

Université de Bourgogne

Modules et réglage d'un cytomètre en flux Seuils, voltages, PMT, compensations, billes, notion de triage cellulaire, suivi de la machine....

Gérard LIZARD

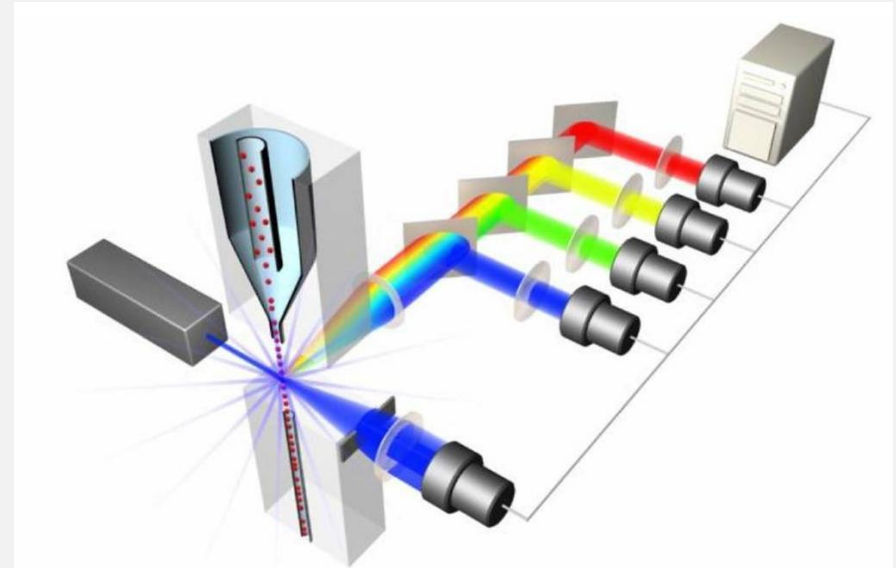
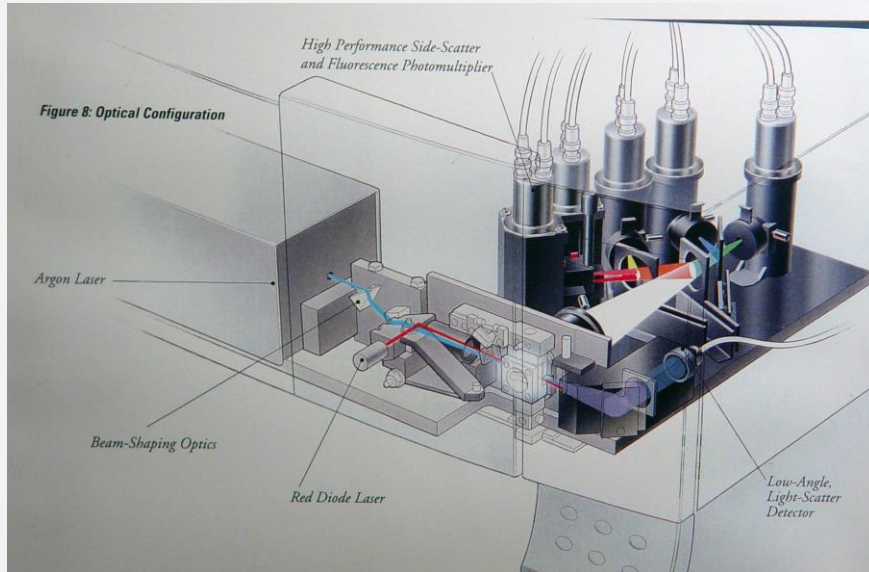
Université de Bourgogne / Laboratoire Bio-peroxIL (EA 7270) / Inserm, Dijon, France

Objectifs Pédagogiques

A la fin de la conférence, les étudiants seront en mesure :

- de citer les composants des cytomètres en flux,
- de résumer le principe de la focalisation hydrodynamique et du fonctionnement des trieurs de cellules utilisant la formation de gouttelettes,
- de comparer les procédés d'illumination des cellules en considérant leurs avantages et leurs inconvénients,
- de définir les éléments du banc optique et les détecteurs des cytomètres de flux,
- de décrire les différentes lumières analysées par les cytomètres de flux,
- de donner des exemples des différents histogrammes obtenus par cytométrie de flux,
- de rappeler les propriétés d'un fluorochrome,
- d'identifier les réglages réalisés sur le cytomètre de flux (compensation de fluorescence),
- d'avoir des notions de tri-cellulaire,
- de pouvoir définir ce qu'est un cytomètre et ce qu'il permet de mesurer (paramètres pris en compte).

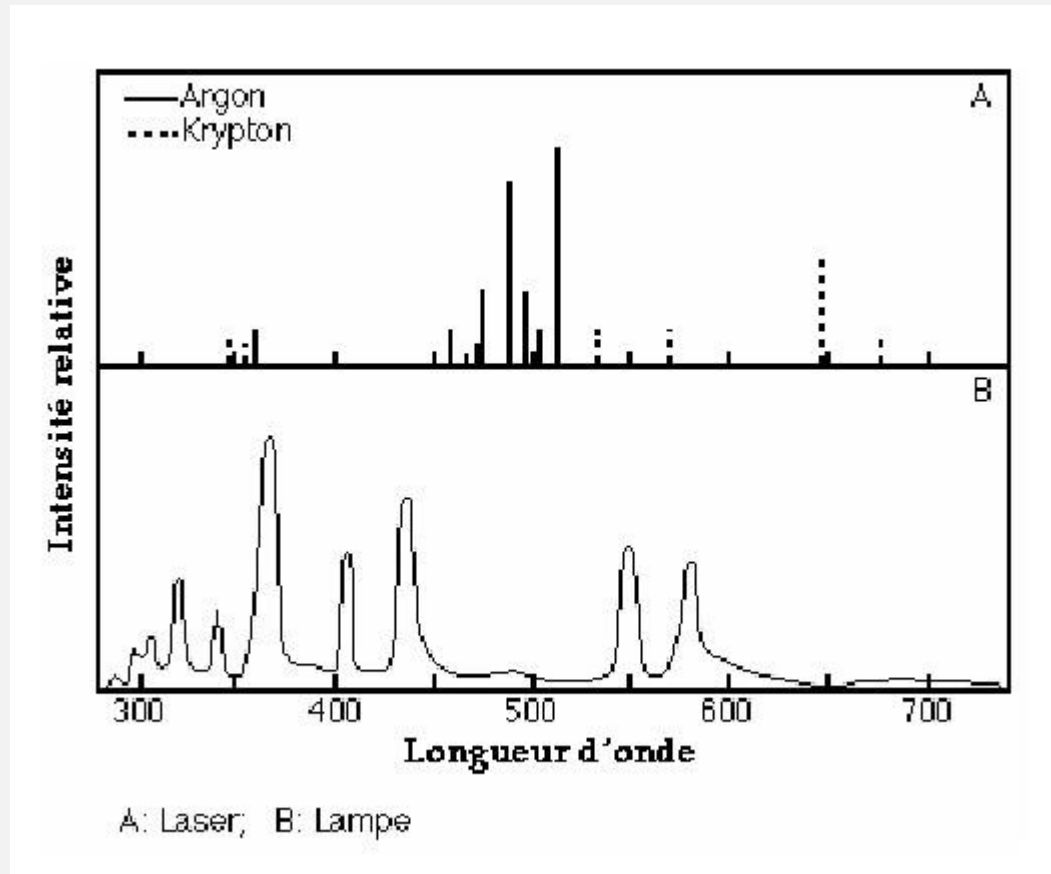
Modules Composant les Cytomètres en Flux



- ✓ **Module d'excitation lumineuse**
- ✓ **Module de présentation de l'échantillon à la source lumineuse**
- ✓ **Module de réception des signaux**
- ✓ **Module analytique de traitement des signaux et de stockage des données**
- ✓ **Module d'analyse des données et de présentation des résultats**

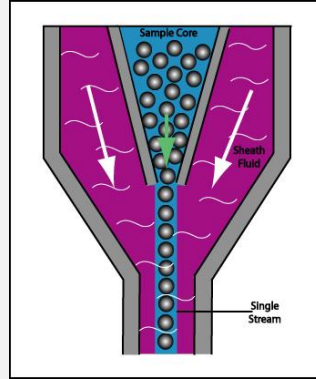
Module d'Excitation Lumineuse

A - Lasers (gaz: Argon, Krypton; solides): lumière monochromatique, faible section de faisceau, puissance focalisée, stabilité.



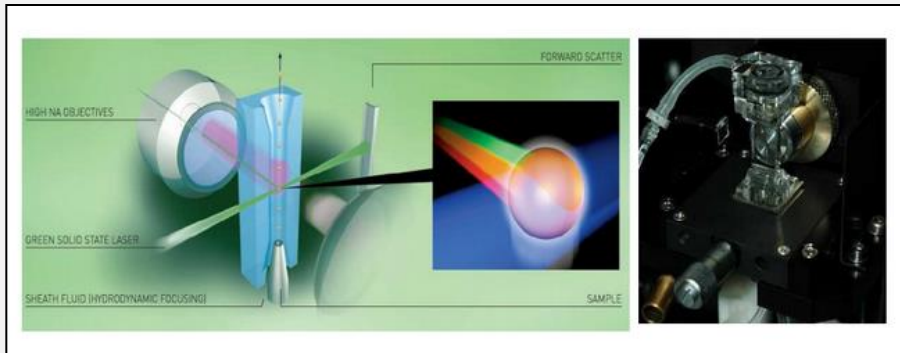
B - Lampes (Xenon, mercure): moins bonne focalisation, bande passante large, puissance instable.

Module de Présentation de l'Echantillon À la Source Lumineuse



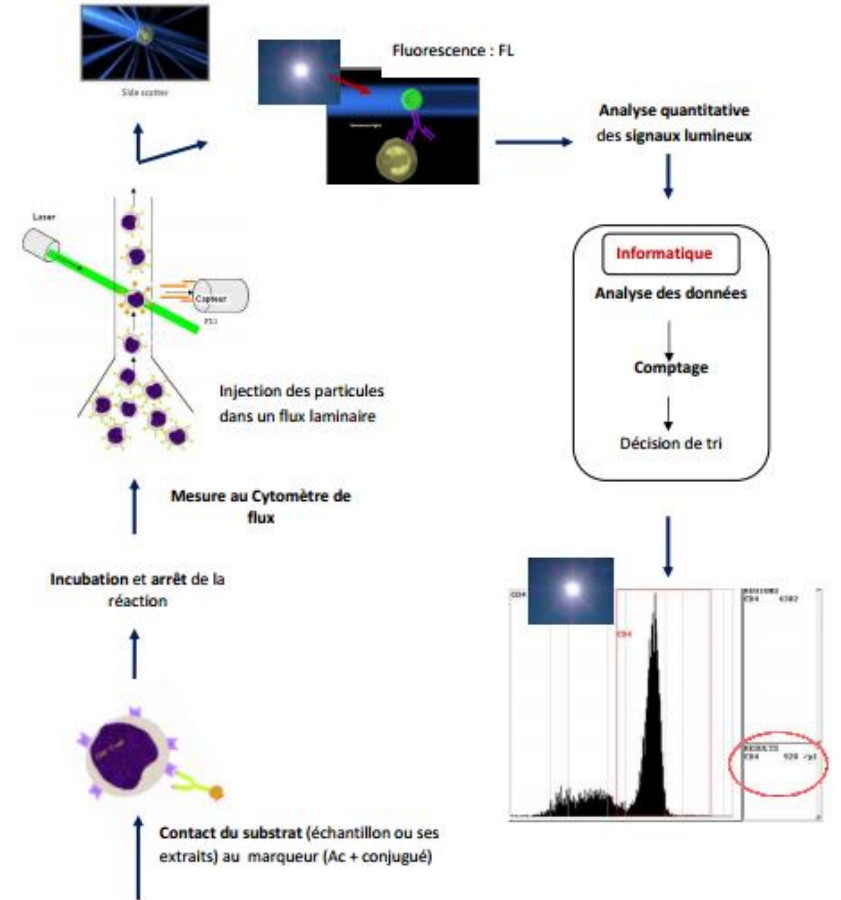
Focalisation hydrodynamique

Cellule d'écoulement avec jet de l'échantillon dans l'air; gouttelettes; risque biologique élevé



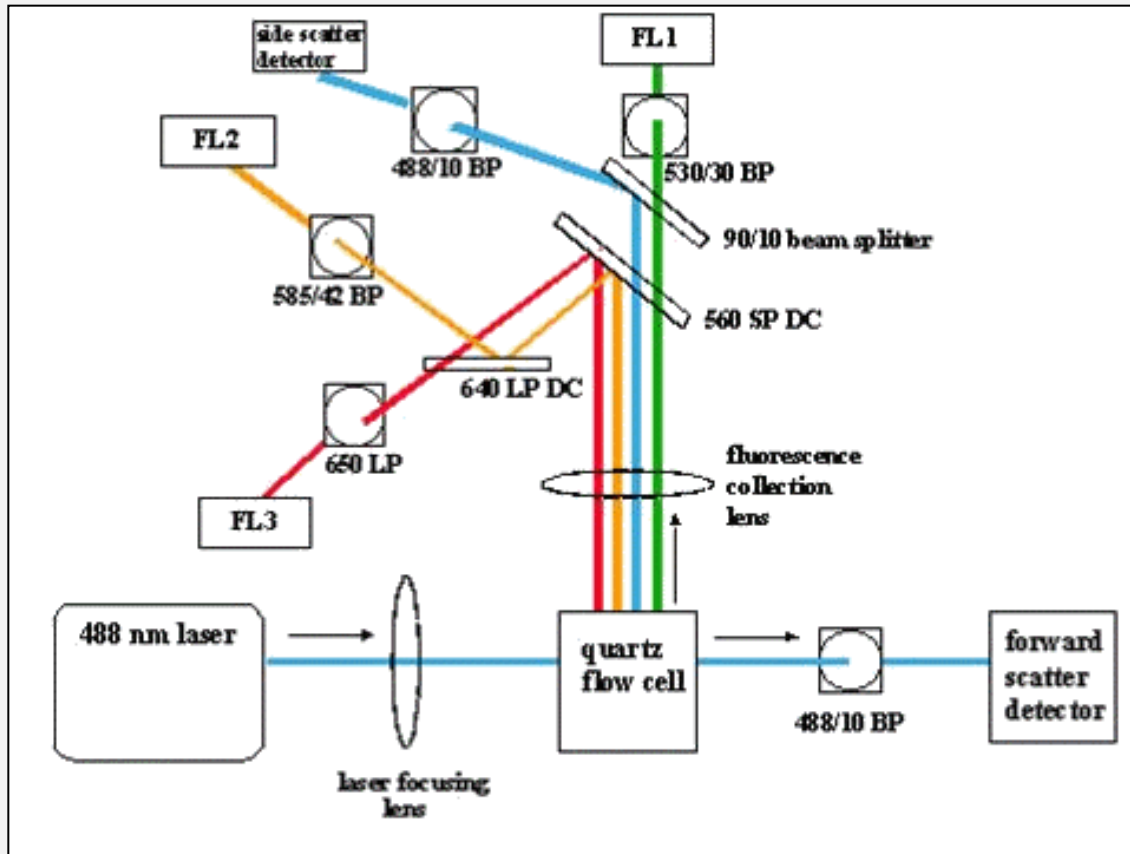
Cellule d'écoulement avec jet de l'échantillon à l'abri de l'air; risque biologique faible

Lumière diffractée: FSC et SSC

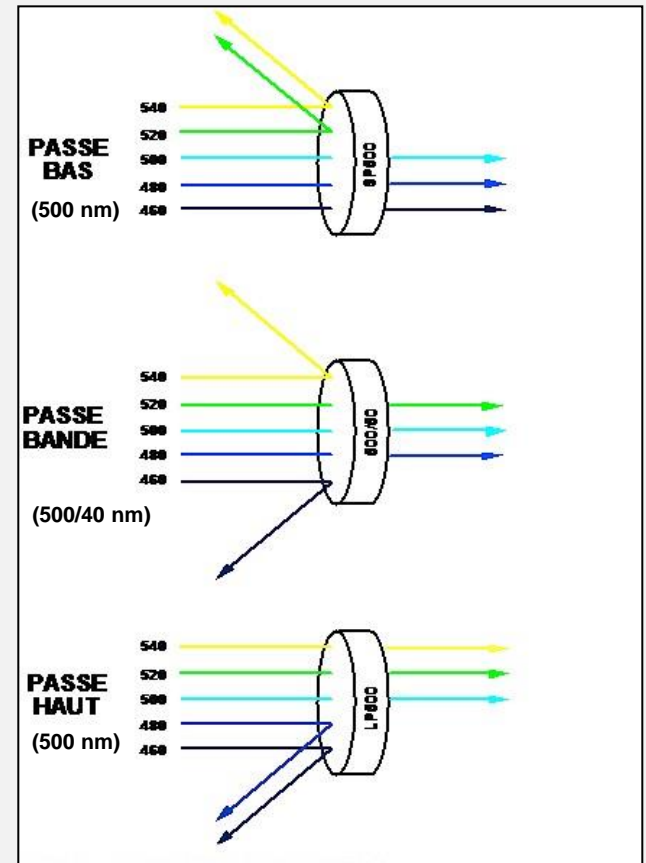


Echantillons : Sang total, Cytokine, Biopsies ou résections chirurgicales, Bactéries, Produits végétaux, Solutions...

Module de Réception des Signaux



Banc optique: avec alternance de filtres absorbants et dichroïques et beam splitter



Exemple de filtres absorbants

Module Analytique de Traitement des signaux et de Stockage des Données

photomultiplicateurs

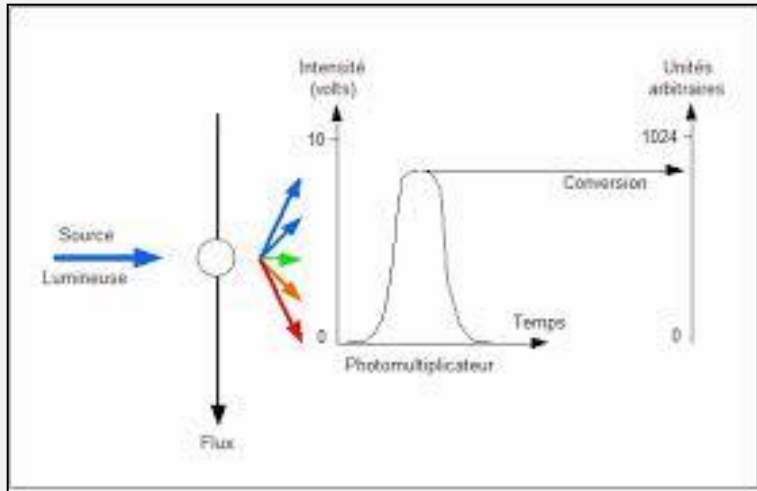
amplificateurs

Signal pic

A: area

H: high

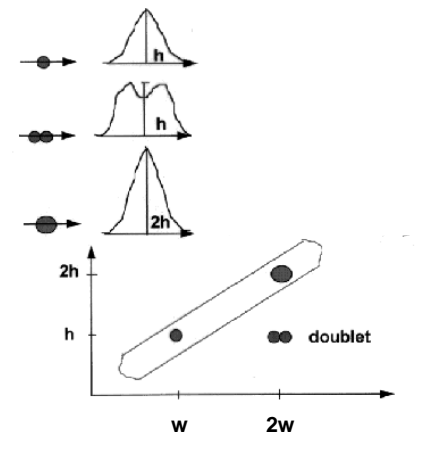
W: width



Convertiseur analogique numérique

Unités arbitraires

Système informatique



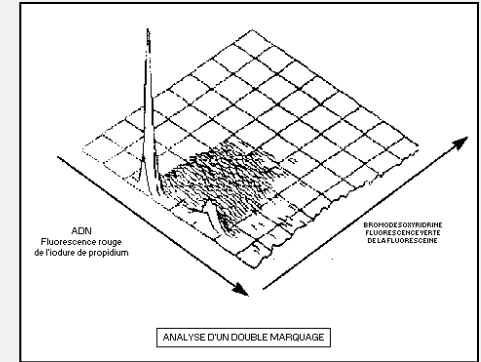
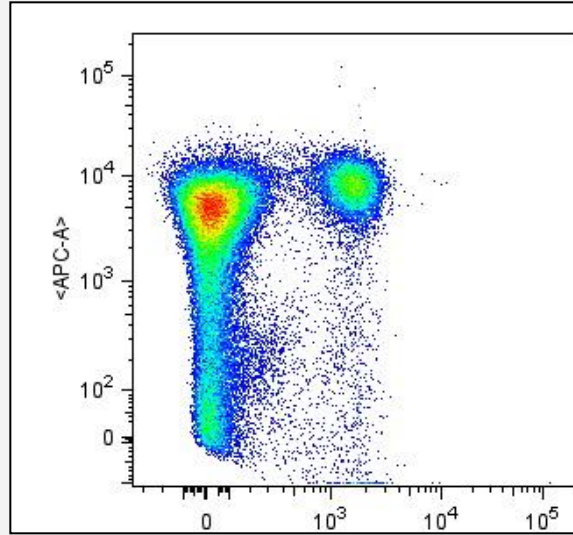
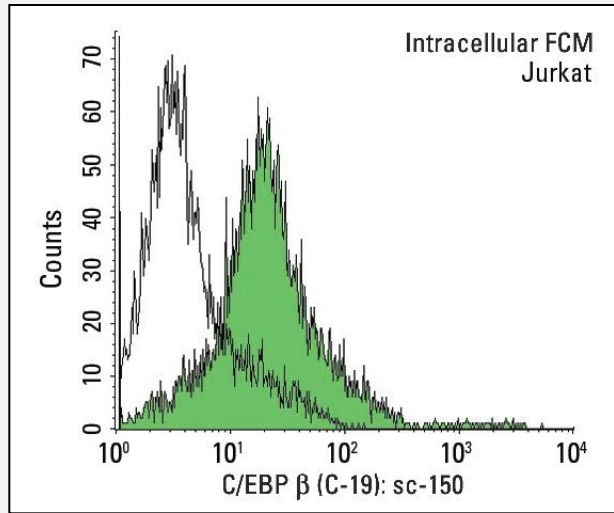
Elimination des agrégats

Représentations monoparamétriques

Représentations biparamétriques

Représentations Tridimensionnelles....

Module d'Analyse des Données et de Présentation des Résultats



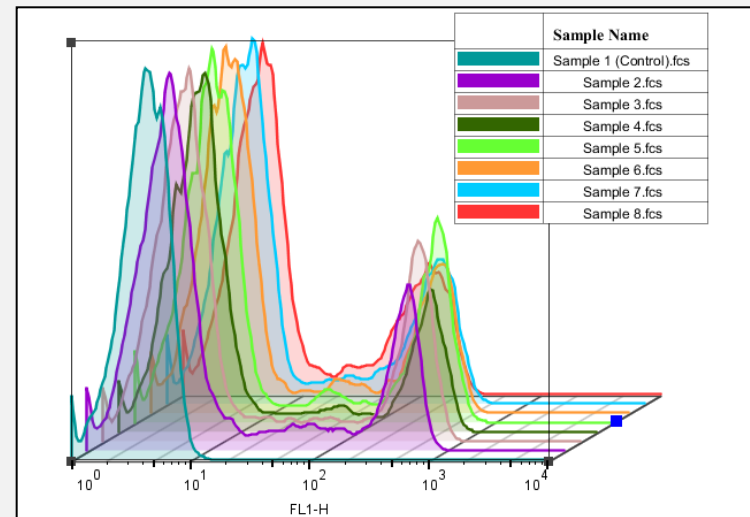
Valeurs:

Les populations cellulaires sont caractérisées en

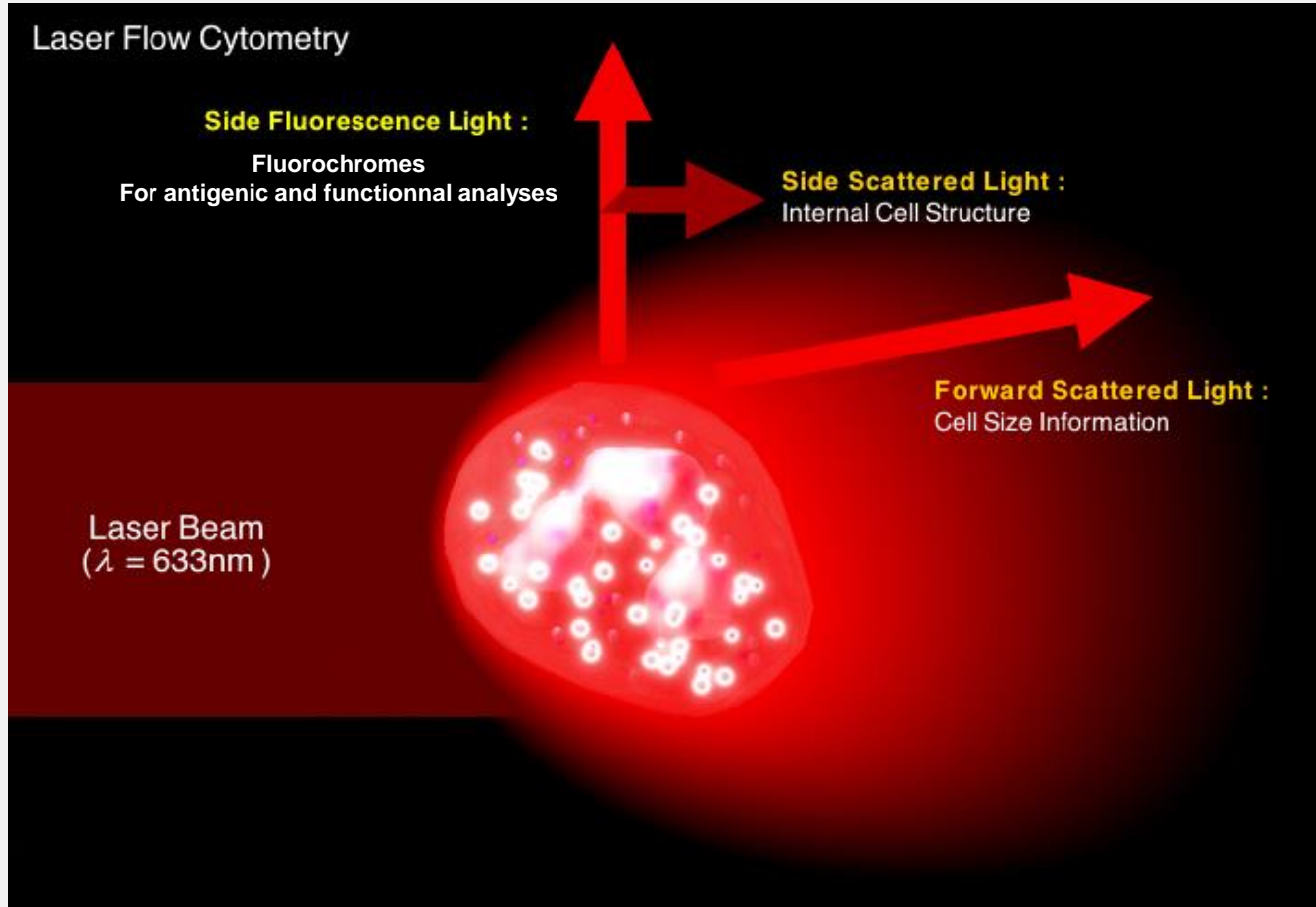
- Pourcentages

- Intensités moyennes de fluorescence
valeurs arbitraires pouvant être parfois converties
en valeurs absolues (**calibration; standard interne**):

- * nbre d'Ag par cellules
- * qté d'ADN par cellule



Différentes Lumières Analysées par les Cytomètres en Flux



Optimisation du Cytomètre en Flux et Calibrations

Utilisation de microbilles fluorescentes

° Réglage et optimisation du cytomètre en flux

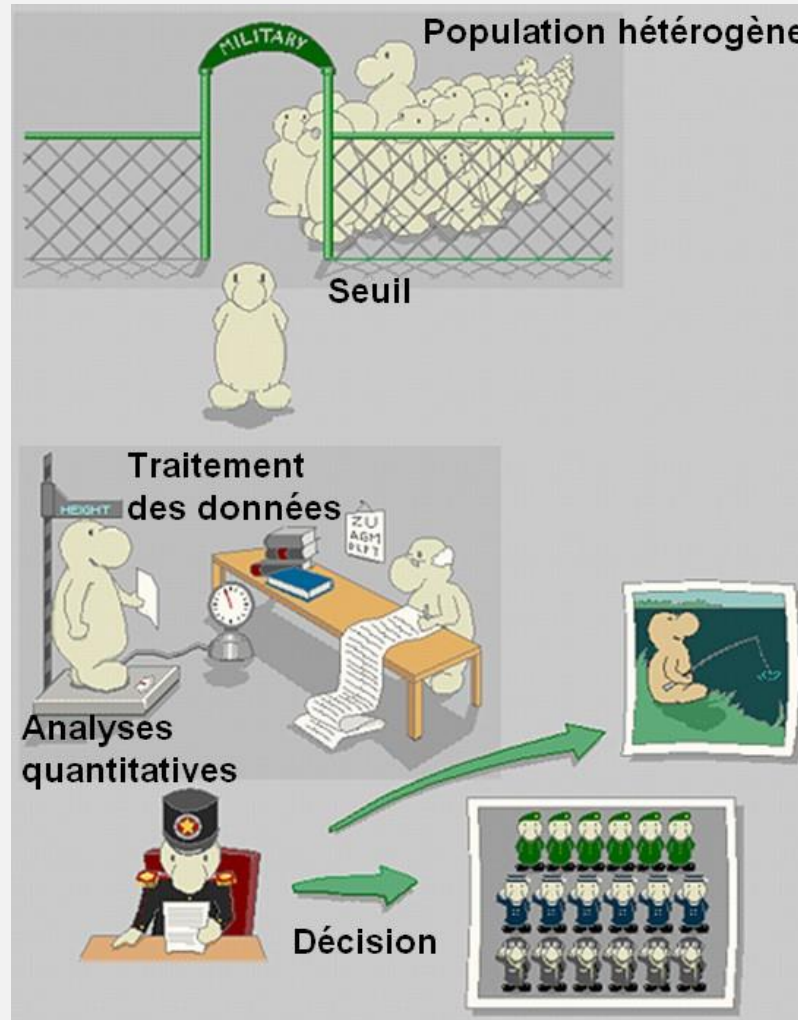


° Calibration en taille
et

° Calibration en fluorescence
(équivalent de molécules fluorescentes par microbilles)

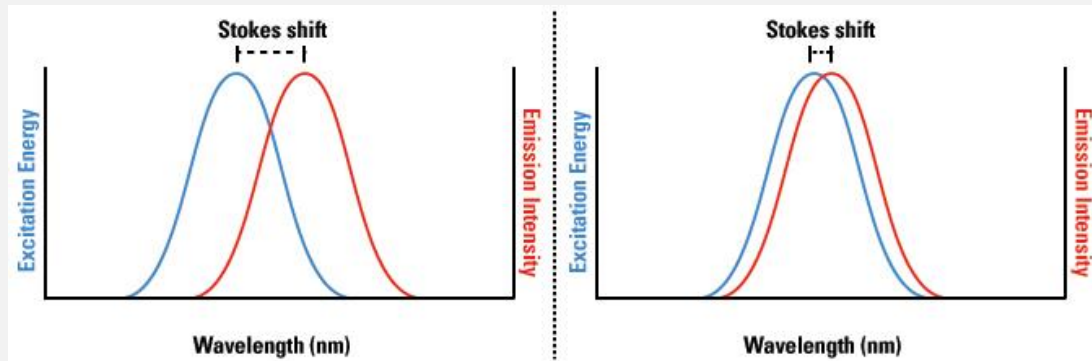


Notion de Seuil pour la Détection des Signaux (Threshold)



D'après Philippe PONCELET

Notion de Fluorochromes

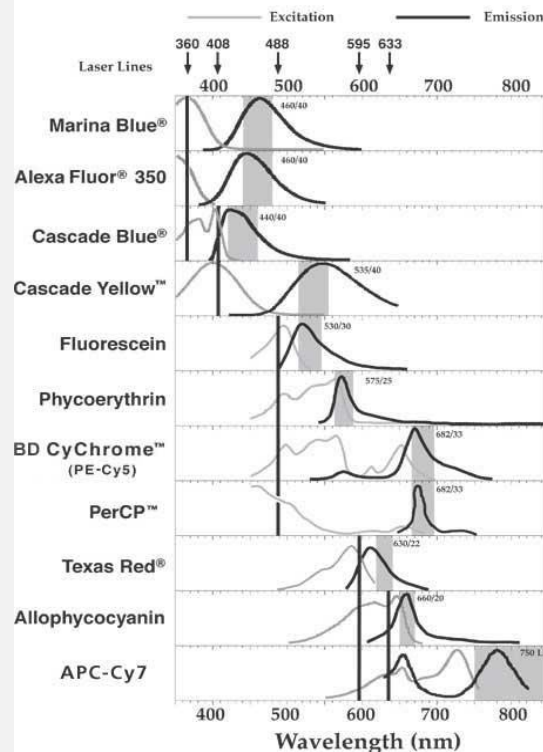


- Un bon fluorochrome doit avoir un 'Stokes shift' (écart de Stokes) assez élevé

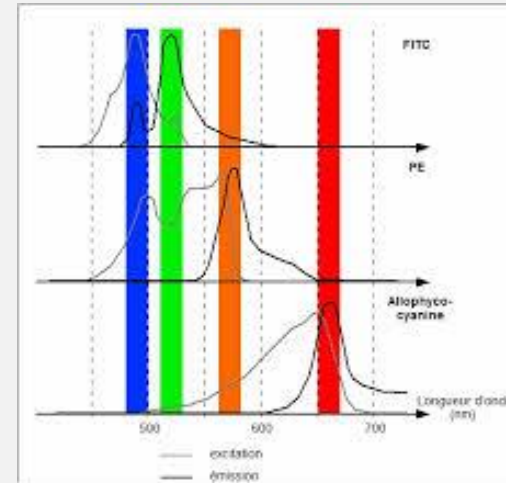
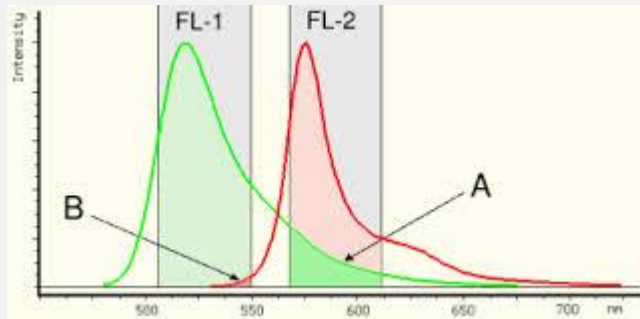
- Un fluorochrome peut présenter plusieurs pics d'excitation et d'émission (toutefois un seul λ_{ExMax} et un seul λ_{EmMax})

- Les caractéristiques des fluorochromes conditionnent leur utilisation simultanée

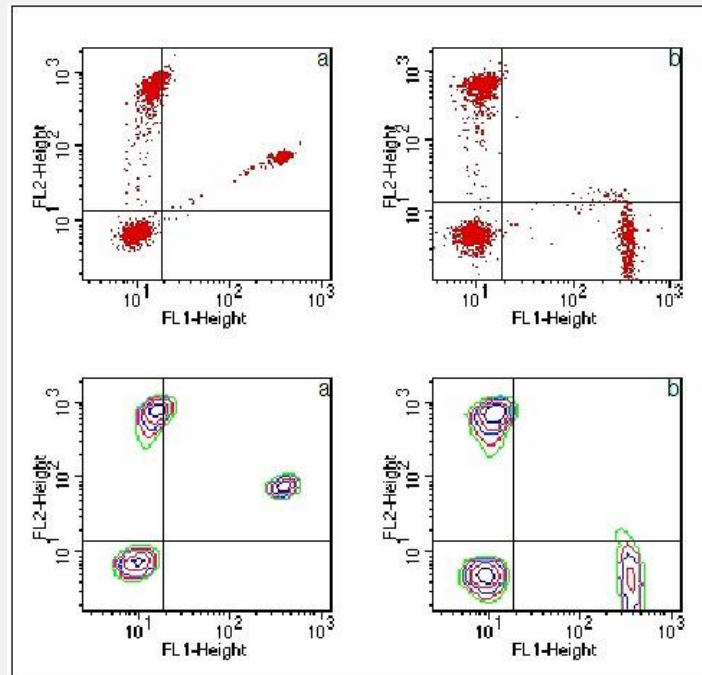
Fluorochrome Dyes Used in Flow Cytometry



Notion de Compensation de Fluorescence

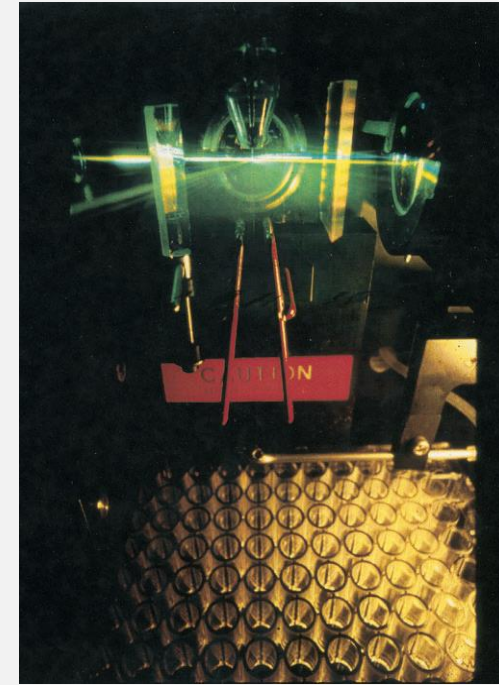
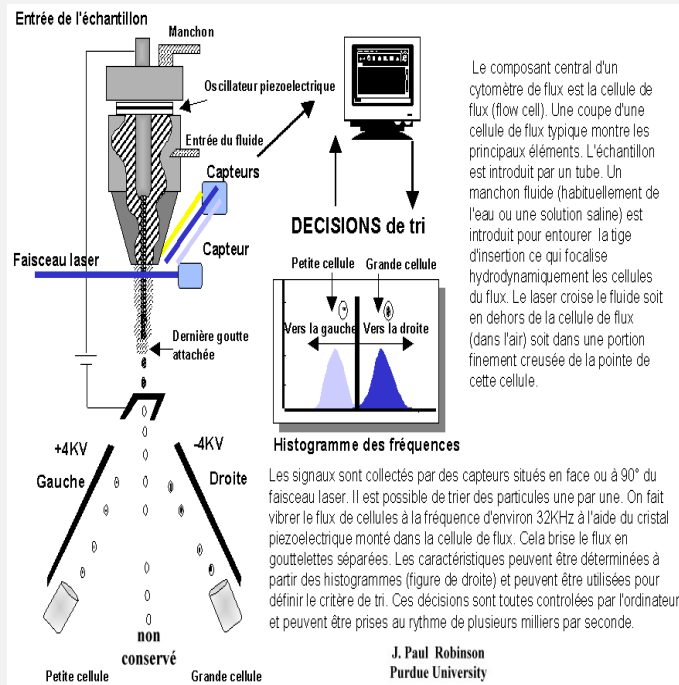


- La compensation de fluorescence s'impose quand les pics d'émission de fluorescence se chevauchent au niveau de la bande passante où est collectée la fluorescence
- La compensation de fluorescence est **une soustraction électronique** de signal indésirable.

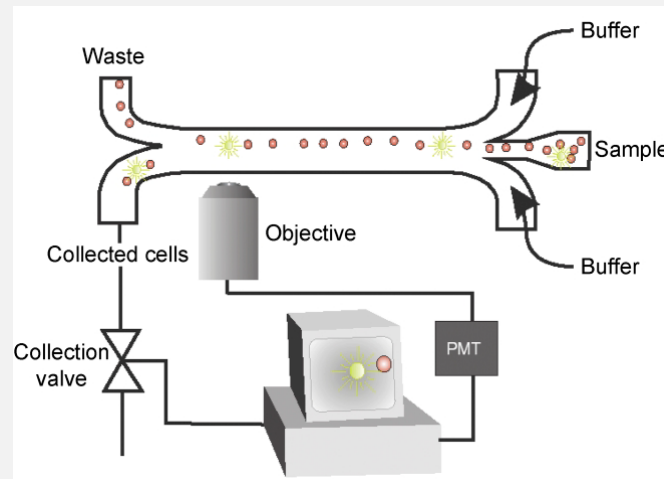


Notion de Triage Cellulaire par Cytométrie en Flux

**Tri en gouttelettes
haute vitesse:
Isolement d'évènements
rares (cellules souches)**



**Tri mécanique
faible vitesse: enrichissement**



Suivi du Cytomètre en Flux

- Optimisation quotidienne si possible (ou hebdomadaire)
- Qualibration de fluorescence (bon état de fonctionnement des PMT)
- Vérification des chemins optiques
- Changement de la tubulure régulièrement (adsorption de fluorochromes, relargage)
- Cycle de lavage de la machine à la fin de chaque journée
- Deux maintenances annuelles si possible.