

**T. Montange** <sup>(1)</sup>, **A. Vejux** <sup>(1)</sup>, **E. Kahn** <sup>(2)</sup>, **G. Lizard** <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> LBMC / Inserm U498 / IFR 100, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon / CHU – Hôpital du Bocage, Biochimie Médicale, BP 77908, 21079 Dijon Cedex, France

<sup>(2)</sup> INSERM U678 / UMR-S UPMC, CHU Pitié-Salpêtrière, 75643, Paris Cedex 13, France

## Introduction

La majorité des cytomètres en flux utilisés dans les laboratoires actuels sont équipés de laser argon émettant à 488 nm. Il existe une large gamme de fluorochromes et de sondes fluorescentes excitables avec ces cytomètres. Dans ces conditions, des analyses antigéniques et fonctionnelles sont réalisables sur des cellules en suspension et récemment des analyses moléculaires basées sur l'utilisation de microbilles ont été développées.

Des avancées récentes de la technologie LASER ont permis le développement de lasers de petites tailles comme les lasers Nd : YAG émettant à 532 nm.

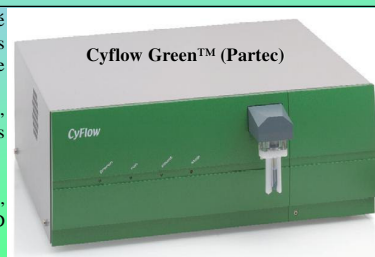
Au cours du travail réalisé sur différentes lignées de cellules humaines ainsi que sur des levures, les possibilités d'analyses biologiques offertes par un laser vert ont été évaluées en utilisant un cytomètre en flux Cyflow Green™ (Partec, Münster, Allemagne).

## Matériel et Méthodes

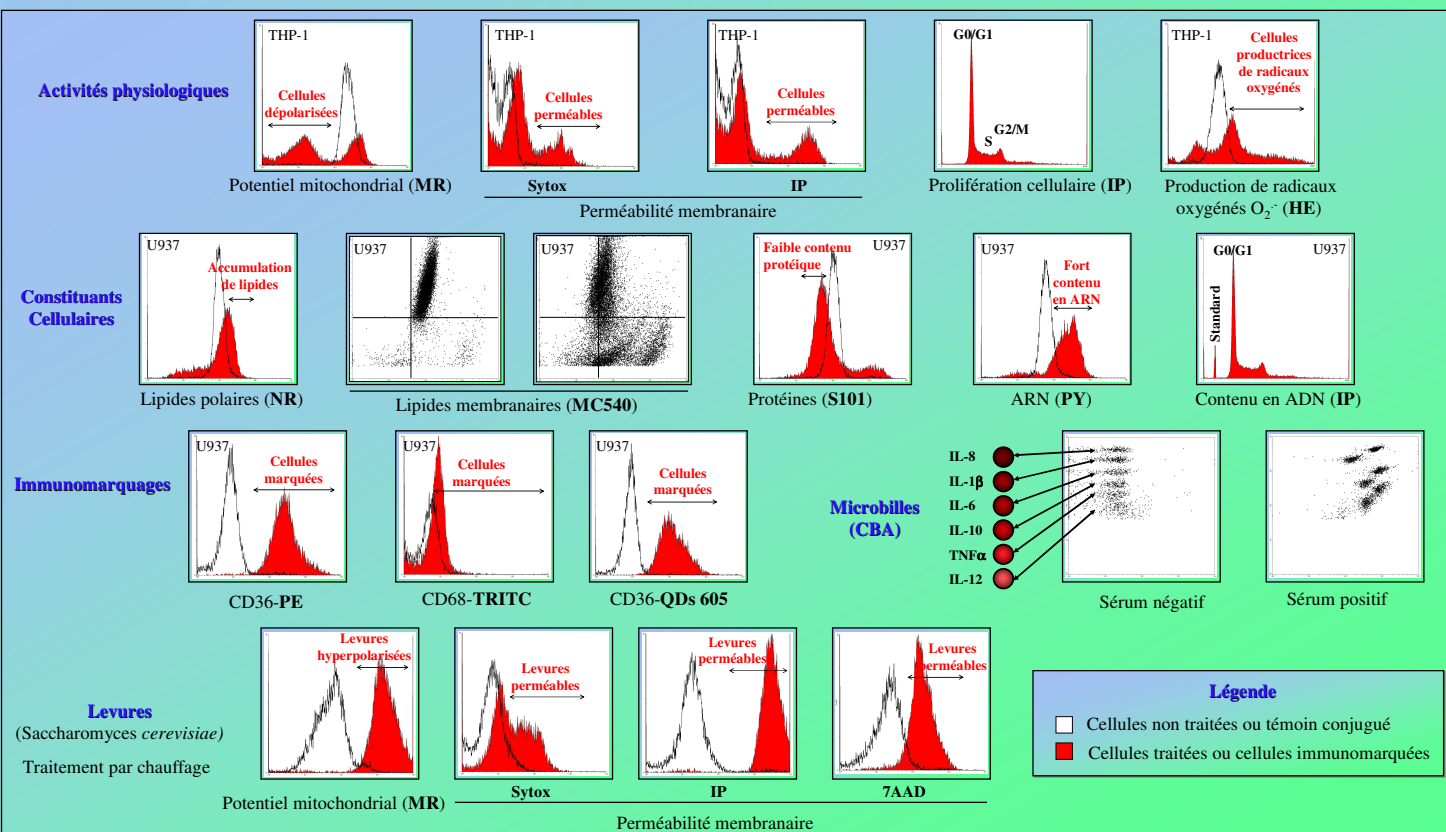
Les possibilités d'analyses biologiques offertes par un laser vert ont été évaluées sur un cytomètre en flux Cyflow Green™ (Partec) équipé d'un laser Nd : YAG émettant à 532 nm à la puissance de 50 mW. Ce cytomètre prend en compte les critères de diffraction aux petits angles (taille ; FSC) et aux grands angles (granularité cellulaire ; SSC). La configuration utilisée a permis de mesurer des fluorescences orange (filtre *band pass* : 590 ± 30 nm) et rouge (filtres *long pass* : 630 ou 665 nm).

De nombreuses sondes fluorescentes ont été utilisées pour évaluer la toxicité (perméabilité membranaire, dépolarisation mitochondriale), l'activité physiologique (oxydation, cycle cellulaire) et mettre en évidence des constituants cellulaires (lipides, protéines, ARN, ADN). Des anticorps couplés à des sondes fluorescentes comme la phycoérythrine (PE) ou à des nanocristaux (Q-Dots 605 nm) ont également été utilisés. Des cellules monocytaires (U937 et THP-1) ainsi que des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été analysées.

Les molécules fluorescentes utilisées sont les suivantes : Iodure de propidium (IP), Sytox Orange™ (Sytox), Mitotracker Red™ (MR), hydroéthidine (HE), Nile Red (NR), Mérocyanine 540 (MC540), pyronine Y (PY), sulforhodamine 101 (S101), 7-aminoactinomycine D (7-AAD), phycoérythrine (PE), Tétra méthyl Rhodamine Iso Thio Cyanate (TRITC), Q-Dots 605 (QDs 605).



## Résultats



## Conclusions

Les résultats obtenus permettent de conclure qu'un cytomètre en flux équipé d'un laser vert constitue un outil performant qui répond à de nombreuses exigences d'analyses d'un laboratoire de biologie. Du fait de sa petite taille et de son prix inférieur à celui d'un cytomètre équipé d'un laser bleu, ce type d'appareil rend accessible les analyses de cytométrie en flux à des laboratoires disposant d'un petit budget.

Le développement de nouvelles sondes fluorescentes multiplierait les domaines d'utilisation de cytomètres équipés d'un laser vert bien que les sondes disponibles actuellement permettent déjà d'aborder les analyses essentielles réalisées par cytométrie en flux : viabilité, physiologie cellulaire, immunomarquage, cycle cellulaire, ...

Il est important de préciser que comme le laser vert émet à 532 nm, il est parfaitement adapté pour réaliser des analyses moléculaires multiplexes à l'aide de microbilles. Ces dernières, qui portent l'anticorps de capture, ainsi que la phycoérythrine couplée à l'anticorps de révélation permettant la quantification de l'analyte sont en effet excitables à 532 nm. Ce type d'excitation à 532 nm est d'ailleurs utilisé par des cytomètres en flux spécifiquement dédiés aux analyses multiplexes comme le Luminex (Luminex Corporation), le cytomètre Guava (Guava Technologies) et le FacsArray (BD Biosciences).