



HAL
open science

Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous-populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire par le sang périphérique

Julie Pont

► **To cite this version:**

Julie Pont. Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous-populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire par le sang périphérique. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01674613

HAL Id: dumas-01674613

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01674613>

Submitted on 3 Jan 2018

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

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

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 2015

N°

MEMOIRE DU DIPLOME 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

DIPLOME D'ETAT

**Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous-populations
de la moelle osseuse en fonction de l'âge
et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire
par le sang périphérique**

Julie PONT, [Données à caractère personnel]

Soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble* le 07 octobre 2015

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 Adriana PLESA

**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.*

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

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

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

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC- IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC- IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON- MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC- IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU

UFR de Pharmacie de Grenoble



DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ- DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »- EAM 4128) UCB

MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT- MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER- FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC- IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC- IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU		Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
PAST	TROILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEW	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche Institut

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogénèse »

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse

IPB :

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse 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

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maîtres de Conférences des Universités

MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeurs des Universités

PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation

UMR : Unité Mixte de Recherche

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron, pour avoir accepté la présidence de ce jury, pour m'avoir accueilli dans votre service et pour avoir soutenu ce projet.

A Madame le Docteur Marie-Christine Jacob, directrice de thèse, pour m'avoir confié et encadré ce travail de thèse. Merci pour votre grande disponibilité, votre rigueur, votre sympathie, et aussi pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises lors de mon passage au laboratoire d'immunologie.

A Monsieur le Professeur Pascal Mossuz, pour avoir accepté de juger ce travail et pour votre accueil lors de ma venue au laboratoire d'hématologie.

A Mesdames le Professeur Lydia Campos et le Docteur Adriana Plesa, merci pour votre investissement et votre collaboration à ce travail, merci aussi d'avoir accepté de juger ce travail en tant que spécialistes.

A l'ensemble des membres du laboratoire d'Immunologie de Grenoble, pour ces deux semestres passés ensemble. Je tiens à remercier les biologistes Chantal Dumestre-Perard, Martine Pernollet, Denise Ponard et Giovanna Clavarino pour leurs enseignements et leurs conseils. Un grand merci aussi à tous les techniciens de cytométrie : Séverine Béatrix, Ghislaine Del Vecchio, Richard Di Schiena, Michel Drouin et Christine Vallet de m'avoir si bien accueillie au laboratoire et pour tout le travail effectué ensemble.

A tous les biologistes médicaux rencontrés au cours de mon internat qui m'ont transmis leur passion pour ce métier qui sera bientôt le mien.

A l'ensemble de mes co-internes actuels et anciens et plus particulièrement :

A Eléna, Aurélie et Caro

A David, Maëlle, Elodie G, Cécile et Isabelle

A mes amis grenoblois : Alice, Sylvain et Jean-Pierre

A mes amies : Clélia, Pauline, Clotilde et Manon pour votre soutien sans faille durant toutes ces années, pour tous ces moments de complicité, et pour toutes les belles choses à venir...

A toute ma famille ainsi qu'à **Bubu, Annie et Barbara**

A mes grands-mères, pour ces souvenirs inoubliables que vous me laissez, pour toutes ces journées et vacances passées ensemble, pour vos talents culinaires qui ont égayé mon quotidien grenoblois.

A mes parents, vous avez toujours été là pour moi, vous avez toujours cru en moi, vous m'avez offert le meilleur, vous m'avez amenée jusqu'ici, cette réussite c'est aussi la vôtre. Merci pour tout, je vous aime tant.

A Guillaume, pour ces huit belles années passés ensemble, pour ton amour de chaque jour. A nos projets et à cette nouvelle vie qui approche enfin !

A la famille de Guillaume et bientôt aussi la mienne...

A toi mémé,

J'aurais tant aimé que tu sois là pour ce moment particulier, tu aurais été si fière.

La vie en a décidé autrement.

Mon cœur et mes pensées sont toutes vers toi aujourd'hui.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ANNEXES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
I. GENERALITES ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	16
A. La moelle osseuse.....	16
1. Rôle physiologique	16
2. Sites de productions de la moelle osseuse.....	17
3. Le prélèvement de moelle osseuse : La ponction-aspiration ou myélogramme	18
B. Analyse cytologique.....	19
1. Préparation des frottis : méthodologie	19
2. Lecture du myélogramme	21
C. La cytométrie en flux : une technique de choix pour l'analyse de la moelle osseuse	23
1. Principe et fonctionnement.....	23
2. Différenciation des cellules hématopoïétiques (myéloïdes/lymphoïdes).....	27
3. Apport de la CMF dans l'étude des hémopathies malignes.....	35
D. Evaluation de l'hémodilution: revue de la littérature	37
1. Preuve de l'hémodilution	37
2. Evaluation de l'hémodilution	37
E. Valeurs de référence pour les sous populations médullaires	40
1. En cytologie	40
2. En cytométrie de flux.....	43
II. MISE AU POINT DE CRITERES CYTOMETRIQUES D'APPRECIATION DE LA PURETE MEDULLAIRE	46
A. Introduction.....	46
B. Matériels et méthodes	46
1. Patients.....	46
2. Prélèvements médullaires.....	47
3. Calcul de l'indice de pureté par la méthode d'Holdrinet	47
4. Analyse par cytométrie en flux.....	47
5. Analyse statistique	48
C. Résultats	49

1.	Etude de la corrélation entre sous-populations médullaires et dilution selon Holdrinet.....	49
2.	Stratégies de classification des moelles avec des paramètres cytométriques	53
3.	Intérêts du rapport GRIM/PNN	56
D.	Discussion	57
E.	Conclusion	58
III.	STANDARDISATION POUR UNE ETUDE OLIGOCENTRIQUE	60
A.	Organisation de l'étude	60
B.	Standardisation des conditions techniques	61
1.	Préanalytique selon les « Standard Operating Procedures » de France Flow/Euroflow	61
2.	Analytique.....	63
3.	Post analytique	65
IV.	DEFINITION DE VALEURS DE REFERENCES POUR LES SOUS POPULATIONS DE LA MOELLE OSSEUSE ..	66
A.	Introduction.....	66
B.	Publication.....	67
	CONCLUSION	87
	PERSPECTIVES.....	89
	ANNEXES.....	90
	BIBLIOGRAPHIE	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les compartiments de l'hématopoïèse (d'après (10))	17
Figure 2 : Les sièges de l'hématopoïèse au cours de la vie (d'après (11))	18
Figure 3 : Etalements médullaires par les techniques d'écrasement de grain et de frottis de sang (d'après (13))	20
Figure 4 : Conformation de l'optique de collecte : octogone pour le laser bleu et trigone pour les lasers rouge et violet du FACSCanto-II (d'après (1))	24
Figure 5 : Différents modes de représentation des données obtenues en CMF (d'après(19))	26
Figure 6 : Phénotype de la lignée granuleuse neutrophile au cours de sa maturation (d'après (23) et (24))..	29
Figure 7 : Phénotype de la lignée monocytaire au cours de sa maturation (d'après (23) et (24))	30
Figure 8 : Phénotype de la lignée érythroïde au cours de sa maturation (d'après (23))	31
Figure 9 : Corrélations entre différentes populations médullaires et l'indice de pureté d' Holdrinet (test de Spearman)	52
Figure 10 : Valeur de l'IP en fonction de la répartition de 106 moelles en 3 groupes selon les seuils fixés sur le rapport GRIM/PNN	56
Figure 11 : Réglage des voltages appliqués aux PMT	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Choix de l'anticoagulant pour chaque type de prélèvement (d'après (13))	19
Tableau 2 : Configuration du FACSCanto II « 4-2-2 » (d'après (20))	25
Tableau 3 : Différenciation des lymphocytes B (d'après (28))	32
Tableau 4 : Caractérisation phénotypique des populations identifiées par notre tube	34
Tableau 5 : Présentation synthétique de la classification OMS 2008	35
Tableau 6 : Récapitulatif des critères d'évaluation de l'hémodilution de la moelle osseuse retrouvés dans la littérature	39
Tableau 7 : Valeurs de référence du myélogramme en cytologie données en intervalles ou moyennes +/- SD (Standard déviation) en %	40
Tableau 8 : Influence de la technique d'étalement du frottis sur les valeurs de référence	41
Tableau 9 : Quantification des populations médullaires en CMF.	44
Tableau 10 : Relation entre populations médullaires et dilution selon Holdrinet : comparaison des coefficients de corrélations de Spearman entre notre étude et celle de Brooimans (5).....	52
Tableau 11 : Age moyen des patients pour chaque groupe de dilution médullaire selon Holdrinet	53
Tableau 12 : Répartition des échantillons de moelle en fonction de leur pureté, évaluée en CMF par le rapport GRIM/PNN et par la méthode d'Holdrinet (test de Fisher exact).....	54
Tableau 13 : Répartition des échantillons de moelle en fonction de leur pureté, évaluée en CMF par le taux d'érythroblastes et par la méthode d'Holdrinet (test du Khi2).....	54
Tableau 14 : Attribution de points en fonction de la pureté médullaire évaluée en CMF	54
Tableau 15 : Corrélation entre score CMF et dilution selon Holdrinet (test de Fisher exact)	55
Tableau 16 : Comparaison du score et du rapport GRIM/PNN pour l'évaluation de la pureté médullaire (test de Fisher exact)	55
Tableau 17 : Standardisation des cytomètres grâce aux billes Rainbow	62
Tableau 18 : Valeurs des voltages appliqués à chaque PMT afin d'obtenir des MFI dans l'intervalle cible donné par EuroFlow	62
Tableau 19 : Matrice de compensation avec les Compbeads® et les anticorps du tube 8 couleurs	64

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Classification des hémopathies selon l’OMS 2008.....	90
Annexe 2 : Déroulement de l’étude oligocentrique en vue de l’établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse.....	92
Annexe 3 : Fiche de liaison à joindre lors de l’envoi d’un « experiment » pour l’étude oligocentrique en vue de l’établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse	96
Annexe 4 : Réalisation de la maquette pour l’étude oligocentrique en vue de l’établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse.....	97
Annexe 5 : Aide à l’analyse de la maquette utilisée pour l’étude oligocentrique permettant l’établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse	102

LISTE DES ABREVIATIONS

APC : Allophycocyanin

BCR : B-Cell Receptor

CD : Cluster of Differentiation

CD34M : Myéloblastes CD34+

CMN : Cellules Mononuclées

CMF : Cytométrie en Flux

CNI : Cellules Non Identifiées

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

Cy7 : Cyanine 7

EB: Erythroblaste

FITC : Fluorescein Iso-Thiocyante

FSC : Forward Scatter

GB : Globule Blanc

GR : Globule Rouge

GRA : Cellules granuleuses totales

GRIM : Cellules granuleuses immatures

HG : Hématogone

IP : Indice de pureté défini selon la méthode de Holdrinet

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique

LB : Lymphocyte B

LBA : Liquide Broncho Alvéolaire

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LLC: leucémie lymphoïde chronique

LT : Lymphocyte T

MO : Moelle Osseuse

MDS : Myélodysplasie

MFI : Moyenne des intensités de fluorescence

NFS : Numération Formule Sanguine

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PE : Phycoerythrin

Per-CP : Peridinin Chlorophyll

PMT : Photomultiplicateur

PNB : Polynucléaire Basophile

PNE : Polynucléaire Eosinophile

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique

SPM : Sous Populations de la Moelle

SPM 8C : Tube d'analyse des sous populations de la moelle osseuse en 8 couleurs

SSC : Side Scatter

TCR : T-cell receptor

VB421 : Brilliant Violet 421

VB500 : Brilliant Violet 500

INTRODUCTION

La cytométrie en flux (CMF) s'est aujourd'hui imposée comme une technique de choix aussi bien pour quantifier les cellules hématopoïétiques que pour étudier leur différentes caractéristiques biologiques comme leur niveau de maturation, d'activation ou leurs fonctions, grâce à l'étude d'antigènes cytoplasmiques, d'antigènes de membrane ou du contenu en ARN et en ADN. Les quinze dernières années ont vu apparaître des avancées considérables aussi bien dans le domaine de l'instrumentation que dans la mise à disposition d'une large gamme d'anticorps et de fluorochromes. Toutes ces nouveautés ont largement amélioré la capacité à identifier les différentes lignées et les sous-populations cellulaires ainsi qu'à reconnaître les aberrations phénotypiques même celles présentes sur une toute petite partie de la population cellulaire analysée.

L'immunophénotypage par CMF est devenu un outil indispensable pour le diagnostic, le classement et le suivi des hémopathies malignes. Les caractéristiques phénotypiques et les anomalies observées ont été largement documentées dans de nombreuses hémopathies malignes ou désordres de l'immunité. Ainsi la nouvelle classification OMS 2008 prône une approche multiparamétrique lors du diagnostic et souligne l'intérêt majeur d'associer chacune des disciplines clinique, cytologie, immunophénotypage, génétique et biologie moléculaire pour définir les différentes entités clinico-biologiques.

La moelle osseuse est régulièrement investiguée car fréquemment le siège d'hémopathies. L'analyse en CMF s'appuie sur des panels d'anticorps qui dépendent de la pathologie recherchée. Cette pathologie n'est pas toujours connue, elle peut être différente de celle qui est à priori évoquée et plusieurs pathologies peuvent être associées. C'est pourquoi, nous avons développé au laboratoire une méthodologie avec un tube en 8 couleurs : CD3-FITC / CD10-PE / CD38-PerCP-Cy5.5 / CD19-PECy7 / CD36-APC / CD16-APC-H7 / CD34 VB421 / CD45-V500 destiné à détecter un grand nombre d'anomalies et orienter ensuite le choix des panels d'anticorps. Ce tube est complémentaire de l'analyse morphologique du myélogramme. Nous avons dans un premier temps validé la capacité de cette approche à compter 14 sous-populations myéloïdes (7) et lymphoïdes (7) normales ou pathologiques en comparant les résultats obtenus à ceux d'un frottis médullaire (1)(2). Notre objectif dans le travail actuel est d'établir des valeurs de référence en fonction de l'âge pour les différentes populations identifiables. Elles sont indispensables pour détecter ensuite des anomalies quantitatives en pathologie. Ces informations n'existent pas dans la littérature, sauf pour quelques populations cellulaires (au plus huit) (3)(4)(5) et sans considération de l'âge sauf pour une référence (4).

La première difficulté a été de sélectionner des moelles « normales ». En dehors des donneurs volontaires pour allogreffe, nous avons constaté l'impossibilité d'obtenir des prélèvements d'individus sains, sans pathologie et sans traitement. Bien que très intéressants pour ce travail, ceux-ci sont des adultes de moins de 60 ans et ne correspondent qu'à une seule tranche d'âge. Nous avons donc décidé d'établir ces références sur des moelles cytologiquement normales, comme cela est habituel dans la littérature (6)(7).

La seconde difficulté rencontrée est le problème de la dilution médullaire par le sang qui vient interférer sur les valeurs quantitatives des différentes populations. Son appréciation la plus « validée » est basée sur la méthode d'Holdrinet (8) qui nécessite une numération conjointe des GR et GB du sang et de la moelle sur un automate d'hématologie. Devant les difficultés que peut poser cette démarche en pratique, nous avons dans la première partie de notre travail, déterminé un paramètre d'évaluation par CMF uniquement, facilement applicable, adapté aux moelles normales aussi bien que pathologiques. Nous l'avons ensuite utilisé pour sélectionner les prélèvements peu ou pas dilués.

Dans la seconde partie de notre travail nous avons alors étudié 97 moelle osseuses cytologiquement normales et non diluées pour établir des valeurs de référence pour 16 populations (13 citées précédemment + 3 autres) pour 5 tranches d'âge, depuis le bébé jusqu'à l'adulte de plus de 70 ans.

Notre étude est l'étape ultime avant l'évaluation des capacités de ce tube en 8 couleurs à détecter des hémopathies dans la moelle osseuse. Elle a été conduite en oligocentrique, en collaboration avec les CHU de Saint-Etienne et de Lyon afin d'augmenter le nombre d'échantillons médullaires et de montrer la reproductibilité de la méthode. A l'heure où la qualité est au cœur des préoccupations des laboratoires de biologie médicale, nous avons choisi une approche standardisée des protocoles de marquage, d'analyse et de réglage des cytomètres. Cette approche s'inscrit ainsi dans une démarche de qualité selon les recommandations établies par un groupe d'experts européens (EuroFlow) et français (France Flow).

I. GENERALITES ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. La moelle osseuse

1. Rôle physiologique

a) Définition

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes assurant la production, le développement et la maturation des cellules sanguines à partir des cellules souches, permettant le renouvellement et l'adaptation aux besoins. Les cellules sanguines sont pour la plupart d'entre elles très différenciées, éléments terminaux et fonctionnels de lignées. Elles n'ont pas ou peu de possibilités de synthèse protéique et de division cellulaire (les hématies et les plaquettes n'ont pas de noyau). Cependant leur durée de vie est courte : quelques heures pour les polynucléaires, quelques jours pour les plaquettes, quelques semaines pour les hématies. L'hématopoïèse assure donc une production journalière d'environ 10^{13} cellules sanguines.

b) Organisation fonctionnelle de l'hématopoïèse

Dans le schéma général de l'hématopoïèse les cellules souches constituent le premier compartiment. Elles ont la capacité d'autorenouvellement et de totipotence : elles peuvent donner naissance à toutes les lignées myéloïdes (pour la cellule souche myéloïde) et lymphoïdes (pour la cellule souche lymphoïde). Il est possible d'évaluer par cytométrie le compartiment des CSH en mettant en évidence les cellules CD45+, CD34+, HLA DR-, CD38-, CD33- ne présentant pas de marqueurs de différenciation de lignée (Lin-) dans le sang circulant de patients avant collecte par cytaphérèse ou dans des produits de thérapie cellulaire ou dans la moelle osseuse (9).

Par des mécanismes complexes où interviennent l'environnement cellulaire et diverses cytokines, les cellules souches peuvent être stimulées et produire des progéniteurs : les CFU pour Colony - Forming Unit. Les CFU constituent le 2^{ème} compartiment de l'hématopoïèse. Ce sont des cellules programmées, multipotentes (CFU-GEMM) ou seulement monopotentes, capables d'une importante prolifération, mais ayant perdu la propriété d'autorenouvellement. Elles sont cultivables in vitro, et ont une croissance exponentielle. C'est à leur niveau qu'agissent les principales cytokines régulatrices de l'hématopoïèse. Elles sont CD34+, CD33+, CD38+ HLA-DR+, Lin-.

Le 3^{ème} compartiment est celui des lignées cellulaires morphologiquement identifiables : les précurseurs. Ces cellules sont celles observables au microscope sur un myélogramme.

Pour chaque lignée les cellules se différencient, acquièrent des fonctions spécialisées et une morphologie particulière pour donner naissance aux cellules matures observables dans le sang. Elles constituent le 4^{ème} et dernier compartiment.

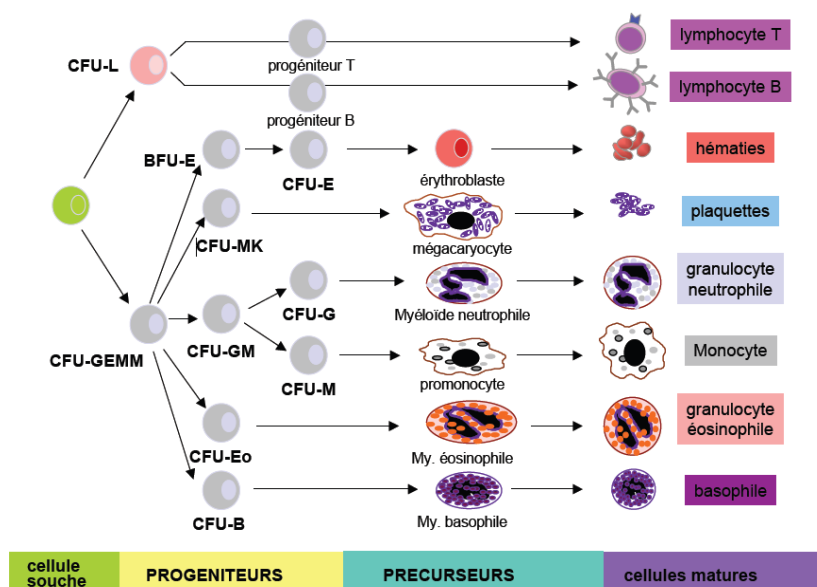


Figure 1 : Les compartiments de l'hématopoïèse (d'après (10))

CFU-L : Colony Forming Unit – Lymphoid; CFU-GEMM : Colony Forming Unit - Granulo-Erythro-Mono-Megakaryocyte; CFU-Eo (éosinophiles) et CFU-Baso (basophiles); BFU-E : Burst Forming Unit – Erythroid (les plus immatures) ; CFU-E : Colony Forming Unit –Erythroid (plus matures) ; BFU-MK : Burst Forming Unit – Megakaryocyte (les plus immatures) ; CFU-MK : Colony Forming Unit –Megakaryocyte (plus matures)

2. Sites de productions de la moelle osseuse

L'hématopoïèse fœtale lors de la vie intra-utérine s'effectue au niveau du tissu conjonctif embryonnaire jusqu'au 2^{ème} mois. Elle est hépatique et splénique du 2^{ème} au 6^{ème} mois et devient médullaire à partir du 4^{ème} mois, période à partir de laquelle les ébauches osseuses commencent à se développer. Après la naissance l'hématopoïèse normale est localisée exclusivement dans la moelle osseuse. Jusque l'âge de 5 ans tous les os ont une activité hématopoïétique. Ensuite cette activité va progressivement se limiter au niveau des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaques). En situations pathologiques il peut exister une hématopoïèse extra-médullaire qui se traduit alors par une augmentation de la taille de l'organe qui en est le siège.

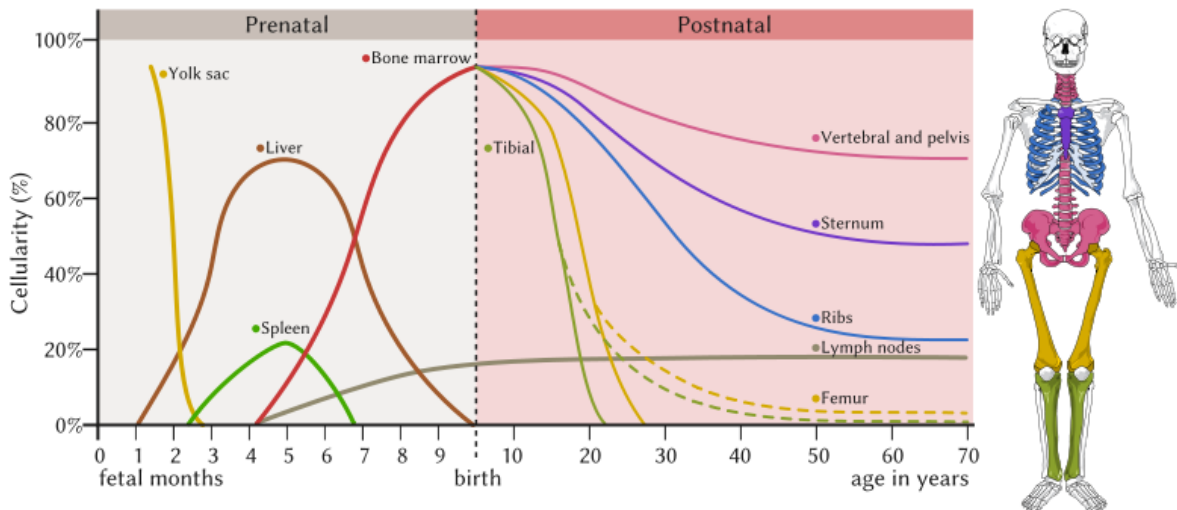


Figure 2 : Les sièges de l'hématopoïèse au cours de la vie (d'après (11))

3. Le prélèvement de moelle osseuse : La ponction-aspiration ou myélogramme

C'est un moyen d'investigation de routine en hématologie. Il permet d'effectuer des examens spécialisés comme l'analyse cytologique et cytochimique, l'étude immunophénotypique et cytogénétique, la culture de progéniteurs médullaires ou l'analyse en biologie moléculaire. (12)

a) Choix du site de ponction :

Le patient se positionne de décubitus dorsal (ponction sternale) ou ventral (ponction iliaque), puis le prélèvement est réalisé aux niveaux suivants :

- **Manubrium sternal**
- **Epine iliaque postéro-supérieure** : le site iliaque peut être choisi d'emblée par le préleveur car cette localisation comporte théoriquement moins de risques, ou lors de contre-indication à la ponction sternale, notamment chez les sujets avec antécédents de sternotomie, ou d'irradiation dans cette zone.
- **Crête iliaque antéro-supérieure** : ce site est plus rarement choisi pour une ponction car non dénué de risques (perforation osseuse, hémorragie rétro péritonéale).

Chez l'enfant, les prélèvements sont réalisés en localisation iliaque postérieure ou antérieure. Chez le bébé, il est possible de prélever l'extrémité proximale antérieure du tibia sous la grosse tubérosité.

b) La ponction

Elle se fait en utilisant soit un trocart soit une aiguille à ponction lombaire.

Quelle que soit la technique de ponction une seringue stérile de 20ml préalablement purgée est montée rapidement sur le trocart ou l'aiguille. L'aspiration de la moelle osseuse doit être brève car elle est douloureuse. Les aspirations ne doivent pas excéder 2 à 3ml afin d'éviter une hémodilution trop importante.

c) Répartition du prélèvement pour les différentes analyses

Le début du prélèvement, le moins dilué est réservé à l'analyse cytologique, soit par réalisation directement d'un frottis au lit du malade, soit par remplissage de 0,5 ml dans un tube EDTA. Il faut respecter le bon ordre des seringues : d'abord le matériel sur EDTA ensuite celui sur héparine. Le second prélèvement est pour la cytométrie en flux et le troisième pour la cytogénétique et la biologie moléculaire.

Méthode diagnostique	Anticoagulant			Attention	Transport
	EDTA	Héparine	Citrate		
Morphologie	+	-	+	EDTA préférable au citrate (moins de formations de caillots) Bien faire sécher les frottis avant envoi	≤ 24 h à température ambiante
Immunophénotypage	+	+	+	-	
Cytogénétique	-	+	-	Uniquement héparine	
Hybridation fluorescente in situ (FISH)	+	+	+	-	
Techniques de PCR	+	+	+	ARN instable si temps de transport prolongé	

+ peut être utilisé comme anticoagulant ; - est contre-indiqué pour la méthode diagnostique concernée.

Tableau 1 : Choix de l'anticoagulant pour chaque type de prélèvement (d'après (13))

B. Analyse cytologique

1. Préparation des frottis : méthodologie

Les étalements doivent être réalisés rapidement car le suc médullaire coagule vite. Le suc médullaire doit être séparé du sang en déposant quelques gouttes de prélèvement à partir de la seringue sur plusieurs lames légèrement inclinées.

a) Par écrasement de grains

Pour réaliser des étalements par la méthode dite d'écrasement de grains, il faut prélever avec l'extrémité d'une lame un grain du suc médullaire, le placer au tiers supérieur de la lame à bord rodés sur laquelle on s'apprête à faire le frottis, puis faire glisser une lame propre et parfaitement dégraissée parallèlement sur la première sans écraser trop fortement jusqu'à l'autre extrémité de la lame. Cinq à dix lames doivent être réalisées pour en garder en réserve et pouvoir effectuer des colorations complémentaires si nécessaire. Cette technique permet d'apprécier plus facilement la richesse médullaire et facilite le dépistage des cellules anormales. Cependant l'analyse de la morphologie médullaire peut s'avérer parfois plus difficile.

b) Par étalement de sang médullaire

La méthode par étalement de sang médullaire se fait à partir du dépôt d'une goutte de sang médullaire sur une lame à bords rodés en poussant à l'aide d'une autre lame inclinée à 40° comme lors de la réalisation des frottis sanguins. La répartition des éléments cellulaires sur ce frottis est comparable à celle du matériel analysé en CMF.

Les lames sont séchées à l'air sans ventilation ni chauffage ni agitation.

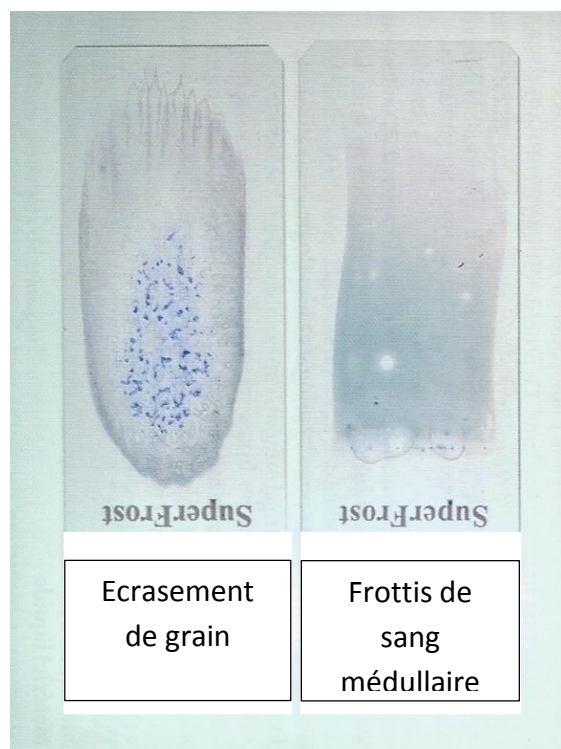


Figure 3 : Etalements médullaires par les techniques d'écrasement de grain et de frottis de sang (d'après (13))

c) Coloration

Une partie des lames est colorée au May Grünwald-Giemsa. Les autres sont en général gardées pour des colorations spécifiques : coloration de Perls ou pour des réactions cytochimiques (myéloperoxydase, estérase non spécifique). Enfin quelques lames peuvent être congelées pour être utilisées ultérieurement pour des techniques immunocytochimiques.

2. Lecture du myélogramme

a) Principe

Après ponction médullaire les étalements médullaires sont colorés selon la coloration de MGG.

La lecture des frottis médullaires comporte plusieurs étapes successives : (d'après (14))

- **Examen au faible grossissement** (100 X = oculaires 10 X et objectif 10 X) : Il s'agit d'une appréciation générale des frottis :
 - aspect des cellules étalées :
 - hétérogénéité (aspect habituel de la MO normale : pas de cellules morphologiquement dominantes)
 - homogénéité (les cellules semblent toutes identiques = MO envahie, par exemple une leucémie aiguë)
 - couleur dominante (MO « bleue » des anémies mégalo-blastiques ou du myélome multiple)
 - richesse globale (désertique, pauvre, hypoplasique, normale, hyperplasique) : Il s'agit ici seulement d'une appréciation qualitative. Il faut garder à l'esprit, qu'il est impossible d'augmenter artificiellement la densité en cellules sur un frottis, à l'inverse il est possible de la diminuer par hémodilution (aspiration d'un volume trop élevé de suc médullaire). Il est donc important d'observer le frottis sanguin en parallèle au faible grossissement

Attention, un prélèvement pauvre peut traduire une moelle diluée de sang ou bien une aplasie ou une fibrose médullaire. Il faut bien penser à apprécier la qualité du prélèvement.

- richesse en mégacaryocytes
- recherche des cellules rares de grande taille
 - normales : ostéoblastes, ostéoclastes, mastocytes, histiocytes

- anormales : cellules métastatiques, souvent disposées en placards ou amas, des cellules de maladie de surcharge constitutionnelle, des histiocytes hémophagocytants

On sélectionne les frottis les plus riches (non dilués), et les zones les mieux étalées, avec peu de cellules éclatées, que l'on observera au fort grossissement (souvent près des grumeaux de moelle).

- **Examen au fort grossissement** (grossissement final de 500 X à 630 X, l'objectif 100 X n'est habituellement utilisé que très ponctuellement, pour un détail précis). L'examen morphologique est d'abord qualitatif : on définit s'il existe ou non des anomalies morphologiques des diverses cellules.
- **Réalisation du décompte en % des éléments cellulaires (= myélogramme)**
 - Les mégacaryocytes, les cellules totalement éclatées ou très altérées, les cellules rares, qu'elles soient normales ou pathologiques ne sont pas comptés dans le pourcentage.
 - En pratique 200 cellules sont comptées en plusieurs régions de la lame, et si possible sur 2 ou plusieurs lames, donne une idée satisfaisante de la fréquence des populations. Cependant il est indispensable de compter beaucoup plus d'éléments et de répéter les numérations lorsqu'il existe une augmentation nette d'une catégorie de cellules dont le compte peut faire basculer le diagnostic (excès de blastes, plasmocytose, lymphocytose...)

b) Limites du myélogramme

L'analyse du myélogramme en cytologie reste l'examen de 1^{ère} intention en cas de suspicion d'une pathologie médullaire. La préparation de l'échantillon est rapide à mettre en œuvre, l'examen permet une évaluation de la richesse médullaire et une analyse morphologique fine de toutes les lignées.

Cependant, la différenciation des sous populations lymphocytaires et de leurs précurseurs (hématogones, lymphocytes B transitionnels, lymphocytes B matures, lymphocytes T, lymphocytes NK) est impossible. De plus la subjectivité de chaque lecteur, associée à des difficultés d'harmonisation des pratiques, et de fortes variations dans la répartition des cellules sur la lame (15) en font un examen peu reproductible (16)(17)(18). Cette variabilité est d'ailleurs prise en compte dans la table de Rümke (17) qui montre la variation des valeurs relatives d'une population leucocytaire selon le nombre de cellules comptées. D'autre part, malgré un temps conséquent passé pour la lecture du myélogramme par le

biologiste, la sensibilité de l'analyse reste faible, ceci étant lié à un nombre faible de cellules comptées (200 cellules sur deux lames différentes en pratique courante).

C. La cytométrie en flux : une technique de choix pour l'analyse de la moelle osseuse

1. Principe et fonctionnement

La cytométrie en flux (CMF) consiste en l'analyse multiparamétrique à la fois quantitative et qualitative de cellules en suspension individualisées dans un flux liquidien. Les cellules défilent à plus de 30 km/heure devant un laser et le cytomètre permet d'analyser jusqu'à 100000 cellules par seconde. Il s'agit d'une technique assez récente dont le développement s'est accentué ces 15 dernières années. C'est en 1934 que le premier article évoquant la CMF est publié dans *Science* par Moldavan. Viendra ensuite le développement des anticorps couplés à une molécule fluorescente dans les années 1940 puis dans les années 1960 l'apparition des premiers cytomètres.

Cette technique est particulièrement adaptée aux cellules en suspension et donc à l'analyse des liquides biologiques : sang, LBA, ascite, épanchement pleural, LCR, aspiration médullaire mais elle permet également d'analyser des cellules tissulaires après une étape mécanique et/ou enzymatique de dissociation.

a) Fonctionnement du cytomètre (19)

Les cytomètres fonctionnent selon des principes communs. Dans toute cette partie la description correspond à celui du laboratoire d'immunologie (BD FACSCanto-II).

Un cytomètre est constitué de 3 systèmes :

(1) Le système fluide

Il est basé sur le principe de focalisation hydrodynamique. Il s'agit d'un flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser. Grâce au principe d'hydrofocalisation qui consiste en l'application d'une surpression sur le liquide de gaine par rapport à l'échantillon, celui-ci est comprimé, et il y a création d'une veine liquide dont le diamètre étroit ne permet le passage que d'une cellule à la fois.

(2) Le système optique

La description du système optique correspond à celui du BD FACSCanto-II du laboratoire. L'optique d'excitation est composée de 2 ou 3 lasers. Trois types de signaux lumineux résultent de l'interaction entre le faisceau laser et les particules :

- **La diffusion aux petits angles : le Forward scatter (FSC)** collecté dans l'axe du faisceau qui correspond à la lumière diffractée et dont le signal est relatif à la taille de la cellule.
- **La diffusion aux grands angles : le Side scatter (SSC)** qui fait un angle de 90° avec le faisceau incident à la longueur d'onde 488 nm. Le signal recueilli est relatif à la structure (granularité...) de la cellule.
- **La fluorescence collectée à 90°** par rapport au faisceau lumineux incident, qui résulte d'un marquage par un ou plusieurs fluorochromes (8 couleurs avec le FACSCanto-II)

L'optique de collecte est composée de fibres optiques dirigeant la lumière émise (fluorescence) vers le block approprié d'analyse du signal (octogone ou trigone) et de filtres et miroirs qui sélectionnent et dirigent les signaux à l'intérieur du block octogone ou trigone vers le photomultiplicateur (PMT) approprié. Il existe plusieurs types de filtres : les filtres « passe bas » qui laissent passer toutes les longueurs $< x$ nm et réfléchissent les longueurs d'ondes $> x$ nm, les filtres « passe haut » qui agissent de manière inverse et les filtres « passe bande » qui se trouvent juste devant les détecteurs et permettent de sélectionner la longueur d'onde du fluorochrome recherché.

Exemple : Devant un détecteur qui collecte la fluorescence de la PE on placera un filtre 585/42 qui laisse passer les longueurs d'ondes de 585 ± 21 nm, soit comprises entre 564 et 606 nm.

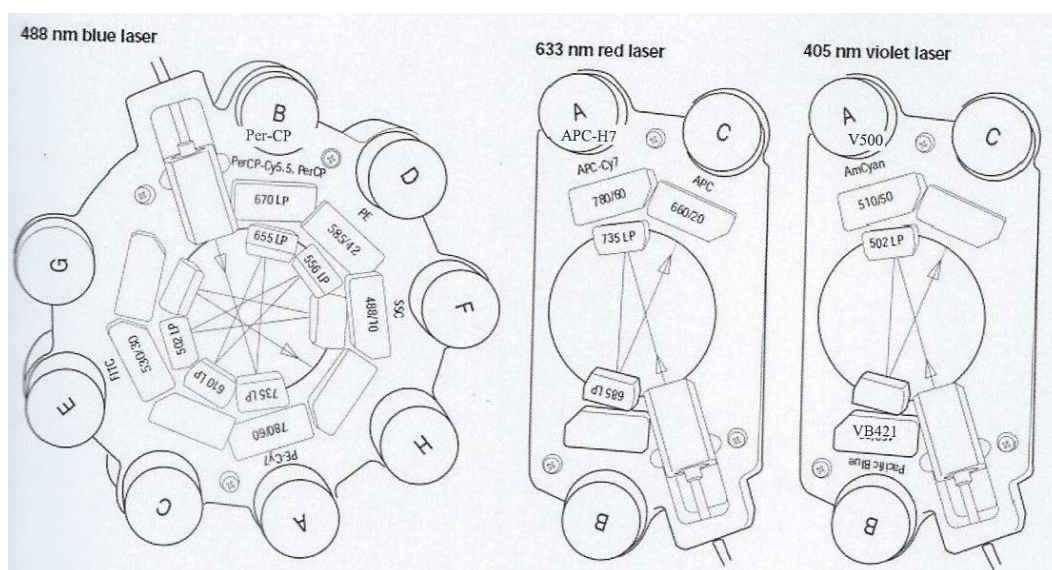


Figure 4 : Conformation de l'optique de collecte : octogone pour le laser bleu et trigone pour les lasers rouge et violet du FACSCanto-II (d'après (1))

Lasers (longueur d'onde d'excitation en nm et couleur)	Configuration du block optique de collecte	Position des PMT associés	Longueur d'onde des filtres (en nm)	Fluorochromes utilisés dans notre combinaison	Longueurs d'onde d'excitation et d'émission (en nm)	Anticorps couplés
488-bleu	Octogonale	A	750-810	PE-Cy7	496 785	CD19
		B	>670	PerCP-Cy5.5	482 695	CD38
		D	564-606	PE	496 578	CD10
		E	515-545	FITC	494 519	CD3
633-rouge	Trigonale	A	750-810	APC-H7	650 785	CD16
		C	650-670	APC	650 660	CD36
407-violet	Trigonale	A	502-535	VB500	415 500	CD45
		B	425-475	VB421	407 421	CD34

Tableau 2 : Configuration du FACSCanto II « 4-2-2 » (d'après (20))

Dans la dernière colonne du tableau 2 sont présentés les anticorps utilisés dans notre combinaison.

(3) Le système électronique

Il est composé de PMT capables de transformer le signal lumineux de photons en signal électrique constitué d'électrons auquel est associé un voltage. Pour le FSC qui est un signal de forte intensité, il n'est pas nécessaire d'avoir un détecteur de grande sensibilité comme un PMT et c'est donc une photodiode qui est utilisée comme détecteur. L'ensemble du signal électrique issu de l'émission de fluorescence lors de son passage devant le laser est appelée impulsion. Elle a une amplitude comprise entre 0 et 10 volts et une durée de quelques microsecondes : c'est le temps de vol.

b) Traitement de l'impulsion et digitalisation du signal

Le signal provenant de chaque détecteur est transformé en un signal informatique et traité par un circuit de compensation de fluorescence réalisé par soustraction analogique. Il est digitalisé 10 millions de fois par seconde (10 MHz) sur une échelle de 262 128 intervalles ou canaux pour la mesure de l'aire de l'impulsion. Cette technologie mise en place par la société BD Biosciences permet de répartir les données obtenues sur une échelle logarithmique à 5 décades ou en représentation bi exponentielle qui permet de mieux visualiser les populations dont le marquage est de faible intensité.

c) Présentation des résultats

Les résultats peuvent se présenter sous la forme d'histogrammes monoparamétrés, c'est-à-dire avec un paramètre en abscisses, l'ordonnée correspondant au nombre d'évènements par canal ou sous forme d'histogrammes biparamétrés où il y a un paramètre en abscisse et un en ordonnée. Dans ce dernier type de représentation, le nombre d'évènements correspond à un axe Z pouvant être représenté par la densité de nuage de points ou par des courbes de niveau.

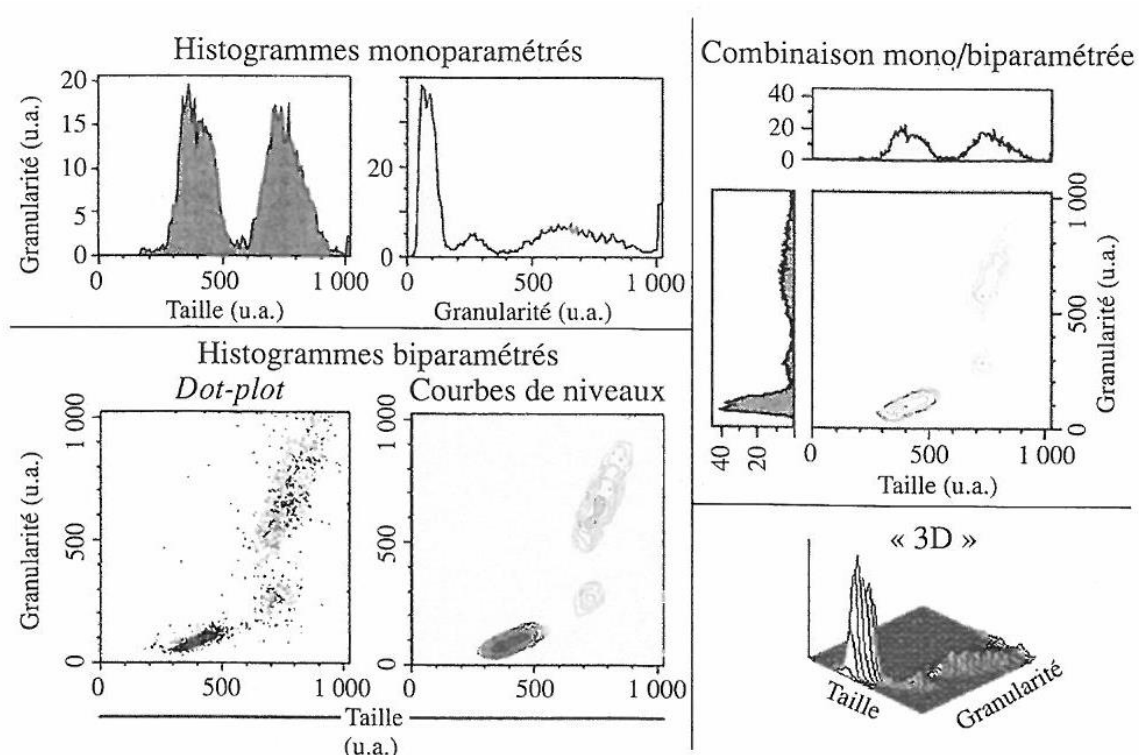


Figure 5 : Différents modes de représentation des données obtenues en CMF (d'après(19))

(1) Evaluation d'une fréquence au sein d'une suspension cellulaire

Cette problématique correspond à celle que nous avons pour la définition de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse. Il est important de définir clairement la population d'intérêt et la population de référence, c'est-à-dire celle à laquelle doit être rapporté le pourcentage. Dans notre travail il s'agit du « SPM » pour « Sous Populations de la Moelle » qui correspond à toutes les cellules acquises auxquelles ont été retirés les débris, les globules rouges et les plaquettes.

(2) Numération en valeur absolue

Il existe deux approches pour évaluer une population en valeur absolue dans une suspension cellulaire :

- **Technique en double plateforme** : l'analyse se fait sur deux automates : un compteur de cellules pour la numération en valeur absolue des leucocytes et un cytomètre pour l'évaluation du pourcentage des différentes populations. Cette technique est très largement utilisée notamment pour l'évaluation des sous populations lymphocytaires dans le sang. Elle donne des résultats moins précis que la technique en simple plateforme, puisqu'elle cumule les erreurs de mesure de deux automates.
- **Technique en simple plateforme** : l'évaluation en pourcentage et en valeur absolue se fait par CMF en utilisant des billes comme étalon interne. Cette technique est celle utilisée au laboratoire pour la numération des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ dans le suivi des patients VIH+. Elle ne sera pas développée ici car elle n'a pas été utilisée dans notre étude de moelle osseuse.

(3) Expression d'un antigène par une sous population

La présence d'un antigène sur une sous population peut s'exprimer soit en pourcentage de cellules positives pour ce marqueur, soit en niveau moyen d'expression. Lorsque le marquage est intense et bimodal, la présence d'une vallée permet de distinguer facilement la population négative de la population positive et de placer ainsi le seuil de positivité. En revanche lorsque l'expression d'un antigène est faible et unimodale, l'idéal est de considérer la population dans son ensemble et de calculer le rapport entre les moyennes de fluorescence (MFI) du marqueur considéré et du témoin isotypique : c'est le rapport de fluorescence (RFI). Lorsque le RFI est supérieur à 2 on considère que le marqueur est positif sur 100% des cellules.

Il existe également des techniques plus complexes de quantification évaluant précisément un nombre de sites antigéniques. Cette approche ne sera pas détaillée ici.

2. Différenciation des cellules hématopoïétiques (myéloïdes/lymphoïdes)

a) Expression du CD45 par les cellules médullaires normales

Toutes les cellules hématopoïétiques expriment le CD45 au cours de leur développement. L'expression de ce marqueur persistera sur les leucocytes tout au long de leur vie tandis que les érythrocytes et les plaquettes vont perdre son expression au cours de leur différenciation.(21)

Les progéniteurs peuvent être identifiés non seulement par leur expression de CD34 mais aussi par leur faible expression de CD45. Les progéniteurs de la lignée myéloïde montrent un signal plus intense en SSC que les progéniteurs de la lignée lymphoïde pour un niveau d'expression identique du CD45. Les cellules de la lignée érythroïde montrent une diminution de l'expression de CD45 depuis le stade d'érythroblaste jusqu'au stade d'érythrocytes matures. Les GR sont en effet CD45 négatifs. En revanche, les progéniteurs de la lignée lymphoïde B montrent une expression progressive de l'expression du CD45 avec leur maturation pour atteindre une expression maximale au stade de lymphocyte mature. Au niveau des cellules de la lignée myéloïde, les modifications de l'expression du CD45 avec la maturation sont moins marquées : elle reste faible pendant la majorité du processus et montre une faible augmentation lors du passage du métamyélocyte au polynucléaire neutrophile segmenté. Quant aux monocytes, on observe une augmentation marquée de l'expression du CD45 du monoblaste au monocyte.

Lors de la différenciation plasmocytaire l'expression du CD45 forte sur le plasmablaste décroît progressivement jusqu'à devenir très faible sur le plasmocyte mature.

Les lymphocytes T ne sont pas évoqués ici car ils ne se différencient pas dans la moelle. La différenciation des lymphocytes NK est quant à elle mal connue.

b) Caractéristiques immunophénotypiques des cellules dérivant du progéniteur commun CFU-GEMM (22)

(1) La lignée myéloïde neutrophile

Les CFU-G donnent naissance aux myéloblastes qui sont caractérisés par la diminution de l'expression du CD34, et une augmentation de celle du CD13 et du CD33.

Au stade promyélocyte, les cellules perdent l'expression de CD34 et du HLA-DR. Elles sont caractérisées par l'expression forte de CD13, et CD38 notamment. Une diminution importante de l'expression du CD13 et une augmentation des paramètres de Side Scatter (SSC) signent le passage du promyélocyte vers le myélocyte.

Ainsi les myélocytes sont caractérisés par une expression faible de CD13 et CD38 et montrent une augmentation de la densité d'expression du CD16. L'expression de CD33 commence à diminuer.

Le passage du myélocyte au métamyélocyte est caractérisé par l'augmentation d'expression du CD11b, du CD13 et du CD16. La densité d'expression du CD33 continue à diminuer.

La densité d'expression du CD11b, du CD13, et du CD16 continue d'augmenter pour atteindre un maximum au stade de polynucléaire neutrophile mature. Le CD10 apparait et la densité d'expression du CD33 devient alors faible.

Les polynucléaires basophiles matures ont les mêmes caractéristiques de FSC/SSC que les lymphocytes. Ils expriment faiblement le CD45 et se distinguent des blastes par leur phénotype CD123 high, HLA-DR-, CD13+, CD33low. D'autre part ils sont CD38 fort et CD16- (25).

Les polynucléaires éosinophiles ont un SSC plus élevé et une expression plus forte de CD45 que les polynucléaires neutrophiles. Ils sont CD16 négatifs ou CD16 faible ainsi que CD13 abaissé. Ils expriment fortement le CRTH2 (ou CD294) marqueur également trouvé sur les lymphocytes T helper de type 2 et les basophiles (26)(27).

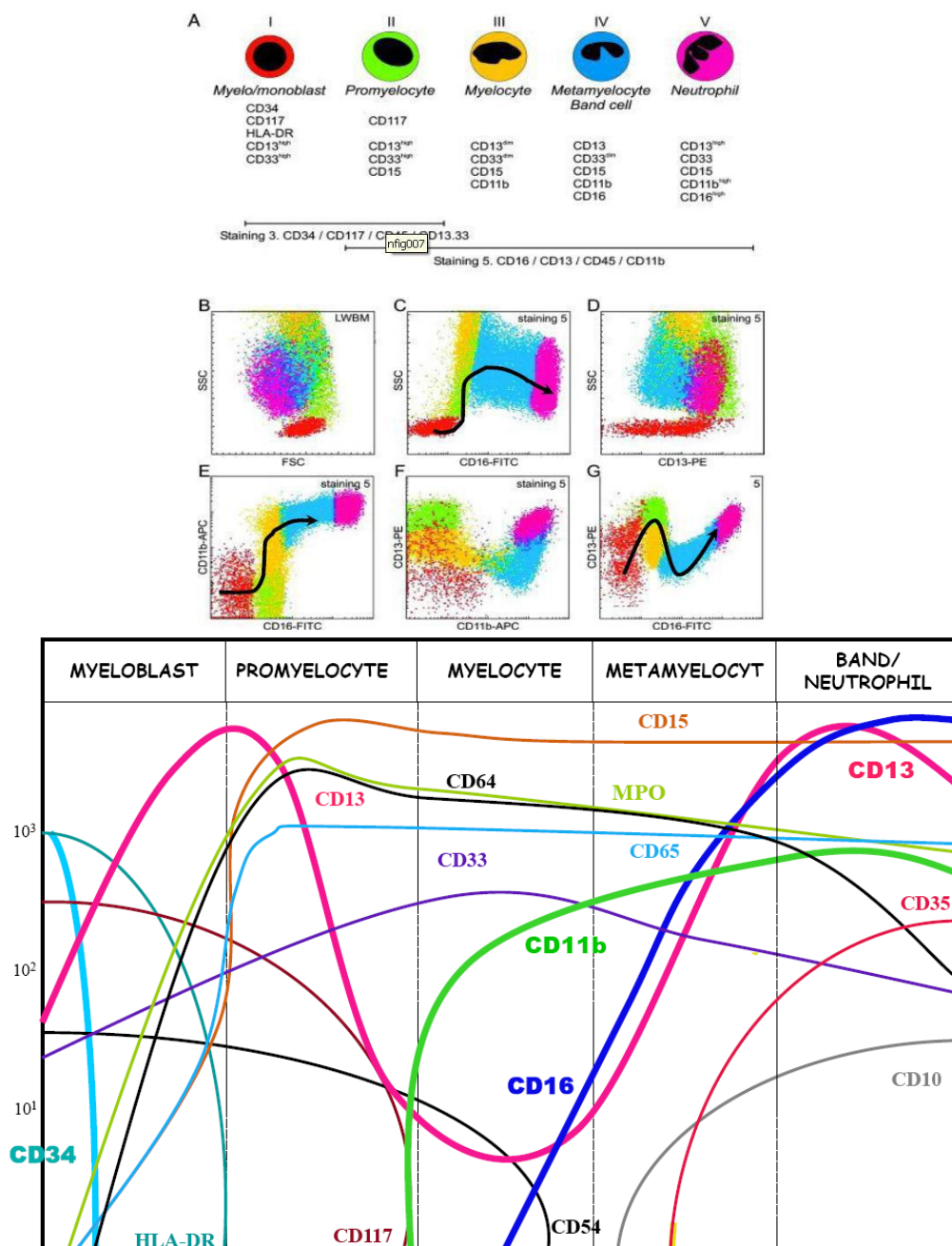


Figure 6 : Phénotype de la lignée granuleuse neutrophile au cours de sa maturation (d'après (23) et (24))

(2) La lignée monocyttaire

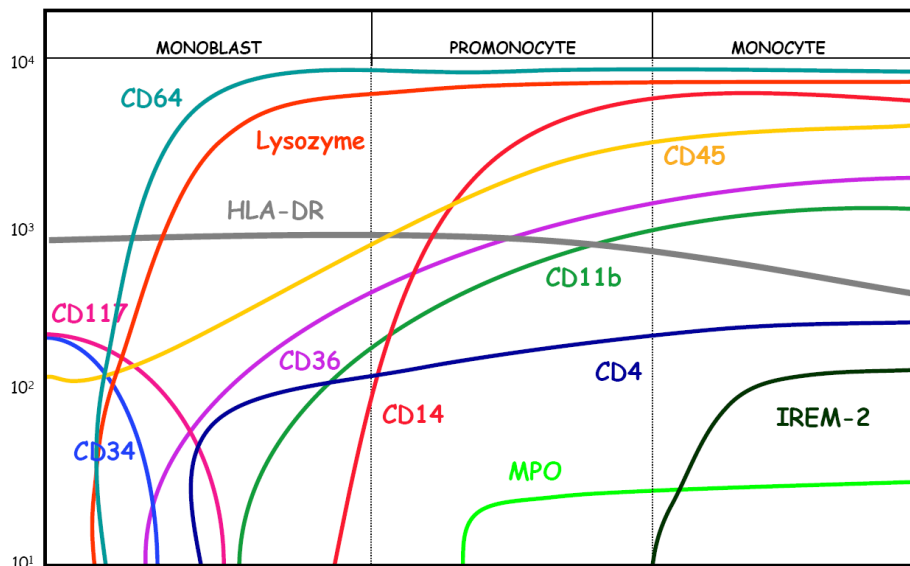
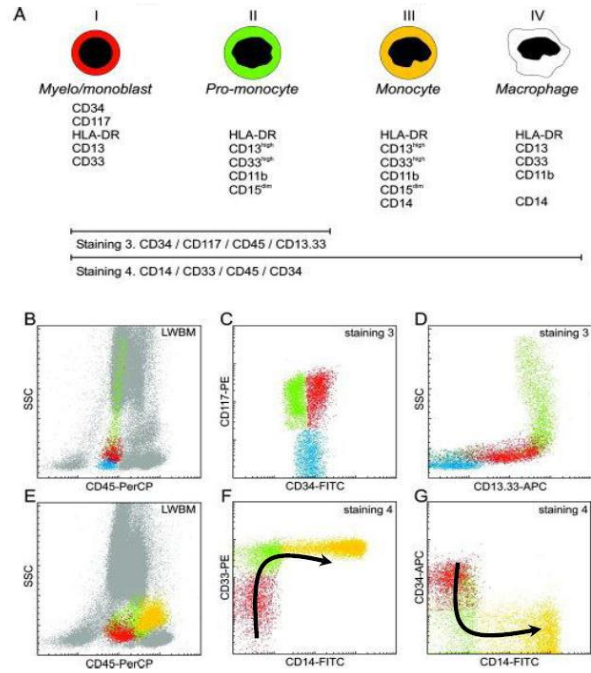


Figure 7 : Phénotype de la lignée monocyttaire au cours de sa maturation (d'après (23) et (24))

La CFU-M va donner naissance au monoblaste caractérisé par une absence d'expression de CD14 et une diminution de l'expression du CD34 qui devient rapidement négatif. Tout au cours du processus de maturation, on va observer une augmentation des densités d'expression du CD13, du CD33, du CD11b, du CD36 ainsi que du CD4 qui deviennent maximales au stade de monocyte mature. Les cellules de la lignée monocyttaire vont garder l'expression de HLA-DR tout au long du processus de maturation. L'intensité d'expression du CD45 augmente au fil de la maturation.

Le passage du promonocyte au monocyte est caractérisé par l'apparition de l'expression d'IREM-2 (CD300e).

(3) La lignée érythroïde

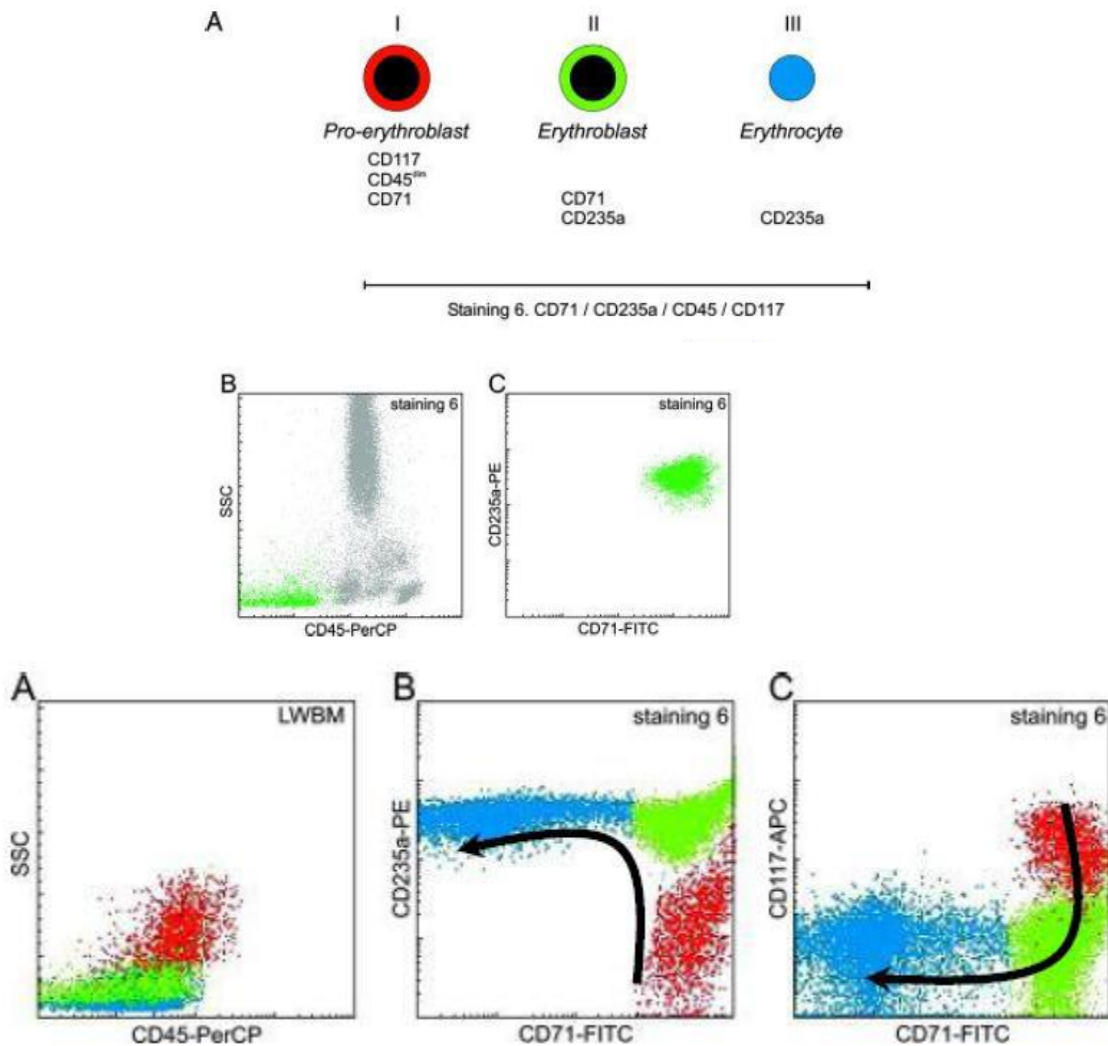


Figure 8 : Phénotype de la lignée érythroïde au cours de sa maturation (d'après (23))

Les CFU-E sont CD34+, CD117+, CD13+, CD33+, CD36+. Les cellules qui s'engagent dans la lignée érythroïde montrent une augmentation de l'expression du CD36 avec la diminution de l'expression du CD45, du CD34 puis du CD117. Les proérythroblastes sont caractérisés par une expression faible du CD45, du CD34, du CD117 et sont CD36+, CD71+, aussi CD13- et CD33-. Au cours de la maturation les densités d'expression du CD36 et du CD71 diminuent et toutes les cellules deviennent positives pour la Glycophorine A (CD235a). Le CD45 n'est plus exprimé au stade d'érythroblaste. En fin de maturation, les érythrocytes ne sont plus positifs que pour la Glycophorine A.

(4) La lignée plaquettaire

La CFU-MK va donner naissance au mégacaryoblaste, qui perd l'expression du CD45, du CD34, du CD33 et voit une augmentation de l'expression du CD36 et du CD61. Au stade mégacaryocyte les cellules acquièrent l'expression de CD41 et du CD42. Les plaquettes sont finalement CD41+, CD42+, CD61+ et CD9+. Ni les plaquettes, ni les mégacaryoblastes ne sont étudiés dans notre tube.

c) Caractéristiques immunophénotypiques de la lignée lymphoïde

(1) Maturation de la lignée lymphoïde B

stade	Précurseur B				Lymphocyte B				Plasmocyte
	pro-B précoce	pro-B tardif	pré-B	B immature	B transitionnel	B naïf	B activé	B mémoire	
CD34	■	■							
HLA-DR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CD19	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CD79 a/b	■ ic	■	■	■	■	■	■	■	■ ic
CD22	■ ic	■	■	■	■	■	■	■	■
CD20		■	■	■	■	■	■	■	■
CD24			■	■	■	■	■	■	■
CD21						■	■	■	■
CD10	■				■		■		■
CD38					■	■	■		■
CD179			■	■					
M			■ ic	■	■	■	■	■	■
D					■	■	■	■	■
A ou G							■	■	■ ic
K ou λ				■	■	■	■	■	■ ic
CD77							■		
CD27							■	■	■
CD138									■

ic= intra cytoplasmique en couleur kaki

+ : intensité d'expression faible, ++ : intensité d'expression modérée, +++ : intensité d'expression forte

en dégradé de rouge : les marqueurs pan-B

en vert : les marqueurs relatifs au BCR

en noir et gris : les autres marqueurs d'identification pertinents

Tableau 3 : Différenciation des lymphocytes B (d'après (28))

La différenciation des lymphocytes B commence dans la moelle osseuse à partir du progéniteur lymphoïde commun CFU-L CD34+. L'acquisition progressive de marqueurs pan-B et liés au récepteur pour l'antigène (BCR) permet d'identifier 3 grands stades dans la maturation du lymphocyte B :

- Précurseurs B : pro-B + pré pré-B + pré-B + B immature
- Lymphocytes B matures : B transitionnel + B naïf + B activé + B mémoire
- Plasmocytes

Les marqueurs d'appartenance à la lignée B (les pan-B) sont présents sur tous les lymphocytes B matures, ils peuvent être absents sur les précurseurs et peu ou pas exprimés sur les plasmocytes. Ce sont CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD79a et CD79b. Les lymphocytes B synthétisent des immunoglobulines (Ig) qui représentent le récepteur de l'antigène ou B-Cell Receptor (BCR). Chez les précurseurs les Ig sont absentes ou immatures, elles sont membranaires sur les lymphocytes B matures et intra cytoplasmiques pour les plasmocytes. Au stade pré-B il y a apparition du pré-BCR constitué d'une IgM intracytoplasmique ou membranaire et du CD179, sans chaînes légères kappa ou lambda. Le BCR au stade B immature est de type M Kappa ou M Lambda. (29)

Les hématogones correspondent aux précurseurs B (type 1 et 2) ainsi qu'aux B immatures (type 3). Les hématogones de type 1 sont CD19+, CD38 fort, CD10 fort, CD34+, et CD45 faible. Le passage au stade hématogone de type-2 se caractérise par une perte du CD34, une diminution de l'expression du CD10 et une augmentation de celle du CD45. Au stade B transitionnel CD45 a le même niveau d'expression que celui des cellules B matures, CD38 reste fort et CD10 positif. Le passage au stade B mature est marqué par la perte du CD10. CD45 est fort et l'expression de CD38 diminue progressivement jusqu'à devenir négatif.

(2) Maturation de la lignée lymphoïde T

Les lymphocytes T sont issus du progéniteur lymphoïde commun CFU-L CD34+ de la moelle osseuse. Leur différenciation se fait dans le thymus et ne sera pas abordée ici. Les T identifiés dans la moelle viennent du sang et sont reconnus spécifiquement par CD3.

(3) Maturation des lymphocytes Natural Killer (NK)

Les lymphocytes T sont issus du progéniteur lymphoïde commun CFU-L CD34+ de la moelle osseuse. Ils peuvent se différencier dans la moelle osseuse, le thymus et d'autres sites. Ils sont surtout présents dans le sang. Ils se caractérisent par l'expression de CD16 et CD56 qui sont chacun positifs sur 90% des NK, et à la différence des lymphocytes T n'expriment pas CD3.

d) Les cellules dendritiques

Tout comme les cellules souches, les cellules dendritiques sont très rares dans la moelle osseuse. Il en existe deux grandes familles : les cellules dendritiques myéloïdes (M-DC) et plasmacytoïdes (P-DC). Leur identification par CMF dans la moelle osseuse n'est pas standardisée ni réalisée en routine.

e) Les mastocytes

Les mastocytes sont très rares dans la moelle osseuse. Ils ont des paramètres de Side Scatter assez élevés et sont CD117 fort.

f) Anticorps utilisés dans le tube SPM pour l'identification des différentes sous populations médullaires

Sous populations	Marqueurs d'identification
Myéloblastes	CD34 + / CD45 faible / CD19- / SSC intermédiaire
Promyélocytes	CD 34- / CD16- / CD38 fort / CD45+ / CD10- SSC élevé
Myélocytes	CD16 +/- / CD38+/- / CD45+ / CD10- SSC élevé
Métamyélocytes	CD 16 intermédiaire / CD38 - / CD45+ / CD10- SSC élevé
PNN	CD16 fort / CD10+ / CD45+ / SSC élevé
PNE	CD16- / CD45 fort / CD10+ / SSC très élevé
PNB	CD16- / CD10- / CD38 fort / CD45 intermédiaire / SSC faible
Monocytes	CD36+ / CD45+ / SSC intermédiaire
Erythroblastes	CD36+ / CD45- / SSC faible ou intermédiaire
HG de type 1	CD19+ / CD38 fort / CD10 fort / CD45 faible / CD34+
HG de type 2	CD19+ / CD38 fort / CD10+ / CD45 intermédiaire / CD34-
B transitionnels	CD19+ / CD38 fort / CD10+ / CD45 fort
B matures	CD19+ / CD38 +/- / CD10- / CD45 fort
Lymphocytes T	CD3+ / CD45+
Lymphocytes NK	CD16+ / CD45+ / CD3- / SSC faible ou intermédiaire
Plasmocytes	CD19+ / CD38 très fort / CD10- / CD45 intermédiaire

Tableau 4 : Caractérisation phénotypique des populations identifiées par notre tube

3. Apport de la CMF dans l'étude des hémopathies malignes

Le myélogramme lu par un cytologiste averti reste l'examen de première intention en cas de suspicion d'hémopathie. Il est en effet très rapide à réaliser. C'est aussi sans doute la technique qui permet le mieux d'apprécier les anomalies qualitatives des cellules. Cependant cet examen reste peu reproductible. Il est en effet en partie subjectif, nécessite une solide expérience et ne permet de compter qu'un faible nombre de cellules parfois dans des zones qui ne sont pas représentatives de la distribution cellulaire globale. De plus il ne permet pas la différenciation des sous populations lymphocytaires.

C'est dans ce contexte que l'analyse par CMF prend toute son importance. Elle permet une analyse immunologique complémentaire de la morphologie comme préconisé dans la classification OMS 2008 qui distingue en effet trois catégories de tumeurs selon leur lignée d'origine (30) : myéloïde, lymphoïde, histiocytaire et dendritique (Tableau 5). La classification des cellules anormales dans une entité nosologique est une étape indispensable à la prise en charge optimisée du patient.

Lignée d'origine	Précurseurs immatures	Précurseurs matures
Myéloïde	Leucémie aigüe myéloïde	Néoplasies myéloprolifératives Syndromes myélodysplasiques Mixtes (myéloprolifératives/myélodysplasiques)
Lymphoïde	Leucémie / Lymphome lymphoblastique	Lymphome de Hodgkin Lymphome non hodgkinien B Lymphome non hodgkinien T/NK
Histiocytaire/dendritique	Tumeurs à cellules dendritiques plasmacytoïdes	Néoplasies hystiocytaires/dendritiques

Tableau 5 : Présentation synthétique de la classification OMS 2008

L'analyse en CMF est particulièrement intéressante dans l'exploration des situations suivantes :

- cytopénies périphériques
- lymphocytoses et monocytoses
- présence de cellules atypiques ou de blastes au myélogramme
- plasmocytose ou gammopathie monoclonale

- organomégalies et infiltrations tissulaires (peau, muqueuses, os)

La CMF a ainsi un intérêt pour le screening des cellules anormales, que ce soit au diagnostic (avec un seuil en routine qui dépend de la pathologie), ou en suivi avec une très grande sensibilité dans certaines hémopathies (seuil pouvant atteindre 10^{-5})(31)(32)(33). Elle permet notamment la recherche de maladie résiduelle après traitement dans les leucémies aiguës, les LLC et les myélomes.

Elle permet de définir l'appartenance à une lignée (T, B, myéloïde), et elle affirme le caractère clonal de la population étudiée : restriction d'une chaîne légère kappa ou lambda pour les lymphocytes B, perte d'un marqueur pan-T (CD2, CD7 ou CD5) ou expression homogène d'une famille V β du TCR pour les lymphocytes T. Les marqueurs les plus appropriés pour l'étude des différentes entités sont détaillés dans plusieurs articles faisant référence (34)(35)(36)(37).

D'autre part, elle permet de mettre en évidence des marqueurs pronostiques (*exemple* : expression du CD38, de ZAP-70 et survie des patients atteints de LLC (38)(39)), et d'étudier des cibles dans les traitements par anticorps monoclonaux (*exemple* : CD20 pour le Rituximab(40), CD52 pour l'Alemtuzumab(41)).

La CMF est ainsi devenue une discipline incontournable dans le domaine des hémopathies malignes. A ce titre un besoin de standardisation des pratiques s'est fait ressentir. La conférence de Bethesda de 2006 donne des recommandations consensuelles pour l'étude immunophénotypique des hémopathies. Elle précise ainsi :

- Les situations dans lesquelles un bilan par CMF doit être réalisé en fonction du tableau clinique présenté par le patient et des résultats de la Numération Formule Sanguine (NFS) (42)
- L'importance capitale d'une formation de qualité pour chaque catégorie de personnel du laboratoire de CMF, garantissant ainsi une prise en charge optimale du prélèvement de la phase pré analytique jusqu'à l'interprétation et la validation du résultat (43).
- Les panels d'anticorps qui doivent être utilisés en fonction de la pathologie recherchée et la manière de rendre les résultats (37)(36)(35).

D. Evaluation de l'hémodilution: revue de la littérature

1. Preuve de l'hémodilution

Le prélèvement de moelle est contaminé par du sang, ce qui a un impact sur l'évaluation du pourcentage des cellules (surreprésentation des cellules du sang, sous-représentation des cellules de la moelle). La détermination des valeurs de référence doit tenir compte de ce paramètre. Le phénomène de dilution des prélèvements de moelle par les cellules nucléées du sang périphérique est connu depuis longtemps. Déjà en 1936 Pontoni faisait état de ce problème. Diverses expériences utilisant des traceurs radioactifs : ^{32}P (44), ^{51}Cr ou ^{125}I (6) ont permis de mettre en évidence cette dilution.

2. Evaluation de l'hémodilution

Dès lors 2 types d'approches ont été mises en œuvre pour évaluer ce phénomène : définition de proportionnalité entre populations, de facteurs de corrections (8) (45) (46) ou de seuil sur une population particulière.

a) Définition de rapports de populations ou proposition de facteurs de corrections

En 1980 Holdrinet et son équipe (8) montrent que 97% des globules rouges retrouvés dans la moelle osseuse proviennent du sang périphérique. En partant de l'hypothèse qu'il existe une proportionnalité entre le phénomène décrit pour les globules rouges et les globules blancs, ils proposent une formule permettant de calculer le pourcentage de pureté d'une moelle :

$$\% \text{ de pureté} = \left(1 - \left(\frac{GRMO}{GRSg} \times \frac{GBSg}{GBMO} \right) \right) \times 100$$

Un facteur de correction visant à normaliser le compte de blastes dans le prélèvement dilué afin d'obtenir sa « vraie » valeur comme si l'on avait pu l'établir à partir d'une biopsie ostéo médullaire a aussi été proposé (45). La formule utilisée est la suivante :

$$\% \text{ de blastes normalisé} = \% \text{ de blastes de l'échantillon dilué} \times \frac{80\%}{\% \text{ dim CD16}}$$

La proportion de 80% au numérateur correspond à la proportion moyenne de cellules CD16 faible ou négatif retrouvée dans une biopsie et donc à la proportion de cellules granuleuses immatures que l'on s'attend à avoir si l'aspiration médullaire était pure. Le dénominateur correspond à la proportion de granuleux immatures retrouvée dans l'échantillon étudié.

Lee et al. (46) proposent de s'affranchir de la dilution sanguine en ne prenant en compte que les cellules médullaires immatures capables de division (myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et

érythroblastes) de façon à compter avec précision les myéloblastes dans le diagnostic des myélodysplasies.

Cette première stratégie qui vise à définir un facteur de correction, présente tout de même un certain nombre de limites. Le calcul de l'indice de pureté selon Holdrinet (8) n'est pas forcément réalisable parce qu'il implique d'une part qu'une numération de la moelle soit effectuée sur un automate d'hématologie et d'autre part, qu'un prélèvement de sang soit réalisé en parallèle le même jour. Si l'on utilise la stratégie proposée par Loken et al.(45), il est primordial de bien distinguer les cellules granuleuses immatures des polynucléaires éosinophiles eux aussi CD16- notamment sur la base de l'expression de CD45 et du SSC comme réalisé dans notre tube d'analyse. Il faut aussi s'assurer qu'aucune cellule granuleuse immature ou cellule blastique ne soit présente dans le sang. Enfin, dans certaines situations le facteur de correction n'est pas applicable. Il s'agit des cas de syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs avec expression aberrante du CD16, des patients présentant une hémoglobinurie paroxystique nocturne ou des maladies génétiques affectant l'expression du CD16 sur les cellules myéloïdes.

b) Définition de seuils

Intéressons-nous maintenant à la deuxième approche qui vise à définir des seuils sur certaines populations. Si la population choisie est une population médullaire (granuleux immatures, érythroblastes...) le seuil correspond alors à une proportion minimale qu'il faut dépasser pour s'assurer que la moelle est pure. Au contraire si la population choisie est une population préférentiellement d'origine sanguine (PNN, lymphocytes T...) le seuil correspond à une proportion maximale à ne pas dépasser pour s'assurer que la moelle est pure. Les PNN ont été choisis à plusieurs reprises, seuls avec un seuil de 30% (45), ou en association à d'autres critères (érythroblastes et lymphocytes T) avec un seuil à 40% (47). Des seuils ont été proposés à 15% (33) et 5% (47) sur les érythroblastes, toujours en association à d'autres marqueurs. Les lymphocytes T avec un seuil à 20% (33)(47), en association avec les érythroblastes (33) ou en association avec les érythroblastes et les PNN (47) ont aussi été retenus. Enfin la somme lymphocytes + monocytes avec un seuil à 30% a été utilisée (5). Ces seuils ont été définis en s'appuyant sur des observations personnelles des auteurs sans que des études validées aient été menées. En effet le seuil de 20% sur les lymphocytes T choisi dans l'article de Björklund et al. (33) a été défini en référence à l'article de Porwirt-MacDonald et al. (48) où le taux moyen de lymphocytes T exprimant le marqueur pan-T CD7 dans 35 échantillons de moelles osseuses de donneurs ou de patients avec un purpura thrombopénique idiopathique (PTI) est évalué à 10% +/- 3,6%, avec un intervalle allant de 5,2 à 20,4%. Dans l'étude de Garnad et al. (47) aucune justification n'est donnée

quant aux seuils retenus. Dans l'article de Loken et al. (45) le seuil fixé sur les PNN correspond à la moyenne plus deux écarts-type des taux de cellules CD16+ retrouvées dans des biopsies ostéo-médullaires (échantillon considéré comme une référence en terme de pureté).

c) Importance du volume de l'aspiration médullaire

La notion de volume de l'aspiration médullaire a été également proposée comme critère à prendre en compte dans l'évaluation de la pureté médullaire. En 1990, Batinic et al. (49) montrent sur des aspirations de moelle de donneurs sains que le 1^{er} ml prélevé était beaucoup moins contaminé par les cellules nucléées du sang périphérique (8% de contamination contre 20% pour les ml suivant). Brooimans et son équipe (5) définissent à 2 ml obtenus en une seule ponction par une seule aspiration le volume maximal prélevé pour obtenir un prélèvement représentatif de la richesse médullaire.

	Critères de pureté médullaire
Holdrinet et al. (8)	$\% \text{ de pureté} = \left(1 - \left(\frac{GRMO}{GRSg} \times \frac{GBSg}{GBMO} \right) \right) \times 100$
Björklund et al. (33)	Erythroblastes >15% et lymphocytes T < 20%
Loken et al. (45)	PNN matures <30% Ou utilisation d'un facteur de correction: $\% \text{ de blastes normalisé} = \% \text{ de blastes de l'échantillon dilué} \times \frac{80\%}{\% \text{ dim CD16}}$
Brooimans et al. (5)	Lymphocytes + monocytes < 30% Et % de pureté selon la méthode d'Holdrinet > 80%
Garand et al. (47)	PNN matures < 40% Et Erythroblastes >5% Et Lymphocytes T < 20%

Tableau 6 : Récapitulatif des critères d'évaluation de l'hémodilution de la moelle osseuse retrouvés dans la littérature

E. Valeurs de référence pour les sous populations médullaires

1. En cytologie

a) Par lecture au microscope

	Enfants de 0 à 2 ans	Adultes (> 18 ans)					
	Angers (14) <i>(tech. non précisée)</i>	Angers (14) <i>(tech. non précisée)</i>	EMC (50) <i>(étalement de grain)</i>	Atlas d'hémato (13) <i>(tech. non précisée)</i>	Lee et al. (46) <i>(étalement de grain)</i>	Shibata et al.(51) <i>(tech. non précisée)</i>	Yamamura et al.(52) <i>(tech. Non précisée)</i>
Lignée neutrophile							50+/-11,2
Myéloblastes	0,5-1	2-3	0-2	0-4	0-5	0,67+/-0,53	0,64+/-0,32
Promyélocytes	1-2	4-8	1-4	0-6	5-16	14,0+/-6,3	21,5+/-6,1
Myélocytes	3-6	5-15	10-15	0-7	12-29		
Métamyélocytes	5-15	15-20	10-20	4-16	/		
Polynucléaires	15-20	20-30	15-25	13-41	/	30,7+/-9,3	29,6+/-8,2
Lignée éosinophile	1-4	1-4	0-3	0-12	/	2,5+/-2,4	2,5+/-1,5
Lignée basophile	0,5-1	0,5-1	0-1	<1	/	0,24+/-0,4	0,30+/-0,31
Lignée érythroblastique	12-23	15-30	15-30	8-41	53-82	24,4+/-11,2	26,86+/-9,6
Proérythroblastes	0,5-2	1-2	/	0-3	/	/	/
Erythroblastes basophiles	1-3	4-8	/	0-3			
Erythroblastes polychromatophiles	5-8	6-10	/	1-4			
Erythroblastes acidophiles	6-10	4-10	/	7-31			
Lymphocytes	30-50	5-20	5-20	5-21			
Plasmocytes	0-0,5	1-3	0-3	0-3	/	/	
Monocytes	0,5-2	2-3	0-2	0-3	3,4+/-2,4	4,0+/-1,5	

Tableau 7 : Valeurs de référence du myélogramme en cytologie données en intervalles ou moyennes +/- SD (Standard déviation) en %

On retrouve peu de références sur les valeurs des sous-populations de la moelle osseuse établies par microscopie.

	Adultes (> 18 ans)	
	Fadem et al. (44)	
	<i>par écrasement de grain</i>	<i>sur frottis de sang médullaire</i>
Lignée neutrophile		
Myéloblastes	0,6	0,6
Promyélocytes	2,1	1,2
Myélocytes	15,7	8,4
Métamyélocytes	11,2	10,0
« Band cells »	21,7	23,4
Polynucléaires	7,6	20,8
Lignée éosinophile	/	/
Lignée basophile	/	/
Lignée érythroblastique	24,3	12,7
Lymphocytes	2,1	10,4
Plasmocytes	/	/
Monocytes	/	/

Tableau 8 : Influence de la technique d'étalement du frottis sur les valeurs de référence

Les valeurs proposées ont été établies à partir de moelles de donneurs (46)(44)(50)(14) ou de moelles cytologiquement normales pour les deux articles qui comparent les résultats obtenus pour le décompte d'un myélogramme par microscopie classique et par technique automatisée sur un automate d'hématologie (52)(51), ou de moelles de patients avec une numération sanguine normale pour l'âge (13). Elles concernent uniquement l'adulte sans différenciation d'âge sauf une référence (14) qui donne des valeurs chez l'enfant de 0 à 2 ans. On retrouve dans cette référence chez l'enfant une proportion plus importante de lymphocytes et une quantité moindre de blastes par rapport à l'adulte. Pour l'adulte, les valeurs obtenues par les différentes sources sont similaires sauf pour Lee et al. (46) où les intervalles proposés sont largement supérieurs, sans explication particulière.

En cytologie, 2 techniques sont utilisées pour la réalisation des frottis : par écrasement de grains ou par frottis de sang médullaire. Pour certaines sous populations la technique utilisée change de

manière assez importante les valeurs obtenues (44) (Tableau 8). On note en effet une différence importante sur les pourcentages de granuleux immatures et d'érythroblastes qui sont bien plus importants lors d'un frottis réalisé par étalement de grain. A l'inverse le pourcentage de lymphocytes est beaucoup plus faible. Ceci s'explique par la dilution du prélèvement de moelle par du sang périphérique lorsque l'on réalise le frottis à partir de sang médullaire. Le comptage effectué en CMF correspond plutôt à une lecture de myélogramme sur étalement de sang médullaire.

b) Par méthode automatisée

Actuellement le compte des cellules dans les myélogrammes se fait au microscope optique. L'analyse par des automates d'hématologie classiques était jusque-là impossible parce que les aspirations de moelle contiennent des particules de gras et des cellules à noyaux de taille et de forme variées. Les automates avaient également des difficultés à distinguer les érythroblastes des lymphocytes en raison d'une taille et d'une forme de noyaux similaires. La mise au point d'une technique de CMF en cinq dimensions dans les nouveaux automates d'hématologie, associée à la lyse membranaire des érythroblastes et à la coloration de leur ADN avec des substances fluorescentes (Stromatolyser NR™) a permis de mieux les différencier des lymphocytes. Les 5 paramètres utilisés sont les suivants :

- FSC qui donne des informations sur la taille de la cellule comme décrit au DC.1.
- SSC qui donne des informations sur la granularité de la cellule comme décrit au DC.1.
- SFL pour Side Fluorescence Light ou fluorescence latérale de la lumière qui indique la quantité d'ARN ou d'ADN que contient la cellule
- RF pour Radio Frequency et DC pour Direct Current qui en association à l'utilisation de réactifs spécifiques (un surfactant anionique qui cause des dommages dans les membranes cellulaires notamment celles des globules rouges et des plaquettes et un réactif sulfuré contenant des acides aminés qui fixe des composants intracellulaires et membranaires lipidiques des globules rouges) permet dans le canal de détection des granuleux immatures d'obtenir une image des érythroblastes. Les érythroblastes contenant moins de lipides que les globules rouges matures sont moins denses et donc en résulte un plus petit signal en RF.

Les réactifs de marquages sont des substances fluorescentes : Stromatolyser-4DST™ pour les leucocytes et Stromatolyser NR™ pour les érythroblastes.

Des corrélations satisfaisantes (coefficient > 0,7) avec l'analyse cytologique classique en microscopie optique ont été retrouvées pour les lymphocytes (sans distinction des sous-populations), les PNN, les PNE, les granuleux immatures (compte global uniquement), et les érythroblastes à

condition que l'échantillon soit lavé (51). A l'inverse, aucune corrélation n'a pu être démontrée pour les PNB, les monocytes, les blastes et les métamyélocytes (51)(52). Ainsi, ce type d'automate permet un compte des sous populations de la moelle osseuse en moins de 2 minutes. Cependant, ils apportent bien moins de renseignements que la lecture au microscope : pas de compte des différentes catégories de granuleux immatures ou d'érythroblastes et une numération des monocytes peu satisfaisante, nécessitant en plus un prétraitement de l'échantillon assez long. Par ailleurs, dans le cas de moelles osseuses pathologiques, l'identification des cellules malignes (52) et notamment des blastes chez les patients atteints de leucémies aiguës ou de myélodysplasies est difficile car les cellules prennent des tailles et des formes variables selon les hémopathies impliquées.

Les nouvelles approches par CMF sur des automates d'hématologie doivent donc encore être perfectionnées pour pouvoir être utilisées en routine au quotidien.

2. En cytométrie de flux

On retrouve seulement 3 articles dans la littérature, dont 2 très anciens (>20 ans), qui définissent par CMF des valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse (Tableau n°9).

Tout d'abord, on remarque que le nombre de sous populations identifiées est faible : respectivement 8 (4), 6 (3) et 5 (5) alors que le nombre d'anticorps utilisé est au contraire parfois très important. En effet 23 anticorps ont été utilisés pour permettre une identification de 8 sous populations dans l'étude d'Andreoni et al (4).

Ensuite, parce que les échantillons de moelles analysées proviennent de donneurs, les valeurs obtenues ne concernent qu'une population adulte d'âge restreint. Seule une très petite cohorte d'enfants (n=14) a été étudiée (4). Les valeurs obtenues sont similaires à celles des adultes en dehors des lymphocytes B et de leurs précurseurs ainsi que celles des progéniteurs où les proportions retrouvées sont significativement plus importantes. Au contraire, on retrouve dans l'étude cytologique qui s'intéresse aux enfants (14) une proportion moindre de blastes par rapport à l'adulte. Cette discordance peut probablement s'expliquer par le fait que la distinction lymphocytes / hématogones / blastes myéloïdes est délicate en cytologie, et qu'un certain nombre d'hématogones sont ainsi comptées avec les lymphocytes. La variation des valeurs normales pour les différentes sous populations en fonction de l'âge a bien été décrite dans le sang (6) suggérant qu'une telle étude serait grandement intéressante dans la moelle.

Référence	Stratégie de gating et réactifs utilisés	Echantillons	Valeurs obtenues (Mean +/- SD %)
Andreoni et al. 1990(4)	- SSC et FSC - 23 anticorps monoclonaux	48 moelles de donneurs sains (34 adultes et 14 enfants) Pureté non prise en compte	Lignée myéloïde : 31% +/-16% Monocytes matures : 6% Erythroblastes : 14% +/- 9% Lymphocytes : 45 +/- 14% - Lymphocytes T : 28% +/-10% - Lymphocytes B : 12% +/-8% - Pré-B :8% +/-7% - NK<5% Progéniteurs CD34+ : 7% +/-5% Cellules non identifiées : 6%
Terstappen et al. 1992(3)	-SSC et FSC - 1 anticorps monoclonal : le CD45 - 2 marqueurs de l'ADN (Thiazole orange et LDS-751)	50 moelles de donneurs sains Pureté non prise en compte	PNN : 72,3% +/- 5,1% PNE : 1,8% +/- 1,3% Monocytes : 2,8% +/- 1,2% Lymphocytes : 12,1 +/-3,6% Erythroblastes : 8,9% +/- 3,9% Réticulocytes : 2,2% +/- 0,88% Blastes + plasmocytes + PNB + mégacaryocytes : 1,6+/-1,2%
Brooimans et al. 2009(5)	- SSC et FSC - 4 anticorps monoclonaux	78 moelles de donneurs d'âge médian de 48 ans (intervalle entre 15 et 79 ans) Pureté > 80% selon a méthode de Holdrinet	Progéniteurs CD34+ : 1,8% +/-0,7% Granuleux immatures : 5,9% +/-2% Lymphocytes: 14,2% +/-5,8% Granuleux matures (PNN):73,4% +/- 7,6% Monocytes: 3,7% +/-1,2% Cellules non identifiées (plasmocytes, mégacaryocytes, débris, cellules non hématopoïétiques) : 2,8% +/-2%

Tableau 9 : Quantification des populations médullaires en CMF.

(SD pour Standard Deviation)

Enfin, seul un article (5) prend en compte l'impact de la dilution médullaire par le sang périphérique. En effet les valeurs pour cet article ont été établies sur des moelles dont l'indice de pureté est supérieur à 80% selon la méthode de Holdrinet (8). D'ailleurs la valeur retrouvée pour les lymphocytes est de 14% contre 45% dans l'article qui ne prend pas en compte la dilution (4) reflétant bien la contamination par les cellules dérivées du sang. Si l'on s'intéresse aux monocytes, une population équitablement répartie entre le sang et la moelle les valeurs obtenues sont semblables dans les 3 études : 6%(4) 2,8%(3) 3,7%(5). En revanche on pourrait s'attendre à avoir une proportion plus importante de myéloblastes dans l'étude qui prend en compte la dilution (5), puisque les moelles incluses sont plus pures et donc les populations spécifiquement médullaires présentes en plus grande proportion. Ils sont pourtant retrouvés à 1,8% (5) contre 7% (4) dans l'étude qui ne prend pas en compte la dilution. Cet écart peut probablement être expliqué par une stratégie d'identification différente entre les deux études.

II. MISE AU POINT DE CRITERES CYTOMETRIQUES D'APPRECIATION DE LA PURETE MEDULLAIRE

A. Introduction

Un des critères préalable à l'établissement de valeurs de référence est la définition de la pureté médullaire car la dilution par le sang périphérique modifie la fréquence des populations médullaires. L'objectif de ce premier travail est d'établir des critères en CMF pour l'évaluer. Comme il a été montré dans la partie bibliographique, il n'existe pas de méthode consensus, chaque auteur définissant un seuil plus ou moins arbitrairement. L'indice de pureté (IP) défini par Holdrinet semble cependant être la méthode qui fasse le plus référence. Cependant, elle n'est pas facilement applicable en routine car nécessite d'avoir une numération de la moelle osseuse sur un automate d'hématologie et une numération formule sanguine du même jour. Nous avons donc recherché des paramètres cytométriques afin de pouvoir nous en affranchir. Nous nous sommes intéressés aux populations présentes majoritairement dans le sang d'une part et à celles présentes majoritairement dans la moelle d'autre part. Nous sommes partis du principe que moins il y a de cellules « médullaires » et plus il y a de cellules « sanguines » plus l'hémodilution est importante:

- Populations uniquement présentes dans la moelle osseuse : érythroblastes, hémotogones, plasmocytes, granuleux immatures (GRIM), myéloblastes CD34+.
- Populations exclusivement ou préférentiellement présentes dans le sang : lymphocytes T CD3, PNN.

Nous avons donc cherché les paramètres pertinents qui permettent de définir un seuil qui tranche entre moelle pure ou diluée, en prenant comme référence l'indice de pureté de Holdrinet.

B. Matériels et méthodes

1. Patients

Un total de 106 patients provenant du CHU de Grenoble dont 61 hommes et 45 femmes d'âge moyen 49 ans ont été inclus dans l'étude. Ils ont été inclus de manière prospective entre Mars 2014 et Janvier 2015.

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- Existence d'un prélèvement de sang réalisé le même jour que le prélèvement de moelle
- Absence de cellules pathologiques mises en évidence en cytologie ou en CMF

- Absence d'anomalies qualitatives mises en évidence en cytologie (notamment absence de signes de myélodysplasie)
- Caryotype médullaire et biopsie ostéo-médullaire normaux s'ils sont réalisés
- Absence d'antécédents d'autogreffe ou d'allogreffe chez les patients

2. Prélèvements médullaires

Chaque prélèvement est constitué d'environ 0,5 ml d'une aspiration de moelle osseuse collectée dans un tube plastique avec anticoagulant (EDTA) utilisé en routine : BD Vacutainer® 4ml K2E. L'analyse par CMF est ensuite réalisée dans les 8 heures.

3. Calcul de l'indice de pureté par la méthode d'Holdrinet

Les prélèvements de moelle sont dilués au 1/10^{ème} dans du PBS avant d'être passés sur un automate de cytologie, l'ABX MICROS 60, pour qu'une numération soit effectuée.

Les valeurs des globules rouges et leucocytes du sang sont obtenues par mesure sur un échantillon sanguin du patient prélevé dans le même type de tube que celui utilisé pour recueillir l'aspiration médullaire. Le prélèvement sanguin datant du même jour que celui de la moelle est passé sur l'automate de cytologie hématologique : SYSMEX XE-2100 ou SYSMEX XE-5000 afin qu'une numération soit effectuée.

L'indice de pureté est ensuite calculé selon la formule décrite par Holdrinet :

$$\text{Indice de pureté (\%)} = \left(1 - \left(\frac{GRMO}{GRSg} \times \frac{GBSg}{GBMO} \right) \right) \times 100$$

4. Analyse par cytométrie en flux

a) Panel d'anticorps

CD3-FITC (5µl) (SK7 ; Mouse IgG1, κ ; Ref 345763 ; BD Pharmingen™), **CD10-PE** (5µl) (HI10a ; Mouse IgG1, κ ; Ref 332776 ; BD Pharmingen™), **CD38-PerCP-Cy5.5** (5µl) (HIT2 ; Mouse IgG1, κ ; Ref 551400 ; BD Pharmingen™), **CD19-PE-Cy7** (5µl) (SJ25C1 ; Mouse IgG1, κ ; Ref 341113 ; BD Pharmingen™) ou **CD-19-PE-Cy7** (5µl) (J3-J119 ; Mouse IgG1, κ ; Ref IM3628 ; Beckman Coulter), **CD36-APC** (10µl) (CB38 ; Mouse IgM, κ ; Ref 550956 ; BD Pharmingen™), **CD16-APC-H7** (5µl) (3G8 ; Mouse IgG1, κ ; Ref 560195 ; BD Pharmingen™), **CD34-BV421** (5µl) (581 ; Mouse IgG1, κ ; Ref 562577 ; BD Pharmingen™), **CD45-V500** (5µl) (HI30 ; Mouse IgG1, κ ; Ref 560777 ; BD Pharmingen™)

b) Marquage des cellules

Le marquage est réalisé par incubation de 50 µl d'un échantillon de moelle de concentration en globules blancs comprise entre 10 et 20 G/l avec la combinaison d'anticorps décrite précédemment durant 15 minutes dans le noir, à température ambiante. En cas de richesse supérieure à 20 G/l, une dilution dans du PBS sera réalisée afin d'ajuster la concentration cellulaire. En cas de concentration inférieure à 10 G/l, le volume de moelle marqué est doublé à 100 µl. La lyse des globules rouges et le lavage de l'échantillon sont réalisés avec la BD FACS™ Lysing solution et du PBS (Gibco by lifetechnologies) grâce à l'appareil BD FACS Lyse/Wash Assistant. Les Anticorps peuvent être ajoutés individuellement ou un prémix valable durant 7 jours peut être utilisé.

c) Acquisition des données

L'acquisition a été réalisée en utilisant un FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) équipé de 3 lasers et 8 canaux de fluorescence. Un minimum de 30 000 évènements est acquis afin de s'assurer d'une sensibilité d'au moins 10^{-3} . Une population étant définie par un cluster d'au moins 20 points, 30 000 évènements acquis garantissent ainsi une sensibilité de 7×10^{-4} (20/30 000).

d) Analyse des données

L'analyse est réalisée grâce au logiciel BD FACS Diva Software version 6. selon le protocole établi au laboratoire(1)(2). La méthode d'analyse est détaillée dans l'Annexe 5.

5. Analyse statistique

La comparaison entre l'indice de pureté défini par Holdrinet et les paramètres candidats pour la définition de nouveaux critères de pureté de la moelle a été faite par calcul de coefficients de corrélation Rho selon Spearman. Les différences sont considérées comme significatives pour une p-value inférieure à 0,01.

Des tests du Khi2 ou de Fisher exact (en cas d'effectifs attendus inférieurs à 5) ont été réalisés pour comparer la méthode de Holdrinet à celles testées dans cette étude pour caractériser la pureté médullaire. Les deux méthodes seront considérées comme comparables pour une p-value inférieure à 0,01.

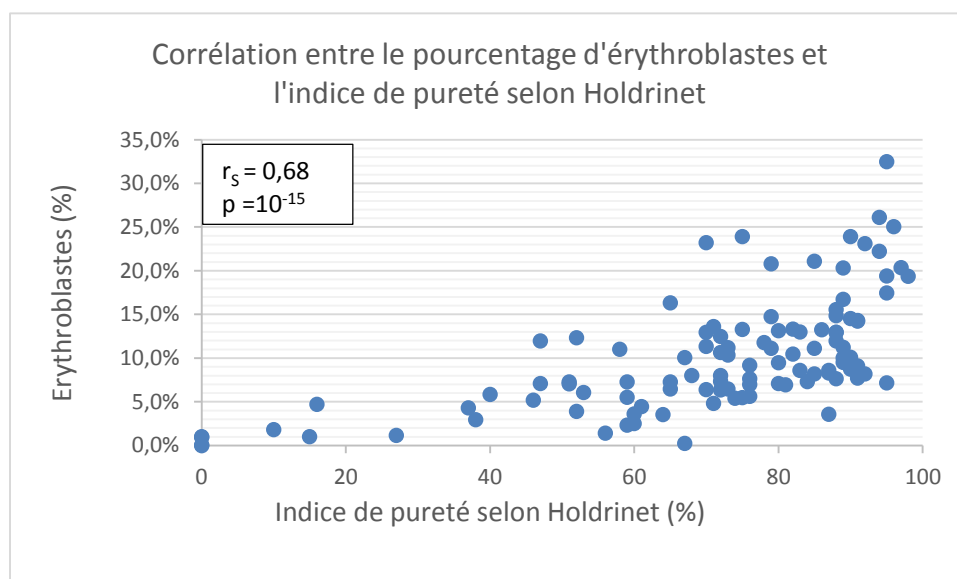
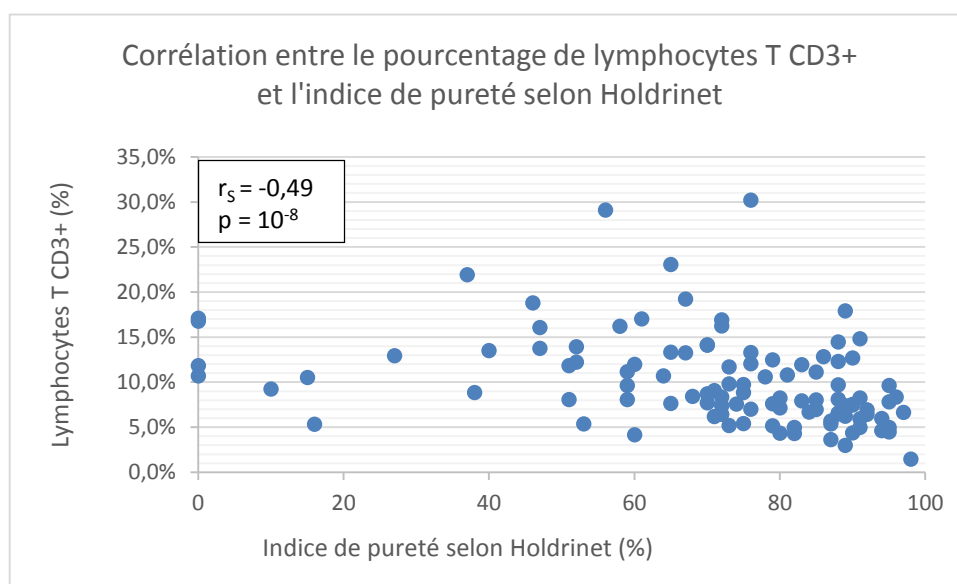
Les calculs ont été réalisés grâce au site de statistiques en ligne Biosta TGV utilisant lui-même le logiciel de statistiques R (53).

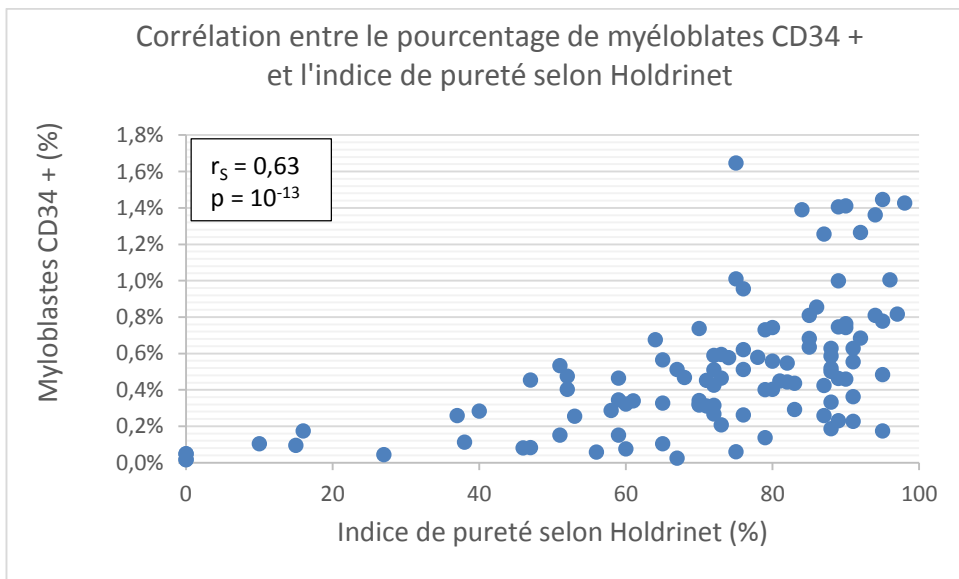
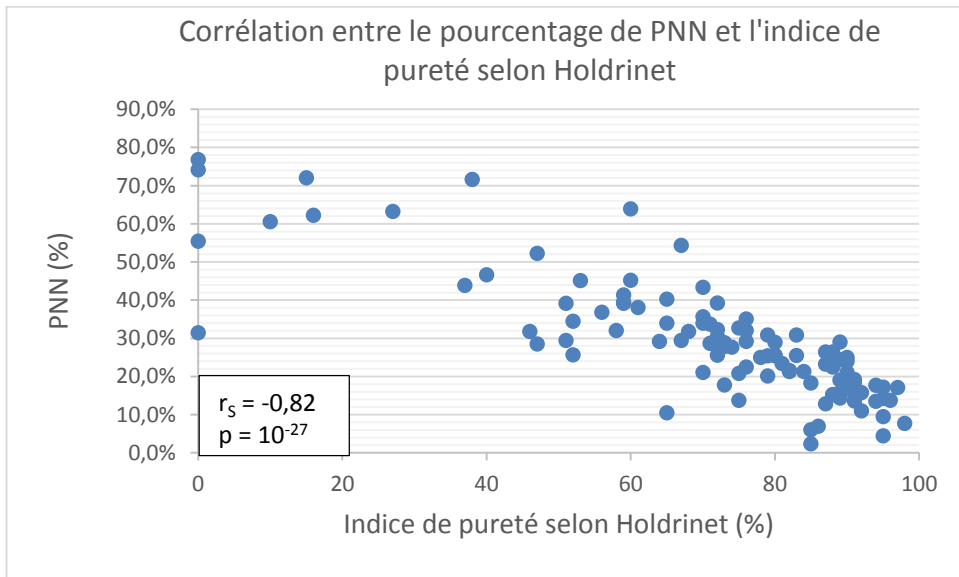
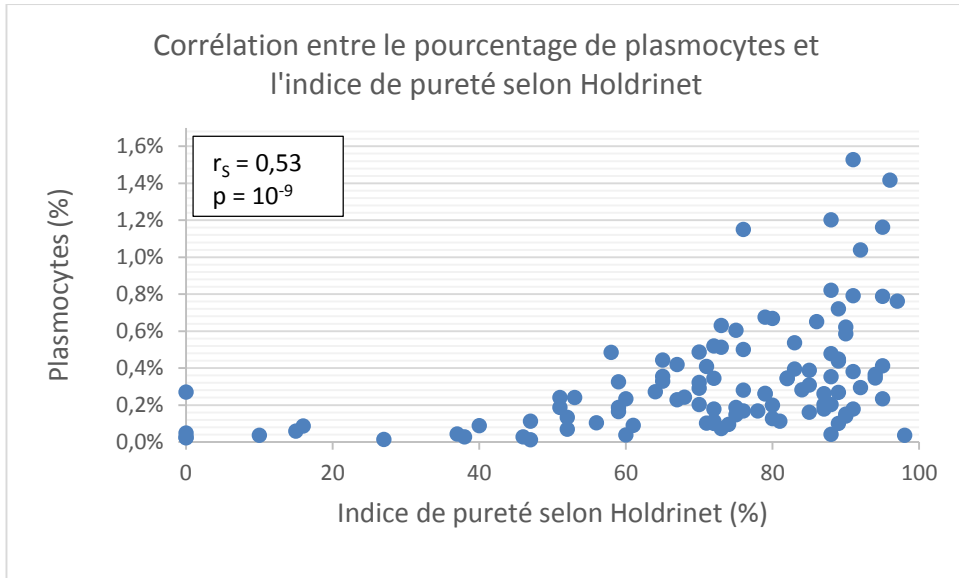
La présentation de la répartition des échantillons pour chacun des paramètres étudiés dans plusieurs groupes est faite dans Excel 2013 par la réalisation de boîtes à moustaches.

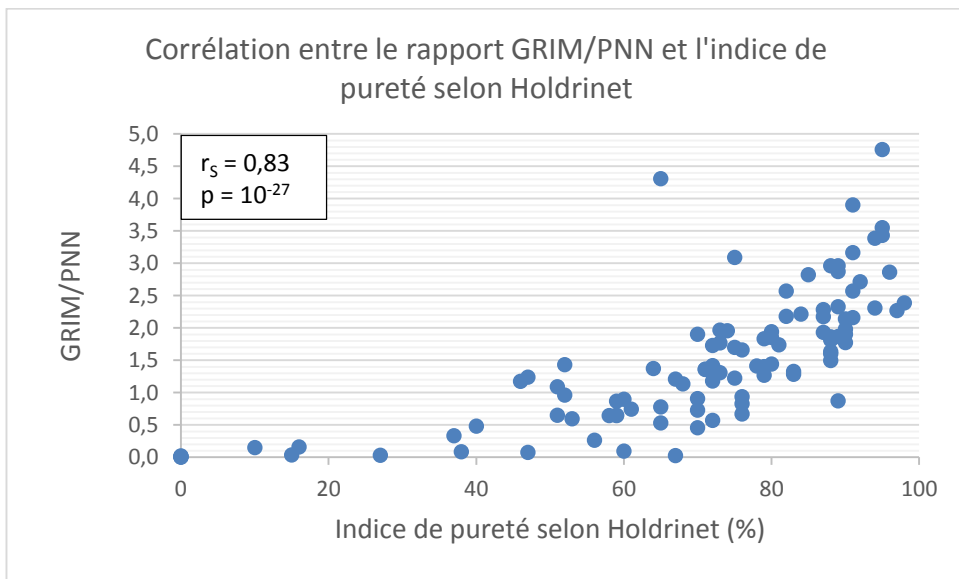
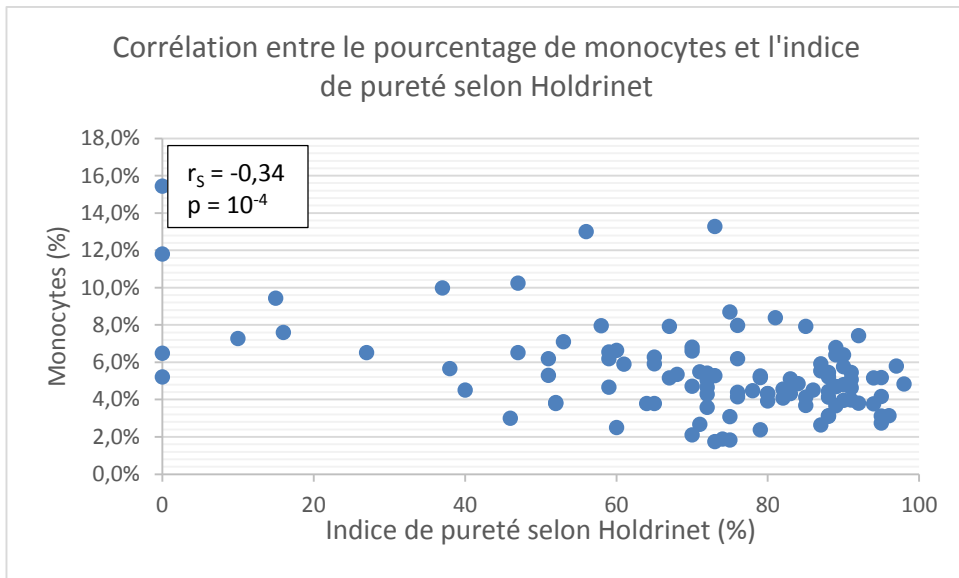
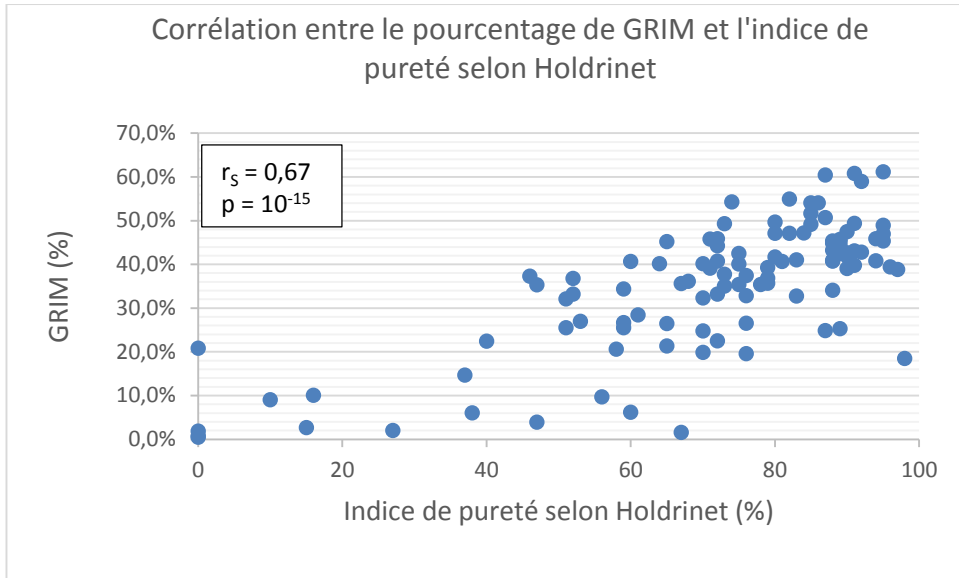
C. Résultats

1. Etude de la corrélation entre sous-populations médullaires et dilution selon Holdrinet

On identifie tout d'abord une ou des populations qui soient représentatives de la pureté (population exclusivement présente dans la moelle osseuse) ou de la dilution médullaire (population préférentiellement présente dans le sang). Pour chacune d'entre elles a été recherché une éventuelle corrélation entre leur fréquence et l'indice de pureté de Holdrinet par un test de Spearman. Le calcul proposé par Loken et al. a également été testé (45).







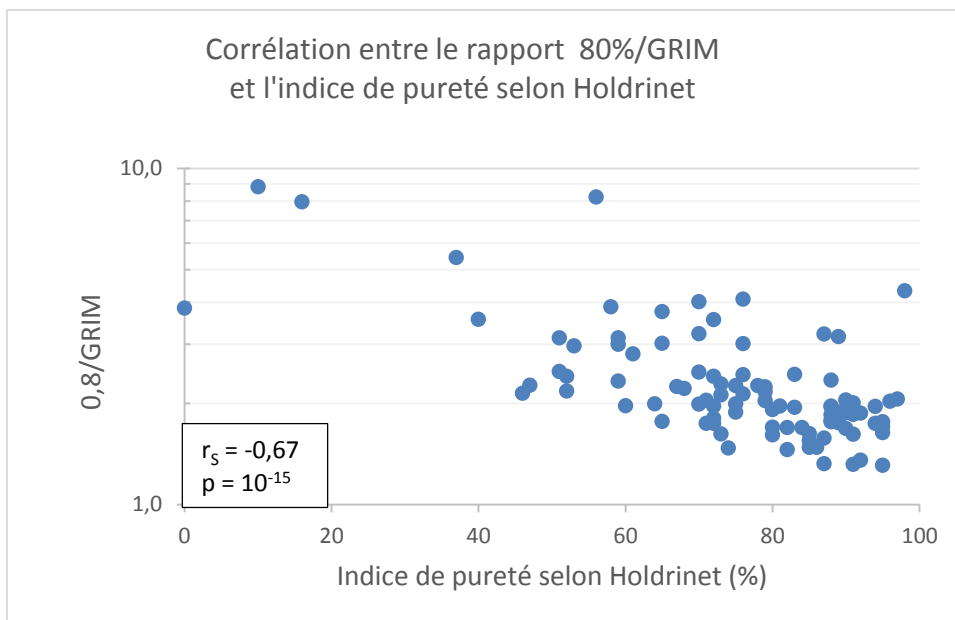


Figure 9 : Corrélations entre différentes populations médullaires et l'indice de pureté d' Holdrinet (test de Spearman)

Nos résultats montrent qu'il y a une corrélation entre toutes ces données et l'IP selon Holdrinet ($p < 0.01$). Les plus fortes concernent les PNN et le rapport GRIM/PNN ($r_s > 0,8$), puis les EB, les GRIM, le paramètre « 80%/GRIM » (45), CD34M ($0.8 > r_s > 0,6$). Pour les T CD3, les plasmocytes et les monocytes, la corrélation est faible ($r_s \leq 0,5$). Ces corrélations sont comparables à celles obtenues dans la littérature pour les mêmes populations (Tableau 10 et(5)).

Population étudiée	Rho de Spearman obtenu dans notre étude	Rho de Spearman obtenu dans l'article de Brooimans et al.(5)
T CD3	-0,49	-0,63
Monocytes	-0,34	-0,59
PNN	-0,82	/
Granuleux immatures (GRIM)	0,67	0,6
Myéloblastes CD34 +	0,63	0,67
Erythroblastes	0,68	/
Plasmocytes	0,53	/
GRIM/PNN	0,83	/
80%/GRIM	-0,67	/

Tableau 10 : Relation entre populations médullaires et dilution selon Holdrinet : comparaison des coefficients de corrélations de Spearman entre notre étude et celle de Brooimans (5)

2. Stratégies de classification des moelles avec des paramètres cytométriques

a) Définition de seuils sur le rapport GRIM/PNN et sur le pourcentage d'EB

Pour classer les moelles en fonction de leur pureté sur des critères cytométriques nous décidons de les répartir en trois groupes en fonction de l'indice de pureté (IP) selon Holdrinet, et de rechercher des seuils discriminants pour chacun des paramètres retenus :

- Groupe 1 : moelles très pures : $IP \geq 70\%$
- Groupe 2 : moelles de pureté intermédiaire : $50\% \leq IP < 70\%$
- Groupe 3 : moelles diluées : $IP < 50\%$

Le Tableau 11 montre l'âge des patients en fonction de la répartition dans ces groupes. Il existe une tendance à observer des patients un peu plus âgés dans le groupe des moelles très diluées, mais peu importante.

	IP < 50%	50% ≤ IP < 70%	IP ≥ 70%	Total
Nombre de patients	14	20	72	106
Age moyen (min-max) en années	62 (1-91)	48 (3-86)	47 (<1-94)	49 (<1-94)

Tableau 11 : Age moyen des patients pour chaque groupe de dilution médullaire selon Holdrinet

Parmi tous les paramètres de cytométrie analysés, deux ont été sélectionnés :

Le rapport GRIM/PNN a été retenu pour 2 raisons:

- il montre la plus forte corrélation avec la pureté selon Holdrinet ($r_s = 0.83$)
- il est le seul à être indépendant d'un envahissement de la moelle par une population pathologique. Le % de PNN a une aussi forte corrélation, mais sera diminué dans ces conditions, indépendamment d'une dilution médullaire.

Visuellement, sur le graphe de corrélation entre GRIM/PNN et dilution selon Holdrinet, nous avons déterminé 2 seuils correspondant aux 70% et 50% d'Holdrinet, respectivement 1,3 et 0,5.

Le Tableau 12 suivant montre qu'il existe une excellente corrélation entre les 2 méthodes ($p = 6 \times 10^{-18}$).

Nombre de MO	IP < 50%	50% ≤ IP < 70%	IP ≥ 70%	Total	Résultats
GRIM/PNN ≤ 0,5	12	3	1	16	p < 0.01
0,5 < GRIM/PNN < 1,3	2	14	11	27	
GRIM/PNN ≥ 1,3	0	3	60	63	
Total	14	20	72	106	

Tableau 12 : Répartition des échantillons de moelle en fonction de leur pureté, évaluée en CMF par le rapport GRIM/PNN et par la méthode d'Holdrinet (test de Fisher exact).

Nous avons également étudié les EB car la corrélation avec Holdrinet est intéressante ($r_s = 0,68$) et ce paramètre est souvent pris en compte dans la littérature (47)(33).

Dans ce cas, il n'y a pas de seuil séparant les dilutions 50% et 70%. En revanche, 7,5 % est visuellement la meilleure valeur discriminante pour la dilution 70%. Le tableau qui suit montre également une bonne corrélation entre les 2 approches ($p = 3 \times 10^{-9}$).

Nombre de MO	IP < 50%	50% ≤ IP < 70%	IP ≥ 70%	Total	Résultats
EB < 7,5	13	15	14	42	p < 0.01
EB ≥ 7,5	1	5	58	64	
Total	14	20	72	106	

Tableau 13 : Répartition des échantillons de moelle en fonction de leur pureté, évaluée en CMF par le taux d'érythroblastes et par la méthode d'Holdrinet (test du Khi2).

b) Utilisation d'un score

Pour essayer d'améliorer l'approche cytométrique, nous avons essayé de combiner les 2 paramètres GRIM/PNN et pourcentage d'EB. Pour cela nous avons établi un score à partir de points attribués en fonction de la dilution, selon les règles explicitées dans le Tableau 14 :

Paramètre étudié		Points		Points
GRIM/PNN	≥ 1,3	1	< 1,3	0
EB (%)	≥ 7,5 %	1	< 7,5 %	0

Tableau 14 : Attribution de points en fonction de la pureté médullaire évaluée en CMF

Un score à 0 caractérise donc une moelle diluée, un score à 1 une moelle de pureté intermédiaire et un score à 2 une moelle pure.

Nous montrons que ce score permet de discriminer la pureté médullaire aussi bien que l'indice de pureté de Holdrinet ($p = 2 \times 10^{-16}$) (Tableau 15)

Nombre de MO	IP < 50%	50% ≤ IP < 70%	IP ≥ 70%	Total	Résultats
Score à 0	13	13	3	29	p < 0.01
Score à 1	1	6	20	27	
Score à 2	0	1	49	50	
Total	14	20	72	106	

Tableau 15 : Corrélation entre score CMF et dilution selon Holdrinet (test de Fisher exact)

Nous avons dans une dernière étape, cherché à savoir si l'utilisation d'un score à 2 paramètres permettait de mieux discriminer les moelles pures que le seul rapport GRIM/PNN toujours en prenant comme référence la répartition des moelles selon l'IP de Holdrinet.

Nombre de MO	IP < 50%	50% ≤ IP < 70%	IP ≥ 70%	Total	Résultats
Score à 2	0	1	49	50	p = 0,6
GRIM/PNN ≥ 1,3	0	3	60	63	
Total	0	4	109	113	

Tableau 16 : Comparaison du score et du rapport GRIM/PNN pour l'évaluation de la pureté médullaire (test de Fisher exact)

Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la répartition des moelles avec l'une ou l'autre des méthodes utilisées (Test de Fisher exact, p > 0,01).

Pour des raisons détaillées dans la discussion, nous choisissons d'utiliser le rapport GRIM/PNN seul pour la suite du travail.

3. Intérêts du rapport GRIM/PNN

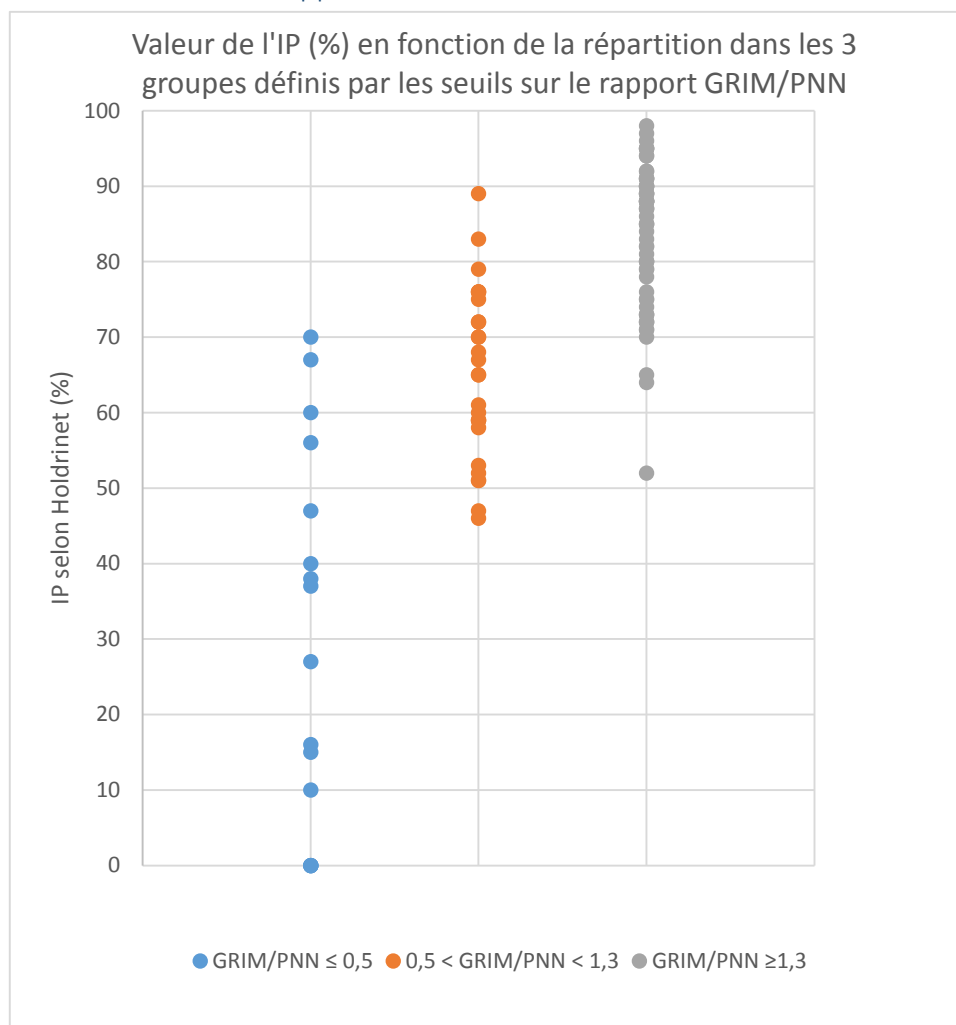


Figure 10 : Valeur de l'IP en fonction de la répartition de 106 moelles en 3 groupes selon les seuils fixés sur le rapport GRIM/PNN

En utilisant le rapport GRIM/PNN, nous montrons (Tableau 12 et Figure 10) que dans le groupe des moelles pures ($\text{GRIM/PNN} \geq 1,3$), 60 moelles sur 63 soit 95% ont un $\text{IP} \geq 70\%$, les 3 moelles restantes ayant respectivement un IP relativement élevé de 65%, 64% et 52%. Pour les moelles très diluées ($\text{GRIM/PNN} \leq 0,5$) 12 moelles sur 16 soit 75% ont un $\text{IP} \leq 50\%$, les 4 restantes ayant respectivement des IP de 56%, 60%, 67% et 70%. Dans le groupe des moelles de pureté intermédiaire ($0,5 < \text{GRIM/PNN} < 1,3$), 14 moelles sur 27 soit 52% ont un IP compris entre 50 et 70%, 11 moelles sur 27 soit 41% ont un $\text{IP} \geq 70\%$, et 2 moelles sur 27 soit 7% un $\text{IP} \leq 50\%$ mais qui reste proche de 50% (respectivement 46% et 47%).

Sur la base de cette classification, 59% des moelles cytologiquement normales sont considérées comme pures (63/106), 14% des moelles comme très diluées (15/106) et 26% des moelles modérément diluées (28/106).

D. Discussion

Il est indispensable de s'intéresser à la pureté de l'échantillon médullaire avant d'établir des valeurs de référence car la contamination par les cellules du sang modifie la fréquence réelle des populations de la moelle. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode consensus pour l'apprécier. Comme cela a été expliqué dans la partie bibliographique, différentes approches sont proposées: soit l'utilisation d'un facteur de correction permettant de recalculer la proportion des populations pour s'affranchir de la dilution (8)(46)(45), soit des seuils sur une ou plusieurs populations (33)(45)(5)(47). Cependant, aucune de ces méthodes n'est vraiment validée, ni applicable à des moelles pathologiques. L'indice de pureté (IP) défini par Holdrinet semble être la méthode qui fasse le plus référence malgré les difficultés de son application en routine. Elle requière en effet la numération le même jour d'un échantillon de sang et de moelle sur un automate d'hématologie. De plus, définir cette méthode comme une référence est discutable, car sur les 106 moelles analysées au laboratoire, 4 présentent un IP négatif ce qui est théoriquement impossible. Nous avons donc recherché de nouveaux critères en CMF pour apprécier le degré de dilution de la moelle par du sang périphérique.

Dans un 1^{er} temps, nous avons étudié la corrélation entre l'indice de pureté selon Holdrinet et différents paramètres : le pourcentage de lymphocytes T, de PNN, de monocytes (populations préférentielles du sang), de plasmocytes, de myéloblastes, d'érythroblastes, de GRIM (populations médullaires), ainsi que deux rapports, GRIM/PNN et 80%/GRIM. Nous obtenons des corrélations du même ordre celles de Brooimans et al. pour les mêmes populations, excepté pour les monocytes. Ces corrélations sont très bonnes pour les PNN et le rapport GRIM/PNN ($r_s > 0,8$), ou bonnes ($r_s > 0,6$) pour les GRIM, le rapport 80%/GRIM, les EB, et les myéloblastes CD34+. Elles sont en revanche faibles ($r_s \leq 0,5$) pour les plasmocytes, les monocytes et les lymphocytes T CD3. Concernant cette dernière population, la médiocrité de la corrélation est surprenante. En effet les lymphocytes T paraissaient intéressants car ils ne sont pas normalement présents dans la moelle : Ils ont une origine thymique et sont ensuite retrouvés dans le sang périphérique. Concernant les myéloblastes CD34+ et les plasmocytes, les différences sont difficiles à évaluer précisément car ces populations sont rares.

Pour classer les moelles en fonction de leur dilution, nous avons étudié deux stratégies impliquant les populations les plus pertinentes. La première est un score de pureté à 3 points impliquant le rapport GRIM/PNN et les érythroblastes. La seconde consiste à définir 2 seuils sur le rapport GRIM/PNN pour répartir les moelles en 3 groupes : les moelles très pures avec un GRIM/PNN $\geq 1,3$, les moelles diluées avec un GRIM/PNN $\leq 0,5$ et les moelles de pureté intermédiaire avec un GRIM/PNN compris entre 0,5 et 1,3. Les tests statistiques effectués n'ont pas montré de supériorité de l'approche qui utilise le score.

Nous avons donc choisi le rapport GRIM/PNN pour plusieurs raisons. Tout d'abord, dans les situations de moelles pathologiques, ce rapport sera plus fiable que le score. En effet, il permet de s'affranchir de l'envahissement médullaire par une population pathologique : clone de lymphocytes B dans le cas d'un lymphome, blastes dans le cas d'une leucémie aiguë ou plasmocytes dans le cas de myélome. En effet, si la population pathologique devient importante en proportion et que l'on utilise un seul paramètre pour apprécier la pureté (ex : EB, GRIM), la proportion de celui-ci va diminuer artificiellement sans pour autant que la moelle soit diluée. Concernant les érythroblastes, leur taux est fortement influencé aussi par la présence d'une anémie qui est d'ailleurs un critère fréquent de demande de myélogramme. Dans cette situation, leur valeur peut être fortement augmentée, faisant ainsi croire à tort une moelle plus pure. D'autre part, la corrélation entre le rapport GRIM/PNN et l'IP ($r_s = 0,83$) est la meilleure de toutes. Enfin, en routine au laboratoire, le simple rapport GRIM/PNN est plus rapide et facile à calculer que le score.

Deux limites concernant ce rapport peuvent toutefois être évoquées. En situation de myélodysplasie, l'intensité du CD16 sur les PNN est parfois diminuée et pourrait conduire à leur mauvaise identification. Néanmoins, nous utilisons aussi le CD10 pour l'identification des PNN, permettant ainsi de s'affranchir de ce problème. Ce rapport pourrait aussi être mis à défaut dans l'étude des leucémies myéloïdes chroniques, cependant il n'y a pas d'indication à l'étude de cette pathologie par CMF.

Ainsi, les seuils utilisés de 1,3 et 0,5 pour classer les moelles correspondent respectivement à 70% et 50% des seuils d'Holdrinet. Avec le seuil de 1,3, nous montrons que 95% des moelles sont pures selon Holdrinet (60/63), et 5% sont modérément diluées (65%, 64% et 52%). Aucune n'est très diluée. En revanche, nous manquons 11 moelles, considérées comme diluées en CMF et qui classées comme pures selon Holdrinet. Avec l'objectif de définir des valeurs de référence, il est important de privilégier la pureté médullaire, ce qui est le cas avec notre approche.

Ces résultats montrent aussi que le nombre de moelles prélevées qui sont non diluées est relativement bas : 59 % avec le rapport GRIM/PNN $\geq 1,3$ et 68% avec le seuil d'Holdrinet $> 70\%$. Ce pourcentage est sous-évalué par rapport à l'ensemble des prélèvements, car nous avons exclu les moelles trop diluées sur le 1^{er} tube de prélèvement pour lesquelles le compte des sous-populations en cytologie n'a pas été réalisé.

E. Conclusion

Nous avons donc trouvé un critère cytométrique unique, facile à calculer, utilisable chez l'enfant comme chez l'adulte, que la moelle soit normale ou pathologique. Il s'agit d'un rapport faisant

intervenir 2 populations myéloïdes dont l'une est exclusivement présente dans la moelle osseuse, les granuleux immatures, et l'autre préférentiellement présente dans le sang, les PNN.

Il permet de classer les moelles en trois groupes. Un rapport GRIM/PNN $\leq 0,5$ caractérise une moelle diluée ce qui correspond à un IP selon Holdrinet $< 50\%$, un rapport compris entre 0,5 et 1,3 une moelle de pureté intermédiaire, et un rapport $\geq 1,3$ une moelle pure ce qui correspond à un IP selon Holdrinet $\geq 70\%$.

III. STANDARDISATION POUR UNE ETUDE OLIGOCENTRIQUE

L'immunophénotypage par CMF est un outil puissant pour le diagnostic et la classification des hémopathies malignes. Le développement de l'instrumentation et des fluorochromes permet aujourd'hui l'utilisation en routine de panels comprenant de 8 à 10 anticorps par tube. Ainsi la quantité de données obtenues par cette analyse multiparamétrique associée à la capacité grandissante des systèmes d'analyse ont rendu l'interprétation de plus en plus compliquée. Des différences importantes ont donc été introduites, dépendant à la fois des connaissances et de l'expérience du biologiste dans la variabilité des panels de réactifs, les protocoles d'acquisition, de préparation des échantillons, et d'analyse des données. Dans l'idée de diminuer cette variabilité, des recommandations et conduites à tenir ont été proposées par divers groupes d'experts. Ainsi, EuroFlow propose un protocole de standardisation des cytomètres incluant le contrôle des performances du cytomètre, le réglage des PMT et le réglage des compensation à l'aide de différents de types de billes (54)(37). Des panels d'anticorps adaptés à l'étude des diverses hémopathies malignes pour lesquelles la CMF à une indication sont aussi à disposition. Les caractéristiques des réactifs, ainsi que les protocoles de marquage y sont détaillés. Enfin des outils pour l'analyse des données ont été développés permettant par exemple d'associer directement un profil d'expression de certains anticorps à une entité de la classification OMS. Un programme d'évaluation externe de la qualité a aussi été mis en place par ce même groupe d'expert (55)(56). Son but est d'évaluer dans sa globalité l'application des divers protocoles techniques, proposés pour la standardisation de la préparation de l'échantillon jusqu'à l'analyse des données, en monitorant l'intensité de fluorescence d'antigènes exprimés à des niveaux stables sur des populations lymphocytaires particulières. A l'inverse la plupart des autres contrôles de qualité externes concernent la quantification de certaines sous populations comme les lymphocytes TCD4+ ou les progéniteurs CD34+(56).

Nous expliquons dans ce chapitre comment nous avons standardisé l'étude dans les 3 centres.

A. Organisation de l'étude

Nous avons rédigé un document afin de décrire le déroulement de l'étude aux centres partenaires. Il a été envoyé à chacun d'eux et présenté lors d'une visite sur site (Annexe 2).

B. Standardisation des conditions techniques

1. Préanalytique selon les « Standard Operating Procedures » de France Flow/Euroflow

Dans ce travail les 3 centres appliquent les procédures recommandées par FranceFlow pour le réglage et le suivi des performances du cytomètre ainsi que le réglage des PMT sur les valeurs cibles fournies.

a) Vérification quotidienne des performances du cytomètre (bille CST)

Les billes FACSDiva™ CST IVD Beads sont passées chaque jour au démarrage du cytomètre avec un logiciel dédié. Elles permettent au départ de calibrer le cytomètre en définissant une « baseline » avec des PMT de référence, puis d'effectuer un contrôle qualité quotidien en vérifiant les performances du cytomètre (delta des PMT et du coefficient de variation) et enfin de réinitialiser les valeurs cibles des MFI lors de l'utilisation d'un nouveau lot de billes. Ce sont des billes marquées par des fluorochromes à 3 concentrations différentes qui sont excités par les lasers du cytomètre et qui émettent alors une fluorescence captée par les détecteurs utilisés pour les fluorochromes précédemment cités.

b) Standardisation des fluorescences et contrôle quotidien (billes Rainbow)

Le réglage des voltages appliqués aux photomultiplicateurs (PMT) est réalisé grâce aux billes Rainbow Calibration Particles (BD Sphero™ ; lot 23755 en cours). Il s'agit de billes avec 8 niveaux différents de fluorescence correspondant aux fluorochromes utilisés. La moyenne des intensités de fluorescence (MFI) à atteindre est fixée par EuroFlow pour un lot de billes donné et pour chaque canal de détection de fluorescence. Les voltages des PMT sont ainsi ajustés de façon à obtenir des MFI dans l'intervalle fixé qui correspond à la valeur MFI cible plus ou moins 15% (tableaux 17 et 18).

Ce tube de billes Rainbow est acquis quotidiennement. Les pics de forte intensité sont utilisés pour contrôler la MFI et le coefficient de variation qui lui est lié. Le coefficient de variation correspond à celui du 8^{ème} pic pour les fluorochromes excités par les lasers bleu et rouge (il est fixé à 4% maximum) et à celui du 7^{ème} pic pour les fluorochromes excités par le laser violet (il est fixé à 6% au maximum).

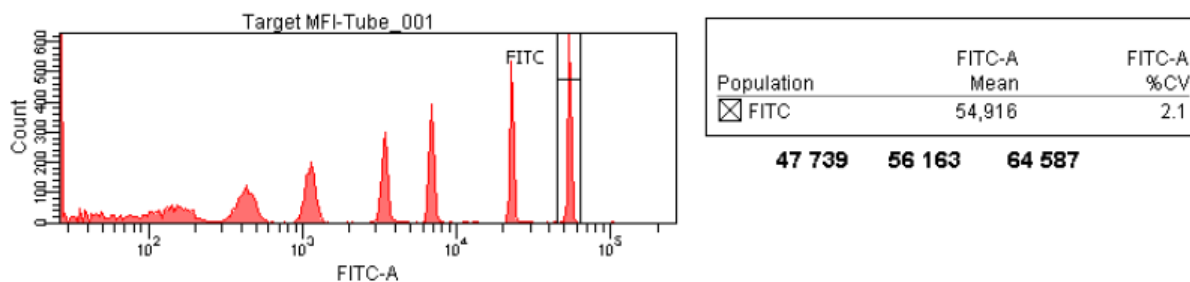


Figure 11 : Réglage des voltages appliqués aux PMT

Exemple du réglage du détecteur de la FITC : Le fenêtrage est réalisé sur le pic de plus forte intensité (8^{ème} pic), et le voltage du détecteur est modifié jusqu'à obtenir une MFI dans l'intervalle indiqué en gras.

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	VB421	V500
MFI obtenue	54976	82576	209751	30318	206577	43562	192173	157044
MFI cible	56163	88401	221025	29327	208842	43562	180118	155930
Intervalle de MFI recommandé (+/- 15% MFI cible)	47739 - 64587	75141 - 101661	187871 - 254179	24928 - 33726	177516 - 240168	37902 - 51280	153100 - 207136	132540 - 179320

Tableau 17 : Standardisation des cytomètres grâce aux billes Rainbow

Sont présentées dans ce tableau les MFI obtenues après réglage des voltages appliqués aux PMT, les MFI et intervalles cibles dont les valeurs sont données par EuroFlow pour un lot de billes données.

	FSC	SSC	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	VB421	V500
Voltage (Volts)	310	380	430	418	559	587	531	481	456	523

Tableau 18 : Valeurs des voltages appliqués à chaque PMT afin d'obtenir des MFI dans l'intervalle cible donné par EuroFlow

Les voltages appliqués au PMT du paramètre SSC et à la diode du paramètre FSC sont obtenus à partir d'un échantillon de sang normal non marqué afin d'obtenir les valeurs cibles suivantes pour les lymphocytes :

- FSC : 55 000 ; intervalle de 50 000 à 60 000
- SSC : 13 000 ; intervalle de 11 000 à 15 000

Dans ces conditions, un même échantillon marqué avec les mêmes réactifs donne les mêmes résultats en terme de fluorescence sur tous les cytomètres standardisés.

c) Echantillons de moelle

Chaque prélèvement est constitué d'environ 0,5 ml d'une aspiration de moelle osseuse collectée dans un tube plastique avec anticoagulant (EDTA) utilisé en routine : BD Vacutainer® 4ml K2E. L'analyse par CMF est ensuite réalisée dans les 8 heures.

2. Analytique

a) Réglage des compensations

Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des 2 signaux de fluorescence. Le logiciel FACS Diva permet une soustraction électronique des fuites optique de fluorescence de chaque canal selon la méthode d'égalité des médianes de fluorescence des populations négatives et positives. Le réglage des compensations doit être réalisé après le réglage des voltages des PMT.

Les billes CompBeads BD Biosciences sont utilisées pour le réglage des compensations. Elles sont recouvertes d'immunoglobulines anti chaîne κ de souris spécifiques de la fraction Fc des anticorps. Neuf tubes sont réalisés :

- 1 tube contenant 1 goutte de billes CompBeads seules non marquées (non recouvertes d'immunoglobulines, correspondant au contrôle négatif)
- 8 tubes contenant chacun 1 goutte de billes CompBeads monomarquées avec chacun des 8 anticorps utilisés + 1 goutte de billes négatives

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	VB421	VB500
FITC	/	13,74	3,68	0,34	0,03	0,00	0,00	8,96
PE	1,31	/	33,5	2,83	0,04	0,01	0,00	0,00
PerCP-Cy5.5	0,00	0,00	/	17,88	1,53	4,77	0,00	0,00
Pe-Cy7	0,08	0,94	3,35	/	0,03	5,78	0,00	0,00
APC	0,00	0,00	1,41	0,18	/	9,53	0,00	0,00
APC-H7	0,00	0,00	0,07	1,88	2,54	/	0,00	0,00
VB421	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	/	10,86
VB500	1,78	0,38	0,16	0,04	0,02	0,00	6,38	/

Tableau 19 : Matrice de compensation avec les Compbeads® et les anticorps du tube 8 couleurs

Est ensuite effectué un contrôle de la matrice de compensations, par mélange de 5 µl de chacun des tubes monomarqués précédemment réalisés. Les dot plots de toutes les combinaisons de fluorochromes associés successivement deux par deux sont ensuite analysées pour une vérification visuelle.

La matrice de compensation est réalisée obligatoirement pour la mise en place de chaque nouveau panel, et une fois par mois selon les recommandations d'Euroflow, puis en cas de problème.

Le réglage des voltages et la mise en place de la matrice de compensation constituent le « cytometer setting » qui sera ensuite appliqué pour toutes les analyses de moelle.

b) Marquage et acquisition des échantillons

Le panel des anticorps, les techniques de marquage et d'acquisition sont décrits dans la partie II)B.4 . Toutes les modalités ont été remises à chaque centre.

c) Analyse des échantillons

(1) Réalisation de la maquette d'analyse

La maquette d'analyse mise au point à Grenoble est complexe. Nous avons donc rédigé un document support pour que chaque centre la réalise de manière identique dans son laboratoire. En effet, celle-ci doit être créée spécifiquement, à cause des différences de configuration des cytomètres

dans les différents centres. Ce document décrit ainsi très précisément les dots plots et les gates à réaliser afin d'obtenir la même hiérarchie de populations et les mêmes dénominations dans les 3 centres pour calculer les pourcentages de toutes les populations voulues. Il a été expliqué et mis en application lors des visites sur site. Il est présenté dans l'Annexe 4.

(2) Analyse des données

Afin d'homogénéiser au maximum la démarche analytique, nous avons proposé un power point (Annexe 5) reprenant pour chacune des fenêtres à analyser la démarche à suivre, les petites astuces, et les pièges à éviter. Ce document a également été présenté lors de la visite sur site des deux centres.

(3) Echantillons « d'entraînement »

Un CD contenant 5 moelles osseuses normales de patients d'âges variés a été remis aux deux centres partenaires. Il permet ainsi de s'assurer de la bonne compréhension de la maquette avant de passer à l'analyse des moelles incluables dans l'étude.

3. Post analytique

a) Document de traçabilité et de recueil des données

Un formulaire reprenant les données essentielles à l'inclusion des patients a été rédigé (Annexe 3) et remis aux centres. Il doit être rempli pour tout envoi d'experiment.

b) Validation monocentrique (Grenoble) de tous les résultats

Tous les experiments envoyés par les centres partenaires ont été relus en binôme par l'interne en charge de ce travail et par la biologiste avant inclusion.

IV. DEFINITION DE VALEURS DE REFERENCES POUR LES SOUS POPULATIONS DE LA MOELLE OSSEUSE

A. Introduction

Nous avons dans ce travail étudié 97 moelles osseuses cytologiquement normales et non diluées pour établir des valeurs de référence de 16 populations pour 5 tranches d'âge, depuis le bébé jusqu'à l'adulte de plus de 70 ans. Il a été conduit en oligocentrique, en collaboration avec les CHU de Saint-Etienne et de Lyon afin d'augmenter le nombre d'échantillons médullaires et de montrer la reproductibilité de la méthode.

B. Publication

Quantification of normal bone marrow cell subsets using flow cytometry, from infant to elderly

Authors and affiliations

Julie Pont¹, Alice Souvignet², Lydia Campos³, Françoise Solly³, Adriana Plesa⁴, Sanae Kesr³, Bénédicte Bulabois⁵, Jean-Yves Cesbron¹, Marie-Christine Jacob¹⁻⁶

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

2.Department of Hematology, CH Annecy Genevois , Metz-Tessy, F-74370, France

3.Department of Hematology, CHU Saint-Etienne, Saint Priest en Jarez, F-42270, France

4.Department of Hematology, CHU Lyon-HCL, Pierre-Bénite, F-69495,France

5.Department of Hematology, CHU Grenoble, La Tronche, F-38700, France

6.INSERM U823, CRI/ Institut Albert Bonniot, La Tronche, F-38700, France

Running title: Bone marrow cell counts by 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

Credits for research support

This study has been supported by grants from BD Biosciences.

Key words: Bone marrow, reference values, flow-cytometry, peripheral blood contamination

ABSTRACT

Background. No flow cytometric references for bone marrow (BM) subsets currently exist. In the present work we quantified 16 populations with regards to age, and appreciated the impact of peripheral blood contamination.

Methods. A total of 135 cytomorphologically normal BM samples were selected from 13 stem cell donors and 122 patients. Cell subsets were identified using a single combination of 8 antibodies, i.e. CD3 /CD10 /CD38 /CD19 /CD36 /CD16 /CD34 /CD45, and sample dilution was evaluated using the immature granular cells (IGRA) / neutrophil ratio. **Results.** Reference values were established from 97 undiluted samples (IGRA / neutrophils ≥ 1.3) for 5 age ranges from infant to elderly. In the myeloid lineage, CD34-cells were rare and decreased from 1.6% to 0.5%, whereas all other subsets were statistically stable -IGRA (36.9% to 44.4%), neutrophils (10.4% to 23.5%), eosinophils (2.5% to 2.1%), basophils (0.3% to 0.2%), erythroblasts (7.3% to 16.5%) and monocytes (4.2% to 5.1%). In the B-cell lineage, the most immature cells decreased during life - hematogones from 19.7% to 0.2% and transitional B-cells from 3.1% to 0.1%. Opposite, plasma cells slightly increased from 0.2% to 0.5%. All mature lymphoid cells were stable, i.e. mature B-cells (1.7% to 1.3%), T-cells (4.7% to 6.5%) and NK-cells (0.5% to 0.9%). These values had to be corrected by about 30% when BM is moderately diluted (IGRA / neutrophils between 0.5 and 1.3). **Conclusion.** These results represent the first reference values for 9 myeloid and 7 lymphoid BM subsets for 5 age ranges.

INTRODUCTION

Immunophenotyping by flow cytometry is definitely an essential tool to screen, classify and monitor hematological malignancies. In this context, BM is frequently investigated. In order to optimize the diagnostic process, we designed a unique 8-color tube, providing an easy and accurate overview of BM cell composition. The analysis revealed to be robust, highly standardisable, and highly correlated to morphological cell counting by microscopy(1).

Normal values for the main BM cells subsets actually exist for cytology (2)(3)(4)(5), but are lacking for flow cytometry. Indeed, 2 of the 3 related reports are old and only quantify few subsets (6)(7)(8), sometimes not relevant for hematological investigations (no lymphoid cells analysis (8)). In the present work, reference values were originally defined for 7 subsets of the lymphoid lineage, and 9 subsets of the myeloid lineage. In peripheral blood, it is well documented that the proportions of hematopoietic cell subsets vary with age(9)(10), while it is quite unknown in BM. Only Andreoni et al. reported a diminution of B-cells from childhood to adults (6). Interestingly, the reference values we calculated were defined for 5 age classes from 0 to over 70 years, matching those from Hannet et al. in blood samples(9).

Defining reference values implies analysis of BM from normal individuals, without any treatment. Obviously, only donors for stem cell transplantation are truly healthy individuals, but they are rare and do not cover the entire ages of life. So, as usually performed (11)(4)(3), our control BM were selected upon normal qualitative and quantitative cytomorphological criteria (2) from patients with various diseases.

It should be pointed out that BM cell counts may be altered by peripheral blood-derived cells contamination, which is highly variable among patients (12)(13)(14)(15)(8). Even if percentages of neutrophils, erythroblasts, lymphocytes or monocytes have occasionally been reported in relation to peripheral blood contamination, either isolated or in combination (13)(14)(15)(8), there is presently no consensus for a flow cytometric parameter. In our laboratory, we validated the IGRA/neutrophils ratio as a surrogate marker for the Holdrinet ratio (12). Although referent, this method has the disadvantage to need simultaneous quantification of erythrocytes and leucocytes in peripheral blood and BM samples with hematological analyzers, what is often difficult to obtain in routine analysis. Interestingly, our reference values were thus defined for poorly diluted

samples only, in contrast to other studies (6)(7) Since BM samples may be diluted or not in case of routine investigations, we also evaluated the influence of dilution on the defined reference values.

Importantly, this oligocentric study was conducted using the Euroflow standardized operating procedure to allow reproducibility of the approach among laboratories (16)(17).

MATERIALS AND METHODS

Population

BM samples from 135 subjects from Grenoble (122 cases), Saint Etienne (8 cases) and Lyon (5 cases) hospitals were prospectively included in the study from January 2013 to May 2015, after information according to the protocol approved by the Institutional Review Board of Grenoble Hospital. They consisted in 69 women and 66 men with a mean age of 45 years (3 months- 94 years). Criteria for inclusion were the followings - i. quantitative and qualitative normal cytomorphology (2), ii. no immunophenotypic or karyotypic abnormalities if analyses have been performed, and iii. no history of allogenic or autologous stem cell transplantation. Thus, 13 samples from healthy donors and 122 samples from patients with various clinical situations were included (table 1).

BM samples and leukocyte numeration

BM samples were collected in BD Vacutainer® 4 ml K2E (EDTA) anticoagulant plastic tubes (Ref 368861, BD Diagnostics, Le Pont de Claix Cedex, France)), for routine analysis. Remaining cells were used for the present study.

Leukocyte numeration was performed using an ABX MICROS 60 device (HORIBA ABX SAS, Montpellier, France)

Immunophenotyping by flow cytometry

Five day- available cocktails of the eight following monoclonal antibodies from BD Pharmingen™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were prepared for 10 sample analysis, i.e. 50µl CD3-FITC (SK7; Ref 345763), 50µl CD10-PE (HI10a; Ref 332776), 50µl CD38-PerCP-Cy5.5 (HIT2; Ref 551400), 50µl CD19-PE-Cy7 (SJ25C1; Ref 341113), 100µl CD36-APC (CB38; Ref 550956), 50µl CD16-APC-H7 (3G8; Ref 560195), 50µl CD34-BV421 (581; Ref 562577), 50µl CD45-V500 (HI30; Ref 560777).

Analysis was performed within 8 hours after BM aspiration, as previously described (1). Briefly, 100 µl of BM sample containing between 1 and 2 x 10⁶ leukocytes were incubated during 15 minutes in the dark with 42 µl of the antibody cocktail. Then, erythrocytes were lysed with BD FACST™ Lysing Solution (Ref 349202; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and washed with PBS (Ref 18912-014; Gibco by Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) using a BD FACST™ Lyse/Wash Assistant device (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Between 50,000 to 500,000 events were collected using 3-lasers, 8-color BD FACSCanto™ II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and BD FACSDiva Software version 6 BD™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The operating procedure from the Euroflow group was used for standardization between the three hospitals (16)(17). Instrument setup was monitored daily using FACSDiva™ CST IVD beads (Ref 656046; BD Biosciences, , San Jose, CA, USA) and PMT voltages were adjusted using Rainbow® Calibration Particles BD Sphero™ (Ref 559123; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Finally, CompBeads® (Ref 552843; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were used for compensation settings.

Data were analyzed using BD FACSDiva Software version 6 BD™ according to our recently published gating strategy (1), leading to the identification of 7 lymphoid subsets (T-cells, mature B-cells (Bm), transitional B-cells (Bt), type-1 and type-2 hematogones (HG1 and HG2), NK-cells, plasma cells) and 7 myeloid subsets (CD34+ myeloblasts, immature granular cells (IGRA), neutrophils, eosinophils, basophils, erythroblasts and monocytes. Interestingly, three additional stages of immature granular cells were characterized (IGRA-1, IGRA-2, and IGRA-3) grossly corresponding to promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes. They were separated on a graph showing the maturation way from CD38 high / CD16 negative events (IGRA-1) to CD38

low / CD16 negative events (IGRA-2) and CD38 low / CD16 positive events (IGRA-3). The upper cut-off for CD38 high was standardized using hematogone CD38 expression.

Evaluation of peripheral blood contamination

Using the IGRA/neutrophils ratio, BM samples were parted in 3 groups - highly pure with a ratio over 1.3, intermediately pure with a ratio between 0.5 and 1.3, and poorly pure with a ratio below 0.5 (Table 2). This classification proved to be highly related to the method of Holdrinet (12), the 1.3 and 0.5 IGRA/neutrophils ratios grossly corresponding to the 70% and 50% thresholds (personnel results).

Statistical analysis

BM subset frequencies are presented as box plots using Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Influence of age was analyzed using the Kruskal-Wallis test, and comparison of BM subset frequencies between healthy donors and patients was studied using the Mann-Whitney Rank Sum test. This was achieved using the R software via the Biostatgv website (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

RESULTS

Quantification of BM subsets in cytomorphologically normal samples, with reference to age

Using the IGRA/neutrophils ratio, 72% (97/135) of our specimen were classified as poorly diluted (ratio > 1.3), 25% (34/135) as moderately diluted (ratio between 0.5 and 1.3) and 3% (4/135) as highly diluted (ratio < 0.5). Only highly pure samples were selected for de definition of reference values (Table 2).

Individuals consisted in 46 men and 51 women. They were classified in five groups as regards age distribution, as reported for blood samples(9): 0-1 year (4 cases), 1-6 years (12 cases), 6-17 (22 cases), 18-70 (67 cases) and over 70 years (30 cases). The median, 5th and 95th percentiles rates for the 16 myeloid and lymphoid cell subsets were then calculated for each age range (Table 3 and Fig.1). Of note, individuals were not separated by sex, since no difference between age-matched men and women could have been observed (data not shown).

CD34+ myeloblasts are the most immature identified myeloid cells. They are rare cells, below 2%. Their frequency is the highest under the age of 1 year with a median value of 1.6% (1.4-1.9%). Afterwards they decrease to 0.8% (0.6-1.4%) in young children to reach 0.6% (0.2-1.1%) after the age of 7 years. They remain quite stable afterwards, i.e. 0.6% (0.3-1.4%) in adults and 0.5% (0.3-0.9%) over 70 years. Those variations, although of low amplitude are statistically significant ($p = 2.0 \times 10^{-3}$).

More differentiated granular cells are the most frequent BM nuclear cells. Within this population, promyelocytes-related IGRA-1 are rare (median 1.9% to 3.2%). Myelocytes-related IGRA-2 are the most numerous (median 20.0 to 25.4%), whereas metamyelocytes-related IGRA-3 show intermediate rates (median 13.5 to 17.5%), as neutrophils (median 10.4 to 23.5%). A trend exists towards more neutrophils after the age of 7 years -10.4% (7.9-12.2%) and 17.2% (4.4-27.0%) versus 22.3% (12.8-19.4%), 23.5% (12.3-30.0%) and 21.4% (5.3-32.2%) ($p = 0.02$). The two other kinds of polymorphonuclear cells, eosinophils and basophils, are rare cells. Median values ranged from 1.8 to 2.5% for the former one and below 1% for the last one, without distinction as regards age ($p = 0.68$ and 0.13).

Monocytes are a little more numerous, from 4.2 to 5.1%, and this frequency does not vary during life ($p = 0.30$). Conversely, erythroblasts are more frequent and fluctuate. They are the highest under 1 year, at 16.5% (5.7-19.1%). Then, they decrease to 8.6% (3.3-17.5%) between 1 and 6 years and to 7.3% (3.2-16.6%) between 7 to 17 years. Afterwards, they increase to 12.6% (5.4-23.8%) between 18-70 years and to 13.5% (6.2-24.3%) over 70 years. Such variations are only slightly statistically significant ($p = 0.02$).

As regards lymphoid cells, all 3 lineages can be distinguished using our protocol. B cells are differentiating in the BM and 5 separate stages could be discriminated. Hematogones are highly expressed under the age of 1 year at 19.7% (3.2-35.9%) and drastically fall to 0.2% (0.0-1.9%) over the age of 70 years ($p = 10^{-8}$). Intermediate values are observed in young children at 6.6% (1.7-4.2%), between 7 and 17 years at 1.6% (0.3-7.8%) and in adults at 0.8% (0.0-2.8%). Of note, no difference could be observed regarding type-1 and type-2 hematogone ratio along life ($p = 0.41$). Transitional B-cells also decrease, but with lower variations, from 4.4% (1.7-7.8%) under 1 year to 1.4% (0.3-2.5%) over 70 years ($p = 2.4 \times 10^{-8}$). Conversely, mature B-cells are quite stable in the range of 1.3% to 2.8% ($p = 0.03$), and plasma cells increase during life. Median values are as low

as 0.2% under the age of 17 years (0.1-0.2% in infants, 0.1-0.4% in young children, and 0.1-0.7% between 7-18 years). They are a little more frequent in adults at 0.3% (0.1-1.2%) and old people at 0.5% (0.2-1.2). These differences are statistically significant ($p = 0.002$). T-cells do not differentiate in BM and only mature stages due to peripheral blood contamination are observed. Median values range from 4.7% to 7.9%, and no statistically significant relation with age could be shown ($p = 0.11$). It is also true for NK-cells ($p = 0.29$), with a rate under 1%.

The T-/B-cell ratio, another parameter for “normal” BM, demonstrates a regular increase from 1.0% (0.3-1.5%) in infants, to 1.9% (0.6-3.5%) between 1-6 years, and 3.5% (1.9-10.6%) between 7-17 years. The maximum value is reached in adults, i.e. 5.1% (2.4-18.5%) between 18-70 years, and 4.5% (1.8-29.7%) over 70 years. Such differences are highly significant ($p = 10^{-6}$).

Comparison of BM cell subset rates in stem cell donors and age matched patients

The percentages of the 16 afore mentioned BM subsets in poorly diluted BM samples were compared in age matched stem cell donors (8 cases with a mean age of 36 years (min 30- max 53 years) and patients with different clinical conditions (14 cases with a mean age of 41 years (min 25- max 52 years)). Our results demonstrated no significant difference ($p > 0.01$) (Table 4).

Evaluation of BM peripheral blood dilution impact on cell subsets frequencies

BM cell subsets rates were quantified in 81 highly pure samples (IGRA/neutrophils > 1.3) in comparison to 34 moderately pure samples (IGRA/neutrophils ratio between 0.5 and 1.3). In order to avoid influence of age, this comparison was conducted separately for 7 to 17 years children, 18 to 70 years adults and over 70 years old subjects. Younger individuals were too infrequent to allow comparison. Our results demonstrate a decrease of BM derived cells, i.e. about 20% for erythroblasts and 32% for IGRA, and an increase of peripheral blood-derived cells, i.e. about 34% for PNN, 34% for T-cells, and 43% for B-cells. Of note, monocytes as well as the T-/B-cells ratio remain stable (Fig. 2). For rare (under 5%) BM-derived cells also, i.e. CD34 myeloblasts, hematogones and plasma cells, frequency is lower in more diluted samples, although difference is not quantifiable. NK-cells demonstrate an opposite variation, whereas eosinophils and basophils do not differ.

DISCUSSION

We present in this work the first report detailing the frequency of 16 myeloid and lymphoid subsets characterizing cytomorphological normal BM, for 5 age ranges from infant to elderly.

Reference values for cell subsets are normally obtained from healthy individuals without treatment. Only stem cell donors would be eligible, but they correspond to a restricted rather young population, not including children, nor old people. Consequently, the present BM samples were selected according to strict normal quantitative and qualitative criteria upon morphological examination, from individuals with various clinical conditions (Table 1), as in many reports (3)(4) Our approach proved to be correct, since no difference in the BM subset frequencies could have been observed between age-matched donors and patients (Table 4). Such samples are indeed the right controls for hematological neoplasia screening.

Reference values reported in the literature for BM cell subsets mainly concerned cytomorphological examination (2)(3)(4)(5). Only 3 studies including 2 fairly old involved flow cytometry (6)(7)(8). The first originality of our work relies on the very high number of the quantified subsets -7 within the lymphoid lineage and 9 within the myeloid lineage. This is far over the published results (6)(7)(8). Interestingly, such a high number was unambiguously obtained using only one combination of 8 antibodies (1), in contrast to the 23 antibodies needed to attain the discrimination of 8 subsets (6). The second originality is due to the age-related references, separated in 5 groups from infants to elderlies, matching those from Hannet et al. for blood samples(9). Only one report by Andreonai et al. (6) took into account age, but just opposed children to adults for only some subsets. Even for cytology, only one study discriminated children under 2 years, and adults over 18 years (6). The third originality is our selection of only poorly diluted samples, a consideration taken into account in only one report (8).

A total of 97 non-diluted and morphologically normal BM samples were thus analyzed. The values we obtained revealed to be in the range of the corresponding morphologically- (2)(5), or flow cytometric identified subsets. It should be pointed out that our methodology also allowed classification of the highest number of cells. Only 0.6% remained unidentified, versus 6% by Andreoni (6) and 2.5% by Brooimans (8). Variation of cell subsets along life was evident from our results (Table 3 and Fig.1). As a general rule, more immature cells were

more frequent in children, especially in infants. This concerned both myeloid and mainly lymphoid progenitors. CD34 myeloblasts decrease from 1.6 to 0.5% and hematogones from 19.7 to 0.2%. Such a difference has also been outlined in the literature by flow cytometry (6), but not by morphology, even if no statistical comparison exists. By contrast, myeloid precursors (IGRA), which represent about 40% of total cells, do not fluctuate. Concerning polymorphonuclear cells, only neutrophils progressively vary, from about 10% for infants and 17% for young children, up to about 20 to 30% later. Eosinophils and basophils are infrequent, respectively 2% and 0.3%, and stable. Monocytes are a little more frequent, about 5% and also stable. Only erythroblasts show more complex evolution. They are the highest under the age of 1 year (median value: 16.5%); then, they decrease during infancy to about 9%, and increase afterwards in adults to 14%. Differences between children and adults are similar by flow cytometry and morphology, except for erythroblasts, which inversely vary with age. It is unknown whether it is due to differences in the patient population or to more mature forms in adults that are deleted with erythrocyte lysis. As regards T- and NK-cells, rates are rather stable along life, about 7% and 1% respectively. Conversely, B-cells are diminishing from 4.4% to 1.4%, as also reported by Andreoni (6). Our approach revealed this is mainly due to a gradual drop of transitional B cells from 3.1 to 0.1%, whereas mature B-cells remained stable. Consequently, the T-/B-cell ratio regularly increases during life, from 1 to a maximum of 5 (Table 3).

In routine investigation, BM samples are indeed variably diluted by peripheral blood, with impacts on cell counts (5). Using the IGRA/neutrophils parameter, about one fourth of our samples appeared diluted, particularly those of normal stem cell donors (38%; 5/13). The observation of dilution in case of quantitatively normal BMs probably results from the sequence of aspiration, the first tube being devoted to microscopic examination and the second one to flow cytometry. The consecutive variation of informative cell rate was about 30% when poorly and moderately diluted samples for 3 age ranges are compared. As suspected, blood-derived cells (T-cells, B-cells and neutrophils) increase whereas bone-marrow-derived cells (erythroblasts and IGRA) decrease. This variation is highly significant and should be taken into account in routine analysis.

In conclusion, our approach for BM cell identification using 8 antibodies in a single tube allowed the quantification of 16 myeloid or lymphoid subsets and the demonstration of their variations from infant to elderly.

To our knowledge, these results represent the only reference values for so many BM subsets and for 5 age ranges. Importantly, they are the indispensable step for further screening of pathological samples.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Severine BEATRIX, Ghislaine DEL VECCHIO, Richard DI SCHIENA, Michel DROUIN, Eve MATTEI and Christine VALLET for their highly helpful technical assistance. We are grateful to Guillaume CERARDI for help in the preparation of figures and english corrections.

REFERENCES

1. Jacob, Marie-Christine, Souvignet, Alice. Single eight-color tube for flow cytometric reliable extended leukocyte differential in bone marrow. 2015 (submitted).
2. Sébahoun G, Horschowski N. Cytologie et histologie médullaires normales. *Encycl. Méd.-Chir. Ed. Sci. Médicales Elsevier SAS Hématologie* 2002;13-000-A-30:8.
3. Yamamura R, Yamane T, Hino M, Ohta K, Shibata H, Tsuda I, Tatsumi N. Possible automatic cell classification of bone marrow aspirate using the CELL-DYN 4000 automatic blood cell analyzer. *J. Clin. Lab. Anal.* 2002;16:86–90.
4. Shibata H, Yamane T, Yamamura R, Ohta K, Takubo T, Kamitani T, Hino M. Automatic analysis of normal bone marrow blood cells using the XE-2100 automated hematology analyzer. *J. Clin. Lab. Anal.* 2003;17:12–17.
5. Lee S-H, Ho S-J, Thomas DT, Giri P, Lee H, Sia H, To LB, Sullivan TR. A partial nucleated differential cell count of the bone marrow aspirate that is independent of peripheral blood dilution. *Int. J. Lab. Hematol.* 2008;30:473–479.
6. Andreoni C, Rigal D, Bonnard M, Bernaud J. Phenotypic analysis of a large number of normal human bone marrow sample by flow cytometry. *Blut* 1990;61:271–277.
7. Terstappen LW, Levin J. Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry. *Blood Cells* 1992;18:311–330; discussion 331–332.
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;76B:18–26.
9. Hannet I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyère M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol. Today* 1992;13:215, 218.
10. Huenecke S, Behl M, Fadler C, Zimmermann SY, Bochennek K, Tramsen L, Esser R, Klarmann D, Kamper M, Sattler A, von Laer D, Klingebiel T, Lehrnbecher T, Koehl U. Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *Eur. J. Haematol.* 2008;80:532–539.
11. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, van den Beemd MW, van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000;14:816–825.
12. 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.
13. 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.
14. 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;76B:27–36.

15. 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.
16. 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.
17. 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: Comparison of Flow Instruments. *Cytometry A* 2013;83:1066–1072.

Figure 1.

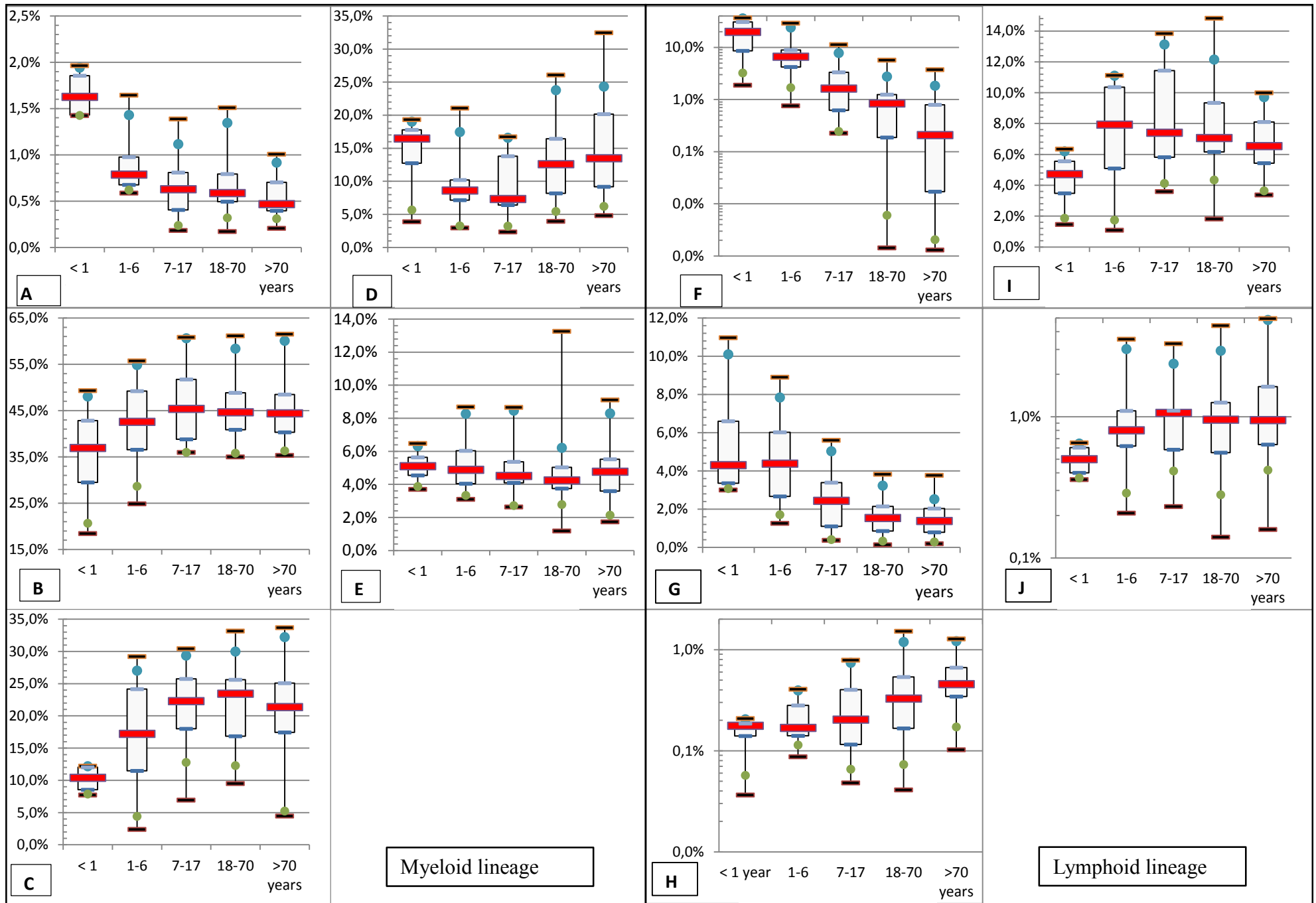


Figure 2.

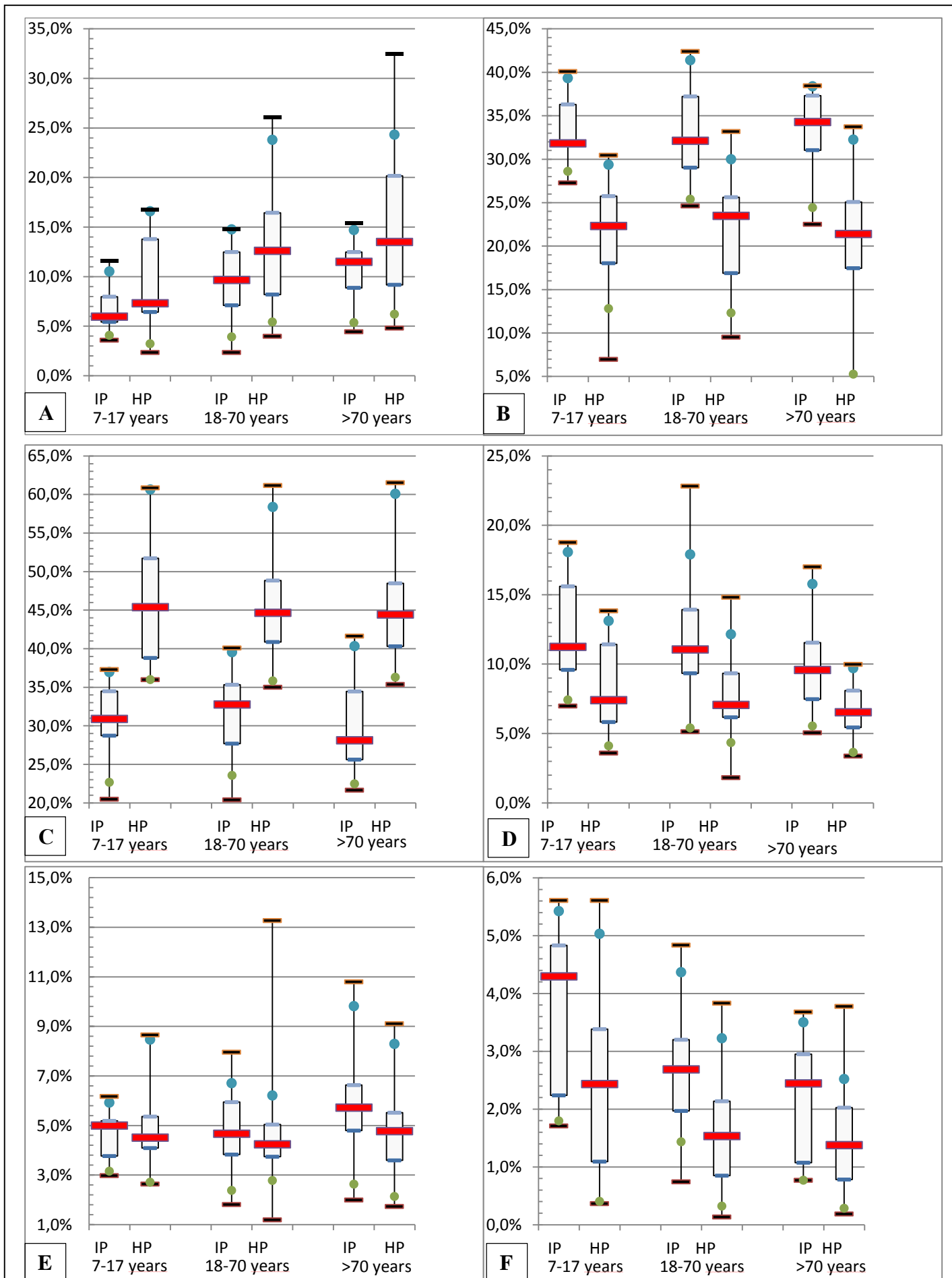


Figure 1. Bone marrow cell subset counts according to age

The thick line in the middle of each box represents the median of the data. The boxes extend from the 25th to the 75th centiles. The lines emerging from the boxes (whiskers) represent the minimal and the maximal values. Points represent the 5th and 95th centiles. A) CD34+ myeloblasts B) Immature granular cell (IGRA) C) Neutrophils D) Erythroblasts E) Monocytes F) Hematogones G) B-cells H) Plasma cells I) T-cells and J) NK-cells. IP: Intermediate bone marrow purity; HP: high bone marrow purity.

Figure 2. Impact of peripheral blood dilution on bone marrow cell subsets counts

The thick line in the middle of each box represents the median of the data. The boxes extend from the 25th to the 75th centiles. The lines emerging from the boxes (whiskers) represent the minimal and the maximal values. Points represent the 5th and 95th centiles. A) Erythroblasts B) Neutrophils C) Immature granulocytes (IGRA) D) T-cells E) Monocytes and F) B-cells.

Table 1. Patient's clinical conditions

	Number (135)
Healthy stem cell donors	13
Hematological neoplasia	18
- B-cell lymphoma without bone marrow involvement	3
- ALL or AML in remission	11
- Myeloma in remission	3
- Myeloproliferative syndrome during remission	1
Unexplained cytopenia and ITP	78
Solid tumors	5
Infectious pathologies	7
Various disorders	14
- Autoimmune disorders	4
- Rare diseases (Krabbe disease and Langerhans cell histiocytosis)	2
- Others	8

ALL: Acute Lymphoid Leukemia. AML: Acute Myeloid Leukemia.

ITP: Idiopathic Thrombocytic Purpura

Table 2. Bone marrow purity at each age range

	< 1 year n (M/F)	1-6 years n (M/F)	7-17 years n (M/F)	18-70 years n (M/F)	> 70 years n (M/F)	Total n (M/F)
High purity	4 (2-2)	12 (7-5)	15 (9-6)	44 (21-23)	22 (7-15)	97 (46-51)
Intermediate purity	0	0	7 (4-3)	21 (9-12)	6 (4-2)	34 (17-17)
Low purity	0	0	0	2 (1-1)	2 (1-1)	4 (2-2)
Total	4 (2-2)	12 (7-5)	22 (13-9)	67 (31-36)	30 (12-18)	135 (65-70)

Bone marrow samples were classified according to the immature granular cells (IGRA) / neutrophils ratio in 3 groups as regards peripheral blood dilution: high purity with a ratio ≥ 1.3 , intermediate purity with a ratio between 0.5 and 1.3, and low purity with a ratio ≤ 0.5 . The number of samples for each category is presented for 5 age ranges, with respect to male (M) or female (F) sex.

Table 3. Quantification of 16 bone marrow cell subsets, at 5 age ranges

	< 1 year	1-6 years	7-17 years	18-70 years	> 70 years	p
Myeloid lineage median (5 th -95 th centiles) %						
Myeloblasts	1.6 (1.4-1.9)	0.8 (0.6-1.4)	0.6 (0.2-1.1)	0.6 (0.3-1.4)	0.5 (0.3- 0.9)	2.0x10 ⁻⁴
Granular cells	49.9 (31.4-62.8)	60.3 (47.8-74.0)	66.4 (55.4-87.9)	67.5 (47.4-80.1)	69.4 (53.8-78.6)	0.03
- IGRA	36.9 (20.7-48.1)	42.6 (28.7-54.9)	45.4 (36.0-60.6)	44.6 (35.8-58.4)	44.4 (36.3-60.1)	0.52
IGRA-1	2.9 (2.1-5.1)	2.5 (1.5-4.4)	1.9 (1.3-5.6)	3.0 (1.3-6.3)	3.2 (1.6-6.3)	0.04
IGRA-2	20.0 (9.8-26.6)	20.5 (11.9-34.4)	22.5 (18.8-33.4)	24.9 (18.5-35.6)	25.4 (14.3-34.9)	0.27
IGRA-3	13.5 (7.9-16.5)	17.0 (10.7-22.6)	16.1 (10.7-27.7)	15.0 (8.8-24.9)	17.5 (7.1-26.3)	0.34
- Neutrophils	10.4 (7.9-12.2)	17.2 (4.4-27.0)	22.3 (12.8-19.4)	23.5 (12.3-30.0)	21.4 (5.3-32.2)	0.02
- Eosinophils	2.5 (1.8-2.7)	1.8 (0.6-4.6)	2.1 (1.2-4.9)	2.1 (0.9-4.4)	2.1 (0.3-3.2)	0.68
- Basophils	0.3 (0.2-0.6)	0.3 (0.2-0.3)	0.3 (0.1-0.6)	0.3 (0.1-0.4)	0.2 (0.1-0.5)	0.13
IGRA / neutrophils	3.6 (2.5-4.0)	2.0 (1.4-14.1)	2.2 (1.3-4.7)	1.9 (1.4-4.3)	1.9 (1.4-7.3)	0.29
Monocytes	5.1 (3.9-6.3)	4.9 (3.3-8.3)	4.5 (2.7 (8.5)	4.2 (2.8-6.2)	4.8 (2.1-8.3)	0.30
Erythroblasts	16.5 (5.7-19.1)	8.6 (3.3-17.5)	7.3 (3.2-16.6)	12.6 (5.4-23.8)	13.5 (6.2-24.3)	0.02
Lymphoid lineage median (5 th -95 th centiles) %						
Hematogones	19.7 (3.2-35.9)	6.6 (1.7-4.2)	1.6 (0.3-7.8)	0.8 (0.0-2.8)	0.2 (0.0-1.9)	1.3x10 ⁻⁸
- HG1 / HG	17.8 (11.3-30.2)	17.9 (12.5-44.9)	26.8 (14.7-67.0)	24.6 (14.0-60.8)	18.3 (2.6-56.6)	0.37
- HG2 / HG	82.2 (69.8-88.8)	82.1 (55.9-87.5)	73.2 (33.0-85.3)	76.2 (39.2-86.1)	81.8 (43.4-97.4)	0.38
HG2 / HG1	5.2 (2.4-7.9)	4.6 (1.3-1.5)	2.7 (0.5-5.8)	3.1 (0.7-6.2)	3.4 (0.2-22.1)	0.41
Lymphoid cells	8.5 (7.1-16.6)	13.7 (6 .1-17.8)	11.0 (5.6-17.6)	9.8 (5.5-17.6)	9.8 (6.1-13.1)	0.27
- B-cells	4.3 (3.1-10.1)	4.4 (1.7-7.8)	2.4 (0.4-5.1)	1.5 (0.3-3.2)	1.4 (0.3-2.5)	1.7x10 ⁻⁵
Bt-cells	3.1 (1.3-6.9)	1.1 (0.2-4.1)	0.3 (0.1-1.2)	0.1 (0.0-0.6)	0.1 (0.0-0.5)	2.4x 10 ⁻⁸
Bm-cells	1.7 (0.9-3.4)	2.8 (1.1-5.9)	1.3 (0.2-4.4)	1.4 (0.2-3.0)	1.3 (0.3-2.4)	0.03
- T-cells	4.7 (1.9-6.2)	7.9 (1.8-11.1)	7.4 (4.1-13.1)	7.1 (4.3-12.2)	6.5 (3.6-9.7)	0.11
- NK-cells	0.5 (0.4-0.7)	0.8 (0.3-3.0)	1.1 (0.4-2.4)	1.0 (0.3-2.9)	0.9 (0.4-4.9)	0.29
T-cells / B-cells	1.0 (0.3-1.5)	1.9 (0.6-3.5)	3.5 (1.9-10.6)	5.1 (2.4-18.5)	4.5 (1.8-29.7)	1.3x10 ⁻⁶
Plasma cells	0.2 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.4)	0.2 (0.1-0.7)	0.3 (0.1-1.2)	0.5 (0.2-1.2)	2.0x10 ⁻³
Unidentified cells median (5 th -95 th centiles) %						
Unidentified cells	1.0 (0.8-1.1)	0.9 (0.6-1.5)	0.7 (0.3-1.6)	0.6 (0.3-1.4)	0.6 (0.3-2.0)	0.01

Granular cells = Immature Granular Cells (IGRA) + neutrophils + basophils + eosinophils.

IGRA= IGRA-1 + IGRA-2 + IGRA-3, grossly corresponding to promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes.

HG1: type-1 hematogones. HG2: type-2 hematogones. Bt-cells: transitional B-cells. Bm-cells: mature B-cells.

Lymphocytes = B-cells + T-cells + NK-cells.

Comparison between different ages was achieved using the Kruskal Wallis test.

Table 4. Comparison of bone marrow subsets in stem cell donors and age-matched patients

	Stem cell donors (n=8)	Age matched patients (n=14)	P
Myeloid lineage median (5 th -95 th centiles) %			
Myeloblasts	0.7 (0.5-1.1)	0.6 (0.3-1.1)	0.10
Granular cells	57.1 (45.8-73.2)	71.9 (61.8-79.7)	0.04
- IGRA	42.2 (37.0-46.2)	45.3 (35.6-55.0)	0.15
IGRA-1	3.6 (2.4-7.2)	2.8 (1.4-5.5)	0.19
IGRA-2	20.5 (18.2-27.4)	25.8 (18.7-33.2)	0.05
IGRA-3	15.7 (10.1-19.9)	14.4 (10.0-28.7)	0.66
- Neutrophils	28.1 (24.9-32.0)	24.7 (17.5-29.7)	0.02
- Eosinophils	2.6 (1.5-3.7)	1.8 (0.8-3.6)	0.24
- Basophils	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.2-0.4)	0.32
IGRA/neutrophils	1.5 (1.3-1.7)	1.8 (1.4-3.1)	0.02
Monocytes	4.5 (4.0-6.0)	4.2 (2.2-5.3)	0.19
Erythroblasts	8.8 (4.6-12.8)	11.5 (7.2-19.3)	0.09
Lymphoid lineage median (5 th -95 th centiles) %			
Hematogones	1.0 (0.6-1.2)	1.2 (0.1-3.8)	0.58
- HG1/HG	29.0 (17.0-38.9)	23.4 (13.6-61.4)	0.47
- HG2/HG	72.7 (62.4-83.0)	76.6 (38.6-86.4)	0.59
HG2/HG1	2.6 (1.6-4.9)	3.8 (1.9-7.1)	0.15
Lymphoid cells	12.9 (9.2-16.2)	9.4 (4.2-17.6)	0.13
- B-cells	2.1 (1.0-3.6)	1.5 (0.3-2.7)	0.10
Bt-cells	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.0-0.6)	0.70
Bm-cells	1.9 (1.0-3.4)	1.2 (0.1-2.2)	0.05
- T-cells	9.2 (7.0-11.4)	6.8 (3.5-11.3)	0.05
- NK-cells	0.9 (0.6-2.0)	1.0 (0.4-4.2)	0.56
T-cells/B-cells	4.4 (2.6-7.3)	4.6 (2.6-18.2)	0.48
Plasma cells	0.2 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.5)	0.02
Unidentified cells median (5 th -95 th centiles) %			
Unidentified cells	0.8 (0.4-1.3)	0.5 (0.3-1.0)	0.04

Granular cells = Immature Granular Cells (IGRA) + neutrophils + basophils + eosinophils. IGRA = IGRA-1 + IGRA-2 + IGRA-3, grossly corresponding to promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes. HG1: type-1 hematogones. HG2: type-2 hematogones. Bt-cells: transitional B-cells. Bm-cells: mature B-cells. Lymphocytes = B-cells + T-cells + NK-cells. Comparison between stem cell donors and age-matched patients was achieved using the Mann and Whitney test.

CONCLUSION

MEMOIRE SOUTENU PAR : Julie PONT

TITRE : Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous-populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire par le sang périphérique.

CONCLUSION

L'immunophénotypage de la moelle osseuse par cytométrie en flux (CMF) est un outil indispensable au screening, au classement et au suivi des hémopathies malignes. Il fait partie du bilan de routine en raison de la fréquence de l'envahissement médullaire et des conséquences cliniques et thérapeutiques que celui-ci implique. Afin d'optimiser la démarche diagnostique par CMF, une seule combinaison de 8 anticorps permettant l'identification de 16 sous-populations myéloïdes ou lymphoïdes normales et pathologiques a été mise au point et validée au laboratoire d'immunologie. L'objectif de ce travail est de définir des valeurs de référence pour chacune de ces sous-populations. Elles ont été établies pour des moelles cytologiquement normales, c'est à dire sans anomalies qualitatives ou quantitatives au myélogramme.

En pratique les moelles osseuses sont souvent hémodiluées. Il a donc été nécessaire d'établir un critère cytométrique d'appréciation de la pureté médullaire, unique, facile à calculer, utilisable chez l'enfant comme chez l'adulte, que la moelle soit normale ou pathologique. Il s'agit ainsi du premier critère cytométrique validé. Il consiste en un rapport de deux populations myéloïdes : les granuleux immatures (GRIM) qui sont exclusivement présents dans la moelle osseuse, et les PNN qui sont préférentiellement présents dans le sang. Un rapport GRIM/PNN $< 0,5$ caractérise une moelle diluée, un rapport compris entre 0,5 et 1,3 une moelle de pureté intermédiaire, et un rapport $> 1,3$ une moelle pure. Sur une cohorte de 106 patients, nous avons montré que cette classification était fortement corrélée à la méthode d'Holdrinet qui fait actuellement référence.

Nous avons dans un second temps utilisé ce critère cytométrique pour sélectionner 97 moelles osseuses non diluées dans une étude oligocentrique avec les CHU de Saint-Etienne et de Lyon. Nous avons alors déterminé les valeurs de référence des 16 sous-populations pour 5 classes d'âge, du bébé à l'adulte de plus de 70 ans. A ce jour, il s'agit des seules valeurs disponibles en CMF pour autant de populations sur cinq tranches d'âge.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la dilution médullaire sur la fréquence de ces populations et montré une augmentation significative du pourcentage des cellules dérivées du sang

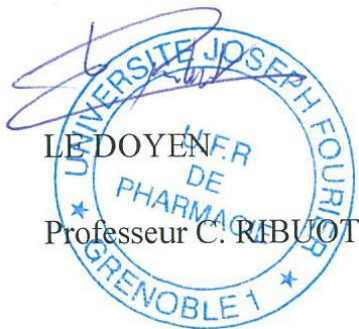
et une diminution significative de celles issues de la moelle en situation de dilution. Le taux de variation est en effet d'environ 30 % entre les moelles peu et moyennement diluées. Il est donc primordial de prendre en compte ce paramètre lors de l'analyse des moelles en routine.

Nous avons également étudié le rapport lymphocytes T/lymphocytes B pour lequel nous avons démontré l'indépendance vis à vis de la dilution médullaire, ce qui en fait un outil de choix pour le screening de l'envahissement médullaire par un lymphome B.

Nos résultats sont la base indispensable à l'étape suivante d'évaluation du potentiel de screening de ce tube chez des patients atteints de diverses hémopathies.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 21/07/2015



LE PRESIDENT DE THESE
Professeur J.-Y. CESBRON

PERSPECTIVES

Nous avons, à l'heure actuelle, établi des valeurs de référence pour 16 sous populations médullaires. La suite de ce travail va s'articuler autour de deux grands axes :

Le premier axe consiste en une étude multicentrique qui permettra d'une part de valider les valeurs que nous avons obtenues et d'autre part d'augmenter le nombre de moelles d'enfants de moins de 7 ans analysées. Nous pourrions ainsi affiner les valeurs de référence pour cette classe d'âge. Nous n'avons en effet pu inclure que 4 bébés et 12 jeunes enfants avec des moelles cytologiquement normales et de bonne pureté ($\text{GRIM/PNN} \geq 1,3$) en un an et demi d'étude. Dans le cadre de l'accréditation des examens de biologie médicale, des valeurs de références sont indispensables pour la validation du myélogramme en cytologie. Une proposition d'associer une analyse en CMF à l'analyse cytologique des moelles pourra être faite au groupe du GFHC (Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire).

Le second axe est l'étude de moelles pathologiques pour lesquelles on recherchera des anomalies qualitatives et quantitatives. Les résultats obtenus seront comparés aux techniques de référence : cytologie, cytogénétique et biologie moléculaire. Cette étude permettra pour chaque pathologie d'apprécier la sensibilité et la spécificité de notre technique et ainsi de définir sa place au sein du laboratoire dans la prise en charge ou le suivi d'une hémopathie. Cette étude rendra également possible la validation sur des moelles pathologiques du critère cytométrique d'évaluation de la pureté médullaire que nous avons défini : le rapport GRIM/PNN.

ANNEXES

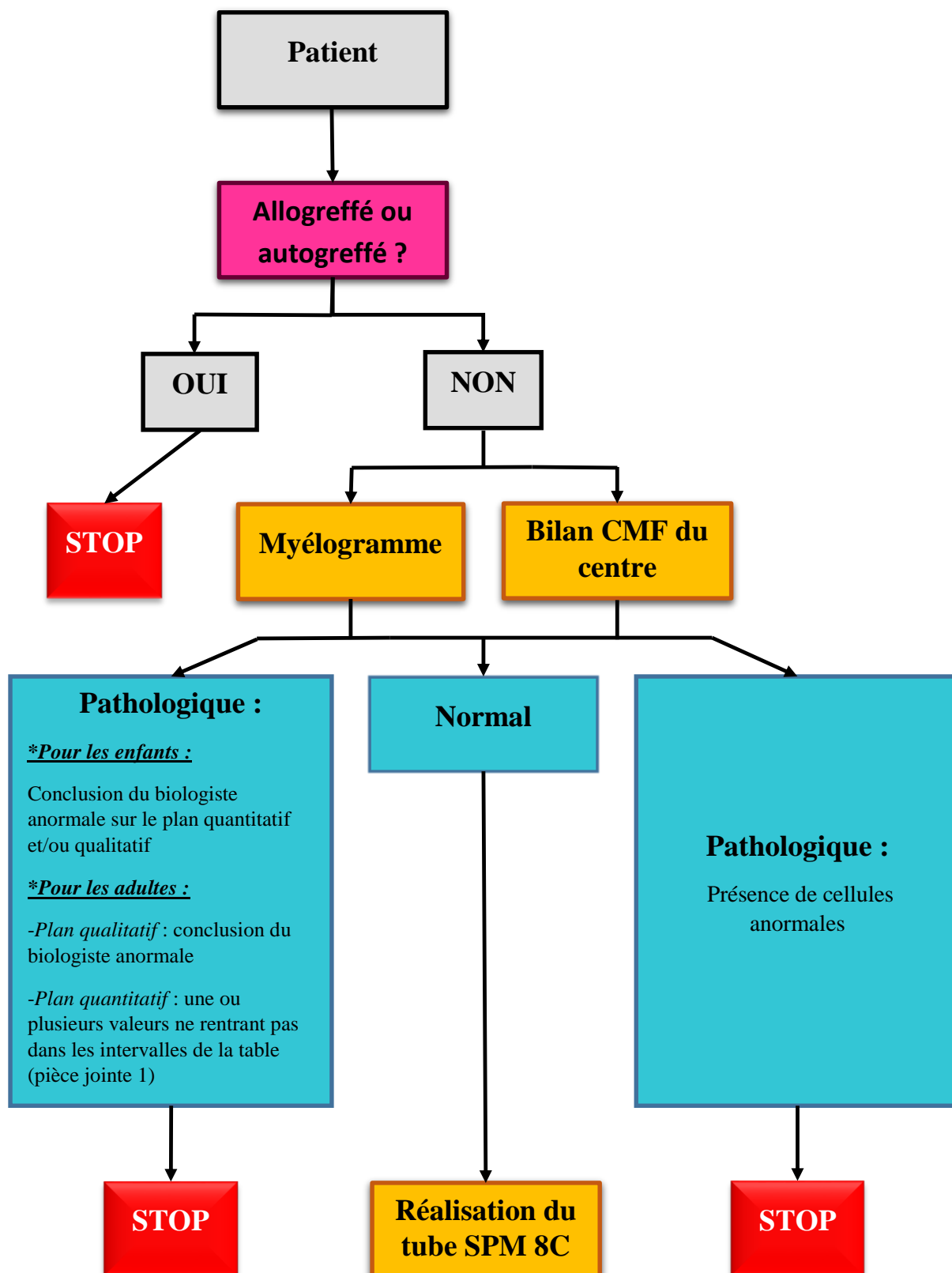
Annexe 1 : Classification des hémopathies selon l'OMS 2008

Leucémies aiguës myéloïdes
<p>LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes LAM avec anomalies associées aux syndromes myélodysplasiques (suite à un SMD, en raison de la cytogénétique, avec dysplasie multilignée : 2 à 3 lignées hématopoïétiques avec ≥ 50 % des cellules dysplasiques) Néoplasies myéloïdes secondaires aux traitements LAM sans autre assignation :</p> <ul style="list-style-type: none">- LAM avec différenciation minimale (LAM 0)- LAM sans maturation (LAM1)- LAM avec maturation (LAM 2)- Leucémie aiguë myélomonocytaire (LAM 3)- Leucémie aiguë monocyttaire (LAM 5)- Leucémie aiguë érythroblastique (LAM 6)- Leucémie aiguë mégacaryoblastique (LAM7)- Leucémie aiguë à basophiles- Panmyélose aiguë avec myélofibrose <p>Leucémies aiguës avec ambiguïté de lignée :</p> <ul style="list-style-type: none">- LA indifférenciée- LA de phénotype mixte t(9;22)- LA de phénotype mixte t(v;11q23)- LA de phénotype mixte B/myéloïde, sans autre précision- LA de phénotype mixte T/myéloïde, sans autre précision- Lymphome/leucémie lymphoblastique à cellules Natural Killer <p>Myélosarcome Myéloprolifération associée au syndrome de Down Néoplasie blastique à cellules plasmocytoides dendritiques</p>
<p>Lymphome de Hodgkin Syndromes lymphoprolifératifs associées à l'immunodépression Néoplasies des cellules dendritiques et des histiocytes</p>

Syndromes myéloprolifératifs :	Syndromes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs :	Syndromes myélodysplasiques
<p>Leucémie myéloïde chronique Thrombocyémie Essentielle Polyglobulie primitive de Vaquez Myélofibrose primitive Leucémie chronique à polynucléaires neutrophiles Leucémie chronique à polynucléaires éosinophiles Mastocytoses - Mastocytoses cutanées - Mastocytoses systémiques indolentes - Mastocytoses systémiques associées à une hémopathie (avec anomalie clonale non mastocytaire) - Mastocytoses systémiques agressives - Leucémie à mastocytes - Sarcome mastocytaire - Mastocytome extra-cutané SMP inclassables</p>	<p>Leucémie myélomonocytaire chronique Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile Leucémie Myéloïde Chronique atypique (aCML) BCR-ABL1 négative Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose notable (ARSI-T) SMD/SMP inclassables</p>	<p>Cytopénies réfractaires avec dysplasie unilignée Anémie Réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARSI) Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignées (CRDM) Myélodysplasies avec lésion chromosomique 5q isolée Syndromes myélodysplasiques inclassables (SMD – U) Anémies Réfractaires avec Excès de Blastés (AREB)</p>
<p>Néoplasies à cellules lymphoïdes T matures ou cellules Natural Killer</p>	<p>Néoplasies à cellules lymphoïdes B matures</p>	
<p>Formes leucémiques ou disséminées - Leucémie prolymphocytaire T - Proliférations T ou NK à grands lymphocytes granuleux - Leucémie agressive à cellules NK - Leucémie/ lymphome T de l'adulte (HTLV+) - Syndrome de Sézary Lymphomes cutanés - Lymphome T anaplasique cutané primitif - Proliférations avec cellules de Sézary (Mycosis fungoides, Syndrome de Sézary) Lymphomes ganglionnaires - Lymphome T périphérique sans autre spécificité - Lymphome T anaplasique à grandes cellules (ALK positif) - Lymphome T angioimmunoblastique Lymphomes extra-ganglionnaires - Lymphome T hépatosplénique gamma/delta - Lymphome T/NK extra nodal de type nasal (EBV positif) - Lymphome T de type entéropathie</p>	<p>Leucémie lymphoïde chronique / lymphome lymphocytaire Leucémie prolymphocytaire B Leucémie à tricholeucocytes Lymphome lymphoplasmocytaire (Macroglobulinémie de Waldenström) Lymphomes de la zone marginale : - Lymphome de la zone marginale splénique - Lymphome de la zone marginale ganglionnaire - Lymphome de la zone marginale extraganglionnaire (MALT) Leucémie/lymphome splénique à petites cellules B inclassable : - LNH diffus de la pulpe rouge splénique à petites cellules B - Leucémie à tricholeucocytes variante Lymphome du manteau Lymphome folliculaire Lymphome centrofolliculaire cutané primitif Néoplasies plasmocytaires : - MGUS - Myélome multiple - Plasmocytome solitaire osseux - Plasmocytome extra osseux - Maladie du dépôt d'Immunoglobuline monoclonale - Maladie des dépôts de chaînes légères - Maladie des dépôts des chaînes lourdes (gamma, mu, alpha) - Amyloidose primaire - Myélome ostéosclérotique (syndrome POEMS) Lymphomes diffus à grandes cellules B : - Centroblastique - Immunoblastique - Anaplasique à grandes cellules Lymphome de Burkitt</p>	

Annexe 2 : Déroulement de l'étude oligocentrique en vue de l'établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse

Etape 1 : Quand réaliser le tube SPM 8C ?



Etape 2 :

- Analyse par chaque centre des données de CMF obtenues avec le tube SPM 8C
- Envoi à Grenoble :
 - Des « experiments » pour chaque analyse
 - Des informations clinico-biologiques :
 - *Informations cliniques :*
 - Sexe
 - Age
 - Diagnostic retenu
 - *Informations biologiques*
 - Myélogramme
 - Caryotype médullaire si réalisé
 - Biopsie ostéo-médullaire si réalisée
 - Numération Formule Sanguine correspondant au jour de réalisation du myélogramme
 - Numération de la moelle si réalisée

Etape 3 :

- Réception des documents à Grenoble et décision d'inclusion des patients selon les critères définis (pièce jointe 2)
- Relecture des datas de CMF centralisée à Grenoble et discussion au cas par cas des discordances éventuelles avec le centre concerné

Etape 4 :

Traitement statistique des données à Grenoble

Pièce jointe 1 : Valeurs des différentes sous populations médullaires chez l'adulte pour qualifier un myélogramme « quantitativement normal »

	EMC	EMC selon Rümke
Lignée neutrophile		
Myéloblastes	0-2	0-5
Promyélocytes	1-4	0-8
Myélocytes	10-15	6-21
Métamyélocytes	10-20	6-26
Polynucléaires	15-25	10-32
Lignée éosinophile	0-3	0-6
Lignée basophile	0-1	0-4
Lignée érythroblastique	15-30	10-37
Lymphocytes	5-20	2-26
Plasmocytes	0-3	0-6
Monocytes	0-2	0-5

Pièce jointe 2 : Critères requis pour l'inclusion dans l'étude

Critères d'inclusion

- Myélogramme rendu normal en cytologie (quantitativement et qualitativement)
- Absence d'anomalies au caryotype médullaire
- Absence d'anomalies à la biopsie ostéo médullaire si réalisée
- Concernant la CMF :
 - Absence de cellules anormales identifiées en CMF (critère qualitatif)
 - Pureté médullaire convenable selon des critères choisis
 - Minimum de 50 000 évènements acquis

Critères d'exclusion

→ Référence pour l'exclusion des hémopathies malignes (classification OMS 2008)

Cf. ANNEXE 1

- Patients allogreffés ou autogreffés de moelle osseuse

Annexe 3 : Fiche de liaison à joindre lors de l'envoi d'un « experiment » pour l'étude oligocentrique en vue de l'établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse

Fiche de liaison à joindre lors de l'envoi d'un Experiment

NOM :

PRENOM :

Sexe :

Date de naissance :

Diagnostic retenu :

Autogreffe/allogreffe :

OUI

NON

Pièces à fournir obligatoirement :

- Myélogramme

Pièces à fournir si disponibles :

- Résultats du bilan de CMF du centre si réalisé
- Caryotype médullaire
- Résultats de biopsie ostéo-médullaire
- NFS du même jour que le prélèvement de moelle
- Numération de la moelle
- Autres informations pertinentes

Annexe 4 : Réalisation de la maquette pour l'étude oligocentrique en vue de l'établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse

1) Elimination des évènements indésirables

	graphe	Sélection	hiérarchie	Gate à créer	Modalités
1	FSC-A FSC-H	All events	All events	singulets	
2	CD45 CD36	All events	Singulets	CD36+45-	Dessiner la gate : bien inclure les 36 high en « collant » la gate en haut
				CD36+45-	Dessiner la gate : « coller » la gate en haut à la précédente et en bas à l'axe des abscisses. * A gauche, la gate sera positionnée à la fin de l'analyse. Elle doit s'arrêter au niveau des hématogones et ne pas inclure les myéloblastes. A la fin de l'analyse, mettre en « bring to front » ces 2 populations.
4	FSC-A CD36	CD36+45-	CD36+45-	PLT	Dessiner la gate : coller la gate en haut, à droite et à gauche sur les axes. En bas, trouver la frontière entre FSC et en CD36 (zoomer) La gate contient les plaquettes
→				EB+	= PLT « Invert gate ». La population est enrichie en érythroblastes
7	FSC-A SSC-A	EB+	EB+	DEBRIS 1	Sélectionner les évènements avc un SSC élevé
5	CD19 CD38	CD36-45-	CD36-45-	GR	Sélectionner les évènements CD19- (les CD19+ pourraient correspondre à des blastes) et CD38 – ou low (les CD38 high incluent les plasmocytes pathologiques)
9	FSC-A SSC-A	GR			Vérifier que les évènements GR sont de faible FSC. Possibilité de métastases si nuage de cellules de taille plus grande
3	CD38 SSC-A	Singulets	Singulets	CD38H	Coller la gate en haut, à droite et en bas sur les axes. A gauche, elle s'arrête à la frontière des granuleux
6	FSC-A SSC-A	CD38H	CD38H	DEBRIS 2	Sélectionner les évènements FSClow et/ou SSC high. Bien coller la gate sur les axes en haut, à gauche et à droite
→			Singulets	PLT or DEBRIS 1 or GR or DEBRIS 2	Faire l'union de tous les évènements indésirables : PLT or DEBRIS 1 or GR or DEBRIS 2
→			Singulets	Not(PLT or DEBRIS 1 or GR or DEBRIS 2)	Eliminer tous les évènement indésirables par « invert gate »
8	FSC-A SSC-A	Not(PLT or DEBRIS 1 or GR or DEBRIS 2)	Not(PLT or DEBRIS 1 or GR or DEBRIS 2)	SPM	Sélectionner la population de référence SPM en éliminant les débris restant et les granuleux apoptotiques. Bien coller la gate sur les axes en haut et à droite. *A la fin de l'analyse, mettre les érythroblastes et les monocytes en

					« bring to front » pour affiner la limite avec les débris.
--	--	--	--	--	--

2) Sélection des érythroblastes et des monocytes

	graphe	Sélection	hiérarchie	Gate à créer	Modalités
10	CD45 CD36	SPM	SPM	ERYTHROBLASTES	Cerner le nuage de points CD36low ou high et CD45- ou faiblement +
			SPM	CD45+36+	Cerner la population CD36+45+. Prendre « large » à droite, gauche et bas
11	CD45 SSC-A	CD45+36+ zoomer	CD45+36+	MONOCYTES	Sélectionner les monocytes en éliminant les granuleux et les lymphocytes
12	CD19 CD3				Vérifier que la gate des monocytes n'inclue pas de lymphocytes T ou B
13	CD16 CD38				Vérifier que la gate des monocytes n'inclue pas granuleux CD16 fort Visualisation de monocytes activés CD16+

3) Sélection des plasmocytes

	graphe	Sélection	hiérarchie	Gate à créer	Modalités
14	CD45 CD38	SPM	SPM	CD38H 45	Créer une gate autour des événements CD38 très fort. Agrandir la gate à gauche pour inclure les plasmocytes pathologiques CD38 plus faible et CD45-
15	FSC-A SSC-A	CD38H 45	CD38H 45	PLASMOCYTES	Affiner la sélection des plasmocytes en éliminant les cellules trop granuleuses ou de trop petite taille
16	CD45 CD19	PLASMOCYTES	PLASMOCYTES	PLASMOS N	Ajuster une gate autour des cellules CD19+ CD45+
				PLASMOS P	Ajuster une gate autour des cellules CD19- ou low et/ou CD45- ou low
→			SPM	EB+MONO+PC	
→			SPM	NOT (EB+MONO+PC)	

4) Sélection des cellules lymphoïdes

	graphe	Sélection	hiérarchie	Gate à créer	Modalités
17	CD3 SSC-A	NOT (EB+MONO+PC)	NOT (EB+MONO+PC)	CD3	
→				NOT(CD3)	CD3 « Invert gate »
18	CD16 SSC-A	NOT (EB+MONO+PC)	NOT CD3	CD16 NK	Inclure les CD16+ SSC low ou intermédiaires. Ne pas hésiter à déborder sur les granuleux
19	CD19 SSC-A	NOT (EB+MONO+PC)	NOT (EB+MONO+PC)	CD19	Inclure les CD19+ de SSC low ou intermédiaire. Ne pas hésiter à zoomer pour inclure les CD19low SSC low.
20	CD45 CD38	CD19	CD19	Bm	Inclure les CD45high et les CD45low/CD38low
				HG	Inclure les CD45low/CD38high
21	CD10 CD38	CD19			Vérifier l'absence de CD38low CD10+ ou de CD38high CD10-
22	CD45 SSC-A	NOT (EB+MONO+PC)	NOT (EB+MONO+PC)	CD45 SSC LY	Inclure les CD45low/SSC low (élimination des granuleux) et CD45high/SSC low ou intermédiaire
23	CD19 CD10	CD45 SSC LY			Vérifier l'absence de CD19-CD10+, possiblement des T C10+
→			NOT (EB+MONO+PC)	T CD3	Faire l'intersection des gates CD3 et CD45 SSC LY
→			NOT (EB+MONO+PC)	NK CD16	Faire l'intersection des gates CD16 NK et CD45 SSC LY
→			NOT (EB+MONO+PC)	B CD19	Faire l'intersection des gates Bm et CD45 SSC LY
20	CD45 CD38	CD19	B CD19	B tr	Sélection de B transitionnels CD38high CD45high
→			NOT (EB+MONO+PC)	HEMATOGONES	« intersect » HG et CD45 SSC LY
39	CD34 CD19	HEMATOGONES	HEMATOGONES	HG 34+	Sélectionner la population d'hématogones CD34+ bien individualisé. Ne pas inclure les CD34 low
20	CD45 CD38	CD19	HEMATOGONES	HG1	Sélectionner les hématogones 1, exprimant le plus faiblement CD45
→			HEMATOGONES	HG2	HG1 « invert gate »
24	FSC-A SSC-A	T CD3+ NK CD16+ B CD19			Analyser la taille des lymphocytes
→			SPM	CMN	Joindre (EB+MONO+PC)+T CD3 + B CD19 + NK CD16 + HEMATOGONES
→			SPM	NOT(CMN)	CMN « Invert gate »
25	CD45 SSC-A	SPM			Visualisation des populations identifiées

5) Sélection des granuleux

	graph e	Sélection	hiérarchie	Gate à créer	Modalités
26	CD34 SSC-A	NOT(CMN) + HEMATOGONES	NOT(CMN)	CD34M	Sélectionner les myéloblastes CD34high / SSClow ou intermédiaire. Pour la limite à gauche, utiliser le seuil de positivité de CD34 sur les HG
27	CD34 CD38	CD34M + ERYTHROBLASTES	CD34M	CD34+38L	Sélectionner les CD34 CD38 négatifs. Le seuil est donné par la limite supérieure de CD38 sur les érythroblastes
→			NOT(CMN)	NOT(CD34M)	CD34 « invert gate »
28	CD45 SSC-A	NOT(CD34M)	NOT(CD34M)	GRA	Sélectionner les granuleux
29	CD16 CD10	GRA	GRA	GRA10+	Sélectionner les CD16high CD10+. La limite inférieure de la gate est à la limite supérieure de CD10 pour les CD16low. Une fois créée, la forme de la gate ne doit pas être modifiée.
32	CD45 SSC-A	GRA	GRA	CD45I SSCH	Sélectionner une région incluant les événements CD45high et SSC high. Prendre large à gauche
33	CD45 CD10	GRA	CD45I SSCH	CD45I CD16-	Sélectionner les évènements CD45high et CD16- ou low. Prendre large à gauche. La partie supérieure ne doit pas couper en 2 une population. Elle peut inclure des cellules CD16+
34	FSC-A SSC-A	CD45I CD16-	CD45I CD16-	EOSINO	Sélectionner la population SSChigh / FSC intermédiaire. Les grandes cellules doivent être éliminées
→			GRA	GRA10+ OR EOSINO	Joindre GRA10+ et EOSINO
→			GRA	GRI	GRA10+ or EOSINO « invert gate »
38	CD10 CD34	GRI	GRI	GRA10-34-	Sélectionner les évènements CD10- CD34-
42	SSC-A	GRA10-34-	GRA10-34-	GRA10-	Mettre une région éliminant les évènements sur le dernier canal à droite
30	CD16 CD38	NOT(CD34M)	GRA	CD38H 16-	Sélectionner les CD38high CD16-
28	CD45 SSC-A	NOT(CD34M)	CD38H 16-	BASOS	Sélectionner le nuage de point CD45lo wSSClow
→			SPM	GRIM	« intersect » GRIM et not CMN
31	CD16 CD38	GRIM + HG	GRIM	GRIM-1 Q2 GRIM-2 GRIM-3	Ajouter un quadrant. Les GRIM-1 sont CD16- et CD38 fort identique aux hématogones (le seuil est positionné à la limite inférieure des hématogones) Les GRIM-2 sont CD16- et CD38 hétérogène Les GRIM-3 sont CD16+ et CD38low
→			SPM	PNN	« intersect » GRA10+ et NOT(CMN)
→			SPM	PNE	« intersect » EOSINOS et NOT(CMN)
→			SPM	PNB	« intersect » BASOS et NOT(CMN)
→			SPM	GRANULEUX	Jonction de PNN + PNE + PNB + GRIM +

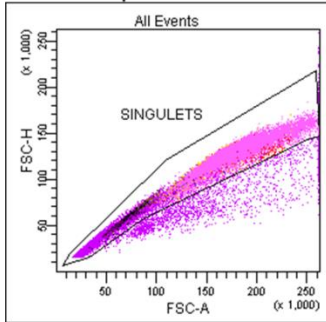
6) Sélections diverses

	graphe	Sélection	hiérarchie	Gate à créer	Modalités
25	CD45 SSC-A	SPM	SPM	CD45	Mettre un curseur sur les CD45+ = exclure les érythroblastes
→			SPM	CID	Joindre toutes les cellules identifiées : CMN+ GRA+ CD34M
→			SPM	CNI	CID « invert gate »
35	CD45 SSC-A	CNI	CNI	???	Sélection d'un nuage de point parmi les CNI
36	FSCA SSC-A	CNI			
40	CD45 CD34	CD34M + HG 34+	SPM	CD34 totaux	Joindre CD34M + HG 34+
22			SPM	Ly	Sélectionner les CD45high et SSClow
37	FSCA SSC-A	SPM			Visualisation des différentes populations identifiées
41	SSC-A	T CD3			Visualisation pour score OGATA
43	CD45	CD34M			Visualisation pour score OGATA
44	CD45	T CD3			Visualisation pour score OGATA
45	CD10 CD34 contours	GRIM			Visualisation pour score OGATA

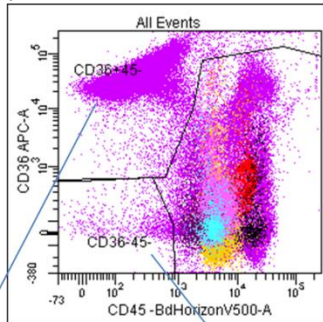
Annexe 5 : Aide à l'analyse de la maquette utilisée pour l'étude oligocentrique permettant l'établissement de valeurs de référence pour les sous populations de la moelle osseuse

Exclusion des évènements indésirables (1/2)

Elimination des doublets
Ne pas hésiter à mettre moins de point

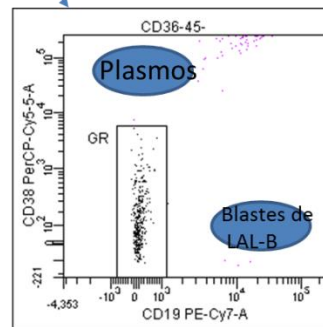
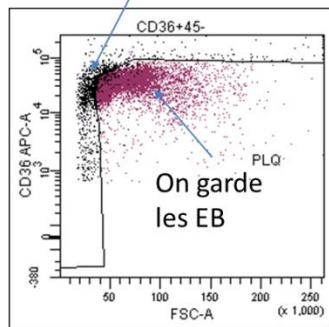
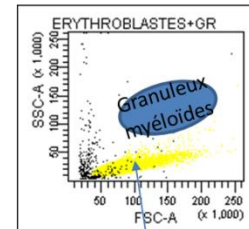


Elimination des plaquettes CD36+CD45-
pour enrichir en EB



Elimination des GR CD36-CD45-
Si on prend trop de CD45:
on peut retrouver

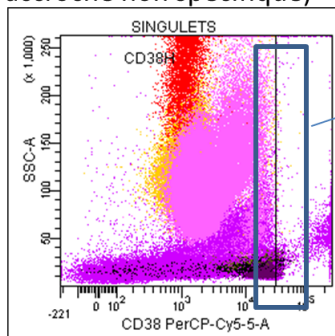
- des plasmocytes en CD38H
- des blasts de LAL-B CD45 low CD36-
- Des cellules granuleuses myéloïdes



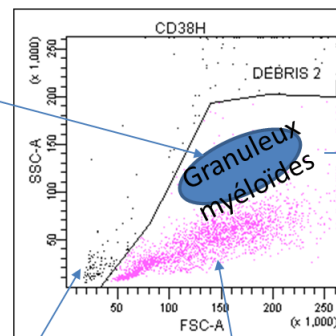
EB

Exclusion des évènements indésirables (2/2)

Elimination des CD38 forts:
accroche non spécifique)

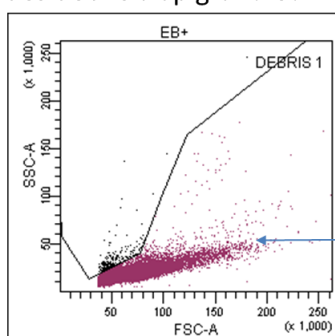


Si on prend du CD38 pas assez fort



Ne pas les exclure!

Purification des EB par élimination des débris trop granuleux

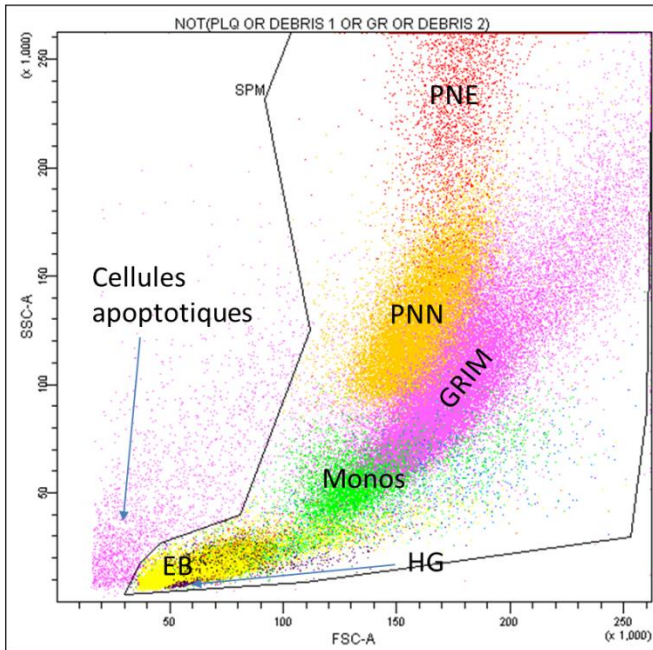


EB

Définition de « SPM »

Populations éliminées: Débris 1 + Débris 2 + Plaquettes + GR

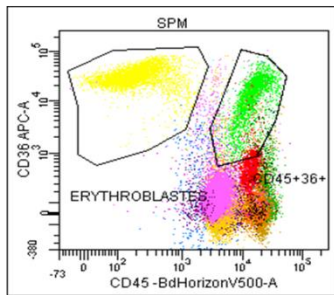
SPM= Toutes les cellules acquises au départ – les populations éliminées



Pour la fenêtre SPM:

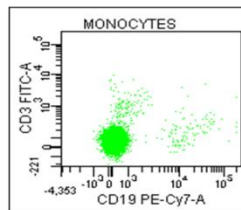
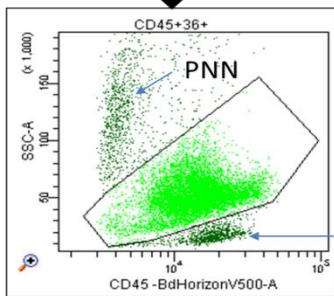
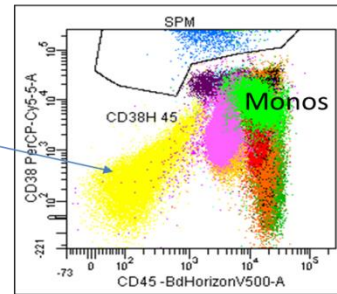
- Faire un agrandissement
- Un bring to front sur les EB permet savoir où sont les cellules les plus petites: attention à ne pas les couper
- Bien coller les axes en SSC high (en haut) et FSC high (à droite)

Sélection des EB et des monocytes

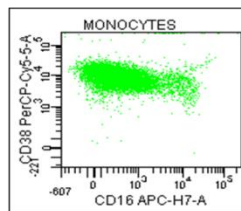


EB: Regarder l'allure du nuage sur le dot plot

Monos CD45+ CD36+: Prendre assez large lors du 1^{er} fenêtrage, des gates ensuite permettent d'affiner



Permet de s'assurer que l'on n'a pas pris de LB CD19+ ou LT CD3+ dans le nuage des monos

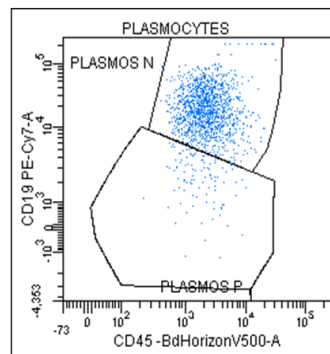
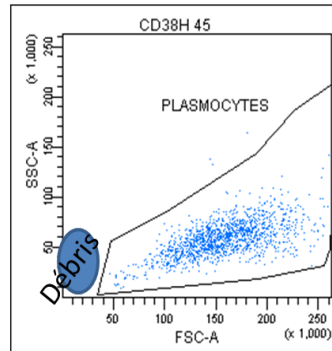
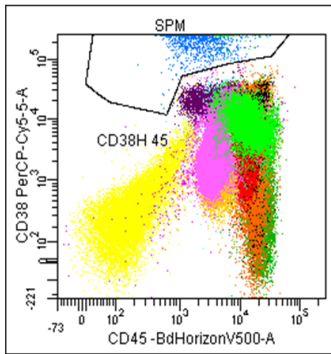


Permet :

- d'observer des monos activés CD16+
- de s'assurer que l'on a pas pris des granuleux CD45+CD16+CD36+ (se voit dans les SMD)

Sélection des plasmocytes

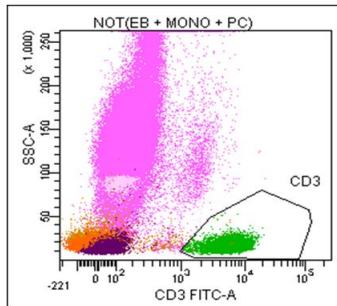
- Bien descendre en CD45 low (CD 38 high) pour prendre les plasmocytes anormaux
- Bien coller l'axe du haut
- Attention à ne pas prendre d'hématogones



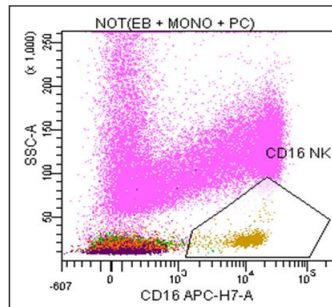
Ne pas déplacer ces gates: seuil fixé!

Sélection des cellules lymphoïdes (1/2): Sur une fenêtre SPM - (EB+Monos+Plasmos)

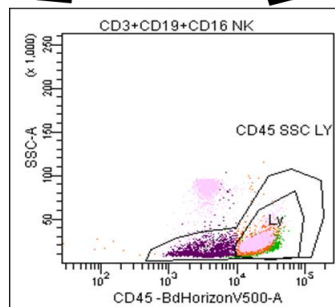
Sélection des LT et NK



Sélection des LT CD3+



Sélection des NK CD16+: Bien prendre les NK SSC high quitte à prendre à tort des PNN dégranulés (se voit dans les SMD)



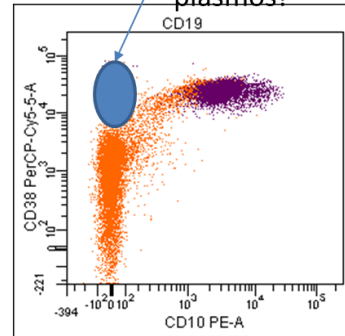
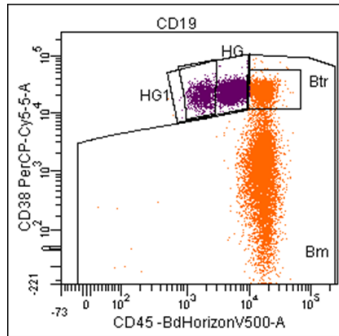
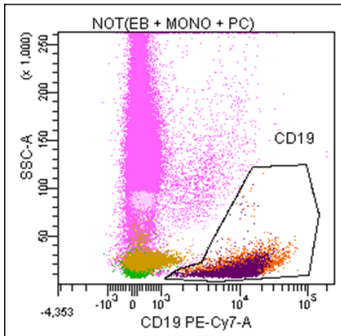
Fenêtre d'affinage de la sélection des LT et NK: permet d'exclure les granuleux en CD45 plus faible que les lymphos et SSC fort

Dans le fenêtre « Ly » qui sert au calcul du score d'OGATA, il faut veiller à bien exclure les hématogones et ne prendre que les lymphocytes T+B+NK

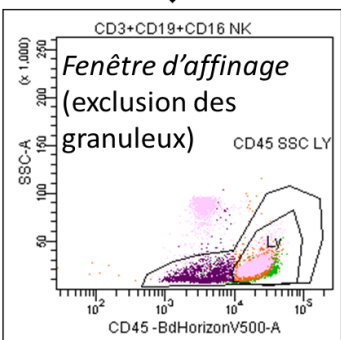
Sélection des cellules lymphoïdes (2/2)
Sélection des LB et hémotogones

HG1: CD34+ CD10+ CD19+
 HG2: CD34- CD10+ CD19+

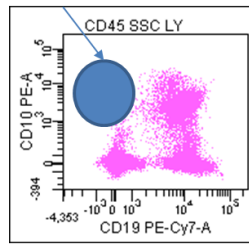
Boîte vide
 Attention aux plasmos!



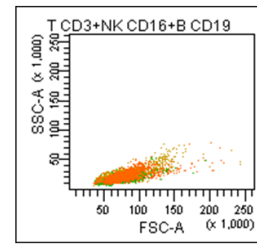
Appréciation de la maturation des LB
 (HG1 → HG2 → B transitionnels → B matures)



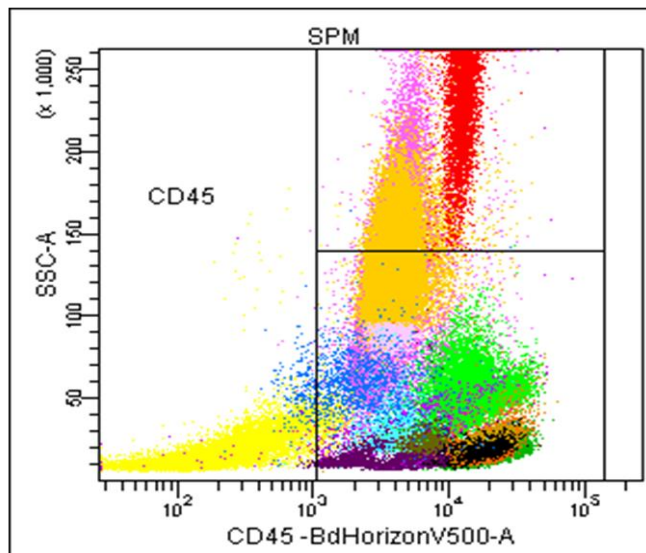
Boîte vide:
 Attention au LT de LAI qui sont CD10+ CD19- CD3+/-



Visualisation des LT+LB+NK



Visualisation des différentes sous populations de la moelle



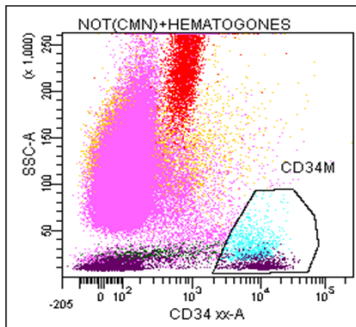
Placement des curseurs sur la population CD45+ (intervient dans le score d'OGATA): éliminer les érythroblastes +/- les plasmos (mais normalement leur pourcentage est faible)

CMN = LT + LB + NK + HG + Plasmos + Monos + EB
SPM = CMN + GRA + CD34M

Sélection des granuleux (1/3)

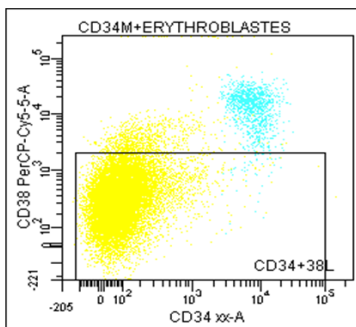
Granuleux totaux = GRIM + PNN + PNE + PNB

Exclusion des myéloblastes



Sélection des myéloblastes CD34 high SSC low ou intermédiaire:

Pour la limite à gauche, on utilise le seuil de positivité de CD34 sur les hématogones.



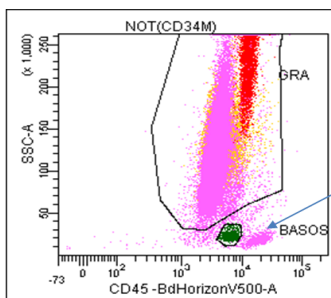
Recherche d'une baisse d'expression de CD38 sur les myéloblastes (possible dans les SMD)

Pour définir les CD34+CD38 low, on montre les EB qui sont CD38- et permettent donc de définir le seuil de positivité du CD38.

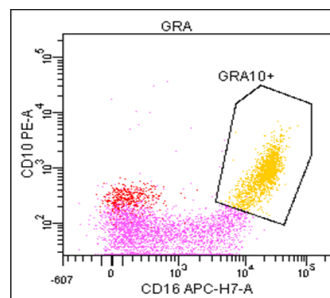
Fenêtre fixe qui ne doit pas être déplacée.

Sélection des granuleux (2/3)

Granuleux totaux, GRIM et PNN



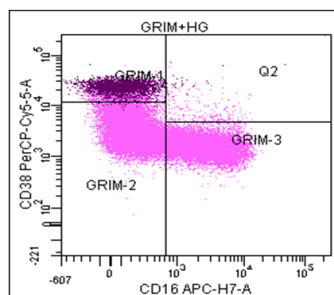
NK CD16-



Sélection des PNN CD16+ CD10+

Limite inférieure de la gate à la limite supérieure de CD10 pour les CD16 low. La forme de la gate ne doit pas être modifiée.

Sélection des granuleux sur les non CMN non myéloblastes CD34+



Identification des sous populations de GRIM

GRIM-1: CD16- CD38 fort (comme les HG: on se sert donc des HG pour positionner le seuil de positivité sur le CD38)

« Promyélocytes »

GRIM-2: CD16- CD38 intermédiaire

« Myélocytes »

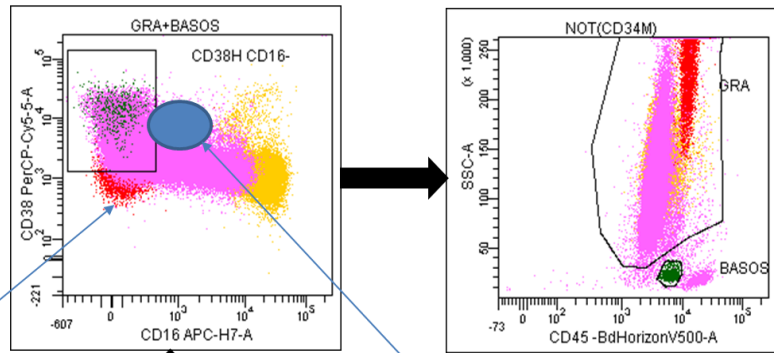
GRIM-3: CD16+ CD38 low

« Métamyélocytes »

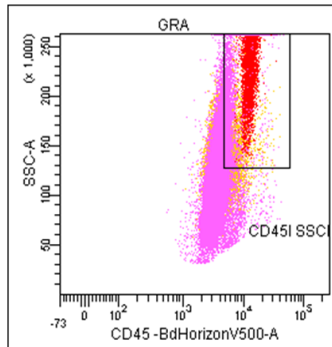
Sélection des granuleux (3/3)

Les PNB

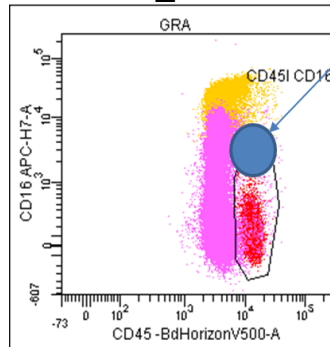
- 1) Sélection de la population CD38 high CD16-
- 2) Possible présence de PNE CD16 intermédiaire CD38 intermédiaire



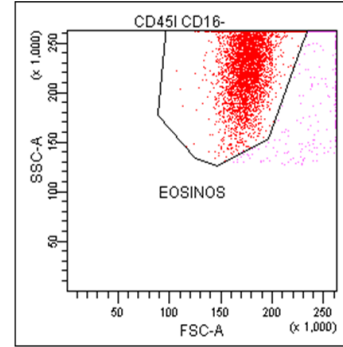
Les PNE



Prendre les CD45 high SSC high, de manière large



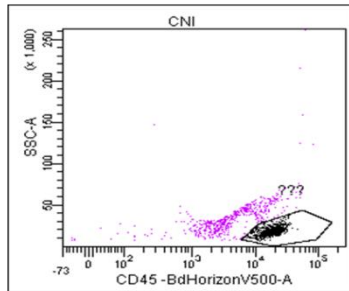
Prendre les CD45 high CD16- ou low. Veiller à ce que la partie supérieure de la gate ne coupe pas une population, il est possible qu'elle contienne des CD16+ s'il y a présence d'un continuum



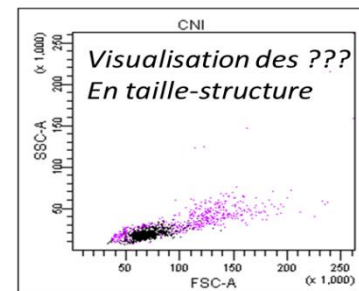
Elimination des grandes cellules ou GRIM SSC high FSC high

Possible présence de PNE CD16 et CD38 intermédiaires

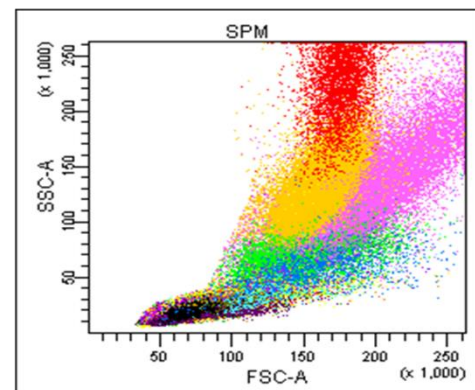
Cellules non identifiées (CNI)



Placer la gate ??? sur une population non identifiée qui vous interpelle pour essayer de voir où elle sort dans les autres dot plot (stratégie de back-gating)



Visualisation de toutes les sous-populations identifiées
SPM = CMN + GRA + CD34M

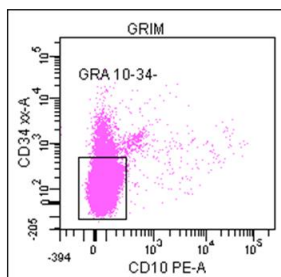


Score OGATA (1/2)

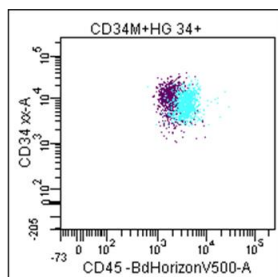
Rappel sur les paramètres du score

		Points		Points
% de myéloblastes CD34+ / CD45	$\leq 2,4\%$	0	$> 2,4\%$	1
% d'hématogones CD34+ / CD34	$\geq 5\%$	0	$< 5\%$	1
MFI CD45 sur lymphos / MFI CD45 sur myéloblastes	≥ 4 et $\leq 7,8$	0	< 4 ou $> 7,8$	1
Mode SSC Granuleux CD10- / mode SSC lymphocytes	≥ 6	0	< 6	1

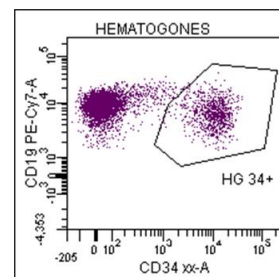
Score OGATA (2/2)



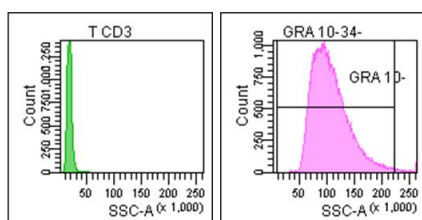
Sélection des granuleux CD10-
Ne pas hésiter à zoomer



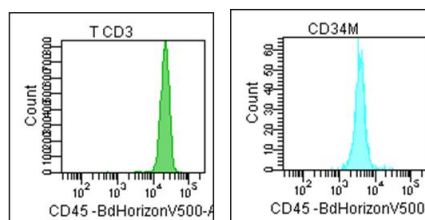
CD34M et HG CD34+



Sélection des HG CD34+



Mode SSC LT CD3
Mode SSC Granuleux CD10-



MFI CD45 sur LT CD3
MFI CD45 sur MB

BIBLIOGRAPHIE

1. Souvignet A. Nouvelle démarche d'identification des sous populations cellulaires de la moelle osseuse par cytométrie en flux, en un tube huit couleurs. 2014. (Thèse d'exercice)
2. Jacob, Marie-Christine, Souvignet, Alice. Single eight-color tube for flow cytometric reliable extended leukocyte differential in bone marrow. 2015. (soumis)
3. Terstappen LW, Levin J. Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry. *Blood Cells* 1992;18:311–330; discussion 331–332.
4. Andreoni C, Rigal D, Bonnard M, Bernaud J. Phenotypic analysis of a large number of normal human bone marrow sample by flow cytometry. *Blut* 1990;61:271–277.
5. 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;76B:18–26.
6. Hannet I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyère M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol. Today* 1992;13:215, 218.
7. Huenecke S, Behl M, Fadler C, Zimmermann SY, Bochennek K, Tramsen L, Esser R, Klarmann D, Kamper M, Sattler A, von Laer D, Klingebiel T, Lehrnbecher T, Koehl U. Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *Eur. J. Haematol.* 2008;80:532–539.
8. 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.
9. Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 2002;30:3–6.
10. Galland F. Hématopoïèse. Available at: http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p76/L2_FG_h_mato.pdf. Accessed April 15, 2015.
11. Faculté de médecine de Rennes. Hématopoïèse. Available at: https://facmed.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20131015091629gacHematopoiese_L2-UE6_30SEPT--14OCT2013_4heures_bis.pdf. Accessed April 15, 2015.
12. Bain BJ. Bone marrow aspiration. *J. Clin. Pathol.* 2001;54:657–663.
13. Haferlach T, Bacher U, Thöml H, Diem H. Atlas de poche d'hématologie, diagnostic pratique morphologique et clinique. 3ème édition. Lavoisier; 2014.
14. Zandecki M. <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/les-cellules-du-sang/apprendre-a-observer-un-frottis-medullaire-et-realiser-un-myelogramme/12-enseignements/134-principes-generaux-de-lecture-du-frottis-medullaire>.
15. Davidson E. The distribution of cells in peripheral blood smears. *J. Clin. Pathol.* 1958;11:410–411.
16. Ruemke CL. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. *Triangle Sandoz J. Med. Sci.* 1960;4:154–158.
17. Rümke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. *Blood Cells* 1985;11:311–314, 315.

18. Fuentes-Arderiu X, Rigo-Bonnin R. Measurement uncertainty and clinical interpretation of measurement results. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* 2014;52:e163–165.
19. Ronot X, Grunxald D, Mayol J-F, Boutonnat J. *La cytométrie en flux*. Lavoisier; 2006. 456 p.
20. BD FACSCanto™ II Flow Cytometer Filter Guide - BD_FACSCanto_II_FilterGuide.pdf. Available at: http://static.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCanto_II_FilterGuide.pdf. Accessed May 14, 2015.
21. Stelzer GT, Shults KE, Loken MR. CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993;677:265–280.
22. 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.
23. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal N a. C, 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. Van de Loosdrecht A. Myelodysplastic Syndromes the emerging application of Flow Cytometry. ESCCA European Society for clinical cell analysis Budapest. 2012. Available at: http://www.escca.eu/budapest2012/files/static/session_7_-_Van_de_Loosdrecht.pdf. Accessed April 15, 2015.
25. 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.
26. 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.
27. Gopinath R, Nutman TB. Identification of eosinophils in lysed whole blood using side scatter and CD16 negativity. *Cytometry* 1997;30:313–316.
28. Jacob M-C. Identification phénotypique des sous populations lymphoïdes normales dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes. 2014.
29. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;70:1316–1324.
30. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
31. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br. J. Haematol.* 2005;128:732–733; author reply 733–734.
32. Baer MR. Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* 2002;4:398–402.
33. 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.

34. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse 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.
35. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001;46:23–27.
36. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111:3941–3967.
37. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S14–22.
38. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zucchetto A, Marini R, Niscola P, Consalvo MAI, Mazzone C, Ottaviani L, Panetta P, Bruno A, Bomben R, Suppo G, Degan M, Gattei V, de Fabritiis P, Cantonetti M, Lo Coco F, Del Principe D, Amadori S. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:853–861.
39. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:2633–2639.
40. Perz J, Topaly J, Fruehauf S, Hensel M, Ho AD. Level of CD 20-expression and efficacy of rituximab treatment in patients with resistant or relapsing B-cell prolymphocytic leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2002;43:149–151.
41. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJ, Catovsky D. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leuk. Res.* 1998;22:185–191.
42. 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.
43. 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.
44. Fadem RS, Berlin I, Yalow R. Comparisons between bone marrow differentials prepared from particles and from random samples of aspirate and determinations of the dilution of aspirate with peripheral blood utilizing radioactive phosphorus (P32). *Blood* 1951;6:160–174.
45. 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;76B:27–36.

46. Lee S-H, Ho S-J, Thomas DT, Giri P, Lee H, Sia H, To LB, Sullivan TR. A partial nucleated differential cell count of the bone marrow aspirate that is independent of peripheral blood dilution. *Int. J. Lab. Hematol.* 2008;30:473–479.
47. 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.
48. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, van den Beemd MW, van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000;14:816–825.
49. Batinić D, Marusić M, Pavletić Z, Bogdanić V, Uzarević B, Nemet D, Labar B. Relationship between differing volumes of bone marrow aspirates and their cellular composition. *Bone Marrow Transplant.* 1990;6:103–107.
50. Sébahoun G, Horschowski N. Cytologie et histologie médullaires normales. *Encycl. Méd.-Chir. Ed. Sci. Médicales Elsevier SAS Hématologie* 2002;13-000-A-30:8.
51. Shibata H, Yamane T, Yamamura R, Ohta K, Takubo T, Kamitani T, Hino M. Automatic analysis of normal bone marrow blood cells using the XE-2100 automated hematology analyzer. *J. Clin. Lab. Anal.* 2003;17:12–17.
52. Yamamura R, Yamane T, Hino M, Ohta K, Shibata H, Tsuda I, Tatsumi N. Possible automatic cell classification of bone marrow aspirate using the CELL-DYN 4000 automatic blood cell analyzer. *J. Clin. Lab. Anal.* 2002;16:86–90.
53. BiostaTGV - Statistiques en ligne. Available at: <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>. Accessed May 14, 2015.
54. 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.
55. Kalina T, Flores-Montero J, Lecomte Q, Pedreira CE, van der Velden VHJ, Novakova M, Mejstrikova E, Hrusak O, Böttcher S, Karsch D, Sędek Ł, Trinquand A, Boeckx N, Caetano J, Asnafi V, Lucio P, Lima M, Helena Santos A, Bonaccorso P, van der Sluijs-Gelling AJ, Langerak AW, Martin-Ayuso M, Szczepański T, van Dongen JJM, Orfao A. Quality assessment program for EuroFlow protocols: Summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2015;87:145–156.
56. Gratama JW, Bolhuis RL, Van 't Veer MB. Quality control of flow cytometric immunophenotyping of haematological malignancies. *Clin. Lab. Haematol.* 1999;21:155–160.



*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 couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque »).



Julie Pont

Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire

Résumé

L'immunophénotypage de la moelle osseuse par cytométrie en flux est un outil indispensable au screening, classement et suivi des hémopathies malignes. Notre objectif dans ce travail est de déterminer des valeurs de référence pour les sous populations lymphoïdes et myéloïdes de la moelle.

Un problème important est la fréquente hémodilution des moelles osseuses qui modifie les proportions des populations. Dans un premier temps, nous avons donc validé un critère cytométrique d'appréciation de la pureté médullaire : le rapport des granuleux immatures (GRIM) sur les PNN. Sur une cohorte de 106 patients, nous avons montré que ce paramètre était fortement corrélé à la méthode d'Holdrinet. Il s'agit ainsi du premier critère cytométrique validé. Il est unique, facile à calculer, utilisable chez l'enfant comme chez l'adulte, que la moelle soit normale ou pathologique.

Nous avons dans un second temps utilisé ce critère cytométrique pour sélectionner 97 moelles osseuses cytologiquement normales, non diluées, dans une étude oligocentrique avec les CHU de Saint-Etienne et de Lyon et nous avons déterminé les valeurs de référence de 16 sous-populations pour 5 classes d'âge, du bébé à l'adulte de plus de 70 ans. A ce jour, il s'agit des seules valeurs disponibles en cytométrie pour autant de populations et pour tous les âges de la vie.

Enfin, notre étude est l'étape ultime avant l'évaluation des capacités de screening des hémopathies de ce tube en 8 couleurs dans la moelle osseuse.

Mots clés : moelle osseuse, valeurs de référence, cytométrie en flux, pureté médullaire

Definition of reference values for 16 bone marrow subsets by flow cytometry according to age and proposal of a cytometric criterion for medullar dilution evaluation

Abstract

Bone marrow immunophenotyping by flow cytometry is an essential tool to screen, classify and monitor hematological malignancies. Our aim in the present work is to determine reference values for myeloid and lymphoid bone marrow subpopulations.

A major issue for bone marrow cell subsets quantification is contamination by peripheral blood-derived cells which modify cell counts. Thus, in a first step, we validated a criterion for assessing cytometric bone marrow purity. It's the ratio of immature granulocytes (IGRA) on neutrophils. In a cohort of 106 patients, we have shown that this parameter is highly correlated to the standard Holdrinet method. This first validated cytometric test is unique, easy to calculate, applicable for children and adults, for normal or pathological samples.

Secondly we used this cytometric criterion to select 97 cytomorphologically normal, undiluted bone marrow samples, in an oligocentric study with Saint-Etienne and Lyon hospitals. We determined the reference values of 16 subpopulations in 5 age groups, from infants to over 70 years old adults. They are the only values available by flow cytometry for as many populations and for as many age classes.

Finally, our study is the last step before testing the capacity of this 8-color tube to screen hematological disorders in bone marrow samples.

Key words: bone marrow, reference values, flow-cytometry, peripheral blood contamination