

# La cytométrie en flux



# La cytométrie en flux

- Historique & définition
- Principes
- Applications
- Autres

# La cytométrie en flux

- Historique & définition
- Principes
- Applications
- Autres

# La cytométrie en flux

## Historique et Définition

Origines anciennes (relatif)

- 1934 : Premier appareil conçu par Moldavan :  
Numération cellulaire par capillaire/capteur photoélectrique  
(Science , [Moldavan, A. Photo-Electric Technique For The Counting Of Microscopical Cells. Science 1934: 188-189.](#))
- 1949 : Wallace Coulter dépose un brevet : Appareil permettant de compter et de mesurer la taille des cellules
- 1965 : Kamentsky : ajout de l'analyse des constituants cellulaires



# La cytométrie en flux

## Historique et Définition

- 1969 un des premier article décrivant le tri de cellules de mammifère (HERZENBERG , Stanford), puis en 1973 ses applications:

FACS ou Fluorescence Activated cell Sorter

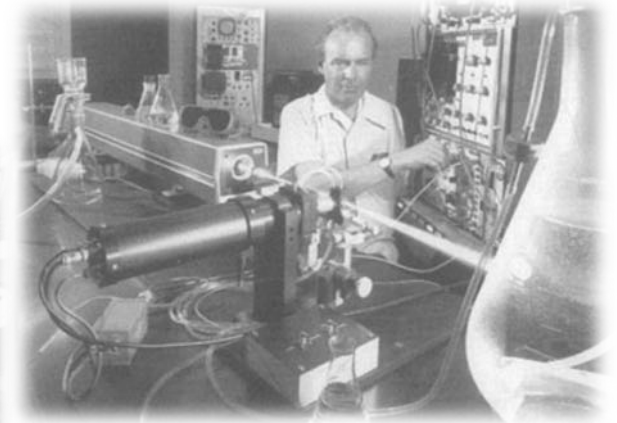
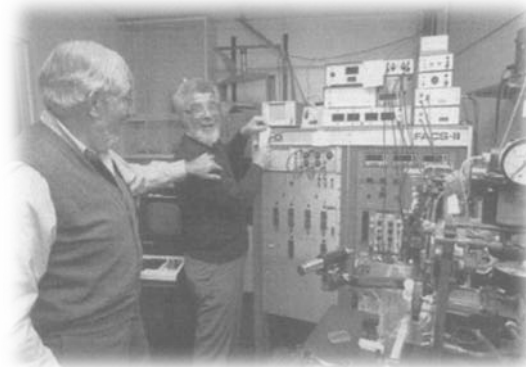
Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barrett, J. and Herzenberg, L.A. (1969) Cell sorting: Automated separation of Mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* **166**; 747-9.

Hulett, W.R., Bonner, W. A., Sweet, R. G. and Herzenberg, L. A. (1973) Development and application of a rapid cell sorter. *Clin. Chem.* **19**, 813-16.



- 1969 Marvin Van Dilla : utilisation du laser comme source de lumière

B. Shoor et L. Herzengerg devant  
le premier Cytomètre en flux  
Becton Dickinson



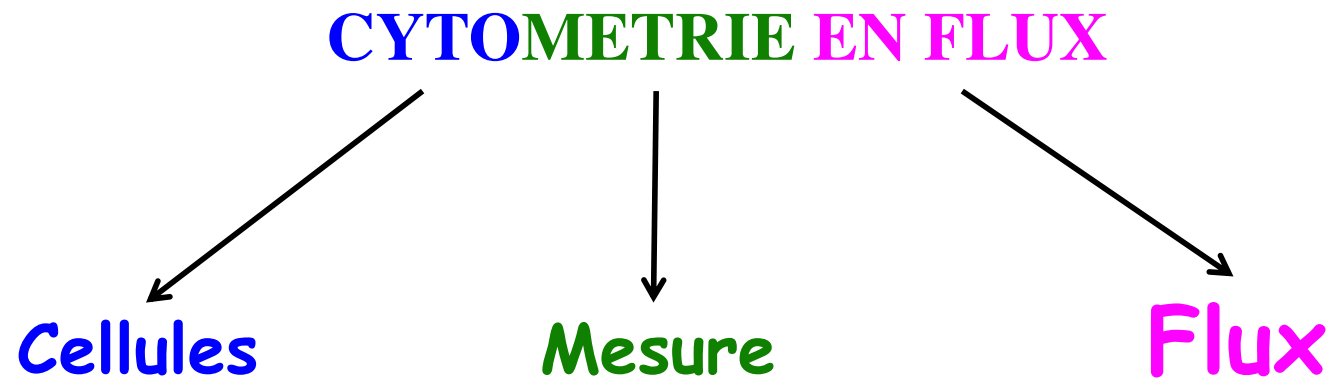
# La cytométrie en flux

## Historique et Définition

- 1974 commercialisation par Becton-Dickinson (FACSSII)
- 1980 Analyse de 3 paramètres de Fluorescence par cellule
- 1990 Analyse de 7 paramètres de fluo par cellule
- 2001 Analyse de 11 paramètres de fluo/cellule
- 2006 Analyse de 18 paramètre de fluo /cellule
- 2016 Analyse de 20 paramètres par cellule.....

# La cytométrie en flux

## Historique et Définition



# La cytométrie en flux

## Historique et Définition

→ Etude précise de *cellules isolées* entraînées par un *flux liquidien*.

→ Caractérisation :

- Individuelle,
- Quantitative,
- Qualitative
- Fonctionnelle

de particules en suspension dans un liquide.



# La cytométrie en flux

## Historique et Définition

**Consiste à :**

→ analyser les *signaux optiques ou physiques*

→ **émis** par une **particule**

→ coupant le **faisceau lumineux d'un laser** ou d'une lampe à arc.

# La cytométrie en flux

- Historique & définition
- **Principes**
- Applications
- Autres

# La cytométrie en flux

## Principe

### La cytométrie ?

#### Mesures simultanées

- des différentes caractéristiques d'une cellule ou particule

#### Mesures effectuées pendant que les cellules défilent une à une

- dans une chambre d'analyse,
- à plus ou moins grande vitesse.

# La cytométrie en flux

Principe : quelles informations?

## Quelles informations sur la cellule ?

→ Sa taille (Forward scatter : FSC)

→ Sa granularité ou complexité interne (Side Scatter = SSC)

→ Son intensité de fluorescence (en fonction des fluorochromes)



**Diffraction**

**Fluo**

# La cytométrie en flux

Principe : quelles informations?

## Diffraction

Chaque événement passant devant le faisceau laser va diffracter de la lumière.

On mesure :



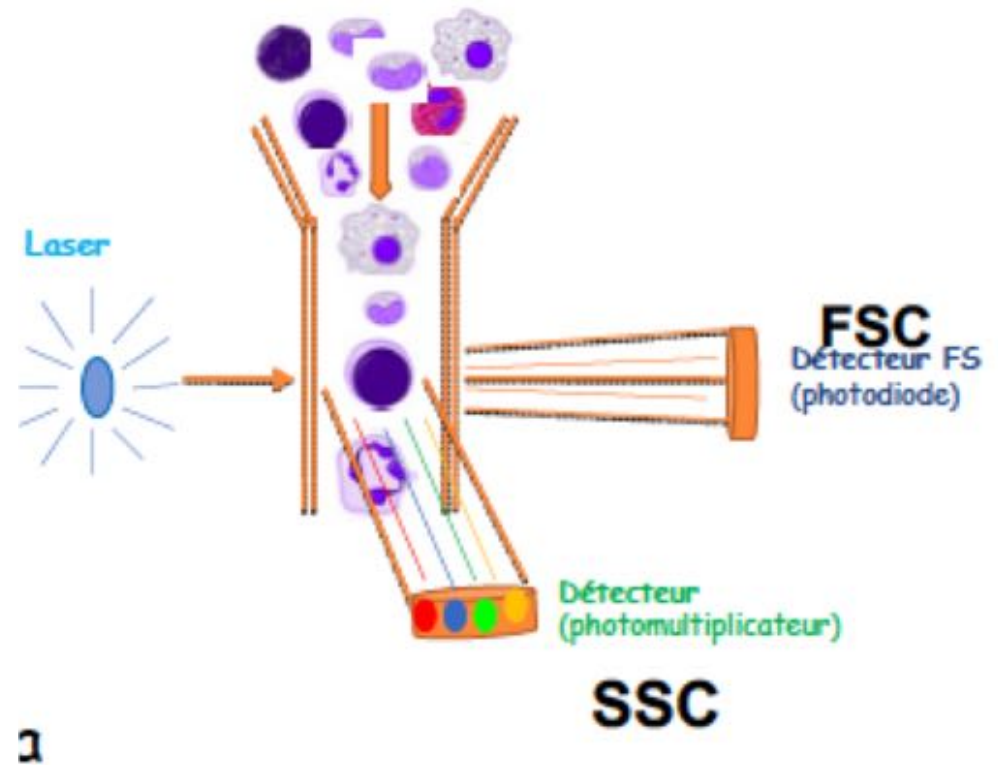
### Taille des cellules (FSC)

Diffraction proportionnelle à la taille des cellules



### Structure des cellules (SSC)

Diffraction proportionnelle à la granularité ou complexité de la cellules



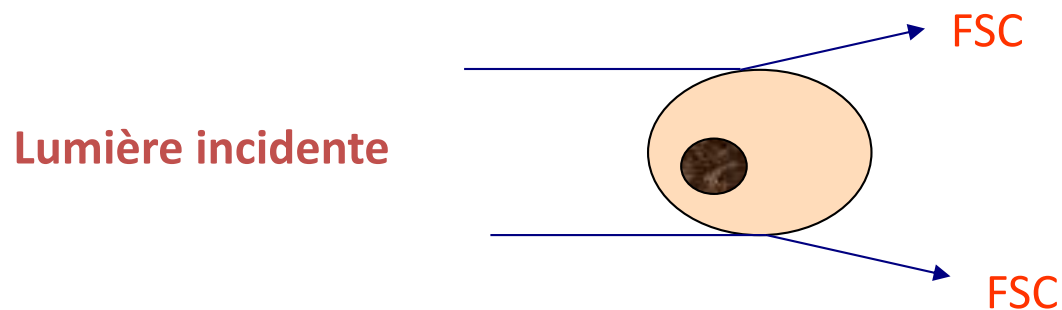
# La cytométrie en flux

## Principe : quelles informations?

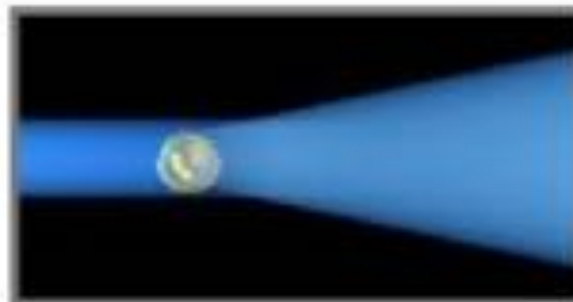
**FORWARD SCATTER** = Lumière diffractée aux petits angles

→ La lumière diffractée est collectée sous un petit angle (compris entre 1 et 10 degrés),

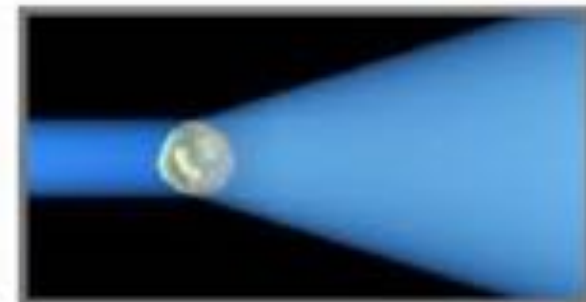
→ Le signal est proportionnel à la **taille de la cellule.**



**FSC : Forward SCatter**  
Évalue la taille des cellules



le détecteur est presque aligné avec le laser,  
il se trouve dans le cône de lumière diffractée

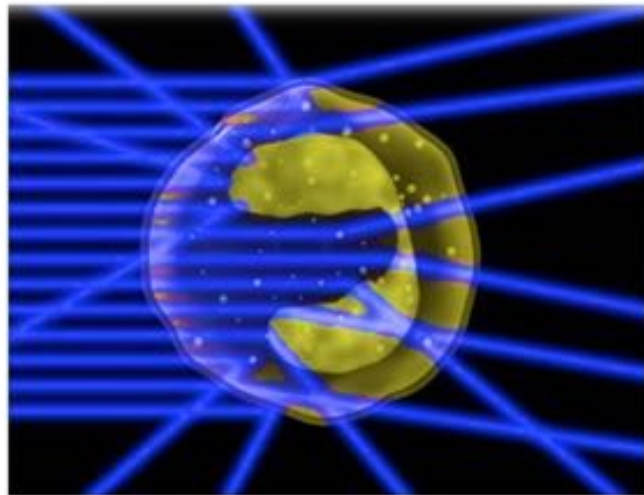
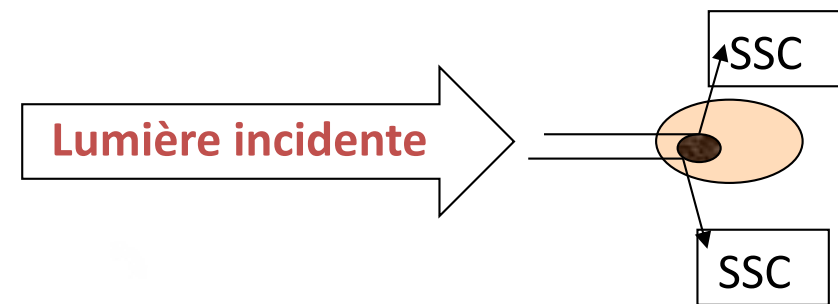


# La cytométrie en flux

## Principe : quelles informations?

SIDE SCATTER = Lumière diffractée aux grands angles

- La lumière diffractée est collectée à 90° de l'axe du laser,
- Le signal est proportionnel à la granularité et la complexité cellulaire.



Le détecteur est plus ou moins perpendiculaire au rayon laser il se trouve dans la zone de lumière largement diffractée

SSC : Side SCatter Évalue la granularité

position approximative du détecteur

Permet de faire un premier tri en caractérisant taille et structure

# Exemple: sur du sang total lysé

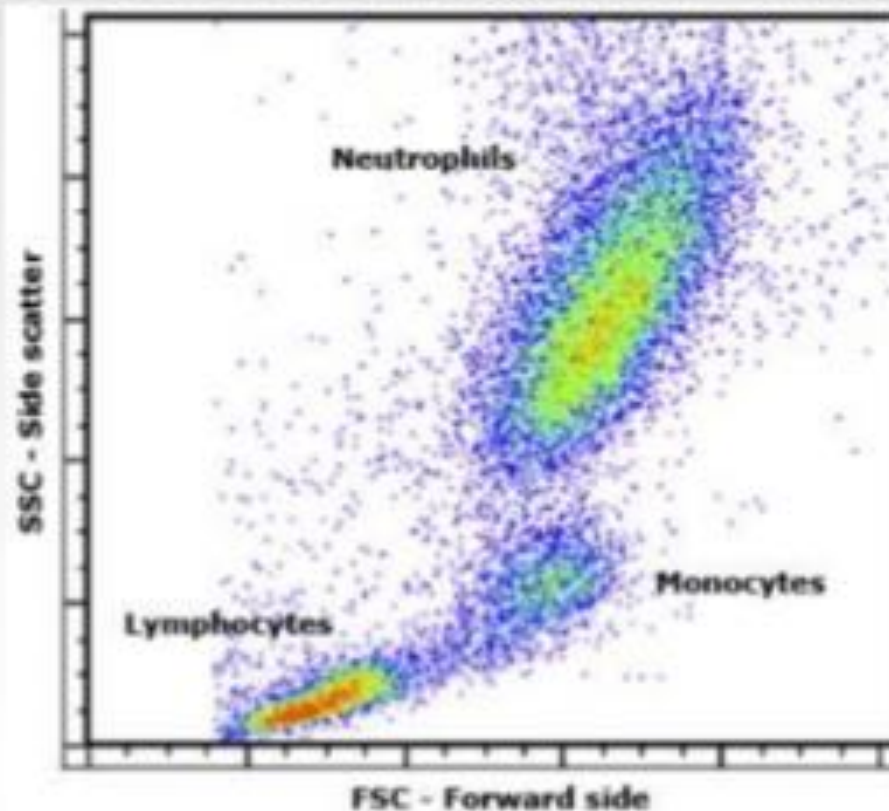
## How Flow Cytometers Work

FSC vs. SSC alone tells us a great deal about our cells.

Lymphocyte



Monocyte



Eosinophil



Basophil



Neutrophil

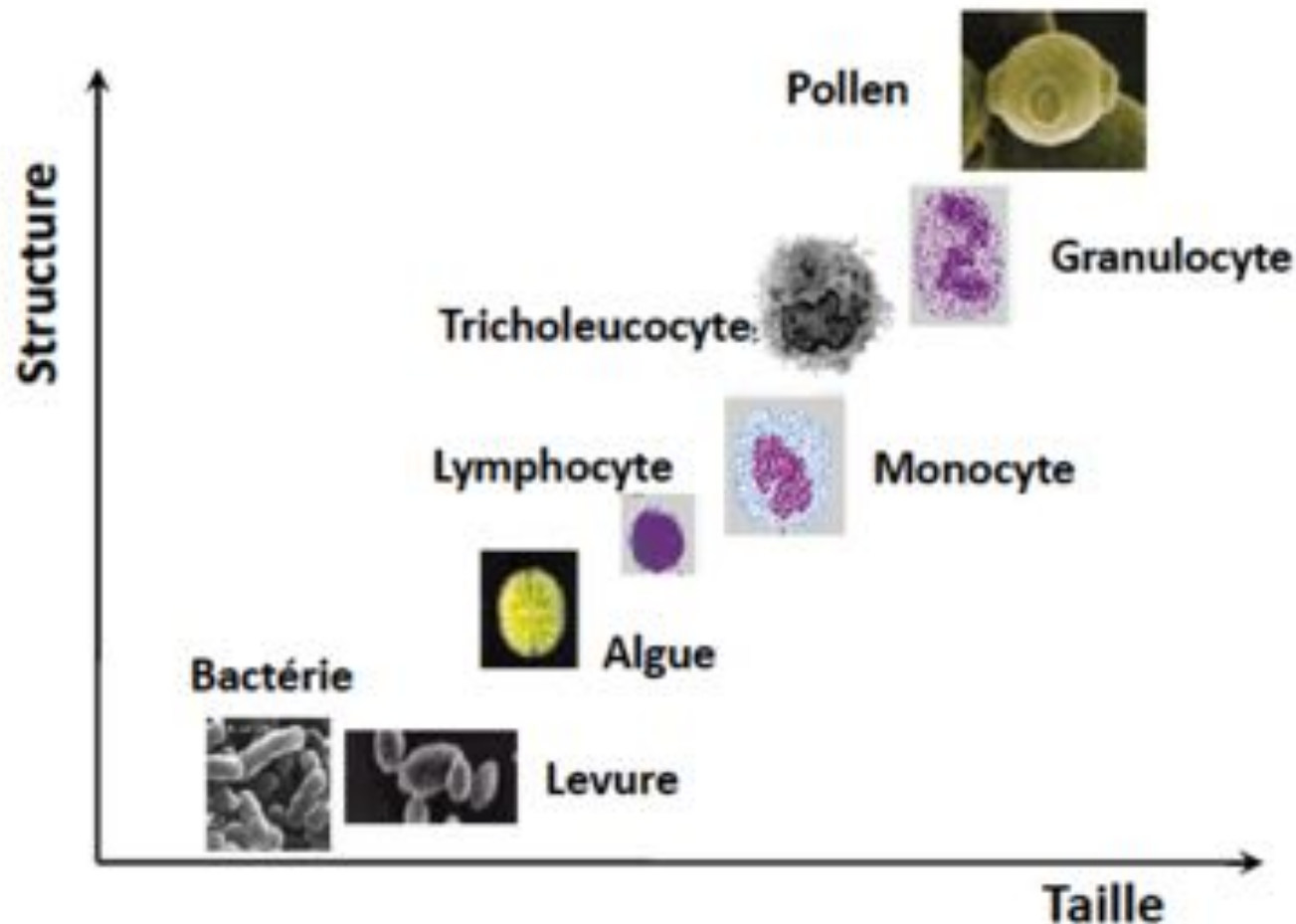




# La cytométrie en flux

Principe : quelles informations?

## Mesure de la cellule

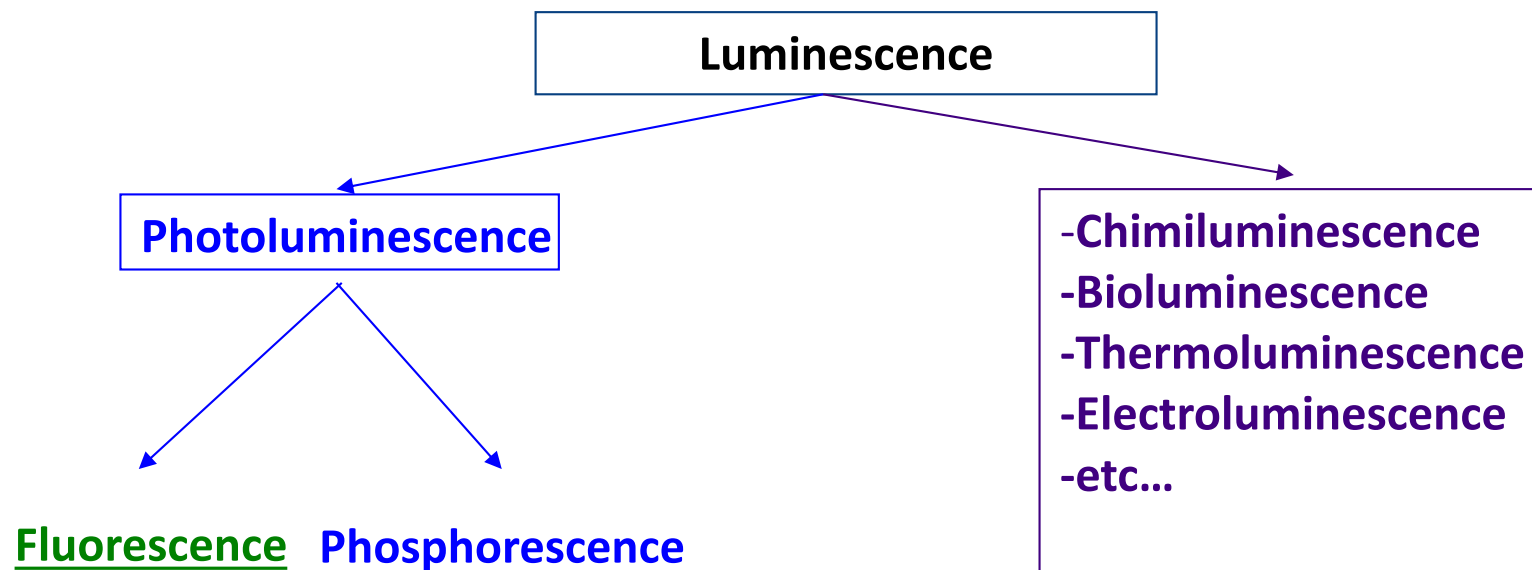


Mesure des particules allant 100nm à 100 µm

# La cytométrie en flux

## Principe : quelles informations?

**Fluorescence** : chaque événement passant devant un laser peut aussi émettre de la fluorescence qui sera mesurée à 90°C.



- **La photoluminescence** est un phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse (photons de lumière visible ou UV)

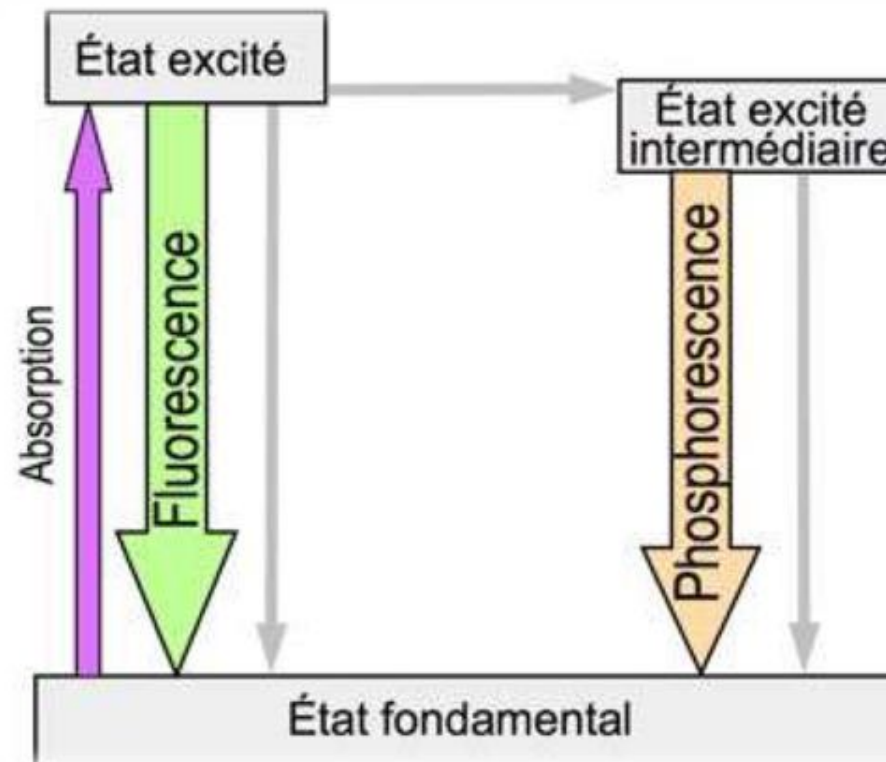
- **La chimiluminescence** est un phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique (chimiluminescence vraie) ....

# La cytométrie en flux

## Principe : quelles informations?

**Fluorescence** est une Emission lumineuse suivant  
1-l'excitation d'une molécule (absorption d'un photon)  
2-l'émission spontanée rapide

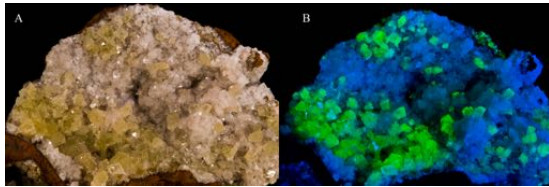
**Différent de la Phosphorescence** : beaucoup moins rapide  
car passe par un état de transition  $S_0$  vers  $S_1$



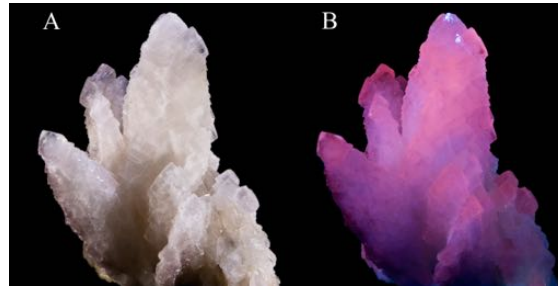
# La cytométrie en flux

## Principe : quelles informations?

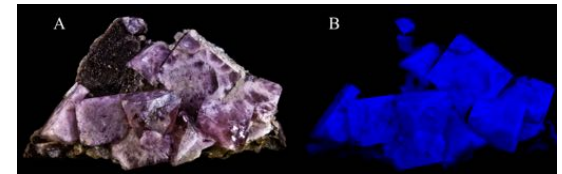
### Fluorescence naturelle:



Adamite: Verte  
Hémmimorphite : Bleu pâle



Calcite



Fluorite



Sous UVA

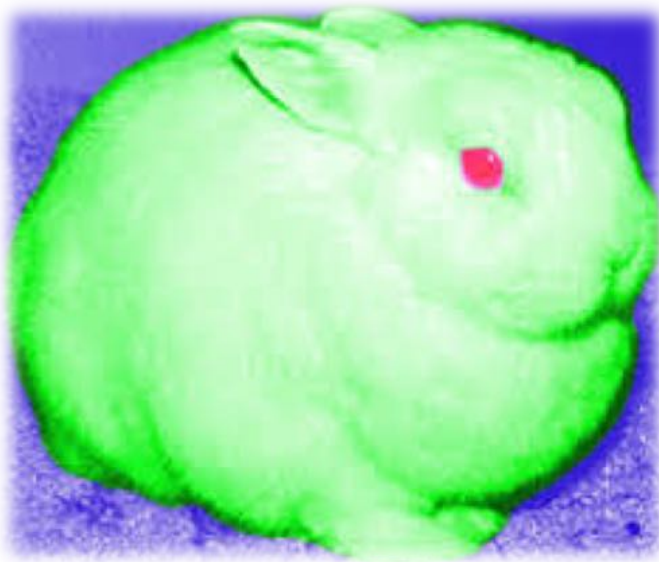


Quinine sous UV

# La cytométrie en flux

Principe : quelles informations?

Fluorescence importée:



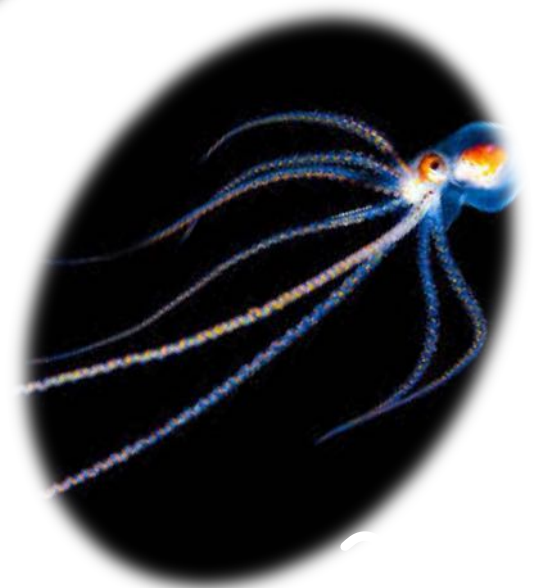
Souris ou autre GFP sous promoteur ubiquitaire



# La cytométrie en flux

Principe : quelles informations?

Phosphorescence naturelle:

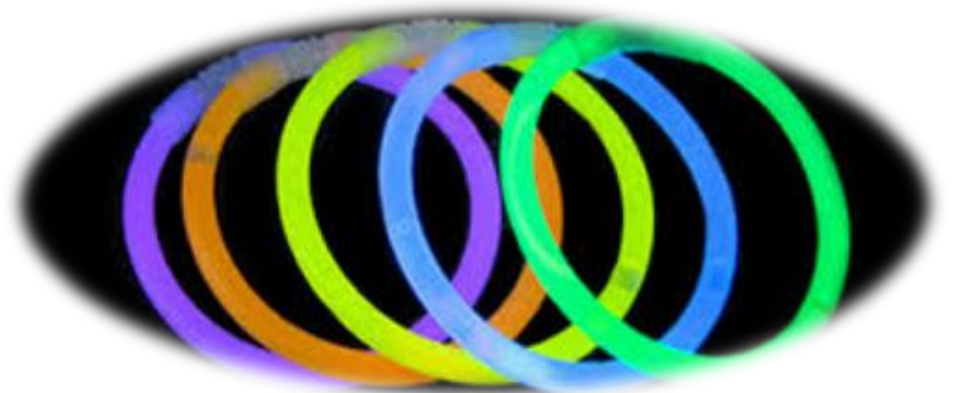
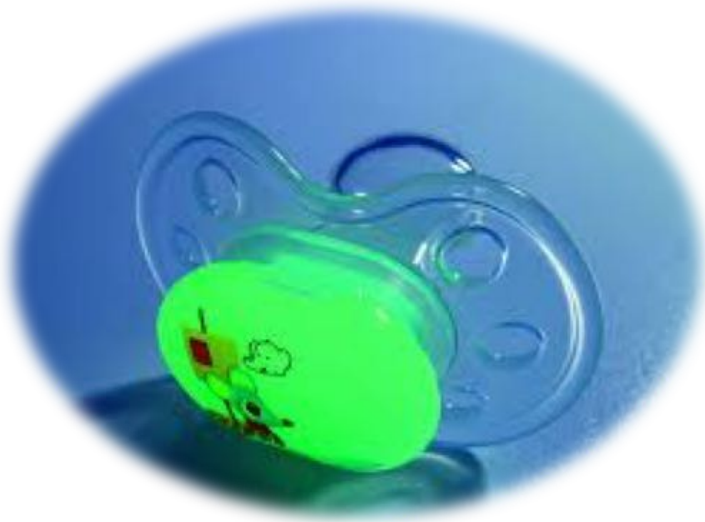


# La cytométrie en flux

Principe : quelles informations?



Phosphorescence artificielle:



# La cytométrie en flux

## Principe : fonctionnement?

### FLUIDIQUE

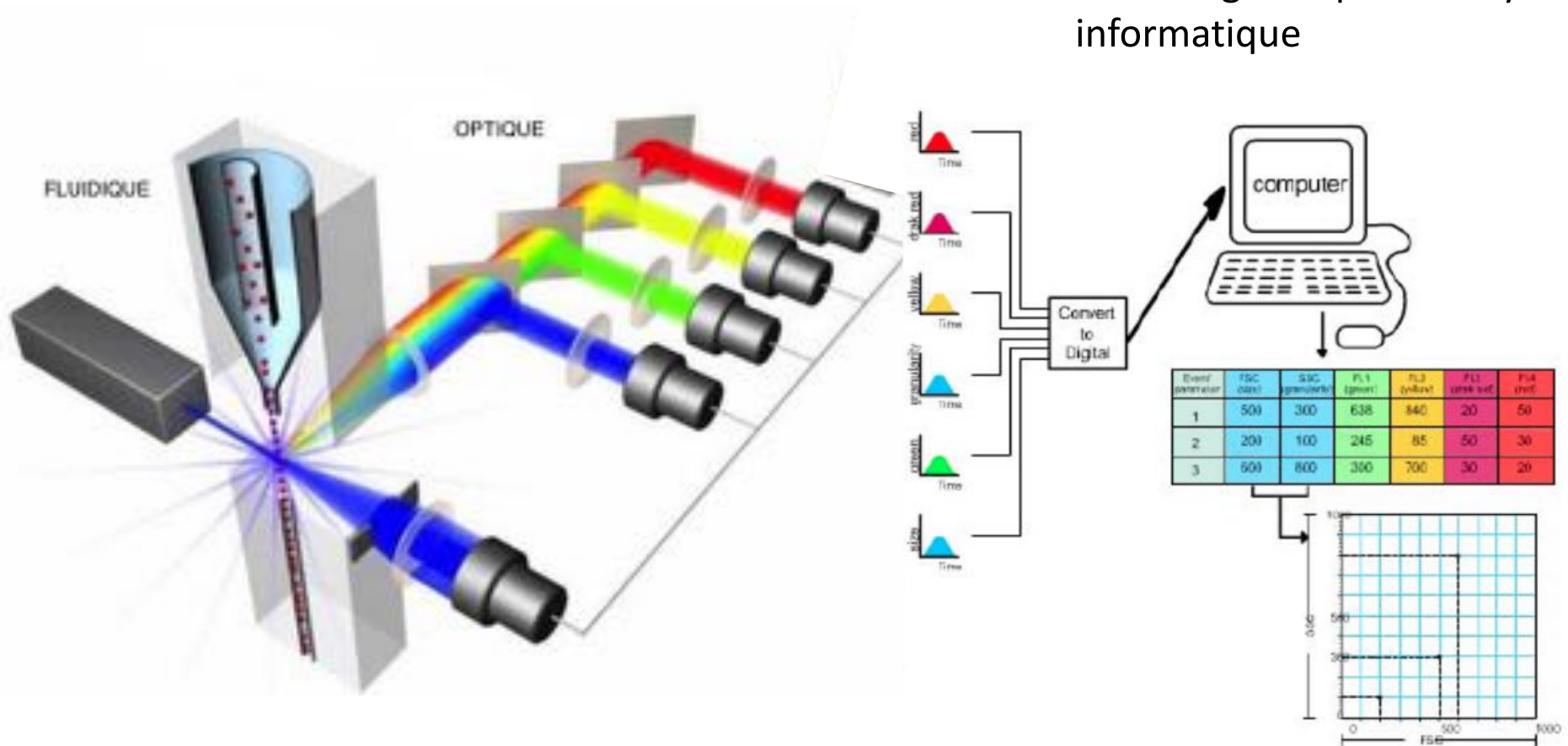
Introduction et positionnement des cellules

### OPTIQUE

Production et recueil de signaux lumineux

### ELECTRONIQUE

Conversion des signaux optiques en signaux électroniques et numérisation de ces signaux pour analyse informatique



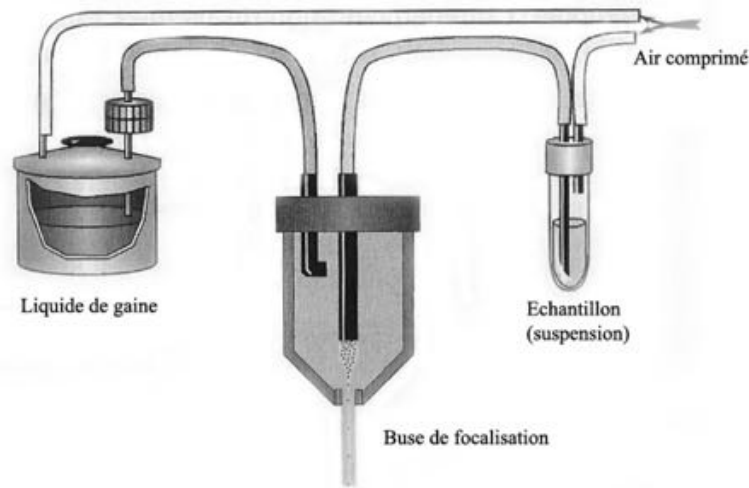


# La cytométrie en flux

## Principe : fluide

Particularité des cytomètres est d'analyser une cellule à la fois, Pour cela :

- Les cellules sont mises en suspension
- Elles sont entraînées par une pompe et envoyées une à une ( principe d'hydrofocalisation) devant un ou plusieurs lasers



- centrage des cellules dans un flux laminaire (focalisation hydrodynamique)
  - Accélération progressive (séparation des cellules)
  - Passage dans une buse (canalisation, centrage)

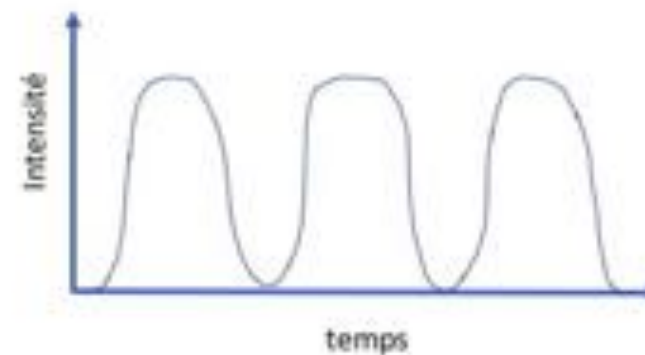
# La cytométrie en flux

## Principe : fluide

Nécessité d'un centrage des cellules dans un flux laminaire : focalisation hydrodynamique

### Pour cela :

- Accélération progressive (séparation des cellules)
- Passage dans une buse (canalisation, centrage)

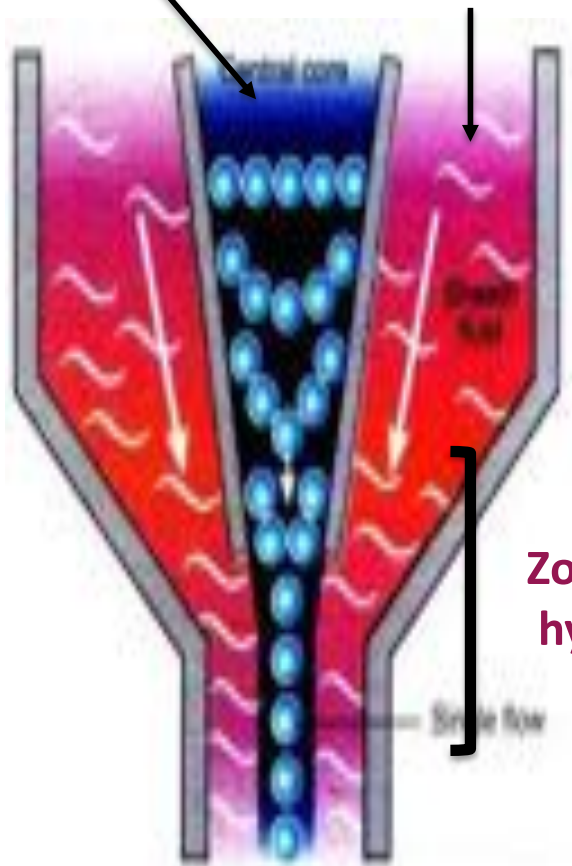


# La cytométrie en flux

## Principe : fluide

Echantillon  
sous pression

Liquide  
de gaine  
sous pression



Zone de focalisation  
hydrodynamique

- Centrage et alignement des cellules dans un flux laminaire (focalisation hydrodynamique)

- Accélération progressive du liquide gaine = étirement du liquide de gaine (séparation des cellules)

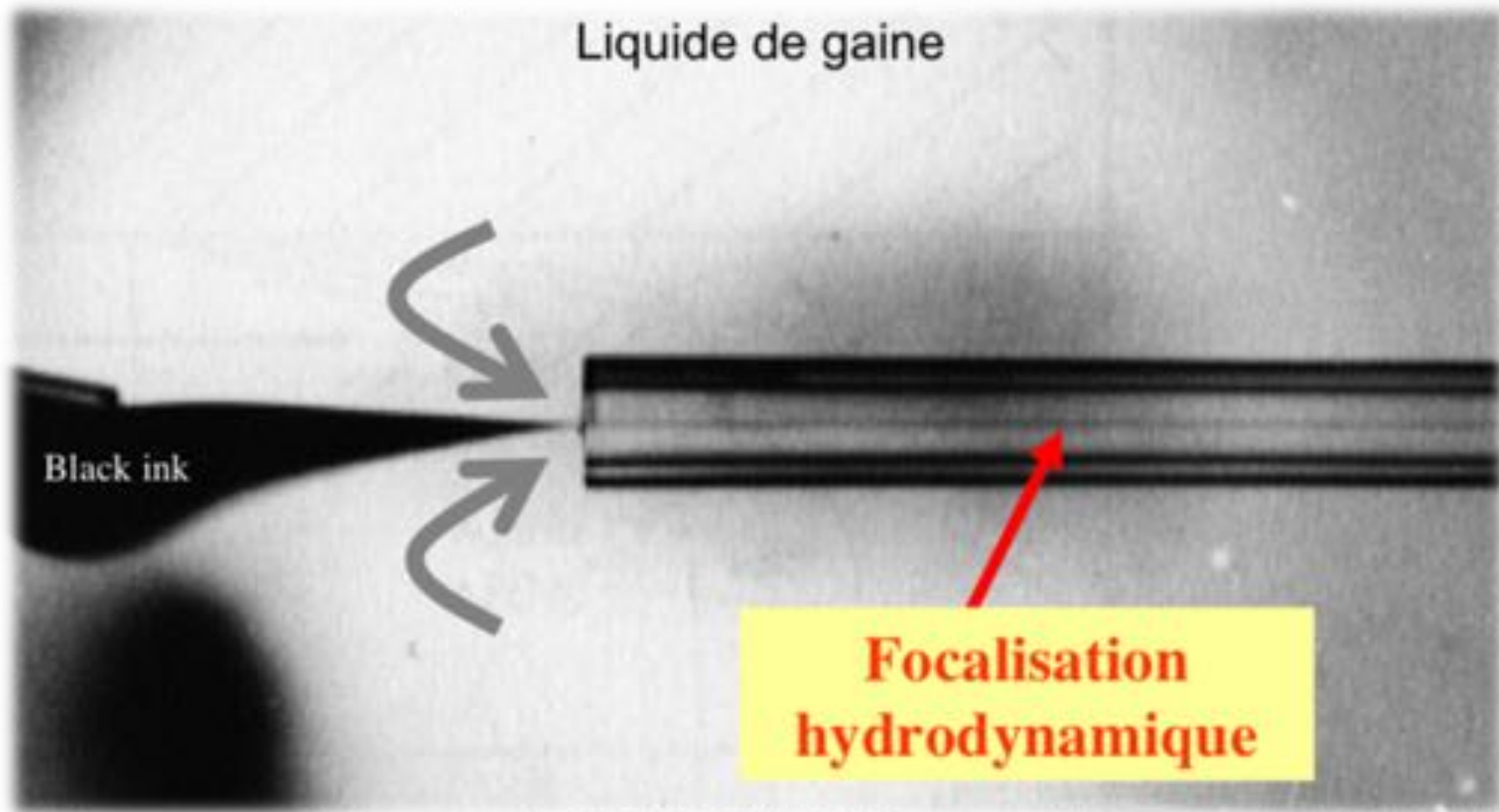
- Passage dans une buse (canalisation, centrage)

LASER

Pas de mélange entre le liquide de gaine et l'échantillon car différence de pression

# La cytométrie en flux

Principe : fluide



# La cytométrie en flux

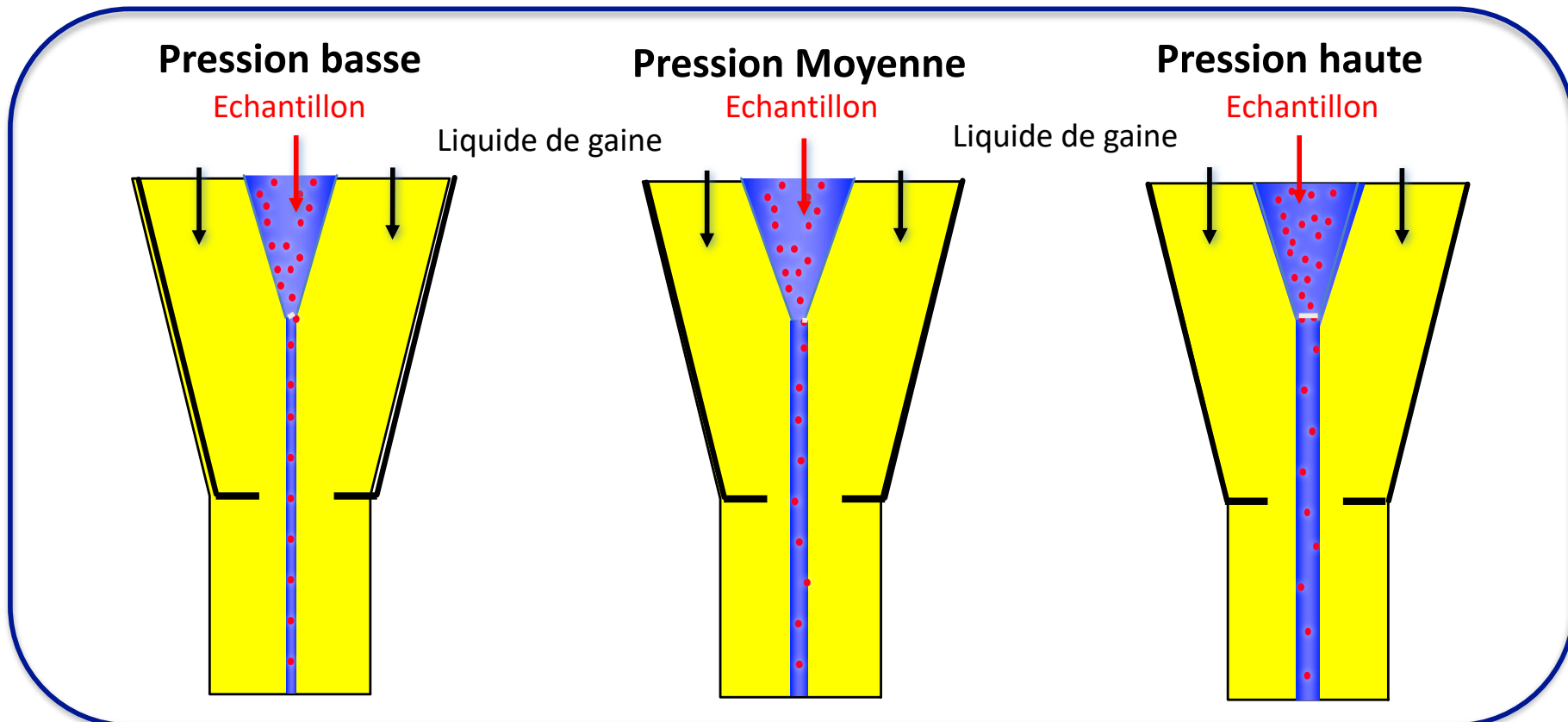
## Principe : fluide

### Différences de pressions

La pression de liquide de gaine reste la même, à la différence de l'échantillon

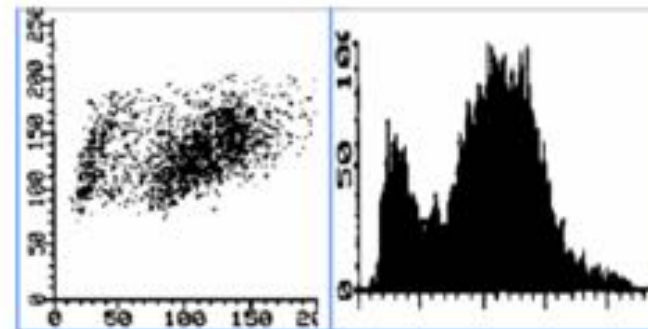
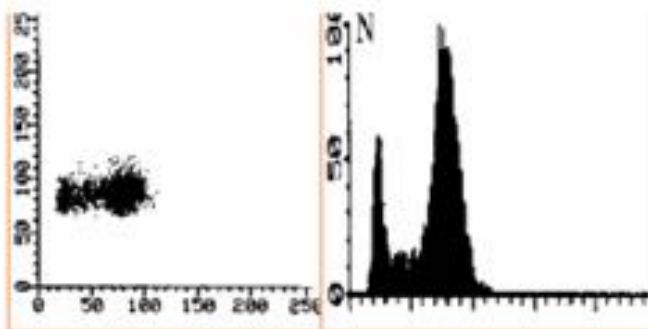
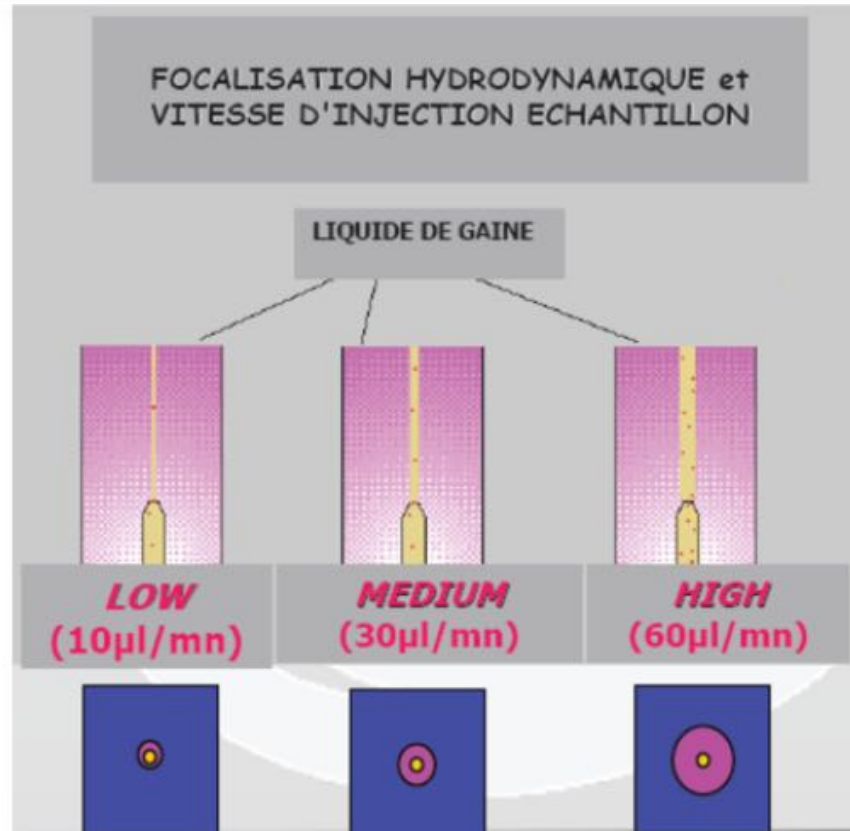
Une augmentation de pression entraîne une augmentation du débit

Plus la pression augmente plus les cellules ont de liberté de mouvement



# La cytométrie en flux

## Principe : fluidique



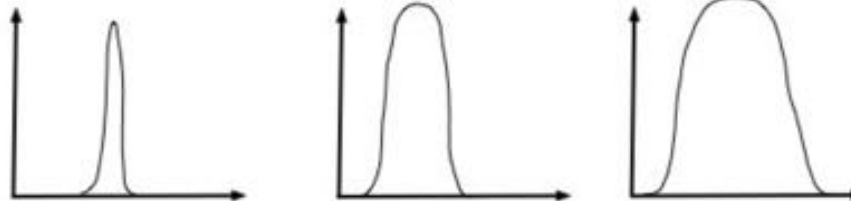
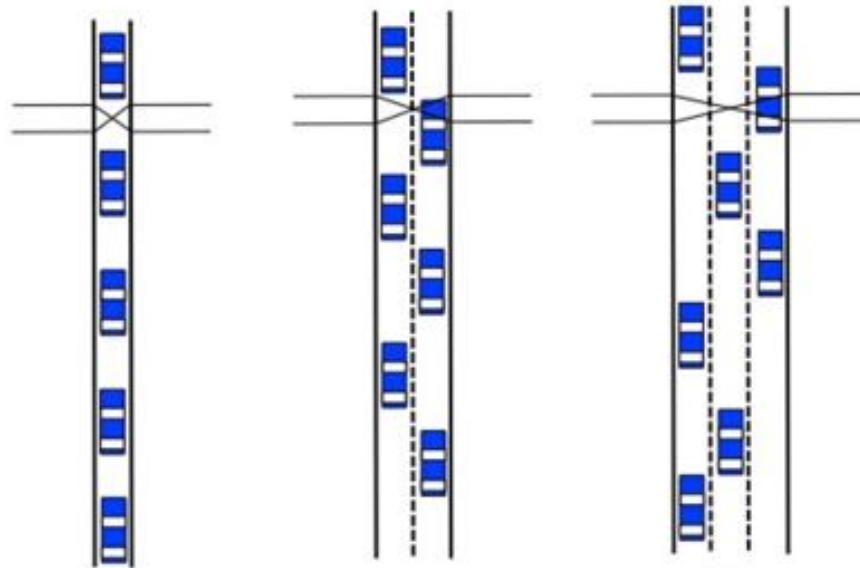
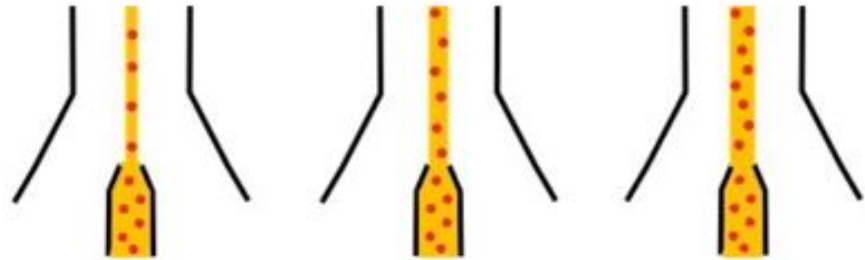
# La cytométrie en flux

Principe : fluïdique

Basse

Moyenne

Forte



# La cytométrie en flux

## Principe : optique d'émission

- Il est **nécessaire de focaliser la source lumineuse** sur les cellules
- Doit permettre une **illumination des colorants** à une longueur d'onde proche de leur max d'excitation
- Pour cela :
  - Les lasers (les + fréquemment utilisés) : puissance, stabilité
  - Les lampes à vapeur : (mercure, Xénon) : - cher mais - précis



# La cytométrie en flux

## Principe : optique

### 1-L'optique d'excitation se compose :

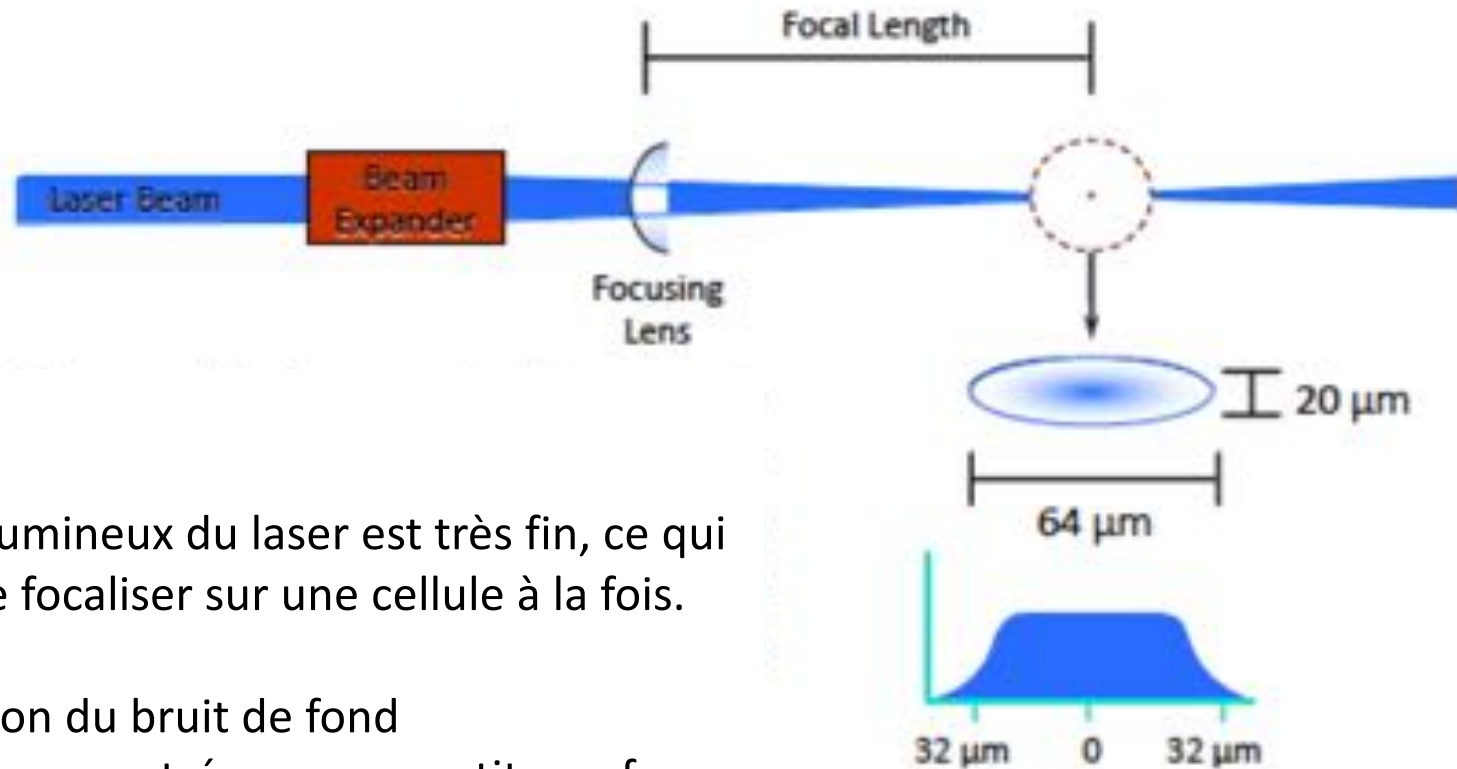
- une ou des sources d'excitation (laser(s)...)
- des lentilles et des prismes pour focaliser le faisceau laser

### 2-L'optique de réception se compose de :

- une lentille pour collecter la lumière émise
- un système de miroirs et de filtres optiques pour diriger les longueurs d'onde spécifiques sur les détecteurs correspondant

# La cytométrie en flux

## Principe : optique d'émission



Le faisceau lumineux du laser est très fin, ce qui permet de le focaliser sur une cellule à la fois.

Limitation du bruit de fond  
Energie concentrée sur une petite surface  
Excitation lumineuse monochromatique  
très puissante

# La cytométrie en flux

## Principe : optique d'émission

- La lumière venant d'un laser est :  
monochromatique  
Unidirectionnelle

- Les lasers les plus utilisés :

Laser UV 325 nm : UV

Laser 405 nm : violet

Laser 488 nm : bleu

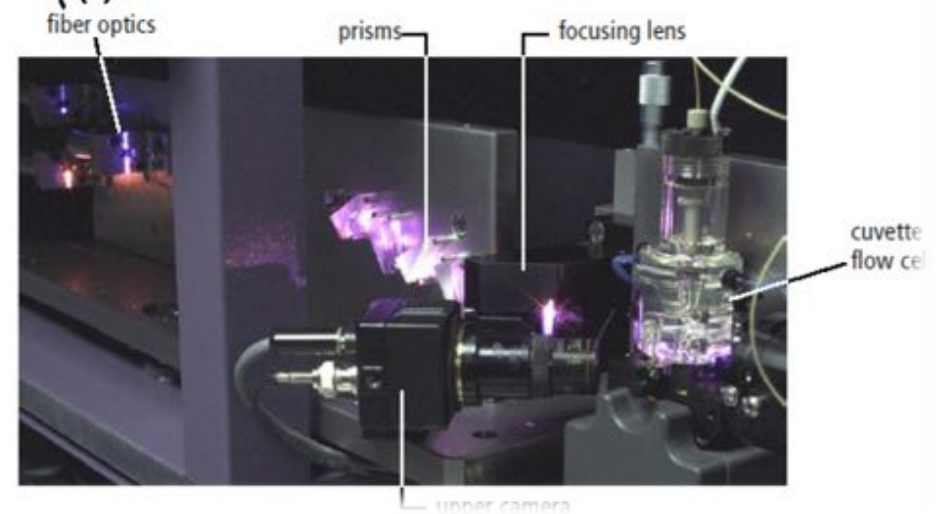
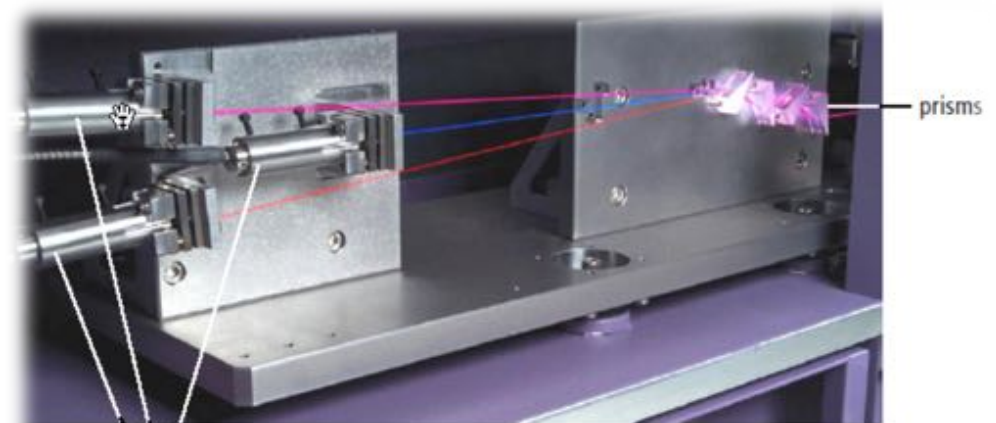
Laser 532nm : vert

Laser 561 jaune

Laser 592 nm : orange

Laser 635nm : rouge

Un système de prismes et de lentilles canalise le laser vers la chambre d'analyse




# La cytométrie en flux

## Principe : optique de réception

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être

 focalisés

 séparés

 acheminés vers des systèmes de détection:  
photomultiplicateurs ou  
photodiodes

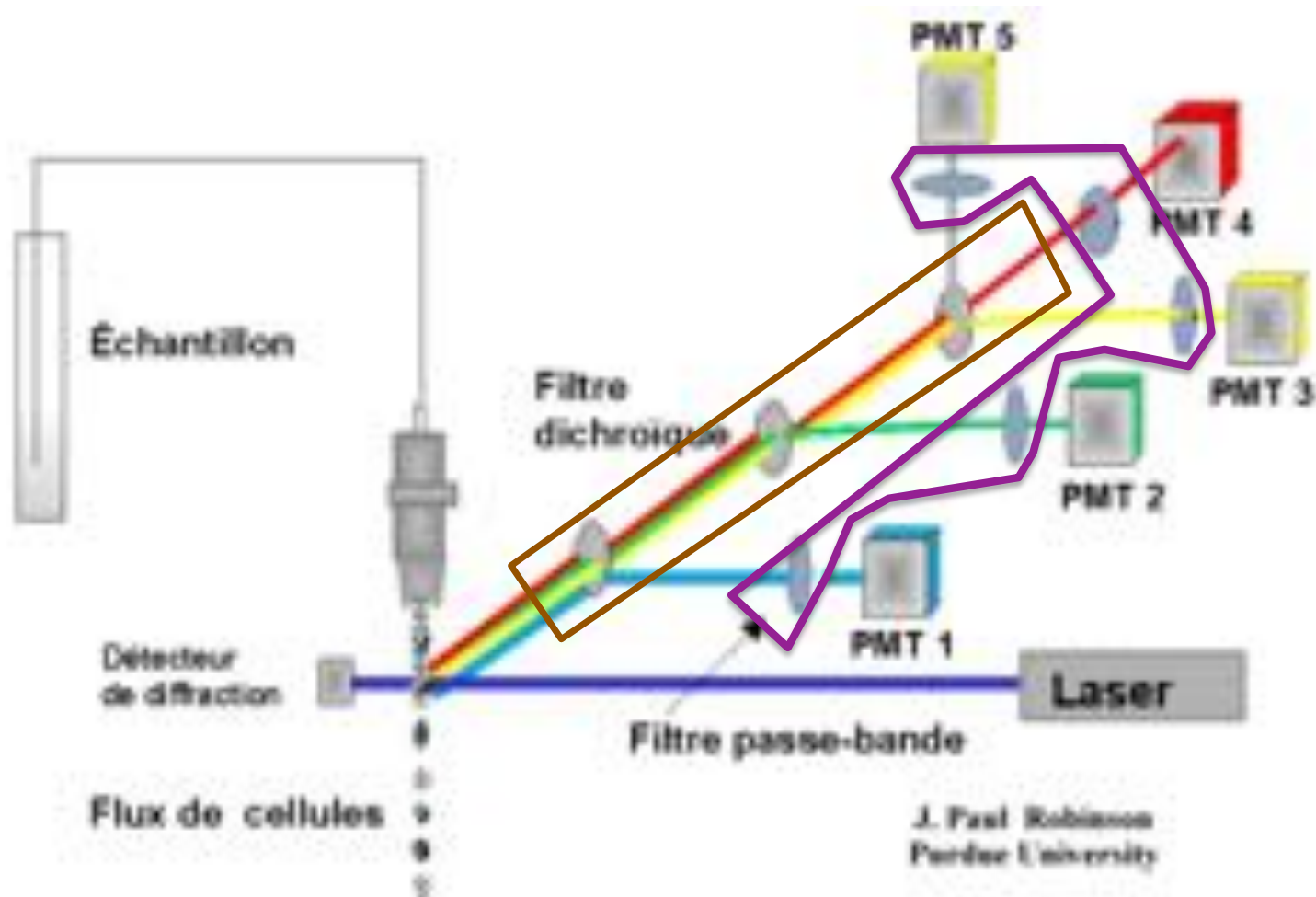


Pour cela : sélection par **différents circuits optiques**  
composés de **miroirs et de filtres**

# La cytométrie en flux

## Principe : optique de réception

Composé de miroirs dichroïques et de filtres optiques

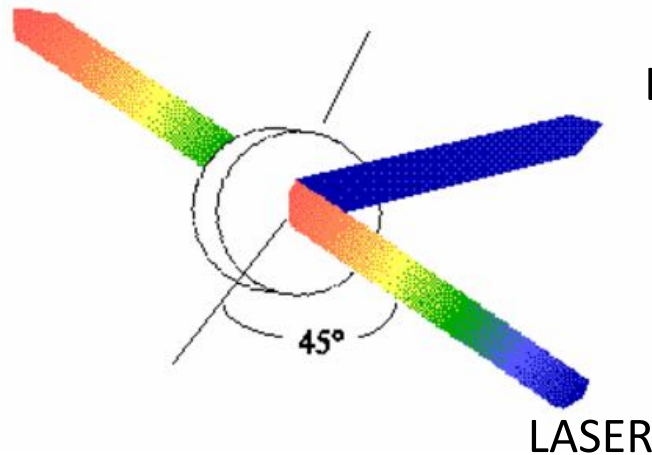


# La cytométrie en flux

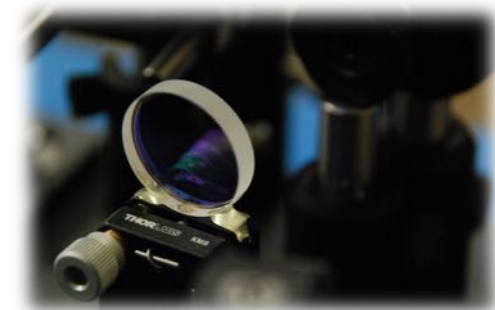
## Principe : optique de réception

Le **miroir dichroïque** permet d'aiguiller chaque signal vers le détecteur approprié.

Lumière transmise  
Dans l'axe de la source  
(**Transmission**)



Lumière réfléchié à 90°  
(**Réflexion**)



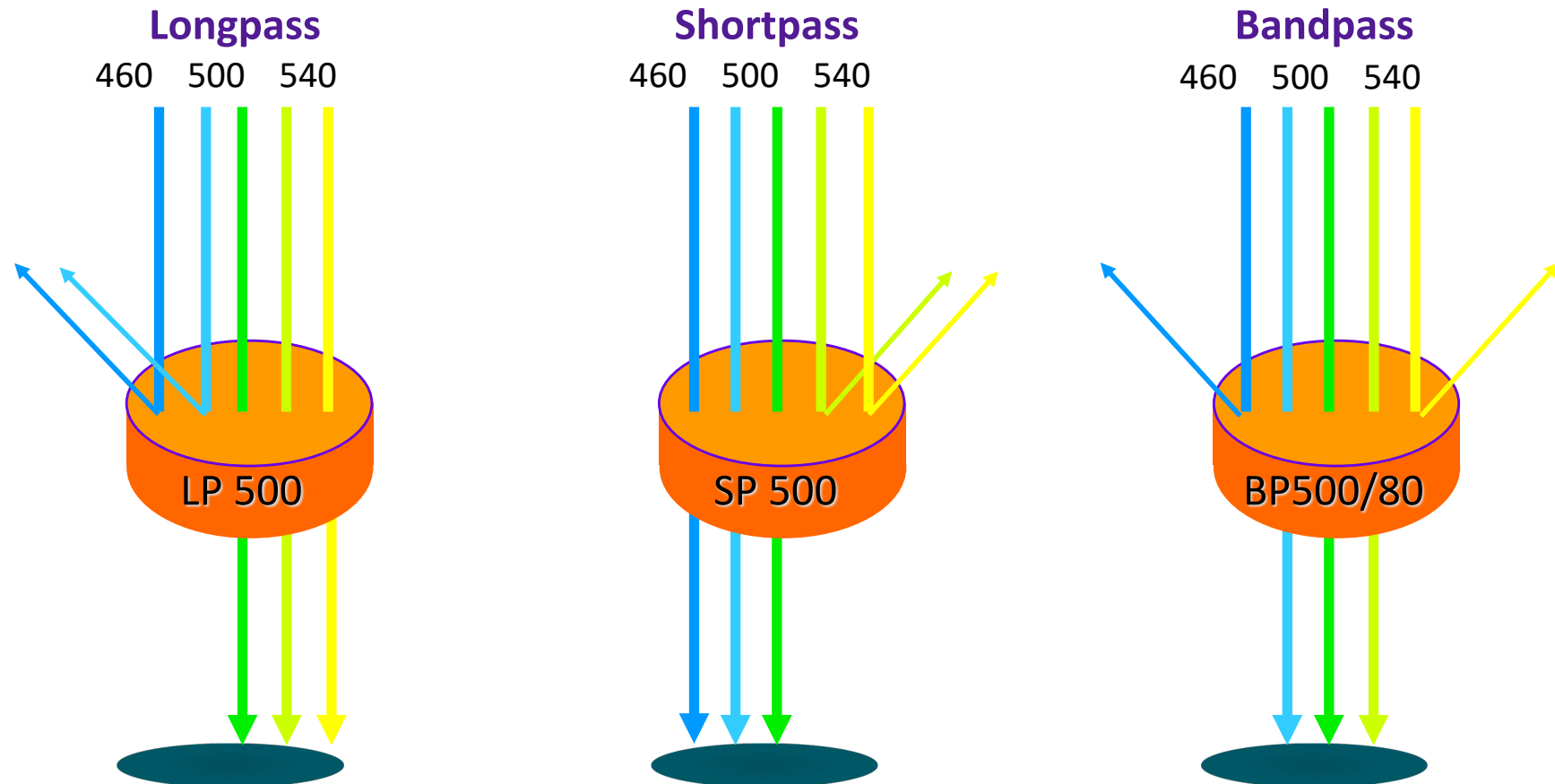
Permet le **passage** du signal dans une direction : **Transmission**  
Permet l'**envoi** du signal dans une autre direction : **Réflexion**

# La cytométrie en flux

## Principe : optique de réception

**Filtres optiques** : composés absorbant certaines longueurs d'onde et transmettent les autres

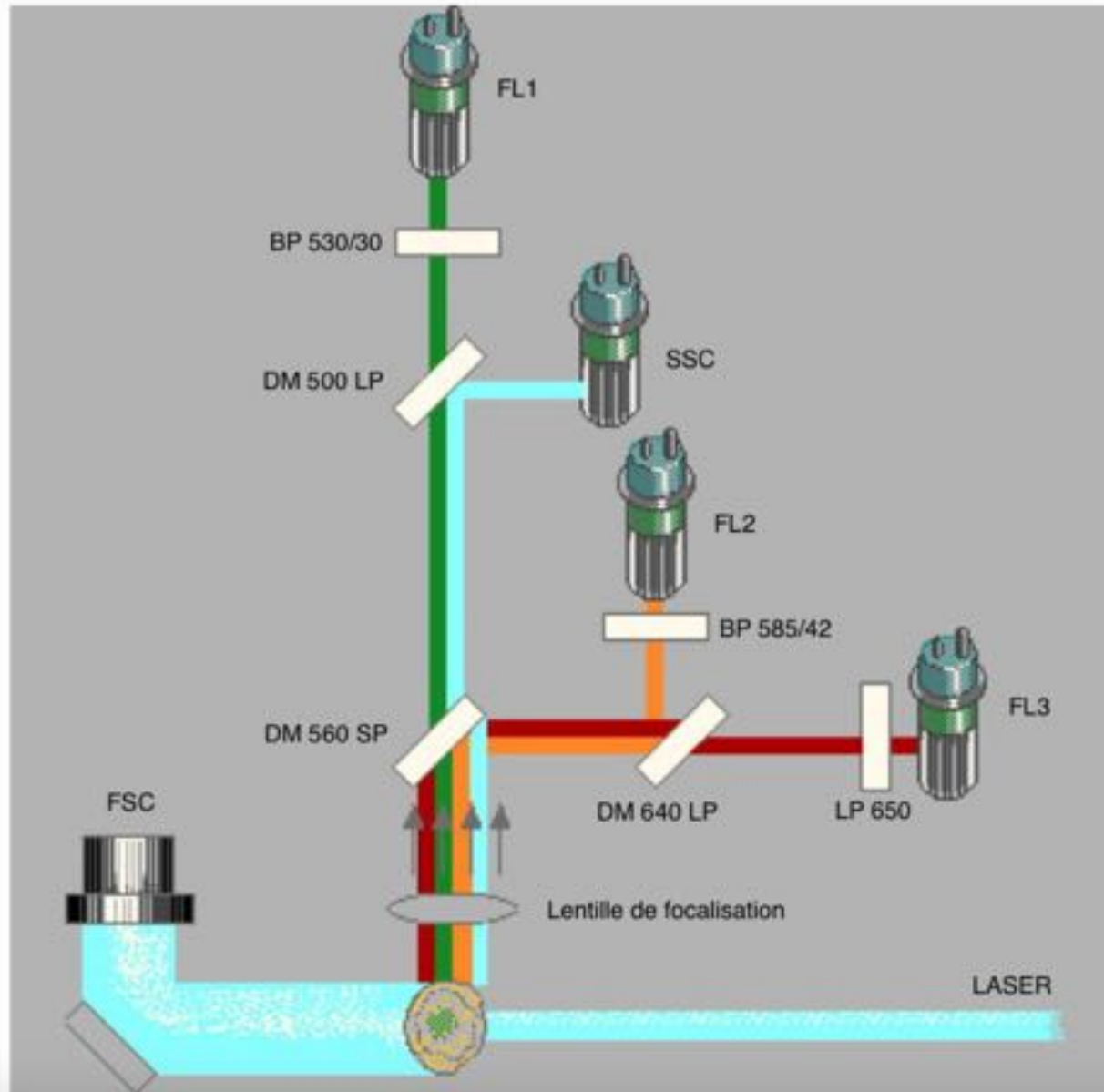
### Passage selon trois modalités :



# La cytométrie en flux

## Principe : optique de réception

Exemple :  
d'un trajet optique  
simple



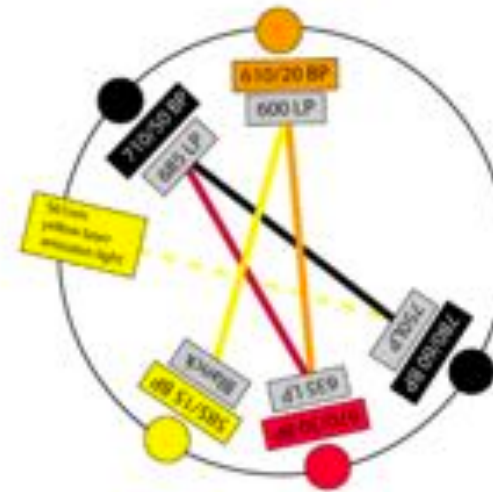
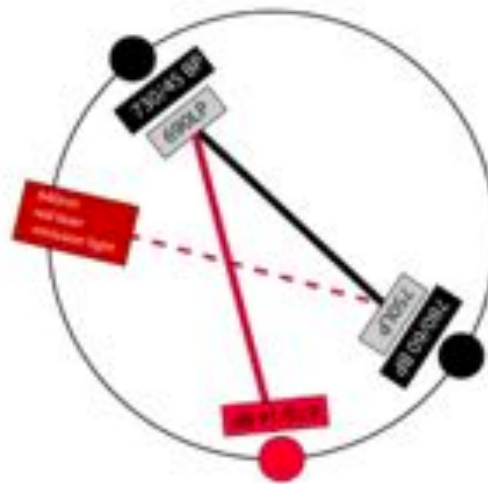
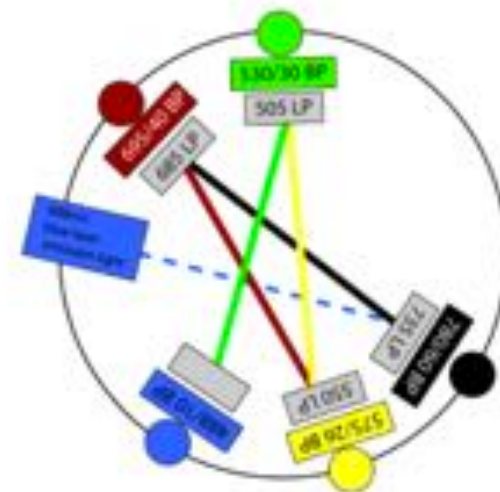


# La cytométrie en flux

## Principe : optique de réception

Exemple :  
d'un trajet optique  
Plus complexe

fortessa-june 2015 version



# La cytométrie en flux

## Principe : optique de réception

- Après avoir traversée la succession de miroirs et de filtres
- La lumière est recueillie et transformée en signal électrique par :



### **Photomultiplicateur (PMT) :**

très sensible  
utilisé pour signaux faibles  
gain important  
-> fluorescence/structure



### **Photodiode (PD)**

sensibilité plus faible  
Pour les signaux forts, très intenses  
Quand la saturation du détecteur constitue un problème potentiel  
(pas gain)  
-> La taille

# La cytométrie en flux

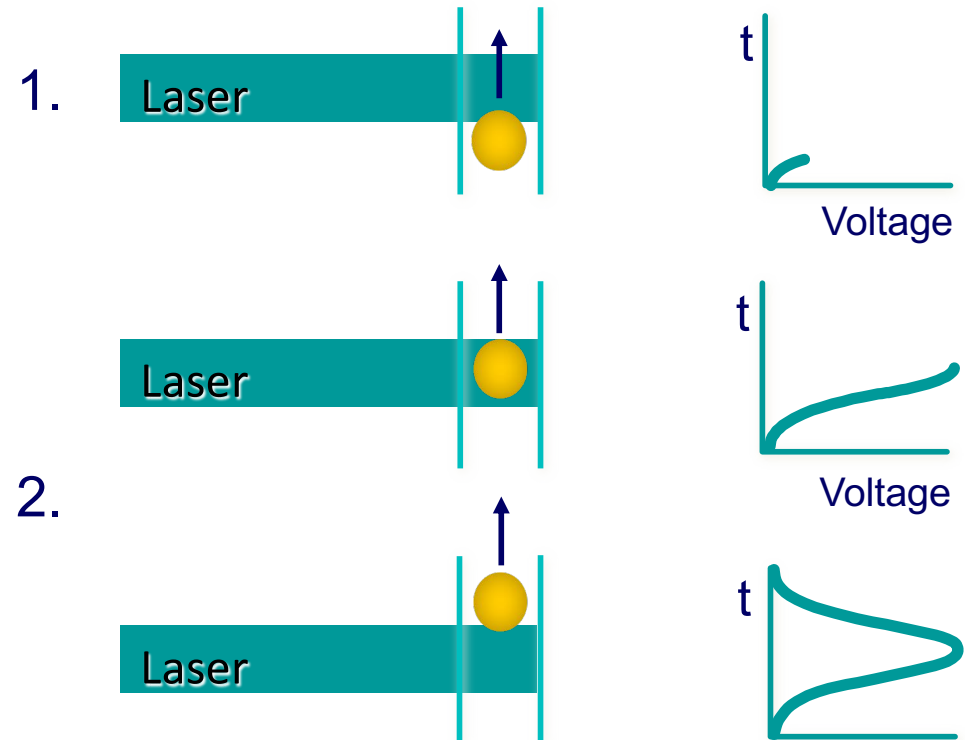
## Principe : électronique

**BUT:**

Transformer les signaux optiques lumineux (photons) en signaux électrique pour être numérisés.

Ce sont les **PMT (photo multiplicateur)** ou photodiodes qui transforment un **photon en courant électrique**

Création d'une impulsion



# La cytométrie en flux

## Principe : électronique

L'impulsion se caractérise par:

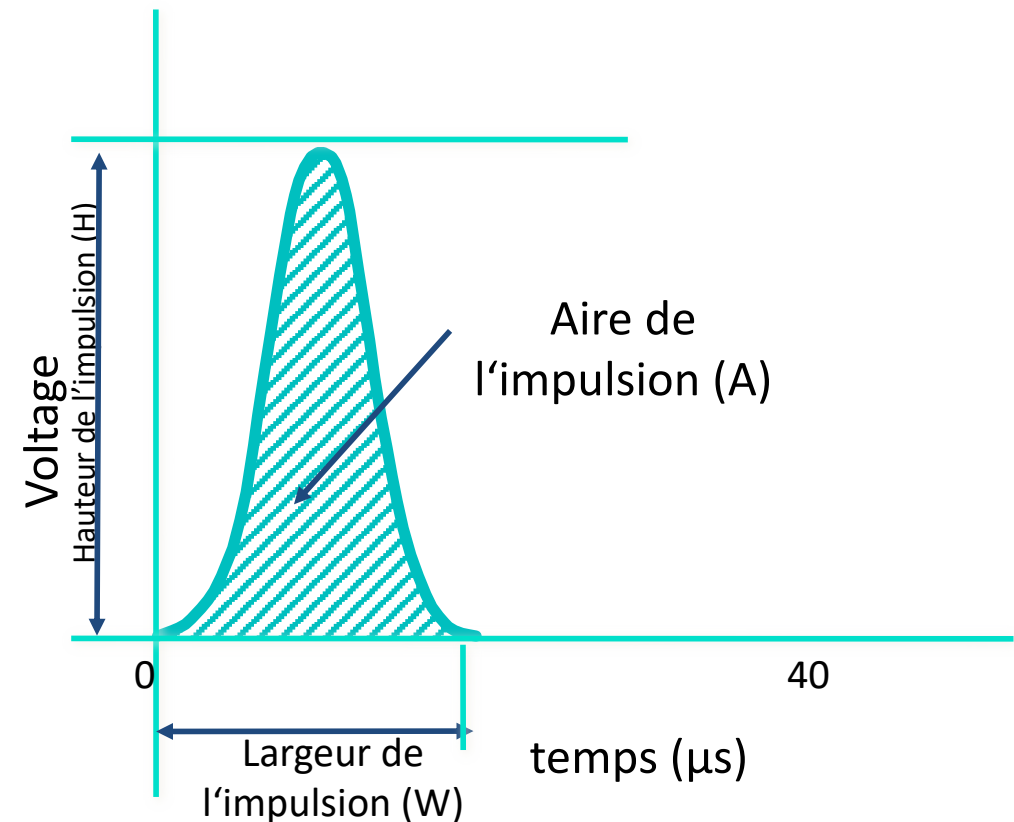
### 1/ la hauteur (pulse height)

mesure l'intensité de la lumière diffusée par la particule

### 2/ L'aire (pulse area)

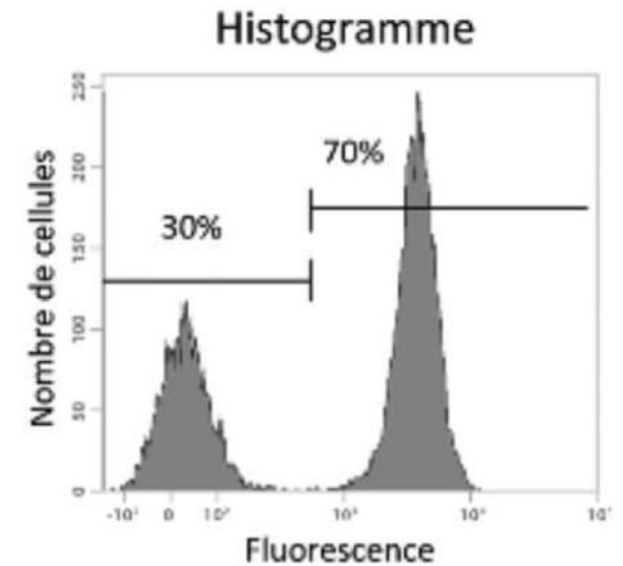
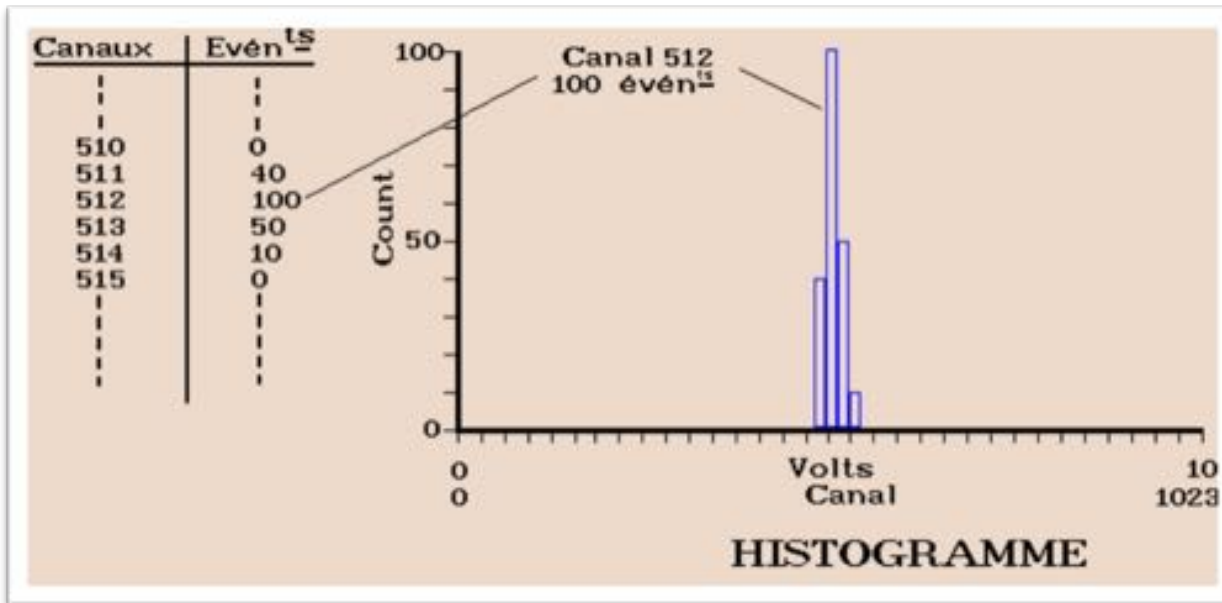
renseigne sur la fluorescence globale de la particule

### 3/ La durée de l'impulsion (Pulse width)



# La cytométrie en flux

## Principe : électronique



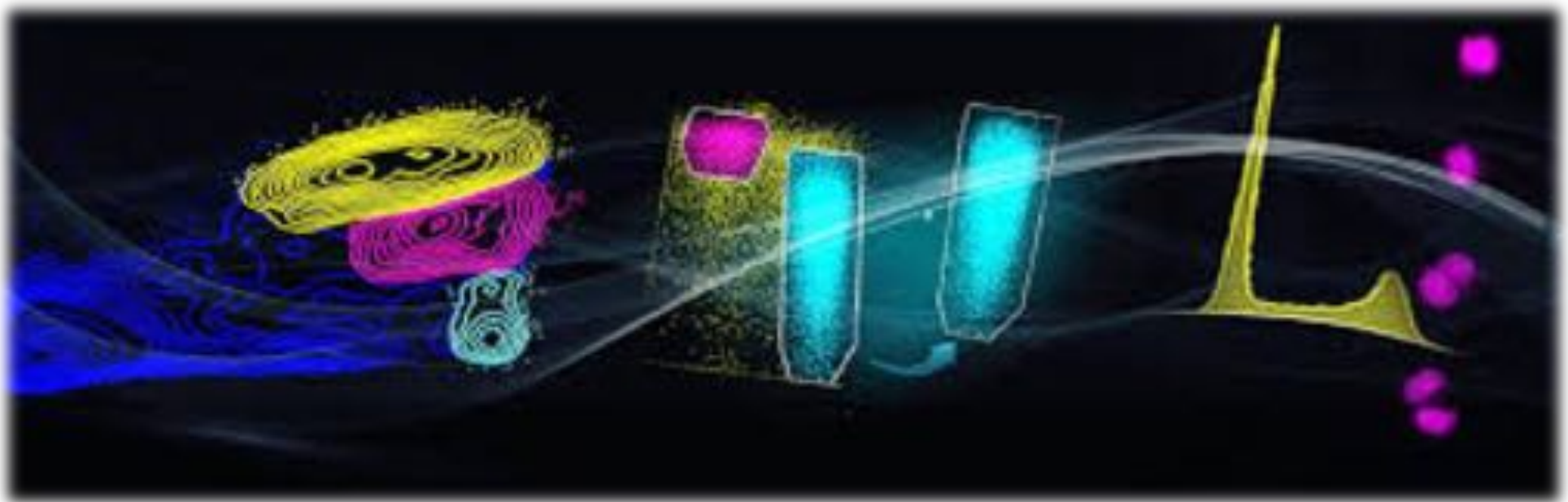
A chaque valeur numérique correspond un canal dont le compteur est incrémenté du nombre d'évènements

Le tracé du nombre d'évènements par canal est appelé **Histogramme monoparamétrique**

# La cytométrie en flux

Principe : électronique

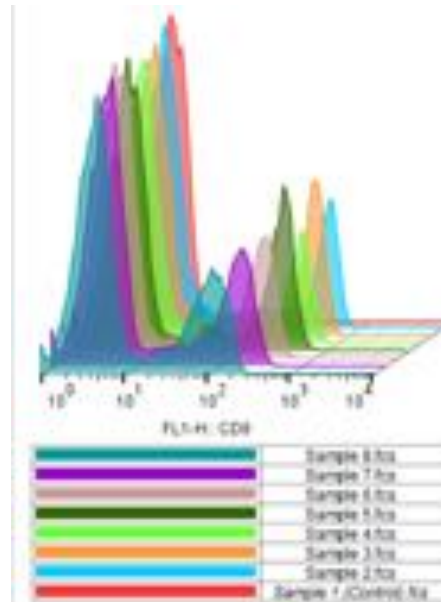
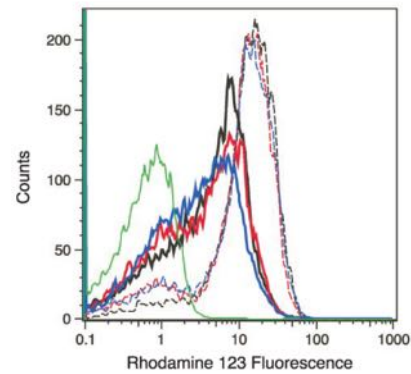
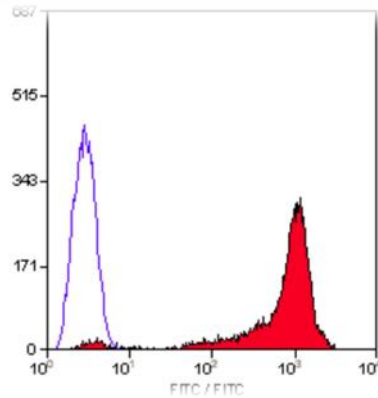
Présentation des résultats



# La cytométrie en flux

## Principe : électronique

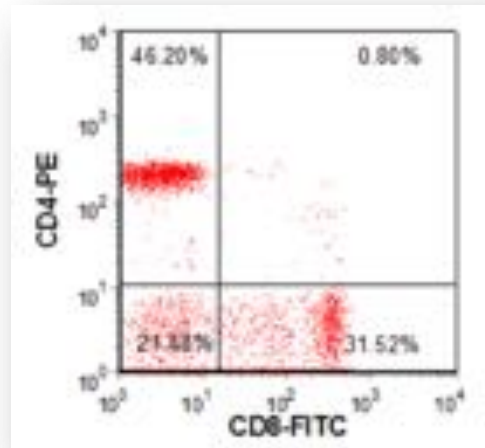
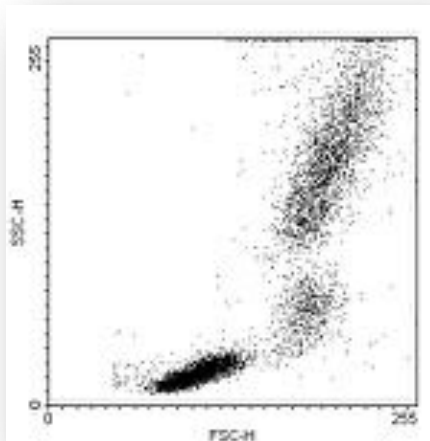
Le moyen le plus simple : **histogramme** :



La fluorescence relative par rapport au nombre d'événements : sur un paramètre

Mais pour apprécier les caractéristiques relatives aux autres paramètres : dot plot

Le **dot plot** :



Bon moyen de détecter un petit nombre d'événements dont les pop sont bien séparées

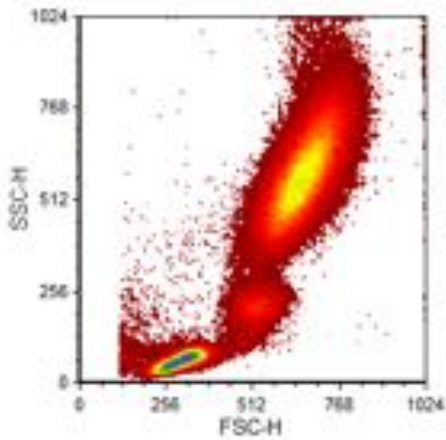
Aucun renseignement sur la densité relative des évènements

**Density plot**

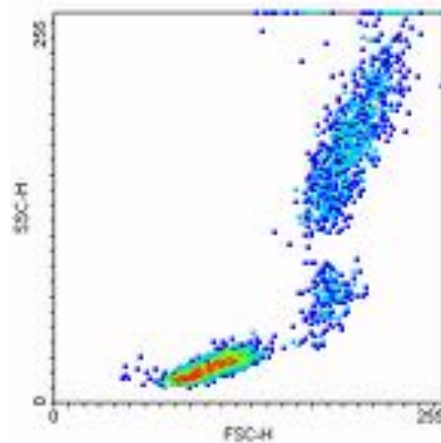
# La cytométrie en flux

## Principe : électronique

Density plot

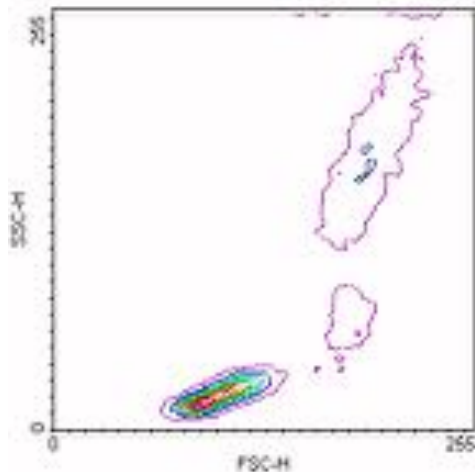


Pseudo colors plot



Simule une représentation 3D où le 3ième paramètre est le nbre d'évts  
Permet de mettre en évidence une pop discrète

Contour plot



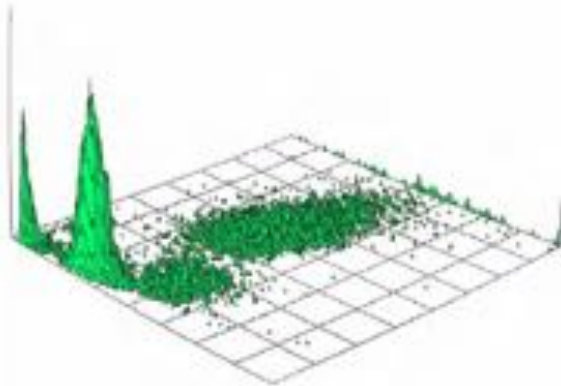
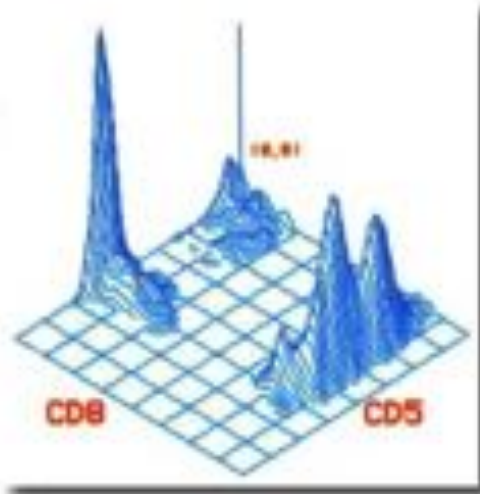
Autre représentation en 2D de pop dont le nbre d'évts est similaire.  
Attention les populations présentes en faible pourcentage peuvent ne pas apparaître



# La cytométrie en flux

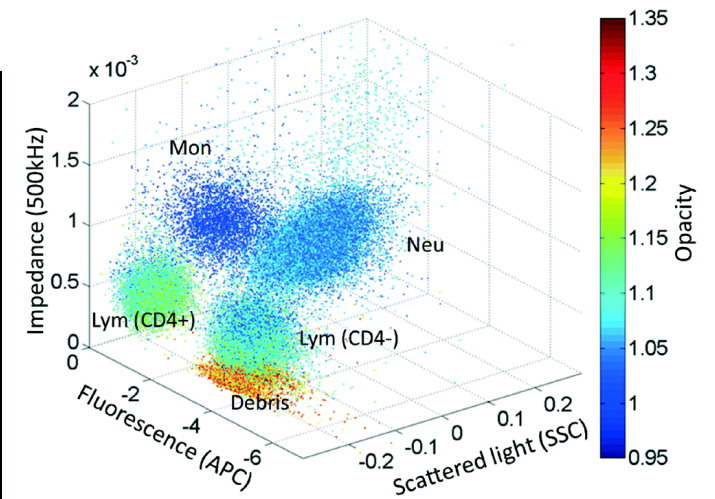
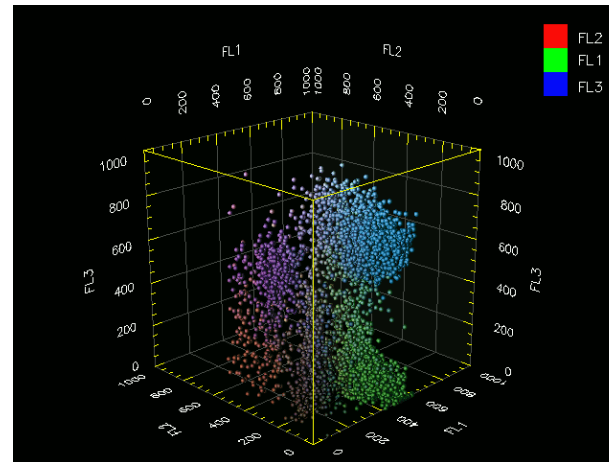
## Principe : électronique

**Histogramme tridimensionnel :**



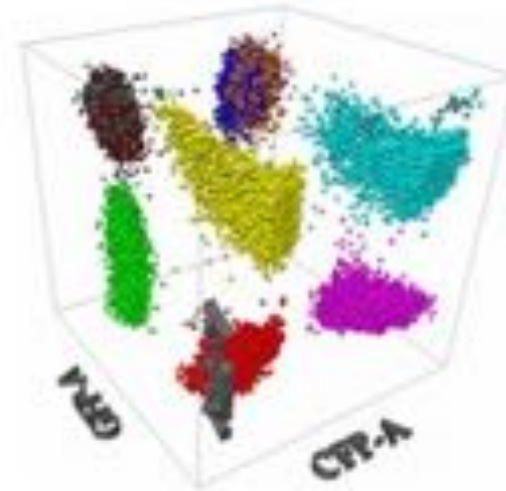
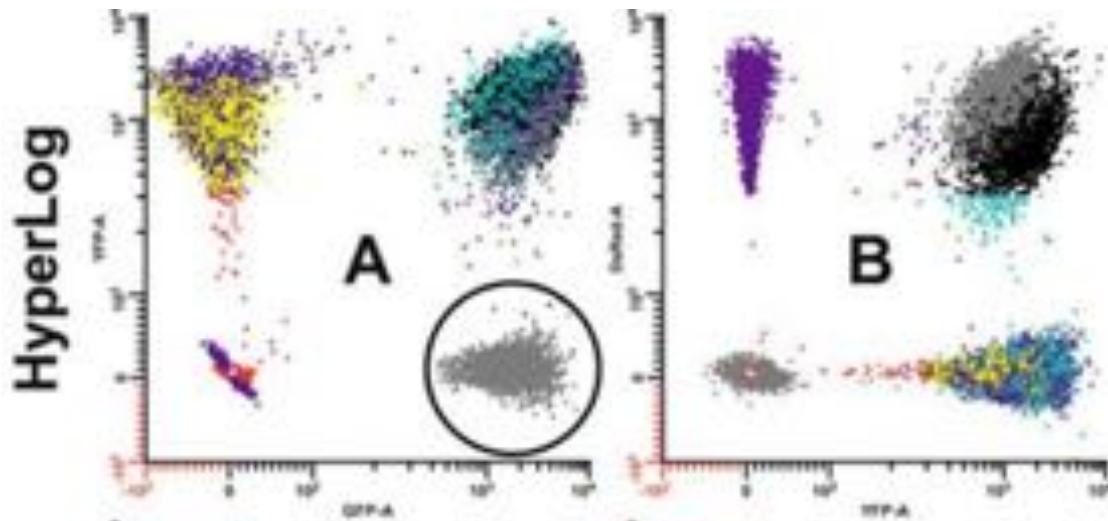
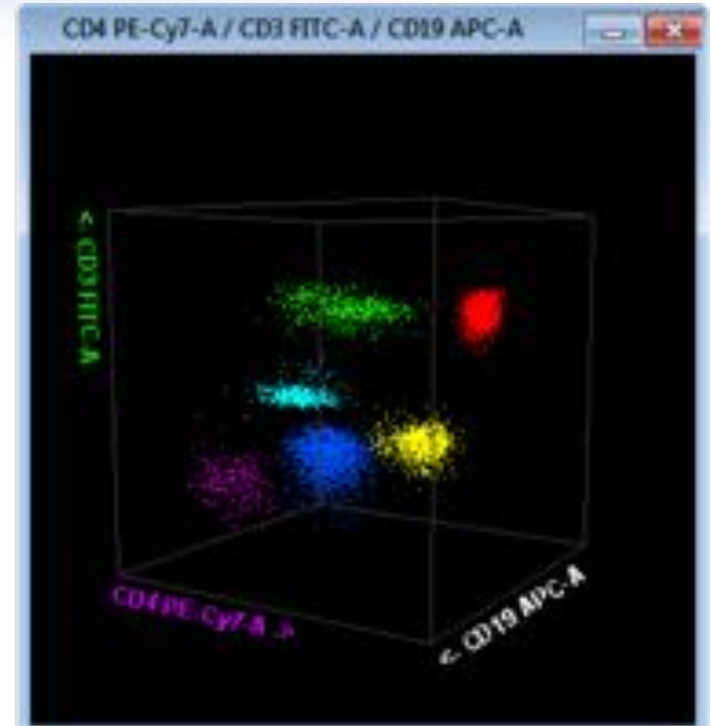
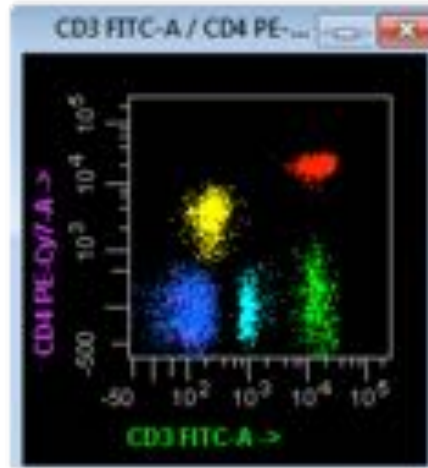
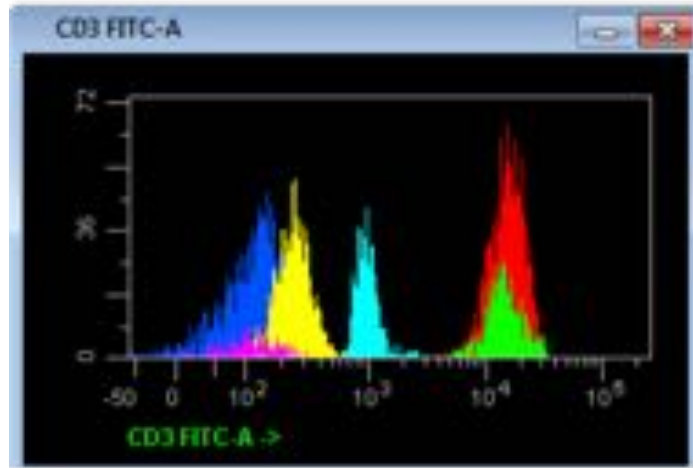
- Cet histo triparamétrique est obtenu à partir d'un biparamétrique auquel on ajoute une troisième dimension = nbre de cellules

- Permet d'avoir une idée de la proportion des diff catégories de cellules les unes % aux autres



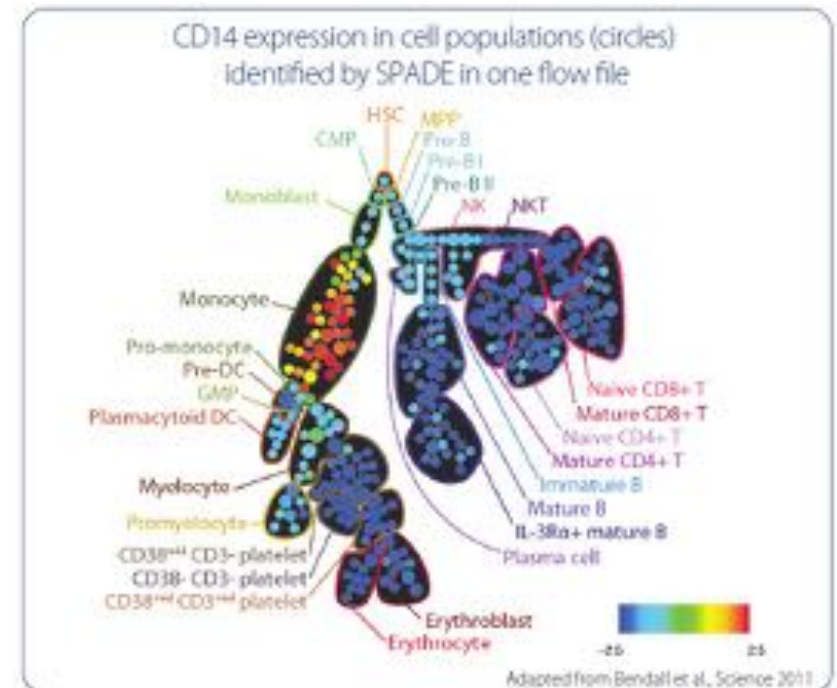
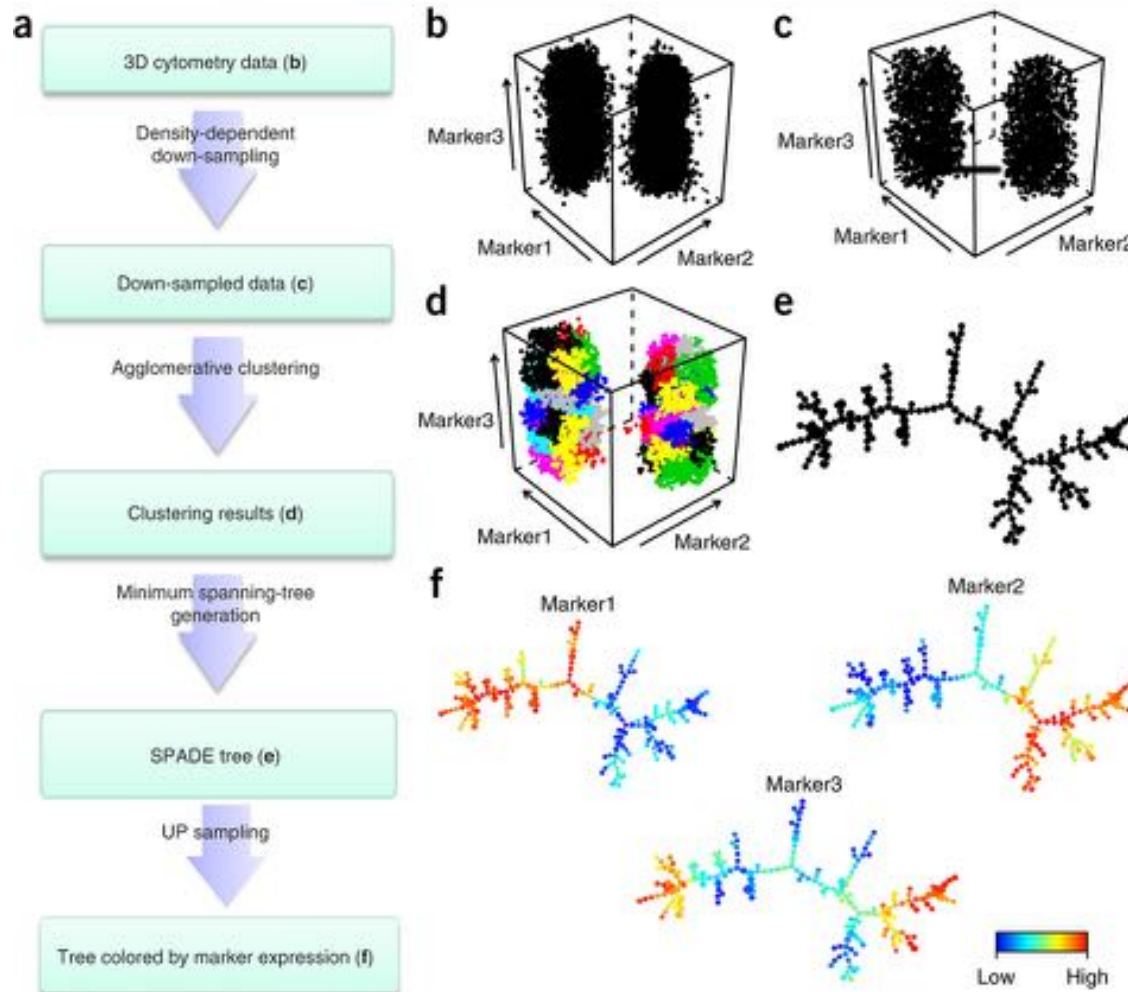
# La cytométrie en flux

Principe : électronique



# La cytométrie en flux

## Principe : électronique



# La cytométrie en flux

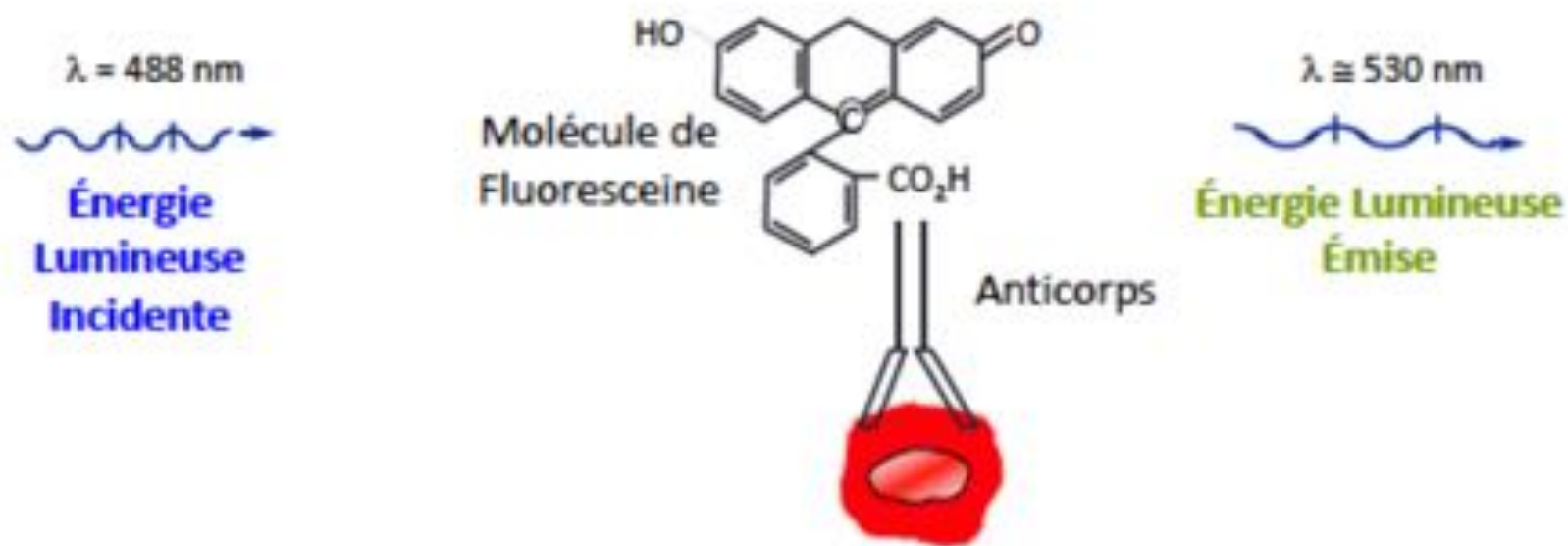
- Historique & définition
- Principes
- Applications
- Autres

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes

### Définition du fluorochrome:

- Molécule capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation
- La longueur d'onde d'émission étant supérieure à la longueur d'onde d'excitation



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes

### Un peu d'histoire...

**Fin du 19ème siècle:** méthyl violet, malachite green, safranin O, méthylène blue...  
Base pour le développement des futures sondes fluorescentes comme la fluoresceïne, la rhodamine ou l'acridine orange.

**Début des années 1920:** Développement de la microscopie de fluorescence: premiers marquages vitaux pour bactérie, protozoaires

**Début des années 1940:** Développement (par Albert Coons) d'une technique pour marquer les anticorps avec des sondes fluorescentes: développement des techniques d'immunofluorescence.  
Développement d'un large spectre d'anticorps secondaires couplés à une large variété de fluorochromes permettant des marquages multiples.

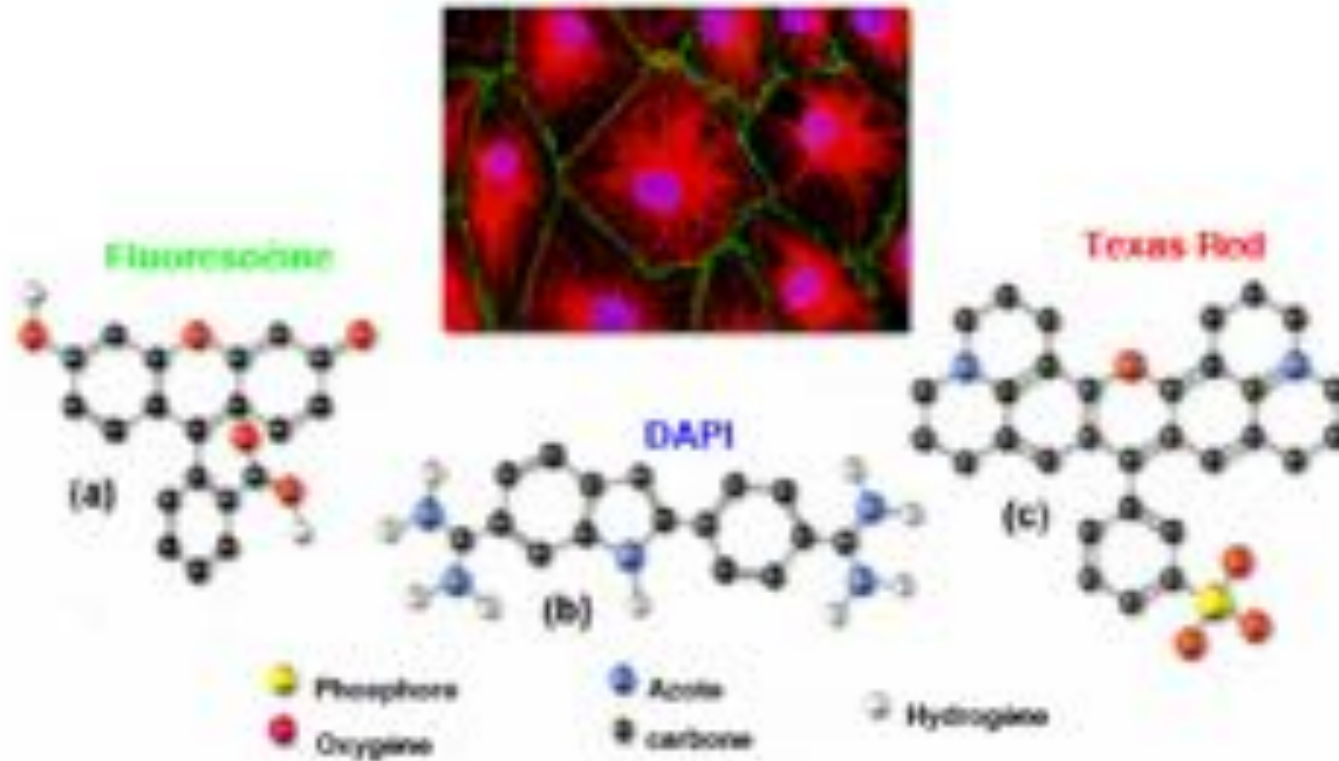
**1992:** Clonage du gène codant pour la GFP à partir de la méduse du pacifique *Aequorea victoria*: développement des techniques de production de protéines de fusion.  
Développement de nombreux variants spectraux de la GFP et découverte d'autres protéines fluorescentes

**Plus récemment:** Développement des nano-particules fluorescentes semi-conductrices: quantum dots permettant le suivi d'objet individuel.

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes

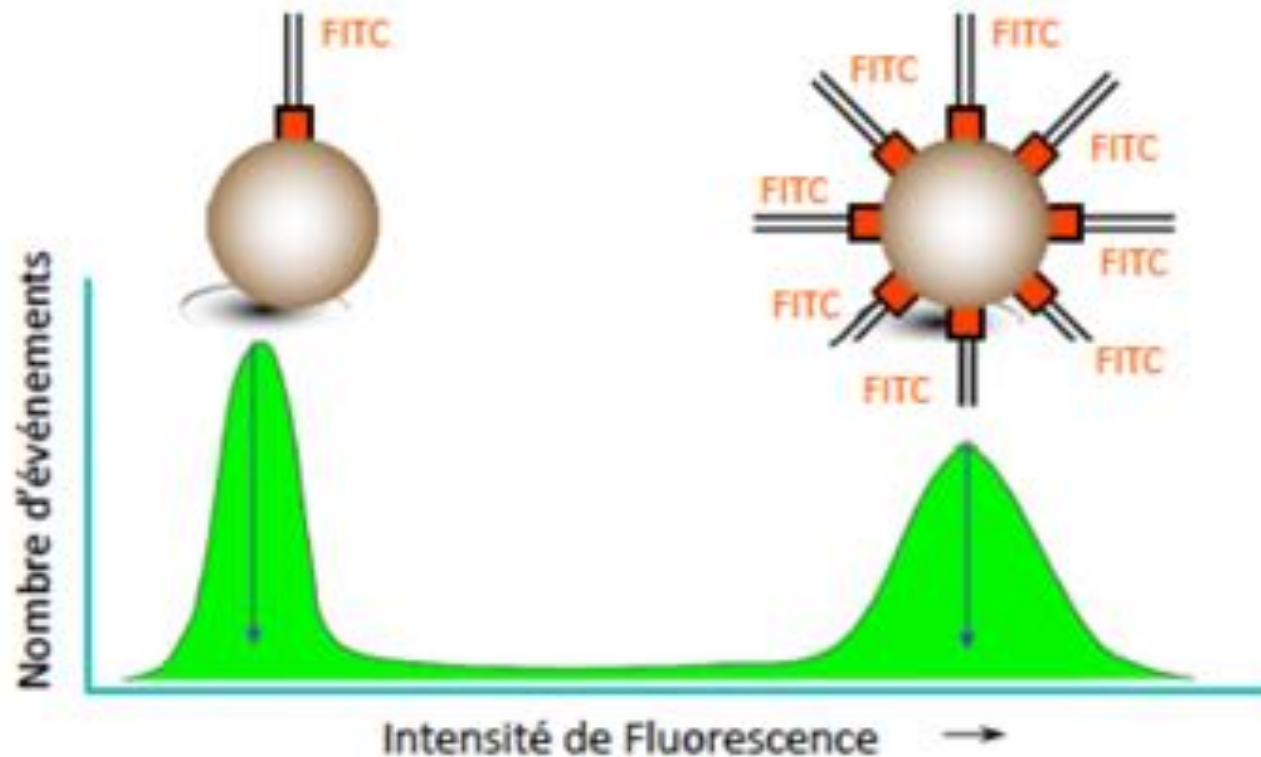
Substances chimique composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore de molécules planes et cycliques possédant une ou plusieurs liaisons  $\pi$   
Sont excités par une longueur d'onde spécifique et émettent à une longueur d'onde spécifique.



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes

Intensité de fluorescence émise  $\propto$  Nombre de sites de fixation  
(QB)

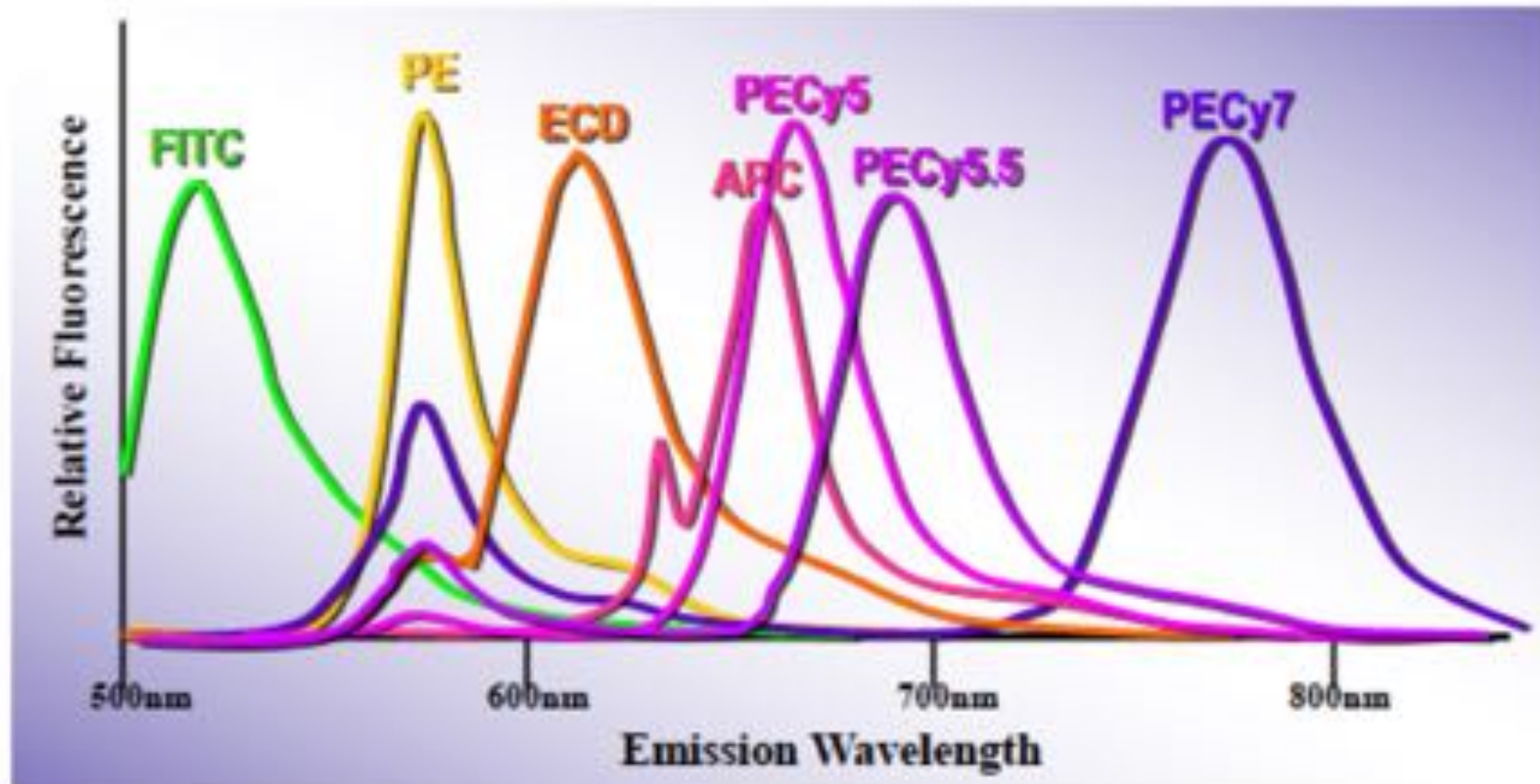




# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes

Chaque fluorochrome est caractérisé par un spectre excitation et un spectre d'émission de fluorescence



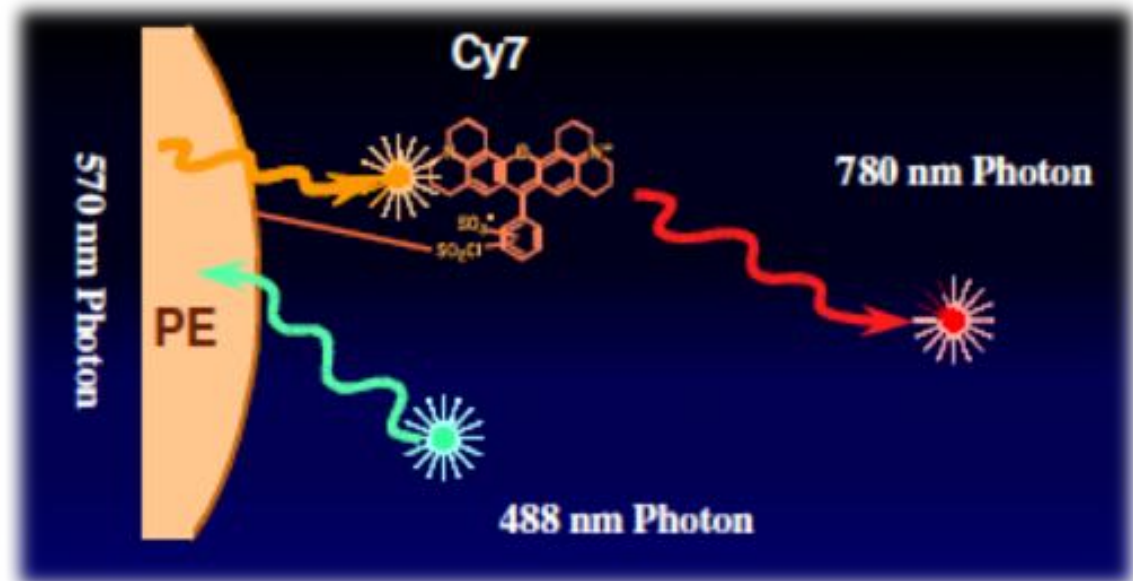
# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes, cas du tandem

PerCP-Cy5,5, PE-Cy5, APC-H7, PE-Cy7.....

Qu'est ce que c'est?

- 2 molécules fluorescentes attachées de manière covalente
- L'une sert de donneur et l'autre d'accepteur (processus de FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Propriété d'excitation du donneur et d'émission du receveur
- Déplacement de Stokes élevé : facilite le marquage multi couleur



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes, cas du tandem

### Historiquement

- Fin année 1980 avec pour base le PE comme donneur : PE-cy5 ou PE-cy7.....
- Dans les années 1990 utilisation de l'APC ou PerCP : APC-CY7 ou PerCP-CY5.5
- Beaucoup plus récemment, nouvelle classe de tandem comme ceux utilisant le Brillant violet comme donneur (avantage ils sont moins fragiles)

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes, cas du tandem

### Limites et préservation des performances:

- IL existe toujours une fluorescence résiduelle du donneur dont va dépendre qualité du tandem
- L'efficacité du FRET peut être différente d'un lot à un autre d'un même tandem
- Dégradation ou découplage  
lumière  
Activité métabolique propre à la cellule (APC-X)  
PFA (PE-X, APC-X....)

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes, cas du tandem

### Bonnes pratiques d'utilisation des tandems:

- Garder les flacons d'anticorps et les marquages à 4°C
- Garder les flacons et les marquages à l'abri de la lumière
- Fixation max 30 minutes suivi d'un lavage
- Calculer les compensations avec le même Ac que celui utilisé dans le marquage final
- Contrôler la compensation après changement de lot

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

A prendre en compte pour un marquage:



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

 Connaître la ou les question que l'on se pose

 Bien connaître son matériel :

- Facs : laser dispo, possibilité
- Cellules, tissus
- Les fluorochromes dont on dispose

Ils n'ont pas tous le même rendement

 on ne détecte pas de la même façon un Antigène avec le même Anticorps si il est couplé à des fluorochromes différents

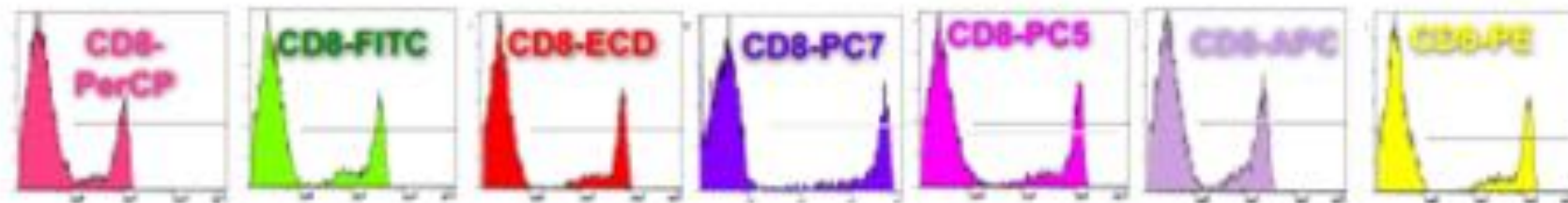
# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

Rendement quantique ( $\psi$ )

$$\frac{\text{Nombre de photons \textit{émis}}}{\text{Nombre de photons \textit{absorbés}}} \text{ par molécule}$$

PerCP < FITC < ECD < PC7 < PC5 < APC < PE



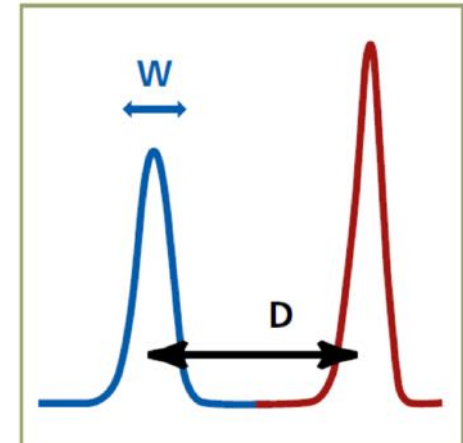
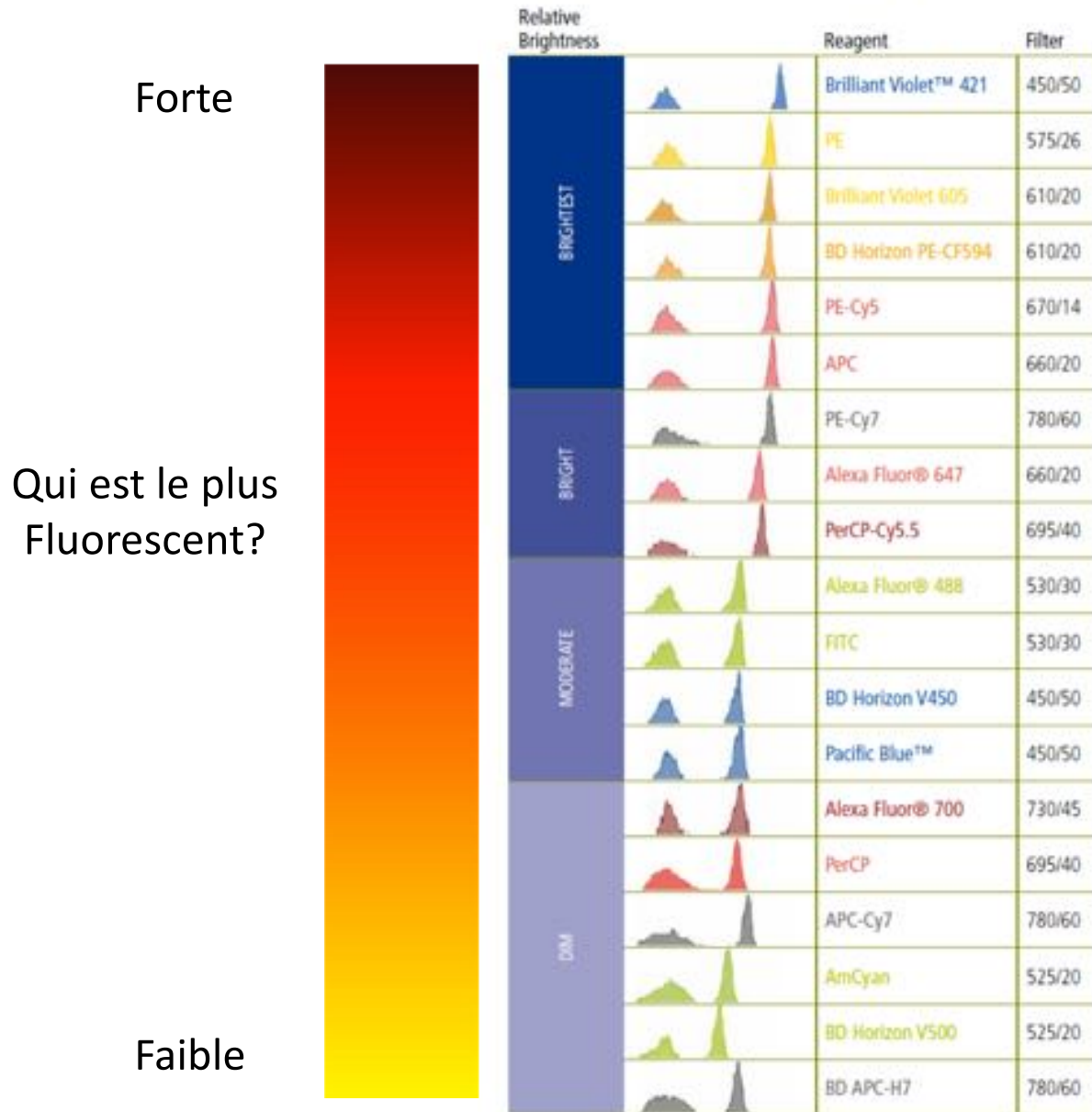
Proportionnel à la brillance



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

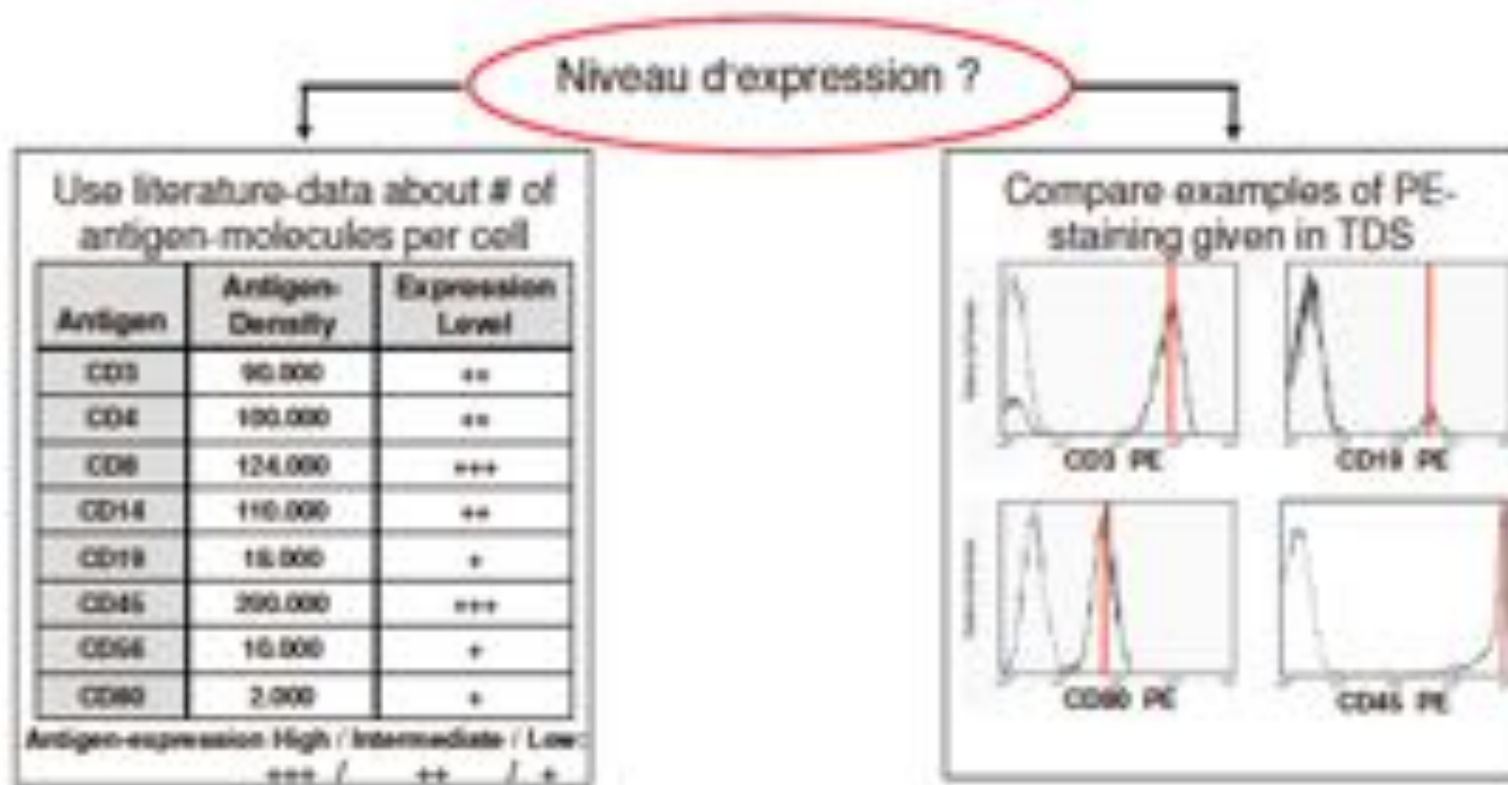
Brightness of various fluorochrome conjugates



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

Choix dépendant de ce que vous voulez marquer

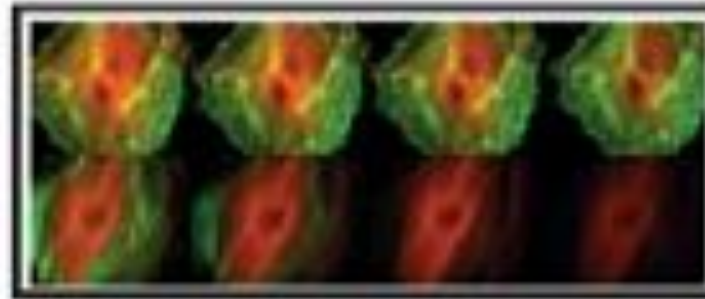
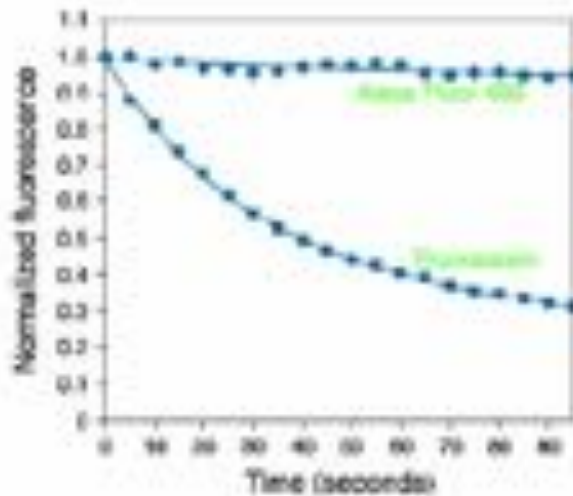


# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

Attention à l'exposition de vos échantillons marqués, la fluo n'est pas permanente

### Comparaison du photoblanchiment de deux fluorochromes



Les échantillons ont été illuminés continuellement et une image a été enregistrée toutes les 5 secondes avec une caméra CCD.

(D'après C. Fournier)

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

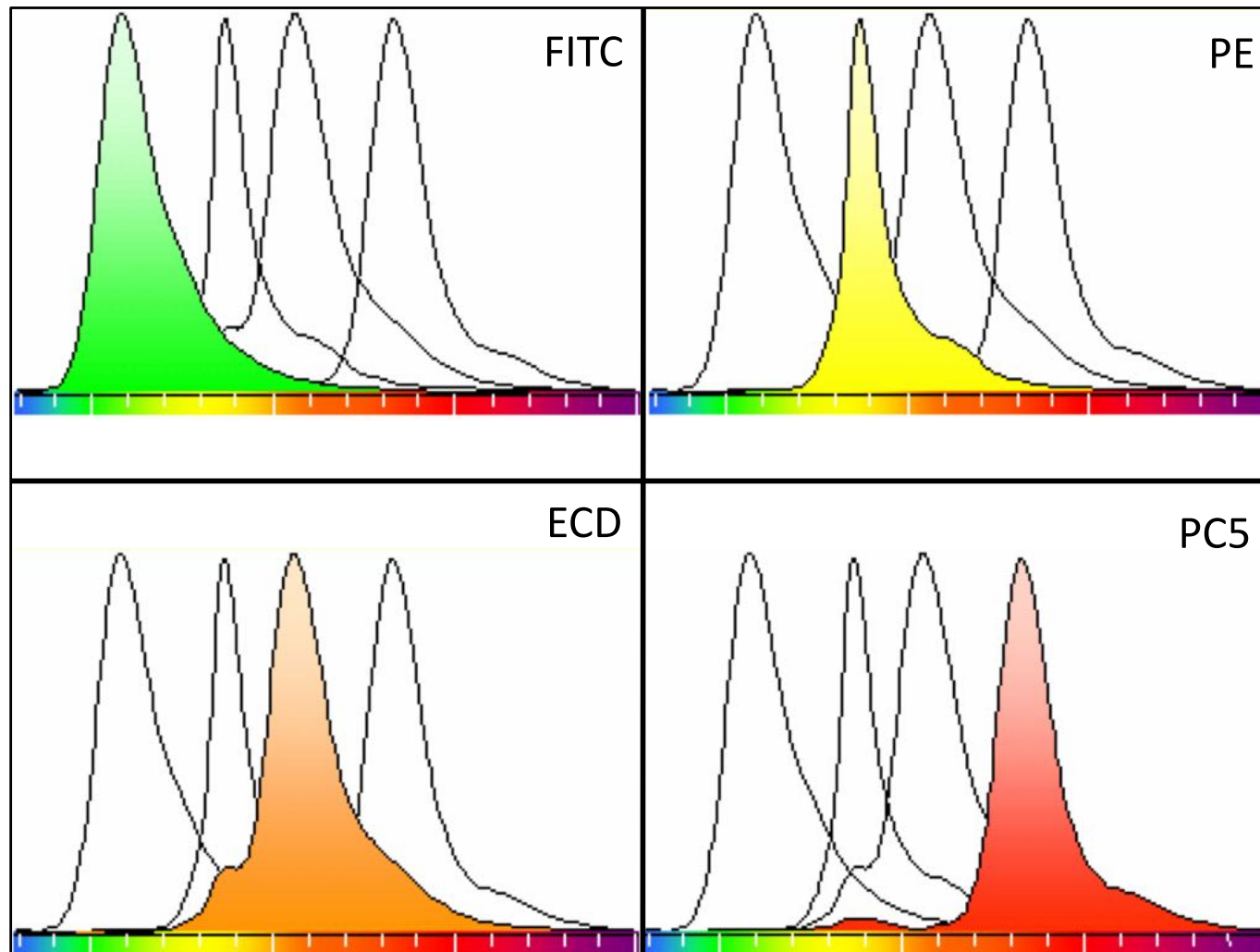
A prendre en compte pour un marquage:



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

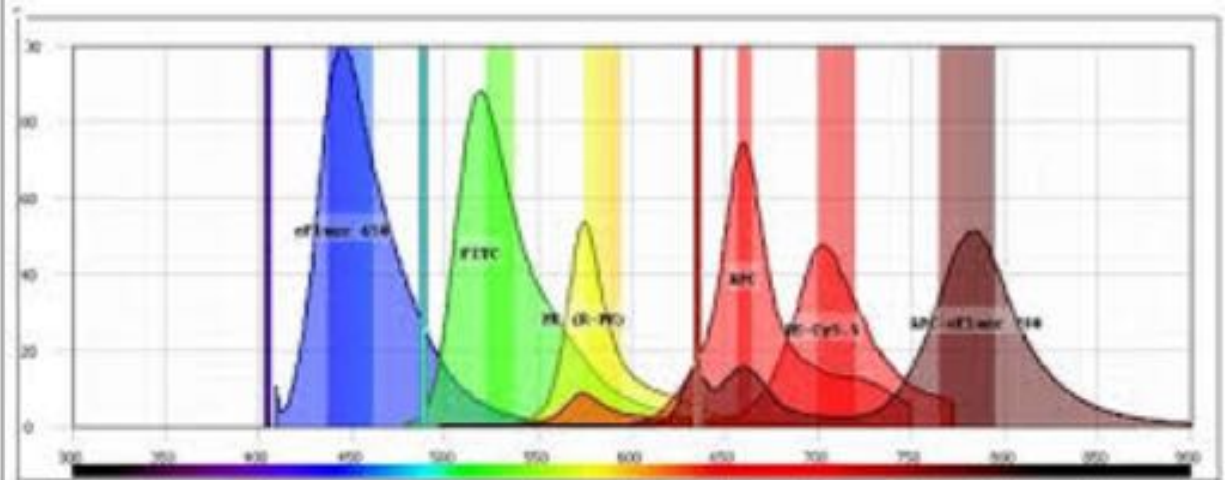
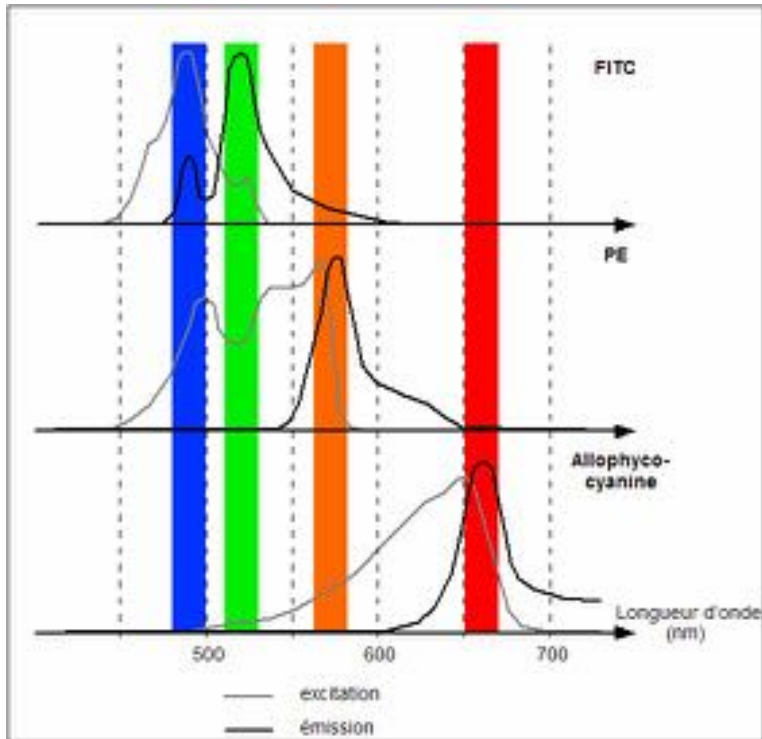
Chaque fluorochrome a un spectre qui lui est propre



-Les spectres d'émissions n'étant pas de fines raies mais des spectres plus ou moins large  
Certains spectres d'émission se chevauchent

# La cytométrie en flux

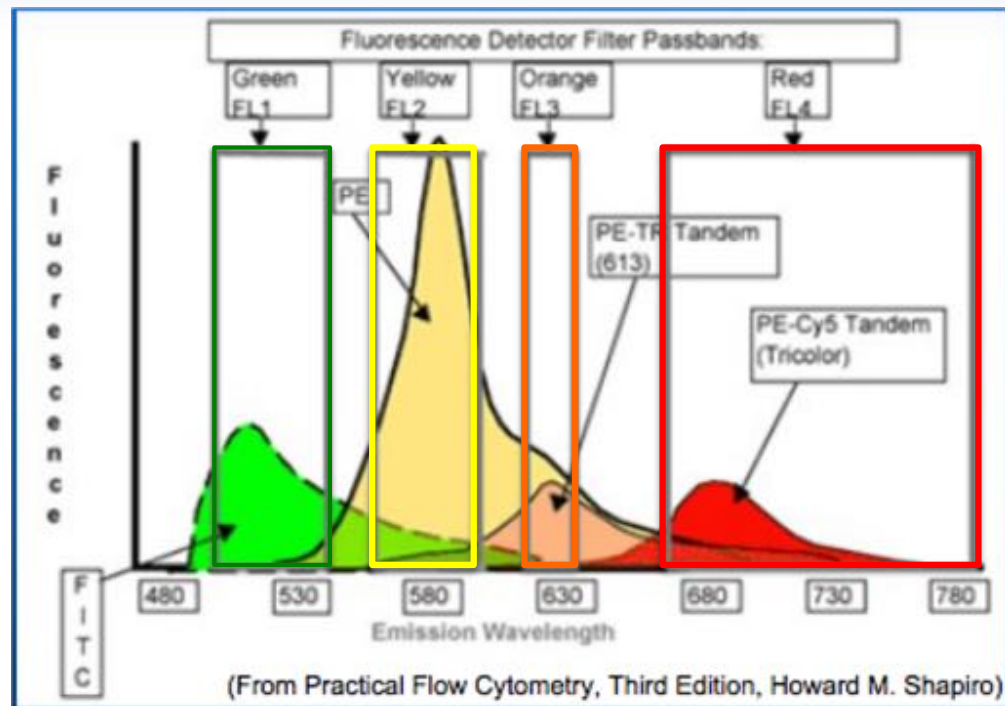
## Applications : Fluorochromes le choix



Détection du signal d'1 seul fluorochrome par 2 (ou plus) détecteurs :  
=> COMPENSATIONS

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix



Il est quasi impossible d'éviter un chevauchement partiel des spectres d'émission des fluorochromes

On observe alors des fluorescences artéfactuelles du fait de ces fuites de fluorescence lues sur les autres PMT

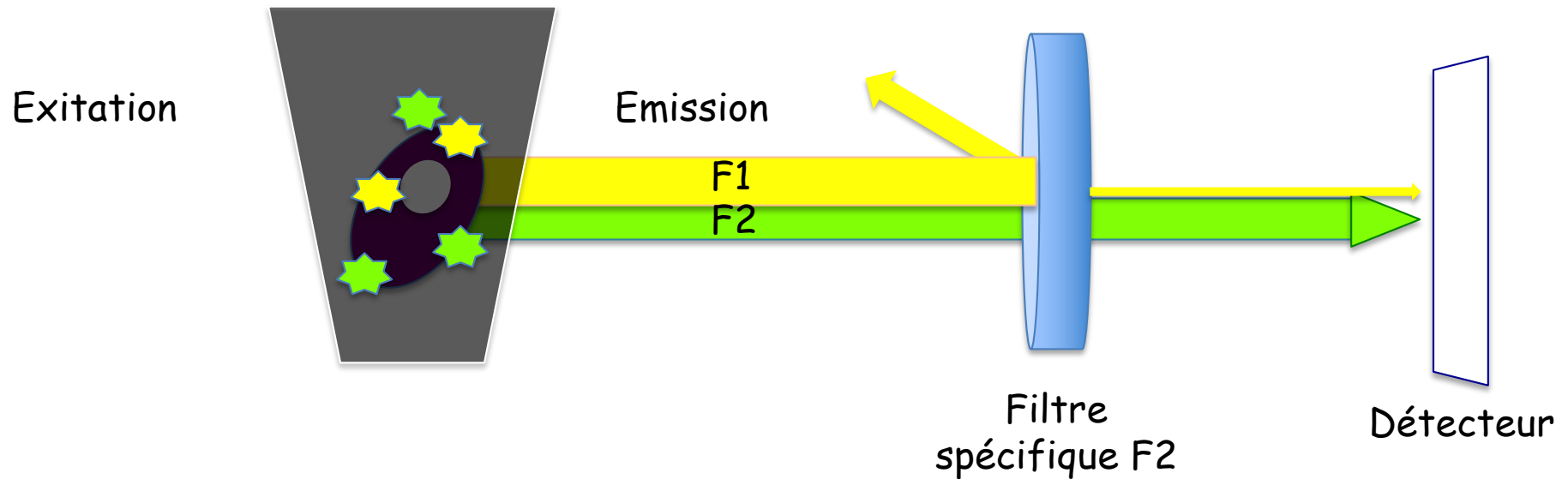
Création d'interférences (faux positif)

Il est donc indispensable de retrancher électroniquement un certain pourcentage de la fluorescence parasite : c'est la compensation

# La cytométrie en flux

Applications : Fluorochromes le choix

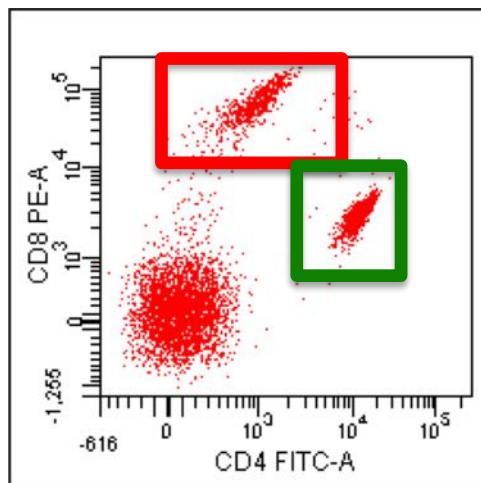
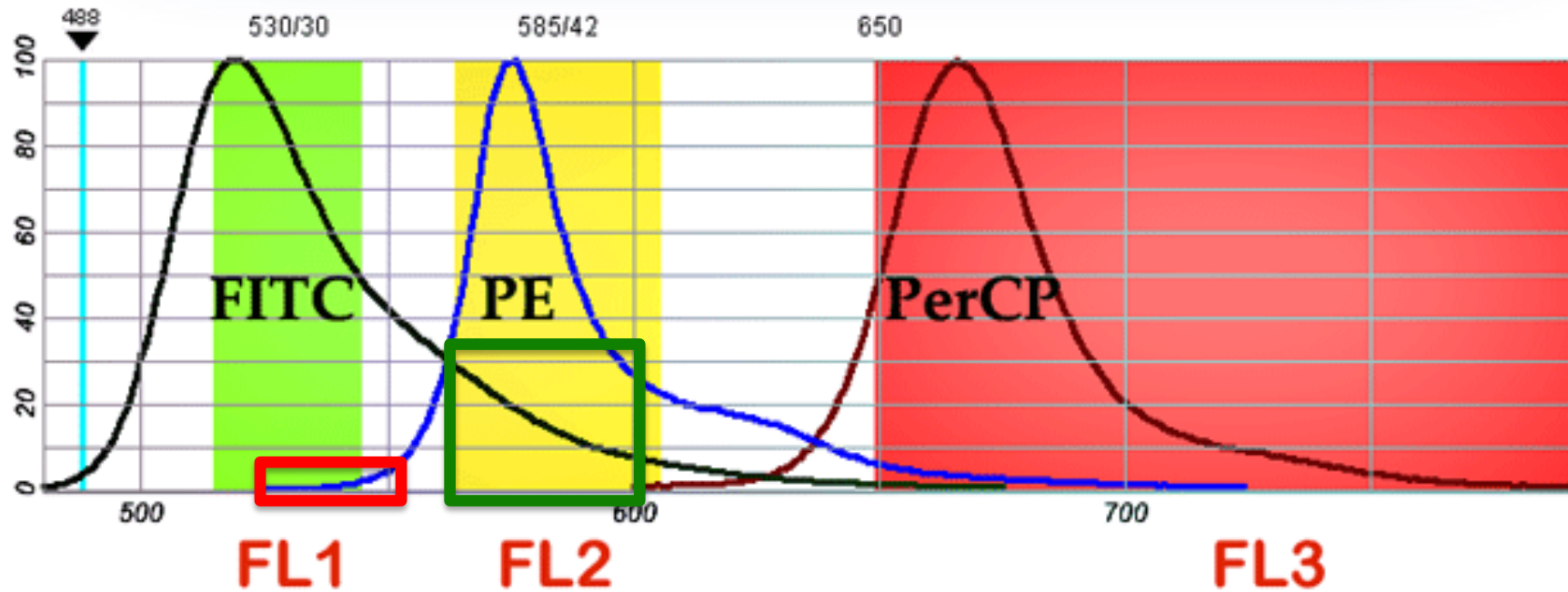
En pratique:



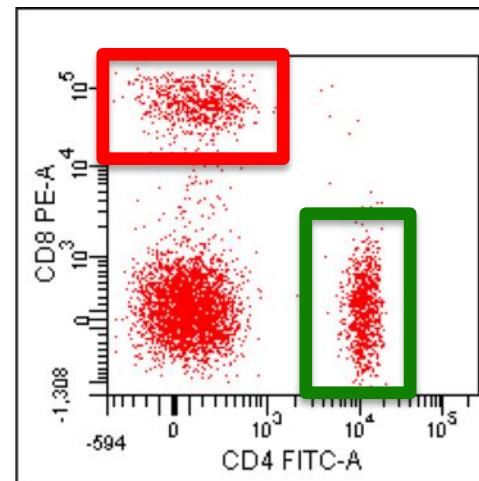


# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

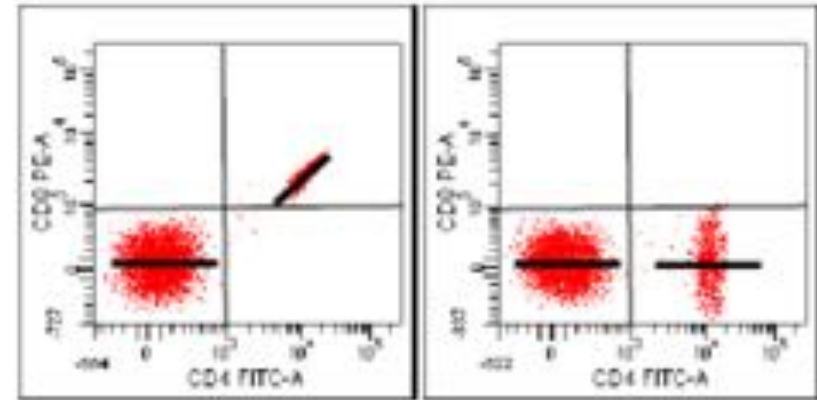
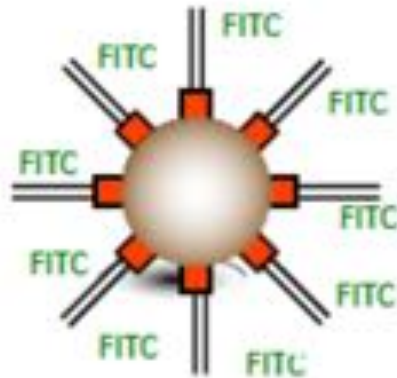
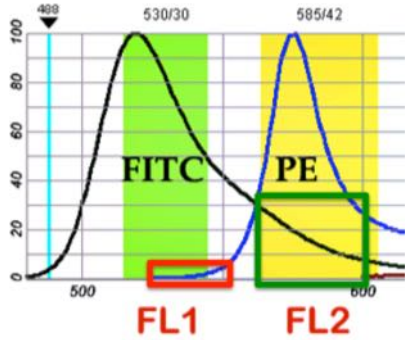


compensation



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix



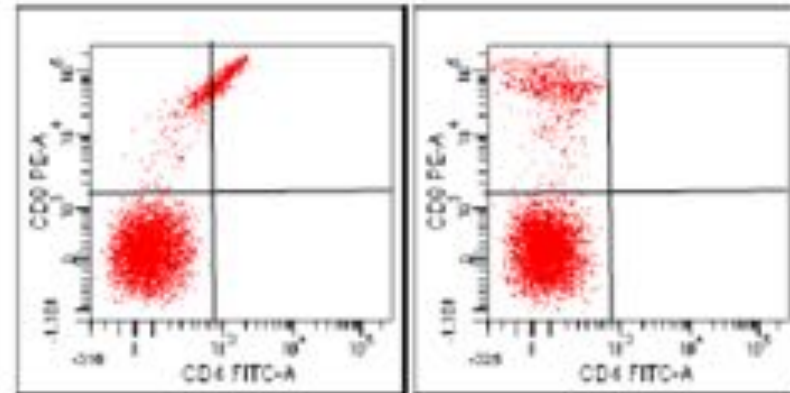
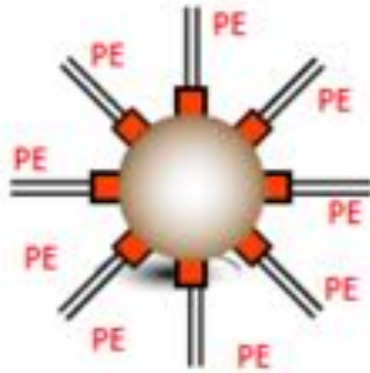
$$FL2' = FL2 - n\% \times FL1$$

Populatio	Mean
P1	55
G1	700
G2	700
G3	51
G4	71

La compensation correcte est obtenue quand la médiane de la population positive à compenser devient la même que celle de la population négative

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

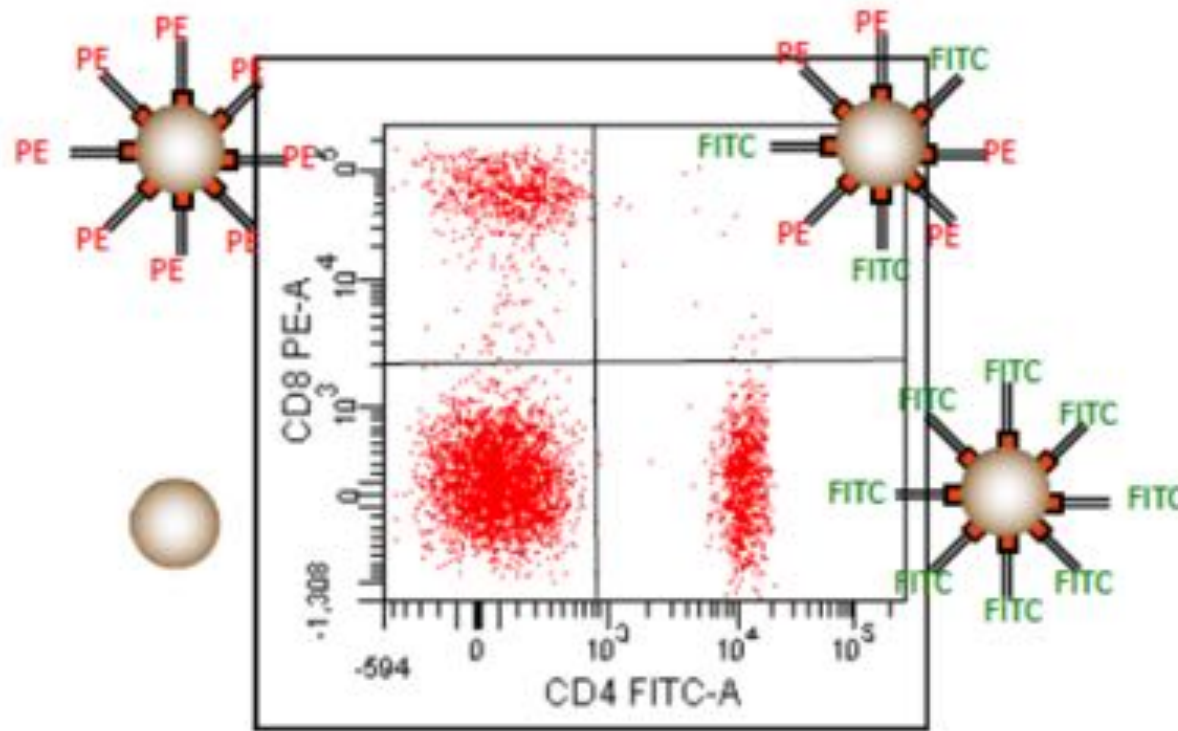


$$FL1' = FL1 - n\% \times FL2$$

Population	Event
■ P1	77
□ Q1	119
□ Q2	2224
□ Q3	60
□ Q4	4994

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix



$$FL1' = FL1 - n\% \times FL2$$

$$FL2' = FL2 - n\% \times FL1$$

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

### En pratique:

Passage de tube contenant :

cellules non marquées (seuil de positivité et négativité)  
et/ou cellules marquées par un contrôle isotypique

Réglage des PMT

FSC

SSC

Définition d'une « gate » sur les cellules d'intérêts

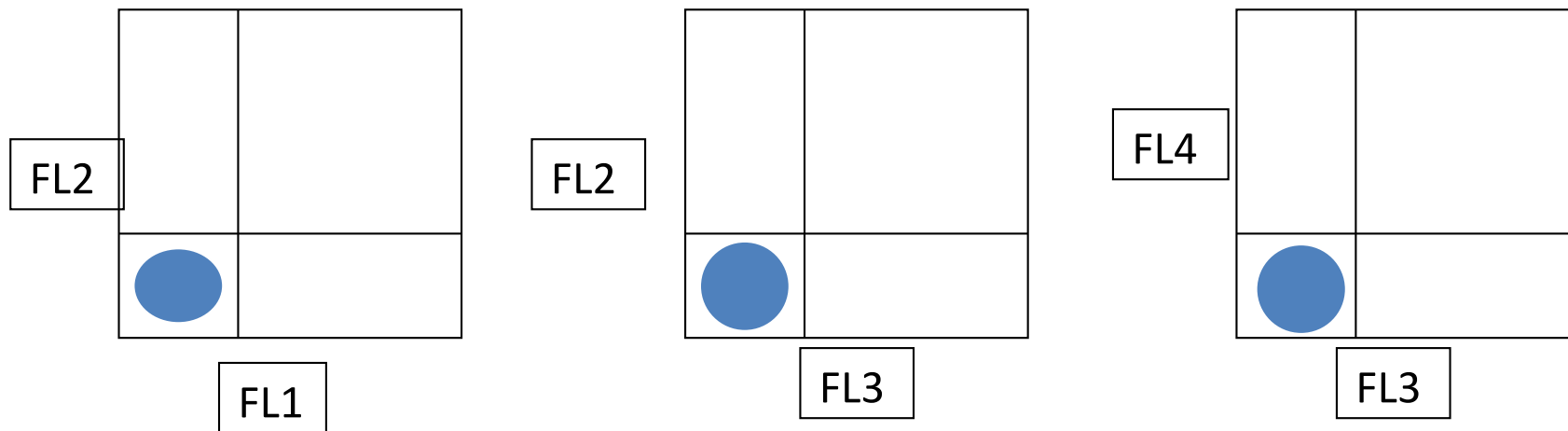
Conditionner les plots sur cette gate

Passage de cellules (ou de billes) monomarquées avec les fluorochromes d'intérêts

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

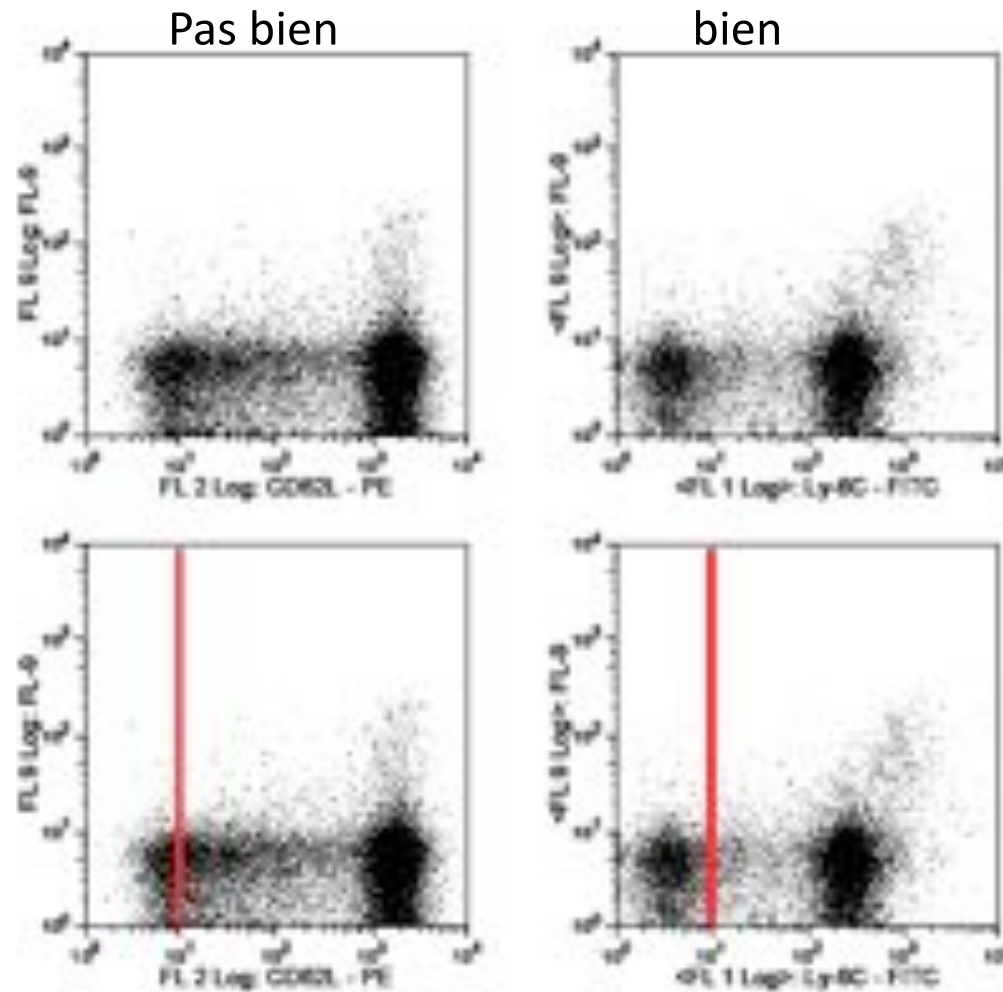
Passage de tube contenant :  
cellules non marquées (seuil de positivité et négativité)  
et/ou cellules marquées par un contrôle isotypique



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

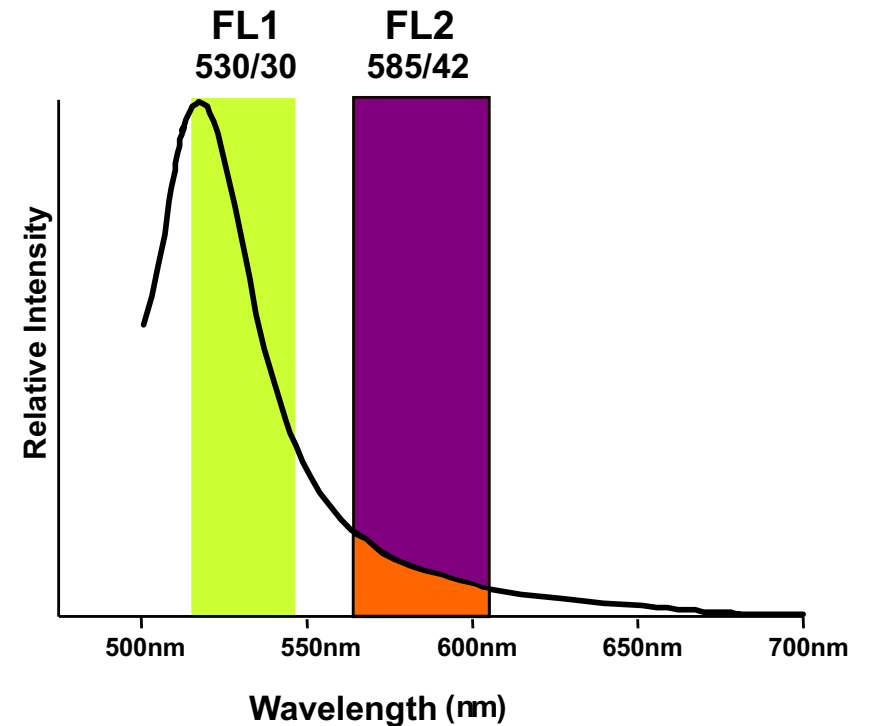
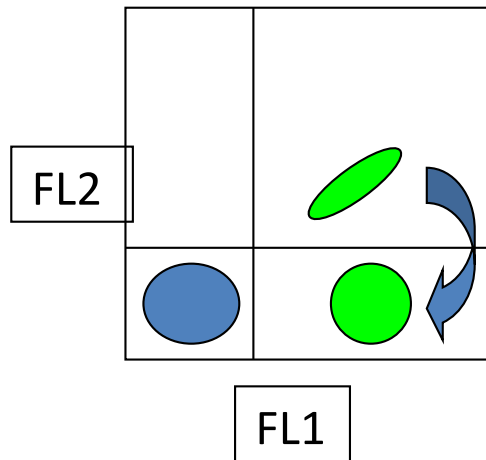
Définition seuil positivité et négativité pour les compensations



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

Passage du tube avec un mono marquage FITC



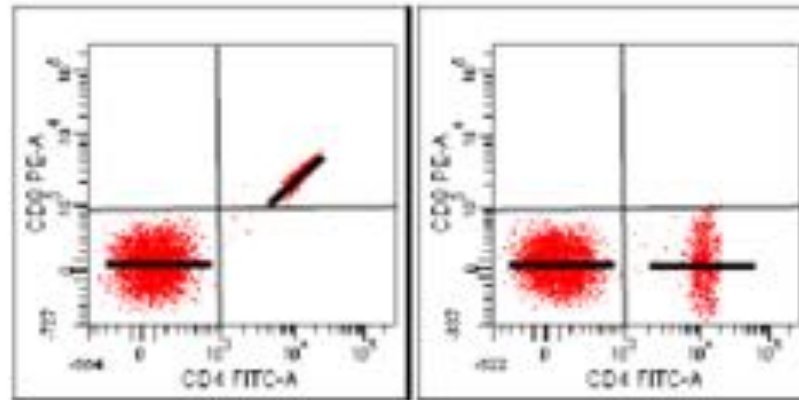
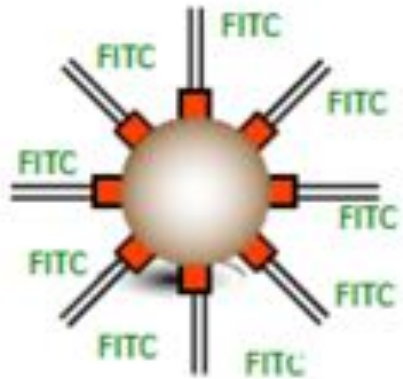
La population positive pour FITC (FL1) doit s'aligner avec la pop négative pour FL2

→ On retranche de la fluo FL1 à FL2  
Correspondant à la superposition  
 $FL2 - x\%FL1$



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix



$$FL2' = FL2 - n\% \times FL1$$

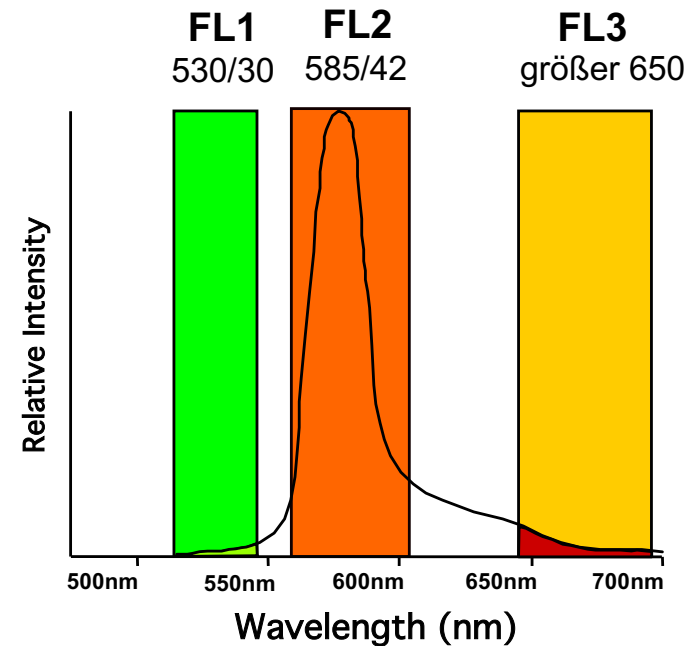
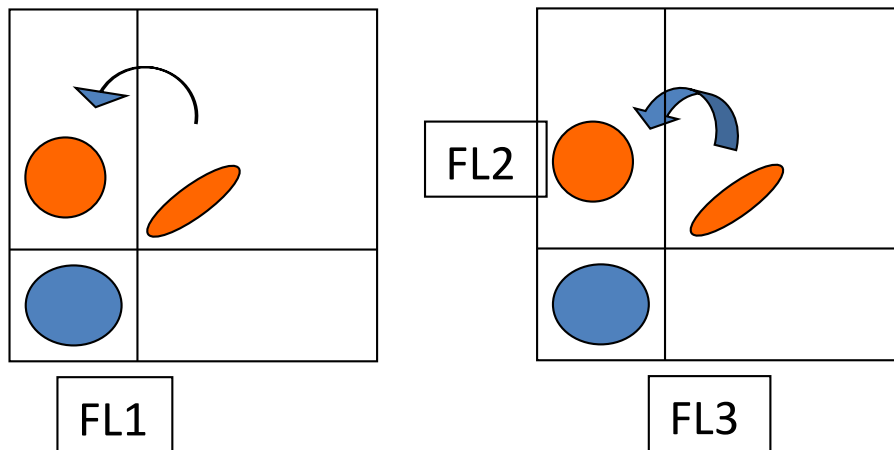
Populatio	Mean
P1	55
G1	7777
G2	7777
G3	51
G4	71

La compensation correcte est obtenue quand la médiane de la population positive à compenser devient la même que celle de la population négative

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

Passage du tube marqué PE (2<sup>ième</sup> fluorescence)



La population PE doit s'aligner avec

La pop négative FL1 et FL3

→ On retranche de la fluo FL2 à FL1 et FL3

Correspondant à la superposition des spectres d'émission

FL1-%FL2 et FL3-%FL2

# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

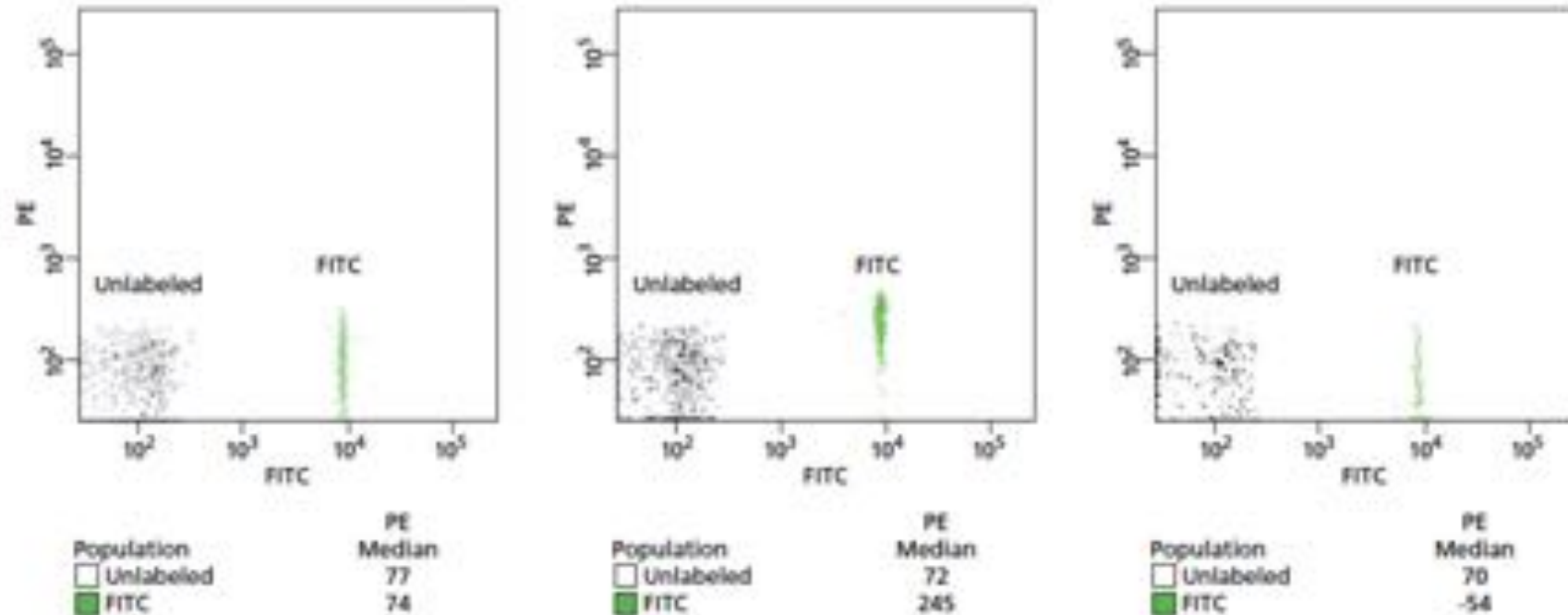


Figure 3.

### Compensated properly

The medians of the positive and negative FITC populations are equal in the PE channel.

### Undercompensated

Not enough fluorescence subtraction. The PE MFI of the positive FITC population is greater than that of the negative FITC population.

### Overcompensated

Too much fluorescence subtraction. The PE MFI of the negative FITC population is greater than that of the positive FITC population.

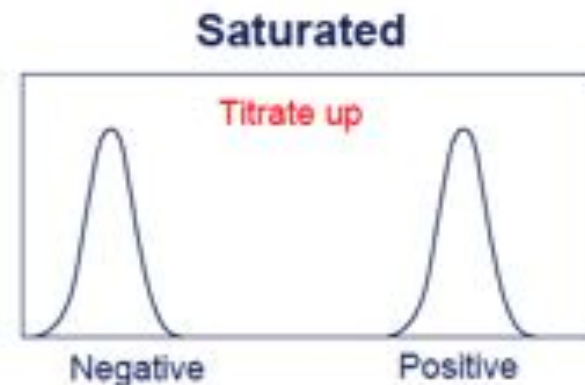
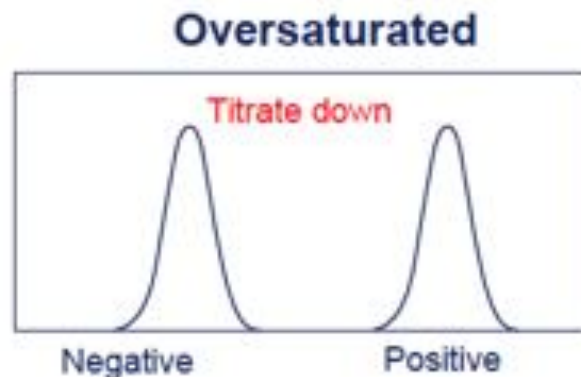
# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

Même principe pour des marquages > 4 couleurs

- > plus complexe
- > logiciel adapté de compensation
- > quelque fois nécessité de recompenser

⚠ vos Ac marqués doivent être bien calibrés et donc utilisés à la dilution optimale sinon vous avez un risque de perte de signal (pas assez dilué) ou de mauvaise discrimination positives/négatives. (trop dilué)



# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

### Attention : cas des tandem:

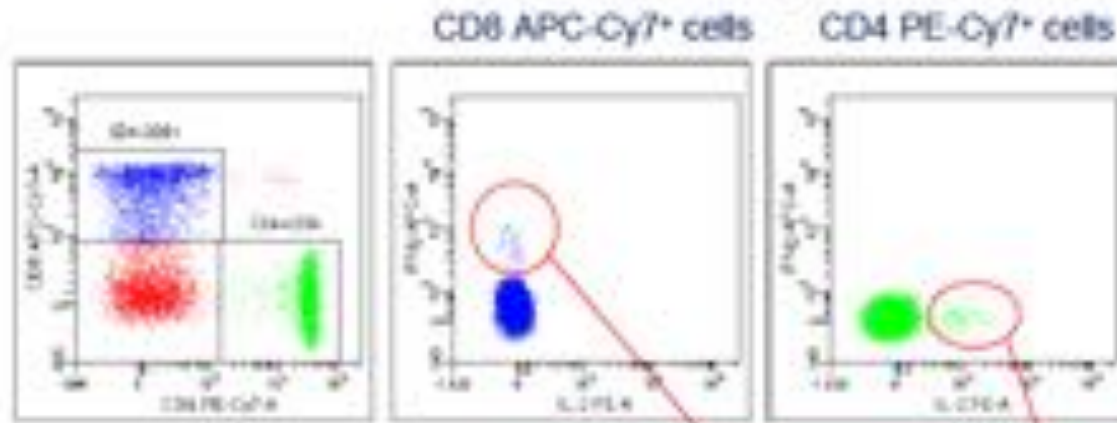
Les compensations pour les tandems peuvent varier avec le même Ac  
d'une expérience à l'autre (idem pour lot identique ou différent)  
phénomène de découplage  
faire systématiquement les compensations

Certains tandems (APC-Cy7, PE-CY7)  
dégradation : expo lumière  
température  
fixation

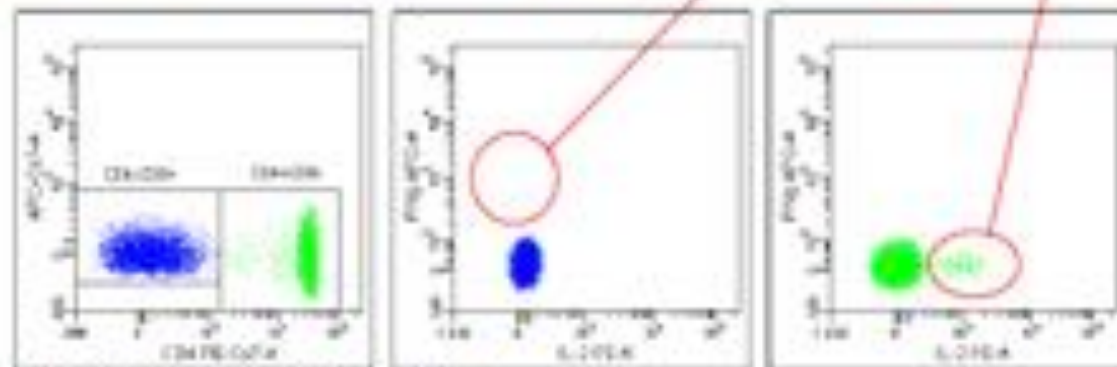
# La cytométrie en flux

## Applications : Fluorochromes le choix

### A. With CD8 APC-Cy7 and CD4 PE-Cy7



### B. Without CD8 APC-Cy7



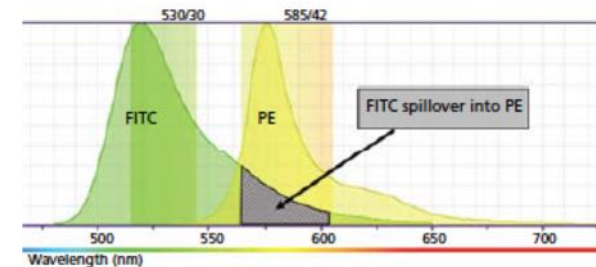
© 2011 BD Biosciences. All rights reserved. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

# La cytométrie en flux

## Applications : panel multi couleurs

1- Associer les fluorochrome brillant en fonction de la densité des Ag  
si peu d'Ag → stain index important  
si beaucoup d'Ag → stain index plus faible

2- Minimiser le spill over



3- Attention aux tandem et leurs spécificités (couplage, titre, perméabilisation, fixation)

4- Bien connaître son appareil (filtres)

5- Utiliser les bons contrôls

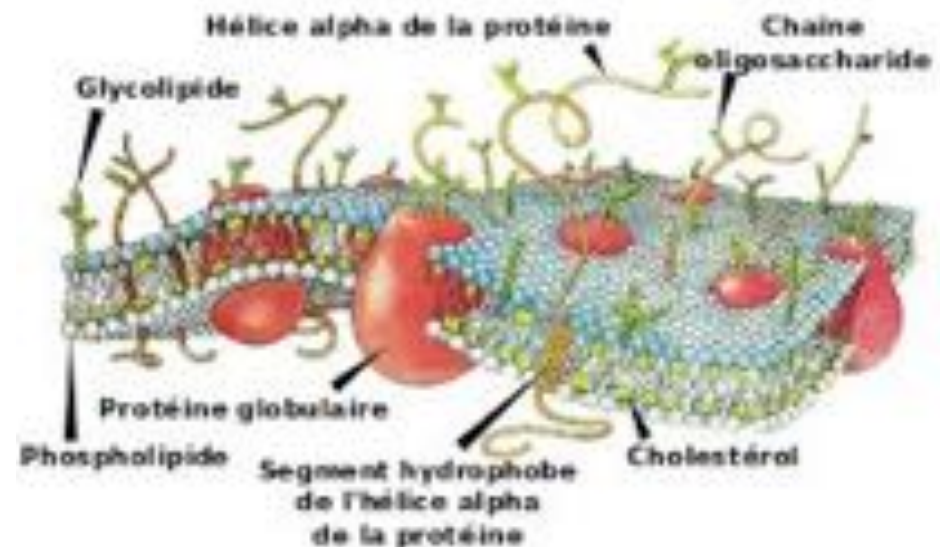
# La cytométrie en flux

## Applications : panel multi couleurs

Cell	Antigen	Molecules per Cell
T cell	TCR	100,000
	CD2	55,000
	CD3	124,000
	CD5	90,000
	CD7	20,000
	CD45	>200,000
CD4+ T cell	CD4	100,000
	CD28	20,000
	CCRS5	4,000-24,000
CD8+ T cell	CD8	90,000
	CD28	15,000
B cell	CD19	18,000
	CD20	109,000
	CD21	210,000
	CD22	14,000
	HLA-DR	85,000
	CD11a	10,000
	CD40	2,000
	CD86	16,000
	CD80	2,000
	Dendritic cell	CD11a
CD40		17,000
CD80		132,000
CD86		208,000
Monocyte	CD14	110,000
	CD32	21,000
	CD64	13,000
Neutrophil	CD14	3,500
	CD16	225,000
NK cell	CD56	10,000
Red Blood Cell	Glycophorin A	340,000
Basophil	CD23	15,000

Réaliser une bonne association  
densité Ag/ brillance

Phénomène d'encombrement stérique





# La cytométrie en flux

## Applications : panel multi couleurs

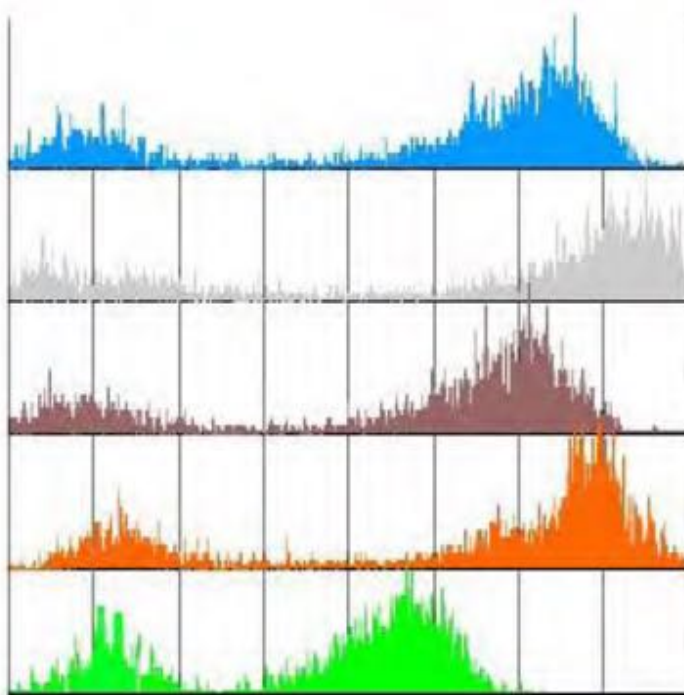
Fluorochrome	Stain Index
PE-Cy™5	353
PE	302
APC	278
Alexa Fluor® 647	214
PE-Cy™7	139
PerCP-Cy™5.5	107
<b>BD Horizon™ V450</b>	<b>85</b>
Pacific Blue™	80
Alexa Fluor® 488	73
Alexa Fluor® 700	61
FITC	56
APC-Cy7	37
PerCP	37
AmCyan	25
APC-H7	24

Sur les sites fournisseurs

# La cytométrie en flux

## Applications : panel multi couleurs

CD5



APC

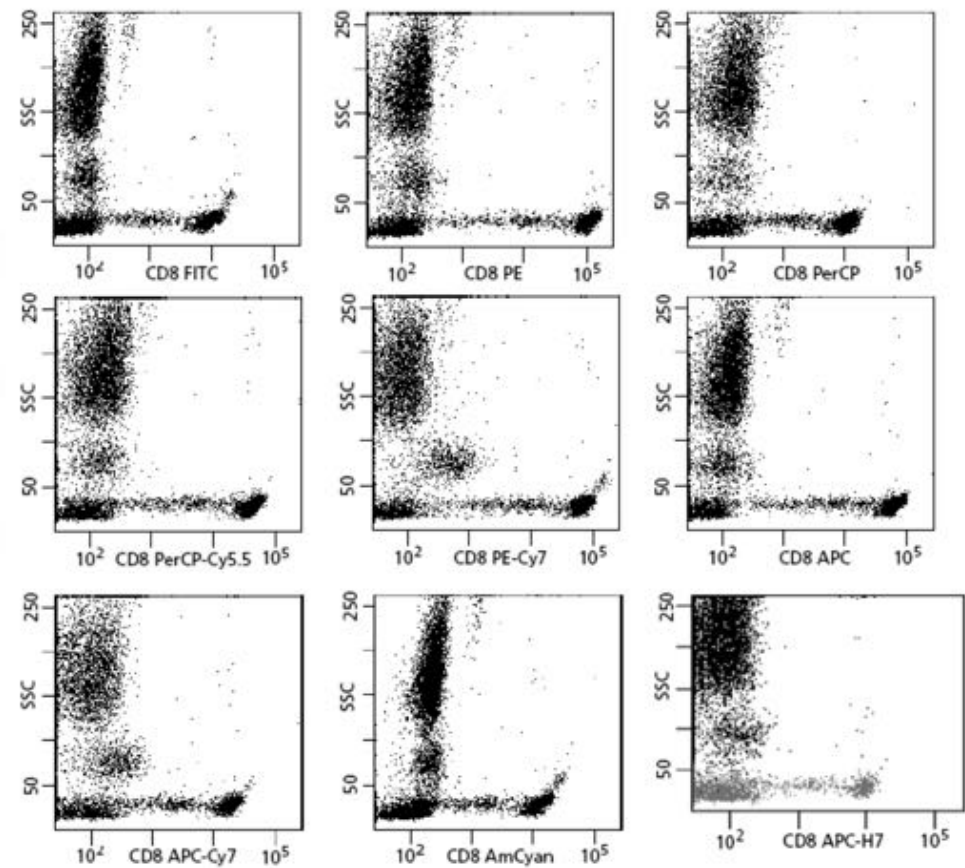
PE-Cy7

PerCP-Cy5.5

PE

FITC

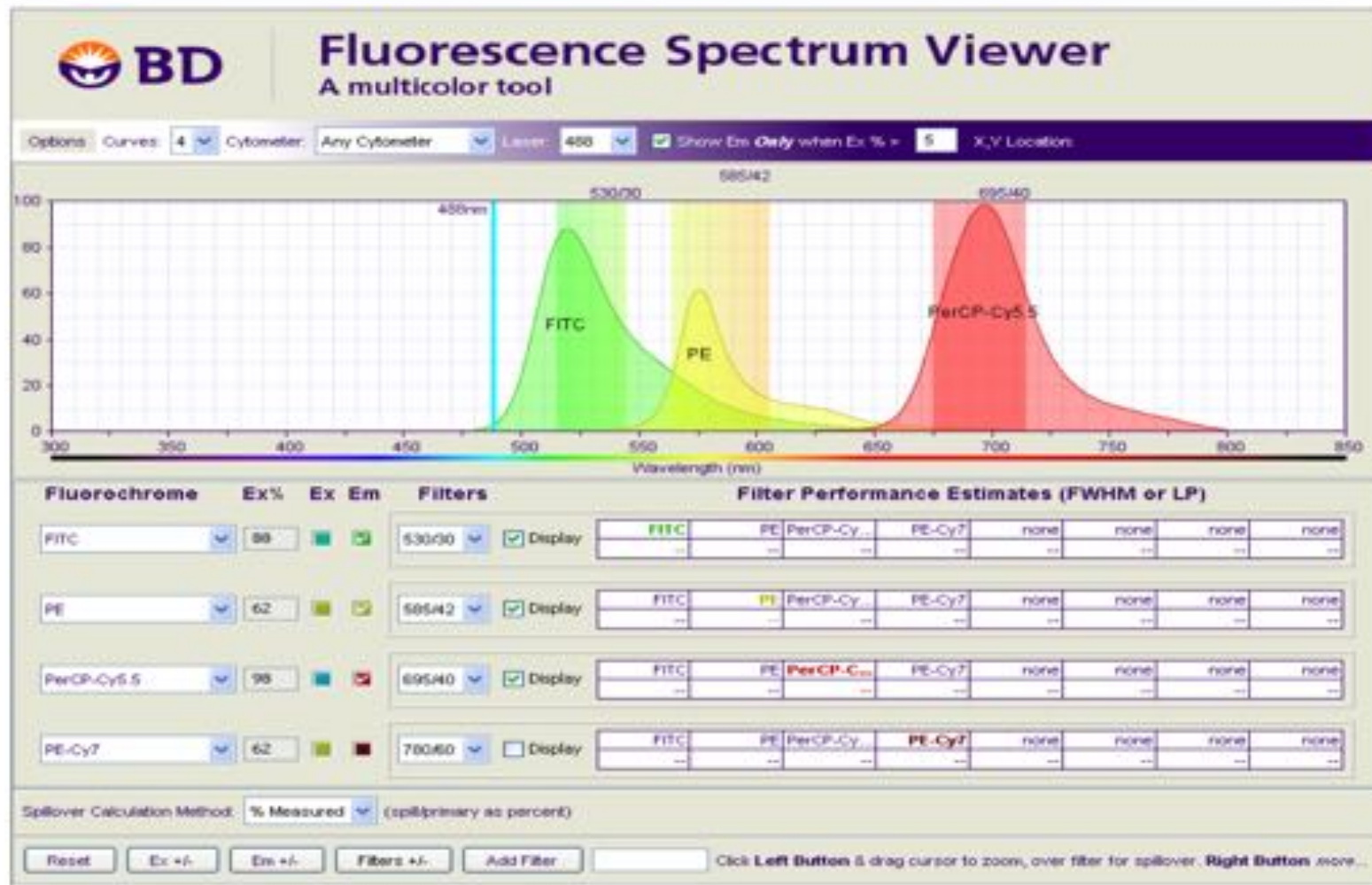
CD8



Attention au choix du fluorochrome

# La cytométrie en flux

## Applications : panel multi couleurs



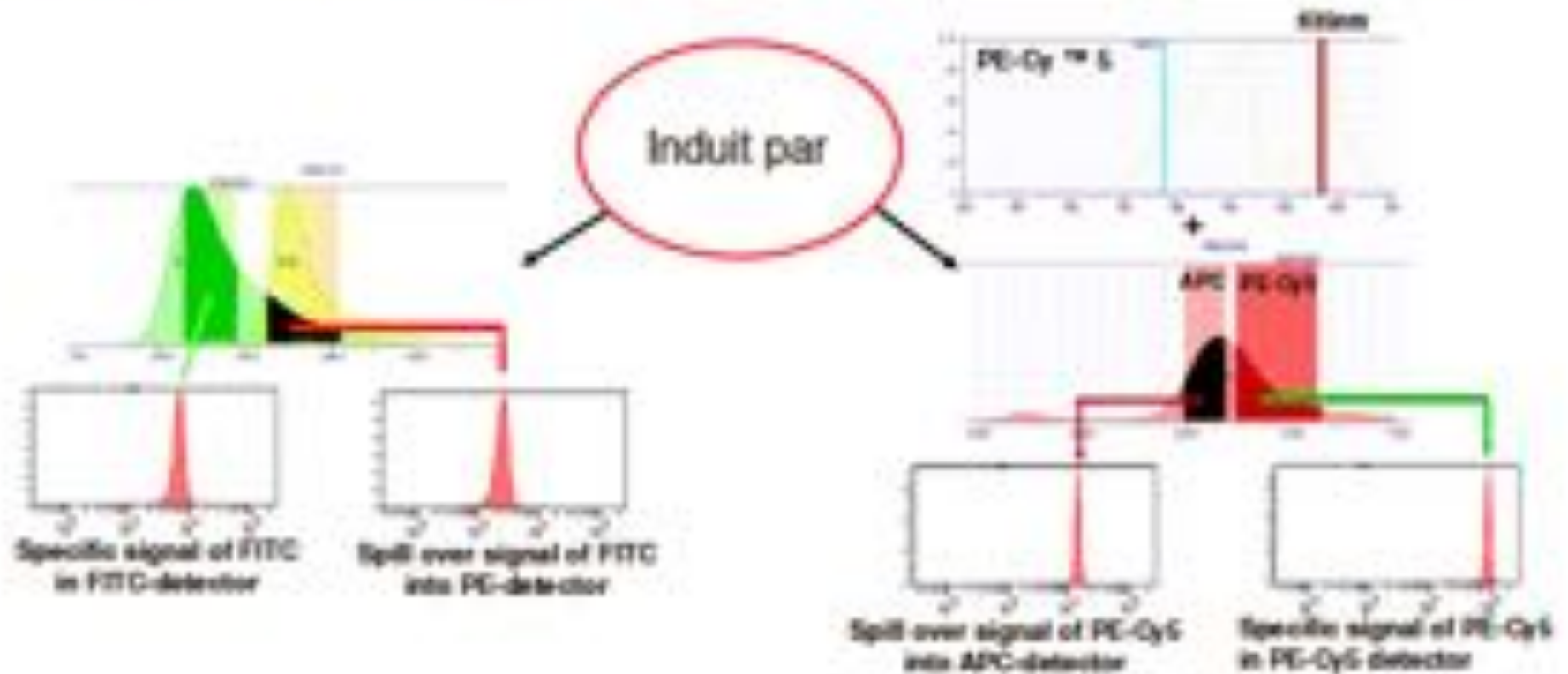
Aide au choix de fluorochromes et du taux de spill over, sur site fournisseur

# La cytométrie en flux

Applications : panel multi couleurs

Le spill over

Détection du signal d'un fluorochrome par 2 détecteurs (ou plus)



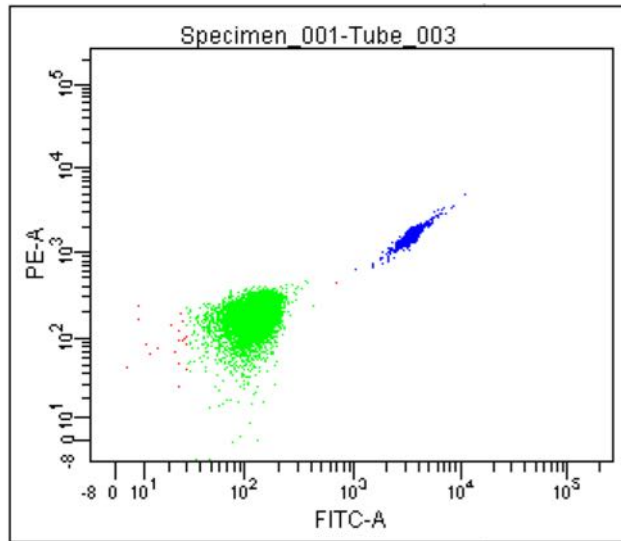
**Faux positif**

# La cytométrie en flux

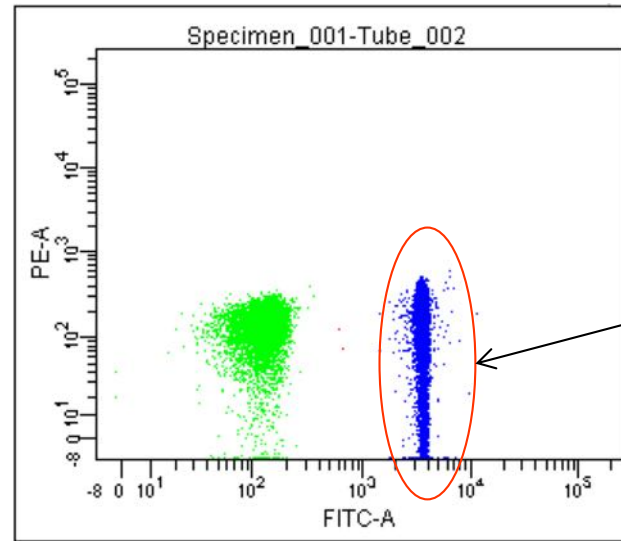
## Applications : panel multi couleurs

### Le spill over

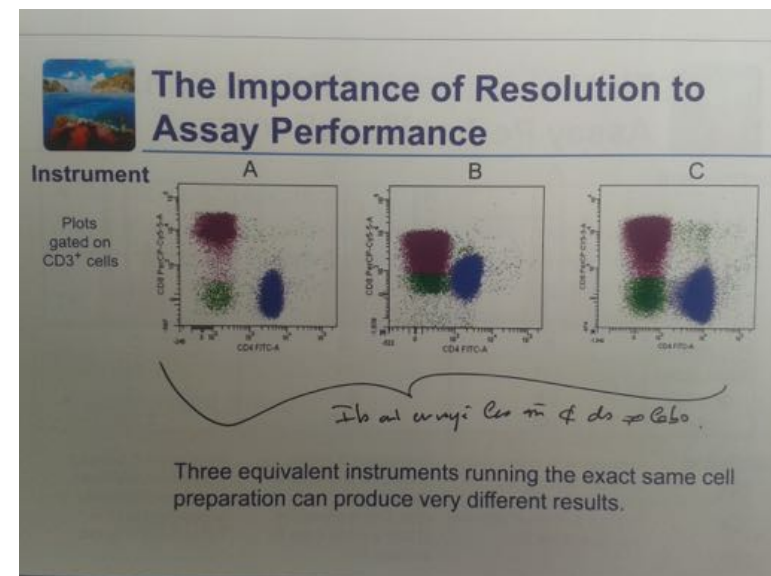
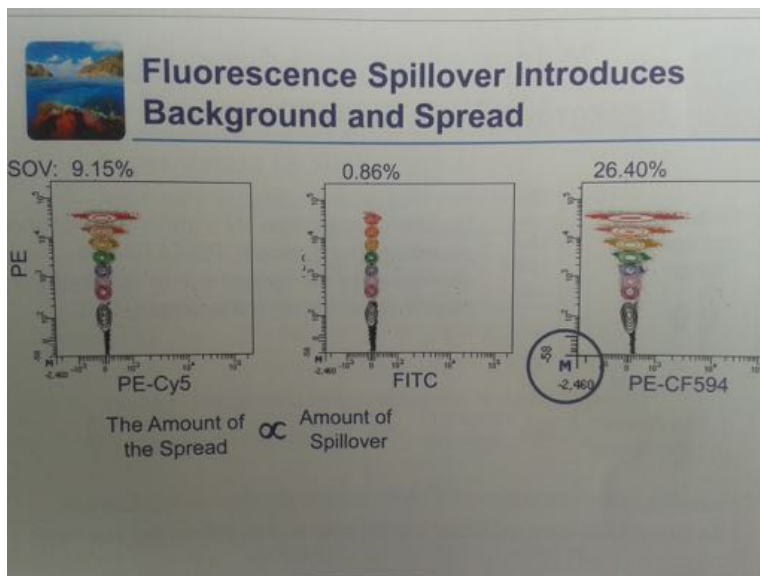
Non compensé



compensé



Spread data  
Du  
Au spill over



# La cytométrie en flux

## Applications : le seuil de positivité

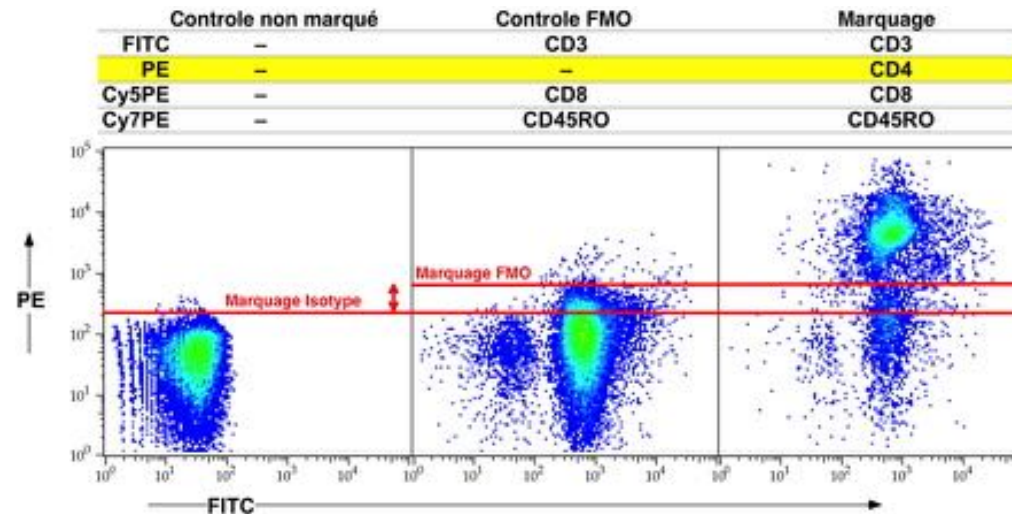
### Comment le définir?

- Vérification de l'autofluorescence (cellules seules)
- Faire des contrôles isotypique  
(anticorps non réactif de même isotype que l'anticorps test directement couplé)

- Faire des contrôles biologiques (ex: cellules stimulées/non stimulées)

- Faire des contrôles de type FMO (Fluorescence Minus One)

Toutes les fluorescences moins une, à réaliser lors d'une nouvelle combinaison de marquage et/ou à chaque fois que le seuil de positivité est difficile à déterminer.



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### → Dans un laboratoire clinique :

Immunophénotypage VIH  
Comptes absolus CD4  
Immunophénotypage leucémies et lymphomes  
cycle cellulaire  
Numération de cellules progéniteur (CD34)

...

### → Dans un laboratoire de recherche :

Etudes système immunitaire  
cellules hématopoïétique  
Etudes cinétiques  
Détection  
Tri cellulaire

...

# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

→ Plus précisément:

- Viabilité/mortalité cellulaire
- Marquages membranaires de surface
- Marquages intracellulaires
- Division cellulaire
- Cycle cellulaire
- Potentiel de membrane
- Flux calciques intracellulaire
- pH intracellulaire
- Activité du cytochrome P450
- Marquages d'enzymes
- Apoptose ....

tout dépend du fluorochrome, de la préparation cellulaire et du laser

Quelques exemples:



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Viabilité/mortalité cellulaire :

Iodure de propidium

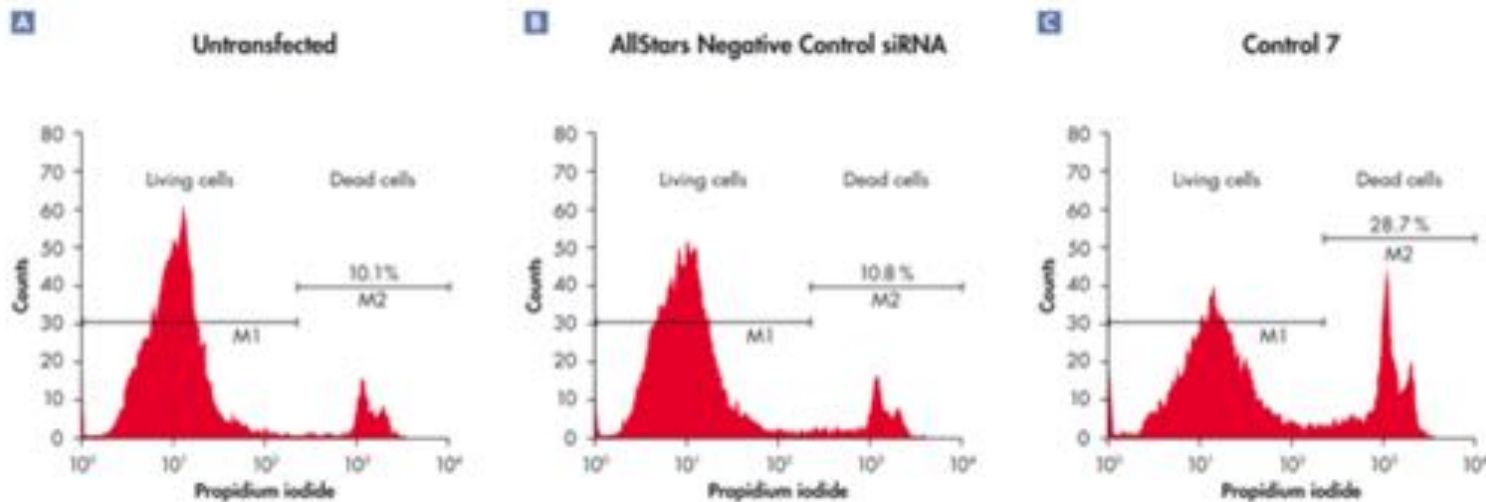
7 AAD (7 amino-actinomycin D)

live dead

....

-> Intercalant de l'ADN (BET, IP), Bases A-T (DAPI, Hoechts), Base C-G (7AAD)

-> Pénètrent dans les cellules mortes



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

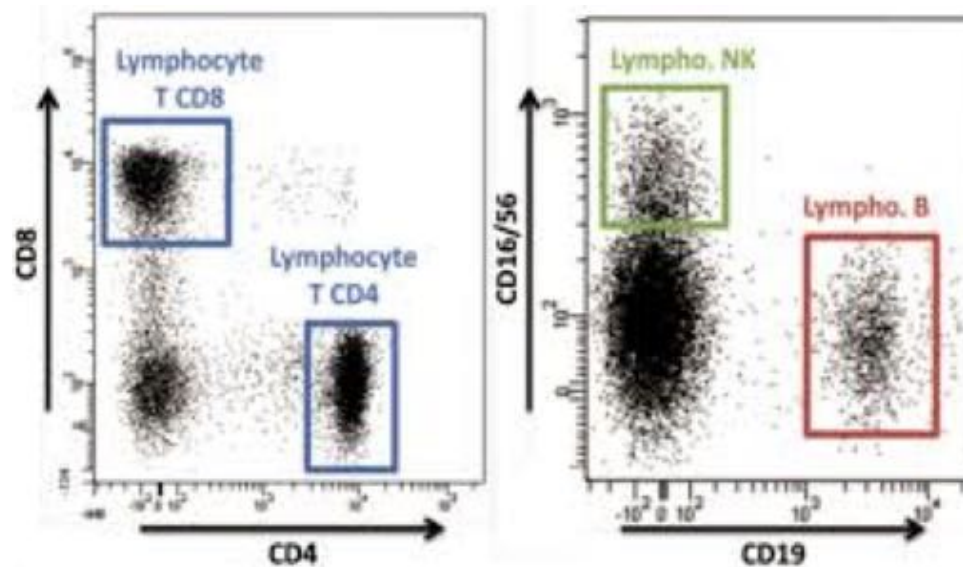
### Marquage membranaire de surface :

Anticorps couplés à un fluorochrome directement ou à de la biotine

Marquage par incubation directe

Exemple :

CD4, CD8, CD19 TCR....

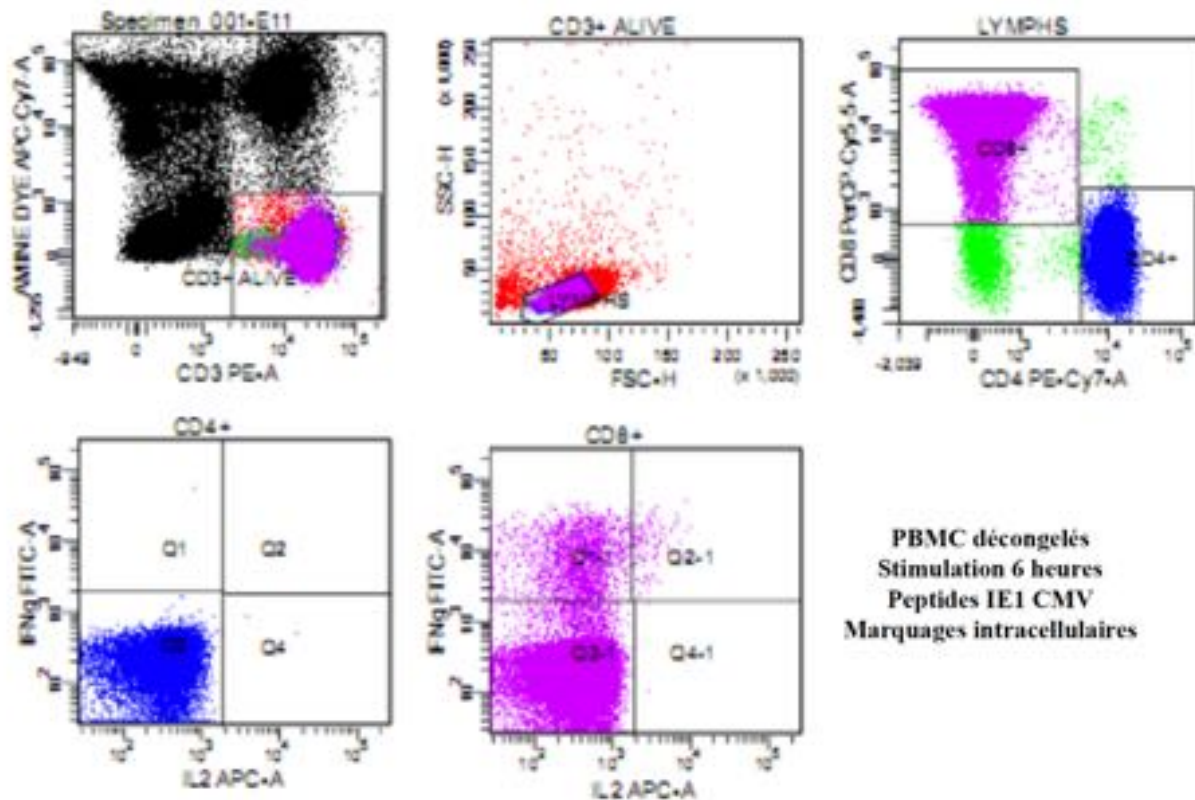


# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Marquage intracellulaire :

Anticorps couplés directement à un fluorochrome (mieux)  
Phase de perméabilisation de la membrane avant marquage  
Exemple:  
FoxP3, IL2, IFN $\gamma$ ...



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Potentiel de membrane :

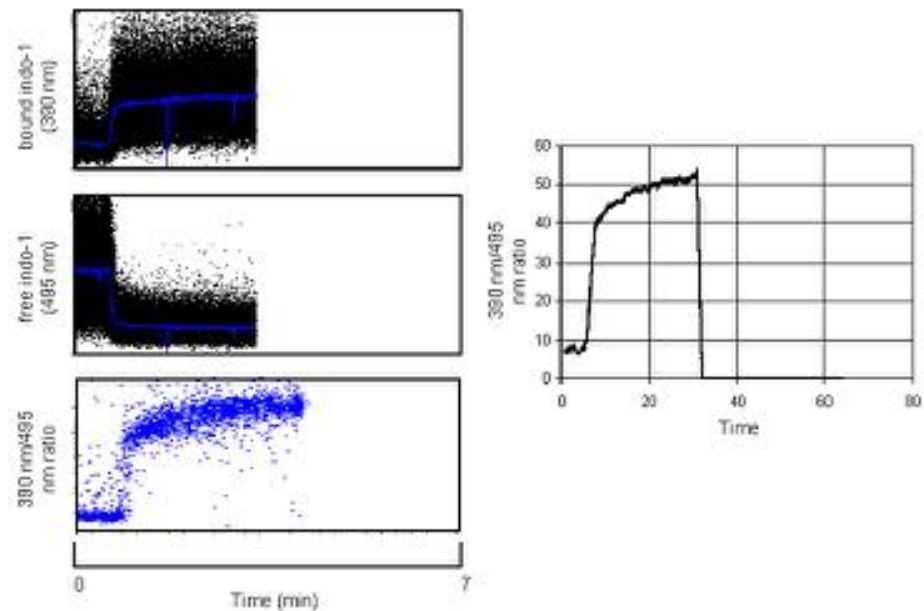
DIOC5(3) Dipentylaxocarbocyanine iodide

Famille de carbocyanine

les cellules hyperpolarisées capte le DIOC

Exemple :

utilisé en neurologie pour les études sur l'activation des neurones



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Cycle cellulaire :

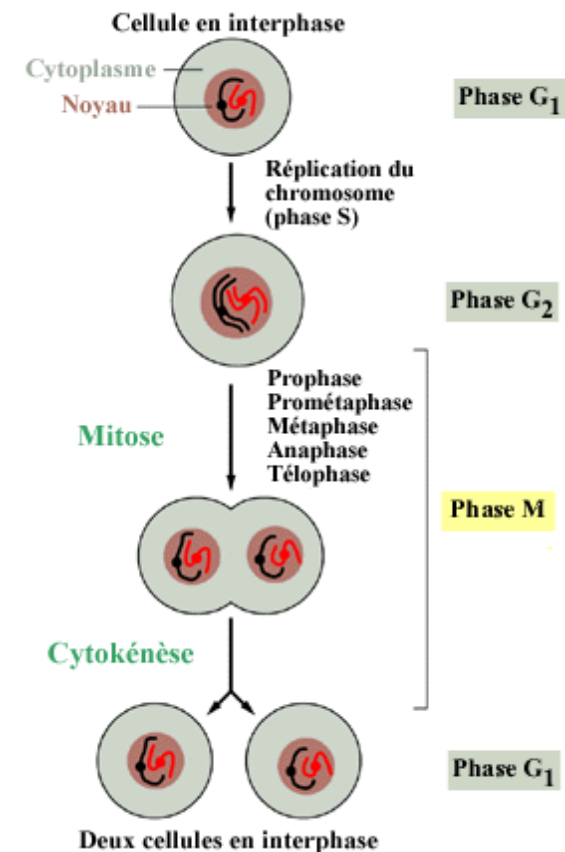
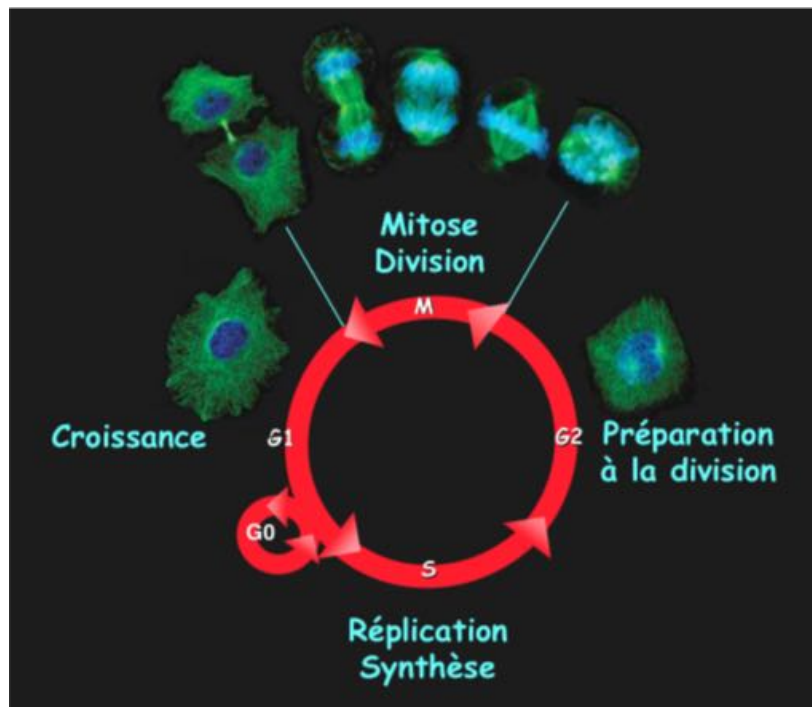
Mesure de la ploïdie de l'ADN : + il y a d'ADN + le signal est fort

Iodure de propidium

Hoechst (le plus lipophile)

DAPI (di amino phenyl Indol)

BrDU



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Cycle cellulaire :

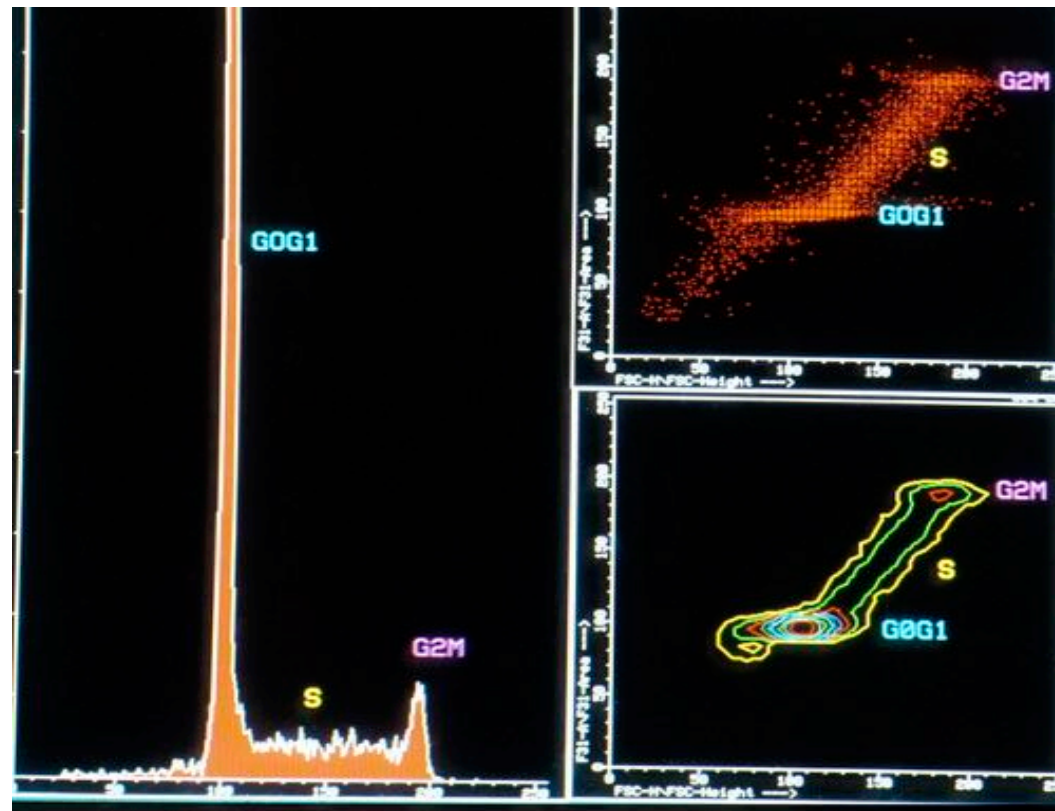
Mesure de la ploïdie de l'ADN : + il y a d'ADN + le signal est fort

Iodure de propidium

Hoechst (le plus lipophile)

DAPI (di amino phenyl Indol)

BrDU



# La cytométrie en flux

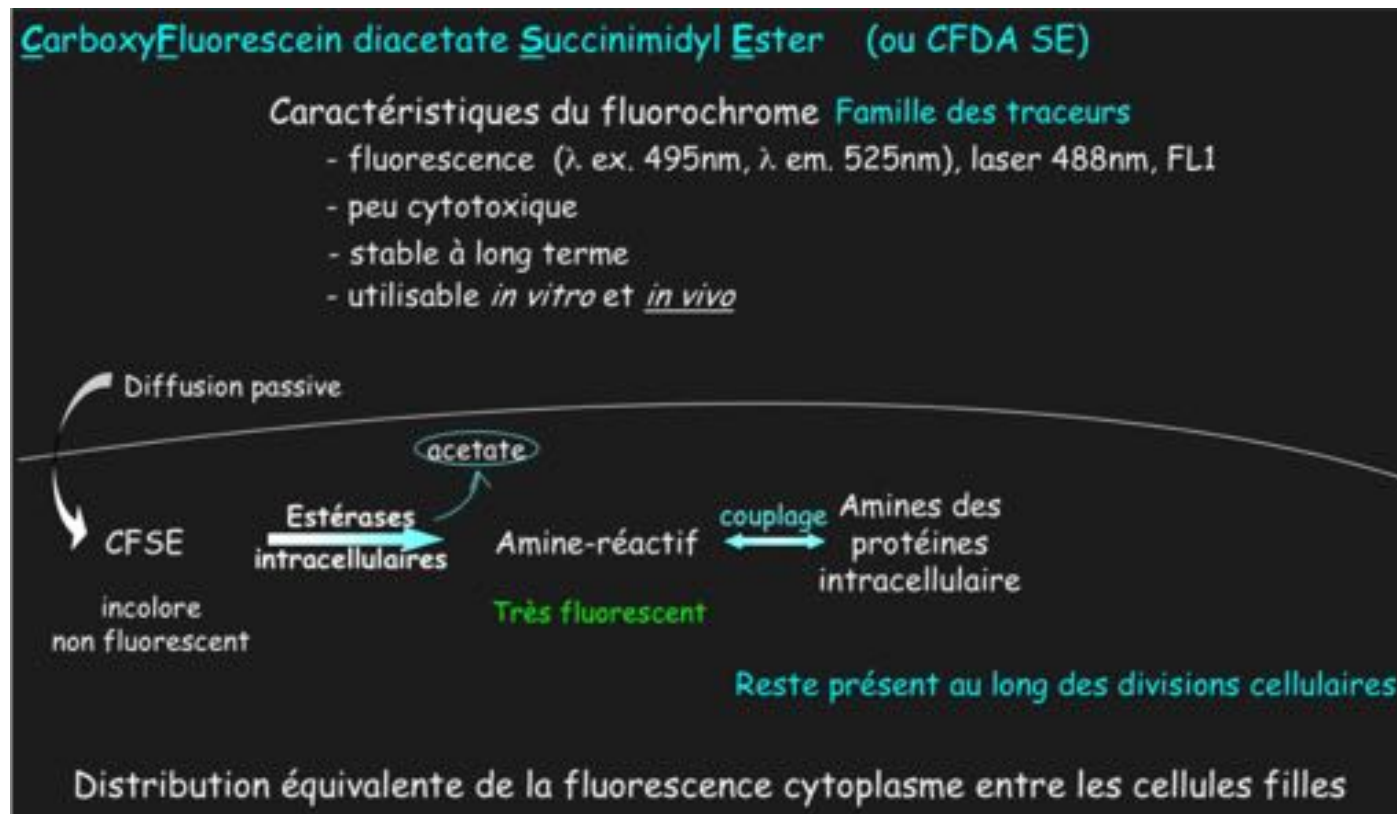
## Applications : exemples

### Prolifération cellulaire :

CFSE : 5(6) carboxyfluorescein diacetate N succinidyl ester

Lipophile : pénètre facilement dans la cellule vivante puis estérification :  
coupure de liaison entraînant la fluo et le piégeage dans le cytoplasme (liaison protéique-  
perméabilisation possible)

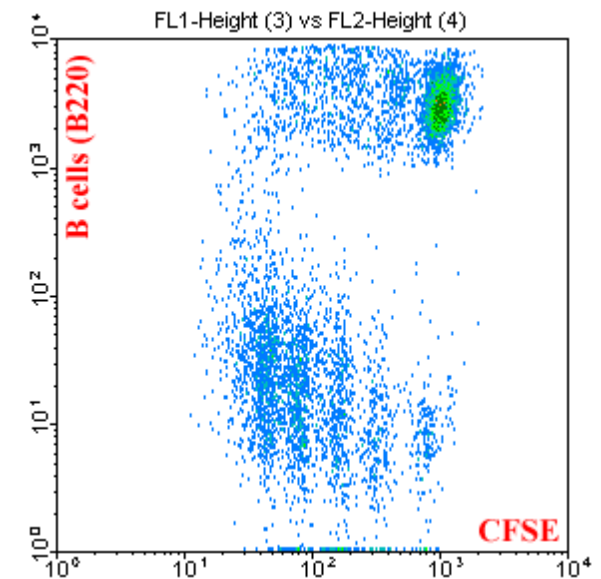
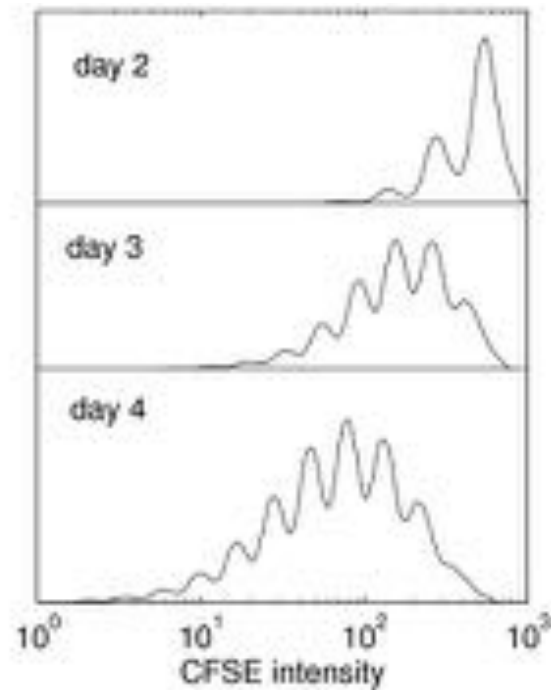
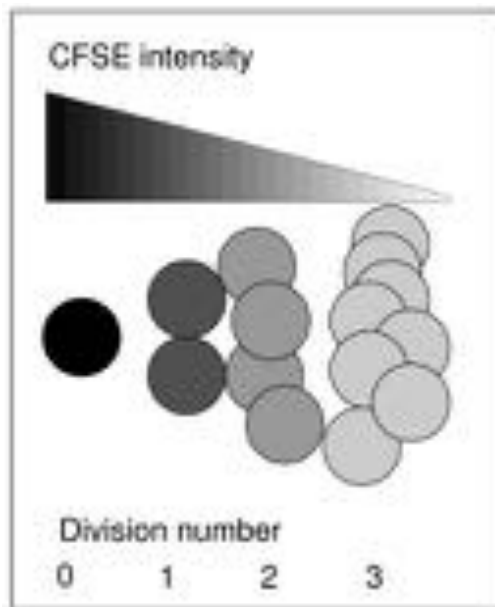
- > plus la cellule se divise moins elle fluoresce.
- > Image typique de peigne



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Prolifération cellulaire :





# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Recherche radicaux oxygénés:

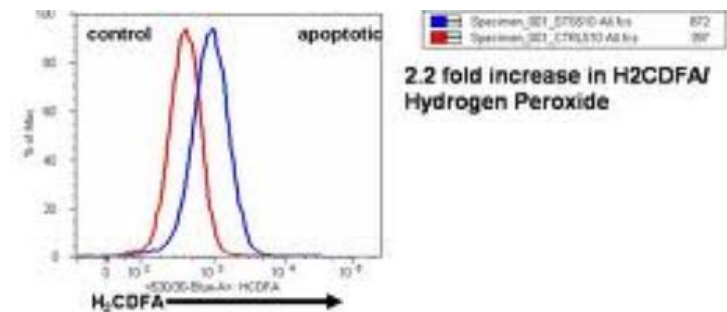
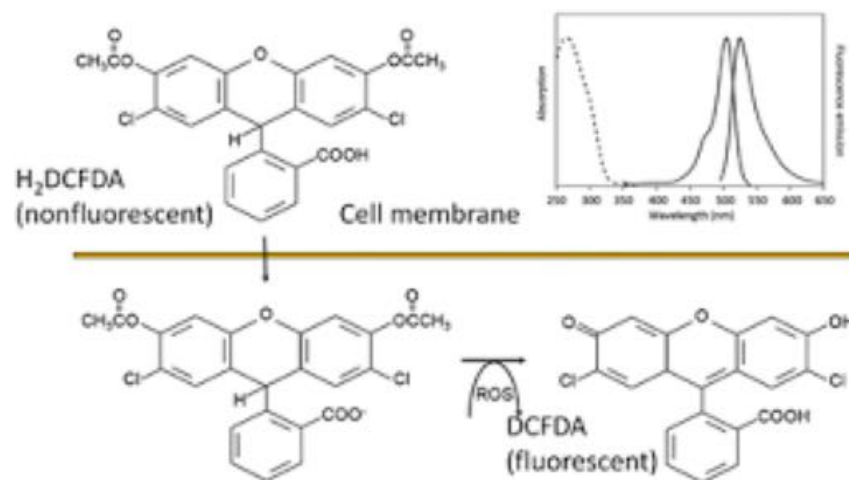
H<sub>2</sub>DCFDA

pénètre facilement dans la cellule vivante

Se couple aux radicaux libres

Produit → fluo

(pas de liaison protéique-perméabilisation non possible)



Legend. Jurkat T-cell line were treated with 1  $\mu$ M staurosporine (STS) for 2h at 37°C. Cells were then incubated with 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min at 37°C and washed. Cells (30,000 events) were then analysed on a BD LSRII and data collected in 530/30nm channel to determine H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence. Control cells (untreated) had a median H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence of 397, while the STS apoptotic cells had a median H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence of 872 or a 2.2 fold increase in hydrogen peroxide compared to controls.

# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Recherche flux d'ions $Ca^{++}$ , $Mg$ :

**Sondes fluorescentes**

### Les fluorochromes utilisés

Spécifiques d'un organe ou d'un composé cellulaire

#### 1 - Ions

Indicateurs de $Ca^{2+}$ ratiométrique	UV	Indo 1	Ex 351	Em 475	Em 400 <sup>(+ <math>Ca^{2+}</math>)</sup>
		Fura 2	Ex 340 Ex 380 <sup>(+ <math>Ca^{2+}</math>)</sup>	Em 510	
	Vis	Fluo 3	Ex 488	Em 525	

Indicateurs de $Mg^{2+}$	UV	Mag-Fura2, Mag-Indo1...	Vis	Mag-Fluo4...
Indicateurs de $Zn^{2+}$	UV	FuraZin1, IndoZin1	Vis	FluoZin2....

**Autres Indicateurs d'ions métalliques**

Intensité de fluorescence  
haute = rouge > orange > jaune > verte > bleu = faible

FLA3000G laser scanner (Fuji Photo Film Co.)  
 $\lambda_{ex}$  473 nm  $\lambda_{em}$  520 nm

Indicateurs de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  —

# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

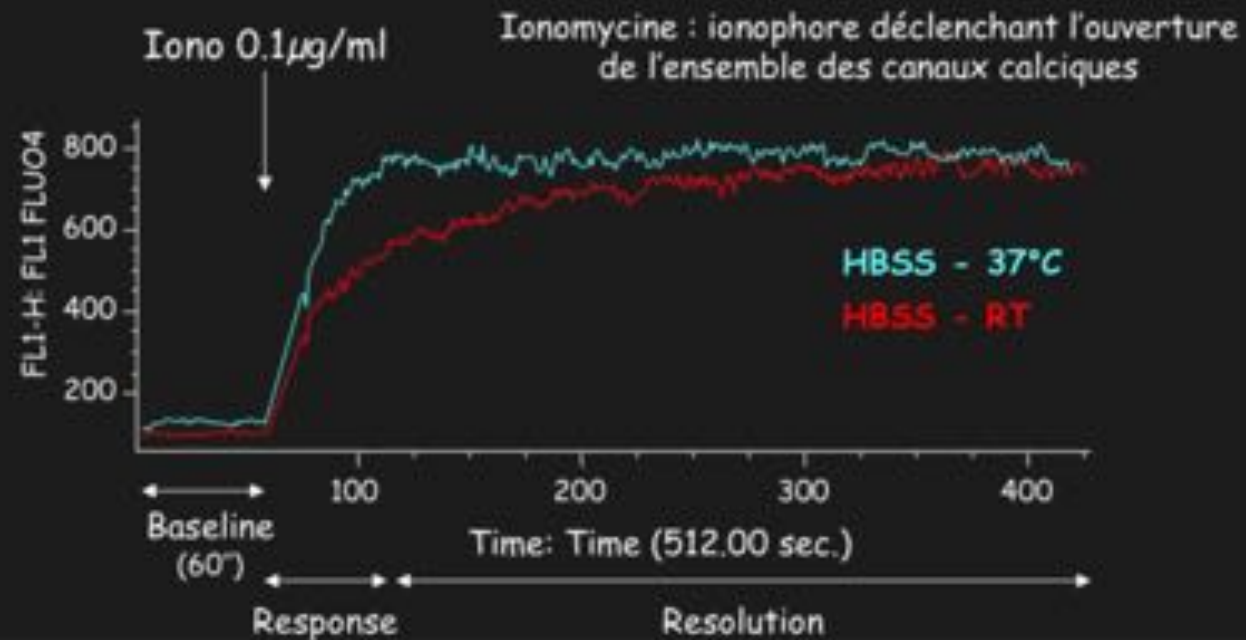
### Recherche flux d'ions $Ca^{++}$ , Mg:

#### Marquage de cellules T primaires avec du Fluo4

Fluorochrome perméant,  $\lambda_{ex}$ . 494nm,  $\lambda_{em}$ . 516nm ; laser 488nm, FL1

Non ratiométrique : Intensité de fluorescence varie avec  $[Ca^{2+}]_{lié}$

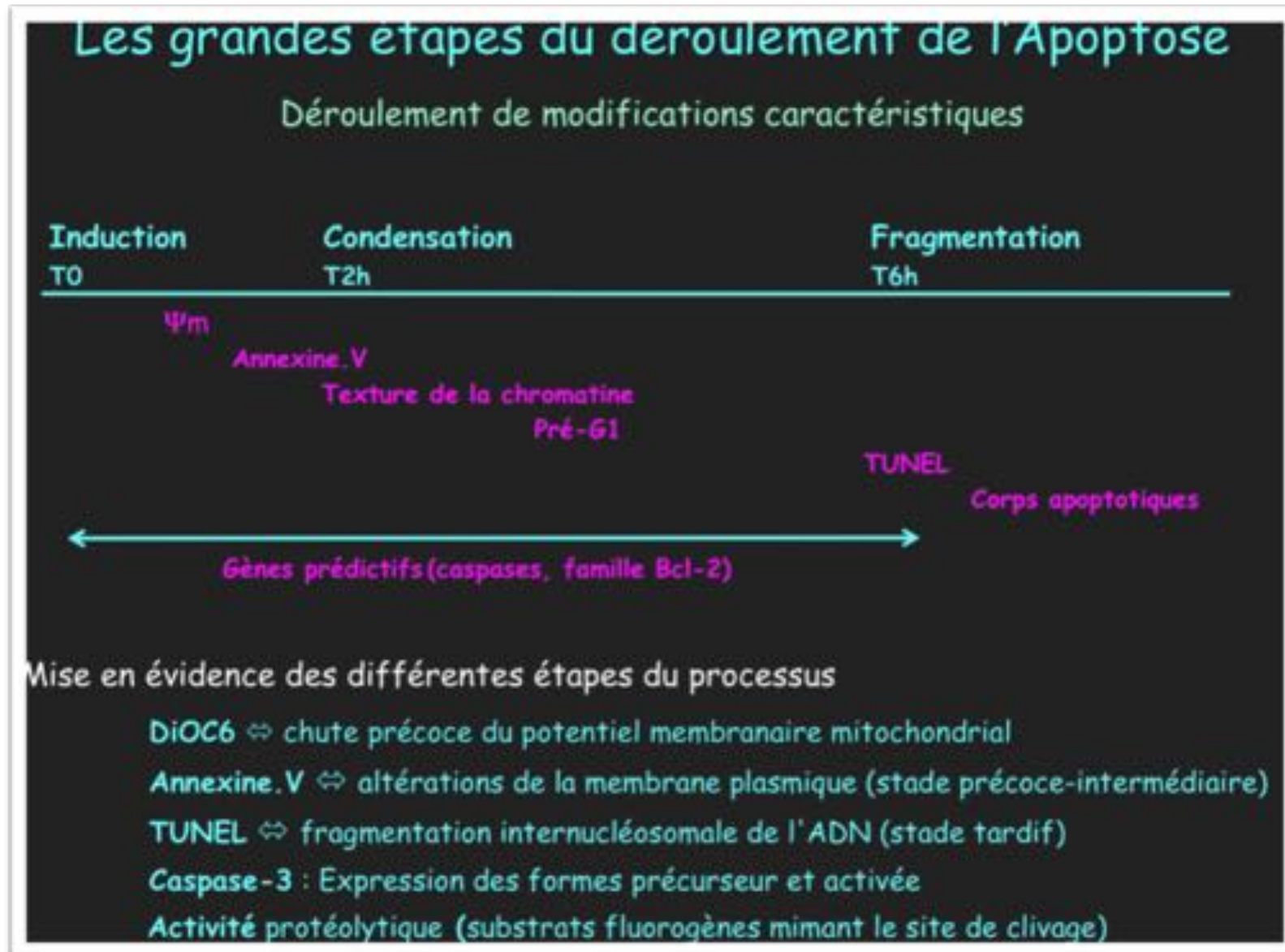
Contrôle positif : mesure du calcium présent dans le milieu



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Apoptose:

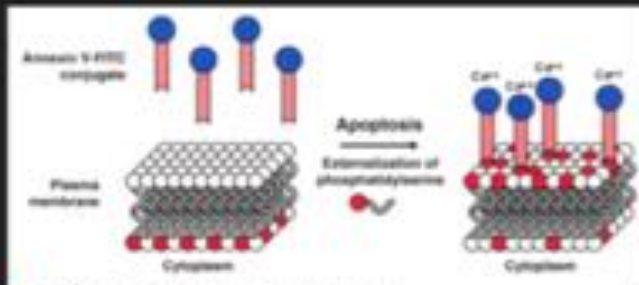


# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### Apoptose: ANNEXINE 5

#### Détection des altérations de la membrane plasmique



#### Distribution des phospholipides

Cellule normale : asymétrique

Cellule apoptotique : translocation PS à l'extérieure  
(stade précoce-intermédiaire)

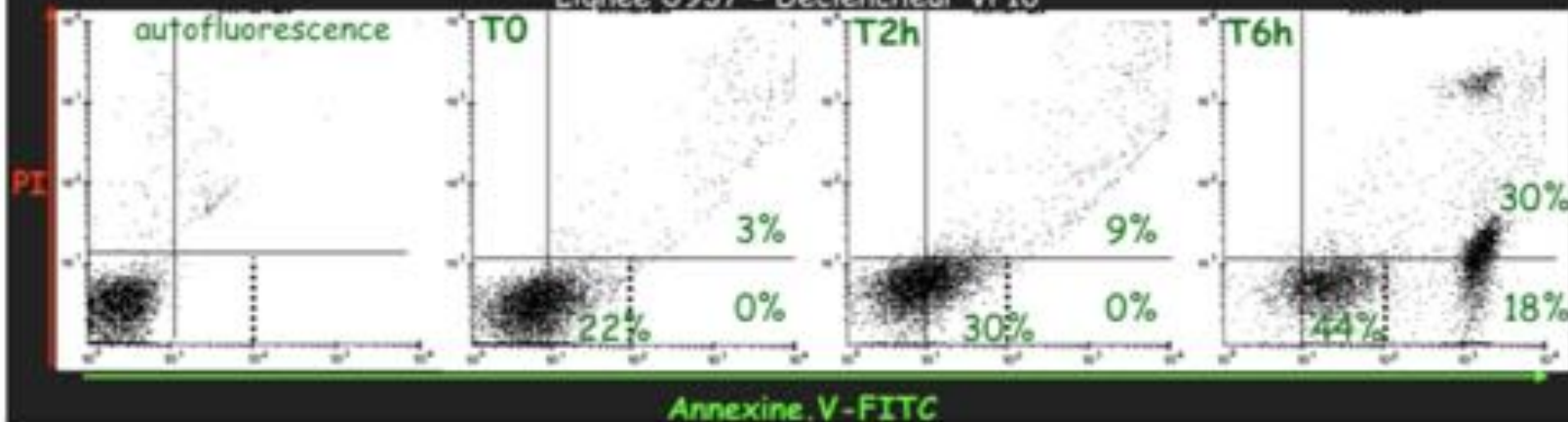
- Phospholipides anioniques
- Phospholipides neutres

#### Annexine V

protéine  $Ca^{2+}$  dépendante  
forte affinité pour résidus PS

Cellules	AnnexineV	PI
Normales	-	-
Apoptotiques	+	-
Nécrotiques	+	+

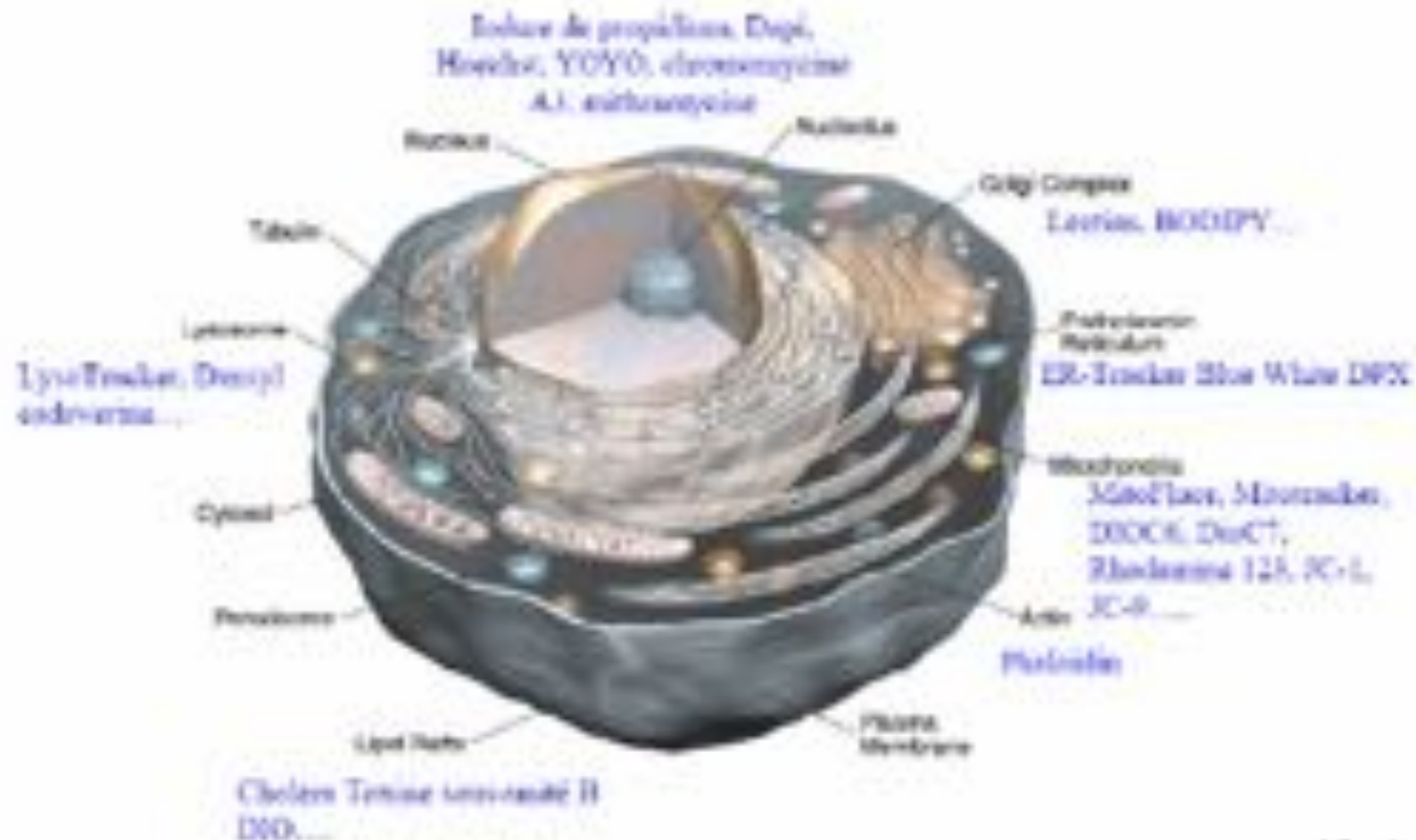
Lignée U937 - Déclencheur VP16



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

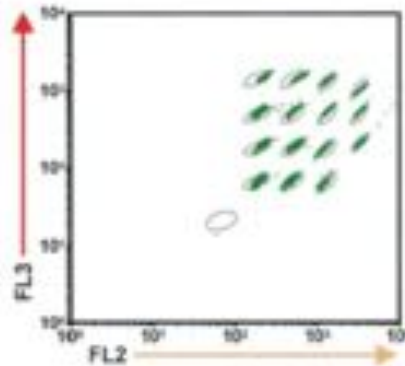
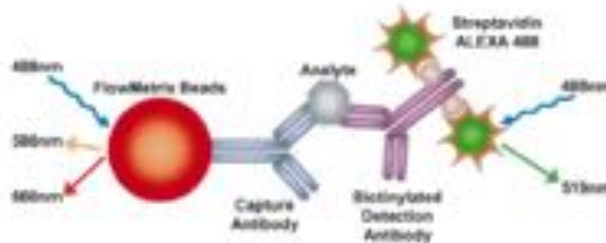
### Exemples de marqueurs spécifiques des organites



# La cytométrie en flux

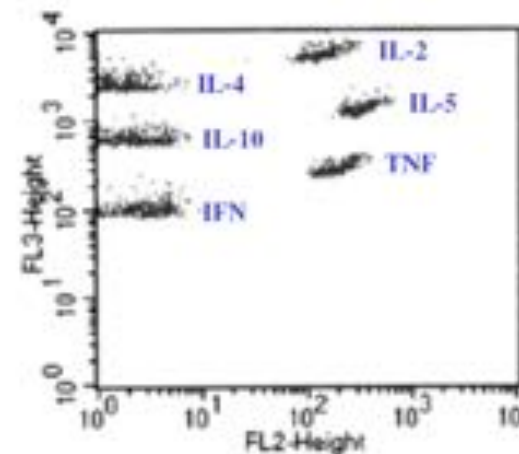
## Applications : exemples

### Dosage multiplex en cytométrie en flux



Plusieurs analytes solubles (Cytokines, Chemokines) ou en lysat cellulaire (phosphoprotéines) peuvent être analysés en multiplex à partir d'un même échantillon.

Billes de capture de différentes intensités de fluorescence, chacune coatée avec un anticorps spécifique pour mesurer en simultané plusieurs analytes.



# La cytométrie en flux

## Applications : exemples

### → Dans un laboratoire clinique :

Immunophénotypage VIH

Comptes absolus CD4

Immunophénotypage leucémies et lymphomes  
cycle cellulaire

Numération de cellules progéniteur (CD34)

...

### → Dans un laboratoire de recherche :

Etudes système immunitaire

cellules hématopoïétique

Etudes cinétiques

Détection

**Tri cellulaire**

...



# La cytométrie en flux

## Applications : tri cellulaire

- Enrichissement d'une sous population.
- Tri d'évènements rares (HIV-cellules dendritiques- Cellules souches).
- Clonage dans des microplaques 96puits (Production d'hybridomes, receptor-transfected cell lines).
- Oter les cellules mortes d'une culture

# La cytométrie en flux

## Applications : tri cellulaire

- Base : on sépare les cellules selon les info données par le phénotype
- La colonne de fluide est fractionnée et chaque gouttelette est analysée une cellule/gouttelette
- Selon les valeurs : on décide la séparation

# La cytométrie en flux

## Applications : tri cellulaire

- Cette séparation est obtenue par électrisation de la goutte
- Puis déflexion par des champs électriques ou magnétiques
- Selon les appareils on peut trier 1, 2 à 4 population différentes

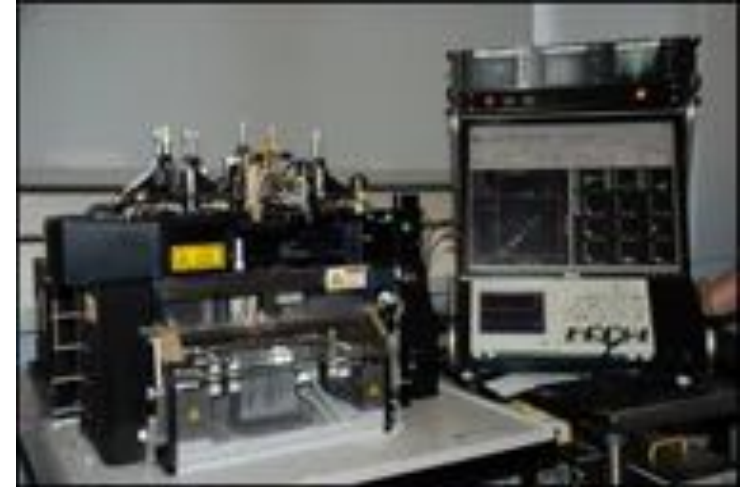
# La cytométrie en flux

## Applications : tri cellulaire

ARIA



INFLUX

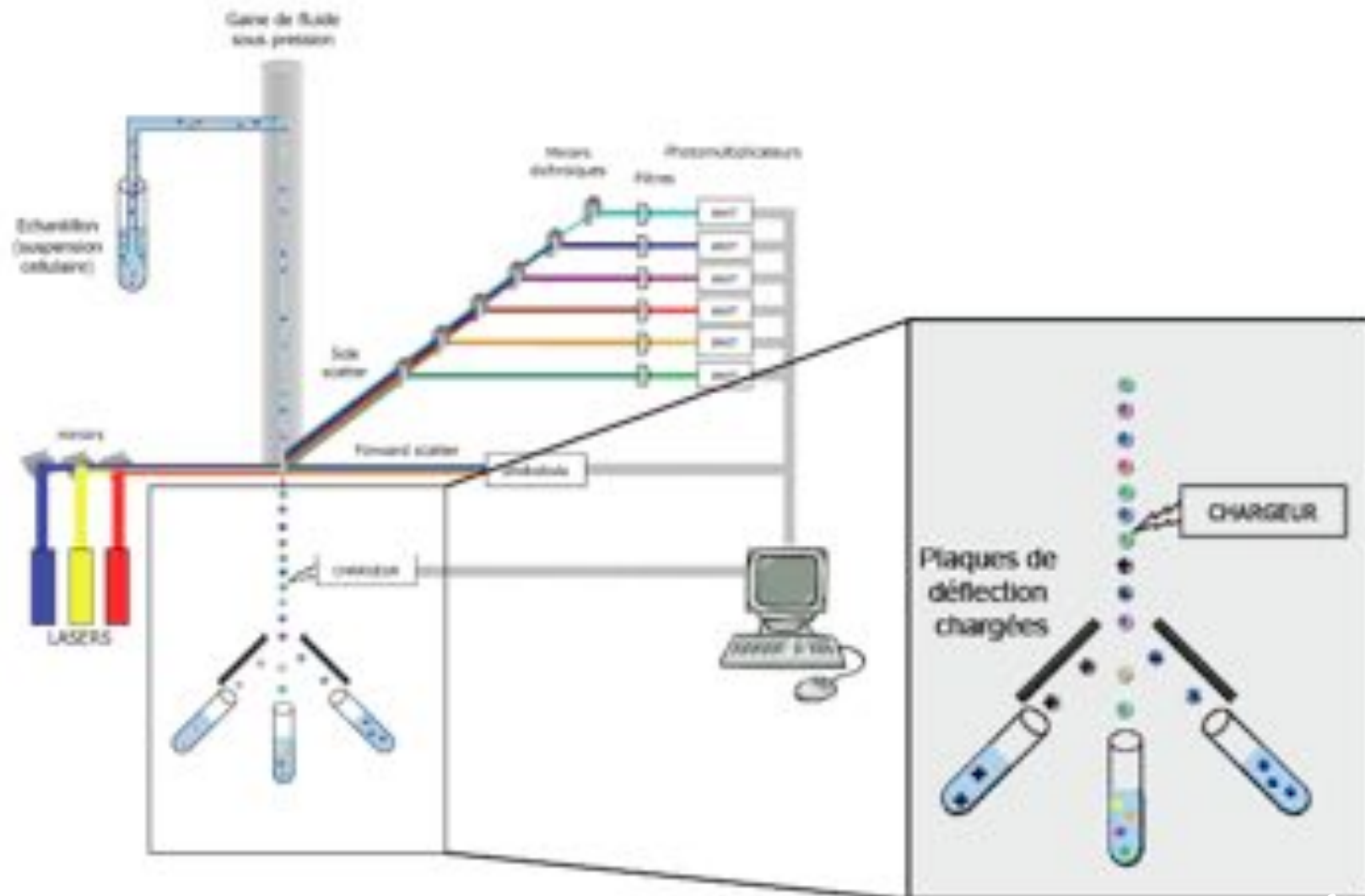


ASTRIO-MOFLO



# La cytométrie en flux

## Applications : tri cellulaire



# La cytométrie en flux

- Historique & définition
- Principes
- Applications
- **Autres**

# La cytométrie en flux

## Evolution de la cytométrie

### Cytométrie de masse



- Passe de 18 paramètres à 135
- Caractérisation ultra fine de cellules même très rares
- Marqueurs biologiques sont détectés en utilisant des anticorps munis d'étiquettes métalliques  
120kD < PM des métaux > 215 kD

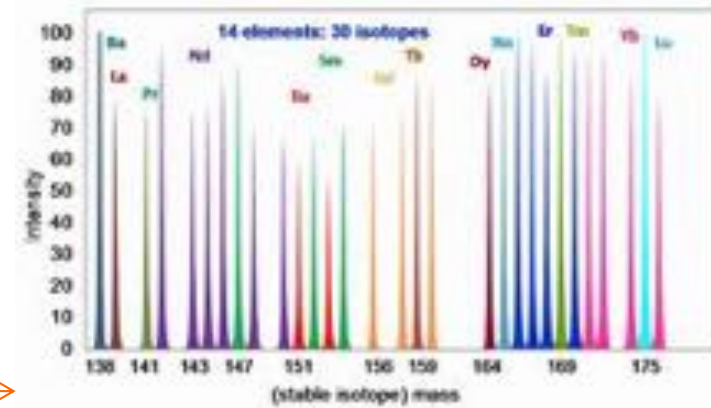
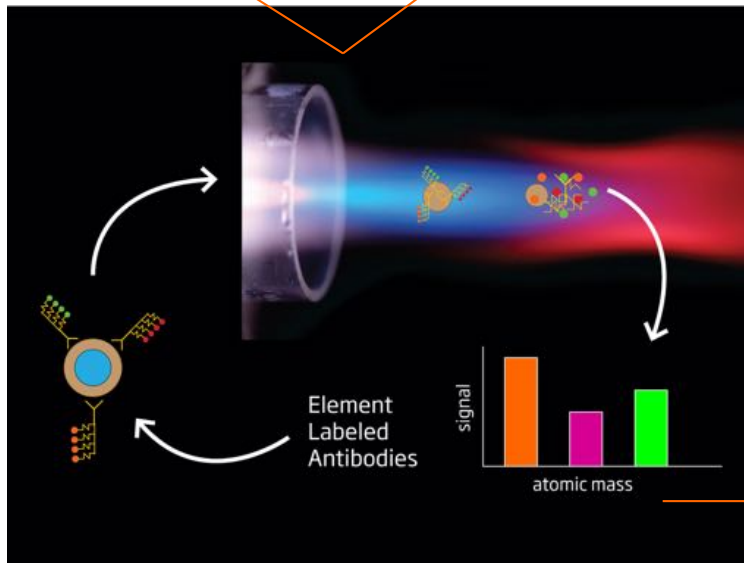
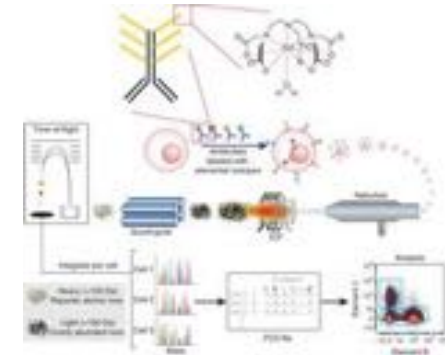
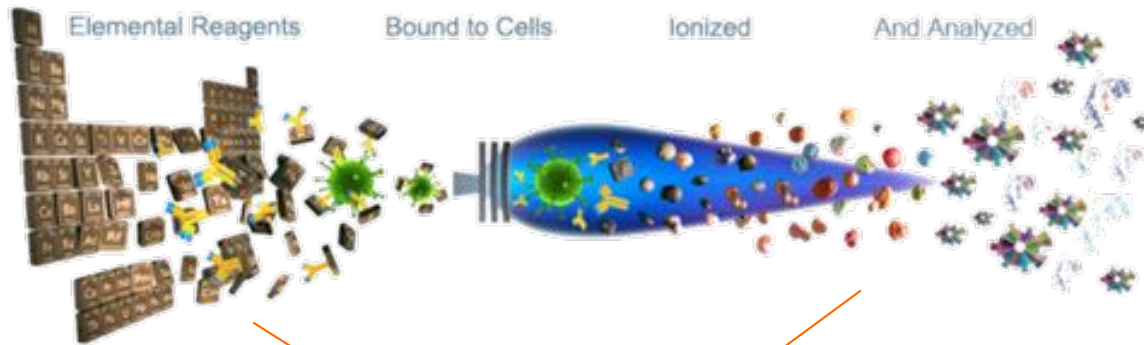


- Les cellules sont vaporisées dans une chambre à plasma
- la cellule génère un nuage d'ions
- Analyse par spectrométrie de masse
- Les signaux de sortie de spectrométrie de masse sont dépourvus de chevauchement spectral

# La cytométrie en flux

## Evolution de la cytométrie

### Cytométrie de masse

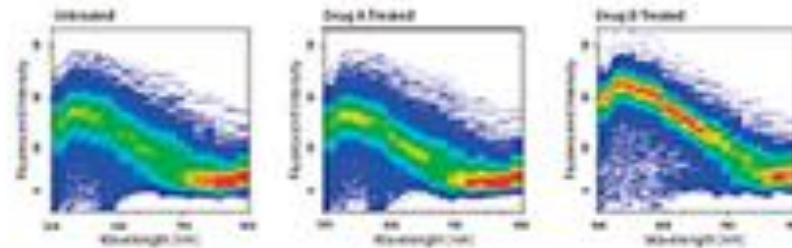
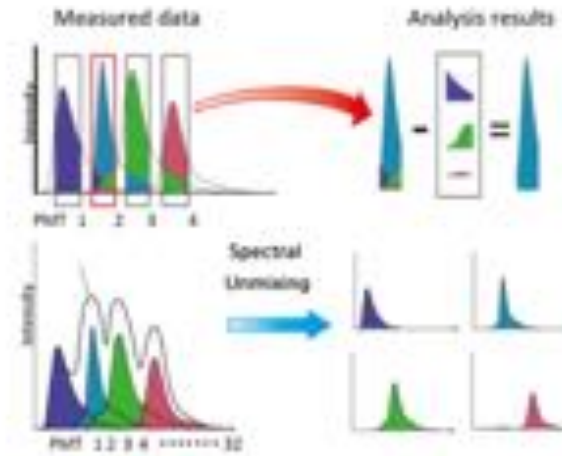




# La cytométrie en flux

## Evolution de la cytométrie

### Spectral cell analyser

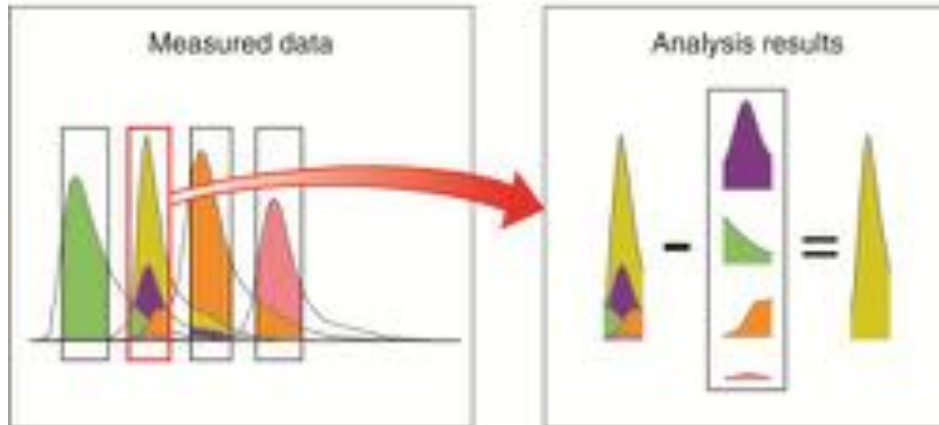


# La cytométrie en flux

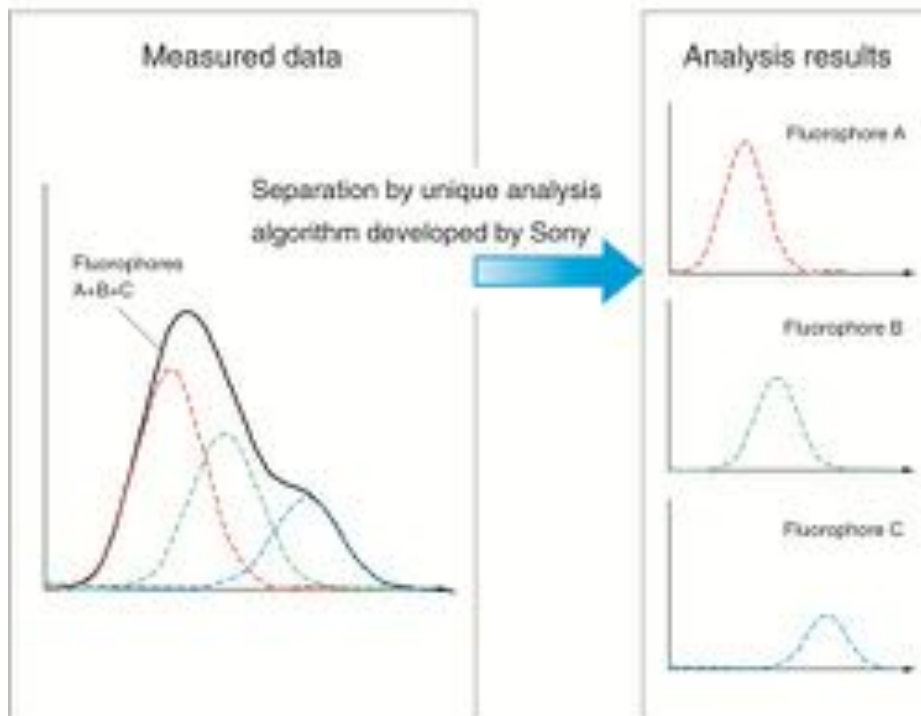
## Evolution de la cytométrie

### Spectral cell analyser

Analysis by Conventional Cell Analyzers



Analysis by the Spectral Cell Analyzer



- division des émissions de fluorescence de tous les fluorophores par un réseau de prismes de conception unique de Sony
- en combinaison avec un photomultiplicateur '32-canal nouvellement développé
- Permet l'analyse des émissions spectrales de pratiquement tous les fluorophores se chevauchant en les divisant en émissions de fluorophores individuelles avec l'algorithme d'analyse développé indépendamment de Sony.
- Résultats attendu :
  - Plus besoin de faire de compensation
  - Augmentation du nombre de déterminant

# La cytométrie en flux

## Sécurité

1/ Risques électriques

2/ Risques laser de classe 3

3/Risques chimiques

fluorochromes

Formaldéhyde

Parformaldéhyde

attention à l'élimination des déchets

4/Risque biologiques

aérosols

FIN

