

Applications de la cytométrie en flux en biologie médicale

The applications of flow cytometry in medical biology

B. ADMOU

Laboratoire d'Immunologie, Centre de Recherche clinique, CHU Mohammed VI, Marrakech - Maroc.
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad, Marrakech - Maroc.

Résumé

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse multiparamétrique des cellules à travers l'étude quantitative et qualitative de leurs molécules membranaires, cytoplasmiques voire nucléaires, et qui a révolutionné le domaine de la biologie médicale. En hématologie, la CMF représente un outil incontournable pour le diagnostic des leucémies aiguës et des syndromes lymphoprolifératifs chroniques, en permettant de préciser la nature myéloïde ou lymphoïde de la prolifération et son degré de différenciation, d'identifier des marqueurs pronostiques et d'évaluer la maladie résiduelle minimale. En immunologie, hormis l'évaluation et le suivi du statut immunitaire au cours des déficits immunitaires acquis (infection à VIH, transplantation rénale, immunothérapie), la CMF s'est également imposée dans le diagnostic des déficits immunitaires primitifs, notamment des lymphocytes T et B, des phagocytes et même du complément. Son apport dans le domaine de la microbiologie se traduit par la possibilité d'étudier de nombreux paramètres bactériens, comme le potentiel et l'intégrité membranaire, les activités enzymatiques, et certaines structures nucléaires. Dans tous les cas, l'usage du cytomètre requiert un degré élevé d'expertise technique et scientifique, avec une étroite collaboration clinico-biologique.

Mots clés : Cytométrie en flux ; applications ; biologie médicale

*
Auteur correspondant :
Brahim ADMOU
E-mail : admou.fmpm@gmail.com

Abstract

Flow cytometry (FCM) is a multi-parameter analysis technique of cells, which allows a quantitative and qualitative study of membrane, cytoplasmic and even nuclear molecules, and has revolutionized many fields of medical biology. In hematology, it represents an essential tool for the diagnosis of acute leukemias and chronic lymphoproliferative syndromes, by making it possible to specify the myeloid or lymphoid lineage of the proliferation and its degree of differentiation, and to characterize some prognostic markers, and evaluate minimal residual disease. In immunology, apart from the evaluation and monitoring of the immune status during acquired immune deficiencies (HIV infection, renal transplantation, immunotherapy), CMF is fundamental in the exploration of primary immune deficiencies, given its ability to categorize T, B, phagocytes and even complement deficits. The contribution of FCM in microbiology consists on the possibility of studying many bacterial parameters, such as membrane potential and integrity, enzymatic activities, and certain nuclear structures. In all cases, the use of the cytometer requires a high degree of technical and scientific expertise, with a close collaboration between the cytometrist and the physicians.

Key-words: Flow cytometry; applications; medical biology

Introduction

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse multiparamétrique qualitative et quantitative et de tri de cellules ou de particules en suspension [1]. Elle permet de mesurer les caractéristiques individuelles de chaque cellule, telles que sa taille, sa structure et ses marqueurs. Grâce aux anticorps monoclonaux (ACM), la CMF couvre un éventail large d'indications en biologie médicale, particulièrement en immunologie et en hématologie. Ces applications se sont étendues à la cancérologie, à la cytogénétique, et même à la microbiologie, puis aux domaines de la recherche, notamment pour l'étude du cycle cellulaire, du flux calcique, du pH

intracellulaire, et bien d'autres [1, 2]. L'objectif de cette revue est de faire le point sur les principales applications de la CMF dans le domaine de la biologie médicale.

Principe de la cytométrie en flux

La CMF est basée sur 3 principales composantes (Figure 1) :
■ Un système fluide qui permet de séparer et d'aligner des cellules ou particules solubles (fluoromarquées) grâce à une pression hydrostatique appelée aussi focalisation hydrodynamique exercée par un liquide de gaine.

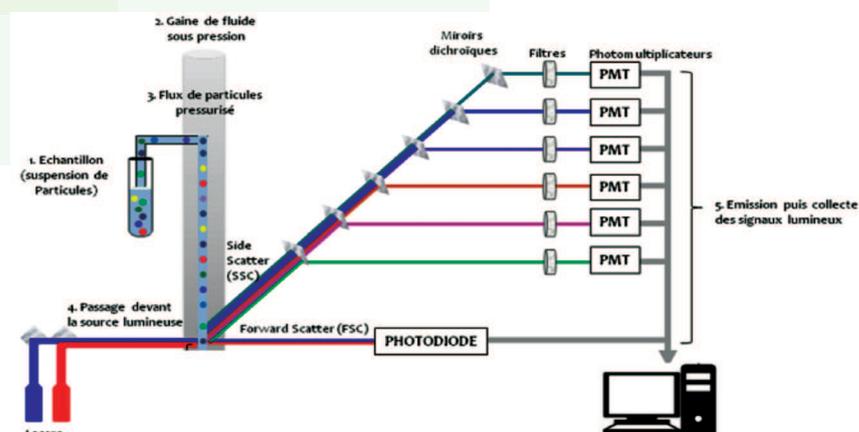


Figure 1 : Représentation schématique des composants et du principe de la CMF (Adapté de BFA-CNRS UMR 8251)

1 Système fluide : Préparation et marquage de l'échantillon en suspension, focalisation hydrodynamique par le liquide de gaine préssurisé faisant passer les particules devant le laser (spectre d'excitation) ; 2 Système optique : Séparation et canalisation des signaux lumineux (spectres d'émission) par des miroirs dichroïques et des filtres ; 3 Système informatique : Amplification et conversion électronique des signes optiques à l'aide des Photomultiplicateurs (PMT).

Une fois alignées, les cellules passent une par une devant un faisceau laser utilisé comme source d'excitation ;

- Un système optique composé de miroirs dichroïques et de filtres permettent de canaliser et de séparer les différentes longueurs d'onde issues de l'excitation lumineuse ;
- Un système informatique, qui permet d'amplifier à l'aide de photomultiplicateurs (PMT) les signaux optiques recueillis, et de les convertir en signaux électroniques [3, 4].

La CMF permet d'analyser 3 paramètres : le *Forward Scatter* (FSC), proportionnel à la taille de la cellule, qui correspond à la lumière émise aux petits angles (incidence frontale), le *Side Scatter* (SSC) proportionnel à la granularité de la cellule, qui correspond, à la lumière mesurée aux grands angles (90°, incidence latérale) (Figure 2), puis celui généré par les spectres d'émission des fluorochromes utilisés pour marquer les cellules.

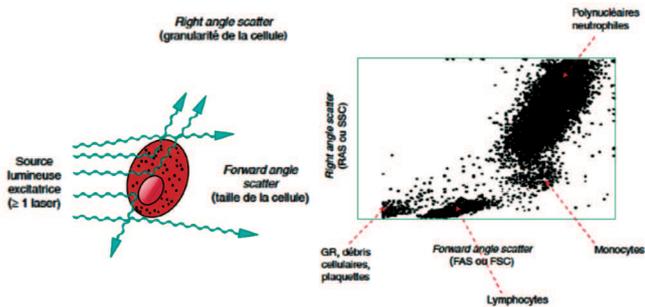


Figure 2 : Informations morphologiques apportées par la CMF selon l'angle de diffraction de la lumière incidente avec le laser [5]

(A) : Taille de la cellule mesurée par le FSC et structure (ou granularité) mesurée par le SSC ; (B) : Fenêtrage (*Gating*) sur la population leucocytaire à étudier : lymphocytes, monocytes ou polynucléaires neutrophiles

La CMF utilise divers réactifs fluorescents, incluant des ACM, des colorants liant l'ADN, des colorants de viabilité, des colorants indicateurs d'ions et des marqueurs d'expression de protéines. Les fluorochromes les plus utilisés sont la FITC (isothiocyanate de fluorescéine), la phycoérythrine (PE), l'allophycocyanine (APC) et la peridinine chlorophylleprotéine (PerCP), caractérisés par des spectres d'émission et d'excitation propres avec souvent un chevauchement spectral qui impose des compensations spécifiques avant leur utilisation en cytométrie. D'autre part, afin d'améliorer leur rendement quantique et d'accroître le nombre de paramètres mesurables, certains fluorochromes sont couplés à des molécules telles que des cyanines pour former des tandems (Tableau I) [6]. Les données recueillies se présentent sous forme de graphiques (cytogrammes ou dot plots) et d'histogrammes, auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , CV, intensité de fluorescence, ...) [1].

Tableau I : Cahier des charges relatif à l'environnement et la qualité de l'air dans le laboratoire de FIV (Tiré de [3])

Fluorochrome	Longueurs d'excitation (nm)	Longueurs d'émission (nm)
FITC	488	519
PE	488, 532	578
APC	595, 633, 635, 647	660
PerCP	488, 532	678
PE-Cy5	488, 532	667
PerCP-Cy5.5	488, 532	695
PE-Cy7	488, 532	785
APC-Cy7	595, 633, 635, 647	785
PE-Texas Red®	488, 532	615
Alexa Fluor®	488 488	519
Texas Red®	595	615
Pacific Blue®	360, 405, 407	455

FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; PE : R-phycoérythrine ; APC : allophycocyanine ; PE-Cy5 : PE-cyanine 5 ; PerCP : peridinine chlorophylleprotéine ; PerCP-Cy5.5 : PerCP- cyanine 5.5 ; PE-Cy7 : PE-cyanine 7 ; APC-Cy7 : APC-cyanine 7

Principales applications bio-médicales de la cytométrie en flux

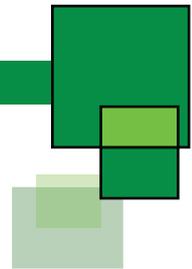
CMF en hématologie

La classification OMS des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, révisée en 2016 a préservé une place prépondérante à la CMF pour le diagnostic des leucémies aiguës et des syndromes lymphoprolifératifs chroniques et prend en compte les données moléculaires obtenues grâce notamment aux techniques de séquençage [7].

La CMF repose ainsi sur la détection et la quantification de l'expression d'antigènes de différenciation (CD pour cluster of differentiation) à la surface et dans le cytoplasme des cellules hématopoïétiques normales et pathologiques. Elle permet de préciser à partir de différents prélèvements (sanguins, médullaires, ganglionnaires, etc), la lignée cellulaire (myéloïde ou lymphoïde) ainsi que son degré de différenciation (cellules immatures ou différenciées). Elle permet également de caractériser des marqueurs pronostiques ou des cibles thérapeutiques potentielles et d'évaluer la maladie résiduelle minimale (*minimal residual disease ou MRD*) de certaines hémopathies [8, 9].

Diagnostic des leucémies aiguës par CMF

Les leucémies aiguës sont des hémopathies malignes



définies désormais par la présence dans la moelle osseuse de plus de 20 % de blastes. La CMF permet ainsi de distinguer les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) B ou T des leucémies aiguës myéloïdes (LAM), issues des lignées granuleuse, myélomonocytaire, mégacaryocytaire ou érythroïde [7].

- Leucémies aiguës lymphoblastiques

Chacune des LAL B ou T comporte un large spectre de formes cliniques, morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires, et l'identification de la lignée hématopoïétique en cause peut être rapidement réalisée à l'aide de la CMF moyennant un panel initial d'orientation B/T/ Myéloïde. Ainsi, afin d'optimiser le panel du marquage, il est recommandé d'obtenir une positivité pour au moins deux marqueurs dans une lignée, associée à la négativité des marqueurs des autres lignées [10]. Grâce aux critères immunophénotypiques de ces lignées cellulaires, il est aisé de distinguer des LAL de type B et celles de type T.

■ LAL-B

Les LAL-B sont essentiellement des hémopathies de l'enfant, puisque 75 % d'entre elles surviennent chez des enfants de moins de 6 ans [7]. L'analyse immunophénotypique conclut par définition à la positivité des marqueurs pan-B : CD19, CD79a et CD22 en intracytoplasmique (cCD22) et la négativité de la Myéloperoxidase (MPO). Les marqueurs de stade de la lignée B étant CD10, cμ (chaîne μ d'IgM cytoplasmique) et sIgM (IgM de surface), CD20 et le marqueur de maturité Flinder Médical Centre (FMC7) [5].

Le CD10 est souvent positif, alors que l'expression du CD34 (marqueur d'immaturité) et du CD20 est très variable,

l'expression différentielle de ces marqueurs permettant d'attribuer à la population leucémique un stade de différenciation plus ou moins précoce (Tableau II) [7, 5].

■ LAL-T

Les leucémies aiguës lymphoblastiques d'origine T (LAL-T) représentent 15 % des LAL de l'enfant ou de l'adolescent et 25 % des LAL de l'adulte. Elles se définissent par une infiltration médullaire par des blastes exprimant le cCD3, qui traduit leur appartenance à la lignée T, associé à d'autres marqueurs T d'expression variable : CD1a, CD2, CD7, CD4, CD8, CD5, CD34, et parfois CD10 [7]. Les LAL-T peuvent être classées en sous-groupes correspondant aux stades de différenciation des lymphoblastes (Tableau III).

- Leucémies aiguës myéloïdes

La classification de l'OMS 2008 définit les sous-groupes de LAM en intégrant les critères cytologiques du FAB (Franco-Américano Britannique), permettant de classer les LAM en 7 catégories (de LAM-0 à LAM-7). Dans les LAM avec différenciation minimale, dite LAM-0, où les analyses cytomorphologiques et cytochimiques apportent peu d'arguments en faveur d'une différenciation myéloïde, l'immunophénotypage prend tout son intérêt pour les distinguer des LAL [7]. Certains marqueurs importants permettent de caractériser une LAM, notamment les antigènes CD117, CD33, CD13 et MPO [10].

La caractérisation phénotypique des LAM fera aussi appel aux marqueurs d'immaturité des blastes (CD34, CD38 et HLA-DR), et ceux marquant la lignée granuleuse (CD15 et CD16), monocytaire (CD14, CD64, CD11), érythrocytaire (CD235a) et plaquettaire (CD41a, CD42b et CD61) (Tableau IV) [7, 11].

Tableau II : Caractéristiques phénotypiques des leucémies aiguës lymphoïdes B [5]

CD	LAL-pro B LAL-B I	LAL pré-pré B Commune LAL-B II	LAL pré B LAL-B III	LAL-B mature LAL-B IV	LAL3 de type Burkitt
Marqueurs d'immaturité : CD34	+	+	-/+	-	-
Marqueurs pan-B					
CD19	+	+	+	+	+
CD22	+ (cytoplasme)	+	+	+	+
cCD79a	+	+	+	+	+
Marqueurs de stade de différenciation					
CD10	-	+	+	-	+
Cμ / sIgM	-	-	cμ+	sIgM+	sIgM+++
CD20	-	+/-	+/-	+	+
CD79b	+/-	+	+	+	+
FMC7	-	-	-	-/+	-/+
Marqueurs non spécifiques					
HLA DR	+	+	+	+	+

cCD79a : CD79a intracytoplasmique ; cμ : chaîne μ intracytoplasmique ; sIgM : immunoglobuline M exprimée en surface

Tableau III : Caractéristiques phénotypiques des leucémies aiguës lymphoïdes T [7]

CD	LAL-pro T/immature LAL-T I	LAL pré-T/ immature LAL-T II	LAL-T Corticale/commune LAL-T III	LAL-T mature LAL-T IV
Marqueurs d'immaturité : CD34	+/-	-	-	-
Marqueurs pan-T				
CD7	+	+	+	+
CD2	+	+	+	+
CD5	+	+	+	+
CD3	+ (cytoplasme)	+ (cytoplasme)	+ (cytoplasme)	+
TCRαβ	-	-	+ (cytoplasme)	+
Marqueurs de stade de différenciation				
CD1a	-	-	+	-
CD4	-	-	+	soit +/-
CD8	-	-	+	soit -/+
Marqueurs non spécifiques				
CD38	+	+	+/-	-
HLA DR	+	+	+/-	-

Tableau IV : Caractéristiques phénotypiques des leucémies aiguës myéloïdes [7]

CD	LAM-0	LAM-1	LAM-2	LAM-3	LAM-4	LAM-5	LAM-6	LAM-7	
Marqueurs d'immaturité									
CD34	+++	+++	++	+/-	+	-	-/+	-/+	+/-
CD117	+++	+++	++	+/-	+	+/-	-/+	-/+	+/-
HLA-DR	+++	+++	+++	-	++	++	+++	+/-	+/-
Marqueurs myéloïdes									
CD13		+++	+++	+++	++	++	++	+/-	+/-
CD33	+++	+++	+++	++	++	+/-	+/-	+/-	+/-
cMPO	-	+	++	+++	++	+/-	+/-	-	-
Marqueurs granuleux matures									
CD15 et CD16	-	-	+/-	+	-	+	+	-	-
Marqueurs monocytaires									
CD14	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CD64	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CD11a, b et c	-	-	-	-	-	++	++	-	-
Marqueurs érythroïdes									
CD235a	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Marqueurs plaquettaires									
CD41a et CD42b	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+
CD61	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+
Marqueurs non spécifiques									
CD36	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CD71	-	-	-	-	-	-	-	++	-

CD : *cluster of différenciation* ; HLA : *human leukocyte antigen* ; cMPO : myéloperoxidase intracytoplasmique ; LAM-0 : leucémie aiguë myéloïde peu différenciée ; LAM-1 : leucémie aiguë myéloïde sans maturation ; LAM-2 : leucémie aiguë myéloïde avec maturation ; LAM-3 : leucémie aiguë promyélocytaire ; LAM-4 : leucémie aiguë myélomonocytaire ; LAM-5 : leucémie aiguë monoblastique/monocytaire ; LAM-6 : érythroleucémie ; LAM-7 : leucémie aiguë mégacaryoblastique ; CD : classe ou "cluster" de différenciation ; MPOcy : myéloperoxydases intracytoplasmiques ; AGA : glycophorine A

CMF et autres hémopathies

La CMF permet également d'explorer les syndromes lymphoprolifératifs (SLP) chroniques d'origine B, T ou NK, moyennant des panels adaptés [12, 5]. La LLC est le SLP le mieux défini phénotypiquement et les cellules sont facilement accessibles dans le sang périphérique. Grâce à des caractéristiques immunologiques, la LLC est définie par un score de Matutes-Moreau de 4 à 5, un score strictement inférieur à 3 exclut une LLC (Tableau V).

Tableau V : Score de Matutes [7]

Marqueurs	Points	
	0	1
Intensité des Ig de surface	Modérée/Forte	Faible
CD5	-	+
CD23	-	+
FMC7	+	Faible/-
CD22 ou CD79b	+	Faible/-

CD : *cluster* de différenciation ; Ig : immunoglobuline

CMF et suivi des hémopathies

La détection de la *minimal residual disease* (MRD) est une étape importante pour évaluer l'efficacité du traitement chez des patients suivis pour une hémopathie maligne. A ce propos, la CMF constitue donc un outil de choix pour la mise en évidence de la MRD et la prédiction des rechutes précoces, essentiellement dans les LAM et les LAL-B et T, la LLC, et plus rarement dans le myélome multiple [13].

CMF en immunologie

Hormis l'étude des cellules T, B et NK et leurs différentes

sous populations, la CMF permet également d'explorer les monocytes, les polynucléaires, les cellules dendritiques, et autres, avec par conséquent une variété d'applications dans le domaine de l'immunologie.

CMF et déficits immunitaires primitifs (DIP)

Devant la suspicion clinique d'un DIP et à côté du bilan biologique initial (NFS-Plaquettes, immunoglobulines, complément, ...), la CMF représente un outil diagnostique rapide et hautement sensible en permettant d'abord d'étudier le nombre et le pourcentage des lymphocytes et autres cellules de l'immunité, puis leur fonction (prolifération, sécrétion de cytokines, cytotoxicité). Elle offre également la possibilité d'analyser des protéines nucléaires spécifiques [14, 15]. De ce fait, un grand nombre de DIP peuvent être caractérisés par CMF à savoir les déficits humoraux, dont l'agammaglobulinémie liée à l'X et les syndromes hyper IgM, les déficits cellulaires notamment les déficits immunitaires combinés sévères (DICS), le syndrome de Wiskott-Aldrich, le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X, la lymphohistiocytose familiale, le syndrome lymphoprolifératif auto-immun, le syndrome IPEX, le déficit en IRAK4 et en MyD88, la susceptibilité mendélienne aux mycobactéries, la granulomatose septique chronique et autres [15].

En pratique, devant la suspicion d'un DIP de type humoral, la CMF permet de confirmer le déficit en lymphocytes B et de définir l'agammaglobulinémie ou maladie de Bruton comme illustré par la figure 3. En revanche, devant un tableau clinique évocateur d'un déficit cellulaire, une lymphopénie T sévère avérée affirme le diagnostic d'un DICS dont la caractérisation immunophénotypique impose l'analyse combinée des lymphocytes B et des cellules NK. Ceci permettra de raisonner facilement sur la nature moléculaire du déficit génétique (Tableau VI). La CMF peut ainsi servir comme un trait d'union entre les tests immunologiques conventionnels et l'étude moléculaire [15].

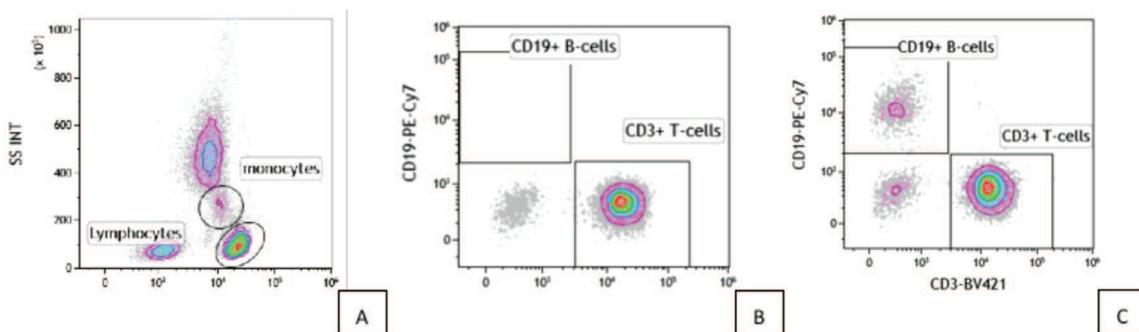


Figure 3 : Stratégie diagnostique d'un cas de maladie de Bruton par CMF

(A) : Fenêtrage des sous populations lymphocytaires ; (B) : Absence des lymphocytes B CD19 ; (C) : Patient témoin (Adapté de [14])

Tableau VI : Classification phénotypique des DICS [16]

Phénotype CMF	Type de DIP	Nature moléculaire du DIP
T-B-NK-	Adenosine deaminase Adenylate kinase (<i>reticular dysgenesis</i>)	ADA AK2
T-B-NK+	<i>RAG1/RAG2</i> (<i>Recombinase activating genes 1 and 2</i>) Artemis (<i>DNA cross-link repair enzyme 1C</i>) Cernunnos (<i>Nonhomologous end-joining protein 1</i>) <i>DNA-dependent protein kinase</i> DNA ligase IV	RAG1, RAG2 DCLRE1C NHEJ1 PRKDC LIG4
T-B+NK-	IL-7Ra <i>chain</i> (<i>X-linked SCID</i>) <i>JAK3</i> (<i>Janus kinase 3</i>) <i>deficiency</i> IL-2Ra <i>chain</i> (<i>CD25</i>) <i>deficiency</i>	IL2RG JAK3 IL2RA
T-B+NK+	CD3 <i>complex</i> (CD3d, CD3ε, CD3ζ) <i>defects</i> <i>Coronin 1A deficiency</i> CD45 (<i>protein tyrosine phosphatase receptor type C</i>) <i>deficiency</i> IL-7 <i>receptor deficiency</i>	CD3D, CD3E, CD3Z CORO1A PTPRC IL7RA

Exploration du déficit de la microbicidie

L'activité microbicide des phagocytes contre les agents infectieux est cruciale, elle est liée à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS), et fait intervenir une enzyme clef, la NADPH oxydase. Le déficit d'une des sous-unités de cette dernière, définit la granulomatose septique chronique (GSC), une maladie génétique liée à

l'X [17]. Son diagnostic fait actuellement appel à la CMF, basé sur l'exploration du pouvoir oxydatif des phagocytes, en utilisant une sonde fluorescente, la Dihydro-rhodamine (DHR) 123. Suite à l'activation des phagocytes par différents stimuli (PMA, E coli), les ROS produits réduisent la DHR 123 en Rhodamine 123 (R123) fluorescente [18, 17] (Figure 4).

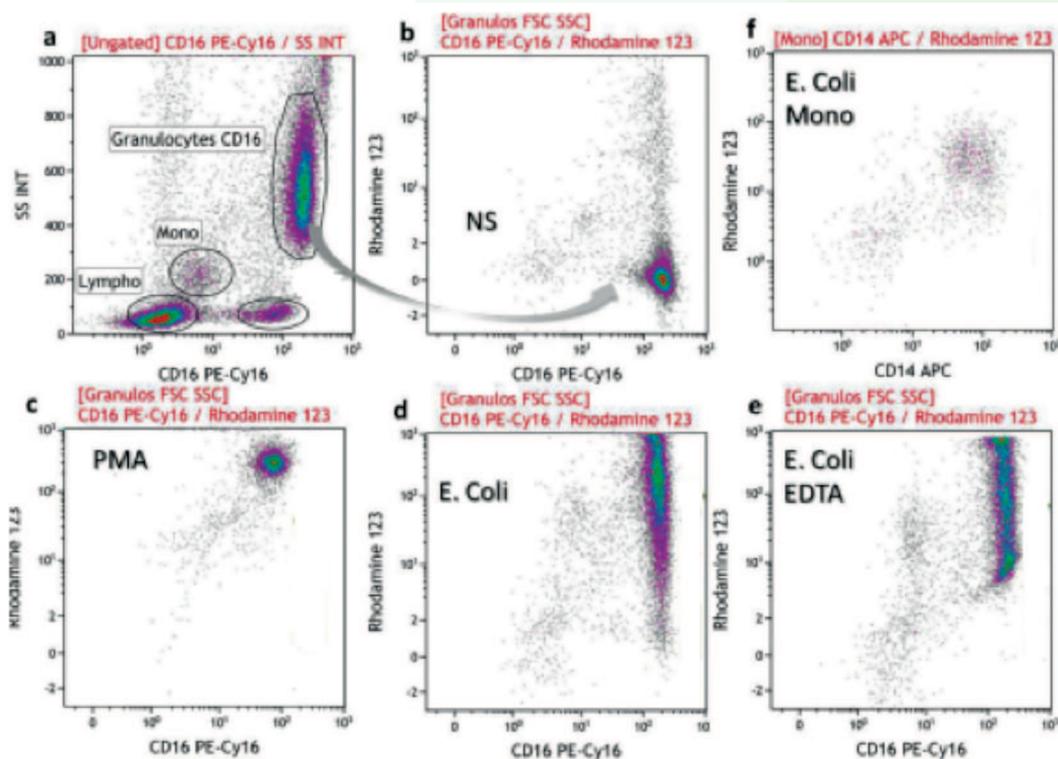
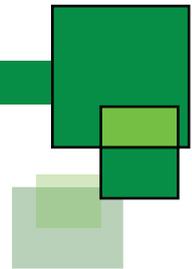


Figure 4 : Analyse de l'activité microbicide par cytométrie en flux (adapté de [18])



CMF et exploration du complément : exemple de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est une anomalie génétique liée à l'X du gène *PIG-A* codant pour l'enzyme nécessaire à l'ancrage membranaire des protéines de régulation du complément, telles que CD55 et CD59. Le déficit entraîne une activation inappropriée du complément entraînant la lyse cellulaire, à l'origine de crises d'hémolyse, et d'hémoglobinurie avec un risque augmenté d'hémopathies [19, 20]. Le diagnostic de l'HPN se base sur l'étude de l'expression des récepteurs associés à une glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la surface des neutrophiles, des monocytes ou des globules rouges, moyennant la CMF qui met en évidence une diminution de l'expression membranaire de CD55 et de CD59 sur les globules rouges et les monocytes [21].

Autres applications en immunologie

La CMF représente un outil incontournable pour évaluer le statut immunitaire initial et lors du suivi de l'infection à VIH (taux de lymphocytes T CD4), évaluer l'efficacité de l'immunothérapie anti-lymphocytes B (Rituximab et certains lymphomes) [21] ou anti-lymphocytes T (thymoglobuline) au cours du traitement d'induction ou en traitement curatif au cours de la transplantation rénale, ... [22].

La CMF a également rendu accessible l'exploration de certains types d'allergie, grâce notamment au test d'activation des basophiles (TAB), essentiellement pour mettre en évidence une allergie médicamenteuse à des produits anesthésiques, à des antibiotiques et anti-inflammatoires, pour lesquels les IgE spécifiques sont soit non disponibles, soit non contributifs [23, 24]. La sensibilité du TAB varie de 50 à 60 % et la spécificité peut atteindre 80 à 90% au cours de l'allergie médicamenteuse [24].

Applications en microbiologie

Depuis quelques années, des travaux visant l'extension des applications de la CMF à l'analyse des cellules procaryotes

ont vu le jour, et ont permis l'analyse de cellules plus petites, telles que les bactéries, et même des virus libres ou des virus marins [25].

En effet, la CMF permet d'étudier de nombreux paramètres bactériens, parmi lesquels le potentiel de membrane, l'intégrité membranaire, des activités enzymatiques, certaines structures antigéniques ou nucléaires, ainsi que le niveau d'expression de certains gènes grâce à l'utilisation de molécules fluorescentes (Figure 5).

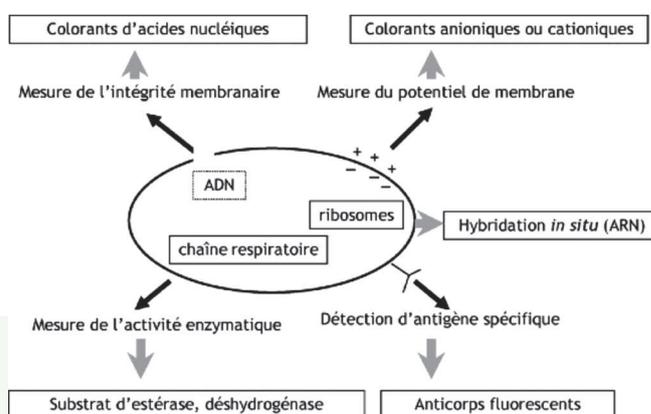


Figure 5 : Exemples de paramètres bactériens analysables par cytométrie en flux [26]

Différents fluorochromes (Tableau VII), peuvent être utilisés pour la détection des bactéries par CMF, ils visent à mettre en évidence leur état physiologique ou structural.

Enfin, un des atouts majeurs de la CMF est la vitesse d'acquisition des données pour un très grand nombre de cellules, permettant l'analyse de sous-populations cellulaires complexes et/ou rares et de les trier pour éventuellement les mettre en culture ou encore les analyser avec des outils de biologie moléculaire [28].

De plus, l'évolution biotechnologique a permis d'avoir actuellement des cytomètres comportant jusqu'à 5 lasers voire plus, avec la possibilité d'analyser davantage de paramètres, puis tout récemment ceux basés sur le principe

Tableau VII : Exemples de marqueurs utilisés pour la détection des microorganismes à l'aide la CMF [adapté de 27]

Type de marqueur	Fluorescence	Absorption	Emission	Cible
SYBR Green II	Verte	494	521	ADN/ARN
SYTOX Green	Verte	504	523	ADN/ARN
Ethidium homodimer-2	Rouge	534	624	ADN
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Bleue	344	449	ADN (A-T sélectif)
Chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium (CTC)	Rouge	400/450	602	Activité enzymatique déshydrogénase
Chemchrome V6 (CV6)	Verte	480	500	Activité enzymatique estérase
Rhodamine 123	Rouge	541	572	Potentiel membranaire - mitochondrie

de la focalisation acoustique ou disposant d'un système de *cell sorting* pour l'étude de certaines populations cellulaires non accessibles à la cytométrie classique, fait de la CMF un outil dont les applications ne cessent de s'étendre pour concerner d'autres domaines de la science tels que la cytogénétique, l'agroalimentaire et même l'environnement [29, 30].

Conclusion

L'essor considérable de la cytométrie en flux au cours des dernières décennies a rendu possible une évaluation rapide et fiable des sous-populations cellulaires à partir de différents échantillons. Elle constitue de nos jours un outil indispensable pour le diagnostic, la caractérisation et le suivi d'un grand nombre de pathologies essentiellement oncohématologiques et dysimmunitaires. D'autres secteurs de la biologie médicale comme la bactériologie et la cytogénétique représentent des domaines prometteurs où la CMF s'impose de plus en plus à l'image des autres domaines de la science et de la recherche. Toutefois, tant l'usage que l'interprétation des résultats générés par la CMF requièrent un degré élevé d'expertise technique et scientifique en prenant en considération des facteurs propres au sujet (âge, sexe, valeurs de référence) avec la nécessité d'une étroite collaboration entre le cytométriste et le clinicien.

Conflit d'intérêt

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

- McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120: 5.1.1–5.1.1.
- Veldhoen M. Guidelines for the use of flow cytometry. *Immun Inflamm Dis*. 2017; 5(4):384-5.
- Longobardi-Givan A. Flow Cytometry: First Principles. In Edit John Wiley & Sons. 2013. ISBN: 978-1-118-68839-7.
- Lees O. Immunophénotypage : apport de la cytométrie à la biologie. *Rev Fr Lab*. 2000;327:91-104.
- Merle-Béral H, Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie. 2008; 13-000-L-10.
- Roederer M et al. 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry*. 1997;29:328-39.
- Costopoulos M, Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie en flux. EMC – Hématologie. 2016;11(4):1-15.
- Béné MC, Lacombe F. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *RFL*. 2015;471:35-41.
- Le Garff-Tavernier M et al. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B. *RFL*. 2013;452:37-48.
- Swerdlow SH et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Fourth Edition. Lyon, CIRC IARC, 2008.
- Vardiman JW et al. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-302.
- Béné MC et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European leukemia network package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567-74.
- Rawstron AC et al. A complementary role of multiparameter flow-cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease (MRD) detection in chronic lymphocytic leukemia (CLL): an European Research Initiative on CLL (ERIC) study. *Leukemia*. 2016;30:929-36.
- Ulrich S et al. Flow cytometry in the diagnosis and follow up of human primary immunodeficiencies. *eJIFCC*. 2019;30(4):407-22.
- Hirokazu K et al. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergology International*. 2018;67(1):43-54.
- Bonilla FA et al. Practice Parameter for the Diagnosis and Management of Primary Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136 (5):1186-205, e1-78.
- Nordenfelt P. Quantitative assessment of neutrophil phagocytosis using flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2014;1124:279-89.
- Jeraiby M et al. Déficit d'activité microbicide des phagocytes mesuré par cytométrie en flux. *RFL*. 2018;499:59-66.
- Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev*. 2008;22(2):65-74.
- Richards SJ et al. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72(5):291-8.
- El Hentati F et al. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *RFL*. 2009;410: 23-32.
- Chatenoud L. CD3-specific antibodies as promising tools to aim at immune tolerance in the clinic. *Int Rev Immunol*. 2006;25:215-33.
- De Amici M et al. Clinical Use of Basophil Activation Test in Drug, Food and Hymenoptera Venom Allergies. *Minerva Pediatr*. 2019;71(2):209-17.
- Ebo D-G et al. In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity During Anesthesia: A Review of the Literature. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(4):1176-84.
- Chau F et al. Intérêt et applications de la cytométrie de flux en bactériologie médicale. *Antibiotiques*. 2008;10:226-31.
- Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect*. 2000;12:1523-35.
- Léonard L et al. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Front Microbiol*. 2016;7:1225-8.
- Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;106:19-39.
- McFarlin BK, Bowman EM. Advanced flow cytometry techniques for clinical detection. *Methods*. 2018;134:1-2.
- Montange T et al. Cytométrie en flux, microbilles et analyses biomoléculaires multiplexes. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2005;20(1):2-10. ■