

La cytométrie en flux : un nouvel outil diagnostique en hématologie

N. BRAHAM-JMILI*,
MC. JACOB**

* Laboratoire d'Hématologie
CHU Farhat Hached - Sousse
Tunisie

** Laboratoire d'Immunologie
Cellulaire - Site Rhône Alpe
Grenoble - France

Résumé : La cytométrie en flux est un procédé d'analyse biologique basé sur l'analyse des caractéristiques physiques de particules distinctes défilant l'une derrière l'autre dans un flux de liquide par le biais de trois systèmes : fluide, optique et informatique. Cette analyse est précédée d'une étape de marquage avec des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire, ces molécules étant susceptibles d'émettre une fluorescence après leur excitation par un faisceau laser, le plus employé étant le laser à argon. Les signaux de diffusion et de fluorescence (photons) sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques qui seront traités par un système informatique. La cytométrie en flux a investi un champ d'application très large en hématologie : l'immunophénotypage des hémopathies, la détection de la maladie résiduelle, la numération des réticulocytes, le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. Ses champs d'applications en immuno-hématologie sont multiples, notamment la numération des cellules souches. D'autre part l'étude du cycle cellulaire a permis de mieux comprendre les facteurs contrôlant l'apoptose.

Généralités

L'étude de la cellule a longtemps reposé sur des observations microscopiques. La seule nécessité était alors de grossir l'objet afin de repérer les particularités propres à chaque type cellulaire dans le but de les identifier et de les compter et donc de détecter des anomalies quantitatives et qualitatives (1).

En hématologie biologique, la connaissance précise de l'origine des cellules s'avère parfois indispensable pour une caractérisation complète des maladies du sang nécessitant à côté de la morphologie, l'immunophénotype, le caryotype voire la biologie moléculaire (2,3).

Parmi ces techniques, la cytométrie en flux (CMF), basée sur la mesure de signaux lumineux émis par des cellules devant une source lumineuse, s'est imposée comme une technique de choix. Elle permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres et séparées d'au moins 1mm, défilent à grande vitesse (plus de 30 km/h) devant un rayon laser (4).

La CMF a été développée dans les années 60 par les chercheurs de Los Alamos et de Standford aux Etats Unis. Elle ne s'est cependant réellement développée que depuis les années 80 avec la mise au point d'appareils performants : «les cytomètres de flux» et le développement de la production des anticorps monoclonaux (5,6).

Analyse de la lumière diffusée et de la fluorescence :

La source lumineuse peut être une lampe de vapeur de mercure (ou de xenon) ou un laser (argon, Krypton, Hélium), le plus utilisé étant le Laser à argon (488 nm et 514 nm) (4).

La source lumineuse permet l'excitation de molécules fluorescentes appelées fluorochromes, marquant les anticorps eux même fixés sur des cellules, excitation qui entraîne la «diffusion lumineuse».

Cette dernière se fait soit dans l'axe du laser, soit à 90° et donne respectivement une information sur la taille et la granularité (ou structure) de chacune des cellules à analyser (6,7).

Le passage des cellules dans un cytomètre est donc pré-

revue générale

cédé d'une étape de marquage avec des anticorps marqués par des fluorochromes susceptibles d'émettre une fluorescence après leur illumination. Les signaux de diffusion et de fluorescence (photons) sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques (Figure 1), traités et amplifiés par un système informatique. Chaque cellule est ainsi transformée en un "évènement électrique" (event) avec plusieurs coordonnées (taille, granularité, fluorescence 1, fluorescence 2...). Ces évènements électriques forment des nuages de points (sur des cytogrammes (Figure 2 et 3)) autour desquels on dessine des fenêtres électroniques (gating). Au

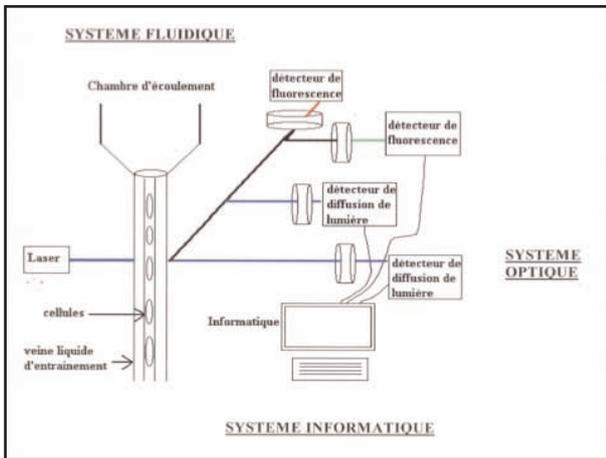


Figure 1 : Description d'un cytomètre en flux

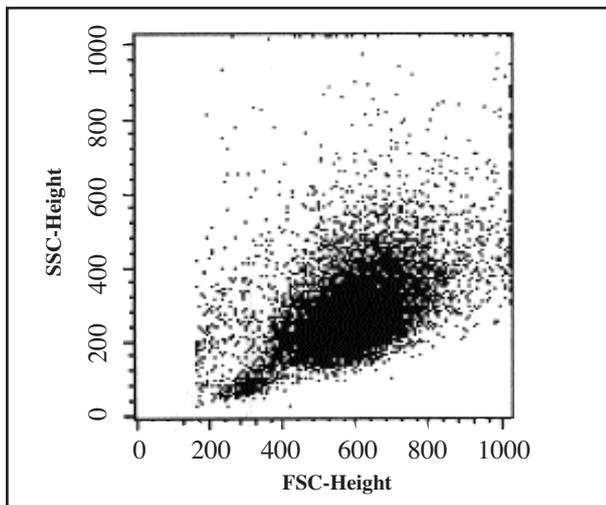


Figure 2 : Cytogramme biparamétrique Taille/Structure (granularité)

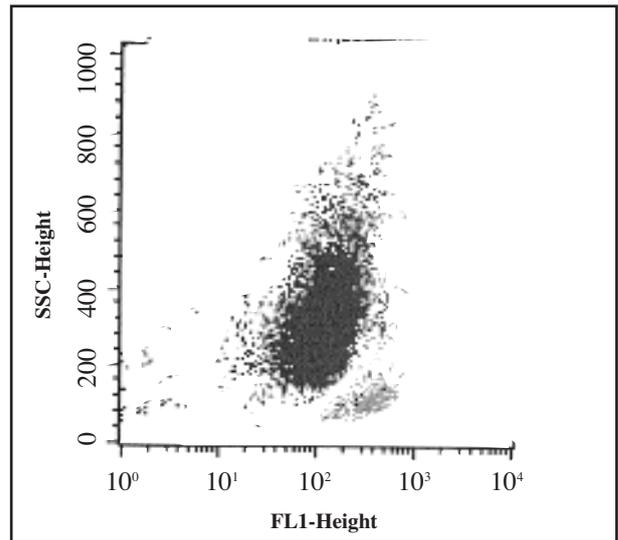


Figure 3 : Cytogramme biparamétrique CD45 / Structure au cours d'une leucémie aigue (Meilleure séparation des populations cellulaire en particulier des blastes (CD45 faible) des lymphocytes (CD45 fort))

sein de chaque fenêtre, il est possible de préciser la distribution de la fluorescence sous forme d'histogramme de distribution de fréquence (Figure 4). L'axe horizontal correspond à l'étendu des canaux de fluorescence. La mesure de l'intensité de la fluorescence se fait selon une échelle arbitraire (8,9). Le nombre de canaux est de 0 à 1023 en

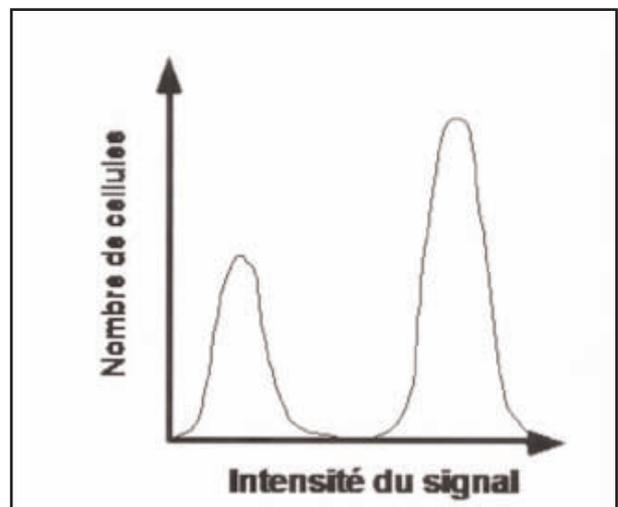


Figure 4 : Histogramme monoparamétrique

échelle linéaire, de 0 à 104 en mode logarithmique.

Fluorochromes

Les cellules en suspension de l'échantillon sont marquées par des anticorps monoclonaux marqués par des fluorochromes (Tableau I) qui se lient spécifiquement à des molécules de la surface cellulaire et plus récemment à l'intérieur des cellules. La fluorescence est la propriété que possèdent certaines molécules lorsqu'elles sont soumises à l'action d'un rayonnement électromagnétique d'émettre dans toutes les directions des radiations lumineuses dont la longueur d'onde caractéristique de la substance est différente de celles qui les ont provoquées. Ces molécules, à l'état de repos (niveau d'énergie W0), ont la propriété d'absorber l'énergie émise par une source

fluorochromes. Elles sont très utiles comme marqueurs de molécules.

Les fluorochromes choisis doivent être compatibles avec la source lumineuse utilisée. En cas d'utilisation simultanée de plusieurs fluorochromes, ils doivent être distingués les uns des autres (spectres d'émission différents) mais si possibles pouvoir être excités par la même source lumineuse (1).

L'utilisation de plusieurs fluorochromes émettant à des longueurs d'ondes différentes permet de marquer simultanément les cellules par plusieurs fluorochromes pouvant se fixer sur des structures différentes (5). 3 ou 4 fluorochromes différents, ou plus, en fonction du nombre de lasers, peuvent être détectés en fonction de

Tableau I : Fluorochromes et tandems de fluorochromes couramment utilisés (4).

ABREVIATION	NOMS DES FLUOROCHROMES	LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION	LONGUEUR D'ONDE D'EMISSION
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine	488	525
TRITC	Isothiocyanate de Tétraméthylrodamine	560	590
TR	Texas Red	594	597-640(618)
PE	Phycoérythrine	488	565-590(575)
APC	Allophycocyanine	590	645-675
CY5	Carboxyméthylindocyanine		677
PerCP	Peridine-chlorophylle-A-proteine	488	672
AMCA	7-amino-4methylcoumarine-3- acide acetique	351	430
PE+TE	Tandems* PE+Texas Red	488	597-640
PE/CY5	Tandems PE+CY5	488	677

• : Dans le tandem, la longueur d'onde émise par le premier fluorochrome excite le second dont la lumière émise est mesurée.

lumineuse et de gagner un niveau d'énergie supérieur (W1) en faisant passer un électron d'une sous-couche à un autre. Si l'apport d'énergie extérieure cesse, l'électron va gagner une sous - couche d'énergie inférieure W2, dans un premier temps intermédiaire entre W0 et W1. Dans cette dernière étape, il va libérer l'énergie acquise = W1-W2 sous forme de lumière selon la relation de base :

$$W = h\nu \quad (h = \text{constante de Planck, } \nu = \text{fréquence de la lumière})$$

Les molécules qui ont cette propriété sont appelées

leur longueur d'onde d'émission.

Appareillage

Le «cytomètre en flux» est basée sur 3 systèmes (Figure 1) (4,10) :

- Le système fluide : assure par un mécanisme d'hydrofocalisation le transport des cellules les unes derrière les autres après leur marquage par un ou plusieurs anticorps dans un liquide de gaine.
- Le système optique : les cellules passent dans une

chambre de lecture devant un faisceau laser. Les lasers présentent l'intérêt d'émettre une lumière monochromatique. Selon les longueurs d'onde nécessaires pour exciter le fluorochrome marquant l'anticorps lui-même fixé sur les cellules, on choisira un type de laser ou un autre (1). Les différents signaux optiques émis (lumière diffractée, fluorescence...) définissant 3 canaux optiques (taille, granularité et fluorescence) sont séparés les uns des autres par un jeu de miroirs et de filtres optiques. En effet, l'intensité de la lumière diffractée dans l'axe (Angle = 10°) est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : forward scatter); celle diffractée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique (SSC : side scatter) (11).

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés puis acheminés vers des systèmes de détection ; photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres (Figure 1).

- Le système informatique : le signal électronique est converti en valeurs digitales en mode linéaire ou logarithmique. Le convertisseur ADC (analog to digital converter) affecte une valeur numérique pouvant être stockée électroniquement et proportionnelle à l'intensité du signal (4). Le cytomètre mémorise tous les paramètres de chaque cellule considérée individuellement dans une liste informatique le «list mode».

Présentation des résultats

Les profils immunophénotypiques des cellules sont évalués sur des sous-populations cellulaires par dénombrement des éléments à l'intérieur d'une zone d'intérêt et sont exprimés en pourcentages ou en unités arbitraires en fonction de l'intensité de fluorescence.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme des :

- Histogrammes monoparamétriques ou l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules (Figure 4).
- Histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément (Figure 2 et 3).

La détermination du seuil permet de distinguer les cellules positives ou négatives exprimant ou n'exprimant pas l'antigène étudié (6).

Application en hématologie

La CMF a investi un champ d'application très large. Celui-ci ne cesse de s'étendre en raison, en particulier, de la grande diversité des réactifs disponibles.

Les applications dans le secteur de l'hématologie sont difficiles à résumer (12,13), aussi nous n'en citerons que quelques unes.

Immunophénotypage des hémopathies malignes

Les leucémies aiguës (LA) :

La CMF est la technique de choix pour le diagnostic immunophénotypique des LA. Le but de l'immunophénotypage est de repérer les cellules anormales, d'en déterminer les caractéristiques phénotypiques, la ou les lignée(s) cellulaire(s) d'origine, et leur degré de maturation (14, 15, 16).

L'immunophénotypage est devenu un examen indispensable au diagnostic des leucémies aiguës. En effet, en présence de blastes sans signes morphologiques de différenciation myéloïde, l'immunophénotypage est le seul moyen permettant d'affirmer leur caractère myéloïde (17). L'introduction du marqueur CD 45 permet une meilleure individualisation des populations cellulaires et une précision accrue du fenêtrage des blastes (figure 3). Le phénotype immunologique des LA permet de définir plusieurs sous-groupes (tableau II), dont certains sont corrélés à un aspect cytologique et/ou à des anomalies cytogénétiques et moléculaires. Il identifie certaines formes rares de LA. (16,18).

Dans la classification EGIL (european group for immunological characterization of leukemias) (17), la définition immunologique des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) repose sur l'expression par les blastes d'au moins deux marqueurs myéloïdes : MPO, CD13, CD33, CD65, CD117. La CMF permet de rattacher pratiquement toutes les LAL aux lignées B ou T et à certains stades de la différenciation au sein de chacune de ces lignées (17) (tableau II).

Tableau II : Classification immunologique des leucémies aiguës (2)

<p>1/ Leucémies aiguës lymphoblastiques B : CD19+, CD79a+, OO22+ (au moins 2 des 3)</p> <ul style="list-style-type: none">- Pro B (BI) Td T+, HLA-DR+, CD10-- Commune (BII) TdT+, HLA-DR+, CD10+- Pré B (BIII) TdT+, HLA-DR+, CD10+, μ cyto+- B mature (B IV) TdT-, HLADR+, CD10+/-, μ cyto+, Igs+ <p>2/ Leucémies aiguës lymphoblastiques T: CD3c/s+</p> <ul style="list-style-type: none">- Pro T (T I) CD3c+ CD7+- Pré T (T II) CD3c+, CD7+ , CD2+, CD5+/-, CD8+/-- Cortical T (T III) CD3C+, CD7+, CD2+, CD1a+, CD4+ ou CD8+- Mature (T IV) CD 3s+, CD7+, CD2+, CD1a-, TCR x/_ ou x/_ <p>3/ Leucémies aiguës myéloïdes : anti MPO+, CD13+, CD33+, CD65+, CD117+ (au moins 2 des 5)</p>

L'immunophénotypage permet aussi l'identification des marqueurs pronostiques des LA tels que la présence de marqueurs lymphoïdes (exemple CD19 et CD56) au cours de leucémies aiguës myéloïdes (19,20) et l'évaluation de la maladie résiduelle (ensemble des cellules malignes persistant dans l'organisme et non détectables par l'étude morphologique classique). La caractérisation des cellules leucémiques de la maladie résiduelle repose sur la mise en évidence par un marquage multiple de phénotypes «aberrants» non retrouvés dans la différenciation lymphoïde ou myéloïde normale. La maladie résiduelle est définie par la présence du phénotype «aberrant» (le même que celui identifié lors du diagnostic) à un seuil de sensibilité de l'ordre de 10⁻⁵. En comparant la CMF à la biologie moléculaire, en dehors de la difficulté pratique (qualité de l'échantillon, nécessité de disposer d'un grand nombre de cellules, fixation non spécifique des anticorps, difficulté à définir les seuils de positivité par rapport au témoin) et au fait que le phénotype «aberrant» n'est pas présent dans toutes les cellules de la population maligne, la cytométrie en flux présente plusieurs avantages par rapport à la biologie moléculaire (sensibilité équivalente, moindre coût, rapidité de résultats, ne dépend pas de l'existence d'un transcrit) (16,21, 22,23).

Les syndromes lymphoprolifératifs Chroniques (SLP) :

Dans les SLP chroniques, l'immunophénotypage permet de distinguer (24) :

- une prolifération maligne d'une hyperlymphocytose réactionnelle, en particulier dans un contexte d'infection virale. Pour les proliférations lymphocytaires B malignes, on distingue une restriction isotypique des chaînes légères d'immunoglobulines de type Kappa ou Lambda, permettant d'affirmer la monoclonalité dans 98% des cas.

- de déterminer la nature B, T ou NK de la prolifération : il est impossible par le seul examen morphologique de distinguer les cellules lymphoïdes B des cellules lymphoïdes T. Cette distinction est cependant importante en raison des différences de pronostic entre les proliférations B, T et NK. Si la réalisation de ces immunophénotypages est relativement aisée, il n'en va pas de même de l'interprétation des résultats au cours d'un diagnostic de lymphoprolifération de type T/ ou Natural Killer (NK) (25).
- d'aider au diagnostic et à la classification des SLP chroniques. Pour les SLP chroniques de type B (90% des SLP chroniques), l'interprétation des résultats repose sur la positivité/négativité de certains marqueurs mais aussi leur intensité d'expression (tableau III).

Le score de Matutes (26), basé sur 5 marqueurs, CD5,

revue générale

CD23, FMC7, intensité d'expression du CD22 et des immunoglobulines de surface, a pour objectif de distinguer la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC B) des autres SLP chroniques (tableau III).

Numération des réticulocytes :

La détermination des réticulocytes mise au point par Coulter est une application de la méthode utilisée pour la détermination de la formule leucocytaire, adaptable sur tous les Coulter actuellement en service. Il s'agit

d'une méthode semi automatisée, qui combine l'usage d'une coloration supravitale au bleu de méthylène avec une analyse par un cytomètre en flux utilisant un laser de faible énergie. D'autres sondes fluorescentes des acides nucléiques sont utilisées. Ainsi la technique de Nobe utilise le thiazole orange qui est un marqueur fluorescent de l'ARN, la fluorescence est analysée par cytométrie (27,28).

Diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne :

Tableau III : Profil d'expression dans les pathologies lymphoprolifératives chroniques d'origine B (21)

Marqueurs	LLC	LPL	SLVL	HCL	LF	LM
CD19	+	+	+	+	+	+
Igs	faible	++	+ / ++	+ / ++	++	++
CD5	+	- / +	-	-	-	+
CD23	+	-	-	-	+ / -	-
CD22	faible	++	+	+	+	+
CD79b	-	+	+	+	+	+
FMC7	-	+	+	+	+	+
CD10	-	-	-	-	+ / -	-
CD25	+ / -	+ / -	-	++	+	-
CD11c	- / +	+ / -	++	++	- / +	-
CD103	-	-	+ / -	+	-	-
CD43	+	+	+	-	+	+
CD38	- / +	-	-	- / +	- / +	-
Score de Matutes	4 ou 5	0	0	0	0 / 1	1 ou 2

Abréviations :

+ : positif

- : négatif

+ / - : positif dans plus de 50% des cas

++ : fortement positif

- / + : positif dans moins de 50% des cas

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LF : lymphome folliculaire

LPL : leucémie prolymphocytaire

LM : lymphome du manteau

SLVL : syndrome des lymphocytes villeux

HCL : leucémie à tricholeucocytes.

Les techniques de CMF peuvent également être appliquées au diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HNP)(29,30). Cette pathologie qui résulte d'une mutation somatique au niveau des cellules souches, se traduit par un déficit partiel ou total des protéines de surface liées à la membrane cellulaire par un groupement glycoposphatidyl inositol (GPi) (exemple CD55, CD58, CD59), présents sur la plupart des cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Sur la population érythrocytaire des patients, on observe le plus souvent deux populations cellulaires : l'une exprimant normalement la protéine (type I) l'autre étant soit partiellement (type II) soit totalement déficiente (type III).

La CMF est bien sûr plus sensible que le test de HAM-DACIE classiquement pratiqué sur les hématies, particulièrement lorsque la proportion des cellules anormales est faible. Cependant, en raison de la fragilité des hématies pathologiques et des éventuelles transfusions, l'étude conjointe des autres lignées cellulaires apparaît le plus souvent nécessaire. En effet, d'autres marqueurs à GPI non érythrocytaires peuvent également être recherchés tels que le CD 14 au niveau des monocytes et le CD 16 au niveau des polynucléaires neutrophiles.

Cytogénétique en flux :

Les chromosomes sont mis en suspension puis incubés en présence de substances fluorescentes (molécules fluorescentes spécifiques de certains gènes, anticorps dirigés contre des protéines constituant des chromosomes et marqués par des fluorochromes...).

L'analyse des intensités de fluorescence émise par chaque chromosome permet de les classer selon la quantité de substances fluorescentes qu'ils ont fixées (fonction de leur contenu en ADN) et donc d'obtenir un histogramme représentant le caryotype en flux (31).

Immuno-hématologie :

La CMF permet d'évaluer l'expression des antigènes des groupes sanguins (29, 32, 33) ainsi que la proportion des cellules positives et négatives. Ainsi, elle est très utile pour phénotyper des doubles populations érythrocytaires, particulièrement dans le cas où l'une des populations est très minoritaire et pour phénotyper avec plusieurs anticorps chacune des populations d'un mélange cellulaire plus au moins complexe. La CMF permet également de détecter les antigènes intracellulaires après perméabilisation de la membrane érythrocytaire.

Par ailleurs, cette technique est utilisée pour le contrôle de la déleucocytation en dénombrant les leucocytes résiduels contaminant les préparations plaquettaires et érythrocytaires utilisées en transfusion.

La CMF est a priori une technique parfaitement adaptée à l'étude quantitative des anticorps. En particulier de nombreuses équipes européennes ont utilisé la CMF pour titrer les anticorps anti D des femmes enceintes immunisées.

Enfin, l'utilisation d'anticorps réagissant de manière spécifique avec les antigènes leucocytaires humains a

permis l'étude des phénotypes HLA de classe I et II (34,35).

Etude des sous populations lymphocytaires

Les processus immunitaires font intervenir l'ensemble des populations leucocytaires sanguines. Leur numérisation et leur caractérisation sont des paramètres importants pour la connaissance du phénotype immunitaire. La mise sur le marché de cytomètres de maniement plus aisé qui sont figés dans des configurations simplifiées et adaptées à l'étude d'une ou deux populations cellulaires a facilité ce type d'analyse (35). C'est l'exemple de l'étude des sous populations lymphocytaires T chez les sidéens qui est systématisée grâce à la CMF (36,37). En effet, l'infection par le virus VIH se traduit par des désordres immunitaires liés à la disparition progressive des lymphocytes T helper (TCD4+) et des lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs (TCD8+). Le suivi des numérations en valeur absolue des LT CD4+ et LT CD8+ donne une indication sur l'évolution de la maladie.

Numération des cellules CD 34 :

La cytométrie en flux a la possibilité de faire la numération des progéniteurs hématopoïétiques en utilisant comme traceur un anticorps monoclonal marqué qui reconnaît la molécule CD34 à la surface des cellules souches. Cette molécule est présente à la fois sur les cellules immatures et sur tous les progéniteurs en voie de différenciation (39).

La numération des progéniteurs CD34+ est primordiale en cas de greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), qu'ils s'agissent de l'autogreffe ou de l'allogreffe. Ainsi, la CMF permet d'estimer les capacités de régénération d'un échantillon de moelle osseuse, de sang de cordon ou de sang périphériques. Ces matrices représentent les sources de CSH.

Autres applications :

Font partie des nouvelles applications de la CMF,

- L'étude du cycle cellulaire : L'analyse du pourcentage de cellules dans les différentes phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire a permis l'étude des facteurs contrôlant l'apoptose (40,41).

- *Le tri cellulaire* : Une fragmentation contrôlée du flux liquide conduit à l'emprisonnement de chaque cellule

dans une goutte peu après l'analyse dans un délai parfaitement connu par la machine durant lequel elle décidera de charger électrostatiquement chaque goutte contenant une seule cellule intacte et viable répondant à des critères désigné par le chercheur. Les gouttes chargées sont déviées de leur chute initiale par un champ électrique constant et dirigées vers des flacons collecteurs (42).

- La détection de cellules métastatiques de tumeurs solides dans le sang ou la moelle (43,44).

- *L'Array* : C'est l'utilisation de billes pour des dosages immunologiques des molécules telles que les cytokines dans les milieux biologiques (45).

Bibliographie

- 1- Metezeau P. Cytométrie en flux. L'information du biotechnicien 1994 ; 2 (4) : 233-9.
- 2- Valensi F. Classification des leucémies aiguës : nouvelles propositions de l'OMS. Rev Fr Labo 2002 ; 344 : 19-24.
- 3- Flandrin G. La nouvelle classification OMS des hémopathies malignes. Hémopathies myéloïdes. Hématologie 2001; 7(2) : 134-6.
- 4- Owens MA, Loken MR Flow cytometry : Principles, for Clinical Laboratory Practice. New York: Wiley-Liss, 1995 : 288.
- 5- Gane P. La cytométrie en flux en immunohématologie. Transfus Clin Biol 2002 ; 9 : 271-9.
- 6- Roederer M. Conjugaison of monoclonal antibodies. Oxford : Oxford University Press, 1997 : 23.
- 7- Givan A. Flow cytometry: First principles. New York: Wiley-Liss, 2001 : 273.
- 8- Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, Ault KA. Establishing optimal lymphocytes gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 1990 ; 11 : 453-9.
- 9- Stewart CC, Stewart SJ. The use of directly and indirectly labeled monoclonal antibodies in Flow cytometry. In methods in molecular biology. Vol. 45 : Monoclonal antibodies protocols. Edited by WC Davis. Immuna Press In C., Totowa, NJ. 1994.
- 10- <http://www.tours.inra.fr/equipements/cytometrie/utilisations-principes/schema-cytometre.htm>
- 11- Recktenwald DJ. Introduction to Flow cytometry : Principles, Fluorochromes, Instrument Set-Up, Calibration. J. Hematotherapy 1993 ; 2 (3) : 387-94.
- 12- Stewart CC, Nicholson JKA, eds. Immunophenotyping. New York : Wiley-Liss, 2000 : 442.
- 13- Lamy B, Herve P, Peters A. Uses of FC in hematology. Rev Fr Transfus Immunohematol 1988; 31(4): 641-60.
- 14- Del Vecchio L., Brando B., Lanza F., Ortolani C., Pizzolo G., Semenzato G., Basso G. Recommended reporting format for low cytometry diagnosis of acute leukemia. Haematologica 2004 ; 89(5) : 594-8.
- 15- Feki S., El Omri H., Laatiri M.A., Ennabli S., Boukef K., Jenhani F. Contribution of flow cytometry to acute leukemia classification in Tunisia. Dis Markers 2000 ; 16(3-4) : 131-3.
- 16- Jouault H. Place de la cytométrie de flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. Rev Fr Lab 2004 ; 344 : 25-30.
- 17- Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., van't Veer M.B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995 ; 9 (10) : 1783-6.
- 18- Carbera E., Rojas B., Labras S., Matutes E., Puga B. Acute myeloid leukemia MO : Clinical and laboratory characteristics. Rev Med Chil 1997 ; 125 (4) : 433-7.
- 19- Cruse JM., Lewis RE., Pierce S., Lam J., Tadros Y. Aberrant expression of CD7, CD56 and CD79a antigens in acute myeloid leukemias. Exp Mol Pathol 2005 ; 79 (1) : 39-41.
- 20- Pei MF, Zhang GS, Xiao L. The features and significance of immunophenotyping in adult acute leukemia. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2000; 25(3): 262-4.
- 21- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. Br J Haematol 2003; 121(6): 823-38.
- 22- Kern W., Voskova D., Schoch C., Schnittinger S., Hiddemann W., Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. Haematologica 2004 ; 89(5) : 528-40.
- 23- Vidriales M.B., San-Miguel J.F., Orfao A., Coustan-Smith E., Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. Best Pract Res Clin Haematol 2003 ; 16(4) : 599-612.

- 24-** Troussard X., Salaun V. La cytométrie de flux dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques de l'adulte. *Spectra Biologie* 2001 ; 20 (121) : 31-2.
- 25-** Plonquet A. Différenciation lymphoïde T. Méthode d'exploration des lymphocytes T et applications aux lymphoproliférations T/NK.
- 26-** Matutes E., Owusu-Ankomah K., Morilla R., Marco J.G., Houlihan A., Que T.H., Ctovsky D. The immunological profile of B cell disorders and proposal of scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994 ; 8 : 1640-5.
- 27-** Valensi F, Vandemeulebroucke E, Burtin-Curutchet ML, Widemer M, Tetard MC, Flandrin G. Evaluation of the coulter method for reticulocyte count. *Ann Biol Clin* 1995 ; 53(9) : 481-6.
- 28-** Laharrague P, Corberand JX, Fillola G, Marcelino N. Evaluation of an automatic analyzer of reticulocytes : the Sysmex R -1000. *Ann Biol Clin* 1990 ; 48(4) : 253-8.
- 29-** Gane P. La cytométrie en flux en immunohématologie. *Transfusion Clinique et biologique* 2002 ; (9) : 271-9.
- 30-** Cui W, Fan Y, Yang M, Zhang Z. Expression of CD59 on lymphocyte and the subsets and its potential clinical application for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2004 ; 26 (2) : 95-100.
- 31-** Metezeau P. Cytogénétique en flux. Principes, avantage et limites. Quelle perspectives pour l'onco-Hématologie ? *Pathol Biol* 1988 ; 36 (1) : 46-51.
- 32-** Boval B. La cytométrie en flux : application en transfusion. *Transfus Clin Biol* 2000 ; (7) suppl 1 : 63s-68s.
- 33-** Doinel C, Bourin P. Flow cytometry in immuno and hemato : some essential practical aspects. *Rev Fr Transf Hemobiol* 1989 ; 32(6) : 467-81.
- 34-** Monneret G, Seffert O, Debard AL, Gutowski MC, Couprie N, Larbre JP, Tebib J, Bienvenu J. Standardization and automation of HLA B27 typing by flow cytometry : validation and comparison with microlymphocytotoxicity. *Ann Biol Clin* 2000 ; 58(4) : 461-6.
- 35-** Kravtsoff R, Canepa S, Boulanger MD, Babault C, Chassaigne M. HLA B27 phenotyping using flow cytometry. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1991; 34(2) : 131-7.
- 36-** Rabson A. Enumeration of T cells subsets in patients with HIV infection. *AIDS Clin Care* 1995 ; 7(1) : 1-3.
- 37-** Mandy F, Bergeron M, Houle G, Bradley j, Fahey J. Impact of the international program for quality assessment and standardization for immunological measures relevant to HIV/AIDS : QASI. *Cytometry* 2002 ; 50 (2) : 111-6.
- 38-** Martini E, Noet G. The pitfalls of lymphocyte immunophenotyping during HIV infection. *Ann Biol Clin* 1993; 51 (7 - 8) : 689-96.
- 39-** Durand B, Bernaud J, Raffin A, Merieux Y, Rigal D, Salles G, Coiffier B. Contribution of dual CD13/CD14 markers in combination with CD 34 for the collection of peripheral hematopoietic stem cells. *Pathol Biol* 1997 ; 45(9) : 767-70.
- 40-** Elstein KH, Zucker RM. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptic subpopulations. *Exp Cell Res* 1994 ; 211(2) : 322-31.
- 41-** Schneider F, Kieser A. A novel assay to quantify cell death after transient expression of apoptotic genes in B- and T-lymphocytes. *J Immunol Methods* 2004 ; 292 (1-2) : 165-74.
- 42-** Lamb LS Jr. Hematopoietic cellular therapy: implications for the flow cytometry laboratory. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002 ; 16 (2) : 455-76.
- 43-** Georgakoudi I, Solban N, Rice WL, Wei X, Hasan T, Lin CP. In vivo flow cytometry : a new method for enumerating circulating cancer cells. *Cancers Res* 2004 ; 64(15) : 5044-7.
- 44-** Zhang J, Shen KW, Liu G, Zhou J, Shen Q, Shen ZZ, Shao ZM. Antigenic profiles of disseminated breast tumour cells and microenvironment in bone marrow. *Eur J Surg Oncol* 2003 ; 29 (2) : 121-6.
- 45-** Antunez C, Torres MJ, Corzo JL, Pena RR, Mayorga C, Jurado A, Santamaria-Babi LF, Blanca M. Different lympho-