

# Application de la cytométrie en immunologie

Juliette Desfrancois (Plateforme Cytocell)  
Faouzi Braza (Unité 1087 et 1064)



UNIVERSITÉ DE NANTES

Séminaire IRT, 13 Novembre 2012



Faouzi Braza  
Faouzi.braza@etu.univ-nantes.fr

# Cytométrie en flux

---

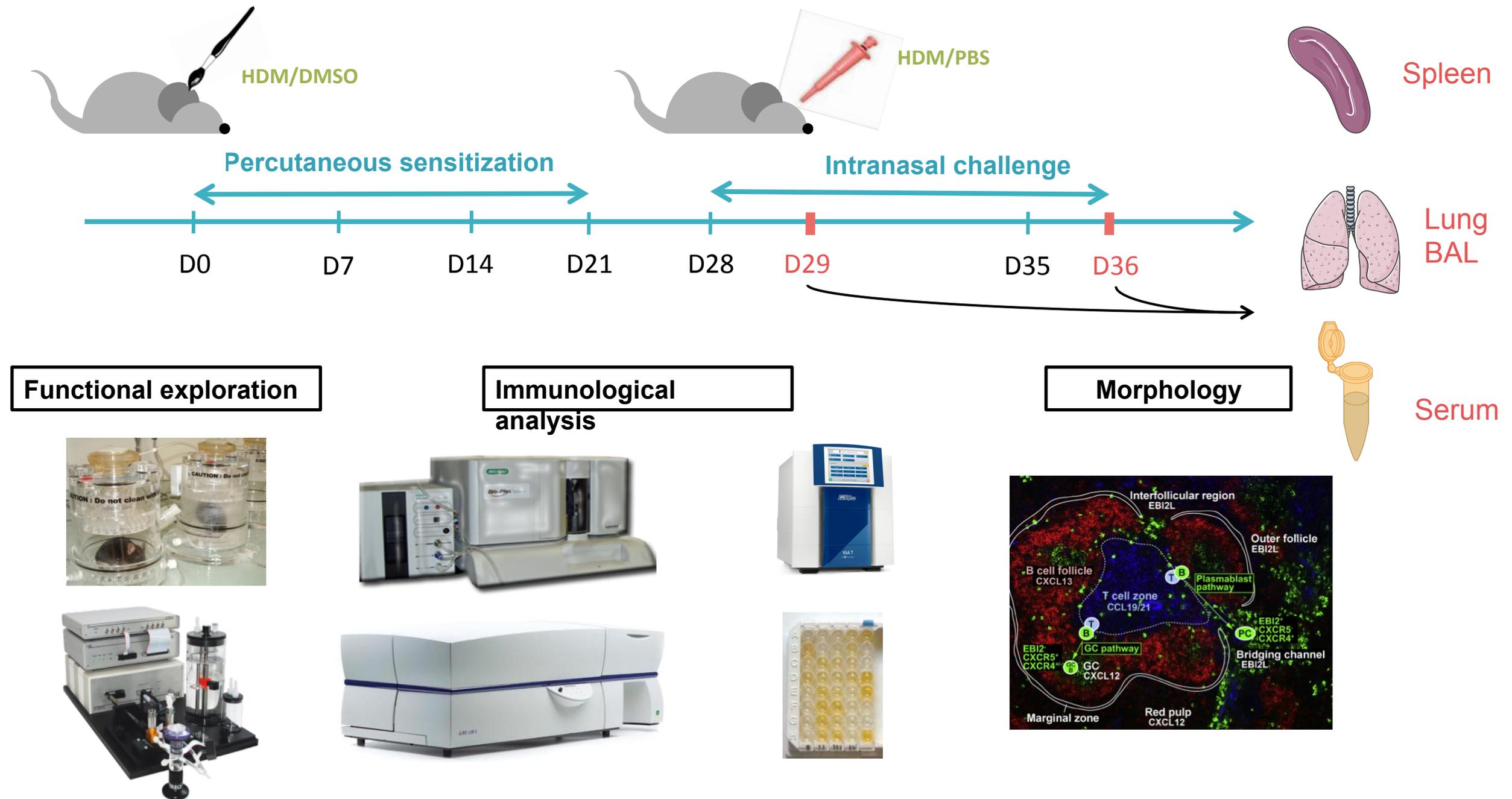
- Evolution technologique en cytométrie en flux
- Evolution des entreprises de biotechnologie
- Technique de routine en recherche
- Domaine très innovant
- Quelques applications au travers divers projets développés sur le site de la SFR

# Projets

---

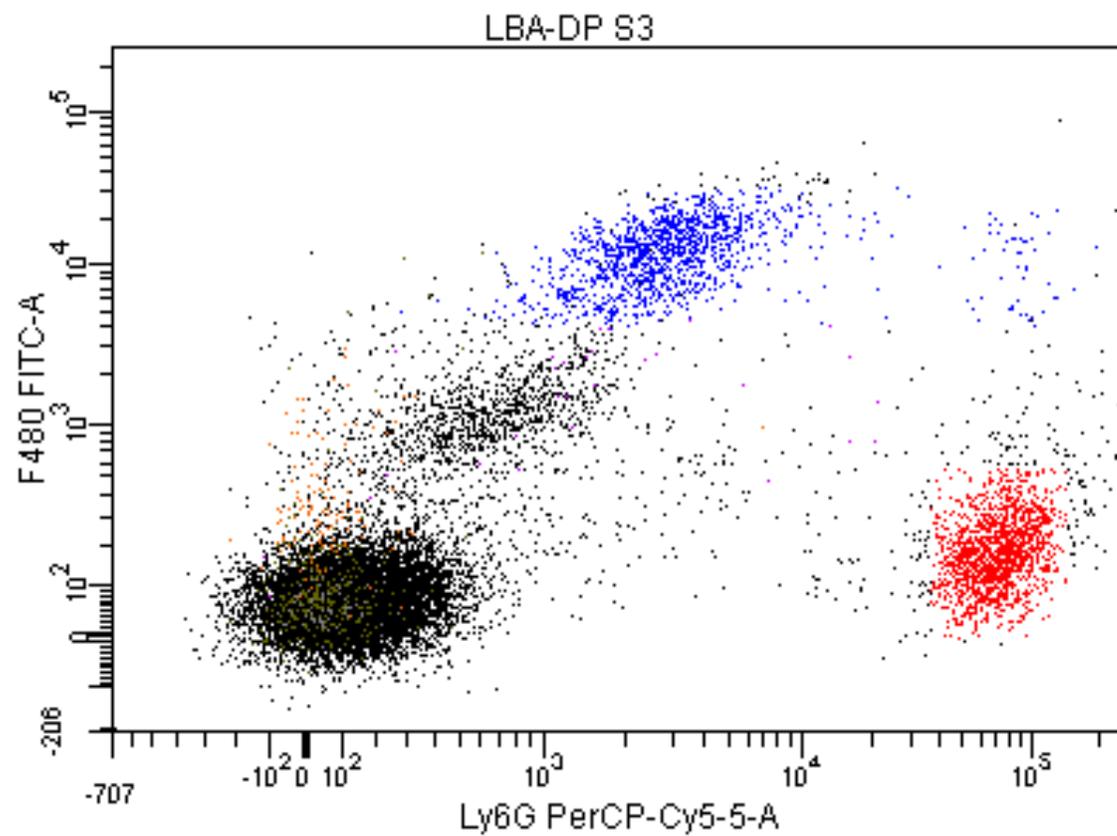
- Phénotypage dans un modèle d'asthme allergique aux acariens
- Caractérisation des cellules B régulatrices chez des souris asthmatiques
- Standardisation des méthodes de cytométrie en flux chez l'homme (exemple de la cohorte TARC-ABPA)
- Etude l'apoptose, de la prolifération et du cycle cellulaire dans un modèle de différenciation in vitro de lymphocytes B naifs

# Protocole d'induction de l'asthme allergique

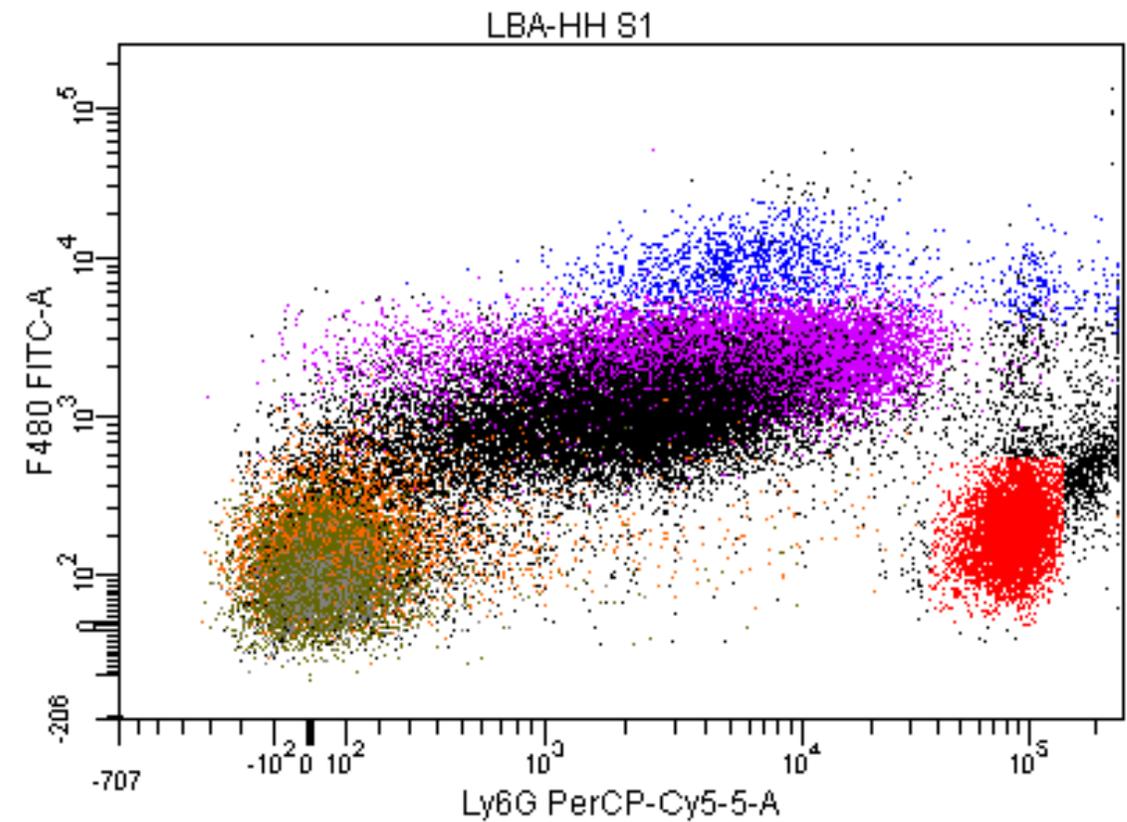


Description du modèle d'asthme  
(Lair et al., in submission)

# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique



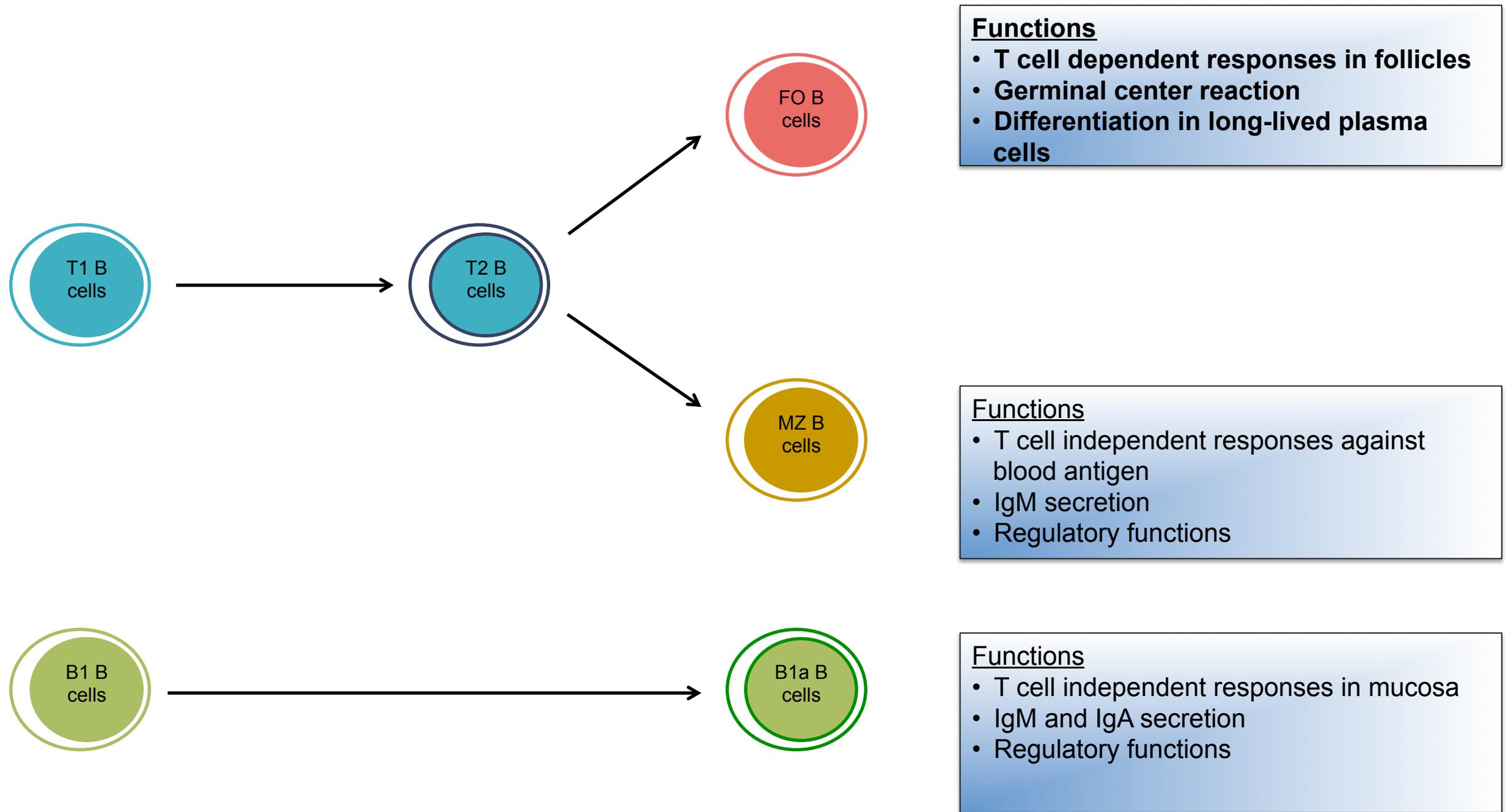
Souris contrôle



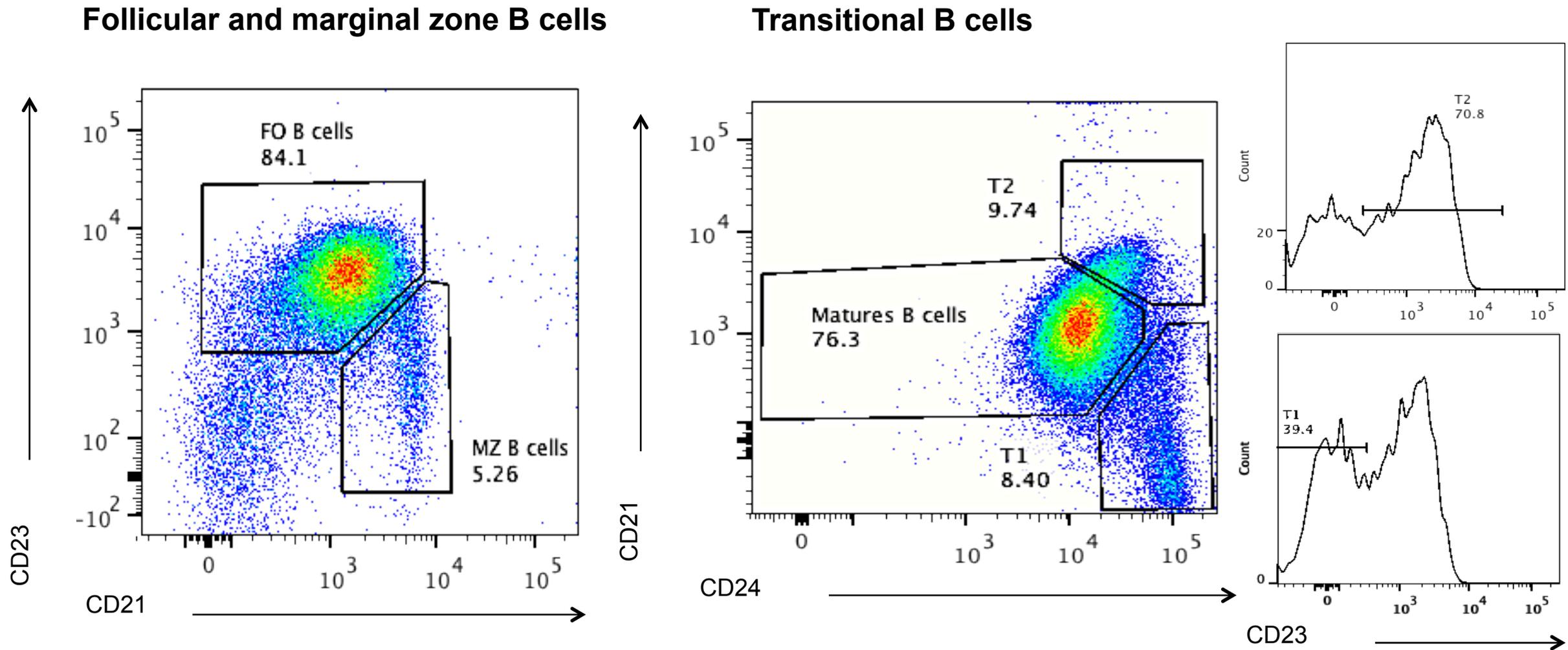
Souris asthmatique

- Neutrophiles
- Macrophages
- Eosinophiles
- Lymphocytes B
- Lymphocytes T
- Lymphocytes T CD8+

# Développement des B chez la souris



# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique



**Viabilité, CD19, CD21, CD23, CD24**

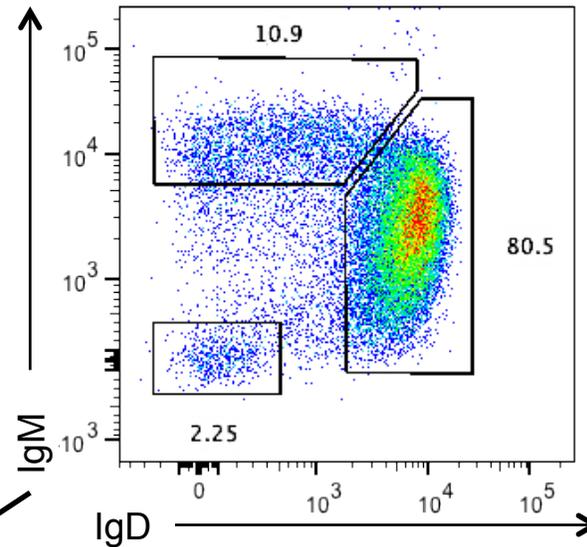
Immunophénotypage

Phénotype B dans la rate des souris

# Strong activation of B cells after HDM challenge

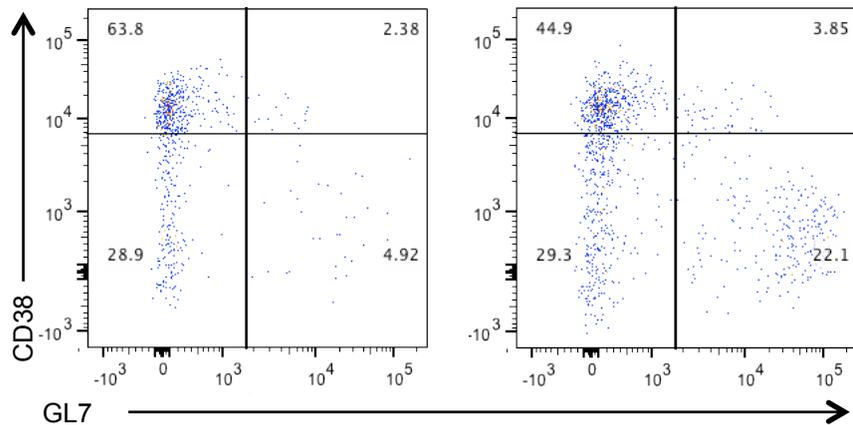
GL7 est un marqueur d'activation des B  
(Nayto et al., 2007)

CD38 est un marqueur de maturation  
Qui transduit des signaux anti-apoptotiques  
(Perez-Andres et al., 2010)

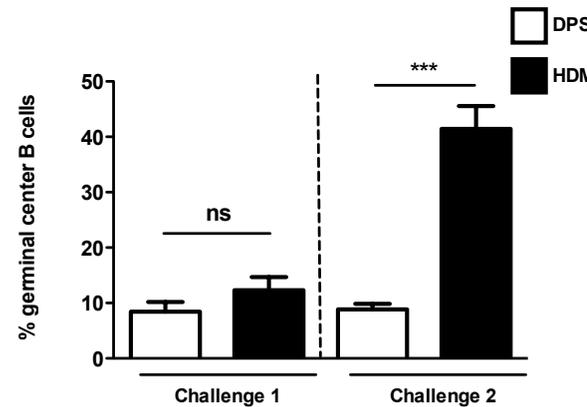
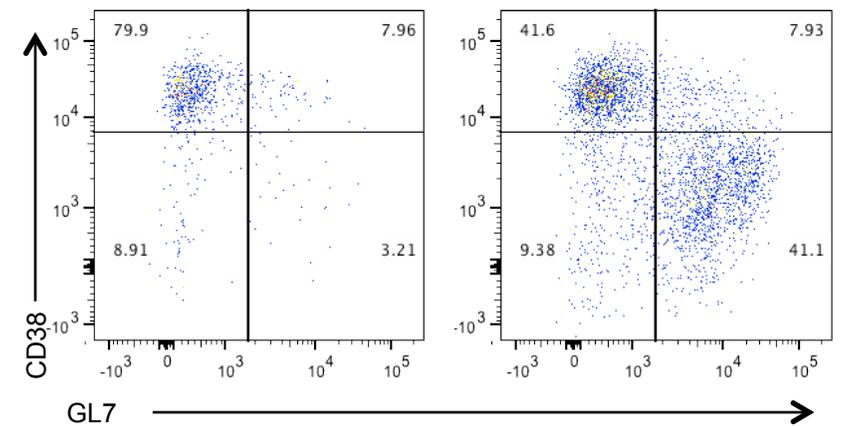


La combinaison des deux permet  
d'identifier les cellules B du centre  
germinatif (Pape et al., 2011; Taylor et al.,  
2012)

Gated on memory B cells  
after one challenge



Gated on memory B cells  
after two challenge



L'immunisation avec l'extrait total d'acariens induit une  
activation des B qui entrent en réaction de centre germinatif

# Projets

---

- Phénotypage dans un modèle d'asthme allergique aux acariens
- **Caractérisation des cellules B régulatrices chez des souris asthmatiques**
- Standardisation des méthodes de cytométrie en flux chez l'homme (exemple de la cohorte TARC-ABPA)
- Etude l'apoptose, de la prolifération et du cycle cellulaire dans un modèle de différenciation in vitro de lymphocytes B naifs

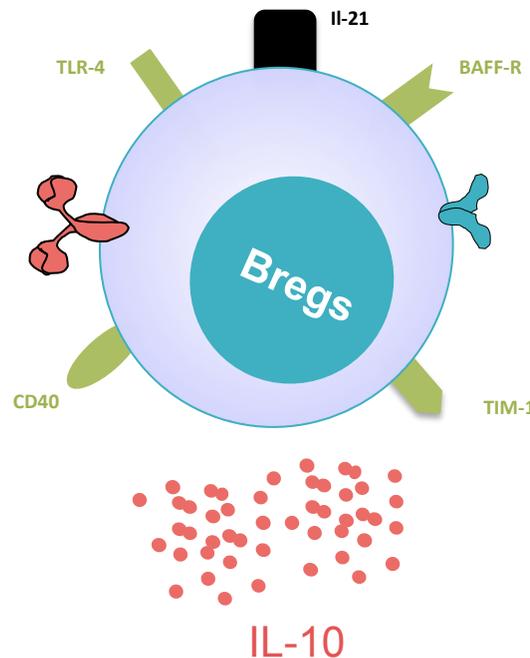
# Rôle des Bregs dans l'asthme ?

Deficiency in B cells and IL-10 secretion in B cells aggravates autoimmune disease (Fillatreau et al., 2002; Carter et al., 2011)

LPS-Treated B cells inhibit inflammation in auto-immune disease and transplantation (Fuchs and Matzinger, 1992; Parekh et al., 2003; Lampropoulou et al., 2008)

CD40L treated mice inhibits collagen-induced arthritis (Mauri et al., 2001; Mauri et al., 2003; Evans et al. 2011)

Major mechanism mediated by Bregs is the secretion of IL-10 that inhibit proliferation of T cells, Th1 and Th17 responses, generates regulatory T cells (Mizoguchi et al., 2002; Matsushita et al., 2008; Yanaba et al., 2008; Carter et al., 2011; Ding et al., 2011)

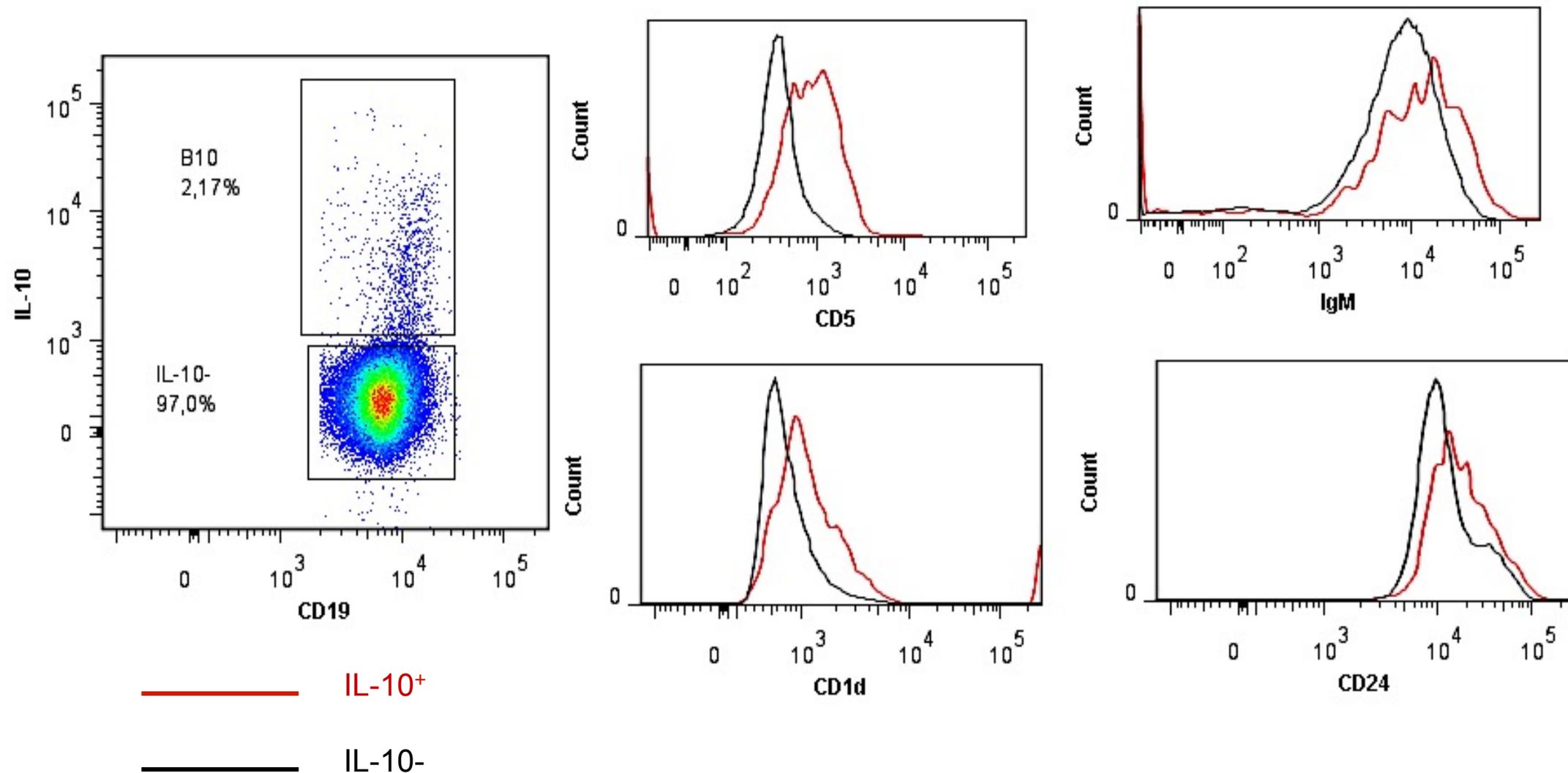


BAFF treatment increased the proportion of B cells and inhibits arthritis in mice (Yang et al., 2010 and 2012)

Anti-TIM-1 injection in mice induces expansion of Breg cells and promote tolerance (Ding et al., 2011; Lee et al., 2012)

There is no consensus in the phenotype of regulatory B cells. B1a B cells (Carroll and Prodeus, 1998; Silverman et al., 2008; Yanaba et al., 2008), MZ B cells (Gray et al., 2007; Lenert et al., 2005) have been described for their regulatory functions

# Rôle des Bregs dans l'asthme ?

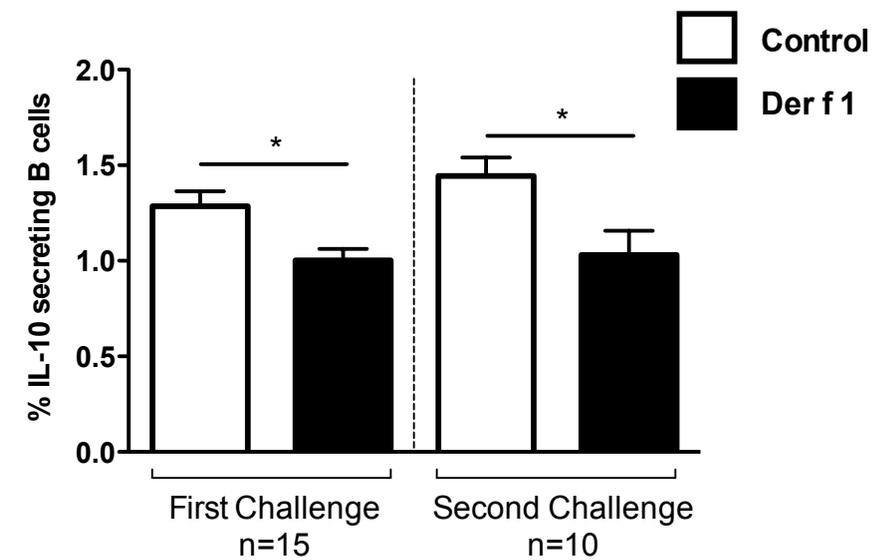
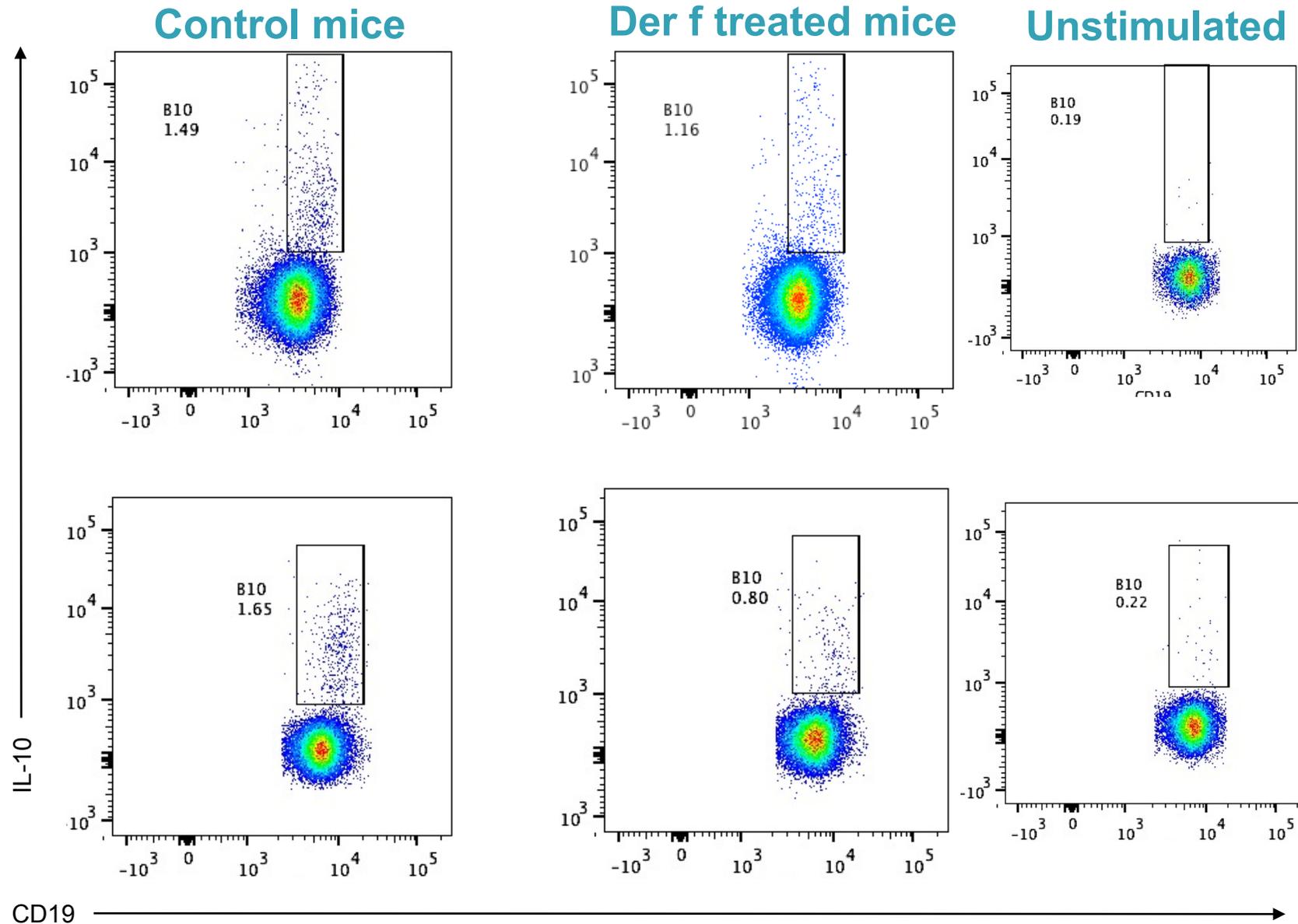


Caractérisés dans la bibliographie par un phénotype B1-a T2-MZ

Marquage intra-cellulaire

L'exemple des B régulateurs

# Rôle des Bregs dans l'asthme ?



Marquage intra-cellulaire

L'exemple des B régulateurs

# Projets

---

- Phénotypage dans un modèle d'asthme allergique aux acariens
- Caractérisation des cellules B régulatrices chez des souris asthmatiques
- **Standardisation des méthodes de cytométrie en flux chez l'homme (exemple de la cohorte TARC-ABPA)**
- Etude l'apoptose, de la prolifération et du cycle cellulaire dans un modèle de différenciation in vitro de lymphocytes B naifs

# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique

---

## SPECIAL REPORT

### EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols

T Kalina<sup>1,11</sup>, J Flores-Montero<sup>2,11</sup>, VHJ van der Velden<sup>3</sup>, M Martin-Ayuso<sup>4</sup>, S Böttcher<sup>5</sup>, M Ritgen<sup>5</sup>, J Almeida<sup>2</sup>, L Lhermitte<sup>6</sup>, V Asnafi<sup>6</sup>, A Mendonça<sup>7</sup>, R de Tute<sup>8</sup>, M Cullen<sup>8</sup>, L Sedek<sup>9</sup>, MB Vidriales<sup>10</sup>, JJ Pérez<sup>10</sup>, JG te Marvelde<sup>3</sup>, E Mejstrikova<sup>1</sup>, O Hrusak<sup>1</sup>, T Szczepański<sup>9</sup>, JJM van Dongen<sup>3</sup> and A Orfao<sup>2</sup> on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708)

The EU-supported EuroFlow Consortium aimed at innovation and standardization of immunophenotyping for diagnosis and classification of hematological malignancies by introducing 8-color flow cytometry with fully standardized laboratory procedures and antibody panels in order to achieve maximally comparable results among different laboratories. This required the selection of optimal combinations of compatible fluorochromes and the design and evaluation of adequate standard operating procedures (SOPs) for instrument setup, fluorescence compensation and sample preparation. Additionally, we developed software tools for the evaluation of individual antibody reagents and antibody panels. Each section describes what has been evaluated experimentally versus adopted based on existing data and experience. Multicentric evaluation demonstrated high levels of reproducibility based on strict implementation of the EuroFlow SOPs and antibody panels. Overall, the 6 years of extensive collaborative experiments and the analysis of hundreds of cell samples of patients and healthy controls in the EuroFlow centers have provided for the first time laboratory protocols and software tools for fully standardized 8-color flow cytometric immunophenotyping of normal and malignant leukocytes in bone marrow and blood; this has yielded highly comparable data sets, which can be integrated in a single database.

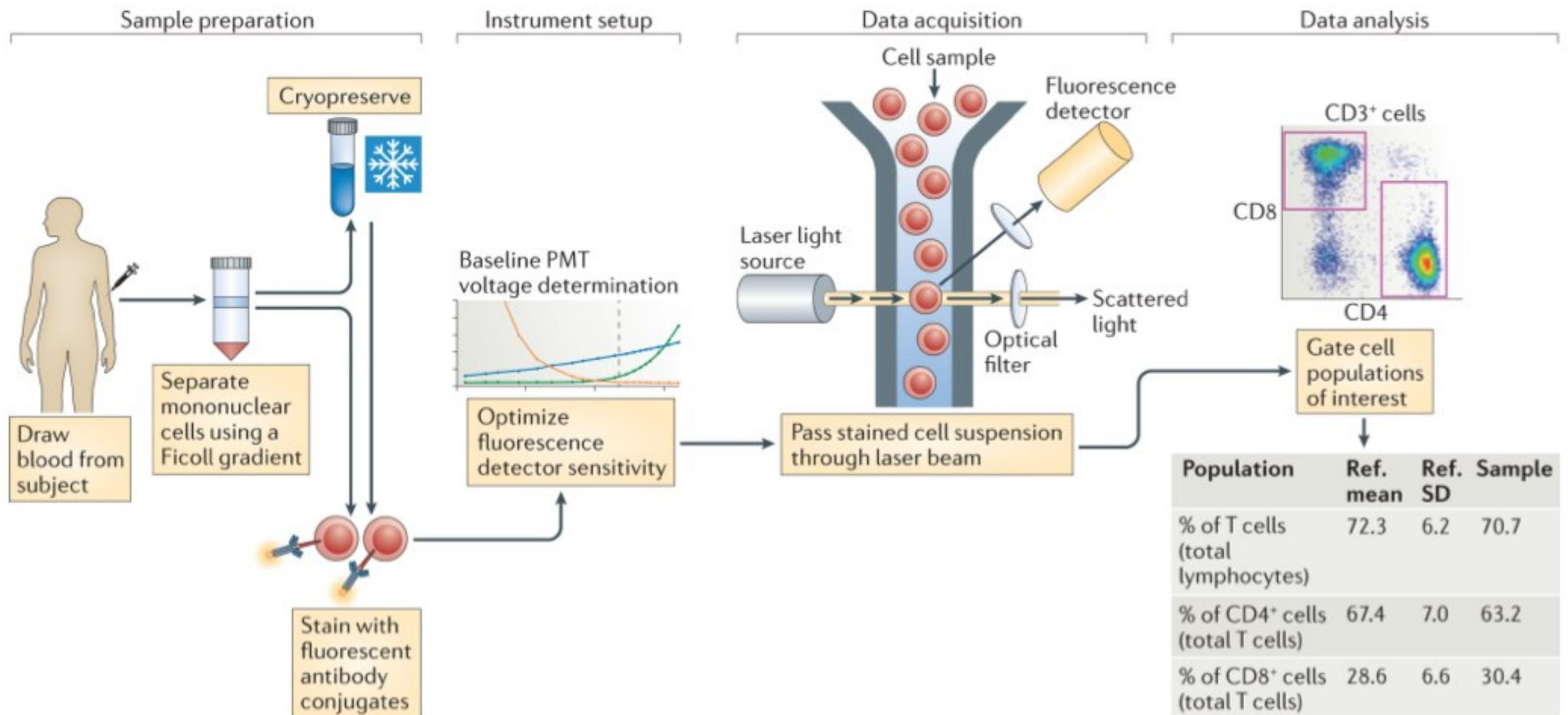
*Leukemia* (2012) **26**, 1986–2010; doi:10.1038/leu.2012.122

**Keywords:** flow cytometry; standardization; compensation; software; fluorochromes; immunophenotyping

## Immunophénotypage

Exemple en recherche translationnelle (Kalina et al., 2012)

# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique

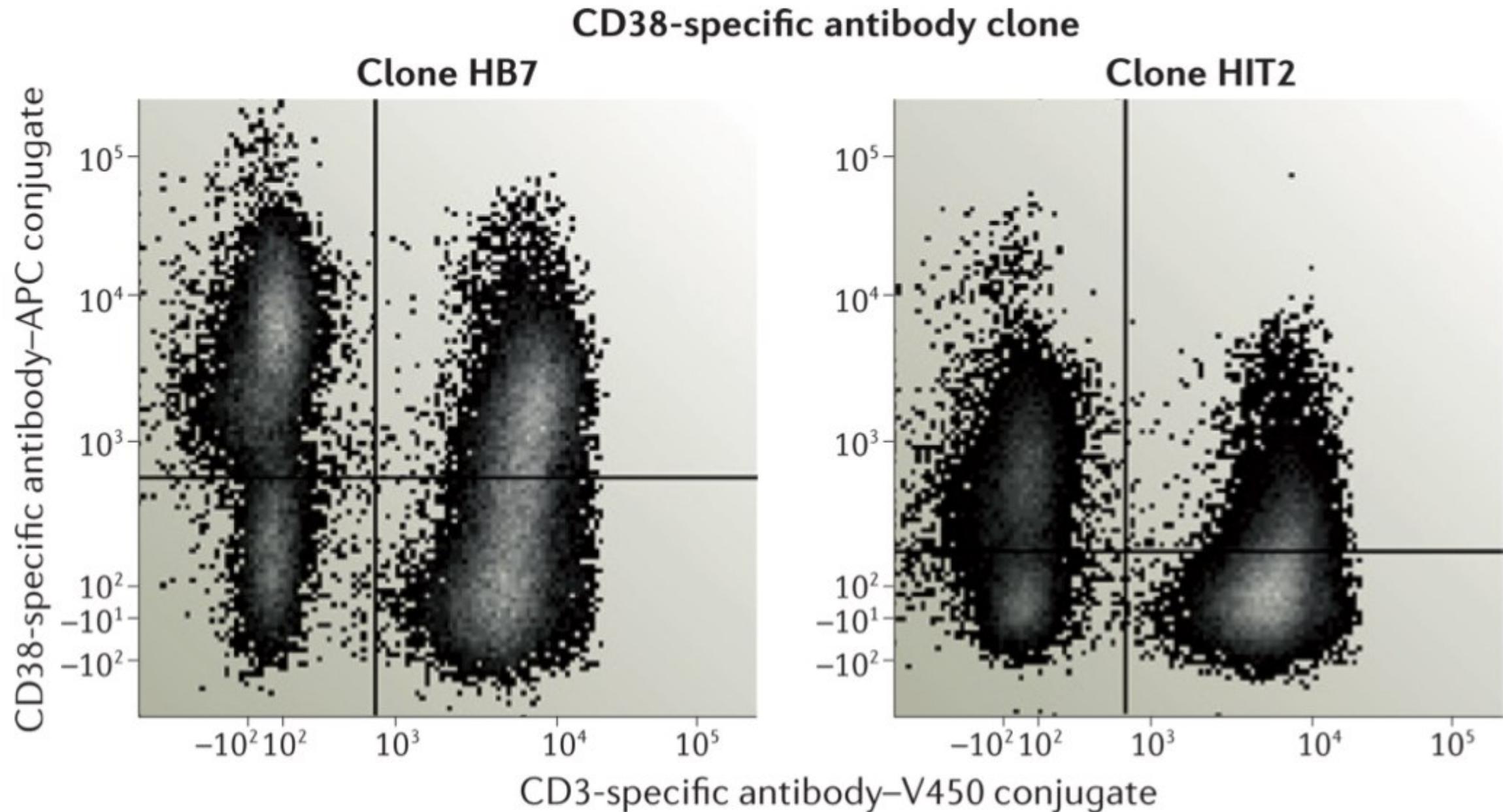


## Immunophénotypage

Exemple en recherche translationnelle (Maecker et al., 2012)

# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique

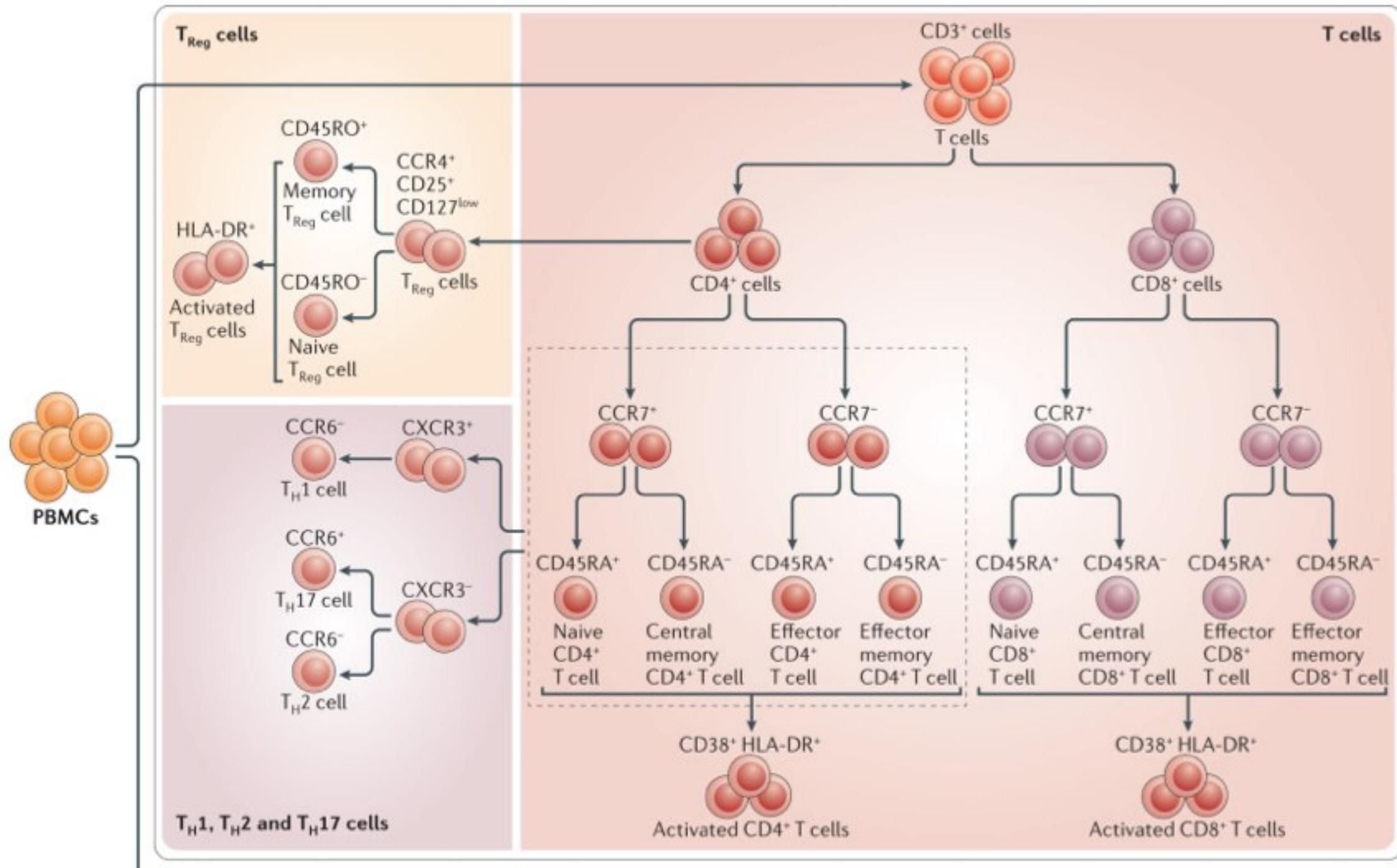
---



## Immunophénotypage

Exemple en recherche translationnelle (Maecker et al., 2012)

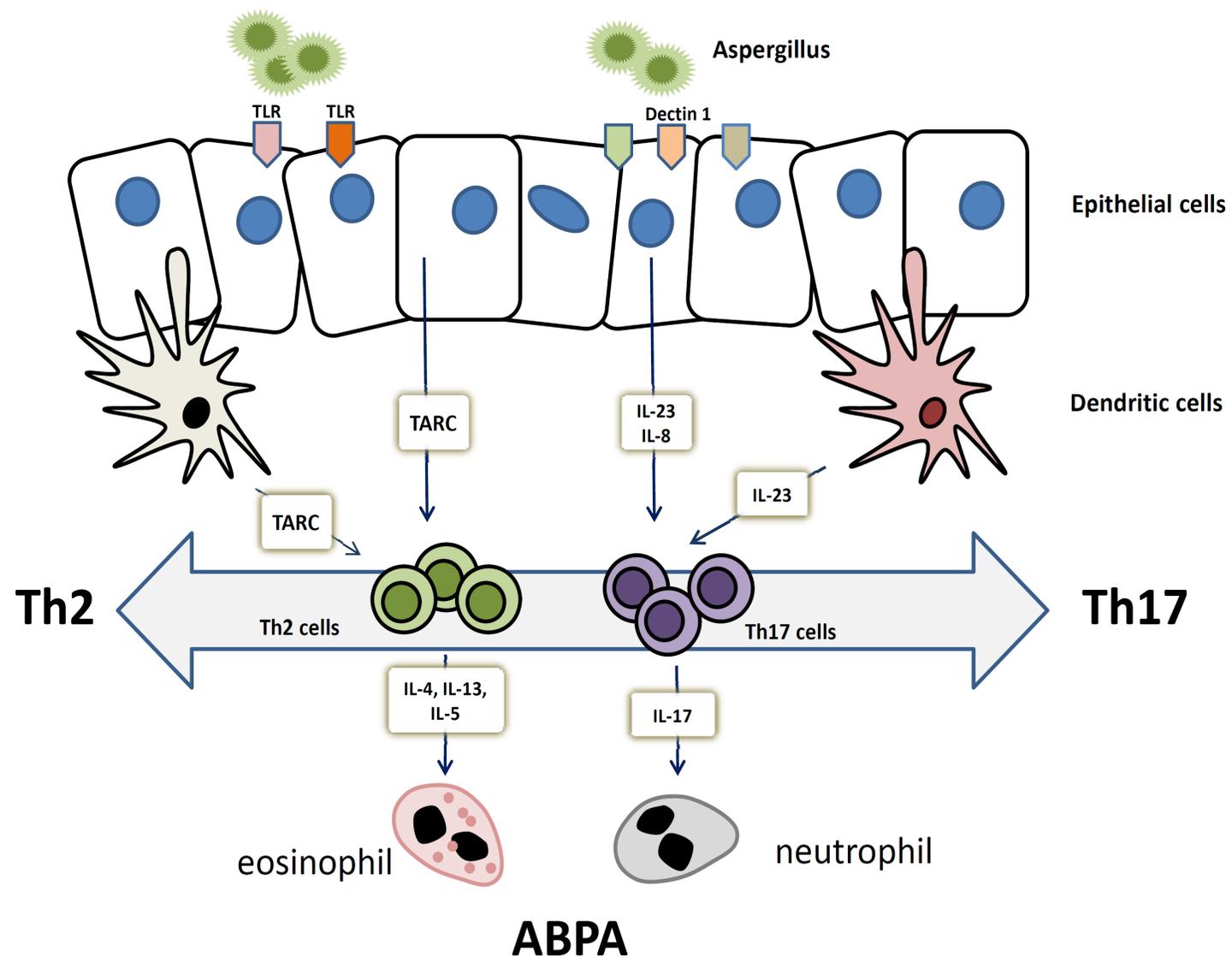
# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique



## Immunophénotypage

Exemple en recherche translationnelle (Maecker et al., 2012)

# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique

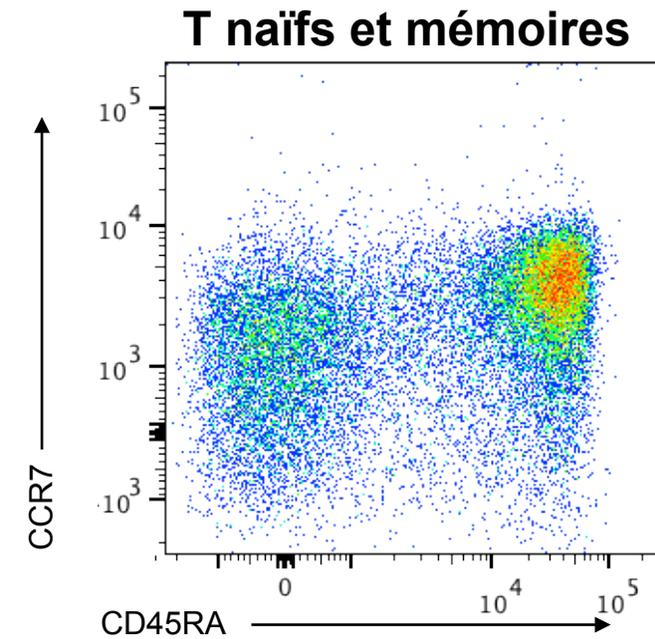
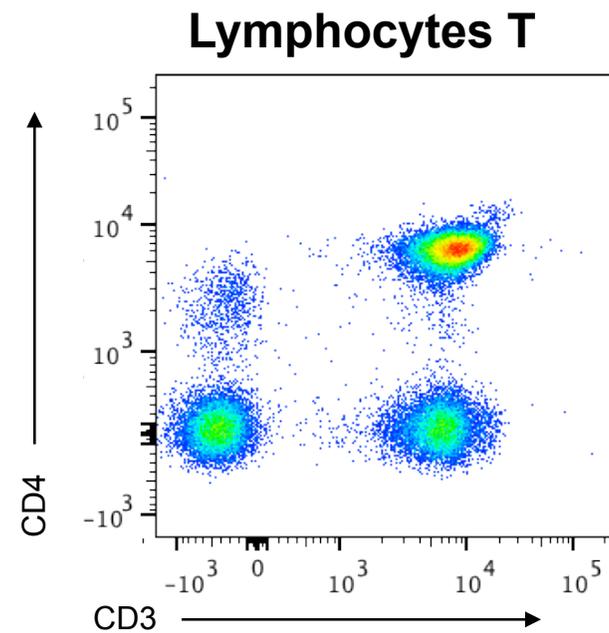
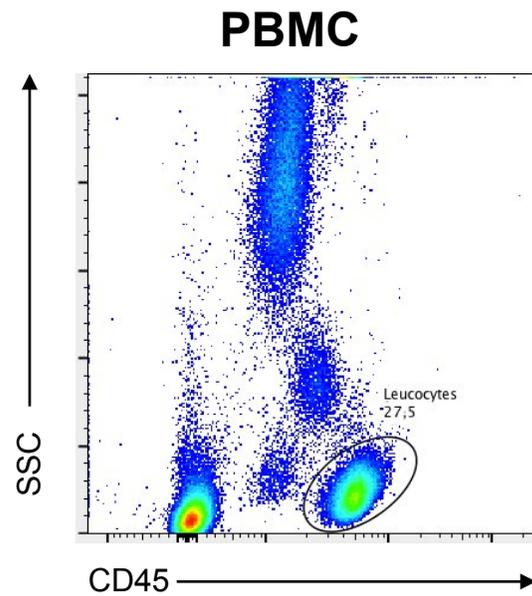


Etude des sous populations T et B avant, pendant et après exacerbations.

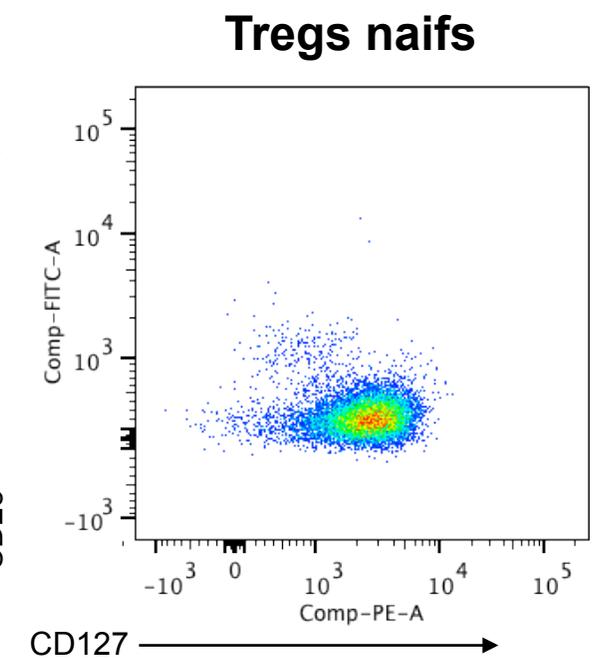
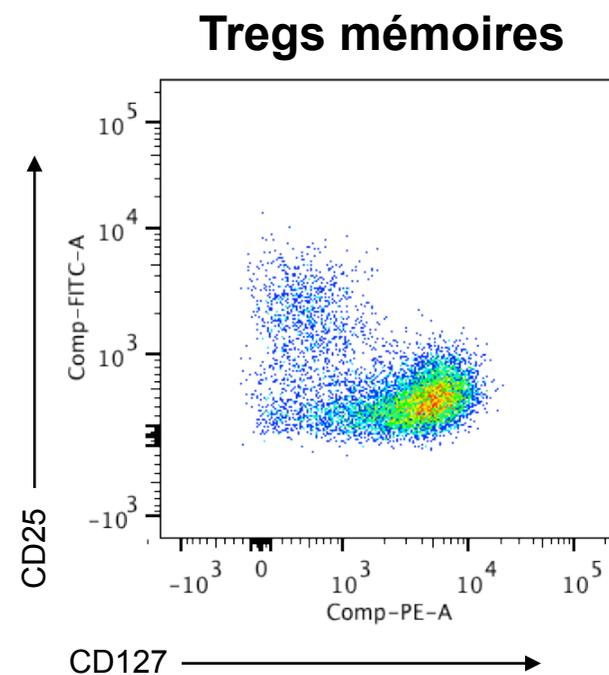
## Immunophénotypage

Exemple en recherche translationnelle (Protocole TARC-ABPA)

# Immunophénotypage: de la recherche à la clinique



Maecker et al., 2012  
Seddiki et al., 2008  
Valmori et al., 2005



## Immunophénotypage

Exemple en recherche translationnelle (Protocole TARC-ABPA)

# Projets

---

- Phénotypage dans un modèle d'asthme allergique aux acariens
- Caractérisation des cellules B régulatrices chez des souris asthmatiques
- Standardisation des méthodes de cytométrie en flux chez l'homme (exemple de la cohorte TARC-ABPA)
- Etude de l'apoptose, de la prolifération et du cycle cellulaire dans un modèle de différenciation in vitro de lymphocytes B naifs

# Étude de l'apoptose et du cycle cellulaire

---

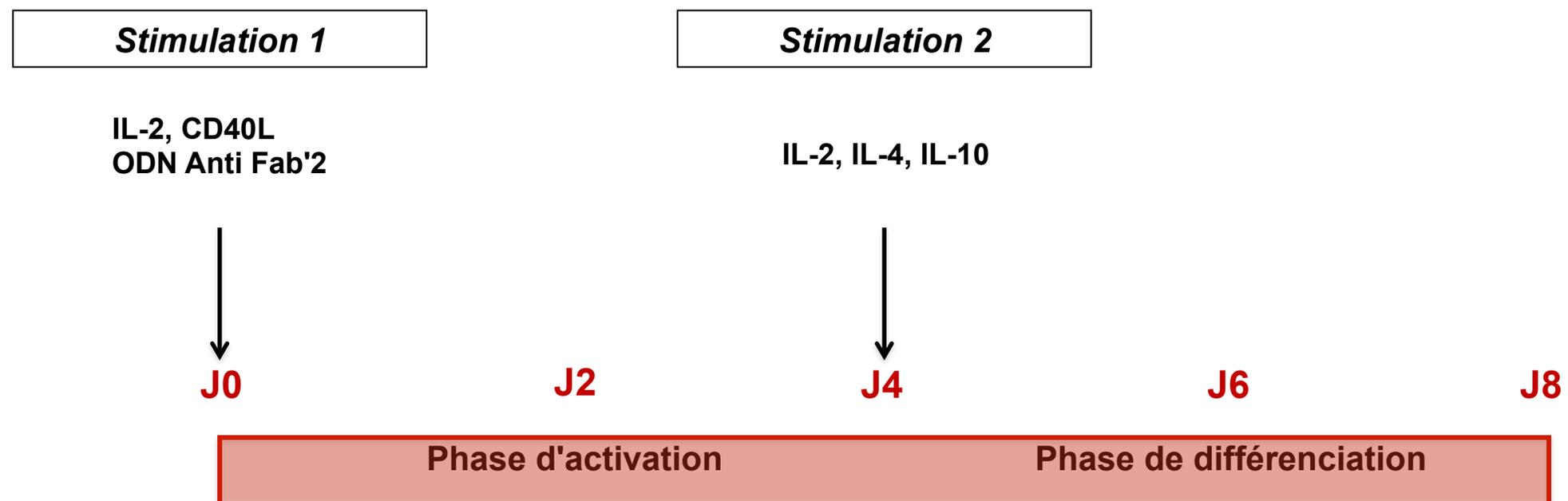
Activation et différenciation des lymphocytes B (Jourdan et al., 2009; Le Gallou et al., 2012; Chesneau et al., in submission)



# Étude de l'apoptose et du cycle cellulaire

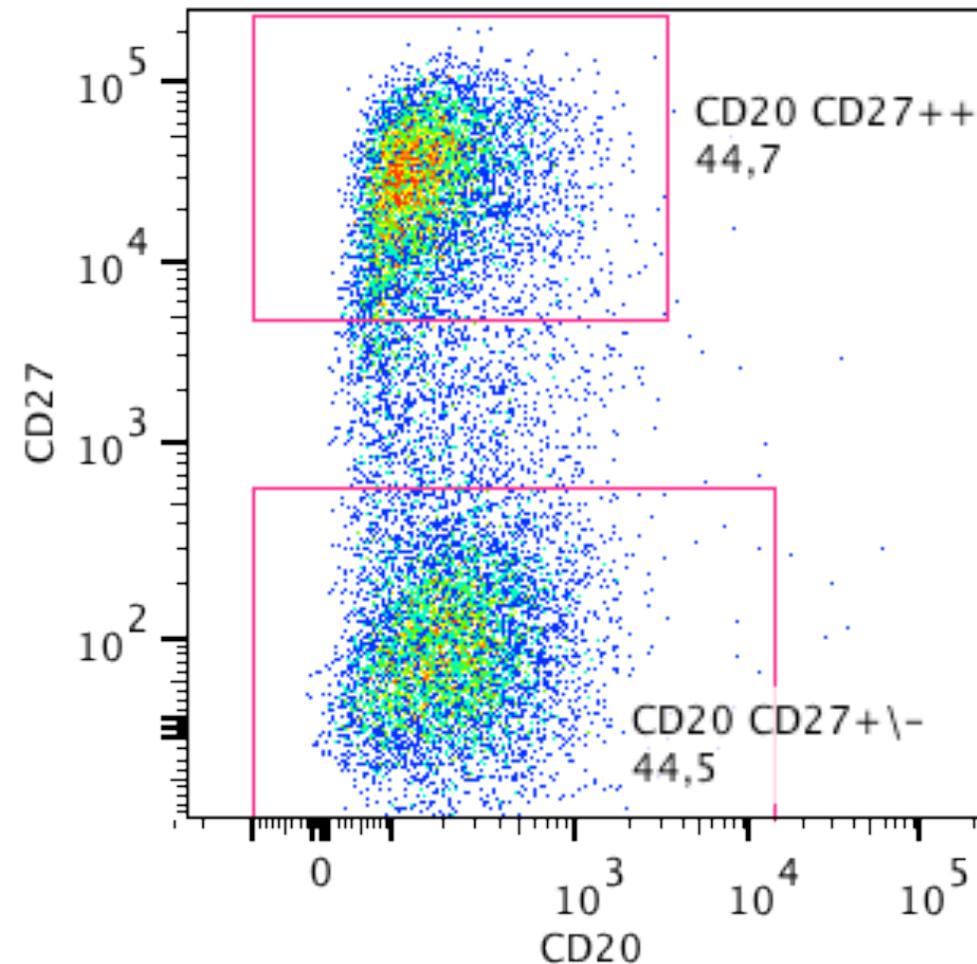
---

Activation et différenciation des lymphocytes B (Jourdan et al., 2009; Le Gallou et al., 2012; Chesneau et al., in submission)



# Étude de l'apoptose et du cycle cellulaire

---



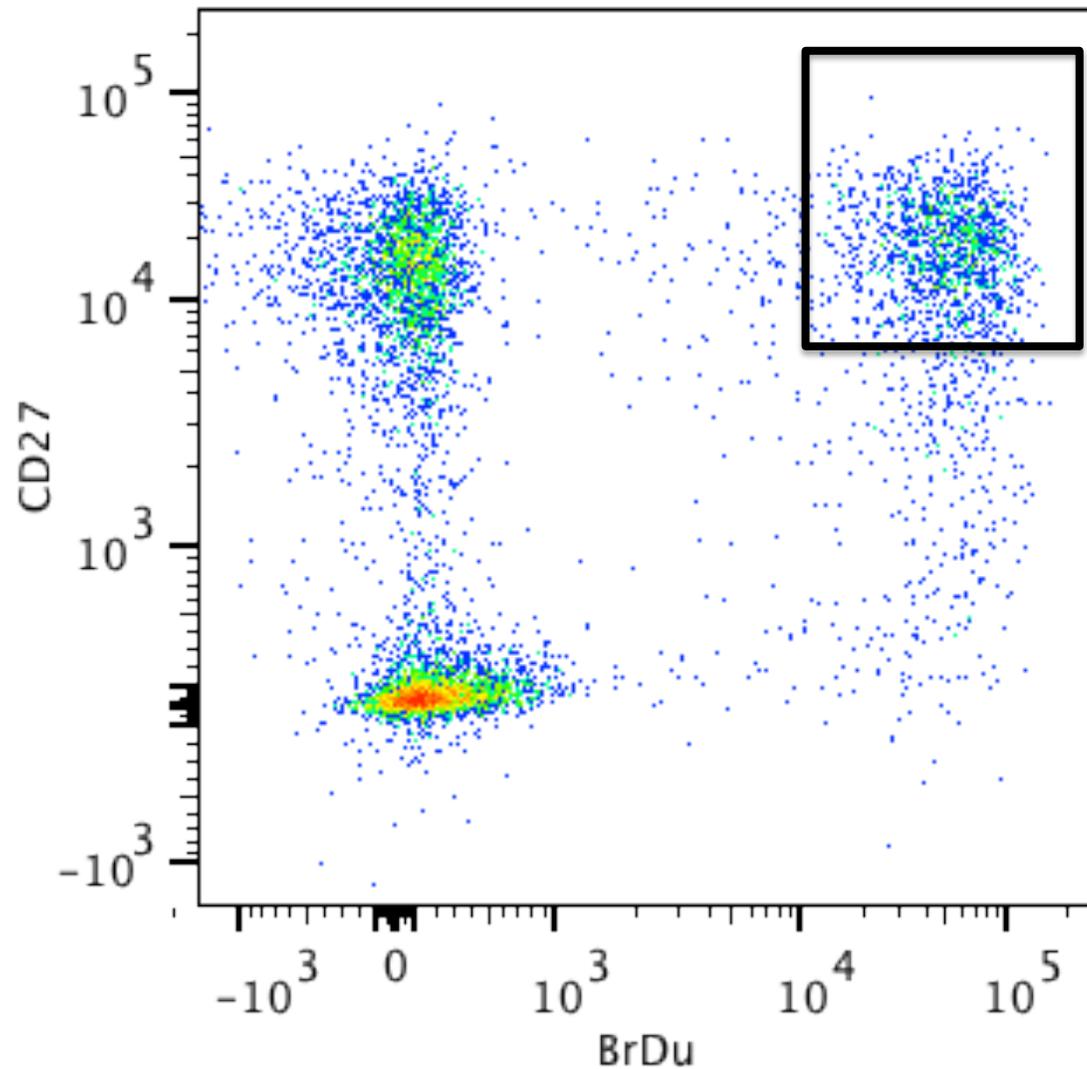
**Génération d'une population B mémoire  
Au jour 6. Prolifération et apoptose ?**

Apoptose et prolifération

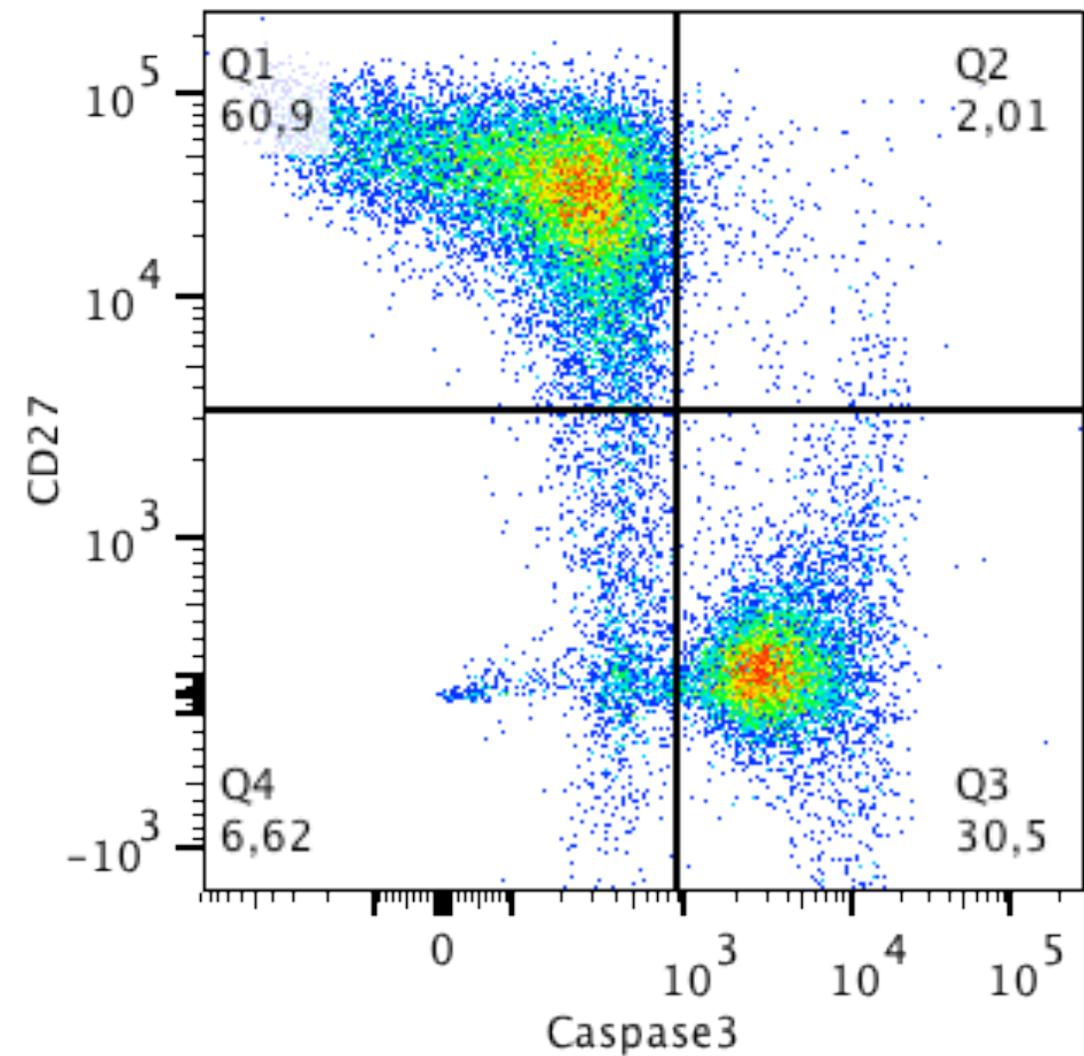
Modèles de différenciation in vitro

# Étude de l'apoptose et du cycle cellulaire

BrDu, analogue de la thymidine



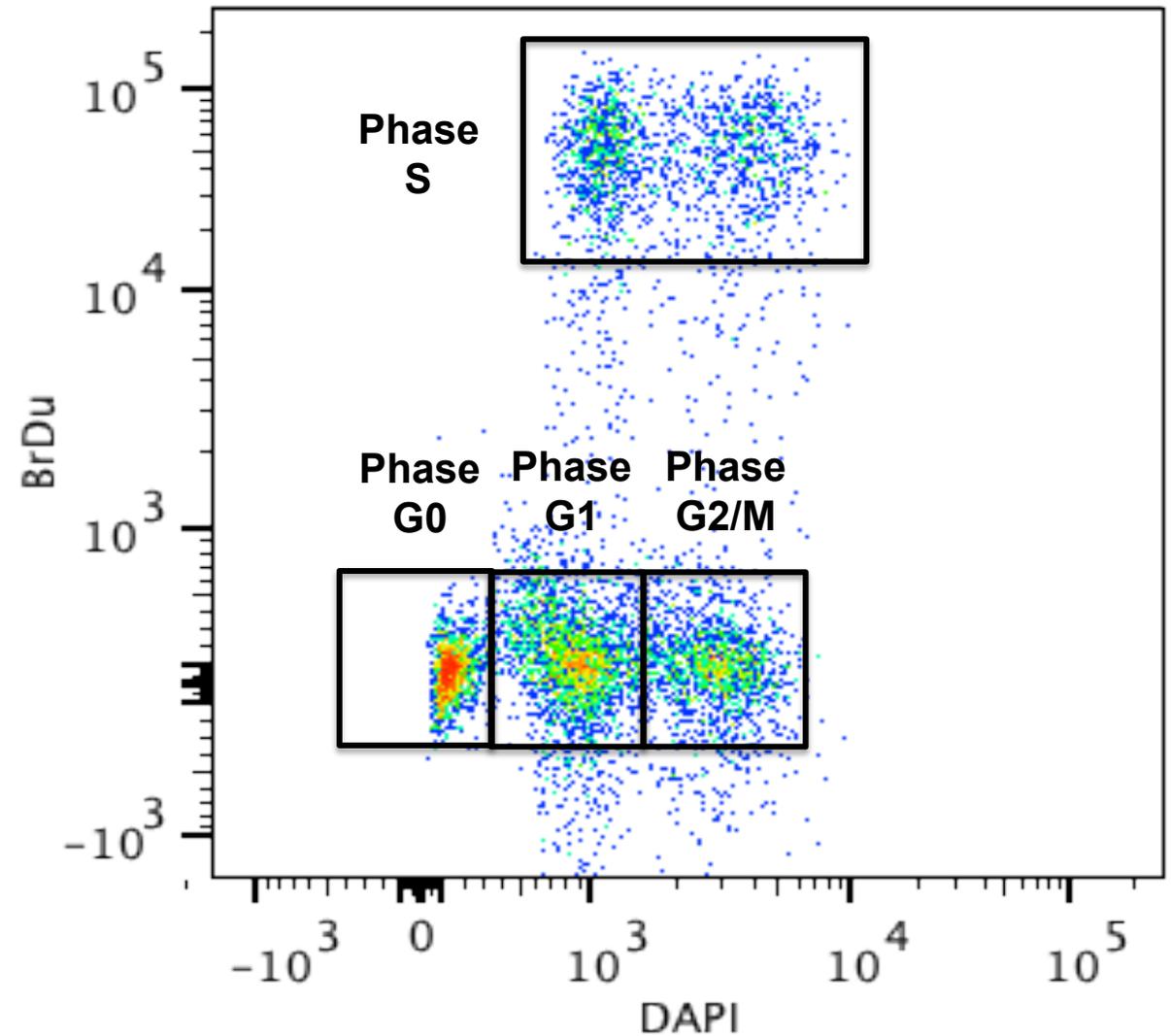
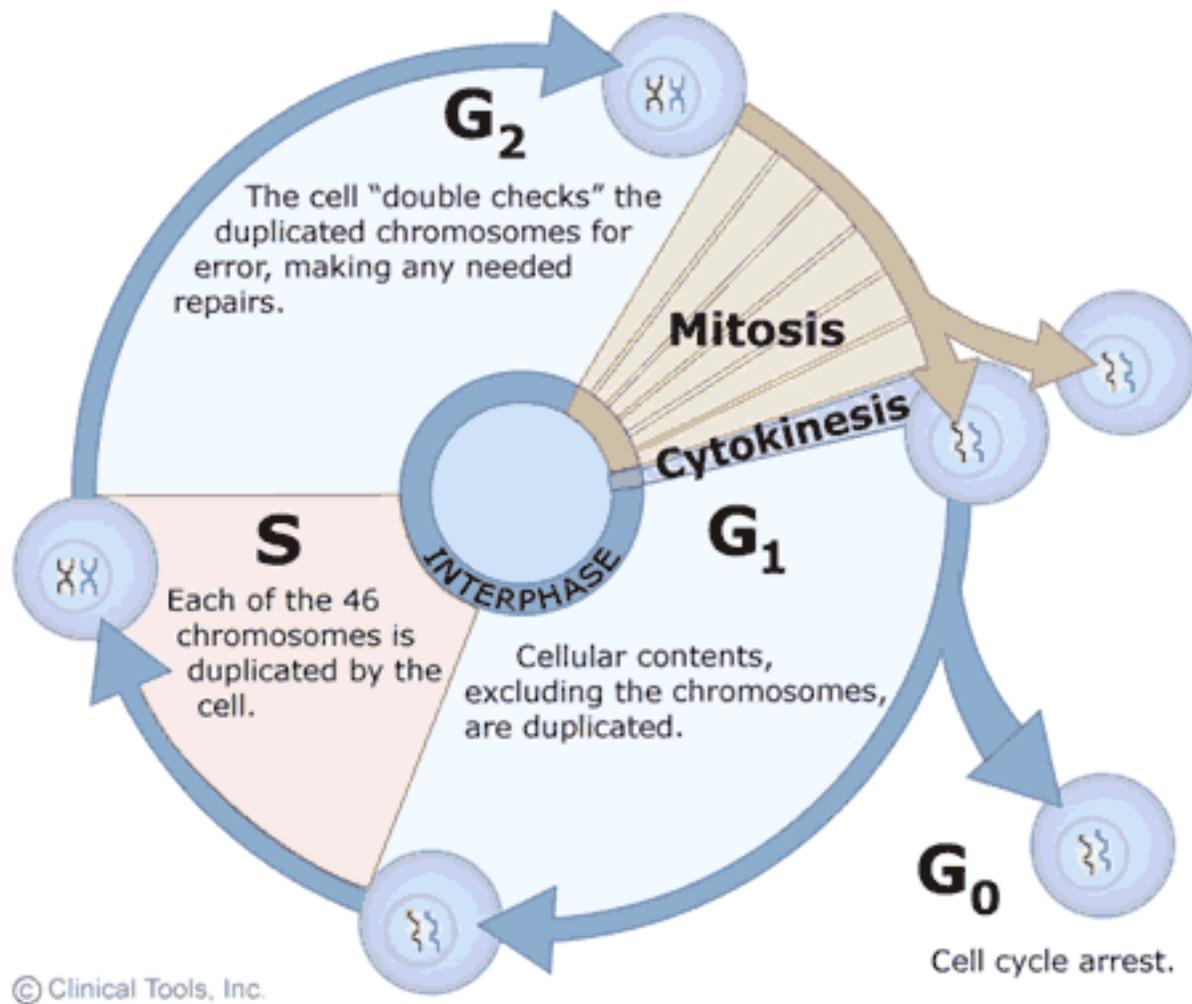
Caspase 3, forme active



## Apoptose et prolifération

Les cellules B mémoires prolifèrent et sont résistantes à l'apoptose

# Étude de l'apoptose et du cycle cellulaire



## Apoptose et prolifération

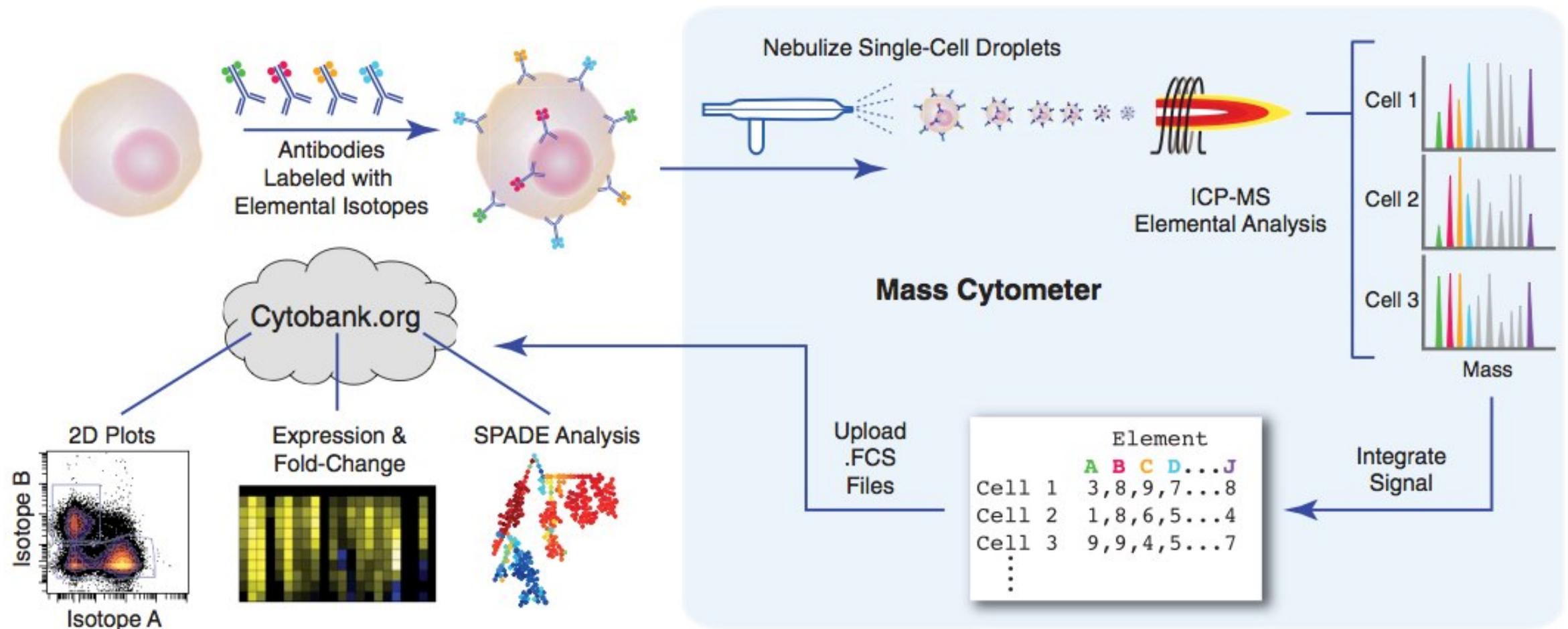
Cycle cellulaire pendant la différenciation des B totaux

# Autres applications

---

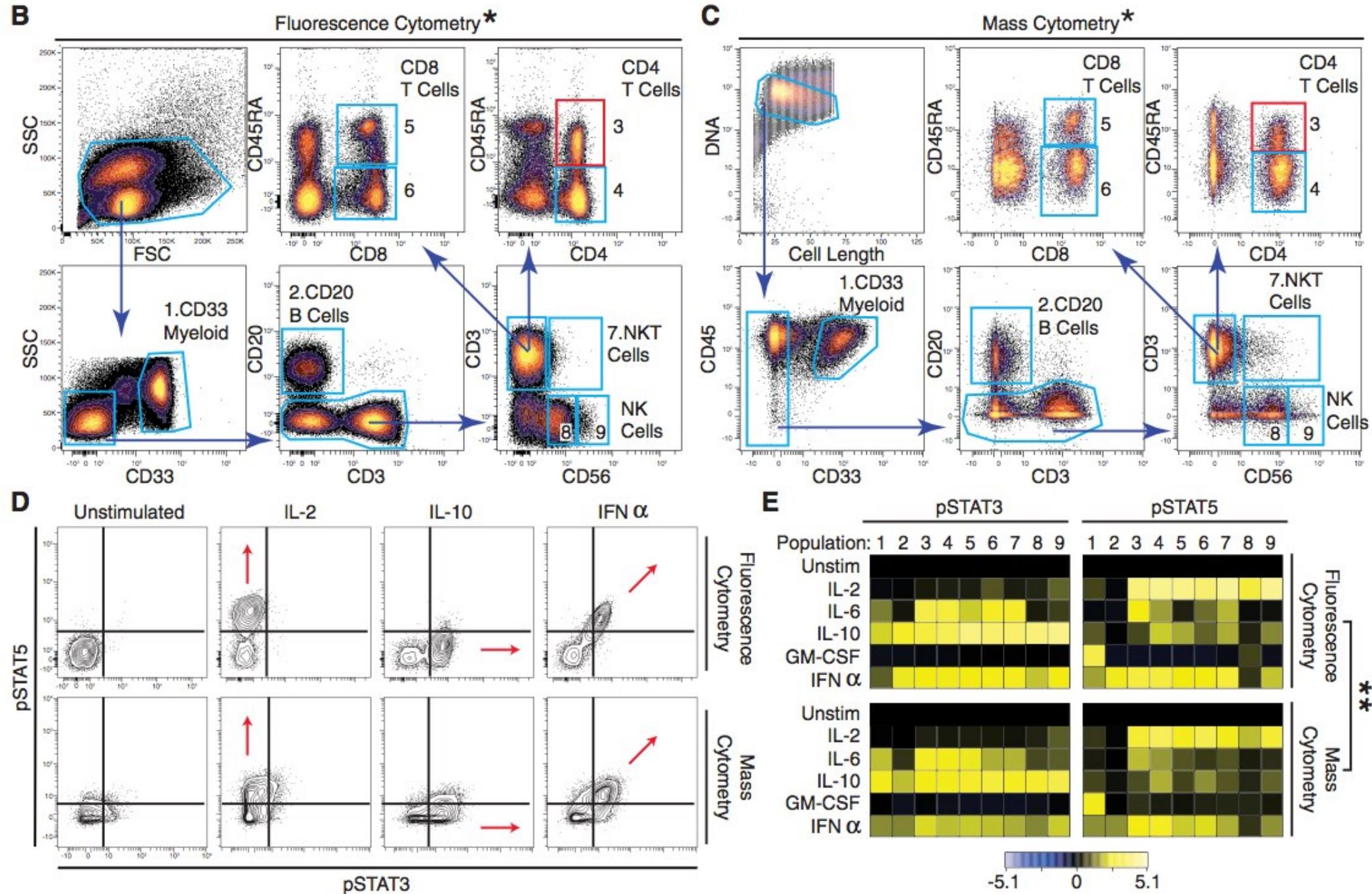
- Autres méthodes de prolifération (CFSE)
- Suivi du signal calcique
- Marquage des protéines phosphorylées
- CytoF, ImageStreamX

# Cytométrie de masse



Utilisation d'anticorps couplé à un isotope

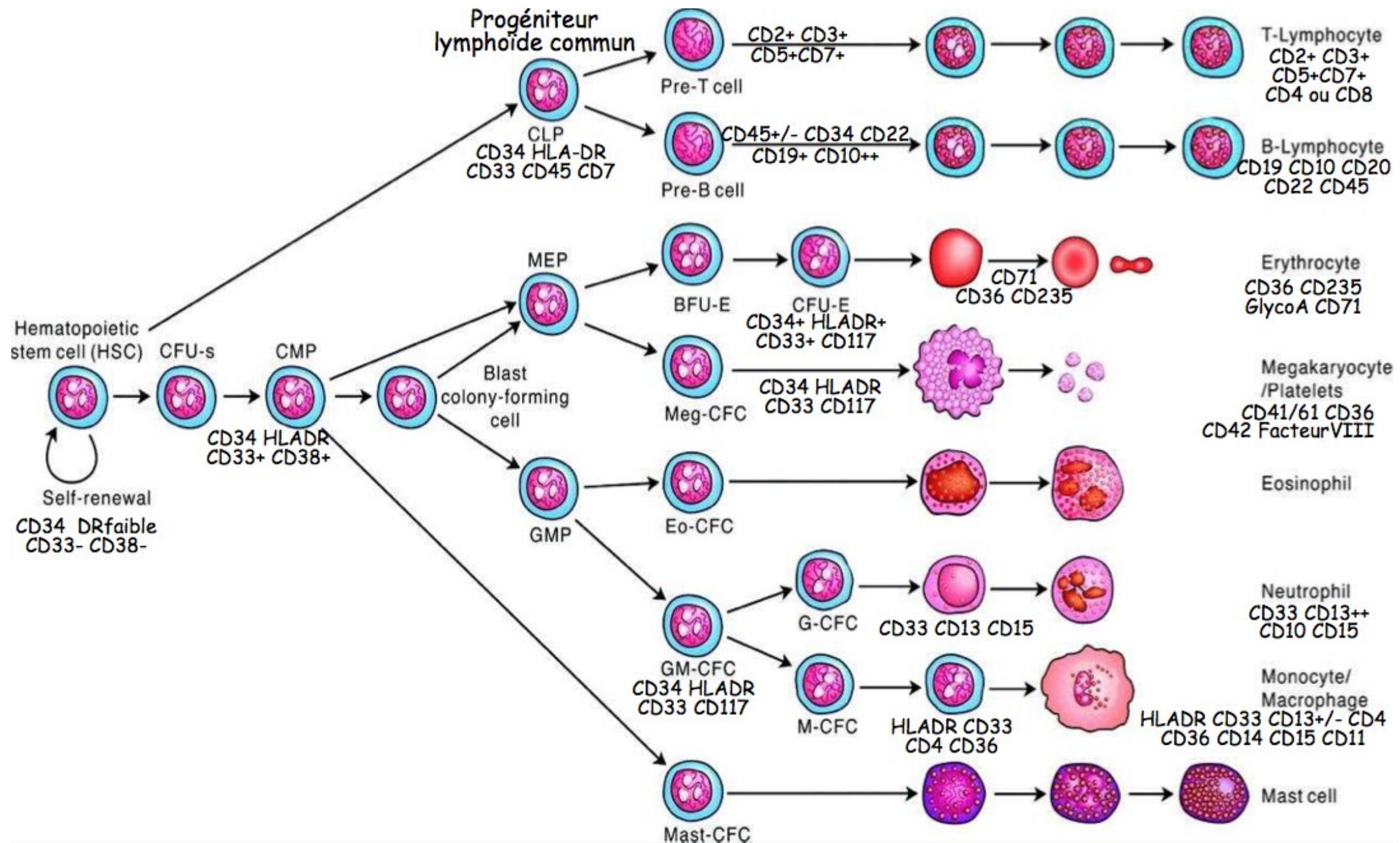
# Cytométrie de masse



Cytométrie de masse

Bendall et al., 2011

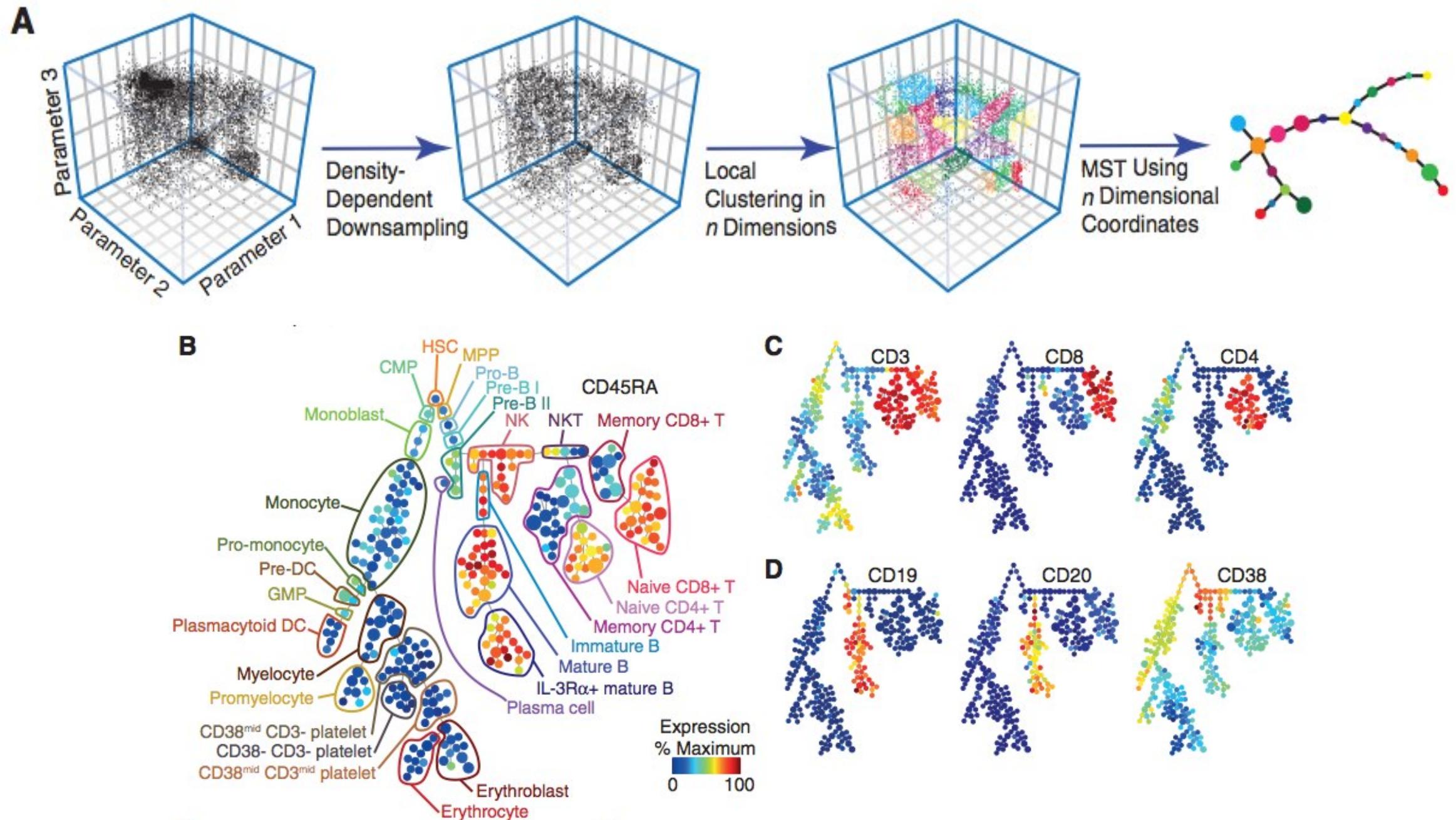
# Cytométrie de masse



## Cytométrie de masse

Bendall et al., 2011

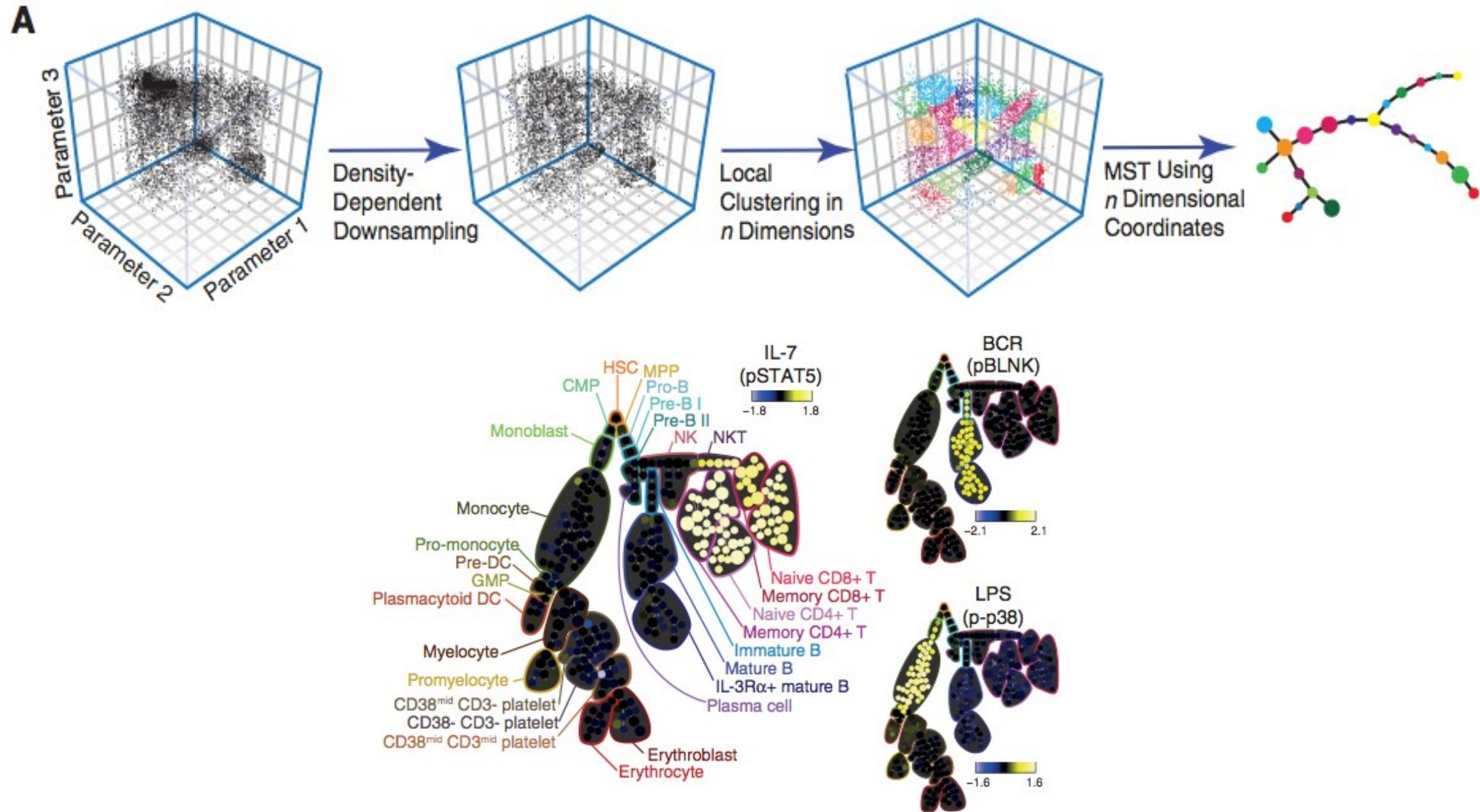
# Cytométrie de masse



Cytométrie de masse

Bendall et al., 2011

# Cytométrie de masse



## Cytométrie de masse

Bendall et al., 2011

# Cytométrie de masse

---

- **Combinaison d'une multitude de marqueurs possibles (pas de compensation)**
- **Possibilité de combiner phosphorylation, phénotypage à haut débit**
- **Evolution des outils bio-informatiques, support de la cytométrie**
- **Matériel très cher, couplage d'un anticorps avec isotope (3000 euros !!!)**
- **Attendre la démocratisation de ces méthodes et l'évolution avec les entreprises**

# THANK YOU !

## FOR YOUR ATTENTION



Faouzi Braza, PhD student  
Faouzi.braza@etu.univ-nantes.fr



UNIVERSITÉ DE NANTES

