

# Cytométrie en flux

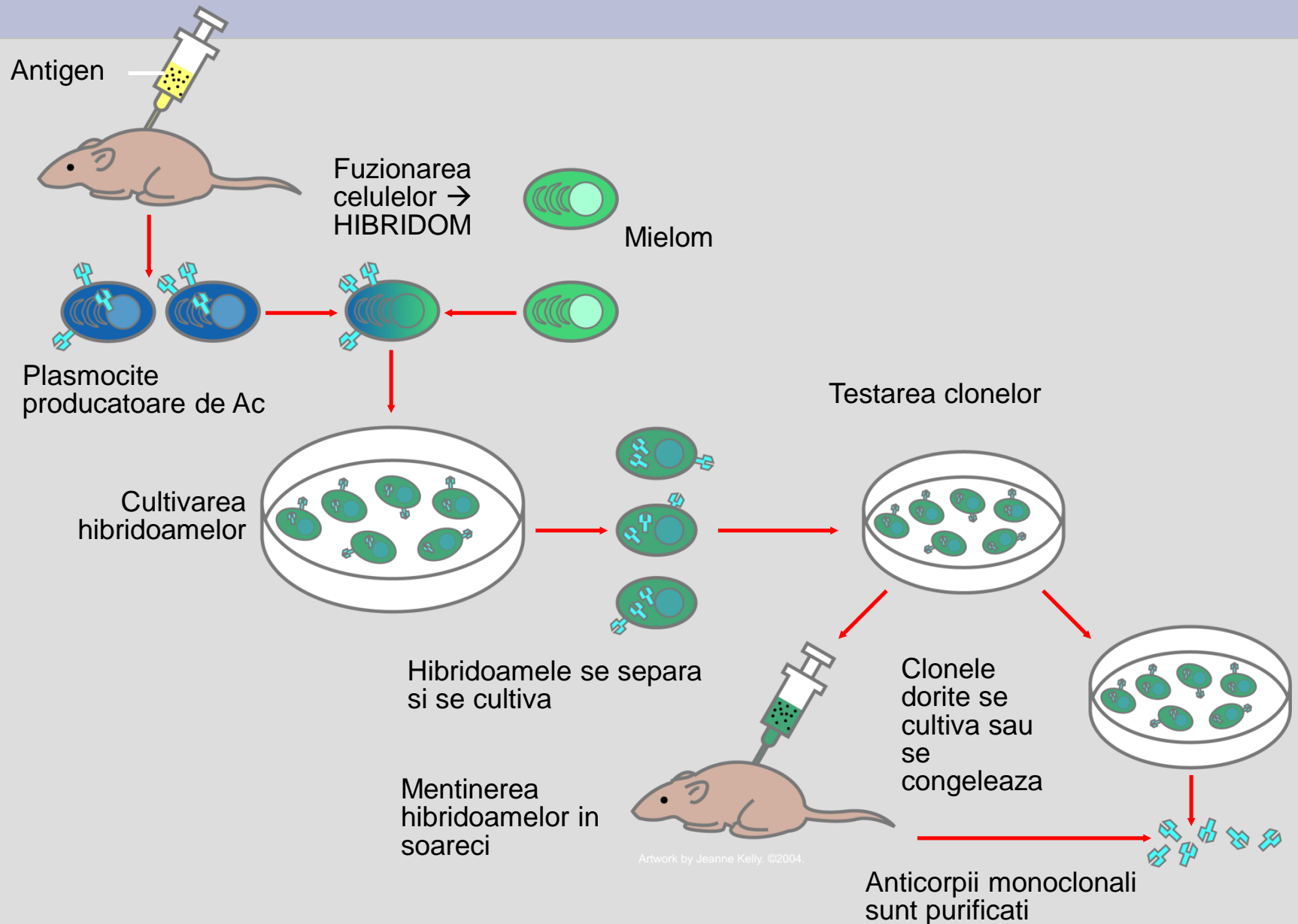
# Qu'est-ce que la citométrie en flux?

- **Méthode de mesure** des caractéristiques physiques et/ou biochimiques des particules (**cellules**, noyaux, organites cellulaires):
  - Taille
  - Granularité
  - Quantité d'ADN
  - Antigènes de surface
- **Méthode de tri cellulaire**

# Étapes

1. Préparation de la suspension cellulaire
  2. Marquage des cellules
- Acquisition de données
- Stockage des données
- Interprétation des données

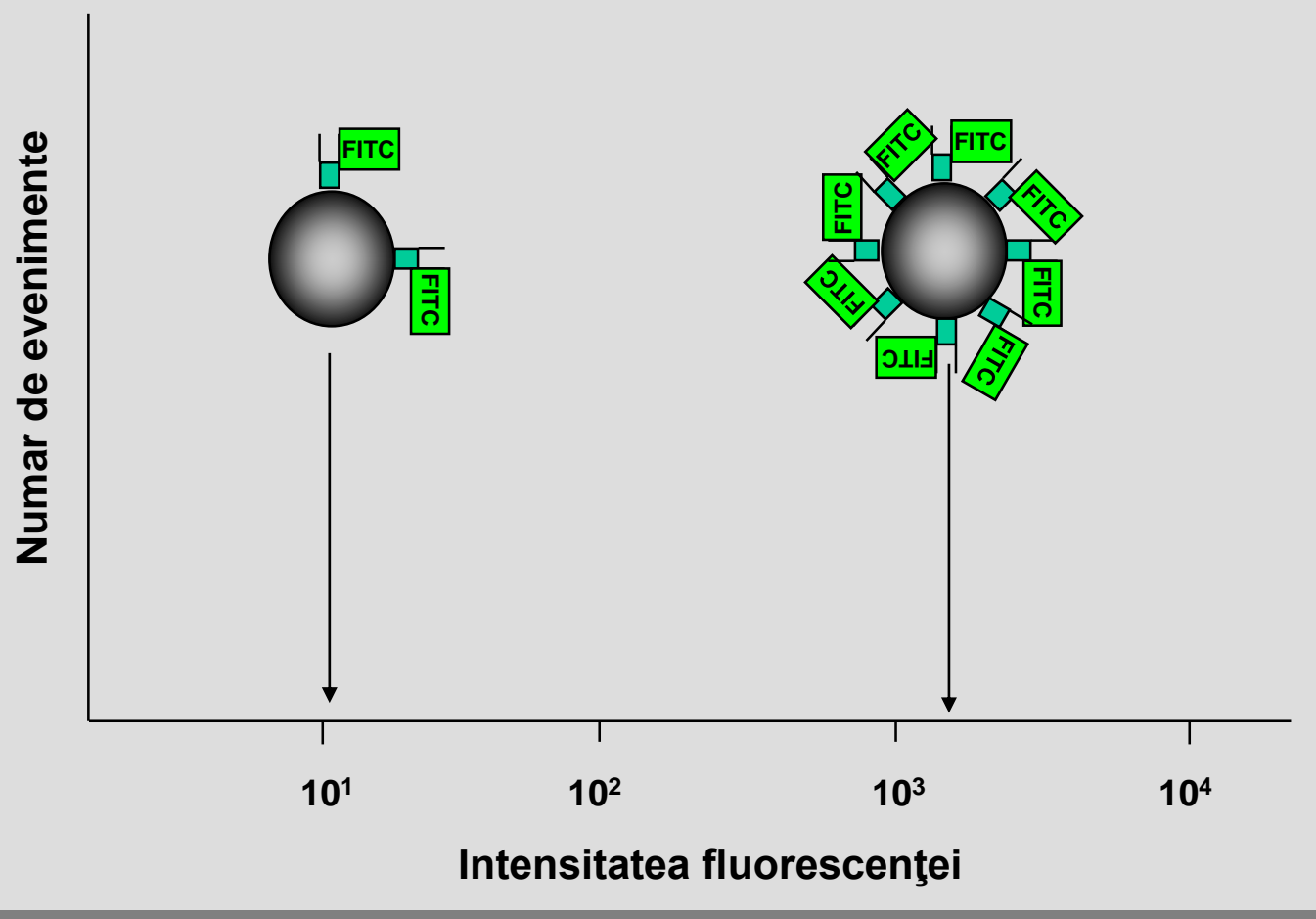
# Production d'anticorps monoclonaux



# Fluorochromes

- Les IgM sont conjuguées avec les fluorochromes  
Spectre d'absorption (excitation)  
Spectre d'émission
- Pour 2 paramètres – 2 IgM lié à 2 fluorochromes avec différents spectres d'émission:
  - Isothiocanate de fluorescéine – une molécule de fluorescéine (FITC)
  - Phycoérythrine - pigment rouge(PE)

# IMUNOFLOURESCENȚA



# Composants du cytomètre de flux

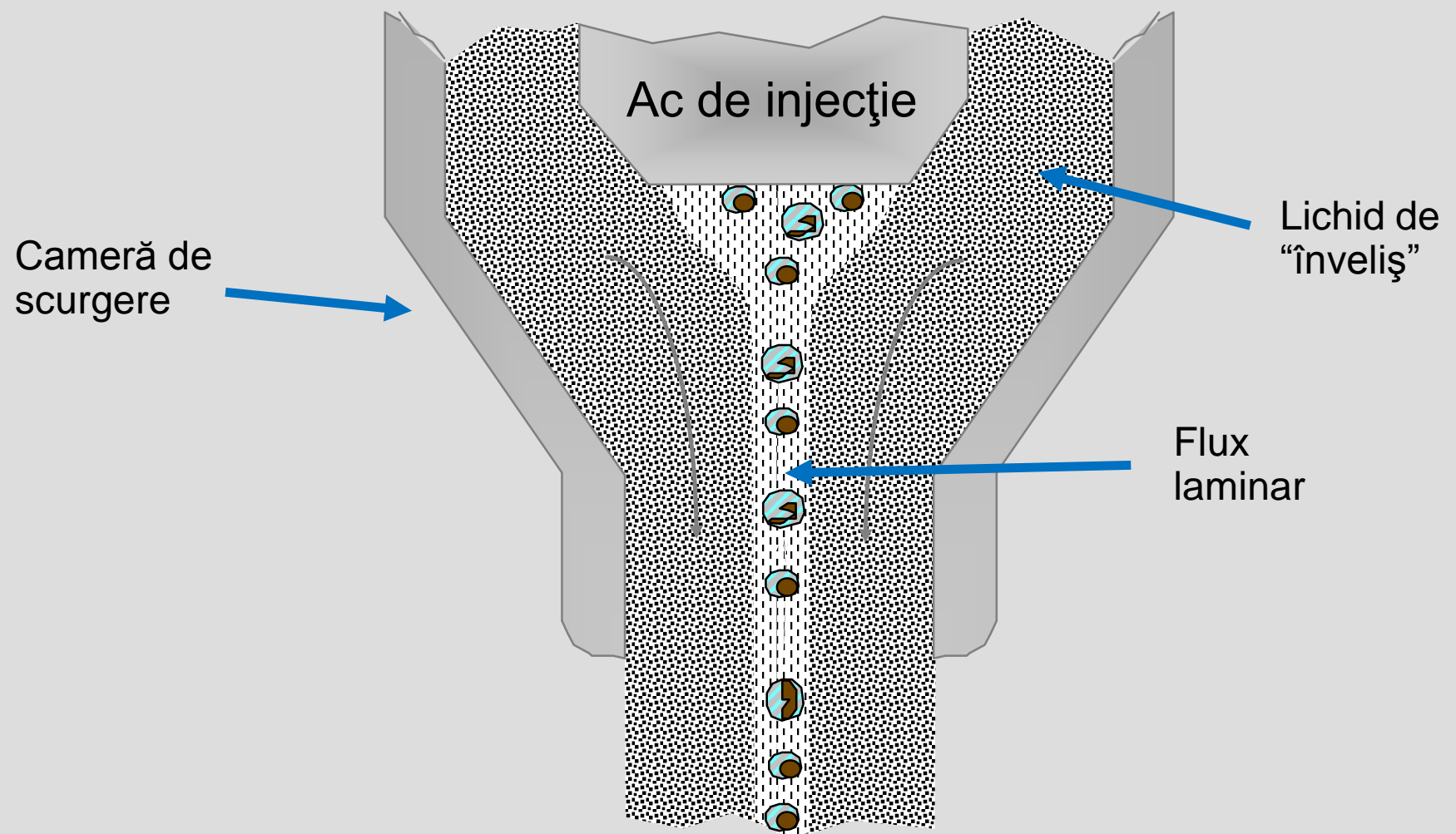
- Système fluide
- Système optique
- Système électronique

# Système fluide

- Cellules en suspension:
  - sang
  - liquide synovial
  - liquide céphalo-rachidien
  - ganglions lymphatiques
  - tumeurs solides
- Liquide “înveliș”
- Courant interne unicellulaire – “șir indian”
- Intersection avec un faisceau lumineux



# Système fluide

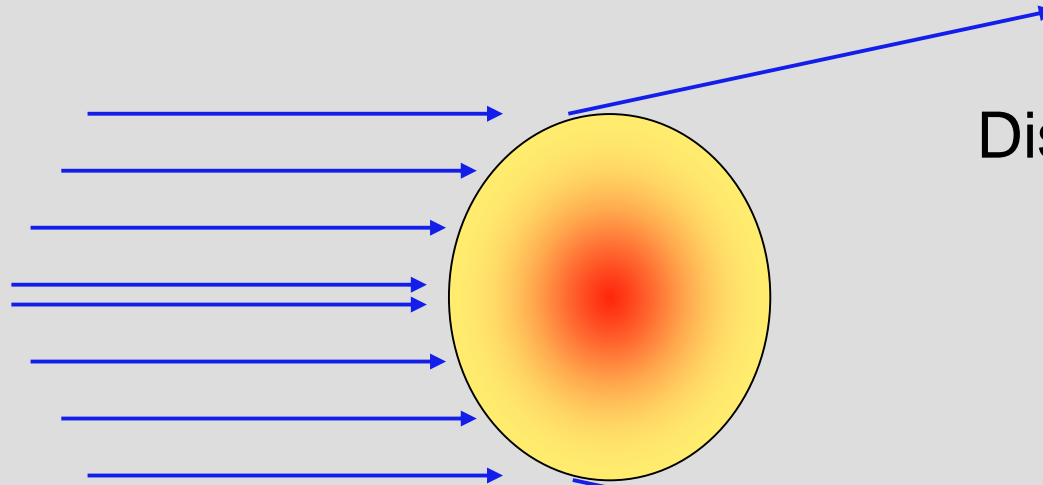


# Système d'excitation optique

- Source laser (Ar  $\lambda=488$  nm)
  - Faisceau lumineux  $\rightarrow$  Dispersion et stimulation du fluorochrome
- Dispersion de la lumière:
- $\alpha=0 \rightarrow$  Forward Scatter (FS)  $\rightarrow$  taille
  - $\alpha=90^\circ \rightarrow$  Side Scatter (SS)  $\rightarrow$  granularité
- Émission de lumière fluorescente:
    - $\sim$  quantité de fluorochrome  $\rightarrow$  Informations qualitatives et quantitatives
- Éléments optiques de focalisation (lentilles)

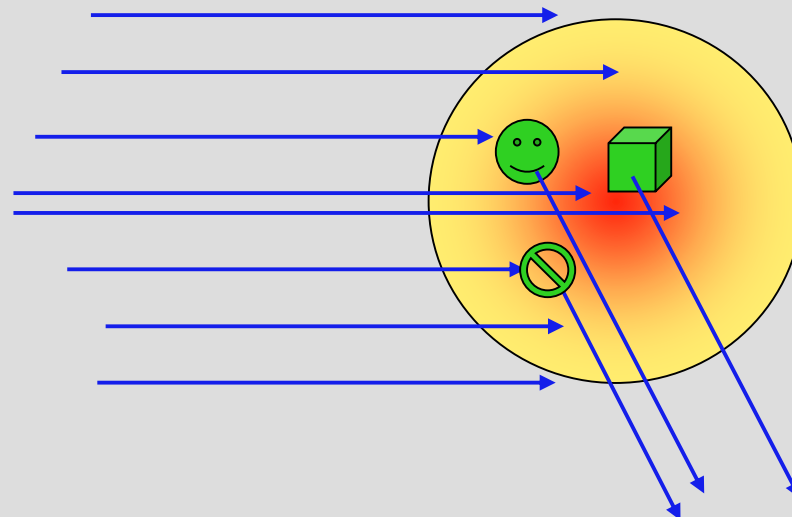
# FS ŞI SS

LASER



Dispersion vers l'avant

LASER

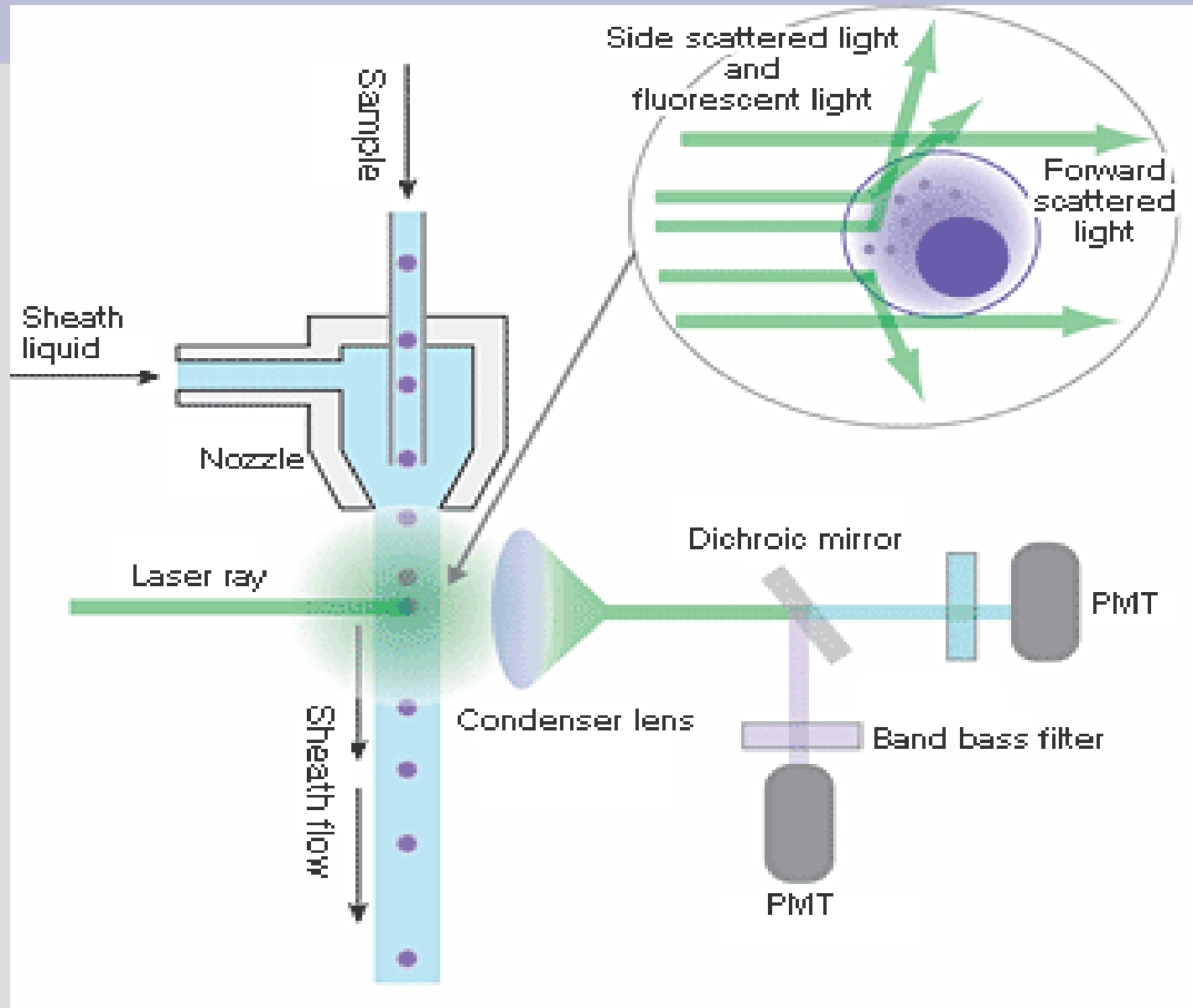


Dispersion latérale

# Systeme de collecte optique

- Conversion du signal optique → Signal électronique
- Détecteurs pour:
  - Lumière dispersée: avant, latérale
  - Émission de fluorescence
  - Filtres optiques

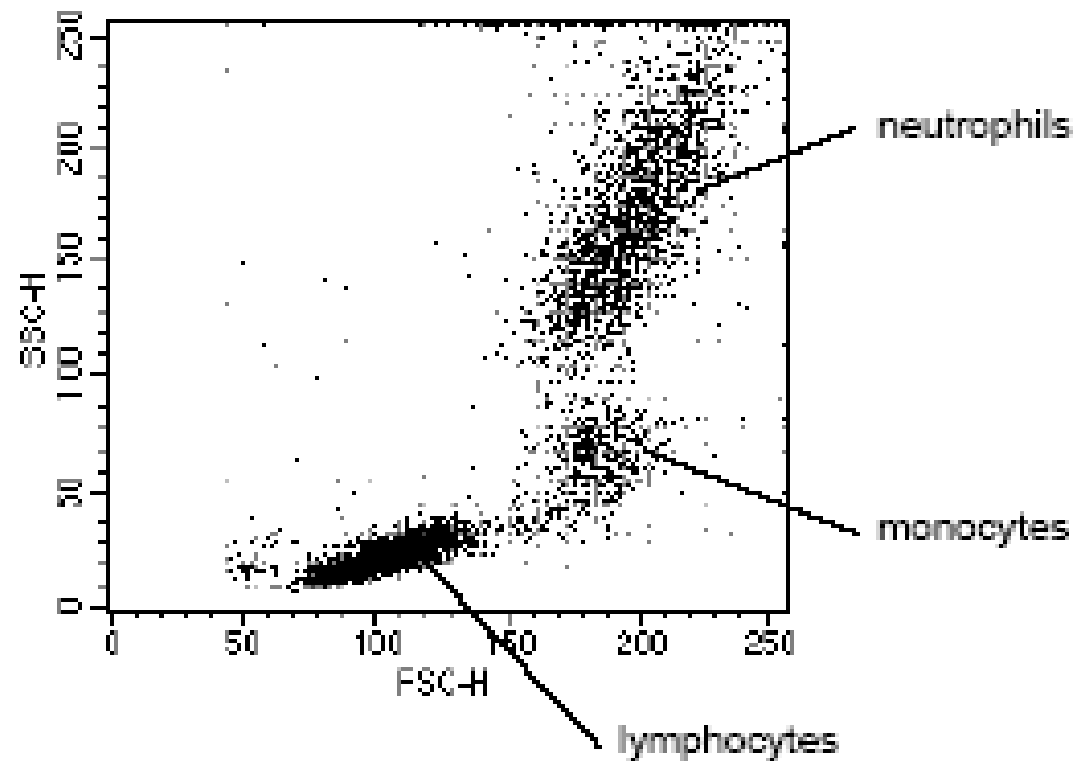
# Cytomètre de flux



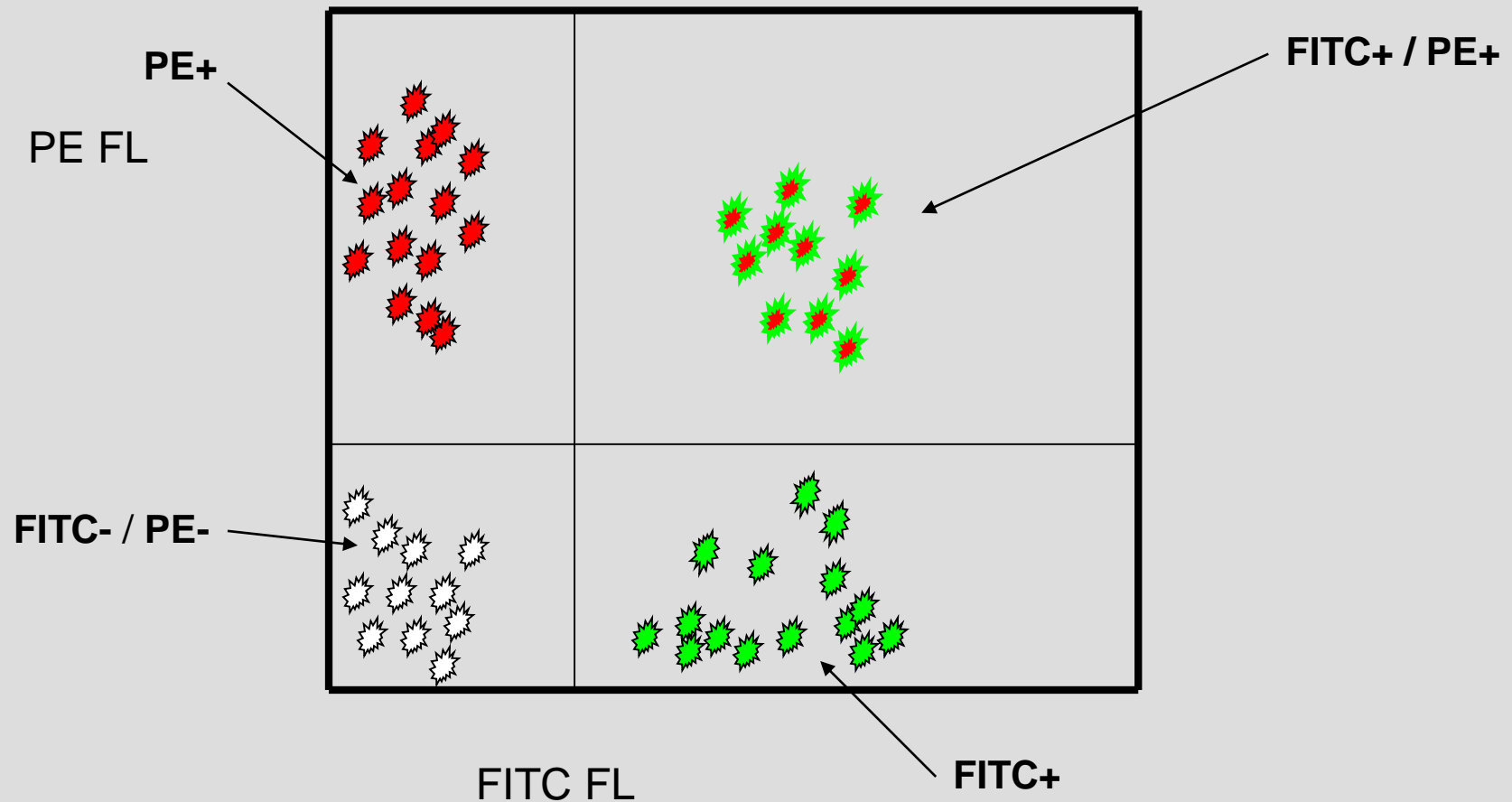
# Système électronique

- Réception des impulsions du détecteur  
Traitement du signal
- Présentation des résultats:
  - Histogrammes – 1 paramètre
  - Graphiques – 2 Paramètres: 1 point= 1 Particules (dot-plot)

# Cellules sanguines

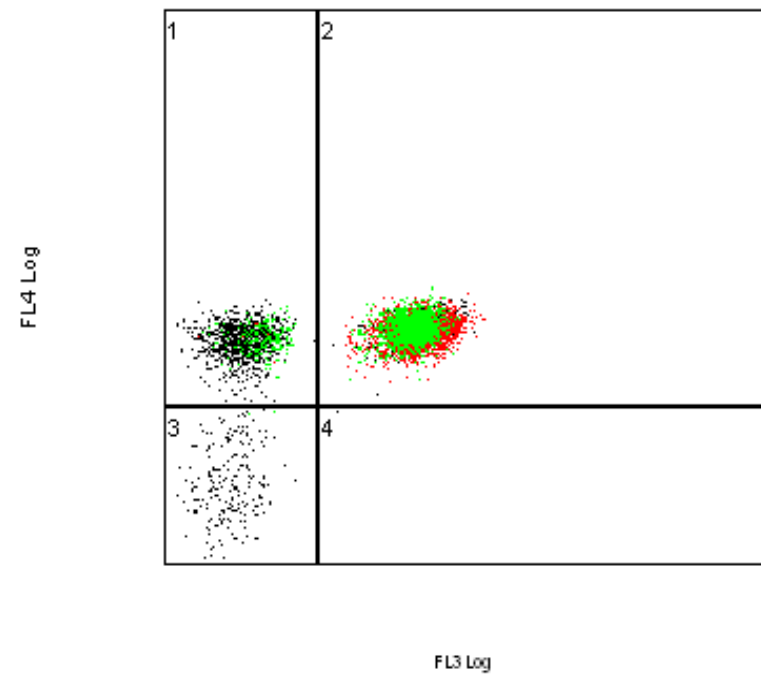
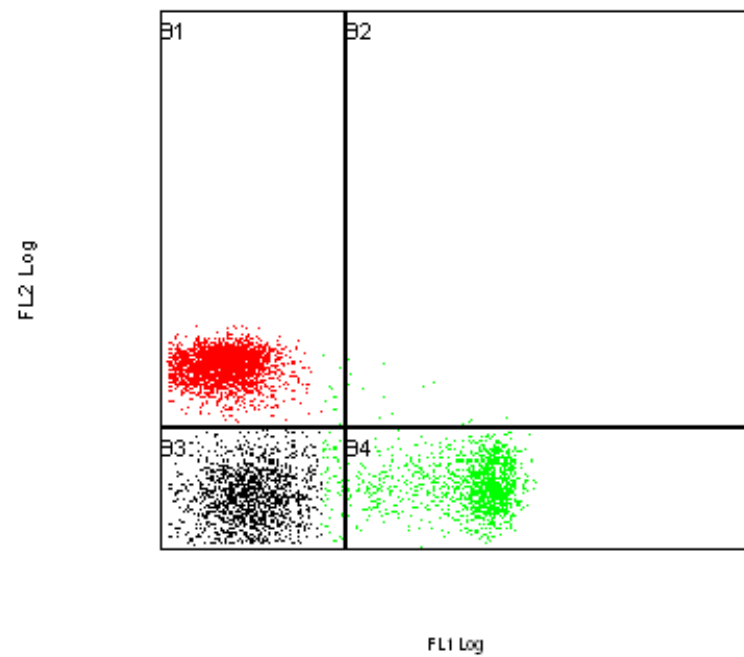


# Graphique DOT-PLOT pour FITC et PE





# FITC / PE



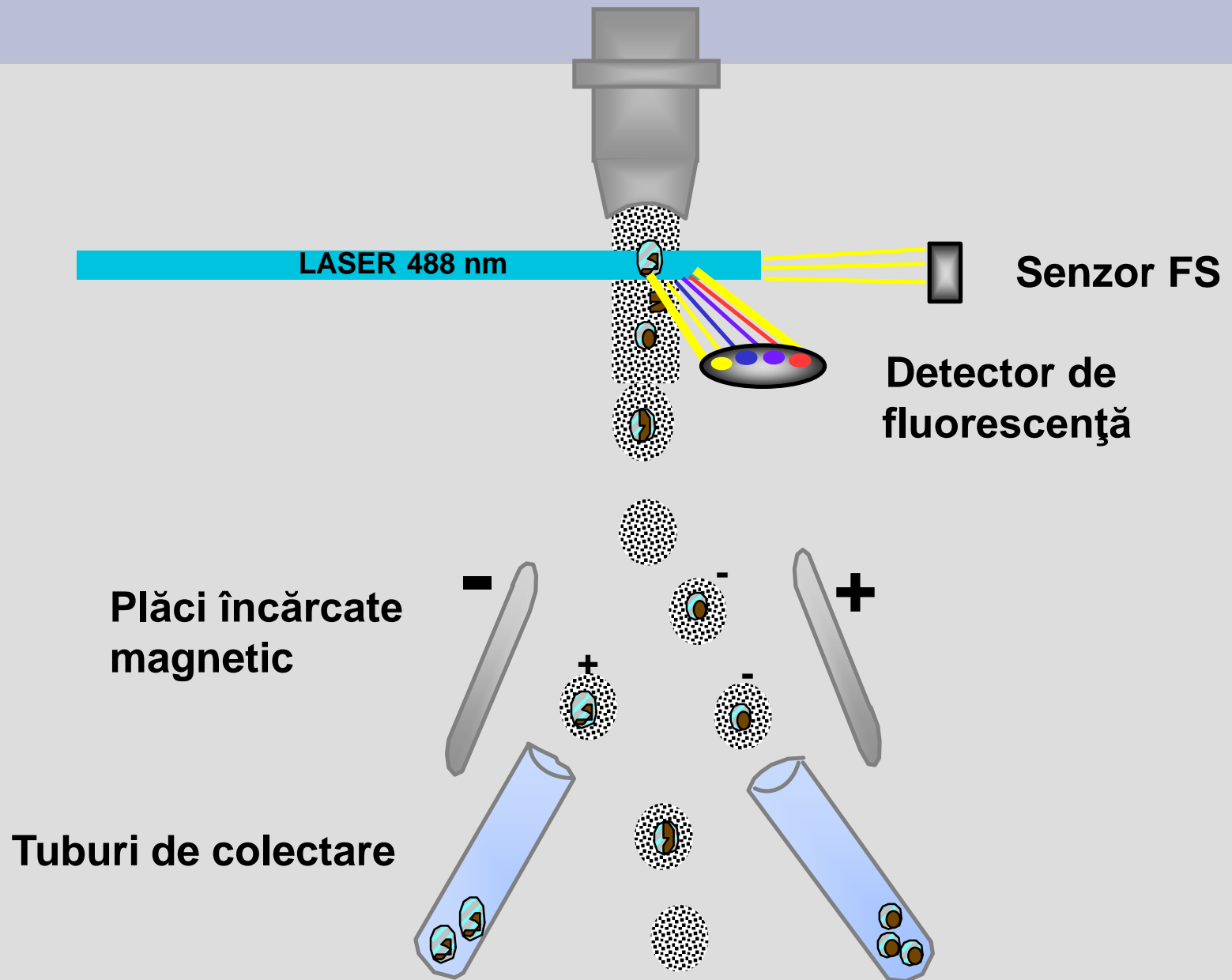
# Tri des cellules

- Séparation des (sub)populations cellulaires d'un mélange:
  - Taille
  - Granularité
  - Antigènes de surface

# Tri des cellules-étapes

1. Identification du critère  
Marquage avec IgM+fluorochromes
3. Identification des cellules – est-ce intérêt?
4. Charge avec positif/négatif/null  
Champ magnétique – dévié vers les tubes  
collecteurs
6. Centrifugation

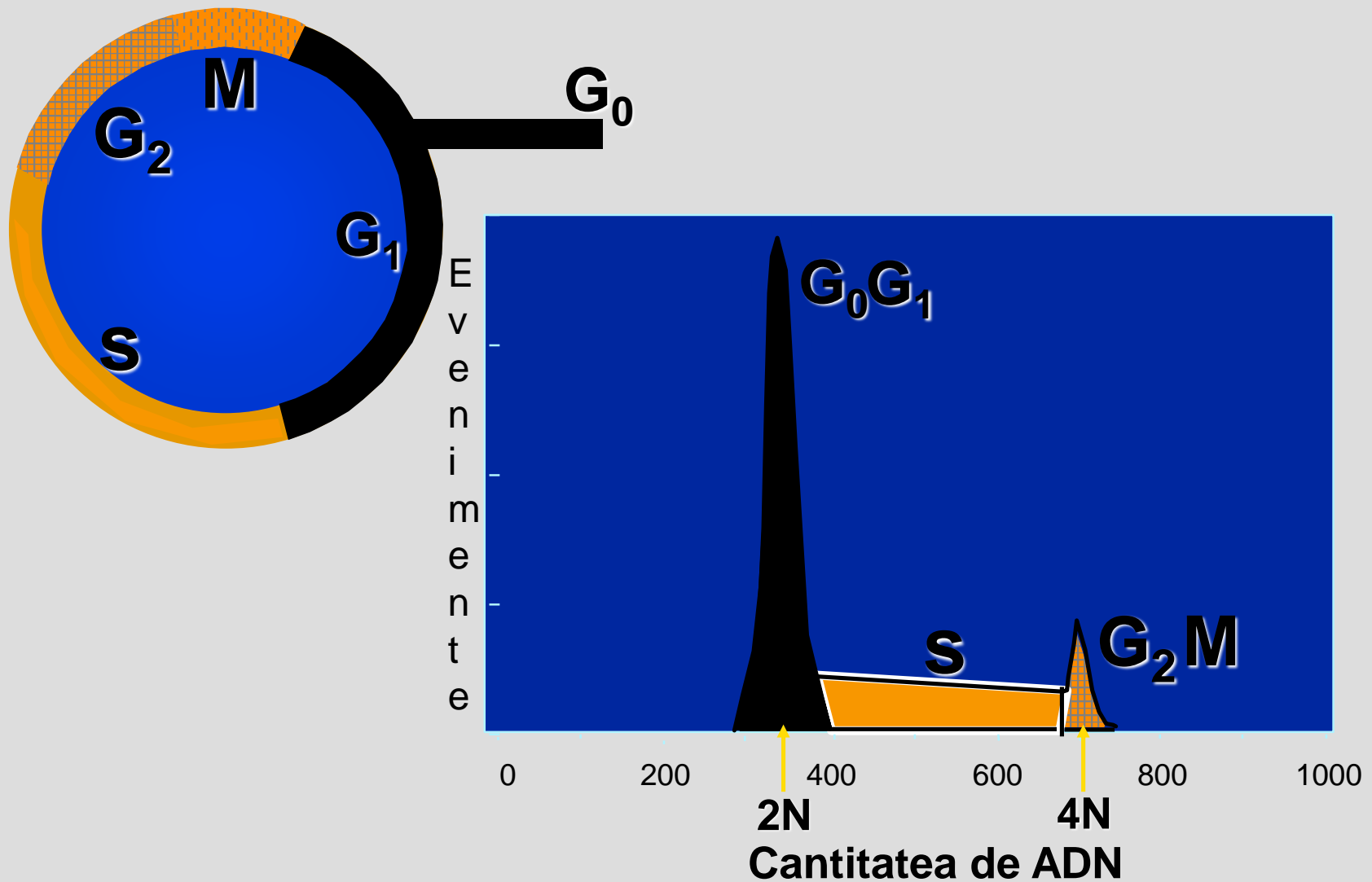
# Tri des cellules



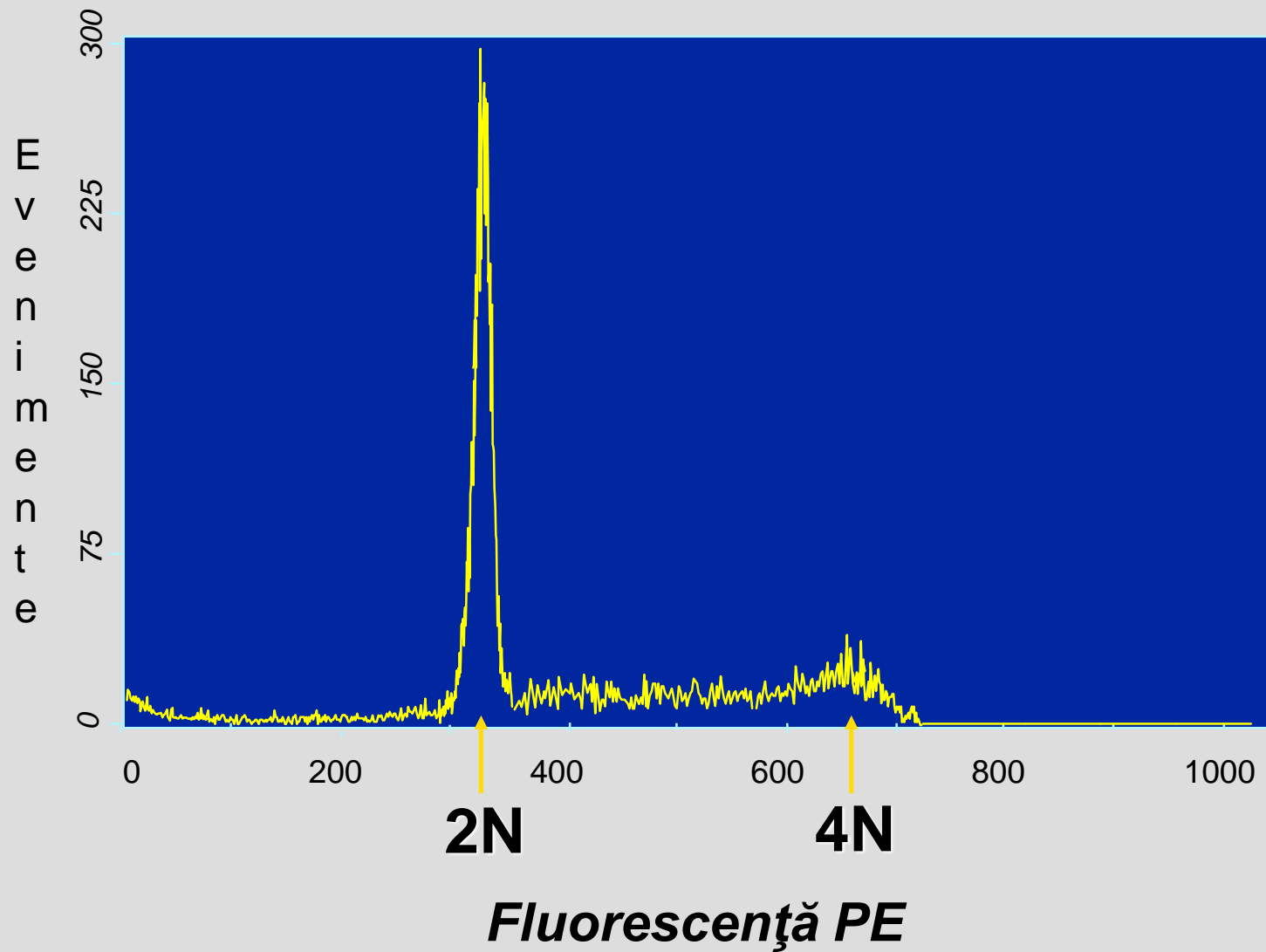
# Applications

- Analyse des sous-populations de lymphocytes  
Diagnostic des hémopathies malignes
- Biologie cellulaire  
Identification des molécules HLA
- Détermination des autoanticorps  
Etude du cycle et des fonctions cellulaires
- Diagnostic, évolution, pronostic des tumeurs malignes solides  
Microbiologie

# Analyse de l'ADN



# Analyse de l'ADN



# Analyse de l'ADN

