

Analyses des fonctions cellulaires

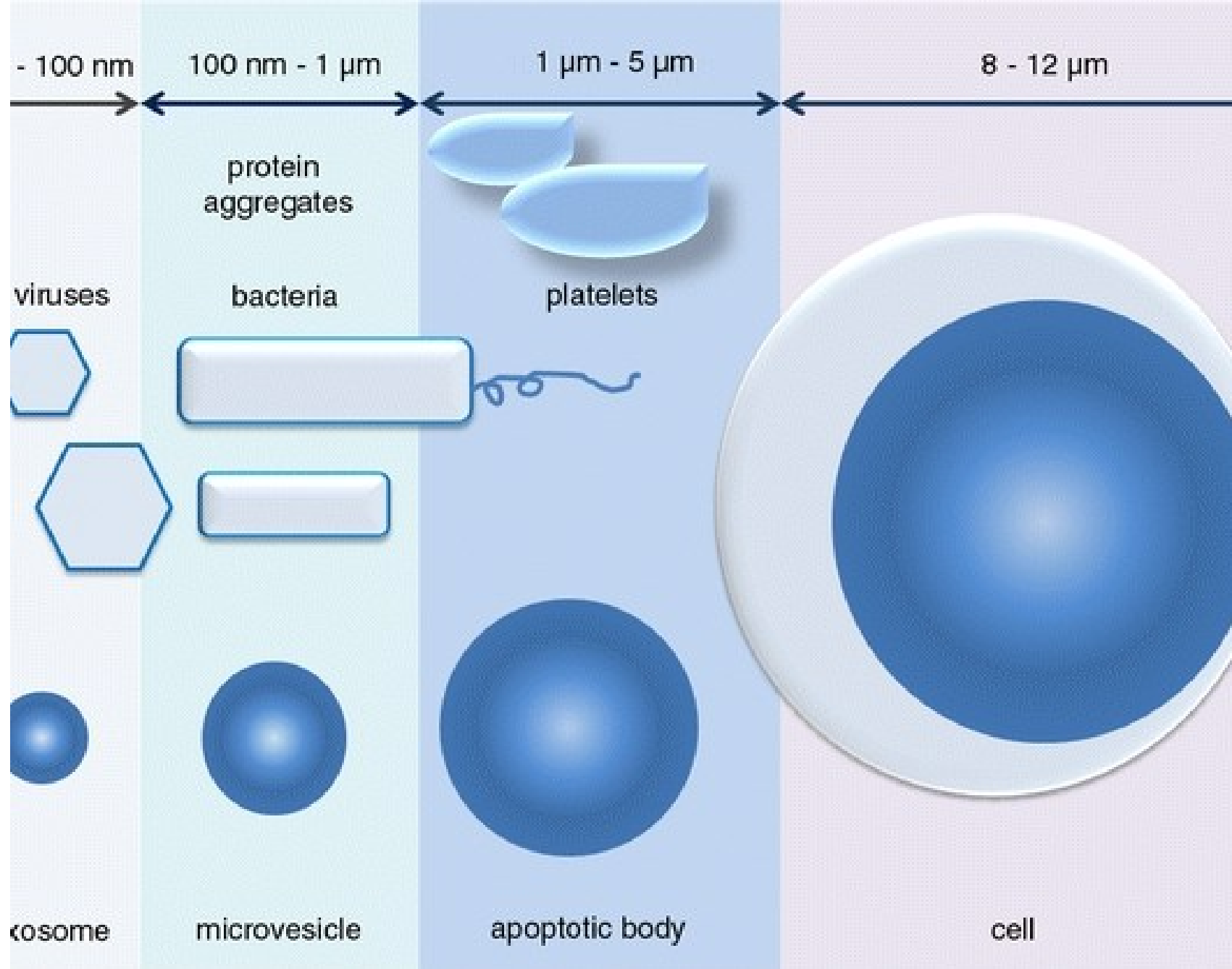
Cytométrie en flux

C'est quoi?

- 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 populations
- 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.

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...



Composition d'un cytomètre

1) Système fluidique :

Permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser

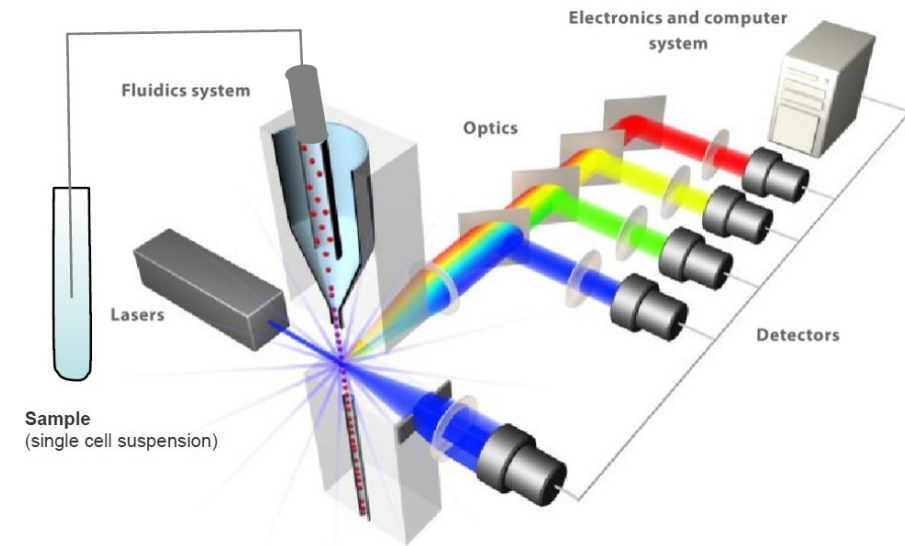
2) Système optique :

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

3) Système électronique :

Permet la conversion et le traitement des signaux lumineux

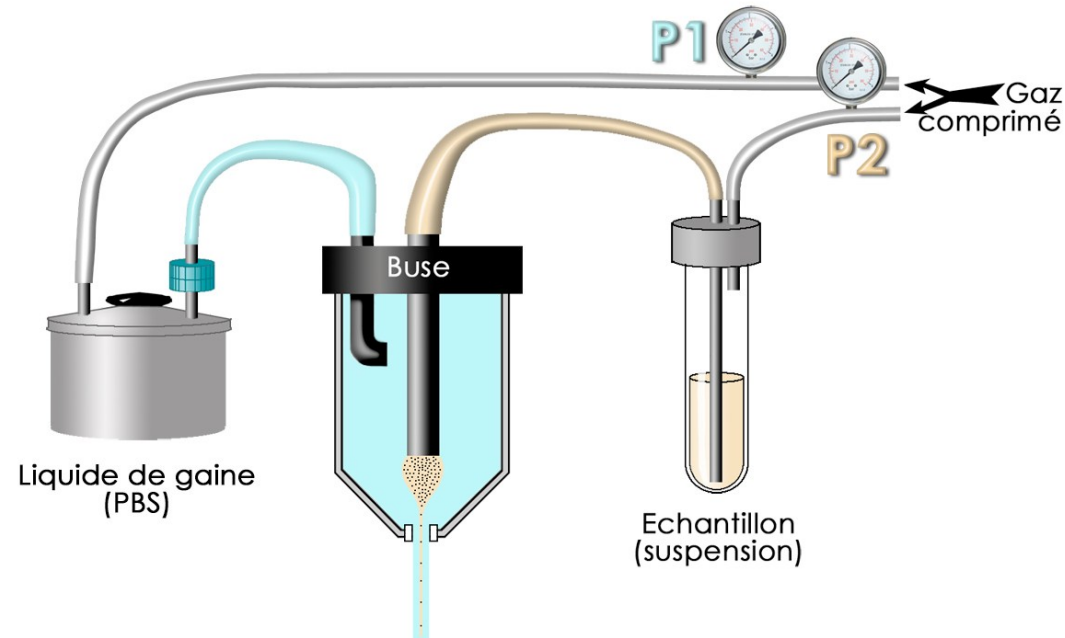
Instrument Overview



Fluidique

Fluidique

Focalisation hydrodynamique



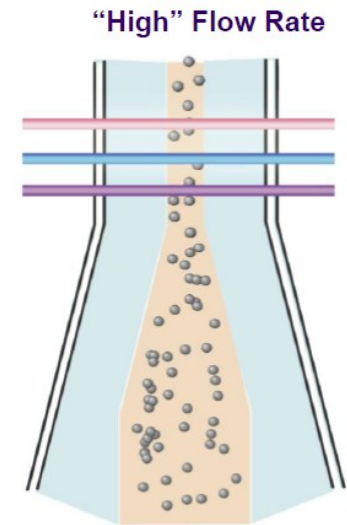
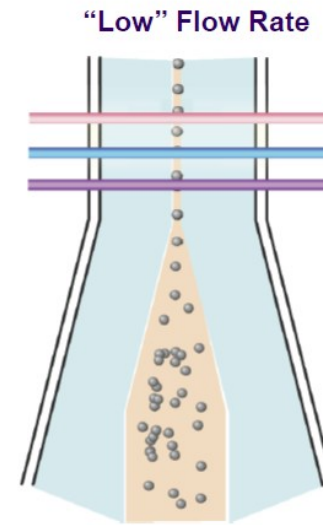
Le flux du liquide de gaine accélère les cellules et les oblige à s'aligner pour être analysées une à une

Vitesse d'injection

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



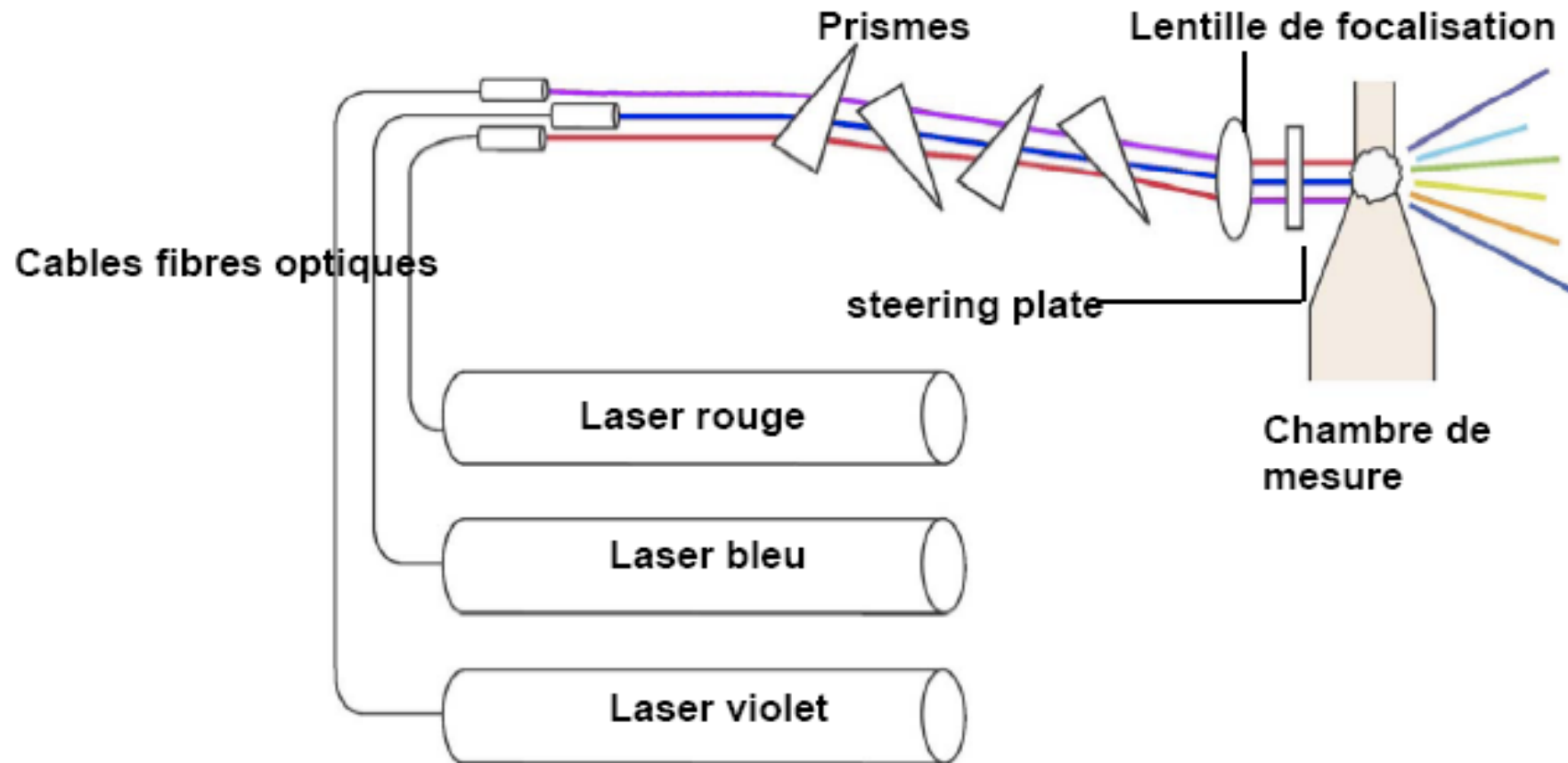
Optique

Excitation- Emission

- **La source d'excitation consiste en:**
 - Un laser
 - Des prismes et miroirs pour focaliser la source d'excitation vers la veine liquide de la chambre de mesure
- **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 (PMT).

Optique d'excitation

Production des signaux

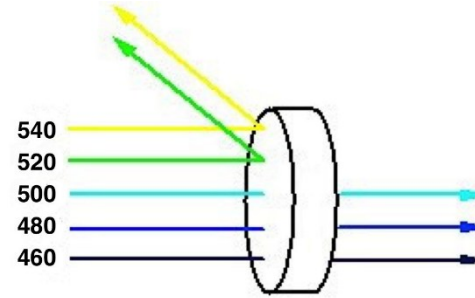


Détecteurs

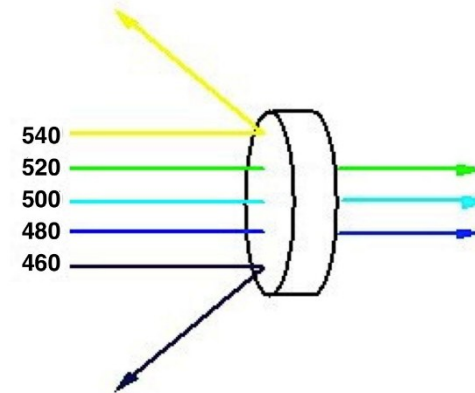
- **Photodiodes**
 - Utilisé pour les signaux forts à risque de saturation (Ex FSC)
- **Photomultiplicateurs (PMT)**
 - Plus sensibles utilisé pour détecter des signaux plus faibles émis par les fluorochromes

Différents types de filtres utilisés en CMF.

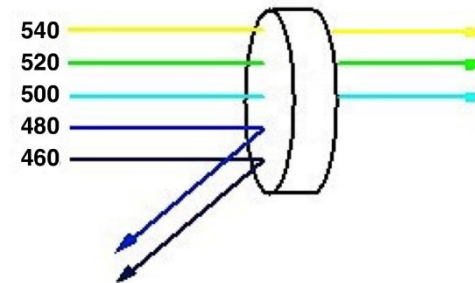
Filtre Passe Bas
500 nm



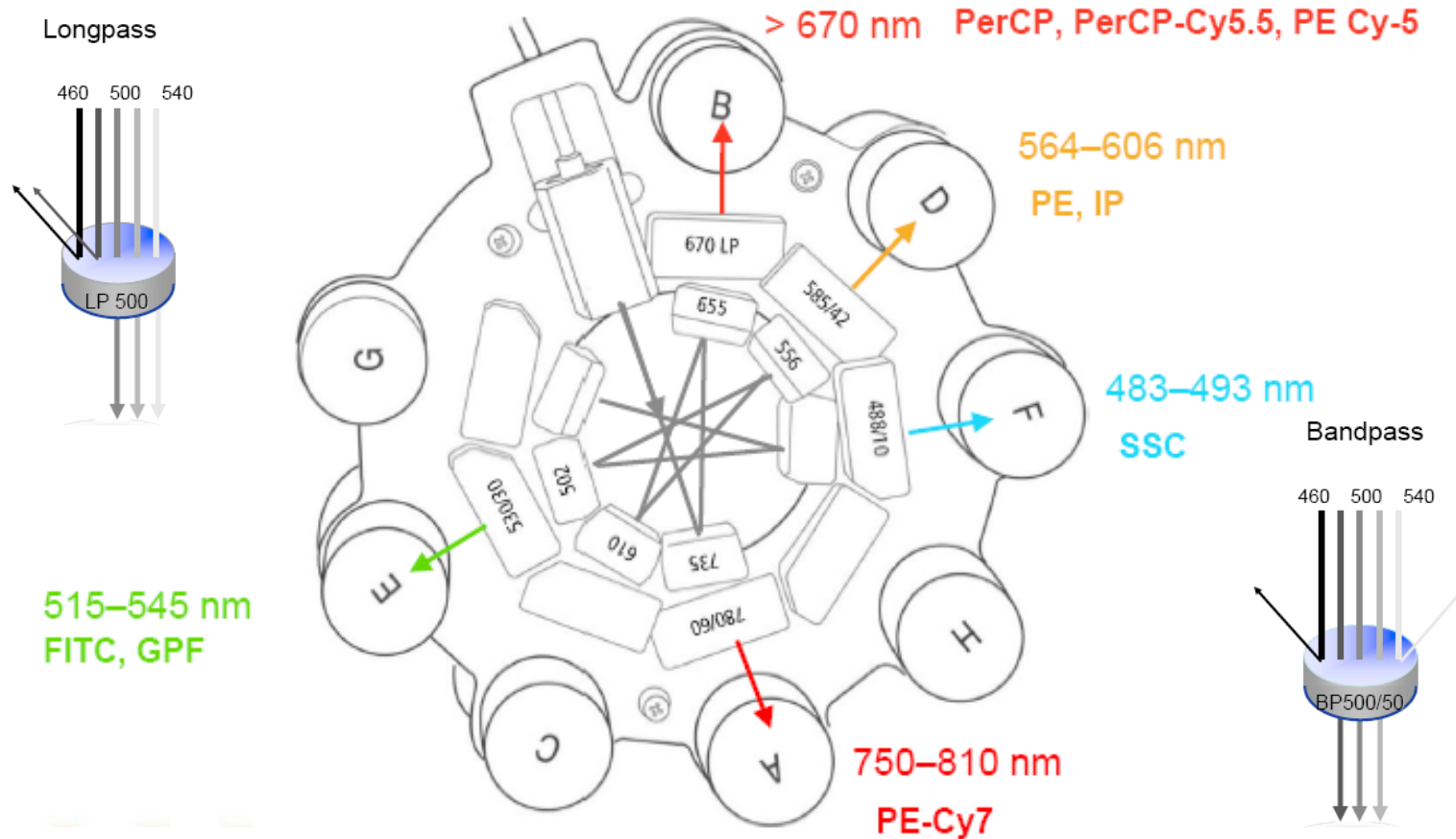
Filtre Bande Passe
500/40



Filtre Passe Haut
500 nm



Optique de collecte



Laser bleu

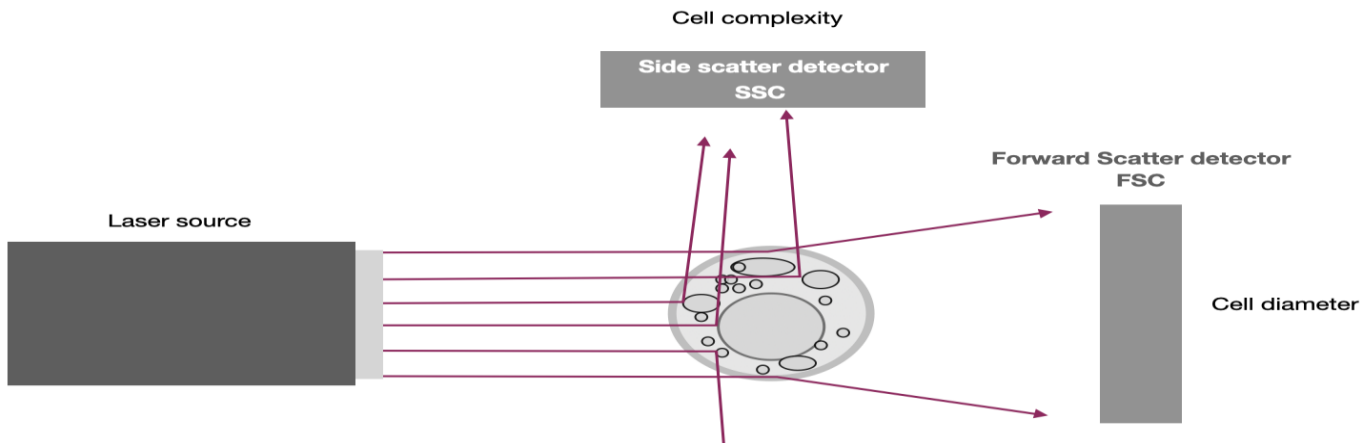
FSC and SSC Properties

Forward Scatter

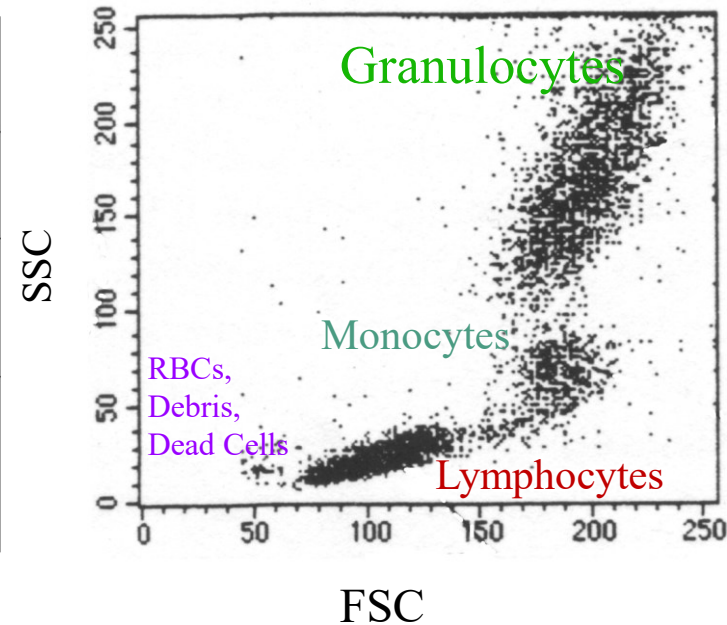
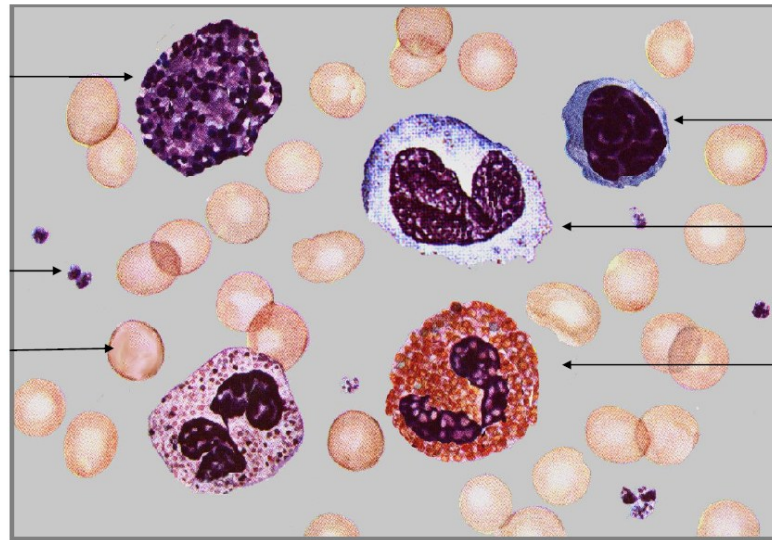
La taille des cellules peut être mesurée à l'aide de la diffusion (FSC), qui est une lumière légèrement déviée par la membrane plasmique. La quantité de lumière diffusée est proportionnelle au diamètre de la cellule.

Side Scatter

La complexité des cellules est mesurée à l'aide de la diffusion latérale (SSC), qui résulte de la lumière fortement déviée lorsqu'elle frappe des objets dans le cytoplasme de la cellule.



Pourquoi regarder en FSC/SSC?

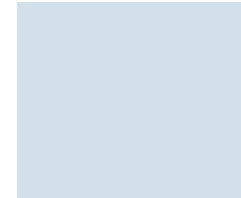
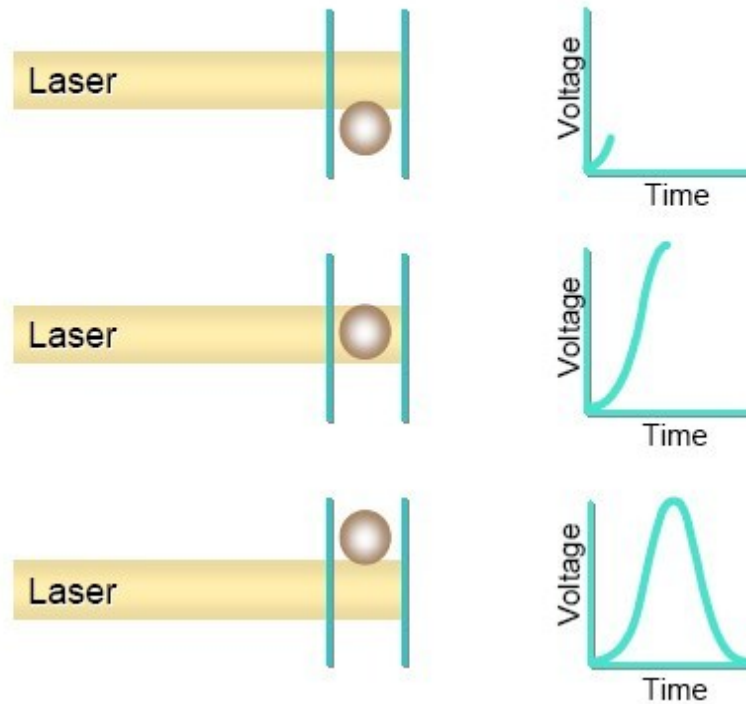


Les mesures FSC-SSC combinées peuvent être utilisées pour identifier et compter le nombre de types de cellules morphologiquement distinctes présentes dans des échantillons biologiques hétérogènes tels que le sang.

L'électronique

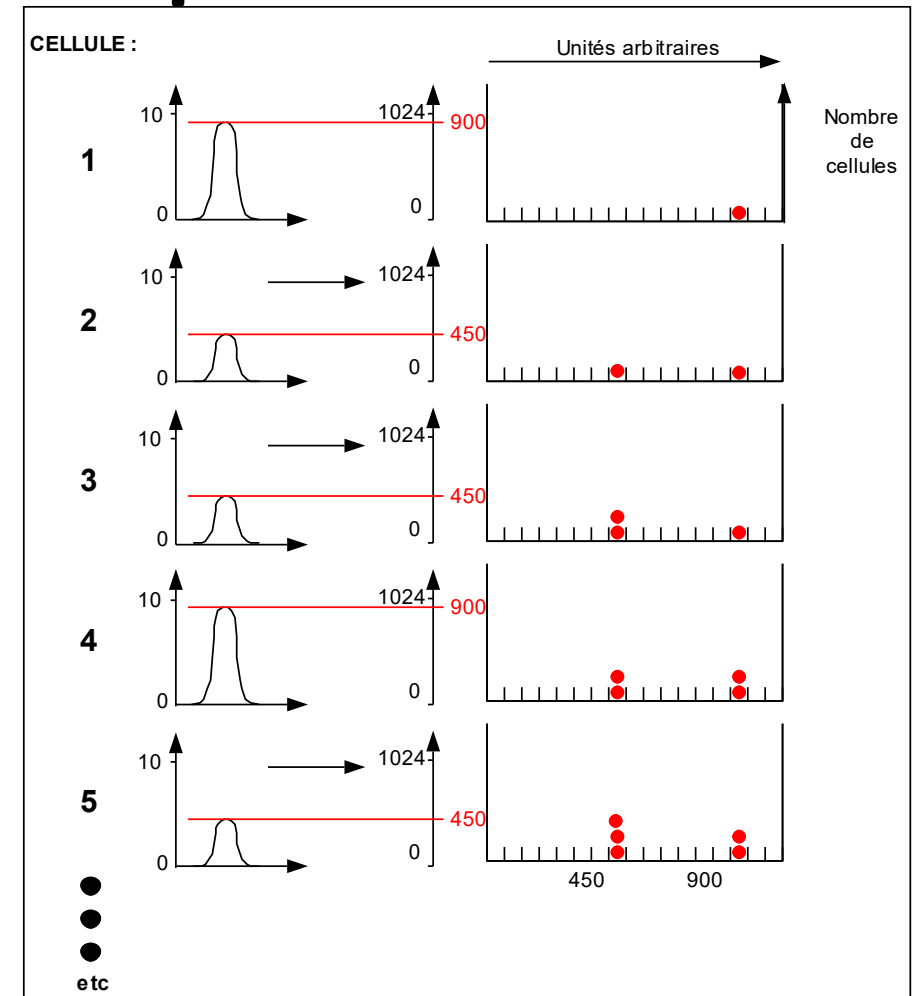
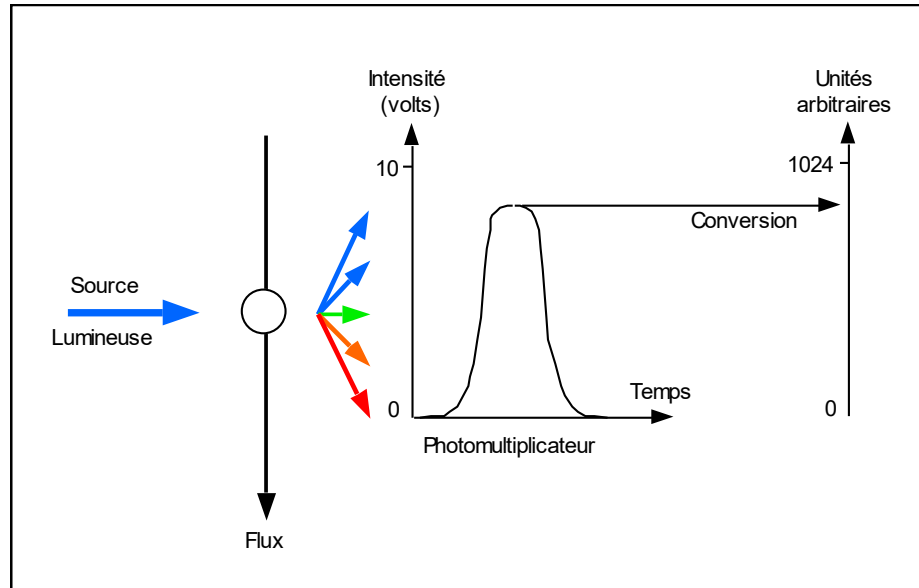
L'électronique est le cerveau du cytomètre en flux. C'est là que le photo-courant des détecteurs est numérisé et traité pour être sauvegardé en vue d'une analyse ultérieure.

Pulse électronique — Signal analogique

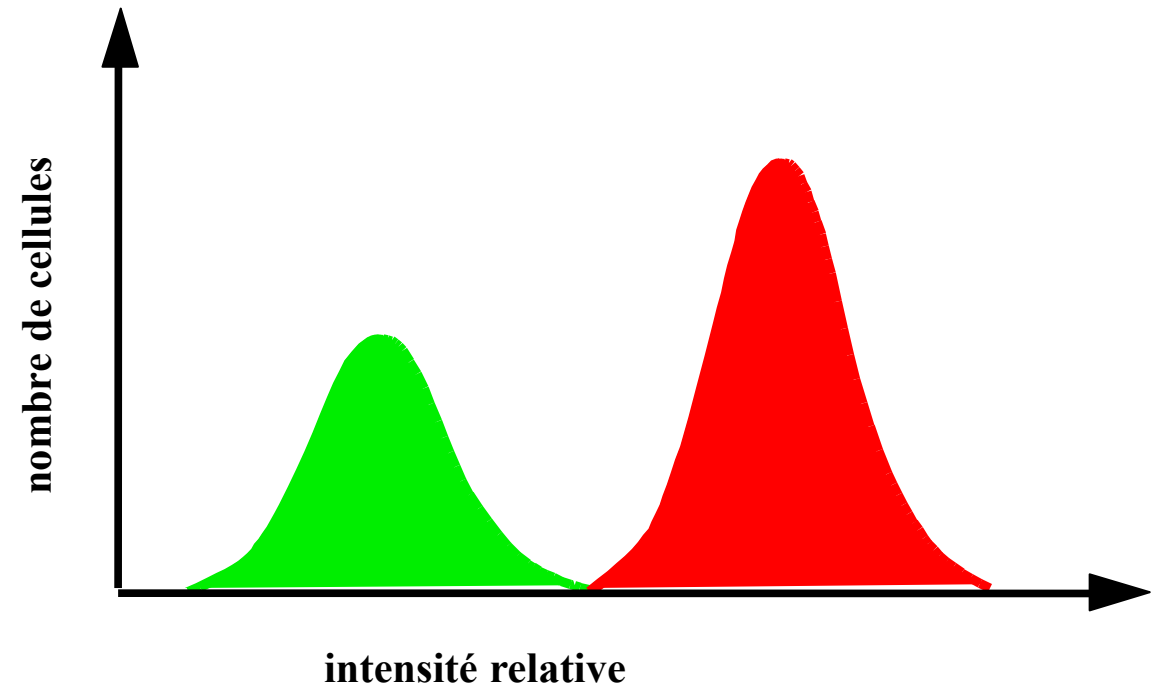
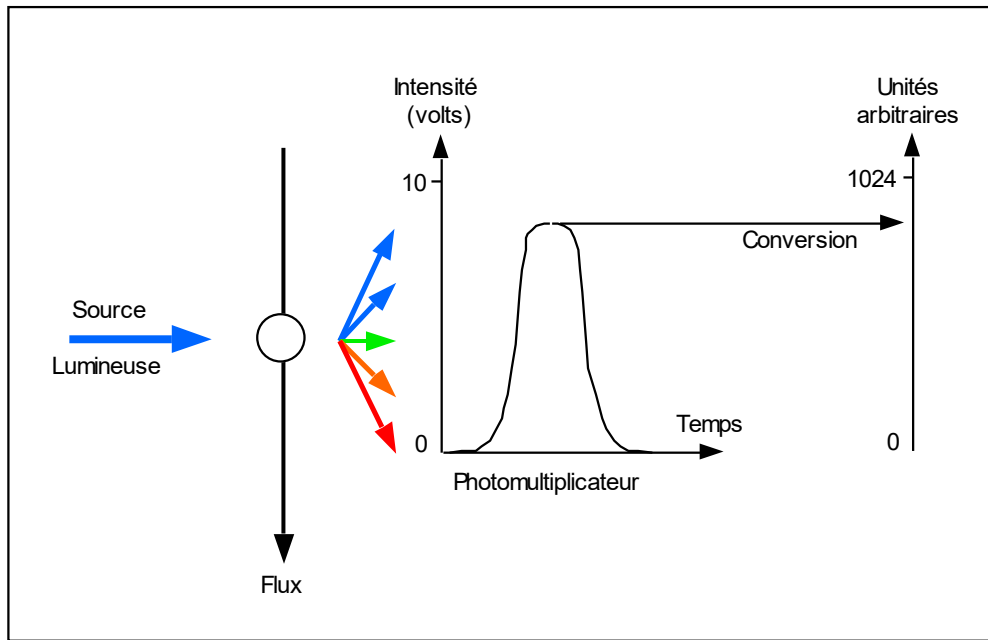


Lorsqu'une cellule traverse le laser, elle génère une impulsion électrique aux bornes de chaque détecteur qui reflète la lumière émise lorsqu'il est éclairé. Cette impulsion est maximale lorsque l'élément se trouve au centre du faisceau laser.

Conversion des signaux optiques en signaux numériques

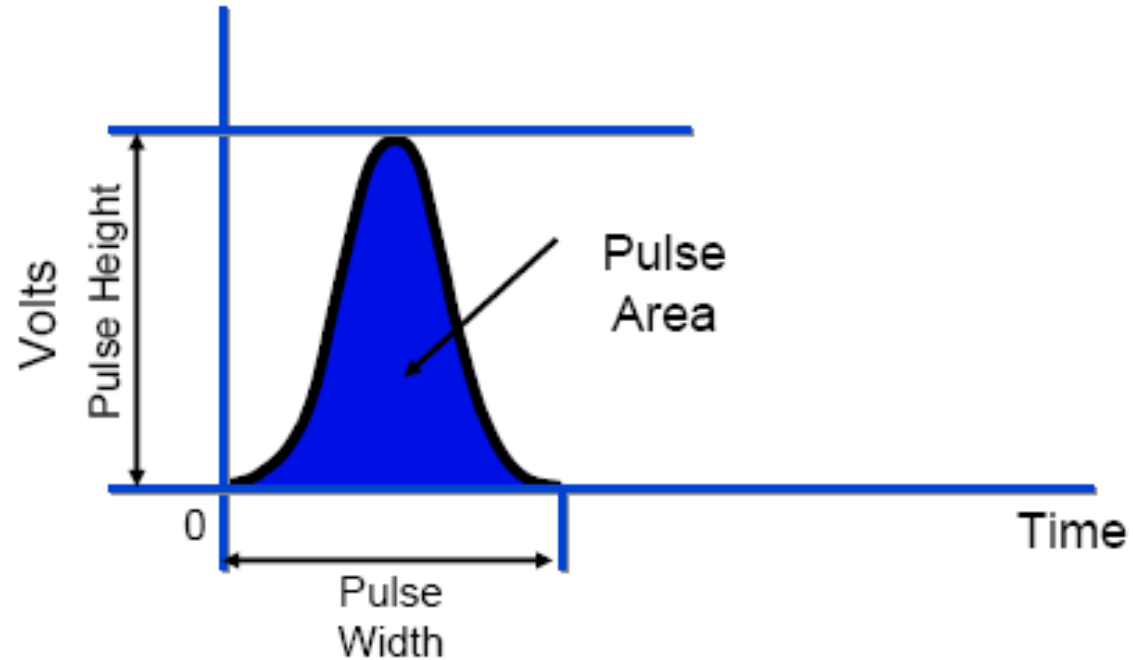


Conversion des signaux optiques en signaux numériques



Paramètres mesurés

- Width = Area/Height
Proportionel au temps de passage de la cellule
- Height = hauteur maximale du pic
- Area = somme de toutes les hauteurs



Réglage des détecteurs

- **Le seuil**

Sélection d'un signal numérique déclencheur qui détermine si l'échantillon est pris en compte ou non. En général, la taille : purement visuelle

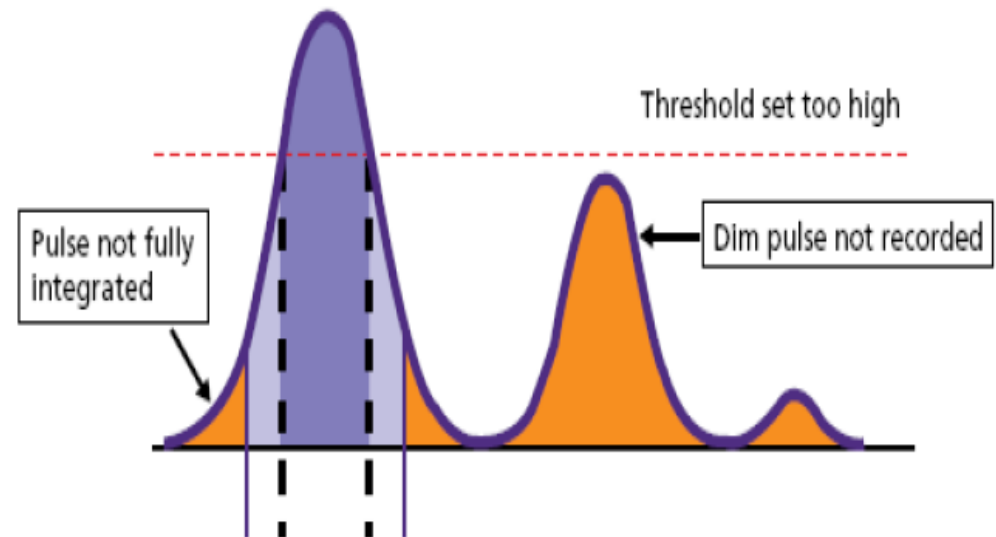
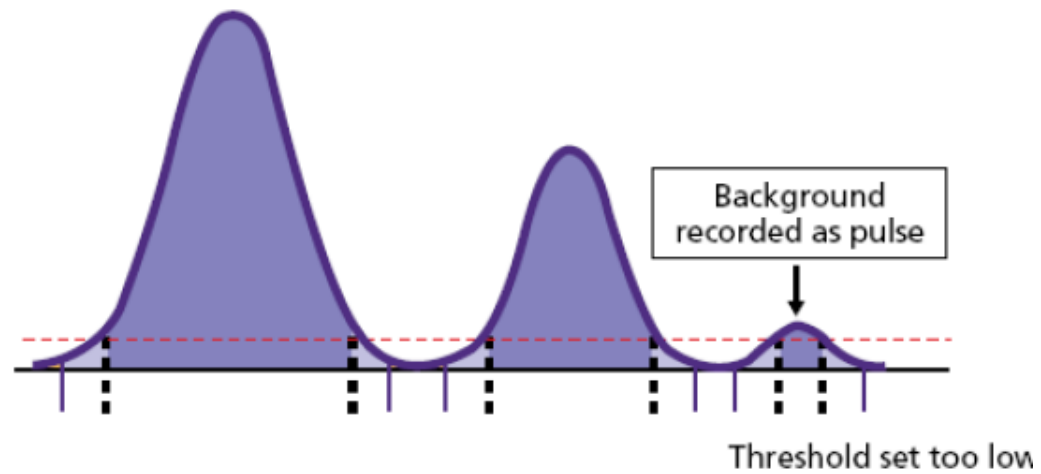
- **Voltage**

Pour obtenir la plus grande sensibilité de détection et la meilleure discrimination entre positifs et négatifs, il est nécessaire de mettre en place un système de contrôle de la qualité.

- **Linéaire ou logarithmique**

En fonction des amplitudes de fluorescence analysées

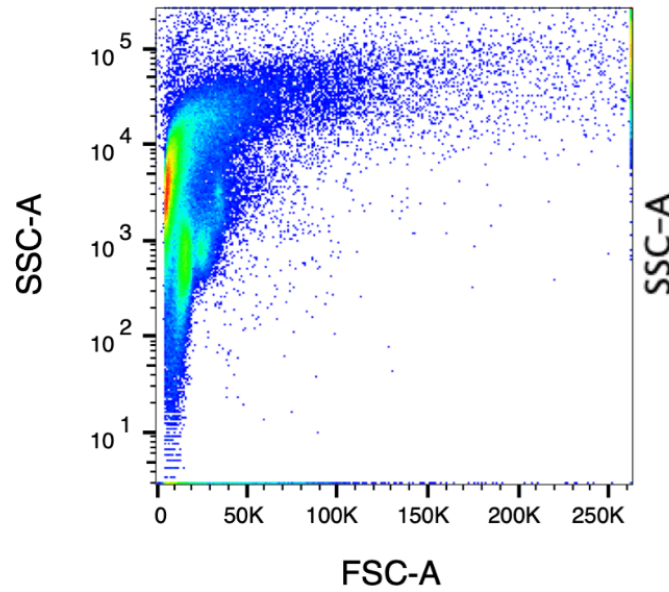
Le seuil



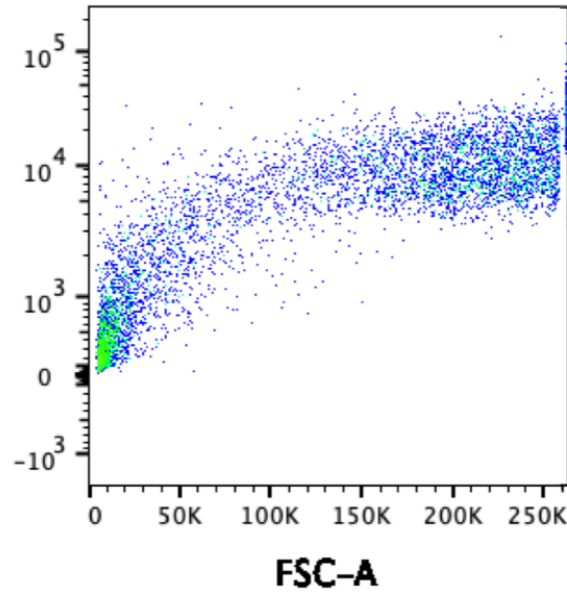
Voltage



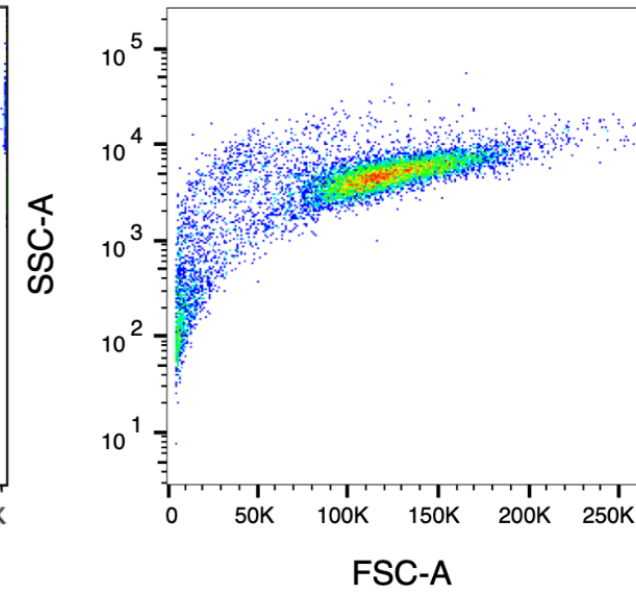
FSC too low



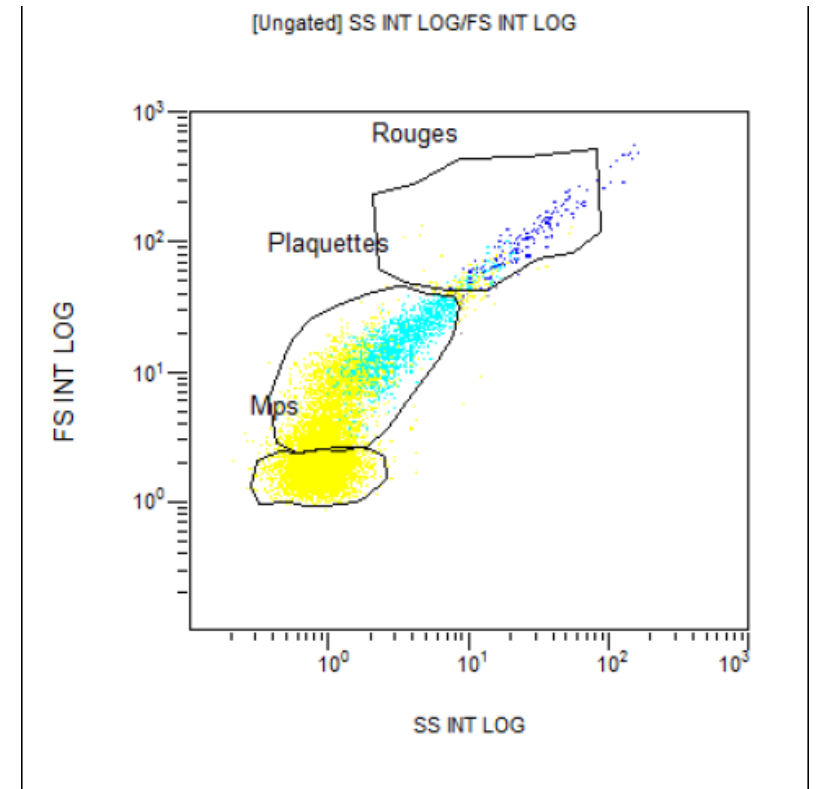
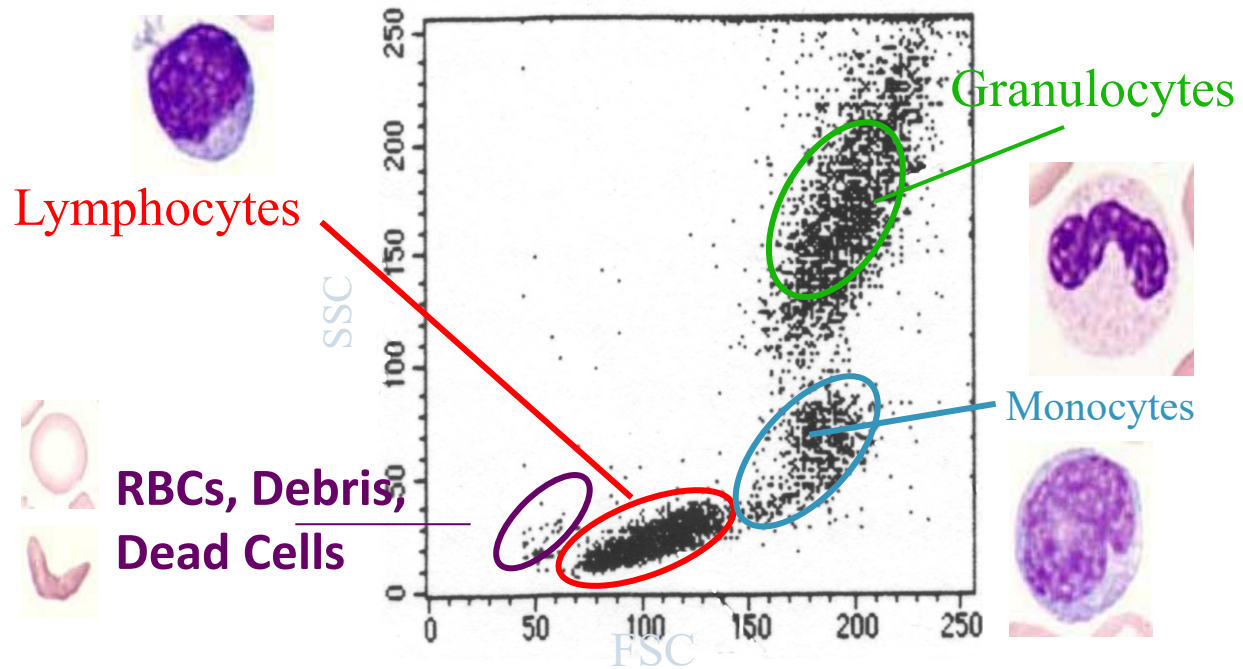
FSC too high



FSC correct

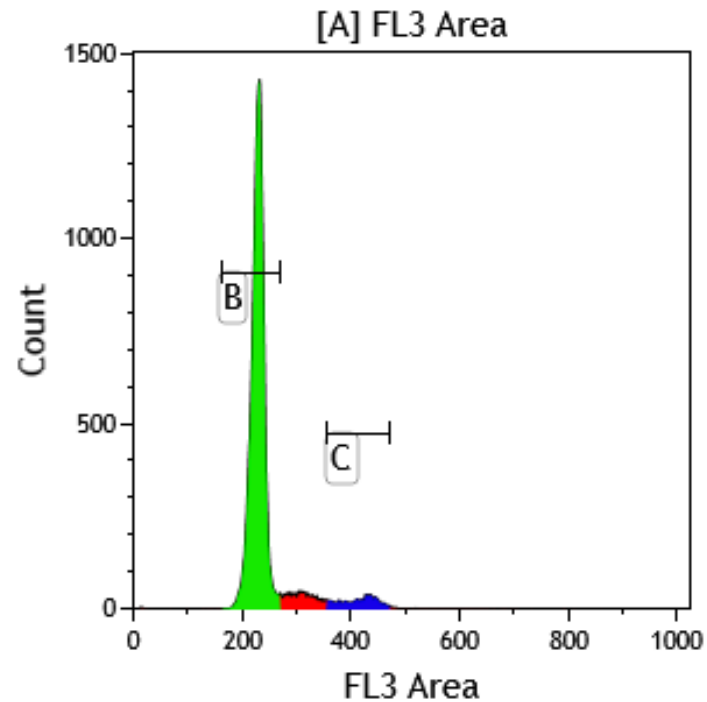


Lin vs log



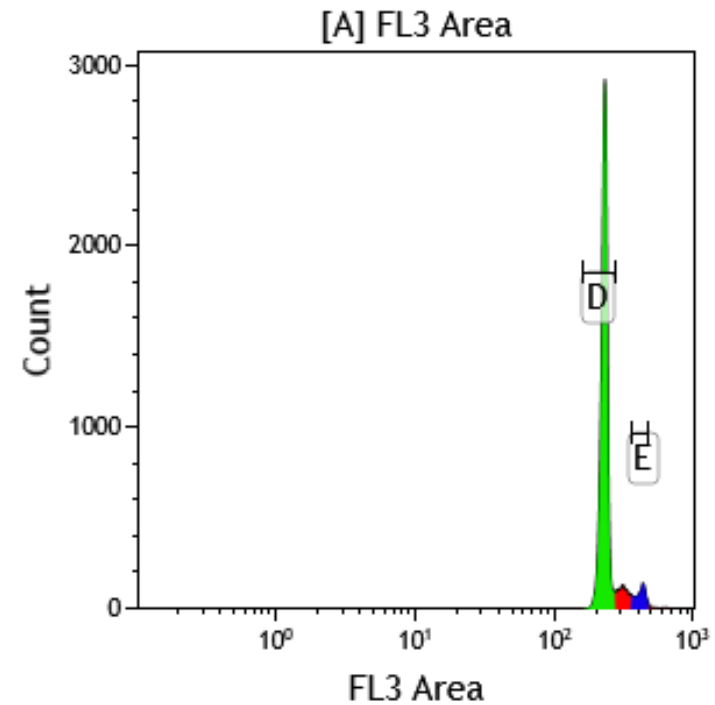
Lin vs log

Echelle linéaire



Gate Number %Total %Gated			
All	42 983	85,97	100,00
B	36 277	72,55	84,40
C	2 786	5,57	6,48

Echelle logarithmique

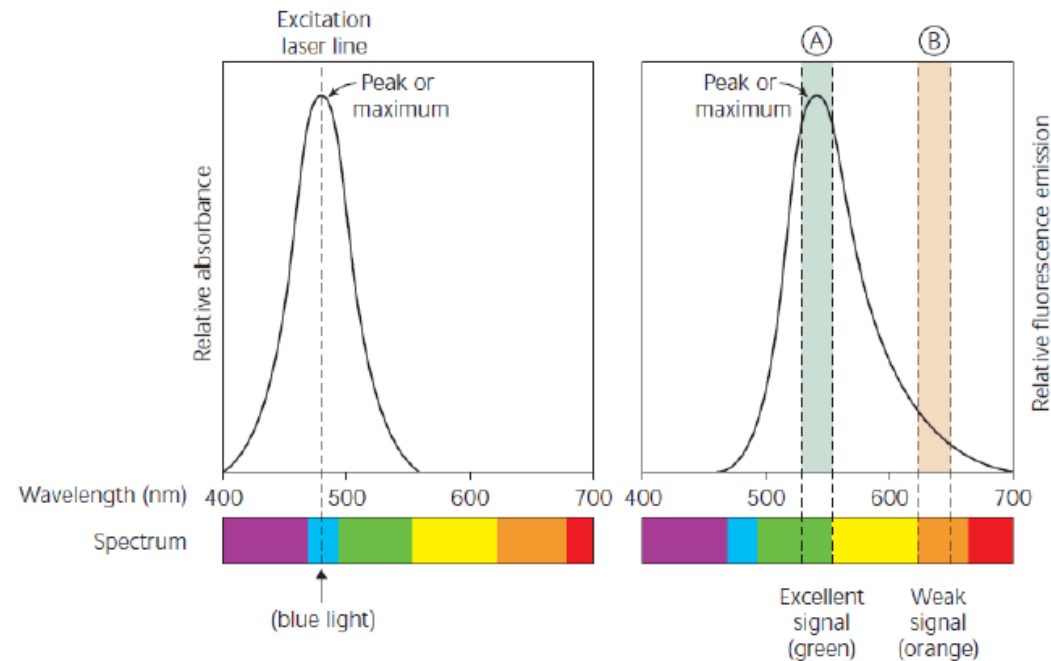


Gate Number %Total %Gated			
All	42 983	85,97	100,00
D	36 277	72,55	84,40
E	2 786	5,57	6,48

La fluorescence

Fluorochromes characteristics

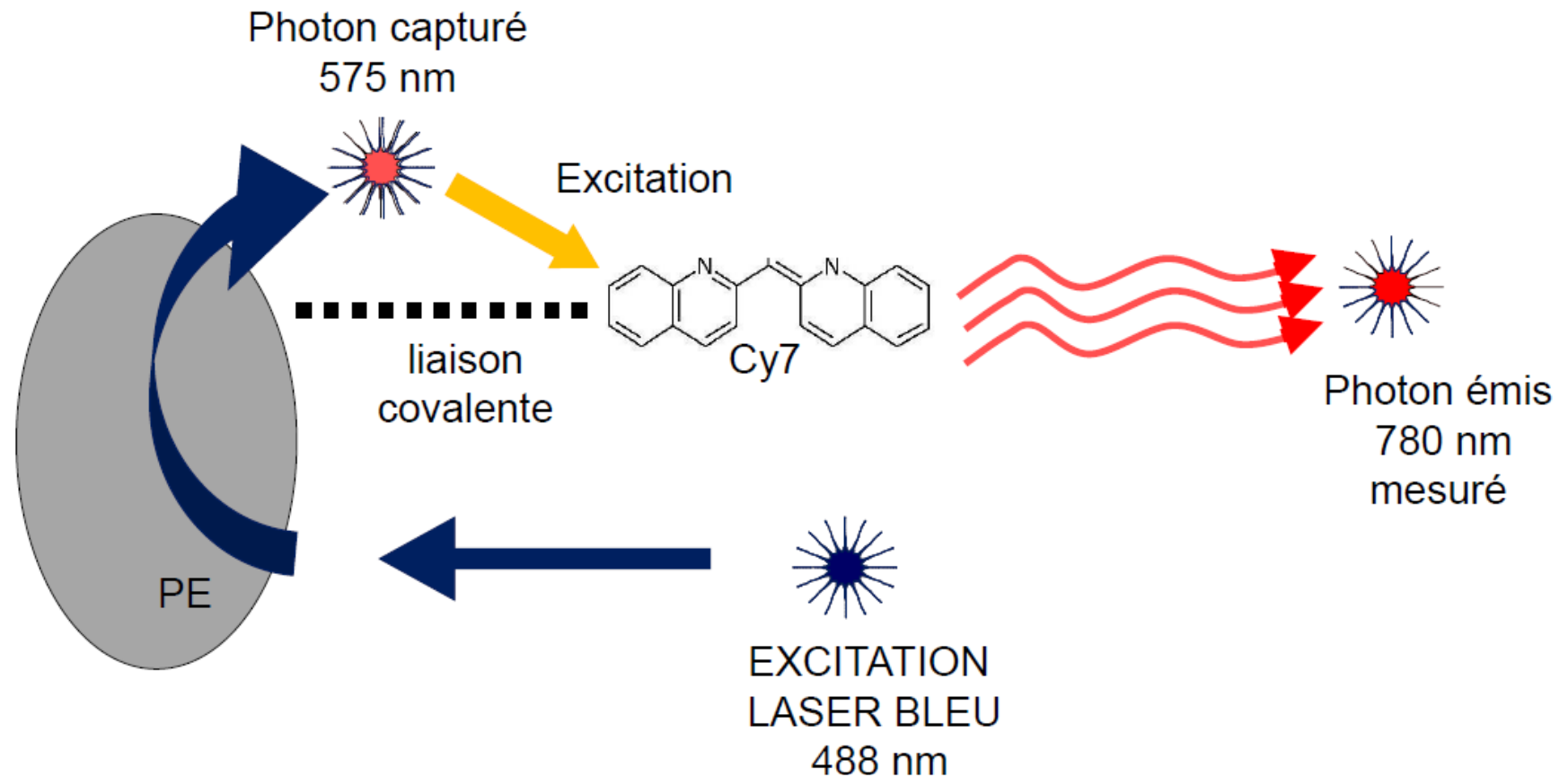
Emission wavelength (spectrum maximum): λ_{em}
Excitation wavelength (spectrum maximum): λ_{ex}



Fluorochromes couramment utilisés

- Molécules chimiques: FITC, Cy5, Cy7, Alexa Fluor
 - Petite taille (FITC = 0,3 KDa)
 - Couplage facile, excellente stabilité,
 - Faible brillance
- Protéines: PE, APC, PerCP
 - Grosses molécules (PE = 220 KDa, APC = 120 KDa)
 - Couplage difficile, bonne stabilité
 - Brillance moyenne à forte
- Tandems: PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC-Cy7
- Polymères : BV421, BV510, BV605, BB515, BB700, BUV395
 - Taille intermédiaire
 - Excellente stabilité
 - Forte à très forte

Principe des fluorochromes tandems



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.

	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.

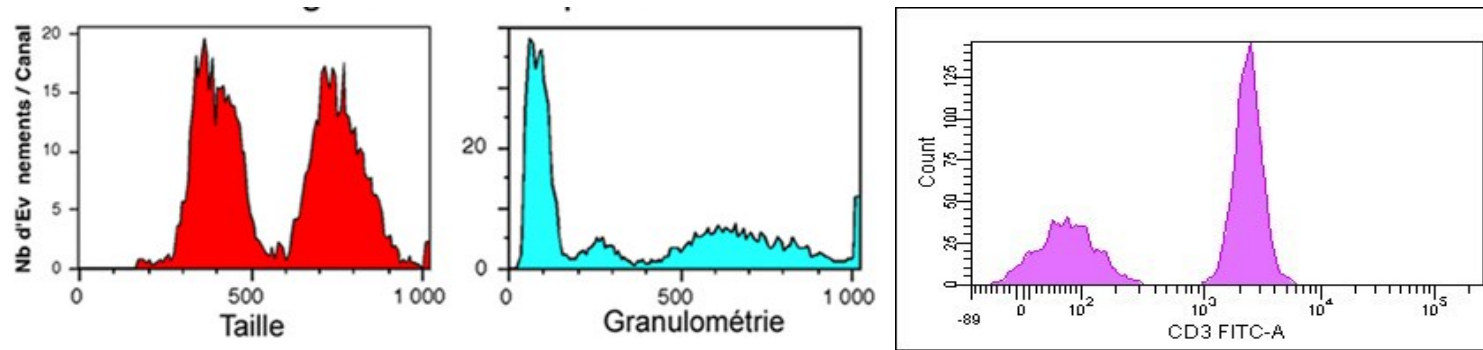
Trademarks are the property of their respective owners.

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

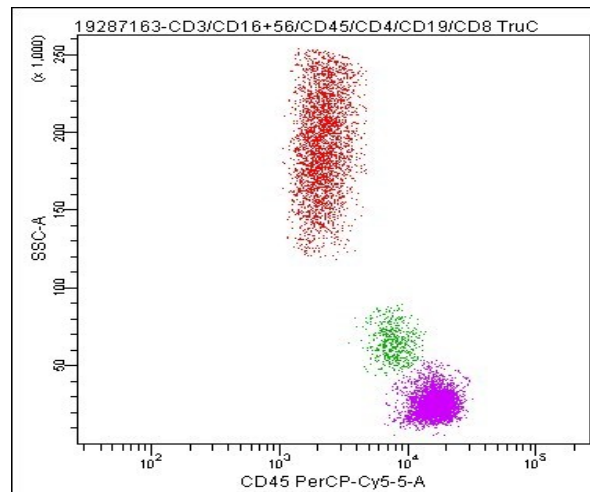
23-16181-07



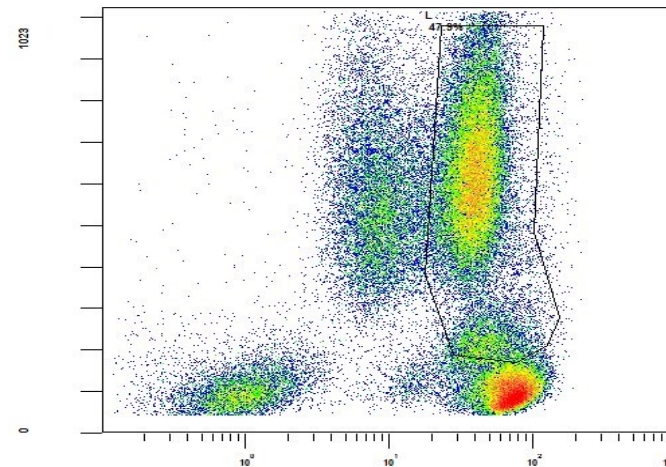
Présentation des résultats



Histogramme monoparamétrique

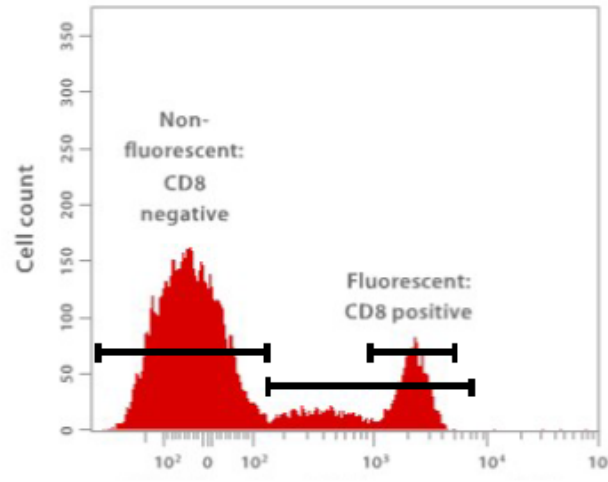


Dot plot

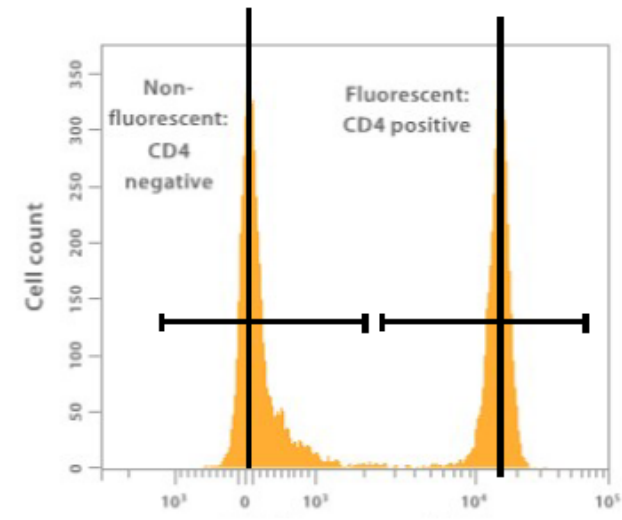


Density plot

Histogrammes biparamétriques

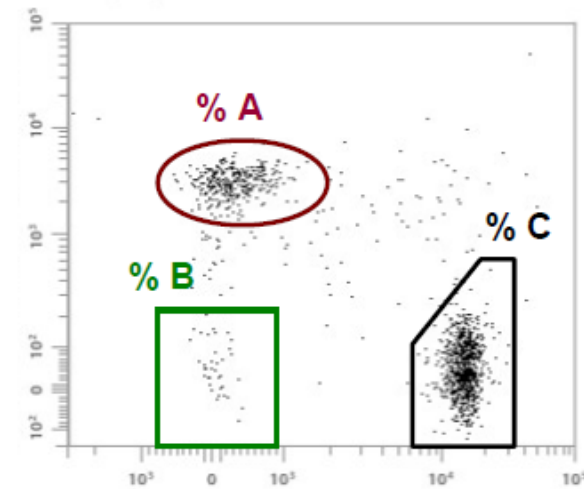
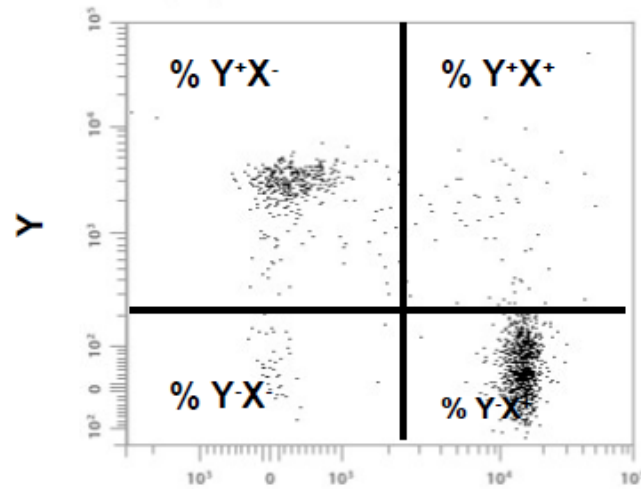


Mean Fluorescence Intensity (MFI)

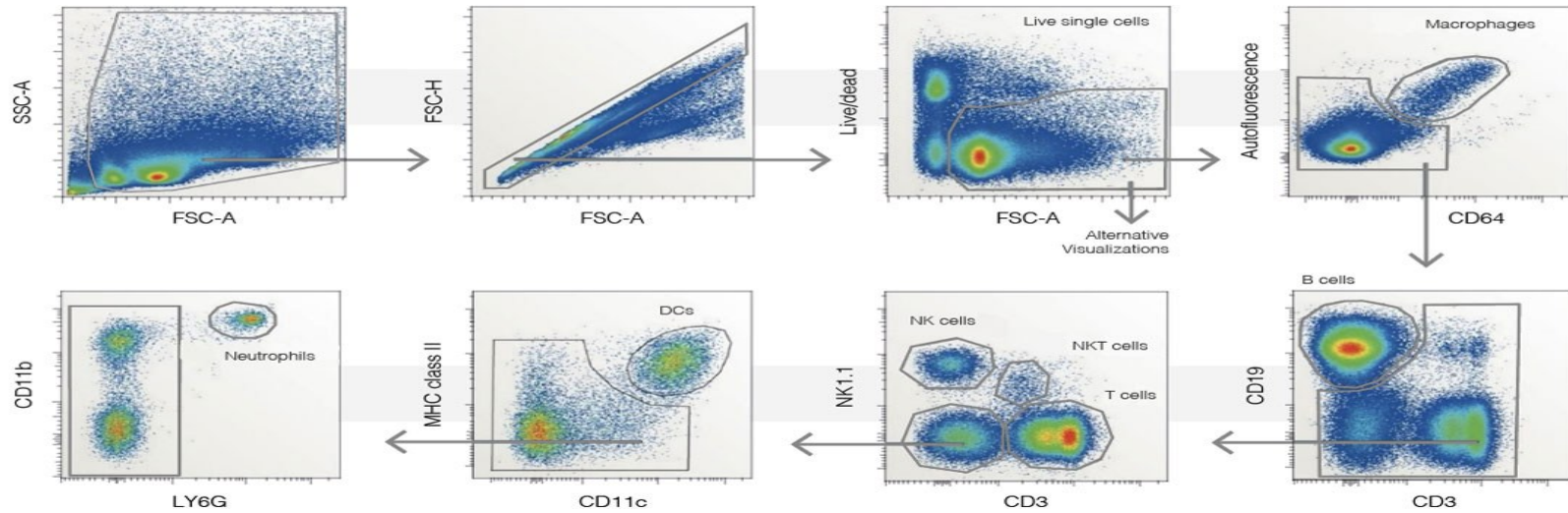


MFI =10 MFI =150

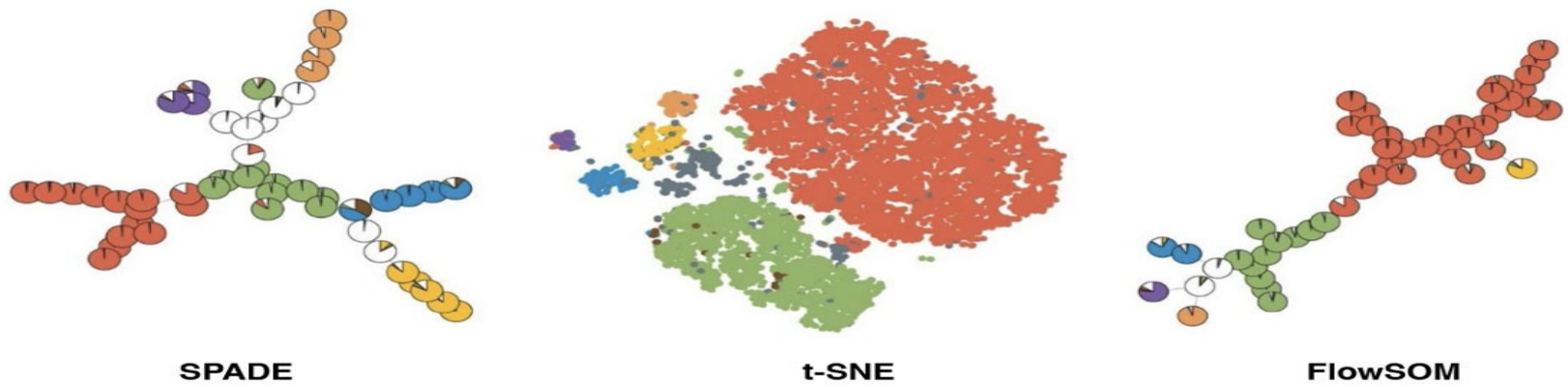
Quadrant Statistic



a Manual Gating



b Mapping of the manual gating



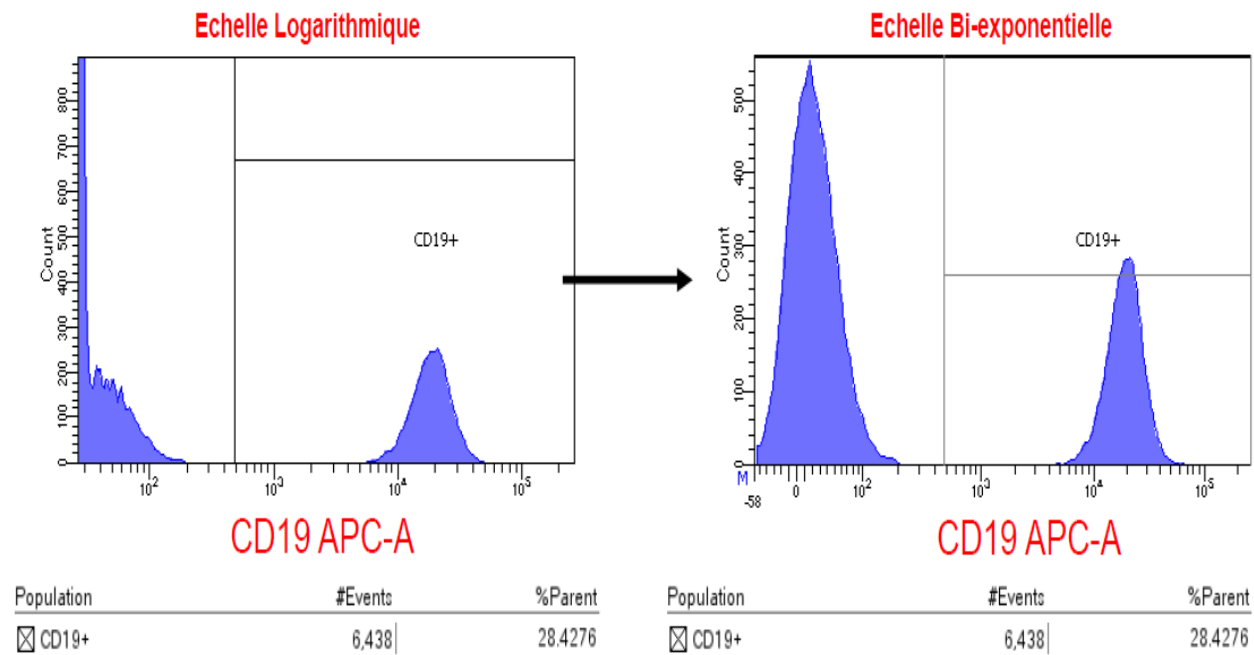
□ Unknown
 ■ Macrophages

■ B cells
 ■ T cells

■ NK cells
 ■ NKT cells

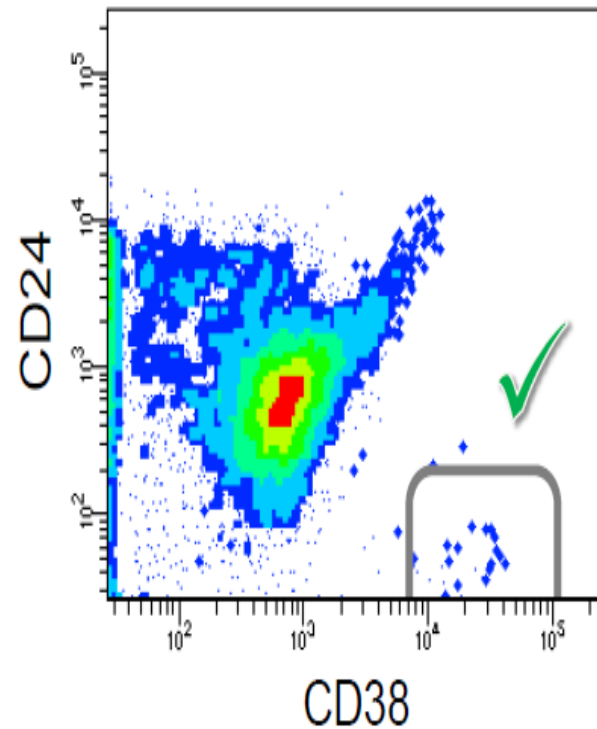
■ DCs
 ■ Neutrophils

Bi-exponentiel



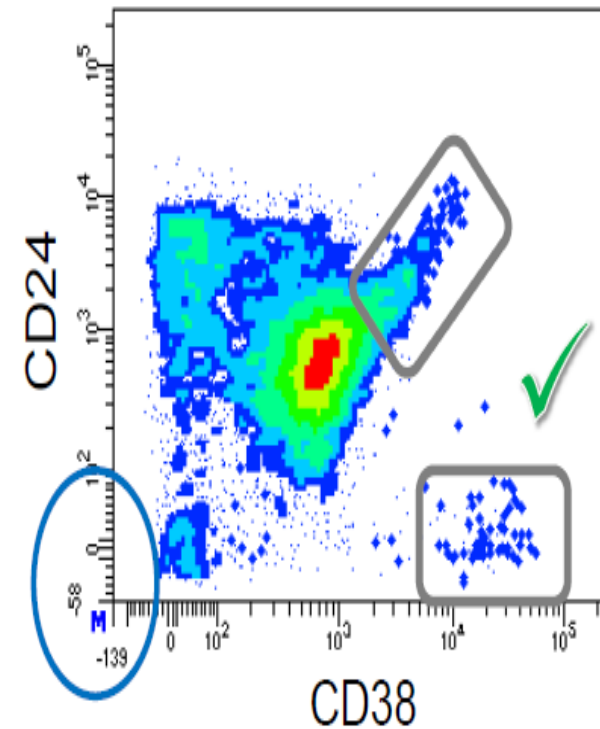
- Visuel optimisé
 - Sélection des populations plus intuitive

Echelle Logarithmique



Population	#Events	%Parent
CD24highCD38high	155	2.4386
CD24-CD38high	9	33.3333

Echelle Bi-exponentielle



Population	#Events	%Parent
CD24highCD38high	155	2.4386
CD24-CD38high	9	33.3333

Quelques applications

Quelles propriétés cellulaires en cytométrie

Noyau

ADN; protéines
nucléaires

Mitochondries

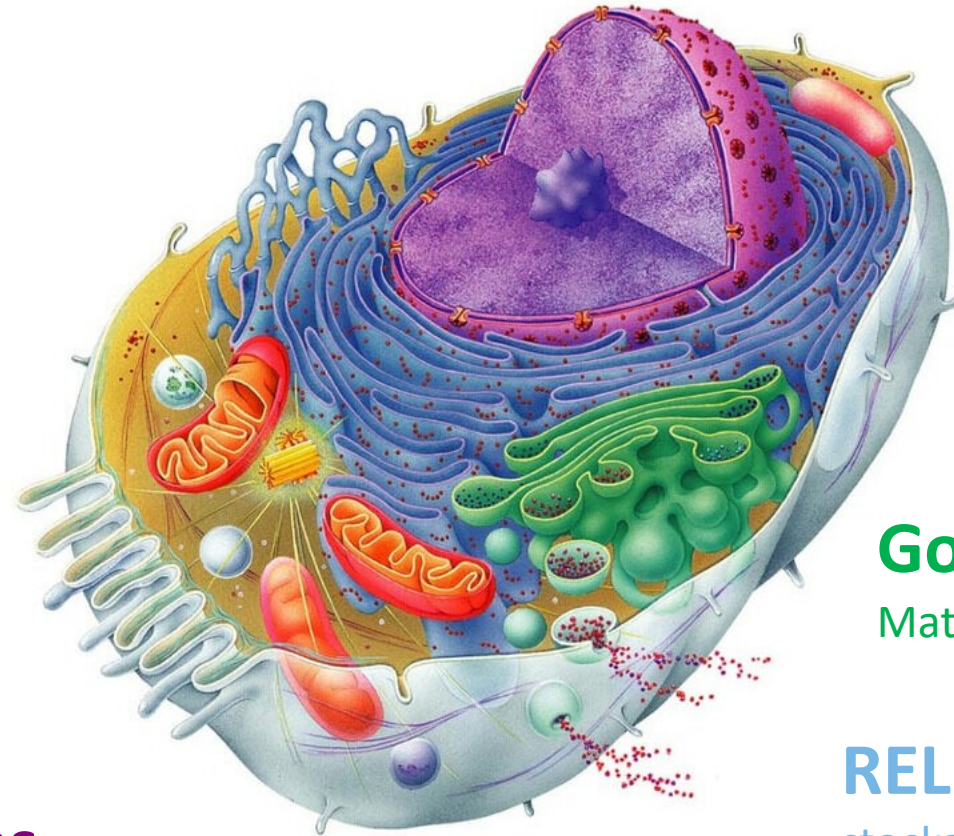
Apoptose- métabolisme
énergétique

RER :

ARNm- biosynthèse
protéique

Vésicules

Transport- excrétion-
communication



Cytosquelette

Structure – motricité-
dynamique

Membrane

Transport-
communication

Golgi

Maturation protéique

REL

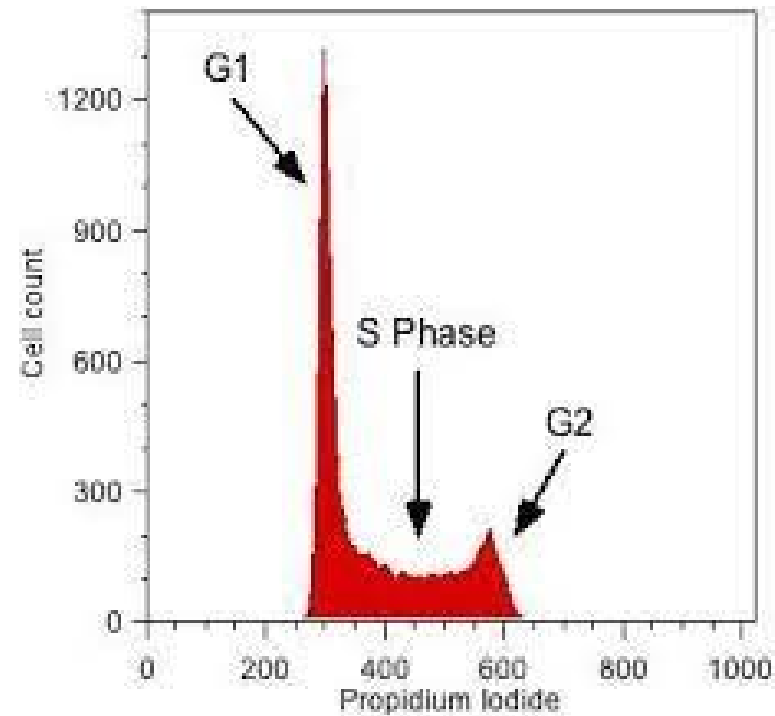
stockage Calcium

Analyse du cycle cellulaire

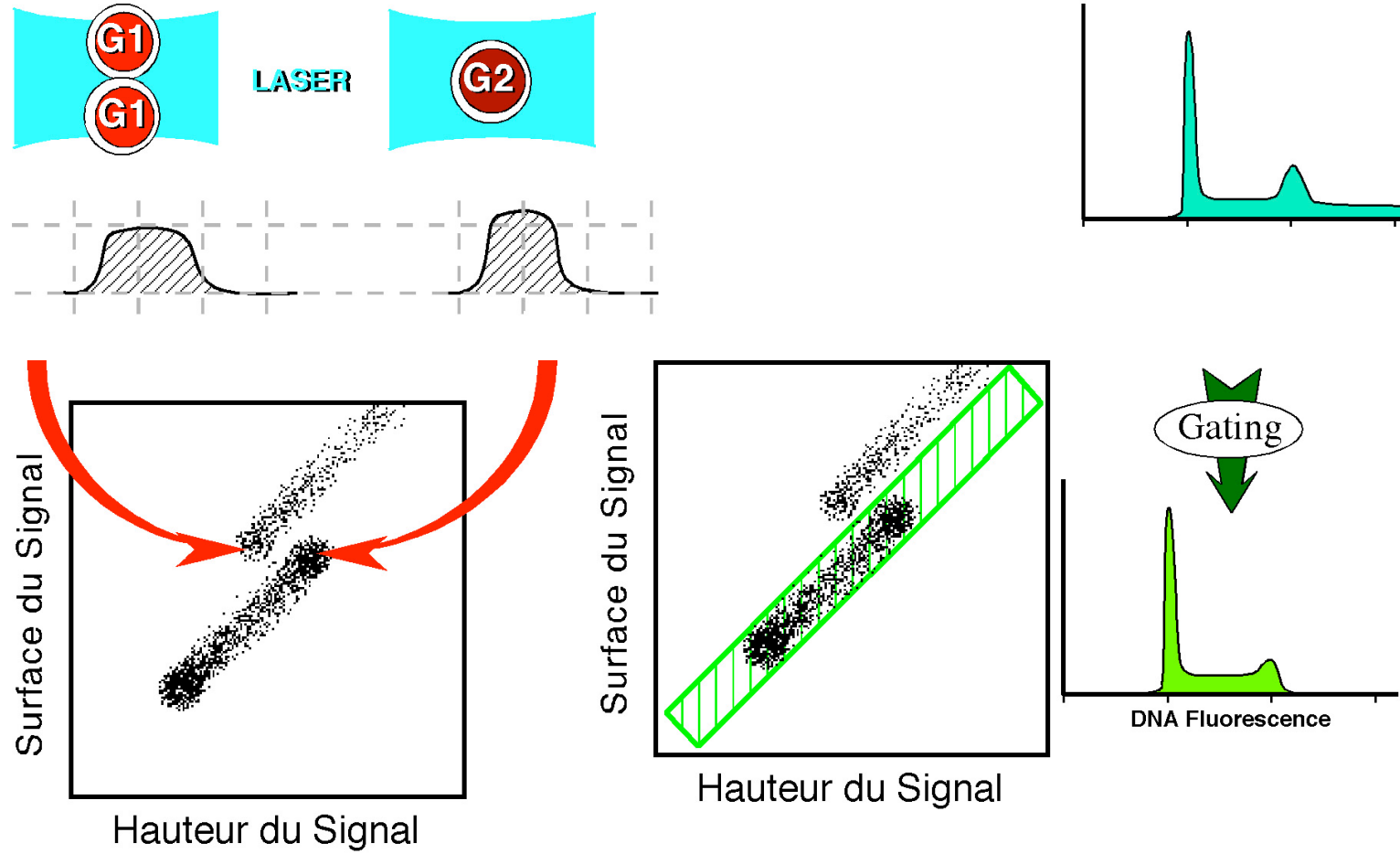
Élimination des doublets

La concentration

Préparation des échantillons



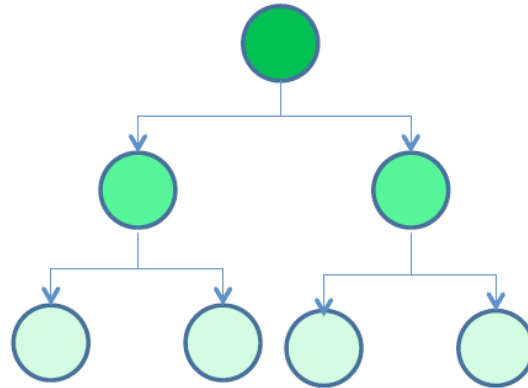
Élimination des doublets



Prolifération cellulaire

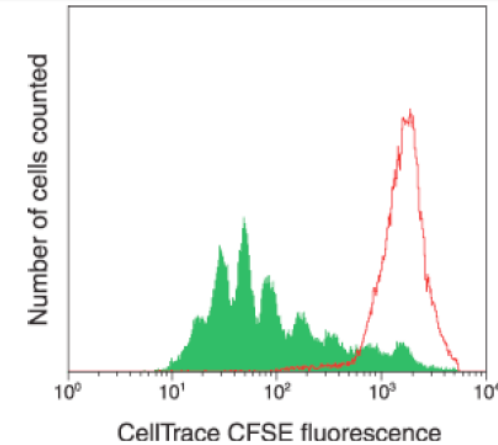
CFSE: CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester

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

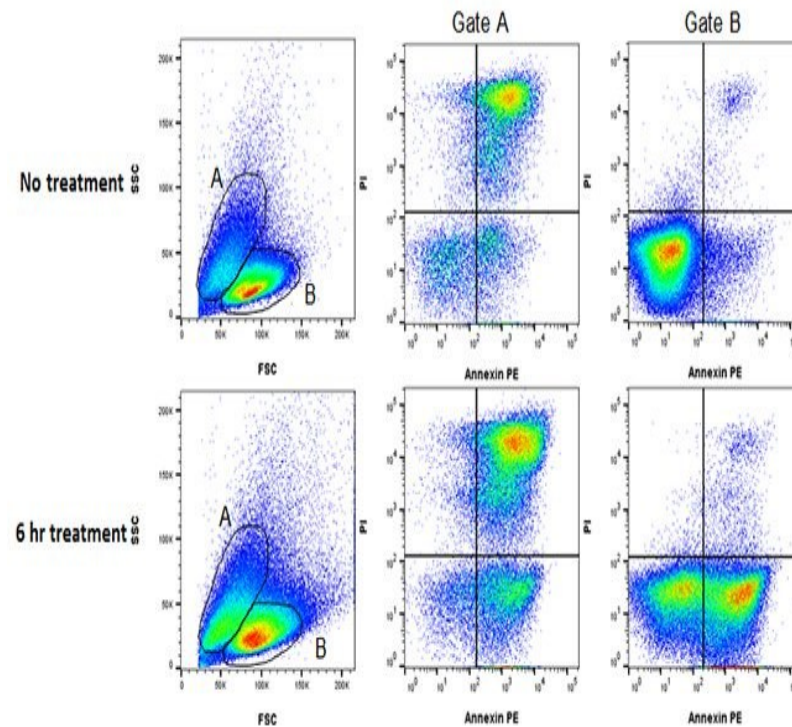
Couplage aux amines des protéines intracellulaires

Peu cytotoxique

Stable jusqu'à 8 semaines

Répartition égale entre les cellules filles

Apoptosis



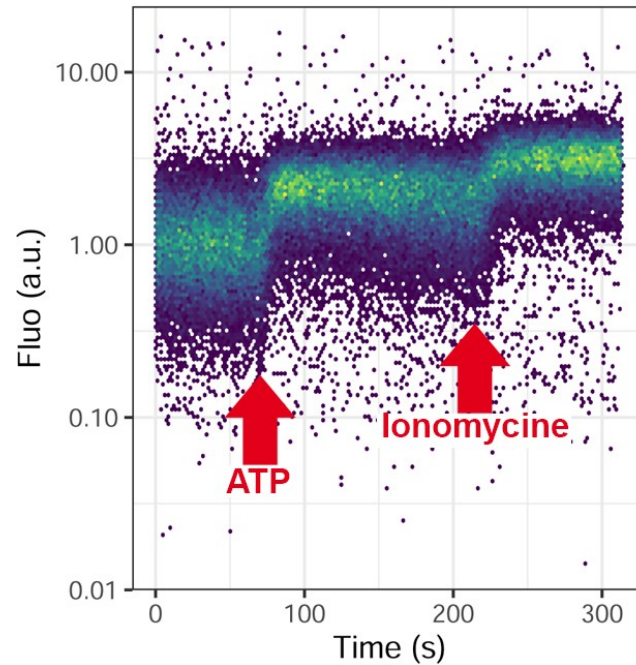
- **Avantages**

- Largement utilisé
- Permet un phénotypage supplémentaire
- Phénomène rapide et universel d'apoptose

- **Désavantages**

- Faux positifs (vésiculation)
- Travail sur cellules fraîches
- Difficile de travailler avec des cellules adhérentes

Calcium influx



Fluo-3 Sonde fluorescente sensible au Ca^{+2} . Son intensité d'émission varie avec la concentration en Ca^{+2} .

Cytokines solubles

PRINCIPLE OF THE ASSAY

