
Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux

Université de Toulon, L2 PC parcours LR 2023/2024

Projet personnel de recherche

Yann BEGARD

Table des matières

1	Introduction	3
2	Principe de la cytométrie en flux	3
2.1	Acheminement des cellules devant le rayon laser	3
2.2	Détecteur FSC	4
2.3	Détecteur SSC	4
2.4	Fluorescence et Cytométrie	5
2.5	Montage optique	6
3	Présentation du cytomètre Accuri C6	9
4	Etude d'un milieu marin avec cette technique	11
5	Conclusion	15
6	Annexes	16

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur et Madame Jamet, Professeur de biologie à l'université de Toulon au sein du laboratoire MIO, pour m'avoir accueilli, formé et aidé à l'élaboration de ce travail.

1 Introduction

Le premier microscope optique découle des travaux de Zacharias Janssen, un lunetier hollandais du 16^{ème} siècle. Suite à ces travaux, on a ainsi pu découvrir ce qu'on ne pouvait voir à l'oeil nu, notamment l'existence de cellules biologiques.

Il est ensuite apparu nécessaire d'avoir une approche quantitative et qualitative pour caractériser les cellules étudiées.

C'est en 1934 que Moldovan a finalement mis au point une technique permettant de compter des cellules dans un tube très fin. Cette technique est le point de départ de la cytométrie en flux.

En 1953, Wallace Coulter, un ingénieur américain, développe et brevète une méthode de comptage et de détermination des tailles de particules mises en suspension dans un liquide.

Le principe Coulter a été utilisé dans de nombreuses applications scientifiques et industrielles : comptage de particules fines, caractérisation de pathologies sanguines, etc...

Dans notre cas, la cytométrie en flux est utilisée en biologie marine pour permettre l'investigation de milieux marins de la petite et de la grande rade de Toulon.

Nous allons dans un premier temps détailler le principe de la cytométrie en flux, puis décrire le cytomètre utilisé (Accuri C6) et présenter les résultats obtenus grâce à cette technique.

2 Principe de la cytométrie en flux

2.1 Acheminement des cellules devant le rayon laser

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'acheminer des cellules une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser.

Pour cela, les cellules sont mises en suspension et aspirées par une pompe. Elles passent ensuite devant un ou plusieurs faisceaux laser. La diffraction du faisceau laser au passage des cellules permet de recueillir de nombreuses informations.

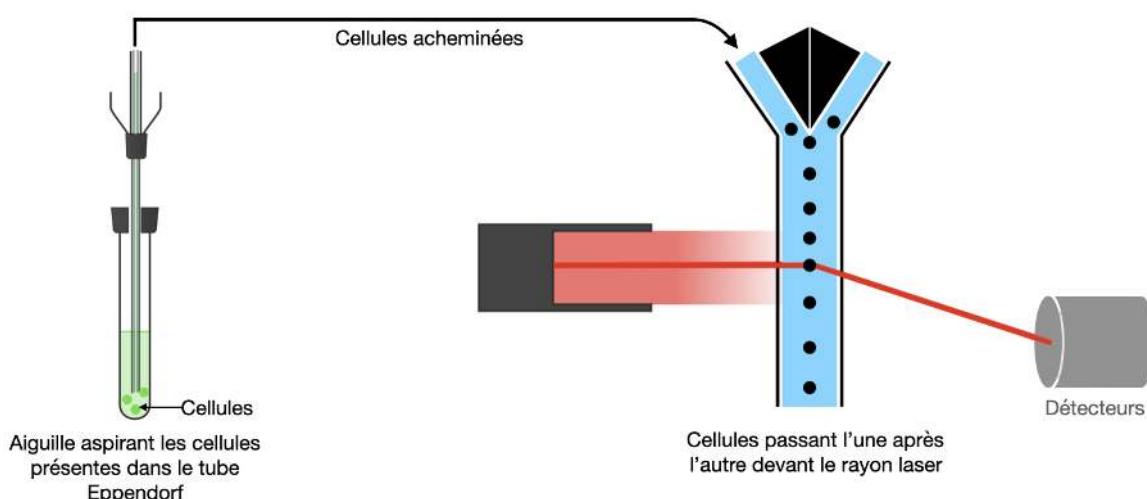


Figure 1 : Schéma du passage des cellules acheminées une à une devant le laser

Pour obtenir un passage individuel de chaque cellule devant le laser, plusieurs conditions sont réunies :

- Un liquide appelé liquide de gaine est ajouté à l'échantillon lors de son aspiration par l'aiguille du cytomètre. Ce liquide est de l'eau ultra pure qui ne va donc aucunement altérer l'échantillon (seule la molécule H_2O est présente dans cette eau ultra pure).

- L'aspiration de l'échantillon dans le circuit du cytomètre est réalisée par une pompe péristaltique (voir figure 2). Cette pompe est composée de patins, d'un rotor et d'un stator. La rotation du rotor entraîne les patins qui compriment le tube en caoutchouc dans lequel transitent les cellules. Le milieu n'est donc pas en contact avec le mécanisme de la pompe, ce qui lui permet de rester stérile.

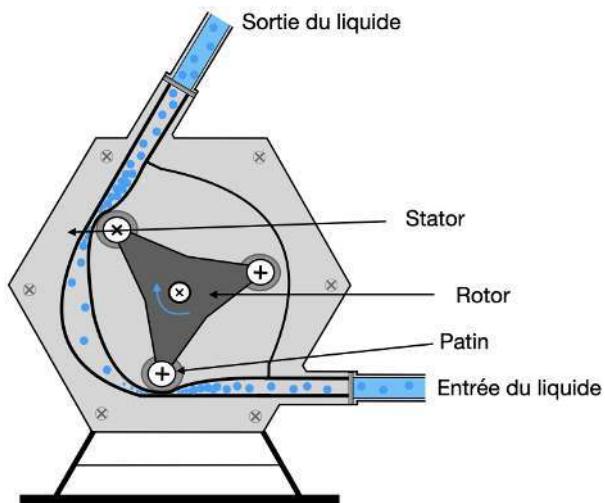


Figure 2 : Schéma de principe d'une pompe péristaltique

- Le rétrécissement du conduit provoque une différence de pression qui permet de concentrer les cellules aspirées en un seul point. C'est en variant la vitesse d'écoulement que ces cellules vont être acheminées unes à unes devant le rayon laser. Cette technique s'appelle le centrage hydrodynamique.

2.2 DéTECTEUR FSC

Le rayon laser intercepte les cellules ainsi acheminées. Le détecteur FSC, placé dans l'alignement du rayon laser, va détecter l'ombre projetée au passage de chaque cellule. Cette ombre est directement proportionnelle à la taille des cellules.

L'information est ensuite transmise à l'ordinateur, qui stocke toutes les informations recueillies.

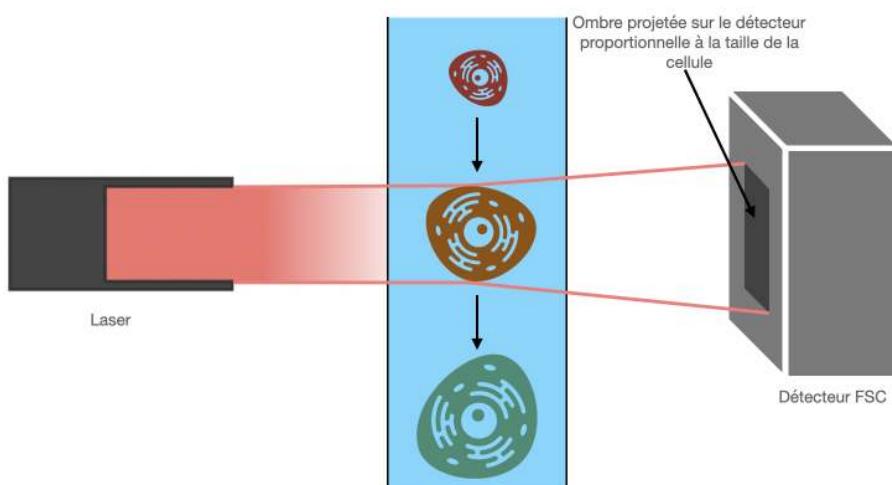


Figure 3 : Schéma du détecteur FSC

2.3 DéTECTEUR SSC

Le détecteur Side Scatter (SSC) permet de déterminer la structure interne de la cellule. Le rayon laser se diffracte au passage de chaque cellule.

Le détecteur SSC, placé perpendiculairement au rayon, détecte alors tous les points lumineux qui seront ensuite convertis en signaux électriques. L'ordinateur interprète ensuite les résultats pour déterminer la structure interne de la cellule.

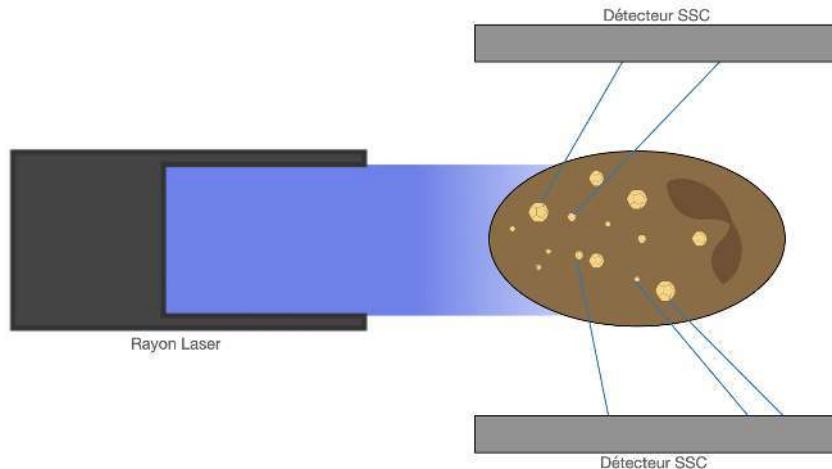


Figure 4 : Schéma du détecteur SSC

2.4 Fluorescence et Cytométrie

Le principe de la cytométrie en flux utilise la propriété de fluorescence.

Elle permet de caractériser chaque cellule grâce à des détecteurs plus ou moins nombreux en fonction de la sophistication de l'appareil.

La fluorescence est une propriété caractéristique de certaines molécules. Elles absorbent l'énergie d'un photon passant ainsi d'un état fondamental à un état excité. Elles réémettent ensuite un photon lorsqu'elles reviennent à l'état fondamental. Cette émission s'effectue à une longueur d'onde plus élevée, dû à la perte d'énergie sous des formes de radiation, conversion interne, etc...[1]

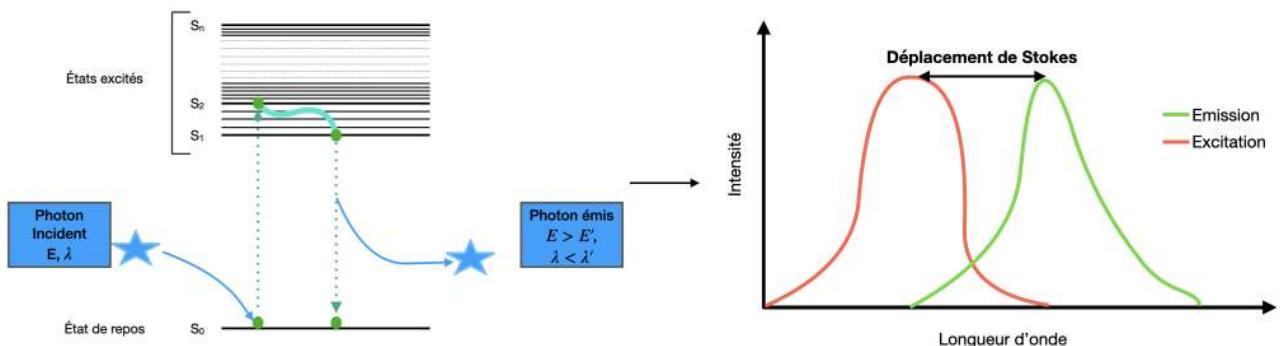


Figure 5 : Diagramme des états d'énergies et déplacement de Stokes

Nous savons que $E = h\nu \iff E = \frac{hc}{\lambda}$. Il est alors normal de trouver une énergie $E > E'$ et donc une longueur d'onde $\lambda < \lambda'$ (car l'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde).

Dans le cas d'une molécule fluorescente, plus l'énergie apportée à l'électron est grande, plus, lors de la relaxation, l'électron émet une longueur d'onde importante comparée à celle qu'il a reçue.

La distance entre les pics d'excitation et d'émission dépend de la molécule fluorescente. On appelle cela, le déplacement de Stokes.

Les cellules non fluorescentes ne seront pas détectées par les détecteurs de fluorescence du cytomètre. Afin de pouvoir repérer ces cellules, nous ajoutons des molécules, appelées fluorochromes, à des anticorps susceptibles de reconnaître ou non les marqueurs situés à la surface des cellules à identifier.

Le passage des cellules « marquées » sera donc détecté par le cytomètre.

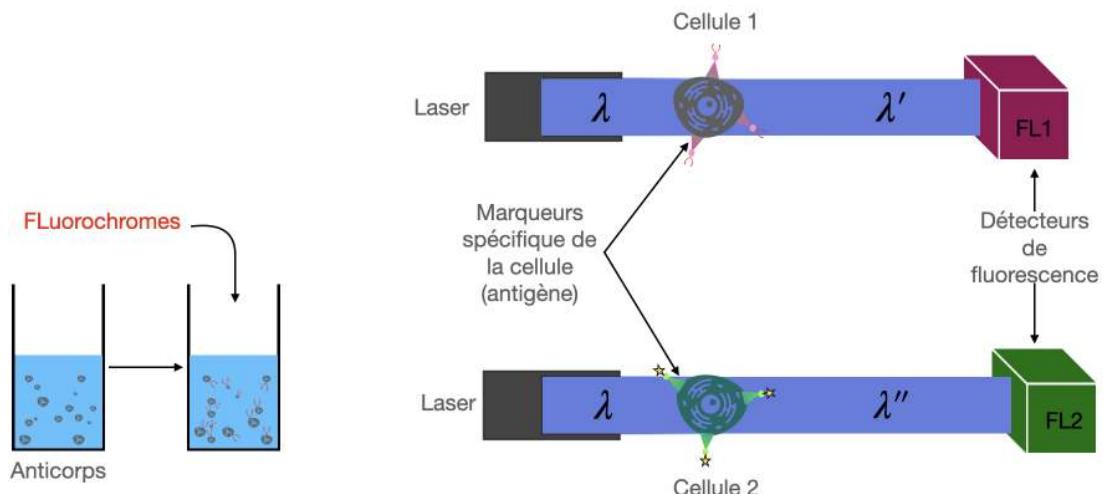


Figure 6 : Identification des cellules fluorescentes

Si l'anticorps choisi se fixe au marqueur de la cellule, la molécule fluorescente qui lui est associée émet un flash de lumière caractéristique lors du passage devant le rayon laser.

Nous pouvons ainsi identifier chaque cellule puisque nous connaissons sa taille, sa structure interne et ses marqueurs spécifiques.

2.5 Montage optique

La cytométrie en flux fait également appel à des notions d'optique physique. Le montage optique du cytomètre est le suivant :

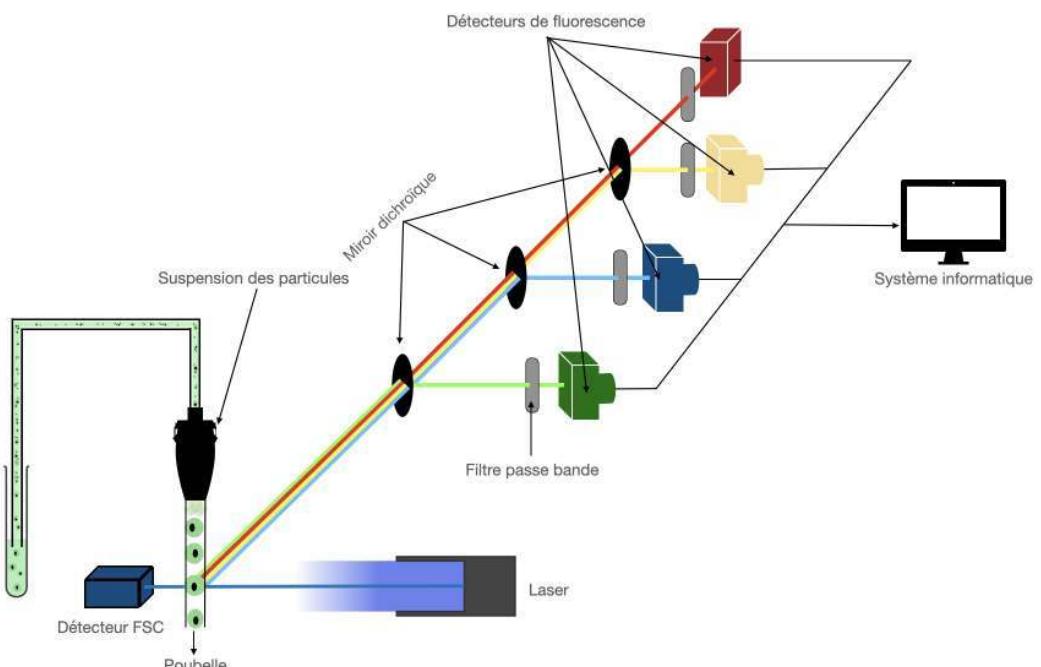


Figure 7 : Schéma du montage optique du cytomètre

Le montage optique est constitué de miroirs dichroïques.

Le miroir dichroïque ou filtre interférentiel est un filtre qui possède des propriétés changeantes de réflexion ou de transmission en fonction de la longueur d'onde incidente.

La méthode la plus utilisée pour fabriquer des miroirs dichroïques est le traitement de surface multicouche.

Le principe physique qui réside derrière ce type de filtre est le principe d'interférence par couche mince. Ce principe associe 3 couches d'indices différents. Une lumière incidente monochromatique est transmise et réfléchie selon le schéma suivant :

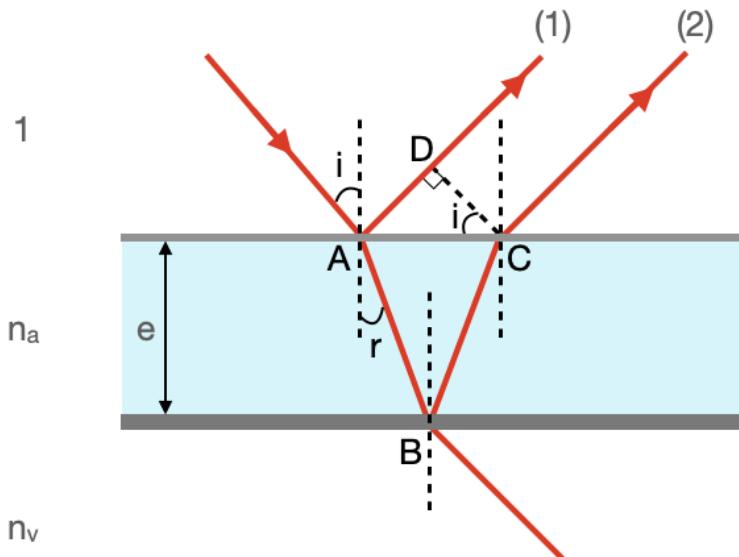


Figure 8 : Schéma du principe d'interférence par couche mince

Nous déterminons ainsi l'expression du déphasage entre les deux rayons réfléchis (1 et 2) :

$$\left. \begin{array}{l} \cos(r) = \frac{e}{AB} \\ \cos(r) = \frac{e}{BC} \end{array} \right\} \Rightarrow AB = BC = \frac{e}{\cos(r)}$$

$$\left. \begin{array}{l} \sin(r) = \frac{AC}{2AB} \\ \sin(i) = \frac{AD}{AC} \end{array} \right\} \Rightarrow AD = 2AB \sin(r) \sin(i)$$

Nous en déduisons le déphasage :

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \times \delta \text{ avec } \delta = 2n_a AB - AC \Rightarrow \Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \times 2n_a AB - AD$$

Nous remplaçons AB et AD dans l'expression du déphasage et nous trouvons :

$$\begin{aligned} \Delta\varphi &= \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{2n_a e}{\cos(r)} - \frac{2 \sin(r) \sin(i)}{\cos(r)} \right) \\ \Delta\varphi &= \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{2n_a e - 2e \sin(r) \sin(i)}{\cos(r)} \right) \end{aligned}$$

En utilisant la 2^{ème} Loi de Snell-Descartes : $\sin(i) = n_a \sin(r)$

Nous en déduisons :

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{2n_a e - 2e(1 - \sin^2(r))}{\cos(r)} \right)$$

Ainsi :

$$\boxed{\Delta\varphi = \frac{4\pi}{\lambda} n_a e \cos(r)}$$

Nous remarquons que le déphasage est fonction de l'angle d'incidence et de l'indice du milieu. C'est donc sur la base de ce déphasage que nous créons les miroirs dichroïques. Ces miroirs permettent de filtrer les longueurs d'ondes émises lors du passage de la cellule devant le rayon laser. Ils réfléchissent ainsi une gamme de longueur d'onde. Les autres longueurs d'ondes sont transmises par le miroir jusqu'à être déviées par un autre miroir dichroïque.

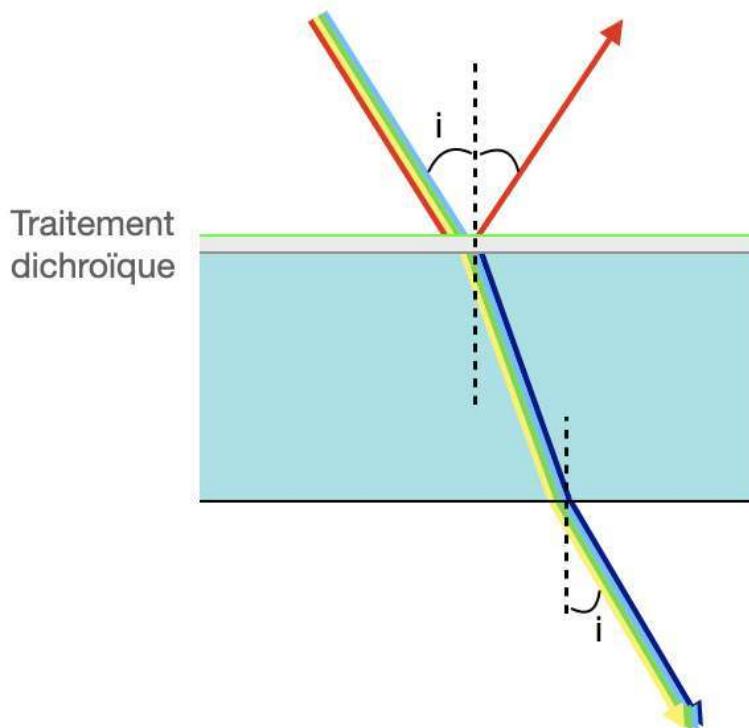


Figure 9 : Schéma du miroir dichroïque

Sur ce schéma, le miroir reçoit une lumière blanche incidente. Nous remarquons que seule la gamme de longueur d'onde correspondante à la couleur rouge est réfléchie. Ce miroir est donc un miroir aux propriétés réfléchissantes pour les longueurs d'ondes comprises entre 700 et 800nm.

Nous observons également des filtres passe bande. Ces filtres ne sont pas toujours présents dans le montage optique d'un cytomètre. Ils sont cependant présents si la gamme de longueur d'onde réfléchie par le filtre dichroïque est trop importante. Le filtre passe bande atténue donc les fréquences. En effet, les filtres passe bande sont des filtres électroniques qui laissent passer seulement les basses fréquences. Les détecteurs de fluorescence reçoivent ainsi la longueur d'onde appropriée.

Les détecteurs transforment le signal optique en signal électronique. Ces informations sont ensuite communiquées à un ordinateur qui traite les données transmises.

3 Présentation du cytomètre Accuri C6

Le cytomètre Accuri C6 est un cytomètre de paillasse. De petite taille, il permet d'étudier rapidement et facilement jusqu'à 10 000 évènements par seconde [2].



Figure 10 : Cytomètre Accuri C6

Le cytomètre prélève les cellules présentes dans le tube eppendorf à l'aide de l'aiguille de prélèvement que l'on observe sur la figure 10.

Ce cytomètre est équipé des composantes suivantes :

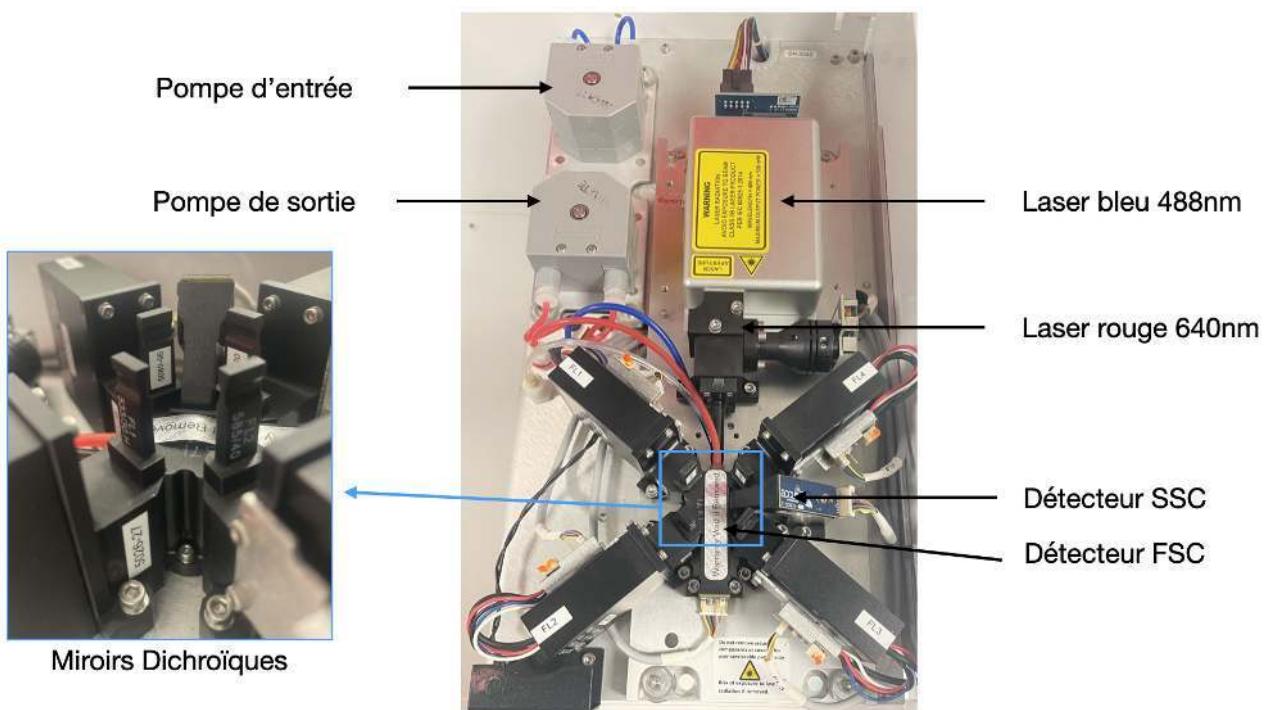


Figure 11 : Équipement du cytomètre Accuri C6

Ce cytomètre regroupe toutes les caractéristiques du principe de la cytométrie. On observe 2 pompes péristaltiques. La pompe d'entrée va aspirer les cellules présentent dans le tube eppendorf. La deuxième, rejette les cellules hors du circuit de ce cytomètre. On observe 2 lasers, le laser rouge et le laser bleu. Le choix de ces deux gammes de longueur d'onde permet de balayer un large spectre de longueur d'onde. Ce cytomètre est équipé de 4 détecteurs de fluorescence numérotés de 1 à 4 sur la figure 11.

- FL1 longueur d'onde associée : 510nm. Déetecte les Fluorochromes (Sybergreen)
- FL2 longueur d'onde associée : 565nm. Déetecte la Phycoérythrine (pigment naturel)
- FL3 longueur d'onde associée : 610nm. Déetecte la Chlorophylle
- FL4 longueur d'onde associée : 780nm. Déetecte la Phycocyanine au niveau cellulaire

On observe le détecteur FSC au centre du montage optique et le détecteur SSC sur la droite du montage. Enfin, on observe 4 miroirs dichroïques présents devant chaque détecteur de fluorescence.

Après prélèvement et passage devant les 2 rayons laser, les cellules sont rejetées dans le compartiment "Poubelle" que l'on observe sur la figure 12 :

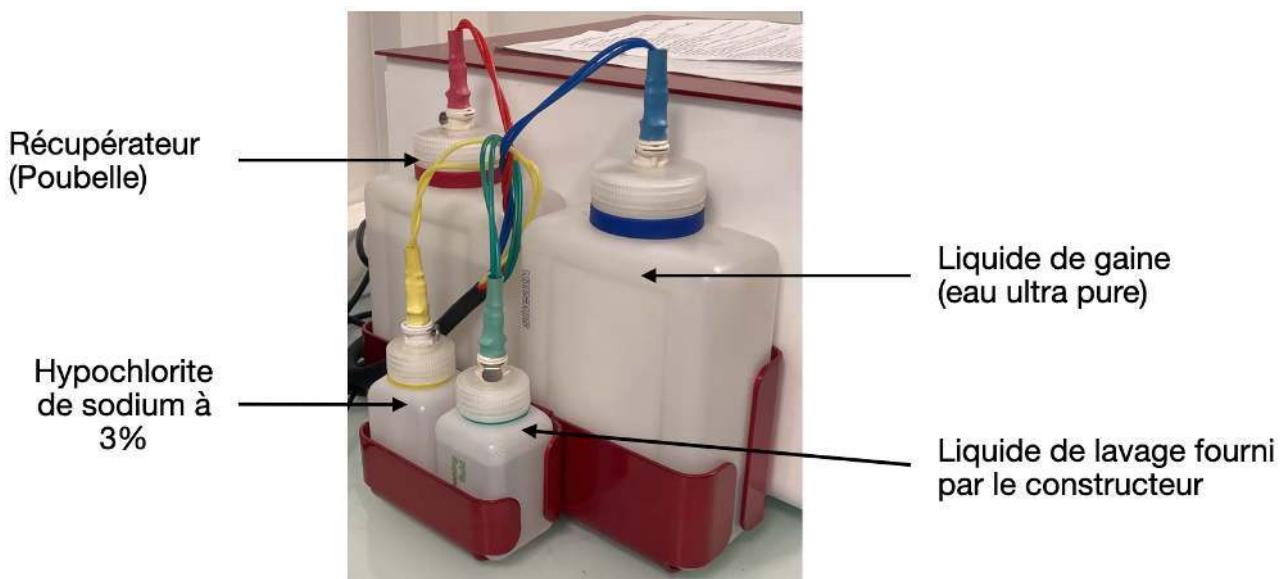


Figure 12 : Organisations des liquides du cytomètre Accuri C6

Sur cette figure, on visualise le liquide de gaine qui transporte les cellules dans le circuit du cytomètre, l'hypochlorite de sodium à 3% et un produit non identifié fourni par le constructeur du cytomètre. L'eau de javel et le produit fourni par le constructeur permettent de rincer le circuit lorsque les mesures ont été réalisées. Ceci garantit la stérilité du circuit pour le passage des échantillons suivants.

Enfin, ce cytomètre est connecté à un PC qui traite les données relatives à chaque échantillon.

4 Etude d'un milieu marin avec cette technique

Le Laboratoire MIO étudie des communautés Planctoniques depuis 25 ans.

Les recherches entreprises ont pour objectif d'étudier l'état de deux milieux marins différents.

La petite et la grande Rade de Toulon sont ainsi deux milieux très intéressants à étudier puisque la petite Rade de Toulon représente un milieu pollué alors que la grande rade représente un environnement "sain".

La digue séparant la petite Rade de la grande Rade de Toulon crée en effet une différence bien distincte.

Le cytomètre Accuri C6 est utilisé à Toulon, au sein du laboratoire MIO. Ce laboratoire étudie des échantillons d'eau de mer prélevés dans la petite et la grande rade de Toulon en utilisant la technique de la cytométrie en flux.

L'objectif de cette étude est d'identifier, grâce au cytomètre, les populations biologiques présentes dans un milieu aquatique.

Les prélèvements sont effectués en mer chaque mois, à différentes profondeurs, en suivant un protocole bien défini, permettant entre-autre de « figer » les populations biologiques de chaque échantillon à analyser.

Dans le cas d'investigations concernant des cellules phytoplanctonique, les échantillons sont filtrés à 90 μm afin de ne pas boucher les conduits du cytomètre. On n'ajoute pas de marqueur fluorescent car ces cellules présentent une fluorescence naturelle.

Dans le cas d'analyses de bactéries, la filtration s'effectue avec un filtre 5 μm . On ajoute alors au milieu du glutaldéhyde et de l'Acide Pluronique afin de neutraliser les bactéries présentes. On ajoute ensuite du Sybergreen, substrat fluorescent, qui permettra la détection par le cytomètre.

Dans les deux cas, les échantillons ainsi préparés sont analysés par le cytomètre.

Filtration sur 90 μm :

Nous allons présenter les résultats obtenus pour un prélèvement effectué à une profondeur de 3 mètres dans la petite rade de Toulon. Après passage au cytomètre, à une vitesse d'écoulement de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous pouvons visualiser à l'écran le diagramme suivant :

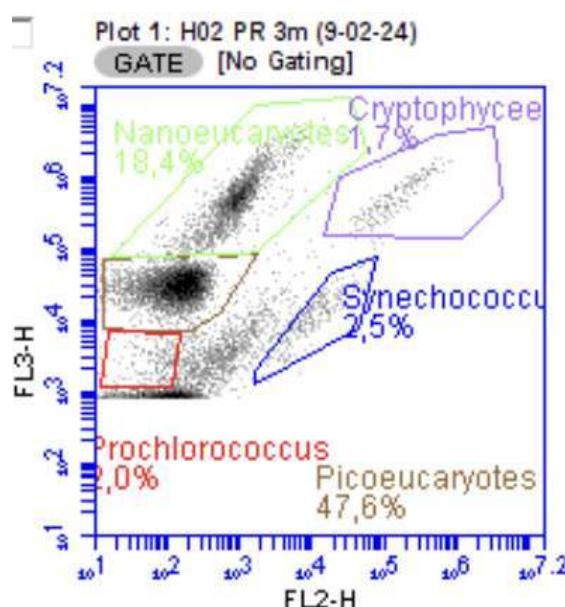


Figure 13 : Diagramme 2D des détecteurs FL3 et FL2

Ce diagramme représente le signal perçu par le détecteur FL3 (détecteur de Chlorophylle) en fonction du signal perçu par le détecteur FL2 (détecteur de Phycoerythrine).

Prochlorococcus :

On sait que les Prochlorococcus sont des Cyanobactéries, caractérisées par une absence de noyau et la présence de pigments chlorophylliens.

Ces bactéries apparaissent donc au cytomètre avec une faible concentration en Chlorophylle et en Phycoerythrine. La zone rouge correspond donc à cette population.

Le nombre de cellules apparaissant dans cette zone nous permet de déterminer le nombre de Prochlorococcus : 392 cellules/mL.

Synechococcus :

Les Synechococcus sont également des Cyanobactéries. Elles ont la particularité d'avoir une concentration en Phycoerythrine plus importante que les Prochlorococcus tout en ayant une concentration faible en Chlorophylle. On peut donc attribuer la zone bleue à cette population.

De la même façon, on mesure 502 cellules/mL de Synechococcus dans notre échantillon.

Picoeucaryote :

Les Picoeucaryotes sont des cellules comportant un noyau et une concentration plus élevée de chlorophylle (donc naturellement fluorescente) et une concentration faible en Phycoerythrine.

On attribue la zone de couleur marron à cette population qui représente environ 9372 cellules/mL des espèces de notre échantillon.

Nanoeucaryotes :

Les Nanoeucaryotes sont également des cellules avec noyau. Leur concentration en Chlorophylle est plus élevée que l'espèces précédente. Leur concentration en Phycoerythrine est faible. Ceci explique qu'elles apparaissent dans la partie supérieure du diagramme (zone verte). Leur population est estimée à 3626 cellules/mL de l'échantillon.

Cryptophyce :

Les Cryptophyce présentent à l'inverse des Nanoeucaryotes, une concentration plus élevée en Phycoerythrine. Elles apparaissent dans la zone violette. Leur population est de l'ordre de 340 cellules/mL de l'échantillon.

On remarque qu'une population non identifiée n'apparaît pas dans les 5 zones pré-citées.

Pour approfondir nos investigations, nous avons eu recours à un deuxième diagramme :

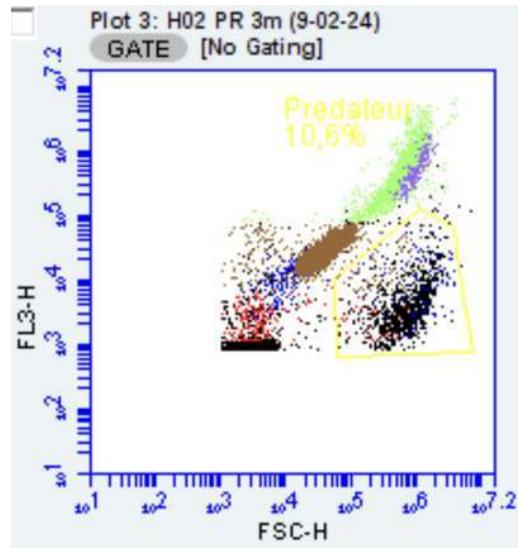


Figure 14 : Diagramme 2D des détecteurs FL3 et FSC

Ce diagramme représente le signal perçu par FL3 (détecteur de Chlorophylle) en fonction du signal perçu par le détecteur FSC (qui rend compte de la taille des cellules).

Nous retrouvons sur ce diagramme les 5 espèces identifiées précédemment. Elles y sont matérialisées par les points ayant les couleurs utilisées dans la figure 13.

On remarque des points présents dans une zone matérialisée en jaune. Cette population présente une taille importante et une concentration en Chlorophylle faible. Elle représente environ 2082 cellules/mL de l'échantillon et correspond alors à la population non identifiée de la figure 13.

Concernant cette population non identifiée, nous avons émis 2 hypothèses :

1. L'espèce biologique apparaissant dans la zone jaune est une espèce prédatrice.
2. Cette population est constituée de déchets (matière organique et/ou cellules mortes)

Une recherche d'ADN effectuée sur la population de la zone jaune a été menée sans succès.

D'autres investigations ont été entreprises à l'aide d'un cytomètre plus performant (le cytomètre Attune CytPix). Ce cytomètre permet en effet de photographier individuellement chaque cellule passant devant le rayon laser.

Les résultats obtenus montrent que la population non identifiée de la zone jaune correspond à des cellules mortes et des matières organiques. Cela confirme donc l'hypothèse numéro 2.

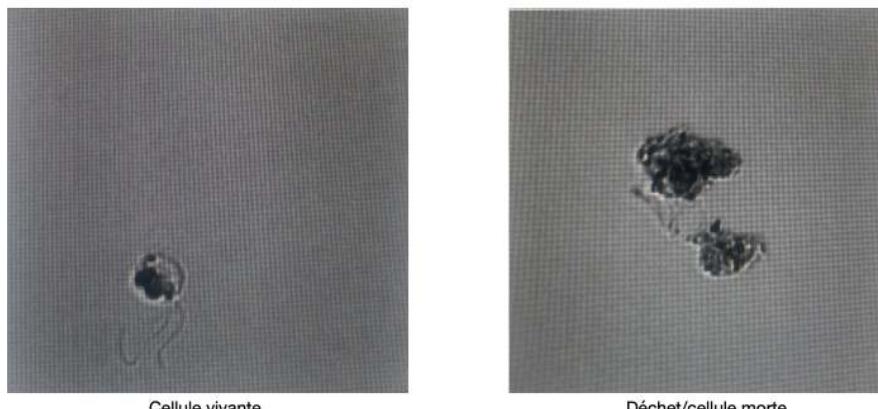


Figure 15 : Comparaisons des photos prise avec le cytomètre Attune CytPix

Résultats filtration sur 5 μm :

Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus pour le même prélèvement effectué à une profondeur de 3 m.

Après passage au cytomètre, à une vitesse d'écoulement de $11\mu\text{L}/\text{min}$, nous pouvons visualiser à l'écran le diagramme suivant :

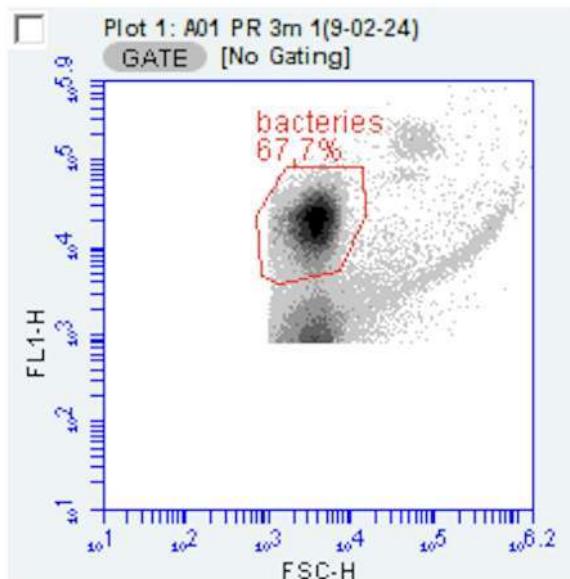


Figure 16 : Diagramme 2D FL1 et FSC

On visualise une densité de points importante dans l'encadré rouge. Cette population rend compte de la présence de bactéries (car filtration à 5 microns).

Cette population représente 534120 cellules/mL de la population totale présente dans l'échantillon analysé.

Sur la base du même échantillon, on obtient le diagramme FL1 (Sybergreen) en fonction de FL3 (Chlorophylle) :

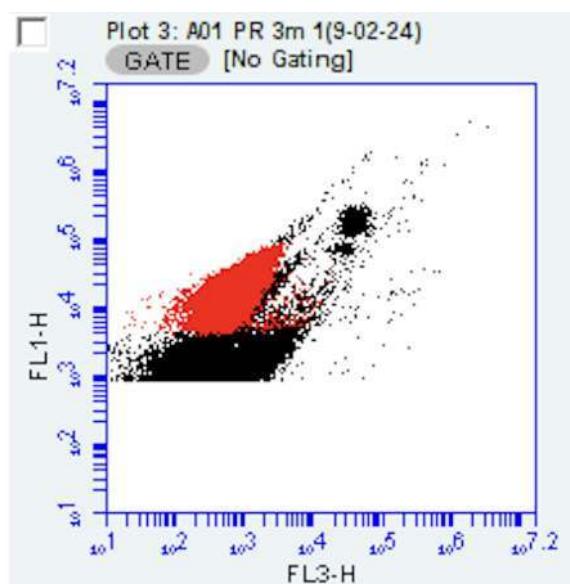


Figure 17 : Diagramme 2D FL1 et FL3

On visualise des points rouges correspondant aux bactéries marquées par le Sybergreen (donc pas naturellement fluorescentes).

On remarque également un groupement de points noirs situés en haut et à droite du diagramme. Le positionnement de ces points démontre une concentration plus importante en Chlorophylle. On peut donc conclure qu'il s'agit de Cyanobactéries (car naturellement fluorescentes et concentration importante en pigments chlorophylliens).

5 Conclusion

Ce stage en laboratoire m'a permis de découvrir l'utilisation de la physique appliquée à la biologie marine.

Ce stage a été l'opportunité d'appliquer expérimentalement le principe de la cytométrie en flux. J'ai abordé la partie théorique sur le plan de la physique et j'ai pu appliquer expérimentalement ces principes théoriques au niveau de la Biologie marine.

J'ai ainsi pu constater qu'il existe des "passerelles" entre chaque sciences. Les avancées techniques d'une science permettent des avancées techniques pour une autre science.

Nous avons présenté une application du cytomètre Accuri C6.

L'objet de l'étude consistait à rendre compte de populations bactériennes et cellulaires présentes dans un prélèvement effectué dans la petite rade de Toulon à une profondeur de 3 mètres.

Le premier échantillon de ce prélèvement a été filtré à $90\mu\text{m}$. Un deuxième échantillon du même prélèvement a été filtré à $5\mu\text{m}$.

Le passage au cytomètre des deux échantillons nous a permis d'identifier les populations bactériennes et cellulaires présentes dans le prélèvement.

Nous avons été confrontés à une population non identifiée dans notre échantillon. Le recours à un cytomètre plus performant a permis l'identification de cette population inconnue.

Au travers de cet exemple, nous constatons que l'évolution constante de la technique de la cytométrie en flux est très utile dans le domaine de la recherche scientifique.

6 Annexes

Références

- [1] <https://trigenotoul.com/wp-content/uploads/2014/09/Fluorescence-cours.pdf>
- [2] <https://www.dutscher.com/article/123720>