

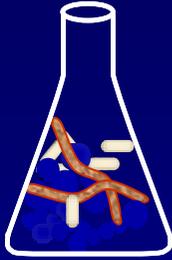
Le tri cellulaire : principe et applications

Gérald Grégori

Laboratoire de Microbiologie, de Géochimie et d'Ecologie Marines CNRS UMR 6117
163 Avenue de Luminy - Case 901- Bât TPR1, 13288 Marseille cedex 9
Tél. : (+33) 4.91.82.91.14
Fax : (+33) 4.91.82.96.41

Contact : gregori@com.univ-mrs.fr

Intérêt du tri

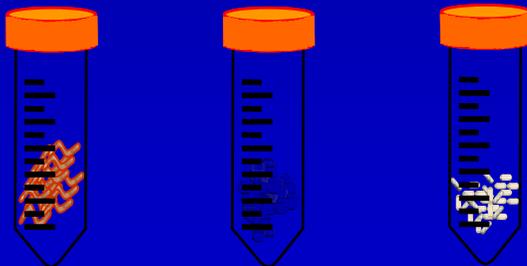


Echantillon hétérogène

- Diversité spécifique
- Diversité physiologique (ex: cellules vivantes/mortes)

Tri par Cytométrie en flux

- **Séparation physique** des cellules d'intérêt
- **Concentration** des « cellules moins abondantes »
- Maintien de la **viabilité**



- **Analyses ultérieures**
(biologie moléculaire, protéomique)
- **Mises en culture**
- **Observation microscopique**

Principes de tri par cytométrie en flux

- Tri mécanique
- Tri électrostatique
- Technique de photo-altération
 - toutes les particules à l'exception des cellules d'intérêt sont illuminées par un faisceau laser pulsé de très haute énergie qui a pour but de les tuer

Principe du tri mécanique

- Action mécanique pour dévier la portion de liquide qui contient la particule à trier
- Différents types :

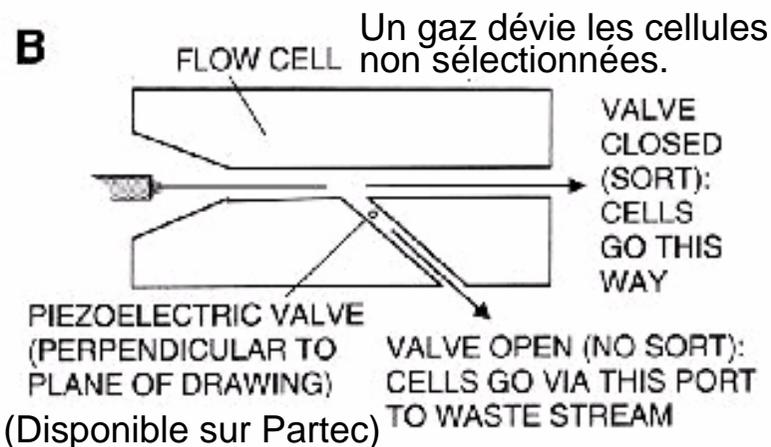
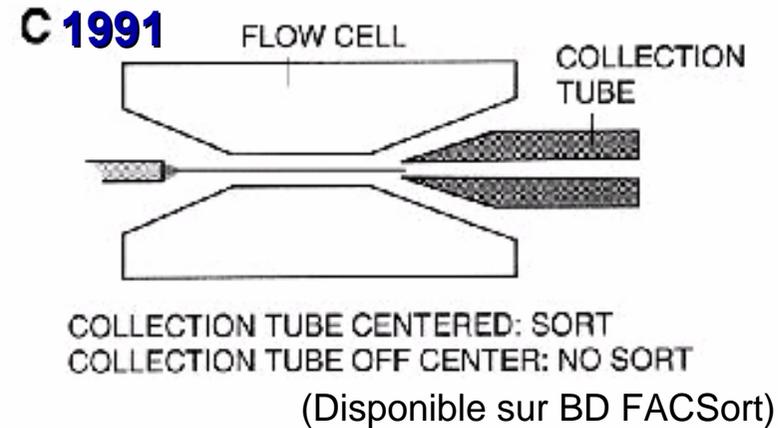
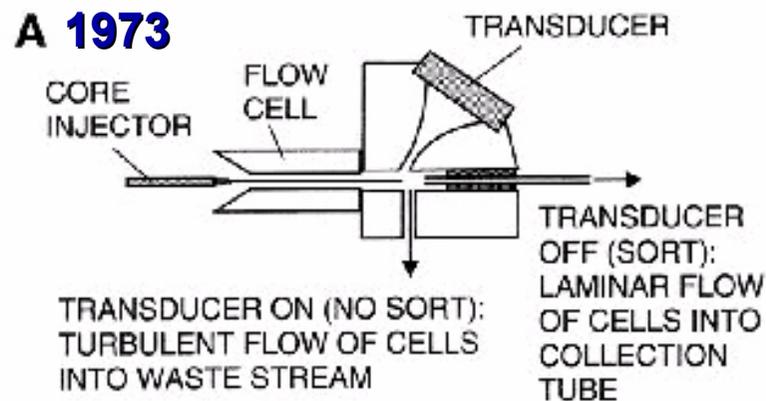


Figure 6-4. Fluidic sorter designs. **A:** Friedman's acoustic sorter. **B:** Fluidic switching sorter as used in some Partec instruments. **C:** Sorting arrangement in B-D FACSort and FACSCalibur.

Extrait de Practical Flow Cytometry, 4 Ed – H. Shapiro

Avantages et inconvénients du tri mécanique

■ Avantages

- Matériel moins onéreux que le tri électrostatique
- Facilité d'utilisation (pas besoin d'un technicien spécialisé)
- Tri en système clos → pas de génération d'aérosol (important pour le tri de cellules pathogènes)

■ Inconvénients

- Tri peu rapide (environ 300 – 500 cellules/s max.) en raison des contraintes physiques
- Dilution des cellules triées en raison du volume de liquide déplacé
- Action mécanique sur les particules (cellules endommagées?)

La technologie du tri électrostatique

- Richard Sweet a développé la technologie électrostatique des imprimantes à jet d'encre.
- Utilisé par Mack Fulwyler pour créer un trieur de cellules (1960s).

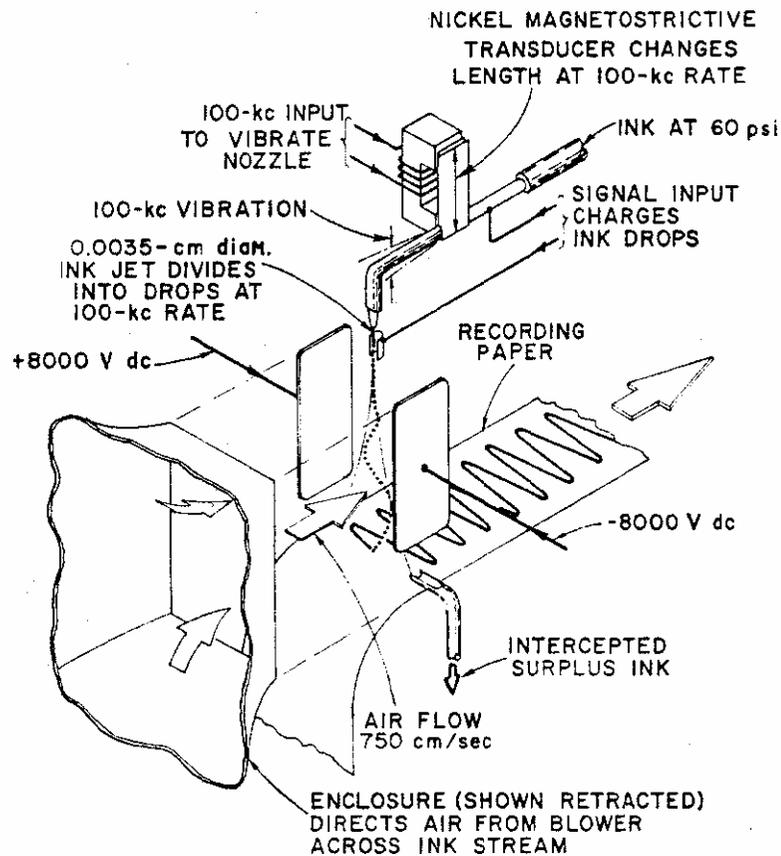


FIG. 1. Ink-jet oscillograph.

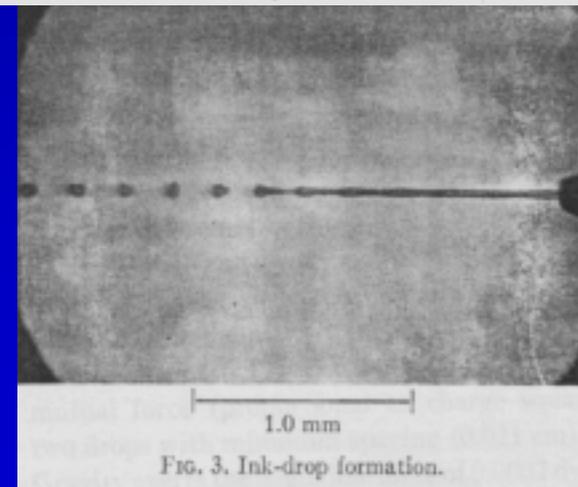
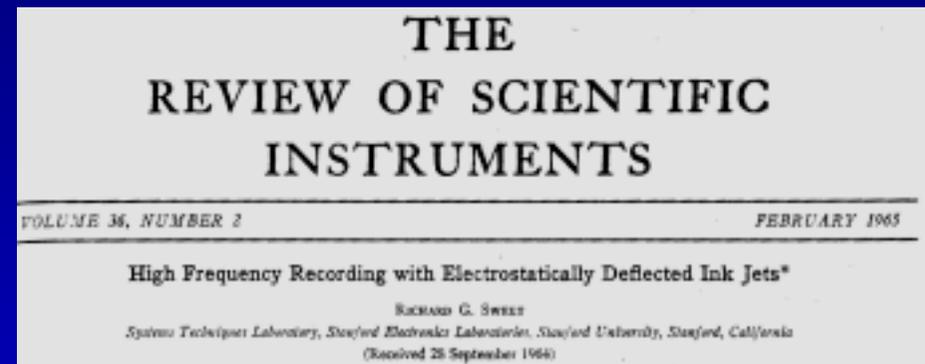
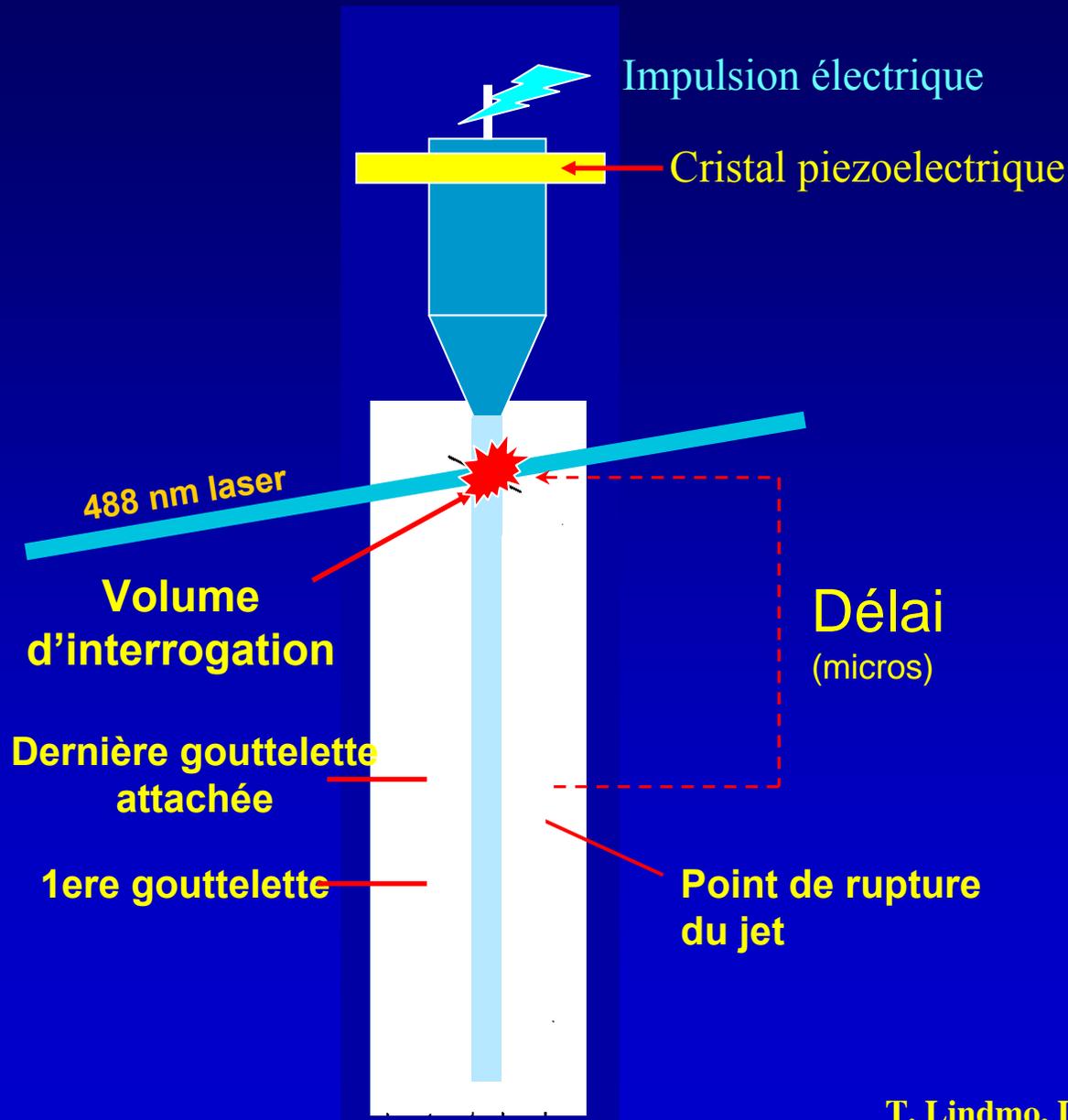


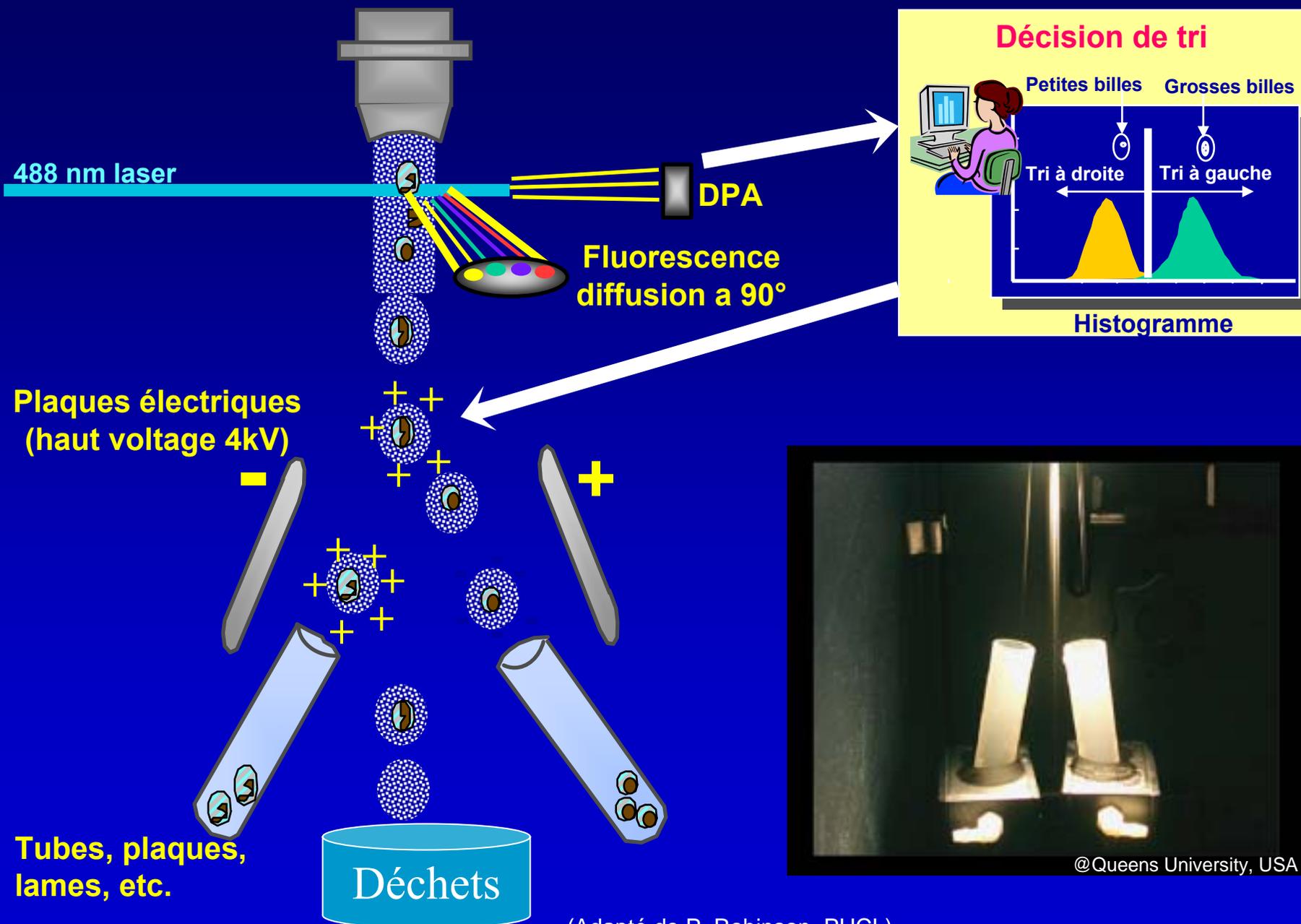
FIG. 3. Ink-drop formation.

Génération de gouttelettes



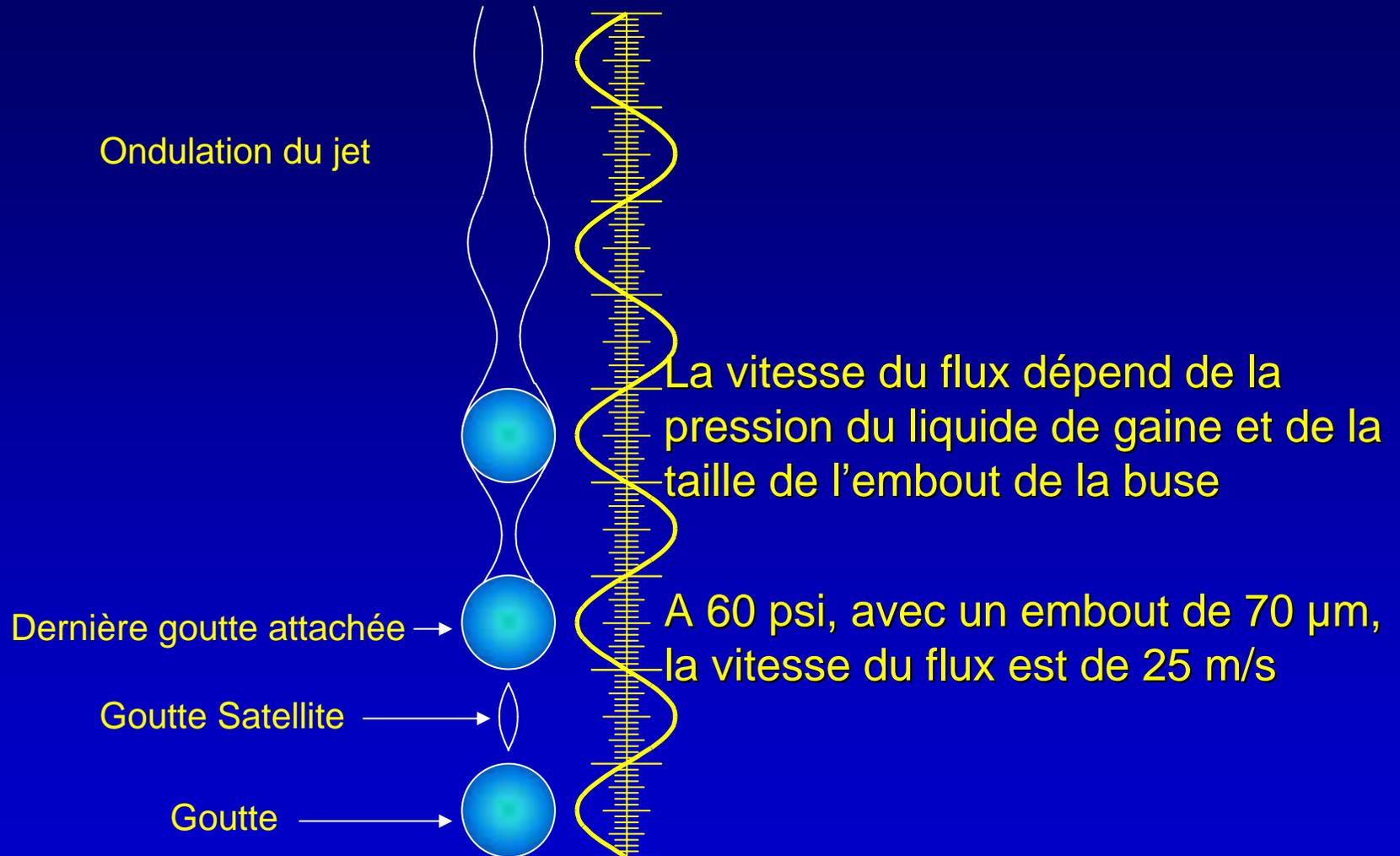
As liquid is ejected into air, it will form droplets. By vibrating the nozzle at a defined frequency, the size of these droplets and the position along the stream where they form can be controlled with great precision.

Séparation des gouttelettes



(Adapté de P. Robinson, PUCL)

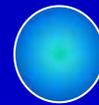
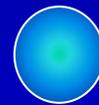
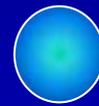
Optimiser la formation des gouttelettes



Formation des gouttelettes

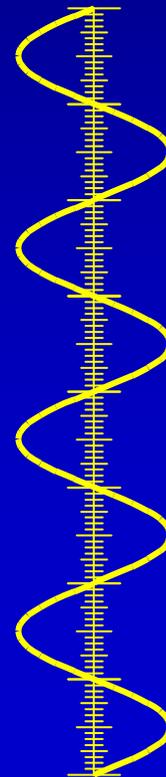
- Fréquence et amplitude de vibration du cristal piézoélectrique -

- **Amplitude**
0 - 135 V
- **Fréquence**
Gouttes/Sec
0 - 200 000 Hz



Gouttes

**Amplitude
augmentée (v)**



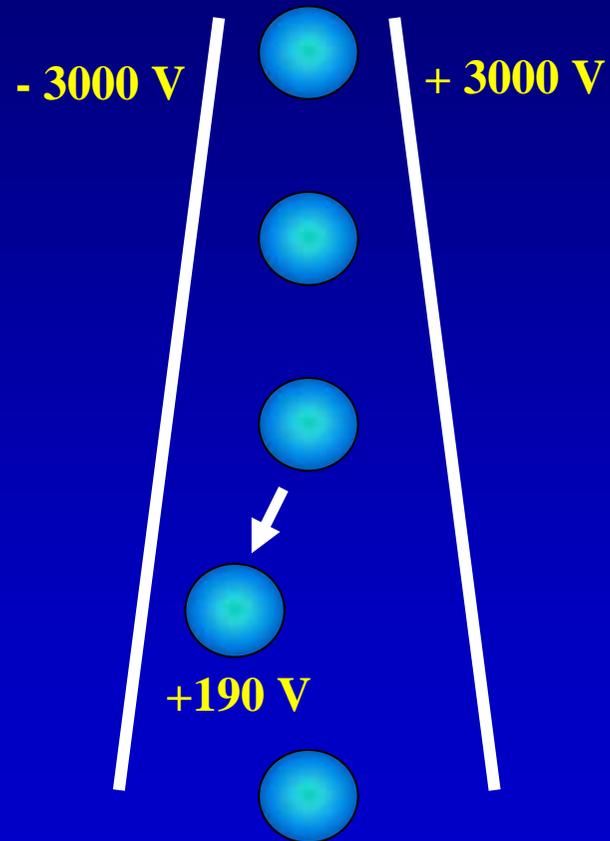
**Fréquence
augmentée (Hz)**



Augmentation
du nombre
de gouttelettes

Formation des gouttelettes

- Charge électrique des gouttelettes -



- La déflexion électrostatique agit sur les gouttes individualisées
- Tri 2 voies
 - ± 190 volts
- Tri 4 voies
 - ± 190 volts (gauche & droite)
 - ± 85 volts (1/2 gauche & 1/2 droite)

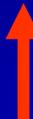
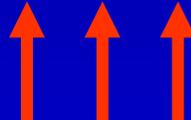
Condition hydrodynamique

- ***Pressions du liquide de gaine / échantillon :***
 - **Pression de l'échantillon toujours supérieure à celle du liquide de gaine**
 - **Sur MoFlo, la différence entre les 2 : 0,1 à 0,7 psi (soit 0,007 à 0,05 bars)**

Différents modes de tri (I)

Mode de tri	Caractéristique	Application
Enrichi / enrichir	Essai de retenir tous les événements positifs sans se soucier de la présence d'événements négatifs	Haut recouvrement
Pureté / purifier	Trie les événements positifs seulement (en l'absence d'événements négatifs)	Haute pureté
Une seule cellule Single cell	Idem que mode pureté si ce n'est qu'il accepte seulement un seul événement positif par décision de tri	Dépôt d'une seule cellule
Mixte	Trie en mode pureté à gauche et tous les événements non retenus à droite	Haute pureté dans une direction et recouvrement des événements positifs (aborts) non retenus dans l'autre direction

Différents modes de tri (II)

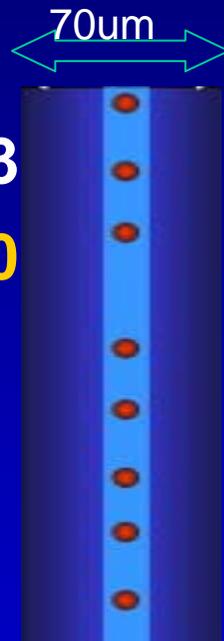
	Pureté	Rendement	Cellules exclues du tri
Single	99 - 100 %		
Purifier	95 %		
Enrichir	65-85 %		

De l'importance des rapports des pressions

Pression (PSI) :

Echantillon 60.3

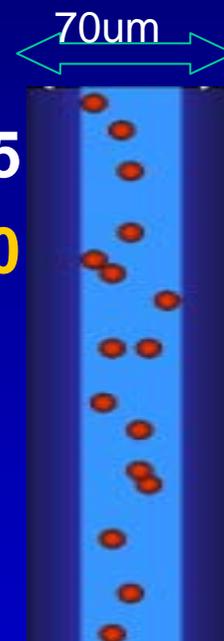
Liquide de gaine 60.0



- Bon rendement
- Volume trié correct
- Nombre d'aborts faible

61.5

60.0



- Rendement moyen
- Faible volume trié
- Nombre d'aborts important

Risque de doublets!

3 Règles fondamentales pour le tri

- 1) Pression différentielle échantillon / liquide de gaine
(pression éch. > pression liquide de gaine)

- 2) [Echantillon/ml] = Vitesse X 1000
 Ex: Si tri à 40 000 événements/sec, il faut un échantillon où 40 millions de cellules/ml

- 3) Diamètre de la buse / diamètre de la cellule = 3 à 5 fois supérieur

Avantages et inconvénients du tri électrostatique

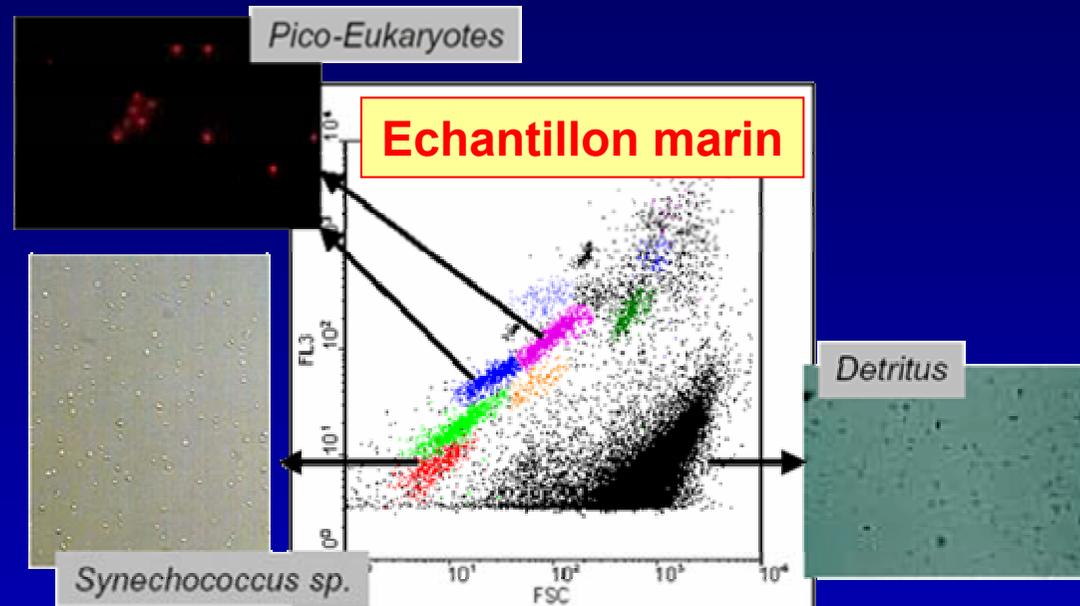
■ Avantages

- Très rapide (jusqu'à 70 000 cellules triées par seconde)
- Peu de dilution des cellules (faible volume des gouttelettes)
- Pas d'action mécanique sur les cellules
- Tri sur plusieurs voies
- Viabilité cellulaire

■ Inconvénients

- Prix
- Système ouvert (formation d'aérosol)
- Stabilité/sensibilité (sensible à température)
- Mise au point (requiert un technicien expérimenté)

Exemple d'application du tri (I)

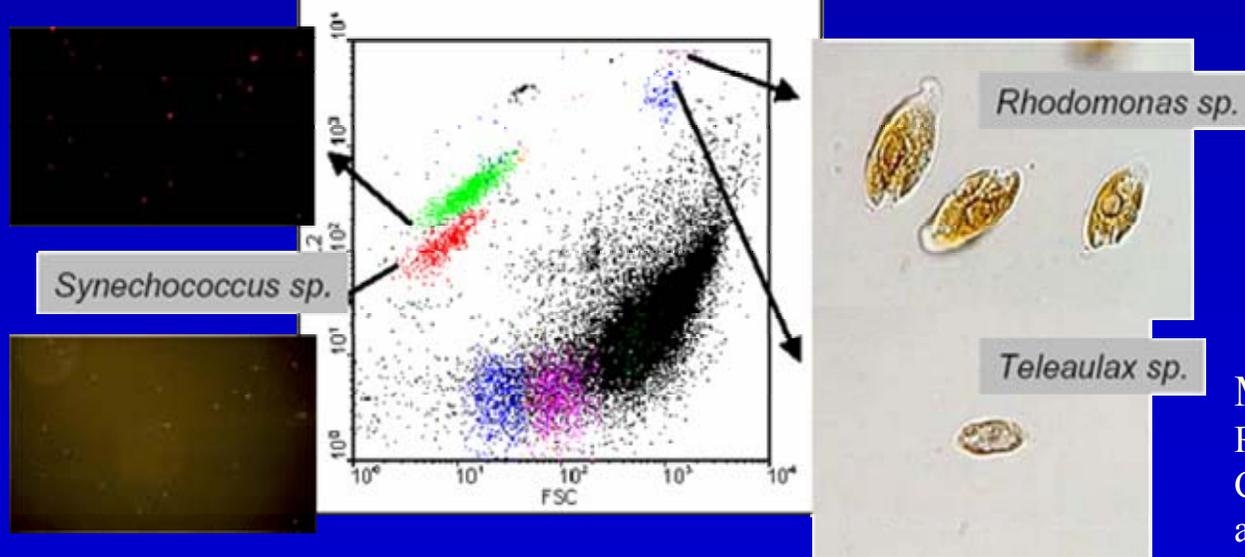


- **Séparation physique** des cellules d'intérêt

- **Observation visuelle** (microscopie)

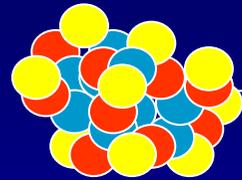
- **Concentration** des « cellules moins abondantes »

- **Mises en culture**



Marcus Reckermann,
Research and Technology
Centre Westcoast (FTZ)
at Büsum (Kiel University)

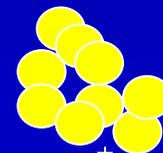
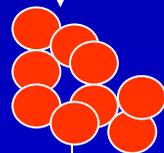
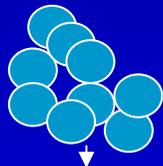
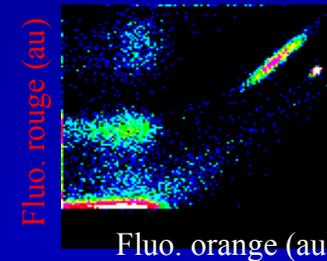
Exemple d'application du tri (II)



Echantillon hétérogène



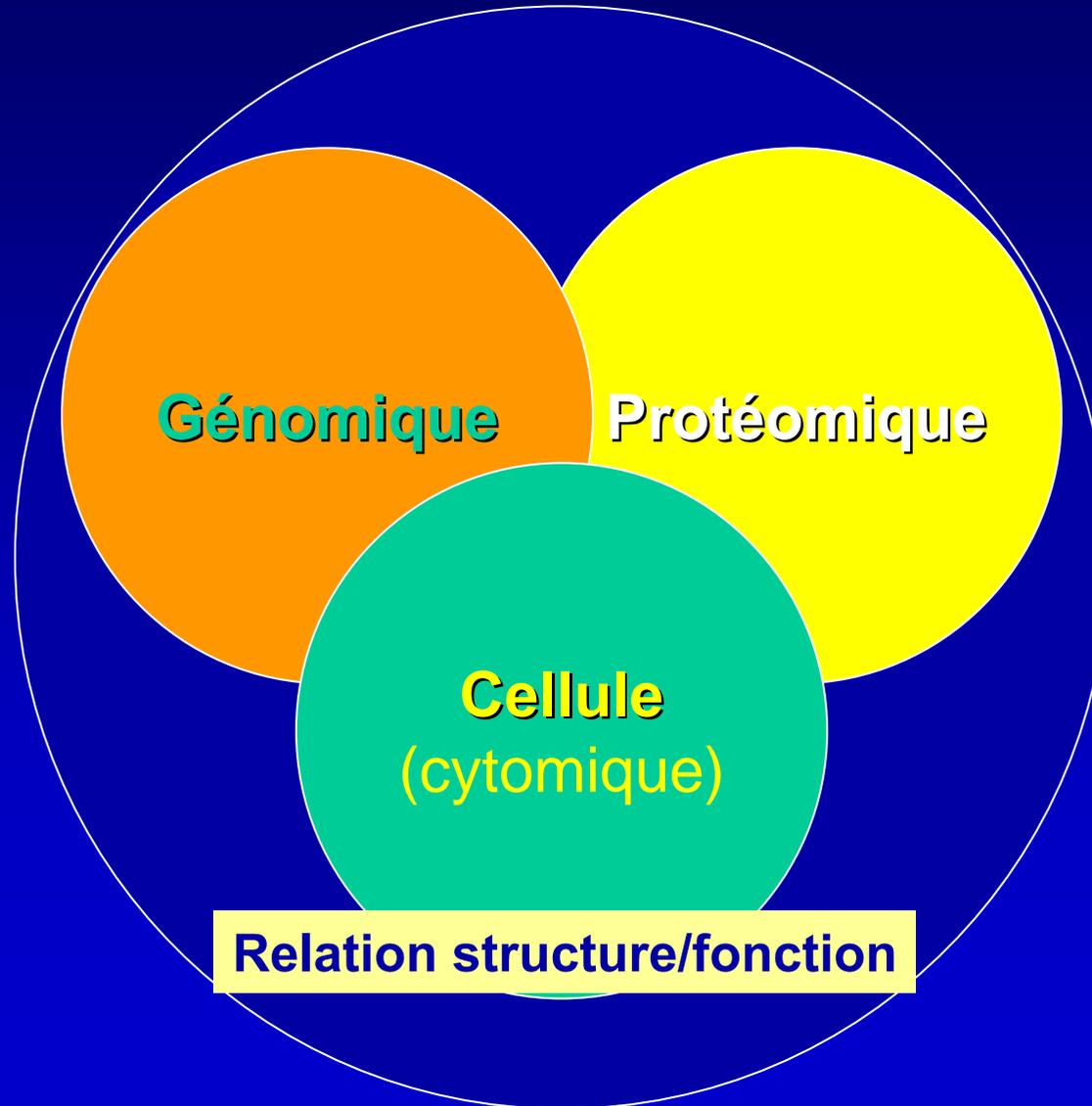
Analyse par cytométrie en flux



Tri

**Analyses ultérieures
Biologie moléculaire
(génomique, protéomique)**

Conclusion



A scenic view of a bay at sunset. The sky is a vibrant orange and yellow, reflecting on the water. Silhouetted cliffs frame the bay, and a rocky island is visible in the distance. The overall mood is peaceful and beautiful.

Thank you

Gracias

Grazie

Merci

Obrigado

Danke