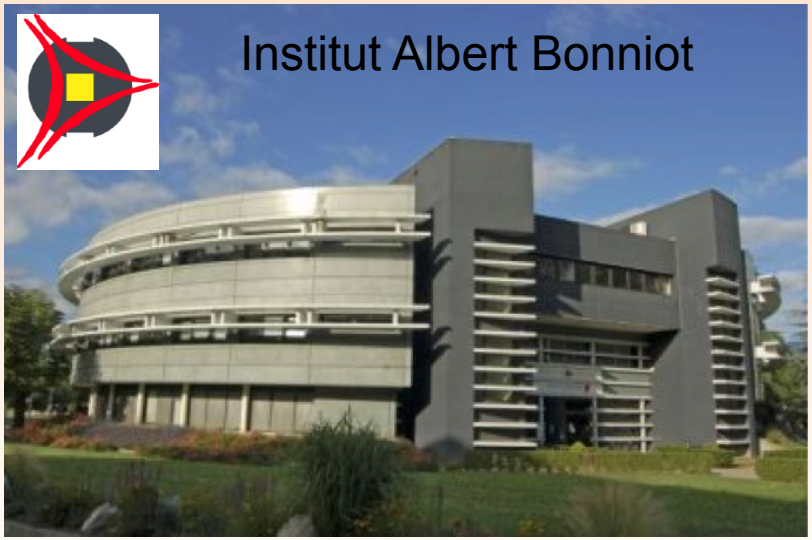
Génétique Humaine : Maladies et Diagnostics

Daniel PERAZZA
(daniel.perazza@ujf-grenoble.fr)
Maître de conférences – UFR Chimie-Biologie
Université J. Fourier



Université Joseph Fourier
GRENOBLE
UFR de CHIMIE et de BIOLOGIE

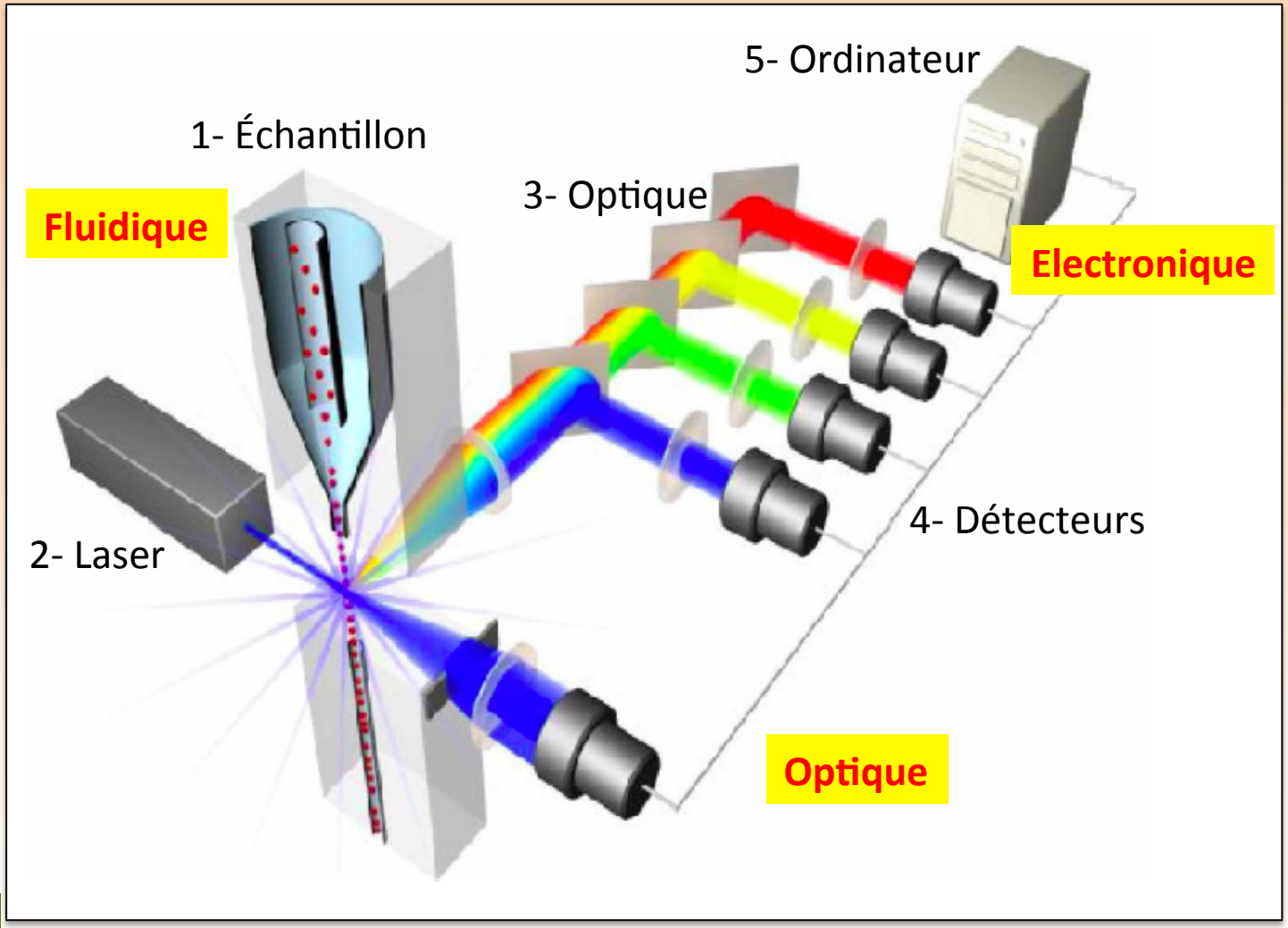
FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

Définition :

Méthode optique d'analyse à haut-débit, multiparamétrique, de cellules individuelles en solution.

Les cellules analysées peuvent si nécessaire être triées et récupérées.

Principe Général du FACS



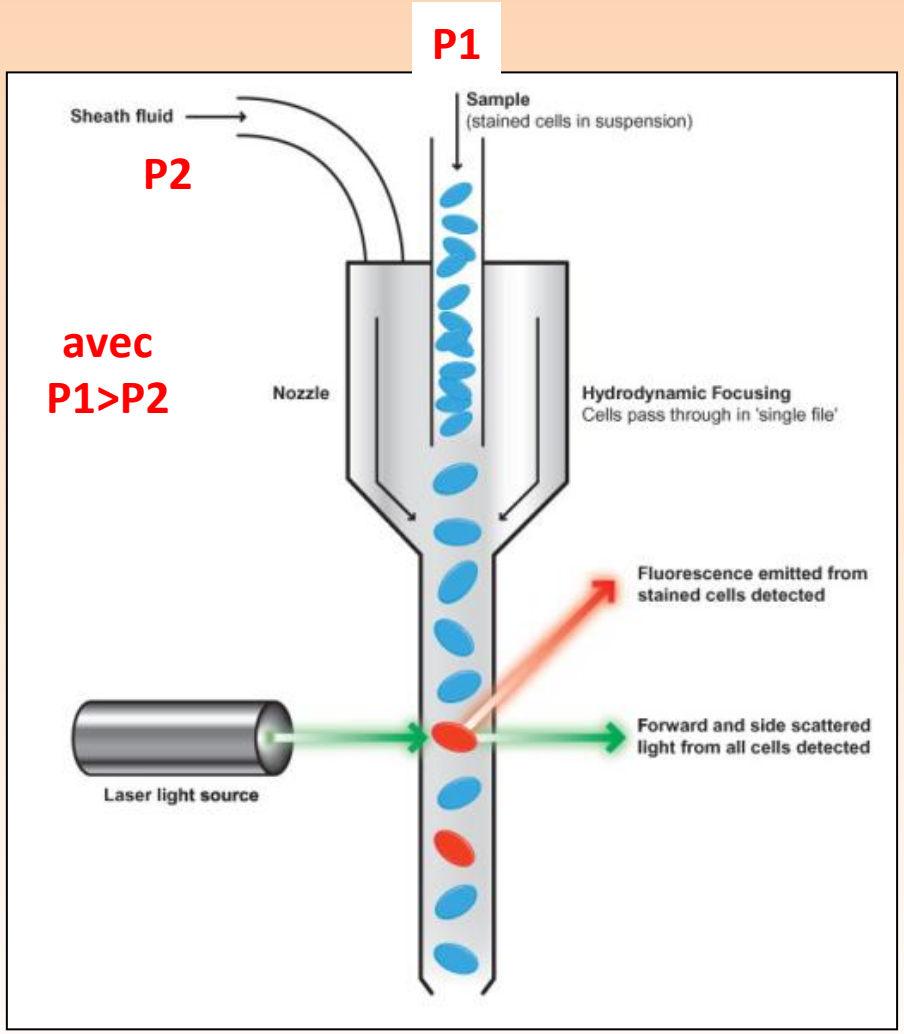
La Fluidique

Objectifs :

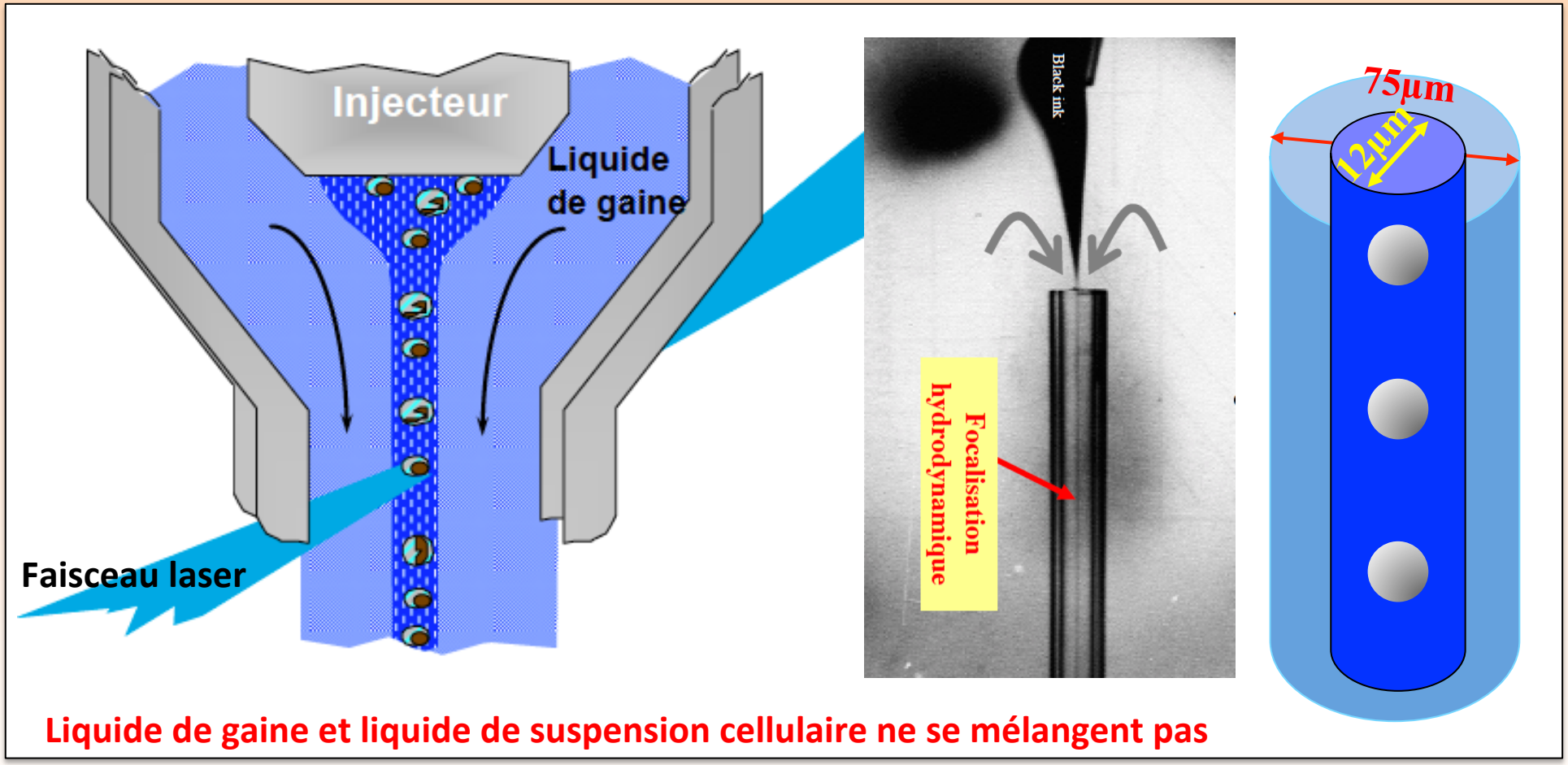
- Entraîner les cellules

- Les orienter avant passage devant le laser

- Les faire passer 1 à 1 devant le laser



Focalisation Hydrodynamique



Liquide de gaine et liquide de suspension cellulaire ne se mélangent pas

Sources Lumineuses : Les Lasers

Ancestralement: lampes à vapeur de mercure

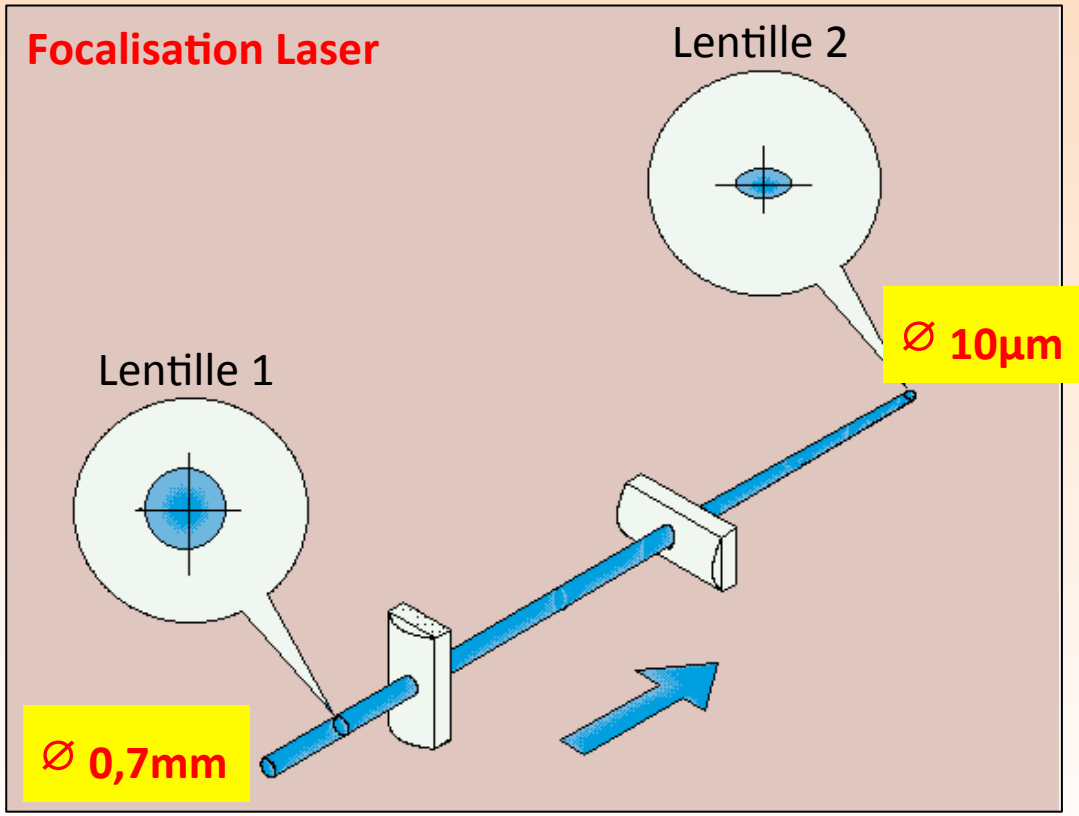
Les Lasers:

Bleu (488nm)

Rouge (633nm)

Violet (407nm)

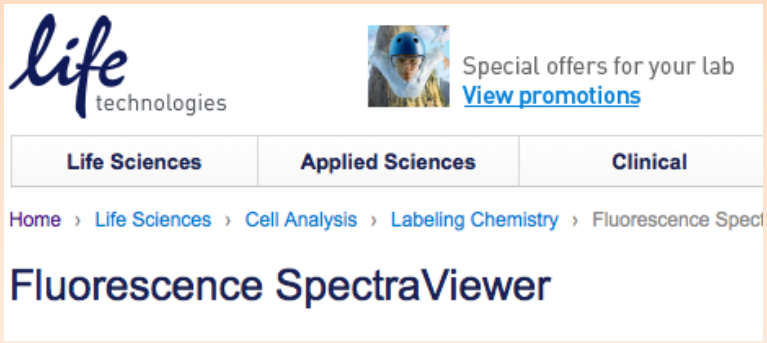
UV (355nm)



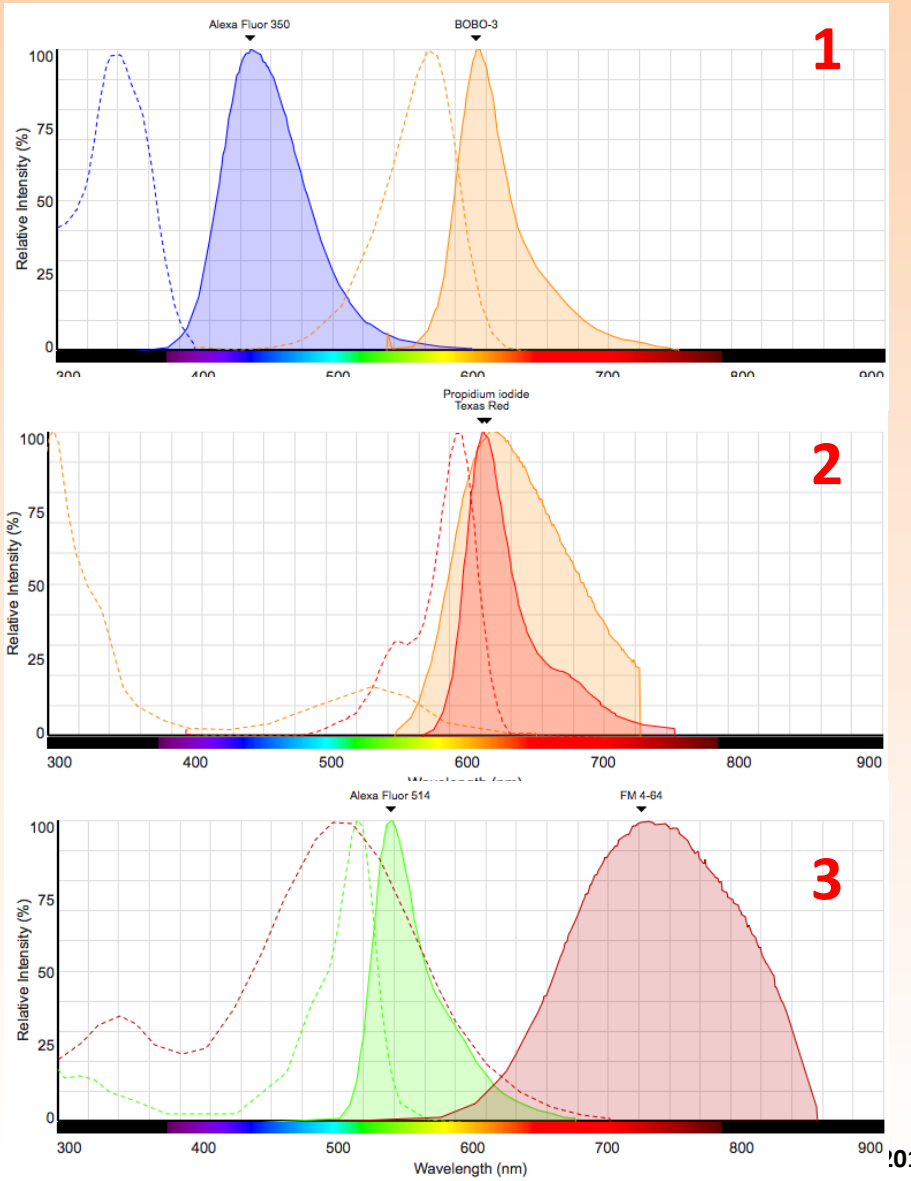
Université Joseph Fourier
GRENOBLE
UFR de CHIMIE et de BIOLOGIE

Les Fluorochromes

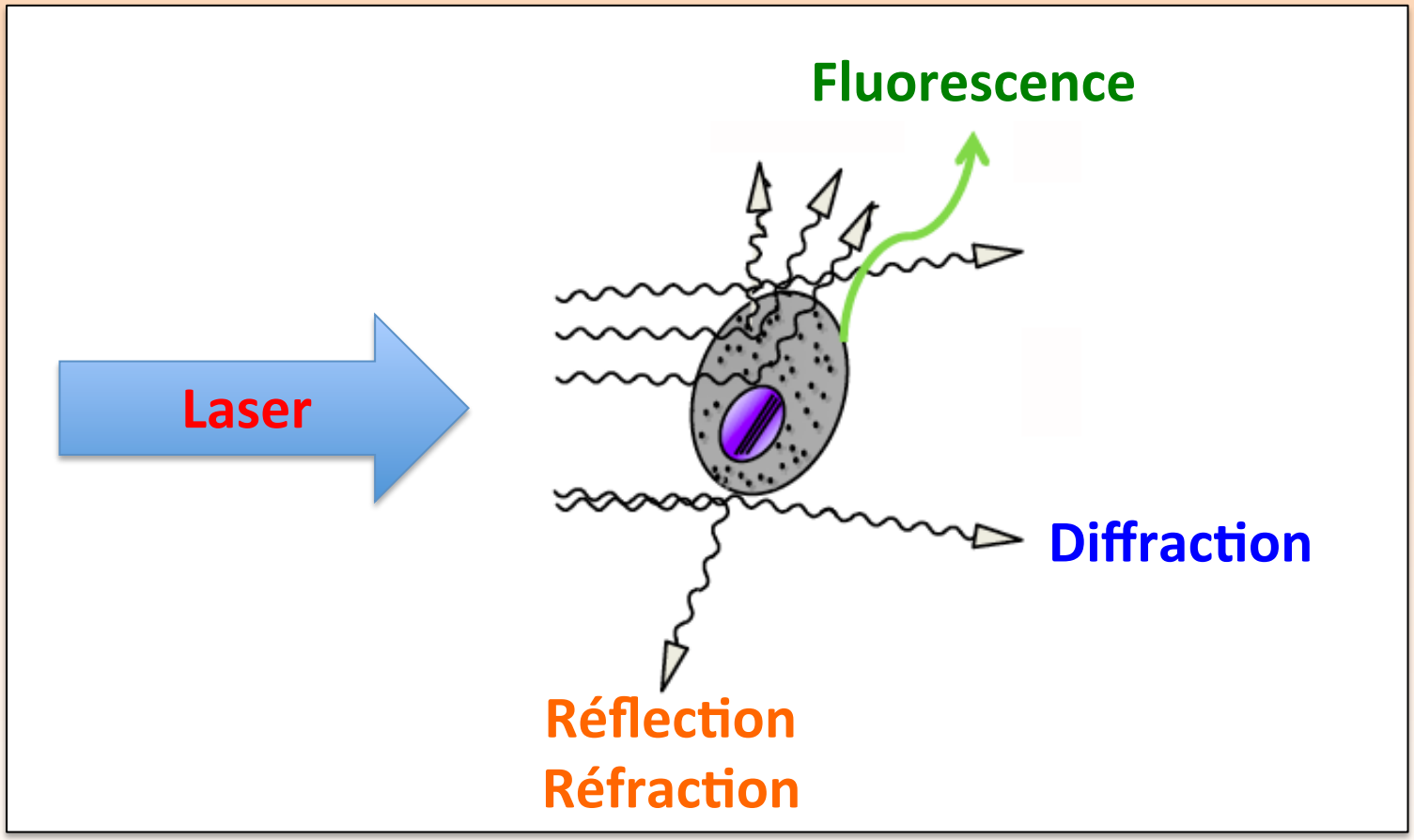
Il en existe des dizaines, il suffit de faire le bon choix…



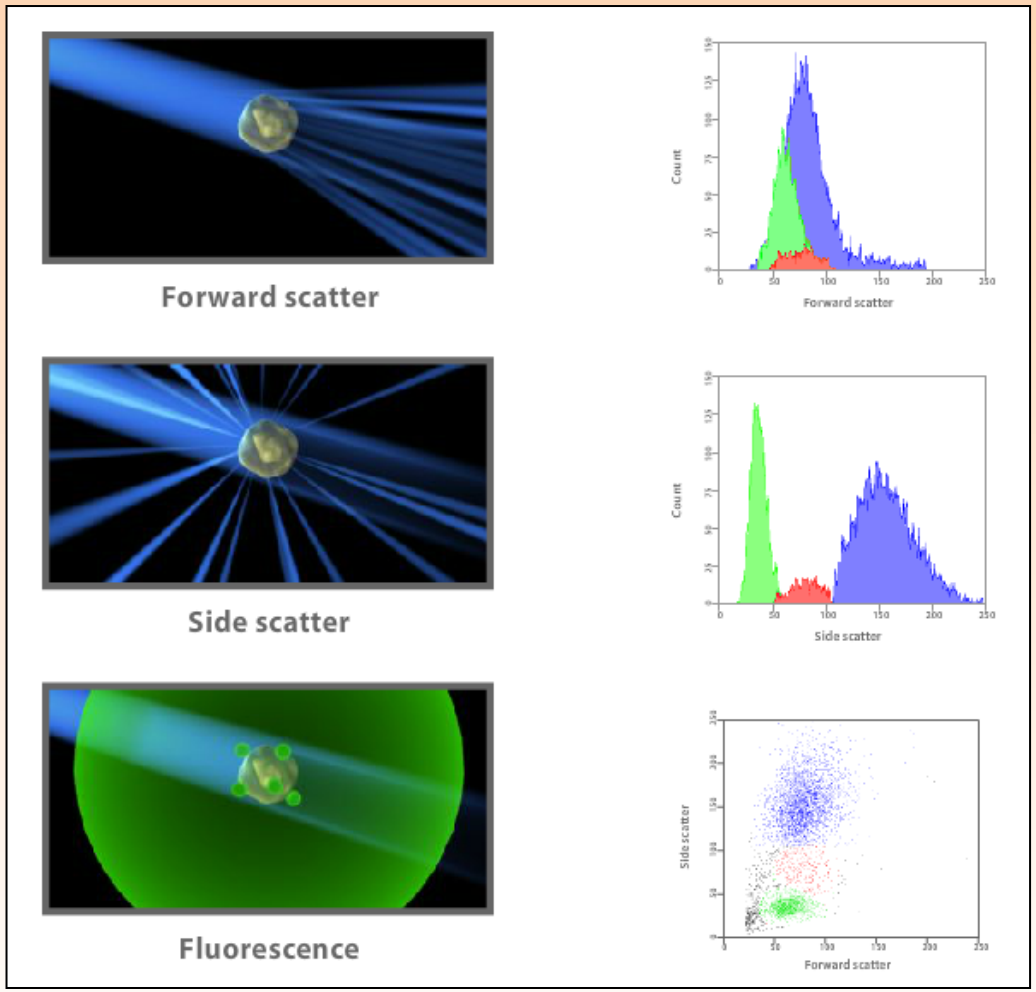
Quel serait le votre parmi ces 3 couples de fluorophores ?



Les Différents Types de Signaux Lumineux Émis



FACS : Une Analyse Multiparamétrique

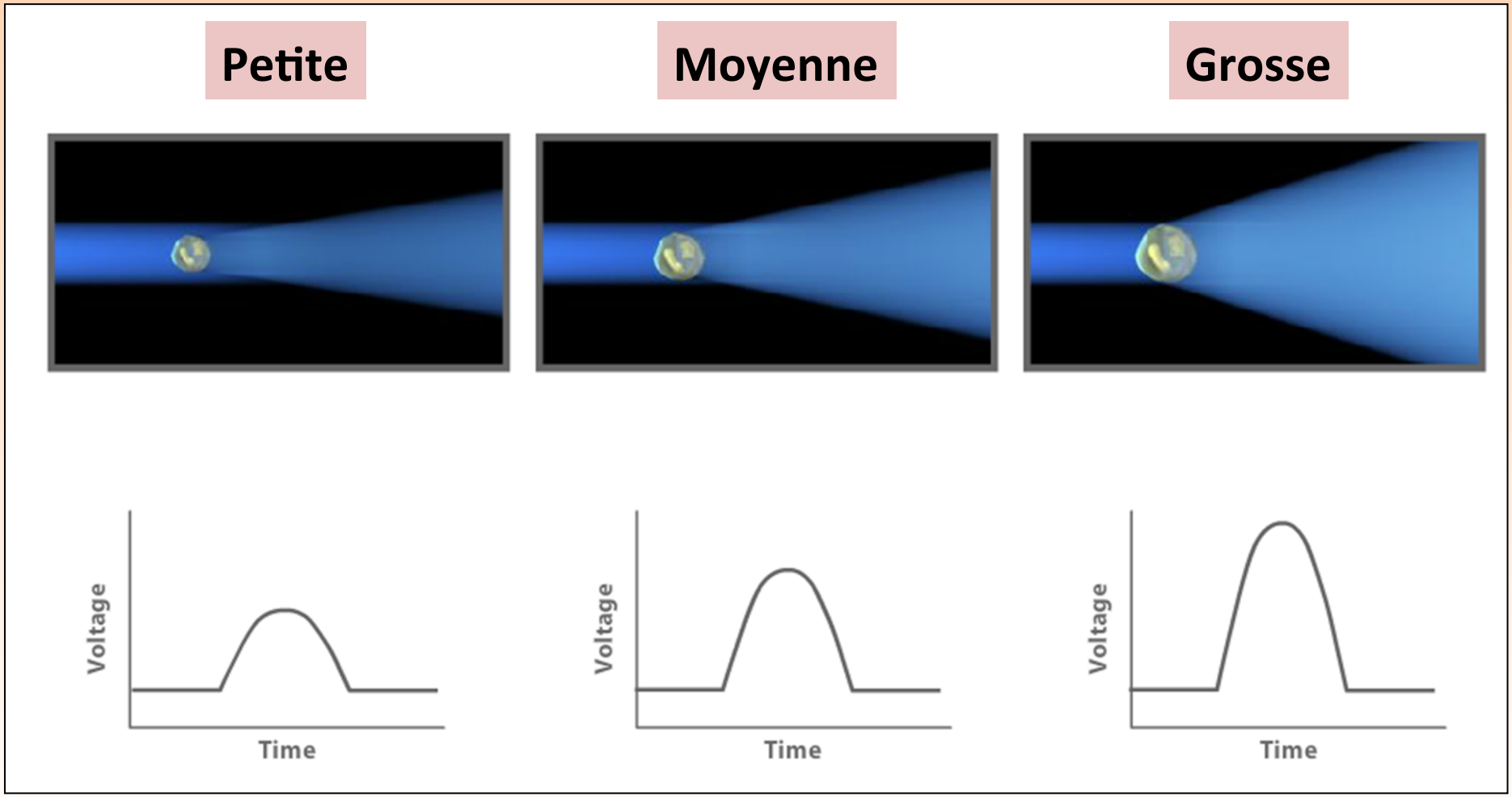


Diffraction (Diffusion) = f(**taille**)

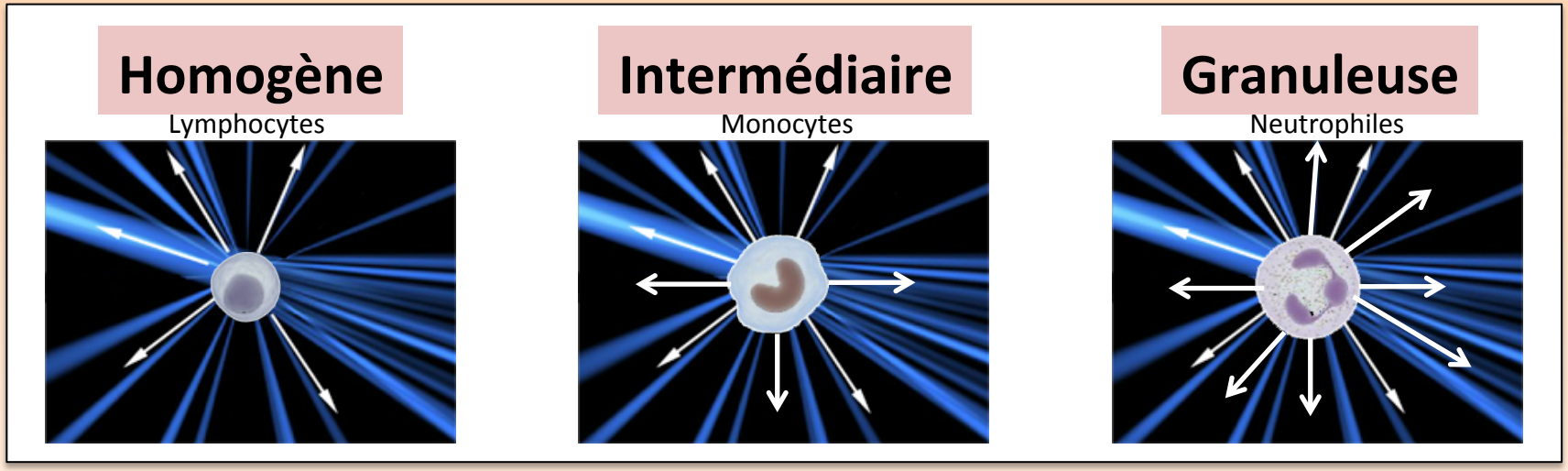
Réflexion/Réfraction = f(**granularité**)

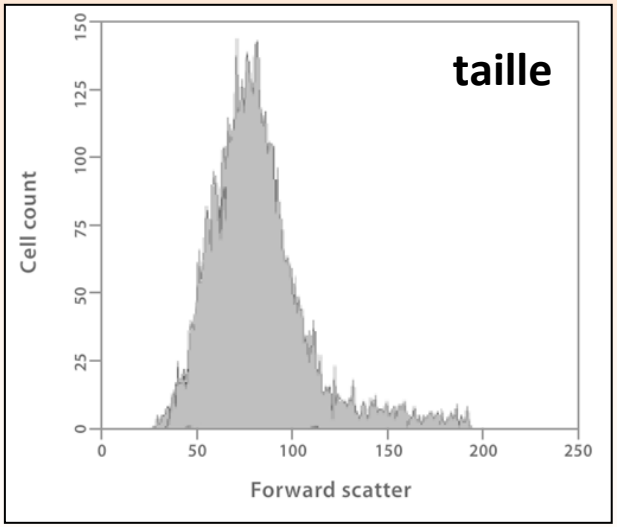
Fluorescence = f(**signal fluorochrome**)

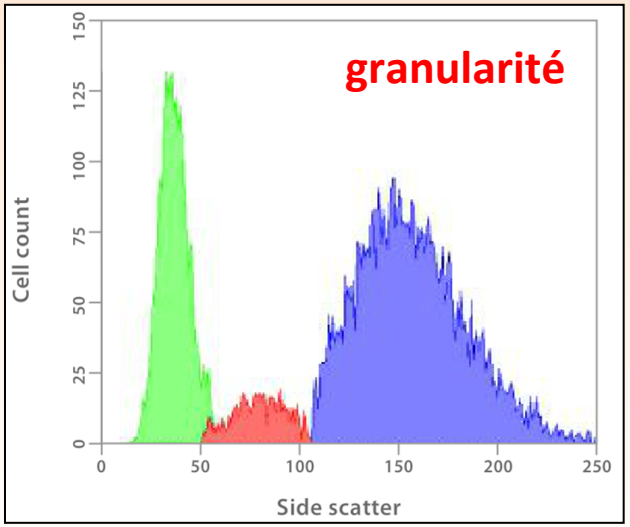
Analyse de la Taille Cellulaire : *Forward Scatter*



Analyse de la « Structure » Cellulaire : *Side Scatter*

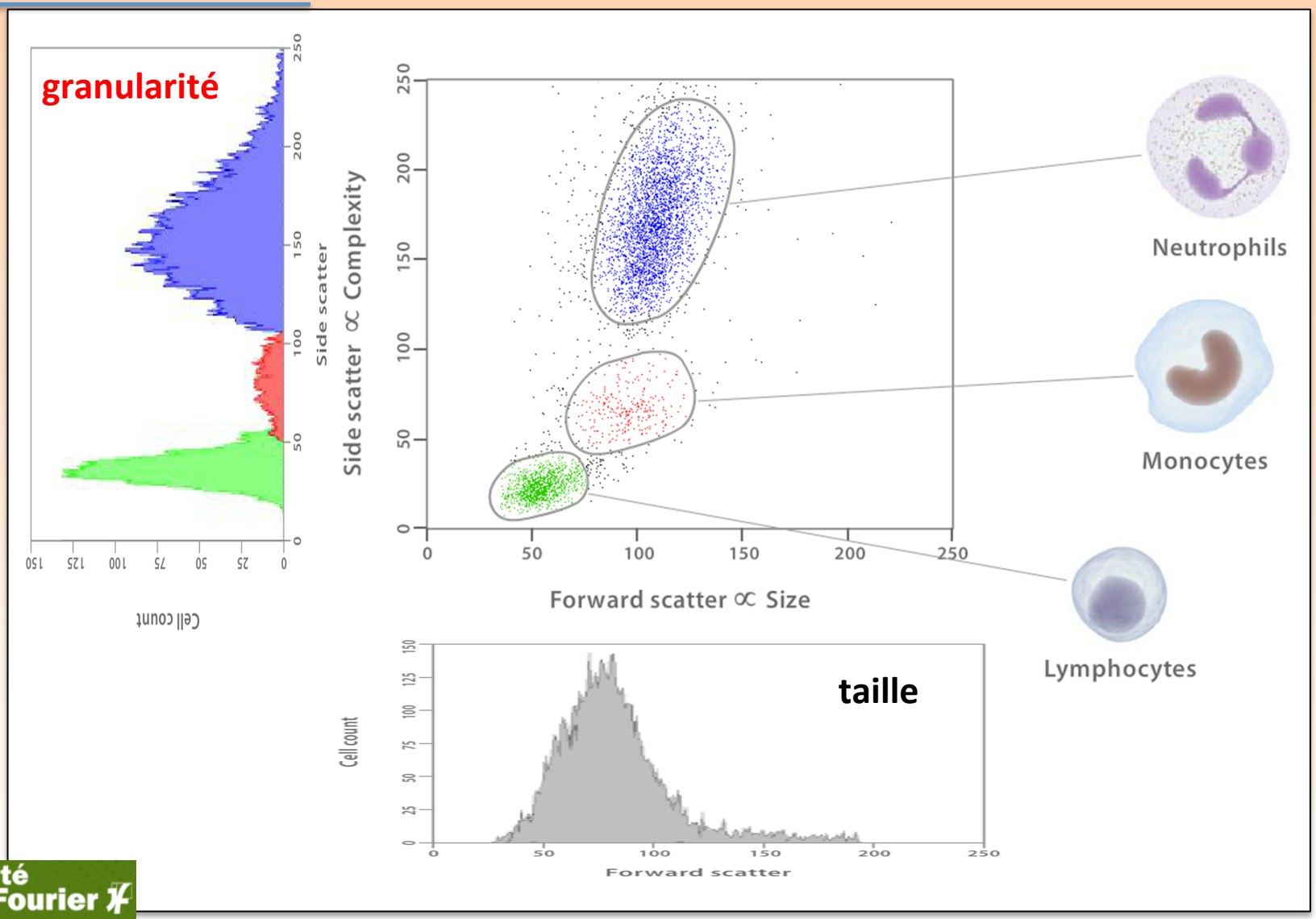




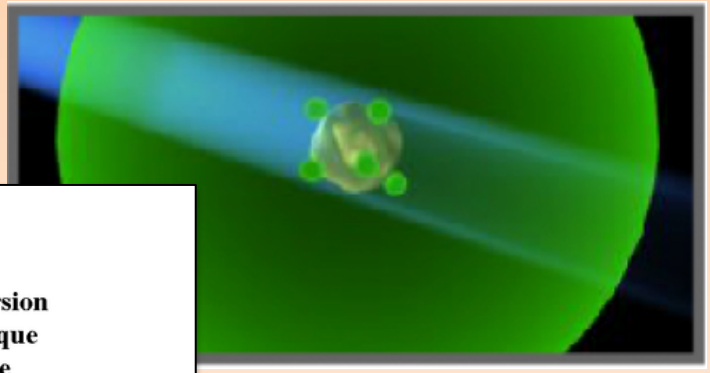


Université Joseph Fourier
GRENOBLE
UFR de CHIMIE et de BIOLOGIE

Première Analyse Biparamétrique



Analyse de la Fluorescence



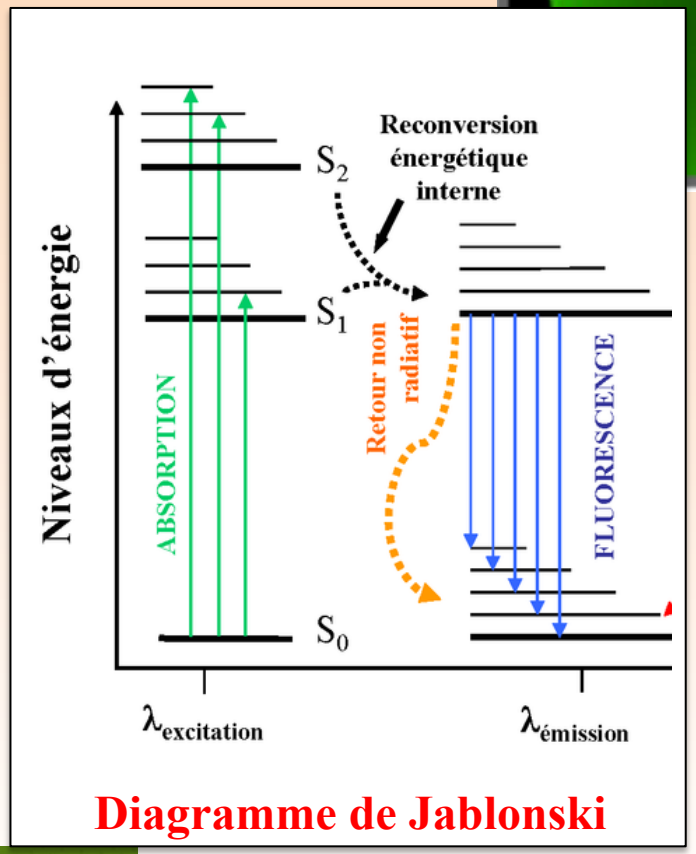
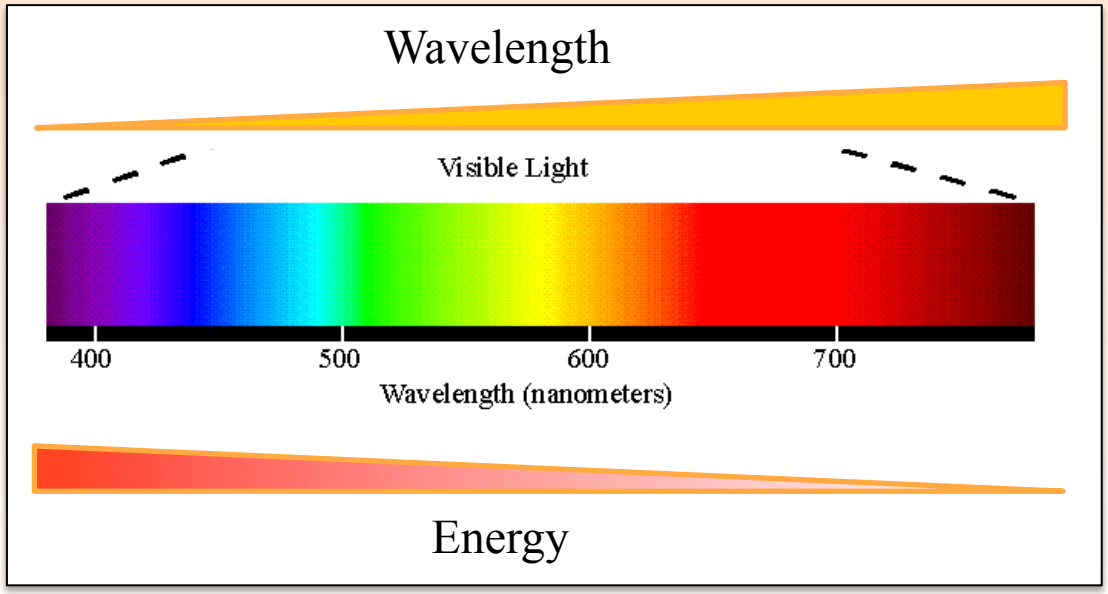
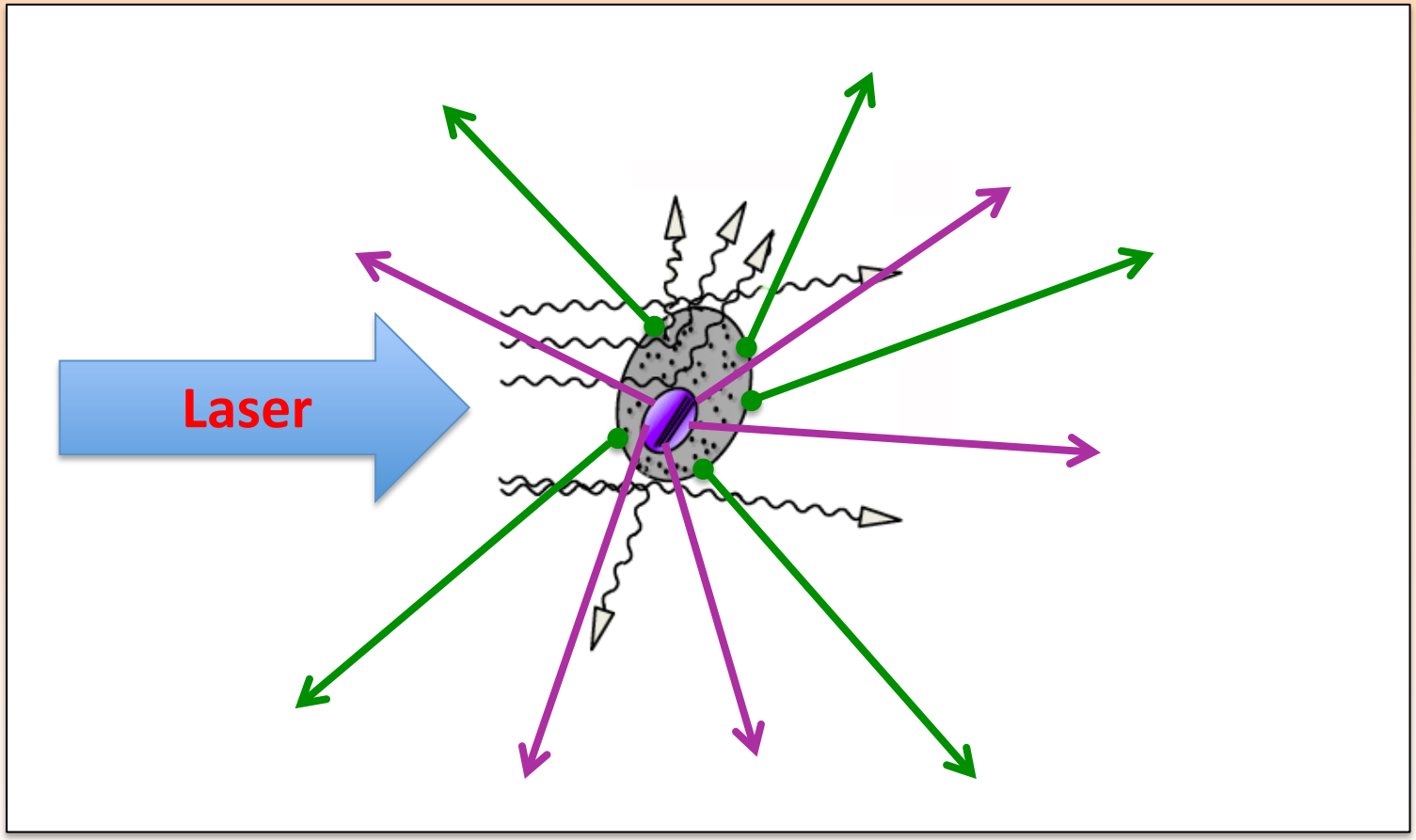


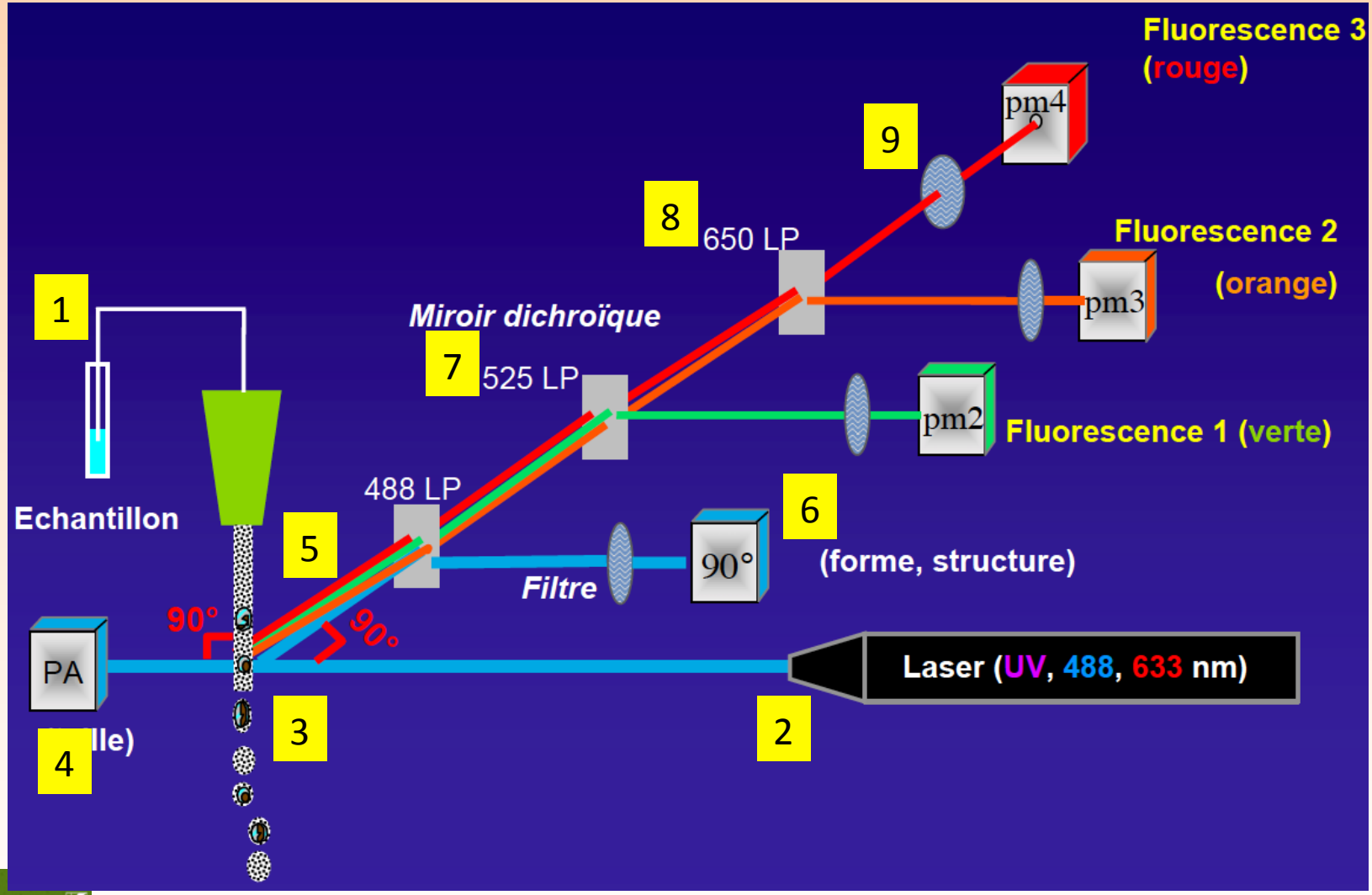
Diagramme de Jablonski



Multi-Marquage

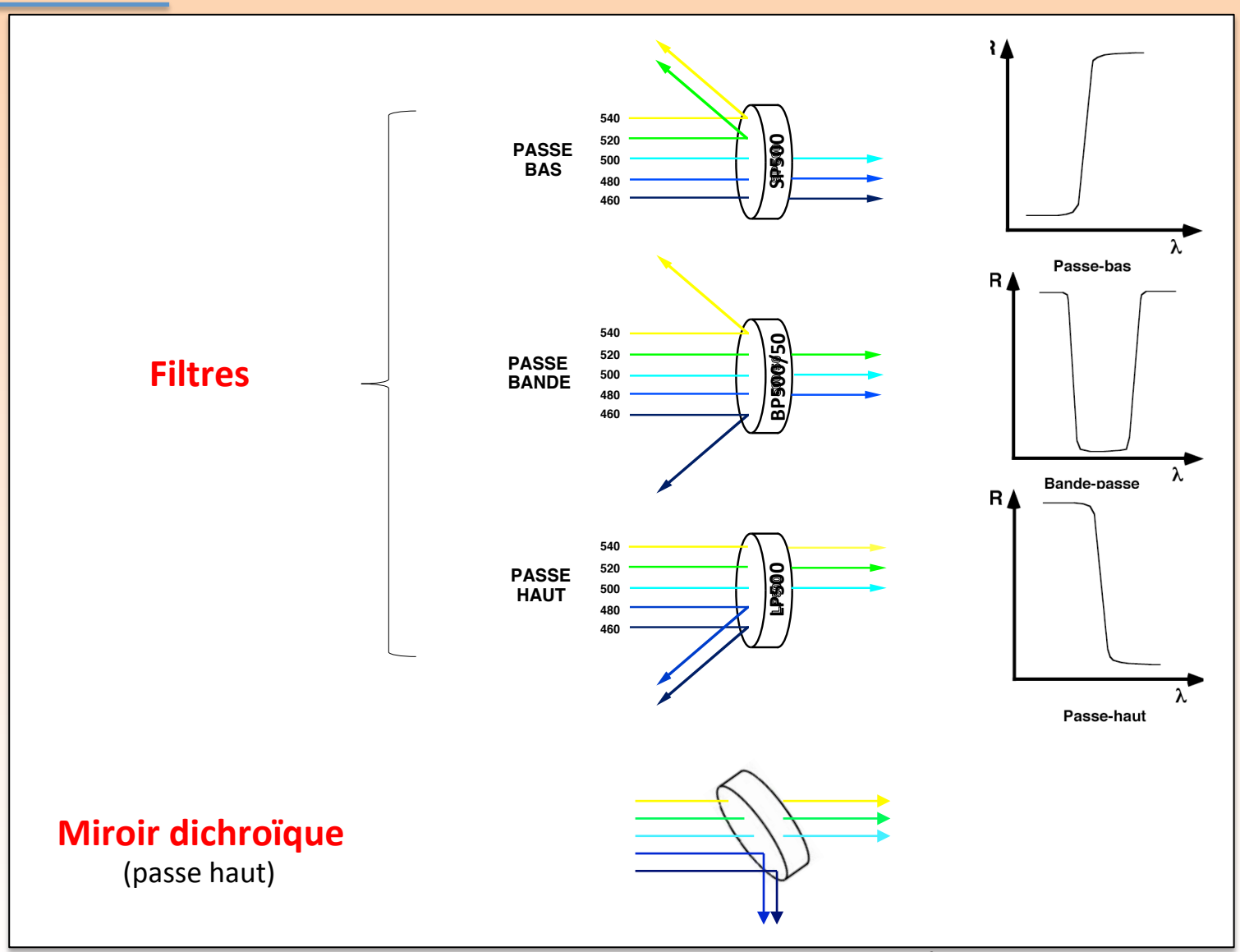


Collecte et Tri de l'Information de Fluorescence



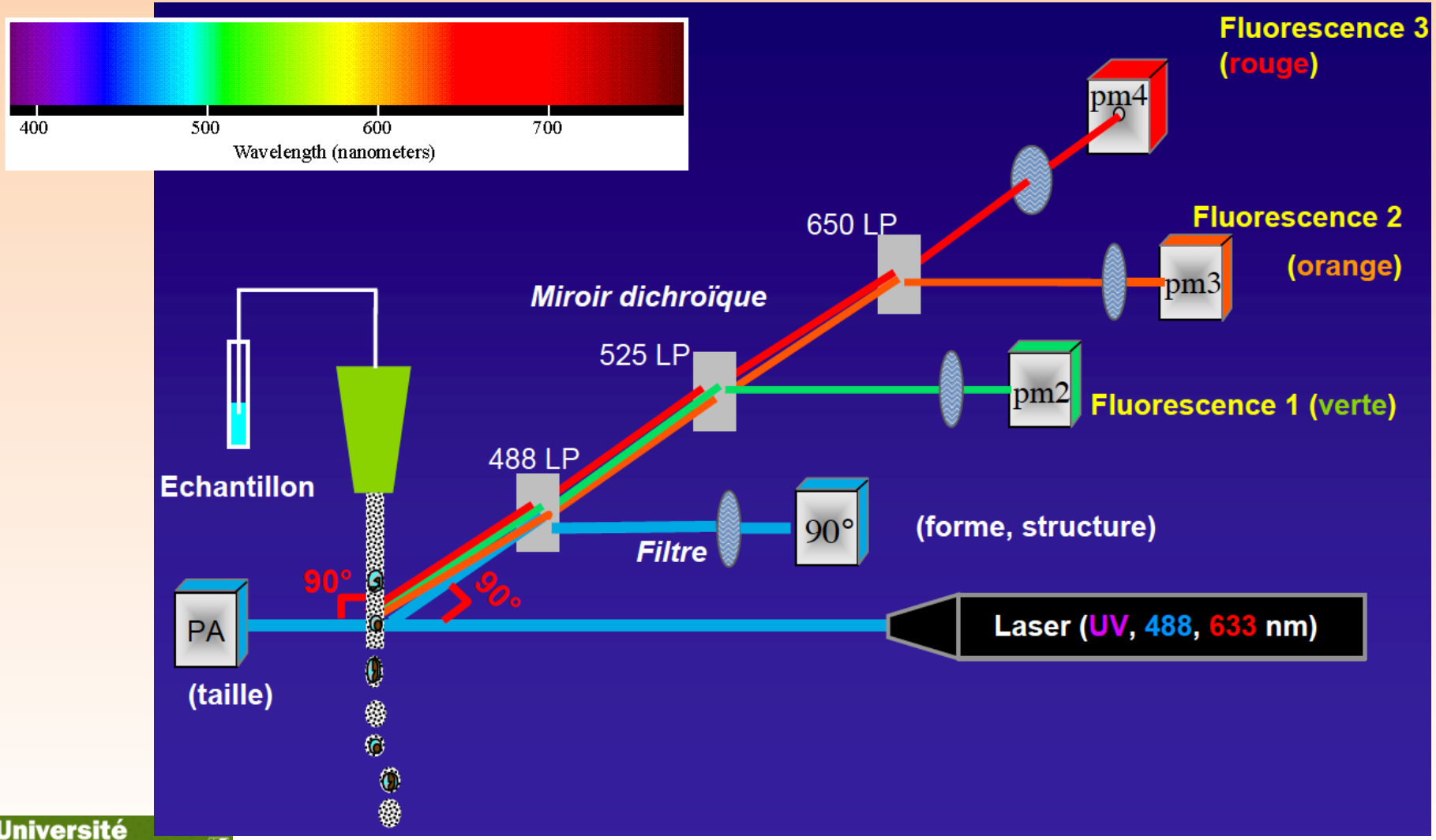
Filtres et Miroirs

Filtres

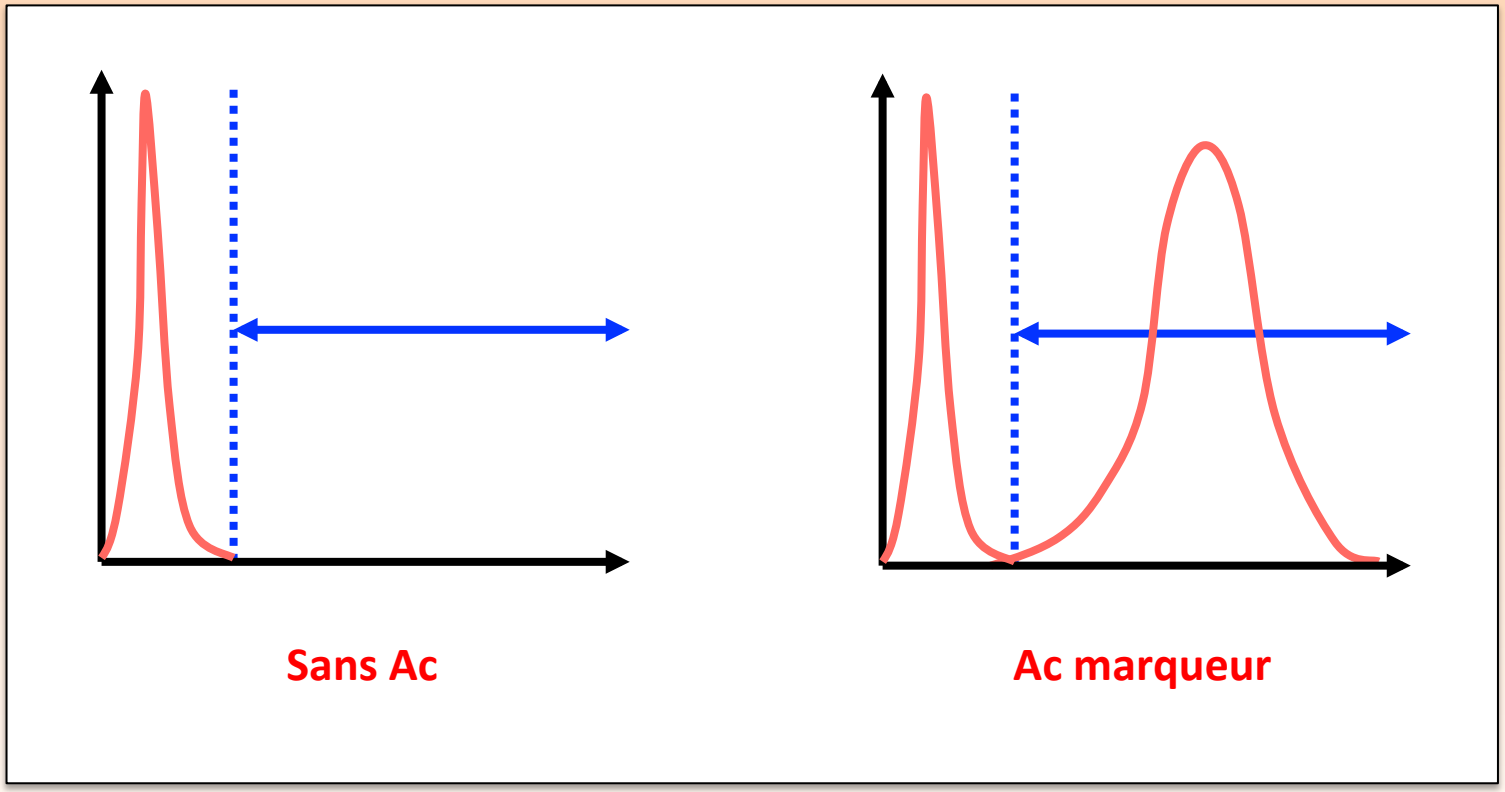


Miroir dichroïque
(passe haut)

Collecte et Tri de l'Information de Fluorescence



Quid des Contrôles ?



Applications du FACS

Immunophénotypage

Phagocytose

Viabilité cellulaire

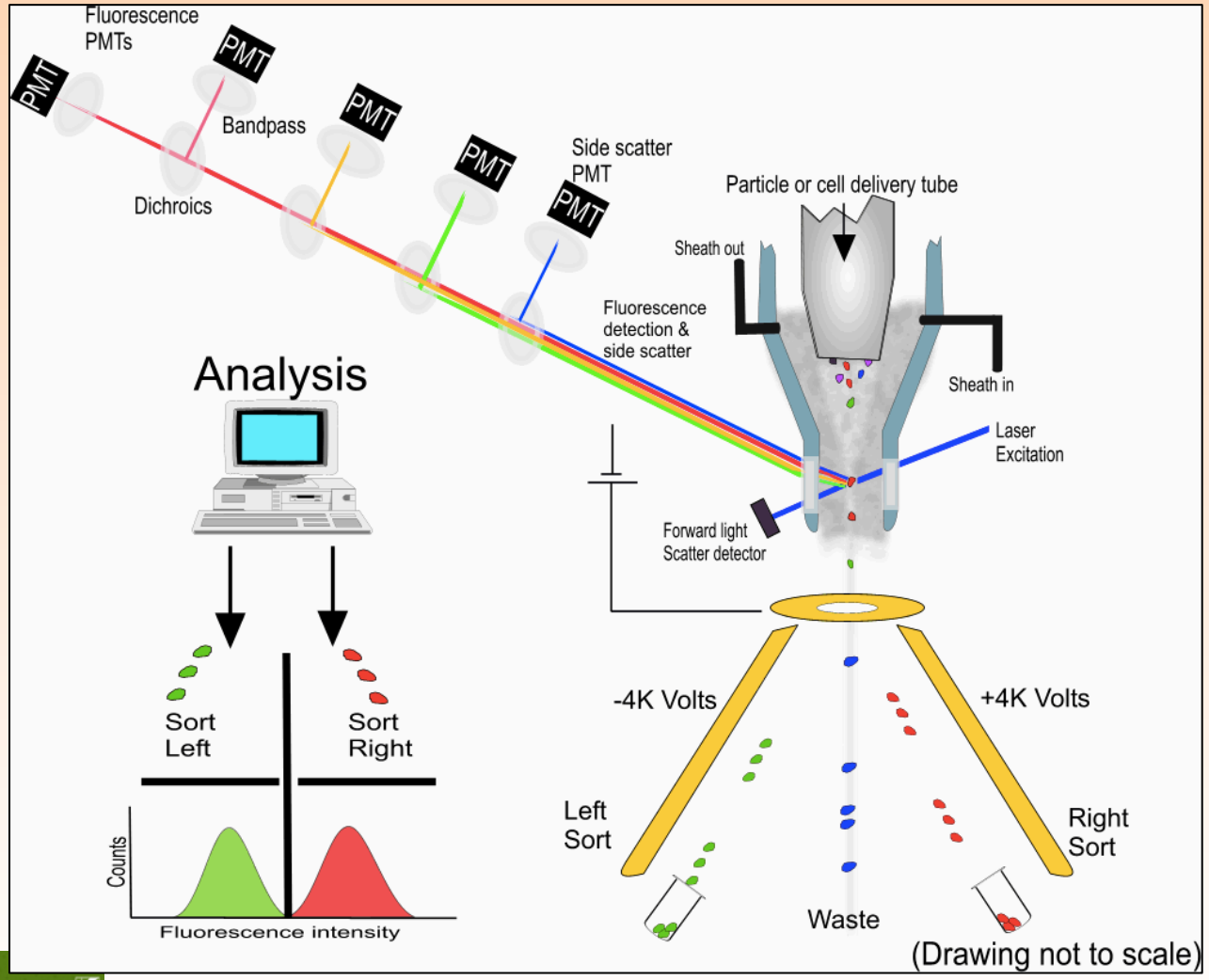
Apoptose

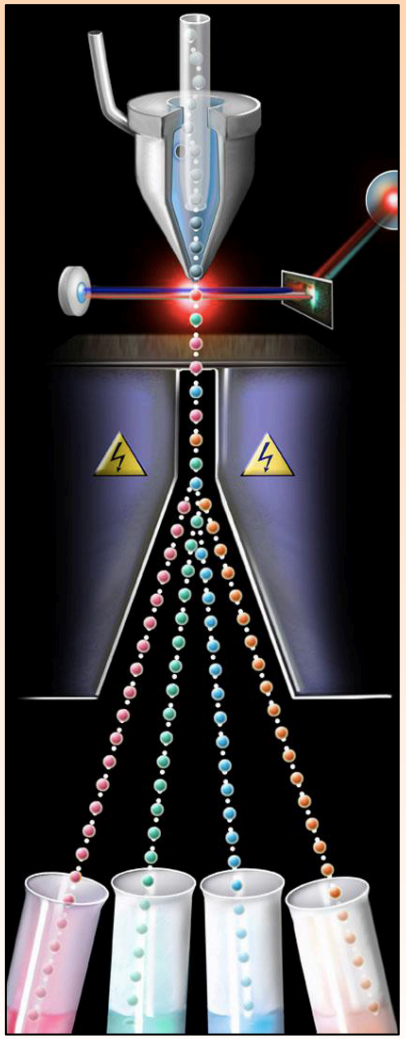
Cycle cellulaire

etc.

Le Tri Cellulaire

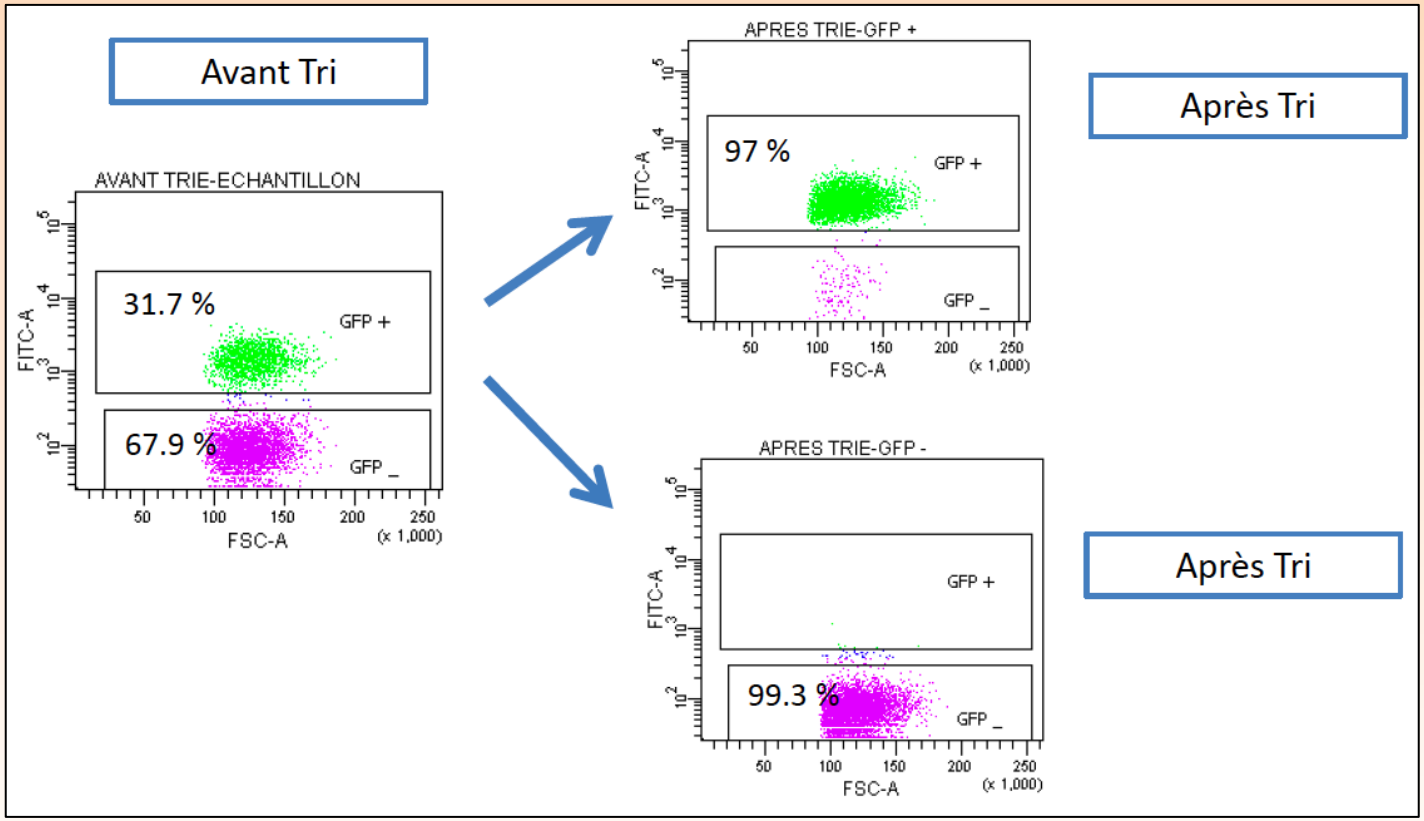
BD FACSAria III





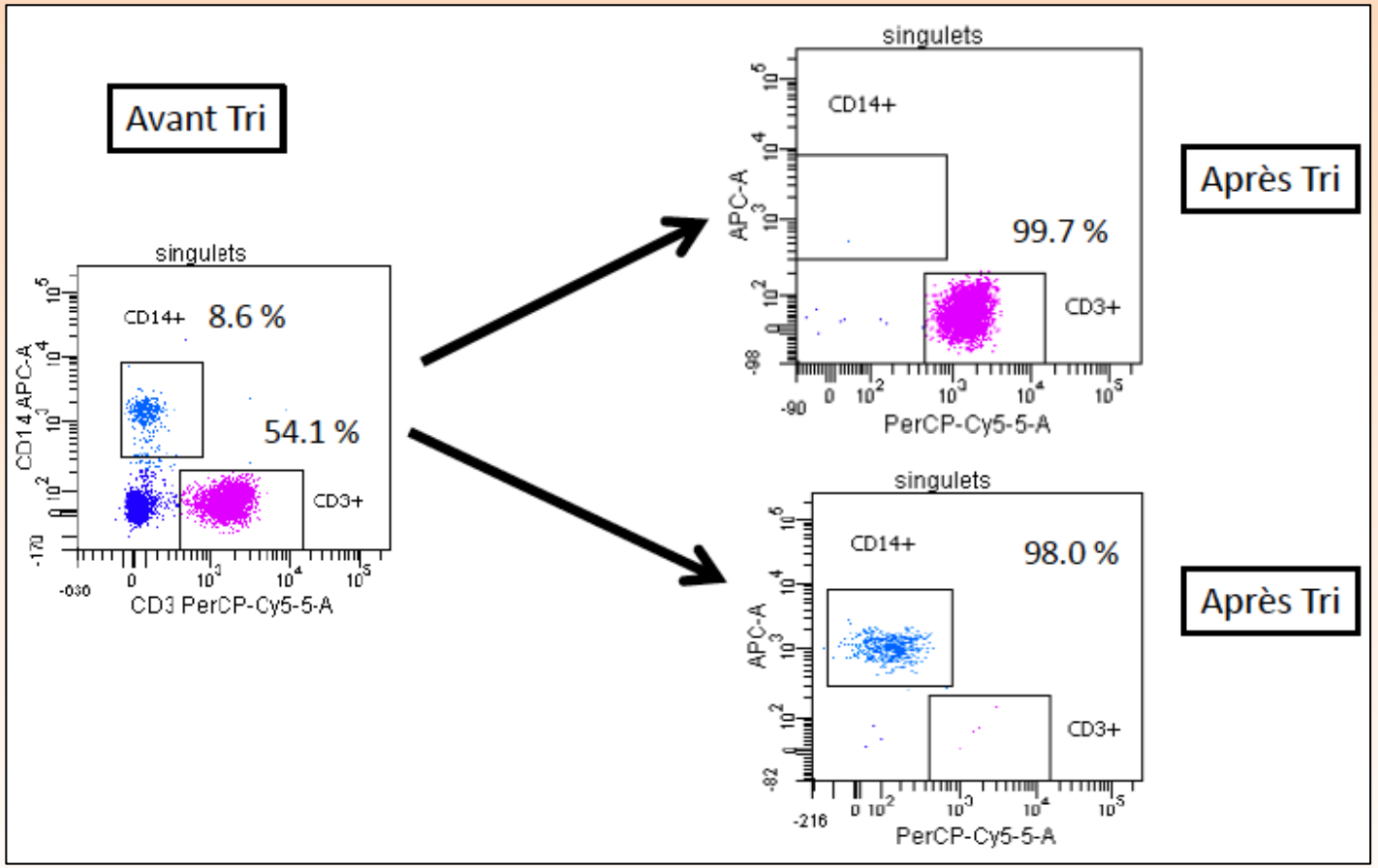
Exemples de Tri Cellulaire

Tri de cellules transfectées avec la GFP



Exemples de Tri Cellulaire

Tri de cellules CD3+ et CD14+
(leucémie myéloïde chronique)



Intérêts & Limites du FACS

Analyse quantitative rapide

Sensibilité

Information multiparamétrique

Possibilité de tri cellulaire avec remise en culture

Dosage de protéines exprimées vs surexprimées très délicat