



HAL
open science

Cytométrie et ses applications en immunologie clinique / Cytometry and its clinical applications in immunology

Fatima Zahra El Hentati, Cristina Iobagiu, Claude Lambert

► To cite this version:

Fatima Zahra El Hentati, Cristina Iobagiu, Claude Lambert. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique / Cytometry and its clinical applications in immunology. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009, 410, pp.23-2. hal-00466034

HAL Id: hal-00466034

<https://hal.science/hal-00466034>

Submitted on 22 Mar 2010

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

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

Cytométrie et ses applications en immunologie clinique

Cytometry and its clinical applications in immunology

FATIMA ZAHRA EL HENTATI^{(1) (2)}, CHRISTINA IOBAGIU⁽¹⁾, CLAUDE LAMBERT^{(1) (2) (*)}

⁽¹⁾ *Laboratoire d'Immunologie - Pôle de Biologie Pathologie - Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne, 42055 St Etienne Cedex 2.*

⁽²⁾ *Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne, Centre CIS – Axe des Systèmes Biologiques - LPMG UMR CNRS 5148, 158 Cours Fauriel 42023 Saint-Étienne Cedex 2, France*

^(*) *claudelambert@chu-st-etienne.fr*

Résumé :

La cytométrie (cyto = cellule ; métrie = mesure) consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique des cellules. Elle utilise la fluorescence, des moyens fluidiques, optiques et le soutien informatique pour le traitement des signaux ou des images. Ses performances sont exceptionnelles (analyse 4, 6, 8, à très grande vitesse (de 500 à 10 000 cellules par seconde). La cytométrie en image est très utilisée en recherche. En analyse médicale, la cytométrie en flux est de plus en plus utilisée, pour le typage des leucémies, la numération des très nombreux sous-types cellulaires par exemple pour le suivi du SIDA ou des traitements immunosuppresseurs et greffes. De plus, l'état d'activation, de maturation et de prolifération des cellules peuvent être mesurés. La haute précision et large utilisation de la cytométrie en routine a déjà permis de décrire des nouveaux sous-types cellulaires tels que les lymphocytes T gamma delta, muqueux, les cellules TNK, les lymphocytes régulateurs dont l'action est ciblée au sein de la cellule immune. Des proliférations monoclonales de signification indéterminées mais potentiellement évolutives ont été observées. Les désordres prolifératifs et des hétéroplodies peuvent être rapidement analysés. D'autres applications en cancérologie et microbiologie sont en cours de développement. En conclusion, l'apport majeur de la cytométrie est de pouvoir aborder les populations cellulaires dans leur grande diversité et complexité. Il serait en effet ridicule de limiter ces systèmes à des ensembles homogènes et uniformes. La « sociologie » des populations cellulaires est un nouveau champ encore à défricher.

Abstract:

Cytometry (cyto = cell; metry = measuring) consist in an objective, quantitative et multiparametric analysis of cells. It is based on fluorescence, fluidic and optical tools with the help of signal or image computer treatment. It is a high performance system allowing simultaneously analysis 4, 6, 8 or more parameters, at very high speed from 500 to 10 000 cells per second). Image cytometry is largely used in research. In medical analysis, Flow-cytometry is more and more used for leukaemia typing, lymphocyte counting, among them HIV monitoring or immunological treatments follow-up. Identification of numerous cell subtypes and their activation, maturation or proliferation status is now possible. Its high precision and wide use have lead to the description of new cell subtypes (e.g. gamma delta, mucosal, T.NK or regulatory T cells...) that have targeted activity. Recently, oligoclonal clonopathies of undetermined significance but with risks for pathological development have been described. Proliferative or heteroploidy disorders can also be evaluated. Applications in solid tumor and microbiology are under development. In conclusion, the major point of cytometry is to bring tools to approach cell populations in their diversity and complexity. It would be ridiculous to consider them as homogeneous, uniform systems. In other words, cell « sociology » is a wide new field that remains to be explored.

Descripteurs :

Cytométrie ; Cytométrie en flux; Lymphocytes T gamma delta ; Lymphocytes T muqueux ; TNK ; Lymphocytes régulateurs ; Lymphocytes T non conventionnels ; clonotypage ; sociologie cellulaire ; cancérologie ; microbiologie ; mesure.

Keywords:

Cytometry ; Flowcytometry ; cell characterisation ; unconventional T cells ; gamma delta T cells ; Treg ; Clonotyping ; cell sociology

Abréviations :

BCECF	Bis carboxyméthyl carboxy fluorescéine
CD	Cluster de différenciation
CFSE	Carboxyfluoresceine succinimidyl ester
CMF	Cytométrie en flux
CMV	Cytomégalovirus
Cy	Cyanines
FSC	Diffraction en angle faible (forward scatter)
FITC	F luoresceine;
GFP	Green Fluorescent Protein
HIV	Virus human du déficit immunitaire.
HPN	hémoglobinurie paroxytique nocturne
MFI	Moyenne de fluorescence
PE	Phycoérythrine
PMT	Photomultiplicateurs
SIDA	Syndrome d'immunodéficit aigu
SSC	Diffraction latérale (side scatter)
TMRM	Tétraméthylrhodamine Méthyl Ester
Treg	T régulateurs
T $\gamma\delta$	Lymphocytes T de type gamma-delta

I. Introduction

Grâce au développement récent des technologies instrumentales, de nombreuses applications de la cytométrie ont été développées pour l'analyse quantitative du système immunitaire surtout dans ses composantes cellulaires. Ces applications sont progressivement transférées aux applications cliniques. Cette technologie est en plein essor et devrait nettement améliorer les moyens de monitoring objectif de l'état immunitaire chez les patients dans différentes maladies (déficits immunitaires, infections graves, maladies inflammatoires chroniques, auto-immunité) au décours de traitements (immunostimulants, immunosuppresseurs, vaccinations préventive, thérapeutique) ou encore les tentatives d'induction de tolérance.

La cytométrie est une spécialité récente qui s'est développée principalement au cours des quinze dernières années.

Elle consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique des cellules (cyto = cellule ; métrie = mesure). La cytométrie a recours à des moyens technologiques très

sophistiqués, alliant optique et traitement du signal ou de l'image. On en distingue deux grandes familles :

I.1. La cytométrie en image

A partir de la microscopie optique avec traitement informatique des images. Elle comprend la microscopie fluorescence classique mais à plusieurs couleurs et la microscopie confocale qui scanne les préparations cellulaires sur plusieurs plans optiques permettant d'une part, d'avoir des images d'une très haute définition et d'autre part des possibilités de construction d'images en trois dimensions. Elle peut être appliquée sur des frottis cellulaires et des cellules fixées mais également sur des cellules vivantes. Il est possible de cinématographier les comportements cellulaires en culture voire directement dans les organismes chez l'animal mais également chez l'homme, à travers la peau et les muqueuses fines. Très récemment, il a été mis au point un microscope confocal pour des applications par l'endoscopie au niveau broncho-pulmonaire et digestif.

I.2. La cytométrie en flux (CMF)

Sujet principal de cette revue, son principe est assez simple : les cellules sont propulsées une par une et à grande vitesse, dans un flux hydraulique de très faible diamètre (entre 50 et 150 microns) autocentré par un second flux liquide qui sert de gaine (liquide de gaine) [1]. Elles passent devant un (ou plusieurs) faisceau lumineux au niveau de la « cellule » d'analyse. Ce faisceau lumineux est généralement un faisceau laser de diamètre presque équivalent à la cellule (environ 50 microns) ce qui peut expliquer l'importance de son alignement sur le flux hydraulique. Les cellules ne sont généralement observées que par le signal lumineux qu'elles diffusent en passant devant le laser. Les lumières diffractées sont capturées par des détecteurs électroniques (photodiodes). Certains capteurs ont une forte amplification électronique (photomultiplicateurs (PMT)). L'utilisation de fluorochromes (colorants fluorescents) fixés sur des anticorps spécifiques permet de détecter, la présence des molécules comme les marqueurs (CD) des leucocytes. La CMF s'applique donc uniquement à des cellules en suspension et est particulièrement adaptée à l'analyse de liquides biologiques : sang, lavage broncho alvéolaire, ascite, épanchement pleural ou ascite, liquide céphalorachidien, aspiration médullaire Mais il est possible de faire des études sur des cellules tissulaires après remise en suspension des cellules par dilacération des tissus. Un instrument très récent permet de capturer directement l'image de la cellule par une micro caméra disposée à la place des PMT.

La cytométrie est quantitative. L'intensité des signaux émis est directement dépendante de la taille de l'évènement analysé et de la densité de molécules à sa surface. Le nombre d'éléments analysés peut également être compté avec précision. Elle est multiparamétrique : plusieurs signaux peuvent être analysés simultanément.

II. Principes de la cytométrie

La reconnaissance des cellules a été largement développée grâce à l'utilisation de la fluorescence. Les molécules fluorescentes excitées par une source de lumière à une longueur d'ondes donnée émettent un signal lumineux d'une autre longueur d'ondes. Leur application en cytométrie est limitée par la disponibilité des sources lumineuses utilisées. En microscopie, presque tout le spectre de l'UV au rouge profond est utilisable par filtration d'une source à large spectre. En CMF les sources sont représentées par des lasers à une seule longueur d'ondes chacun. Les plus courants sont des lasers à argon (bleus ; 488 nanomètres -nm-, laser), lasers à hélium- néon (rouges, 633nm) et lasers ultra-violet (355nm). Plus récentes, des diodes permettent des excitations violettes (405nm) ou vertes (532nm). Les cytomètres peuvent utiliser plusieurs sources d'excitation en même temps, en parallèle. Les instruments les plus récents utilisés dans les laboratoires de diagnostics utilisent deux à trois lasers. En recherche, certains appareils ont 4 ou 5 lasers.

De très nombreuses molécules fluorescentes sont disponibles. Elles sont caractérisées par leurs spectres d'excitation et d'émission (Figure 1) et leurs propriétés physico-chimiques. Par

exemple, la fluorescéine est excitée autour de 488nm (bleu) et émet une lumière verte (pic à 525nm).

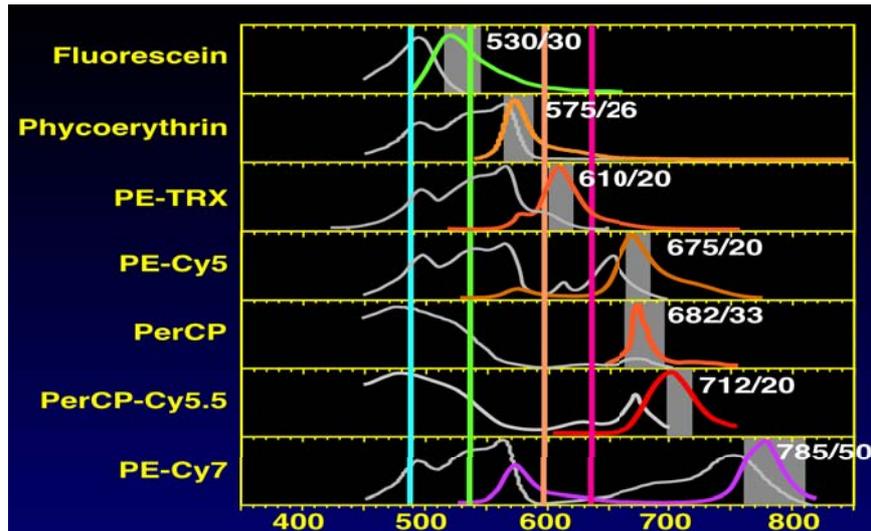


Figure 1 : Différents fluorochromes utilisés en CFM, avec leurs spectres où ils peuvent être excités (en gris) et spectres qu'ils émettent (en couleur) en nm (Archives de BD Biosciences).

Certaines molécules fluorescentes sont directement utilisables par leurs capacités à se fixer de façon relativement spécifique à certains constituants cellulaires par exemple les acides nucléiques (ex : iodure de propidium-IP) ou de constituants membranaires (ex : carboxyfluoresceine succinimidyl ester (CFSE) ou PKH26).

Des molécules peuvent changer de couleur en fonction des conditions de leur environnement : selon le pH comme le carboxyméthyl carboxy fluorescéine (BCECF) ou le contenu en calcium comme le fluo-4, l'activité mitochondriale comme le Tétraméthylrhodamine Méthyl Ester (TMRM).

Enfin, des molécules sont utilisées comme révélateurs, en couplage avec des ligands spécifiques. Les plus utilisées sont la fluoresceine (FITC, émission verte, pic maximum à 525nm), la phycoérythrine (PE, orange, pic à 575nm), les cyanines (Cy3, Cy5, Cy7 rouge) et les alexas. Le nombre de molécules excitable par un même laser est assez restreint. Des tandems de molécules élargissent les possibilités. Elles consistent à l'association de deux molécules, la première molécule (souvent PE) est activée par le laser. Elle émet une lumière qui active le deuxième fluorochrome qui émettra une couleur de longueur d'ondes différente. Ce procédé s'appelle FRET qui signifie « fluorescence par résonance de transfert d'énergie ».

Plus récemment, des molécules physiologiques ont pu être marquées par génie génétique avec une molécule fluorescente comme la Green Fluorescent Protein (GFP) et ses dérivés. Leur expression par la cellule est donc directement mesurable.

Les fluorochromes peuvent être couplés à des anticorps monoclonaux ou des ligands de récepteurs pour détecter la présence de la molécule sur ou dans la cellule. La liste des anticorps disponibles dans le commerce est extrêmement étendue. Les spécificités les plus connues sont codées internationalement (clusters de différenciation CD). Pour les anticorps les plus utilisés, beaucoup de couplages de différentes couleurs sont disponibles, prêts à l'emploi. Il suffit de faire son choix de combinaisons. Il est également possible de fabriquer ses propres couplages ou de demander des couplages à façon à des sociétés de service.

Les applications de la cytométrie en biologie médicale sont essentiellement développées à partir de la CMF et nous nous limiterons à analyser cette technique.

III. Données techniques (Figure 2)

Le passage des cellules ou particules devant le faisceau laser entraîne une diffusion de la lumière en fonction de leurs caractères physiques. Le signal est capturé par deux photodiodes. La première est disposée dans le prolongement du laser (forward scatter, FSC) à faible angle.

Le signal capté reflète approximativement la taille de la cellule. La seconde est placée latéralement, à 90° (Side Scatter, SS). Le signal capté reflète l'hétérogénéité des cellules (granularité du cytoplasme). Les cellules éventuellement marquées avec des fluorochromes émettent des signaux de différentes longueurs d'onde, triés par des jeux de miroirs selectifs (dichroïques) et filtres (en ligne ou en étoile) et capturés par des photomultiplicateurs (PMT). Le signal fluorescent émis par les cellules marquées est relatif. Le principe est de comparer le signal émis par la cellule en présence d'un marqueur spécifique au bruit de fond émis par les cellules seules (auto-fluorescence) ou incubées avec un marqueur non spécifique conjugué au même fluorochrome (marquage non spécifique). Le plus souvent, la référence est un anticorps de même isotype, même source, même fabricant mais sans spécificité (contrôle isotypique). La très forte amplification du signal permet de détecter une fluorescence non spécifique répartie en courbes en cloche. Le signal spécifique a généralement aussi une répartition en cloche mais il peut être de 100 à 1000 fois plus fort. Dans les meilleurs cas qui sont très fréquents, il est aisé de distinguer les deux répartitions de signaux avec une vallée très nette entre les deux courbes. La fréquence de cellules « positives » est alors considérée. L'intensité de marquage sur les cellules marquées peut aussi être prise en compte (Moyenne de fluorescence, MFI). Il existe des cas où la détermination de positivité n'est pas aussi nette, soit parce que le marqueur analysé est exprimé en faible quantité sur la cellule, soit parce que l'anticorps conjugué est de mauvaise qualité. Le signal positif correspond seulement à un glissement (shift) du pic de signal. Il est alors plus objectif de comparer le ratio positif/négatif.

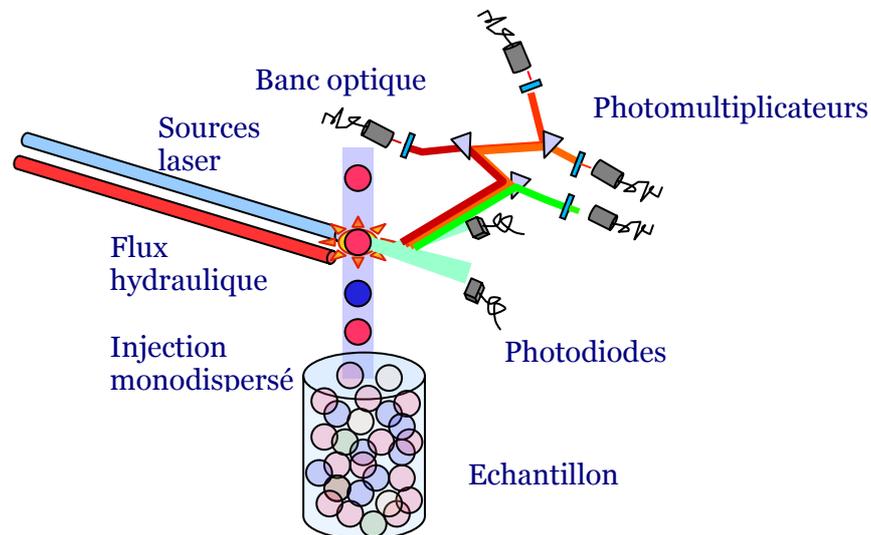


Figure 2 : Schéma technique du cytomètre en flux. Excitation des cellules par deux ou trois sources lasers. Injection monodispersée de cellules dans le flux hydraulique; analyse de la dispersion de la lumière par des photodiodes (en ligne FSC et latéralement SSC). Capture de la fluorescence émise par les photomultiplicateurs (PMT) après redirection et sélection des longueurs d'ondes par des miroirs dichroïques et des filtres.

La distinction entre les couleurs peut poser des problèmes techniques d'autant plus compliqués que le nombre de couleurs analysées simultanément est grand. La capture du signal est limitée par les filtres à une bande passante. Il n'est pas possible d'utiliser des bandes trop étroites car le signal serait trop faible. Comme les couleurs émises ont un spectre d'émission relativement large qui peut chevaucher, en marge, dans la bande d'un autre signal adjacent. Ces chevauchements de spectres induisent du signal non spécifique sur les autres détecteurs. Par exemple, l'utilisation d'un anticorps couplé à de la PE émet un fort signal sur le détecteur rouge. Mais une faible proportion de ce signal est également détectée sur le détecteur du vert et sur le détecteur du rouge profond. Ces artefacts sont corrigés par traitement mathématique (compensations de fluorescence). Le réglage des compensations est un problème délicat en cytométrie. Il existe des procédures assistées par ordinateur pour les

marquages courants. Cependant, pour un marquage donné, si le réglage des détecteurs et des compensations est correctement appliqué, il reste très stable pendant plusieurs mois et l'analyse est hautement robuste et fiable si des procédures de contrôles de qualité sont pratiquées avec rigueur. Dans notre expérience, nous voyons des résultats très proches chez des patients qui ont des bilans annuels.

Les analyses étant pratiquées dans un flux liquide, il est difficile de maîtriser le volume du liquide de l'échantillon qui est analysé et donc d'en déduire le compte des cellules. Cette difficulté a été solutionnée par l'utilisation d'un standard interne qui permet par calcul de déterminer la concentration exacte de cellules mesurées. Quelques instruments garantissent le volume analysé en utilisant des systèmes de seringues micrométriques.

La combinaison des sources lumineuses et des fluorochromes permet d'analyser couramment deux, trois, jusqu'à huit marquages simultanés. Sur certains instruments de recherche, il a été possible d'utiliser jusqu'à 17 marquages simultanés sur chaque cellule.

Les cytomètres ont des performances exceptionnelles. Ils sont très précis, extrêmement sensibles et rapides. Le seuil de détection de molécules sur chaque cellule est très bas : de l'ordre de 5 000 molécules par cellule. Il est possible d'analyser un très grand nombre de cellules : entre 1 000 et 500 000 cellules; ce qui donne des résultats fiables. L'analyse est à grande vitesse de 500 à 50 000 cellules par seconde. Enfin, l'analyse est objective et, comme nous l'avons vu quantitative et multiparamétrique.

La CMF est utilisée dans de nombreux laboratoires hospitaliers. Il existe trois à quatre fournisseurs principaux qui proposent des instruments avec un à trois lasers, trois à neuf détecteurs de couleur. Le passage des échantillons peut être automatisé par l'utilisation de passeur de tubes ou de prise sur des plaques à 96 puits. La préparation peut être également automatisée pour les grandes séries. Les cytomètres d'analyse sont des instruments de paillasse dont la taille varie entre 50 cm et un mètre de long, 50 à 90 cm de profondeur et de hauteur. A cela, il faut ajouter l'encombrement dû à l'environnement informatique et le système de compresseur pour les mouvements des fluides. De nouveaux systèmes apparaissent qui sont de plus en plus miniaturisés jusqu'à des biopuces [2].

Il y a également des systèmes plus élaborés qui sont équipés d'un système de tri. Les cellules sont d'abord identifiées dans la cellule d'analyse puis elles sont récupérées par déviation de gouttelettes du flux à l'aide de vibrations et de champs piezzo électriques. Les instruments les plus modernes permettent de trier 4 sous-populations cellulaires en même temps. Ces instruments trieurs sont plus délicats à utiliser et nécessitent généralement un manipulateur ingénieur spécialisé [1].

Il existe d'autres méthodes de diagnostic récentes de haute technologie. La biologie moléculaire permet de mesurer de très faibles quantités d'acide nucléique pouvant provenir de très petits nombres de cellules puisqu'il est extrêmement amplifié. Elle peut être de très grande utilité dans les analyses de cellules tumorales, cellules infectées, d'activation cellulaire, de typage. Cependant, la biologie moléculaire beaucoup plus sensible que la cytométrie ne permet qu'une analyse globale de la population cellulaire dans le tube et donne un résultat moyenné de la population alors que la CMF propose des statistiques de données individuelles de la population.

Tous les types cellulaires peuvent être analysés par CMF. Les cellules idéales sont les lymphocytes qui ont la taille adaptée et sont très homogènes. Ils ont un faible contenu cytoplasmique ce qui minimise le signal parasite. Il existe de nombreux outils d'immunomarquage pour les caractériser. L'analyse des granuleux est plus délicate du fait de leur fort contenu cytoplasmique source de signaux parasites et de leur grande fragilité.

L'application la plus courante dans les laboratoires d'Immunologie est le compte des lymphocytes T (Figure 3) notamment pour le suivi des infections à HIV ou de greffes. La technique est relativement simple et très robuste. Brièvement, un échantillon (50 à 100 µl) de

sang est prélevé du tube, incubé avec des anticorps qui identifient les lymphocytes T CD4+ qui expriment les CD3 et CD4. Il est possible d'ajouter dans la même analyse un marqueur pour les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B (CD19 ou CD20), les lymphocytes NK (CD56) voire les CD16 (neutrophiles) et le CD14 ou CD15 (monocytes). Enfin, le CD45 (qui marque tous les leucocytes) est souvent utilisé pour mieux démarquer le signal du bruit de fond.

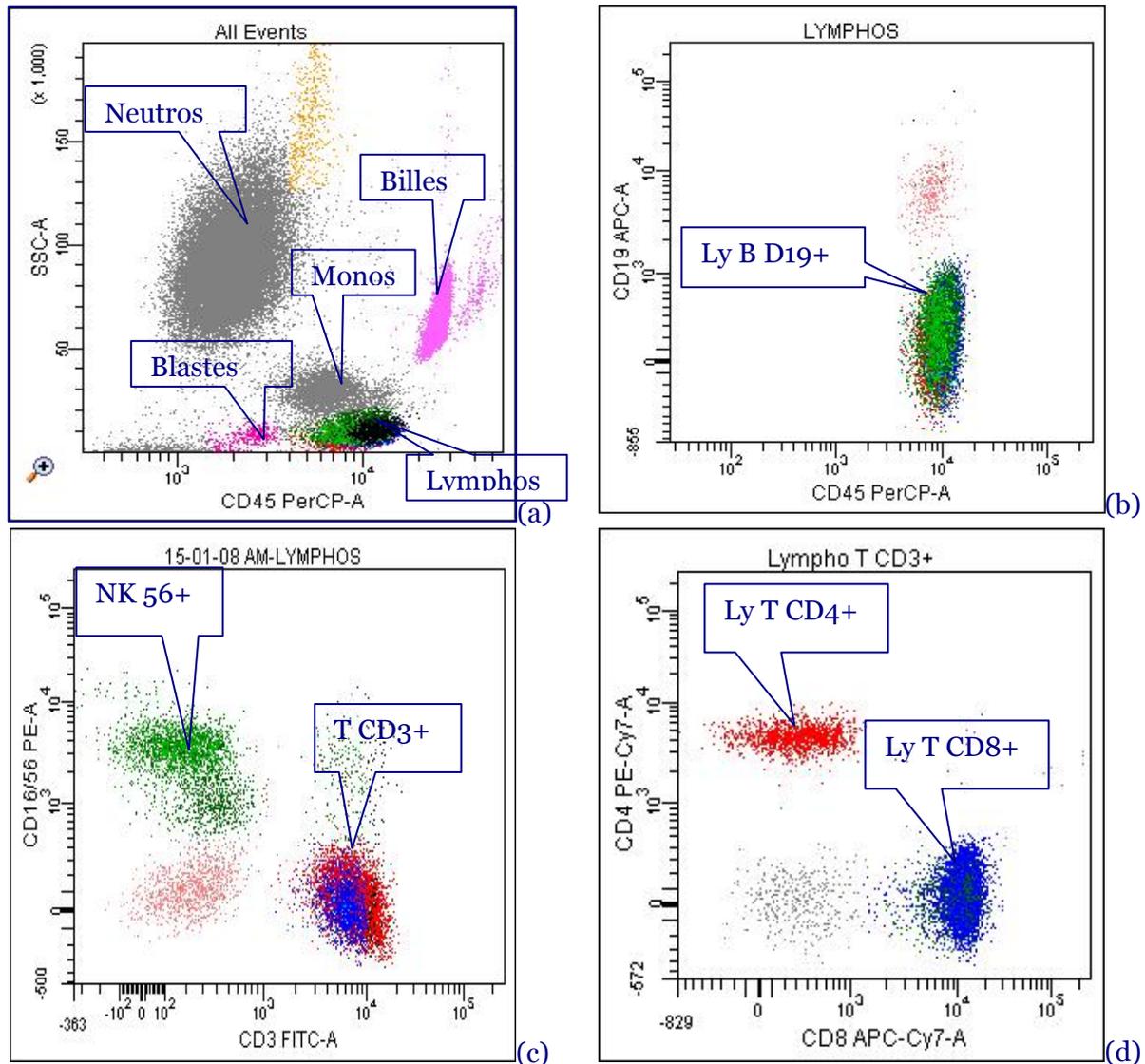


Figure 3 : Séméiologie typique d'analyse lymphocytaire. (a) distribution des leucocytes; (b) sélection des lymphocytes B (CD19+); (c) sélection des lymphocytes T (CD3+) et des NK (CD3-CD56+); (d) sélection des sous-populations lymphocytaires T CD4+ ou T CD8+.

La CMF est la méthode la plus fiable de comptage des lymphocytes T [3]. Elle est rapide : maximum 30 minutes de préparation pour une à trois minutes d'analyse. L'utilisation simultanée de plusieurs paramètres permet une identification très précise des cellules comptées. Par exemple, les lymphocytes T qui expriment CD4 sont clairement distingués des monocytes qui expriment également CD4 (bien qu'en densité beaucoup plus faible) mais pas CD3. Ainsi, les lymphocytes T CD4+ conventionnels qui expriment CD3 et CD4 correspond à 66% des T du sang périphérique chez l'adulte en bonne santé (775-1450 cell/ μ L, dans notre laboratoire). Les lymphocytes T CD8 qui expriment CD3 et CD8 (33% des T; 290-765 cell/ μ L) sont également clairement identifiés. Le rapport entre ces deux sous-populations est de 2/3 à 1/3. Les résultats peuvent être directement transmis électroniquement au système de gestion

informatique du laboratoire voire au dossier électronique du patient après validation biologique.

En revanche, l'utilisation simultanée de ces trois anticorps et l'analyse d'un très grand nombre de cellules permet d'observer des sous types rares et encore très méconnus (Figure 4) : une petite fraction (<2%) de T CD4 exprime de faibles quantités de CD8 (T CD4+CD8dim) [4]. Inversement une petite fraction (<3%) de lymphocytes T CD8 exprime de faibles quantités de CD4 (TCD8+CD4dim) [5].

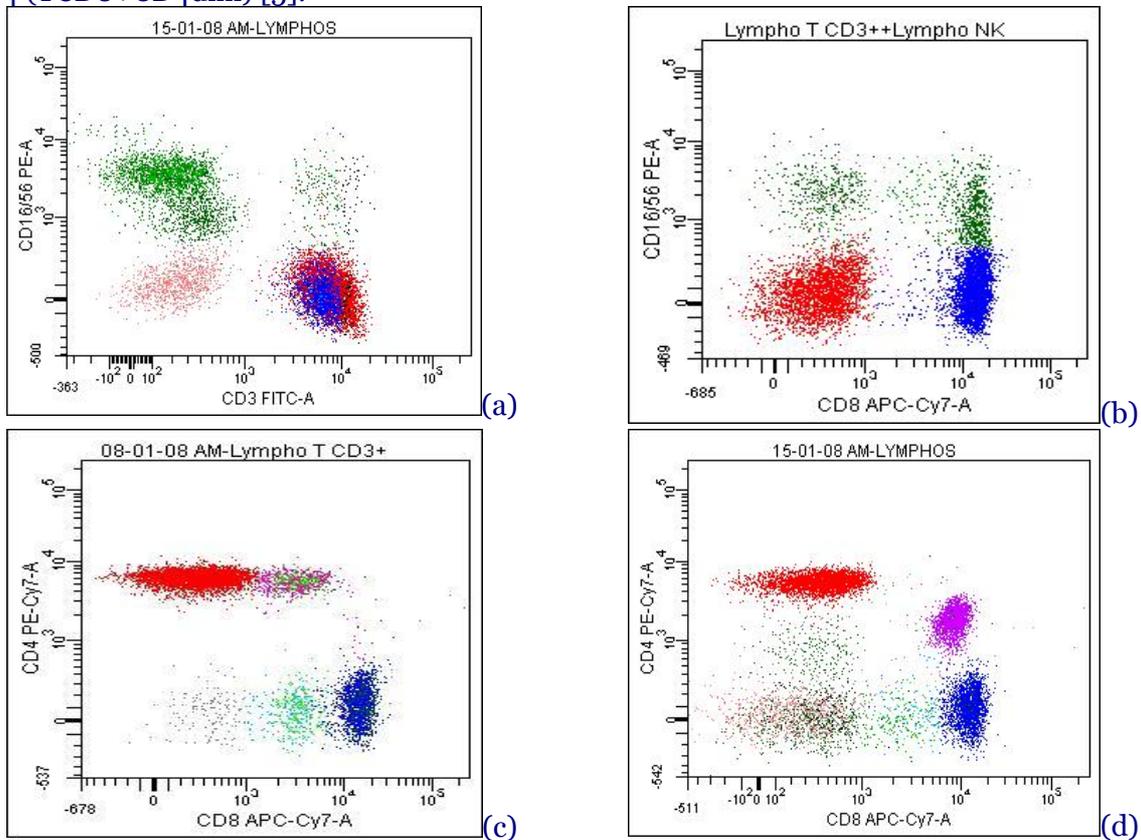


Figure 4 : Séméiologie de quelques phénotypes non conventionnels qui peuvent être observés dans les analyses lymphocytaires. (a) double population NK CD56 fort ou faible, (b) population T CD8+ exprimant le CD56, (c) T CD4+ exprimant du CD8 (T CD4+CD8dim), (d) T CD8+ exprimant du CD4 (T CD8+CD4dim).

Une autre fraction (<7%) de T CD8 exprime une quantité normale de CD3 mais du CD8 en quantité très diminuée (de l'ordre de 1/4 à 1/8 de la quantité normalement exprimée). Enfin, il existe des lymphocytes T qui n'expriment ni CD4 ni CD8. En ajoutant CD56 à cette combinaison, il est possible d'identifier et d'énumérer les lymphocytes NK qui expriment du CD56 mais pas de CD3. Une petite fraction de NK exprime de forts niveaux de CD56 qui seraient moins cytotoxique mais producteur de cytokines. Mais certains lymphocytes T CD8+ authentiques peuvent aussi exprimer du CD56 et pourraient être très cytotoxiques.

Des anticorps permettent de distinguer des lymphocytes T qui expriment les récepteurs (TCR) de type alpha-bêta (lymphocytes T $\alpha\beta$) ou de type gamma-delta (lymphocytes T $\gamma\delta$). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont minoritaires dans le sang périphérique de donneurs sains (de 2 à 10% des T) mais très nombreux dans les muqueuses [6]. Ils n'expriment jamais CD4 mais peuvent exprimer CD8 et parfois CD56. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont un peu rudimentaires, peu discriminants et peu diversifiés, entre réponse spécifique et innée. Ils ne reconnaissent pas des peptides mais des glycolipides bactériens, fongiques ou tumoraux. Ils peuvent être cytotoxiques ou modulateurs. Ils sont impliqués dans des pathologies des muqueuses comme l'asthme ou les maladies inflammatoires de l'intestin. Ils ont également une activité de protection contre le cancer. Certaines infections comme le cytomégalovirus (CMV) peuvent

induire de très fortes réponses lymphocytes $T\gamma\delta$ qui persistent plusieurs années [7]. Il a été montré qu'une telle réaction était associée à une plus faible incidence de tumeurs chez des greffés rénaux [7]. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ ont aussi une activité important dans l'organogénèse et la cicatrisation [8]. La stimulation prolongée par un virus comme le CMV pourrait être à l'origine de syndrome lymphoprolifératifs [9].

Si ces sous-populations non conventionnelles sont rares chez le sujet en bonne santé, elles peuvent être très augmentées (jusqu'à 20-30% des lymphocytes) dans certaines pathologies [4, 5]. Le même raisonnement pourrait être tenu pour les lymphocytes B circulants et pour les lymphocytes NK, pour lesquels de nombreuses sous populations sont également décrites.

Nous n'avons évoqué que des analyses de lymphocytes dans le sang périphérique. Les hématologues s'intéressent beaucoup à la moelle normale pour les diagnostics précoces d'hémopathies ou de leur maladie résiduelle après traitement. Il est également possible et serait probablement très intéressant d'analyser finement la répartition des cellules dans des liquides biologiques comme les lavages broncho-alvéolaires, les épanchements pleuraux ou les ascites [10, 11]. Il est aussi possible de le faire sur des tissus inflammatoires ou ganglions après dilacération. Ces méthodes devraient permettre de mieux identifier le type de réponse immunitaire et aider à la caractérisation de syndromes qui sont encore « monitorés » de façon très approximative.

Il est possible d'aborder la diversité des clones lymphocytaires T dans chaque sous population ($TCD4+$, $TCD8+$) en analysant les clonotypes V des chaînes du récepteur des lymphocytes T [4, 5,12]. Il existe actuellement entre 20 et 30 anticorps disponibles pour l'identification de la partie variable de la chaîne β du récepteur. L'analyse dans 7 à 9 tubes différents de la diversité du répertoire $V\beta$ permet d'identifier d'éventuelles proliférations monoclonales (Figure 5) et d'en déterminer le phénotype par exemple lymphocytes T CD4 dans la maladie de Cézary ou la prolifération de populations minoritaires monoclonales de signification indéterminée (OCUS) [4, 5], comparables aux dysglobulinémies monoclonales bénignes (MGUS) des lymphocytes B [11].

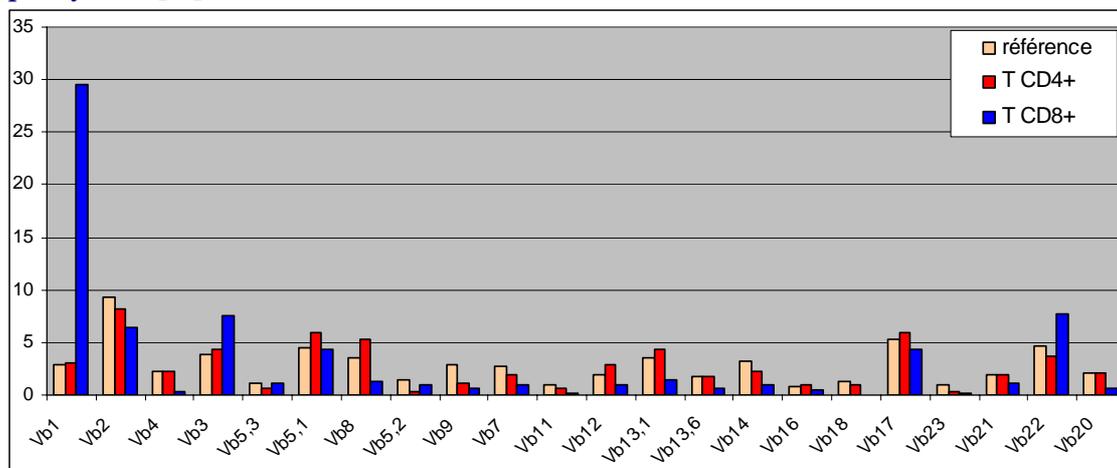


Figure 5 : Diversité des chaînes bêta du récepteur TCR (portion V) sur les lymphocytes T CD4 + (rouge) et T CD8 + (bleu). Exemple de présence d'une population monoclonale T CD8+ Vb β 1 de signification indéterminée.

Il est encore possible d'utiliser des paramètres fonctionnels comme par exemple CD25 qui est une des chaînes du récepteur de l'Interleukine 2, exprimée par des lymphocytes qui sont activés. En général, les lymphocytes T circulants ne sont pas activés. Mais en fait, une minorité (<2%) de lymphocytes T CD4 ($CD3+CD4+$) circulants exprime de façon permanente CD25, associé à l'expression de niveaux réduits de récepteur d'IL-7 (CD127) qui facilite leur identification [13]. Il a été maintenant largement démontré que ces lymphocytes T $CD4+CD25+CD27-$ avaient une très forte activité inhibitrice en produisant notamment des cytokines immunosuppressives comme l'Interleukine-10 et le TGF Bêta. Ces lymphocytes T

régulateurs (Treg) jouent un rôle très important dans plusieurs situations de tolérance immunologique comme la grossesse, les tumeurs ou les greffes. Leurs taux sont fréquemment diminués dans certaines pathologies inflammatoires chroniques comme les maladies auto-immunes. Il faut noter que l'expression du CD25 sur les lymphocytes T CD4 n'est pas absolument spécifique des lymphocytes T régulateurs. D'autres marquages ont été proposés comme l'expression d'un marqueur nucléaire : le Fox P3.

La CMF permet également de faire des tests de fonctionnalité des cellules (Figure 6). La mise en culture de lymphocytes avec des stimulants non spécifiques, des antigènes infectieux ou vaccinaux par exemple, induit une réponse immunitaire *in vitro*.

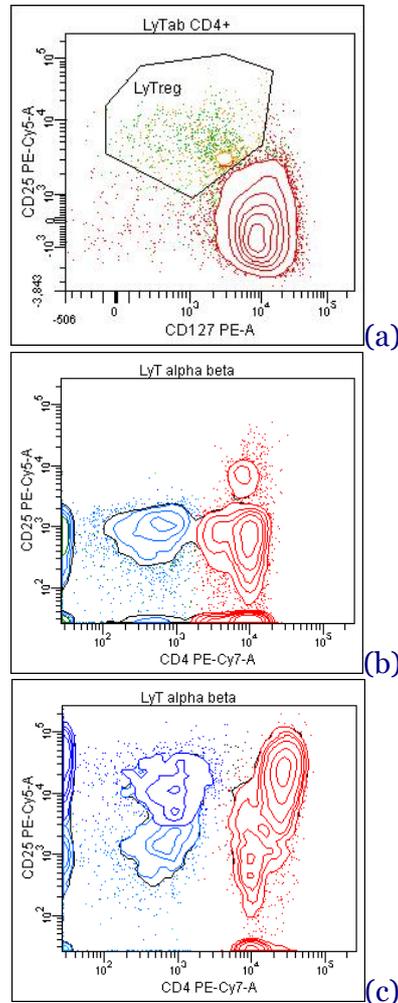


Figure 6 : Lymphocytes T exprimant (a) constitutivement du CD25 et CD 127 faible (Treg) au repos, (b) après 24h de culture sans stimulant, (c) avec stimulant non spécifique (en rouge lymphocytes T CD4+, en bleu T CD8+).

La capacité de réponse cellulaire peut être mesurée par l'expression de marqueurs d'activation comme CD25 mais également CD69 et d'autres [14]. L'analyse est très précise et permet de déterminer exactement le type de cellules activées (CD4 plus souvent que CD8) si ces lymphocytes sont T naïfs, effecteurs ou mémoires. Il est possible d'identifier les cytokines produites par chaque cellule, en capturant les cytokines dans le cytoplasme [15]. La haute sensibilité permet de rechercher des stimulations de lymphocytes spécifiques d'un peptide, cellules rares représentant moins de 1% les lymphocytes totaux, en utilisant des peptides purifiés, couplés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité [16]. Ces cellules spécifiques qui sont rares (moins de 1%) parmi les lymphocytes totaux. La stimulation peut être détectée dès 24 heures, la prolifération dès 48 heures. Il est également possible de

mesurer le nombre de divisions cellulaires en suivant les dilutions de moitié (division d'une cellule mère en deux cellules filles) d'un marquage initial des cellules (CFSE, PKH26) [17, 18]. Après stimulation, un lymphocyte T peut se diviser 6 à 8 fois en moins de 10 jours. Le test historique de transformation lymphoblastique (TTL) par incorporation de nucléotides radioactifs dans l'ADN (tests de thymidine tritiée) n'a plus aucun sens : Il nécessite 7 jours de manipulation, utilise des produits radioactifs très toxiques et ne permet pas de distinguer le type cellulaire qui est activé. Il détecte très difficilement les activations d'une faible quantité de lymphocytes spécifiques.

Il est possible par CMF de tester la cytotoxicité. En bref, des cellules cibles (tumoraux ou infectées) sont marquées avec un fluorochrome (CFSE, PKH26) et incubées avec des leucocytes plus ou moins purifiés selon les objectifs. Après 24 et 48 heures d'incubation, il est possible de mesurer la fraction de cellules cibles qui ont survécu [19], d'identifier les lymphocytes impliqués et les différents mécanismes de cytotoxicité. Cette technique reste encore délicate. Le test de cytotoxicité historique qui consistait à mesurer l'éclatement de cellules tumorales par libération de chrome 51 radioactif est trop imprécis et toxique pour être encore justifié.

D'autres nombreuses applications de tests fonctionnels des cellules peuvent être appliqués en CMF: il est possible de déclencher des réactions allergiques immédiates par incubation des basophiles avec des allergènes [20, 21]. Ce test est rapide, incomparablement précis comparé aux tests historiques de dégranulation des basophiles interprétés au microscope, moins coûteux que les tests de libération de l'histamine. Cette méthode permet de tester plusieurs molécules, d'analyser les réactions croisées. Elle permet d'étudier des molécules potentiellement toxiques interdisant les tests cutanés chez le patient. Enfin, elle ne comporte aucun risque de choc anaphylactique comparé aux tests de provocation chez le patient.

La capacité de phagocytose des monocytes et des polynucléaires peut être mesurée en mettant en culture les leucocytes avec des bactéries ou des billes de latex fluorescentes et en mesurant la proportion d'éléments qui ont été ingérés par la cellule [22]. Il est possible de mesurer la capacité de destruction des bactéries après phagocytose (mesure de l'activité oxydative).

Le cycle cellulaire peut être étudié en CMF par mesure du contenu en ADN des cellules, en utilisant de l'iodure de propidium, agent intercalant de l'ADN. La grande majorité des cellules saines est en phase de repos (Go-G1). Les cellules en mitose ou phase G2 ont exactement la double quantité d'ADN. Les cellules en apoptose en ont moins. Les clones avec aberration chromosomique ont un second pic Go-G1 et son corolaire en G2-M [23, 24].

Enfin, il est également possible d'analyser les étapes très précoces de mort cellulaire par apoptose [25] dans des maladies génétiques, des maladies inflammatoires, toxiques ou dans des syndromes prolifératifs et tumeurs. Ces techniques permettent également de mesurer la sensibilité des cellules par des traitements cytotoxiques. Elle est très utilisée dans la recherche de nouvelles drogues cytotoxiques.

IV Les indications médicales courantes

En immunologie, le compte des leucocytes est très utile pour le suivi des déficits immunologiques constitutionnels ou acquis d'origines infectieuses (SIDA) ou toxiques (immunosuppresseur, intoxication, cytopénie induite par des médicaments). Beaucoup de types de déficits immunitaires génétiques peuvent être identifiés. Il permet de suivre l'efficacité / toxicité des traitements immunosuppresseurs dans les maladies auto immunes ou inflammatoires chroniques). Les tests fonctionnels peuvent aider au diagnostic des infections chroniques ou opportunistes ou à évaluer le risque de complications infectieuses. Certains états de stress peuvent être à l'origine de déficit de réponse immunitaire (immunoparalysie) et permettre des infections nosocomiales [26]. Cet état est très fréquent dans les services de soins intensifs suite à la traumatologie ou la chirurgie lourde.

Le deuxième champ d'application médicale de la CMF concerne le typage de toutes les hémopathies [27]. En utilisant des combinaisons de marqueurs, il a été possible de caractériser très précisément un grand nombre de types de leucémies aiguës, leucémies

chroniques et lymphomes. Les cellules leucémiques peuvent être identifiées par leurs caractères aberrants de marqueurs de surface : changement d'intensité de marquage, combinaison inappropriée pour la lignée ou le stade de maturité). Les hémopathies ont largement bénéficié des progrès de la CMF pour leur caractérisation précise et leur suivi (maladie résiduelle après traitement, récurrence). De nouveaux phénotypes ont été décrits et corrélés avec des analyses de biologie moléculaire, des anomalies caryotypiques et des réponses aux protocoles thérapeutiques. Ces analyses sont faites sur sang périphérique, sur de la moelle ou sur ganglions remis en suspension. Ce domaine est plutôt réservé aux laboratoires d'hématologie et n'a pas été développé dans cette revue. De nouvelles applications sont en cours de développement.

Le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) peut être porté par l'analyse de l'expression des récepteurs associés à une glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la surface des neutrophiles, monocytes ou globules rouges [28, 29]. L'HPN est une pathologie rare qui induit des crises d'hémolyse, hémoglobinurie et un risque augmenté d'hémopathies. L'HPN est liée à une anomalie génétique liée à l'X du gène *PIG-A* codant pour l'enzyme responsable de la biosynthèse de la partie lipidique nécessaire à l'ancrage des protéines dans la membrane cellulaire. Une douzaine de récepteurs sont concernés, presque tous impliqués dans la régulation de l'activation du complément tels que CD 55 et Cd 59. Le déficit est souvent clonal. Il empêche l'expression de ces protéines sur les cellules issues du clone pathologique permettant des activations inappropriées du complément et la lyse cellulaire. Ce déficit peut être analysé par cytométrie en flux. Il existe actuellement un anticorps monoclonal thérapeutique qui bloque l'activation du C5 (eculizumab) [28].

Les études sur des cellules de tumeurs solides dans des liquides biologiques (épanchements..) ou après dilacération de tumeurs sont encore peu développées. Il est possible d'analyser l'expression de récepteurs de facteurs de croissance, hormone ou de marqueurs d'agressivité [30].

L'application de la CMF s'étend à des cellules procaryotes comme les parasites, les moisissures, les bactéries (<1µm) voire à des particules virales (<0,1µm) [31]. Ces applications sont très utiles dans l'industrie pharmaceutique (production de vaccins) et l'agro-alimentaire (qualité de préparations, contamination de jus de fruits, caractérisation du vin).

L'analyse de grands nombres d'éléments rend possible d'identifier de très petites minorités cellulaires (<0.01% de cellules). C'est la problématique très délicate des «événements rares» qui fait l'objet de projets de recherche clinique [32] : détection dans le sang périphérique ou la moelle de cellules souches CD34+ pour la greffe ; de cellules dendritiques [33] ; de cellules foetales chez la mère ; de cellules métastatiques de tumeurs solides ; plus récemment de cellules endothéliales dans les pathologies vasculaires. La mise en évidence de cellules leucémiques résiduelles après traitement dont la valeur pronostique de maladie résiduelle est démontrée [34] a permis de mieux préciser et d'abaisser les critères de guérison des patients ou d'adapter les protocoles thérapeutiques pour obtenir de meilleurs résultats. Le diagnostic très précoce des récurrences devrait aussi améliorer leur prise en charge. Dans ces applications, la CMF est moins sensible mais plus précise que la biologie moléculaire.

V Autres applications

De façon surprenante, la CMF a eu d'autres types de développements dans le cadre du diagnostic immunologique. En effet, les cytométristes utilisent beaucoup de billes qui ont approximativement la taille des cellules pour la standardisation et la validation de leurs méthodes. Récemment, il a été proposé d'utiliser des billes à la place des cellules pour faire des détections immunologiques (Figure 7).

En bref, chaque bille est utilisée comme support de test sandwich. Les billes sont incubées dans l'échantillon, l'antigène capturé est détecté par un second anticorps qui est couplé à un fluorochrome et mesuré par CMF [35-37]. Le test pratiqué sur 100 à 500 microbilles pour chaque échantillon est très sensible et très fiable. La gamme de valeurs s'étend sur plusieurs logs. Le test n'a que deux étapes et il est très rapide. De plus, en utilisant des billes qui sont

colorées par des fluorochromes, il est possible d'utiliser plusieurs tests en même temps. Les billes préparées pour différents immunodosages et colorées différemment sont mélangées avec l'échantillon dans le même tube. L'anticorps de révélation est ajouté après lavage. Les différents immunodosages sont identifiés sur la couleur des billes avec un photo-détecteur.

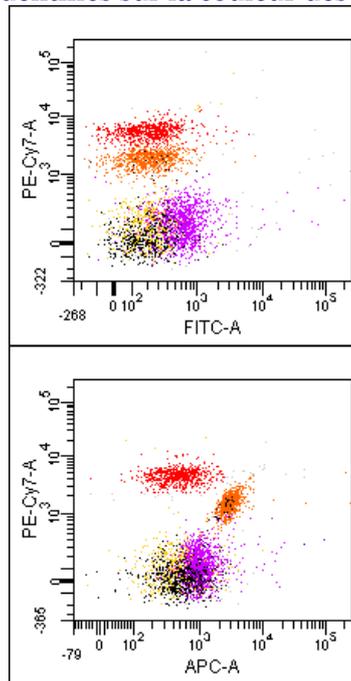


Figure 7: Exemple d'immunodosages multiples sur billes. 3 dosages simultanés (billes rouges, oranges et violettes). Contrôles en noir. Déviation des billes vers la droite selon la quantité d'antigène capturé sur chaque bille.

La quantité d'antigène capturé est détectée avec un autre photo-détecteur. Il est ainsi relativement facile d'analyser entre 6 et 12 cytokines ou facteurs solubles simultanément dans un échantillon de très petit volume (de 25 à 100 µl) et dans un temps très court (moins d'une heure). Certains systèmes proposent jusqu'à 100 analyses simultanées. Les billes sont distinguées alors par la combinaison de deux couleurs ce qui nécessite des réglages très délicats, ces cytomètres sont en général développés spécifiquement pour cette application. Il reste à déterminer le nombre et le choix des analyses simultanées qui pourraient avoir un intérêt clinique [38].

VI Limites de la CMF en diagnostic

Le champ d'adaptation de la cytométrie est donc très large mais il reste encore des difficultés. Comme nous l'avons vu, les réglages du cytomètre et les déterminations des populations positives ou négatives comportent encore une part de subjectivité et de dépendance de l'opérateur. Un travail de standardisation internationale a été élaboré pour la numération des lymphocytes T CD4+ pour le suivi des infections par HIV mais il reste à faire pour tous les tests fonctionnels et les populations non conventionnelles. Il existe actuellement plusieurs groupes de travail à l'échelle européenne, voire mondiale, pour essayer de standardiser les procédures et pour pouvoir mieux comparer les résultats de ces tests.

Les difficultés de réglage font que les analyses à plus de 4 couleurs, sont encore limitées à des laboratoires très spécialisés. Enfin et surtout, l'augmentation du nombre de paramètres analysés augmente significativement le coût de l'analyse. Ces instruments sont coûteux en investissement, les lasers restent fragiles et les systèmes de fluidiques les plus sophistiqués sont très exposés au bouchage et à l'instabilité du flux. La maintenance de ces appareils est donc coûteuse et cruciale dans les pays émergents qui ont des problèmes de chaleur, poussière, humidité, stabilité de l'alimentation électrique, d'approvisionnement des liquides

purifiés, d'achat des réactifs fluorescents coûteux, de maintenance par des ingénieurs spécialisés. Il existe des programmes de développement de systèmes à faible coût et robustes plus adaptés aux analyses dans ces pays. Des appareils ont été aussi développés pour l'océanographie ou l'espace.

VII. Conclusion

La cytométrie est en plein essor, avec augmentation continue des performances et diminution des difficultés d'utilisation et de maintenance. Elle apporte de nouveaux outils à l'exploration du système immunitaire dont la précision et la quantification devrait permettre de pouvoir suivre de façon objective, reproductible et fiable le système immunitaire dans toute sa complexité. L'utilisation d'un nombre croissant de paramètres permet la découverte de nouveaux sous-types lymphocytaires qui ont des fonctions particulières souvent contradictoires et dont le suivi pourrait avoir un intérêt en diagnostic. Le grand apport de la CMF en biologie médicale est de pouvoir aborder la grande complexité du système immunitaire, encore trop souvent négligée. Il serait bien ridicule de considérer que tous les lymphocytes T sont équivalents et se limiter à suivre leur nombre total. La sociologie de ces populations T est à ses balbutiements et reste encore un champ à défricher. La CMF et le support bio-informatique nous apportent maintenant les moyens extrêmement puissants pour le maîtriser. Le chemin est long et accidenté mais passionnant.

L'utilisation des méthodes historiques approximatives a donné aux immunologistes biologistes le sentiment d'impuissance et d'inutilité dans le support diagnostique et thérapeutique. La cytométrie apporte une nouvelle chance de support pour un suivi rationnel des pathologies, de leurs traitements et peut constituer une véritable révolution en immunologie clinique pourvu qu'on lui accorde suffisamment d'attention et la rigueur qu'elle mérite. Elle ne progressera pas en ayant peur de l'explorer. D'autres domaines plus complexes ont déjà été abordés avec succès par la science moderne.

Références

- [1] Ronot, D Grunwald, JF Mayol, J Boutonnat. ; La Cytométrie en flux coordinateurs : XEd Lavoisier, Paris 2007.
- [2] Sims CE, Allbritton NL.; Analysis of single mammalian cells on-chip., Lab Chip. 2007 Apr; 7(4):423-40.
- [3] Lambert C, Iobagiu C, Genin C ; Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs 4 color staining : a clinical evaluation of a new Flowcytometer.; Cytometry B Clin Cytom. 2006 Jan; 70(1):29-38
- [4] Lambert C, Ibrahim M, Iobagiu C *et al.*, Significance of Unconventional CD4+CD8dim T cell subsets., J Clin Immunol 2005; 25(5): 418-27.
- [5] Lambert C, Iobagiu C, Genin C ; Persistent Oligoclonal CD4dimCD8+T cells in peripheral blood; Cytometry B Clin Cytom. 2005; 66B 10-17.
- [6] Carding SR, Egan PJ. ;Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity.; Nat Rev Immunol. 2002 May;2(5):336-45.
- [7] Pitard V, Roumanes D, Lafarge X *et al.*; Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. ; Blood. 2008;112(4):1317-24.
- [8] Jameson J, Havran WL. ; Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. ; Immunol Rev. 2007 ; 215:114-22.
- [9] Rodríguez-Caballero A, García-Montero AC, Bárcena P *et al.* ; Expanded cells in monoclonal TCR-alpha-beta+/CD4+/NKa+/CD8-/+/dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. ; Blood. 2008;112(12):4609-16.
- [10] Olteanu H, Wang HY, Chen W *et al.* ; Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. ; BMC Clin Pathol. 2008 ;8(1):13-22.

- [11] Kolopp-Sarda MN, Kohler C, De March AK *et al.* ; Discriminative immunophenotype of bronchoalveolar lavage CD4 lymphocytes in sarcoidosis. ; Lab Invest. 2000 ; 80(7):1065-9.
- [12] MacIsaac C, Curtis N, Cade J, Visvanathan K. ; Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood. ; J Immunol Methods. 2003 Dec;283(1-2):9-15
- [13] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, *et al.*, Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. ; J Exp Med. 2006 ; 203(7):1693-700.
- [14] Fuhrmann S, Streitz M, Kern F. ; How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis. ;Cytometry A. 2008;73(11):1100-6.
- [15] Arora SK. ; Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. ; Methods Cell Sci. 2002; 24(1-3):37-40.
- [16] Li Pira G, Kern F, Gratama J *et al.* ; Measurement of antigen specific immune responses: 2006 update. ; Cytometry B Clin Cytom. 2007 ; 72(2):77-85.
- [17] Caruso A, Licenziati S, Corulli M, *et al.* ; Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. ; Cytometry 1997; 27(1):71-76.
- [18] Wallace PK, Muirhead KA. ; Cell tracking 2007: a proliferation of probes and applications. ; Immunol Invest. 2007; 36(5-6):527-61.
- [19] Betts MR, Brenchley JM, Price DA *et al.* ; Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. ; J Immunol Methods. 2003;281(1-2):65-78.
- [20] Lambert C, Guilloux L, Dzvinga C. *et al.* ; Flow-cytometry versus Histamine release tests analysis of In vitro Basophil Degranulation in Allergy to Hymenoptera venom. ; Cytometry. 2003; 52B(1): 13-9.
- [21] Beauvillain Céline, Drouet Martine, Renier Gilles ; Le test d'activation des basophiles ; Rev Franc. Lab. 2008 ; 404 : 67-77.
- [22] Vander Top EA, Perry GA, Gentry-Nielsen MJ. ; A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. ; BMC Microbiol. 2006;6:61-68.
- [23] Li G, Cottier M, Sabido O *et al.* ; The in vivo DNA aneuploidization during expansion of conventional renal cell carcinoma. ; In Vivo. 2002; 16(5): 341-344.
- [24] Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM *et al.* ; Contribution of DNA ploidy image cytometry to the management of ASC cervical lesions. ; Cancer. 2008 ; 114(4):263-9.
- [25] Macnamara B, Palucka KA, Porwit-MacDonald A. ; Balance between proliferation and apoptosis in leukemic cell lines resistant to cytostatics. ; Leuk Lymphoma. 1999;36(1-2):179-89.
- [26] Döcke WD, Höflich C, Davis KA *et al.* ; Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. ; Clin Chem. 2005 ; 51(12):2341-7.
- [27] Drenou B, Fardel O, Fauchet R *et al.* ; Flow cytometry: application for the diagnosis and the follow-up of hematological malignancies. ; Ann Biol Clin. 2002; 60(6):663-72.
- [28] Brodsky RA. ; Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. ; Blood Rev. 2008; 22(2):65-74.
- [29] Richards SJ, Hill A, Hillmen P. ; Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. ; Cytometry B Clin Cytom. 2007; 72(5):291-8.
- [30] Li G, Passebosch-Faure K, Lambert C *et al.* ; The expression of G250/MN/CA9 antigen by flowcytometry: its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells. ; Clin Cancer Res. 2001; 7(1): 89-92.
- [31] Klouche M, Schröder U. ; Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. ; Clin Chem Lab Med. 2008;46(7):888-908.

- [32] Donnenberg AD, Donnenberg VS. ; Rare-event analysis in flow cytometry. ; Clin Lab Med. 2007 ;27(3):627-52, viii.
- [33] Della Bella S, Giannelli S, Taddeo A *et al.* ; Application of six-color flow cytometry for the assessment of dendritic cell responses in whole blood assays. ; J Immunol Methods. 2008;339(2):153-64.
- [34] Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. ; Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. ; Cancer. 2008 ; 112(1):4-16.
- [35] Hsu HY, Wittemann S, Schneider EM, Weiss M, Joos TO. ; Suspension microarrays for the identification of the response patterns in hyperinflammatory diseases. ; Med Eng Phys. 2008 ; 30(8):976-83.
- [36] Vedrine C, Caraion C, Lambert C *et al.* ; Cytometric Bead Assay of cytokines in sepsis : clinical evaluation ; Cytometry. 2004; 60B(1):14-22.
- [37] de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. ; Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. ; Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan;10(1):133-9.
- [38] Daniela Lakomya, Nils-Olivier Olssona ; Apport du multiplexage en pratique diagnostique immunologique ; Rev Fran Lab. 2008 ; 404 : 59-66

Remerciements

Il existe des sociétés de cytométrie qui permettent à tous les amateurs de cette technologie de s'échanger des informations et du savoir faire :

Association Française de Cytométrie -www.afcytométrie.fr

Société Européenne de cytométrie clinique –ESCCA-) Sociétés Internationales, clinique (CCS) ou scientifique et technique (ISAC).

Le prochain congrès européen de cytométrie clinique se déroulera à Saint-Etienne en septembre 2009 (www.cytometry2009.eu).