

Faculté de Pharmacie

Année 2021

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 octobre 2021

Par **Nicolas VOIRIN-MATHIEU**

Né le 14/09/1994 à Paris 12ème

Evaluation des performances analytiques d'un nouvel automate de cytométrie le XF-1600 Sysmex® : corrélation avec les Navios de Beckman Coulter®.

Thèse dirigée par Estelle GUERIN

Examineurs :

M. Franck SAINT-MARCOUX, Professeur des Universités, laboratoire de Pharmacologie, faculté de Pharmacie.

M. Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, laboratoire Hématologie biologique, faculté de Médecine.

Mme. Jeanne COOK-MOREAU, Maitre de Conférences, Immunologie, faculté de Pharmacie.

M. David RIZZO, Maitre de Conférences, Laboratoire Hématologie biologique, faculté de Médecine.

M. Franck TRIMOREAU, Praticien Hospitalier, Laboratoire Hématologie biologique.

Mme. Estelle GUERIN, Praticien Hospitalier, Laboratoire Hématologie biologique.





Faculté de Pharmacie

Année 2021

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 octobre 2021

Par **Nicolas VOIRIN-MATHIEU**

Né le 14/09/1994 à Paris 12ème

Evaluation des performances analytiques d'un nouvel automate de cytométrie le XF-1600 Sysmex® : corrélation avec les Navios de Beckman Coulter®.

Thèse dirigée par Estelle GUERIN

Examineurs :

M. Franck SAINT-MARCOUX, Professeur des Universités, laboratoire de Pharmacologie, faculté de Pharmacie.

M. Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, laboratoire Hématologie biologique, faculté de Médecine.

Mme. Jeanne COOK-MOREAU, Maitre de Conférences, Immunologie, faculté de Pharmacie.

M. David RIZZO, Maitre de Conférences, Laboratoire Hématologie biologique, faculté de Médecine.

M. Franck TRIMOREAU, Praticien Hospitalier, Laboratoire Hématologie biologique.

Mme. Estelle GUERIN, Praticien Hospitalier, Laboratoire Hématologie biologique.



Liste des enseignants

Le 1^{er} octobre 2020

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur Bertrand **COURTIOUX**

VICE-DOYEN :

Monsieur David **LEGER**, Maître de conférences

ASSESEURS :

Monsieur le Professeur Serge **BATTU**, Monsieur le Professeur Nicolas **PICARD**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COURTIOUX Bertrand	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
VIANA Marylène	PHARMACIE GALÉNIQUE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine

MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,
IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE

JOST Jérémy

CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET
PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES :

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine

PHARMACIE GALÉNIQUE

BÉGAUD Gaëlle

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES

CHEMIN Guillaume

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

CLÉDAT Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis

CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET
PHARMACIE CLINIQUE

COOK-MOREAU Jeanne

MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,
IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE

DELEBASSÉE Sylvie

MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,
IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

FABRE Gabin

BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES

FROISSARD Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

JAMBUT Anne-Catherine

CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET
PHARMACIE CLINIQUE

LABROUSSE Pascal

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

LAVERDET Betty

PHARMACIE GALÉNIQUE

LAWSON Roland

PHARMACOLOGIE

LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

AUDITEAU Émilie	ÉPIDÉMIOLOGIE, STATISTIQUE, SANTÉ PUBLIQUE
MARCHAND Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE

ENSEIGNANTS D'ANGLAIS :

HEGARTY Andrew	CHARGÉ DE COURS
VERCELLIN Karen	PROFESSEUR CERTIFIÉ

Remerciements

Aux membres du jury :

A Monsieur le Professeur Franck SAINT-MARCOUX pour avoir accepté d'être le président de ce jury ;

A Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD de me faire l'honneur de participer à ce jury, pour son accueil dans le service d'hématologie, ainsi que pour son enseignement de haute valeur durant ces deux semestres d'hématologie ;

A Monsieur le docteur David Rizzo pour avoir accepté d'être membre de ce jury, ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité ;

A Madame le docteur Jeanne MOREAU qui a également accepté de juger ce travail ;

A Madame le docteur Estelle GUERIN qui a dirigé ce travail. Je la remercie chaleureusement pour son encadrement, son enseignement et sa disponibilité tout au long de ce travail. Merci également pour tout ce que tu m'as appris.

Un grand merci aussi à Franck TRIMOREAU d'être présent aujourd'hui. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour ta passion que tu partages autour du microscope. Tu m'as beaucoup appris.

Merci à tous les biologistes pour ce qu'ils m'ont appris et qui ont contribué à me faire aimer un peu plus la biologie médicale. Merci également aux techniciens du secteur de cytométrie en flux : Anne, Patrick, Patricia et bien sûr Stéphane. Merci pour ton implication dans le projet ainsi que pour tout ce que tu m'as appris.

Une pensée enfin pour tous mes co-internes, à commencer par Fifamé pour m'avoir supporté dans ce bureau pendant de nombreux mois et pour ses encouragements. Merci aussi à tous mes co-internes d'hémato, Sarah, Emilien, Marie-Mathilde, Mathieu, Maxime, Léa. Une grosse pensée pour Caroline et Léa pour ce semestre d'été génial que l'on a passé ensemble.

Et tous les autres, que je n'oublie pas...

Merci à mon meilleur ami Baptiste qui a toujours été présent pour moi et qui m'a toujours soutenu dans le bon comme dans les mauvais moments !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

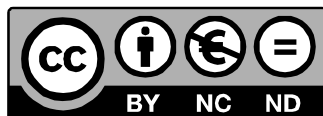


Table des matières

Introduction.....	18
I. Généralités sur la cytométrie en flux	19
I.1. Définition et principe de la cytométrie en flux (CMF).....	19
I.1.1. Le système fluide.....	20
I.1.2. Le système optique.....	21
I.1.3. Le système électronique et informatique	22
I.1.4. Anticorps, fluorochromes et fluorescence	24
I.1.5. Les compensations.....	27
I.1.6. Préparation des échantillons	28
I.2. Définition des clusters de différenciation (CD).....	29
I.3. Applications de la CMF	30
II. Principes des panels utilisés dans la comparaison d'automates	31
II.1. Panel orientation lymphoïde B	31
II.1.1. Stratégie de fenêtrage	32
II.2. Panel « complément B »	37
II.2.1. Stratégie de fenêtrage	39
II.3. Panel d'orientation lymphoïde T.....	42
II.3.1. Stratégie de fenêtrage	43
II.4. Panel typage plasmocytaire	47
II.4.1. Stratégie de fenêtrage	49
II.5. Panel LMMC.....	54
II.5.1. Stratégie de fenêtrage	54
II.6. Panel Covid	59
II.6.1. Stratégie de fenêtrage	59
II.7. Panel « leucémie aigüe »	60
II.7.1. Stratégie de fenêtrage	61
III. Présentation du XF-1600 Sysmex®	65
III.1. Caractéristiques techniques.....	65
III.2. Maintenance quotidienne et CIQ.....	67
III.3. Passage des échantillons.....	70
III.4. Acquisition des images.....	72
III.5. Création et paramétrage des panels.....	73
IV. Matériel et méthodes	74
V. Résultats	76
I.1. Description générale.....	76
V.1. Panel orientation lymphoïde B.....	77
V.1.1. Corrélation méthode quantitative.....	77
V.1.2. Corrélation méthode qualitative	80
V.1.3. Exemples d'images	82
V.2. Panel complément B.....	107
V.2.1. Corrélation méthode quantitative	107
V.2.2. Corrélation méthode qualitative	110
V.2.3. Exemples d'images	110
V.3. Panel orientation lymphoïde T	123

V.3.1. Corrélation méthode quantitative	123
V.3.2. Corrélation méthode qualitative	126
V.3.3. Exemples d'images	126
V.4. Panel typage plasmocytaire.....	139
V.4.1. Corrélation quantitative	139
V.4.2. Corrélation méthode qualitative	142
V.4.3. Exemples d'images	144
V.5. Panel LMMC.....	157
V.5.1. Corrélation méthode quantitative	157
V.5.2. Corrélation méthode qualitative	159
V.5.3. Exemples d'images	160
V.6. Panel Leucémie aigue	169
V.6.1. Corrélation méthode qualitative	169
V.6.2. Corrélation méthode qualitative	172
V.6.3. Exemples d'images	173
VI. Discussion.....	189
VI.1. Biais généraux	189
VI.2. Panel orientation lymphoïde B.....	189
VI.3. Panel complément B.....	195
VI.4. Panel d'orientation lymphoïde T	196
VI.5. Panel de typage plasmocytaire.....	197
VI.6. Panel LMMC.....	199
VI.7. Panel leucémie aigue.....	199
VI.8. Utilisation et performances de l'automate	200
Conclusion.....	202
Références bibliographiques	203
Annexes.....	207
Serment De Galien.....	219

Table des illustrations

Figure 1 : Principe général de la CMF (3)	20
Figure 2 : Principe de focalisation hydrodynamique (4)	20
Figure 3 : Graphique biparamétrique FS/SS	21
Figure 4 : Illustration de la fonction des différents filtres (5).....	22
Figure 5 : Exemple d'histogramme mono paramétrique	23
Figure 6 : Exemple d'histogramme bi paramétrique en dot plot.....	23
Figure 7 : Principe de la fluorescence (7)	24
Figure 8 : Principe du marquage en tandem (ex : Phycoérythrine - Cyanine 5) (8).....	25
Figure 9 : Principaux fluorochromes utilisés en CMF	25
Figure 10 : Spectre d'excitation et d'émission pour le FITC (10)	26
Figure 11 : Spectre d'excitation et d'émission pour le Pacific Blue (PB) (10).....	26
Figure 12 : Spectre d'excitation et d'émission pour l'Alexa Fluor® 700 (AF700) (10).....	26
Figure 13 : Fuites de fluorescence (4)	27
Figure 14 : Principaux CDs utilisés en hématologie (11)	29
Figure 15 : Graphique FS/SS.....	32
Figure 16 : Graphique CD45/SS en density plot	33
Figure 17 : Graphique CD3/SS	33
Figure 18 : Graphique CD4/CD8.....	34
Figure 19 : Graphique CD2/CD3.....	34
Figure 20 : Graphique CD19/CD3.....	35
Figure 21 : Graphique CD5/CD19.....	35
Figure 22 : Graphique kappa/lambda	36
Figure 23 : Graphique CD20/SS	36
Figure 24 : Calcul du score de Matutes (19)	38
Figure 25 : Marqueurs des lymphomes B en CMF (22)	39
Figure 26 : Stratégie de fenêtrage du panel complément B.....	40
Figure 27 : Stratégie de mise en place des seuils de positivité pour chacun des marqueurs étudiés	41
Figure 28 : Graphique CD19+TCRGD/CD3	43
Figure 29 : Graphique CD5/CD7.....	44
Figure 30 : Graphique CD4/CD8.....	44
Figure 31 : Graphique CD10/CD4.....	45

Figure 32 : Graphique CD16/CD56 sur CD3+	45
Figure 33 : Graphique CD16/CD56 sur CD3-.....	46
Figure 34 : Tableau récapitulatif CDs présent dans le myélome (33).....	48
Figure 35 : sélection des plasmocytes CD38/CD138.....	49
Figure 36 : Sélection des lymphocytes totaux (graphique CD45/SS).....	49
Figure 37 : Graphique CD19/CD20	50
Figure 38 : kappa/lambda sur la population plasmocytaire.....	50
Figure 39 : kappa/lambda sur la population lymphocytaire B	51
Figure 40 : Stratégie de fenêtrage du panel plasmocytes (1).....	52
Figure 41 : Stratégie de fenêtrage du panel plasmocyte (2).....	53
Figure 42 : Sélection des singulets.....	55
Figure 43 : Sélection des monocytes en CD45/SS	55
Figure 44 : Exclusion des lymphocytes CD7+	56
Figure 45 : Exclusion des lymphocytes NK CD56+.....	56
Figure 46 : Exclusion des lymphocytes B et des granuleux CD24+	57
Figure 47 : Exclusion des granuleux, graphique CD16/SS.....	57
Figure 48 : Elimination des doubles négatifs : graphique CD14/CD16.....	58
Figure 49 : Distribution des sous populations monocytaires en CD14/CD16.....	58
Figure 50 : Fenêtrage du SLAN.....	59
Figure 51 : Marqueurs des différentes lignées pour le typage des Leucémies Aigües (39) ..	60
Figure 52 : Classification immunologique des Leucémies Aigues Lymphoblastiques selon l'EGIL (40).....	60
Figure 53 : Principe de sélection de la population blastique.....	62
Figure 54 : Stratégie de fenêtrage et mise en place des seuils pour le panel LA (1).....	63
Figure 55 : Mise en place des seuils pour le panel LA (2)	64
Figure 56 : Cytomètre XF-1600 Sysmex®.....	65
Figure 57 : Lasers et détecteurs de fluorescence du XF-1600 (41).....	65
Figure 58 : Préparateur PS-10 Sysmex ®.....	67
Figure 59 : Menu maintenance sur XF-1600	68
Figure 60 : Menu de suivi des CIQ sur XF-1600	68
Figure 61 : Exemple de rapport des contrôles qualité.....	69
Figure 62 : Liste des échantillons analysés par le cytomètre.....	70
Figure 63 : Images acquises sur XF-1600.....	71
Figure 64 : Passage des échantillons en mode manuel	71

Figure 65 : Passage des échantillons en mode rotor (automatique)	72
Figure 66 : Acquisition des images sur XF-1600.....	72
Figure 67 : Menu "panel master" sur XF-1600	73
Figure 68 : Tableau de corrélation entre deux cytomètres	75
Figure 69 : Diagrammes des différences pour le panel d'orientation (1)	78
Figure 70 : Diagrammes des différences pour le panel d'orientation (2)	79
Figure 71 : Tableau récapitulatif des concordances pour le panel d'orientation B.....	81
Figure 72 : Exemple de patient avec lymphocytes B polytypiques.....	84
Figure 73 : Comparaison d'images, clone CD5+ lambda.....	87
Figure 74 : Comparaison d'image, clone CD5+ kappa.....	90
Figure 75 : Comparaison d'image, clone CD5- kappa	93
Figure 76 : Comparaison clone CD5- lambda	96
Figure 77 : Comparaison d'un échantillon de lymphocytes B polytypiques (ganglion).....	99
Figure 78 : Exemple de clone CD5+ lambda minoritaire (30% des lymphocytes B totaux) .	102
Figure 79 : Exemple de patient avec population CD4-/CD8- en excès et lymphopénie B. ..	105
Figure 80 : Diagrammes des différences pour le panel complément B (1).....	108
Figure 81 : Diagrammes des différences pour le panel complément B (2).....	109
Figure 82 : Phénotypes retrouvés pour chacun des échantillons sur les deux automates ..	110
Figure 83 : Exemple de clone lymphocytaire B (LLC)	112
Figure 84 : Images CD5, CD20, kappa et lambda, acquisition XF-1600 en haut, sur Navios en bas.....	113
Figure 85 : Exemple de patient avec clone B FMC7 fort, CD11c+faible, CD180+	115
Figure 86 : : Exemple de clone B FMC7+ d'intensité forte, CD180+ fort.....	118
Figure 87 : Clone B CD38+ sur ponction ganglionnaire.....	121
Figure 88 : Diagrammes des différences pour le panel T (1).....	124
Figure 89 : Diagrammes des différences pour le panel T (2).....	125
Figure 90 : Exemple de patient sans anomalies des lymphocytes T	128
Figure 91 : Exemple de patient avec augmentation des lymphocytes T gamma delta	131
Figure 92 : Exemple de patient avec excès de lymphocytes NK.....	134
Figure 93 : Exemple de patient avec immunophénotypage en faveur d'une LPL-T.....	137
Figure 94 : Diagrammes des différences pour le panel plasmocytes (1).....	140
Figure 95 : Diagrammes des différences pour le panel plasmocytes (2).....	141
Figure 96 : Exemple de plasmocytes polytypiques	146
Figure 97 : Comparaison d'images d'un clone plasmocytaire lambda.....	149

Figure 98 : Comparaison d'images d'un clone plasmocytaire lambda (2)	152
Figure 99 : Exemple de clone plasmocytaire CD38-.....	155
Figure 100 : Diagrammes des différences pour le panel LMMC.....	158
Figure 101 : Comparaison patient sain, MO1<94%	162
Figure 102 : Comparaison d'images, MO1>94%	164
Figure 103 : Comparaison profil inflammatoire en "bulbe" des monocytes.....	166
Figure 104 : Comparaison profil compatible avec LMMC, MO1>94%.....	168
Figure 105 : Diagrammes des différences pour le panel LA (1)	170
Figure 106 : Diagrammes des différences pour le panel LA (2)	171
Figure 107 : Exemple de population blastique B.....	175
Figure 108 : Exemple de population blastiques B avec expression forte du CD34.....	178
Figure 109 : Exemple de population blastique biphénotypique (T et myéloïde).....	181
Figure 110 : Exemple de population blastique myéloïde.	184
Figure 111 : Exemple d'hématogones en CMF	187
Figure 112 : Expression antigénique au cours de la maturation des précurseurs des lymphocytes B (45).....	188
Figure 113 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes totaux	189
Figure 114 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD3+.....	190
Figure 115 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD4+	191
Figure 116 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD8+	191
Figure 117 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD19+.....	192
Figure 118 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes kappa	192
Figure 119 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes lambda	193
Figure 120 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD20+.....	193
Figure 121 : CD20/SS sur XF-1600 (à gauche) et sur Navios (à droite)	194
Figure 122 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes B CD5+	194
Figure 123 : CD19/CD5 sur XF-1600 (à gauche) et sur Navios (à droite).....	195
Figure 124 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD4+ CD10+	196
Figure 125 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes cytotoxiques	196
Figure 126 : Diagramme des différences pour le pourcentage de plasmocytes kappa et lambda.....	197
Figure 127 : CD56+28/CD19 ; Navios à gauche et XF-1600 à droite.....	198

Table des tableaux

Tableau 1 : Composition du panel d'orientation B.....	31
Tableau 2 : Composition du panel Leucémie Aigue.....	61
Tableau 3 : Corrélation du panel B.....	77
Tableau 4 : Corrélation panel complément B.....	107
Tableau 5 : Corrélation du panel T.....	123
Tableau 6 : Corrélation panel plasmocytes.....	139
Tableau 7 : Corrélation panel LMMC.....	157
Tableau 8 : Corrélation panel LA.....	169
Tableau 9 : Corrélation qualitative pour le panel LA.....	172

Table des abréviations

AF700	: Alexa Fluor® 700
APC	: Allophycocyanine
BAL	: Leucémie Aigüe biphénotypique
CMF	: Cytométrie en flux
CD	: Cluster de différenciation
CSH	: Cellule souche hématopoïétique
DLBCL	: Lymphome B diffus à grande cellules
ECD	: R Phycoerythrine-Texas Red®
ETDA	: Acide éthylènediaminetétraacétique
FCL	: Lymphome folliculaire
FS	: Foward scatter
FITC	: Fluorescéine
HPN	: Hémoglobinurie paroxystique nocturne
KO	: Krome orange
LA	: Leucémie Aigüe
LAIT	: Lymphome angioimmunoblastique T
LAM	: Leucémie Aigüe Myéloïde
LAL	: Leucémie Aigüe Lymphoblastique
LCR	: Liquide céphalorachidien
LDH	: Lactate déshydrogénase
LLC	: Leucémie lymphoïde chronique
LMMC	: Leucémie Myélomonocytaire chronique
LNH-B	: Lymphome non Hodgkinien B
LPL-T	: Leucémie prolymphocytaire T
LZM	: Lymphome de la zone marginale
MCL	: Lymphome du manteau
MO1	: Monocytes 1 (monocytes classiques)
MO2	: Monocytes 2 (monocytes intermédiaires)
MO3	: Monocytes 3 (monocytes non classiques)
MRD	: Minimal Residual Disease
NK	: Natural Killer
PB	: Pacific Blue
PC 5.5	: Phycoerythrine-Cyanine 5.5
PCL	: Leucémie à plasmocytes
PE	: Phycoérythrine

PE Cy 5.5 : Phycoéretine Cyanine 5.5

PE Cy7 : Phycoéretine Cyanine 7

PBS : Tampon phosphate salin

SLAN : 6SulfoLacNAc

SLVL : Lymphome splénique à lymphocytes villeux

SS : Side scatter

PMT : Photomultiplicateur

TCR : T-cell receptor (récepteur des cellules T)

Introduction

Devenue depuis maintenant une trentaine d'année un outil utilisé dans le diagnostic et le suivi des hémopathies, la cytométrie en flux est désormais indispensable dans le domaine de la biologie médicale notamment l'hématologie. Assez rudimentaire, les premiers cytomètres n'étaient équipés que d'un unique laser, limitant l'utilisation de ces derniers. Les progrès technologiques ainsi qu'informatiques ont permis d'augmenter le nombre de lasers possibles dans les automates ainsi que la performance des automates et de leur système d'acquisition. De nos jours la plupart des cytomètres utilisés dans le domaine de la santé humaine sont équipés de trois lasers. Cette avancée technologique est conjointe à la découverte de nouveaux marqueurs exploitables. Le Human leukocyte differentiation antigen a d'ores et déjà identifié plus de 400 cluster de différenciation (1), autant de cibles pour de nouveaux anticorps et fluorochromes utilisables en Cytométrie en flux.

Complément indispensable à la cytologie traditionnelle, la cytométrie s'impose de plus en plus comme recours aux situations où la cytologie au microscope bien dépendante des compétences du biologiste ne suffit pas. Sa rapidité ainsi que son coût relativement faible permettent un apport incontestable dans le diagnostic et la prise en charge du patient en ces temps où la demande d'examen de biologie médicale ne cesse de croître et où les délais de rendu demandés sont toujours plus rapides.

Ayant prouvé son savoir-faire dans le domaine de la cytologie depuis plusieurs années maintenant, Sysmex® a mis au point un nouvel automate de cytométrie en flux : le XF-1600, une première dans ce domaine.

Cette thèse a pour objectif, après avoir exposé les principes de la cytométrie en flux, de présenter les performances de ce nouvel automate en réalisant une corrélation avec les cytomètres déjà utilisés au laboratoire d'hématologie biologique du CHU de Limoges : les Navios Beckman®. Pour cela 200 échantillons de toute nature seront analysés en double.

I. Généralités sur la cytométrie en flux

I.1. Définition et principe de la cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux (CMF) est une technique permettant l'étude individuelle des paramètres physiques et biologiques des cellules présentes dans un prélèvement (sang, moelle osseuse, liquide céphalorachidien, ou autre). En regroupant par la suite les données issues de l'analyse d'un très grand nombre de cellules il est alors possible de déduire les caractéristiques de toutes les populations cellulaires étudiées. On parle d'immunophénotypage cellulaire.

Le principe de la CMF est basé sur les phénomènes optiques engendrés après le passage des cellules une à une devant différents lasers.

Dans un premier temps, des phénomènes optiques permettent une analyse des caractéristiques physiques de chaque cellule. Ainsi on peut obtenir des informations sur la taille et la structure des cellules.

Dans un second temps, après un marquage des cellules par un anticorps monoclonal couplé à un fluorochrome, il est possible de détecter de façon très précise des antigènes présents à la surface de chaque cellule. Ces antigènes appelés clusters de différenciation (CD) nous renseignent sur l'appartenance de chaque cellule à une lignée : voir tableau des CD (figure 14).

Par exemple, le CD19 est présent sur tous les lymphocytes B. La présence de ce cluster de différenciation à la surface d'une cellule signe son appartenance à la lignée lymphocytaire B.

Schématiquement, le cytomètre se décompose en trois parties (figure 1).

- Un système fluide qui a pour objectif d'une part d'aligner la multitude de cellules présentes dans l'échantillon les unes derrière les autres et, d'autre part, de permettre le passage d'un maximum de cellules en un minimum de temps. Principe de base de la CMF, ce phénomène est appelé focalisation hydrodynamique.
- Un système optique constitué de lasers comme source de lumière ainsi que de filtres optiques qui séparent la lumière émise et la redirige vers les détecteurs. Tout cela a pour objectif de transformer les caractéristiques physiques et biologiques des cellules en signaux lumineux mesurables.
- Un système électronique qui convertit les signaux lumineux en données informatiques exploitables (2).

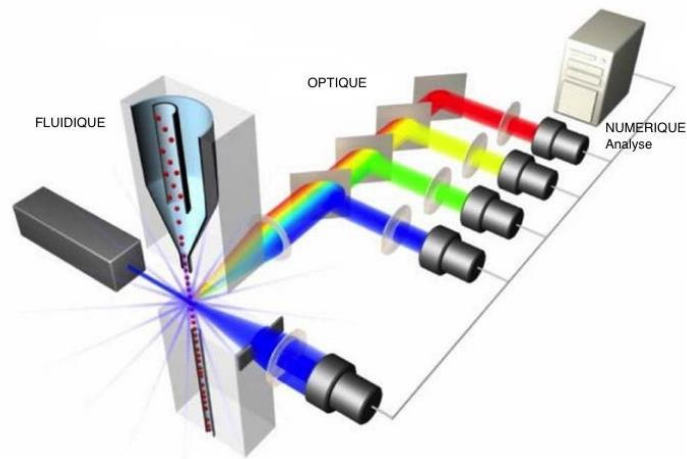


Figure 1 : Principe général de la CMF (3)

I.1.1. Le système fluidique

Il s'agit de la focalisation hydrodynamique. La suspension cellulaire contenue dans le prélèvement est injectée à l'intérieur du flux du liquide de gaine dont la vitesse est constante. Le liquide s'écoule ensuite par une buse de plus faible diamètre qui permet à un débit constant une accélération de la vitesse d'écoulement. La suspension cellulaire est alors étirée et les cellules se retrouvent alors alignées les unes derrière les autres au centre du jet. Cela permet une analyse rapide. Elles sont alors dirigées vers le système optique ou elles passent devant les différents lasers. Ce phénomène est schématisé sur la figure ci-dessous (figure 2).

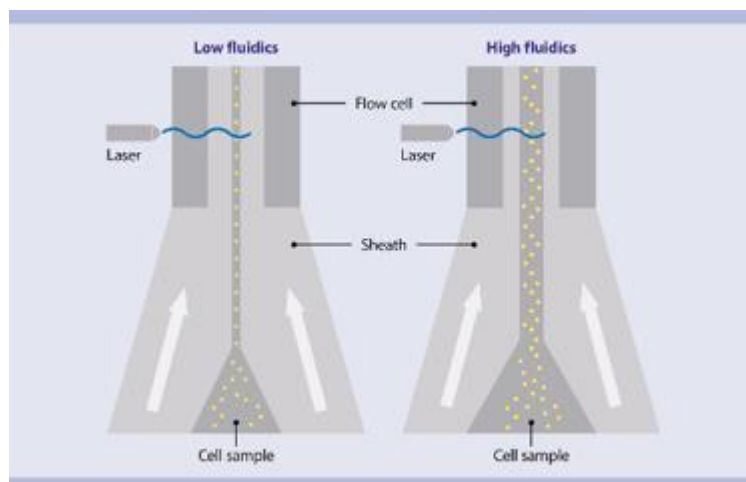


Figure 2 : Principe de focalisation hydrodynamique (4)

I.1.2. Le système optique

Après l'étape d'hydrofocalisation, les cellules passent devant les différents faisceaux lasers.

Le passage devant le faisceau laser permet de générer trois grands types d'informations lumineuses indispensables à l'analyse :

Le premier est la diffusion aux petits angles (forward scatter ou FS). Elle est collectée dans l'axe du faisceau laser et correspond à la diffraction de la lumière lors du passage des cellules devant le faisceau. Elle est donc directement liée à la taille des cellules.

Le deuxième est la diffusion aux grands angles (side scatter ou SS). Elle est collectée perpendiculairement au faisceau laser et correspond à la lumière diffusée par les éléments intracellulaires. Elle est donc liée à la granulosité du contenu cellulaire.

La combinaison de ces deux informations permet l'obtention du graphique FS/SS, et permet d'ores et déjà une séparation des cellules (figure 3).

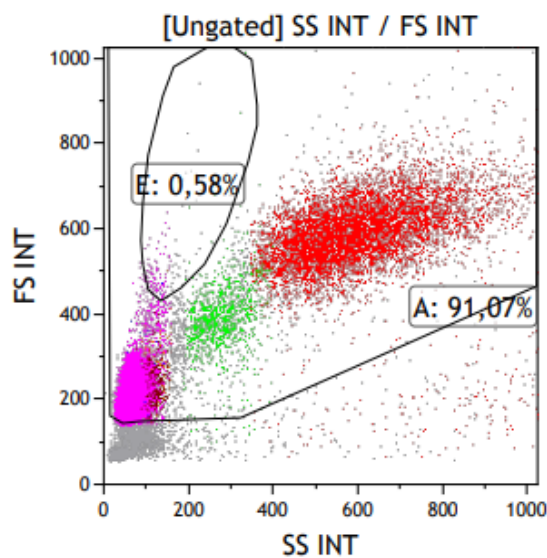


Figure 3 : Graphique biparamétrique FS/SS

La population rose correspond aux lymphocytes (cellules de petite taille sans granulations intracellulaires), la population verte correspond aux monocytes. La population rouge quant à elle correspond aux polynucléaires (cellules de taille plus importante et contenant de nombreuses granulations intracytoplasmiques).

La troisième et dernière information obtenue est l'intensité de fluorescence. Les fluorochromes assignés à chacune des cellules sont excités par une source de lumière à une longueur d'onde donnée. Ils émettent un signal lumineux d'une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde absorbée. La fluorescence est ainsi émise dans toutes les directions de l'espace et est mesurée à 90° de l'axe du faisceau laser.

Le banc optique a pour objectif de séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence émises et d'acheminer chacune d'entre elles vers un détecteur dédié. Pour cela de nombreux miroirs sélectifs appelés miroirs dichroïques, ainsi que des filtres interférentiels sont répartis au niveau de ce banc optique. Plusieurs types de miroirs et de filtres optiques sont utilisés dans un banc optique de cytomètre (figure 4).

- Des filtres passe-haut (high-pass), qui laissent passer la lumière au-dessus d'une longueur d'onde choisie et arrêtent la lumière en dessous de cette même longueur d'onde. Par exemple un filtre 500 passe-haut arrête les longueurs d'ondes inférieures à 500 nm et permet la transmission des longueurs d'onde supérieures à 500 nm.
- Des filtres passe-bas (short-pass) qui a l'inverse laissent passer les longueurs d'ondes inférieures à une longueur d'onde donnée.
- Des filtres passe-bande (band-pass) qui laissent passer la lumière comprise entre deux longueurs d'ondes données.

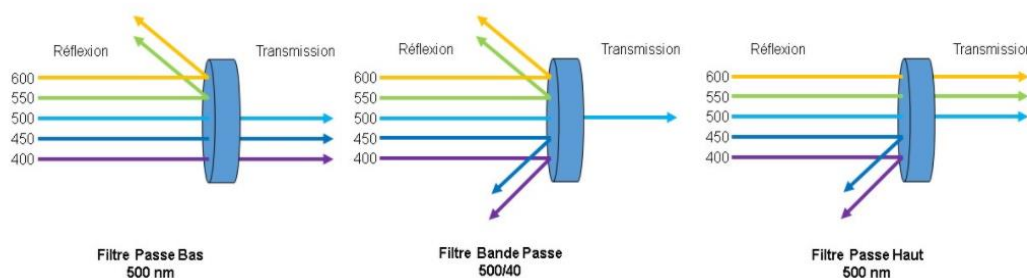


Figure 4 : Illustration de la fonction des différents filtres (5)

I.1.3. Le système électronique et informatique

Les différents types de signaux lumineux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT). Ces signaux sont donc amplifiés, numérisés puis traités et stockés par un ordinateur. La conversion des signaux lumineux en courant électrique est

assurée par les PMT. Les signaux électriques alors obtenus vont être analysés par un convertisseur analogique digital. Ces fichiers peuvent par la suite être modifiés et retraités grâce à l'utilisation de logiciels dédiés.

L'ordinateur calcule les données statistiques associées à la distribution des paramètres mesurés et les représente sous différentes formes :

D'une part les histogrammes monoparamétriques avec le nombre d'évènements en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse (figure 5).

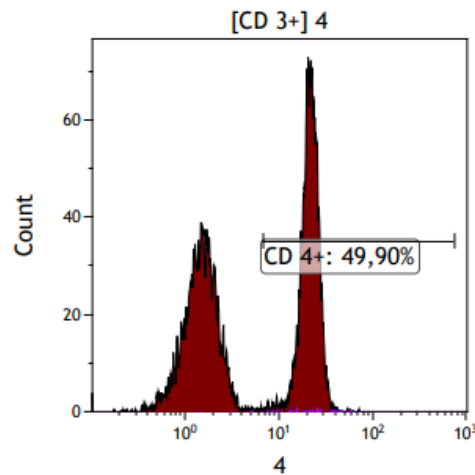


Figure 5 : Exemple d'histogramme mono paramétrique

D'autre part, les nuages de points (ou dot-plots) qui montrent l'expression de deux paramètres l'un par rapport à l'autre. Les axes représentent alors les intensités de fluorescence (figure 6).

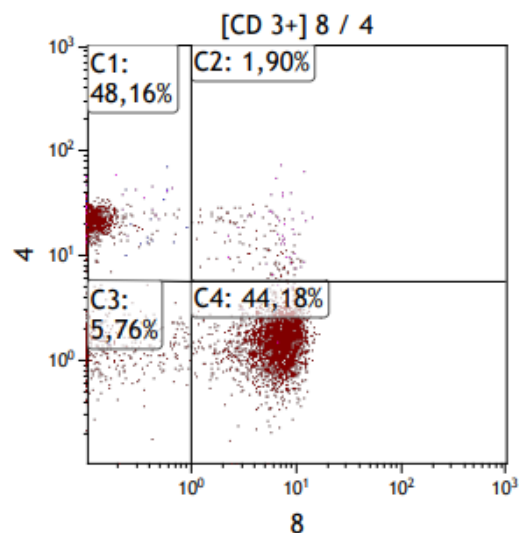


Figure 6 : Exemple d'histogramme bi paramétrique en dot plot

Le réglage des voltages appliqués à chacun des photomultiplicateurs est primordial et nécessite une grande finesse. En effet, si un anticorps ne délivre que peu de fluorescence, l'application d'un voltage fort au PMT correspondant permettra alors d'avoir un signal plus intense. En effet le signal lumineux peut être trop faible et donc non transmis au système informatique. On risque alors de ne pas pouvoir observer certains événements sur les histogrammes bi paramétriques.

Inversement pour un fluorochrome qui émet une fluorescence beaucoup plus importante, on pourra alors appliquer un gain plus faible au PMT. En effet si le fluorochrome a une fluorescence trop importante et que le PMT amplifie trop le signal, il est alors possible de passer la aussi à côté de certaines populations sur les histogrammes bi paramétriques.

I.1.4. Anticorps, fluorochromes et fluorescence

La fluorescence est une émission de lumière résultant de l'excitation d'une molécule. Cette molécule absorbe l'énergie lors de son excitation à une longueur d'onde caractéristique puis émet cette énergie sous forme de lumière presque instantanément à une longueur d'onde plus élevée (6) (figure 7). Les principales molécules fluorescentes sont composées de noyaux aromatiques. Les spectres d'absorption et d'émission sont propres à chaque fluorochrome, l'excitation est générée par les lasers des cytomètres et les fluorescences plus ou moins brillantes sont captées par les détecteurs spécifiques.

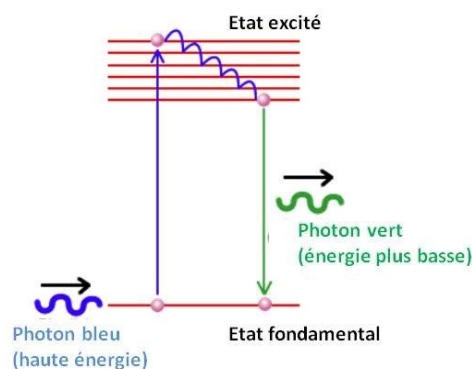


Figure 7 : Principe de la fluorescence (7)

A noter que chaque fluorochrome n'est excitable que par certaines longueurs d'onde. Par exemple l'APC n'est excitable que par le laser rouge. Chacun des lasers peut donc exciter certains fluorochromes mais pas d'autres entraînant une limite dans le choix des anticorps. Afin de multiplier les anticorps utilisables (excitables) par chacun des lasers et ainsi augmenter le nombre de marqueurs utilisables dans un panel d'anticorps, le marquage en tandem peut être utilisé (figure 8). Il s'agit du couplage de deux anticorps marqués par deux fluorochromes ; le premier est excité à une longueur d'onde donnée et sa fluorescence

émise entraîne alors l'excitation du second. Le second peut alors émettre à son tour sa fluorescence. Ce marquage en tandem permet également de limiter les phénomènes de chevauchement des spectres d'émission.

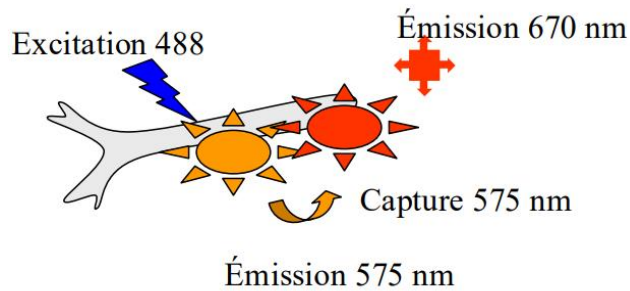


Figure 8 : Principe du marquage en tandem (ex : Phycoérythrine - Cyanine 5) (8)

De plus, il faut savoir que certains fluorochromes sont plus « brillants » que d'autres. C'est la notion de rendement quantique. Il faut donc utiliser les fluorochromes les moins « brillants » tels que l'ECD ou FITC pour des populations leucocytaires très présentes dans le milieu ou des marqueurs forts. A l'inverse il sera préférable d'utiliser les fluorochromes les plus « brillants » tels que l'APC pour le marquage de marqueurs (ou CD) plus faiblement exprimés ou bien des populations rares (9).

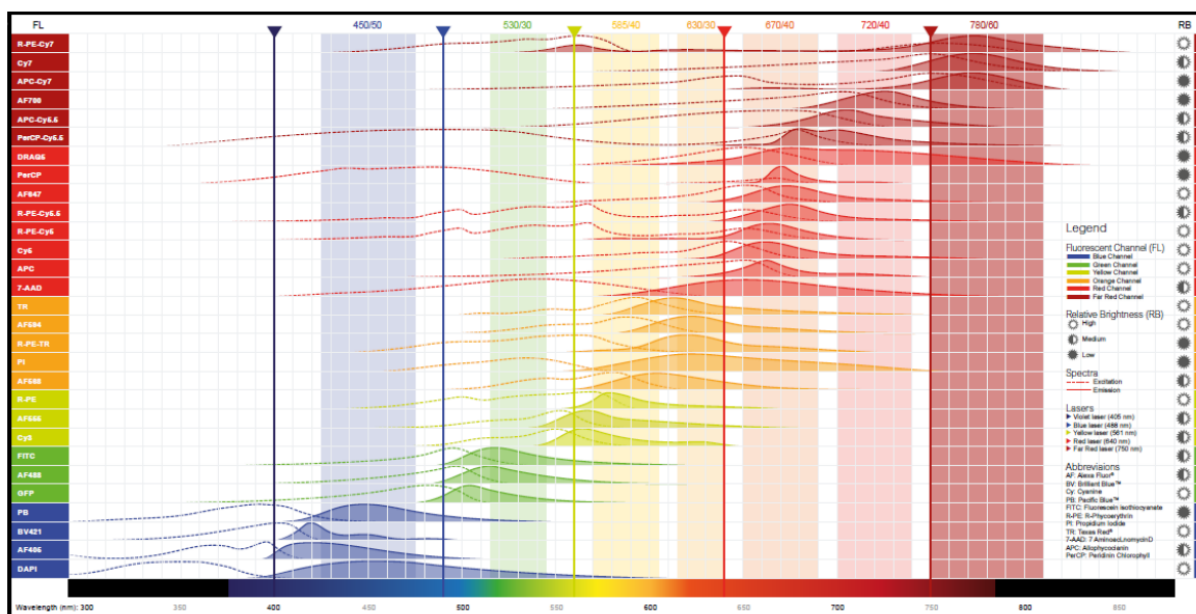


Figure 9 : Principaux fluorochromes utilisés en CMF

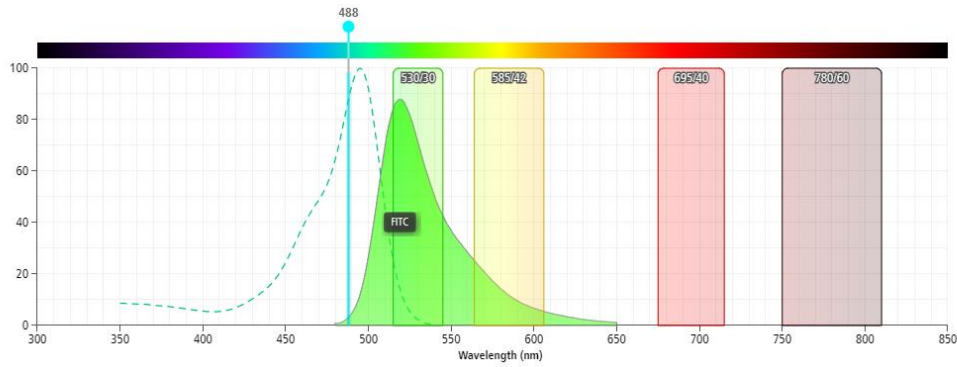


Figure 10 : Spectre d'excitation et d'émission pour le FITC (10)

Excitation du FITC par le laser bleu (488 nm) et émission dans le jaune/vert.

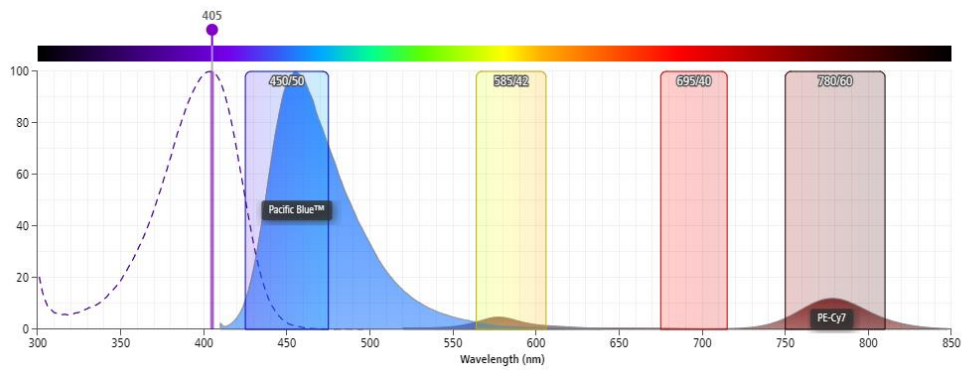


Figure 11 : Spectre d'excitation et d'émission pour le Pacific Blue (PB) (10)

Excitation du Pacific Blue par le laser violet (405 nm) et émission dans le bleu.

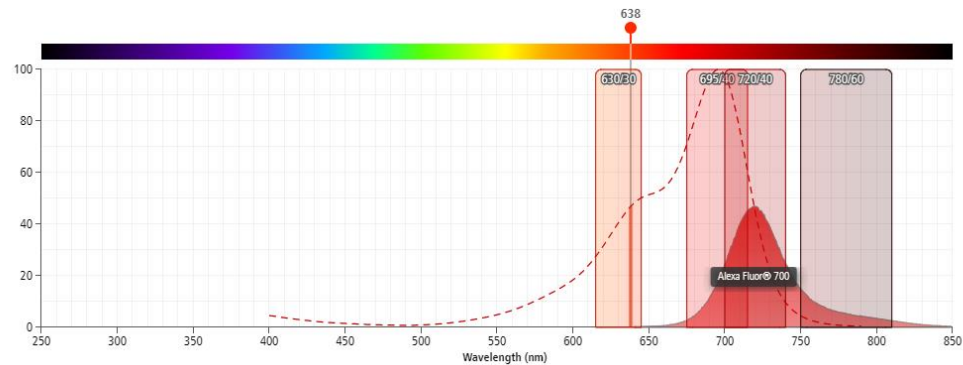


Figure 12 : Spectre d'excitation et d'émission pour l'Alexa Fluor® 700 (AF700) (10)

Excitation de l'AF700 par le laser rouge (638 nm) et émission dans le rouge.

Les spectres d'excitation sont représentés en pontillés, ceux d'émission en trait continu.

I.1.5. Les compensations

Comme vu précédemment (figure 9), les spectres d'émission des différents fluorochromes utilisés se chevauchent très souvent. Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes simultanément utilisés en cytométrie sont à l'origine d'interférences et nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence. Par exemple, le FITC et la PE ont respectivement un maximum d'émission de fluorescence à 520 nm et 578 nm. En raison de la largeur des spectres d'émission de ces deux fluorochromes, une partie de la fluorescence émise par le FITC sera collectée par le photomultiplicateur (PMT) dédié à la PE et *vice versa* (figure 13). En l'absence de réglage de compensation, une population cellulaire marquée par le FITC et non marquée par la PE apparaîtrait comme ayant un marquage de cette dernière en raison de la contamination du canal PE par la fluorescence du FITC.

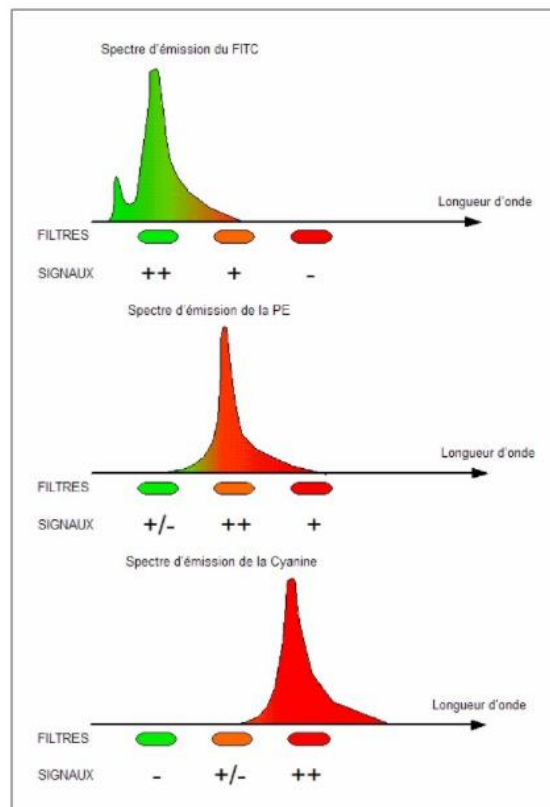


Figure 13 : Fuites de fluorescence (4)

Pour s'affranchir de ces phénomènes de chevauchement des spectres d'émission, des compensations sont alors calculées et appliquées au logiciel informatique.

Le réglage des compensations se fait avec l'utilisation de billes monomarquées. Différents tubes contenant chacun des billes marquées avec un seul fluorochrome sont analysés par le cytomètre. Un exemple de matrice de compensation est présenté en annexe 1.

I.1.6. Préparation des échantillons

Les échantillons analysables en CMF doivent être composés de cellules en suspension. Le sang et la moelle osseuse sont donc des prélèvements de choix pour l'analyse par CMF. L'utilisation de tubes avec anticoagulant (EDTA ou héparinate de lithium) est à privilégier. L'analyse doit être réalisée si possible dans les 24 heures avec une conservation à température ambiante afin d'éviter la dégradation des cellules et ainsi obtenir des résultats optimaux. La préparation de l'échantillon commence par une numération des éléments présents dans le prélèvement. Le marquage par les anticorps couplés aux fluorochromes est ensuite réalisé. Les anticorps sont mis en excès dans le prélèvement afin de marquer le plus de cellules possibles. Une incubation à l'abri de la lumière est ensuite réalisée afin qu'un maximum d'anticorps se fixent sur leurs cellules cible. La mise à l'abri de toute lumière est indispensable afin de perdre le moins de fluorescence que possible et avoir ainsi des signaux de meilleure qualité et bien détectables. Une ou plusieurs étapes de lavage sont à réaliser afin de se débarrasser de l'excès d'anticorps ainsi que de l'accrochage non spécifique.

L'étape de lyse des globules rouges par un agent de lyse préalable à l'analyse est indispensable. En effet les hématies sont mille fois plus représentées dans le sang que les leucocytes. Leur présence dans l'échantillon à analyser provoquerait trop d'interférences ainsi qu'une saturation des images. Il est également possible d'appliquer un seuil (threshold) sur le cytomètre au niveau du paramètre SS afin de ne pas voir les images saturées par des débris cellulaires ou alors des globules rouges mal lysés.

Après cette étape de lyse, une centrifugation est réalisée afin de récupérer un culot de cellules vivantes. Ce culot sera remis en suspension dans du PBS et enfin analysé par le cytomètre. Cependant les protocoles varient en fonction du type d'analyse.

I.2. Définition des clusters de différenciation (CD)

Le développement de la CMF a abouti à l'utilisation d'une nomenclature permettant de classer les différents marqueurs cellulaires utilisés en les désignant sous le terme de clusters de différenciation (CD) suivi d'un nombre ; ex : « CD19 ». Les différents CD sont exprimés en fonction du type de cellule mais sont aussi exprimés selon le type de pathologie.

<p>Marqueur panleucocytaire CD45 (toutes les cellules hématopoïétiques)</p> <p>Cellules immatures CD34 (précurseurs hématopoïétiques) CD117 (c-kit) (cellules leucémiques myéloïdes) HLA-DR (précurseurs myéloïdes, monocytes, cellules B, cellules T activées) TdT (thymocytes, lymphoblastes, certains myéloblastes)</p> <p>Cellules myélo/monocytaires CD4 (monocytes) CD11b (lignée granulocytaire et monocyttaire, lymphocytes B,T, et NK) CD13 (lignée granulocytaire et monocyttaire) CD14 (lignée monocyttaire) CD15 (lignée granulocytaire et monocyttaire) CD33 (lignée granulocytaire et monocyttaire) CD65 (lignée granulocytaire et monocyttaire)</p> <p>Lignée plaquettaire CD41 (gp IIb/IIIa) (mégacaryocytes, plaquettes) CD42b (gp Iba) (mégacaryocytes, plaquettes) CD61 (gp IIIa) (mégacaryocytes, plaquettes)</p> <p>Lignée érythrocytaire Glycophorine A (précurseurs érythroïdes, globules rouges)</p>	<p>Lymphocytes B CD10 (lymphocytes pré-B, précurseurs B) CD19 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD20 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD22 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD23 (lymphocytes B, monocytes) CD24 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs)</p> <p>Plasmocytes CD138 (plasmocytes) CD38 (plasmocytes, lymphocytes T activés)</p> <p>Lymphocytes T CD1a (thymocytes corticaux) CD2 (thymocytes, lymphocytes T mûrs et NK) CD3 (thymocytes, lymphocytes T mûrs) CD4 (thymocytes, lymphocytes T-helper mûrs) CD5 (thymocytes, lymphocytes T mûrs) CD7 (tous les précurseurs et lymphocytes T mûrs, NK) CD8 (thymocytes, lymphocytes T-cytotoxiques)</p> <p>Lymphocytes NK CD11b (lymphocytes B,T, et NK, lignée granulocytaire et monocyttaire) CD16 (lymphocytes NK, granulocytes) CD57 (lymphocytes T-LGL, certains lymphocytes NK, monocytes) CD56 (lymphocytes T et NK)</p>
---	---

Tableau 2. Principaux antigènes utilisés dans le diagnostic hématologique.
CD: cluster de différenciation; *TdT*: terminal deoxynucleotidyl transferase; *NK*: natural killer; *T-LGL*: T-large granular lymphocytes; *gp*: glycoprotéine.

Figure 14 : Principaux CDs utilisés en hématologie (11)

I.3. Applications de la CMF

La CMF est le complément indispensable de la morphologie pour le diagnostic et le suivi de nombre d'hémopathies. On la considère comme la méthode de référence pour compter les éléments cellulaires circulants ainsi que pour caractériser l'immunophénotypage d'une cellule. L'immunophénotypage est un élément clé du diagnostic de la plupart des hémopathies malignes, notamment les syndromes lymphoprolifératifs B et T, ainsi que les leucémies aiguës, qu'elles soient d'origine myéloïde (LAM), ou lymphoblastique (LAL). L'utilisation de la CMF et l'immunophénotypage cellulaire est au cœur d'une démarche diagnostique pluridisciplinaire, s'associant avec la cytologie, la cytogénétique, la biologie moléculaire et l'anatomo-pathologie.

En plus de son utilité diagnostique, la CMF est utilisée dans le suivi notamment des lymphomes B afin de suivre par exemple la présence ou la disparition d'un clone sous traitement. La CMF est également utilisée dans l'évaluation et le suivi de la maladie résiduelle (MRD), pour les LAL et LAM, ou encore dans la MRD du myélome (12). Outre le diagnostic et le suivi des hémopathies, elle est également utilisée pour la numération des cellules souches hématopoïétiques (CSH), le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), le diagnostic de certaines thrombopathies (13) ou également dans des domaines autres que l'hématologie tel que l'allergologie (test d'activation des basophiles) (14), ou encore en microbiologie (15)...

II. Principes des panels utilisés dans la comparaison d'automates

Différents panels d'anticorps utilisés au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges ont été mis en place sur le nouveau cytomètre de flux XF-1600 Sysmex® afin de tester ses performances sur un éventail assez large d'anticorps et de situations pathologiques ou non pathologiques. Les panels d'anticorps testés sont les suivants : orientation lymphoïde B, complément B, panel T, panel de typage plasmocytaire, panel leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) et enfin le panel d'orientation de leucémie aigüe (LA). Ces différents panels seront décrits ci-dessous afin de mieux comprendre leur principe.

II.1. Panel orientation lymphoïde B

Le panel d'anticorps utilisé pour l'analyse des lymphocytes B est le suivant :

Tableau 1 : Composition du panel d'orientation B

ANTICORPS	FLUOROCHROME	LASER	FL
KAPPA	FITC	BLEU	1
LAMBDA	PE	BLEU	2
CD4	ECD	BLEU	3
CD19	PE CY5.5	BLEU	4
CD2	PE CY7	BLEU	5
CD5	APC	ROUGE	6
CD8	APC700	ROUGE	7
CD3	PC5.5	ROUGE	8
CD20	PB	VIOLET	9
CD45	KO	VIOLET	10

Le but de ce panel est de permettre une orientation diagnostic rapide dans les suspicions de prolifération B.

Devant des signes cliniques (adénopathies, masses tumorales) ou devant des signes biologiques tels qu'une hyperlymphocytose, des cytopénies, une suspicion de masse tumorale (LDH, et béta2microglobuline élevée), le prescripteur peut être amené à demander un immunophénotypage lymphocytaire. Cet examen peut également être ajouté à l'initiative du biologiste en cas d'anomalies morphologiques sur le frottis sanguin touchant les

lymphocytes, associé ou non à une hyperlymphocytose. Cette exploration peut se faire sur de nombreuses matrices (sang, moelle osseuse, ponction ganglionnaire, LCR, etc...).

Ce panel d'orientation B permet d'établir les proportions entre les différentes populations lymphocytaires : Les lymphocytes T : CD3+, pour lesquels le ratio CD4/CD8 est évalué, les lymphocytes B : CD19+, les lymphocytes NK : CD2+ CD3- . La monotypie des lymphocytes est mise en évidence par un déséquilibre du ratio kappa/lambda (normalement 2/3 kappa et 1/3 lambda). La caractérisation d'une population anormale se fait par la mise en évidence d'une expression aberrante d'un ou plusieurs antigènes ou par une monotypie des chaînes légères sur les lymphocytes B.

II.1.1. Stratégie de fenêtrage

Comme dit précédemment, ce panel d'orientation B vise à caractériser les populations lymphocytaires. Pour cela, un fenêtrage précis est mis en place afin d'optimiser au mieux l'immunophénotypage. D'un point de vue analytique on procède à un fenêtrage en ciblant tour à tour les différentes populations d'intérêt et un appliquant à ces dernières des marquages successifs.

Une première fenêtre FS/SS (figure 15) permet la séparation des cellules en fonction de la taille et de la complexité du contenu cellulaire tels que déjà décrit précédemment (figure 5). Cette fenêtre est utilisée dans l'intégralité des panels.

On retrouve également les débris cellulaires ou autres dans le bas de la fenêtre. Une fenêtre de plus nommée « E » permet de cibler les cellules de grande taille pouvant être suspectes.

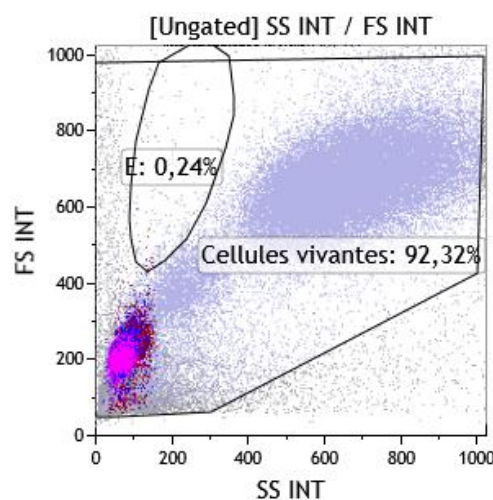


Figure 15 : Graphique FS/SS

Un fenêtrage est réalisé sur toutes les cellules vivantes et permet ainsi de s'affranchir des débris cellulaires pour le reste de l'analyse.

Une seconde fenêtre 45/SS (figure 16) est mise en place afin de séparer au mieux les différentes lignées hématopoïétiques. On utilise ici le CD45, marqueur pan leucocytaire qui permet une meilleure discrimination des différentes lignées leucocytaires. On sélectionne ici la population lymphocytaire d'intérêt dans ce panel d'orientation en CD45 fort et SS faible dans une fenêtre « lymphocytes totaux ».

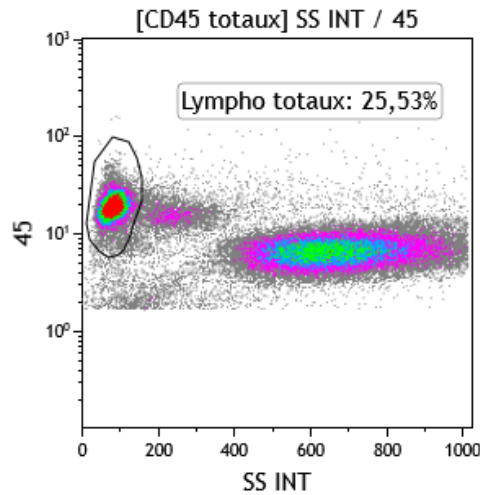


Figure 16 : Graphique CD45/SS en density plot

Une troisième fenêtre CD3/SS est mise en place. Conditionnée sur la population lymphocytaire totale séparée précédemment, elle permet de séparer les lymphocytes T CD3+ des autres lymphocytes (B et NK) CD3- (figure 17). Il est ensuite possible d'évaluer la proportion de lymphocytes T CD4 et CD8 en appliquant un fenêtrage CD4/CD8 conditionné sur la population CD3+ isolée en amont (figure 18). On peut alors calculer le rapport CD4/CD8.

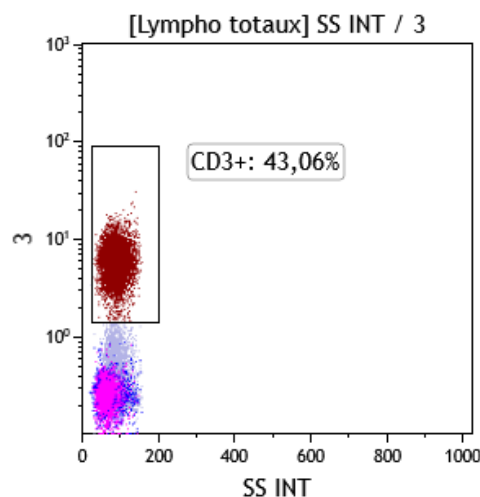


Figure 17 : Graphique CD3/SS

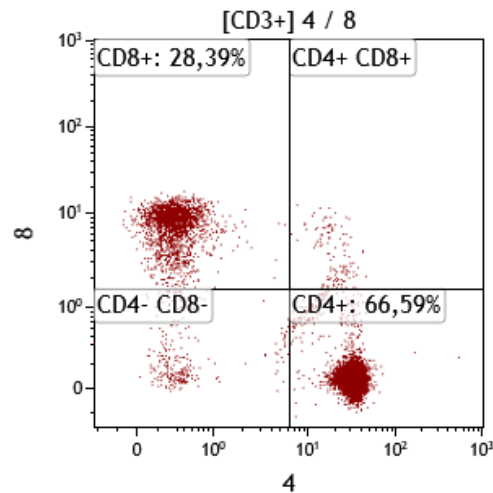


Figure 18 : Graphique CD4/CD8

La fenêtre suivante CD2/CD3 est elle aussi conditionnée sur la population « lymphocytes totaux » isolés en CD45/SS, on cherche à déterminer le pourcentage de lymphocytes NK CD2+ et CD3- (figure 19).

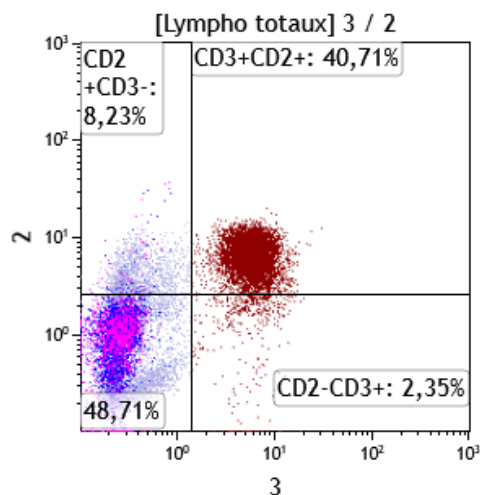


Figure 19 : Graphique CD2/CD3

De même principe que la fenêtre utilisée pour séparer les lymphocytes T CD3+, une fenêtre CD19/CD3 conditionnée sur les « lymphocytes totaux » permet de séparer les lymphocytes B CD19+ des autres populations lymphocytaires CD19- (T et NK). On peut donc estimer un pourcentage de lymphocytes B parmi les lymphocytes totaux (figure 20).

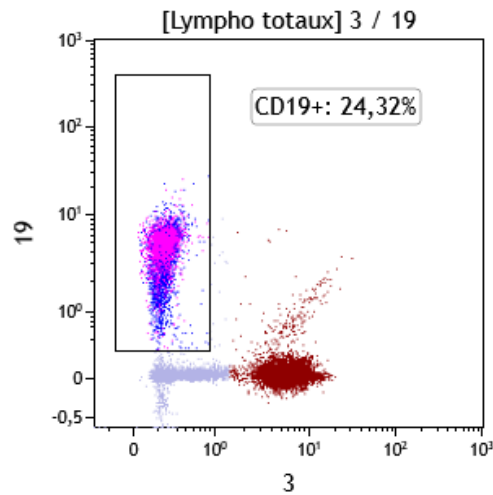


Figure 20 : Graphique CD19/CD3

C'est cette population isolée en CD19+ correspondant aux lymphocytes B qui nous intéresse dans ce panel d'orientation lymphoïde. C'est sur cette population CD19+ qu'est conditionné le reste du fenêtrage.

Tout d'abord une fenêtre CD5/CD19 permettant de détecter une éventuelle expression du CD5 sur les lymphocytes B (figure 21). En effet, bien qu'il existe des lymphocytes B physiologiques polytypiques en faible proportion exprimant le CD5, l'expression du CD5 sur les lymphocytes B monotypiques est souvent retrouvée en pathologie hématologique. Cette fenêtre est donc d'une importance capitale pour orienter le diagnostic.

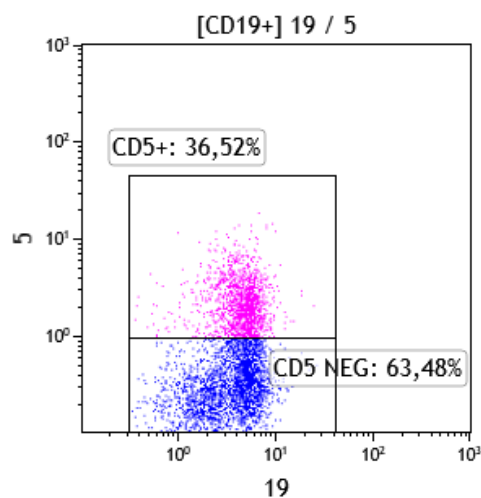


Figure 21 : Graphique CD5/CD19

Une fenêtre kappa/lambda est également appliquée sur cette population CD19+ afin de déceler une éventuelle monotypie de la population lymphocytaire B (figure 22). Ce fenêtrage kappa/lambda est également appliqué à la population CD5+ si cette dernière est présente.

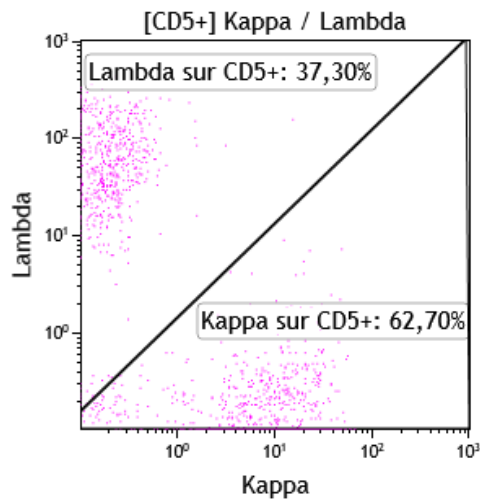


Figure 22 : Graphique kappa/lambda

Une dernière fenêtre SS/CD20 et conditionnée sur les lymphocytes B CD19+ permet de vérifier la coexpression CD19 et CD20 sur les lymphocytes B (figure 23). On peut également utiliser cette fenêtre pour déceler une sous expression du CD20 sur certains lymphocytes dans certains lymphomes, notamment la LLC (16).

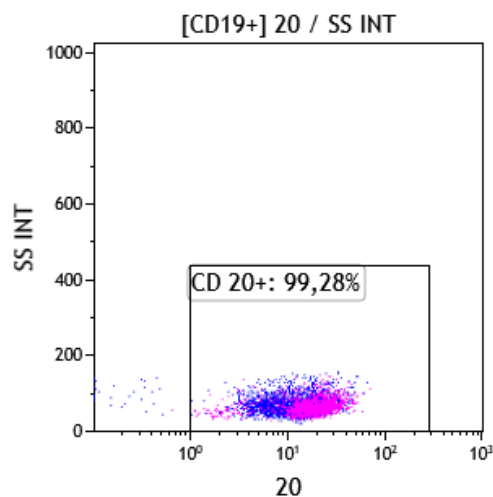


Figure 23 : Graphique CD20/SS

II.2. Panel « complément B »

Le panel d'anticorps qui constitue le complément B est constitué des marqueurs suivants :

Tableau 2 : Composition du panel complément B

ANTICORPS	FLUOROCHROME	LASER	FL
FMC7	FITC	Bleu	1
CD180	PE	Bleu	2
CD19	ECD	Bleu	3
CD38	PE Cy5.5	Bleu	4
CD11C	PE Cy7	Bleu	5
CD79B	APC	Rouge	6
CD23	A700	Rouge	7
CD10	A750	Rouge	8
CD25	PB	Violet	9
CD45	KO	Violet	10

Ce panel est réalisé en complément du panel d'orientation B si on retrouve dans ce dernier une population suspecte. Il précise le phénotype du clone retrouvé et permet d'étayer le diagnostic de lymphome ou même de poser ce dernier comme le diagnostic de LLC.

Chacun des marqueurs présents dans ce panel a une utilité différente. Les CD23, FMC7 et CD79b permettent en association avec le panel d'orientation précédemment décrit de calculer le score de Matutes, utile pour le diagnostic de LLC (figure 24). Classiquement les lymphocytes retrouvés dans la LLC ont le phénotype suivant : CD5+, CD23+, FMC7- et CD79b-, CD20 dim (17) et le score de Matutes sera de 4 ou 5. Ce score permet également le diagnostic différentiel avec le lymphome du manteau (MCL), classiquement CD5+, CD23-, FMC7+, CD79b+ et CD20+ (18).

Points	1	0
Immunoglobuline de surface	Expression faible	Expression forte
Expression du CD5	+	-
Expression du CD23	+	-
Expression du CD79b	Faible ou nulle	Forte
Expression de FMC7	-	+

Figure 24 : Calcul du score de Matutes (19)

Le CD10 est fréquemment retrouvé dans le lymphome folliculaire (FCL) (20,21) ou encore le lymphome B diffus à grande cellules (DLBCL) (22).

Les CD11c et CD25 sont quant à eux des marqueurs souvent retrouvés dans le lymphome de la zone marginale (LZM) (22), le CD11c et le CD25 sont aussi positifs pour les tricholeucocytes (23).

Le CD180 est quant à lui un marqueur normalement présent sur les lymphocytes B ainsi que sur les monocytes. Il est en revanche sous exprimé dans la plupart des lymphomes B à l'exception du lymphome de la zone marginale (LZM) (24). Le CD180 est aussi fortement exprimé dans les leucémies à tricholeucocytes (24).

On comprend bien l'utilité de ce panel d'anticorps ainsi que l'apport de la cytométrie pour affiner ou même poser le diagnostic de lymphome B. La figure ci-dessous (figure 25) résume les phénotypes couramment observés en hématologie. L'annexe 2 présente plus en détail les marqueurs retrouvés dans certains lymphomes B.

Table 2. Flow cytometric approach to the diagnosis and classification of B-cell lymphoid neoplasms

Disease entities to consider	Distinguishing phenotypic features	Additional diagnostic information
CD5⁺ CD10⁻		
Chronic lymphocytic leukemia	Typical phenotype: CD20 (d), CD22 (d), slg (d), CD23 ⁺ , FMC-7 ⁻	Characteristic morphology
Mantle cell lymphoma	Variable phenotype not typical for CLL; often CD20 (i), slg (i), CD23 ^{+/-} , FMC-7 ^{+/-}	Cyclin-D1 IHC, t(11;14)/CCND rearrangement
Prolymphocytic leukemia	Variable phenotype, may overlap with CLL and MCL	Large cells prominent nucleoli; exclude blastic MCL
Marginal zone B-cell lymphoma	Variable phenotype, not typical for CLL: CD23 ⁻ ; often CD11c ^{+/-} , CD103 ^{+/-} but not typical for HCL, sometimes clg only	Growth around and into follicles, may demonstrate plasmacytic differentiation, t(11;18), t(1;14), t(14;18)/MALT-1 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype	Large cells, diffuse growth pattern; consider Richter transformation CLL and MCL
Lymphoplasmacytic lymphoma	Phenotype not typical for CLL, often CD23(-/d), sometimes slg ⁻ but clg ⁺	Small cells, subset with plasmacytic differentiation Primarily PB and BM
CD5⁻ CD10⁺		
Follicular lymphoma	Usually bcl-2 ⁺ , CD43 ⁻	Some follicular growth, t(14;18)/BCL-2 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype, bcl-2 ^{+/-} , CD43 ^{+/-}	Large cells somewhat pleomorphic, diffuse growth
Burkitt lymphoma	Usually bcl-2 ⁻ , CD10 (+b), CD43 ⁺	Uniform intermediate size cells; MYC rearrangement, Ki-67 approximately 100%
Hairy cell leukemia	Typical phenotype: CD20 (b), CD22 (b), CD11c (b), CD25 ⁺ , CD103 ⁺ , slg (i), CD123 ⁺	Characteristic morphology; Annexin-A1 ⁺
CD5⁺ CD10⁺		
Follicular lymphoma	Usually bcl-2 ⁺ , CD43 ⁻	Some follicular growth, t(14;18)/BCL-2 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype, bcl-2 ^{+/-} , CD43 ^{+/-}	Large cells, diffuse growth pattern
Mantle cell lymphoma	Variable phenotype not typical for CLL; often CD20 (i), slg (i), CD23 ^{+/-} , FMC-7 ^{+/-}	Cyclin-D1 IHC, t(11;14)/CCND rearrangement
Burkitt lymphoma	Usually bcl-2 ⁻ , CD10 (b), CD43 ⁺	Uniform intermediate size cells; MYC rearrangement, Ki-67 approximately 100%
CD5⁻ CD10⁻		
Hairy cell leukemia	Typical phenotype: CD20 (b), CD22 (b), CD11c (b), CD25 ⁺ , CD103 ⁺ , slg (i)	Confirm characteristic morphology
Marginal zone B-cell lymphoma	Often CD11c ^{+/-} , CD103 ^{+/-} but not typical for HCL, sometimes slg ⁻ but clg ⁺	Growth around and into follicles, maybe plasmacytic t(11;18), t(1;14), t(14;18)/MALT-1 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype	Large cells, diffuse growth pattern
Follicular lymphoma CD10 ⁻	Variable phenotype	Some follicular growth, t(14;18)/BCL-2 rearrangement
Mantle cell lymphoma CD5 ⁻	Variable phenotype	Cyclin-D1 IHC, t(11;14)/CCND rearrangement

+ indicates usually positive; -, usually negative; +/-, may be positive or negative; d, dim or weak intensity; i, intermediate intensity; b, bright or strong intensity; slg, surface immunoglobulin; and clg, cytoplasmic immunoglobulin.

Figure 25 : Marqueurs des lymphomes B en CMF (22)

II.2.1. Stratégie de fenêtrage

Dans ce panel, le fenêtrage est conditionné sur la population clonale dépistée avec le panel d'orientation lymphoïde B correspondant à la population de lymphocytes B CD19⁺.

Une première fenêtre FS/SS permet toujours de sélectionner les cellules vivantes, nous affranchissant ainsi des débris cellulaires. Conditionnée sur les cellules vivantes, une seconde fenêtre CD45/SS permet de sélectionner les lymphocytes totaux (CD45 fort SS faible). Sur une troisième fenêtre conditionnée sur la population lymphocytaire totale, l'application d'un CD19/SS permet de sélectionner les lymphocytes B. La première partie de cette stratégie de fenêtrage est résumée sur la figure suivante (figure 26) :

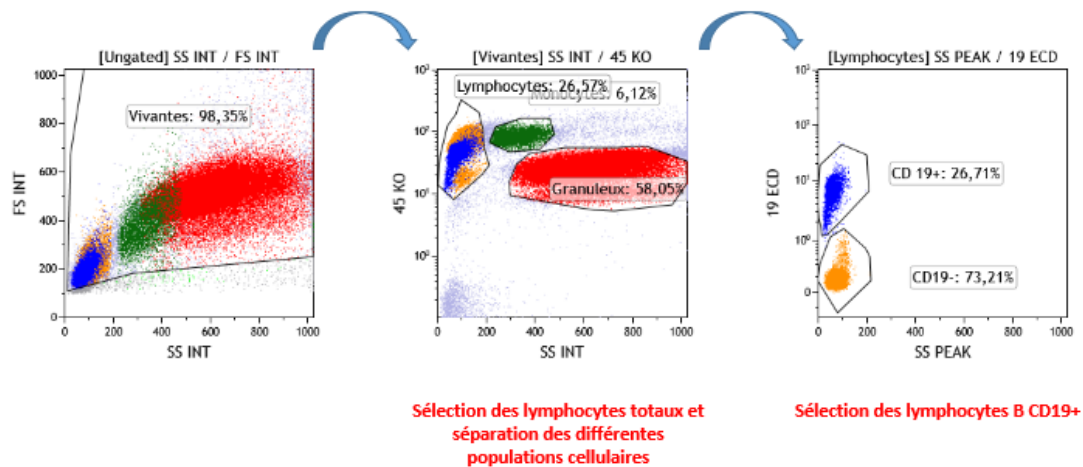


Figure 26 : Stratégie de fenêtrage du panel complément B

C'est sur cette population lymphocytaire B que sont ensuite appliqués les différents marqueurs recherchés. Il est alors possible de déterminer l'expression ou l'absence d'expression d'un marqueur donné pour la population clonale. Les seuils de positivité pour chacun des marqueurs sont déterminés préalablement sur des populations cellulaires connues.

La population lymphocytaire CD19- sélectionnée (colorée en orange) permet de définir les seuils pour le CD10, le CD23, le CD38 le FMC7. Les lymphocytes normaux n'expriment aucun de ces quatre marqueurs. Il est donc possible de placer le seuil pour ces quatre marqueurs de sorte que ces lymphocytes soient « négatifs ».

L'expression du CD38 sur certains lymphocytes T permet d'utiliser le nuage correspondant à ces lymphocytes T pour établir le seuil de positivité.

Concernant les marqueurs CD10 et CD25, on utilise les populations monocytaires et granuleuses pour déterminer les seuils. Les granuleux sont CD10+ et CD25+ (25). Il est donc possible de placer le seuil pour ces deux marqueurs de sorte que la population granuleuse (en rouge sur la figure) soit « positive ».

Enfin, le seuil pour le CD180 est déterminé en faisant de sorte que la population de monocytes (en vert) soit positive pour ce marqueur, les monocytes étant CD180+.

Une fois tous ces seuils établis on peut déterminer l'expression ou l'absence d'expression du clone lymphocytaire B pour tous les CDs étudiés.

La figure ci-après (figure 27) illustre les seuils pour chacune des populations.

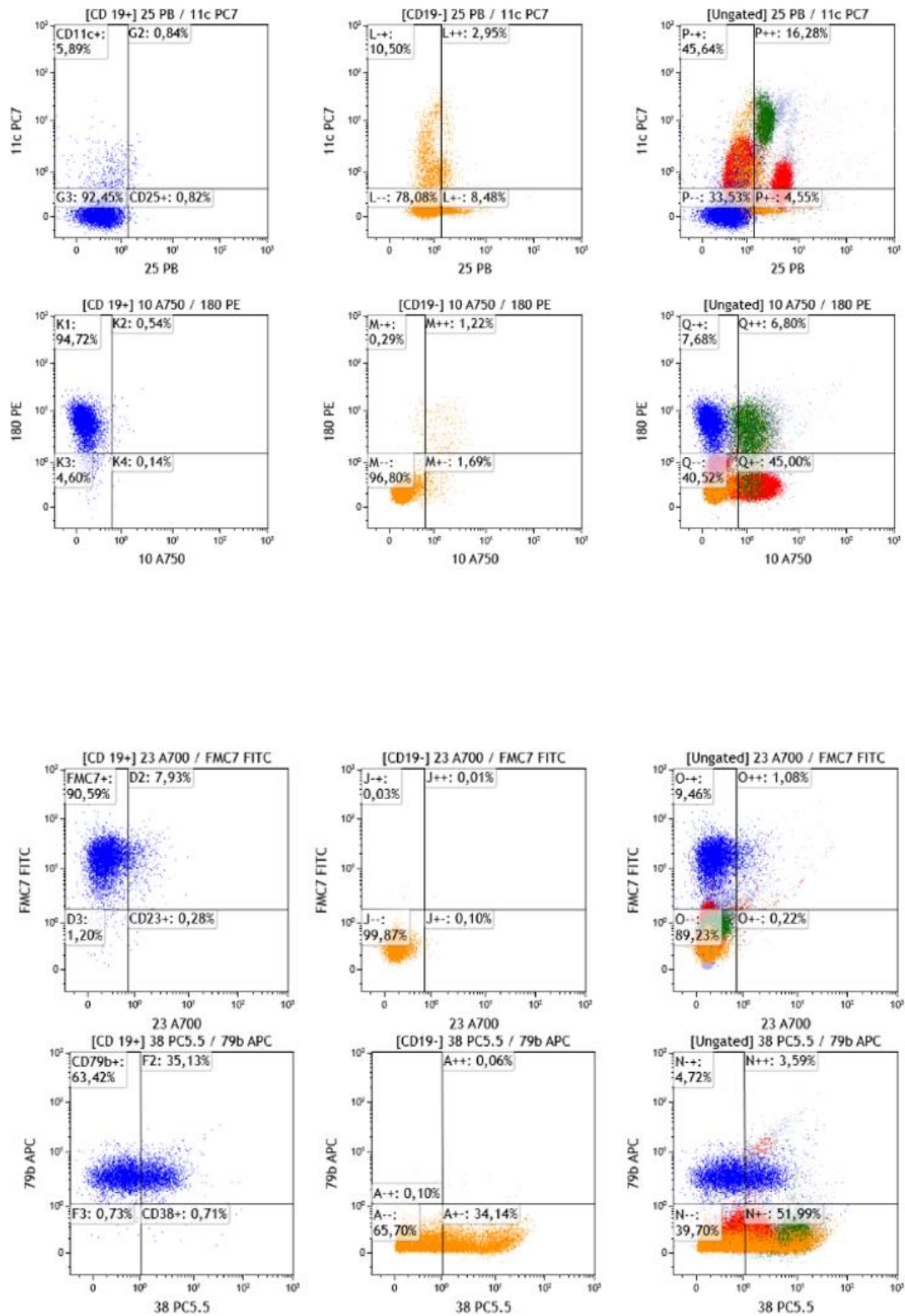


Figure 27 : Stratégie de mise en place des seuils de positivité pour chacun des marqueurs étudiés

II.3. Panel d'orientation lymphoïde T

Le panel d'anticorps utilisé pour l'analyse des lymphocytes T est le suivant :

Tableau 3 : Composition du panel T

ANTICORPS	FLUOROCHROME	LASER	FL
CD4	FITC	BLEU	1
CD19+TCR	PE	BLEU	2
CD8	ECD	BLEU	3
CD3	PE	BLEU	4
CD56	PE CY7	BLEU	5
CD10	APC	ROUGE	6
CD7	APC700	ROUGE	7
CD5	APC A750	ROUGE	8
CD16	PB	VIOLET	9
CD45	KO	VIOLET	10

Utilisé dans le but d'explorer le phénotype des lymphocytes T, ce panel est beaucoup moins utilisé que le panel d'orientation B. Il est demandé par le clinicien en cas de suspicion de lymphome T, ou dans le cadre de l'exploration d'une hyperéosinophilie. Ce panel T peut également être prescrit à l'initiative du biologiste notamment après une anomalie décelée dans le panel d'orientation décrit précédemment, quand cette anomalie touche les marqueurs lymphocytaires T (CD3 CD4 et CD8). Il peut bien sûr être demandé à la suite d'anomalies évocatrices d'un lymphome T retrouvées en cytologie sur le frottis sanguin ou médullaire. Cet immunophénotypage T permet de déceler la présence d'éventuels marqueurs aberrants à la surface des lymphocytes T tels que le CD10 ; l'absence ou la baisse d'intensité de certains marqueurs normalement retrouvés sur les lymphocytes T normaux peuvent également être retrouvés dans certaines hémopathies lymphoïdes T. L'utilisation de ce panel T permet donc une première orientation diagnostique.

Difficile à interpréter, ce panel est souvent complété par une recherche de clonalité T et d'une étude de réarrangement du TCR en biologie moléculaire afin de poursuivre les investigations.

II.3.1. Stratégie de fenêtrage

Après une première fenêtre permettant de sélectionner les cellules vivantes, puis un CD45/SS permettant de sélectionner les lymphocytes, on utilise une fenêtre CD3/CD19+TCR (figure 28). Cette fenêtre permet avec simplement deux marqueurs la séparation de quatre populations lymphocytaires. Les lymphocytes B (CD19+/CD3-), les lymphocytes T (CD3+/CD19-), les lymphocytes NK (CD3-/CD19-) et la population lymphocytaire exprimant à sa surface le TCR gamma delta. Ces quatre populations sont bien distinguées en quatre nuages de points bien distincts. Il est alors facilement possible de se centrer sur l'une des populations pour l'étude de son phénotype. On désigne les quatre populations lymphocytaires de la façon suivante :

- CD3- CD19- correspondant aux lymphocytes NK
- CD3+ CD19- correspondant aux lymphocytes T
- CD3- CD19+ correspondant aux lymphocytes B
- CD3+ TCR gamma delta + correspondant aux lymphocytes T gamma delta.

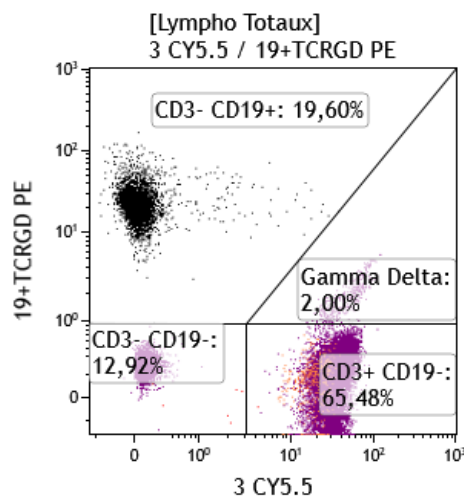


Figure 28 : Graphique CD19+TCRGD/CD3

Par la suite on peut étudier le phénotype de chacune des sous populations lymphocytaires. Une fenêtre CD5/CD7 centrée sur la population de lymphocytes T (CD3+ CD19-) permet de vérifier la présence des CD5 et CD7 à la surface des lymphocytes T (figure 29). En effet ces deux marqueurs sont normalement présents sur la lignée lymphocytaire T. Leur absence ou bien la diminution d'expression d'un de ces deux marqueurs est retrouvée dans certaines pathologies. Par exemple dans le mycosis fongoïde également appelé syndrome de Sézary, on retrouve une diminution d'expression du CD7 sur les lymphocytes T (26).

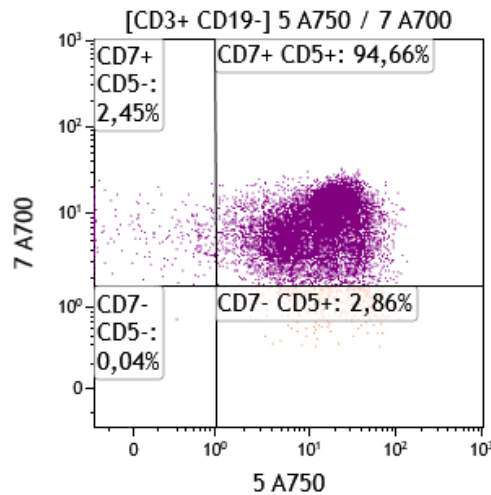


Figure 29 : Graphique CD5/CD7

Également conditionnée sur la population de lymphocytes T (CD3+ CD19-) une fenêtre CD4/CD8 permet d'étudier la répartition des sous populations de lymphocytes T : CD4 et CD8 (figure 30).

Ce fenêtrage CD4/CD8 est également réalisé sur une fenêtre conditionnée sur la population CD5+/CD7+ afin de vérifier que les populations soient identiques. Tous les lymphocytes T isolés en CD3 doivent être identiques aux lymphocytes T sélectionnés en CD5/CD7.

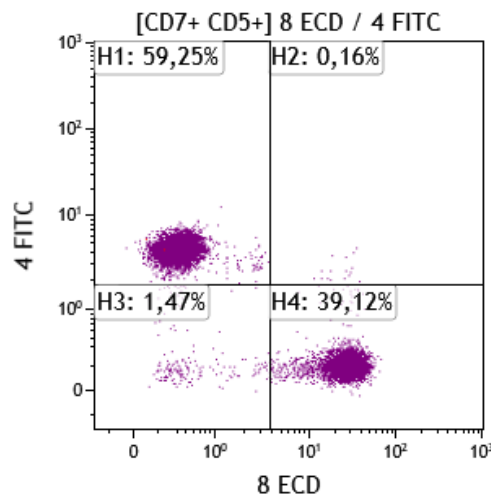


Figure 30 : Graphique CD4/CD8

Un fenêtrage CD4/CD10 est réalisé sur la population correspondant aux lymphocytes T (CD3+ CD19-) (figure 31). Il permet de visualiser l'éventuelle expression du CD10 sur les

lymphocytes T : expression aberrante retrouvée dans certains lymphomes T tel que le lymphome angio immunoblastique (27,28) (LAIT).

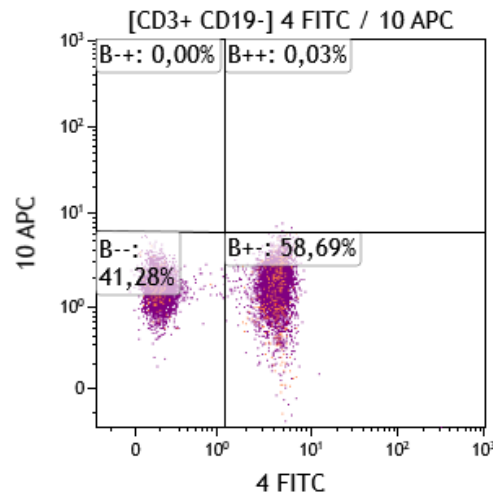


Figure 31 : Graphique CD10/CD4

Un fenêtrage CD56/CD16 est effectué en se conditionnant sur la population lymphocytaire T (CD3+ CD19-) (figure 32). Cette fenêtre permet de contrôler l'absence d'expression de ces deux marqueurs sur la majorité de la population lymphocytaire T. Cette fenêtre nous renseigne également sur la proportion de lymphocytes T cytotoxiques CD3+, CD16+ et CD56+.

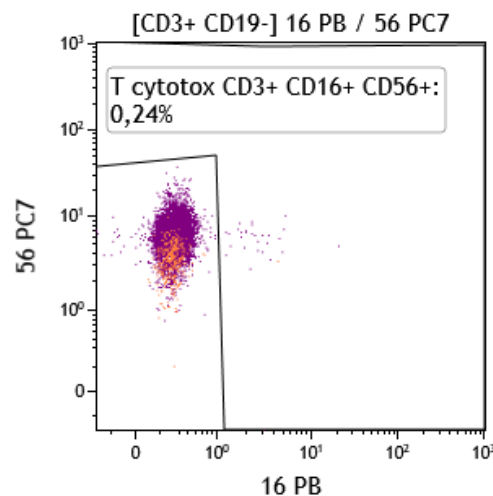


Figure 32 : Graphique CD16/CD56 sur CD3+

Un deuxième fenêtrage CD56/CD16 est effectué mais conditionné ici sur les lymphocytes NK (CD3- CD19-) (figure 33). Il permet de contrôler la présence du CD56 et du CD16 sur la population de lymphocytes NK. En effet un phénotype aberrant tel qu'une diminution d'expression du CD16 sur cette population cellulaire est décrite dans certains lymphomes NK (29).

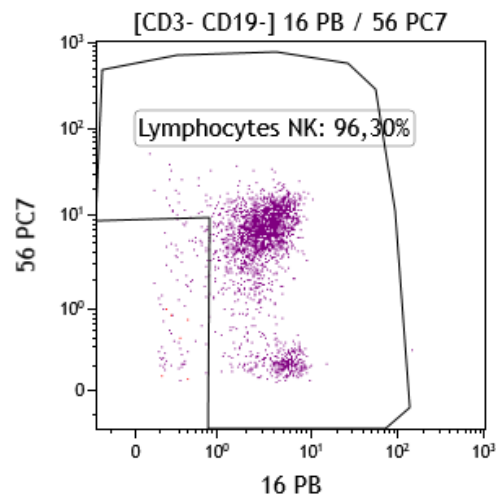


Figure 33 : Graphique CD16/CD56 sur CD3-

II.4. Panel typage plasmocytaire

Le panel d'anticorps utilisé pour l'analyse des plasmocytes est le suivant :

Tableau 4 : Composition du panel plasmocytes

ANTICORPS	FLUOROCHROME	LASER	FL
LAMBDA	APC	Bleu	1
CD56+28	PE	Bleu	2
CD34+117	ECD	Bleu	3
CD27	PC5.5	Bleu	4
CD20	PC7	Bleu	5
KAPPA	FITC	Rouge	6
CD38	A700	Rouge	7
CD19	A750	Rouge	8
CD138	PE Cy5	Violet	9
CD45	KO	Violet	10

Ce panel permet de caractériser la population plasmocytaire dans un prélèvement. Il est demandé par le clinicien en cas de suspicion de myélome multiple ou bien devant l'apparition d'un pic monoclonal sur l'électrophorèse des protéines sériques et fait partie des analyses à effectuer dans le bilan initial du myélome multiple. En plus d'indiquer la présence ou non de plasmocytes, il permet de définir le caractère bénin ou malin et clonal des plasmocytes présents. En effet bien que la cytologie permette par l'observation de signes de dystrophies bien connus tels que par exemple une taille augmentée des cellules, une anisocaryose ou une chromatine fine (30) d'orienter le diagnostic, la CMF permet d'avoir une confirmation sur l'origine clonale d'une population plasmocytaire suspecte. Enfin l'utilisation de ce panel est utile en cas de doute sur l'origine clonale ou réactionnelle d'une plasmocytose. En effet il existe de rares situations de plasmocytose médullaire réactionnelle, en cas de réaction immunitaire, d'agranulocytose (31), ou secondaire à un lymphome (32). C'est dans ces cas que l'immunophénotypage des plasmocytes en CMF permet d'affirmer ou non le caractère clonal des plasmocytes.

Ce panel utilise les marqueurs de différenciation plasmocytaires CD38 et CD138, ainsi que des marqueurs servant à définir le caractère malin des plasmocytes : CD56, CD19 (33–35).

Il est en effet connu que les plasmocytes dit malins peuvent présenter une perte du CD19 et une acquisition du CD56.

Le reste du phénotype plasmocytaire dans le myélome peut être varié. On retrouve cependant souvent une perte d'expression du CD27, du CD20 ou encore du CD45 ainsi qu'une acquisition du CD117 ou encore du CD28 (34,35).

Outre la détection des éventuels plasmocytes présent, ce panel d'anticorps permet l'identification de population lymphocytaire B monotypique grâce au CD19, CD20, et le marquage des chaînes légères kappa lambda. Les phénotypes les plus fréquemment retrouvés dans le myélome multiple sont résumés dans le tableau suivant (figure 34).

Table 1
*Most Frequently used Markers for Detection of Myeloma
Associated Phenotypes (MAP) Included in MM MRD Panels*

Antigen	Aberrant pattern	% of abnormal expression cases
CD19	–	96%
CD20	dim+	17–30%
CD27	– or dim+	40–68%
CD28	+	15–45%
CD33	+	18%
CD38	dim+	80%
CD45	–	73%
CD54	dim+	60–80%
CD56	++	60–75%
CD81	– or dim+	55%
CD117	+	30–32%
CD200	+ / ++	>70%
CD307	++	NA

Figure 34 : Tableau récapitulatif CDs présent dans le myélome (33)

II.4.1. Stratégie de fenêtrage

Comme dit précédemment l'objectif de ce panel d'anticorps est de rechercher les éventuels plasmocytes et de définir leur phénotype.

La population plasmocytaire CD38+/CD138+ est d'emblée isolée grâce à un fenêtrage CD38/CD138 (figure 35).

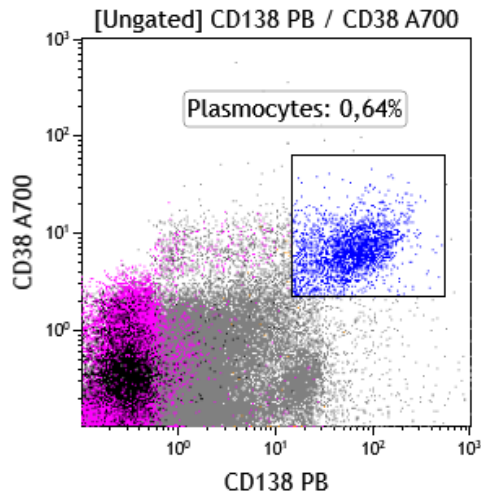


Figure 35 : sélection des plasmocytes CD38/CD138

En parallèle, une sélection des lymphocytes totaux est réalisée en CD45 fort SS faible (figure 36) puis de ces derniers sont isolés les lymphocytes B CD20+ et CD19+ grâce à une fenêtrage CD20/CD19 (figure 37).

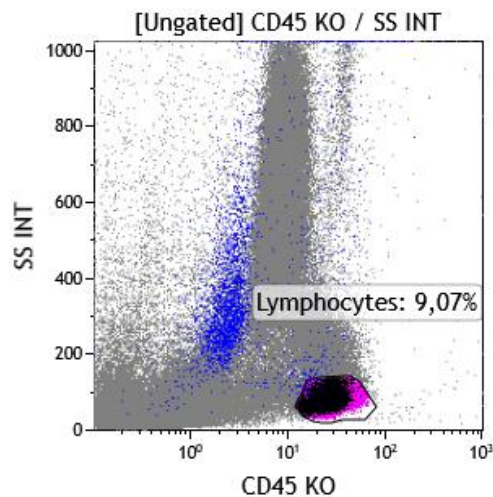


Figure 36 : Sélection des lymphocytes totaux (graphique CD45/SS)

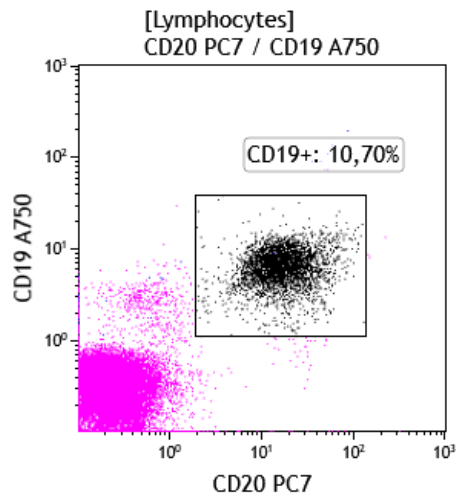


Figure 37 : Graphique CD19/CD20

Par la suite, on évalue le rapport kappa/lambda sur les deux populations afin de détecter une éventuelle monotypie des plasmocytes ou des lymphocytes (figures 38 et 39).

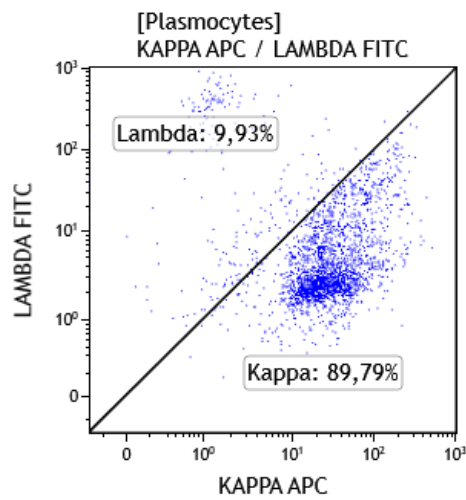


Figure 38 : kappa/lambda sur la population plasmocytaire

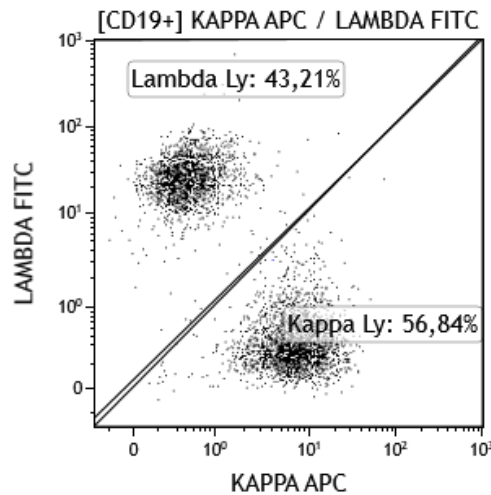


Figure 39 : kappa/lambda sur la population lymphocytaire B

L'étude des autres marqueurs (CD56+28, CD19, CD45, CD20, CD27 et CD117) se fait à l'aide de graphique en quadrant. Afin d'évaluer l'expression ou l'absence d'expression de ces marqueurs pour la population plasmocytaire, on utilise pour référence la population lymphocytaire pour laquelle on connaît l'expression des différents CDs. Ces seuils ainsi définis sont ensuite appliqués aux fenêtres conditionnées sur les plasmocytes. On peut alors apprécier l'acquisition, la baisse ou même l'absence d'expression pour chaque marqueur (figures 40 et 41).

Par exemple on sait que les lymphocytes B sont CD19+ ; le seuil d'expression du CD19 sera donc fixé à gauche du nuage de points correspondant aux lymphocytes B. Ce même seuil sera fixé sur la population plasmocytaire et permettra de savoir si cette dernière a perdu le CD19 (nuage de points à gauche du seuil) ou si elle a conservé le CD19 (nuage de points à droite du seuil). On fera de même pour tous les marqueurs.

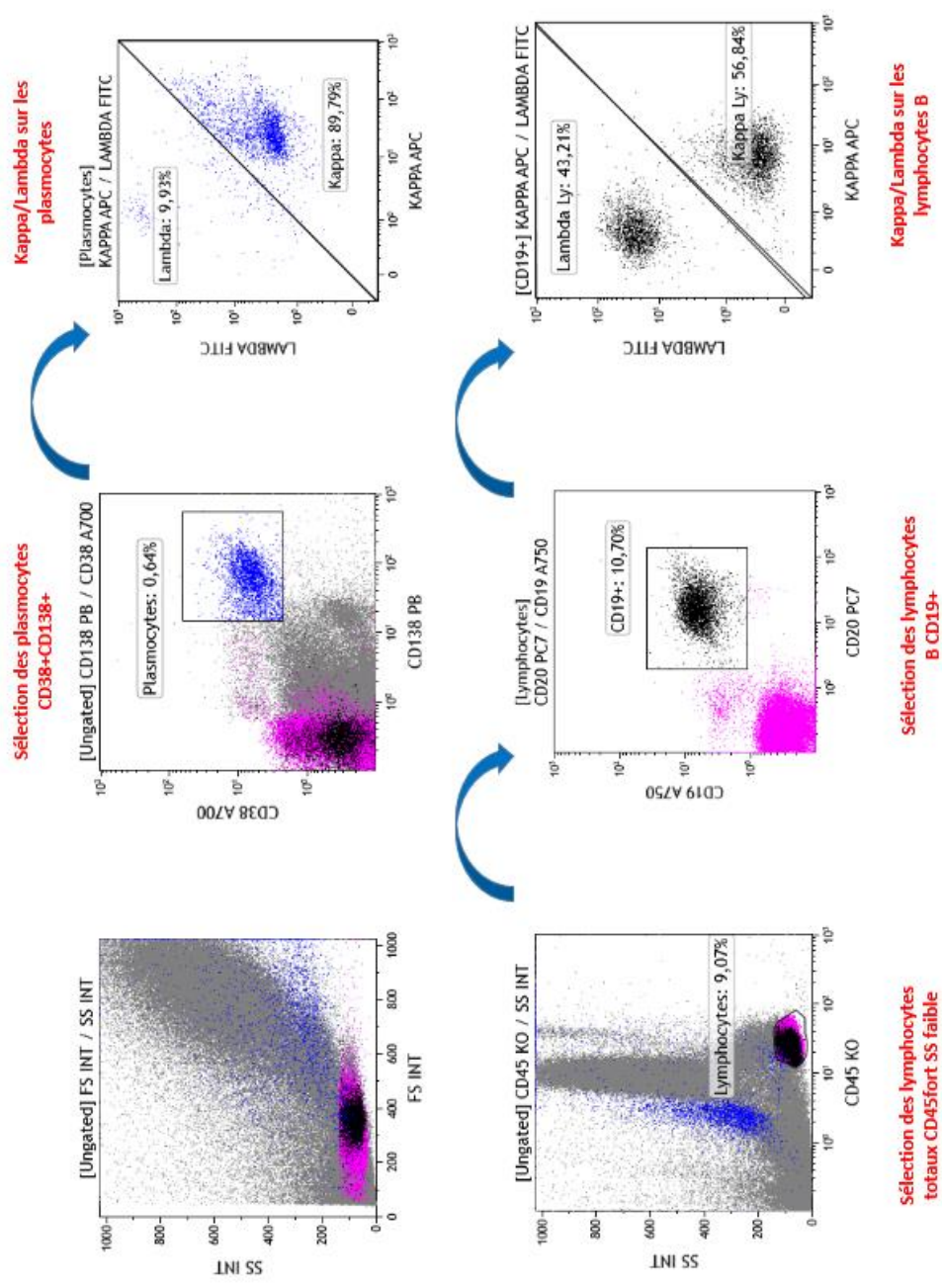
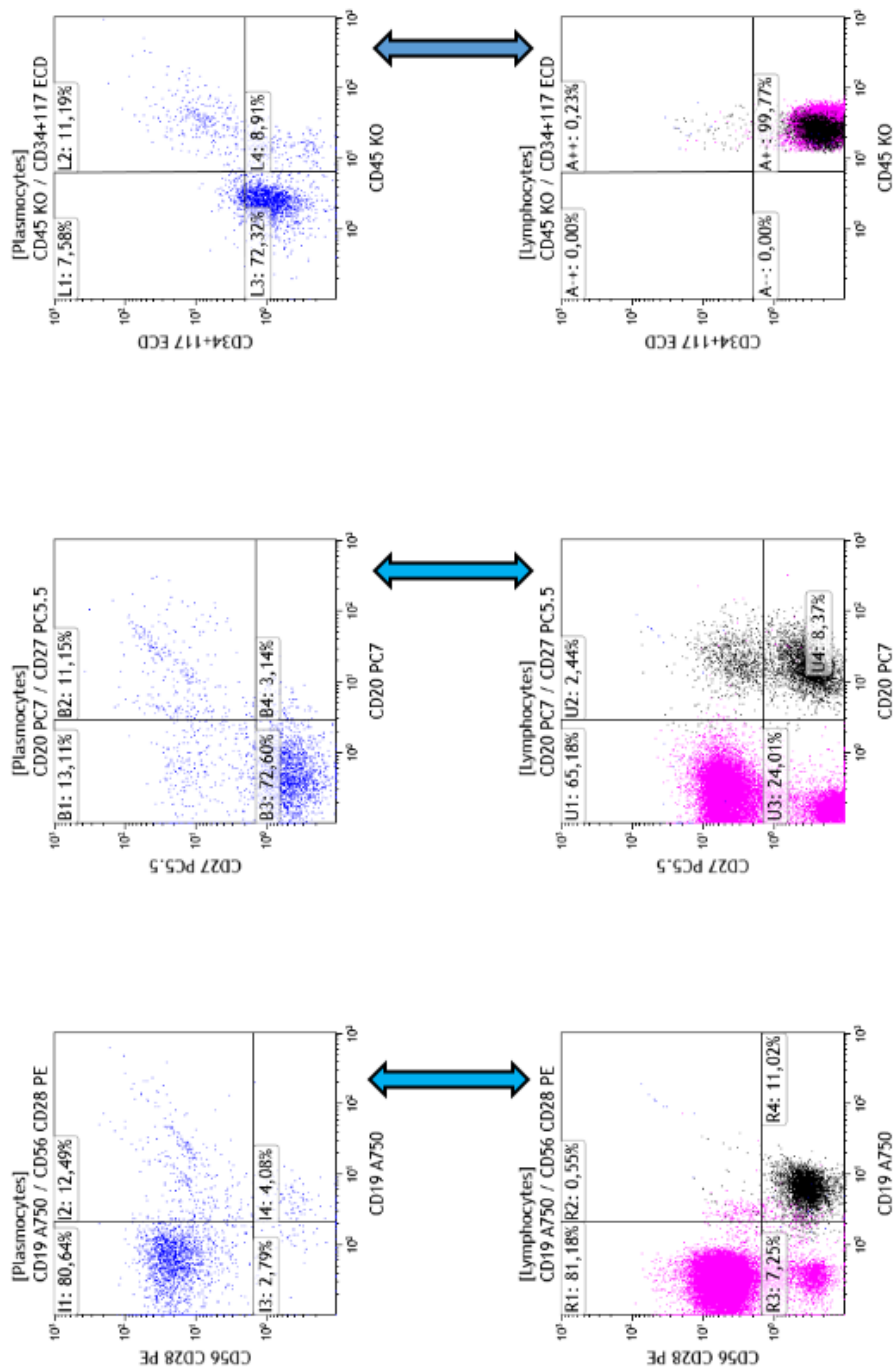


Figure 40 : Stratégie de fenêtrage du panel plasmocytes (1)



Les seuils d'expression des CD19, CD56, CD28, CD20, CD27 et CD117 sont établis sur les lymphocytes. Les seuils sont ensuite appliqués sur la population plasmocytaire.

Figure 41 : Stratégie de fenêtrage du panel plasmocyte (2)

II.5. Panel LMMC

Le panel d'anticorps qui constitue de LMMC est constitué des marqueurs suivants

Tableau 5 : Composition du panel LMMC

ANTICORPS	FLUOROCHROME	LASER	FL
SLAN	FITC	BLEU	1
CD24	PE	BLEU	2
CD56	PE CY5.5	BLEU	4
CD14	PC7	BLEU	5
CD7	A700	ROUGE	7
CD16	PB	VIOLET	9
CD45	KO	VIOLET	10

II.5.1. Stratégie de fenêtrage

L'objectif de cette stratégie de fenêtrage est d'isoler les monocytes au sein du sang périphérique et de quantifier les 3 sous-populations monocytaires (36).

- MO1 correspondant aux monocytes classiques
- MO2 correspondant aux monocytes intermédiaires
- MO3 correspondant aux monocytes non classiques

En effet, tel que décrit par Selimoglu-Buet et al en 2015 (37), un taux de monocytes MO3 >94% est en faveur d'une LMMC.

La stratégie d'exclusion des différentes sous-populations afin de sélectionner spécifiquement les monocytes est la suivante :

Tout d'abord, une élimination des doublets est faite en fonction de la taille et de la structure des cellules (figure 42). Ces événements sont présents lorsque plusieurs cellules passent simultanément devant le laser.

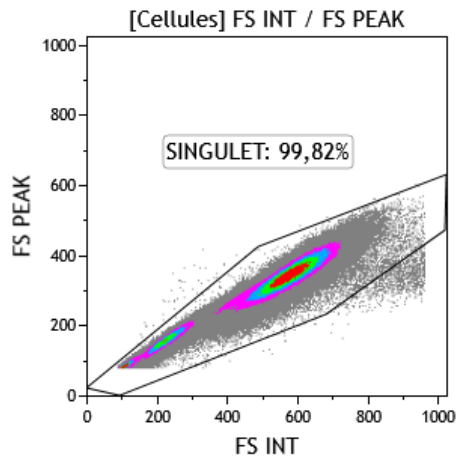


Figure 42 : Sélection des singulets

Ensuite, une sélection est faite de façon très élargie des cellules de structure intermédiaire grâce au CD45, marqueur pan leucocytaire, et au SSC (Side SCatter) (figure 43). Ces cellules correspondent aux monocytes.

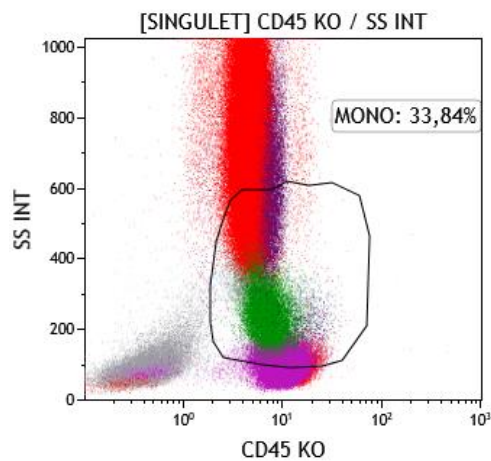


Figure 43 : Sélection des monocytes en CD45/SS

L'exclusion des cellules sélectionnées ne correspondant pas aux monocytes peut commencer.

En premier lieu, les cellules exprimant le CD7 à leur surface sont sélectionnées en CD7/SS puis éliminées (figure 44). Cette population correspond aux lymphocytes T.

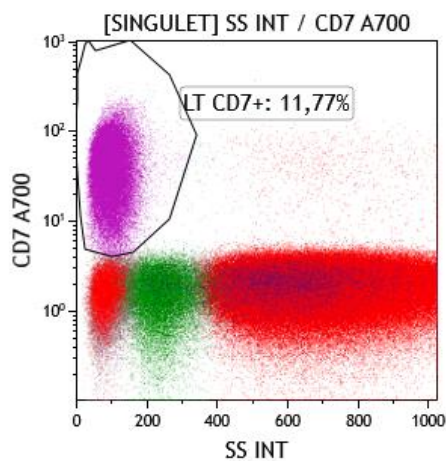


Figure 44 : Exclusion des lymphocytes CD7+

De la même manière, les cellules exprimant le CD56 sont sélectionnées en CD56/SS puis éliminées (figure 45). Ces cellules CD56+ SS faible correspondent aux lymphocytes NK.

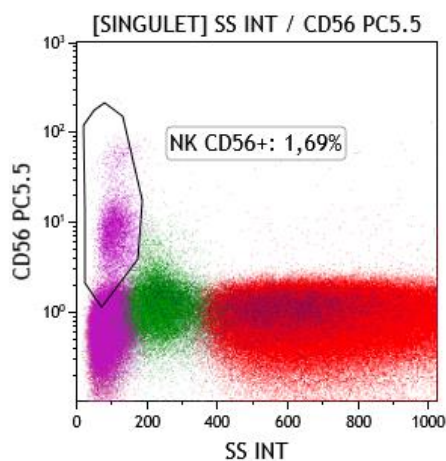


Figure 45 : Exclusion des lymphocytes NK CD56+

Les lymphocytes B sont sélectionnés grâce au CD24 et un SS faible (figure 46). Le CD24 permet également une première élimination des granuleux.

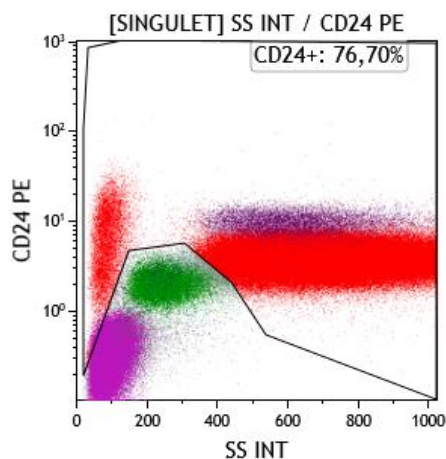


Figure 46 : Exclusion des lymphocytes B et des granuleux CD24+

Les granuleux restant sont éliminés en utilisant le CD16 sur un graphique CD16/SS (figure 47). Il faut toutefois être vigilant et ne pas éliminer les monocytes CD14^{low} CD16⁺.

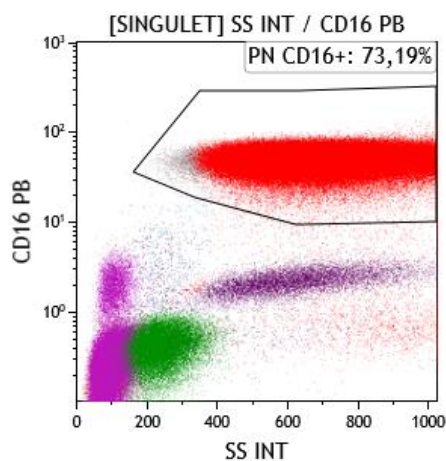


Figure 47 : Exclusion des granuleux, graphique CD16/SS

Une dernière fenêtre CD14/CD16 conditionnée sur les monocytes permet d'éliminer la population double négative (CD16⁻/CD14⁻) correspondant aux lymphocytes n'ayant pas été éliminés préalablement (figure 48).

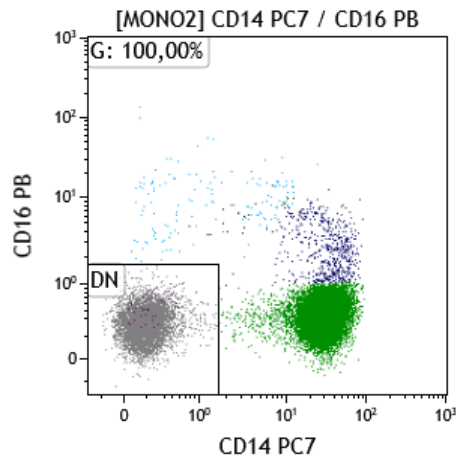


Figure 48 : Elimination des doubles négatifs : graphique CD14/CD16

Toutes ces étapes ont permis d'éliminer une à une les différentes populations cellulaires dans le but de sélectionner la population d'intérêt : les monocytes.

Une fenêtre finale exclusivement composée de monocytes est obtenue, représentée en « Density Plot » (figure 49) afin de mieux séparer les trois populations d'intérêt : monocytes classiques (MO1), intermédiaires (MO2), non classiques (MO3).

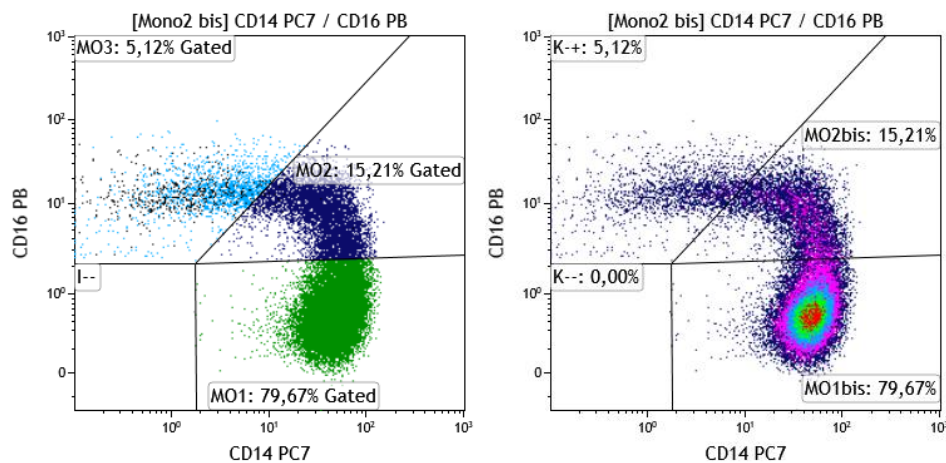


Figure 49 : Distribution des sous populations monocytaires en CD14/CD16.

Dans les cas de LMMC inflammatoires, l'aspect en bulbe des monocytes ne permet pas une séparation optimale des populations MO1 et MO2. De plus dans les cas de LMMC inflammatoires, on retrouve une augmentation des MO2. Par ailleurs, une fraction des monocytes non classiques MO3 est SLAN+ et correspond aux monocytes CD14 les plus faibles.

Un taux de monocytes SLAN+ inférieur à 1.7% est en faveur d'une LMMC si on retrouve l'aspect de bulbe.

II.6. Panel Covid

II.6.1. Stratégie de fenêtrage

Une étude de 2020 démontre l'utilité de la cytométrie en flux dans le pronostic des infections à SARSCoV2. Elle démontre que la diminution des monocytes non classiques CD14low et CD16+ corrélée à une diminution des monocytes SLAN+ est un facteur de gravité d'une infection à SARSCoV2 (29). Ce panel permet également de quantifier les monocytes non classiques MO3, les monocytes SLAN+, et de quantifier les granuleux immatures.

Le fenêtrage appliqué pour l'étude des monocytes dans le panel Covid est le même que pour la sélection des monocytes dans le diagnostic de LMMC.

Un paramètre est cependant ajouté correspondant au 6SulfoLacNAc (SLAN). Il s'agit d'un résidu d'hydrate de carbone décrit à l'origine comme étant exprimé à la surface des cellules dendritiques. Il est retrouvé notamment sur les monocytes non classiques MO3 (38).

Dans ce panel, l'anticorps anti-SLAN est couplé au fluorochrome suivant : FITC.

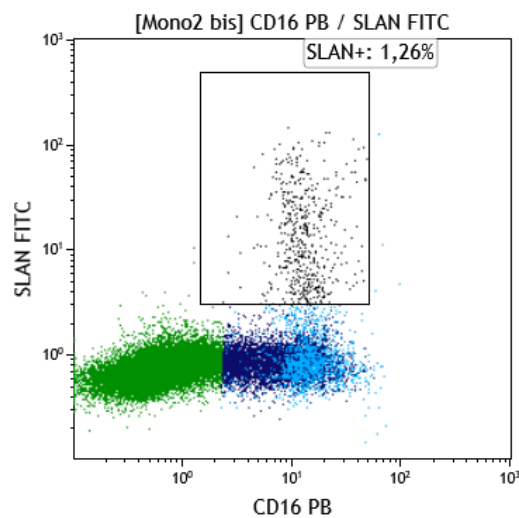


Figure 50 : Fenêtrage du SLAN

II.7. Panel « leucémie aigüe »

Ce panel permet une orientation rapide du diagnostic de leucémie aigüe (LA) vers une leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) ou une leucémie aigüe myéloblastique (LAM) en complément de la cytologie. Elle apporte également des indications précieuses pour classer le type de leucémie (classification fab, EGIL), (figure 52). L'utilisation de ce panel au diagnostic est également utile pour un éventuel suivi de MRD en CMF.

cytCD79a*, cytCD22*, CD19*, CD10, CD20	Lignée lymphocytaire B
cytCD3*, CD2, CD5, CD7, CD8, CD1, sCD3, CD4, TCR	Lignée lymphocytaire T
CyMPO*, cytCD13* ou CD13*, CD33*, CD117*, CD14, CD15, CD65, CD11b, CD64	Lignée myéloïde
CD41*, CD42*, CD61*	Lignée plaquettaire
Glycophorine A*, CD36*	Lignée érythroïde
* Marqueurs les plus spécifiques de chaque lignée	

Figure 51 : Marqueurs des différentes lignées pour le typage des Leucémies Aigües (39)

Lignée B	
B-I (pro-B)	CD19+ et/ou CD79a+ et/ou CD22+
B-II (commune)	CD10+
B-III (pré-B)	IgM cyt+
B-IV (mûre)	Kappa ou Lambda, cyt ou s
Lignée T	
T-I (pro-T)	CD7+
T-II (pré-T)	CD2+ et/ou CD5+ et/ou CD8+
T-III (T corticale)	CD1a+
T-IV (T mûre)	CD1a- CD35+
Groupe a : TCR αβ+	
Groupe b : TCR γδ+	

Figure 52 : Classification immunologique des Leucémies Aigües Lymphoblastiques selon l'EGIL (40)

Le panel d'anticorps qui constitue le panel Leucémie Aigüe est constitué des marqueurs suivants :

Tableau 2 : Composition du panel Leucémie Aigue

ANTICORPS	FLUOROCHROME	LASER	FL
CD7+56	A700	Bleu	1
CD13	PE	Bleu	2
HLA-DR	ECD	Bleu	3
CD33	PE Cy5.5	Bleu	4
CD38	PE Cy7	Bleu	5
CD33	PE Cy5.5	Rouge	6
CD10	A700	Rouge	7
CD19	PB	Rouge	8
CD117	A700	Violet	9
CD45	KO	Violet	10

II.7.1. Stratégie de fenêtrage

L'objectif de ce panel étant de caractériser le phénotype des éventuels blastes présents dans l'échantillon, il faut tout d'abord isoler cette population blastique.

Les blastes ont comme caractéristiques immunophénotypiques un CD45 d'expression faible et un SSC d'expression très variable (25).

Une première fenêtre FS/SS permet de sélectionner les cellules vivantes ainsi que d'avoir un aperçu général des populations cellulaires présentes dans l'échantillon (figure 53).

Une seconde fenêtre CD45/SS permet de séparer l'éventuelle population de cellules blastiques que l'on recherche en cas de suspicion de leucémie aigüe. Pour rappel, les blastes présentent en effet comme caractéristiques une expression diminuée du CD45 (25).

Comme pour deux panels précédemment décrits (typage plasmocytaire et complément B), le reste du panel d'orientation LA est conditionné sur cette population blastique CD45 faible. Avec différents marquages on peut ainsi déterminer le phénotype de la population blastique et orienter le diagnostic vers une LAM ou une LAL.

Les CD utilisés dans ce panel sont les suivants :

- Marqueurs de la lignée lymphoïde : CD7, CD56, CD38,
- Marqueurs de la lignée myéloïde : CD13, CD117, CD33, MPO
- Marqueurs d'immaturation : HLA-DR, CD34

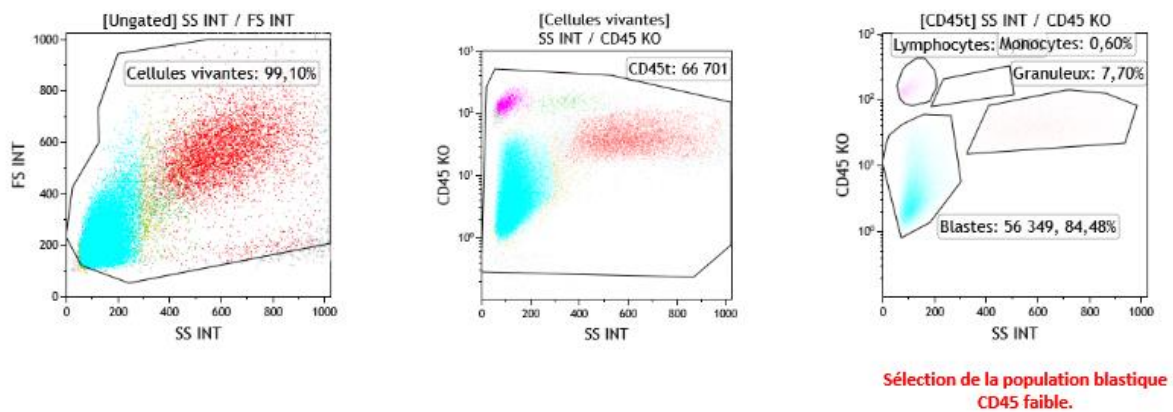


Figure 53 : Principe de sélection de la population blastique

Comme pour les panels « typage plasmocytaire » et « complément B » il sera primordial de fixer les bons seuils de positivité pour chacun des paramètres étudiés (figure 54 et 55).

Pour cela on utilise les autres populations présentes (lymphocytes et granuleux) dont on connaît le phénotype.

Le CD34 n'est exprimé ni sur les lymphocytes ni sur les granuleux. Le CD33 est exprimé sur les granuleux mais pas sur les lymphocytes (25). Il en est de même pour le CD117 (exprimé sur les précurseurs myéloïdes) (25).

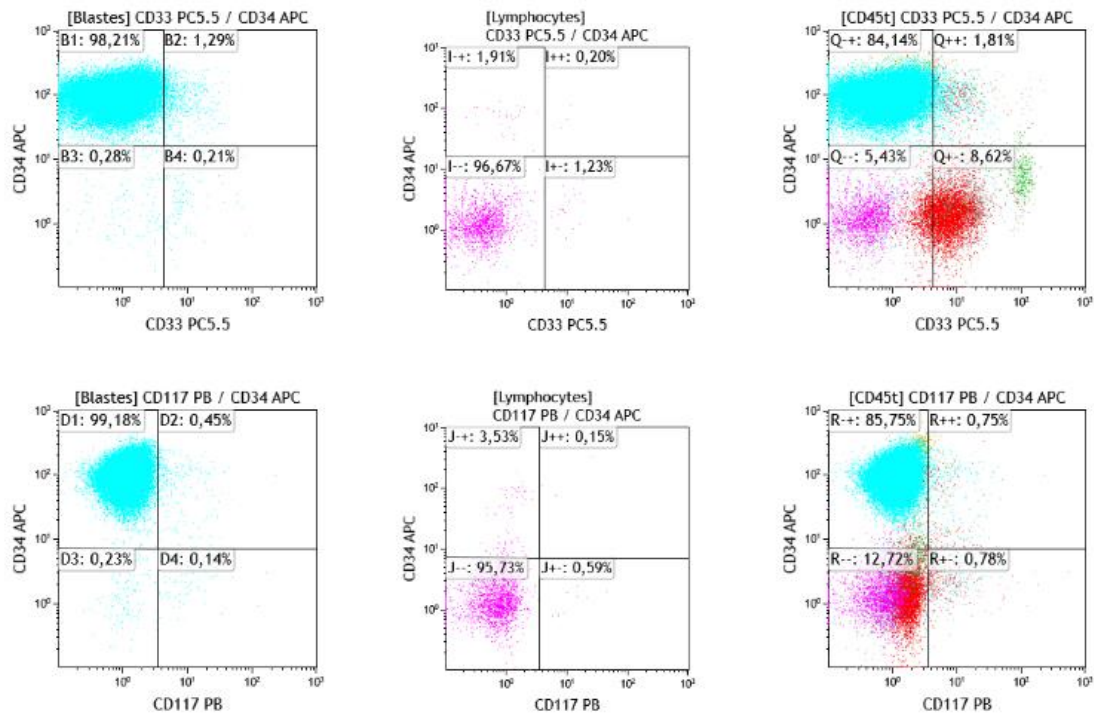


Figure 54 : Stratégie de fenêtrage et mise en place des seuils pour le panel LA (1)

Le CD13 n'est pas exprimé sur les lymphocytes mais positif sur les granuleux (25).

Le CD10 est positif sur les granuleux (25), le CD38 positif sur certains lymphocytes (lymphocytes T activés).

Enfin le HLA-DR (marqueur d'immaturité) est fortement exprimé sur les monocytes (25) (en vert sur la figure ci-après) mais également exprimé sur les granuleux. Le HLA-DR n'est pas exprimé sur les lymphocytes.

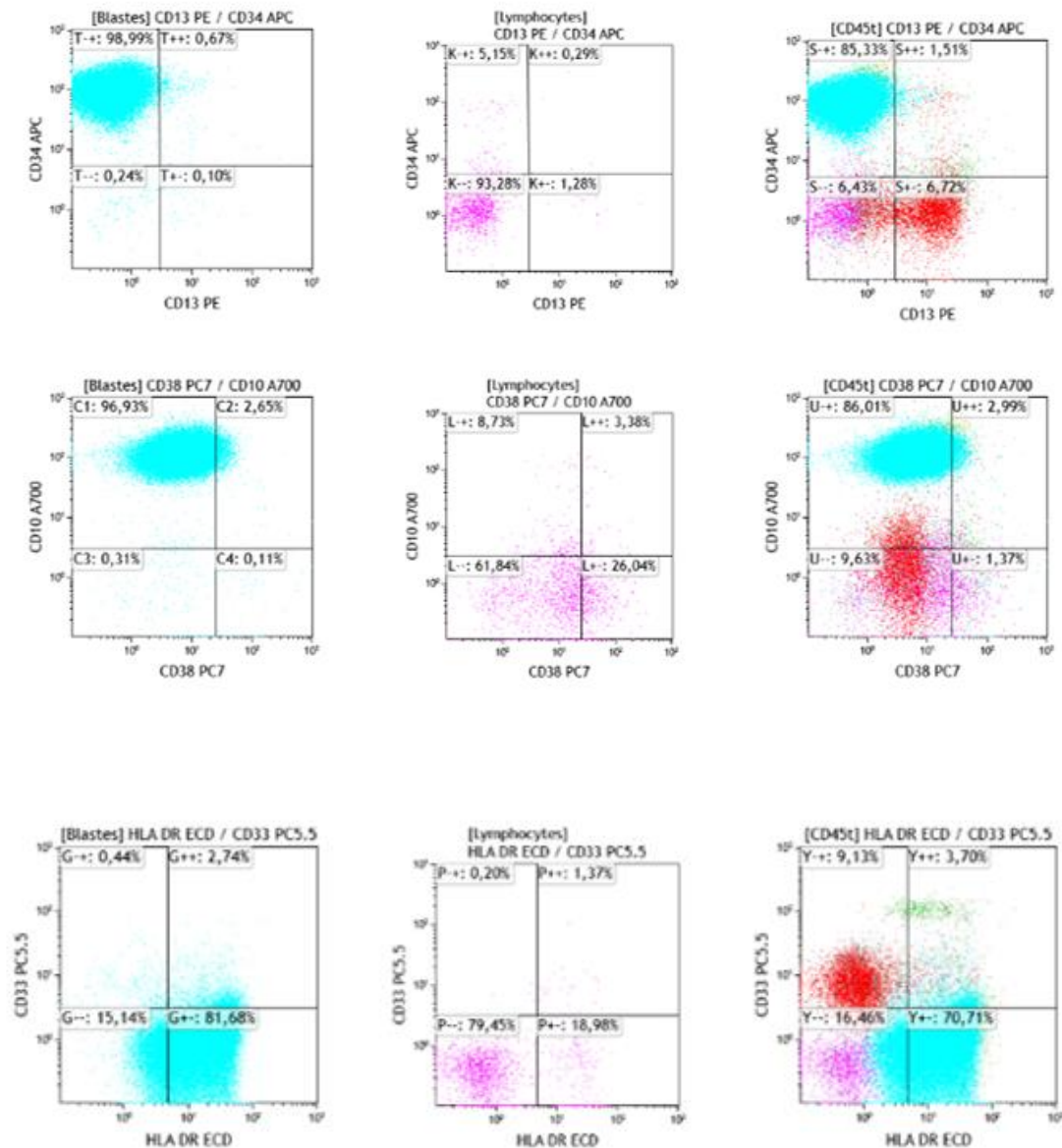


Figure 55 : Mise en place des seuils pour le panel LA (2)

III. Présentation du XF-1600 Sysmex®



Figure 56 : Cytomètre XF-1600 Sysmex®

III.1. Caractéristiques techniques

Le cytomètre XF-1600 (figure 56) est un cytomètre classique, composé de trois lasers : un violet d'une longueur d'onde de 405 nm, un bleu de 488 nm et un rouge de 638 nm. Dix détecteurs couplés à des PMT composent ce cytomètre. Ils sont couplés comme indiqués ci-dessous (figure 57).

Laser	Channel	Filter	Laser	Channel	Filter
488 nm	FL1	530/30	638 nm	FL6	660/20
	FL2	580/30		FL7	720/40
	FL3	610/14		FL8	780/60
	FL4	700/50	405 nm	FL9	450/50
	FL5	750 LP		FL10	540/80

Figure 57 : Lasers et détecteurs de fluorescence du XF-1600 (41)

L'analyse de l'échantillon se fait de la façon suivante : dans un premier temps, le cytomètre procède à un rinçage de la flowcell avec un liquide de rinçage spécifique. L'échantillon est ensuite aspiré grâce à un système de pompe. L'aspiration de l'échantillon se fait par volume de 250 μL . Plusieurs aspirations successives de ce même volume peuvent être effectuées afin d'augmenter le nombre d'évènements à analyser. A noter qu'il existe également un mode pour aspirer un volume plus réduit égal à 150 μL , en cas d'échantillons peu volumineux ou précieux. Après aspiration des 250 μL , l'intégralité de la prise d'essai est utilisée et analysée. Cela peut poser quelques problèmes notamment en cas de prélèvements très riches. En effet afin de ne pas saturer les images, il peut être nécessaire de stopper l'acquisition avant l'analyse des 250 μL . Le reste de la prise est donc perdu car envoyé à la poubelle. Sur d'autres cytomètres tels que les Navios, l'échantillon est aspiré au fur et à mesure et analysé dans la foulée.

Des conditions d'arrêt automatique de l'analyse sont aussi paramétrables afin d'optimiser le temps d'acquisition. Par exemple, il est possible d'arrêter l'acquisition quand le cytomètre a analysé 2000 lymphocytes B. Cela permet un gain de temps dans l'analyse.

Après analyse de l'échantillon, le cytomètre procède de nouveau à un rinçage automatique afin de minimiser les risques de contaminations inter-échantillon.

Plusieurs vitesses de passage réparties en trois modes sont possibles pour l'analyse de l'échantillon :

- Mode « low » avec une vitesse de 5 μL par minute
- Mode « medium » avec des vitesses de 30 ou 60 μL par minute
- Mode « high » avec des vitesses de 90 et 120 μL par minute

Concernant les choix des plots celui-ci est limité en nombre mais peut inclure plusieurs types de fenêtres. Les axes peuvent être utilisés avec différentes échelles : logarithmique, linéaire ou bien en logicle (auto-scaling).

Le XF-1600 peut également fonctionner en association avec un système de préparation d'échantillons PS-10™ (figure 58) pour automatiser l'ensemble du processus de coloration des anticorps, d'incubation et d'analyse par cytométrie en flux. Cette automatisation complète permet de minimiser les erreurs possibles, améliore la traçabilité et permet l'obtention de résultats plus rapides et plus fiables.

Une centrifugeuse laveuse automatique peut également être incorporée à la chaîne analytique.

Il s'agit là d'un avantage certains en termes d'assurance qualité et de traçabilité des échantillons, les erreurs humaines étant écartées. Couplé à une chaîne analytique de cytologie ainsi qu'à un étaleur/colorateur, le trio composé du cytomètre, de la centrifugeuse-laveuse et du préparateur permettrait une prise en charge encore plus rapide et plus complète de échantillons sanguins et donc une amélioration dans la prise en charge du patient.



Figure 58 : Préparateur PS-10 Sysmex ®

III.2. Maintenance quotidienne et CIQ

Comme tout automate utilisé en biologie médicale, le cytomètre XF-1600 doit subir une maintenance quotidienne, ainsi qu'un passage de contrôle afin de vérifier le bon fonctionnement de l'automate, notamment l'alignement des lasers ainsi qu'une éventuelle dérive du cytomètre.

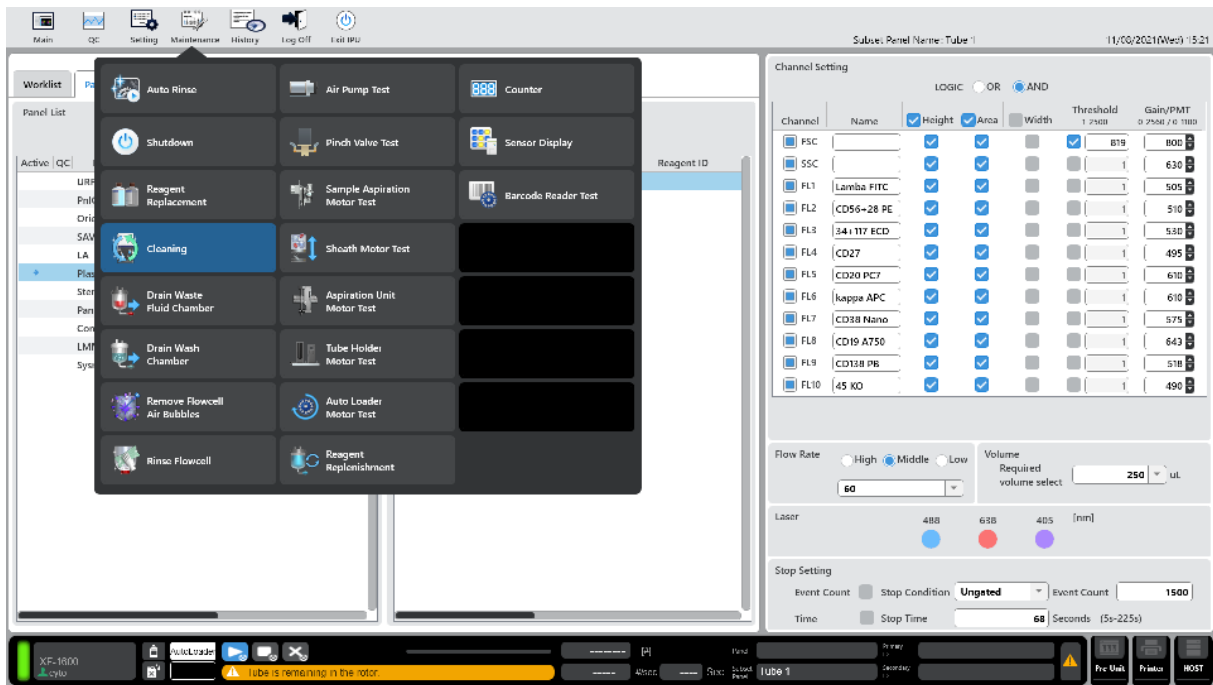


Figure 59 : Menu maintenance sur XF-1600

Le menu « maintenance » présenté sur la figure ci-dessus (figure 59) laisse de multiples choix pour l'opérateur. Le changement de réactif, le rivage de la flowcell (Rinse flowcell), la purge du système fluïdique (Remove flowcell Air Bubble) ou encore des tests à effectuer par l'automate sont paramétrables dans ce menu « maintenance »

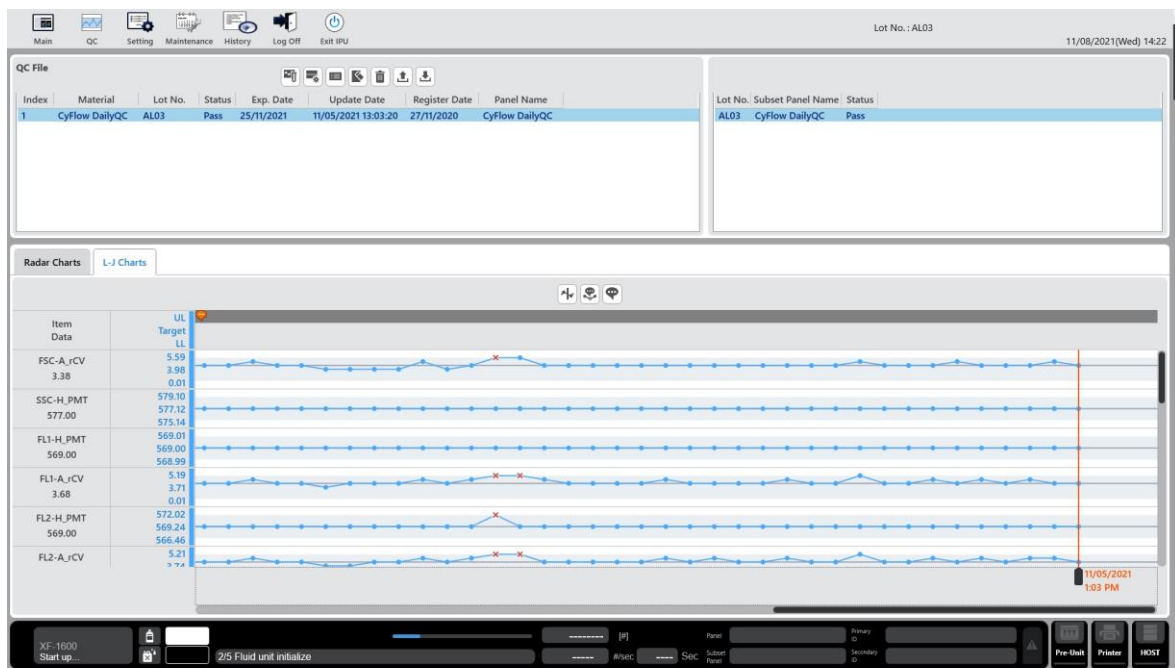


Figure 60 : Menu de suivi des CIQ sur XF-1600

Le menu de suivi des CIQ permet une visualisation rapide du suivi de chacun des PMT (figure 60).

Cytometer QC Report						
System:	XF-1600	Facility Name:	Laboratoire hemato			
Serial No.:	A1030	Measured by (Logon name):	cyto			
Version:	00-10	Measured by (User role):	AssayDeveloper			
Date measured:	11/05/2021 13:03:20	Overall Result:	Pass			
		Managed:	Managed			
Setup Beads						
Material Name	CyFlow DailyQC					
Lot No.	AL03					
Exp. Date	25/11/2021					
Detectors(PMT)						
Detector	Laser[nm]	Target	PMT	Lower Limit	Upper Limit	Status
SSC	488	577.12	577.00	575.14	579.10	Pass
FL1	488	569.00	569.00	568.99	569.01	Pass
FL2	488	569.24	569.00	566.46	572.02	Pass
FL3	488	616.00	616.00	615.99	616.01	Pass
FL4	488	588.33	585.00	577.88	598.78	Pass
FL5	488	741.00	741.00	740.99	741.01	Pass
FL6	638	771.03	773.00	760.44	781.62	Pass
FL7	638	606.15	600.00	591.79	620.51	Pass
FL8	638	661.53	663.00	653.60	669.46	Pass
FL9	405	538.00	538.00	537.99	538.01	Pass
FL10	405	568.24	569.00	563.87	572.61	Pass
Detectors(rCV)						
Detector	Laser[nm]	Target	rCV	Lower Limit	Upper Limit	Status
FSC	488	3.98	3.38	0.01	5.59	Pass
FL1	488	3.71	3.68	0.01	5.19	Pass
FL2	488	3.74	3.73	0.01	5.21	Pass
FL3	488	3.81	3.77	0.01	5.22	Pass
FL4	488	3.50	3.48	0.01	4.82	Pass
FL5	488	3.94	3.90	0.01	5.02	Pass
FL6	638	4.42	4.34	0.01	5.44	Pass
FL7	638	3.71	3.70	0.01	4.82	Pass
FL8	638	3.90	3.87	0.01	4.97	Pass
FL9	405	3.42	3.49	0.01	4.84	Pass
FL10	405	3.47	3.54	0.01	4.88	Pass
Comments						

Figure 61 : Exemple de rapport des contrôles qualité

Au quotidien, le gain appliqué à chacun des photomultiplicateurs est réadapté et ajusté afin de pallier les éventuelles dérives de l'automate. Sur le rapport ci-dessus, est renseigné pour chacun des 12 PMT le voltage cible ainsi que le voltage appliqué le jour même qui a permis d'obtenir les valeurs de fluorescence attendues. Les bornes limites haute et basse

permettent de savoir si le voltage appliqué ne diffère pas trop de la cible initiale. Enfin le statut du contrôle est renseigné : « pass » ou « fail » (figure 61).

La maintenance quotidienne consiste à un rinçage avec une solution clean avant la mise hors tension du cytomètre.

III.3. Passage des échantillons

Le passage des échantillons sur le cytomètre peut se faire de différentes façons. Un mode automatisé avec passeur, et un mode manuel. Il est possible de charger jusqu'à 25 échantillons différents dans le mode passeur grâce à des rotors appropriés. Il est également prévu un mode de passage manuel pour un échantillon à la fois.

Active	Status	Err	Validate	HostInfo	Primary ID	Secondary ID	Date measured	Panel Name	Subset	Panel Name	Rotor	Position	Register Date
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M CHA Phi	moelle	02/08/2021 16	Plasmo 12X	Tube 1				02/08/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M ARI Elo	moelle	02/08/2021 16	LA	T1 (DIAG + LAIP)				02/08/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M LAV Pau2	sang2	23/07/2021 15	LA	T1 (DIAG + LAIP)				23/07/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M LAV Pau	sang	23/07/2021 11	LA	T1 (DIAG + LAIP)				23/07/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M CAS Odi	Panel T	20/07/2021 17	Panel T	Panel T				20/07/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M JAC DAN2	plasmo	20/07/2021 14	Plasmo 12X	Tube 1				20/07/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M JAC DAN	Plasmo	16/07/2021 15	Plasmo 12X	Tube 1				16/07/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M PHI Jac	plasmo	16/07/2021 11	Plasmo 12X	Tube 1				16/07/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M test 34	moelle low	18/05/2021 11	Sysmex	panel 3				18/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M test 34	moelle	18/05/2021 11	Sysmex	panel 3				18/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M test 34	moelle	18/05/2021 11	Sysmex	panel 3				18/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M LUR Jea	moelle	17/05/2021 17	LA	T1 (DIAG + LAIP)				17/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M AHR Tim	sang	17/05/2021 17	LA	T1 (DIAG + LAIP)				17/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M test c55	test	14/05/2021 16	Sysmex	panel 3				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M TEST CDS	TEST LLC	14/05/2021 15	Sysmex	panel 3				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M BAB test 3	Test	14/05/2021 15	Orientation	Panel B				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M test conty 2	cell wash	14/05/2021 15	Orientation	Panel B				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M BAB Test 2	test	14/05/2021 15	Orientation	Panel B				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M Test conta	cell wash	14/05/2021 15	Orientation	Panel B				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M BAB test	test	14/05/2021 15	Orientation	Panel B				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M Moelle norma	test	14/05/2021 15	Sysmex	panel 3				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M BAB Dan	sang	14/05/2021 10	Orientation	Panel B				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M LUR Jea	sang	14/05/2021 10	LA	T1 (DIAG + LAIP)				14/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M test panel 3	test T1-05-2	11/05/2021 16	Sysmex	panel 3				11/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M MAR Leo	Moelle	06/05/2021 16	LA	T1 (DIAG + LAIP)	3	0300		06/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M CHA Phi	sang	06/05/2021 16	Complexe	LHN B	2	0300		06/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M CHA Phi	sang	06/05/2021 16	Orientation	Panel B	1	0300		06/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M GAS Cla	Sang	05/05/2021 15	Orientation	Panel B	8	0300		05/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M DOM Sjl	sang	05/05/2021 15	Orientation	Panel B	7	0300		05/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M KAN Ahm	sang	05/05/2021 15	LMMC	LMMC	6	0300		05/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M CHA Rog	sang	05/05/2021 15	LMMC	LMMC	5	0300		05/05/2021
Measured	<input checked="" type="checkbox"/>				H M VAC Jea	sang	05/05/2021 15	LMMC	LMMC	4	0300		05/05/2021

Figure 62 : Liste des échantillons analysés par le cytomètre

Sur la figure ci-dessus (figure 62), nous avons un aperçu de la liste de travail du cytomètre. Tous les échantillons analysés sont représentés sur cette liste de travail. On retrouve l'identification de l'échantillon avec nom, prénom du patient ainsi qu'un numéro interne au laboratoire. Pour chacun des échantillons analysés, cette liste de travail nous renseigne également sur le panel utilisé, la date d'acquisition, ainsi que le statut (validé ou non) de chaque échantillon. Il est également possible de revisualiser les images acquises pour chacun des patients tout simplement en sélectionnant le patient voulu sur la worklist. (Figure 63). Il est alors possible de modifier ou réajuster certaines fenêtres ou plots.

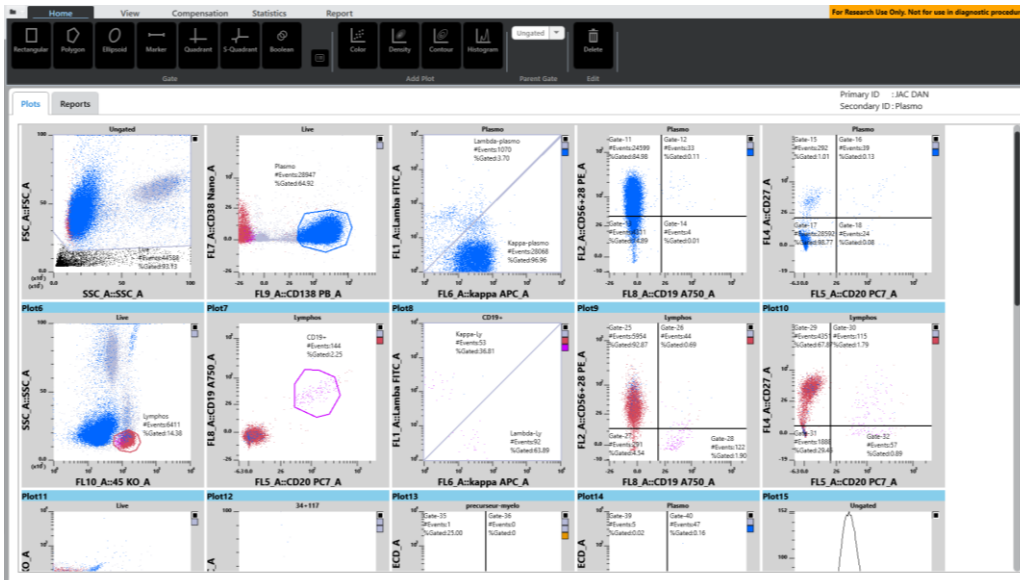


Figure 63 : Images acquises sur XF-1600

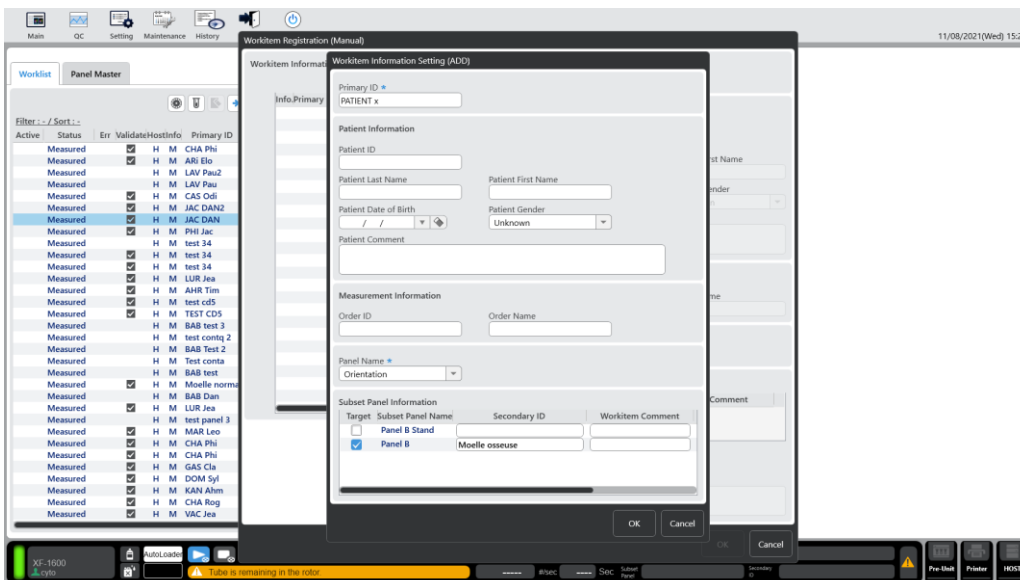


Figure 64 : Passage des échantillons en mode manuel

En passage manuel, un seul échantillon de patient peut être analysé. Pour cela on indique l'identité du patient puis on sélectionne le panel choisi pour l'analyse.

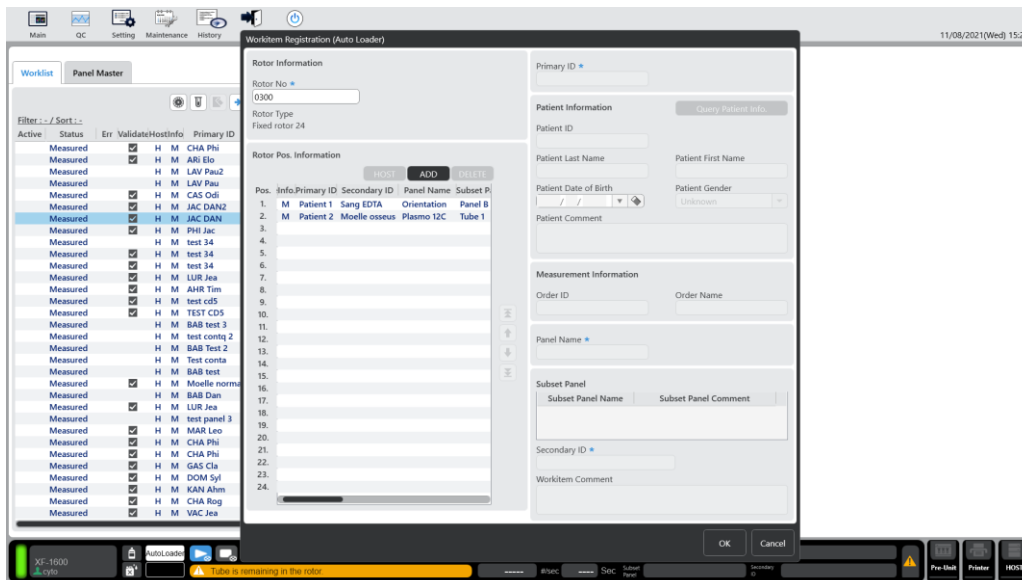


Figure 65 : Passage des échantillons en mode rotor (automatique)

De la même façon que pour le passage en mode manuel, dans le mode passeur automatique, l'identité de chaque échantillon est rentrée dans le logiciel puis le panel d'anticorps est sélectionné pour analyse de l'échantillon. Il est possible de programmer des panels différents les uns à la suite des autres pour des échantillons de patients différents.

Un système d'agitation permet une homogénéisation des échantillons entre les acquisitions des différents patients. En effet sans ce système, une sédimentation pourrait avoir lieu pour les derniers échantillons à analyser entraînant une impossibilité d'analyse.

III.4. Acquisition des images

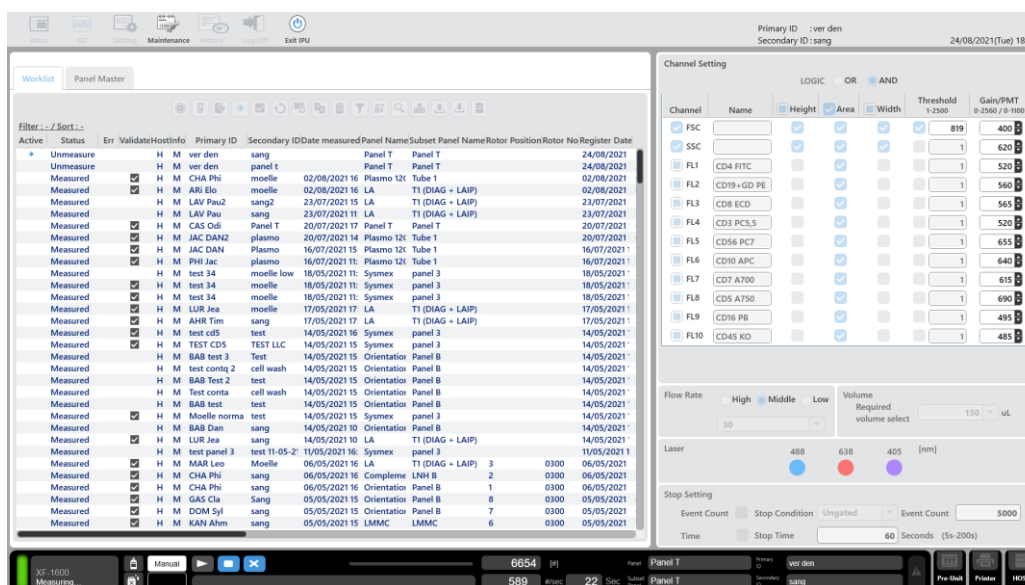


Figure 66 : Acquisition des images sur XF-1600

L'acquisition des images se fait en temps réel sur le logiciel d'acquisition au fur et à mesure que l'échantillon est analysé. Il est possible de réajuster certaines fenêtres en cours d'analyse afin de mieux cibler les populations d'intérêt. Un bandeau en bas de l'écran rappelle le panel utilisé, ainsi que l'identification de l'échantillon en cours d'acquisition. Il est également mentionné le nombre d'évènement total déjà acquis par le cytomètre, ainsi que la durée d'acquisition et le nombre d'évènements acquis par seconde.

III.5. Création et paramétrage des panels

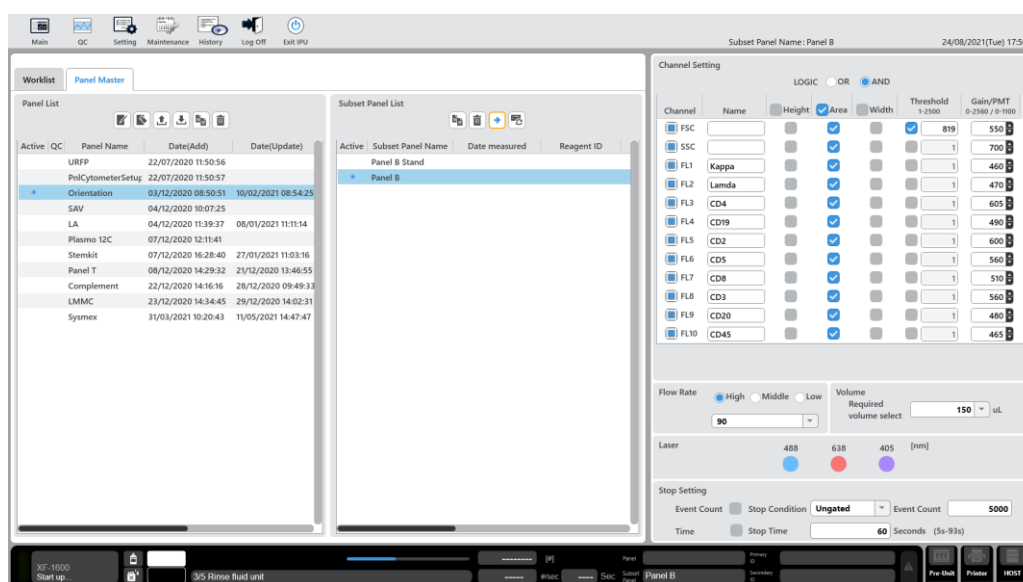


Figure 67 : Menu "panel master" sur XF-1600

Un menu « panel master » (présenté ci-dessus) permet la création de nouveaux panels ou la modification des panels déjà paramétrés sur l'automate. Après sélection du panel voulu sur la gauche de l'écran, il est possible de modifier les réglages du dit panel sur la droite de l'écran. Les possibilités sont multiples : modification du nom de chaque canal de détection, application d'un seuil de détection (Threshold) pour certains paramètres, réglage du gain appliqué à chacun des photomultiplicateurs. C'est également dans ce menu qu'est paramétrée la vitesse d'acquisition, ou les éventuelles conditions automatiques d'arrêt de l'acquisition. Ces deux derniers paramètres sont également modifiables avant chaque acquisition sans nécessairement utiliser le menu « panel master ».

IV. Matériel et méthodes

Afin de procéder à la corrélation des deux automates Navios et XF-1600, un passage d'échantillons sur les deux cytomètres est réalisé sur un total de 200 échantillons.

Les échantillons de patients sont tout d'abord analysés par les cytomètres utilisés en routine au laboratoire (Navios). Les échantillons pour lesquels la quantité de prélèvement est suffisante sont alors analysés par le XF-1600. Le choix des échantillons à analyser sur le XF-1600 se fait également en fonction des situations retrouvées, pathologiques ou non, afin d'obtenir une variété la plus importante possible. De plus différentes matrices sont analysées : sang total, moelle osseuse, ponction ganglionnaire, liquide céphalorachidien.

Le même tube est donc analysé sur les deux automates avec un marquage qui est identique. Dans un premier temps a été réalisé le montage des panels voulus sur le XF-1600, ainsi que les réglages du cytomètre (voltage des PMT, compensations).

Plusieurs panels sont testés afin de couvrir un maximum de situations. Panel d'orientation lymphoïde B, complément B, panel T, panel plasmocyte, panel LMMC/Covid, et panel leucémie aigüe.

À la suite de l'acquisition des données sur les deux cytomètres, les fichiers FCS sont retraités sur le logiciel de retraitement Kaluza. Les protocoles de retraitement pour chacun des panels étudiés sont identiques pour retraiter les données acquises sur les deux automates. Les images correspondant aux résultats de ce retraitement sont comparées une à une pour une comparaison qualitative des cytomètres.

D'autre part, les proportions des différentes sous populations étudiées obtenues pour chacun des panels par les deux automates sont comparées afin de procéder à une corrélation quantitative.

Les populations comparées pour chacun des panels sont les suivantes :

- Panel d'orientation lymphoïde B : lymphocytes totaux, lymphocytes CD3+, lymphocytes CD4+, lymphocytes CD8+, lymphocytes CD2+, lymphocytes CD19+, lymphocytes CD5+, lymphocytes CD20+, lymphocytes CD19+ kappa et lymphocytes CD19+ lambda. La composition du panel d'orientation lymphoïde est présentée en annexe 5.
- Panel complément B : expression des marqueurs suivants : FMC7, CD79b, CD23, CD38, CD10, CD11c, CD25 et CD180 sur les lymphocytes B CD19+. La composition du panel complément d'orientation B est présentée en annexe 6.
- Panel T : lymphocytes T (CD3+/CD19-), lymphocytes B (CD19+/CD3-), lymphocytes NK (CD3-/CD19-), lymphocytes T gamma delta, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+, lymphocytes T cytotoxiques (CD3+/CD19- et CD16+ouCD56+), lymphocytes T CD10+, lymphocytes NK (CD3-/CD19- et

CD56+ et/ou CD16+), lymphocytes T CD7dim. La composition du panel T est présentée en annexe 7.

- Panel plasmocytes : plasmocytes totaux (CD38+/CD138+), puis pourcentage de plasmocytes CD19+, CD56 et/ou 28+, CD20+, CD27+, CD34 et/ou CD117+, plasmocytes kappa et plasmocytes lambda et perte du CD45 par rapport à des plasmocytes contrôles. La composition du panel de typage plasmocytaire est présentée en annexe 8.
- Panel LMMC : Pourcentage de monocytes MO1, MO2, MO3, SLAN+ et pourcentage de monocytes totaux. La composition du panel LMMC est présentée en annexe 9.
- Panel Leucémie Aigüe : Pourcentage de blastes, puis pourcentage de blastes CD7 et/ou CD56+, CD19+, CD13+, CD117+, CD33+, CD34+, CD10+, CD38+ et HLA-DR+. La composition du panel Leucémie Aigüe est présentée en annexe 10.

Les statistiques correspondant aux proportions des différentes sous populations étudiées sont ensuite extraites dans un fichier Excel puis comparées grâce à un tableur dédié (ACMF-TABLEUR DE CORRELATION DE DEUX CYTOMETRES) (figure 68).


	ACMF -TABLEUR DE CORRELATION ENTRE DEUX CYTOMETRES	LHEM ACMF 0023 A
		APPROUVE PAR : ESTELLE GUERIN BIOL RESP SECTEUR CYTOMETRIE EN FLUX ET RESP. INFORMATIQUE
TEST DE CORRELATION DE METHODES		1/10 pages LHEM INF 0015 - XXX
Automate 1 : Automate 2 :	N° DTB Navios Sysmex XF-1600	
Détermination des spécifications ou limites acceptables (+réf) :		
Vérifications bibliographiques : NA		
10% pour la répétabilité (Davis BH, Mo Laren CE. CytometryB Clin Cytom. 2013 ;84 ; 329-337))		
Corrélation annoncée par le(s) fournisseur(s) : NA		
Plan d'expérimentation et de mise en oeuvre au laboratoire : Passage en double sur les 2 équipements de 74 échantillons patients pour lesquels on a évalué la comparabilité de la proportion de 9 sous-populations cellulaires (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD2+, CD20+, kappa, lambda et CD5+)		
Test entre 2 méthodes différentes ?	non	
Si oui, lister les 2 méthodes / automates	Méthode 1 : Méthode 2 :	
Test entre 2 méthodes identiques ?	oui	
Si oui, quelle est cette méthode ?	Phénotypage hématocytologique : Recherche et identification des cellules leucémiques et lymphomateuses	
Fournisseurs différents ?	non	
Préciser le(s) fournisseur(s)	Méthode 1 : Beckman	Méthode 2 : Sysmex
Mode fonctionnement des 2 automates (techniques) ?		
Opérateur(s)	SD+NVM	Date des analyses
Paramètre	% de cellules CD3+ parmi les lymphocytes	Année 2021
	Nb mesures	74

Figure 68 : Tableau de corrélation entre deux cytomètres

Les résultats de corrélation entre les Navios et le XF-1600 Sysmex® pour chacun des panels sont donnés pour chaque marqueur étudié et sont interprétés grâce à une droite de régression ainsi que les diagrammes des différences.

V. Résultats

I.1. Description générale

Durant trois mois ont été passés en double (Navios 1 ou 2 et XF-1600) 200 échantillons pour un objectif initial de 200 échantillons. Parmi ces 200 échantillons, la répartition par panel est la suivante :

- 74 panels d'orientation B
- 13 panels complément B
- 37 panels plasmocytes 10 couleurs
- 28 panels T
- 33 panels LMMC/COVID
- 15 panels d'orientation de leucémie aigüe.

Plus de précisions concernant les résultats de ces échantillons sont apportées dans les parties suivantes.

Concernant les différentes matrices utilisées pour les typages réalisés, on retrouve en majorité du sang total ainsi que des échantillons de moelle osseuse. Cependant trois échantillons de LCR ainsi que quatre échantillons de ponction ganglionnaire ont été analysés par les cytomètres.

V.1. Panel orientation lymphoïde B

V.1.1. Corrélation méthode quantitative

La comparabilité de la proportion de 10 sous-populations cellulaires (lymphocytes totaux, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD2+, CD20+, kappa, lambda et CD5+) a été évaluée sur 74 échantillons.

Les résultats de corrélation entre les Navios® et le XF-1600 Sysmex® pour le panel d'orientation lymphoïde sont donnés pour chaque marqueur étudié et sont interprétés grâce à une droite de régression ainsi que les diagrammes des différences.

Les équations des droites de régressions pour chacun des paramètres testés sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Corrélation du panel B

Paramètre étudié	Droite de régression	R ²
Lymphocytes totaux	$y = 0,9289x - 3,849$	0.93733
CD3	$y = 1,0184x + 0,1816$	0.99259
CD4	$y = 1,0187x - 1,4079$	0.99202
CD8	$y = 0,9994x - 0,0399$	0.99418
CD19	$y = 1,0141x - 0,8009$	0.99742
CD20	$y = 1,1305x - 16,813$	0.84508
CD2	$y = 1,0074x + 1,693$	0.97449
Kappa	$y = 0,9876x + 1,6752$	0.98176
Lambda	$y = 0,9868x - 0,3177$	0.98212
CD5	$y = 0,9131x - 3,7493$	0.94370

Les diagrammes des différences pour chacun des paramètres analysés avec le panel d'orientation B sont donnés ci-dessous (figure 69 et 70).

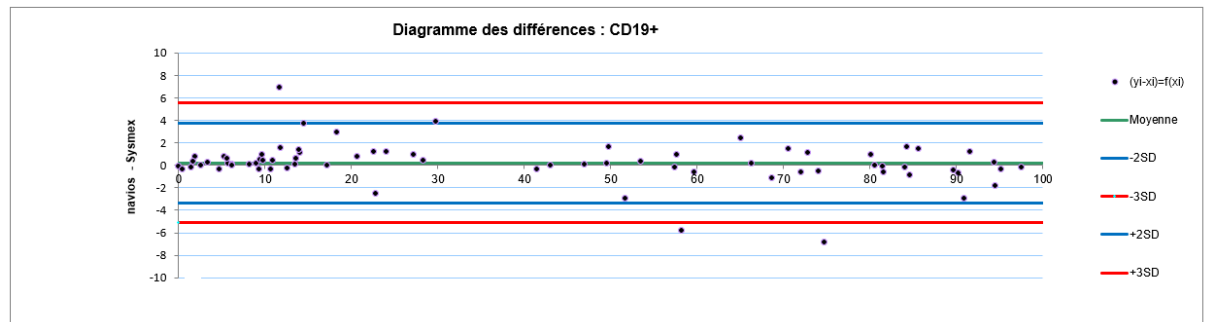
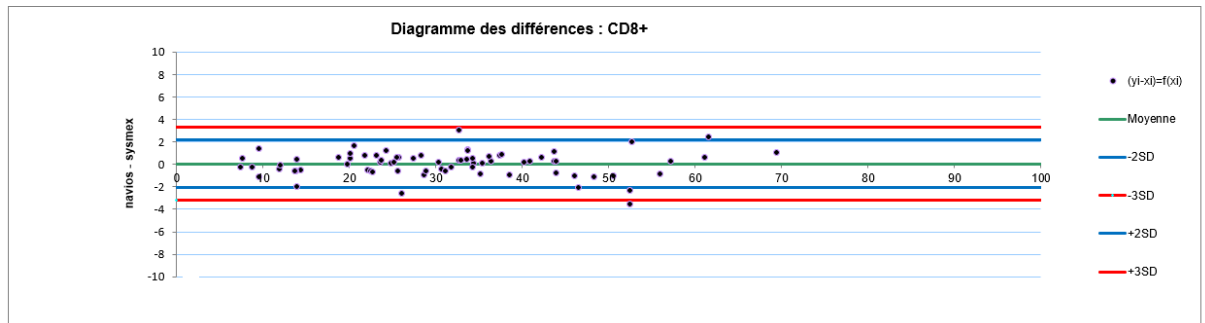
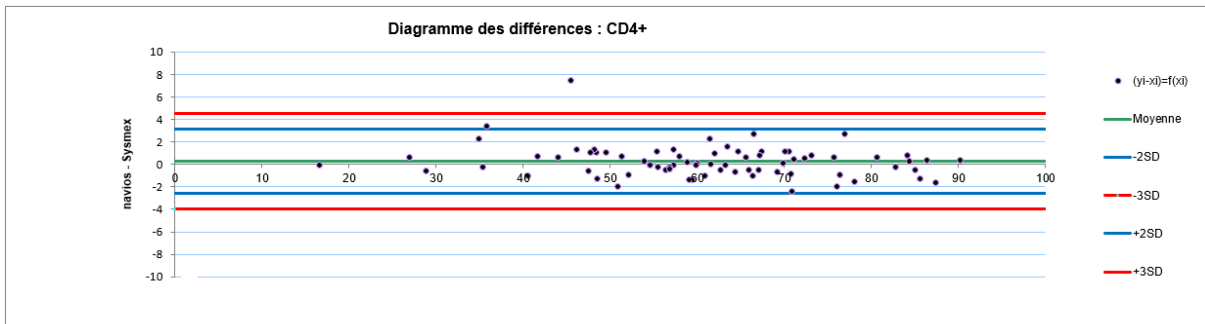
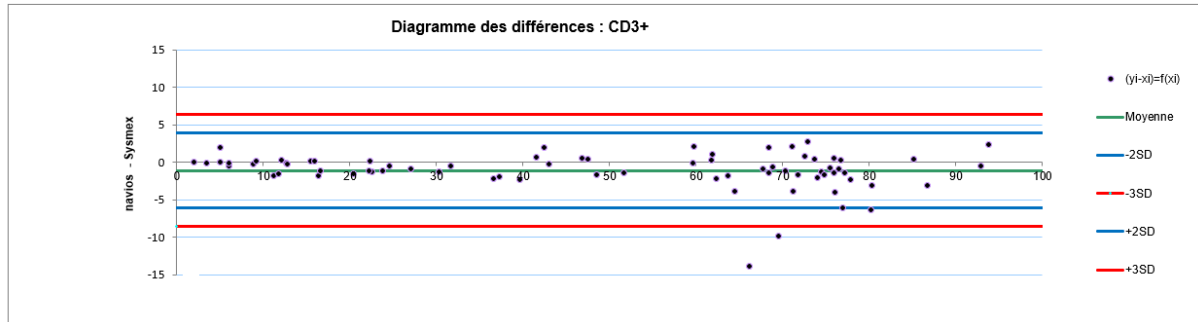
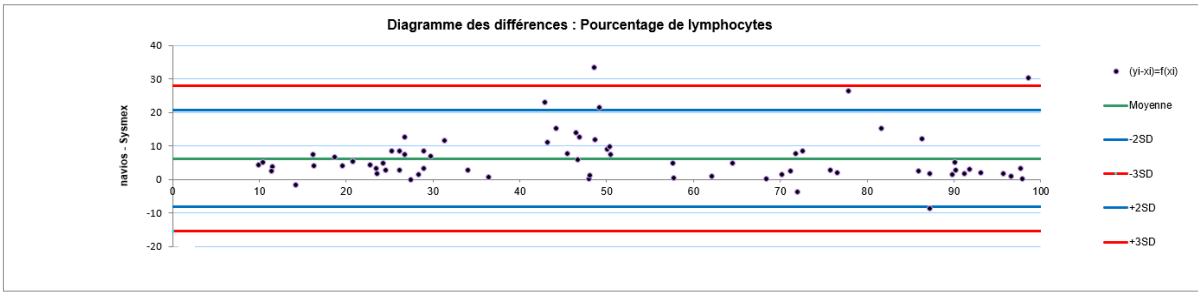


Figure 69 : Diagrammes des différences pour le panel d'orientation (1)

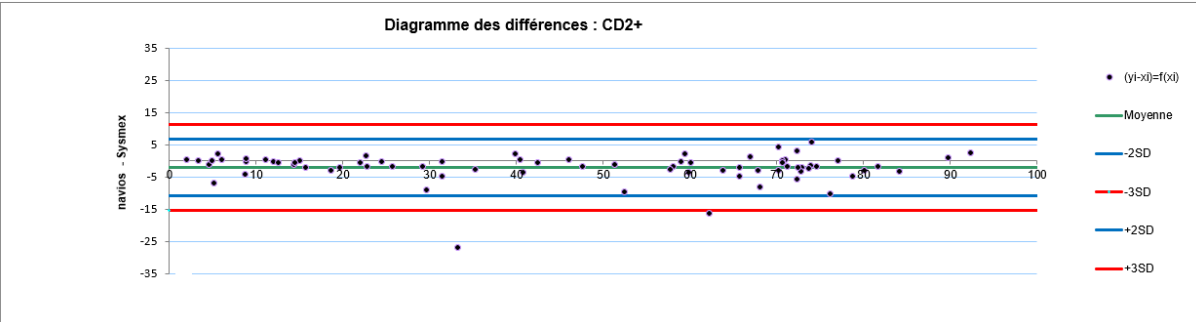
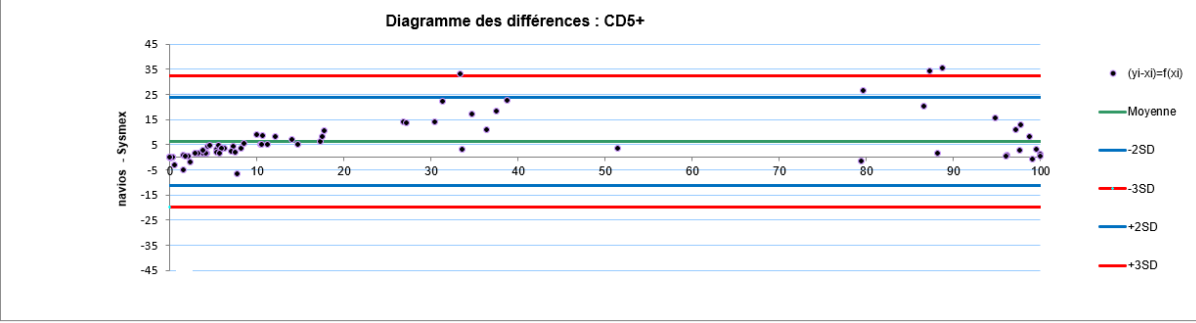
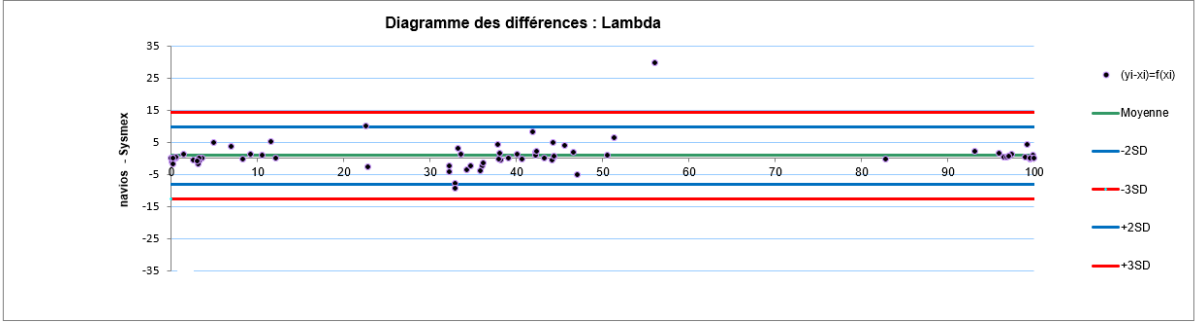
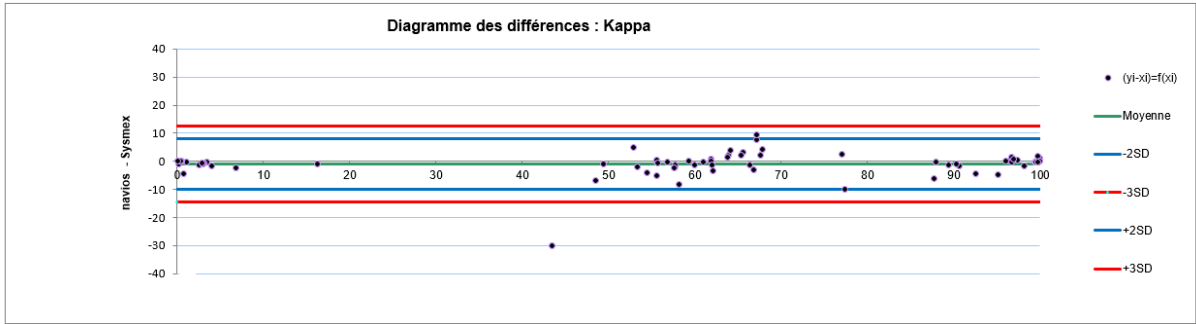
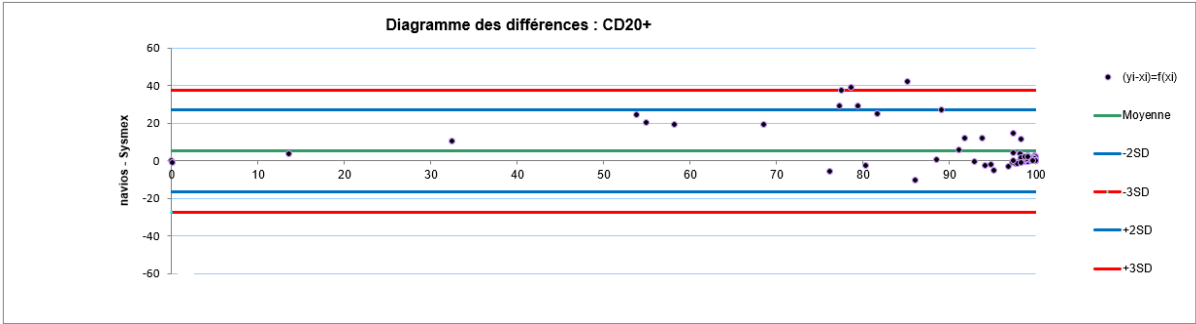


Figure 70 : Diagrammes des différences pour le panel d'orientation (2)

V.1.2. Corrélation méthode qualitative

La simple comparaison des proportions des différentes sous populations cellulaires obtenues après analyse sur les deux automates ne suffit pas. La concordance des interprétations des résultats donnés par les différents automates est indispensable notamment pour le paramètre CD5 sur les lymphocytes B pour lequel rendre un pourcentage seul n'a que peu de sens. Il est plus judicieux de rendre un résultat qualitatif : CD5+ ou CD5- afin de caractériser la population.

Pour les 74 échantillons testés avec le panel d'orientation lymphoïde B, on retrouve dans tous les cas la même interprétation du phénotype. Ces interprétations sont présentées pour chacun des 74 échantillons dans la figure suivante (figure 71).

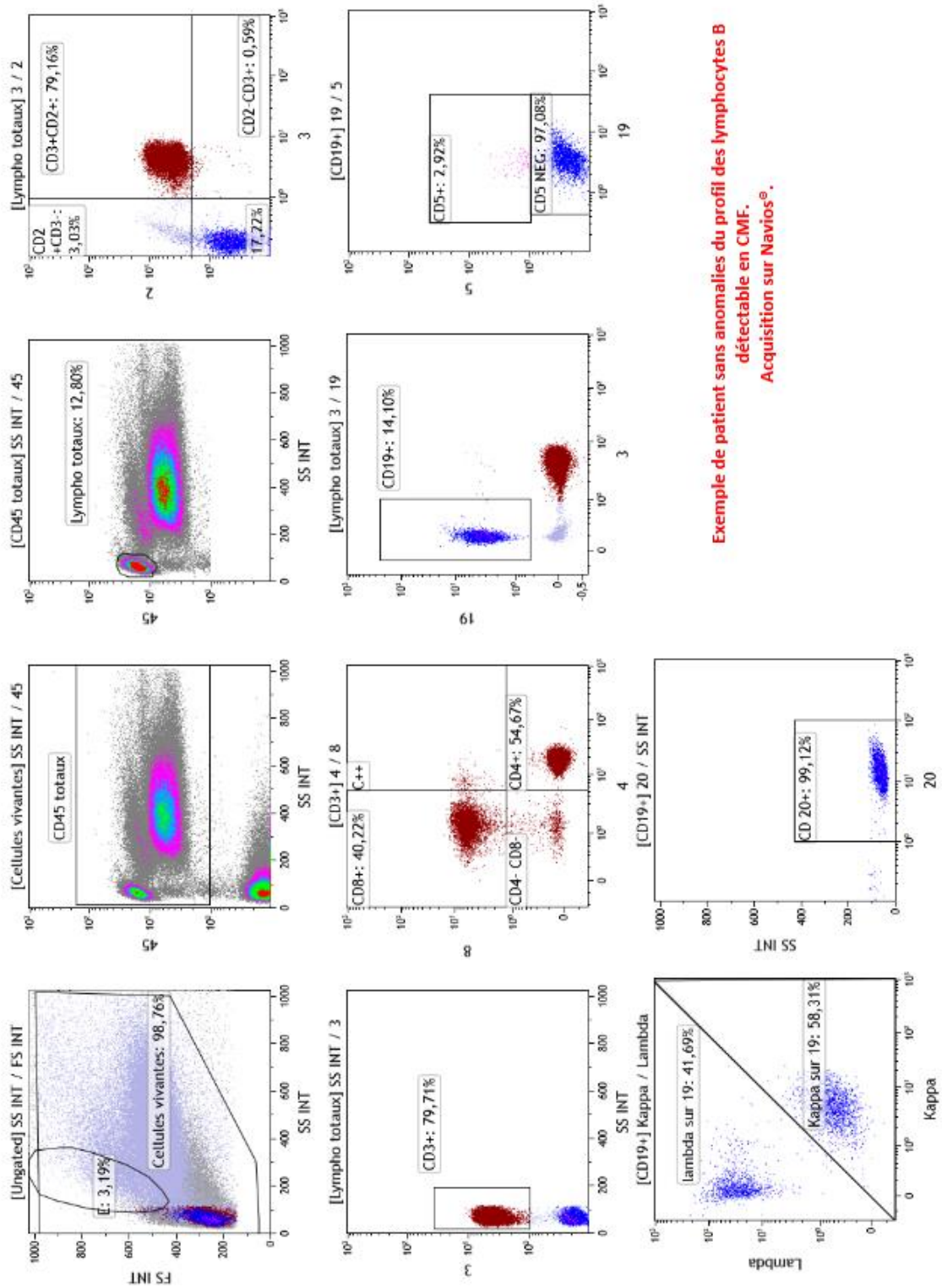
Numéro d'échantillon	Navios	XF-1600	Numéro d'échantillon	Navios	XF-1600
1	Polytypiques	Polytypiques	38	Polytypiques	Polytypiques
2	Polytypiques	Polytypiques	39	Polytypiques	Polytypiques
3	CD5-lambda	CD5-lambda	40	Polytypiques	Polytypiques
4	CD5-lambda	CD5-lambda	41	Polytypiques	Polytypiques
5	CD5+kappa	CD5+kappa	42	CD5+kappa	CD5+kappa
6	Polytypiques	Polytypiques	43	Absence de B	Absence de B
7	CD5+kappa	CD5+kappa	44	Polytypiques	Polytypiques
8	CD5-kappa	CD5-kappa	45	Polytypiques	Polytypiques
9	CD5-kappa	CD5-kappa	46	CD5-kappa	CD5-kappa
10	CD5-kappa	CD5-kappa	47	Polytypiques	Polytypiques
11	CD5+kappa	CD5+kappa	48	CD5+kappa	CD5+kappa
12	Polytypiques	Polytypiques	49	Polytypiques	Polytypiques
13	CD5+lambda	CD5+lambda	50	Polytypiques	Polytypiques
14	CD5+lambda	CD5+lambda	51	Polytypiques	Polytypiques
15	Polytypiques	Polytypiques	52	Polytypiques	Polytypiques
16	CD5-kappa	CD5-kappa	53	Polytypiques	Polytypiques
17	Polytypiques	Polytypiques	54	Polytypiques	Polytypiques
18	CD5-kappa	CD5-kappa	55	CD5-kappa	CD5-kappa
19	CD5+kappa	CD5+kappa	56	CD5+kappa	CD5+kappa
20	CD5+lambda	CD5+lambda	57	CD5-lambda	CD5-lambda
21	CD5-kappa	CD5-kappa	58	CD5-kappa	CD5-kappa
22	CD5-lambda	CD5-lambda	59	CD5+kappa	CD5+kappa
23	Polytypiques	Polytypiques	60	Polytypiques	Polytypiques
24	Polytypiques	Polytypiques	61	Polytypiques	Polytypiques
25	Polytypiques	Polytypiques	62	0	0
26	Polytypiques	Polytypiques	63	Polytypiques	Polytypiques
27	CD5-lambda	CD5-lambda	64	CD5-lambda	CD5-lambda
28	CD5-lambda	CD5-lambda	65	CD5+lambda	CD5+lambda
29	CD5+kappa	CD5+kappa	66	CD5+lambda	CD5+lambda
30	CD5+lambda	CD5+lambda	67	CD5-kappa	CD5-kappa
31	Polytypiques	Polytypiques	68	CD5+kappa	CD5+kappa
32	Polytypiques	Polytypiques	69	Polytypiques	Polytypiques
33	Polytypiques	Polytypiques	70	CD5-kappa	CD5-kappa
34	CD5+kappa	CD5+kappa	71	CD5+lambda	CD5+lambda
35	CD5+lambda	CD5+lambda	72	CD5+kappa	CD5+kappa
36	Polytypiques	Polytypiques	73	Polytypiques	Polytypiques
37	Polytypiques	Polytypiques	74	CD5+lambda	CD5+lambda

Figure 71 : Tableau récapitulatif des concordances pour le panel d'orientation B

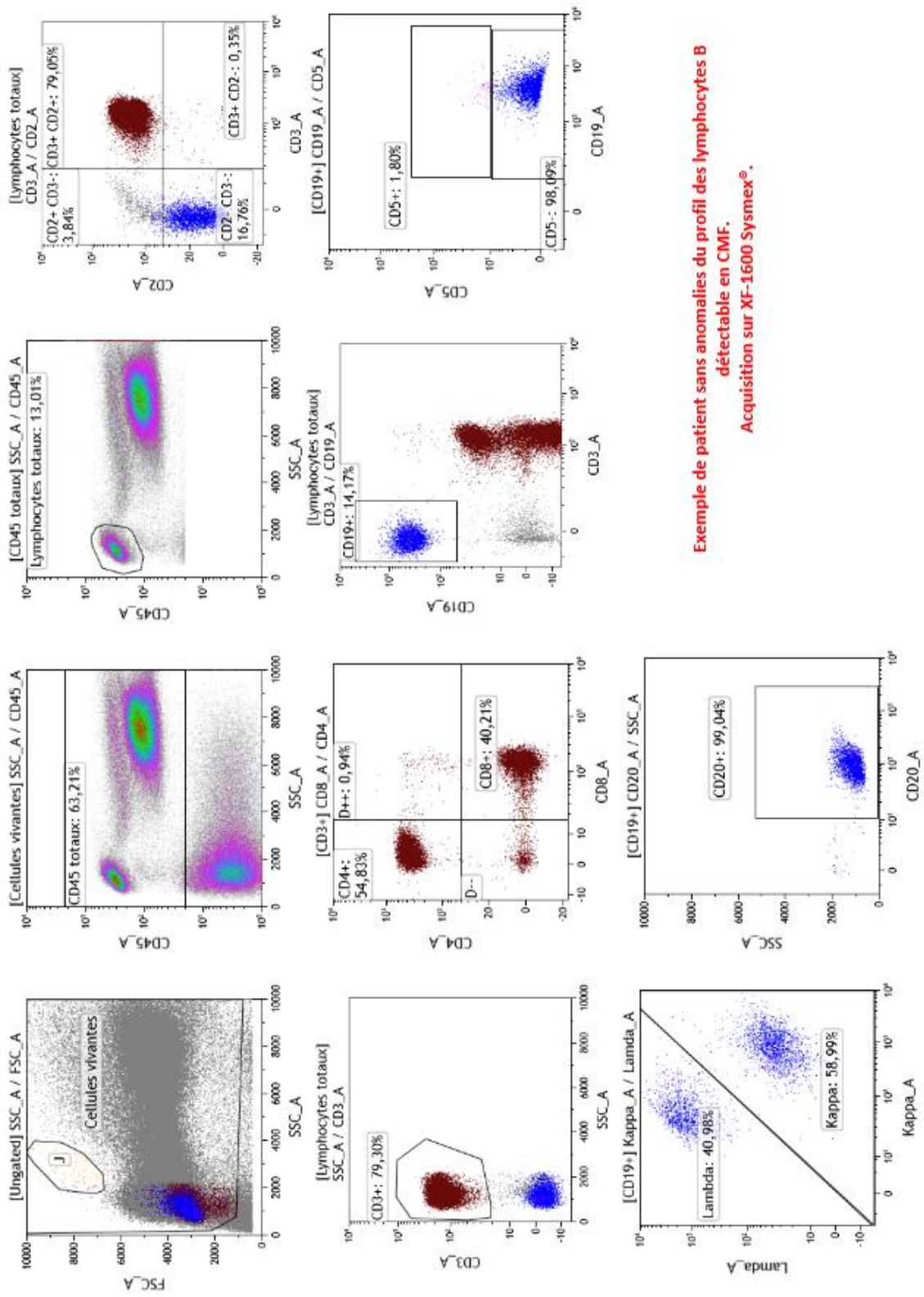
Les résultats sont identiques pour tous les échantillons analysés par les deux cytomètres.

V.1.3. Exemples d'images

Afin de mieux se rendre compte des performances analytiques du XF-1600 ainsi que de sa corrélation avec les Navios, la comparaison des images obtenues avec les deux automates est indispensable. Dans cette partie sont présentées les images des graphiques biparamétriques obtenus après retraitement des données acquises en fichiers FCS sur le logiciel de retraitement Kaluza®. Les différentes situations pathologiques ainsi que non pathologiques sont comparées.



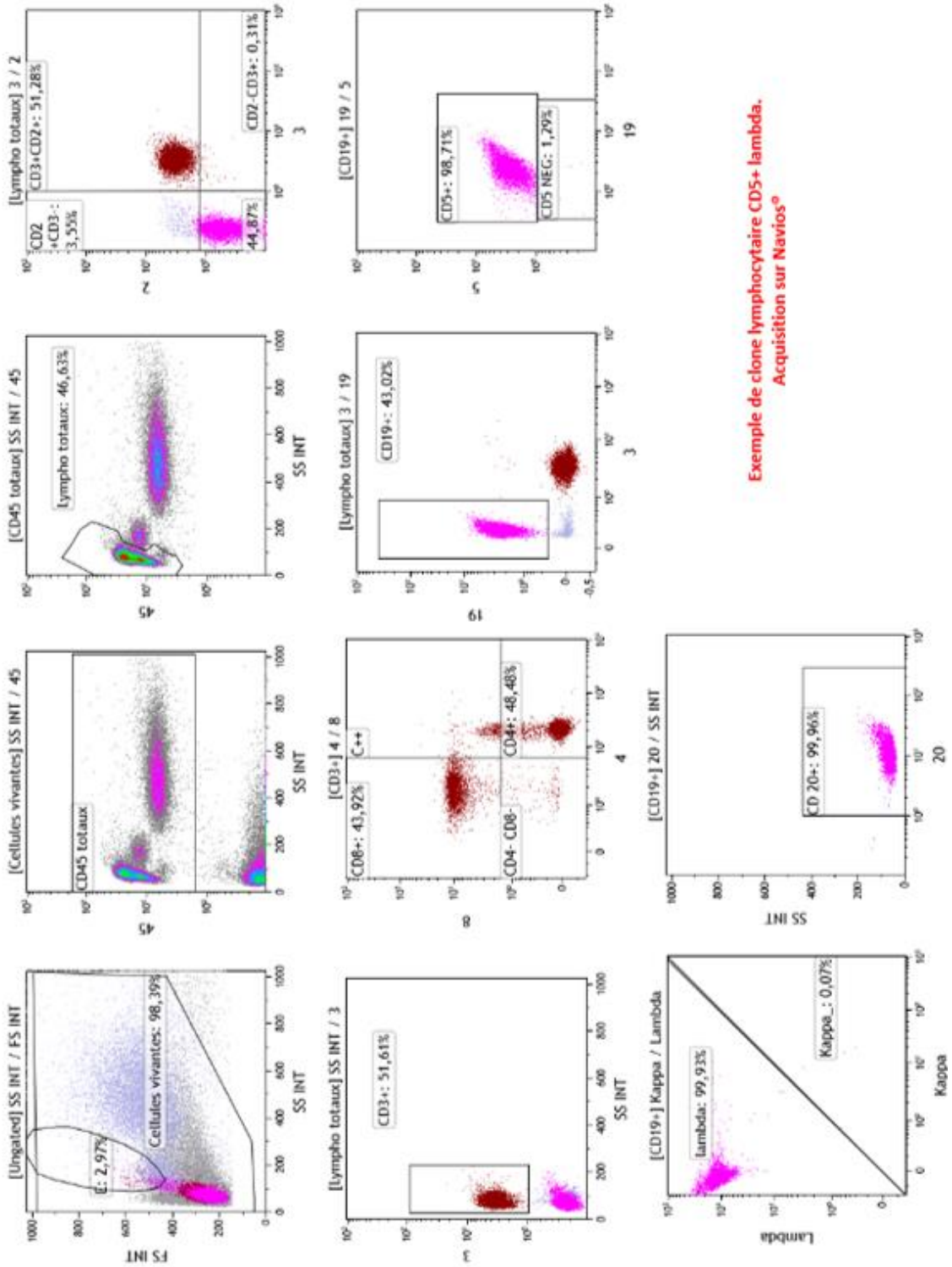
Exemple de patient sans anomalies du profil des lymphocytes B détectable en CMF.
 Acquisition sur Navios®.



Exemple de patient sans anomalies du profil des lymphocytes B détectable en CMF.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.

Figure 72 : Exemple de patient avec lymphocytes B polytypiques.

Sur ce premier exemple (figure 72), correspondant à un échantillon non pathologique, les lymphocytes totaux sélectionnés en CD45fort et SS faible représentent environ 13% de la population de CD45 totaux. Parmi ces lymphocytes, environ 79% correspondent à des lymphocytes CD3+ (en marron) et 14% à des lymphocytes B CD19+ (en bleu). En se conditionnant sur ces lymphocytes B CD19+, on remarque que l'immense majorité de ces derniers n'exprime pas le CD5 et que la répartition de l'expression des chaînes légères est équilibrée : 60% kappa et 40% lambda environ. Enfin, 99% des lymphocytes B CD19+ expriment également le CD20.



Exemple de clone lymphocytaire CD5+ lambda.
Acquisition sur Navios®

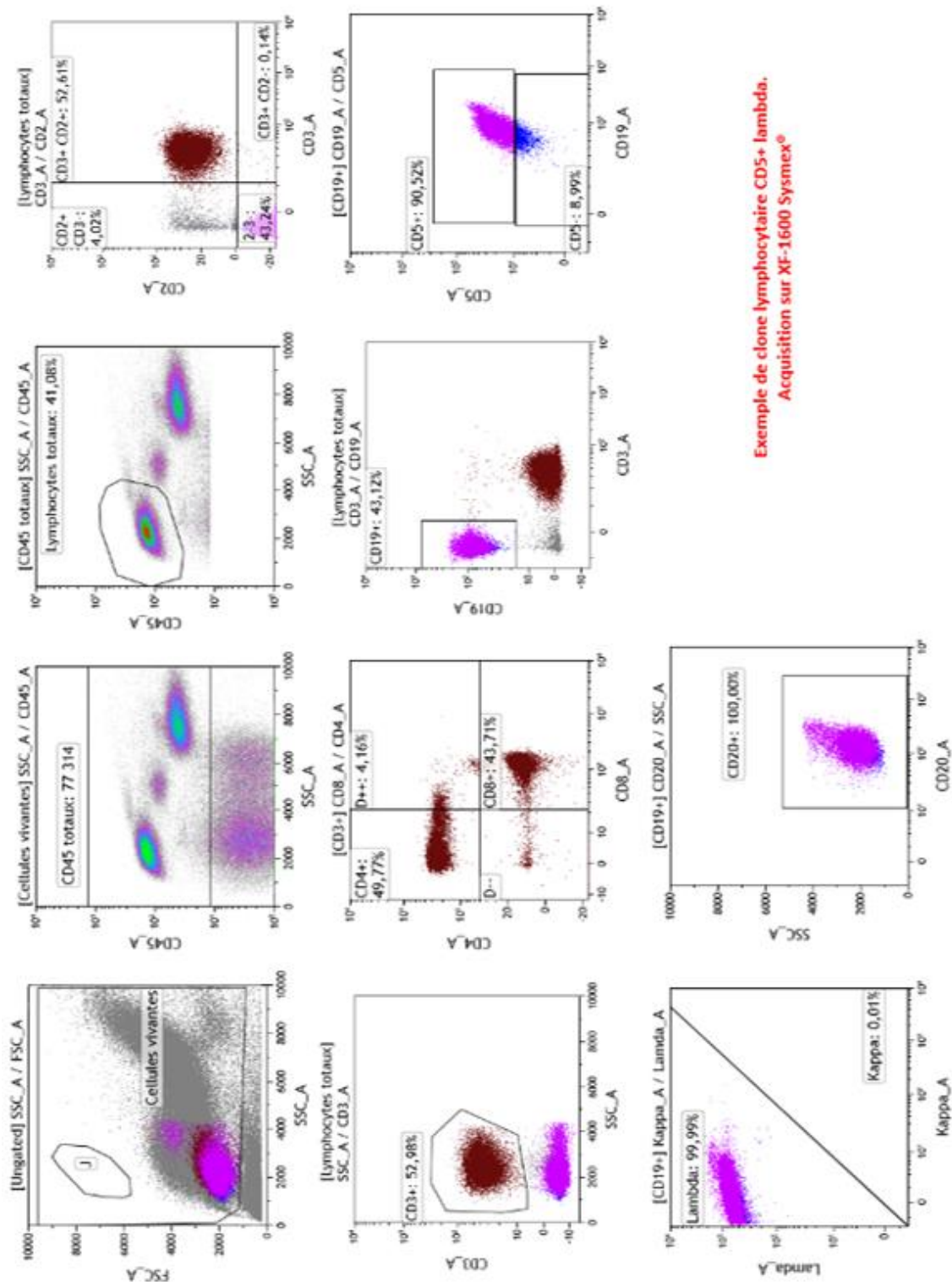
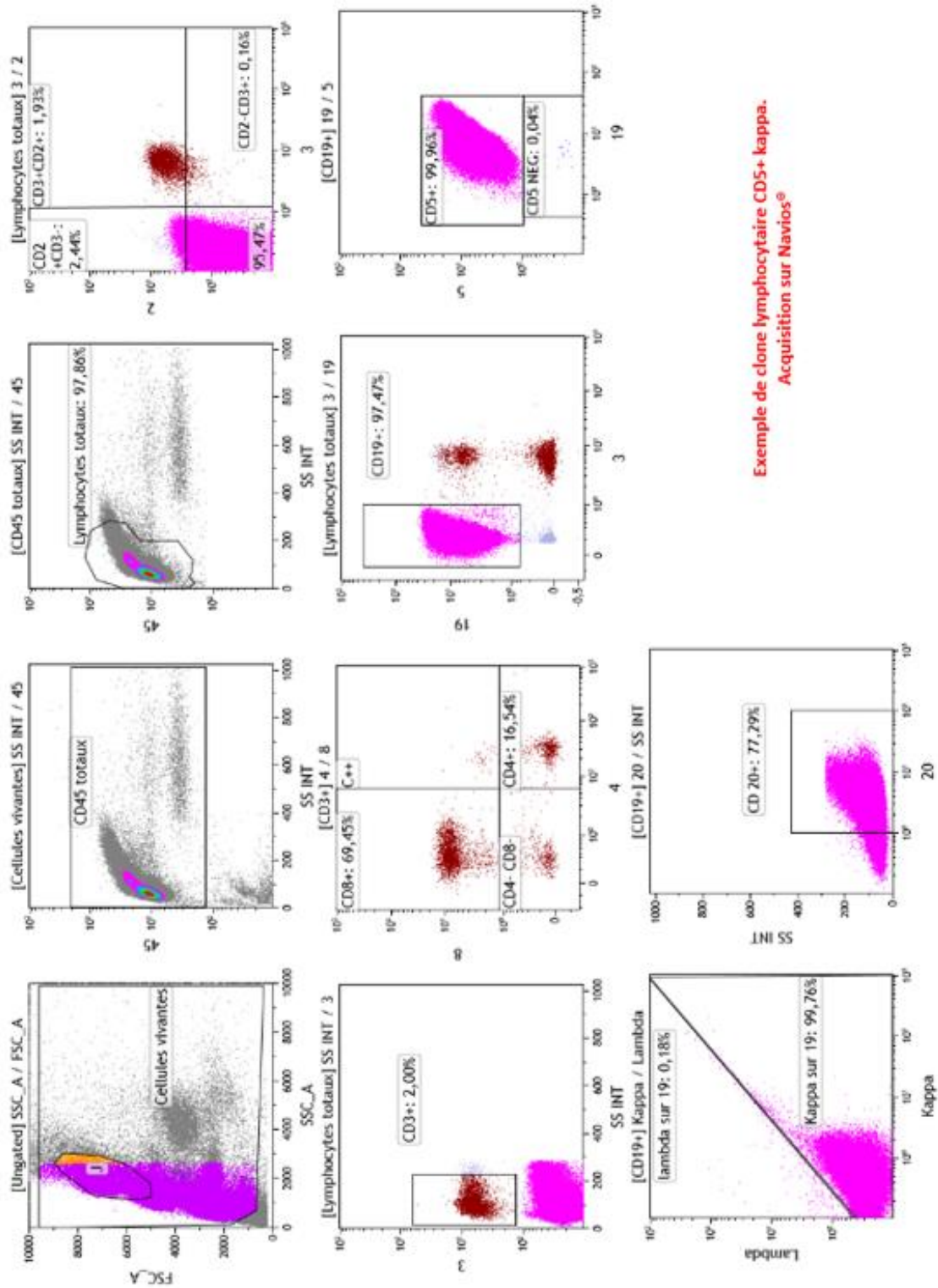
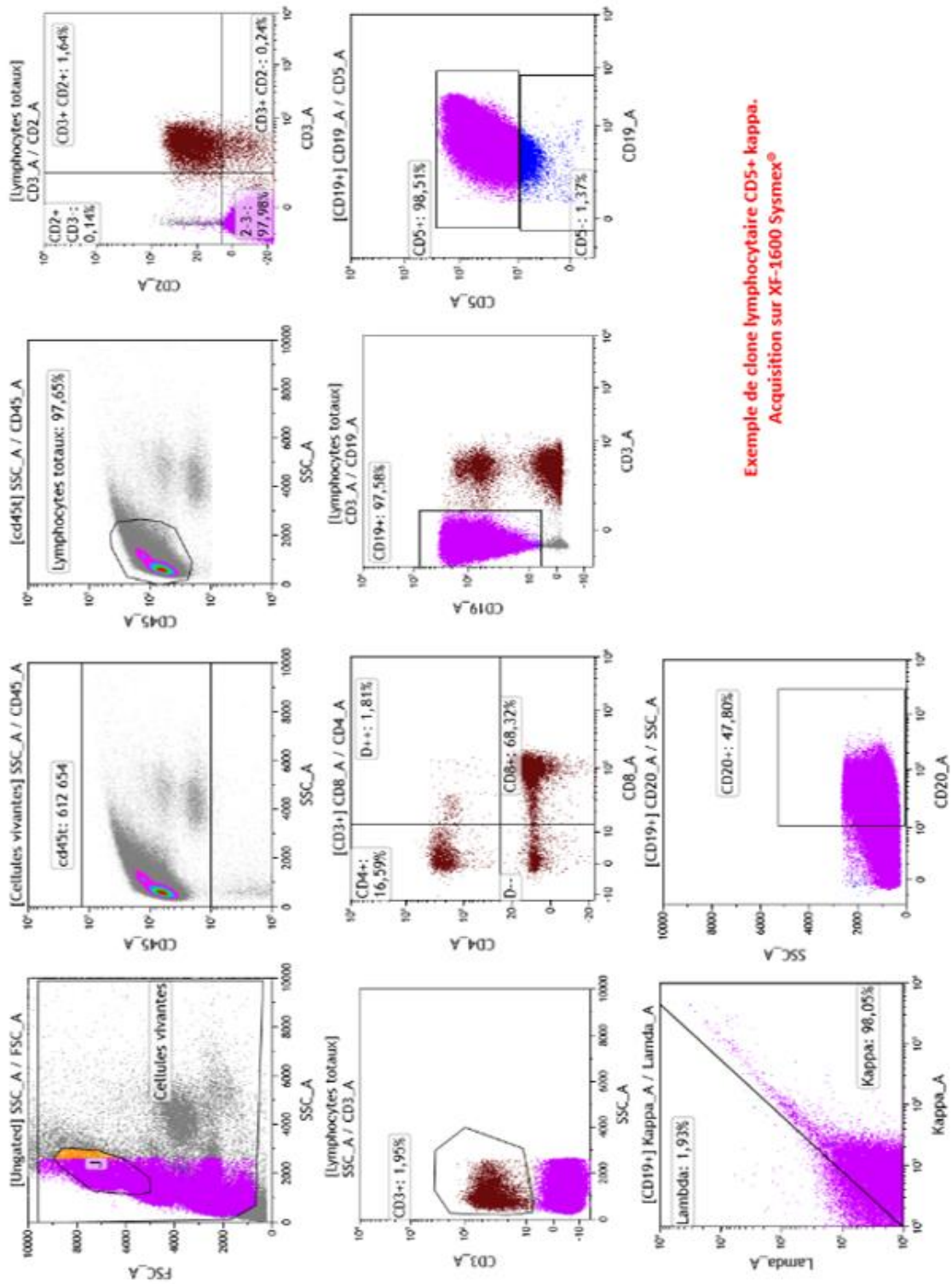


Figure 73 : Comparaison d'images, clone CD5+ lambda

Sur cet exemple d'échantillon (figure 73), on retrouve sur les deux cytomètres une population de lymphocytes totaux représentant 45% environ des CD45 totaux. Parmi ces lymphocytes, 51% environ sont CD3+ et correspondent aux lymphocytes T. Parmi ces lymphocytes T CD3+, on retrouve 50% de T CD4+ et 45% de T CD8+. Ici, les lymphocytes B CD19+ (en rose) représentent 43% de la population de lymphocytes totaux. Ces lymphocytes B CD19+ présentent une monotypie lambda d'expression plutôt forte, expriment le CD5 et conservent une expression du CD20. En effet 99,9% des lymphocytes CD19+ expriment également le CD20.

On retrouve donc sur les deux cytomètres la population clonale lymphocytaire B CD19+, CD5+ et lambda d'expression forte. Cette population correspond à environ 43% des lymphocytes totaux. Cet échantillon correspond à une patiente suivie pour un lymphome du manteau.



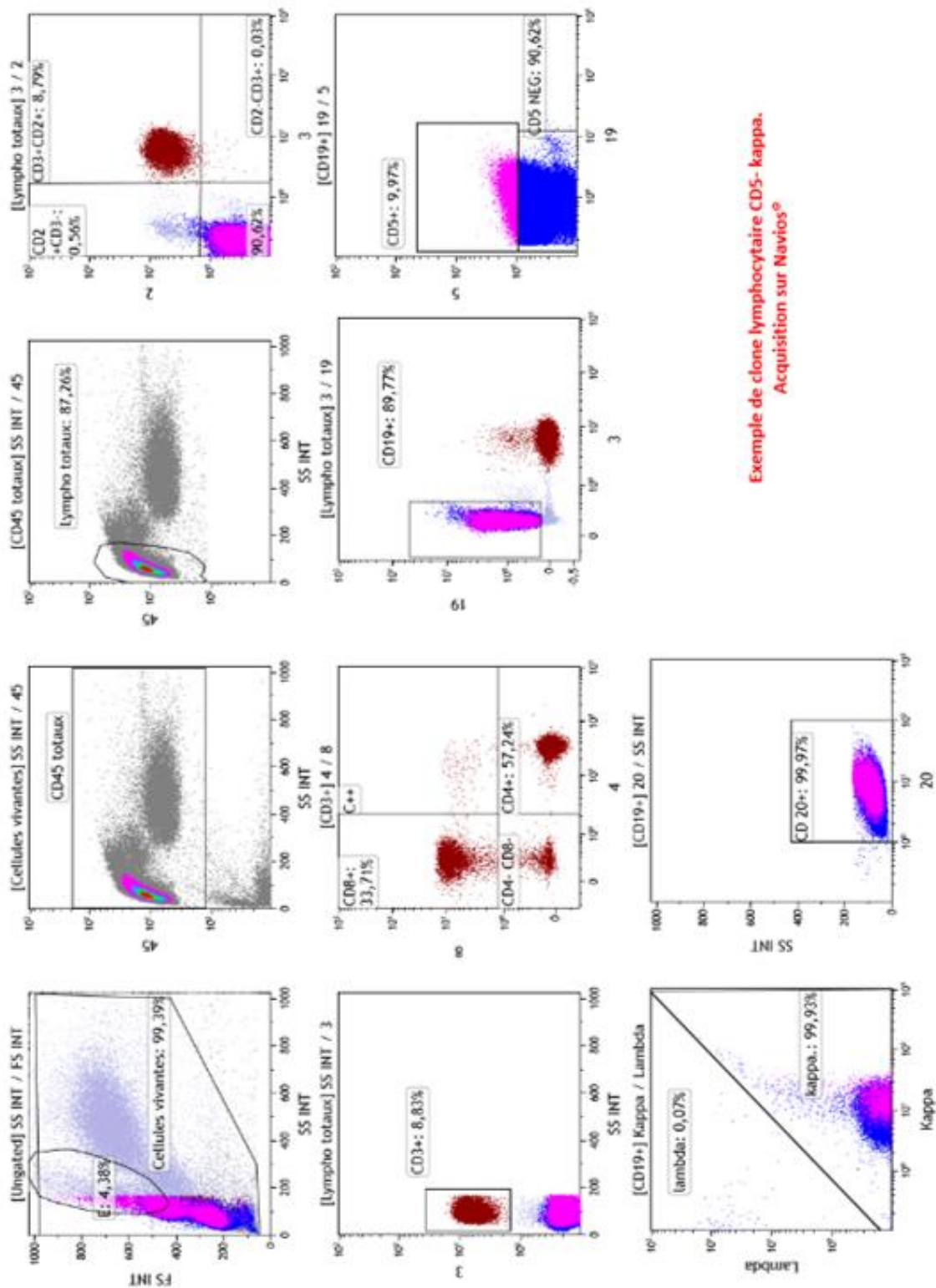


Exemple de clone lymphocytaire CD5+ kappa.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

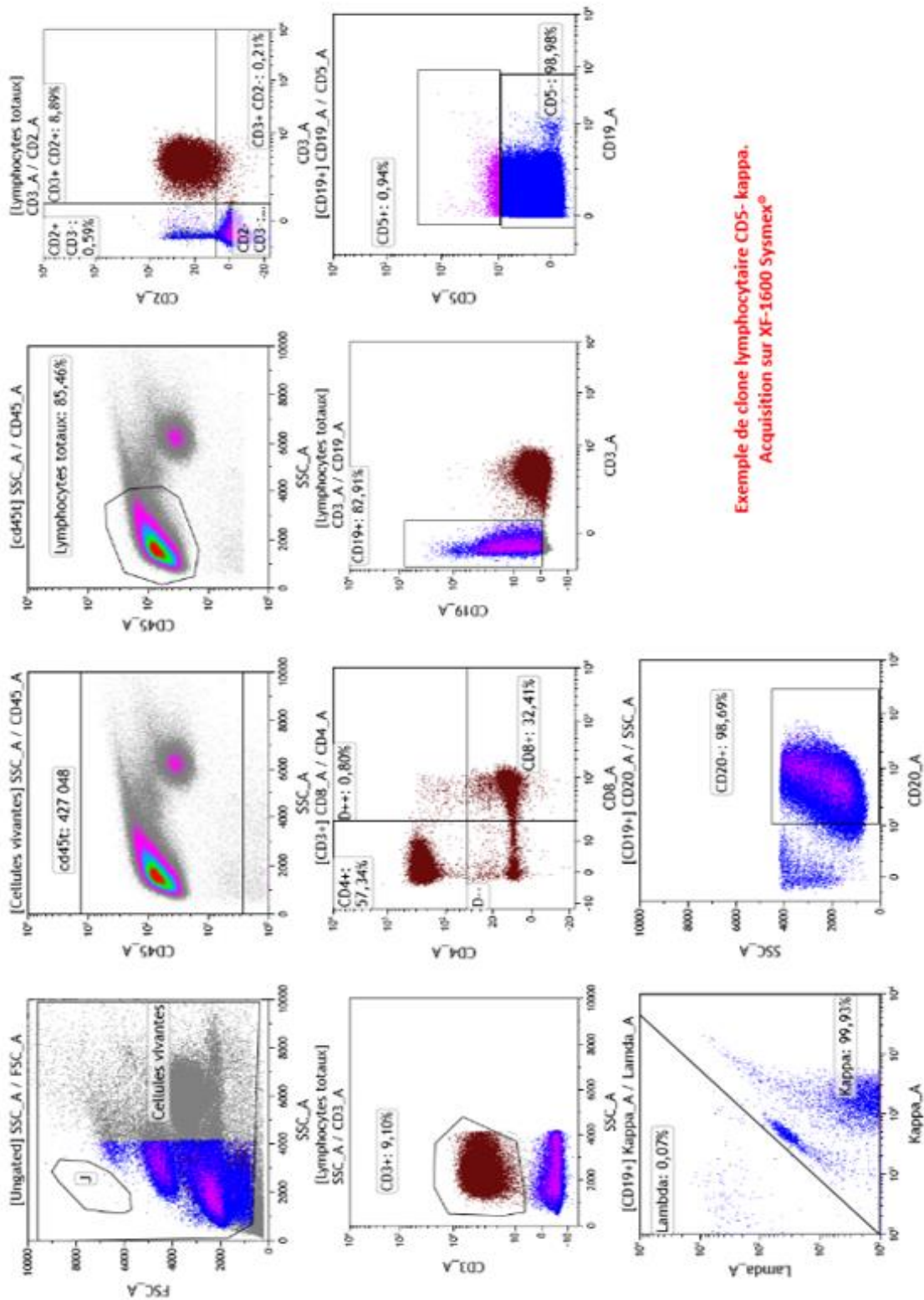
Figure 74 : Comparaison d'image, clone CD5+ kappa

Sur cet exemple d'échantillon (figure 74), on retrouve sur les deux cytomètres une population de lymphocytes totaux représentant 97% environ des CD45 totaux. Parmi ces lymphocytes, 1% environ d'entre-eux expriment le CD3+ et correspondent aux lymphocytes T. Parmi ces lymphocytes T CD3+, on retrouve 16% de T CD4+ et 65% de T CD8+. Ici, les lymphocytes B CD19+ (en rose) représentent 97% de la population de lymphocytes totaux soit l'immense majorité des cellules du prélèvement. Cette population lymphocytaire B CD19+ exprime également le CD5 et une chaîne légère kappa d'intensité faible. On remarque également la diminution d'intensité du CD20 sur ces lymphocytes B clonaux (le nuage de points en CD20/SS est décalé vers la gauche). Cet échantillon correspond à un patient atteint de leucémie lymphoïde chronique (LLC).

Par ailleurs on retrouvait pour ce patient un score de Matutes égal à 5. De plus la lymphocytose sanguine était égale à 14,20 G/L et la cytologie retrouvait de petits lymphocytes murs ainsi que de nombreuses ombres de Gumprecht.



Exemple de clone lymphocytaire CD5- kappa.
Acquisition sur Navios®



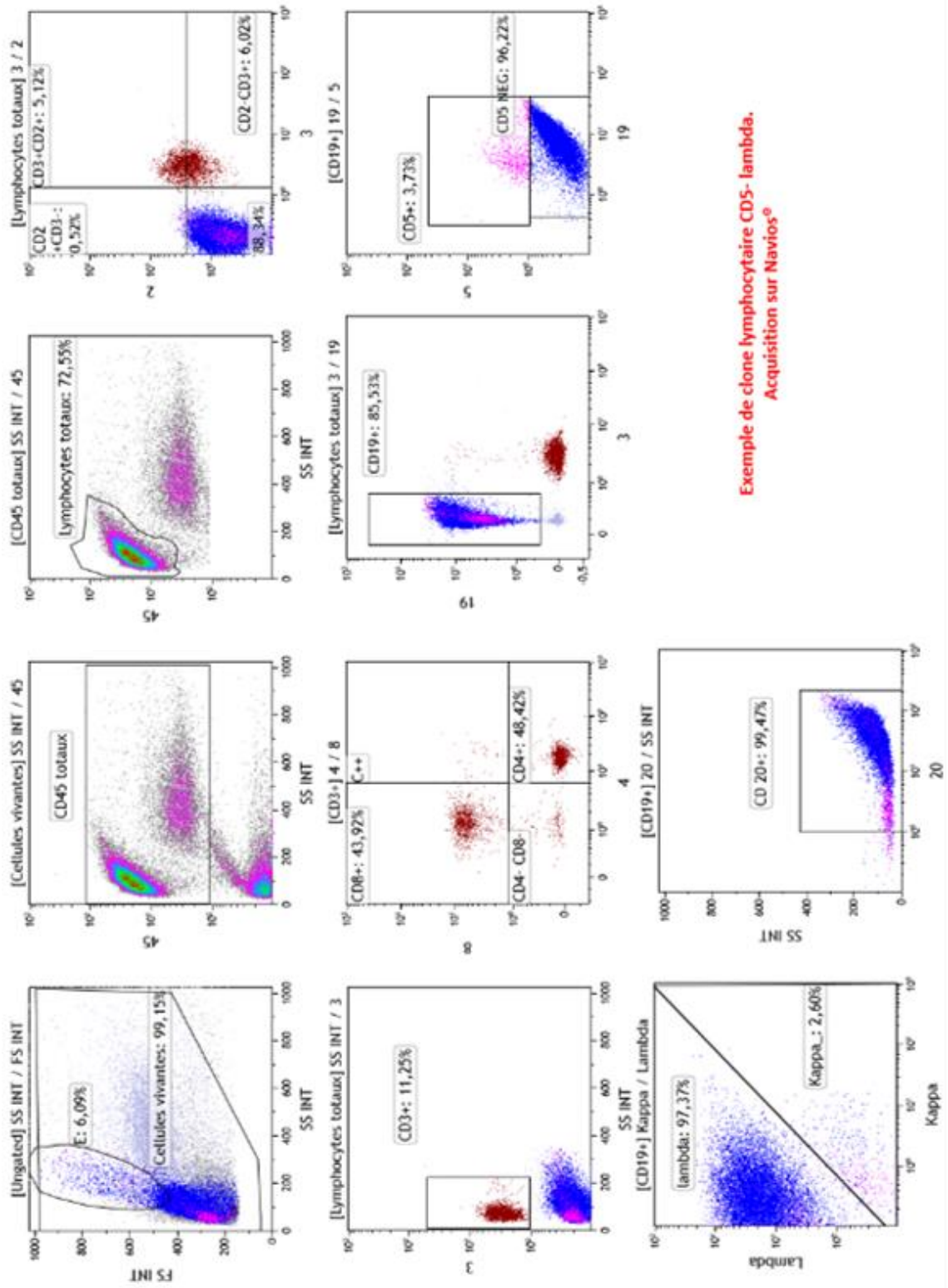
Exemple de clone lymphocytaire CD5- kappa.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 75 : Comparaison d'image, clone CD5- kappa

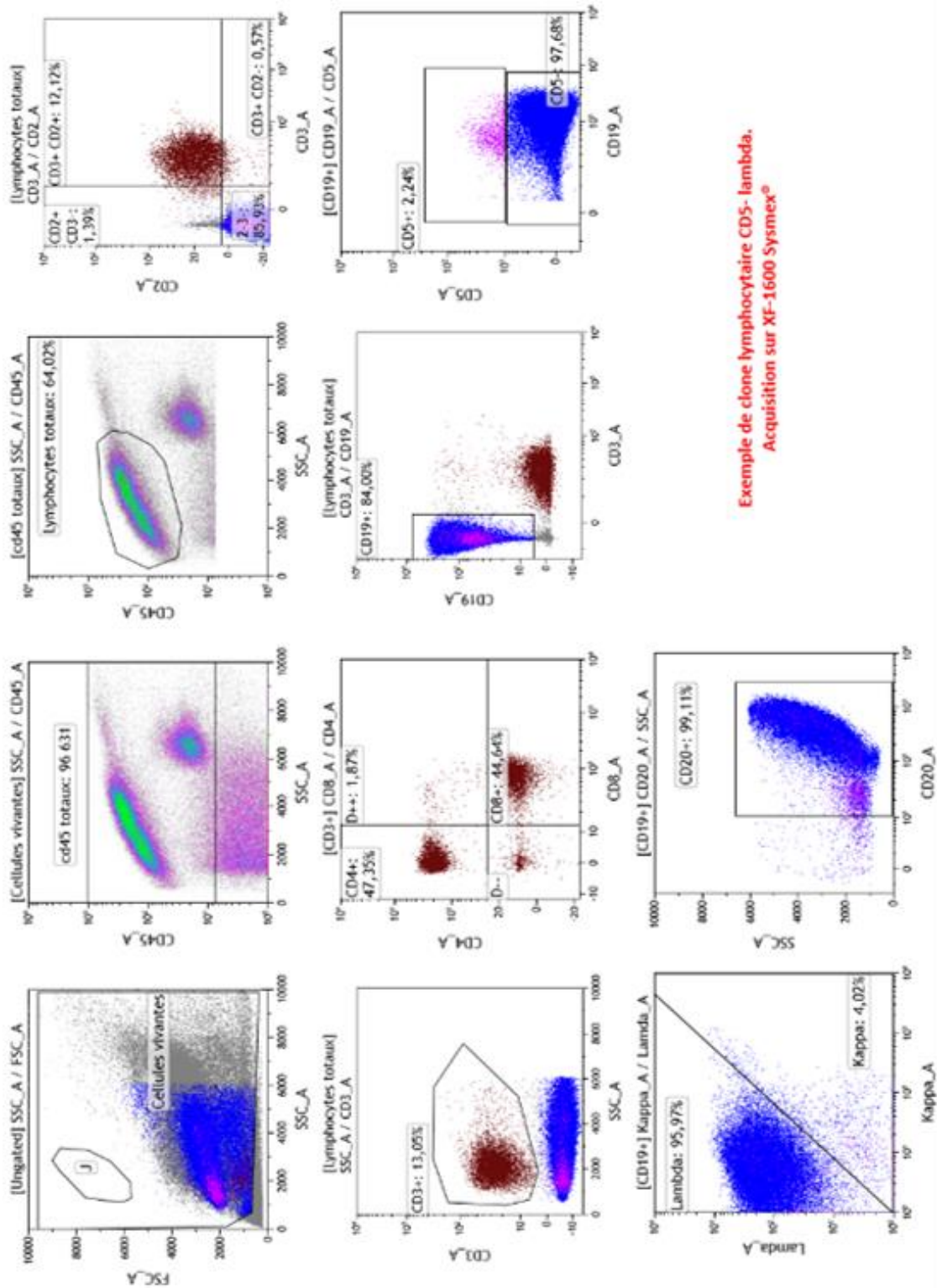
Sur cet exemple d'échantillon (figure 75), on retrouve sur les deux cytomètres une population de lymphocytes totaux représentant 85% environ des CD45 totaux. Parmi ces lymphocytes, environ 9% d'entre-eux expriment le CD3+ et correspondent aux lymphocytes T. Parmi ces lymphocytes T CD3+, on retrouve 57% de T CD4+ et 32% de T CD8+. Ici, les lymphocytes B CD19+ (en bleu) représentent 85% de la population de lymphocytes totaux. Cette population lymphocytaire B CD19+ n'exprime pas le CD5 et exprime en revanche une chaîne légère kappa d'intensité normale. Par ailleurs, les lymphocytes B présents expriment le CD20 de façon normale.

On retrouve donc ici une population clonale de lymphocytes B CD19+, CD5-, avec expression d'une chaîne légère kappa d'intensité modérée. Le clone représente 90% des lymphocytes B en CMF.

Cet échantillon correspond à une patiente atteinte d'un LNH-B non LLC non classable en cytologie et en CMF. Le score de Matutes retrouvé pour ce patient est de 1. Par ailleurs, on retrouve chez cette patiente une mutation MYD88 positive ainsi qu'un pic monoclonal IgM Kappa à l'électrophorèse des protéines égal à 5,7 g/L. L'ensemble a donc orienté le diagnostic vers un lymphome lymphoplasmocytaire (maladie de Waldenström) (42).



Exemple de clone lymphocytaire CD5- lambda.
Acquisition sur Navios®



Exemple de clone lymphocytaire CD5- lambda.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 76 : Comparaison clone CD5- lambda

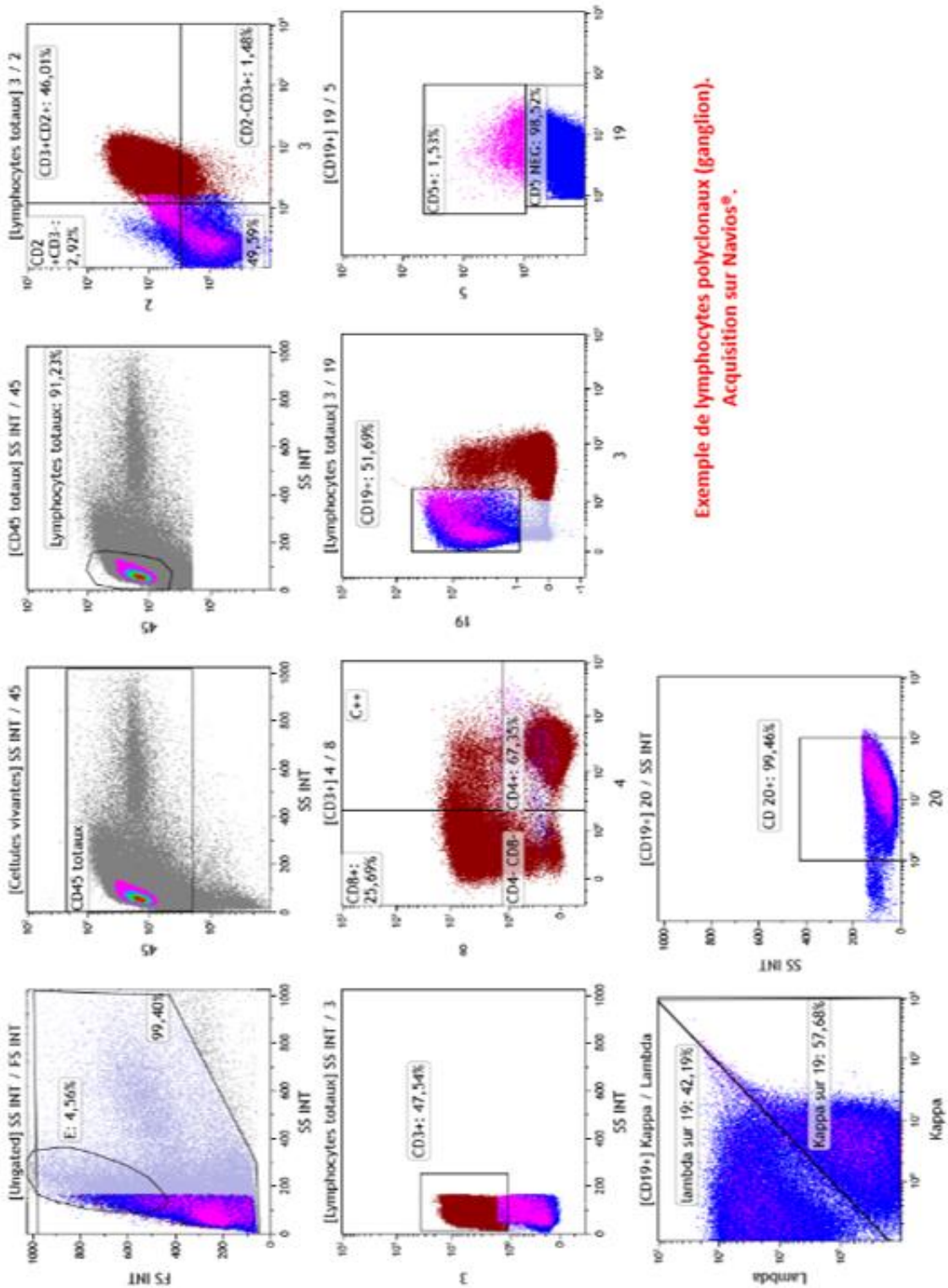
Sur cet exemple d'échantillon (figure 76), on retrouve sur les deux cytomètres une population de lymphocytes totaux représentant 70% environ des CD45 totaux. Parmi ces lymphocytes, 12% environ d'entre eux expriment le CD3+ et correspondent aux lymphocytes T. Parmi ces lymphocytes T CD3+, on retrouve 48% de T CD4+ et 44% de T CD8+. Ici, les lymphocytes B CD19+ (en bleu) représentent 85% de la population de lymphocytes totaux.

Cette population de lymphocytes B CD19+ n'exprime pas le CD5 mais exprime une chaîne légère lambda d'intensité normale. Par ailleurs, l'intégralité des lymphocytes B CD19+ expriment également le CD20. Le clone B CD19+ CD5- lambda représente ici 85% des lymphocytes totaux en CMF.

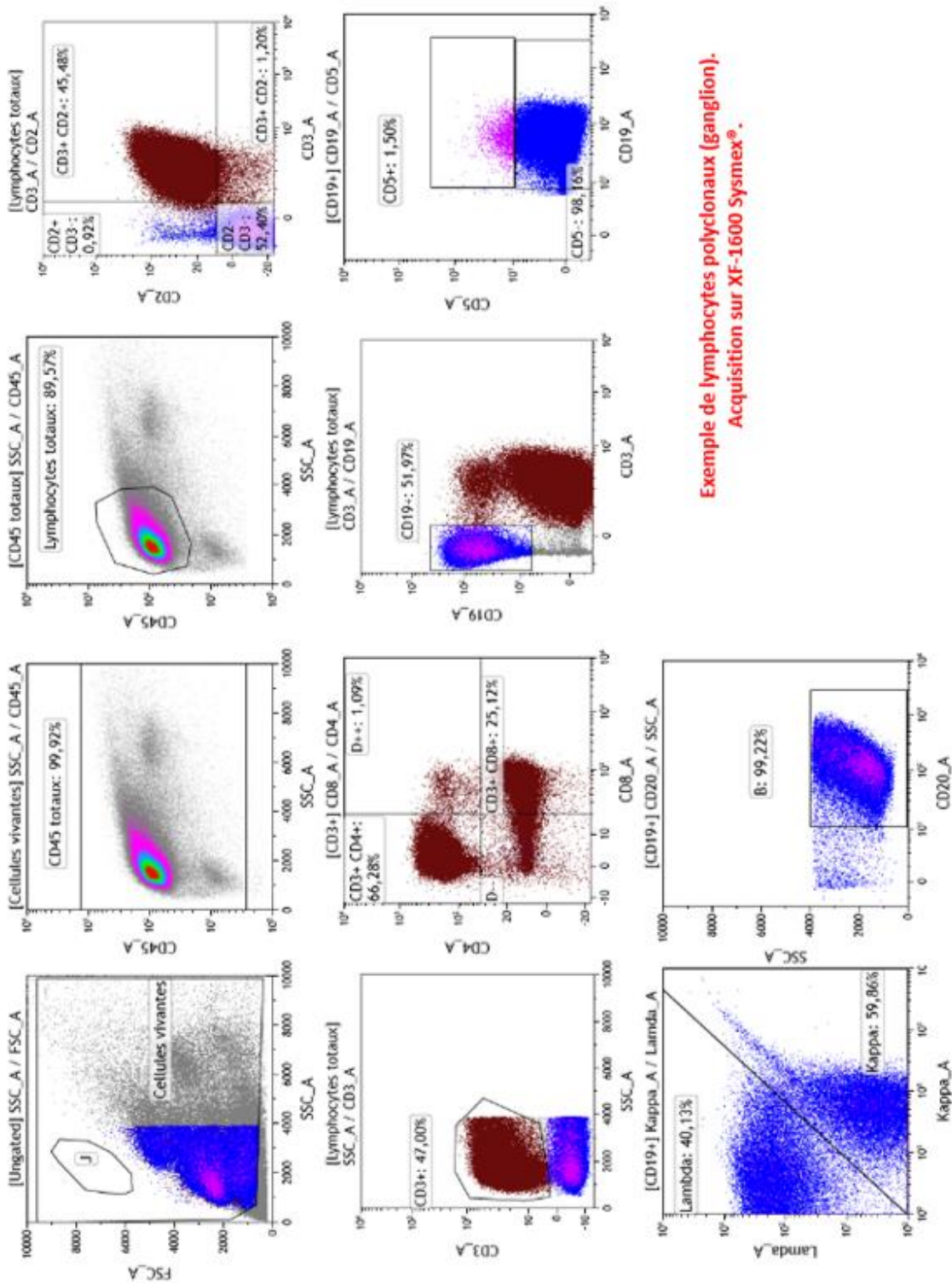
Un point intéressant est à souligner sur cet échantillon : l'aspect du nuage de lymphocytes en FS/SS. On remarque en effet que la population lymphocytaire déborde en SS vers la droite, là où se situe habituellement le nuage de monocytes. On retrouve très bien cet aspect sur les deux automates, en FS/SS ainsi qu'en CD20/SS.

Il s'agit là d'un aspect très évocateur des tricholeucocytes. Cela s'explique par la structure du tricholeucocytes, se rapprochant de celle d'un monocyte. Un panel spécifique aux tricholeucocytes a donc été réalisé en complément de ce panel d'orientation B.

On retrouvait alors un immunophénotypage en faveur de tricholeucocytes : CD5-, monotypie lambda d'intensité normale, CD20+, CD103+, CD123+, CD11c+ et CD25+.



Exemple de lymphocytes polyclonaux (ganglion).
Acquisition sur Navios®.

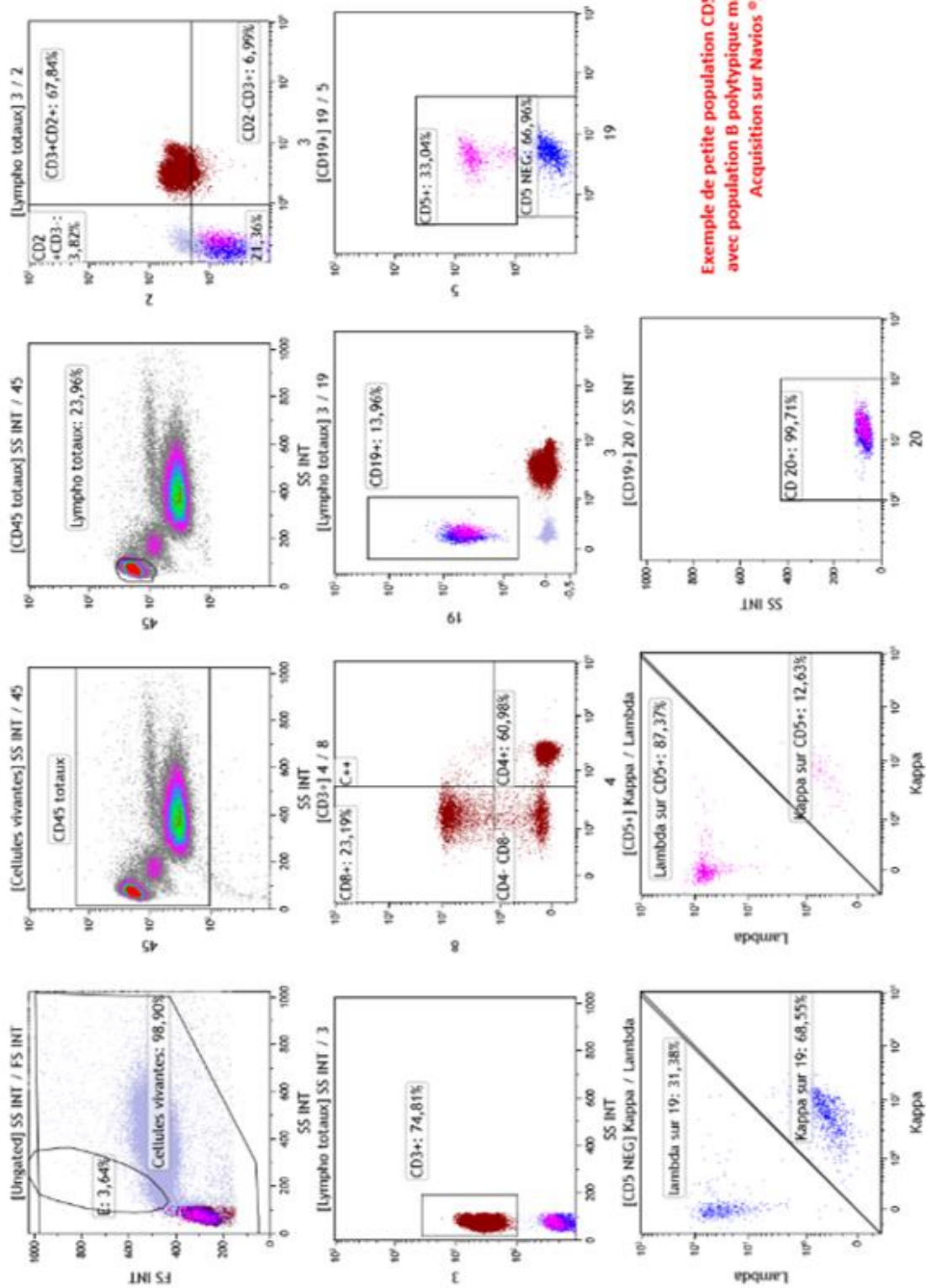


Exemple de lymphocytes polyclonaux (ganglion).
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.

Figure 77 : Comparaison d'un échantillon de lymphocytes B polytypiques (ganglion).

Sur cet échantillon (figure 77), on remarque que la quasi-intégralité du prélèvement est composée de lymphocytes, ce qui est attendu dans une ponction ganglionnaire. Ici la répartition des populations lymphocytaires est équilibrée, sans mise en évidence de lymphocytes B monotypiques.

- La répartition entre les lymphocytes B et T est équilibrée : 47% de CD3+ (lymphocytes T) et 51% de CD19+ (lymphocytes B).
- Parmi les lymphocytes CD3+, la répartition CD4+/CD8+ est normale avec environ 66% de T CD4+ et 25% de CD8+.
- Parmi la population de CD19+ correspondant aux lymphocytes B, la répartition de l'expression des chaînes légères est équilibrée, avec 60% de lymphocytes B kappa environ et 40% de lymphocytes B lambda. De plus cette population CD19+ exprime également le CD20.



Exemple de petite population CD5+ lambda avec population B polytypique majoritaire. Acquisition sur Navios®.

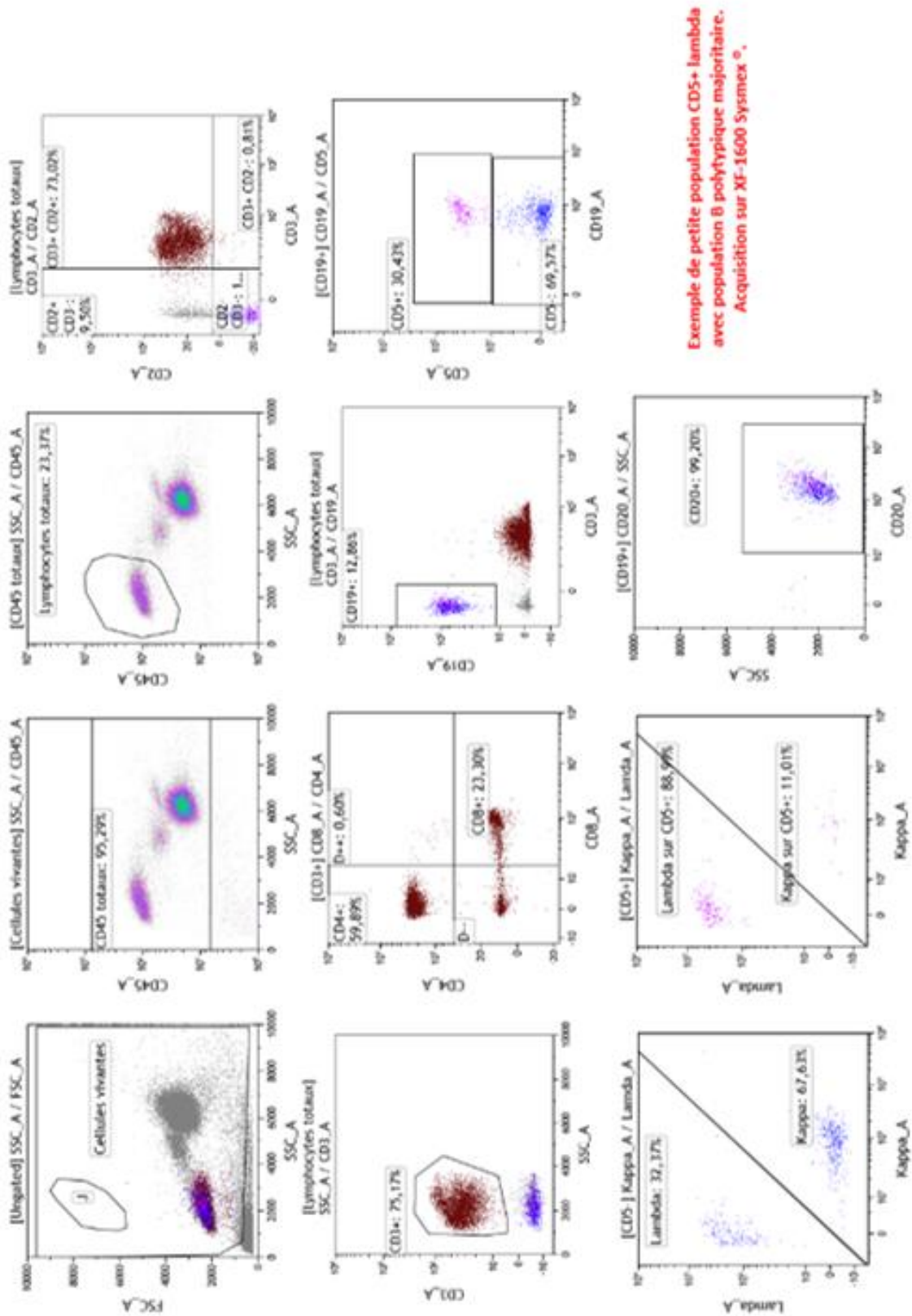
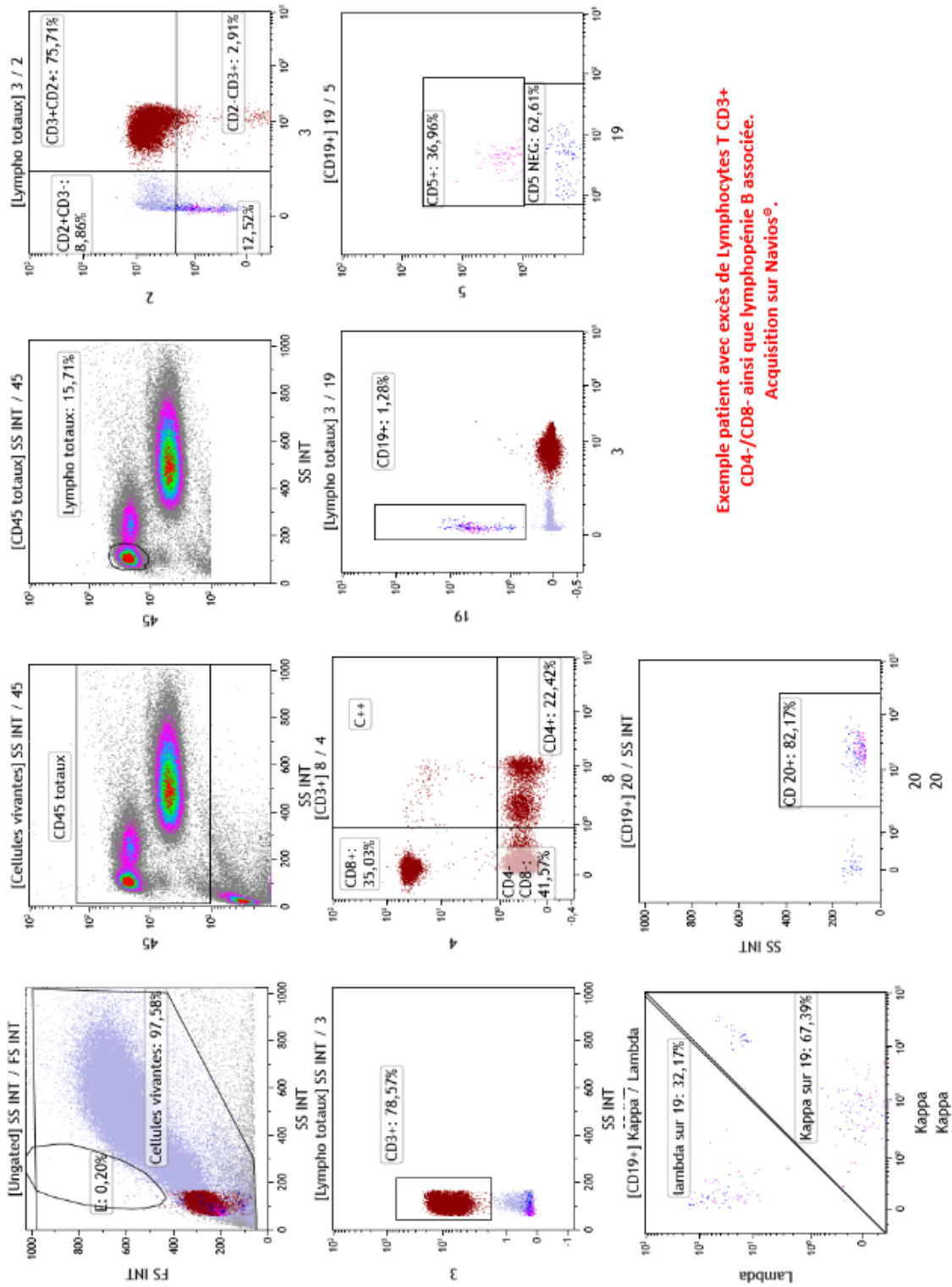
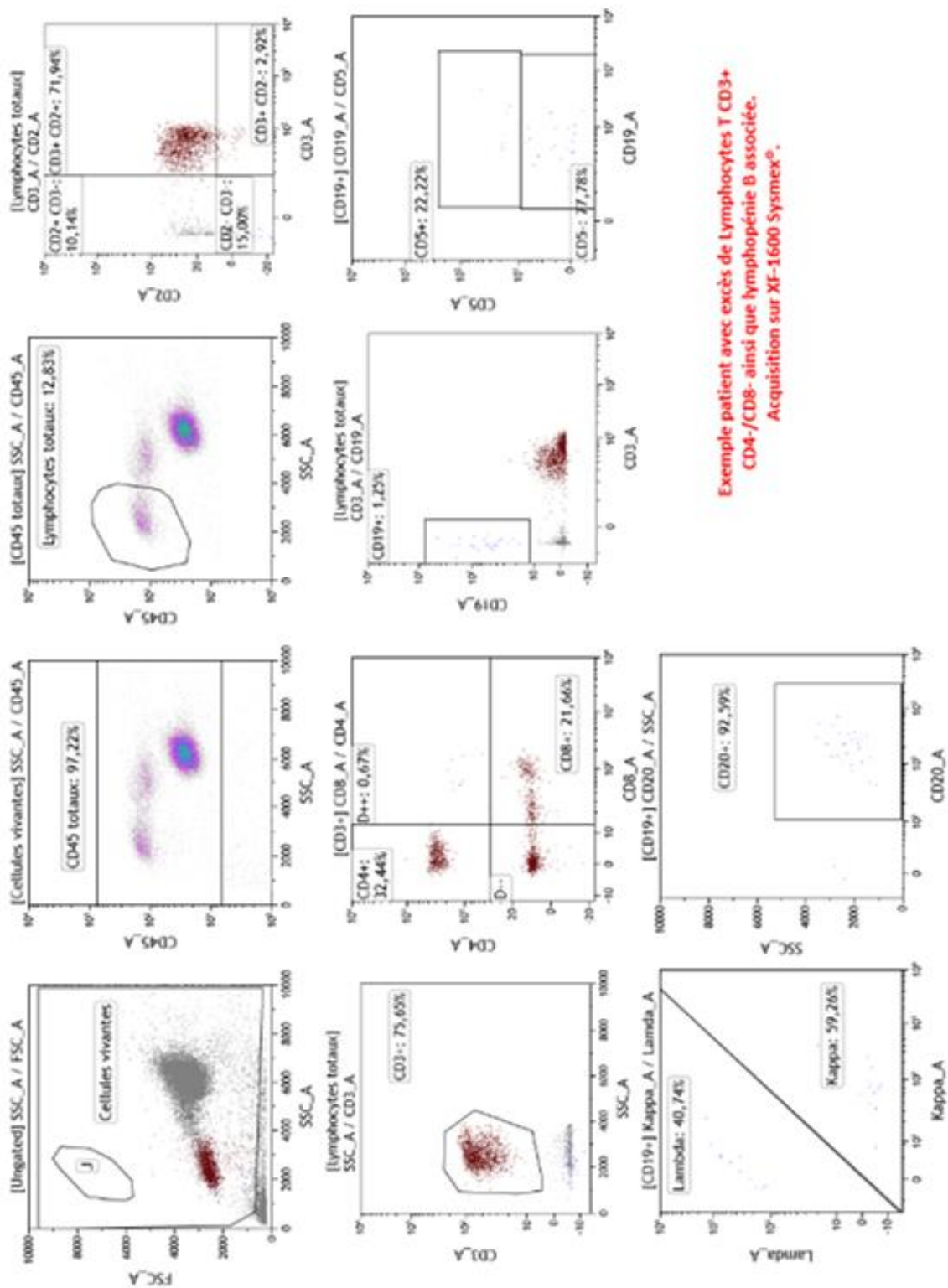


Figure 78 : Exemple de clone CD5+ lambda minoritaire (30% des lymphocytes B totaux)

Cet échantillon (figure 78) est également intéressant. En effet on remarque très bien la présence des deux populations de lymphocytes B CD19+ sur l'histogramme CD5/CD19. La population lymphocytaire B CD19+ et CD5- (en bleu) est polytypique. En effet, 68% de ces lymphocytes expriment une chaîne légère kappa et environ 32% une chaîne légère lambda. En revanche, en conditionnant l'histogramme kappa/lambda sur la population CD5+, on remarque que près de 90% de ces lymphocytes expriment une chaîne légère lambda. Nous avons donc ici une population monotypique CD5+ lambda représentant 30% des lymphocytes B soit 3.6% des lymphocytes totaux en CMF.



Exemple patient avec excès de Lymphocytes T CD3+
 CD4-/CD8- ainsi que lymphopénie B associée.
 Acquisition sur Navios®.



Exemple patient avec excès de Lymphocytes T CD3+
CD4-/CD8- ainsi que lymphopénie B associée.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.

Figure 79 : Exemple de patient avec population CD4-/CD8- en excès et lymphopénie B.

Concernant cet échantillon de patient (figure 79), plusieurs anomalies ont été décelées en CMF. La première d'entre elles est la présence en quantité beaucoup trop élevée de la population CD4-/CD8- sur les lymphocytes CD3+. Elle représente environ 40% des lymphocytes CD3+. Une telle proportion doit faire rechercher une anomalie du profil phénotypique des lymphocytes T. Une exploration du profil T sera réalisée pour ce patient (figure 91).

La deuxième anomalie est la quasi-absence de lymphocytes CD19+ chez ce patient. En effet avec 1.25% de lymphocytes CD19+ nous avons ici une lymphopénie B.

V.2. Panel complément B

V.2.1. Corrélation méthode quantitative

Concernant le panel complément B, 13 échantillons ont pu être analysés en double. Les résultats de corrélation entre les Navios® et le XF-1600 Sysmex® pour ce panel sont donnés pour chaque marqueur étudié et sont interprétés grâce à une droite de régression ainsi que des diagrammes des différences.

Les équations des droites de régressions pour chacun des paramètres testés sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Corrélation panel complément B

Paramètre étudié	Droite de régression	R ²
CD19	$y = 1,0153x - 1,4994$	0,98647
FMC7	$y = 0,9808x + 2,5737$	0,97594
CD23	$y = 0,6559x + 0,4181$	0,83487
CD79b	$y = 0,9886x - 1,4323$	0,97837
CD38	$y = 1,1661x + 3,6257$	0,88034
CD10	$y = 0,1311x + 0,4433$	0,29723
CD11c	$y = 0,7676x - 0,13$	0,82731
CD25	$y = 0,8183x + 0,3995$	0,89280
CD180	$y = 0,4824x + 0,0214$	0,81052

Les diagrammes des différences pour chacun des paramètres testés sont présentés ci-dessous (figures 80 et 81).

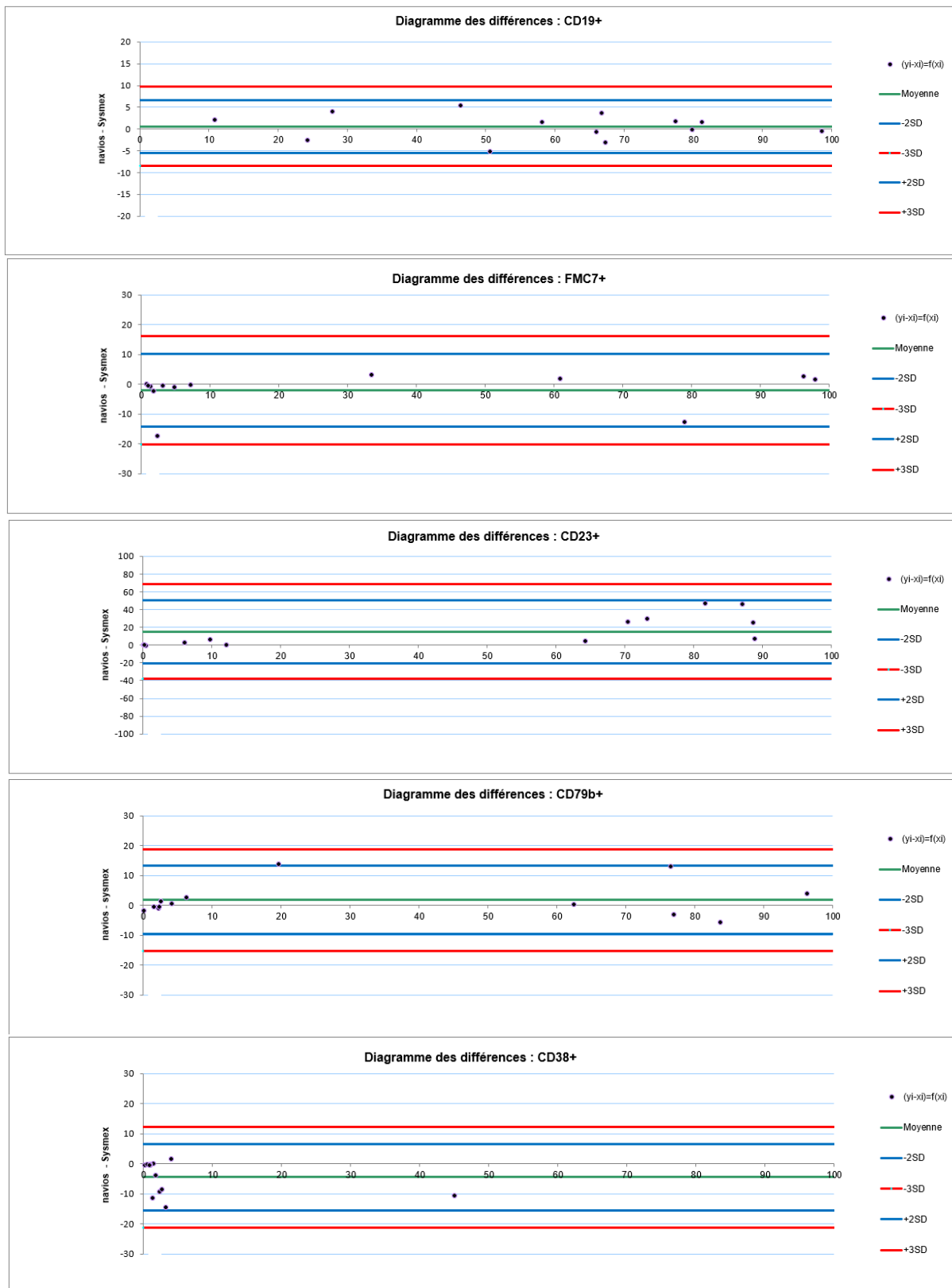


Figure 80 : Diagrammes des différences pour le panel complément B (1)

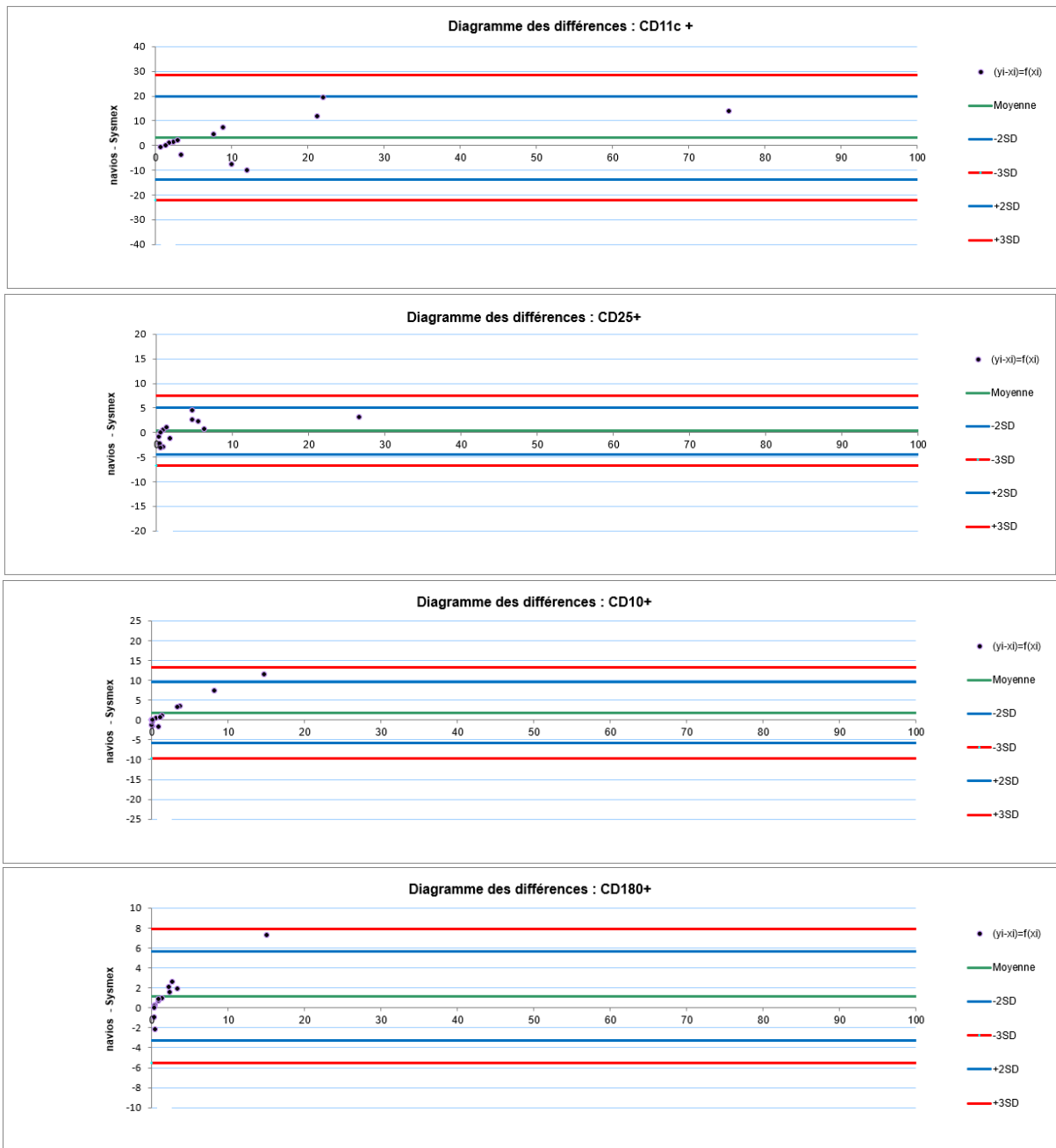


Figure 81 : Diagrammes des différences pour le panel complément B (2)

V.2.2. Corrélation méthode qualitative

Concernant la corrélation en termes d'interprétation, pour les 13 échantillons on retrouve le même phénotype quel que soit l'automate utilisé. Ces phénotypes sont représentés dans le tableau ci-dessous (figure 82) :

Num échantillon	FMC7		CD23		CD79b		CD38		CD11c		CD25		CD180		CD10	
	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600
1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
11	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
12	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
13	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

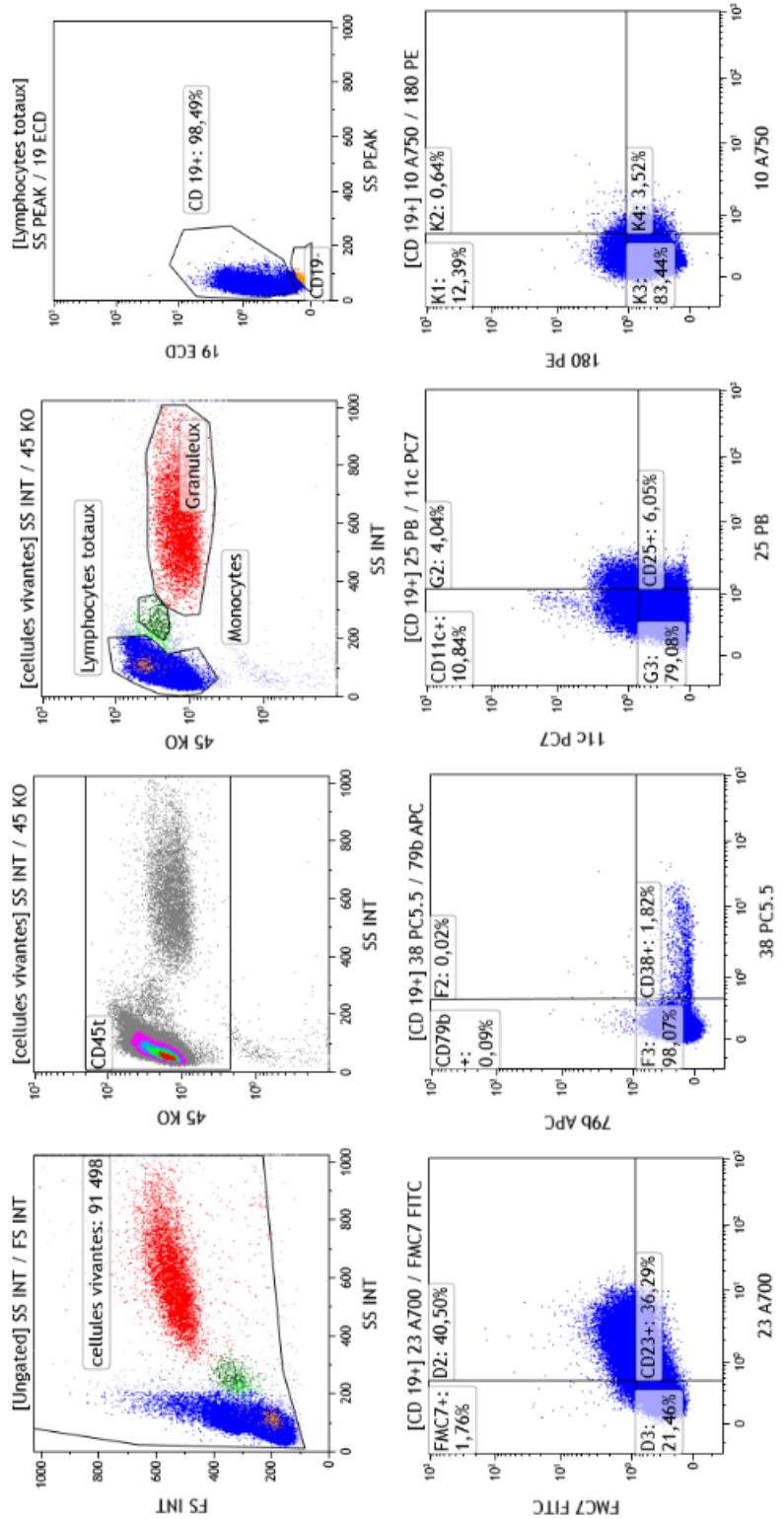
Figure 82 : Phénotypes retrouvés pour chacun des échantillons sur les deux automates

Aucune discordance n'est observée parmi les 13 échantillons analysés pour le panel complément B.

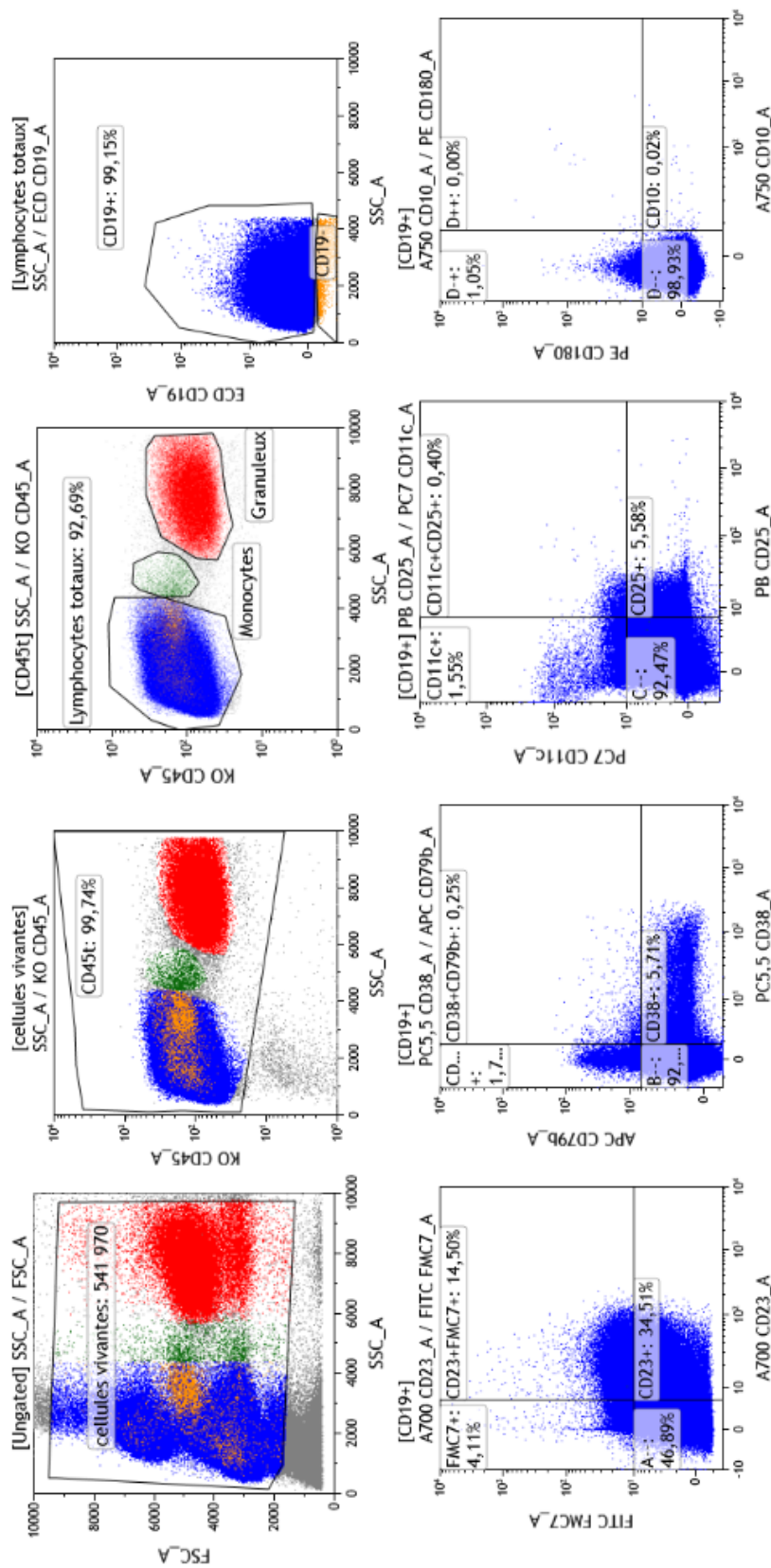
V.2.3. Exemples d'images

Afin de comparer pleinement les deux cytomètres, il convient de comparer les images obtenues après acquisition sur chacun des deux cytomètres. Des figures correspondant à différentes situations pathologiques sont présentées ci-après.

- Clone lymphocytaire B avec score de Matutes égal à 5 (figure 83).
- Clone lymphocytaire B avec score de Matutes égal à 0 (figure 85).
- Clone lymphocytaire B avec expression forte du FMC7 et score de Matutes égal à 1 (figure 86).
- Clone lymphocytaire B CD38+ sur prélèvement ganglionnaire, avec score de Matutes égal à 1 (figure 87).



Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, FMC7-, CD11c-, CD25-, CD10-, CD180-, CD79b-, CD38-
Acquisition sur Navios®



Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23+, FMC7-, CD11c-, CD25-, CD10-, CD180-, CD79b-, CD38-
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 83 : Exemple de clone lymphocytaire B (LLC)

Sur cet exemple (figure 83), on peut observer une population lymphocytaire B CD19+ représentant environ 98% des lymphocytes totaux. Cette population a le phénotype suivant : CD23+, FMC7-, CD79b-, CD180-, CD25-, CD11c-, CD38-.

Par ailleurs, les lymphocytes B de ce patient exprimaient également le CD5 et avaient une intensité d'expression faible des chaînes légères kappa (figure 84). Cela porte donc le score de Matutes à 5 et pose le diagnostic de LLC. De plus, ce patient présentait une hyperlymphocytose à 48 G/L.

On peut également remarquer la difficulté de séparation des populations CD19+ et CD19- quel que soit le cytomètre utilisé. Par ailleurs le CD19 peut être faiblement exprimé dans une LLC.

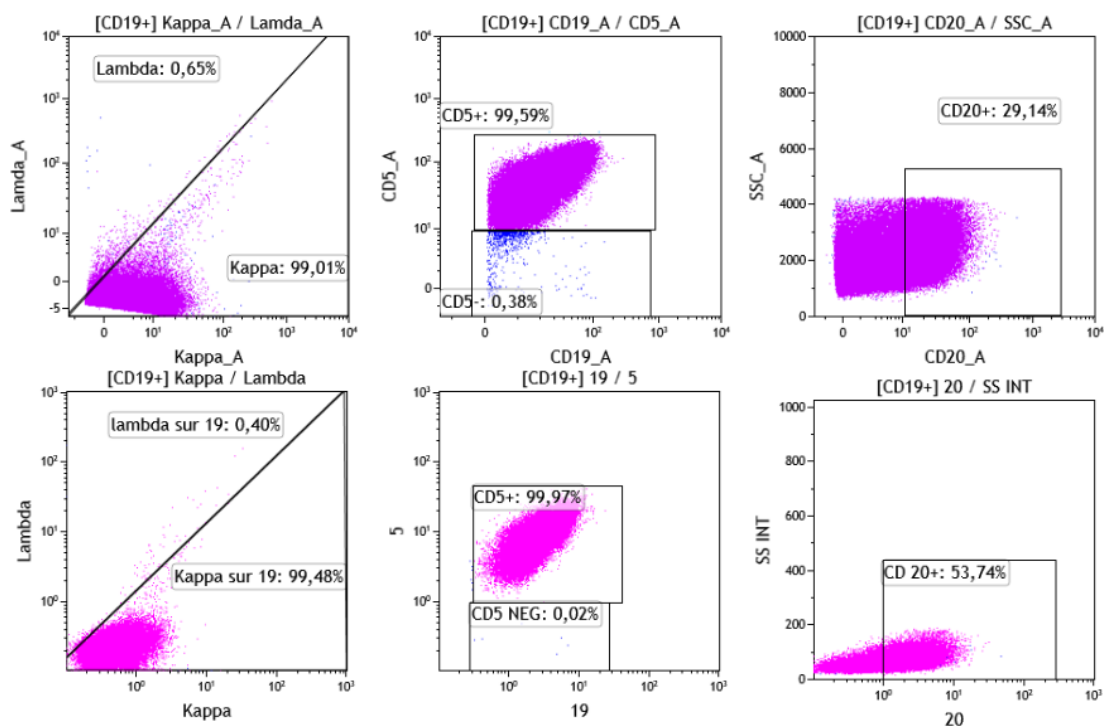
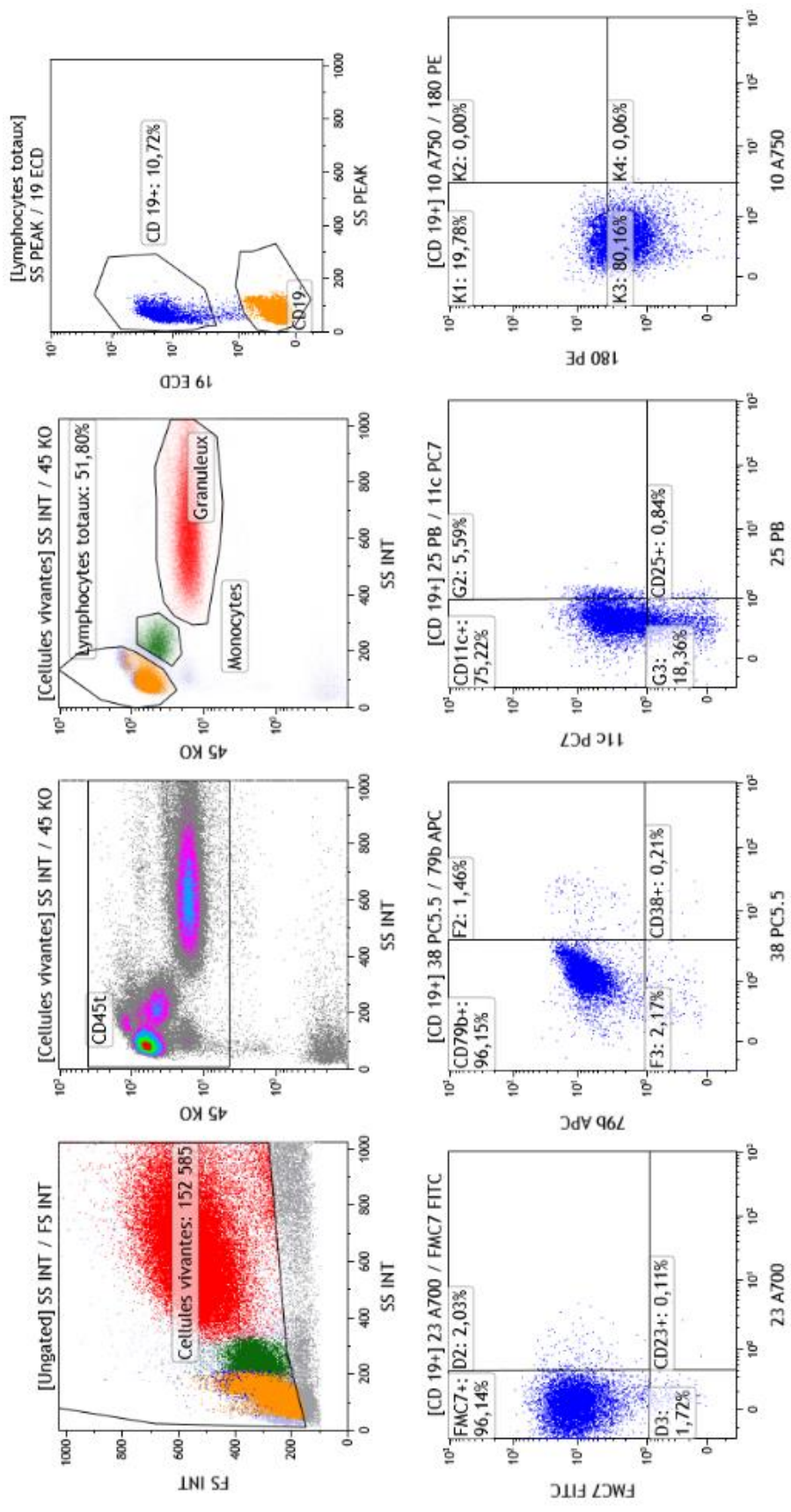


Figure 84 : Images CD5, CD20, kappa et lambda, acquisition XF-1600 en haut, sur Navios en bas.



Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23-, FMC7+, CD11c+, CD25-, CD10-, CD180-, CD79b-, CD38-
 Acquisition sur Navios®

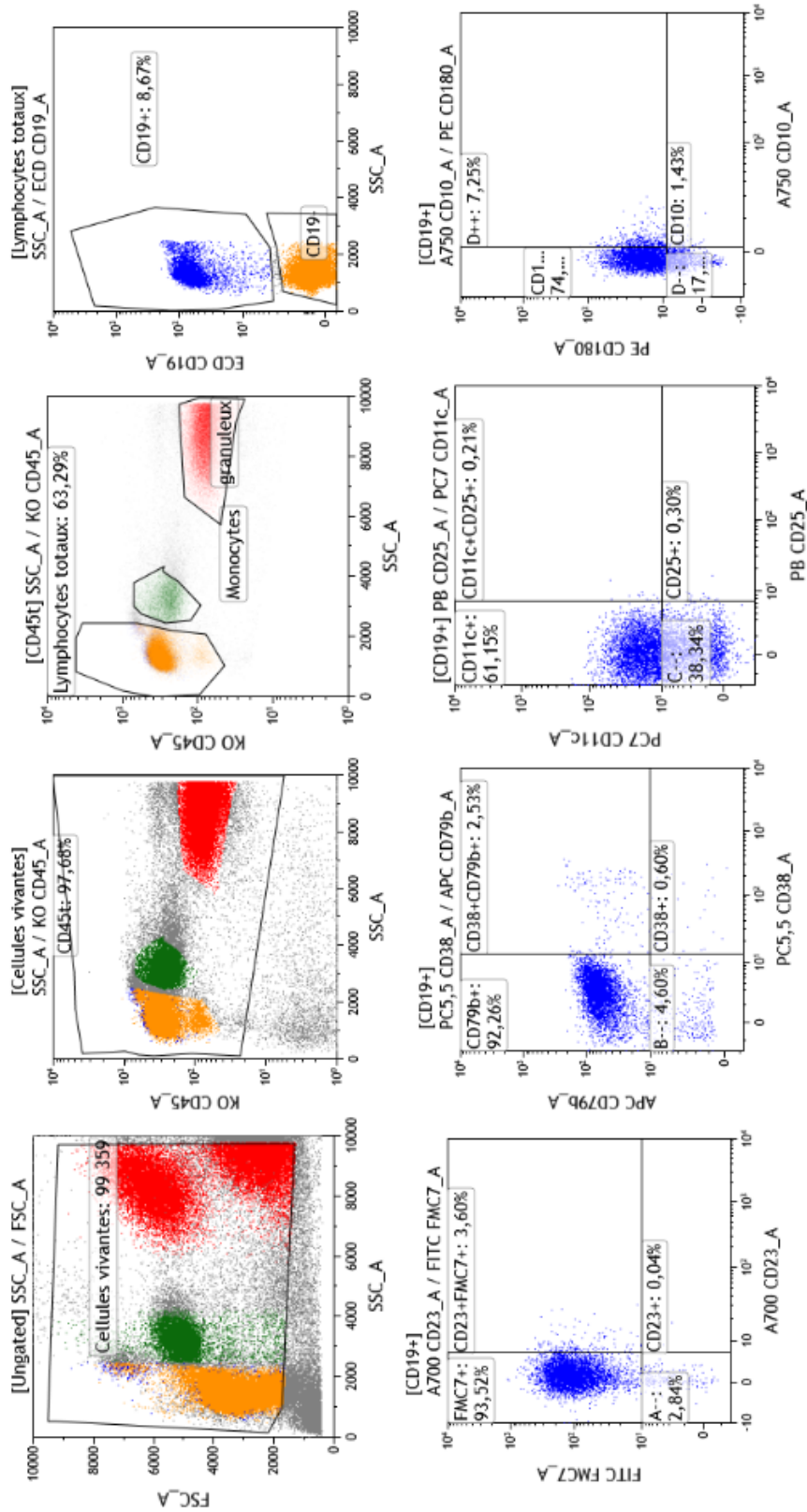
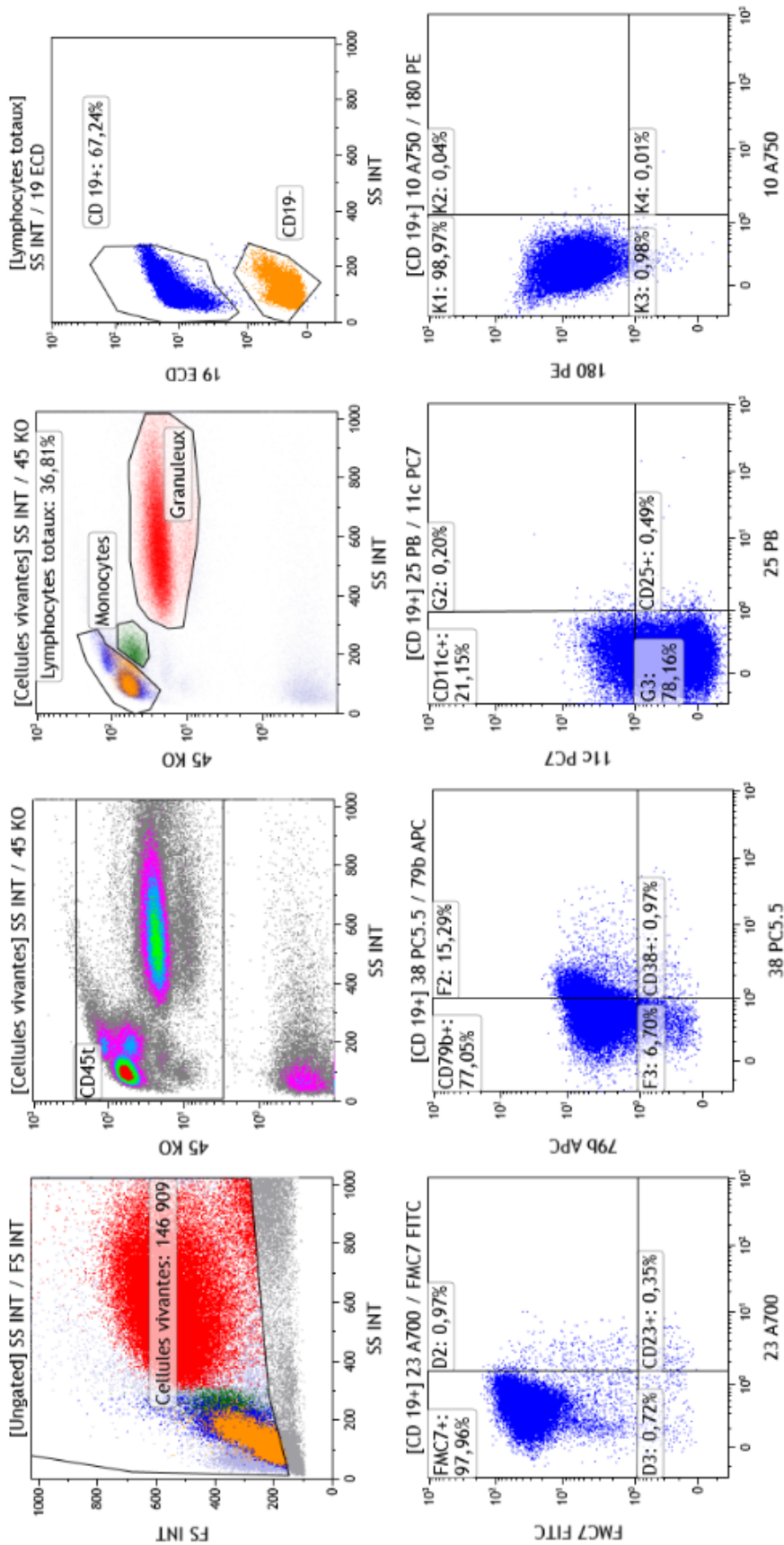


Figure 85 : Exemple de patient avec clone B FMC7 fort, CD11c+faible, CD180+

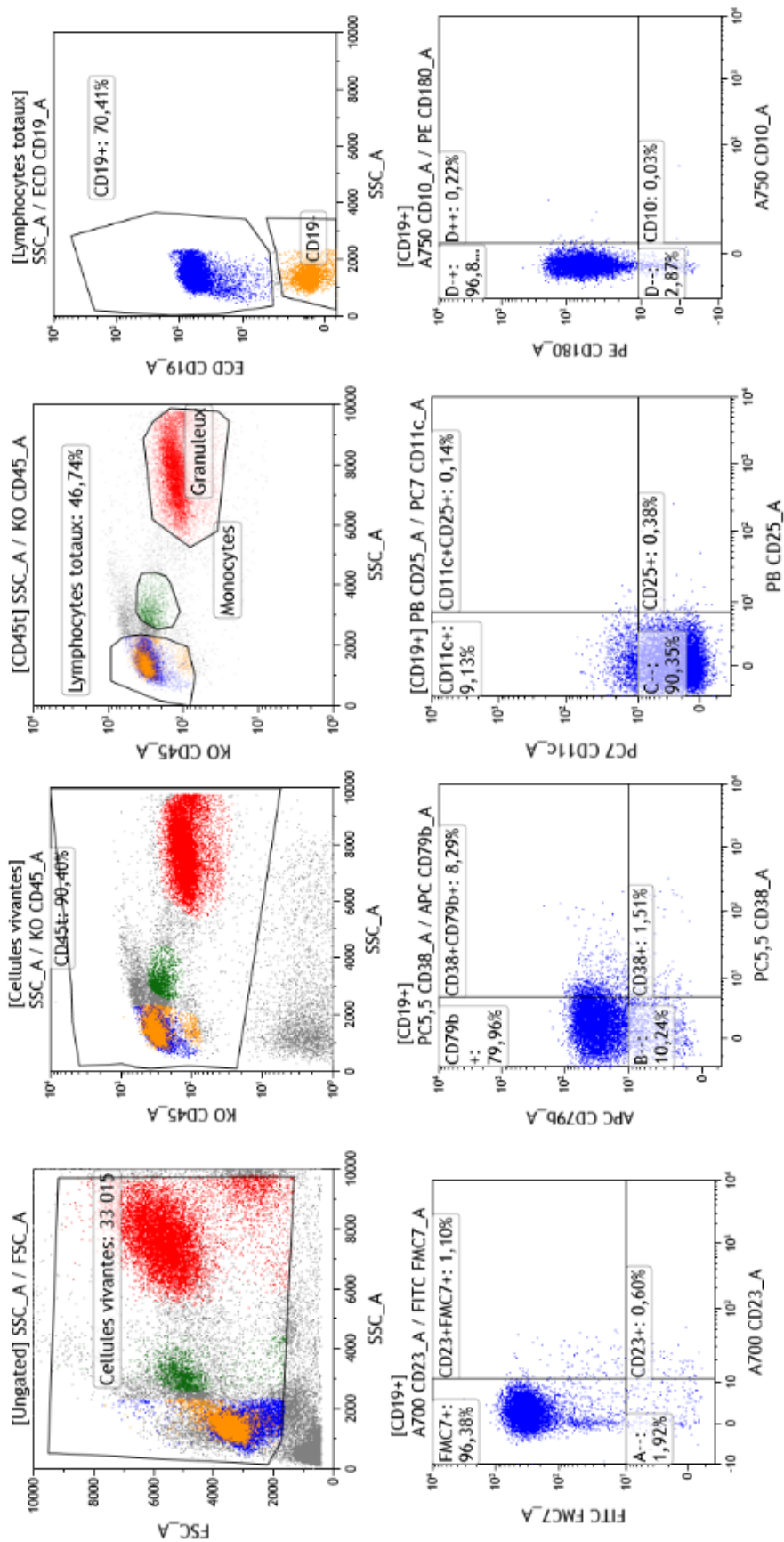
Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23-, FMC7+, CD11c+, CD25-, CD10-, CD180+, CD79b-, CD38-
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Sur cet exemple de patient (figure 85), la population B CD19+ ne représente qu'environ 10% des lymphocytes totaux en CMF. Cette population présente le phénotype suivant : FMC7 d'intensité forte, CD79b+, CD11c+ faible, CD38-, CD25-, CD180+ et CD10-. Par ailleurs il s'agissait d'un clone B CD5- monotypique kappa portant le score de Matutes à 0.

Ce patient était connu pour un lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL). Il s'agit ici d'une phase leucémique de ce SLVL. De plus, la cytologie retrouvait quelques lymphocytes villeux.



Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23-, FMC7+ fort, CD11c-, CD25-, CD10-, CD180+, CD79b+, CD38-
 Acquisition sur Navios®

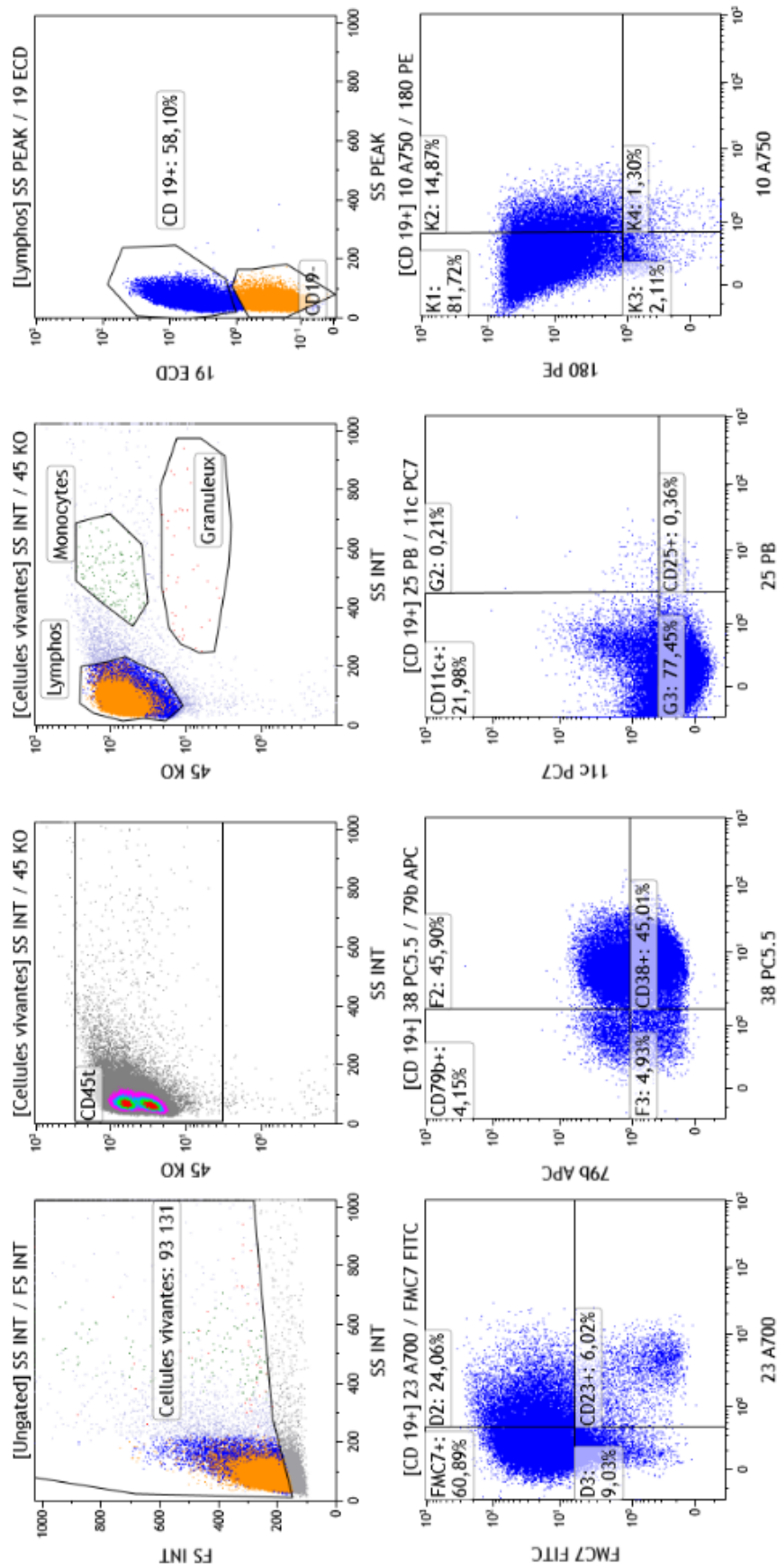


Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23-, FMC7+ fort, CD11c-, CD25-, CD10-, CD180+, CD79b+, CD38-
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

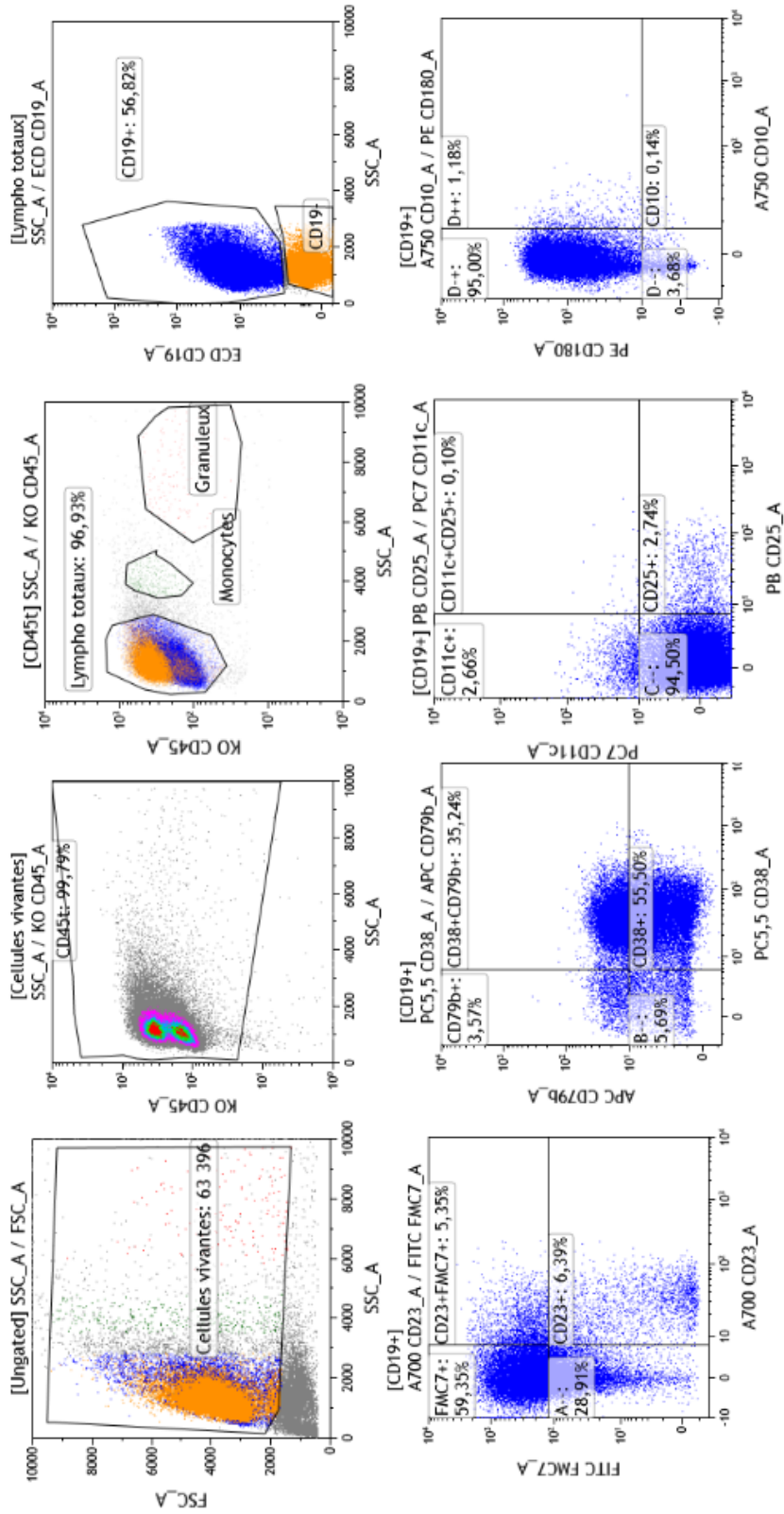
Figure 86 : : Exemple de clone B FMC7+ d'intensité forte, CD180+ fort

Pour ce patient (figure 86), le clone B CD19+ représente environ 70% des lymphocytes totaux retrouvés en CMF. Le profil immunophénotypique de ce clone est le suivant : FMC7 d'intensité forte, CD79b+, CD180+. Les CD23, CD38, CD25, CD10, CD11c sont quant à eux négatifs.

Associé à un profil CD5+ et avec une expression monotypique lambda, le score de Matutes est de 1.



Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23-, FMC7+ fort, CD11c-, CD25-, CD10-, CD180+, CD79b-, CD38+
Acquisition sur Navios®



Exemple de clone lymphocytaire B CD19+, CD23-, FMC7+ fort, CD11c-, CD25-, CD10-, CD180+, CD79b-, CD38+
 Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 87 : Clone B CD38+ sur ponction ganglionnaire

Sur ce dernier exemple (figure 87), le typage est réalisé sur ponction ganglionnaire. On remarque que la quasi-totalité des cellules sont des lymphocytes. Parmi ces lymphocytes, environ 55% sont des lymphocytes B CD19+. Le profil immunophénotypique de ce clone est le suivant : FMC7+, CD23-, CD79b-, CD38+, CD25-, CD11c-, CD10- et CD180+. Par ailleurs, le clone est également CD5- avec une monotypie lambda d'expression normale, portant le score de Matutes à 1.

V.3. Panel orientation lymphoïde T

V.3.1. Corrélation méthode quantitative

Concernant ce panel, 28 échantillons de patients ont été évalués. Les populations cellulaires comparées sont les suivantes :

- Lymphocytes CD3+/CD19- (lymphocytes T)
- Lymphocytes CD3-/CD19- (lymphocytes non-B et non-T = lymphocytes NK)
- Lymphocytes TCR gamma delta parmi les CD3+
- Lymphocytes T CD4+ parmi les CD3+
- Lymphocytes T CD8+ parmi les CD3+
- Lymphocytes T cytotoxiques CD3+/CD19-/CD56+ et/ou CD16+
- Lymphocytes CD10+ parmi les lymphocytes T CD4+
- Lymphocytes NK (CD56+/CD16+) parmi les CD3-/CD19-
- Lymphocytes CD7+dim parmi les CD3+

Les équations des droites de régressions pour chacun des paramètres testés sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Corrélation du panel T

Paramètre étudié	Droite de régression	R ²
CD3+/CD19-	$y = 1,0026x + 0,1089$	0.99301
CD3-/CD19-	$y = 1,0273x + 0,8202$	0.97962
CD4+	$y = 1,0115x - 1,2704$	0.96835
CD8+	$y = 1,0165x - 0,4475$	0.94713
TCR gamma delta	$y = 0,9593x - 0,0639$	0.99438
CD10+	$y = -0,0335x + 0,1801$	0.00300
Ly T cytotoxiques	$y = 0,6472x + 0,9346$	0.61740
CD7+dim	$y = 0,9641x + 0,1892$	0.92913
Lymphocytes NK	$y = 0,9377x + 1,0642$	0.75893

Les diagrammes des différences pour chacun des paramètres testés sont présentés ci-dessous (figures 88 et 89).

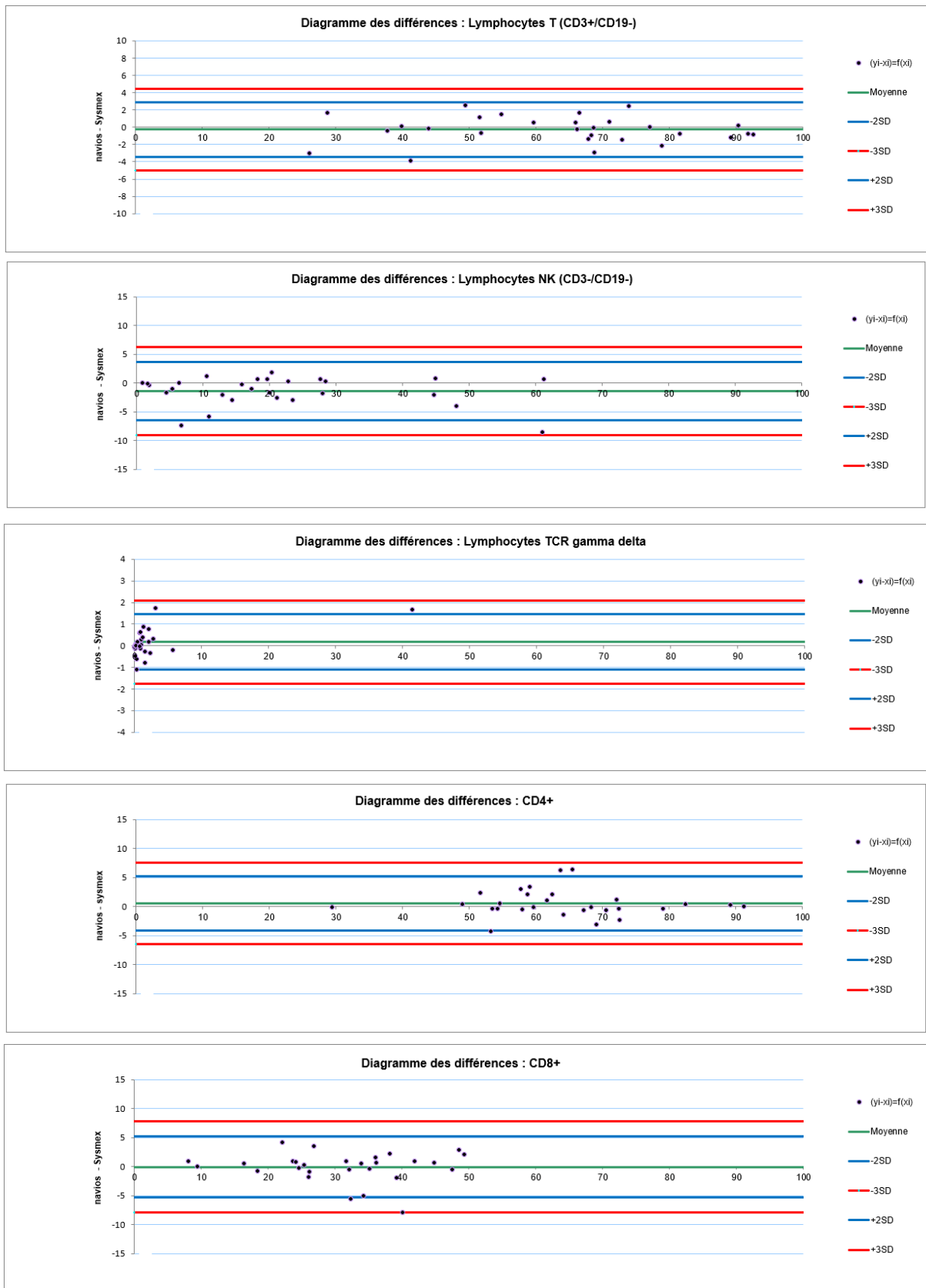


Figure 88 : Diagrammes des différences pour le panel T (1)

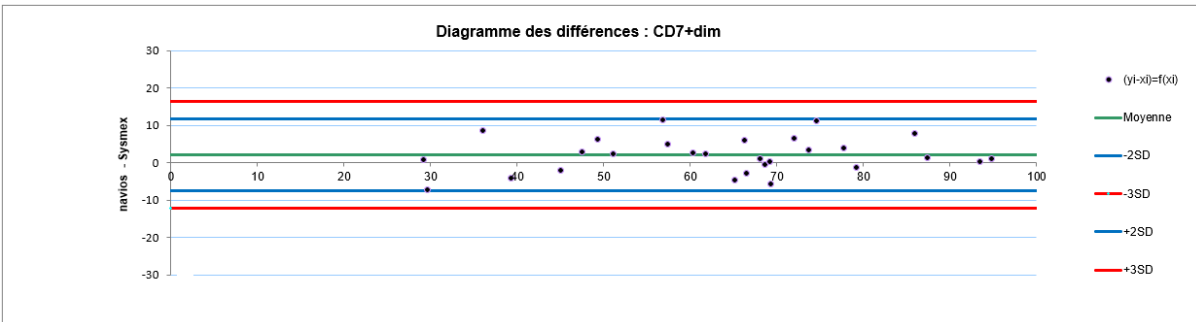
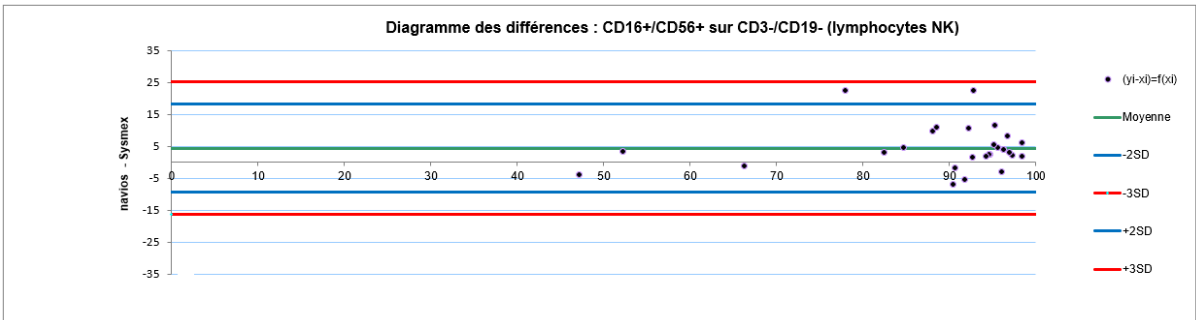
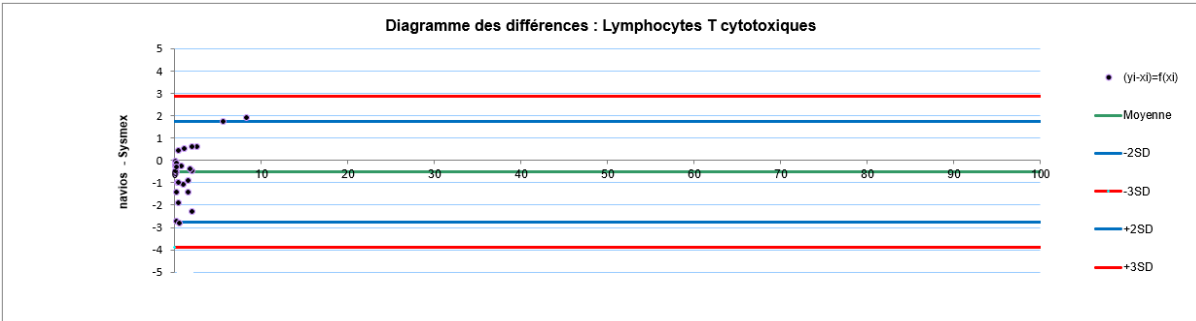
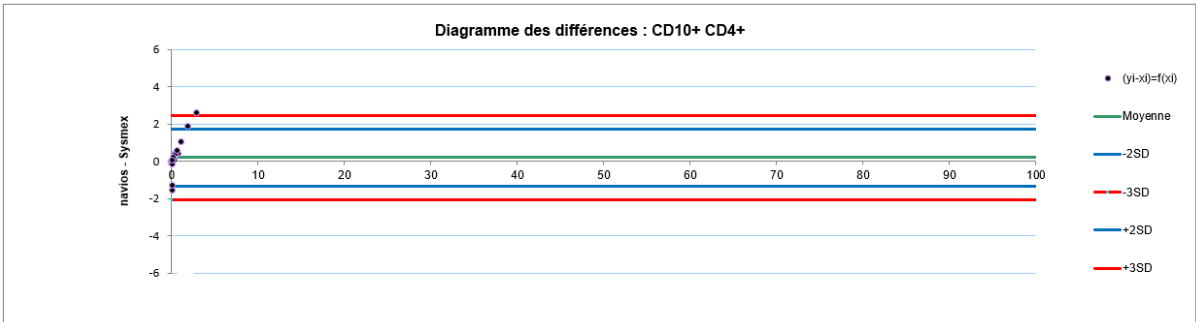


Figure 89 : Diagrammes des différences pour le panel T (2)

V.3.2. Corrélation méthode qualitative

Concernant ce panel T, parmi les 28 échantillons analysés en double, seuls trois d'entre eux présentaient une anomalie du profil lymphocytaire T. Les 25 autres ne montraient pas d'anomalies phénotypiques.

Les 25 échantillons retrouvés sans anomalies sur le Navios l'étaient également après acquisition sur le XF-1600.

Le premier des cas pathologique est celui d'une expansion des lymphocytes TCR gamma delta. Pour cet échantillon, les deux automates retrouvent les mêmes proportions de cette population lymphocytaire (figure 90).

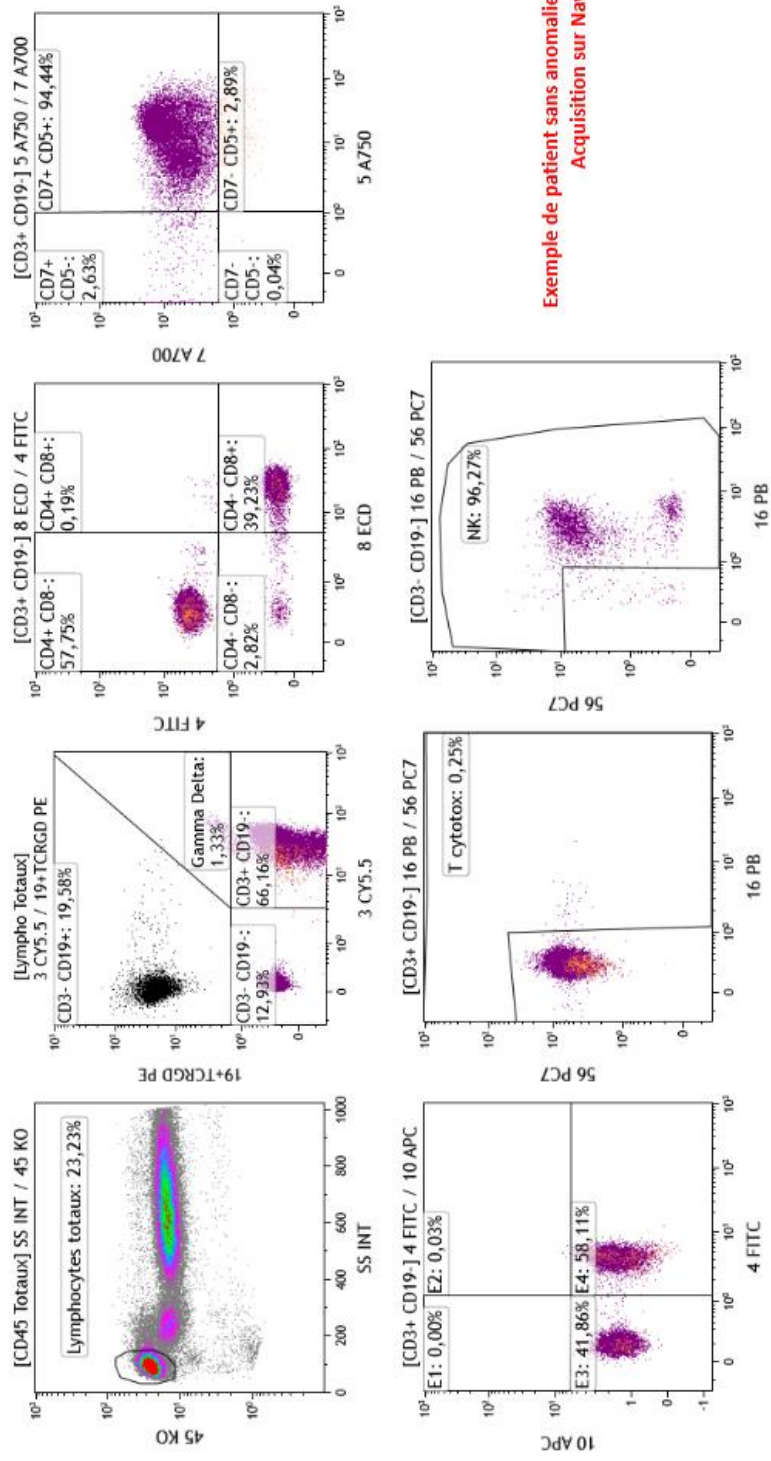
Concernant le second échantillon avec une anomalie retrouvée, là encore les deux cytomètres retrouvent des résultats similaires. Pour ce deuxième échantillon, on retrouve une population CD3-/CD19- , CD56+/CD7+ représentant 40% de lymphocytes totaux en CMF et correspondant à des lymphocytes NK (figure 91).

Pour le dernier échantillon présentant une anomalie, on retrouve une population CD3-CD19- représentant environ 80% des lymphocytes. Cette population exprime également les CD2, CD5 et CD7 et correspond à des lymphocytes de Leucémie prolymphocytaire T (LPL-T). Pour ce dernier cas là encore les résultats des deux cytomètres sont similaires (figure 92).

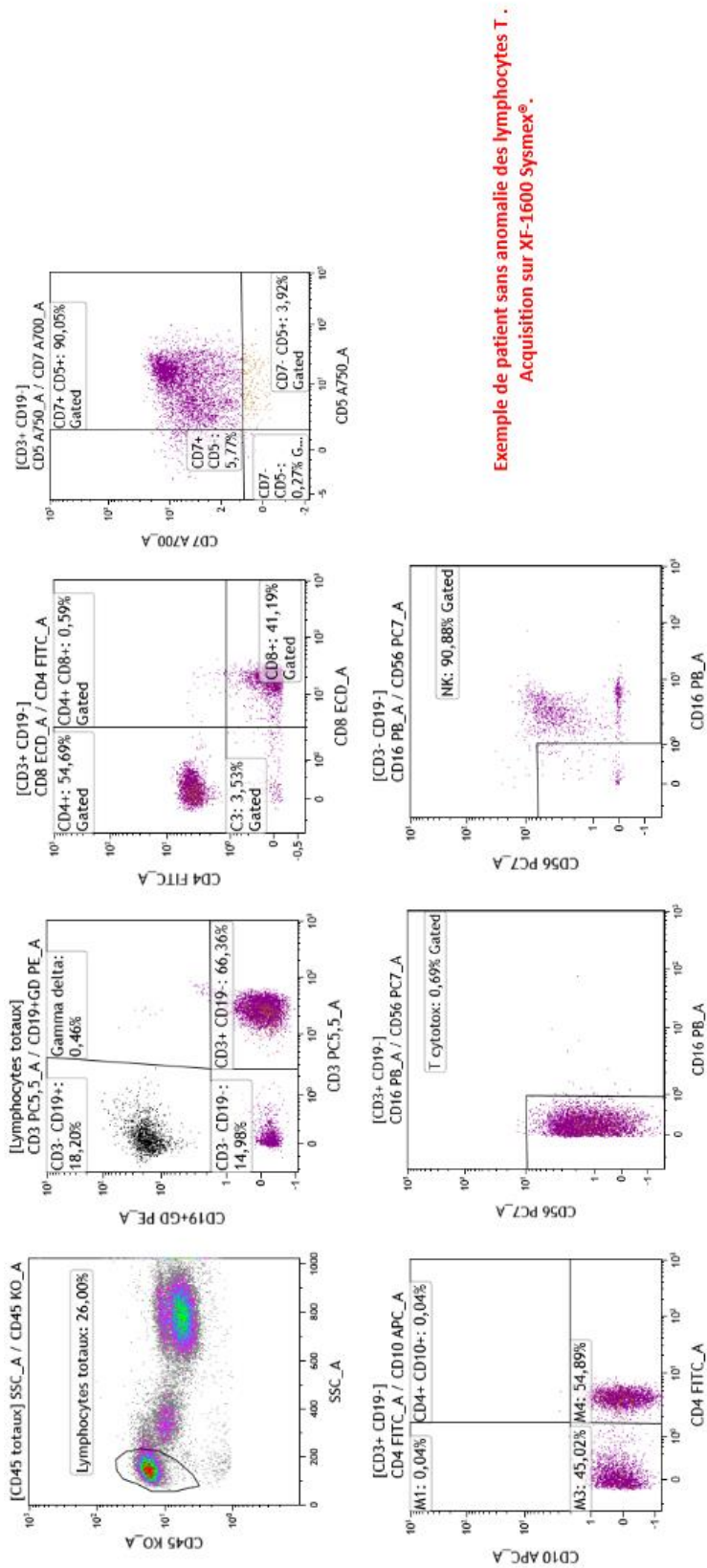
V.3.3. Exemples d'images

Différentes situations pathologiques ou non pathologiques de répartition et de phénotypes des lymphocytes T sont présentés dans cette partie :

- Patient sans anomalies du profil des lymphocytes T en CMF (figure 90).
- Patient avec augmentation des lymphocytes T gamma delta (figure 91).
- Patient avec augmentation des lymphocytes NK (figure 92).
- Patient présentant une population lymphocytaire T de profil compatible avec une LPL-T (figure 93).



Exemple de patient sans anomalie des lymphocytes T.
Acquisition sur Navios®.

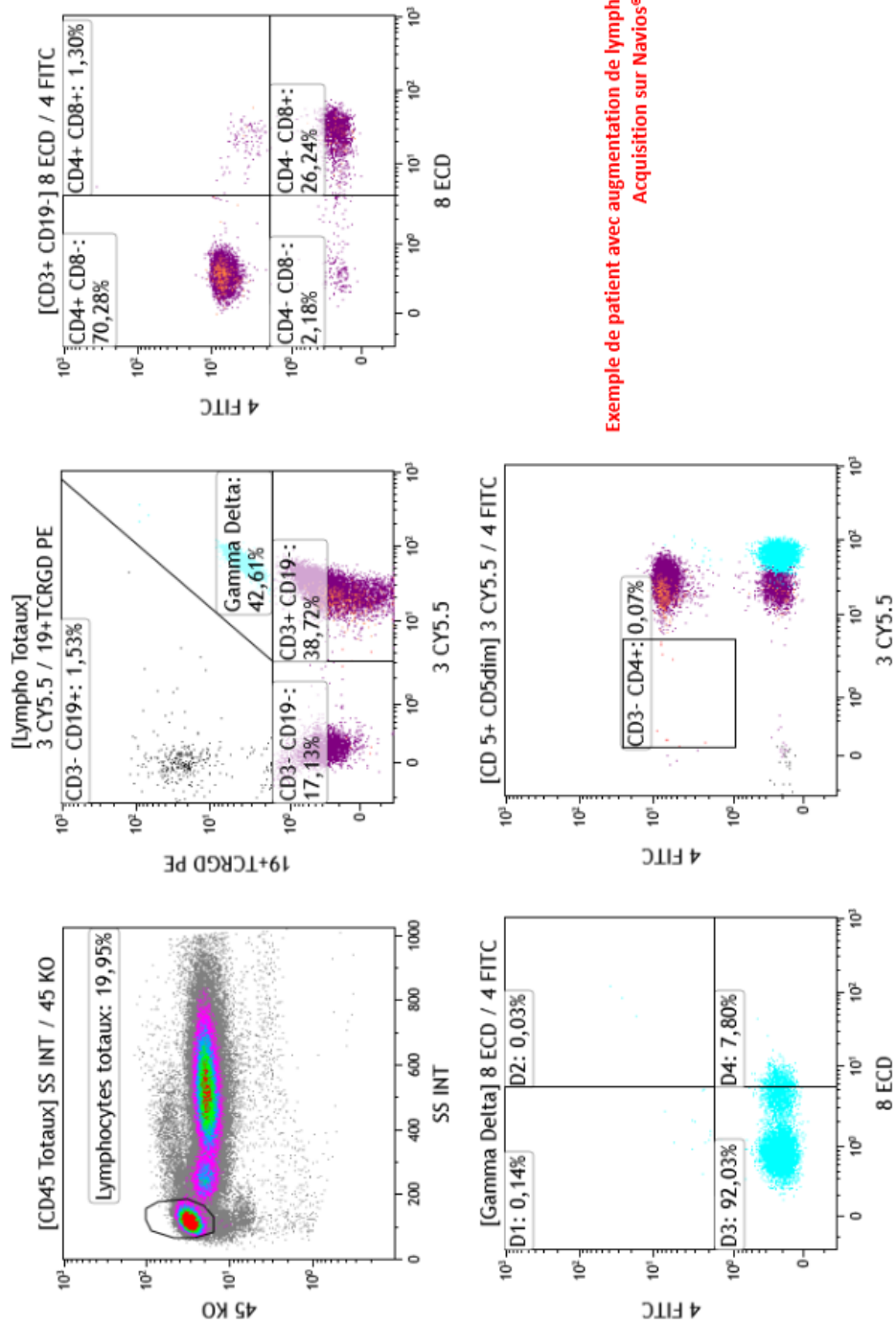


Exemple de patient sans anomalie des lymphocytes T.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.

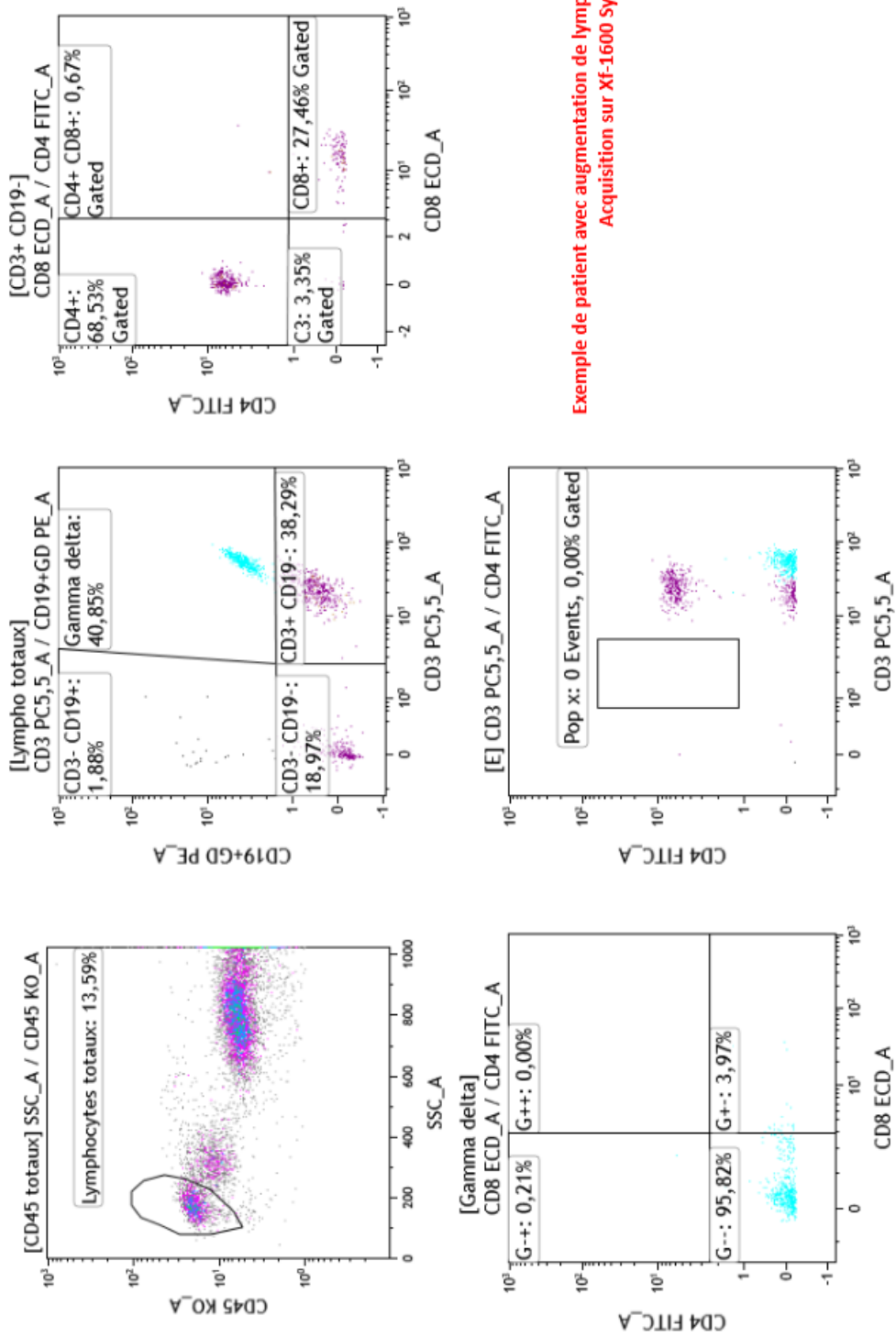
Figure 90 : Exemple de patient sans anomalies des lymphocytes T

Sur cet exemple de patient (figure 90), on ne retrouve aucune anomalie du profil T en CMF. Ici les lymphocytes représentent environ 25% des CD45 totaux. Parmi ces lymphocytes, on retrouve environ 66% de lymphocytes CD3+ CD19- (lymphocytes T), 13% de lymphocytes CD3-/CD19- (lymphocytes NK) et 20% de lymphocytes CD19+/CD3- correspondant aux lymphocytes B (en noir). La population de lymphocytes T gamma delta est ici représentée autour de 1% des lymphocytes totaux.

En se conditionnant sur les lymphocytes T(CD3+/CD19-), on peut voir que 55% d'entre-eux sont des LT CD4+ et environ 40% des LT CD8+. Ces lymphocytes T coexpriment également le CD5 et le CD7 et n'expriment pas le CD10. Toujours en se conditionnant sur la population CD3+/CD19-, on remarque que la proportion de lymphocytes T cytotoxiques (CD16+ et/ou CD56+) n'est pas excessive et représente ici moins de 1% des lymphocytes T. Enfin, en se conditionnant sur la population CD3-/CD19- isolée sur la deuxième fenêtre, on peut voir que la quasi-intégralité de cette population (environ 90%) exprime bien le CD56 et/ou le CD16 et correspond bien à des lymphocytes NK.



Exemple de patient avec augmentation de lymphocytes T TCR gamma delta.
 Acquisition sur Navios®.



Exemple de patient avec augmentation de lymphocytes T TCR gamma delta. Acquisition sur Xf-1600 Sysmex®.

Figure 91 : Exemple de patient avec augmentation des lymphocytes T gamma delta

Sur cet échantillon médullaire (figure 91), les lymphocytes totaux sélectionnés en CD45fort et SS faible représentent environ 13% des cellules totales. Parmi ces lymphocytes, on remarque une augmentation de la proportion de lymphocytes T gamma delta, représentant ici 40% des lymphocytes. Par ailleurs les proportions de lymphocytes T CD3+CD19- et NK CD3-/CD19- sont par conséquent diminuées. De plus on observe une très faible proportion de lymphocytes B CD19+CD3-.

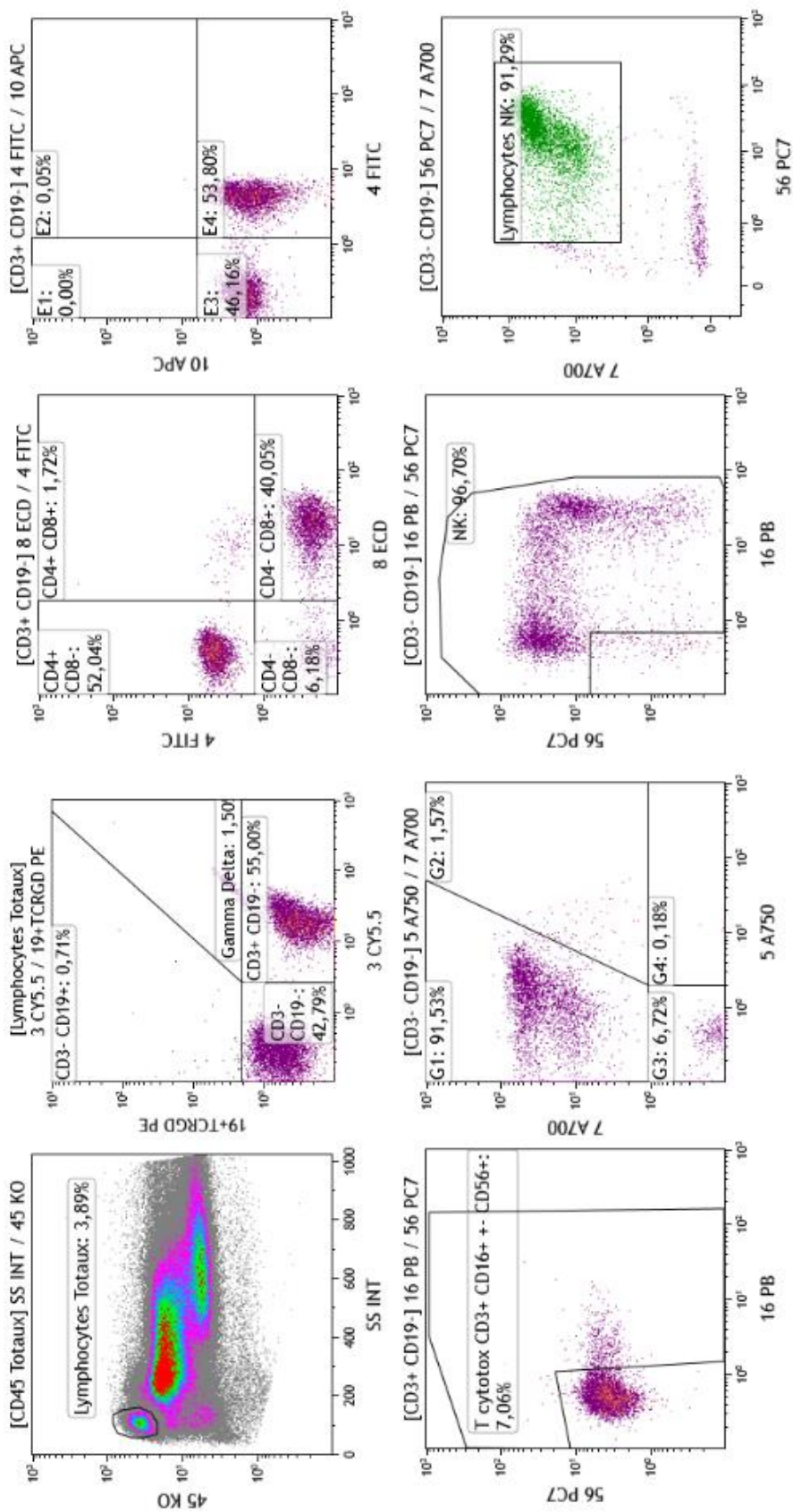
La population T CD3+CD19- a une expression équilibrée pour les CD4 et CD8. La population de lymphocytes T gamma delta (ici en turquoise) exprime partiellement le CD8 mais pas le CD4. Enfin nous n'observons pas de population CD3dim parmi les lymphocytes CD3+.

Sur cet échantillon sanguin, les lymphocytes totaux sélectionnés en CD45fort et SS faible représentent environ 25% des cellules totales. Les proportions des différentes sous populations lymphocytaires sont bien respectées. On a ainsi environ 65% de lymphocytes T CD3+CD19-, 20% de lymphocytes B CD19+CD3-, et environ 15% de lymphocytes NK (CD3-/CD19-). Contrairement à l'exemple précédent, les lymphocytes T gamma delta sont ici présents en proportion normale (moins de 1%).

Parmi les lymphocytes T, la coexpression du CD5 est du CD7 est bien présente, sans sous expression du CD7. On devine également la présence de deux nuages de points sur l'histogramme CD7/CD5, correspondant aux deux sous populations de lymphocytes T (CD4 et CD8).

La répartition entre les lymphocytes TCD4+ et CD8+ est équilibrée. Enfin nous n'observons pas d'expression du CD10 sur ces lymphocytes T CD3+CD19-.

Par ailleurs, le taux de lymphocytes T cytotoxiques est normal et la proportion de cellules CD56+ et/ou CD16+ parmi les lymphocytes CD3-/CD19- est proche de 100%.



Exemple de patient avec excès de lymphocytes NK CD3-/CD19-/CD56+/CD7+).
Acquisition sur Navios®

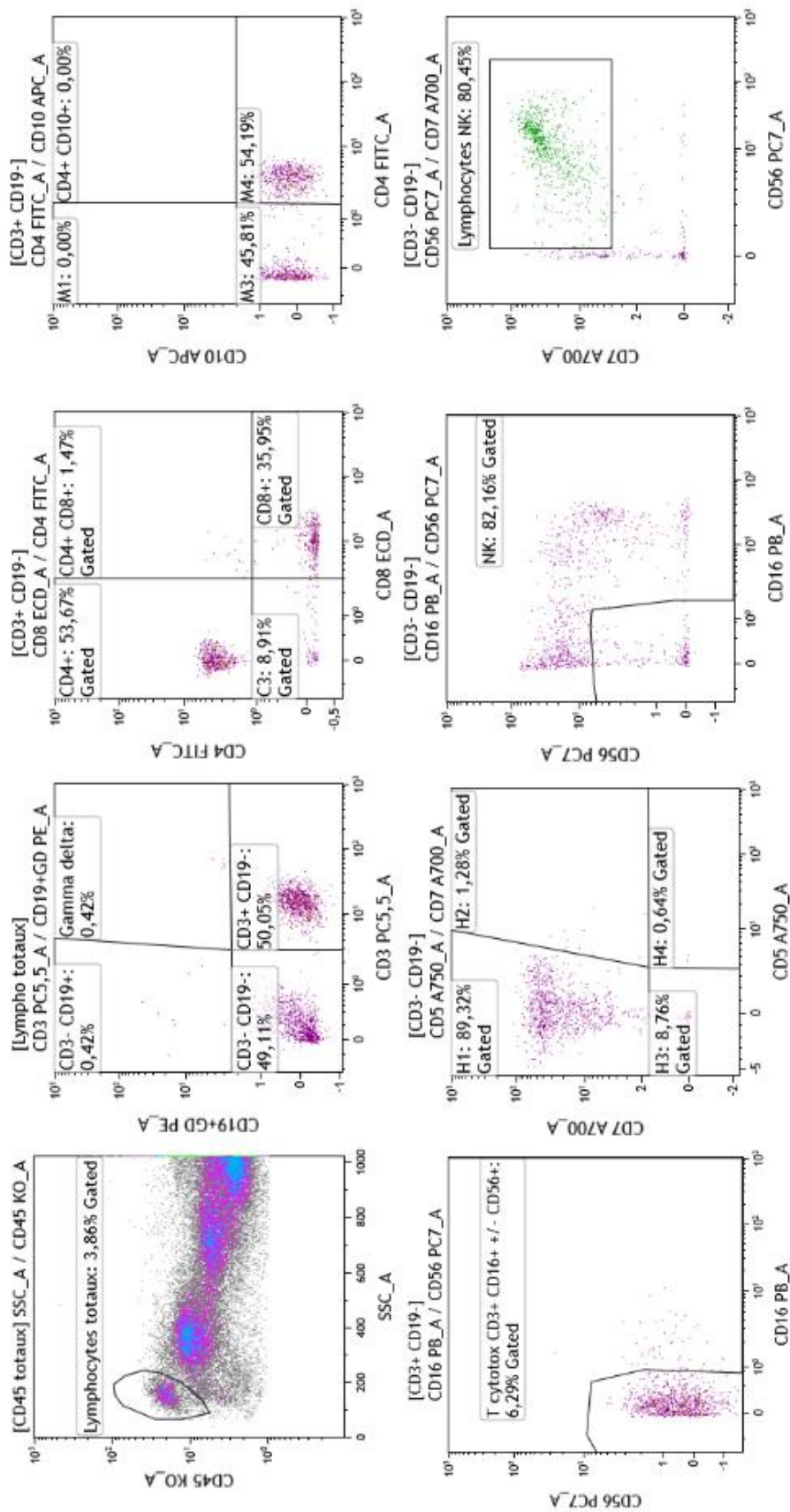


Figure 92 : Exemple de patient avec excès de lymphocytes NK.

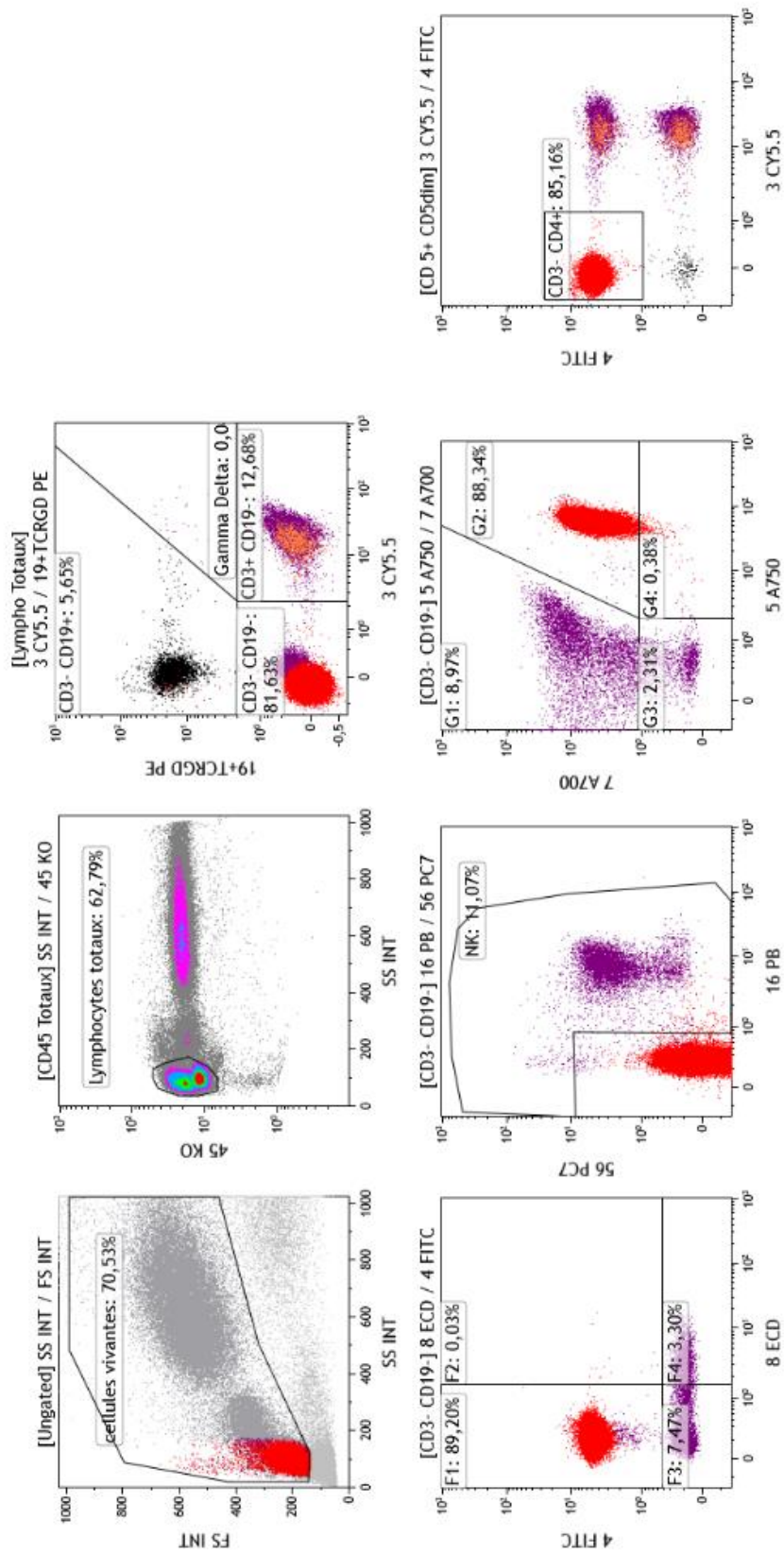
Exemple de patient avec excès de lymphocytes NK CD3-/CD19-/CD56+/CD7+).
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Sur cet échantillon médullaire (figure 92), les lymphocytes totaux sélectionnés en CD45fort et SS faible représentent environ 4% des cellules totales. Les proportions des différentes sous populations lymphocytaires ne sont ici pas respectées. On observe ainsi environ 50% de lymphocytes T CD3+/CD19-, moins de 1% de lymphocytes B CD19+/CD3-, et un excès de lymphocytes NK (CD3-/CD19-) ici à 50% environ.

La répartition entre les lymphocytes T CD4+ et CD8+ est équilibrée. Enfin nous n'observons pas d'expression du CD10 sur ces lymphocytes T CD3+/CD19-.

Par ailleurs, le taux de lymphocytes T cytotoxiques est normal et la proportion de cellules CD56+ et/ou CD16+ parmi les lymphocytes CD3-/CD19- est proche de 100%.

Enfin, la population de lymphocytes NK représentée en excès ne présente pas d'anomalie phénotypique. Ces derniers expriment dans leur grande majorité le CD16 et/ou CD56 ainsi que le CD7.



Exemple de patient présentant une population lymphoïde T suspecte : CD2+ CD3- CD4+ CD5+ et CD7+.
Immunophénotypage compatible avec le diagnostic de Leucémie prolymphocytaire T.
 Acquisition sur Navios.

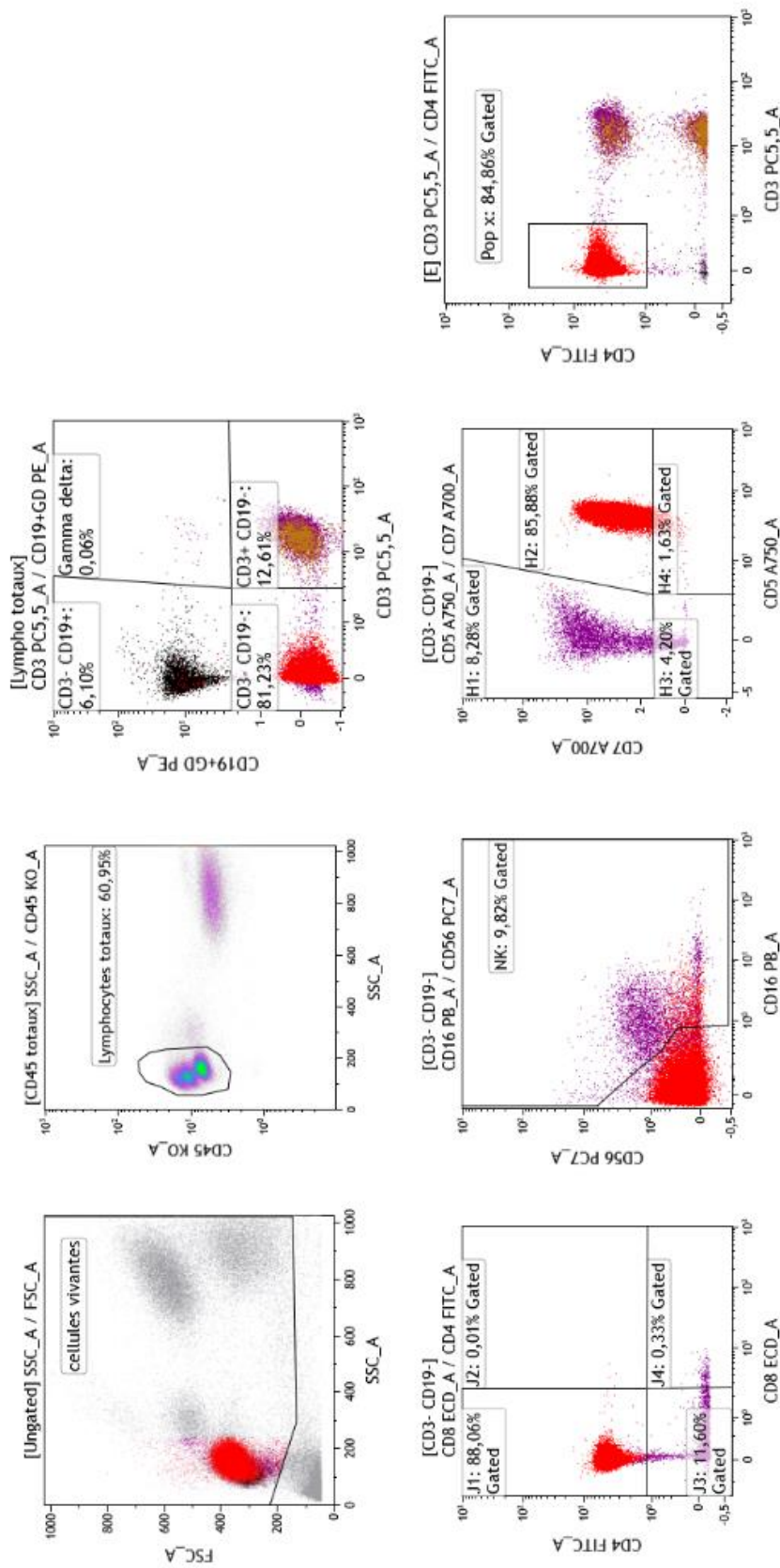


Figure 93 : Exemple de patient avec immunophénotypage en faveur d'une LPL-T

Exemple de patient présentant une population lymphoïde T suspecte : CD2+ CD3-CD4+ CD5+ et CD7+. Immunophénotypage compatible avec le diagnostic de Leucémie prolymphocytaire T. Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.

Sur cet échantillon sanguin (figure 93), les lymphocytes totaux sélectionnés en CD45fort et SS faible représentent environ 60% des cellules totales. On remarque d'emblée la présence de deux populations bien distinctes, notamment sur le graphique en « density plot ».

Concernant les différentes sous populations lymphocytaires, nous n'observons tout d'abord pas d'excès de lymphocytes T gamma delta (moins de 1%). La population correspondant aux lymphocytes B (CD19+/CD3-) est représentée à hauteur de 6% environ, et la population de lymphocytes T(CD3+/CD19-) est également sous représentée avec un taux de 12% environ. Cette sous-représentation des différentes populations lymphocytaires est due à l'excès majeur de la population CD3-/CD19- correspondant normalement aux lymphocytes NK représentant ici plus de 80% des lymphocytes. Cette population suspecte ici en rouge est donc la cible du reste du fenêtrage.

Il s'agit d'une population de lymphocytes T CD2+ CD4+ CD5+ CD7+ mais ayant perdu le CD3 de surface.

Les marqueurs des lymphocytes NK que sont le CD16 et CD56 ne sont pas exprimés sur cette population, écartant ainsi une origine NK de la population suspecte.

Le diagnostic de leucémie prolymphocytaire T suspecté est confirmé par la suite avec l'utilisation d'un panel d'anticorps spécifiques non testé ici, comprenant le TCL-1 (marqueur fortement associé à la LPL-T) (43).

Le phénotype complet de la population est le suivant : CD2+ CD3cy+ CD3 surface - CD4+ CD5+ CD7+ TCL-1+.

Les critères diagnostiques de la LPL-T sont présentés en annexe 3.

V.4. Panel typage plasmocytaire

V.4.1. Corrélation quantitative

Concernant ce panel, 37 échantillons ont pu être passés en doubles. Les résultats de corrélation entre les Navios® et le XF-1600 Sysmex® pour le panel de typage plasmocytaire sont donnés pour chaque marqueur étudié et sont interprétés grâce à une droite de régression ainsi que les diagrammes des différences.

Les équations des droites de régressions pour chacun des paramètres testés sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Corrélation panel plasmocytes

Paramètre étudié	Droite de régression	R ²
Plasmocytes	$y = 1,0106x - 0,0086$	0.99692
Kappa	$y = 0,9002x + 1,7068$	0.93329
Lambda	$y = 0,9019x + 7,9224$	0.93817
CD19	$y = 0,3747x + 0,8565$	0.35514
CD56+28	$y = 0,8289x + 16,421$	0.79400
CD34+117	$y = -0,5012x + 37,242$	0.12003
CD45	$y = 0,7121x + 2,6073$	0.57782
CD27	$y = 0,7722x + 1,4783$	0.72972
CD20	$y = 1,3095x + 0,1007$	0.72356

Les diagrammes des différences pour chacun des paramètres testés sont présentés ci-dessous (figure 94 et 95).

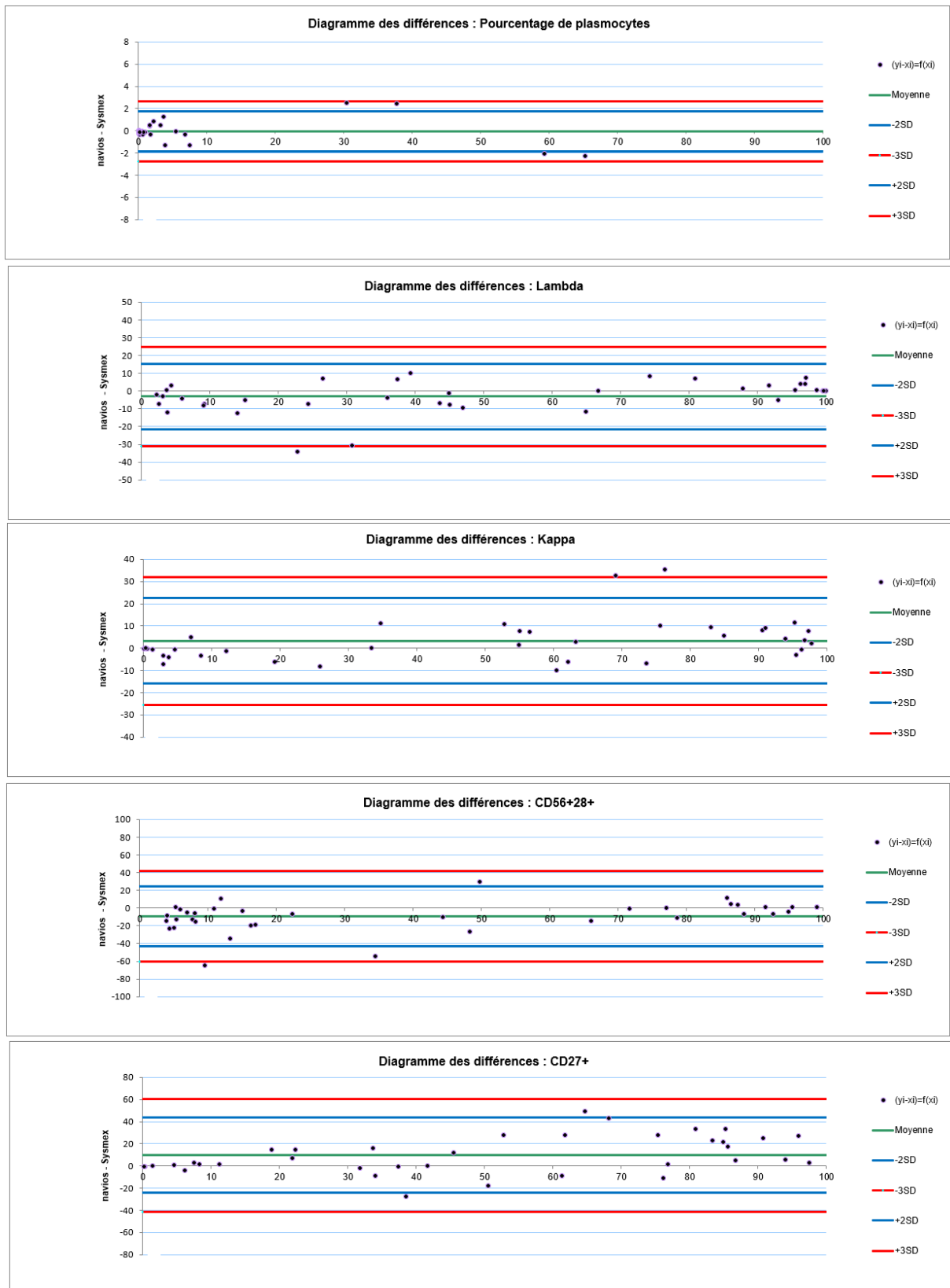


Figure 94 : Diagrammes des différences pour le panel plasmocytes (1)

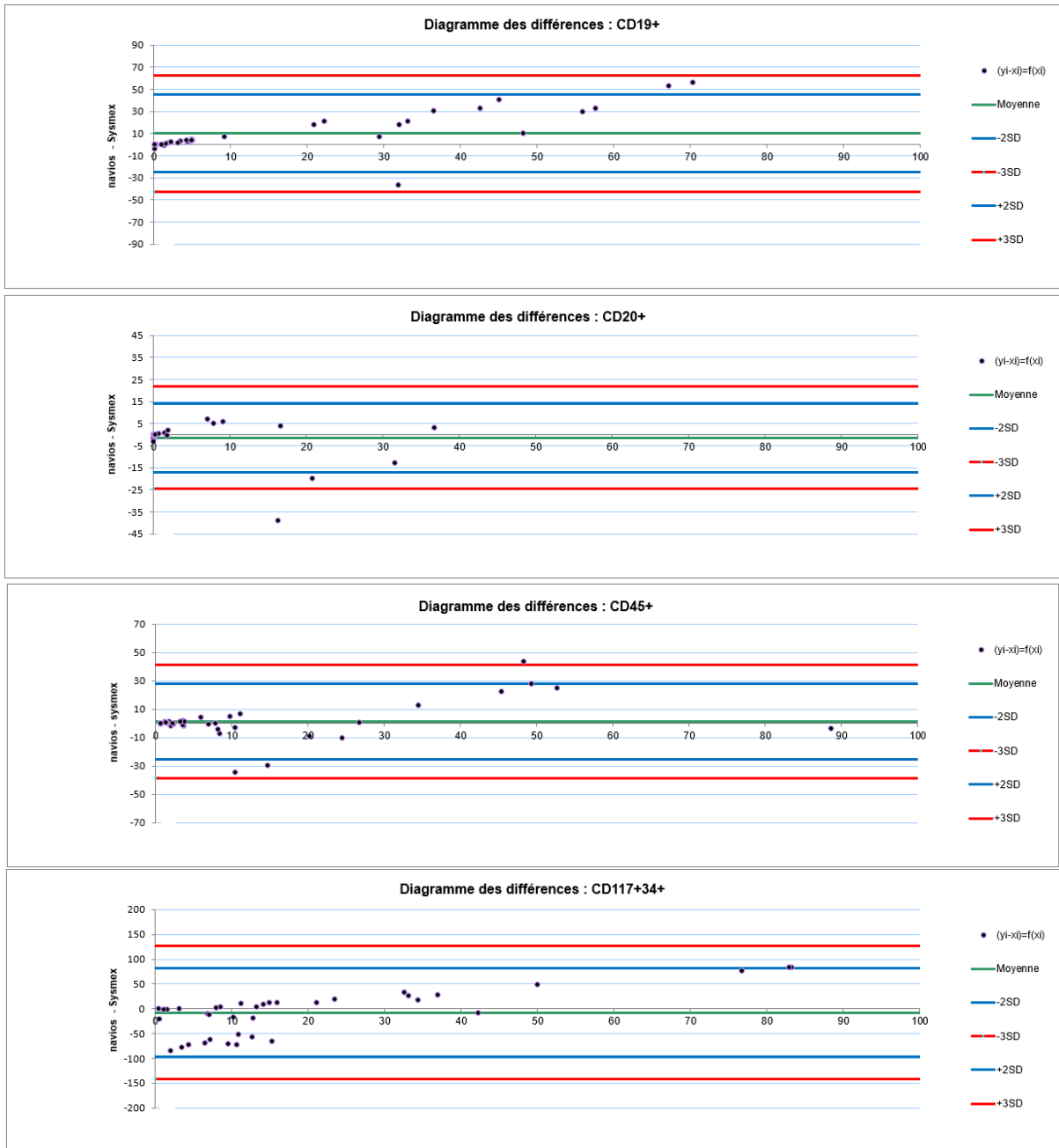


Figure 95 : Diagrammes des différences pour le panel plasmocytes (2)

V.4.2. Corrélation méthode qualitative

Pour évaluer la corrélation de manière qualitative, on compare le phénotype obtenu sur les deux cytomètres pour chacun des échantillons. Les paramètres comparés sont les suivants :

- Plasmocytes polytypiques ou monotypiques
- Acquisition ou non du CD56 sur les plasmocytes
- Perte d'expression ou non du CD19 sur les plasmocytes
- Perte d'expression ou non du CD45 sur les plasmocytes
- Perte d'expression ou non du CD27 sur les plasmocytes
- Perte d'expression ou non du CD20 sur les plasmocytes

Les résultats de cette comparaison sont résumés dans le tableau suivant :

On observe un seul échantillon de patients pour lequel on met en évidence une discordance. En effet pour l'échantillon numéro 10, après acquisition sur le XF-1600 on retrouve une population plasmocytaire exprimant le CD56 et/ou CD28, ce qui n'est pas le cas après acquisition sur le Navios.

Num échantillon	Kappa/Lambda		CD56+28		CD19		CD45		CD27		CD20	
	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600
1	k	k	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	p	p										
3	p	p										
4	p	p										
5	l	l	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
6	p	p										
7	p	p										
8	k	k	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
9	l	l	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	l	l	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
11	k	k	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	p	p										
13	k	k	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
14	p	p										
15	l	l	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
16	l	l	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
17	p	p										
18	l	l	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
19	p	p										
20	k	k	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
21	l	l	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	p	p										
23	p	p										
24	k	k	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	p	p										
26	p	p										
27	l	l	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	k	k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	p	p										
30	l	l	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	l	l	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
32	p	p										
33	k	k	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
34	l	l	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	k	k	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
36	k	k	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37	p	p										

k : monotypie kappa l : monotypie lambda p : plasmocytes polytypiques

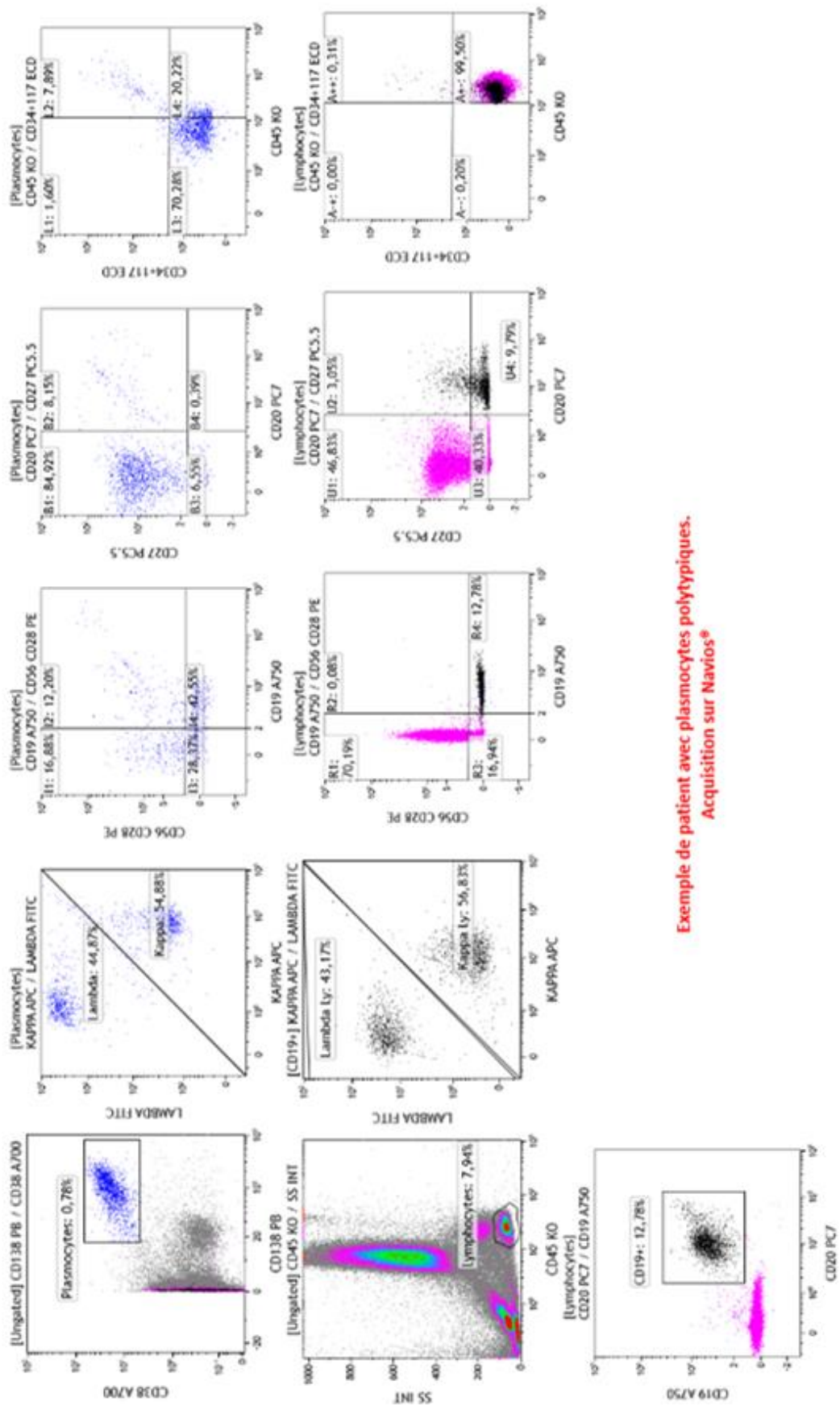
+ : Acquisition ou conservation d'expression du marqueur.

- : Perte ou absence d'acquisition d'expression du marqueur.

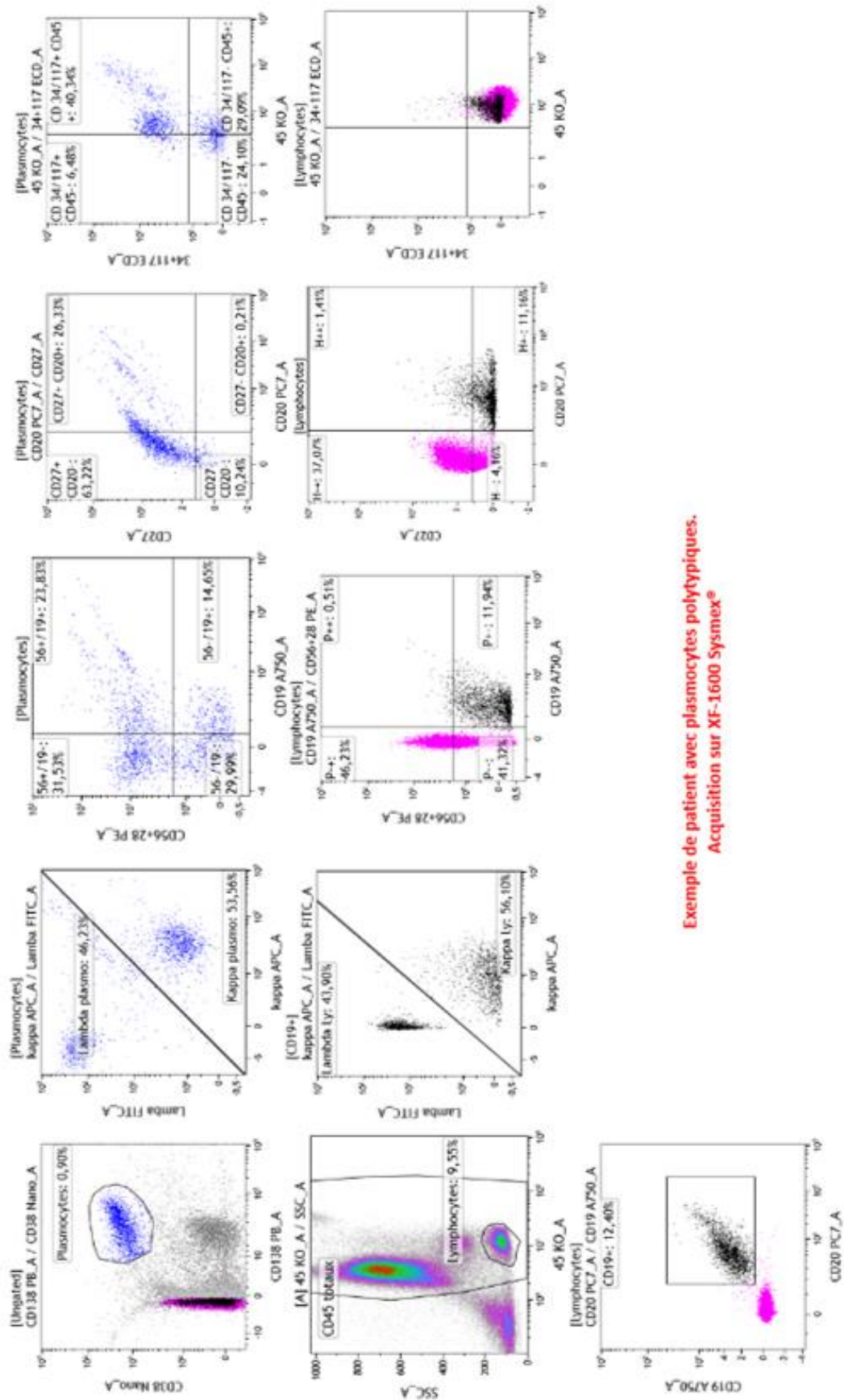
V.4.3. Exemples d'images

Diverses situations rencontrées lors du passage des différents échantillons sont présentées dans cette partie :

- Exemple de plasmocytes polytypiques (figure 96).
- Exemple de clone plasmocytaire lambda, CD56+ CD19- CD27- (figure 97).
- Exemple de clone plasmocytaire lambda CD56+ CD19- CD27+ (figure 98).
- Exemple de clone plasmocytaire kappa CD56+ CD19- CD38- (figure 99).



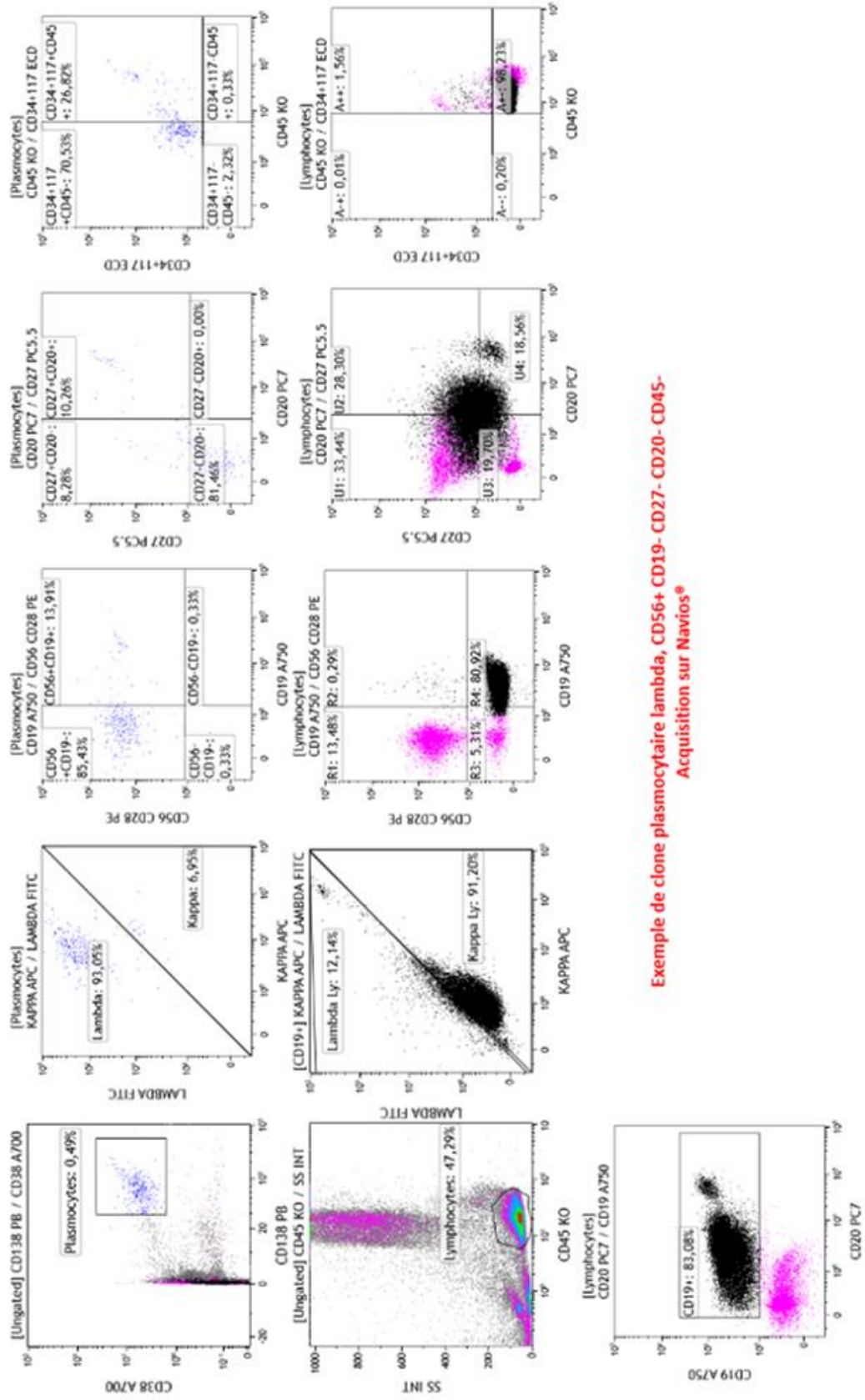
Exemple de patient avec plasmocytes polytypiques.
Acquisition sur Navios®



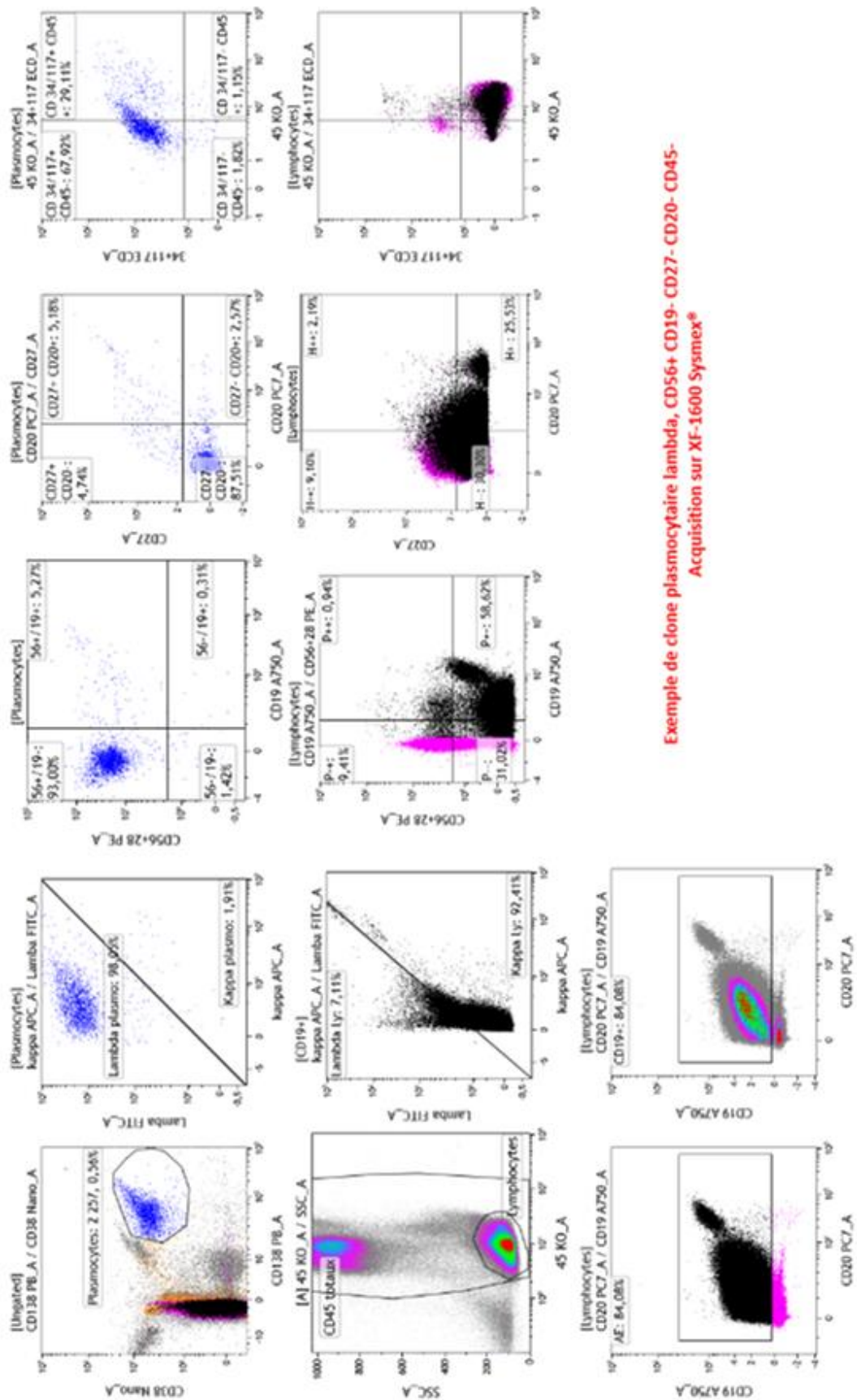
Exemple de patient avec plasmocytes polytypiques.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 96 : Exemple de plasmocytes polytypiques

Sur cet échantillon (figure 96), les rares plasmocytes retrouvés en CMF sont polytypiques. Représentant moins de 1% des cellules totales ces plasmocytes CD38+/CD138+ présentent une répartition des chaînes légères kappa et lambda équilibrée. Par ailleurs, on ne retrouve pas d'acquisition de marqueur de malignité tel le CD56, ou encore de perte du CD19 CD45 ou CD27. De plus, la population lymphocytaire est également polytypique ; les 13% de lymphocytes B CD19+/CD20+ présents (en noir) expriment de manière équilibrée les chaînes légères kappa et lambda.



Exemple de clone plasmocytaire lambda, CD56+ CD19- CD27- CD20- CD45- Acquisition sur Navios®



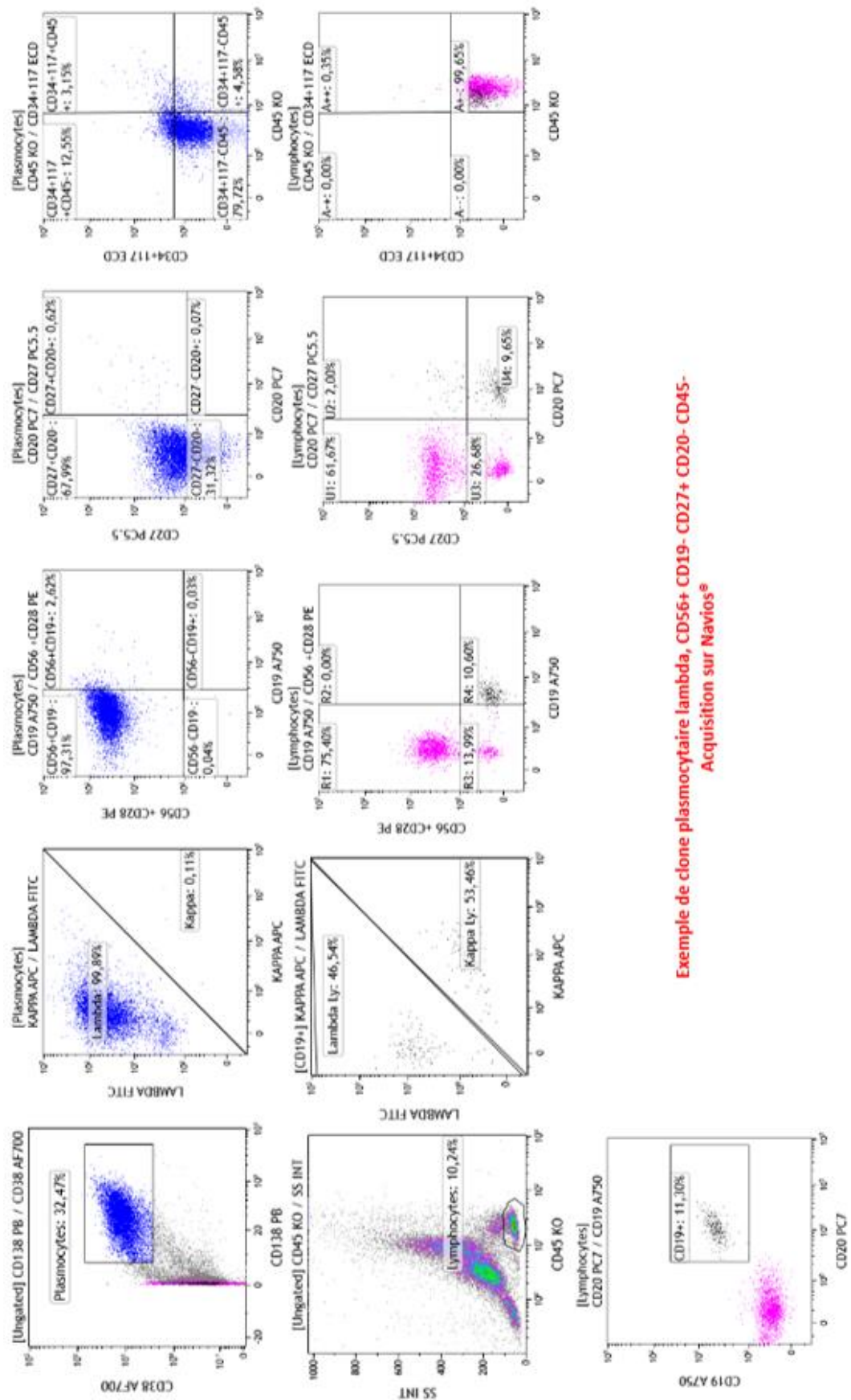
Exemple de clone plasmocyttaire lambda, CD56+ CD19- CD27- CD20- CD45-
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 97 : Comparaison d'images d'un clone plasmocyttaire lambda

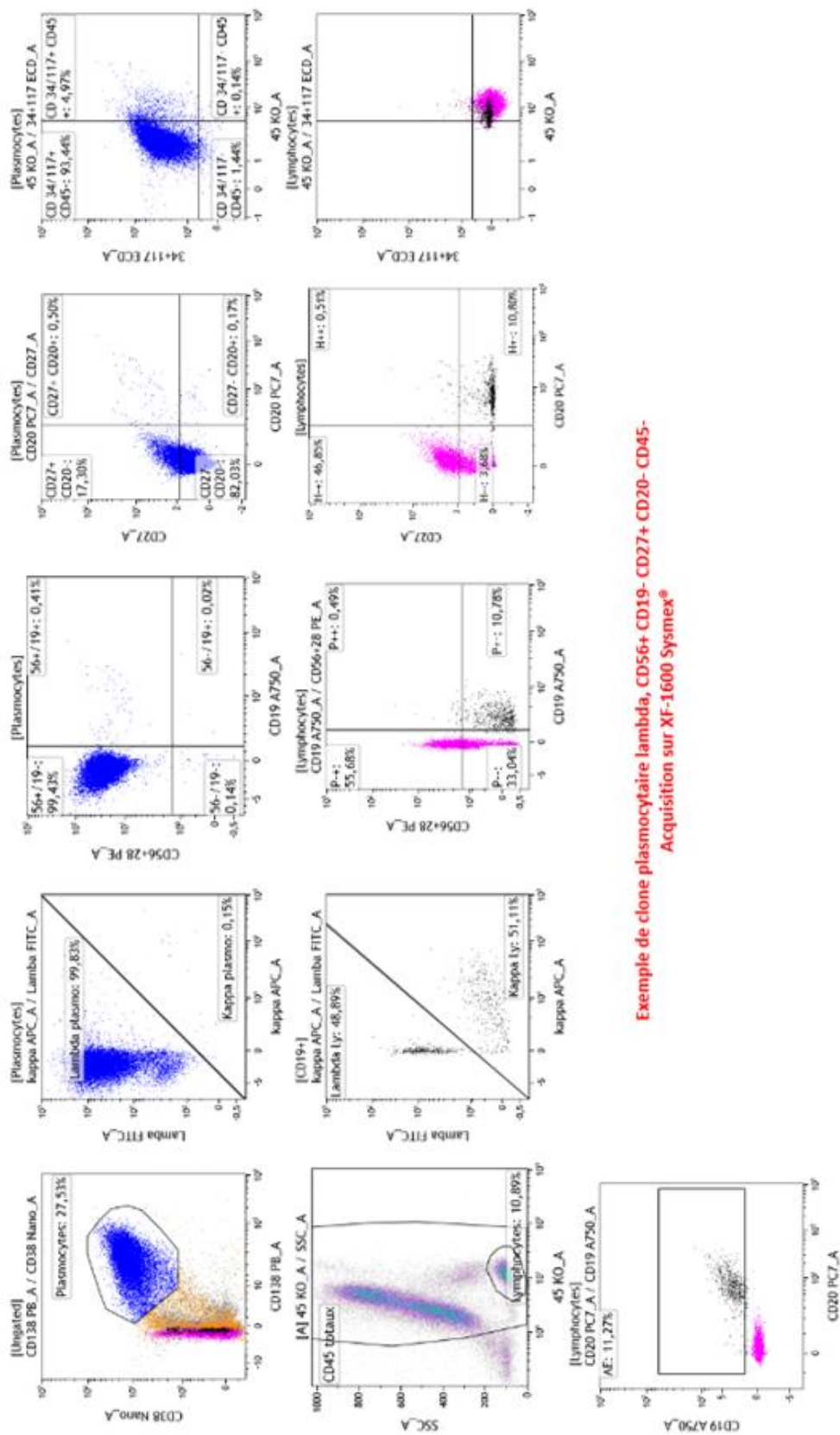
Pour ce patient (figure 97), le clone plasmocytaire isolé en CD38/CD138 est bien détecté après acquisition sur les deux automates. Il est estimé à environ 0.5% de la population totale. On remarque l'acquisition du CD56 et/ouCD28, ainsi que la perte du CD19 et du CD45. Cette population plasmocytaire est également CD20- et CD27-.

Par ailleurs, on remarque également les trois populations lymphocytaires en CD19/CD20. La population de lymphocytes non-B (en CD19-/CD20-) ainsi que deux populations bien distinctes (en noir) CD19+ correspondant aux lymphocytes B. L'une de ces populations possède une diminution d'expression du CD20. On remarque enfin que la population CD19+CD20+ est monotypique kappa.

Ce patient est en effet connu pour une LLC caractérisée par un clone B de monotypie kappa et CD20 faible.



Exemple de clone plasmocytaire lambda, CD56+ CD19- CD27+ CD20- CD45-
Acquisition sur Navios®



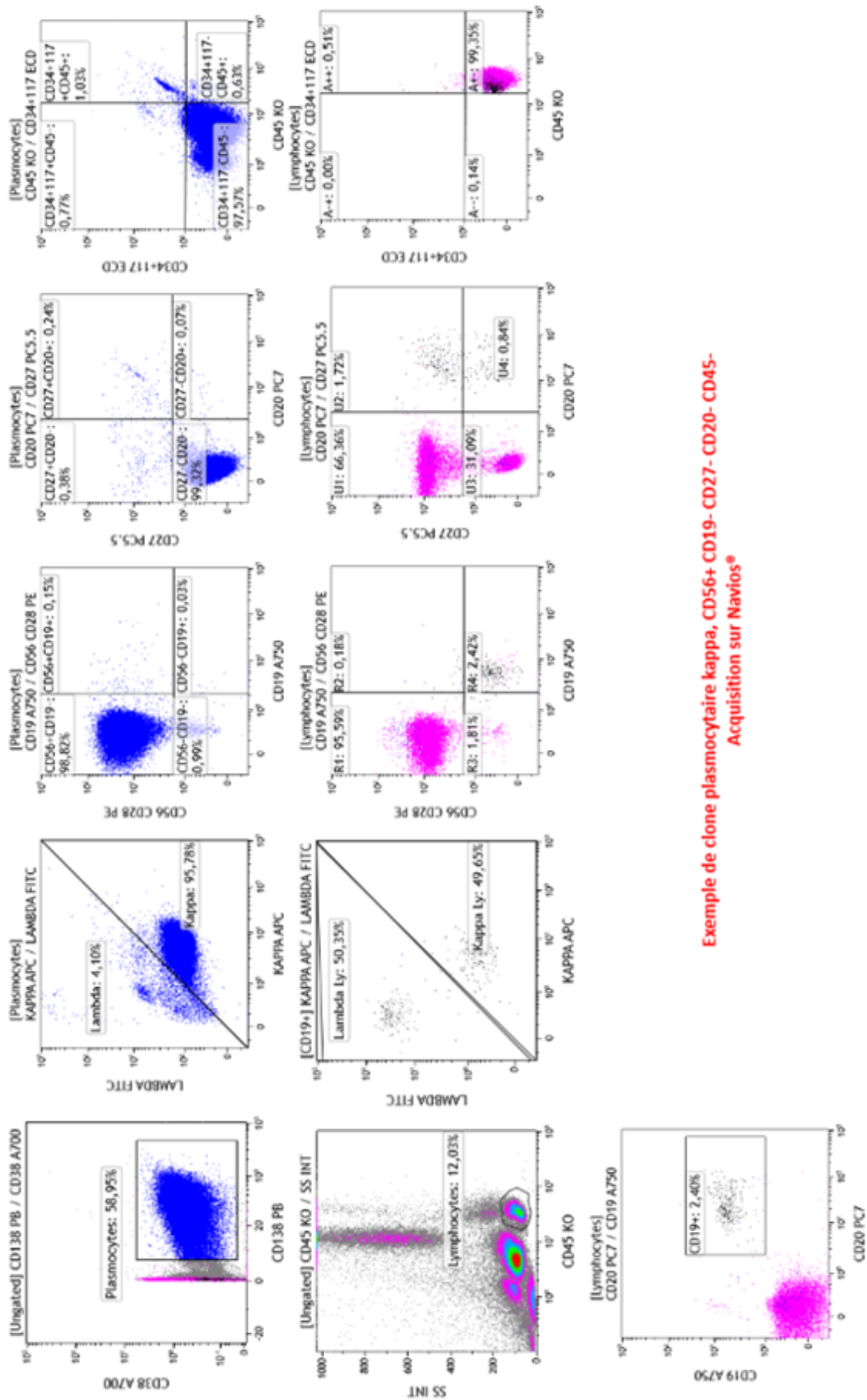
Exemple de clone plasmocytaire lambda, CD56+ CD19- CD27+ CD20- CD45-
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 98 : Comparaison d'images d'un clone plasmocytaire lambda (2)

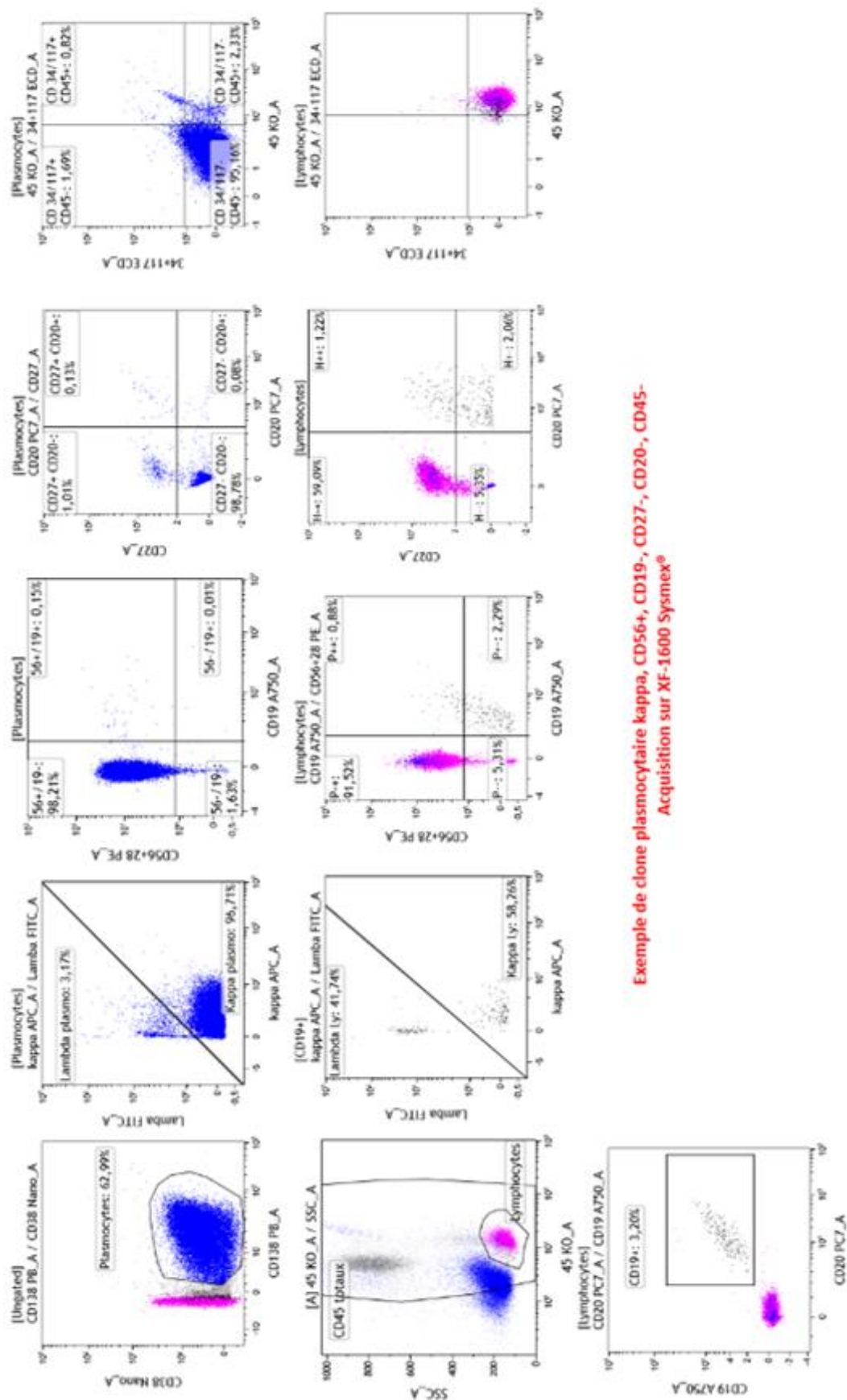
Cet échantillon (figure 98) est celui d'un clone plasmocytaire lambda représentant environ 30% de la population cellulaire totale. La population de plasmocytes (en bleu) est toujours isolée en CD38/CD138.

Ce clone plasmocytaire est également CD56+ et/ou CD28+, CD19-, CD20-, CD27-, et CD45-. On retrouve le même phénotype quel que soit le cytomètre utilisé. La population lymphocytaire est quant à elle polytypique.

Ce patient est connu et suivi pour un myélome multiple avec un clone plasmocytaire lambda.



Exemple de clone plasmocytaire kappa, CD56+ CD19- CD27- CD20- CD45-
Acquisition sur Navios®



**Exemple de clone plasmocytaire kappa, CD56+, CD19-, CD27-, CD20-, CD45-
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®**

Figure 99 : Exemple de clone plasmocytaire CD38-

Concernant cet exemple d'échantillon (figure 99), on remarque tout d'abord que la population plasmocytaire ne présente pas d'expression pour le CD38. Après investigations, il sera finalement conclu que ce défaut d'expression vient de l'anticorps utilisé (CD38 nano).

La population de plasmocytes représente ici environ 60% des cellules sanguines. Le clone plasmocytaire retrouvé était monotypique kappa, présentait une acquisition du CD56 et/ou du CD28, une perte d'expression des CD19, CD27 et CD45, et une absence d'expression du CD20.

Connu pour un myélome, il s'agit ici d'une évolution vers une leucémie à plasmocytes. En effet, avec une plasmocytose sanguine de 60% représentant 15.4 G/L de plasmocytes, ce patient rentre dans les critères diagnostic de Leucémie à Plasmocytes (PCL) (44).

V.5. Panel LMMC

V.5.1. Corrélation méthode quantitative

Concernant le panel LMMC, 33 échantillons patients ont pu être analysés en double.

Le résultat de corrélation entre les Navios® et le XF-1600 pour le panel LMMC est donné pour chacun des marqueurs étudiés et interprété grâce à des droites de régression ainsi que des diagrammes des différences.

Les équations des droites de régression ainsi que les R^2 pour les différents paramètres sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Corrélation panel LMMC

Paramètre étudié	Droite de régression	R^2
MO1	$y = 0.7198x + 25.985$	0.84402
MO2	$y = 0.689x + 1.6663$	0.85991
MO3	$y = 0.8286x + 0.5537$	0.61110
SLAN	$y = 0.713x + 0.0143$	0.93197
% Monocytes	$y = 1.0024x + 0.423$	0.97365

Les diagrammes des différences pour chacun des paramètres sont présentés ci-dessous (figure 100).

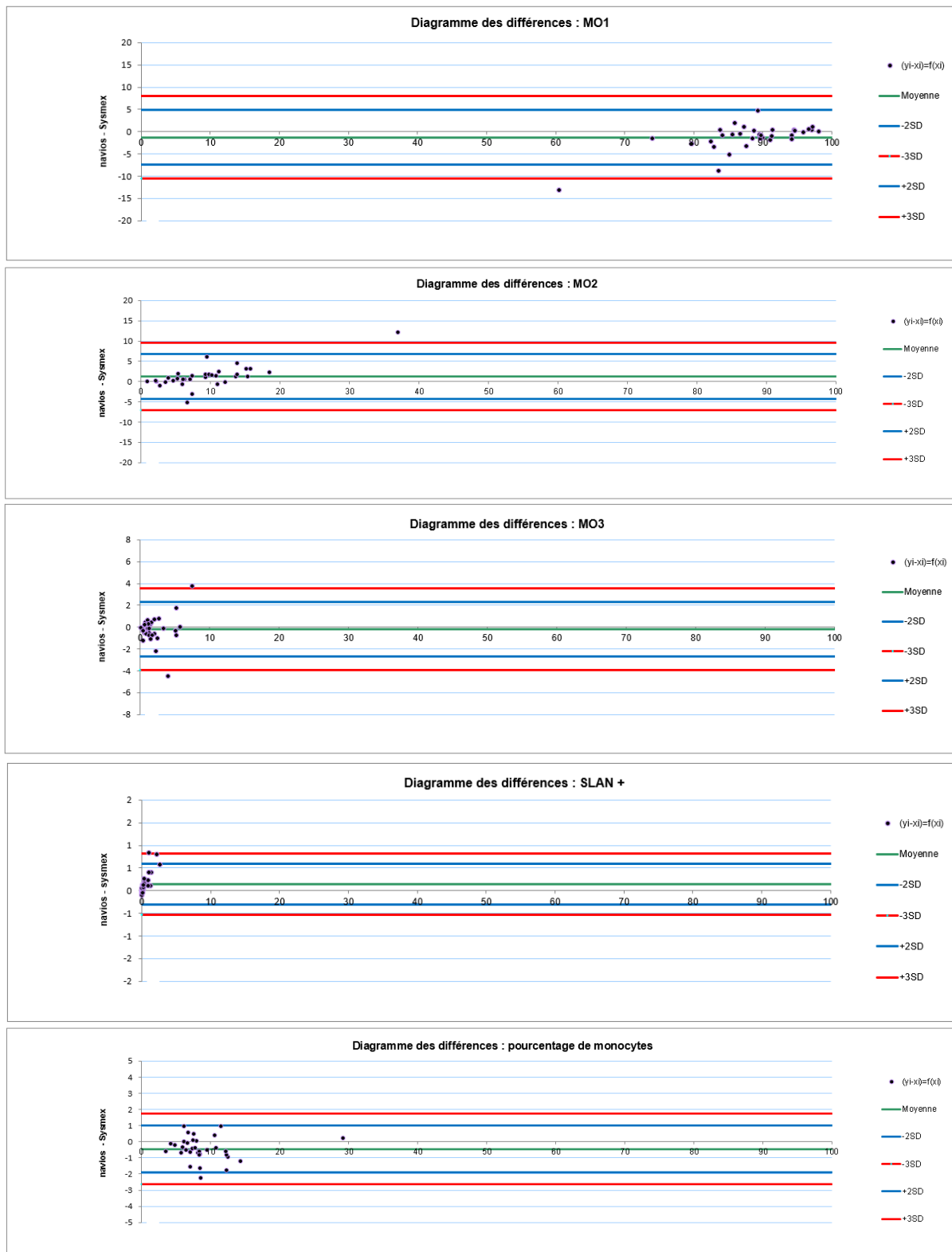


Figure 100 : Diagrammes des différences pour le panel LMMC

V.5.2. Corrélation méthode qualitative

Les conclusions possibles pour ce panel LMMC sont les suivantes :

- Absence d'augmentation de la fraction classique des monocytes, ce qui n'est pas en faveur d'une LMMC (37) (avec une spécificité 95.1% et une sensibilité de 91.9%) - Blood,2016.
- Augmentation de la fraction classique des monocytes, ce qui est en faveur d'une LMMC (37) (avec une spécificité 95.1% et une sensibilité de 91.9%) - Blood,2016.
- Même si le pourcentage de MO1 est inférieur au seuil diagnostique, la répartition des sous populations monocytaires est anormale ; en cas de taux de monocytes SLAN+ parmi les monocytes totaux inférieur à 1.7%, le profil est en faveur d'une LMMC en phase inflammatoire.

Pour le panel Covid 19 :

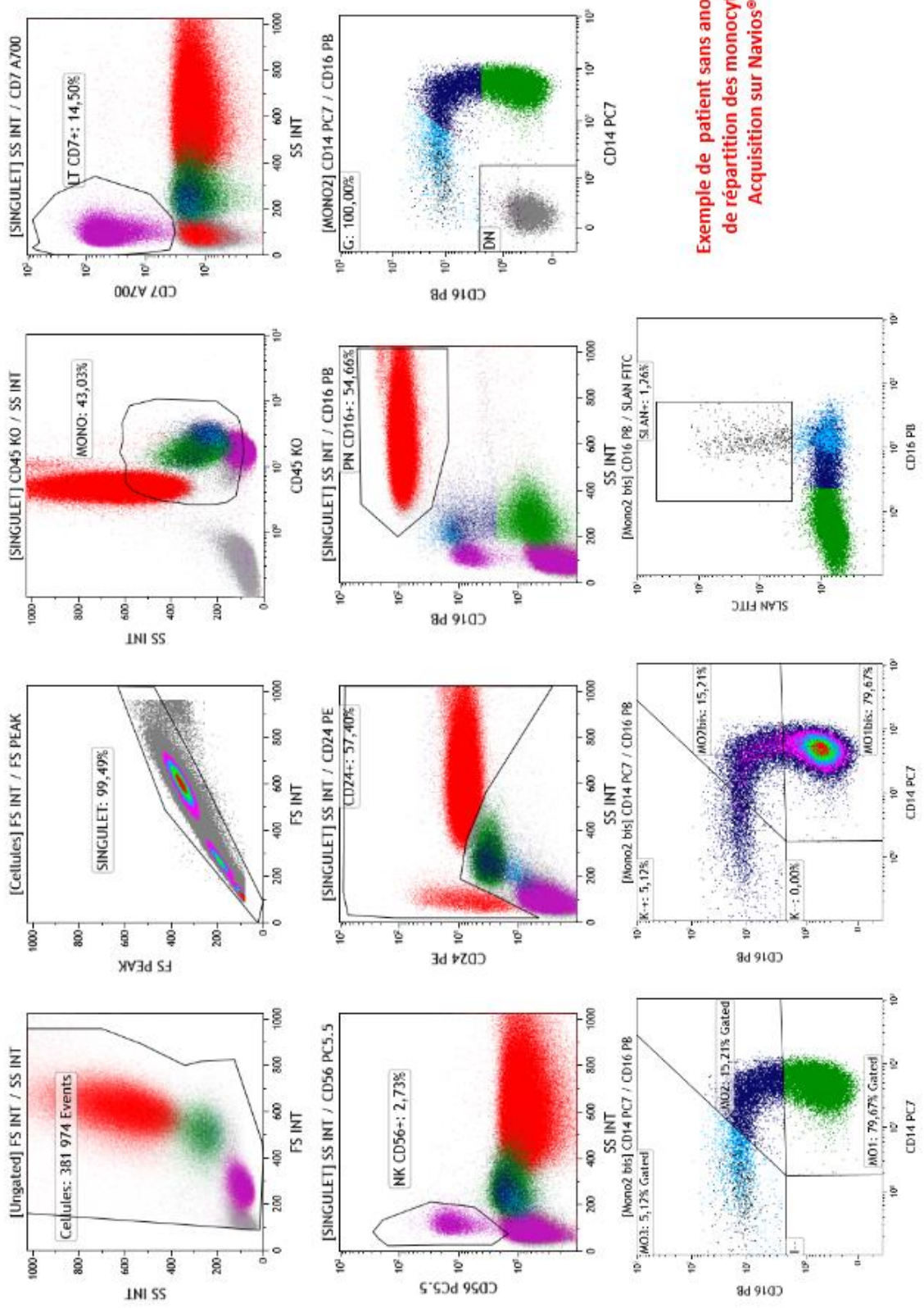
- Diminution des monocytes non classiques CD14 faible CD16+ corrélée avec une diminution des monocytes SLAN+
- Diminution des monocytes non classique CD14 faible CD16+ avec profil inflammatoire, corrélée avec une diminution des monocytes SLAN+
- Pas de diminution des monocytes non classiques CD14 faible CD16+ sans diminution des monocytes SLAN+

Concernant la concordance des interprétations biologiques pour ce panel LMMC, sur les 33 échantillons testés en double, le cytomètre XF-1600 a rendu une proportion de MO1> 94% pour 9 patients et une population MO1< 94% pour les 24 autres échantillons. De la même manière, le Navios à lui rendu un taux de MO1> 94% dans 9 cas et MO1< 94% dans 24 cas. De plus les cas avec une population MO1>94% sont les mêmes pour les deux cytomètres. Enfin, les interprétations biologiques pour les 33 patients sont identiques après passage sur les deux automates. La concordance des interprétations est identique pour tous les échantillons.

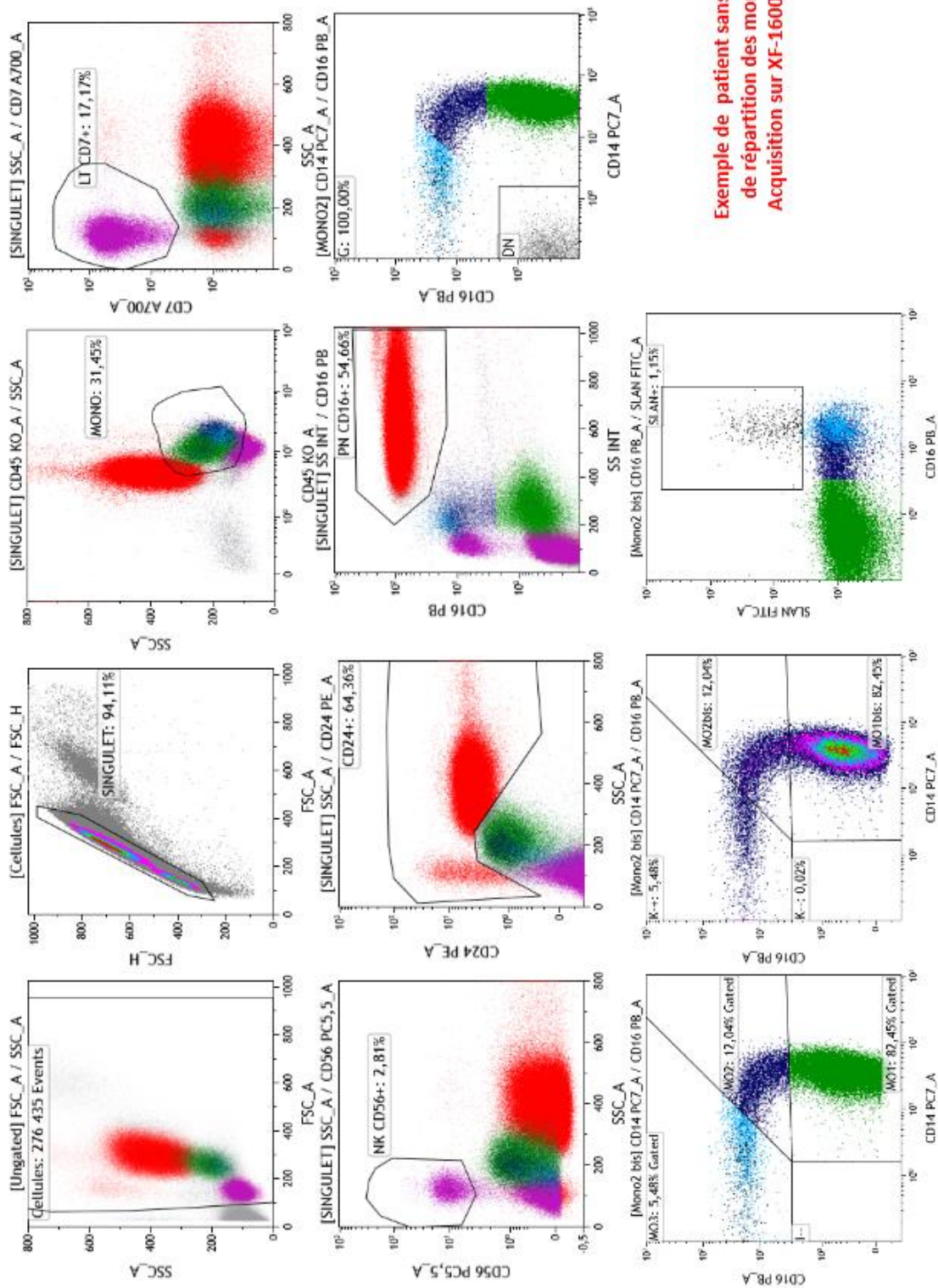
V.5.3. Exemples d'images

Les différentes situations pathologiques ainsi que non pathologiques retrouvées lors du passage des échantillons sont les suivantes :

- Patient avec une répartition des populations MO1, MO2 et MO3 normale. La population MO1 est inférieure à 94% (ici MO1=80%). De plus les monocytes SLAN + sont présents (figure 101).
- Patient avec profil compatible avec une LMMC. On observe bien la population MO1 en large excès (ici MO1=98%). On observe également la quasi-disparition des monocytes SLAN + (figure 102).
- Patient avec profil inflammatoire en « bulbe » des monocytes. Ici la séparation entre les populations MO1 et MO2 est impossible. Le taux de monocytes SLAN + est inférieur à 1.7% ce qui est en faveur d'une LMMC inflammatoire (figure 103).
- Patient avec une répartition des population monocytaires en faveur d'une LMMC. Cependant pour cet échantillon aucun autre critère en faveur d'une LMMC n'a été retrouvé, notamment sur la NFS. On remarque bien sur cet échantillon la population de polynucléaires éosinophiles CD24+ (CD24/SS) et CD16+ (CD16/SS). Cette population est colorée en violet et suis la répartition des granuleux colorés en rouge (figure 104).

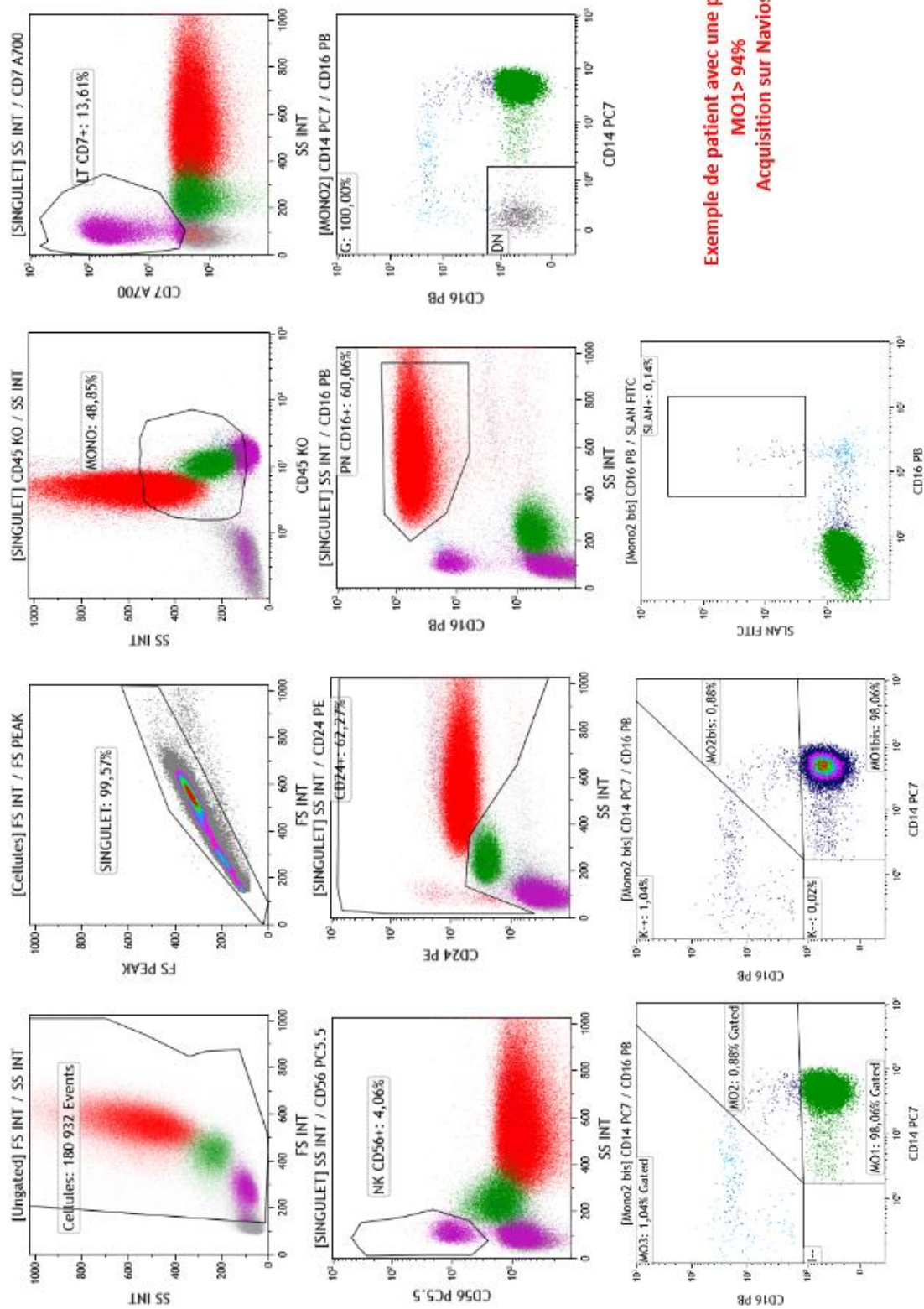


Exemple de patient sans anomalie de répartition des monocytes. Acquisition sur Navios®

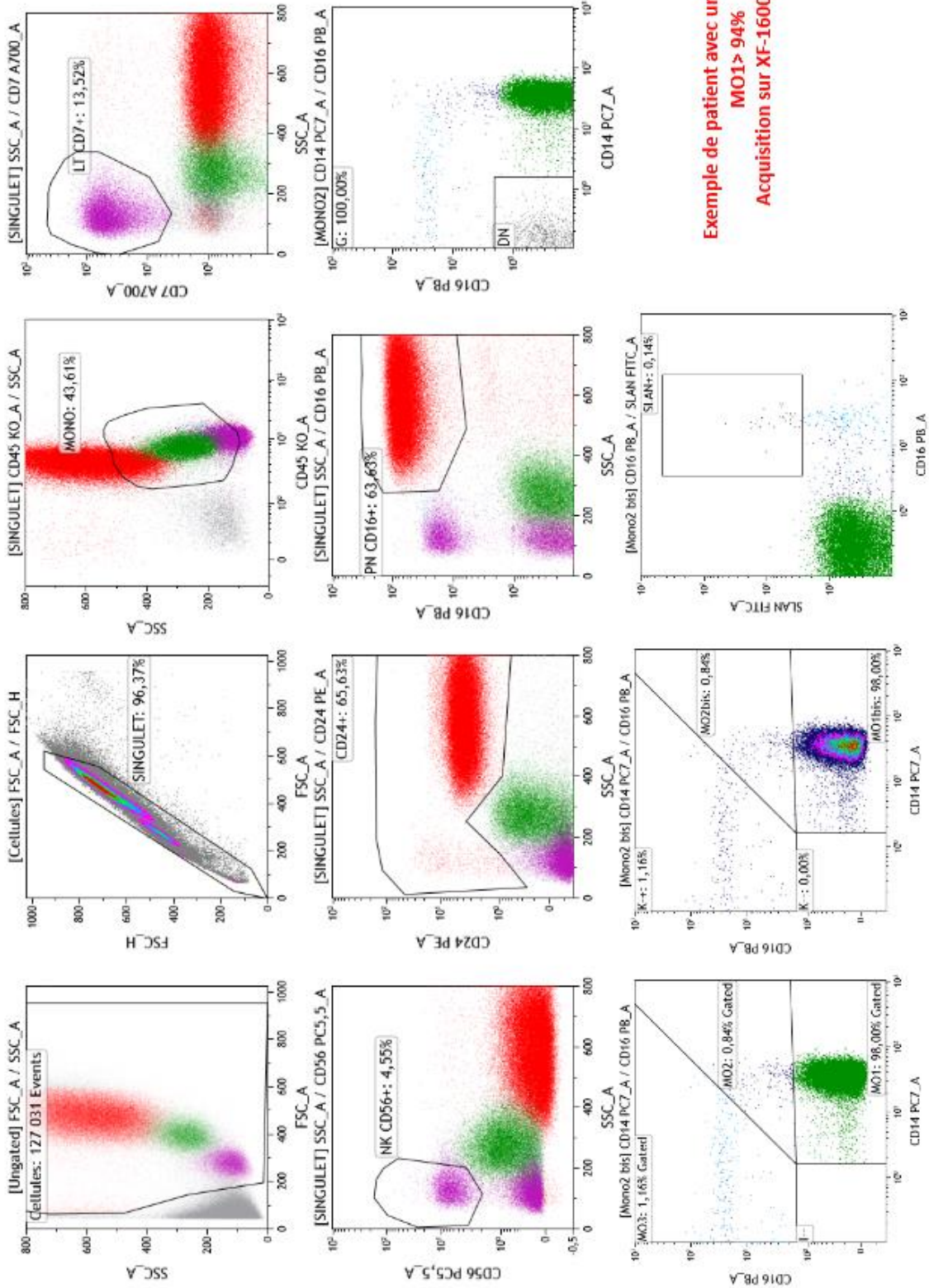


Exemple de patient sans anomalie de répartition des monocytes. Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 101 : Comparaison patient sain, MO1<94%

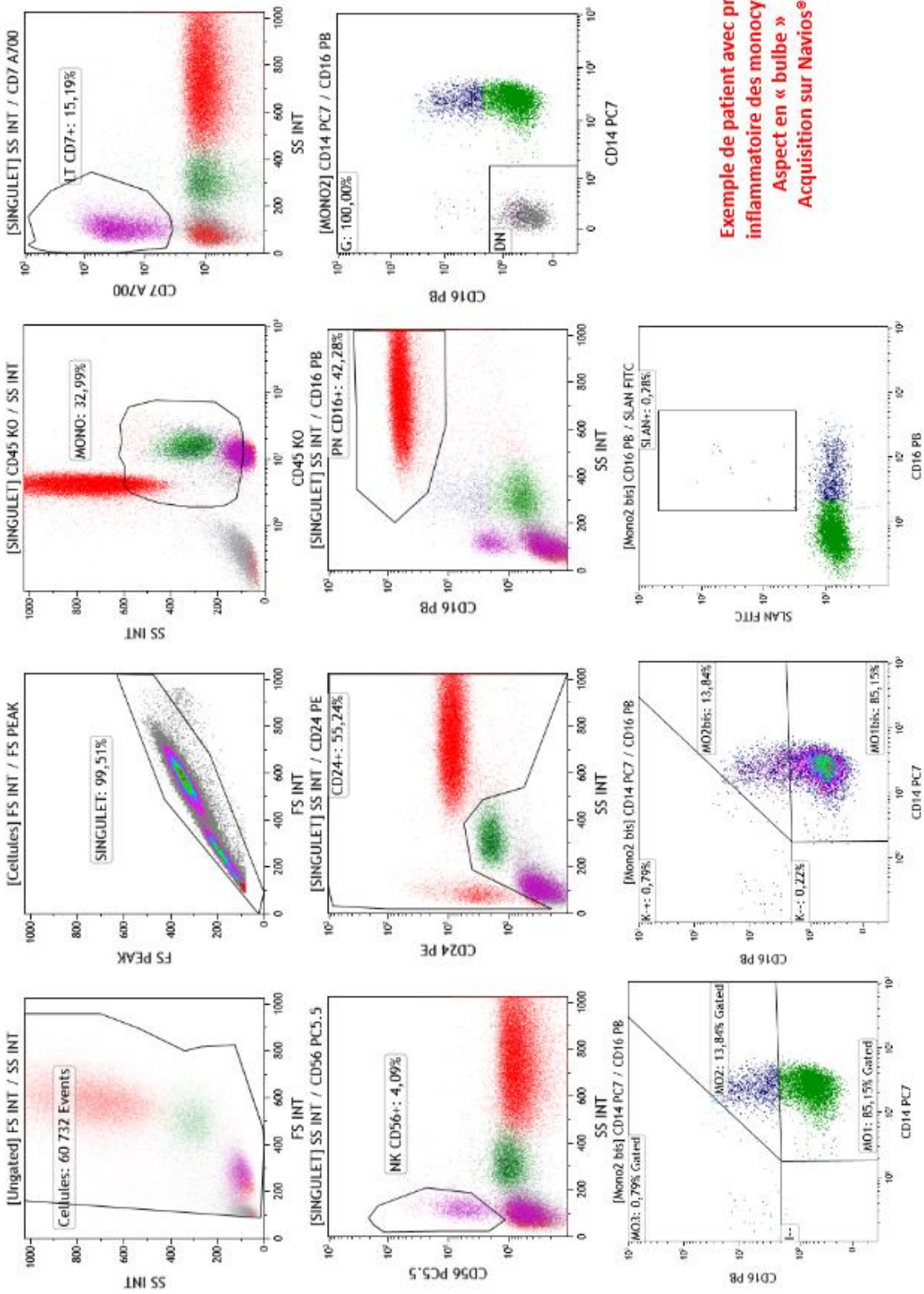


**Exemple de patient avec une population
MO1 > 94%
Acquisition sur Navios®**

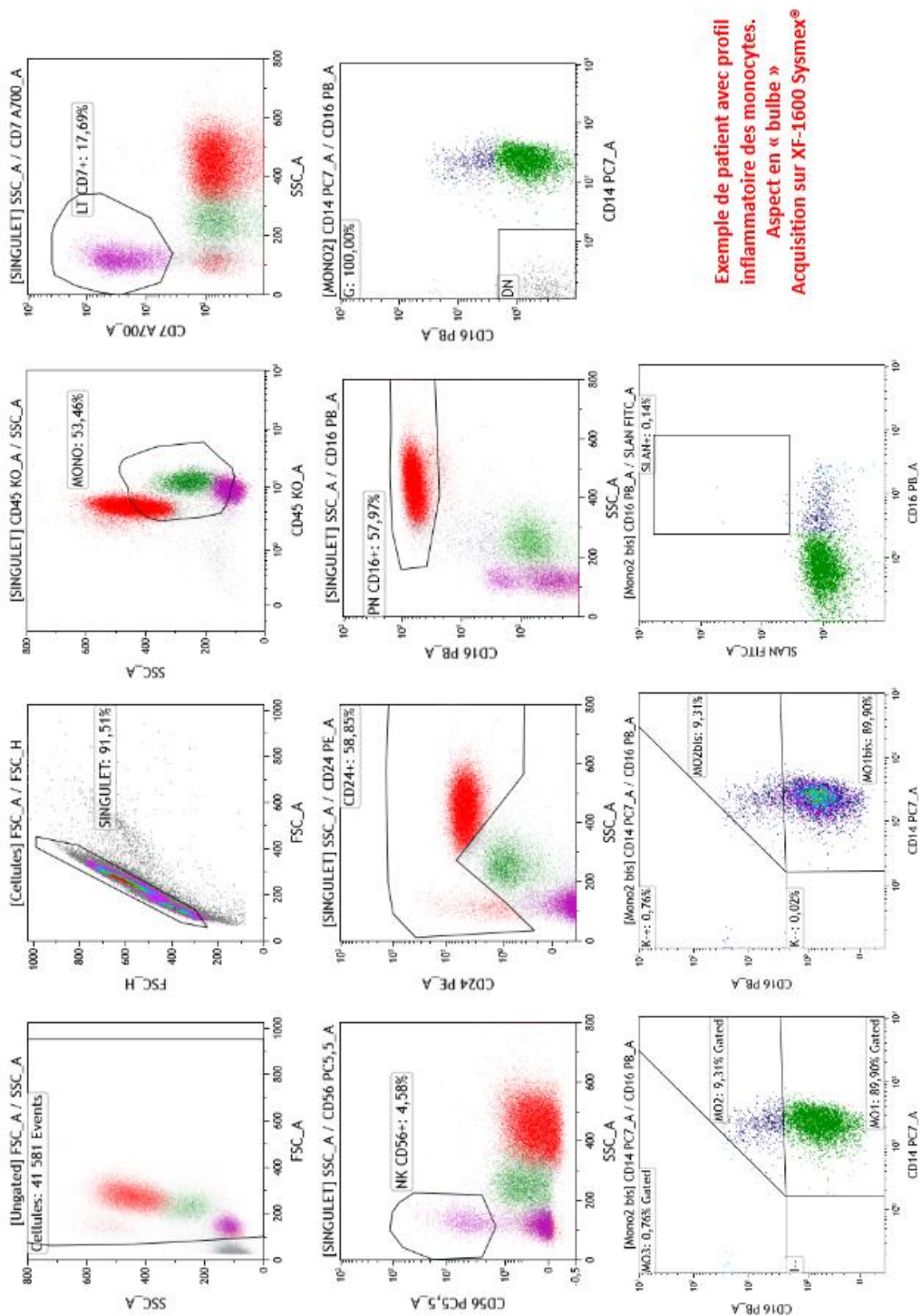


Exemple de patient avec une population MO1 > 94%
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 102 : Comparaison d'images, MO1 > 94%



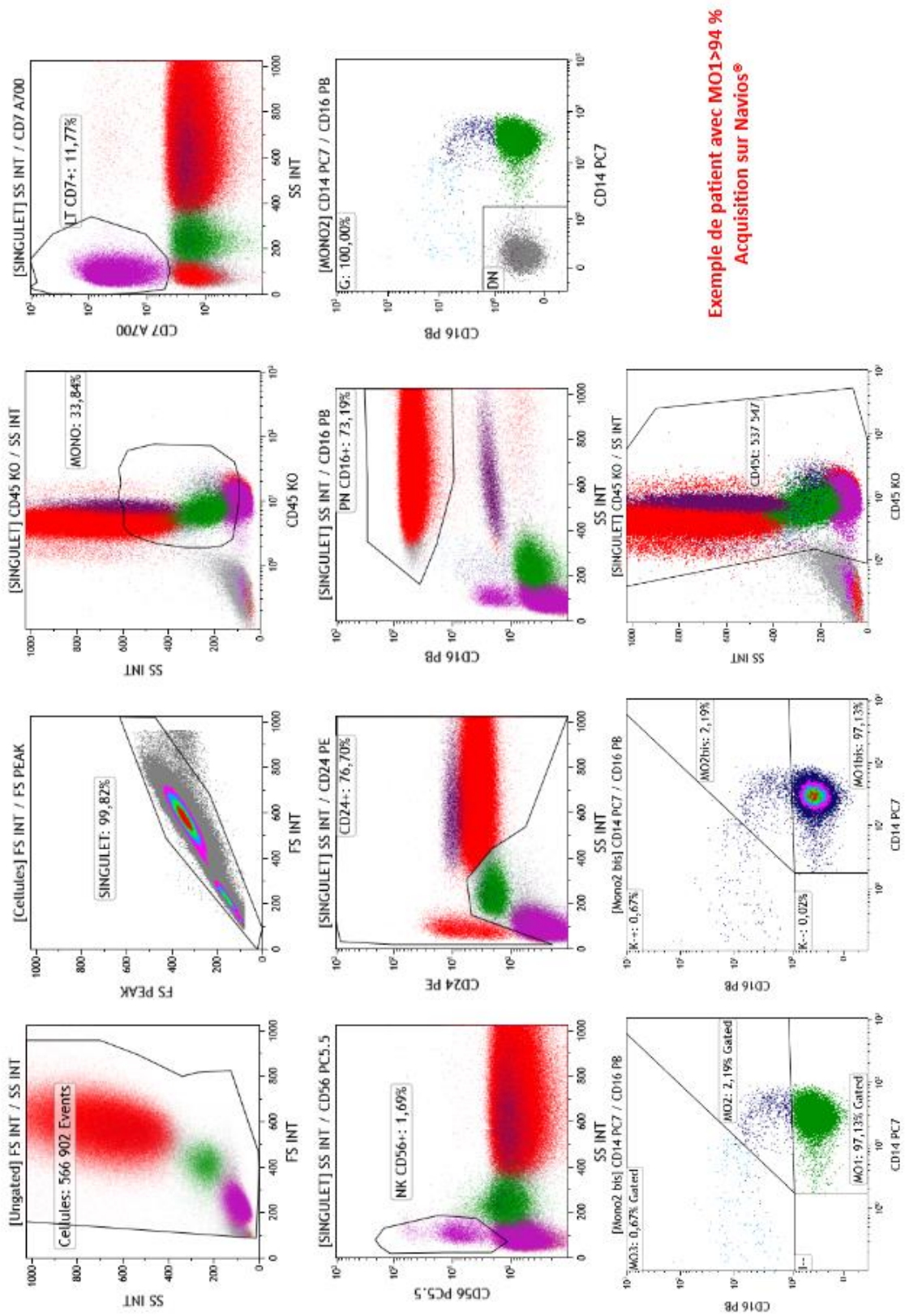
Exemple de patient avec profil inflammatoire des monocytes. Aspect en « bulbe » Acquisition sur Navios®



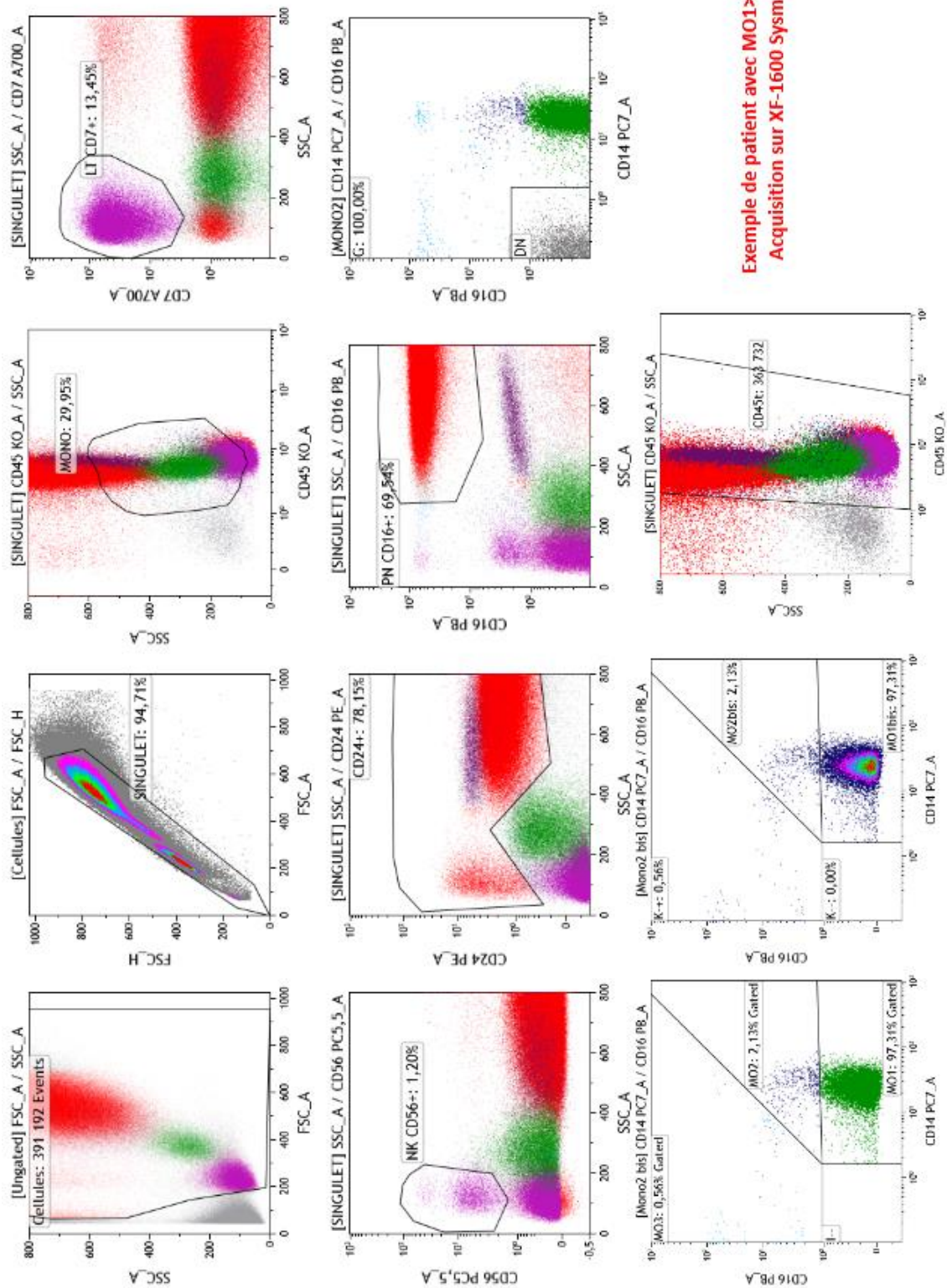
Exemple de patient avec profil inflammatoire des monocytes. Aspect en « bulbe »
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 103 : Comparaison profil inflammatoire en "bulbe" des monocytes.

On remarque bien sur cet échantillon la difficulté de séparation de populations MO1 et MO2, due à l'aspect en « bulbe » des monocytes.



Exemple de patient avec MO1>94 %
Acquisition sur Navios®



Exemple de patient avec MO1>94 %
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 104 : Comparaison profil compatible avec LMMC, MO1>94%

V.6. Panel Leucémie aigue

V.6.1. Corrélation méthode qualitative

Concernant le panel Leucémie Aigüe, 15 échantillons de patients ont pu être analysés en double.

Les résultats de corrélation entre les Navios® et le XF-1600 Sysmex® pour ce panel sont donnés pour chaque marqueur étudié et sont interprétés grâce à une droite de régression ainsi que des diagrammes des différences.

Les équations des droites de régressions pour chacun des paramètres testés sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Corrélation panel LA

Paramètre étudié	Droite de régression	R ²
Blastes	$y = 0,9902x + 1,3217$	0,98713
CD7+56	$y = 0,9892x - 3,0432$	0,97944
CD13	$y = 1,0583x + 1,1421$	0,95078
HLA-DR	$y = 0,9832x - 1,7493$	0,95027
CD33	$y = 0,9917x + 3,2602$	0,98110
CD38	$y = 0,8315x + 16,703$	0,74673
CD34	$y = 0,9483x - 0,5513$	0,93929
CD10	$y = 0,6644x + 34,104$	0,47291
CD19	$y = 0,9376x + 1,9067$	0,97637
CD117	$y = 0,8952x + 1,5703$	0,94438

Les diagrammes des différences pour chacun des paramètres testés sont présentés ci-dessous (figures 105 et 106).

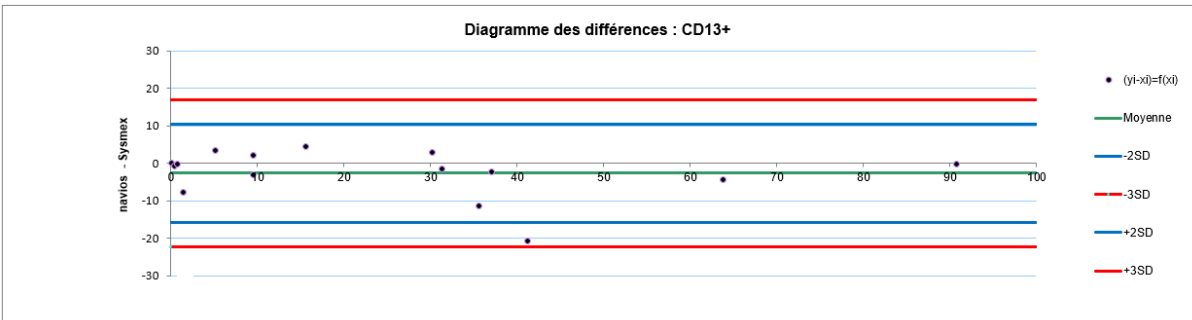
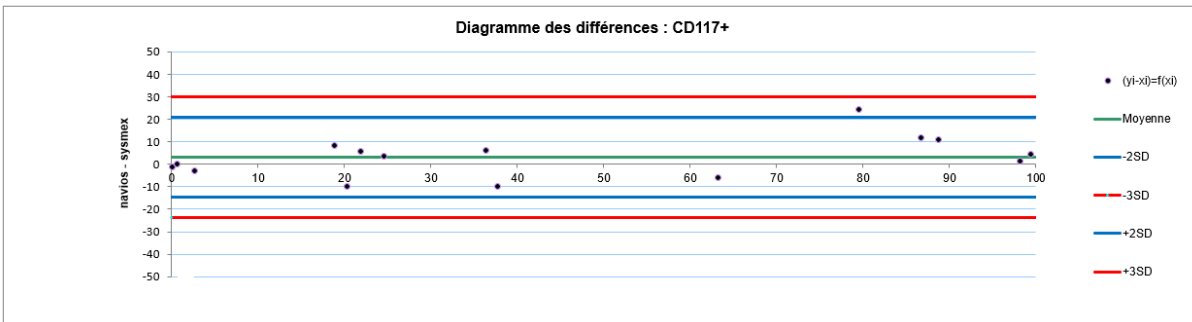
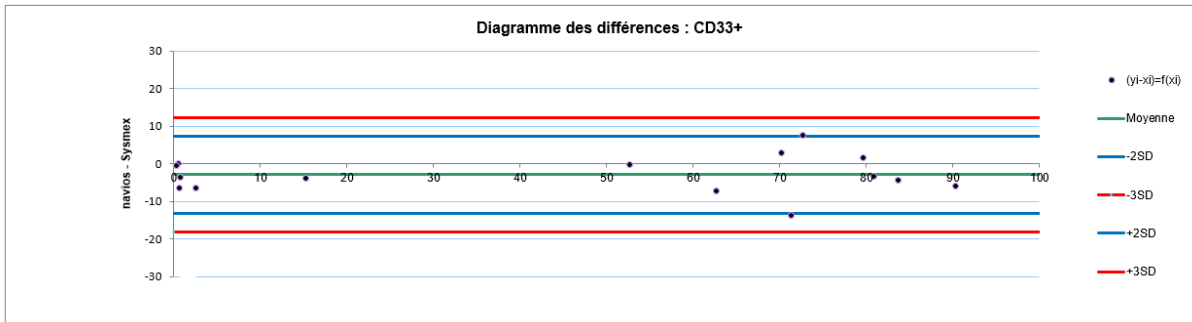
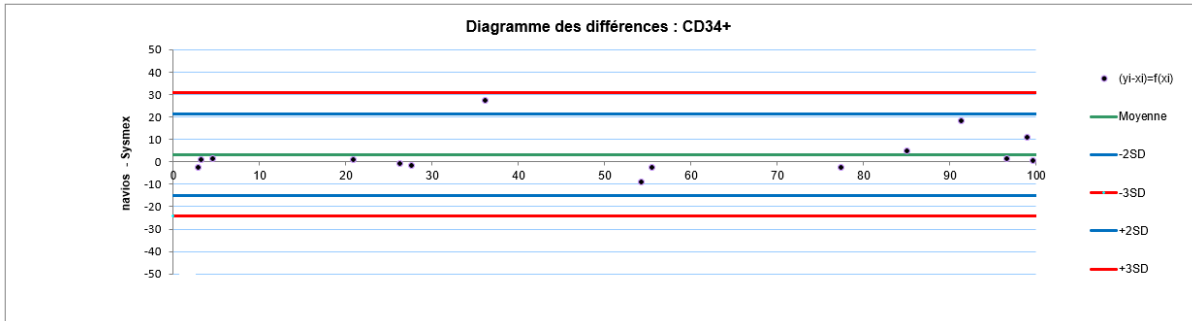
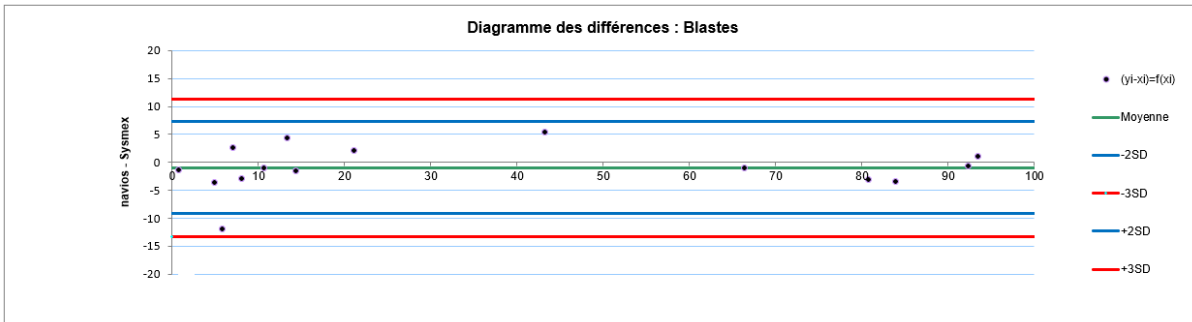


Figure 105 : Diagrammes des différences pour le panel LA (1)

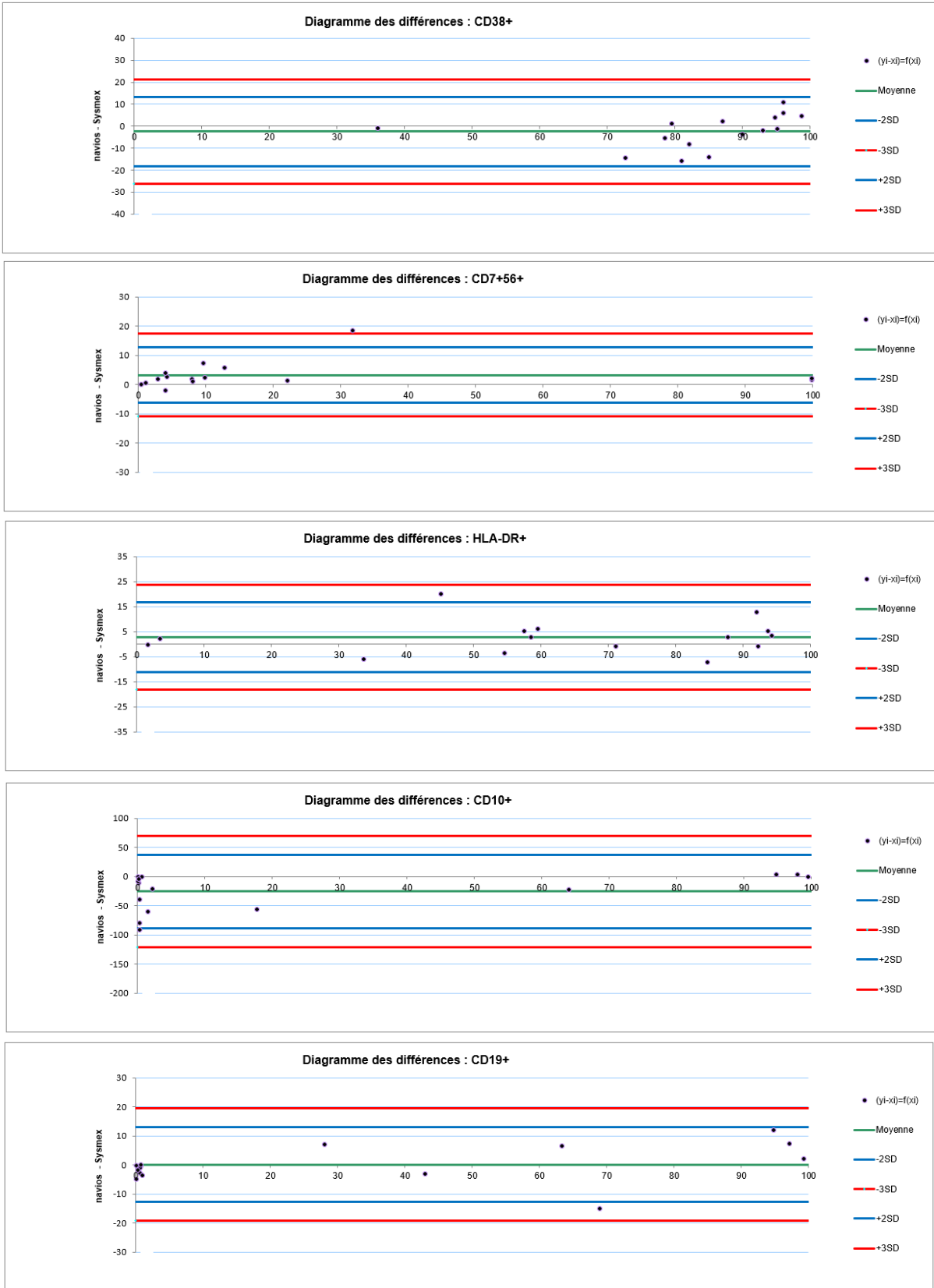


Figure 106 : Diagrammes des différences pour le panel LA (2)

V.6.2. Corrélation méthode qualitative

Le tableau ci-dessous représente les différents phénotypes de la population blastique retrouvée dans l'échantillon après acquisition sur chacun de deux cytomètres. La présence de blastes est notée (+), l'absence de ces derniers est notée (-). Il en est de même pour le phénotype : présence du marqueur (+) ou absence de celui-ci (-). Les cas discordants sont surlignés en jaune. Ils correspondent à des échantillons pour lesquels le XF-1600 retrouve la présence du CD10 sur la population blastique contrairement au Navios.

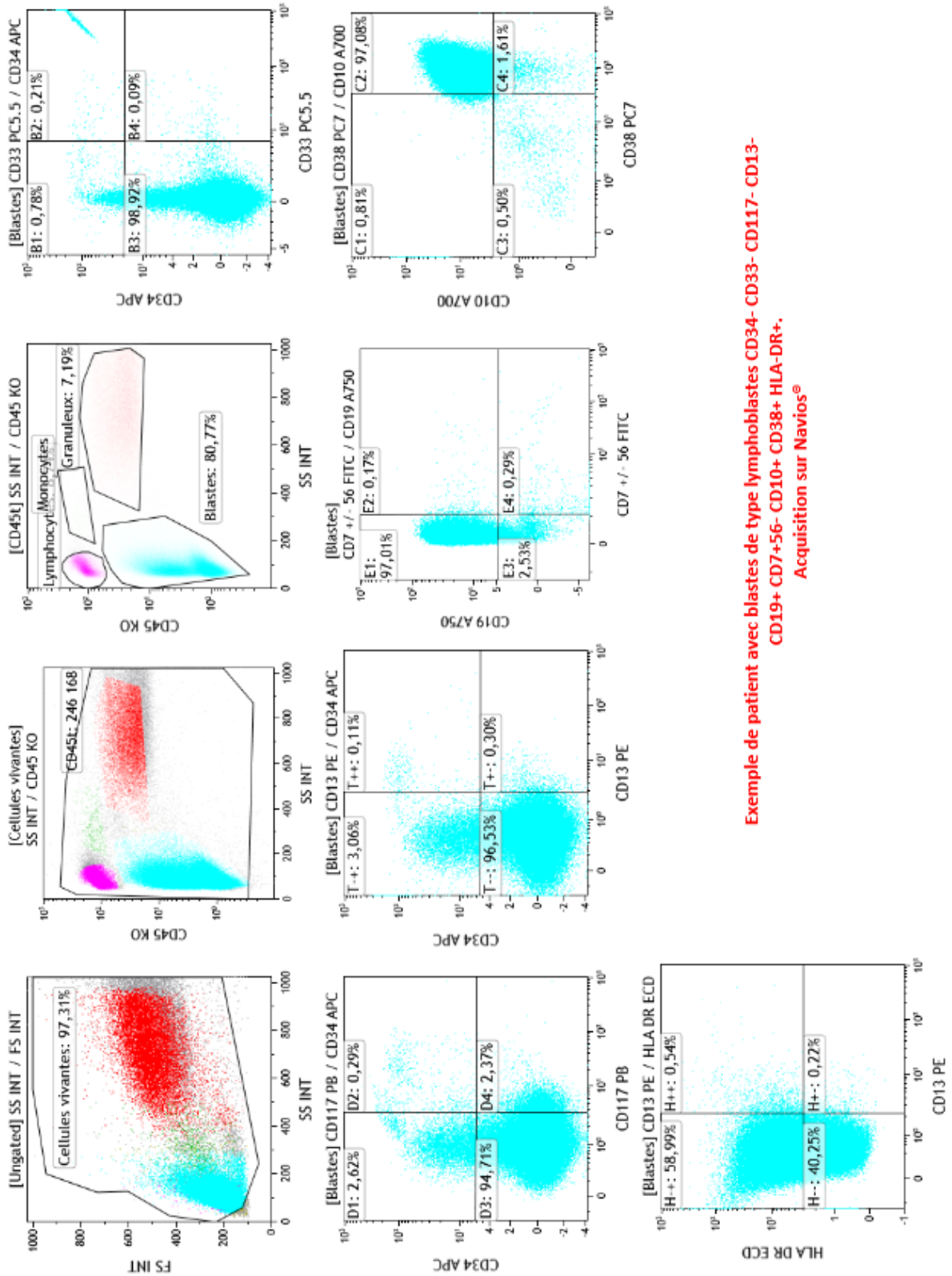
Tableau 9 : Corrélation qualitative pour le panel LA

Num échantillon	Blastes		CD33		CD13		CD117		CD34	
	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600
1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
3	-	-								
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-								
6	-	-								
7	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
9	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
10	-	-								
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Num échantillon	CD19		CD7+56		CD10		CD38		HLA-DR	
	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600	Navios	XF-1600
1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3										
4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
5										
6										
7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10										
11	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

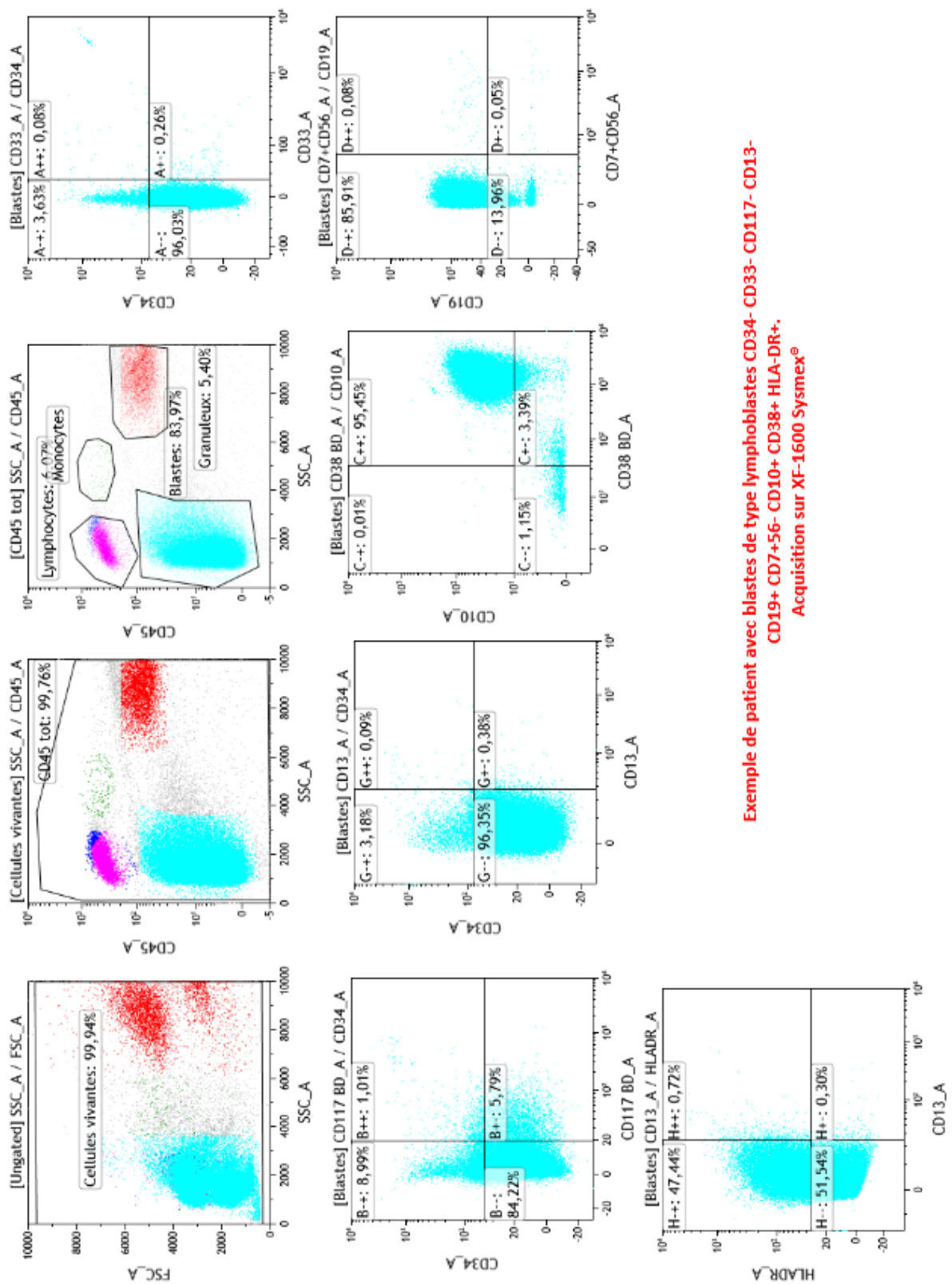
V.6.3. Exemples d'images

Différentes situations rencontrées lors du passage en double des échantillons sont présentées ci-dessous :

- Exemple de population lymphoblastique B CD34- représentant 80.5% des cellules (figure 107).
- Exemple de population lymphoblastique B CD34 d'expression forte représentant 85% des cellules (figure 108).
- Exemple de population blastique biphénotypique : lymphoblastique T et myéloïde représentant 90% des cellules (figure 109).
- Exemple de population myéloblastique (figure 110).
- Exemple d'hématogones (figure 111).



Exemple de patient avec blastes de type lymphoblastes CD34- CD33- CD117- CD13- CD19+ CD7+56- CD10+ CD38+ HLA-DR+.
Acquisition sur Navios®



Exemple de patient avec blastes de type lymphoblastes CD34- CD33- CD117- CD13- CD19+ CD7+56- CD10+ CD38+ HLA-DR+.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 107 : Exemple de population blastique B

Sur cet exemple (figure107), correspondant à une patiente de 7 ans, on retrouve en CMF la population blastique (en turquoise) CD45faible. Elle représente environ 80% des cellules totales.

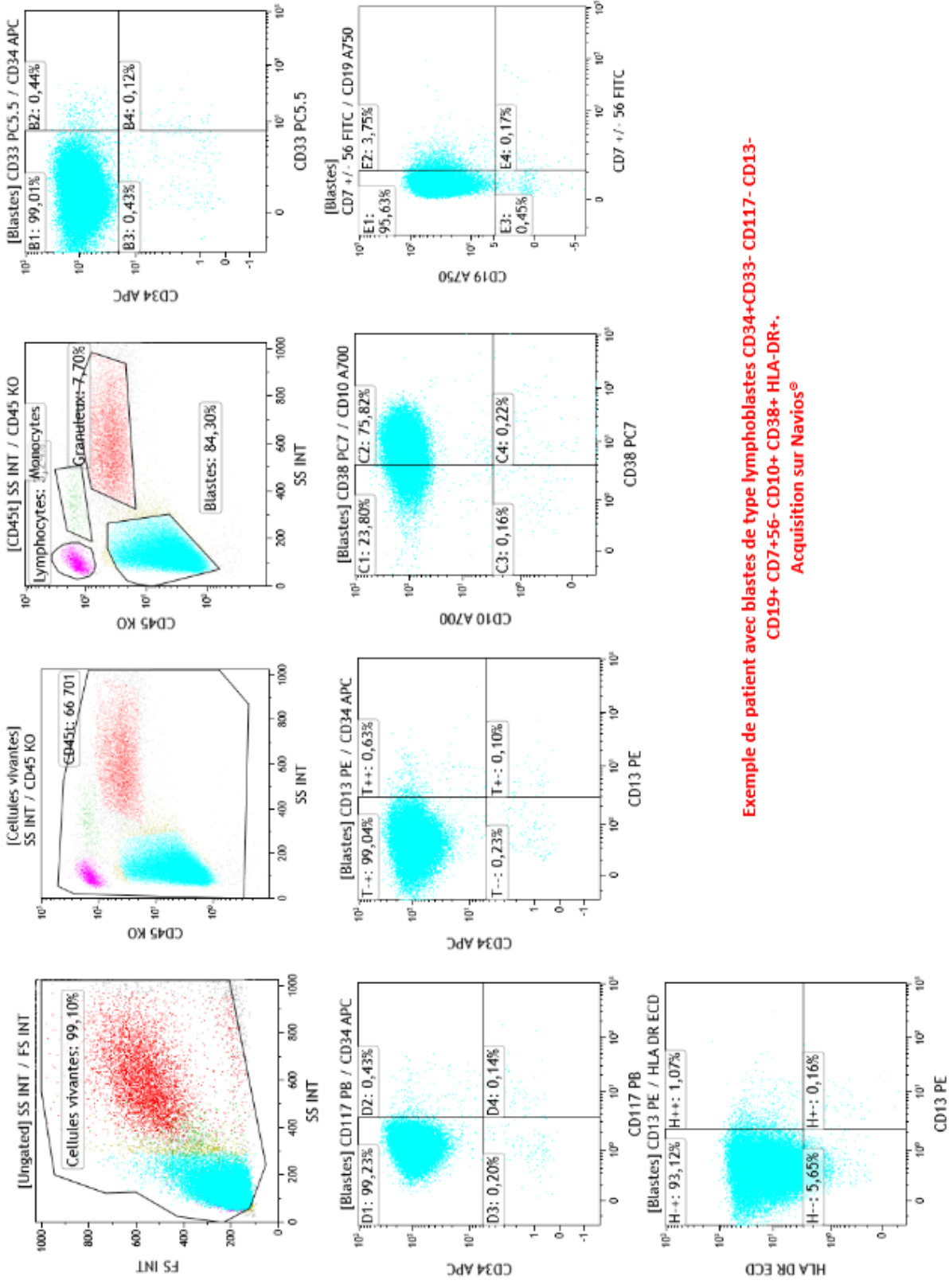
Concernant cette population blastique, on retrouve le marqueur d'appartenance à la lignée lymphoïde B : le CD19.

En revanche aucun des marqueurs de la lignée myéloïde ne sont exprimés par cette population blastique : les CD13, CD33 et CD117 sont négatifs.

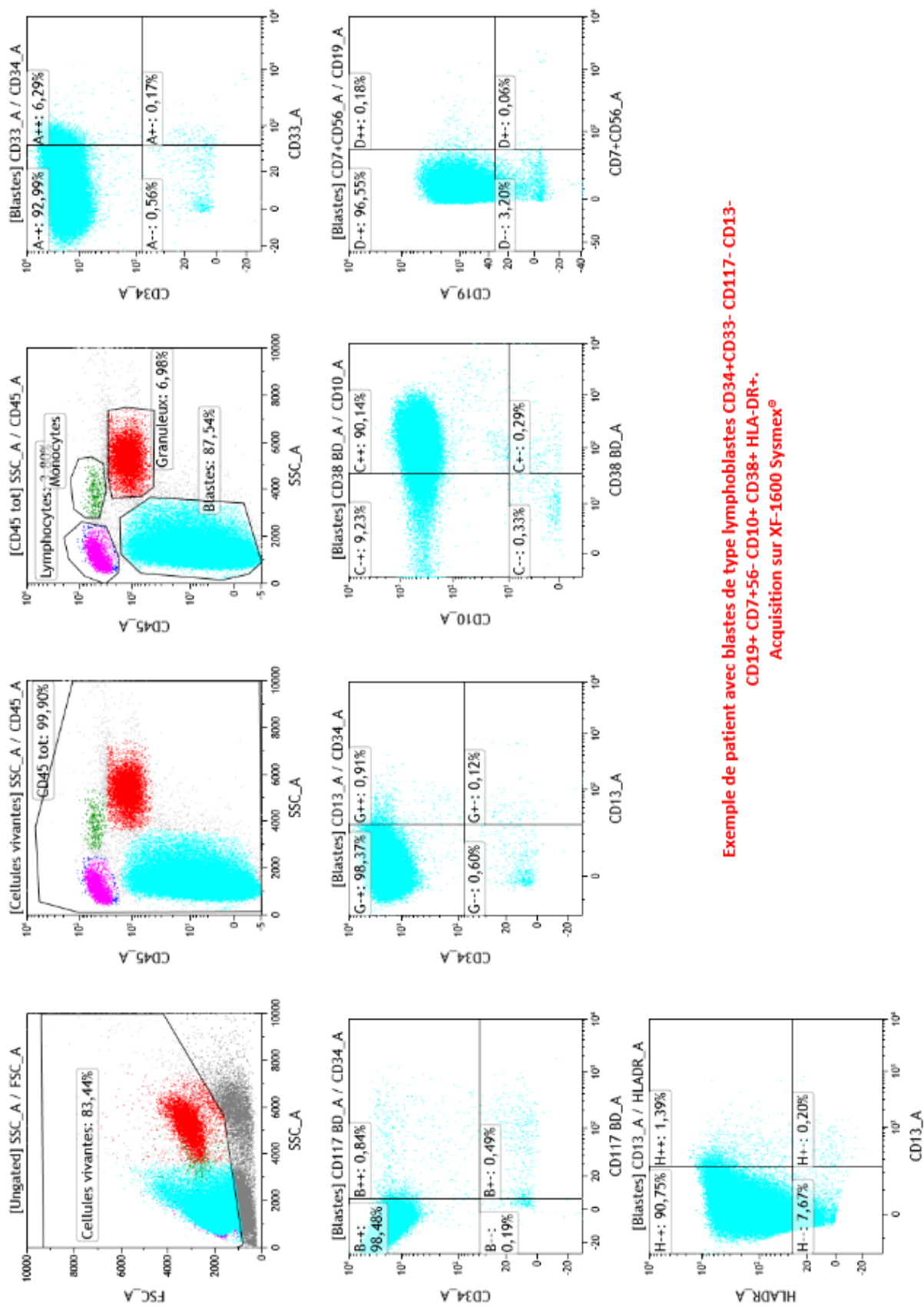
Par ailleurs on retrouve le CD38 et le CD10, fréquemment retrouvés sur ces populations blastiques, ainsi que le HLA-DR positif.

Le CD7 et le CD56 sont négatifs, écartant ainsi une appartenance à la ligné T ou NK. La suite de l'immunophénotypage réalisé sur d'autres panels d'anticorps non testés ici permet la classification en LAL préBII TdT+,CD19+, CD10+ et c IgM- (40).

Le frottis médullaire retrouvait quant à lui une blastose estimée à 88.5% et ces blastes étaient de type lymphoblastique.



Exemple de patient avec blastes de type lymphoblastes CD34+CD33- CD117- CD13- CD19+ CD7+56- CD10+ CD38+ HLA-DR+.
Acquisition sur Navios®

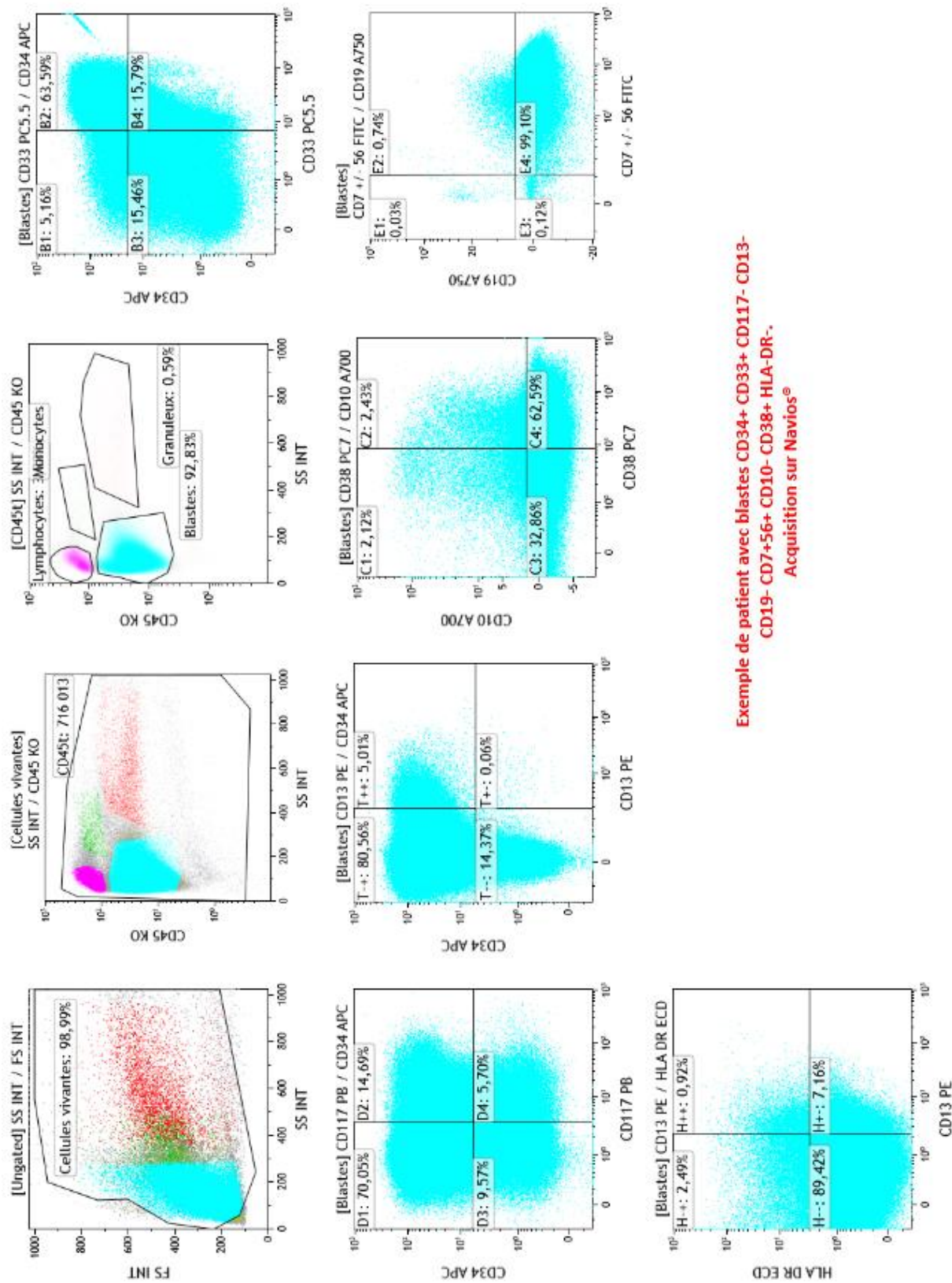


Exemple de patient avec blastes de type lymphoblastes CD34+CD33- CD117- CD13- CD19+ CD7+56- CD10+ CD38+ HLA-DR+.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®

Figure 108 : Exemple de population blastiques B avec expression forte du CD34

Il s'agit ici d'un autre exemple de patient atteint de Leucémie Aigüe Lymphoblastique B (LAL-B) (figure 108). En effet la population blastique CD45faible est représentée à hauteur de 85% environ. On retrouve ici un CD34 d'expression forte. Le marqueur de lignée B (CD19) est positif, ainsi que le CD38, CD10 et le HLA-DR. En revanche aucun des marqueurs d'appartenance à la lignée myéloïde n'est exprimé sur cette population blastique : CD13, CD33 et CD117 sont tous les trois négatifs.

La cytologie médullaire retrouvait une blastose estimée à 89%, avec blastes de type lymphoblastes.



**Exemple de patient avec blasts CD34+ CD33+ CD117- CD13-
CD19- CD7+56+ CD10- CD38+ HLA-DR-.**
Acquisition sur Navios®

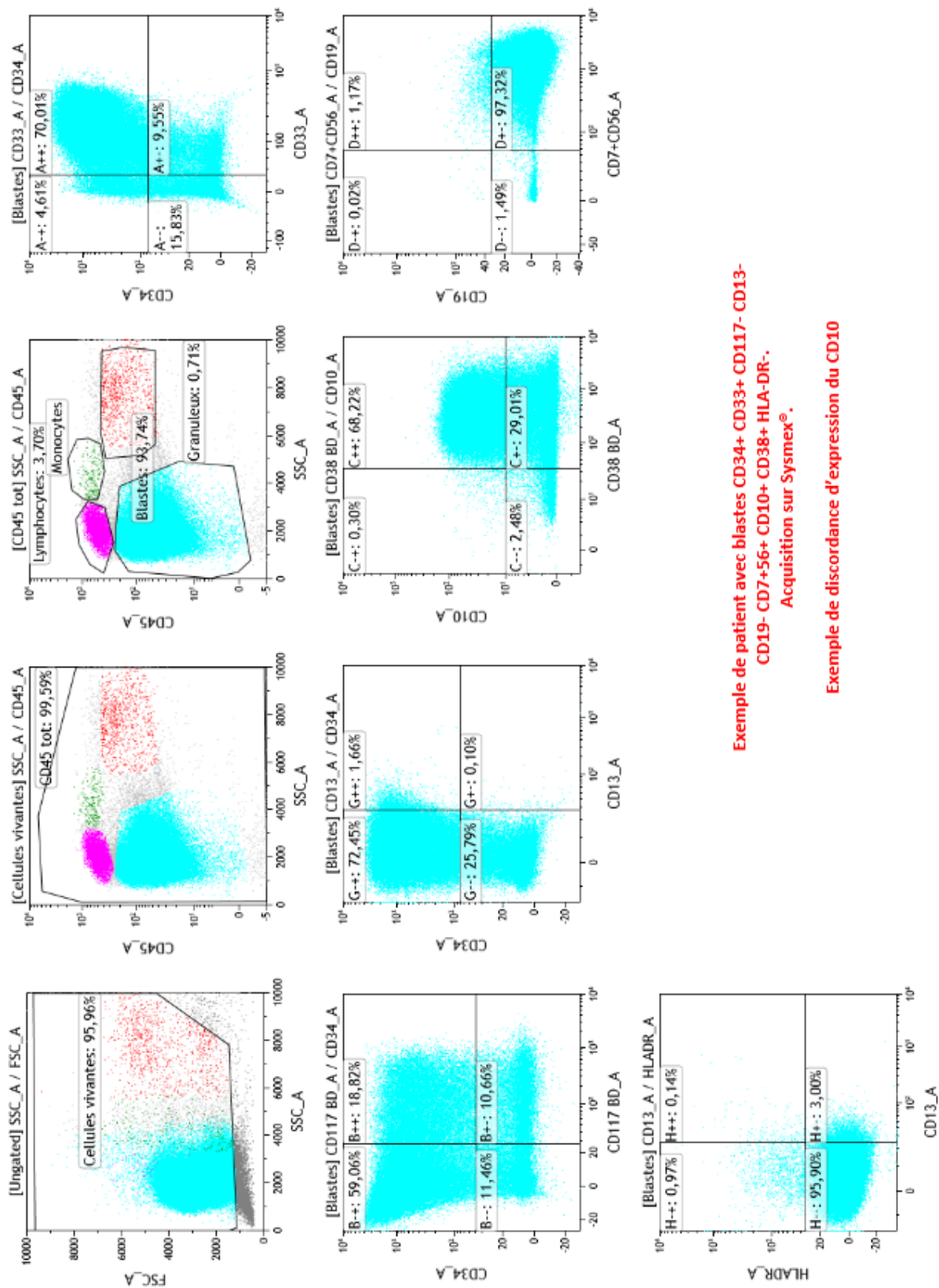


Figure 109 : Exemple de population blastique biphenotypique (T et myeloïde)

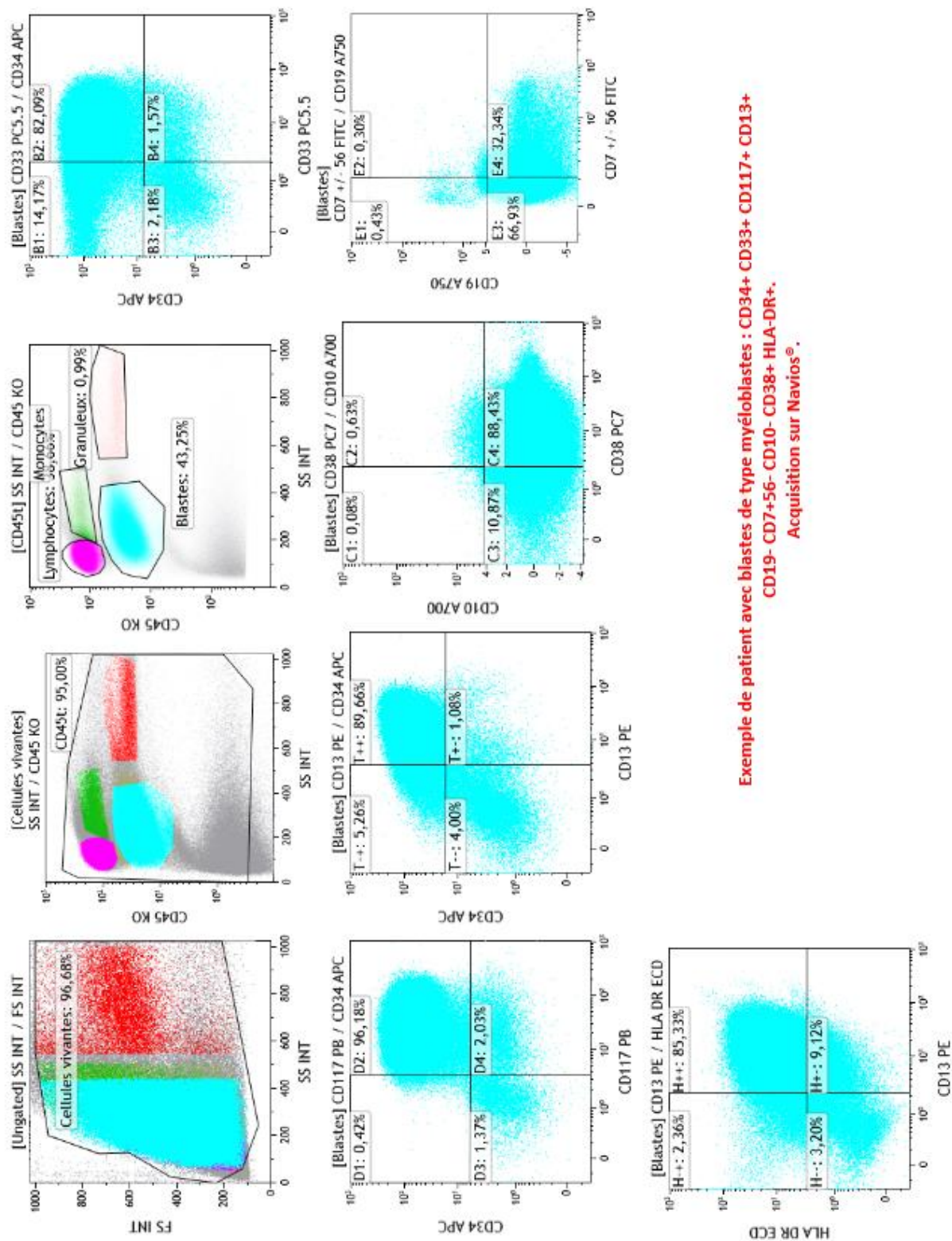
**Exemple de patient avec blastes CD34+ CD33+ CD117- CD13-
CD19- CD7+56+ CD10+ CD38+ HLA-DR-.**
Acquisition sur Sysmex®.

Exemple de discordance d'expression du CD10

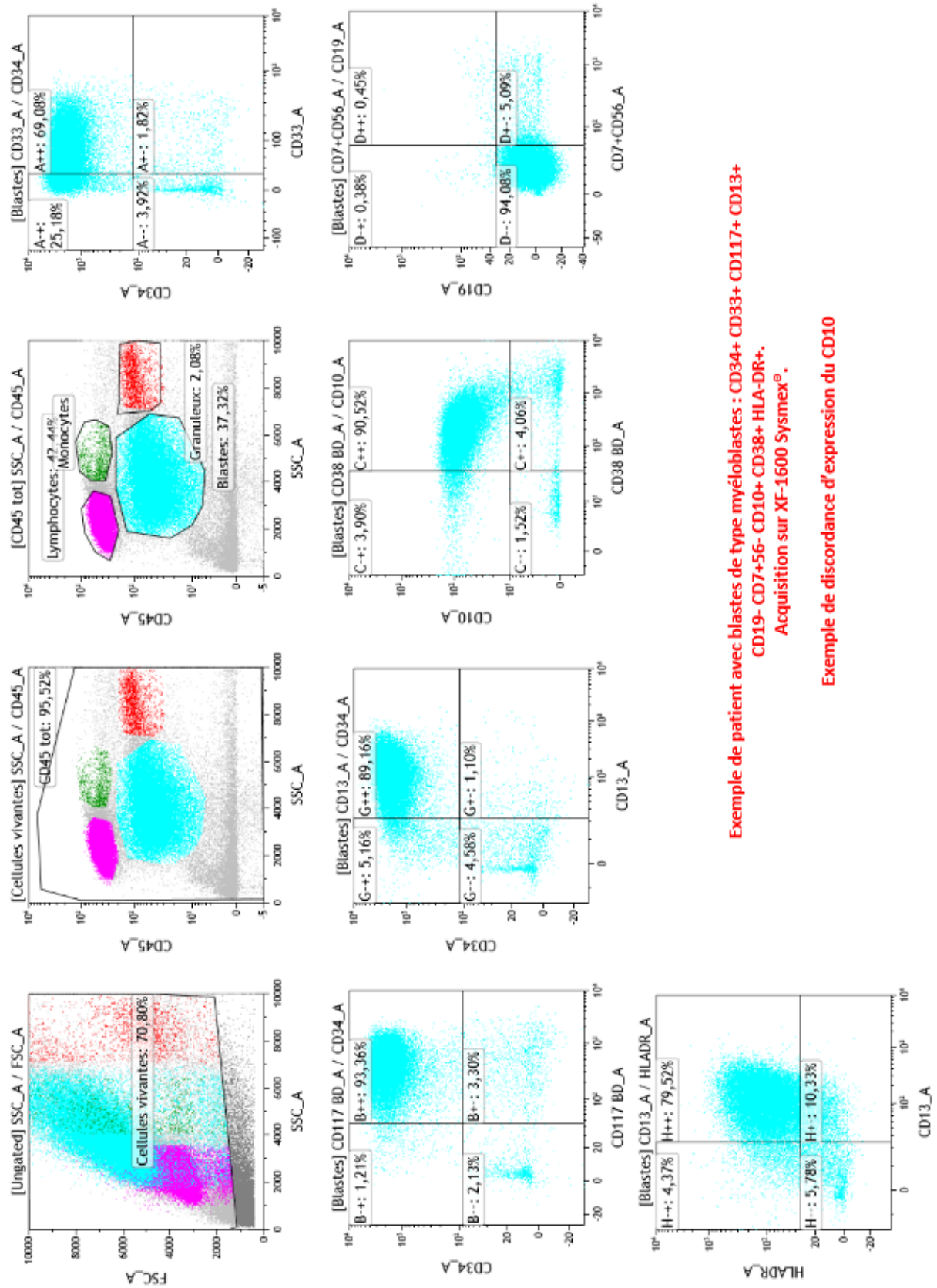
Sur cet exemple d'échantillon (figure 109), on met bien en évidence la population anormale CD45faible correspondant aux blastes. Ils sont ici représentés à hauteur de 90% de cellules totales en CMF. Ici l'immunophénotypage est en faveur d'une leucémie aigue biphénotypique. Les leucémies aiguës biphénotypiques (BAL) sont définies par la présence sur les mêmes blastes de molécules membranaires ou cytoplasmiques appartenant à au moins deux lignées (lymphoïde B, lymphoïde T ou myéloïde) (40). En effet, on retrouve sur la population blastique des marqueurs orientant vers une LAL-T tel le CD7+ ainsi que des marqueurs orientant vers une origine myéloïde des blastes : CD13+.

La suite de l'immunophénotypage (non testé en double), a permis également de retrouver un CD3+ et MPO- précisant donc le diagnostic de LAL-T My+.

Le phénotype complet des blastes pour ce patient est le suivant : CD7/56+, CD34+, CD33+, CD10+, CD38+, CD19-, HLA-DR-, CD117- et CD13-.



**Exemple de patient avec blastés de type myéloblastés : CD34+ CD33+ CD117+ CD13+
 CD19- CD7+56- CD10- CD38+ HLA-DR+.**
 Acquisition sur Navios®.

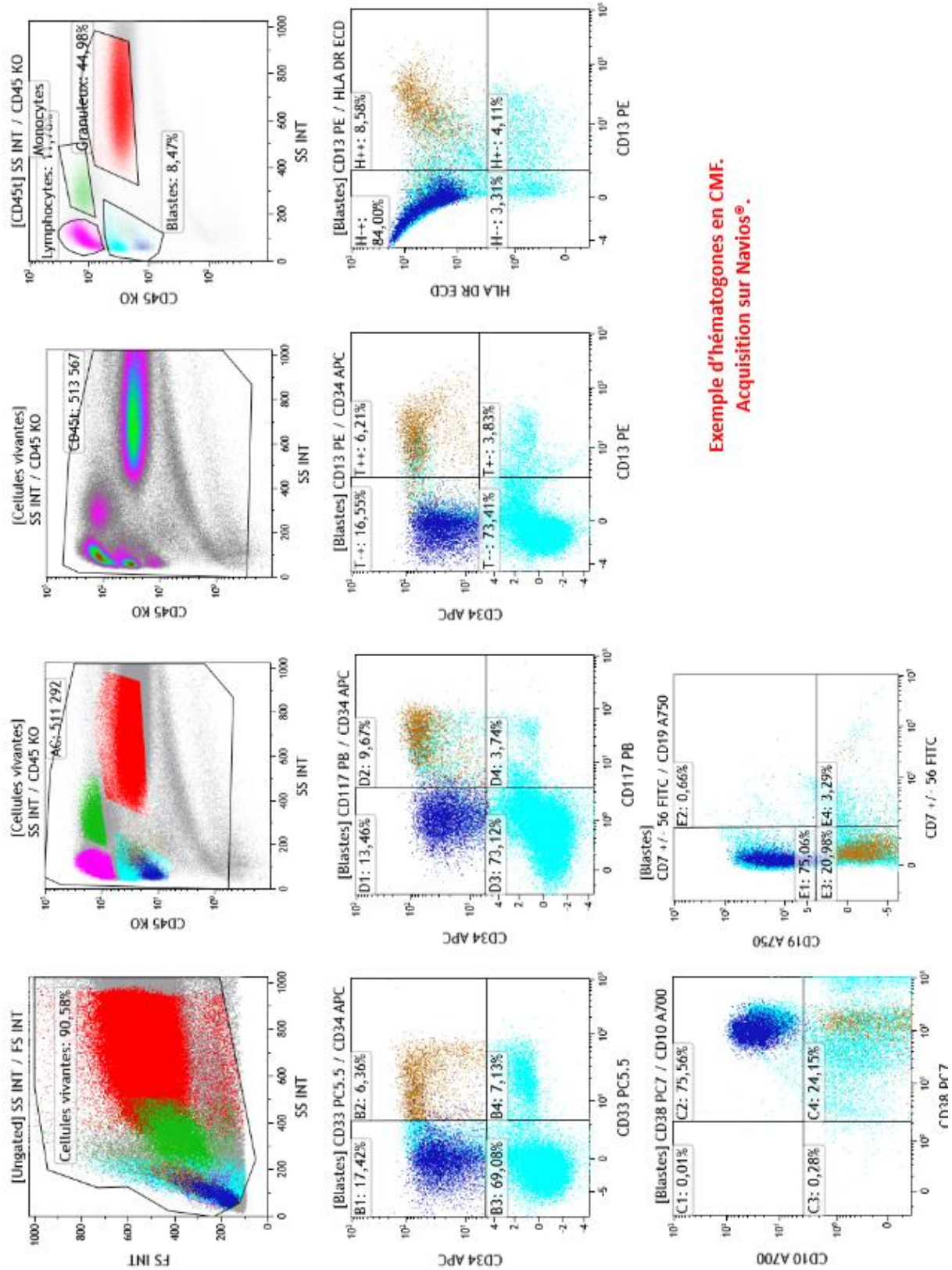


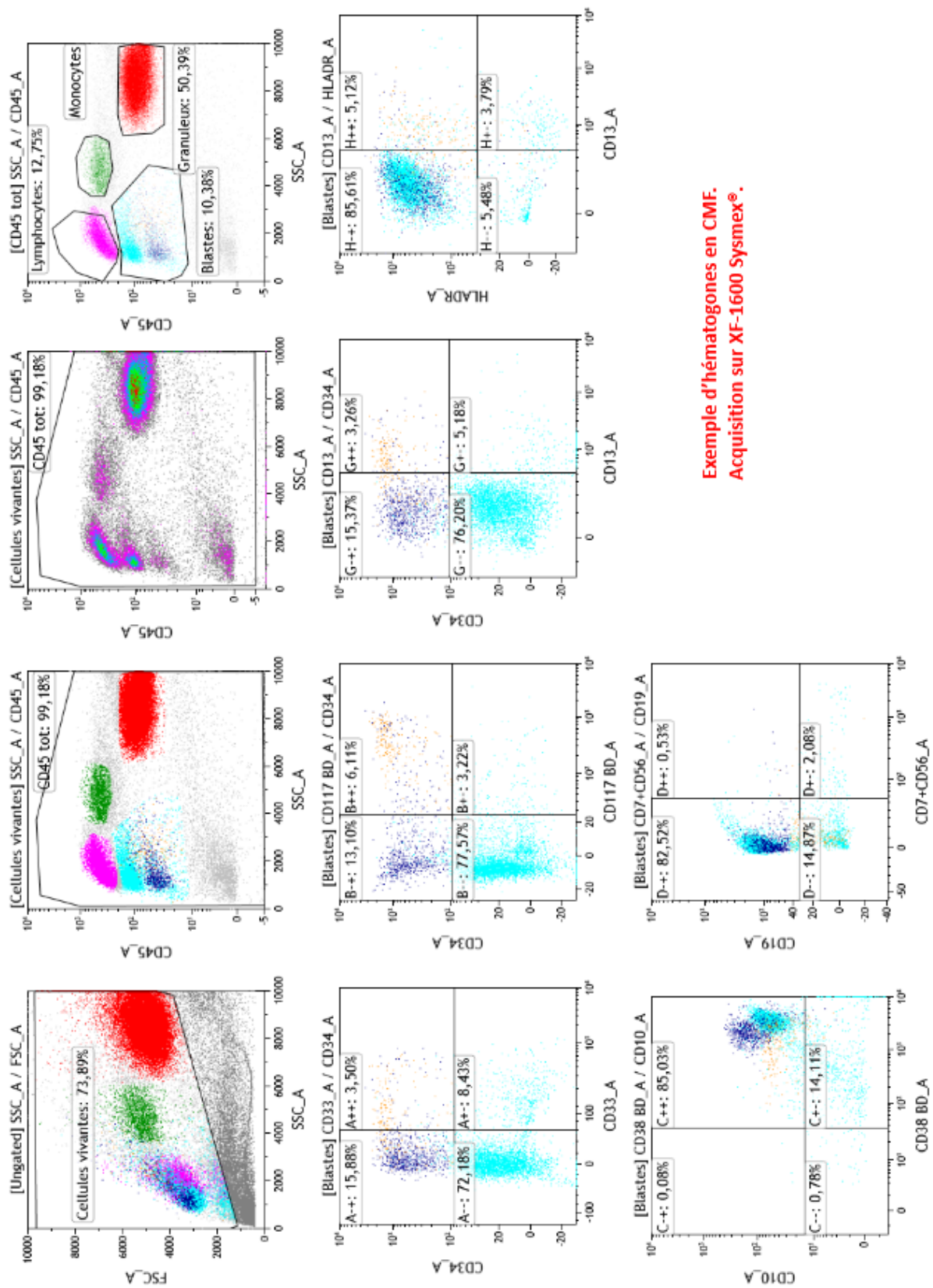
**Exemple de patient avec blastes de type myéloblastes : CD34+ CD33+ CD117+ CD13+
 CD19- CD7+56- CD10+ CD38+ HLA-DR+.
 Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.**

Exemple de discordance d'expression du CD10

Figure 110 : Exemple de population blastique myéloïde.

On retrouve sur cet exemple d'échantillon (figure 110) un phénotype de Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM) avec la positivité des CD13, CD33 et CD117 sur la population blastique CD45 faible estimée à 40% en CMF. Par ailleurs, cette population blastique est CD34+ CD38+ CD19- et CD7/56-.





Exemple d'hématogones en CMF.
Acquisition sur XF-1600 Sysmex®.

Figure 111 : Exemple d'hématogones en CMF

Sur cet exemple d'échantillon testé pour le panel Leucémie Aiguë (figure 111), on retrouve une population d'hématogones, précurseurs des lymphocytes B. On remarque très aisément la présence de trois populations en SS faible avec pour chacune d'entre-elles une intensité différente d'expression du CD45.

En CD45fort tout d'abord, on retrouve les lymphocytes matures (en rose), en CD45 intermédiaire et CD45 faible les lymphocytes immatures.

La population la plus immature est représentée en bleu marine sur les histogrammes. Elle exprime le phénotype suivant : CD34+, CD19+ et CD10+ CD38.

La population intermédiaire ici représentée en turquoise exprime le phénotype suivant : CD19+ CD10+ et CD38+. Cette population a perdu l'expression du CD34 (marqueur d'immaturité).

Enfin les lymphocytes matures représentés en rose ont perdu le CD10.

On peut également visualiser les précurseur myéloïdes (en ocre) CD13+ CD33+ CD117+ et CD34+ et CD19- (45).

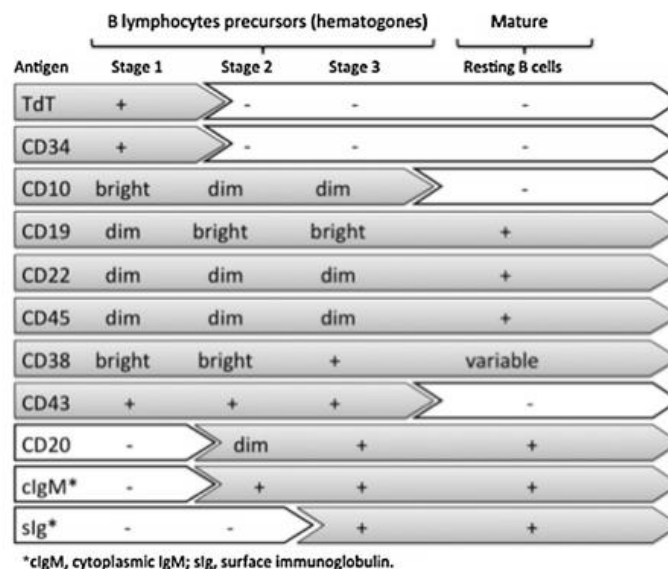


Figure 112 : Expression antigénique au cours de la maturation des précurseurs des lymphocytes B (45)

VI. Discussion

VI.1. Biais généraux

La corrélation de deux automates étant réalisée en passant un même échantillon sur les deux cytomètres, plusieurs biais viennent impacter les résultats de l'étude.

D'une part, le délai entre le passage des échantillons sur les deux cytomètres n'a pas été encadré. Pour plusieurs échantillons ce délais a pu être trop long, entraînant une mort cellulaire importante. D'autre part, le stockage des échantillons après acquisition sur les Navios ne s'est pas faite à l'abri de la lumière, pouvant entraîner alors une perte de fluorescence important avant le passage sur le XF-1600. Cette perte de fluorescence est d'autant plus importante que l'échantillon reste longtemps sur la paillasse.

VI.2. Panel orientation lymphoïde B

Concernant ce panel d'anticorps, on peut largement conclure qu'avec des R^2 supérieurs à 0.90 pour la majorité des paramètres étudiés, la corrélation entre les deux automates est excellente.

Les diagrammes des différences permettent la visualisation rapide des échantillons pour lesquels les résultats sont trop différents.

Concernant le pourcentage de lymphocytes totaux, le R^2 est de 0.93733, la corrélation entre les deux cytomètres est excellente.

On retrouve cependant deux échantillons pour lesquels une trop grande différence ($>3SD$) entre les deux automates est observée (figure 113) :

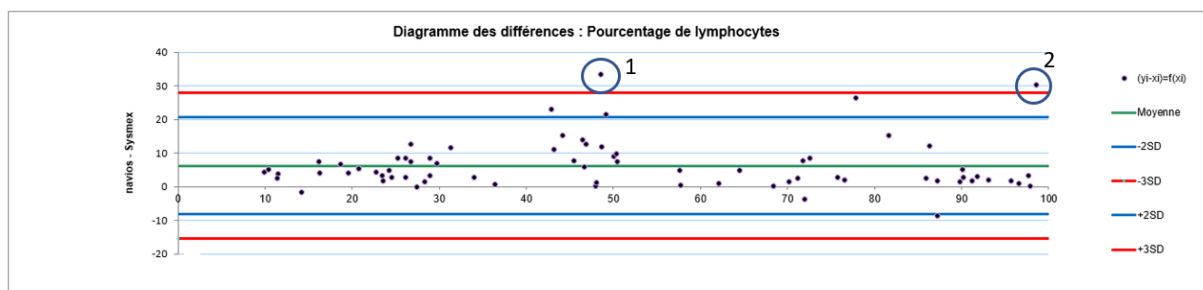


Figure 113 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes totaux

D'une part, l'échantillon numéro 1 correspond à un prélèvement de liquide céphalorachidien (LCR) pour lequel le nombre de lymphocytes analysés par le XF-1600 est égal à 60. Il s'agit d'une population beaucoup trop faible pour obtenir des pourcentages fiables de populations.

De plus les échantillons de LCR sont fragiles et doivent être analysés le plus rapidement possible. Ici le temps de passage trop long entre les différents cytomètres a pu entraîner une diminution de la cellularité du prélèvement.

D'autre part, pour l'échantillon numéro 2, il s'agit là encore d'un prélèvement de LCR. Les mêmes problèmes sont rencontrés pour cet échantillon que pour le précédent.

Concernant le pourcentage de lymphocytes CD3+, le R^2 de 99.259 indique une excellente corrélation inter automates.

Cependant ici aussi certains échantillons analysés présentent des valeurs trop différentes >3DS. Le diagramme des différences pour le CD3 (figure114) nous permet de visualiser ces deux échantillons discordants.

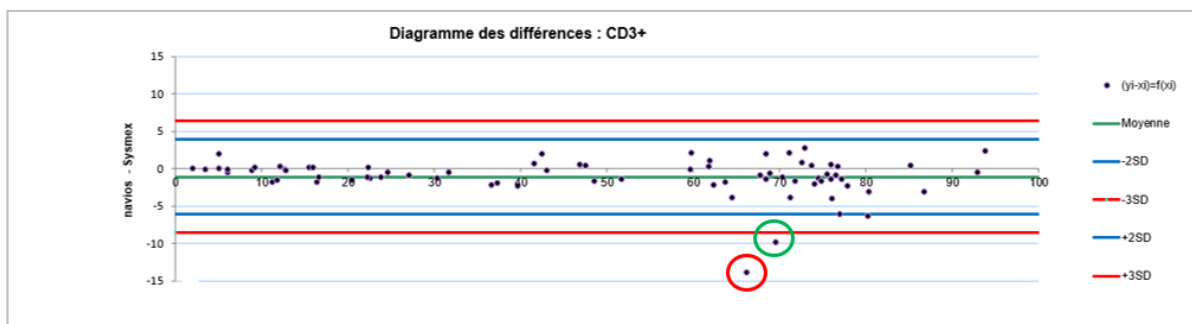


Figure 114 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD3+

Le premier d'entre eux (entouré en rouge) correspond à un échantillon dans lequel trop peu de lymphocytes ont été analysés sur le XF-1600. En effet on retrouvait 7002 lymphocytes analysés sur les Navios contre seulement 654 sur le XF-1600. Cela explique la différence retrouvée.

Le deuxième (entouré en vert), correspond à un échantillon de LCR dans lequel seulement 60 lymphocytes ont été analysés, échantillon déjà mentionné précédemment. Il est difficile de conclure à un phénotype sur si peu d'éléments analysés.

Concernant le paramètre suivant (pourcentage de CD4+ parmi les CD3+) (figure 115), on retrouve un R^2 égal à 0.99202 indiquant une excellente corrélation.

On retrouve cependant encore une fois un échantillon discordant, correspondant la encore à l'échantillon de LCR pour lequel seulement 60 lymphocytes ont pu être analysés par le XF-1600.

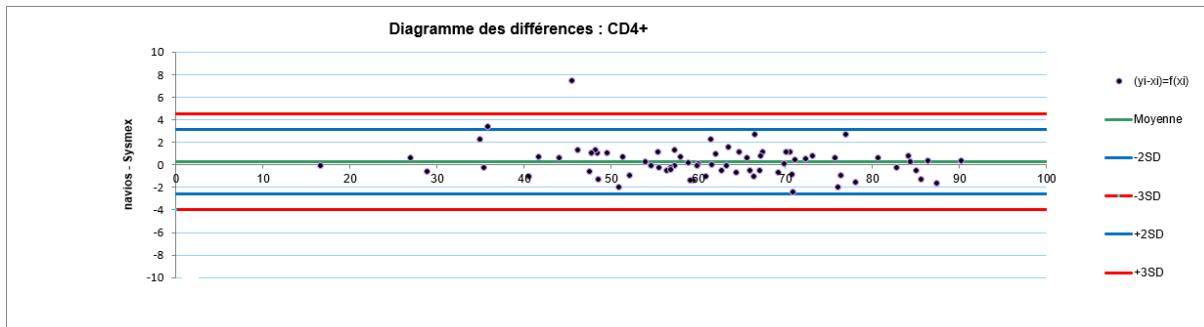


Figure 115 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD4+

Pour le pourcentage de CD8+ parmi les lymphocytes CD3+, le R^2 retrouvé est égal à 0.99418 est permet là encore d'affirmer la parfaite corrélation pour ce paramètre. Une nouvelle fois on retrouve un échantillon discordant avec une différence >3 DS correspondant toujours à l'échantillon de LCR pour lequel 60 lymphocytes ont pu être analysés.

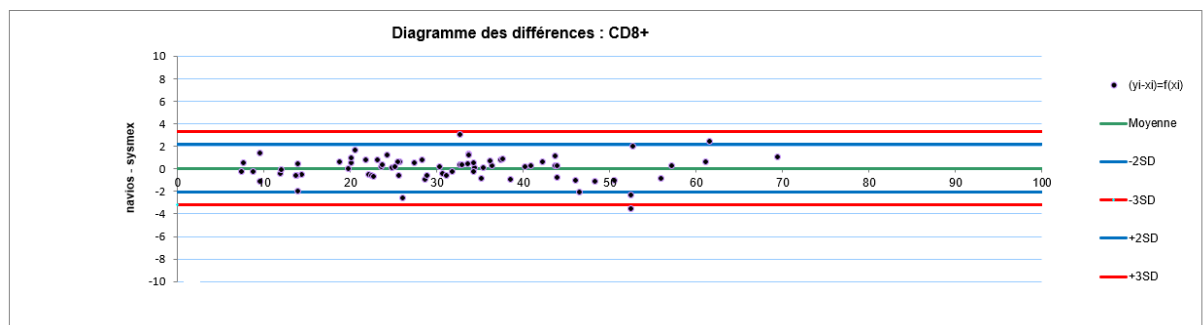


Figure 116 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD8+

Concernant le CD19, avec un R^2 de 0.99742, la corrélation entre les deux cytomètres pour ce paramètre est excellente.

Quelques échantillons affichent cependant des différences >3DS entre les passages sur les différents automates.

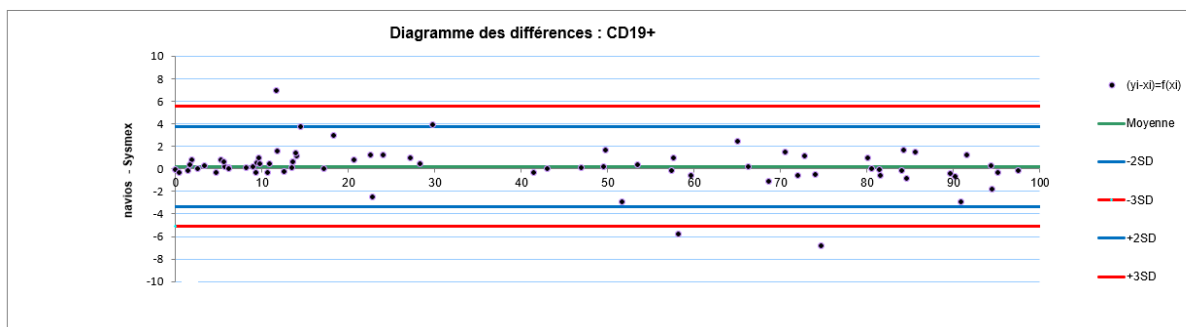


Figure 117 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD19+

Le premier correspond encore à l'échantillon de LCR pour lequel le nombre de lymphocytes analysés était égal à 60.

Le deuxième correspond à un patient pour lequel on retrouve 58.13% de lymphocytes CD19+ après acquisition sur le Navios contre 63.90% de lymphocytes CD19+ après acquisition sur le XF-1600. Cette différence de proportion est cependant minime. De plus aucun impact sur le rendu de résultat n'a été retrouvé. Cet échantillon présentait un clone CD19+ monotypique lambda CD5+.

Le dernier correspond à un patient pour lequel on retrouve 74.63% de lymphocytes CD19+ après acquisition sur le Navios contre 71.49% de lymphocytes CD19+ après acquisition sur le XF-1600. Là encore la différence est minime et n'impacte en rien le rendu de résultat. Un clone B monotypique lambda CD5- a bien été retrouvé sur les deux cytomètres.

Concernant les paramètres kappa et lambda, les R^2 retrouvés sont respectivement de 0.98176 et 0.98212 et sont donc excellents.

Un échantillon présente des différences importantes pour chacun de ces deux paramètres comme on peut le remarquer dans les figures suivantes :

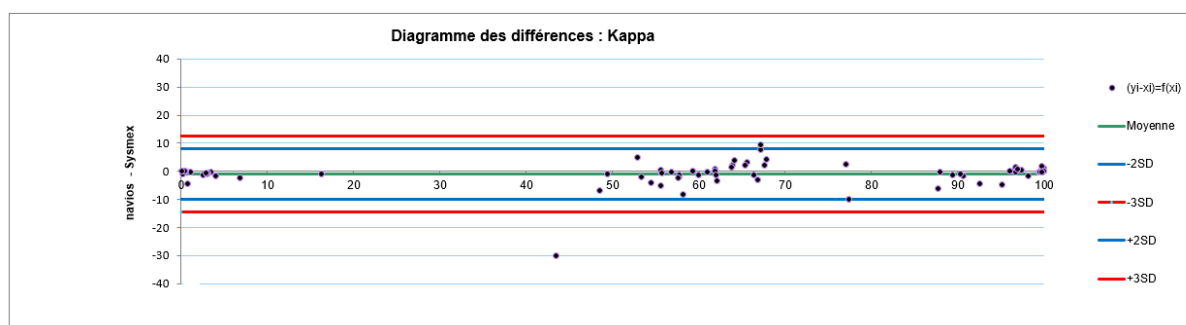


Figure 118 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes kappa

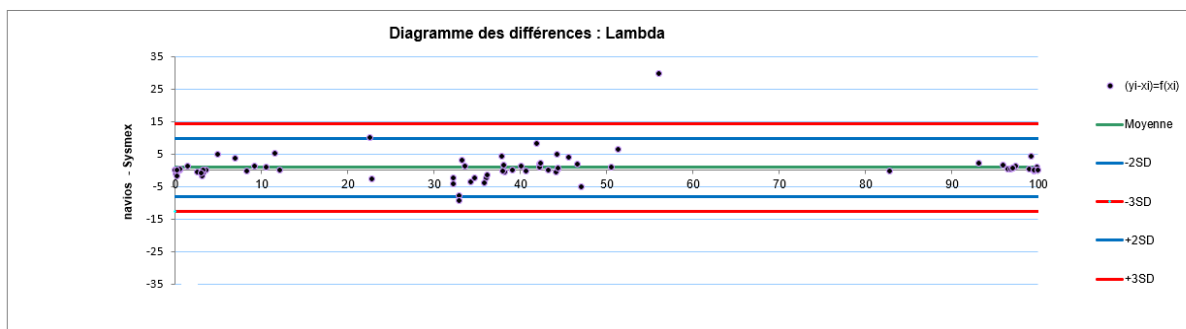


Figure 119 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes lambda

Cet échantillon correspond à une patiente pour laquelle on retrouvait 43.46% de lymphocytes B kappa sur le Navios contre 74.63% après acquisition sur le XF-1600. Par ailleurs, le Navios rendait 56.05% de lymphocytes B lambda contre 23.39% de lymphocytes B lambda sur le XF-1600. Ces différences sont aisément explicables par le fait que seulement 60 lymphocytes B ont pu être analysés par le XF-1600.

Concernant le pourcentage de lymphocytes CD20+ parmi les CD19+, avec un R^2 de 0.84508, la corrélation est plutôt bonne. Cependant sur ce paramètre de nombreux échantillons présentent des écarts importants en termes de pourcentage de population.

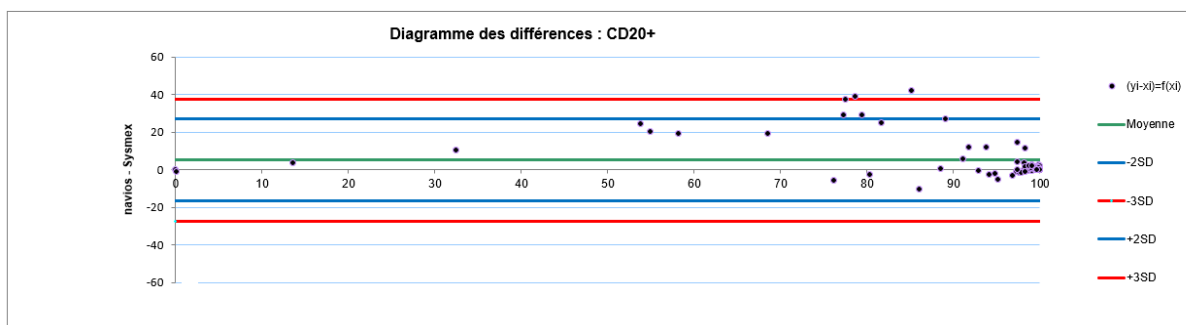


Figure 120 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD20+

En effet les nuages de points correspondants aux différentes populations cellulaires sont souvent « coupés » au moment du retraitement, entraînant des différences de pourcentages importantes. Cependant, l'intérêt du pourcentage de positivité pour ce paramètre n'est pas primordial et est peu judicieux. Il est préférable de s'intéresser plutôt à une interprétation qualitative tels que l'expression ou l'absence d'expression pour ce paramètre. La figure ci-dessous (figure 121) représente bien ce phénomène.

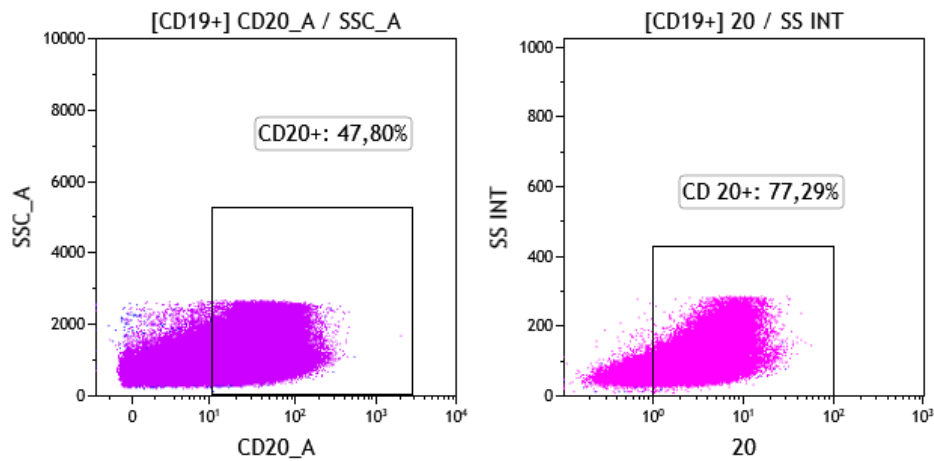


Figure 121 : CD20/SS sur XF-1600 (à gauche) et sur Navios (à droite)

Pour un même échantillon, l'aspect du nuage de points est identique alors que les pourcentages obtenus diffèrent de manière importante. Cependant, on voit bien que la population CD19+ présente une diminution d'expression du CD20 pour les deux automates. Concernant le CD5, avec un R^2 égal à 94.370, la corrélation est bonne. On remarque les mêmes discordances que celles observées pour le CD20 et cela pour des causes identiques.

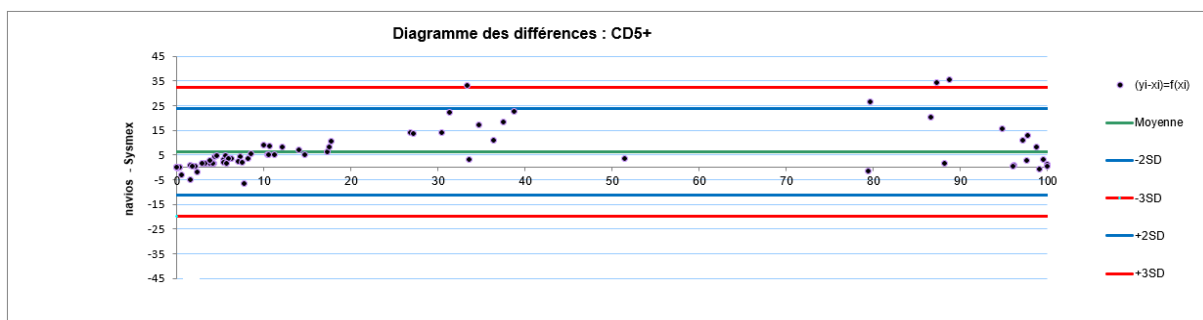


Figure 122 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes B CD5+

La figure ci-dessous nous montre bien le phénomène décrit pour le CD5. Les nuages sont identiques quel que soit le cytomètre utilisé cependant les pourcentages diffèrent de manière plus ou moins importante.

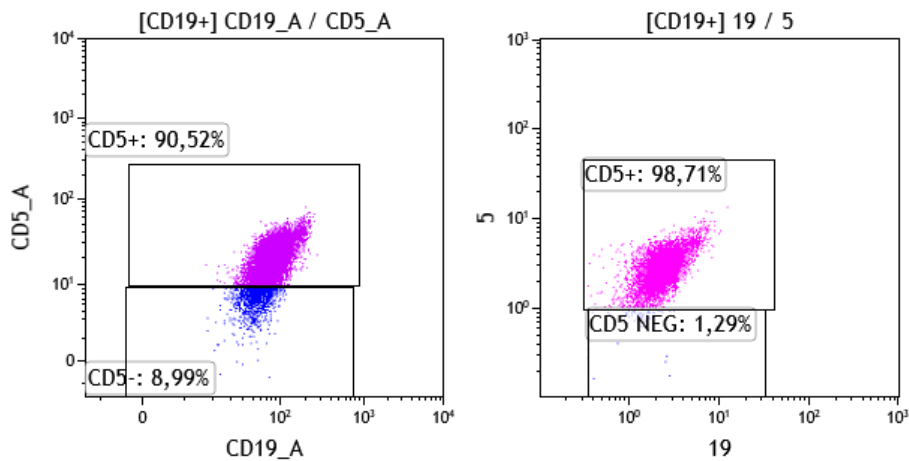


Figure 123 : CD19/CD5 sur XF-1600 (à gauche) et sur Navios (à droite)

Concernant la comparaison des images, on voit dans la partie résultats qu'elles sont similaires pour tous les paramètres. Bien que par moment le nombre d'évènements acquis sur les deux cytomètres soit très différent. On remarque cependant quelques différences notamment au niveau du CD19. Une perte d'intensité de fluorescence due au délai entre les différents passages entraîne une mauvaise séparation des populations B CD19+ et CD19-. Cette baisse d'intensité est d'autant plus grande que les échantillons n'étaient pas stockés à l'abri de la lumière après passage sur le Navios.

Concernant les interprétations qualitatives des résultats obtenus, pour les 74 échantillons l'interprétation biologique était similaire quel que soit l'automate utilisé.

VI.3. Panel complément B

Les deux cytomètres donnent des résultats identiques pour chacun des échantillons analysés. Que ce soit au niveau du pourcentage de la population lymphocytaire B clonale ou pour le phénotype de chacun des clones retrouvés. La figure 82 présentée dans la partie résultat montre bien cette parfaite concordance.

On remarque encore une fois la difficulté pour séparer la population de lymphocytes B CD19+ des autres lymphocytes CD19- en CD19/SS. Sur les Navios cette séparation s'avère déjà compliquée mais là encore, la perte de fluorescence même minimale entre certains passages a pu entraîner des difficultés supplémentaires pour la discrimination des populations. De plus il est fréquent de retrouver une expression plus faible du CD19 sur les lymphocytes de LLC (46).

VI.4. Panel d'orientation lymphoïde T

Concernant ce panel d'anticorps, on peut largement conclure que la corrélation entre les deux automates est excellente. Les R^2 des différentes sous populations étudiées ainsi que les diagrammes des différences pour chacun des paramètres montrent une corrélation excellente entre les deux automates.

Les diagrammes de différences ne montrent pas d'échantillons pour lesquels une trop grande différence entre les deux passages est observée.

Deux paramètres cependant présentent un R^2 largement insuffisant. Ces paramètres sont le pourcentage de lymphocytes CD10+ parmi les CD4+ et le pourcentage de lymphocytes cytotoxiques. Pour ces deux populations, les R^2 sont respectivement de 0.00300 et de 0.61740. Ces valeurs s'expliquent par le fait que pour ces populations, l'intégralité des valeurs observées sont proches de 0%. Cependant les diagrammes de différences présentés ci-dessous pour ces deux paramètres montrent bien la parfaite corrélation entre les deux cytomètres.

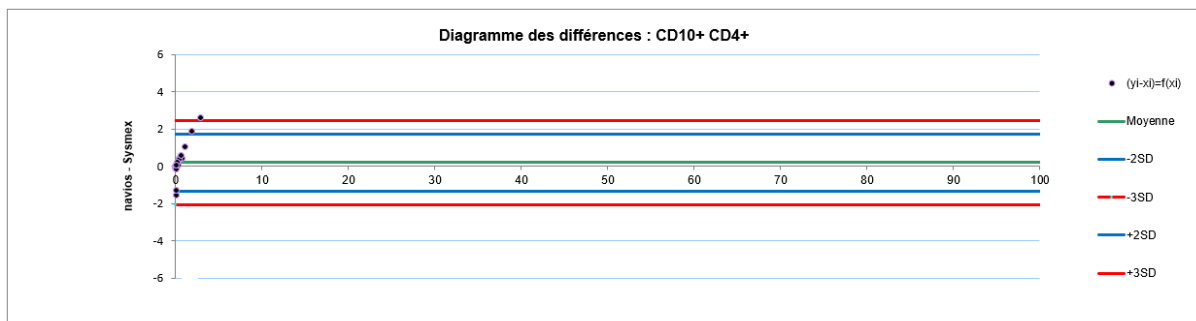


Figure 124 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes CD4+ CD10+

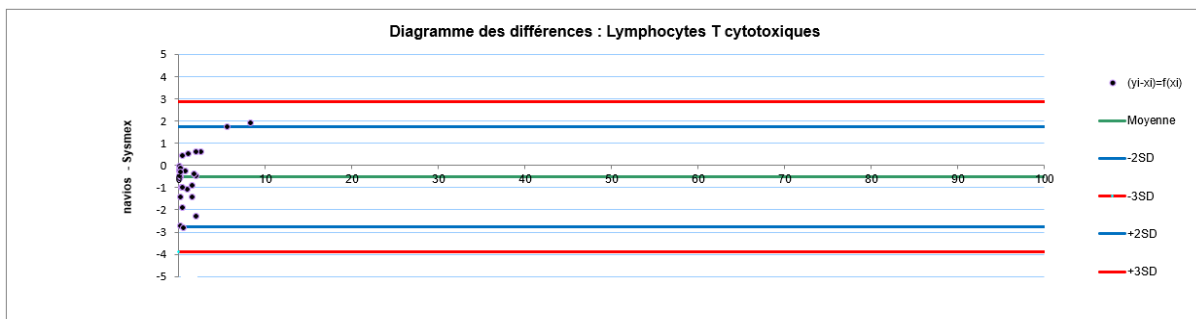


Figure 125 : Diagramme des différences pour le pourcentage de lymphocytes cytotoxiques

Enfin, pour l'intégralité des échantillons de patient analysés en double, les populations pathologiques retrouvées étaient similaires, ainsi que les interprétations biologiques, pour un rendu de résultats qui aurait été similaire quel que soit l'automate utilisé.

VI.5. Panel de typage plasmocytaire

Concernant ce panel de typage plasmocytaire les R^2 observés pour chacun des marqueurs étudiés sont assez hétérogènes. En premier lieu, avec un R^2 de 0.99692, le pourcentage de plasmocytes (CD38+/CD138+) est très bien corrélé entre les deux cytomètres. Pour le pourcentage de plasmocytes kappa ou lambda, avec des R^2 respectivement de 0.93329 et de 0.93817, la corrélation est également excellente. De plus, sur les diagrammes des différences de ces trois paramètres nous n'observons qu'un seul échantillon pour lequel une trop grande différence entre les deux automates est mise en évidence. Pour cet échantillon discordant, le pourcentage de plasmocytes exprimant une chaîne kappa est de 76.25% après acquisition sur le Navios contre 40.65% après passage sur le XF-1600. En ce qui concerne le pourcentage de plasmocyte lambda, il est retrouvé à 22.81% après acquisition sur le Navios et à 56.77% après acquisition sur le XF-1600. Cette différence importante mise en évidence est due à la présence d'un nombre trop faible de plasmocytes dans le prélèvement. Pour ce patient, la plasmocytose médullaire retrouvée en CMF était de seulement 0.17%, soit 155 plasmocytes, ce qui est trop peu pour une bonne représentativité des proportions des différentes sous populations.

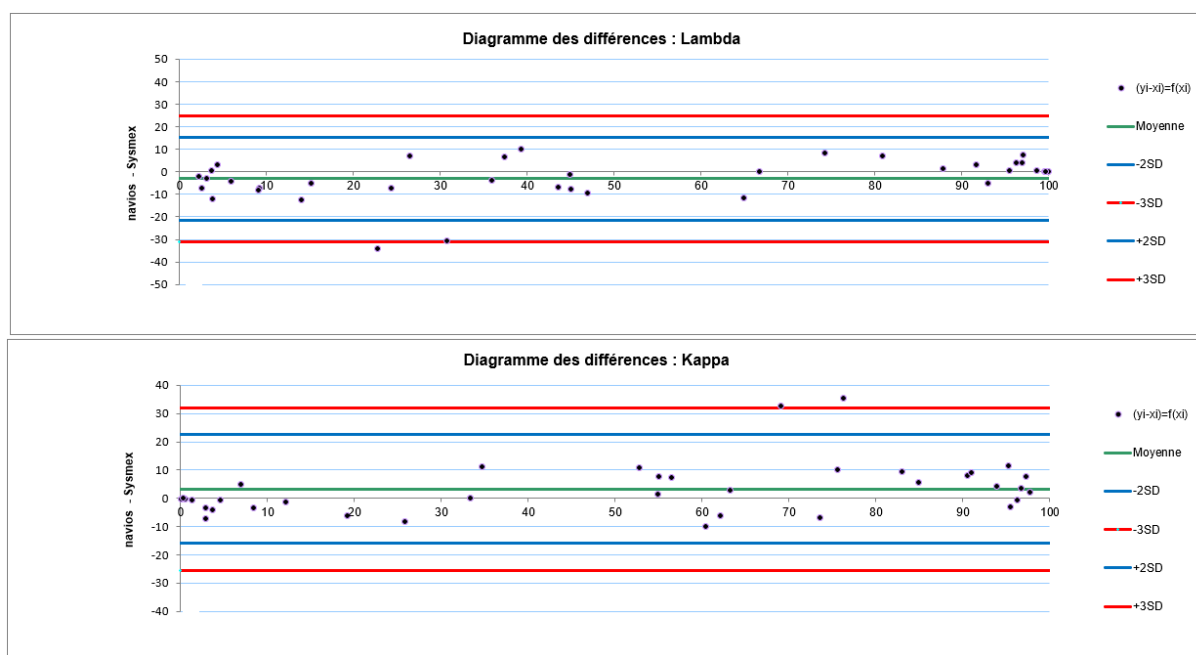


Figure 126 : Diagramme des différences pour le pourcentage de plasmocytes kappa et lambda

En ce qui concerne les autres paramètres de ce panel, avec de R^2 de 0.57782 pour le CD45, de 0.72972 pour le CD27, de 0.72356 pour le CD20, de 0.35514 pour le CD19, de 0.79400 pour le CD56+28 et de 0.12003 pour le CD34+117, la corrélation semble beaucoup moins bonne. Cela s'explique cependant par le fait que les nuages de points correspondants à ces populations sont souvent coupés, de la même manière qu'expliqué pour le panel d'orientation lymphoïde. Les seuils mis en place sont responsables de ce découpage des nuages de points. Là encore un pourcentage d'expression de ces marqueurs sur la population plasmocytaire n'a qu'un intérêt limité. Il est préférable d'interpréter les graphiques de manière qualitative en raisonnant en termes d'acquisition ou de perte d'acquisition pour un marqueur donné.

Concernant les interprétations qualitatives, malgré des pourcentages parfois très différents d'un cytomètre à l'autre, les interprétations biologiques ainsi que les rendus de résultats auraient été identiques quel que soit le cytomètre utilisé pour 36 des 37 échantillons analysés en double. L'échantillon discordant est celui d'un patient pour lequel on retrouve une population plasmocytaire CD56+ et/ou CD28+ après acquisition sur le XF-1600 et CD56- et CD28- après passage sur le Navios (figure 127). Pour cet échantillon le reste du phénotype ainsi que le pourcentage de plasmocytes retrouvés est identique sur les deux cytomètres. Cette discordance peut s'expliquer par une altération de l'échantillon due à une attente trop longue entre les passages sur les différents cytomètres.

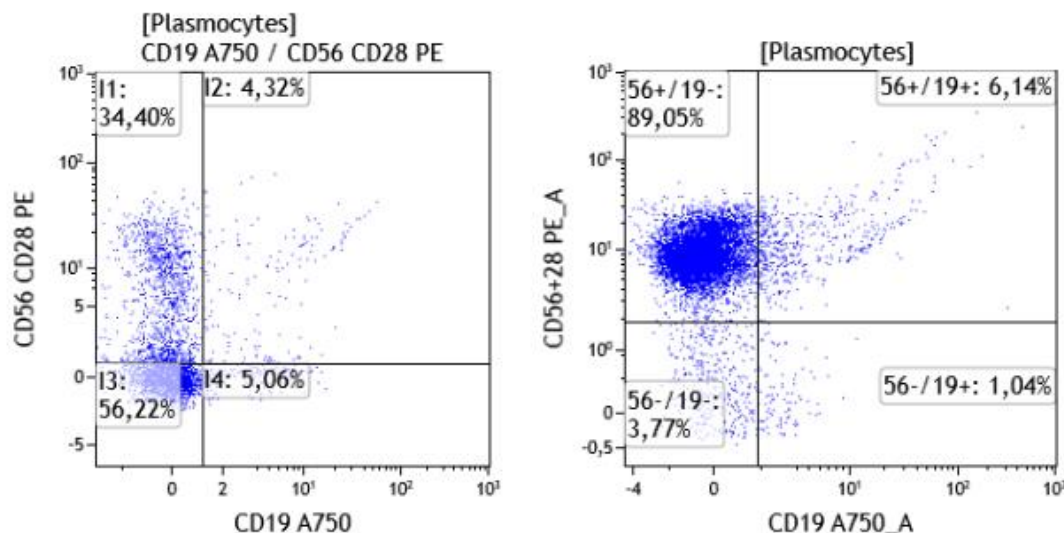


Figure 127 : CD56+28/CD19 ; Navios à gauche et XF-1600 à droite

Enfin, le CD34+117 est pour ce panel très discordant. Cela s'explique également par un réglage défectueux pour ce paramètre, que ce soit au niveau des compensations ou au niveau des gains appliqués au PMTs.

Avec seulement quelques échantillons analysés pour mettre en place le panel plasmocytaire sur le XF-1600, certains paramètres sont moins bien réglés que d'autres. Il est vrai que lors de la mise en place, nous nous sommes surtout intéressés au pourcentage de plasmocytes, l'expression kappa lambda et l'expression du CD56+28 CD19, délaissant les autres marqueurs tel le CD117. De plus, l'ECD n'est pas un fluorochrome optimal.

VI.6. Panel LMMC

Concernant ce panel, les coefficients de régression R^2 ainsi que les diagrammes des différences ne montrent aucune discordance pour chacun des patients passés en doubles. On retrouve également la même image correspondant à chacune des situations pathologiques ou non existantes : l'aspect de patient sain, l'aspect typique de répartition des sous populations monocytaires présent dans la LMMC ainsi que l'aspect inflammatoire en « bulbe ».

Enfin les conclusions et interprétations biologiques sont similaires pour chaque échantillon utilisé pour les deux cytomètres.

Les quelques différences viennent de la différence du nombre d'éléments acquis sur les deux automates, ainsi que du délais (parfois long) d'attente des échantillons entre les deux passages. Délai qui augmente la mortalité cellulaire et diminue la capacité de fluorescence des fluorochromes utilisés.

VI.7. Panel leucémie aigue

Tout comme le panel complément B, le nombres d'échantillons analysés en double est très faible. Les échantillons de patients analysés l'ont été sur un panel pour lesquels on ne connaissait pas les performances des réglages de chacun des marqueurs notamment le CD10.

Par exemple nous nous sommes rendu compte très tardivement que le CD45 été trop faible sur le XF-1600 par rapport au Navios. En effet, nous sommes passés à côté d'une population blastique CD45 très faible voir CD45 négative. De plus le CD10 est également discordant.

Cependant, les pourcentages de blastes retrouvés par les deux cytomètres sont très corrélés, avec un R^2 de 0,98713. Les phénotypes des blastes sont aussi similaires pour

chacun des échantillons analysés, sauf pour le CD10. De plus les exemples d'images présentés démontrent que les deux cytomètres donnent des résultats similaires.

VI.8. Utilisation et performances de l'automate

Tout d'abord, il est important de signaler que la solution complète n'a pas été testée. Seul le cytomètre et son logiciel d'acquisition ont été étudiés dans ce travail. Un logiciel de retraitement existe cependant (VenturiOne®) mais ce dernier n'a été fourni que trop tard lors de l'étude.

L'utilisation d'un logiciel de retraitement adapté semble pourtant indispensable à l'analyse des données acquises pour les panels ou le nombres d'éléments est important et pour lesquels la stratégie de fenêtrage est plus complexe. En effet il est impossible d'utiliser le logiciel d'acquisition pour retraiter les données acquises pour les panels Leucémie Aiguë, LMMC ou en MRD. Il est cependant possible de s'affranchir d'un logiciel de retraitement pour les panels simples tels que le panel d'orientation lymphoïde B ou encore le panel T.

Les limites de ce logiciel d'acquisition pour le retraitement des données sont les suivantes :

- Impossibilité de régler la résolution sur les différents plots ;
- Impossibilité d'agrandir ou de réduire la taille des plots ;
- Le nombre de fenêtres utilisables est limité ;
- Il est impossible de réorganiser l'ordre des plots ou de les déplacer ;
- Les populations non sélectionnées sont par défaut colorisées en noir. Il aurait été préférable que ces dernières soient colorisées dans une couleur moins visible tel que le gris clair.

Il a également été mis en évidence que la cadence de l'automate était beaucoup trop lente. Cette dernière est due à l'étape de rinçage inter échantillon qui prend beaucoup trop de temps. Cette lenteur impacterait fortement la routine du laboratoire et serait préjudiciable notamment pour le délai de rendu de résultat.

En ce qui concerne les panels testés, bien que les résultats soient satisfaisants, il est à noter que certains panels d'anticorps n'ont pu être évalués sur le XF-1600. En effet un panel de numération des CD34 destiné à la thérapie cellulaire donnait des résultats trop différents. La numération quantitative des cellules CD34+ différait d'un facteur dix entre les deux automates. Malgré plusieurs tentatives de réglages et de paramétrages, le montage de ce panel a été abandonné sur le XF-1600.

De plus certains panels destinés au suivi de la maladie résiduelle (MRD) comme la MRD du myélome multiple nécessite une acquisition d'évènements bien plus importante que celles proposées par le XF-1600. De plus, avec un temps d'acquisition allongé dû à la répétition des prises d'essais de 250 µL afin d'obtenir un nombre d'évènement suffisant, le suivi en MRD prendrait en plus beaucoup trop de temps, impactant ainsi fortement l'activité du laboratoire. De plus, comme pour les panels LMMC ou Leucémie Aiguë, avec un nombre d'évènements acquis très important, l'analyse des populations est impossible sur le cytomètre. Là encore un logiciel de retraitement est indispensable à l'analyse et au rendu de résultats.

Outre les limites du XF-1600 décrites précédemment, il s'agit d'un cytomètre pour lequel la prise en main est d'une grande facilité. L'interface très intuitive permet à n'importe quel opérateur l'acquisition d'une autonomie certaine et ce en très peu de temps dans la manipulation du cytomètre. Cette aisance dans l'utilisation est le point fort de ce nouveau cytomètre par rapport aux automates de génération antérieure tels que les Navios.

De plus la perspective d'une solution dite complète, associant préparateur automatisé, centrifugeuse laveuse et cytomètre, le tout couplé à une chaîne de cytologie et à un logiciel de retraitement adapté permettrait une meilleure évaluation de ce nouveau cytomètre.

Conclusion

Nous avons montré dans ce travail de corrélation que les performances analytiques du XF-1600 étaient au moins égales à celles des cytomètres de génération précédente. Cependant les réglages du cytomètre tels que le voltage des PMT ou encore les compensations, ainsi que les nombreux biais tels que le vieillissement de l'échantillon, impliquant mort cellulaire et perte de fluorescence ont pu rendre certains résultats discordants. Certains panels au vu de leur complexité n'ont pu être suffisamment bien mis au point, notamment pour les échantillons rares ou précieux. L'interface d'utilisation très simple et utilisable par n'importe quel opérateur même non spécialisé dans le domaine de la cytométrie permet une utilisation de l'automate dans n'importe quel centre de biologie médicale, notamment généraliste, et reste son essentiel point fort. L'utilisation d'une solution complète associant préparateur, centrifugeuse laveuse et cytomètre, le tout couplé à une chaîne analytique de cytologie permettrait un apport significatif autant pour la qualité de rendu du résultat biologique que pour les apports liés à l'automatisations tels que la standardisation, la traçabilité ou encore les discordances inter opérateurs.

Références bibliographiques

1. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 nov 2015;195(10):4555-63.
2. La cytométrie en flux - Xavier Ronot, Didier Grunwald,... - Librairie Eyrolles [Internet]. [cité 9 août 2021]. Disponible sur: <https://www.eyrolles.com/Sciences/Livre/la-cytometrie-en-flux-9782743008987/>
3. CyPS - Plateforme Cytométrie Pitié-Salpêtrière [Internet]. CyPS - Plateforme Cytométrie Pitié-Salpêtrière. [cité 9 août 2021]. Disponible sur: <http://www.cytometrie.pitie-salpetriere.upmc.fr/>
4. Accueil Cytobase - Montpellier [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur: <http://cytobase.montp.inserm.fr/>
5. Principes Techniques [Internet]. [cité 9 août 2021]. Disponible sur: <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/PrincipesTechniques.html>
6. BROWN11-fluorochromes.pdf [Internet]. [cité 16 août 2021]. Disponible sur: <https://www.ptibc-imaging.fr/wp-content/uploads/BROWN11-fluorochromes.pdf>
7. Cytometrie en flux.pdf.
8. Lambert C. Lymphocytes T non conventionnels circulants détectés par cytométrie en flux. :127.
9. base_spectrale_luorochromes_organiques.pdf [Internet]. [cité 16 août 2021]. Disponible sur: http://institut-lwoff.fr/pdfs/base_spectrale_luorochromes_organiques.pdf
10. BD Spectrum Viewer [Internet]. [cité 13 août 2021]. Disponible sur: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer>
11. Voirin-Mathieu E. Caractérisation leucocytaire en cytométrie en flux huit couleurs de nouveau-nés septiques et non septiques : résultats préliminaires [Internet] [exercice]. Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2018 [cité 17 août 2021]. Disponible sur: <http://thesesante.ups-tlse.fr/2532/>
12. Galtseva IV, Davydova YO, Kapranov NM, Julhakyan HL, Mendeleeva LP. Minimal residual disease in multiple myeloma: Benefits of flow cytometry. *Int J Lab Hematol*. févr 2018;40(1):12-20.
13. Jouault H, Imbert M. La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie. *Rev Fr Lab*. 1 avr 1995;1995(275):29-35.
14. Hemmings O, Kwok M, McKendry R, Santos AF. Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 15 nov 2018;18(12):77.
15. Lochmanová A, Chmelař D, Beran V, Hájek M. [Flow cytometry in microbiology]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol Cas Spolecnosti Epidemiol Mikrobiol Ceske Lek Spolecnosti JE Purkyne*. Fall 2017;66(4):182-8.

16. Abdel-Ghafar AA-A, El Din El Telbany MAS, Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. *Hematol Rep.* 2 janv 2012;4(1):e3.
17. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia.* avr 2016;30(4):929-36.
18. Jain P, Wang M. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication, and management. *Am J Hematol.* juin 2019;94(6):710-25.
19. Leucémie lymphoïde chronique. In: Wikipédia [Internet]. 2021 [cité 9 août 2021]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Leuc%C3%A9mie_lympho%C3%AFde_chronique&oldid=180854247
20. Freedman A. Follicular lymphoma: 2018 update on diagnosis and management. *Am J Hematol.* févr 2018;93(2):296-305.
21. Freedman A, Jacobsen E. Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *Am J Hematol.* mars 2020;95(3):316-27.
22. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 15 avr 2008;111(8):3941-67.
23. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma.* 1994;14 Suppl 1:57-61.
24. Mayeur-Rousse C, Guy J, Miguet L, Bouyer S, Geneviève F, Robillard N, et al. CD180 expression in B-cell lymphomas: A multicenter GEIL study. *Cytometry B Clin Cytom.* sept 2016;90(5):462-6.
25. 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;103:221-66.
26. Guitart J. Sézary syndrome and mycosis fungoides flow cytometric evaluation: The clinicians' perspective. *Cytometry B Clin Cytom.* mars 2021;100(2):129-31.
27. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Berger F, Ffrench M, Jallades L, Morel D, et al. CD10 and ICOS expression by multiparametric flow cytometry in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* juill 2011;24(7):993-1003.
28. Lunning MA, Vose JM. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma. *Blood.* 2 mars 2017;129(9):1095-102.
29. Lima M. Extranodal NK/T cell lymphoma and aggressive NK cell leukaemia: evidence for their origin on CD56+bright CD16-/dim NK cells. *Pathology (Phila).* oct 2015;47(6):503-14.
30. Ribourtout B, Zandecki M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphol Bull Assoc Anat.* juin 2015;99(325):38-62.

31. Mellot C, Cabon M, Bousquet A, Caré W, Audisio MA, Andriamanantena D, et al. Plasmocytose médullaire et agranulocytose médicamenteuse : rôle d'une répllication virale hépatite B ? Rev Médecine Interne. 1 juin 2017;38:A208.
32. Masson E. Importante plasmocytose sanguine et médullaire réactionnelle à un lymphome angioimmunoblastique [Internet]. EM-Consulte. [cité 16 août 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/167843/importante-plasmocytose-sanguine-et-medullaire-rea>
33. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. Cytometry B Clin Cytom. janv 2016;90(1):61-72.
34. Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. Br J Haematol. mai 2010;149(3):334-51.
35. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica. mars 2008;93(3):431-8.
36. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood. 21 oct 2010;116(16):e74-80.
37. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. Blood. 4 juin 2015;125(23):3618-26.
38. Hofer TP, van de Loosdrecht AA, Stahl-Hennig C, Cassatella MA, Ziegler-Heitbrock L. 6-Sulfo LacNAc (Slan) as a Marker for Non-classical Monocytes. Front Immunol. 2019;10:2052.
39. Poleszczuk L. Apport de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans la classification morphologique des leucémies aiguës myéloïdes [Internet] [exercice]. Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2015 [cité 17 août 2021]. Disponible sur: <http://thesesante.ups-tlse.fr/1014/>
40. Troussard X, Maarouf N. Leucémies biphénotypiques (BAL): mythe, réalité, perspectives. 2006;5.
41. XF-1600-Brochure-MKT-10-1324-FINAL-9-28-2020.pdf [Internet]. [cité 16 août 2021]. Disponible sur: <https://us.systemex-flowcytometry.com/media/pdf/43/2b/c2/XF-1600-Brochure-MKT-10-1324-FINAL-9-28-2020.pdf>
42. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2021 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am J Hematol. 1 févr 2021;96(2):258-69.
43. Staber PB, Herling M, Bellido M, Jacobsen ED, Davids MS, Kadia TM, et al. Consensus criteria for diagnosis, staging, and treatment response assessment of T-cell prolymphocytic leukemia. Blood. 3 oct 2019;134(14):1132-43.
44. Gundesen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. Curr Oncol Rep. 28 janv 2019;21(1):8.

45. Chantepie SP, Cornet E, Salaün V, Reman O. Hematogones: an overview. *Leuk Res.* nov 2013;37(11):1404-11.
46. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol.* mai 1998;51(5):364-9.

Annexes

Annexe 1. Exemple de table de compensation	208
Annexe 2. Phénotypes des principaux lymphomes B.....	209
Annexe 3. Critères diagnostiques et diagnostiques différentiels pour la LPL-T.....	210
Annexe 4. Cytomètre, préparateur et centrifugeuse laveuse	211
Annexe 5. Composition du panel d'orientation lymphoïde	212
Annexe 6. Composition du panel complément B.....	213
Annexe 7. Composition du panel T	214
Annexe 8. Composition du panel de typage plasmocytaire.....	215
Annexe 9. Composition du panel LMMC	216
Annexe 10. Composition du panel Leucémie Aigue.....	217

Annexe 1. Exemple de table de compensation

Compensation Matrix 33

Use Show Autofluorescence Area ▾

Cha...	-FIT...	-PE%	-EC...	-PC...	-PC...	-AP...	-AP...	-AP...	-PB...	-KO...	-Vio...	-Vio...	-Vioe...
FITC		1,32	0,75	0,14	0,00	0,07	0,16	0,08	0,19	0,67	0,00	0,00	0,00
PE	14,80		15,25	1,62	0,00	0,01	0,07	0,03	0,07	0,42	0,00	0,00	0,00
ECD	6,09	56,34		0,93	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00
PC5.5	1,39	15,06	39,68		0,00	0,23	1,33	0,01	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
PC7	1,19	10,05	31,88	40,00		0,22	4,58	2,74	0,23	0,41	0,00	0,00	0,00
APC	0,00	0,00	0,69	4,43	0,00		0,86	7,23	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
APC...	0,00	0,00	0,11	45,61	0,00	9,95		0,95	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
APC...	0,00	0,02	0,23	35,62	0,00	7,95	104...		0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
PB4...	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,11	0,03		3,36	0,00	0,00	0,00
KO5...	2,91	0,06	0,36	0,00	0,00	0,04	0,15	0,09	16,97		0,00	0,00	0,00
VioL...	0,44	6,46	10,38	0,07	0,00	0,06	0,08	0,06	1,17	55,41		0,00	0,00
VioL...	0,33	3,29	6,82	0,97	0,00	3,10	0,14	0,25	0,66	35,91	0,00		0,00
VioL...	0,93	1,64	6,10	26,21	0,00	1,50	23,94	18,28	1,01	21,01	0,00	0,00	

Save to Compensation Library... Save As... Close

Annexe 2. Phénotypes des principaux lymphomes B

Table 1. Reagents of clinical utility in the evaluation of mature B-cell lymphoid neoplasms

Reagent	Normal distribution of staining	Clinical utility in mature B-cell lymphoid malignancy	Comments
CD5	T cells and minor B-cell subset.	Expression on B cells: CLL, MCL.	—
CD10	Immature T cells and B cells, subset of mature T cells and B cells, and neutrophils.	Germlinal center-like phenotype: FL, DLBCL, BL. Frequently present in ALL.	—
CD19	All B cells, including lymphoblasts, mature B-lymphoid cells, and most plasma cells.	Indicates B-cell lineage. May demonstrate abnormal intensity in B-cell neoplasms. Usually absent in plasma cell neoplasms.	Aberrant expression on myeloid cells in AML or MDS.
CD20	Acquired during maturation of precursor B cells (hematogones). Mature B-lymphoid cells positive. Absent on most BM plasma cells. Minor T-cell subset.	Supports B-cell lineage. Intensity often differs between subtypes: CLL/SLL dim, FL brighter. Aberrant expression on ALL or PCN.	Present on T-cell lymphoid neoplasms.
CD45	All B cells (weaker intensity on precursors and plasma cells), all T cells (weaker intensity on precursors).	Useful in distinguishing mature lymphoid neoplasms (bright intensity) from ALL and PCN (weak intensity to negative).	—
Kappa and lambda, surface	Mature B cells.	Immunoglobulin light chain restriction.	—
CD9*	Precursor B cells, activated T cells, platelets.	Precursor B-cell ALL.	—
CD11c*	Some B cells, some T cells.	Hairy cell leukemia CD11c (+ br.).	Frequent weaker expression on CLL, MCL and others.
CD15*	Myeloid and monocytic cells.	May be aberrantly expressed in B-cell neoplasia.	More frequently seen in ALL than in mature neoplasm.
CD22*	Cytoplasmic expression in early B cells. Surface expression acquired during maturation of precursor B cells.	Indicates B-cell lineage in ALL and mature lymphoid neoplasms. Intensity often differs between subtypes of mature B-cell neoplasm: CLL/SLL dim.	Cross reactivity of some clones with monocytes and basophils.
CD23*	Weak intensity expression on resting B cells and increased with activation.	Distinguish CD5+ B-cell lymphoid neoplasms: CLL/SLL (+ br).	—
CD25*	Activated B cells and T cells.	Hairy cell leukemia in combination with CD11c and CD103.	—
CD13*	Myeloid and monocytic cells.	May be aberrantly expressed in B-cell neoplasia.	More frequently seen in ALL than in mature neoplasm.
CD33*	Myeloid and monocytic cells.	May be aberrantly expressed in B-cell neoplasia.	More frequently seen in ALL than in mature neoplasm.
CD34*	B-cell and T-cell precursors and myeloblasts.	ALL.	Also AML.
CD38*	Precursor B cells (hematogones), normal follicle center B cells, immature and activated T cells, plasma cells (bright intensity), myeloid and monocytic cells, and erythroid precursors.	Bright intensity staining may indicate plasmacytic differentiation. Prognostic marker in CLL/SLL.	—
CD43*	T cells, myeloid, monocytes, small B-cell subset.	Aberrant expression in CLL, MCL, some MZL.	—
CD58*	Leukocytes including bright intensity staining of precursors and decreased intensity with maturation.	Distinction of ALL from normal precursor B-cell (hematogones) including detection of MRD.	—
CD79a and b*	Cytoplasmic staining in precursor B cells, plasma cells positive, variable expression mature B cells.	Indicates B-cell lineage in ALL and mature lymphoid neoplasms. Intensity often differs between subtypes of mature B-cell neoplasm: CLL/SLL dim CD79b.	CD79a staining has been reported in some T-ALL and rare mature T-cell lymphoid neoplasms.
CD103*	B-cell subset, intramucosal T cells.	Hairy cell leukemia and some MZL.	Also EATCL.
FMC-7*	B cells.	Distinguish CD5+ lymphoid neoplasm: CLL-, MCL often positive. Also HCL+.	—
bcl-2*	T cells, some B cells; negative normal germinal center cells.	Distinguish CD10+ lymphoid neoplasms: FL+, BL-.	Variable staining in DLBCL.
Kappa and lambda, cytoplasmic*	Plasma cells.	Light chain restriction in cells with plasmacytic differentiation.	Most flow cytometric assays detect surface and cytoplasmic Ig.
Zap-70*	T cells, NK cells, precursor B cells.	Prognostic marker in CLL/SLL.	—
TdT*	B-cell and T-cell precursors.	ALL.	Also some AML.
cdlgM*	First Ig component in precursor B cells. Expressed by subset of plasma cells and mature B cells.	IgM producing neoplasms that might be associated with Waldenström macroglobulinemia	—

Reagents included in this table were recommended in the consensus guidelines.

+ indicates usually positive; —, usually negative; b, bright or strong intensity; Ig, immunoglobulin; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; cdlg, cytoplasmic immunoglobulin; and —, not applicable.

*These reagents may be considered for secondary evaluation, after other reagents listed have been used in the initial evaluation.

Annexe 3. Critères diagnostiques et diagnostiques différentiels pour la LPL-T

D'après Staber et al. Blood 2019.(43)

Table 2. Requirements to establish the diagnosis of T-PLL

Major criteria	Minor criteria (at least 1 required)
<ul style="list-style-type: none"> • $>5 \times 10^9/L$ cells of T-PLL phenotype in peripheral blood or bone marrow 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormalities involving chromosome 11 (11q22.3; ATM)
<ul style="list-style-type: none"> • T-cell clonality (by PCR for TRB/TRG, or by flow cytometry) 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormalities in chromosome 8: idic(8)(p11), t(8;8), trisomy 8q
<ul style="list-style-type: none"> • Abnormalities of 14q32 or Xq28 OR expression of <i>TCL1A/B</i>, or <i>MTCP1</i>* 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormalities in chromosome 5, 12, 13, 22, or complex karyotype • Involvement of T-PLL specific site (eg, splenomegaly, effusions)

*Cases without *TCL1A*, *TCL1B*, or *MTCP1* rearrangement or their respective overexpression are collected as *TCL1*-family negative T-PLL.

Table 3. Immunophenotype of T-PLL and the most relevant differential diagnosis

Differential diagnosis	Immunophenotype
T-PLL	cyTCL1 ⁺ (>90%), CD3 ⁺ (>80%), CD4 ⁺ (60%), CD5 ⁺ (100%), CD7 ⁺ (>90%), CD8 ⁺ (15%), CD4 ⁺ CD8 ⁺ (25%)
T-ALL	Tdt ⁺ , CD1a ⁺
Leukemic PTCL	cyTCL1 ⁻
T-cell large granular lymphocytic leukemia	CD8 ⁺ , CD57 ⁺ , CD16 ⁺
Sézary syndrome	CD7 ⁻ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺
Adult T-cell lymphocytic leukemia	CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , HTLV1 ⁺

Percentage of patients with T-PLL expressing specific markers.¹⁹

Annexe 4. Cytomètre, préparateur et centrifugeuse laveuse



Annexe 5. Composition du panel d'orientation lymphoïde

Panel	Fournisseur	Ac	Référence	Clone
Orientation Lymphoïde	Dako	Kappa FITC	FR481	(Dual color Dako Clone A8B5+N10.2 poly lapin poly F(ab') ₂)
		Lambda PE		
	Beckman	CD4 ECD	6604727	Clone SFC112T4D11
	Beckman	CD19 PC5,5	B49211	J4.119
	Beckman	CD2PC7	A21689	39C1.5
	Beckman	CD5APC	A60790	BL1a
	Beckman	CD8A700	B49181	B9.11
	Beckman	CD3APCA750	A94680	UCHT1
	Beckman	CD20PB	B49208	B9E9 (HCR20)
	Beckman	CD45KO	B36294	Clone J.33

Annexe 6. Composition du panel complément B

Panel	Fournisseur	Ac	Référence	Clone
Orientation Lymphoïde	Dako	Kappa FITC	FR481	(Dual color Dako Clone A8B5+N10.2 poly lapin poly F(ab') ₂)
		Lambda PE		
	Beckman	CD4 ECD	6604727	Clone SFC12T4D11
	Beckman	CD19 PC5,5	B49211	J4.119
	Beckman	CD2PC7	A21689	39C1.5
	Beckman	CD5APC	A60790	BL1a
	Beckman	CD8A700	B49181	B9.11
	Beckman	CD3APCA750	A94680	UCHT1
	Beckman	CD20PB	B49208	B9E9 (HCR20)
	Beckman	CD45KO	B36294	Clone J.33

Annexe 7. Composition du panel T

Panel	Fournisseur	Ac	Référence	Clone
Orientation Lymphoïde	Dako	Kappa FITC	FR481	(Dual color Dako Clone A8B5+N10.2 poly lapin poly F(ab') ₂)
		Lambda PE		
	Beckman	CD4 ECD	6604727	Clone SFC12T4D11
	Beckman	CD19 PC5,5	B49211	J4.119
	Beckman	CD2PC7	A21689	39C1.5
	Beckman	CD5APC	A60790	BL1a
	Beckman	CD8A700	B49181	B9.11
	Beckman	CD3APCA750	A94680	UCHT1
	Beckman	CD20PB	B49208	B9E9 (HCR20)
	Beckman	CD45KO	B36294	Clone J.33

Annexe 8. Composition du panel de typage plasmocytaire

Panel	Fournisseur	Ac	Référence	Clone
Orientation Lymphoïde	Dako	Kappa FITC Lambda PE	FR481	(Dual color Dako Clone A8B5+N10.2 poly lapin poly F(ab') ₂)
	Beckman	CD4 ECD	6604727	Clone SFC112T4D11
	Beckman	CD19 PC5,5	B49211	J4.119
	Beckman	CD2PC7	A21689	39C1.5
	Beckman	CD5APC	A60790	BL1a
	Beckman	CD8A700	B49181	B9.11
	Beckman	CD3APCA750	A94680	UCHT1
	Beckman	CD20PB	B49208	B9E9 (HCR20)
	Beckman	CD45KO	B36294	Clone J.33

Annexe 9. Composition du panel LMMC

Panel	Fournisseur	Ac	Référence	Clone
	Beckman	Slan (M-DC8) FITC	130-117-371	
	Beckman	CD24 PE	IM1428U	
	Beckman	CD 56 PC5.5	B49189	
	Beckman	CD14 PC7	A22331	RMO52
	Beckman	CD7APCA700	B36290	
	Beckman	CD16 PB	A82792	
	Beckman	CD45KO	B36294	
Panel LMMC				

Annexe 10. Composition du panel Leucémie Aigue

Panel	Fournisseur	Ac	Référence	Clone
LA T1	iotest	CD7 FITC	A07755	8H8.1
	BDBIOSCIENCES	CD56 FITC	345811	NCAM16.2
	Beckman	CD13 PE	A07762	SJ1D1
	Beckman	HLADR ECD	B92438	immu357
	Beckman	CD33 PC5,5	B36289	UCHT1
	BDBIOSCIENCES	CD38 PC7	335825	HB7
	Beckman	CD34 APC	IM2472	581
	Beckman	CD10 AA700	B49223	alb1
	Beckman	CD19 AA750	A94681	J3-119
	BDBIOSCIENCES	CD117PB	563856	104D2
	Beckman	CD45 KO	B36294	J.33

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit 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, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Evaluation des performances analytiques d'un nouvel automate de cytométrie le XF-1600 Sysmex® : corrélation avec les Navios de Beckman Coulter®.

La cytométrie en flux est un outil indispensable dans le domaine de la biologie médicale, notamment en hématologie avec son apport dans le diagnostic et le suivi des hémopathies. Le XF-1600, nouvel automate de cytométrie en flux, est le premier cytomètre commercialisé par Sysmex®. L'objectif de ce travail est d'évaluer les performances analytiques de ce nouveau cytomètre en procédant à une corrélation avec les cytomètres déjà présent au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges : les Navios Beckman Coulter®. Cette corrélation est effectuée par passage en double de 200 échantillons marqués. Plusieurs panels d'anticorps utilisés en routine ont été paramétrés et évalués sur le XF-1600. La corrélation se fait par une comparaison quantitative des pourcentages des différentes sous populations cellulaires retrouvées, ainsi que par une comparaison qualitative des images obtenues par les deux cytomètres pour chacun des six panels d'anticorps testés en double. Les résultats de cette comparaison montrent une excellente concordance entre les deux cytomètres.

Mots-clés : Cytométrie en flux, corrélation, XF-1600, Navios

