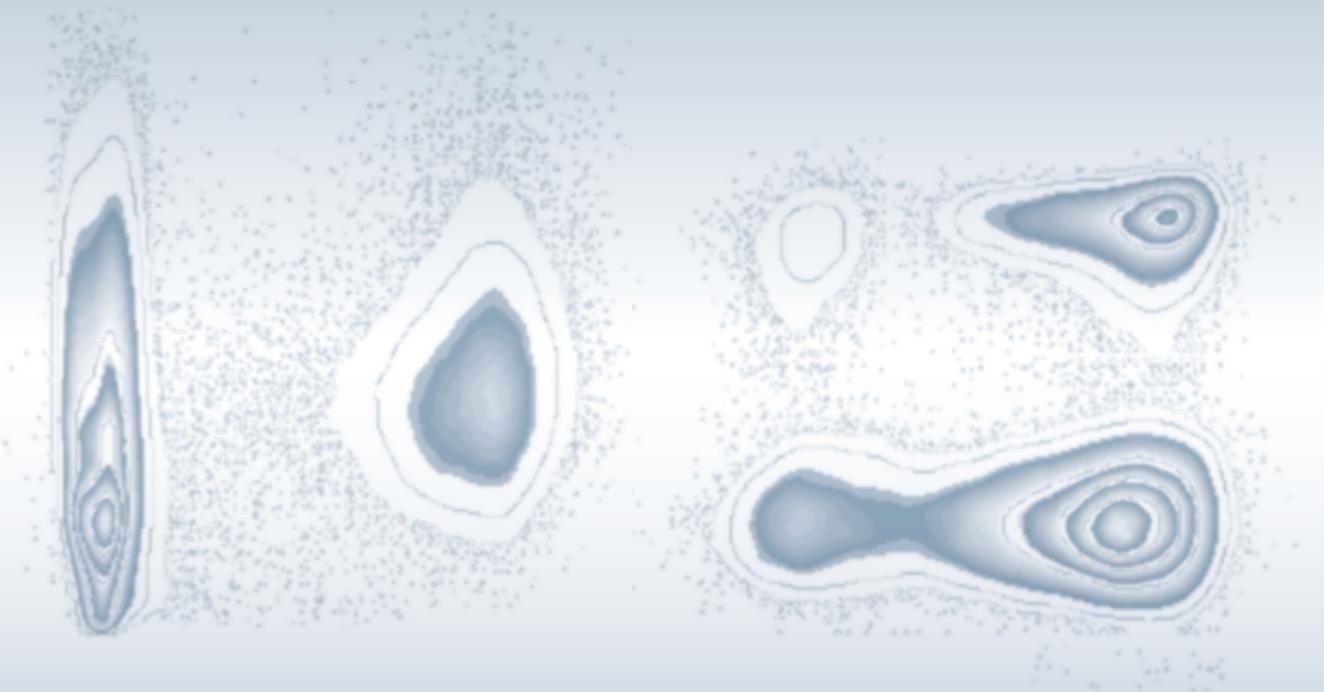


LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

2^e édition

Coordonné par

Jean-François Mayol
Corinne Laplace-Builhé
Christian D. Muller



Lavoisier
TEC & DOC

LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

Chez le même éditeur

Explorations en biochimie médicale : interprétations et orientations diagnostiques, par D. Bonnefont-Rousselot, J.-L. Beaudoux, Ph. Charpiot

Explorations en biochimie médicale : cas cliniques – Interprétations et orientations diagnostiques, par V. Annaix, É. Bigot-Corbel et L. Bermont

Cycle cellulaire et cytométrie en flux, par D. Grunwald, J.-F. Mayol, X. Ronot

Biochimie médicale – Marqueurs actuels et perspectives, par J.-L. Beaudoux, G. Durand

Biologie moléculaire de la cellule, 6^e édition, par B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter

Introduction aux biotechnologies en santé, par S. Bourgoin-Voillard, W. Rachidi et M. Seve

Culture de cellules animales, 3^e édition, par G. Barlovatz-Meimon et X. Ronot

Biochimie, 7^e édition, par J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer

Manuel de poche de biologie cellulaire, par H. Plattner et J. Hentschel

Manuel de poche de microbiologie médicale, par F. H. Kayser, E. C. Böttger, P. Deplazes, O. Haller, A. Roers

Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes, par F. Rusconi

Le technicien d'analyses biomédicales, par J. Béraud

Pour plus d'informations sur nos publications :



newsletters.lavoisier.fr/9782743024901

Coordonné par

Jean-François Mayol

Corinne Laplace-Builhé

Christian D. Muller

LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

2^e édition

Préface de Philippe Métézeau

Direction éditoriale : Jean-Marc Bocabeille
Édition : Brigitte Peyrot
Composition et couverture : Patrick Leleux PAO, Colombelles

© 2020, Lavoisier, Paris
ISBN : 978-2-7430-2490-1

À la mémoire de notre collègue et ami Didier Grunwald

Liste des collaborateurs

Muriel ANDRIEU, Plateforme de Cytométrie et d'Immuno-Biologie CYBIO, Institut Cochin – INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris V, Paris.

Nicolas BAILLY, Université catholique de Louvain, CHU UCL Namur, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Laboratoire d'Hématologie, Yvoir, Belgique.

Élodie BELNOUE, AMAL Therapeutics, Genève, Suisse.

Christine BEZOMBES, INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse.

Catherine BLANC, Plateforme de Cytométrie CyPSUMS 030 – LUMIC, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Paris.

Marielle BOUIX, UMR LGMPA (CBAI), AgroParisTech/SPAB, Thiverval Grignon.

Mickaël BOURGE, Imagerie-Gif Plateforme de Cytométrie, CNRS, Gif-sur-Yvette.

Céline BOUVY, Université de Namur, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Département de Pharmacie, Namur, Belgique.

Chantal BROUZES, Service de Biologie médicale, Hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

Julie CAZARETH, Plateforme de Cytométrie IPMC, CNRS UMR 7275, Sophia Antipolis, Valbonne.

Bernard CHATELAIN, Université catholique de Louvain, CHU UCL Namur, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Laboratoire d'Hématologie, Yvoir, Belgique.

Pierre-Henri COMMERE, Ingénieur Plateforme de Cytométrie en flux, Institut Pasteur, Paris.

Antonio COSMA, IDMIT/FlowCyTech CEA, Fontenay-aux-Roses.

Cécile COTTET-ROUSSELLE, Département de Biologie, Université Grenoble-Alpes, Grenoble.

Céline COUTURIER, UTEC03 – Immunomonitoring BIOASTER, Lyon.

Claire CROLA DA SILVA, INSERM U1060 CarMeN, Équipe 5 « Cardioprotection », Bron.

Émilie DECAUP, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), UMR1037 INSERM, Toulouse.

Yohann DEMONT, CHU d'Amiens, Amiens.

Jean-Michel DOGNÉ, Université de Namur, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Département de Pharmacie, Namur, Belgique.

Hélène DUJARDIN, HCD bioexperts, Nantes.

Christophe DUPERRAY, Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy, Montpellier.

Françoise DURRIEU, Laboratoire de Biologie médicale, Institut Bergonié, Bordeaux.

Tony FAZIO, Covance, Genève, Suisse.

Stéphanie GIRAUDET, Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique – CIMNA – Laboratoire d'Immunologie, Nantes.

Christèle GONNEAU, Covance, Genève, Suisse.

Morgan GRAU, AMAL Therapeutics, Genève, Suisse.

Gérald GRÉGORI, Mediterranean Institute of Oceanography, Marseille.

Pierre GRENOT, ImmunoPHEnomique (CIPHE US12), Marseille.

Didier GRUNWALD†, Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble, Grenoble.

Coralie L. GUÉRIN, Institut Curie & Université de Paris, Paris.

Julien GUY, Service d'Hématologie biologique, CHU de Dijon, Dijon.

Léa GUYONNET, Institut Curie & Université de Paris, Paris.

Sébastien HERBERT, Hub d'Analyse d'images, Institut Pasteur, Paris.

Thierry IDZIOREK, Bio Imaging Center of Lille, Université de Lille, Lille.

Marie-Christine JACOB, Laboratoire d'Immunologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble, La Tronche.

Nathalie JOUY, Bio Imaging Center of Lille, Université de Lille, Lille.

Claude LAMBERT, Laboratoire d'Immunologie, Pôle de Biologie – CHU de St-Étienne, Saint-Étienne.

Corinne LAPLACE-BUILHÉ, UMS AMMICa – Plateforme Imagerie et Cytométrie, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif.

Anne LAZZARI, Plateforme de Cytométrie IPMC CNRS UMR 7275, Sophia Antipolis, Valbonne.

Clément LE BESCOP, Da Volterra, Paris.

Philippe LEFEBVRE, Institut Cochin, Paris.

Stéphane LEONCE, Servier, Oncology Unit, Suresnes.

Fatima-Ezzahra L'FAQIHI, UMR Inserm 1043 CNRS 5282, UT3, Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU Purpan, Toulouse.

Maria Chiara MAIURI, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris.

Dominique MARIE, CNRS, Station biologique de Roscoff, Roscoff.

Véronique MARTEL-FRACHET, Cancer Target and Experimental Therapeutics, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Université Grenoble Alpes, Grenoble. EPHE, PSL Research University, Paris.

Jean-François MAYOL, AMAL Therapeutics, Genève, Suisse.

Didier MÉTIVIER, CNRS, UPR 420, Villejuif.

Maxime MOULARD, BioCytex, Marseille.

Christian D. MULLER, Équipe CAMBA – UMR 7178 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch.

François MULLIER, Université catholique de Louvain, CHU UCL Namur, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Laboratoire d'Hématologie, Yvoir, Belgique.

Annie MUNIER, UMS 30 LUMIC, Faculté de Médecine Sorbonne-Université, Site Saint-Antoine, Plateforme de Cytométrie en Flux, CISA, Paris.

Marie NGUYEN DE BERNON, Unité de Génétique fonctionnelle des maladies infectieuses, Institut Pasteur, Paris.

Pauline OSTYN, UMR 8200 CNRS, Institut Gustave-Roussy, Villejuif.

Martine PERNOLLET, CHU de Grenoble, Grenoble.

Philippe PONCELET, Département Recherche et Technologie, BioCytex SARL, Marseille.

Florent RAFFIN, Institut de Recherche biomédicale des Armées, Bretigny-sur-Orge.

Philippe RAMEAU, UMS AMMICa – Plateforme Imagerie et Cytométrie, Gustave-Roussy Cancer Campus, Villejuif.

Fabienne RIGAUT-JALABERT, CNRS, Station biologique de Roscoff, Roscoff.

Xavier RONOT, EPHE, PSL Research University, Paris.

Peggy SANATINE, Généthon, Évry.

Béatrice SATIAT-JEUNEMAÎTRE, Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette.

Nicolas TCHITCHECK, i3 Research unit, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière – Université de la Sorbonne, Paris.

Fabrice THOMAS, Département de Chimie moléculaire, Université Grenoble Alpes, UMR-5250 CNRS UGA, CS 40700, Grenoble.

Michel TICCHIONI, Laboratoire d'Immunologie, CHU de Nice, Nice.

Yasmine TOUIL, Centre de Recherche Jean Pierre Aubert, U837, Lille.

Adeline WANNEZ, Université de Namur, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Département de Pharmacie, Namur, Belgique.

Naoufal ZAMZAMI, CNRS, UPR 420, Villejuif.

Sommaire

| | |
|---|-------|
| Liste des collaborateurs | VII |
| Préface (Philippe Métézeau) | XXI |
| Abréviations | XXIII |
| Avant-propos (Lydia Campos) | XXXI |
| | |
| Chapitre 1 Les principes de la cytométrie en flux (Pierre Grenot, Gérald Grégori, Jean-François Mayol, Didier Grunwald, Christophe Duperray) | 1 |
| 1. Une brève histoire de la cytométrie en flux | 2 |
| 2. Principes généraux de la cytométrie en flux | 5 |
| 2.1. Composante fluidique | 5 |
| 2.2. Composante optique | 8 |
| 2.3. Composante électronique | 15 |
| 3. Représentation des données | 21 |
| 4. Maîtrisez votre cytomètre | 21 |
| 4.1. Réglages des photodétecteurs | 22 |
| 4.2. Compensation de fluorescence | 25 |
| 5. Tri cellulaire | 26 |
| 5.1. Tri mécanique | 26 |
| 5.2. Tri électrostatique | 26 |
| 6. Sécurité | 28 |
| 7. Nouvelles approches | 30 |
| 7.1. Cytométrie en flux spectrale | 30 |
| 7.2. Cytométrie capillaire microvolume | 32 |
| 7.3. Cytomètre de masse (CyTOF) | 32 |
| 7.4. Cytométrie en flux automatisée et <i>in situ</i> | 33 |
| 8. La cytométrie en flux de demain | 35 |
| | |
| Chapitre 2 Le tri cellulaire et la biosécurité (Pierre Henri Commère, Philippe Rameau) | 39 |
| 1. Introduction | 40 |
| 2. Théorie du tri cellulaire | 40 |
| 2.1. Fluide transporteur | 40 |
| 2.2. Fluidique du tri | 41 |
| 3. Physique de la fluidique | 41 |
| 3.1. Flux laminaire : équation de Reynolds | 41 |
| 3.2. Générations des gouttelettes : équation de Bernoulli | 42 |
| 3.3. Causes de mortalité cellulaire | 42 |
| 4. Notion d'enveloppe de tri et de retard de charge (<i>drop delay</i>) | 42 |
| 4.1. Enveloppe de tri | 43 |
| 4.2. Détermination du nombre de cellules par enveloppe de tri | 43 |
| 5. Acquisition du signal | 43 |
| 5.1. Notion de temps mort | 44 |

| | |
|--|----|
| 6. Aspects pratiques du tri | 45 |
| 6.1. Déclenchement du signal sur la hauteur du signal | 45 |
| 6.2. Élimination du signal provenant des débris cellulaires | 45 |
| 7. Stratégies de tri | 45 |
| 7.1. Pré-enrichissement de l'échantillon par tri magnétique ou par élutriation | 46 |
| 7.2. Enrichissement de l'échantillon à l'aide d'un trieur | 46 |
| 8. Quelques facteurs importants pour le tri | 49 |
| 9. Biosécurité du tri | 49 |
| 9.1. Risques et protections adaptées | 50 |
| 9.2. Amélioration des machines | 50 |
| 9.3. Quelques bonnes pratiques pour réduire significativement les risques | 51 |
| 10. Conclusion | 51 |
| | |
| Chapitre 3 Les fluorochromes (Florent Raffin) | 53 |
| 1. Fluorescence | 54 |
| 2. Choix des fluorochromes | 56 |
| 2.1. Fluorochromes couplés à des anticorps | 57 |
| 2.2. Sondes et substrats fluorogènes | 61 |
| 2.3. Protéines fluorescentes | 70 |
| 2.4. Quantum dots | 72 |
| 3. Fluorochrome et sécurité | 72 |
| | |
| Chapitre 4 L'analyse multi-couleurs en cytométrie en flux conventionnelle (Julie Cazareth, Anne Lazzari) | 75 |
| 1. Préparation des échantillons | 76 |
| 1.1. Les différents types d'échantillons | 76 |
| 1.2. Dissociation | 76 |
| 1.3. Choix et mise au point des cocktails enzymatiques | 77 |
| 1.4. Élimination des globules rouges, ou désérythrocytation | 77 |
| 1.5. Séparation et pré-enrichissement cellulaire | 78 |
| 2. Les différentes étapes de marquages | 78 |
| 2.1. Comptage cellulaire | 78 |
| 2.2. Blocage des sites de fixation non spécifiques | 79 |
| 2.3. Immunomarquage | 79 |
| 2.4. Marquage des cellules mortes | 79 |
| 2.5. Fixation et perméabilisation des cellules | 79 |
| 3. Prérequis du <i>panel design</i> | 80 |
| 3.1. Antigènes cibles et co-marquages attendus | 80 |
| 3.2. Autofluorescence | 81 |
| 3.3. Sondes fluorescentes | 81 |
| 3.4. Configuration optique du cytomètre | 81 |
| 3.5. Performances et réglages du cytomètre | 82 |
| 3.6. Titration des anticorps | 84 |
| 4. Les clés du <i>panel design</i> : maîtriser le pipeline expérimental | 86 |
| 5. Spécificités de la cytométrie multi-couleurs | 88 |
| 5.1. Influence de l'échantillon sur la qualité des marquages | 88 |
| 5.2. Sondes « tandem » | 88 |
| 5.3. Contrôle de l'échantillon | 88 |
| 5.4. Contrôle qualité | 89 |
| 5.5. Standardisation | 90 |
| 5.6. Mise en place de la stratégie d'analyse | 90 |
| 6. Particularités de l'analyse spectrale | 91 |
| 7. Conclusion et perspectives | 93 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 5 Les données de cytométrie en flux : affichage, contenu, représentation et optimisation (Hélène Dujardin, Corinne Laplace-Builhé) | 97 |
| 1. Affichage des données de cytométrie en flux | 98 |
| 1.1. Visualisation des résultats | 98 |
| 1.2. Échelles utilisées | 100 |
| 2. Enregistrement des données de cytométrie en flux | 102 |
| 2.1. Informations contenues dans les fichiers de cytométrie | 102 |
| 2.2. Standards des fichiers de cytométrie | 103 |
| 3. Outils pour l'analyse supervisée manuelle et optimisation des données de cytométrie | 103 |
| 3.1. Bases de la sélection des populations d'intérêt | 103 |
| 3.2. Sélection sur les paramètres FSC et SSC et temps : une option préliminaire utile | 105 |
| 3.3. Stratégie de gestion des échantillons et des données pour optimiser les résultats | 105 |
| 4. Conclusion | 111 |
| | |
| Chapitre 6 L'analyse de données cytométriques de grande dimension (Nicolas Tchitchek, Clément Le Bescop) | 113 |
| 1. Introduction | 114 |
| 2. Stockage des données cytométriques | 114 |
| 3. Prétraitement des données cytométriques | 114 |
| 4. Analyses manuelles de données cytométriques | 116 |
| 5. Identification automatique de populations cellulaires | 116 |
| 5.1. Algorithme SPADE | 117 |
| 5.2. Algorithme Citrus | 118 |
| 5.3. Algorithme viSNE | 118 |
| 6. Analyse des clusters cellulaires identifiés | 119 |
| 6.1. Analyse de la diversité phénotypique des populations cellulaires identifiées | 119 |
| 6.2. Analyse du comportement des clusters cellulaires identifiés | 122 |
| 7. Intégration de données de cytométrie | 122 |
| 8. Modélisation mathématique et prédiction des états physiopathologiques | 124 |
| 9. Diffusion des données cytométriques | 125 |
| | |
| Chapitre 7 Les statistiques en cytométrie en flux (Nicolas Bailly, Bernard Chatelain, François Mullier) | 127 |
| 1. Statistiques descriptives | 128 |
| 1.1. Statistiques de base | 128 |
| 1.2. Statistiques robustes | 129 |
| 2. Statistiques comparatives | 130 |
| 2.1. Index de séparation | 130 |
| 2.2. Distinguer une différence de fluorescence | 131 |
| 3. Précision de la mesure | 134 |
| 3.1. Loi de Poisson | 134 |
| 3.2. Impact de la résolution de l'instrument sur les statistiques | 135 |
| 4. Expression et interprétation des contrôles de qualités | 135 |
| 4.1. Contrôles de qualité internes | 135 |
| 4.2. Contrôles de qualité externes | 136 |
| | |
| Chapitre 8 Le cycle cellulaire (Véronique Martel-Frchet, Fabrice Thomas, Annie Munier, Xavier Ronot) | 141 |
| 1. Préparation des échantillons (suspension cellulaire ou noyaux) | 142 |
| 1.1. Cellules entières | 142 |
| 1.2. Obtention de noyaux | 142 |

| | |
|--|-----|
| 2. Fixation | 143 |
| 2.1. Principe | 143 |
| 2.2. Propriétés des agents fixateurs | 143 |
| 3. Fluorochromes d'intérêt pour l'analyse du cycle cellulaire | 144 |
| 3.1. Les différentes familles | 144 |
| 3.2. Stœchiométrie | 144 |
| 4. Analyse monoparamétrique | 144 |
| 4.1. Principe | 144 |
| 4.2. Coefficient de variation | 145 |
| 4.3. Élimination des doublets et agrégats | 147 |
| 5. Quantification des fractions de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire | 148 |
| 5.1. Méthode du miroir | 148 |
| 5.2. Modèles mathématiques | 148 |
| 6. Analyse multiparamétrique | 149 |
| 6.1. Distinction G0/G1 : l'antigène Ki67 | 149 |
| 6.2. Analyse de la phase S | 150 |
| 6.3. Distinction G2+M | 151 |
| 6.4. Exemple d'un double marquage pour la quantification des cellules dans les différentes phases du cycle et en apoptose | 152 |
| 6.5. Cyclines | 152 |
| 6.6. PCNA | 152 |
| 7. Exemples de protocoles | 153 |

Chapitre 9 Les applications en hématologie et immunologie médicales (Martine Pernollet,

| | |
|---|-----|
| Marie-Christine Jacob) | 157 |
| 1. Caractérisation immunophénotypique des cellules hématopoïétiques | 158 |
| 1.1. Lymphocytes T | 158 |
| 1.2. Lymphocytes innés | 159 |
| 1.3. Lymphocytes B | 162 |
| 1.4. Cellules myéloïdes | 163 |
| 1.5. Cellules dendritiques | 163 |
| 2. Exploration des sous-populations leucocytaires selon les sites de prélèvement | 163 |
| 2.1. Sang périphérique | 163 |
| 2.2. Moelle osseuse | 168 |
| 2.3. Biopsies de ganglions ou de tissus lymphoïdes | 168 |
| 3. Étude des déficits immunitaires primitifs ou acquis | 169 |
| 3.1. Diagnostic des déficits immunitaires primitifs | 169 |
| 3.2. Déficits immunitaires acquis : numération des lymphocytes T CD4 et VIH | 172 |
| 4. Immunophénotypage des hémopathies malignes | 173 |
| 4.1. Leucémies aiguës | 174 |
| 4.2. Syndromes lymphoprolifératifs de la lignée B (SLP-B) | 176 |
| 4.3. Syndromes lymphoprolifératifs des lignées T ou NK (SLP-T/NK) | 183 |
| 4.4. Étude de la maladie résiduelle | 186 |
| 4.5. Autres pathologies | 186 |
| 5. Numération des CD34 dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques | 187 |
| 5.1. Monitoring des donneurs de CSP après mobilisation | 188 |
| 5.2. Validation des greffons | 188 |
| 5.3. Technique | 188 |
| 6. Diagnostic d'hémoglobinurie paroxystique nocturne | 188 |
| 6.1. Généralités | 188 |
| 6.2. Méthodologie | 189 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 10 Les applications en immunologie (Morgan Grau, Élodie Belnoue) | 193 |
| 1. Immunité innée | 194 |
| 1.1. Acteurs de l'immunité innée | 194 |
| 1.2. Mécanismes effecteurs de l'immunité innée | 195 |
| 2. Immunité adaptative | 198 |
| 2.1. Lymphocytes T | 198 |
| 2.2. Lymphocytes B | 209 |
| | |
| Chapitre 11 La détection des vésicules extracellulaires (Adeline Wannez, Céline Bouvy, Jean-Michel Dogné, Nicolas Bailly, Bernard Chatelain, Philippe Poncelet, François Mullier) | 213 |
| Préambule | 214 |
| 1. Introduction | 214 |
| 1.1. Vésicules extracellulaires : définition | 214 |
| 1.2. Intérêts cliniques des vésicules extracellulaires | 214 |
| 2. Analyse des vésicules extracellulaires en cytométrie en flux | 215 |
| 2.1. Analyses sur vésicules isolées | 215 |
| 2.2. Analyses sur liquides biologiques | 216 |
| 2.3. Analyse des vésicules extracellulaires par cytométrie en flux | 218 |
| 3. Autres méthodes d'analyse des vésicules extracellulaires | 222 |
| 4. Conclusion | 223 |
| | |
| Chapitre 12 La détection des évènements rares (Thierry Idziorek, Nathalie Jouy, Yasmine Touil, Pauline Ostyn) | 225 |
| 1. Introduction | 226 |
| 1.1. Généralités | 226 |
| 1.2. Cellules souches | 226 |
| 2. Identification par méthode enzymatique : activité de l'aldéhyde déshydrogénase | 227 |
| 2.1. Généralités | 227 |
| 2.2. Principe de la technique | 227 |
| 3. Caractérisation de la <i>side population</i> | 230 |
| 3.1. Utilisation de l'intercalant Hoechst 33342 | 230 |
| 3.2. Utilisation d'autres intercalants | 232 |
| 4. Détection des cellules quiescentes, phase G0 du cycle cellulaire | 233 |
| 4.1. Cycle cellulaire et quiescence | 233 |
| 4.2. Cycle cellulaire et prolifération des cellules hématopoïétiques souches | 233 |
| 5. Exclusion de colorants par la cellule : mise en évidence des cellules excluant la rhodamine 123 | 235 |
| 6. Perspectives | 236 |
| 6.1. Appareillage | 236 |
| 6.2. Caractérisation enzymatique | 236 |
| 6.3. Détection d'ARN spécifiques | 237 |
| 7. Conclusion | 237 |
| | |
| Chapitre 13 La caractérisation des cellules souches par cytométrie en flux (Jean-François Mayol) | 239 |
| 1. Introduction | 240 |
| 2. Caractérisation phénotypique | 241 |
| 2.1. Marqueurs de cellules souches | 241 |
| 2.2. Absence de marqueurs de différenciation | 243 |
| 3. Caractérisation fonctionnelle | 244 |
| 3.1. Quiescence | 244 |

| | |
|--|------------|
| 3.2. Mécanismes enzymatiques liés à la chimiorésistance | 245 |
| 3.3. Capacité de migration | 246 |
| 4. Caractérisation des cellules souches | 247 |
| 4.1. Cellules souches hématopoïétiques | 247 |
| 4.2. Cellules souches mésenchymateuses | 247 |
| 4.3. Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites | 248 |
| 4.4. Cellules souches cancéreuses | 248 |
| 5. Conclusion | 249 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 14 La quantification antigénique par cytométrie en flux (Julien Guy, Philippe Poncelet) | 251 |
| 1. Pourquoi mettre la -métrie dans l'immunocytométrie ? | 252 |
| 2. Comment mettre la -métrie dans l'immunocytométrie ? | 252 |
| 2.1. Viser la reproductibilité | 252 |
| 2.2. Numériser le profil phénotypique : modalités d'expression des résultats | 252 |
| 2.3. Calibrer l'intensité de marquage | 253 |
| 3. Évolution historique de la quantimétrie | 258 |
| 4. Applications de la quantification antigénique | 259 |
| 4.1. Intérêt diagnostique | 259 |
| 4.2. Intérêt thérapeutique | 259 |
| 4.3. Intérêt pronostique | 260 |
| 5. Conclusion | 261 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 15 Les applications en pharmacologie anticancéreuse (Stéphanie Giraudet, Stéphane Leonce) | 263 |
| 1. Introduction | 264 |
| 2. Analyse monoparamétrique du cycle cellulaire | 264 |
| 2.1. Intérêt pour l'étude de molécules antiprolifératives | 264 |
| 2.2. Artefacts et pièges | 265 |
| 3. Analyse multiparamétrique du cycle cellulaire | 268 |
| 3.1. Phase G0 ou phase G1 ? | 268 |
| 3.2. Phase G2 ou phase M ? | 270 |
| 3.3. Phase S | 270 |
| 3.4. Intérêt du marquage des cyclines | 271 |
| 3.5. Identification des cassures double brin de l'ADN | 271 |
| 4. Exemples d'applications pour l'étude préclinique d'un candidat médicament | 272 |
| 5. Exemples d'applications en immuno-oncologie | 276 |
| 5.1. Suivi de l'activation des lymphocytes T | 276 |
| 5.2. Intérêt du tri en immuno-oncologie | 278 |
| 6. Conclusion | 279 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 16 Le criblage cytomique à haut contenu (Christian D. Muller) | 281 |
| 1. Introduction | 282 |
| 1.1. Criblage | 282 |
| 1.2. Cytomique | 283 |
| 2. Mise en place d'un criblage fiable | 283 |
| 2.1. Vers une mesure objective de l'activité de molécules actives : IC ₅₀ ou taux de prolifération ? | 283 |
| 2.2. Le facteur Z', un incontournable pour la validation du test de criblage | 285 |
| 2.3. Exemple de résultats de mesure de l'induction d'apoptose | 286 |
| 3. Tests de criblages en multitraitements | 287 |
| 3.1. Application à un test de trithérapie 3D <i>in vitro</i> | 288 |

| | |
|---|-----|
| Chapitre 17 « Fluorescent cell barcoding » : principes et applications (Fatima-Ezzahra L'Faqihi, Christine Bezombes, Émilie Decaup)..... | 295 |
| 1. Introduction | 296 |
| 2. Généralités et principe | 296 |
| 3. Considérations techniques | 297 |
| 3.1. Étape 1 : fixation et perméabilisation des échantillons | 297 |
| 3.2. Étape 2 : coloration des échantillons | 298 |
| 3.3. Étape 3 : combinaison des échantillons et marquage..... | 298 |
| 3.4. Étape 4 : acquisition au cytomètre..... | 298 |
| 3.5. Étape 5 : déconvolution et analyse..... | 299 |
| 4. Protocole de base avec un colorant sur lignée cellulaire | 299 |
| 5. Avantages du fluorescent cell barcoding | 303 |
| 5.1. Simplification des étapes de marquage..... | 303 |
| 5.2. Diminution des erreurs de marquage | 303 |
| 5.3. Réduction de la consommation d'anticorps..... | 303 |
| 5.4. Rapidité d'acquisition | 303 |
| 5.5. Robustesse des résultats..... | 303 |
| 6. Paramètres critiques de la technique FCB | 304 |
| 6.1. Importance de l'homogénéisation des colorants avant marquage..... | 304 |
| 6.2. Choix des colorants et optimisation de la concentration | 304 |
| 6.3. Compensation..... | 304 |
| 6.4. Résolution et pureté des échantillons déconvolués | 304 |
| 7. Exemples d'applications | 305 |
| 7.1. <i>Phosphoflow</i> | 305 |
| 7.2. Criblages de molécules | 306 |
| 7.3. <i>Immunomonitoring</i> | 306 |
| 7.4. Autres applications..... | 307 |
| 8. Conclusion | 307 |
| | |
| Chapitre 18 La microbiologie (Marielle Bouix)..... | 309 |
| 1. Introduction | 310 |
| 2. Généralités sur les différentes cibles d'études d'un micro-organisme par CMF | 310 |
| 3. Échantillons analysables par CMF | 311 |
| 4. Marquages non spécifiques, indicateurs de viabilité/mortalité | 312 |
| 4.1. Détection des cellules totales..... | 312 |
| 4.2. Intégrité membranaire | 312 |
| 4.3. Activité enzymatique..... | 314 |
| 4.4. Double marquage activité estérase/intégrité membranaire : principe et exemples d'utilisation dans les industries de fermentation | 316 |
| 5. Marquages spécifiques | 316 |
| 5.1. Hybridation <i>in situ</i> | 316 |
| 5.2. Immunomarquage | 318 |
| 6. Marquages physiologiques pour caractériser l'état cellulaire | 321 |
| 6.1. Potentiel de membrane..... | 321 |
| 6.2. pH intracellulaire | 321 |
| 6.3. Vitalité | 323 |
| 6.4. Fluidité membranaire | 324 |
| 7. Green fluorescent protein (GFP) | 324 |
| 8. Conclusion | 324 |

| | |
|---|-----|
| Chapitre 19 L'analyse des micro-organismes marins (Dominique Marie, Fabienne Rigaut-Jalabert) ... | 329 |
| 1. Introduction | 330 |
| 2. Analyse du phytoplancton | 330 |
| 2.1. Réactifs et matériels | 330 |
| 2.2. Comptage des cellules phytoplanctoniques | 331 |
| 2.3. Problèmes et solutions | 333 |
| 3. Analyse des bactéries et virus marins | 335 |
| 3.1. Analyse des bactéries marines | 336 |
| 3.2. Analyse des virus marins | 337 |
| 4. Tri de cellules phytoplanctoniques | 338 |
| 4.1. Paramètres de tri | 339 |
| 4.2. Additifs | 339 |
| | |
| Chapitre 20 Les applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs (Mickael Bourge, Béatrice Satiat-Jeunemaitre) | 341 |
| 1. Introduction | 342 |
| 2. Applications classiques de la cytométrie | 342 |
| 2.1. Prolifération et développement | 342 |
| 2.2. Quantification de l'ADN | 346 |
| 3. Autres applications exploratoires | 348 |
| 3.1. Analyse d'activités métaboliques : pH, état énergétique | 348 |
| 3.2. Analyses sur cellules entières ou sur amas cellulaires | 348 |
| 3.3. Analyse d'organites | 349 |
| 3.4. Tri de chromosomes, noyaux, protoplastes et pollen | 349 |
| 4. Conclusion | 350 |
| 5. Protocoles | 350 |
| | |
| Chapitre 21 La viabilité cellulaire (Jean-François Mayol, Florent Raffin) | 355 |
| 1. Introduction | 356 |
| 2. Mort cellulaire | 356 |
| 3. Techniques d'étude de la viabilité cellulaire | 357 |
| 3.1. Modification des propriétés de diffusion de la lumière | 358 |
| 3.2. Mesure de l'intégrité membranaire | 358 |
| 3.3. Mesure de potentiels | 364 |
| 3.4. Étude de l'activité oxydative | 365 |
| 3.5. Cytoenzymologie | 365 |
| 3.6. Combinaison de marquages | 366 |
| 3.7. Marquages compatibles avec la fixation des cellules | 366 |
| 3.8. L'estimation de la viabilité est-elle cytotoxique ? | 367 |
| | |
| Chapitre 22 L'analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux (Yohann Demont, Didier Métivier, Maria Chiara Maiuri, Naoufal Zamzami) | 369 |
| 1. Introduction | 370 |
| 2. Techniques de détection de la mort cellulaire basées sur la cytométrie en flux | 373 |
| 2.1. Mesure des altérations de la membrane plasmique | 373 |
| 2.2. Mesure des altérations mitochondriales | 375 |
| 2.3. Mesure des altérations cytosoliques | 378 |
| 2.4. Mesure des altérations nucléaires | 379 |
| 2.5. Évaluations spécifiques | 382 |
| 3. Perspectives | 383 |
| 4. Conclusion | 385 |

| | |
|---|-----|
| Chapitre 23 L'évaluation des fonctions mitochondriales au sein de cellules intactes ou des mitochondries isolées (Cécile Cottet-Rousselle, Claire Crola Da Silva) | 389 |
| 1. Introduction | 390 |
| 2. Organisation et fonctions des mitochondries | 390 |
| 2.1. Structure | 390 |
| 2.2. Chaîne respiratoire et phosphorylation oxydative | 390 |
| 2.3. Production d'espèces radicalaires | 392 |
| 2.4. Transition de perméabilité mitochondriale | 392 |
| 2.5. Homéostasie calcique | 392 |
| 3. Outils de mesure de la fonction mitochondriale | 393 |
| 3.1. Méthodes | 393 |
| 3.2. Utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude du compartiment mitochondrial | 394 |
| 3.3. Les différentes méthodes de mesure de la fonction mitochondriale par fluorescence | 398 |
| 4. Cas des études sur mitochondries isolées | 399 |
| 5. Limites et précautions : mesure du $\Delta\Psi$ mitochondrial | 401 |
| 5.1. Concentration de sonde et <i>déquenching</i> : comparaison avec l'effet d'un découplant | 401 |
| 5.2. Intensité de fluorescence et mV | 402 |
| 5.3. Précautions biologiques | 404 |
| 6. Innovations | 406 |
| 7. Implications des mitochondries dans certaines pathologies | 406 |
| | |
| Chapitre 24 L'assurance qualité et la validation de protocoles (Christèle Gonneau, Tony Fazio, Maxime Moulard) | 409 |
| 1. Introduction | 410 |
| 2. Validation de protocoles de cytométrie en flux | 411 |
| 2.1. Critères de validation | 412 |
| 2.2. Plan de validation | 417 |
| 2.3. Les différents types de protocoles de cytométrie en flux | 418 |
| 2.4. Validation de l'instrumentation | 419 |
| 3. Assurance qualité | 420 |
| 3.1. Phase pré-analytique | 421 |
| 3.2. Phase analytique | 422 |
| 3.3. Phase post-analytique | 423 |
| 4. Exemples : de la faisabilité à l'étude clinique | 425 |
| 4.1. Étude de la densité d'un récepteur à la surface de monocytes et des neutrophiles | 425 |
| 4.2. Étude de la densité d'un récepteur aux chimiokines à la surface de lymphocytes B | 425 |
| 5. Conclusion | 428 |
| | |
| Chapitre 25 La cytométrie en flux et l'accréditation dans les laboratoires de biologie médicale (Chantal Brouzes, Françoise Durrieu, Claude Lambert, Michel Ticchioni) | 431 |
| 1. Identification du paramètre | 432 |
| 2. Choix de la portée | 432 |
| 3. Description de la méthode | 433 |
| 4. Mise en œuvre | 434 |
| 5. Modalité de l'analyse de risques et calcul de la criticité | 435 |
| 6. Maîtrise des risques (les 5 M) | 435 |
| 7. Évaluation des performances de la méthode | 439 |
| 8. Conclusion | 444 |

| | |
|---|-----|
| Chapitre 26 Gestion d'une plateforme de cytométrie (Léa Guyonnet, Coralie L. Guérin) | 447 |
| 1. Rôle de la plateforme | 448 |
| 1.1. Politique institutionnelle | 448 |
| 1.2. Définitions des besoins | 448 |
| 2. Équipements et locaux | 448 |
| 2.1. Choix des technologies | 449 |
| 2.2. Implémentation des instruments | 449 |
| 3. Hygiène et sécurité | 450 |
| 3.1. Risque et confinement | 450 |
| 3.2. Installations et mesures de précaution | 450 |
| 4. Contrôles qualité et procédures | 451 |
| 4.1. Calibration et standardisation | 451 |
| 4.2. Procédures opérationnelles standard | 451 |
| 5. Formations et support | 451 |
| 5.1. Formations théorique et pratique | 451 |
| 5.2. Design d'expérience | 452 |
| 5.3. Acquisition | 452 |
| 5.4. Analyse de données | 452 |
| 6. Gestion administrative | 452 |
| 6.1. Ressources humaines | 452 |
| 6.2. Ressources financières | 453 |
| 6.3. Ressources informatiques | 453 |
| | |
| Chapitre 27 La cytométrie en flux et en images (Sébastien Herbert, Marie NGuyen de Bernon) | 455 |
| 1. Introduction | 456 |
| 2. De multiples technologies d'imagerie | 457 |
| 2.1. Imagerie par PMT | 458 |
| 2.2. Imagerie par caméra | 461 |
| 3. Microscopes atypiques | 463 |
| 3.1. Microscopes atypiques à capacité de tri cellulaire | 463 |
| 3.2. Microscopes atypiques sans capacité de tri cellulaire | 463 |
| 4. Instruments utilisant la microfluidique | 463 |
| 5. Conclusion | 464 |
| | |
| Chapitre 28 La cytométrie de masse (Antonio Cosma) | 467 |
| 1. Introduction | 468 |
| 2. Description d'un cytomètre de masse | 468 |
| 2.1. Description de l'appareil | 468 |
| 2.2. Traitement du signal | 470 |
| 3. Réactifs | 472 |
| 4. Conception des panels | 474 |
| 5. Préparation des échantillons | 475 |
| 6. Analyse des données | 475 |
| 7. Analyse de données multiparamétriques | 478 |
| 8. Contrôles de la spécificité des anticorps | 481 |
| 9. Conclusion | 481 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 29 La biosécurité et la cytométrie en flux (Muriel Andrieu, Peggy Sanatine, Céline Couturier, Philippe Lefebvre, Catherine Blanc) | 483 |
| 1. Évaluer les risques en cytométrie en flux | 484 |
| 1.1. Identification du type d'échantillon | 484 |
| 1.2. Considération sur la nature ou la modalité de l'exposition | 484 |
| 1.3. Appréciation de la durée, de la fréquence et de l'intensité de l'exposition | 485 |
| 1.4. Identification des tâches, procédés ou équipements susceptibles de générer une exposition | 485 |
| 1.5. Études françaises sur la production des aérosols par les trieurs | 485 |
| 2. Confiner le risque en cytométrie en flux | 488 |
| 2.1. Niveau de la zone confinement du cytomètre | 488 |
| 2.2. Risque d'aérosols pour les cytomètres-trieurs | 488 |
| 2.3. Risque d'aérosols pour les cytomètres-analyseurs | 488 |
| 2.4. Risques inhérents aux déchets | 489 |
| 3. Recommandations du groupe biosécurité de l'AFC | 489 |
| 3.1. Recommandations générales | 489 |
| 3.2. Recommandations pour la biosécurité des trieurs | 489 |
| 3.3. Recommandations pour la biosécurité des analyseurs | 489 |
| Annexes | 491 |
| Annexe 29-1. Formulaire d'évaluation des risques liés au tri cellulaire par cytométrie en flux | 491 |
| Annexe 29-2. Procédure d'utilisation du compteur Fluke 985™ (Fluke corporation) pour tester le confinement des aérosols dans la chambre et déterminer le temps d'épuration sur un trieur de type BD Aria™ III (BD Biosciences) ... | 492 |
| Postface (Didier Grunwald†, Xavier Ronot) | 493 |
| Un environnement encadré | 493 |
| La construction du savoir | 494 |
| Une nouvelle édition enrichie | 495 |
| Index | 497 |

Préface

Lorsqu'avec Marie-Hélène Ratinaud, Xavier Ronot et Geneviève Le Noan-Merdrignac nous avons coédité en 1988 un premier ouvrage en langue française, *La Cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique*, nous étions loin de penser que cette technique connaîtrait le développement que l'on constate aujourd'hui, et surtout qu'elle n'aurait pas été remplacée dans son domaine de prédilection : l'analyse rapide des cellules. Rapidement et simultanément, la cytométrie en flux empruntait en parallèle la voie de la recherche scientifique et celle de l'analyse médicale. Comme souvent, ces voies ne sont pas restées parallèles et se sont régulièrement rejointes pour se conforter et s'enrichir mutuellement.

Depuis une quinzaine d'années, mes engagements et responsabilités se sont éloignés de la cytométrie en flux et de la recherche en général. C'est donc avec surprise que je me suis vu proposer la préface de ce nouvel ouvrage. Quand je lis le nom des préfaciers des ouvrages précédemment publiés (comme les prix Nobel Georges Charpak ou Luc Montagnier), je ne peux qu'apprécier l'honneur (bien immérité) qui m'est fait.

Le présent ouvrage se partage entre les données purement techniques et les applications possibles. Au fond, les titres de la trentaine de chapitres ressemblent fort à ceux que l'on retenait déjà il y a un quart de siècle. Ce qui est nouveau, c'est l'étendue des applications dans les diverses disciplines abordées. L'abondante bibliographie en est la preuve.

Ce qui est particulier pour la cytométrie en flux, c'est la cohabitation au sein d'une même technique d'appareils aux objectifs complémentaires. Pour la recherche, on apprécie la sensibilité, la facilité d'utilisation des programmes d'analyse, la vitesse (principalement pour le tri). Pour les analyses biomédicales, on privilégie la facilité d'emploi et la reproductibilité. Ces exigences ne sont pas contradictoires, et cohabitent harmonieusement dans la cytométrie en flux.

Tout ne sera jamais dit sur la cytométrie en flux. Chercheur, ingénieur, technicien, enseignant, chacun lui apporte sa pierre, lui impose ses exigences, lui confie ses projets.

Puisse cet ouvrage apporter à ses lecteurs que je souhaite le plus nombreux possible quelques lumières. Puissent ses éditeurs et auteurs en être remerciés.

Philippe MÉTÉZEAU
Vice-président du Conseil départemental du Val-d'Oise
Président de la Commission Action sociale – Santé
Président de la Fédération hospitalière de France 95

Abréviations

| | |
|-------|---|
| 7-AAD | 7-aminoactinomycine D |
| ABC | <i>Antibody binding capacity</i> |
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> |
| AB/C | <i>Antibody bound per cell</i> |
| ACD | Acide citrique citrate dextrose |
| ACP | Analyse en composantes principales |
| ADA | <i>Adenosine deaminase</i> |
| ADC | <i>Analogic to digital converter</i> (convertisseur analogique digital) |
| ADCC | <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| ADR | Adriamycine |
| AFC | Association française de cytométrie |
| AHR | <i>Aryl hydrocarbon receptor</i> |
| AID | <i>Activation-induced cytidine deaminase</i> |
| AIF | <i>Apoptosis-inducing factor</i> (facteur inducteur d'apoptose) |
| ALDH | Aldéhyde déshydrogénase |
| ALK | <i>Anaplastic lymphoma kinase</i> |
| ALK2 | <i>Activin receptor-like kinase 2</i> |
| ALPS | Syndrome d'auto-immunité avec lymphoprolifération |
| AM | <i>Acetoxymethyl ester</i> |
| AMDEC | Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| ANSM | Agence nationale française du médicament et des produits de santé |
| APC | Allophycocyanine |
| APD | <i>Avalanche photodiode</i> (photodiode à avalanche) |
| Ara-C | Cytosine arabinoside |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNr | ARN ribosomique |
| ATP | Adénosine-5'-triphosphate |
| B | Bruit de fond optique |
| BAAAA | BODYPI amino acétyle aldéhyde |
| BAC | <i>Bacterial artificial chromosome</i> (chromosome artificiel bactérien) |
| BCECF | bis-carboxyéthyl carboxyfluorescéine |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| BCMA | <i>B-cell maturation antigen</i> |
| BCPR1 | <i>Breast cancer resistance protein 1</i> |
| BCR | Récepteur pour l'antigène du lymphocyte B |
| BEt | Bromure d'éthidium |
| BF | <i>Brightfield</i> (champ clair) |

| | |
|--------------------|--|
| BFP | <i>Blue fluorescent protein</i> |
| BIM | <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i> |
| BLNK | <i>B-cell linker protein</i> |
| BMP | <i>Bone morphogenetic proteins</i> |
| BP | <i>Band-pass (passe-bande)</i> |
| BPF | <i>Bonnes pratiques de fabrication</i> |
| BPL | <i>Bonnes pratiques de laboratoire</i> |
| BrdU | <i>5-bromo-2'-désoxyuridine</i> |
| BrdUTP | <i>Bromo-uridine-triphosphate</i> |
| BSA | <i>Bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)</i> |
| BTK | <i>Bruton's tyrosine kinase</i> |
| C12FDG | <i>5-dodecanoylamino fluorescein di-β-D-galactopyranoside</i> |
| Calcéine-AM | <i>Calcein acetoxymethyl ester</i> |
| CAP | <i>College of American Pathologists</i> |
| CARD | <i>Caspase recruitment domain</i> |
| CBA (test) | <i>Cytometric bead array</i> |
| CCCP | <i>Carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone</i> |
| CCD | <i>Charge-coupled device (capteur d'images à transfert de charge)</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CDCF | <i>5-6 carboxy 2'7'-dichlorofluorescein</i> |
| CE | <i>Conformité européenne</i> |
| CFDA | <i>Carboxyfluorescein diacetate (diacétate de carboxyfluorescéine)</i> |
| CFDA-SE | <i>CFDA succinimidyl ester</i> |
| CFSE | <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester (carboxyfluorescéine succinimidyl ester)</i> |
| CIL | <i>Comparaison inter-laboratoires</i> |
| CLIA | <i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i> |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CMF | <i>Cytométrie en flux</i> |
| CMH | <i>Complexe majeur d'histocompatibilité</i> |
| CMV | <i>Cytomégalovirus</i> |
| CMXRos | <i>Chlorométhyl-X-rosamine</i> |
| CNQ | <i>Contrôle national de qualité</i> |
| CNRS | <i>Centre national de la recherche scientifique</i> |
| CPT | <i>Camptothécine</i> |
| CQ(I) | <i>Contrôle qualité (interne)</i> |
| CSE | <i>Cellule-souche embryonnaire</i> |
| CSH | <i>Cellule-souche hématopoïétique</i> |
| CSM | <i>Cellule-souche mésenchymateuse</i> |
| CSN | <i>Cellule-souche neurale</i> |
| CSP | <i>Cellule-souche périphérique</i> |
| CSPH | <i>Cellules-souches et progéniteurs hématopoïétiques</i> |
| CSPi | <i>Cellule-souche pluripotente induite</i> |
| CTAD | <i>Citrate théophylline adénosine dipyridamole</i> |
| CTC | <i>Chlorure 5-cyano-2-3-dilotyltétrazolium</i> |
| CTF | <i>2-cyano-1,5-dilotyl formosan</i> |
| CTLA4 | <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> |
| CuAAC | <i>Cu-catalyzed azide alkyne cycloaddition</i> |
| CV | <i>Coefficient de variation</i> |
| CX43 | <i>Connexine 43</i> |
| Cy | <i>Cyanine</i> |
| CyTOF | <i>Cytometry by time of flight (cytométrie de masse, ou cytométrie par temps de vol)</i> |
| DAF-FM (DA) | <i>4-amino-5-méthylamino- 2',7'-difluorofluorescéine (diacétate)</i> |

| | |
|--------------------------|---|
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phénylindole |
| DAPI | Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate |
| DAPK1 | <i>Death-associated protein kinase 1</i> |
| DCFH-DA | Diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine |
| DEAB | Diéthyle aminobenzaldéhyde |
| DED | <i>Death effector domain</i> |
| DEP | Diélectrophorèse |
| DF | <i>Darkfield</i> |
| DHR | Dihydrorhodamine |
| DiBAC₄ | bis(acide 1,3-dibutylbarbiturique) triméthine oxonol |
| DICS | Déficit immunitaire combiné sévère |
| DICV | Déficit immunitaire commun variable |
| DiIC(5) | 1,1',3,3,3',3'-hexaméthylindodicarbocyanine iodide |
| DiOC | Iodure 3-3'-dialkyl oxacarbocyanine |
| DIP | <i>Drug-induced proliferation</i> |
| DISC | <i>Death-inducing signaling complex</i> |
| DLBCL | LNH à grandes cellules de type diffus |
| DLS | <i>Dynamic light scattering</i> (diffusion dynamique de la lumière) |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's minimal essential medium</i> |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DNase-I | Désoxyribonucléase I |
| DPH | 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène |
| DTPA | Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique |
| DTX | Docétaxel |
| EBSS | <i>Earle's balanced salts solution</i> |
| EBV | Virus d'Epstein-Barr |
| EDTA | Éthylène diamine tétra-acétate, ou acide éthylène diamine tétraacétique |
| EdU | 5-éthynyl-2'-désoxyuridine |
| EEQ | Évaluation externe de la qualité |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| EGIL | <i>European group for the immunological characterisation of leukemias</i> |
| EGTA | <i>Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ELN | <i>European leukaemia net</i> |
| EMA | <i>Eosin-5-maleimide</i> |
| EMA | <i>European medicines agency</i> (Agence européenne des médicaments) |
| EM-CCD | <i>Electron-multiplying CCD</i> (CCD à multiplication d'électrons) |
| En | <i>Electronic noise</i> (bruit de fond électronique) |
| EPI | Équipements de protection individuelle |
| eps | <i>Event per second</i> (nombre d'événements par seconde) |
| ERF | Équivalents fluochrome de référence |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| ESCCA | <i>European society for clinical cell analysis</i> |
| ESG1 | <i>Embryonal stem cell-specific gene 1 protein</i> |
| ETP | Équivalents temps plein |
| EXGCCA | <i>European working group on clinical cell analysis</i> |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorter</i> |
| FAD | Flavine adénine dinucléotide |
| FCCP | Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone |
| FCS | <i>Flow cytometry standard</i> |
| FCSS | <i>Flow cytometric seed screening</i> |
| FDA | Diacétate de fluorescéine |

| | |
|-------------------|--|
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FDC-M1/2 | <i>Follicular dendritic cell markers 1/2</i> |
| FGF4 | <i>Fibroblast growth factor 4</i> |
| FIA | <i>Fluorescent immunoassay</i> |
| FIRE | <i>Fluorescence imaging using radiofrequency-tagged emission</i> |
| FISH | <i>Fluorescence in situ hybridization (hybridation in situ en fluorescence)</i> |
| FITC | <i>Isothiocyanate de fluorescéine</i> |
| FLAME | <i>Flow analysis with automated multivariate estimation</i> |
| FLICA | <i>Fluorescent-labeled inhibitors of caspase</i> |
| FMO | <i>Fluorescence minus one</i> |
| F2N12S | <i>4'-N,N-diéthylamino-6-(N,N,N-dodécyl-méthylamino-sulfopropyl)-méthyl-3-hydroxyflavone</i> |
| FRET | <i>Fluorescence resonance energy transfert (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes)</i> |
| FSC | <i>Forward angle light scatter (diffusion aux petits angles)</i> |
| Fc13 | <i>Fms-like tyrosine kinase 3 receptor</i> |
| 5-FU | <i>5-fluorouracile</i> |
| Gcm-1 | <i>Glial cells missing homolog 1</i> |
| G-CSF | <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> |
| GEIL | <i>Groupe franco-belge d'étude immunologique des leucémies</i> |
| GFP | <i>Green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)</i> |
| GLP | <i>Good laboratory practices</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |
| GMP | <i>Good manufacturing practices</i> |
| GMT | <i>Gemcitabine</i> |
| GPI | <i>Glycosyl-phosphatidylinositol</i> |
| GPIIb/IIIa | <i>Glycoprotéine IIb/IIIa</i> |
| GR | <i>Growth rate</i> |
| GSK3 | <i>Glycogène synthase kinase 3</i> |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution (solution de sels équilibrés de Hanks)</i> |
| HCL | <i>Leucémie à tricholeucocytes</i> |
| HDL | <i>High density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)</i> |
| HEPES | <i>Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique</i> |
| HLA | <i>Human leukocyte antigen</i> |
| HNF-3B | <i>Hepatocyte nuclear factor 3-bêta</i> |
| HPN | <i>Hémoglobinurie paroxystique nocturne</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase (peroxydase de radis noir)</i> |
| IC50 | <i>Concentration inhibitrice médiane</i> |
| ICAM-1 | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> |
| ICP | <i>Inductively coupled plasma</i> |
| ICS | <i>Intracellular cytokine staining (marquage intracellulaire des cytokines)</i> |
| ICSS | <i>International clinical cytometry society</i> |
| idU | <i>Iododésoxyuridine</i> |
| IFN | <i>Interféron</i> |
| Ig | <i>Immunoglobuline</i> |
| IL | <i>Interleukine</i> |
| ILC | <i>Innate lymphoid cell</i> |
| Inserm | <i>Institut national de la santé et de la recherche médicale</i> |
| IP | <i>Iodure de propidium</i> |
| iPSC | <i>Induced pluripotent stem cells</i> |
| IRF4 | <i>Interferon regulatory factor 4</i> |
| ISAC | <i>International society for advancement of cytometry</i> |
| ISAGHE | <i>International society of haematotherapy and graft engineering</i> |
| ISO | <i>International organization for standardization</i> |

| | |
|------------------------|---|
| IVD | <i>In vitro diagnostic</i> |
| KDR | <i>Kinase insert domain receptor</i> |
| KLRG1 | <i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i> |
| LAD | Déficit d'adhésion des leucocytes |
| LAG3 | <i>Lymphocyte-activation protein 3</i> |
| LAL | Leucémies aiguës lymphoblastiques |
| LAM | Leucémie aiguë myéloblastique |
| LAMP | <i>Lysosomal-associated membrane protein</i> |
| LAP | <i>Leukemia-associated phenotype</i> |
| LASER | <i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i> |
| LCR | Liquide céphalorachidien |
| LDA | <i>Laboratory developed assay</i> |
| LDT | <i>Laboratory developed test</i> |
| LED | <i>Light emitting diode</i> (diode électroluminescente) |
| LLC | Leucémie lymphoïde chronique |
| LLOQ | <i>Lower limit of quantification</i> |
| LMH | Largeur à mi-hauteur |
| LMMC | Leucémie myélomonocytaire chronique |
| LNH | Lymphome malin non hodgkinien |
| LOCID | <i>Late onset combined immunodeficiency</i> |
| LOD | <i>Limit of detection</i> (limite de détection) |
| LP | Lipoprotéines |
| LP | <i>Long pass</i> (passe-haut) |
| LpDC (ou LP-DC) | Leucémie à cellules blastiques dendritiques plasmacytoïdes |
| LPL | Lymphome lymphoplasmocytaire |
| LPO | lipoprotéines oxydées |
| LSC | <i>Laser scanning cytometry</i> (cytométrie à balayage laser) |
| LSFM | <i>Light sheet fluorescence microscopy</i> (microscopie par feuillets de lumière) |
| LTi | <i>Lymphoid tissue inducer</i> |
| LZMS | Lymphomes de la zone marginale splénique |
| MALT | Lymphome associé aux muqueuses |
| MAP1LC3B | <i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 isoform B</i> |
| MAPC | <i>Multipotent adult progenitor cells</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MCL | Lymphome du manteau |
| MCU | <i>Mitochondrial calcium uniporter</i> |
| M-DC | Cellule dendritique conventionnelle ou « myéloïde » |
| MDR | <i>Multidrug resistance</i> |
| MDSC | <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> |
| Mel | Melphalan |
| MEM | <i>Mitochondria associated membranes</i> |
| MES | acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique |
| MESF | Molécules d'équivalents fluorochrome soluble de fluorochrome |
| MET | Microscopie électronique à transmission |
| Mfge8 | <i>Milk fat globule-EGF factor 8</i> |
| MFI | <i>Mean fluorescence intensity</i> (intensité moyenne de fluorescence) |
| MGUS | <i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> (gammopathie monoclonale de signification indéterminée) |
| MIAMI | <i>Marrow-isolated adult multilineage inducible stem cells</i> |
| MIP1bêta | <i>Macrophage inflammatory protein 1 bêta</i> |
| Mitox | Mitoxantrone |
| MLR | <i>Mixed lymphocyte reaction</i> (réaction lymphocytaire mixte) |

| | |
|------------------|--|
| M-MDSC | <i>Monocytic myeloid-derived suppressor cells</i> |
| MPAL | <i>Mixed phenotype acute leukemia</i> |
| MPC1 | <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> |
| MPEC | <i>Memory precursor effector cells</i> |
| MPG | <i>N-méthylpurine ADN glycosylase</i> |
| MPM2 | <i>Mitotic phosphoprotein 2</i> |
| MPO | <i>Myéloperoxydase</i> |
| mPTP | <i>Mitochondrial permeability transition pore</i> |
| MRD | <i>Maladie résiduelle</i> |
| MRP | <i>Multidrug resistance-associated protein</i> |
| MRS | <i>Gélose de Man, Rogosa, Sharpe</i> |
| MTC | <i>Mitomycine C</i> |
| MTG | <i>MitoTracker™ Green</i> |
| MTT | <i>bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium</i> |
| MTX | <i>Méthotrexate</i> |
| NAD | <i>Nicotinamide adénine dinucléotide</i> |
| NET | <i>Neutrophil extracellular trap</i> |
| NFS | <i>Numération formule sanguine</i> |
| NHE | <i>Échangeur Na⁺/H⁺</i> |
| NIH | <i>National institutes of health</i> |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| NK-T | <i>Lymphocytes T natural killer</i> |
| NTA | <i>Nanoparticle tracking analysis</i> |
| NVB | <i>N avelbine</i> |
| OMS | <i>Organisation mondiale de la santé</i> |
| PARP | <i>POLY(ADP-ribose) polymerase</i> |
| PBMC | <i>Peripheral blood mononuclear cell (cellules mononucléées du sang périphérique)</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)</i> |
| PC7 | <i>Phycoérythrine-cyanine 7</i> |
| PCNA | <i>Proliferating cell nuclear antigen (antigène nucléaire de prolifération cellulaire)</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PD | <i>Photodiode</i> |
| PD1 | <i>Programmed cell death protein 1</i> |
| PE | <i>Phycoérythrine</i> |
| PerCP | <i>Peridinin chlorophyll protein</i> |
| PFA | <i>Para-formaldéhyde</i> |
| PFP | <i>Plasma sans plaquette</i> |
| PHA | <i>Phytohémagglutinine</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> |
| PIDDosome | <i>p53-induced protein with a death domain</i> |
| PL | <i>Phospholipides</i> |
| PMA | <i>Phorbol 12-myristate 13-acétate</i> |
| PMT | <i>Photomultiplier tube (tube photomultiplicateur)</i> |
| PNB/E/N | <i>Polynucléaires basophile/éosinophile/neutrophile</i> |
| PP2A | <i>Protein phosphatase 2A</i> |
| PPAR-γ2 | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2</i> |
| PS | <i>Phosphatidylsérine</i> |
| PSGL-1 | <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> |
| PTX | <i>Paclitaxel</i> |
| QIFI | <i>quantification par immunofluorescence indirecte</i> |
| qPCR | <i>PCR quantitative</i> |
| RAG | <i>Recombinase-activating gene</i> |

| | |
|----------------------------------|--|
| RIP-1/3 | <i>Receptor interacting protein 1/3</i> |
| RNS | <i>Reactive nitrogen species</i> (espèces réactives de l'azote) |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> (espèces réactives de l'oxygène) |
| rSD | <i>Robust standard deviation</i> |
| RSFC | <i>Raman spectral flow cytometer</i> |
| RSP | <i>Resistive pulse sensing</i> (détection à impulsions résistives) |
| RUO | <i>Research use only</i> |
| SA-β-gal | <i>Senescence-associated beta-galactosidase</i> |
| sCMOS | <i>scientific complementary metal-oxide semi-conducteur</i> |
| SD | <i>Standard deviation</i> (déviatiion standard) |
| SI | <i>Stain index</i> (index de marquage) |
| SIDA | <i>Syndrome d'immunodéficience acquise</i> |
| SLEC | <i>Short-lived effector cells</i> |
| SLL | <i>LNH lymphocytiqne à petites cellules</i> |
| SLP | <i>Syndrome lymphoprolifératif</i> |
| SLVL | <i>Lymphome splénique à lymphocytes villeux</i> |
| SMD | <i>Syndrome myélodysplasique</i> |
| SMP | <i>Syndrome myéloprolifératif</i> |
| SNARF-1 | <i>Seminaphthorhodafluorescéine-1</i> |
| SNR array | <i>Signal-to-noise ratio array</i> |
| SOP | <i>Standard operating procedure</i> (procédure opératoire standard) |
| SP | <i>Short-pass</i> (passe-bas) |
| SPADE | <i>Spanning-tree progression analysis of density-normalized events</i> |
| SRPL | <i>Lymphome splénique diffus de la pulpe rouge</i> |
| SSC | <i>Sideward scatter</i> |
| SSEA | <i>Stage-specific embryonic antigen</i> |
| STAT | <i>Signal transducers and activators of transcription</i> |
| STEAM | <i>Serial time-encoded amplified microscopy</i> (microscopie amplifiée à codage temporel en série) |
| SVF | <i>Sérum de veau fœtal</i> |
| TAP-1/2 | <i>Transporter associated with antigen processing 1/2</i> |
| TCM | <i>Lymphocyte T mémoire central</i> |
| TCR | <i>T cell receptor</i> |
| TCSC | <i>Tissue committed stem cell</i> |
| TDI | <i>Time delay integration</i> |
| TdT | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> |
| TEM | <i>Lymphocyte T mémoire périphérique</i> |
| TEM | <i>Transverse electromagnetic mode</i> (mode électromagnétique transverse) |
| TEMRA | <i>Terminally differentiated effector memory</i> |
| TGFβ | <i>Transforming growth factor β</i> (facteur de croissance transformant bêta) |
| Th | <i>Lymphocyte T helper</i> |
| TMRM | <i>Tetramethylrhodamine, methyl ester</i> |
| TNFα | <i>Tumor necrosis factor α</i> (facteur de nécrose tumorale alpha) |
| TNFR | <i>Tumor necrosis factor receptor</i> |
| TOF | <i>Time of flight</i> (temps de vol) |
| TP53 | <i>Tumor protein 53</i> |
| TPO | <i>Thrombopoïétine</i> |
| TPT | <i>Topotécan</i> |
| TRAIL | <i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i> |
| Trég | <i>Lymphocyte T régulateur</i> |
| TRM | <i>Tissue resident memory cells</i> |
| TSCM | <i>T stem cell memory</i> |
| t-SNE | <i>t-stochastic neighbour embedding</i> (imbrication t-stochastique de voisinage) |

| | |
|-----------------|--|
| TTL | Test de transformation lymphoblastique |
| TUNEL | <i>Terminal transferase dUTP nick end labeling</i> |
| TYL | Typage lymphocytaire |
| UK NEQAS | <i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i> |
| USSC | <i>Unrestricted somatic stem cell</i> |
| UTF1 | <i>Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1</i> |
| UV | Ultraviolet |
| VASP | <i>Vasodilator stimulated phosphoprotein</i> |
| VCR | Vincristine |
| VDAC | <i>Voltage-dependent anion selective channel</i> |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| WDM | <i>Wave division module</i> |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| XLA | Agammaglobulinémie liée à l'X |
| ZAP70 | <i>Zeta-chain-associated protein of 70 kda</i> |

Avant-propos

Cette nouvelle édition de *La cytométrie en flux* actualise un ouvrage qui est devenu une référence dans de nombreux laboratoires. Il permet de faire le point sur les dernières avancées technologiques, scientifiques et médicales de la cytométrie en flux et décrit de façon moderne des applications devenues incontournables dans différentes disciplines telles que l'hématologie, l'immunologie, la microbiologie, la biologie végétale et marine. La cytométrie en flux est une technique transversale qui, fait assez rare de nos jours, n'est pas cloisonnée, ce qui a permis de développer de nombreux échanges et approches interdisciplinaires qui en font toute la richesse.

Depuis la première version de ce livre, les technologies ont évolué de façon extraordinaire grâce aux progrès et à la miniaturisation des lasers, de l'optique, de la fluidique mais aussi de l'informatique, des logiciels embarqués et de l'analyse de données, sans oublier les réactifs qui couvrent maintenant une gamme inimaginable il y a seulement encore quelques années. Il était grand temps de faire le point sur toutes ces nouveautés et c'est tout précisément l'intérêt de la nouvelle édition de cet ouvrage.

Ce livre très didactique est destiné à la fois aux étudiants qui commencent leur apprentissage en cytométrie mais aussi aux cytométristes plus expérimentés qui souhaitent approfondir leur formation et leurs connaissances. Chaque chapitre est rédigé par un ou plusieurs experts du domaine et aborde des thématiques très variées pouvant servir de support dans tous les laboratoires de cytométrie, qu'ils soient hospitaliers, plateformes, ou recherche.

Chaque chapitre présente une partie théorique et une partie pratique accompagnée d'exemples. Les premiers chapitres sont dédiés aux principes de la cytométrie, aux techniques utilisées, aux statistiques appliquées à la cytométrie. Une place importante est consacrée aux applications dans différents domaines (hématologie, immunologie, détection des microparticules, étude des cellules souches, pharmacologie anticancéreuse). Ensuite sont étudiés le criblage à haut débit (*high throughput screening*) pour identifier de nouvelles molécules, et les principes et applications du *fluorescent cell barcoding*. D'autres chapitres importants concernent l'assurance qualité, la gestion des plateformes et les avancées de la cytométrie couplée à d'autres techniques comme l'imagerie et la spectrométrie de masse. Enfin, pour les laboratoires hospitaliers, un tout nouveau chapitre est consacré à l'accréditation et à la façon de l'aborder de manière simple selon les recommandations de l'AFC. Le dernier chapitre est dédié à l'hygiène et la sécurité.

Je suis sûre que cet ouvrage, élaboré dans une démarche de rigueur et de didactisme, sera extrêmement utile à tous ceux, étudiants, biologistes, scientifiques, cliniciens, industriels, qui s'intéressent à notre spécialité et désirent apprendre ou réviser toutes les nouveautés de la cytométrie.

Lydia CAMPOS
Présidente de l'Association française de cytométrie
(2016-2019)

La cytométrie en flux, technique permettant l'analyse rapide des cellules, a considérablement évolué ces dernières décennies et a contribué à de nombreuses avancées scientifiques et médicales. Ses avancées ont ouvert la porte à des applications devenues incontournables dans différentes spécialités telles que l'hématologie, l'immunologie, la microbiologie, la biologie végétale et marine. La transversalité interdisciplinaire de la cytométrie en flux en fait toute la richesse.

La deuxième édition de **La Cytométrie en Flux** fait le point, en 29 chapitres, sur toutes les nouveautés dues aux avancées instrumentales, à la miniaturisation des lasers, aux progrès de l'optique, de la fluidique mais aussi de l'informatique, des logiciels embarqués et de l'analyse de données, sans oublier les réactifs couvrant maintenant une gamme inimaginable il y a seulement encore quelques années. De nombreux thèmes sont ainsi abordés :

- Principes, techniques, statistiques appliquées à la cytométrie
- Applications dans différents domaines (hématologie, immunologie, détection des microparticules, étude des cellules souches, pharmacologie anticancéreuse...)
- Criblage à haut débit (*high throughput screening*), applications du *fluorescent cell barcoding*
- Assurance qualité, accréditation
- Avancées de la cytométrie couplée à d'autres techniques comme l'analyse spectrale et la spectrométrie de masse
- Gestion des plateformes
- Hygiène et sécurité

Les nombreuses illustrations en couleurs et les protocoles d'analyse viennent compléter ce livre didactique.

Cet ouvrage est destiné aux enseignants et étudiants, chercheurs, biologistes, cliniciens, ingénieurs, techniciens et industriels désireux d'approfondir ou de mettre à jour leurs connaissances.

Il permettra surtout aux utilisateurs non experts d'acquérir les concepts de base de la cytométrie en flux.

Coordonné par **Jean-François Mayol** (AMAL Therapeutics, Genève), **Corinne Laplace-Builhé** (Institut Gustave Roussy, Villejuif) et **Christian D. Muller** (Université de Strasbourg, IPHC-UMR 7178 CNRS, Illkirch), le livre réunit près de 70 auteurs spécialistes de la cytométrie en flux, scientifiques, chercheurs ou industriels.

