



## Université de Bourgogne

## Introduction à la Cytométrie : Applications en Toxicologie, Pharmacologie et Biosurveillance

Amira ZARROUK,<sup>1,2</sup> Thomas NURY,<sup>1</sup> Mounira KHELIFI,<sup>1,3</sup> Mohamed BOUMHRAS,<sup>1,4</sup> **Gérard LIZARD**,<sup>1</sup>

1 - Université de Bourgogne / Equipe Bio-peroxIL (EA 7270) / INSERM, Dijon, France

2 - Université de Monastir, Laboratoire de Biochimie- UR 'Nutrition Humaine et Désordre Métabolique', Monastir, Tunisie

3 - Faculté de Médecine Ibn El Jazzar, UR 'Biophysique', Sousse, Tunisie

4 - Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Equipe de Toxicologie Appliquée, université Hassan 1<sup>er</sup>, Settat, Maroc

**Vèmes Journées Nationales de Cytométrie en Flux (JNCF-2013)**

الايام الوطنية الخامسة للقياس الخلوي المتدفق

Faculté de Pharmacie de Monastir, TUNISIE : 7-9 Mars 2013

Gérard Lizard, EA7270  
Université de Bourgogne / INSERM

# Cytomique et Cytome : Définition

---

➤ L'analyse exhaustive visant à définir l'état d'une cellule à un moment donné et dans un contexte donné, en intégrant plusieurs paramètres, porte le nom de **cytomique**.

➤ La cytomique correspond à l'analyse du **cytome** : ensemble des constituant morphologiques, antigéniques et fonctionnels qui permettent non seulement de définir mais aussi de modéliser l'état et le fonctionnement d'une cellule à un instant t.

*Boumhras M: Thèse de Doctorat cotutelle Université Hassan1er, Maroc et Université de Bourgogne, France*

PubMed (20 février 2012)

\* Cytomic  
**17 citations**

\* Cytomics  
**104 citations**

\* Cytome  
(cytome assay; micronoyaux)  
**91 citations**

➤ **Cytomique: méthode alternative aux modèles animaux en toxicologie et pharmacologie**

# Contraintes et Intérêts de la Cytomique

---

## ➤ **Containtes et difficultés**

- Population de cellules homogène et en quantité suffisante (mythe ou réalité?)
  - synchronisation
  - différents types de sélections
- Type de cellules considérées (Eucaryotes, procaryotes) :
  - Difficiles sur cellules animales (état de prolifération, de différenciation)
  - Levures et bactéries (plus facile?)
- Méthodes d'analyses : à développer

## ➤ **Intérêts**

- Panorama « complet » de l'état morphologique, antigénique et fonctionnel de l'état de la cellule: **analyse biologique exhaustive** (mythe ou réalité?)

Créer des cellules artificielles

*Questions éthiques et philosophiques: aborder les bases du « mystère de la vie »*

# Cytomique et Techniques de Cytométrie

---

**Importances des techniques de cytométrie**

*(cytométrie en flux, microscopie conventionnelle et confocale)*

**en cytomique**

**Pourquoi ?**

**Contrairement aux approches de biochimie et biologie moléculaire conventionnelles**

**qui mesurent des paramètres à partir de populations cellulaires**

**le plus souvent hétérogènes**

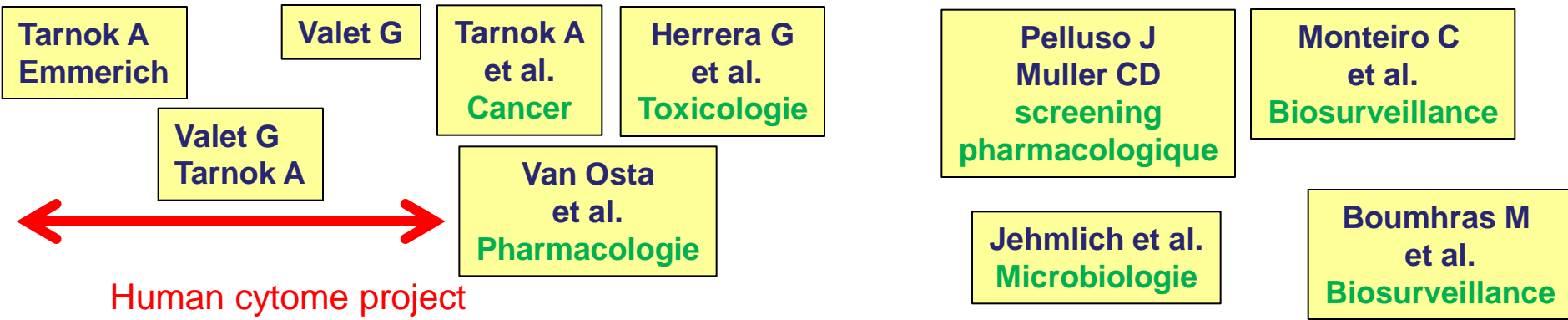
**les techniques de cytomiques permettent de travailler sur des cellules individuelles**

**en intégrant l'aspect qualitatif et quantitatif**

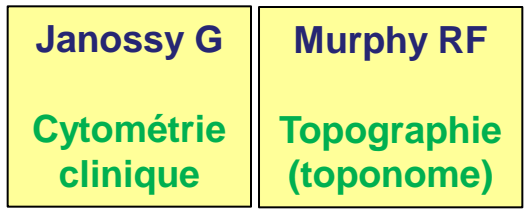
**tout en prenant en compte la morphologie et la topographie**

# Cytomique : dates et contributions

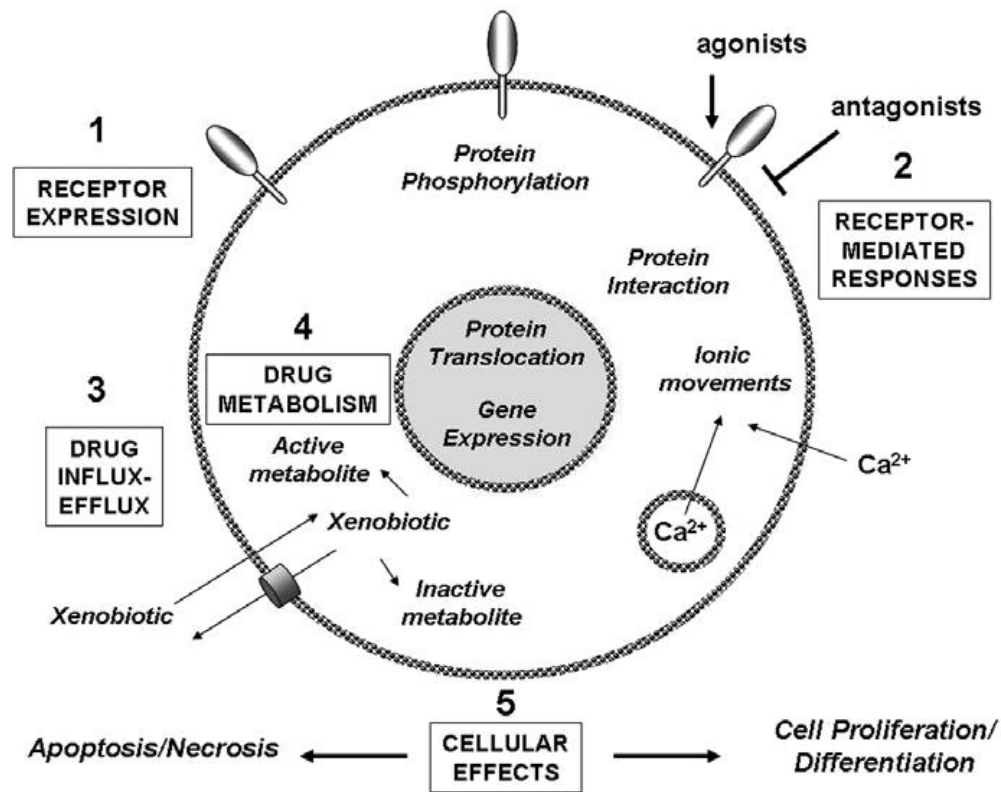
2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013



Médecine prédictive et individualisée



# Cytomique et Toxicologie



Summary of the main processes susceptible of being analyzed by cytoxic techniques in the investigation of the interactions between drugs/ toxicants and cells. The boxes represent major aspects of the interaction. **In italics, particular phenomena that are frequently explored by cytoxic.**

# Cytomique et Pharmacologie

---

- To improve drug discovery and development, we should work towards **a better quantitative understanding of the dynamics of cellular processes in multiple (primary) cell types.**
- Using cell based disease models, which **take into account the spatial and temporal molecular diversity of the human cytome**, could help us to improve the predictive power of drug discovery. Improving our disease models by extracting more content from multiple (primary) cell types would allow us to bring down the attrition rates in drug development.
- **Nature does not adapt or simplify itself to the level of our disease models, but we have to adapt our models to the complexity of nature.**

## **Cytomics and Drug Discovery**

Peter Van Osta,\* Kris Ver Donck, Luc Bols, and Johan Geysen  
***Cytometry Part A 69A:117–118 (2005)***

# Cytomique et Optimisation de 'Process'

---

Flow-cytometry and cell sorting: An efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories

Niraj Kumar, Nicole Borth

Department of Biotechnology, BOKU University Vienna, Austria

Methods 56 (2012) 366–374

**The performance of cell lines used for the production of biotherapeutic proteins typically depends on the number of cells in culture, their specific growth rate, their viability and the cell specific productivity (qP).** Therefore both cell line development and process development are trying to (a) improve cell proliferation to reduce lag-phase and achieve high number of cells; (b) delay cell death to prolong the production phase and improve culture longevity; (c) and finally, increase qP.

All of these factors, when combined in an optimised process, concur to increase the final titre and yield of the recombinant protein. As cellular performance is at the centre of any improvement, analysis methods that enable the characterisation of individual cells in their entirety can help in identifying cell types and culture conditions that perform exceptionally well. This observation of cells and their complexity is reflected by the term “cytomics” and flow cytometry is one of the methods used for this purpose. **With its ability to analyse the distribution of physiological properties within a population and to isolate rare outliers with exceptional properties, flow cytometry ideally complements other methods used for optimisation, including media design and cell engineering.** In the present review we describe approaches that could be used, directly or indirectly, to analyse and sort cellular phenotypes characterised by improved growth behaviour, reduced cell death or high qP and outline their potential use for cell line and process optimisation.



# Cytomique et Biosurveillance

- Extraits (totaux, aqueux, lipidiques) d'animaux 'sentinelle' : moules, poissons,...
- Solutés de matières premières : poudre de minerais.....
- .....



Analyses biochimiques des extraits et solutés : métaux lourds, phtalates, ...



Cellules : normales et tumorales

## • *Analyses multiparamétriques*

- métabolisme, inflammation, oxydation, mutagénicité, mort cellulaire,

analyses morphologiques, tests fonctionnels, analyses antigéniques,  
analyses biochimiques, biologie moléculaire.....

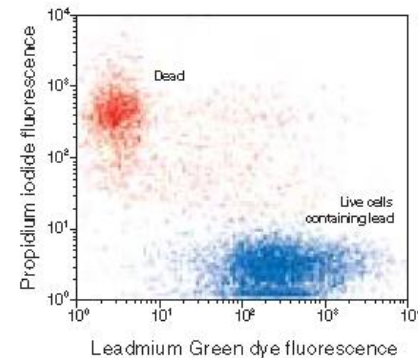
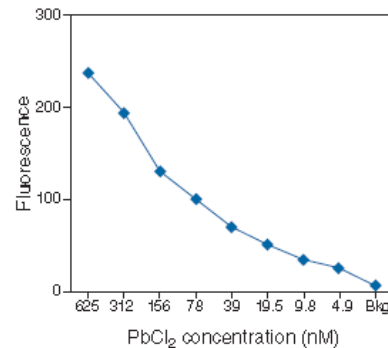
- *Représentation des données, analyses statistiques*
- *Identification de facteurs de risques : chroniques, saisonniers, ....*
- *Identification de cibles cellulaires...*

**Tests rapides applicables en routine**

# Détection de Métaux Lourds par Cytométrie en Flux

- Détection conventionnelle de métaux lourds: spectrométrie d'absorption atomique
- Détection par cytométrie en flux de métaux lourds:

Analyse semi-quantitative des taux intracellulaires de Cd et Pb  
(*Intracellular Lead and Cadmium Detection Kit for Flow Cytometry*)



Développement envisageable en cytomique :

- Détection simultanée Cd, Pb / stress oxydant / inflammation / mort cellulaire

# Exemple : Pollution et Maladie Métabolique

Surnutrition, manque d'activité physique, facteurs psychiques et génétiques



Risque de maladie métabolique : Diabète type2 , maladies cardiovasculaires

- Polluants présents dans l'environnement et l'alimentation (métaux toxiques, pesticides, hydrocarbures ...)
- Tissu adipeux : lieu de stockage principal des POPs

- Utilisation des cellules MIN-6 bien adaptées pour étudier les désordres métaboliques

- Approche multiparamétrique :

- **Cytométrie en flux**
  - **Microscopie**
  - **Imagerie**
  - **Biochimie**
- Profilé de données :
- Prolifération et mort cellulaire
  - Stress oxydant et inflammation
  - Métabolisme mitochondrial et peroxysomal



Vers une approche  
cytomique dédiée à la  
biosurveillance  
environnementale

# Cytomique : Outils et Méthodes

## Techniques

➤ Cytométrie en flux

➤ Microscopie et imagerie

\* *Microscopie confocale (spectrale)*

\* *Microscopie en champ proche*

\* *Analyse d'images*

➤ Biochimie

• *Electrophorèse, gel 2D...*

\* *Spectrométrie de masse*

➤ Biologie moléculaire

➤ Traitement informatique

➤ Analyse statistique

➤ Modélisation

(cellules artificielles)

## Schéma possible du 'Work-flow'

*Analyse morphologique, antigénique et fonctionnelle de cellules vivantes dans leur contexte environnemental* (cytome)

Analyse multiplexe des surfaces cellulaires

Analyse des structures intracellulaires

Détection/ Isolement de cellules d'intérêt (événements rares)

Analyse cellulaire sub- $\mu$ m 3 D

Identification de cellules à intérêt (événements rares)

Protéomique: cellules individuelles

Génomique: cellules individuelles

## Approche systémique

### Cytomique

Lipidomique

Génomique

Toponomique

Métabolomique

Protéomique

Médecine prédictive

Toxicologie

Biosurveillance

Pharmacologie

# Cytomique et Approche Multiparamétrique

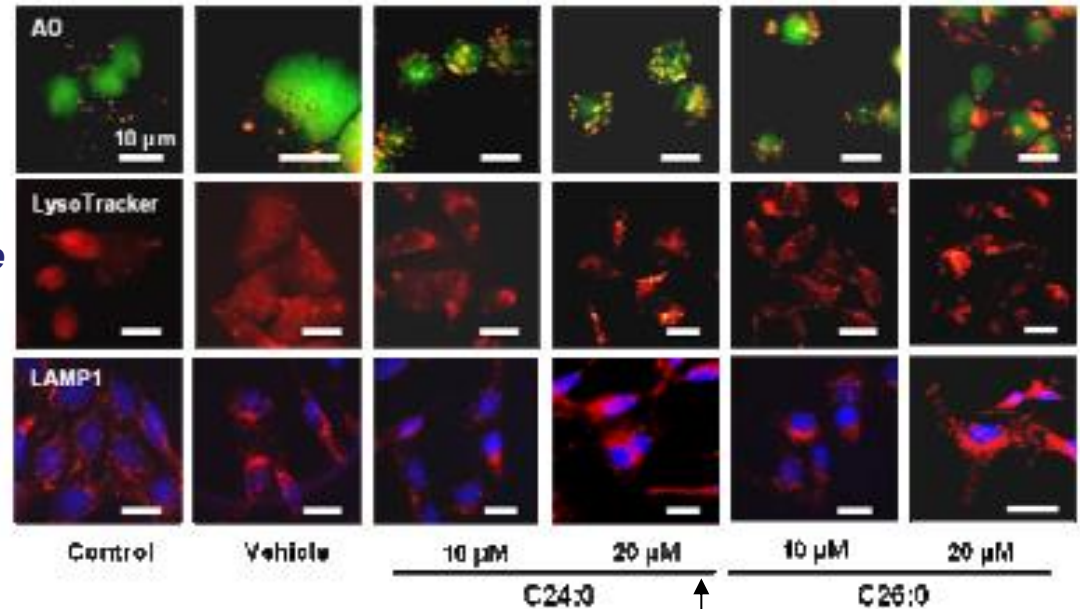
- CMF et Microscopie conventionnelle

\* *Information dans un plan*

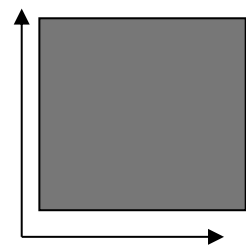
\* *Quantification relative ou absolue*

- Microscopie confocale

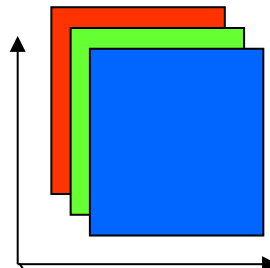
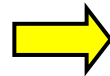
\* *Information dans l'espace*



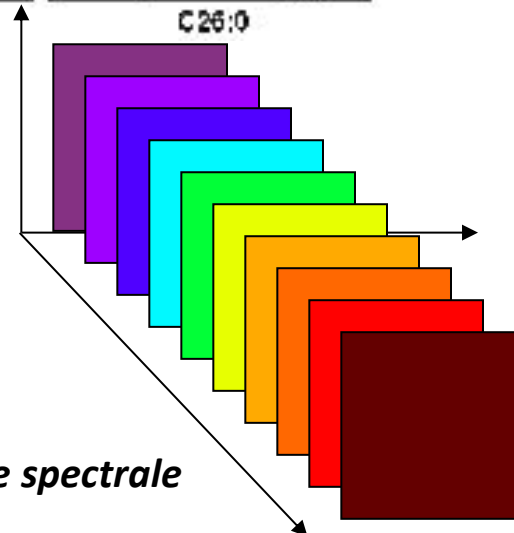
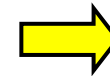
*Microscopie confocale mono ou multiphotonique (Résolution en z augmentée);  
Information indépendante de l'intensité de la longueur d'onde d'excitation et d'émission*



*image  
niveaux de gris*

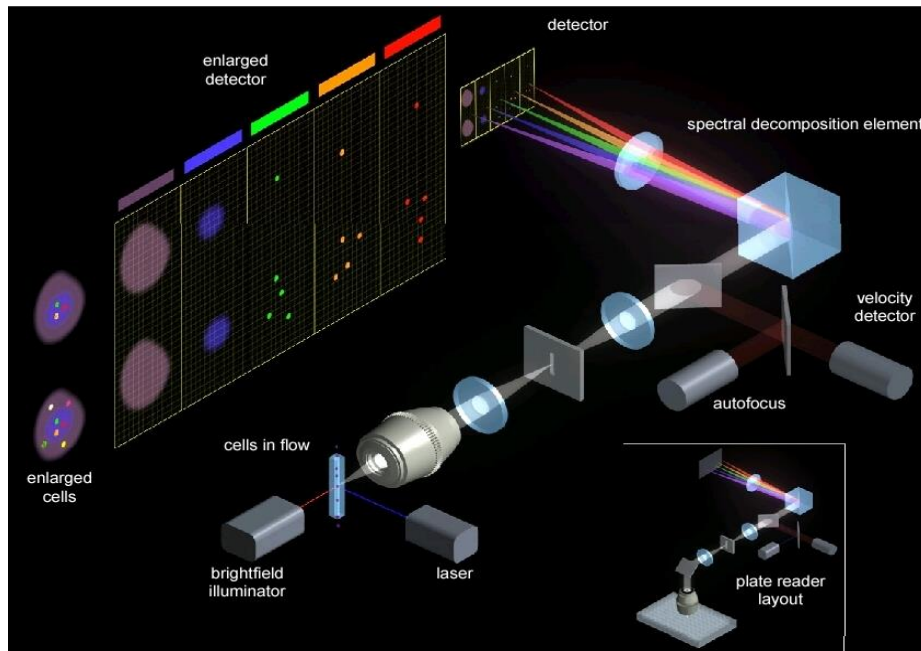


*Image couleur  
(RGB)*



*Image spectrale*

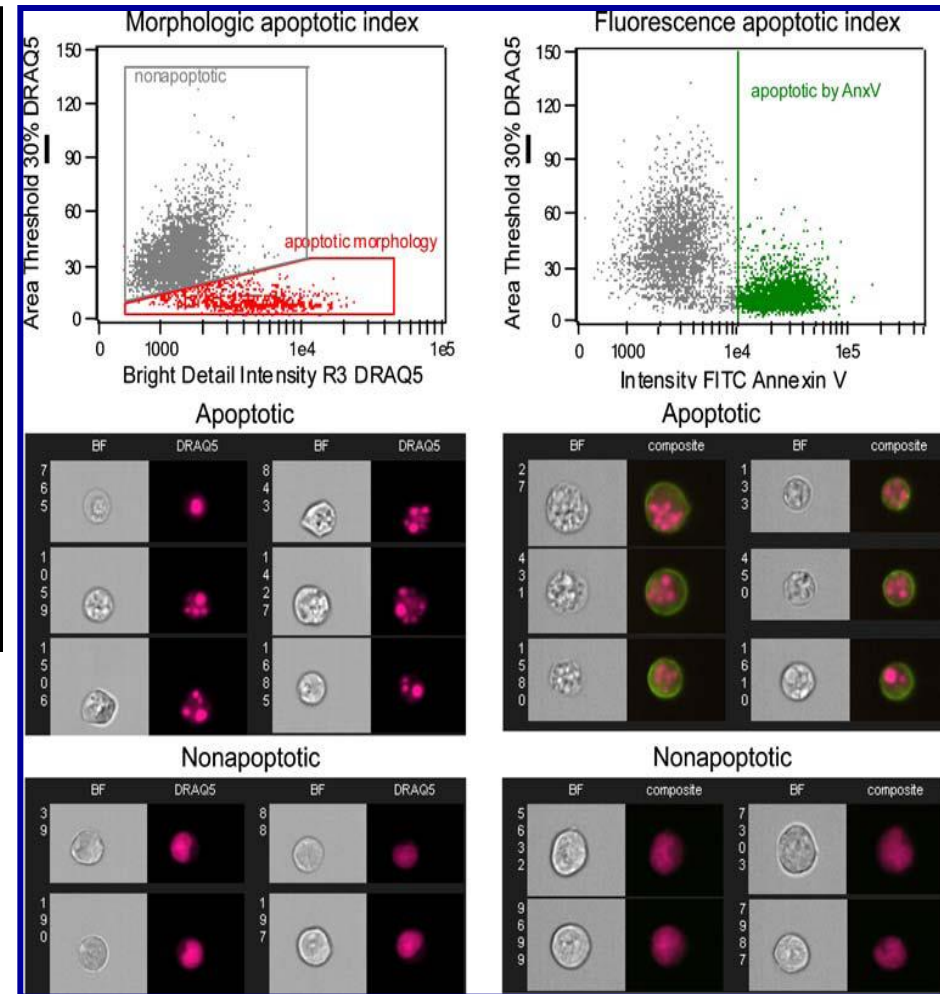
# Cytométrie en Flux Multispectrale



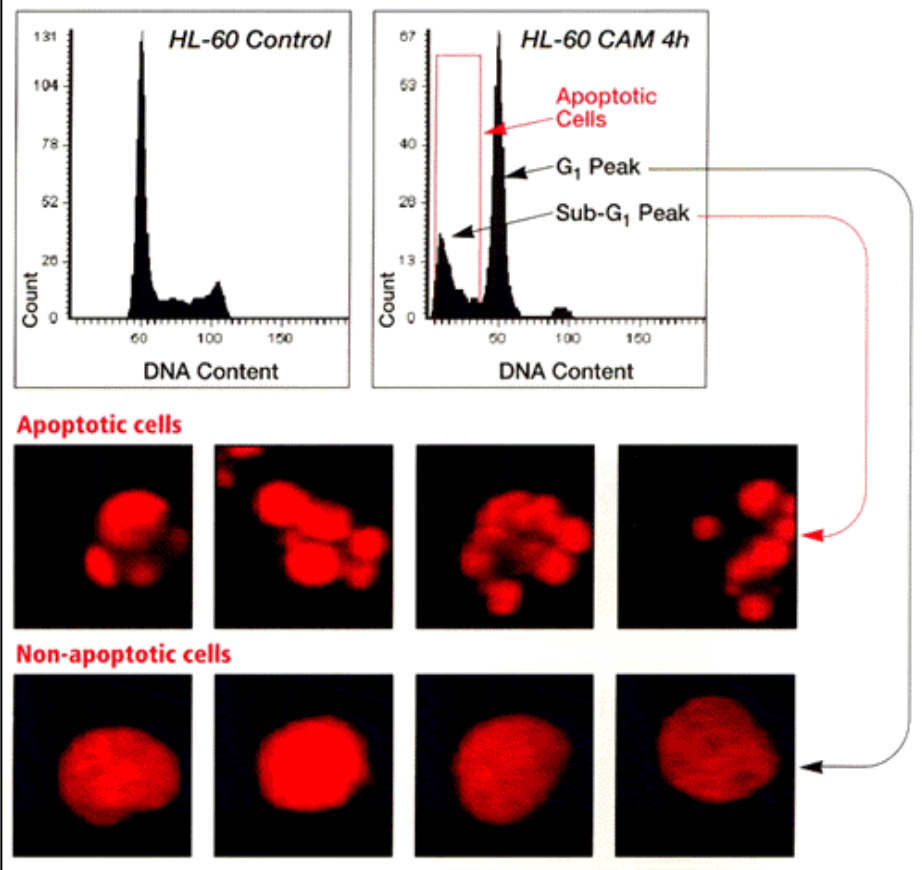
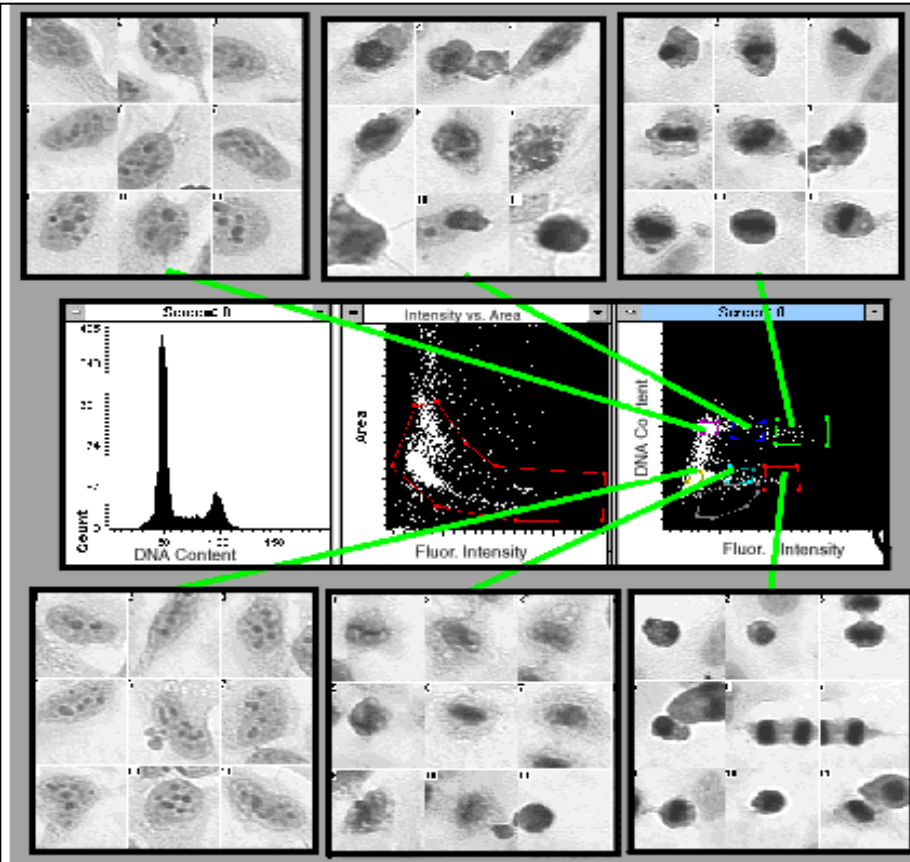
Analyse morphologique, antigénique  
et fonctionnelle (**cellules non adhérentes**)



*Limite de la méthode :  
capacité importante  
de stockage des données*



# Laser Scanning Cytometer



Analyse morphologique, antigénique  
et fonctionnelle (**cellules non adhérentes**)



- Vitesse d'analyse modérée
- Base de données facile à gérer
- Nécessite une capacité de stockage importante

# Sélection de cellules – Tri cellulaire

---

La **cytomique** correspond à l'analyse du **cytome** : ensemble des constituant morphologiques, antigéniques et fonctionnels qui permettent non seulement de définir mais aussi de **modéliser l'état et le fonctionnement d'une cellule à un instant t.**

## - *Méthodes de cytométrie*

- \* analyse les cellules une à une
- \* sélection informatique des cellules
- \* sélection physique des cellules

### ° TRI CELLULAIRE

études complémentaires sur cellules isolées

## - *Billes magnétiques*

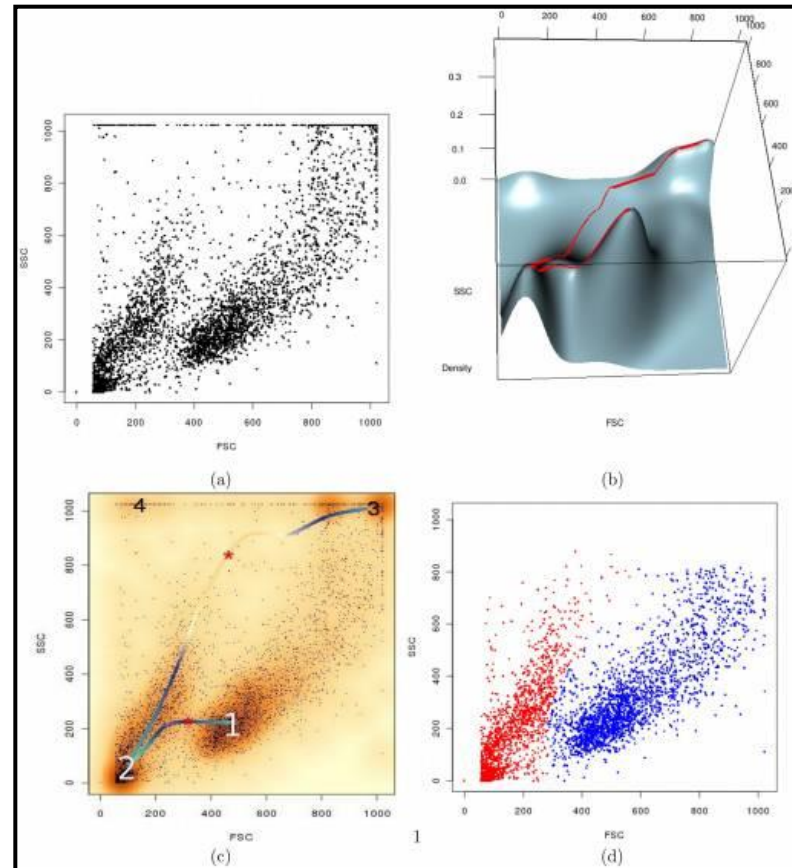
## - *Microdissection laser*

## - *Elutriation*

## - *Sélection chimique* (toxicité sélective)

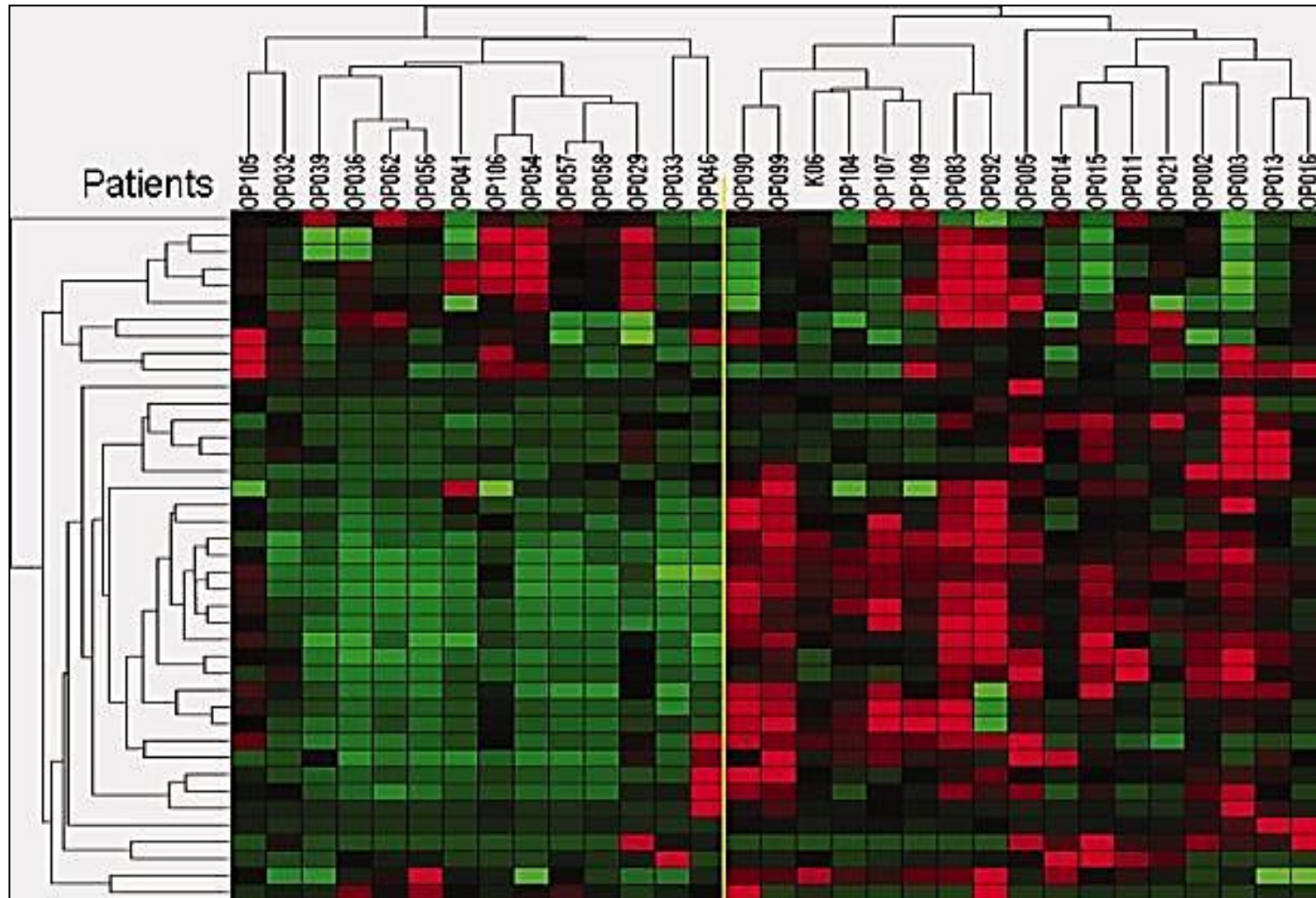


# Cytomique : Analyse de Données



**Importance du gating dans la sélection de cellules d'intérêt :  
développement de méthodes mathématiques non subjectives**

# Cytomique : Présentation de Données

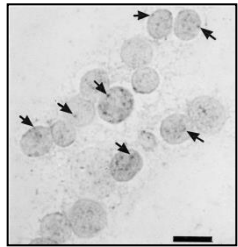


	Sans effet
	Peu d'effet
	Avec effet

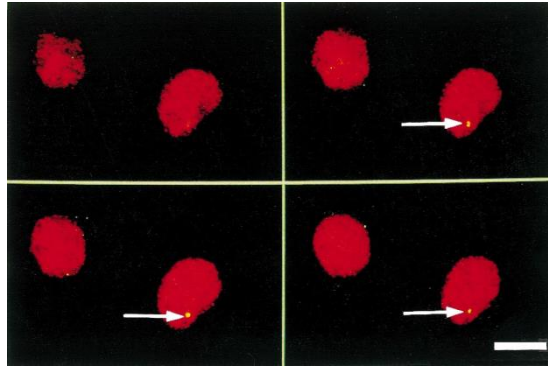
			Extraits Lipidiques de Moules				
			OL	JL	ES		
Approche Analytique Biochimie: (GC/MS)	Métaux lourds	Cd	Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
		Cr	Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
		Pb	Peu d'effet	Peu d'effet	Sans effet		
	Profils lipidiques	Acides Gras	Avec effet	Avec effet	Sans effet		
		Phosphlipides	Avec effet	Avec effet	Sans effet		
		Oxystérols	Avec effet	Avec effet	Sans effet		
		Phytostérols	Sans effet	Sans effet	Sans effet		
In Vivo (Rats)	Glycémie et fonction rénale	Glycémie	Peu d'effet	Avec effet			
		Urée	Sans effet	Sans effet			
		Acides urique	Sans effet	Sans effet			
		Créatinine	Peu d'effet	Avec effet			
	Fonction hépatique	Transaminases	Peu d'effet	Avec effet			
		Phosphatase	Sans effet	Sans effet			
	Bilan lipidique	Triglycérides	Avec effet	Avec effet			
		CT	Sans effet	Sans effet			
		C-HDL	Sans effet	Sans effet			
		C-LDL	Sans effet	Sans effet			
		CT/C- HDL	Sans effet	Sans effet			
	In vitro (cellules MIN6)	Prolifération et mort cellulaire	Prolifération	Peu d'effet		Avec effet	Sans effet
			LDH	Peu d'effet		Avec effet	Sans effet
Mort cellulaire (IP)			Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
Cycle cellulaire			Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
Organites cellulaires		$\Delta\Psi_m$	Avec effet	Avec effet	Peu d'effet		
		Lysosomes	Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
		Peroxyosomes	Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
Equilibre RedOx		GSH	Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		
		$O_2^{\bullet-}$	Peu d'effet	Avec effet	Avec effet		
		$H_2O_2$	Sans effet	Avec effet	Sans effet		
		NO	Peu d'effet	Avec effet	Peu d'effet		
		Peroxydation lipidique	Avec effet	Avec effet	Peu d'effet		
		Insuline	Peu d'effet	Avec effet	Sans effet		

# Cytométrie : Application Clinique

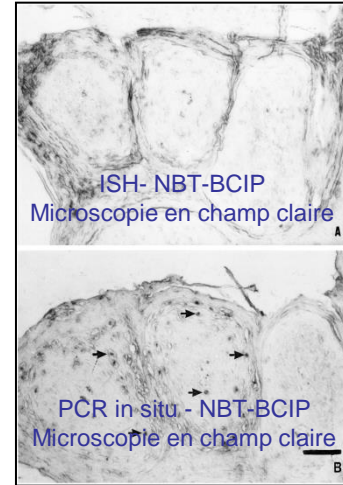
## Infection à Papillomavirus dans les Lésions du Col Utérin



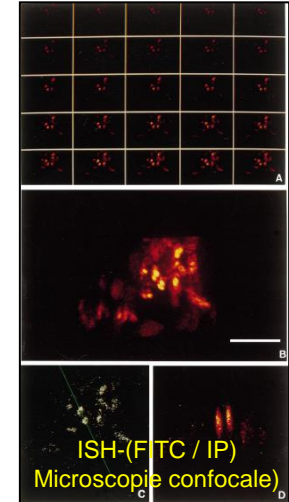
ISH-NBT-BCIP  
Microscopie en champ claire



ISH-(FITC / IP)  
Microscopie confocale



ISH-NBT-BCIP  
Microscopie en champ claire  
A  
PCR in situ - NBT-BCIP  
Microscopie en champ claire  
B



ISH-(FITC / IP)  
Microscopie confocale  
C  
D

**Cellules SiHa (1-2 copies de HPV-16)**

**Limites de détection en microscopie (1-2 copies)**

**En CMF (30-50 copies)**

**La microscopie confocale à fluorescence**

**est une alternative à la PCR in situ**

**pour l'identification d'HPV et fournit en plus**

**des informations spatiales**

*Morphological Patterns of HPV DNA Signals and DNA Ploidy of the 69 CIN Specimens Studied Containing HPV DNA 16 or 18\**

DNA ploidy	Morphology of in situ HPV DNA hybridization signals		
	Diffuse	Punctate	Diffuse + punctate
<b>Aneuploidy (38 cases)</b>			
CIN1K (19 cases)	7 (37%)	8 (42%)	4 (21%)
CIN2K (14 cases)	4 (29%)	9 (64%)	1 (7%)
CIN3K (5 cases)	0	5 (100%)	0
<b>Total</b>	<b>11 (29%)</b>	<b>22 (58%)</b>	5 (13%)
<b>Euploidy (31 cases)</b>			
CIN1K (22 cases)	14 (64%)	7 (32%)	1 (4%)
CIN2K (8 cases)	4 (50%)	3 (37%)	1 (12%)
CIN3K (1 case)	1	0	0
<b>Total</b>	<b>19 (62%)</b>	<b>10 (32%)</b>	2 (6%)

\*The distribution of CIN with diffuse, punctate, and diffuse + punctate in situ hybridization signals was significantly different between aneuploid and euploid lesions (Likelihood Ratio Chi-Square  $P < 0.025$ ).

**L'aspect ponctué du signal (HPV intégré) par rapport à un aspect diffus (HPV épisomal) pourrait être un critère de tumorigénicité**

### Morphological Analysis of In Situ Hybridization Signals in Cervical Intraepithelial Neoplasia Containing Human Papillomavirus Type 16 or 18: Relationship With Histological Grade and DNA Content

Gérard Lizard,<sup>\*1</sup> Patrick Roignot,<sup>2</sup> Patrick Brunet-Lecomte,<sup>3</sup> and Yvette Chardonnet<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INSERM Unité 498, Centre Hospitalier Universitaire/Hôpital du Bocage, Dijon, France

<sup>2</sup>Centre de Pathologie, Institut de Recherche Médicale de Bourgogne, Dijon, France

<sup>3</sup>Informatique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire/Hôpital du Bocage, Dijon, France

<sup>4</sup>INSERM Unité 346, Centre Hospitalier Universitaire/Hôpital Ed. Herriot, Lyon, France

Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 34:180-186 (1998)

**Gérard Lizard, EA7270,  
Université de Bourgogne / INSERM**

# CONCLUSIONS

---

- Plusieurs approches de cytométrie (flux, image) permettent une approche cytomique et d'appréhender le cytome.
- Les méthodes de cytométrie (flux, image) sont appropriées pour aborder différents aspects du cytome (cytométrie en flux multispectrale, laser scanning cytometer) : applications potentielles (toxicologie, pharmacologie, diagnostique...)
- L'identification des mécanismes moléculaires et des cibles nécessite des approches complémentaires de biochimie et biologie moléculaire (chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse, western blotting, DNA / RNA arrays....).
- ***La cytomique est une approche pertinente qui peut se substituer à l'expérimentation animale et la compléter.***
- La cytomique peut permettre une meilleure évaluation des risques à partir de composés complexes (extraits tissulaires animaux ou végétaux, minerais...)