

- La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide.

- Elle permet une caractérisation :

- Individuelle,
- Quantitative,
- Qualitative de la cellule
- Analyse simultanée de paramètres
- Trie des population

- Les informations sur la cellule apportées sont:

- Sa taille relative (Forward Scatter),
- Sa granularité ou sa complexité interne relative (Side Scatter),
- Son intensité relative de fluorescence.

Cytométrie en flux



Analyse multiparamétrique de cellules individualisées
taille, structure, signaux fluorescents



Echantillon :

Cellules en suspension rendues fluorescentes par des marqueurs spécifiques
(anticorps monoclonaux + fluorochromes, sondes)

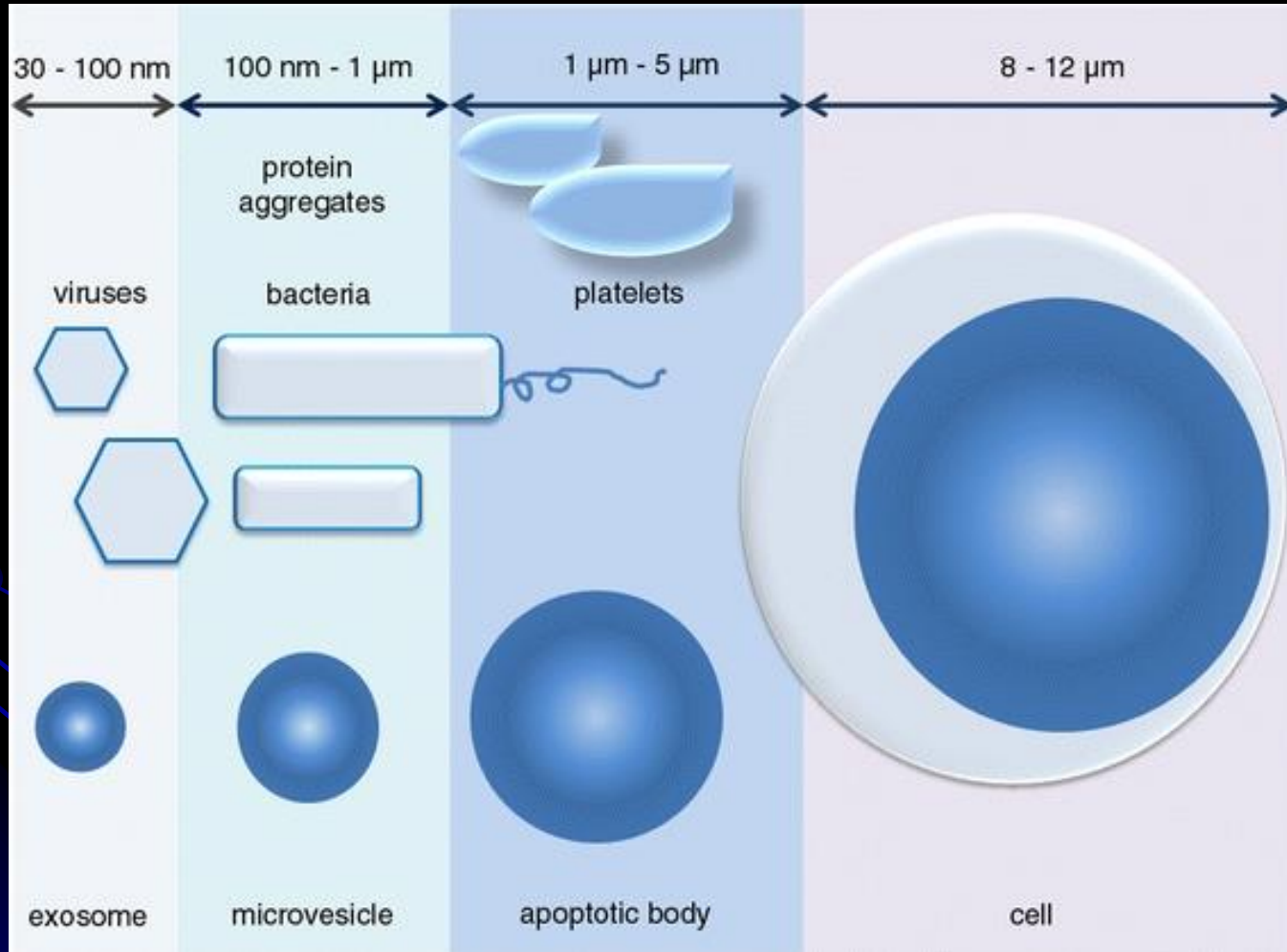


Rapidité d'acquisition d'un grand volume de données

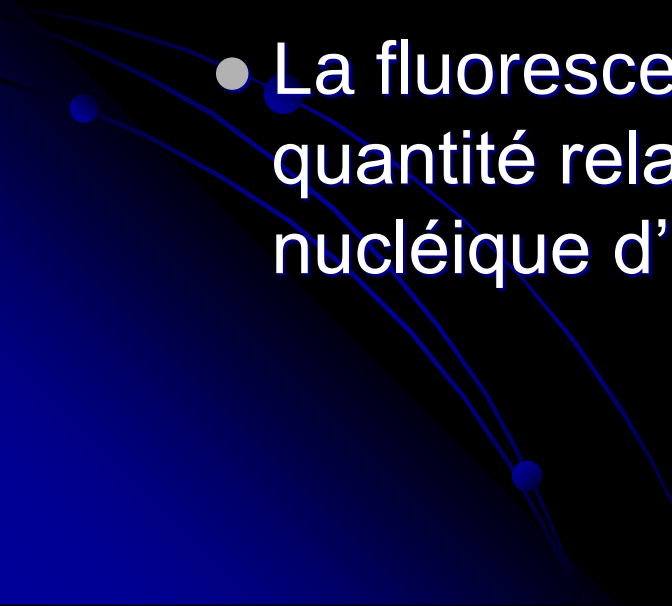


Précision et multiplicité des mesures

Echantillons



Que mesure un cytomètre en flux?

- La cytométrie en flux repose sur la mesure de deux phénomènes physique distincts:
 - La diffraction de la lumière: elle permet de mesurer la taille relative et la granulosite relatives des particules
 - La fluorescence: elle permet de mesurer une quantité relative de protéines, d'acide nucléique d'organite etc...
- 

Principe

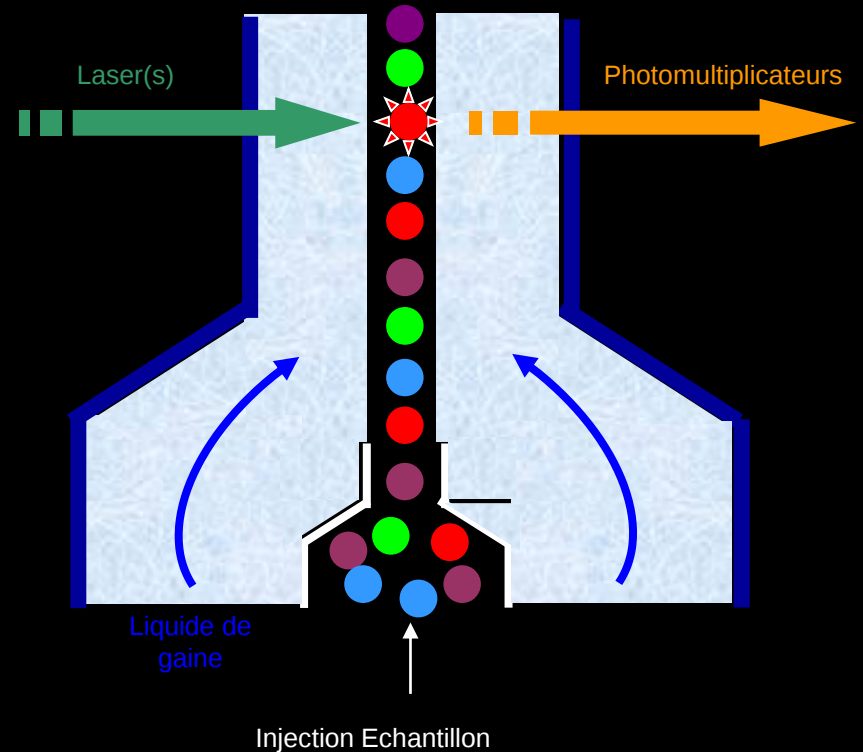
Cellules en suspension

Injection dans un flux laminaire continu

Pressions différentielles

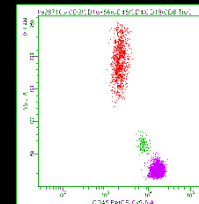
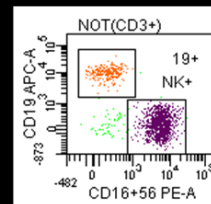
Passage devant un ou plusieurs lasers

Irradiation laser des cellules



Détection, capture et amplification du signal par photomultiplicateurs

Intégration informatique



Composition d'un cytomètre

Un cytomètre est une combinaison de 3 différents systèmes

1) *Système fluide* :

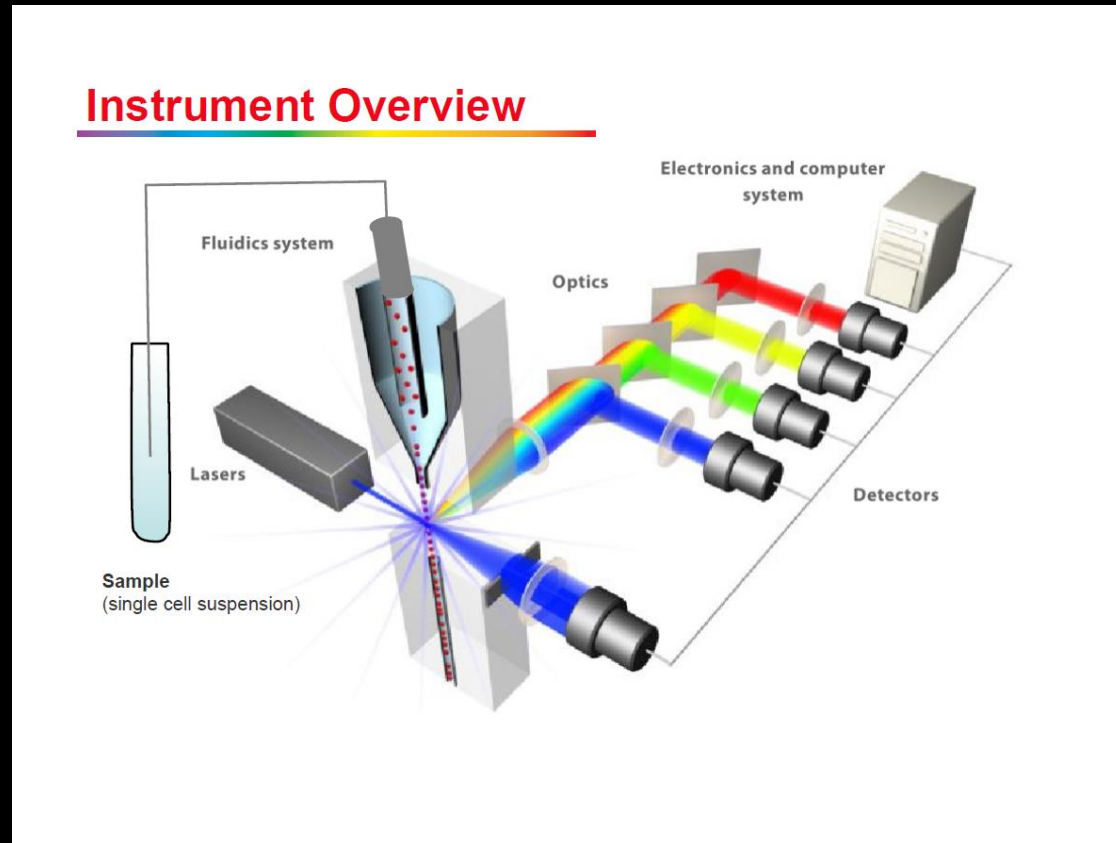
Flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser

2) *Système optique* :

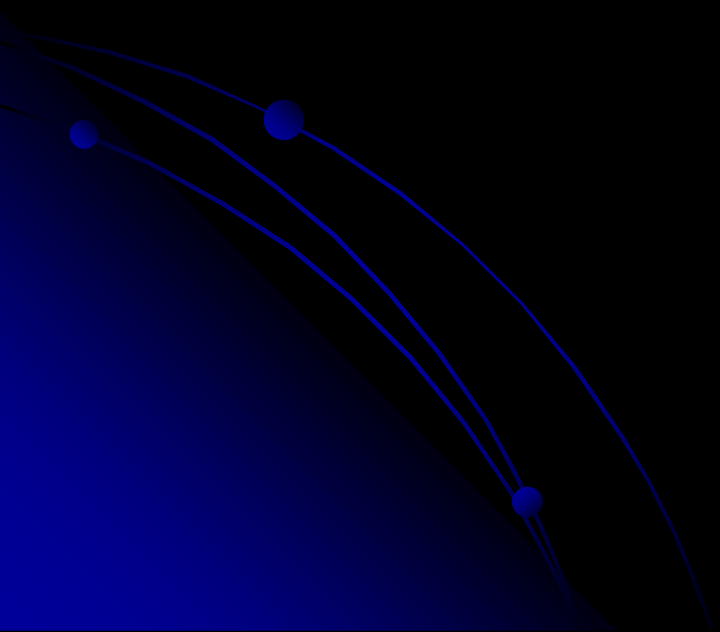
permet l'excitation des particules et la récolte des différentes fluorescences

3) *Système électronique* :

Permet la conversion et le traitement des signaux lumineux

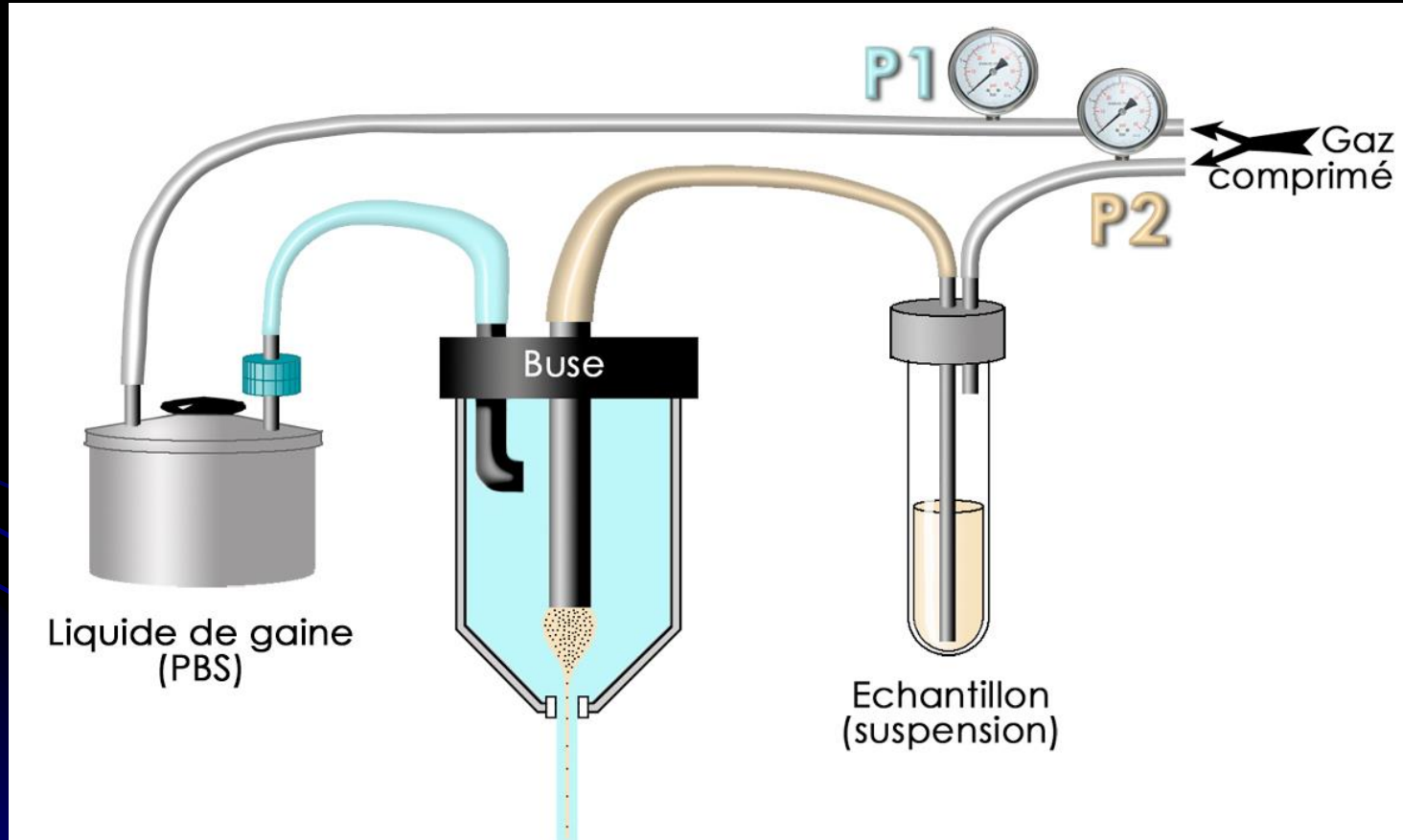


Fluidique



Fluidique

Focalisation hydrodynamique

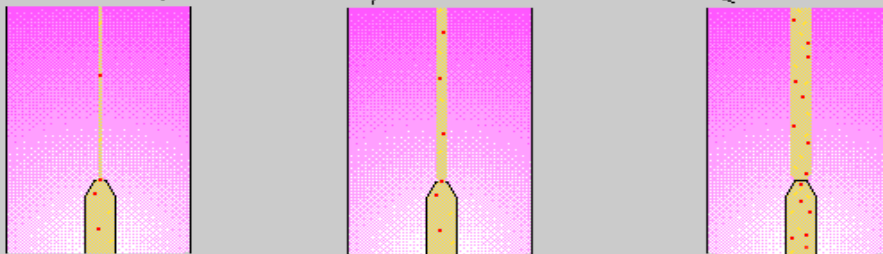


Le flux du liquide de gaine accélère les cellules et les oblige à s'aligner pour être analysées une a une

LA FLUIDIQUE-VITESSE D'INJECTION

FOCALISATION HYDRODYNAMIQUE et
VITESSE D'INJECTION ECHANTILLON

LIQUIDE DE GAINE



LOW

MEDIUM

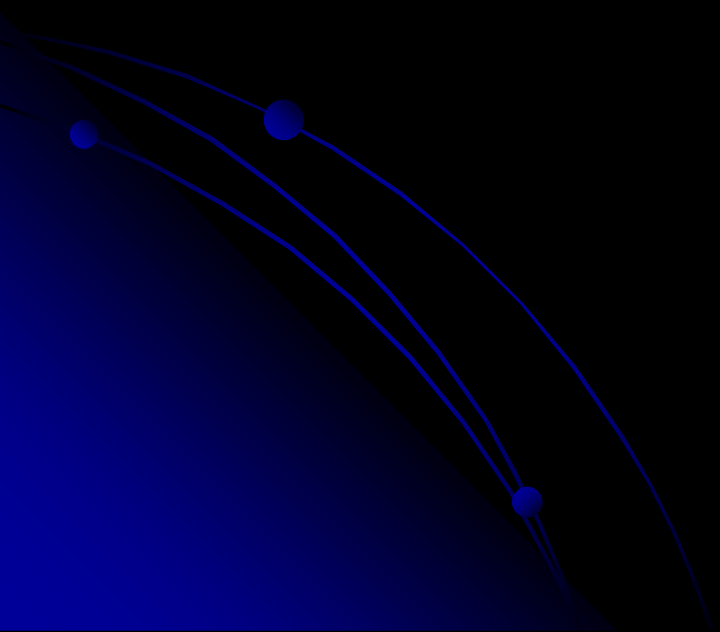
HIGH

La pression de liquide de gaine reste fixe.

Une augmentation de la pression d'échantillon entraîne une augmentation du débit.

Analyse jusqu'à 20 000 événements/s

L'optique



L'OPTIQUE

- **La source d'excitation consiste en:**

- Un laser
- Des lentilles pour mettre en forme et focaliser la source d'excitation.

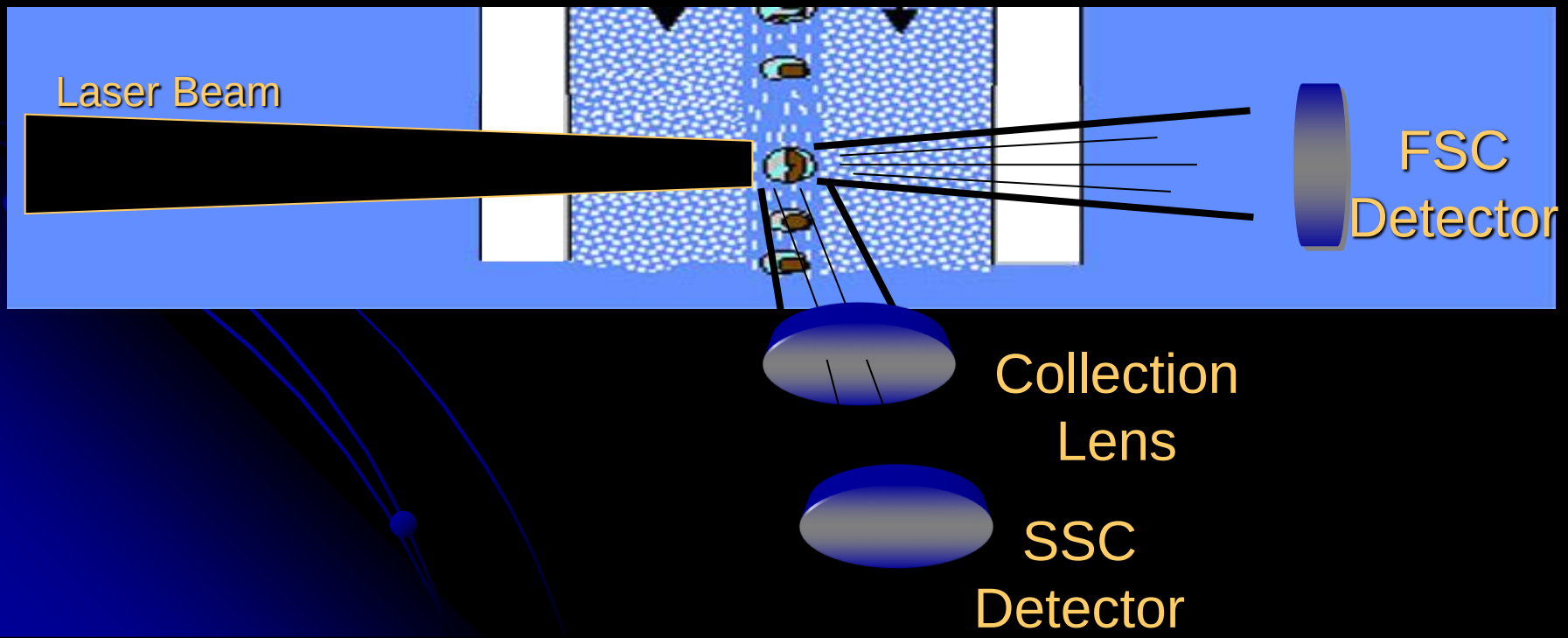
- **L'optique de collection des signaux consiste en:**

- Un système de miroirs et de filtres pour diriger et sélectionner certaines longueurs d'onde vers les détecteurs.

L'OPTIQUE

Diffraction de la lumière

- **FORWARD SCATTER (Diffusion aux petits angles)**
 - La lumière diffractée est collectée sous un petit angle (compris entre 1 et 10 degrés),
 - Le signal est relatif à la taille de la cellule.
- **SIDE SCATTER (Diffusion aux grands angles)**
 - La lumière diffractée est collectée à 90° de l'axe du laser,
 - Le signal est relatif à la granularité et la complexité cellulaire.



Détecteurs

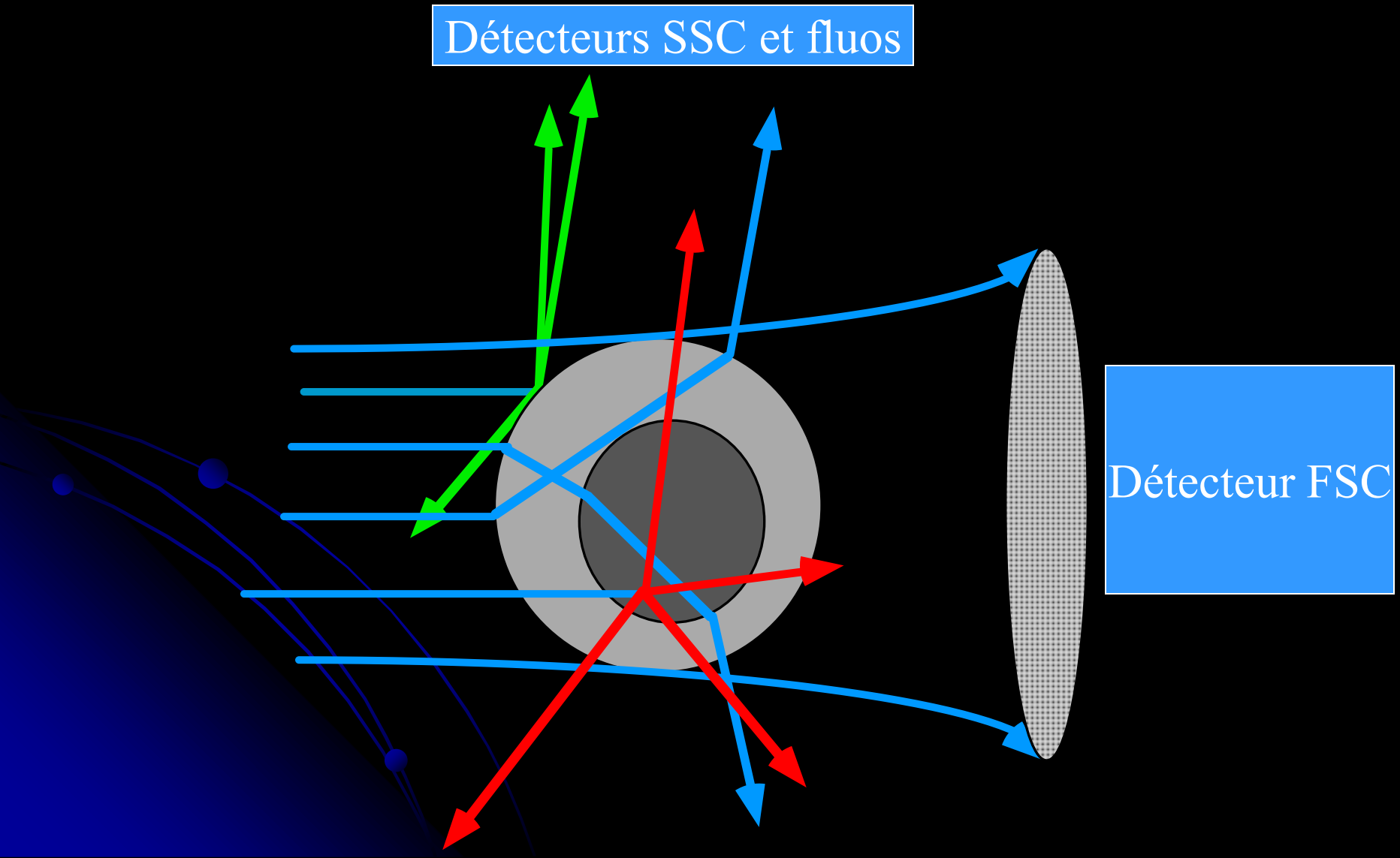
- Photodiodes

- Utilisé pour les signaux forts à risque de saturation (Ex FSC)

- Photomultiplicateurs (PMT)

- Plus sensibles utilisé pour détecter des signaux plus faibles émis par les fluorochromes

Les « Fluorescences » et « Scatters » sont SIMULTANEMENT émis dans toutes les directions. Par construction, le cytomètre « regarde » À zéro degré (FSC) et à 90 degrés (SSC et Fluorescences)



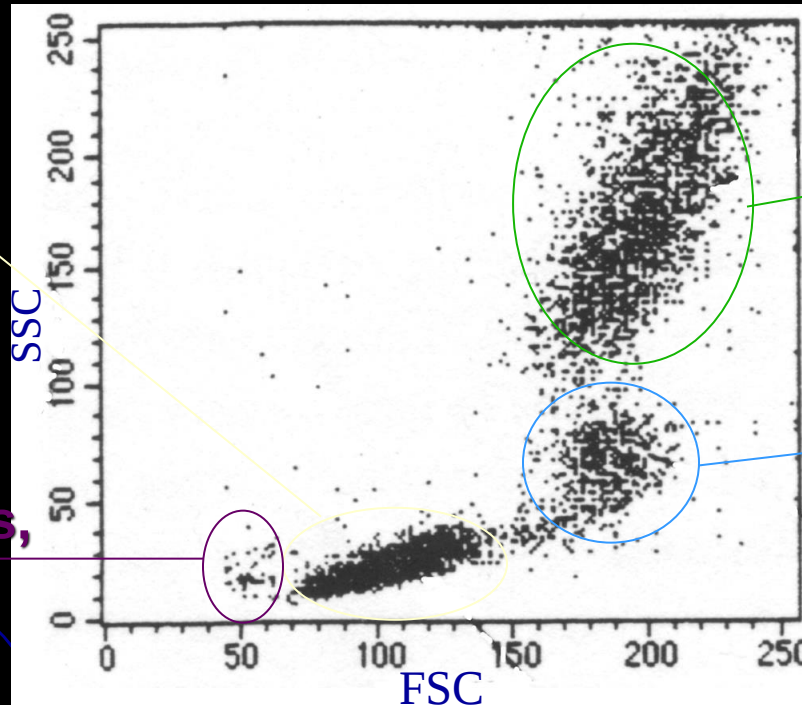
Pourquoi regarder le FSC / SSC?



Lymphocytes



RBCs, Debris,
Dead Cells



Granulocytes

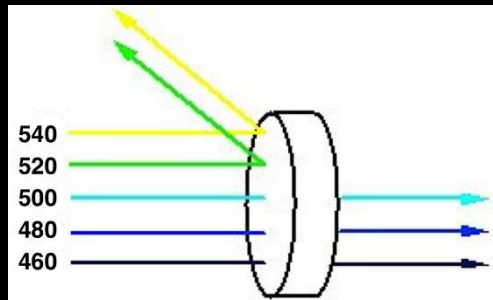


Monocytes

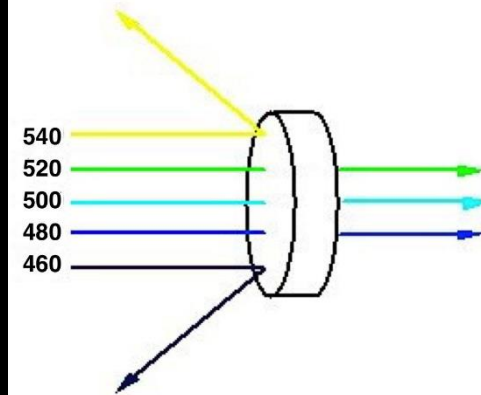


Différents types de filtres utilisés en CMF.

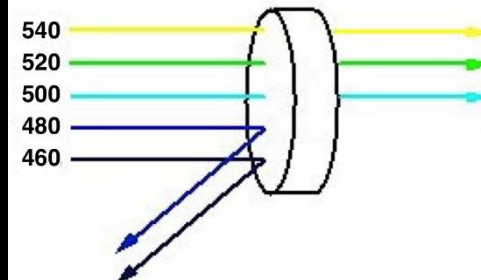
Filtre Passe Bas
500 nm



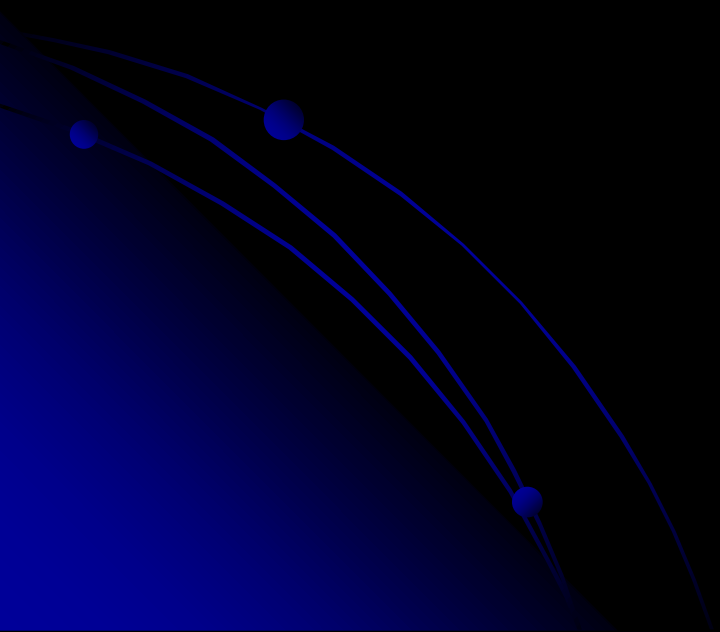
Filtre Bande Passe
500/40



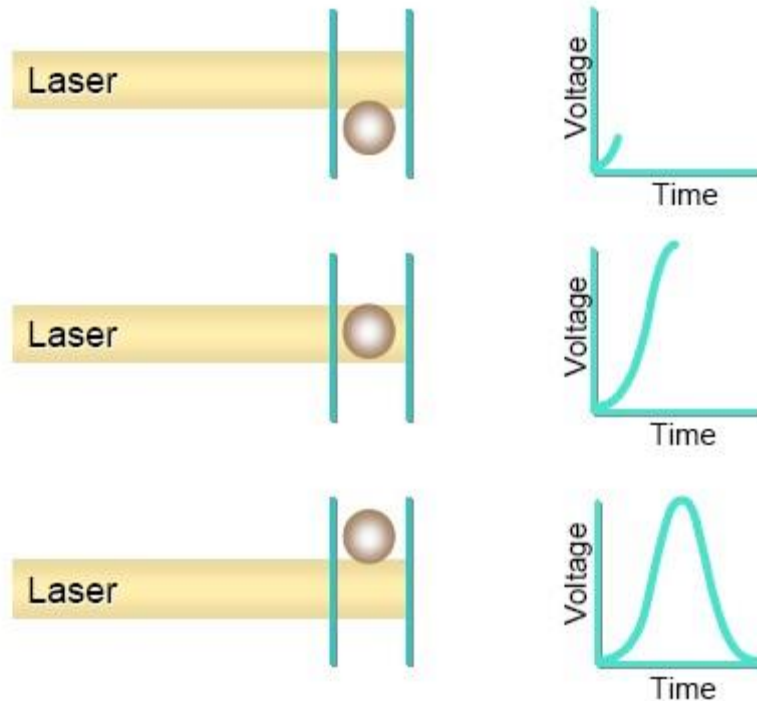
Filtre Passe Haut
500 nm



L'électronique



Pulse électronique — Signal analogique



Lorsqu'un élément traverse le laser, il génère aux bornes de chaque détecteur une impulsion électrique qui reflète la lumière émise au fur et à mesure de son illumination. Cette impulsion est au maximum quand l'élément est au centre du faisceau laser.

CELLULE :

Unités arbitraires

Nombre de cellules

1

2

3

4

5

etc

intensité relative

Réglage des détecteurs

- Le threshold (seuil)

Sélection d'un « trigger » déclencheur du signal numérique qui détermine que l'échantillon est considéré ou pas en général la taille: purement visuel

- Echelle linéaire ou logarithmique?

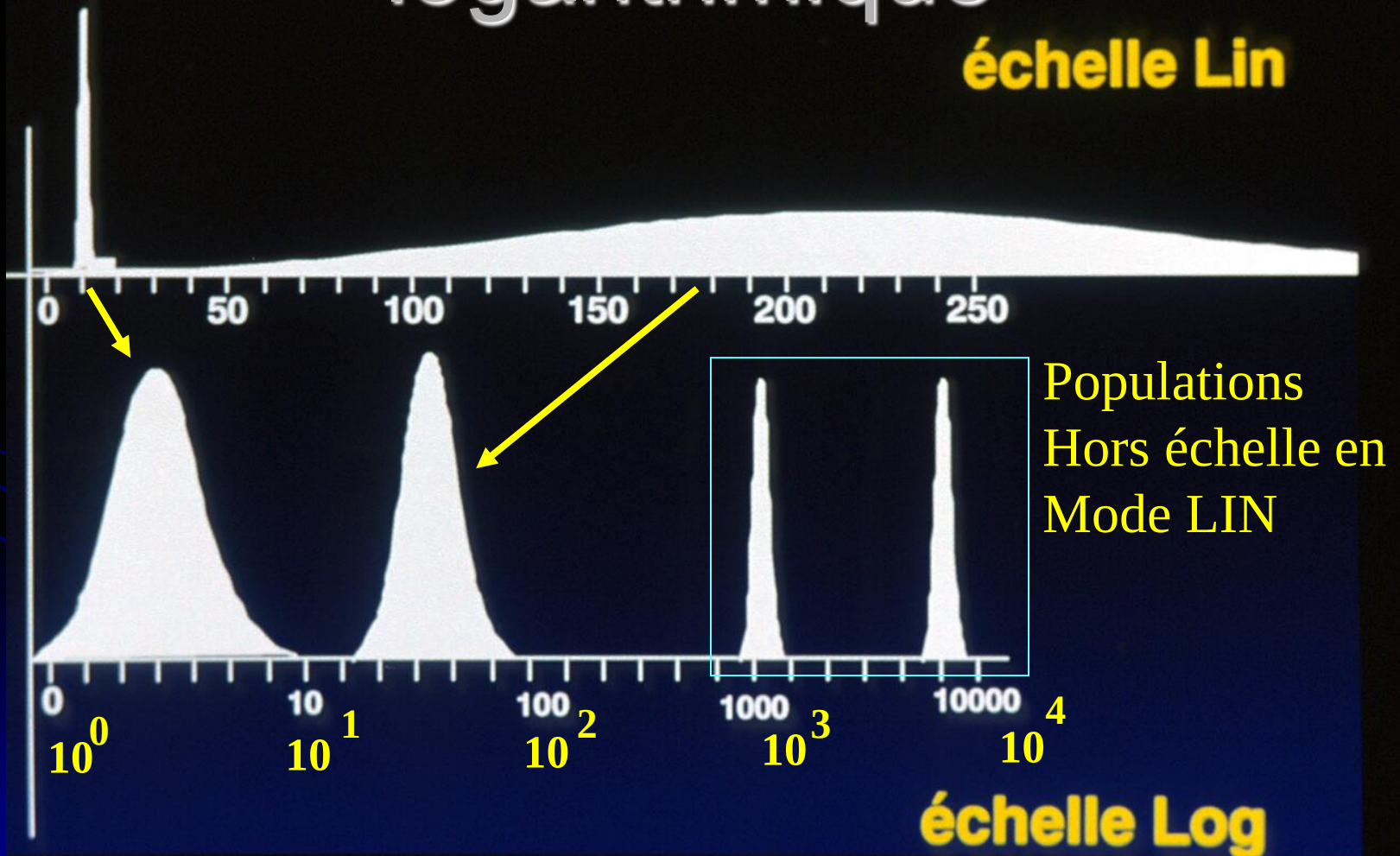
En fonction des amplitudes de fluorescence analysées

- Réglage des voltages

Avoir la plus grande sensibilité de détection et la meilleure discrimination entre positif et négatif

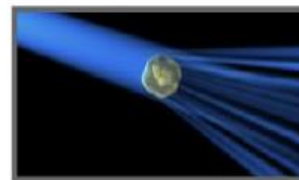
Echelle linéaire ou logarithmique

échelle Lin

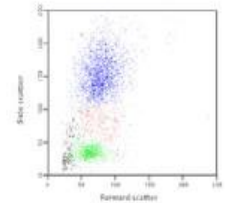
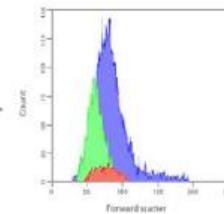


Paramètres mesurés

- the relative size (FSC)



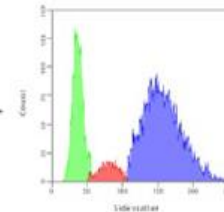
Forward scatter



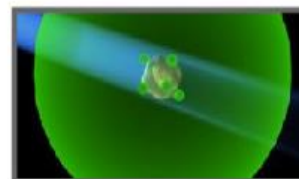
- the relative granularity or complexity (SSC)



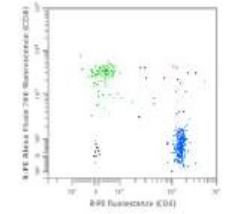
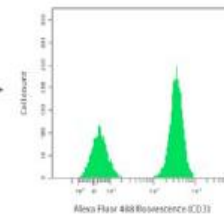
Side scatter



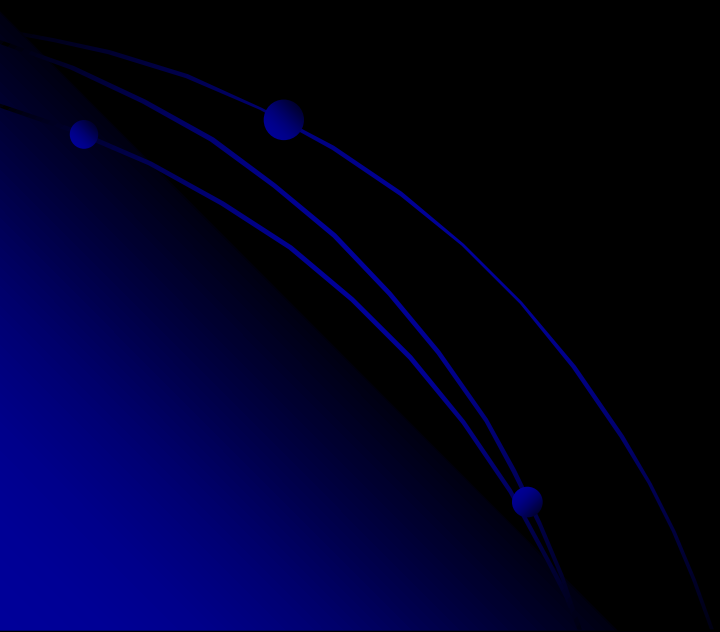
- the fluorescence intensity (FL1/2, up to FL X)

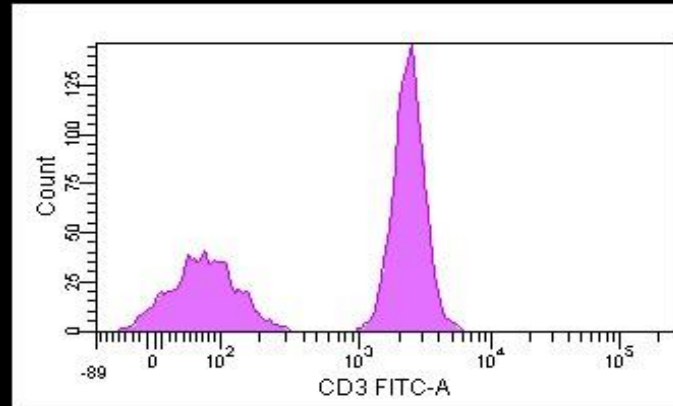


Fluorescence

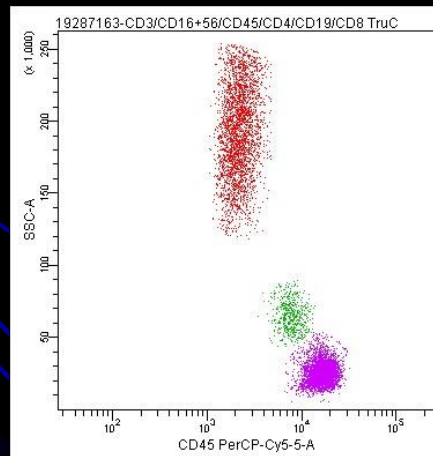


Présentation des données

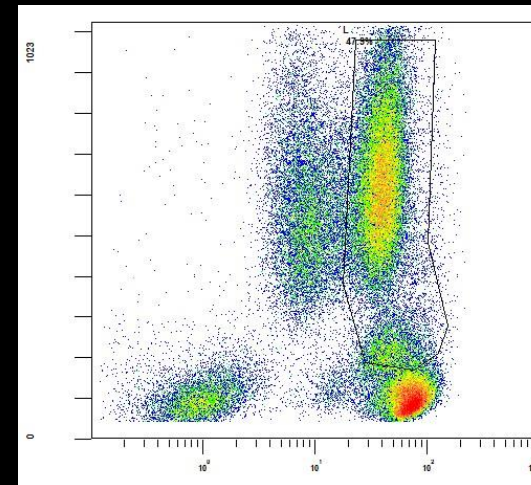




Histogramme monoparamétrique



Dot plot

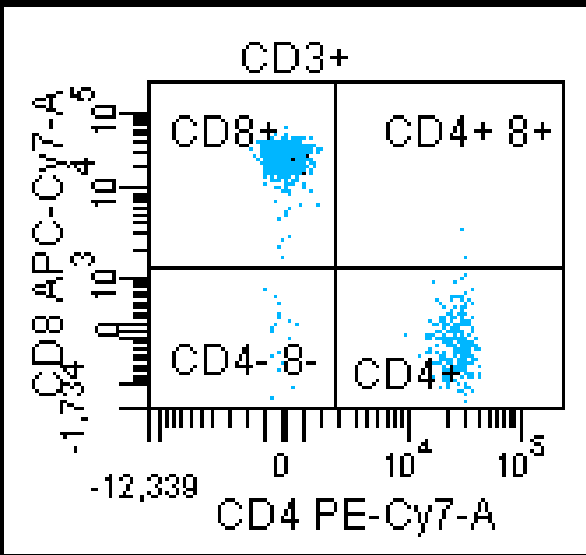
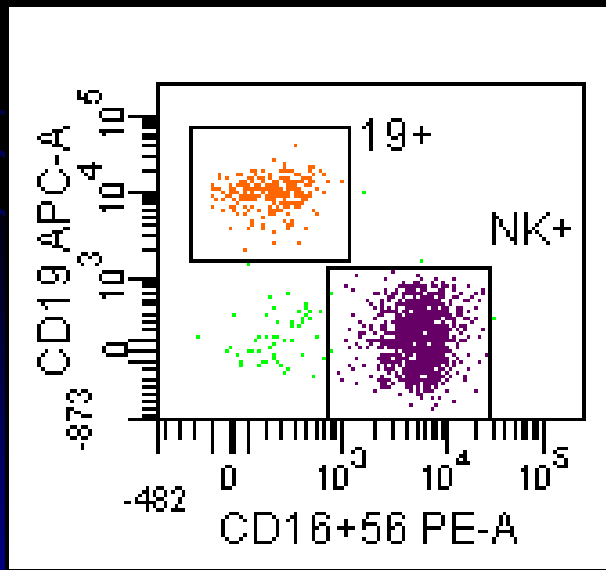
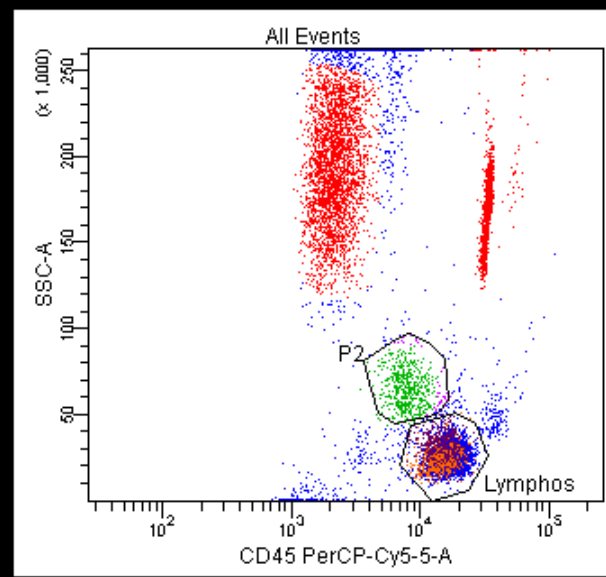
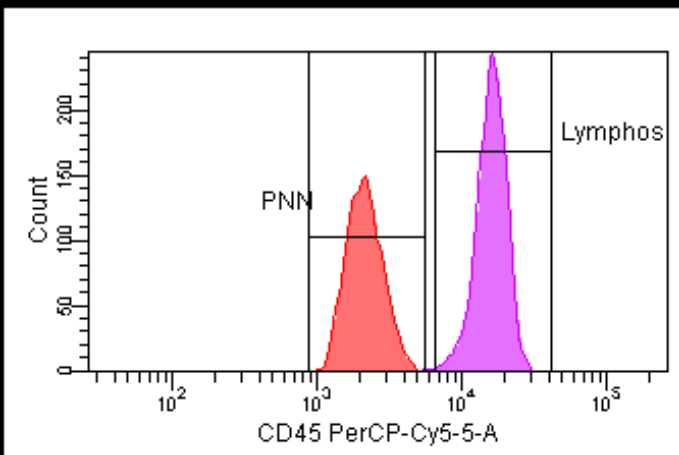


Density plot

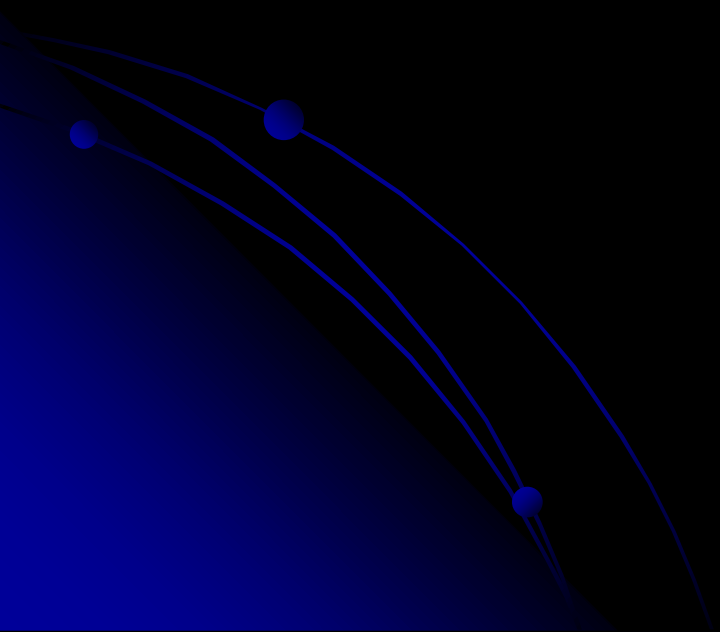
Histogrammes biparamétriques

Présentation des données

Régions d'intérêt – Analyse conditionnée

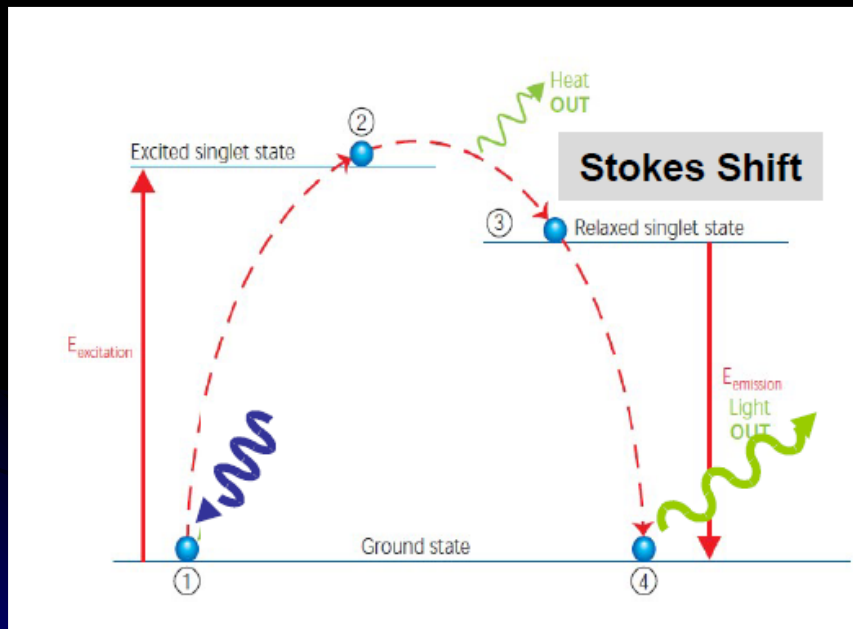


La fluorescence



Le phénomène de fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée.



- 1 Absorption d'énergie lumineuse par une molécule à l'état $S(0)$
- 2 Passage à l'état de molécule excitée $S'(1)$
- 3 Relaxation partielle avec perte de chaleur $S(1)$
- 4 Retour à l'état fondamental $S(0)$ avec émission lumineuse

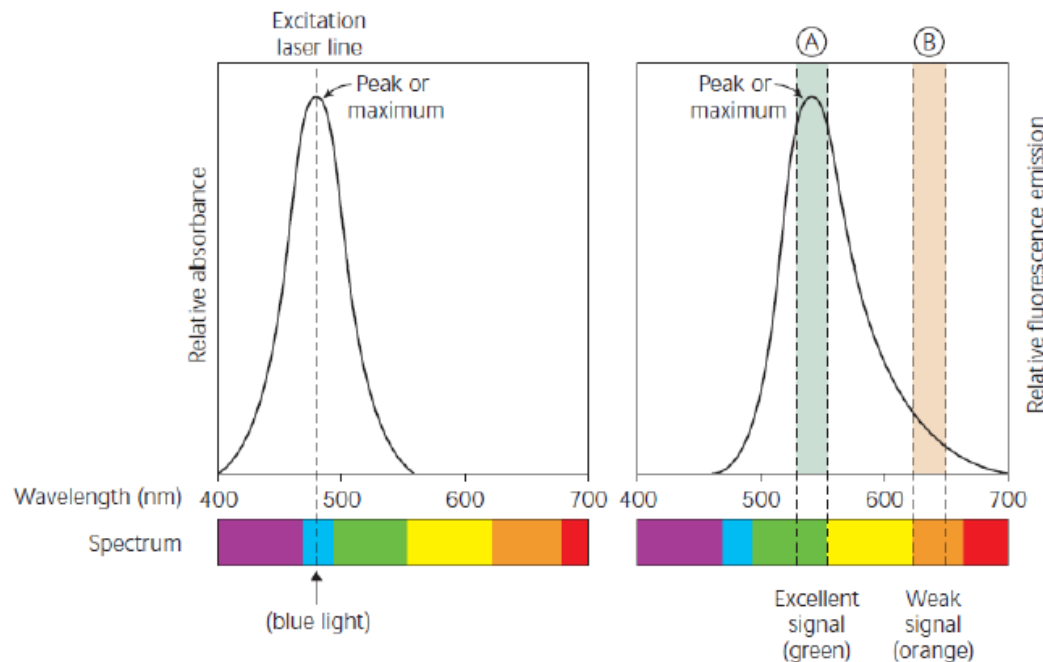
Diagramme de Jablonski

La durée de vie moyenne de l'état excité est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} s

Caractéristiques de la fluorescence

Longueur d'onde d'émission (maximum du spectre): λ_{em}

Longueur d'onde d'excitation (maximum du spectre): λ_{ex}



BD Life Sciences Relative Fluorochrome Brightness

bdbiosciences.com/colors

This table provides general guidance with respect to the relative capability of different fluorochromes to resolve dimly stained populations; it is not a representation of absolute fluorescence. Rankings were determined by comparing the stain index (resolution) of cells stained with multiple formats on several clones run on a variety of flow cytometers. Many factors can influence the relative fluorochrome/reagent performance on a given instrument, including laser power, PMT voltage, optical filters, antibody clone and biological sample.

Laser	Fluorochrome			
	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
	Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon™ BUV563 BD Horizon™ BUV661 BD Horizon™ BUV737	BD Horizon™ BUV395 BD Horizon™ BUV496 BD Horizon™ BUV805
	Violet (405 nm)	BD Horizon™ BV421 BD Horizon™ BV650 BD Horizon™ BV711	BD Horizon™ BV480 BD Horizon™ BV605 BD Horizon™ BV786	BD Horizon™ BV510 BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
	Blue (488 nm)	BD Horizon™ BB515 BD Horizon™ BB700 BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy™5	PE PE-Cy™7	FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy™5.5 PerCP
	Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7		
	Red (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647 BD Horizon™ APC-R700	Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Alexa Fluor® is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

Cy™ is a trademark of GE Healthcare. Cy™ dyes are subject to proprietary rights of GE Healthcare and Carnegie Mellon University, and are made and sold under license from GE Healthcare only for research and in vitro diagnostic use. Any other use requires a commercial sublicense from GE Healthcare, 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08855-1327, USA.

Trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

23-16181-07



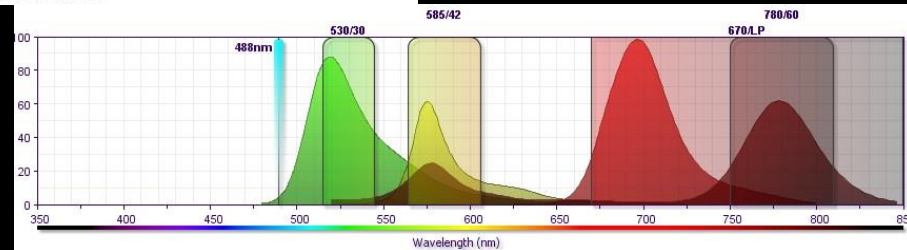
Spectral Compensation for Flow Cytometry: Visualization Artifacts, Limitations, and Caveats

Mario Roederer*

Vaccine Research Center, NIH, Bethesda, Maryland

Received 11 April 2001; Revision Received 6 August 2001; Accepted 10 August 2001

Dans une analyse multi couleurs



Compensation presque toujours nécessaire

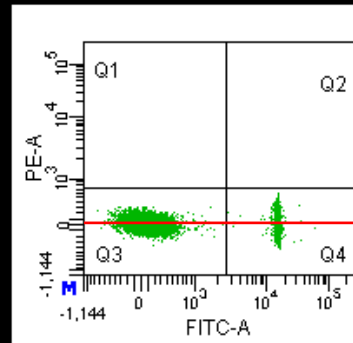
Résulte de l'utilisation de sondes fluorescentes détectables par plusieurs détecteurs

Procédé mathématique de correction

Détermination du signal vrai d'une sonde individuelle

Compensations

- ❖ Méthode visuelle : peut être fausse mathématiquement
- ❖ Méthode des médianes



- ❖ Compensations automatiques

Réglages des compensations

- Utiliser des mono-marquages
- Ne pas compenser à l'œil
- Utiliser la méthode des médianes
- Utiliser les aides logicielles à la compensation

Réglages des compensations

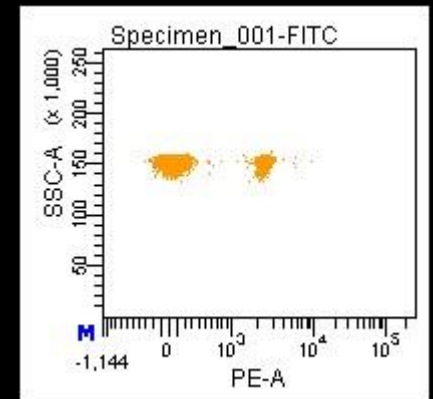
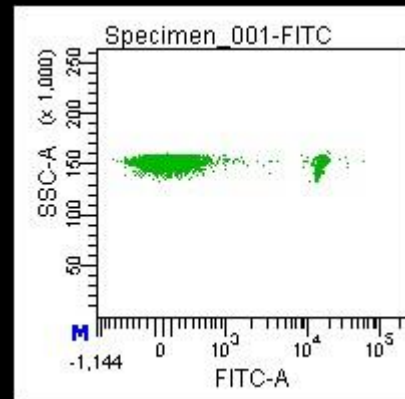
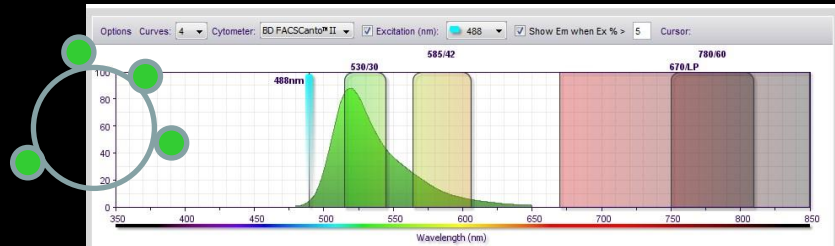
- Mono-marquages:

- Population positive fortement marquée
- Population positive bien représentée (50%)
- Population négative bien représentée (50%)
- Ac peut-être substitué par un autre si même fournisseur
- Population peut être substitué par des billes

- Méthode des médianes

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

Monomarquage FITC



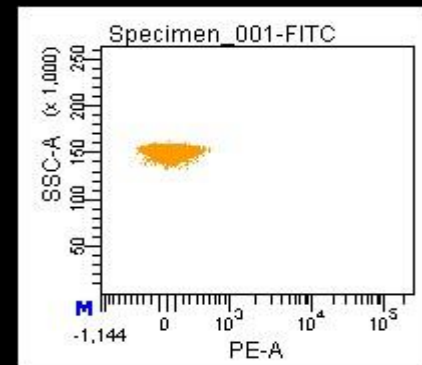
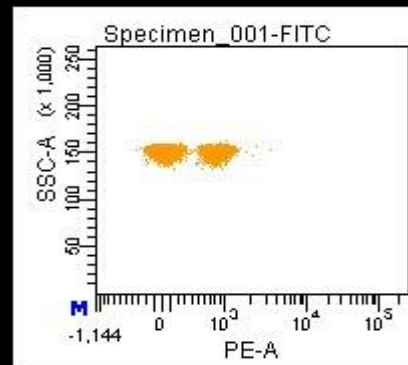
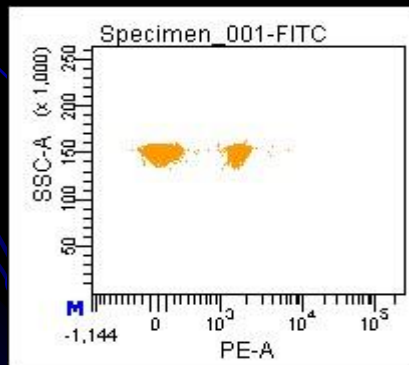
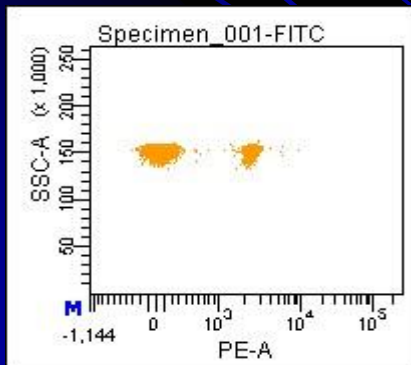
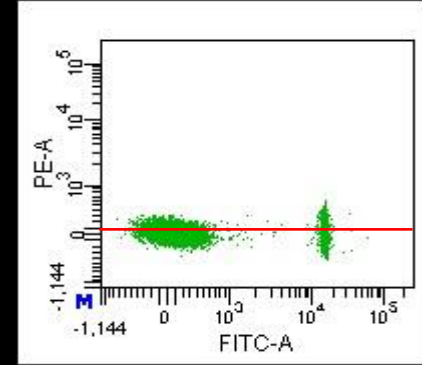
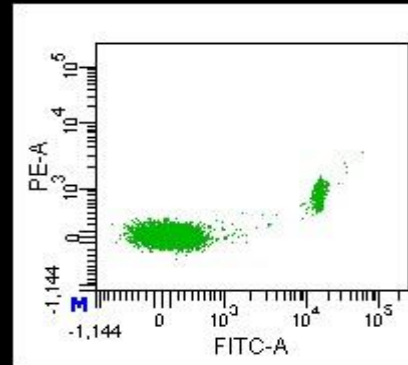
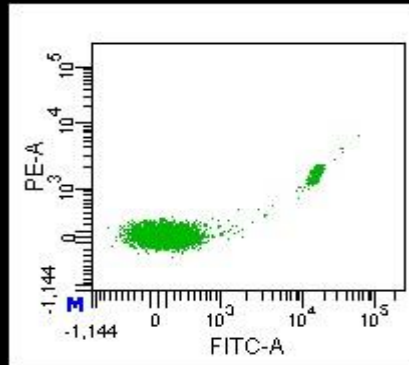
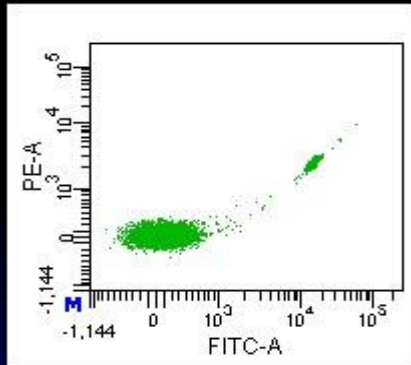
Fluo PE - % Fluo FITC

0

5 %

10 %

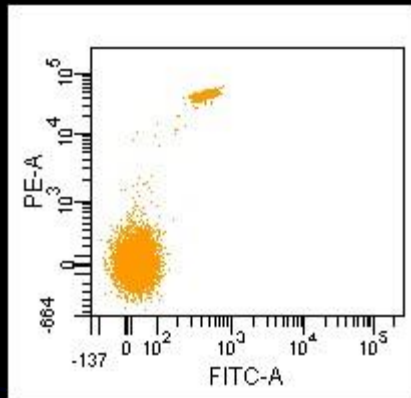
15 %



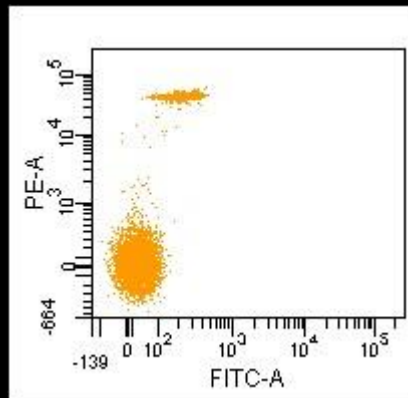
Monomarquage PE

Fluo FITC - % Fluo PE

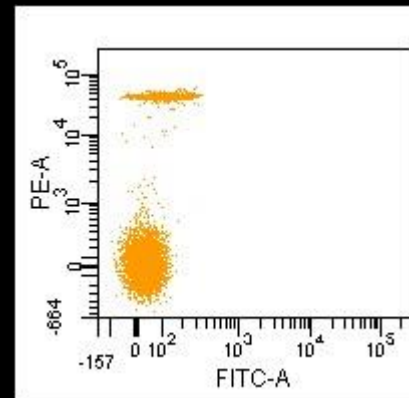
0



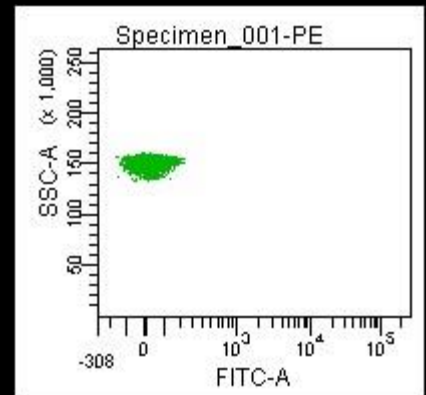
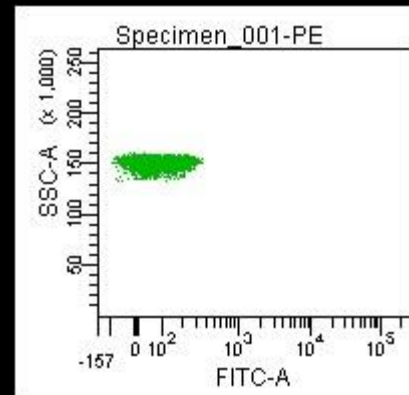
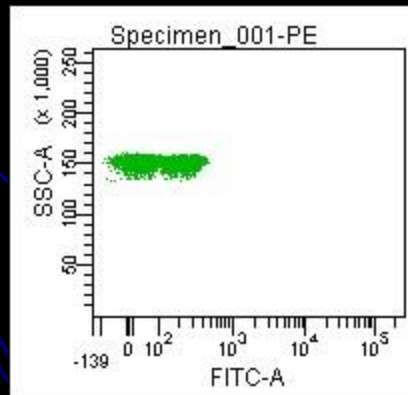
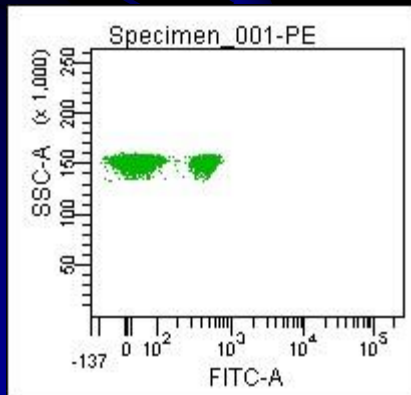
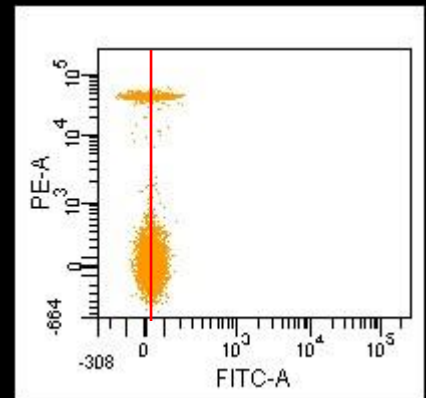
0.5 %



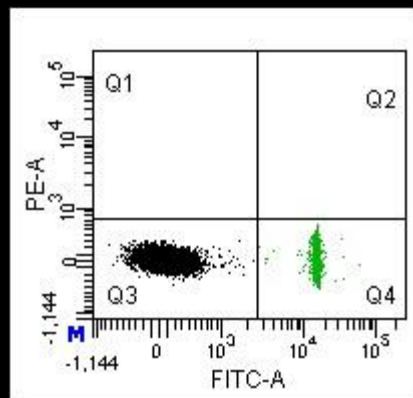
0.75 %



1 %



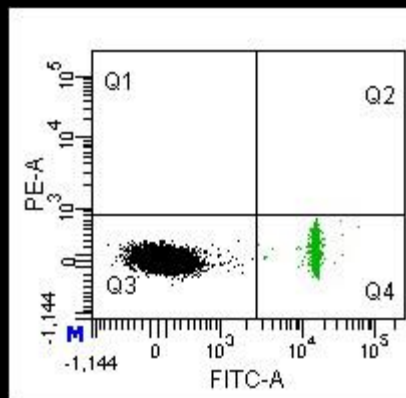
Compensation correcte



15,6%

Population	PE-A Mean
Q3	11
Q4	14

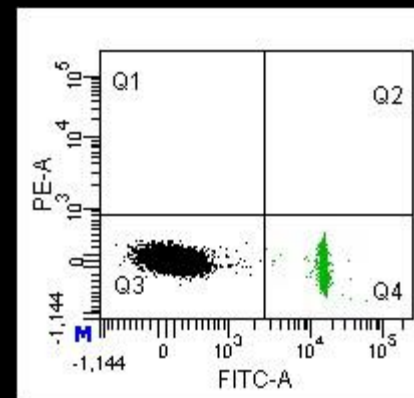
Sous-Compensé



14,6%

Population	PE-A Mean
Q3	11
Q4	167

Sur-Compensé



16,6%

Population	PE-A Mean
Q3	10
Q4	-138

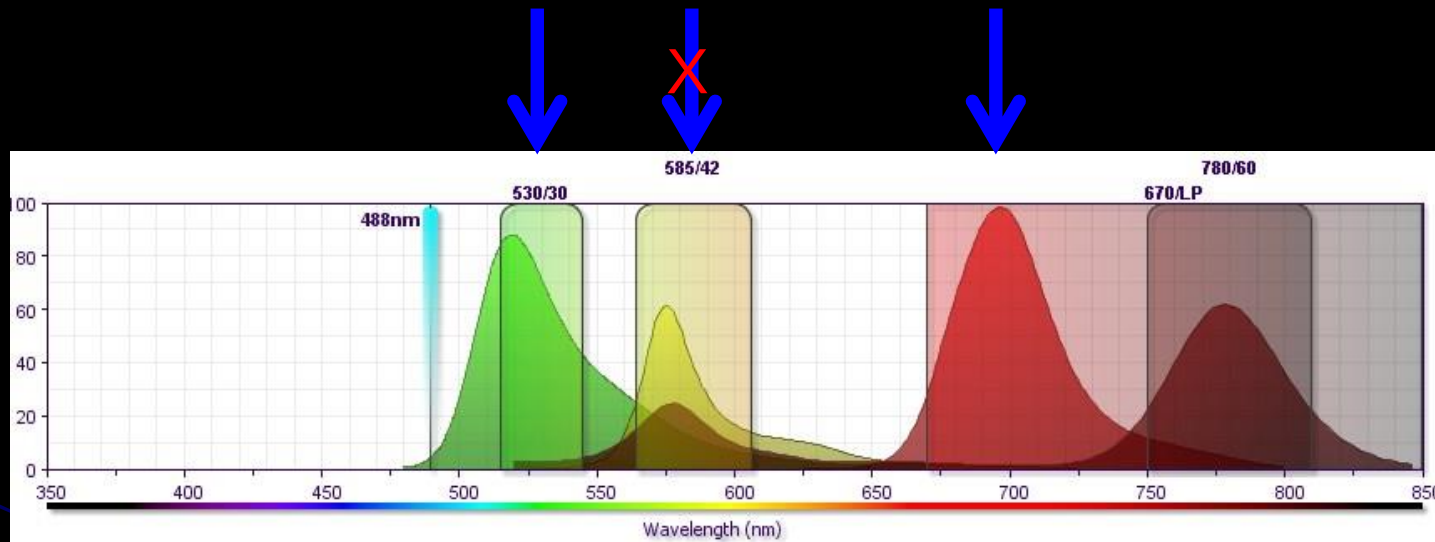
Réglages des compensations

Fluorochrome avec lequel il y a interférence	Fluorochrome à l'origine de l'interférence	% compensation
FITC	PE	<5
PE	FITC	10-20
PE	PE-Texas red	20-40
PE-Texas red	PE	20-50
PE-Texas red	PE-Cy5	<20
PE-Cy5	FITC	<5
PE-Cy5	PE	<20
PE-Cy5	PE-Texas red	<20

Nombre de compensation théorique = $n^2 - n$ (pour 8 couleurs $n=56$)

Limiter les compensations

Eviter les chevauchements de spectres



Répartir les fluorochromes sur les différents lasers

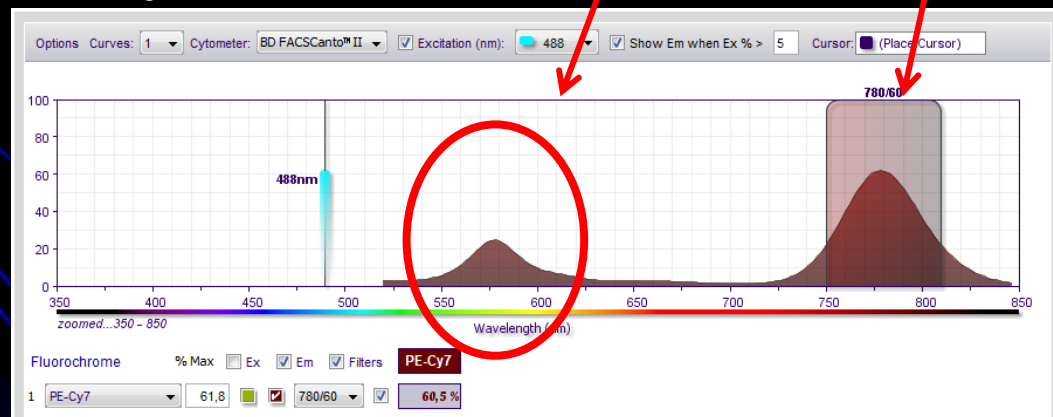
Fluorochromes couramment utilisés

- Molécules chimiques: FITC, Cy5, Cy7, Alexa Fluor
 - Petite taille (FITC = 0,3kDa)
 - Couplage facile
 - Faible brillance
- Protéines: PE, APC, PerCP
 - Grosses molécules (PE=225 Kda, APC) 120 Kda)
 - Couplage difficile, bonne stabilité
 - Brillance moyenne à forte
- Tandems: PerCP-Cy5, PE-Cy7, APC-Cy7
- Polymères: BV421, BV510, BV605, BB515, BB700, BUV395
 - Taille intermédiaire
 - Excellente stabilité
 - Brillance forte à très forte

Tandems



PE-Cy7



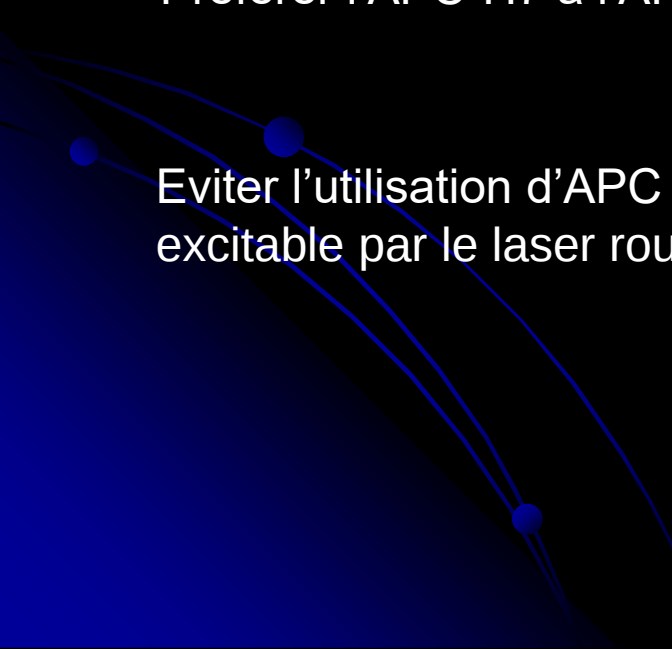
Tandems : précautions

Utiliser des solutions de fixation sans PFA : les aldéhydes altèrent les tandems

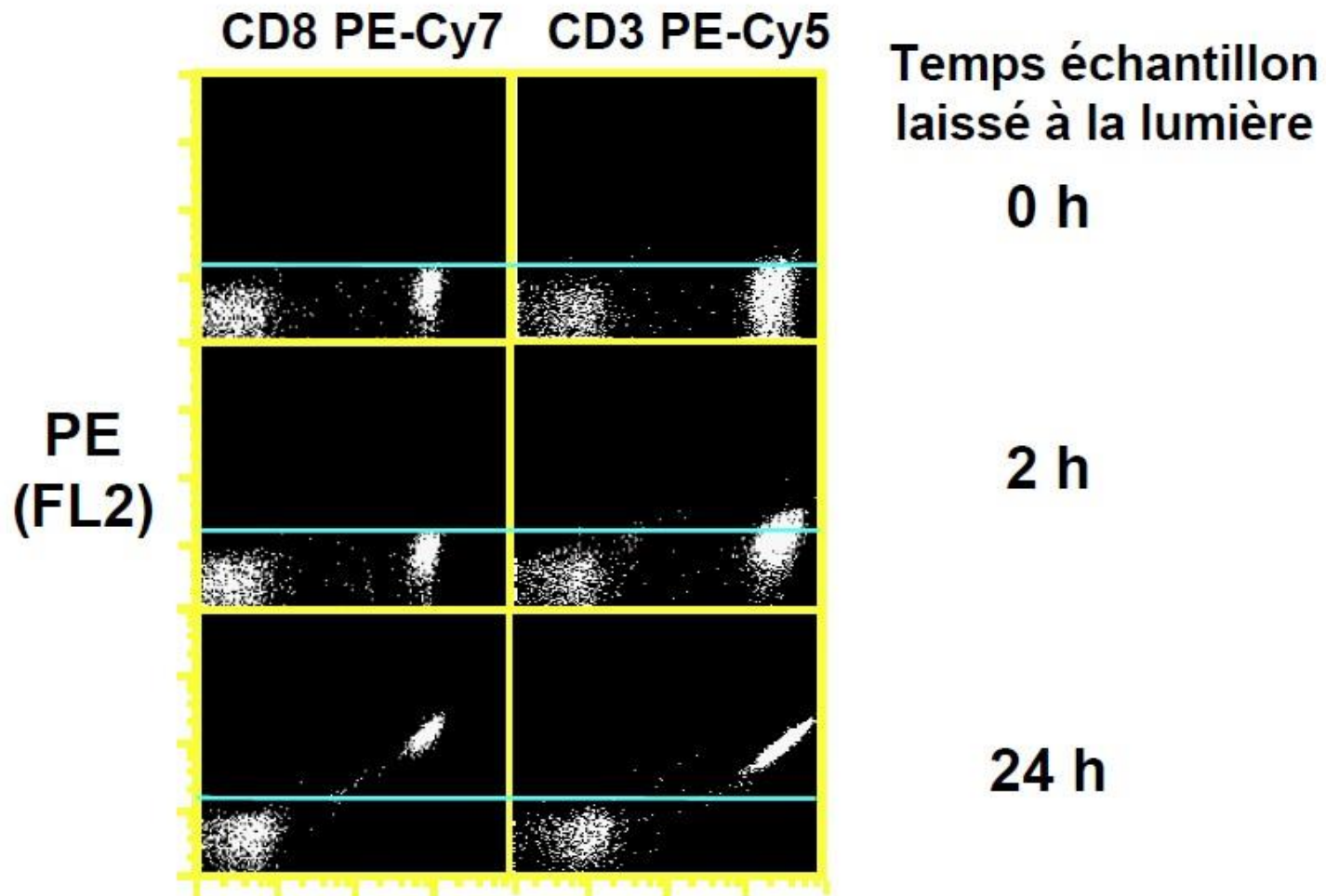
Sensibilité à la lumière, à la chaleur et à l'oxydation

Préférer l'APC-H7 à l'APC-Cy7 car plus robuste

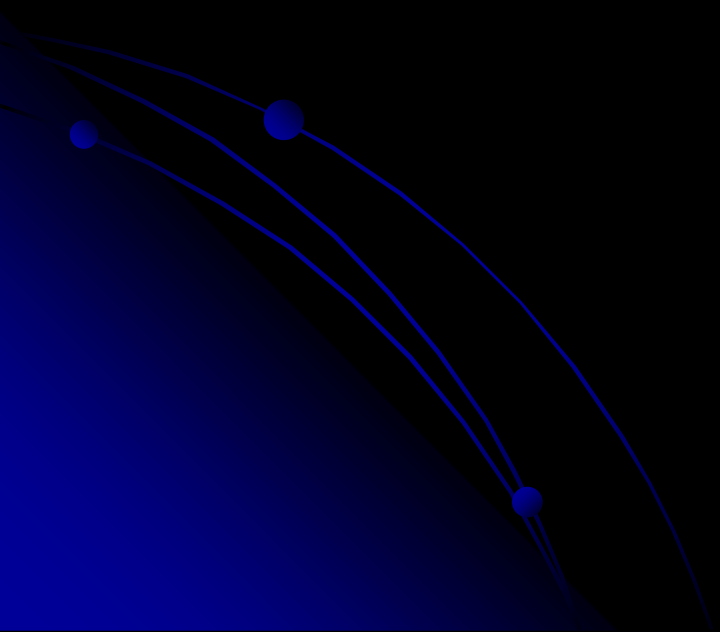
Eviter l'utilisation d'APC et de PE-Cy5 dans le même tube car la Cy5 est excitable par le laser rouge



Exemple: effet de la lumière



L'expérimentation



Les risques

- Risque laser

- Sur les appareils risque nul sauf en cas de maintenance

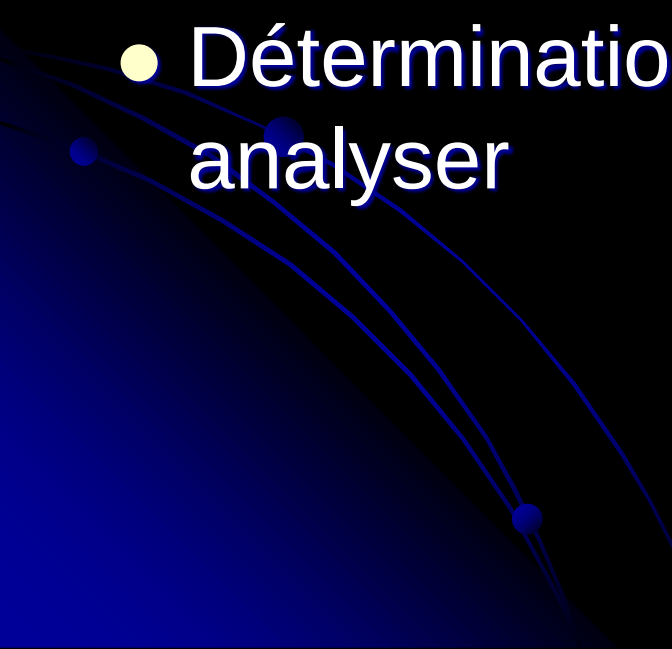
- Risque biologique

- Fixer les échantillons à risque

- Risque chimique

- Traitement séparé des déchets: essentiellement les intercalent!!!!

Réglage de base du Cytomètre

- **Préparation de l'échantillon**
 - Réalisation des témoins
 - Détermination du nombre de cellules à analyser
- 

Préparation des échantillons

- Fixation

- **Éthanol 70%**

Précipitation des protéine, dissout les lipides complexes, forte rétraction cellulaire, perméabilisation de la mb plasmique

Fixateur rapide-conservation : +4°C crts période, -20°C +lgtps

- **Formaldéhyde/paraformaldéhyde**

Réducteurs, fixation des lipides, maintien de l'intégrité cellulaire

Fixateur lents

Pour marquage intracellulaire perméabilisation nécessaire (triton X100 0.1%)

Longue conservation

Faible autofluorescence induite

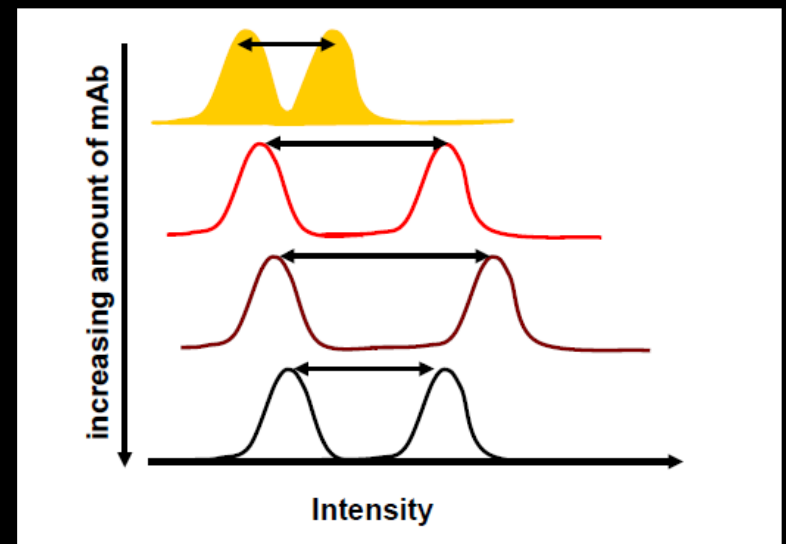
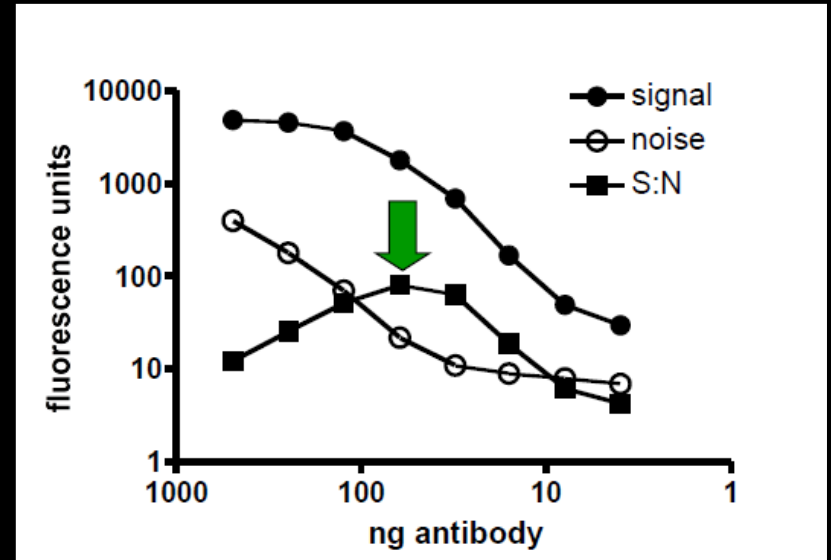
- **Glutaraldéhyde**

Fixation similaire à formaldéhyde

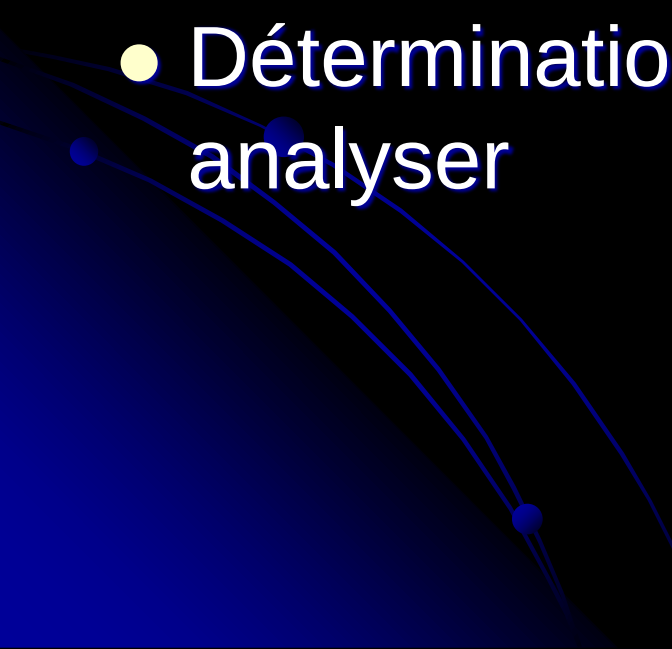
Forte autofluorescence induite

Préparation des échantillons

- Titration de l'Ac
 - Marquage avec dilution en série
 - bruit sans diminuer signal
- Titrage [Ac]/[Cellules]
 - Idéal [Ac] en excès



Réglage de base du Cytomètre

- Préparation de l'échantillon
 - Réalisation des témoins
 - Détermination du nombre de cellules à analyser
- 

Réalisation des témoins

- Absorption non-spécifique

- Faible en extracellulaire

- Forte en intra-cellulaire

} ajout de protéines dans la solution de marquage (BSA)

- Fixation sur les récepteurs FC

- Préincubation avec AC bloquant les récepteurs FC

- Fixation non-spé de faible affinité sur Ag de surface

- Modifier la stringence des solutions saline

Réalisation des témoins

- Contrôle négatif:
 - Anticorps isotypique ou pas d'anticorps?
 - Control FMO (fluorescence minus-one)
- Contrôle positif
 - Recherche d'une population rare
 - Compensation

Réalisation des témoins

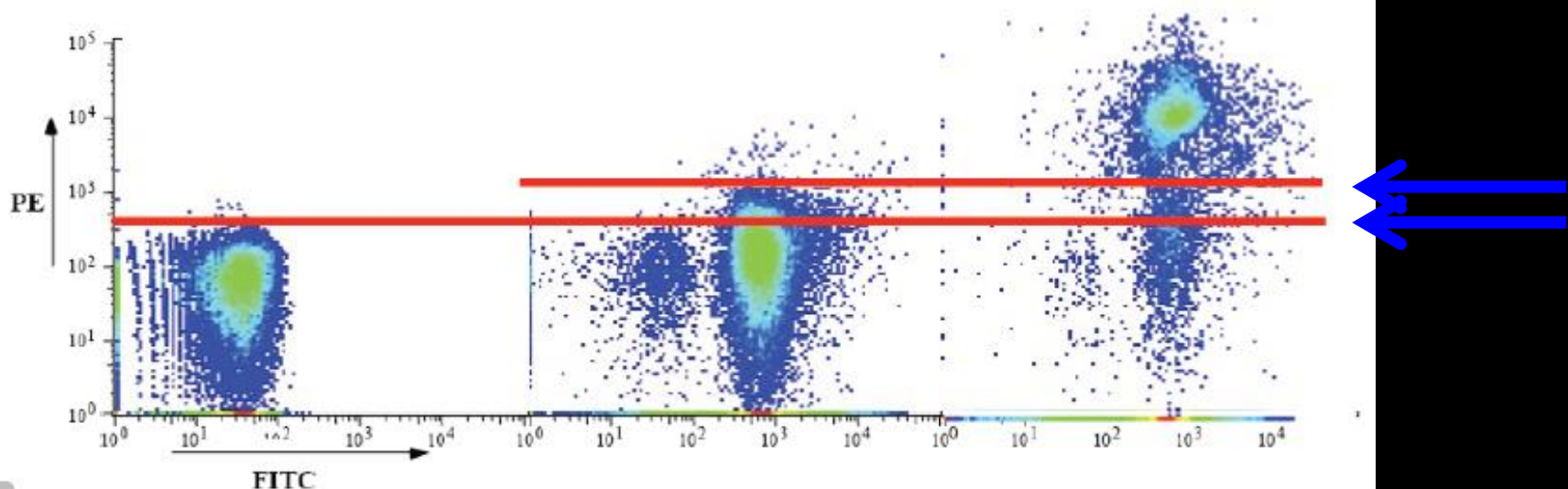
(Fluorescence Minus One)

Les contrôles FMO

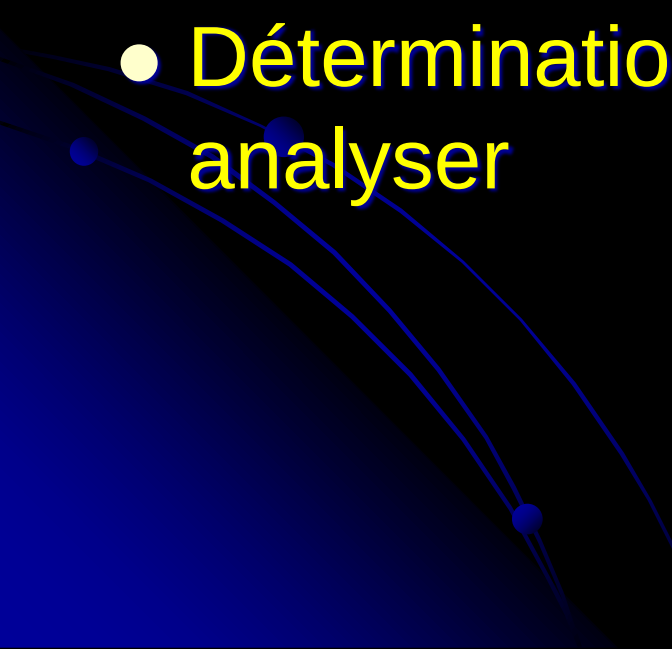
Des leucocytes ont été marqués en trois couleurs

Les compensations ont été correctement réglées au préalable

	Cellules non marquées	Contrôle FMO	Marquage
FITC	-	CD3	CD3
PE	-	Isotype	CD4
PE-Cy5	-	CD8	CD8



Réglage de base du Cytomètre

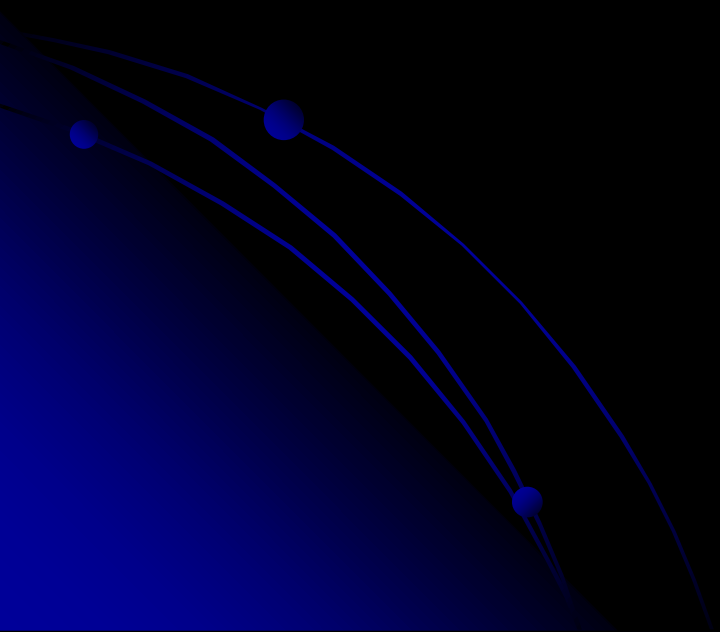
- Préparation de l'échantillon
 - Réalisation des témoins
 - Détermination du nombre de cellules à analyser
- 

Détermination du nombre de cellules à analyser

- Plus le nombre de cellules est grand plus l'incertitude à la mesure sera faible

Pour un CV de %	1	2.5	5	10	20
Nb de Cellules positives requises	10000	1600	400	100	25
A une fréquence de %	Nombre d'événement à analyser				
10	100000	16000	4000	1000	250
1	1000000	160000	40000	10000	2500
0.1	10000000	1600000	400000	100000	25000
0.01	100000000	16000000	4000000	1000000	250000
0.001	1000000000	160000000	40000000	10000000	2500000

Quelques exemples



APPLICATIONS



Comptage cellulaire



Immunophénotypages membranaires et/ou intracellulaires



Analyse du cycle cellulaire / Prolifération / Apoptose



Etude et dosage de la production de cytokines (cellulaire ou soluble)

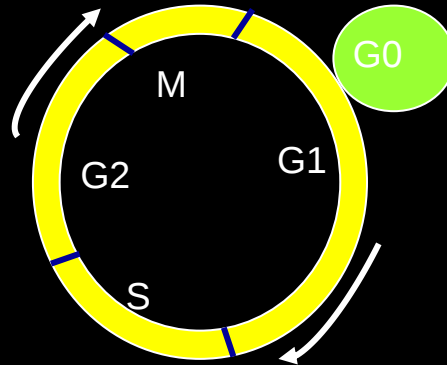


Analyse des Microparticules

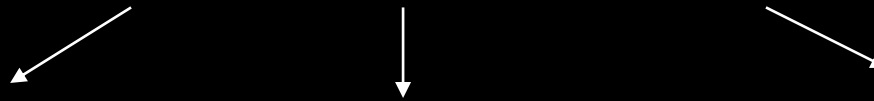


Tri en flux

Analyse du cycle cellulaire



Perturbation du cycle cellulaire



Arrêt du cycle en sénescence



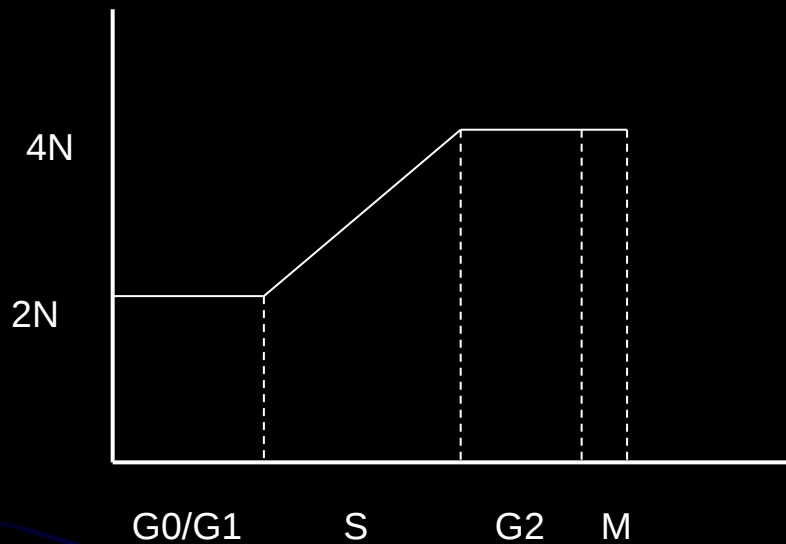
Mort cellulaire



Prolifération incontrôlée



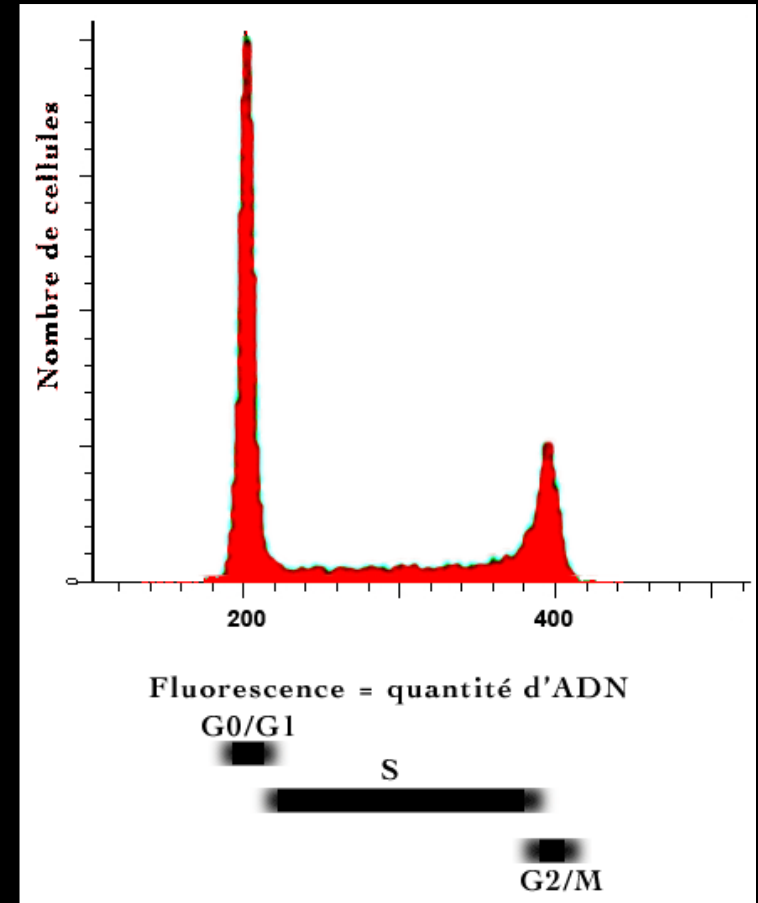
Analyse du cycle cellulaire



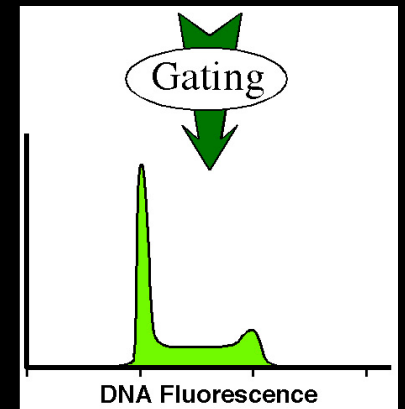
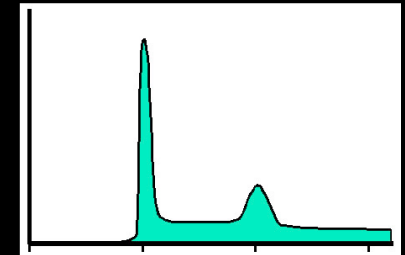
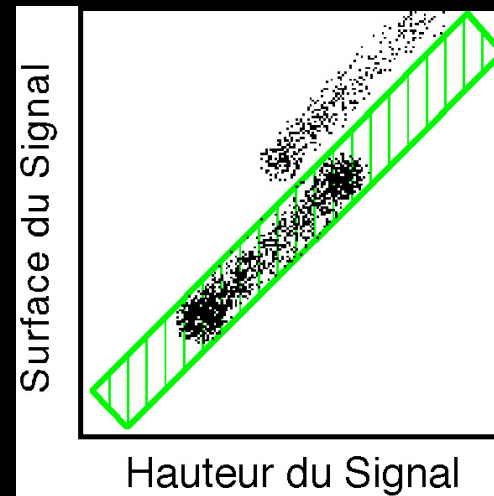
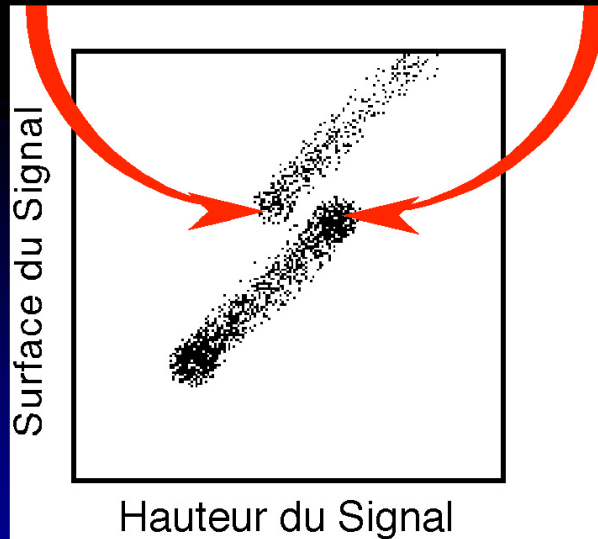
Élimination des doublets

La concentration

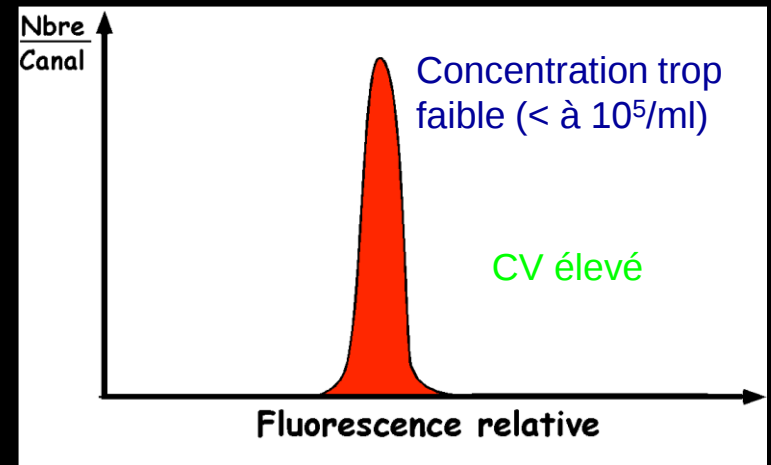
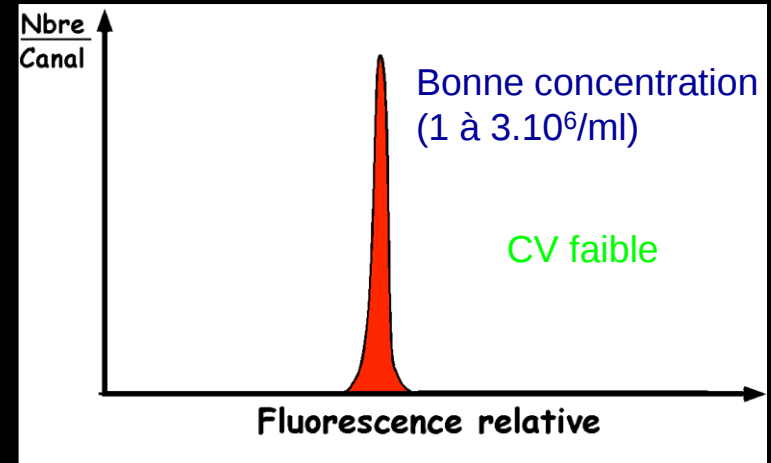
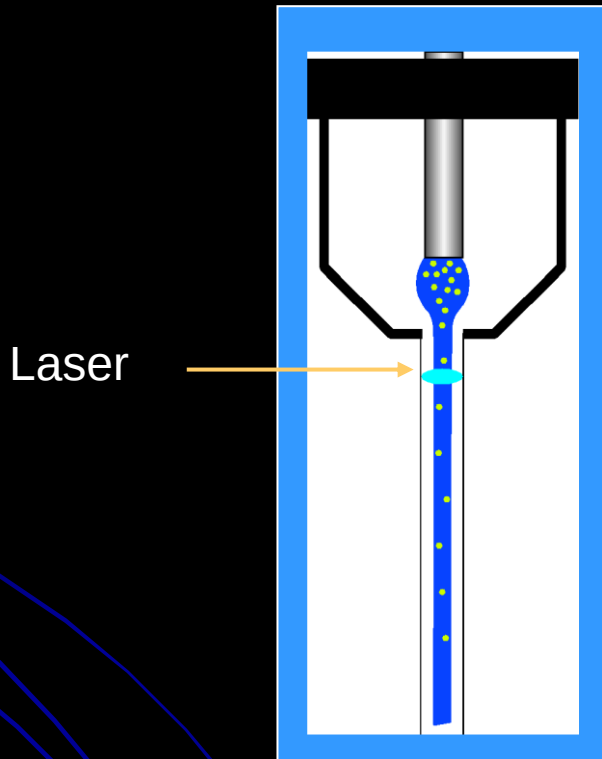
Préparation des échantillons



Élimination des doublets



Influence de la concentration



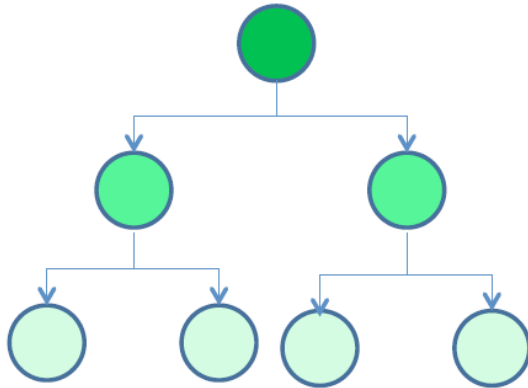
$$\text{Coeff Variation} = \frac{\text{Ecart -Type}}{\text{Moyenne}}$$

Ecart type = 0,425 x largeur à mi hauteur

Prolifération cellulaire

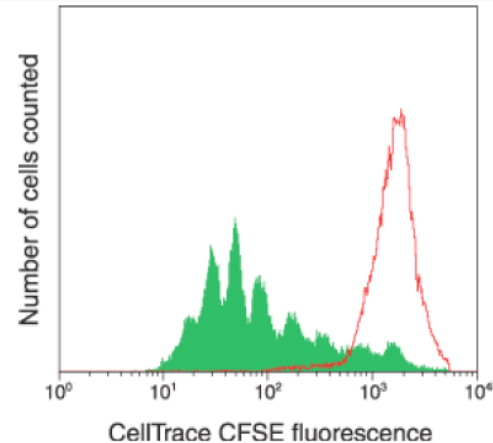
CFSE: CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester

Charge des cellules au CFSE



Distribution équivalente de la fluorescence entre les cellules filles

Suivi de la prolifération lymphocytaire dans le sang périphérique



J0: cellules arrêtées en génération parentale (mitomycin)

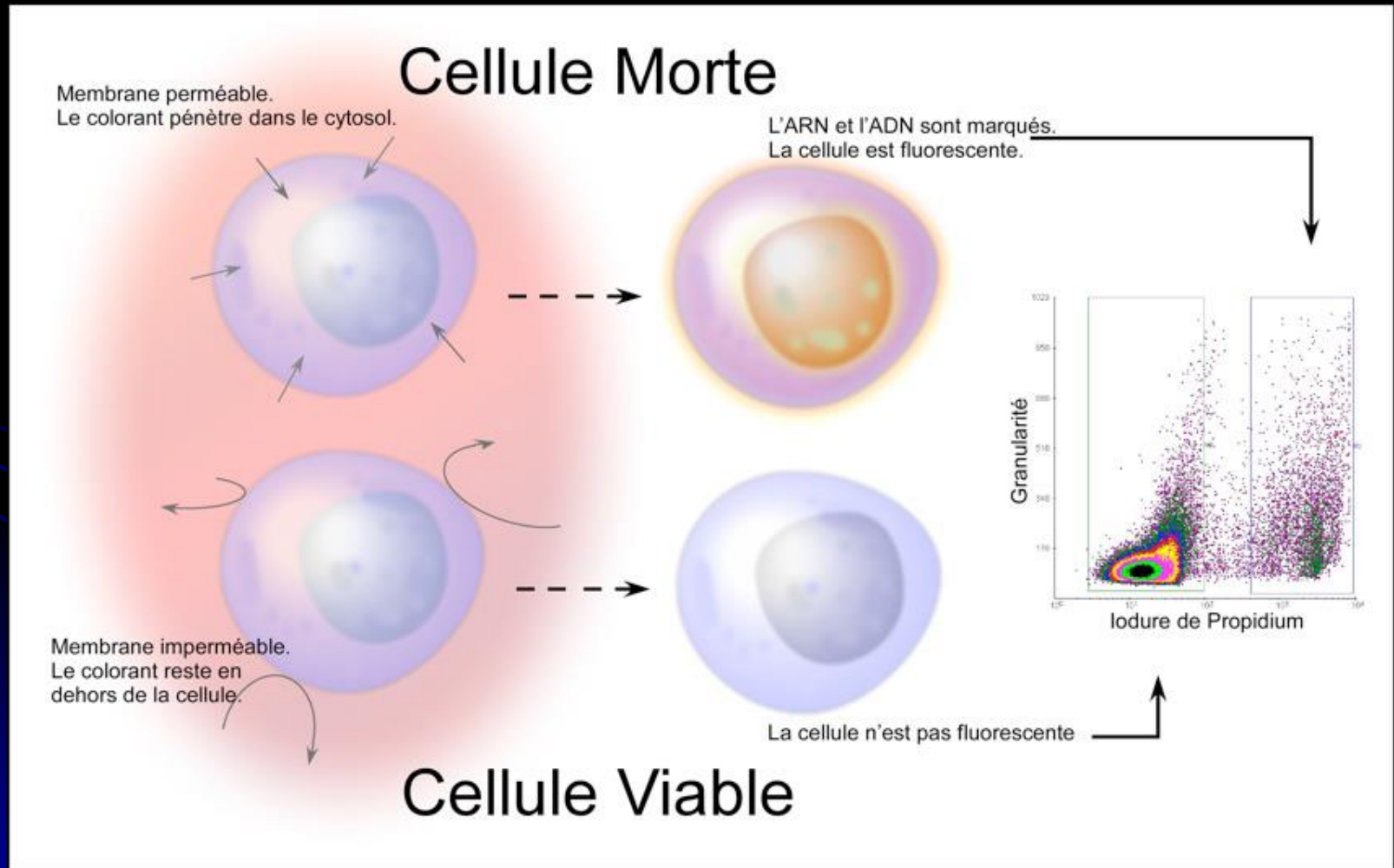
Stimulation de la prolifération (PHA)

J7: générations successives

- Diffusion passive dans la cellule
- Les estérases intracellulaires rendent la molécule fluorescente
- Couplage aux amines des protéines intracellulaires
- Peu cytotoxique
- Stable jusqu'à 8 semaines
- Répartition égale entre les cellules filles

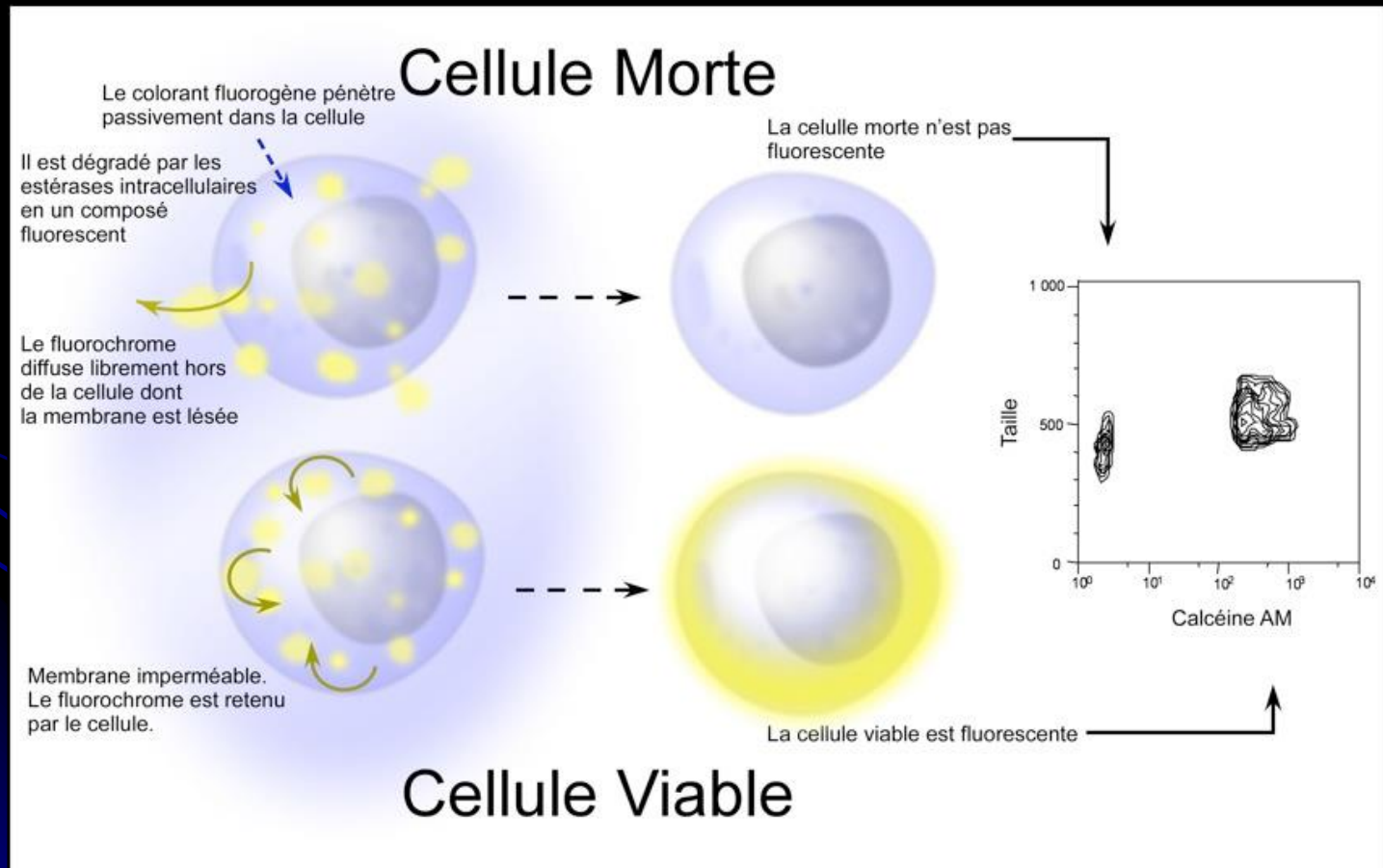
Étude de l'intégrité membranaire

Colorants d'exclusion

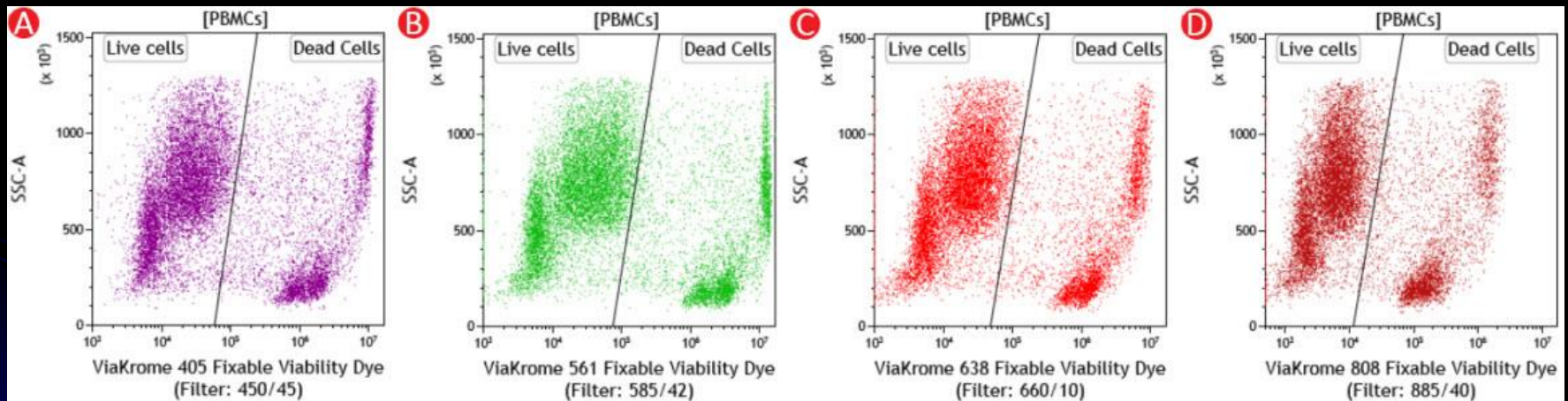


Étude de l'intégrité membranaire

Sondes vitales



Marqueurs amines-Viabilité



Préparation des échantillons

- La fixation idéale éthanol fixe et perméabilise lge conservation, mais pas conseillé pour marquage membranaire
- Les intercalants marquent aussi l'ARN: faire une RNase avant le marquage
- Les cellules mortes fixent moins présence d'un pic sub-G1
- IP fait exploser la double hélice
- On ne lave pas les colorants

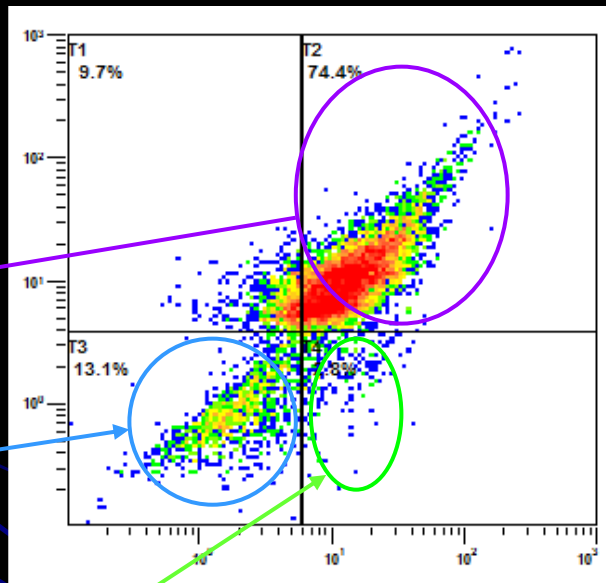
Intégrité- retournement membranaire

● Avantages:

- Très utilisé
- Permet de faire des phénotypes supplémentaires
- Rapide
- Phénomène universel de l'apoptose

● Inconvénients

- Faux positifs (vésiculation)
- Travail sur cellules fraiche
- Difficile cellules adhérentes



Apoptose
+
nécrose

PI

Viable

Annexin V

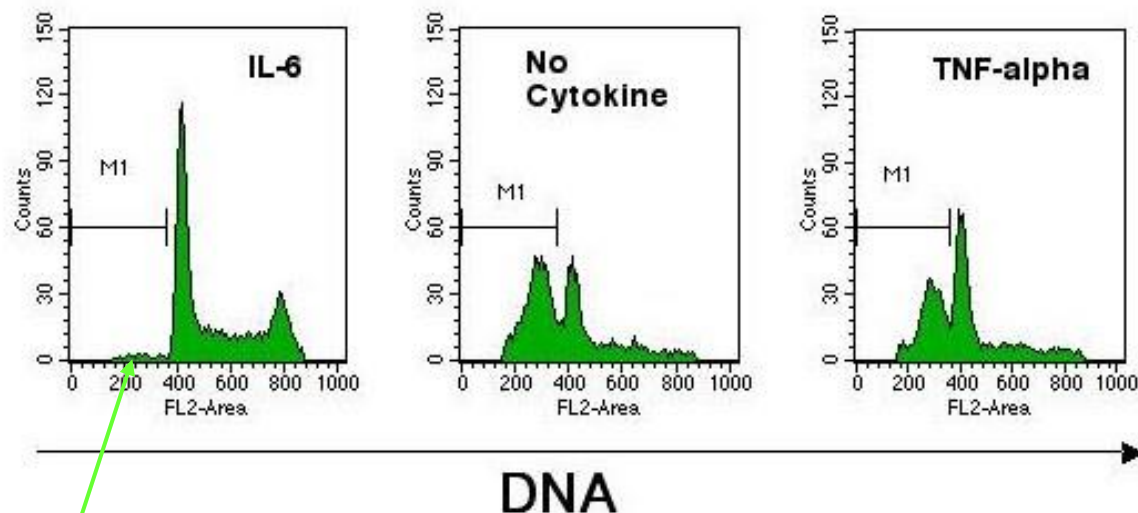
Apoptose
précoce

Autre fluorochromes:

7AAD

Hoechst 33342

Fragmentation de l'ADN



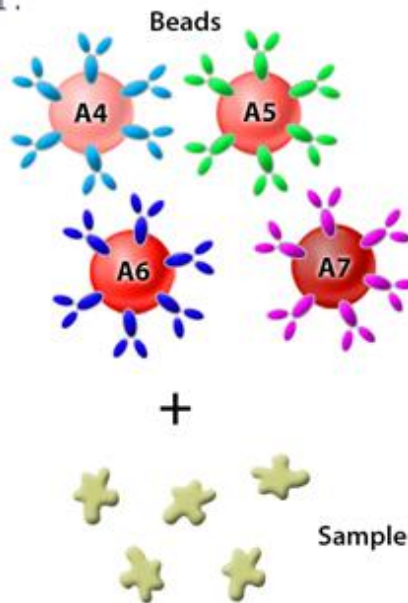
Pic sub-G1

- **Avantages:**
 - Travail sur cellules fixées
 - Rapide
 - Peu couteuse
 - Grand choix de fluorochromes
 - Bon départ pour l'étude de l'apoptose
- **Inconvénients:**
 - Événement « tardifs » de l'apoptose

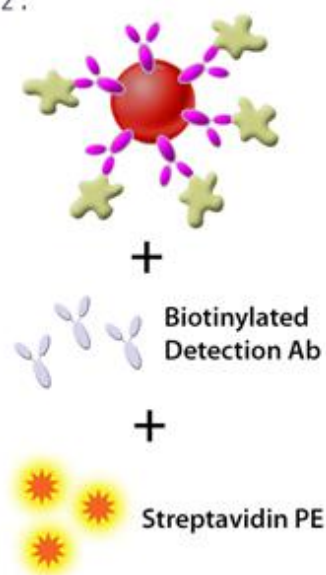
Cytokines solubles

PRINCIPLE OF THE ASSAY

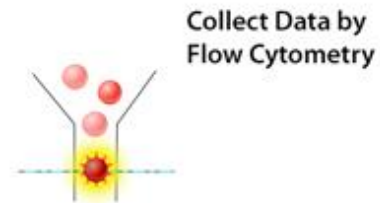
1.



2.

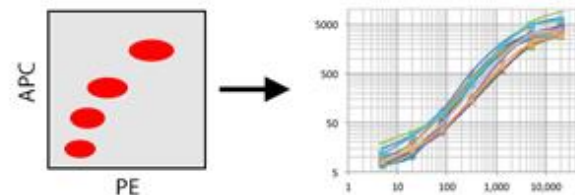


3.

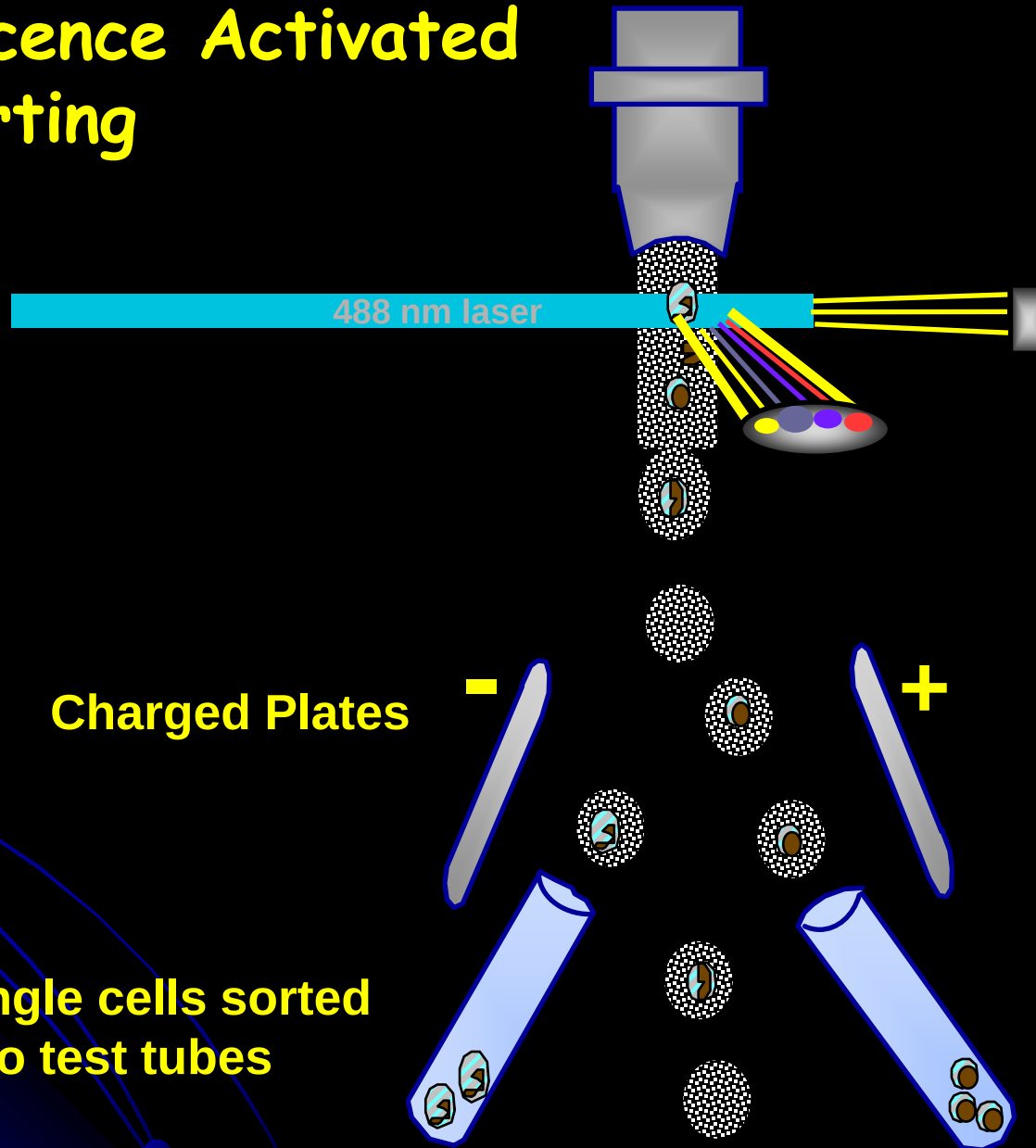


4.

Quantitate Using LEGENDplex™ Software



Fluorescence Activated Cell Sorting



Tri électrostatique

- Préparation de la machine:
 - Stérilité
 - Mode de tri
 - Plaques de déflexion
- Est-ce faisable?
 - Population initiale 1%
 - Besoin de 1.10^6 cell viables
 - Vitesse 10 000 cell/sec
 - Rendement de 50%



5h30

La cytométrie en flux

Le tri par CMF

- Technique longue
- Sélection sur plusieurs paramètres à la fois
- Choix entre pureté et rendement
- Bonne pureté >95%
- Clonages
- Préparations pour :
 - Mise en culture
 - Biologie moléculaire
 - Western blots
 - Activité enzymatiques
 - Etc ...