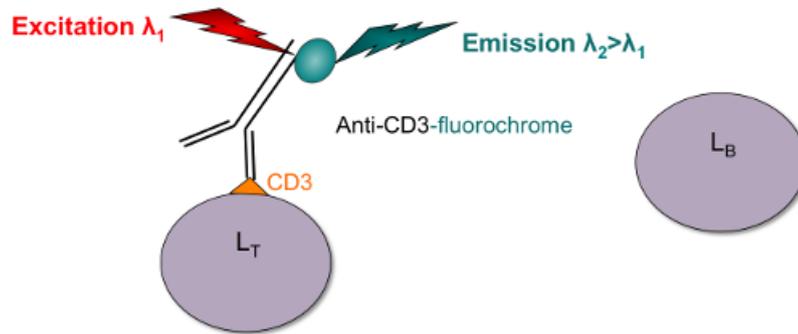
➤ **Granularité**



SSC
side scatter

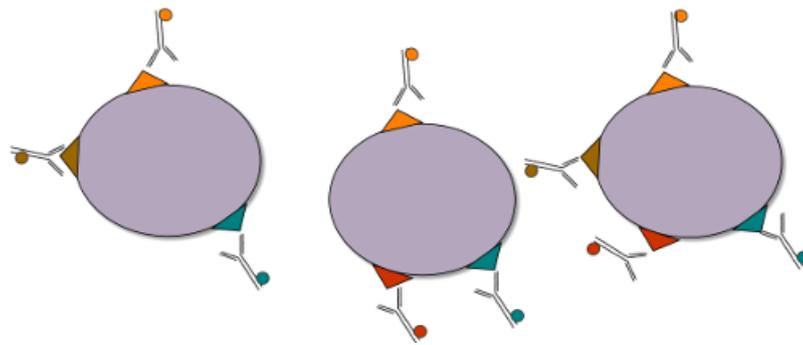
La diffusion frontale du faisceau incident (forward scatter, FSC) indique la taille des cellules, la diffusion latérale (side scatter, SSC) indique la granularité.

Figure 4. Analyse des paramètres de fluorescence : expression de marqueurs de surface.



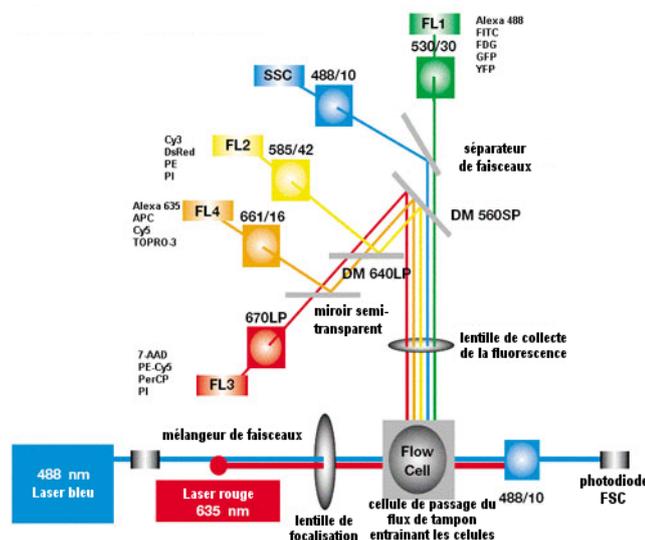
Dans cet exemple, on cherche à identifier les lymphocytes T parmi une population de lymphocytes B et T. Les LT expriment le marqueur de surface CD3, et les LB ne l'expriment pas. On utilise donc des anticorps anti-CD3 couplés à un fluorochrome pour marquer en fluorescence la population de LT de façon spécifique.

Figure 5. Analyse multiparamétrique.



En combinant différents anticorps couplés à des fluorochromes distincts, on peut analyser simultanément un grand nombre de paramètres (expression de différents marqueurs de surface par exemple). Le nombre de paramètres analysables dépend du cytomètre utilisé, les plus performants analysant jusqu'à 19 paramètres simultanément.

Figure 6. Système optique du FACSCalibur.



Ce diagramme indique les deux lasers et les différents détecteurs (FSC, SSC, FL1 à 4) présents dans le cytomètre et autorisant une analyse multiparamétrique. Les filtres optiques utilisés sont également figurés. Les fluorochromes détectables sont indiqués à côté de chaque détecteur de fluorescence.

Présentation du logiciel Cytométrie et de ses applications en immunologie

Logiciel libre et gratuit : adresse de téléchargement et notice complète : <http://accs.ens-lyon.fr/accs/logiciels/cytometrie/le-logiciel-cytometrie>

Le logiciel Cytométrie permet de traiter des données de cytométrie en flux.¹ Orienté vers une utilisation pédagogique simplifiée, ce logiciel n'a pas la prétention de remplacer les logiciels professionnels. Il a été développé par Jean-François Madre dans le cadre de l'IFÉ (Institut Français de l'Éducation – ENS-Lyon) avec l'aide de Chloé Journo et Katia Mayol.

Dans l'enseignement secondaire, son utilisation principale concerne l'immunologie. Il permet de se familiariser avec les marqueurs de surface utilisables en complément de la microscopie pour distinguer les différentes populations de cellules immunitaires.

Trois exemples vont être présentés :

- identification et numération des leucocytes du sang,
- évolution des population leucocytaires chez les patients atteints de SIDA
- suivi de la réponse immunitaire adaptative à l'infection par le virus de la grippe.

Identification et numération des leucocytes du sang

Identification d'après la taille et la granularité

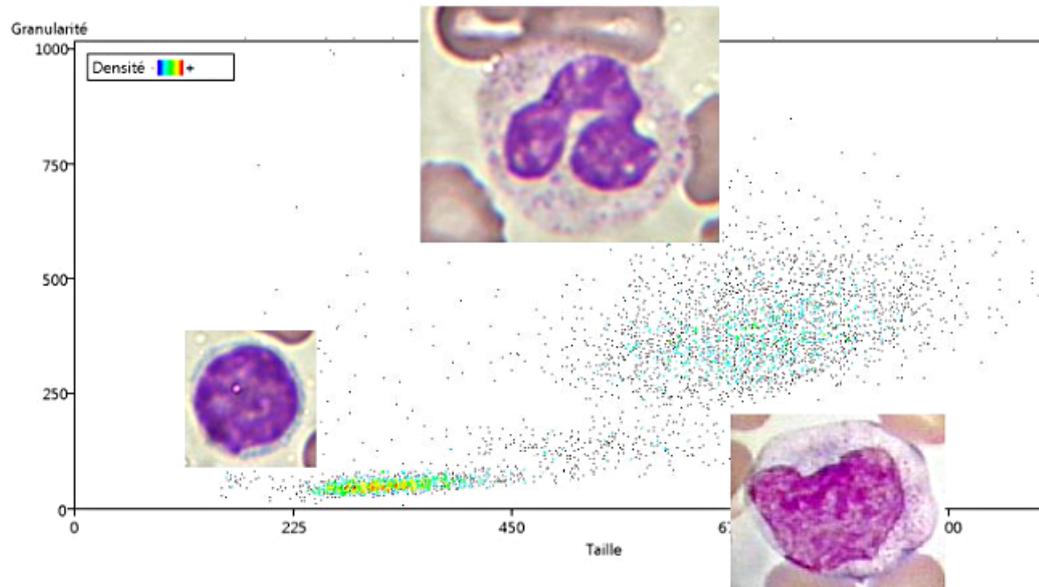
D'après l'observation microscopique d'un frottis sanguin :

- les lymphocytes sont de petite taille, voisine de celle des hématies, et peu granuleux ;
- les granulocytes sont de grande taille et ont un cytoplasme granuleux ;
- les monocytes sont assez gros et assez peu granuleux.

Lancer le logiciel Cytométrie et ouvrir le fichier *sang.fcs*.

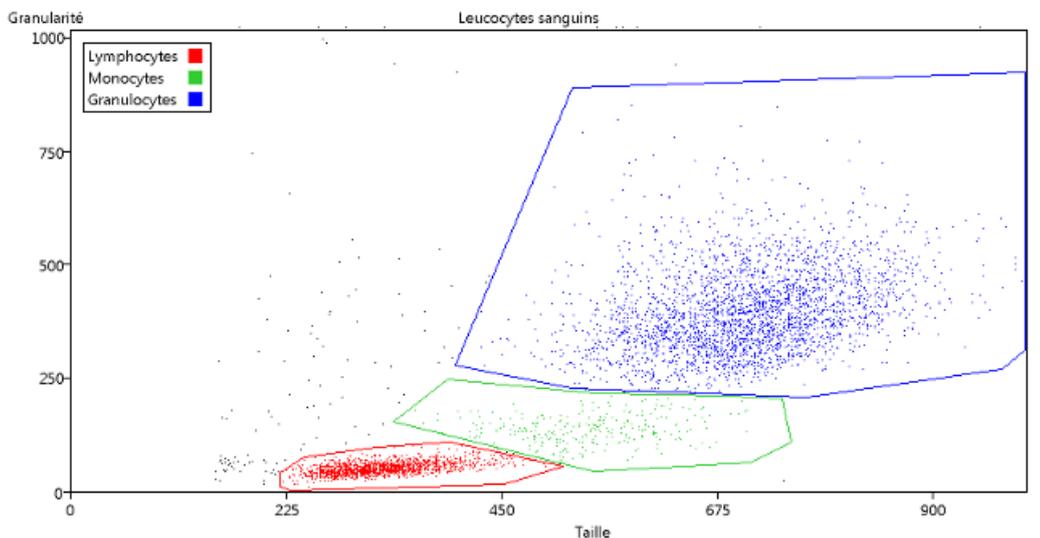
¹Le logiciel lit les données de cytométrie aux formats FCS2.0 et FCS3.0

Figure 7. Taille et granularité des Leucocytes sanguins.



Le logiciel affiche le graphique en nuage de points (« dot plot ») de la granularité des cellules (mesure SSC – side scatter du cytomètre) en fonction de leur taille (mesure FSC – forward scatter). Chaque point correspond à une cellule². Les échelles sont en unités arbitraires. On repère ainsi les trois populations de leucocytes.

Figure 8. Repérage de différents types de leucocytes.



Pour délimiter ces catégories sur le graphique, il faut utiliser le menu *Catégories / Délimiter ...* (menu de la fenêtre du graphique).

- Il faut alors faire un clic gauche sur chaque angle du polygone entourant le nuage de points à délimiter. Pour terminer (et fermer le polygone), cliquer sur le bouton droit de la souris.

- La fenêtre des catégories qui s'ouvre demande le nom de la catégorie délimitée. Taper le nom puis cliquer sur OK pour valider.

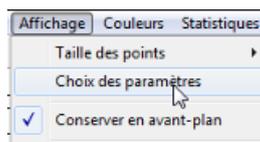
²Chaque point correspond à un « événement » détecté, dans la plupart des cas, il s'agit d'une cellule.

- Recommencer l'opération pour chaque catégorie.

Pour **dénombrer les différentes populations leucocytaires** ainsi définies, utiliser le menu *Statistiques*. En faisant défiler les données dans la fenêtre statistiques, on peut vérifier que les proportions de lymphocytes, granulocytes et monocytes sont à peu près les mêmes dans les trois jeux de données.

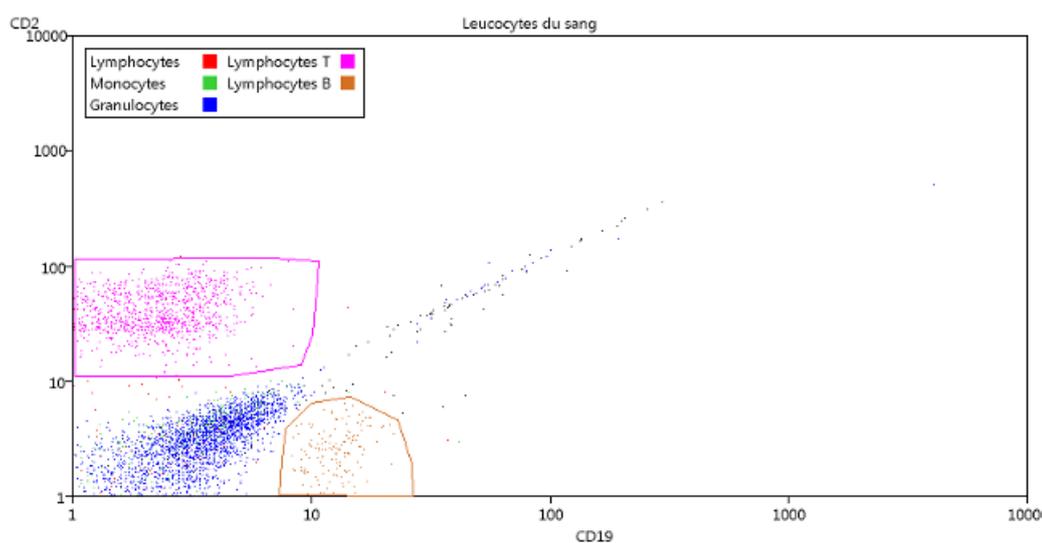
Identification des lymphocytes B et T par les marqueurs de surface CD19 et CD2

Les lymphocytes B expriment spécifiquement le marqueur CD19 et les lymphocytes T le marqueur CD2. Ce sont les marqueurs détectés dans le premier jeu de données.



Cliquer sur *Affichage / Choix des paramètres* et choisir CD19 comme paramètre 1 et CD2 comme paramètre 2. Le graphique s'affiche :

Figure 9. Repérage des lymphocytes B et des lymphocytes T.

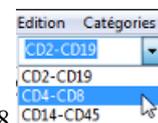


Les populations de lymphocytes B et T ont été délimitées avec l'outil de délimitation des catégories.

Si on clique à nouveau sur le menu *Statistiques*, les nouvelles catégories seront incluses dans les statistiques.

Identification des sous-populations de lymphocytes T par les marqueurs de surface CD4 et CD8

Les lymphocytes exprimant le marqueur CD4 sont pour la plupart des lymphocytes T auxiliaires LTa (ou LTh), tandis que ceux exprimant le marqueur CD8 sont pour la plupart des lymphocytes T cytotoxiques LTc, responsables de la lyse spécifique de cellules infectées ou altérées.

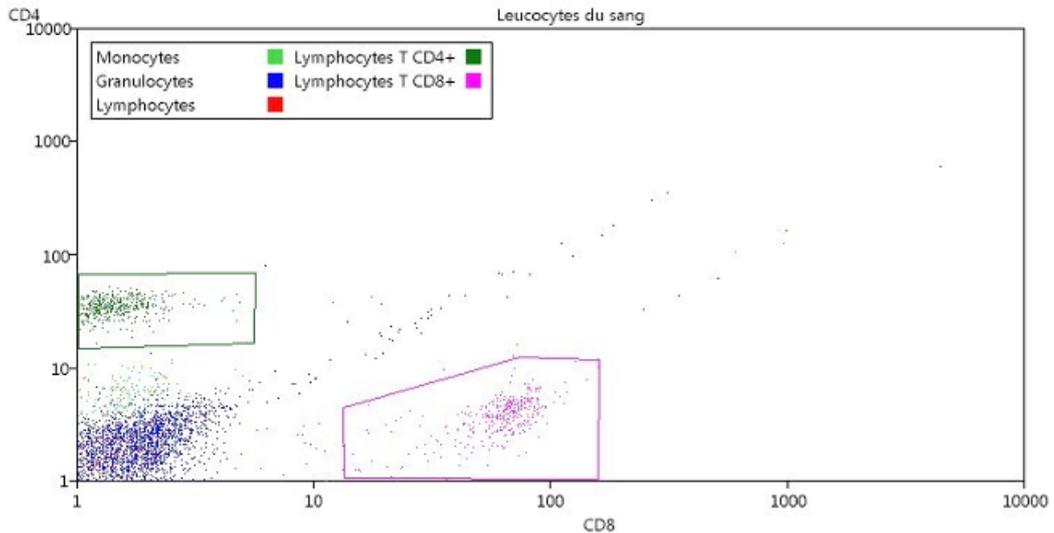


Cliquer sur *Affichage / Choix des paramètres*, puis choisir Données : CD4-CD8

Le graphique en nuage de points de la granularité en fonction de la taille s'affiche. Les trois catégories définies sur le premier graphique (lymphocytes, monocytes, granulocytes) y sont délimitées.

Choisir CD8 comme paramètre 1 et CD4 comme paramètre 2. On repère facilement les deux populations de lymphocytes CD4+ et CD8+ sur ce graphique.

Figure 10. Distinction entre lymphocytes Ta et lymphocytes Tc.



On a délimité les populations de lymphocytes T CD4+ (les LTa) et T CD8+ (les LTc). On remarque également que les monocytes expriment faiblement le marqueur CD4. Ceci explique que les monocytes sont, comme les LT CD4+, des cellules cibles du virus du SIDA.

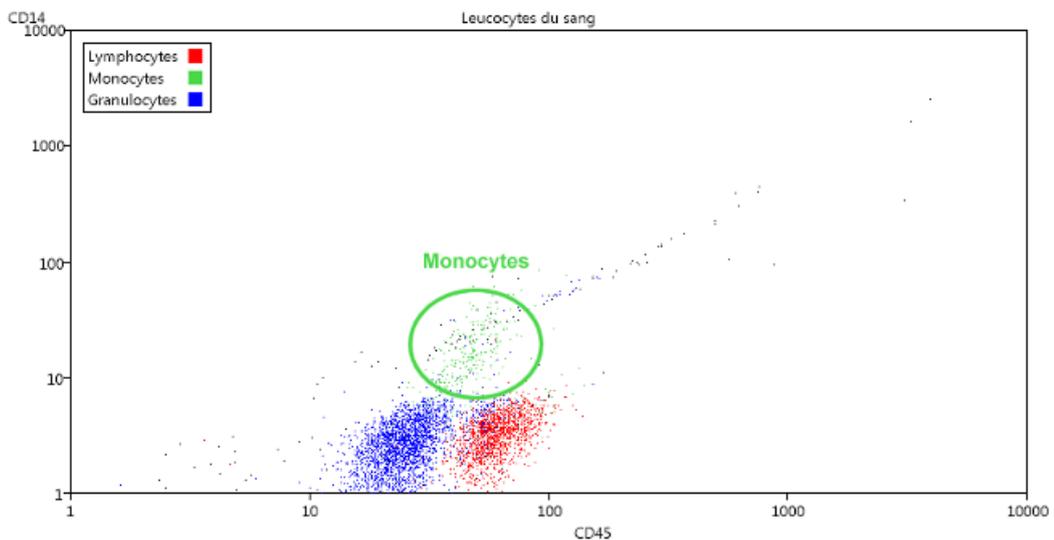
Vérification de la délimitation de la population de monocytes

Les monocytes portent un marqueur spécifique, le CD14. Le troisième jeu de données permet de vérifier que les monocytes ont été bien délimités sur le graphique taille / granularité.

Cliquer sur *Affichage / Choix des paramètres* puis choisir Données : CD14-CD45.

Choisir CD45 comme paramètre 1 et CD14 comme paramètre 2. On repère facilement les monocytes, qui expriment nettement le marqueur CD14.

Figure 11. Repérage des Monocytes.



Les points de couleur verte correspondent à la délimitation des monocytes par leur taille et leur granularité qui a été réalisée sur le premier graphique. On remarque que cette délimitation était correcte.

Evolution des population leucocytaires chez les patients atteints de SIDA

On cherche à comparer l'effectif des populations leucocytaires chez un individu sain et chez un individu atteint de SIDA. On analyse l'expression de trois marqueurs de surface : CD3 (un marqueur commun aux LT et à certaines cellules NK), CD4 et CD8.

Chargement du fichier : SuiviSIDA.fsc

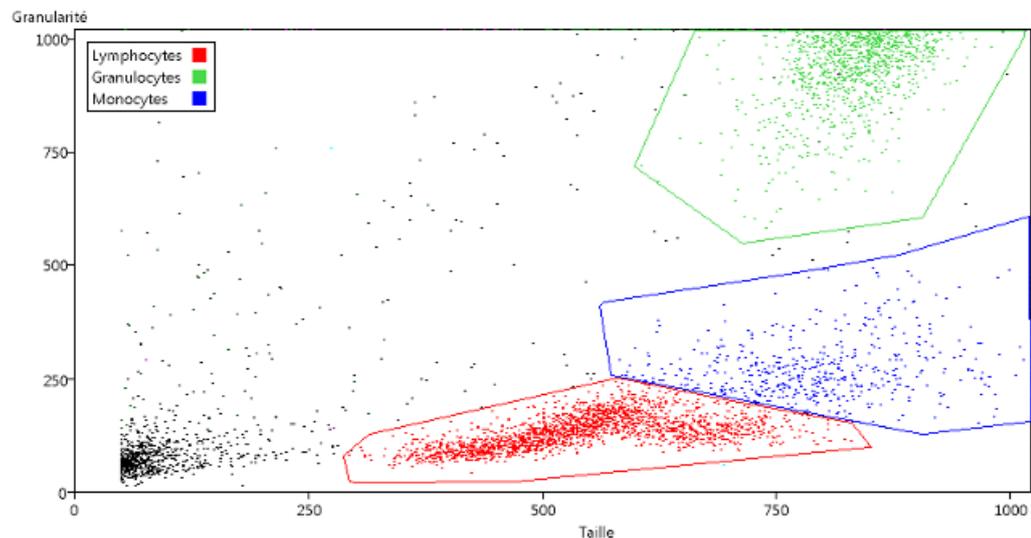
Utiliser le menu *Fichier / Ouvrir* et chercher le fichier dans le répertoire du logiciel.

Un graphique s'ouvre avec la représentation des données taille / granularité du premier cas : cas normal.

Identification des trois populations de leucocytes d'après la taille / granularité (lymphocytes, monocytes, granulocytes) et délimitation des catégories

Procéder comme dans la partie I

Figure 12. Cas normal.

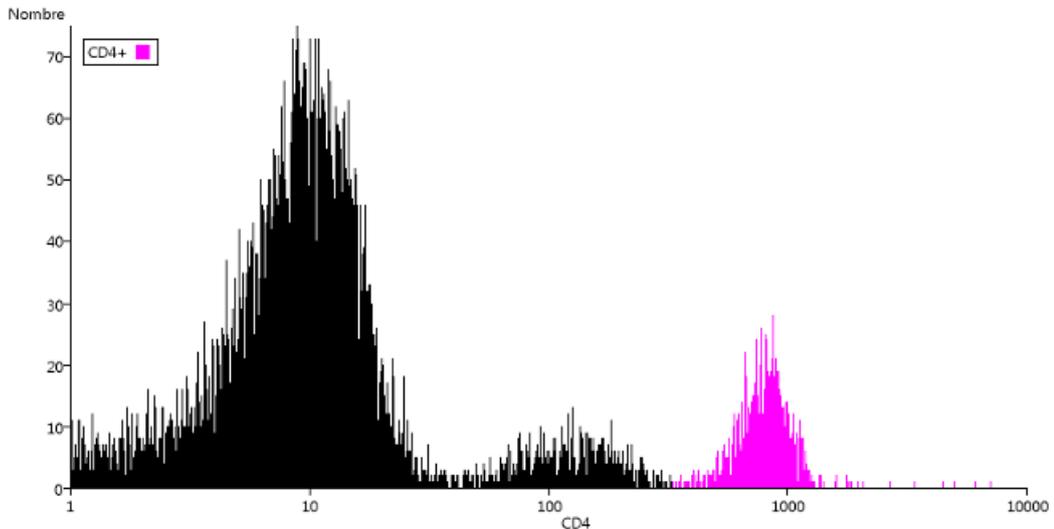


Analyse de l'expression des marqueurs de surface : individu sain

Créer un nouveau graphique (à partir de la fenêtre principale). Choisir le même jeu de données (cas normal).

Sélectionner un seul paramètre, par exemple CD4 (choisir CD4 comme paramètre 1 et histogramme comme paramètre 2).

Figure 13. Histogramme de répartition des cellules suivant leur expression du marqueur CD4.



Délimiter la catégories des cellules CD4+ avec la souris sur l'histogramme.

Si on reprend le graphique taille / granularité (en cliquant dessus, ou s'il n'est plus visible, avec le menu *Graphique / Afficher* de la fenêtre principale), on observe que la catégorie CD4+ a été ajoutée aux légendes et que les points appartenant à cette catégorie ont la couleur correspondante.

Créer un nouveau graphique et y délimiter la catégorie CD8+.

Puis, sur le même graphique, changer de paramètre (utiliser d'abord le menu *Affichage / Choix des paramètres* pour que le choix redevienne visible) et délimiter la catégorie CD3+.

Si on revient au graphique taille / granularité, on observe que les points correspondant aux cellules CD4+ et CD8+ sont masqués par la couleur de la population CD3+ qui a été définie après. Les catégories pouvant se recouper, l'ordre dans lequel elles ont été générées intervient forcément sur la coloration.

On remarque aussi que les couleurs se distinguent mal. On peut en choisir d'autres pour améliorer la lisibilité.

Amélioration de la lisibilité

Pour améliorer l'affichage, on peut modifier les paramètres des catégories (à partir du menu *Catégories / Editer* dans une des fenêtres graphiques).

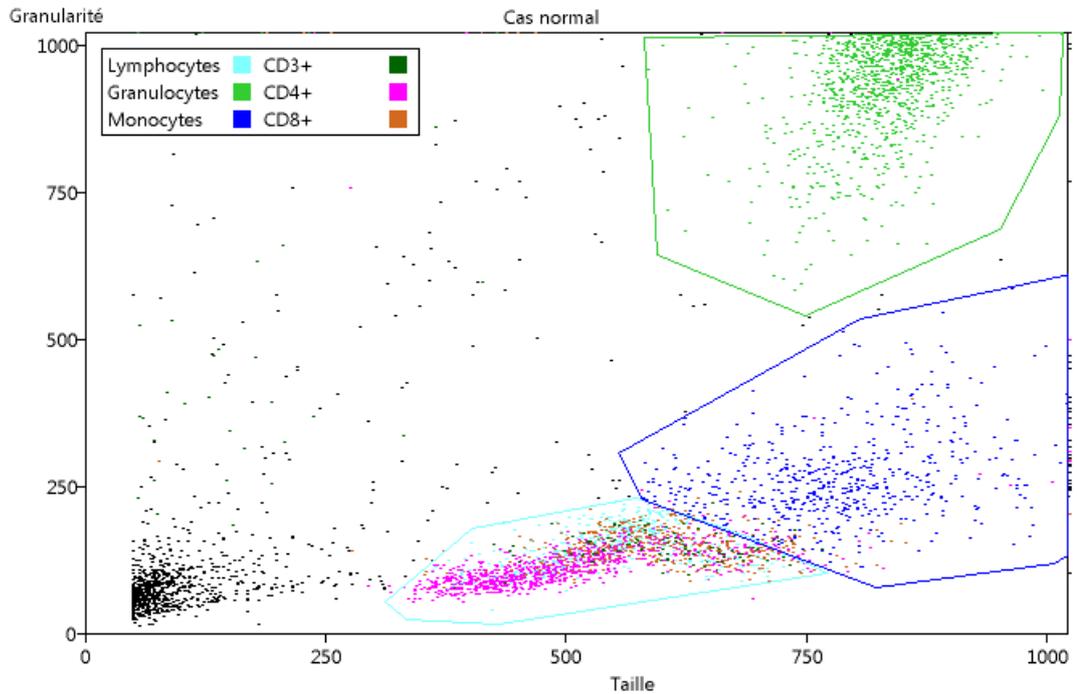
Pour modifier l'ordre d'affichage des catégories, cliquer sur l'étiquette CD3+ et la remonter avec la souris (bouton gauche enfoncé) pour la placer au-dessus de CD4+. Pour améliorer la lisibilité des couleurs, cliquer sur la couleur rouge de la catégories Lymphocytes et choisir un bleu-pâle.

Valider en cliquant sur OK. Le graphique est alors réajusté.

Lorsqu'il n'y a pas beaucoup de cellules comptées, comme ici, on peut aussi grossir la taille des points avec le menu *Affichage / Taille des points / Augmenter*. On peut aussi mettre un titre à partir du menu *Edition / Choisir le titre*.

Comparaison des effectifs des populations leucocytaires chez un individu sain et un individu malade du SIDA

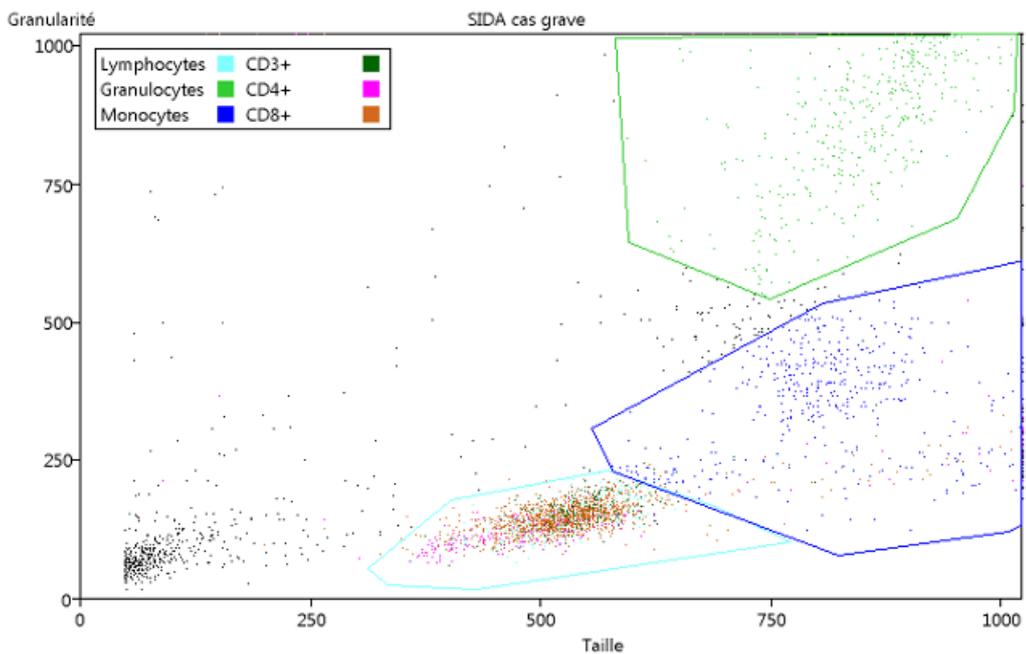
Figure 14. Cas normal légendé.



Revenir à la fenêtre principale. Utiliser le menu *Graphique/Nouveau* et choisir *Cas grave* dans l'onglet Données.

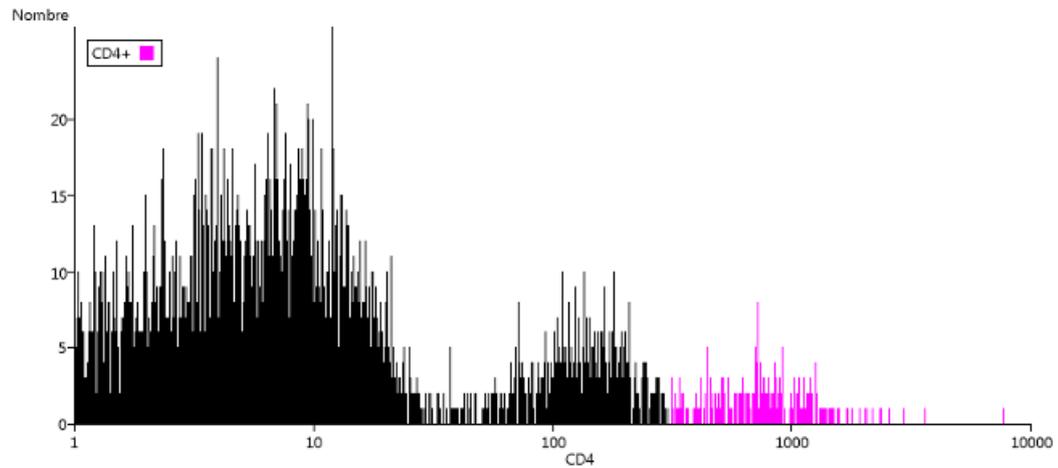
Le graphique en nuage de points Taille/Granularité correspondant s'affiche en utilisant les catégories définies sur le cas normal.

Figure 15. Cas grave légendé.



La comparaison des histogrammes de l'expression du marqueur CD4 est aussi très parlante.

Figure 16. Histogramme du cas grave.



Remarque : Le menu Fichier permet d'ajouter des données. Dans ce cas, les délimitations faites avec le premier fichier sont conservées. Pour que cela fonctionne correctement, il faut que les paramètres utilisés soient les mêmes. Ils doivent provenir de la même source et d'un même ensemble. Il vaut mieux utiliser les fichiers fournis qui comportent souvent plusieurs jeux de données compatibles entre eux.

Les graphiques obtenus peuvent ensuite être copiés et collés dans un traitement de texte (ou un logiciel de dessin). Ils peuvent aussi être enregistrés sous forme d'image ou imprimés (avec la possibilité d'imprimer plusieurs fois le graphique sur la même page en augmentant le nombre de lignes ou de colonnes).

Suivi de la réponse immunitaire adaptative à l'infection par le virus de la grippe (données fournies par Katia Mayol).

Ces données sont issues d'expérimentation chez la souris.

Protocole expérimental.

Ces données sont issues d'expérimentation chez la souris.

L'expérience consiste à infecter des souris avec le virus de la grippe par voie intra-nasale, puis à suivre l'apparition des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus dans différents organes (ganglion lymphatique drainant les poumons, sang, poumons) au cours du temps après infection (jour 0 à jour 9 ou 11).

L'inoculation du virus par voie intra-nasale permet l'infection des poumons. Les cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes professionnelles) de cet organe capturent des antigènes viraux et migrent vers le ganglion drainant les poumons (ganglion médiastinal), où elles présentent des peptides du virus aux lymphocytes. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant ces peptides vont alors proliférer, se différencier et migrer vers le lieu de l'infection, où ils élimineront les cellules infectées.

Les jeux de données sont fournis dans des fichiers qui contiennent les données obtenues aux différents temps post-infection (jour 0 à jour 9 ou 11). Les trois fichiers sont disponibles dans un dossier compressé sur le site ACCES. Pour faciliter le travail des élèves, les événements (cellules débris ou paquets de cellules) qui ne correspondent pas à des lymphocytes, d'après leur taille et leur granularité, ont été retirés des fichiers. Les fichiers complets sont aussi disponibles sur le site ACCESS.

- fichier ganglion_j0_j11_r.fcs : lymphocytes T CD8+ spécifiques du peptide viral NP68 dans le ganglion médiastinal (où les lymphocytes spécifiques prolifèrent) ;
- fichier sang_j0_j11_r.fcs : lymphocytes T CD8+ spécifiques du peptide viral NP68 dans le sang (où ils circulent pour rejoindre l'organe infecté) ;
- fichier poumon_j0_j9_r.fcs : lymphocytes T CD8+ spécifiques du peptide viral NP68 dans les poumons (où les lymphocytes spécifiques vont exercer leur fonction cytotoxique et éliminer les cellules infectées).

L'expression du marqueur de surface CD8 (paramètre CD8) et du TCR spécifique du peptide NP68 (paramètre NP68) à la surface des cellules isolées a été analysée.

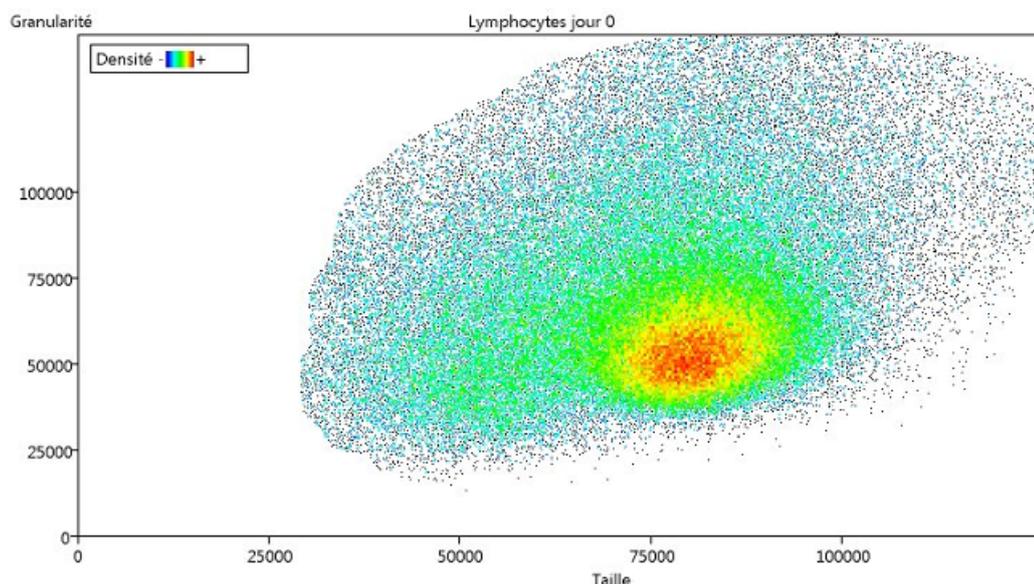
La démarche d'exploitation des données sera expliquée pour le fichier poumon_j0_j9_r.fcs qui a donné les résultats les plus tranchés. Utiliser le menu Fichier / Ouvrir et choisir le fichier poumon_j0_j9_r.fcs.

Patienter jusqu'à ce que les 5 jeux de données soient chargés (Poumon jour 0, Poumon jour 2, Poumon jour 4, Poumon jour 7 et Poumon jour 9). Le nombre de cellules passées au cytomètre est important (entre 110 000 et 400 000 suivant le jeu de données). Le graphique Taille / Granularité s'affiche. Les événements (cellules débris ou paquets de cellules) qui ne correspondent pas à des lymphocytes, d'après leur taille et leur granularité ont été retirés du fichier.

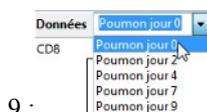
Exploitation des résultats

Le graphique qui s'affiche au départ correspond donc aux cellules ayant des caractéristiques semblable à celles des lymphocytes.

Figure 17. Taille et granularité des lymphocytes prélevés dans les poumons au jour 0.

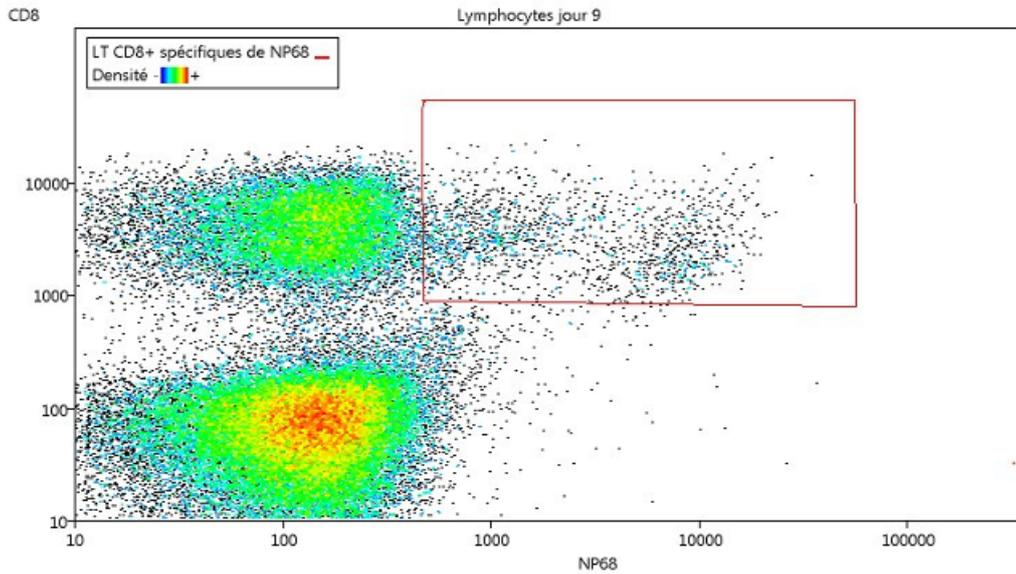


On choisit alors de nouveaux paramètres d'affichage, NP68 et CD8, et on affiche les données du jour



Sur le graphique CD8-NP68 du jour 9, on repère les lymphocytes T CD8+ qui expriment un TCR spécifique du peptide NP68 et on délimite la catégorie correspondante.

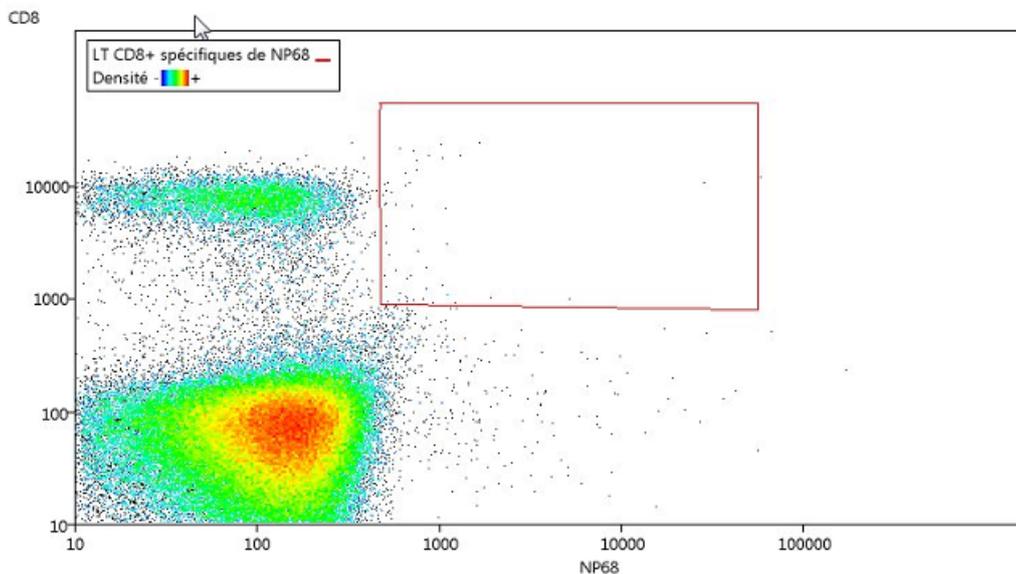
Figure 18. Délimitation des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent le peptide NP68 du virus de la grippe au jour 9.



On peut alors faire défiler les jours et comparer l'effectif de la population. *Afficher / Choix des paramètres*

Données : sélectionner le jour. Par exemple ici, au jour 0.

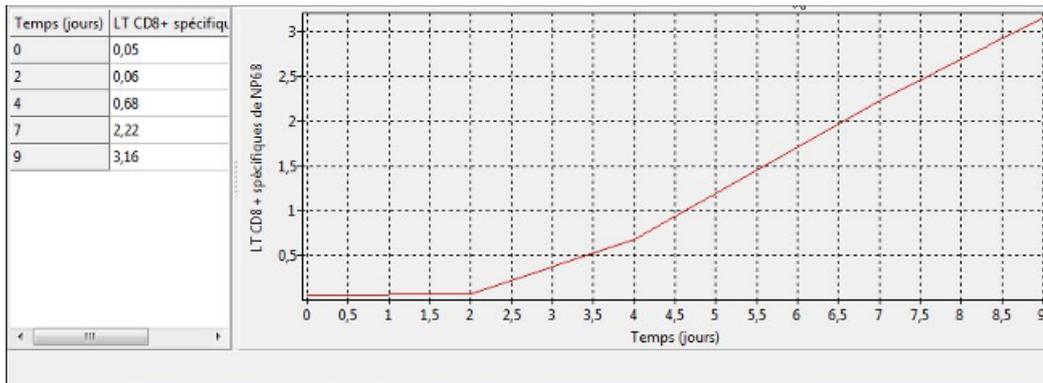
Figure 19. Délimitation des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent le peptide NP68 du virus de la grippe au jour 0.



A partir du menu *Statistiques*, on peut obtenir le tableau et le graphique montrant l'évolution au cours du temps du pourcentage de lymphocytes CD8+ qui reconnaissent le peptide NP68 du virus de la grippe.

Dans la fenêtre *Statistiques*, cliquer sur le menu *Graphique*.

Figure 20. Évolution du pourcentage des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent le peptide viral NP68.



Il est possible d'ajouter un titre et de copier le tableau ou le graphique (menu *Edition*).

Le graphique peut être imprimé ou enregistré comme une image (menu *Fichier*).