

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enregistrement supérieur et de la recherche scientifique

Université Saleh Boubnider Constantine III

Faculté de médecine

Département de pharmacie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Docteur  
en Pharmacie

## Thème

**Apport de la volumétrie dans la quantification des  
LTCD4/LTCD8 par le cytomètre en flux**

**Réalisé et présenté par :**

ALIOUECHE Imane

BELHADJ MOSTEFA Fadia Rania

**Encadré par :**

Dr. ZOUITEN Raouf

Année universitaire : 2019/2020

# Table des Matières

Liste des Annexes

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I. CYTOMÉTRIE EN FLUX .....</b>	<b>3</b>
I.1 DEFINITION.....	3
I.2 HISTORIQUE.....	3
I.3 PRINCIPES GENERAUX DE LA CMF .....	4
I.3.1 système fluidique .....	5
I.3.2 système optique .....	6
I.3.2.1 Les paramètres optiques analysés .....	7
I.3.2.2 Sources d'énergie.....	8
I.3.2.3 Canaux optiques.....	9
I.3.2.4 Détecteurs .....	10
I.3.2.5 L'immunofluorescence : .....	11
I.3.2.6 Les fluorochromes : .....	11
I.3.2.7 Les anticorps monoclonaux : .....	14
I.3.2.8 Chevauchement spectrale et compensation : .....	14
I.3.3 système électronique/informatique .....	15
I.3.3.1 Seuil (Threshold) .....	16
I.3.3.2 Présentation des résultats .....	17
I.3.3.3 Stratégie de sélection (Gating):.....	20
I.4 AVANTAGES ET LIMITES DE LA CMF .....	21
<b>II. APPLICATIONS DE LA CMF .....</b>	<b>22</b>
II.1 IMMUNOPHENOTYPAGE .....	23
II.2 QUANTIFICATION DU CONTENU EN ADN : .....	23
II.3 LE CYCLE CELLULAIRE .....	24
II.4 LA NUMERATION DES RETICULOCYTES : .....	24
II.5 CONTROLE DES PREPARATIONS DELEUCOCYTEES : .....	24
II.6 LE TRI CELLULAIRE:.....	24
II.7 OCEANOGRAPHIE: .....	24
II.8 APPLICATION EN VIROLOGIE CLINIQUE:.....	24
II.9 APPLICATION EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE : .....	24
II.10 AUTRES APPORTS DE LA CYTOMETRIE : .....	24
<b>III. ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE PAR CMF.....</b>	<b>25</b>
III.1. LES ELEMENTS FIGURES DU SANG .....	25
III.2 IDENTIFICATION DES SOUS-POPULATIONS DE LEUCOCYTES PAR CMF .....	26

III.3 INTERET DE L'ETUDE DE L'IMMUNITE CELLULAIRE PAR CMF.....	27
III.3.1 Aide dans le diagnostic ou pronostique .....	28
III.3.1.1 Les déficits immunitaires congénitaux.....	28
III.3.1.2 Les déficits immunitaires acquis .....	29
III.3.1.3 Maladies auto-immunes .....	30
III.3.2 La Cytométrie en flux, une aide au traitement.....	31
III.3.2.1 Surveillance du traitement immunosuppresseur ALG et OKT3 .....	31
III.3.2.2 Surveillance après traitement par la Cyclosporine .....	32
III.3.2.3 Immunothérapie et vaccinations.....	32
<b>IV. QUANTIFICATION DES LYMPHOCYTES T PAR CMF.....</b>	<b>33</b>
IV.1 INTRODUCTION A LA CYTOMETRIE QUANTITATIVE .....	33
IV.2 DEFINITION DE LA QUANTIFICATION CELLULAIRE.....	33
IV.3 TECHNIQUES DE NUMERATION DES LYMPHOCYTES T PAR CMF .....	33
IV.3.1 Technique Double plate-forme .....	34
IV.3.2 Technique simple plate-forme : .....	38
IV.3.2.1 Méthode des microbilles .....	39
IV.3.2.2 Méthode volumétrique .....	41
<b>I. OBJECTIF.....</b>	<b>43</b>
<b>II. PRESENTATION DU LABORATOIRE .....</b>	<b>44</b>
<b>III. DEVELOPPEMENT : MATERIELS, PRINCIPES ET METHODES.....</b>	<b>44</b>
III.1. MATERIELS .....	44
III.1.1 Invitrogen™ Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer   Thermo Fisher Scientific .....	44
III.1.1.1 différents systèmes du cytomètre .....	44
III.1.2 Analyseur d'hématologie .....	48
III.1.3 équipements de laboratoire .....	49
III.1.4 Réactifs .....	49
III.2 METHODES .....	50
III.2.1 Réglage du cytomètre.....	50
III.2.1.1 Contrôle de la performance du cytomètre .....	50
III.2.1.2 Compensation.....	50
III.2.2 Préparation des échantillons.....	54
III.2.3 Acquisition des données et analyse des résultats .....	56
III.2.3.1 Stratégie d'analyse .....	56
III.2.3.2 Mesure de la concentration des cellules par les 3 techniques .....	58
III.2.3.3 Mesure de la linéarité (limite de quantification) .....	63
III.2.4 Méthode d'analyses statistiques des résultats .....	65
<b>IV. RESULTATS.....</b>	<b>66</b>
IV.1 QUANTIFICATION DES LTCD4 D'UN ECHANTILLON PAR LES TROIS TECHNIQUES.....	66
IV.1.1 La technique Double plate-forme .....	66
IV.1.2 Technique des microbilles simple plateforme .....	68
IV.1.3 Technique volumétrique .....	69
IV.2 COMPARAISONS STATISTIQUES DES RESULTATS.....	70

<b>V. DISCUSSION</b> .....	<b>83</b>
<b>VI. CONCLUSION</b> .....	<b>91</b>

**Bibliographie**

**ANNEXES**

## **RÉSUMÉ :**

La cytométrie en Flux (CMF) est une technique d'analyse cellulaire qui a bénéficié des progrès de l'électronique et de l'informatique, permettant ainsi l'acquisition et le traitement de données sur des milliers de cellules en quelques secondes. Cette étude porte sur l'évaluation des performances de la technique simple plateforme volumétrique par cytomètre en flux dans la quantification des lymphocytes LTCD4/LTCD8 en nombre absolu, et la comparaison de ses résultats à ceux des deux autres techniques ; la technique simple plateforme utilisant des microbilles et la technique double plateforme utilisant le cytomètre en flux associé à l'analyseur d'hématologie. La présente étude a été faite sur 19 échantillons, nous avons quantifié les LTCD4/LTCD8 des échantillons par les trois techniques mentionnées ci-dessus. Les statistiques obtenus ont démontré que la technique simple plateforme utilisant les billes donnait des résultats surestimés par rapport aux deux autres techniques qui avaient des résultats approximativement rapprochés, compte tenu de la pandémie qui a surgit lors de notre étude, nous n'avons pas pu constater quelle hypothèse pourrait expliquer cette surestimation, quelques paramètres importants n'ont toutefois pas été évalués dans cette étude comme la linéarité, la reproductibilité et le nombre d'échantillons qui était relativement faible. La technique volumétrique simple plateforme par cytomètre en flux a donné des résultats satisfaisants, c'est une technique performante, rapide et facile à réaliser qui requiert une étude plus approfondie pour confirmer pleinement son efficacité et sa fiabilité.

**Mots clé :** Cytomètre en flux, microbilles, quantification des LTCD4/LTCD8, technique double plateforme, technique simple plateforme, volumétrie.

## **ABSTRACT:**

Flow cytometry (CMF) is a cell analysis technique that gained its benefits from advances in electronics and computer science, enabling the acquisition and processing of data on thousands of cells in a few seconds. This study involves the performance evaluation of the simple volumetric platform flow cytometer technique in the quantification of LTCD4 / LTCD8 lymphocytes in absolute number, and the comparison of the results with those of the other two techniques; the single platform technique using micro beads and the dual platform technique using the flow cytometer associated with the haematology analyser. The present study was made on 19 samples; we quantified the samples' LTCD4/LTCD8 by the three techniques mentioned above. The results showed that the simple platform technique using the beads gave overestimated results compared to the two other techniques which had approximately similar results. Given the pandemic that arose during our study, we were unable to observe which hypothesis could explain this overestimation; some important parameters were however not evaluated in this study such as linearity, reproducibility and the number of samples which was relatively low. The single-platform volumetric flow cytometer technique has given satisfactory results; it is a rapid, efficient and easy-to-perform technique that requires further study to fully confirm its effectiveness and reliability.

**Keywords:** Flow cytometer, micro beads, quantification of LTCD4 / LTCD8, dual platform technique, single platform technique, volumetry.