HAL
open science

Cytométrie en flux et en images

Marie Nguyen - de Bernon, Sébastien Herbert

To cite this version:

Marie Nguyen - de Bernon, Sébastien Herbert. Cytométrie en flux et en images. MAYOL Jean-François; LAPLACE-BUILHÉ Corinne; MULLER Christian D. La cytométrie en flux, 2ème édition, Lavoisier, pp.455-464, 2020, 978-2-7430-2490-1. pasteur-02878022

HAL Id: pasteur-02878022

https://pasteur.hal.science/pasteur-02878022

Submitted on 22 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Cytométrie en flux et en images

Sébastien HERBERT & Marie NGUYEN

Introduction

La cytométrie en flux est une technique de haut débit très robuste qui permet de caractériser de manière quantitative les caractéristiques physiques et biologiques des cellules en suspension dans un flux. Elle permet également de trier les cellules d'intérêt, cependant, la décision de créer une région ('gating') pour délimiter une population cellulaire doit être prise sur des critères relatifs à l'échantillon complet. En effet, les cellules s'affichant comme des nuages de points, des erreurs peuvent se produire en particulier pour les personnes qui débutent en cytométrie. Les paramètres FSC ('forward scatter') et SSC ('side scatter') habituellement utilisés pour la taille et la granulosité des cellules ne correspondent pas à des valeurs absolues mais à des valeurs relatives qu'il est possible de faire varier afin de différencier les différentes populations entre elles. À l'inverse, les images de cellules analysées permettraient de distinguer différents types de cellules, leurs tailles, leurs morphologies, les débris, les agrégats etc. En bref, une analyse qualitative détaillée et absolue telle que celle obtenue par microscopie serait des plus utiles. Cependant, la microscopie classique demeure en règle générale limitée quant à l'aspect quantitatif.

Pour réconcilier ces deux mondes, les cytomètres en images produisent des images de cellules de manière suffisamment détaillées et relativement rapidement. Sans égaler la vitesse d'analyse d'un cytomètre en flux, ni avoir la résolution d'un microscope confocal, les cytomètres en images ont trouvé leur niche :

Ils sont ainsi particulièrement adaptés à l'étude de la morphologie, des changements conformationnels, des localisations subcellulaires, de la distribution de biomarqueurs dans la cellule, des interactions cellule-cellule, etc.

Bénéficiant de la convergence des avancées récentes de la microscopie et de la microfluidique, la cytométrie en images est aujourd'hui un domaine en plein développement.

De façon générale, ce qui distingue les cytomètres en images des microscopes conventionnels, ce sont des motorisations et automatisations totales de tous les éléments permettant de faire des séquences d'acquisition paramétrées et répétitives (filtres, platine échantillons, illumination, etc…). De plus, ces systèmes sont dotés de logiciels de traitement d'images performant capables d'analyser en quasi-simultané les différents paramètres définis

par l'utilisateur. Il est ainsi possible, tout comme pour un cytomètre en flux, d'obtenir un certain nombre de résultats dès la fin de l'acquisition ou d'effectuer des analyses plus poussées en post-acquisition. Dans ce chapitre, les microscopes à haut débit en tant que tels ne seront pas mentionnés, excepté lorsqu'ils sont également des cytomètres en images.

Pour tous les instruments réputés être des cytomètres, les représentations graphiques s'affichent sous forme d'histogrammes et « dot-plots » et les fichiers de données peuvent s'exporter en « FCS » ('Flow Cytometry Standard'), tout comme pour la cytométrie en flux. En prime, ils offrent la possibilité de voir spécifiquement les images des cellules d'une région ou d'un nuage de points, chaque point représentant une cellule (voir Fig. 1).

Le fonctionnement des différents types de cytomètres en images repose sur des techniques qui relèvent l'imagerie optique. Pour cette raison, la première partie de ce chapitre détaillera les multiples technologies d'imagerie qui existent et leur rapport à la cytométrie. La deuxième partie se référera aux instruments atypiques permettant, ou non, le tri de cellules. En effet, certains appareils, bien qu'ils ne soient pas à proprement parler des cytomètres, utilisent des techniques originales soit pour imager les cellules, soit pour les « trier ». Enfin, la troisième partie parlera de l'apport de la microfluidique à la cytométrie en images.

D'autres techniques d'imagerie par fluorescence appliquées à la cytométrie telles que parallélisation des champs de vue, le STEAM, FIRE, transformation spatio-temporelle et LSFM (microscopie par feuillets de lumière) ne seront décrits ici que dans l'encadré récapitulatif (voir **Encart 1**), car ce sont des techniques encore en développement (revue dans [1]). Ce chapitre ne mentionnera que les technologies abouties ayant donné lieu à la commercialisation d'instruments.

I. De multiples technologies d'imagerie

Il existe 2 principales familles de microscopes conventionnels. La première famille est basée sur des caméras permettant d'acquérir une image complète du champ de vue en une seule étape d'acquisition de l'échantillon. Cette approche repose généralement sur les caméras CCD (Charge-Coupled Device), EM-CCD (electron-Multiplying CCD), ou sCMOS (scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor) qui tendent à être de plus en plus présentes sur les systèmes d'imagerie du fait de leur relatif faible coût ainsi que leurs grandes vitesse d'acquisition et sensibilité à la lumière. La seconde famille est basée sur l'utilisation de PMT (tubes photomultiplicateurs) possédant un temps de transfert du pixel imagé extrêmement court et avec une forme de bruit d'acquisition (courant d'obscurité) très faible

mais qui nécessite une acquisition pixel par pixel. La vitesse du système est ainsi limitée par la vitesse de scan de l'échantillon complet.

Enfin, puisqu'une image ne peut être nette qu'à une distance donnée de l'objectif, les microscopes par fluorescence conventionnels reconstruisent le volume des objets en découpant l'objet en tranches optiques acquises en série. Cette approche n'étant pas compatible avec le principe d'acquisition rapide en flux, l'information volumique sera soit ignorée soit encodée de façon à ce que toutes les tranches optiques soient au point et nettes sur une seule image.

Ces deux familles ont été adaptées à la cytométrie en images et peuvent être sous-divisées en plusieurs sous-catégories (revue dans [1]) :

1. Imagerie par PMT

La méthode dite de « Laser Scanning Cytometry » (LSC), proche des systèmes de 'Laser Scanning Microscopy' conventionnels, nécessite de scanner un échantillon pixel par pixel de manière aussi rapide que possible. L'une des manières de procéder consiste à utiliser un miroir rapide pour orienter le laser sur l'échantillon et scanner/imager chaque pixel ligne après ligne. Bien qu'efficace, robuste et permettant une acquisition multi-spectrale (multiples canaux de fluorescence acquis en parallèle), elle est limitée en vitesse et permet une acquisition inférieure à 100 cellules/sec dans les meilleures conditions et en limitant fortement la résolution spatiale.

Pour ce type d'instruments, tout comme pour les microscopes, les cellules ou tissus doivent être sur un support (lame, plaques…) et être préférentiellement en monocouche afin de minimiser tout problème d'identification des cellules uniques.

Le LSC, utilise à la base un microscope ainsi qu'un procédé propriétaire qui lui permet de scanner les cellules très rapidement (Fig. 2). Les faisceaux lasers de multiples longueurs d'onde sont spatialement rassemblés par un jeu de miroirs dichroïques puis dirigés vers un miroir oscillant qui va permettre un balayage laser de la lame située sous l'objectif [2]. Le diamètre du faisceau de balayage varie selon l'objectif. Les réponses fluorescentes émises à différentes longueurs d'onde par les cellules sont captées au niveau de la lentille de l'objectif, puis dirigées vers un miroir de 'scan' avant de passer par une série de miroirs dichroïques / filtres optiques et d'atteindre les PMT. Tout comme pour les cytomètres en flux, chaque PMT associé à sa combinaison de filtres optiques et de miroirs dichroïques va enregistrer spécifiquement une fluorescence correspondant à une gamme précise de longueurs d'ondes.

De même que pour les cytomètres en flux les compensations de fluorescence peuvent être effectuées en temps réel ou au moment de l'analyse. Les cellules peuvent aussi être caractérisées en lumière blanche. Dans ce cas, les caractéristiques de diffusion de la lumière incidente ainsi que l'absorbance des objets est mesurée par un condenseur optique et l'intensité des signaux est mesurée par des capteurs optiques. L'autofocus est automatique facilitant les mises au point. Pour capturer les images, selon le détail désiré, il est possible de scanner entièrement une lame en haute résolution ou pour une analyse fine plus rapide : d'effectuer un premier scan à basse résolution qui servira à identifier les régions d'intérêt puis un deuxième scan à haute résolution uniquement des régions d'intérêt.

D'une manière générale, les instruments de cette famille sont particulièrement adaptés pour :

- Les études cinétiques de cellules individuelles (cinétiques enzymatiques…)
- L'analyse de petits échantillons de cellules (liquide cephalo-rachidien…)
- L'analyse des cellules adhérentes et des tissus

Une fois analysé, l'échantillon fixé peut être conservé pour des ré-analyses ultérieures ou pour des marquages supplémentaires.

Parmi les instruments actuels les plus représentatifs du marché, on peut citer :

- Le *iCyte* (Thorlabs – CompuCyte), la dernière génération de LSC utilise une base de microscope inversé permettant l'utilisation de divers supports standards (lame, boites de Pétri, chambres de culture, plaques de microtitration ou autre système, défini par l'utilisateur, de la taille d'une plaque de culture). Il peut également disposer d'une chambre d'incubation avec température et atmosphère contrôlées. Il propose jusqu'à 4 lasers et peut détecter jusqu'à 4 gammes de fluorescence simultanément ainsi que l'absorbance et le SSC avec un grossissement de 4x à 60x (Tableau 1).

- Le *LEAP* ('Laser Enabled Analysis and Processing' - Intrexon), ainsi que le *Celigo Imaging Cytometer* (Nexcelom), utilisent une lentille F-theta propriétaire ainsi qu'un jeu de galvanomètres optiques pour scanner les cellules très rapidement sur une grande profondeur de champ et sur une surface allant jusqu'à 1 cm^2 sans avoir à refaire une mise au point [3]. Ces deux machines ont une même origine (Cyntellect), l'un étant un cytomètre en images « analyseur » (le Celigo) alors que l'autre est un « trieur » (le LEAP, Tableau 1). Le LEAP peut détecter jusqu'à 6 fluorescences + BF + 'Darkfield' (DF) et

permet d'isoler les cellules d'intérêt en détruisant physiquement les autres cellules grâce à un laser pulsé puissant et très précis. Au final, seules les cellules d'intérêt sont préservées et restent sur le support.

- L'*Acumen Cellista* (TPP Labtech) est un 'laser scanning imaging cytometer' [4] qui supporte jusqu'à 3 lasers d'excitation. Pour scanner, cet appareil utilise également une lentille de scan F-theta qui permet de diriger le laser incident sur l'échantillon et d'acquérir sur une grande profondeur de champ évitant ainsi d'avoir à faire des mises au point. Les échantillons doivent être scannés de manière séquentielle avec chacun des lasers. Jusqu'à 4 fluorescences/laser peuvent être acquises simultanément (Tableau 1).

2. Imagerie par caméra

Les instruments de cette famille sont particulièrement adaptés pour :

- L'étude des cellules en suspension
- Les analyses morphologiques ou de changements conformationnels
- L'étude des interactions cellule/cellule (synapse…)

Une limitation de l'acquisition d'image de cellules en mouvement (*i.e.* dans un flux) est que le temps d'acquisition doit être très court pour minimiser les effets de floutage induits par le déplacement de l'objet imagé. En conséquence, l'intensité lumineuse recueillie est très faible. Pour contrer cet effet, plusieurs approches ont été utilisées :

a) Décalage temporel et intégration ('Time Delay and Integration' – TDI)

Ce système permet d'additionner le signal sur plusieurs intervalles d'exposition mais nécessite un contrôle électronique extrêmement précis du flux en coordination avec l'acquisition de l'image par la caméra. L'ensemble de ces contraintes limite le système à une vitesse d'acquisition de l'ordre de quelques milliers de cellules par seconde. Ce système est utilisé notamment par l'*ImageStream* (voir Tableau 1).

- L'*ImageStream*, grâce à des caméras CCD à décalage temporel, peut détecter de faibles intensités de signal avec une sensibilité comparable à la cytométrie classique [5]. Des éléments de décomposition spectrale, en amont des caméras, décomposent les signaux lumineux émis en différentes gammes de longueurs d'onde et permettent d'obtenir jusqu'à 12 images par cellule simultanément (10 Fluorescences + SCC/DF + BF, Fig. 3). Les capteurs des caméras sont divisés en 'arrays' : c'est-à-dire en autant de lignes ('tranches temporelles') et de colonnes ('gammes spectrales') que nécessaire pour détecter l'ensemble

des émissions optiques de la population étudiée. Du fait que cette technique génère de fortes contraintes concernant le centrage ainsi que la vitesse dans l'axe du flux et rotationnelle de l'objet, un système de tri en aval peut difficilement être envisagé car il générerait de probables perturbations du flux causant des instabilités dans le système TDI.

La dernière génération *ImageStream^X Mark* II peut accueillir jusqu'à 6 lasers et acquérir jusqu'à 4,000 cellules/seconde, avec un grossissement de 20x à 60x. Son « petit frère » le Flowsight a une configuration plus restreinte (Tableau 1).

b) Encodage de l'information temporelle ('Temporally coded excitation' [6])

Une autre approche pour renforcer le signal recueilli par la caméra est l'encodage de l'information temporelle dans l'image par l'utilisation d'une source de lumière intermittente (stroboscopique). En corrélant la séquence d'allumage/extinction de la source lumineuse à une acquisition en continu, l'image brute acquise par la caméra est la somme des différentes photos instantanées de l'objet étudié (une pour chaque flash de lumière). Il est ensuite possible pour un ordinateur de séparer puis d'additionner les différents instantanés superposés pour reconstruire une image plus intense de l'objet.

- Le *FlowCam* (Fluid Imaging Technologies) utilise ce type de technologie. Bien que cet instrument ait été développé à l'origine pour analyser des particules en suspension (gestion des eaux, recherche aquatique, industries pharmaceutiques…), certaines de ses applications (identification des micro-organismes aquatiques, processus de microencapsulation…) le rapprochent de la catégorie des cytomètre en images. Cet appareil dispose d'un laser (3 Fluorescences + BF) et peut acquérir jusqu'à 167 images/sec avec un grossissement de 20x à 60x (Tableau 1).

II. Les microscopes atypiques

a) Les microscopes atypiques à capacité de tri cellulaire

Dans ce paragraphe, seront mentionnés des instruments qui ne se définissent pas comme des cytomètres en images, même s'ils s'en rapprochent par leur capacité à trier les cellules.

- Le *LEAP* (voir paragraphe I.1. ci-dessus).
- L'*ALS CellCelector* (ALS Automated Lab Solutions) utilise une base de microscope inversé et peut prendre des images de cellules sur différents types de supports de culture

cellulaire (plaque de culture, lame…). Une fois identifiées, les cellules d'intérêt sont aspirées via un système de seringue à embouts jetables (Tableau 1).

- Dans la même veine, le *CytePicker* (RareCyte) utilise une base de microscope à grand champ de vision couplé à une seringue pour aspirer les cellules d'intérêt sur des lames de culture. Ces deux machines trient les cellules de manière très douce et précise, mais à vitesse très lente (Tableau 1).

- Le *CellSearch System* (CellSearch) a été développé pour isoler les CTC (cellules tumorales circulantes). Le CellSearch System est un ensemble de deux machines : un automate pour préparer l'échantillon et un microscope semi-automatique. Le sang est centrifugé dans un tube spécial pour séparer le plasma des autres composants du sang. Les CTC sont séparées magnétiquement des autres cellules puis marquées par une combinaison d'anticorps. Elles sont ensuite placées dans une cartouche magnétique propriétaire pour amener les cellules sur un champ focal précis permettant leur observation par un microscope dédié. En utilisant des anticorps dirigés contre d'autres types cellulaires, il est également possible d'isoler d'autres types de cellules que les CTC (Tableau 1).

b) Les microscopes atypiques sans capacité de tri cellulaire

- Le *SpectraMax i3x* (Molecular Devices) est un instrument compact multifonctionnel qui peut mesurer l'absorbance, la fluorescence, la luminescence, les Western-blots et peut également faire de la cytométrie en images (base de microscope à épifluorescence). Ces différentes options sont sur des cassettes interchangeables. Il détecte 2 fluorescences + BF (grossissement de 4x, Tableau1).

- Le *NucleoCounter NC-3000* (Chemometec) utilise une base de microscope à épifluorescence entièrement automatisée permettant l'acquisition, l'analyse et la présentation des données. Il peut détecter jusqu'à 5 fluorescences + BF + DF (grossissement de 2x), et a la possibilité d'avoir jusqu'à 8 sources LED d'excitation et 9 filtres d'émission interchangeables (Tableau 1).

- Le *Cytell Cell Imaging System* (GE Healthcare Life Sciences) utilise une base de microscope à épifluorescence inversé. Il peut détecter jusqu'à 4 fluorescences + BF (grossissement de 4x – 10x, Tableau 1).

- L'*IC2000-KIC* (Vala Sciences) est un cytomètre en images utilisant une caméra CMOS et un système propriétaire d'autofocus basé à la fois sur la détection de surface et sur l'image. Cet instrument scanne en continu en champ large la totalité de l'échantillon à analyser. Il possède de 2 à 7 lasers et une roue à filtres d'émission de 10 positions (grossissement de 4x à 60x). Le contrôle environnemental est en option (Tableau 1).

- Le *Cellometer Vision CBA* (Nexcelom) est un cytomètre en images conçu à la base pour compter les cellules. Cet instrument très simple d'utilisation possède deux modules optiques à fluorescence interchangeables (grossissement de 5x à 10x). Il utilise uniquement un format de lame propriétaire (Tableau 1).

- Le *TissueFAXS* (TissueGnostics) se définit comme un cytomètre pour tissus. C'est un système intégré couplé à un microscope à épifluorescence droit ou inversé à champ large. Il est possible de contrôler le scan de manière automatique et de traiter les images à la façon d'un logiciel de cytométrie. Cet instrument peut intégrer un module confocal de type spinning-disk ainsi qu'un contrôle environnemental en option (Tableau 1).

- Le *HoloMonitor* (Phase Holographic Imaging) est un cytomètre utilisant les technologies de microscopie holographique et à contraste de phase quantitatif couplé à une acquisition d'images à intervalles réguliers (imagerie intermittente ou 'Time-Lapse'). Ces procédés permettent d'obtenir une imagerie quantitative à contraste de phase pour observer les cellules de manière non-invasive (*i.e.*, sans marquage) dans leur milieu de culture sur une durée de plusieurs jours. Plusieurs paramètres peuvent être extrapolés : surface, épaisseur, volume, confluence et nombre de cellules (Tableau 1).

III. Instruments utilisant la microfluidique

L'évolution actuelle de la microfluidique vise à miniaturiser les instruments soit pour les rendre portables, soit pour utiliser la plus petite quantité possible d'échantillons, soit enfin pour permettre une avancée technologique. Les systèmes miniaturisés sont communément appelés 'lab-on-a-chip' (LOC) ou laboratoire-sur-puce [7].

Les cytomètres en flux de par leur conception même utilisent la microfluidique. Cependant, ils sont généralement volumineux et difficilement déplaçables.

La miniaturisation n'a permis pour le moment de rendre que certains cytomètres en flux portables, tels que le *HPC-100* (Handyem) ou le *CyFlow miniPOC* (Sysmex - Partec) qui restent cependant des instruments très basiques.

Par ailleurs, un certain nombre de cytomètres en flux récents utilisent des puces microfluidiques jetables pour l'analyse ou le tri des cellules (par exemple Agilent Technologies, On-Chip Biotechnologies, Cytonome, Mitenyi Biotec, Sony…). Ces puces ont l'avantage de ne pas générer d'aérosols et permettent d'éviter les problèmes de contamination que ce soit au niveau cellulaire ou au niveau du manipulateur.

Dans cette catégorie, très peu d'appareils ont été commercialisés et un seul se présente comme un cytomètre en images. Cependant, la recherche est considérable dans ce domaine (revues dans les références [7–9]).

- Le *DEPArray* (Silicon Biosystems) utilise une technologie basée sur l'utilisation d'un champ électrique non uniforme permettant d'exercer des forces sur des particules neutres polarisables telles que des cellules en suspension dans un liquide. Ce principe électrocinétique, appelé DEP (diélectrophorèse) peut être utilisé pour capturer individuellement des cellules en suspension dans des « cages DEP ». Chaque cellule capturée est alors examinée par microscopie à fluorescence et analysée via un logiciel adapté. Ce système dispose d'une illumination par LED (4 fluorescences + BF) et d'un grossissement de 10x à 20x. Les cellules d'intérêt peuvent ensuite être triées en les déplaçant une par une d'une cage à une autre grâce à une matrice ('array') d'électrodes (Fig. 4). Une cartouche *DEPArray*, dans laquelle les cellules sont déposées, combine la microfluidique et la microélectronique nécessaire pour isoler les cellules. La limitation de ce système est qu'il ne peut traiter au maximum que 28 cellules/s pour une cartouche. Par conséquent, il peut être nécessaire d'enrichir en amont.

Certains systèmes microfluidiques ont été développés pour des applications autres que la cytométrie. Il nous a semblé pertinent de les signaler car ils pourraient être utilisés dans le futur pour de nouvelles applications de la cytométrie en images.

- Le *Cyto-Mine* (Sphere Fluidics) utilise une technologie d'encapsulation de cellules dans des picogouttes ('picodroplets' : ~ 300 pL). Ces picogouttes peuvent ensuite être visualisées via un microscope à épifluorescence et triées via un système de microfluidique propriétaire.

- Le *BioFlux 1000Z* (Fluxion Biosciences) a été développé pour étudier le comportement des cellules dans un flux physiologique (flux sanguin, salive…,[10]). Il utilise la microfluidique pour fournir un flux laminaire dans le but de créer un environnement de culture dynamique similaire aux conditions physiologiques *in vivo*. Ce système est combiné à microscope à épifluorescence pour visualiser les cellules.
- Dans cette catégorie, le *ChipCytometry* (Zellkraftwerk), bien qu'il ait une base de microscopie comme les instruments cités ci-dessus, procède d'une approche différente [11] : sa technologie est basée sur l'utilisation d'une puce microfluidique sur lame. Les cellules sont déposées sur la puce à laquelle elles vont adhérer. Les marquages des cellules puis leurs lavages s'effectuent directement sur la puce soit manuellement soit via un système d'injection microfluidique. La lame est ensuite placée sur un microscope à épifluorescence pour acquérir les images, puis, les marqueurs fluorescents sont photoblanchis ('photobleached'). D'autres marqueurs peuvent par la suite être utilisés de manière itérative avec le(s) même(s) fluorochrome(s). A chaque passage, jusqu'à 1.000 cellules/sec et 5 fluorescences peuvent être détectés. Cette approche permet d'utiliser un nombre quasiment illimité d'anticorps différents (> 30, [12]) sans avoir à composer des panels complexes, ni faire de compensations.

Conclusion

Du fait des convergences technologiques, les limites entre cytomètres en images et microscopes à haut débit sont devenues floues en particulier pour les cytomètres utilisant une base de microscopie.

Etymologiquement, rappelons que cyto=cellule et métrie=mesure. Ceci recouvre des technologies très diverses. Pour tenter d'englober les deux catégories de cytomètres (en flux et en images) et pour les différencier d'un microscope à haut débit, nous proposons la définition suivante : un cytomètre est capable de mesurer quasi-simultanément (*i.e.,* en un seul passage) un grand nombre (> 3) de paramètres mesurables d'une particule individuelle (*i.e.,* la cellule), ces paramètres devant s'afficher en temps réel. Le nombre de paramètres dépend du nombre de lasers d'excitation et du nombre de capteurs des signaux lumineux émis. Le corollaire est que les spectres d'émission des différents signaux fluorescents peuvent parfois se recouvrir, en particulier, lorsqu'un grand nombre de paramètres est mesuré. Dans ce cas, il sera nécessaire de les séparer par des compensations électroniques.

L'une des limites actuelles de la cytométrie en images est la difficulté à pouvoir trier rapidement les cellules d'intérêt et, lorsque cela est faisable, le procédé est relativement lent.

Les nouvelles technologies d'imagerie permettent désormais d'acquérir des images de cellules en flux avec une vitesse qui les rapprochent de la cytométrie en flux. En couplant ces techniques de cytométrie en images avec les dernières avancées de la microfluidique, il est probable que les prochaines années verront apparaître de nouveaux trieurs-cytomètres en images, capables de répondre à des besoins non encore couverts aujourd'hui, et qui pourraient profiter à tous les domaines tant en recherche exploratoire, qu'en clinique.

Références

1 Han, Y. *et al.* (2016) Review: imaging technologies for flow cytometry. *Lab. Chip* 16, 4639–4647

2 Pozarowski, P. *et al.* (2006) Laser Scanning Cytometry. In *Cell Imaging Techniques* (Taatjes, D. and Mossman, B., eds), pp. 165–192, Humana Press

3 Koller, M.R. *et al.* (2004) High-throughput laser-mediated in situ cell purification with high purity and yield. *Cytometry A* 61A, 153–161

4 Wylie, P.G. *et al.* (2015) Advances in Laser Scanning Imaging Cytometry for High-Content Screening. *ASSAY Drug Dev. Technol.* 13, 66–78

5 Basiji, D. (2016) Principles of Amnis Imaging Flow Cytometry. In *Imaging Flow Cytometry* (Barteneva, N. S. and Vorobjev, I. A., eds), pp. 13–21, Springer New York

6 Gorthi, S.S. *et al.* (2013) Fluorescence imaging of flowing cells using a temporally coded excitation. *Opt. Express* 21, 5164–5170

7 Béné, M.C. (2017) Microfluidics in flow cytometry and related techniques. *Int. J. Lab. Hematol.* 39, 93–97

8 Piyasena, M.E. and Graves, S.W. (2014) The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication. *Lab. Chip* 14, 1044–1059

9 Antfolk, M. and Laurell, T. (2017) Continuous flow microfluidic separation and processing of rare cells and bioparticles found in blood – A review. *Anal. Chim. Acta* 965, 9–35

10 Katritsis, D. *et al.* (2007) Wall Shear Stress: Theoretical Considerations and Methods of Measurement. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49, 307–329

11 Hennig, C. *et al.* (2009) A versatile platform for comprehensive chip-based explorative cytometry. *Cytometry A* 75A, 362–370

12 Hennig, C. *et al.* (2014) High-content cytometry and transcriptomic biomarker profiling of human B-cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 172–180.e10

13 Schonbrun, E. *et al.* (2012) Microfabricated multiple field of view imaging flow cytometry. *Lab. Chip* 12, 268–273

14 Goda, K. *et al.* (2009) Serial time-encoded amplified imaging for real-time observation of fast dynamic phenomena. *Nature* 458, 1145

15 Diebold, E.D. *et al.* (2013) Digitally synthesized beat frequency multiplexing for sub-millisecond fluorescence microscopy. *Nat. Photonics* 7, 806

16 Han, Y. and Lo, Y.-H. (2015) Imaging Cells in Flow Cytometer Using Spatial-Temporal Transformation. *Sci. Rep.* 5, 13267

17 Gualda, E.J. *et al.* (2017) Three-dimensional imaging flow cytometry through light-sheet fluorescence microscopy. *Cytometry A* 91, 144–151

Nouvelles technologies

- Parallélisation des champs de vue (‘Multiple field of view’, [13])

La parallélisation des canaux de transport dans des puces microfluidiques dédiées permet d’augmenter le nombre d’objets acquis par unité de temps puisqu’ils sont imagés dans plusieurs champs de vue en simultané. Cette méthode augmente donc la vitesse d’acquisition mais nécessite des modifications du chemin optique limitant l’acquisition à une acquisition monochromatique. Ce type de technique est également utilisé par certains microscopes à haut débit.

Commented [i1]: Combien ?

- STEAM (Serial Time-Encoded Amplified Microscopy).

Le principe de scanning pour obtenir une image 2D étant long, il est difficilement compatible avec les concepts de cytométrie en flux et l’acquisition rapide de cellules. En modifiant le spectre et la dispersion spatiale d’un laser, Goda *et al.* [14] sont parvenus à acquérir une image complète d’une cellule en une seule image extrêmement rapidement. Leur méthode STEAM a ainsi démontré des capacités de vitesse d’acquisition supérieures à 10^5 cellules/sec. De part son encodage spectral de l’image, cette méthode n’a cependant été appliquée qu’à l’imagerie en champ clair (brightfield) ou par contraste de phase et reste limitée à une illumination dans la gamme infrarouge (~1µm).

- FIRE (Fluorescence Imaging using Radiofrequency-tagged Emission)

En se basant sur un principe de marquage des pixels à l’aide de fréquences différentes similaire au STEAM, le concept FIRE [15] utilise des radios fréquences pour encoder la position spatiale de chaque pixel et les acquérir rapidement à l’aide d’un seul PMT. Il permet ainsi d’imager jusqu’à 5.10^4 cellules/sec en flux et en microscopie par fluorescence. Le système optique est cependant compliqué à adapter pour une acquisition de plusieurs canaux de fluorescence, ne permet pas l’acquisition multi-spectrale et est inadapté à l’acquisition d’images en lumière blanche.

- Transformation spatio-temporelle [16]

Cette approche relativement simple peut être adapté à des systèmes de cytométrie en flux conventionnels par l’ajout d’un filtre spatial et de PMTs. Ce système permet d’imager de manière multi-modale (champ clair, contraste de phase et fluorescence) et multi-spectrale si plusieurs PMT sont disponibles. Il reste cependant limité en terme de vitesse d’acquisition avec une vitesse supérieure à 10^3 cellules/sec.

- LSFM (‘Light Sheet Fluorescence Microscopy’, [17])

Par opposition aux systèmes classiques dans lesquels les chemins optiques de la source lumineuse d'excitation et de la collecte des photons émis par les marqueurs fluorescents sont parallèles, les microscopes à fluorescence en feuillets de lumière n'excitent qu'une fine tranche optique perpendiculaire à l'axe de collecte. Cette conception novatrice permet de diminuer drastiquement les effets nocifs de phototoxicité et photoblanchiment tout en diminuant le bruit dû aux marqueurs fluorescents hors focus. Bien que les premiers protocoles de cette technologie nécessitaient une préparation longue et complexe des échantillons, les protocoles actuels mettent à profit les avancées en microfluidique et clarification des échantillons pour simplifier les acquisitions.

Définitions

- **FSC** ('Forward Scatter') : Renseigne sur la taille relative de la cellule.
- **SSC** ('Side Scatter') : Renseigne sur la complexité relative de la cellule.
- **FCS** ('Flow Cytometry Standard') : Format de fichier de données fournissant toutes les spécifications permettant de lire et écrire les données d'une expérience de cytométrie en flux. La dernière version adoptée internationalement est FCS 3.1.
- **CCD** ('Charge-Coupled Device') : dispositif à transfert de charge utilisé dans les capteurs photographiques.
- **EM-CCD** ('Electron-Multiplying' CCD) : CCD à multiplication d'électrons utilisé en particulier lorsque le signal lumineux est très faible.
- **sCMOS** ('scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor') : composants électroniques possédant des parties photosensibles utilisés dans les capteurs photographiques.
- **LSC** ('Laser Scanning Cytometry')
- **PMT** ('PhotoMultiplier Tube')

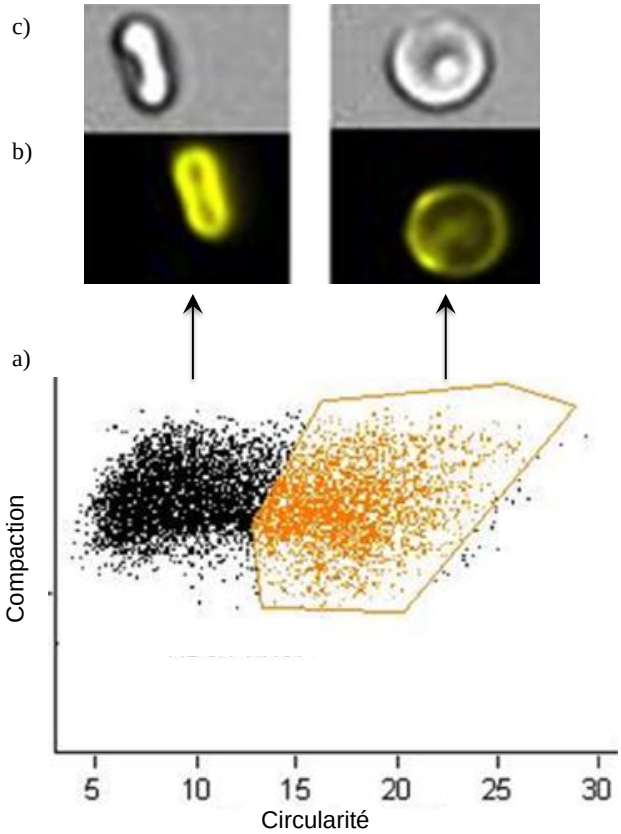

Fig. 1. Extraits d'images d'un « Dot plot » représentant la circularité des globules rouges en fonction de leur compaction. Chaque point (a) correspond à une image/cellule. Images représentatives de cellules de chaque région après marquage par un marqueur fluorescent de surface (b) ou en champ clair (c). Les données ont été obtenues à partir d'un *ImageStream*.

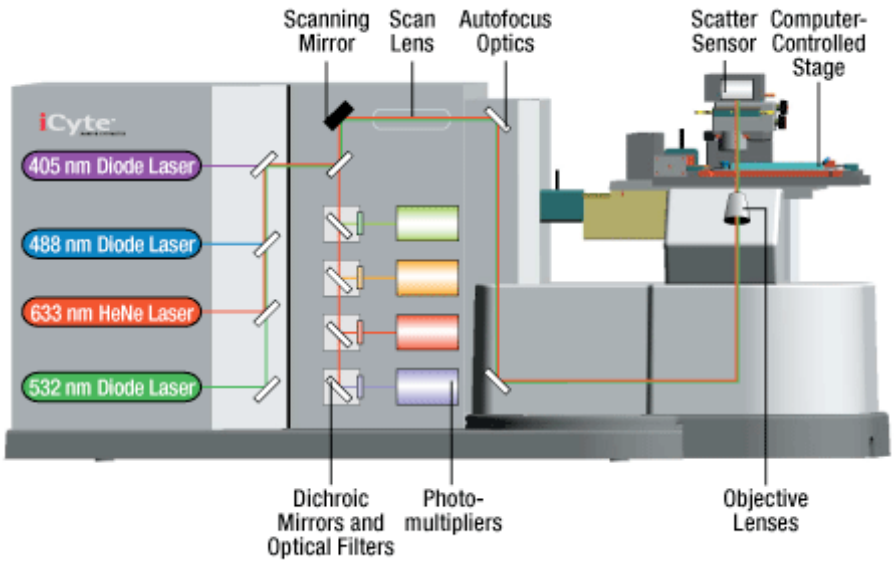

Fig. 2. Schéma du LSC *iCyte*

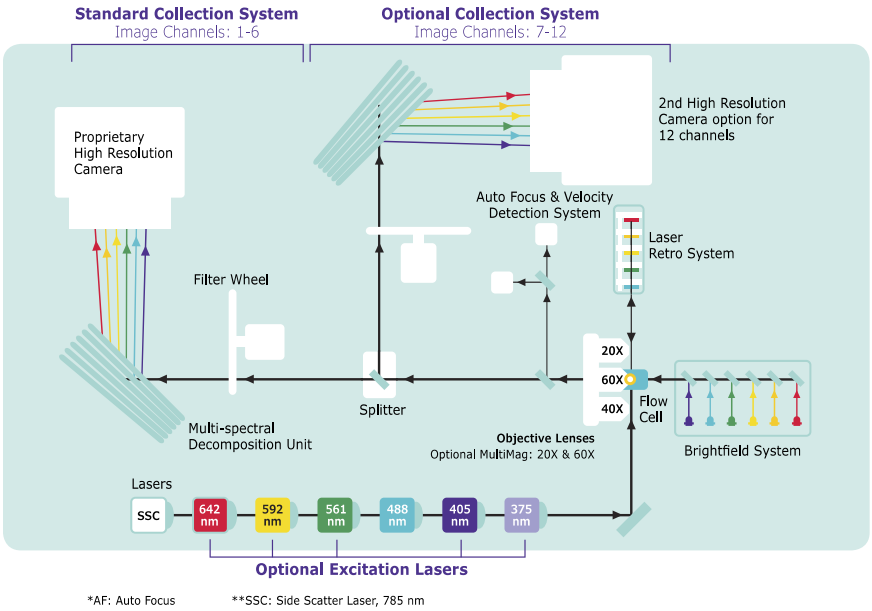

Fig. 3. Schéma de l'*ImageStream*

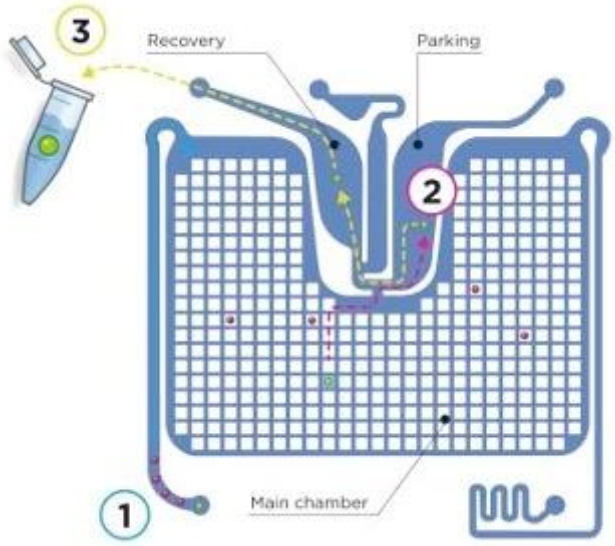

Fig. 4. Schéma du DEPArray. 1) les cellules sont injectées et examinées ; 2) Les cellules d'intérêt sont envoyées vers un lieu de « parking » ; 3) les cellules d'intérêt sont récupérées