

Principe de la cytométrie en flux et du tri cellulaire

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes) les caractéristiques individuelles de chaque particules telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent.

Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que:

La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules

La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.

Les signaux de fluorescence

Fluorescence émise par la cellule elle-même (autofluorescence)

Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

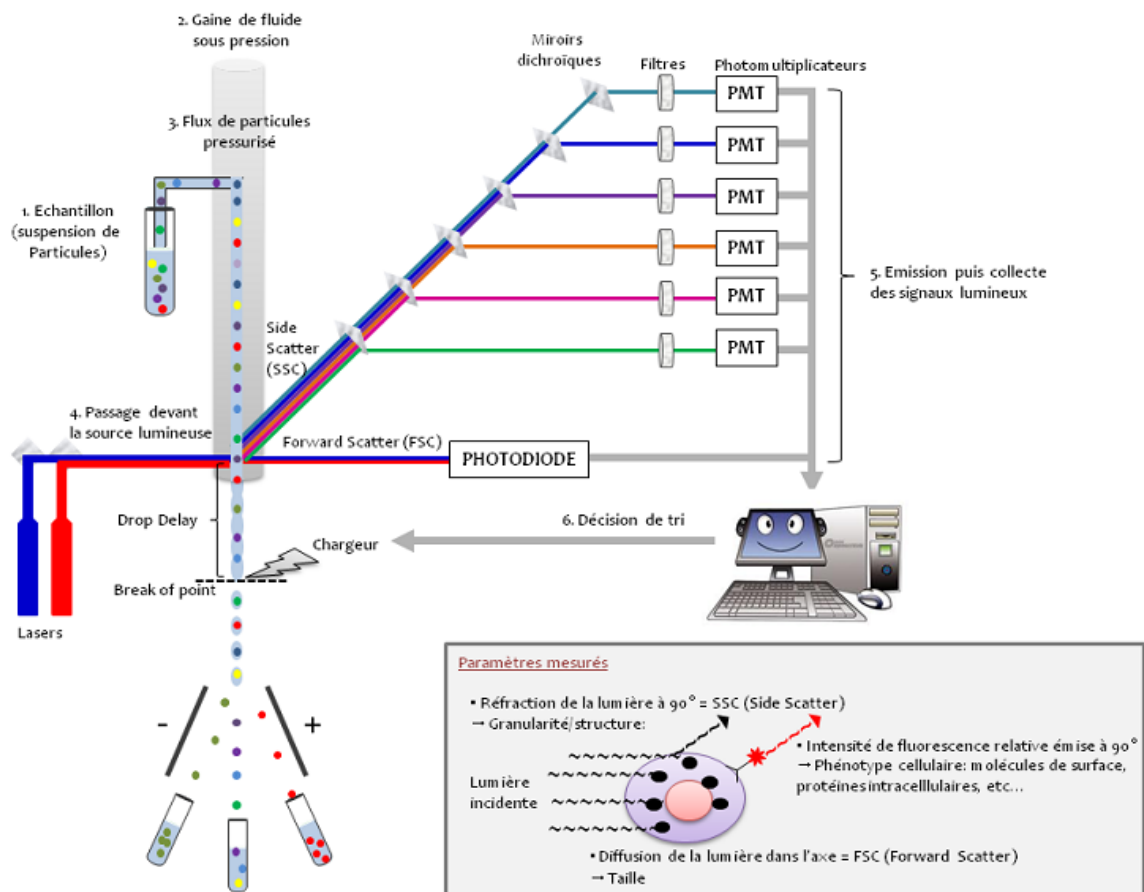
Les données ainsi recueillies se présentent sous forme de graphiques ou d'histogrammes auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , CV, intensité de fluorescence, etc.). Le principal avantage de la cytométrie en flux est la vitesse d'acquisition des données pour un très grand nombre de cellules, permettant l'analyse de sous-populations cellulaires complexes et/ou rares et de les trier pour ensuite les mettre en culture ou encore les analyser avec des outils de biologie moléculaire.

Le tri peut être défini comme la séparation physique de cellules ou de particules d'intérêt à partir d'une population hétérogène. Les cellules ou particules sont aspirées de l'échantillon et injectées une à une par une buse dans un courant continu de tampon (type PBS). En appliquant au jet, une onde de vibration d'une fréquence et d'une amplitude déterminée, il va se rompre pour donner des gouttes à un point précis caractérisé par sa position et son temps d'apparition appelé « break of point ». Au moment de l'interception de la cellule avec le faisceau laser,

la lumière déviée et la fluorescence émise génèrent un signal qui est traité par le programme de tri afin de décider si la cellule doit être isolée ou non selon les critères définis par l'utilisateur. La distance entre le point d'impact du laser avec la cellule et le « break of point » est appelé le « drop delay ». Si une cellule d'intérêt devant être triée a été détectée, le cytomètre attend qu'elle arrive jusqu'au « break of point » pour charger la goutte. Comme celle-ci contient la cellule à trier, en passant entre les plaques de déflexion fortement chargées, elle est déviée du côté de la plaque de polarité opposée et collectée.

Le mode de tri peut être modifié pour choisir un maximum de pureté ou un maximum de rendement (pour une petite et précieuse population) ou un maximum de précision dans le comptage pour un clonage.

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur



Principales applications

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la cytométrie en flux. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections, notamment les hémopathies malignes. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées. Bien que l'étude porte généralement sur les leucocytes, certaines affections plaquettaires (thrombopathies) ou encore des globules rouges ont un diagnostic pouvant être précisé par l'usage de la cytométrie en flux.

En cancérologie, la détection de la cellule pathologique est l'application la plus développée. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale.

L'immunologie utilise la CMF pour la détection ou l'identification des sous-types des cellules impliquées dans l'immunité.

Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est-à-dire l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques qui sont responsables de la prolifération cellulaire. La CMF offre une méthodologie rapide et simple à mettre en œuvre pour l'analyse du cycle cellulaire. Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimulus ou de l'ajout de certaines drogues. Elle permet aussi de voir la présence de cellules avec des contenus anormaux d'ADN.

De nombreuses études en pharmacologie font aussi appel à des techniques de CMF : mise au point ou étude de drogues antiméitotiques, immunothérapie.

Diffusion lumineuse

Les cellules diffusent une fraction lumineuse qui est ensuite détectée par des photomultiplicateurs (détecteurs de lumière). La quantité de lumière mesurée correspond à la taille des cellules et à leur complexité. Les Granulocytes, par exemple, reflètent davantage de lumière que les lymphocytes B ou T à surface lisse en raison de la texture rugueuse de leur surface et de la quantité plus élevée de vésicules présentes dans la cellule. L'analyse de la diffraction de la lumière selon un angle plat est appelée prodiffusion (FSC, forward scatter), laquelle dépend du volume de la cellule. L'analyse de la diffraction de la lumière dans un angle droit est appelée diffusion latérale (SSC, sideways scatter). Elle dépend de la granularité, de la taille des cellules, de la structure de leur noyau, et de la quantité de vésicules contenues dans les cellules. Par exemple, il est possible de distinguer des globules blancs rien qu'en observant ces deux analyses (Fig. 1).

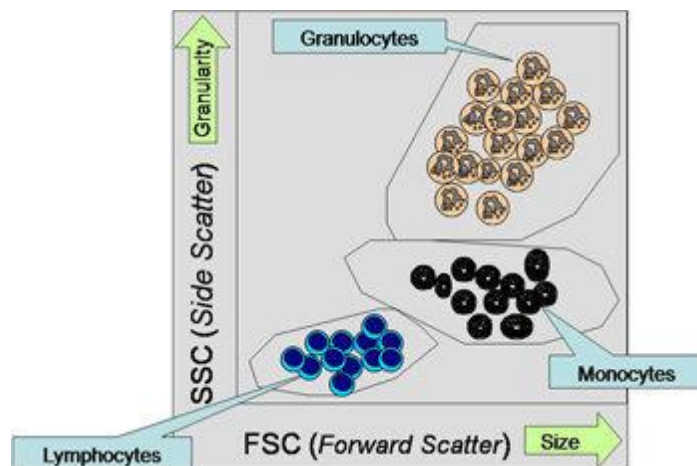


Fig. 1. Caractérisation de cellules non colorées à l'aide d'une diffusion de lumière (graphique à points) En haut à droite : grosses cellules En haut : cellules granulaires Les grosses cellulaires granulaires (par ex., les granulocytes) sont visibles en haut à droite tandis que les petits globules blancs, qui sont lisses, sont visibles en bas à gauche.

Analyses de la fluorescence (analyse par cytométrie de flux)

Des couleurs fluorescentes peuvent être mesurées de manière simultanée à l'aide de la lumière diffusée lors de la cytométrie de flux. Seules quelques cellules produisent une lumière fluorescente de manière endogène. En utilisant, par exemple, les substances colorimétriques DAPI et iodure de propidium qui s'intercalent dans l'ADN d'une cellule (entre les paires de base), il est possible de mesurer la quantité d'ADN d'une cellule en déterminant la brillance de cette cellule. Des anticorps marqués par fluorescence peuvent également être utilisés. En général, les anticorps utilisés ciblent les protéines de surface (par ex., les CD antigens ; CD = cluster de différenciation). La densité d'informations peut être augmentée en utilisant des filtres et une lumière laser de couleurs différentes. Si les longueurs d'ondes de la lumière transmise par fluorescence depuis les fluorophores peut être discernée, alors il est possible d'utiliser plusieurs marqueurs de couleurs (coloration multiple).

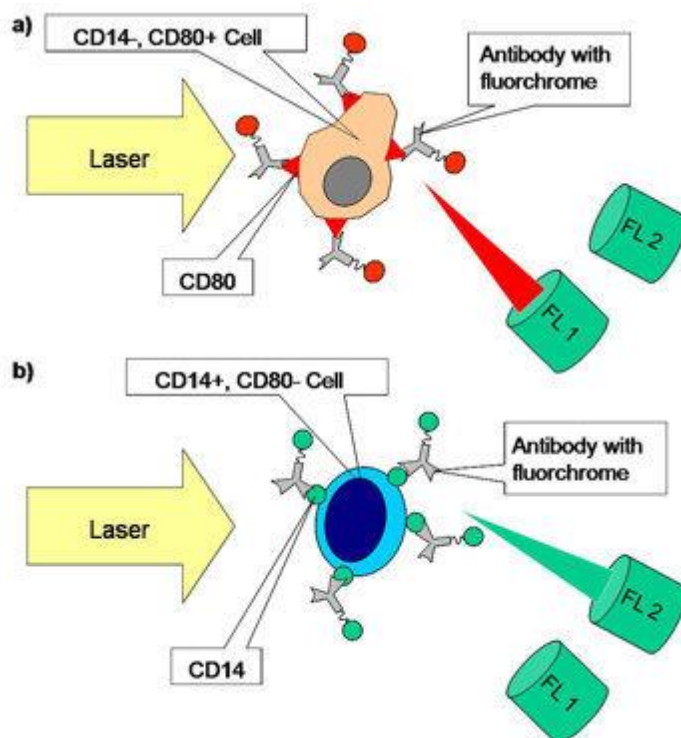


Fig. 2. Schéma des cellules colorées dans une analyse FACS. La première image représente une cellule CD80 positive et une cellule CD14 négative. Le fluorochrome combiné à l'anticorps est stimulé par la lumière du laser et émet une lumière fluorescente d'une certaine longueur d'onde (en rouge). La lumière est mesurée au niveau du canal fluorescent 1. La deuxième image illustre une cellule CD80 négative et une cellule CD14 positive. Le canal deux analyse la lumière du fluorochrome d'une autre longueur d'onde (en vert).

Grâce au logiciel du fabricant de l'équipement, les résultats finaux des analyses réalisées sont présentées dans un graphique. Le type de graphique peut être choisi par l'utilisateur. Généralement, les graphiques à point et les histogrammes sont les plus utilisés. Les colorations mentionnées plus haut pourraient donner ceci :

GRAPHIQUE À POINTS

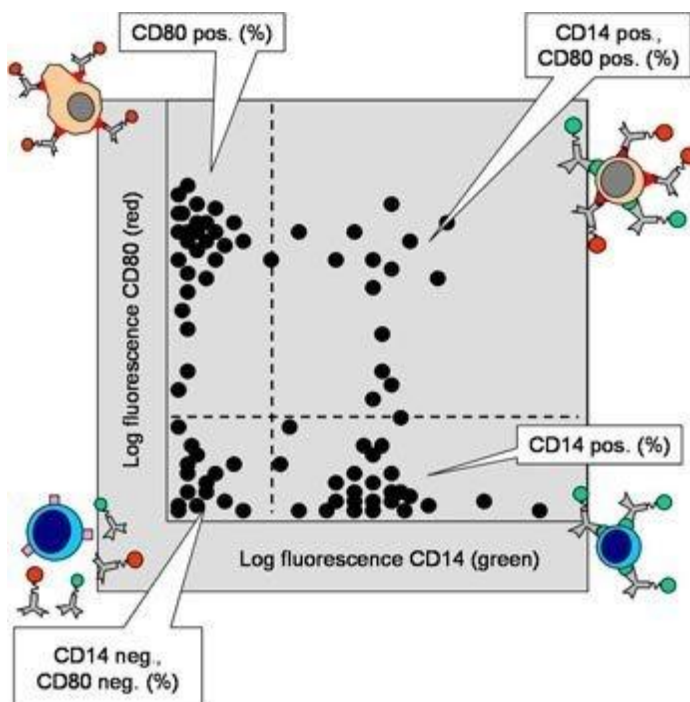


Fig. 3. Illustration d'un graphique à points pour les cellules CD14 et CD80. Les cellules négatives aux deux marqueurs figurent en bas à gauche, les

cellules positives au CD14 en bas à droite et les cellules positives au CD80 en haut à gauche. Les cellules positives aux deux marqueurs figurent en haut à droite. L'intensité de la fluorescence augmente de gauche à droite (axe des X) et de bas en haut (axe des Y).

Histogramme

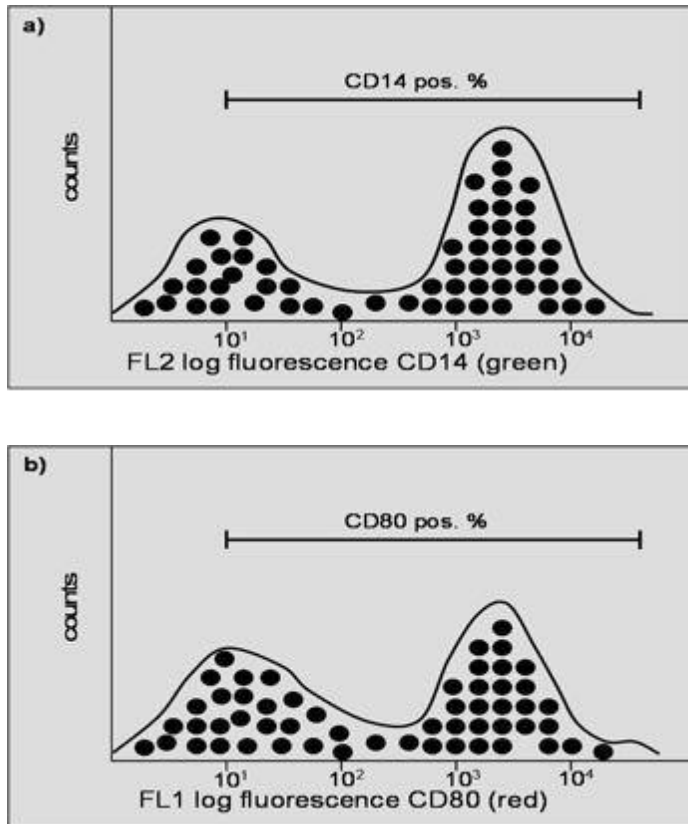


Fig. 4. Ces deux histogrammes représentent les résultats des marqueurs de surface CD14 (a) et CD80 (b) pris séparément. L'axe des X représente l'intensité de la fluorescence ; l'axe des Y représente le nombre de cellules. La barre représente la quantité de cellules positives.