

Configurations des instruments et protocoles utilisés dans l'étude

Deux systèmes ont été utilisés successivement. Initialement, nous avons effectué nos analyses sur un cytomètre 4 couleurs Epics XLM[®] (Beckman Coulter ; Fullerton, CA). Il comprenait 1 seul laser Argon (488 nm) et 4 photomultiplicateurs disposés en lignes, dans l'ordre croissant de longueurs d'ondes (fig.1.2). Les échantillons étaient marqués avec 4 anticorps : CD45 FITC (clone B321 F4A), CD8 PE (clone SFC12 thyD3), CD4 PE-Texas Red (clone SFC12T4D11) et CD3 PE-Cy5 (clone UCHT1) fournis mélangés, prêts à l'emploi (TetraChrom[®]) par Beckman Coulter (table II). Les anticorps étaient appliqués simultanément sur sang total (100µL, 15 min, température ambiante, à l'abri de la lumière), l'échantillon était ensuite traité pour érythrolyse et fixation, en deux temps (Immunoprep[®] ; Beckman Coulter) et analyse immédiate (dans l'heure) sans lavage. Exactement le même volume (100µL, même pipette, même manipulateur) de billes calibrées (Flowcount[®] ; Beckman Coulter) était ajouté à l'échantillon juste et vortexé, avant analyse au cytomètre. La dilution finale est évaluée à 100µL de sang dans 1205µL final. Les valeurs absolues étaient calculées par le logiciel (Tetraone[®] ; Beckman Coulter) et directement éditées. L'analyse était effectuée sur 7500 lymphocytes et un minimum de 1000 billes, sauf si l'analyse excédait 5 minutes (en cas de grande lymphopénie).

Plus récemment, nous avons utilisé un système FACSCanto[®] (BD Biosciences, San José CA) qui comporte deux sources d'excitations laser : Argon (488 nm) et Hélium-Néon (633 nm). Il possède 6 photomultiplicateurs (4 pour l'excitation bleue et 2 pour l'excitation rouge) disposés en étoile, dans l'ordre décroissant de longueur d'onde (fig.3.2). Les échantillons étaient marqués avec 7 anticorps simultanés : CD3 FITC (clone SK7), CD16 PE (clone B73.1), CD56 PE clone (NCAM 16.2), CD45 PerCP (clone 2D1), CD4 PE-Cy7 (clone SK3), CD19 APC (clone SJ25C1), CD8 APC-Cy7 (clone SK7) fournis par BD Biosciences (Table III). De la même façon, les anticorps étaient ajoutés simultanément à l'échantillon de sang total (50µL exact : pipette électronique, calibrée ; 15 min, température ambiante à l'abri de la lumière) qui était ensuite traité en un temps (érythrolyse et fixation – addition manuelle de 500µL de solution FACSlyzing[®], BD Biosciences) et analysé dans l'heure. Les valeurs absolues étaient analysées par l'utilisation de tubes contenant des billes calibrées lyophilisées (Trucount[®], BD Biosciences). Les valeurs absolues étaient calculées manuellement selon les recommandations du fournisseur. La dilution finale est estimée à 50µL de sang dans 575µL final. L'analyse était fixée à 10 000 lymphocytes et effectuée par le logiciel FACSDiva[®] (BD Biosciences).

Dans tous les cas, les échantillons de sang périphérique étaient prélevés sur anticoagulant Ethylene Diamine Tetra Acétique Acid - EDTA, traités dans les 6 heures après collecte et analysés dans l'heure après le marquage.

Table X : Matériel utilisés pour phénotypages des lymphocytes T, B et NK

	Fluo	clone	Isotype	Fournisseur
EPICS XL				Beckman-Coulter
Lymphocytes T CD4/CD8 en valeurs absolues				
TetraChrome				Beckman-Coulter
CD3 ϵ	PE-Cy5	UCHT1		Beckman-Coulter
CD4	PE-TR	SFCI12T4D11		Beckman-Coulter
CD8 α	PE	SFCI21thyD3		Beckman-Coulter
CD45	FITC	B3821F4A		Beckman-Coulter
Flowcount		calibration		Beckman-Coulter
Immunoprep		Lyse + fixation		Beckman-Coulter
Lymphocytes B / NK				
CD16	FITC	DJ130c	G1	DakoCytomation
CD56	PE	N901	G1	Beckman-Coulter
CD19	PE-TR	89B	G1	Beckman-Coulter
CD3 ϵ	PE-Cy5	UCHT1	G1	DakoCytomation
FAC Canto				
FAC Canto	6 couleurs			BD Biosciences
Lymphocytes T CD4/CD8 / B / NK en valeurs absolues				
Multi-check				BD Biosciences
CD3 ϵ	FITC	SK7	G1	BD Biosciences
+ CD4	PE-Cy7	SK3	G1	BD Biosciences
+ CD8 α	APC-Cy7	SK1	G1	BD Biosciences
CD45	PerCP	2D1	G1	BD Biosciences
CD19	APC	SJ25C1	G1	BD Biosciences
CD16	PE	B73.1	G1	BD Biosciences
CD56	PE	NCAM 16.2	G1	BD Biosciences
Trucount		calibration		BD Biosciences
FACSLysing		Lyse + fixation		BD Biosciences

Les marquages complémentaires comportaient une partie commune (CD3/CD4/CD8 α +/-CD8 β) accompagnée des différents marqueurs listés dans la table XI.

Table XI : Matériel utilisés pour phénotypages des lymphocytes T

	Fluo	clone	Isotype	Fournisseur
Lymphocytes T $\alpha\beta/\gamma\delta$/CD8				
TCR $\alpha\beta$	PE-Cy5	BMA031	G1	Beckman-Coulter
CD8 α	PE-TR	SFCI21thyD3	G1	Beckman-Coulter
CD8 β	PE	2ST8.5H7	G1	Beckman-Coulter
TCR $\gamma\delta$	FITC	Immu510	G1	Beckman-Coulter
Lymphocytes T CD3/CD8α en combinaisons 4 couleurs				
CD8 α	PE-TR	SFCI21thyD3	G1	Beckman-Coulter
CD3	PE-Cy5	UCHT1	G1	DakoCytomation
Lymphocytes T CD3/CD8α en combinaisons 6 couleurs				
CD8 α	APC			
CD3	PE-Cy5			
CD8 α	PE-TR			
CD3	PE-Cy7			
Lymphocytes T CD3/CD8α Activés				
CD69*	FITC	TP1.55.3	G1	Beckman-Coulter
CD25*	FITC	ACT-1	G1	DakoCytomation
Lymphocytes T CD3/CD8 mémoires *				
CD45 RA	FITC			
CD45 RO	PE			
Lymphocytes T CD3/CD8 mémoires *				
CD28	FITC	CD25.1		DakoCytomation
CD27	PE	M-T271		DakoCytomation
Lymphocytes T CD3/CD8a mémoires*				
CD195	PE	2D7	CCR5	BD Biosciences
CD197	PE	3D12	CCR7	BD Biosciences
Lymphocytes T CD3/CD8a mémoires*				
CD62L	FITC	LECAM-1		Beckman-Coulter
CD7	PE	DK24		DakoCytomation
Quantification densité				
QuiFiKit®				DakoCytomation
Tri magnétiques				
TCR $\gamma\delta$	haptène	11F2	G1	Miltenyi biotech
anti-haptène	lloïde ferrique			Miltenyi biotech

* validés sur cellules mononuclées périphériques de donneurs sains stimulés par Phytohemagglutinin

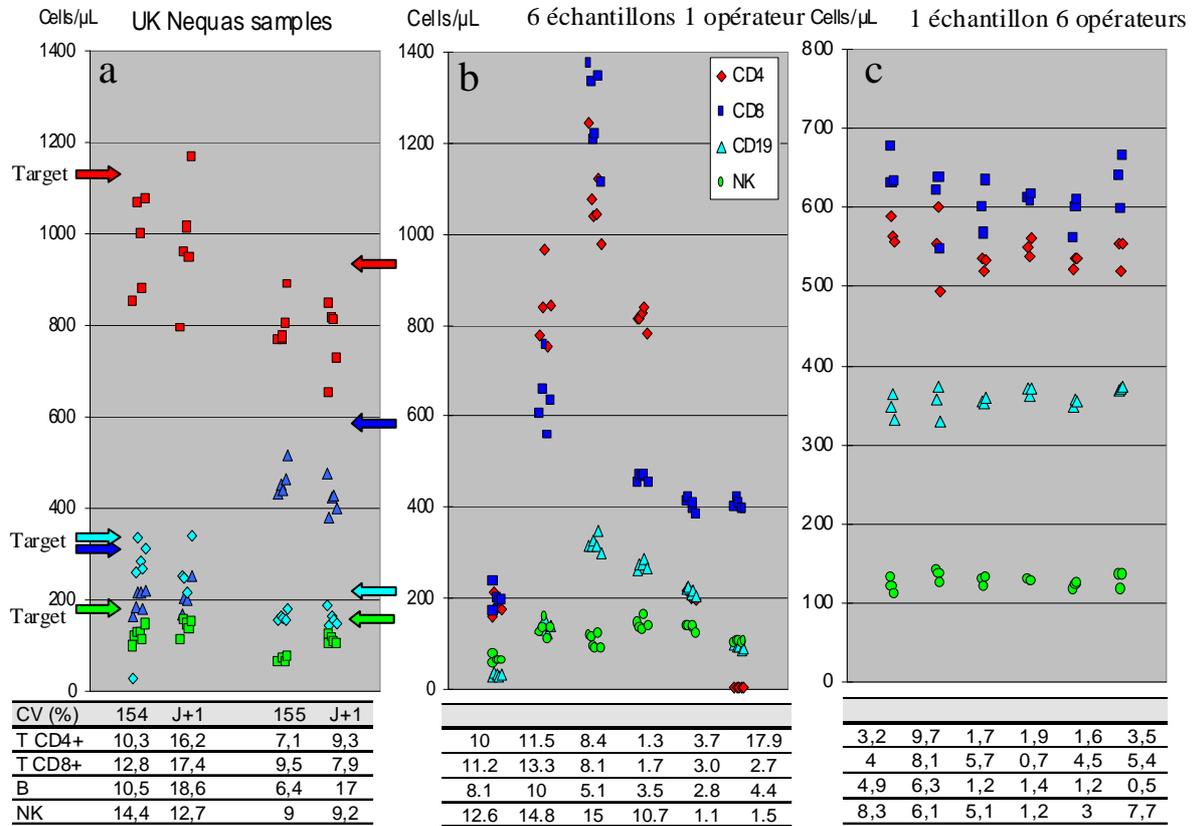
1 – Standardisation des procédures d'identification et quantification :

Dans une étude préliminaire, nous avons évalué les performances de la technique de numération des lymphocytes T en 4 couleurs (EPICS XLM® Beckmann-Coulter), lorsque toutes les précautions et les recommandations de bonnes pratiques sont respectées. Dans cette configuration, nous avons utilisé simultanément les marquages avec CD45, CD3, CD4 et CD8 (Tetraone® Beckmann-Coulter).

Nous avons utilisé les procédures standardisées de validation de réglage du cytomètre (gains –Flowset® - ; calcul automatique des compensations -Cytocomp®-). La stratégie de fenêtrage était celle recommandée par le fournisseur assisté par logiciel semi-automatisé. Les réglages étaient validés journallement sur un contrôle de qualité (sang stabilisé Immunotrol® Beckmann-Coulter). La validité de quantification absolue était évaluée par adjonction de standard interne (billes à concentration calibrée Flowcount® Beckmann-Coulter).

Nous avons pu mettre en évidence la bonne précision (avec des coefficients de variation inférieurs à 4%), exactitude et stabilité (avec des CV inférieurs à 5%) de cette analyse, sous réserve de respect de ces procédures, ce qui permet d'être très confiant sur la représentativité de nos résultats, notamment pour le suivi dans le temps et la comparaison entre laboratoires (fig 3.1).

Figure 3.1 : Reproductibilité d'analyse quantitative absolue de populations lymphocytaires par cytométrie en flux : reproductibilité a) de contrôles de qualité internationaux; b) intra-manip et c) entre opérateurs.



2 – Les phénotypes non conventionnels en cytométrie 4 ou 6 couleurs :

A l'occasion du renouvellement de l'instrumentation, nous avons été amenés à valider un système qui possédait la capacité d'analyser six marqueurs simultanés (FACSCanto®, BD Biosciences), en utilisant une combinaison de marqueurs encore inédite en routine.

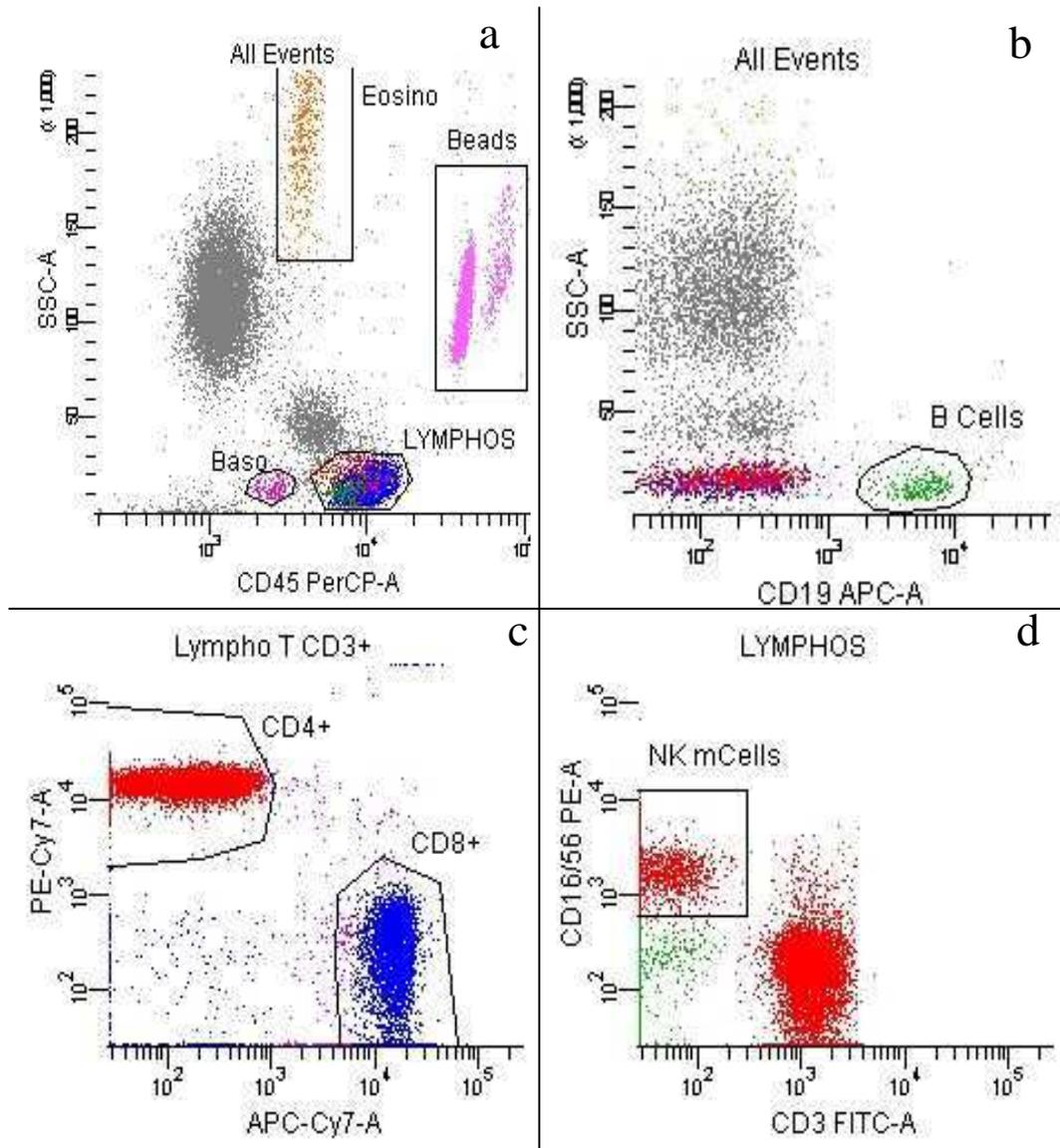
Dans cette configuration, nous avons choisi d'utiliser simultanément les marquages avec CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56 et enfin CD19. Le mélange, non disponible commercialement, était préparé au laboratoire. Cette combinaison nous paraît être la plus judicieuse pour la numération des principales populations des lymphocytes circulants, en accord avec les fournisseurs qui souhaitent la commercialiser en mode standardisé. Les valeurs absolues étaient mesurées en utilisant un standard interne (Billes TRUCOUNT).

Cette combinaison nous permet d'identifier et de quantifier précisément les principales composantes lymphocytaires que sont les lymphocytes T (CD4 et CD8), les lymphocytes B et les lymphocytes NK (fig. 3.2).

Nous avons montré que cette analyse était très reproductible dans une même et entre différentes manipulations ($CV < 5\%$). Nous avons observé une excellente corrélation entre les quantifications en valeurs absolues obtenues avec les deux systèmes en utilisant une stratégie de fenêtrage proche. En effet, les solutions actuelles, proposées par les différentes compagnies montrent des résultats différant significativement sur les études internationales de contrôles de qualité. Les différences de stratégies de fenêtrage en sont une des explications. Les standards internes et leurs recommandations d'utilisation sont également différents.

Dans l'étude actuelle, nous considérerons donc indifféremment les résultats qualitatifs d'analyses effectuées avec l'un ou l'autre système. Cependant, la continuité quantitative sera évitée car les numérations des populations très minoritaires n'étaient que pauvrement corrélées entre les deux systèmes. L'expérience d'analyse biologique nous montre que les coefficients de variations sont habituellement mauvais pour les valeurs très faibles (10-20%). Les illustrations présentées ici sont choisies en priorité avec le système le plus récent que nous (et de plus en plus d'utilisateurs) continuerons à utiliser pour les années à venir.

Figure 3.2 : Identification lymphocytaire en cytométrie en flux 6 marquages simultanés.



Nous avons également pu confirmer, sur ce système, l'existence des populations lymphocytaires T non conventionnelles que nous décrivons en détail plus loin (T CD4+ CD8dim et T CD4dim CD8+ ainsi que des lymphocytes T CD8dim CD4-). Une fraction de lymphocytes T exprimant une forte intensité de CD3 était également retrouvée.

De plus, cette combinaison nous a permis de démontrer l'existence d'autres sous-populations lymphocytaires non conventionnelles et rarement considérées qui sont : des lymphocytes T CD3+ (toujours CD8+) exprimant du CD56, que ces lymphocytes soient CD3 normal (T $\alpha\beta$) ou CD3fort (Tgd) et d'authentiques NK (CD3-CD56+) qui expriment le CD8. Les fréquences de ces particularités phénotypiques étaient très variables d'un patient à l'autre, suggérant qu'elles aient une valeur sémiologique d'autant plus intéressante qu'elles sont restreintes à certaines sous-populations.

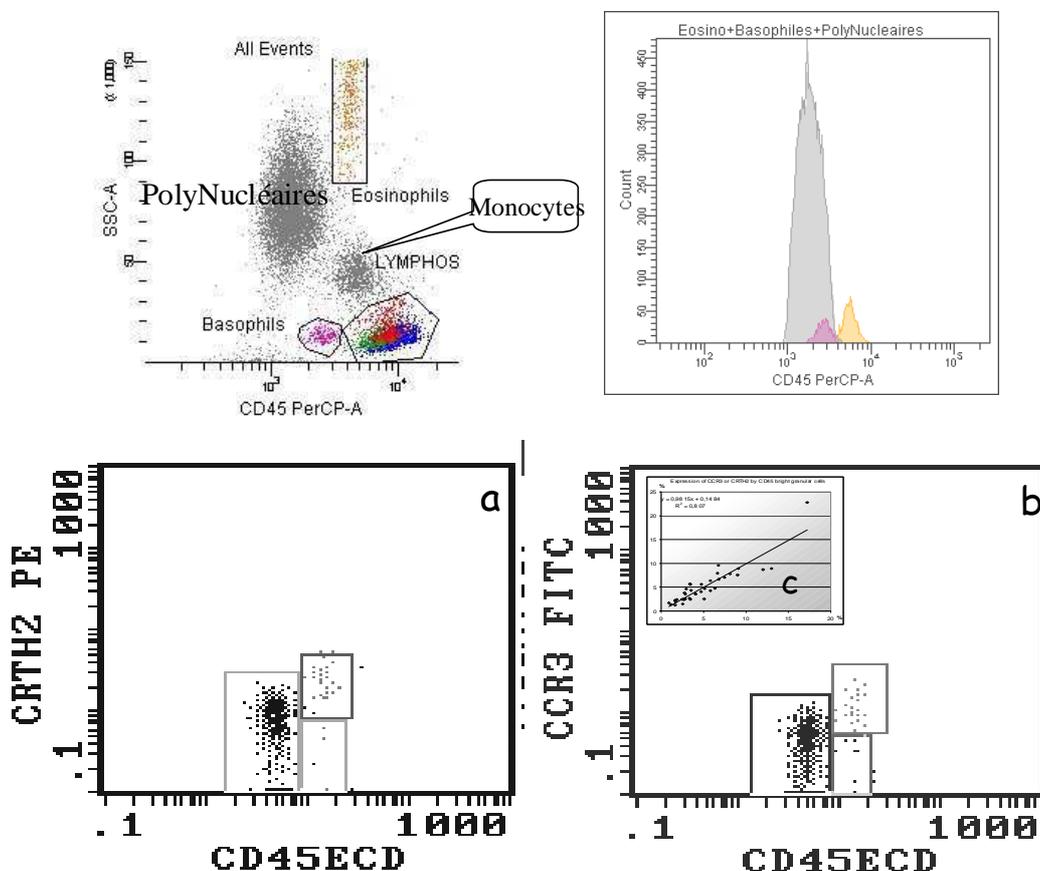
Leurs significations physio-pathologiques ne sont pas encore élucidées. Une baisse d'expression de CD8 pourrait modifier l'avidité du lymphocyte pour son peptide et sera discutée plus tard. La présence de CD56 est généralement synonyme d'activité cytotoxique. Le rôle du CD8 sur les NK n'est pas connu mais il existe plusieurs formes intermédiaires (normales ou tumorales) entre cellules NK et cellules T comme par exemple les T.NK. Ces populations n'ont pas pu être caractérisées dans la présente étude.

3 – Double population de polynucléaires selon la densité de CD45

Dans les deux systèmes, nous avons choisi d'utiliser le marquage par CD45 (pan-leucocytaire) pour l'identification des lymphocytes dans les procédures de routine (fig. 3.3). Ce marqueur non discriminant occupe un canal de détection et réduit d'un paramètre les possibilités de combinaisons « utiles ». Est-il suffisamment informatif pour justifier cette limitation?

L'utilisation du CD45 présente plusieurs avantages : il permet de différencier les leucocytes (lymphocytes, monocytes et polynucléaires) des autres éléments comme des érythroblastes, des débris de globules rouges et les plaquettes.

Figure 3.3 : Identification leucocytaire selon le marquage de CD45 : mise en évidence d'une population de polynucléaires à forte expression de CD45 correspondant à une hyper-éosinophilie (CCR3+, CRTH2+).



L'ensemble des lymphocytes est regroupé dans un nuage de points très homogène, exprimant fortement le CD45 et une faible diffraction latérale (Side Scatter). Les monocytes expriment le CD45 à moindre intensité et ont une diffraction latérale plus importante. Le phénomène est encore plus important pour les polynucléaires.

En utilisant le CD45, nous pouvons observer dans certains échantillons, une petite population qui exprimait du CD45 faiblement mais était très peu granuleuse (faible diffraction latérale - SC). Nous avons pu montrer que cette population représentait des polynucléaires basophiles (IgE membranaire +, CD3-, CD14-) au cours d'une étude du test de dégranulation de polynucléaires basophiles dans un contexte d'allergie aux venins d'hyménoptères (Lambert 2001).

Nous observons également, beaucoup plus fréquemment, une population leucocytaire qui présente une grande diffraction latérale (SC) comparable à des polynucléaires neutrophiles mais avec une intensité de fluorescence de CD45 nettement augmentée qui permet de les distinguer de la population de polynucléaires neutrophiles. Nous avons pu observer que ces leucocytes granuleux CD45 fort exprimaient le récepteur de chimiokine N°3 (CCR3) ainsi que le récepteur CRTH2. Le marqueur CCR3 est spécifique des polynucléaires éosinophiles. Le marqueur CRTH2 est également exprimé par les polynucléaires basophiles et les lymphocytes T de type Th2. Nous avons observé que l'augmentation de cette population de polynucléaires éosinophiles était souvent associée à une hyperactivité immunitaire de type Th2 (taux sériques élevés d'IgE et augmentation de protéine cationique éosinophile sérique - ECP-).

En enrichissant les cellules exprimant le CRTH2 à l'aide de billes magnétiques, nous avons pu montrer que la population granuleuse CD45 fort était nettement augmentée ainsi que la population granulaire basophile, alors que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes étaient fortement réduits. L'analyse microscopique nous a permis de confirmer le fort enrichissement en polynucléaires éosinophiles. La considération de cette population a permis de dépister des échantillons qui possédaient une hyper éosinophilie qui peut avoir des conséquences cliniques (Illich 1995) ? Certaines formes atteignaient les critères quantitatifs permettant d'évoquer un syndrome d'hyper éosinophilie (HES (Brito-Babapulle 2003).

4 – Expression différentielle de CD45 sur les leucocytes :

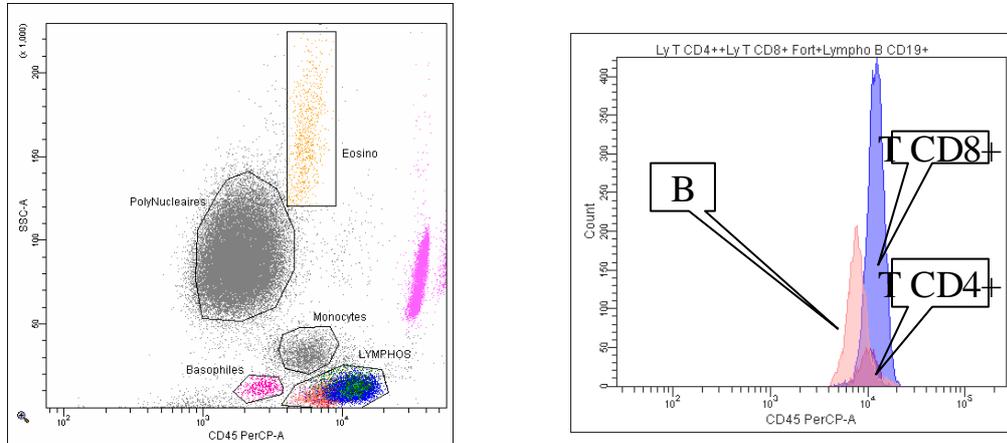
L'utilisation du CD45 permet également d'identifier des lymphocytes qui ont un caractère lymphoprolifératif. En effet, chez les patients porteurs de leucémie lymphoïde, on distingue une double population lymphocytaire. Les lymphocytes lymphoprolifératifs présentent une nette diminution d'expression du CD45. La très grande majorité des syndromes prolifératifs concerne des lymphocytes B (leucémie lymphoïde chronique -LLC-). Cette observation a fait l'objet de plusieurs publications et sert actuellement de référence pour l'analyse phénotypique des syndromes prolifératifs (Festin 1994, Lacombe 1997). Une population lymphocytaire CD45 faible peut être découverte fortuite dans la pratique du phénotypage leucocytaire de routine et mener au diagnostic de LLC.

Nous avons cherché à savoir si l'expression des CD45 pouvait être différente entre des lymphocytes B matures normaux et des lymphocytes T matures (fig. 3.4). Ces données sont maintenant directement disponibles avec l'utilisation du marquage à six couleurs. L'expression du CD45 apparaît réduite sur des lymphocytes B normaux (moyenne de fluorescence (Moyenne de fluorescence : 6595 ± 763 comparée à celle des lymphocytes T matures T ($p = 2.9 \cdot 10^{-35}$).

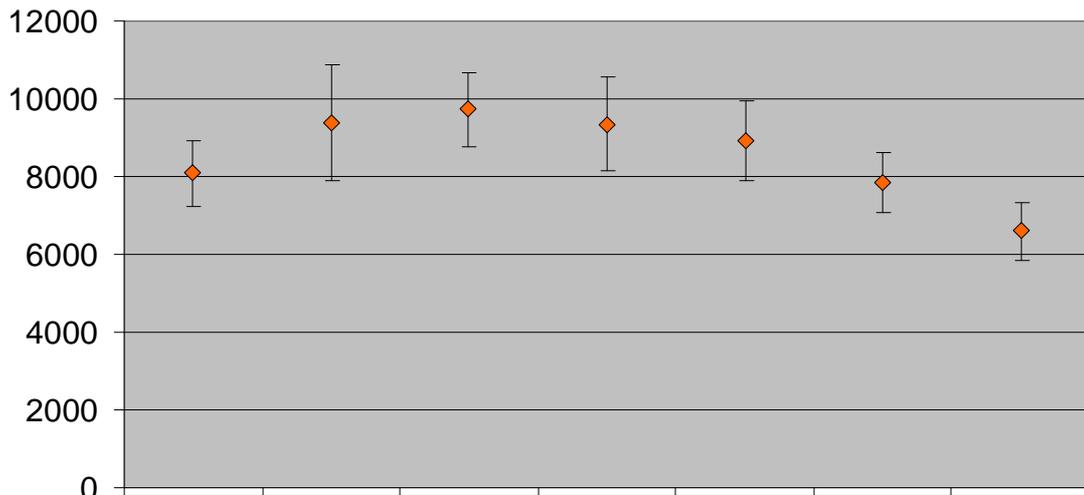
De façon intéressante, les lymphocytes T CD4 ont une expression significativement différente des lymphocytes T CD8+ : MFI 8093 ± 841 et 9721 ± 939 respectivement (test de Student pairé $p = 2.8 \cdot 10^{-37}$).

Enfin, l'expression du CD45 était significativement plus faible sur les NK (MFI 7835 ± 774) comparée aux lymphocytes (test de Student pairé $p = 2.8 \cdot 10^{-33}$)

Figure 3.4 : Expression différentielle du CD45 membranaire sur les populations leucocytaires. Les lymphocytes non tumoraux expriment de moindres densités de CD45 (b). Les lymphocytes T CD4+ et NK expriment moins de CD45 que les T CD8+ ($p < 0.0001$).



Moyennes de fluorescence de CD45 PerCP



	MFI CD45+						
	CD4+	CD4+/CD8dim	CD8+	CD4dim/CD8+	CD8dim	NK	CD19+
MOYENNE	8093	9373	9721	9344	8925	7835	6595
ECART-TYPE	841	1481	939	1194	1047	774	763
CV	10,4%	15,8%	9,7%	12,8%	11,7%	9,9%	11,6%
nombre	70	70	70	70	70	70	64
MIN	4316	4243	5862	5330	4689	5307	3703
MAX	10377	13445	11425	12591	11718	9567	8736

5 – Double population lymphocytaire selon la densité du CD3

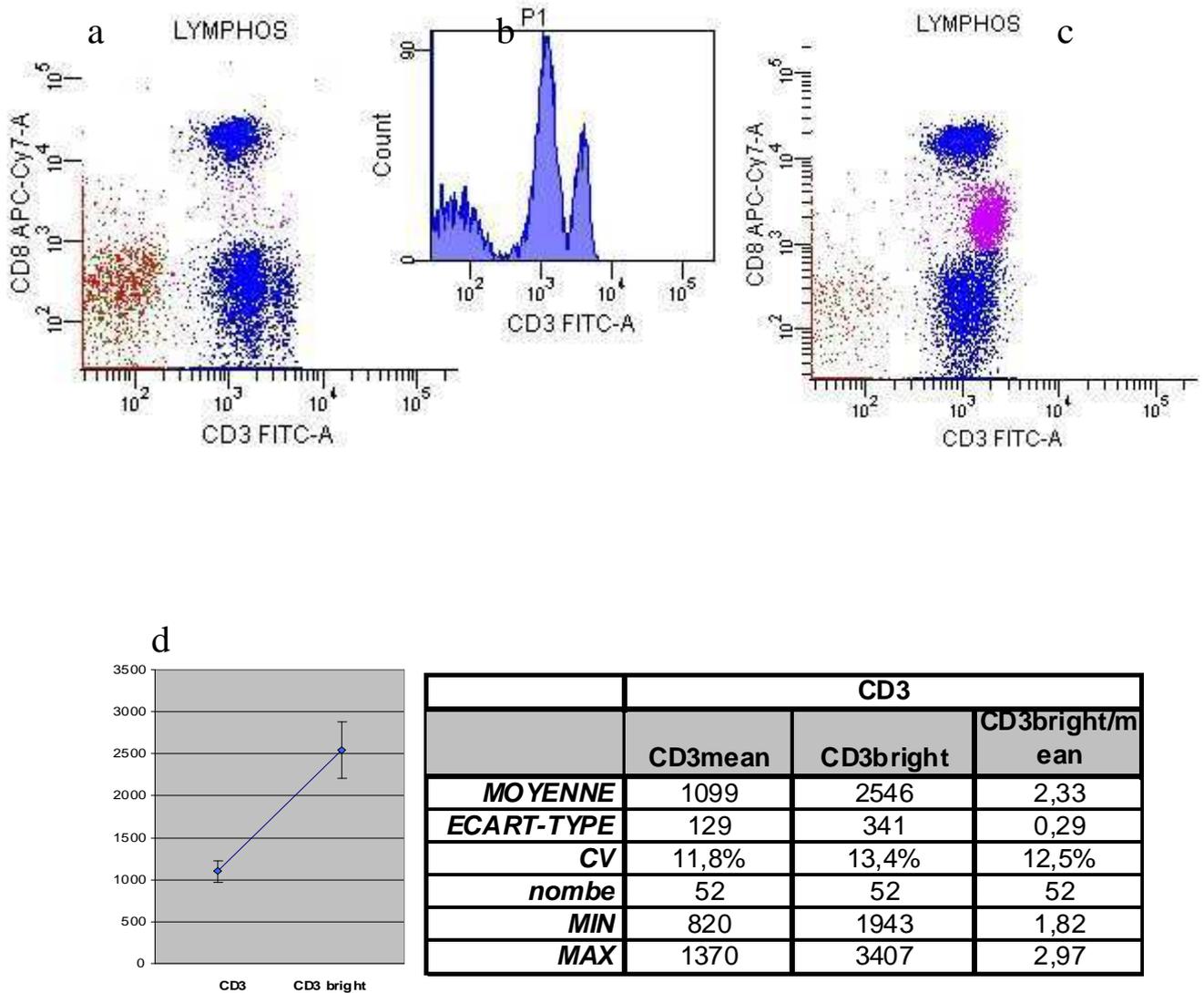
De la même façon, le CD3 est couramment utilisé pour différencier les lymphocytes T (CD3+) des autres lymphocytes (B : CD19+ ou NK : CD3 -CD16+C D56+).

La grande majorité des lymphocytes exprime le CD3 avec une distribution d'intensité de fluorescence très homogène (courbe gaussienne). Cependant, chez certains patients, il est possible de voir plus ou moins clairement un dédoublement de la distribution d'intensité de fluorescence avec, sur les graphes bi dimensionnels, apparition d'un nuage supplémentaire à très forte intensité de fluorescence du CD3 (fig. 3.5). Cette distribution peut revêtir un aspect bimodal en histogramme. Sur une analyse bi-paramétrique CD3 versus CD8, les lymphocytes qui expriment CD3 en forte intensité n'expriment jamais de CD4 mais peuvent occasionnellement exprimer du CD8, généralement à plus faible intensité que les lymphocytes T conventionnels.

Cette observation a été faite sur un cytomètre XL (Beckman Coulter) avec les anticorps du même fabricant (Tetraone), avec érythrolyse (Immunoprep) et sans lavage. Elle a pu être confirmée sur le système BD Biosciences comprenant le cytomètre FACSCanto et anticorps BD Biosciences, FACS lysing solution et sans lavage. L'observation de cette double distribution a pu aussi être confirmée avec d'autres anticorps anti-CD3, d'origines commerciales différentes, y compris couplés avec des fluorochromes différents.

Le phénotype de ces lymphocytes CD3fort, CD4 négatif et généralement CD8 négatif nous a fait suspecter qu'il pouvait s'agir de lymphocytes Tgd en accord avec des études antérieures (Thibault 1995, Nicolas 2001). Dans cette étude, nous avons démontré chez 31 donneurs de sang en bonne santé que les lymphocytes T CD3 fort représentaient de l'ordre de 3% des lymphocytes totaux. Ils n'exprimaient ni le CD4 ni le CD8.

Figure 3.5 : Mise en évidence d'une double population lymphocytaire T sur la base d'intensité de fluorescence de CD3 (a, b) : les lymphocytes T expriment de plus fortes densités de CD3 membranaire. Une partie d'entre eux peut exprimer le CD8 (c). Le rapport des moyennes de fluorescence est de 2.3 (d).



Nous avons montré que :

- 1 - Le nombre (en valeur absolue) des lymphocytes T CD3 fort était directement (bien que modestement) corrélé au nombre des lymphocytes Tgd ($R^2 = 0.544$).
- 2 - En analysant simultanément l'expression de CD3 et de récepteurs T (ab ou Tgd en combinaison), les lymphocytes Tgd exprimaient de plus fortes intensités de fluorescence de CD3 comparées aux lymphocytes Tab (exemple : 15.2 versus 12.1). Les fluorochromes utilisés étaient choisis de façon à

éviter les transferts d'énergie entre deux fluorochromes (FRET) combinés par des anticorps reconnaissant des molécules très proches comme le CD3 et le récepteur T.

3 – En enrichissant des lymphocytes T $\gamma\delta$ par technique de tris magnétiques (anticorps anti $\gamma\delta$ couplés à des nanoparticules ferriques : MACS Milteniy, Allemagne) ; les lymphocytes T $\gamma\delta$ triés exprimaient une très forte intensité de fluorescence de CD3 (MFI 20) comparée aux lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnel du même échantillon (MFI = 8.6).

Nous avons observé que les lymphocytes T CD3 fort comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ pouvaient exprimer le CD8 (39.5 % des lymphocytes T $\gamma\delta$). Les isoformes du CD8 étaient en majorité de type hétéro-dimérique (CD8 α CD8 β). La fréquence d'expression de CD8 par des lymphocytes T $\gamma\delta$ n'était pas liée à l'âge ni au sexe du donneur et n'était pas plus fréquente chez les donneurs qui avaient de forts taux de T $\gamma\delta$. Une petite fraction de lymphocytes T $\gamma\delta$ (14 %) exprimait l'isoforme homo-dimérique CD8 α CD8 α . Dans tous les cas, le CD8 exprimé par les lymphocytes Tgd était significativement beaucoup moins intense que sur les lymphocytes T $\alpha\beta$ (exemple 5.4 \pm 3 comparé à 32.4 \pm 7).

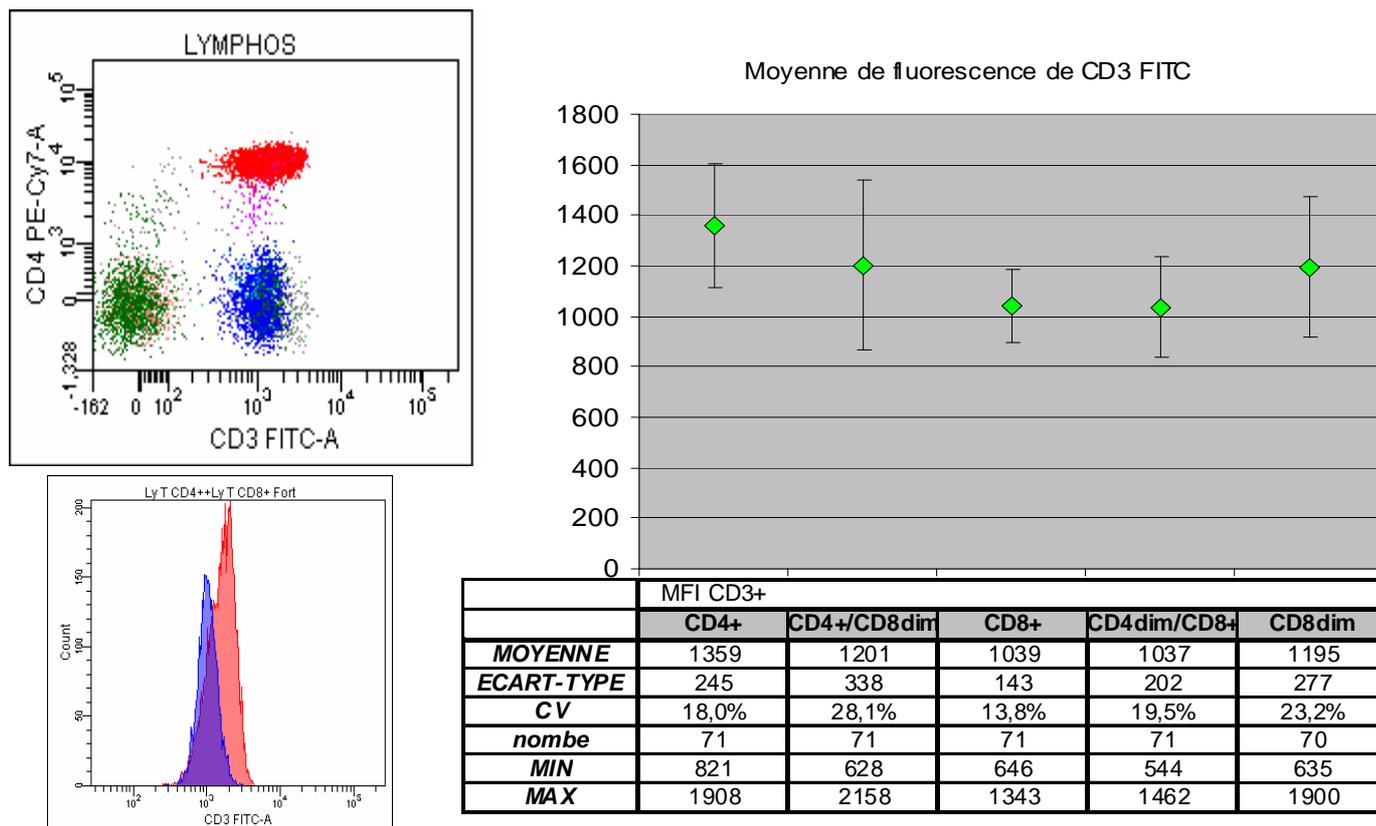
Le nombre de T $\gamma\delta$ circulant est très variable d'un échantillon à l'autre suggérant une signification sémiologique encore inconnue. Nous avons comparé la fréquence de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le sang périphérique d'un groupe de patients hospitalisés pour infection par virus d'immunodéficience (VIH) et un groupe de patients sous immuno supresseurs pour transplantation rénale. Nous avons étudié 78 patients dans chaque groupe. Le nombre des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez les patients transplantés était équivalent (52 \pm 33) aux donneurs de sang (51 \pm 38, non significatif). Par contre, la concentration des lymphocytes T $\gamma\delta$ était significativement augmentée chez les patients VIH+ (88 \pm 53, p = 0.0056) comparée aux patients transplantés. Comme cela a déjà été rapporté dans la littérature, nous avons observé une distribution bimodale de la concentration des lymphocytes T $\gamma\delta$. La valeur intermédiaire entre cette distribution bimodale était située à 105 cellules par microlitre. Une fraction de patients (VIH+ 22,8%, transplantés rénaux 8.8%) exprimait une augmentation des lymphocytes T $\gamma\delta$. Cette augmentation était retrouvée mais plus rarement chez les donneurs de sang (un donneur sur 31).

6 – Expression différentielle de CD3 sur les lymphocytes T :

En comparant la distribution de l'intensité de fluorescence du CD3 des lymphocytes T CD4 et CD8, nous pouvons observer un décalage des moyennes de fluorescences (fig 3.6). En analysant séparément l'expression du CD3 sur des lymphocytes T CD4 et T CD8, nous avons observé que les lymphocytes T CD8 expriment généralement des taux de CD3 inférieurs (MFI : 1039 ± 143) comparés aux lymphocytes T CD4+ (MFI : 1359 ± 245 ; $p < 0.0001$).

De même, le taux d'expression du CD3 était très augmenté (MFI 2540 ± 340) sur la population CD3bright comparée aux lymphocytes T CD3 conventionnel du même échantillon (MFI = 1099 ± 129 , $p < 0.0001$).

Figure 3.6 : Expression différentielle du CD3 membranaire sur les différentes sous-populations lymphocytaires T. Les lymphocytes T CD8+ expriment moins le CD3 comparé aux T CD4+.



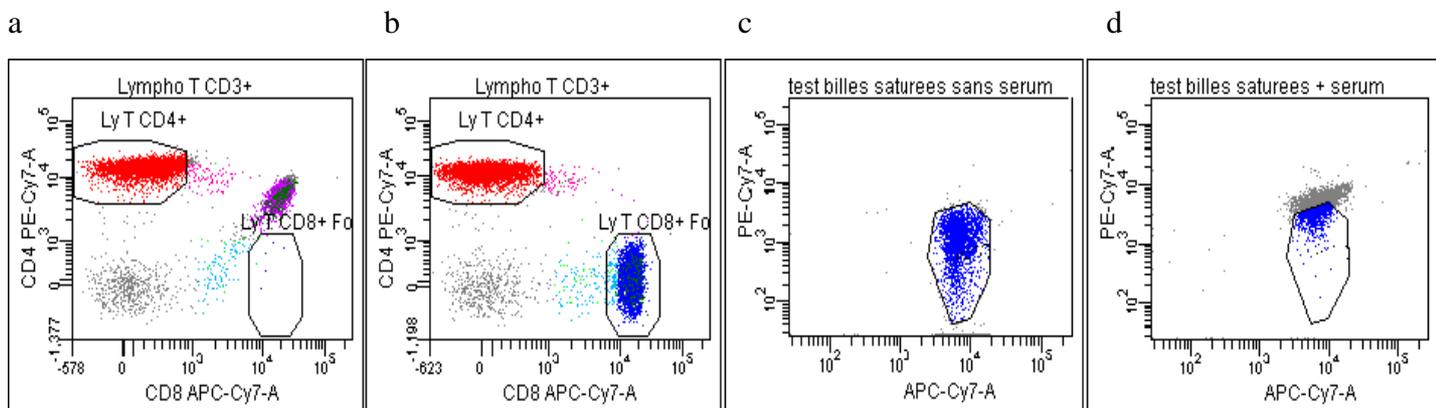
7 – Artefact de détection de CD4/CD8 par activité sérique anti-Cyanine

(Ch.Leclerc, C.Lambert, P.Saby, C.Genin : AFC octobre 2005)

Nous avons observé, pour 3 patients différents, une anomalie du marquage par les anticorps anti-CD4 PE Cy7 et anti-CD8 APC Cy 7, caractérisée par une émission de fluorescence de APC Cy7 sur le détecteur de PE Cy7, mimant un défaut de compensation alors que les lasers sont séparés (fig 3.7).

Analyse de différents échantillons (sang total, cellules lavées, cellules sanguines mononucléées (Ficoll) et billes (BD Compbeads anti Ig κ souris) avec ou sans sérum, sérum fractionné (dialyse et chromatographie) ou médicaments.

Figure 3.7 : artefact mimant un défaut de compensation par activité sérique anti-cyanine (a). L'analyse sur les même cellules lavées du sérum corrige l'artefact (b). Le phénomène peut être reproduit avec des billes couvertes d'IgG-APC-Cy7 avec sérum témoin (c) et sérum du patient (d).



Nous avons montré que :

- Le phénomène disparaît si les CD8-APC-Cy7 ou le CD4-PE-Cy7 sont retirés.
- Il disparaît également si le sérum du patient est soustrait par lavage des cellules ou analyse après séparation des cellules mononucléées (PBMC) sur gradient de densité (Ficoll)
- Il est reproduit par transfert du sérum sur des PBMC de donneur témoin.
- Il persiste dans le temps pour un même patient (deux tests à deux mois d'intervalle).
- Il a été observé chez plusieurs patients (estimé à environ 1/400)
- Il est possible de reproduire ce phénomène sur des billes couvertes d'anticorps originaux ou contrôles isotypiques : APC-Cy7 et avec de l'IgG-PE-Cy7 dans le milieu.
- La présence simultanée des deux fluorochromes et du sérum est nécessaire.
- L'effet est observé entre les fluorochromes APC Cy7 et PE Cy7 mais aussi PE Cy5 mais il n'apparaît pas avec PE et APC
- L'ajout des médicaments du patient ne permet pas de reproduire le phénomène
- Le sérum fractionné (dialyse et chromatographie) est en cours d'expérimentation

Conclusion : Le sérum de certains patients mime un défaut de compensation, impliquant des fluorochromes tandems contenant des cyanines, le rôle d'anticorps anti-cyanines est probable, nous n'en connaissons pas les significations cliniques éventuelles.