CYTOMETRIE EN FLUX EN IMMUNOLOGIE

1. Généralités.

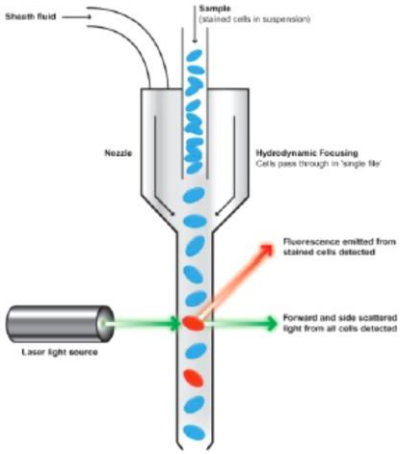
INTRODUCTION

• Origines :
Technique assez récente, développement accentué ces 15 dernières années.
→ 1934 = applicable aux cellules hématopoïétiques (comptage).
→ 1941 = développement des techniques d'Ac couplés *(ex : ELISA).*
→ 1960 = développement des premiers cytomètres.

• Cytométrie en flux (CMF)
= étude précise des cellules isolées entrainées dans un flux liquide
= cellules alignées les unes derrière les autres analysées une par une à grande vitesse (plus de 30 km/h) en défilant devant une source lumineuse (laser).
= technique incontournable en immunologie (chaque résultat nécessite l'utilisation préalable de cette technique).

PRINCIPE

•On injecte des cellules dans un liquide où elles vont être comprimées par une « benne » ? liquide → Création d'une focalisation hydrodynamique → **Propulsion des cellules à grande vitesse dans un flux hydrostatique** → passage une à une devant une source lumineuse (laser) → récupération de la fluorescence émise.



• Fluorescence permise par un immuno marquage préalable.
Fixation (ou pas) d'anticorps marqués par un fluorochrome sur un/des antigène(s) ciblé(s).

• Technique adaptée +++ aux cellules en suspension et donc à l'analyse des liquides biologiques *(ex : sang, LBA, ascite, épanchement pleural, LCR, aspiration médullaire ...).*

• Permet également l'analyse des cellules tissulaires après étape supplémentaire de dissociation enzymatique.

INTERET

• Technique rapide permettant une caractérisation :
- INDIVIDUELLE de chaque cellule.
- QUANTITATIVE (analyse de millions de cellules, intérêt statistique).
- QUALITATIVE et MULTIPARAMETRIQUE (= morphologie cellulaire + phénotypage).

• Principal intérêt clinique = suivi de l'état immunitaire des patients (monitoring) :
- LT CD4+ dans le SIDA.
- Patients immuno déprimés.
- Infections graves (suivi des # populations du SI).
- Maladies inflammatoires chroniques pour étudier leurs périodes de crise/d'accalmie *(ex : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, spondylarthrite ankylosante, polyarthrite rhumatoïde...).*
- Maladies auto immunes *(ex : diabète de type 1, sclérose en plaque ...).*
- Suivi au décours d'un traitement *(ex : vérification du niveau de cytotoxicité des immunosuppresseurs chez les patients greffés, après une chimiothérapie, une vaccination...).*

• Principale application = phénotypage des # populations cellulaires (SI ou de manière plus large).
Permet d'obtenir les % de chaque type cellulaire du système immunitaire, grâce aux divers Ag de surface qu'elles possèdent → aide au diagnostic et au traitement.

AVANTAGES ET LIMITES

• Permet :
- Une analyse qualitative ET quantitative
- Une analyse multiparamétrique sur une même cellule (attention au phénomène de compensation).
- Un tri « stérile » puis une remise en culture

• Technique utilisée de + en + en immunologie.
• Technique également utilisée en cancérologie et qui tend à s'étendre à toutes les disciplines.

- MAIS absence d'étalons internationaux de fluorescence
  - → Comparaison difficile des résultats entre les pays.
  - → Etude statistique des histogrammes générés par les logiciels de cytométrie difficile.

2. Techniques.

RAPPEL

Dans le sang, toutes les cellules sont issues de la différenciation d'une seule et même cellule souche hématopoïétique (CSH).
Différenciation de la CSH sous l'influence de divers facteurs de croissance *(ex : interleukines).*

2 grandes voies de différenciations :
- Différenciation lymphoïde → lymphocytes T et B.
- Différenciation myéloïde → le reste = globules rouges + plaquettes + monocytes/macrophages + polynucléaires...

Intérêt de la cytométrie = identifier tous ces types cellulaires.
Chaque type cellulaire possède des Ag membranaires +/- spécifiques = épitopes = cluster de différenciation à la surface (CD).
On peut les marquer avec des Ac couplés à un fluorochrome (immunomarquage).

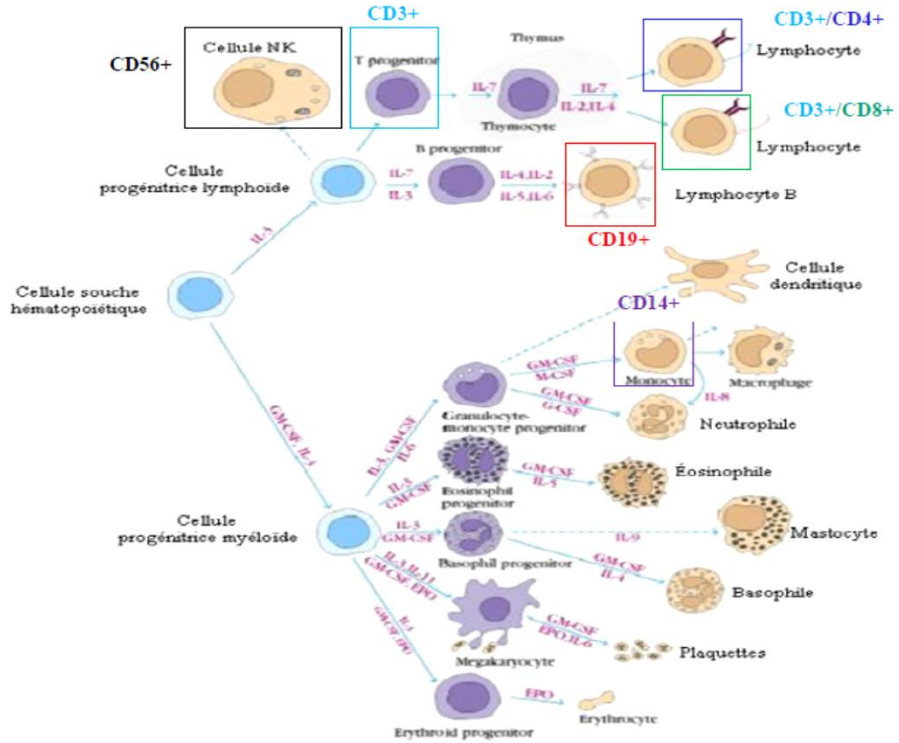
Principaux marqueurs de la lignée lymphoïde :
CD3 = Lymphocytes T (présents sur les progéniteurs T).
CD 4 = Lymphocytes T « helper ».
CD 8 = Lymphocytes « cytotoxiques ».
CD 19 = Lymphocytes B.
CD 14 = Monocytes / macrophages + cellules dendritiques.
CD 56 = Cellules Natural Killer.

IMMUNOFLUORESCENCE

IMMUNOMARQUAGE :

1er type = immunomarquage direct par utilisation d'Ac directement couplés à un fluorochrome qui se fixe spécifiquement sur l'antigène ciblé.





2ème type = immunomarquage indirect par utilisation de 2 types d'Ac :
- Anticorps primaires anti-Ag cellulaire.
- Anticorps secondaires anti-Ac primaires couplés à un fluorochrome.

FLUOROCHROMES :

- Fluorochromes = support de l'étude multiparamétrique.
- Utilisation possible de plusieurs Ac couplés à un fluorochrome émetteur d'une longueur d'onde différente pour chaque type de population → obtention de cellules multimarquées.

Lors du passage dans le cytomètre les différents laser excitent ces fluorochromes qui **s'excitent et émettent** dans des couleurs différentes → distinction des différentes sous populations lymphocytaires..

- *Exemple de lymphocytes T marqués par plusieurs fluorochromes :*
  - *1 Ac couplé à un fluorochrome vert reconnaissant le CD3*
  - *1 Ac couplé à un fluorochrome rouge reconnaissant le CD4*
  - *1 Ac couplé à un fluorochrome bleu reconnaissant le CD8*

Nota : 2 fluorochromes à retenir, le FITC (fluorescéine émettant dans le vert) et le PE (phycoérythrine émettant dans le rouge).

AUTRES OUTILS DE L'IMMUNOMARQUAGE :

L'immunomarquage ne sert pas qu'à faire du phénotypage.

• Utilisation de sondes des acides nucléiques (intercalant de l'ADN +++) pour visualiser les # phases du cycle cellulaire.

• Utilisation de sondes calciques qui ont la capacité de changer leur propriété d'absorption et d'émission en fonction de si elles sont liées au calcium ou pas (utilisées pour visualiser les flux calciques).

Ex : utilisée pour l'étude de l'activation des lymphocytes T au cours de laquelle survient un influx calcique à l'intérieur de la cellule.

CYTOMETRIE POLYCHROMATIQUE :

Pour une identification cellulaire la plus précise possible.

1 marqueur = étude maximale de 2 populations.
2 marqueurs = étude maximale de 4 populations.
3 marqueurs = étude maximale de 12 populations.
4 marqueurs = étude maximale de 24 populations.
5 marqueurs = étude maximale de 40 populations.
6 marqueurs = étude maximale de 60 populations.

Maximum actuel = 17 couleurs utilisées simultanément.

Appareils nouvelle génération = nombre de lasers augmentés :

- laser de référence émettant à 488 nm (dans tous les cytomètres).
- +/- d'autres laser émettant dans d'autres longueurs d'onde.

En général 3 lasers, 5 à 7 pour les + performants. Permet d'utiliser ++ de fluorochromes.

Remarque :
+ On augmente le nombre de marqueurs à détecter + on est précis dans la population à déterminer → véritable politique inflationniste concernant le nombre de marqueurs utilisés.

FLUOROCHROMES ET COMPENSATION :

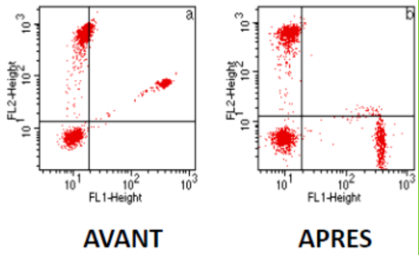
L'utilisation de # fluorochromes nécessite :

- Que les spectres ne se chevauchent pas.
- Un cytomètre adapté avec un nombre de lasers suffisant.

Problème = **phénomène de compensation** = chevauchement de spectres lors de l'utilisation de plusieurs fluorochromes conduisant à des « **faux positifs** »

→ cellules apparaissant positives pour plusieurs marqueurs alors qu'elles en sont réellement positives que pour un seul.

Exemple :
1 population normalement simplement positive pour 1 fluorochrome et l'autre positive pour l'autre, donc aucune population double positive.
Donc avant, c'est un artéfact.



Solution = utilisation de la formule FL2 - % FL1 donnant un résultat corrigé.

GFP

GFP = protéine fluorescente issue de la méduse Aequorea victoria, émettant dans le vert.

Modification génétique cellulaire par association du gène de la GFP à un gène cible codant pour une protéine cible = formation d'un transgène puis d'une protéine hydride.
Utilisable in vivo.

Création et commercialisation de molécules fluorescentes dérivées de la GFP par mutations.

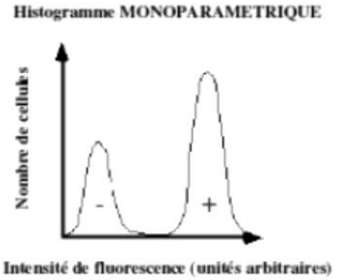


PRESENTATION DES RESULTATS

Traduction informatique de signaux électroniques générés par les fluorochromes excités.

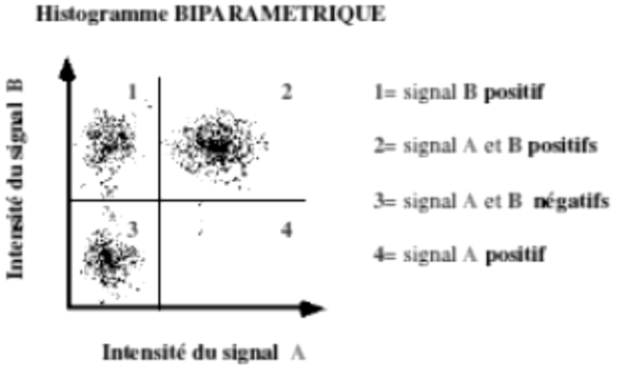
REPRESENTATION MONOPARAMETRIQUE :

Ordonnées = nombre de cellules.
Abscisses = intensité de fluorescence.



Souvent = histogramme avec 2 courbes.

1er pic (-) = fluorescence faible/nulle → cellules non marquées donc non porteuses de l'antigène recherché.
2ème pic (+) = fluorescence intense → cellules marquées porteuses de l'Ag.

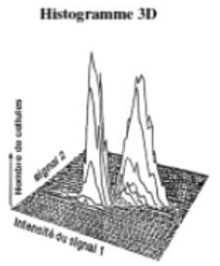


REPRESENTATION BIPARAMETRIQUE :

= représentation de 2 intensités de fluorescence l'une par rapport à l'autre.
→ nuage de points, chaque point correspondant à une cellule.

Permet de déterminer si les cellules sont :
- Négatives = non porteuses d'aucun Ag recherché (pop 3).
- Simple positive = porteuses de l'un des 2 Ag (pop 1).
- Double positive = porteuse des 2 Ag (pop 2).

REPRESENTATION MULTIPARAMETRIQUE ET EN 3D :

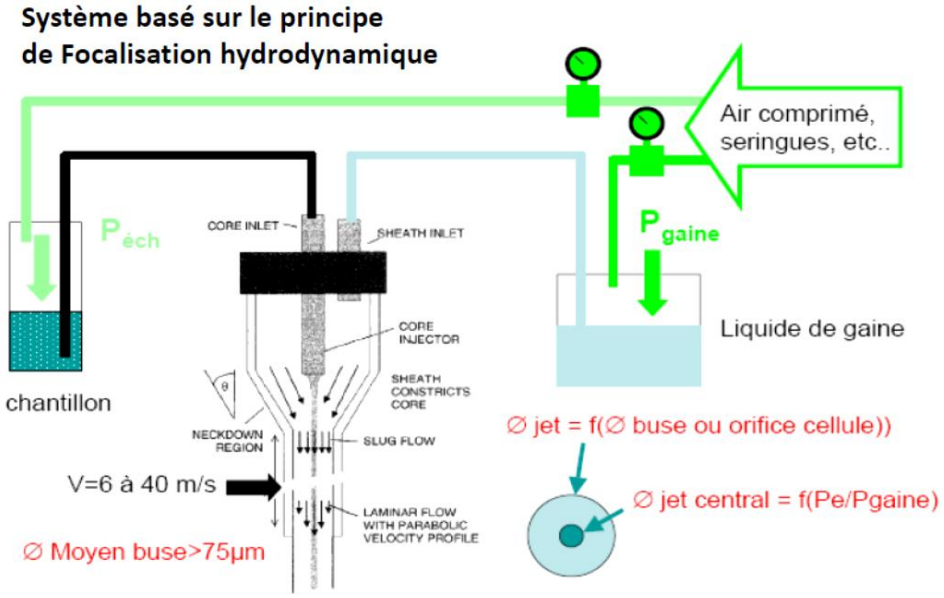


3. Le cytomètre.

Cytomètre = combinaison de 3 systèmes différents.

SYSTEME FLUIDIQUE

• Système fluidique = système basé sur le principe de focalisation hydrodynamique = flux laminaire permettant aux cellules en suspension de passer une à une devant un laser.



• Principe :
Aspiration de l'échantillon injecté dans la « buse » + injection du liquide de gaine sur les côtés de l'échantillon.
Liquide en surpression par rapport à l'échantillon → compression → création d'une « veine liquide » dont le diamètre ne permet le passage que d'une cellule à la fois.

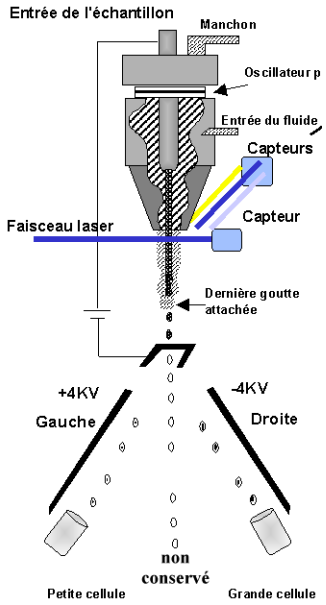
TRIEUR CELLULAIRE :

= variante du système fluidique.
Utilisé en recherche +++ pour la caractérisation précise de populations.
Permet de récupérer une population précise.

Flux liquidien soumis à une sorte de piézo électrique qui le fait vibrer → transformation du flux en fines gouttelettes.

Objectif de la machine = calculer le temps que met la cellule entre le moment où elle est analysée et le moment où elle se transforme en gouttelette.

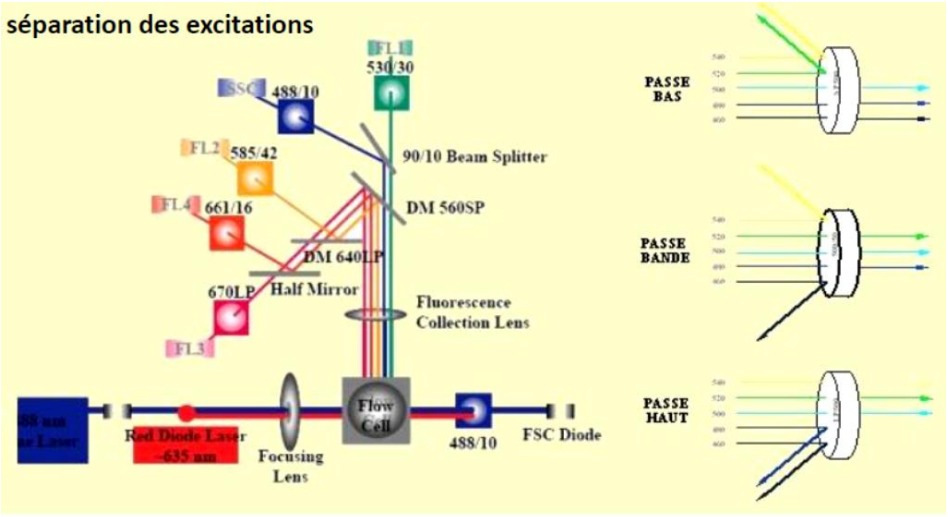
Ensuite des plaques électriques chargent les gouttelettes selon leur phénotype:
Cellule positive pour le marqueur recherché : impulsion positive.
Cellule négative pour le marqueur recherché : impulsion négative.
→ Attraction électrostatique vers une des plaques électriques → la cellule tombe dans le tube
→ obtention d'une population pure > 90%.



Intérêt en recherche surtout pour l'étude des populations rares.

Cette technique de tri permet de trier :
- classiquement 2 populations différentes (D/G).
- jusqu'à 4 populations en faisant varier l'intensité de la charge.

SYSTEME OPTIQUE



Le trajet optique **Les filtres**

Trajet optique jalonné de # types de filtres :
Dans un 1er temps = miroirs dichroïques (DM) (comme des miroirs sans teint).
Dans un 2ème temps = filtres passe-bande.

- 2 types de miroirs dichroïques :
  - **Miroir dichroïque passe bas** → laissent passer toutes les longueurs d'ondes < X nm et réfléchissent toutes les longueurs d'ondes > X nm.
  - **Miroir dichroïque passe haut** → laissent passer toutes les longueurs d'ondes > X nm et réfléchissent toutes les longueurs d'ondes < X nm.

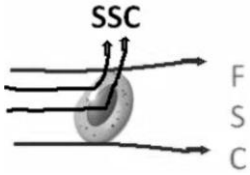
X = valeur attribuée à chaque miroir *(ex : 640nm).*

- Filtres bande passe:

Se trouvent juste devant les détecteurs et permettent la toute dernière sélection.
Possèdent 2 valeurs *(ex : 488/10).*

Permettent de récupérer une longueur d'onde spécifique (ex : longueur d'onde comprise entre 483 et 493 nm).

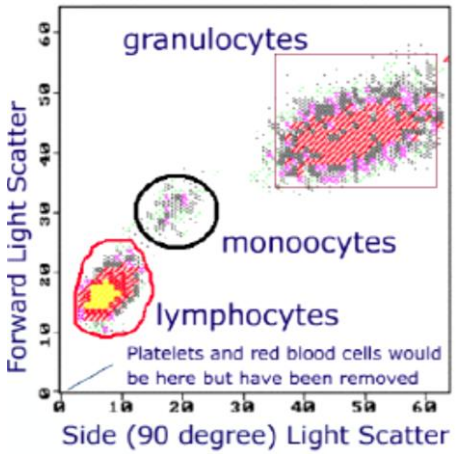
→ Tous ces filtres permettent à chaque photomultiplicateur d'être spécifique d'une longueur d'onde.



- 2 autres paramètres :
  - FSC = Foward Scatter
  - SSC = Side Scatter

→ détermination des paramètres morphologiques des cellules par récupération des phénomènes de diffusion de la lumière du laser sur la cellule (et non de la fluorescence !).

Une partie de la lumière est réfléchie et l'autre réfractée (qui traverse).
En ce mettant à des angles différents on récupère soit la réflexion soit la réfraction.



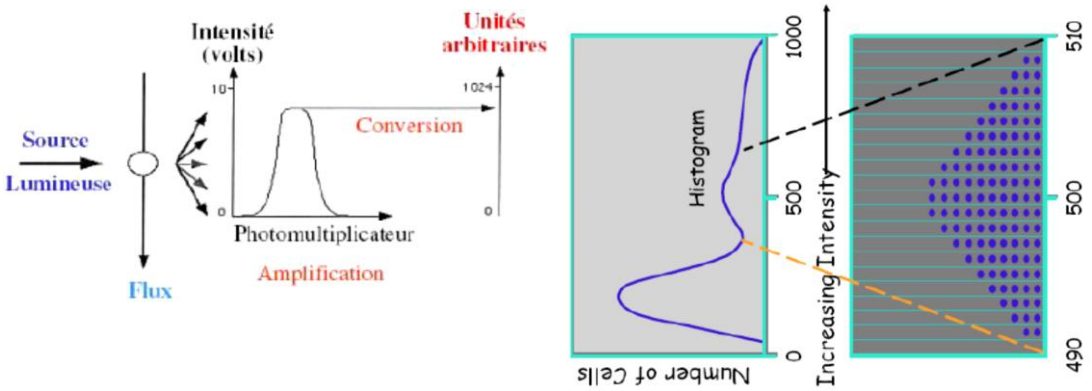
Foward scatter récupéré à ~ 180° = signal spécifique à la taille de la cellule → + la cellule est grande + on récupère un angle important.
Side scatter récupéré à 90° = signal relatif à la granularité de la cellule.
→ + la cellule est granuleuse + elle à tendance à dévier la lumière.

SYSTEMATIQUES, en 1er lieu, ne nécessite pas d'immunomarquage.
Exemple :
1ère population = petites cellules peu réfringentes.
2ème population = moyennes cellules moyennement réfringentes.
3ème population = grosses cellules très réfringentes.

SYSTEME ELECTRONIQUE

Système électronique constitué de photomultiplicateurs (= PMT) et d'une fibre optique.

- Le photon passe dans la fibre optique et est capté par le PMT = sorte d'échelle où le photon est transformé en électron qui lui engendre une cascade d'autres électrons → formation d'un signal électrique conséquent analysable



→ Traduction proportionnelle de l'intensité de fluorescence émise en Volt.

• Répartition de l'intensité du signal sur une échelle de 1024 bit → + la fluorescence est importante, + la variable attribuée par l'ordinateur sur l'échelle 1024 est importante et inversement.
• L'ordinateur les « ordonne » dans des cases → obtention d'une association des fluorescences de chaque cellule et des histogrammes.

4. Applications.

COMPTAGE DES LYMPHOCYTES T DANS LE SUIVI DES INFECTIONS HIV ET DES GREFFES

Application CLINIQUE la + courante.

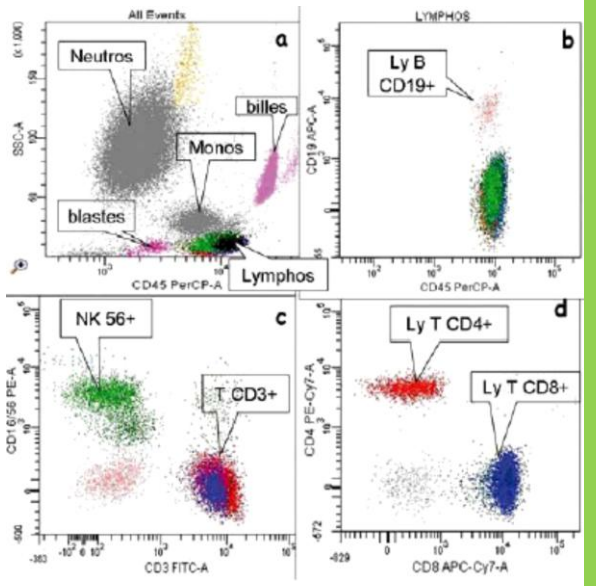
• **Principe** :
Prélèvement de 50 à 100 µL de sang.
=> Diagramme FSC / SSC.
=> Immunomarquage avec utilisation des marqueurs :
Exemple :
CD3 = Lymphocytes T (présents sur les progéniteurs T).
CD 4 = Lymphocytes T « helper ».
CD 8 = Lymphocytes « cytotoxiques ».
CD 19 = Lymphocytes B.
CD 14-15 = Monocytes / macrophages + cellules dendritiques.
CD 16 = Polynucléaires neutrophiles.
→ obtention du % de chaque population à partir d'une petite quantité de sang.
Nota : il existe + de 100 marqueurs cellulaires, donc un type cellulaire ne correspond pas qu'à un seul CD !

• **Avantages** :
Intérêt statistique.
Technique rapide : 3 min d'analyse.
Technique multiparamétrique donc précise.
Exemple : certaines cellules CD4+ sont en fait CD3- parce qu'en réalité ce ne sont pas des lymphocytes mais des monocytes ! D'où l'intérêt de coupler tous ces fluorochromes.

• **Sujet sain** :
Lymphocyte T CD4+ = 66%
Lymphocyte T CD8+ = 33%
LTCD4/LTCD8 = 2/3 à 1/3.

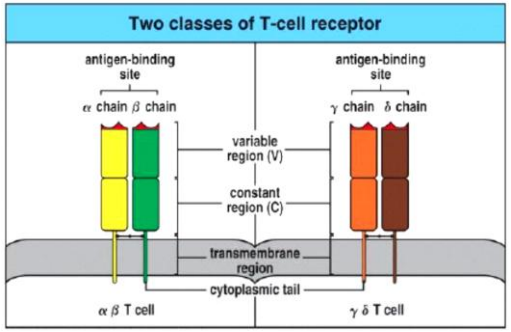
Mais situations atypiques +++ avec sous types de populations cellulaire rares chez des personnes saines.
Ex : LT CD4 ou 8+ « low ».
Ex n°2 : population CD8 + et CD56 + « super-cytotoxique » retrouvée parfois dans certains cancers.

Rôle et aspect pathologique / physiologique de ces populations cellulaires pas encore clairement défini, d'où l'intérêt en recherche et de l'utilisation du tri cellulaire.



INTERET DE CD3 :

Les TCR sont composés de # types de chaines qui définissent # LT :
• Chaines αβ : Majoritaires (> 90%).
Reconnaissent les peptides.
Possèdent une région constante C.
Possèdent une région variable V chargée de la reconnaissance des peptides.
→ intérêt de la détermination du % de LT possédant telle partie V dans certaines pathologies.



• Chaines γδ :
Retrouvées chez les cellules CD4-, CD8+, CD56+/-.
Minoritaires dans le sang (2 à 10%).
Présents au niveau des muqueuses +++.
Reconnaissent les glycolipides bactériens, fongiques et tumoraux.
Possèdent également la partie constante et variable.
→ intéressant dans certaines pathologies comme l'asthme, les MIC ou les infections à CMV pour lesquelles le taux de la population γδ augmente considérablement dans les muqueuses, d'où l'intérêt diagnostic.

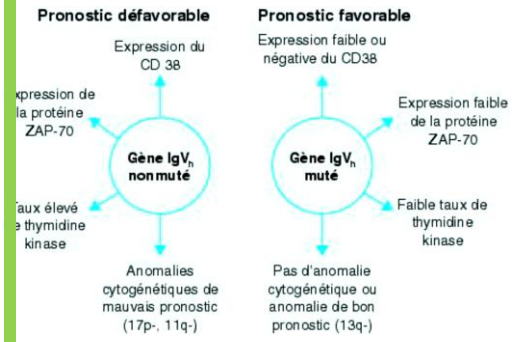
Actuellement ~ 30 Ac disponibles pour l'identification de la partie variable des # chaines.
Or certaines chaines variables sont spécifiques de certaines pathologies.
Ex : LT CD4+ et maladie de Sézari.

Nota : syndrome de Sézary = variété de lymphome malin non hodgkinien, dû à des cellules anormales provenant des lymphocytes T.

APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES, PRONOSTIQUES ET DE SUIVI DES HEMOPATHIES MALIGNES

Combinaison des résultats de cytométrie avec d'autres analyses *(ex : cytogénétiques)* → diagnostic + pronostic + suivi de l'efficacité des thérapies + suivi de la maladie *(ex : est-ce que le patient fait une rechute ?).*

Exemple de la **Leucémie Lymphoïde Chronique** :
Pathologie l'une des + fréquentes en hémato.
Pathologie des lymphocytes T → prolifération de la cellule souche myéloïde qui envahit la moelle.



Marqueur d'intérêt = marqueur CD38 = marqueur des progéniteurs hématopoïétiques.
• **Hémogramme + phénotypage** : on recherche le % des lymphocytes B (CD9+) porteurs du marqueur CD38.
→ quasi inexistants chez un patient sain.
→ majorité des LB CD38+ chez les patients atteints de LLC.

• Couplage avec des tests cytogénétiques visualisant certains remaniements chromosomiques permettant d'orienter le pronostic :
- Marqueur CD 38+ exprimé +++ + expression de la protéine ZAP 70 = mauvais pronostic.
- Marqueur CD 38+ pas/peu + expression de la protéine ZAP 70 pas/peu = pronostic plus favorale.

→ orientation du traitement.

TESTS FONCTIONNELS

TEST D'ACTIVATION IN VITRO :
Permet d'étudier le niveau d'action in vitro des lymphocytes CD3+.

Mécanisme physiologique :
LT CD3+ circulant inactif → stimulation (CD, cytokines, Ag...) → activation avec expression des CD25 et CD69.

Principe du test :
• Lymphocytes T en culture.
• Ajout de stimulants (Ag infectieux ou vaccinaux).
• Observation de la réponse → déficitaire / normale / accrue ?
→ quel type de population lymphocytaire répond à quel Ag (par utilisation de l'apparition de tel ou tel marqueur) ?

Lymphocytes T régulateurs suppresseurs = 2% des LT CD4+ = CD4+ / CD25+ / CD127+ / FOXP3+ (facteur de transcription intracellulaire).
=> production de cytokines immunosuppressives
=> tolérance immunitaire dans la grossesse, les tumeurs, les greffes...
Recherche +++ sur la possibilité de faire varier le pourcentage selon le besoin.

KIT DE DOSAGE DES CYTOKINES :
Nouvelle application de la cytométrie en flux apparentée à l'ELISA.
Permet le dosage de molécules en suspension *(ex : cytokines)* à partir d'un faible volume (< 50 µL) de sang.

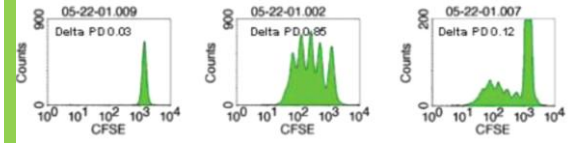
Principe :
• Billes recouvertes chacune d'un Ac de capture.
• Dosage simultané de plusieurs molécules (une bille spécifique d'une cytokine).
• Révélation via des Ac secondaires fluorescents (méthode « sandwich »).

Sur le marché, Kits permettant de déterminer le profil cellulaire Th1/Th2.

TEST DE PROLIFERATION AU CFSE



Surtout utilisés sur les LTCD3 *(ex : tests de transformation lymphoblastique).*
Un LT se divise 6 à 8 fois en - de 10 jours, division +++ en cas de transformation lymphoblastique.

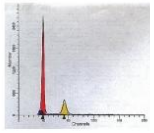


Principe :
Incubation cellulaire en présence de CFSE, colorant du cytoplasme.
1er passage dans le cytomètre : population avec fluorescence homogène.
Remise en culture.
Nouveaux passages.

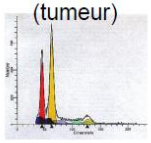
Résultats :
Aucune anomalie = division cellulaire avec dilution du colorant dans le cytoplasme → présence de pics de fluorescence de + en + petits à chaque division cellulaire.
Anomalie de division = pas de division cellulaire, donc pas de dilution → persistance du pic initial.

ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE

Normal



Aneuploïdie (tumeur)



Application légèrement hors du cadre de l'immunologie.
Utilisée notamment en cancérologie *(ex : cancer du sein)*, pour parfois analyser des cellules initialement non en suspension.

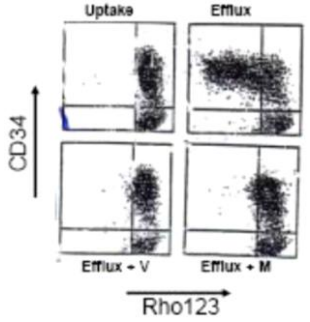
Principe = analyse du cycle cellulaire grâce à des marqueurs de l'ADN (colorants intercalant) → + il y a d'ADN + la coloration est importante.

Résultats :
Phase G0-G1= 1er pic. (n chromosomes)
Phase S = augmentation de l'intensité du fait de la synthèse d'ADN (2n chromosomes).
Phases G2-M = 2ème pic.

Pathologies :
Cycles cellulaires anormaux.
Aneuploïdie cancéreuse caractérisée par un pic surnuméraire = cellules se divisant mal avant une quantité excessive d'ADN.
OU elle peut aussi se traduire par une quantité moindre d'ADN et donc par un pic nettement moins important.

Valeur d'orientation diagnostic.
Valeur pronostic → + il y a de cellules touchées par l'aneuploïdie + le pronostic est mauvais.

ETUDE DU PHENOTYPE MDR EN CLINIQUE



Certains patients et certains lymphomes agressifs sont résistants à quasiment toutes les chimiothérapies = phénotype MDR « Multi Drug Resistance ».

Résistance des cellules cancéreuses grâce à des pompes d'efflux capables d'expulser les agents pharmacologiques hors de la cellule.

Mesure de cette résistance par la **rhodamine 123** (colorant cytoplasmique) :
- Intensité de couleur diminue → rhodamine effluée, cellule résistante.
- Intensité de couleur constante sur pls jrs → pas de phénotype MDR.
- Situations intermédiaires.

Recherche = criblage de nouvelles thérapies capables de bloquer ce phénotype MDR => actuellement quelques inhibiteurs des pompes assez efficaces *(ex : Vérapamil).*
Clinique = possibilité de suivre les cellules cancéreuses d'un patient pour vérifier qu'elles ne développent pas ce phénotype MDR.

MORT CELLULAIRE EN CYTOMETRIE DE FLUX

Utiliser dans le domaine de la recherche.

2 types de morts cellulaires :
- **Apoptose** = mort cellulaire programmée participant au développement embryonnaire et au maintient de l'homéostasie cellulaire et tissulaire.
- **Nécrose** = mort cellulaire induite *(ex : phénomène extérieur physique).*

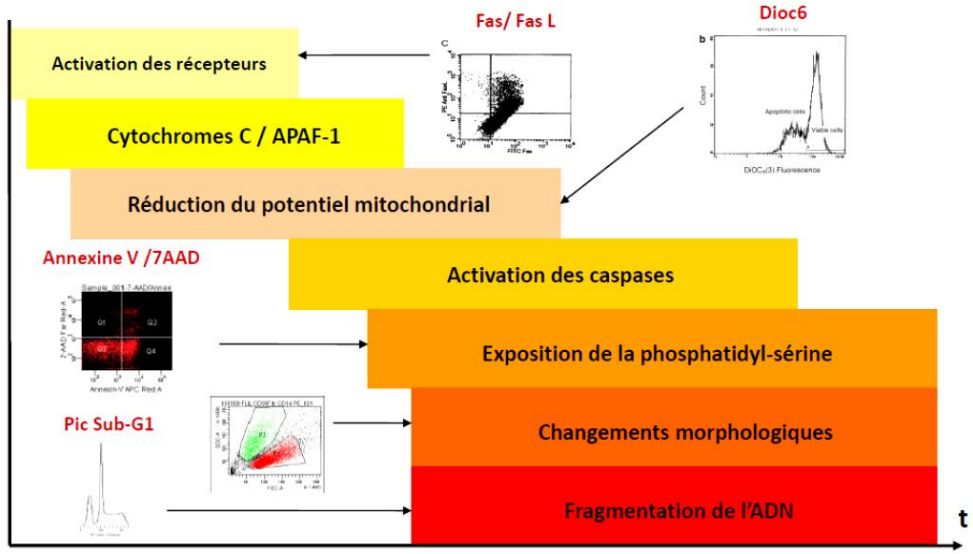
Apoptose intéressante +++ en recherche car implication pathologique de son dérèglement +++ :

- **Suractivation** → maladies neuro-dégénératives + désordres immunitaires…
- **Inhibition** → transformation cancéreuse + désordres immunitaires *(ex : maladies auto-immunes)*…

La cytométrie en flux permet d'identifier à quel stade de l'apoptose se trouve le problème et quelles sont les voies apoptotiques bloquées/enclenchées → développement de **thérapies ciblées**.

A chaque étape de l'apoptose - une technique de cytométrie en flux :

1. Présence du FAS-ligand sur le récepteur FAS.
2. Cascade avec phosphorylation de protéines entre elles.
3. Aboutissent à la libération du cytochrome C normalement dans la mitochondrie qui se retrouve dans le cytoplasme de la cellule → *détection avec des Ac anti-cytochrome C.*
4. Arrêt du fonctionnement de la mitochondrie qui se traduit par une réduction du potentiel membranaire mitochondrial.
5. En résulte une activation des caspases, protéines chargées de cliver le maximum de protéines dans la cellule → *utilisation de sondes qui reconnaissent le site de clivage des caspases et permettent de déterminer quelles caspases sont activées et donc quelles types de voies apoptotiques sont mises en jeu.*
6. Modifications membranaires à un stade avancé → *marquage à l'Annexine V (protéine)/ 7 AAD pour marquer les phosphatidylsérine de la membrane plasmique*, qui sont toujours côté intracytoplasmiques, sauf au moment de l'apoptose où elles sont externalisées.
   Ceci permet aux macrophages de détecter les cellules apoptotiques et de les digérer.
7. La cellule se rétracte complètement, les organites sont tous +/- lysés, caractéristiques étudiables en cytométrie grâce aux paramètres FSC (très diminué) et un SSC (très augmenté).
8. Fragmentation de l'ADN par les caspases → *mesure de la quantité d'ADN et de la perte d'ADN, que l'on observe par le même principe qu'énoncé plus haut pour les aneuploïdies.*



Question dans les annales (2011):
Après une brève description de la technique de cytométrie en flux, décrivez plusieurs applications de cette technique :
- Pour la rechercher fondamentale.
- Comme outil diagnostique.