UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n’a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l’utilisation de ce document.

D’autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2014 N°

MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

Nouvelle démarche d'identification des sous-populations cellulaires de la moelle osseuse par cytométrie en flux, en un tube huit couleurs

Alice SOUVIGNET

[Données à caractère personnel]

Soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble* le 02 Juillet 2014

Devant le jury composé de

Monsieur le Professeur Jean-Yves CESBRON, Président du jury

Madame le Docteur Marie-Christine JACOB, Directrice de thèse

Monsieur le Professeur Pascal MOSSUZ

Madame le Professeur Lydia CAMPOS - GUYOTAT

Madame le Docteur Françoise SOLLY

** La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2013-2014

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=12)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES (n=2)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)

Dernière mise à jour : 23/01/2014 Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

BEDOUCH	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=3)

CHANOINE	Sébastien	Pharmacie Clinique (UF-CHU)
GARNAUD	Cécile	Parasitologie-Mycologie
VAN NOLLEN	**Laetitia**	**Biochimie Toxicologie (HP2-DNTP-BGM)**

MEDAILLE D'OR D'ANNE D'INTERNAT SUPPLEMENTAIRE (n=2)

BERNARD	Delphine	période de 6 mois – novembre 2013 à avril 2014
GAUTIER	Elodie	période de 6 mois – mai 2014 à novembre 2014

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

ATER (n= 3)

BRAULT Julie	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
GRAS Emmanuelle	ATER	Physiologie-Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS

BEL	Coraline	(01-10-2012 au 30-09-2014)	
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
BOSSON	Anthony	(01-10-2013 au 30-09-2015)	Laboratoire GIN
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
CHRISTEN	**Aude**	(01-10-2013 au 30-09-2015)	DCM
CRESPO	Xenia	(01-10-2013 au 30-09-2015)	LBGE
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Pharmacochimie (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-11-2011 au 31/10.2014)	Laboratoire HP2(JR)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09.2013)	Laboratoire HP2(JR)
OUIDIR	Marion	(01-10-2011 au 30-09-2014)	
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

Professeur Invité

NURISSO	**Alessandra**	(01/11/13 au 31/12/2013))

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail,

A Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron, président du jury, pour avoir accepté de présider ce jury, et pour vos conseils méthodologiques tout au long de notre travail.

A Madame le Docteur Marie-Christine Jacob, directrice de thèse, pour m'avoir confié ce projet enthousiasmant et pour le temps que tu m'as consacré, tant lors du master 2 que de la thèse. Je te remercie également pour les nombreuses connaissances que tu m'as transmises.

A Monsieur le Professeur Pascal Mossuz, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour votre accueil au laboratoire d'Hématologie de Grenoble.

A Mesdames le Professeur Lydia Campos-Guyotat et le Docteur Françoise Solly, merci d'avoir accepté d'apporter un œil expert à notre travail. C'est à votre contact et à celui de tous les biologistes du laboratoire d'hématologie du CHU de Saint Etienne que j'ai découvert mon intérêt particulier pour ce domaine, merci pour votre accueil et vos enseignements.

A l'ensemble des membres du laboratoire d'Immunologie de Grenoble, pour cette année riche passée ensemble. Je remercie les biologistes Chantal Dumestre-Perard, Martine Pernollet et Denise Ponard et Giovanna Clavarino pour vos enseignements et conseils. A toute l'équipe technique d'immunophénotypage, Ghislaine Del Vecchio, Séverine Beatrix, Christine Vallet, Richard Di Schiena et Michel Drouin, un très grand merci pour ces excellents moments passés ensemble, pour votre accueil chaleureux au sein de votre équipe.

A Véronique Ligeon, statisticienne, dont les conseils ont été précieux. Merci pour ta disponibilité.

A l'ensemble des pharmaciens et biologistes que j'ai pu rencontrer au cours de mon cursus, à Grenoble, Saint Etienne ou encore Annecy, qui m'ont transmis leur passion pour ce métier et m'ont conforté dans mon choix d'orientation. Merci pour nos discussions scientifiques et personnelles.

Plus personnellement, je tiens à remercier,

Mes chers parents, Odile et Claude, pour leurs encouragements et leur soutien sans faille tout au long de ma scolarité. Vous avez su m'aider à m'orienter vers un métier passionnant. Merci pour m'avoir transmis la passion des sciences… naturelles ou médicales ! Voyages, montagne, musées, bricolage, jardinage et déménagements… merci aussi pour toutes ces passions partagées !

Edouard, pour ta douce présence à mes côtés. Trinquons à nos projets et notre avenir ensemble.

Mes grands-parents, Joseph et Janine, pour m'avoir donné le goût des voyages et de l'aventure pour le premier, de la culture et de l'école pour la seconde. J'y adjoints un clin d'œil à tout le reste de ma famille, de métropole comme d'outre-mer, et notamment Sylvain, Denis, Nitaya, Noa et Mila !

Tous les co-internes et assistants, pour ces quatre années de folie passées ensemble ! Aux grenoblois de ma promo Julien, Céline, Elise Bo, Elise Ba, Pauline, David et Elodie, mais aussi Julie P, Maelle, Lysiane, Pierre F, Julie M, Thibault et Sophie ; aux stéphanois Fabrice, Pierre et Laurence ; et à tous ceux que j'oublie! Pour avoir partagé nos premières gardes, nos premières COP, nos premières grèves, nos bureaux, stylos et ordinateurs. Pour ces fameux repas à l'internat, pour toutes nos sorties et soirée, nos virées marque-avenue, nos craquages à tous les étages de l'IBP. Aux cliniciens égarés qui ont eu la curiosité de venir passer un semestre au labo, j'ai nommé Violaine, Pierre B et Martin bien sûr.

Mes amis de longue date, Emilie-Charlotte, Anne-Sophie, Charline et Céline les coloc', JP et Emilie, Djé et Julie, Tonio et tous les autres… A nos week-ends, soirées, vacances, voyages qui nous rassemblent.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

ANALYSE DE LA MOELLE OSSEUSE EN HEMATOLOGIE ET EN IMMUNOLOGIE 17

A. Myélogramme par microscopie optique 17
1. Principe et indications 17
2. Avantages et limites 19
B. La cytométrie en flux (CMF) 20
1. Définition et historique 20
2. Principes techniques 21
3. Avantages et limites de la CMF 30
4. Place de la CMF dans le diagnostic des hémopathies 31
C. Evolution vers l'automatisation : nécessité de l'association de techniques complémentaires 32

OBJECTIFS DE CETTE ETUDE 34

PUBLICATION

DONNEES COMPLEMENTAIRES

S'INSCRIRE DANS UNE DEMARCHE QUALITE EN CMF 62

A. Réglage des settings et standardisation 62
1. Contrôles des performances du cytomètre 62
2. Obtention des valeurs cibles de fluorescence 62
3. Réglage des compensations 63
4. Détermination du seuil ou threshold 65
B. Validation technique 65
1. Validation des volumes d'anticorps utilisés 65
2. Validation de la conservation des échantillons 67
C. Validation du fenêtrage difficile de certaines populations : lignée myéloïde 70
1. Lignée neutrophile 71
2. Polynucléaires éosinophiles 72
3. Polynucléaires basophiles 73

EVALUATION DE LA PURETE MEDULLAIRE 74

COMPARAISON DES POPULATIONS IDENTIFIEES PAR CYTOLOGIE ET CYTOMETRIE DANS NOTRE DEMARCHE 77

ANOMALIES DETECTABLES DANS NOTRE DEMARCHE 78

A. Anomalies quantitatives 78
B. Anomalies qualitatives 80
1. Lignée lymphoïde 80
2. Lignée myéloïde 83
3. Difficultés analytiques 86

CONCLUSION

PERSPECTIVES

ETABLISSEMENT DE VALEURS NORMALES 91

EVALUATION DES POTENTIALITES DE SCREENING D'ANOMALIES DE NOTRE COMBINAISON 92

ANNEXES

Annexe 1 – Tables de Rümke 94
Annexe 2 – Moyennes de fluorescence d'intérêt pour l'établissement de valeurs normales. 95

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Réalisation des lames de myélogramme : principes du frottis de sang médullaire et d'écrasement du grain médullaire. 19

Figure 2 Principe de fonctionnement d'un analyseur trieur. *(Source : site internet de l'université Paris Diderot – Unité BFA)* 22

Figure 3 Principe centrage hydrodynamique. *(Source : site internet de l'Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier)* 23

Figure 4 Représentation du side scatter (SSC) et du forward scatter (FSC). 25

Figure 5 Conformations des cartes de déctecteurs : trigonales pour les lasers rouge et violet (gauche) et octogonale pour le laser bleu (droite). 26

Figure 6 Diagrammes de transitions énergétiques lors de l'excitation des fluorochromes : cas du fluorochrome simple et des fluorochromes en tandem. 26

Figure 7 Principe de fonctionnement d'un convertisseur analogique. *(Source : site internet de l'Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier)* 28

Figure 8 Modes de présentation des résultats en CMF. *(Source : site internet de l'Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier)* 28

Figure 9 Représentation des doublets de cellules. Le nuage des doublets de cellules est dissociable de celui des cellules isolées sur le graphe représentant la hauteur en fonction de l'aire. 30

Figure 10 Réglage des voltages de PMT à l'aide des billes Rainbow. Exemples du réglage du détecteur FITC : la valeur cible EuroFlow de MFI FITC est 56871, en fenêtrant sur le huitième pic, on modifie le voltage du détecteur jusqu'à obtenir une MFI FITC dans l'intervalle accepté (48340 – 65401). Cette méthode doit être appliquée à chaque détecteur. 63

Figure 11 Réglage des compensations à l'aide des billes CompBeads. Exemple de FITC et PE : les évènements fluorescents en FITC peuvent également fluorescer dans le canal PE à cause de la superposition des spectres d'émission (P5). Après soustraction de la fluorescence FITC dans le canal PE, on obtient des médianes de fluorescences en PE identiques pour les évènements FITC négatifs (P4) et FITC positifs (P5). Cette méthode doit être appliquée à chaque couple d'anticorps. 64

Figure 12 Courbes de stabilité entre les différents volumes d'anticorps testés : volumes recommandés par le fournisseur et 5 µL. 67

Figure 13 Courbes de stabilité entre J0 et J3 des pourcentages de chaque population cellulaire, pour le SSC des granuleux et le pourcentage des granuleux rapporté aux cellules totales. 69
Figure 14 Courbes de stabilité dans le temps des moyennes de fluorescence des populations d'intérêt entre J0 et J3. 70
Figure 15 Démarche de validation de l'utilisation de CD38 dans l'étude de la maturation granuleuse, à l'aide des marqueurs de référence CD117, CD16 et CD13. 72
Figure 16 Démarche de validation de la stratégie d'identification des polynucléaires éosinophiles à l'aide du marqueur de référence CRTH2. La positivité pour CRTH2 des évènements comptés comme des éosinophiles confirme que la stratégie d'identification est correcte. 73
Figure 17 Courbes de corrélation de paramètres potentiels d'évaluation de la pureté médullaire avec la méthode de référence décrite par Holdrinet. 76
Figure 18 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de clone T (lymphome). On note l'excès de lymphocytes T. 78
Figure 19 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de blocage toxique de maturation granuleuse. On ne note pas de d'excés de cellules CD34 positives sur le premier scattergram. La maturation granuleuse est présente en quantité normale mais on ne retrouve peu de polynucléaires neutrophiles matures, indiquant bien un blocage de la maturation granuleuse 79
Figure 20 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de clone B (leucémie à tricholeucocytes). On note l'excès de lymphocytes B matures. Une partie d'entre eux exprime de façon aberrante CD10. 81
Figure 21 Exemples de moelles osseuses pathologiques. Cas de myélome multiple (en haut) et de M-GUS (en bas). On note un excès de plasmocytes, plus ou moins important selon le cas, accompagné d'un nuage de plasmocytes d'expression CD19 et CD45 diminuée, correspondant aux plasmocytes pathologiques. 82
Figure 22 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de leucémie aigüe avec myéloblastes CD34 positifs. L'excès de cellules CD34 positives est visible sur le premier graphe. Les trois autres graphes montrent une maturation granuleuse résiduelle quasiment inexistante..... 84
Figure 23 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de leucémie aigüe avec myéloblastes CD34 négatifs. On ne note un léger excès de cellules CD34 positives sur le premier graphe. La maturation granuleuse est présente en très faible quantité et on retrouve un nuage très important de cellules non identifiées. Des compléments d'analyse ont permis de

typer cette population comme myéloïde immature. Par superposition des évènements non identifiés et de la maturation granuleuse totale, le dernier graphe nous permet de visualiser très nettement le blocage de maturation. 85
Figure 24 Exemple de visualisation d'un nuage de monocytes inflammatoires CD16 positifs. 86

LISTE DES TABLES

Table 1 Présentation de la configuration du FACS Canto II et des caractéristiques optiques des fluorochromes utilisés dans ce travail. *(Source : site internet de BD biosciences)* 24
Table 2 MFI obtenues après réglages du cytomètre, valeurs comprises entre +/- 15% des valeurs cibles EuroFlow. Le réglage du voltage des détecteurs de fluorescence par rapport à des valeurs cibles de moyennes de fluorescence (MFI) permet la standardisation entre différents automates et d'obtenir des mesures reproductibles..... 63
Table 3 Matrice de compensations. Le réglage des compensations permet de soustraire les fuites optiques de fluorescence dans les canaux inappropriés. 65
Table 4 Validation des volumes d'anticorps utilisés : Moyennes des différences des médianes de fluorescence pour chaque population cellulaire référente, et intervalles de confiance à 95%, entre les deux volumes d'anticorps testés. 66
Table 5 Validation de la stabilité des résultats sur 3 jours. Moyennes des différences des pourcentage de chaque population cellulaire référente et intervalles de confiance à 95%, entre J0 et J3. 68
Table 6 Critères d'évaluation de l'hémodilution et seuils choisis selon les publications. Résultats de concordance à la méthode de Holdrinet considérée comme méthode de référence, pour 40 moelles osseuses normales de notre série. 75
Table 7 Comparaison qualitative des sous-populations cellulaires médullaires identifiables par les deux techniques. 77
Table 8 Paramètres et seuils utilisés dans le calcul du score d'Ogata. 84

LISTE DES ABREVIATIONS

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

CMF : Cytométrie en Flux

FSC : Forward Scatter

SSC : Side scatter

PMT : Photomultiplicateur

LGL : large granular lymphocyte

GEIL : Groupe franco-belge d'étude Immunologique des Leucémies

EGIL : European Group for the Immunological Characterization of Leukemias

CRTH2 : Chemoattractant receptor T-cells Helper 2

CD : Cluster of Differenciation

NK : Natural Killer

TCR : T-Cell Receptor

CMN : Cellules Mononucléées

PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique

MDS : Myélodysplasie

FITC : Fluorescein Iso-Thicyanate

PE : Phycoerythrin

Per-CP : Peridinin Chlorophyll

Cy7 : Cyanine 7

APC : Allophycocyanin

VB421 : Brilliant Violet 421

V500 : Violet 500

INTRODUCTION

Les hémopathies malignes sont actuellement classées sur la base de données multidisciplinaires cliniques, morphologiques, immunologiques, cytogénétiques et moléculaires. La moelle osseuse est un prélèvement essentiel dans le diagnostic et le suivi des hémopathies.

L'étude immunologique en cytométrie en flux (CMF) est aujourd'hui un complément incontournable de l'analyse du myélogramme en cytologie. Elle permet un screening des cellules anormales et leur caractérisation immunologique afin d'aider à leur classement dans une entité, ainsi que l'étude de marqueurs pronostiques et de cibles thérapeutiques. Cette étude nécessite l'utilisation de panels d'anticorps qui dépendent de la pathologie (leucémies aigües, myélodysplasies, syndromes lymphoprolifératifs B ou T…). Il est donc important d'avoir une orientation diagnostique pour faire le meilleur choix, sur la base de renseignements fournis par le prescripteur ou d'après les données de l'analyse cytologique. En l'absence de ces données, ou en cas de mauvaise orientation, l'analyse cytométique n'est pas possible dans de bonnes conditions. Pour pallier à ces difficultés fréquentes dans la pratique quotidienne, nous cherchons à utiliser un panel d'anticorps dans un seul tube qui offre une vision de l'ensemble des cellules présentes dans l'échantillon et serve de screening des cellules anormales.

Les objectifs de ce travail sont de définir une stratégie d'identification de la majorité des sous-populations médullaires grâce à une combinaison unique de huit anticorps, de valider la quantification des sous-populations cellulaires à l'aide de la corrélation avec l'analyse en cytologie, et de valider les conditions techniques (volume des réactifs, conservation de l'échantillon, reproductibilité). Nous avons également voulu définir des critères d'alerte permettant de suspecter des situations pathologiques et de déclencher des compléments l'analyse. Cette étude a été réalisée dans des conditions de standardisation des moyennes de fluorescence selon les valeurs du groupe européen EUROFlow.

GENERALITES

ANALYSE DE LA MOELLE OSSEUSE EN HEMATOLOGIE ET EN IMMUNOLOGIE

A. Myélogramme par microscopie optique

1. Principe et indications

L'analyse par microscopie optique est considérée comme la méthode de référence pour l'analyse de la moelle osseuse (1). Deux types de préparations sont classiquement acceptés, l'écrasement du grain médullaire et le frottis de sang médullaire. La première présente l'intérêt d'être le reflet réel de la composition de la niche hématopoïétique, tandis que la seconde est issue d'un mélange avec du sang périphérique. Les frottis doivent être fins (couche monocellulaire), nombreux, permettant si nécessaire la réalisation de techniques cytochimiques, et seront colorés au May Grümwald-Giemsa après séchage à l'air (figure 1).
L'observation est d'abord effectuée à faible grossissement de manière à évaluer la richesse cellulaire, étape importante car c'est en fonction de ce critère que sont interprétés les pourcentages respectifs de chaque lignée. La moelle est normo-cellulaire lorsque les frottis montrent une surface d'hématies égale à celle recouverte par les cellules nucléées. Cette richesse peut être augmentée en cas de proliférations médullaires, réalisant alors une nappe de cellules nucléées. Inversement les frottis peuvent être hypo-cellulaires, un décompte devenant alors impossible à établir lorsqu'ils sont désertiques. Le cytologiste doit alors éliminer la cause d'erreur la plus importante de l'appréciation de la richesse médullaire qui est la dilution du suc médullaire par des éléments d'origine sanguine. La formule leucocytaire est alors constituée d'une majorité de polynucléaires et de lymphocytes, avec une formule leucocytaire proche de celle du sang périphérique. Cette dilution est évaluée par le lecteur de façon semi-quantitative. En cas de très forte dilution, le résultat du compte cellulaire ne sera pas rendu, le prélèvement étant considéré comme non informatif. Toujours au faible grossissement, on apprécie de façon semi-quantitative la richesse des frottis en mégacaryocytes. On en dénombre à l'état normal de 8 à 20 par lame, mais ici encore leur raréfaction n'est interprétable qu'en l'absence d'hémodilution. Le faible grossissement permet aussi de dépister des éléments normaux, de grande taille, et présents en petit nombre : ostéoblastes, ostéoclastes, histiocytes-macrophages. En pathologie, c'est au faible grossissement que sont décelés des groupements de cellules métastatiques ou de volumineuses cellules de surcharge.

Après avoir choisi les zones les plus riches et les mieux étalées, l'examen au fort grossissement permet l'analyse cytologique à la recherche d'anomalies morphologiques. Le pourcentage des différents éléments de chaque lignée sera ensuite réalisé après un décompte de 100 à 300 éléments distribués dans des champs contigus, en éliminant les cellules en mitose et les cellules écrasées, mal ou non identifiables. On dénombre classiquement 18 sous-populations cellulaires en plus des mégacaryocytes (1). Ce décompte de chaque catégorie cellulaire permet d'apprécier une maturation harmonieuse normale caractérisée par une distribution pyramidale avec peu de cellules jeunes et davantage de cellules matures. Le pourcentage global de chaque lignée permet de mettre en évidence un éventuel déséquilibre dans leur répartition (hyper- ou hypoplasie érythroblastique ou granuleuse). A la différence de la formule sanguine, le compte cellulaire dans la moelle inclut toutes les cellules nucléées. En cas de plus de 50% d'érythroblastes, un compte corrigé est réalisé sur les leucocytes seuls.

Une conclusion synthétique est donnée par le cytologiste, en fonction des données quantitatives ou qualitatives, après avoir pris connaissance de l'âge du sujet et de sa présentation clinique et biologique.

Ce sont les anomalies de l'hémogramme qui conditionnent en premier lieu les indications du myélogramme (2). En dehors de la présence dans la moelle de cellules anormales, le myélogramme peut montrer des anomalies quantitatives dans la répartition des différentes lignées ou des altérations qualitatives des éléments cellulaires. Il est nécessaire d'évaluer si ces anomalies portent sélectivement sur une lignée ou sur plusieurs. Devant une cytopénie, le myélogramme permet d'éliminer une origine centrale et il est de ce fait normal dans les cytopénies de cause périphérique. En dehors de toutes anomalies de l'hémogramme, le myélogramme est aussi pratiqué au cours du bilan d'extension de certaines affections malignes : lymphome, maladie de Hodgkin, cancers (1). Il peut être faussement normal en présence d'une localisation hodgkinienne ou d'une métastase de cancer lorsque celles-ci sont entourées de fibrose et ne sont pas aspirées à la ponction. Elles ne sont alors détectables qu'en histologie et la biopsie médullaire est plus appropriée que le myélogramme dans cette indication.

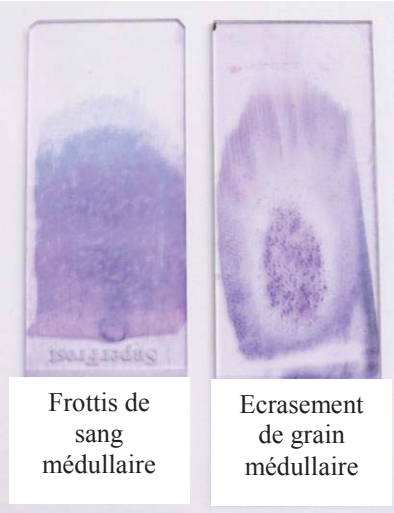


Figure 1 Réalisation des lames de myélogramme : principes du frottis de sang médullaire et d'écrasement du grain médullaire.

2. Avantages et limites

Grâce à un temps de préparation technique très court, la cytologie est un examen réalisable en urgence. Elle permet une évaluation précise de la richesse médullaire ainsi qu'une analyse fine des caractéristiques morphologiques de toutes les lignées, avec plusieurs stades de maturation : lignées érythroblastique, monocytaire, neutrophile, éosinophile, basophile et lymphocytaire. Aucun critère morphologique ne permet la différenciation entre les sous-classes de lymphocytes B, T et NK, ainsi que celle des hématogones. La lignée mégacaryocytaire est évaluée de façon semi-quantitative. On note la taille des cellules, leur rapport-nucléocytoplasmique, la couleur du cytoplasme ainsi que la présence ou non de granulations ou d'inclusions. L'analyse du noyau nous informera sur le degré de condensation de la chromatine, la présence ou non de nucléoles ainsi que de lobes. Malgré ces avantages, la cytologie souffre d'un fort coefficient de variation, mis en lumière par les tables de Rümke (3,4) (Annexe 1) ainsi que dans plusieurs travaux plus récents (5,6). Cela s'explique par différents facteurs : la subjectivité du jugement du lecteur et la difficulté d'harmonisation des pratiques, de fortes variations de répartition des cellules entre différentes zones de la lame et entre différentes lames (7), voir des variations de coloration. Malgré une forte consommation de temps de travail de biologiste, la cytologie n'offre qu'une faible sensibilité en cas de clone pathologique faiblement représenté, due à un nombre peu important de cellules comptées (classiquement 200 cellules sur deux lames), en particulier si la morphologie des cellules

pathologiques est proche de celle des cellules normales. L'analyse cytologique du myélogramme demande donc une grande expertise avec un temps d'apprentissage très long.
Ces dernières années, l'utilisation d'automates pour le compte des cellules a révolutionné le mode d'analyse du sang, mais différents problèmes techniques ne permettent pas pour l'instant une précision suffisante pour l'analyse de la moelle osseuse (8).

B. La cytométrie en flux (CMF)

1. Définition et historique

Les cellules hématopoïétiques présentent chacune un phénotype immunologique spécifique. Une combinaison d'anticorps judicieusement choisis permet ainsi d'identifier et de caractériser les sous-types cellulaires. La cytométrie en flux est une biotechnologie permettant d'analyser les cellules individuellement en phase liquide. Elle offre la possibilité de mesurer plusieurs caractéristiques d'une même cellule simultanément : sa taille relative (Forward Scatter ou FSC), sa structure (Side Scatter ou SSC) et son expression d'antigènes. Pour cette dernière caractéristique, on utilise un marquage par des anticorps spécifiques d'un antigène (membranaire ou intracytoplasmique), sur lesquels sont fixés des fluorochromes.
L'histoire de la CMF est marquée de plusieurs étapes importantes.
1934 : Moldavan publie le premier article mentionnant la CMF dans Science. Il présente la réalisation de numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire. Le compte des cellules est obtenu par mesure d'extinction des signaux lors du passage des cellules devant un détecteur photoélectrique (9).
1949 : Coons et son équipe proposent l'utilisation d'anticorps couplé à une molécule fluorescente (fluorochrome) (10).
1970 : De nouveaux appareils, nommés Cytograph et Cytofluorograph, sont mis au point. Ils sont capables respectivement de mesurer la taille par collection de la lumière diffusée aux petits angles (forward scatter), ainsi que les fluorescences verte et rouge (11,12). Ces appareils sont les premiers à être équipés d'une source laser (13). Les chercheurs associent des méthodes de mesure individuelle du volume, de la diffusion de la lumière, et de la fluorescence de cellules pour discriminer plusieurs types cellulaires (14).
1976 : L'analyse de multiples fluorescences devient possible grâce à la conception de cytomètres équipés de plusieurs lasers (15). Les analyseurs de cellules permettront la mesure de trois couleurs (1985) puis quatre couleurs (1986) en laboratoire de routine.

1978 : La production des anticorps monoclonaux est facilitée par l'apparition des hybridomes. Cela conduisant à une importante diversification des activités impliquant la CMF (16).

Par la suite, l'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto-fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables d'étudier de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes. En routine, les hémopathies seront ainsi définies immunologiquement (17). Les laboratoires d'hématologie verront également l'apparition de formules sanguines automatisées basées sur le principe de la cytométrie en flux (18).

A l'heure actuelle, il existe plus d'une vingtaine de compagnies fabriquant des appareils de CMF. Certains appareils sont capables d'analyser les cellules à la vitesse de 100 000 évènements par seconde, de trier en quatre voies, de trier des cellules à la vitesse de 70 000 évènements par secondes ou d'analyser seize paramètres simultanément, voir plus de 40 sur des cytomètres expérimentaux. Dans le domaine de l'analyse médicale, la plupart des laboratoires sont équipés à l'heure actuelle de cytomètres 8 à 10 couleurs.

2. Principes techniques

2.1 Les composantes d'un cytomètre

Pour fonctionner, un cytomètre nécessite une combinaison de trois composantes : fluidique, optique et électronique (figure 2).

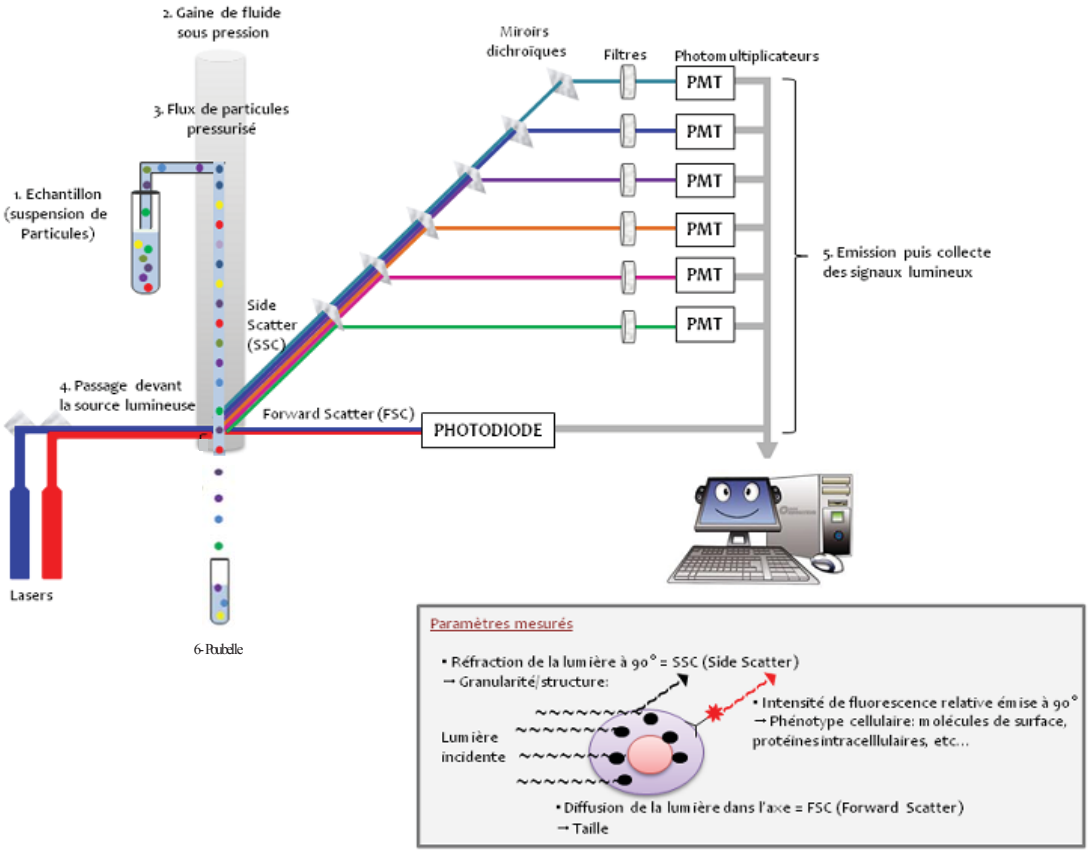


Figure 2 Principe de fonctionnement d'un analyseur trieur. ***(Source : site internet de l'université Paris Diderot – Unité BFA)***

2.1.1 Fluidique

Grâce à un principe de mécaniques des fluides appelé hydrofocalisation, les cellules en suspension sont amenées les unes derrière les autres au centre de la buse de mesure par le biais d'un injecteur (figure 3). Dans la buse, un liquide dit « de gaine » est poussé avec une pression plus ou moins forte dont va dépendre la vitesse de défilement des cellules. Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide échantillon et ainsi aligne les cellules au centre du jet, afin d'être excitées une par une par un faisceau lumineux. Sur un analyseur, les cellules sont ensuite amenées dans une poubelle et ne peuvent être triées. Sur un trieur, les cellules sont collectées de façon séparées selon les critères définis par l'utilisateur, fonction qui n'est pas utilisée dans notre travail.

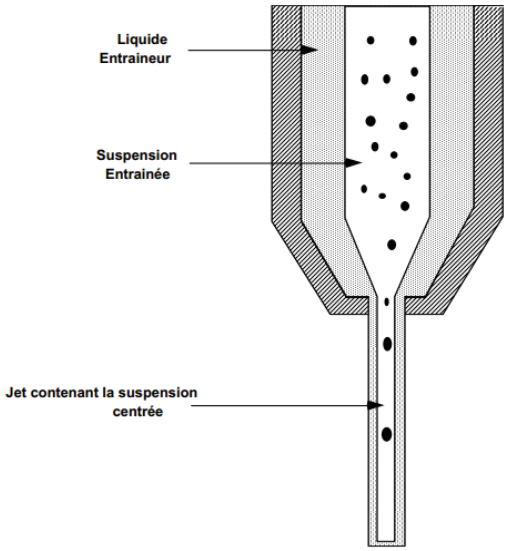


Figure 3 Principe centrage hydrodynamique. ***(Source : site internet de l'Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier)***

2.1.2 Optique

Excitation lumineuse

En aval de la focalisation hydrodynamique, l'analyse des cellules est rendue possible par le biais d'une source d'excitation lumineuse. Cette source vient frapper les cellules induisant ainsi l'émission de fluorescence par les fluorochromes utilisés pour le marquage, elle doit donc être à une longueur d'onde proche du maximum d'absorption du fluorochrome. Elle doit être puissante et nécessite une bonne focalisation, qualités reconnues des faisceaux laser monochromatiques. Un jeu de prismes et de lentilles permet de positionner avec précision le point d'intersection entre le laser et le flux.

Plusieurs types de laser peuvent être utilisés comme source d'excitation lumineuse, les plus couramment utilisés sont les lasers Argon qui fournissent plusieurs raies d'excitation (488 et 514 nm). La quantité de fluorescence émise par les fluorochromes est proportionnelle à l'intensité de l'excitation. La puissance du laser a donc une influence sur la sensibilité de détection d'un appareil. Les appareils de CMF peuvent être équipés d'un ou plusieurs lasers pour élargir le panel de fluorochromes utilisables et donc le nombre de paramètres analysables.

Le FACS Canto II du laboratoire d'immunophénotypage du CHU de Grenoble est équipé de trois lasers : un rouge (488 nm), un bleu (633 nm) et un violet (405 nm).

Système optique

Lorsque les cellules circulant dans la veine liquide sont frappées par le faisceau laser, elles émettent des signaux lumineux qui sont collectés par un système optique, composé d'une alternance de miroirs et de filtres, pour être amenés jusqu'aux détecteurs. Le rôle d'un filtre ou d'un miroir est fondamental car il permet de sélectionner la frange du signal lumineux à transmettre, réfléchir, stopper ou atténuer afin que chaque détecteur capte uniquement les longueurs d'onde qui lui sont destinées. La configuration du FACS Canto II est présentée dans la table 1.

Lasers du FACS Canto II	Longueur d'onde (nm) d'excitation	Fluorochromes utilisés dans notre combinaison	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Configuration de la carte des détecteurs	Détecteurs (PMT)	Longueur d'onde des filtres
Coherent Saphire solid state	488 – Bleu	FITC	495	519	Octogonale	PMT E	530/30
		PE	496	576		PMT D	575/26
		PerCP	477	678		PMT B	695/40
		PE-Cy7	496	778		PMT A	780/60
JDS Uniphase HeNe air cooled	633 – Rouge	APC	650	660	Trigonale	PMT C	660/20
		APC-H7	650	767		PMT A	780/60
Point Source™ iFLEX™	405 – Violet	VB421	407	421	Trigonale	PMT B	450/500
		V500	415	500		PMT A	510/50

Table 1 Présentation de la configuration du FACS Canto II et des caractéristiques optiques des fluorochromes utilisés dans ce travail. ***(Source : site internet de BD biosciences)***

Diffusion de la lumière

De l'interaction entre le faisceau et les particules, résultent des signaux lumineux de plusieurs natures :

- La diffusion aux petits angles (forward scatter ou FSC), correspondant à la diffraction, donne une indication sur la taille des particules analysées. On mesure alors l'ombre portée, qui dépend de la taille de la cellule mais aussi d'autres paramètres comme la présence de prolongements cytoplasmiques (figure 4).
- La diffusion aux grands angles (side scatter ou SSC), collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux, est un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction et donne des indications sur la structure interne des cellules (granularité, rapport nucléocytoplasmique…) (figure 4).

En associant les deux diffusions, il est ainsi possible de séparer grossièrement les différentes sous populations du sang ou de la moelle hématopoïétique.

- La fluorescence émise, collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux. Cette fluorescence peut être spontanée ou apportée à la cellule grâce à un marquage par un ou plusieurs fluorochromes spécifiques de constituants cellulaires. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réemet l'énergie absorbée par émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée. Plusieurs signaux de fluorescence peuvent ainsi être collectés simultanément et séparés les uns des autres grâce à l'emploi de filtres optiques adéquats.

Les signaux sont ensuite collectés et dirigés vers les détecteurs grâce au banc optique.

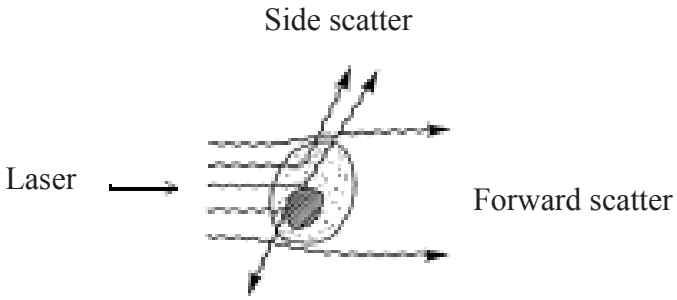


Figure 4 Représentation du side scatter (SSC) et du forward scatter (FSC).

Les fluorochromes

La fluorescence est définie comme la luminescence émise, résultant de l'absorption de lumière à une certaine longueur d'onde et de sa ré-émission à une longueur d'onde plus grande. Les fluorochromes sont des molécules capables de fluorescence, leur excitation provoque le déplacement d'électrons du cortège électronique vers des niveaux d'énergie supérieurs, créant un état instable. Lorsque ces électrons reviennent à leur état stable, de l'énergie est libérée sous forme de lumière. Chaque fluorochrome est caractérisé par un spectre d'absorption (ou d'excitation) et un spectre d'émission de fluorescence. Grâce à ces caractéristiques, on peut choisir le laser le plus efficace pour l'excitation, c'est-à-dire celui situé le plus près possible du pic du spectre d'absorption, ainsi que le filtre le mieux adapté pour une collection spécifique de la fluorescence, c'est-à-dire celui situé le plus près possible du pic du spectre d'émission. Les caractéristiques optiques des fluorochromes utilisés dans ce travail sont résumées dans la table 1. Nous analysons 4 couleurs avec le laser bleu et 2 avec chacun des lasers rouge et violets, ce qui nous permet d'étudier 8 antigènes simultanément.

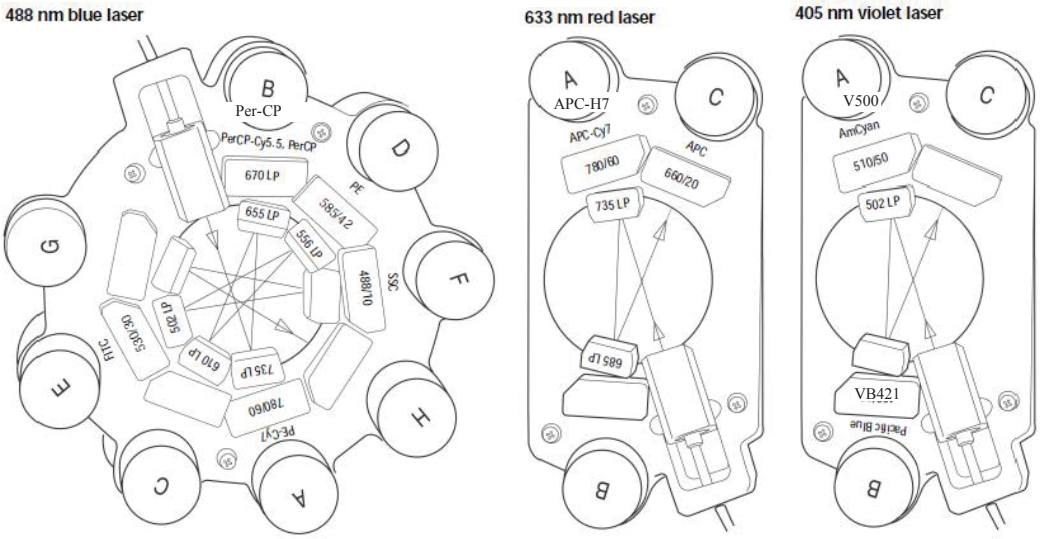


Figure 5 Conformations des cartes de déctecteurs : trigonales pour les lasers rouge et violet (gauche) et octogonale pour le laser bleu (droite).

Certains fluorochromes sont utilisés en tandem. L'excitation du premier fluorochrome donneur transfert son énergie à un second fluorochromes accepteur (figure 6). Deux conditions doivent être respectées pour un couple de fluorochromes : la distance entre le donneur et l'accepteur doit être comprise entre 1 et 10 nm et les bandes spectrales d'émission du donneur et d'absorption du receveur doivent se chevaucher. Deux fluorochormes tandem sont utilisés dans la combinaison présentée dans ce travail : PE-Cy7 et APC-H7.

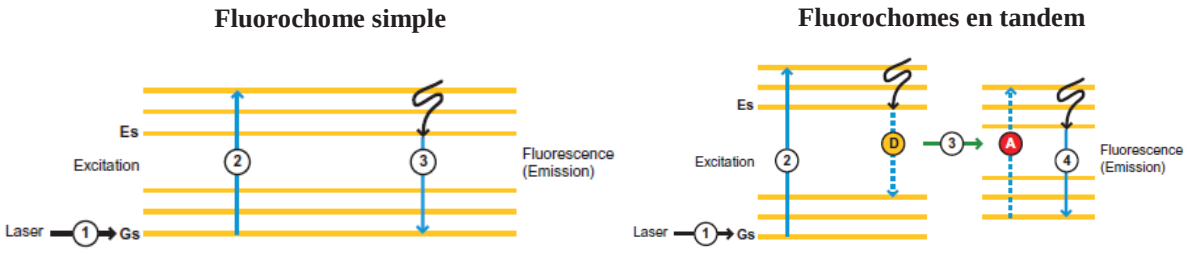


Figure 6 Diagrammes de transitions énergétiques lors de l'excitation des fluorochromes : cas du fluorochrome simple et des fluorochromes en tandem.

2.1.3 Electronique

Le détecteur

Le rôle des photomultiplicateurs (PMT) est de transformer les signaux optiques en signaux électriques. Les photons émis sont alors transformés en voltages compris entre 0 et 10 volts.
Les PMT ont également la capacité d'amplifier le signal électrique, ce qui permet d'augmenter la sensibilité. Pour le signal FSC, le détecteur n'est pas un PMT mais une photodiode.
L'ensemble du signal électrique issu de l'émission de fluorescence d'une cellule lors de son passage devant le laser est appelé impulsion. La durée de cette impulsion est appelée temps de vol, et est de l'ordre de quelques microsecondes.

La digitalisation du signal

Le rôle du convertisseur analogique-digital est de convertir un signal analogique (valeur d'un voltage) en signal digital (valeur numérique) assimilable par l'ordinateur (figure 7). Les systèmes actuels sont extrêmement performants. La société BD Biosciences a développé un système de traitement du signal entièrement digital. Le signal provenant des PMT est directement et continuellement digitalisé 10 millions de fois par secondes. Pour la mesure de l'aire de l'impulsion, les données obtenues correspondent à une résolution de 18 bits (262 128 canaux). Nous avons la possibilité de représenter ces données de deux façons différentes : sur une échelle logarithmique de 5 décades, ou avec la représentation biexponentielle qui utilise une échelle logarithmique pour les fortes intensités de fluorescence et une échelle linéaire pour les faibles intensités (2 décades autour de zéro), permettant une meilleurs visualisation des marquages faible.

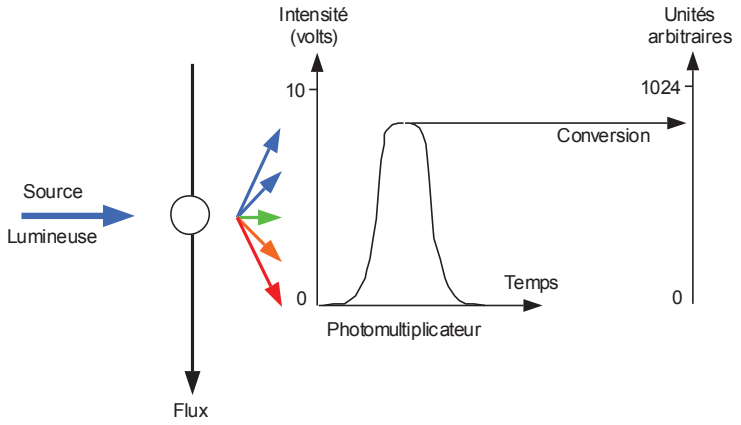
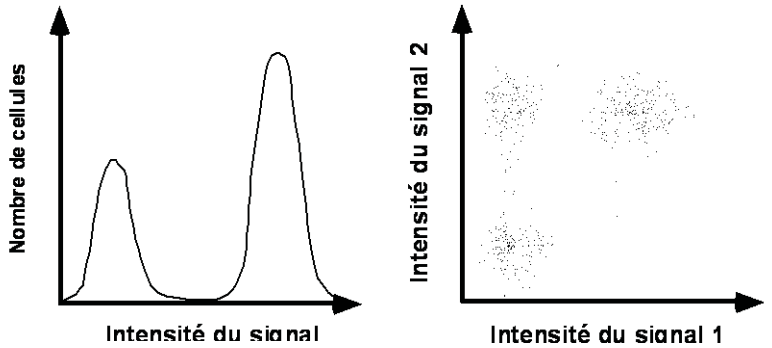


Figure 7 Principe de fonctionnement d'un convertisseur analogique. ***(Source : site internet de l'Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier)***

2.1.4 Représentation des données

Les valeurs numériques fournies par le convertisseur peuvent être présentées sous deux formes. Les histogrammes monoparamétriques représentent l'intensité de fluorescence en abscisse et le nombre de cellules en ordonnée. Les histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentent eux deux signaux simultanément, un sur chaque axe. Chaque point représente une cellule, et est appelé un « évènement » (figure 8). D'autres représentations sont possibles, mais non détaillées ici ca non utilisées dans ce travail.



Histogramme monoparamétrique Histogramme biparamétrique

Figure 8 Modes de présentation des résultats en CMF. ***(Source : site internet de l'Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier)***

2.1.5 Les réglages de l'appareil

Avant analyse, il est nécessaire d'optimiser les réglages de l'instrument en adéquation avec le type de marquage et le type de cellules utilisées (19).

- Le réglage des PMT est réalisé à l'aide de cellules non marquées, et est ajusté afin de visualiser l'ensemble des sous-populations cellulaires dans la première ou la seconde décade (20,21).
- Les débris pourront être éliminés grâce au réglage du seuil (threshold), qui définit le niveau minimum de fluorescence d'une particule pour qu'elle soit détectée comme un évènement. Ce seuil peut s'appliquer sur le FSC ou tout autre paramètre de fluorescence.
- Les chevauchements des spectres de fluorescence émis par les différents fluorochromes simultanément utilisés dans les protocoles multi-couleurs créent des interférences. Les appareils de CMF possèdent des algorithmes qui permettent de corriger ce phénomène, c'est le réglage des compensations (21,22). Les nouveaux systèmes de digitalisation du signal permettent un réglage des compensations a posteriori, après l'acquisition des données.

2.2 Problème des doublets de cellules

Il arrive que les cellules s'associent deux par deux, formant des doublets, et soient analysées sous forme d'une seule cellule. Cela constitue un artéfact qu'il faut éliminer. On peut repérer les évènements associés à des doublets de cellules grâce au cytogramme FSC-H (hauteur du pic) fonction de FSC-A (aire du pic). Pour une cellule seule, ces deux paramètres sont proportionnels, le point représentant l'évènement est donc sur l'axe médian x = y. Une cellule seule est caractérisée par H et A. Une cellule deux fois plus grande est caractérisée par 2H et 2A. Un doublet de cellules est caractérisé par 2A et 2H-ε, en d'autres termes la hauteur du pic est moins importante qu'attendue car l'intégralité du doublet n'est pas inclus dans le faisceau laser d'un seul coup. Le nuage des doublets de cellules est donc identifiable en dessous de l'axe médian (figure 9).

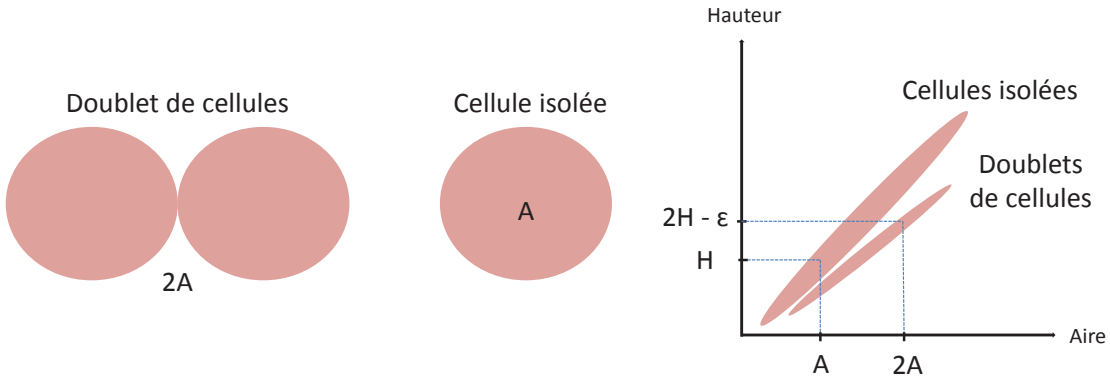


Figure 9 Représentation des doublets de cellules. Le nuage des doublets de cellules est dissociable de celui des cellules isolées sur le graphe représentant la hauteur en fonction de l'aire.

2.3 Les échantillons cellulaires

Pour être analysables, les cellules doivent être en suspension. Les échantillons de sang ne posent donc pas de problèmes, mais les tissus cellulaires doivent être préalablement dilacérés. Concernant l'analyse de la moelle osseuse, nous travaillons pour cette raison sur le sang médullaire et non les grains médullaires. Les cellules sont recueillies dans un tube avec anticoagulant à l'état frais, le délai l'avant analyse doit donc être court, de l'ordre de 24 heures. Afin de travailler sur moelle totale, une étape préalable de lyse des érythrocytes est indispensable.

3. Avantages et limites de la CMF

La CMF, relativement simple d'utilisation, présente des caractéristiques très intéressantes.

- Elle donne la possibilité d'une analyse simultanée de plusieurs paramètres, dont le nombre dépend des performances de l'automate. Le FACS Canto II, dont le laboratoire de Grenoble dispose, est équipé de huit canaux de fluorescence, permettant l'analyse simultanée de 10 paramètres (huit fluorescences associées aux mesures de taille et de granularité). Grâce à l'utilisation de multiples combinaisons d'anticorps, on peut identifier et dénombrer de très nombreux types de lignées cellulaires ainsi que leurs stades de maturation. Des marqueurs de référence spécifiques de chaque sous classes de cellules ont ainsi été décrits dans la littérature (23,24).
- Le grand nombre d'évènements analysables en peu de temps, de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers par secondes, offre des résultats précis et la possibilité de détection d'évènements rares.

- On note peu de risques techniques, hormis le prétraitement des échantillons. Ces étapes d'incubation, de lyse des érythrocytes et de lavage, indispensables à l'analyse, peuvent cependant conduire à la perte d'érythroblastes et/ou de cellules fragiles (25,26).
- Grâce à une grande stabilité de l'automate, l'analyse technique est très reproductible.
- La standardisation des résultats entre différents automates, et donc entre laboratoires, est réalisable grâce à une procédure précise de réglage des détecteurs.

4. Place de la CMF dans le diagnostic des hémopathies

La CMF est un maillon aujourd'hui incontournable de l'exploration des hémopathies. Elle répond à plusieurs interrogations au moment du diagnostic ou lors du suivi du patient, essentielles à une prise en charge thérapeutique correcte :

- Rechercher, confirmer ou infirmer un diagnostic d'hémopathie maligne ;
- Préciser les caractéristiques du clone, c'est-à-dire déterminer la lignée impliquée et le niveau du blocage de maturation ;
- Rechercher des marqueurs pronostics, thérapeutiques ou de progression tumorale ;
- Définir les sites atteints par les cellules malignes ;
- Suivre l'efficacité d'un traitement et/ou dépister précocement une rechute.

Ces analyses peuvent être réalisées sur n'importe quel type de prélèvement : sang, moelle osseuse, liquides biologiques, ponctions de ganglions ou biopsies. Les populations cellulaires normales sont détectées grâce à leurs phénotypes spécifiques. Des populations cellulaires phénotypiquement anormales ont été décrites dans de nombreuses hémopathies, notamment au cours des syndromes lymphoprolifératifs T, B ou NK (lymphomes non Hodgkinien, leucémie lymphoïde chronique, maladie de Waldenström, leucémie à ticholeucocytes, à LGL, syndrome de Sézary…), néoplasies plasmocytaires, leucémies aigües lymphoïdes et myéloïdes, pathologies mastocytaires, pathologies à cellules dendritiques, syndromes myélodysplasiques et/ou myéloprolifératifs et hémoglobinurie paroxystique nocturne (21,24,27,28).

Ces applications sont soumises aux recommandations du Groupe franco-belge d'étude immunologique des leucémies (GEIL), de l'European group for the Immunological Characterisation of Leukemias (EGIL) (29), ainsi qu'à d'autres instances européennes ou internationales. La conférence de consensus Bethesda International en CMF donne des recommandations précises concernant les indications médicales de l'analyse immunophénotypique (28), ainsi que des panels de réactifs d'intérêt selon le contexte clinique (19). EuroFlow, qui est un groupe d'expert européen travaillant à l'harmonisation des

pratiques de cytométrie en flux et à la standardisation, propose également des panels d'anticorps correspondants à des situations cliniques précises (30,31). Une synthèse discutant en détail des applications du typage cellulaire au cours des différentes hémopathies a été publiée dans Blood en 2008 (24).

Utilisée quotidiennement pour la caractérisation des cellules malignes, la CMF n'est pas utilisée à ce jour pour classer et effectuer un compte des cellules normales de la moelle osseuse. L'immunophénotypage des cellules malignes est à la nomenclature des actes de biologie médicale.

C. Evolution vers l'automatisation : nécessité de l'association de techniques complémentaires

La cytométrie en flux et la cytologie ont des intérêts très complémentaires pour l'identification des populations cellulaires. Concernant l'analyse du sang, la pratique courante est d'associer les deux techniques (18). Aujourd'hui, la majorité des automates de numération fonctionnent sur le principe de la CMF, permettant une reconnaissance des différentes sous-populations cellulaires et leur numération en peu de temps à partir d'un grand nombre d'évènements. En cas de difficultés de l'automate, d'alarmes ou d'anomalies biologiques, la cytologie est associée apportant l'analyse morphologique des cellules (33).Les automates de numération formule sanguine Sysmex XE, dont dispose le laboratoire d'hématologie de Grenoble, proposent une formule leucocytaire sanguine basée sur la diffraction aux grands angles (granularité) et aux petits angles (taille) ainsi que sur la fluorescence des cellules liée à leur contenu en ARN et ADN (plus la cellule est immature, plus elle est riche en acide nucléiques, plus l'intensité de fluorescence est élevée) (18). De nombreux autre automates proposent des numérations formules sanguines basées sur la cytométrie en flux (ABBOTT Cell Dyn Sapphire, BAYER Advia, BECKMANN-COULTER LH, HORIBA ABX Pentra).

Seul l'Hématoflow, système automatisé d'expertise cytologique proposé depuis 2005 par Beckman Coulter, réalise réellement un immunophénotypage des cellules. Cette méthode conjugue un analyseur de cellules classique et un cytomètre en flux 5 couleurs, avec réactif pré-mix de 6 anticorps en 5 couleurs associé à une démarche analytique. Elle s'est avérée plus reproductible et sensible que le comptage manuel, en particulier pour le compte des blastes. Son intérêt en tant que méthode de support en cas de leucocytes pathologiques ou de leucopénies semble prouvé (32).

Encore utilisé en recherche seulement, l'automate ImageStream^X Imaging Flow Cytometer (amnis) associe l'immunophénotypage, avec un marquage par 10 fluorochromes, et la cytologie grâce à des images haute résolution des cellules dans le flux.

Concernant l'analyse de la moelle osseuse, l'apport d'une technique de comptage des populations cellulaires en cytométrie semble donc très intéressant. Son association à la cytologie permettrait de cumuler les avantages des deux techniques : évaluation de la richesse médullaire, analyse morphologique des cellules et évaluation de la lignée mégacaryocytaire par la cytologie ; compte d'un grand nombre de cellules, reproductibilité et standardisation inter-laboratoire des pratiques, ainsi que différenciation des sous types de lymphocytes pour la cytométrie.

OBJECTIFS DE CETTE ETUDE

Dans le quotidien du laboratoire, nous recevons de nombreux prélèvements de moelle osseuse pour bilan d'hémopathies, avec des orientations cliniques souvent incomplètes voir absentes. Il est recommandé de commencer l'étude par une analyse cytologique rapide du même tube de moelle avant l'analyse immunologique. Cela permet d'apprécier la qualité du prélèvement (hémodilution) et de donner une orientation diagnostique afin de choisir au mieux le panel d'anticorps à utiliser pour la caractérisation des cellules anormales. Nous souhaitons remplacer cette étape afin d'éviter de doubler l'analyse cytologique, car les tubes de prélèvement ne sont pas les mêmes pour l'hématologie et l'immunologie, et d'optimiser les renseignements fournis pour la poursuite de l'analyse et le délai de rendu du résultat. Le panel d'anticorps doit répondre à 4 objectifs :

- identifier un maximum de cellules appartenant aux différentes lignées, à chacun des stades de leur maturation, avec 8 anticorps en un seul tube ;
- compter chacune des catégories de cellules, normales ou pathologiques, par rapport à une population référente, avec fiabilité, précision (même pour des évènements rares) et reproductibilité ;
- détecter les moelles pathologiques, caractériser l'anomalie pour orienter vers un panel complémentaire approprié ;
- apprécier la qualité du prélèvement, en particulier répondre à la question de l'hémodilution.

Cette approche doit être rapide, simple, et réalisable par des techniciens sous la responsabilité du biologiste. A l'heure actuelle, de nombreuses combinaisons d'anticorps permettant de cibler une pathologie sont validées, mais aucune méthode remplissant ces quatre objectifs n'est publiée.

La mise au point de cette démarche analytique a nécessité plusieurs étapes.

▪ **Le choix d'une combinaison unique de 8 anticorps**, basée sur la connaissance de leur spécificité rapportée dans la littérature, permettant de compter la majorité des sous populations médullaires en un seul tube (travail préalablement réalisé au laboratoire), et la mise au point d'une stratégie d'identification de ces sous populations.

▪ **La validation de la stratégie proposée pour l'identification et le comptage des populations cellulaires normales ou pathologiques**. Nous avons réalisé une étude prospective et en aveugle d'une centaine d'échantillons normaux et pathologiques reçus au

laboratoire portant sur la comparaison du comptage cellulaire obtenu en CMF à celui de la cytologie.

▪ **La recherche de critères d'alerte permettant de suspecter des situations pathologiques et de déclencher des compléments d'analyse,** à partir d'exemples.

▪ **La mise en place d'une démarche qualité**

- La standardisation du FACS Canto-II selon les recommandations du groupe France-Flow,
- La validation des volumes d'anticorps utilisés,
- La validation de la stabilité du résultat après plusieurs jours de conservation des prélèvements,
- L'étude de la reproductibilité de l'analyse,
- Le choix d'une méthode d'évaluation de l'hémodilution, indicateur de la qualité des prélèvements.

PUBLICATION

Single eight-color tube for flow cytometric reliable extended leukocyte differential in bone marrow

Authors and affiliations

Marie-Christine Jacob[1-2], Alice Souvignet[2], Julie Pont[3], Françoise Solly[4], Julie Mondet[3], Martine Pernollet[2], Lydia Campos[4], Jean-Yves Cesbron[2]

MC JACOB and A SOUVIGNET contributed equally to the work and are the co-first authors

1. INSERM U823, CRI/ Albert Institut Albert Bonniot, La Tronche, F-38700, France
2. Department of Immunology, CHU Grenoble, La Tronche, F-38700, France
3. Department of Hematology, CHU Grenoble, La Tronche, F-38700, France
4. Department of Hematology, CHU Saint Etienne, Saint Priest en Jarez, F-42270, France

Running headline : Bone marrow cells and flow cytometry

Corresponding author

Marie-Christine Jacob

Department of Immunology, CHU Grenoble, La Tronche, F-38700, France

Tel: 33 (0)4 76 76 54 16 FAX: 33 (0)4 76 76 52 66

MCJacob@chu-grenoble.fr

Credits for research support

This study has been supported by grants from BD Biosciences

Acknowledgements

We thank Christine VALLET, Michel DROUIN, Richard DI SCHIENA, Ghislaine DEL VECCHIO and Séverine BEATRIX for their highly helpful technical assistance.

ABSTRACT

Background. Bone marrow analysis by flow cytometry is part of the routine diagnosis of hematological disorders in medical laboratories. Previous leukocyte differential and search for abnormal subsets is yet usually performed through morphological examination on glass smears by skilled microscopists. In the present work we propose a single 8-color tube aiming at equivalent information using flow cytometry. **Methods.** 99 bone marrow samples were classified in 2 groups, i) 51 normal samples from healthy donors (3) or patients suffering from different diseases at diagnosis or during remission (48), and ii) 48 pathological samples involving quantitative and/or qualitative abnormalities. A panel of 8 antibodies – CD3-FITC / CD10-PE / CD38-PerCP-Cy5.5 / CD19-PECy7 / CD36-APC / CD16-APC-H7 / CD34-BV421 / CD45-V500 - was tested for identification of the main cell subsets at different stages of maturation using a FACSCanto-II analyzer. **Results.** We first proposed a strategy of sequential regions leading to identification 14-part normal leukocyte differential, i.e. erythroblasts, monocytes, B-cells from hematogones to plasma-cells (4 subsets), T- and NK-cells, polymorphonuclear cells (neutrophils, eosinophils and basophils), myeloblasts and other immature granular cells. We validated this approach by flow cytometry against microscopic morphological examination, in case of normal as well as tumor cells. Very interestingly, we showed that cell identification and numeration by flow cytometry was very easily performed and highly reproducible. **Conclusion.** A very simple, rapid, and reproducible flow cytometric approach is able to determine the bone marrow cell composition with high precision using a combination of 8 antibodies.

Key words

Bone marrow, leukocyte differential, standardization, flow-cytometry

INTRODUCTION

Bone marrow is a complex tissue where multiple haematopoietic lineages are differentiating. Many cell subsets are thus normally present, at different stages of maturation. As a central site of haematopoiesis, it is frequently disturbed in pathological conditions, and quantitative as well as qualitative abnormalities are regularly tracked in medical practice.

With the aimed at excluding malignancies, investigating peripheral cytopenia at diagnosis, or evaluating therapy, immunophenotyping using flow cytometry is nowadays part of the diagnostic for numerous haematological diseases, including myeloid as well as lymphoid lineage (1). Because of only vaguely defined diagnostic questions in many instances, it is usually performed after manual examination of the stained sample smear by a skilled microscopist, based on morphological criteria. Previous overview of cell composition is indeed prerequisite to more accurate further investigation. In the present work, we propose a unique combination of 8 antibodies, i.e. CD3 / CD10 / CD38 / CD19 / CD36 / CD16 / CD34 / CD45 which, in addition to FSC and SSC parameters, is able to delineate reliable evaluation of 14 normal bone marrow cell subsets, using a simple, reproducible, precise and standardized approach. The antibodies have been chosen because of their well-known and complementary specificities towards several hematopoietic cell subsets (table 1), and a sophisticated gating strategy has been defined. Interestingly, we demonstrated that our approach is highly correlated to microscopic cell differential count of the corresponding subsets i.e. erythroblasts, monocytes, mature polymorphonuclear cells (neutrophils, eosinophils and basophils), myeloblasts and other immature granular cells, plasma cells and lymphocytes. All lineages can thus be examined by flow cytometry, except megakaryocytes. Delineation between different stages of maturation within myeloid cells is possible, but less accurate by flow cytometry. Conversely, lymphocytes can be separated as regards T-, NK- and B-cell lineages, what is morphologically impossible. Furthermore, all stages of B-cell differentiation from type 1 and 2 hematogones to transitional, then mature B cells and plasma cells are also distinguishable. Such discrimination is indeed of great importance as regards immunophenotyping applications of flow cytometry. Of note, the present work aimed at correctly classify cell subsets within the adequate lineage and stage of maturation, whether they are normal or abnormal. Discrimination between normal and pathologic cells was not currently on purpose. This will be performed in a further study.

Similar studies aiming at leukocyte differential by flow cytometry using only one tube have rarely been reported in the literature (2,3). Four of them concerned only blood samples, what corresponds to far less complex cell composition. They used 6 to 10 antibodies to identify respectively 8 to 13 cell subsets (4–7). Only one study analyzed bone marrow, allowing recognition of 4 subsets with 4 antibodies (8). The originality of the present study is the distinction of a very large number of cell populations or stages of maturation, in particular within the lymphoid lineages, what authorized better detection and characterization of abnormal contexts.

Also very interesting, we demonstrated that the analysis is easy, quickly achieved, highly reproducible between technicians in charge of the study, and requires far less specialization than for microscopic examination.

MATERIALS AND METHODS

Patients

At Grenoble hospital, 99 consecutive patients were prospectively included in the study from March to August 2013, after information according to the protocol approved by the Institutional Review Board. They consisted in 59 men and 40 women, with mean age of 61.3 years (minimum 4 months, maximum 91 years). They were classified in 2 groups according to morphologic and immunological criteria: 1) 51 normal samples from healthy stem cell transplantation donors (4), or from patients with various diseases (47) at diagnosis or at remission during follow-up, 2) 48 abnormal samples including infiltration by tumor cells (38) dysplasia (9) or other disorders (1). The precise diagnosis is shown on table 1.

Cell preparation and flow cytometric analysis

About 0.5 ml of bone marrow aspirate was collected in BD Vacutainer® 4 ml K2E (EDTA) anticoagulant plastic tubes (Ref 368861) for routine analysis. Remaining cells were used for the present study. Morphological examination by microscopy and immunophenotyping by flow cytometry were performed within 8 hours, using the same sample tube.

Cell numeration.

Leucocyte concentration was obtained with an ABX MICROS 60 instrument.

Immunophenotyping.

The present panel consisted in one tube containing the following 8 antibodies from BD Pharmingen™: CD3-FITC (SK7; Mouse IgG1,κ; Ref 345763), CD10-PE (HI10a,[3]; Mouse IgG1, κ; Ref 332776), CD38-PerCP-Cy5.5 (HIT2; Mouse IgG1, κ; Ref 551400), CD19-PE-Cy7 (SJ25C1; Mouse IgG1, κ Ref 341113), CD36-APC (CB38; Mouse IgM, κ; Ref 550956), CD16-APC-H7 (3G8; Mouse IgG1, κ; Ref 560195), CD34-BV421 (581; Mouse IgG1, κ; Ref 562577), CD45-V500 (HI30; Mouse IgG1, κ; Ref 560777). The specificity of these reagents is presented in table 2.

Staining has been performed using direct immunofluorescence lyse and wash method. Briefly: 100 µl of bone marrow sample containing a maximum of 2 million cells were incubated with the combination of antibodies at the supplier recommended concentration during 15 minutes in the dark, at room temperature. Then, erythrocyte lysis and sample washing were achieved

with BD FACS™ Lysing Solution (Ref 349202) and PBS (Gibco by lifetechnologies; Ref 18912-014) respectively, using a BD FACS Lyse/Wash Assistant device.

Analysis was performed using 3-laser, 8-color BD FACSCanto ™ II flow cytometer (BD Biosciences, san Jose, CA, USA) and BD FACSDiva Software version 6. BD™ CompBeads (Ref 552843) were used for compensation settings. In order to allow standardization (9), we used the operating procedure from Euroflow group and PMT were adjusted using Rainbow Calibration Particles (BD Sphero ™; Ref 559123), according to target values provided by this group for each of the 8 fluorescence channels (9). Afterwards, 100 000 up to 300 000 events were acquired.

Morphological analysis by microscopy.

A drop of bone marrow sample was spread on glass as a smear, and analyzed after May-Grümwald-Giemsa coloration (AerosprayPro by ELITech using Thiazine SS-071B-EU and Eosine SS-071C-EU) with an Axioskop microscope (ZEISS). At least two hundred cells were counted by two different operators on two separated slides.

Statistical analysis

Differential cell counts by 2 techniques were compared using Spearman's correlation test with Statview software. Differences were considered significant for a p-value <0.05 and Rho correlation coefficient was calculated. The dispersion of differences as regards mean values was shown using Bland Altman graphs using Excel 2003.

RESULTS

The combination of the following eight antibodies, i.e. CD3 / CD10 / CD38 / CD19 / CD36 / CD16 / CD34 / CD45 was used to identify cell composition of bone marrow samples. Except CD3 and CD19, which are specific for T- and B-cell lineage respectively, all other antibodies have been selected because of their ability to recognize different subsets of several lineages, or discrete stages of differentiation within a lineage (table 2). A precise gating strategy is thus necessary to select the numerous bone marrow cell populations.

A precise gating strategy allows the identification of 14 normal cell subsets

Exclusion of undesirable events (Fig.1 A-E)

First, singlet cells were selected by eliminating doublets using FSC-area / FSC-height, as classically performed. Then, platelets were gated as CD36+ CD45- events, and further separated from erytroblasts on the basis of lower FSC and higher CD36 expression. A separation between the two subsets was clearly visible in most instances. The following step consisted in discriminating debris (FSC and SSC low within CD38 high) and erythrocytes (CD36- CD45- CD19- CD38-). In normal bone marrows, negativity of both CD45 and CD36 is characteristic of erythrocytes. In pathologic conditions yet, this phenotype might be shared by abnormal plasma cells and some leukemic B-blasts (10,11). Therefore CD38 high and CD19 positive cells had to be excluded from this selection, in order to avoid elimination as undesirable events. Metastatic cells, which are exceptionally present in bone marrow, can be also discriminated from erythrocytes on the basis of their larger size. All undesirable events were then joined as a single population and finally eliminated in order to select a definite region of as pure as possible bone marrow nucleated cells (BMNC).

Erythroblasts, monocytes and plasma cells identification (Fig.1 F-H)

Erythroblasts were selected as CD36+ CD45- events. They were identified as a sole population, but down regulation of CD36 was indicative of maturation towards erythrocytes (12–14). Monocytic cells are CD36+ CD45+ (1). They were selected after further elimination of CD36+ granular cells on the basis of intermediate SSC. Unfortunately, there was no possible discrimination between stages of maturation, but expression of CD16 should be noticed, as indicative of inflammatory monocytes (15,16). Next, plasma cells were selected on the basis of CD45+ CD38 high and SSC intermediate phenotype. The gate was enlarged to

include abnormal myeloma plasma cells, which may be CD45 negative and express lower CD38 levels (10). At this step of evaluation, all 3 subsets were joined and then eliminated for subsequent analysis.

Lymphocytes identification (Fig.1 I-L)

CD19 was used to identify all B-cell lineage members. Interestingly, maturation could precisely be followed from type-1 to type 2 hematogones (HG), then to transitional (Bt) and more mature B (Bm) cells, using CD38 and CD45. Three spots are indeed clearly observed within CD38high cells, with three different levels of CD45 intensity, corresponding to the first three subsets. All of them were CD10+ and type-1 HG were CD34 + (data not shown), as expected from the literature (17). Mature B-cells are CD45 high and heterogeneous regarding CD38 intensities. Besides, T-cells were selected as CD3+, and NK-cells as CD16+ and CD3- events. In these lineages, early stages of differentiation do not take place in the bone marrow or are not recognizable. Finally, all lymphocytes were also selected as SSC low events, thus eliminating non-specifically stained cells. Next step consisted in pooling erythroblasts, monocytes, plasma cells, B- T- and NK-cells as mononuclear cells (MNC), and excluding them from analysis.

Myeloid cells identification (Fig.1 N-R)

First, myeloblasts were identified as CD34+ SSC low events and then eliminated from further analysis. Among remaining granular cells, eosinophils were selected as CD45 high, CD16 low or negative, SSC high and FSC intermediate events (3,14). The analysis of CRTH2 expression (18) demonstrated that such a gating strategy was indeed a good way for their identification (data not shown). Opposite, basophils are known to rely within a region of SSC low, CD45 low and CD38 high characteristics (3,14). This is not specific of this subset, but normal cells harboring the same phenotype are infrequent. So we assumed that such an evaluation is satisfactory, if the subset remains rare. Precise identification needs to be performed only in case of excess. Neutrophils were then recognized as SSC high, CD10+ and CD16 high events (2, 3, 14, 19). The following step consisted in pooling all previously identified myeloblasts and polymorphonuclear cells. After their exclusion from the granular populations, only immature granulocytes (IGRA) i.e. promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes, remained. Although a maturation way from CD38 high / CD16 negative, towards CD38 low / CD16 high was evident, there was no clear cut-off between different stages. As we could not

manage to define a standardized strategy to discriminate between them, we enumerated them as a whole, and only qualitatively appreciated maturation.

Unidentified cells (Fig.1 S)

At the end of analysis, we jointed all classified subsets and deduced the frequency of unidentified events within the selected bone marrow nucleated cells. FSC/SSC and CD45/SSC representations allowed us to determine whether they consisted in a well-defined subset or were dispersed in different points of the graph.

Sample analysis

We thus applied this strategy to 51 normal and 48 pathological samples. In most instances, we did not encounter any difficulty in positioning the successive gates. The final results consisted in the differential count of the 14 aforementioned subsets in % within BMNC. They also relied on qualitative appreciation of erythroblastic and granulocytic differentiation. The presence of inflammatory monocytes too was noticed. Also very important was the evaluation of the frequency of unidentified cells. In normal bone marrows it was very low, ranging from 0.4% to 2.5% (mean 1.2% +/- 0.5%), and cells were dispersed throughout the graph. In pathological bone marrows, unidentified cells represented less than 3% (mean 1.4% +/- 0.6%) of total cells in 90% of the cases (43/48). In 2 samples, they were moderately higher (3.3% and 4.3%), but still consisted in isolated events. In the last 3 cases, they clearly corresponded to homogeneous subsets of 7.6%, 22% and 45% of BMNC. Complementary investigations let us classify these cells as CD34- CD117+ CD13+ myeloblasts in 2 samples, and CD20+ Ig Kappa B-cells with low CD19 expression in one case. We thus consider that more than 3% undefined cells that are grouped as a unique subset could be pathologic, and must be further identified using more specific markers.

Since normal and pathological cells could have been identified in the same way, all samples from both groups were consequently pooled for further analysis.

The flow cytometric approach is validated by microscopic examination

We validated our approach by comparing results obtained by flow cytometry and morphological examination. Therefore, we grouped T-, NK-, B-cells and hematogones as lymphocytes, since they are counted together by microscopists. We also grouped promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes as immature granulocytes because these

stages were not separated by flow cytometer. We first pointed out that the presence of unidentified cells did not indicate wrong classification, but just fail in classification of a cell subset. When assigned to the proper lineage thanks to additional antibodies, a great correlation with morphology could then be observed in the three samples revealing more than 7% unidentified cells. In the 2 first cases, CD34+ and unidentified cells reached 37 % and 49 %, whereas blasts cells represented 35 % and 45 % respectively by microscopic examination. In the third case, 28.3 % lymphoid cells and undefined cells were counted by flow cytometry and 34 % by morphology. Of note, in one case only, abnormal cells were misclassified. They were categorized as immature granulocytes instead of immature monocytes, due to lack of CD36 (20). For all other cases a very good correlation was demonstrated, in cases of normal as well as pathologic samples (Fig.2). Evaluation of lymphocytes revealed to be highly similar by both techniques (Rho = 0.91, $p < 0.001$ and slope = 0.94). Three other subsets, i.e. erythroblasts, neutrophils, and immature granular cells also were statistically well correlated (Rho ≥ 0.80 and $p < 0.001$), while there was a trend towards underestimation for the first two populations (slope = 0.61 and 0.76 respectively) and towards overestimation for the last one (slope = 1.28) by flow cytometry. Although statistically significant ($p<0.001$), correlation of monocytes counts only reaches 0.66 for Rho, with a slope of 0.80. Myeloblasts, eosinophils, basophils and plasma cells are rare cells in normal conditions (<5%). This was also observed using the present approach. In one case only, eosinophils reached 5% by flow cytometry, and only 1% by microscopy. Interestingly, expansions of these cells, as observed by morphological examination (myeloblasts in 5 cases, eosinophils in 3 cases, basophils in 1 case, and plasma cells in 3 cases), have always been detected too by flow cytometry.

The enumeration of cell subsets by flow cytometry is highly reproducible

In order to appreciate the feasibility of the analysis in a medical laboratory, we randomly selected 10 bone marrow samples, 5 within the normal group and 5 within the pathologic group. All of them were blindly analyzed by 9 technicians, students or biologists after entertainment on previous samples, using our well-defined template. Of note, gates had to be only marginally adjusted in most cases, and results demonstrated great reproducibility of the analysis (table 3). Concerning bone marrow cell subsets over 5% of total cells, CV was indeed below 11% in 95% of the cases (41/43). It reached 17% and 18% for only two neutrophil subsets. For populations representing less then 5% of total cells, CV was not a

good indicator of reproducibility. In these cases, the little dispersion of the values was attested by low standard deviations.

DISCUSSION

Eight- or 10-color most recent medical flow cytometers offer inestimable opportunities to easily and precisely analyze complex cell populations using reduced number of antibodies thanks to multiparametric approaches. In the present work, we demonstrated that a unique tube containing 8 antibodies allowed a detailed evaluation of bone marrow cell composition, by identifying and enumerating at least 14 subsets within lymphoid and myeloid lineages.

Such a leukocyte differential was achieved using sophisticated sequential gating with progressive elimination of identified cells. This strategy greatly facilitated selection of the various subsets. Definition of a pure as possible referent population of nucleated cells was also of major importance in the analysis. Differently from several reports, we did not use DNA dyes that directly identify nucleated cells (4). We preferred to eliminate undesirable events by a series of gates to spare fluorescent channels for antigenic markers. Therefore we had to remove aggregated cells, platelets, erythrocytes and debris, as described in Fig.1. The very low frequency of unidentified cells (<2% in normal samples) proved the high efficacy of this method.

Our panel included 8 antibodies i.e. CD3 / CD10 / CD38 / CD19 / CD36 / CD16 / CD34 / CD45. It allowed quantitative differential of 7 normal subsets within each of the lymphoid and myeloid lineages. Concerning myeloid cells, the first identified cells were erythroblasts (CD36+ CD45-) and monocytes (CD36+ CD45+). In contrast to morphological examination, erythroblastic maturation was only qualitatively evaluated. Otherwise, immature and mature monocytes were not separable, but inflammatory cells could be identified as CD16+ events (15). All mature polymorphonuclear cells were classified too, i.e. neutrophils (CD10+ CD16 high) and eosinophils (CD45high CD16-) within SSChigh events, and basophils as SSClow CD45low events. Although not specific, this last phenotype is essentially expressed by basophils, provided CD34+ immature cells had been previously excluded. They are very rare cells, under 1% in normal conditions. More specific markers such as CRTH2, CD123 or CD203 (1,14,18,21) have to be tested for definitive identification only in cases of over representation, to formally discriminate them from other potentially pathological cells like CD34 negative blasts. Opposite on the maturation direction, myeloblasts were selected as CD34+ CD19- events. Interestingly, they were thus clearly separated from CD34+ hematogones. Between blasts and mature cells, all steps from promyelocytes to metamyelocytes could be observed on CD38/CD16 representation. Although clear discrimination could not be standardized, qualitative evaluation was

appreciable, and careful observation could reveal blockage of differentiation with accumulation at early stages, or abnormal pathways. Of note, megacarycytic lineage was nor observable.

Compared to morphological examination on glass smears, lymphoid cells were far more precisely characterized. Within the CD45high SSClow events they can clearly be separated in CD3+ T-cells, CD3- CD16+ NK-cells, and CD19+ B-cells. Opposite to mature T- and B cells, which are all specifically recognized by CD3 or CD19, a minority of NK-cells do not express CD16 (22). They will thus appear as CD45high unidentified events. Such a subset is indeed always visible in the corresponding graphs (Fig.1 S). As a general rule with our method, these cells have to be formally identified by CD56, CD2 or CD7 markers only in case of overrepresentation. Of note, B-cells are differentiating in the bone marrow, and it is remarkable that all the maturation steps from the most immature type-1 and 2 hematogones, up to mature B-cells and plasma-cells via transitional B-cells could easily be identified using CD45 and CD38 levels of expression (17).

To our knowledge, only one study reported bone marrow leukocyte differential using flow cytometry and a single tube (8). It referred to 4 antibodies (CD66abce / CD14 / CD45 / CD34) for the delineation of 4 subsets (granulocytes, monocytes, lymphocytes and immature cells). This is obviously insufficient for bone marrow cell composition overview, as regards its complexity. Four other reports proposed combinations of 6 (CD36 / CD2+CRTH2 / CD19 / CD16 / CD45) (6), 7 (CD36 / CD203+CD138 / CD45 / CD16+CD56/ DRAQ5) (4), and 10 (CD16+CD19 /CD123 /CD33+CD64 / HLA-DR / CD34+CD117 / CD45 / CD38+Hoechst) (5), CD4+CD14 /CD16+CD56+CD34 / CD19 / CD45+CD138 / CD3+CD71) (7) antibodies or dyes for the delineation of respectively 11, 10, 8 and 13 leukocyte subsets. All of them identified monocytes, mature neutrophils, eosinophils and basophils, blasts, immature granulocytes, and total lymphocytes. Only the first and last panels also identified T- B- and NK-cells (6), only the second and third panels also identified erythroblasts (4,6), and only the third and last panels counted plasma-cells (5,23). None of them appreciated early stages of B- or myeloid- cell differentiation. Compared to our proposal, cell subsets differentiation was thus less complete and adapted to bone marrow samples, and noteworthy, these combinations have actually only been tested for blood samples. In such localizations, immature cells, erythroblasts and plasma cells are only observed in pathological conditions, and notably, never altogether. Conversely, all these cells are normal components of bone marrow, what highly increased the difficulty of differentiation. Otherwise, several groups reported extended bone marrow cell differentiation, but using several tubes of analysis (2,3).

Importantly, we demonstrated that cell identification and counting using our strategy was appropriate, as attested by comparison of flow cytometry to microscopic examination. Indeed, using Spearman's correlation, we obtained p values <0.001 and rho coefficients ≥ 0.7 for most well represented subsets. This could be considered as a very interesting correlation comforting our approach, given the difficulty and limited reproducibility in cell counting by microscopy as discussed later. Indeed, lymphocytes were counted to the same extend by flow cytometry as by morphology (linear correlation slope = 0.94). Erythroblasts and monocytes were also well correlated, but with a trend towards underestimation using flow cytometry (linear correlation slope = 0.61 and 0.80 respectively), probably because of loss of the most mature subsets of erythroblasts following sample lysis, as reported from the literature (24), and lack of CD36 on some monocytic subsets, such as very immature cells (25). Correlation of both technics for immature and mature neutrophils was also quite good, with an inverse trend, i.e. slight overestimation in the former case (linear correlation slope = 1.28), ad underestimation in the second one (linear correlation slope = 0.80). This means that microscopic and flow cytometric discrimination between both subsets did not exactly overlap, what has already been noticed by other teams (4,5). However the difference observed with our approach did not reach twofold for immature granulocytes as described. Concerning plasma cells, we did not obtain lower cell counts by flow cytometry, as described in many reports (26,27). It should be pointed out that both normal (group 1) and pathological subsets (group 2) were correctly identified and counted (Fig. 2) using our approach. In 3 cases only, unidentified cells were abnormally high (7.6%, 22% and 45%). They revealed to be immature CD34- myeloid cells (2 cases) or abnormal B-cells with low expression of CD19 (1 case). Importantly, such cells had not been missed as abnormal subsets. At present, only one misclassification had been observed. This was due to lack of CD36 on pathological monocytic cells. Because of high SSC and low CD45 expression, these cells did not revealed as undifferentiated events, but were confused with immature granulocytes. Although very rare, such an observation obliged to confirm the origin of all overexpressed subsets. Even if obviously our single tube cytometric approach will not replace morphologic examination, it should be pointed out that the rapidity, easiness and reproducibility of analysis should be helpful for the precise enumeration of particular subsets.

Apart from quantitative evaluation, abnormal phenotypes could also be detected, for example, CD10 expression by mature B-cells or T-cells, CD19 and CD45 negativity on myeloma plasma cells… Likewise, all parameters allowing calculation of the Ogata score for myelodysplasic syndrome diagnosis are too available (28). The ability of the present panel to

detect quantitatively or qualitatively abnormal cells is of particular interest for a screening test that could orientate the choice of antibodies for further characterization of hematological or immunological disorders. This will be the subject of detailed further investigations.

The present flow cytometric approach revealed to be very precise for bone marrow cell subsets quantification, even for rare cells, since at least 100,000 events were counted. It was also very rapid and easy to perform since selecting gates had to be only marginally adapted for each sample as far as a previously defined template was used. Consequently, cell counting proved to be highly reproducible, as attested by the analysis of the same samples by 9 different individuals (Table 3). Rümke tables highlighted this is very different using microscopic examination (29,30). There might be actually a large bias in the selection and counting areas, a large statistical imprecision in microscopical classification due to the fact there are many cell classes but relatively few cells counted in the sample, and color bias in staining may affect the cellular classification. Nowadays, automated cell analysis may be performed by computer software to reduce human subjectivity in cell classification, but they only concern blood and not bone marrow.

Another very interesting point was the opportunity to standardize the technique thanks to target values that were defined with beads for each of the 8 channels of fluorescence (31). This might allow highly reproducible results along time within a same laboratory, or between several flow cytometers from different laboratories. This has begun to be tested in the Saint Etienne hospital, and results revealed to be highly reproducible, as expected (data not shown). According to the aforementioned characteristics of the test, it might also be envisaged that analysis should be automatized on flow cytometers, as it has been performed with blood samples (32).

In conclusion, our combination of only 8 antibodies proved to accurately characterize 14 normal cell subsets actually representing bone marrow cell composition. The analysis is rapid, reliable, highly reproducible, standardized, robust, and can probably be semi-automatized. Interestingly it could detect quantitative as well as qualitative abnormalities, thus providing a very interesting overview of bone marrow cell composition, and a screening test for hematological or immunological disorders.

REFERENCES

1. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008;111:3941–3967.

2. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, Jouault H, Maynadié M, Lacombe F. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. Cytometry B Clin. Cytom. 2010;78:4–10.

3. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin. Cytom. 2004;60:1–13.

4. Björnsson S, Wahlström S, Norström E, Bernevi I, O'Neill U, Johansson E, Runström H, Simonsson P. Total nucleated cell differential for blood and bone marrow using a single tube in a five-color flow cytometer. Cytometry B Clin. Cytom. 2008;74:91–103.

5. Cherian S, Levin G, Lo WY, Mauck M, Kuhn D, Lee C, Wood BL. Evaluation of an 8-color flow cytometric reference method for white blood cell differential enumeration. Cytometry B Clin. Cytom. 2010;78:319–328.

6. Faucher J-L, Lacronique-Gazaille C, Frébet E, Trimoreau F, Donnard M, Bordessoule D, Lacombe F, Feuillard J. "6 markers/5 colors" extended white blood cell differential by flow cytometry. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2007;71:934–944.

7. Van de Geijn G-J, van Rees V, van Pul-Bom N, Birnie E, Janssen H, Pegels H, Beunis M, Njo T. Leukoflow: multiparameter extended white blood cell differentiation for routine analysis by flow cytometry. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2011;79:694–706.

8. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: influence of peripheral blood contamination. Cytometry B Clin. Cytom. 2009;76:18–26.

9. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, Almeida J, Lhermitte L, Asnafi V, Mendonça A, de Tute R, Cullen M, Sedek L, Vidriales MB, Pérez JJ, te Marvelde JG, Mejstrikova E, Hrusak O, Szczepański T, van Dongen JJM, Orfao A, EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia 2012;26:1986–2010.

10. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau J-L, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. Haematologica 2006;91:1234–1240.

11. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2004;58:62–71.

12. Fajtova M, Kovarikova A, Svec P, Kankuri E, Sedlak J. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. Leuk. Lymphoma 2013;54:2523–2530.

13. Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. Int. J. Lab. Hematol. 2014;36:184–196.

14. Gorczyca W, Sun Z-Y, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic pattern of myeloid populations by flow cytometry analysis. Methods Cell Biol. 2011;103:221–266.

15. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J. Leukoc. Biol. 2007;81:584–592.

16. Heimbeck I, Hofer TPJ, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14+CD16++ monocytes in females. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2010;77:823–830.

17. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ, San Miguel JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. Leukemia 1999;13:419–427.

18. Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Sugamura K, Nakamura M, Takano S. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). FEBS Lett. 1999;459:195–199.

19. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. Blood Cells. Mol. Dis. 2002;28:260–274.

20. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. Am. J. Clin. Pathol. 2005;124:799–806.

21. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, Schlette E, Huh YO, Shi Y, Awagu S, Chen W. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. Arch. Pathol. Lab. Med. 2008;132:813–819.

22. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001;22:633–640.

23. Van de Geijn G-J, van Rees V, van Pul-Bom N, Birnie E, Janssen H, Pegels H, Beunis M, Njo T. Leukoflow: multiparameter extended white blood cell differentiation for routine analysis by flow cytometry. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2011;79:694–706.

24. Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Severin E, Göhde W. High-grade loss of leukocytes and hematopoietic progenitor cells caused by erythrocyte-lysing procedures for flow cytometric analyses. J. Hematother. Stem Cell Res. 2003;12:321–330.

25. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, Rasillo A, Sayagues JM, Sánchez ML, Bárcena P, Hernandez-Rivas JM, Salvador C, Fernandez-

Mosteirín N, Giralt M, Perdiguer L, Laranjeira P, Paiva A, Orfao A. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. Cytometry B Clin. Cytom. 2010;78:154–168.

26. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE, European Myeloma Network. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica 2008;93:431–438.

27. Smock KJ, Perkins SL, Bahler DW. Quantitation of plasma cells in bone marrow aspirates by flow cytometric analysis compared with morphologic assessment. Arch. Pathol. Lab. Med. 2007;131:951–955.

28. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, Yamashita T, Tamura H, Tsukada J, Dan K. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. Haematologica 2009;94:1066–1074.

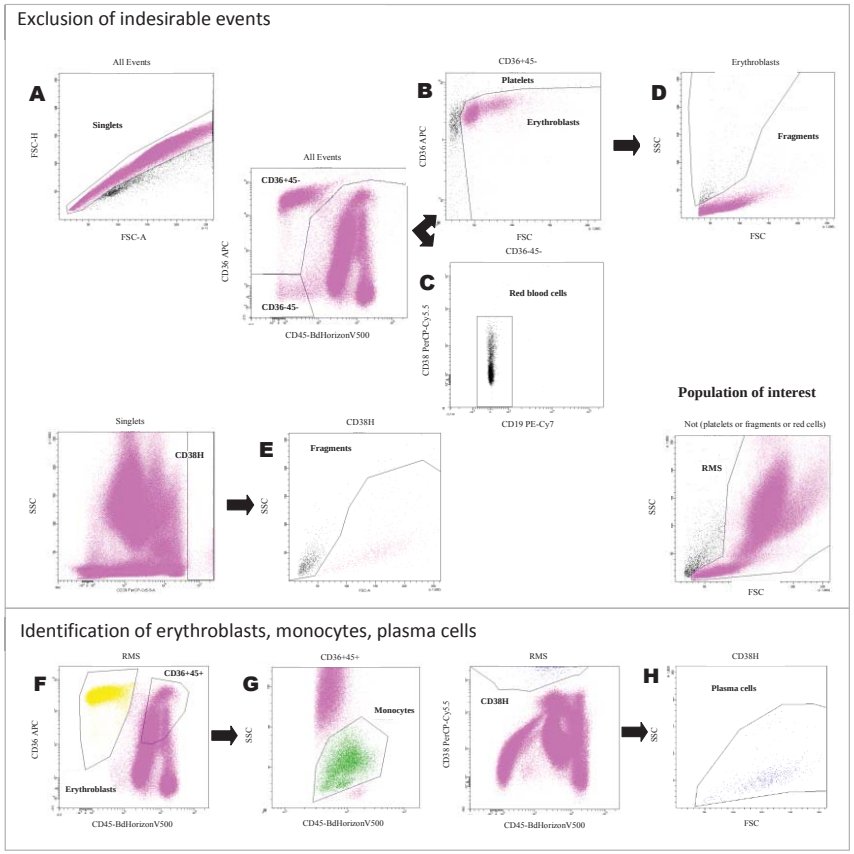
29. RUEMKE CL. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. Triangle Sandoz J. Med. Sci. 1960;4:154–158.

30. Rümke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 1985;11:311–314, 315.

31. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, Guy J, Borgeot J, Guérin E, Debliquis A, Drenou B, Campos L, Lacombe F, Béné MC. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2013;83:1066–1072.

32. Jo Y, Kim SH, Koh K, Park J, Shim YB, Lim J, Kim Y, Park Y-J, Han K. Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using Hematoflow method. Korean J. Lab. Med. 2011;31:131–137.

Figure 1.


Exclusion of indesirable events
All Events
A
Singlets
FSC-H
FSC-A
All Events
CD36+45-
CD36-45-
CD36 APC
CD45-BdHorizonV500
CD36+45-
B
Platelets
Erythroblasts
CD36 APC
FSC
CD36-45-
C
Red blood cells
CD38 PerCP-Cy5.5
CD19 PE-Cy7
Erythroblasts
D
Fragments
SSC
FSC
Singlets
CD38H
SSC
CD38H
E
Fragments
SSC
Population of interest
Not (platelets or fragments or red cells)
RMS
SSC
FSC
Identification of erythroblasts, monocytes, plasma cells
RMS
CD36+45+
F
CD36 APC
Erythroblasts
CD45-BdHorizonV500
CD36+45+
G
Monocytes
SSC
CD45-BdHorizonV500
RMS
CD38H
CD38 PerCP-Cy5.5
CD45-BdHorizonV500
CD38H
H
Plasma cells
SSC
FSC

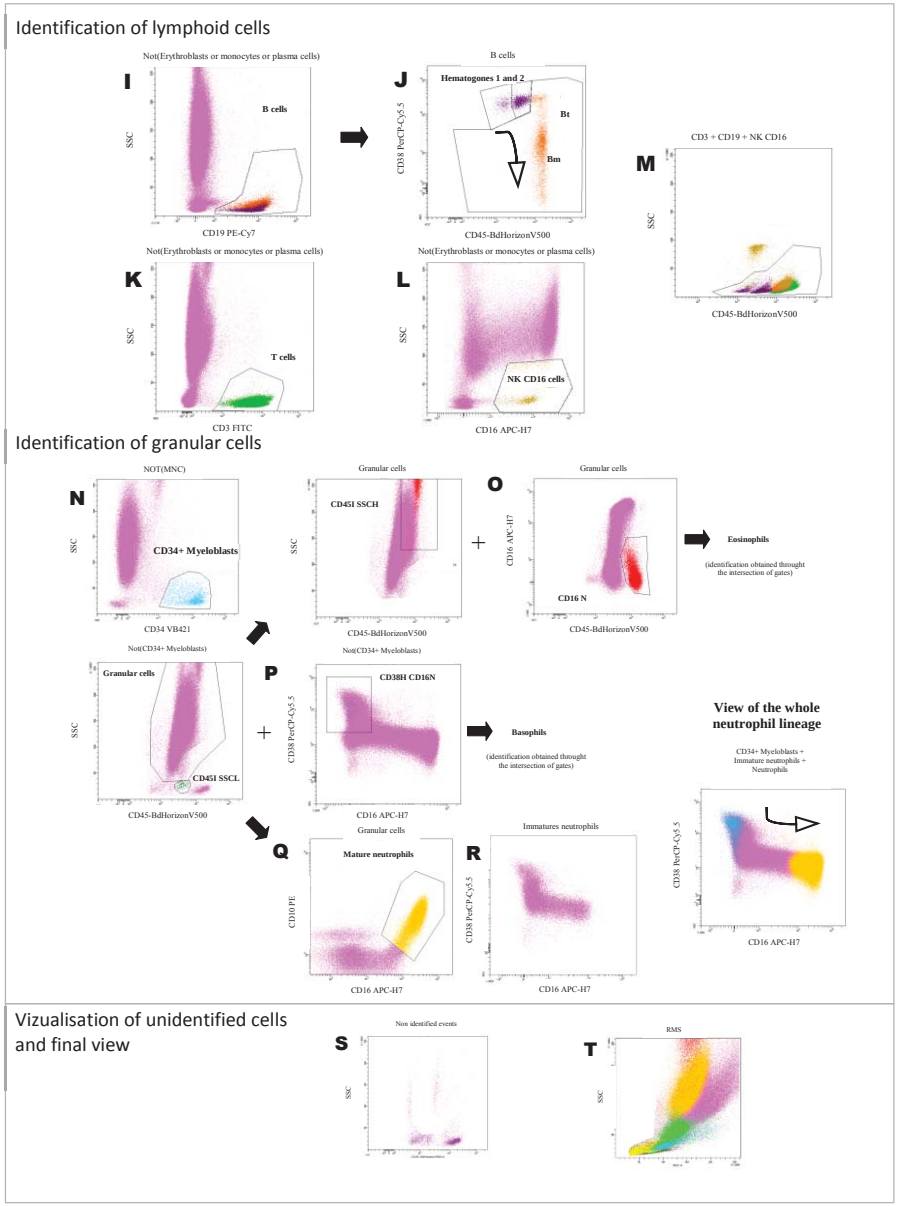
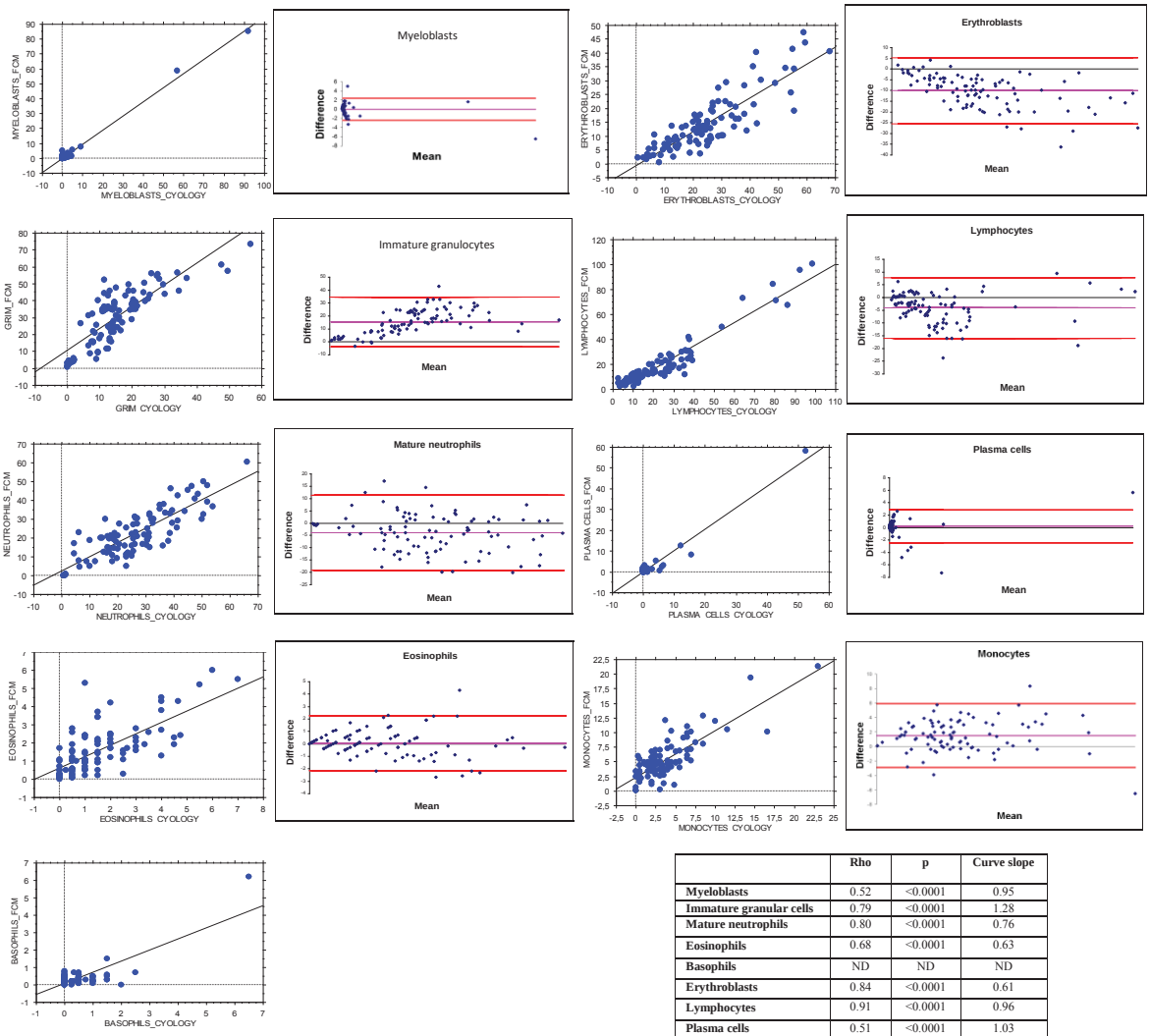

Identification of lymphoid cells
Not(Erythroblasts or monocytes or plasma cells)
I
B cells
SSC
CD19 PE-Cy7
B cells
J
Hematogones 1 and 2
Bt
Bm
CD38 PerCP-Cy5.5
CD45-BdHorizonV500
CD3 + CD19 + NK CD16
M
SSC
CD45-BdHorizonV500
Not(Erythroblasts or monocytes or plasma cells)
K
T cells
SSC
CD3 FITC
Not(Erythroblasts or monocytes or plasma cells)
L
NK CD16 cells
SSC
CD16 APC-H7
Identification of granular cells
NOT(MNC)
N
CD34+ Myeloblasts
SSC
CD34 VB421
Granular cells
CD45I SSCH
SSC
CD45-BdHorizonV500
Granular cells
O
CD16 APC-H7
CD16 N
CD45-BdHorizonV500
Eosinophils
(identification obtained throught the intersection of gates)
Not(CD34+ Myeloblasts)
Granular cells
CD45I SSCL
SSC
CD45-BdHorizonV500
P
Not(CD34+ Myeloblasts)
CD38H CD16N
CD38 PerCP-Cy5.5
CD16 APC-H7
Basophils
(identification obtained throught the intersection of gates)
View of the whole neutrophil lineage
CD34+ Myeloblasts + Immature neutrophils + Neutrophils
CD38 PerCP-Cy5.5
CD16 APC-H7
Granular cells
Q
Mature neutrophils
CD10 PE
CD16 APC-H7
Immatures neutrophils
R
CD38 PerCP-Cy5.5
CD16 APC-H7
Vizualisation of unidentified cells and final view
Non identified events
S
SSC
RMS
T
SSC

Figure 2.



	Rho	p	Curve slope
Myeloblasts	0.52	<0.0001	0.95
Immature granular cells	0.79	<0.0001	1.28
Mature neutrophils	0.80	<0.0001	0.76
Eosinophils	0.68	<0.0001	0.63
Basophils	ND	ND	ND
Erythroblasts	0.84	<0.0001	0.61
Lymphocytes	0.91	<0.0001	0.96
Plasma cells	0.51	<0.0001	1.03
Monocytes	0.66	<0.0001	0.80

Figure 1. Gating strategy. Step 1: exclusion of undesirable events (platelets, red blood cells and debris), optimizing the bone marrow nucleated cells population (BMNC) characterization. Step 2: identification of erythroblasts, monocytes and plasma cells. Step 3: identification of lymphoid cells (T-, NK-cells and four B-cell maturation stages). Step 4: identification of CD34+ myeloblasts, eosinophils, basophils, mature and immature neutrophils. Visualization of a maturation way from promyelocyte towards metamyelocytes on a CD16/CD38 graph. Step 5. Visualization of unidentified cells and final view. At the end of each step, all identified cells were excluded for further analysis.

Figure 2. Comparison of bone marrow cell differential between flow cytometry and microscopic examination for 99 normal or pathological samples. Values of the slopes and Spearman's correlation coefficient Rho and p are given in a separate table. The dispersion of differences as regards mean values is shown using Bland Altman graphs. Values for basophils are too low to be statistically used.

Table 1. Clinical context for patients with studied bone marrow.

	Nb (99)
Normal bone marrow samples	
Healthy donors	4
ALL or AML during remission	11
B-cell lymphoma without bone marrow involvement	5
Myeloma during remission	1
Myeloproliferative syndrome during remission	2
Unexplained cytopenia and ITP	23
Polyclonal lymphocytosis	1
Others	4
Total	**51**
Pathological bone marrow samples	
B-cell ALL and AML	8
B-cell LPD	18
T-cell LPD	2
Myeloma	8
MGUS	1
Myeloproliferative disease	1
Myelodysplastic syndrome	5
Folate deficiency	4
Iatrogenic pancytopenia	1
Total	**48**

ALL: Acute Lymphoid Leukemia; AML: Acute Myeloid Leukemia;
ITP: Idiopathic Thrombocytic Purpura; LPD: LymphoProliferative Disease;
MGUS: monoclonal gammapathy of unknown significance.

Table 2. Flow cytometric approach for the identification of different cell subsets, used in our gatting strategy.

Antibody	Normal cellular expression
Anti-Human CD3	T-cell specific expression (on mature T-cells only)
Anti-Human CD10	Positive on precursors and transitional B-cells Negative on mature B-cells in bone marrow No expression in the T-cell lineage Positive on mature polymorphonuclear cells
Anti-Human CD16	Positive in neutrophils lineage (metamyelocytes and matures cells) Negative on eosinophils and basophils Positive on 90% of NK-cells Positive on a subset of T-cells Positive on activated monocytes
Anti-Human CD19	B-cell specific expression (whole lineage from precursors to plasma-cells)
Anti-Human CD34	Positive on lymphoblastics and myeloblastics progenitors
Anti-Human CD36	Erythroblasts (decreased expression during maturation) Megacaryoblast lineage Positive on monocytes
Anti-Human CD38	Modulated expression during B-cell differentiation (identifies stages of maturation) Characteristic very high expression on plasma-cells Positive on all myeloid cells (various intensities during myeloid differentiation) Positive on monocytes
Anti-Human CD45	Pan-leucocytes specific expression (various intensities among hematopoietic cell subsets and during differentiation within lineages) Negative on megacaryoblast lineage and erythroblasts
Anti-Human CD13	Positive on all myeloid cells (various intensities during myeloid differentiation)
Anti-Human CD117	Positive on myeloid precursors (myeloblasts and promyelocytes)
Anti-Human CD294 (CRTH2)	Eosinophils, basophils and TH2 lymphocytes specific expression

Table 3. Reproducibility of bone marrow cell differential analysis. Ten samples including 5 normal (A) and 5 pathologic (B) bone marrows were analyzed by 9 different individuals. Coefficient of variation demonstrated great reproducibility for means over 5%. For lower values, only standard deviations have been calculated and were also indicative of great reproducibility.

A

Normal bone marrow samples	Patient 7			Patient 10			Patient 25			Patient 76			Patient 82		
	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %
Erythroblasts	9,14	0,50	**5**	17,57	0,49	**3**	15,41	0,83	**5**	13,66	0,56	**4**	12,86	0,18	**1**
Monocytes	3,44	0,08	-	11,37	0,78	**7**	4,47	0,16	-	2,52	0,09	-	4,53	0,23	-
Plasma-cells	0,10	0,00	-	0,40	0,00	-	0,28	0,04	-	0,40	0,00	-	0,14	0,05	-
T-cells	7,19	0,10	**1**	6,88	0,08	**1**	11,74	0,16	**1**	9,01	0,09	**1**	9,90	0,05	**0**
NK-cells	0,82	0,10	-	0,78	0,09	-	2,78	0,11	-	0,84	0,05	-	0,94	0,05	-
B-cells	4,64	0,22	-	0,00	0,00	-	9,59	0,14	**2**	2,50	0,00	-	1,90	0,00	-
Hematogones	8,64	0,36	**4**	1,68	0,04	-	2,51	0,17	-	0,19	0,03	-	1,00	0,00	-
Myeloblasts	0,84	0,15	-	1,43	0,22	-	2,06	0,17	-	0,57	0,09	-	0,99	0,11	-
Immature ganular cells	44,41	1,44	**3**	36,49	1,32	**4**	29,73	2,27	**8**	41,90	4,51	**11**	38.6	1.55	**4**
Mature neutrophils	17,32	1,30	**8**	21,44	1,43	**7**	18,97	2,11	**11**	25,69	4,52	**18**	24,54	1,27	**5**
Eosinophils	2,53	0,14	-	0,26	0,11	-	0,59	0,03	-	1,88	0,17	-	3,56	1,05	-
Basophils	0,21	0,06	-	0,62	0,59	-	0,22	0,06	-	0,23	0,05	-	0,16	0,07	-
Unidentified cells	0,94	0,32	-	1,18	0,24	-	1,86	1,05	-	0,77	0,27	-	0,92	0,13	-

B

Pathological bone marrow samples	Patient 11			Patient 15			Patient 33			Patient 36			Patient 92		
	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %	m %	sd %	CV %
Erythroblasts	14,83	1,23	**8**	30,76	1,45	**5**	18,86	1,32	**7**	2,07	0,84	-	33,72	1,01	**3**
Monocytes	3,33	0,13	-	10.5	0.54	**5**	4,36	0,42	-	1,31	0,94	-	4,54	0,63	-
Plasma-cells	12,13	0,38	**3**	0,12	0,06	-	0,50	0,00	-	0,99	0,03	-	1,34	0,07	-
T-cells	8,02	0,19	**2**	7,87	0,16	**2**	10,08	0,20	**2**	3.7	0.12	-	4,84	0,05	-
NK-cells	1,50	0,00	-	0,84	0,05	-	0,90	0,11	-	4.6	4.13	-	1,67	0,12	-
B-cells	0,70	0,00	-	2,03	0,07	-	19,89	0,44	**2**	0,79	0,03	-	1,90	0,37	-
Hematogones	0,10	0,00	-	0,00	0,00	-	0,10	0,00	-	0,01	0,03	-	0,10	0,00	-
Myeloblasts	0,84	0,08	-	3,63	0,33	-	0,61	0,07	-	81,2	4,56	**6**	0,73	0,17	-
Immature ganular cells	34,23	1,12	**3**	9.10	0.60	**7**	33,72	1,81	**5**	2,38	0,27	-	33,16	1,91	**6**
Mature neutrophils	21,61	1,46	**7**	20,5	1,12	**5**	9,39	1,61	**17**	0,86	0,18	-	14,58	1,67	**11**
Eosinophils	1,48	0,08	-	6.50	0.74	**11**	1,00	0,15	-	0,23	0,05	-	1,03	0,29	-
Basophils	0,32	0,04	-	3,16	2,22	-	0,09	0,03	-	0,06	0,07	-	0,27	0,13	-
Unidentified cells	1,03	0,51	-	4,41	2,51	-	0,91	0,39	-	1,96	1,15	-	2,42	1,16	-

m : means, sd : standard deviation, cv : coefficient of variation.

DONNEES COMPLEMENTAIRES

S'INSCRIRE DANS UNE DEMARCHE QUALITE EN CMF

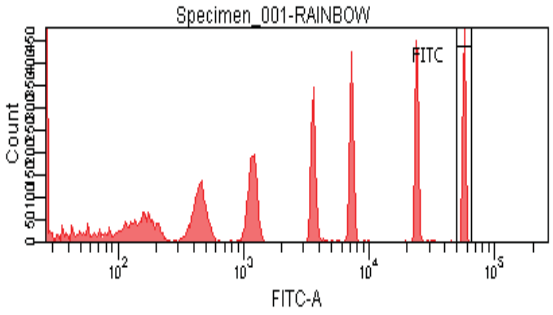
A. Réglage des settings et standardisation

1. Contrôles des performances du cytomètre

Le cytomètre est contrôlé au quotidien grâce au passage de billes CST. Des règles de validation de ces contrôles et la conduite à tenir en cas d'anomalie ont été définies selon les recommandations du groupe FranceFlow.

2. Obtention des valeurs cibles de fluorescence

Avec l'avènement de la démarche qualité en biologie médicale, la standardisation des automates est devenue un prérequis indispensable à l'analyse en CMF (29). L'objectif est de diminuer la variabilité de l'analyse entre automates et donc entre laboratoires, mais également d'un jour à l'autre sur un même automate. De nombreuses recommandations ont été données par plusieurs groupes d'experts. Parmi eux EuroFlow propose une démarche de standardisation basée sur l'obtention de mêmes valeurs de fluorescence (valeurs cibles) pour un même lot de billes (20). Ce groupe propose d'utiliser des billes qui fluorescent dans tous les canaux, les billes Rainbow. Pour un lot donné de billes, Euroflow fournit des valeurs cibles de moyennes de fluorescence pour chaque fluorochrome. Il est alors nécessaire de régler les voltages de chaque PMT de chaque instrument de façon à obtenir des moyennes de fluorescence dans l'intervalle cible pour chaque fluorochrome (moyenne +/- 15%) (figure 10 et table 2). Dans ces conditions, les résultats de l'analyse d'échantillons biologiques, fréquences et moyennes de fluorescence, sont identiques sur tous les instruments si les mêmes réactifs sont utilisés (34).



Population	FITC-A Mean
☒ FITC	57,632

Figure 10 Réglage des voltages de PMT à l'aide des billes Rainbow. Exemples du réglage du détecteur FITC : la valeur cible EuroFlow de MFI FITC est 56871, en fenêtrant sur le huitième pic, on modifie le voltage du détecteur jusqu'à obtenir une MFI FITC dans l'intervalle accepté (48340 – 65401). Cette méthode doit être appliquée à chaque détecteur.

Canaux de fluorescence	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	VB421	V500
MFI	57632	89205	219483	29741	205058	45113	181894	153816
Valeurs cibles de MFI (intervalle accepté +/- 15%)	56871 (48340 – 65401)	88544 (75263 – 101826)	219328 (186429 – 252227)	28495 (24221 – 32769)	206454 (175486 – 237422)	45530 (38700 – 52359)	182893 (15549 – 210327)	155453 (132135 – 178771)

Table 2 MFI obtenues après réglages du cytomètre, valeurs comprises entre +/- 15% des valeurs cibles EuroFlow. Le réglage du voltage des détecteurs de fluorescence par rapport à des valeurs cibles de moyennes de fluorescence (MFI) permet la standardisation entre différents automates et d'obtenir des mesures reproductibles.

3. Réglage des compensations

Les spectres d'émission des différents fluorochromes ont tendance à se superposer dans des proportions variables conduisant, par exemple, à ce qu'une proportion de FITC fluoresce dans le canal PE et soit détectée par le photomultiplicateur comme un signal PE, et vice versa (29). Avec l'utilisation de plusieurs anticorps fluorescents à la fois, le problème des superpositions de spectres devient significatif et altère la précision du résultat. Le logiciel FACS DIVA permet une soustraction électronique des fuites optiques de fluorescence entre chaque canal. Ce processus, appelé « réglage des compensations » permet de rendre les résultats interprétables. Pour cela, nous utilisons des billes CompBeads. Ce sont des billes non

fluorescentes sur lesquelles sont fixées des immunoglobulines anti-Kappa de souris spécifiques de la fraction Fc des anticorps. Elles sont incubées avec chacun des 8 anticorps fluorescents de notre combinaison séparément permettant un monomarquage, et avec des billes non marquées. Pour chaque fluorochrome, le logiciel est capable d'éliminer la fluorescence détectée dans les autres canaux, selon la méthode d'égalité des médianes de fluorescence des populations négatives et positives (figure 11 et table3) (20,22).

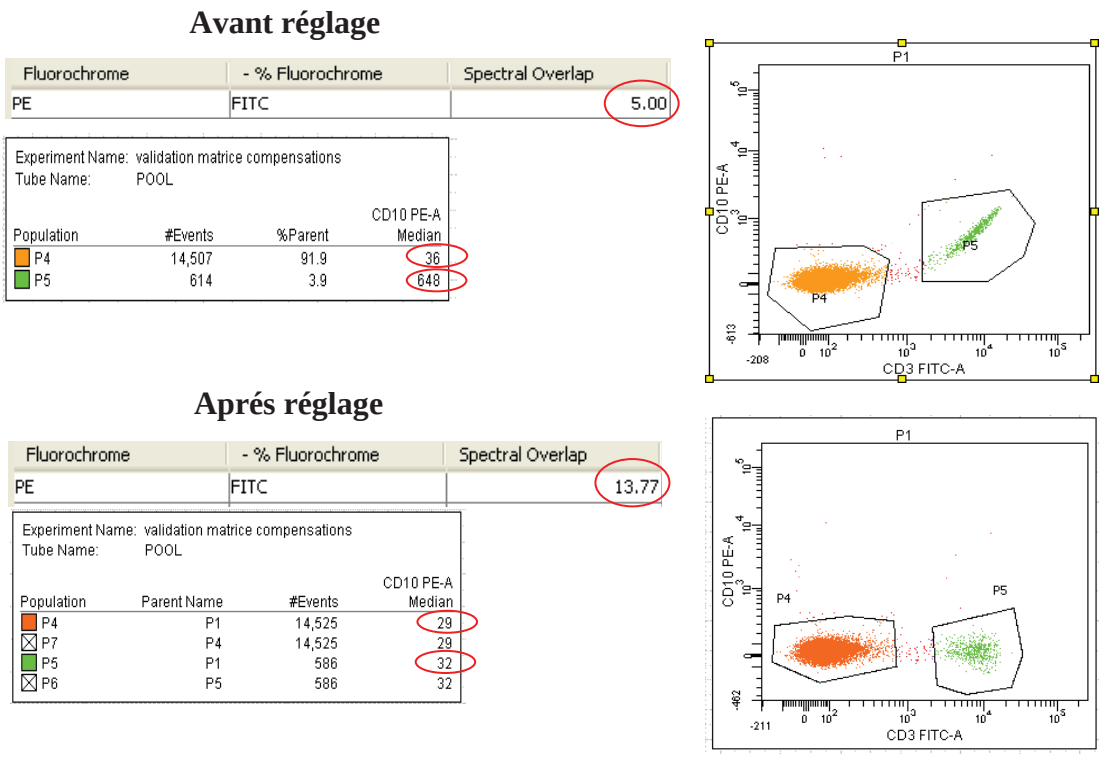


Figure 11 Réglage des compensations à l'aide des billes CompBeads. Exemple de FITC et PE : les évènements fluorescents en FITC peuvent également fluorescer dans le canal PE à cause de la superposition des spectres d'émission (P5). Après soustraction de la fluorescence FITC dans le canal PE, on obtient des médianes de fluorescences en PE identiques pour les évènements FITC négatifs (P4) et FITC positifs (P5). Cette méthode doit être appliquée à chaque couple d'anticorps.

Canaux de fluorescence	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	VB421	V500
- FITC	/	13.77	4.11	0.33	0.00	0.00	0.15	8.91
- PE	1.52	/	35.75	2.89	0.04	0.01	0.08	0.12
- PerCP	0.00	0.00	/	17.40	1.24	5.32	0.02	0.02
- PE-Cy7	0.09	0.97	4.94	/	0.02	6.81	0.03	0.03
- APC	0.01	0.00	1.65	0.20	/	10.21	0.05	0.04
- APC-H7	0.04	0.00	0.08	1.77	1.44	/	0.20	0.20
- VB421	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	/	70.79
- V500	1.64	0.38	0.21	0.02	0.00	0.00	7.07	/

Table 3 Matrice de compensations. Le réglage des compensations permet de soustraire les fuites optiques de fluorescence dans les canaux inappropriés.

4. Détermination du seuil ou threshold

Les débris cellulaires constituent l'une des difficultés analytiques car ils peuvent être marqués non spécifiquement par les anticorps, et sont donc comptés comme des cellules. Ils pourront être éliminés en partie grâce au réglage du seuil (threshold), qui définit le niveau minimum de diffusion aux petits angles (ou FSC) d'une particule pour qu'elle soit détectée comme un évènement et acquise par le cytomètre.

B. Validation technique

1. Validation des volumes d'anticorps utilisés

L'analyse en CMF étant basée sur la réaction antigène-anticorps, il est nécessaire d'être systématiquement en excès d'anticorps pour assurer le marquage optimal des cellules. Les fabricants d'anticorps recommandent des volumes à utiliser, entre 5 et 20 µL selon le réactif. Pour des raisons de coût, nous avons souhaité valider l'utilisation de volumes inférieurs. Pour

cela nous avons décidé de traiter le même jour 5 échantillons avec volume fournisseur d'anticorps d'une part et 5 µL d'anticorps d'autre part. La quantité de cellules est fixée à 2 millions dans 100 µL maximum dans les deux cas. L'objectif est de comparer les médianes de fluorescence de populations sélectionnées pour leur positivité avec le marqueur. Nous avons choisi les érythroblastes et les monocytes pour CD36 ; les hématogones 2 pour CD38 et CD10, et les lymphocytes T pour CD3. Les anticorps anti CD34, CD45, CD19, CD16 sont recommandés d'emblée par le fournisseur au volume de 5 µL. L'absence d'excès d'anticorps serait mise en évidence par une nette diminution de la médiane de fluorescence entre les différentes concentrations.

L'analyse statistique peut se faire par un test de Student apparié, en admettant l'hypothèse de la normalité de la distribution malgré le faible nombre d'échantillons. On calcule la moyenne des différences pour chaque paramètre ainsi que l'intervalle de confiance à 95% (table 4). L'hypothèse H0 est que la différence entre les moyennes est nulle, l'hypothèse H1 alternative est que la différence entre les moyennes est différente de 0. Si 0 est inclus dans l'intervalle de confiance alors on admet H0. Au vu des résultats, on met en évidence une différence significative pour CD36, qui doit être utilisé au volume recommandé par le fournisseur de 20µL. Concernant les autres anticorps, on ne peut pas mettre en évidence de différence significative, et H0 peut être admis. Cette analyse statistique demanderait un nombre d'échantillon plus élevé pour être confirmée.

L'analyse des courbes « dose-réponse » (figure 12) montre que 5µL suffisent pour CD38, CD10 et CD3. A l'inverse, on voit une nette baisse des MFI pour CD36, qui doit donc être utilisé au volume de 20 µL recommandé par le fournisseur. Au quotidien, la richesse des prélèvements sera vérifiée avant le marquage, et une dilution sera réalisée en cas de richesse supérieur à 2 millions de cellules pour 100 µL.

Populations d'intérêt / anticorps	Moyennes des différences	Intervalles de confiance à 95%	
Erythroblastes / CD36	-11628,8	-16834.6	-6423.0
Monocytes / CD36	-4933,6	-8322.8	-1544.4
Hématogones 2 / CD38	509	-723.2	1741.2
Hématogones 2 / CD10	-251,2	-525.2	22.8
Lymphocytes T / CD3	332,2	-1040.7	1705.1

Table 4 Validation des volumes d'anticorps utilisés : Moyennes des différences des médianes de fluorescence pour chaque population cellulaire référente, et intervalles de confiance à 95%, entre les deux volumes d'anticorps testés.

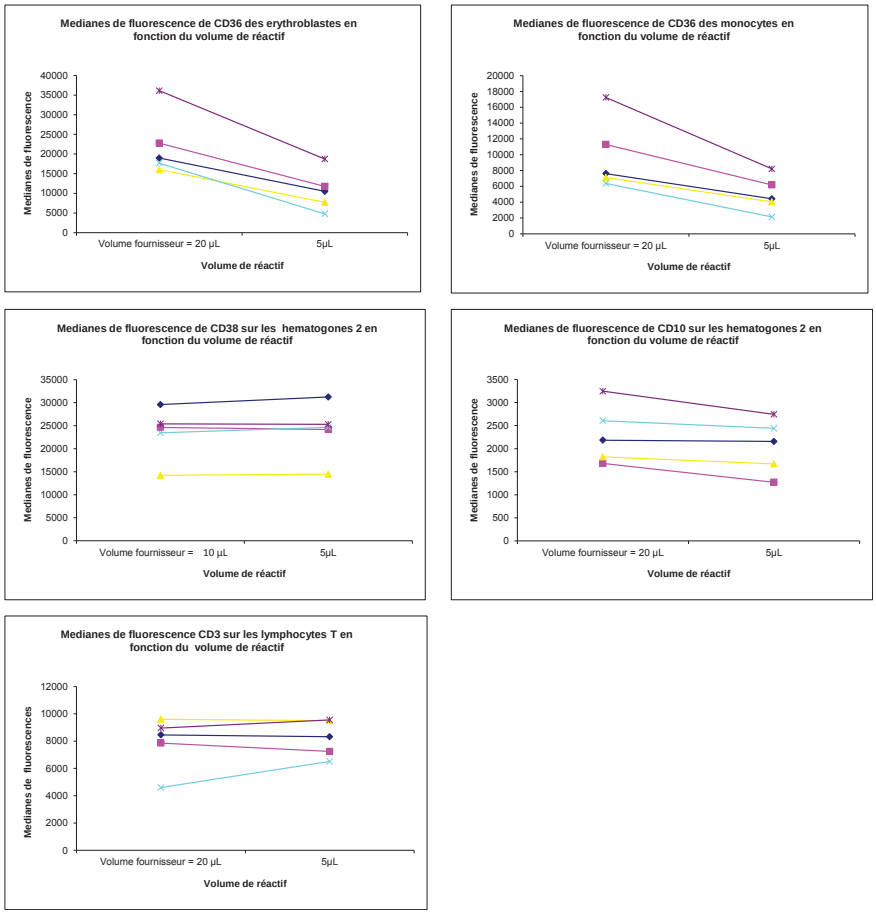


Figure 12 Courbes de stabilité entre les différents volumes d'anticorps testés : volumes recommandés par le fournisseur et 5 µL.

2. Validation de la conservation des échantillons

Dans l'organisation pratique du laboratoire, en cas de week-end, de jours fériés ou de compléments d'analyses, il arrive que les prélèvements ne soient pas traités le jour même du recueil. Il est alors nécessaire de connaitre la durée de validité des résultats après conservation du prélèvement. Nous avons choisi d'observer les pourcentages des populations cellulaires entre J0 et J3 sur 5 échantillons, car c'est sous cette forme que le résultat est rendu au clinicien. De cette façon, une éventuelle perte de cellules serait mise en évidence. Parce qu'il est connu que les granuleux sont particulièrement fragiles, nous avons également comparé les médianes de SSC pour s'assurer que les cellules ne soient pas dégranulées. Le traitement de l'échantillon est réalisé dans les mêmes conditions de temps d'incubation et de volumes

d'anticorps, et les tubes ont été conservés à +4°C jusqu'à moins d'une heure avant passage dans le cytomètre.

Tout comme pour la validation des volumes de réactifs, l'analyse statistique peut se faire par un test de Student apparié, en admettant l'hypothèse de la normalité de la distribution malgré le faible nombre d'échantillons. On calcule la moyenne des différences pour chaque paramètre ainsi que l'intervalle de confiance à 95% (table 5). L'hypothèse H0 est que la différence entre les moyennes est nulle, l'hypothèse H1 alternative est que la différence entre les moyennes est différente de 0. Si 0 est inclus dans l'intervalle de confiance alors on admet H0. Au vu des résultats, on ne peut pas mettre en évidence de différence significative, et H0 peut être admis. Cette analyse statistique demanderait un nombre d'échantillon plus élevé pour être confirmée.

Populations cellulaires	Moyennes des différences	Intervalles de confiance à 95%	
Erythroblastes	2,84	-0,4	6,0
Monocytes	0,4	-0,6	1,3
Plasmocytes	-0,1	-0,4	0,1
Lymphocytes T	-0,3	-1,1	0,5
Lymphocytes NK	-0,1	-0,3	0,1
Lymphocytes B	-0,1	-0,3	0,1
Myéloblastes	0,2	-0,1	0,4
Granuleux immatures	0,8	-7,2	8,7
Polynucléaires neutrophiles	-6,5	-15,1	2,0
Polynucléaires éosinophiles	-0,7	-1,4	0,0
Polynucléaires basophiles	0,0	-0,1	0,1
SSC granuleux	-13634,2	-27391,3	122,9

Table 5 Validation de la stabilité des résultats sur 3 jours. Moyennes des différences des pourcentages de chaque population cellulaire référente et intervalles de confiance à 95%, entre J0 et J3.

Ces résultats peuvent être également représentés sous forme de courbes de stabilité (figure 13). En rapportant à l'échelle, les lymphocytes T, B et NK, les plasmocytes, les monocytes, les polynucléaires basophiles, les granuleux immatures et les myéloblastes sont particulièrement stable. Les polynucléaires neutrophiles matures accusent globalement une très légère baisse, mais les SSC est stable. Les érythroblastes présentent une légère augmentation pour 4 des 5 patients, qui s'explique probablement par une meilleure conservation induisant une augmentation de leur proportion relative.

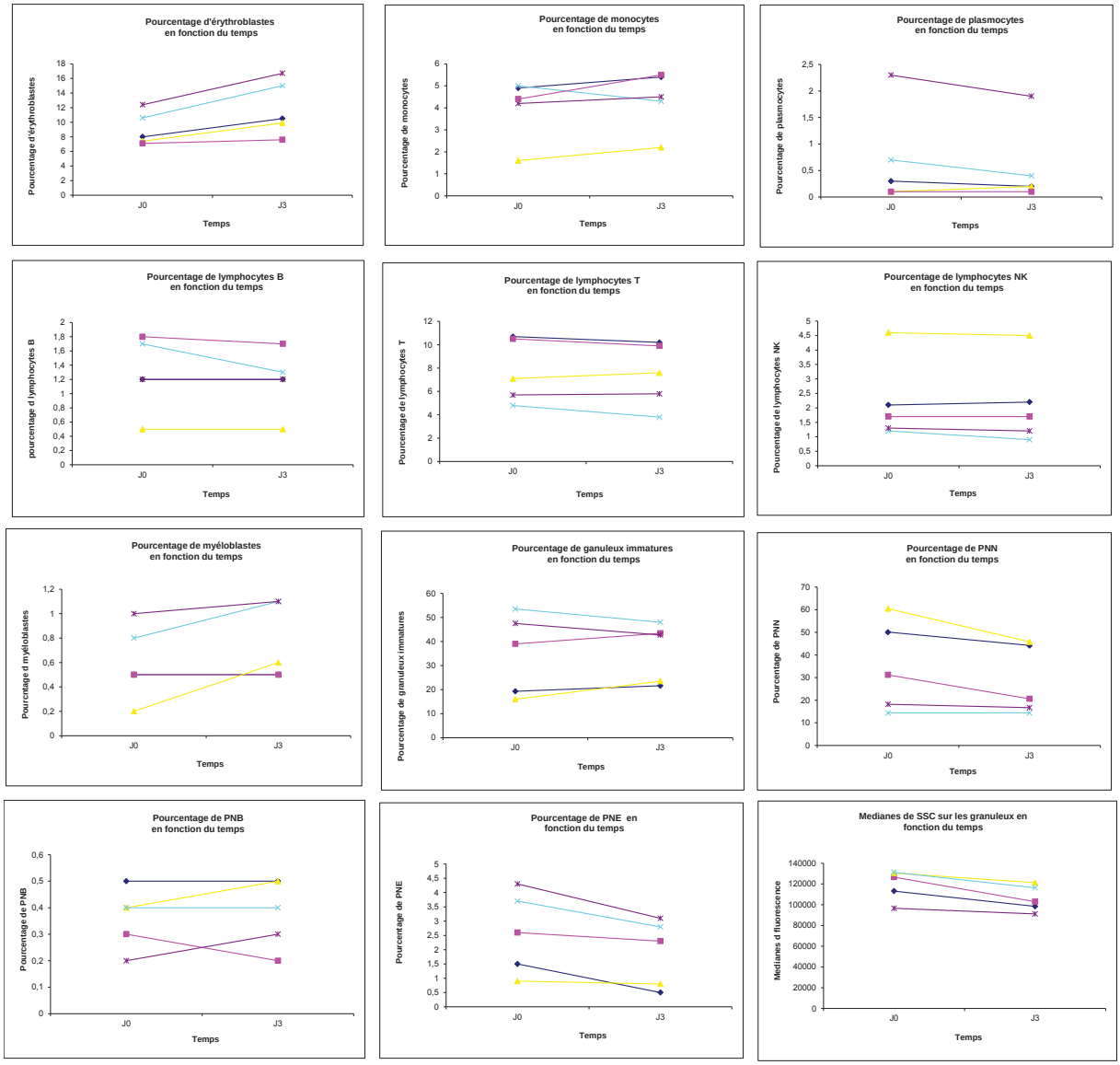


Figure 13 Courbes de stabilité entre J0 et J3 des pourcentages de chaque population cellulaire, pour le SSC des granuleux et le pourcentage des granuleux rapporté aux cellules totales.

Au cours de la conservation on peut s'attendre à une altération qualitative des cellules. On peut donc également s'intéresser aux médianes de fluorescence, en choisissant les mêmes que pour la validation des volumes d'anticorps.

Pour l'analyse, il n'a pas été nécessaire de déplacer les fenêtres ce qui montre qu'il n'y a pas d'altération majeure des intensités de fluorescences. Malgré cela, on note des variations de MFI relativement importantes, notamment pour CD36, mises en évidence sur des courbes de stabilité dans la figure 14.

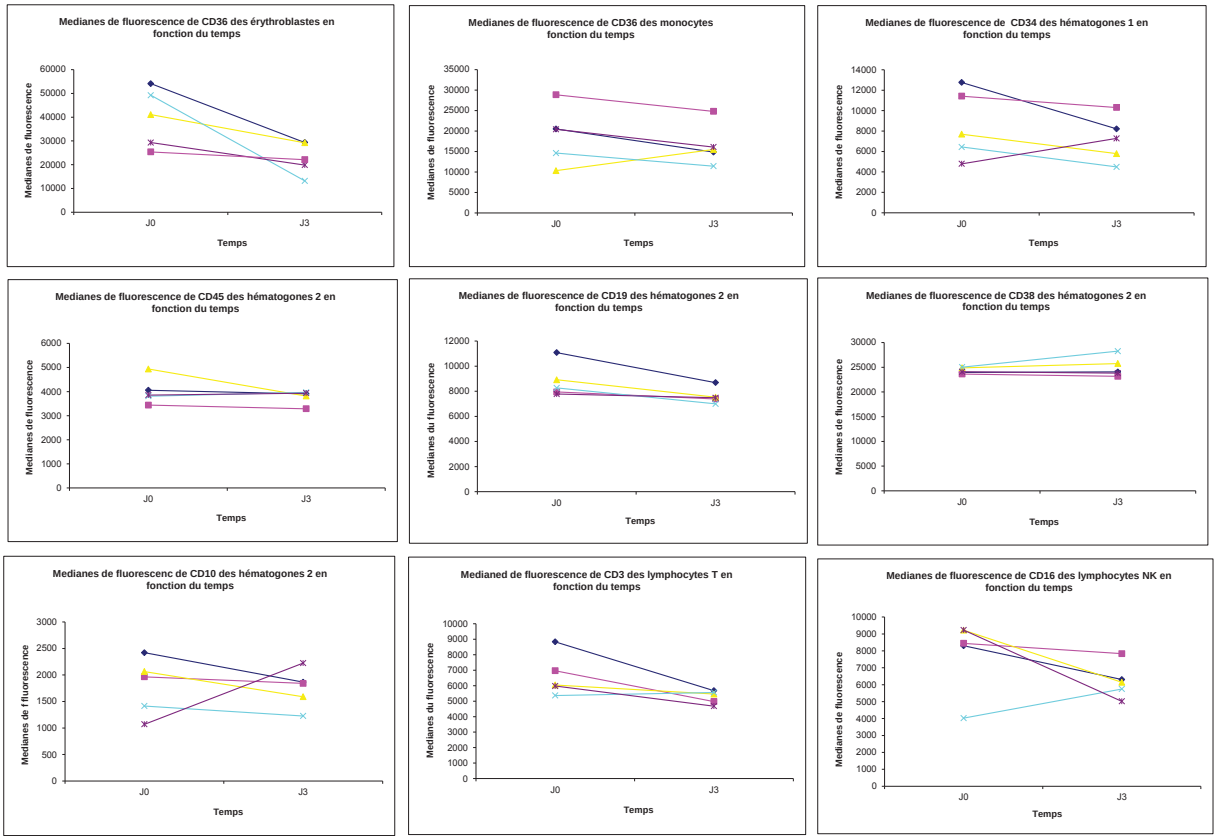


Figure 14 Courbes de stabilité dans le temps des moyennes de fluorescence des populations d'intérêt entre J0 et J3.

Ces observations nous permettent de conclure que les pourcentages de populations cellulaires peuvent être rendus à J3 sans altération de la qualité du résultat, mais nous incitent à la prudence concernant d'éventuelles conclusions qualitatives basées sur les moyennes de fluorescence.

C. Validation du fenêtrage difficile de certaines populations : lignée myéloïde

La démarche d'identification des sous-populations cellulaires choisies dans ce travail est décrite en détail dans la publication. Néanmoins, certaines fenêtres difficiles à placer ont demandé un travail complémentaire pour valider leur utilisation. C'est le cas des sous-populations myéloïdes, qui regroupent les lignées neutrophile, éosinophile et basophile, avec au sein de chacune d'elles plusieurs étapes de différenciation jusqu'aux aux cellules matures. La lignée neutrophile reste largement majoritaire dans la moelle osseuse, à tous les stades de maturation, comparativement aux lignées éosinophiles et basophiles.

1. Lignée neutrophile

Les précurseurs granuleux les plus immatures, appelés myéloblastes sont caractérisés par l'expression de CD34 (23,35). Les promyélocytes sont définis comme CD117 positifs, CD34 négatifs, CD13 et CD33 forts. Les myélocytes perdent d'expression de CD117 et présentent une expression de CD13 et CD33 nettement diminuée. Les métamyélocytes retrouvent une expression de CD13 d'intensité moyenne et acquièrent l'expression de CD16. Pour finir, les neutrophiles matures expriment CD13 et CD16 fortement, mais également CD10 (36,37). CD13 est décrit comme un marqueur de la lignée granuleuse dont l'expression varie au cours de la maturation, permettant une visualisation facile du chemin de maturation sur un graphe CD13/CD16 (23).

Dans la combinaison choisie pour notre étude de la moelle osseuse, nous disposons de CD34, CD16 et CD10, mais pas de CD117 ni de CD13. CD38 est également présent et montre une variation de l'expression au cours de la maturation granuleuse. Nous avons donc cherché à savoir si les stades de maturation granuleuse pouvaient être définis par les anticorps CD34, CD10, CD16 et CD38. Pour cela nous avons utilisé la combinaison complémentaire CD10-PE/CD38-PerCP/CD13-PE-Cy7/CD117-APC/CD16-APC-H7/CD34-VB421/CD45-V500 (Figure 13). Une étape préliminaire a consisté à reconnaitre puis à éliminer les myéloblastes grâce à l'expression de CD34 et les polynucléaires neutrophiles matures grâce à l'expression de CD10 (fenêtre conçue grâce à l'analyse de sang périphérique ne contenant pas de précurseurs granuleux, sur 2 échantillons). Les promyélocytes sont ensuite identifiés sur la base de l'expression forte de CD13 et de CD117. Parmi les cellules restantes, on différencie les myélocytes des métamyélocytes par l'expression de CD16 sur le graphe CD13/CD16. Après avoir défini précisément les stades de promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes à l'aide des marqueurs CD13, CD16 et CD117, une couleur a été attribuée de façon à visualiser leurs caractéristiques sur le graphe CD38/CD16. Nous constatons que les promyélocytes expriment très fortement CD38. Cette expression diminue au niveau des myélocytes pour devenir minimale et le rester aux stades suivants (figure 15). CD16 est acquis progressivement par les métamyélocytes pour atteindre les niveaux très élevés des polynucléaires matures. Cette analyse nous permet de confirmer le chemin de maturation du promyélocyte jusqu'au métamyélocyte sur le graphe CD16/CD38, mais ne permet pas d'individualiser chaque stade, la maturation étant un continuum et non une juxtaposition de nuages distincts entre les différents stades comme on peut l'observer pour les lymphocytes B. Cette analyse a été réalisée sur 13 échantillons, et nous n'avons pas trouvé de seuil positionnable de manière reproductible entre ces populations. Ainsi, seuls sont quantifiés les

stades extrêmes, myéloblastes et polynucléaires matures, et l'ensemble des stades intermédiaires est dénommé « granuleux immatures ». L'observation visuelle du graphe permet cependant d'apprécier qualitativement la maturation et de mettre en évidence d'éventuelles anomalies.

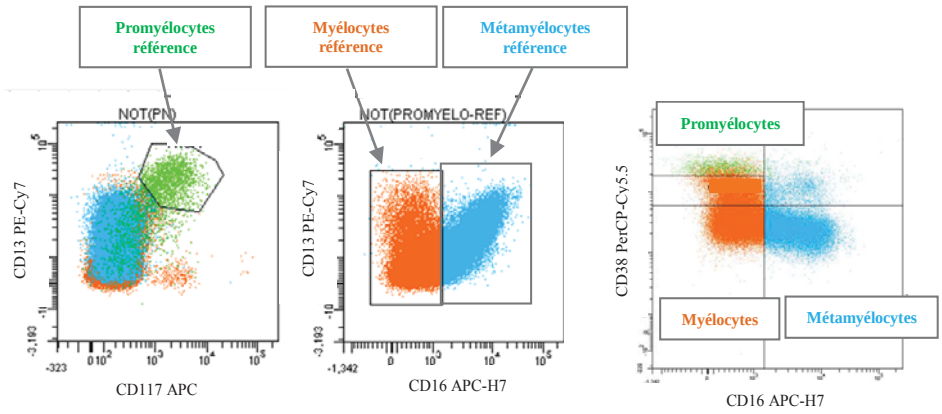


Figure 15 Démarche de validation de l'utilisation de CD38 dans l'étude de la maturation granuleuse, à l'aide des marqueurs de référence CD117, CD16 et CD13.

2. Polynucléaires éosinophiles

La littérature définit des caractéristiques précises permettant de différencier les éosinophiles des neutrophiles. Ils présentent un SSC plus élevé, une expression de CD45 plus forte, de CD16 ainsi que de CD13 abaissées (23). CRTH2 (ou CD294), marqueur décrit sur les lymphocytes T helper de type 2, est aussi exprimé par les éosinophiles (38).

Nous identifions les éosinophiles grâce à l'intersection de deux fenêtres, permettant de ne compter que les cellules présentant trois caractéristiques cumulées : SSC fort, CD45 fort et CD16 négatif. Cette démarche a été validée sur 9 échantillons grâce à une combinaison complémentaire incluant CRTH2-FITC/CD16-APC-H7/CD45-V500, en mettant en évidence l'expression de CRTH2 par les cellules identifiées comme étant des éosinophiles (figure 16). Les stades immatures de la lignée éosinophile ne sont pas identifiables dans notre travail. Ils sont représentés en très faibles proportions, et seul un compte global de la lignée éosinophile est donné.

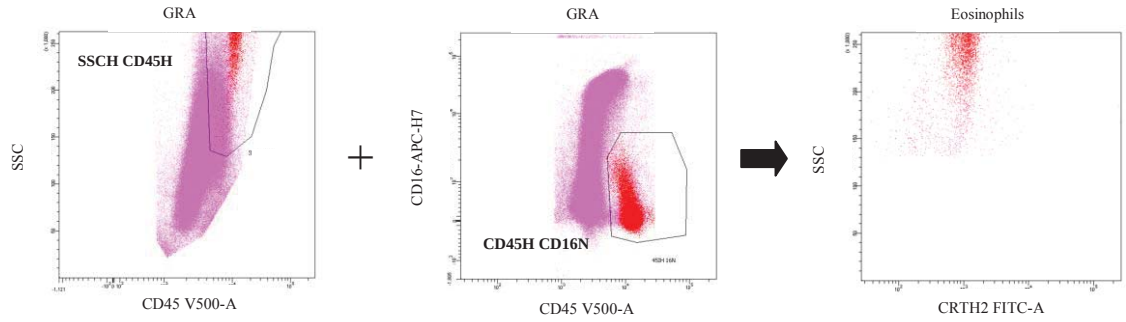


Figure 16 Démarche de validation de la stratégie d'identification des polynucléaires éosinophiles à l'aide du marqueur de référence CRTH2. La positivité pour CRTH2 des évènements comptés comme des éosinophiles confirme que la stratégie d'identification est correcte.

3. Polynucléaires basophiles

Les basophiles se différencient des autres populations granuleuses notamment par un SSC faible. Ils sont également décrits comme exprimant CD13 et CD45 avec une intensité intermédiaire (23). CRTH2 est également décrit comme présent sur les basophiles (38).

Nous proposons d'identifier les basophiles grâce à l'intersection de deux fenêtres et sur la base de quatre critères : CD38 fort, CD16 négatif, SSC faible et CD45 intermédiaire (36,39), après élimination des cellules immatures CD34+ qui partagent aussi ces caractéristiques. Malheureusement, la positivité de CRTH2 s'est avérée trop faible pour être utilisable et valider cette stratégie. Pour placer les différentes fenêtres, nous avons pu nous aider de l'analyse de deux échantillons de sang périphérique, qui ne contient pas de granuleux immatures.

EVALUATION DE LA PURETE MEDULLAIRE

L'hémodilution des prélèvements de moelle osseuse par du sang périphérique au moment du recueil est un problème important car il est une source d'erreur non négligeable dans la numération des sous-populations médullaires. Son évaluation peut être faite par une analyse cytologique, mais seulement de façon semi-quantitative et peu reproductible. Plusieurs travaux se sont donc penchés sur l'évaluation de la pureté médullaire grâce à la cytométrie en flux. La méthode considérée comme référente a été proposée par l'équipe de Holdrinet en 1980 (40,41). Elle est basée sur le ratio entre érythrocytes et leucocytes provenant de prélèvements de sang et de moelle osseuse. En pratique, cette méthode n'est parfois pas réalisable car la numération sanguine n'est pas systématiquement prescrite en parallèle du myélogramme. Elle nécessite également de réaliser une numération cellulaire de la moelle osseuse sur un analyseur. Trois autres méthodes sont également publiées, plus faciles de réalisation car basées uniquement sur des données de cytométrie lors de l'analyse du prélèvement de moelle osseuse. Le principe est d'étudier les populations cellulaires qui sont normalement représentées exclusivement dans le compartiment médullaire telles que les érythroblastes, hématogones, plasmocytes, ou granuleux neutrophiles immatures, ou celles qui sont majoritairement représentées dans le compartiment périphérique telles que les lymphocytes T ou les polynucléaires neutrophiles matures. L'idée est qu'en cas de dilution de la moelle par le sang, la proportion des cellules d'origine médullaire diminue alors que celle des cellules d'origine sanguine augmente. Les trois méthodes publiées sont adaptables à notre combinaison d'anticorps. Björlund propose de prendre en compte les érythroblastes (seuil > 15%) et les lymphocytes T (seuil < 20%) (42), Loken les polynucléaires neutrophiles matures (seuil < 30%) (43), et Garand les polynucléaires neutrophiles matures (seuil < 40%), les érythroblastes (seuil > 5%) et les lymphocytes T (seuil < 20%) (44).

Notre objectif est de comparer ces trois méthodes à celle de Holdrinet de façon à pouvoir évaluer leurs performances respectives pour nos échantillons. Pour cela, nous avons calculé les taux de concordance avec la méthode de référence (vrais positifs + vrais négatifs / nombre d'échantillons) sur 40 échantillons normaux. Les critères et seuils choisis dans chaque méthode, ainsi que les résultats de concordance sont présentés dans la table 6. La méthode qui semble la plus concordante est celle de Björlund et al. Cependant, une concordance de 70% n'est pas satisfaisante.

Publication	Critères et seuils	Se	Sp	Concordance
Holdrinet et al.	(1 – (GRMO/GRSG)*(GBSG/GBMO))*100 >80%	/	/	/
Björlund et al.	Erythroblastes > 15% et lymphocytes T < 20%	0.50	0.79	0.70
Loken et al.	Polynucléaires neutrophiles matures < 30%	0.92	0.54	0.65
Garand et al.	Polynucléaires neutrophiles matures < 40% et érythroblastes > 5% et lymphocytes T < 20%	0.83	0.32	0.48

Table 6 Critères d'évaluation de l'hémodilution et seuils choisis selon les publications. Résultats de concordance à la méthode de Holdrinet considérée comme méthode de référence, pour 40 moelles osseuses normales de notre série.

Suite à ces conclusions, nous avons souhaité évaluer l'intérêt potentiel d'autres paramètres, accessibles avec combinaison d'anticorps, en choisissant les populations cellulaires qui sont représentées majoritairement dans les compartiments médullaire ou périphérique, à savoir les plasmocytes, les hématogones, les granuleux immatures neutrophiles, les polynuclaires neutrophiles matures, les ratios (polynuclaires neutrophiles matures / granuleux immatures neutrophiles), les lymphocytes T, les (lymphocytes T + lymphocytes NK), les érythroblastes ainsi que les myéloblastes. Le but est de trouver un ou des critères qui serai(en)t corrélé(s) à la méthode de Holdrinet. Nous avons choisi de présenter les courbes de corrélation entre le pourcentage de cellules et le taux de pureté par la méthode Holdrinet (figure 17), dans le but de rechercher une corrélation et d'essayer de trouver un seuil. Même en l'absence de tests statistiques, il n'apparaît pas de seuil évident sur aucun des paramètres. Aucun critère ne s'est avéré bien corrélé, et nous avons choisi de conserver la méthode de Holdrinet dans notre pratique quotidienne au laboratoire malgré ses difficultés et ses limites. On peut en effet se poser la question de la pertinence de la méthode de Holdrinet. Sur ce groupe d'échantillons normaux, 70% des prélèvements ont une pureté inférieure à 80% et sont donc considérés comme dilués. En prenant des exemples, on constate également des discordances : le patient numéro 74 a une répartition leucocytaire qui évoque une hémodilution (6.8% d'érythroblastes, 0.1% de plasmocytes, 0.2% d'hématogones et 46,4% de polynucléaires neutrophiles matures) mais est considéré comme pur avec le calcul de Holdrinet (pureté à 83.6%) ; alors que le patient numéro 26 a une formule leucocytaire compatible avec de la moelle osseuse pure (4% d'érythroblastes, 0.2% de plasmocytes, 13% d'hématogones et 5% de polynucléaires neutrophiles matures) et obtient un taux de pureté faible par Holdrinet (pureté à 64%).

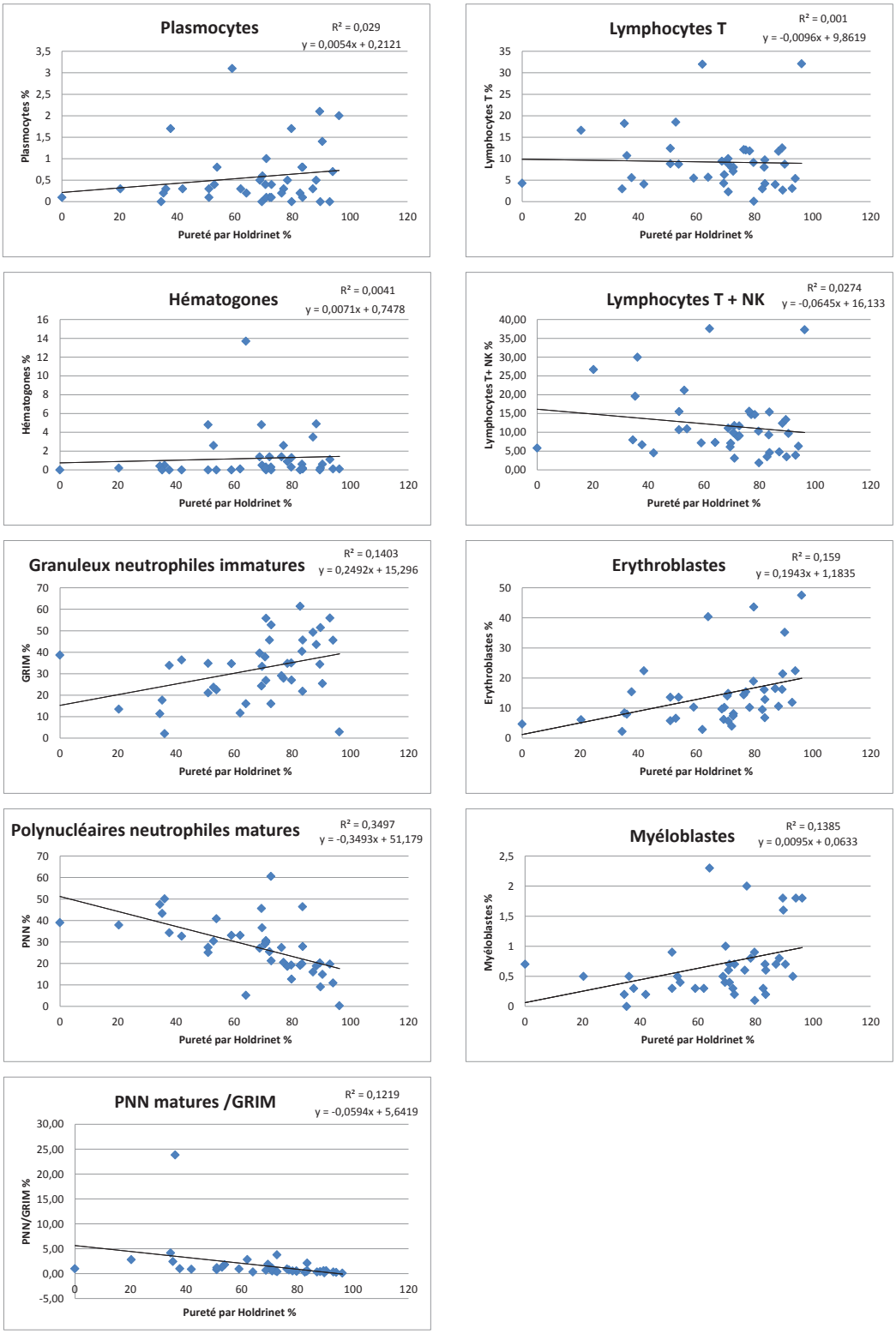


Figure 17 Courbes de corrélation de paramètres potentiels d'évaluation de la pureté médullaire avec la méthode de référence décrite par Holdrinet.

COMPARAISON DES POPULATIONS IDENTIFIEES PAR CYTOLOGIE ET CYTOMETRIE DANS NOTRE DEMARCHE

La table 7 présente les sous-populations identifiées par l'analyse cytologique comparativement à celle de l'analyse cytométrique de notre démarche. L'un des principaux atouts de la cytométrie en flux est la différenciation possible entre les sous-populations lymphocytaires T, B et NK, avec les étapes de la maturation B, qui fait son intérêt tout particulier dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs. Elle permet également la différenciation entre les précurseurs myéloïdes et lymphoïdes, ce qui n'est pas possible en cytologie à des stades très immatures (45).

Sous populations cellulaires identifiées	Analyse cytométrique	Analyse cytologique
Mégacaryoblastes	Non	Oui
et étapes de maturation	Non	Oui
Lignée érythroblastique	Oui	Oui
et étapes de maturation	Non	Oui
Monocytes	Oui	Oui
et étapes de maturation	Non	Oui
et monocytes inflammatoires	Oui	Non
Lignée lymphocytaire	Oui	Oui
Lymphocytes T	Oui	Non
Lymphocytes NK	Oui	
Lymphocytes B	Oui	
et étapes de maturation B	Oui	
Plasmocytes	Oui	Oui
Lignée polynucléaires éosinophiles	Oui	Oui
et étapes de maturation	Non	Oui
Lignée polunucléaires basophiles	Oui	Oui
Lignée polynucléaires neutrophiles	Oui	Oui
et étapes de maturation	Oui	Oui
Précurseurs : différenciation entre myéloïdes et lymphoïdes	Oui	Non

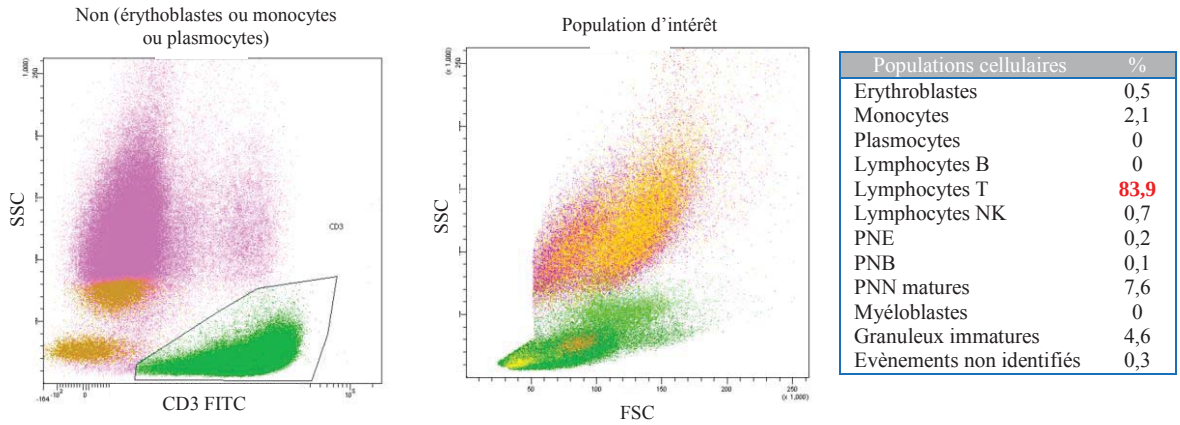
Table 7 Comparaison qualitative des sous-populations cellulaires médullaires identifiables par les deux techniques.

ANOMALIES DETECTABLES DANS NOTRE DEMARCHE

Nos résultats montrent que cette stratégie d'identification est capable de dénombrer les sous populations médullaires de façon très performante. Afin d'être utilisée en tant que technique de screening, il est nécessaire de définir des critères d'alerte évoquant les situations pathologiques, de façon à pourvoir compléter l'analyse par des combinaisons ciblées. Ces critères peuvent être quantitatifs, détectant un excès de cellules d'une sous population, ou qualitatifs, de par la variation d'expression d'antigènes. Dans la plupart des cas, les deux types d'anomalies sont cumulées.

A. Anomalies quantitatives

De nombreuses pathologies peuvent être suspectées grâce à des anomalies quantitatives (46). Une augmentation du pourcentage d'une sous-population peut orienter vers une hémopathie : myéloblastes et myélodysplasies ou leucémie aigüe myéloïde, lymphocytes B ou T et syndromes lymphoprolifératifs B ou T (figure 18), monocytes et leucémie myélo-monocytaire chronique, plasmocytes et myélome, par exemple.

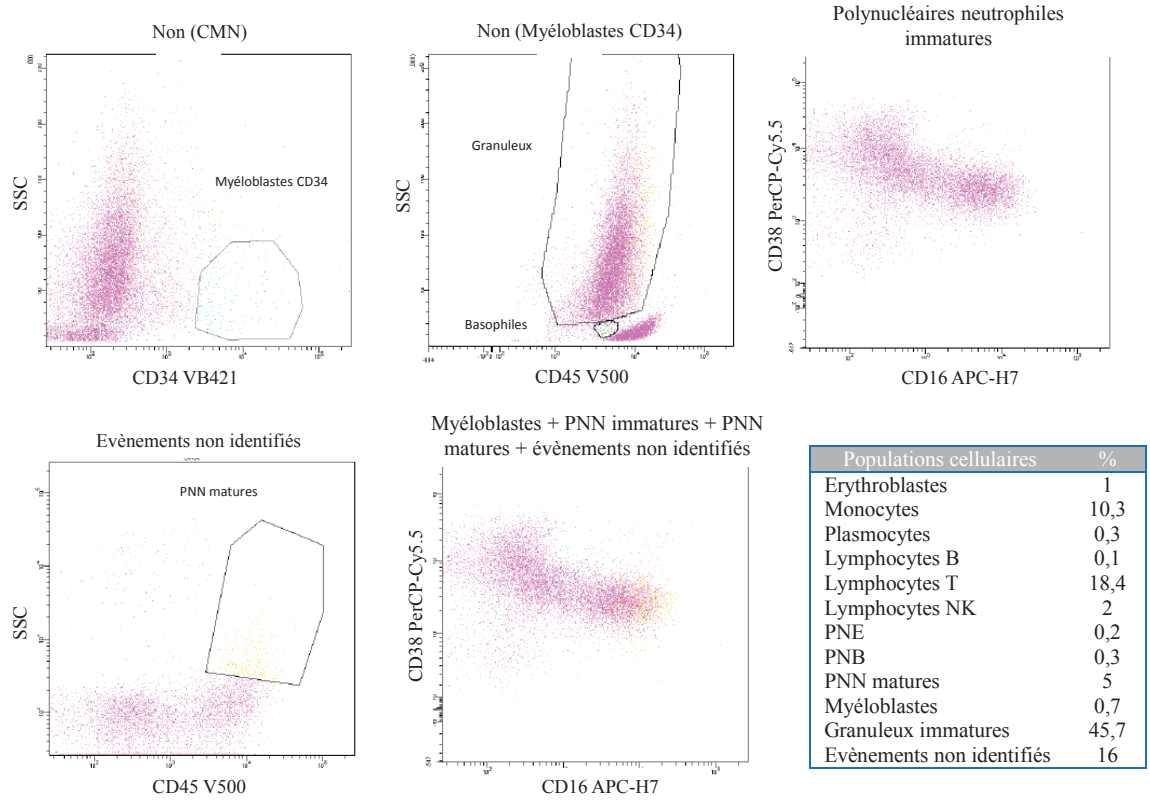


Populations cellulaires	%
Erythroblastes	0,5
Monocytes	2,1
Plasmocytes	0
Lymphocytes B	0
Lymphocytes T	**83,9**
Lymphocytes NK	0,7
PNE	0,2
PNB	0,1
PNN matures	7,6
Myéloblastes	0
Granuleux immatures	4,6
Evènements non identifiés	0,3

Figure 18 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de clone T (lymphome). On note l'excès de lymphocytes T.

Une diminution voir l'absence d'une sous-population doivent également peuvent être observés dans certains contextes cliniques : c'est le cas dans certains déficits immunitaires (absence de lymphocytes B et de plasmocytes dans le syndrome de Bruton (21,47)), sous traitement par Rituximab® (anticorps anti-CD20 conduisant à l'absence de lymphocytes B en

cas d'efficacité thérapeutique (21,48)), ou encore en cas de toxicité médicamenteuse (blocage de maturation myéloïde (49)) (figure 19).



Populations cellulaires	%
Erythroblastes	1
Monocytes	10,3
Plasmocytes	0,3
Lymphocytes B	0,1
Lymphocytes T	18,4
Lymphocytes NK	2
PNE	0,2
PNB	0,3
PNN matures	5
Myéloblastes	0,7
Granuleux immatures	45,7
Evènements non identifiés	16

Figure 19 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de blocage toxique de maturation granuleuse. On ne note pas de d'excés de cellules CD34 positives sur le premier scattergram. La maturation granuleuse est présente en quantité normale mais on ne retrouve peu de polynucléaires neutrophiles matures, indiquant bien un blocage de la maturation granuleuse

Un excès de cellules non identifiées par la stratégie décrite doit être exploré car il nous alerte sur la présence de cellules potentiellement pathologiques. Il est alors nécessaire de les identifier dans un second temps par des marqueurs appropriés. En fonction de leur niveau de FSC et SSC, de CD45 ou d'autres marqueurs de la combinaison, on s'orientera vers des cellules matures ou immatures, myéloïdes ou lymphoïdes. Il est maintenant nécessaire de définir des valeurs normales de pourcentages de chaque sous-populations cellulaire.

B. Anomalies qualitatives

Certaines hémopathies sont également détectées grâces à des variations de l'expression de certains marqueurs, soit par des variations d'intensité de fluorescence soit par l'expression aberrante de marqueurs associés habituellement à d'autres lignées. Les anomalies qualitatives se surajoutent la plupart du temps à des anomalies quantitatives.

1. Lignée lymphoïde

1.1. Syndromes lymphoprolifératifs B

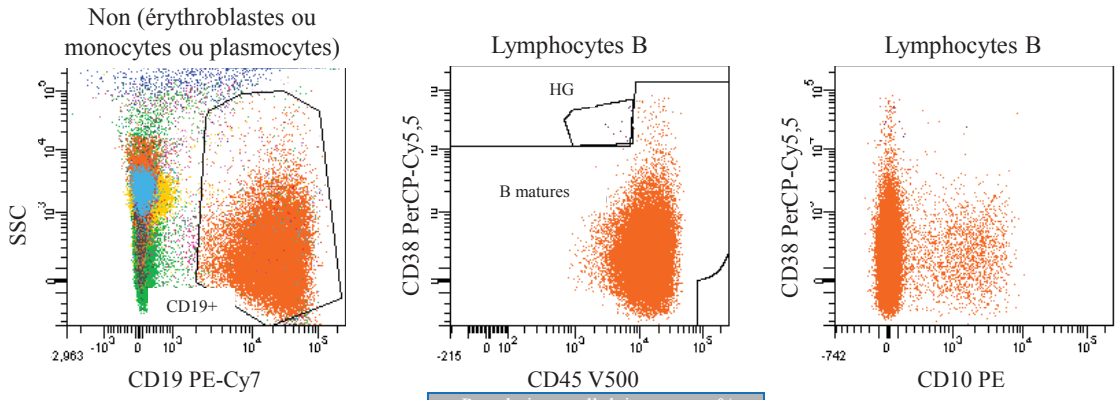
Les populations clonales de lymphocytes B matures peuvent être mises en évidence de deux manières : par la restriction des chaines légères d'immunoglobulines (50) ou par l'expression de marqueurs aberrants (51). Contrairement aux populations réactives de lymphocytes B, qui présentent une expression hétérogène des chaînes légères d'immunoglobulines (2/3 kappa et 1/3 lambda), les populations clonales n'expriment qu'une seule classe, et l'étude de leur expression associée au calcul du ratio permettent la détection du clone.

Dans notre démarche, en l'absence d'étude des chaînes légères, plusieurs indices s'offrent à nous. Des anomalies qualitatives détectables par notre combinaison concernent l'expression de CD19, CD10 (52), CD38, CD45 ou les paramètres de taille et de structure FSC et SSC. A titre d'exemples :

- L'expression faible de CD45 est par exemple observée dans la leucémie lymphoïde chronique.
- L'expression faible de CD19 associée à l'expression aberrante de CD10 est observée dans les cas de lymphomes folliculaires (53,54), l'expression forte de CD38 est retrouvée dans les lymphomes de la zone marginale (24).
- L'expression de CD38, facteur pronostic dans la LLC, sera variable au cours de l'évolution de la maladie (55).
- Des cellules de taille anormalement grande peuvent permettre la détection de lymphomes à grande cellules (56).
- L'expression forte de CD19 associée à des cellules de grande taille, et parfois une expression aberrante de CD10 sur les lymphocytes B matures évoquera la leucémie à tricholeucocytes (figure 20) (57–59).

Tous ces critères, issus de la littérature, restent à évaluer dans notre méthode par une étude à plus large échantillonnage. En cas de suspicion de syndrome lymphoprolifératif B, il est

toujours nécessaire d'ajouter dans un second tube l'étude des chaînes légères d'immunoglobulines de façon à prouver la clonalité de la population.

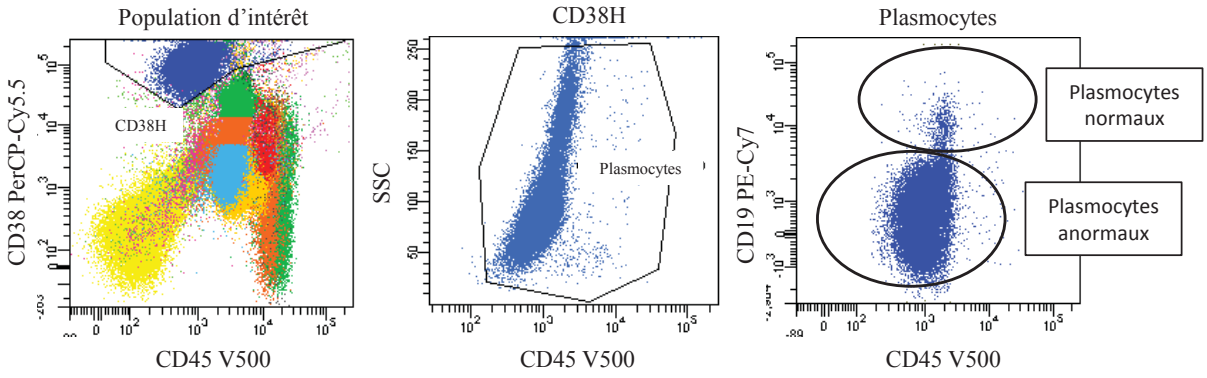


Populations cellulaires	%
Erythroblastes	7,2
Monocytes	0,2
Plasmocytes	0,6
Lymphocytes B	**29,1**
Lymphocytes T	19,8
Lymphocytes NK	4,4
PNE	0,5
PNB	0,1
PNN matures	14,5
Myéloblastes	0,1
Granuleux immatures	24,1
Evènements non identifiés	0,6

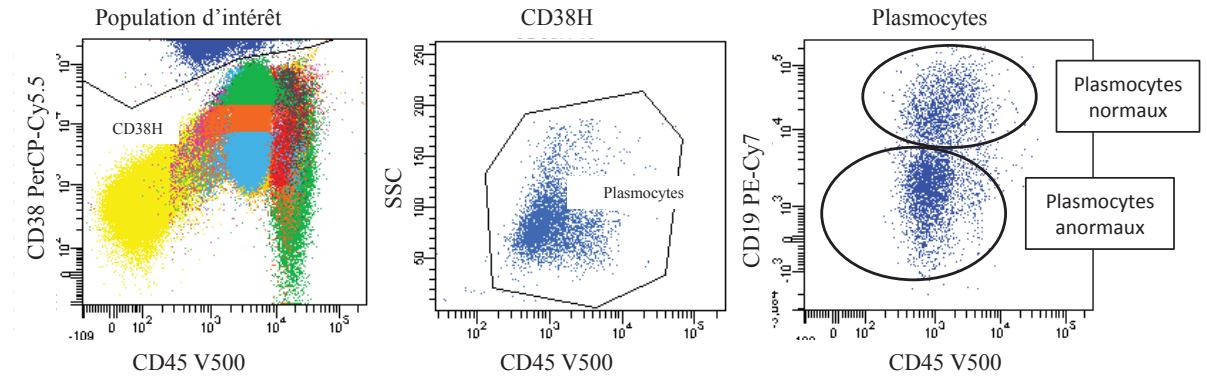
Figure 20 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de clone B (leucémie à tricholeucocytes). On note l'excès de lymphocytes B matures. Une partie d'entre eux exprime de façon aberrante CD10.

1.2 Myélomes et M-GUS

Le myélome est une hémopathie touchant la sous-population cellulaire des plasmocytes. En plus de l'excès de cellules, il est décrit que les plasmocytes pathologiques expriment faiblement CD19 et CD45 (60). Dans notre combinaison, il est d'ailleurs aisé de dissocier le nuage des plasmocytes normaux de celui des cellules clonales de façon très sensible sur ces critères (figure 21). Les plasmocytes sont également caractérisés par une expression de CD38 très forte, et une diminution d'intensité de fluorescence de CD38 est aussi un marqueur d'anomalie (60).



Populations cellulaires	%
Erythroblastes	13,5
Monocytes	3,6
Plasmocytes	**12,5**
Lymphocytes B	0,7
Lymphocytes T	8,2
Lymphocytes NK	1,5
PNE	1,4
PNB	0,3
PNN matures	21,9
Myéloblastes	0,8
Granuleux immatures	34,6
Evènements non identifiés	1,1



Populations cellulaires	%
Erythroblastes	35,2
Monocytes	5,2
Plasmocytes	**1,4**
Lymphocytes B	2,1
Lymphocytes T	8,7
Lymphocytes NK	1
PNE	2,7
PNB	0,3
PNN matures	14,9
Myéloblastes	0,7
Granuleux immatures	25,4
Evènements non identifiés	1,9

Figure 21 Exemples de moelles osseuses pathologiques. Cas de myélome multiple (en haut) et de M-GUS (en bas). On note un excès de plasmocytes, plus ou moins important selon le cas, accompagné d'un nuage de plasmocytes d'expression CD19 et CD45 diminuée, correspondant aux plasmocytes pathologiques.

1.3 Syndromes lymphoprolifératifs T

La seule anomalie qualitative détectable est l'expression aberrante de l'antigène CD10 sur les lymphocytes T. Elle orientera vers un lymphome angio-immunoblastique T (61). En cas de forte suspicion clinique de lymphome T, il est nécessaire de compléter l'analyse par une étude du répertoire du TCR pour prouver la clonalité de la population (62,63).

1.4 Leucémies aigües lymphoïdes

Les leucémies aigües lymphoïdes B sont détectables sur le graphe de la maturation lymphoïde B. On retrouvera un nuage quantitativement important de lymphocytes B immatures d'expression CD45 faible (23,64). Comparativement aux hématogones, l'expression de CD38 peut être abaissée, et celle de CD10 augmentée (30,65). On pourra également visualiser l'expression de CD34 sur cette sous population (30,66).

Dans les leucémies aigües lymphoïdes T, les blastes, qui en majorité n'expriment pas CD3 (30,67), seront retrouvés parmi les cellules non identifiées, et formeront un nuage CD45 faiblement positif. Ils seront identifiés dans un second temps comme appartenant à la lignée T.

2. Lignée myéloïde

2.1 Myélodysplasies et score d'Ogata

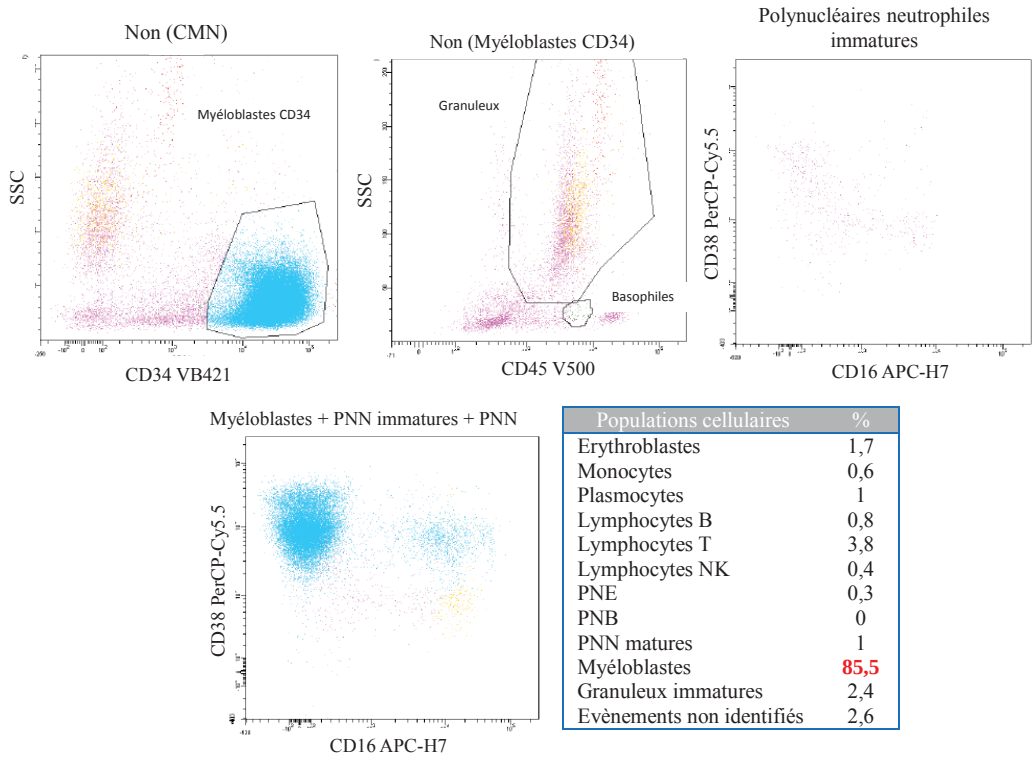
Le diagnostic des myélodysplasies par la cytométrie en flux est actuellement source de nombreux projets de recherche. Un score a été établi, le score d'Ogata, permettant de diagnostiquer les myélodysplasies de bas grade sans marqueurs spécifiques (excès de blastes, anomalies caryotypiques, sidéroblastes en couronnes). Il est basé sur quatre points résumés dans la table 8. Un score supérieur ou égal à 2 est fortement prédictif de myélodyplasie (68). Nous disposons dans notre combinaison des quatre anticorps nécessaires à son calcul, et il a été mis en place au laboratoire. Son évaluation fait partie des perspectives intéressantes. Il a été également décrit dans les myélodysplasies une diminution de l'expression de CD45, CD16 et CD10 sur les polynucléaires neutrophiles matures (69–71) et l'expression abaissée de CD38 sur les myéloblastes (71). Une hétérogénéité de d'expression de CD36 sur les érythroblastes fait également partie des critères d'orientation (71).

Paramètres	Seuils et points		Seuils et points	
Pourcentage de myéloblastes CD34+ / évènements CD45+	< 2.4 %	0	> 2.4 %	1
Pourcentage d'hématogones CD34+ / évènements CD34+	> 5 %	0	< 5 %	1
Ratio des MFI CD45 (lymphocytes / myéloblastes)	> 4 ou < 7.8	0	< 4 ou > 7.8	1
Ratio des modes SSC (granuleux CD10- / lymphocytes)	> 6	0	< 6	1

Table 8 Paramètres et seuils utilisés dans le calcul du score d'Ogata.

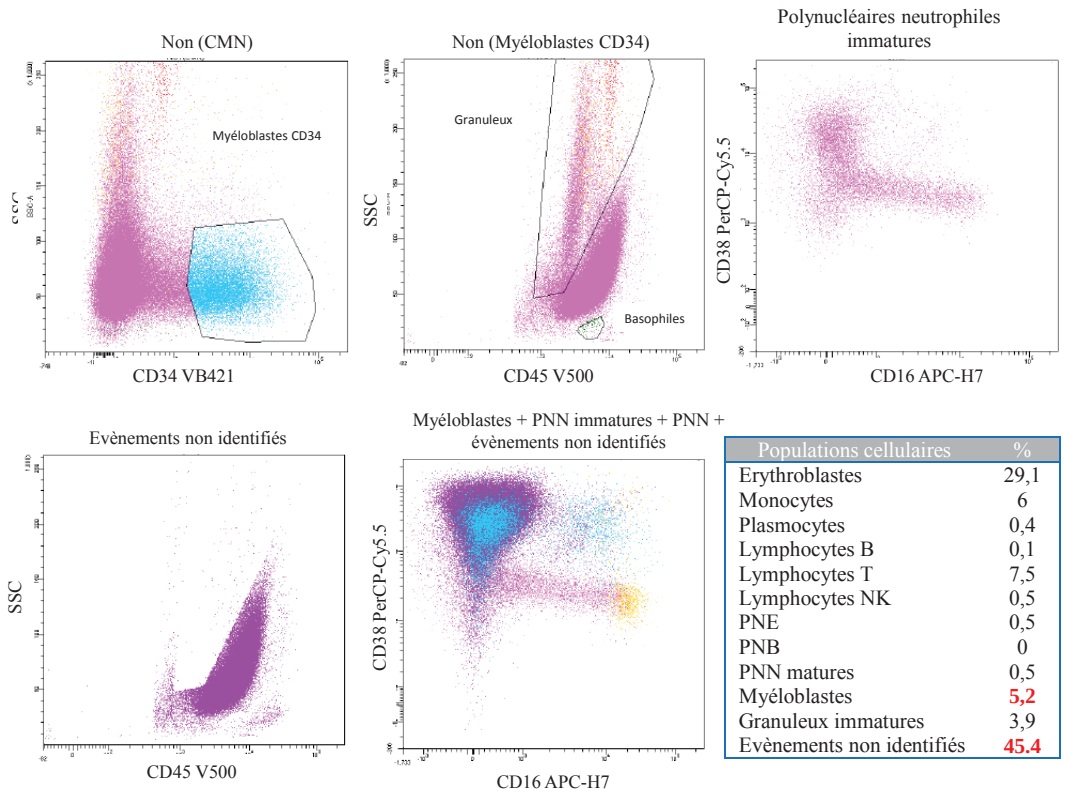
2.2 Leucémies aigües myéloïdes

Dérivant d'un blocage de maturation, la leucémie aigüe myéloïde se détecte dans notre méthode par la mise en évidence d'un excès de cellules immatures CD34+ (supérieur à 20% si l'on considère les critères cytologiques) (figure 22). En cas de clone CD34 négatif, on détecte un excès de cellules non identifiées (figure 23) (35). Par superposition des myéloblastes, granuleux immatures et neutrophiles matures sur un même graphe CD16/CD38, on visualise très nettement le blocage de maturation ainsi que la maturation granuleuse normale résiduelle.



Populations cellulaires	%
Erythroblastes	1,7
Monocytes	0,6
Plasmocytes	1
Lymphocytes B	0,8
Lymphocytes T	3,8
Lymphocytes NK	0,4
PNE	0,3
PNB	0
PNN matures	1
Myéloblastes	**85,5**
Granuleux immatures	2,4
Evènements non identifiés	2,6

Figure 22 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de leucémie aigüe avec myéloblastes CD34 positifs. L'excès de cellules CD34 positives est visible sur le premier graphe. Les trois autres graphes montrent une maturation granuleuse résiduelle quasiment inexistante.



Populations cellulaires	%
Erythroblastes	29,1
Monocytes	6
Plasmocytes	0,4
Lymphocytes B	0,1
Lymphocytes T	7,5
Lymphocytes NK	0,5
PNE	0,5
PNB	0
PNN matures	0,5
Myéloblastes	**5,2**
Granuleux immatures	3,9
Evènements non identifiés	**45.4**

Figure 23 Exemple de moelle osseuse pathologique. Cas de leucémie aigüe avec myéloblastes CD34 négatifs. On ne note un léger excès de cellules CD34 positives sur le premier graphe. La maturation granuleuse est présente en très faible quantité et on retrouve un nuage très important de cellules non identifiées. Des compléments d'analyse ont permis de typer cette population comme myéloïde immature. Par superposition des évènements non identifiés et de la maturation granuleuse totale, le dernier graphe nous permet de visualiser très nettement le blocage de maturation.

2.3 Syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs

La diminution voir la perte totale d'expression de CD36 sur les monocytes peut être détectée grâce à notre combinaison. Cas rare, elle est néanmoins décrite dans certains cas de leucémies myélo-monocytaires chroniques (72).

2.4 Monocytes inflammatoires

Deux sous-populations majoritaires de monocytes ont été décrites dans le sang chez l'homme, l'une CD14++ et CD16-, et la seconde CD14+ et CD16+. Il a été prouvé que ces deux populations ont des fonctions différentes, et le groupe CD14+ CD16+ a été associé à une plus forte production de cytokines pro-inflammatoires et un potentiel plus élevé de présentation de l'antigène, arguments suggérant un rôle crucial de ces cellules dans le processus inflammatoire (73,74). La combinaison proposée dans ce travail inclue l'anticorps anti-CD16, ce qui donne la possibilité de visualiser cette sous population de monocytes inflammatoires, et de la dénombrer (figure 24).

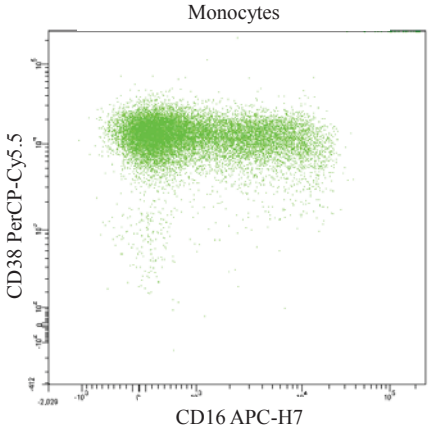


Figure 24 Exemple de visualisation d'un nuage de monocytes inflammatoires CD16 positifs.

3. Difficultés analytiques

Au cours de cette étude, nous avons identifié trois difficultés analytiques dans le contexte de sous-populations pathologiques.

- Les lymphocytes B matures exprimant CD19 très faiblement voir négatifs, situation possible dans certains lymphomes (24). Les cellules seront alors retrouvées dans le groupe des cellules non identifiées, formant un nuage en SSC faible et CD45 fort.
- Les myéloblastes CD34 négatifs, situation retrouvée dans certaines leucémies aigües myéloïdes (35). La population blastique est alors retrouvée parmi les cellules non-identifiées.
- Les monocytes CD36 négatifs, situation rare mais décrite dans le contexte de leucémies myélomonocytaires chroniques (72). Etant relativement granuleuses et d'expression CD45 intermédiaire, les cellules ont été faussement identifiées comme des granuleux neutrophiles immatures.

Un excès de cellules non identifiées ou un nuage anormal dans le graphe des cellules non identifiées doit conduire à des analyses plus ciblées.

Deux situations sont à différencier :

- La présence de cellules non identifiées, qu'il faut caractériser dans un second temps,
- La présence de cellules mal identifiées, situation possible car on ne dispose parfois que d'un seul anticorps pour identifier une population. La nature exacte de toute population anormalement élevée doit être confirmée par un tube complémentaire avec d'autres anticorps spécifiques.

CONCLUSION

MÉMOIRE SOUTENU PAR : Mlle Alice SOUVIGNET

TITRE : Nouvelle démarche d'identification des sous-populations cellulaires de la moelle osseuse par cytométrie en flux en un tube huit couleurs.

CONCLUSION

La cytométrie en flux, en permettant une étude immunologique très sensible et reproductible des sous-populations cellulaires, est un outil complémentaire de la cytologie et un maillon incontournable de l'exploration des hémopathies.

L'objectif de ce travail a été de valider une stratégie d'identification et de numération des principales populations de la moelle osseuse, qu'elles soient normales ou pathologiques, basée sur une combinaison de huit anticorps dans un seul tube, CD3-FITC/CD10-PE/CD38-PerCP/CD19-PECy7/CD36-APC/CD16-APCH7/CD34-VB421/CD45-V500, choisis grâce aux données de la littérature concernant leurs spécificités et complémentarités. La finalité de cette approche est d'obtenir une méthode de screening des moelles osseuses pathologiques, d'orientation du panel de caractérisation immunologique des hémopathies, et d'appréciation de la qualité des prélèvements.

Nous avons commencé par mettre au point une stratégie optimisée et standardisée de fenêtrages successifs qui nous a permis d'identifier 14 sous-populations médullaires (érythroblastes, monocytes, plasmocytes, lymphocytes B avec 4 étapes de maturation, lymphocytes T, lymphocytes NK, myéloblastes, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, polynucléaires neutrophiles matures et granuleux immatures). Nous avons ensuite validé cette approche en comparant les résultats de la numération obtenue par cytométrie en flux avec ceux de l'analyse cytologique lors d'une étude prospective et en aveugle de 99 échantillons normaux et pathologiques de moelle osseuse.

Nous avons montré que cette approche conduisait à des résultats très reproductibles, ne requérant qu'une formation spécifique simple pour du personnel qualifié maîtrisant la cytométrie en flux. Nous avons également prouvé que les résultats obtenus restaient stables après 3 jours de conservation de l'échantillon. Différentes méthodes d'évaluation de

l'hémodilution, indicateur de la qualité du prélèvement médullaire, ont été évaluées. En dépit d'évidentes limitations, nous avons retenu la méthode de référence de Holdrinet.

Nous avons ensuite défini des critères qualitatifs d'anomalies des cellules lymphoïdes et myéloïdes, de façon à détecter les moelles pathologiques. La possibilité d'une identification séparée des lymphocytes T, B et NK et la représentation du chemin de maturation des cellules granuleuses neutrophiles immatures sont des points particulièrement intéressants dans cette démarche. Nous avons comme objectif de rechercher également des critères d'anomalies quantitatifs, qui nécessiteront l'établissement de valeurs de référence lors d'un futur travail.

Cette démarche d'analyse de la moelle osseuse est utilisée en routine au laboratoire d'Immunophénotypage de Grenoble depuis juillet 2013. La suite de ce travail visera à déterminer dans quelle mesure ces critères sont performants pour le screening des moelles pathologiques correspondant à la grande variété de situations rencontrées, qu'elles concernent la lignée lymphoïde ou myéloïde, qu'elles soient tumorales ou non. Les perspectives sont de transférer la démarche à d'autres centres standardisés au sein du groupe FranceFlow, afin de montrer que cette démarche analytique est facilement exportable et que la standardisation permet d'obtenir des résultats identiques quelles que soient les équipes.

VU ET PERMIS D 'IMPRIMER

Grenoble, le 13/6/2014

LE DOYEN

Professeur C. RIBUOT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R. DE PHARMACIE GRENOBLE 1

LE PRESIDENT DE THESE

Professeur J-Y. CESBRON

PERSPECTIVES

La suite de ce travail consistera en une étude multicentrique avec deux objectifs principaux : la standardisation et l'établissement de valeurs normales, et l'évaluation des potentialités de screening de pathologies.

ETABLISSEMENT DE VALEURS NORMALES

L'établissement de valeurs normales est maintenant une étape indispensable. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir des prélèvements de moelle osseuse normale. Peuvent être admis comme normaux les prélèvements issus de donneurs sains pour greffe de moelle osseuse (41) ainsi que les prélèvements issus des contextes de thrombopénies périphériques (PTI) ou bilans initiaux de lymphomes sans envahissement médullaire (23). Il est également indispensable de s'assurer de l'absence d'hémodilution (41). Les proportions relatives des sous-populations variant au cours de la vie, il sera nécessaire de définir des valeurs normales par tranches d'âges.

Il peut être intéressant de définir deux types de valeurs normales :

- Les pourcentages de chaque population, comme cela peut être fait en cytologie, et permettant de détecter des anomalies quantitatives ;
- Les moyennes de fluorescence de marqueurs pour différentes populations, connues comme étant modifiées dans des situations pathologiques et permettant de détecter des anomalies qualitatives. Ces dernières pourront également être utilisées comme indicateurs de la qualité du marquage, à la manière d'un étalon interne, car l'oubli d'un anticorps sera immédiatement détecté. Les moyennes de fluorescence d'intérêt de chaque sous-population, en situations normales et pahtologiques, sont représentées dans l'annexe 2.

EVALUATION DES POTENTIALITES DE SCREENING D'ANOMALIES DE NOTRE COMBINAISON

Afin d'évaluer les critères d'alerte que nous venons de définir, il est maintenant nécessaire d'étudier une importante cohorte d'échantillons, incluant un large panel de pathologies y compris des cas rarement rencontrés.

Dans une étude prospective des moelles osseuses de routine reçues au laboratoire, on effectuera la recherche d'anomalies quantitatives et /ou qualitatives puis la comparaison des résultats à l'ensemble des investigations incluant la cytologie, la biochimie, la cytogénétique, la biologie moléculaire et la symptomatologie clinique. Le but sera d'évaluer pour chaque pathologie les sensibilités et spécificités de l'analyse en cytométrie, ainsi que la place de ce tube au laboratoire (comparaison des potentialités de screening par rapport à celles de la cytologie, évalutation de l'aide au comptage des cellules de myélogramme…). Cette étude devrait être multi-centrique, permettant ainsi d'évaluer la standardisation de la technique ainsi que la reproductibilité des conclusions biologiques.

ANNEXES

Annexe 1 – Tables de Rümke - Variations des valeurs relatives d'une population leucocytaire selon le nombre de cellules comptées.

%	100	200	500	1.000	10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 4.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38.0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0

Annexe 2 – Moyennes de fluorescence d'intérêt pour l'établissement de valeurs normales.

Sous-populations cellulaires	Expression caractéristique des populations normales	Expression modifiée lors de situations pathologiques, et sens de variation
Erythroblastes	CD36	-
Monocytes	CD36 / CD45	CD16 positivité si cellules activées CD36 diminution voir négativité
Plasmocytes	CD19 / CD38	CD38 / CD19 / CD45 diminution
Lymphocytes T	CD3	CD10 positivité aberrante
Lymphocytes NK CD16	CD16	-
Lymphocytes B	CD19 / CD45	CD10 positivité aberrante CD19 diminution ou augmentation CD45 diminution ou augmentation
Hematogones	CD19 / CD38 / CD10 / CD45	CD10 négativité aberrante / diminution ou augmentation CD19 diminution ou augmentation CD38 diminution
Myeloblastes CD34	CD34	CD38 expression aberrante
Polynucléaires neutrophiles immatures	CD38 / CD16 / SSC	CD16 diminution
Polynucléaires neutrophiles matures	CD16 / CD10	CD10 / CD16 diminution
Polynucléaires éosinophiles	SSC	SSC diminution

BIBLIOGRAPHIE

1. Sébahoun G, Horschowski N. Cytologie et histologie médullaires normales. Encycl. Méd.-Chir. Ed. Sci. Médicales Elsevier SAS Paris 2002;Hématologie.

2. Bain BJ. Bone marrow aspiration. J. Clin. Pathol. 2001;54:657–663.

3. RUEMKE CL. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. Triangle Sandoz J. Med. Sci. 1960;4:154–158.

4. Rümke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 1985;11:311–314, 315.

5. Bain BJ. Blood cells, A practical guide. 4th Edition. Wiley-Blackwell; 2006. 486 pages p.

6. Fuentes-Arderiu X, Dot-Bach D. Measurement uncertainty in manual differential leukocyte counting. Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC 2009;47:112–115.

7. DAVIDSON E. The distribution of cells in peripheral blood smears. J. Clin. Pathol. 1958;11:410–411.

8. Kim M, Kim J, Lim J, Kim Y, Han K, Kang CS. Use of an automated hematology analyzer and flow cytometry to assess bone marrow cellularity and differential cell count. Ann. Clin. Lab. Sci. 2004;34:307–313.

9. Moldavan A. PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. Science 1934;80:188–189.

10. COONS AH, KAPLAN MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 1950;91:1–13.

11. Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. Science 1965;150:630–631.

12. Kamentsky LA, Melamed MR. Spectrophotometric cell sorter. Science 1967;156:1364–1365.

13. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. Science 1969;163:1213–1214.

14. Terstappen LW, Loken MR. Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. Cytometry 1988;9:548–556.

15. Shapiro HM, Schildkraut ER, Curbelo R, Laird CW, Turner B, Hirschfeld T. Combined blood cell counting and classification with fluorochrome stains and flow instrumentation. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 1976;24:396–401.

16. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. Pillars article: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979. 76: 4061-4065. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2013;190:5346–5350.

17. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood 1997;90:2863–2892.

18. Lacombe F, Vial J-P, Belloc F, Praloran V. La cytométrie en flux: clé des automates de numération formule sanguine. BioTribune Mag. 2005;15:38–47.

19. Greig B, Oldaker T, Warzynski M, Wood B. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: recommendations for training and education to perform clinical flow cytometry. Cytometry B Clin. Cytom. 2007;72 Suppl 1:S23–33.

20. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, Almeida J, Lhermitte L, Asnafi V, Mendonça A, de Tute R, Cullen M, Sedek L, Vidriales MB, Pérez JJ, te Marvelde JG, Mejstrikova E, Hrusak O, Szczepański T, van Dongen JJM, Orfao A, EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia 2012;26:1986–2010.

21. Virgo PF, Gibbs GJ. Flow cytometry in clinical pathology. Ann. Clin. Biochem. 2012;49:17–28.

22. Bayer J, Grunwald D, Lambert C, Mayol JF, Maynadié M. Thematic workshop on fluorescence compensation settings in multicolor flow cytometry. Cytometry B Clin. Cytom. 2007;72:8–13.

23. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin. Cytom. 2004;60:1–13.

24. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008;111:3941–3967.

25. Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Severin E, Göhde W. High-grade loss of leukocytes and hematopoietic progenitor cells caused by erythrocyte-lysing procedures for flow cytometric analyses. J. Hematother. Stem Cell Res. 2003;12:321–330.

26. Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Göhde W. The impact of erythrocyte lysing procedures on the recovery of hematopoietic progenitor cells in flow cytometric analysis. Stem Cells Dayt. Ohio 2006;24:793–799.

27. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. Cytometry B Clin. Cytom. 2007;72 Suppl 1:S3.

28. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, Gorczyca W, Lee R, Maiese R, Orfao A, Wells D, Wood BL, Stetler-Stevenson M. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. Cytometry B Clin. Cytom. 2007;72 Suppl 1:S5–13.

29. Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Boutonnat J. La cytométrie en flux. Lavoisier; 2006. 456 pages p.

30. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécrevisse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A, EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia 2012;26:1908–1975.

31. Van Dongen JJM, Orfao A, EuroFlow Consortium. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. Leukemia 2012;26:1899–1907.

32. Jo Y, Kim SH, Koh K, Park J, Shim YB, Lim J, Kim Y, Park Y-J, Han K. Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using Hematoflow method. Korean J. Lab. Med. 2011;31:131–137.

33. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E, international consensus group for hematology. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Lab. Hematol. Off. Publ. Int. Soc. Lab. Hematol. 2005;11:83–90.

34. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, Guy J, Borgeot J, Guérin E, Debliquis A, Drenou B, Campos L, Lacombe F, Béné MC. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2013;83:1066–1072.

35. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2004;58:62–71.

36. Gorczyca W, Sun Z-Y, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic pattern of myeloid populations by flow cytometry analysis. Methods Cell Biol. 2011;103:221–266.

37. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, Jouault H, Maynadié M, Lacombe F. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. Cytometry B Clin. Cytom. 2010;78:4–10.

38. Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Sugamura K, Nakamura M, Takano S. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). FEBS Lett. 1999;459:195–199.

39. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, Schlette E, Huh YO, Shi Y, Awagu S, Chen W. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. Arch. Pathol. Lab. Med. 2008;132:813–819.

40. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. Exp. Hematol. 1980;8:103–107.

41. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: influence of peripheral blood contamination. Cytometry B Clin. Cytom. 2009;76:18–26.

42. Björklund E, Mazur J, Söderhäll S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2003;17:138–148.

43. Loken MR, Chu S-C, Fritschle W, Kalnoski M, Wells DA. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. Cytometry B Clin. Cytom. 2009;76:27–36.

44. Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, Bertrand Y, Boulland M-L, Brouzes C, Clappier E, Delabesse E, Fest T, Garnache-Ottou F, Huguet F, Jacob M-C, Kuhlein E, Marty-Grès S, Plesa A, Robillard N, Roussel M, Tkaczuk J, Dombret H, Macintyre E, Ifrah N, Béné MC, Baruchel A. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. Leukemia 2013;27:370–376.

45. Wells DA, Sale GE, Shulman HM, Myerson D, Bryant EM, Gooley T, Loken MR. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy and bone marrow transplantation. Am. J. Clin. Pathol. 1998;110:84–94.

46. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. Int. J. Lab. Hematol. 2014;36:279–288.

47. Moise A, Nedelcu FD, Toader MA, Sora SM, Tica A, Ferastraoaru DE, Constantinescu I. Primary immunodeficiencies of the B lymphocyte. J. Med. Life 2010;3:60–63.

48. Makatsori M, Kiani-Alikhan S, Manson AL, Verma N, Leandro M, Gurugama NP, Longhurst HJ, Grigoriadou S, Buckland M, Kanfer E, Hanson S, Ibrahim MAA, Grimbacher B, Chee R, Seneviratne SL. Hypogammaglobulinaemia after rituximab treatment-incidence and outcomes. QJM Mon. J. Assoc. Physicians 2014.

49. Goudemand J, Plouvier J, Bauters F, Goudemand M. [Acute agranulocytosis induced by pyramidon or phenothiazines. Apropos of 31 cases]. Sem. Hôp. Organe Fondé Par Assoc. Enseign. Méd. Hôp. Paris 1976;52:1513–1520.

50. Li S, Eshleman JR, Borowitz MJ. Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma. Am. J. Clin. Pathol. 2002;118:229–234.

51. Nakase K, Kita K, Shiku H, Tanaka I, Nasu K, Dohy H, Kyo T, Tsutani H, Kamada N. Myeloid antigen, CD13, CD14, and/or CD33 expression is restricted to certain lymphoid neoplasms. Am. J. Clin. Pathol. 1996;105:761–768.

52. Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Assessment of CD10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. Am. J. Clin. Pathol. 2002;117:291–300.

53. Ray S, Craig FE, Swerdlow SH. Abnormal patterns of antigenic expression in follicular lymphoma: a flow cytometric study. Am. J. Clin. Pathol. 2005;124:576–583.

54. Bellido M, Rubiol E, Ubeda J, López O, Estivill C, Carnicer M, Muñoz L, Bordes R, Sierra J, Nomdedéu J. Flow cytometry using the monoclonal antibody CD10-Pe/Cy5 is a useful tool to identify follicular lymphoma cells. Eur. J. Haematol. 2001;66:100–106.

55. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood 2002;99:1023–1029.

56. Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Ohshima K, Nishikori M, Tamaru J, Taniwaki M, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. Haematologica 2008;93:1195–1202.

57. Chen Y-H, Tallman MS, Goolsby C, Peterson L. Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia. Am. J. Clin. Pathol. 2006;125:251–259.

58. Sharpe RW, Bethel KJ. Hairy cell leukemia: diagnostic pathology. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2006;20:1023–1049.

59. Jasionowski TM, Hartung L, Greenwood JH, Perkins SL, Bahler DW. Analysis of CD10+ hairy cell leukemia. Am. J. Clin. Pathol. 2003;120:228–235.

60. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau J-L, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. Haematologica 2006;91:1234–1240.

61. Tan LH-C, Tan S-Y. Aberrant immunoarchitecture distinguishes hyperplastic germinal centres in pattern 1 angioimmunoblastic T-cell lymphoma from reactive follicles. Hematol. Oncol. 2013.

62. Morice WG, Kimlinger T, Katzmann JA, Lust JA, Heimgartner PJ, Halling KC, Hanson CA. Flow cytometric assessment of TCR-Vbeta expression in the evaluation of peripheral blood involvement by T-cell lymphoproliferative disorders: a comparison with conventional T-cell immunophenotyping and molecular genetic techniques. Am. J. Clin. Pathol. 2004;121:373–383.

63. Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. Clin. Lab. Med. 2007;27:513–532, vi.

64. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ, San Miguel JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. Leukemia 1999;13:419–427.

65. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood 2001;98:2498–2507.

66. Digiuseppe JA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. Clin. Lab. Med. 2007;27:533–549, vi.

67. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, Cheng C, Su X, Rubnitz JE, Basso G, Biondi A, Pui C-H, Downing JR, Campana D. Early T-cell precursor

leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol. 2009;10:147–156.

68. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, Yamashita T, Tamura H, Tsukada J, Dan K. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. Haematologica 2009;94:1066–1074.

69. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, Venzon D, Rick ME. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. Blood 2001;98:979–987.

70. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2003;102:394–403.

71. Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, Font P, Germing U, Haase D, Homburg CH, Ireland R, Jansen JH, Kern W, Malcovati L, Te Marvelde JG, Mufti GJ, Ogata K, Orfao A, Ossenkoppele GJ, Porwit A, Preijers FW, Richards SJ, Schuurhuis GJ, Subirá D, Valent P, van der Velden VHJ, Vyas P, Westra AH, de Witte TM, Wells DA, Loken MR, Westers TM. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. Haematologica 2009;94:1124–1134.

72. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. Am. J. Clin. Pathol. 2005;124:799–806.

73. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J. Leukoc. Biol. 2007;81:584–592.

74. Heimbeck I, Hofer TPJ, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14+CD16++ monocytes in females. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2010;77:823–830.

Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.



Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».