

Analyses Cytokiniques par Cytométrie en Flux

*Rabat, 29 novembre 2018
CytoMagh 2018*

**Gérard LIZARD
EA7270 / Laboratoire Bio-peroxIL
Faculté des Sciences Gabriel
Dijon, France**

Cytokines : domaines d'intérêt

- Pathologies
 - * Maladies auto-immunes
 - * Maladies liées à l'âge (maladies neurodégénératives, athérosclérose....)
 - * Cancers
 - * Traumatismes (post-chirurgie oculaire...)
- Pharmacologie
- Toxicologie (industries cosmétiques, alimentaires...)

Dosages des Cytokines : méthodologies

- **ELISA**
- **ELISPOT**
- **Cytométrie en Flux:**
 - * **Cytokines intracellulaires**
 - * **Sécrétion de Cytokines**

Quantification de Cytokines Intracellulaires

- Immunomarquages directs ou indirects en présence de monensine pour bloquer l'efflux de cytokines (amplification du signal),
- Informations fournies:
 - * % de cellules produisant des cytokines,
 - * Quantité de cytokines par cellules:
 - Valeurs souvent arbitraires (moyenne de fluorescence)
 - Valeurs absolues : (envisageable)

Présentation et exploitation des données

- Histogrammes : monoparamétriques, biparamétriques...
- Tableaux de données : % et/ou moyenne de fluorescence
- Analyses statistiques

NOM: microbilles (nanobilles)

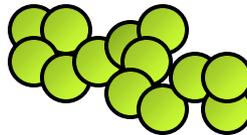
SAVOIR FAIRE PRINCIPAL:

- 1980: optimisation
- 1985: quantification antigénique
- 1990: tri magnétique
- 1995: nanocristaux
- 2000: détection et quantification de macromolécules d'intérêt biologique



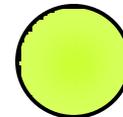
Microbilles: le début !

- ° Réglage et optimisation du cytomètre en flux

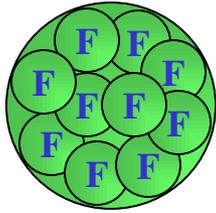


- ° Calibration en taille
et

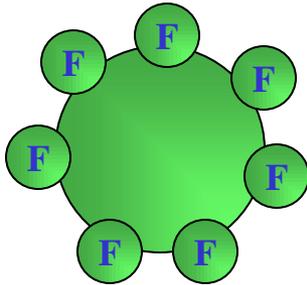
- ° Calibration en fluorescence
(équivalent de molécules fluorescentes par microbilles)



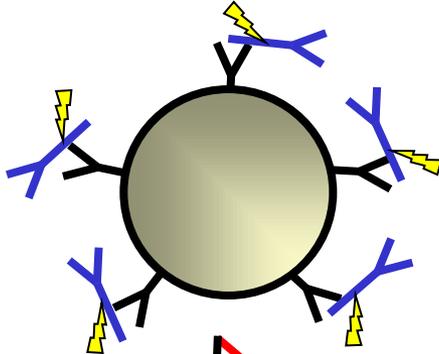
Différents types de microbilles



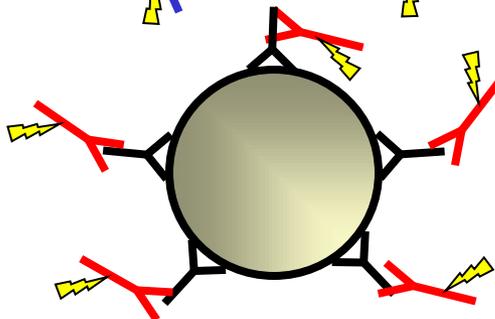
- microbille de calibration avec fluorochrome (F) interne



- microbille de calibration avec fluorochrome externe



- microbille de calibration non fluorescente recouverte d'anticorps anti-IgG pour la quantification antigénique en immunofluorescence directe



- microbille de calibration non fluorescente, mimant la cellule ayant fixé l'anticorps primaire, et sur laquelle se fixe le conjugué pour la quantification antigénique en immunofluorescence indirecte

Concepts d'analyses multiplexes sur microbilles en suspension



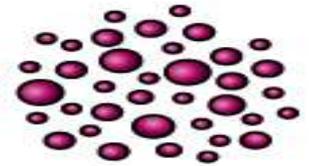
• Tests en tubes



• Microplaques



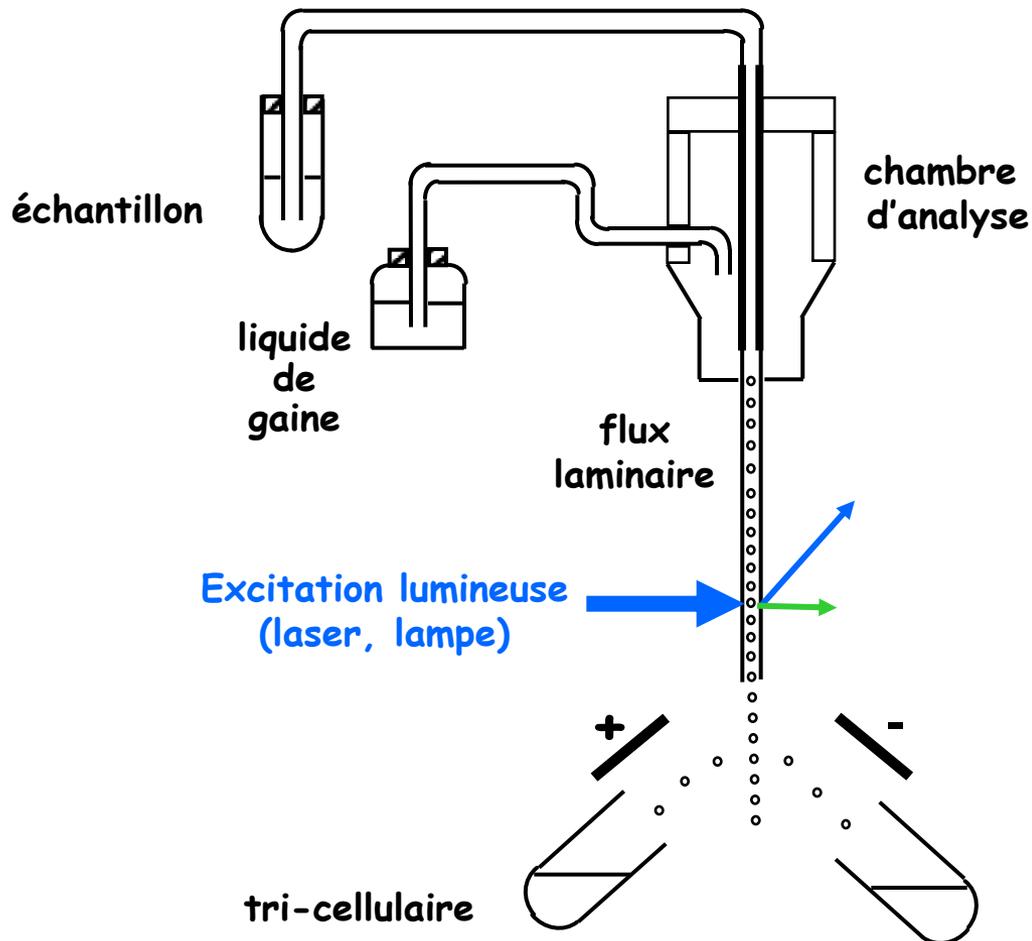
• Microarrays



• Microsphères en suspension

- ° Réactifs et matériels à prix abordables,
- ° Technique assez rapide et assez facile à mettre en œuvre,
- ° Technique réalisable à partir de fluides biologiques, et d'extraits cellulaires et tissulaires
- ° Faible quantité d'échantillon requis (5-10 µl en routine)
- ° Technique alliant spécificité et reproductibilité :
bien adaptée à l'identification de cytokines (de biomarqueurs)

Cytométrie en flux: principe et applications

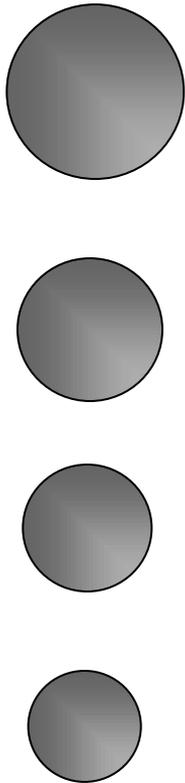


Applications:

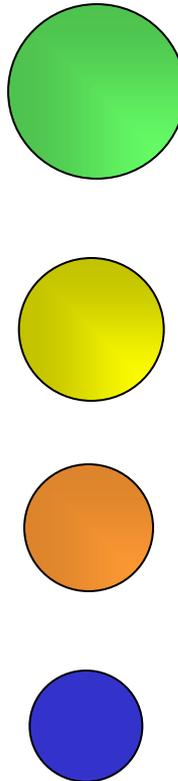
- ° Analyses morphologiques
- ° Analyses antigéniques
- ° Analyses fonctionnelles
- ° **Analyses moléculaires ?
(Analyses multiplexes)**

Distinction de microbilles par cytométrie en flux

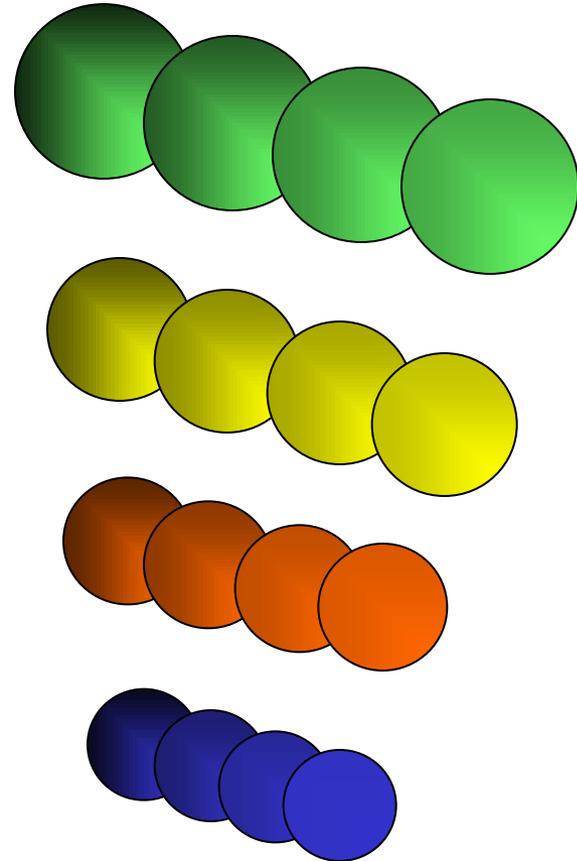
Tailles différentes



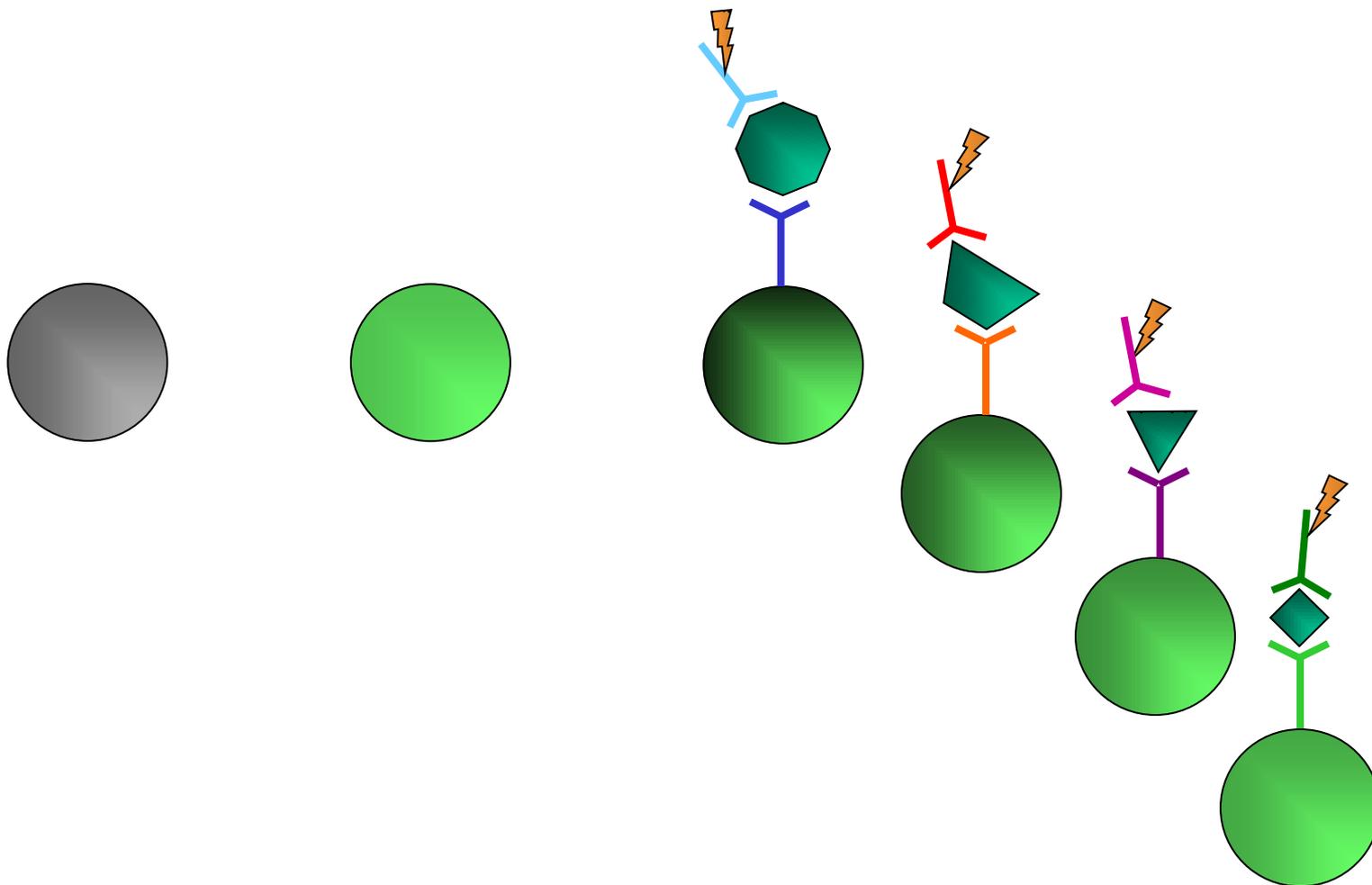
Fluorescences différentes



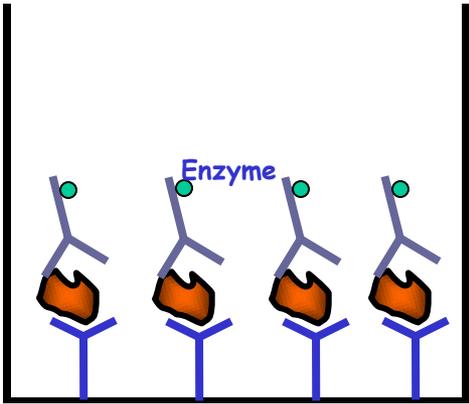
Intensités de fluorescences différentes



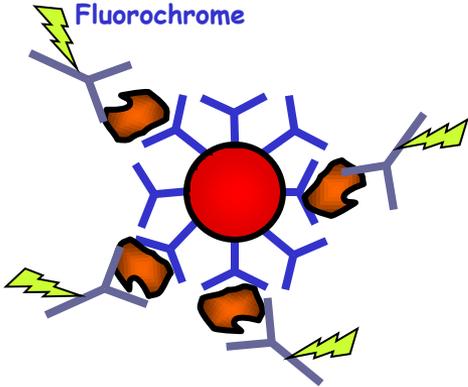
Microbilles et détection d'antigènes



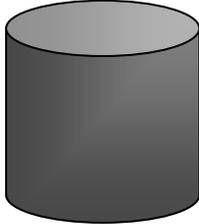
ELISA versus SAT (Suspension Array Technology)



ELISA

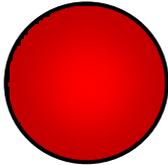


SAT



micropuits

=



microbille

Appareillages et analyses moléculaires par la technologie multiplexe avec des microbilles

° Cytomètres en flux conventionnels

(BD Biosciences, Beckman-Coulter, Guava Technologies, PARTEC)
associés à un logiciel d'analyse approprié
(FCAP Array, Soft Flow Inc)

° Cytomètres en flux spécifiquement dédiés

- FACSarray (BD Biosciences)

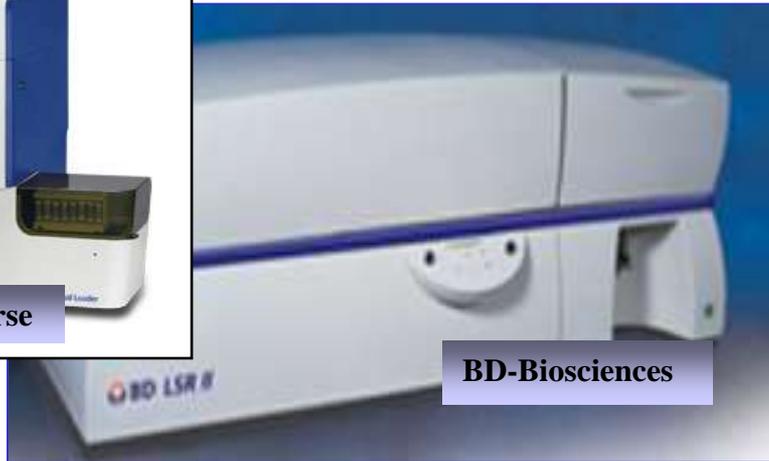
- Système Luminex



Cytomètres en flux et analyses moléculaires



BD-Biosciences FACSVerse



BD-Biosciences



Beckman-Coulter



PARTEC

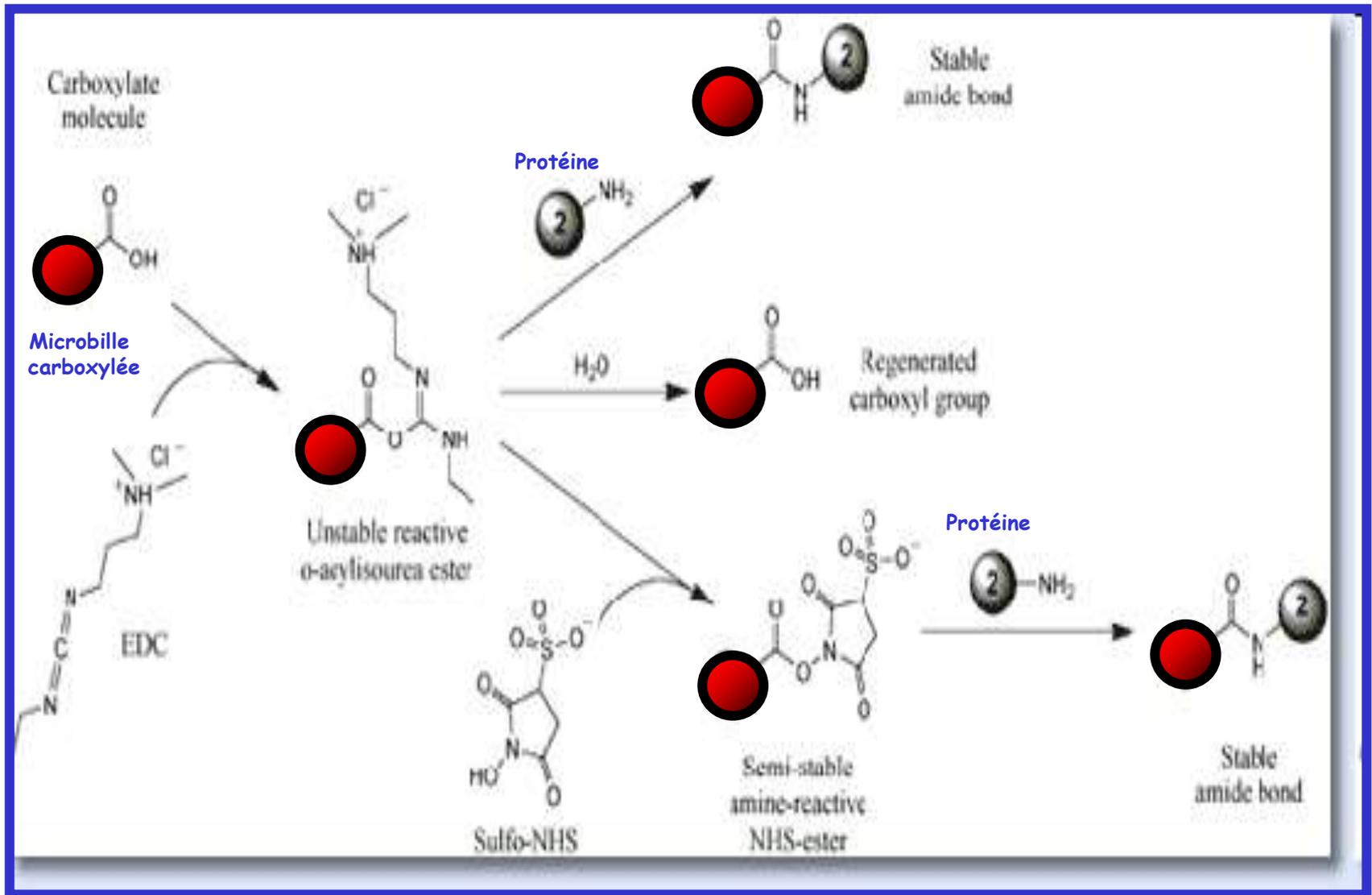


ACCURI Cytometers



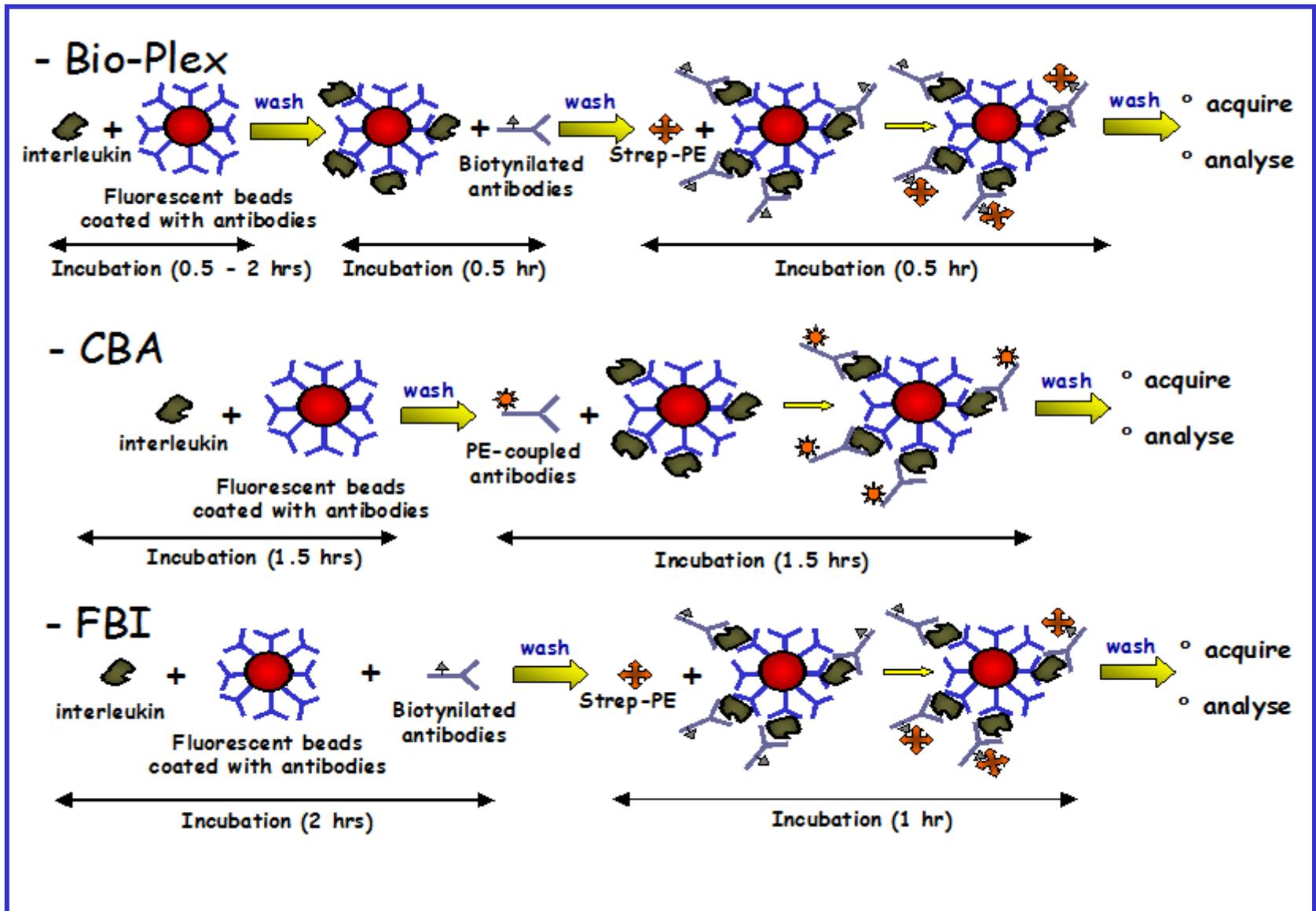
GUAVA Technologies

Couplage de protéines à des microbilles

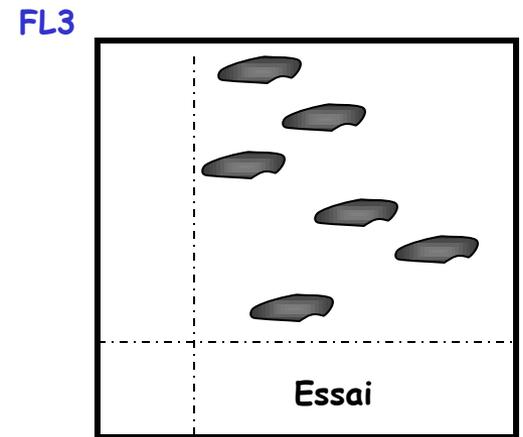
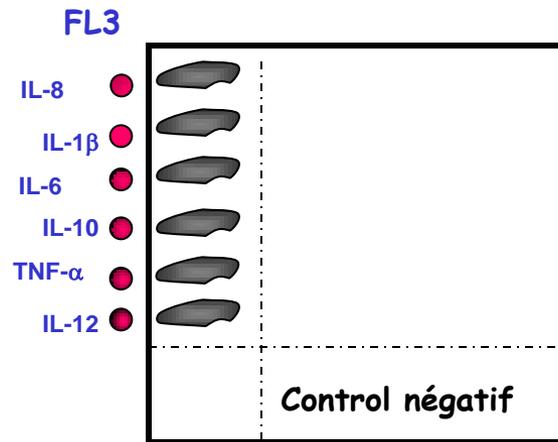
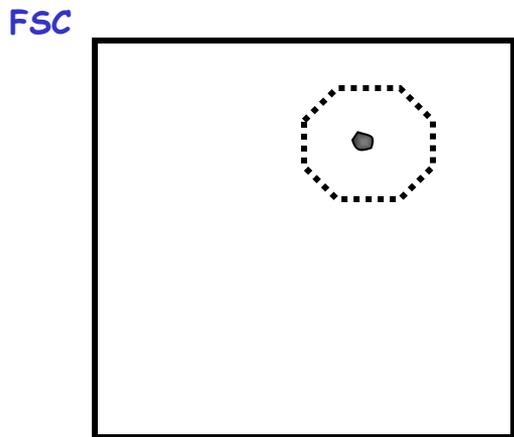
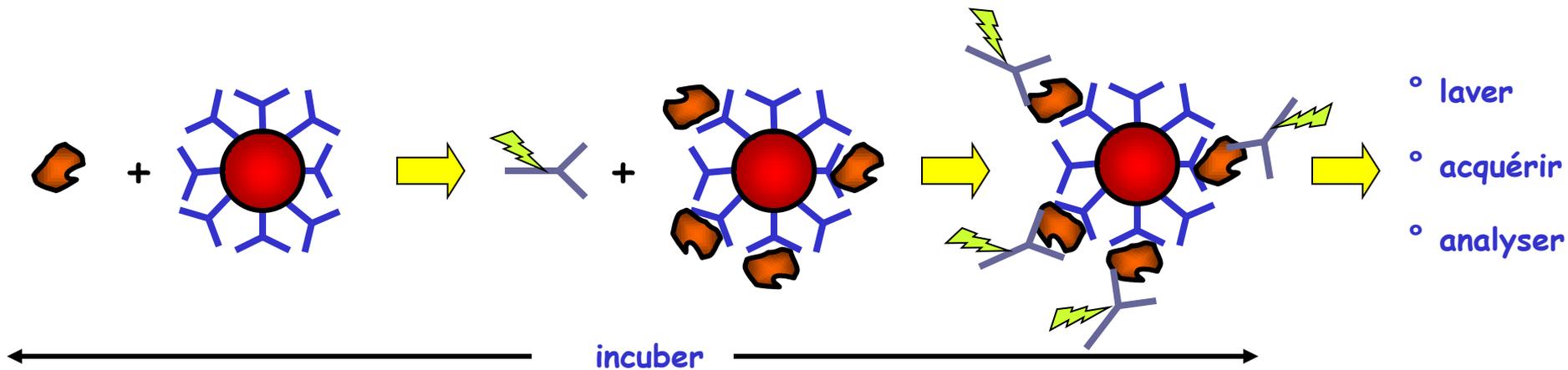


EDC = (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)

Techniques multiplexes et quantification de cytokines

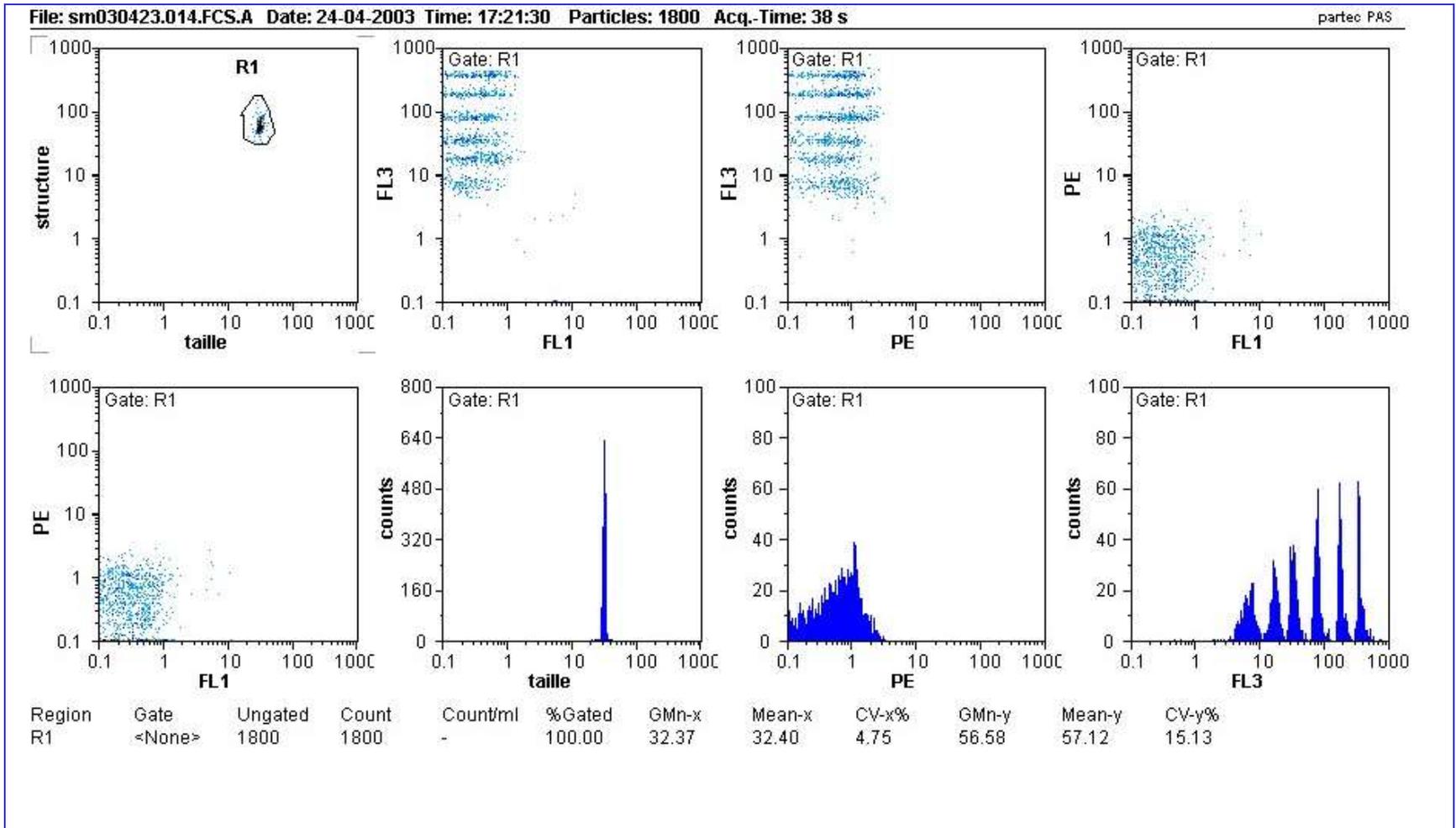


Cytometric Bead Array (CBA)



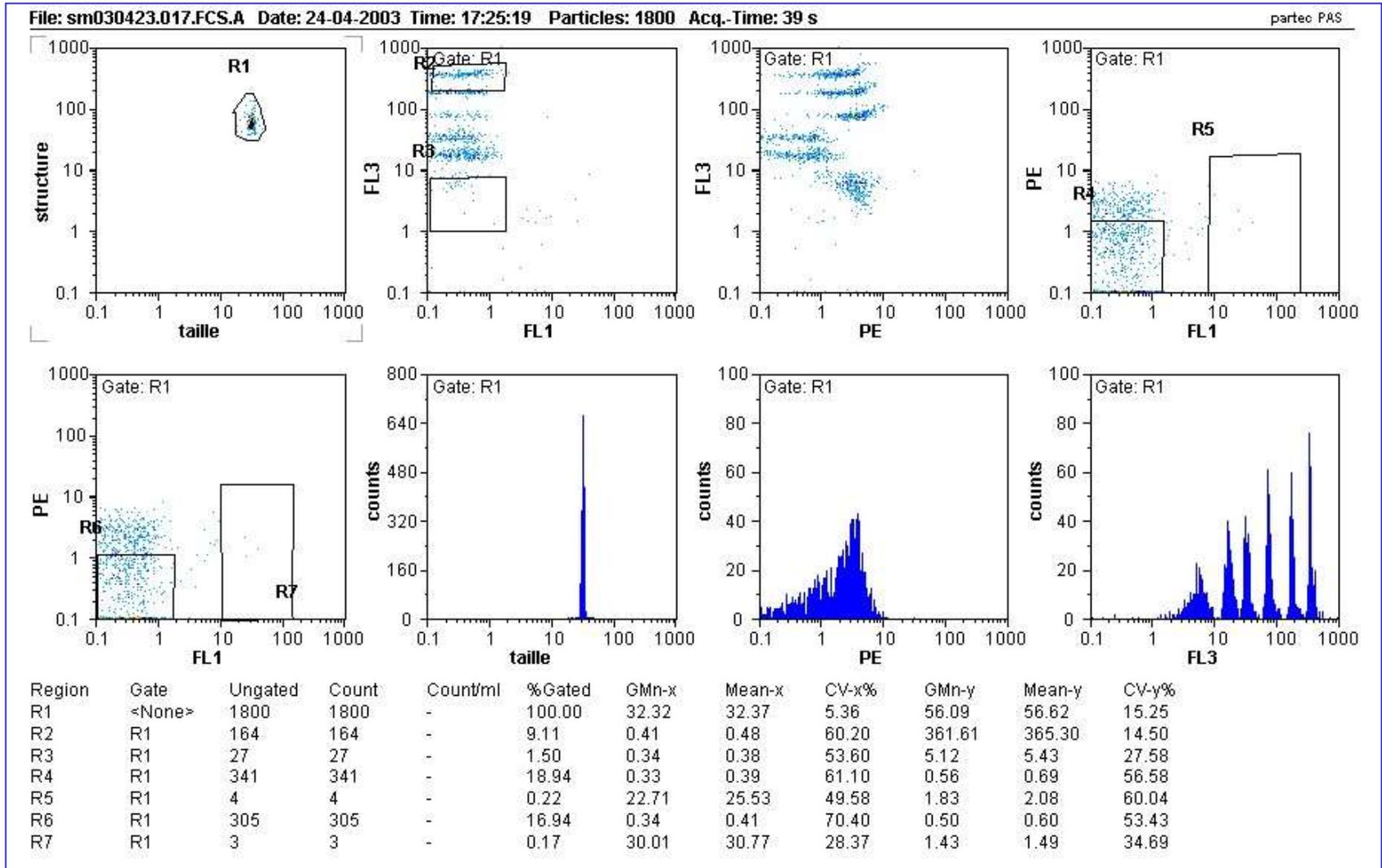
Analyse d'interleukines chez des prématurés: diagnostic d'infections materno-fœtales précoces

Profil cytokinique normal (5-10 µl de sérum)

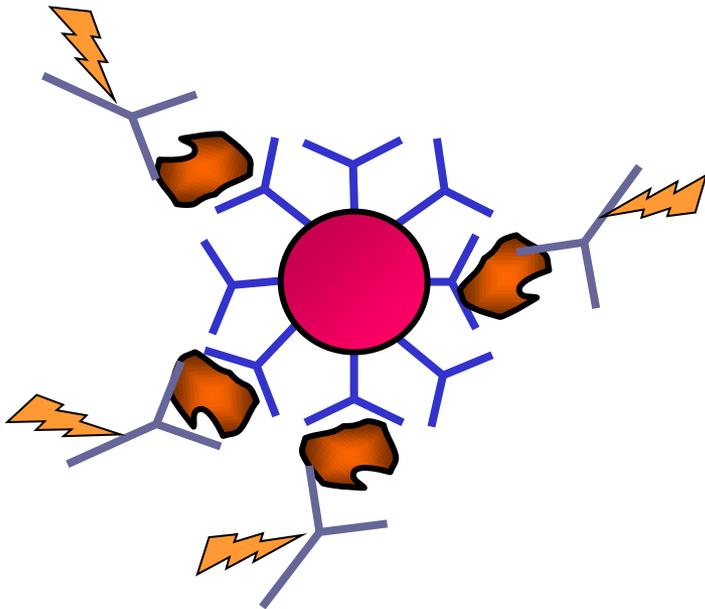


Analyse d'interleukines chez des prématurés: diagnostic d'infections materno-foétales précoces

Profil cytokinique anormal (5-10 µl de sérum)



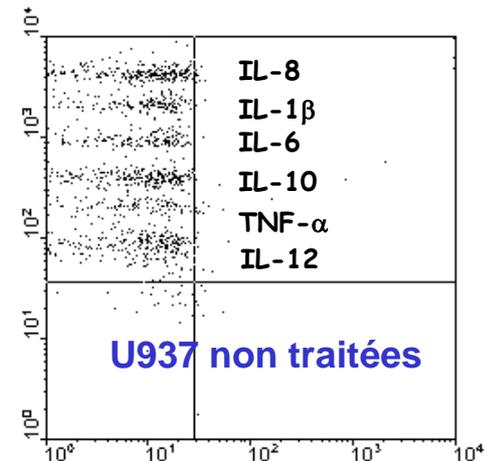
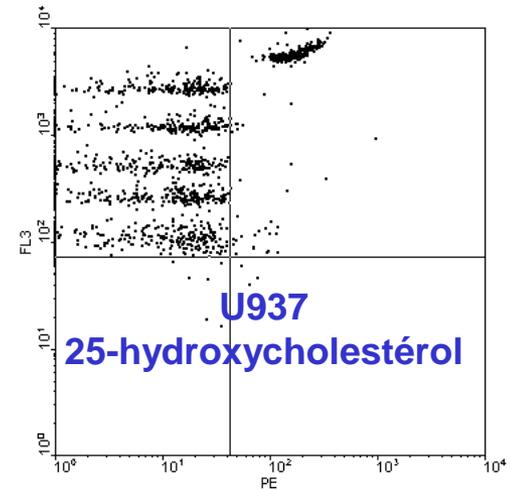
Dosages de cytokines en milieu de culture



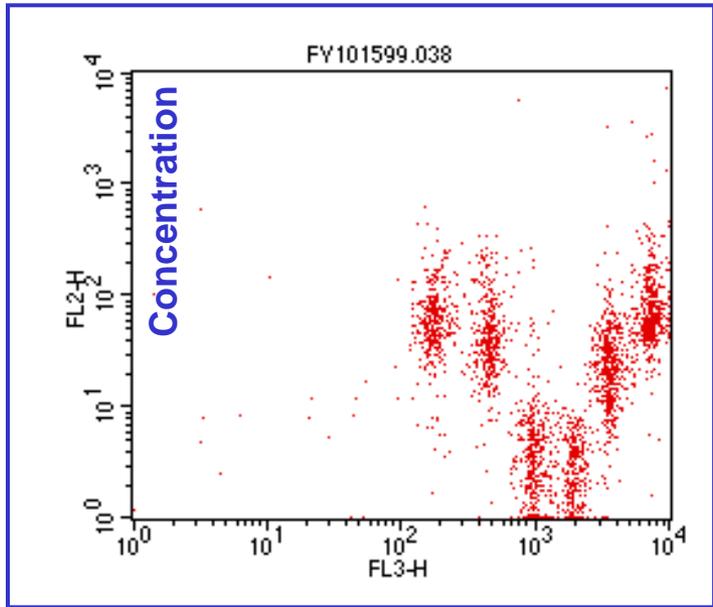
Laser bleu 488 nm

50 µl d'échantillon

- IL-8 ●
- IL-1β ●
- IL-6 ●
- IL-10 ●
- TNF-α ●
- IL-12 ●

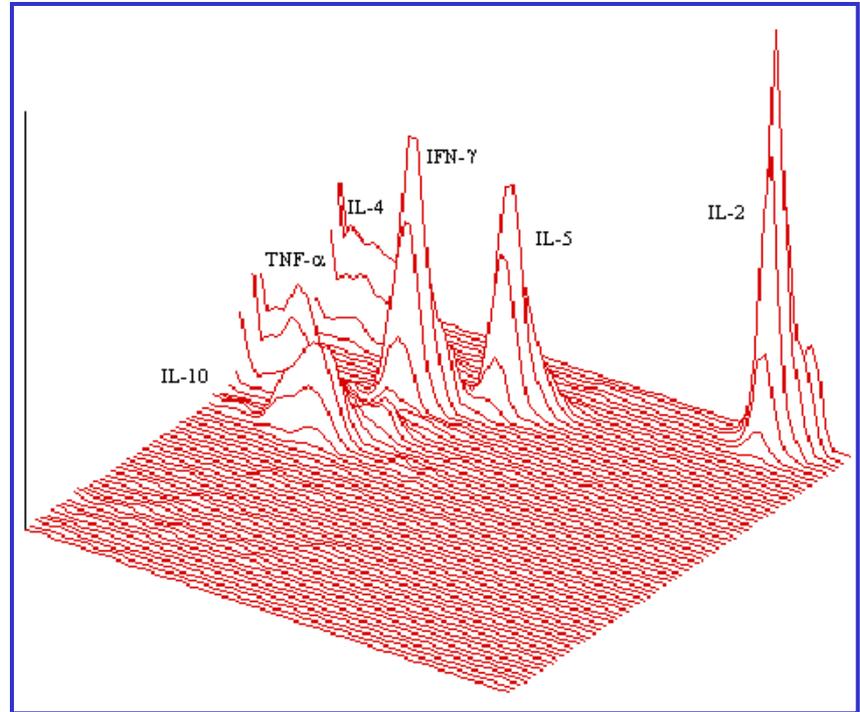


Dosages de cytokines dans les larmes

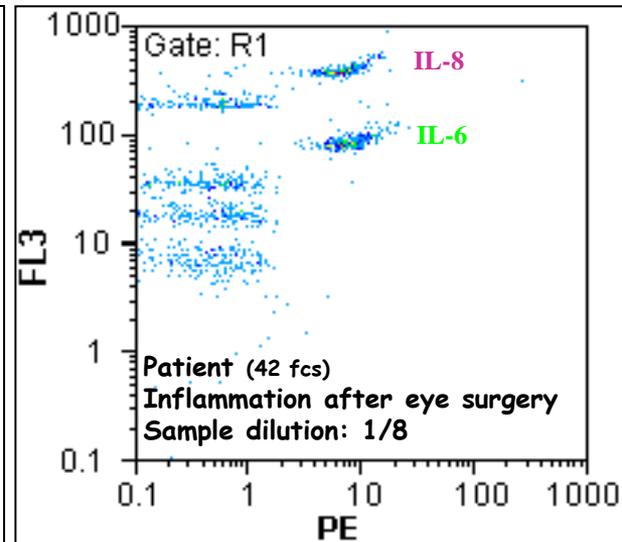
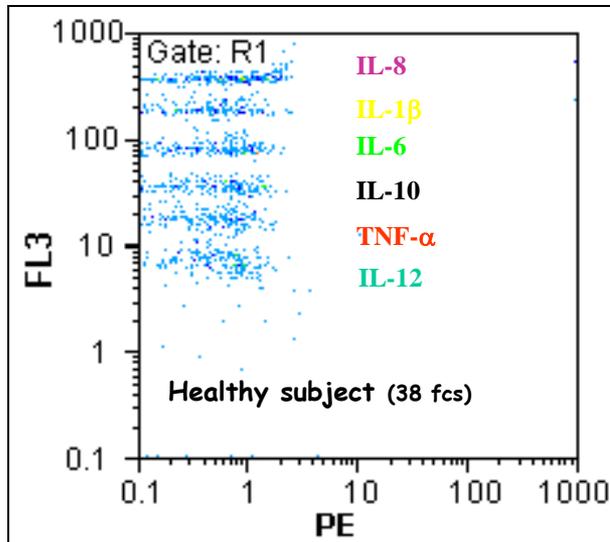
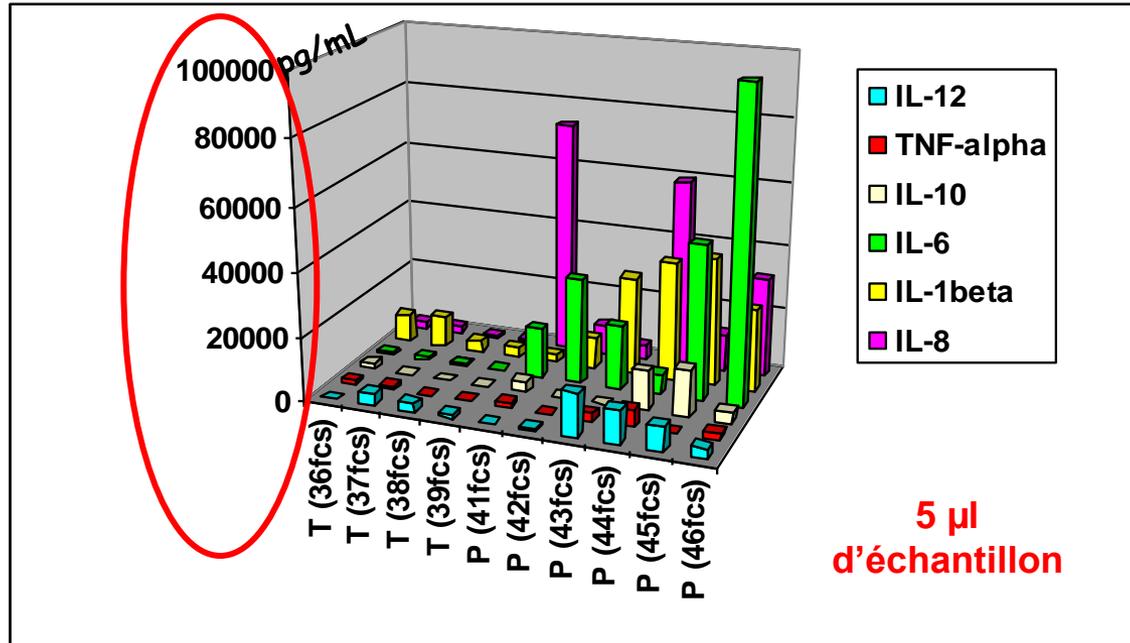


Cytokines Analysées

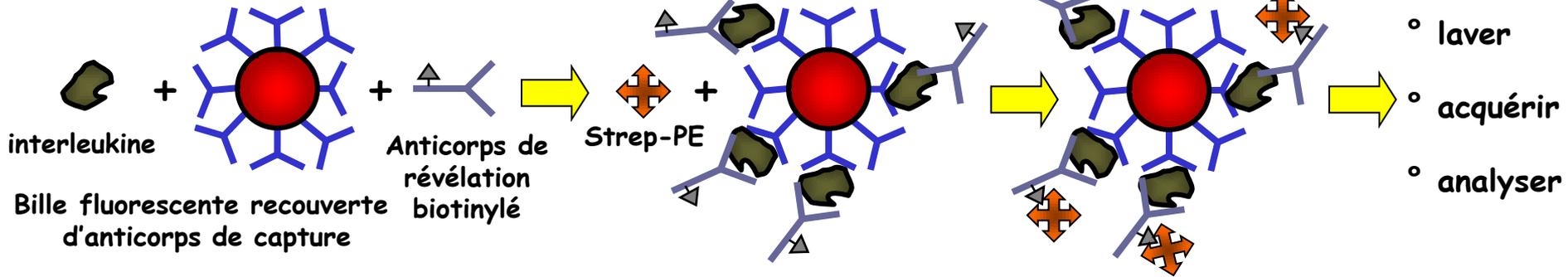
IFN- γ , TNF- α , IL-10, 5, 4, 2



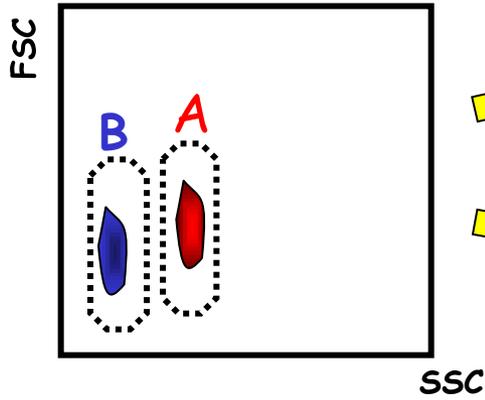
Dosages de cytokines dans les larmes : concentrations de cytokines mesurées



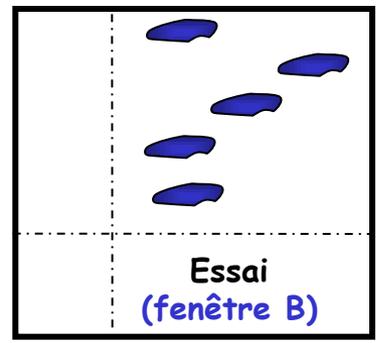
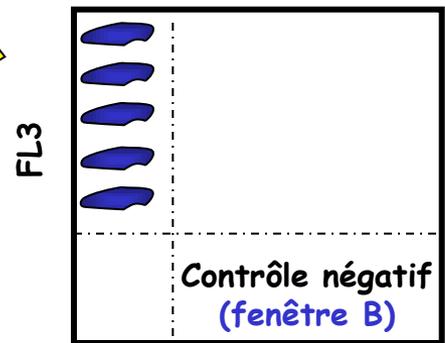
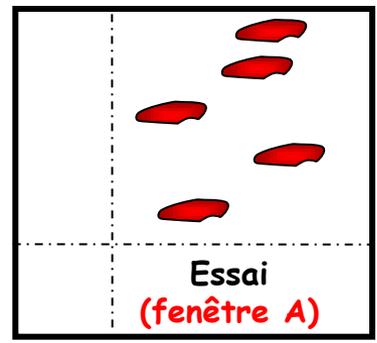
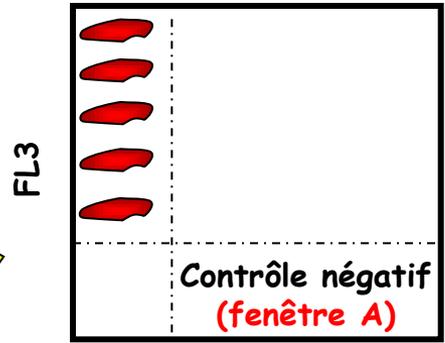
FBI (FlowCytomix; Bender MedSystems)



← incuber →

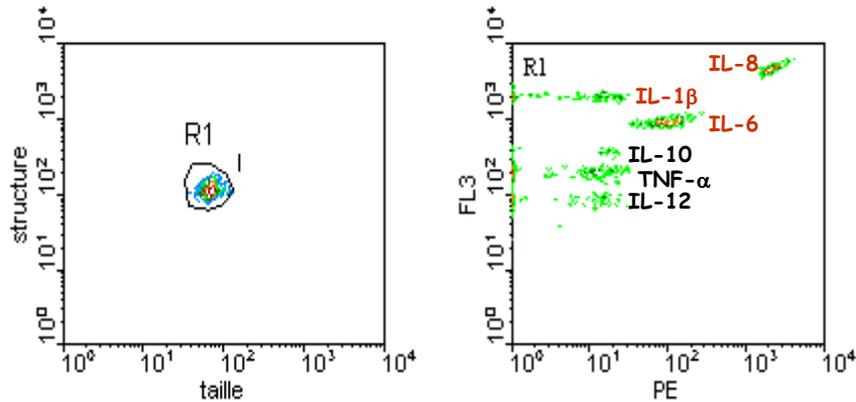


A: billes 5,5 μm
B: billes 4,4 μm

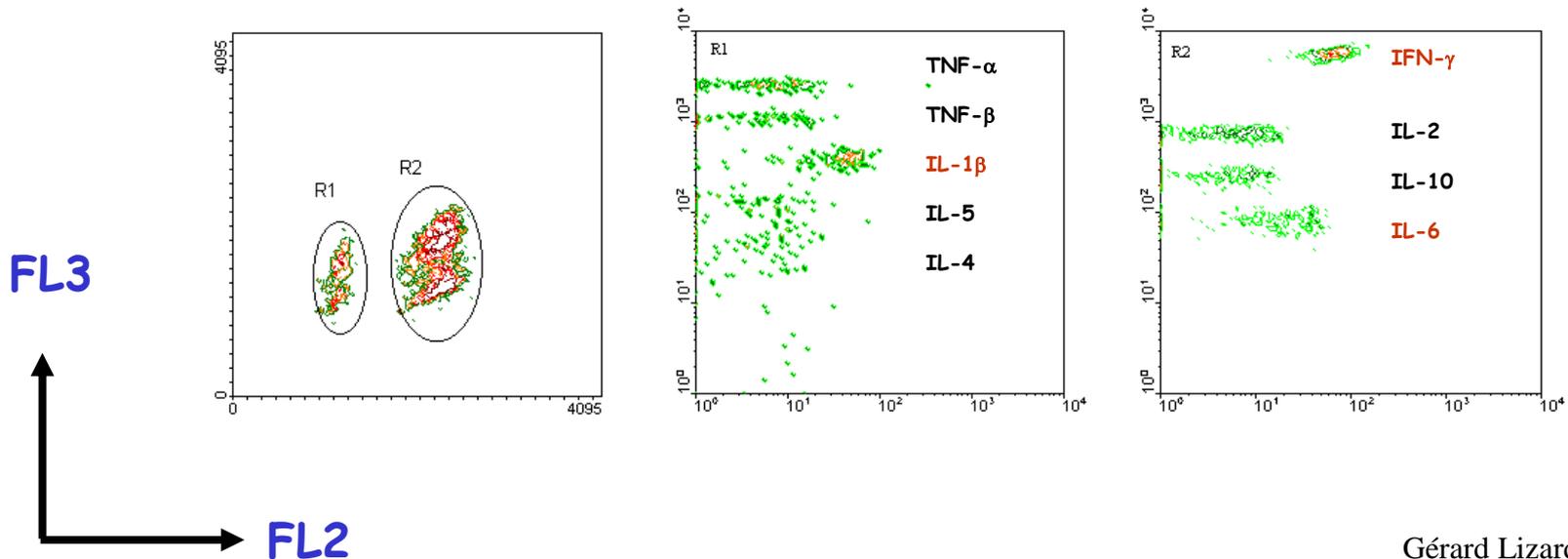


Dosages de cytokines : polyarthrite rhumatoïde

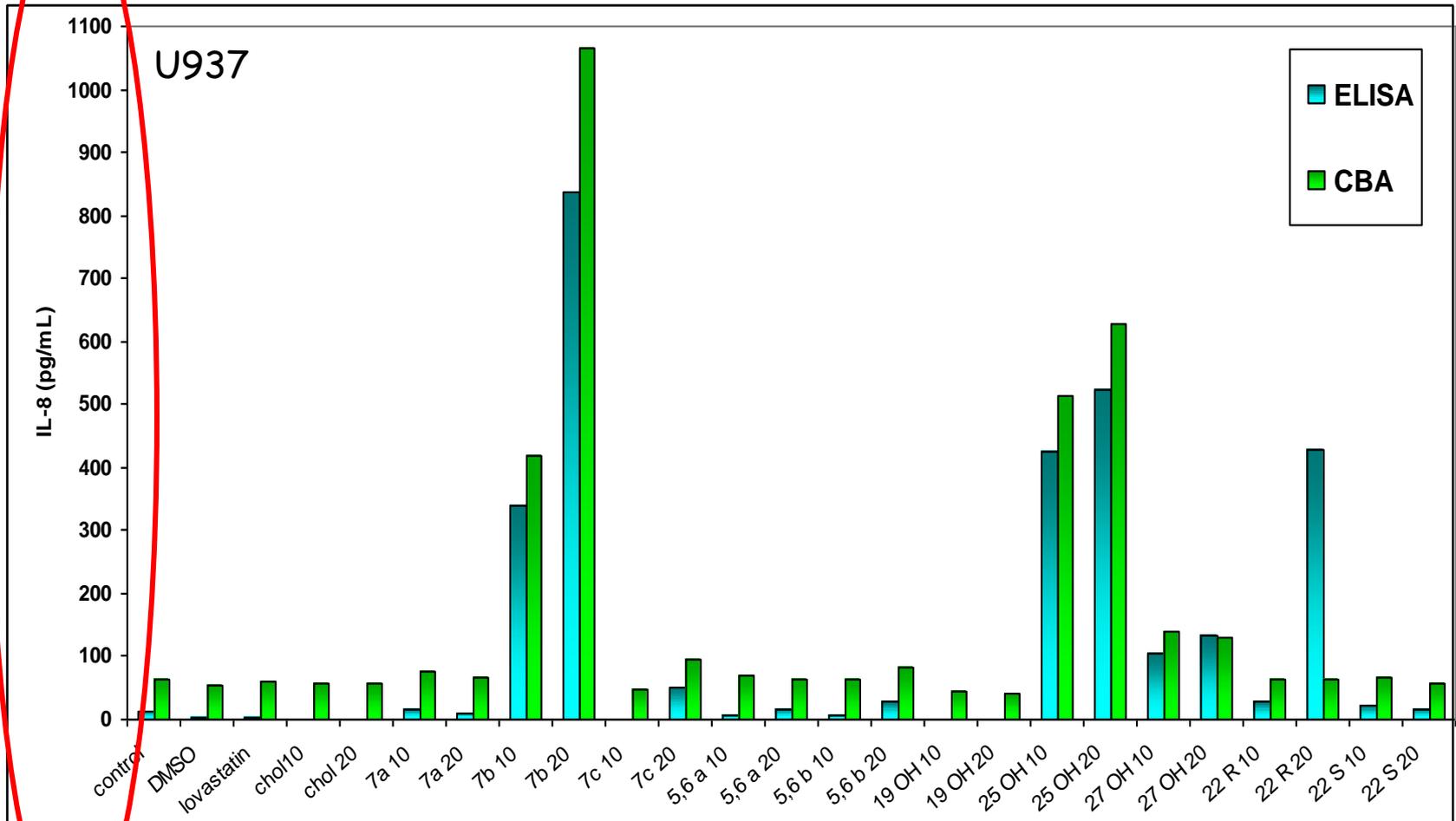
CBA



FACS-Fluorescent Bead Immunoassay



Comparaison de la sécrétion d'IL-8 ELISA / CBA



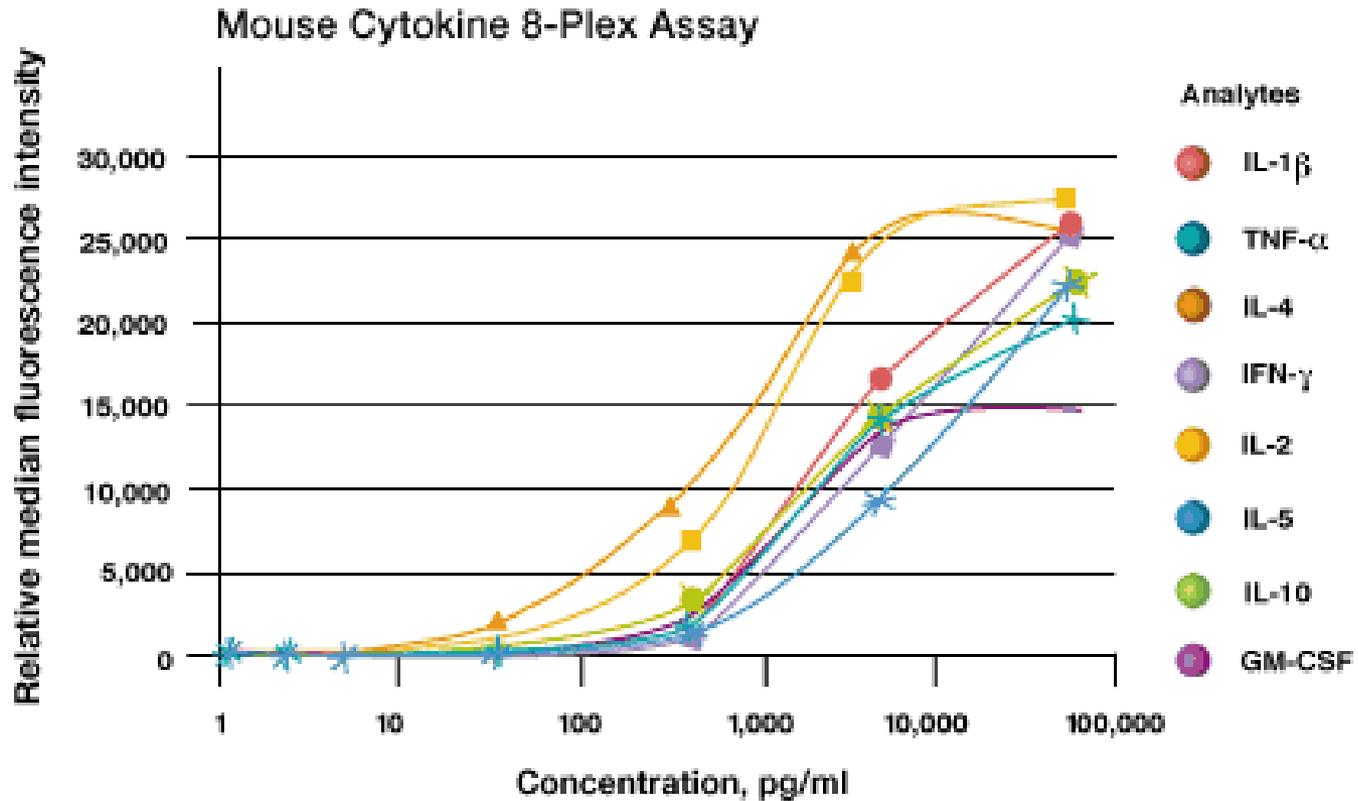
Volume d'échantillon : microbilles versus ELISA



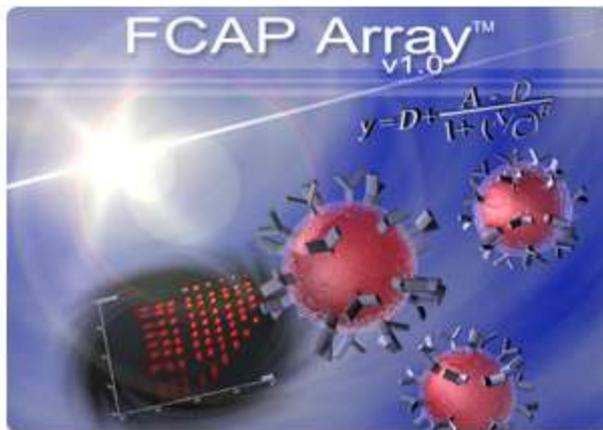
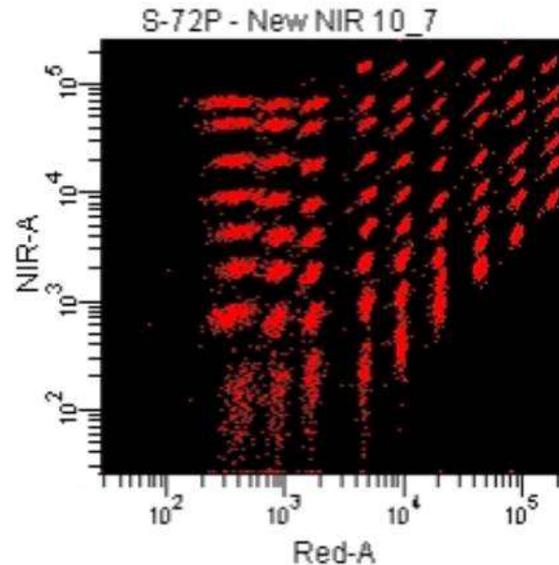
FlowCytomix and Conventional **tebu-bio** *ELISA - Sample Volume*

human	FlowCytomix	ELISAs
IL-1 β	25 μ l	50 μ l
IL-2	25 μ l	50 μ l
IL-4	25 μ l	50 μ l
IL-5	25 μ l	50 μ l
IL-6	25 μ l	50 μ l
IL-8	25 μ l	50 μ l
IL-10	25 μ l	50 μ l
IFN- γ	25 μ l	50 μ l
TNF- α	25 μ l	50 μ l
TNF- β	25 μ l	100 μ l
total	25 μl	550 μl

Gammes étalon



Cytométrie et analyses moléculaires multiplexes : perspectives



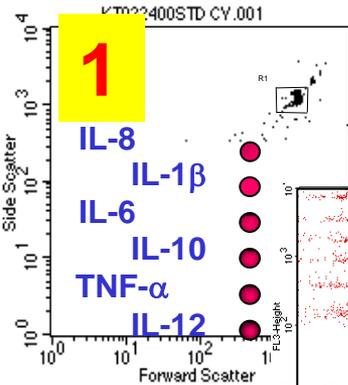
BD FACSCalibur™
BD™ LSR
BD FACSAria™
BD FACSCanto™
BD FACScan™
BD FACSVantage™

Coulter® EPICS XL™
Coulter® EPICS XL-MCL™
Cytomics FC 500
Cytomics FC 500 MPL

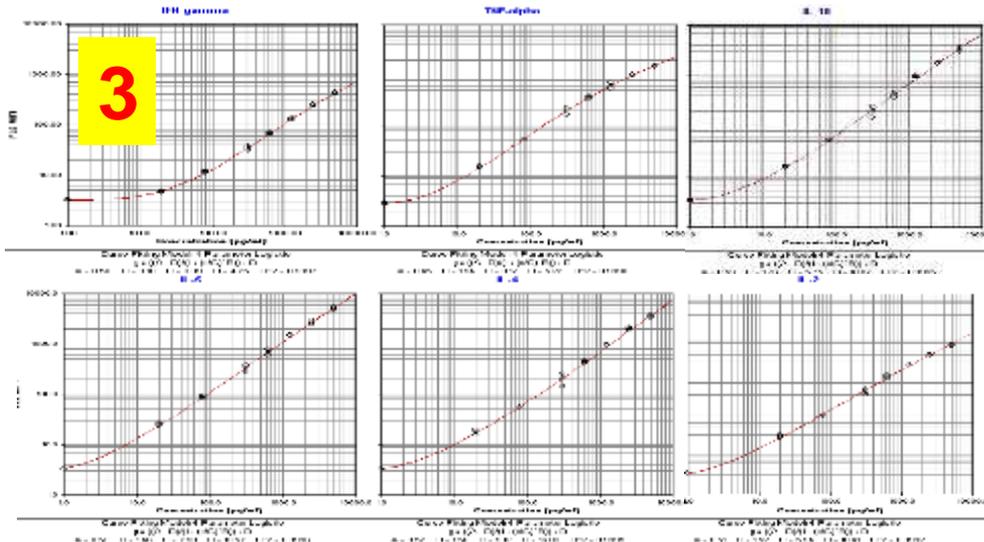
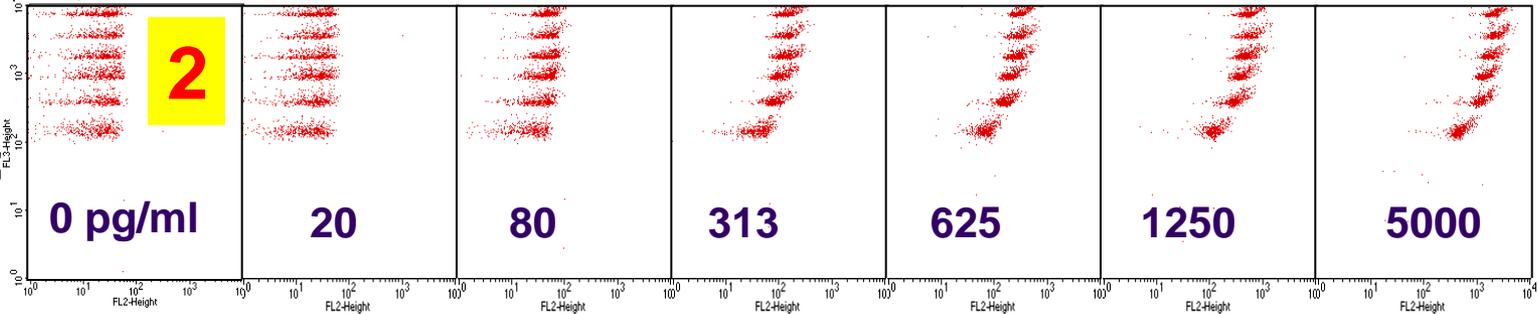
Luminex 100™

- * **Soft Flow Inc;** www://softflow.com
- * **BD-Biosciences**

Gammes étalon : obtention



Région sur les singulets



6 courbes standards
automatiquement
générées par logiciel