



**HAL**  
open science

# Phénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux multiparamétrique : un outil indispensable dans l'immunopathologie du Sida

Patrick Autissier

## ► To cite this version:

Patrick Autissier. Phénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux multiparamétrique : un outil indispensable dans l'immunopathologie du Sida. Immunothérapie. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2010. Français. NNT : 2010CNAM0726 . tel-00555509

**HAL Id: tel-00555509**

**<https://theses.hal.science/tel-00555509>**

Submitted on 20 Jan 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



*CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS*

*ÉCOLE DOCTORALE*

**THÈSE** présentée par :

**Patrick AUTISSIER**

soutenue le : 26 Novembre 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur du Conservatoire National des Arts et Métiers**

Spécialité : Biologie

**PHÉNOTYPAGE DES CELLULES IMMUNITAIRES PAR CYTOMÉTRIE  
EN FLUX MULTIPARAMÉTRIQUE : UN OUTIL INDISPENSABLE  
DANS L'IMMUNOPATHOLOGIE DU SIDA**

**PRESIDENT du Jury :**      **DESJEUX Jehan-Francois**      Professeur émérite, CNAM, Paris

**THÈSE dirigée par :**      **ZAGURY Jean-Francois**      Professeur, CNAM, Paris

**RAPPORTEURS :**      **RONOT Xavier**      Docteur, EPHE, Grenoble

**MATIEU Jacques**      Docteur, CRSSA, Grenoble

A Anne-Cécile, Estelle et Damien

Quel voyage !

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements à :

Monsieur le Professeur J.F. DESJEUX, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Monsieur le Professeur J.F. ZAGURY, qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse depuis Paris.

Messieurs les Docteurs X. RONOT et J. MATHIEU, qui me font l'honneur de bien vouloir évaluer ce travail.

Votre présence au sein de ce jury est un beau clin d'œil car il met un point final à ma très longue formation « officielle » en matière de biologie commencée au CNAM il y a 23 ans, et de cytométrie il y a 13 ans. Vous étiez présent au début, vous l'êtes encore à la fin. Je vous remercie pour ce long voyage.

Je tiens également à remercier le Professeur R. MORFIN, qui a eu la bonne idée d'avoir sa maison de campagne à côté de celle de mes beaux-parents, et surtout d'avoir pris le temps de m'aider tout au long de ce périple.

Je tiens à remercier mes collègues américains, Pr Kenneth Williams et Dr Tricia Burdo, au sein du laboratoire d'immunologie de Boston College, MA. USA.

Enfin, je tiens à remercier ma collègue française, le Dr Caroline Soulas, qui m'a donné de précieux conseils tout au long de ce travail, et ce sans jamais perdre patience, ce qui n'était pas gagné d'avance.

**RÉSUMÉ / ABSTRACT**

## RÉSUMÉ

Le suivi des changements dans les populations de cellules immunitaires tels que les lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques (DC) au cours de maladies infectieuses comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez l'homme ou son équivalent chez le singe (VIS) est crucial. Grâce aux récentes avancées technologiques en cytométrie en flux, il est maintenant possible de mesurer et d'analyser simultanément jusqu'à 14 paramètres individuels à l'échelon cellulaire.

L'objectif de ce travail consiste en la mise au point de 2 panels multicolore de 12 anticorps permettant d'analyser simultanément les principales populations de cellules immunitaires, respectivement chez l'humain et le macaque rhésus. Au terme de ce travail, il est maintenant possible de mesurer précisément tous les principaux acteurs du système immunitaire, à savoir les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les lymphocytes B, les cellules NK et NKT, les sous-populations de monocytes, et toutes les sous-populations de cellules dendritiques connues à ce jour, en utilisant une approche multiparamétrique de cytométrie en flux. Ce protocole d'analyse est réalisé sur du sang total, il est rapide, il n'implique pas de technique d'isolation cellulaire, et requiert une quantité minimum de sang. De plus, l'analyse de chaque population cellulaire est plus précise grâce à une contamination minimum entre les populations séparées.

L'intérêt de ce travail est d'étudier les interactions entre les différentes populations de cellules immunitaires durant l'infection par VIH chez l'homme, ou VIS chez le singe ou potentiellement d'autres maladies, et en particulier de mieux comprendre le rôle important que les cellules dendritiques jouent dans la progression de ces maladies.

**Mots-clés** : Cytométrie en flux multiparamétrique, lymphocyte, monocyte, cellule dendritique, singe rhésus, immunophénotypage.

## ABSTRACT

Monitoring changes in immune cell populations such as lymphocytes, monocytes and dendritic cells (DC) during infectious diseases like human immunodeficiency virus (HIV) or its counterpart in rhesus monkeys (SIV) is crucial. Thanks to recent technological advances in flow cytometry, it is now possible to measure and analyze simultaneously up to 14 individual parameters at the single cell level.

The goal of this work is to develop 2 multicolor flow cytometry panels comprising of 12 antibodies, allowing measuring simultaneously the main immune cells population, respectively in humans and rhesus monkeys. After 2 years of development and optimization, we can now measure precisely all the main actors of the immune system, that is CD4+ and CD8+ T lymphocytes, B lymphocytes, NK and NKT cells, the 3 monocyte subsets, and all the dendritic cell subsets known today, by using a multicolor flow cytometry approach. This assay is done on whole blood, it is rapid to do, it does not involve a cell isolation technique, and it requires only a minimum amount of blood. Moreover, the analysis of each population is much more precise because of a minimum contamination between different cell populations.

The advantage of this work is to study interactions between different cell populations of immune cells during HIV infection in humans, or SIV infection in monkeys, or potentially other diseases, and in particular to better understand the important role that dendritic cells might play in disease progression.

**Key-words** : Multiparameter flow cytometry, lymphocyte, monocyte, dendritic cell, rhesus monkey, immunophenotyping,

## TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Résumé / abstract</b>	<b>3</b>
<b>Table des matières</b>	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>10</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>12</b>
<b>Abréviations</b>	<b>15</b>
<b>Introduction</b>	<b>18</b>
<b>I – VIH et système immunitaire</b>	<b>19</b>
<b>I.1 – Introduction : vers un retour aux fondamentaux ?</b>	<b>19</b>
<b>I.2 – VIH : un virus particulier</b>	<b>20</b>
I.2.1 – Historique de l'épidémie	20
I.2.2 – Cycle de réplication du VIH	22
I.2.3 – Immunopathologie du SIDA	23
<b>I.3 – Les cellules cibles du VIH</b>	<b>27</b>
I.3.1 – Les lymphocytes T CD4+	27
I.3.2 – Les monocytes/macrophages	28
I.3.3 – Les cellules dendritiques	29
<b>I.4 – Les cellules chargées d'éliminer le VIH</b>	<b>31</b>
I.4.1 - Les lymphocytes T CD8+	31
I.4.2 – Les lymphocytes B	32
I.4.3 – Les cellules NK	33
<b>I.5 – Comment identifier les principaux « acteurs »             du système immunitaire ?</b>	<b>35</b>



III.3.1 – Exemple du compte T CD4+	59
III.3.2 – Mesure précise des populations rares	60
<b>Objectif</b>	<b>62</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>64</b>
<b>I – Sujets</b>	<b>65</b>
<b>II – Instrumentation</b>	<b>65</b>
<b>III - Anticorps utilisés pour l'étude</b>	<b>69</b>
<b>IV - Protocole de marquage des échantillons</b>	<b>72</b>
<b>V - Acquisition des données et analyse de l'échantillon</b>	<b>73</b>
<b>VI - Pourcentages et nombres absolu des sous-populations de lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques</b>	<b>74</b>
<b>Publications / Résultats</b>	<b>75</b>
<b>I – Article « Cytometry Part A» 2010</b>	<b>76</b>
Patrick Autissier, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, Kenneth C. Williams. “Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans”. Cytometry A, May, 77(5): 410-9.	
<b>II – Article « Journal Immunol Methods » 2010</b>	<b>89</b>
Patrick Autissier, Caroline Soulas, Tricia Burdo and Kenneth Williams. “Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cells subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: clarification on DC heterogeneity”. J. Immunol Methods, 360, 119-128.	
<b>Discussion</b>	<b>101</b>
<b>I – Pourquoi 12 couleurs ?</b>	<b>102</b>
<b>II – Différence phénotypique entre humain et rhésus</b>	<b>105</b>
<b>III – Analyse multiparamétrique : Perspective d'avenir</b>	<b>107</b>

<b>III.1 – Associer phénotype et fonction</b>	<b>107</b>
<b>III.2 – Quelle est la limite au nombre de couleurs mesurables ?</b>	<b>109</b>

<b>Conclusion</b>	<b>112</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>115</b>
<b>Annexe</b>	<b>134</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Principaux marqueurs des leucocytes humains	<b>37</b>
<b>Tableau 2</b> : Description des panels d'anticorps utilisés	<b>70</b>
<b>Tableau 3</b> : Principaux marqueurs pour l'étude des fonctions des lymphocytes (d'après Chattopadhyay et al, Cytometry Part A, 2010).	<b>108</b>

## **LISTE DES FIGURES**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Adultes et enfants vivant avec le VIH, estimation en 2008	<b>21</b>
<b>Figure 2</b> : Estimation du nombre de décès par SIDA chez l'adulte et l'enfant en 2008	<b>21</b>
<b>Figure 3</b> : Cycle de réplication du VIH	<b>23</b>
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de la progression de l'infection par VIH	<b>24</b>
<b>Figure 5</b> : Hiérarchie des cellules immunitaires	<b>26</b>
<b>Figure 6</b> : Fonction des lymphocytes T CD4+ auxiliaire	<b>27</b>
<b>Figure 7</b> : Perte de tissu cérébral dans la phase de SIDA	<b>29</b>
<b>Figure 8</b> : Fonction de la cellule dendritique	<b>30</b>
<b>Figure 9</b> : Interaction entre lymphocyte T CD4+, lymphocyte T CD8+ et la cellule dendritique	<b>32</b>
<b>Figure 10</b> : Fonctionnement des lymphocytes B	<b>33</b>
<b>Figure 11</b> : (a) Inhibition ou (b) activation des cellules NK	<b>34</b>
<b>Figure 12</b> : Molécules de surface du lymphocyte T auxiliaire (CD4 et CCR5)	<b>35</b>
<b>Figure 13</b> : Composants majeurs d'un cytomètre en flux	<b>40</b>
<b>Figure 14</b> : Identification des leucocytes dans le sang total	<b>41</b>
<b>Figure 15</b> : Exemple de marquage de sang total avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8	<b>42</b>
<b>Figure 16</b> : Exemple de fichier FCS et représentation graphique correspondante	<b>43</b>
<b>Figure 17</b> : Nombre de publications scientifiques mentionnant la cytométrie en flux, entre 1974 et 2009	<b>47</b>
<b>Figure 18</b> : Fluorochromes les plus utilisés actuellement	<b>50</b>
<b>Figure 19</b> : Rapport MMWR du CDC du 5 Juin 1981	<b>53</b>
<b>Figure 20</b> : Article de M. Gottlieb et al décrivant les 1 <sup>ers</sup> cas de SIDA.	<b>54</b>

<b>Figure 21</b> : Configuration optique du cytomètre BD FACSAria	<b>66</b>
<b>Figure 22a</b> : Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes excitables par le laser bleu à 488nm	<b>67</b>
<b>Figure 22b</b> : Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes excitables par le laser violet à 407nm et le laser rouge à 633nm	<b>68</b>
<b>Figure 23</b> : Contamination des fluorochromes dans tous les détecteurs	<b>71</b>
<b>Figure 24</b> : Le "navire du futur" CMF avec un nombre possible de "passagers"	<b>110</b>

## **ABRÉVIATIONS**

## ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique  
APC : cellule présentatrice d'antigène  
ARN : acide ribonucléique  
CD : cluster de différenciation  
CDC : Center for Disease Control  
CMF : cytométrie en flux  
CMV : cytomégalovirus  
CSH : cellule souche hématopoïétique  
DC : cellule dendritique  
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique  
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay  
FBS : sérum foetal de bovin  
FCS : flow cytometry standart  
FITC : Fluorescéine Isothiocyanate  
FSC : forward scatter  
GFP : protéine fluorescente verte  
gp : glycoprotéine  
HPV : papillomavirus humain  
mDC : cellule dendritique myéloïde  
NEPRC : New England Primate Research Center  
NK : natural killer  
NKT : natural killer T  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PBS : Phosphate buffered saline  
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde

PE : Phycoérythrine

QD : quantum dot

RIA : Radio immuno assay

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SSC : side scatter

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : virus de l'immunodéficience simienne

## **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

### I – VIH ET SYSTÈME IMMUNITAIRE

#### I.1 – Introduction : vers un retour aux « fondamentaux » ?

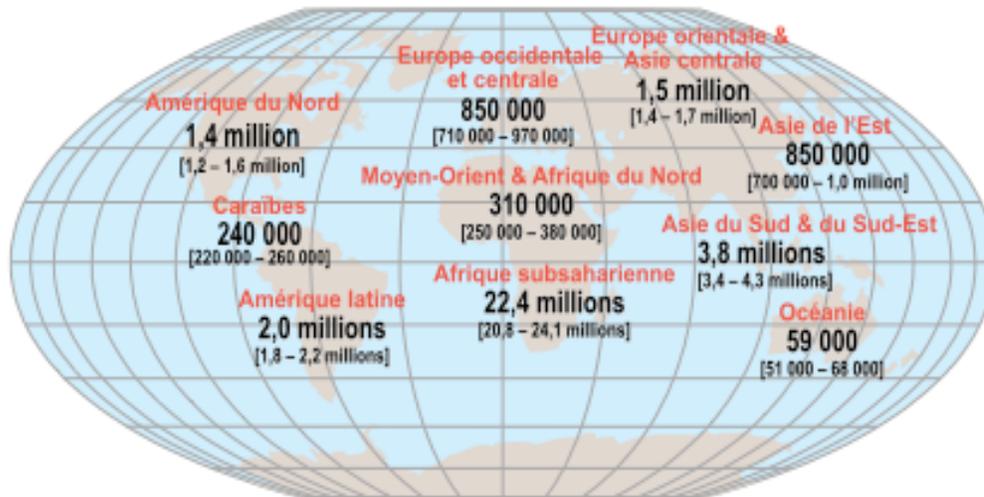
Le système immunitaire est composé de nombreux types de cellules dépendants les unes des autres et qui, ensemble, protègent le corps humain contre les infections bactériennes, parasitaires, fongiques, virales et empêchent la croissance des cellules tumorales. La plupart de ces cellules ont des fonctions spécialisées. Les cellules du système immunitaire peuvent “digérer” des bactéries, tuer des parasites ou des cellules tumorales, ainsi que tuer des cellules infectées par des virus (Delves and Roitt, 2000a). Souvent, ces cellules sont dépendantes d’une population cellulaire particulière appelée lymphocyte T auxiliaire ou T CD4+, qui sécrètent des signaux d’activations sous forme de molécules appelées cytokines, ou interleukines (Delves and Roitt, 2000b). L’importance cruciale de cette population de lymphocytes T CD4+ dans le système immunitaire a été malheureusement mise en évidence grâce, ou à cause de la pandémie de SIDA (McCune, 2001). En effet, le virus VIH, responsable de cette pandémie, a pour cible directe les cellules exprimant le récepteur CD4 à leur surface, comprenant majoritairement les lymphocytes T CD4+, mais aussi les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (Stevenson, 2003). Au fur et à mesure que le nombre de lymphocytes T CD4+ décroît durant l’infection par VIH, c’est tout le système immunitaire qui s’effondre et entraîne la susceptibilité à d’autres infections opportunistes, et éventuellement à la mort du patient (Forsman and Weiss,

2008). Ces dernières années ont montré un effort très important de la recherche pour la mise au point d'un vaccin, malheureusement sans succès et avec même de retentissants échecs (Ledford, 2008b; Ledford, 2008a; Butler, 2009). Depuis, de nombreuses voix s'élèvent pour demander une meilleure distribution de l'argent et un retour à la recherche fondamentale, afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules du système immunitaire (Virgin and Walker; Cohen, 2008). Une telle compréhension pourrait aider à expliquer l'origine des déficits immunitaires, que ce soit dûe au virus VIH ou à d'autres maladies, et permettrait d'enrayer ou au moins d'atténuer les effets sur le système immunitaire dans son ensemble.

## **I.2 – VIH : un virus particulier**

### **I.2.1 – Historique de l'épidémie**

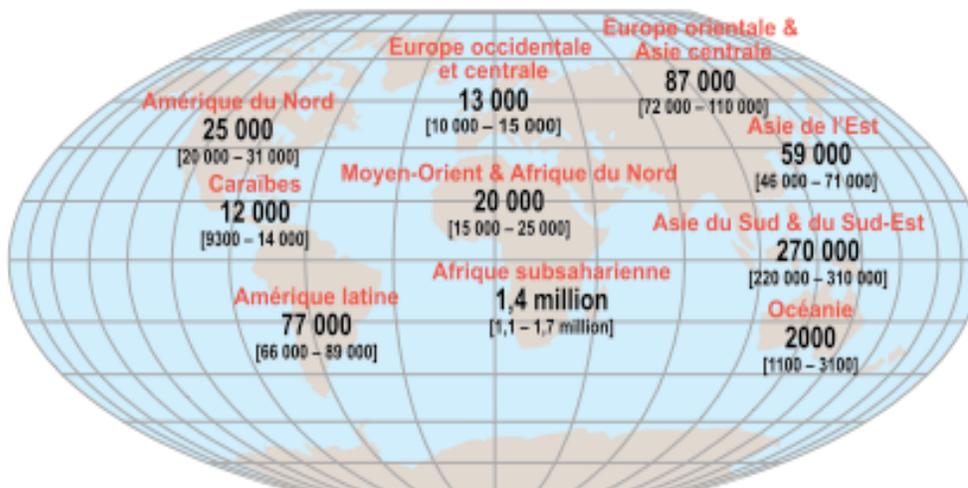
La description des premiers cas de SIDA en 1981 (Friedman-Kien, 1981; Gottlieb et al., 1981a; Gottlieb et al., 1981b) et l'identification du virus VIH-1 en 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gelmann et al., 1983) marquent le début de la pandémie de SIDA. Aujourd'hui, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une des causes majeures de décès dans le monde. Depuis le début de l'épidémie, plus de 60 millions de personnes ont été infectées par le VIH et 25 millions de personnes sont décédées de causes liées au VIH ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)). Les pays les plus affectés par le SIDA sont localisés dans l'Afrique Sub-saharienne, qui contient plus de 60% de toutes les personnes infectées par VIH (**Figure 1**).



**Total: 33,4 millions (31,1 – 35,8 millions)**

**Figure 1** : Adultes et enfants vivant avec le VIH, estimation en 2008 ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)).

Pour l'année 2008, près de 2 millions de personnes sont mortes du SIDA (**Figure 2**).



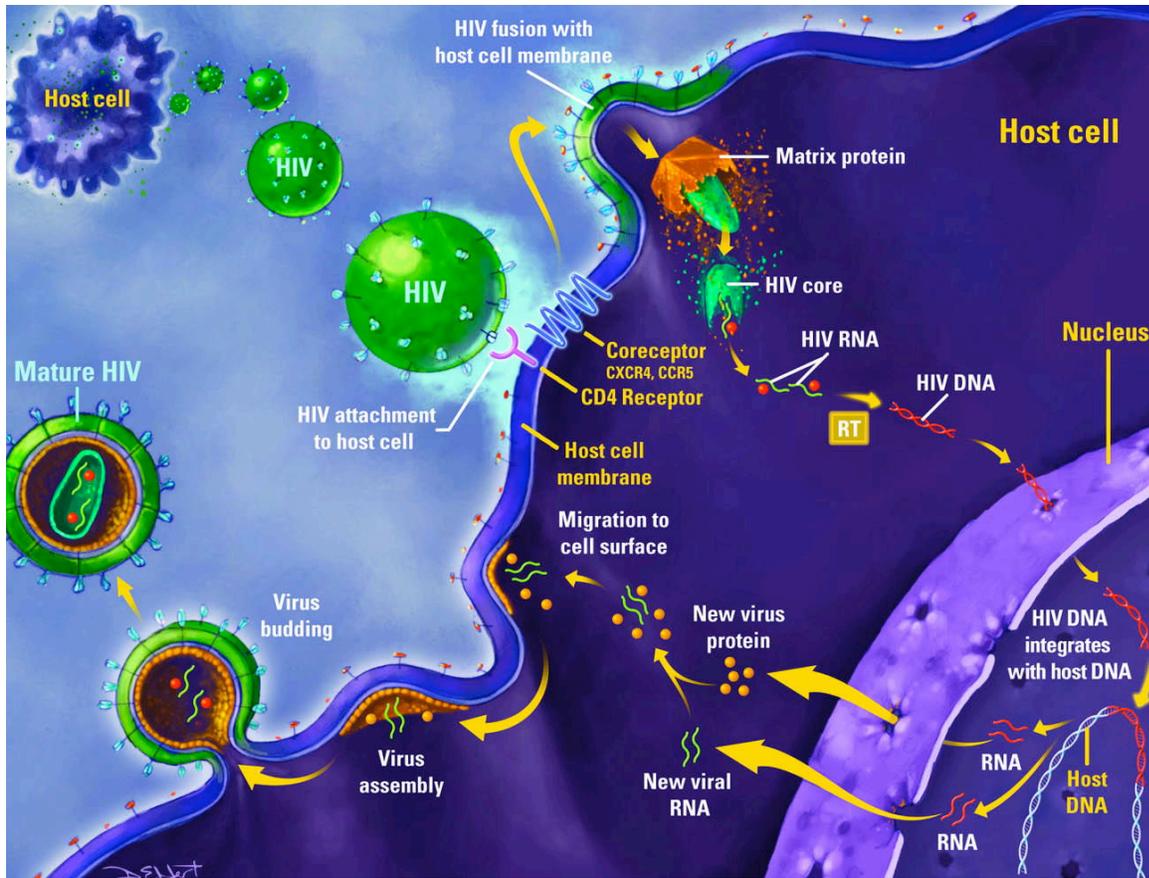
**Total: 2,0 millions (1,7 – 2,4 millions)**

**Figure 2** : Estimation du nombre de décès par SIDA chez l'adulte et l'enfant en 2008 ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)).

Malgré l'introduction de la thérapie antivirale en 1986, l'effet sur la mortalité a été modeste jusqu'à l'apparition des inhibiteurs de protéases et le traitement par trithérapie (Egger et al., 1997; Mocroft et al., 1998; Palella et al., 1998). A partir de ce moment-là, la morbidité et la mortalité parmi les patients infectés par le VIH ayant accès à la trithérapie a fortement diminué (Mocroft et al., 2003; 2008; Klimas et al., 2008).

### I.2.2 – Cycle de réplication du VIH

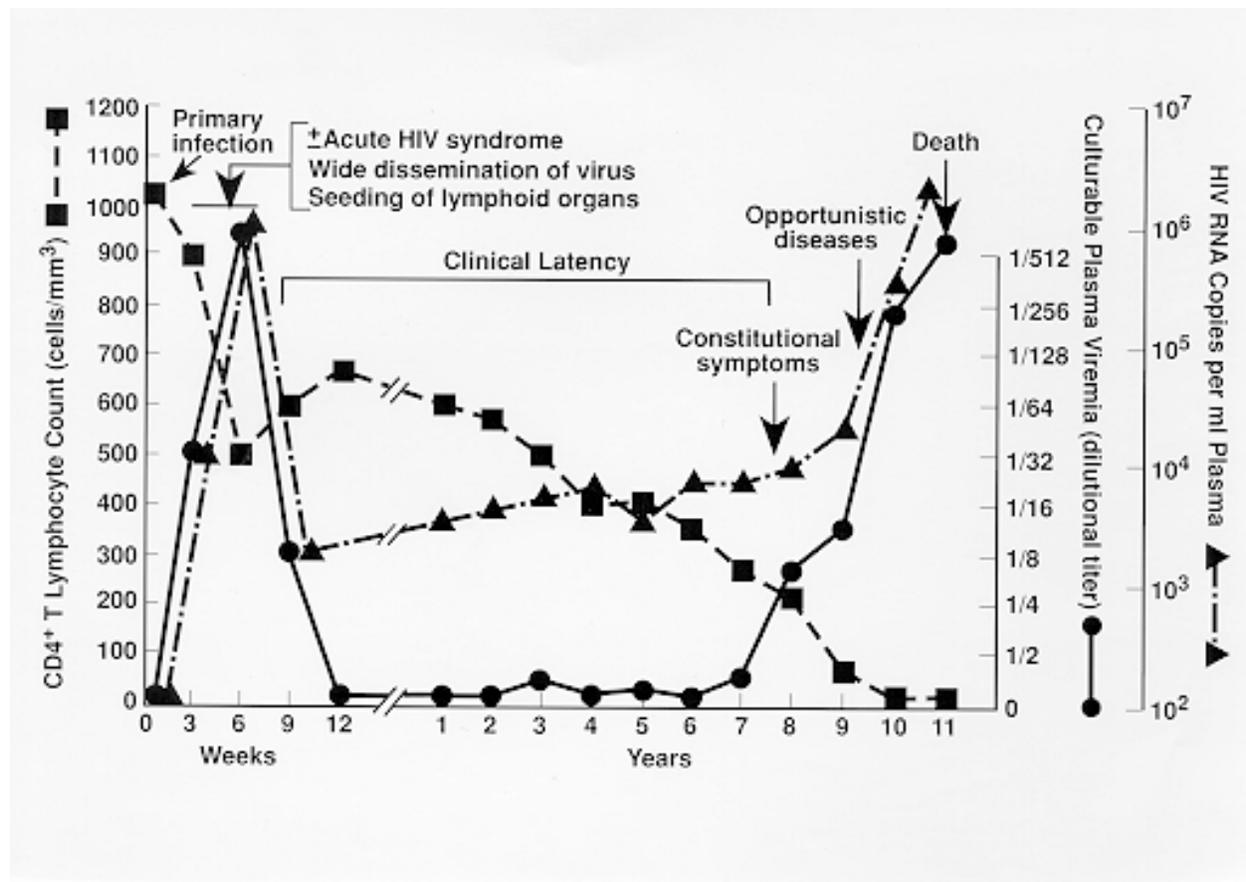
Le VIH est un lentivirus, une sous-famille des rétrovirus. Les lentivirus causent une maladie lente et dégénérative consistant en 3 phases : une infection aiguë, une plus ou moins longue période de latence, enfin une progression de la maladie (Tang et al., 1999). Le cycle de réplication du virus est caractérisé par la « reverse transcription » de l'ARN viral en ADN dans le cytoplasme de la cellule infectée. Le virus VIH, par l'intermédiaire de sa glycoprotéine gp120, entre en contact avec une protéine CD4 de la cellule cible ainsi qu'un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). Cette interaction entraîne la fusion des membranes cellulaire et virale, suivie par la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. L'ARN viral est transcrit en ADN, qui est ensuite intégré dans l'ADN du noyau de la cellule hôte. L'intégration de l'ADN viral a lieu en dehors de toute synthèse d'ADN par la cellule. Une cellule au repos peut donc être infectée au même titre qu'une cellule activée. Enfin, l'ADN viral intégré au noyau est transcrit en ARN pour la synthèse des protéines virales et la constitution du génome viral. Les protéines de structure virales et 2 copies du génome viral s'assemblent pour former un virion, qui « bourgeonne » et finit par se détacher de la cellule (Gomez and Hope, 2005). Un schéma du cycle de réplication du VIH est représenté dans la **Figure 3**.



**Figure 3** : Cycle de réplication du VIH (d'après [www.nwabr.org/education](http://www.nwabr.org/education))

### I.2.3 – Immunopathologie du SIDA

Bien que chaque individu puisse réagir différemment face à l'infection par le VIH, la progression de la maladie suit en général trois phases bien distinctes : l'infection primaire, la phase de latence clinique, et le SIDA proprement dit (**Figure 4**) (Pantaleo et al., 1993). Jusqu'à récemment, le SIDA était vu comme une infection chronique avec une dégradation lente du système immunitaire, due à la destruction progressive des lymphocytes T auxiliaire CD4+ et à l'incapacité pour la réponse immunitaire d'éliminer complètement le virus (Pantaleo and Fauci, 1996).



**Figure 4 :** Représentation schématique de la progression de l'infection par VIH (d'après Fauci et al, Ann Intern Med, 1996)

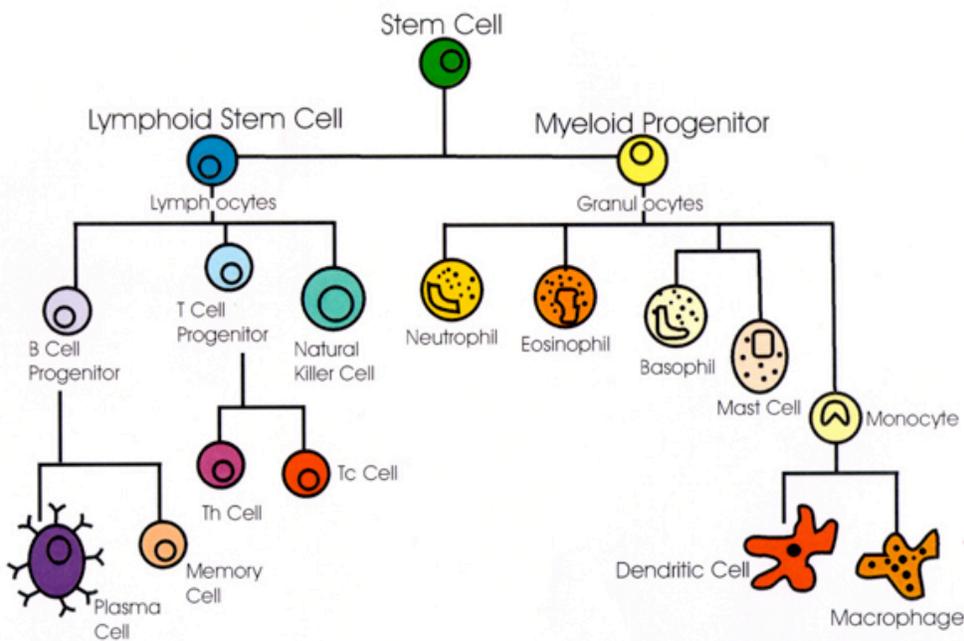
Cependant, de récentes études ont montré que les singes infectés par VIS perdent presque entièrement leur réservoir de lymphocytes T CD4+ mémoires (exprimant CCR5) de la muqueuse intestinale dès les 1<sup>ers</sup> jours de l'infection (Veazey et al., 1998; Mattapallil et al., 2005), et ce pendant toute la durée de l'infection. Ces observations chez le singe ont été depuis confirmées chez l'homme (Brenchley et al., 2004; Mehandru et al., 2004). Il semblerait donc que le SIDA soit en fait « 2 infections en 1 » : une 1<sup>ère</sup> infection massive pendant la phase aiguë dans laquelle le virus détruit le compartiment des lymphocytes T CD4+ mémoires, suivi d'une infection chronique qui

voit une perte progressive des lymphocytes T CD4+ restants due à la persistance d'une activation immunitaire et un insuffisant remplacement des cellules perdues (Picker and Watkins, 2005; Levy, 2009). Au regard de cette infection massive durant la phase aiguë, il est clair que la réponse immunitaire innée, constituée par les cellules NK et NKT, les cellules dendritiques activées, et des cytokines antivirales élevées telles que l'interféron, ne remplit pas complètement son rôle (McMichael et al.; Borrow and Bhardwaj, 2008). De plus, la réponse immunitaire acquise qui suit, constituée des lymphocytes T CD8+ et de la production d'anticorps neutralisant par les lymphocytes B, n'arrive pas à contrôler l'infection bien que semblant être forte au début (McMichael and Rowland-Jones, 2001; Willey and Aasa-Chapman, 2008). Enfin, l'impossibilité pour les traitements actuels d'éliminer les « réservoirs » à VIH que sont les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, pose un problème majeur (Pierson et al., 2000; Coleman and Wu, 2009).

Ce très bref aperçu de l'immunopathologie du SIDA montre l'extraordinaire complexité de l'infection par VIH, qui malgré 25 ans de recherche intense et des sommes considérables dépensées, continue à mettre en échec toute une génération de chercheurs. Cependant, les dernières avancées scientifiques décrits ci-dessus, de même que les échecs des candidats vaccins, montrent deux points très importants : 1) la réponse immunitaire cellulaire par l'intermédiaire des lymphocytes T CD8+ n'est probablement pas la panacée et la seule solution pour un vaccin efficace, et 2) la réponse immunitaire innée devient beaucoup plus critique, au vu de la destruction massive des lymphocytes T CD4+ mémoires durant la phase aiguë de l'infection (Levy, 2001). Les premières semaines de l'infection apparaissent absolument critiques et

donnent le ton sur l'évolution de la maladie (Picker and Watkins, 2005). La réponse immunitaire innée, mettant en jeu les cellules NK, NKT, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, ainsi que leurs interactions avec les cellules du système immunitaire acquis (lymphocytes T et B) doivent faire l'objet d'un effort majeur de recherche dans les années à venir (Lehner et al., 2008).

C'est dans cette optique que j'ai voulu apporter ma petite contribution à l'édifice gigantesque que représente la recherche contre le SIDA, et ainsi j'ai pu développer 2 panels multicolores de cytométrie en flux, pour l'identification précise des populations majeures de cellules immunitaires innées et acquises, en parallèle chez l'homme et le singe. Avant de présenter la cytométrie en flux, technologie utilisée pour mon travail de thèse, je vais brièvement détailler les cellules du système immunitaire, qui sont toutes issues de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (**Figure 5**).

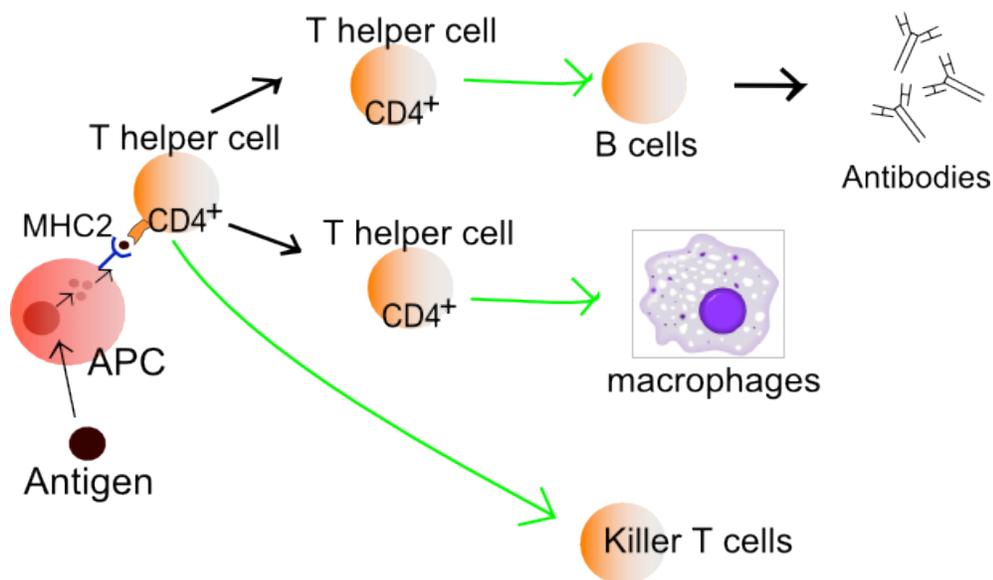


**Figure 5 :** Hiérarchie des cellules immunitaires (d'après [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net))

### I.3 – Les cellules cibles du VIH

#### I.3.1 – Les lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T sont habituellement divisés en deux grands sous-ensembles qui sont fonctionnellement et phénotypiquement différents. La sous-population T auxiliaire, aussi appelée T CD4+, est un coordinateur de la régulation immunitaire. La principale fonction de la population T auxiliaire est d'initier et de maximiser les réponses immunitaires par la sécrétion de facteurs spécialisés (cytokines) qui activent d'autres cellules du système immunitaire, en particulier les macrophages, les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes B, à combattre les infections (**Figure 6**). Cette population cellulaire n'a pas d'activité cytotoxique ou phagocytaire, et ne peut donc pas tuer des cellules infectées ou des pathogènes (Mosmann and Coffman, 1989).



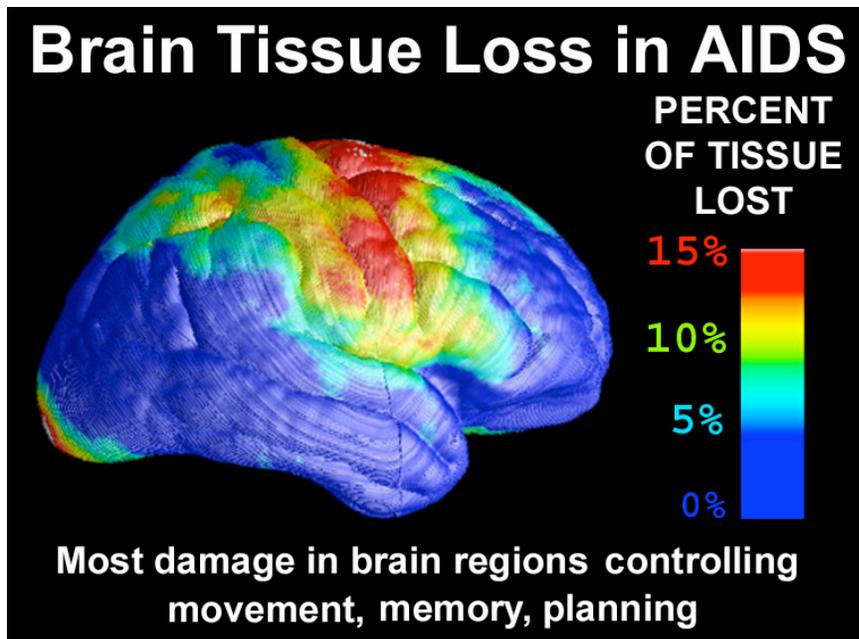
**Figure 6 :** Fonction des lymphocytes T CD4+ auxiliaire (d'après Wikipedia, M. Häggström)

De plus, les lymphocytes T CD4+ sont importants pour entraîner les cellules dendritiques à initier la réponse immunitaire cellulaire T CD8+ (**Figure 9**) (McMichael and Rowland-Jones, 2001). Comme précisé plus haut, les lymphocytes T CD4+ mémoires sont les principales cellules cibles du VIH (Mattapallil et al., 2004).

### I.3.2 – Les monocytes/macrophages

Les monocytes, se trouvant dans la circulation sanguine, et les macrophages, dérivant des monocytes et se trouvant eux dans les tissus, jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires. Ils sont souvent désignés comme des phagocytes, car ils peuvent phagocyter ou digérer des débris cellulaires et des pathogènes. Une fois le pathogène ingéré, le monocyte/macrophage, faisant partie des cellules présentatrice d'antigènes, présentent ces antigènes étrangers aux autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T et les lymphocytes B. C'est l'une des premières étapes importantes dans l'initiation d'une réponse immunitaire.

Les monocytes/macrophages sont, comme les lymphocytes T CD4+, les cibles du virus VIH, par l'intermédiaire de l'antigène CD4 et du corécepteur CCR5. Les monocytes sont considérés comme les principaux « réservoirs » à virus (Kim et al., 2003; Crowe, 2006). De plus, les monocytes sont des cellules agissant comme des « chevaux de Troie », c'est-à-dire qu'ils traversent la barrière hémato-encéphalique et apporte donc le virus dans le cerveau (Herbein et al., 2002; Williams and Hickey, 2002). Une fois dans le cerveau, le virus VIH s'attaque aux neurones de façon directe ou indirecte (**Figure 7**).

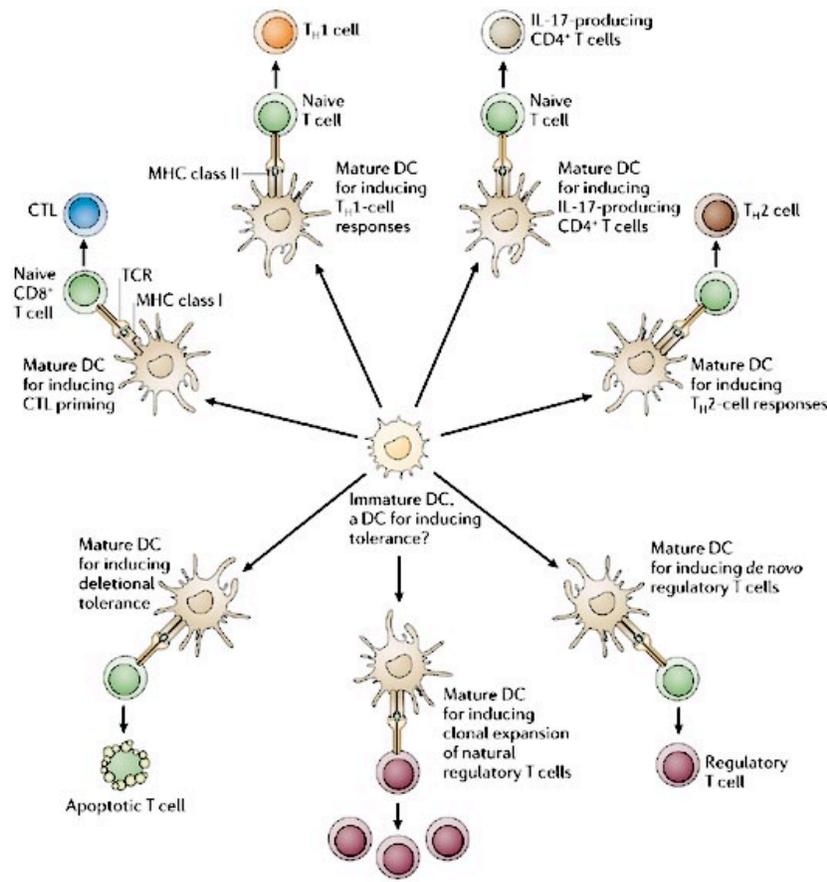


**Figure 7 :** Perte de tissu cérébral dans la phase de SIDA (d'après Thompson et al, PNAS, 2005).

### I.3.3 – Les cellules dendritiques

Un autre type de cellule, adressée récemment, est la cellule dendritique. Les cellules dendritiques, qui sont aussi originaires de la moelle osseuse, fonctionnent comme des cellules présentatrices d'antigènes (APC). En fait, les cellules dendritiques sont plus efficaces que les macrophages APC. Ces cellules se trouvent généralement dans le compartiment structurel des organes lymphoïdes comme le thymus, les ganglions lymphatiques et la rate. Cependant, ils sont également présents dans la circulation sanguine et dans d'autres tissus du corps. Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives et dans l'induction de la tolérance périphérique (**Figure 8**). Malheureusement, l'une des raisons pour

lesquelles nous savons si peu sur les cellules dendritiques, c'est qu'elles sont extrêmement difficiles à isoler, ce qui est souvent une condition préalable à l'étude fonctionnelle de types cellulaires spécifiques.



**Figure 8** : Fonction de la cellule dendritique (d'après Reis e Sousa, Nature Review Immunol, 2006).

Récemment, la découverte que les cellules dendritiques se lient au VIH de façon importante, et qu'elles peuvent être un réservoir du virus qui est transmis aux lymphocytes T CD4+ au cours d'une activation immunitaire, a ouvert de nouvelles perspectives et intensifier les études sur les cellules dendritiques (Piguet and Steinman, 2007). Ainsi, les 2 populations principales de cellules dendritiques, les cellules

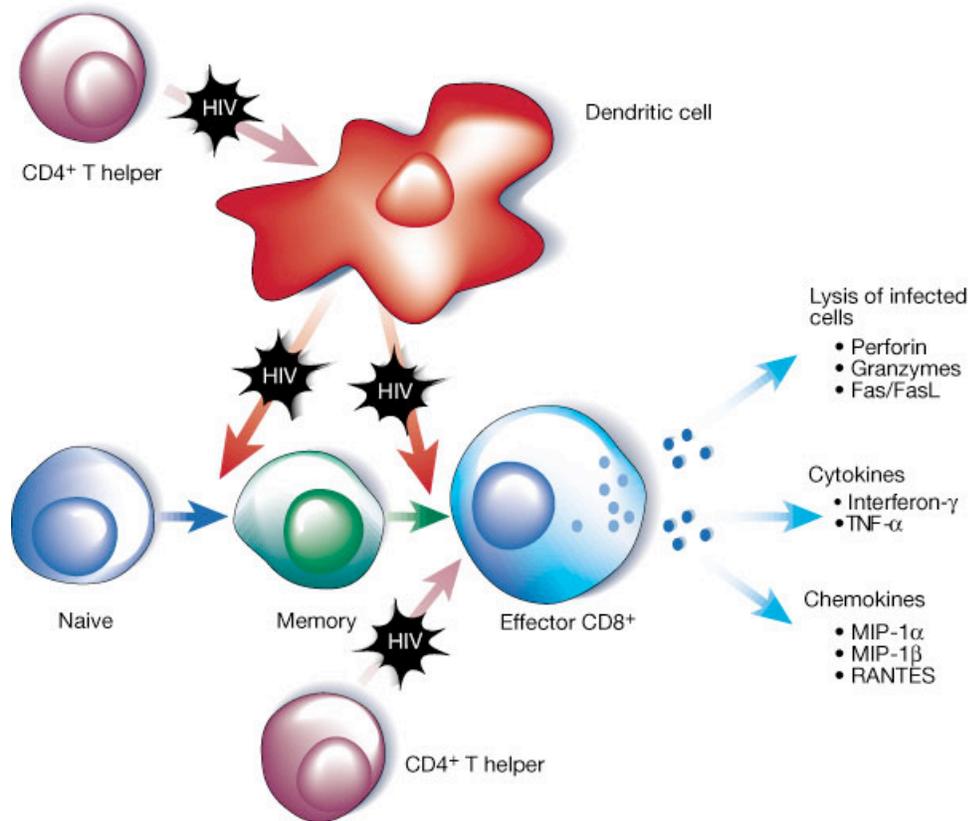
myéloïdes et plasmacytoïdes, sont diminuées pendant l'infection par le VIH, et pourraient expliquer en partie une réponse immunitaire insuffisante (Barratt-Boyes et al., 2006).

## **I.4 – Les cellules chargées d'éliminer le VIH**

### **I.4.1 – Les lymphocytes T CD8+**

Un autre type important de lymphocyte T est appelée cellule T cytotoxique ou T CD8+. Ces cellules jouent un rôle essentiel en tuant directement certaines cellules tumorales, les cellules infectées par des virus et parfois des parasites. Les lymphocytes T CD8+ sont également importants dans la régulation négative des réponses immunitaires. Ils sont essentiellement localisés dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate), où leur activation et la réponse immunitaire qui s'en suit se produit, mais ils sont également présents dans d'autres tissus du corps, le plus souvent le foie, les poumons, le sang, l'intestin et le tractus uro-génital.

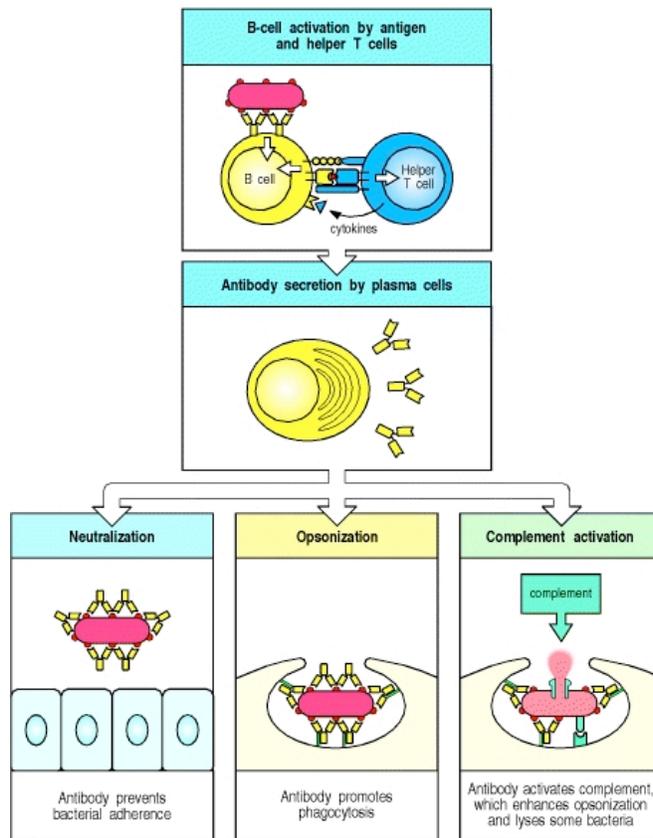
Pendant l'infection par VIH, Le lymphocyte T CD8+ interagit avec le lymphocyte T CD4+ auxiliaire et la cellule dendritique qui l'aide à sa maturation et à maintenir un réservoir de cellules mémoires (**Figure 9**). Cependant, malgré une réponse immunitaire forte, les lymphocytes T CD8+ n'arrivent pas à contrôler l'infection, soit par un manque d'aide des lymphocytes T auxiliaires CD4+ au fur et à mesure de leur destruction progressive, ou bien par leur fonction cytotoxique altérée directement ou indirectement par VIH (Champagne et al., 2001; Rowland-Jones et al., 2001; Zhang et al., 2007).



**Figure 9** : Interaction entre lymphocyte T CD4+, lymphocyte T CD8+ et la cellule dendritique (d'après McMichael et al, Nature, 2001).

#### I.4.2 – Les lymphocytes B

La principale fonction des lymphocytes B est la production d'anticorps en réponse à des protéines étrangères de bactéries, de virus et de cellules tumorales. Les anticorps sont des protéines spécialisées qui reconnaissent et se lient spécifiquement à une protéine particulière. La production d'anticorps et la liaison à une protéine étrangère ou un antigène, est souvent un moyen nécessaire pour signaler aux autres cellules de digérer, de tuer ou de supprimer cette substance de l'organisme (**Figure 10**).



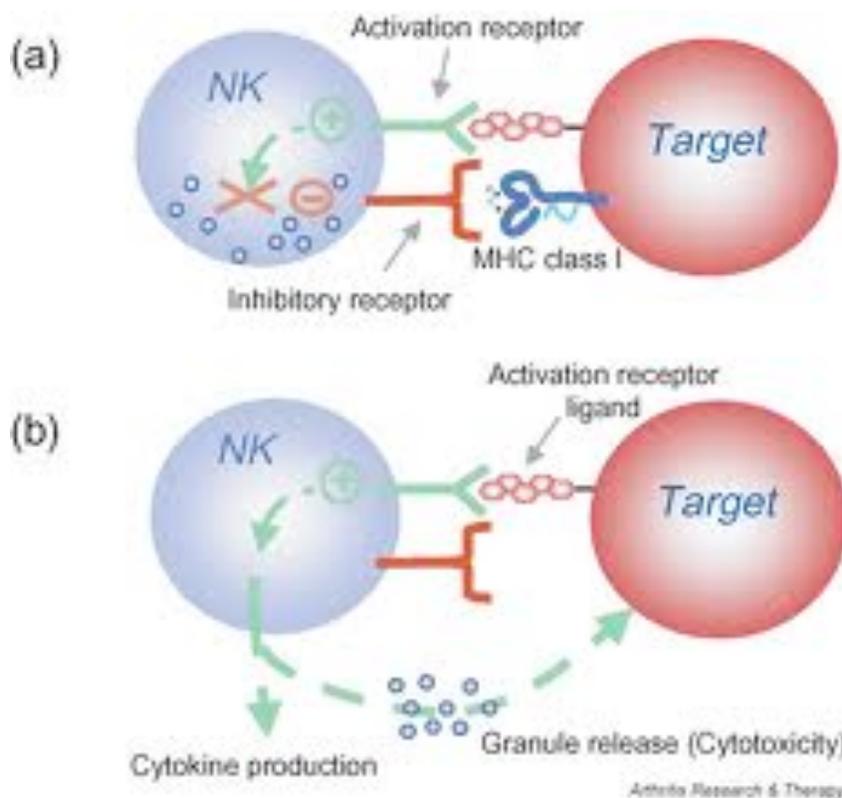
**Figure 10** : Fonctionnement des lymphocytes B (d'après Janeway et al, Immunobiology, 5<sup>th</sup> edition, 2001).

Au début de l'infection, les lymphocytes B produisent des anticorps neutralisant contre le VIH. Mais probablement à cause de mutations rapides du VIH, les anticorps produits par les lymphocytes B deviennent de moins en moins efficace à neutraliser le virus (Wei et al., 2003).

#### I.4.3 – Les cellules NK

Les cellules tueuses naturelles, souvent appelées cellules NK, sont similaires à la sous-population de lymphocytes T cytotoxiques ou T CD8+. Ils fonctionnent comme des

cellules effectrices qui tuent directement certaines tumeurs comme les mélanomes, les lymphomes et les cellules infectées par des virus, notamment le virus de l'herpès (HPV) et les cellules infectées par le cytomégalovirus (CMV). Cependant les cellules NK, contrairement aux lymphocytes T CD8+, tuent leurs cibles sans interaction préalable dans les organes lymphoïdes. Les cellules NK, qui ont été activées par les sécrétions de cytokines provenant des lymphocytes T CD4+, vont tuer les cellules tumorales ou les cellules infectées par des virus de manière plus efficace. Du fait de leur puissante activité cytolytique, l'activité des cellules NK est fortement régulée par l'expression à la surface membranaire de récepteurs d'activation et d'inhibition (**Figure 11**) (Moser et al., 2002).



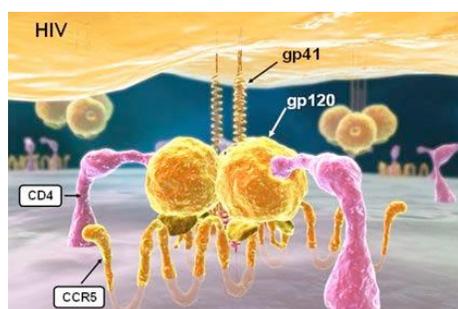
**Figure 11** : (a) Inhibition ou (b) activation des cellules NK (d'après French et al, Arthritis Res Ther, 2004).

Le rôle des cellules NK dans l'immunopathologie du VIH fait l'objet à l'heure actuelle d'un intérêt croissant. Il semblerait que, suivant l'infection, les cellules NK ont une diminution de leur fonction cytolytique à cause de perturbations de leurs récepteurs spécifiques, qui ensuite altèrent leurs interactions avec d'autres cellules du système immunitaire acquis, en particulier les cellules dendritiques (Fauci et al., 2005; De Maria and Moretta, 2008).

## I.5 – Comment identifier les principaux « acteurs » du système immunitaire

### I.5.1 – Introduction

Toutes les cellules ont de nombreuses molécules différentes, appelées antigènes, à leur surface (**Figure 12**). Certains antigènes sont exprimés par plusieurs types cellulaires, d'autres sont uniques pour une cellule donnée, et enfin certains apparaissent seulement à certains stades de maturation ou d'activation. La fonction biologique de la plupart des antigènes est connue, mais d'autres molécules de surface ont une fonction inconnue et ne servent uniquement de marqueurs de types cellulaires.



**Figure 12** : Molécules de surface du lymphocyte T auxiliaire (CD4 et CCR5) (d'après [www.hivandhepatitis.com](http://www.hivandhepatitis.com)).

### I.5.2 - Anticorps monoclonaux et la nomenclature CD

La plus importante avancée technologique pour l'aide à l'identification des cellules immunitaires a été le développement des anticorps monoclonaux par C. Milstein en 1975 (Kohler and Milstein, 1975; Milstein, 1999). Les anticorps monoclonaux sont de très puissants réactifs spécifiques d'un antigène particulier, qui indique par leur liaison (ou leur absence de liaison), que l'antigène en question est exprimé (ou absent) de la surface des cellules analysées. De plus en plus utilisés et commercialisés par différentes sociétés sous différents noms, une confusion s'est rapidement installée pour savoir quel anticorps reconnaissait tel ou tel antigène. Un comité international a rapidement été formé pour tester tous les anticorps connus, et établir une nomenclature standard pour les antigènes reconnus par ces anticorps. Au cours du 1<sup>er</sup> workshop sur les antigènes de différenciation leucocytaire humains à Paris en 1982, le terme « CD » pour cluster de différenciation a été introduit (Bernard and Boumsell, 1984; Fiebig et al., 1984). Un « CD » fait référence à un groupe d'anticorps monoclonaux réagissant avec un antigène particulier. Par exemple, les lymphocytes T auxiliaires exprime l'antigène CD4, et donc tous les anticorps qui reconnaissent l'antigène CD4 sont simplement appelés « anticorps anti-CD4 ». A l'heure actuelle, plus de 350 « CD » ont été incorporés dans la nomenclature (Zola et al., 2007).

### I.5.3 – Les antigènes de surface : carte d'identité cellulaire

La plupart des analyses de cellules immunitaires dans le sang sont effectuées à l'aide d'anticorps monoclonaux. Chaque type cellulaire exprime différents antigènes CD.

Malheureusement, un ou plusieurs antigènes CD peuvent être exprimés par différents types cellulaires, ce qui rend l'analyse plus complexe. Par exemple, l'antigène CD16 est exprimé par les cellules NK, mais aussi par les monocytes, les cellules NKT, les cellules dendritiques et les granulocytes. Le problème est donc de trouver d'autres antigènes, présents ou absents, capable de différencier les populations ci-dessus. Ainsi, les cellules NKT peuvent être différenciées des cellules NK grâce à l'expression de l'antigène CD3. Un tableau ci-dessous résume les antigènes utilisés pour différencier les principales cellules du système immunitaire (**Tableau 1**).

Humain		CD3	CD4	CD8	CD11c	CD14	CD16	CD20	CD34	CD56	CD123	HLA-DR
Lymphocyte T	T aux	++	++									+ si activés
	T cyto	++		++								+ si activés
Lymphocyte B								++				++
NK							+ ou -			++		
NKT		++		+ ou -			+					
Monocyte			+			++	+ ou -					++
DC	pDC		+								+	+
	mDC		+		+		+ ou -					+
Cellule souche (CSH)									+			+

**Tableau 1** : Principaux marqueurs des leucocytes humains

## **II – CYTOMÉTRIE EN FLUX : LA TECHNIQUE DE CHOIX EN IMMUNOLOGIE**

### **II.1 – Définition**

La cytométrie en flux ou CMF est une technologie qui permet l'analyse simultanée qualitative et quantitative de multiples paramètres à l'échelon cellulaire dans une population hétérogène en suspension dans un liquide. Les cytomètres en flux sont utilisés dans un grand nombre d'applications comme l'immunophénotypage, l'analyse du cycle cellulaire, le comptage des cellules, ou encore la mesure d'expression de protéine de fluorescence verte (GFP). Les données sur la cellule recueillies par le cytomètre en flux sont la taille relative de la cellule, sa granularité ou complexité interne relative, et enfin son intensité relative de fluorescence (Recktenwald, 1993; Brown and Wittwer, 2000).

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représentent sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

### **II.2 – Historique**

Les méthodes d'analyse des cellules individuelles sont essentielles pour la compréhension des fonctions des cellules normales et la possibilité de modulation des

cellules pathologiques. La CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. (Melamed, 2001; Herzenberg et al., 2002)

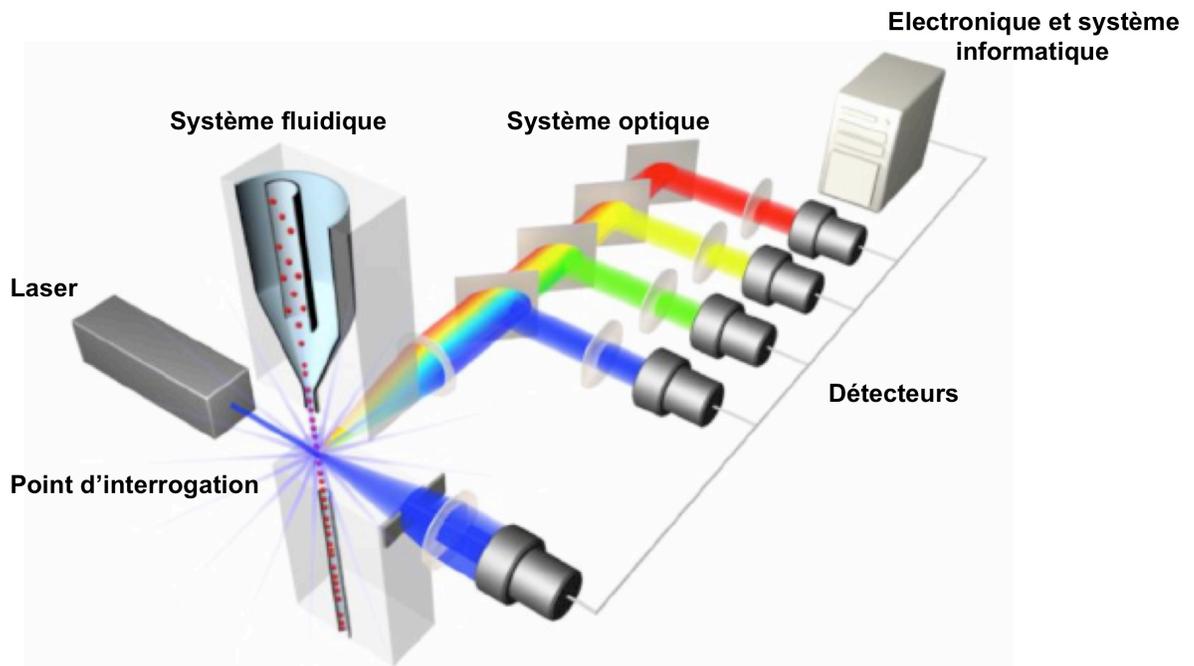
Les origines de la CMF sont anciennes puisque c'est en 1934 que Moldavan conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique. Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales (Herzenberg and Sweet, 1976). La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Le développement simultané d'appareillages commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en flux. L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes.

## II.3 – Principes

### II.3.1 – Composition d'un cytomètre

Le cytomètre en flux est un instrument complexe qui possède trois systèmes : le **système fluide** qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire au point d'interrogation, le **système optique** comprenant les lasers comme source de lumière,

et les filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers les détecteurs, et enfin le **système électronique** qui va convertir la lumière en signaux électroniques analysables par l'ordinateur (**Figure 13**) (Givan, 2004).



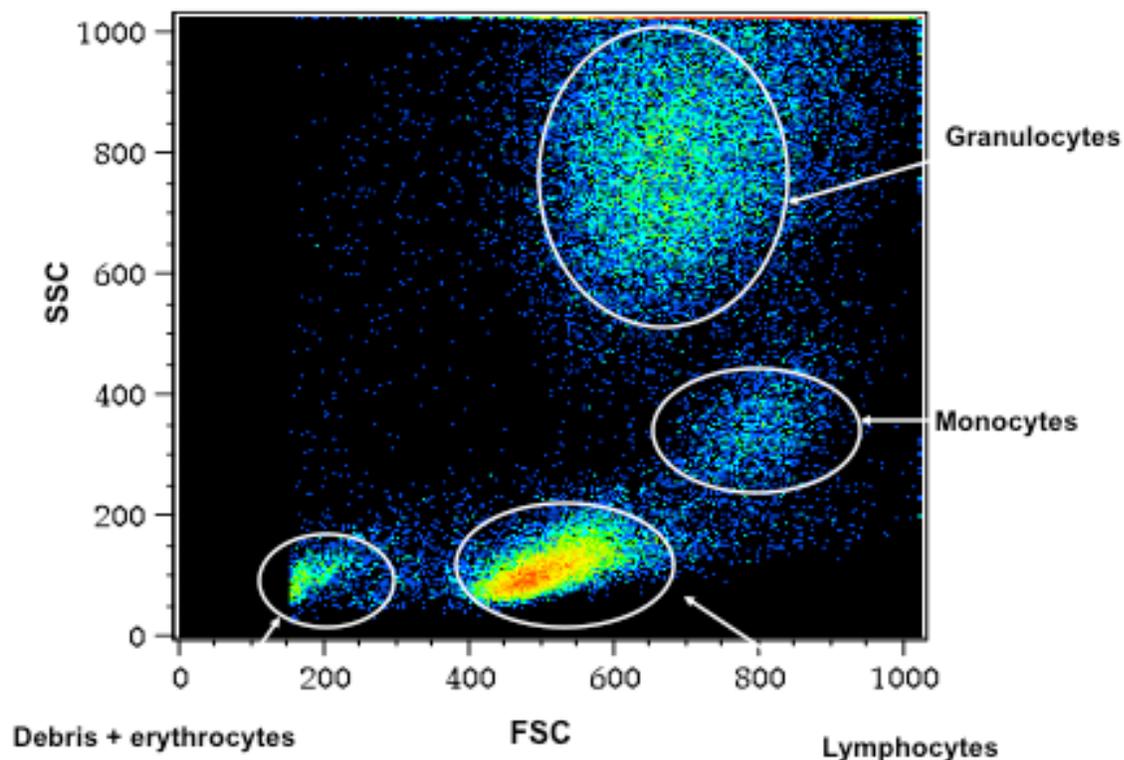
**Figure 13** : Composants majeurs d'un cytomètre en flux (d'après [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

Cependant, le « cœur » du système est représenté par le point d'interrogation (voir **Figure 13**). En effet, c'est là que les cellules traversent le ou les lasers et que le système optique collecte la lumière diffractée et la fluorescence émise par la cellule. Le passage des cellules les unes derrière les autres, réalisée par le principe de centrage hydrodynamique est primordial pour une analyse précise des signaux optiques.

### II.3.2 – Collecte des signaux optiques cellulaires

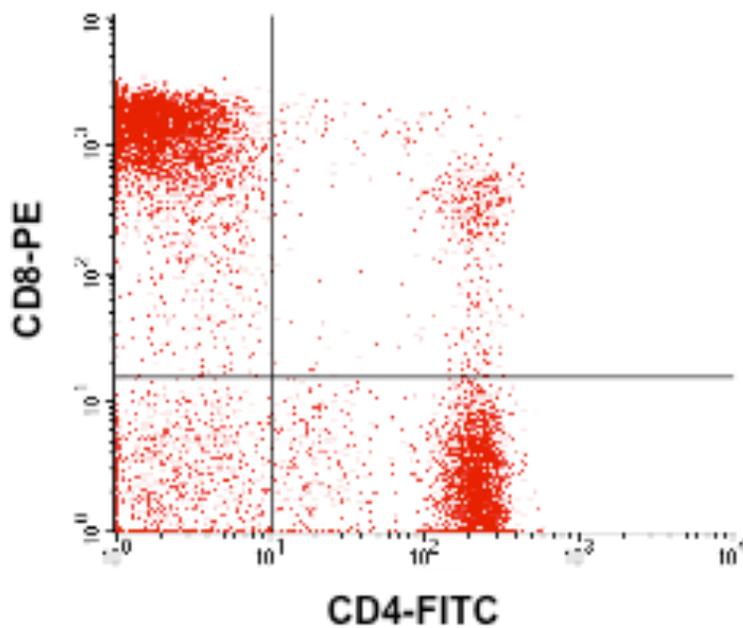
Le cytomètre en flux analyse les cellules en les faisant défilier à grande vitesse à travers un ou plusieurs lasers. Les signaux optiques émis par la cellule coupant le faisceau lumineux d'un laser sont mesurés par l'instrument et sont essentiellement relatifs :

1) aux propriétés optiques intrinsèques des cellules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la cellule et à leur structure interne. La taille relative (FSC) et la granularité relative (SSC) des cellules sont ainsi mesurées. Cela permet d'identifier les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes (Figure 14).



**Figure 14 :** Identification des leucocytes dans le sang total

2) aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. En général, des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes sont nécessaires pour ces mesures optiques (**Figure 15**). Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, d'où une émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée.



**Figure 15** : Exemple de marquage de sang total avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8

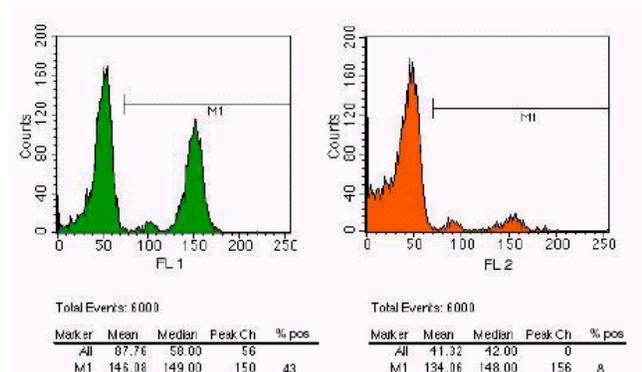
Ces signaux, séparés par des filtres optiques, sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

### II.3.3 – Analyse des données

Une fois que les signaux optiques sont convertis de façon proportionnelle en signaux électroniques puis en chiffres, les données sont stockées dans l'ordinateur sous forme de fichier FCS (flow cytometry standard). Le fichier représente une liste de valeurs numérique de chaque paramètre étudié pour chaque cellule analysée (**Figure 16**). Les données peuvent être représentées sous forme :

- 1) d'histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules,
- 2) d'histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.

CELLS IN SEQUENCE	FSC-H	SSC-H	FL1-H	FL2-H
1	120	28	152	24
2	190	169	42	60
3	175	149	56	52
4	107	25	149	0
5	97	22	151	26
6	174	136	47	36
7	190	127	42	47
8	106	14	148	0
9	86	17	165	23
10	90	16	149	31
11	184	165	58	50
12	191	160	39	48
13	101	24	152	19
14	126	36	153	0
15	126	28	157	0
16	96	17	155	0
17	215	224	61	59
18	165	95	55	46
19	173	73	49	43
20	91	27	158	0
21	210	180	59	52
22	179	161	60	52
23	165	93	54	35
24	187	45	67	52
25	192	184	48	50
26	111	25	149	17
27	207	206	58	40



**Figure 16** : Exemple de fichier FCS et représentation graphique correspondante

## II.4 – Avantages et limites de la CMF

Le 1<sup>er</sup> avantage très important de la cytométrie en flux est qu'elle permet **l'analyse d'un très grand nombre de cellules** dans un temps relativement court. Par exemple, l'instrument qui a servi à cette thèse peut analyser une population cellulaire à une vitesse de près de 20,000 cellules par seconde, et cela sans perdre sa capacité de résolution. Cette vitesse de travail permet non seulement d'avoir des statistiques d'analyse bien plus solide/fiable que la microscopie, qui ne peut compter que quelques centaines de cellules, mais aussi la CMF peut analyser des populations très rares, comme par exemple des cellules souches hématopoïétiques CD34+, qui représentent moins de 0,05% des leucocytes dans le sang (Donnenberg et al., 2001; Sutherland et al., 2003; Keeney et al., 2004).

Le 2<sup>ème</sup> avantage de la CMF est qu'elle permet **l'analyse de plusieurs paramètres simultanément** au niveau cellulaire. A l'heure actuelle, les meilleurs instruments de cytométrie peuvent mesurer jusqu'à 17 paramètres, alors que les microscopes les plus perfectionnés ne peuvent mesurer que 5 paramètres (Chattopadhyay et al., 2006). Aucune autre méthode d'analyse n'offre autant d'informations que la CMF.

Le 3<sup>ème</sup> avantage est que la CMF, contrairement à la microscopie, permet une **analyse quantitative** des paramètres mesurés. En effet, au microscope, il est difficile de classer des cellules en plus de quatre catégories selon leur fluorescence: "négatives", "faibles", "moyennes", "fortes". Un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier rigoureusement chaque critère optique sur une gamme de 1 à 262.144 unités arbitraires de fluorescence. En utilisant des billes de calibration avec un nombre connu

de molécules fluorescentes, il est possible de créer une courbe d'étalonnage standard, et ensuite de calculer par exemple le nombre de récepteurs CD4 à la surface des cellules, basée sur leur intensité de fluorescence (Schwartz and Fernandez-Repollet, 2001; Poncelet, 2004).

Enfin, le 4<sup>ème</sup> avantage qu'offre la cytométrie en flux est que les **cellules analysées peuvent être isolées ou triées**, de façon stérile, avec des taux de pureté supérieurs à 99% (Ibrahim and van den Engh, 2007). Ces cellules peuvent être remises en culture. L'application la plus importante est le tri des cellules souches CD34+ pour les transplantations (Beaujean, 1997).

Cependant, même si la vitesse de travail des instruments a considérablement augmenté ces dernières années, le tri d'une population reste relativement lent : par exemple, pour obtenir  $10^6$  cellules d'une population représentant initialement 0,5% de la population de départ, il faudrait, à la vitesse théorique de 20,000 cellules par seconde environ 3 heures de tri. La grande pureté des populations triées par CMF ne peut donc être obtenue qu'au prix d'une sérieuse limitation du nombre de cellules recueillies et d'une surveillance critique constante lors de la séparation (Robinson, 2005).

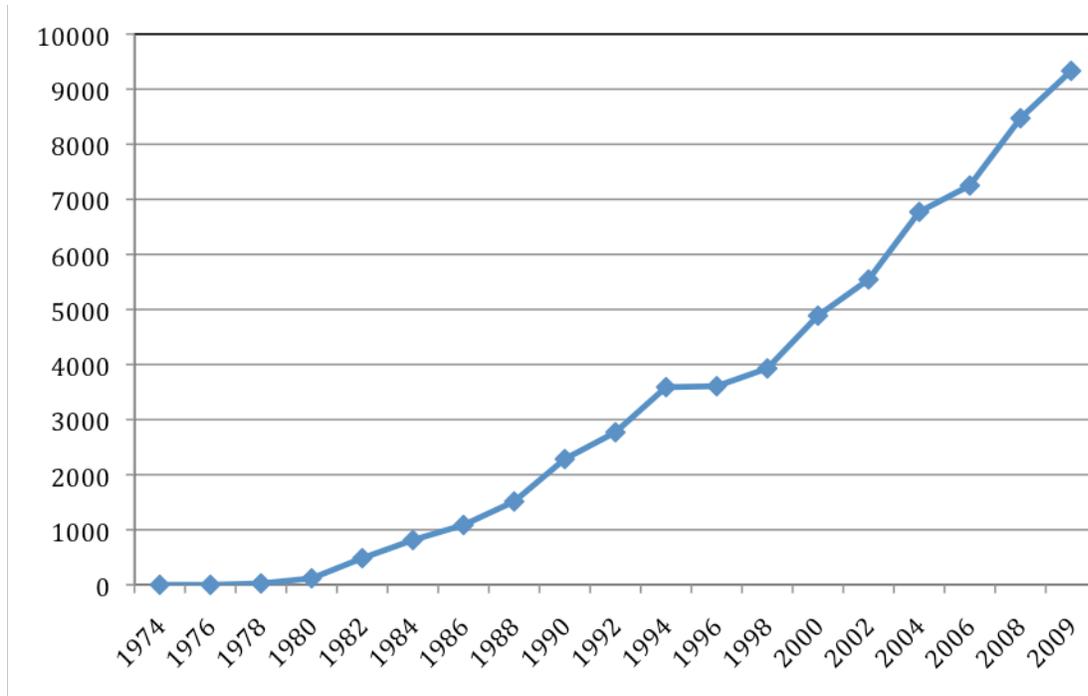
## **II.5 – Applications**

La cytométrie en flux couvre un champ d'applications très large dans des disciplines très variées telles que **l'hématologie**, **l'immunologie**, la **cancérologie** et la

**généti**que, autant dans les domaines de la recherche fondamentale que dans ceux de la recherche clinique et des applications cliniques. La CMF est également utilisée dans des domaines d'études autres que celui de la cellule animale. C'est le cas par exemple de la **biologie végétale**, de la **microbiologie** ou de la **biologie marine**.

De loin, la mesure la plus utilisée est l'**immunophénotypage**, ou des anticorps conjugués avec des fluorochromes se lient à leurs récepteurs spécifiques à la membrane des cellules immunes, ce qui permet l'identification de différentes populations cellulaires. Ces dernières années, le développement de la cytométrie multiparamétrique a démontré la complexité incroyable du système immunitaire, en identifiant par exemple des sous-populations de cellules dendritiques myéloïdes, inconnu il y a peu (MacDonald et al., 2002; Piccioli et al., 2007). De plus en plus, en association avec l'immunophénotypage, les chercheurs veulent aussi connaître le **statut fonctionnel de la cellule**, avec par exemple des mesures de cytokines ou des mesures de prolifération cellulaire, afin d'avoir une vision plus complète de la cellule (Shankar et al., 2000; Maecker et al., 2005; Petrovas et al., 2007; McLaughlin et al., 2008).

L'utilisation de cette technologie dans le domaine de la biologie peut se mesurer par le nombre d'ouvrages scientifiques la mentionnant. Il suffit de faire une recherche sur la banque de données PubMed pour voir que la cytométrie en flux a été citée dans 112.023 articles depuis 1974. Le nombre d'articles scientifiques publiés, mentionnant la cytométrie en flux, est passé de 118 dans l'année 1980 à 2284 en 1990, 4887 en 2000 et enfin 9332 en 2009 (**Figure 17**). Il est fort probable que le nombre d'articles utilisant cette technique est bien plus important.



**Figure 17** : Nombre de publications scientifiques mentionnant la cytométrie en flux, entre 1974 et 2009 (source: PubMed)

## II.6 – Immunophénotypage : de 3 à 17 couleurs en 20 ans

### II.6.1 – Introduction

Dans les années 1980, les cytomètres les plus perfectionnés, et souvent modifiée par l'utilisateur, possédaient 2 lasers, en général un laser argon émettant à 488nm et un laser réglable à 615nm. L'instrument était capable de détecter les fluorochromes organiques comme la fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et l'allophycocyanine (APC) (Parks et al., 1984). A l'heure actuelle, le « record » de paramètres mesurés (et publiés !) par un cytomètre est de 17 couleurs, sur une machine commercialisée avec 4 lasers, un « violet » émettant à 405nm, un « bleu » à 488nm, un « vert » à 532nm et un « rouge » à 633nm (Chattopadhyay et al., 2006). Le choix de fluorochromes utilisés est

désormais de plus en plus important et permet une grande flexibilité pour la mise au point d'un panel multicolore. Cette augmentation de paramètres mesurés est sans précédent dans aucune autre technique d'analyse, et a été rendu possible grâce au développement des 3 composantes majeures de la cytométrie : l'instrument proprement dit (en particulier les lasers), les réactifs (anticorps et fluorochromes), et enfin les logiciels d'analyse de données.

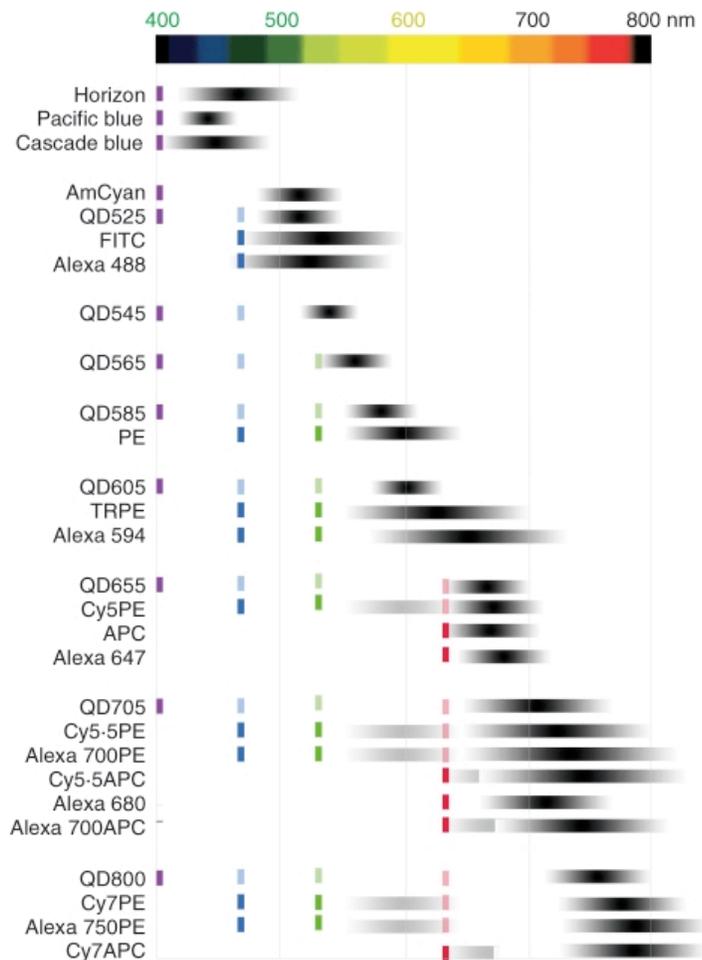
### II.6.2 – Lasers et fluorochromes

Au début des années 1980, les lasers utilisés avaient des longueurs d'onde d'excitation limitées, et surtout avaient besoin d'un système de refroidissement par eau, du fait de leur puissance. Aujourd'hui, les lasers sont beaucoup plus petits, ne requièrent plus de système de refroidissement, et ils fournissent une excitation stable à diverses longueurs d'onde (Kapoor et al., 2007). De plus, ils sont beaucoup moins chers que leurs prédécesseurs, ce qui réduit considérablement le coût total de la machine. Les 3 lasers les plus couramment utilisés aujourd'hui sont le bleu (488nm), le violet (405nm) et le rouge (633nm). Le laser vert à 532nm fournit plus de sensibilité, comparé au laser bleu, pour les fluorochromes PE (Perfetto and Roederer, 2007). Le laser UV (350nm) permet la mesure des colorants Hoechst, pour la mesure de l'ADN, et reste en grande partie réservé à cette application. Enfin, récemment le laser jaune (560nm) et orange (610nm) viennent combler le « trou » entre le vert (532nm) et le rouge (633nm) et permettent de couvrir tout le champ d'excitation de la lumière visible (Kapoor et al., 2008).

Au début des fluorochromes, seul FITC, PE et APC étaient utilisés. Les années 1990 ont vu l'arrivée des fluorochromes tandem, des molécules de cyanines ou Alexa fluors couplées avec PE ou APC qui leur fournissent l'énergie d'excitation. D'un coup, le répertoire des fluorochromes s'est élargi et a permis d'augmenter rapidement le nombre de paramètres mesurables à 8 couleurs en 1997 (Roederer et al., 1997). Dernièrement, une nouvelle classe de fluorochromes, les nanocristaux ou QDots, sont apparus et ont contribué à un nouveau bond en avant du nombre de paramètres mesurés (Chattopadhyay et al., 2006). Ces nanocristaux (au nombre de 8, de QD525 à QD800) ont la double particularité d'avoir une large longueur d'onde d'excitation, et donc d'être tous excitable par le même laser (le violet), et d'avoir aussi une très petite longueur d'onde d'émission, ce qui minimise les chevauchements de spectre d'émission avec d'autres fluorochromes. Leur intensité de fluorescence est en général très bonne. Ainsi, les QDots sont de parfaits fluorochromes pour l'utilisation dans un panel multicolore, mais il convient de rester prudent car leur utilisation est très récente et mérite encore d'être évaluée.

Comme montré dans la **Figure 18**, il y a maintenant près de 30 fluorochromes utilisés, qui peuvent être couplés aux anticorps monoclonaux. Tous ne peuvent pas être utilisés en même temps, du fait de leur chevauchement spectral. Cependant cela permet de donner un choix plus important au chercheur quand il développe un panel de cytométrie. De plus, les compagnies qui vendent les anticorps monoclonaux les proposent maintenant dans un grand nombre de « couleurs », ce qui évite d'une part d'avoir à conjuguer soi-même les anticorps avec les fluorochromes d'intérêt, et d'autre

part cela ajoute une flexibilité supplémentaire, afin d'avoir le meilleur panel possible (Chattopadhyay et al., 2008).



**Figure 18** : Fluorochromes les plus utilisés actuellement (d'après Chattopadhyay et al, Immunol, 2008).

Pour chaque fluorochrome, le laser optimal est indiqué par une ligne plus sombre (violet = 405 nm, bleu = 488 nm, vert = 532 nm, rouge = 633 nm). Chaque longueur d'émission est indiquée par une bande grise/noire, noire étant la bande d'émission maximale.

### II.6.3 – Logiciel d'analyse de données

Il est relativement simple d'analyser une expérience avec 4 paramètres mesurés. Cependant, au fur et à mesure que les paramètres mesurés ont augmenté, la quantité

d'information a aussi augmenté de façon exponentielle, et l'analyse des données est devenue de plus en plus complexe. Heureusement, les logiciels d'analyse de cytométrie se sont adaptés à cette masse de données à gérer et sont même devenus au fil des années plus simple d'utilisation, avec en particulier :

1) Le calcul de compensation automatique entre les fluorochromes, alors que sur les machines analogiques des années 1980 (ex : BD FACSCalibur), il fallait calculer manuellement la matrice de compensation. La robustesse des compensations automatisées rend une analyse multicolore plus fiable et est utilisée maintenant de façon routinière (Corver et al., 2002)

2) Une stratégie d'analyse hiérarchique de l'échantillon ou « gating strategy » : cela permet de sélectionner une population donnée pendant l'analyse (par exemple les lymphocytes T CD3+), et d'étudier les sous-populations de T CD3+ (par exemple T CD4+ et T CD8+), en omettant les cellules CD3-. Cela rend l'analyse beaucoup plus compréhensible et logique car elle suit un classement hiérarchique des cellules.

Cependant, aussi simple qu'il y paraît, ce système d'analyse est toujours dépendant du chercheur et de ces connaissances des populations cellulaires étudiées. En effet, c'est lui qui fait les choix d'étudier telle ou telle molécule sur une population particulière. Avec des expériences à 12, 15 ou 17 paramètres/couleurs, le chercheur ne peut pas tout « voir » et le danger est de passer à côté de résultats significatifs, car « noyé » dans la masse de données générées par un panel multicolore. C'est pour cela que depuis

quelques années, un gros effort est fait pour développer des logiciels d'analyse automatique (Petrausch et al., 2006; Jeffries et al., 2008; Lo et al., 2008).

En résumé, la cytométrie en flux multiparamétrique n'aurait pas été possible sans la contribution de 3 disciplines totalement séparés au départ : la biologie cellulaire (anticorps et fluorochromes), la physique des lasers et l'informatique (Mandy et al., 1997). Tous ces progrès technologiques ont permis d'analyser le système immunitaire de façon incroyablement détaillée (De Rosa and Roederer, 2001; Roederer, 2002; Chattopadhyay et al., 2008). L'immunologie est probablement une des disciplines scientifiques qui connaît à l'heure actuelle le plus grand essor, avec une masse d'informations sans précédent. La cytométrie en flux multiparamétrique est, sans aucun doute, en partie responsable de cet essor. Mais le « moteur » des développements parallèles de la cytométrie en flux multiparamétrique et de l'immunologie est sans contexte le SIDA (Mandy, 2004).

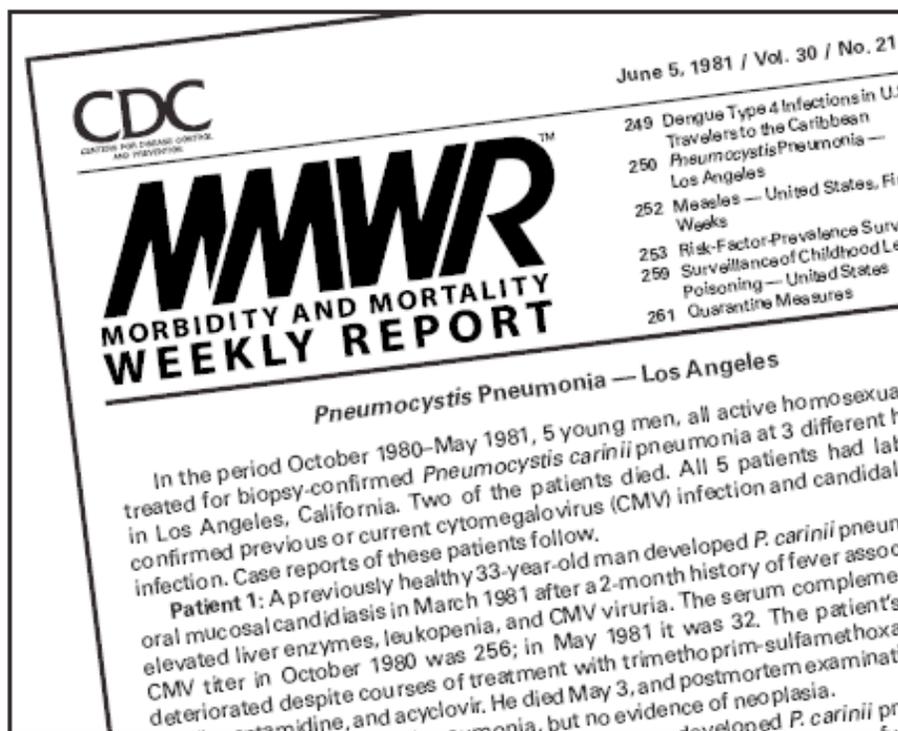
### **III – SIDA ET CYTOMÉTRIE**

#### **III.1 – Historique**

##### **III.1.1 – Les premières années**

Au début des années 1980, grâce aux développements des instruments et des anticorps monoclonaux, la cytométrie en flux commençait à pouvoir analyser les cellules du système immunitaire. Cependant, mise à part l'application dans l'étude du

contenu en ADN des leucémies et des lymphomes (Braylan et al., 1980; Shackney et al., 1980), il ne semblait pas y avoir de possibilités d'utiliser cette nouvelle technique pour une large application clinique. Cependant, tout a changé le 5 Juin 1981 avec la publication par le CDC des premiers cas d'infection à Los Angeles (1981) (**Figure 19**).



**Figure 19** : Rapport MMWR du CDC du 5 Juin 1981 (source : CDC)

En décembre 1981, un des tout premiers articles scientifiques décrivant les premiers cas de ce qui allait devenir une des plus terribles épidémies du 20<sup>ème</sup> siècle utilisait déjà la cytométrie en flux pour décrire l'élimination de la population Leu-3+ (lymphocyte T CD4+ auxiliaire) et l'augmentation de la population Leu-2+ (lymphocyte T CD8+ cytotoxique) (Gottlieb et al., 1981b) (**Figure 20**). Très rapidement, il s'est avéré que le

nombre de lymphocytes T CD4+ auxiliaires était d'une importance capitale dans l'infection par VIH (Newman et al., 1983). Ce lien entre le nombre de lymphocyte T CD4+ et son importance dans le diagnostic et l'évolution de l'infection par VIH allait donner en quelque sorte une justification clinique dans l'utilisation de la cytométrie en flux (Mandy, 2004). Même si il est exagéré de dire que la cytométrie « doit tout » au SIDA, il est évident que le développement incroyable de la CMF pendant les 30 dernières années est en grande partie dû à la recherche sur le SIDA et à la nécessité de mieux définir les cellules immunitaires et le rôle qu'elles jouent dans l'infection par VIH.

## The New England Journal of Medicine

©Copyright, 1981, by the Massachusetts Medical Society

---

Volume 305

DECEMBER 10, 1981

Number 24

---

### *PNEUMOCYSTIS CARINII* PNEUMONIA AND MUCOSAL CANDIDIASIS IN PREVIOUSLY HEALTHY HOMOSEXUAL MEN

Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency

MICHAEL S. GOTTLIEB, M.D., ROBERT SCHROFF, PH.D., HOWARD M. SCHANKER, M.D.,  
JOEL D. WEISMAN, D.O., PENG THIM FAN, M.D., ROBERT A. WOLF, M.D., AND ANDREW SAXON, M.D.

**Figure 20** : Article de M. Gottlieb et al décrivant les 1<sup>ers</sup> cas de SIDA

Le comptage des lymphocytes T CD4+ est rapidement devenu le facteur pronostic le plus fiable dans l'infection par VIH (Mandy et al., 1997). Depuis l'introduction des

trithérapies, le compte CD4+, avec la charge virale, conditionne le démarrage d'un traitement. Cependant, avec l'implémentation des trithérapies dans les pays en voie de développement, il est essentiel de fournir à ces pays une technologie de comptage des T CD4+ beaucoup plus simple et moins chers que les machines que nous utilisons aujourd'hui en clinique ou en recherche (Mandy et al., 2008). Il est ainsi intéressant de constater qu'un des défis majeurs que doit relever la cytométrie en flux est de construire des instruments possédant les caractéristiques de ceux des années 1980, à savoir capable de mesurer 1 ou 2 paramètres seulement, mais pour un coût bien moindre, de l'ordre de \$5,000 (Barnett et al., 2008). L'autre défi de notre discipline est à l'autre extrémité, à savoir construire des instruments extrêmement sophistiqués qui permettent l'analyse d'un plus grand nombre de paramètres à l'échelle cellulaire, afin de mieux identifier les stratégies que le virus utilise pour entraîner un dysfonctionnement des mécanismes immunitaires, et ainsi échapper au contrôle du système immunitaire.

### III.1.2 – 30 ans après : la recherche est devenue globale

Aujourd'hui, un des outils les plus performants dans l'étude et l'identification des cellules immunitaires est la cytométrie en flux multiparamétrique (Baumgarth and Roederer, 2000; De Rosa et al., 2003). Grâce à ces outils de mesure, on s'est aperçu au fil des années que le VIH affectait directement ou indirectement toutes les cellules du système immunitaire, et pas uniquement les lymphocytes T CD4+. La conséquence première de ces recherches de plus en plus pointues a été de faire un bond en avant dans les connaissances du système immunitaire en général. Les populations

cellulaires, qui autrefois étaient considérés comme homogènes, apparaissent maintenant beaucoup plus complexe. L'identification de sous-populations de lymphocytes appelé naïves ou mémoires, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au VIH identifiés par la technologie des tétramères, ou encore la discrimination de sous-populations de monocytes, ont considérablement aidé notre compréhension de l'immunopathologie du SIDA (De Rosa, 2004). De plus, la CMF multiparamétrique est devenue primordial pour identifier des cellules rares dans le sang comme les cellules dendritiques, ou un minimum de 8 paramètres sont nécessaires pour distinguer les 5 sous-populations de DC (MacDonald et al., 2002; Piccioli et al., 2007). Enfin, de plus en plus de laboratoires équipés de machines performantes associent maintenant les mesures de phénotypage des cellules avec leurs fonctions, grâce en particulier aux mesures de cytokines ou encore de prolifération (Hengel and Nicholson, 2001).

En résumé, à côté du comptage de T CD4+ pour le suivi clinique des patients, un grand nombre d'autres populations cellulaires ont été étudiées, dans le but de prévoir le pronostic clinique, de développer de nouvelles cibles pour les thérapies, de trouver des marqueurs spécifiques pour mesurer l'efficacité des candidats vaccins, et enfin de comprendre la pathogenèse de la maladie. La CMF est devenue le principal outil de recherche pour ces études. Cependant, un autre « acteur » a aussi permis de faire des progrès considérables dans la compréhension de l'infection, en partie dans la partie initiale aiguë des premières semaines, le macaque rhesus.

## III.2 – Apport du modèle animal macaque rhésus

### III.2.1 - Introduction

Les modèles animaux de maladies humaines sont essentiels pour étudier des maladies infectieuses telles que le SIDA, la grippe ou la tuberculose (Gardner and Luciw, 2008). Malgré des débuts controversés, le modèle macaque rhésus, infecté par VIS, homologue de VIH chez le singe, est devenu au fil des années un outil indispensable dans la lutte contre le SIDA (Desrosiers and Ringler, 1989). Son intérêt vient du fait que le VIS ressemble au VIH au niveau de sa séquence génétique et de ses propriétés biologiques. De plus, il induit le SIDA chez le singe dans une période courte de quelques mois, rendant son étude beaucoup plus accessible au niveau du temps. Beaucoup d'études, faites chez le singe, ont démontré le rôle des lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques pendant l'infection par VIS (Kim et al.; DeMaria et al., 2000; Ibegbu et al., 2001; Pichyangkul et al., 2001; Pitcher et al., 2002; Mattapallil et al., 2004; Barratt-Boyes et al., 2006; Williams and Burdo, 2009). Une des découvertes majeures ces dernières années a été le fait de mesurer une très forte perte de lymphocytes T CD4+ mémoires dans différents tissus après seulement quelques semaines d'infection par VIS (Mattapallil et al., 2005). Grâce à cette découverte, d'abord chez le singe et ensuite chez l'homme, l'infection par VIS/VIH, considérée comme progressive et lente, semble avoir en plus une phase aigüe très agressive, qui détruit près de 60% des T CD4+ mémoires du corps et pourraient expliquer le début de l'effondrement du système immunitaire. La conséquence a été pour les chercheurs de commencer à se tourner vers l'étude de la réponse immunitaire innée et acquise pendant les premières semaines de l'infection (Mogensen et al.). Pour ce faire, le

modèle macaque rhésus est d'une aide capitale, car on peut avoir accès à une période dans l'infection (les premiers jours) qui est quasiment impossible à étudier chez l'homme, et ainsi suivre l'infection aiguë jour après jour, avec entre autre la mesure des variations du nombre de cellules immunitaires par cytométrie.

### III.2.2 – Similarités et différences entre macaque rhésus et humain

A cause de la relative proximité génétique entre l'homme et le singe, les anticorps monoclonaux anti-humains peuvent souvent reconnaître l'antigène humain homologue chez le singe (Reimann et al., 1994; Sopper et al., 1997). Cependant, des différences entre certaines populations existent qui peuvent limiter l'utilisation des anticorps anti-humains chez les singes. Ces différences peuvent être de 2 ordres : soit l'anticorps anti-« x » utilisé chez l'humain ne reconnaît pas l'antigène correspondant sur les cellules du singe, par manque de réactivité croisée de l'anticorps. Dans ce cas, on essaiera de trouver un autre clone de l'anticorps anti-« x » qui puisse réagir avec l'antigène en question chez le singe (Sestak et al., 2007). Ou alors, l'anticorps humain reconnaît l'antigène correspondant chez le singe, mais qui est exprimé par d'autres cellules. C'est le cas par exemple de l'antigène CD56 qui est exprimé uniquement par les cellules NK chez l'homme, alors qu'il est principalement exprimé par les monocytes et les cellules dendritiques myéloïdes chez le singe (Carter et al., 1999; Brown and Barratt-Boyes, 2009). De même, l'antigène CD8 est exprimé par une sous-population de lymphocytes B chez le singe, mais pas chez l'homme (Webster and Johnson, 2005). Il convient donc d'être très prudent dans des études d'immunophénotypage chez le singe, et ne pas

assumer qu'un panel d'anticorps testé sur l'humain va reproduire et reconnaître les mêmes populations cellulaires chez le macaque rhésus. C'est pour cela que la CMF multiparamétrique est d'une aide capitale pour reconnaître ces différences car elle permet d'étudier simultanément un grand nombre d'antigènes exprimé par différentes populations cellulaires, et ainsi d'en déduire leurs phénotypes, ou carte d'identité de façon beaucoup plus précise.

### **III.3 – L'harmonisation des résultats en cytométrie est cruciale**

#### III.3.1 – Exemple du compte T CD4+

L'importance du compte T CD4+ effectué par cytométrie en flux est évidente puisque de ce chiffre dépend la mise en place ou non du traitement par antirétroviraux. Les dernières recommandations de l'OMS demande une prise en charge thérapeutique si le compte T CD4+ est en dessous de 350 (Zuger). Depuis 20 ans, la stratégie d'analyse des T CD4+ a évolué considérablement, dans le but d'avoir une population de T CD4+ la plus « pure » possible, c'est à dire en éliminant le maximum de cellules contaminantes (Mandy et al., 1997). A l'heure actuelle, les recommandations du CDC sont pour l'utilisation d'un simple plate-forme avec d'une part un panel de 3 ou 4 anticorps pour discriminer les lymphocytes T CD4+ (anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 (et anti-CD8)), et d'autre part l'inclusion de microsphères pour calculer le compte absolu (Mandy et al., 2003). Cette méthode marche très bien quand le sang est traité dans les 12 à 24 heures après la prise de sang. Cependant, si le sang est traité après 24 heures, les caractéristiques physiques des cellules changent rapidement, et il devient difficile de

sélectionner de façon précise les cellules d'intérêt, par exemple de séparer les lymphocytes des monocytes (Bergeron et al., 2002). De plus, les anticorps ont tendance à marquer les cellules mortes ou apoptotiques, et cela rend l'analyse plus complexe. Un moyen efficace d'éliminer ces cellules contaminantes est d'ajouter dans le panel des anticorps spécifiques à ces cellules. Cela réduit considérablement le risque de contamination d'une population cellulaire à une autre, et permet aussi de pouvoir analyser des échantillons qui ne peuvent pas être traités rapidement.

### III.3.2 – Mesure précise des populations rares

Les cellules dendritiques chez l'homme et le singe représentent en général moins de 1% du total des leucocytes, et de plus elles sont très hétérogènes. Elles sont primordiales dans la réponse immunitaire et sont l'objet d'un intérêt grandissant dans l'immunothérapie (Ju et al.; Palucka and Banchereau, 1999; Banchereau et al., 2000; Banchereau et al., 2003; Steinman, 2003). Historiquement, les cellules dendritiques étaient séparées en 2 sous-populations : les DC myéloïdes CD11c+ et plasmacytoïdes CD123+. Récemment, l'hétérogénéité des DC myéloïdes chez l'homme a été mise en évidence par la caractérisation de 3 sous-populations, exprimant CD16, CD1c et CD141 (MacDonald et al., 2002). Cependant, cette caractérisation précise des cellules dendritiques n'a pas été faite chez le singe, probablement du fait d'un nombre de paramètres insuffisant à la disposition des chercheurs. En effet, pour identifier simultanément toutes les sous-populations de cellules dendritiques chez l'homme, pas moins de 8 paramètres sont nécessaires. Cela a même amené à une certaine

confusion dans la littérature, avec l'utilisation soit de CD11c ou de CD1c comme marqueurs des mDC chez le singe (Malleret et al., 2008; Brown and Barratt-Boyes, 2009).

Ces 2 exemples, caractérisation des lymphocytes T CD4+ et des cellules dendritiques, montrent l'importance grandissante de l'utilisation de multiples paramètres afin de limiter les contaminations entre populations cellulaires et ainsi d'évaluer au mieux chaque population cellulaire. De plus, on voit bien maintenant que le VIH affecte directement ou indirectement toutes les cellules immunes. Ainsi, il devient important de bien définir chaque population étudiée pendant une étude longitudinale chez l'homme ou le singe, afin d'évaluer leurs variations. C'est pour toutes ces raisons que j'ai entrepris ce travail de thèse, afin de fournir, « clés en main », 2 panels de cytométrie en flux multicolores pour l'humain et le singe, testés et validés pour la mesure simultanée de toutes les populations majeures du système immunitaire.

## **OBJECTIF**

## OBJECTIF

En dépit de la commercialisation de cytomètres en flux pouvant mesurer jusqu'à 17 couleurs maintenant, un nombre très limité de laboratoires utilisent ces instruments à leur pleine capacité. Bien que l'élaboration d'un panel d'anticorps multicolore prend du temps et nécessite un certain nombre de tests de validation, la quantité d'informations recueillie par un tel panel est bien plus importante qu'un panel utilisant 2 à 6 couleurs, et peut permettre non seulement une compréhension plus globale du système immunitaire, mais aussi peut définir des sous-populations cellulaires qui pourraient n'être que peu ou pas définies, par manque de marqueurs. En outre, l'utilisation d'un panel de cytométrie en flux multicolore permet de diminuer la quantité de sang nécessaire pour l'immunophénotypage, qui est souvent limitée, en particulier au cours des études longitudinales. Habituellement, la plupart des laboratoires de recherche ou d'analyse biomédicale mesurent les populations de lymphocytes, de monocytes et de DC en utilisant des panels d'anticorps distincts dans différents tubes, principalement en raison de limitations techniques. Avec les dernières avancées technologiques de la cytométrie en flux, et la commercialisation d'anticorps disponibles en un plus grand nombre de couleurs, le but de ce travail était de mettre au point 2 panels de 12 anticorps afin de permettre, dans un seul tube, et en n'utilisant que 200µl de sang total, la mesure simultanée des principales populations cellulaires du système immunitaire, que sont les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK et NKT, et les sous-populations de monocytes et de cellules dendritiques, chez l'humain et le macaque rhésus. Ces 2 panels, une fois validés, pourraient permettre une meilleure harmonisation des résultats entre laboratoires et équipes de recherche.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

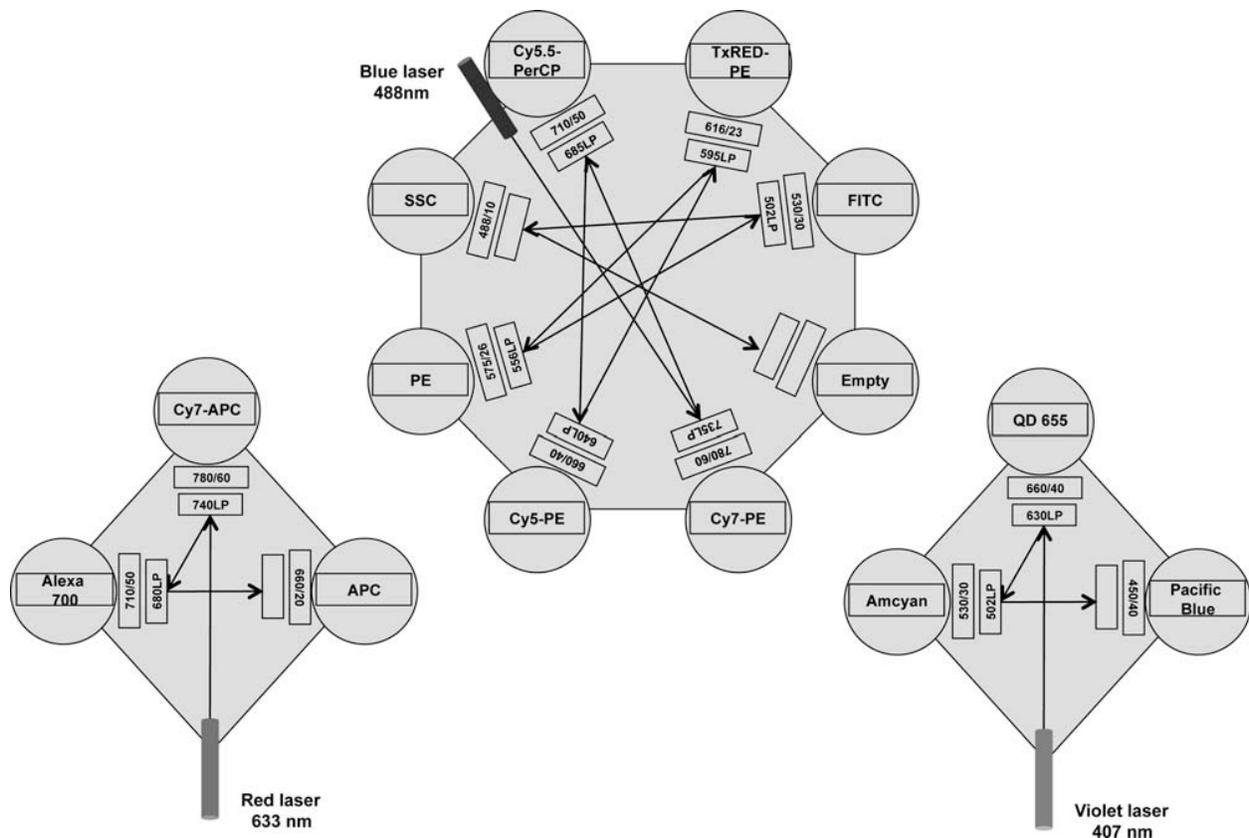
### I - Sujets :

Le sang veineux périphérique humain a été prélevé chez neuf donneurs adultes en bonne santé et a été collecté dans des tubes contenant un anticoagulant EDTA. Un consentement par écrit et une autorisation de prélèvement pour la participation à l'étude a été signé par chaque volontaire avant la collecte de sang.

Pour l'étude sur les singes, le sang veineux a été prélevé chez douze macaques rhésus, non infectés et en bonne santé, et collecté dans des tubes contenant un anticoagulant EDTA. Tous les animaux ont été maintenus en conformité avec les directives du comité sur les animaux du Centre de recherche sur les Primates de la Nouvelle-Angleterre (NEPRC), ainsi que le « guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoires » (Bayne, 1996). Les échantillons de sang, humains et de primates, ont été traités dans les 2 à 4 heures après le prélèvement.

### II - Instrumentation :

Un cytomètre en flux Becton-Dickinson FACSAria avec trois lasers a été utilisé pour ce travail. Notre instrument a été optimisé pour mesurer jusqu'à 12 paramètres de fluorescence ainsi que 2 paramètres physiques (FSC et SSC). Le détail de la configuration optique de l'instrument est montré dans la **Figure 21**.

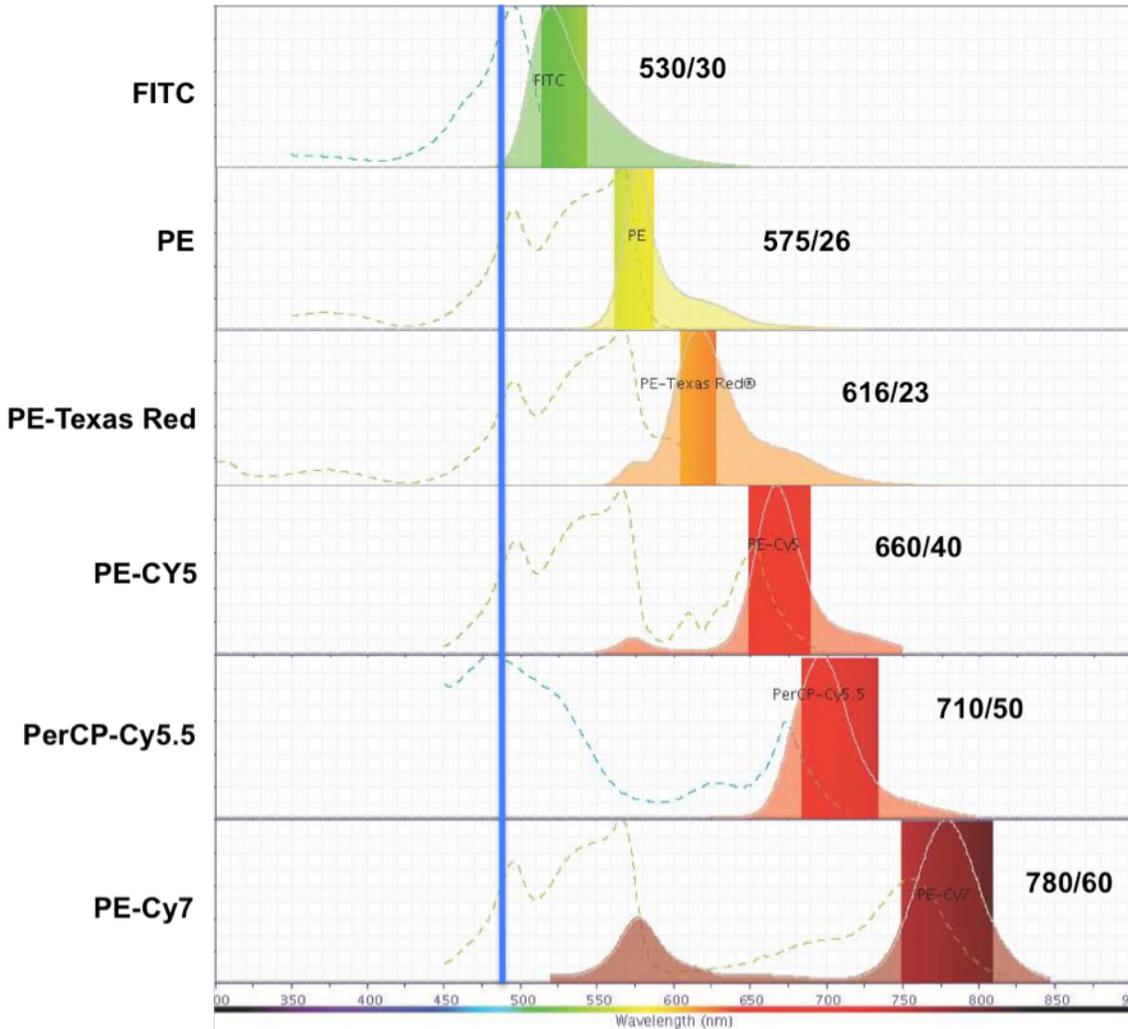


**Figure 21 :** Configuration optique du cytomètre BD FACSAria (d'après Autissier et al, Cytometry Part A, 2010).

L'instrument est équipé de trois lasers : bleu (488nm), rouge (633nm) et violet (405nm). La collecte des signaux optiques est réalisée à l'aide de photomultiplicateurs disposés de façon octogonale pour le laser bleu et triangulaire pour les lasers rouge et violet, ainsi que d'une série de filtres optiques (dichroïques et passe bande), permettant de mesurer jusqu'à sept paramètres pour le laser bleu et trois paramètres chacun pour les lasers rouge et violet. La séparation de chaque paramètre ou longueur d'onde est réalisée par un système de cascades. Par exemple, sur le laser bleu, les plus grandes longueurs d'onde, au-dessus de 735nm, sont transmises à travers un 1<sup>er</sup> filtre optique appelé passe-haut (735LP), puis ensuite affinée à travers un 2<sup>ème</sup> filtre appelé passe bande (780/60) qui permet la transmission de longueur d'onde entre 750 et 810nm au photomultiplicateur qui va amplifier le signal optique et le transformer en signal électronique traité par l'ordinateur. Les longueurs d'ondes plus courtes que 735nm seront réfléchies et dirigées vers les PMT suivants.

Le laser bleu, émettant à 488nm peut indépendamment exciter six fluorochromes (FITC, PE, Texas Red-PE (ECD), Cy5-PE, Cy5.5-PerCP et Cy7-PE). Le laser rouge, émettant à 633nm peut exciter trois fluorochromes (APC, Alexa700 et Cy7-APC). Enfin le laser violet, émettant à 405nm, peut exciter trois fluorochromes (Pacific Blue,

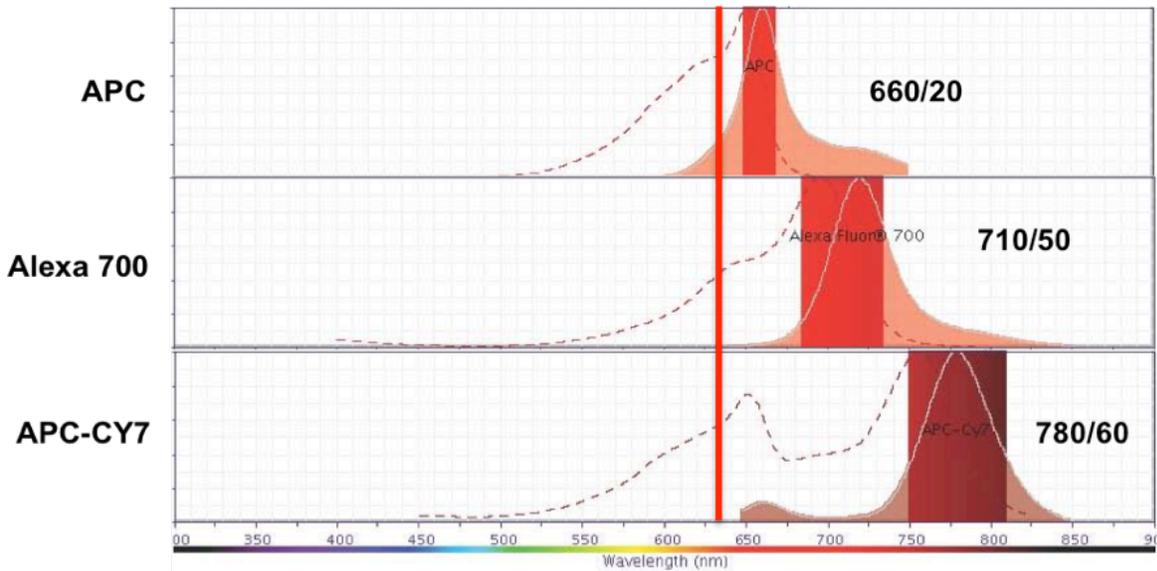
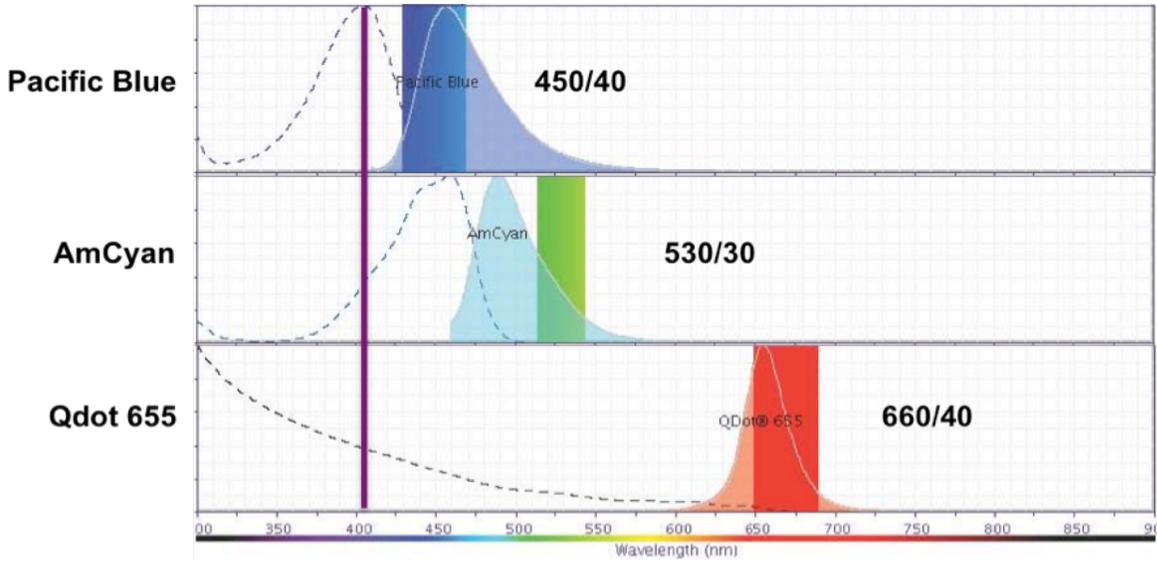
AmCyan ou Aqua, et QDot 605). Les profils des longueurs d'ondes d'excitations et d'émissions de chaque fluorochrome sont détaillés dans la **Figure 22a et 22b**.



..... spectre d'excitation ——— spectre d'émission  filtres passe bande

**Figure 22a :** Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes excitables par le laser bleu à 488nm (d'après [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Les différents fluorochromes sont indiqués sur la gauche de la figure. Les spectres d'excitation et d'émission de chaque fluorochrome, ainsi que la longueur d'onde du laser, sont dans le corps de la figure. Les filtres d'émission sont représentés par un rectangle dans la figure, ou est indiqué aussi la longueur d'onde centrale et les longueurs d'onde supérieure et inférieure passée par chaque fluorochrome.



..... spectre d'excitation ——— spectre d'émission  filtres passe bande

**Figure 22b :** Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes excitables par le laser violet à 407nm et le laser rouge à 633nm (d'après [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Les différents fluorochromes sont indiqués sur la gauche de la figure. Les spectres d'excitation et d'émission de chaque fluorochrome, ainsi que la longueur d'onde du laser, sont dans le corps de la figure. Les filtres d'émission sont représentés par un rectangle dans la figure, ou est indiqué aussi la longueur d'onde centrale et les longueurs d'onde supérieure et inférieure passée par chaque fluorochrome.

### III - Anticorps utilisés pour l'étude :

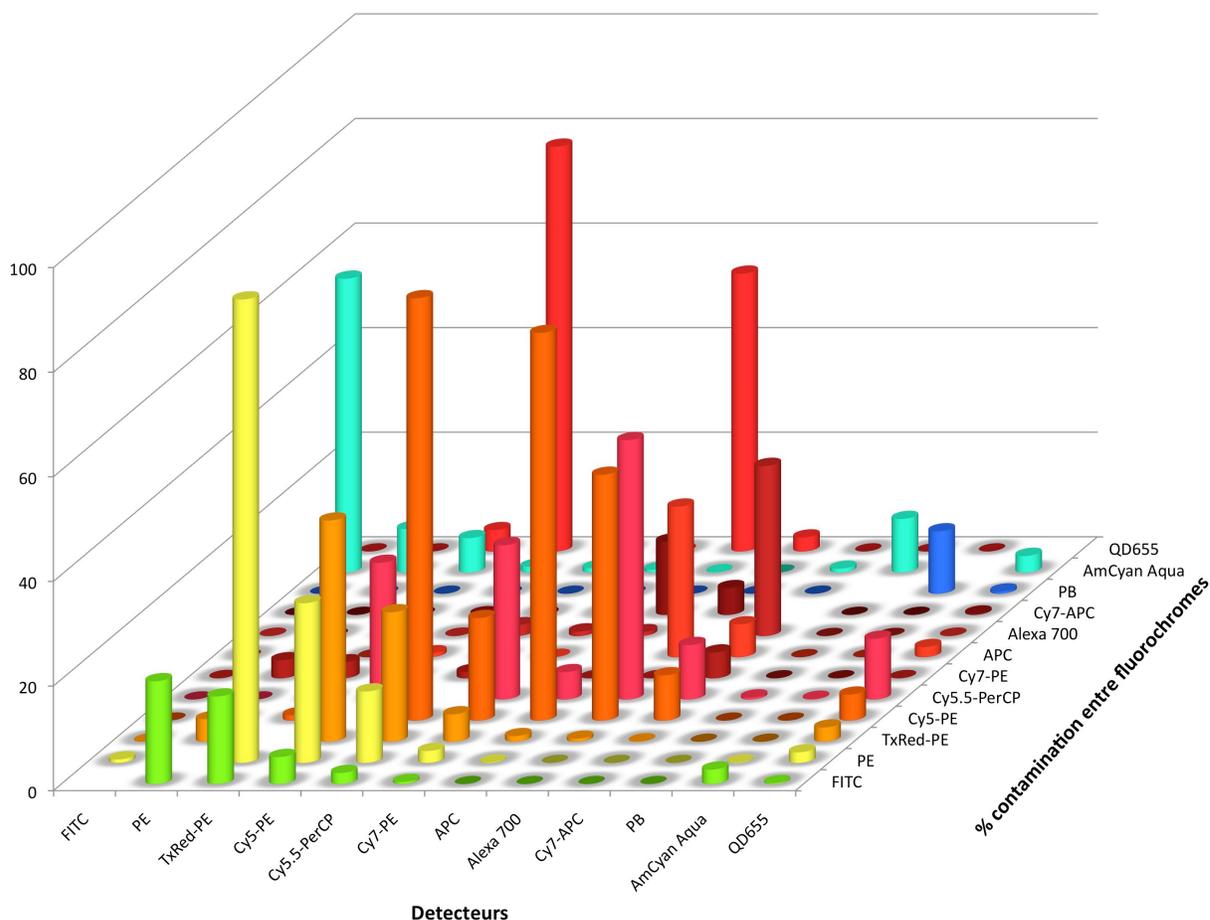
Le but ultime de cette étude était le développement de 2 panels multicoloreurs de cytométrie en flux, afin d'étudier l'immunophénotypage des principales cellules du système immunitaire, respectivement chez l'humain et le macaque rhésus. Pour déterminer la fiabilité et la précision de ces 2 panels, j'ai comparé les données obtenues par ces 2 panels 12 couleurs avec ceux obtenues par des panels plus petits mesurant individuellement les lignées cellulaires distinctes que sont les lymphocytes, les monocytes et les cellules dendritiques. Pour le panel 12 couleurs et les panels de lignée cellulaire spécifiques utilisés chez l'humain, les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés : CD16-FITC (clone 3G8), CD141-PE (clone 1A4), CD11c-Cy5-PE (clone B-Ly6), CD123-Cy5.5-PerCP (clone 7G3), CD20-Cy7-PE ou CD20-Cy7-APC (clone L27), CD56-Cy7-PE (clone B159), CD3-Alexa Fluor 700 ou CD3-Cy7-PE (clone SP34-2), HLA-DR-Cy7-APC (clone L243), CD14-Pacific Blue ou CD14-Cy7-PE (clone M5E2), CD4-AmCyan (clone SK3) (tous les anticorps sont de BD Pharmingen, San Jose, CA) ; CD34-TxRed-PE (ECD) (clone 581, Beckman Coulter, Miami, FL) ; CD1c-APC (clone AD5-8E7, Miltenyi Biotech, Auburn, CA) ; et CD8-QD655 (clone 3B5, Invitrogen, Carlsbad, CA). En ce qui concerne les panels utilisés chez le singe, quelques anticorps monoclonaux ci-dessus, ne réagissant pas avec les cellules du singe ou bien étant peu réactifs, ont été remplacés par d'autres, afin d'optimiser le signal obtenu par chaque anticorps. Ces anticorps sont : CD4-FITC (clone L200), CD34-PE (clone 563), CD16-Cy5-PE (clone 3G8) (tous les anticorps sont de BD Pharmingen, San Jose, CA) ; CD11c-Alexa Fluor 700 (clone 3.9, eBiosciences, San Diego, CA), HLA-DR-TxRed-PE (clone Immu-357, Beckman Coulter, Miami, FL). J'ai aussi testé les anticorps CD1c-

FITC (clone AD5-8E7) et CD141-PE (clone AD5-14H12), provenant de chez Miltenyi Biotech, ainsi que CD141-PE (clone 1A4) de chez Becton-Dickinson. Tous les anticorps ont été titrés pour déterminer leur concentration optimale. Les différents panels utilisés sont montrés dans le **Tableau 2** ci-dessous.

	Panels humain				Panels macaque rhésus			
	12C	Lympho	Mono	DC	12C	Lympho	Mono	DC
<b>FITC</b>	CD16	CD16	CD16	CD16	CD4	CD4	-	-
<b>PE</b>	CD141	-	-	CD141	CD34	-	-	CD34
<b>TxRed-PE</b>	CD34	-	-	CD34	HLA-DR	-	HLA-DR	HLA-DR
<b>Cy5-PE</b>	CD11c	-	-	CD11c	CD16	CD16	CD16	CD16
<b>Cy5.5-PerCP</b>	CD123	-	-	CD123	CD123	-	-	CD123
<b>Cy7-PE</b>	CD20+CD56	CD56	CD20	CD3+CD14+ CD20+CD56	CD3	CD3	CD3	CD3+CD14 +CD20
<b>APC</b>	CD1c	-	-	CD1c	CD1c	-	-	CD1c
<b>Alexa 700</b>	CD3	CD3	CD3	-	CD11c	-	-	CD11c
<b>Cy7-APC</b>	HLA-DR	CD20	HLA-DR	HLA-DR	CD20	CD20	CD20	-
<b>PB</b>	CD14	-	CD14	-	CD14	CD14	CD14	-
<b>AmCyan Aqua</b>	CD4	CD4	-	-	Live/Dead	Live/Dead	Live/Dead	Live/Dead
<b>QD655</b>	CD8	CD8	-	-	CD8	CD8		CD8

**Tableau 2** : Description des panels d'anticorps utilisés

Des billes de capture d'anticorps (CompBeads, BD Biosciences) ont été utilisées individuellement pour chaque fluorochrome utilisé dans cette étude, afin de calculer la matrice de compensation, montrée dans la **Figure 23** ci-dessous.



**Figure 23** : Contamination des fluorochromes dans tous les détecteurs

Les billes ont été marquées individuellement avec chacun des 12 anticorps directement conjugués avec les fluorochromes et analysées au cytomètre. Le pourcentage de lumière provenant de l'excitation d'un fluorochrome qui contamine chacun des autres détecteurs a été calculé. Chaque barre représente le pourcentage de signal détecté d'un fluorochrome donné, mesuré par les autres détecteurs. Par exemple, les billes marquées par l'anticorps anti-CD16-FITC montre la plus grande contamination sur le détecteur PE et TxRed-PE et très peu ou pas de contamination sur les autres détecteurs (barres verte au 1<sup>er</sup> plan).

Enfin, pour exclure les cellules mortes de l'analyse, j'ai utilisé dans le panel pour les singes un fluorochrome réagissant aux amines (kit Aqua Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA), marqueur de discrimination entre les cellules vivantes et mortes (Perfetto et al., 2006b).

#### **IV - Protocole de marquage des échantillons :**

100µl de sang total est transféré dans un tube à fond rond de 5ml. Les érythrocytes sont lysés en utilisant un automate (TQ-Prep, Beckman Coulter). En général, pour des analyses concernant les lymphocytes et les monocytes, 100µl de sang total est suffisant pour avoir assez de cellules à analyser. Cependant, les cellules dendritiques représentant moins de 1% des cellules immunitaires, se retrouvent en très petit nombre dans le sang circulant. C'est pour cela que j'ai utilisé 2 tubes de 100µl de sang total, afin d'avoir assez de cellules dendritiques pour l'analyse cytométrique. La lyse des globules rouges est effectuée avant le marquage par les anticorps pour éviter la réduction de l'intensité de fluorescence de CD16 sur les cellules, due aux IgG Fc $\gamma$  RIII dans le plasma qui peuvent potentiellement se lier à l'anticorps anti-CD16 (Huizinga et al., 1994). Le sang lysé des 2 tubes est transféré dans un seul tube, lavé avec 3ml de tampon PBS contenant 2% FBS, et ensuite incubé avec un cocktail d'anticorps pré-mélangé, pour 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules marquées sont ensuite lavées avec 3ml de PBS contenant 2% FBS et fixées avec 1% PFA fraîchement préparé.

## V - Acquisition des données et analyse de l'échantillon :

Les échantillons ont été collectés sur un cytomètre BD FACSAria (BD Biosciences), en utilisant une pression de 20 psi et une buse de 100µm. La calibration de l'instrument est effectuée chaque jour en utilisant des billes fluorescentes (rainbow beads, BD Biosciences). En premier, l'acquisition par l'instrument des tubes d'échantillon appelés « contrôles », qui comportent le tube « négatif » ou non marqué, et les tubes de billes marqués individuellement par chacun des fluorochromes utilisés pour l'expérience, permette de calculer la matrice de compensation (**Figure 23**). Ensuite, entre  $5 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$  cellules par échantillon ont été collectées, ce qui permet d'obtenir un minimum de 200 cellules souches CD34+ et 500 CD123+ pDC, les 2 populations cellulaires les moins représentées dans un échantillon de sang normal. Les agrégats de 2 cellules, ou doublons, sont exclus de l'analyse en utilisant la mesure de la surface et la mesure de la hauteur du paramètre de taille relative (Forward Scatter) des cellules. Les cellules mortes sont exclues de l'analyse par leur identification positive au marqueur des amines. Les sous-populations de lymphocytes, monocytes et DC sont identifiées par le cytogramme FSC et SSC, par leur absence d'expression de certains marqueurs (sélection négative) et par l'expression positive de leurs marqueurs respectifs. Enfin, du fait du nombre très important d'informations numériques générées par un échantillon marqué par 12 anticorps, un logiciel d'analyse des données est absolument indispensable pour visualiser les nombreuses sous-populations identifiées. Le logiciel utilisé pour cette étude est FlowJo 8.7.1 (Treestar, Ashland, OR) et l'analyse informatique a été faite sur un ordinateur Macintosh.

## **VI - Pourcentages et nombres absolus des sous-populations de lymphocytes, monocytes et DC :**

Les nombres absolus dans le sang périphérique des populations de lymphocytes, de monocytes et de cellules dendritiques ont été calculés en multipliant le nombre total des globules blancs déterminé par un analyseur automatique d'hématologie, avec le pourcentage total de chaque population de cellules identifiées par cytométrie en flux, de l'ensemble de l'échantillon de sang.

## **PUBLICATIONS / RÉSULTATS**

## PUBLICATIONS / RÉSULTATS

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont conduit à la publication de deux articles dans des revues scientifiques internationales. Le premier article, publié dans le journal « **Cytometry Part A** » en Mai 2010, a porté sur la mise au point et l'évaluation d'un panel multicolore de cytométrie en flux afin d'étudier simultanément les lymphocytes, les monocytes et les cellules dendritiques chez l'humain. Le deuxième article, publié dans le journal « **Journal of Immunological Methods** » en Août 2010 a porté sur l'immunophénotypage des lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques chez le macaque rhésus, par un unique panel multicolore de cytométrie en flux. Cet article a permis en particulier de clarifier le phénotypage des sous-populations de cellules dendritiques. Ces articles et les résultats obtenus vous sont présentés dans les deux chapitres suivants.

### I – Article « **Cytometry Part A** » 2010

**Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, Kenneth C. Williams. (2010). "Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans". *Cytometry A*, May, 77(5): 410-9.

## Résumé :

Le suivi des changements dans les populations de cellules immunitaires chez l'homme tels que lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques (DC) au cours de maladies infectieuses comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est crucial. Cependant, des difficultés à identifier des populations cellulaires rares ou hétérogènes peuvent être limitantes. Par exemple, pour mesurer avec précision les sous-populations de cellules dendritiques, huit paramètres de cytométrie en flux sont nécessaires. L'objectif de ce travail est d'analyser chez l'humain le phénotype des sous-populations de lymphocytes, de monocytes et de cellules dendritiques en utilisant un seul panel 12-couleurs de cytométrie en flux. Après la lyse des érythrocytes, le sang de donneurs sains a été lavé et marqué avec un cocktail de 12 anticorps. Les échantillons ont été analysés sur un FACSAria Becton-Dickinson équipé de trois lasers. Les données ont été comparées avec trois panels spécifiques à chaque lignée en utilisant 5-8 combinaisons d'anticorps par lignée. Les données acquises ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo. Notre panel de 12 couleurs permet l'identification des sous-populations de cellules circulantes suivantes dans un seul tube: les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les lymphocytes B, les cellules NK, les cellules NKT, les sous-populations de monocytes (exprimant CD14 et/ou CD16), et cinq populations indépendantes exprimant HLA-DR et négatif pour les lignées (CD3+CD14+CD20+CD56) : les cellules souches hématopoïétiques CD34+, les cellules dendritiques plasmacytoïdes CD123+, et trois sous-populations de cellules dendritiques myéloïdes CD11c+, exprimant soit CD16, CD1c (BDCA-1), ou CD141 (BDCA-3). Nous avons développé un seul panel de cytométrie en flux qui permet la détection simultanée

des populations de lymphocytes, monocytes et toutes les sous-populations connues de cellules dendritiques. L'étude de ces acteurs majeurs du système immunitaire dans un seul panel pourra nous donner une vision plus large de la réponse immunitaire au cours de l'infection par VIH et la capacité de mieux définir le rôle de chacune de ces population cellulaires individuelles dans la pathogenèse du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

## Evaluation of a 12-Color Flow Cytometry Panel to Study Lymphocyte, Monocyte, and Dendritic Cell Subsets in Humans

Patrick Autissier, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, Kenneth C. Williams\*

Department of Biology, Boston College,  
Chestnut Hill, Massachusetts 02467

Received 24 September 2009; Revision  
Received 17 November 2009; Accepted 21  
December 2009

Additional Supporting Information may be  
found in the online version of this article.

Grant sponsor: USA National Institutes of  
Health; Grant numbers: R01NS37654,  
R01NS40237.

\*Correspondence to: Kenneth C.  
Williams, Department of Biology, Boston  
College, Higgins Hall 445B, Chestnut Hill,  
MA 02467, USA

Email: kenneth.williams.3@bc.edu

Published online 22 January 2010 in Wiley  
InterScience (www.interscience.  
wiley.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.20859

© 2010 International Society for  
Advancement of Cytometry

### • Abstract

Monitoring changes in human immune cell populations such as lymphocytes, monocytes, and dendritic cells (DCs) during infectious diseases like human immunodeficiency virus (HIV) is crucial. However, difficulties to identify rare or heterogeneous cell populations can be limiting. For example, to accurately measure DC subsets, eight flow cytometry parameters are ideal. The aim of this work was to analyze the phenotype of human lymphocyte, monocyte, and DC subsets using a single 12-color flow cytometry panel. After erythrocyte lysis, blood from healthy human volunteers was washed and labeled with a cocktail of 12 antibodies. Samples were analyzed on a Becton-Dickinson FACSAria™ equipped with three lasers. Data were compared with lineage-specific panels using 5–8 Ab combinations per lineage. Acquired data were analyzed using FlowJo software. Our 12-color panel allows for the identification of the following major subsets of circulating cells in a single tube: CD4+ and CD8+ T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, NKT cells, monocyte subsets (CD14 and/or CD16), and five nonoverlapping HLA-DR+ Lin– subsets: CD34+ hematopoietic stem cells, CD123+ plasmacytoid DC, and three subsets of CD11c+ myeloid DC expressing either CD16, CD1c (BDCA-1), or CD141 (BDCA-3). We have developed a single flow cytometry panel that allows for simultaneous detection of the lymphocyte and monocyte cell populations and all known DC subsets. Studying these major players of the immune system in one single panel may give us a broader view of the immune response during HIV infection and the ability to better define the role of individual cell types in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) pathogenesis. © 2010 International Society for Advancement of Cytometry

### • Key terms

polychromatic flow cytometry; lymphocyte; monocyte; dendritic cell; immunophenotyping

It is well established that many immune cell types play critical roles during human immunodeficiency virus (HIV) or simian immunodeficiency virus (SIV) infection in humans and monkeys, respectively, either as targets, viral reservoirs, or host defense (1,2). Helper CD4+ T lymphocytes, especially activated memory CD4+ T cells, are the main target of HIV and SIV (3). CD8+ T cells have been shown to play a critical role in controlling viremia (4). However, CD8+ T cells ultimately fail to stop infection (5). CD20+ B lymphocytes initially produce neutralizing antibodies against HIV and SIV, but likely because of rapid mutation, overtime the antibodies produced by B lymphocytes become less efficient at viral neutralization (6). Although the natural killer (NK) cells' precise role in HIV infection is unclear, it appears that following infection, they have a decreased ability to kill virus-infected target cells and interact with other cellular components of the adaptive immune system, including dendritic cells (DCs) (7). NK T cells (NKT) are a rare population that is selectively depleted with HIV infection (8). Monocytes/macrophages are considered to be one of the main viral reservoirs (9). In addition, HIV- and SIV-infected bone

marrow-derived monocytes are “Trojan horse” cells that traffic to the central nervous system (CNS) and bring virus into the brain (10). Circulating myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC) are depleted during HIV and SIV infection (11). Finally, a decrease of the pool of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells from the bone marrow may limit T-cell generation (12). Thus, it becomes critical to precisely identify these cell subsets in clinical viral studies for a broader view of their role in HIV immunopathogenesis.

Today, one of the most powerful tools for immunophenotypic study of the immune system is polychromatic flow cytometry (13,14). Over the last decade, our knowledge of the immune system has greatly increased, partly due to the development of flow cytometry (15). Cell populations that were considered to be homogenous in the past, appear more complex now. The identification of specialized lymphocyte subsets such as naïve, memory, or cytotoxic T lymphocytes or monocyte subsets has considerably helped our understanding of immunopathogenesis during HIV and SIV infection (16). Moreover, the polychromatic flow cytometry technique has become increasingly useful in identifying rare subsets of cells such as DC, where a minimum of eight fluorescent parameters, in addition to the physical parameters [forward scatter (FSC) and side scatter (SSC)], are ideal to distinguish five nonoverlapping DC subsets simultaneously (17,18).

Despite access to commercially available flow cytometers that can measure up to 12 colors without significant modifications, a limited number of laboratories are routinely using such instruments. Although developing a reliable multicolor panel is time consuming and requires a number of validation trials, compared to 2 to 4-color assays, the amount of information provided by such a panel will aid in our understanding of the immune system, potentially defining cell subsets that might otherwise be missed (19,20). In addition, using a multicolor flow cytometry panel can decrease the amount of blood needed for immunophenotyping, which is often limited especially during longitudinal studies. Until recently, most research laboratories were measuring populations of lymphocytes, monocytes, and DC using separate antibody panels in individual tubes, mainly because of technical limitations. With advances of the flow cytometry technology, scientists are now able to measure up to 17 colors in one single panel (21). Using this panel, we characterized T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, NKT cells, monocyte subsets, and DC subsets.

## MATERIAL AND METHODS

### Subjects

Peripheral venous blood was obtained from nine healthy adult volunteers and collected in tubes containing anticoagulant EDTA. A properly executed, written, and IRB-approved informed consent was obtained from each volunteer before blood collection.

### Instrumentation

A Becton Dickinson FACSAria™ cytometer with three lasers (BD Biosciences, San Jose, CA) was used for the study.

Our instrument has been optimized to measure up to 12 fluorescent parameters (Fig. 1). The blue laser can independently excite six fluorochromes [FITC, PE, Texas Red-PE (ECD), Cy5-PE, Cy5.5-PerCP, and Cy7-PE], the red laser can excite three fluorochromes (APC, Alexa Fluor 700, and Cy7-APC), and the violet laser can excite three fluorochromes (Pacific Blue, AmCyan, and QDot 655; Fig. 1).

### Antibodies Used for Flow Cytometry

Our ultimate goal was the development of a 12-color flow cytometry panel. To determine the accuracy of this panel, we compared this panel to smaller panels of select lineages, including lymphocytes (six colors), monocytes (five colors), and DCs (eight colors). For the 12-color flow cytometry panel and the lineage-specific panels, the following monoclonal antibodies were used: CD16-FITC (clone 3G8), CD141-PE (clone 1A4), CD11c-Cy5-PE (clone B-Ly6), CD123-Cy5.5-PerCP (clone 7G3), CD20-Cy7-PE or CD20-Cy7-APC (clone B27), CD56-Cy7-PE (clone B159), CD3-Alexa Fluor 700 or CD3-Cy7-PE (clone SP34-2), HLA-DR-Cy7-APC (clone L243), CD14-Pacific Blue or CD14-Cy7-PE (clone M5E2), CD4-AmCyan (clone SK3) (all from BD Pharmingen, San Jose, CA); CD34-ECD (clone 581, Beckman Coulter, Miami, FL); CD1c-APC (clone AD5-8E7, Miltenyi Biotec, Auburn, CA); and CD8-QD655 (clone 3B5, Invitrogen, Carlsbad, CA). All antibodies were titrated to determine optimal concentrations. Antibody-capture beads (CompBeads, BD Biosciences) were used for single-color compensation controls for each reagent used in the study, with the exception of CD3-Alexa Fluor 700 that does not bind anti-mIgGκ CompBeads. In this case, cells were stained with CD3-Alexa Fluor 700. Gating controls were determined using fluorescence minus one (FMO) controls for CD1c, CD14, CD16 where all antibodies are used except one (22,23) (Supporting Information Figs. 1 and 2). A description of the different panels and the compensation matrix are shown in the Table. 1.

### Blood Samples and Staining Protocol

Erythrocytes within 100  $\mu$ l of whole blood were lysed using a cell lyse preparation workstation (TQ-Prep instrument, Beckman Coulter). We routinely use two tubes of 100  $\mu$ l of whole blood, to ensure we have enough DC for each data point. For studies strictly focusing on DC, larger volumes of blood are required. For lymphocyte and monocyte staining, we used only 100  $\mu$ l of whole blood and followed the same protocol. Erythrocyte lysis was performed before the staining to avoid a reduction in fluorescence of CD16 on cells because of endogenous Fc $\gamma$  RIII-IgG in the plasma that can potentially bind to the CD16 antibody (24). After lysis, samples from both tubes were pooled, washed with 3 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 2% fetal bovine serum (FBS), and then incubated with a premixed antibody cocktail for 15 min at room temperature. Stained cells were washed with 3 ml of PBS containing 2% FBS and fixed with freshly made 1% paraformaldehyde (PFA).



**Table 1.** Panel description (A) and compensation matrix (B)

(A) PANEL DESCRIPTION												
PANEL	FITC	PE	TEXAS RED-PE	CY5-PE	CY5.5- PERCP	CY7-PE	APC	ALEXA 700	CY7-APC	PACIFIC BLUE	AMCYAN	QDOT655
12-Colors	CD16	CD141	CD34	CD11c	CD123	CD20+ CD56	CD1c	CD3	HLA-DR	CD14	CD4	CD8
Lymphocyte	CD16	–	–	–	–	CD56	–	CD3	CD20	–	CD4	CD8
Monocyte	CD16	–	–	–	–	CD20	–	CD3	HLA-DR	CD14	–	–
DC	CD16	CD141	CD34	CD11c	CD123	CD3+ CD14+ CD20+ CD56	CD1c	–	HLA-DR	–	–	–
(B) COMPENSATION MATRIX												
	FITC	PE	TEXAS RED-PE	CY5-PE	CY5.5- PERCP	CY7-PE	APC	ALEXA 700	CY7-APC	PACIFIC BLUE	AMCYAN	QDOT 655
FITC		19.67	16.76	5.18	2.14	0.41	0	0	0	0	2.78	0.20
PE	0.69		88.63	30.55	13.66	2.29	0.11	0	0	0	0.1	2.04
Texas Red-PE	0.08	4.32		42.32	24.77	5.26	1.09	0.59	0.09	0	0	2.74
Cy5-PE	0	0.85	1.05		80.78	19.63	74.13	47.02	8.66	0	0	4.98
Cy5.5-PerCP	0	0	0	26.14		29.51	5.23	49.58	10.41	0.39	0.13	11.62
Cy7-PE	0.06	3.46	3.07	1.16	1.24		0.08	0.07	4.94	0	0	0.05
APC	0	0	0	0.74	0.31	0.07		28.8	6.29	0	0	1.95
Alexa 700	0.05	0	0.07	0.07	2.08	0.88	0.73		32.54	0	0	0.06
Cy7-APC	0	0	0	0.13	0.06	1.96	14.03	5.13		0	0	0.26
Pacific Blue	0	0	0	0	0	0	0	0	0		11.94	0.43
AmCyan	56.21	8.36	6.59	1.13	0.85	0.57	0.10	-0.53	0.75	10.27		3.20
QDot 655	0	0	4.08	77.4	4.95	0.08	53.12	2.67	0	0	0	

Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; Cy5, Cyanine-5; Cy5.5-PerCP, Cyanine-5.5-peridin-chlorophyll; APC, allophycocyanin; QDot, Quantum dot.

Compensation matrix obtained by staining Antibody-capture beads Compbeads with each of the mAbs used in the panel, with the exception of Alexa 700-anti-CD3 used on cells. Spectral overlap or spillover between fluorochromes was calculated using flowJo software 8.7.1.

compared with a six-color lymphocyte panel using CD8-QD655 and CD4-AmCyan (data not shown) (25). Very low percentages of double positive CD4+CD8+ are normally found in humans (26). We note that the CD4-AmCyan results in a reasonable separation of CD4+ T lymphocytes in normal blood, but may present a problem if CD4 is significantly down-regulated in specimens from samples of patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). For such studies, other CD4 conjugates may be preferable. Finally, for efficiency we used together in one channel anti-CD20 and anti-CD56 antibodies, both Cy7-PE, as their target cells (B cells and NK cells, respectively) can be identified using HLA-DR, which is expressed on B cells and not NK cells. Thus, our final panel is described in Table 1.

#### Phenotypic Analysis of Lymphocyte Populations

To identify lymphocyte populations, we first gated on cells based on FSC and SSC properties (Fig. 2A). We excluded monocytes based on CD14 expression (Fig. 2B). From this gate, CD3+CD16– T lymphocytes (median: 60.6%, range: 48.7–77.1%,  $n = 9$ ) were selected (Fig. 2C) and further divided into CD4+CD8– (median: 35.46%, range: 26.15–

48.26%,  $n = 9$ ), CD4–CD8+ (median: 21.13%, range: 12.38%–77.1%,  $n = 9$ ), CD4+CD8+ (median: 0.48%, range: 0.18%–0.75%,  $n = 9$ ), and CD4–CD8– (likely gamma delta T cells) (median: 3.51%, range: 1.02–7.12%,  $n = 9$ ) lymphocytes (Fig. 2D). In addition, using an anti-CD16 antibody we can identify CD3+CD16+ NKT cells (median: 2.35%, range: 0.26–4.42%,  $n = 9$ ) (Fig. 2C) as well as CD3–CD16+ cells. Within the CD3–CD16+ cells, we can identify a major NK population (median: 14.42%, range: 5.08–33.37%,  $n = 9$ ) that does not express HLA-DR (Fig. 2E) as well as a small population expressing HLA-DR (CD3–CD16+HLA-DR+) but not CD56 (data not shown), which might be a myeloid DC subset (17). CD3–CD16– cells (Fig. 2C) were further divided into HLA-DR+CD20+ B cells (median: 13.15%, range: 6.36–16.51%,  $n = 9$ ) (Fig. 2F) and CD56+ NK cells (median: 0.39%, range: 0.23–0.85%,  $n = 9$ ) (Fig. 2F). HLA-DR+CD20+ B cells can be further divided into CD1c+ resting (median: 3.3%, range: 1.23–5.48%,  $n = 9$ ) and CD1c– activated (median: 9.83%, range: 5.13–13.03%,  $n = 9$ ) B cells (Fig. 2G). Finally, the CD20–CD56– cells (Fig. 2F) represent the overall contamination of nonlymphocyte cells within the lymphocyte gate and are usually <5% of the total lymphocyte

**Table 2.** Percentages and absolute cell numbers of lymphocyte, monocyte and DC subsets

	PERCENTAGE		ABSOLUTE COUNT (CELLS/ $\mu$ L)	
	MEDIAN	RANGE	MEDIAN	RANGE
Total Lymphocytes	44.30	40.70–59.50	2379.5	1683.4–3068.5
T Cells				
CD3+	60.60	48.70–77.10	1514.5	1140.5–1856.4
CD4+ CD8–	35.46	26.15–48.26	860.7	520.8–1173.2
CD4– CD8+	21.13	12.38–33.11	505.0	410.5–825.4
CD4+ CD8+	0.48	0.18–0.75	11.2	4.1–17.5
CD4– CD8–	3.51	1.02–7.12	131.4	98.2–178.1
B Cells				
CD20+	13.15	6.36–16.51	282.5	140.7–434.8
CD20+ CD1c–	9.83	5.13–13.03	219.2	107.9–308.7
CD20+ CD1c+	3.30	1.23–5.48	80.9	26.8–153.9
NK cells				
Total NK	15.41	6.84–35.17	432.7	115.1–823.6
CD16+ CD56dim	14.42	5.08–33.37	405.1	85.5–781.5
CD16– CD56+	0.39	0.23–0.85	8.7	5.6–14.1
NKT cells				
CD3+ CD16+	2.35	0.26–4.42	54.1	6.5–124.1
Monocytes				
HLA–DR+	9.28	6.04–11.56	455.7	309.5–604.6
CD14+ CD16–	8.11	7.83–8.54	402.9	263.2–552.6
CD14+ CD16+	0.62	0.18–0.75	24.8	12.03–37.8
CD14+/- CD16+	0.35	0.16–0.81	18.5	9.0–47.9
Dendritic Cells				
HLA–DR+/Lin–	1.16	0.63–1.46	60.3	35.4–82.7
pDC CD123+ CD11c–	0.27	0.12–0.35	15.3	3.7–19.2
mDC CD123– CD11c+	0.75	0.54–0.86	35.2	14.5–60.8
CD11+ CD16+	0.55	0.13–0.74	23.1	6.8–46.2
CD11c+ CD1c+	0.12	0.09–0.27	5.7	3.0–16.7
CD11c+ CD141+	0.01	0.00–0.03	0.8	0.4–1.9
CD34+	0.03	0.01–0.06	1.3	0.9–3.4

Data were obtained from nine healthy adult donors (age range 21–48 years) by an automated hematology blood analyzer and FACS Aria flow cytometer. Median and range are reported.

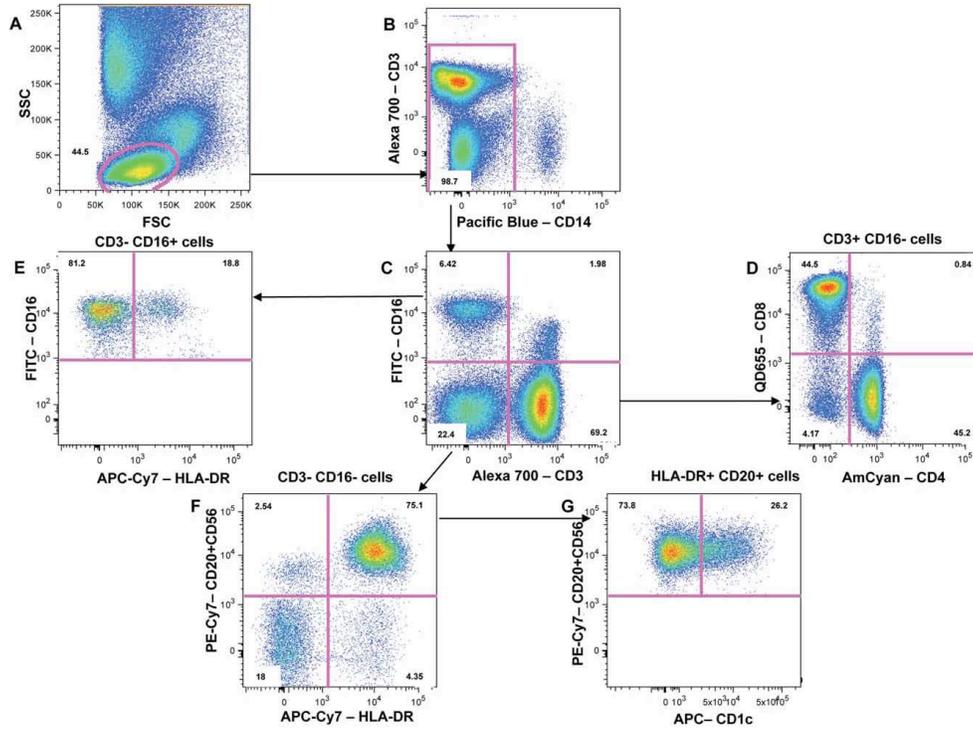
population. Of these, ~1% of the overall contamination are HLA-DR+ cells corresponding to DC. Four percent are HLA-DR– cells (Fig. 2), half of which are CD123+ basophilic granulocytes. The remaining 2% are not defined.

#### Phenotypic Analysis of Monocyte Populations

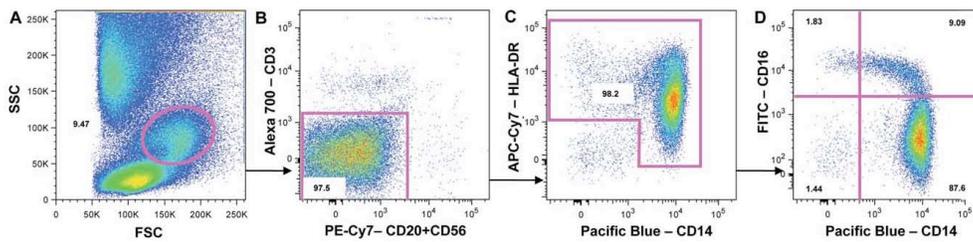
The monocyte populations were analyzed by first gating using FSC and SSC (Fig. 3A) and then excluding T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells, expressing CD3, CD20, and CD56, respectively (Fig. 3B). From the HLA-DR+ and CD14+ population (median: 9.28%, range: 6.04–11.56%,  $n = 9$ ) (Fig. 3C), three monocyte subsets were distinguished: CD14+CD16– classical monocytes (median: 8.11%, range: 7.83%–8.54%,  $n = 9$ ) and two subsets of activated monocytes: CD14+CD16+ (median: 0.62%, range: 0.18–0.75%,  $n = 9$ ) and CD14dimCD16+ (median: 0.35%, range: 0.16–0.81%,  $n = 9$ ) (Fig. 3D). Granulocytes that are HLA-DR– and CD14 dim are excluded from monocyte analysis, based on FSC vs. SSC and HLA-DR and CD14 expression (Fig. 3C).

#### Phenotypic Analysis of DC Populations

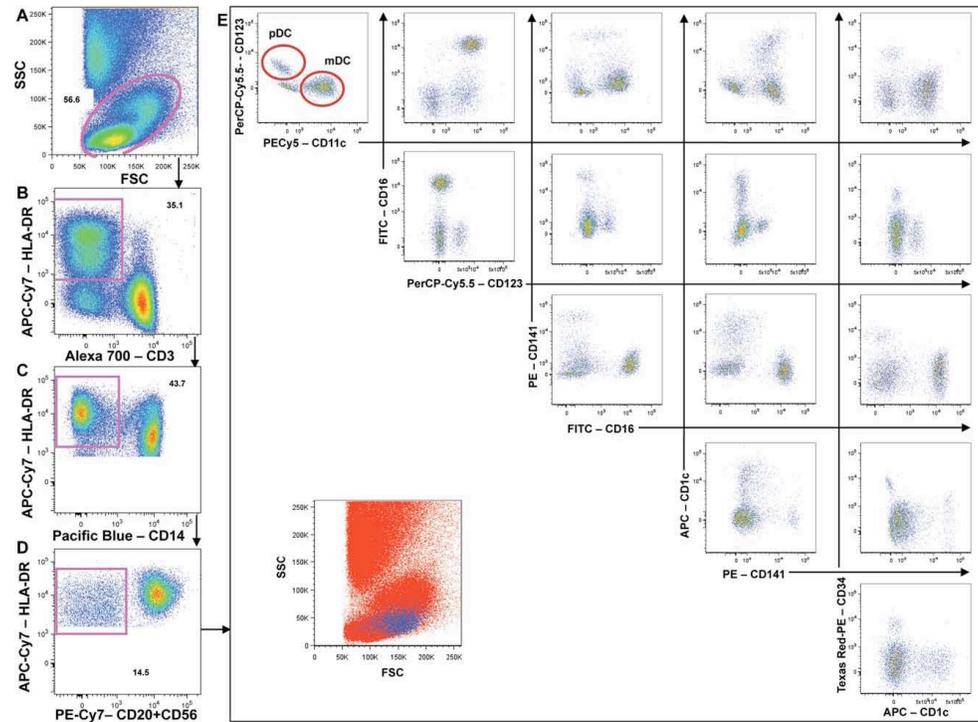
As DCs have an intermediate size that falls between that of monocytes and lymphocytes, the FSC vs. SSC gate included both populations (Fig. 4A). DCs were gated as HLA-DR+ cells and lineage-negative (Lin–) cells by excluding CD3+ T lymphocytes and NK cells (Fig. 4B), CD14+ monocytes (Fig. 4C), and then CD20+ B lymphocytes and CD56+ NK cells (Fig. 4D). HLA-DR+Lin– cells (median: 1.16%, range: 0.63–1.46%,  $n = 9$ ) were further divided into CD123+CD11c– plasmacytoid DC cells (pDC, median: 0.27%, range: 0.12–0.35%,  $n = 9$ ) and CD123–CD11c+ myeloid DC cells (mDC, median: 0.75%, range: 0.54–0.86%,  $n = 9$ ) (Fig. 4E). Consistent with previous publications (18), we distinguished three nonoverlapping subsets of CD11c+ mDC expressing CD16 (median: 0.55%, range: 0.13–0.74%,  $n = 9$ ), CD1c (BDCA-1; median: 0.12%, range: 0.09–0.48%,  $n = 9$ ), or CD141 (BDCA-3; median: 0.01%, range: 0–0.03%,  $n = 9$ ) (Fig. 4E). Finally, CD34+ hematopoietic stem cells (median: 0.03%, range: 0.01–0.06%,  $n = 9$ ) were identified within CD123– CD11c–



**Figure 2.** Flow cytometry analysis of lymphocyte populations from whole blood. First, lymphocytes were gated based on FSC and SSC (A), followed by CD14<sup>+</sup> monocyte exclusion (B). T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>), and NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) populations were identified using CD3 and CD16 (C). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were distinguished within the CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (D). CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> NK cells and a CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> mDC subset were distinguished within the CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> population (E). CD56<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> NK cells and CD20<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> B cells are distinguished within CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup> cells (F). Gating on CD20<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> B cells are distinguished based on CD1c expression (G). Results presented here are from one donor and are representative of nine donors. Numbers are percentages of each population within the same dotplot.



**Figure 3.** Flow cytometry analysis of monocytes. First, monocytes were gated based on FSC and SSC (A). CD3<sup>+</sup> T cells, CD20<sup>+</sup> B cells, and CD56<sup>+</sup> NK cells were excluded (B). HLA-DR<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells were selected (C) and three monocyte subsets were gated based on expression of CD14 and/or CD16. These include the classical monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) and activated monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) (D). Granulocytes that are HLA-DR<sup>-</sup> and CD14<sup>dim</sup> are excluded from monocyte analysis, based on FSC vs. SSC and HLA-DR and CD14 expression (Fig. 3C). Results presented here are from one donor and are representative of nine donors. Numbers are percentages of each population within the same dotplot.



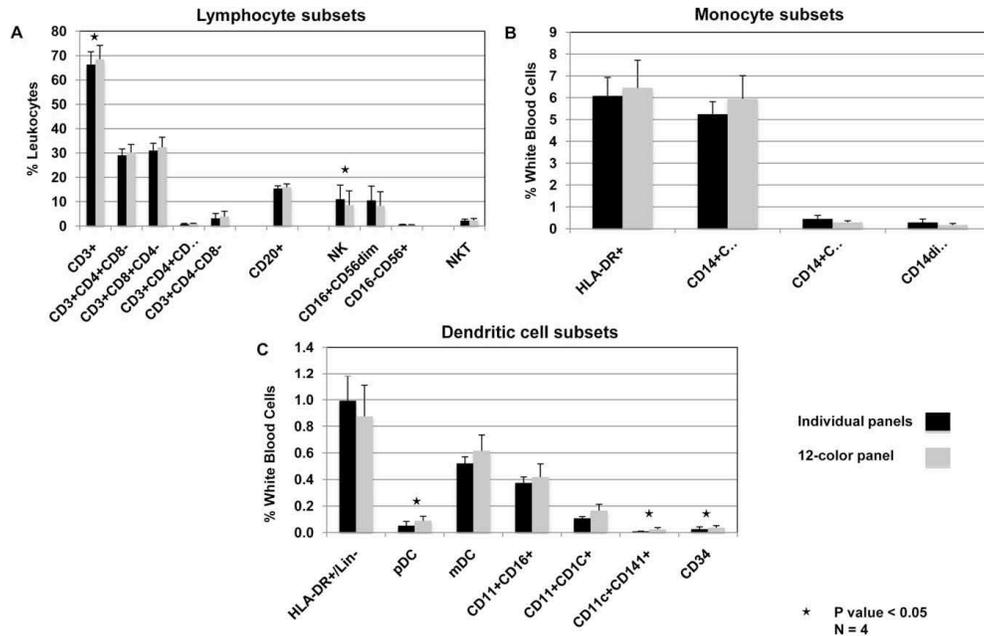
**Figure 4.** Flow cytometry analysis of dendritic cells. DCs were gated based on FSC and SSC including both lymphocytes and monocytes (A). HLA-DR+ cells were gated and Lin- cells (i.e., CD3+ T lymphocytes, CD14+ monocytes, CD20+ B lymphocytes, and CD56+ NK cells) were excluded (B, C, D). In agreement with the literature, five nonoverlapping Lin- HLA-DR+ cell subsets are shown in (E) and are distinguished based on CD123, CD1c, CD16, CD141, and CD34 expression. Results presented here are from one donor and are representative of nine donors. Numbers are percentages of each population within the same dotplot.

cells. For flow cytometric analysis focusing solely on DC, analysis of >500 cells per subset is ideal. This would require more than 200  $\mu$ l of whole blood that we used in the current study.

#### Individual Lineage-Specific Panels Versus 12-Color Panel

To further validate the 12-color flow cytometry panel, we compared data obtained using three flow cytometry panels, each specific for each single population, lymphocytes, monocytes, and DCs, with our multicolor flow panel. The different panels are described in Table 1. Comparing the two panels (Fig. 5A), we noticed that within the leukocyte population the percentage of CD3+ T lymphocytes were lower when using the lymphocyte panel compared to the 12-color panel (percent change: 3.2%,  $P = 0.02$ ). This difference is probably due to monocyte contamination in the lymphocyte gate on the FSC vs. SSC that we can measure consistently with the 12-color panel (Fig. 2). We also found a statistical difference in the total NK population, with a higher percentage of CD16+CD56dim NK cells using the lymphocyte panel when compared with the

12-color panel (percent change: 28.7%,  $P = 0.006$ ). This difference is likely due to the CD16+ mDC that express HLA-DR as opposed to the CD16+ NK cells that do not express HLA-DR (Fig. 2). No statistical differences were measured on the monocyte subsets using either panel (Fig. 5B). Although DC subsets are usually very rare populations and difficult to precisely identify, we were able to consistently measure higher percentages of all five previously defined subsets, when using a 12-color panel as compared with a specific DC panel (Fig. 5C). Statistical differences were measured on the pDC (percent change: 42%,  $P = 0.04$ ), CD141+ mDC (percent change: 64%,  $P = 0.04$ ), and CD34+ cells (percent change: 31%,  $P = 0.01$ ) subsets. When comparing a phenotypic analysis of DC subsets using the two panels, we found that it is difficult to gate HLA-DR+Lin- cells when all the exclusion markers are in the same channel (Fig. 6A). Therefore, the percentage of CD11c-CD123- cells, most likely contaminating cells (that also contains CD34+ cells), is important (Fig. 6A, red circles, ~40.0%). However, when using exclusion markers in specific channels as demonstrated in the 12-color panel, the



**Figure 5.** Comparison between individual lineage-specific panels and 12-color panel. (A) lymphocyte subsets, (B) monocyte subsets, and (C) DC subsets. Individual lineage-specific panels and a 12-color panel are described in Table 1. Percentage median and intra quartile range were calculated for each subset ( $n = 4$ ). Statistical significance was determined by using two-tailed, paired Students' *t*-test, where  $*P < 0.05$ .

gating strategy is clear and leads to less contamination and more precise data (Fig. 6B, red circles, ~12.0%).

#### Absolute Cell Numbers of Lymphocyte, Monocyte, and DC Subsets by a Single 12-Color Flow Cytometry Assay

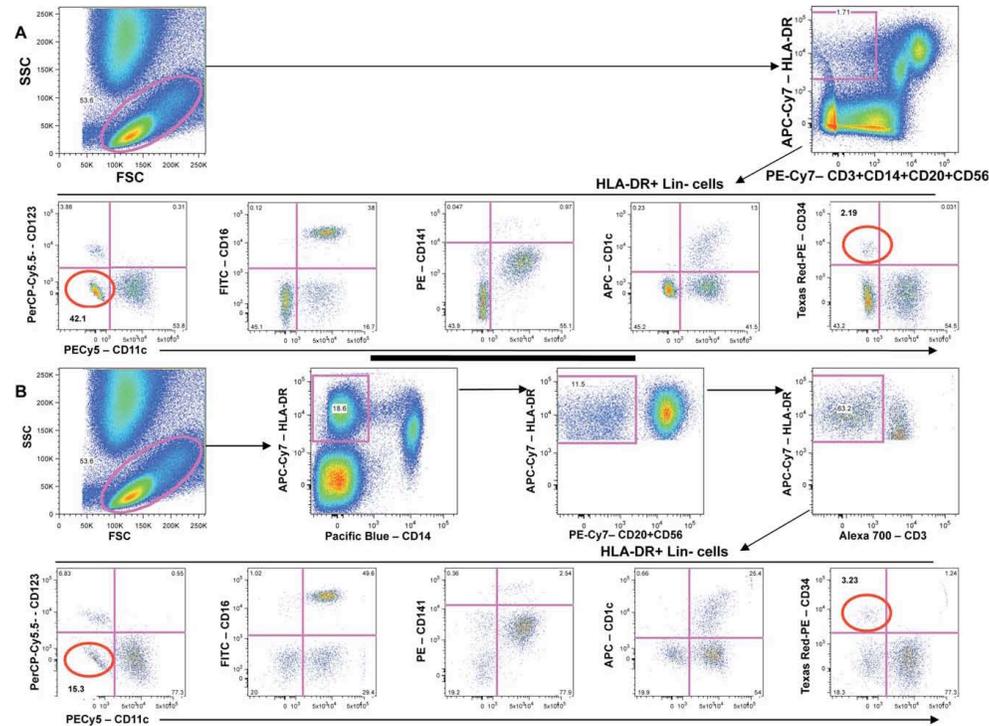
Using the gating strategy previously described, we find a normal distribution of lymphocyte, monocyte, and DC subsets in humans that are in agreement with data obtained using three flow cytometry panels specific for each population. Percentages and absolute numbers of lymphocytes, monocytes, and DC subsets are shown in Table 2.

#### DISCUSSION

In this study, we developed a 12-color flow cytometry panel for human specimens, capable of characterizing and measuring precisely major lymphocyte, monocyte, and DC populations. To optimally study monocyte/macrophages and DCs in normal and HIV-infected individuals, a panel for simultaneous detection of all cell types is advantageous. In addition to such work, CD4+ and the CD8+ T lymphocyte cell subsets need to be monitored, as these lymphocyte populations change during AIDS development (21,27). Furthermore, a multicolor panel allows the simultaneous phenotypic

analysis of different cell types that express the same antigen. This leads to more accurate data and a better understanding of the immune responses during viral infection. For example, a "lymphocyte" panel used to analyze T and B lymphocytes usually comprises anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and anti-CD20 antibodies. However, by using this four-color panel only, one potentially excludes the NKT cells (CD3+CD16+), a unique population that has been recently thought to play a critical role in HIV infection (28).

The power of multiparameter flow cytometry lies in the ability to study rare subsets of cells like DCs. DCs are important professional antigen-presenting cells (29–32). DCs comprise <1% of total leukocytes and are heterogeneous, thus requiring multiparameter flow cytometry to correctly identify the DC subsets. Classically, DCs have been defined as two main subsets: Lin–HLA-DR+ CD11c+ CD123– mDC and the Lin–HLA-DR+ CD11c– CD123+ pDC (30,32–34). More recently, MacDonald et al. distinguished five cell subsets within Lin–HLA-DR+ cells: Lin–HLA-DR+ CD123+ pDC, CD34+ hematopoietic stem cells, and three subsets of CD11c+ mDCs expressing CD16, CD1c (BDCA-1), or CD141 (BDCA-3) similar to what we describe here (18). However, the authors had to use a cell purification technique to remove all the unwanted cells, prior to the staining. Another technique to



**Figure 6.** Comparison of single channel vs. multichannels for exclusion markers for DC gating. **(A)** Flow cytometry analysis of DC subsets using an individual lineage-specific panel with exclusion markers in the same channel. **(B)** Flow cytometry analysis of DC subsets using a 12-color panel with exclusion markers in different channels. Results presented here are from one donor and are representative of four donors. Numbers are percentages of each population within the same dotplot. The contaminating cells within the HLA-DR+ Lin(CD3+CD14+CD20+CD56) – population equals the % of CD123 – CD11c – minus the % of CD34+ cells (CD123 – CD11c –) (second row, single channel exclusion, 39.91% contamination; fourth row, multichannel exclusion, 12.07% contamination).

“remove” the unwanted cells from the analysis is the use of a lineage cocktail used as exclusion markers for DC (CD3, CD14, CD20, CD56). Often, these exclusion markers are all grouped in one single channel, referred to as a dump channel, and, thus, it is impossible to also identify lymphocyte and monocyte populations (35,36). With our 12-color panel, we used the exclusion markers in different fluorescent channels, and thus were also able to assess the major lymphocytic populations (T, B, NK, and NKT cells) and monocyte subsets. Using a channel for “removing” all the unwanted cells and/or dead cells from the analysis is commonly employed. However, gating out these unwanted cells is difficult and there is usually no clear separation between the unwanted cells and the cells of interest. Furthermore, when the cells of interest are rare populations like DCs, it is important to clearly remove cells that can lead to contamination. With the availability of measuring more parameters on flow cytometers, it is now possible to use exclusion markers in individual channels and this should be used whenever possible.

Another important advantage of a multiparameter flow panel over four- or six-color flow panels is the decreased level of contamination among populations. An example of that is the NKT population that expresses CD3 and CD16. If the anti-CD16 antibody is not used in a “lymphocyte” flow cytometry panel, the entire NKT population can potentially “contaminate” the T lymphocyte population and results in an overestimation of the percentage of T cell subsets, as 50% of the NKT population express CD4 (8). Another example is a well-characterized, both phenotypically and functionally, CD11c+CD16+ mDC subset (17). The CD16 molecule is expressed on many cells such as NK cells, monocytes, macrophages, granulocytes, and DCs. It is virtually impossible to gate DCs only based on their size and granularity, as DC overlap with the lymphocyte and monocyte gates. Therefore, it is very easy to misidentify these cells as being NK cells, unless one includes HLA-DR or CD11c in the flow cytometry panel as we have done, or even CD4, as all DCs express low levels of CD4, in contrast to NK cells.

Finally, one last advantage of a 12-color flow cytometry panel is the ability to use small volumes of blood to monitor changes in the phenotyping of lymphocyte, monocyte, and DC subsets. During longitudinal studies, the volume of blood from patients can be limited. Using one flow cytometry panel with markers for all major blood cell populations is of interest and can save material for other analysis such as cell sorting or *in vitro* assays.

In summary, we show in this study that all the main players of the immune system, lymphocytes, monocytes, and DCs, can be precisely measured using a 12-color multiparameter flow cytometry approach. This assay is rapid, does not involve a cell isolation technique, and requires a minimum amount of blood. Moreover, this assay is precise with minimal contamination between populations. Most importantly, the 12-color panel is an important tool to study the interactions between different immune cell populations during HIV and potentially other diseases, and to better understand the vital role that DCs play in disease progression.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Cynthia Lubianez, Assistant Director of the Health Services Primary Care Center of Boston College and Anyeris Paulino, Nursing assistant, for help with the blood draw protocol.

#### LITERATURE CITED

- Williams KC, Bunde TH. HIV and SIV infection: The role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. *APMIS* 2009;117:400–412.
- Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2003;9:853–860.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005;434:1093–1097.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz E, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallan BJ, Chayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Lerin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Science* 1999;283:857–860.
- Zhang D, Shankar P, Xu Z, Harnisch B, Chen G, Lange C, Lee SJ, Valdez H, Lederman MM, Lieberman J. Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood* 2003;101:226–235.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307–312.
- Fauci AS, Mavilio D, Kottlilil S. NK cells in HIV infection: Paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* 2005;5:835–843.
- Motzinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 2002;195:869–879.
- Crowe SM. Macrophages and residual HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2006;1:129–133.
- Williams KC, Hickey WE. Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:537–562.
- Barratt-Boyes SM, Brown KN, Melhem N, Soloff AC, Gleason SM. Understanding and exploiting dendritic cells in human immunodeficiency virus infection using the nonhuman primate model. *Immunol Res* 2006;36:265–274.
- Thiebot H, Vasin B, Derdouch S, Bertho JM, Mouthon F, Prost S, Gras G, Ducouret F, Dormont D, Le Grand R. Impact of bone marrow hematopoiesis failure on T-cell generation during pathogenic simian immunodeficiency virus infection in macaques. *Blood* 2005;105:2403–2409.
- De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M. Beyond six colors: A new era in flow cytometry. *Nat Med* 2003;9:112–117.
- Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 2000;243:77–97.
- Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA. Modern flow cytometry: A practical approach. *Clin Lab Med* 2007;27:453–468, v.
- De Rosa SC. Multicolor immunophenotyping: Human mature immune system. *Methods Cell Biol* 2004;75:577–594.
- Ficcioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammiceli C, Bardelli M, Montagna D, Locatelli F, Wack A. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 2007;109:5371–5379.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100:4512–4520.
- Perfetto SE, Ambrozak D, Nguyen R, Chattopadhyay P, Roederer M. Quality assurance for polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc* 2006;1:1522–1530.
- Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med* 2007;27:469–485, v.
- Perfetto SE, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:648–655.
- Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 2001;45:194–205.
- Roederer M. Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2002;Chapter 1:Unit 1.14.
- Huizinga TW, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, von dem Borne AE. Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest* 1990;86:416–423.
- Chattopadhyay PK, Price DA, Harper TR, Betts MR, Yu J, Gostick E, Perfetto SE, Goepfert P, Koup RA, De Rosa SC, Bruchez MF, Roederer M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat Med* 2006;12:972–977.
- Nascimbene M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004;104:478–486.
- De Rosa SC, Roederer M. Eleven-color flow cytometry: A powerful tool for elucidation of the complex immune system. *Clin Lab Med* 2001;21:697–712.
- Li D, Xu XN. NKT cells in HIV-1 infection. *Cell Res* 2008;18:817–822.
- Banchereau J, Briere E, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Palendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
- Banchereau J, Pacesny S, Bianco P, Bennett L, Pascual V, Fay J, Palucka AK. Dendritic cells: Controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann NY Acad Sci* 2003;987:180–187.
- Klechevsky E, Kato H, Sponaas AM. Dendritic cells star in Vancouver. *J Exp Med* 2005;202:5–10.
- Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: A link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 1999;19:12–25.
- Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 2003;111:675–697.
- Vickovic S, Gardiner D, Field K, Chapman GV, Khalil D, Gill D, Markon P, Taylor K, Wright S, Pinzon-Charry A, Pyke CM, Rodwell R, Hockey RL, Gleason M, Tepes S, True D, Cotterill A, Hart DN. Monitoring dendritic cells in clinical practice using a new whole blood single-platform TruCOUNT assay. *J Immunol Methods* 2004;284:73–87.
- Della Bella S, Giannelli S, Taddeo A, Presicce P, Villa ML. Application of six-color flow cytometry for the assessment of dendritic cell responses in whole blood assays. *J Immunol Methods* 2008;339:153–164.
- Wang JC, Kobie JF, Zhang L, Cochran M, Mosmann TR, Ritchlin CT, Quataert SA. An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform. *J Immunol Methods* 2009;341:106–116.

## **II – Article « Journal Immunol Methods » 2010**

**Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia Burdo and Kenneth Williams. (2010).  
“Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cells subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: clarification on DC heterogeneity”. J. Immunol Methods, 360, 119-128.

### **Résumé :**

Le suivi des changements dans les populations de cellules immunitaires chez le singe rhésus au cours de maladies infectieuses est crucial. L'objectif de ce travail était d'analyser simultanément chez le singe rhésus le phénotype des sous-populations de lymphocytes, de monocytes et de cellules dendritiques en utilisant un seul panel 12-couleurs de cytométrie en flux. Le sang de singes rhésus normaux non infectés a été marqué par un cocktail de 12 anticorps. Les données ont été comparées à trois petits panels spécifiques à chaque lignée et les pourcentages et nombres absolus de cellules ont été comparés. Notre panel de 12 couleurs permet d'identifier les principales sous-populations suivantes : les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les lymphocytes B, les cellules NK, les cellules NKT, les sous-populations de monocytes (exprimant CD14 et/ou CD16), et quatre populations indépendantes exprimant HLA-DR et négatif pour les lignées (CD3+CD14+CD20) : les cellules souches hématopoïétiques CD34+, les cellules dendritiques plasmacytoïdes CD123+ CD11c-, et deux sous-populations de cellules dendritiques myéloïdes CD11c+ CD16+ et CD11c-/dim CD1c+. Le développement d'un panel multicolore de cytométrie en flux permettra l'énumération

simultanée des lymphocytes matures, des cellules NK, des monocytes et des sous-populations de cellules dendritiques. L'étude de ces acteurs majeurs du système immunitaire dans un seul panel pourra nous donner une vision plus large de la réponse immunitaire lors de l'infection par VIS et la capacité de mieux définir le rôle de chacune de ces population cellulaires individuelles dans la pathogenèse du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jim](http://www.elsevier.com/locate/jim)

Research paper

## Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification on DC heterogeneity

Patrick Autissier, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, Kenneth C. Williams\*

Department of Biology, Boston College, Higgins Hall 468, 140 Commonwealth Avenue, Chestnut Hill, MA 02467, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 May 2010

Received in revised form 15 June 2010

Accepted 21 June 2010

Available online xxxx

## Keywords:

Flow cytometry

Immune cells

Whole blood

Rhesus monkey

Dendritic cells

## ABSTRACT

Monitoring changes in rhesus macaque immune cell populations during infectious disease is crucial. The aim of this work was to simultaneously analyze the phenotype of rhesus macaque lymphocyte, monocyte and dendritic cell (DC) subsets using a single 12-color flow cytometry panel. Blood from healthy non-infected rhesus macaques was labeled with a cocktail of 12 antibodies. Data were compared to three smaller lineage specific panels and absolute and relative percentages of cells were compared. Our 12-color panel allows for the identification of the following major subsets: CD4+ and CD8+ T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer (NK) cells, natural killer T (NKT) cells, monocyte subsets and four non-overlapping Lin-HLA-DR+ cell subsets: CD34+ hematopoietic stem cells, CD11c- CD123+ plasmacytoid DC, CD11c+ CD16+ and CD11c<sup>dim</sup> CD1c+ myeloid DC. The development of a multiparameter flow cytometry panel will allow for simultaneous enumeration of mature lymphocyte, NK cells, monocyte and DC subsets. Studying these major players of the immune system in one panel may give us a broader view of the immune response during SIV infection and the ability to better define the role of each of these individual cell types in the pathogenesis of AIDS.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Non-human primates provide essential models for studying human infectious diseases such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), influenza and tuberculosis (Gardner and Luciw, 2008). The key to our understanding of the immunopathogenesis of diseases such as human immunodeficiency virus (HIV) and simian immunodeficiency virus (SIV) infection is the precise identification, quantification and analysis of immune cell subsets in SIV infected rhesus macaques. Multicolor flow cytometry is a powerful tool for this (Herzenberg et al., 2002; Tung et al., 2007). Many studies using flow cytometry have underscored the role of lymphocyte, monocyte and

dendritic cell (DC) subsets in SIV infection and pathogenesis of AIDS (DeMaria et al., 2000; Ibegbu et al., 2001; Pichyangkul et al., 2001; Pitcher et al., 2002; Mattapallil et al., 2004; Barratt-Boyes et al., 2006; Kim et al., 2009; Williams and Burdo, 2009).

Because of the relative genetic proximity between humans and monkeys, monoclonal anti-human antibodies (mAbs) can often recognize the simian counterpart of human antigens on monkey leukocytes (Reimann et al., 1994; Sopper et al., 1997). However, several key differences exist that can limit the use of anti-human antibodies in non-human primates (Carter et al., 1999; Webster and Johnson, 2005). These include expression of CD56 that is restricted to NK cells in humans, while it is primarily expressed on monocytes and mDC subset in monkeys (Carter et al., 1999; Brown and Barratt-Boyes, 2009). CD8 is expressed on B lymphocytes in rhesus monkeys but not in humans (Webster and Johnson, 2005).

Studies of DC in humans and monkeys are more complex not only because of issues with antibody cross-reactivity but

Abbreviations: DC, dendritic cells; NK, natural killer; NKT, natural killer T; mDC, myeloid DC; pDC, plasmacytoid DC; Lin, lineage; FMO, fluorescence minus one; CNS, central nervous system.

\* Corresponding author. Tel.: +1 617 552 1186; fax: +1 617 552 2011.

E-mail address: [kenneth.williams.3@bc.edu](mailto:kenneth.williams.3@bc.edu) (K.C. Williams).

0022-1759/\$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jim.2010.06.017

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.

also the nomenclature and subpopulation of these cells is evolving. DC represent less than 1% of total leukocytes and are a heterogeneous population (Palucka and Banchereau, 1999; Banchereau et al., 2000; Banchereau et al., 2003; Ju et al., 2010). Classically, human DC have been defined as two main subsets: Lin–HLA-DR+CD11c+CD123– mDC and Lin–HLA-DR+CD11c–CD123+ pDC (Palucka and Banchereau, 1999; Banchereau et al., 2003; Steinman, 2003). Human CD11c+ mDC heterogeneity in blood was illustrated by MacDonald et al. who distinguished five non-overlapping subsets within Lin–HLA-DR+ cells: CD11c–CD123+ pDC, CD11c–CD123–CD34+ hematopoietic stem cells, and three subsets of CD11c+ mDC expressing CD16, CD1c (BDCA-1) or CD141 (BDCA-3) (MacDonald et al., 2002). We have recently described a single 12-color human flow cytometry panel that distinguished these DC subsets, in addition to major lymphocyte and monocyte subsets (Autissier et al., 2010). Like their human counterparts, rhesus monkey DC subsets are usually defined as Lin–HLA-DR+CD11c+CD123– mDC, and Lin–HLA-DR+CD11c–CD123+ pDC (Coates et al., 2003; Brown et al., 2007; Brown and Barratt-Boyes, 2009).

Based on the single 12-color panel we developed to analyze human leukocytes, we designed a single 12-color flow cytometry panel to measure in rhesus monkey major lymphocyte, monocyte and DC populations (Autissier et al., 2010). Using this panel, we characterized T and B lymphocytes, NK cells, NKT cells, monocytes and four subsets of Lin–HLA-DR+ cells on normal non-infected rhesus macaques. In addition to the complete phenotypic characterization of major blood cell types, our 12-color panel pointed out phenotypic differences in DC subsets of rhesus macaques compared to humans, suggesting that more complete flow cytometry panels should be used in order to correctly study all known DC subsets in non-human primates.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

Venous blood was obtained from twelve healthy non-infected rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and collected in tubes containing anti-coagulant EDTA (Vacutainer, BD Biosciences). All animals were maintained in accordance with the guidelines of the Committee on Animals for the New England Primate Research Center (NEPRC) and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Bayne, 1996). Blood samples were processed within 2–4 h following collection.

### 2.2. Instrumentation

The optical configuration of the instrument has been previously described (Autissier et al., 2010). Briefly, a Becton Dickinson FACSAria™ cytometer with 3 lasers (BD Biosciences, San Jose, CA) was used for the study. The cytometer was optimized to measure up to 12 fluorescent parameters. The blue laser independently excites 6 fluorochromes (FITC, PE, Texas Red-PE (ECD), Cy5-PE, Cy5.5-PerCP, and Cy7-PE), the red laser can excite 3 fluorochromes (APC, Alexa Fluor 700 and Cy7-APC), and the violet laser can excite 3 fluorochromes (Pacific Blue, Aqua and QDot 655).

### 2.3. Antibodies used for the study

Our ultimate goal was the development of a 12-color flow cytometry panel to assess major lymphocyte, monocyte, NK cells and DC subsets. When developing a multicolor panel for monkeys, one has to test and choose the brightest antibody-fluorochrome combination available and further optimize the panel for maximum antigen detection (Mahnke and Roederer, 2007). In order to determine the accuracy of this panel, we compared it to smaller panels of select lineages already established in the laboratory, including lymphocytes (7 colors), monocytes (6 colors) and DC (9 colors). The following monoclonal antibodies were used: FITC-CD4 (clone L200), PE-CD34 (clone 563), Cy5-PE-CD16 (clone 3G8), Cy5.5-PerCP-CD123 (clone 7G3), Cy7-PE-CD20 or Cy7-APC-CD20 (clone L27), Cy7-PE-CD3 (clone SP34-2), Pacific Blue-CD14 or Cy7-PE-CD14 (clone M5E2) (all from BD Pharmingen, San Jose, CA); Alexa Fluor 700-CD11c (clone 3.9, eBiosciences, San Diego, CA), TxRed-PE-HLA-DR (clone Immu-357, Beckman Coulter, Miami, FL); APC-CD1c (clone AD5-8E7, Miltenyi Biotec, Auburn, CA); and QD655-CD8 (clone 3B5, Invitrogen, Carlsbad, CA). We also tested FITC-CD1c (clone AD5-8E7) and PE-CD141 (clone AD5-14H12) both from Miltenyi Biotec and PE-CD141 (BD, clone 1A4). Antibodies were titrated to determine optimal concentrations. Antibody-capture beads (CompBeads, BD Biosciences) were used for single-color compensation controls for each reagent used in the study. To exclude dead cells from the analysis, we used in our panel an amine reactive dye as a live/dead discrimination marker (Perfetto et al., 2006). Aqua Live/Dead kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used first to gate out dead cells. The final composition of the different panels used in this study is shown in the Table 1.

### 2.4. Blood samples and staining protocol

We routinely use two 100  $\mu$ l samples of whole blood in a separate tube, to ensure we have enough DC, although this can be scaled up if necessary. Erythrocytes in 100  $\mu$ l of whole blood were lysed using a cell lyse preparation workstation (TQ-Prep instrument, Beckman Coulter). Then, samples from two tubes, equivalent to 200  $\mu$ l of whole blood, were pooled, washed with 3 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 2% fetal bovine serum (FBS) and incubated with a pre-mixed antibody cocktail for 15 min at room temperature. After staining, cells were washed with 3 ml of PBS containing 2% FBS, and fixed with freshly prepared 1% paraformaldehyde (PFA).

### 2.5. Data acquisition and sample analysis

Samples were collected on a BD FACS Aria™ flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software 8.7.1 (Treestar, Ashland, OR) on a MAC® workstation. Instrument calibration was checked daily using rainbow fluorescent particles (BD Biosciences). After acquiring unstained and single-color control samples, calculating the compensation matrix, we collected between  $5 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  events per sample, which we determined was requested to allow for the collection of at least 200 CD34+ cells and 500 pDC. Doublets

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.

**Table 1**  
Flow cytometry panel description for rhesus monkey.

Panel	FITC	PE	TxRed-PE	Cy5-PE	Cy5.5-PerCP	Cy7-PE	APC	Alexa 700	Cyc7-APC	Pacific Blue	Aqua	QD655
12-colors	CD4	CD34	HLA-DR	CD16	CD123	CD3	CD1c	CD11c	CD20	CD14	Live/dead	CD8
Lymphocyte+ NK+NKT	CD4	-	-	CD16	-	CD3	-	-	CD20	CD14	Live/dead	CD8
Monocyte	-	-	HLA-DR	CD16	-	CD3	-	-	CD20	CD14	Live/dead	-
DC	-	CD34	HLA-DR	CD16	CD123	CD3+CD14+CD20	CD1c	CD11c	-	-	Live/dead	CD8

Abbreviation: FITC: fluorescein isothiocyanate, PE: phycoerythrin, Cy5: Cyanine-5, Cy5.5-PerCP: Cyanine-5.5-peridin-chlorophyll, APC: allophycocyanin, QD: quantum dot.

were excluded using forward scatter (FSC) area versus FSC height. Dead cells were excluded by staining with amine reactive dye. Lymphocyte, monocyte and DC subsets were identified based on FSC vs. SSC, negative selection and positive expression of their respective markers. Further gating adjustments were made based on fluorescence minus one (FMO) where all antibodies were present except the one of interest as previously described (Roederer, 2002; Autissier et al., 2010).

**2.6. Percentages and absolute numbers of lymphocyte, monocyte and DC subsets**

Absolute numbers of peripheral blood lymphocyte, monocyte and DC subsets were calculated by multiplying the total

white blood cell count (WBC), determined with an automated hematology analyzer, with the total percentage of each cell population as determined by flow cytometry from the whole blood sample (see Table 2).

**3. Results**

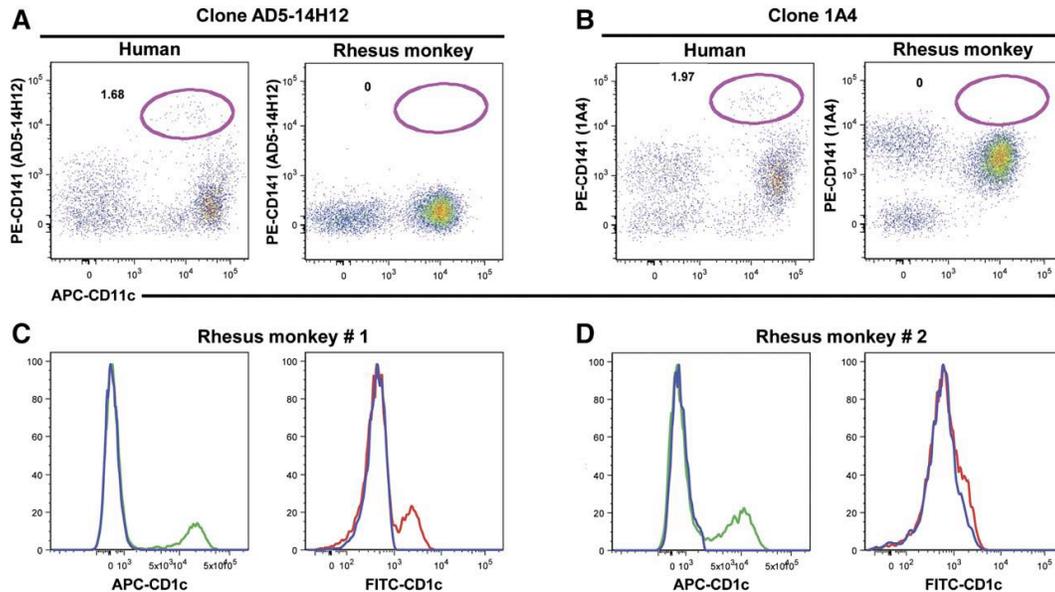
**3.1. Panel strategy and development**

The goal of this study was to design and develop a 12-color flow cytometry panel that would allow simultaneous analysis of the lymphocyte, monocyte and DC populations in rhesus macaques. Bandpass and dichroic filters used in this study have been previously described (Autissier et al., 2010). Taking

**Table 2**  
Percentages and absolute cell numbers of lymphocyte, monocyte and DC subsets. Data were obtained from 12 healthy adult rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) by an automated hematology blood analyzer and FACS Aria flow cytometer. Median and range are reported.

	Percentage		Absolute count (cells/ $\mu$ l)	
	Median	Range	Median	Range
Total lymphocytes	30.09	8.73–47.44	1747.4	890.1–2967.4
T cells				
CD3+	65.80	52.60–79.50	1083.6	468.2–1845.5
CD4+ CD8–	43.48	25.51–47.44	699.3	365.1–1128.5
CD4– CD8+	18.27	8.04–28.85	305.9	71.5–669.7
CD4+ CD8+	1.57	0.45–11.54	29.1	6.6–274.5
CD4– CD8–	3.10	1.27–3.93	50.5	23.2–116.6
B cells				
CD20+	25.77	7.78–41.18	363.7	185.0–950.1
CD20+ CD8–	22.74	5.06–36.11	321.5	118.8–945.1
CD20+ CD8+	2.33	0.13–6.27	39.3	1.9–97.0
CD20+ CD1c–	4.33	2.60–15.17	44.18	15.48–116.2
CD20+ CD1c+	21.44	10.53–23.29	125.05	29.28–305.0
NK cells				
Total NK	5.12	2.25–18.23	100.9	41.9–336.8
CD16+CD8+CD20–	4.10	1.47–16.19	74.4	31.2–290.9
CD16–CD8+CD20–	0.98	0.54–2.76	18.3	5.3–45.2
CD16–CD8+CD20dim	0.21	0.06–0.86	3.6	1.16–15.4
NKT cells				
CD3+ CD16+	0.08	0.03–0.25	1.8	0.2–4.2
Monocytes				
HLA-DR+	4.52	1.90–12.23	306.6	80.6–514.5
CD14+ CD16–	3.74	1.59–9.20	243.1	74.5–674.9
CD14+ CD16+	0.34	0.07–0.92	23.1	2.3–46.6
CD14 <sup>+/–</sup> CD16+	0.23	0.07–0.35	12.3	0.7–42.9
Dendritic cells				
HLA-DR+Lin–	1.34	0.30–2.89	70.8	17.9–143.6
pDC CD123+	0.03	0.00–0.08	1.8	0.5–5.3
Total mDC	0.96	0.23–2.29	54.5	10.2–126.9
mDC1 CD11c+ CD16+	0.61	0.06–2.17	38.1	4.2–108.3
mDC2 CD11c– CD1c+	0.25	0.07–0.53	17.0	3.7–37.4
CD34+	0.01	0.00–0.02	0.7	0.2–1.7

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.



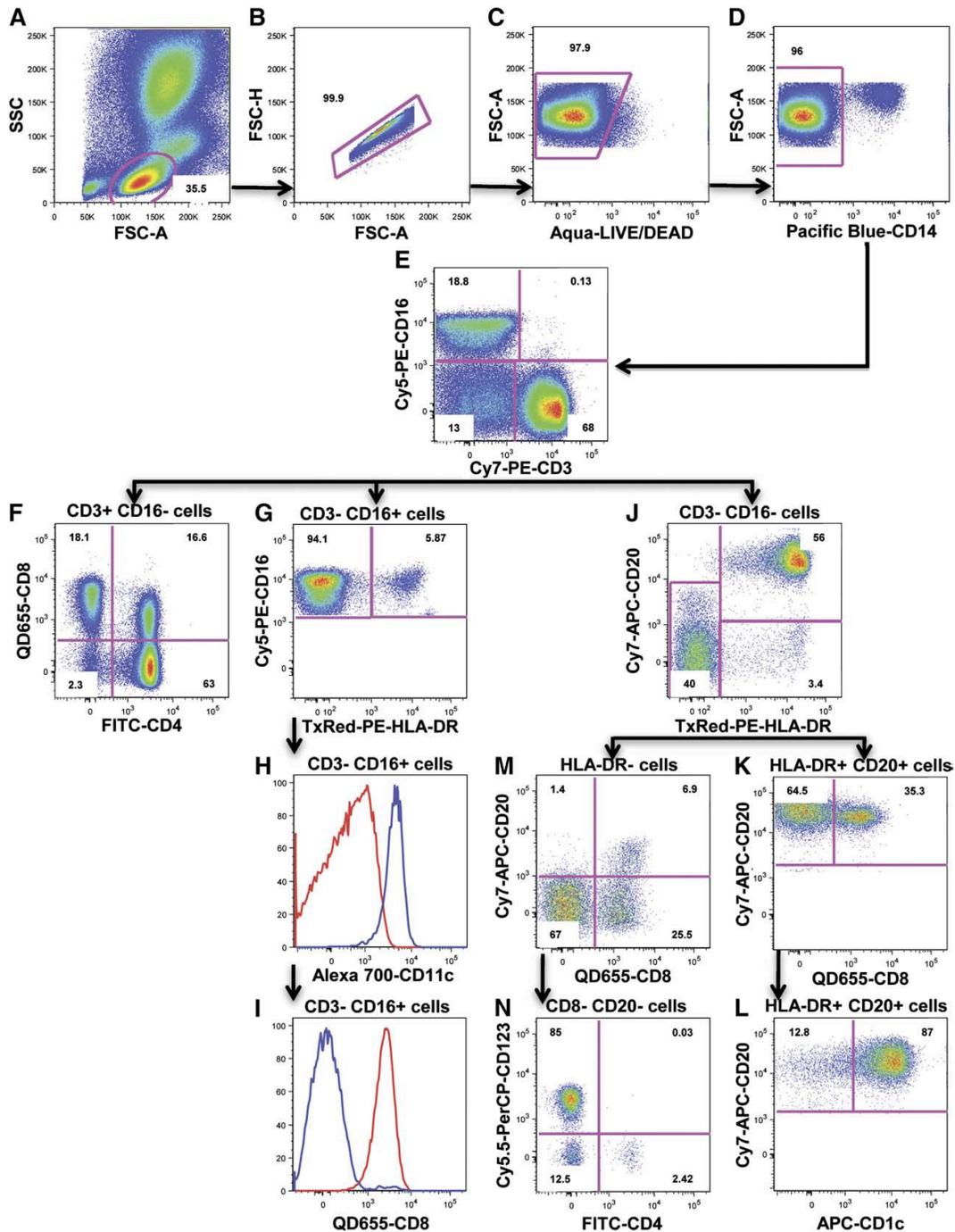
**Fig. 1.** Cross-reactivity assessment of anti-CD141 (A and B) and anti-CD1c (C and D) antibodies. Two different clones of anti-CD141 antibody, AD5-14H12 (Miltenyi Biotec) (A) and 1A4 (BD Biosciences) (B) were tested on whole blood from humans and rhesus monkeys. After gating on HLA-DR+Lin<sup>-</sup> cells [CD3+CD14+CD20+CD56 (human) or CD8 (monkey)], dotplot of CD11c versus CD141 are shown. Percentages of human CD141<sup>bright</sup>CD11c<sup>+</sup> mDC subset are comparable using either clone (A and B). In rhesus monkey, clone AD5-14H12 does not cross-react with monkey cells (A), whereas clone 1A4 cross-reacts but does not identify the CD141<sup>bright</sup> mDC subset described in human (B). Anti-CD1c antibody was tested in rhesus monkeys using either FITC- or APC-conjugate (Miltenyi Biotec). After gating on HLA-DR+Lin<sup>-</sup> cells (CD3+CD14+CD20+CD8), APC-CD1c (green histogram) shows strong staining whereas FITC-CD1c (red histogram) shows either weak staining (C) or no staining at all (D). Results presented here are from 2 different monkeys.

advantage that monoclonal antibodies directed against human antigens often cross-react to rhesus monkeys, our first approach was to start from a 12-color panel that we developed for human specimens (Autissier et al., 2010). Next we verified that optimal antibodies used in humans cross-reacted with rhesus macaques and their fluorescence signals were significantly robust to delineate cell types and subpopulations. The majority of antibody clones from our human panel cross-reacted to monkeys, with the exception of anti-CD141, CD11c and CD34 antibodies (Autissier et al., 2010). In humans, CD141 is expressed at a high level on a small CD11c<sup>+</sup> mDC subset (Dzionek et al., 2000). Two different clones of the anti-CD141 antibody were tested, AD5-14H12 (Miltenyi Biotec) and 1A4 (BD). As shown in Fig. 1A, we found that the clone AD5-14H12 did not cross-react with monkeys, as previously published by others (Coates et al., 2003). The clone 1A4 cross-reacted with monkeys but did not delineate the CD141<sup>bright</sup> mDC subset described in humans (Fig. 1B). Thus we removed the anti-CD141 antibody from our monkey panel. The Cy5-PE-anti-CD11c (BD, clone B-Ly6) and TxRed-PE-anti-CD34

(Beckman Coulter, clone 581) antibodies did not cross-react with rhesus monkeys and were substituted with Alexa 700-anti-CD11c (eBiosciences, clone 3.9) and PE-anti-CD34 (BD, clone 563) antibodies, respectively. Because anti-CD56 cross-reacts to monkey monocytes and mDC, we did not include the anti-CD56 antibody in the lineage panel, which includes antibodies against CD3, CD14 and CD20 (Brown and Barratt-Boyes, 2009). Next, we tested the anti-CD1c (clone AD5-8E7) antibody, conjugated to FITC or APC. The FITC-conjugated antibody showed variable immunoreactivity giving a very weak signal in one animal (Fig. 1C) or no signal in a second animal (Fig. 1D). By contrast, the APC-conjugated antibody always gave a consistent signal and was therefore chosen to be included in the 12-color panel. Finally, we tested antibodies against “primary” antigens (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD20 and HLA-DR) in all possible fluorochromes available (data not shown), selecting those with the maximum signal. The final 12-color flow cytometry panel, optimized for the detection of lymphocyte, monocyte and DC in rhesus monkeys is shown in Table 1.

**Fig. 2.** Flow cytometry analysis of lymphocyte populations. First, lymphocytes were gated based on FSC and SSC (A), followed by exclusion of doublets (B), dead cells (C) and CD14<sup>+</sup> monocytes (D). T lymphocytes (CD3+CD16<sup>-</sup>), NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) and NKT (CD3+CD16<sup>+</sup>) populations are identified using CD3 and CD16 (E). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were distinguished within the CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (F). CD16+HLA-DR<sup>-</sup> NK cells and a CD16+HLA-DR<sup>+</sup> mDC subset were distinguished within the CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> population (G). Both subsets can also be distinguished based on CD11c and CD8 expressions (H and I). HLA-DR<sup>-</sup> cells and CD20+HLA-DR<sup>+</sup> B cells are distinguished within CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup> cells (J). Gating on CD20+HLA-DR<sup>+</sup> cells, 2 subsets of B cells are distinguished based on CD8 expression (K) or CD1c expression (L). From HLA-DR<sup>-</sup> cells, 2 minor subsets of NK cells can be distinguished based on CD8 and CD20 expressions (M). Results presented here are from one animal and are representative of n = 12. Numbers are percentages of each population within the same dotplot.

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.



Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.

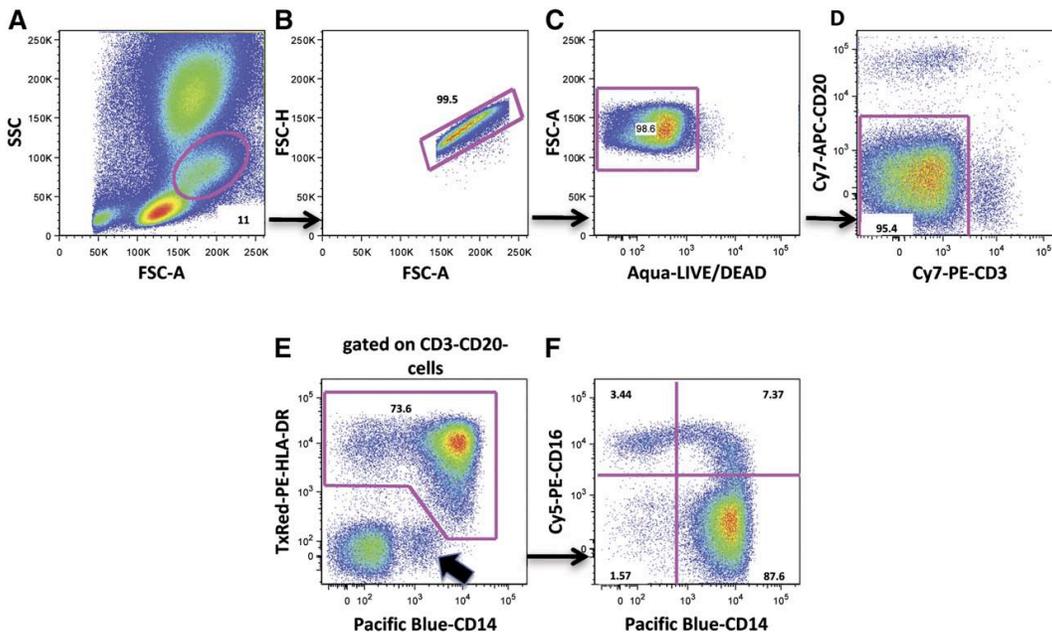
### 3.2. Phenotypic analysis of lymphocyte populations

In order to identify lymphocyte populations, we first gated on cells based on forward (FSC) and side scatter (SSC) properties (Fig. 2A). We excluded doublets (Fig. 2B), dead cells (Fig. 2C) and monocytes (Fig. 2D), using FSC height, amine reactive dye and CD14 expression, respectively. From this gate, CD3+CD16– T lymphocytes (median: 65.8%, range: 52.6%–79.5%, n = 12) were selected (Fig. 2E) and further divided into CD4+CD8– (median: 43.48%, range: 25.51%–47.44%, n = 12), CD4–CD8+ (median: 18.27%, range: 8.04%–28.85%, n = 12), CD4+CD8+ (median: 1.57%, range: 0.45%–11.54%, n = 12) and CD4–CD8– (likely gamma delta T cells) (median: 3.10%, range: 1.27%–3.93%, n = 12) lymphocytes (Fig. 2F). In addition, using an anti-CD16 antibody we identified CD3+CD16+ NKT cells (median: 0.08%, range: 0.03%–0.25%, n = 12) (Fig. 2E) as well as CD3–CD16+ cells (Fig. 2E). Within the CD3–CD16+ cells, we identified a major HLA-DR–CD8+ NK population (median: 4.10%, range: 1.47%–16.19%, n = 12; Fig. 2G, 2H and 2I: red histogram), as well as a small population of myeloid DC subset expressing HLA-DR (CD3–CD16+HLA-DR+, Fig. 2G), CD11c (blue histogram, Fig. 2H), but not CD8 (Fig. 2F). CD3–CD16– cells (Fig. 2E) were further divided into HLA-DR+CD20+ B cells (median: 25.77%, range: 7.78%–41.18%, n = 12) and HLA-DR–CD20–/dim cells (Fig. 2J). HLA-DR+CD20+ B lymphocytes can be further divided into CD20+CD8– (median: 22.74%, range: 5.06%–36.11%, n = 12) and CD20+CD8+ B lymphocytes (median: 2.33%, range: 0.13%–6.27%, n = 12; Fig. 2K). HLA-DR+CD20+

B cells can also be divided into CD1c+ resting (median: 21.44%, range: 10.53%–23.29%, n = 12) and CD1c– activated (median: 4.33%, range: 2.60%–15.17%, n = 12) B cells (Fig. 2L). HLA-DR–CD20–/dim cells can be further divided into 2 small subsets of NK cells: CD8+CD20– cells (median: 0.98%, range: 0.54%–2.76%, n = 12) and CD8+CD20dim cells (median: 0.21%, range: 0.06%–0.86%, n = 12) (Fig. 2M). Finally, the overall contamination of non-lymphocyte cells within the lymphocyte gate represents consistently 3% of the total lymphocyte population, and is mainly comprised of HLA-DR+CD20– cells (Fig. 2J) and CD123+ basophil granulocytes (Fig. 2N).

### 3.3. Phenotypic analysis of monocyte populations

Monocyte populations were analyzed by first gating using FSC and SSC (Fig. 3A). We excluded doublets (Fig. 3B) and dead cells (Fig. 3C) using FSC height and amine dye, respectively, and then excluded CD3+ T and CD20+ B lymphocytes (Fig. 3D). From the HLA-DR+ and CD14+ cells (median: 4.52%, range: 1.90%–12.23%, n = 12) (Fig. 3E), three monocyte subsets were distinguished: CD14+CD16– classical monocytes (median: 3.74%, range: 1.59%–9.20%, n = 12), and two subsets of activated monocytes: CD14+CD16+ (median: 0.34%, range: 0.07%–0.92%, n = 12) and CD14–CD16+ (median: 0.23%, range: 0.07%–0.35%, n = 12) (Fig. 3F). It can be noted that potential contamination of CD14<sup>low</sup>HLA-DR– granulocytes can be easily identified (Fig. 3E).



**Fig. 3.** Flow cytometry analysis of monocyte populations. First, monocytes were gated based on FSC and SSC (A). Doublets (B), dead cells (C), CD3+ T and CD20+ B lymphocytes (D) were excluded. HLA-DR+ and CD14+ cells were selected (E) and three monocyte subsets were gated based on expression of CD14 and/or CD16. These include the classical monocytes (CD14+CD16–) and activated monocytes (CD14+CD16+ and CD14–CD16+) (F). Contamination from granulocytes that are HLA-DR– and CD14<sup>low</sup> are excluded from monocyte analysis, based on HLA-DR and CD14 expression (Fig. 3E, black arrow). Results presented here are from one animal and are representative of n = 12. Numbers are percentages of each population within the same dotplot.

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.

### 3.4. Phenotypic analysis of dendritic cell populations

DC have an intermediate size that falls between that of monocytes and lymphocytes, when analyzed in FSC versus SSC (Fig. 4A). After excluding doublets (Fig. 4B) and dead cells (Fig. 4C), DC were gated as HLA-DR+ cells and lineage-negative (Lin-) cells by excluding CD3+ T lymphocytes and CD14+ monocytes (Fig. 4D), CD8+ NK cells and CD20+ B lymphocytes (Fig. 4E) and selecting HLA-DR+ cells (Fig. 4F). Lin-HLA-DR+ cells (median: 1.34%, range: 0.30%–2.89%, n=12) were further divided into CD123+CD11c- pDC (median: 0.03%, range: 0%–0.08%, n=12), CD123-CD11c+CD16+ mDC (median: 0.61%, range: 0.06%–2.17%, n=12) and CD123-CD11c<sup>-/dim</sup> CD1c+ mDC (median: 0.25%, range: 0.07%–0.53%, n=12) (Fig. 4G). Finally, CD34+ hematopoietic stem cells (median: 0.01%, range: 0%–0.02%, n=12) were identified within the CD123-CD11c-CD16- cell population (Fig. 4G).

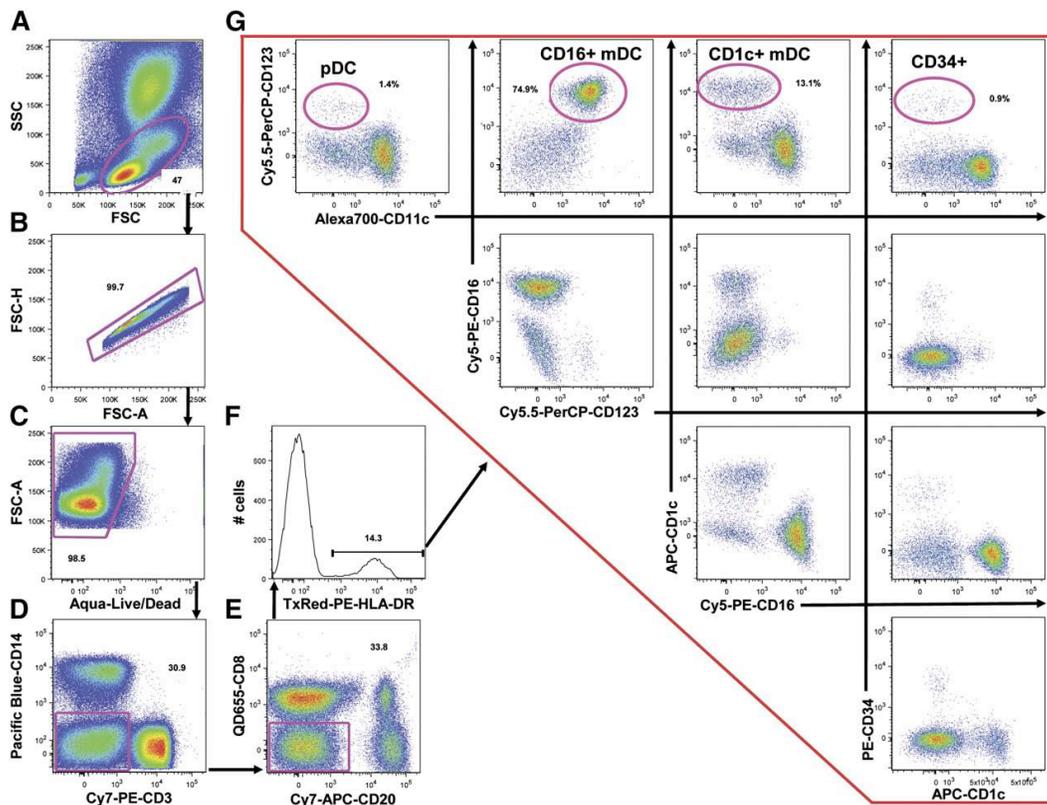
### 3.5. Individual lineage specific panels versus 12-color panel

To further validate the 12-color flow cytometry panel, we compared data generated from our 12-color flow panel with

data obtained using three smaller flow cytometry panels, specific for lymphocytes, monocytes and dendritic cells. The different panels are described in Table 1. Comparing the two panels (Fig. 5A), the percentage of the different leukocyte subsets were very comparable with no statistical differences, except for the total NK population, where a higher percentage of CD16+ NK cells was found using the small lymphocyte panel as compared with the 12-color panel (percent change: 29.6%, P=0.0001). This difference is likely due to the inclusion of CD16+ mDC subset in the NK population using the small lymphocyte panel as opposed to exclusion of this mDC subset in the 12-color panel because of the use of HLA-DR (Fig. 2G). No statistical differences were measured on the monocyte subsets and the DC subsets using either panel (Fig. 5B and C).

### 3.6. Absolute cell numbers of lymphocyte, monocyte and DC subsets by a single 12-color flow cytometry assay

Using the gating strategy previously described, we find a normal distribution of lymphocyte, monocyte and DC subsets in rhesus macaques that are in agreement with data obtained using three flow cytometry panels specific for each population.



**Fig. 4.** Flow cytometry analysis of dendritic cell populations. DC cells were gated based on FSC and SSC including both lymphocytes and monocytes (A). Doublets (B) and dead cells (C) were excluded. Lin- cells (i.e. CD3+ T lymphocytes and CD14+ monocytes (D), CD20+ B lymphocytes and CD8+ NK cells (E) were excluded and HLA-DR+ cells were gated (F). Four non-overlapping Lin-HLA-DR+ cell subsets are shown in G and are distinguished based on CD123, CD1c, CD16, CD11c and CD34 expressions. Results presented here are from one animal and are representative of n=12. Numbers are percentages of each population within the same dotplot.

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.

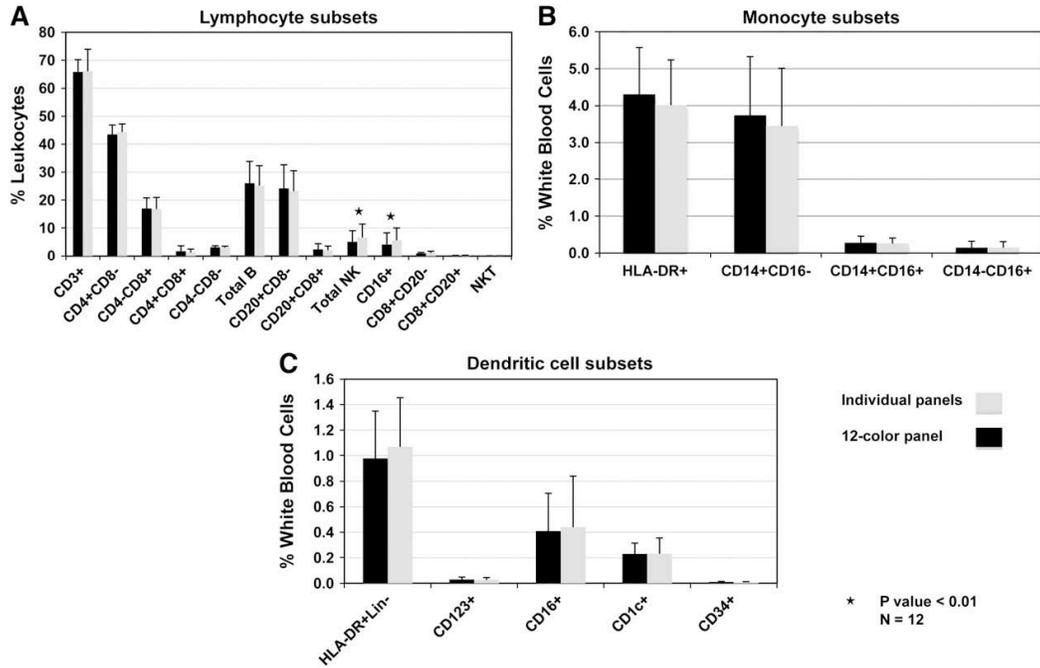


Fig. 5. Comparison between individual lineage specific panels and the 12-color panel. (A) Lymphocyte subsets, (B) monocyte subsets, (C) DC subsets. Individual lineage specific panels and a 12-color panel are described in Table 1B. Percentage median and Intra Quartile Range were calculated for each subset (n = 12). Statistical significance was determined by using 2-tailed paired Students' t-test where \*P<0.01.

Percentages and absolute numbers of lymphocytes, monocytes and DC subsets are shown in Table 2.

#### 4. Discussion

Identifying and measuring precisely immune cell subsets during longitudinal infectious studies in rhesus macaques is critical to our understanding of diseases such as SIV infection. The CD8+ lymphocyte depletion model in rhesus macaques has clearly demonstrated the importance of a strong adaptive immune response, mainly through the CD8+ T lymphocyte (Schmitz et al., 1999). However, events during early acute infection where innate immune effector cells interact with the virus might be of crucial importance for the progression of the infection and ultimately the outcome of the disease (Pereira and Ansari, 2009). In addition, there is a strong B cell depletion very early after SIV infection (Mattapallil et al., 2004; Klatt et al., 2010). It suggests that a number of immune cells, from both the innate and adaptive immune responses, are affected, directly or indirectly, by SIV infection. The 12-color flow cytometry panel described in this study demonstrates that we can reliably identify simultaneously major lymphocyte populations, comprising CD4+ and CD8+ T lymphocytes, CD20+ B lymphocytes, some of which express CD8, 3 subsets of NK cells (i.e. CD16+CD8+CD20-, CD16-CD8+CD20- and CD16-CD8+CD20<sup>dim</sup>) and NKT cells. As demonstrated in this study, identifying NK cells as CD8+CD3- or CD16+CD3- cells might overestimate the percentage of NK cells by including some CD20+ B lymphocytes that express CD8 and mDC that

express CD16. An ideal phenotyping flow cytometry panel for NK cells in rhesus monkeys would minimally include at least anti-CD3, anti-CD20, anti-CD8, anti-CD16 and anti-HLA-DR antibodies.

Monocytes/macrophages are thought to be one of the main reservoirs for HIV and SIV (Collman et al., 2003; Montaner et al., 2006). They represent early targets of infection and might contribute to the central nervous system (CNS) infection by bringing the virus into the brain (Pulliam et al., 1997; Williams et al., 2001; Kim et al., 2003; Williams and Burdo, 2009). In addition, subsets of non-infected monocytes expand in bone marrow with AIDS and traffic to the CNS and accumulate with disease (Burdo et al., 2010). Monocytes are a heterogeneous population identified by the expression of CD14 and CD16 (Ellery and Crowe, 2005; Crowe and Ziegler-Heitbrock, 2010). Using our multicolor panel we can clearly identify the 3 monocyte subsets: CD14+CD16- classical monocytes, and two subsets of activated monocytes defined as CD14+CD16+ and CD14-CD16+ cells.

The study of DC in non-human primates is more complicated in part by the lack of cross-reactivity and/or poor sensitivity of some anti-human antibodies. First, because of limited channels available on flow cytometers, researchers used lineage specific cocktails as exclusion markers for DC. In humans, different lineage cocktails have been used that are usually composed of anti-CD3, anti-CD19 and/or anti-CD20, and anti-CD14 antibodies to gate out T and B lymphocytes and monocytes respectively. In addition, some groups alternatively complete this lineage cocktail with an anti-

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., J. Immunol. Methods (2010), doi:10.1016/j.

CD16 antibody (Della Bella et al., 2008), anti-CD56 antibody (Piccioli et al., 2007) or both (Ma et al., 2004; Zabel et al., 2005) to exclude NK cells. In monkeys, CD56 is mainly expressed on monocytes and not on NK cells leading to the use of CD16 instead of CD56 as a lineage marker in monkey flow cytometry analyses (Carter et al., 1999; Pichyangkul et al., 2001). However since the CD11c+ mDC in rhesus macaque express high levels of CD16 (Brown and Barratt-Boyes, 2009), using an anti-CD16 antibody in the lineage cocktail gates out a significant proportion of CD11c+ mDC. Different studies on non-human primates are using either CD11c or CD1c as markers of mDC (Malleret et al., 2008; Brown and Barratt-Boyes, 2009). Here we report that the use of these markers taken individually tends to underestimate the percentage of mDC. Using both anti-CD11c and anti-CD1c antibodies in the same panel, we found that CD11c+ mDC do not express CD1c but are CD16+ and that CD1c+ mDC are CD11c<sup>-</sup>/dimCD16<sup>-</sup>. Thus by using only CD11c as an mDC marker in rhesus macaques, the CD1c+ mDC subset is not taken into consideration in the analysis. Conversely, the use of CD1c only tends to exclude the CD11c+CD16+ mDC subset from the analysis. In addition, by comparing the same CD1c clone (AD5-8E7) conjugated either with FITC or APC, we clearly show that the APC conjugate gives a strong signal, while the FITC gives very little or no signal suggesting that the FITC-conjugated anti-CD1c antibody is not appropriate to study mDC in non-human primates. In order to study all known DC subsets, we suggest that an optimal flow cytometry panel for DC phenotyping analyses in non-human primates should include anti-CD11c, anti-CD16, anti-CD1c and anti-CD123 antibodies in addition to anti-CD3, anti-CD14 and anti-CD19 or anti-CD20 antibodies as exclusion lineage markers.

In summary, we show that lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets, can be precisely measured using a 12-color multiparameter flow cytometry approach. Moreover, this assay is more precise than 4- or 5-color panels due in part to minimal contamination between separate populations. Using our 12-color flow cytometry panel, we clearly distinguished three different DC subsets in rhesus macaques based on CD123, CD11c, CD16 and CD1c expressions: CD123+CD11c<sup>-</sup> pDC, and two mDC subsets (CD11c+CD16+CD1c<sup>-</sup> and CD11c<sup>-</sup>/dimCD16-CD1c+). Finally, we believe that this 12-color panel will be an important tool to study the interactions between different immune cell populations during SIV and potentially other diseases, and to better understand the key role that DC play in disease progression.

#### Acknowledgements

The authors thank Angela Carville, veterinarian of the New England Regional Primate Center, Southborough, MA, for help with the blood draw protocol and care of the animals.

#### References

- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T.H., Williams, K.C., 2010. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytom. A* 77, 410.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767.
- Banchereau, J., Pacesny, S., Blanco, P., Bennett, L., Pascual, V., Fay, J., Palucka, A.K., 2003. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Annu. NY Acad. Sci.* 987, 180.
- Barratt-Boyes, S.M., Brown, K.N., Melhem, N., Soloff, A.C., Gleason, S.M., 2006. Understanding and exploiting dendritic cells in human immunodeficiency virus infection using the nonhuman primate model. *Immunol. Res.* 36, 265.
- Bayne, K., 1996. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *Am. Physiol. Society. Physiologist* 39 (199), 208–211.
- Brown, K.N., Barratt-Boyes, S.M., 2009. Surface phenotype and rapid quantification of blood dendritic cell subsets in the rhesus macaque. *J. Med. Primatol.* 38, 272.
- Brown, K.N., Trichel, A., Barratt-Boyes, S.M., 2007. Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J. Immunol.* 178, 6958.
- Burdo, T.H., Soulas, C., Orzechowski, K., Button, J., Krishnan, A., Sugimoto, C., Alvarez, X., Kuroda, M.J., Williams, K.C., 2010. Increased monocyte turnover from bone marrow correlates with severity of SIV encephalitis and CD163 levels in plasma. *PLoS Pathog.* 6, e1000842.
- Carter, D.L., Shieh, T.M., Blosser, R.L., Chadwick, K.R., Margolick, J.B., Hildreth, J.E., Clements, J.E., Zink, M.C., 1999. CD56 identifies monocytes and not natural killer cells in rhesus macaques. *Cytometry* 37, 41.
- Coates, P.T., Barratt-Boyes, S.M., Zhang, L., Donnenberg, V.S., O'Connell, P.J., Logar, A.J., Duncan, F.J., Murphey-Corb, M., Donnenberg, A.D., Morelli, A.E., Maliszewski, C.R., Thomson, A.W., 2003. Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand. *Blood* 102, 2513.
- Collman, R.G., Perno, C.F., Crowe, S.M., Stevenson, M., Montaner, L.J., 2003. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J. Leukoc. Biol.* 74, 631.
- Crowe, S.M., Ziegler-Heitbrock, L., 2010. Editorial: monocyte subpopulations and lentiviral infection. *J. Leukoc. Biol.* 87, 541.
- Della Bella, S., Giannelli, S., Taddeo, A., Presicce, P., Villa, M.L., 2008. Application of six-color flow cytometry for the assessment of dendritic cell responses in whole blood assays. *J. Immunol. Meth.* 339, 153.
- DeMaria, M.A., Casto, M., O'Connell, M., Johnson, R.P., Rosenzweig, M., 2000. Characterization of lymphocyte subsets in rhesus macaques during the first year of life. *Eur. J. Haematol.* 65, 245.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., Schmitz, J., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165, 6037.
- Elery, P.J., Crowe, S.M., 2005. Phenotypic characterization of blood monocytes from HIV-infected individuals. *Meth. Mol. Biol.* 304, 343.
- Gardner, M.B., Luciw, P.A., 2008. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J.* 49, 220.
- Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem.* 48, 1819.
- Ibegbu, C., Brodie-Hill, A., Kouritis, A.P., Carter, A., McClure, H., Chen, Z.W., Nahmias, A.J., 2001. Use of human CD3 monoclonal antibody for accurate CD4+ and CD8+ lymphocyte determinations in macaques: phenotypic characterization of the CD3-CD8+ cell subset. *J. Med. Primatol.* 30, 291.
- Ju, X., Clark, G., Hart, D.N., 2010. Review of human DC subtypes. *Meth. Mol. Biol.* 595, 3.
- Kim, W.K., Corey, S., Alvarez, X., Williams, K., 2003. Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *J. Leukoc. Biol.* 74, 650.
- Kim, W.K., Sun, Y., Do, H., Autissier, P., Halpern, E.F., Piatak Jr., M., Lifson, J.D., Burdo, T.H., McGrath, M.S., Williams, K., 2009. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J. Leukoc. Biol.*
- Klatt, N.R., Shudo, E., Ortiz, A.M., Engram, J.C., Paiardini, M., Lawson, B., Miller, M.D., Else, J., Pandrea, I., Estes, J.D., Apetrei, C., Schmitz, J.E., Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., Silvestri, G., 2010. CD8+ lymphocytes control viral replication in SIVmac239-infected rhesus macaques without decreasing the lifespan of productively infected cells. *PLoS Pathog.* 6, e1000747.
- Ma, L., Scheers, W., Vandenbergh, P., 2004. A flow cytometric method for determination of absolute counts of myeloid precursor dendritic cells in peripheral blood. *J. Immunol. Meth.* 285, 215.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D.N., 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512.
- Mahnke, Y.D., Roederer, M., 2007. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.* 27, 469 v.
- Malleret, B., Karlsson, I., Maneglier, B., Brochard, P., Delache, B., Andrieu, T., Muller-Trutwin, M., Beaumont, T., McCune, J.M., Banchereau, J., Le Grand, R., Vaslin, B., 2008. Effect of SIVmac infection on plasmacytoid and CD1c+ myeloid dendritic cells in cynomolgus macaques. *Immunology* 124, 223.
- Mattapallil, J.J., Letvin, N.L., Roederer, M., 2004. T-cell dynamics during acute SIV infection. *AIDS* 18, 13.
- Montaner, L.J., Crowe, S.M., Aquaro, S., Perno, C.F., Stevenson, M., Collman, R.G., 2006. Advances in macrophage and dendritic cell biology in HIV-1 infection stress key understudied areas in infection, pathogenesis, and analysis of viral reservoirs. *J. Leukoc. Biol.* 80, 961.

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., *J. Immunol. Methods* (2010), doi:10.1016/j.

- Palucka, K., Banchereau, J., 1999. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J. Clin. Immunol.* 19, 12.
- Pereira, L.E., Ansari, A.A., 2009. A case for innate immune effector mechanisms as contributors to disease resistance in SIV-infected sooty mangabeys. *Curr. HIV Res.* 7, 12.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R.A., Roederer, M., 2006. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 313, 199.
- Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Samiccheli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F., Wack, A., 2007. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109, 5371.
- Pichyangkul, S., Saengkrai, P., Yongvanitchit, K., Limsomwong, C., Gettayacamin, M., Walsh, D.S., Stewart, V.A., Ballou, W.R., Heppner, D.G., 2001. Isolation and characterization of rhesus blood dendritic cells using flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 252, 15.
- Pitcher, C.J., Hagen, S.I., Walker, J.M., Lum, R., Mitchell, B.L., Maino, V.C., Axthelm, M.K., Picker, L.J., 2002. Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *J. Immunol.* 168, 29.
- Pulliam, L., Gascon, R., Stubblebine, M., McGuire, D., McGrath, M.S., 1997. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet* 349, 692.
- Reimann, K.A., Waite, B.C., Lee-Parritz, D.E., Lin, W., Uchanska-Ziegler, B., O'Connell, M.J., Letvin, N.L., 1994. Use of human leukocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of rhesus monkeys. *Cytometry* 17, 102.
- Roederer, M. (2002) Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* Chapter 1, Unit 1 14.
- Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M. A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghayeb, J., Forman, M.A., Montefiori, D.C., Rieber, E.P., Letvin, N.L., Reimann, K.A., 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857.
- Sopper, S., Stahl-Hennig, C., Demuth, M., Johnston, I.C., Dorries, R., ter Meulen, V., 1997. Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. *Cytometry* 29, 351.
- Steinman, R.M., 2003. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 111, 675.
- Tung, J.W., Heydari, K., Tirouvanziam, R., Sahaf, B., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., 2007. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin. Lab. Med.* 27, 453 v.
- Webster, R.L., Johnson, R.P., 2005. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology* 115, 206.
- Williams, K.C., Burdo, T.H., 2009. HIV and SIV infection: the role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. *APMIS* 117, 400.
- Williams, K.C., Corey, S., Westmoreland, S.V., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., Alvarez, X., Lackner, A.A., 2001. Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Exp. Med.* 193, 905.
- Zabel, B.A., Silverio, A.M., Butcher, E.C., 2005. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J. Immunol.* 174, 244.

Please cite this article as: Autissier, P., et al., Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification..., *J. Immunol. Methods* (2010), doi:10.1016/j.

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

### I – POURQUOI 12 COULEURS ?

On peut en effet se poser la question de savoir pourquoi les compagnies de cytométrie fabriquent des instruments de plus en plus compliqués, mesurant un nombre toujours plus important de paramètres, rendant ainsi le travail des chercheurs toujours plus complexe afin de développer un panel d'anticorps cohérent. En effet, plus le nombre de paramètres mesurés est grand, plus le nombre de contrôles pour corriger les chevauchements spectraux entre fluorochromes est important afin de valider l'analyse. Pour analyser une expérience avec 2 ou 3 couleurs, il faut quelques minutes, alors qu'une expérience avec 12 couleurs peut prendre plusieurs heures (Baumgarth and Roederer, 2000; Perfetto et al., 2006a; Mahnke and Roederer, 2007). Enfin, développer un panel multicolore comme ceux de cette thèse prend des mois. En résumé, la CMF multiparamétrique peut être « intimidante » pour beaucoup de chercheurs, de par sa complexité à la mettre en œuvre.

La réponse à cette question date en fait du tout début de la cytométrie et de l'immunophénotypage. En effet, les immunologistes pensaient à l'époque que chaque anticorps monoclonal était spécifique à une population cellulaire donnée et à sa fonction propre. Ainsi, il n'aurait pas été nécessaire de construire des appareils à plus de 2 ou 3 paramètres. Malheureusement, ces prévisions se sont révélées incorrectes pour la plupart des leucocytes. Très rapidement, les chercheurs se sont aperçus que la molécule CD4 était non seulement exprimée par les lymphocytes T, mais aussi par les

monocytes. Parallèlement, les lymphocytes T et les cellules NK ont montré qu'elles exprimaient la molécule CD8. Ainsi, ces résultats ont montré que CD4 et CD8 étaient seulement spécifiques d'une fonction, et pas spécifiques d'une lignée cellulaire. Ce manque de dualité phénotype/fonction a été formellement établie en conjuguant les anticorps anti-CD4 et anti-CD8 avec un nouveau fluorochrome, la phycoérythrine (PE), et en marquant les cellules avec un anticorps anti-CD3 marqué avec FITC (Filion et al., 1990). Depuis, les chercheurs se sont aperçus au fil des années que nombre d'antigènes de surface étaient exprimés par différentes populations cellulaires. Par exemple, CD4 est exprimé par les lymphocytes T auxiliaires, les monocytes et les cellules dendritiques, ou encore CD16 est exprimé par les cellules NK, les cellules NKT, les cellules dendritiques et les granulocytes. Par conséquent, pour séparer ces populations à l'analyse, il faut ajouter un ou plusieurs autres marqueurs. En fin de compte, on s'est aperçu que plus on ajoutait de marqueurs, plus on arrivait à « décortiquer » le système immunitaire et à visualiser des sous-populations nouvelles qui pouvait avoir un rôle important dans la réponse immunitaire (Perfetto et al., 2004).

Ce travail de thèse montre la puissance d'analyse d'un panel 12 couleurs, capable d'identifier et de mesurer précisément et simultanément les populations de lymphocytes, de monocytes et de cellules dendritiques dans le sang. Le 1<sup>er</sup> avantage d'un panel multicolore est l'analyse phénotypique simultanée de cellules de types différents exprimant le même antigène. Cela conduit à une **meilleure identification des populations cellulaires**. Par exemple, un panel « lymphocyte » utilisé pour analyser les lymphocytes T et B comprend en général les anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD20. Cependant, en utilisant ce panel 4 couleurs, on exclut

potentiellement de l'analyse les cellules NKT (CD3+CD16+), une population qui pourrait jouer un rôle important dans l'infection par VIH (Li and Xu, 2008). De plus, cette population NKT est maintenant incluse dans le pourcentage total de lymphocytes T CD3+, du fait du manque de l'anticorps anti-CD16 dans le panel, et ainsi la « contaminate ». L'utilisation d'un panel multicolore **réduit considérablement les risques de contamination entre populations cellulaires différentes**. Le 2<sup>ème</sup> avantage d'un tel panel est qu'il permet **l'analyse de cellules « rares » et hétérogènes**, comme les cellules dendritiques. MacDonald et al a distingué 5 sous-populations de DC : les pDC CD123+, les cellules souches hématopoïétiques CD34+, et 3 sous-populations de mDC exprimant à leur surface soit CD16, CD1c ou CD141 (MacDonald et al., 2002). Cependant, les auteurs ont dû avoir recours à des techniques de purification cellulaire pour enlever toutes les cellules non DC, avant de faire le marquage phénotypique. Une autre possibilité aurait été d'utiliser tous les marqueurs d'exclusion (CD3+CD14+CD20+CD56, pour l'humain : CD3+CD14+CD20, pour le singe) dans un seul paramètre/couleur. Mais l'utilisation de ce paramètre « poubelle » aurait empêché l'identification des lymphocytes ou des monocytes. Avec les panels de cette thèse, il est inutile de faire une quelconque séparation cellulaire avant le marquage, ce qui pourrait altérer les pourcentages totaux de certaines cellules. Mais en plus, vu que les marqueurs d'exclusion sont utilisés de façon individuelle dans le panel, il est aussi possible de mesurer les lymphocytes et les monocytes. Enfin, le 3<sup>ème</sup> avantage, non négligeable, est la possibilité d'utiliser **de petits volumes de sang** pour une analyse des variations des populations leucocytaires. On obtient beaucoup **plus d'informations pour moins d'échantillon**. Cela devient important pour les études

longitudinales, ou le volume de sang provenant de patients peut être limité. En utilisant un seul panel pour mesurer les principales populations de leucocytes, nécessitant seulement 200µl de sang total, on peut utiliser beaucoup plus de sang pour d'autres analyses comme le tri cellulaire ou les mesures de cytokines.

## **II – DIFFÉRENCE PHÉNOTYPIQUE ENTRE HUMAIN ET RHÉSUS**

Le développement de modèles animaux pour étudier des maladies humaines est crucial pour une meilleure compréhension de la maladie et évite de porter un préjudice physique aux êtres humains. Cependant, un bon modèle animal, pour le SIDA en particulier, doit remplir certains critères pour pouvoir être utilisé dans l'étude de l'infection : 1) il doit réagir de la même façon que l'être humain à l'agent infectieux, 2) son système immunitaire doit être le plus « proche » possible de celui de l'être humain, 3) il doit développer la maladie de façon plus rapide afin que le temps de l'étude immunopathologique ne se mesure pas en années, mais en mois, 4) il doit pouvoir être facilement élevé en captivité.

Tous ces critères sont satisfaits avec l'utilisation du macaque rhésus dans l'étude du SIDA. Le rétrovirus VIS, équivalent du VIH chez le singe, existe depuis très longtemps et est capable d'infecter près de 33 espèces de primates africains, mais sans provoquer de maladies. Par contre, si VIS infecte le macaque rhésus d'Asie, l'animal va développer le SIDA, à l'image des êtres humains, avec destruction des lymphocytes T CD4+, une réponse immunitaire forte au début mais qui n'arrive pas à stopper l'infection et en définitive un effondrement du système immunitaire (Fox et al., 1997; Geretti,

1999). Le travail sur le génome du rhesus a montré une homologie de 93% de leur séquence d'ADN avec l'être humain. En général, le macaque rhesus infecté par VIS va développer le SIDA en 2 à 3 mois, période beaucoup plus courte que l'humain et donc un gain de temps précieux pour la recherche. Enfin, le macaque rhesus se reproduit facilement en captivité.

Cependant, le plus grand avantage de l'utilisation du macaque rhesus, est l'accessibilité pour les chercheurs à l'étude de la phase aiguë de l'infection, c'est à dire les 2 à 3 premières semaines de l'infection, période qui est en général inaccessible chez les êtres humains. Cela a pris même une importance capitale avec la découverte que le VIS détruisait près de 60% des lymphocytes T CD4+ mémoires dans la phase aiguë (Mattapallil et al., 2005)

Malgré tout, le système immunitaire du macaque rhesus n'est pas la copie conforme de celui de l'être humain, et il est toujours prudent d'étudier ou au moins de connaître les différences entre les 2 systèmes. C'est ce que j'ai voulu faire en développant ces 2 panels de cytométrie. Au regard des résultats, on peut voir qu'il y a plusieurs différences dans l'expression ou non de certains antigènes par des populations cellulaires. Par exemple, contrairement à l'humain, CD8 est exprimé par une sous-population de lymphocytes B et par la totalité des cellules NK chez le macaque. De plus, CD56 n'est pas exprimé par les cellules NK chez le singe, mais par les monocytes et les cellules dendritiques. Enfin, chez l'humain, 2 populations majeures de cellules dendritiques sont étudiées, les pDC CD123+ et les mDC CD11c+, alors que chez le macaque rhesus, une 3<sup>ème</sup> population de mDC CD1c+CD11c-CD123- a été nouvellement caractérisé dans mon 2<sup>ème</sup> article. Enfin, en termes de pourcentage et de

comptes absolus, il y a près de 2 fois plus de lymphocytes B chez le macaque par rapport à l'humain, mais il y a 4 fois moins de cellules NK chez le singe par rapport à l'humain. Cela peut signifier que le système immunitaire inné chez le singe est moins développé que chez l'humain, et pourrait avoir une incidence sur la réponse immunitaire provoqué par l'infection par VIS.

En conclusion, ces 2 panels de 12 couleurs montrent les similarités et les différences phénotypiques des systèmes immunitaires du macaque rhesus et de l'humain et peut aider à une meilleure compréhension de l'immunopathologie du SIDA.

### **III – ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE : PERSPECTIVE D'AVENIR**

#### **III.1 – Associer phénotype et fonction**

Jusqu'à récemment, la qualité de la réponse immunitaire à des antigènes viraux était basée sur les réponses anticorps mesurés par ELISA ou RIA (Davey and Lane, 1990; Farzadegan, 1994). Cependant, la quantification des réponses immunitaires dûes aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+ est devenue de plus en plus importante pour essayer de comprendre le mécanisme de protection immunitaire à de nombreuses maladies infectieuses (Gruters et al., 2002; Kaur et al., 2003). Les techniques habituellement utilisées pour mesurer des paramètres tels que la prolifération cellulaire et la cytotoxicité était la mesure de thymidine tritiée et la mesure de Cr<sup>51</sup>, 2 techniques très fiables mais avec certains désavantages comme l'utilisation de matériel radioactifs et surtout une mesure globale de toute la population lymphocytaire. Avec le développement de la CMF multiparamétrique et de marqueurs spécifiques pour certaines fonctions cellulaires

(prolifération, activation, cytokines, apoptose), il est maintenant possible de mesurer ces fonctions au niveau cellulaire et ainsi obtenir une vision beaucoup plus précise des mécanismes de la réponse immunitaire (Chattopadhyay et al., 2008). Le **Tableau 3** ci-dessous décrit un certain nombre de marqueurs utilisés pour étudier les fonctions cellulaires des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ pendant l'infection par VIH ou VIS (Chattopadhyay and Roederer). Il est fort probable que de plus en plus de laboratoires vont combiner phénotype et fonction dans les analyses en CMF afin d'avoir une vision plus « dynamique » du système immunitaire.

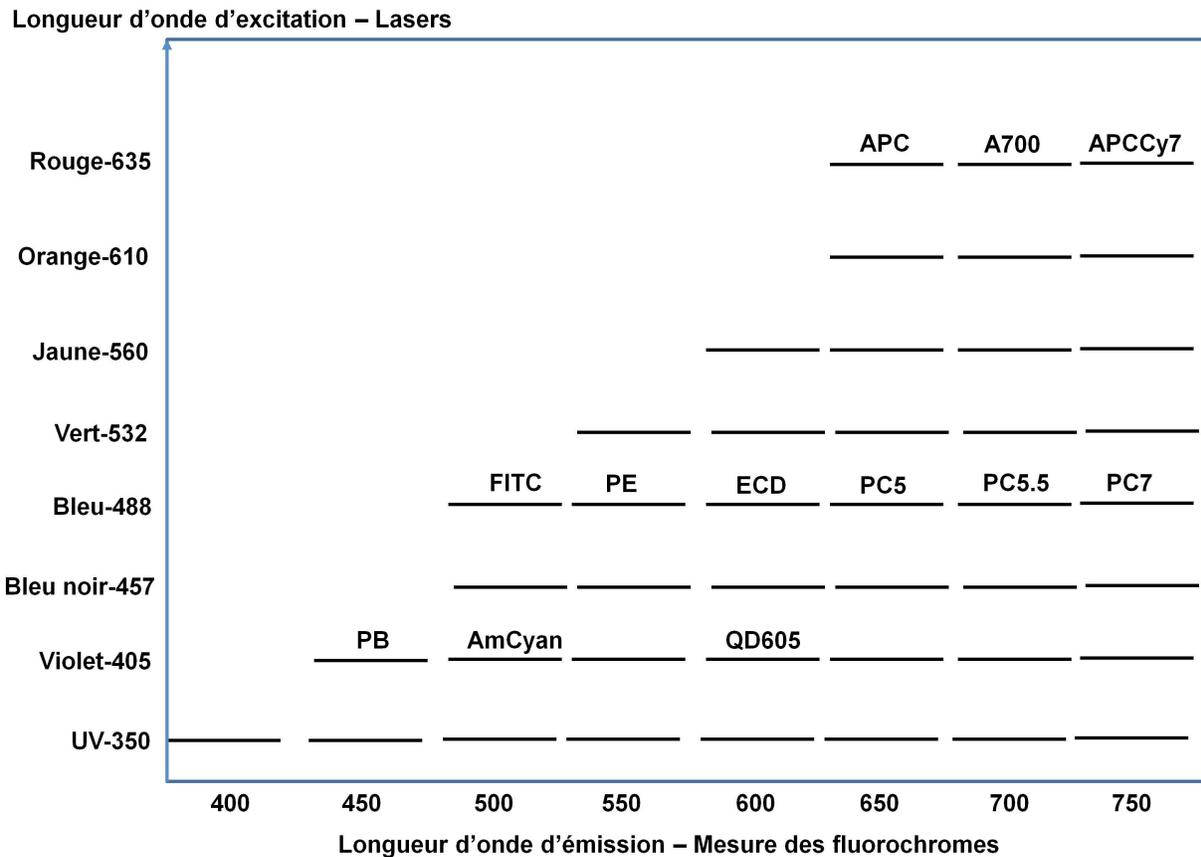
CATEGORY	MARKER(S)	SURFACE OR INTRACELLULAR	CHARACTERISTICS	REPS.
Activation	HLA-DR	Surface	Constitutive expression on APCs, upregulated on T-cells upon stimulation	19
	CD38	Surface	Constitutive expression on naïve cells, upregulated on memory with activation	22
Senescence	CD69	Surface	Early activation marker, diluted with cell proliferation	26
	CD28	Surface	Costimulatory molecule, expression reduced in HIV+ individuals	30
	CD57	Surface	Terminal cells, expressed by multiple subsets, marker for highly cytotoxic cells	37
	PD-1/CTLA-4	Surface	Inhibitory receptors that block activation, complex expression patterns	40
Early cells	CD95/FasL	Surface	Expressed by activated cells, involved in apoptotic pathways	49
	CD127	Surface	IL7 receptor, expressed by naïve and central memory cells	15
	CD45RA, CD45RO, CD11a, CCR7, CD27, CD62L	Surface	Markers used to distinguish naïve, central memory, effector memory, and terminal cells.	54
Regulatory	CD25/FoxP3/ CD127	Surface	Consensus that regulatory T-cells are CD25+ FoxP3+ CD127-; however, this is also phenotype of some activated cells.	66
	CD39	Surface	Produces adenosine, which has immunoinhibitory properties	67
	GITR	Surface	Costimulatory molecule for regulatory T-cells	68
	IL10/TGF $\beta$	Intracellular	Immunosuppressive cytokines, expression very low even after in vitro stimulation	65
Cytotoxic function	Granzyme A, Granzyme B, Perforin	Intracellular	Precise mechanisms of function unclear, released upon stimulation, kinetics of regeneration differ by molecule.	70
Proliferation	CFSE	Intracellular	Cell labeling dye, diluted over 5 day in vitro proliferation, not for effector cells	74
	Ki-67	Intracellular	Present during all active phases of cell cycle, but not during resting (G0) phase.	28
Cytokines	MIP1 $\beta$ , IL2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$	Intracellular	Cytokines produced upon in vitro stimulation, markers of polyfunctional cells	76
Coreceptors	CCR5/CXCR4	Surface	Coreceptors for HIV	81

**Tableau 3** : Principaux marqueurs pour l'étude des fonctions des lymphocytes (d'après Chattopadhyay et al, Cytometry Part A, 2010).

### III.2 – Quelle est la limite au nombre de couleurs mesurables ?

A l'heure actuelle, l'instrument commercialisé le plus perfectionné (ex : BD Influx Cell Sorter) est capable théoriquement d'analyser jusqu'à 22 paramètres à l'échelon cellulaire, en utilisant jusqu'à 7 lasers, et à une vitesse de 200,000/sec. Cet instrument (la « Rolls » des cytomètres !) peut également trier jusqu'à 6 populations en même temps. Bien que la société Becton Dickinson, qui possède près de 50 % du marché, soit un très bon fournisseur d'instruments de cytométrie et aussi d'anticorps, il convient d'être prudent en lisant les caractéristiques techniques de l'Influx. En effet, utiliser aujourd'hui un panel de 22 anticorps couplé à des fluorochromes peut générer beaucoup de chevauchement spectral entre les fluorochromes. Cependant, il est clair que le futur de la cytométrie en flux va passer par une augmentation du nombre de paramètres mesurés.

En effet, le cadre ou l'espace dans lequel le cytomètre peut mesurer des signaux optiques est limité et représente la lumière visible, de 400 à 800nm. Chaque fluorochrome a une longueur d'onde d'excitation et d'émission particulière. Par exemple, FITC a une longueur d'onde d'excitation optimale autour de 488nm, et réémet de la lumière à une longueur d'onde de 530nm. Par conséquent, chaque fluorochrome a une « place » déterminée au sein de cet espace de lumière. Ainsi, la combinaison des 12 fluorochromes que j'ai utilisé pour ma thèse peut être représentée dans un cadre où l'axe des abscisses serait la longueur d'onde d'émission utilisable (400nm - 800nm) et l'axe des ordonnées la longueur d'onde d'excitation, représenté par les lasers utilisables (**Figure 24**).



**Figure 24 :** Le “navire du futur” CMF avec un nombre possible de “passagers”.

C’est comme si la CMF représentait un navire dans lequel prennent place les fluorochromes. La longueur du navire contiendrait des rangées représentées par les différents lasers utilisables, et la largeur contiendrait les « sièges passagers » pour les fluorochromes, utilisant en moyenne à l’heure actuelle 50nm d’espace. Comment remplir les cases vides de ce « navire du futur » CMF, ou qu’est ce qui limite à l’heure actuelle le remplissage du « navire » ?

Nous savons que les 3 composantes majeures pour une augmentation du nombre de paramètres mesurés sont : les lasers, les fluorochromes et l'informatique. Le développement des lasers est arrivé à maturité avec l'utilisation de toute la gamme de la lumière visible, allant du laser UV à 350nm jusqu'au laser rouge à 635nm. Comme nous l'avons vu précédemment, il y a une trentaine de fluorochromes utilisables à l'heure actuelle, mais certains ont les mêmes caractéristiques optiques et ne peuvent donc pas être utilisés en même temps. Il faudra donc dans les années à venir développer de nouveaux fluorochromes qui pourront par leurs caractéristiques optiques d'excitation et d'émission rentrer dans ce navire. Enfin, l'informatique devra être encore plus performante afin de pouvoir séparer dans le temps les signaux d'émission optiques des fluorochromes. Théoriquement, il serait possible de mesurer jusqu'à 40 paramètres à l'échelle cellulaire. Une fois cela accompli, il faudra des logiciels d'analyse automatisée pour pouvoir analyser la montagne d'informations recueillies et évidemment essayer de donner un sens scientifique à ces résultats.

Cette évolution de la cytométrie en flux multiparamétrique peut paraître très lointaine, mais il est important de rappeler qu'on est passé de 3 à 17 paramètres en moins de 20 ans. Plus important encore, la technologie de base (lasers, fluorochromes, informatique) est en place et elle est très fiable. Je suis convaincu qu'il ne faudra pas attendre 20 ans de plus pour doubler le nombre de paramètres mesurables. La CMF va continuer à nous fournir des informations sur le système immunitaire qui, un jour peut-être, permettra de trouver la solution au problème du SIDA et à d'autres maladies.

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Ces dernières années, l'immunophénotypage par cytométrie en flux a connu un essor très important et est devenu de plus en plus multiparamétrique, permettant l'analyse simultanée de multiples paramètres à l'échelon cellulaire. Afin d'optimiser la qualité des informations obtenues, les panels d'anticorps doivent être développés avec soin, en y incluant des contrôles nécessaires à chaque étape. Ce processus de développement et d'optimisation d'un panel multicolore est très laborieux et demande beaucoup de temps. Cependant, une fois validées, les informations apportées par un tel panel se révèlent d'une grande importance et beaucoup plus précises que celles obtenues par un plus petit panel, et justifient amplement l'investissement de temps.

Les résultats présentés dans cette thèse ont été réalisés sur les 2 dernières années, et ont nécessité un travail considérable de mise au point et de validation des 2 panels 12 couleurs de cytométrie en flux pour la mesure des principales cellules du système immunitaire chez l'homme et le macaque rhésus. En utilisant uniquement 200 µl de sang, et en moins d'1 heure, il est maintenant possible de mesurer précisément les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes B, les cellules NK et NKT, les sous-populations de monocytes et de cellules dendritiques chez l'homme et le macaque rhésus. De plus, l'analyse multiparamétrique sur le macaque rhésus a démontré pour la 1<sup>ère</sup> fois l'existence de 2 populations distinctes de cellules dendritiques myéloïdes : les CD11c<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> et les CD11c<sup>-dim</sup> CD1c<sup>+</sup>. Je pense que ces 2 panels devraient devenir un outil important pour étudier les interactions entre les différentes populations de cellules immunitaires pendant l'infection par VIH ou VIS, et pourraient même être applicable pour d'autres maladies. Enfin, il devient maintenant possible d'étudier

facilement les cellules dendritiques, autrefois si difficiles à identifier de par leur rareté dans le sang et leur hétérogénéité.

Ce travail démontre que la cytométrie en flux a fait d'énormes progrès ces 15 dernières années, passant rapidement de 5 paramètres mesurables à près de 17 paramètres à l'heure actuelle. Maintenant, les instruments commercialisés bénéficient des dernières avancées technologiques et il n'est plus nécessaire de faire d'importantes modifications pour optimiser l'instrument. De même, du fait de l'automatisation de l'instrument et de sa fiabilité, un ingénieur hautement qualifié n'est plus primordial, et le niveau de compétence de l'opérateur s'est maintenant déplacé plus vers la question scientifique elle-même, et moins vers le côté technique de la machine. Enfin, rien ne serait possible sans le développement des anticorps et fluorochromes nécessaires à ces analyses multiparamétriques. Un choix très important d'anticorps est maintenant disponible commercialement et il n'est donc plus nécessaire de les développer au laboratoire. Toutes ces avancées font qu'à l'heure actuelle, il n'est techniquement plus compliqué de réaliser une analyse multiparamétrique de 8, 10 ou même 12 couleurs.

En conclusion, les 2 articles publiés dans *Cytometry Part A* et *Journal of Immunological Methods*, issus de ce travail, détaillent par le menu les panels de cytométrie humaine et macaque rhésus, la configuration optique de l'instrument, les anticorps utilisés, ainsi que l'analyse des données et la description de chaque population cellulaire qui en découlent. Tous ces détails devraient permettre à d'autres chercheurs, possédant cette technologie, de réaliser très facilement ce genre d'analyse immunophénotypique complexe, que ce soit dans le domaine du SIDA, ou d'autres maladies infectieuses et/ou hématologiques.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- (1981) Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 30, 250-2.
- (2008) Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. Lancet 372, 293-9.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 18, 767-811.
- Banchereau, J., Fay, J., Pascual, V. and Palucka, A.K. (2003) Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. Novartis Found Symp 252, 226-35; discussion 235-8, 257-67.
- Barnett, D., Walker, B., Landay, A. and Denny, T.N. (2008) CD4 immunophenotyping in HIV infection. Nat Rev Microbiol 6, S7-15.
- Barratt-Boyes, S.M., Brown, K.N., Melhem, N., Soloff, A.C. and Gleason, S.M. (2006) Understanding and exploiting dendritic cells in human immunodeficiency virus infection using the nonhuman primate model. Immunol Res 36, 265-74.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220, 868-71.

- Baumgarth, N. and Roederer, M. (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243, 77-97.
- Bayne, K. (1996) Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist* 39, 199, 208-11.
- Beaujean, F. (1997) Methods of CD34+ cell separation: comparative analysis. *Transfus Sci* 18, 251-61.
- Bergeron, M., Nicholson, J.K., Phaneuf, S., Ding, T., Soucy, N., Badley, A.D., Hawley Foss, N.C. and Mandy, F. (2002) Selection of lymphocyte gating protocol has an impact on the level of reliability of T-cell subsets in aging specimens. *Cytometry* 50, 53-61.
- Bernard, A. and Boumsell, L. (1984) [Human leukocyte differentiation antigens]. *Presse Med* 13, 2311-6.
- Borrow, P. and Bhardwaj, N. (2008) Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* 3, 36-44.
- Braylan, R.C., Diamond, L.W., Powell, M.L. and Harty-Golder, B. (1980) Percentage of cells in the S phase of the cell cycle in human lymphoma determined by flow cytometry. *Cytometry* 1, 171-4.
- Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T. and Douek, D.C. (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200, 749-59.
- Brown, K.N. and Barratt-Boyes, S.M. (2009) Surface phenotype and rapid quantification of blood dendritic cell subsets in the rhesus macaque. *J Med Primatol* 38, 272-8.

- Brown, M. and Wittwer, C. (2000) Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 46, 1221-9.
- Butler, D. (2009) Jury still out on HIV vaccine results. *Nature* 461, 1187.
- Carter, D.L., Shieh, T.M., Blosser, R.L., Chadwick, K.R., Margolick, J.B., Hildreth, J.E., Clements, J.E. and Zink, M.C. (1999) CD56 identifies monocytes and not natural killer cells in rhesus macaques. *Cytometry* 37, 41-50.
- Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., Forster, R., Rowland-Jones, S., Sekaly, R.P., McMichael, A.J. and Pantaleo, G. (2001) Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410, 106-11.
- Chattopadhyay, P.K., Hogerkorp, C.M. and Roederer, M. (2008) A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology* 125, 441-9.
- Chattopadhyay, P.K., Price, D.A., Harper, T.F., Betts, M.R., Yu, J., Gostick, E., Perfetto, S.P., Goepfert, P., Koup, R.A., De Rosa, S.C., Bruchez, M.P. and Roederer, M. (2006) Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat Med* 12, 972-7.
- Chattopadhyay, P.K. and Roederer, M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease. *Cytometry A* 77, 614-22.
- Cohen, J. (2008) HIV/AIDS. Where have all the dollars gone? *Science* 321, 520.
- Coleman, C.M. and Wu, L. (2009) HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 6, 51.

- Corver, W.E., Fleuren, G.J. and Cornelisse, C.J. (2002) Software compensation improves the analysis of heterogeneous tumor samples stained for multiparameter DNA flow cytometry. *J Immunol Methods* 260, 97-107.
- Crowe, S.M. (2006) Macrophages and residual HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 1, 129-33.
- Davey, R.T., Jr. and Lane, H.C. (1990) Laboratory methods in the diagnosis and prognostic staging of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Rev Infect Dis* 12, 912-30.
- De Maria, A. and Moretta, L. (2008) NK cell function in HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 6, 433-40.
- De Rosa, S.C. (2004) Multicolor immunophenotyping: human mature immune system. *Methods Cell Biol* 75, 577-94.
- De Rosa, S.C., Brenchley, J.M. and Roederer, M. (2003) Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nat Med* 9, 112-7.
- De Rosa, S.C. and Roederer, M. (2001) Eleven-color flow cytometry. A powerful tool for elucidation of the complex immune system. *Clin Lab Med* 21, 697-712, vii.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000a) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343, 37-49.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000b) The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343, 108-17.
- DeMaria, M.A., Casto, M., O'Connell, M., Johnson, R.P. and Rosenzweig, M. (2000) Characterization of lymphocyte subsets in rhesus macaques during the first year of life. *Eur J Haematol* 65, 245-57.

- Desrosiers, R.C. and Ringler, D.J. (1989) Use of simian immunodeficiency viruses for AIDS research. *Intervirology* 30, 301-12.
- Donnenberg, V.S., O'Connell, P.J., Logar, A.J., Zeevi, A., Thomson, A.W. and Donnenberg, A.D. (2001) Rare-event analysis of circulating human dendritic cell subsets and their presumptive mouse counterparts. *Transplantation* 72, 1946-51.
- Egger, M., Hirschel, B., Francioli, P., Sudre, P., Wirz, M., Flepp, M., Rickenbach, M., Malinverni, R., Vernazza, P. and Battegay, M. (1997) Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multicentre study. *Swiss HIV Cohort Study. BMJ* 315, 1194-9.
- Farzadegan, H. (1994) HIV-1 antibodies and serology. *Clin Lab Med* 14, 257-69.
- Fauci, A.S., Mavilio, D. and Kottlilil, S. (2005) NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* 5, 835-43.
- Fiebig, H., Behn, I., Gruhn, R., Typlt, H., Kupper, H. and Ambrosius, H. (1984) [Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells]. *Allerg Immunol (Leipz)* 30, 242-50.
- Filion, L.G., Izaguirre, C.A., Garber, G.E., Huebsh, L. and Aye, M.T. (1990) Detection of surface and cytoplasmic CD4 on blood monocytes from normal and HIV-1 infected individuals. *J Immunol Methods* 135, 59-69.
- Forsman, A. and Weiss, R.A. (2008) Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol* 16, 555-60.
- Fox, H.S., Gold, L.H., Henriksen, S.J. and Bloom, F.E. (1997) Simian immunodeficiency virus: a model for neuroAIDS. *Neurobiol Dis* 4, 265-74.

- Friedman-Kien, A.E. (1981) Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol* 5, 468-71.
- Gardner, M.B. and Luciw, P.A. (2008) Macaque models of human infectious disease. *ILAR J* 49, 220-55.
- Gelmann, E.P., Popovic, M., Blayney, D., Masur, H., Sidhu, G., Stahl, R.E. and Gallo, R.C. (1983) Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS. *Science* 220, 862-5.
- Geretti, A.M. (1999) Simian immunodeficiency virus as a model of human HIV disease. *Rev Med Virol* 9, 57-67.
- Givan, A.L. (2004) Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 263, 1-32.
- Gomez, C. and Hope, T.J. (2005) The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol* 7, 621-6.
- Gottlieb, G.J., Ragaz, A., Vogel, J.V., Friedman-Kien, A., Rywlin, A.M., Weiner, E.A. and Ackerman, A.B. (1981a) A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am J Dermatopathol* 3, 111-4.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. and Saxon, A. (1981b) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305, 1425-31.
- Gruters, R.A., van Baalen, C.A. and Osterhaus, A.D. (2002) The advantage of early recognition of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes. *Vaccine* 20, 2011-5.

- Hengel, R.L. and Nicholson, J.K. (2001) An update on the use of flow cytometry in HIV infection and AIDS. *Clin Lab Med* 21, 841-56.
- Herbein, G., Coaquette, A., Perez-Bercoff, D. and Pancino, G. (2002) Macrophage activation and HIV infection: can the Trojan horse turn into a fortress? *Curr Mol Med* 2, 723-38.
- Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O. and Roederer, M. (2002) The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48, 1819-27.
- Herzenberg, L.A. and Sweet, R.G. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234, 108-17.
- Huizinga, T.W., de Haas, M., van Oers, M.H., Kleijer, M., Vile, H., van der Wouw, P.A., Moulijn, A., van Weezel, H., Roos, D. and von dem Borne, A.E. (1994) The plasma concentration of soluble Fc-gamma RIII is related to production of neutrophils. *Br J Haematol* 87, 459-63.
- Ibegbu, C., Brodie-Hill, A., Kourtis, A.P., Carter, A., McClure, H., Chen, Z.W. and Nahmias, A.J. (2001) Use of human CD3 monoclonal antibody for accurate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte determinations in macaques: phenotypic characterization of the CD3<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cell subset. *J Med Primatol* 30, 291-8.
- Ibrahim, S.F. and van den Engh, G. (2007) Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 106, 19-39.
- Jeffries, D., Zaidi, I., de Jong, B., Holland, M.J. and Miles, D.J. (2008) Analysis of flow cytometry data using an automatic processing tool. *Cytometry A* 73, 857-67.

- Ju, X., Clark, G. and Hart, D.N. Review of human DC subtypes. *Methods Mol Biol* 595, 3-20.
- Kapoor, V., Karpov, V., Linton, C., Subach, F.V., Verkhusha, V.V. and Telford, W.G. (2008) Solid state yellow and orange lasers for flow cytometry. *Cytometry A* 73, 570-7.
- Kapoor, V., Subach, F.V., Kozlov, V.G., Grudinin, A., Verkhusha, V.V. and Telford, W.G. (2007) New lasers for flow cytometry: filling the gaps. *Nat Methods* 4, 678-9.
- Kaur, A., Kassis, N., Hale, C.L., Simon, M., Elliott, M., Gomez-Yafal, A., Lifson, J.D., Desrosiers, R.C., Wang, F., Barry, P., Mach, M. and Johnson, R.P. (2003) Direct relationship between suppression of virus-specific immunity and emergence of cytomegalovirus disease in simian AIDS. *J Virol* 77, 5749-58.
- Keeney, M., Gratama, J.W. and Sutherland, D.R. (2004) Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. *Cytometry A* 58, 72-5.
- Kim, W.K., Corey, S., Alvarez, X. and Williams, K. (2003) Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *J Leukoc Biol* 74, 650-6.
- Kim, W.K., Sun, Y., Do, H., Autissier, P., Halpern, E.F., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D., Burdo, T.H., McGrath, M.S. and Williams, K. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J Leukoc Biol* 87, 557-67.
- Klimas, N., Koneru, A.O. and Fletcher, M.A. (2008) Overview of HIV. *Psychosom Med* 70, 523-30.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.

- Ledford, H. (2008a) HIV vaccine developers battle on, despite high-profile failures. *Nat Biotechnol* 26, 591-2.
- Ledford, H. (2008b) Merck's HIV vaccine flop brings vectors under closer scrutiny. *Nat Biotechnol* 26, 3-4.
- Lehner, T., Wang, Y., Pido-Lopez, J., Whittall, T., Bergmeier, L.A. and Babaahmady, K. (2008) The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine* 26, 2997-3001.
- Levy, J.A. (2001) The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol* 22, 312-6.
- Levy, J.A. (2009) HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* 23, 147-60.
- Li, D. and Xu, X.N. (2008) NKT cells in HIV-1 infection. *Cell Res* 18, 817-22.
- Lo, K., Brinkman, R.R. and Gottardo, R. (2008) Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. *Cytometry A* 73, 321-32.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J. and Hart, D.N. (2002) Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-20.
- Maecker, H.T., Rinfret, A., D'Souza, P., Darden, J., Roig, E., Landry, C., Hayes, P., Birungi, J., Anzala, O., Garcia, M., Harari, A., Frank, I., Baydo, R., Baker, M., Holbrook, J., Ottinger, J., Lamoreaux, L., Epling, C.L., Sinclair, E., Suni, M.A., Punt, K., Calarota, S., El-Bahi, S., Alter, G., Maila, H., Kuta, E., Cox, J., Gray, C., Altfeld, M., Nougarede, N., Boyer, J., Tussey, L., Tobery, T., Bredt, B., Roederer, M., Koup, R., Maino, V.C., Weinhold, K., Pantaleo, G., Gilmour, J., Horton, H.

- and Sekaly, R.P. (2005) Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol* 6, 13.
- Mahnke, Y.D. and Roederer, M. (2007) Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med* 27, 469-85, v.
- Malleret, B., Karlsson, I., Maneglier, B., Brochard, P., Delache, B., Andrieu, T., Muller-Trutwin, M., Beaumont, T., McCune, J.M., Banchereau, J., Le Grand, R. and Vaslin, B. (2008) Effect of SIVmac infection on plasmacytoid and CD1c+ myeloid dendritic cells in cynomolgus macaques. *Immunology* 124, 223-33.
- Mandy, F., Janossy, G., Bergeron, M., Pilon, R. and Faucher, S. (2008) Affordable CD4 T-cell enumeration for resource-limited regions: a status report for 2008. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1, S27-39.
- Mandy, F.F. (2004) Twenty-five years of clinical flow cytometry: AIDS accelerated global instrument distribution. *Cytometry A* 58, 55-6.
- Mandy, F.F., Bergeron, M. and Minkus, T. (1997) Evolution of leukocyte immunophenotyping as influenced by the HIV/AIDS pandemic: a short history of the development of gating strategies for CD4+ T-cell enumeration. *Cytometry* 30, 157-65.
- Mandy, F.F., Nicholson, J.K. and McDougal, J.S. (2003) Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 52, 1-13.

- Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M. and Roederer, M. (2005) Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434, 1093-7.
- Mattapallil, J.J., Letvin, N.L. and Roederer, M. (2004) T-cell dynamics during acute SIV infection. *AIDS* 18, 13-23.
- McCune, J.M. (2001) The dynamics of CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410, 974-9.
- McLaughlin, B.E., Baumgarth, N., Bigos, M., Roederer, M., De Rosa, S.C., Altman, J.D., Nixon, D.F., Ottinger, J., Oxford, C., Evans, T.G. and Asmuth, D.M. (2008) Nine-color flow cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part I: Panel design by an empiric approach. *Cytometry A* 73, 400-10.
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N. and Haynes, B.F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10, 11-23.
- McMichael, A.J. and Rowland-Jones, S.L. (2001) Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410, 980-7.
- Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P. and Markowitz, M. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200, 761-70.
- Melamed, M.R. (2001) A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods Cell Biol* 63, 3-17.

- Milstein, C. (1999) The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays* 21, 966-73.
- Mocroft, A., Ledergerber, B., Katlama, C., Kirk, O., Reiss, P., d'Arminio Monforte, A., Knysz, B., Dietrich, M., Phillips, A.N. and Lundgren, J.D. (2003) Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 362, 22-9.
- Mocroft, A., Vella, S., Benfield, T.L., Chiesi, A., Miller, V., Gargalianos, P., d'Arminio Monforte, A., Yust, I., Bruun, J.N., Phillips, A.N. and Lundgren, J.D. (1998) Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* 352, 1725-30.
- Mogensen, T.H., Melchjorsen, J., Larsen, C.S. and Paludan, S.R. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 7, 54.
- Moser, J.M., Byers, A.M. and Lukacher, A.E. (2002) NK cell receptors in antiviral immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 509-16.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-73.
- Newman, J.T., Nicodemus, D.S., Ordonez, G.A. and Stone, M.J. (1983) Lymphocyte phenotyping by fluorescence microscopy and flow cytometry: results in homosexual men and heterosexual controls. *AIDS Res* 1, 127-34.
- Palella, F.J., Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J. and Holmberg, S.D. (1998) Declining morbidity and

- mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-60.
- Palucka, K. and Banchereau, J. (1999) Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 19, 12-25.
- Pantaleo, G. and Fauci, A.S. (1996) Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 50, 825-54.
- Pantaleo, G., Graziosi, C. and Fauci, A.S. (1993) New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 328, 327-35.
- Parks, D.R., Hardy, R.R. and Herzenberg, L.A. (1984) Three-color immunofluorescence analysis of mouse B-lymphocyte subpopulations. *Cytometry* 5, 159-68.
- Perfetto, S.P., Ambrozak, D., Nguyen, R., Chattopadhyay, P. and Roederer, M. (2006a) Quality assurance for polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1522-30.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R.A. and Roederer, M. (2006b) Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods* 313, 199-208.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K. and Roederer, M. (2004) Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 648-55.
- Perfetto, S.P. and Roederer, M. (2007) Increased immunofluorescence sensitivity using 532 nm laser excitation. *Cytometry A* 71, 73-9.

- Petrausch, U., Haley, D., Miller, W., Floyd, K., Urba, W.J. and Walker, E. (2006) Polychromatic flow cytometry: a rapid method for the reduction and analysis of complex multiparameter data. *Cytometry A* 69, 1162-73.
- Petrovas, C., Price, D.A., Mattapallil, J., Ambrozak, D.R., Geldmacher, C., Cecchinato, V., Vaccari, M., Trynieszewska, E., Gostick, E., Roederer, M., Douek, D.C., Morgan, S.H., Davis, S.J., Franchini, G. and Koup, R.A. (2007) SIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. *Blood* 110, 928-36.
- Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sammicheli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F. and Wack, A. (2007) Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109, 5371-9.
- Pichyangkul, S., Saengkrai, P., Yongvanitchit, K., Limsomwong, C., Gettayacamin, M., Walsh, D.S., Stewart, V.A., Ballou, W.R. and Heppner, D.G. (2001) Isolation and characterization of rhesus blood dendritic cells using flow cytometry. *J Immunol Methods* 252, 15-23.
- Picker, L.J. and Watkins, D.I. (2005) HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol* 6, 430-2.
- Pierson, T., McArthur, J. and Siliciano, R.F. (2000) Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 18, 665-708.

- Piguet, V. and Steinman, R.M. (2007) The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol* 28, 503-10.
- Pitcher, C.J., Hagen, S.I., Walker, J.M., Lum, R., Mitchell, B.L., Maino, V.C., Axthelm, M.K. and Picker, L.J. (2002) Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *J Immunol* 168, 29-43.
- Poncelet, P. (2004) [Microbeads and flow cytometry: how and why put the "-metry" in immuno-cytometry?]. *Ann Biol Clin (Paris)* 62, 53-7.
- Recktenwald, D.J. (1993) Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration. *J Hematother* 2, 387-94.
- Reimann, K.A., Waite, B.C., Lee-Parritz, D.E., Lin, W., Uchanska-Ziegler, B., O'Connell, M.J. and Letvin, N.L. (1994) Use of human leukocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of rhesus monkeys. *Cytometry* 17, 102-8.
- Robinson, J.P. (2005) Comparative overview of flow and image cytometry. *Curr Protoc Cytom* Chapter 12, Unit 12 1.
- Roederer, M. (2002) Multiparameter FACS analysis. *Curr Protoc Immunol* Chapter 5, Unit 5 8.
- Roederer, M., De Rosa, S., Gerstein, R., Anderson, M., Bigos, M., Stovel, R., Nozaki, T., Parks, D. and Herzenberg, L. (1997) 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry* 29, 328-39.
- Rowland-Jones, S.L., Pinheiro, S., Kaul, R., Hansasuta, P., Gillespie, G., Dong, T., Plummer, F.A., Bwayo, J.B., Fidler, S., Weber, J., McMichael, A. and Appay, V.

- (2001) How important is the 'quality' of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? *Immunol Lett* 79, 15-20.
- Schwartz, A. and Fernandez-Repollet, E. (2001) Quantitative flow cytometry. *Clin Lab Med* 21, 743-61.
- Sestak, K., Scheiners, C., Wu, X.W. and Hollemweguer, E. (2007) Identification of anti-human CD antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 21-6.
- Shackney, S.E., Skramstad, K.S., Cunningham, R.E., Dugas, D.J., Lincoln, T.L. and Lukes, R.J. (1980) Dual parameter flow cytometry studies in human lymphomas. *J Clin Invest* 66, 1281-94.
- Shankar, P., Russo, M., Harnisch, B., Patterson, M., Skolnik, P. and Lieberman, J. (2000) Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96, 3094-101.
- Sopper, S., Stahl-Hennig, C., Demuth, M., Johnston, I.C., Dorries, R. and ter Meulen, V. (1997) Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. *Cytometry* 29, 351-62.
- Steinman, R.M. (2003) The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 51, 59-60.
- Stevenson, M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9, 853-60.
- Sutherland, D.R., Keeney, M. and Gratama, J.W. (2003) Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Protoc Cytom* Chapter 6, Unit 6 4.
- Tang, H., Kuhen, K.L. and Wong-Staal, F. (1999) Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 33, 133-70.

- Veazey, R.S., DeMaria, M., Chalifoux, L.V., Shvetz, D.E., Pauley, D.R., Knight, H.L., Rosenzweig, M., Johnson, R.P., Desrosiers, R.C. and Lackner, A.A. (1998) Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280, 427-31.
- Virgin, H.W. and Walker, B.D. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* 464, 224-31.
- Webster, R.L. and Johnson, R.P. (2005) Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology* 115, 206-14.
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D. and Shaw, G.M. (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307-12.
- Willey, S. and Aasa-Chapman, M.M. (2008) Humoral immunity to HIV-1: neutralisation and antibody effector functions. *Trends Microbiol* 16, 596-604.
- Williams, K.C. and Burdo, T.H. (2009) HIV and SIV infection: the role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. *APMIS* 117, 400-12.
- Williams, K.C. and Hickey, W.F. (2002) Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci* 25, 537-62.
- Zhang, J.Y., Zhang, Z., Wang, X., Fu, J.L., Yao, J., Jiao, Y., Chen, L., Zhang, H., Wei, J., Jin, L., Shi, M., Gao, G.F., Wu, H. and Wang, F.S. (2007) PD-1 up-regulation

is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109, 4671-8.

Zola, H., Swart, B., Banham, A., Barry, S., Beare, A., Bensussan, A., Boumsell, L., C, D.B., Buhring, H.J., Clark, G., Engel, P., Fox, D., Jin, B.Q., Macardle, P.J., Malavasi, F., Mason, D., Stockinger, H. and Yang, X. (2007) CD molecules 2006-  
-human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods* 319, 1-5.

Zuger, A. The data continue to support early ART . . . and now the guidelines do, too. In late 2009, both the DHHS and WHO guidelines raised the CD-4-cell-count threshold for starting treatment. *AIDS Clin Care* 22, 1-2.

## **ANNEXE**

## ANNEXE

### LISTE DES PUBLICATIONS :

1. **Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, Kenneth C. Williams. (2010). "Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans". *Cytometry Part A*, 77A: 410-419.
2. **Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia Burdo, Kenneth Williams. (2010). "Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry : Clarification on DC heterogeneity". *J. Immunol. Methods*, 360, 119-128.

### COMMUNICATIONS :

1. **Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia Burdo, Kenneth Williams. "Immunophenotypic analysis of dendritic cells using an 11-color panel flow cytometry". XXIV ISAC International Congress, Budapest, Hongrie, **Mai 2008**.
2. **Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia Burdo, Kenneth Williams. "Dendritic cells in humans and Rhesus monkeys: Phenotypic differences found using multicolor flow cytometry". Keystone meeting, Banff, Canada, **Mars 2009**.
3. **Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia Burdo, Kenneth Williams. "Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte and dendritic

cell subsets in humans". XXV ISAC International Congress, Seattle, WA, USA, **Mai 2010**.

4. **Patrick Autissier**, Caroline Soulas, Tricia Burdo, Kenneth Williams. "Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification on DC heterogeneity". 28<sup>th</sup> Annual Symposium on Non-Human Primate Models For AIDS, New Orleans, LA, USA, **Octobre 2010**.
5. Caroline Soulas, **Patrick Autissier**, Jeffrey D. Lifson, Michael Piatak Jr., and Kenneth C. Williams. "Modulation and Susceptibility to Infection of Blood Dendritic Cells during SIV Infection". 28<sup>th</sup> Annual Symposium on Non-Human Primate Models For AIDS, New Orleans, LA, USA, **Octobre 2010**.

Logo  
partenaire

**Patrick AUTISSIER**  
**PHÉNOTYPAGE DES CELLULES IMMUNITAIRES**  
**PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX**  
**MULTIPARAMÉTRIQUE : UN OUTIL INDISPENSABLE**  
**DANS L'IMMUNOPATHOLOGIE DU SIDA**

Logo  
partenaire

## Résumé

Le suivi des changements dans les populations de cellules immunitaires tels que les lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques (DC) au cours de maladies infectieuses comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez l'homme ou son équivalent chez le singe (VIS) est crucial. L'objectif de ce travail consiste en la mise au point de 2 panels multicolores de 12 anticorps permettant d'analyser simultanément les principales populations de cellules immunitaires, respectivement chez l'humain et le macaque rhésus. Au terme de ce travail, il est maintenant possible de mesurer précisément tous les principaux acteurs du système immunitaire, à savoir les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les lymphocytes B, les cellules NK et NKT, les sous-populations de monocytes, et toutes les sous-populations de cellules dendritiques. L'intérêt de ce travail est d'étudier les interactions entre les différentes populations de cellules immunitaires durant l'infection par VIH chez l'homme, ou VIS chez le singe ou potentiellement d'autres maladies, et en particulier de mieux comprendre le rôle important que les cellules dendritiques jouent dans la progression de ces maladies.

**Mots-clés** : Cytométrie en flux multiparamétrique, lymphocyte, monocyte, cellule dendritique, immunophénotypage, singe rhésus.

## Abstract

Monitoring changes in immune cell populations such as lymphocytes, monocytes and dendritic cells (DC) during infectious diseases like human immunodeficiency virus (HIV) or its counterpart in rhesus monkeys (SIV) is crucial. The goal of this work is to develop 2 multicolor flow cytometry panels comprising of 12 antibodies, allowing measuring simultaneously the main immune cells population, respectively in humans and rhesus monkeys. After 2 years of development and optimization, we can now measure precisely all the main actors of the immune system, that is CD4+ and CD8+ T lymphocytes, B lymphocytes, NK and NKT cells, the 3 monocyte subsets, and all the dendritic cell subsets. The advantage of this work is to study interactions between different cell populations of immune cells during HIV infection in humans, or SIV infection in monkeys, or potentially other diseases, and in particular to better understand the important role that dendritic cells might play in disease progression.

**Key-words** : Multiparameter flow cytometry, lymphocyte, monocyte, dendritic cell, immunophenotyping, rhesus monkey