



Plateforme de Cytométrie en Flux

Atelier pratique - 17 Mars 2015

M. Pezet

Cytométrie en flux et recherche sur le cancer

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse de cellules en suspension, véhiculées à grande vitesse jusqu'à une chambre d'analyse traversée par des faisceaux lasers. L'interaction des cellules avec la lumière permet de caractériser et classer les cellules selon différents critères tels que la taille, la forme, la complexité ou la présence d'une molécule révélée par un composé fluorescent. L'utilisation de molécules fluorescentes (fluorochromes) couplées à des anticorps, protéines ou molécules permettent la détection spécifique des composants cellulaires ou leur intégration. Les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée ($\lambda_{\text{émission}} > \lambda_{\text{excitation}}$). L'émission de fluorescence est canalisée et véhiculée par fibre optique jusqu'à une série de détecteurs (photomultiplicateurs) placés en aval de filtres (sélection chromatique). Il est ainsi possible d'identifier des sous-types cellulaires en fonction de leurs propriétés physiques et leurs caractéristiques fluorescentes puis de les isoler et éventuellement les trier.

En réalisant une analyse quantitative multiparamétrique, à l'échelle de la cellule individuelle ou de sous-populations au sein d'échantillons hétérogènes la cytométrie en flux est ainsi devenue une méthode de référence dans la recherche sur le cancer. Un des tests fondamentaux dans ce domaine consiste à mesurer l'effet de composés sur les cellules tumorales. La cytométrie en flux permet de réaliser des études dose-réponse rapidement et très précisément en analysant plusieurs marqueurs de façon simultanée. Il est ainsi possible en une seule expérience de tester l'efficacité d'un composé sur la viabilité, les mécanismes de mort cellulaire, le potentiel mitochondrial, les dommages à l'ADN ou encore la prolifération, et de croiser ces paramètres avec la détection de marqueurs moléculaires membranaires véritables signatures de sous-types cellulaires ou de molécules intra-cellulaires (voies de signalisation impliquées, effecteurs...).

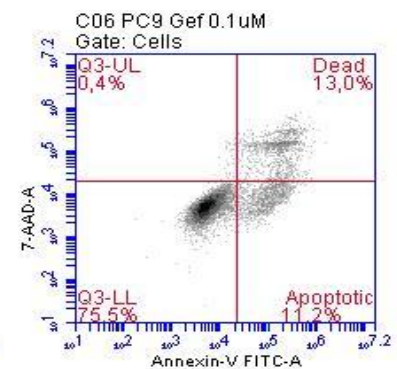
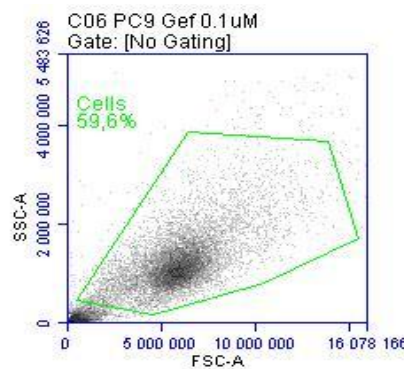
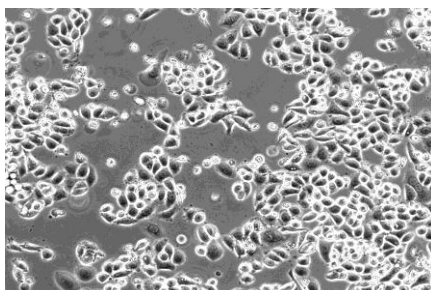
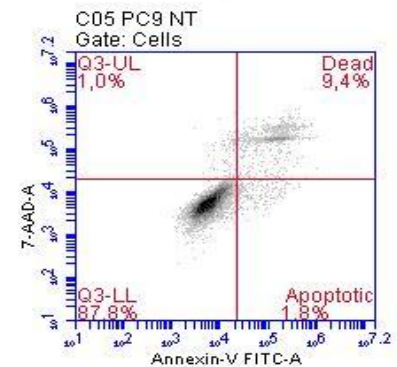
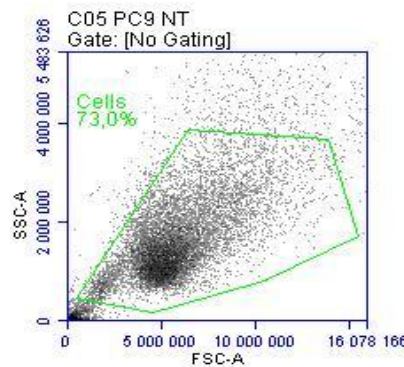
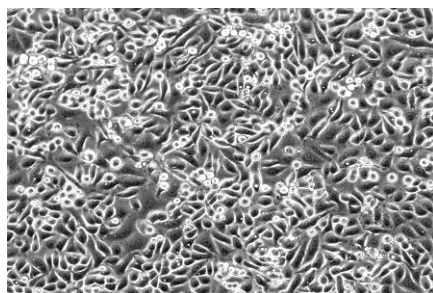
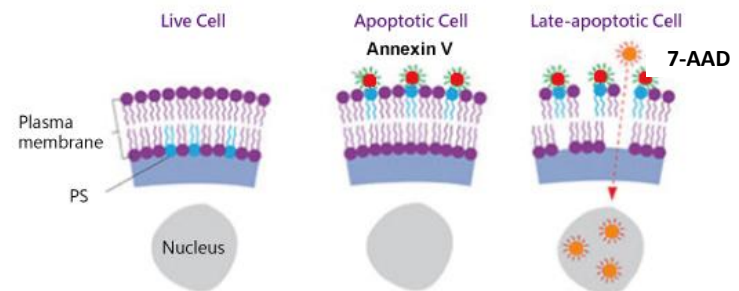
Atelier : Détection de la mort cellulaire par apoptose en réponse à un agent anti-tumoral.

Principe :

La membrane cellulaire est formée d'une bi-couche lipidique dont certains composés sont normalement localisés sur la face interne, c'est le cas des phosphatidylsérines chargées négativement. Lors de l'entrée d'une cellule dans un processus de mort programmée ou apoptose, les résidus phosphatidylsérine sont transloqués sur le versant extracellulaire, aboutissant à une perte d'asymétrie de la membrane. L'annexine-V possédant une forte affinité pour ces résidus permet de détecter la phase précoce d'entrée en apoptose. Le 7-aminoactinomycine D est un composé chimique fluorescent dérivé de l'actinomycine D, avec laquelle elle partage une forte affinité pour l'ADN. Le 7-AAD s'intercale entre les paires de bases C-G. Cet agent n'étant pas perméant, seules les cellules dont l'intégrité de la membrane est compromise seront marquées. Cela permet ainsi la détection des cellules mortes ou en phase tardive d'apoptose. La combinaison de ces deux marqueurs permet de différencier les cellules vivantes (Annexine-V et IP négatives) des cellules en phase précoce d'apoptose (Annexine-V positives, IP négatives) ou en phase tardive d'apoptose (Annexine-V positives, IP positives).

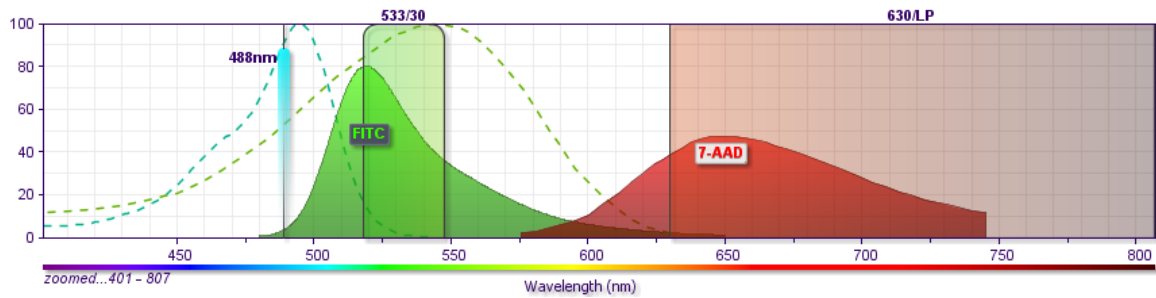
Exemple d'analyse :

Cellules(PC9, cancer du poumon non à petites cellules) traitées par le Gefitinib (agent anti-tumoral) pendant 24h.

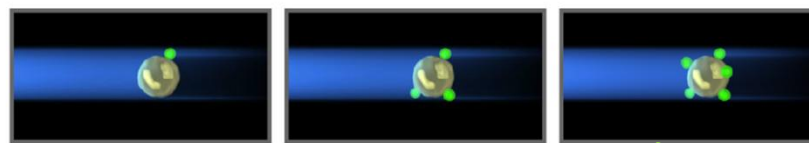
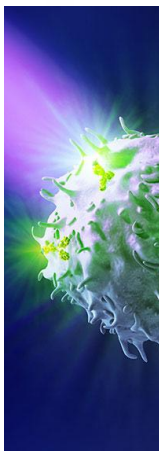
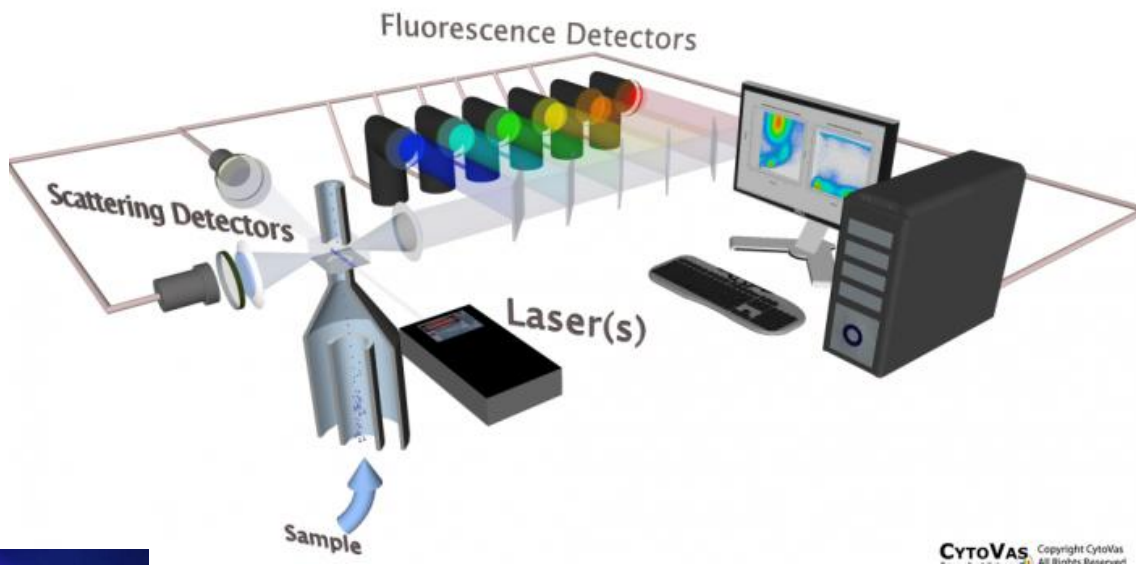


Caractéristiques spectrales des marqueurs :

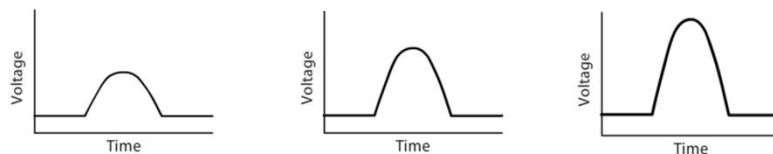
Marqueur	λ excitation (nm)	λ émission (nm)
Annexine-V FITC	488 nm	521 nm
7-AAD	488 nm	647 nm



Principe de la cytométrie en flux



Intensité de fluorescence croissante



Signal : Amplitude (V) = f(t)

Caractéristiques du cytomètre Accuri-C6



Laser bleu 488 nm : canaux de détection FL1-FL2-FL3

Laser rouge 640 nm : canal FL4

Detector	Filter	Fluorochrome
FL1	530/30	FITC, GFP, CFSE
FL2	585/40	PE, PI PE-Texas Red
FL3	670 LP	PerCP-Cy5.5 PE-Cy5, PE-Cy7
FL4	675/25	APC Alexa-647 PE-Cy5

Optics

Laser Excitation

488 nm (rated at 20,000-h life)

640 nm (rated at 20,000-h life)

Laser Profile

10 x 75 μ m

Light Scatter Detection

Forward (0°, \pm 13°)

Side (90°, \pm 13°)

Emission Detection

4 colors, user-changeable optical filters

Standard set installed:

- FL1 533/30 nm (eg, FITC/GFP)
- FL2 585/40 nm (eg, PE/PI)
- FL3 > 670 nm (eg, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-CyTM7)
- FL4 675/25 nm (eg, APC)

Optical Alignment

Fixed alignment

Fluidics

Flow Cell

200 μ m ID quartz capillary

Minimum Detectable Particle Size

0.5 μ m

Minimum Sample Volume

50 μ L (in 1.5-mL microcentrifuge tube)

Pre-Set Flow Rates and Core Sizes

Slow : 14 μ L/min, 10- μ m core

Medium: 35 μ L/min, 16- μ m core

Fast: 66 μ L/min, 22- μ m core

Custom Sample Flow Rates

10–100 μ L/min

Custom Core Diameter

5–40 μ m

Recommended Sheath Fluid

0.2- μ m filtered DI water

Maximum Events Per Sample

1 million events per well

Performance

Fluorescence Sensitivity, MESF*

FITC < 150; PE < 100

Scatter Resolution

Resolves human peripheral blood lymphocytes, monocytes, and granulocytes

Fluorescence Linearity

2 \pm 0.05% for chicken erythrocyte nuclei (CEN)

Fluorescence Precision

<3% CV for CEN

Data Acquisition Rate

10,000 events/second, maximum

Protocole de marquage :

Matériel :

- Cellules K562 (leucémie chronique) et KHYG (cellules « Natural Killer ») cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté par du sérum et incubées à 37°C avec de l'air enrichi en CO₂ (5%).
- Tampon salin phosphaté : PBS 1x
- Trichostatine (T8552, Sigma) 2 mg/mL dans du DMSO
- Kit de détection de l'apoptose (BD Pharmingen) :
 - o Tampon de liaison pour le marquage Annexin-V (10X)
 - o Annexin-V-FITC
 - o 7-AAD
- Tubes 5mL

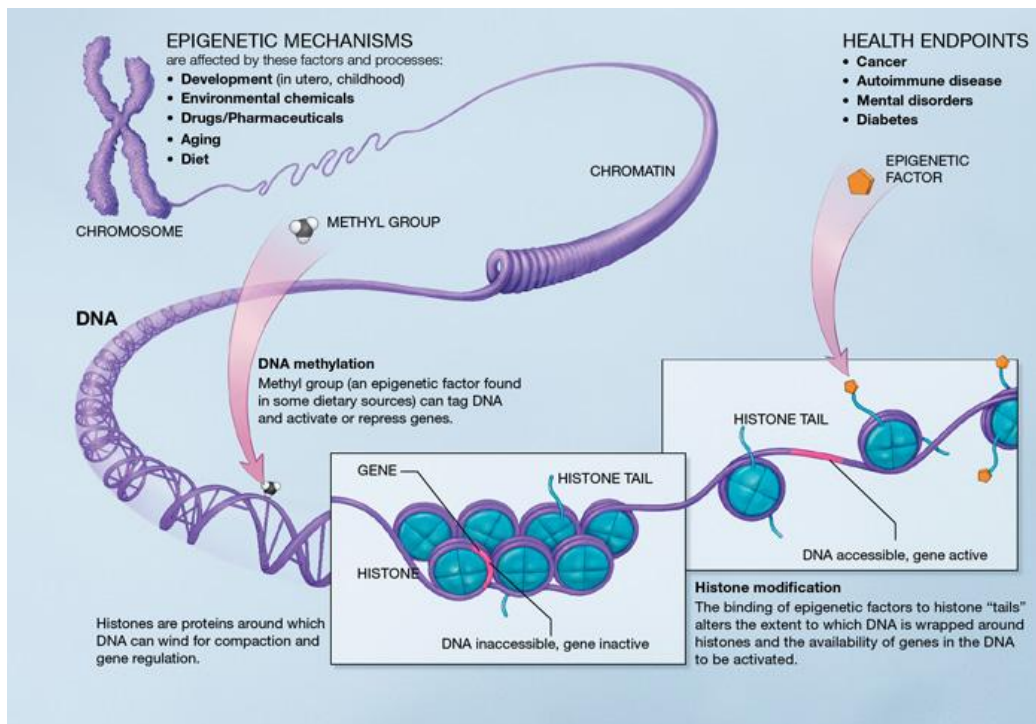
Protocole :

- 1) Test de dose-réponse : Les cellules cultivées en suspension sont comptées puis réparties équitablement dans une plaque multipuits. Elles sont ensuite mises en présence du composé TSA (trichostatine) à la concentration de 0.1 à 10 µM et incubées pendant 24h. Un puits contrôle ne contient pas le composé mais une quantité équivalente du solvant.
- 2) Test de cytotoxicité : Les cellules K562 (cibles) et KHYG (effectrices) contrôles ou traitées (1 µM TSA) sont mises en co-culture au ratio 1 :1 pendant 5h.
- 3) Marquage Annexine-V et 7-AAD :
 - a. Centrifuger les cellules (1200 rpm, 5 min) puis reprendre le culot dans le tampon de liaison (1X) à la concentration de 1×10^6 cellules/mL.
 - b. Transférer 100 µL de suspension (1×10^5 cellules) dans un tube 5 mL.
 - c. Ajouter 5 µL d'Annexine-V FITC puis 5 µL de 7-AAD
 - d. Vortexer doucement et incuber 15 min à température ambiante à l'obscurité.
 - e. Ajouter 400 µL de tampon de liaison.
 - f. Analyser au cytomètre en flux.

- L'épigénétique

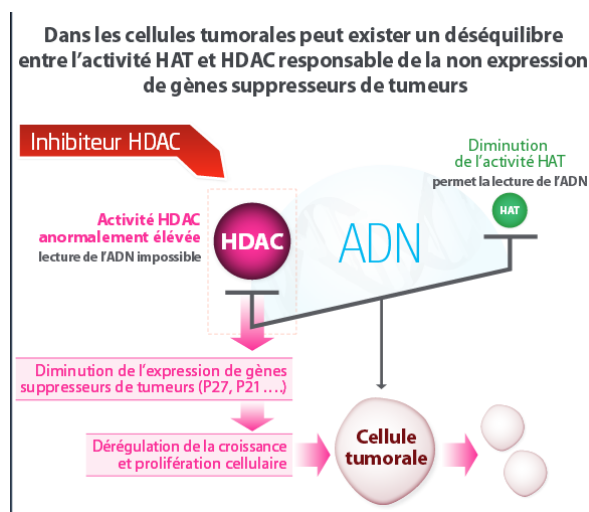
Alors que la génétique correspond à l'étude des gènes, l'épigénétique s'intéresse à une "couche" d'informations complémentaires qui définit **comment ces gènes vont être utilisés par une cellule... ou ne pas l'être**. En d'autres termes, l'épigénétique correspond à **l'étude des changements dans l'activité des gènes**, n'impliquant **pas de modification de la séquence d'ADN** et pouvant être **transmis lors des divisions cellulaires**. Contrairement aux mutations qui affectent la séquence d'ADN, **les modifications épigénétiques sont réversibles**. (Dossier d'information Inserm : Epigénétique)

Si l'étude des causes génétiques du cancer (mutations, amplification ou perte de matériel chromosomique, translocations récurrentes) a longtemps occupé le devant de la scène, l'explosion récente des connaissances sur les acteurs moléculaires et les mécanismes sous-jacents qui, en modulant la structure de la chromatine, contrôlent l'expression des gènes a révélé le rôle prépondérant joué par des modifications **épigénétiques** dans le déclenchement et la progression de nombreuses maladies, en particulier des cancers. De plus, contrairement aux modifications génétiques, les modifications épigénétiques sont dynamiques et réversibles. La caractérisation d'inhibiteurs spécifiques de certains effecteurs épigénétiques a ouvert une nouvelle voie thérapeutique, la **thérapie épigénétique**, qui semble très prometteuse, certaines molécules étant déjà en essais cliniques. (*Med&Sciences 2005 ; 21 : 405-11*)



Wikipedia

Les inhibiteurs des histone-désacétylases (HDACi) représentent une nouvelle classe de médicaments anticancéreux actuellement en développement. Ils ciblent une famille d'enzymes qui catalysent les modifications d'acétylation des histones. Cette unité fondamentale de la chromatine représente le premier niveau de compaction nucléaire de l'ADN. L'équilibre de l'acétylation des histones est assuré par les histone-acétyltransférases (HAT) et les histone-désacétylases (HDAC) qui jouent un rôle important dans la transcription des gènes. Des modifications des HDAC ont été identifiées au niveau de cellules tumorales et contribuent aux altérations des gènes retrouvées dans de nombreuses tumeurs. Les inhibiteurs des HDAC (HDACi) induisent une différenciation, un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose des cellules tumorales et inhibent la croissance tumorale dans des modèles précliniques. Plusieurs classes d'HDACi structurellement différentes sont entrées en clinique et montrent une activité antitumorale intéressante sur différents types de tumeurs. (*Bulletin du cancer* 2006, vol. 93, n°1, 27-36)



- **Immunothérapie des cancers**

Les cellules NK "Natural Killer" représentant 10 à 15% des cellules lymphocytaires, sont des cellules sentinelles tueuses. Comme d'autres congénères du système immunitaire inné, elles patrouillent l'organisme et peuvent repérer des cellules cancéreuses et infectées. Elles jouent un rôle important dans l'élimination des cellules par mécanisme cytotoxique et production de cytokines immunorégulatrices. Leur potentiel thérapeutique est actuellement le champ de nombreuses investigations.

