

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences et Ingénierie pour l'Information

FACULTE des Sciences et Techniques

Institut de recherche XLIM

HORIBA Medical, Montpellier

Thèse N°25/2011

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et systèmes

Spécialité : Biophotonique

Présentée et soutenue par

Nelly RONGEAT

Le 6 septembre 2011

Utilisation de sources polychromes pour le diagnostic cytologique.
Application à l'hématologie.

Thèse dirigée par Vincent Couderc et Philippe Nérin

Président

Marc Douay

Professeur – Université de Lille

Rapporteurs :

Jean-François Rossi

Professeur – CHRU St Eloi de Montpellier

Jérôme Bibette

Professeur – ESPCI ParisTech

Examineurs

Brice Sorli

Maître de conférences - Université de Montpellier

Philippe Leproux

Maître de conférences - Université de Limoges

Vincent Couderc

Directeur de Recherche CNRS - Université de Limoges

Philippe Nérin

Directeur de la Recherche - HORIBA Medical

Remerciements

Les travaux de recherches décrits dans ce manuscrit ont été effectués au sein du département Recherche de l'entreprise HORIBA Medical et en étroite collaboration avec l'Institut de Recherche XLIM. Je tiens à remercier Bertrand de Castelnaud, Président d'HORIBA Medical, Christian Dubuc, successivement Directeur de la Recherche et Directeur général délégué d'HORIBA Medical, pour m'avoir accueillie au sein de leur entreprise et pour avoir contribué au bon déroulement de mon doctorat. Je souhaite également remercier Alain Barthélémy, Responsable du département Photonique d'XLIM et Directeur de recherche CNRS, de m'avoir permis d'effectuer mon doctorat.

Je tiens à remercier Jean-François Rossi, Professeur au CHRU St Eloi de Montpellier, et Jérôme Bibette, Professeur à l'ESPCI ParisTech, pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail de thèse.

J'exprime également ma reconnaissance à Marc Douay, Professeur à l'Université de Lille, pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je souhaite également remercier Brice Sorli, Maître de conférences à l'Université de Montpellier, Philippe Leproux, Maître de conférences à l'Université de Limoges, pour avoir examiné mes travaux et participé à ce jury.

J'exprime plus particulièrement ma gratitude et ma reconnaissance à mon encadrant universitaire, Vincent Couderc, Directeur de Recherche CNRS à Limoges. Un grand merci pour ses conseils très précieux, sa disponibilité, son souci du détail. Ce travail de thèse ne serait pas ce qu'il est sans ton soutien. MERCI Vincent !!

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse d'entreprise, Philippe Nérin, Directeur du département Recherche à HORIBA Medical, pour ses connaissances scientifiques de haut niveau et sa confiance. MERCI Philippe !

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes ayant participé au projet européen NextGenPCF, notamment Noella Evanno, Pascale Nouchi, Marc Douay, Philippe Leproux, Guillaume Huss, pour leurs soutiens et leurs conseils.

Sincères remerciements à toutes les personnes du département Recherche d'HORIBA Medical, qui m'ont apporté de près, ou de loin, une aide précieuse. Merci pour les rigolades et l'ambiance « MECS » du labo, fortement animée par Pat, Ben, Mousse, Jean-Phi et JC (Joli Cœur alias Sylvain) !! Merci à TineMar pour ces mails-apéros suite à une bonne nouvelle (brevet, ou publi acceptée...) ! Et bien sûr aussi pour son soutien et son aide précieuse ! Merci aux filles du réactif, avec qui il y a toujours un p'tit mot sympa !! Merci au bureau E06, aux chansonnettes comme Dam dam Dé, in your Dream !! Merci au chef du bureau E06, DIDIER CREMIEN qui se rend tout le temps disponible !! Bien sûr, je pense aussi à toi le catalan ☺! Merci aux personnes de la pause de 16h, sans qui les journées auraient été différentes (Alex, Martine, JC, Christèle, Nina, Dam, Ben, ...) !!!

Merci à toutes les filles du repas du vendredi midi et à Cé pour les p'tites bouffes le midi,...

Je remercie très fortement Aurél, Liréo, Dédé, Cé avec qui j'ai passé de très bons moments en soirée mais aussi au téléphone, blabla blabla bla...

Je remercie très particulièrement les personnes qui m'ont toujours soutenues notamment, Nicole, ma maman qui a toujours cru en moi et qui a toujours été là pour moi, Christian mon père pour ses conseils, mon fréro, pour ses p'tites blagounettes sympathiques, mes beaux-parents et particulièrement mon beau-père pour avoir relu patiemment mon manuscrit, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes et mes cousins ! ! Merci à toute la familia !!!

Enfin, ces derniers mots reviendront aux deux personnes qui me sont les plus chères. Merci, Vince, mon grand homme, qui a toujours été là, dans les bons comme dans les moments où j'étais au plus bas, merci d'avoir toujours cru en moi même quand je doutais fortement !! Et merci mon p'tit Tom, d'être arrivé au milieu de cette thèse, de m'avoir fait rire,... !! **Grand merci à mon grand homme et mon p'tit Tom !!**

FEU FLAMME !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	18
I. GENERALITE SUR LA CYTOMETRIE EN FLUX	22
I.1. Introduction.....	23
I.2. L'hématologie.....	24
I.3. Etat de l'art [I-1, I-2, I-3].....	27
I.4. Les analyseurs d'hématologie	29
I.4.1. Introduction à la physique des analyseurs d'hématologie.....	30
I.4.1.1. Mesure électrique	30
I.4.1.2. Mesures optiques.....	31
➤ <i>Diffusion de la lumière</i>	31
➤ <i>Fluorescence</i>	33
I.4.2. Traitement du signal.....	36
I.4.2.1. Filtrage des signaux de faibles tensions.....	36
I.4.2.2. Filtrage temporel des signaux.....	36
I.4.2.3. Corrélation temporelle des mesures électriques et optiques	37
I.4.2.4. Méthodologie de classification des populations leucocytaires	38
BIBLIOGRAPHIE	40
II. STATISTIQUE DES TEMPS DE PASSAGE DES CELLULES BIOLOGIQUES DANS UN ANALYSEUR D'HEMATOLOGIE.....	43
II.1. Introduction.....	44
II.2. Description de la méthode	44
II.3. Exploitation des données	47
II.4. Conclusion	50
BIBLIOGRAPHIE	51
III. SYSTEME OPTIQUE PERMETTANT DE MINIMISER LES COMPENSATIONS DANS UN CYTOMETRE AUTOMATISE.....	52
III.1. Introduction.....	53
III.2. Discrimination cellulaire dans un analyseur d'hématologie par excitation à une longueur d'onde (491 nm).....	56
III.2.1. Matériels et méthodes.....	56
III.2.1.1. Système optique d'illumination.....	57
III.2.1.2. Système fluidique et mesures réalisées.....	62
III.2.1.3. Matrices.....	64

III.2.2.	Résultats obtenus avec la source unique à 491 nm	65
III.2.3.	Conclusion.....	66
III.3.	Discrimination cellulaire dans un analyseur d'hématologie par excitation à deux longueurs d'onde (491 nm et 561 nm)	67
III.3.1.	Choix de la deuxième longueur d'onde d'excitation en fonction des signaux de fluorescences.....	67
III.3.2.	Calibration fluide des analyseurs d'hématologie	72
III.3.3.	Faisabilité avec un autre fluorochrome.....	74
III.3.4.	Séparation cellulaire en utilisant l'analyseur à double longueurs d'onde d'excitation - Campagne de tests	75
III.3.4.1.	Discrimination des lymphocytes B.....	76
III.3.4.2.	Discrimination des éosinophiles et des basophiles	79
III.4.	Conclusion	86
	BIBLIOGRAPHIE	88
IV.	MODULATION DES SIGNAUX OPTIQUES DANS UN CYTOMETRE EN FLUX	91
IV.1.	Introduction.....	92
IV.2.	Matériel et méthode	94
IV.2.1.	Système optique d'illumination.....	95
IV.2.1.1.	Source lumineuse	95
IV.2.1.2.	Modulateur acousto-optique	95
➤	<i>Efficacité de diffraction</i>	97
➤	<i>Efficacité de modulation</i>	97
IV.2.1.3.	Système optique de mise en forme anamorphique.....	99
IV.2.2.	Système optique de collection	99
IV.2.3.	Système fluide	101
IV.3.	Analyses de microsphères fluorescentes grâce à une technique de modulation dans un analyseur d'hématologie	102
IV.3.1.	Tests préliminaires sur l'analyseur.....	102
IV.3.2.	Tests avec deux types de microsphères fluorescentes	103
IV.4.	Conclusion	108
	BIBLIOGRAPHIE	109
V.	ANALYSE CELLULAIRE MULTIPARAMETRIQUE AU SEIN D'UN CYTOMETRE EN FLUX COUPLE A UNE SOURCE LASER POLYCHROMATIQUE	112
V.1.	Introduction.....	113
V.2.	Technologie supercontinuum	115
V.2.1.	Les fibres optiques non linéaires	118
V.2.1.1.	Rappel sur les fibres optiques.....	118
➤	<i>Fibres multimodes</i>	119
➤	<i>Fibres monomodes</i>	120
V.2.1.2.	Les fibres microstructurées à cristal photonique.....	122

➤	<i>Fabrication des fibres à cristal photonique</i>	122
➤	<i>Propagation de la lumière</i>	123
V.2.1.3.	Différents types de fibres à cristal photonique	124
V.2.1.4.	Fibres microstructurées hautement non linéaires.....	125
➤	<i>L'automodulation de phase</i>	127
➤	<i>La modulation de phase croisée</i>	128
➤	<i>Les effets solitoniques</i>	128
➤	<i>Effets paramétriques de type mélange à quatre ondes</i>	129
➤	<i>Génération d'ondes dispersives</i>	129
V.2.2.	Les sources de pompe et les supercontinua utilisés	130
➤	<i>Source Multitel à base de diode laser amplifiée</i>	131
➤	<i>Source Altechna à base de microlaser</i>	133
➤	<i>Source Teem Photonics à base de microlaser</i>	134
➤	<i>Résumé concernant les densités d'énergie des sources à large bande spectrale</i>	137
V.3.	Les sources de lumières supercontinuum dédiées à la cytométrie en flux	139
V.3.1.	Besoin de la cytométrie	139
V.3.2.	Caractéristiques temporelles et énergétiques des supercontinua pour la cytométrie.....	142
V.3.2.1.	Lasers déclenchés émettant de manière récurrente	143
➤	<i>Laser Multitel à 500 kHz</i>	143
➤	<i>Laser Altechna à 100 kHz</i>	144
V.3.2.2.	Lasers Teem déclenchés et synchronisés.....	145
➤	<i>Mesures des caractéristiques temporelles</i>	145
➤	<i>Mesures des caractéristiques énergétiques</i>	148
V.3.2.3.	Conclusion sur les sources de supercontinuum	149
V.3.3.	Cytomètres en flux intégrant une source à large bande spectrale	151
V.3.3.1.	Diffraction en lumière blanche	152
➤	<i>Description du système optique</i>	152
➤	<i>Description du système fluide, du déclenchement de l'impulsion lumineuse et des mesures effectuées</i> 155	
➤	<i>Résultats obtenus</i>	157
V.3.3.2.	Optimisation des mesures de diffraction en lumière blanche	160
➤	<i>Description du système optique</i>	160
➤	<i>Optimisation de la carte électronique de déclenchement</i>	163
➤	<i>Résultats obtenus</i>	164
V.3.3.3.	Analyse cellulaire par diffraction et fluorescence.....	165
➤	<i>Description du système</i>	166
➤	<i>Résultats obtenus</i>	168
V.4.	Conclusion	169
	BIBLIOGRAPHIE	171
	CONCLUSION GENERALE	176
	Liste des publications	180

TABLE DES FIGURES

<i>Figure I-1 : Tube de sang sédimenté.</i> _____	24
<i>Figure I-2 : Représentation simplifiée de l'hématopoïèse (correspondant à la production des cellules du sang (ou cellules matures) à partir d'une cellule souche pluripotente).</i> _____	25
<i>Figure I-3 : Photo du barillet.</i> _____	25
<i>Figure I-4 : Schéma de systèmes fluidiques (a) non hydrofocalisé et (b) hydrofocalisé. Les cellules du sang circulent de bas en haut, (a) en passant à des vitesses différentes en fonction de leur position transverse dans le flux ; (b) en passant à vitesse constante transversalement au flux grâce aux liquides de gainage.</i> _____	27
<i>Figure I-5 : Analyseur d'hématologie Pentra 60 d'HORIBA Medical.</i> _____	30
<i>Figure I-6 : Schéma optique général d'un dispositif d'analyse en flux spécifiquement créer pour les expériences décrites dans ce manuscrit.</i> _____	31
<i>Figure I-7 : Diffraction d'un faisceau laser par une cellule de sang. La longueur des flèches est proportionnelle à l'intensité lumineuse.</i> _____	32
<i>Figure I-8 : Schéma de la mesure optique aux petits angles.</i> _____	32
<i>Figure I-9 : Matrices discriminant les populations leucocytaires. (a) Intensité SSC en fonction de l'intensité FSC. (b) Intensité SSC en fonction de l'intensité du signal électrique.</i> _____	33
<i>Figure I-10 : Spectres d'absorption et d'émission de deux composés fluorescents, (a) le Thiazole Orange (TO) et (b) la phycoérythrine cyanine 5 (PC5).</i> _____	35
<i>Figure I-11 : Matrices obtenues sur un analyseur spécifiquement développé (cf. III) montrant la discrimination des populations leucocytaires. (a) Intensité SSC en fonction de l'intensité du FSC. (b) Intensité SSC en fonction de l'intensité du signal électrique.</i> _____	35
<i>Figure I-12 : Signal électronique correspondant à une seule cellule (singulet) et à trois cellules passant en même temps dans la fenêtre de mesure (triplet).</i> _____	37
<i>Figure I-13 : Filtrage qualitatif des impulsions par approximation linéaire en fonction de la relation entre leurs largeurs temporelles et de leurs tensions maximales.</i> _____	37
<i>Figure I-14 : Principe général de classification des populations cellulaire.</i> _____	38
<i>Figure I-15 : Etapes de rotations et de mise à l'échelle.</i> _____	39
<i>Figure II-1 : Représentation schématique du système de mesure.</i> _____	45
<i>Figure II-2 : Nombre d'érythrocytes en fonction du temps inter-cellulaire au niveau de la fenêtre optique ; le (b) est un zoom du (a).</i> _____	46
<i>Figure II-3 : Nombre de leucocytes en fonction du temps inter-cellulaire au niveau de la fenêtre optique ; le (b) est un zoom du (a).</i> _____	47
<i>Figure II-4 : Pourcentage de leucocytes détectés après le temps mort (t_0) en fonction de la fréquence de passage des cellules biologiques ; (a) fréquences de passage de 0 à 400 kHz et (b) fréquences de passage de 0 à 40 kHz. Ces courbes sont déduites de l'Equation II-5.</i> _____	49
<i>Figure II-5 : Tableau représentant le pourcentage des leucocytes détectés en fonction de la fréquence des impulsions optiques utilisées.</i> _____	49

Figure II-6 : Nombre de cellules mesurées en fonction du nombre de cellules passées dans la fenêtre de mesure optique. _____	50
Figure III-1 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une seule pompe laser. Les filtres utilisés proviennent du fabricant Semrock. _____	57
Figure III-2 : Système optique de mise en forme et de focalisation, (a) plan y, (b) plan x ; L1 : lentille cylindrique, L2 : lentille sphérique. _____	58
Figure III-3 : (a) Profil spatial du faisceau laser issue de la source ; (b) profil du faisceau au niveau de la chambre d'analyse, le flux cellulaire se propage suivant l'axe y. _____	58
Figure III-4 : Représentation schématique des faisceaux lumineux dans la chambre de mesure, a) pour une taille identique suivant l'axe des y (d_y), b) pour une taille identique suivant l'axe des x (d_x). La lumière se propage dans le plan. Le flux de cellule se propage dans le canal suivant l'axe des y (flèche rouge). _____	60
Figure III-5 : Eclairage énergétique en fonction de la largeur de l'ellipse. La distance considérée entre la dernière lentille et les parois de la cuve optique est de (a) 16 mm et (b) 26 mm. _____	61
Figure III-6 : Tableau résumant les caractéristiques du faisceau laser en fonction de différentes valeurs de D. _____	61
Figure III-7 : Spectres d'absorption et d'émission du TO et de la PC5 conjuguée à des anticorps, dans le cas a) ce sont des anticorps anti-CD20, dans le cas b) ce sont des anticorps anti-CRTH2. Les filtres passés bandes permettant de détecter les fluorescences du TO et la PC5 sont représentés par des rectangles et sont compris respectivement de 508,5 nm à 551,5 nm et de 655 nm à 685 nm. Excitation lumineuse monochrome (491 nm (λ_1)). _____	63
Figure III-8 : Cytogrammes de la fluorescence du TO en fonction de la fluorescence de la PC5. La fluorescence de la PC5 représente (a) les lymphocytes B, ou (b) les cellules CRTH2 positives. Excitation lumineuse à 491 nm. Un point correspond à une cellule. _____	66
Figure III-9 : Spectres d'absorption et d'émission du TO et de la PC5. Les bandes passantes des filtres de détection du TO et de la PC5 sont schématisées par des rectangles (respectivement 508,5-551,5 nm et 655-685 nm). Représentation des longueurs d'onde d'excitation laser à 491 nm (λ_1) et à 561 nm (λ_2). _____	68
Figure III-10 : Représentation schématique du nouveau système optique d'analyse utilisant deux sources lasers. _____	69
Figure III-11 : Système optique de collection permettant la détection de la diffraction à 90° et des fluorescences. _____	69
Figure III-12 : Eclairage énergétique en fonction de la largeur de l'ellipse dans la chambre de mesure optique pour des faisceaux lumineux émettant à 491 nm et 561 nm, a) en fonction des coordonnées x, b) en fonction des coordonnées y. c) Schéma optique des faisceaux lumineux à 491 nm (en bleu) et à 561 nm (en orange). Le diamètre du flux de cellule dans l'axe des x est de 27,4 μm . _____	70
Figure III-13 : Oscillogrammes des mesures électriques, de diffraction dans l'axe (FSC), de diffraction orthogonale (SSC) et de fluorescence du Thiazole Orange (TO) dans le cas d'une illumination lumineuse (a) à 491nm puis (b) à 561 nm. Chaque impulsion correspond à une cellule biologique. _____	71
Figure III-14 : Oscillogrammes des mesures électrique, de diffraction dans l'axe à 491 nm et 561 nm et de diffraction orthogonale (a) à 491 nm puis (b) à 561 nm pour une bille polymère. Le TO n'est pas utilisé. _____	71
Figure III-15 : Comptage de la totalité des leucocytes, sur l'analyseur d'hématologie intégrant deux longueurs d'onde d'excitation, pour différents cycles fluidiques, l'un étant utilisé pour des sangs non marqués (mode	

<i>standard) et l'autre pour des sangs dilués avec du PBS (mode marqué) ; 9 sangs différents sont testés. (a) Nombre de cellules comptées. (b) Courbe de régression linéaire. Réglage Fluidique non optimisé.</i>	73
<i>Figure III-16 : Comptage de la totalité des leucocytes, sur l'analyseur d'hématologie intégrant deux longueurs d'onde d'excitation, pour différents cycles fluidiques, l'un étant utilisé pour des sangs non marqués (mode standard) et l'autre pour des sangs dilués avec du PBS (mode marqué) ; 9 sangs différents sont testés. (a) Nombre de cellules comptées. (b) Courbe de régression linéaire. Réglage fluidique optimisé.</i>	73
<i>Figure III-17 : Spectres des filtres de collection utilisés pour détecter la diffraction aux grands angles, la fluorescence du TO et (a) la fluorescence de la PC5 ou (b) la fluorescence de l'ECD. Spectres de fluorescences du TO et (a) de la PC5 ou (b) de l'ECD.</i>	74
<i>Figure III-18 : Matrices obtenues avec l'analyseur d'hématologie ayant deux longueurs d'onde d'excitation, les monocytes sont marquées avec l'anti-CD14 couplé à différents fluorochromes, (a) la phycoérythrine cyanine 5 (PC5) ou (b) la phycoérythrine Texas Red (ECD).</i>	75
<i>Figure III-19 : Cytogrammes du FACScan de référence permettant dans un cas (a) d'identifier les lymphocytes B (marquage avec de la PC5-anti-CD20) et dans un autre cas (b) de discriminer les éosinophiles, les basophiles et des sous-populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2) (marquage avec de la PC5-anti-CRTH2).</i>	76
<i>Figure III-20 : Cytogrammes obtenus pour des leucocytes marqués avec l'anticorps anti-CD20 couplé à la PC5. Le sang analysé est pauvre en lymphocytes B (1%). Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).</i>	77
<i>Figure III-21 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CD20 couplé à la PC5. Le sang analysé est moyennement représenté en lymphocytes B (3.1%). Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).</i>	77
<i>Figure III-22 : Comparaison entre les pourcentages des cellules marquées obtenus avec les analyseurs d'hématologie incluant une longueur d'onde d'excitation ou deux longueurs d'onde d'excitation et le cytomètre FACScan utilisé comme référence.</i>	78
<i>Figure III-23 : Pourcentage des lymphocytes B mesuré sur douze sangs différents avec un cytomètre de référence (FACScan) et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation. Droite : courbe de régression linéaire.</i>	78
<i>Figure III-24 : Différence de pourcentage des lymphocytes B mesuré sur douze sangs différents entre le cytomètre de référence (FACScan) et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation.</i>	79
<i>Figure III-25 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est pauvre en éosinophiles et en basophiles. Cytogrammes représentant la fluorescence du TO en fonction de la PC5. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).</i>	80
<i>Figure III-26 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est riche en éosinophiles (respectivement 7,7% et 0,9%). Cytogrammes représentant la fluorescence du TO en fonction de la PC5. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).</i>	81

<i>Figure III-27 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est pauvre en éosinophiles et en basophiles (respectivement 1,1% et 0,2%). Cytogrammes représentant la fluorescence de la PC5 en fonction du SSC. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).</i>	81
<i>Figure III-28 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est riche en éosinophiles (respectivement 7,7% et 0,9%). Cytogrammes représentant la fluorescence de la PC5 en fonction du SSC. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).</i>	82
<i>Figure III-29 : Cytogrammes permettant d'identifier les cellules CRTH2 positives, c'est-à-dire les éosinophiles, les basophiles et les sous-populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2) avec l'analyseur d'hématologie utilisant deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm). (a) Intensité de fluorescence PC5-anti-CRTH2 en fonction de l'intensité de la diffraction orthogonale. (b) et (c) Intensité de fluorescence du TO en fonction de l'intensité de la diffraction orthogonale, (c) seulement les cellules marquées au CRTH2 sont affichées.</i>	83
<i>Figure III-30 : Comparaison entre les pourcentages de cellules marquées obtenus avec les analyseurs d'hématologie incluant une longueur d'onde d'excitation ou deux longueurs d'onde d'excitation et avec le cytomètre FACScan utilisé comme référence.</i>	84
<i>Figure III-31 : Pourcentage des éosinophiles mesuré sur douze sangs différents avec un cytomètre de référence le FACScan et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation. Droite : courbe de régression linéaire.</i>	84
<i>Figure III-32 : Pourcentage des basophiles mesuré sur douze sangs différents avec un cytomètre de référence le FACScan et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation. Droite : courbe de régression linéaire.</i>	85
<i>Figure IV-1 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique permettant de moduler les deux faisceaux lumineux du laser. Les filtres utilisés proviennent du fabricant Semrock.</i>	94
<i>Figure IV-2 : Schéma représentant les chemins lumineux des faisceaux à λ_1 et à λ_2 sélectionnés via le driver du modulateur acousto-optique.</i>	96
<i>Figure IV-3 : Schématisation de l'expérience permettant de déterminer les efficacités de diffraction et de modulation du modulateur acousto-optique.</i>	97
<i>Figure IV-4 : Signaux permettant de déterminer les efficacités de modulation du système acousto-optique pour un faisceau lumineux à 491 nm. (a) aucune modulation n'est appliquée. (b) à (e) différentes fréquences de modulation sont appliquées.</i>	98
<i>Figure IV-5 : Efficacité de modulation du filtre acousto-optique en fonction de la fréquence de modulation pour des faisceaux lasers à 491 nm et à 532 nm.</i>	99
<i>Figure IV-6 : Transmissions des filtres optiques utilisés pour mesurer les signaux de fluorescence.</i>	101
<i>Figure IV-7 : Spectres d'absorption et d'émission des microsphères fluorescentes vertes et rouges. Les longueurs d'onde d'excitation laser ($\lambda_1=491$ nm et $\lambda_2=532$ nm) sont représentées par des flèches. Les filtres de type passe-bande sont schématisés par des rectangles.</i>	101
<i>Figure IV-8 : Signaux obtenus avec l'analyseur d'hématologie, en illuminant des microsphères fluorescentes vertes avec un faisceau lumineux à 491 nm.</i>	102

Figure IV-9 : (a) Faisceaux de lumières incidents à 491 nm et à 532 nm modulés respectivement à des fréquences $w_1=200$ kHz et $w_2=300$ kHz. (b) Signal de fluorescence provenant du canal 1. (c) Signal de fluorescence du canal 2. _____	104
Figure IV-10 : Signaux de fluorescence provenant du canal 2 (signal S2). a) Signal optique utile correspondant au signal fluorescent des microsphères rouges (Flu _{ORED}) et b) signal non utile. _____	106
Figure IV-11 : Diaphonie des signaux sm1 et sm2 quand seulement les microsphères vertes sont excitées par les faisceaux lumineux à 491 nm et à 532 nm, pour une différence de fréquence de modulation différente. (a) $w_1=200$ kHz, $w_2=300$ kHz d'où $\Delta w=100$ kHz ; (b) $w_1=200$ kHz, $w_2=250$ kHz d'où $\Delta w=50$ kHz. _____	107
Figure V-1 : Représentation schématique de la constitution d'une source de lumière large bande de type supercontinuum. _____	117
Figure V-2 : Schéma comparant une fibre optique et un cheveu humain. L_c et L_g sont respectivement les rayons du cœur et de la gaine de la fibre optique. _____	118
Figure V-3 : (a) Représentation schématique des rayons lumineux se propageant dans une fibre optique. α_c est l'angle critique. (b) Représentation schématique de l'indice de réfraction en fonction de la distance radiale d'une fibre optique. n_c et n_g correspondent respectivement aux indices de réfraction du cœur et de la gaine. θ_{max} est l'angle d'entrée maximale de la fibre optique. _____	119
Figure V-4 : Représentation schématique d'une fibre multimode. L'indice du cœur (n_c) varie continument du centre à la périphérie. _____	120
Figure V-5 : Représentation schématique d'une fibre monomode. L'onde électromagnétique se propage rectilignement dans le cœur de la fibre optique (en rouge). _____	120
Figure V-6 : Photo de fibres microstructurées (FCP) avec un cœur en silice. (a) Profil global de la fibre et zoom de la partie centrale. (b) Partie centrale de la fibre avec un autre type d'arrangement des cylindres d'air autour du cœur. _____	122
Figure V-7 : Etapes de fabrication de la fibre FCP. (a) Fabrication des capillaires ; (b) assemblage des capillaires et du cœur : la préforme ;(c) insertion dans un tube de maintien et réduction de l'ensemble ;(d) manchonnage dans un tube à bord épais avant la dernière étape de fibrage. _____	123
Figure V-8 : (a) Fibres microstructurées non linéaires avec contrôle de la dispersion, (b) fibre dissymétrique à contrôle de polarisation, (c) fibre à cœur creux à très faible coefficient non linéaire. _____	125
Figure V-9 : Profil d'une fibre microstructurée hautement non linéaire. _____	126
Figure V-10 : Profil des courbes de dispersion pour les modes LP01 et LP12 de la fibre microstructurée montrée sur la Figure V-9. Longueur d'onde de dispersion nulle pour le mode LP01: 1025 nm. _____	126
Figure V-11 : (a) Exemple d'automodulation de phase à partir d'une impulsion gaussienne ; (b) modification du spectre de l'impulsion. _____	127
Figure V-12 [V-35] : Exemple d'autodécalage des solitons - Evolution du spectre en fonction du temps de groupe en régime femtoseconde. _____	129
Figure V-13 [V-35] : Exemple de génération d'ondes dispersives dans le visible et l'infrarouge. _____	130
Figure V-14 [V-37] : Schéma du laser de pompe à base de diode laser amplifiée. Source de pompe de la société Multitel. _____	131
Figure V-15 : Photo du supercontinuum Multitel. Source réalisée par XLIM et Leukos. _____	132

Figure V-16 : (a) Spectre du supercontinuum composé d'un laser de pompe à base de diode laser amplifiée. Mesures réalisées à une fréquence de 500 kHz. (b) photo et caractéristiques de la fibre. Mesures effectuées par XLIM et Leukos. _____	132
Figure V-17 : Schéma de la source laser à base de puce à semi-conducteur. Source de pompe de la société Altechna. _____	133
Figure V-18 : Photo de la source supercontinuum Altechna. Supercontinuum réalisé par XLIM et Leukos. _	134
Figure V-19 : Spectre du supercontinuum ayant une source de pompe à base de puce à semi-conducteur. Mesures réalisées par XLIM et Leukos. _____	134
Figure V-20 : Photo de la source supercontinuum TeemSi. Source réalisée par XLIM et Leukos. _____	135
Figure V-21 : Spectre du laser de pompe Teem Photonics couplé avec une fibre microstructurée en silice pure. Mesures réalisées par XLIM et Leukos à une fréquence de répétition de 2kHz. _____	136
Figure V-22 : Photo de la source de supercontinuum TeemGe. Source réalisée par XLIM et Leukos. _____	137
Figure V-23 : Spectre du laser de pompe Teem Photonics couplé avec une fibre microstructurée en germanium. Mesures effectuées par XLIM et Leukos à une fréquence de répétition de 2 kHz. _____	137
Figure V-24 : Spectres des quatre lasers supercontinua. Mesures réalisées par XLIM et Leukos. _____	138
Figure V-25 : Tableau récapitulatif des puissances et des énergies obtenues avec les différentes sources. _	139
Figure V-26 : Spécification de la source idéale utilisable en cytométrie. f correspond à la fréquence de récurrence des lasers. _____	141
Figure V-27 : Résumé des énergies par impulsion lumineuse et par cellule, obtenues pour chaque supercontinuum. _____	141
Figure V-28 : Variations temporelles du laser ayant une fréquence de répétition de 500 kHz. (a) et (b) Mesures réalisées avec l'oscilloscope pour des plages de mesures différentes, (a) 50 ns et (b) 500 ns. (c) Résultats de la gigue temporelle. _____	143
Figure V-29 : Pourcentages de la variation d'amplitude du supercontinuum à 500 kHz non filtré et filtré. _	143
Figure V-30 : Impulsions lumineuses du supercontinuum ayant une fréquence de répétition de 100 kHz. Caractérisation temporelle du supercontinuum. a) Signaux obtenus en temps réel, b) signaux obtenus avec un temps de pause de 15 min. _____	144
Figure V-31 : Résultats des mesures temporelles réalisées sur le supercontinuum à 100 kHz. _____	145
Figure V-32 : Mesure de la stabilité en amplitude du supercontinuum à 100 kHz. (a) Variation de la tension entre deux impulsions optiques. (b) Pourcentages de variation d'amplitude sans filtre et avec différents filtres passe bande optiques. _____	145
Figure V-33 : Exemple de signal de déclenchement provenant d'un générateur de fonction permettant de déclencher l'impulsion lumineuse du supercontinuum. (a) Signaux au cours du temps. (b) Signaux obtenus avec un temps de pause de 15 minutes. _____	147
Figure V-34 : Variation temporelle des signaux lasers non filtrés pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz. _____	147
Figure V-35 : Variation temporelle des signaux lasers filtrés dans le bleu (FF01-482/35 de chez Semrock) pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz. _____	148
Figure V-36 : Pourcentage de la variation d'amplitude liée au faisceau laser pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz. _____	149

<i>Figure V-37 : Pourcentage de la variation d'amplitude du rayonnement laser TeemGe pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz.</i>	149
<i>Figure V-38 : Tableau récapitulatif des caractéristiques temporelles et de variations d'amplitudes des supercontinua testés. Le filtre bleu est le FF01-482/35 de chez Semrock.</i>	150
<i>Figure V-39 : Points négatifs et positifs des différents supercontinua.</i>	151
<i>Figure V-40 : Exemple d'analyseur intégrant une source supercontinuum.</i>	152
<i>Figure V-41 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une source de lumière supercontinuum. La forme du faisceau optique dans la cuve de mesure est circulaire. La diffraction orthogonale en lumière blanche est détectée. Le flux de cellules se propage suivant l'axe y.</i>	153
<i>Figure V-42 : Différences de distances focales liées à la lentille de focalisation (O1LAO 011) pour des longueurs d'onde allant de 400 nm à 600 nm.</i>	154
<i>Figure V-43 : Tache du faisceau optique dans la cuve de mesure. Image réalisée grâce à une caméra Infra Rouge (Laser CamIIID de chez Coherent).</i>	154
<i>Figure V-44 : Schéma du système de détection électrique permettant le déclenchement de l'impulsion laser.</i>	156
<i>Figure V-45 : Chronologie d'émission des signaux électriques conduisant au déclenchement de l'impulsion laser à partir de la détection d'une cellule.</i>	156
<i>Figure V-46 : Système optique permettant de détecter la diffraction aux grands angles en lumière blanche.</i>	157
<i>Figure V-47 : Mesure à l'oscilloscope de signaux électriques engendrés par notre système de détection pour une microsphère de 9µm de diamètre.</i>	158
<i>Figure V-48 : Cytogramme du signal de diffraction à 90° (SSC) en fonction du signal électrique. Un point correspond à une, deux ou trois billes de latex de 9 µm de diamètre.</i>	158
<i>Figure V-49 : Cytogrammes de l'intensité du signal électrique en fonction du signal de diffraction à 90° (échantillon de sang « normal »).</i>	159
<i>Figure V-50 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une source de lumière supercontinuum. La forme du faisceau optique dans la cuve de mesure est rectangulaire et uniforme. La diffraction orthogonale en lumière blanche est détectée. Le flux de cellules se propage suivant l'axe y.</i>	161
<i>Figure V-51 : Profil du faisceau lumineux dans la cuve de mesure. Couplage entre les fibres FCP et rectangulaire a) optimisé ou b) non optimisé. Le sens de circulation des cellules est représenté par une flèche rouge.</i>	161
<i>Figure V-52 : Pourcentage de cellules mesurées en fonction de la variation temporelle du parcours moyen du système fluidique au niveau de la fenêtre optique.</i>	162
<i>Figure V-53 : Pourcentage du flux en fonction du diamètre du flux. En x, 0 correspond à l'axe passant par le centre de la buse. La somme des barres représente 100 % du flux.</i>	163
<i>Figure V-54 : Les différents signaux allant de la mesure électrique à la mesure optique. Le temps t_{laser} est fixe et intrinsèque au laser. Par contre, le temps $t_{interval}$ peut être ajusté via la carte électronique.</i>	164
<i>Figure V-55 : Matrices du signal SSC en fonction du signal électrique. Un point correspond à une cellule.</i>	165
<i>Figure V-56 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une source de lumière supercontinuum. Le flux de cellules se propage suivant l'axe y.</i>	167

Figure V-57 : Spectres d'absorption et d'émission du Thiazole Orange (TO). La bande d'excitation du supercontinuum est représentée par le rectangle bleu. _____ 167

Figure V-58 : Transmission des filtres optiques utilisés dans l'optique de collection. _____ 168

Figure V-59 : Matrice montrant la discrimination des populations leucocytaires. Un point correspond à une cellule. Deux types de matrice sont représentées, (a) électrique/SSC et (b) SSC/FluoTO. _____ 168

Introduction générale

Les progrès de la médecine reposent notamment sur la détection précoce des pathologies, ce qui permet de mettre en place rapidement des traitements et donc d'augmenter les chances de guérison des patients. Ces progrès sont dus à l'évolution des connaissances médicales et aux avancées technologiques des appareils de diagnostic. La cytométrie en flux est une technique d'aide au diagnostic permettant de réaliser des mesures rapides des propriétés physiques, biologiques, fonctionnelles et biochimiques des particules individuelles se déplaçant à vitesse rapide ($v \sim 5$ à 10 m/s) au sein d'un milieu liquide. Cette technique est généralement appliquée à des cellules biologiques mais aussi à des éléments subcellulaires tels que des mitochondries et des chromosomes. Les cellules se propagent en file indienne et sont illuminées une par une par une forte lumière généralement issue d'une source laser. Les informations déterminées correspondent aux propriétés morphologiques des cellules comme la forme, le volume, la taille, la structure interne... La réfraction, la diffusion et la réflexion sont les paramètres optiques analysés qui permettent d'extraire ces différentes caractéristiques. Il est également possible de marquer les cellules avec des sondes ou des colorants fluorescents permettant par exemple de déterminer la teneur en ADN et en ARN, ou de mettre en évidence des molécules spécifiques et donc identifier des populations ou sous-populations cellulaires comme les lymphocytes B. La cytométrie en flux est une technique performante et précise, néanmoins, la multiplication des sources d'excitations lumineuses et des spectres d'émissions de fluorescences complexifie énormément les systèmes optiques d'exposition et de détection¹. Cela engendre également des incertitudes sur les mesures, principalement en raison des recouvrements spectraux entre les émissions des différents fluorochromes². A partir de ce constat, nous avons souhaité créer de nouveaux systèmes optiques permettant de pallier ces inconvénients en ajustant les intensités d'émission de

¹ C. Arnoulet, M. C. Béné, F. Durrieu, J. Feuillard, C. Fossat, B. Husson, H. Jouault, M. Maynadié and F. Lacombe, "Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL", *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78(1), 4-10 (2010).

² M. Roederer "Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats", *Cytometry Part A*, 45(3), 194-205 (2001).

fluorescences par le biais des puissances lasers (chapitre III), en codant les signaux lumineux d'excitation (chapitre IV) et en intégrant une source de lumière cohérente polychromatique au sein d'un analyseur (chapitre V).

Dans **le premier chapitre** de ce manuscrit, nous décrivons les systèmes de cytométrie en flux et particulièrement les analyseurs d'hématologie utilisés lors des expériences décrites dans les chapitres III à V. Nous introduisons brièvement les notions théoriques permettant de comprendre le fonctionnement de nos systèmes de d'analyse. Cette approche générale permet d'avoir une vue globale de la cytométrie tout en s'attardant plus sur les systèmes optiques.

Le second chapitre présente une étude statistique de l'apparition des cellules dans les fenêtres de mesures électrique et optique de l'analyseur d'hématologie. Celle-ci permet de mieux comprendre la statistique des temps de passage des cellules dans nos systèmes, elle est indispensable pour la mise au point de l'analyseur cellulaire présenté dans le chapitre V.

Le troisième chapitre présente une technique permettant d'utiliser simultanément deux types de composés chimiques ayant des efficacités de fluorescences différentes dans une même région spectrale. On démontre alors la possibilité d'identifier les éosinophiles, les basophiles et des sous-populations lymphocytaires (telles que les lymphocytes B) grâce à un analyseur d'hématologie automatique non conventionnel combinant des fluorescences du Thiazole Orange TO et de la phycoérythrine cyanine 5 (PC5). Notre appareil spécifique mélange deux radiations d'excitation grâce à un filtre accordable acousto-optique dans le but de contrôler les émissions de fluorescences du TO, et de la PC5 conjuguée à des anticorps (anti-CD20 ou anti-CRTH2). Cette technique permet de fortement améliorer le rapport signal sur bruit et de diminuer les recouvrements spectraux provenant des émissions de fluorescences multiples.

Le quatrième chapitre concerne la combinaison de plusieurs longueurs d'onde d'excitation afin d'améliorer la précision des mesures de fluorescences liées aux cellules marquées. Cette expérience est réalisée avec un analyseur d'hématologie basé sur les principes de la cytométrie en flux et sur une source laser continue émettant deux longueurs d'onde visibles. Un codage optique temporel donné associé à chaque longueur d'onde permet l'identification des fluorescences provenant de deux types de microsphères fluorescentes. Ce système de codage optique permet de pallier les problèmes de recouvrements spectraux entre les émissions de fluorescences.

Le dernier chapitre présente l'intégration d'une source polychromatique de type supercontinuum dans des analyseurs d'hématologie. Nous avons dans un premier temps testé et sélectionné différentes sources polychromatiques en nous basant sur leur densité spectrale d'énergie et leur stabilité en amplitude pour des radiations positionnées dans la région visible bleue. Nous avons utilisé ce type de source pour valider un concept de mesure basé sur une calibration précise du taux d'illumination des cellules. Différentes configurations optiques ont été testées, notamment concernant les formes des fenêtres optiques et aussi les signaux de détections (mesures de diffraction en lumière blanche et bleue, mesures de fluorescence du TO). L'utilisation de microsphères a permis d'ajuster les réglages avant d'effectuer des mesures sur des cellules sanguines humaines.

I. Généralité sur la cytométrie en flux

I.1. Introduction

La cytométrie en flux est une technique qui permet de faire défiler des cellules biologiques à une vitesse rapide et de déterminer leurs propriétés physiques, biologiques, et biochimiques individuellement. Ces éléments biologiques en suspension dans un milieu liquide sont acheminés par un ou plusieurs fluides vers une zone confinée où sont agencés des moyens de mesure à base d'optique laser. Cette technique est généralement appliquée à des cellules biologiques mais aussi à des éléments subcellulaires tels que des mitochondries et des chromosomes. Les cellules dans un fluide sont véhiculées à grande vitesse et sont illuminées par une forte lumière, habituellement un laser. Les informations déterminées correspondent à une ou plusieurs propriétés morphologiques des cellules comme la forme, le volume, la taille, la structure interne... Elles peuvent être déterminées directement avec la lumière diffractée. Il est aussi possible de marquer les cellules avec des sondes ou des colorants fluorescents permettant par exemple de déterminer la teneur d'ADN, d'ARN...

Un cymomètre en flux permet d'effectuer uniquement des mesures sur des populations cellulaires préalablement choisies et marquées. Il peut réaliser des mesures en utilisant jusqu'à une dizaine d'émissions de fluorescences. Cet outil est également difficile à manipuler et nécessite l'emploi d'une personne spécialisée.

Une étude globale des cellules sanguines est réalisée grâce à un analyseur d'hématologie, dispositif de cytométrie spécialisé. Celui-ci utilise les mesures d'impédance électriques permettant le comptage des cellules et d'obtenir des renseignements sur leur taille. L'analyseur d'hématologie utilise aussi la diffusion de la lumière aux petits angles (FSC pour forward scattering) collectée dans l'axe du faisceau excitateur et la diffusion aux grands angles (SSC pour side scattering) collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux. Ces effets de diffusion et de réfraction permettent d'obtenir des renseignements sur la taille et sur la structure interne des cellules (granulométrie, rapport nucléo-cytoplasmique,...). La mesure de la fluorescence est un autre moyen utilisé dans les analyseurs pour caractériser les cellules. La fluorescence peut provenir de colorant fluorescent ou être le résultat d'un marquage par un fluorochrome spécifique d'un constituant cellulaire particulier, mais ces appareils n'utilisent pas plus de deux fluorescences. L'automatisation des analyseurs d'hématologie permet

également de réaliser des mesures rapides sans la nécessité de confier la manipulation à un technicien très expérimenté.

L'analyseur d'hématologie permet d'effectuer les premières analyses de sang d'un patient, et si le résultat est suspect, des analyses complémentaires et plus spécifiques seront réalisées, la plupart du temps sur un cytomètre en flux.

I.2. L'hématologie

Après avoir prélevé du sang chez un patient à l'aide d'une seringue, le sang sédimente par gravité au bout de trente minutes seulement. Il est alors spatialement divisé en trois phases : le plasma (contenant les plaquettes), les globules blancs (ou leucocytes) et les globules rouges (ou érythrocytes) (Figure I-1). Les analyses hématologiques sont effectuées sur la totalité de l'échantillon de sang et sont réalisées grâce à un analyseur et elles permettent d'obtenir un hémogramme et/ou une Numération Formule Sanguine (NFS). Celle-ci permet d'effectuer une analyse quantitative et qualitative grâce à un comptage des cellules et à une identification des lignées des globules blancs (en pourcentage et en valeur absolue) (Figure I-2).

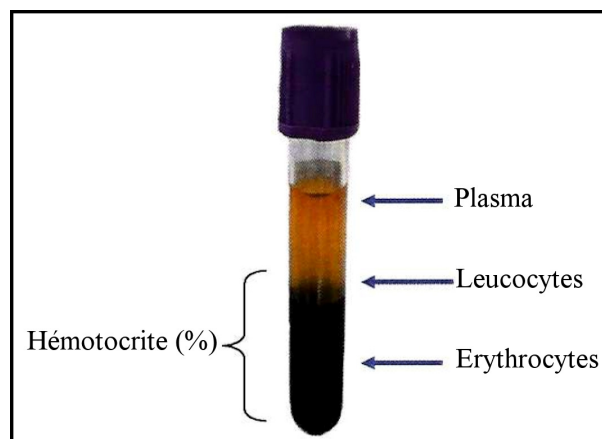


Figure I-1 : Tube de sang sédimenté.

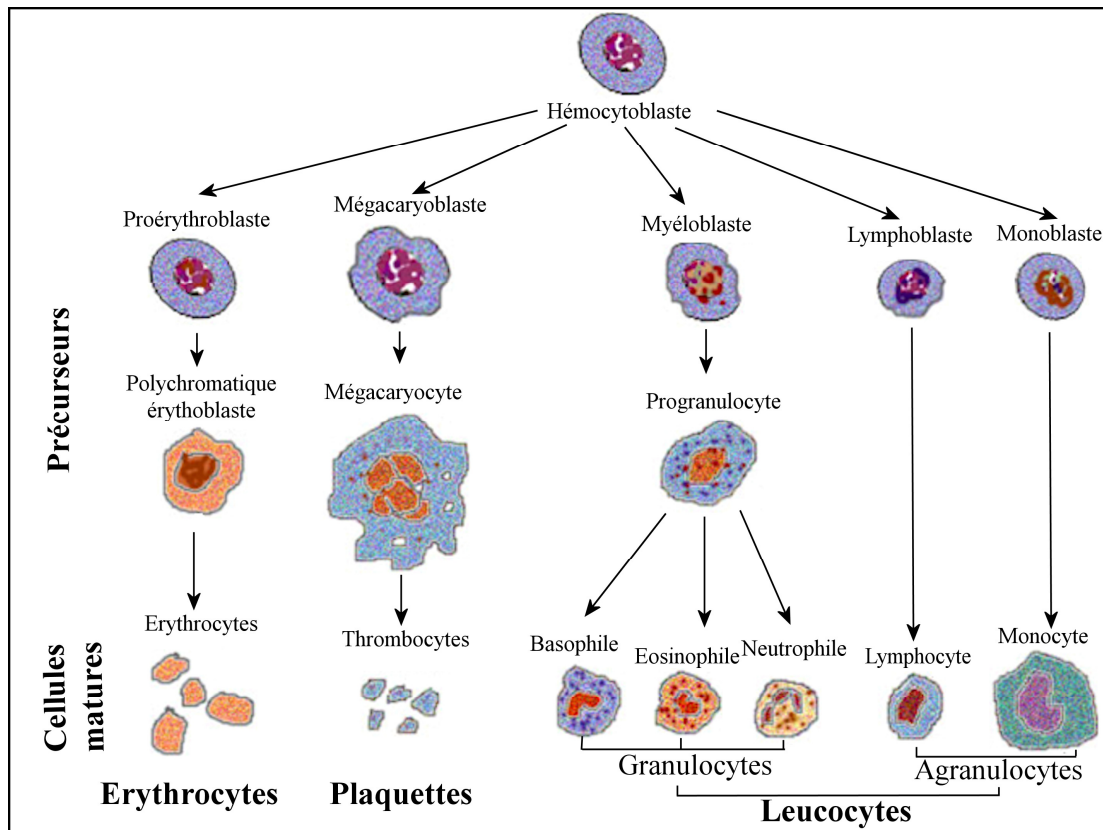


Figure I-2 : Représentation simplifiée de l'hématopoïèse (correspondant à la production des cellules du sang (ou cellules matures) à partir d'une cellule souche pluripotente).

Un tube de sang préalablement prélevé chez un patient est inséré dans le barillet (Figure I-3) prévu à cet effet. Une seringue prélève une quantité définie de sang tandis que le surplus est rejeté dans le bac des déchets.

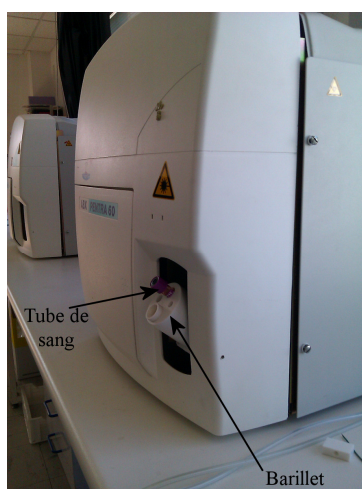


Figure I-3 : Photo du barillet.

Le sang est mélangé à un réactif qui dépend de l'analyse à effectuer. Pour l'analyse des cellules nucléées (contenant majoritairement des globules blancs), le réactif va lyser (détruire) les globules rouges, qui sont mille fois plus nombreux et qui peuvent générer des perturbations. Pour les analyseurs haut de gamme, le réactif contient aussi du Thiazole Orange, colorant fluorescent permettant de déterminer la teneur en acides nucléiques des cellules. Le système fluidique mélange les différents composés et sépare la solution finale en différentes aliquotes pour effectuer plusieurs mesures.

Ensuite, le flux de cellules est dirigé à une vitesse d'environ 10 m/s vers la cuve de mesure (où sont positionnées les fenêtres de mesures électrique et optique). D'après la théorie des fluides, la vitesse des fluides dans un conduit est hyperbolique, c'est à dire que la vitesse est maximum au centre et nulle sur les bords (Figure I-4a). Ce phénomène entraîne le tourbillonnement des cellules et des vitesses de progression différentes suivant la taille des cellules. Ainsi, les cellules plus grosses vont plus vite. Pour remédier à ce phénomène physique non désiré, un autre fluide (fluide de gainage) est placé de chaque côté du flux sanguin (Figure I-4b). La vitesse des particules sanguines est alors constante quelle que soit leur position transverse au sein du flux biologique. Ce système d'hydrofocalisation permet le passage des cellules en file indienne au niveau des fenêtres de mesures électrique et optique. L'optimisation de l'alignement entre le faisceau lumineux et le flux de cellules est alors fondamentale pour obtenir des mesures fiables et d'une sensibilité élevée. Ce réglage est souvent réalisé en utilisant des billes calibrées.

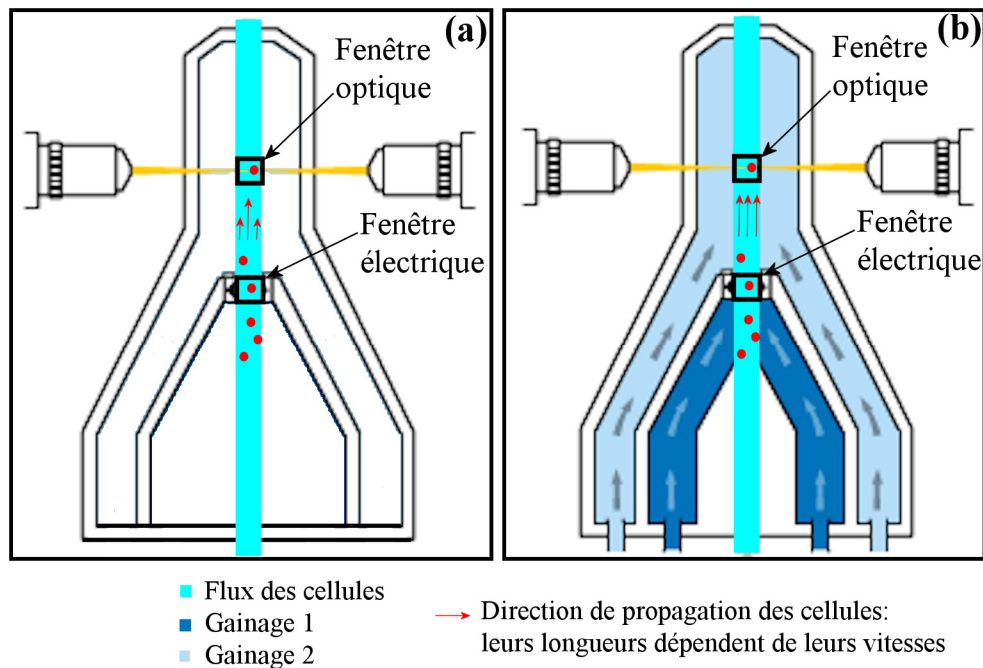


Figure I-4 : Schéma de systèmes fluidiques (a) non hydrofocalisé et (b) hydrofocalisé. Les cellules du sang circulent de bas en haut, (a) en passant à des vitesses différentes en fonction de leur position transverse dans le flux ; (b) en passant à vitesse constante transversalement au flux grâce aux liquides de gainage.

I.3. Etat de l'art [I-1, I-2, I-3]

Avant 1934, la caractérisation cellulaire est réalisée par microscopie simple puis par microscopie de fluorescences par Paul Ehrlich [I-4] et G.N. Papnicolau [I-5]. Les premiers appareils d'analyse cytologique en flux apparurent vers la moitié du vingtième siècle. En 1934, A. Moldavan mit en place le premier appareil de cytométrie en flux qui a permis de compter uniquement les globules rouges [I-6]. Les érythrocytes mélangés à une solution passent dans un tube capillaire placé sous un microscope auquel est adaptée une cellule photoélectrique. La difficulté d'obtenir des tubes capillaires standards ne permettait pas de garantir une focalisation optimum, de plus, ces systèmes rencontraient une obstruction importante pour les grandes cellules ou les amas cellulaires. C'est pour cela que Gücker intégra une gaine principale de flux laminaire [I-7]. L'amélioration du système fluidique en rétrécissant le flux de particules, permit à Wallace Coulter d'augmenter la précision des mesures et de déterminer le volume individuel des particules en intégrant une mesure électrique [I-8, I-9]. Des améliorations successives ont abouti à une série d'appareils vendus par la société Coultronics Inc. Le rétrécissement du flux de particules a permis de diminuer le

rapport signal sur bruit et d'augmenter le nombre de particules seules dans la fenêtre de mesure. Malheureusement, ces innovations fluidiques ont conduit à une dégradation des mesures électriques en raison de la non-uniformité des champs électriques à l'entrée et à la sortie de l'orifice, conduisant à des mesures erronées de la taille des cellules. Un flux de particules plus long couplé à une focalisation hydrodynamique a donc permis d'améliorer la précision de ces systèmes [I-10, I-11].

Le premier appareil de comptage optique de globules rouges a vu le jour grâce à Crosland-Taylor en 1953 [I-12]. Plus tard, Parker et Horst mettent au point le premier appareil de comptage et de différenciation des cellules sanguines [I-13] grâce à deux faisceaux de lumière opérant à des longueurs d'onde différentes. Le flux de cellules croise un faisceau contenant des longueurs d'onde bleue et rouge et la lumière transmise est collectée par deux photodétecteurs sensibles aux mêmes longueurs d'onde. En 1965, l'utilisation d'un spectrophotomètre a permis de quantifier les constituants cellulaires spécifiques et de classer les cellules grâce à des mesures multiples simultanées [I-14]. Plus tard, et en se basant sur cette technologie, le Ortho Cytograf et le Cytofluorograf ont été développés. L'intégration d'une lampe conventionnelle au xénon ou au mercure haute pression dans les cytomètres permet de fournir des intensités d'illumination et d'avoir des bandes d'excitation large (de l'ultraviolet au visible) [I-2, I-15]. Le PhyweImpulscytometer (ICP 22) devient la version commerciale de cette technologie. Des études sur la quantification des acides nucléiques, sans utilisation de colorant fluorescent, ont été réalisées débouchant sur des mesures simultanées de l'ADN et des protéines spécifiques [I-16].

Alors que l'illumination se faisait parallèlement au flux, en 1967, Van Dilla développa un système permettant d'illuminer les éléments biologiques et de détecter leur fluorescence suivant des directions perpendiculaires au flux [I-17]. Ce système utilisait un laser argon-ion comme source de lumière et a permis de développer davantage la détection de fluorescence et de diffraction. En 1969, Mullaney a mis au point un cytomètre en flux en mesurant la taille des cellules grâce à un effet de diffraction de la lumière obtenu dans l'axe du faisceau exciteur (FSC pour Forward scattering). Le laser utilisé était une source à gaz de type hélium néon [I-18].

Les trieurs cellulaires ont vu leur apparition vers 1965 grâce à Fulwyler [I-19]. Le trieur de cellules en fluorescences de Becton-Dickinson (FACS) a largement été utilisé en immunologie pour obtenir des populations cellulaires pures qui étaient identifiées par des

antigènes de surface. Ces antigènes sont des molécules situées sur la membrane de la cellule biologique et ils peuvent être spécifiques de populations ou sous populations cellulaires. Le développement de multi-stations comme le Cytomat ou le TechniconHemalog a permis d'effectuer différentes combinaisons de mesures dans des systèmes fonctionnant en parallèle et qui ont chacun leur propre méthode de traitement cellulaire et leur propre station de mesure. De 1980 à 1990, les progrès se sont surtout portés sur des nouvelles méthodes de traitements chimiques et biologiques des cellules, et de nouvelles molécules fluorescentes. Ces avancées ont permis de développer des produits biologiques innovants et de démontrer de nouvelles applications biomédicales. Des microprocesseurs et des logiciels puissants permettant de gérer des systèmes d'acquisition ultrarapides ont également été mis au point et cela avec des interfaces numériques conviviales. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis une grande avancée en immunologie cellulaire [I-20]. Cette technique a permis l'identification de nombreuses sous populations cellulaires comme les lymphocytes T, Th2, Tc2, les lymphocytes matures et immatures,... En 1982, les protéines des algues phycobili, de la phycoérythrine ont été découvertes, et ont été utilisées dans un cytomètre intégrant un laser à gaz de type argon.

I.4. Les analyseurs d'hématologie

Un analyseur d'hématologie est composé de différents éléments, tels que des systèmes fluidique, mécanique, électronique, optique, informatique embarqué, de traitements de signal et utilise plusieurs types de produits chimiques (réactifs) (Figure I-5). Les analyseurs utilisés lors des expériences de ce mémoire sont basés sur un Pentra 60 d'HORIBA Medical spécifiquement configuré.

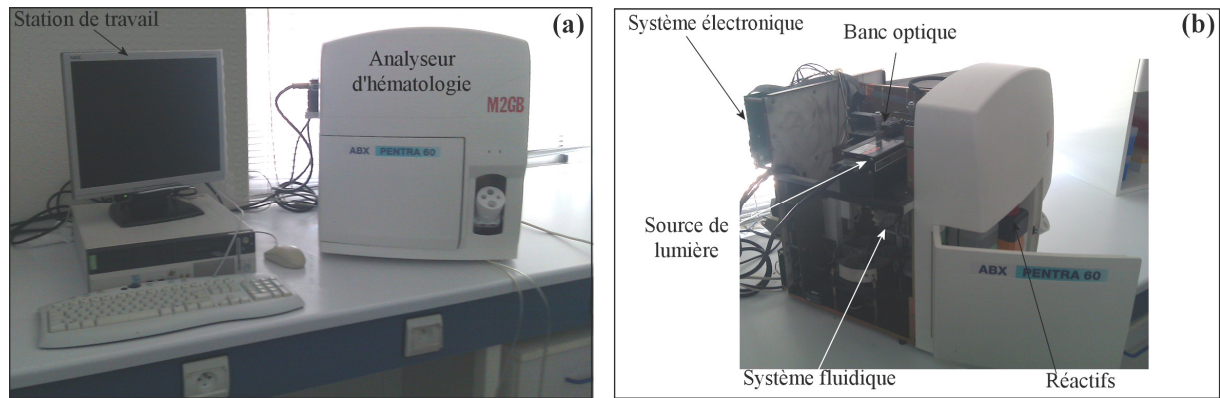


Figure I-5 : Analyseur d'hématologie Pentra 60 d'HORIBA Medical.

I.4.1. Introduction à la physique des analyseurs d'hématologie

Les analyseurs décrits dans ce manuscrit se caractérisent par le fait qu'ils sont composés de deux fenêtres de mesures. La première permet d'effectuer une mesure d'impédance électrique liée aux cellules biologiques tandis que la seconde permet une analyse optique par le biais d'effets de diffraction et/ou de fluorescence (Figure I-4).

I.4.1.1. Mesure électrique

Une cellule est considérée comme un diélectrique. La cellule passe à travers un micro-orifice qui est immergé dans un liquide de conductivité connue [I-21]. L'augmentation d'impédance entre les électrodes placées de chaque côté du micro orifice dévoile la présence d'une cellule. Cette variation d'impédance permet de compter et de déterminer le volume de la cellule ainsi que d'effectuer un comptage cellulaire. Cette méthode est extrêmement rapide et fiable.

I.4.1.2. Mesures optiques

Selon les caractéristiques de la cellule, la lumière est diffractée, réfléchiée ou absorbée par la particule, ce qui permet d'obtenir des renseignements sur sa taille et sa constitution [I-3, I-22, I-23]. Les analyseurs d'hématologie spécialisés utilisés dans les expériences décrites dans ce manuscrit peuvent exploiter trois mesures optiques (Figure I-6) :

- La diffusion aux petits angles (FSC : Forward Scattering)
- La diffusion aux grands angles (SSC : Side Scattering)
- La fluorescence

Le principe général des mesures optiques réalisées en diffraction et en fluorescence est maintenant décrit plus en détail.

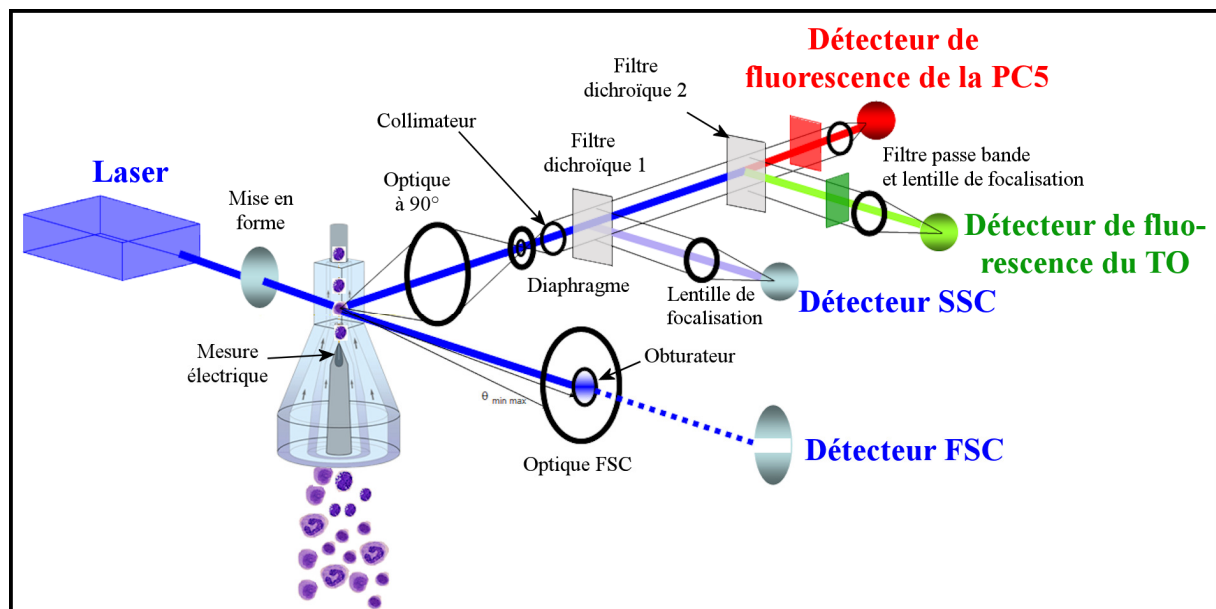


Figure I-6 : Schéma optique général d'un dispositif d'analyse en flux spécifiquement créé pour les expériences décrites dans ce manuscrit.

➤ Diffusion de la lumière

Les caractéristiques des mesures FSC et SCC sont étroitement liées aux angles de mesures et aux longueurs d'onde d'excitation des sources lumineuses. La diffraction résultant de l'interaction du faisceau laser et de la cellule biologique, a la forme d'un lobe dirigé vers l'avant par rapport au faisceau incident (Figure I-7). Ce phénomène est déduit de la théorie de

Mie qui permet d'étudier l'interaction de la lumière avec une particule plus grosse que la longueur d'onde. Cette théorie est une solution analytique des équations de Maxwell.

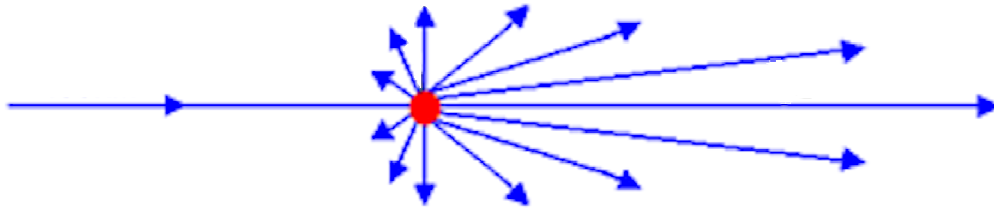


Figure I-7 : Diffraction d'un faisceau laser par une cellule de sang. La longueur des flèches est proportionnelle à l'intensité lumineuse.

- La diffusion aux petits angles (Forward scatter FSC, en anglais)

Cette mesure de diffraction est collectée dans l'axe du faisceau lumineux incident, elle nous renseigne sur la taille des cellules [I-3, I-24]. Plusieurs paramètres peuvent influencer sur ce signal (composition chimique du flux où circulent les cellules, structure des cellules...) ce qui diminue fortement la précision des mesures. Un obturateur rectangulaire placé sur l'axe de propagation du faisceau laser permet de stopper la partie centrale du rayonnement (Figure I-8). Les radiations diffractées par les cellules nucléées (leucocytes et érythroblastes) placées à l'intérieur de deux demi-lunes de 1-3° d'ouverture sont détectées par une photodiode (PD).

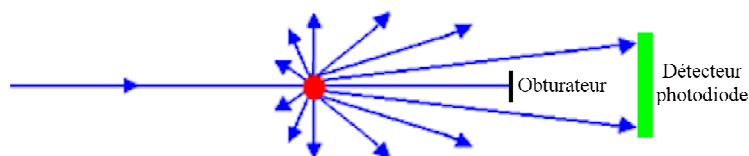


Figure I-8 : Schéma de la mesure optique aux petits angles.

- La diffusion aux grands angles (Side scatter SSC, en anglais)

La diffusion aux grands angles s'effectue à 90° par rapport à l'axe du faisceau laser incident. Une partie de la lumière du rayon laser traverse la paroi cellulaire, elle est à son tour diffusée par les organites intracellulaires sous l'effet de phénomènes de diffusion, de réfraction et de réflexion. Cette lumière a une faible intensité, elle ne peut donc pas être recueillie par une simple photodiode. Ainsi, un photomultiplicateur ayant une sensibilité très élevée est utilisé. Ce photodétecteur est un tube électronique qui convertit par effet photoélectrique (mécanisme

par lequel des électrons sont émis à la surface d'un matériau sous l'influence de la lumière) un rayonnement incident en un signal électrique, puis il amplifie ce signal, par émission d'électrons secondaires, jusqu'à un niveau exploitable. Cette mesure va surtout nous informer sur la structure interne des cellules (granularité, rapport nucléocytoplasmique) et il nous permet de discriminer trois populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes et granulocytes) qui ont des signaux SSC d'intensités différentes [I-26].

Les mesures de diffusion (FSC et SSC) permettent donc de séparer les populations leucocytaires : lymphocytes, monocytes et granulocytes (contenant les éosinophiles et les neutrophiles) (Figure I-9a). Les résultats des mesures électriques permettent d'ajouter un 3^{ème} paramètre et d'obtenir ainsi un résultat à 3 dimensions pour un seul passage d'un échantillon de sang testé (Figure I-9b).

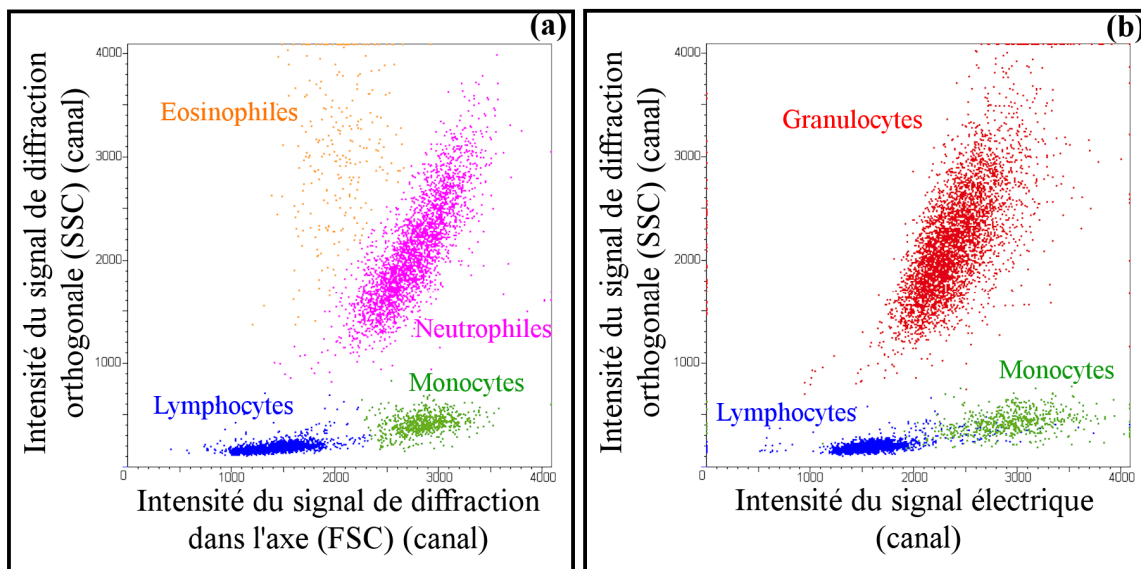


Figure I-9 : Matrices discriminant les populations leucocytaires. (a) Intensité SSC en fonction de l'intensité FSC. (b) Intensité SSC en fonction de l'intensité du signal électrique.

➤ Fluorescence

La fluorescence est quasiment isotrope en terme de direction d'émission et sa mesure s'effectue à 90° de l'axe d'excitation. Le rayonnement est absorbé par des molécules fluorescentes intracellulaires ou membranaires préalablement fixées sur les cellules qui passent d'un niveau d'énergie bas à un niveau plus élevé. Ce niveau étant instable, les électrons reviennent à leur état d'énergie d'origine en libérant une particule de lumière [I-3]. Celle-ci est émise à une longueur d'onde Stokes supérieure à celle de l'excitation. Des

exemples de spectres d'absorption et d'émission sont montrés sur la Figure I-10a. Plusieurs fluorescences correspondant à des marquages peuvent être détectées [I-25 à I-27]. Le rendement quantique Q des fluorochromes dépend de la quantité de photons absorbés et émis (Equation I-1).

$$Q = \frac{h\nu_{\text{emission}}}{h\nu_{\text{absorption}}} \text{ avec } 0 < Q < 1 \quad (\text{Equation I-1})$$

Le rendement quantique dépend de la concentration du fluorochrome, du pH, de la concentration en ion et de la longueur d'onde d'excitation. Dans les expériences décrites dans ce manuscrit, deux fluorescences au maximum seront intégrées dans un analyseur cellulaire.

La première fluorescence provient d'un colorant fluorescent intercalant des acides nucléiques, le Thiazole Orange (TO). Ce composant appartient à la famille des cyanines et s'intercale dans l'ADN et l'ARN [I-28]. En solution, le TO libre n'est quasiment pas fluorescent, par contre, en se liant aux acides nucléiques, sa fluorescence augmente d'un facteur 3000. Le TO est excité à des longueurs d'onde situées dans le « bleu » (de 450 nm à 540 nm), ce qui lui permet d'émettre un spectre en longueurs d'onde dans le « vert » très étendu (de 500 nm à 700 nm) (Figure I-10a). Il nous permet de mettre en évidence les granulocytes immatures et les cellules à haute teneur en acides nucléiques (telles que les lymphoblastes, les monoblastes et les plasmocytes) (Figure I-11a). Ce paramètre supplémentaire est aussi important pour déterminer les basophiles même si l'identification de chaque population est réalisée grâce à l'utilisation de tous les paramètres (électrique, SSC, FSC, fluorescence).

La deuxième fluorescence est seulement utilisée dans les expériences décrites dans le chapitre III et elle provient d'une sonde immunologique composée d'un anticorps couplé à un tandem de fluorochromes. Les analyses multiparamétriques permettant de mesurer plusieurs protéines utilisent des émissions de fluorescences multiples excitées par un laser émettant une seule longueur d'onde. Malheureusement seules quelques molécules répondent à ce critère (i.e. FITC, PE). En général, les fluorochromes nécessitent des longueurs d'onde d'excitations laser spécifiques pour qu'ils soient excités de façon optimum. Pour déplacer le spectre d'émission de fluorescence vers des longueurs d'onde plus élevées, des fluorochromes sont couplés ou associés entre eux. Dans ces conditions, la radiation laser excite le premier fluorochrome dont la fluorescence agit comme une pompe secondaire pour le second fluorochrome. Le tandem

de fluorochromes que nous avons utilisé dans les expériences de ce manuscrit est la phycoérythrine cyanine 5 (PC5). Elle est excitable de 450 nm à 700 nm et son spectre de fluorescence s'étend de 600 nm à 750 nm (Figure I-10b). L'anticorps couplé à la PC5 est spécifique d'un antigène situé sur la membrane de certaines cellules. Par exemple, l'anticorps anti-CD20 reconnaît la molécule CD20 présente uniquement sur la membrane des lymphocytes B (Figure I-11b).

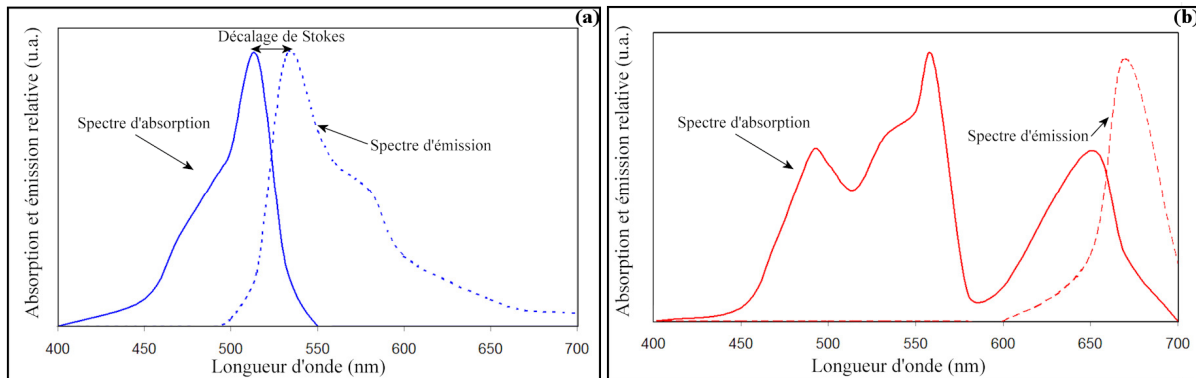


Figure I-10 : Spectres d'absorption et d'émission de deux composés fluorescents, (a) le Thiazole Orange (TO) et (b) la phycoérythrine cyanine 5 (PC5).

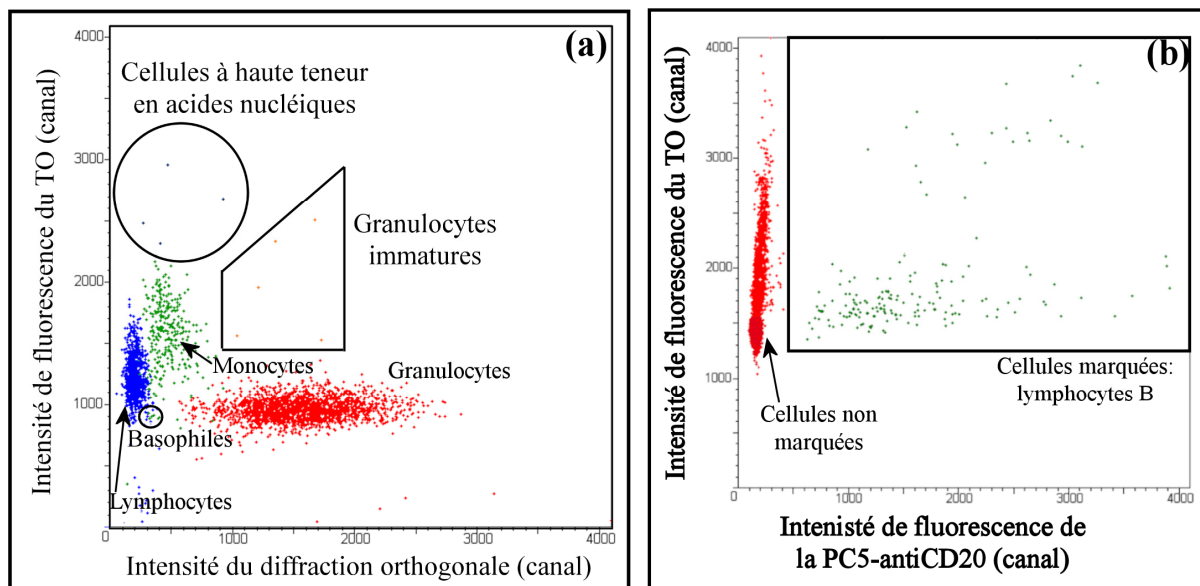


Figure I-11 : Matrices obtenues sur un analyseur spécifiquement développé (cf. III) montrant la discrimination des populations leucocytaires. (a) Intensité SSC en fonction de l'intensité du FSC. (b) Intensité SSC en fonction de l'intensité du signal électrique.

Les émissions des différents signaux de fluorescences sont séparées grâce à des filtres dichroïques. Des filtres passe-bande permettent ensuite de sélectionner la bande de longueurs

d'onde utile (Figure I-6). Etant donné la faible intensité des signaux, des photomultiplicateurs vont alors collecter les signaux de fluorescences.

La sensibilité d'un appareil de cytométrie en flux dépend de la configuration du banc optique, de la longueur optique, de la puissance du laser, des fluorochromes, de la combinaison fluorochromes-anticorps-antigènes et des molécules marquées.

I.4.2. Traitement du signal

Les signaux électroniques issus des mesures électriques et optiques sont transférés vers une station de travail où ils sont enregistrés et traités afin d'extraire le nombre et les caractéristiques des cellules biologiques. Ce traitement repose sur des méthodes algorithmiques de classification et sur une analyse statistique.

Pour chaque mesure, la date d'occurrence, la hauteur et la largeur des impulsions caractéristiques des cellules biologiques sont enregistrées ; elles seront ensuite utiles pour le traitement algorithmique.

I.4.2.1. Filtrage des signaux de faibles tensions

Un traitement électronique analogique permet d'enregistrer seulement les signaux supérieurs à une tension (V_{SEUIL}) qui a été réglée au-dessus des niveaux de tension de bruit. Ces signaux sont envoyés vers un processeur pour le comptage en temps réel des impulsions.

I.4.2.2. Filtrage temporel des signaux

Dans les analyseurs d'hématologie d'HORIBA Medical, le signal temporel associé au passage d'une cellule unique a une forme de type gaussienne (Equation I-2). Ce type d'équation impose une relation entre la largeur temporelle de l'impulsion et sa tension crête (Equation I-3). Un filtrage des impulsions est alors effectué pour ne garder que les signaux engendrés par une cellule unique. Les impulsions dont les largeurs ne sont pas « cohérentes » avec leurs hauteurs résultent du passage simultané de plusieurs cellules biologiques dans la fenêtre de mesure (Figure I-12). Ces signaux sont situés au dessus d'une droite comme représenté sur le graphe de la Figure I-13.

$$V(t) = V_{MAX} \cdot e^{-\frac{(t-t_0)^2}{\tau}} \quad (\text{Equation I-2})$$

$V(t)$ est la tension en fonction du temps, V_{MAX} est la tension maximale de l'impulsion, t correspond au temps, t_0 est le temps correspondant à la tension maximale et τ est une constante de temps liée au filtrage électronique effectué en amont.

$$\text{Si } V_{MAX} > V_{SEUIL} > 0 : L_T = 2|t_1 - t_0| = 2 \cdot \tau \sqrt{\ln(V_{MAX}) - \ln(V_{SEUIL})} \quad (\text{Equation I-3})$$

L_T correspond à la largeur temporelle (de t_1 à t_2) pour une tension de seuil fixe V_{SEUIL} .

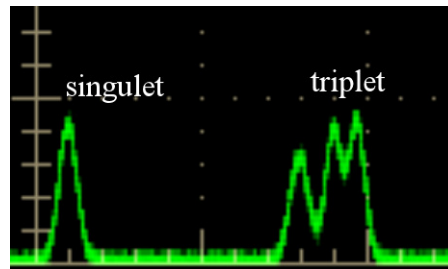


Figure I-12 : Signal électronique correspondant à une seule cellule (singulet) et à trois cellules passant en même temps dans la fenêtre de mesure (triplet).

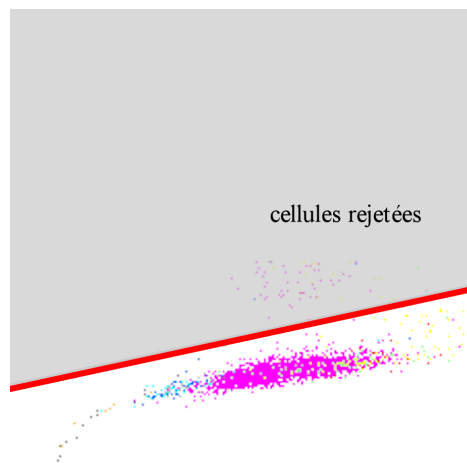


Figure I-13 : Filtrage qualitatif des impulsions par approximation linéaire en fonction de la relation entre leurs largeurs temporelles et de leurs tensions maximales.

I.4.2.3. Corrélation temporelle des mesures électriques et optiques

La distance géométrique entre les fenêtres électrique et optique induit un décalage temporel entre les mesures, qui dépend aussi de la vitesse du flux. Il correspond à un temps de transfert fixe ($T_{transfert}$) ayant une tolérance $\Delta T_{transfert}$ (Equation I-4). Ces paramètres doivent être

adaptés pour être sûr de faire coïncider les signaux issus des mesures électrique et optique correspondant à une même cellule biologique.

$$\left| (t_{opt} - t_{elec}) - T_{transfert} \right| < \Delta T_{transfert} \quad (\text{Equation I-4})$$

T_{elec} et T_{opt} sont les temps d'apparition des impulsions dans les fenêtres électrique et optique, $T_{transfert}$ correspond au temps de transfert (temps moyen entre les deux fenêtres de mesures) et $\Delta T_{transfert}$ est la tolérance sur le temps de transfert.

I.4.2.4. Méthodologie de classification des populations leucocytaires

Dans les systèmes d'hématologie spécifiques présentés dans ce mémoire, il y a une mesure électrique et quatre mesures optiques au maximum (diffraction dans l'axe, diffraction orthogonale, fluorescence du Thiazole Orange (TO) et fluorescence de la phycoérythrine cyanine 5 (PC5)). La méthodologie algorithmique consiste à séparer les différentes populations cellulaires. Deux populations leucocytaires sont discriminées automatiquement dans un espace bidimensionnel et cette opération est réitérée autant de fois que nécessaire pour obtenir une discrimination précise des populations leucocytaires. Cet espace peut être créé à partir de deux mesures ou grâce à une combinaison de différentes mesures. Ces espaces sont conçus de telle façon que la vallée soit franche pour séparer au mieux deux populations cellulaires (Figure I-14). Les combinaisons de différentes mesures sont souvent composées d'une rotation et d'une mise à l'échelle (Figure I-15).

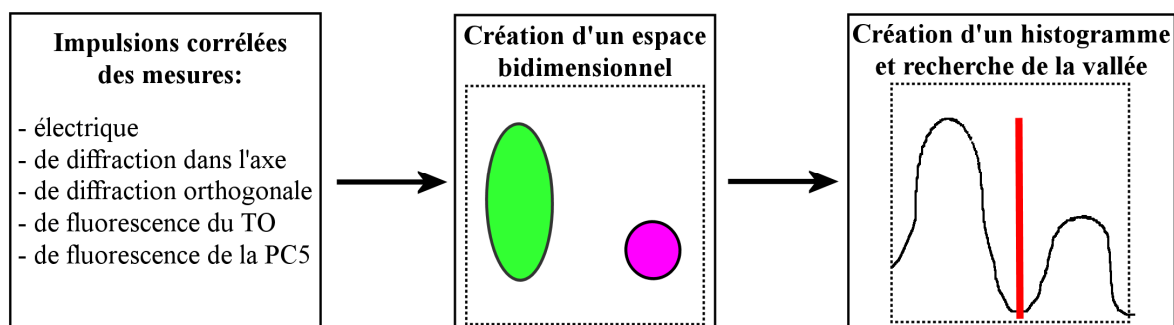


Figure I-14 : Principe général de classification des populations cellulaires.

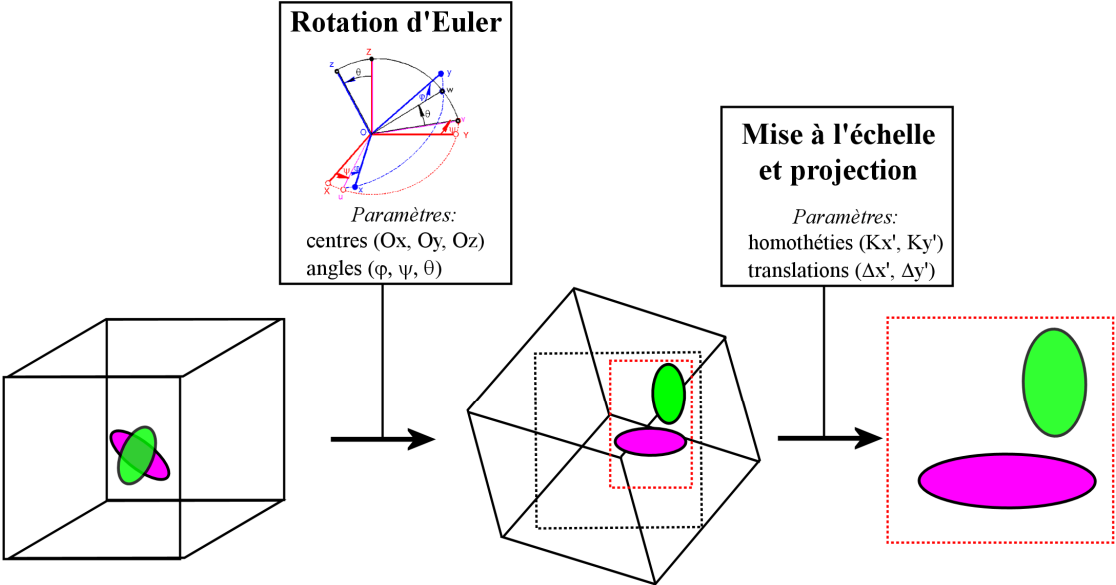


Figure I-15 : Etapes de rotations et de mise à l'échelle.

Bibliographie

- I-1. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelson, *Flow cytometry and sorting Second Edition*, Wiley-Liss, New York, 1-9 (1990).
- I-2. H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry Second Edition*, A. R. Liss, New York (1988).
- I-3. X. Ronot, D. Grunwald, J-F. Mayol and J. Boutonnat, *La cytométrie en flux*, Lavoisier, Edition Tec& Doc, Paris (2006).
- I-4. P. Ehrlich and A. Lazarus, *Histology of the blood*, Cambridge University Press (U.K), Cambridge (UK) (1900).
- I-5. G. N. Papanicolaou and H. F. Traut, "The diagnostic Value of Vaginal smears in carcinoma for the uterus", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 42-193, (1941).
- I-6. A. Moldavan "Photo-electric technique for the counting of microscopical cells", *Science*, 188-189 (1934).
- I-7. F. T. Jr Gucker, C. T. O'Konski and H. B. Pickard, "A photoelectric counter for colloidal particles", *Journal of the American Chemical Society*, 69-2442 (1947).
- I-8. W. Coulter, "Means for counting particles suspended in a fluid", Patent US 656 508 (1949).
- I-9. H. E. Kubitschek, "Electronic measurement of particle size", *Research (London)*, 13, 128-135 (1960).
- I-10. M. A. Van Dilla, N. J. Basman and M. J. Fulwylerand, "Electronic cell sizing", Annual Report, Biological and Medical Research Group of the Health Division, 182-204 (1964).
- I-11. L. Spielman and S. L. Goren, "Improving resolution in Coulter counting by hydrodynamic focusing", *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 176-182 (1968).
- I-12. P. J. Crosland-Taylor, "A device for counting small particle suspended in a fluid through a tube", *Nature (London)*, 171, 37-38, (1953).

- I-13. J. C. Parker and W. R. Horst, “Method of simultaneously counting red and white blood cells”, Patent US 2,875,666 (1953).
- I-14. L. A. Kamensky, M. R. Melamed and H. Derman, “Spectrophotometer : New instrument for ultra rapid cell analysis”, *Science*, 150, 630-631 (1965).
- I-15. B. G. de Grooth, M. van Dam, N. C. Swart, A. Willemsen and J. Greve, “ Multiple wavelength illumination in flow cytometry using a single arc lamp and a dispersing element”, *Cytometry Part A*, 8(5), 445-452 (1987).
- I-16. L. A. Kamensky and M. R. Melamed, “Rapid multiple mass constituent analysis of biological cells”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 157, 310-323 (1969).
- I-17. M. A. Van Dilla, “The fluorescent cell photometer: A new method for the rapid measurement of biological cells stained with fluorescent dyes”, *Annual Report, Biological and Medical Research Group of the Health Division* (1967).
- I-18. P. F. Mullaney, M. A. Van Dilla and J. R. Coulter, “Cell sizing: a light scattering photometer for rapid determination”, *Review of Scientific Instruments*, 40, 1029-1032 (1969).
- I-19. M. J. Fulwyler, “Electronic separation of biological cells by volume”, *Science*, 150, 910-911 (1965).
- I-20. G. Köhler and C. Milstein, “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”, *Nature (London)*, 256, 495-497 (1975).
- I-21. F. De Bisschop, J. Vierendeels and C. Langhe, “Electronic gate detection for cell or particle counting and sizing in liquids: Front-end characteristics, flow-dependent gate impedance, and its remediation”, *IEEE Transaction on Instrumentation and Measurement* (2006).
- I-22. H.C. van de Hulst, *Light scattering by a small particles*, Dover Publications Incorporation, New York (1981).
- I-23. M. I. Mischenko, J. W. Hovenier and J. D. Travis, *Light scattering by non spherical particles, Theory, Measurements, and Applications*, Academic Press, San Diego (2000).

- I-24. G. C. Salzmann, M. E. Wilder and J. H. Jett, "Light scattering with stream-in-air flow systems", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1, 264-267 (1979).
- I-25. J. A. Steinkamp, A. Romero, P.K. Horan and H. A. Crissman, "Multiparameter analysis and sorting of mammalian cells", *Experimental Cell Research*, 84, 15-23 (1974).
- I-26. H. W. Peter, "Method and apparatus for automated identification and enumeration of specified blood cell subclasses", brevet EP 0 022 670, date of publication of application (1981).
- I-27. H. M. Shapiro, E. R. Schildkraut, R. Curbelo, C. W. Laird, B. Turner and T. Hirschfeld, "Combined blood Cell counting and classification with fluorochrome stains and flow instrumentation", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 24(1), 396-411 (1976).
- I-28. S. Prodhomme, J-P. Demaret, S. Vinogradov, U. Asseline, L. Morin-Allory and P. Vigny, "A theoretical and experimental study of two thiazole orange derivatives with single- and double-stranded oligonucleotides, polydeoxyribonucleotides and DNA", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 53(1-3), 60-69 (1999).

II. Statistique des temps de passage des cellules biologiques dans un analyseur d'hématologie

II.1. Introduction

En cytométrie en flux, les cellules biologiques se propagent à une vitesse de plusieurs mètres par seconde dans un fluide et sont illuminées de manière ponctuelle par une lumière généralement issue d'une source laser. Les cellules suivent un mouvement aléatoire dans le flux nommé mouvement Brownien. Bien sûr, la focalisation hydrodynamique a permis d'améliorer considérablement la stabilité et l'homogénéité du flux biologique, pour mesurer les caractéristiques des cellules une par une dans les chambres de mesures électrique et optique [II-1]. Dans ce cadre, nous avons souhaité réaliser une étude sur la statistique des temps de passage des cellules dans les fenêtres de mesure dans le but de mieux comprendre la dynamique d'évolution des cellules biologiques dans le flux.

Dans ce manuscrit, les expériences avec des analyseurs d'hématologie spécifiques sont réalisées sur les leucocytes. Après avoir validé la méthode sur les érythrocytes, nous nous attarderons plus sur la statistique des temps de passage des leucocytes.

II.2. Description de la méthode

La statistique des temps de passage des érythrocytes et des leucocytes a été déterminée grâce à des mesures effectuées sur le futur analyseur d'hématologie haut de gamme d'HORIBA Medical. Dans cet appareil, les leucocytes sont mesurés en même temps que les érythroblastes, comme ceux-ci sont très faiblement représentés, nous ne tiendrons compte que des leucocytes.

Nous avons tout d'abord collecté et analysé les mesures électrique, de diffraction (dans l'axe et à 90°) et de fluorescence du TO. La mesure électrique permet de compter et de déterminer la taille des cellules, la diffraction des cellules dans l'axe (FSC) donne préférentiellement un renseignement sur la taille des cellules, la diffraction à 90° (SSC) nous renseigne préférentiellement sur la structure interne de la cellule et sur sa granularité, et la mesure de la fluorescence du Thiazole Orange permet d'obtenir des données sur la teneur en acides nucléiques.

Les cellules biologiques circulent dans un canal à une vitesse de 10 m/s et sont mesurées à l'intérieur des fenêtres électrique et optique (Figure II-1). Nous déterminons, au niveau de chaque fenêtre, le temps inter-cellulaire (δt), c'est-à-dire le temps entre chaque cellule.

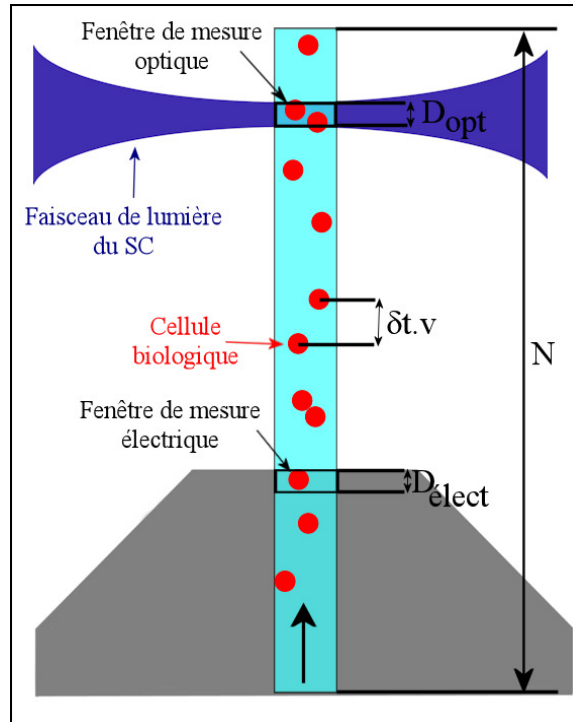


Figure II-1 : Représentation schématique du système de mesure.

Nous avons tout d'abord mesuré le nombre d'érythrocytes pour chaque temps inter-cellulaires. Nous avons remarqué que le nombre de cellules décroît exponentiellement avec l'augmentation des temps inter-cellulaires (Figure II-2a) [II-2]. Nous avons donc pu déduire la courbe de tendance associée à ces mesures (Equation II-1 et courbe rose de la Figure II-2a). Il est important de noter que le système ne permet pas de mesurer tous les temps intercellulaires. En effet, seules les cellules ayant un temps inter-cellulaire supérieur à $55 \mu\text{s}$ procurent un signal caractéristique de la cellule biologique (zoom II-2b de la Figure II-2a). Il existe donc un « temps mort t_0 » lié à la réponse électronique du système et à la présence de doublons et de triplets.

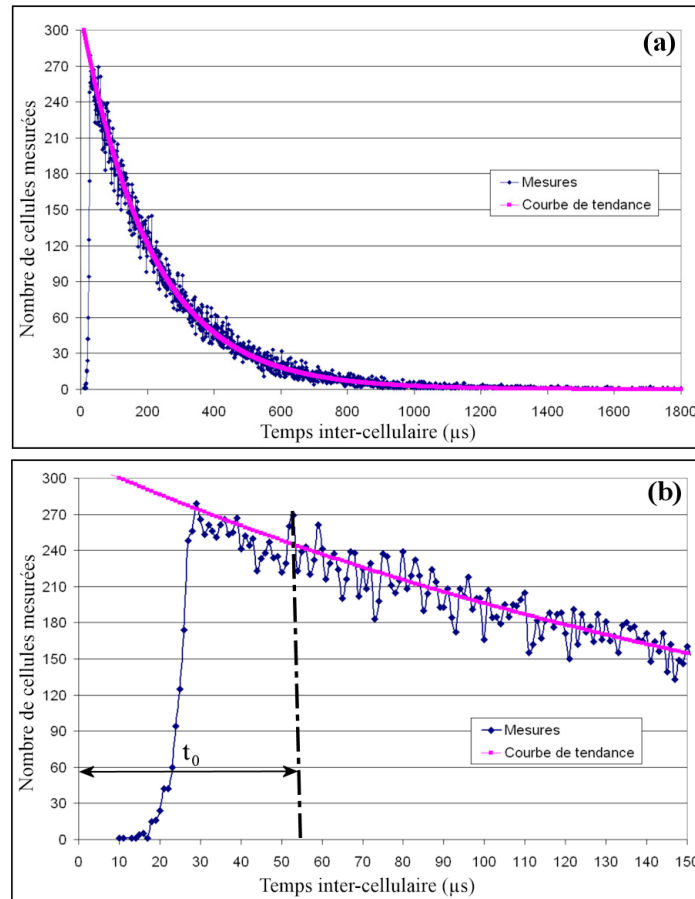


Figure II-2 : Nombre d'érythrocytes en fonction du temps inter-cellulaire au niveau de la fenêtre optique ; le (b) est un zoom du (a).

$$N(\delta t) = \frac{N^2}{T} \cdot \exp\left[-\frac{N \cdot \delta t}{T}\right] \quad (\text{Equation II-1})$$

$N(\delta t)$ est le nombre de cellules pour chaque temps inter-cellulaire, N correspond au nombre de cellules passées dans la cuve de mesure, T est la durée de la mesure et δt représente le temps inter-cellulaire.

Cette évolution exponentielle déduite des mesures sur les érythrocytes, a par la suite, été appliquée aux mesures sur les leucocytes (Figure II-3a). La zone morte identifiée pour les mesures sur les érythrocytes est identique lors d'une mesure sur les leucocytes, populations beaucoup moins nombreuse dans le sang circulant (Figure II-3a).

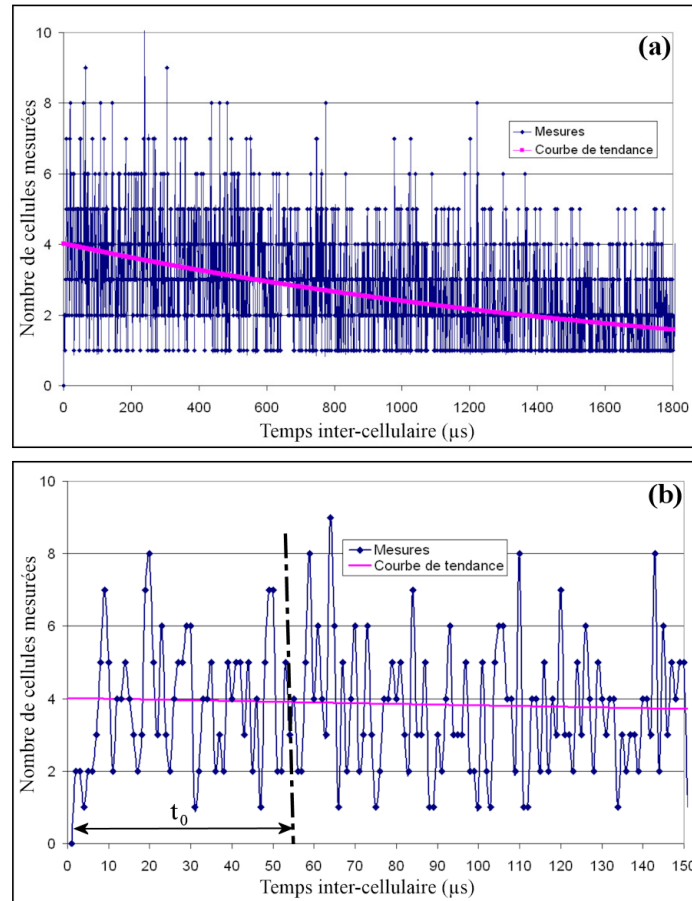


Figure II-3 : Nombre de leucocytes en fonction du temps inter-cellulaire au niveau de la fenêtre optique ; le (b) est un zoom du (a).

II.3. Exploitation des données

Suite à la loi de probabilité que nous avons établie (Equation II-1), le nombre de cellules rejetées ($N_{(\delta t < t_0)}$) et le nombre de cellules mesurées ayant un signal caractéristique des cellules biologiques ($N_{(\delta t > t_0)}$) sont déduits grâce aux Equations II-2 à II-5.

$$N_{(\delta < t_0)} = \int_0^{t_0} N(\delta) dt = \int_0^{t_0} \frac{N^2}{T} \cdot \exp\left[-\frac{N \cdot \delta}{T}\right] dt \quad (\text{Equation II-2})$$

$$N_{(\delta < t_0)} = N \left[1 - \exp\left(-\frac{N \cdot t_0}{T}\right) \right] \quad (\text{Equation II-3})$$

$$N_{(\delta > t_0)} = \int_{t_0}^{+\infty} N(\delta) dt = \int_{t_0}^{+\infty} \frac{N^2}{T} \cdot \exp\left[-\frac{N \cdot \delta}{T}\right] dt \quad (\text{Equation II-4})$$

$$N_{(\delta > t_0)} = N \cdot \exp\left(-\frac{N \cdot t_0}{T}\right) \quad (\text{Equation II-5})$$

$N_{(\delta < t_0)}$ correspond au nombre de cellules biologiques circulant dans la cuve avec un temps inter-cellulaire inférieur à t_0 (cellules rejetées) tandis que $N_{(\delta > t_0)}$ sont les cellules qui suivent la loi de probabilité de l'Equation II-1 ($\delta > t_0$). $N(\delta)$ est le nombre de cellules pour chaque temps inter-cellulaire, N représente le nombre de cellules passées dans la cuve de mesure, T est la durée de la mesure, δ représente le temps inter-cellulaire et t_0 est le temps mort.

Ces équations nous permettent de tracer le pourcentage de leucocytes détectés après le temps mort ($\delta > t_0$) en fonction de la fréquence de passage des cellules (Figure II-4). Il apparaît que le futur analyseur d'hématologie haut de gamme d'HORIBA Medical mesure 97,1 % des leucocytes passant devant la fenêtre optique pour une gamme de sang normal (6 000 cellules biologiques / μl de sang circulant) (Tableau II-5). Cet analyseur requière donc l'utilisation d'une fréquence laser d'utilisation de 18 kHz, en considérant que la source lumineuse émet de façon synchrone avec les cellules biologiques. Néanmoins, les fréquences de répétition supérieures ou égales à 10 kHz sont suffisantes pour obtenir des caractéristiques précises de l'ensemble des leucocytes présents dans le sang circulant (94,8% des cellules détectées pour une gamme normale).

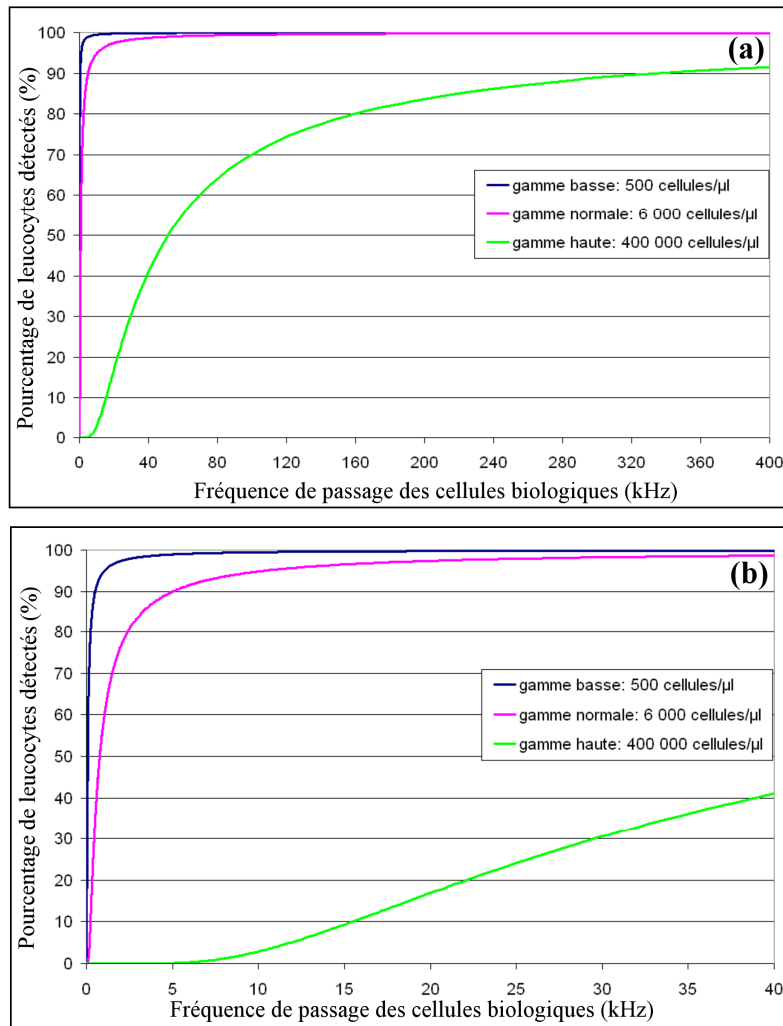


Figure II-4 : Pourcentage de leucocytes détectés après le temps mort (t_0) en fonction de la fréquence de passage des cellules biologiques ; (a) fréquences de passage de 0 à 400 kHz et (b) fréquences de passage de 0 à 40 kHz. Ces courbes sont déduites de l'Equation II-5.

Temps inter-cellulaire (δt) (μs)	Fréquence d'apparition des cellules (kHz)	Pourcentage des cellules biologiques détectées			
		Gamme basse (500 cellules/ μl)	Gamme normal (6000 cellules/ μl)	Gamme haute (400000 cellules/ μl)	
500	2	97,4	76,6	1,86E-06	
200	5	98,9	89,9	0,1	
100	10	99,5	94,8	2,8	
67	15	99,6	96,6	10,2	
56	18	99,7	97,1	13,6	Analyseur d'hématologie classique
20	50	99,9	98,9	49,1	
10	100	99,9	99,5	70,0	
2	500	100	99,9	93,1	

Figure II-5 : Tableau représentant le pourcentage des leucocytes détectés en fonction de la fréquence des impulsions optiques utilisées.

Les courbes représentant le nombre de cellules détectées (pour $(\delta t > t_0)$) en fonction du nombre de cellules passant dans la fenêtre d'analyse sont représentées sur la Figure II-6 et elles sont déduites de l'Equation II-5. Ce phénomène a été validé grâce à des mesures effectuées avec des échantillons de sang ayant des concentrations de leucocytes différents, testés sur le futur analyseur d'hématologie haut de gamme d'HORIBA Medical. Le nombre maximum de cellules détectées augmente linéairement avec le temps de mesure ce qui est parfaitement logique.

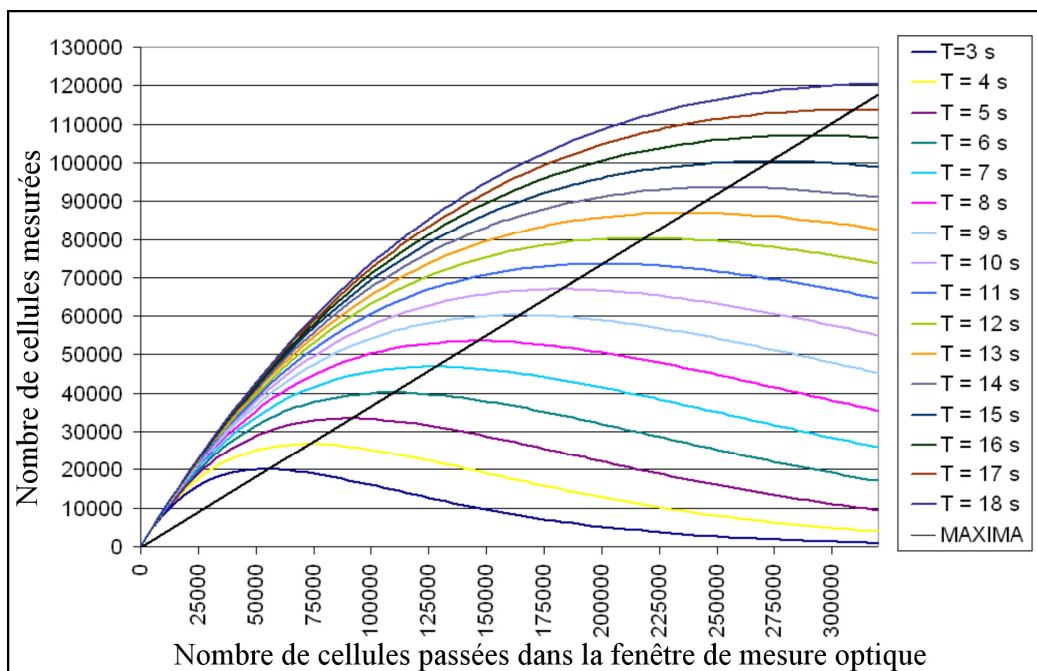


Figure II-6 : Nombre de cellules mesurées en fonction du nombre de cellules passées dans la fenêtre de mesure optique.

II.4. Conclusion

La statistique des temps de passage des cellules dans un analyseur d'hématologie permet à HORIBA Medical d'étudier des phénomènes fluidiques pour optimiser les appareils cellulaires. Cette étude nous a également permis de déterminer le pourcentage des cellules mesurées en fonction des fréquences de défilement des cellules et donc d'en déduire les spécifications des fréquences de répétition des sources lasers émettant une impulsion lumineuse de façon synchrone avec les cellules. Nous avons déduit qu'une fréquence minimale de 10 kHz était nécessaire pour mesurer plus de 95 % des leucocytes.

Bibliographie

II-1. L. Spielman and S. L. Goren, “Improving resolution in Coulter counting by hydrodynamic focusing”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 176-182 (1968).

II-2. G. Saporta, *Probabilités, analyse des données et statistique*, Edition Technip (2006).

**III. Système optique permettant de minimiser
les compensations dans un cytomètre
automatisé**

III.1. Introduction

Dans la plupart des diagnostics hématologiques, le comptage automatique de l'ensemble des cellules biologiques et leur différenciation sont suffisants pour renseigner le praticien sur l'existence d'un déséquilibre ou d'un désordre cytologique [III-1 à III-5]. En routine, ces systèmes d'analyse permettent de déterminer jusqu'à sept populations leucocytaires : les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les lymphocytes, les immatures granuleux et les cellules à haute teneur en acides nucléiques (composées des lymphoblastes, des monoblastes et des plasmocytes) [III-6 à III-11]. Lorsqu'un déséquilibre des concentrations cellulaires, ou que certains types cellulaires normalement absents chez le sujet sain sont détectés, des investigations supplémentaires sont réalisées dans le but d'affiner le diagnostic. Afin d'améliorer la précision du comptage d'une sous-population cellulaire choisie, une analyse complémentaire s'avère donc indispensable. Elle permet de contrôler et/ou de corriger les résultats obtenus avec un automate conventionnel et d'effectuer des diagnostics spécifiques.

Des frottis sanguins manuels suivis d'une coloration et d'une observation sous microscope peuvent par exemple être réalisés. L'identification et le comptage non automatique sont alors un moyen supplémentaire d'analyse couramment utilisé. Les inconvénients majeurs de ces actions sont :

- a) une faible fiabilité lorsque les cellules recherchées sont faiblement discriminées par leur morphologie ou leur faible quantité dans l'échantillon analysé,
- b) une durée d'analyse longue,
- c) un coût important lié à la nécessité d'employer un technicien expérimenté.

Un autre moyen de réaliser des analyses complémentaires peut consister en un marquage cellulaire spécifique grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes ou des colorants fluorescents [III-12 à III-15]. La différenciation des différentes cellules leucocytaires peut être effectuée grâce à un cytomètre en flux ou par une détection en fluorimétrie. Si l'on compare ces systèmes aux analyseurs d'hématologie, le cytomètre en flux permet de séparer les cellules colorées en utilisant des mesures multiples de fluorescences et de discriminer précisément beaucoup de populations ou sous-populations. Dans la plupart des cytomètres en flux disponibles commercialement, le volume de l'échantillon n'est pas déterminé et aucun

renseignement sur le comptage absolu des cellules n'est alors possible, ceci constitue une première limitation en usage clinique.

Dans la grande majorité des cas, le cytomètre est utilisé en complément de l'analyseur d'hématologie. La relation directe avec les résultats obtenus par l'automate et par le cytomètre en flux n'est pas possible du fait qu'un des appareils travaille sur un volume fixe alors que l'autre prélève un volume d'échantillon variable. En cytométrie, les résultats obtenus sont relatifs et non absolus ce qui affecte défavorablement la précision des analyses (i.e. cytomètre FACScan de Becton Dickinson). Une corrélation mathématique des données obtenues par chaque appareil est alors indispensable mais ne garantit en rien une absence d'erreurs sur le résultat final.

Un autre inconvénient est l'obligation de transporter les échantillons de sang entre le laboratoire d'hématologie et le centre de cytométrie en flux pour réaliser les deux analyses (analyse conventionnelle et analyse complémentaire). En effet, seuls quelques laboratoires d'analyses sont équipés de cytomètres en flux qui nécessitent, en outre, l'emploi de personnes qualifiées. Le transport diminue la qualité du sang et augmente la durée d'obtention des résultats de l'analyse.

Pour pallier ces inconvénients, les étapes conventionnelle et complémentaire peuvent être couplées dans un même appareil [III-16]. La première étape, nommée étape conventionnelle, est basée sur l'analyse de quatre paramètres avec lesquels huit populations leucocytaires sont détectées. Cette étape correspond à une analyse d'hématologie classique. Les opérations réalisées sont les suivantes :

- a) mesure de l'impédance liée au passage d'une cellule entre deux électrodes (mesure électrique). Ce paramètre permet de compter et de déterminer la taille des cellules.
- b) détection de la diffraction des cellules dans l'axe (FSC). Cette mesure donne préférentiellement un renseignement sur la taille des cellules [III-17].
- c) détection de la diffraction à 90° (SSC). Ces données nous renseignent préférentiellement sur la structure interne de la cellule et sur sa granularité [III-17].
- d) mesure de la fluorescence du Thiazole Orange (FluoTO). Cette analyse permet d'obtenir des données sur la teneur en acides nucléiques (ARN et ADN).

Pour un sang dit « normal », chaque matrice est traitée automatiquement pour fournir une discrimination totale des leucocytes. Malheureusement, cette classification automatique peut

tomber en défaut, devenir partiellement ou totalement erronée lorsque des cellules « pathologiques » sont présentes dans l'échantillon. En effet, les cellules « anormales » ont des caractéristiques biologiques et physiques différentes des cellules « normales » (volume, indice de réfraction des différents compartiments cellulaires, rapport nucléo cytoplasmique, organelles cellulaire et granularités intra-cytoplasmiques fortement ou faiblement exprimées par rapport à la normalité,...) et peuvent donc générer des interférences sur leur identification et leur dénombrement.

Pour supprimer ces interférences, une seconde étape nommée étape complémentaire est effectuée. Elle utilise, en plus des mesures de la première étape, des mesures d'immunophénotypage. Cette étape complémentaire comprend un marquage de cellules spécifiques, suivi d'une analyse cytologique classique pour identifier et compter les populations marquées.

L'utilisation d'une étape conventionnelle combinée si nécessaire à une étape complémentaire a de nombreux avantages. Tout d'abord, cette méthode offre des résultats ayant un degré de précision et de fiabilité encore jamais égalé du fait de l'utilisation d'un même échantillon et des mêmes conditions de mesures (ex : paramètres fluidiques). De plus, les analyses sont effectuées en simultanée ce qui augmente la vitesse de traitement. Cette méthode permet également de minimiser la plupart des mauvaises interprétations et permet une observation fine de l'évolution de nombreuses pathologies dans le but d'orienter encore plus spécifiquement la prescription. Enfin, cette analyse complexe et unique réduit considérablement le coût des analyses.

Dans la suite de ce chapitre, nous montrons qu'un analyseur d'hématologie utilisant une double excitation laser permet d'améliorer la discrimination de plusieurs sous populations cellulaires. Cette nouvelle méthode d'analyse a été validée en utilisant le Thiazole Orange et un fluorochrome (conjugué à un anticorps) ayant une intensité de fluorescence faible. Cette intensité dépend de nombreux paramètres tels que l'affinité entre les anticorps et les antigènes, les dilutions, les réactifs, l'accessibilité antigénique, le nombre d'antigènes, l'efficacité de couplage anticorps-fluorochrome,... Dans le but de simplifier, nous appelons cet ensemble de paramètres « expression antigénique ».

Nous avons focalisé nos expériences sur les éosinophiles et les basophiles étant donné que dans un échantillon de sang ses populations sont peu représentées et que leur détection et leur comptage est peu précis en analyse de routine hématologique.

Dans le but de montrer clairement le principe de la méthode exposée ici, nous comparons les résultats de discriminations cellulaires obtenus avec une source laser unique et avec deux sources lasers combinées par l'intermédiaire d'un filtre acousto-optique. Il est notamment démontré que les erreurs de mesure liées au recouvrement spectral des émissions de fluorescences ont été significativement réduites.

III.2. Discrimination cellulaire dans un analyseur d'hématologie par excitation à une longueur d'onde (491 nm)

III.2.1. Matériels et méthodes

L'analyseur d'hématologie automatique présenté ici a été développé avec des principes de cytométrie en flux basé sur la focalisation hydrodynamique [III-18]. Le flux de cellules est couplé à un système optique spécifique décrit sur la Figure III-1.

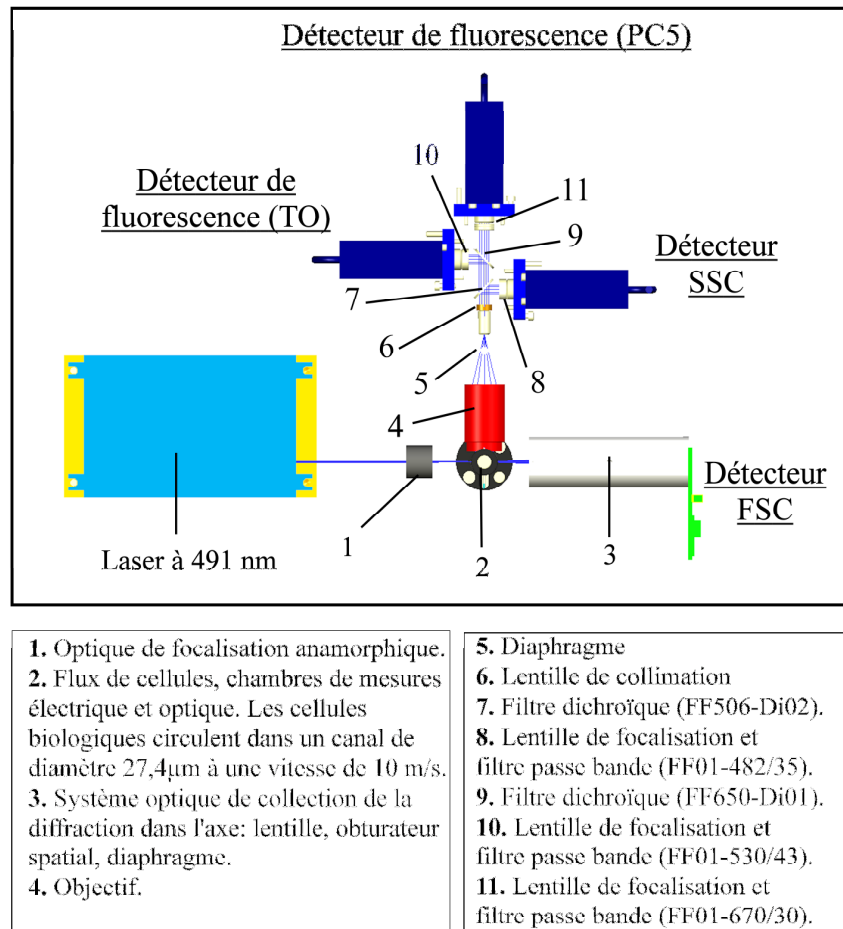


Figure III-1 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une seule pompe laser. Les filtres utilisés proviennent du fabricant Semrock.

III.2.1.1. Système optique d'illumination

Le système optique est composé d'un laser continu émettant à 491 nm (Cobolt Calypso) et dont la puissance nominale est de 25 mW. Ce laser à solide pompé par diode utilise la somme de fréquences entre deux radiations centrées à 1064 nm et à 914 nm. Ces rayonnements proviennent d'une matrice YVO4 dopée aux ions néodyme. La conversion de fréquence est réalisée grâce à un cristal de PPKTP. Le faisceau lumineux en sortie a une répartition énergétique de forme gaussienne (Equation III-1).

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Equation III-1})$$

x : dimension spatiale ; μ : centre du faisceau ; σ : largeur.

Dans le but d'obtenir des résultats précis lors de l'analyse cellulaire, l'éclairement énergétique doit être supérieur à 2000 W/m^2 et la variation de l'éclairement à l'intérieur de la chambre d'analyse doit être inférieure à 5%. Dans ces conditions, nous mettons en place une optique de mise en forme spatiale du faisceau laser adaptée.

Le faisceau lumineux provenant de cette source est focalisé dans la cuve de mesure grâce à un système optique de mise en forme composé de deux lentilles, l'une sphérique et l'autre cylindrique (Figure III-2). La lentille sphérique permet de focaliser le faisceau dans les deux plans transverses à la direction de propagation à l'intérieur de la chambre de mesure. La lentille cylindrique permet de modifier la taille du faisceau suivant une seule dimension (y). La tache obtenue au niveau de la chambre d'illumination a une géométrie elliptique avec un rapport d'anamorphose égale à 1,9 ($y=88 \mu\text{m}$; $x=166 \mu\text{m}$) (Figure III-3).

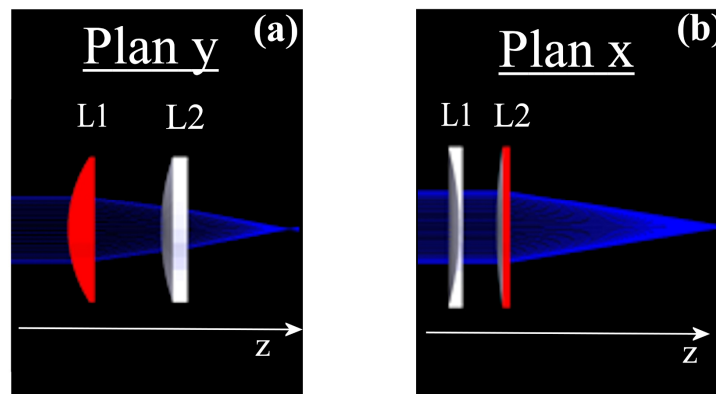


Figure III-2 : Système optique de mise en forme et de focalisation, (a) plan y, (b) plan x ; L1 : lentille cylindrique, L2 : lentille sphérique.

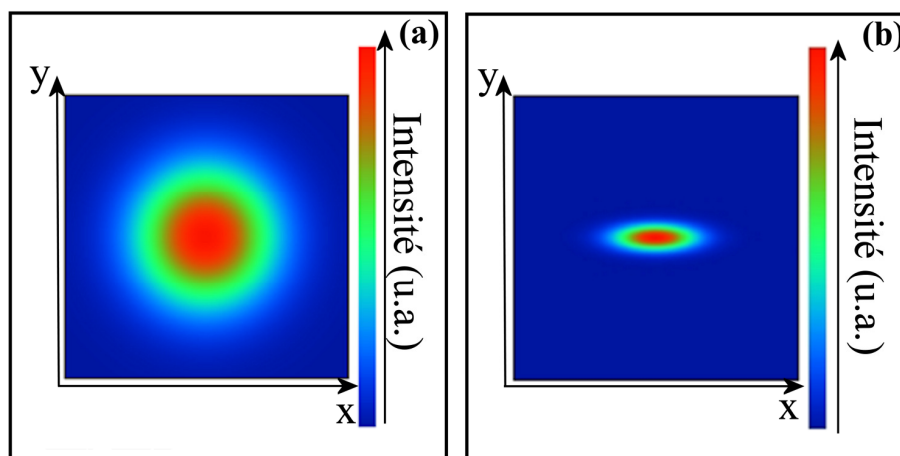


Figure III-3 : (a) Profil spatial du faisceau laser issue de la source ; (b) profil du faisceau au niveau de la chambre d'analyse, le flux cellulaire se propage suivant l'axe y.

L'utilisation de deux lentilles cylindrique et sphérique ne permet pas d'obtenir la position du col du faisceau dans les plans x et y exactement à la même distance z . Néanmoins, les dimensions du faisceau (pour $x=88\mu\text{m}$: $L_f \sim 5 \text{ cm}$; pour $y=166\mu\text{m}$: $L_f \sim 17 \text{ cm}$) permettent d'obtenir un recouvrement des zones de Fresnel et ainsi l'illumination des cellules en régime d'onde plane dans les deux dimensions. Il est à noter que la chambre d'analyse a une dimension de $166 \mu\text{m}$ suivant l'axe x et de $88 \mu\text{m}$ suivant y .

La forme elliptique du faisceau au niveau de la chambre de mesure est indispensable :

- Les cellules circulent suivant la direction y dans le flux représenté en rouge sur la Figure III-4. Suivant cette dimension, le profil d'énergie du faisceau laser a peu d'importance. Toutes les cellules traversent le même faisceau et recevront la même quantité d'énergie optique lors de l'illumination. Néanmoins, étant donné que la fenêtre d'analyse est délimitée par le diamètre du faisceau lumineux utilisé, la réduction de la zone de mesure dans l'axe des y (Figure III-4b) permet de mieux séparer les cellules, et dans le cas général d'analyser une seule cellule à la fois.
- Dans la dimension x , la position des cellules peut varier du fait de leur différence de taille et de l'influence du système fluïdique (vitesses des cellules et du gainage). Dans ces conditions, il est nécessaire d'obtenir une variation d'intensité sur la dimension transverse de la fenêtre d'analyse la plus faible possible. Pour cela nous augmentons la taille du faisceau pour n'utiliser que le centre du profil gaussien où la variation d'intensité est la plus faible (Figure III-4a). Bien évidemment, une augmentation de la taille du faisceau induit une diminution de la densité d'énergie utilisée pour l'illumination cellulaire. Un compromis est donc à trouver entre ces deux paramètres dans le but d'obtenir des niveaux de signaux et de bruit acceptables.

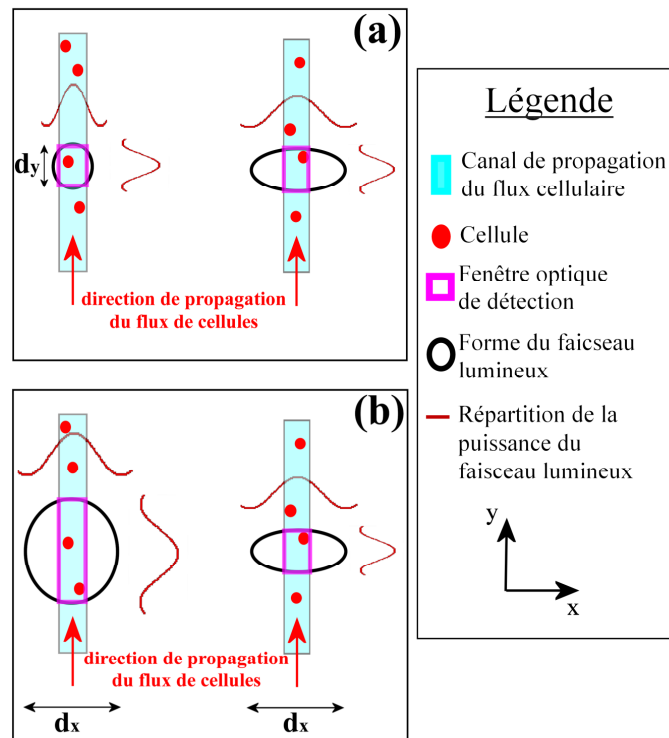


Figure III-4 : Représentation schématique des faisceaux lumineux dans la chambre de mesure, a) pour une taille identique suivant l'axe des y (d_y), b) pour une taille identique suivant l'axe des x (d_x). La lumière se propage dans le plan. Le flux de cellule se propage dans le canal suivant l'axe des y (flèche rouge).

Une étude à l'aide du logiciel de simulation optique Zemax nous a permis de déterminer la distance optimale entre le système de mise en forme et l'axe de mesure optique des cellules (D). Nous avons tenu compte de la taille, de l'éclairement énergétique du faisceau lumineux elliptique dans la cuve, et de la variation de l'éclairement énergétique ($W/m^2/nm$) pour un flux cellulaire de diamètre $27,4 \mu m$ (Figure III-5).

La puissance P , passant par un trou de largeur r dans un plan transverse à la propagation et situé à une distance z , est déterminée grâce à l'Equation III-2. Dans notre système, le rayon r est égal à $w(z)$ (Equation III-3).

$$P(r, z) = P_0 \left[1 - \exp \left[-2 \left(\frac{r}{w(z)} \right)^2 \right] \right] \quad \text{avec } P_0 = \frac{1}{2} \pi I_0 \omega_0^2 \quad (\text{Equation III-1})$$

$P(r, z)$: puissance par une ouverture ; P_0 : puissance totale transmise par le faisceau ; r : rayon du trou ; $w(z)$: largeur du faisceau ; I_0 : intensité du faisceau lumineux ; w_0 : largeur minimale du faisceau lumineux à son origine.

Pour un trou de largeur $r = w(z) : \frac{P(r, z)}{P_0} = 1 - \exp(-2) = 0,865$ (Equation III-2)

D’après ces calculs, on déduit que 86,5% de la puissance du faisceau lumineux passera par l’ouverture.

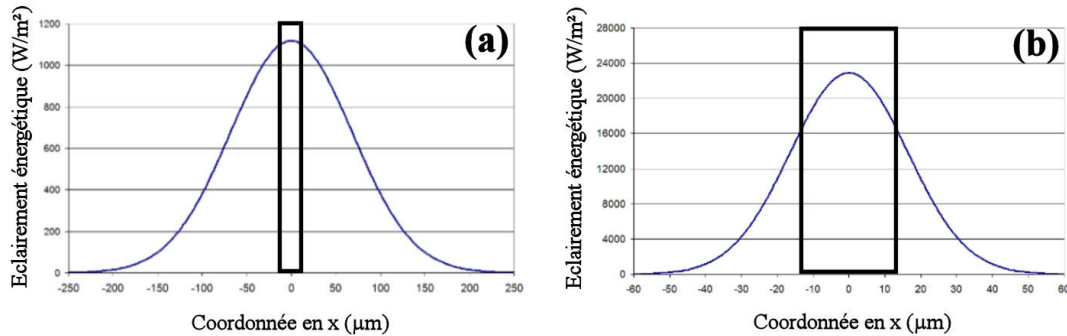


Figure III-5 : Eclairement énergétique en fonction de la largeur de l’ellipse. La distance considérée entre la dernière lentille et les parois de la cuve optique est de (a) 16 mm et (b) 26 mm.

Dans le tableau ci-après, les valeurs des différents paramètres (densité d’énergie et variation de l’éclairement) pour différentes tailles du faisceau laser sont répertoriées.

D (mm)		16	17	18	19	20	21	21,5	22	22,5	23	23,5	24	25	26
Taille ellipse	x : Largeur (µm)	272	252	231	210	189	166	156	195	132	127	115	107	86	67
	y : Hauteur (µm)	209	184	162	136	115	88	77	67	53	45	37	31	28	43
Rapport anamorphique		1,3	1,4	1,4	1,5	1,6	1,9	2,0	2,9	2,5	2,8	3,1	3,5	3,1	1,6
Eclairement énergétique (W/m²/nm)		1118	1368	1714	2212	2967	4196	5123	6396	8203	10900	14800	20400	27200	22900
Pourcentage de la variation de l’éclairement énergétique dans le flux		2,0	2,8	3,2	3,3	3,8	4,2	5,8	6,5	7,8	8,4	10,5	14,2	18,3	32,5

Figure III-6 : Tableau résumant les caractéristiques du faisceau laser en fonction de différentes valeurs de D.

Dans le but d’obtenir un éclairement énergétique supérieur à 2000 W/m² et une variation de l’éclairement énergétique inférieure à 5% sur la dimension transverse x de la fenêtre d’analyse, la distance optimale entre les lentilles et la chambre d’éclairement est de 21 mm. Dans ces conditions, le pourcentage de variation de l’éclairement énergétique est de 4,2%. La taille de l’ellipse dans la chambre de mesure optique est donc de 88 µm par 166µm. Les focales des lentilles cylindrique et sphérique sont respectivement de 230 mm et 33 mm.

III.2.1.2. Système fluïdique et mesures réalisées

Les cellules biologiques circulent dans un canal fluïdique de diamètre 27,4 μm à une vitesse de 10 m/s où elles sont analysées dans une première fenêtre de mesure par un système électrique, puis dans une seconde par des systèmes optiques. Ces fenêtres sont éloignées de 95 μm . La mesure électrique a été décrite dans le chapitre I, elle permet de compter et de déterminer le volume des cellules.

Le flux de cellules biologiques et le faisceau lumineux interagissent dans la chambre de mesure optique ce qui produit des signaux de diffraction, de réflexion, d'absorption ainsi qu'un signal de fluorescence. Dans notre expérience, l'étape conventionnelle comprend les mesures FSC, SSC et FluoTO tandis que l'étape complémentaire contient une mesure supplémentaire, la FluoPC5.

Tout d'abord, la mesure de la diffraction dans l'axe (FSC, forward scattering) est plus sensible à la taille de la cellule qu'aux autres caractéristiques cellulaires. Un obturateur rectangulaire placé sur l'axe de propagation de la lumière permet de stopper la partie centrale du faisceau non diffracté. Les radiations diffractées sont détectées par une photodiode à l'intérieur de deux demi-lunes de 1-3° d'ouverture.

Ensuite, la diffraction diffusée aux grands angles (side scattering en anglais, SSC) est réalisée à 90° de l'axe optique et elle est plus sensible à la structure de la cellule et aux granularités cellulaires que les autres caractéristiques cellulaires. Cette lumière est collectée par un photomultiplicateur. Deux filtres Semrock FF506-Di02 et Semrock FF01-481/35, une lentille de focalisation et un photomultiplicateur (Hamamatsu H9307) sont utilisés pour sélectionner et mesurer ces signaux diffractés à la longueur d'onde laser.

La mesure de la fluorescence du TO (Thiazole Orange) qui nous renseigne sur la teneur des cellules en acides nucléiques (ARN et ADN) est réalisée à 90° de l'axe optique. Un filtre Semrock FF01-530/43, un filtre dichroïque Semrock FF650-Di01, une lentille de focalisation et un photomultiplicateur (Hamamatsu H9307) sont utilisés pour analyser la fluorescence du TO (Figure III-7).

Enfin, la mesure de la fluorescence issue du fluorochrome PC5 (phycoérythrine cyanine 5) couplé à un anticorps particulier permet d'identifier un antigène spécifique. L'émission de fluorescence de la PC5 (Figure III-7) est détectée à travers un filtre Semrock FF01-670/30,

une lentille de focalisation et grâce à un photomultiplicateur (Hamamatsu H9307). Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la PC5 couplée avec les anticorps spécifiques anti-CD20 (Figure III-7a) et anti-CRTH2 (Figure III-7b) sont représentés et mettent en évidence différentes intensités de fluorescence de la PC5 en fonction des « expressions antigéniques ». Seulement l'étape complémentaire utilise la fluorescence de la PC5, et il est nécessaire, avant d'insérer le tube dans l'analyseur d'hématologie, de marquer les cellules biologiques.

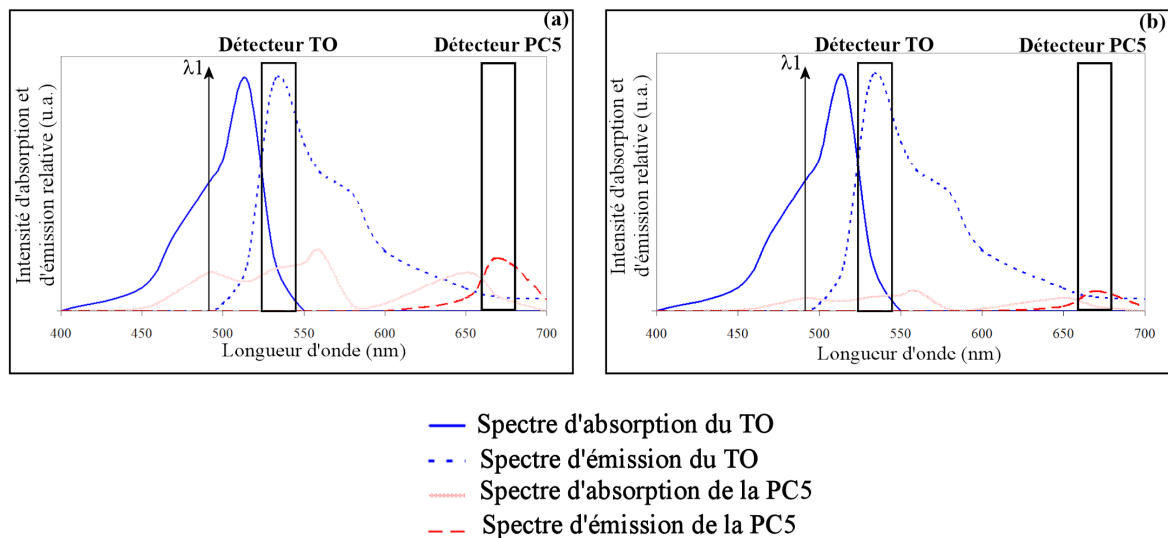


Figure III-7 : Spectres d'absorption et d'émission du TO et de la PC5 conjuguée à des anticorps, dans le cas a) ce sont des anticorps anti-CD20, dans le cas b) ce sont des anticorps anti-CRTH2. Les filtres passes bandes permettant de détecter les fluorescences du TO et la PC5 sont représentés par des rectangles et sont compris respectivement de 508,5 nm à 551,5 nm et de 655 nm à 685 nm. Excitation lumineuse monochrome (491 nm (λ_1)).

Un système microfluidique est utilisé pour prélever, mixer et incuber l'échantillon de sang et le réactif dans le but de lyser spécifiquement les globules rouges et de marquer les acides nucléiques (ARN et ADN) grâce au Thiazole Orange (TO) [III-19]. Les dilutions sont adaptées aux étapes utilisées.

Pour l'étape conventionnelle, ou mode standard (mesures : électrique, SSC, FSC et FluoTO), l'analyseur mélange 2 ml de réactif et 30 μ l de sang. 88 μ l de cet échantillon (sang dilué au 1/67 dans le réactif) sont analysés pendant une durée de 15 secondes.

Pour l'étape complémentaire, ou mode marqué (mesures électrique, SSC, FSC, FluoTO, FluoPC5), les cellules sont marquées avant l'analyse cytologique. Pour cela les sangs sont

incubés dans une solution contenant des anticorps (i.e. anti-CD20 et anti-CRTH2) couplés au fluorochrome PC5 (phycoérythrine cyanine 5). La PC5 conjuguée à l'anticorps anti-CD20 (Beckman Coulter) permet d'identifier les lymphocytes B représentés à 3,5% en fonction des leucocytes contenus dans le sang humain. La PC5 conjuguée à l'anticorps anti-CRTH2 (Beckman Coulter) permet d'identifier les éosinophiles, les basophiles et des sous populations de lymphocytes T très particulier (Th2 et Tc2) [III-20, III-21] respectivement représentés à ~2%, ~1% et ~0,5% des leucocytes contenus dans le sang humain. Le comptage absolu et la proportion des éosinophiles et des basophiles donnent des informations très importantes aux praticiens lors des analyses de routine. Il est par ailleurs difficile de déterminer précisément leur nombre avec une analyse conventionnelle. Lors de ce marquage CRTH2 positif, nous nous intéresserons donc plus précisément aux éosinophiles et aux basophiles (les sous populations de lymphocytes T ne seront pas plus détaillées). 60 µl de sang et 10 µl d'anticorps couplés au fluorochrome sont mélangés et incubés pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après l'incubation, l'analyseur d'hématologie mélange 2 ml de réactif et 35 µl de sang couplé aux anticorps et 88 µl de cet échantillon (sang au 1/57) sont analysés pendant une durée de 15 secondes.

III.2.1.3. Matrices

Les matrices ou cytogrammes représentés ci-après permettent de différencier :

- a) Les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les immatures granuleux, les basophiles et les cellules ayant une haute teneur en acides nucléiques. Ces cellules (positives au TO) sont nommées ci-après « cellules non marquées » car elles ne sont pas reconnues par un des anticorps que nous allons utiliser ci-après. Dans ce cas, le cycle fluide utilisé est le mode standard.
- b) Les cellules marquées grâce au PC5 et à des anticorps couplés sont nommées « cellules marquées » et le cycle fluide utilisé est le mode marqué.

Dans ces expériences, nous nous intéressons à la discrimination des cellules marquées par rapport aux autres. Ainsi, dans un souci de clarté les cellules non marquées sont représentées en rouge et les cellules marquées sont représentées en vert.

III.2.2. Résultats obtenus avec la source unique à 491 nm

Cette expérience consiste à détecter des cellules sanguines en utilisant une seule longueur d'onde d'excitation émettant à 491 nm. Dans une première configuration, la radiation laser excite le TO et la PC5 conjuguée à l'anti-CD20 (Figure III-8a) pour identifier les lymphocytes B. Dans une seconde configuration, la source laser excite le TO et la PC5 conjuguée à l'anti-CRTH2 (Figure III-8b) permettant d'identifier les éosinophiles et les basophiles. En raison d'une forte « expression antigénique », chaque lymphocyte B émet un signal de fluorescence suffisamment fort pour produire un signal assez éloigné du bruit de fond induit par la fluorescence du TO. Le facteur de compensation (Equation III-4) [III-22] induit par le traitement des données permet clairement de discriminer les lymphocytes B du reste des cellules non marquées (Figure III-8a).

En raison d'une faible « expression antigénique », les cellules CRTH2 positives ne fluorescent pas assez pour que le rapport signal sur bruit soit assez important. Ainsi une mauvaise discrimination entre les cellules marquées et non marquées est obtenue. Malgré l'utilisation du facteur de compensation (Equation III-4) introduit dans le traitement de données, aucune amélioration sur la discrimination des cellules marquées n'a pu être obtenue (Figure III-8b).

$$Fluo[PC5] = Déteur2 - B.Fluo[TO] \quad (Equation III-4)$$

*Fluo[PC5] : signal PC5 réel ; Déteur 2 : signal mesuré au niveau du détecteur 2 ;
B : facteur de compensation ; Fluo[TO] : signal du TO mesuré au niveau du détecteur 1.*

$\lambda_{\text{excitation}} : 491 \text{ nm}$

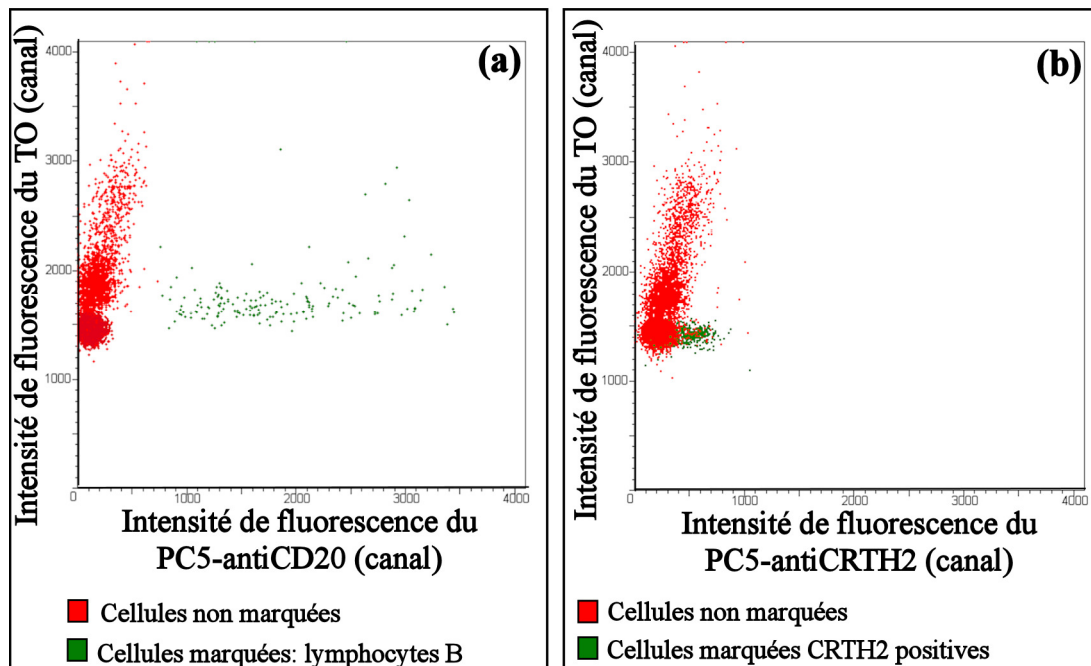


Figure III-8 : Cytogrammes de la fluorescence du TO en fonction de la fluorescence de la PC5. La fluorescence de la PC5 représente (a) les lymphocytes B, ou (b) les cellules CRTH2 positives. Excitation lumineuse à 491 nm. Un point correspond à une cellule.

III.2.3. Conclusion

L'utilisation d'une longueur d'onde d'excitation unique à 491 nm et de deux types de fluorochromes (TO et PC5) au sein d'un système de cytométrie automatisé nous a permis d'identifier différentes populations de cellules. Les lymphocytes B sont parfaitement séparés des « cellules non marquées » tandis que les cellules CRTH2 positives restent noyées dans l'ensemble des populations cellulaires. Les résultats obtenus sont intéressants mais ils doivent être améliorés pour des populations ou sous-populations ayant une expression antigénique plus faible.

Cet exemple montre les limitations de l'utilisation conjointe de plusieurs fluorochromes excités par une seule longueur d'onde, surtout quand les intensités des fluorescences à analyser sont très différentes. Les zones de recouvrements des spectres d'excitation et de fluorescences des fluorochromes sont de véritables problèmes. Un rapport signal sur bruit trop faible ne peut être suffisamment amélioré par l'utilisation des méthodes de compensation conventionnelles.

Ces compensations sont calculées en valeur moyenne et pour une famille donnée de fluorochromes. Il existe des variations importantes des propriétés physiques des fluorochromes d'une même famille notamment en fonction de l'origine de l'approvisionnement. Par exemple, le rendement quantique du transfert PC5 (phycoérythrine cyanine 5) et la nature de l'anticorps utilisé ne sont pas suffisamment stables pour accepter une valeur de compensation unique et définitive. Ceci est particulièrement gênant dans le domaine du diagnostic car pour chaque lot de fluorochromes, les facteurs de compensations doivent être ajustés. A défaut, cela peut conduire à des mesures erronées et donc des résultats d'analyses potentiellement dangereux. La calibration des instruments reste alors un problème important [III-23].

Dans ces conditions, l'usage de plusieurs longueurs d'onde d'excitation permet d'augmenter le choix des fluorochromes et permet de séparer plus facilement les spectres d'émission [III-24]. C'est le but de l'expérience décrite dans le paragraphe suivant.

III.3. Discrimination cellulaire dans un analyseur d'hématologie par excitation à deux longueurs d'onde (491 nm et 561 nm)

III.3.1. Choix de la deuxième longueur d'onde d'excitation en fonction des signaux de fluorescences

Dans le but d'améliorer l'identification des cellules CRTH2 positives tout en gardant une bonne sélection des lymphocytes B, nous rajoutons une seconde source de lumière monochromatique émettant à une longueur d'onde spécifique. Le but est de relever le signal de fluorescence de la PC5 couplée à l'anticorps anti-CRTH2 afin d'obtenir un rapport signal sur bruit important. En effet, le signal de fluorescence du TO est plus important que le signal de la seconde fluorescence (PC5) correspondant à des protéines membranaires spécifiques. Pour égaliser leurs niveaux de fluorescences, nous souhaitons augmenter sélectivement

l'énergie de l'onde de pompe absorbée par la PC5 sans changer d'anticorps lié au marquage. Dans ces conditions, le second faisceau lumineux doit seulement exciter la PC5 sans être absorbé par le TO. Au vu des spectres d'absorptions de la Figure III-9, cette nouvelle radiation d'excitation doit avoir une longueur d'onde supérieure à 550 nm et correspondre à un pic d'absorption du PC5 sans se recouvrir avec son spectre d'émission. L'une des meilleures possibilités est alors la longueur d'onde de 561 nm. La source laser « Cobolt Jive » commercialisée par Cobolt possède cette caractéristique d'émission tout en ayant une excellente stabilité temporelle et un rayonnement monomode parfaitement adapté à nos besoins [III-25, III-26].

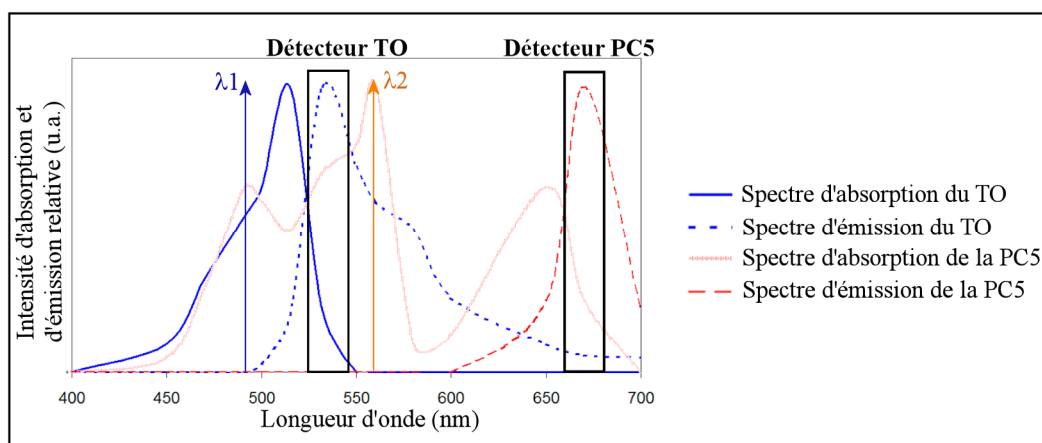


Figure III-9 : Spectres d'absorption et d'émission du TO et de la PC5. Les bandes passantes des filtres de détection du TO et de la PC5 sont schématisées par des rectangles (respectivement 508,5-551,5 nm et 655-685 nm). Représentation des longueurs d'onde d'excitation laser à 491 nm (λ_1) et à 561 nm (λ_2).

Une expérience visant à intégrer la source d'émission à 561 nm au sein de l'analyseur précédent est réalisée. Le laser Cobolt Jive possédant une puissance de 25 mW à 561 nm est intégré à la source lumineuse. Par rapport au précédent banc optique, différents éléments ont été ajoutés. Un système de plusieurs miroirs et un filtre dichroïque permettent d'aligner les faisceaux lumineux des deux lasers sur un même axe optique. Un filtre acousto-optique (AOTF nC.TN, société AA Opto Electronic) permet de sélectionner les faisceaux lumineux et d'ajuster l'intensité de ces deux sources lumineuses indépendamment l'une de l'autre. Le système global est présenté sur la Figure III-10. La Figure III-11 décrit le système optique de collection.

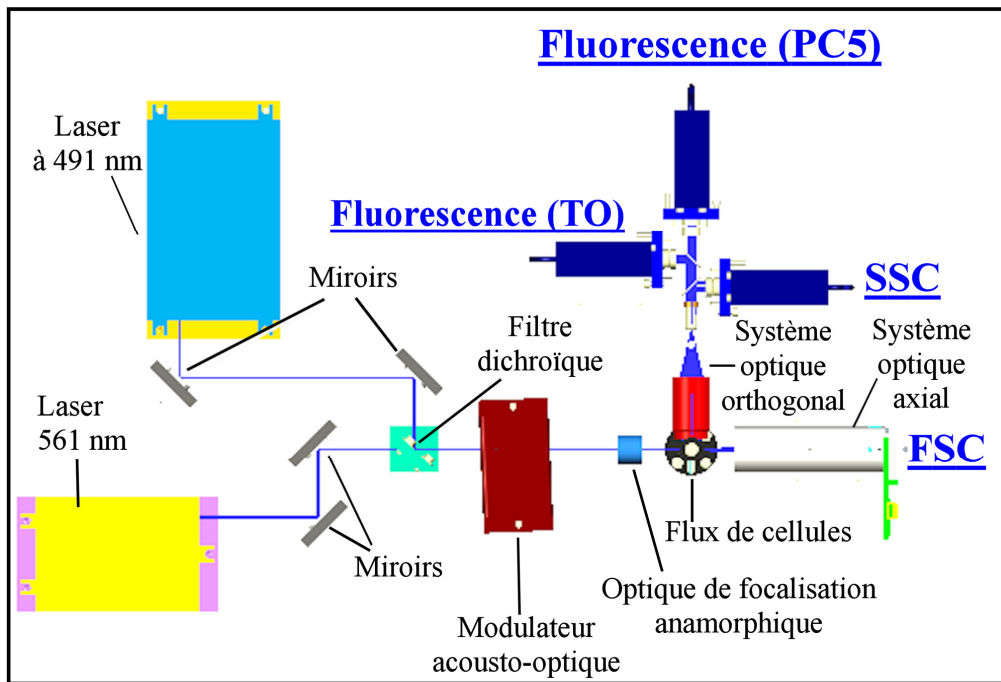


Figure III-10 : Représentation schématique du nouveau système optique d'analyse utilisant deux sources lasers.

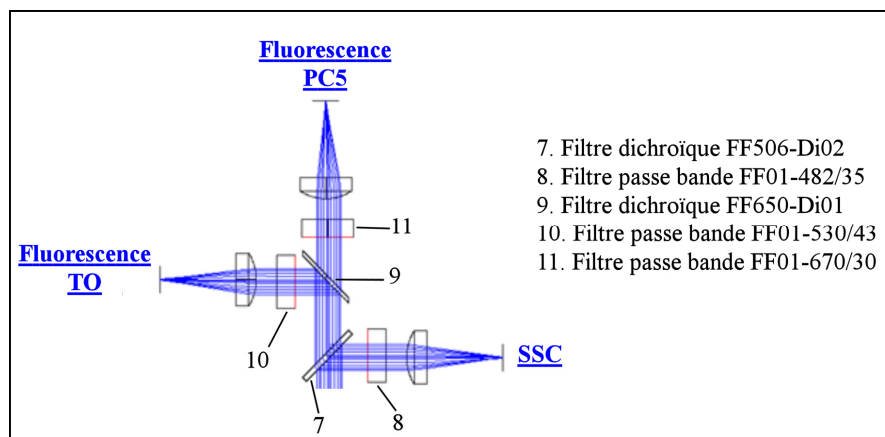


Figure III-11 : Système optique de collection permettant la détection de la diffraction à 90° et des fluorescences.

Comme deux longueurs d'onde sont utilisées dans ce système, il est important de se pencher sur la dispersion chromatique et son influence à l'intérieur de la chambre de mesure optique. Suivant les indices de réfraction vus par les deux radiations de pompe, les faisceaux lumineux focalisent à des abscisses différentes et sur des diamètres inégaux (Figure III-12).

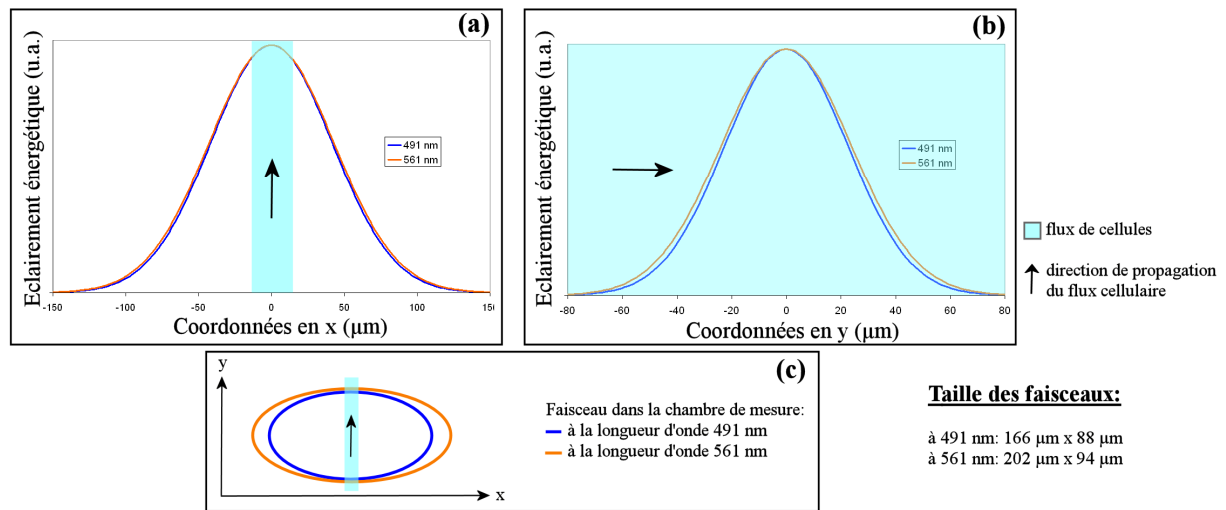


Figure III-12 : Eclairage énergétique en fonction de la largeur de l'ellipse dans la chambre de mesure optique pour des faisceaux lumineux émettant à 491 nm et 561 nm, a) en fonction des coordonnées x, b) en fonction des coordonnées y. c) Schéma optique des faisceaux lumineux à 491 nm (en bleu) et à 561 nm (en orange). Le diamètre du flux de cellule dans l'axe des x est de 27,4 μm.

Après étude, le faisceau lumineux à 491 nm mesure 166 μm x 88 μm tandis que celui à 561 nm mesure 202 μm x 94 μm. On peut conclure que la différence de taille entre les faisceaux lumineux à 491 nm et 561 nm est inférieure à 36 μm dans l'axe x et à 6 μm dans l'axe des y. De plus, en considérant le fenêtrage de la chambre d'analyse, cette différence n'est plus que de 0,7 μm dans l'axe des x. Ainsi, l'effet de chromatisme n'influera pas de manière importante sur l'éclairage des cellules et donc sur les mesures réalisées.

Il est à noter que dans notre appareil, la diffraction dans l'axe met en jeu les faisceaux à 491 nm et à 561 nm, alors que la diffraction orthogonale se mesure seulement à la longueur d'onde 491 nm. Des exemples de signaux obtenus par l'intermédiaire des détecteurs sont représentés sur la Figure III-13. Nous avons utilisé alternativement l'une et l'autre longueur d'onde dans le but de valider le choix de la longueur d'onde à 561 nm (Figure III-13a et III-13b).

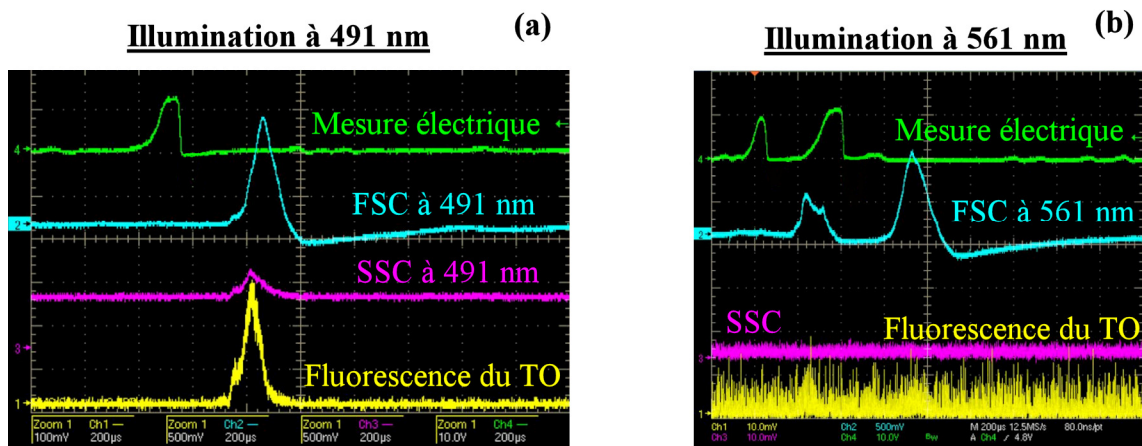


Figure III-13 : Oscillogrammes des mesures électriques, de diffraction dans l'axe (FSC), de diffraction orthogonale (SSC) et de fluorescence du Thiazole Orange (TO) dans le cas d'une illumination lumineuse (a) à 491 nm puis (b) à 561 nm. Chaque impulsion correspond à une cellule biologique.

Dans le but de préparer les expériences suivantes qui visent à ajuster les intensités de fluorescences avec le filtre acousto-optique, les intensités des lasers ont été réglées en fonction des faisceaux de diffraction à 491 nm et à 561 nm avec des billes polymères calibrées de 7 μm de diamètre. Pour cela, en plus des mesures électrique, FSC et SSC à 491 nm, nous avons ajouté au système une mesure SSC à 561 nm en utilisant un filtre passe-bande 582/75. Des exemples de signaux de diffraction obtenus avec les deux longueurs d'onde sont donnés sur la Figure III-14.

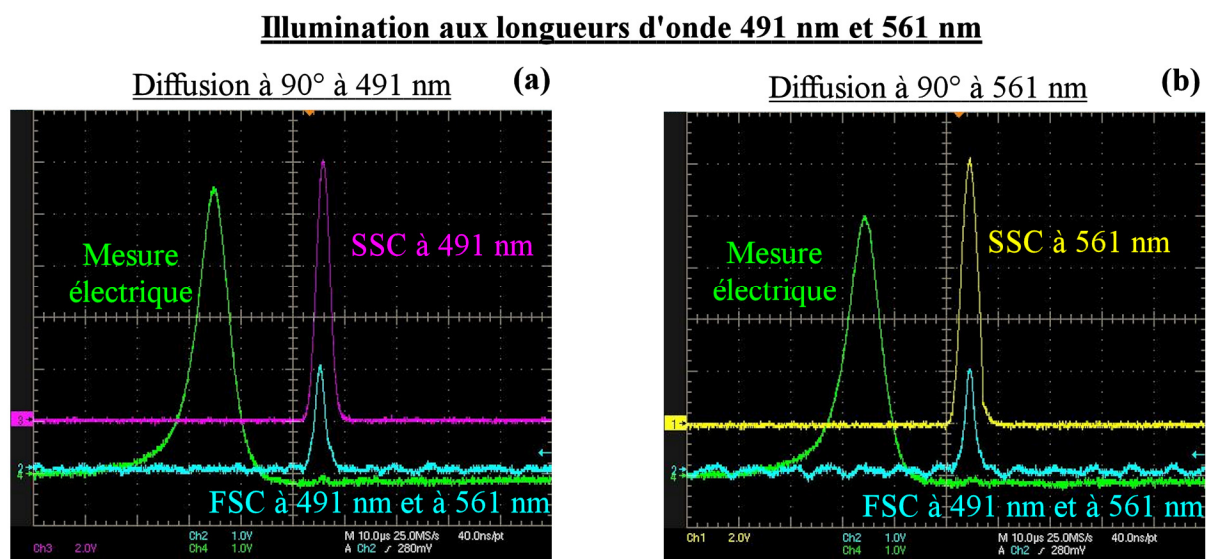


Figure III-14 : Oscillogrammes des mesures électrique, de diffraction dans l'axe à 491 nm et 561 nm et de diffraction orthogonale (a) à 491 nm puis (b) à 561 nm pour une bille polymère. Le TO n'est pas utilisé.

Les puissances des faisceaux et les fréquences acoustiques du filtre achromatique sont optimisées lors de cette expérience sur les billes polymères, ces valeurs sont énoncées ci-dessous.

- λ_1 (491nm) : P = 17,8 dBm ; ν = 128,779 MHz
- λ_2 (561nm) : P = 19,5 dBm ; ν = 107,716 MHz

III.3.2. Calibration fluidique des analyseurs d'hématologie

Avant de procéder au test complet de ce nouvel analyseur, il est important de s'assurer d'obtenir des résultats identiques entre les différents cycles fluidiques utilisés (modes standard et marqué) et entre les deux analyseurs, l'un intégrant une longueur d'onde d'excitation et l'autre deux.

Dans le cas de cellules marquées et avant le passage du tube de sang dans l'analyseur d'hématologie, il est nécessaire de mélanger le sang et la solution contenant le fluorochrome couplé à l'anticorps. Comme nous souhaitons seulement valider le système fluidique, en mode marqué, nous insérons dans l'analyseur notre échantillon de sang dilué avec du PBS (phosphate buffered saline) permettant d'obtenir la même dilution que si on ajoutait la solution de fluorochrome couplé à l'anticorps.

Nous montrons sur les Figures III-15a et III-16a une comparaison du nombre total de cellules en utilisant les différents modes (standard et marqué) et cela pour différents types de sangs avec l'analyseur intégrant deux longueurs d'onde d'excitation. Il est alors possible d'obtenir un coefficient de corrélation (R^2) entre le nombre total de cellules comptées en mode standard et le nombre total de cellules comptées en mode marqué (Figures III-15b et III-16b). Le coefficient de corrélation R^2 entre ces deux variables permet d'étudier l'intensité de la liaison entre ces variables, dans notre cas, cela correspond à une régression linéaire. R^2 est le carré de la covariance c'est-à-dire le produit des écarts types des deux variables. R^2 est compris entre 0 et 1. Le 1 correspond à sa valeur optimale.

Il est important de ne pas se fier seulement au coefficient de corrélation R^2 car les comptages cellulaires des deux analyseurs peuvent présenter un écart constant en nombre de cellules

comme illustré sur la Figure III-15a. La Figure III-16 correspond aux derniers réglages liés au système fluïdique (dilutions, vitesse de poussée des seringues...)

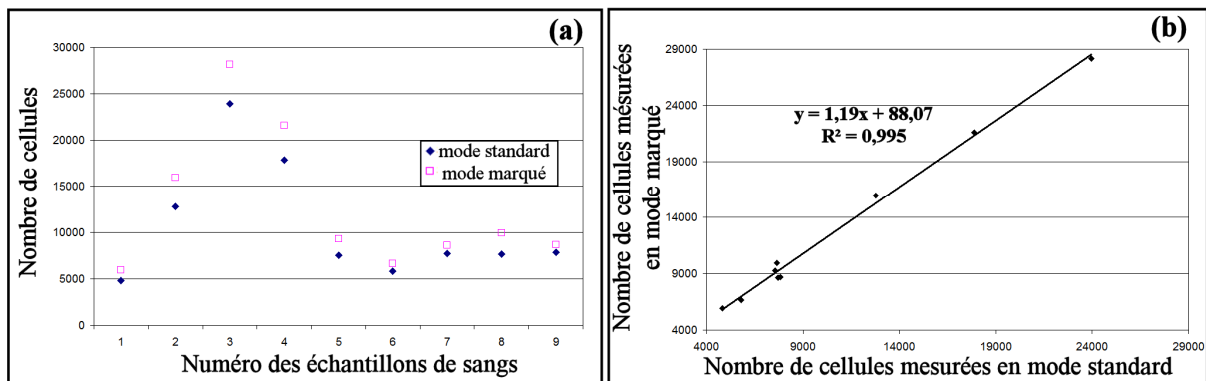


Figure III-15 : Comptage de la totalité des leucocytes, sur l'analyseur d'hématologie intégrant deux longueurs d'onde d'excitation, pour différents cycles fluidiques, l'un étant utilisé pour des sangs non marqués (mode standard) et l'autre pour des sangs dilués avec du PBS (mode marqué) ; 9 sangs différents sont testés. (a) Nombre de cellules comptées. (b) Courbe de régression linéaire. Réglage Fluidique non optimisé.

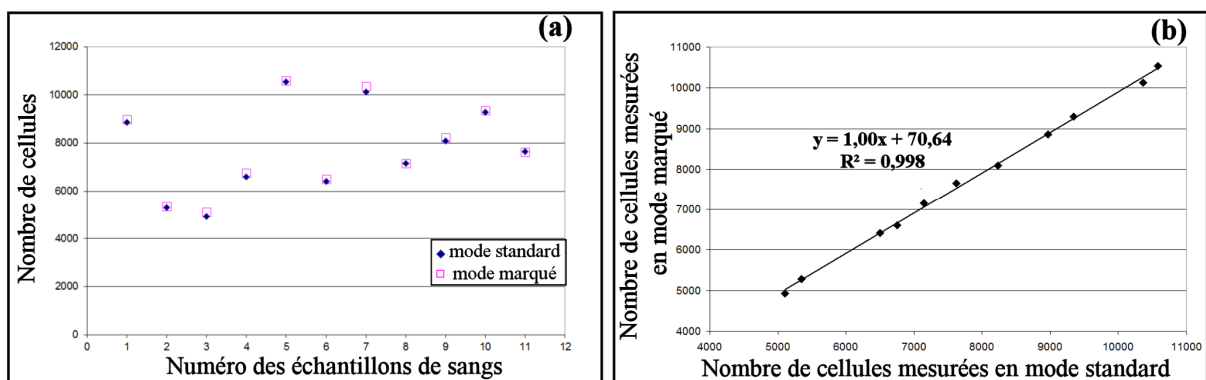


Figure III-16 : Comptage de la totalité des leucocytes, sur l'analyseur d'hématologie intégrant deux longueurs d'onde d'excitation, pour différents cycles fluidiques, l'un étant utilisé pour des sangs non marqués (mode standard) et l'autre pour des sangs dilués avec du PBS (mode marqué) ; 9 sangs différents sont testés. (a) Nombre de cellules comptées. (b) Courbe de régression linéaire. Réglage fluïdique optimisé.

Les nombres de cellules totales comptées suivant les différents modes (Figure III-16a) correspondent fortement et le coefficient de corrélation lié à cette mesure est proche de 1 (Figure III-16b). On peut donc considérer que le système fluïdique et le banc optique sont à présent correctement mis en œuvre et réglés pour entamer la campagne de tests.

III.3.3. Faisabilité avec un autre fluorochrome

Il existe de nombreux fluorochromes, mais seulement quelques-uns sont commercialisés directement couplés à un anticorps. Par exemple, chez le fournisseur Beckman Coulter, l'anticorps anti-CD14 est disponible seulement avec quelques fluorochromes. Cet anticorps est spécifique des monocytes et il permet d'obtenir des résultats fiables, même si cela dépend aussi du système, du fluorochrome et plus généralement de « l'expression antigénique ». Dans le cas de nos expériences, les contraintes liées aux longueurs d'onde d'excitation, aux spectres d'émission des fluorochromes, à leur écart de Stokes et à la plage spectrale des détecteurs, nous imposent des contraintes fortes sur le choix des fluorochromes. Dans ces conditions, la phycoérythrine cyanine 5 (PC5) et la phycoérythrine Texas Red (ECD) apparaissent comme les plus intéressantes. Les filtres de collection diffèrent suivant l'utilisation de la PC5 ou de l'ECD (respectivement les Figures III-17a et III-17b). Les matrices obtenues avec la PC5 révèlent une intensité plus élevée et une meilleure séparation spectrale qu'avec l'utilisation de l'ECD (Figure III-18).

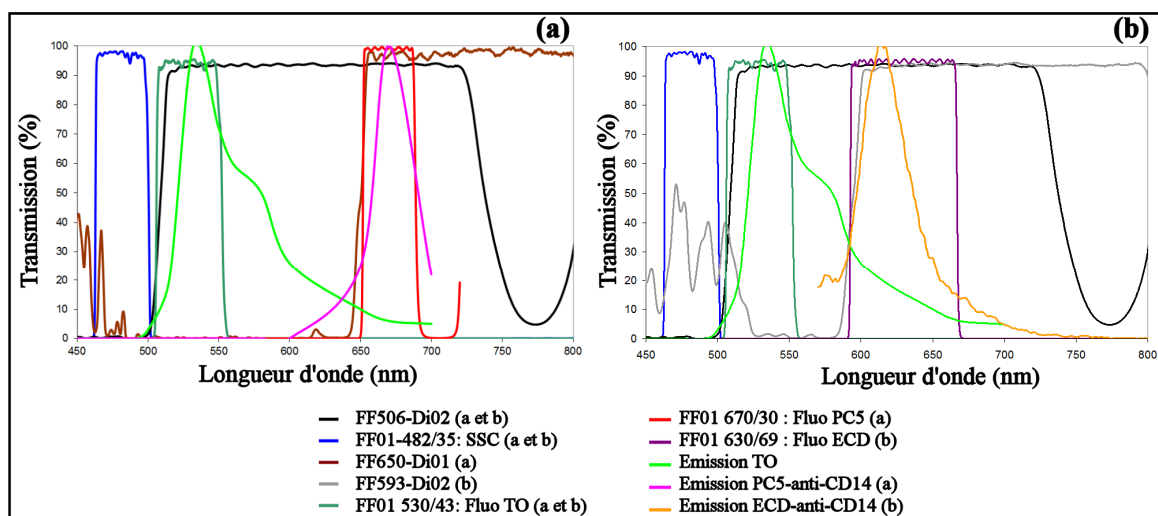


Figure III-17 : Spectres des filtres de collection utilisés pour détecter la diffraction aux grands angles, la fluorescence du TO et (a) la fluorescence de la PC5 ou (b) la fluorescence de l'ECD. Spectres de fluorescences du TO et (a) de la PC5 ou (b) de l'ECD.

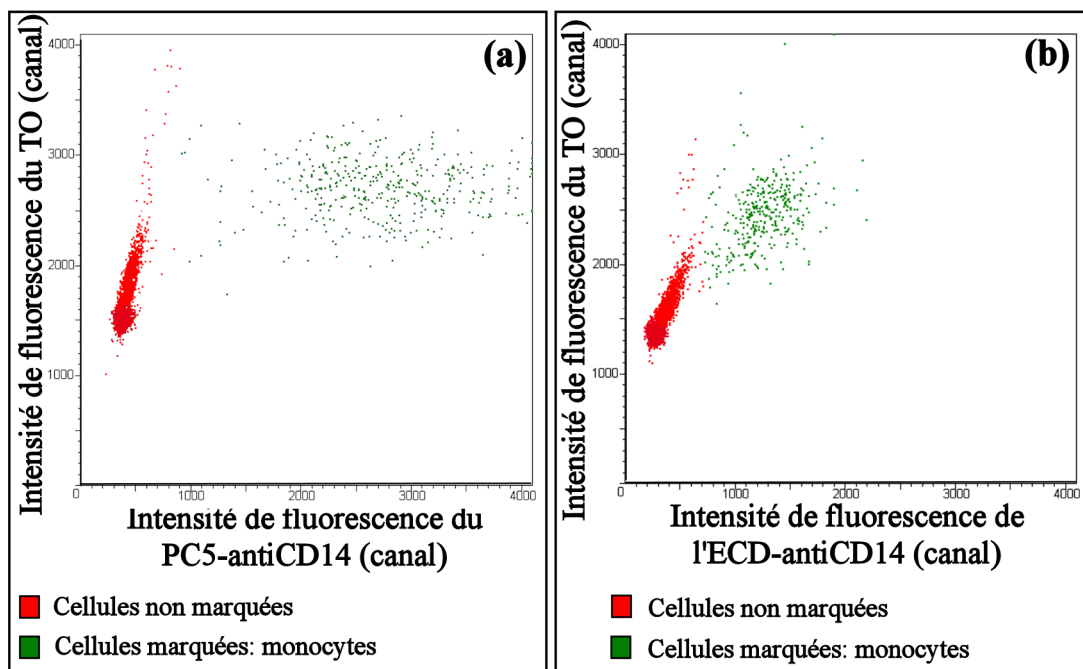
$\lambda_{\text{excitation}} : 491 \text{ nm}$


Figure III-18 : Matrices obtenues avec l'analyseur d'hématologie ayant deux longueurs d'onde d'excitation, les monocytes sont marquées avec l'anti-CD14 couplé à différents fluorochromes, (a) la phycoérythrine cyanine 5 (PC5) ou (b) la phycoérythrine Texas Red (ECD).

Les cellules marquées (points verts sur la Figure III-18) sont mieux discriminées avec l'utilisation du fluorochrome PC5 qu'avec l'ECD. Les expériences suivantes seront donc réalisées avec le fluorochrome PC5.

III.3.4. Séparation cellulaire en utilisant l'analyseur à double longueurs d'onde d'excitation - Campagne de tests

Pour ces tests, la PC5 est utilisée en couplage avec les anticorps anti-CD20 ou anti-CRTH2. Les spectres de transmission des filtres optiques utilisés sont visualisables sur la Figure III-17a. Les résultats obtenus avec le nouveau système couplant deux sources de pompe sont comparés à ceux obtenus avec le premier analyseur utilisant une seule excitation.

Pour permettre de valider les résultats de manière quantitative, nous les comparons également avec ceux d'un appareil de référence : le cytomètre FACScan de Becton Dickinson. Il est

équipé d'un laser argon d'une puissance de 15 mW, émettant à 488 nm et il permet de réaliser des mesures de diffraction dans l'axe (FSC), de diffraction orthogonale (SSC) et trois mesures de fluorescences orthogonales. Seules les mesures FSC, SSC et une fluorescence de la PC5 (filter 670 LP) sont utilisées dans nos expériences. En effet, si on voulait utiliser le TO, sa forte intensité de fluorescence masquerait la fluorescence de la PC5. Deux tests sont réalisés et permettent de discriminer dans un cas les cellules marquées avec l'anticorps anti-CD20 (lymphocytes B) (Figure III-19a) et dans un autre cas les cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 (Figure III-19b). Le CRTH2 est hautement exprimé sur les basophiles, sur les éosinophiles et sur des sous populations des lymphocytes T (Th2 et Tc2) [III-27, III-28]. Il est aussi important de noter que l'analyseur d'hématologie compte les cellules présentes dans une quantité de sang définie alors que le FACScan compte un nombre suffisant de cellules marquées dans un volume de sang indéterminé.

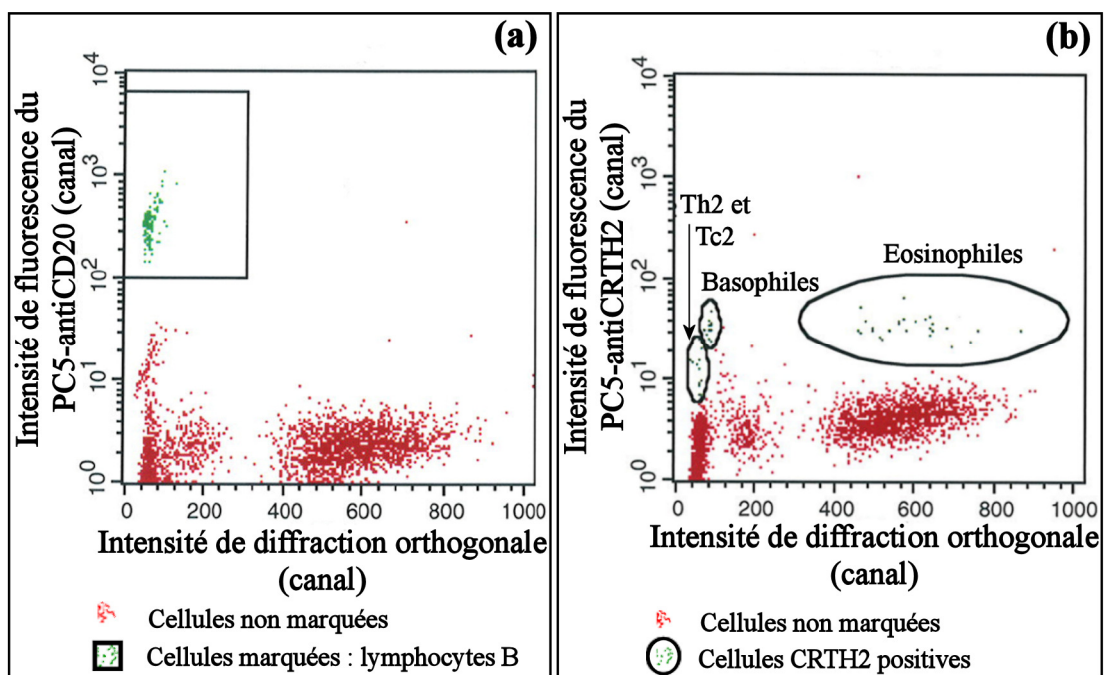


Figure III-19 : Cytogrammes du FACScan de référence permettant dans un cas (a) d'identifier les lymphocytes B (marquage avec de la PC5-anti-CD20) et dans un autre cas (b) de discriminer les éosinophiles, les basophiles et des sous-populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2) (marquage avec de la PC5-anti-CRTH2).

III.3.4.1. Discrimination des lymphocytes B

Des exemples de cytogrammes obtenus pour des sangs ayant des pourcentages de lymphocytes B différents sont présentés sur les Figures III-20 et III-21 Les analyseurs

d'hématologie (avec une et deux longueurs d'onde d'excitation) permettent de séparer correctement les lymphocytes B. On peut noter que l'utilisation de deux longueurs d'onde permet une identification plus stricte des lymphocytes B avec un tassement plus prononcé des cellules non marquées sur l'échelle de l'intensité de fluorescence de la PC5-anti-CD20 (Figures III-20b et III-21b).

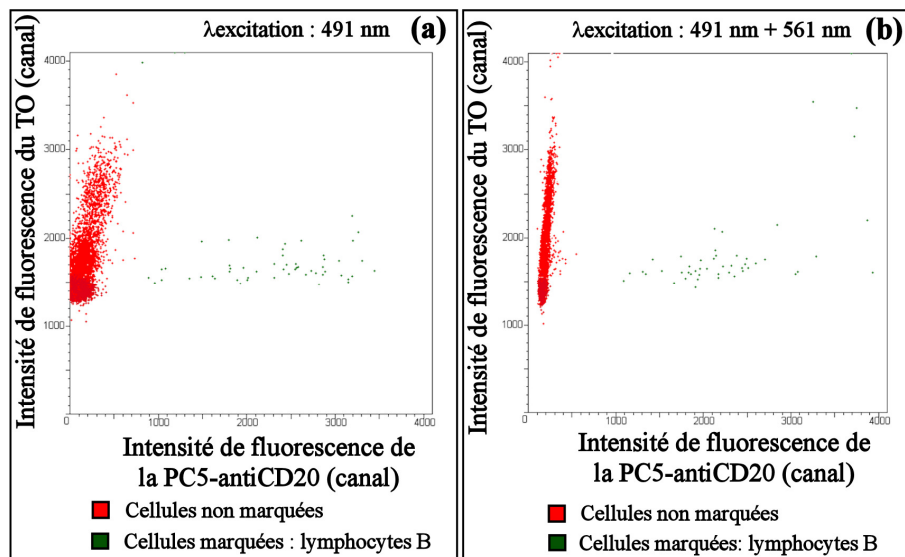


Figure III-20 : Cytogrammes obtenus pour des leucocytes marqués avec l'anticorps anti-CD20 couplé à la PC5. Le sang analysé est pauvre en lymphocytes B (1%). Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).

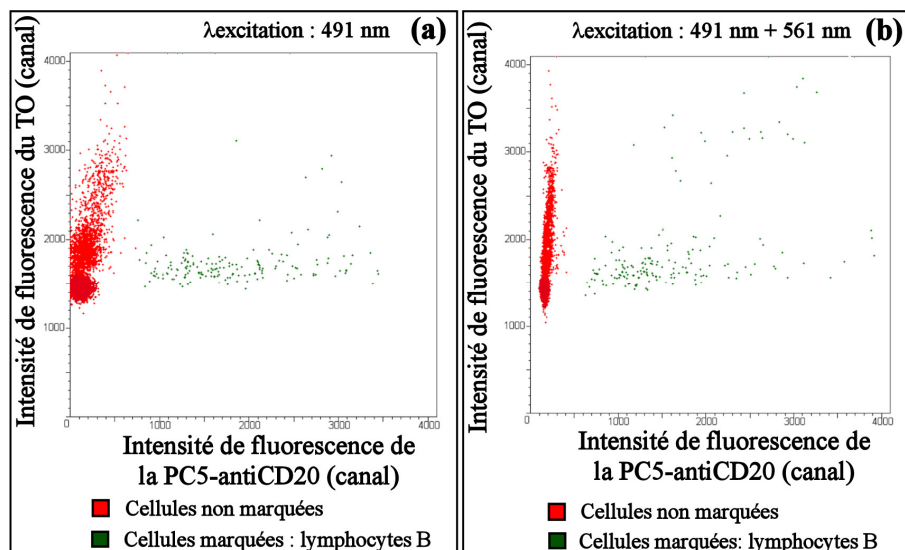


Figure III-21 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CD20 couplé à la PC5. Le sang analysé est moyennement représenté en lymphocytes B (3.1%). Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).

Les résultats des comptages et des identifications cellulaires obtenus avec nos nouveaux analyseurs d'hématologie, sont comparés quantitativement aux données obtenues avec le cytomètre en flux standard FACScan, appareil utilisé comme référence (Figure III-22). Douze échantillons de sang ont été analysés en utilisant une et deux longueurs d'onde d'excitation. Pour chaque échantillon, nous déterminons le pourcentage de lymphocytes B en fonction de la totalité des cellules et nous représentons ses résultats sur des courbes (Figure III-23). La différence de pourcentage entre l'analyseur d'hématologie et le cytomètre de référence permet de mettre en évidence des variations dues aux machines et à leur calibration (Figure III-24).

	Numéro sangs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pourcentage de lymphocytes B	Longueur d'onde d'excitation à 491 nm	4,0	3,4	2,7	3,9	0,9	2,9	1,5	3,5	3,2	2,5	5,0	2,5
	Longueurs d'onde d'excitation à 491 nm et à 561 nm	5,3	4,1	4,1	5,5	1,0	3,1	1,3	3,2	3,1	4,3	6,5	2,2
	Référence FACScan	4,6	3,8	3,0	5,0	0,8	3,6	1,6	3,4	2,9	3,7	5,3	3,6

Figure III-22 : Comparaison entre les pourcentages des cellules marquées obtenus avec les analyseurs d'hématologie incluant une longueur d'onde d'excitation ou deux longueurs d'onde d'excitation et le cytomètre FACScan utilisé comme référence.

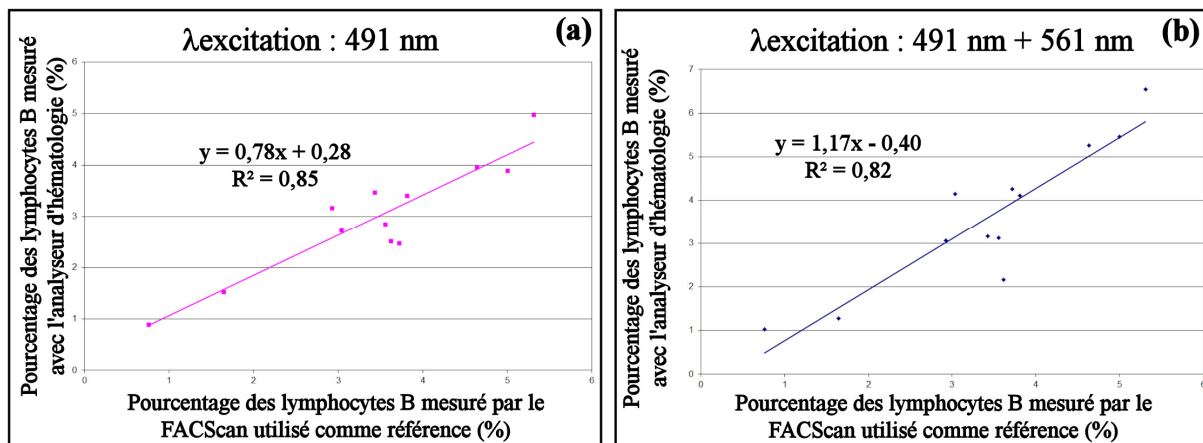


Figure III-23 : Pourcentage des lymphocytes B mesuré sur douze sangs différents avec un cytomètre de référence (FACScan) et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation. Droite : courbe de régression linéaire.

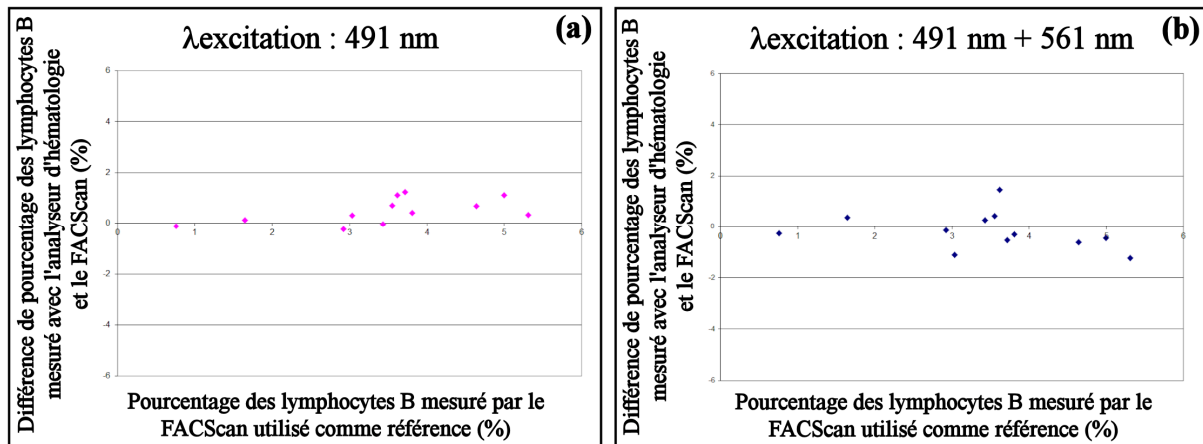


Figure III-24 : Différence de pourcentage des lymphocytes B mesuré sur douze sangs différents entre le cytomètre de référence (FACSscan) et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation.

Les résultats obtenus avec les analyseurs d'hématologie intégrant une seule ou deux longueurs d'onde d'excitation pour les lymphocytes B marqués sont utilisables. En effet, un taux de corrélation de plus de 0,85 est obtenu entre les mesures réalisées avec un système intégrant une longueur d'onde et la référence FACSscan (Figure III-23a). De plus, la différence de pourcentage absolue entre les deux mesures est faible ($\sim 0,54\%$ en moyenne, Figure III-24a). Le taux de corrélation obtenu entre le système à deux longueurs d'onde et la référence est aussi très bon avec un taux proche de 0,82 (Figure III-23b). La différence moyenne des pourcentages absolue est alors de l'ordre de 0,6% seulement (Figure 24b). La variation obtenue entre les taux de corrélation des analyseurs à une longueur d'onde et à deux longueurs d'onde d'excitation n'est pas significative pour la détection des lymphocytes B. L'expression antigénique des lymphocytes B est suffisamment forte pour pouvoir les identifier parmi les autres cellules non marquées. Nous souhaitons maintenant analyser des couplages anticorps-fluorochrome ayant une « expression antigénique » plus faible, pour cela, nous allons tester des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2.

III.3.4.2. Discrimination des éosinophiles et des basophiles

Les expériences présentées sont effectuées sur des taux de cellules marquées faibles et différents dans le but de montrer les limites de notre système d'analyse. Les Figures III-25 et III-27 présentent les résultats obtenus sur un échantillon de sang contenant 1,1% d'éosinophiles et 0,5% de basophiles alors que les Figures III-26 et III-28 sont le reflet d'un

échantillon de sang contenant 6,9% d'éosinophiles et 0,9% de basophiles. Ces pourcentages ont été mesurés avec le cytomètre FACScan (respectivement les numéros de sang 6 et 4 du tableau de la Figure III-30).

Deux types de représentations sont effectués. La première est réalisée en traçant l'intensité de fluorescence du TO en fonction de l'intensité de fluorescence de la PC5-anti-CRTH2 (Figures III-25 et III-26). On compare alors les résultats obtenus en utilisant un analyseur muni d'une seule puis de deux longueurs d'onde d'excitation. La seconde concerne l'intensité de fluorescence de la PC5 en fonction de la mesure de diffraction à 90°. L'utilisation de la PC5 conjugué à un anticorps anti-CRTH2 et des matrices décrites précédemment permettent de déterminer :

- la totalité des cellules marquées (éosinophiles, basophiles et des sous populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2)) (Figures III-25 et III-26),
- les éosinophiles et les autres cellules CRTH2 positives (basophiles et sous populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2)) (Figures III-27 et III-28).

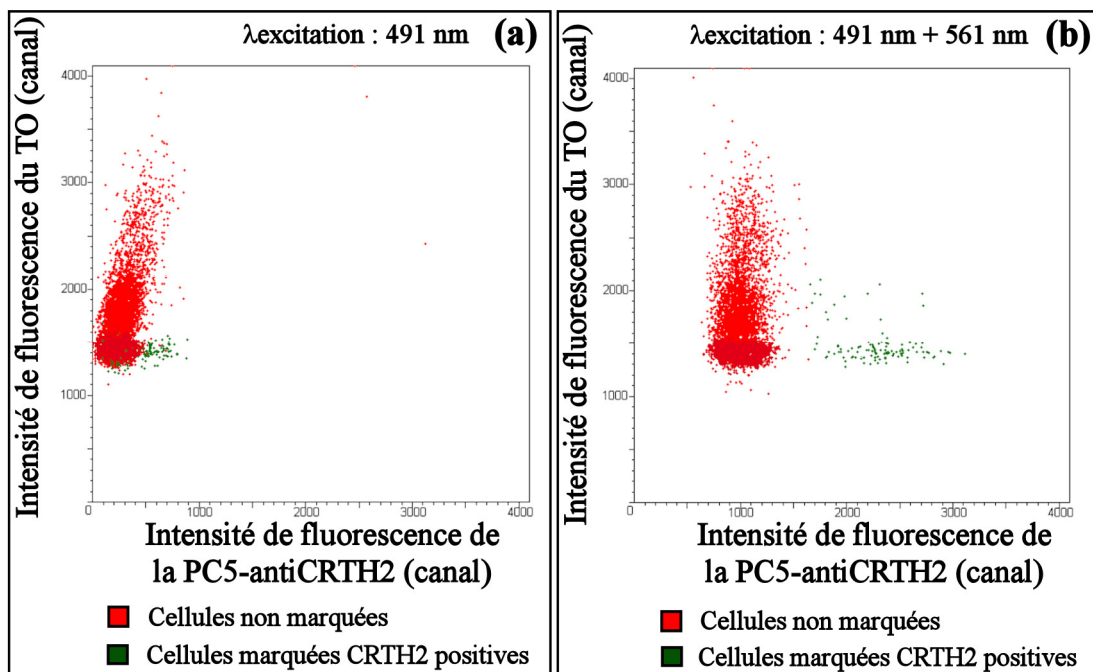


Figure III-25 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est pauvre en éosinophiles et en basophiles. Cytogrammes représentant la fluorescence du TO en fonction de la PC5. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).

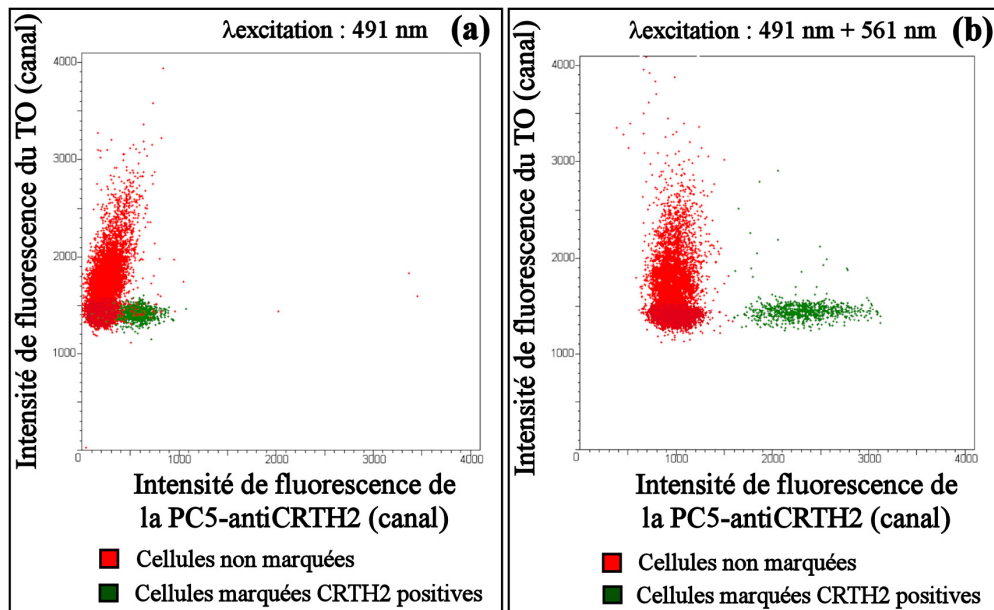


Figure III-26 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est riche en éosinophiles (respectivement 7,7% et 0,9%). Cytogrammes représentant la fluorescence du TO en fonction de la PC5. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).

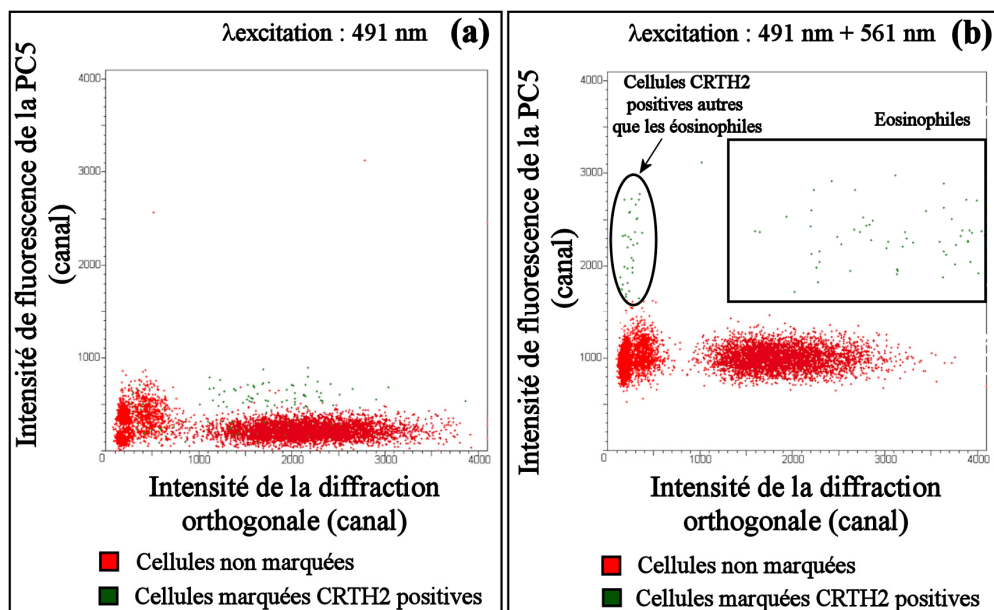


Figure III-27 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est pauvre en éosinophiles et en basophiles (respectivement 1,1% et 0,2%). Cytogrammes représentant la fluorescence de la PC5 en fonction du SSC. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).

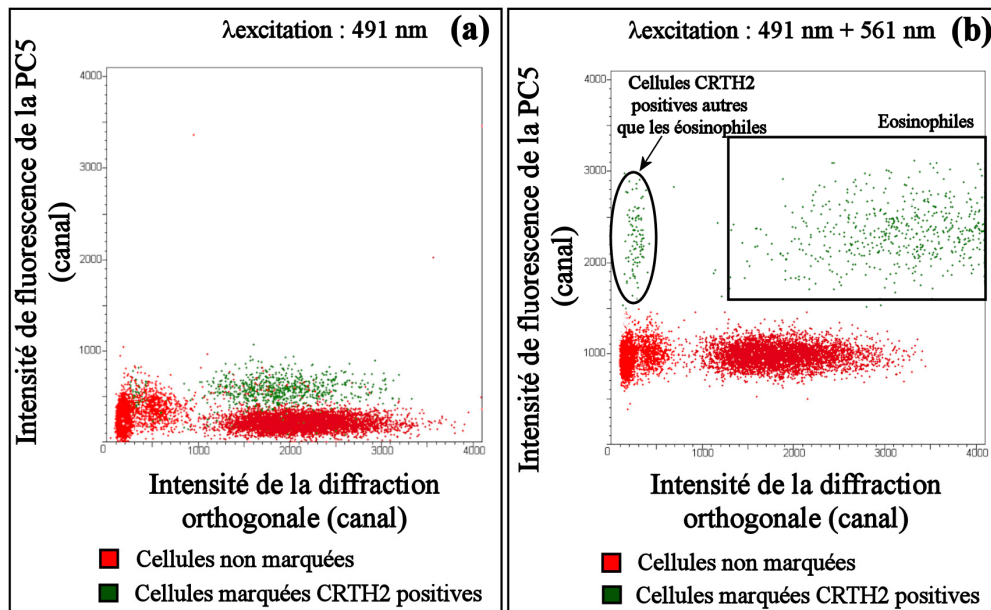


Figure III-28 : Cytogrammes obtenus pour des cellules marquées avec l'anticorps anti-CRTH2 couplé à la PC5. Le sang analysé est riche en éosinophiles (respectivement 7,7% et 0,9%). Cytogrammes représentant la fluorescence de la PC5 en fonction du SSC. Analyseur d'hématologie utilisant (a) une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm + 561 nm).

Les matrices de la fluorescence du TO en fonction de la fluorescence de la PC5 couplée à l'anticorps antiCRTH2 et de la fluorescence de la PC5-antiCRTH2 en fonction de la diffraction orthogonale montrent une forte amélioration de la discrimination des cellules marquées avec un analyseur d'hématologie incluant deux longueurs d'onde d'excitation par rapport à celui ayant une seule excitation.

En effet, l'utilisation d'un système ayant une longueur d'onde d'excitation à 491 nm discrimine que très faiblement les éosinophiles et les basophiles (Figure III-28). Dans cette configuration, leurs pourcentages sont déterminés grâce à plusieurs paramètres (électrique, SSC, FSC, TO) et à des combinaisons linéaires de ces différents paramètres [III-29]. Bien sûr, la précision est plus faible que s'ils étaient discriminés directement grâce à des signaux de fluorescence spécifiques.

Concernant le système à deux longueurs d'onde d'excitations, la discrimination des éosinophiles et des autres cellules CRTH2 positives est réalisée grâce au cytogramme SSC/PC5 (Figure III-29a). Les résultats sont obtenus suite à des investigations multiparamétriques et des inter-relations entre chaque paramètres enregistrés (électrique, FSC, SSC, TO et PC5) [III-30, III-31]. Les basophiles sont discriminés des sous populations de

lymphocytes T (Th2 et Tc2) grâce à la matrice SSC/TO (Figure III-29b). Notre traitement de données permet d'afficher seulement les cellules marquées au CRTH2 (Figure III-29c) dans le but de discriminer les trois types cellulaires marqués par le CRTH2 (éosinophiles, basophiles et les sous populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2)).

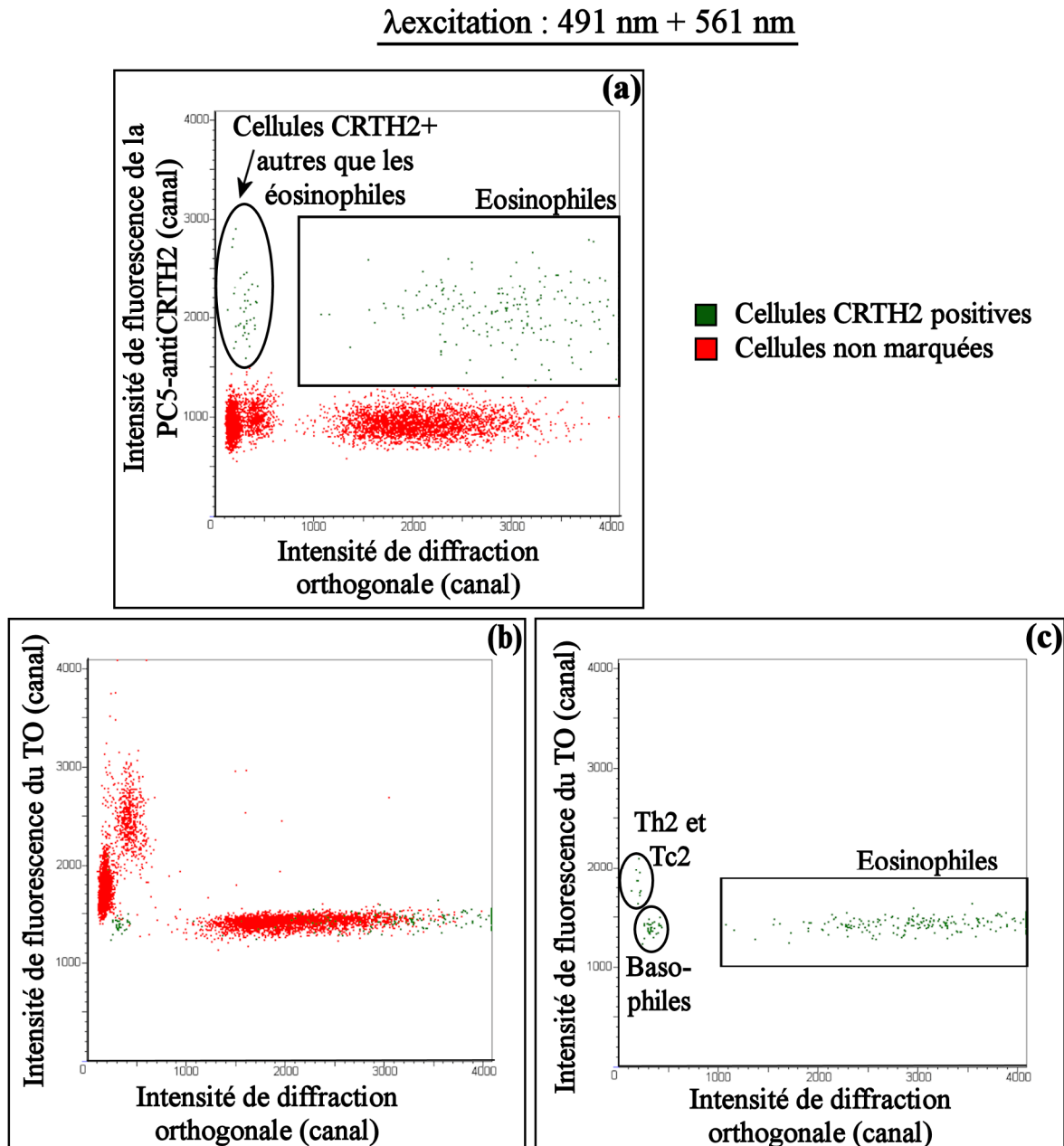


Figure III-29 : Cytogrammes permettant d'identifier les cellules CRTH2 positives, c'est-à-dire les éosinophiles, les basophiles et les sous-populations de lymphocytes T (Th2 et Tc2) avec l'analyseur d'hématologie utilisant deux longueurs d'onde d'excitation (491 nm +561 nm). (a) Intensité de fluorescence PC5-anti-CRTH2 en fonction de l'intensité de la diffraction orthogonale. (b) et (c) Intensité de fluorescence du TO en fonction de l'intensité de la diffraction orthogonale, (c) seulement les cellules marquées au CRTH2 sont affichées.

Les résultats quantitatifs obtenus sur douze échantillons de sangs avec nos nouveaux analyseurs d'hématologie sont comparés à ceux obtenus avec le cytomètre en flux standard FACScan (Figure III-30). Pour chaque échantillon, nous déterminons le pourcentage d'éosinophiles et de basophiles en fonction de la totalité des cellules et nous représentons ces résultats sur les courbes des Figures III-31 et III-32.

Numéro sangs		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pourcentage des éosinophiles (%)	Longueur d'onde d'excitation 491 nm	3,7	-	1,9	8,2	3,8	1,3	2,8	4,9	1,5	8,3	2,3	2,0
	Longueurs d'onde d'excitation 491 nm + 561 nm	9,7	7,0	2,6	7,7	4,6	1,1	3,4	7,6	1,5	8,5	2,2	1,9
	FACScan reference	9,9	6,9	2,6	6,9	4,3	1,1	3,0	7,6	1,6	9,7	1,8	1,6
Pourcentage des basophiles (%)	Longueur d'onde d'excitation 491 nm	3,3	-	0,2	0,4	0,7	0,2	0,5	2,0	0,5	0,3	0,6	0,6
	Longueurs d'onde d'excitation 491 nm + 561 nm	1,5	1,4	0,8	0,9	0,7	0,2	0,4	1,1	0,3	0,8	0,6	0,7
	Référence FACScan	1,6	1,2	0,9	0,9	0,5	0,5	0,4	1,4	0,2	1,0	0,4	0,6

Figure III-30 : Comparaison entre les pourcentages de cellules marquées obtenus avec les analyseurs d'hématologie incluant une longueur d'onde d'excitation ou deux longueurs d'onde d'excitation et avec le cytomètre FACScan utilisé comme référence.

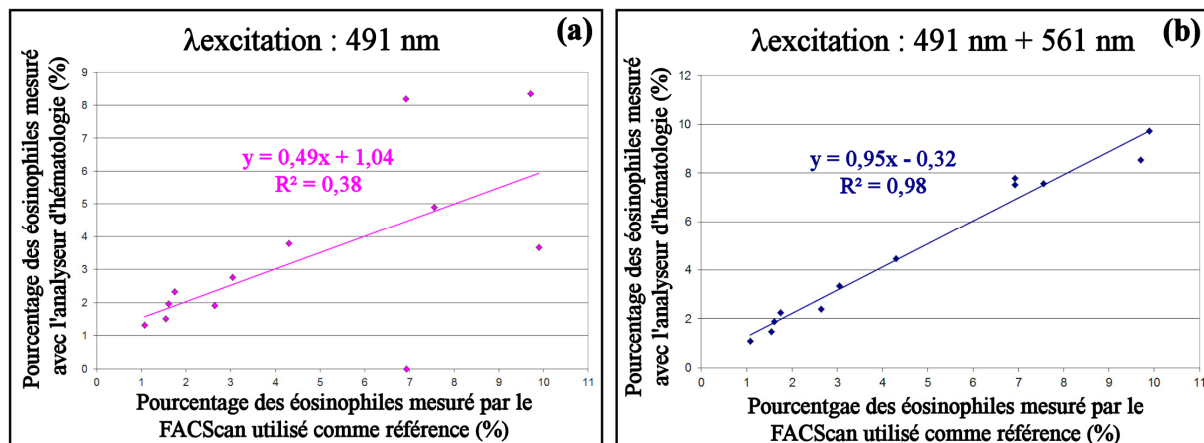


Figure III-31 : Pourcentage des éosinophiles mesuré sur douze sangs différents avec un cytomètre de référence le FACScan et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation. Droite : courbe de régression linéaire.

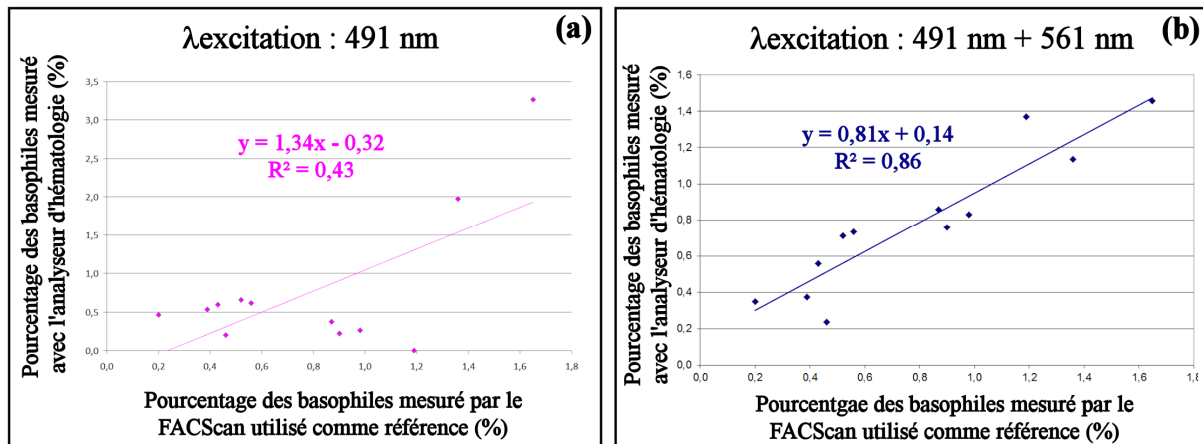


Figure III-32 : Pourcentage des basophiles mesuré sur douze sangs différents avec un cytomètre de référence le FACSscan et les analyseurs d'hématologie (a) incluant une longueur d'onde d'excitation ou (b) deux longueurs d'onde d'excitation. Droite : courbe de régression linéaire.

Dans le reste de l'analyse on se focalisera sur les éosinophiles et les basophiles. En utilisant une seule longueur d'onde d'excitation dans l'analyseur d'hématologie, les coefficients de détermination R^2 , représentant l'adéquation entre la droite de régression linéaire et les données expérimentales, sont de 0,38 pour les éosinophiles et 0,43 pour les basophiles. Les valeurs de R^2 obtenues avec l'analyseur intégrant une seule longueur d'onde d'excitation (491 nm) montrent une faible discrimination entre les éosinophiles et les autres cellules ainsi qu'entre les basophiles et les autres cellules. La précision des mesures est alors très faible. Ce constat est valable autant pour les représentations PC5/TO et SSC/PC5. Par contre, les coefficients de corrélation sont beaucoup plus élevés quand l'identification cellulaire est réalisée avec l'analyseur d'hématologie intégrant deux longueurs d'onde d'excitation. Ils sont de 0,98 et 0,86 respectivement pour les éosinophiles et les basophiles. Le rehaussement du taux de fluorescence de la PC5 grâce à la seconde excitation à 561 nm permet d'obtenir un rapport signal sur bruit plus important et une meilleure identification des éosinophiles et de basophiles. Ces observations quantitatives confirment la pertinence du concept utilisant deux longueurs d'onde au lieu d'une seule pour exciter le TO et la PC5. Ce système permet de réduire considérablement les problèmes liés aux mesures multiparamétriques et cela en minimisant l'utilisation des coefficients de compensation.

III.4. Conclusion

Des analyses multiparamétriques en fluorescences au sein d'un unique analyseur d'hématologie offrent de nombreux avantages comme : la précision des mesures, leur fiabilité, la simplicité de l'appareil. Il permet également de fournir des résultats complets et globaux sans avoir recours à des analyseurs d'hématologie et à des cytomètres, ce qui génère des mesures multiples et séparées, et une augmentation des coûts. Néanmoins, cette technique est difficile à mettre en œuvre en raison des recouvrements spectraux de fluorescences importants et de leur forte différence d'efficacité en terme de fluorescence. Un traitement des données appelé « méthode de compensation », peut partiellement limiter ce problème sans pour autant être efficace pour toutes les sortes de marquages. Par exemple, il est difficile d'utiliser simultanément le TO, et la PC5 conjuguée à l'anticorps CRTH2, pour identifier respectivement les acides nucléiques, les éosinophiles et les basophiles en une seule analyse basée sur une excitation unique centrée à 491 nm. En effet, dans ce cas, le niveau de fluorescence du TO est beaucoup plus important que celui de la PC5. L'utilisation d'une seconde source laser avec une longueur d'onde d'émission judicieusement choisie pour ne pas exciter le TO (mais exciter la PC5), peut améliorer fortement la précision de l'analyse et permettre d'éliminer la plupart des mauvaises interprétations. Cette égalisation des niveaux de fluorescences entre les deux fluorochromes permet une amélioration du rapport signal sur bruit et une sélection plus précise des cellules possédant une « faible expression antigénique ».

Nous démontrons que la discrimination des éosinophiles et des basophiles parmi les autres leucocytes (i.e. monocytes, neutrophiles, lymphocytes, immatures granuleux, cellules à haute teneur en acides nucléiques) peut être fortement améliorée en utilisant deux radiations d'excitation combinées grâce à un filtre acousto-optique.

L'analyseur que nous avons développé fournit, en plus d'un comptage relatif, la quantité de cellules pour un volume de sang donné.

Ce concept d'analyse peut être étendu à d'autres fluorochromes ayant une bande de détection dans l'infrarouge comme la phycoérythrine cyanine 7. Il pourra être aussi intéressant d'utiliser le Texas Red (TR) ou l'Alexa Fluor 568 étant donné que ces fluorochromes sont excités principalement à la longueur d'onde 561 nm et très faiblement à 491 nm. Les fluorochromes

non tandem comme le TR sont plus stables chimiquement et il est donc plus facile de les conserver sans que leurs propriétés chimiques changent dans le temps. Cette nouvelle méthode d'excitation devrait permettre d'améliorer le diagnostic ou le suivi de pathologies de types infectieuses ou inflammatoires, les leucémies aigües (LA), les hémopathies lymphoïdes B dont les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), qui nécessitent le comptage précis de certaines populations cellulaires spécifiques. L'utilisation d'autres lasers d'excitation comme le laser orange (Cobolt Mambo) [III-32] pourrait diminuer encore plus les recouvrements spectraux entre les émissions de fluorescences et augmenter le choix possible de fluorochromes. D'autres recherches présentées dans le chapitre V mettent en œuvre une source optique polychromatique de type supercontinuum qui permet d'avoir un choix ultralarge de longueurs d'onde d'excitation.

Bibliographie

- III-1. W. Coulter, “Means for counting particles suspended in a fluid”, US Patent 2,656,508 (1949).
- III-2. J. C. Parker and W. R. Horst, “Method of simultaneously counting red and white blood cells”, US Patent 2,875,666 (1953).
- III-3. L. Spielman and S. L. Goren, “Improving resolution in Coulter counting by hydrodynamic focusing”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 176-182 (1968).
- III-4. F. De Bisschop, J. Vierendeels and C. Langhe, “Electronic gate detection for cell or particle counting and sizing in liquids: Front-end characteristics, flow-dependent gate impedance, and its remediation”, *IEEE Transaction on Instrumentation and Measurement*, 5, 1160-1168 (2006).
- III-5. F. De Bisshop, “Electronic gating for particle/cell counting and sizing, DSP-operated”, *IEEE Transactions on instrument and measurement*, 58, 3159-3166 (2009).
- III-6. G. C. Salzmann, M. E. Wilder and J. H. Jett, “Light scattering with stream-in-air flow systems”, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1, 264-267 (1979).
- III-7. P. Nérin and D. Lefèvre, “Blood Cell Biology, Optics and Related Technologies”, *Technical Journal Readout Horiba Technical Reports*, 8, 26-37 (2004).
- III-8. P. F. Mullaney, M. A. Van Dilla, J. R. Coulter and P. N. Dean, “Cell sizing: A light scattering photometer for rapid determination”, *Review of Scientific Instruments*, 40, 1029-1032 (1969).
- III-9. J. A. Steinkamp, A. Romero, P.K. Horan and H. A. Crissman, “Multiparameter analysis and sorting of mammalian cells”, *Experimental Cell Research*, 84, 15-23 (1974).
- III-10. B. Merchez, P. Brunel and P. Nérin, “Electrooptic measurement device and method intended for classifying and counting microscopic elements”, WO 2010/004173 (2009).
- III-11. P. Nérin, P. Moreno and D. Cremien, “Device for examining a fluid by uniform illumination using a configured light guide”, US 7,724,371 (2005).

- III-12. F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, T. Sharpless and M. R. Melamed, “Nucleic acid content and cell cycle distribution of five human bladder cell lines analysed by flow cytometry”, *International Journal of Cancer*, 20(1), 30-36 (1977).
- III-13. F. E. Craig and K. A. Foon, “Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms”, *Blood*, 111(8), 3941-3967 (2008).
- III-14. J. L. Faucher, C. Lacronique-Gazaille, E. Frébet, F. Trimoreau, M. Donnard, D. Bordessoule, F. Lacombe and J. Feuillard, ““6 markers/5 colors” extended white blood cell differential by flow cytometry”, *Cytometry Part A*, 71(11), 934-944 (2007).
- III-15. C. Arnoulet, M. C. Béné, F. Durrieu, J. Feuillard, C. Fossat, B. Husson, H. Jouault, M. Maynadié and F. Lacombe, “Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL”, *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78(1), 4-10 (2010).
- III-16. D. Lefèvre, “Method and device for characterizing cellular components of a biological fluid”, US 2008/0124745 (2008).
- III-17. M. I. Mishchenko, J. W. Hovenier and L. D. Travis, *Light scattering by nonspherical particles, Theory, Measurements, and Applications*, Academic Press, San Diego, 596-600 (2000).
- III-18. H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry Second Edition*, A. R. Liss, New York (1988).
- III-19. D. Lefèvre, S. Vériac and H. Champseix “Reagent and process for the identification and counting of biological cells”, US 7,638,290 (2009).
- III-20. F. L. van de Veerdonk and M. G. Netea, “T-cell subsets and antifungal host defenses”, *Current fungal infection reports*, 4(4), 238-243 (2010).
- III-21. S. Saito, M. Sakai, Y. Sasaki, K. Tanebe, H. Tsuda and T. Michimata, “Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and th Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia”, *Clinical and experiment immunology*, 117(3), 550-555 (1999).

III-22. M. Roederer, “Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats”, *Cytometry Part A*, 45(3), 194-205 (2001).

III-23. C. C. Stewart and S. J. Stewart, “Four color compensation”, *Cytometry*, 38(4), 161-175 (1999).

III-24. P. Nérin and D. Lefèvre, “Device and method for multiparametric analysis of microscopic elements”, US 2008/0283754 A1 (2008).

III-25. W. Telford, M. Murga, T. Hawley, R. Hawley, B. Packard, A. Komoriya, F. Haas and C. Hubert, “DPSS yellow-green 561 nm lasers for improved fluorochrome detection by flow cytometry”, *Cytometry Part A*, 68(1), 36-44 (2005).

III-26. V. Kapoor, V. Karpov, C. Linton, F. V. Subach, V. V. Verkhusha and W. G. Telford “Solid state yellow and orange lasers for flow cytometry”, *Cytometry Part A*, 73(6), 570-577, (2008).

[III-27] Data sheet Beckman Coulter CRTH2-PE
<http://www.beckmancoulter.com/customersupport/ifu/ivdd/a07413%202008-03-04.pdf>.

[III-28] K. Nagata, H. Hirai, K. Tanaka, K. Ogawa, T. Aso, K. Sugamura, and S. Takano, “CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s),” *FEBS Letters*, 459, 195–199 (1999).

III-29. S. Raimbault, “Method and device for classifying, displaying, and exploring biological data”, Patent W0 2010/026328 A1 (2010).

[III-30] L. W. Terstappen, D. Johnson, R. A. Mickaels, J. Chen, G. Olds, J. T. Hawkins, M. R. Loken, and J. Levin, “Multidimensional flowcytometric blood cell differentiation without erythrocyte lysis,” *Blood Cells*, 17(3), 585–602 (1991).

[III-31] L. W. Terstappen and M. R. Loken, “Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials,” *Cytometry*, 9, 548–556 (1988).

III-32. W. G. Telford, E. Illy, H. Karlsson and P. Prabhat, “Orange Laser Sources for Life Sciences Research”, *Bio Photonics*, 26-28 (2010).

IV. Modulation des signaux optiques dans un cytomètre en flux

IV.1.Introduction

Les cytomètres en flux sont principalement utilisés pour mesurer l'expression de protéines transmembranaires présentes à la surface de cellules biologiques [IV-1 - IV-3] et ainsi caractériser les différentes populations cellulaires présentes dans un échantillon. En hématologie par exemple, la cytométrie en flux a permis de grands progrès dans la classification des hémopathies, leurs diagnostics et pour le suivi de la maladie résiduelle [IV-4]. Basée sur la détection de signaux lumineux provenant de cellules préalablement marquées par des colorants fluorescents ou des anticorps conjugués à des fluorochromes, la cytométrie permet d'identifier plusieurs sous populations de cellules, grâce à la détermination de leurs sites antigéniques, et de manière plus générale grâce à l'identification de structures chimiques ou biochimiques de la cellule biologique. Ajoutons encore, que la mesure des propriétés physiques de la cellule biologique telles que le volume (déterminé par mesure électrique) ou les intensités de diffraction (mesurées à un ou plusieurs angles) permet de compléter les mesures de fluorescence [IV-5 - IV-7]. L'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs fluorescents introduit des difficultés, telles que des recouvrements spectraux entre les bandes d'absorption et entre les bandes d'émissions de fluorescence. Pour résoudre ces problèmes, les cytométristes utilisent généralement une méthode de correction appelée «compensation» [IV-8 - IV-11]. Pour un canal de fluorescence donné, le signal interprété est celui obtenu après soustraction d'une part proportionnelle des signaux des autres canaux. Ce coefficient de proportionnalité est fonction notamment du recouvrement spectral entre deux signaux de fluorescence. Malheureusement, le principal problème induit par cette méthode est le calcul du facteur de compensation qui est basé sur la moyenne des valeurs des propriétés chimiques des fluorochromes. Pour une même famille de fluorochromes, ces facteurs peuvent varier considérablement et sont directement dépendants des fournisseurs [IV-9]. En effet, un même produit provenant de fabricants différents peut avoir des jeux de compensations inégaux, ce qui provoque un problème critique pour l'étalonnage des instruments et donne lieu à des mesures erronées qui pourraient mener à une interprétation dangereuse des résultats. De plus, il est apparu que les techniques de compensation traditionnellement utilisées en milieu hospitalier ne permettent pas une compensation parfaite des cytomètres multicolore donnant lieu à l'effet « trompette ». Le but de cette partie est d'étudier des méthodes de traitement optique, basées sur le multiplexage en longueurs d'onde, permettant de résoudre partiellement

ou totalement ces limitations qui constituent un obstacle majeur dans la fiabilité et l'interprétation de certaines données biocliniques.

Le principe de notre méthode repose sur le codage d'au moins deux faisceaux d'excitation. Puisque la plupart des fluorochromes utilisés ont un temps de déclin de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde, la fluorescence induite suit de manière quasi instantanée les variations du faisceau d'excitation, étant donné que le niveau de résolution temporelle conféré par notre système d'analyse est de l'ordre de la microseconde.

En définitive, si l'intensité lumineuse suit une loi sinusoïdale de pulsation ω , le signal de fluorescence suivra une loi similaire avec une amplitude proportionnelle :

- à l'intensité du faisceau d'excitation,
- au rendement quantique de fluorescence du fluorochrome,
- à la quantité de molécules présentes dans le volume d'analyse, et
- au rendement de fluorescence lié au couplage fluorochrome-anticorps-antigène.

Une technique d'encodage des signaux excitateurs permet d'identifier un signal de fluorescence spécifique parmi de multiples autres, ce qui permet d'améliorer la détection et le rapport signal sur bruit des mesures [IV-11 - IV-17]. En effet, la détection de fluorescence peut être considérablement améliorée si dans un temps déterminé, chaque fluorochrome est excité par une longueur d'onde spécifique [IV-18 - IV-19]. Malheureusement, cette méthode induit une longue durée d'enregistrement lorsque plusieurs fluorochromes sont utilisés. En microfluorométrie confocale, une technique pour l'enregistrement simultané de plusieurs fluorescences a été publiée en 1993 par Aslund et al. [IV-20]. Elle consiste à moduler l'intensité des longueurs d'onde d'illumination à des fréquences différentes et de les envoyer en même temps sur des échantillons.

Dans ce paragraphe, nous présentons des résultats sur des mesures simultanées de diffusion résolues en longueur d'onde et sur la détection de fluorescences au sein d'un analyseur d'hématologie. Une technique de codage optique des faisceaux lumineux incidents permet de diminuer ou d'éliminer les problèmes de la cytométrie en flux multiparamétrique, traitées de nos jours par des « méthodes de compensations » [IV-21 - IV-22]. Ce codage apporte de nouvelles perspectives pour l'étude multiparamétrique de particules analysées individuellement en flux. Nos mesures sont effectuées à l'aide de microsphères de polymère fluorescentes.

IV.2. Matériel et méthode

Les expériences sont réalisées avec un analyseur d'hématologie, les principes de ce système sont décrits dans le chapitre I. Il intègre des principes de cytométrie en flux basés sur la focalisation hydrodynamique [IV-1]. Le flux de cellules est couplé à un système optique spécifique décrit sur la Figure IV-1.

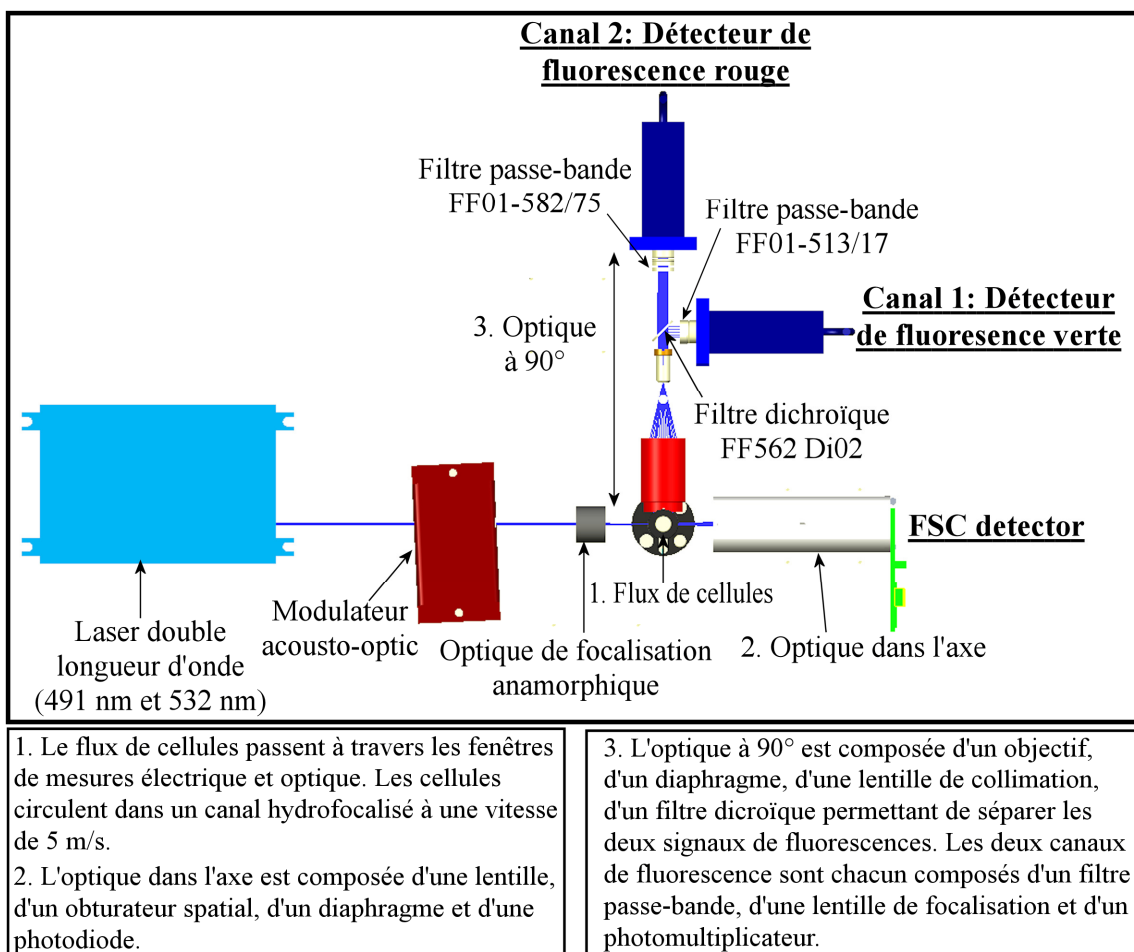


Figure IV-1 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique permettant de moduler les deux faisceaux lumineux du laser. Les filtres utilisés proviennent du fabricant Semrock.

IV.2.1. Système optique d'illumination

IV.2.1.1. Source lumineuse

Le système optique est composé d'un laser continu émettant à 491 nm et à 532 nm (Cobolt Dual Calypso) avec une puissance nominale de 20 mW pour chaque longueur d'onde. Ce laser à solide pompé par une seule diode émettant à 808 nm utilise la génération de second harmonique de l'onde fondamentale (1064 nm) ainsi que la somme de fréquences entre deux radiations centrées à 1064 nm et à 914 nm. Ces rayonnements proviennent de deux matrices YAG et YVO₄, toutes les deux dopées aux ions néodyme. La conversion de fréquence est réalisée au moyen d'un cristal PPKTP (periodically poled potassium titanyl phosphate) ayant deux périodes de réseaux. La polarisation du faisceau en sortie du laser est linéaire (mode TEM₀₀) avec une largeur de bande spectrale fine (<0.01 nm) et un faible bruit (<0.3% rms). Le profil spatial du faisceau est de type TEM₀₀.

IV.2.1.2. Modulateur acousto-optique

Le modulateur acousto-optique (nC.TN AOTF, société AA Opto électronique) sélectionne de manière indépendante les longueurs d'onde et encode chaque radiation lumineuse en modulant son intensité à une fréquence donnée. Ce système spécifique de filtres acousto-optique accordables permet de piloter simultanément jusqu'à 8 lignes distinctes avec une résolution de 1 à 2 nm et un taux d'extinction supérieur à 90%. Une cellule acousto-optique est constituée d'une matrice en oxyde de tellure (TeO₂) présentant des propriétés « photo-élastiques » pour une plage de longueurs d'onde données, ce qui permet au matériau de changer d'indice de réfraction sous l'action d'une onde acoustique externe. Un transducteur piézo-électrique est collé sur l'une des faces du milieu d'interaction ; il a la capacité de varier de volume en fonction de la tension appliquée. Cette vibration est transférée en partie à l'intérieur du milieu d'interaction par couplage électromécanique sous forme d'une onde acoustique. Cette onde progressive crée un réseau de diffraction au sein de la matrice vitreuse avec une cadence et une amplitude réglables. La diffraction simultanée de plusieurs longueurs d'onde avec des angles accordables permet d'aligner les différents faisceaux lumineux désirés sur un même axe optique (ordre -1). Par exemple, si un faisceau lumineux polychromatique incident peut être spectralement découpé pour obtenir une propagation des radiations suivant

une direction unique correspondant à l'ordre -1 des réseaux d'indices, le spectre résiduel se propage alors dans une direction différente sur l'ordre 0 (Figure IV-2).

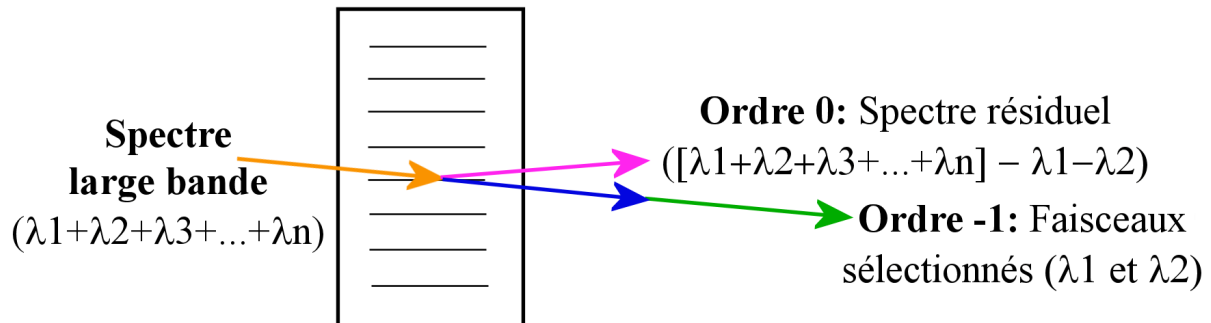


Figure IV-2 : Schéma représentant les chemins lumineux des faisceaux à λ_1 et à λ_2 sélectionnés via le driver du modulateur acousto-optique.

Dans notre expérience, les modulations de l'intensité sous forme sinusoïdale, à des fréquences w_1 et w_2 sont associées respectivement aux longueurs d'onde λ_1 (491 nm) et λ_2 (532 nm). Dans ces conditions, l'expression du faisceau incident multicolore est donnée par les Equations IV-1 et IV-2, sm_1 et sm_2 sont respectivement le premier et le second termes de l'Equation IV-2.

$$I(t) = sm_1(w_1) + sm_2(w_2). \quad (\text{Equation IV-1})$$

$$I(t) = \frac{I_{10}(t)}{2} [1 + M_1 \cdot \cos(2\pi \cdot w_1 t)] + \frac{I_{20}(t)}{2} [1 + M_2 \cdot \cos(2\pi \cdot w_2 t)]. \quad (\text{Equation IV-2})$$

I_{10} et I_{20} sont les intensités maximales des signaux optiques; M_1 , M_2 représentent les amplitudes de modulation et w_1 et w_2 sont les fréquences de modulation.

Nous avons souhaité déterminer les efficacités de diffraction et de modulation du filtre accordable acousto-optique pour les longueurs d'onde à 491 nm et à 532 nm. L'expérience est schématisée sur la Figure IV-3.

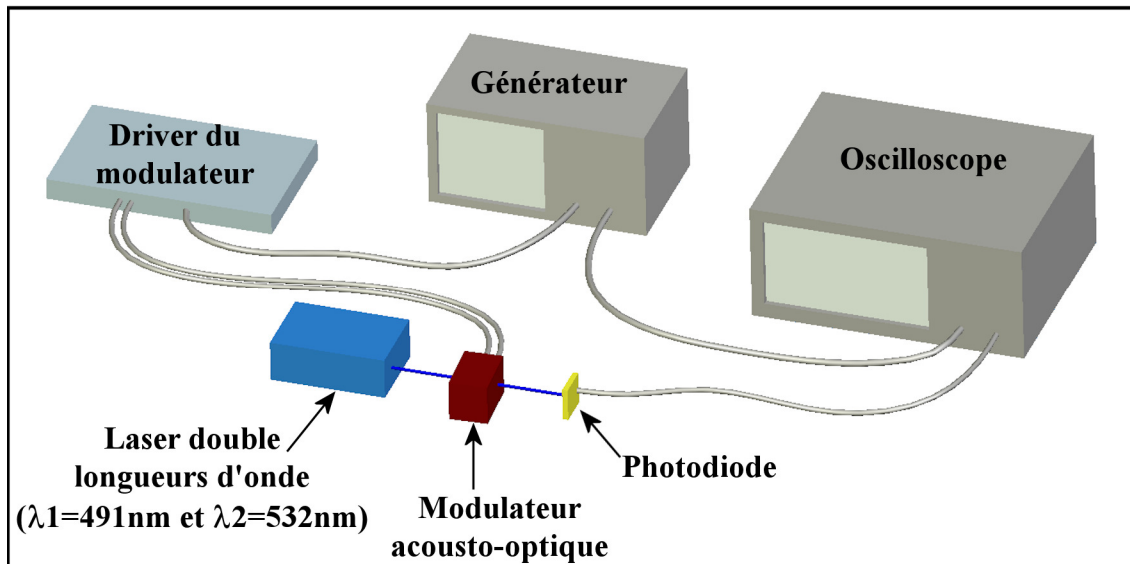


Figure IV-3 : Schématisation de l'expérience permettant de déterminer les efficacités de diffraction et de modulation du modulateur acousto-optique.

➤ Efficacité de diffraction

Pour déterminer l'efficacité de la diffraction (E_{diff}), deux mesures différentes doivent être réalisées pour une longueur d'onde donnée. Dans un premier temps, la tension continue issue de la photodiode est mesurée à l'ordre 0 lorsque le modulateur n'est pas activé (T_0). Dans un second temps, le modulateur est activé et la tension continue provenant de la photodiode est déterminée à l'ordre -1 (T_{-1}). Les efficacités de diffraction à l'ordre -1 pour les faisceaux émettant à 491 nm et à 532 nm sont alors déterminées grâce à l'Equation IV-3 et leurs efficacités sont respectivement de 94,8% et de 98,6% et cela pour des fréquences acoustiques de 129,2 MHz et 116,3MHz.

$$E_{diff} (\%) = \frac{T_{-1}(t)}{T_0(t)} \cdot 100 \quad (\text{Equation IV-3})$$

E_{diff} : efficacité de diffraction ; $T_0(t)$: tension mesurée à l'ordre 0 quand le modulateur n'est pas activé ; $T_{-1}(t)$: tension mesurée à l'ordre -1 quand le modulateur est activé pour une longueur d'onde spécifique (sans fréquence de modulation).

➤ Efficacité de modulation

Le modulateur acousto-optique utilisé permet d'induire différents codes sur chaque signal optique pour des fréquences de modulation comprises entre 0 et 800 kHz. La détermination des efficacités de modulation (E_{mod}) (Equation IV-4), qui dépendent de la fréquence de

modulation, est obtenue en effectuant des mesures à l'ordre -1. Cette efficacité correspond au rapport de la tension engendrée par le signal optique non modulé (Figure IV-4a) sur la tension engendrée par le signal modulé (Figures IV-4b à IV-4d). Cette tension est obtenue grâce à l'utilisation d'une photodiode de type S1223. Les tensions mesurées sont montrées sur la Figure IV-4.

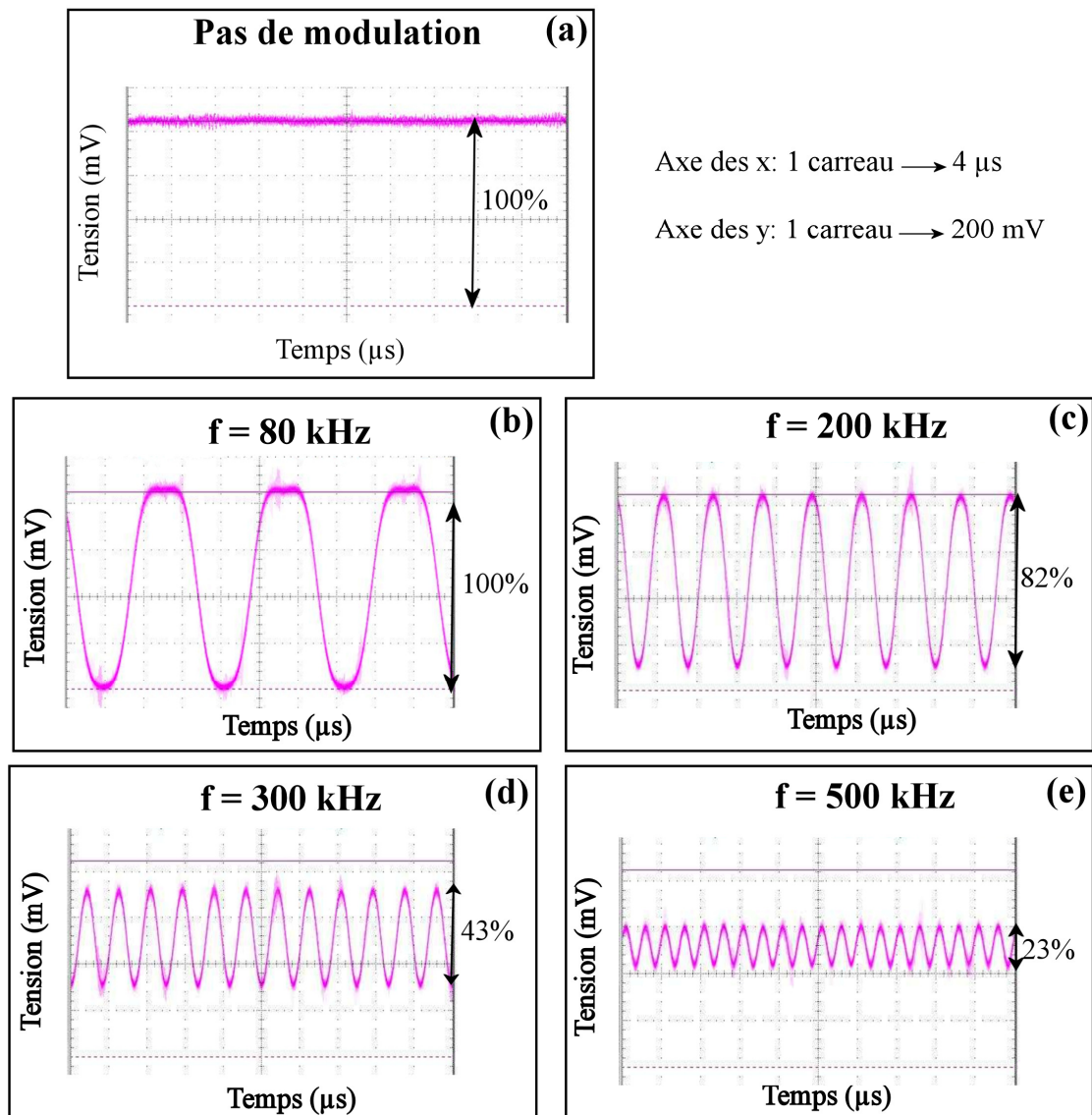


Figure IV-4 : Signaux permettant de déterminer les efficacités de modulation du système acousto-optique pour un faisceau lumineux à 491 nm. (a) aucune modulation n'est appliquée. (b) à (e) différentes fréquences de modulation sont appliquées.

$$E_{\text{mod}} (\%) = \frac{T_{\text{continue}}(t)}{T_{\text{mod}}(t)} \cdot 100 \quad (\text{Equation IV-4})$$

E_{mod} : efficacité de modulation ; $T_{\text{continue}}(t) = T_{-1}(t)$: tension mesurée à l'ordre -1 quand le modulateur est activé pour une longueur d'onde spécifique (sans fréquence de modulation) ; $T_{\text{mod}}(t)$: tension mesurée à l'ordre -1 pour une longueur d'onde spécifique (la même que pour la mesure de $T_{\text{continue}}(t)$) et pour une fréquence de modulation fixe.

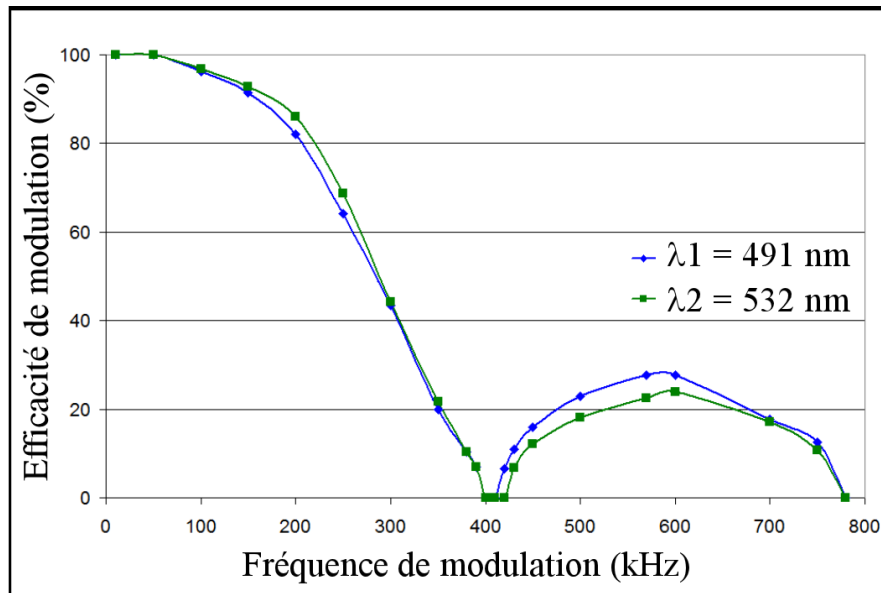


Figure IV-5 : Efficacité de modulation du filtre acousto-optique en fonction de la fréquence de modulation pour des faisceaux lasers à 491 nm et à 532 nm.

IV.2.1.3. Système optique de mise en forme anamorphique

Les faisceaux lumineux provenant de la source sont focalisés dans la cuve de mesure grâce à un système optique de mise en forme composé de deux lentilles, l'une sphérique et l'autre cylindrique. Cette mise en forme anamorphique est décrite dans la partie III.2. La tache lumineuse obtenue au niveau de la chambre d'illumination a une géométrie elliptique mesurant $88 \mu\text{m}$ par $166 \mu\text{m}$.

IV.2.2. Système optique de collection

Le comptage des particules est réalisé en utilisant un système de mesure électrique placé autour du flux cellulaire. Les particules se propagent à travers un micro-trou immergé dans un

liquide de conductivité connue. La modification d'impédance entre les électrodes placées de chaque côté de la micro-ouverture révèle la présence d'une particule. La valeur d'impédance permet aussi de déterminer le volume des particules [IV-23].

La fenêtre de mesure optique est située après la fenêtre électrique. Dans notre expérience, le système de détection optique est composé de trois voies. La diffusion de la lumière dans l'axe (FSC) est détectée par une photodiode (Hamamatsu S1223) placée derrière un obturateur rectangulaire permettant de stopper la partie centrale du faisceau non diffracté. Les radiations sont détectées à l'intérieur de deux demi-lunes de $1-3^\circ$ d'ouverture. Les autres mesures permettent de détecter des signaux de fluorescence (canaux 1 et 2), les filtres utilisés sont représentés sur la Figure IV-6. Les émissions de fluorescence situées dans les longueurs d'onde rouges et vertes proviennent de l'interaction des faisceaux lumineux à 491 nm et 532 nm avec les microsphères rouges (R0300) et vertes (G0300) (fournisseur : Duke Scientific Corporation). Les spectres d'excitation et d'émission de ces microsphères sont présentés sur la Figure IV-7. Le canal 1 est composé d'un filtre Semrock FF01-513/17, d'un filtre dichroïque Semrock FF562 Di02, d'une lentille de focalisation et d'un tube photomultiplicateur (Hamamatsu H9307) permettant d'enregistrer de manière sélective la fluorescence verte. Le canal 2 est composé d'un filtre Semrock FF01-582/75, d'une lentille de focalisation et d'un photomultiplicateur (Hamamatsu H9307) permettant de mesurer les signaux de fluorescence situés autour de 610 nm. Il est important de noter que les émissions spectrales des deux types de microsphères se recouvrent dans la fenêtre spectrale située entre 560 nm et 650 nm, ce qui diminue le rapport signal sur bruit et donc la précision des mesures obtenues dans le canal 2.

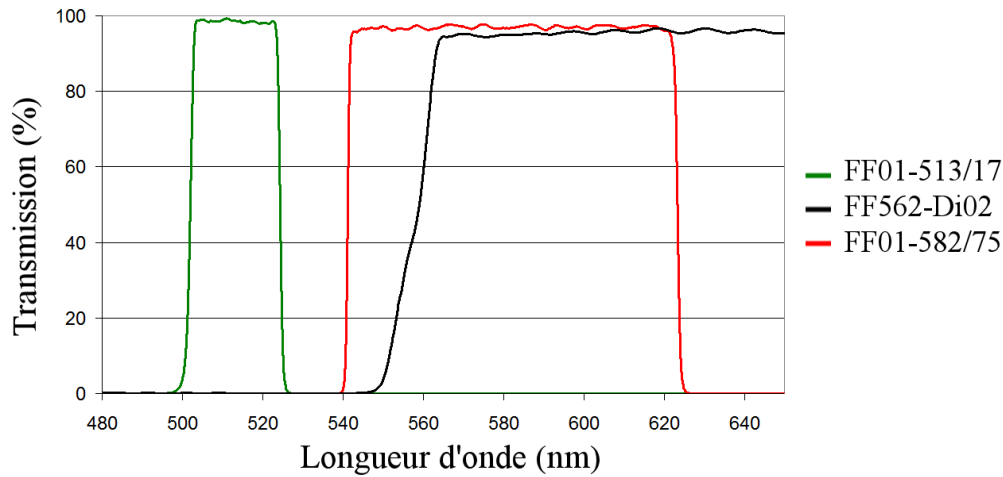


Figure IV-6 : Transmissions des filtres optiques utilisés pour mesurer les signaux de fluorescence.

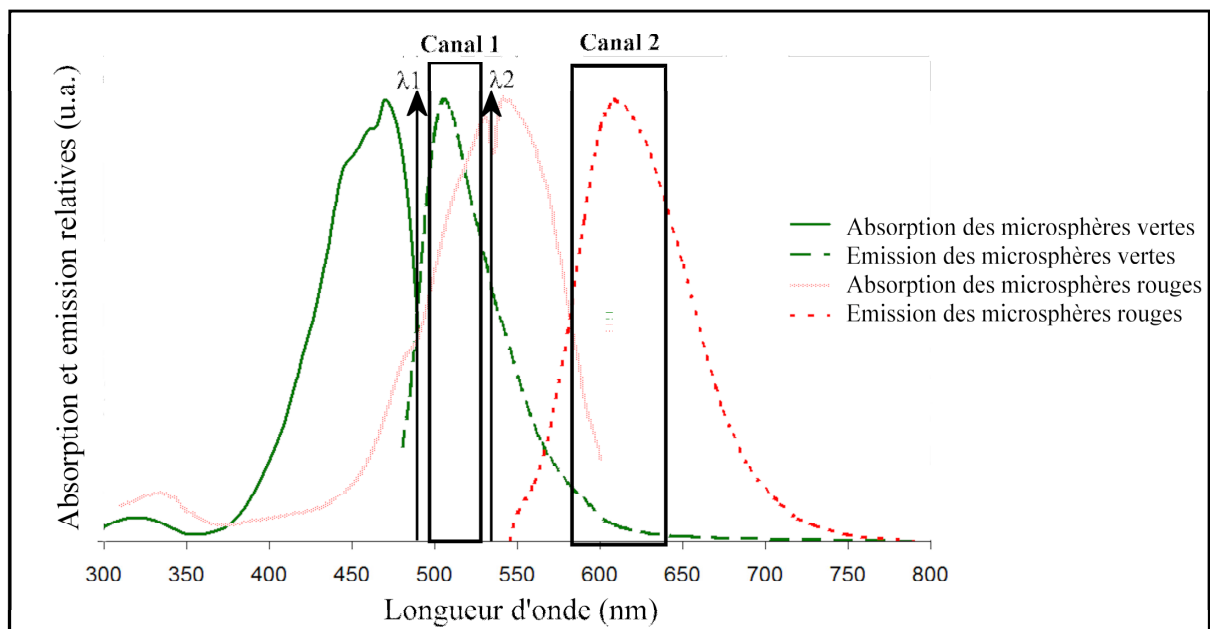


Figure IV-7 : Spectres d'absorption et d'émission des microsphères fluorescentes vertes et rouges. Les longueurs d'onde d'excitation laser ($\lambda_1=491$ nm et $\lambda_2=532$ nm) sont représentées par des flèches. Les filtres de type passe-bande sont schématisés par des rectangles.

IV.2.3. Système fluide

Un dispositif standard microfluidique (HORIBA Medical Pentra 60 instrument, Montpellier, FR) est utilisé pour mélanger et diluer les microsphères fluorescentes vertes et rouges. Ce

système est décrit dans le chapitre I. Dans cette expérience, le flux de particules circule à une vitesse de 5 m/s et est analysé pendant 15 secondes.

IV.3. Analyses de microsphères fluorescentes grâce à une technique de modulation dans un analyseur d'hématologie

IV.3.1. Tests préliminaires sur l'analyseur

Dans le but de montrer la faisabilité du système, nous avons choisi de réaliser une expérience mettant en œuvre un seul type de microspheres (G0300 : microsphères vertes), en illuminant le flux de particules avec une seule longueur d'onde d'excitation à 491 nm. Les mesures électrique, de diffraction dans l'axe et de fluorescence verte sont visualisables sur la Figure IV-8.

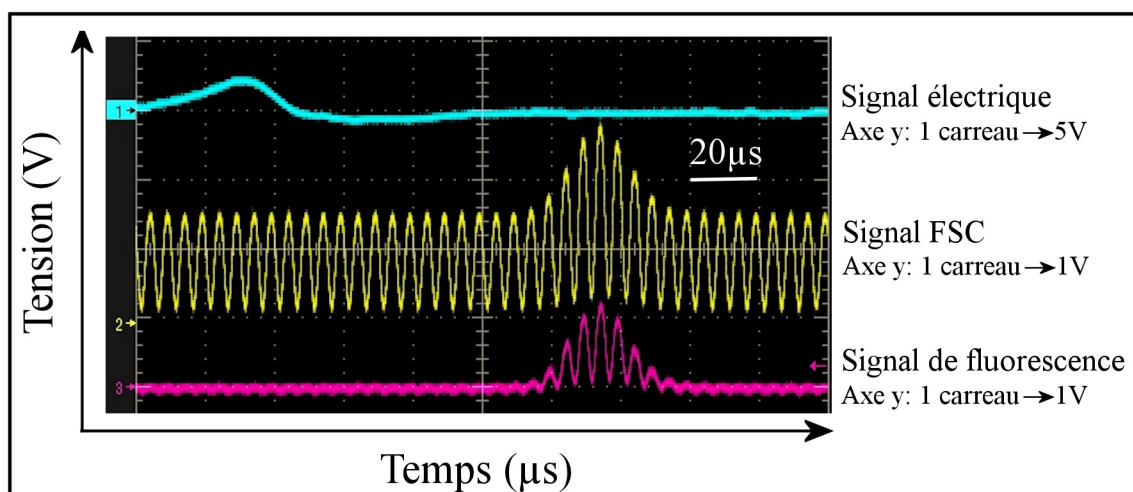


Figure IV-8 : Signaux obtenus avec l'analyseur d'hématologie, en illuminant des microsphères fluorescentes vertes avec un faisceau lumineux à 491 nm.

Le signal issu de la mesure électrique est représenté en haut de la Figure IV-8. On observe une augmentation de la tension à cause du changement d'impédance entre les électrodes, du fait du passage de la microsphère.

Le second signal mesure la diffraction dans l'axe. La partie centrale de l'obturateur spatial ne permettant pas d'éclipser totalement le faisceau incident, cela implique l'enregistrement d'un signal continument modulé avant le passage de la microsphère.

Le troisième signal est caractéristique du signal de fluorescence issue d'une bille illuminée par un signal modulé à ~200kHz (canal 1).

IV.3.2. Tests avec deux types de microsphères fluorescentes

Dans notre expérience, les modulations de l'intensité sous forme sinusoïdale, à des fréquences de 200 kHz et de 300 kHz, sont associées respectivement aux longueurs d'onde 491 nm (λ_1) et 532 nm (λ_2) (Figure IV-9a). Les faisceaux lumineux incidents et codés interagissent avec des microsphères fluorescentes vertes et rouges se propageant dans le canal microfluidique à une vitesse de 5m/s. Le temps d'interaction avec le faisceau laser multilongueur d'onde donne naissance au signal de sortie impulsionnel de forme quasi-gaussienne d'une durée de 20 μ s (mesure à mi-hauteur) dépendant de la taille des microsphères et de la vitesse du flux de particules (Figure IV-9b). Les signaux optiques modulés en sortie (S_m , Equations IV-5 à IV-9) sont représentés sur les Figures IV-9b et IV-9c.

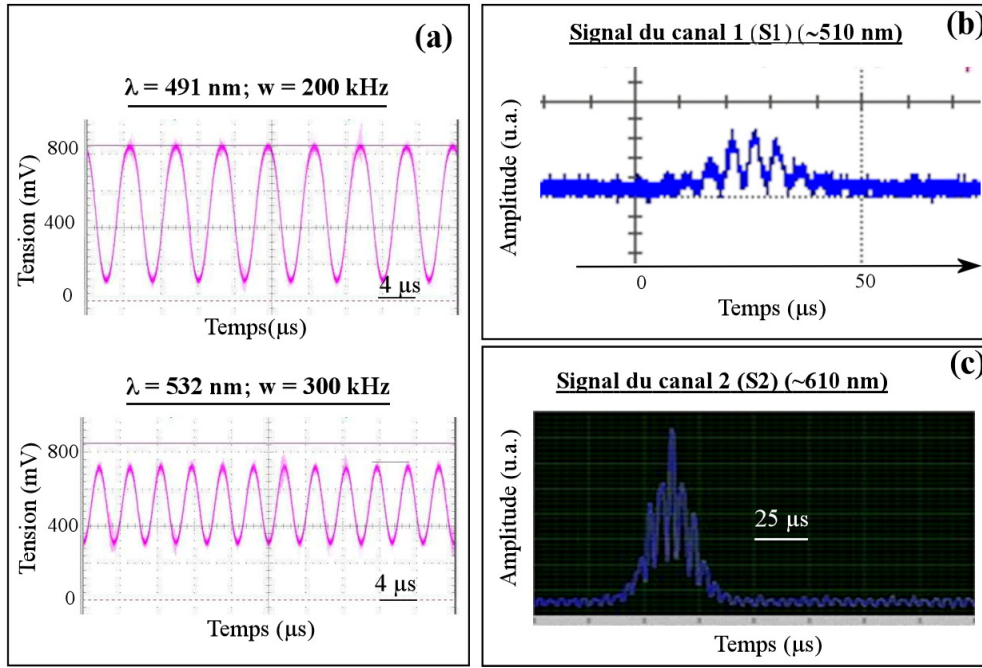


Figure IV-9 : (a) Faisceaux de lumières incidents à 491 nm et à 532 nm modulés respectivement à des fréquences $w_1=200$ kHz et $w_2=300$ kHz. (b) Signal de fluorescence provenant du canal 1. (c) Signal de fluorescence du canal 2.

Les signaux de fluorescence émis sont détectés autour de 510 nm et 610 nm par deux photomultiplicateurs placés au niveau des canaux 1 et 2 respectivement. Le photomultiplicateur du canal 1 (signal S1) recueille une partie du signal de fluorescence des microsphères vertes ($a.k_G.sm_1(w_1)$) seulement (Figure IV-9b et Equations IV-7 et IV-8). Par contre, le détecteur 2 (signal S2) recueille une grande partie du signal de fluorescence des microsphères rouges excitées par le faisceau à 491 nm ($b.k'_R.sm_1(w_1)$) et par le faisceau à 532 nm ($c.k_R.sm_2(w_2)$) et une faible partie de la fluorescence des microsphères vertes ($d.k_G.sm_1(w_1)$) (Figure IV-9c et IV-7, Equations IV-9 et IV-10). (Les facteurs a, b, c et d dépendent des filtres passe-bande).

$$Sm(t) = \exp\left[-\frac{t}{t_0}\right]^2 \cdot [(k_G + k'_R) \cdot sm_1(w_1) + k_R \cdot sm_2(w_2)] \quad (\text{Equation IV-5})$$

$$Sm(t) = \exp\left[-\frac{t}{t_0}\right]^2 \cdot \left[\begin{aligned} &(k_G + k'_R) \cdot \frac{I_{10}(t)}{2} [1 + M_1 \cdot \cos(2\pi \cdot w_1 t)] sm_1(w_1) + \\ &k_R \cdot \frac{I_{20}(t)}{2} [1 + M_2 \cdot \cos(2\pi \cdot w_2 t)] \end{aligned} \right] \quad (\text{Equation IV-6})$$

Les équations ci-dessus peuvent être mises sous forme matricielle :

$$Sm(t) = \exp\left[-\frac{t}{t_0}\right]^2 \cdot \begin{bmatrix} k_G & k'_R \\ 0 & k_R \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} sm1(w1) \\ sm2(w2) \end{bmatrix} \quad (\text{Equation IV-7})$$

$$Sm(t) = \exp\left[-\frac{t}{t_0}\right]^2 \cdot \begin{bmatrix} k_G & k'_R \\ 0 & k_R \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \frac{I_{10}(t)}{2} [1 + M_1 \cdot \cos(2\pi \cdot w1t)] sm1(w1) \\ \frac{I_{20}(t)}{2} [1 + M_2 \cdot \cos(2\pi \cdot w2t)] \end{bmatrix} \quad (\text{Equation IV-8})$$

I_{10} et I_{20} sont les intensités maximales des signaux optiques; M_1 , M_2 représentent les amplitudes de modulation, $w1$ et $w2$ sont les fréquences de modulation; k_G , k_R et k'_R (Equation IV-9) sont des facteurs dépendants du rendement quantique des microsphères fluorescentes.

$$\begin{aligned} k_G &= 0,55 \cdot \rho_G \\ k_R &= 0,44 \cdot \rho_R \\ k'_R &= 1 \cdot \rho_R \end{aligned} \quad (\text{Equation IV-9})$$

ρ_G et ρ_R sont respectivement les rendements quantiques des billes fluorescentes R0300 et G0300.

Le traitement numérique des signaux S1 et S2 (Figures IV-9b et IV-9c) est réalisé avec un algorithme spécifiquement développé pour cette expérience. Il est basé sur le logiciel Labview et permet le filtrage de chaque composante en fréquence ainsi que l'identification des signaux fluorescents provenant des microsphères vertes ou rouges. Ce traitement des données brutes enregistrées sur les canaux 1 et 2 est basé sur une transformée de Fourier et sur l'utilisation de filtres de type « butterworth ».

Le signal S1 est seulement composé de la fluorescence de la bille verte, il intègre donc une seule fréquence de modulation à 200 kHz.

Par contre, le signal S2 n'est pas seulement composé de notre signal utile correspondant au signal de fluorescence des billes rouges modulé à 300 kHz. En effet, le signal S2 est aussi formé d'un signal non utile modulé à 200 kHz. Le résultat du calcul numérique du traitement du canal 2 permet d'obtenir les enveloppes des signaux utile et non utile (Figure IV-10). Le signal non utile (Figure IV-10b) représente plus de 50% du signal utile (Figure IV-10a). Habituellement en cytométrie en flux, la diaphonie est définie comme le pourcentage à enlever d'un canal sur un autre canal en raison du recouvrement des spectres de fluorescences. En utilisant une seule longueur d'onde d'excitation, la fluorescence de la microsphère rouge (Fluo_{RED}) dépendrait des détecteurs (respectivement S1 et S2) et du facteur de diaphonie ($\epsilon \sim 0,04$) (Equation IV-10). En utilisant ce nouveau traitement et filtrage électro-optique, cette diaphonie a été drastiquement diminuée.

Signaux extrait du signal S2

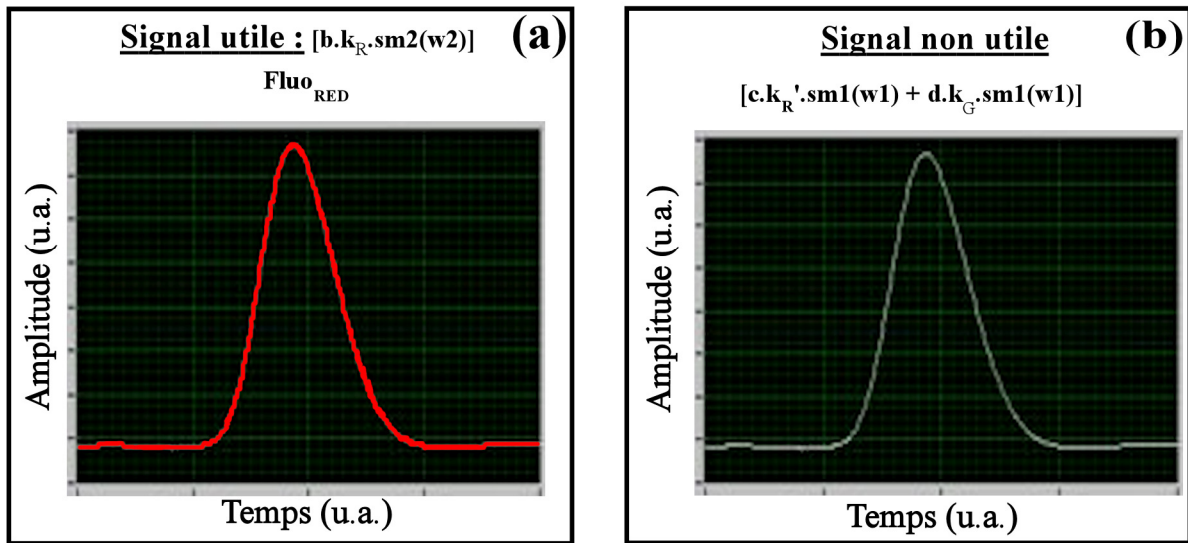


Figure IV-10 : Signaux de fluorescence provenant du canal 2 (signal S2). a) Signal optique utile correspondant au signal fluorescent des microsphères rouges ($Fluo_{RED}$) et b) signal non utile.

$$Fluo_{RED} = S2 - \varepsilon.S1 \quad (\text{Equation IV-10})$$

$Fluo_{RED}$: signal utile extrait du signal S2 correspondant à la fluorescence des billes rouges ;
 $S2$: signal détecté dans le canal 2 ; $S1$: signal détecté dans le canal 1 ; ε : facteur de diaphonie.

Il est important de noter que le traitement numérique des données est considérablement affecté par la différence de fréquence de modulation Δw choisie entre les deux longueurs d'onde lasers. En effet, il existe des interférences entre les deux signaux ayant des fréquences de modulation différentes. Une partie de la modulation d'amplitude principalement consacrée au premier rayonnement optique joue également un rôle sur le second. Pour montrer ce phénomène, nous illuminons seulement les microsphères fluorescentes vertes avec les deux radiations (491 nm et à 532 nm) modulées. D'après les équations précédentes, le signal modulé $sm2$ doit être égal à zéro. Malheureusement un signal significatif est détecté à la fréquence du signal $sm1$. Cette efficacité augmente à mesure que la différence de fréquences entre les deux modulations Δw diminue. Pour deux fréquences de modulation à 200 kHz et à 300 kHz ($\Delta w = 100\text{kHz}$) le signal parasite est estimé à près de 8% par rapport à la première modulation à 200 kHz (Figure IV-11a). Un signal parasite avec une amplitude de 20% (par rapport au signal réel) est alors observé pour les deux fréquences de modulation à 200 kHz et

250 kHz ($\Delta w = 50\text{kHz}$) (Figure IV-11b). Les enveloppes des signaux parasites sont présentées sur la Figure IV-11.

Cette diaphonie mesurée entre les deux signaux de fluorescence peut avoir plusieurs origines. La première concerne la réponse du modulateur aux excitations acoustiques. En effet, l'application simultanée de plusieurs signaux à des fréquences différentes peut engendrer une distorsion du réseau d'indice, ce qui implique une influence du signal 1 sur l'onde 2 et vice versa. La seconde concerne la réponse des éléments marqués c'est à dire le transfert d'énergie entre plusieurs fluorochromes excités par une onde laser. Il est à noter que dans notre cas cet effet n'est pas présent du fait de l'excitation d'un seul type de bille fluorescente.

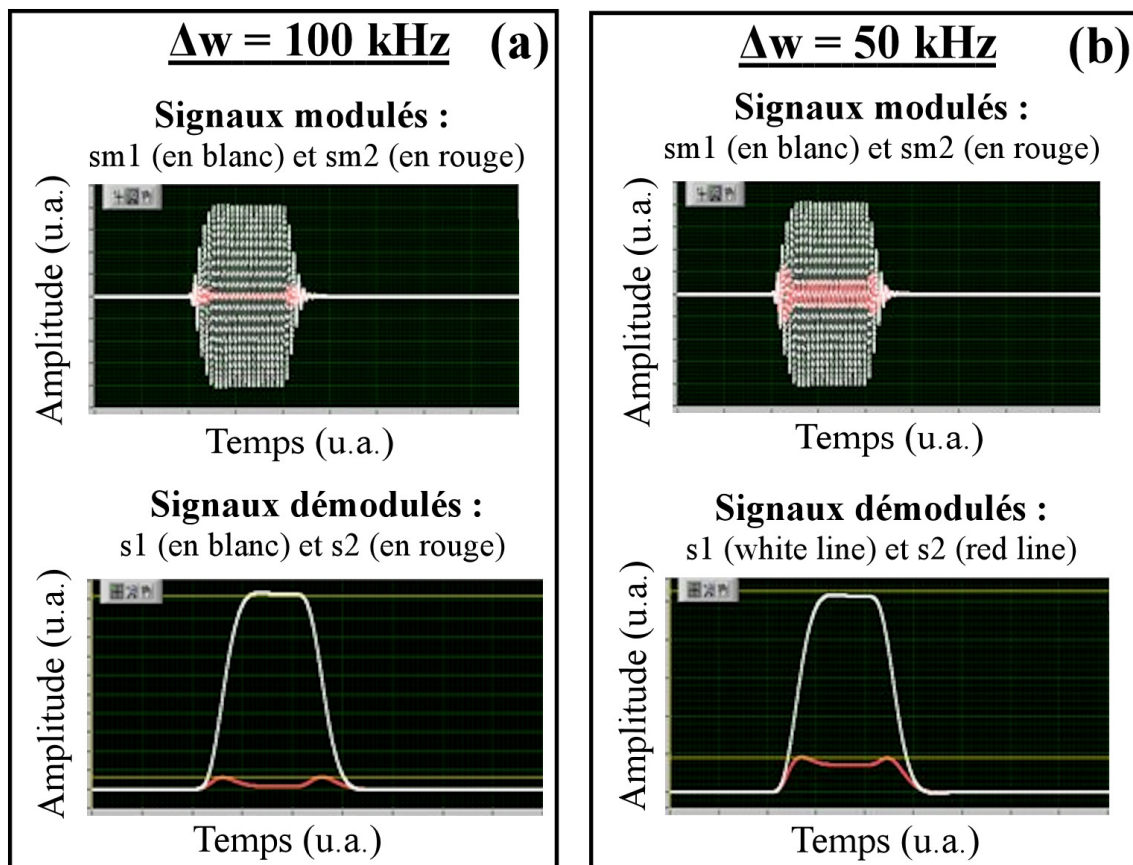


Figure IV-11 : Diaphonie des signaux $sm1$ et $sm2$ quand seulement les microsphères vertes sont excitées par les faisceaux lumineux à 491 nm et à 532 nm, pour une différence de fréquence de modulation différente. (a) $w1=200\text{kHz}$, $w2=300\text{kHz}$ d'où $\Delta w=100\text{kHz}$; (b) $w1=200\text{kHz}$, $w2=250\text{kHz}$ d'où $\Delta w=50\text{kHz}$.

IV.4. Conclusion

Nous avons démontré l'identification de deux types de microsphères fluorescentes en utilisant une source laser émettant deux radiations (491 nm et 532 nm). Les mesures sont réalisées avec un analyseur d'hématologie spécifique basé sur des principes microfluidiques. Le codage en amplitude et pour une fréquence de modulation donnée de chaque signal optique incident permet de discriminer les signaux de fluorescences provenant de différents types de microsphères malgré le recouvrement de leurs spectres de fluorescence. Le traitement numérique des signaux de fluorescence spatialement et spectralement superposés permet d'améliorer la précision des mesures. Cette nouvelle technique de codage spectral ouvre la voie à de nouveaux axes de recherche permettant d'améliorer la précision du diagnostic dans le domaine de l'hématologie.

Plusieurs améliorations peuvent néanmoins être apportées à ce concept de codage. La première concerne l'identification des mécanismes à l'origine des effets de diaphonie. La deuxième est la simplification du système de collection en réduisant les canaux de fluorescence. La troisième est l'utilisation de modulateurs différents tels que des cellules de Pockels ou des éléments électromécaniques de type MOEMS [IV-24]. Cette technique peut également être étendue au domaine temporel et aux sources à large bande spectrale comme les supercontinua [IV-25 - IV-27]. De manière complémentaire, cet effet de modulation pourrait également servir à déterminer le taux de transfert d'énergie entre deux fluorochromes.

Bibliographie

- IV-1. H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry Second Edition*, A. R. Liss, New York (1988).
- IV-2. F. E. Craig and K. A. Foon, “Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms”, *Blood* 111, 3941-3967 (2008).
- IV-3. J. L. Faucher, C. Lacronique-Gazaille, E. Frébet, F. Trimoreau, M. Donnard, D. Bordessoule, F. Lacombe and J. Feuillard, ““6 markers/5 colors” extended white blood cell differential by flow cytometry”, *Cytometry Part A*, 71A, 934-944 (2007).
- IV-4. C. Arnoulet, M. C. Béné, F. Durrieu, J. Feuillard, C. Fossat, B. Husson, H. Jouault, M. Maynadié and F. Lacombe, “Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL”, *Cytometry Part B*, 78, 4-10 (2010).
- IV-5. F. De Bisschop, J. Vierendeels and C. Langhe, “Electronic gate detection for cell or particle counting and sizing in liquids: Front-end characteristics, flow-dependent gate impedance, and its remediation”, *IEEE Transaction on Instrumentation and Measurement* (2006).
- IV-6. X. Ronot, D. Grunwald, J-F. Mayol and J. Boutonnat, *La cytométrie en flux*, Lavoisier, Edition Tec& Doc, Paris (2006).
- IV-7. H.C. van de Hulst, *Light scattering by a small particles*, Dover Publications Incorporation, New York (1981).
- IV-8. C. C. Steward and S. J. Steward, “Four color compensation”, *Cytometry Part B*, 38, 161-175 (1999).
- IV-9. M. Roederer, “Spectral compensation for flow cytometry: visualization artefacts, limitations and caveats”, *Cytometry Part A*, 45, 194-205 (2001).
- IV-10. G. Durack and J. Hatcher, “System and method for the measurement of multiple fluorescence emissions in a flow cytometry system”, Patent US 2008/0213915 A1 (2008).

- IV-11. K. Luong, P. Lundquist, R. Dalal, J. Lyle and S. Turner, "Methods and systems for analysis of fluorescent reactions with modulated excitation", Patent CA 2711560 A1 (2009).
- IV-12. D. Jameson, E. Gratton and R. Hall, "The measurement and analysis of heterogenous emissions by multifrequency phase and modulation fluorometry," *Applied Spectroscopy Reviews*, 20, 55-106 (1984).
- IV-13. G. Durack and J. Paul Robinson, *Emerging tools for single-cell analysis: advances in optical measurement Technologies*, Wiley-Liss., New York (2000).
- IV-14. N. Åslunda and K. Carlsson, "Confocal scanning microfluorometry of dual-labelled specimens using two excitation wavelengths and lock-in detection technique", *Micron*, 24, (1993).
- IV-15. S-W. Lina, C-H. Changa, D-Y. Wub and C-H. Linb, "Digitally synchronized LCD projector for multi-color fluorescence excitation in parallel capillary electrophoresis detection", *Biosensor and Bioelectronics*, 26(2), 717-722 (2010).
- IV-16. A. D. Donnenberg and V. S. Donnenberg, "Configuration of initial control parameters in photodetectors for multi-color flow cytometry", Patent US 2010/0256943 A1 (2010).
- IV-17. M. Dinkelmann and C. Rogers, "Expanding fluorescence detection options with the Accuri C6 flow cytometer system", *Nature Methods* (2010).
- IV-18. K. Mossberg and M. Ericsson, "Detection of doubly stained fluorescent specimens using confocal microscopy," *Journal of Microscopy*, 158, 215-224 (1990).
- IV-19. X. Wang and I. Kurtz, "H⁺/base transport in principal cells characterized by confocal fluorescence imaging", *American Journal of Physiology*, 259, C365-C373 (1990).
- IV-20. N. Aslund and K. Carlson, "Confocal scanning microfluorometry of dual-labelled specimens using two excitation wavelengths and lock-in detection technique", *Micron*, 24, 603-609 (1993).
- IV-21. R. Kapoor and M. Casstevens, "Evaluation of multicomponent mixtures using modulated light beam", Patent US 2007/0096039 A1 (2007).

- IV-22. P. Nérin and D. Lefevre, “Device and method for multiparametric analysis of microscopic elements”, Patent US 7,777,869 (2008).
- IV-23. F. De Bisshop, “Electronic gating for particle/cell counting and sizing, DSP-operated”, *IEEE Transactions Instrumentation and Measurement*, 58, 3159-3166 (2009).
- IV-24. D. Bouyge, C. Lesvignes-Buy, A. Crunteanu, V. Couderc, P. Leproux, P. Blondy and L. Lefort, “Discrete spectral selection and wavelength encoding from a visible continuum using optical MEMS”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(6) (2008).
- IV-25. A. Kudlinski, G. Bouwmans, O. Vanvincq, Y. Quiquempois, A. Le Rouge, L. Bigot, G. Mélin and A. Mussot, “White-light cw-pumped supercontinuum generation in highly GeO₂-doped-core photonic crystal fibers”, *Optics Letters*, 34, 3631-3633 (2009).
- IV-26. B. A. Cumberland, J.C. Travers, S. V. Popov and J. R. Taylor, “Toward visible cw-pumped supercontinua”, *Optics Letters*, 33, 2122-2124 (2008).
- IV-27. J. C. Travers, R. E. Kennedy, S. V. Popov, J. R. Taylor, H. Sabert and B. Mangan, “Extended continuous-wave supercontinuum generation in a low-water-loss holey fiber”, *Optics Letters*, 30, 1938-1940 (2005).

V. Analyse cellulaire multiparamétrique au sein d'un cytomètre en flux couplé à une source laser polychromatique

V.1. Introduction

Dans les dispositifs d'analyse cytologique, l'utilisation de lumière polychrome constitue un avantage important pour les mesures multiples de fluorescence. La plupart du temps, ces systèmes sont composés de plusieurs lasers monochromes, ce qui complexifie énormément le système (coût, encombrement, mise en œuvre,...). Il serait intéressant d'utiliser une seule source de lumière, par exemple des lampes incohérentes de type QTH (Quartz Tungstène Halogène). Malheureusement, la lumière polychrome issue d'une telle lampe présente de nombreux inconvénients pour les analyses biologiques. Tout d'abord, la faible cohérence spectrale et spatiale du rayonnement limite la luminance spectrale et donc la densité de puissance au point de mesure. De plus, l'augmentation de la puissance utile se fait alors au détriment de la durée de vie de la lampe. Dans les années 1990, des sources de lumière basées sur une décharge électrique dans un gaz (de type xénon ou mercure) ont été utilisées dans des systèmes de cytométrie en flux [V-1, V-2]. La brillance de la source peut alors être considérablement augmentée par rapport à une lampe QTH mais conserve néanmoins une forte incohérence spatiale et engendre des perturbations électromagnétiques. Leur grande fragilité mécanique et leur faible durée de vie (100h) ne permettent pas d'améliorer la fiabilité des appareils de mesure.

Par la suite, les systèmes de cytométrie en flux ont été munis de sources cohérentes impulsionnelles (5 – 20 kHz) telles que des lasers à vapeur de cuivre ou des lasers solides utilisant des diodes lasers à semi-conducteur [V-3 à V-5]. Ces systèmes ont permis d'obtenir des intensités d'illumination intenses et instantanées avec des puissances crêtes de plusieurs centaines de watts. L'accession à la mesure de la durée de vie de fluorescence des différents marqueurs a permis d'effectuer des mesures spécifiques [V-6]. Par contre, le caractère monochrome du rayonnement est fixé par le milieu amplificateur et reste, en général, non accordable en longueur d'onde ce qui limite les applications utilisant l'analyse de fluorescence multiparamétrique par exemple.

Actuellement, l'utilisation jusqu'à trois lasers monochromes au sein d'un cymomètre en flux permet de détecter une dizaine de signaux de fluorescences simultanément [V-7 à V-9]. Dans ces conditions, il est possible d'identifier la présence d'un grand nombre de sous-populations cellulaires sanguines. Malgré les récentes diversifications des longueurs d'onde des lasers

monochromatiques [V-10], l'absence d'accordabilité ne permet pas de contrôler parfaitement l'excitation lumineuse des fluorochromes. De plus, la multiplication des sources rend particulièrement complexe l'alignement du système optique et augmente les instabilités opto-mécaniques, ce qui diminue ainsi la précision des mesures. Bien sûr des systèmes ont été créés pour pallier ces inconvénients mais ils sont très complexes [V-11].

La solution qui paraît la plus prometteuse consiste à utiliser une source laser polychromatique émettant un faisceau temporellement et spatialement cohérent et possédant une puissance accordable pour chaque radiation. Les sources se rapprochant le plus de cette description sont les continua de lumière obtenus par propagation d'un faisceau de pompe dans un milieu non linéaire. Récemment, des tests avec des composants non biologiques dans un cytomètre en flux intégrant un supercontinuum de longueurs d'onde ont été effectués [V-12]. La source utilisée a une puissance moyenne élevée (5W) pour un spectre qui s'étend de 480 nm à plus de 700 nm mais avec une énergie limitée dans le domaine du visible. Les impulsions lumineuses n'étant pas synchronisées avec les éléments microscopiques voyageant au sein du flux, ce système manque de précision. La source de pompe utilisée est un laser à modes synchronisés délivrant des impulsions picosecondes à une fréquence de récurrence de plusieurs mégahertz. Le coût et la fragilité de cet appareillage sont élevés.

A partir de l'analyse de ces premières expériences, nous avons envisagé de créer un cytomètre en flux répondant mieux aux attentes des biologistes, en utilisant une source supercontinuum spécifique. Celle-ci ne fonctionne pas à partir d'un laser à forte cadence de récurrence mais utilise une technologie de déclenchement plus lente compatible avec la fréquence de passage des cellules au sein d'un cytomètre en flux. Les impulsions lumineuses possèdent alors suffisamment d'énergie par unité de longueur d'onde pour permettre l'excitation et l'identification d'un fluorochrome permettant la caractérisation d'un type cellulaire. Les spectres obtenus s'étalent de l'UV à l'infrarouge et peuvent être utilisés dans de nombreuses applications telles que : la tomographie cohérente [V-13], la spectroscopie [V-14], la microscopie [V-15]. Il est néanmoins important de noter que très peu d'industriels proposent actuellement des systèmes commerciaux incluant ce type de supercontinuum.

Notre travail de recherche lié au continuum de lumière a été principalement réalisé dans le cadre du projet Européen NextGenPCF FP6 (Next Generation Photonic Cristal Fiber) qui avait pour but de développer de nouvelles fibres optiques microstructurées en silice et de démontrer leur utilité dans de nouvelles applications. Le consortium de NextGenPCF

rassemblait dix-huit groupes de recherche industriels (DrakaComteq, France Télécom, Multitel, Altechna, Leukos, Horiba Medical ...), ainsi que plusieurs groupes de recherche académiques (Université de Limoges (XLIM), Université de Lille (PhLAM), University of Bath, Université de Jena ...). Ces partenaires sont issus de différents corps de métiers qui vont des fabricants de matières premières (silice) aux utilisateurs finaux. Ce projet vise à être l'initiateur de dispositifs dans trois domaines différents : le biomédical, les télécommunications et les capteurs pour l'environnement. Une large partie du projet a été consacrée à l'identification de sous populations cellulaires sanguines à l'aide d'un cytomètre en flux. Les sociétés Leukos, Drakacomteq, Multitel, Altechna et le laboratoire XLIM, ont participé à la conception des sources de lumière spécifiques tandis que HORIBA Medical avait en charge les tests et l'adaptation de ces sources sur les systèmes de diagnostic. Nous nous sommes particulièrement investis dans cette tâche et nous avons travaillé en collaboration avec les différents partenaires afin d'obtenir des résultats qui sont présentés dans ce chapitre. Ils concernent le test des sources à large bande spectrale ainsi que leur intégration au sein d'analyseurs cellulaires. Des mesures de diffraction et de fluorescence ont permis de montrer la faisabilité de l'utilisation d'une source supercontinuum dans un cytomètre en flux.

V.2. Technologie supercontinuum

L'une des caractéristiques les plus surprenantes de la matière réside dans sa capacité à modifier les longueurs d'onde d'un faisceau lumineux. Il est alors possible de mélanger, soustraire, additionner des photons afin d'obtenir des radiations électromagnétiques dans le domaine du visible dont on maîtrise la fréquence, la cohérence, la puissance ... Ces propriétés étonnantes ne peuvent apparaître qu'avec des ondes lumineuses de forte intensité et rentrent dans un domaine particulier de la photonique qui s'appelle l'optique non linéaire. Les premières expériences de ce type ont été réalisées par Franken au début des années 1960 [V-16], grâce à l'apparition de la technologie des lasers. Au delà des sources lasers émettant un rayonnement en régime continu, il est possible de concentrer la lumière sur des temps très courts allant de la femtoseconde à la milliseconde [V-17, V-18]. Il en résulte une puissance instantanée colossale permettant une exacerbation des effets non linéaires et en particulier de la conversion de fréquence.

Les premiers milieux non linéaires permettant une conversion de la longueur d'onde sont des cristaux dans lesquels l'onde optique se propage sans contrainte de guidage. Dans ces conditions, une densité de puissance forte peut être obtenue mais sur des distances courtes (quelques centimètres) ce qui limite l'efficacité de conversion. La propagation de la lumière en régime guidé (fibres optiques) permet d'augmenter considérablement la longueur d'interaction entre la lumière et la matière mais aussi d'obtenir un confinement extrême du champ électromagnétique. Le rendement de conversion de fréquence est alors exacerbé.

L'avènement des fibres à cristaux photoniques ou fibres microstructurées [V-19] au cours des années 1990 a suscité un intérêt très vif, en raison de leurs nouvelles propriétés :

- Confinement extrême du champ optique
- Possibilité d'adapter leur dispersion chromatique
- Possibilité de maîtriser une propagation unimodale transverse pour l'ensemble des longueurs d'onde

Les sources à spectre ultralarge ont alors connu une évolution sans précédent. Ces systèmes sont basés sur la propagation non linéaire d'impulsions visibles ou infrarouges possédant une forte puissance crête au sein d'un guide dont il est possible de contrôler les principales caractéristiques (diamètre de cœur, dispersion, vitesse de groupe, non-linéarité) [V-20 à V-22]. La combinaison de fibres optiques microstructurées (FCP) et de lasers de pompe miniatures impulsionnels (Figure V-1) permet de réaliser des systèmes très compacts générant un spectre de lumière continu très large. En particulier, un élargissement spectral homogène peut être réalisé en régime de dispersion normale ou anormale et en utilisant une ou plusieurs sources de pompe [V-23].

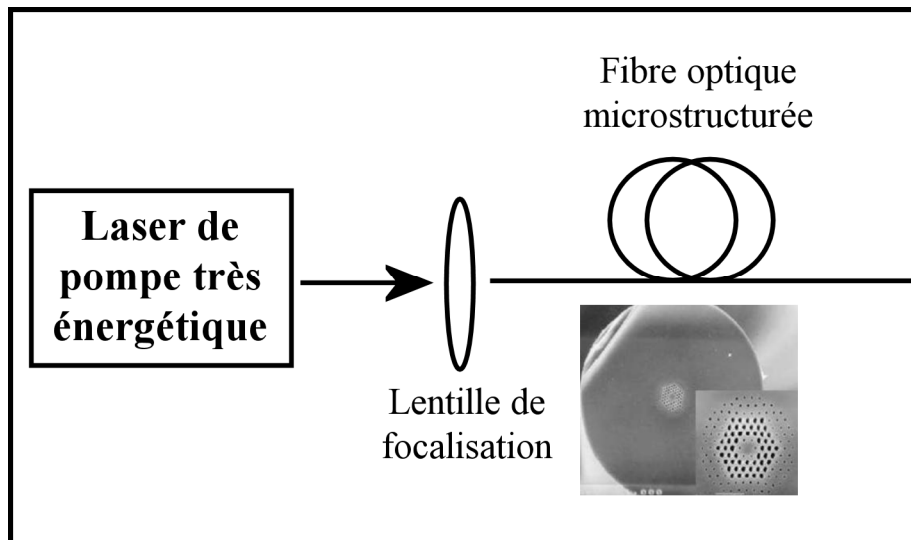


Figure V-1 : Représentation schématique de la constitution d'une source de lumière large bande de type supercontinuum.

Pour obtenir un élargissement spectral large bande, les premiers lasers utilisés avec les fibres optiques microstructurées étaient les lasers femtosecondes [V-24 à V-27]. Le décalage de la longueur d'onde de dispersion nulle de la fibre près de la longueur d'onde de pompe permet de conserver une impulsion courte et ainsi d'obtenir des conversions efficaces sur une longueur de fibre de plusieurs dizaines de centimètres. L'utilisation d'impulsions plus longues (nanoseconde) améliore le recouvrement spectro-temporel entre les longueurs d'onde mais se traduit par une diminution du seuil de dommage de l'entrée de la fibre [V-23, V-26]. Néanmoins, ce régime de pompage peut être obtenu avec des lasers miniatures commandés ou non par une source externe de synchronisation ce qui constitue un avantage important dans beaucoup d'applications. Enfin, le régime de propagation « continu » peut également conduire à l'obtention d'un spectre large aussi bien dans le domaine infrarouge que visible. Il est à noter que ce genre de source nécessite l'utilisation de plusieurs watts de puissance de pompe et l'utilisation de fibres de plusieurs dizaines voir centaines de mètres avec des pertes par propagation faibles [V-28 à V-30].

V.2.1. Les fibres optiques non linéaires

V.2.1.1. Rappel sur les fibres optiques

La structure des fibres optiques est très simple, elle comporte un cylindre en silice dopé représentant le cœur de la fibre et une gaine possédant un indice de réfraction linéaire inférieur à celui du cœur. Une fibre classique monomode à 1064 nm a un cœur dont le diamètre est typiquement de quelques microns (par exemple 6 μm) avec un diamètre extérieur généralement proche de 125 μm (Figure V-2). La réflexion totale interne obtenue au passage cœur/gaine permet de guider la lumière à l'intérieur de la fibre et est décrite par les lois de Snell-Descartes. La relation liant les indices de réfraction des milieux, l'angle incident et l'angle réfracté est donnée ci-dessous (Equation V-1).

$$n_c \cdot \sin(i_c) = n_g \cdot \sin(i_g) \quad (\text{Equation V.1})$$

n_c et n_g correspondent respectivement aux indices de réfraction du cœur et de la gaine. i_c et i_g sont respectivement l'angle incident et l'angle réfracté du cœur et de la gaine.

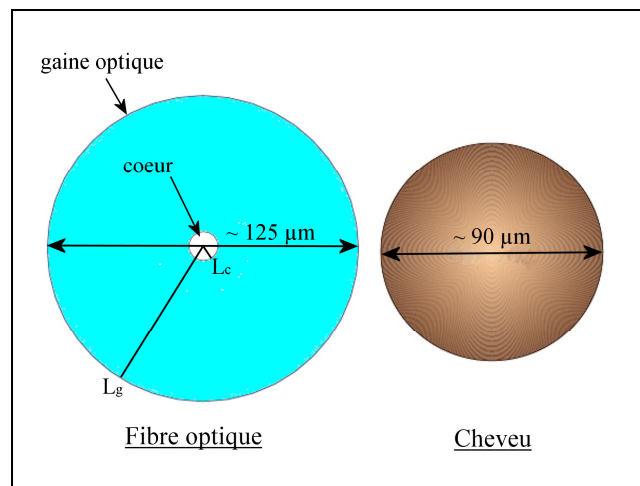


Figure V-2 : Schéma comparant une fibre optique et un cheveu humain. L_c et L_g sont respectivement les rayons du cœur et de la gaine de la fibre optique.

Pour obtenir un guidage de la lumière dans la fibre (Figure V-3), l'angle d'incidence de l'onde optique doit être compris dans l'ouverture numérique de la fibre (Equation V-2) qui est le sinus de l'angle d'entrée maximal (θ_{max}) de la lumière dans le guide.

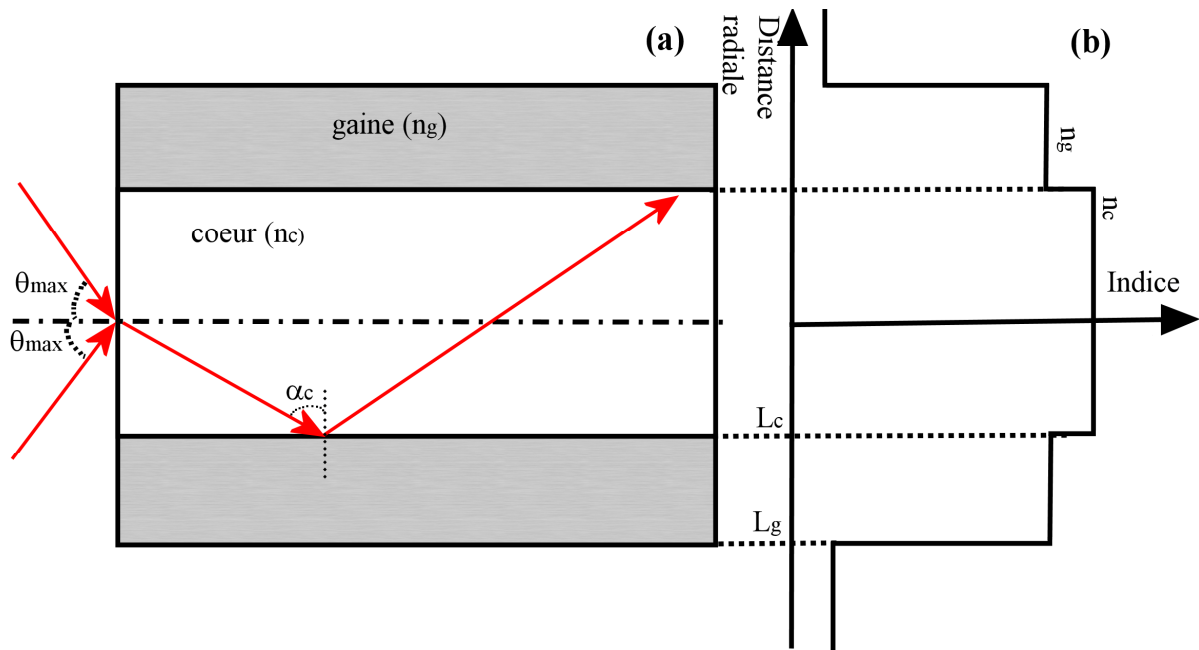


Figure V-3 : (a) Représentation schématique des rayons lumineux se propageant dans une fibre optique. α_c est l'angle critique. (b) Représentation schématique de l'indice de réfraction en fonction de la distance radiale d d'une fibre optique. n_c et n_g correspondent respectivement aux indices de réfraction du cœur et de la gaine. θ_{max} est l'angle d'entrée maximale de la fibre optique.

$$\sin \theta_{max} = \sqrt{n_c^2 - n_g^2} \quad (\text{Equation V-2})$$

➤ Fibres multimodes

Les premières fibres développées avaient la caractéristique de transporter plusieurs modes c'est-à-dire qu'elles possédaient plusieurs trajets possibles pour la propagation (Figure V-4). Ces différents modes de propagation s'accompagnent d'une différence de vitesse et induisent un étalement temporel du signal qui est proportionnel à la longueur de la fibre. Ces fibres possèdent un diamètre de cœur de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de micromètres et sont, en général, très peu utilisées pour obtenir des effets non linéaires.

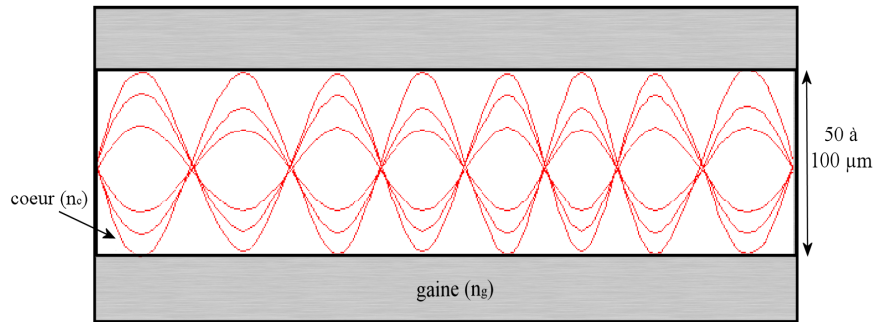


Figure V-4 : Représentation schématique d'une fibre multimode. L'indice du cœur (n_c) varie continument du centre à la périphérie.

➤ Fibres monomodes

Les fibres monomodes sont technologiquement plus avancées et possèdent des diamètres plus faibles. Leur cœur n'admet qu'un mode de propagation et ne possède donc pas de dispersion intermodale (Figure V-5). Il existe néanmoins une dispersion intramodale liée à la dépendance de la vitesse de la lumière en fonction de sa longueur d'onde. On parle alors de dispersion chromatique. Ces fibres monomodes sont caractérisées par un diamètre de cœur de quelques micromètres.

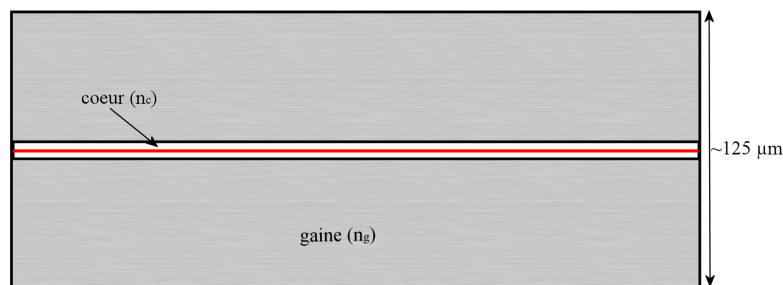


Figure V-5 : Représentation schématique d'une fibre monomode. L'onde électromagnétique se propage rectilignement dans le cœur de la fibre optique (en rouge).

Pour ces fibres, il est important de tenir compte de l'atténuation, de la dispersion chromatique, de la longueur d'onde de coupure et du coefficient non linéaire.

- L'atténuation : α

Cet effet correspond à la perte de puissance du signal optique lors de sa propagation dans le guide. Il est calculé à partir du rapport entre la puissance injectée P_i et la puissance en sortie

P_s . En général, le coefficient d'atténuation linéique α est exprimé en dB/km comme défini dans l'Equation V-3.

$$\alpha_{dB/km} = -\frac{10}{L} \log\left(\frac{P_s}{P_i}\right) = 4,343\alpha_{km^{-1}} \quad (\text{Equation V-3})$$

Les pertes linéiques α varient en fonction de la longueur d'onde à cause de l'absorption et de la diffusion Rayleigh.

- La dispersion chromatique : D_c

La dispersion chromatique représente la dépendance de l'indice de réfraction linéaire du milieu n en fonction de la longueur d'onde. Une impulsion optique se propageant dans une fibre optique subira un étalement temporel plus ou moins important en fonction de sa longueur d'onde centrale et de sa largeur spectrale.

La dispersion chromatique, D_c est exprimée en ps/(nm.km) et a comme expression :

$$D_c(\lambda) = -\frac{2\pi c}{\lambda^2} \beta_2(\lambda) \quad \text{avec} \quad \beta_2(\lambda) = \frac{\lambda^2 d_{neff}^2}{2\pi c^2 d\lambda^2} \quad (\text{Equation V-4})$$

$\beta_2(\lambda)$ représente la dispersion de vitesse de groupe (GVD), c la vitesse de la lumière et n_{eff} l'indice effectif du mode propagé à la longueur d'onde considérée λ .

Si la valeur D_c est négative, le régime de dispersion est dit normal ; les hautes longueurs d'onde voyagent alors plus vite que les basses longueurs d'onde.

- La longueur d'onde de coupure : λ_c

La longueur d'onde de coupure λ_c représente la longueur d'onde la plus élevée permettant à un mode de se propager. Au-dessus de cette valeur, le mode ne peut pas se propager sans subir des pertes importantes.

- Le coefficient non linéaire : γ

Ce coefficient représente la capacité du guide à induire une réponse non linéaire sur l'onde électromagnétique se propageant dans celui-ci. Ce coefficient est calculé avec la formule de l'Equation V-5.

$$\gamma = \frac{2\pi n_2}{\lambda A_{\text{eff}}} \quad \text{en } m^{-1} \cdot W^{-1} \quad (\text{Equation V-5})$$

n_2 correspond à l'indice de réfraction non linéaire du matériau ($\sim 2,6 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2/\text{W}$ pour la silice pure). A_{eff} est l'aire effective du mode se propageant dans le guide.

V.2.1.2. Les fibres microstructurées à cristal photonique

Les fibres à cristal photonique (FCP) ne diffèrent en rien des fibres classiques à première vue. Cependant, l'étude au microscope de la section d'une FCP permet d'observer une structure particulière (Figure V-6). En effet, les fibres sont construites à partir de petits cylindres d'air disposés périodiquement autour du cœur et qui s'apparentent à la structure d'un cristal photonique. L'arrangement et la taille des cylindres sont minutieusement calculés pour imposer une propagation particulière à la lumière et pour permettre de fixer les paramètres de dispersion, de pertes et de population modale.

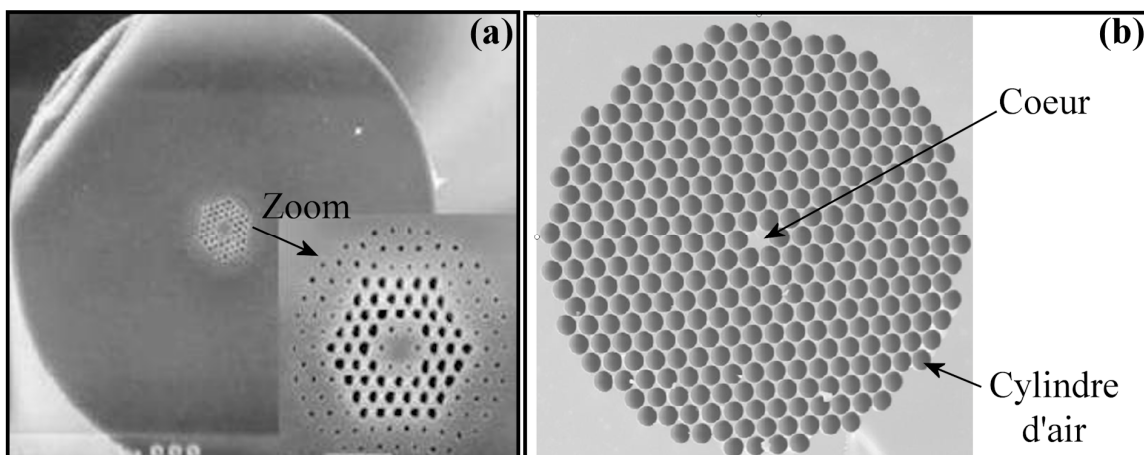


Figure V-6 : Photo de fibres microstructurées (FCP) avec un cœur en silice. (a) Profil global de la fibre et zoom de la partie centrale. (b) Partie centrale de la fibre avec un autre type d'arrangement des cylindres d'air autour du cœur.

➤ Fabrication des fibres à cristal photonique

Plusieurs étapes sont nécessaires pour fabriquer les fibres à cristal photonique. Dans un premier temps, des tubes en verre, achetés dans le commerce, sont étirés sous forme de capillaires possédant des diamètres extérieur et intérieur précis. Pour cela, les tubes choisis sont progressivement introduits au sein du four de la tour de fibrage. Chauffé à 1800°C , le verre à base de silice devient pâteux et s'étire sous l'effet de la gravité tout en gardant un

profil identique à celui d'origine mais diminué d'un rapport homothétique fixé par la vitesse de défilement dans le four (Figure V-7a). Dans un second temps, les capillaires sont positionnés autour d'un tube à cœur plein pour obtenir une préforme reproduisant le profil de la fibre à réaliser (Figure V-7b). Enfin, un tube de maintien est placé autour de la préforme. L'ensemble est étiré pour obtenir une canne de verre similaire au dessin final du guide (Figure V-7c). Une dernière étape d'étirement permet d'obtenir la fibre après manchonnage dans un tube de verre (Figure V-7d).

Il est à noter que les capillaires peuvent avoir des formes, des tailles et des constitutions différentes pour obtenir un profil d'indice transverse particulier. Les paramètres de température et de vitesse de descente dans le four sont particulièrement bien maîtrisés pour obtenir un guide homogène sur sa longueur. La pression entre et dans les capillaires est également un paramètre bien contrôlé qui influe de manière forte sur le résultat final. Une gaine en polymère est ajoutée afin d'obtenir les propriétés mécaniques souhaitées (souplesse).

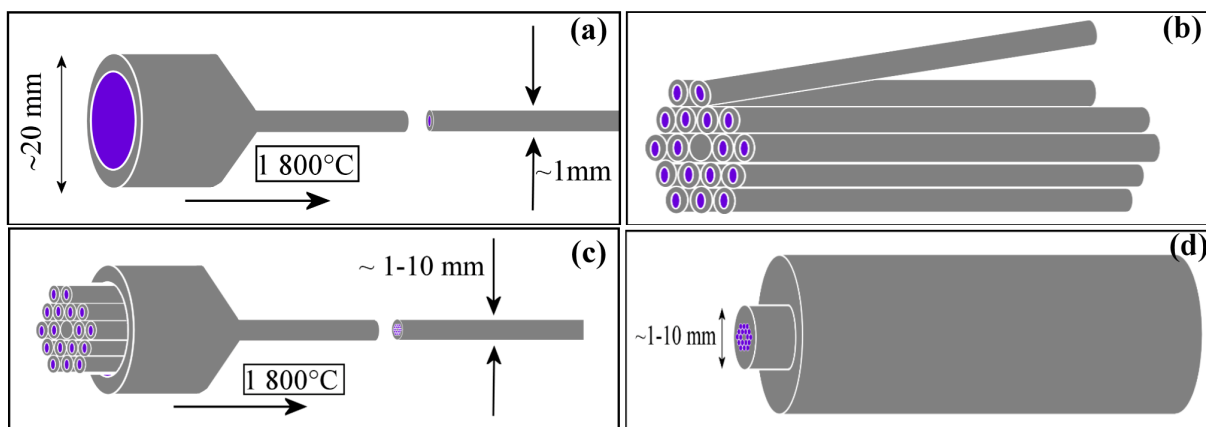


Figure V-7 : Etapes de fabrication de la fibre FCP. (a) Fabrication des capillaires ; (b) assemblage des capillaires et du cœur : la préforme ; (c) insertion dans un tube de maintien et réduction de l'ensemble ; (d) manchonnage dans un tube à bord épais avant la dernière étape de fibrage.

➤ Propagation de la lumière

Les fibres à cristal photonique sont constituées d'un cœur où se propage la lumière et d'une gaine diélectrique périodiquement structurée (appelé aussi cristal photonique) pouvant modifier la propagation des ondes électromagnétiques. Deux principes de guidage sont identifiés dans ce type de structure. Le premier est similaire à celui des fibres standard c'est à dire une réflexion totale interne à la jonction cœur-gaine induite par une différence d'indice.

Le second repose sur une bande interdite photonique c'est-à-dire une impossibilité de la lumière à se propager dans la gaine structurée du fait d'interférences multiples destructrices. Dans ce cas l'indice de cœur peut être inférieur à l'indice de la gaine.

V.2.1.3. Différents types de fibres à cristal photonique

Il existe différents types de fibres microstructurées dont le profil transverse varie en fonction des applications visées. Dans le cadre du projet NextGenPCF auquel nous avons participé, des fibres FCP ont été développées pour les secteurs des télécommunications, des capteurs et de la santé. Les buts principaux liés aux télécommunications étaient la simplification des installations à fibres optiques, une diminution des coûts de fabrication des fibres, et le développement d'amplificateurs optiques Raman. La détection de gaz tels que le méthane était une problématique orientée vers les capteurs. La partie biomédicale contenait deux volets, les lasers Raman pour la thérapie photodynamique et les sources à large bande spectrale pour la cytométrie (partie qui nous concerne).

La Figure V-8 présente plusieurs types de fibres microstructurées. La première (Figure V-8a) possède un cœur de faible dimension entouré d'une grande quantité d'air. Ce guide permet de guider la lumière en régime fortement non linéaire et possède une longueur d'onde de dispersion nulle fortement décalée vers le spectre visible. La seconde fibre (Figure V-8b) est constituée d'un cœur plus large mais très dissymétrique ce qui permet d'obtenir un maintien de la polarisation de l'onde se propageant en son centre. Enfin, la fibre de la Figure V-8c possède un cœur creux de large diamètre et permet par exemple de guider une onde électromagnétique monochromatique de très forte puissance sans effet non linéaire et sans pertes excessives.

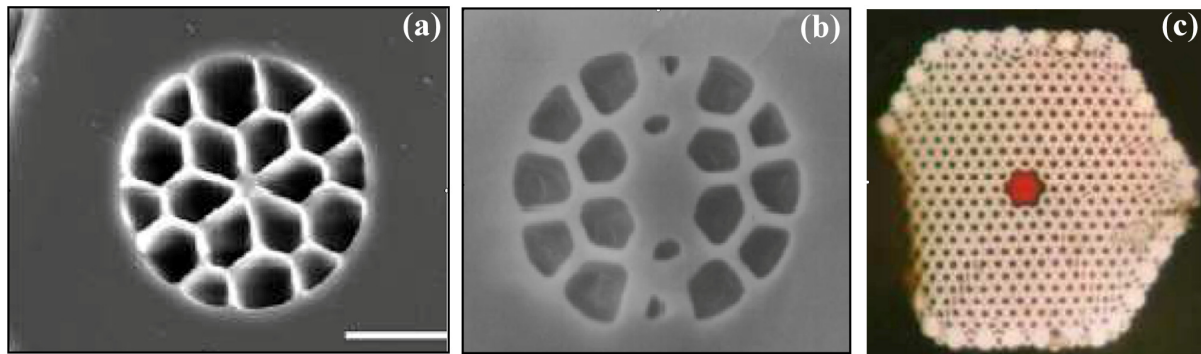


Figure V-8 : (a) Fibres microstructurées non linéaires avec contrôle de la dispersion, (b) fibre dissymétrique à contrôle de polarisation, (c) fibre à cœur creux à très faible coefficient non linéaire.

V.2.1.4. Fibres microstructurées hautement non linéaires

Les fibres microstructurées hautement non-linéaires sont créées pour obtenir des supercontinua d'énergie, sources lumineuses que nous utilisons dans les expériences de ce chapitre. Pour une puissance donnée, le confinement du champ électromagnétique est bien plus important que dans les fibres classiques, ce qui diminue le seuil d'apparition des effets non linéaires à la base des conversions de fréquence. La surface effective du cœur est très faible ($1-10\mu\text{m}^2$) et possède un dopage particulier afin d'augmenter le coefficient non linéaire de la fibre (Figure V-9). La disposition du cristal photonique autour du cœur permet de garantir un guidage monomode transverse et de contrôler le profil de la courbe de dispersion de la fibre (Figure V-10). Le paramètre de dispersion est particulièrement important car il conditionne l'existence de certains effets non linéaires comme les mélanges paramétriques et les solitons (ondes optiques de courte durée et de forte puissance crête se propageant sans déformation).

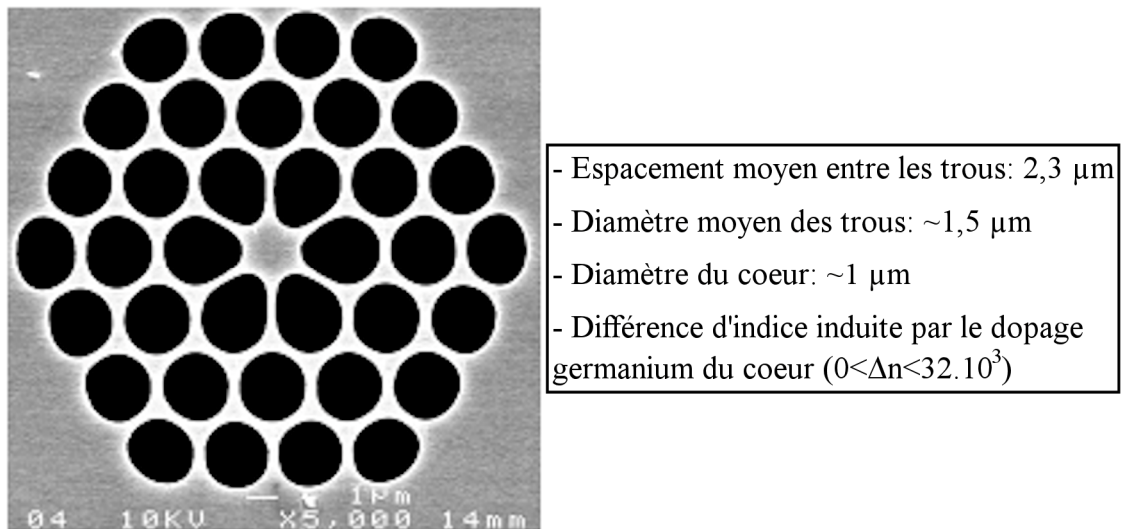


Figure V-9 : Profil d'une fibre microstructurée hautement non linéaire.

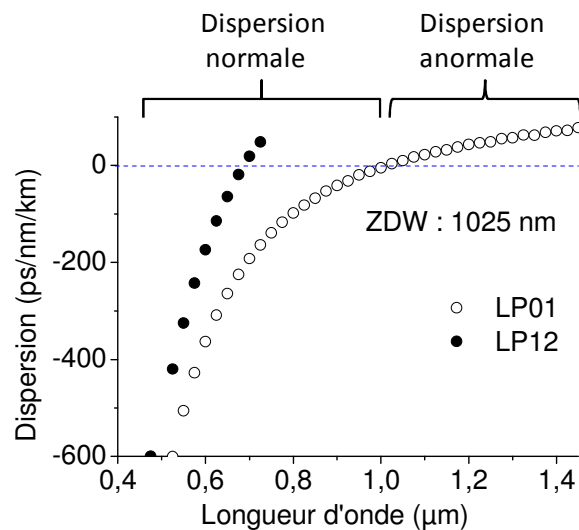


Figure V-10 : Profil des courbes de dispersion pour les modes LP01 et LP12 de la fibre microstructurée montrée sur la Figure V-9. Longueur d'onde de dispersion nulle pour le mode LP01: 1025 nm.

Par nature, la silice est un matériau très faiblement non linéaire. Cependant compte tenu du faible diamètre de cœur des fibres et des fortes puissances optiques mises en jeu, le confinement de l'énergie crée des densités locales d'énergie qui provoquent des interactions non linéaires entre la lumière et le matériau constituant le cœur de la fibre. La plupart de ces non-linéarités sont liées à l'effet Kerr optique, c'est-à-dire à la variation de l'indice de réfraction du cœur de la fibre en fonction de la puissance instantanée de l'onde lumineuse incidente (Equation V-6).

$$n(\omega, P) = n_0(\omega) + n_2 \frac{P}{A_{\text{eff}}} \quad (\text{Equation V-6})$$

n_2 est la constante de Kerr ($\text{m}^2 \cdot \text{W}^{-1}$), P correspond à la puissance optique qui traverse une section droite de fibre (W) et A_{eff} est la surface effective de mode (μm^2).

Nous décrivons ci-dessous les principaux effets non linéaires mis en jeux lors des élargissements spectraux.

➤ L'automodulation de phase

La propagation d'une onde optique de forte puissance dans un milieu non linéaire (ici une fibre optique) induit une modification instantanée de l'indice de réfraction du milieu. Ce phénomène est appelé effet Kerr optique. L'indice de réfraction est alors dépendant de l'intensité du champ optique et se décompose en deux termes [V-31] (Equation V-7).

$$n(\omega, t) = n_L(\omega) + n_2 \cdot I(t) \quad (\text{Equation V-7})$$

n_L correspond à l'indice linéaire, I à l'intensité du champ et n_2 à l'indice non linéaire du milieu.

La variation de l'indice de réfraction entraîne un déphasage auto-induit appelé automodulation de phase ce qui se traduit dans l'espace des longueurs d'onde par un élargissement spectral (Figure V-11).

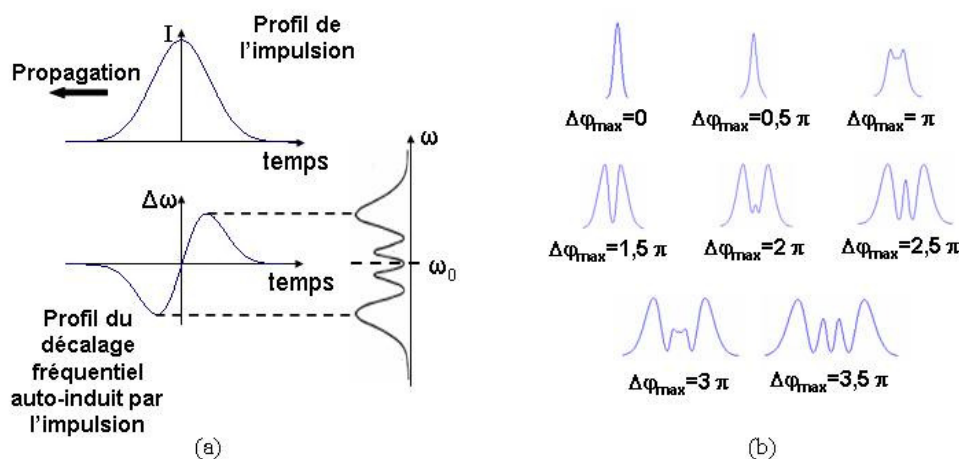


Figure V-11 : (a) Exemple d'automodulation de phase à partir d'une impulsion gaussienne ; (b) modification du spectre de l'impulsion.

➤ **La modulation de phase croisée**

La modulation de phase croisée (XPM pour « Cross Phase Modulation ») est également liée à l'effet Kerr et se traduit par une modulation de phase d'un faisceau sous l'action de l'intensité d'un autre faisceau et cela par l'intermédiaire du milieu non linéaire.

➤ **Les effets solitoniques**

En 1834 Russel a mis en évidence, pour la première fois, un effet de type solitons qui se traduit par la propagation sans déformation d'une impulsion dans un milieu dispersif et non linéaire. En 1973, Hasegawa *et al.* [V-32] furent les premiers à émettre l'idée de propagation d'un soliton dans une fibre optique par compensation mutuelle de l'effet de dispersion et de l'effet non linéaire d'automodulation de phase. Le régime solitonique ne peut avoir lieu que dans le domaine de dispersion anormale.

Les solitons, de durée inférieure à 100 fs, se propageant dans une fibre optique en silice, possèdent une largeur spectrale supérieure au décalage Raman induit par le matériau. Il en résulte un recouvrement entre le spectre de l'impulsion et le gain Raman qu'elle génère. On observe alors une amplification des hautes longueurs d'onde constituant le soliton. Un décalage spectral du centre de l'impulsion vers les hautes longueurs d'onde est alors observé (Figure V-12). On parle alors d'autodécalage soliton (soliton self frequency shift en anglais (SSFS)) [V-33 à V-35].

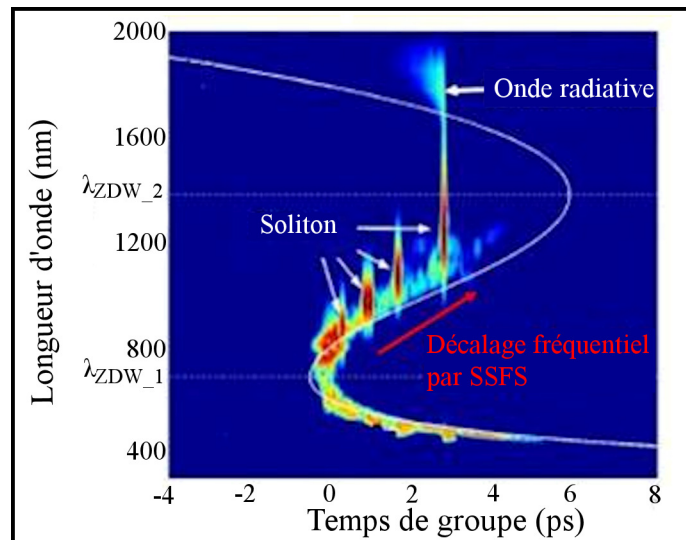


Figure V-12 [V-35] : Exemple d'autodécalage des solitons - Evolution du spectre en fonction du temps de groupe en régime femtoseconde.

➤ Effets paramétriques de type mélange à quatre ondes

L'effet de mélange à quatre ondes (FWM pour « Four-Wave-Mixing ») est elle aussi une résultante de l'effet Kerr. Ce phénomène est régi par deux règles fondamentales : la conservation de l'énergie et l'accord de phase entre les ondes. Ce phénomène représente la capacité à mélanger deux photons de pompe pour en créer deux autres à des longueurs d'ondes différentes :

$$\text{Conservation de l'énergie : } \omega_1 + \omega_2 = \omega_3 + \omega_4 \quad (\text{Equation V-8})$$

$$\text{Accord de phase } \Delta k = k_3 + k_4 - k_1 - k_2 = 0 \quad (\text{Equation V-9})$$

$$\text{Avec } k_i = \frac{n_i \omega_i}{c}, n_i \text{ étant l'indice de réfraction de la silice à la fréquence } \omega_i.$$

Les ondes à ω_3 et ω_4 ($> \omega_3$) sont respectivement nommées ondes « Stokes » et « anti-Stokes » tandis que les ondes ω_1 et ω_2 sont nommées ondes de pompe.

➤ Génération d'ondes dispersives

La génération d'ondes dispersives est un processus de conversion de fréquences utilisant le passage d'un soliton d'ordre élevé à un groupe de solitons fondamentaux. La perte d'énergie liée à ce processus est restituée par la création d'une onde se propageant dans le régime de

dispersion opposé (régime normal) à celui du soliton (régime anormal) (Figure V-13). Ce processus nécessite un accord des vitesses de phase entre les deux ondes et un recouvrement partiel entre le spectre du soliton et celui de l'onde dispersive [V-36].

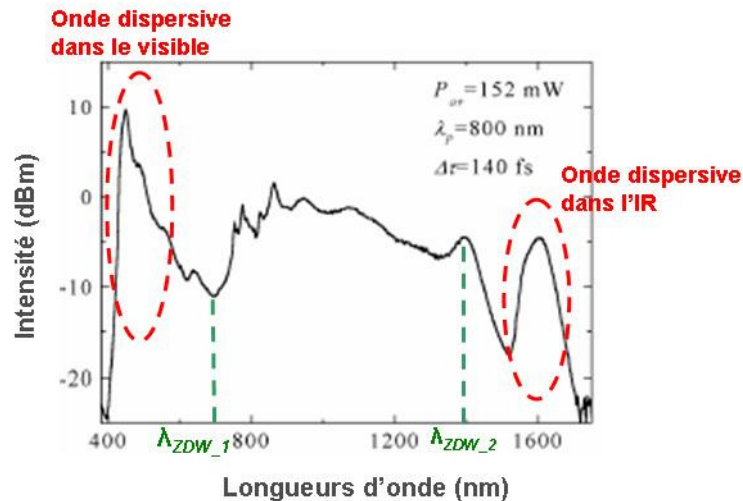


Figure V-13 [V-35] : Exemple de génération d'ondes dispersives dans le visible et l'infrarouge.

V.2.2. Les sources de pompe et les supercontinua utilisés

A partir des fibres optiques microstructurées réalisées dans le programme NextGenPCF et en utilisant les effets non linéaires précédemment décrits, il est possible d'obtenir, un faisceau spatialement cohérent supportant un grand nombre de longueurs d'onde. Pour cela on utilise une source d'énergie émettant des impulsions de forte puissance dont la durée est comprise entre quelques dizaines de picosecondes et quelques nanosecondes. Nous avons donc caractérisé plusieurs sources à large bande spectrale utilisant différentes technologies lasers. Les fibres microstructurées des trois premières sources de supercontinuum (Multitel, Altechna et TeemSi) sont identiques et sont en pure silice. La dernière source (TeemGe) a été mise en œuvre avec une fibre microstructurée au germanium à partir du même laser de pompe utilisé dans la source TeemSi.

➤ Source Multitel à base de diode laser amplifiée

La première source de pompe a été développée par la société Multitel. Elle est basée sur l'amplification d'une diode à semi-conducteur émettant un rayonnement autour de 1060 nm (Figure V-14). L'amplificateur utilise une fibre optique monomode dopée ytterbium [V-37]. L'avantage de ce type de source réside dans la possibilité de contrôler la fréquence de récurrence de la source ainsi que sa durée d'impulsion. Le supercontinuum obtenu en combinant cette source de pompe avec une fibre microstructurée non linéaire spécifique est représenté sur la Figure V-15. Son spectre s'étend de 350 nm à 1750 nm (Figure V-16a), et une photo de la fibre microstructurée est montrée sur la Figure V-16b. La puissance moyenne du supercontinuum est de 525 mW, la fréquence de répétition des signaux optiques est fixe (500kHz) et la durée des impulsions est de 500 ps.

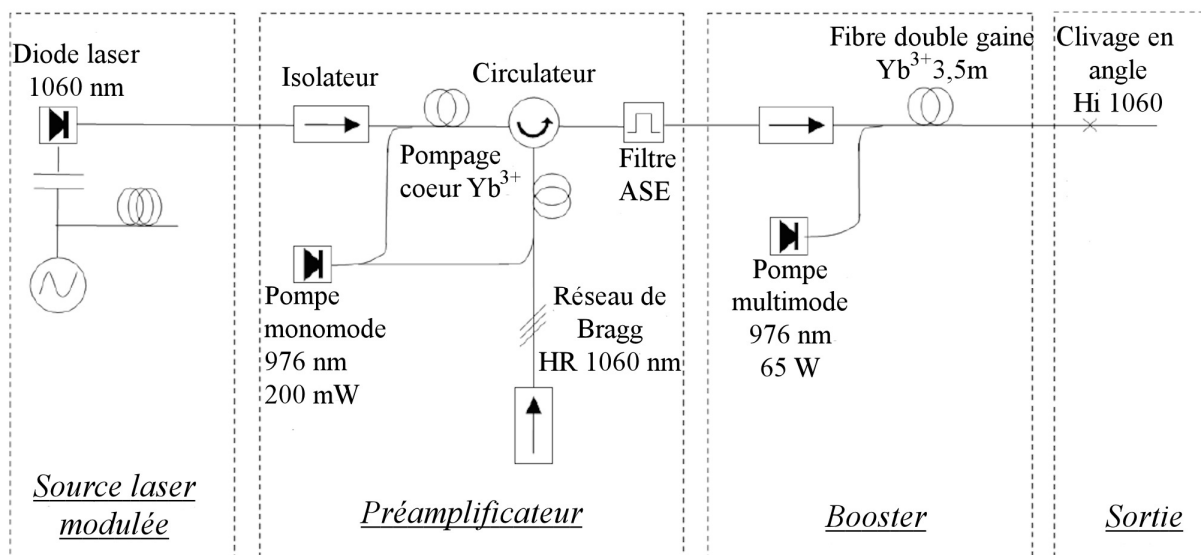


Figure V-14 [V-37] : Schéma du laser de pompe à base de diode laser amplifiée. Source de pompe de la société Multitel.



Figure V-15 : Photo du supercontinuum Multitel. Source réalisée par XLIM et Leukos.

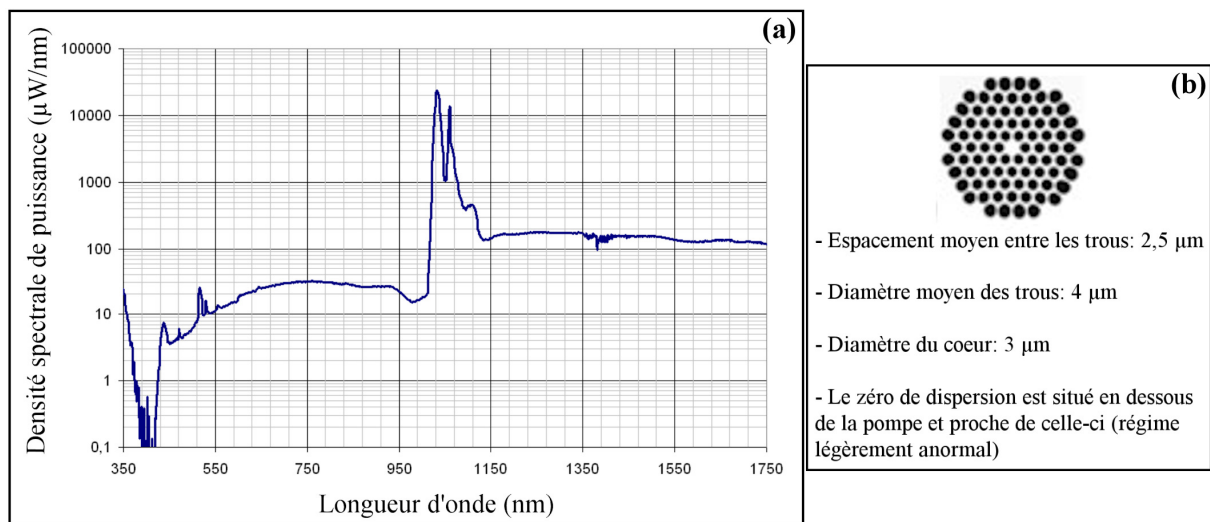


Figure V-16 : (a) Spectre du supercontinuum composé d'un laser de pompe à base de diode laser amplifiée. Mesures réalisées à une fréquence de 500 kHz. (b) photo et caractéristiques de la fibre. Mesures effectuées par XLIM et Leukos.

Ce profil de supercontinuum est un profil assez typique dans lequel chaque effet non linéaire contribue à convertir une partie de l'onde de pompe à 1060 nm. Dans l'infrarouge, après l'automodulation de phase et les instabilités de modulation (mélange à quatre ondes), un régime de propagation solitonique se met en place et convertit l'onde initiale en de multiples radiations infrarouges (1000 nm à 2100 nm). Les longueurs d'onde visibles sont alors créées par des mélanges paramétriques soumis à un accord de phase particulier (mélange à quatre ondes et ondes dispersives). Le pic résiduel d'ASE (émission spontanée amplifiée) à 1030 nm n'a pas pu être filtré totalement par le filtre en sortie du préamplificateur.

➤ Source Altechna à base de microlaser

La source de pompe de la société Altechna est un laser solide de type microlaser (Figure V-17). Il est pompé par une diode laser infrarouge (940 nm). L'absorbant saturable permet une modulation des pertes de la cavité ce qui garantit un fonctionnement en régime déclenché. Ces sources lumineuses sont très compactes et permettent d'obtenir des impulsions subnanosecondes entre quelques kilohertz et une centaine de kilohertz à une longueur d'onde de 1030 nm. Les puissances crêtes accessibles sont de l'ordre de quelques kilowatts. L'utilisation de ce type de source permet d'élargir le spectre tout en minimisant l'impact de la différence de vitesse de groupe entre les ondes. Une photo de la source supercontinuum est visualisable sur la Figure V-18. Nous obtenons alors un continuum homogène et plat entre 400 et 700 nm (Figure V-19). Le spectre lié à cette source se construit de manière identique au précédent c'est-à-dire avec des effets solitoniques dans l'infrarouge et des effets paramétriques dans le visible.

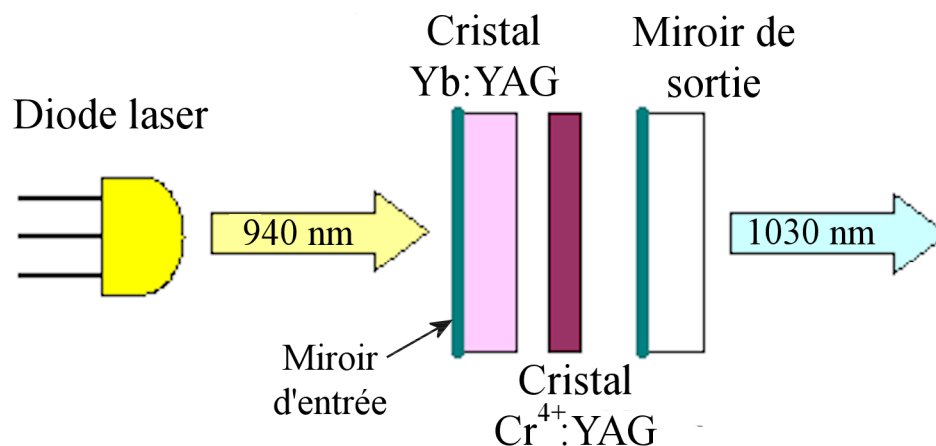


Figure V-17 : Schéma de la source laser à base de puce à semi-conducteur. Source de pompe de la société Altechna.



Figure V-18 : Photo de la source supercontinuum Altechna. Supercontinuum réalisé par XLIM et Leukos.

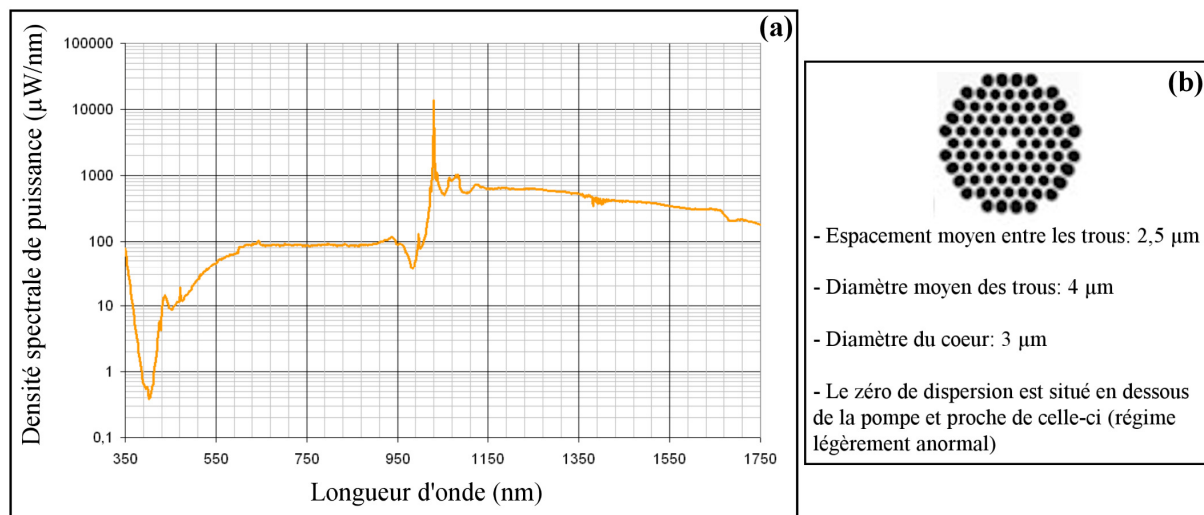


Figure V-19 : Spectre du supercontinuum ayant une source de pompe à base de puce à semi-conducteur. Mesures réalisées par XLIM et Leukos.

➤ Source Teem Photonics à base de microlaser

Les sources de pompe de la société Teem Photonics (Laser SxP infrarouge à 1064 nm, model STP-07E de chez Teem Photonics) sont réalisées sur le même modèle que les sources Altechna. Seul le milieu amplificateur est de nature différente. Teem Photonics utilise un cristal de YAG dopé néodyme au lieu d'un dopage ytterbium pour Altechna. Dans ces conditions, le faisceau de sortie possède des caractéristiques différentes : une longueur d'onde de 1064 nm au lieu de 1030 nm ; des impulsions plus courtes (450 ps au lieu de 2 ns) ainsi

qu'une fréquence de récurrence plus faible (maximum 2 kHz). Deux sources de supercontinuum à base de laser de pompe Teem Photonics ont été réalisées avec des fibres microstructurées différentes, l'une à base de silice non dopée et l'autre à partir d'un cœur de silice dopée au germanium.

- Source utilisant une fibre microstructurée à base de silice pure (source TeemSi)

Une photo de ce laser supercontinuum est visualisable sur la Figure V-20. Le spectre obtenu, avec une fibre microstructurée pure silice identique à celle utilisée pour les lasers décrits précédemment (Multitel et Altechna), est montré sur la Figure V-21b. Il possède une extension infrarouge similaire aux autres spectres (Figure V-21a). Par contre, la densité de puissance au niveau des longueurs d'onde bleues est plus importante. Cette différence est due à une augmentation de la puissance crête des impulsions et au décalage de la longueur d'onde de pompe vers l'infrarouge.

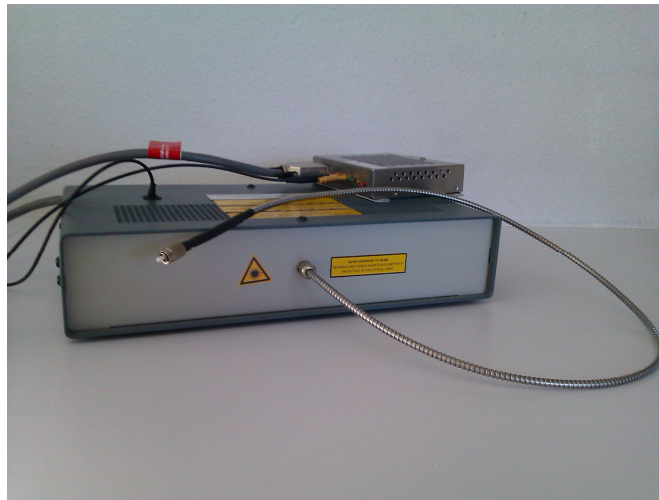


Figure V-20 : Photo de la source supercontinuum TeemSi. Source réalisée par XLIM et Leukos.

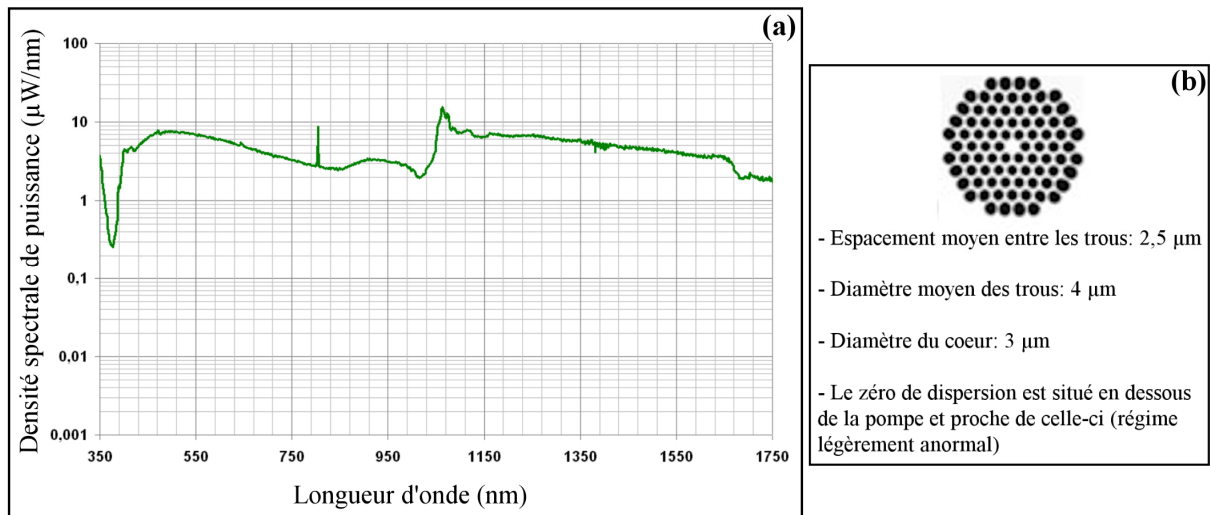


Figure V-21 : Spectre du laser de pompe Teem Photonics couplé avec une fibre microstructurée en silice pure. Mesures réalisées par XLIM et Leukos à une fréquence de répétition de 2kHz.

- Source utilisant une fibre microstructurée de silice dopée au germanium (source TeemGe)

Le supercontinuum de lumière est représenté sur la Figure V-22. La fibre microstructurée dopée au germanium possède une fenêtre de transparence décalée vers les hautes longueurs d'onde avec un pic d'absorption important vers 1400 nm à cause d'une contamination hydrique qui modifie les propriétés électroniques des fibres. Elle absorbe ainsi une partie du signal transmis autour des fréquences de résonance de la liaison OH. De plus les pertes de cette fibre sont plus importantes que celles de la fibre précédente ce qui diminue fortement la puissance moyenne du supercontinuum (Figure V-23).

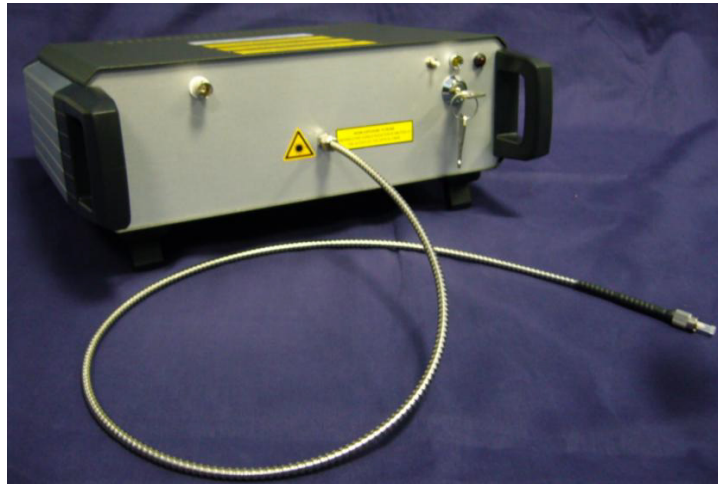


Figure V-22 : Photo de la source de supercontinuum TeemGe. Source réalisée par XLIM et Leukos.

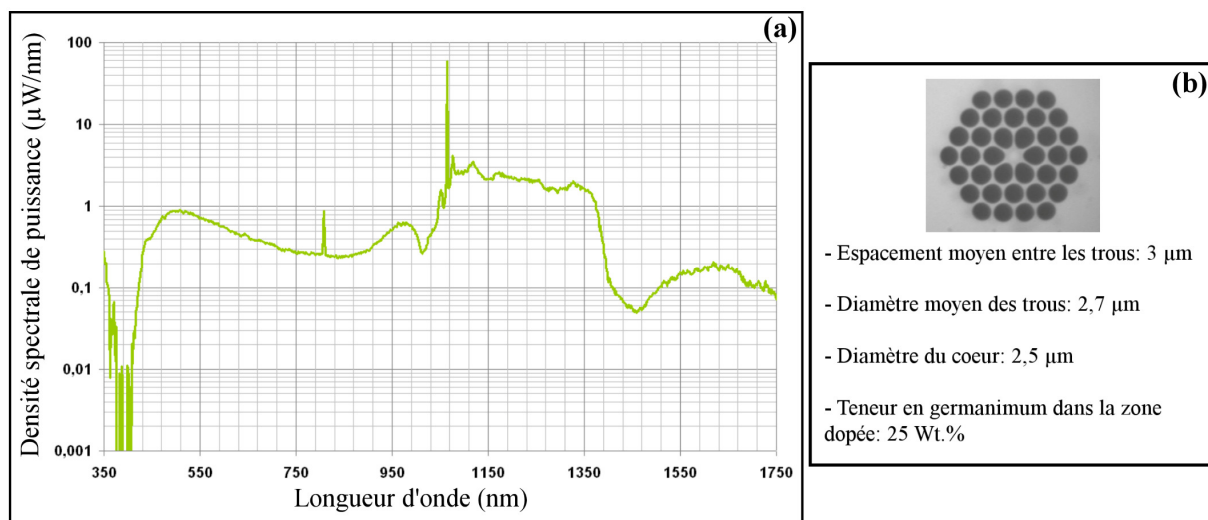


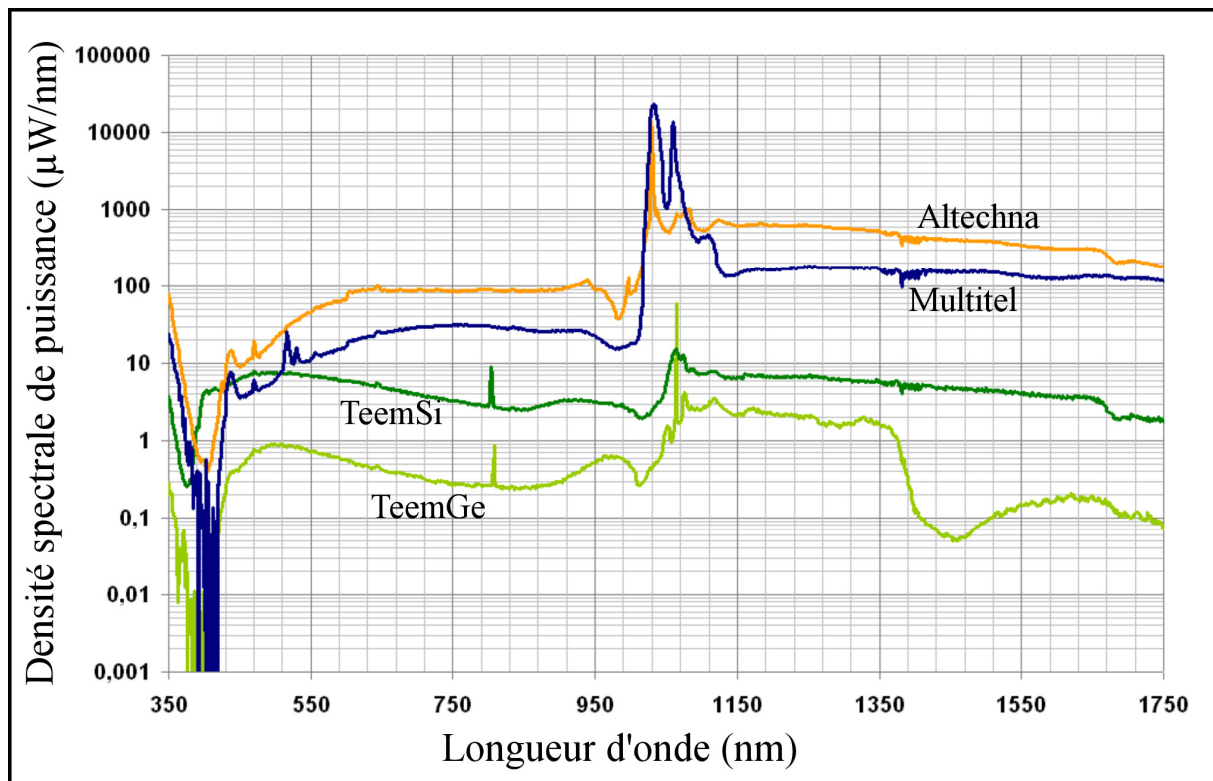
Figure V-23 : Spectre du laser de pompe Teem Photonics couplé avec une fibre microstructurée en germanium. Mesures effectuées par XLIM et Leukos à une fréquence de répétition de 2 kHz.

La densité spectrale d'énergie dans la zone infrarouge est beaucoup plus faible qu'avec une fibre pure silice, néanmoins la densité spectrale d'énergie obtenue dans la région visible reste exploitable pour nos applications de cytométrie.

➤ Résumé concernant les densités d'énergie des sources à large bande spectrale

Les mesures spectrales en fonction de la longueur d'onde réalisées par Leukos et XLIM (Figure V-24) nous ont permis de déterminer les puissances par unité de spectre. On présente

dans le Tableau V-25 un résumé des puissances utilisables et cela pour des largeurs spectrales ($\Delta\lambda$) variant de 50 nm à 1400 nm et centrées autour d'une longueur d'onde centrale (λ_c). La bande spectrale 482 \pm 18 nm correspond à un filtre bleu Semrock (FF01 482/35) que nous avons utilisé dans l'expérience décrite dans la partie V.3.3.3., tandis que la bande 625 \pm 275 nm est la bande de détection du photomultiplicateur (H9307-02 Hamamatsu) utilisé lors de nos expériences décrites dans les parties V.3.3.1. et V.3.3.2. La dernière colonne (1050 \pm 700) représente les mesures sur l'ensemble du spectre.



	Longueurs d'onde centrale +/- largeur spectrale/2 (nm)	475 +/- 25	525 +/- 25	575 +/- 25	625 +/- 25	482 +/- 18	625 +/- 275	1050 +/- 700
Laser Multitel à 500 kHz	Puissance (μ W)	236	589	679	1089	183	10054	525000
	Energie/impulsion (nJ)	0,5	1,2	1,4	2,2	0,4	20,1	1050
Laser Altechna à 100 kHz	Puissance (μ W)	688	1667	2825	4439	551	32356	425000
	Energie/impulsion (nJ)	6,9	16,7	28,3	44,4	5,5	323,6	4250
Laser TeemSi à 2 kHz	Puissance (μ W)	362	356	325	276	269	2464	6600
	Energie/impulsion (nJ)	181,2	178,1	162,3	138,2	134,5	1232,2	3300
Laser TeemGe à 2 kHz	Puissance (μ W)	36	41	33	24	29	220	1110
	Energie/impulsion (nJ)	18,1	20,3	16,3	12,2	14,4	110,0	555

Figure V-25 : Tableau récapitulatif des puissances et des énergies obtenues avec les différentes sources.

Après cette première évaluation des sources, il apparaît que les énergies obtenues par tous les lasers sont exploitables (en large bande ou filtrés). Néanmoins, les caractéristiques de gigue temporelle au déclenchement ainsi que la gigue d'amplitude doivent être mesurées avant d'envisager un test direct sur les cytomètres.

V.3. Les sources de lumières supercontinuum dédiées à la cytométrie en flux

V.3.1. Besoin de la cytométrie

Les sources de lumière utilisées dans le futur analyseur d'hématologie haut de gamme d'HORIBA Medical permettent d'obtenir une énergie d'environ 60 nanojoules dans la fenêtre de mesure optique. Cette énergie permet d'obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant au niveau des détecteurs. Dans ce système, la vitesse du fluide est de 10 m/s et la taille de la fenêtre optique dans le sens de propagation du flux est de 30 μ m.

Dans les systèmes décrits dans cette partie, nous avons souhaité augmenter la taille de la fenêtre de mesure optique et diminuer la vitesse du flux pour relâcher les contraintes sur la synchronisation des impulsions lasers avec le passage des cellules. La fenêtre d'analyse permettant d'illuminer les cellules qui se propagent à une vitesse proche de 5m/s, possède une largeur de l'ordre d'une centaine de micromètres (99 μ m et 140 μ m suivant les systèmes optiques utilisés). Le temps pendant lequel il est possible d'illuminer les cellules à caractériser

est alors proche de quelques dizaines de microsecondes (20 μs et 28 μs suivant les systèmes optiques utilisés). Dans ces conditions, deux manières d'illuminer les cellules sont possibles.

La première consiste à amener de l'énergie par un nombre important d'impulsions possédant une fréquence de récurrence élevée. Par exemple, un laser avec une fréquence de récurrence de 500 kHz n'aura pas moins d'une dizaine d'impulsions qui interagiront avec la cellule. L'énergie minimale utile par impulsion est donc de l'ordre de 6 nJ. Si la fréquence de répétition est de 100 kHz, le nombre d'impulsions sera de 2 ou 3 suivant la taille de la fenêtre de mesure (99 μm ou 140 μm) et l'énergie minimale utile par impulsion sera donc respectivement de 20 ou 30 nJ. Aucune synchronisation des cellules avec les impulsions n'est alors nécessaire.

La seconde consiste à illuminer la cellule avec une seule impulsion. Il est alors nécessaire d'apporter en une seule fois la totalité de l'énergie et surtout de synchroniser les impulsions avec le passage des cellules. Le temps d'apparition de la cellule étant de 20 μs pour une fenêtre optique mesurant 100 μm dans le sens de propagation du flux, une gigue temporelle de $\pm 3 \mu\text{s}$ nous semble tout à fait raisonnable pour réaliser nos premiers essais.

On peut également noter que la stabilité en amplitude tir à tir des impulsions lasers doit être inférieure à 15% pour que le rapport signal sur bruit des mesures soit assez élevé. Les longueurs d'onde concernées par le diagnostic cellulaire sont celles comprises entre 350 nm et 700 nm, soit la partie visible du continuum. Un résumé des valeurs visées pour la cytométrie est donné sur le Tableau V-26. Dans le Tableau V-27, nous avons aussi résumé les énergies par impulsion lumineuse et par cellule de chaque laser.

		Variation temporelle maximale (μ s)	Pourcentage de la variation de puissance (%)	Fréquence de répétition minimale (kHz)	Energie par cellule sur tout le spectre (nJ)	Energie par cellule pour une bande spectrale allant de 464 nm à 500 nm (FF01-482/35) (nJ)	Energie par impulsion sur tout le spectre (nJ)	Energie par impulsion pour une bande spectrale allant de 464 nm à 500 nm (FF01-482/35) (nJ)
Laser déclenché émettant de manière récurrente	Condition acceptable pour des premiers tests	< 3	< 15	> 100	> 60	> 60	> 6 (f = 500 kHz)	> 6 (f = 500 kHz)
							> 20 (f = 100 kHz)	> 20 (f = 100 kHz)
	Condition optimale	< 2	< 5	> 100	> 100	> 100	> 10 (f = 100 kHz)	> 10 (f = 100 kHz)
							> 30 (f = 100 kHz)	> 30 (f = 100 kHz)
Laser déclenché synchronisé	Condition acceptable pour des premiers tests	< 6	< 15	> 2	> 60	> 60	> 60	> 60
	Condition optimale	< 3	< 5	> 10	> 100	> 100	> 100	> 100

Figure V-26 : Spécification de la source idéale utilisable en cytométrie. f correspond à la fréquence de récurrence des lasers.

	Longueurs d'onde centrale +/- largeur spectrale/2 (nm)	475 +/- 25	525 +/- 25	575 +/- 25	625 +/- 25	482 +/- 18	625 +/- 275	1050 +/- 700
Laser Multitel à 500 kHz	Energie/impulsion (nJ)	0,5	1,2	1,4	2,2	0,4	20,1	1050
	Energie/cellule (nJ)	4,7	11,7	13,4	21,6	3,6	199,1	10395
Laser Altechna à 100 kHz	Energie/impulsion (nJ)	6,9	16,7	28,3	44,4	5,5	323,6	4250
	Energie/cellule (nJ)	13,6	33,0	55,9	87,9	10,9	640,6	8415
Laser TeemSi à 2 kHz	Energie/impulsion et énergie/cellule (nJ)	181,2	178,1	162,3	138,2	134,5	1232,2	3300
Laser TeemGe à 2 kHz	Energie/impulsion et énergie/cellule (nJ)	18,1	20,3	16,3	12,2	14,4	110,0	555

Figure V-27 : Résumé des énergies par impulsion lumineuse et par cellule, obtenues pour chaque supercontinuum.

Dans les Tableaux V-26 et V-27, l'énergie par impulsion du laser TeemSi est assez élevée pour réaliser des mesures dans une bande de longueurs d'onde allant de 464 nm à 500 nm, ce qui correspond à un filtre de 36 nm de large (filtre FF01 482/36 de chez Semrock). Par contre, les énergies délivrées par les autres lasers (Multitel, Altechna et TeemGe) sur une même bande spectrale ne sont pas suffisantes. Dans ces conditions, leur utilisation sera possible seulement en utilisant une bande de longueurs d'onde plus importante qui correspond à la plage de détection de notre photomultiplicateur (de 350 nm à 900 nm).

A présent, il est important de caractériser la stabilité temporelle et la stabilité inter impulsion en amplitude des lasers.

V.3.2. Caractéristiques temporelles et énergétiques des supercontinua pour la cytométrie

Dans le but de valider l'utilisation des sources à large bande spectrale au sein d'un cytomètre en flux, il est indispensable de déterminer leurs caractéristiques temporelles et énergétiques. Pour cela, les impulsions lumineuses sont collectées par une photodiode (K29-F40404-16018 Hamamatsu) de bande passante 1,5MHz reliée à un oscilloscope de 350 MHz. Les mesures temporelles sont réalisées six fois et elles sont obtenues grâce à la fonction « persistance » de l'oscilloscope qui consiste à réaliser un temps d'intégration de quinze minutes. La variation d'amplitude est déterminée grâce à des mesures réalisées sur une centaine d'impulsions et en s'appuyant sur l'Equation V-10, en effet la tension crête est proportionnelle à l'énergie de l'impulsion optique. On considère également que la réponse de la diode est parfaitement linéaire par rapport à la puissance reçue.

$$\%dU = \frac{U_{\max} - U_{\min}}{U_{\max}} \cdot 100 \quad (\text{Equation V-10})$$

U_{\max} et U_{\min} sont les tensions maximale et minimale mesurées à partir du signal fourni par la photodiode.

Les mesures de pourcentage de variation d'amplitudes sont réalisées de la même manière pour tous les lasers (synchronisés ou non).

Les caractéristiques temporelles des sources concernent : leur fréquence de récurrence, la variation de cette fréquence et le temps de création de l'impulsion mesuré à partir d'un signal de déclenchement externe (seulement dans le cas des sources synchronisées). Les mesures sont réalisées avec le même type d'appareillage que pour les caractéristiques d'amplitude (Diode K29-F40404-16018 Hamamatsu (1,5Mhz) relié à un oscilloscope de 350 MHz).

V.3.2.1. Lasers déclenchés émettant de manière récurrente

Dans le cas des lasers déclenchés émettant de manière récurrente, les mesures temporelles effectuées sont la fréquence de répétition des impulsions laser et la gigue temporelle.

➤ Laser Multitel à 500 kHz

La gigue temporelle maximale mesurée est très faible (75 ns) (Figure V-28). Cette valeur s'explique par le type de technologie utilisé. En effet le déclenchement électrique d'une diode laser avec une cavité micrométrique est bien maîtrisé et présente une faible gigue temporelle. L'amplification de ce signal à l'intérieur d'une fibre optique ne modifie en rien ce paramètre. Cette variation temporelle est donc idéale pour les applications de cytométrie en flux. Les pourcentages de variation d'amplitude de ce laser pour une lumière non filtrée et pour une lumière filtrée dans le bleu avec un filtre Semrock FF01-482/35 sont respectivement de 5,4% et de 18,7% (Figure V-29). Là aussi la variation d'amplitude reste limitée mais augmente en fonction de l'éloignement spectral entre l'onde filtrée et l'onde de pompe (1060 nm) et cela à cause du transfert non linéaire de l'énergie.

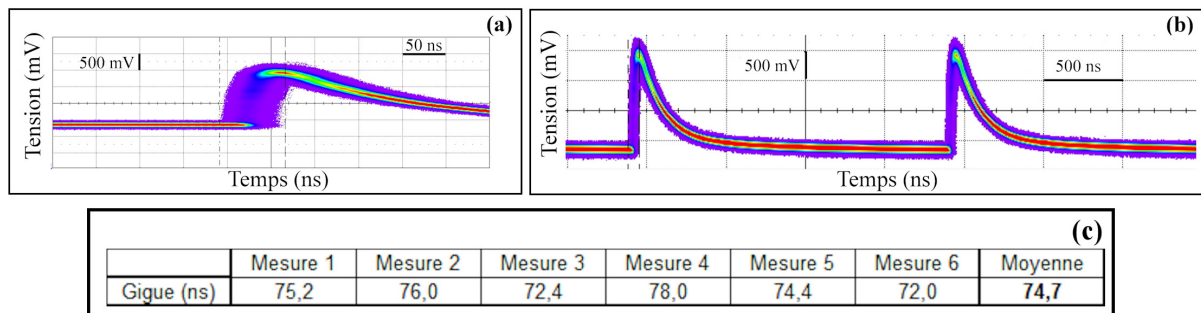


Figure V-28 : Variations temporelles du laser ayant une fréquence de répétition de 500 kHz. (a) et (b) Mesures réalisées avec l'oscilloscope pour des plages de mesures différentes, (a) 50 ns et (b) 500 ns. (c) Résultats de la gigue temporelle.

Filtre	Aucun	Bleu (FF01-482/35)	Vert (FF01-536/40)	Rouge (FF01-630/69)	Rouge (FF01-670/30)
% variation d'amplitude	5,4	18,7	26,3	17,5	17,5

Figure V-29 : Pourcentages de la variation d'amplitude du supercontinuum à 500 kHz non filtré et filtré.

➤ Laser Altechna à 100 kHz

Les mêmes observations ont été réalisées avec le laser Altechna fonctionnant à une fréquence de 100 kHz. Les oscillogrammes permettant d'effectuer les mesures temporelles sont représentés sur la Figure V-28. La fréquence moyenne des impulsions de ce laser est de l'ordre de 140 kHz (Figure V-29) soit une période de 7,14 μs . La gigue temporelle correspond donc à la variation de cette période d'apparition des impulsions, elle est proche de 7 μs soit 100 % de la valeur moyenne. Les variations d'amplitude de ce laser pour une lumière non filtrée et pour une lumière filtrée dans le bleu (FF01-482/35 de chez Semrock) sont respectivement de 45,1% et de 85,2 % (Figure V-30). Ces instabilités temporelles et d'amplitude montrent une très mauvaise répétabilité de l'émission laser. Ceci s'explique principalement par la constitution même de la source et par la présence de multiples modes spatiaux et temporels au sein du résonateur. Il est donc impossible pour nous, de mettre en œuvre une expérience de cytométrie avec un laser de ce type.

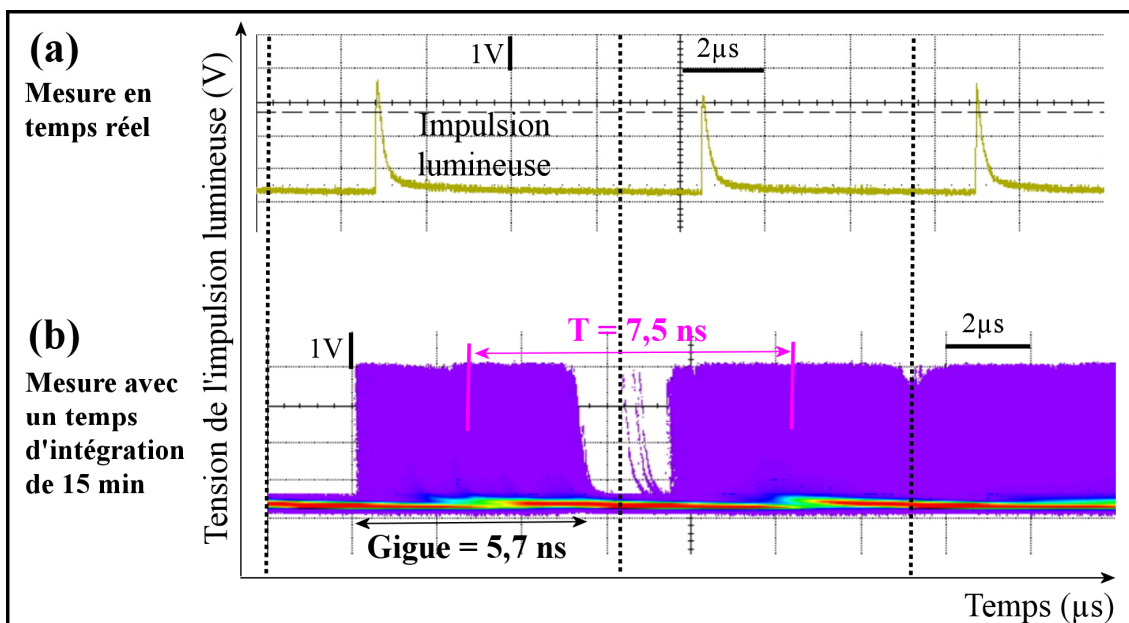


Figure V-30 : Impulsions lumineuses du supercontinuum ayant une fréquence de répétition de 100 kHz. Caractérisation temporelle du supercontinuum. a) Signaux obtenus en temps réel, b) signaux obtenus avec un temps de pause de 15 min.

	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Mesure 4	Mesure 5	Mesure 6	Moyenne
Temps moyen entre deux impulsions (μs)	6,9	6,9	7,5	7,5	7,0	7,1	7,1
Fréquence de récurrence (kHz)	145,8	144,7	133,0	132,8	143,9	140,6	140,1
Gigue temporelle (μs)	6,9	5,6	6,9	8,5	6,5	8,4	7,1

Figure V-31 : Résultats des mesures temporelles réalisées sur le supercontinuum à 100 kHz.

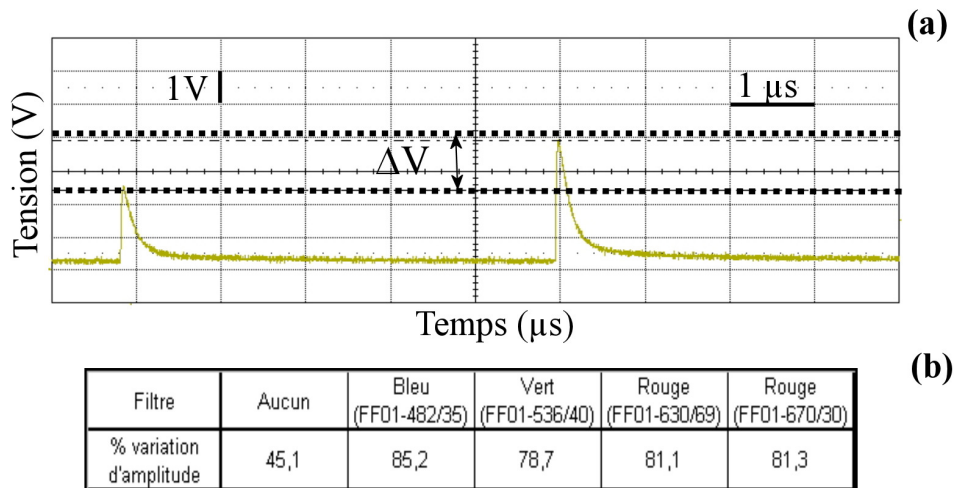


Figure V-32 : Mesure de la stabilité en amplitude du supercontinuum à 100 kHz. (a) Variation de la tension entre deux impulsions optiques. (b) Pourcentages de variation d'amplitude sans filtre et avec différents filtres passe bande optiques.

Sans filtre spectral, l'ensemble des radiations entrant dans la bande d'absorption de la diode influe sur la variation d'amplitude. Dans ce cas, cette gigue est proche de celle de la source monochromatique utilisée. Après filtrage dans une zone du spectre visible, l'amplitude de la gigue est plus élevée et atteint 80% de variation. Ceci s'explique par la conversion non linéaire (en intensité) entre l'onde de pompe infrarouge et les ondes visibles.

V.3.2.2. Lasers Teem déclenchés et synchronisés

➤ Mesures des caractéristiques temporelles

Concernant les lasers déclenchés, la seule mesure de la gigue temporelle ne suffit pas, il faut également mesurer le temps que met l'impulsion à se créer au sein du résonateur. Ce temps de création appelé PCD (Pulse Creation Delay) est également fluctuant mais conserve néanmoins une partie récurrente stable pouvant être compensée par un réglage mécanique ou par un retard électronique réglable. Nous avons testé deux types de supercontinuum déclenchés et

synchronisés. Ils sont tous les deux basés sur le même laser de pompe Teem Photonics, seules les fibres microstructurées sont différentes. La première est en pure silice et l'autre est en silice dopée au germanium. Dans ce cas, les caractéristiques temporelles de ces supercontinua sont donc identiques car ils dépendent de la pompe laser. Par contre, les puissances crêtes varient en fonction du type de conversions non linéaires qui dépendent de la fibre optique utilisée.

Le signal de déclenchement envoyé grâce à une source externe telle qu'un générateur de fonction (GBF) permet d'obtenir la création d'une impulsion optique unique (Figure V-33). Ce signal est répétitif avec une fréquence fixe de 2kHz. Dans ces conditions, l'équilibre thermique de la source peut être atteint ce qui limite les instabilités liées à la température. La variation temporelle maximale du supercontinuum est identique à celle du laser de pompe à 1064 nm, elle est proche de 5,5 μ s (Figure V-34).

Le temps de création de l'impulsion a été mesuré en fonction de la fréquence de sortie du laser. Pour un taux de répétition faible (10 Hz) le PCD est de 28,2 μ s avec une incertitude de +/- 1,2 μ s (Figure V-34). Celui-ci augmente avec la fréquence de récurrence pour atteindre 31,2 μ s +/- 1,3 μ s pour 2 kHz. Dans ces conditions, le défilement aléatoire des cellules avec une fréquence variable comprise entre quelques hertz et 2 kHz imposera une fluctuation temporelle d'au maximum 5,5 μ s. Il est à noter qu'une compensation partielle de la variation du PCD peut être réalisée en utilisant une carte électronique et en déterminant la fréquence à laquelle défilent les cellules. Le filtrage spectral dans le continuum ne change pas les paramètres temporels de la source. Aucun effet aléatoire de retard dans le temps dû aux effets non linéaires n'est possible à ces échelles de temps (Figure V-35).

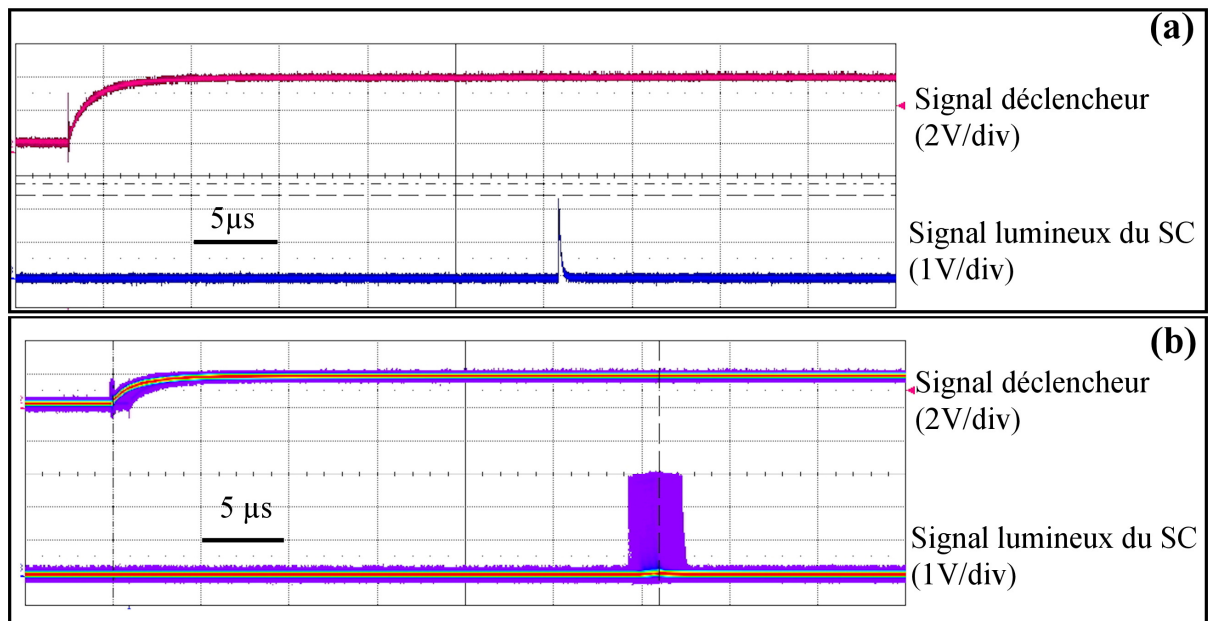


Figure V-33 : Exemple de signal de déclenchement provenant d'un générateur de fonction permettant de déclencher l'impulsion lumineuse du supercontinuum. (a) Signaux au cours du temps. (b) Signaux obtenus avec un temps de pause de 15 minutes.

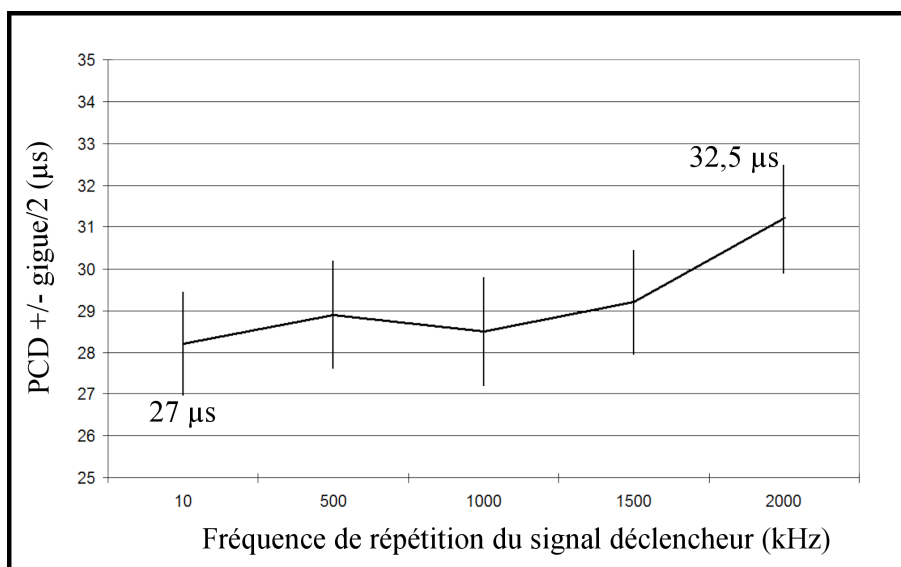


Figure V-34 : Variation temporelle des signaux lasers non filtrés pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz.

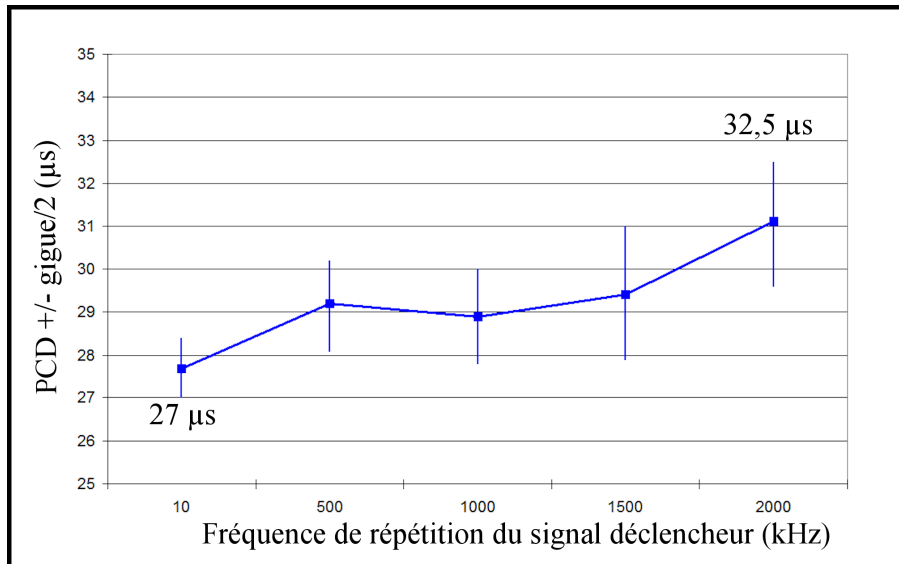


Figure V-35 : Variation temporelle des signaux lasers filtrés dans le bleu (FF01-482/35 de chez Semrock) pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz.

➤ Mesures des caractéristiques énergétiques

- Laser TeemSi

Le laser TeemSi utilise une fibre non linéaire réalisée avec de la silice pure et permet d'obtenir un rayonnement large dans le visible entre 370 nm et 800 nm. Les pourcentages de variation d'amplitude de ce laser pour une lumière non filtrée et pour une lumière filtrée dans le bleu (FF01-482/35 de chez Semrock) sont respectivement de 8,1 % et de 15,2% (Figure V-36). Ces valeurs restent un peu élevées pour des applications en cytométrie en flux mais devraient néanmoins permettre d'obtenir une discrimination des populations cellulaires.

	Fréquence (Hz)	100	500	1000	1500	2000	de 0 à 2000
	Filtre						
% variation d'amplitude	Aucun	2,6	3,7	4,1	4,5	9,5	8,1
	Bleu (FF01-482/35)	9,0	7,1	8,6	7,8	7,7	15,2
	Vert (FF01-536/40)	3,3	2,6	3,3	2,8	3,0	12,0
	Rouge (FF01-630/69)	2,4	3,4	1,8	1,3	2,0	8,2
	Rouge (FF01-670/30)	4,6	6,8	4,8	4,7	3,4	11,5

Figure V-36 : Pourcentage de la variation d'amplitude liée au faisceau laser pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz.

- Laser TeemGe

Le laser TeemGe exploite une fibre en silice dopée au germanium (société Draka Comteq) et permet d'obtenir un rayonnement à partir de 400 nm. L'ordre de grandeur du pourcentage de variation d'amplitude est le même qu'avec la fibre microstructurée en silicium (14,9%) (Figure V-37).

Fréquence (Hz)	10	500	1000	1500	2000	De 0 à 2000
% variation d'amplitude	3,4	4,2	4,1	4,6	4,5	14,9

Figure V-37 : Pourcentage de la variation d'amplitude du rayonnement laser TeemGe pour des fréquences de répétition allant de 0 à 2 kHz.

V.3.2.3. Conclusion sur les sources de supercontinuum

Pour des problèmes de coût et de fiabilité des sources lasers, nous avons décidé de tester uniquement la génération de continua en régime nanoseconde. Trois types de laser de pompe ont été testés (Multitel, Altechna et Temm Photonics).

Le premier (laser Multitel) est une diode laser amplifiée dans une fibre optique. Une fréquence de 500 kHz peut être atteinte avec des impulsions de 500 ps possédant une énergie maximale de 200 nj dans la zone de détection de notre photomultiplicateur. La gigue temporelle de cette source est particulièrement basse (75 ns) mais avec une instabilité en

amplitude de 18,7 % dans le bleu. Le second prototype (laser Altechna) utilise une technologie microchip intégrant un cristal de YAG dopé ytterbium. Les impulsions obtenues sont de l'ordre de 2 ns de largeur avec un taux de répétition supérieur à 100kHz et une énergie par impulsion de 640 nJ dans la plage de détection de notre détecteur. Malgré la possibilité d'obtenir un spectre couvrant une large partie de la transparence de la silice (400nm et 1800 nm) les caractéristiques temporelles sont particulièrement mauvaises avec une variation de 100% de sa fréquence de récurrence et une instabilité d'amplitude de 85 % après filtrage. Enfin, nous avons testé des sources développées par la société Teem Photonics basées sur une micropuce de YAG dopée néodyme. La gigue temporelle cumulée est de l'ordre de 5,5 μ s et la fréquence variable de déclenchement est comprise entre 0 et 2kHz. Deux types de fibres microstructurées ont été testées, la première est en pure silice (laser TeemSi) tandis que la deuxième est en silice dopée au germanium (laser TeemGe). Les impulsions du laser TeemSi sont de 450 ps avec une énergie de 1200 nJ dans la plage de détection de notre photomultiplicateur et avec une stabilité en amplitude de 15,2 % (région spectrale bleu). Le laser TeemGe a une énergie beaucoup plus faible (110 nJ) avec une stabilité en amplitude de 14,9 %. Les caractéristiques temporelles et de variations d'amplitude sont résumées dans le Tableau V-38 et V-39.

Laser SC	Fréquences de répétition (kHz)	Filtre	Variation temporelle maximale (μ s)			Pourcentage de la variation d'amplitude (%)		
			Mesures	Conditions acceptables pour l'intégrer dans un cytomètre	Conditions optimales pour la cytométrie	Mesures	Conditions acceptables pour l'intégrer dans un cytomètre	Conditions optimales pour la cytométrie
SC Multitel à 500 kHz	500	Aucun	0,075	3	2	5,4	15	5
		Bleu	-			18,7		
SC Altechna à 100 kHz	140	Aucun	7,1	6	3	45,1	15	5
		Bleu	-			85,2		
SC TeemSi à 2 kHz	0 à 2	Aucun	5,5	6	3	8,1	15	5
		Bleu	5,5			15,2		
SC TeemGe à 2 kHz	0 à 2	Aucun	28,9	6	3	14,9	15	5
		Bleu	-			-		

Figure V-38 : Tableau récapitulatif des caractéristiques temporelles et de variations d'amplitudes des supercontinua testés. Le filtre bleu est le FF01-482/35 de chez Semrock.

Laser SC	Variations temporelles	Pourcentage de la variation d'amplitude	Coût	Encombrement
SC Multitel à 500 kHz	+++	-	-	+
SC Altechna à 100 kHz	--	--	++	++
SC TeemSi à 2 kHz	++	-	++	++
SC TeemGe à 2 kHz	++	+	++	++

Figure V-39 : Points négatifs et positifs des différents supercontinua.

Au vu de ces résultats et des valeurs fixées par les contraintes de détection des systèmes d'analyse, nous avons décidé d'intégrer et de tester les sources de supercontinuum Teem photonics et d'utiliser une synchronisation entre le passage d'une cellule et l'arrivée d'une impulsion laser de pompe. Il est donc envisageable, dans ce cas-là, de mettre au point un système de diagnostic utilisant une impulsion unique par cellule. Ces systèmes d'analyses cellulaires sont présentés en détail dans la suite du document.

V.3.3. Cytomètres en flux intégrant une source à large bande spectrale

Après les caractérisations des supercontinua, nous avons progressivement intégré ces sources au sein de trois prototypes d'analyseurs cellulaires (exemple d'un analyseur sur la Figure V-40) afin de valider plusieurs fonctions indispensables à un diagnostic cellulaire complet :

- Dans un premier temps, nous avons souhaité valider le principe de déclenchement de la source de lumière optique grâce à une détection électrique des cellules [V-38] et adapter la mesure de diffraction en régime d'éclairage large bande. En effet, même si l'apport principal d'un rayonnement polychromatique se fait au niveau de la détection de la fluorescence, il faut au préalable s'assurer que la mesure en diffraction, particulièrement utile et complémentaire avec les autres types de mesures, fonctionne.
- Dans un second temps, nous avons réalisé des analyses cellulaires en fluorescence.

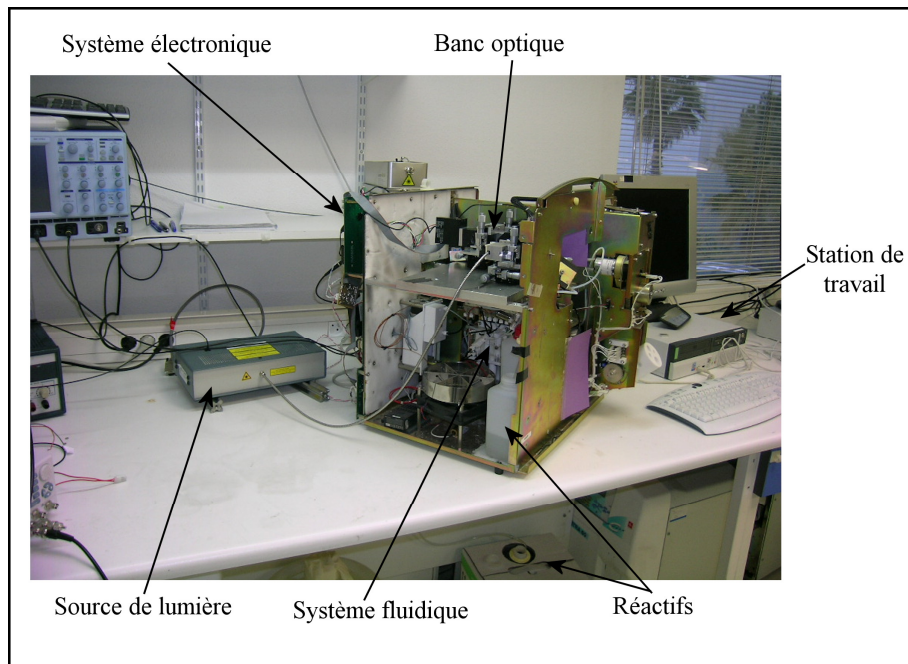


Figure V-40 : Exemple d'analyseur intégrant une source supercontinuum.

V.3.3.1. Diffraction en lumière blanche

➤ Description du système optique

L'analyseur d'hématologie spécifique présenté ici a été développé avec des principes de cytométrie basés sur la focalisation hydrodynamique [V-39]. Le flux de cellules est couplé à un système optique décrit sur la Figure V-41.

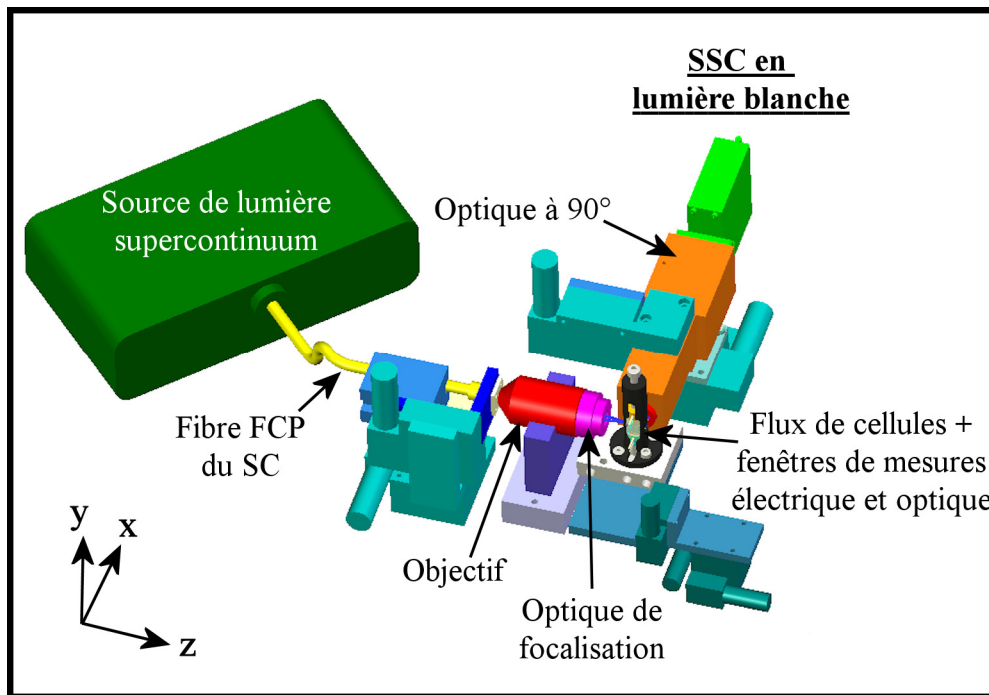


Figure V-41 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une source de lumière supercontinuum. La forme du faisceau optique dans la cuve de mesure est circulaire. La diffraction orthogonale en lumière blanche est détectée. Le flux de cellules se propage suivant l'axe y.

Le système optique est composé d'un laser supercontinuum de type Teem Photonics (cf. partie V.2.2) dont l'énergie est de 1 230 nJ dans la bande de détection que nous allons utiliser (de 350 nm à 900 nm). L'objectif semi-apochromatique UPLFLN 40xPH de chez Olympus permet de collimater le faisceau en sortie de la fibre à cristal photonique. Cet objectif intègre des lentilles traitées antireflets qui permettent de transmettre les différentes longueurs d'onde du visible avec quasiment la même transmission. Il est muni d'une correction de l'aberration chromatique dans le rouge et le bleu ce qui permet d'obtenir une différence de 30 μm sur la valeur de la focale (Figure V-42). En raison des valeurs des ouvertures numériques, la totalité du faisceau lumineux inférieur à 700 nm provenant de la fibre FCP du supercontinuum est collectée par l'objectif. Le faisceau lumineux est focalisé dans la cuve de mesure grâce à une lentille simple de 20 mm de focale. La tache obtenue au niveau de la chambre d'illumination a une géométrie circulaire de diamètre 140 μm (Figure V-43). Au sein de l'analyseur d'hématologie, le réglage mécanique de la position de la tache lumineuse, correspondant à la fenêtre optique de mesure (par rapport à la fenêtre électrique), doit se faire de manière mécanique avec une précision de 3 μm . Pour cela, nous avons souhaité débiter les expériences de cytométrie en utilisant une taille de faisceau lumineux élevée (140 μm) par rapport à celle utilisée dans un analyseur d'hématologie classique (30 μm). Bien sûr, une taille

de faisceau élevée peut engendrer des réfractations avec les éléments mécaniques situés près de la fenêtre optique (comme la buse, élément d'où le flux de cellules arrive).

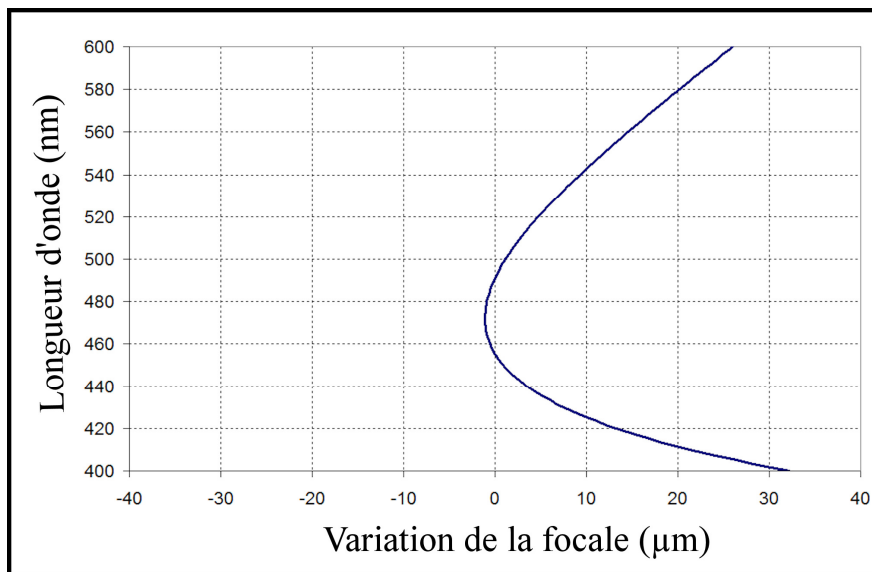


Figure V-42 : Différences de distances focales liées à la lentille de focalisation (OILAO 011) pour des longueurs d'onde allant de 400 nm à 600 nm.

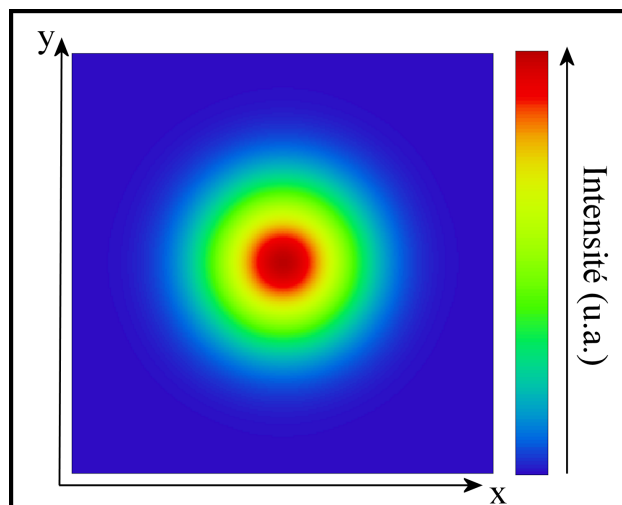


Figure V-43 : Tache du faisceau optique dans la cuve de mesure. Image réalisée grâce à une caméra Infra Rouge (Laser CamIIID de chez Coherent).

➤ Description du système fluide, du déclenchement de l'impulsion lumineuse et des mesures effectuées

Les cellules biologiques circulent dans un canal de 20 μm de diamètre à une vitesse de 5 m/s. Elles sont analysées dans une première chambre par un système électrique puis dans une seconde chambre optique. La mesure électrique est basée sur une modification d'impédance du fluide passant entre deux électrodes. Elle est décrite dans le chapitre I et elle permet de compter et de déterminer le volume des cellules. Un réactif à base de saponine est utilisé pour lyser spécifiquement les globules rouges tout en préservant les globules blancs (incluant les érythroblastes) (Réactif Recherche d'HORIBA Medical).

L'impulsion lumineuse de la source supercontinuum est déclenchée avec le passage d'une cellule au niveau de la fenêtre de mesure électrique (Figure V-44). La distance entre les fenêtres électrique et optique est mécaniquement réglable. Elle dépend du temps de création de l'impulsion laser et du retard électronique intégré dans le système pour pallier les réflexions parasites engendrées par le faisceau lumineux. En effet, la vitesse des particules étant de 5 m/s et le temps moyen de création de l'impulsion (PCD) étant de 30 μs , la distance entre les fenêtres électrique et optique doit être de 150 μm . Cette distance trop faible engendrerait des réflexions parasites, nous avons donc introduit un retard fixe de 12 μs (signal inhibiteur du signal électrique). En tenant compte de tous ces paramètres, la distance optimale entre les deux fenêtres est de 210 μm (Figure V-45).

Une étude sur la statistique des temps de passage (développée dans le chapitre II) montre que la fréquence de déclenchement des impulsions lumineuses doit être de l'ordre de 15,6 kHz afin de détecter l'ensemble des cellules traversant la chambre d'analyse. Dans ces conditions, notre système laser actuel ($f_{\text{max}} = 2 \text{ kHz}$) permet de détecter seulement 76 % des cellules. Une fréquence de répétition de 10 kHz permettrait de détecter 94,8% des cellules.

Le déclenchement est réalisé au moyen d'un système électronique et grâce à la mesure de variation d'impédance induite par le passage d'une cellule entre les électrodes. Ce système électronique de déclenchement réalise plusieurs fonctions [V-40] dans le but de répondre aux spécifications intrinsèques du laser.

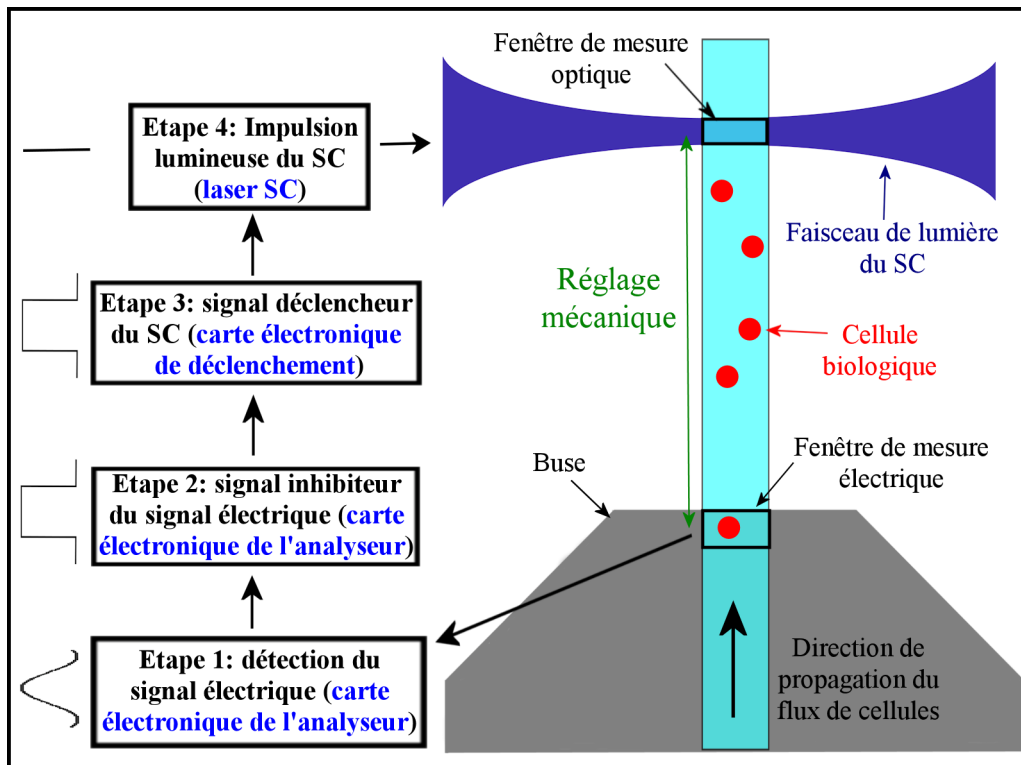


Figure V-44 : Schéma du système de détection électrique permettant le déclenchement de l'impulsion laser.

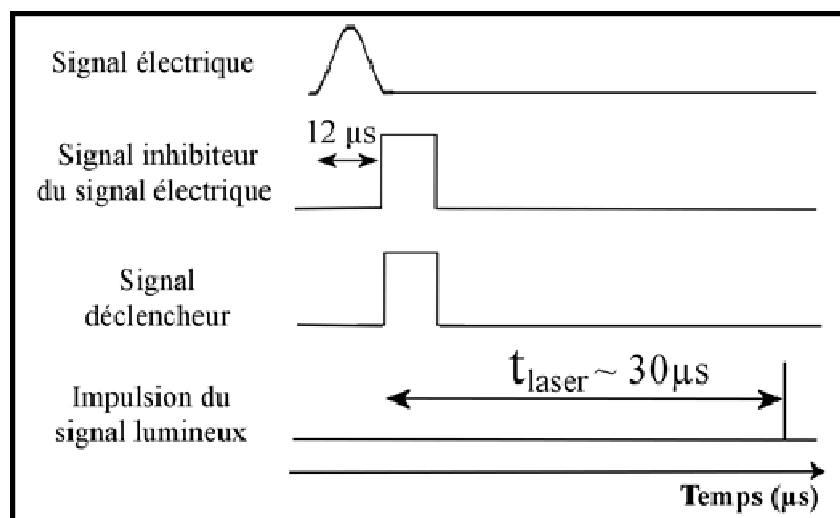


Figure V-45 : Chronologie d'émission des signaux électriques conduisant au déclenchement de l'impulsion laser à partir de la détection d'une cellule.

Après déclenchement, le signal optique interagit avec la cellule biologique. La lumière diffractée dans la direction orthogonale à la direction de propagation du faisceau lumineux incident, est mesurée grâce à un objectif à grande ouverture numérique ($\text{ON} = 0,8$) et à travers un trou de $500 \mu\text{m}$ de diamètre pour supprimer la lumière parasite (réflexion et réfraction multiples dans notre système). Le faisceau lumineux est alors dirigé vers le détecteur optique

(tube photomultiplicateur, H9307-02, Hamamatsu Photonics) en utilisant une lentille mince de longueur focale 10 mm (Figure V-46).

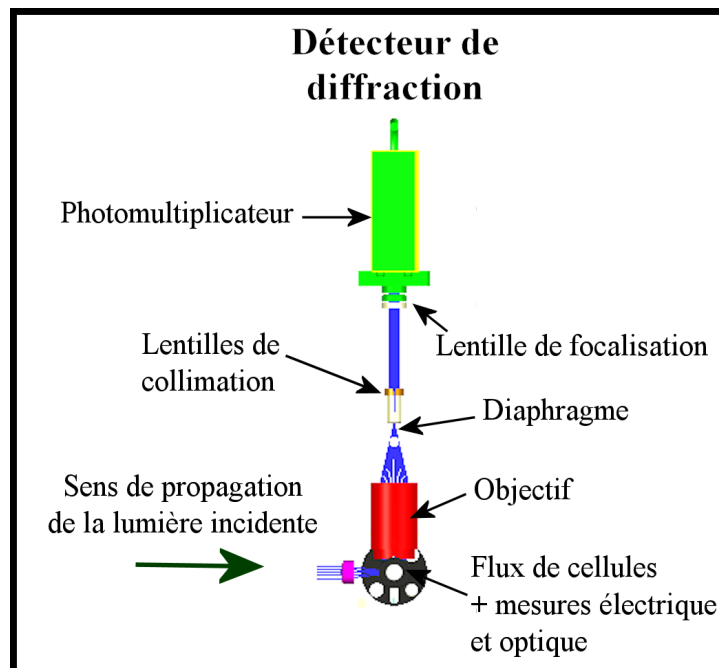


Figure V-46 : Système optique permettant de détecter la diffraction aux grands angles en lumière blanche.

➤ Résultats obtenus

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests avec des microsphères de 9 μm de diamètre (Duke Standards 2000 Series uniform polymer particles, numéro 2009A de chez Thermo Scientific).

L'oscillogramme de la Figure V-47 montre l'enchaînement des signaux obtenus au sein de notre système. A partir de l'émission du signal inhibiteur, délivré 12 μs après la détection du passage d'une microsphère à l'intérieur de la fenêtre de mesure électrique, un signal de déclenchement est envoyé à la source optique. Le démarrage de l'impulsion laser s'effectue sur le front montant du signal (flèche rouge sur la Figure V-47). La lumière diffractée est alors reçue une trentaine de microsecondes après la génération du signal inhibiteur ce qui est conforme à nos précédents calculs. L'ajustement mécanique de la distance entre les fenêtres électrique et optique est réglé de façon précise grâce à ces mesures avec des microsphères.

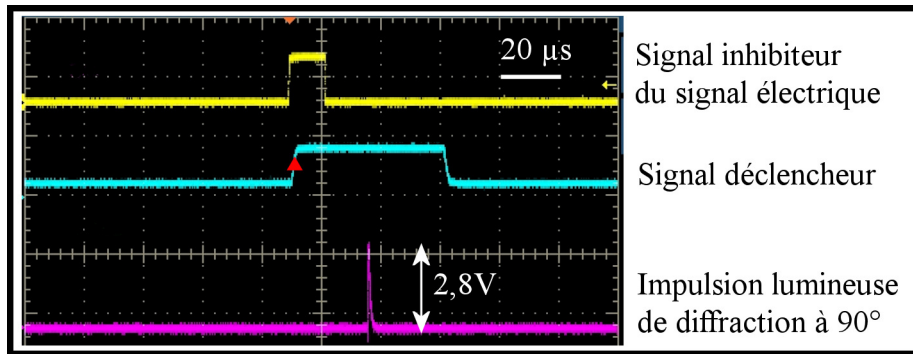


Figure V-47 : Mesure à l'oscilloscope de signaux électriques engendrés par notre système de détection pour une microsphère de 9 μ m de diamètre.

Nous avons tracé, sur la Figure V-48, l'intensité du signal de diffraction optique en fonction de la valeur du signal électrique mesurant la variation d'impédance induite par le passage des microsphères. On observe trois nuages différents qui correspondent aux billes simples, aux doublons et aux triplets. Cette première étape nous permet de valider l'implantation d'une source de supercontinuum à déclenchement actif. Nous pouvons également considérer que la synchronisation entre le faisceau lumineux et les microsphères a été correctement réalisée.

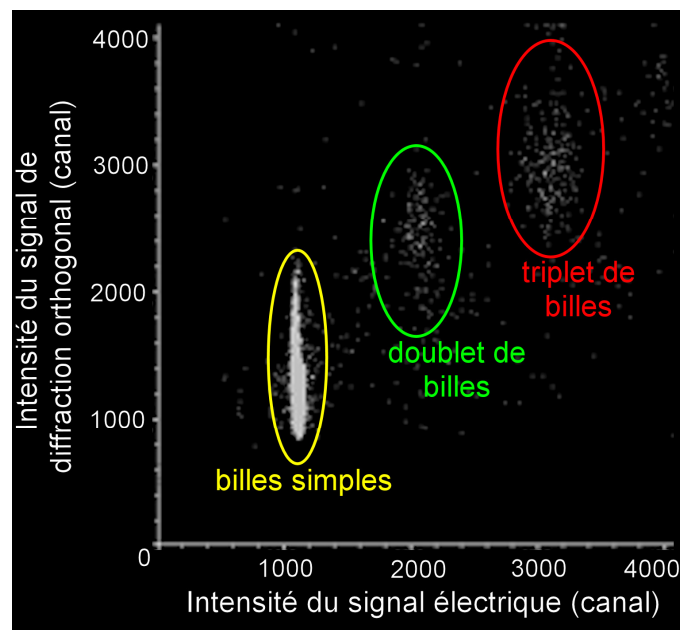


Figure V-48 : Cytogramme du signal de diffraction à 90° (SSC) en fonction du signal électrique. Un point correspond à une, deux ou trois billes de latex de 9 μ m de diamètre.

Après ces essais sur des billes, nous avons réalisé la même analyse sur des échantillons de sangs « normaux ». Les résultats sont montrés sur les cytogrammes de la Figure V-49.

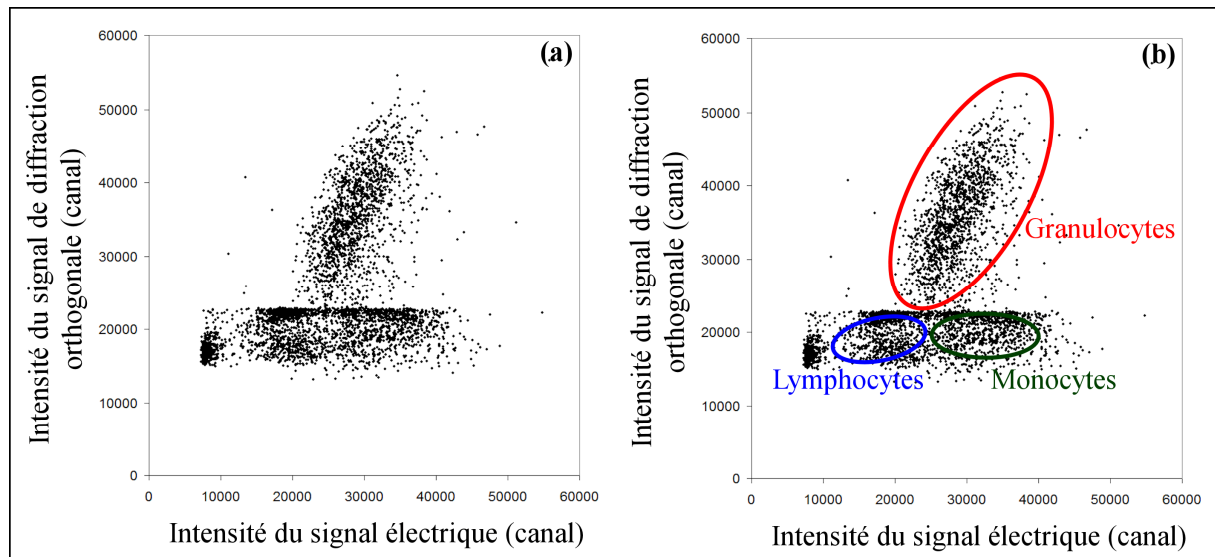


Figure V-49 : Cytogrammes de l'intensité du signal électrique en fonction du signal de diffraction à 90° (échantillon de sang « normal »).

Ces premiers essais montrent la possibilité de caractériser des cellules biologiques avec un supercontinuum déclenché ayant une puissance moyenne peu élevée. Nous avons obtenu une séparation franche des granulocytes, population leucocytaire ayant une intensité de diffraction orthogonale plus importante que les autres cellules. Malheureusement, une faible discrimination des lymphocytes et des monocytes est observée. Plusieurs problèmes peuvent expliquer ce résultat :

- Le profil spatial en énergie du faisceau laser est de type gaussien au niveau de la fenêtre optique. Une variation de puissance notable peut alors être obtenue entre le centre et le bord du canal de propagation des cellules. Dans ces conditions, les effets de diffraction sont dépendants, de manière aléatoire, de la position des cellules au sein du canal ce qui ajoute une erreur sur les mesures (largeur du canal $45\mu\text{m}$).
- Le signal de diffraction (SSC) est trop faible par rapport à des signaux lumineux parasites engendrés par des réflexions optiques du faisceau lumineux sur les éléments mécaniques situés autour de la fenêtre de mesure (mauvais rapport signal sur bruit).
- L'émission d'une lumière polychromatique par la fibre FCP se fait de manière chromatique c'est-à-dire que les modes spatiaux se propageant au sein de la fibre ont des diamètres différents pour chaque longueur d'onde. Une réponse différente de l'effet de diffraction en fonction de la longueur d'onde est donc inévitable ce qui dégrade le rapport signal sur bruit.

Dans le but de pallier ces inconvénients, nous avons modifié le système optique d'injection et amélioré la carte de commande électronique pour que le réglage entre les fenêtres de mesures électrique et optique soit effectué électroniquement et non mécaniquement. Ceci devrait permettre de relâcher les contraintes de positionnement des fenêtres d'analyses.

V.3.3.2. Optimisation des mesures de diffraction en lumière blanche

La plupart de des caractéristiques de l'analyseur d'hématologie spécifique présenté ici sont identiques au précédent. Seules les différences entre ces deux appareils seront donc présentées (système optique et système électronique de déclenchement).

➤ Description du système optique

Seul le système optique de mise en forme a été revu, le système optique de collection restant le même (Figure V-50).

La source supercontinuum utilisée (cf. V.2.2) est basée sur la même technologie que la source blanche de la partie précédente (technologie micropuce de Teem Photonics). Son énergie est de 110 nJ dans la plage de détection utilisée (de 350 nm à 900 nm).

L'amélioration des résultats passe par la mise en forme spatiale du faisceau laser au niveau de la fenêtre d'analyse optique. Pour cela, une fibre multimode à saut d'indice (de Chez IDIL Fibre Optique) est couplée à la fibre FCP générant le supercontinuum. Elle comprend un cœur micro-usiné de forme rectangulaire (150 μm x 70 μm) et délivre un faisceau de lumière avec une répartition homogène de l'énergie sur sa section transverse [V-41]. Du fait de sa structure, un grand nombre de modes spatiaux se propagent dans la fibre. Toutes les longueurs d'onde issues de la FCP sont alors couplées sur un nombre de modes important ce qui permet d'obtenir une répartition transverse homogène de l'énergie et cela pour toutes les longueurs d'onde (Figure V-51). Les effets chromatiques sont alors minimisés. Ce profil rectangulaire est fortement dépendant de la distance de couplage entre la fibre FCP et la fibre micro-usinée (Figures V-51a et V-51b). La pointe de la fibre FCP est ajustée avec des platines de translation micrométriques pour produire un éclairage complet de la fibre rectangulaire.

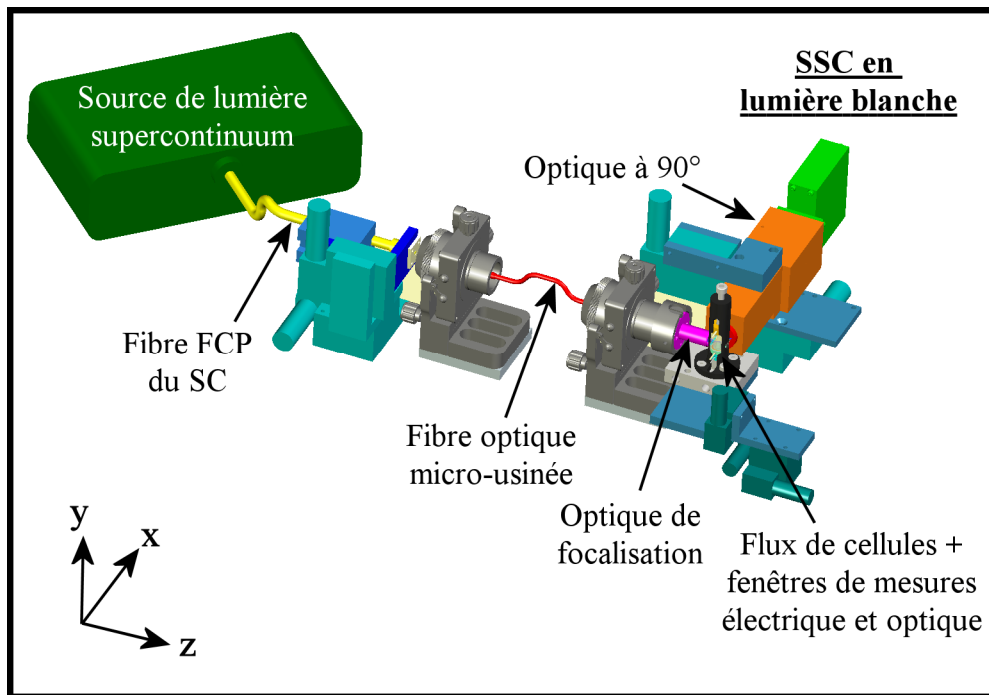


Figure V-50 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une source de lumière supercontinuum. La forme du faisceau optique dans la cuve de mesure est rectangulaire et uniforme. La diffraction orthogonale en lumière blanche est détectée. Le flux de cellules se propage suivant l'axe y .

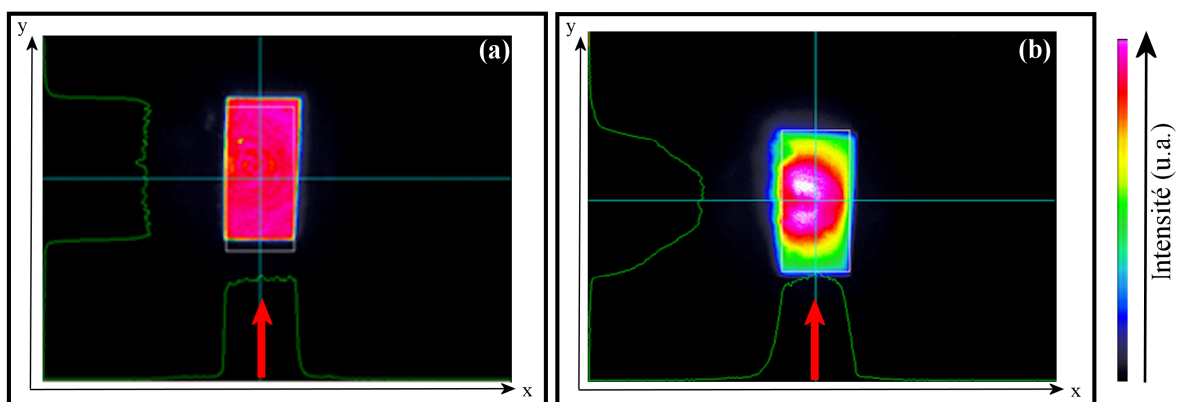


Figure V-51 : Profil du faisceau lumineux dans la cuve de mesure. Couplage entre les fibres FCP et rectangulaire a) optimisé ou b) non optimisé. Le sens de circulation des cellules est représenté par une flèche rouge.

Dans le but d'optimiser le recouvrement entre l'impulsion laser et la cellule à analyser nous avons imagé, avec un facteur de réduction de 1,5, la face de sortie de la fibre au niveau du flux de cellules. La taille du faisceau lumineux dans la cuve de mesure est donc de $99 \mu\text{m}$ (suivant y) sur $46 \mu\text{m}$ (suivant x).

Avec une vitesse de 5m/s la cellule se déplace pendant $20 \mu\text{s}$ dans la fenêtre de mesure optique. La variation temporelle maximale de la source est de $5,5 \mu\text{s}$ (cf. V.3.2.) tandis que la

variation temporelle liée au système fluide est de $3 \mu\text{s}$ pour une identification de 99% des cellules biologiques (Figure V-52). On peut donc facilement déduire que la variation temporelle globale entre l'impulsion et les cellules est de l'ordre de $8,5 \mu\text{s}$; valeur qu'il faut comparer au $20 \mu\text{s}$ du temps de parcours de la cellule dans le faisceau excitateur.

Il est important de noter que le pourcentage de cellules mesurées en fonction de la variation temporelle du déclenchement électrique (axe des y) a été déterminé grâce à des mesures effectuées sur le futur analyseur d'hématologie haut de gamme d'HORIBA Medical. Cette étude, préliminaire à l'intégration des supercontinua dans des analyseurs cellulaires, nous a permis d'obtenir des ordres de grandeur concernant la variation du temps de parcours moyen entre les fenêtres électrique et optique (Figure V-52). Néanmoins il faut noter que les caractéristiques de cet analyseur haut de gamme d'HORIBA Medical (vitesse de 10 m/s , hauteur de la fenêtre optique de $30 \mu\text{m}$) ne correspondent pas tout à fait aux caractéristiques de nos analyseurs spécifiques.

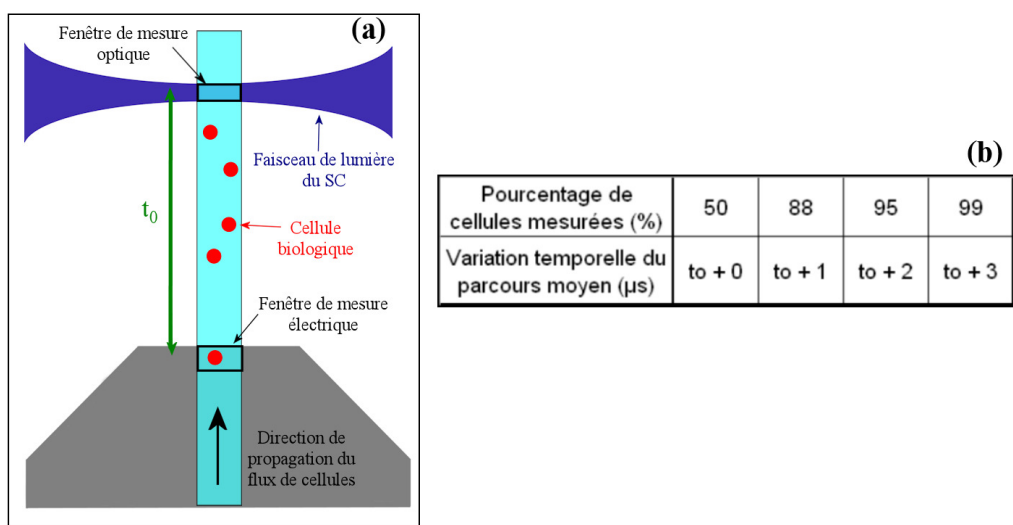


Figure V-52 : Pourcentage de cellules mesurées en fonction de la variation temporelle du parcours moyen du système fluide au niveau de la fenêtre optique.

La répartition transverse du flux cellulaire au sein du canal de propagation ($45 \mu\text{m}$) a été déterminée numériquement grâce au logiciel Comsol Multiphysique (Figure V-53). Le profil obtenu est de type gaussien avec une largeur à mi-hauteur de $18 \mu\text{m}$. Un recouvrement supérieur à 95% est obtenu entre le flux cellulaire et le faisceau laser pour un diamètre de $45 \mu\text{m}$. En tenant compte de ces contraintes, nous avons donc choisi un faisceau mesurant $99 \mu\text{m} \times 46 \mu\text{m}$.

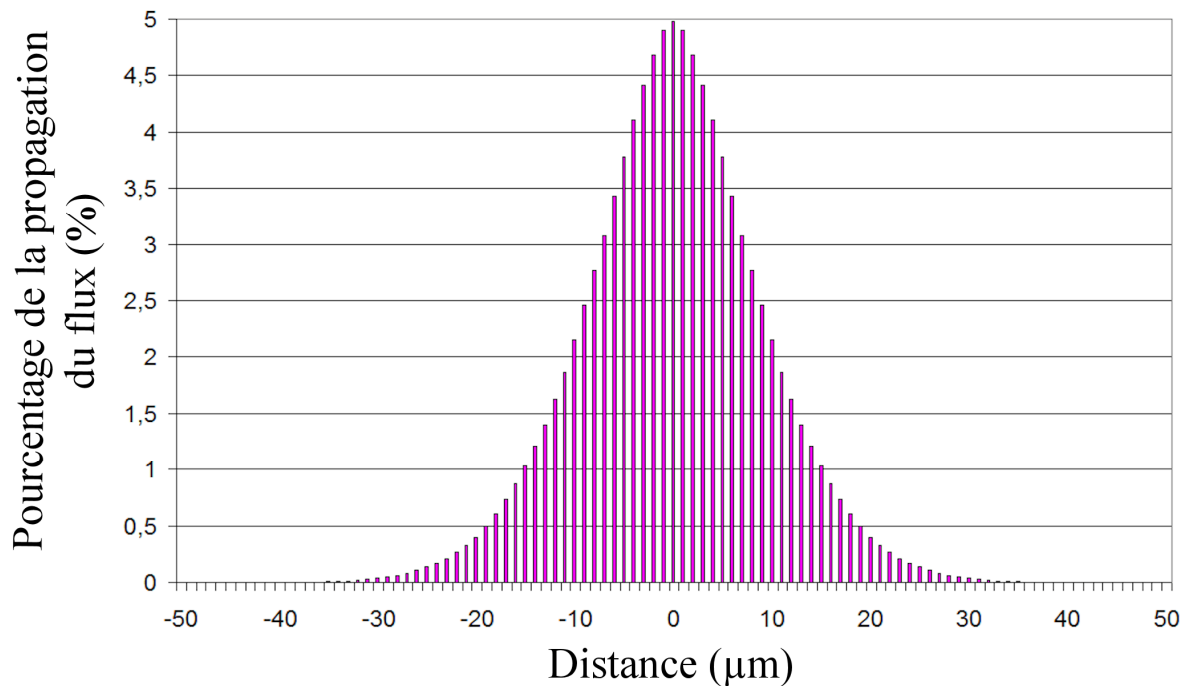


Figure V-53 : Pourcentage du flux en fonction du diamètre du flux. En x , 0 correspond à l'axe passant par le centre de la buse. La somme des barres représente 100 % du flux.

➤ Optimisation de la carte électronique de déclenchement

Au sein du premier analyseur, le réglage de la fenêtre optique par rapport à la fenêtre électrique est réalisé mécaniquement avec de nombreuses tables micrométriques (cf. V.3.3.1). Pour réaliser des réglages plus précis tout en ayant un confort dans les réglages, il nous a semblé indispensable de fixer cette distance et d'ajouter une ligne à retard (t_{interval}) réglable dans notre carte électronique [V-40] (Figure V-54). L'utilisation d'une fenêtre électronique au niveau du détecteur permet de limiter en partie l'impact de la lumière diffusée provenant du système fluide ou de l'environnement lumineux [V-1, V-42].

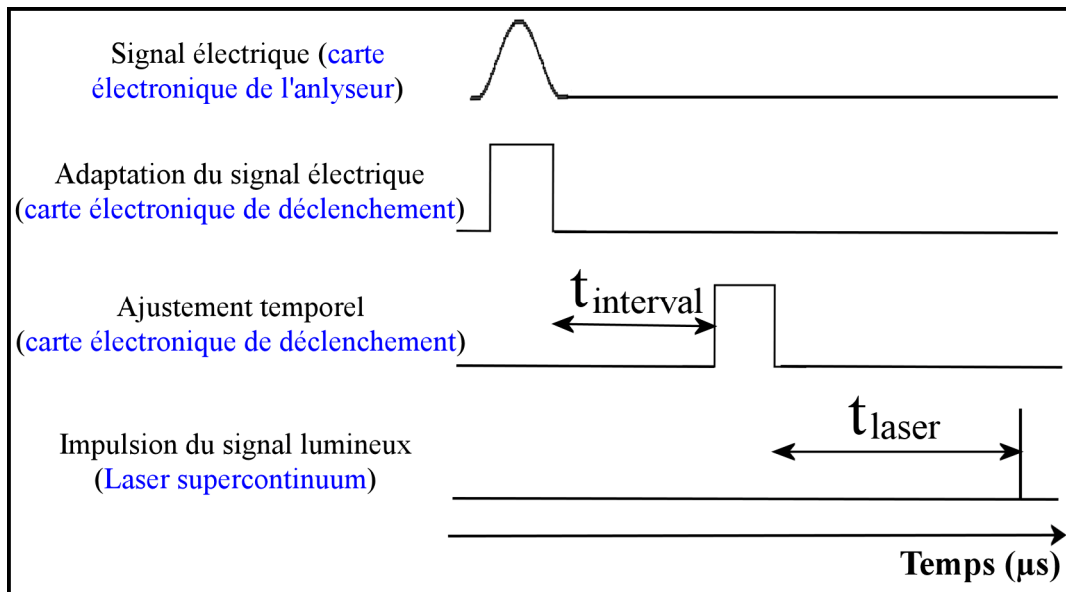


Figure V-54 : Les différents signaux allant de la mesure électrique à la mesure optique. Le temps t_{laser} est fixe et intrinsèque au laser. Par contre, le temps t_{interval} peut être ajusté via la carte électronique.

➤ Résultats obtenus

En utilisant un échantillon de sang dit « normal » nous avons pu détecter et enregistrer l'intensité de diffraction orthogonale en fonction de l'intensité du signal électrique mesurant la variation d'impédance du flux cellulaire. Trois sous-populations leucocytaires ont été différenciées : les granulocytes (60,6%), les lymphocytes (32,4%) et les monocytes (5,9%) (Figure V-55). Ces pourcentages sont similaires à ceux obtenus avec un laser monochromatique et les zones des populations sont positionnées au même endroit. Cela montre qu'une source polychromatique de type supercontinuum permet de réaliser des mesures de diffraction au sein d'un système de diagnostic hématologique dans une configuration « une cellule, une impulsion lumineuse ».

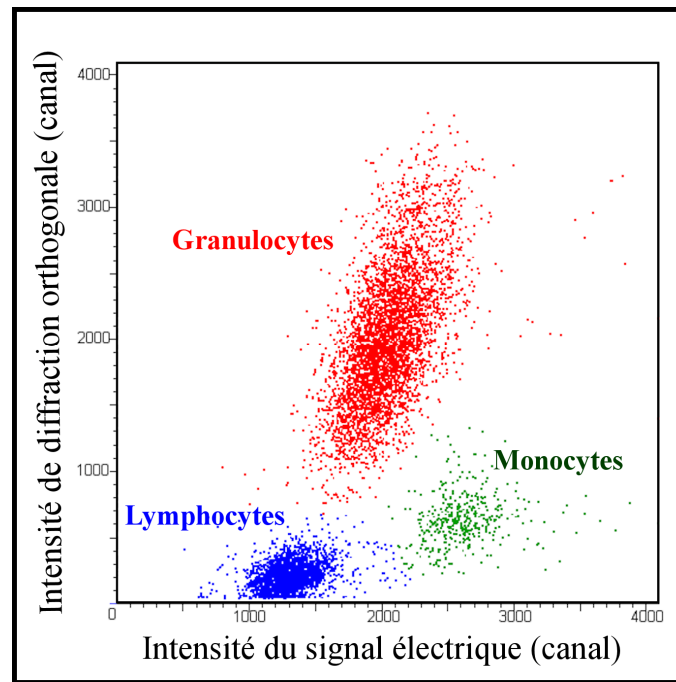


Figure V-55 : Matrices du signal SSC en fonction du signal électrique. Un point correspond à une cellule.

Ces résultats de discrimination LMG (lymphocytes, monocytes, granulocytes) en diffraction à 90° en lumière blanche avec une source supercontinuum sont très innovants.

Le plus grand avantage d'une source polychrome en cytométrie en flux est la possibilité de pouvoir exciter simultanément un nombre important de fluorochromes tout en maintenant une potentialité de mesure au niveau diffractif et ainsi améliorer les performances de nos analyseurs multiparamétriques.

V.3.3.3. Analyse cellulaire par diffraction et fluorescence

Après avoir optimisé les mesures en diffraction aux grands angles, nous pouvons passer à la seconde phase qui consiste à montrer qu'une mesure de fluorescence est tout à fait possible dans les conditions que nous avons mises en place précédemment, c'est-à-dire en utilisant une seule impulsion laser pour une cellule analysée. Pour cela nous avons choisi de filtrer la source polychromatique dans le bleu, gamme de longueurs d'onde où HORIBA Medical réalise la plupart de ses analyses. De plus, cette région est très éloignée de la longueur d'onde de pompe. Si les conditions de synchronisation temporelle sont les mêmes pour toutes les longueurs d'onde, il en est tout autrement pour les variations de puissance. En effet, le spectre de la source se construit de manière progressive à partir de l'onde de pompe et sous

l'influence de cascades de conversions non linéaires. L'instabilité est donc croissante avec le nombre d'étapes de conversion et se fait de plus en plus forte lorsque l'on atteint les bords du spectre. La validation des mesures de fluorescence avec une onde de pompe bleue, devrait donc permettre de valider cette fonction pour toutes les autres longueurs d'onde.

➤ **Description du système**

Le système optique est similaire à celui utilisé précédemment, seul un filtre passe bande de type Semrock FF01-482/35 (longueur d'onde centrale 482 nm ; largeur de bande 35 nm) est placé en amont de la cuve de mesure. Il est inséré à l'intérieur du système de focalisation là où le faisceau lumineux est collimaté (Figure V-56). Le marqueur utilisé est le Thiazole Orange (TO) (Figure V-57), qui est représentatif de la quantité d'acides nucléiques (ARN et ADN) présents dans le noyau des cellules. La diffraction est mesurée avec un filtre passe bande FF01-482/35 et la fluorescence du TO est détectée au moyen d'un filtre dichroïque FF506-Di02 et d'un filtre passe bande FF01-530/43 (Figure V-58). Le supercontinuum (technologie micropuce de Teem Photonics, cf. V.2.2) a une énergie suffisante dans le bleu (134 nJ) pour exciter le TO de manière assez importante et pour obtenir un signal fluorescent du TO suffisamment intense pour qu'il soit détecté.

Les longueurs d'onde d'excitation du TO sont comprises entre 460 nm et 510 nm, le recouvrement des longueurs d'onde d'excitations et du spectre d'émission du TO est faible (Figure V-57). Les filtres utilisés pour sélectionner la fluorescence ont des bandes très sélectives avec un taux de transmission supérieur à 93 % (Figure V-58). Le seul changement chimique par rapport à l'expérience du paragraphe V.3.3.2 est l'ajout du Thiazole Orange dans le réactif [V-43].

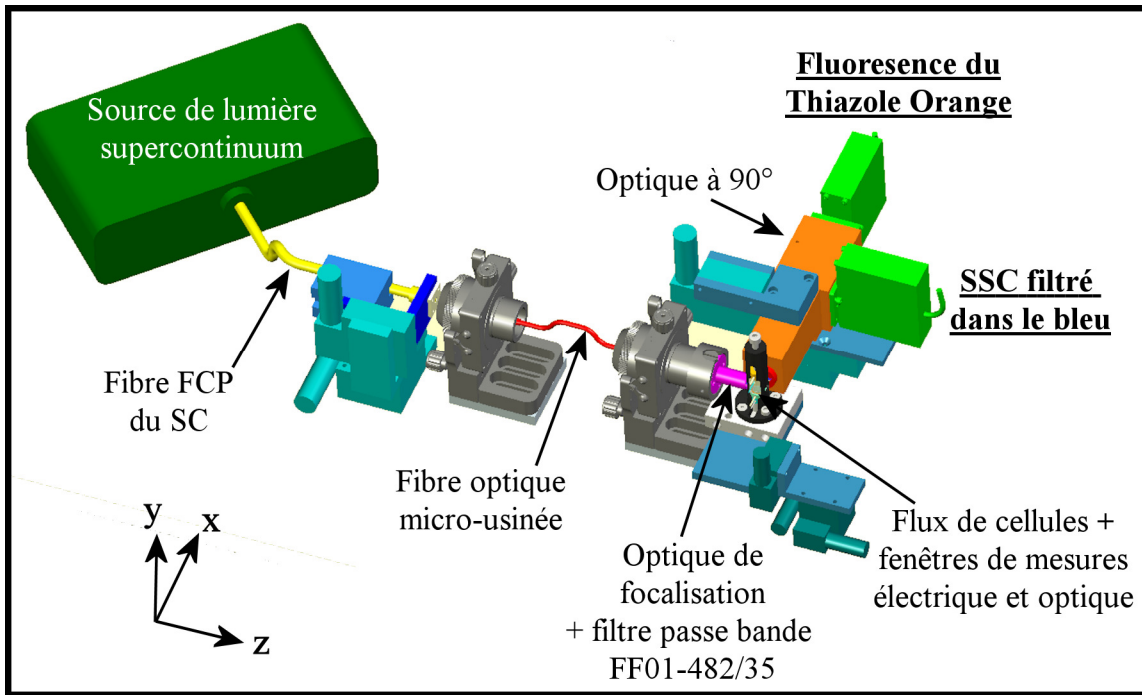


Figure V-56 : Représentation schématique du système optique de l'analyseur hématologique intégrant une source de lumière supercontinuum. Le flux de cellules se propage suivant l'axe y.

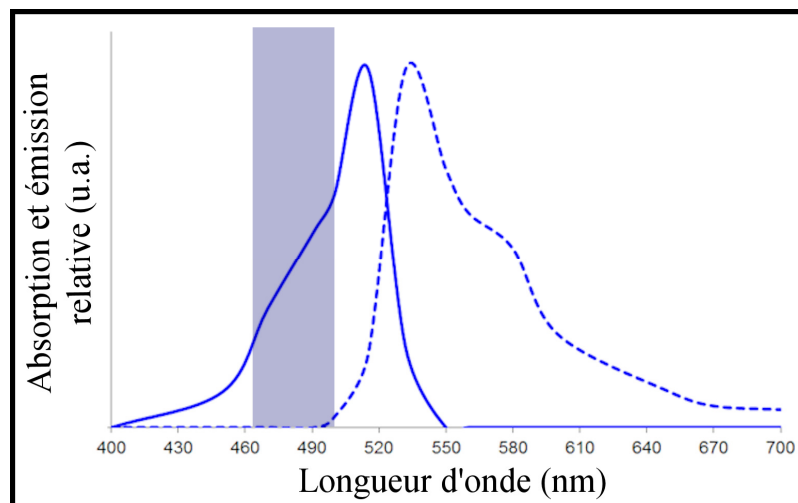


Figure V-57 : Spectres d'absorption et d'émission du Thiazole Orange (TO). La bande d'excitation du supercontinuum est représentée par le rectangle bleu.

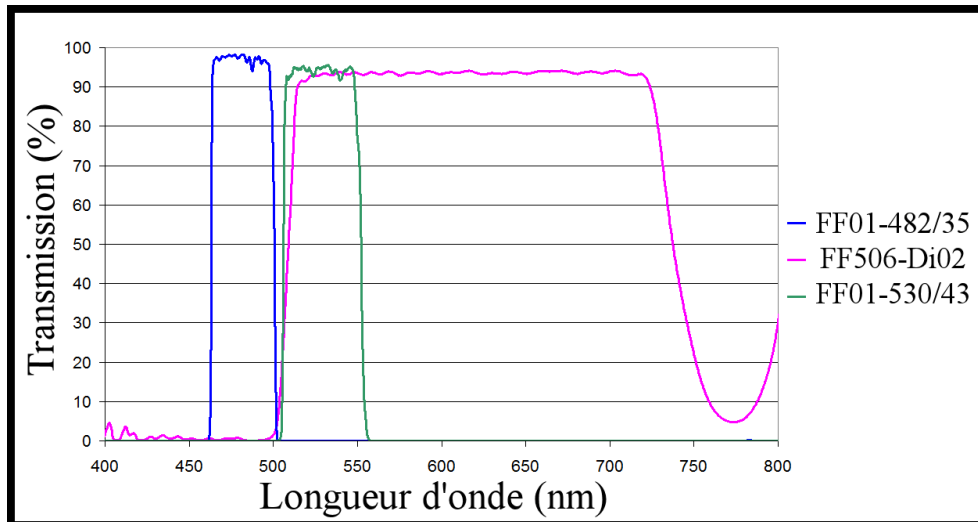


Figure V-58 : Transmission des filtres optiques utilisés dans l'optique de collection.

➤ Résultats obtenus

L'ajout d'une mesure de fluorescence nous permet de discriminer plus de populations leucocytaires. Un exemple de matrice obtenu sur un échantillon de sang sain est montré sur la Figure V-59, l'échantillon contient 28,1% de lymphocytes, 9,4% de monocytes, 58,4% de granulocytes, 0,16% de granulocytes immatures et 0,16% de cellules à haute teneur en acides nucléiques (telles que les lymphoblastes, les monoblastes et les plasmocytes).

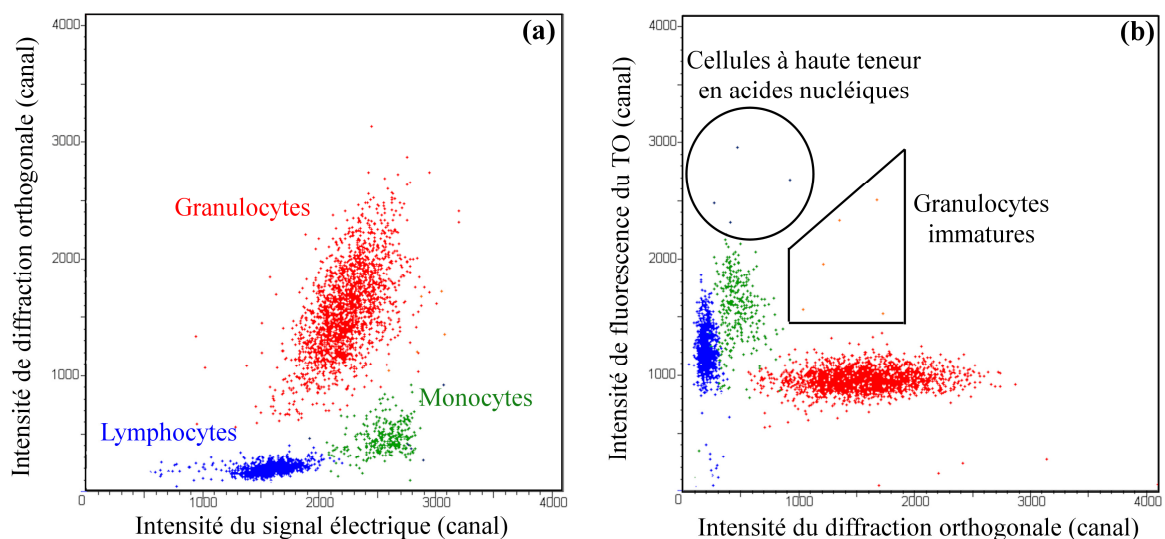


Figure V-59 : Matrice montrant la discrimination des populations leucocytaires. Un point correspond à une cellule. Deux types de matrice sont représentées, (a) électrique/SSC et (b) SSC/FluoTO.

Ces résultats obtenus avec une source blanche sont similaires à des résultats obtenus avec des analyseurs d'hématologie d'HORIBA Medical. Ces mesures de diffraction à 90° et de fluorescence du TO sont innovantes étant donné qu'elles sont réalisées avec une source de supercontinuum synchronisée.

V.4. Conclusion

Des analyses en multifuorescence offrent de nombreux avantages en cytométrie en flux et permettent de détecter précisément des populations cellulaires spécifiques et ainsi aider au diagnostic de pathologies sanguines. Néanmoins, l'utilisation de plusieurs sources lumineuses engendre de l'instabilité opto-mécanique et les longueurs d'onde fixes des lasers ne permettent pas d'exciter les fluorochromes avec la précision spectrale nécessaire. C'est pour cela que nous avons souhaité intégrer une source de lumière « blanche » cohérente dans un cytomètre en flux.

Plusieurs solutions existent pour réaliser cette adaptation. La première consiste à utiliser une source de lumière impulsionnelle à forte cadence de récurrence. L'émission quasi-continue de ces lasers permet l'éclairage systématique de chaque cellule. L'autre solution est d'utiliser une source déclenchée synchronisée permettant de mieux maîtriser la quantité de lumière envoyée, c'est-à-dire de limiter l'excitation de chaque cellule à une impulsion unique.

Pour évaluer ces deux solutions, nous avons mené une étude comparées entre quatre sources déclenchées permettant d'obtenir un spectre large bande dans la région du visible. Après investigations, les deux sources synchronisées de chez Teem Photonics, fonctionnant à une cadence maximum de 2 kHz, semblent posséder les caractéristiques spectrales et temporelles compatibles avec nos cytomètres.

Dans une première expérience nous avons adapté une source de lumière blanche permettant de réaliser une mesure de diffraction à 90° . L'utilisation d'une fibre multimode à profil rectangulaire nous a permis de minimiser les effets chromatiques et d'obtenir une caractérisation de plusieurs sous populations leucocytaires. Dans une seconde phase, nous avons également obtenu une discrimination cellulaire en fluorescence. Pour cela, la partie basse du spectre visible (bleue) a été filtrée et ce faisceau illumine ensuite des cellules

biologiques précédemment colorées avec du Thiazole Orange caractéristique des acides nucléiques (ADN et ARN).

Les fluctuations temporelles et d'amplitudes de la source laser ne sont pas totalement satisfaisantes mais permettent néanmoins de bien séparer les lymphocytes, monocytes, granulocytes, granulocytes immatures et les cellules à haute teneur en acides nucléiques (telles que les lymphoblastes, les monoblastes et les plasmocytes).

Il est à noter qu'actuellement des sources possédant des gages d'amplitudes et temporelles très faibles ont été démontrées et seraient susceptibles d'améliorer les performances de nos systèmes de diagnostic. Des sources blanches cohérentes fonctionnant en régime continu existent aussi depuis peu et permettraient de résoudre les problèmes de synchronisation entre l'émission lumineuse et les cellules.

HORIBA Medical souhaite poursuivre ce projet et étendre cette technologie à des fluorescences multiples. Des tests cliniques systématiques devraient également valider de manière forte ces nouveaux systèmes.

Au-delà des performances analytiques, ces sources polychromatiques nous permettent de simplifier la constitution du design optique tout en diminuant le coût des sources lasers. Le choix des longueurs d'onde d'excitation est également fortement augmenté. De plus, le choix des longueurs d'onde d'excitation en fonction des caractéristiques spectrales des fluorochromes utilisés est un avantage important. L'accordabilité spectrale permet de minimiser les problèmes de compensation et d'améliorer la précision des mesures [V-44].

Bibliographie

- V-1. B. G. de Grooth, M. van Dam, N. C. Swart, A. Willemsen and J. Greve, “ Multiple wavelength illumination in flow cytometry using a single arc lamp and a dispersing element”, *Cytometry Part A*, 8(5), 445-452 (1987).
- V-2. H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry Second Edition*, A. R. Liss, New York (1988).
- V-3. J. A. Pippet, J. A. Narai and D. J. Ramsay, “Pulsed laser flow cytometry”, Patent WO 1992/08120 (1991).
- V-4. R. H. Taylor, T. A. Reid and H. Y. Choi, “System and method for a pulsed light source used in fluorescence detection”, Patent US 2006/0289786 (2006).
- V-5. T-H. Wu, L. Gao, Y. Chen, K. Wei and P-Y. Chiou, “Pulsed laser triggered high speed microfluidic switch”, *Applied physics letters*, 93(14), 144102-3 (2009).
- V-6. G. Gillispie and M. Pavicic, “Multi-dimensional fluorescence apparatus and method for rapid and highly sensitive quantitative analysis of mixtures”, Patent US 2004/014407 (2004).
- V-7. J. L. Faucher, C. Lacronique-Gazaille, E. Frébet, F. Trimoreau, M. Donnard, D. Bordessoule, F. Lacombe and J. Feuillard, ““6 markers/5 colors" extended white blood cell differential by flow cytometry”, *Cytometry Part A*, 71(11), 934-944 (2007).
- V-8. F. E. Craig and K. A. Foon, “Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms”, *Journal of The American Society of Hematology*, 111(8), 3941-3967 (2008).
- V-9. C. Arnoulet, M. C. Béné, F. Durrieu, J. Feuillard, C. Fossat, B. Husson, H. Jouault, M. Maynadié and F. Lacombe, “Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL”, *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78(1), 4-10 (2010).
- V-10. V. Kapoor, V. Karpov, C. Linton, F. V. Subach, V. V. Verkhusha, W. G. Telford, “Solid state yellow and orange lasers for flow cytométrie”, *Cytometry Part A*, 73(6), 570-577 (2008).

- V-11. S. C. Bendall, E. F. Simonds, P. Qiu, E-a. D. Amir, P. O. Krutzik, R. Finck, R. V. Bruggner, R. Melamed, A. Trejo, O. I. Ornatsky, R. S. Balderas, S. K. Plevritis, K. Sachs, D. Pe'ers, S. D. Tanner, G. P. Nolan, "Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum", *Science*, 332(6030), 687-696 (2011).
- V-12. W. G. Telford, F. V. Subach and V. V. Verkhusha, "Supercontinuum white light lasers for flow cytometry", *Cytometry Part A*, 75(5), 450-459 (2008).
- V-13. Y. Wang, Y. Zhao, J. S. Nelson, Z. Chen and R. S. Windeler, "Ultrahigh-resolution optical coherence tomography by broadband continuum generation from a photonic crystal fiber", *Optics Letters*, 28(3), 182-184 (2003).
- V-14. J. Léonard, N. Lecong, J-P. Likforman, O. Crégut, S. Haacke, P. Viale, P. Leproux and V. Couderc, "Broadband ultrafast spectroscopy using a photonic crystal fiber: application to the photophysics of malachite green", *Optics Express*, 15(24), 16124-16129 (2007).
- V-15. A. Kudlinski, M. Lelek, B. Barviau, L. Audry and A. Mussot, "Efficient blue conversion from a 1064 nm microchip laser in long photonic crystal fiber tapers for fluorescence microscopy", *Optics Express*, 18(16), 16640-16645 (2010).
- V-16. P. Franken, A. Hill, C. Peters and G. Weinreich, "Generation of Optical Harmonics", *Physical Review Letters*, 7, 118-119 (1961).
- V-17. R. L. Fork, B. I. Greene, and V. C. Shank, "Generation of optical pulses shorter than 0.1 psec by colliding pulse mode locking", *Applied Physics Letters*, 38(9), 671-672 (1981).
- V-18. R. V. Pole, R. A. Myers and J. Nuñez, "Bidirectional Electrically Switched Laser", *Applied Optics*, 4(1), 119-121 (1965).
- V-19. J. C. Knight, T. A. Birks, P. St. J. Russell and D. M. Atkin, "All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding", *Optics Letters*, 21(19), 1547-1549 (1996).
- V-20. A. H. Hermann, S. W. William and I. K. Farzana, "Continuum generation by perturbation of soliton", *Journal of Optical Society of America*, 14(2), 304-313 (1997).
- V-21. P.-A. Champert, V. Couderc, P. Leproux S. Février, V. Tombelaine, L. Labonté, P. Roy, C. Froehly and P. Nérin, "White-light supercontinuum generation in normally dispersive

optical fiber using original multi-wavelength pumping system”, *Optics Express*, 12(19), 4366-4371 (2004).

V-22. J. M. Dudley, G. Genty, S. Coen, “Supercontinuum Generation in Photonic Crystal Fiber”, *Reviews of Modern Physics*, 78(4), 1135-1184 (2006).

V-23. P. Nérin, P.-A. Champert, S. Février, P. Roy, V. Couderc, P. Leproux et L. Grossard, “Dispositif de génération d’une lumière polychromatique à spectre continu”, Brevet US 7,768,691 (2004).

V-24. J. M. Dudley, L. Provino, N. Grossard, H. Maillotte, R. S. Windeler, B. J. Eggleton and S. Coen, “Supercontinuum generation in air–silica microstructured fibers with nanosecond and femtosecond pulse pumping”, *Journal of the Optical Society of America B*, 19(4), 765-771 (2002).

V-25. S. Leon-Saval, T. Birks, W. Wadsworth, P. St J Russell and M. Mason, “Supercontinuum generation in submicron fibre waveguides”, *Optics Express*, 12(13), 2864-2869 (2004).

V-26. A. Mussot, T. Sylvestre, L. Provino, H. Maillotte, “Generation of a broadband single-mode supercontinuum in a conventional dispersion-shifted fiber by use of a subnanosecond microchip laser”, *Optics Letters*, 28(19), 1820-1822 (2003).

V-27. J. K. Ranka, R. S. Windeler, and A. J. Stentz, “Visible continuum generation in air–silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm”, *Optics Letters*, 25(1), 25-27 (2000).

V-28. B. A. Cumberland, J. C. Travers, S. V. Popov, J. R. Taylor, “Toward visible cw-pumped supercontinua”, *Optics Letters*, 33(18), 2122-2124 (2008).

V-29. A. Kudlinski, G. Bouwmans, M. Douay, M. Taki and A. Mussot, “Dispersion-Engineered Photonic Crystal Fibers for CW-Pumped Supercontinuum Sources”, *Journal of Lightwave Technology*, 27(11), 1556-1564 (2009).

V-30. A. Mussot, A. Kudlinski, M. Kolobov, E. Louvergneaux, M. Douay and M. Taki, “Observation of extreme temporal events in CW-pumped supercontinuum”, *Optics Express*, 17(19), 17010-17015 (2009).

- V-31. G. P. Agrawal, *Nonlinear fiber optics*, Academic press, Third edition (2001).
- V-32. A. Hasegawa and F. Tappert, “Transmission of stationary nonlinear optical pulses in dispersive dielectric fibers. I. Anomalous dispersion”, *Applied Physics Letters*, 23(3), 142-144 (1973).
- V-33. J. P. Gordon, “Theory of the soliton self-frequency shift”, *Optics Letters*, 11(10), 662-664 (1986).
- V-34. F. M. Mitschke and L. F. Mollenauer, “Discovery of the soliton self-frequency shift”, *Optics Letters*, 11(10), 659-661 (1986).
- V-35. G. Genty, M. Lehtonen, H. Ludvigsen and M. Kaivola, “Enhanced bandwidth of supercontinuum generated in microstructured fibers”, *Optics Express*, 12(15), 3471-3480 (2004).
- V-36. N. Akhmediev and M. Karlsson, “Cherenkov radiation emitted by solitons in optical fibers”, *Physical Review A*, 51(2), 2602-2607 (1995)
- V-37. M. Andreana, A. Bertrand, Y. Hernandez, P. Leproux, V. Couderc, S. Hilaire, G. Huss, D. Giannone, A. Tonello, A. Labruyère, N. Rongeat and Philippe Nérin, “Adjustable supercontinuum laser source with low coherence length and low timing jitter”, *Proc. SPIE* 7714, 771404 (2010).
- V-38. F. De Bisschop, “Electronic gating for particle/cell counting and sizing, DSP-operated”. *IEEE Transactions on instrument and measurement*, 58(9), 3159-3166 (2009).
- V-39. L. Spielman and S. L. Goren, “Improving resolution in Coulter counting by hydrodynamic focusing”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(2), 175-182 (1968).
- V-40. N. Rongeat, P. Brunel and P. Nérin, “Dispositif d’inspection d’un fluide biologique”, Demande de Brevet n° FR 11/00050 (2011).
- V-41. P. Nérin, P. Moreno and D. Cremien, “Dispositif d’inspection d’un fluide par illumination uniforme au moyen d’un guide de lumière conforme”, Brevet US 7,724,371 (2006).

V-42. R. A. Hoffman, “Apparatus and method employing incoherent light emitting semiconductor devices as particle detection light sources in a flow cytometer”, Patent US 6,813,017 B1, (2000).

V-43. D. Lefèvre, S. Vériac and H. Champseix, “Reagent and process for the identification and counting of biological cells”, Patent US 7,638,290, (2006).

V-44. M. Roederer “Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats”, *Cytometry Part A*, 45(3), 194-205 (2001).

Conclusion générale

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit concerne l'amélioration des performances des systèmes de diagnostic hématologique commercialisés par HORIBA Medical. Ces analyseurs, basés sur des techniques de cytométrie en flux, permettent de compter et d'identifier différentes populations ou sous-populations cellulaires. Plusieurs systèmes électro-optiques, intégrant ces appareils, permettent d'obtenir des paramètres physiques des cellules grâce à des mesures d'impédance, de diffraction et de fluorescence. Actuellement, les analyseurs d'hématologie d'HORIBA Medical intègrent une seule mesure de fluorescence provenant de l'interaction des cellules nucléées (leucocytes et érythroblastes) marquées au Thiazole Orange (TO) avec une source laser monochromatique émettant en régime continu dans le bleu. HORIBA Medical souhaite augmenter le nombre de fluorescences dans ses analyseurs afin d'effectuer des mesures plus spécifiques, comme des tests sur des sous-populations cellulaires (lymphocytes B,...), qui permettraient de cibler d'autres types de maladies du sang (leucémies aigües, hémopathies lymphoïdes B,...).

L'amélioration des analyses implique l'utilisation d'un nombre de plus en plus élevé de marqueurs cellulaires ce qui complexifie de manière importante les systèmes d'excitation, de détection et de traitement de données. Dans le but de pallier les inconvénients relatifs à l'augmentation du nombre de paramètres à mesurer, nous avons mis aux point différents mécanismes optiques basés sur l'ajustement d'intensités des fluorescences, sur du codage temporel de sources de lumière et sur l'utilisation de sources polychromatiques. Par ce biais nous avons pu résoudre les problèmes de détection liés aux recouvrements spectraux entre émissions de fluorescence et montrer la pertinence d'une nouvelle méthode d'excitation basée sur l'illumination d'une cellule grâce à une impulsion optique polychromatique nanoseconde unique.

Le premier travail a consisté à déterminer la statistique des temps de passage au sein des analyseurs. Grâce à ce travail nous avons pu montrer qu'un fonctionnement à des fréquences de répétitions comprises entre 10 et 20 kHz permettait d'identifier pas moins de 95 % des cellules biologiques. Ce dimensionnement a permis de mieux cibler les sources lasers potentiellement intéressantes et d'envisager la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic

basée sur la synchronisation temporelle des cellules à caractériser et des impulsions lumineuses.

Dans un second temps, nous avons développé un système de test par fluorescence basé sur l'excitation simultanée du Thiazole Orange (TO) et de la phycoérythrine cyanine 5 (PC5) permettant d'augmenter le rapport signal sur bruit des fluorescences dans les canaux de détection, étant donné que l'intensité de fluorescence du TO est beaucoup trop élevée par rapport à celle de la PC5. Lors de la campagne de tests, la PC5 a été conjuguée à des anticorps anti-CD20 ou anti-CRTH2, pour identifier respectivement les lymphocytes B, et les éosinophiles et les basophiles. Pour cela nous avons couplé deux sources lasers dont les longueurs d'onde d'émission ont été judicieusement choisies (491nm et 561nm) pour égaliser les niveaux de fluorescences des deux fluorochromes et cela par l'intermédiaire d'un filtre acousto-optique. Nous avons alors démontré que la discrimination des éosinophiles et des basophiles parmi les autres leucocytes (i.e. monocytes, neutrophiles, lymphocytes, granulocytes, immatures granuleux, cellules à haute teneur en acides nucléiques) peut être fortement améliorée. De plus, cet analyseur permet d'obtenir un comptage absolu des cellules pour un volume de sang donné, ce qui contraste avec la plupart des cytomètres en flux.

Dans le chapitre IV, nous présentons des résultats concernant l'identification de billes fluorescentes en utilisant un système de codage retranscrit sur l'émission d'une source laser à deux longueurs d'onde. Des radiations à 491 nm et 532 nm sont modulées en amplitude par des signaux sinusoïdaux à 200 kHz et à 300 kHz qui interagissent avec des microsphères fluorescentes vertes et rouges. Grâce à la reconnaissance de la fréquence de modulation il est possible d'extraire les signaux de fluorescence émis par chacune des billes.

Dans le dernier chapitre, nous présentons l'étude et la création d'un système optique d'excitation pouvant améliorer les capacités et la précision des cytomètres en flux. Il est basé sur l'utilisation d'une source polychromatique de type supercontinuum fonctionnant en régime subnanoseconde et couvrant les régions spectrales visible et infrarouge entre 400 nm et 2000 nm. Ce spectre est obtenu par conversion non linéaire dans une fibre microstructurée

en silice qui a été développée dans le cadre d'un projet européen (NextgenPCF). Le principe d'excitation des cellules utilise la synchronisation de celles-ci avec une impulsion optique unique.

Nous avons tout d'abord adapté une source de lumière à large spectre permettant de réaliser une mesure de diffraction dans une direction perpendiculaire à celle de l'excitation (mesure à 90°). Cette adaptation a été réalisée par l'intermédiaire d'une fibre multimode à profil rectangulaire qui minimise les effets chromatiques. Une caractérisation de plusieurs sous populations cellulaires a alors été obtenue. Dans un second temps, et grâce à un filtrage spectral dans le bleu, nous avons montré la possibilité d'obtenir une discrimination cellulaire par mesure de la fluorescence du Thiazole Orange révélant la présence d'acides nucléiques (ADN et ARN). Nous avons également obtenu une identification des lymphocytes, monocytes, granulocytes, immatures granuleux et des cellules à haute teneur en acides nucléiques (telles que les lymphoblastes, les monoblastes et les plasmocytes). Les caractéristiques optiques des sources de continuum utilisant des lasers de type microchip apparaissent donc comme particulièrement satisfaisante pour le diagnostic cellulaire par cytométrie de flux. Par la suite, nous souhaitons augmenter le nombre de signaux de fluorescence (>4).

Nous souhaitons combiner les avancées technologiques démontrées pendant ma thèse dans un seul analyseur dans le but de profiter de tous les avantages de chaque méthode et technique. Dans ce cadre, HORIBA Medical prépare le dépôt d'un projet de recherche et développement ambitieux intégrant l'optimisation des analyseurs d'hématologie spécifiques ainsi qu'une campagne de tests sur des sangs « pathologiques ». La commercialisation de ces systèmes haut de gamme, qui permettront de gagner en précision sur l'aide aux diagnostics, devrait être effective d'ici quelques années.

Liste des publications

Journaux Internationaux à Comité de lecture	<p><u>Nelly RONGEAT</u>, Sylvain LEDROIT, Laurence CHAUVET, Didier CREMIEN, Alexandra URANKAR, Vincent COUDERC, Philippe NERIN</p> <p>“Automatic cytometric device using multiple wavelength excitations”</p> <p><i>Journal of Biomedical Optics JBO</i>, 16, publié en ligne le 16 mai (2011).</p> <p><u>Nelly RONGEAT</u>, Patrick BRUNEL, Jean-Philippe GINEYS, Didier CREMIEN, Vincent COUDERC, Philippe NERIN</p> <p>“Wavelength encoding technique for particle analyses in hematology analyzer”</p> <p><i>Optics Express</i>, accepté (2011).</p> <p><u>Nelly RONGEAT</u>, Philippe LEPROUX, Vincent COUDERC, Patrick BRUNEL, Sylvain LEDROIT, Didier CREMIEN, Stéphane HILAIRE, Guillaume HUSS, Philippe NERIN</p> <p>“Flow cytometer based on triggered supercontinuum laser illumination”</p> <p><i>Cytometry Part A</i>, en cours de soumission (2011).</p>
--	---

**Conférences
internationales**

Marco Andreana, Anthony Bertrand, Yves Hernandez, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Stéphane Hilaire, Guillaume Huss, Domenico Giannone, Alessandro Tonello, Alexis Labruyère, **Nelly Rongeat**, Philippe Nérin

“Adjustable supercontinuum laser source with low coherence length and low timing jitter”

Photonics Europe, Conference SPIE 2010 Brussel; Proceedings SPIE 7714.

Nelly RONGEAT, Jean-Philippe GINEYS, Sylvie VERIAC, Didier LEFEVRE, Sébastien RAIMBAULT, Philippe NERIN

“Use of wavelength multiplexing and demultiplexing technique to analyze cellular aspects in flow cytometry for hematology in vitro diagnostic purposes”

Optical Complex System OCS, Cannes, France (2008).

Nelly RONGEAT, Sylvain LEDROIT, Laurence CHAUVET, Didier CREMIEN, Alexandra URANKAR, Vincent COUDERC, Philippe NERIN

“Automatic cytometric device using multiple wavelength excitations”

European Conference of Biomedical Optics ECBO, Munich, Allemagne (2011).

	<p><u>Nelly RONGEAT</u>, Philippe LEPROUX, Vincent COUDERC, Patrick BRUNEL, Sylvain LEDROIT, Didier CREMIEN, Stéphane HILAIRE, Guillaume HUSS, Philippe NERIN</p> <p>“Innovative hematology analyzer: Hematology diagnostics supercontinuum laser illumination”</p> <p><i>Conference on Lasers and Electro Optics CLEO, Baltimore, USA (2011).</i></p>
Conférences nationales	<p><u>Florent DOUTRE</u>, Nicolas MOTHE, Nelly RONGEAT, Dominique PAGNOUX, Vincent COUDERC</p> <p>“Source laser à cavités multiples pour la génération d’une lumière polychromatique sans gigue temporelle : application à la cytométrie en flux”</p> <p><i>Journées nationales d’optique guidée JNOG, Besançon, France (2010).</i></p>
Brevet	<p><u>Nelly RONGEAT</u>, Patrick BRUNEL, Philippe NERIN</p> <p>“Dispositif d’inspection d’un fluide biologique”</p> <p><i>Déposé le 7 janvier 2011, n°11/00050 (France).</i></p>

Résumé

Mon travail de thèse concerne la détection de fluorescences multiples et de signaux d'extinction résolus en longueurs d'onde pour la cytométrie en flux. Plusieurs techniques de traitement des faisceaux sont exposées dans le but d'améliorer le rapport signal sur bruit de la détection. Ces avancées permettent de minimiser les facteurs de compensations traditionnellement utilisés en cytométrie de flux. Dans une première expérience, les intensités de deux sources lasers sont ajustées dans le but d'identifier des populations leucocytaires marquées par deux types de colorants (Thiazole Orange et phycoérythrine cyanine 5 couplé à un anticorps) ayant des intensités de fluorescence fortement inégales. Dans une seconde expérience, nous montrons que l'excitation multilongueur d'onde de l'échantillon permet, dans des conditions de codage appropriées, de séparer les fluorescences provenant de microsphères différentes. Ce procédé apporte une fiabilité accrue pour la caractérisation de cellules marquées. La perspective est d'intégrer ce système dans des analyseurs d'hématologie utilisant des techniques d'immunomarquages multiples. Dans une troisième expérience, nous démontrons qu'un système laser polychromatique de type supercontinuum fonctionnant en régime déclenché avec une synchronisation des impulsions lasers sur le passage de cellules dans un cytomètre en flux permet d'identifier efficacement des populations ou sous-populations cellulaires. Les expériences ont été effectuées sur des cellules sanguines en utilisant la diffraction orthogonale et la fluorescence issue d'un colorant spécifique des acides nucléiques.

Mots Clés : cytométrie en flux, hématologie, longueurs d'onde d'excitation multiple, fluorescences multiple, cellules sanguines, optique non linéaire, supercontinuum, technique de modulation.

Using polychromatic sources for cytologic diagnostic. Application to hematology.

Abstract

The detection of multiple fluorescence and extinction signals resolved in wavelengths for flow cytometry is described in this manuscript. Several techniques in optical beam processing are exposed in order to improve the signal to noise ratio in detection. These headways allow minimizing compensation factors traditionally used in flow cytometry. In the first experiment, intensities of two laser sources are adjusted in order to identify leukocyte populations labeled by two types of dyes (Thiazole Orange and phycoerythrin cyanin 5 coupled to an antibody) having strongly uneven fluorescence intensities. In a second experiment, we show that coding of each wavelength excitation signals allows accurate separation of fluorescences from different microspheres. This process increase reliability on the characterization of labeled cells. The prospect is to integrate this system into hematology analyzers using techniques of multiple immunostaining. In the third experiment, a supercontinuum white-light source is integrated in a specific flow cytometer. This triggered source is synchronized to blood cells in a flow cytometer to identify efficiently cell populations or subpopulations. The experiments were realized on blood cells using orthogonal diffraction and fluorescence coming from a nucleic acid specific stain.

Keywords : flow cytometry, hematology, multiple excitation wavelengths, multiple fluorescences, blood cells, nonlinear optic, supercontinuum, modulation technique.