



Université Catholique d'Afrique Centrale

Centre Supérieur des Sciences de la Santé

COURS DE CYTOMETRIE

Par:

Pr. LEOPOLD GUSTAVE LEHMAN

Immuno-parasitologue

Site Web: www.ured-douala.com

E-mail: iblehman@yahoo.fr

Juillet 2012

I. HISTORIQUE

- En 1934 Moldavan, à Montréal, conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo-électrique.

- En 1949, W. Coulter met au point un appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par variation de résistivité du courant liquidien.

- En 1953, Crosland-Taylor utilise un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire (système décrits par Reynolds en 1883).

- En 1965, Kamensky permet une avancée supplémentaire en permettant l'analyse des constituants cellulaires.

- Dan villa en 1969 utilise le laser comme source lumineuse car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation, et une stabilité du chromatisme.

- Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Le développement simultané d'appareillages commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en Flux (CMF). L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto-fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes. Ainsi, cette technique permet de faire simultanément l'analyse quantitative de plusieurs paramètres sur des éléments en suspension: cellules, levures, bactéries ou constituants cellulaires (noyaux, mitochondries, chloroplastes, chromosomes). Un grand nombre d'éléments peuvent être analysés ce qui apporte précision et représentativité aux résultats.

II. LA FLUORESCENCE

II.1. DEFINITION

La fluorescence est une propriété de certaines molécules, capables d'absorber une radiation de longueur d'onde donnée et de réémettre après un bref intervalle de temps, une radiation de longueur d'onde plus élevée. C'est autrement dit un phénomène chimique, mettant en jeu des transitions électroniques entre deux niveaux d'énergie superficiels, et déclenché par autre chose que la simple chaleur, ce qui la différencie de l'incandescence. Elle se déroule en 3 étapes successives décrivant des niveaux d'énergie différents (figure1):

- **Etape 1:** absorption de l'énergie lumineuse par les atomes de la molécule. On a alors passage de l'état fondamental à l'état excité.
- **Etape 2:** l'état excité (de courte période) est suivi de la relaxation au cours de laquelle une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur et de transfert d'énergie entre molécules.
- **Etape 3:** retour à l'état fondamental par émission lumineuse de longueur d'onde plus élevée (moins énergétique) que la longueur d'onde d'excitation.

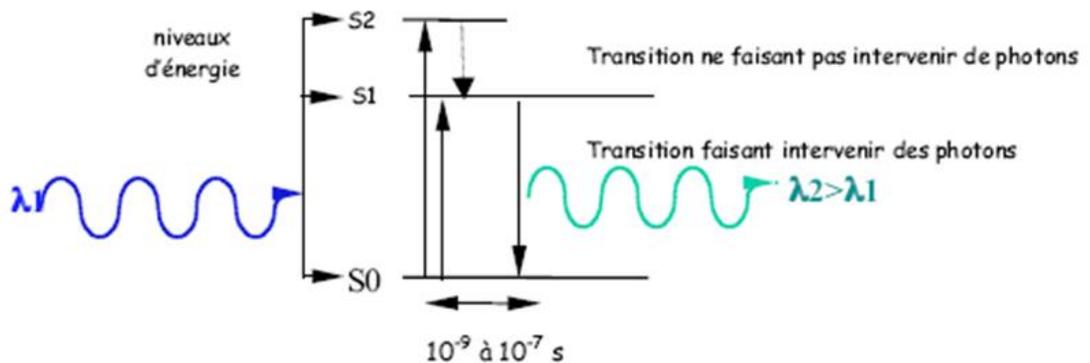


Figure 1: Niveaux d'énergie au cours de la fluorescence.

II.2. PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE

De nombreuses molécules (*fluorophores* ou *fluorochromes*) sont capables d'absorber des photons, et d'augmenter leur énergie d'agitation: la lumière est alors convertie en chaleur. Voir (tableau 1).

II.3. LES FLUOROCHROMES

II.3.1. DEFINITION

Ce sont des molécules qui ont la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer, généralement avec une énergie plus basse (une longueur d'onde plus grande). Ces molécules fluorescentes sont de taille et de nature chimiques diverses; certaines sont suffisamment petites pour être conjuguées à d'autre molécules (comme dans le cas des anticorps couplés à un fluorochrome); d'autres ne sont fluorescentes que dans certains états de chélation (marqueurs fluorescents vitaux, qui ne sont fluorescents que complexés à l'ADN). On cite :

- les petites molécules chimiques: FITC (Fluoresceine isothiocyanate), Cy5, Cy7, Alexa.
- les protéines: PE (Phycoerythrine), APC, PerCP
- les tandems: PE-Cy5, PE-Cy5.5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC-Cy7
- les quantum dots

II.3.2. REGLES POUR CHOISIR LES FLUOROCHROMES

Pour sélectionner un fluorochrome, il faut s'assurer que:

- * le spectre d'excitation est compatible avec l'équipement laser du cytomètre;
- * les spectres d'émission sont non chevauchants;
- * le fluorochrome le plus fort est associé au marqueur antigénique le plus faiblement exprimé.

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie

Colorant	Liaison/Fonction	λ Ex. *	λ Em. @	Réf. \$
Hoechst 33342	ADN (bases A-T)	365	402	1
DAPI	ADN (bases A-T)	357	451	23
Chromomycine A3	ADN (bases G-C)	420	560	37
Iodure de Propidium	ADN (intercalant)	370, 560	631	2
Bromure d'Ethidium	ADN (intercalant)	370, 530	622	12
Acridine Orange	ARN/ADN	492/492	527/630	9
Thioflavine	ARN (ADN)	422	487	32
FITC	Protéines	490	543	5
Phycoérythrine R	Protéines	565	578	20
Allophycocyanine	Protéines	642	660	24
Rouge Texas	Protéines	579	604	35
Pyronine Y	Potentiel mitochondrial	545	566	7
Rhodamine 123	Potentiel mitochondrial	494	523	6
BCECF-AM	pH	488	530	29
SNARF-1	pH	488	580/630	42
INDO-1-AM	Ca ²⁺	331	405/480	26
Fluo-3	Ca ²⁺	488	530	43

* : longueur d'onde d'excitation ; @ : longueur d'onde d'émission ; \$: références.

II.3.3. PRINCIPE DE COMPENSATION DE FLUORESCENCE

Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés simultanément en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des 2 signaux de fluorescence. Sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais pas en orange (PE), est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des 2 fluorescences. Le système de compensation permet de soustraire artificiellement et électroniquement la fluorescence orange parasite qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC ou les fluorescences artéfactuelles sur les autres PMT.

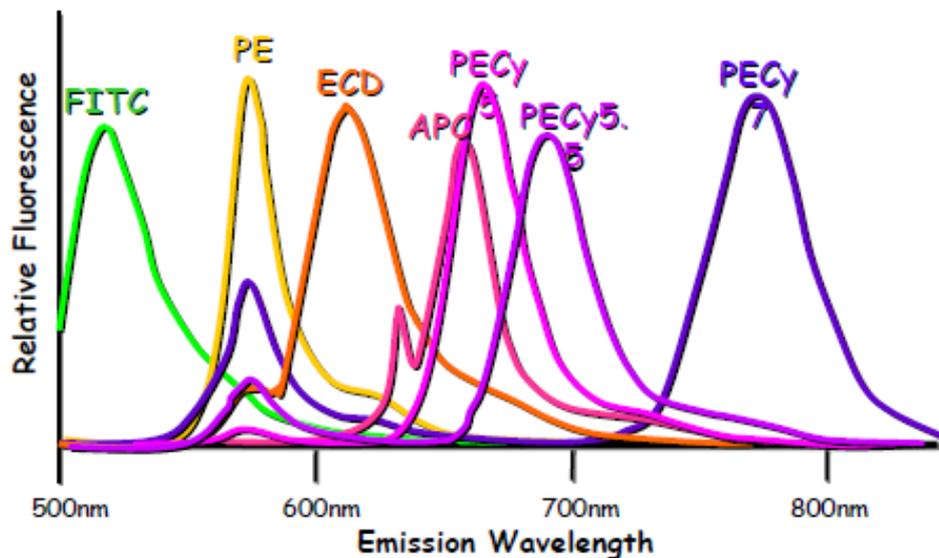


Figure 3: Phénomène de compensation des fluorochromes.