

**UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE**

---

ANNEE 1999

THESE N° 349.

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Obtenu après soutenance du

**MEMOIRE**

**du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie médicale**

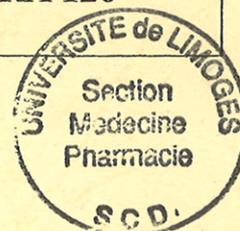
(conformément au décret n°90-180 du 10 septembre 1990)

présenté et soutenu publiquement devant le jury interrégional du Sud-Ouest  
le 30 novembre 1999 à Bordeaux

par

**Martine BLUTEAU**  
née le 30 juin 1971 aux Essarts

**DETECTION DES CELLULES MYELOIDES IMMATURES  
SANGUINES PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET PENTRA 120**



**JURY**

Président : M. le Professeur J. CAMBAR  
Assesseurs : M. le Professeur G. MARIT  
M. le Docteur F. LACOMBE  
Mme le Docteur B. L'AZOU  
M. le Docteur B. GAUTHIER  
M. le Docteur F. BELLOC

**UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE**

---

**DOYEN DE LA FACULTE:**

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

**ASSESEURS:**

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard  
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

**PROFESSEURS:**

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BERNARD</b> Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
<b>BOSGIRAUD</b> Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACOTECHNIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>GHESTEM</b> Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>HABRIOUX</b> Gérard	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACODYNAMIE

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

**POMMARET** Maryse

*Je dédie cette thèse,*

*A Laurent,*

*A mes parents,*

*A ma famille,*

*A Emmanuelle, Nathalie et Anne,*

*A tous mes amis nantais, bordelais et toulousains*

*Au Docteur J.Clémot.*

**A NOTRE PRESIDENT DE THESE,**

**Monsieur le Professeur J. CAMBAR**

Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux

Professeur des universités

Service de Biologie Cellulaire

*Nous vous sommes très reconnaissants d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.*

**A NOTRE JURY DE THESE,**

**Monsieur le Professeur G. MARIT**

Professeur des Universités

Chef du service d'Hématologie

*Nous sommes très honorés pour l'intérêt que vous avez bien voulu accorder à ce travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.*

**Monsieur le Docteur F. LACOMBE**

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'hématologie

*Vous avez bien voulu nous confier cette étude. Nous vous remercions de votre confiance et de l'aide que vous nous avez apportée dans la conduite de ce travail.*

*Nous avons apprécié vos qualités scientifiques et votre disponibilité.*

**Madame le Docteur B. L'AZOU**

Maître de conférence

Service de biologie cellulaire

*Nous vous sommes très reconnaissants de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.*

**Monsieur le Docteur B. GAUTHIER**

Assistant des Hôpitaux de Bordeaux

Laboratoire d'hématologie

*Merci d'avoir accepté avec beaucoup de spontanéité et de gentillesse de juger ma thèse.*

*Je t'adresse mes sincères remerciements.*

**Monsieur le Docteur F. BELLOC**

Docteur d'Université, HDR

Laboratoire d'hématologie

*Nous vous remercions de vous intéresser à ce travail et vous exprimons notre reconnaissance pour la gentillesse de votre accueil.*

Nous remercions tout particulièrement Laurent LACOSTE pour sa participation et sa disponibilité qui ont été déterminantes pour mener à bien ce travail, Franck DESEMERIE pour sa collaboration, l'équipe de cytométrie en flux pour son soutien et l'ensemble du personnel du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Haut-Lévêque, pour leur accueil.

**DETECTION DES CELLULES MYELOIDES  
IMMATURES DANS LE SANG  
PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET PENTRA 120**

# TABLE DES MATIERES

---

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>FORMULE LEUCOCYTAIRE MANUELLE</b>	<b>17</b>
I - Réalisation d'un frottis	17
I-1 Qualité des lames	17
I-2 Confection d'un frottis	18
I-2-1 Méthode classique	18
I-2-2 Autres méthodes	18
II - La coloration des frottis	18
II-1 Composition des colorants du MGG	19
II-2 Principe de la coloration par le MGG	19
II-3 Technique de coloration par le MGG	19
III - Lecture des frottis	20
III-1 Principe	20
III-2 Description sommaire des cellules sanguines nucléées	21
III-3 Description sommaire des cellules myéloïdes immatures	22
IV - Limites de la formule manuelle	24
<b>LA CYTOMETRIE EN FLUX</b>	<b>26</b>
<b>Principe général</b>	<b>26</b>
I - Le système	27
I-1 Centrage hydrodynamique	27
I-2 Faisceau excitateur	28
I-3 Paramètres analysés	28
I-3-1 La diffusion de la lumière dans l'axe	28
I-3-2 La diffusion de la lumière aux grands angles	28
I-3-3 La fluorescence	29
I-3-4 La polarisation de fluorescence	29
I-4 Collecte des signaux	29
I-5 Traitement du signal	30
I-6 Traitement des données	30

I-6-1 Représentation des résultats .....	30
I-6-2 Exploitation des résultats .....	32
II - Les fluorochromes utilisés en cytométrie en flux .....	33
II-1 Généralités .....	33
II-2 Les marqueurs de protéines .....	33
II-3 Les marqueurs d'acides nucléiques .....	34
II-4 Autres marqueurs .....	34
<b><u>Cytométrie en flux et formule manuelle</u></b> .....	<b>34</b>
I - Apport de la cytométrie en flux à la microscopie optique .....	35
II - Principes de l'établissement de la formule leucocytaire par cytométrie en flux.....	36
II-1 Antigènes .....	36
II-2 Détermination des sous-populations leucocytaires .....	36

## **NUMERATION ET FORMULE LEUCOCYTAIRE DU**

<b>PENTRA 120</b> .....	<b>41</b>
I - Principe de la numération des globules blancs .....	41
I-1 Principe de détection .....	41
I-2 Méthode .....	42
I-3 Résultats .....	43
I-4 Histogramme .....	43
II - Formule leucocytaire .....	43
II-1 Canal des polynucléaires basophiles .....	43
II-1-1 Principe de détection .....	43
II-1-2 Méthode .....	44
II-1-3 Résultats .....	44
II-2 Canal LMNE .....	45
II-2-1 Principe de la matrice .....	45
II-2-2 Méthode .....	47
II-2-3 Résultats .....	47
II-2-3-1 Répartition des cellules dans la matrice .....	48
II-2-3-2 Principe de calcul des populations .....	50
II-2-4 Alarmes .....	51
III - Principe de la matrice étendue .....	53

---

## TRAVAUX PERSONNELS

---

<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>56</b>
<b>MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>57</b>
I - Echantillons sanguins .....	57
I-1 Collecte des échantillons .....	57
I-2 Répartition des échantillons .....	57
I-3 Taux de leucocytes des échantillons .....	58
I-4 Cellules granuleuses immatures et cellules blastiques .....	58
II - Formule manuelle .....	59
III - Analyse cytométrique .....	59
III-1 Marquage des échantillons .....	59
III-2 Cytométrie en flux .....	60
III-3 Analyse des données .....	60
III-3-1 Exclusion des débris cellulaires .....	60
III-3-2 Lymphocytes et cellules blastiques .....	60
III-3-3 Monocytes .....	61
III-3-4 Polynucléaires neutrophiles et cellules granuleuses immatures .....	61
IV - Matrice étendue du Pentra 120 .....	62
IV-1 Présentation des données issues de la matrice étendue .....	62
IV-2 Exploitation des données de la matrice étendue .....	63
V - Analyse statistique .....	67
V-1 Coefficient de corrélation de Pearson .....	67
V-2 Coefficient de corrélation intraclass RI .....	67
<b>RESULTATS .....</b>	<b>68</b>
I - Comparaison des résultats fournis par la CMF et la formule manuelle .....	68
I-1 Etude statistique .....	68
I-2 Discordances entre les résultats de la CMF et ceux de la formule manuelle.....	70
a) Insuffisance de la cytométrie en flux .....	70
b) Discordance entre la CMF et la formule manuelle .....	71
II - Comparaison entre les résultats fournis par le Pentra 120 (Matrice étendue) et la CMF .....	72
II-1 Cellules blastiques .....	72
II-1-1 Répartition des blastes .....	73
II-1-2 Etude statistique .....	74
II-2 Cellules granuleuses immatures .....	75
II-2-1 Répartition des cellules granuleuses immatures .....	76

II-2-2 Etude statistique .....	77
III - Analyse détaillée des histogrammes de la matrice étendue (M2) du Pentra 120.....	78

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
I- Formule leucocytaire et cytométrie en flux .....	80
I-1 Nos résultats et ceux de la littérature .....	80
I-2 Limites de la cytométrie en flux .....	81
I-2-1 Limites liées à la technique .....	81
I-2-2 Limites liées aux échantillons : expression antigéniques anormales.....	82
I-2-3 Valeurs de références .....	83
I-2-4 Coût .....	84
I-3 Les limites de la cytométrie en flux dans notre étude .....	84
I-4 Perspectives quant à l'apport de la cytométrie en flux .....	85
II- Matrice étendue du Pentra 120 .....	86
II-1 Apports de notre étude .....	86
II-1-1 Détection des blastes malins .....	86
II-1-2 Détection des cellules granuleuses immatures .....	86
II-2 Perspectives .....	87
II-2-1 Cellules blastiques .....	87
II-2-2 Cellules granuleuses immatures .....	87

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>89</b>
-------------------------	-----------

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>90</b>
--	-----------

# ABREVIATIONS

AREB: Anémie Réfractaire avec Excès de Blastés  
ARSIA: Anémie réfractaire sidéroblastique idiopathique acquise  
ARSIA > LAM : ARSIA transformée en LAM  
CMF: Cytométrie en flux  
FITC: Isothiocyanate de fluorescéine  
FS ou FSC : Forward Scatter  
GB: Globules blancs  
GCI : Alarme grandes cellules immatures  
IG : Cellules granuleuses immatures  
LA Basophiles : Leucémie Aiguë à basophiles  
LAL : Leucémie Lymphoïde Aiguë  
LAM : Leucémie Myéloïde Aiguë  
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique  
LMMC : Leucémie Myéloïde Chronique  
LMNE : Matrice Lymphocyte Monocytes Neutrophiles Eosinophile  
LNH : Lymphome non hodgkinien  
LYA : Alarme Lymphocytes Atypiques  
M2 : Matrice étendue  
MD : Alarme Monocyte Droit de la matrice LMNE  
MD\* : Région Monocyte Droit découpée par le seuil automatique  
MGG : May-Grünwald Giemsa  
ND : Alarme Neutrophile Droit de la matrice LMNE  
ND\* : Région Neutrophile Droit découpée par le seuil automatique  
PE : Phycoérythrine  
PE / Cy 5 : Complexe phycoérythrine-allophycocyanine  
PNN : Polynucléaire neutrophile  
SM : Splénomégalie myéloïde  
SS ou SSC : Side Scatter  
R1 : Région 1 (supérieure) de la matrice M2  
R2 : Région 2 (inférieure) de la matrice M2  
r : Coefficient de corrélation de Pearson  
RI : Coefficient de corrélation intraclasse

---

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

# INTRODUCTION

Les progrès réalisés dans le domaine de l'hématologie biologique ont été considérables ces dernières années. En effet, effectuer un hémogramme classique, c'est-à-dire numération et formule leucocytaire, exigeait, il n'y a pas si longtemps, de nombreuses manipulations : dilution à la pipette d'un échantillon de sang, comptage à l'aide d'une cellule des éléments figurés sanguins, mesure de l'hématocrite après centrifugation, dosage de l'hémoglobine au spectrophotomètre, lecture au microscope d'un frottis coloré au May-Grünwald Giemsa pour établir la formule sanguine.

Actuellement, ces méthodes manuelles traditionnelles ont été avantageusement remplacées, tant au plan de la rentabilité, de la fiabilité, que de l'amélioration des conditions de travail au laboratoire, par la mise sur le marché de compteurs électroniques de plus en plus performants. Ils offrent en outre de nouvelles possibilités, la numération et la caractérisation des réticulocytes en sont des exemples.

La cytologie sanguine a également largement profité de l'apport de la cytométrie en flux qui permet la caractérisation d'un grand nombre de cellules de façon très rapide, par l'étude de leurs antigènes membranaires.

Jusqu'à maintenant, les cellules granuleuses immatures sont détectées par les alarmes des automates de numération sanguine et dénombrées par microscopie optique. Cependant, les nouveaux automates fournissent non seulement des alarmes mais, aussi une estimation du pourcentage de cellules granuleuses immatures.

En ce qui concerne les blastes circulants, les automates d'hématologie ne sont capables que d'indiquer leur présence en générant des alarmes, ce qui rend indispensable leur décompte par microscopie optique.

Seuls certains automates, d'introduction récente, tentent de rendre un résultat approché du nombre de blastes en utilisant des technologies différentes. Ces résultats sont utilisés pour apprécier le poids des alarmes.

# **FORMULE LEUCOCYTAIRE**

## **MANUELLE**

La méthode de référence, pour l'établissement des formules leucocytaires, est pour l'instant la lecture microscopique d'un frottis sanguin après coloration [40].

Nous nous proposons de revoir les différentes étapes de cette méthode.

### **I - REALISATION D'UN FROTTIS [5,40,48]**

L'examen qualitatif des frottis requiert des conditions techniques rigoureuses dans :

La préparation des lames

La confection des frottis

Leur coloration

La lecture des frottis

Un diagnostic cytologique valable ne peut s'établir que sur des frottis parfaitement étalés et colorés.

#### **I-1 Qualité des lames**

On trouve actuellement dans le commerce des lames lavées et dégraissées prêtes à l'emploi. Elles doivent être manipulées par les tranches et il ne faut jamais poser les doigts sur leur surface.

## **I-2 Confection d'un frottis**

### **I-2-1 Méthode classique**

Déposer une petite goutte de sang à environ 1 cm de l'extrémité d'une lame. Maintenir cette lame d'une main et de l'autre, incliner à 45° une deuxième lame, juste à l'avant de la goutte. L'amener au contact sans l'y faire pénétrer. Laisser diffuser le sang le long de l'arête, et avant qu'il n'en ait atteint les bords, d'un mouvement rapide, le tirer vers l'extrémité de la lame horizontale. Sécher rapidement, par agitation à l'air. Identifier le frottis.

Pour être correct, un frottis :

- Ne doit être ni trop épais (les éléments seraient rétractés et non identifiables), ni trop mince (il serait trop pauvre en éléments pour permettre une lecture convenable).
- Ne doit atteindre ni les bords, ni les extrémités de la lame (les éléments les plus volumineux seraient perdus).
- Doit être régulier (sinon la répartition des éléments est hétérogène et le décompte varie selon les champs examinés).
- Doit être correctement séché (un séchage défectueux provoque des artéfacts : hématies crénelées par exemple).

### **I-2-2 Autres méthodes**

L'étalement des cellules sanguines peut se faire par centrifugation (« Cyto-spin »). Ce procédé pourrait assurer une répartition des catégories cellulaires plus homogène.

Il existe également des automates confectionnant des frottis par étirement d'une goutte de sang.

## **II - LA COLORATION DES FROTTIS**

Plusieurs méthodes sont employées pour colorer les frottis sanguins. Les Anglo-saxons utilisent principalement la coloration de Wright. En France, la méthode la plus couramment utilisée est la coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG).

## **II-1 Composition des colorants du MGG**

La coloration MGG associe deux colorants : le May-Grünwald et le Giemsa. Chaque colorant est constitué de deux composés : l'un basique, l'autre acide. Ils forment un mélange neutre stabilisé et inactivé dans du méthanol.

Composition des colorants du MGG :

	<b>Colorant acide</b>	<b>Colorant basique</b>
<b>MAY-GRÜN WALD</b>	Eosine	Bleu de méthylène
<b>GIEMSA</b>	Eosine	azur de méthylène

## **II-2 Principe de la coloration par le MGG**

La première étape de la coloration consiste à fixer le frottis : ceci est obtenu par l'action du méthanol contenu dans le May-Grünwald utilisé pur.

La coloration commence lors de l'ajout d'eau aux colorants. En effet, ces derniers ne sont pas actifs en milieu alcoolique et n'agissent de façon sélective qu'au moment de leur libération en solution aqueuse tamponnée. Cette libération provoque la précipitation des colorants neutres.

Le May-Grünwald colore les éléments acidophiles ainsi que les granulations neutrophiles des leucocytes. Le Giemsa colore le cytoplasme des monocytes, des lymphocytes et la chromatine des noyaux.

Les structures cellulaires :

Acides (donc basophiles) sont colorées en bleu clair, bleu foncé, bleu violet, pourpre

Basiques (donc acidophiles) sont colorées en rose, rose rouge, rose orangé

Neutres (donc neutrophiles) sont colorées en beige (elles prennent les deux colorants)

Azurophiles : sont colorées en pourpre.

## **II-3 Technique de coloration par le MGG**

La coloration s'effectue par immersion des lames dans des bacs à coloration, de façon manuelle ou automatisée. Plusieurs protocoles sont utilisés ; ils diffèrent entre eux par leur durée d'incubation.

Le protocole utilisé dans le laboratoire est le suivant :

- Solution de May-Grünwald pure (Oxoid®)  
(étape de fixation du frottis par l'alcool) 2 min
- Solution de May-Grünwald  
diluée au ½ dans de l'eau tamponnée à pH 7 3 min
- Solution de Giemsa (Oxoid®)  
diluée au 1/10 dans de l'eau tamponnée à pH 7 2 bains de 5 min
- Rincer les lames dans deux bains d'eau du robinet  
Egoutter et sécher les lames à l'air

### **III - LECTURE DES FROTTIS**

#### **III-1 Principe**

L'examen de frottis commence par le contrôle au faible grossissement de la qualité des frottis. Depuis la tête jusqu'à la queue, l'épaisseur doit aller en diminuant. Les leucocytes doivent être intacts et leur répartition relativement homogène. Toutefois, on ne peut éviter une certaine ségrégation : les éléments les plus petits (lymphocytes) prédominent au centre du frottis, les plus volumineux (polynucléaires et monocytes) sont entraînés dans les franges et la queue.

Dans la zone d'épaisseur idéale, les hématies doivent être étalées en couche monocellulaire.

Après examen du frottis au faible grossissement, passer à un objectif à immersion (40 ou 50) le plus fort grossissement 100 étant réservé à l'examen détaillé des cellules. Le décompte s'effectue de la tête à la queue du frottis, sur des lignes parallèles aux bords, mais à une certaine distance d'eux. Il faut dénombrer au moins 100 cellules en les répartissant dans chaque catégorie.

Lorsque la numération des leucocytes révèle une leucopénie la formule est très difficile à établir, en raison du petit nombre de cellules présentes sur le frottis. La lecture du frottis est également plus longue.

Dans le cas des leucopénies, un leucoconcentré peut être réalisé. La leucoconcentration est obtenue par sédimentation (du sang total) puis centrifugation (du plasma et de l'interphase). Le culot de centrifugation, contenant les globules blancs, est étalé sur une lame puis coloré.

### **III-2 Description sommaire des cellules sanguines nucléées**

- **Polynucléaire neutrophile (PNN)**

Taille : 12-14  $\mu\text{m}$

Noyau : segmenté en 2 à 5 lobes réunis les uns aux autres par un filament de chromatine

Rapport nucléo-cytoplasmique bas

Chromatine : condensée en blocs compacts, elle est dépourvue de nucléole

Cytoplasme : acidophile contenant de nombreuses granulations II neutrophiles

- **Polynucléaire éosinophile**

Taille : 14-16  $\mu\text{m}$

Noyau en général bilobé (plus rarement trilobé)

Chromatine condensée en blocs compacts

Cytoplasme acidophile

Granulations nombreuses sphériques, volumineuses, bien individualisées, réfringentes et colorées en rouge orangé brillant par l'éosine

- **Polynucléaire basophile**

Taille : 14-16  $\mu\text{m}$

Noyau : relativement volumineux recouvert par les granulations. Le noyau ne présente pas la même segmentation que les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. La plupart sont peu ou non segmentés, parfois ils ont un aspect en trèfle ou en brioche.

Granulations volumineuses, grosses, métachromatiques, de couleur bleu noir, violacées basophiles.

- **Monocyte**

Taille : 15-20  $\mu\text{m}$

Cellule mononucléée qui est le plus grand des éléments figurés du sang

Noyau : irrégulier, encoché, replié, réniforme

Chromatine : « peignée », souvent plissurée

Cytoplasme : légèrement basophile, gris bleu « ciel d'orage », parfois vacuolé et parsemé de fins grains azurophiles à peine visible.

- **Lymphocyte**

Taille : 10-18  $\mu\text{m}$

Noyau : volumineux par rapport à la taille de la cellule, arrondi, régulier

Chromatine : épaissie, irrégulière, gommée

Cytoplasme : peu abondant, souvent réduit à un liseré périnucléaire, discrètement basophile, sans granulation.

### **III-3 Description sommaire des cellules myéloïdes immatures**

- **Myéloblaste**

Taille : 15-20  $\mu\text{m}$

Forme : cellule ovale, parfois arrondie

Noyau : volumineux, rond ou ovale, rapport nucléo-cytoplasmique élevé

Chromatine fine, avec 1 à plusieurs nucléoles bleu clair

Cytoplasme basophile, bleu franc, souvent plus foncé sur les bords, peu abondant

Quelques granulations primaires azurophiles, petites et d'autant plus rares que la cellule est plus jeune.

- **Promyélocyte**

Taille : 15-20  $\mu\text{m}$

Noyau volumineux excentré à légère concavité (rapport nucléo-cytoplasmique modéré)

Chromatine encore fine mais qui apparaît par endroits plus dense, condensée, les nucléoles sont à peine décelables voir invisibles

Cytoplasme, abondant, étendu, moins basophile que dans le stade précédent

Nombreuses granulations primaires azurophiles colorées en rouge vineux et granulations neutrophiles beiges ou marron clair à peine visible

En regard de la concavité nucléaire, se forme une zone cytoplasmique dépourvue de granules, l'arcoplasme juxtaglomérulaire correspondant à la zone de Golgi.

- **Myélocyte**

Taille : 12-18  $\mu\text{m}$

Noyau : excentré, ovalaire plus petit que celui du promyélocyte est plus foncé, plus dense et présente des masses chromatidiennes bien visibles

Chromatine : légèrement condensée

Cytoplasme : étendu légèrement acidophile (ayant perdu sa basophilie)

Quelques granulations primaires azurophiles mélangées à une grande majorité de granulations secondaires neutrophiles (aspect granité marron, beige-rosé)

- **Métamyélocyte**

Taille : 12-16  $\mu\text{m}$

Allongement du noyau, qui s'incurve sans être encore, comme dans la cellule mature, séparés en plusieurs lobes réunis par un filament, en fer à cheval (réniforme)

Chromatine de plus en plus condensée, forme des blocs très denses, bien limités

Le cytoplasme est le même que celui du myélocyte

Granulations secondaires neutrophiles (beiges).

- **« Band form »**

Stade intermédiaire entre le métamyélocyte et le polynucléaire neutrophile décrit par certains auteurs anglo-saxons. Le noyau est plus allongé que celui du métamyélocyte mais non encore franchement segmenté.

En France, ils sont comptabilisés avec les polynucléaires neutrophiles.

La détermination du taux de « Band form » par méthode manuelle est très aléatoire ainsi que les données fournies par les automates de numération sanguine [2,3,38].

## **IV - LIMITES DE LA FORMULE MANUELLE**

L'établissement de la formule leucocytaire par examen microscopique effectué sur 400 cellules est la méthode de référence [40].

Cette méthode de référence est sujette à de nombreuses critiques :

- Durée de la réalisation et de l'examen des lames.

- Limites liées à la méthode de confection des frottis :

Les méthodes de confection des frottis sont inégales [42].

La distribution des catégories cellulaires sur les frottis sanguins est irrégulière [29].

Les éléments peuvent être altérés lors de l'étalement. Ces altérations sont observées dans les syndromes prolifératifs (leucémie lymphoïde chronique par exemple).

- Cette méthode est limitée par le taux de leucocytes sanguins : plus il diminue et moins la formule est précise et sensible. Lorsqu'il est inférieur à  $1.10^9/L$ , la formule est difficilement réalisable.

- Imprécision de la détermination des sous-populations présentes en petite quantité (polynucléaires basophiles, myélémie, blastes dans les leucémies dites aleucémiques : LAM 3 et LAM 7)

- L'imprécision des résultats est d'autant plus importante que le nombre de cellules comptées est plus petit [46]

- Il existe une importante subjectivité de l'examineur, la reproductibilité entre deux individus est faible :

L'étude HÜBL, montre que deux comptes effectués par deux opérateurs différents sont peu corrélés pour les monocytes et les polynucléaires basophiles et mieux corrélés pour les lymphocytes et polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Les différences entre les deux formules sont significatives pour les polynucléaires basophiles et éosinophiles, mais pas pour les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes [25].

Des différences de résultats sont observées selon que les formules sont réalisées en routine ou incluses dans un protocole. Les formules obtenues en routine sous-estiment les formes anormales, des discordances sont notamment observées pour les polynucléaires neutrophiles non segmentés, les lymphocytes atypiques et les monocytes [29].

- La reconnaissance des cellules n'est pas toujours facile :

Les différents stades de maturation ne sont pas toujours clairement distincts entre eux.

La morphologie des blastes n'est pas toujours caractéristique.

Dans certains cas de myélodysplasie, les polynucléaires neutrophiles ont des aspects méconnaissables (dégranulation, hyposegmentation) et peuvent être confondus avec d'autres types de cellules (monocytes granulés).

Les monocytes sont une population cellulaire présentant une extrême variabilité morphologique dans les échantillons normaux ; cette variabilité est encore plus importante dans les prélèvements anormaux (sortie d'aplasie, facteurs de croissance, leucémies à monocytes) [29].

La difficulté de leur dénombrement est donc due à leur faible pourcentage dans le sang périphérique et à leur morphologie variable [22].

Dans le cas de leucémies monocytaires, il y a un nombre important de monocytes anormaux et il est parfois difficile de faire la distinction entre les cellules normales et néoplasiques [10,20].

- Les résultats manquent de reproductibilité entre deux laboratoires (même école formatrice pour la préparation et la lecture des frottis) [29]. Les formules leucocytaires obtenues par microscopie optique, ne sont donc pas toujours le meilleur reflet de la répartition des sous-populations leucocytaires sanguines.

Ces défauts de la méthode dite de référence affectent le développement des automates de cytologie sanguine, notamment en ce qui concerne le dénombrement des monocytes et des polynucléaires basophiles [7,12,23,42,50,53].

La méthode manuelle doit rester une méthode de base, mais le développement de nouvelles méthodes de référence semble indispensable pour remédier à ces situations.

# LA CYTOMETRIE EN FLUX

---

## PRINCIPE GENERAL [6,35,39]

---

### INTRODUCTION :

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse et de tri des cellules (*cytométrie*). Ces appareils effectuent différentes mesures de paramètre sur des particules en suspension dans un flux continu de liquide (*en flux*). Chaque particule est mesurée séparément et la distribution des populations peut ainsi être analysée. Les cytomètres actuels sont capables d'analyser des intensités de fluorescence, ce qui leur a donné un grand essor lors de l'apparition des anticorps monoclonaux marqués par des fluorochromes.

Les cytomètres actuels permettent de grandes vitesses d'analyses (de l'ordre de plusieurs milliers de cellules par seconde).

Le principe de fonctionnement est le même pour tous les cytomètres en flux. Il est fondé sur une focalisation hydrodynamique de l'échantillon dans un faisceau lumineux exciteur, un système d'acquisition des signaux lumineux engendrés et un système de traitement des données qui rend les résultats interprétables.

# I - LE SYSTEME

## I-1 Centrage hydrodynamique

La suspension cellulaire est injectée dans une veine liquide de forte section qui ne peut s'écouler que par une buse de faible diamètre (Figure 1). Les cellules sont ainsi entraînées par le liquide de veine. Le débit étant constant, le diamètre diminuant, la vitesse augmente. A la sortie de la buse les cellules défilent à raison de plusieurs milliers par seconde dans un jet liquide ayant le diamètre de la buse (quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ ).

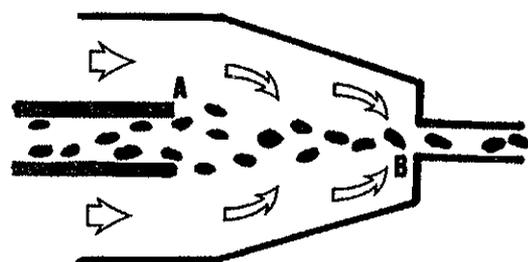
Ce centrage hydrodynamique permet un positionnement précis du jet dans le faisceau laser et favorise l'orientation des particules.

En jouant sur la dilution de l'échantillon cellulaire injecté et sur le diamètre de la buse, il est possible de faire passer les cellules une à une dans les faisceaux lumineux et de les analyser individuellement.

Deux systèmes d'injection existent :

- contrôle de la différence entre les pressions appliquées sur la veine conductrice et sur le jet cellulaire permettant la maîtrise du débit cellulaire.
- injection volumétrique d'une quantité calibrée de suspension cellulaire à l'aide d'une seringue permettant le calcul du nombre absolu de cellules analysées.

Figure 1: Représentation de la focalisation hydrodynamique [6].



Le flux de liquide accélère les cellules à la sortie de A et les oblige à passer une par une par l'orifice B.

## **I-2 Faisceau exciteur**

L'excitation lumineuse des cellules doit se faire par un faisceau facilement focalisable, de grande stabilité et de grande brillance. Le faisceau laser présente, en plus de ces propriétés qui conditionnent la précision et la sensibilité des résultats, un monochromatisme qui facilite et simplifie le filtrage. La répartition de la lumière dans le faisceau laser est gaussienne et nécessite donc un excellent centrage de l'échantillon dans le faisceau. D'autres sources lumineuses peuvent être utilisées : lampes à vapeur de mercure ou laser refroidi.

## **I-3 Paramètres analysés**

Lorsqu'une cellule, entraînée par le flux liquide, traverse le faisceau lumineux dit exciteur, elle émet un certain nombre de signaux lumineux qui seront utilisés comme source de données par le cytomètre.

Ces signaux sont représentatifs de propriétés physiques (regroupées sous le terme de diffusion lumineuse) ou biologiques (c'est le cas de la fluorescence émise par certains fluorochromes spécifiques ou rendus spécifiques pour un composant cellulaire).

### **I-3-1 La diffusion de la lumière dans l'axe**

Lorsqu'une cellule traverse le faisceau laser, elle diffuse une partie de la lumière reçue par la surface membranaire. Cette lumière a la même longueur d'onde que le faisceau exciteur et est recueillie dans l'axe du laser sur une photodiode. Cette diffusion dans l'axe est essentiellement due à la diffraction de la lumière et est surtout liée à la taille de la cellule. Cette diffusion est aussi appelée diffusion aux petits angles ou Forward Scatter (FS ou FSC).

### **I-3-2 La diffusion de la lumière aux grands angles**

Une partie de la lumière du faisceau exciteur, traversant la paroi cellulaire, est à son tour diffusée par les organites intracellulaires dans toutes les directions de l'espace et est recueillie sur un photomultiplicateur (lumière de même longueur d'onde que le faisceau exciteur). Cette diffusion est essentiellement due à des phénomènes de réfraction et de réflexion lumineuse et mesure surtout l'hétérogénéité du contenu cellulaire. On la nomme diffusion aux grands angles, elle est aussi appelée Side Scatter (SS ou SSC).

### **I-3-3 La fluorescence**

Les cellules marquées par un ou plusieurs fluorochromes vont émettre dans toutes les directions de l'espace une ou plusieurs fluorescences de longueur d'onde supérieure à celle du faisceau excitateur.

Ces fluorescences pourront être séparées en fonction de leur longueur d'onde par des filtres interférentiels puis captées sur des photomultiplicateurs. L'intensité de la fluorescence émise sera fonction du nombre de molécules de fluorochrome fixées sur la cellule.

Le fluorochrome peut être spécifique d'un élément cellulaire déterminé et l'intensité de fluorescence émise proportionnelle à sa quantité (par exemple la fluorescence observée avec des colorants des acides nucléiques).

Il peut aussi ne jouer qu'un rôle « d'étiquette fluorescente » pour un marqueur dont le site de fixation cellulaire est connu (par exemple des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes particuliers et couplés à une sonde fluorescente).

### **I-3-4 La polarisation de fluorescence**

Elle peut également être utilisée comme paramètre d'analyse (elle est utilisée dans l'étude des membranes cellulaires).

## **I-4 Collecte des signaux**

Les différents signaux lumineux de diffusion ou de fluorescence émis par une même cellule, doivent être distingués entre eux avant d'être recueillis sur les photomultiplicateurs appropriés.

Ces signaux sont donc séparés en fonction :

- de leur direction (diffusion dans l'axe et diffusion aux grands angles)
- de leur longueur d'onde (fluorescence) par un système de filtres optiques.

Puis, ils parviennent à différents capteurs lumineux (photodiodes ou photomultiplicateurs).

Pour une seule cellule, au moyen de combinaison de filtres appropriés, il est possible de recueillir simultanément sur les capteurs lumineux deux diffusions lumineuses (FSC et SSC) et trois voire quatre fluorescences différentes.

## **I-5 Traitement du signal**

Les signaux lumineux qui viennent frapper un photomultiplicateur provoquent de la part de ce dernier la production d'un courant, dont la tension dépend de la quantité de photons reçus.

Ainsi la diffusion ou la fluorescence d'une cellule sera transformée en un signal électrique. La tension de sortie du photodétecteur est ensuite amplifiée de façon linéaire ou logarithmique. Le traitement du signal ne s'effectue que pour une valeur de tension supérieure à un seuil défini.

Les signaux qui se trouvent sous forme analogique (signal électrique) doivent être transformés en nombres binaires. Ils sont donc pris en charge par un convertisseur analogique digital qui va quantifier l'amplitude de chaque signal (continue entre 0 et 8 V) en un numéro de canal (ces canaux sont en général au nombre de 256 ou 1024).

La valeur d'un canal est codée en bits qui seront utilisables par l'unité informatique. Les nombres électroniques qui constituent les données sont ensuite stockés dans des mémoires tampons afin de pouvoir être rappelés très rapidement.

## **I-6 Traitement des données**

Le traitement des données consiste à les visualiser et à les analyser par différents moyens.

### **I-6-1 Représentation des résultats**

Les données produites par les cytomètres sont le plus souvent multidimensionnelles et doivent être affichées de façon efficace et conviviale. Elles le sont en général sous forme d'histogrammes de distribution mono ou bi-dimensionnels.

- histogramme monoparamétrique

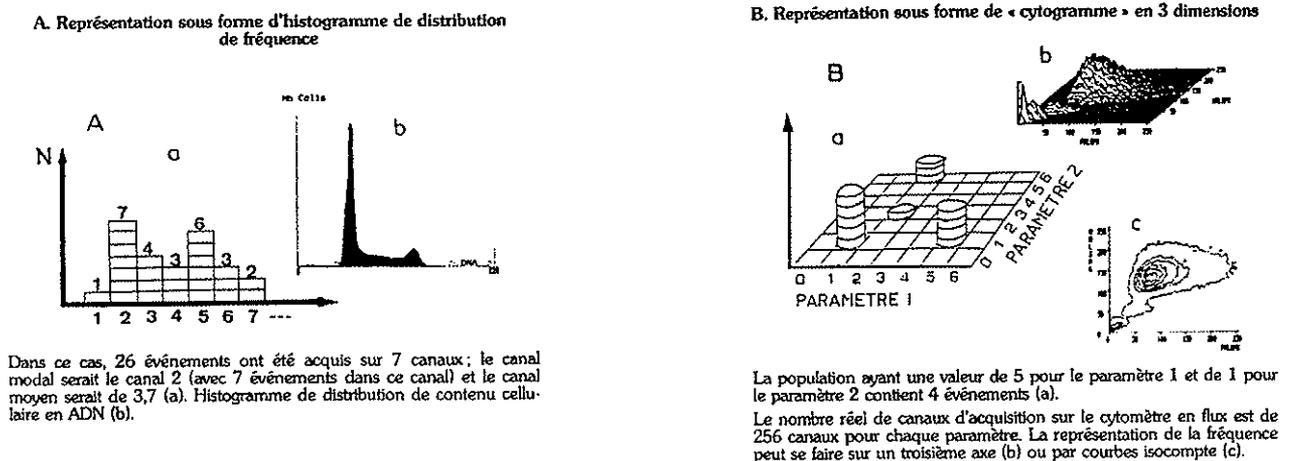
Par abus de langage on appelle simplement histogrammes les histogrammes monoparamétriques. C'est le cas des histogrammes de distribution de fréquence dont l'abscisse (étalonnée de 0 à 255 ou 1024 canaux) représente l'amplitude du paramètre étudié et dont l'ordonnée représente le nombre d'événements (cellules) par canal. Chaque fois qu'une cellule traverse le faisceau laser, elle émet un signal lumineux qui est transformé, digitalisé et incrémenté dans le canal qui lui correspond (Figure 2A).

- histogramme bi-paramétrique

Nous avons vu que chaque cellule émettait plusieurs signaux différents. Il est possible de combiner sur une même représentation deux paramètres indépendants. Il s'agit alors d'histogramme biparamétrique ou « cytogramme » ou « scattergrams ». Dans ce cas, les deux valeurs des deux paramètres déterminent une adresse sur un « échiquier » de 256x256 cases par exemple. Les cellules s'accumulent dans la case correspondant à leur adresse. Le nombre de cellules peut être visualisé sur un troisième axe, par des courbes de niveaux ou par des intensités de couleurs (Figure 2B).

Les cytogrammes représentés sous forme de points sont appelés dot-blot.

Figure 2. Représentations simplifiées des résultats obtenus par cytométrie en flux [1].



Il existe des procédures permettant :

- de sélectionner des régions sur un premier cytogramme
- d'établir un nouvel histogramme à partir de cette région.

On emploie le terme bit-map pour définir un cytogramme sur lequel ont été tracées des fenêtres (ou zones d'intérêts ou « gates ») à partir desquelles seront générés de nouveaux histogrammes.

## I-6-2 Exploitation des résultats

### ➤ Dénombrement à l'intérieur d'une zone d'intérêt

Il s'agit de l'opération la plus simple consistant à compter le nombre d'événements à l'intérieur d'une zone d'intérêt. Il peut s'agir du nombre de cellules entre deux curseurs d'un histogramme monoparamétrique, ou du nombre de cellules contenues dans une zone (une fenêtre) tracée sur un histogramme bi-paramétrique.

### ➤ Calcul des paramètres caractérisant les histogrammes de distribution

Toute distribution peut être caractérisée par les paramètres classiques : mode, moyenne, médiane, écart type. La distribution des valeurs d'un paramètre cellulaire mesuré par cytométrie en flux peut être caractérisée par les mêmes outils :

- Le mode correspond au canal contenant le plus d'éléments
- La moyenne correspond au canal moyen
- La médiane correspond au canal au-delà duquel la moitié de la population est encore distribuée.

L'écart type et le coefficient de variation de la distribution sont aussi utilisés.

En biologie, les paramètres cellulaires analysés se distribuent le plus souvent suivant des lois statistiques dites normales, soit symétriques (distribution gaussienne), soit asymétriques (distribution log-normale).

Les paramètres caractéristiques des histogrammes de distribution tels que le canal moyen d'intensité de fluorescence, le coefficient de variation, le nombre et le pourcentage d'événements à l'intérieur d'une population donnée sont obtenus grâce au calculateur de l'unité informatique.

Des logiciels de traitement informatique des résultats facilitent l'interprétation de ces données.

Il est possible de conditionner l'acquisition d'un paramètre sur la valeur de un ou plusieurs autres paramètres. Cette possibilité est utilisée, par exemple, pour la numération et l'étude de chaque population leucocytaire.

## **II - LES FLUOROCHROMES UTILISES EN CYTOMETRIE EN FLUX**

### **II-1 Généralités**

Les fluorochromes sont des groupements chimiques qui, lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse dont la longueur d'onde entre dans leur spectre d'absorption, réémettent une partie de la lumière absorbée (fluorescence). La lumière émise a une énergie plus faible que la lumière absorbée et donc une longueur d'onde supérieure. Les fluorochromes utilisés en cytométrie en flux doivent être capables d'absorber la lumière dans des longueurs d'ondes correspondant à celles des sources lumineuses utilisées par les appareils et doivent présenter un bon rendement quantique. Si un laser à argon, par exemple, sert de source excitatrice, les fluorochromes utilisés seront capables d'absorber les deux raies principales de l'argon : la raie bleue (488nm) et/ou la raie verte (514nm).

### **II-2 Les marqueurs de protéines**

Certains fluorochromes sont surtout utilisés couplés à une protéine qui leur apporte leur spécificité. Cette protéine est en général (mais pas toujours) un anticorps qui ira se fixer sur son antigène et rendra fluorescentes les cellules exprimant cet antigène. En principe l'intensité de fluorescence de la cellule sera d'autant plus importante qu'elle exprime un plus grand nombre de sites antigéniques.

- L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est certainement le plus employé de ces fluorochromes en raison de la facilité de son couplage avec des protéines. La fluorescence émise est verte.
- La phycoérythrine (PE) est maintenant utilisée pour des doubles marquages car elle est excitée dans les mêmes longueurs d'onde que le FITC, avec un meilleur rendement quantique. Elle émet une fluorescence rouge orangée.
- Un troisième type de fluorochrome utilise le principe du transfert d'énergie et est constitué par un complexe entre la PE et une allophycocyanine ou le rouge Texas : dans ce cas la PE est excitée par le laser, émet une fluorescence orangée qui est absorbée par le rouge Texas qui émet à son tour une fluorescence rouge.

En couplant ces trois fluorochromes à trois anticorps différents, il est maintenant possible d'effectuer des triples marquages sur des appareils relativement simples en utilisant un système de filtres adéquat.

### **II-3 Les marqueurs d'acides nucléiques**

Certaines molécules se fixant sur les acides nucléiques présentent des propriétés spectrales qui les rendent utilisables comme fluorochrome en CMF. Parmi celles-ci, l'iodure de propidium est sans doute le plus utilisé.

### **II-4 Autres marqueurs**

Un grand nombre d'autres fluorochromes est utilisé en CMF comme sondes pour mesurer le contenu cellulaire en ADN, en protéines, en ions ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{H}^+$ ), en organites (mitochondries, lysosomes...), le potentiel ou la viscosité membranaire.

---

## **CYTOMETRIE EN FLUX ET FORMULE LEUCOCYTAIRE**

---

Les applications de la cytométrie en flux en biologie médicale, sont de plus en plus nombreuses :

Comptage automatique des réticulocytes sanguins

Immunophénotypage des cellules hématopoïétiques médullaires et sanguines pour le diagnostic et le suivi des hémopathies aiguës ou chroniques

Quantification des sous-populations lymphocytaires pour le suivi des patients HIV . . .

## I- APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX A LA MICROSCOPIE OPTIQUE

La cytométrie en flux est un apport précieux pour le diagnostic et le pronostic des leucémies aiguës surtout lorsque le typage de la lignée est difficile à réaliser par microscopie optique et par cytochimie [7,8,17,41,52]. Elle permet, pour chaque échantillon, l'étude d'un très grand nombre de cellules (10 000 dans notre étude) ce qui augmente considérablement la précision et la sensibilité du résultat, notamment pour le dénombrement des sous-populations présentes en faible quantité (polynucléaires basophiles, cellules leucémiques, myélémie).

Les échantillons leucopéniques sont aussi analysés sur 10 000 cellules ; alors qu'en routine la formule est réalisée avec de grandes difficultés sur 100 voire seulement sur 50 cellules.

Pour toutes ces raisons, cette technique est plus reproductible au niveau d'un même protocole. La cytométrie en flux est une technique d'analyse rapide : une fois le marquage des échantillons effectué, cinq paramètres sont acquis simultanément par cellules et, 100 à 500 cellules sont analysées par seconde.

Il faut noter la haute précision et l'objectivité des résultats de la cytométrie en flux et la subjectivité relative de l'observation microscopique.

Ce serait donc une bonne méthode de référence pour la détermination des sous-populations leucocytaires, afin de palier aux défauts de la méthode manuelle. Les résultats sont encourageants en ce qui concerne les monocytes et les polynucléaires basophiles [20,22,23,24].

C'est aussi une méthode simple pour isoler et identifier de façon fiable une population blastique, dans le sang et la moelle, où elle est mélangée à d'autres cellules de lignées différentes, la population blastique pouvant elle-même être hétérogène.

Enfin elle peut permettre une évaluation objective de la maturation de la lignée granuleuse [11].

## **II - PRINCIPES DE L'ETABLISSEMENT DE LA FORMULE LEUCOCYTAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

### **II-1 Antigènes**

Les cellules hématopoïétiques présentent au niveau de leur surface membranaire, de nombreux antigènes. L'expression qualitative et quantitative de ces antigènes varie au cours de la maturation cellulaire et en fonction des lignées cellulaires.

Ce sont de véritables marqueurs de lignées cellulaires et de stade de maturation. Leur étude s'effectue à l'aide d'anticorps monoclonaux et, les antigènes les plus importants ont été identifiés par différents groupes de travail [45].

Dans notre étude, nous utilisons trois anticorps reconnaissant les trois antigènes suivants :

- L'antigène CD45 également appelé antigène leucocytaire commun, est exprimé sur tous les globules blancs. L'expression membranaire de cet antigène est différente en fonction de la lignée et de la maturité des cellules [44,47].
- L'antigène CD16 (FcγRIII) est un récepteur membranaire du fragment Fc des immunoglobulines, exprimé par les polynucléaires neutrophiles. Cette glycophorine permet l'opsonisation des particules recouvertes d'IgG [13,14]. L'expression membranaire de l'antigène CD16 augmente au cours de la maturation de la lignée granuleuse [11]. L'antigène CD16 apparaît dès le stade promyélocyte [19].
- L'antigène CD14 : antigène caractéristique de la lignée monocytaire

### **II-2 Détermination des sous-populations leucocytaires**

Dans notre étude, nous ne nous intéressons pas à la détermination des pourcentages de polynucléaires éosinophiles et basophiles. Les paramètres FSC, SSC, CD45, CD16 et CD14 nous permettent de distinguer les sous-populations leucocytaires entre elles. Pour cela, plusieurs histogrammes et conditionnements sont nécessaires.

L'utilisation de l'histogramme FSC/SSC pour définir les sous-populations leucocytaires est peu précis, notamment pour les cellules blastiques :

leur pourcentage est mal estimé  
de faux négatifs et faux positifs sont trouvés.

En effet, les caractéristiques des cellules blastiques, des monocytes, des lymphocytes et des polynucléaires basophiles sont telles que ces populations se chevauchent sur l'histogramme FSC/SSC [10,34].

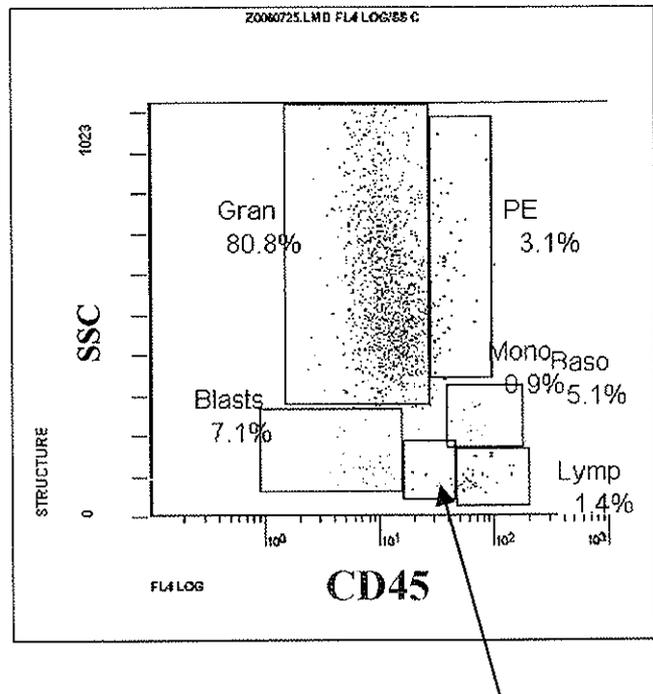
Cet histogramme ne sera donc utilisé qu'afin de délimiter la zone des leucocytes et d'éliminer les débris et agrégats.

En combinant l'expression du CD45 et les caractéristiques SSC, 5 sous-populations peuvent être définies. Parmi les méthodes simples, c'est la plus discriminative, applicable au sang et à la moelle pour différencier les cellules [44].

L'histogramme CD45/SSC, (Figure 3) au niveau du sang permet la définition de 6 fenêtres, après un conditionnement qui exclue les débris cellulaires [10,32] :

- Les lymphocytes matures montrent l'intensité de fluorescence CD45 la plus importante et le signal SSC le plus bas. (Figure 3, Fenêtre « Lymph »)
- Les monocytes matures expriment plus faiblement le CD45. Ils peuvent être clairement distingués des lymphocytes par leur signal SSC plus élevé. (Figure 3, Fenêtre « Mono »)
- Polynucléaires éosinophiles (Figure 3, Fenêtre « PE »)
- Cellules granuleuses (polynucléaires neutrophiles + cellules granuleuses immatures) : l'expression du CD45 est moyenne. Le degré d'expression du CD45 est parfois lié au stade de maturation mais, ceci est inconstant. Le signal SSC de la lignée granuleuse est le plus élevé. (Figure 3, Fenêtre « Gran »)
- Polynucléaires basophiles (Figure 3)
- cellules blastiques (Figure 3, Fenêtre « Blasts ») : les cellules précurseurs de la moelle osseuse et les cellules blastiques de leucémies aiguës expriment faiblement le CD45 et présentent un signal SSC faible [44,47].

Figure 3. Histogramme CD45/SSC



Polynucléaires Basophiles

Chacun des 6 groupes cellulaires définis sur l'histogramme CD45/SSC, peut être analysé par des anticorps spécifiques afin de confirmer l'individualisation [34].

Il en résulte que l'utilisation du CD45 permet une bonne identification des cellules blastiques : précurseurs normaux de la moelle ou blastes de leucémies aiguës primitives ou secondaires. Néanmoins on ne peut pas définir l'origine myéloïde ou lymphoïde de ces cellules.

L'expression du CD45 plus faible pour les blastes que pour les lymphocytes et les monocytes permet une bonne distinction de ces cellules.

L'utilisation de l'histogramme CD45/SSC possède de nombreux avantages pour la détermination des populations blastiques :

- L'intensité d'expression du CD45 est très stable alors que la variété des cellules blastiques est très grande.
- La limite de détection des populations blastiques est basse car la sensibilité est plus importante.
- La détermination de cette population est plus pure, moins contaminée par les autres cellules sanguines. L'analyse de ces cellules est plus fiable.
- La variabilité inter laboratoire diminue
- La fiabilité est plus grande

- La sensibilité pour la détection de maladie résiduelle est plus grande
- L'expression des résultats est facilitée [10,44,47].

L'histogramme CD45/SSC ne permet cependant pas de différencier les myéloblastes normaux des blastes malins [49,51]. Mais, à partir de cette fenêtre, on peut étudier l'expression de marqueurs aberrants [10] afin de différencier les populations bénignes et malignes [36].

#### Contamination par les polynucléaires basophiles

L'histogramme CD45/SSC différencie mal les polynucléaires basophiles des lymphocytes. Ces polynucléaires peuvent même interférer avec les cellules blastiques [25,43].

Différentes méthodes peuvent y remédier :

- utilisation du CD9 pour déterminer le taux de polynucléaires basophiles (utilisé dans le labo) [28].
- purification négative des polynucléaires basophiles en marquant les autres cellules (monocytes par le CD14, lymphocytes T par le CD2, lymphocytes B par HLA-DR, cellules granuleuses par le CD16) [25].

#### Maturation granuleuse

L'expression du CD45 par les cellules granuleuses immatures et matures, est inconstante. La séparation de ces deux types cellulaires est difficile en utilisant seulement cet antigène [44].

Les études de Hübl et Bowen ont montré l'acquisition de l'antigène CD16 par la lignée granuleuse au cours de sa maturation, puis son augmentation d'expression avec les différents stades de maturation [19].

Les populations neutrophiles CD16<sup>-</sup> et CD16<sup>+</sup> ont été comparées aux résultats de la microscopie optique. La population CD16<sup>-</sup> correspondrait aux cellules myéloïdes immatures (myélocytes et métamyélocytes) et la population CD16<sup>+</sup> aux polynucléaires neutrophiles [26,27,30,32].

Cependant, il existe des discordances entre les stades cellulaires définis par microscopie optique et ceux définis par la cytométrie en flux. Certains auteurs ont trouvé le CD16 déjà

exprimé sur les stades de métamyélocytes dans la moelle. Des difficultés de corrélation apparaîtraient en présence de “band cells” [26].

De plus, la séparation entre les neutrophiles CD16<sup>-</sup> et CD16<sup>+</sup> n'est pas toujours distincte et certains échantillons montrent une population CD16<sup>-</sup> étendue vers les neutrophiles CD16<sup>+</sup> sans transition. L'utilisation d'un contrôle pour définir un seuil de positivité peut alors être envisagée dans ces cas [21].

La détermination des différents stades de maturation granuleuse peut donc se faire sur l'histogramme CD16/SSC :

Les lymphocytes, les polynucléaires basophiles et les cellules souches sont exclus par leur SSC faible.

Les monocytes, dont l'intensité d'expression du CD16 est variable sont séparés de la population neutrophile par leur signal SSC bas ou par un conditionnement négatif avec le CD14 [24].

Les polynucléaires éosinophiles CD16<sup>-</sup>, peuvent interférer avec les granuleux CD16<sup>-</sup>, il faut donc les différencier des cellules granuleuses par leur CD45<sup>+</sup>.

Dans certains cas, des blastes granuleux peuvent interférer avec les myélocytes dans l'histogramme anti-CD16/SSC. Un conditionnement négatif de ces cellules détectées sur l'histogramme biparamétrique anti-CD45/SSC permet un “débruitage” de l'histogramme anti-CD16/SSC.

### Monocytes

L'identification des monocytes est effectuée par la détection de leur antigène CD14. L'expression CD45 des monocytes peut aussi permettre leur caractérisation mais de façon moins sensible et moins spécifique [23,24].

Dans les myélémies retrouvées dans les syndromes myélodysplasiques, la dégranulation des éléments se traduit par une diminution de leur intensité SSC. Une confusion devient alors possible. Le marquage par l'anti-CD14 permet de l'éviter.

# NUMERATION ET FORMULE LEUCOCYTAIRE DU PENTRA 120

## I - PRINCIPE DE LA NUMERATION DES GLOBULES BLANCS [1]

### I-1 Principe de détection :

L'automate Pentra 120 (société ABX, Montpellier) détecte et compte des leucocytes en s'appliquant sur la variation d'impédance (principe Coulter) :

- L'échantillon est dilué dans un diluant électrolytique (conducteur de courant), la conductibilité du diluant étant très différente de celle des cellules.

- La dilution est aspirée au niveau d'un micro-orifice calibré. De chaque côté de cet orifice sont placées deux électrodes au travers desquelles circule un courant d'intensité constante.

- les cellules sont détectées et comptées lors de leur passage à travers l'orifice, car elles déplacent leur propre volume d'électrolyte, ce qui conduit à une variation d'impédance (résistance électrique) au niveau de cet orifice.

- Ce phénomène est enregistré sous la forme d'une impulsion, correspondant à une augmentation de différence de potentiel.

- Selon la loi d'Ohm, on peut écrire :

$$U=R.I$$

U= Tension

R= Courant

I= Résistance

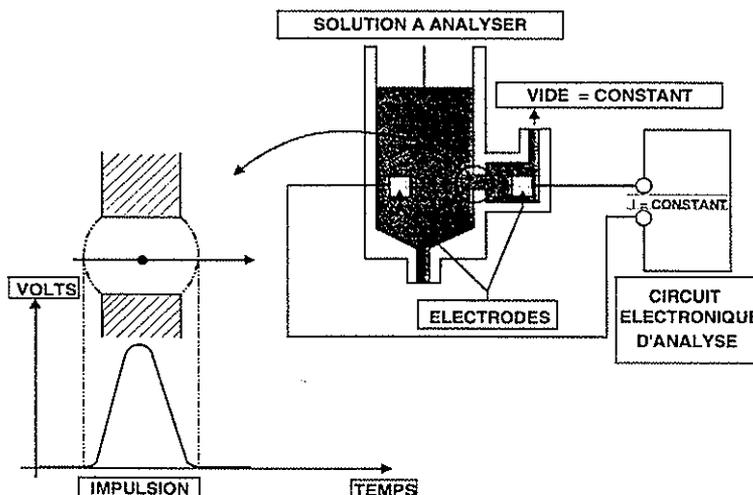
La variation de différence de potentiel est proportionnelle à la résistance. Or, il a été démontré que la résistance varie en fonction du volume de la cellule. Figure 4

Deux données de base sont donc fournies par l'instrument :

Le nombre d'impulsions fournit des renseignements sur les numérations des différents types d'éléments figurés.

L'amplitude des impulsions permet de déterminer les volumes et de calculer les paramètres qui en dérivent [33,48].

Figure 4 :  
Principe du volume Coulter [1]



Les impulsions engendrées ont une tension très faible ; un circuit d'amplification permet de les augmenter. Puis elles sont analysées par un microprocesseur qui rejette toutes les impulsions ne correspondant pas aux caractéristiques d'une cellule. Le système de traitement du signal place un seuil électronique permettant d'éliminer le bruit de fond. Un autre seuil sépare les leucocytes des plaquettes et des hématies lysées.

## **I-2 Méthode :**

La mesure des globules blancs est réalisée dans le même bac que celui utilisé pour la mesure de l'hémoglobine et donc avec la même dilution.

10,7 µl de sang total sont mélangés à 2 ml de VEGADIL® (solution saline tamponnée contenant un détergent). 500 µl de VEGALYSE® (cyanure de potassium et sels d'ammonium quaternaires) sont ajoutés pour la lyse des globules rouges. La dilution est homogénéisée par un bullage appliqué au bas du bac. La dilution finale est de 1/234. La solution est aspirée au travers d'un saphir percé de 100 µm de diamètre. Deux comptages de 5 secondes sont

effectués, séparés par une contre pression qui repousse les cellules et permet d'éviter le bouchage de l'orifice.

### **I-3 Résultats :**

Les résultats sont rendus en nombre de cellules comptées par unité de volume, multiplié par un coefficient de calibration.

### **I-4 Histogramme :**

Les cellules sont classées dans 128 canaux de mesure (canaux 0 à 127) en fonction de leur volume. Ceci permet la construction d'histogrammes de répartition des cellules en fonction de la taille. La courbe obtenue est lissée mathématiquement.

## **II - FORMULE LEUCOCYTAIRE**

L'automate possède deux canaux distincts pour la réalisation de la formule sanguine :

le canal basophile

le canal "matrice LMNE" (Lymphocyte Monocytes neutrophiles Eosinophile)

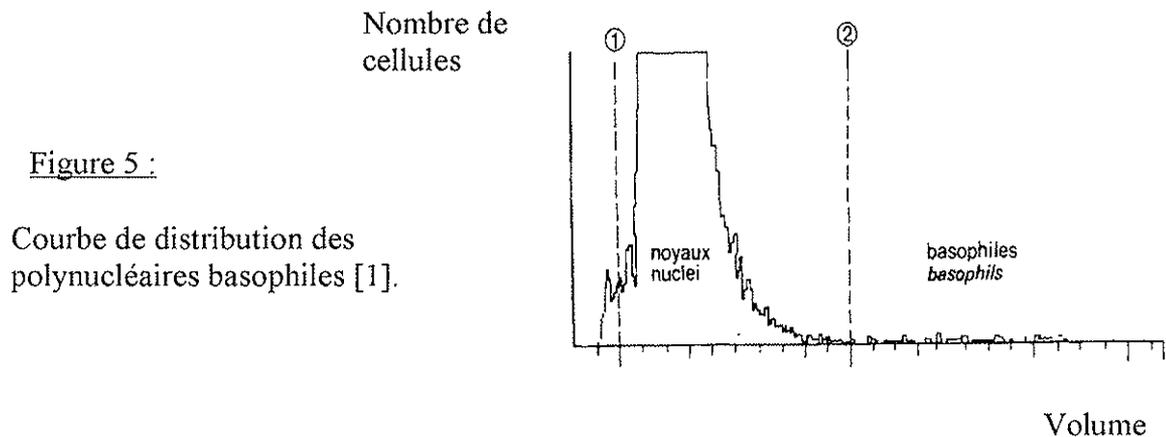
Le premier permet le dénombrement des polynucléaires basophiles, le second celui des autres sous populations leucocytaires (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, lymphocytes et monocytes). En effet, la population des basophiles est trop faible, dans un échantillon de sang normal, pour pouvoir être distinguée des autres.

### **II-1 Canal des polynucléaires basophiles :**

#### **II-1-1 Principe de détection :**

Le principe de dénombrement est le même que celui utilisé pour les globules blancs (principe Coulter). La mesure des polynucléaires basophiles se fait dans un bac spécifique et après une lyse par le réactif BASOLYSE® (solution acide contenant un agent de lyse, un surfactant et un conservateur). Ce réactif permet la lyse des hématies et des cytoplasmes de tous les leucocytes sauf des polynucléaires basophiles et de certains blastes [33]. Tous les éléments qui traversent le saphir (GR lysés, plaquettes, noyaux de GB et basophiles) sont comptabilisés et classés selon leur volume. Le système de traitement du

signal place un seuil électronique entre les polynucléaires basophiles (les plus à droite sur la courbe de distribution) et les noyaux des autres leucocytes d'une part (seuil ①), et les hématies lysées, les plaquettes et le bruit de fond d'autre part (seuil ②). Figure 5.



### II-1-2 Méthode :

10 $\mu$ l de sang total sont mélangés avec 2ml de BASOLYSE<sup>®</sup> (dilution au 1/200). La solution est aspirée au travers d'un orifice calibré de 80  $\mu$ m de diamètre. Deux comptages de 5 secondes sont effectués, séparés par une contre pression qui permet d'éviter le bouchage de l'orifice.

Les impulsions obtenues sont amplifiées puis analysées par un microprocesseur qui rejette toutes les impulsions ne correspondant pas aux caractéristiques d'une cellule.

### II-1-3 Résultat :

L'étude de la courbe de distribution volumétrique des globules blancs du canal basophile permet d'isoler sur la droite de l'histogramme les polynucléaires basophiles. En effet, étant les seuls à conserver leur cytoplasme, ils se distinguent alors par leur grande taille.

- Sur la gauche se trouvent regroupés les noyaux des globules blancs par ordre de taille. C'est ainsi qu'une population de blastes possédant des noyaux de grande taille va avoir tendance à augmenter la population située au milieu de l'histogramme.
- Sur l'extrême gauche de l'image se trouvent les débris dus à l'hémolyse et de l'action cytochimique.
- Les 100% des leucocytes sont donc représentés par la totalité des noyaux plus les basophiles (soit le nombre de cellules entre le seuil ① et la limite haute).

➤ Le pourcentage de polynucléaires basophiles contenus entre le seuil ② et la limite haute, est ainsi calculé.

Les résultats des polynucléaires basophiles sont rendus :

- en pourcentage par rapport au nombre total de cellules comptées (polynucléaires basophiles + noyaux de leucocytes)
- en nombre absolu (nombre de cellules comptées par unité de volume multiplié par un coefficient de calibration).

Notons que ce canal permet en plus du dénombrement des polynucléaires basophiles, celui des globules blancs totaux.

## **II-2 Canal LMNE :**

### **II-2-1 Principe de la matrice :**

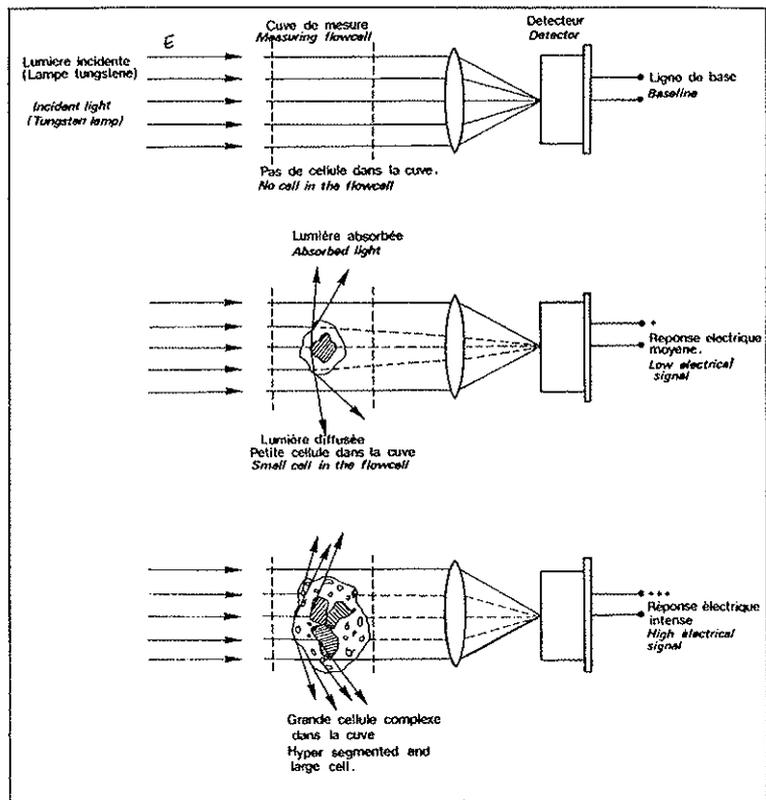
L'analyse des globules blancs de la matrice est fondée sur deux principes fondamentaux :

- La mesure de volume par variation d'impédance (volume Coulter).
- La mesure de la lumière transmise à 0° d'angle, permettant d'obtenir une réponse tenant compte de l'absorbance de chaque cellule ainsi que sa composition interne par diffusion de la lumière incidente (par utilisation d'une source lumineuse halogène). Figure 6

Un volume de sang total est envoyé dans le bac spécifique LMNE pour y subir l'action du réactif EOSINOFIX<sup>®</sup> (solution alcoolique contenant du propylène glycol, un colorant formique, des tampons, des sels alcalins, des tensioactifs surfactants et un aldéhyde conservateur) et y être chauffé à 33,5°C. Par l'action cytochimique de ce réactif, les globules rouges sont lysés, les globules blancs sont stabilisés sous leur forme native et sont teintés (coloration par le noir Soudan). La réaction est arrêtée par l'ajout de VEGADIL<sup>®</sup>. L'action du

Un volume de sang total est envoyé dans le bac spécifique LMNE pour y subir l'action du réactif EOSINOFIX<sup>®</sup> (solution alcoolique contenant du propylène glycol, un colorant formique, des tampons, des sels alcalins, des tensioactifs surfactants et un aldéhyde conservateur) et y être chauffé à 33,5°C. Par l'action cytochimique de ce réactif, les globules rouges sont lysés, les globules blancs sont stabilisés sous leur forme native et sont teintés (coloration par le noir Soudan). La réaction est arrêtée par l'ajout de VEGADIL<sup>®</sup>. L'action du réactif EOSINOFIX<sup>®</sup> a pour but de modifier les propriétés d'absorbance des cellules.

Figure 6 :  
Principe de la diffusion lumineuse [1].



Principe de la coloration au noir Soudan :

Les lymphocytes sont très peu colorés, leur noyau est légèrement coloré en gris et la membrane du cytoplasme en gris foncé.

Les monocytes sont un peu plus colorés, leur noyau et leur membrane cytoplasmique sont colorés en gris foncé, leurs fines granulations sont légèrement colorées.

Les neutrophiles sont colorés de la même façon que les monocytes mais le noir Soudan colore leurs granulations I et II en gris foncé.

Les éosinophiles absorbent très fortement le noir Soudan au niveau de leurs granulations, apparaissant ainsi noires.

Les cellules granuleuses immatures sont colorées au niveau de leurs granulations.

Les corps d'Auer de certains blastes myéloïdes peuvent prendre la coloration au noir Soudan.

Dans les déficits héréditaires en peroxydase, les cellules sont peu colorées par le noir Soudan

La dilution est ensuite envoyée dans une cellule optique sous forme de double gainage hydrodynamique permettant un guidage parfait des éléments lors de leur passage dans l'orifice de comptage (60µm de diamètre) et devant la fenêtre de mesure optique.

Chaque cellule subit individuellement deux mesures différentes permettant la différenciation et la quantification des sous populations leucocytaires :

- un dénombrement et une mesure du volume cellulaire selon le principe Coulter (résistivité).
- une analyse du degré de complexité cellulaire par mesure de la lumière transmise (chaque globule blanc absorbe et diffracte une partie du faisceau lumineux en fonction de la structure du noyau et du cytoplasme et des propriétés apportées par la coloration au noir Soudan).

De ces deux mesures, on établit une matrice, qui permet de quantifier les différents éléments leucocytaires exceptés les polynucléaires basophiles. Chaque population est isolée des autres au moyen d'une analyse de haute définition des signaux transmis.

### **II-2-2 Méthode :**

25µl de sang total sont mélangés à 1ml de réactif EOSINOFIX<sup>®</sup> (dilution au 1/80). Après une phase réaction/dilution dans le bac chauffant, la solution est transférée vers le banc optique par aspiration, avant d'y être analysée dans l'ensemble de mesure.

Dans cet ensemble de mesure, l'échantillon est gainé une première fois avant de passer dans l'orifice de comptage (diamètre de 60µm), où sont réalisés un dénombrement et une mesure de volume par résistivité entre l'anode et la cathode.

L'échantillon est gainé une seconde fois à la sortie de l'orifice de comptage. Le flux traverse alors le faisceau lumineux où est mesurée la transmission optique de chaque cellule.

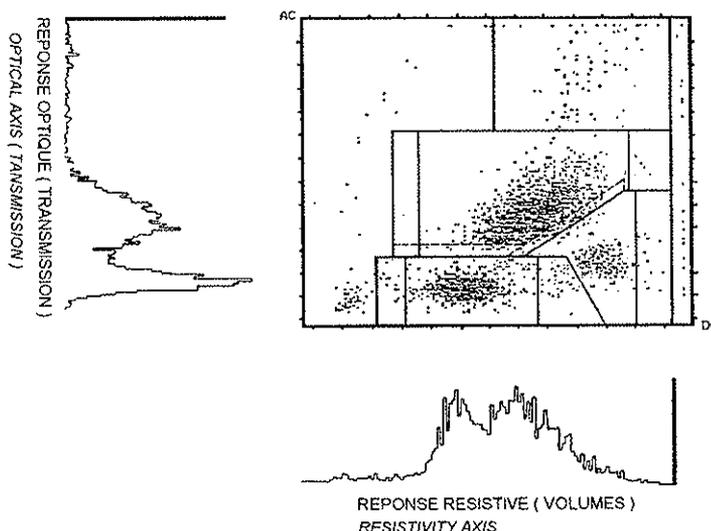
Pour chaque cellule passant dans l'ensemble de mesure, il est donc réalisé successivement une mesure de volume par résistivité puis une mesure de transmission optique.

### **II-2-3 Résultats :**

A partir de ces mesures, un histogramme biparamétrique de distribution des leucocytes est réalisé avec l'impédance électrique sur l'axe Ox (volume) et l'absorption lumineuse sur l'axe Oy (structure). Les axes X et Y sont divisés en 128 canaux numérotés de 0 à 127. Chaque cellule est représentée par un point. Figure 7

Figure 7 :

Histogramme de distribution  
des leucocytes [1].



Dans le dernier canal, s'accumulent les cellules de volume correspondant au canal 127 lui-même et les cellules de diamètre supérieur, qui sont dites en « saturation ».

L'étude de l'image matricielle permet de distinguer plusieurs nuages de points, nettement séparés les uns des autres, correspondant à quatre populations leucocytaires.

#### II-2-3-1 Répartition des cellules dans la matrice :

- **Polynucléaires éosinophiles :** De part l'action du réactif sur les membranes cytoplasmiques, les leucocytes conservent tous à peu près leur taille native et les polynucléaires éosinophiles sont seuls traités afin de les séparer optiquement des neutrophiles. Les polynucléaires éosinophiles se trouvent donc en haut de l'axe optique par leur forte absorbance et ont une taille sensiblement égale aux grands neutrophiles.
- **Polynucléaires neutrophiles :** Les polynucléaires neutrophiles, par la présence de granules dans leur cytoplasme et de noyaux généralement segmentés, vont absorber d'autant plus de lumière que leur morphologie est complexe : un polynucléaire neutrophile hypersegmenté donnera une réponse optique plus importante qu'un jeune polynucléaire hyposegmenté, d'où un positionnement du nuage des polynucléaires neutrophiles d'autant plus haut sur l'axe optique que ceux-ci sont segmentés et/ou granuleux.

Ceci explique la forme elliptique du nuage des neutrophiles.

- **Monocytes** : Les monocytes étant des cellules de grande taille à noyau réniforme et ayant un cytoplasme assez abondant et sans granulations vont diffracter et absorber peu de lumière, ce qui les positionne vers le bas de l'axe optique mais nettement à droite de l'axe des volumes. Certains grands monocytes peuvent venir empiéter plus vers la droite, dans la zone "GCI" (Grandes Cellules Immatures) de la matrice.

Les polynucléaires basophiles se situent dans la zone des monocytes. Donc pour calculer le nombre de monocytes, on retranche le nombre de polynucléaires basophiles (calculé à partir du canal basophile) de cette zone.

- **Lymphocytes** : Les lymphocytes étant petits et de forme régulière, se positionnent en bas de l'axe optique et de l'axe de taille. Les populations de lymphocytes normaux se remarquent généralement par une bonne homogénéité des volumes et par une répartition gaussienne. L'extrême gauche de la case des lymphocytes doit normalement être vide, toutefois en présence de petits lymphocytes, un étalement du nuage vers la gauche peut être observé.

L'analyse de la matrice LMNE, permet également de séparer et dénombrer deux populations supplémentaires dont le pourcentage sert d'alarme :

- **Les Grandes Cellules Immatures (GCI)** : Les cellules granulocytaires immatures sont détectées par leur volume naturellement plus grand que les autres et par la présence de granules accentuant la diffraction optique. Ainsi les éléments tels que les métamyélocytes se retrouvent nettement à droite des neutrophiles et sensiblement à la même hauteur, les myélocytes, promyélocytes, eux, se trouvent en saturation à l'extrême droite de la matrice. Ces trois dernières populations sont comptées en GCI (Grandes Cellules Immatures) et les valeurs rendues sont incluses dans les valeurs des polynucléaires neutrophiles.

Les cellules blastiques se retrouvent généralement à la droite des monocytes et, dans ce cas, viennent augmenter le nombre de GCI comptées.

Les cellules GCI correspondent à celles localisées dans le dernier canal de résistivité (canal 127) et dans les zones ND et MD.

- **Les lymphocytes atypiques (LYA)**

Les lymphocytes de grande taille sont détectés dans la case LYA, dans laquelle on peut également trouver les formes réactionnelles lymphoïdes, lymphocytes stimulés et plasmocytes.

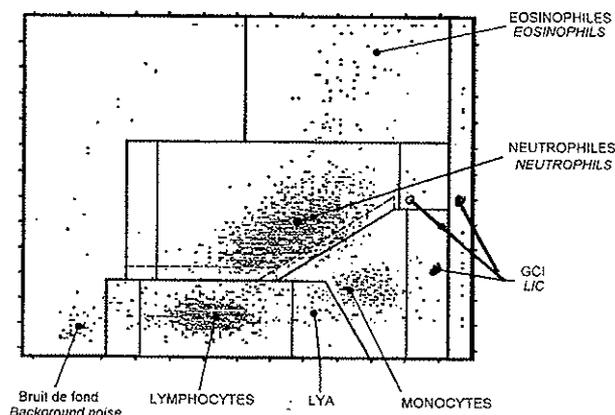
Dans le cas de petits blastes, c'est le nombre de LYA qui sera augmenté, ceux-ci venant déborder entre les lymphocytes et les monocytes normaux.

La présence d'agrégats plaquettaires se détecte par un nuage en fusée partant de l'origine de la matrice (case du bruit de fond) et s'étalant dans la zone des lymphocytes.

Les érythroblastes, par l'action de la lyse, ne conservent plus que leurs noyaux se situent également dans la partie extrême gauche de la zone des lymphocytes.

Les plaquettes et les stromas résultant de l'hémolyse représentent la population dite du bruit de fond, située en bas à gauche de la matrice.

Figure 8 :  
Matrice LMNE [1]



### II-2-3-2 Principe de calcul des populations :

#### Découpage de la matrice :

Un découpage de la matrice en compartiments (délimitant les différentes sous-populations leucocytaires), a été établi à partir de populations leucocytaires normales. Ces différents secteurs sont définis par le positionnement de plusieurs seuils. Que se soit les seuils résistifs (axe Ox) ou d'absorbance (axe Oy), leur positionnement est mesuré en canaux et a été établi afin d'obtenir la meilleure séparation des différentes catégories cellulaires. Schéma.

Les seuils de séparation des populations leucocytaires sont fixes et délimitent les normalités morphologiques des éléments leucocytaires. Seul le seuil entre les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles est mobile.

Ces seuils permettent la numération des cellules contenues dans chaque zone et donc, le dénombrement de chacune des sous populations.

Différents découpages de la matrice peuvent être créés et appliqués au calcul de la formule en fonction de l'utilisation faite de l'automate.

-Améliorer les séparations des différentes populations qui peuvent varier légèrement en fonction des anticoagulants utilisés ou des réglages même de l'automate.

-Création de différents types (standard ou distinction entre homme, femme et enfants).

-Utilisation de l'automate en mode vétérinaire, de façon à mieux cerner les populations en fonction des différentes espèces.

-Modifier fondamentalement une ou plusieurs zones de la matrice afin de cerner plus précisément une population spécifique en vue de recherches

#### calcul des différentes populations cellulaires :

Chaque paramètre est calculé par les formules suivantes :

$$\text{Paramètre en \%} = \frac{\text{nombre de cellules dans un secteur}}{\text{nombre total de cellules égal à "100\% matrice"}}$$

Le nombre total de cellules égal à "100 % matrice" est la somme des impacts reçus dans les secteurs lymphocyte, monocyte, polynucléaires éosinophile et basophile.

Paramètre en valeur absolue = paramètre en % x nombre de globules blancs

#### II-2-4 Alarmes

En ce qui concerne l'établissement de la formule leucocytaire, deux types d'alarmes ont pour but de prévenir l'opérateur de la présence de cellules anormales dont la validation doit être effectuée par l'examen au microscope [1,33].

-les alarmes quantitatives qui sont dites positives au-delà d'un seuil défini par l'opérateur

-les alarmes qualitatives qui interviennent selon deux modalités : présence ou absence.

Les seuils de la matrice ont été optimisés pour l'analyse d'échantillons sanguins normaux. Cela se traduit sur l'histogramme par la localisation des sous populations dans des aires qui leur sont spécifiques. Or, toute altération morphologique (cellules anormales ou atypiques) au sein d'une population se traduira, sur la matrice, par un décalage du nuage correspondant à cette population. Les secteurs délimités ne seront plus adaptés pour différencier les cellules.

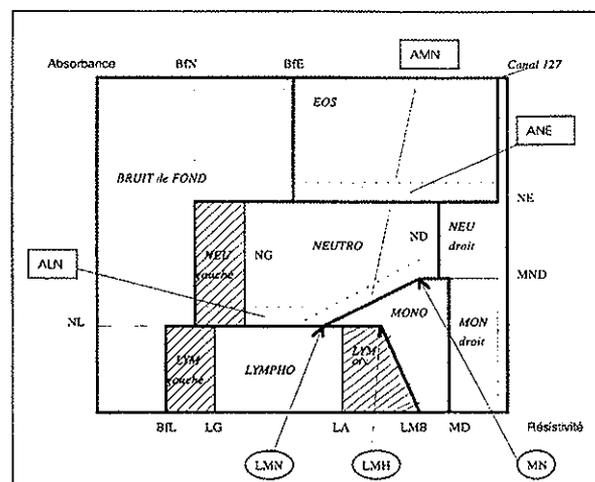
L'alarme quantitative est déclenchée si sa valeur est plus grande ou égale à la valeur fixée du seuil (LYA et GCI).

Les alarmes qualitatives sont créées afin de détecter la moindre anomalie morphologique au sein d'une population cellulaire et les difficultés de séparation des différentes populations. Ces alarmes sont déclenchées lors de la présence de cellules dans des secteurs intermédiaires.

Ainsi au niveau de la matrice, les alarmes définies sont :

Figure 9 : Alarmes de la matrice LMNE [1].

- BF bruit de fond
- LG lymphocytes gauches
- LN lymphocytes neutrophiles
- MN monocytes neutrophiles
- NG neutrophiles gauches
- MD monocytes droits
- ND neutrophiles droits
- NE neutrophiles éosinophiles



Il existe d'autres alarmes non identifiables sur le diagramme et interne à l'appareil, ce sont des alarmes de corrélation :

Corrélation entre les deux comptages de globules blancs du LMNE

Corrélation entre le compte des leucocytes du canal GB et du canal LMNE

Corrélation entre le compte des leucocytes du canal LMNE et du canal Basophile

Corrélation entre le compte de basophiles du canal basophile et la somme monocytes plus basophiles du canal LMNE.

### **III - PRINCIPE DE LA MATRICE ETENDUE**

L'automate de démonstration utilisé pour notre étude est équipé du module d'analyse Pentra 120. Ce module, est équipé, pour l'analyse des populations leucocytaires, d'une matrice LMNE. A cette matrice classique est ajoutée une seconde matrice, dite matrice étendue ou double matrice (M2).

Chacun des axes de la matrice étendue M2 est également constitué de 128 canaux :

128 canaux pour la répartition de la résistivité cellulaire, au niveau de l'axe des abscisses Ox. Ces canaux sont numérotés de 128 à 255, les canaux 0 à 127 étant ceux de la matrice LMNE.

128 canaux pour la répartition de l'absorbance cellulaire, sur l'axe des ordonnées Oy. Ces canaux sont numérotés de 0 à 127, ils correspondent aux mêmes canaux que ceux de la matrice LMNE. Schéma

Les cellules contenues dans la matrice M2 correspondent aux cellules vues en saturation dans le canal 127 de la matrice LMNE.

Cette matrice permet donc l'étude plus fine des caractéristiques résistives des cellules du canal 127. En effet, les cellules sont réparties de la même façon que sur la matrice LMNE en ce qui concerne leur absorbance (marqueur de complexité cellulaire). Mais elles subissent une nouvelle répartition entre elles, en fonction de leurs caractéristiques résistives (marqueur du volume cellulaire).

Les figures 10A et 10B représentent un même échantillon analysé sur Pentra 120 sans et avec matrice étendue.

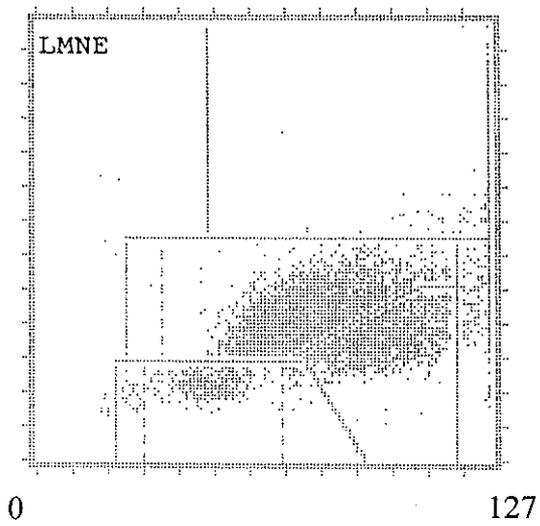


Figure 10A :  
échantillon analysé sans matrice  
étendue

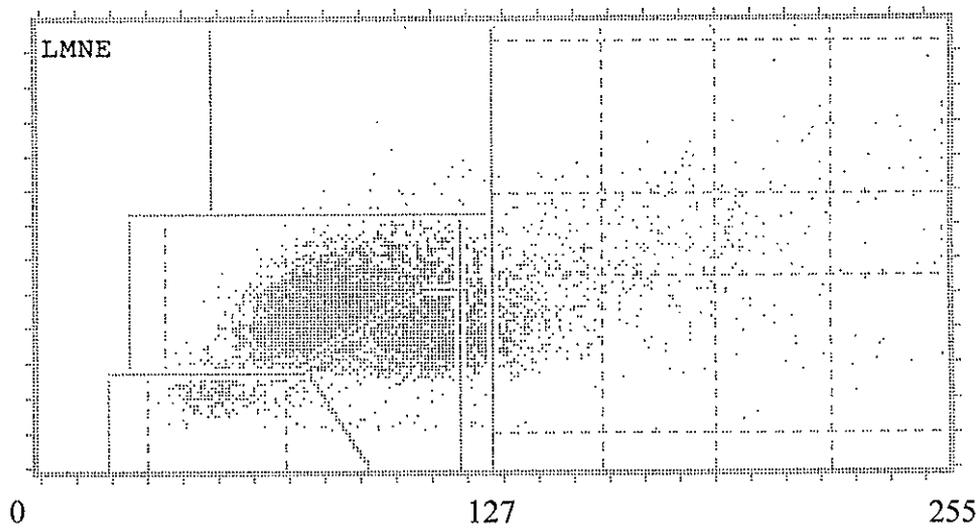


Figure 10B :  
échantillon analysé avec matrice  
étendue

---

# **TRAVAUX PERSONNELS**

---

# OBJECTIFS DE L'ETUDE

Devant les nombreux défauts et contraintes de la réalisation des formules leucocytaires par microscopie optique, les recherches se portent sur le développement de techniques de cytométrie en flux et sur l'amélioration des performances des automates de numération formule sanguine.

Notre étude comporte deux parties. La première consiste à évaluer une technique de cytométrie en flux pour le dénombrement des cellules granuleuses immatures et blastiques sanguines. La seconde à évaluer l'apport de la matrice étendue du Pentra 120 dans la détection de ces mêmes catégories cellulaires.

# MATERIEL ET METHODES

## I - ECHANTILLONS SANGUINS

### I-1 Collecte des échantillons

Les prélèvements proviennent des différents services cliniques de l'hôpital Haut-Lévêque de Bordeaux, essentiellement des services d'hématologie clinique. Ils ont été recueillis pendant une période de 4 mois.

151 échantillons de sang ont été prélevés sur tubes Vacutainer EDTA K3 (Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

Les échantillons ont été sélectionnés, d'après les résultats de la formule leucocytaire manuelle effectuée en routine. Les critères de sélection sont les suivants :

myélémie  $\geq 2\%$

et/ou pourcentage de blastes  $\geq 2\%$ .

Le terme myélémie regroupe les taux de métamyélocytes, myélocytes et promyélocytes. Nous avons également appelé l'ensemble de ces cellules "cellules granuleuses immatures" et lui avons attribué l'abréviation IG.

### I-2 Répartition des échantillons

Parmi les 151 échantillons, 53% (80) proviennent de patients ayant une hémopathie. Les prélèvements ont été réalisés à divers stades de ces pathologies :

Diagnostic ou traitement

Suivi de la maladie

Hospitalisation pour maladie intercurrente

La répartition de ces échantillons en fonction de la pathologie est la suivante :

32 leucémies aiguës

23 syndromes myéloprolifératifs

19 hémopathies lymphoïdes

6 myélodysplasies

Pour les échantillons provenant des autres services, nous n'avons pas recueilli de données cliniques précises. Certains correspondent à des syndromes inflammatoires et à des bicytopenies.

### **I-3 Taux de leucocytes des échantillons**

La numération leucocytaire des 151 échantillons est comprise entre  $1,3.10^9$  et  $97.10^9/L$ .

- 17% (25) sont leucopéniques ( $1,3.10^9$  à  $3,89.10^9/L$ )
- 31% (47) sont normaux ( $4,16.10^9$  à  $9.9.10^9/L$ )
- 52% (79) sont hyperleucocytaires ( $4,16.10^9$  à  $97.10^9/L$ )

### **I-4 Cellules granuleuses immatures et cellules blastiques**

#### Echantillons avec myélémie

126 échantillons présentent une myélémie de 2 à 48%, soit en valeur absolue  $0,046.10^9$  à  $9,6.10^9/L$ .

#### Echantillons avec cellules blastiques

11 échantillons possèdent des blastes avec des pourcentages allant de 2 à 92%, soit en valeur absolue  $0,058.10^9$  à  $67,16.10^9/L$ .

#### Echantillons avec myélémie et cellules blastiques

14 échantillons présentent à la fois une myélémie et des blastes  $\geq 2\%$ .

## **II - FORMULE MANUELLE**

Les résultats de la formule leucocytaire manuelle sont obtenus lors de l'analyse de routine (formule réalisée après coloration et fixation d'un frottis sanguin par la méthode de May-Grünwald Giemsa et sur 100 éléments).

Un second frottis sanguin est réalisé et coloré par la coloration de MGG. La formule leucocytaire établie sur 100 cellules est réalisée par un opérateur différent. Si les deux formules présentent une divergence de plus de 10%, une troisième formule est faite par un troisième cytologiste.

## **III - ANALYSE CYTOMETRIQUE**

Dans notre étude, nous utilisons une méthode cytométrique employant trois anticorps monoclonaux.

Nous nous sommes intéressés aux polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, aux cellules myéloïdes immatures et aux cellules blastiques. Nous laissons de côté les polynucléaires éosinophiles et basophiles.

Un seul mode de préparation des échantillons est utilisé.

Nous n'avons pas fait d'étude de précision et d'influence du délai de conservation des échantillons.

### **III-1 Marquage des échantillons**

Les cellules sanguines ont été marquées par des anticorps monoclonaux selon la technique suivante :

- Ajustement de la concentration en leucocytes à 1 million par ml :
  - à partir du sang total prélevé sur EDTA
  - avec du plasma humain de groupe sanguin AB.
- 50µl de cette dilution
- 5µl d'anti-CD45 PE/Cy5 (Coultronics®)
- 5µl d'anti-CD14 FITC (Immunotech®)
- 5µl d'anti-CD16 PE (Immunotech®)
- Vortex léger
- Incubation pendant 15 min à température ambiante, dans l'obscurité.

Les échantillons sont ensuite traités en utilisant le réactif du kit Coulter ImmunoPrep et l'appareil Multi-Q-Prep System (Coultronics, Margency, France) selon les instructions du constructeur.

Ce système procède de façon automatisée à une hémolyse par de l'acide formique et à la fixation des leucocytes par du formaldéhyde [37].

### **III-2 Cytométrie en flux**

L'analyse cytométrique est réalisée sur le cytomètre EPIC XL (COULTER).

Les cinq paramètres collectés simultanément sont :

- la diffusion de la lumière dans l'axe (Forward Scatter-FSC)
- la diffusion de la lumière aux grands angles (Side Scatter-SSC)
- la fluorescence des trois fluorochromes (525 nm, 575 nm et 675 nm)

10 000 cellules sont comptées

Les données sont stockées en list -mode.

### **III-3 Analyse des données**

#### **III-3-1 Exclusion des débris cellulaires**

Sur l'histogramme FSC/SSC, on délimite une fenêtre C qui exclue les débris cellulaires, les plaquettes et les érythroblastes (à gauche de la fenêtre) et sélectionne les cellules entières.

Toutes les analyses suivantes sont conditionnées sur la fenêtre C.

(Figure 1, région C)

#### **III-3-2 Lymphocytes et cellules blastiques**

Sur l'histogramme CD45/SSC, cinq fenêtres sont délimitées (figure 2) :

- D correspondant aux lymphocytes
- E correspondant aux cellules granuleuses : polynucléaires neutrophiles et cellules granuleuses immatures
- F correspondant aux monocytes
- G correspondant aux blastes
- J correspondant aux polynucléaires éosinophiles

La présence de polynucléaires basophiles se traduit par des cellules entre les fenêtres G et D. Si le taux de polynucléaire basophile est notable, il est calculé à partir du CD9 et les taux de lymphocytes et de blastes sont recalculés.

De cet histogramme, on détermine le pourcentage de lymphocytes, de blastes et de cellules granuleuses (polynucléaires neutrophiles + cellules granuleuses immatures).

### **III-3-3 Monocytes**

Sur l'histogramme CD14/SSC on détermine une fenêtre I contenant les monocytes. En effet, les monocytes se caractérisent par leur positivité en CD14 et leur structure interne peu complexe (ils se situent dans les premiers canaux de l'axe SSC). A partir du nombre d'évènements contenus dans la fenêtre I, on calcule leur pourcentage par rapport au contenu total de la fenêtre C, soit le pourcentage de monocytes. (Figure 3, région I)

La population monocyttaire peut également être délimitée sur l'histogramme CD45/SSC. Elle correspond à la fenêtre F dans laquelle se trouvent des cellules CD45<sup>+</sup> avec une intensité SSC supérieure à celle des lymphocytes. Le second pourcentage de monocyte est comparé au premier. (figure 2, région F)

### **III-3-4 Polynucléaires neutrophiles et cellules granuleuses immatures (IG)**

Sur l'histogramme CD16/SSC, conditionné sur C-I (c'est à dire sur la totalité des leucocytes sans les monocytes) deux fenêtres sont déterminées :

- La fenêtre H comprenant les cellules CD16 fortement positives correspond aux polynucléaires neutrophiles. (figure 4, région H)
- La fenêtre A comprenant les cellules CD16 faiblement positives correspond à la myélémie. Cette détermination se fait sur la fenêtre C-I car, les monocytes présentent la même intensité de marquage CD16 que les granuleux immatures. (figure 4, région A)

A partir de ces deux fenêtres, on détermine les proportions respectives des populations de polynucléaires neutrophiles et de cellules granuleuses immatures. Ce rapport est ensuite appliqué au pourcentage de cellules granuleuses déterminé sur l'histogramme CD45/SSC.

Les polynucléaires éosinophiles, comme les granuleux immatures, sont faiblement marqués par le CD16 et ont les mêmes caractéristiques SSC. Mais la présence de polynucléaires

éosinophiles est détectée sur l'histogramme CD45/SSC. Si le taux de polynucléaires éosinophiles est notable, le taux de cellules granuleuses immatures est recalculé.

#### Utilisation du CD9

Les échantillons contenant des polynucléaires éosinophiles et basophiles sont analysés une seconde fois en cytométrie de flux à l'aide d'un marquage avec l'anticorps anti-CD9 couplé au FITC.

L'anti-CD9 FITC marque les monocytes, les polynucléaires éosinophiles et basophiles.

## **IV - MATRICE ETENDUE DU PENTRA 120**

### **IV-1 Présentation des données issues de la matrice étendue**

Le concepteur de la matrice étendue a mis à la disposition de l'utilisateur 3 seuils résistifs et 3 seuils d'absorbance. Ces seuils permettent le découpage de la matrice en 4 zones verticales et 4 zones horizontales, soit en 16 cases.

Le positionnement de ces seuils, fixé par le constructeur, détermine un découpage dit "standard". Les utilisateurs peuvent cependant créer de nouveaux découpages de la matrice en déplaçant les seuils à l'aide de curseurs. Les nouvelles positions de ces seuils peuvent ensuite être visualisées dans un sous-programme de l'automate, la position d'un seuil étant déterminée par le numéro du canal au niveau duquel il est placé.

La position des seuils ne peut pas se faire en fixant un numéro de canal, mais seulement de manière visuelle sur le graphisme, ce qui est imprécis.

Finalement, nous n'avons pas utilisé ce découpage de la matrice, l'automate n'étant pas équipé du logiciel nécessaire.

Les données contenues dans les deux matrices (matrice LMNE et matrice étendue M2) ont pu être transférées à l'aide d'une connexion bidirectionnelle entre l'automate et un ordinateur, sous la forme d'une feuille Excel. Cette forme de collecte des données permettait donc une analyse plus précise de la répartition des cellules que celle proposée sur l'automate.

Les données de chaque échantillon sont donc contenues sous la forme d'un tableau de :

128 lignes correspondant aux 128 canaux de mesure d'absorbance

256 colonnes correspondant aux 128 premiers canaux de mesure de résistivité (matrice LMNE) et aux 128 canaux supplémentaires (matrice étendue).

Ainsi, chaque case de la feuille de calcul contient le nombre de cellules contenu dans les canaux qui lui correspondent sur les matrices.

Nous avons donc obtenu, après transfert entre l'automate et un ordinateur, les données matricielles des 151 échantillons, sous la forme de 151 feuilles Excel.

#### **IV-2 Exploitation des données de la matrice étendue**

Pour chaque échantillon, nous possédons la répartition des leucocytes sur les matrices LMNE et étendue, sous deux formes :

- un histogramme où les cellules apparaissent sous forme de points
- un tableau Excel

L'analyse visuelle de l'histogramme permet :

- Une évaluation quantitative : matrice vide ou non
- une évaluation qualitative sur la forme du ou des nuages de points

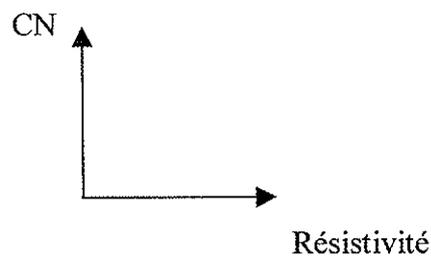
Les données regroupées dans le tableau, peuvent être analysées de façon plus objective. Pour cela, différents programmes informatiques (ou « macro ») ont été conçus. Puis les échantillons ont été analysés, un par un, par ces programmes.

Des données de base ont ainsi pu être calculées pour chaque échantillon :

- L'alarme **GCI** ( $GCI = ND + MD + \text{canal } 127 \text{ ou } M2$ ) calculée directement par le Pentra 120
- Nombre de cellules dans la matrice LMNE
- Nombre de cellules dans la matrice étendue (matrice **M2**)
- Somme des deux matrices
- Pourcentage de cellules contenues dans chacune des matrices par rapport à la totalité des deux matrices

Des analyses plus complexes ont ensuite été réalisées sur la matrice étendue :

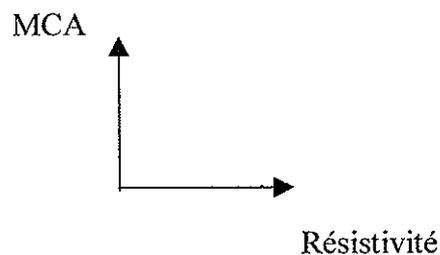
- Une courbe de répartition des cellules uniquement en fonction de leur résistivité c'est à dire le nombre de cellules (CN) dans chaque canal résistif :



Un lissage sur 5 canaux a été effectué.

La courbe est obtenue en ne tenant pas compte des points pour lesquels le nombre de cellules est nul.

- Une courbe de la moyenne d'absorbance (MCA) en fonction de la résistivité (c'est à dire, la moyenne d'absorbance de l'ensemble des cellules contenues dans un canal de résistivité) :



Un lissage sur 5 canaux a été effectué.

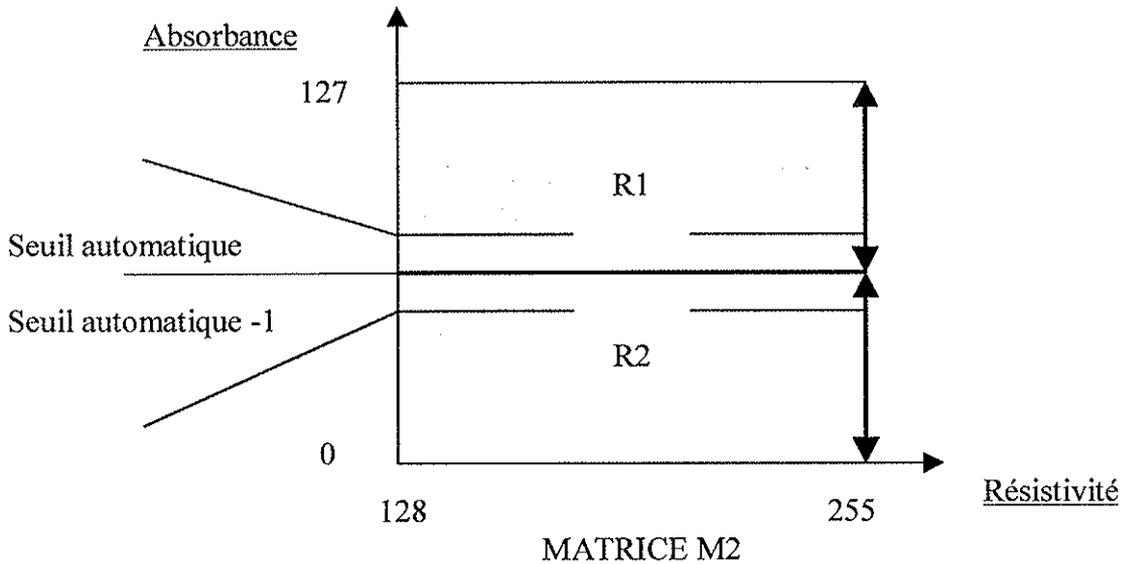
La droite de régression a été calculée et tracée. Nous avons relevé la valeur de sa **pente**.

La courbe et la droite sont obtenues en ne tenant pas compte des points pour lesquels la moyenne d'absorbance est nulle.

Le point d'intersection entre cette droite de régression et l'axe des ordonnées, détermine ce que l'on appellera le "**seuil automatique**". Ce seuil est calculé pour chaque échantillon.

➤ Création de deux régions dans la matrice étendue :

La matrice étendue est divisée en deux dans le sens horizontal. Le seuil de séparation des deux zones est fixé par la valeur du seuil automatique :



Les deux régions sont délimitées en abscisse par les canaux de résistivité 128 et 255 (limites de la matrice étendue).

Les régions sont délimitées en ordonnée par 2 seuils, un seuil dit "haut" et un seuil dit "bas" :

Région	Seuil	N° de canal
R1	haut	127
	bas	Seuil auto
R2	haut	Seuil auto -1
	bas	0

Pour chaque région, on calcule :

Le nombre de cellules

Le pourcentage de cellules dans chaque région par rapport à l'ensemble de la matrice étendue M2 : **R1**

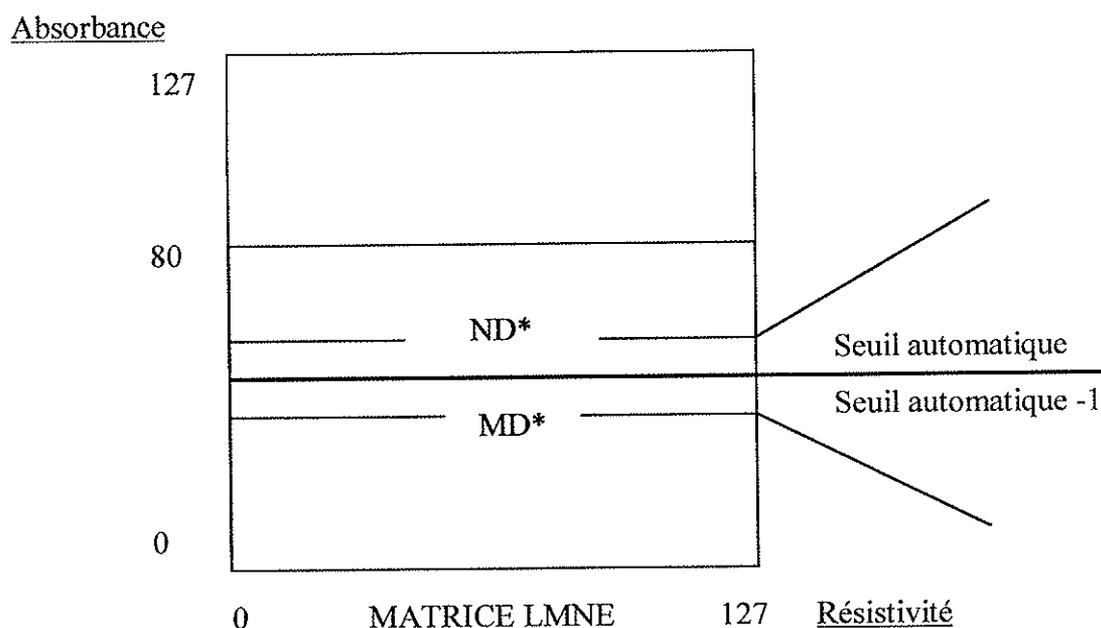
**R2**

Au sein de la matrice LMNE, un découpage est également effectué, afin de déterminer deux nouvelles régions :

- Découpage vertical : à partir du seuil résistif 118, qui détermine les zones ND\* (Neutrophiles Droit) et MD\* (Monocytes Droit) jusqu'au canal 126

Ces régions ND\* et MD\* sont différentes des régions d'alarme ND et MD de la matrice LMNE, dont la position est fixe.

- Découpage horizontal : il délimite deux zones :
  - La première allant du canal 0 au canal seuil auto-1
  - La seconde allant du canal seuil auto au canal 80



A partir de ce découpage, on calcule :

- le nombre de cellules contenues dans la région ND\*
- le nombre de cellules contenues dans la région MD\*
- le pourcentage de cellules contenues dans la région ND\* par rapport à l'ensemble des cellules contenues dans les deux matrices.
- le pourcentage de cellules contenues dans la région MD\* par rapport à l'ensemble des cellules contenues dans les deux matrices.

## **V - ANALYSE STATISTIQUE**

### **V-1 Coefficient de corrélation de Pearson**

Les différentes méthodes utilisées pour la détermination des populations leucocytaires sont comparées entre elles au moyen du coefficient de corrélation de Pearson, adapté pour étudier la corrélation de données contenues dans deux groupes différents.

### **V-2 Coefficient de corrélation intraclass RI**

Le coefficient de corrélation étudie une tendance mais ne donne pas de renseignements sur la concordance. Ainsi, deux méthodes peuvent présenter une bonne corrélation, alors que l'une surestime toujours de la même façon la valeur étudiée par rapport à l'autre méthode.

Pour déterminer le degré de concordance de deux méthodes, nous avons utilisé :

➤ un graphique représentant :

- La moyenne des 2 résultats obtenus par les 2 méthodes (par exemple, la moyenne du pourcentage de PNN manuel et du pourcentage de PNN obtenu par CMF pour un même échantillon).

en fonction de :

- La différence des 2 résultats obtenus par les 2 méthodes (la différence entre le pourcentage de PNN manuel et le pourcentage de PNN obtenu par CMF toujours pour chaque échantillon).

➤ le coefficient de corrélation intraclass RI.

En général, deux méthodes sont jugées concordantes quand la limite inférieure de RI (coefficient intraclass) est 0,75 pour un intervalle de confiance de 95%.

# RESULTATS

## I - COMPARAISON DES RESULTATS FOURNIS PAR LA CMF ET LA FORMULE MANUELLE

Nous avons comparé les résultats obtenus par cytométrie en flux et par décompte manuel pour :

- 11 échantillons avec des blastes et sans myélémie
- 126 échantillons avec myélémie et sans blastes
- 14 échantillons avec des blastes et myélémie

### I-1 Etude statistique

	n*	r	RI
<b>PNN</b>	149	0,99	0,99
<b>Lymphocytes</b>	149	0,97	0,97
<b>Monocytes</b>	149	0,96	0,95
<b>IG</b>	138	0,95	0,94
<b>Granuleux</b>	149	0,99	0,98
<b>Blastes</b>	24	0,99	0,99

\*Ces effectifs ne tiennent pas compte des 2 cas décrits dans le paragraphe I-2

Les diagrammes correspondants sont représentées sur les figures 1 et 2.

Pour chacune des sous-populations leucocytaires, les corrélations entre les méthodes microscopiques et de cytométrie en flux sont excellentes ( $r > 0,95$ ).

La concordance entre les deux méthodes est également très satisfaisante :  $RI > 0,94$ .

Notons tout de même que les pourcentages des cellules granuleuses totales (polynucléaires neutrophiles + granuleux immatures) et des polynucléaires neutrophiles obtenus par la méthode microscopique sont supérieurs à ceux obtenus par CMF . En ce qui concerne les cellules granuleuses immatures, le phénomène contraire est observé, mais de façon moins marquée.

Nous pouvons donc dire que soit la cytométrie en flux sous-estime les polynucléaires neutrophiles, soit la méthode manuelle les surestime (d'environ 2 à 3 %).

## I-2 Discordances entre les résultats de la CMF et ceux de la formule manuelle

### a) Insuffisance de la cytométrie en flux

L'analyse des sous populations leucocytaires par cytométrie en flux a rendu des résultats aberrants pour 2 (1,3%) échantillons :

Cas		I		II	
Leucocytes ( $\cdot 10^9/L$ )		46,65		18,90	
Formule leucocytaire	Technique	Manuelle	CMF	Manuelle	CMF
	PNN	65	<b>42,2</b>	69	<b>41.2</b>
	lymphocytes	3	3,8	4	5,3
	Monocytes	23	18,2	20	29,9
	IG	6	<b>29,5</b>	4	<b>22.9</b>
	blastés	2	2,1	0	0
Pathologie		LMMC		LAM 5b	

Pour ces deux cas, une partie des polynucléaires n'exprime pas le CD16. La fenêtre A de l'histogramme CD16/SSC semble contenir deux populations ayant une expression CD16 différente. Les histogrammes sont sur les figures 3 et 4.

Ces deux patients n'étaient ni en sortie d'aplasie ni sous facteurs de croissance. Par contre, ils présentaient une dysgranulopoïèse (dégranulation de la lignée et hyposégmentation).

Dans ces deux cas, les histogrammes ne présentaient pas de signes évidents d'interprétation impossible par CMF et doivent donc être considérés comme des échecs de la méthode utilisée.

Remarque : la cytométrie en flux a rendu de mauvais résultats dans 8 autres cas. Ces 8 cas ont été exclus dès le début de notre étude et correspondent à des échantillons étudiés par F.Desemery [4]. Pour ces cas, les histogrammes présentaient des signes justifiant le rejet des résultats obtenus par CMF.

Finalement, dans cette étude, le pourcentage d'échantillons sanguins pour lesquels la cytométrie en flux ne pouvait pas être utilisée est de 6,6% (n=10).

b) Discordances entre la CMF et la formule manuelle

6 échantillons présentent 0% de blastes par méthode manuelle et 2,0-2,3-2,4-2,5-3,4-3,4% par CMF.

2 échantillons présentent 1% de blastes par méthode manuelle et 3 et 2,8% par CMF.

Référence	Pathologie	GB 10. <sup>9</sup> /l	Blastes	
			Manuelle	CMF
427-1585	LAM0	3,89	0	2,0
914-2321	Myélome	35,50	0	2,3
528-2198	LAM2	2,20	0	2,4
428-1973		20,00	0	2,5
510-2302	LNH	5,90	0	3,4
505-0746		15,80	0	3,4
609-0916		13,47	1	2,8
920-0537	SM	4,70	1	3,0

## II - COMPARAISON ENTRE LES RESULTATS FOURNIS PAR LE PENTRA 120 (MATRICE ETENDUE) ET LA CMF

### II-1 Cellules blastiques

Pour 13 échantillons présentant des blastes, sans myélémie, nous avons comparé le pourcentage des cellules blastiques (obtenu par CMF) avec les pourcentages de cellules contenues dans les différentes régions des matrices LMNE et M2.

L'ensemble de ces données figure dans le tableau 1 et est représenté sur le graphique 1.

Les 13 cas sont classés en fonction de la valeur croissante du pourcentage de cellules présentes dans M2.

Tableau 1. Données issues des échantillons présentant des cellules blastiques.

Référence	Cas	Pathologie	GB, 10 <sup>9</sup> /L	BLASTES CMF	GCI Pentra 120Vega	seuil automatique	M2 (%)	R1/R2	ND*+R1 (%)	MD*+R2 (%)	ND*+MD*+M2 (%)
528-2026	1	LAM1	4,5	76,1	0,7	24	0,54	2,67	0,58	0,19	0,78
413-2494	2	LAM1	7,2	62,2	1,6	43	1,15	3,11	1,25	0,56	1,81
602-2106	3	AREB	4,16	4,2	1,9	47	1,23	1,89	1,32	1,04	2,36
429-2181	4	LAL1	13,5	53,5	3,5	33	1,61	0,95	1,32	1,32	2,64
528-2033	5	LAM1	2,5	58,1	7,9	35	4,42	2,50	5,28	2,13	7,41
422-1963	6	LAM4	14,58	74,6	21,6	42	11,64	2,57	11,23	6,59	17,82
413-1128	7	LAM4	24,83	79,1	23	43	13,66	1,58	10,03	8,71	18,74
531-1585	8	LAM6	73	92,7	26,1	40	15,05	1,15	11,65	9,23	20,88
921-2488	9	ARSIA-LAM	2,7	53,3	43,5	37	18,16	1,72	16,51	15,27	31,77
531-1443	10	LAM2	14,3	67,7	34,5	51	19,04	1,65	13,70	13,16	26,86
528-3562	11	LAM2	18	52,5	40,8	51	19,37	0,59	8,78	20,41	29,18
916-1377	12	ARSIA-LAM	3,2	50,6	74,2	32	30,25	7,45	35,74	6,99	42,73
914-2319	13	ARSIA-LAM	14,8	76,4	*	37	41,13	2,20	34,63	20,95	55,58

\* L'automate Pentra 120 n'a pas fourni de résultats.

## II-1.1 Répartition des blastes

Différentes possibilités sont observées :

➤ Matrice étendue vide (pourcentage de cellules dans M2 <5%), alors que le pourcentage de blastes est notable (Blastes CMF > 50%) :

- Les cas 1, 2 et 5 correspondent à des LAM1, provenant de trois patients différents

Description des blastes : taille petite à moyenne

rapport nucléo-cytoplasmique très élevé

le cytoplasme contient parfois de fines granulations

L'image des matrices LMNE et M2 du cas n° 2 est reproduite ci-contre.

- Le cas 4 est une LAL 1

Description des blastes : petite taille

rapport nucléo-cytoplasmique très élevé

cytoplasme sans granulations

Les blastes de ces 4 cas présentent une structure et une taille telles qu'ils sont inclus dans la matrice LMNE. Ces blastes ont néanmoins été détectés par des alarmes :

« LYA » pour les LAM1 et la LAL

« Baso » pour l'AREB.

➤ Matrice étendue vide mais taux de blastes faible

Le cas 3 correspond à une AREB.

Le nombre de leucocytes ( $4,16.10^9$ /l) et le taux de blastes (4,2%) sont faibles et ne permettent pas d'analyser la matrice étendue.

➤ Matrice étendue contenant un taux de cellules significatif ( $M2 > 13\%$ )

- Les cas 6 et 7 sont des LAM 4 du même patient.
- Le cas 8 est une LAM 6.
- Les cas 9, 12 et 13 sont des ARSIA transformées en LAM du même patient.
- Les cas 10 et 11 sont des LAM 2 du même patient.

Seulement une partie des blastes de ces 8 échantillons se situent dans les régions ND\* et MD\* ainsi que dans la matrice étendue M2.

L'image des matrices LMNE et M2 du cas n° 8 est reproduite ci-contre.

Le découpage de la matrice étendue en deux régions R1 et R2 avec le seuil automatique, ne permet pas une meilleure reconnaissance des populations blastiques.

## II-1-2 Etude statistique

Les corrélations entre les pourcentages de blastes obtenus par cytométrie en flux et ceux des cellules contenues dans les différentes régions des matrices LMNE et M2 sont les suivants :

REGION	n	r
GCI	12*	0.06
M2	13	0.26
R1	13	0.20
R2	13	0.31
ND*+R1	13	0.19
MD*+R2	13	0.24
ND*+MD*+M2	13	0.23

\* n=12 car pour 1 échantillon, l'automate Pentra 120 n'a pu fournir de résultats.

Il semble que les blastes seraient mieux identifiés par la région R2, mais des effectifs plus importants sont nécessaires pour confirmation.

## **II-2 Cellules granuleuses immatures**

Pour 114 échantillons présentant une myélémie sans blaste nous avons comparé le pourcentage des cellules granuleuses immatures (obtenu par CMF) avec les pourcentages de cellules contenues dans les différentes régions des matrices LMNE et M2.

L'ensemble des données issues de l'analyse de la matrice étendue est représenté sur les graphiques 2 et 3.

Les 114 cas sont classés en fonction des valeurs croissantes du pourcentage de cellules dans la matrice étendue (M2%).

## II-2-1 Répartition des cellules granuleuses immatures

Nous avons constaté que la répartition des cellules dans la matrice étendue peut prendre 2 aspects. Ces 2 aspects ne sont clairement définis que pour un nombre suffisant de cellules présentes dans M2 (au moins 100 cellules dans la matrice étendue).

### ASPECT 1

Un seul nuage qualifié de « fusée » oblique, en continuité avec le nuage des polynucléaires neutrophiles, situé dans la région R1. (cas 428-1997)

La région R2 est pratiquement vide.

Cet aspect est retrouvé par estimation visuelle dans 52 cas.

### ASPECT 2

Présence de deux nuages clairement individualisés :

- Nuage identique au précédent (région R1)
- Nuage horizontal localisé dans la région R2. (cas 914-2333)

Cet aspect est retrouvé par estimation visuelle dans 23 cas.

Pour les 39 échantillons restants, les cellules présentent une distribution plus aléatoire, ne formant pas de nuage précis.

Parmi ces 39 cas, 21 échantillons contiennent moins de 100 cellules dans la matrice étendue M2.

Nous avons relu les frottis sanguins des échantillons présentant ces 2 aspects.

Il semble que les échantillons présentant une myélémie avec surtout des métamyélocytes et myélocytes donnent l'image correspondant à l'aspect 1.

De tels cas ont particulièrement été observés avec des échantillons provenant de LMC (cas 428-1997) et pour un patient ayant un syndrome inflammatoire (cas 916-1443).

Les échantillons avec une myélémie comportant une forte proportion de stades immatures (myéloblastes et promyélocytes) donnent l'image correspondant à l'aspect 2.

De tels aspects ont été observés dans des cas où les patients avaient reçu des facteurs de croissance pour faciliter une sortie d'aplasie (cas 914-2333) ou avant une autogreffe (cas 914-2321).

## II-2-2 Etude statistique

Les corrélations entre les pourcentages de cellules granuleuses immatures obtenues par cytométrie en flux et ceux des cellules contenues dans les différentes régions, sont les suivants :

REGION	n	r
GCI Pentra120	112*	0.77
M2	114	0.72
R1	114	0.72
R2	114	0.59
ND*+R1	114	0.74
MD*+R2	114	0.64
ND*+MD*+M2	114	0.74

\* n=112 car pour 2 échantillons, l'automate Pentra 120 n'a pu fournir de résultats.

GCI Pentra 120 = ND+MD+M2

Il est très important d'analyser la région R1 pour détecter la myélémie plutôt que de se contenter du seul pourcentage de GCI. Dans les cas où le taux de GCI est inférieur à 2,5%, il serait donc intéressant d'étudier si les cellules sont toutes réparties dans la région R1. L'analyse de la région R1 pourrait être un moyen plus fin que l'alarme GCI pour détecter les myélémies les plus basses.

### III - ANALYSE DETAILLEE DES HISTOGRAMMES DE LA MATRICE ETENDUE (M2) DU PENTRA 120

Nous avons éliminé les échantillons présentant trop de canaux vides d'événements, et gardé seulement les échantillons ayant une distribution régulière, en nombre et en absorbance, de leurs cellules dans les canaux de la matrice étendue.

Cette sélection faite visuellement a permis de retenir 39 échantillons.

Les données de ces 39 échantillons sont contenues dans le tableau 2 et représentées sur les graphiques 5 et 6.

Tableau 2.

Référence	CAS	Pathologie	seuil auto	Pente	M2 %	R1/R2
810-2278	1	LAM4	45	0,08	12,59	1,17
914-2333	2	LNH	47	0,10	15,86	1,52
810-2435	3		50	0,11	12,73	1,30
913-2253	4		60	0,17	9,67	1,97
413-0575	5	LLC	43	0,18	12,90	1,19
920-2324	6		44	0,21	10,05	2,12
913-2233	7		46	0,23	12,86	1,61
920-2291	8	LMC	52	0,23	16,08	2,40
510-2329	9		55	0,23	11,35	1,70
428-1997	10	LMC	62	0,25	17,79	2,86
427-1589	11		63	0,25	4,43	2,62
505-2403	12		51	0,25	8,46	2,15
504-2150	13	LLC	68	0,26	8,02	1,56
413-1006	14		63	0,26	15,42	3,19
504-2151	15		62	0,26	5,02	2,03
413-1007	16	LNH	58	0,26	11,18	2,11
504-2152	17		47	0,27	10,76	2,57
413-1008	18		65	0,27	10,94	2,41
504-2153	19		62	0,27	4,66	2,42
413-1009	20	LMC	65	0,28	11,64	2,47
504-2154	21		62	0,28	8,26	2,61
413-1010	22		47	0,28	4,26	1,62
504-2155	23	LAL	58	0,30	3,75	3,00
413-1011	24		49	0,30	5,70	3,59
504-2156	25	LMC	56	0,31	7,26	2,43
413-1012	26		55	0,33	7,95	3,23
504-2157	27		60	0,33	11,62	3,26
413-1013	28	LAM1	62	0,34	16,02	2,85
504-2158	29		54	0,34	7,64	3,53
413-1014	30	LMC	54	0,34	6,23	2,85
504-2159	31	LAM2	60	0,35	6,92	3,61
413-1015	32		60	0,35	5,76	2,83
504-2160	33	LAM2	54	0,36	10,86	2,83
413-1016	34	LNH	54	0,36	14,90	6,77
504-2161	35		57	0,37	9,26	4,79
504-2151	36		57	0,38	7,17	4,38
413-1007	37	LMC	50	0,42	3,99	3,95
504-2152	38		54	0,45	4,92	5,56
413-1008	39	LMC	53	0,48	6,60	4,32

### Corrélation entre le seuil et la pente

Le coefficient de corrélation entre ces deux paramètres est faible ( $r=0,24$ ).

Toutefois, une légère tendance semblerait montrer que lorsque :

Le seuil est bas, la pente est faible

Le seuil est haut, la pente est élevée (graphique 7)

### Pente et rapport du nombre de cellules contenues dans R1 et R2 ( $R1/R2$ )

La pente évolue dans le même sens que la proportion de cellules dans R1 (graphique 8)

Le coefficient de corrélation entre ces deux paramètres est élevé ( $r=0,78$ ).

Il semblerait donc que, lors des myélémies importantes et présentant tous les stades de maturation (comme dans les LMC) à partir des promyélocytes, la pente soit plus importante. Elle témoignerait d'un degré d'absorbance très différent entre les cellules présentant peu de granulations (absorbance faible) et les cellules présentant de nombreuses granulations.

# DISCUSSION

## I FORMULE LEUCOCYTAIRE ET CYTOMETRIE EN FLUX

### I.1 Nos résultats et ceux de la littérature

Dans notre étude, la détermination des sous populations leucocytaires par méthodes manuelles et cytométrique montre une bonne corrélation pour les polynucléaires neutrophiles ( $r = 0,99$ ), les lymphocytes ( $r = 0,97$ ), les monocytes ( $r = 0,95$ ), les cellules granuleuses immatures ( $r = 0,94$ ) et les cellules blastiques ( $r = 0,99$ ).

La concordance entre ces deux méthodes est également excellente.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec d'autres études réalisées dans notre laboratoire en utilisant les mêmes principes, pour dénombrer :

Les cellules granuleuses immatures [30,31,32]

Les cellules blastiques [31,32]

Et par extension, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes.

Cette nouvelle étude, en augmentant le nombre d'échantillons testés, contribue à la validation de cette méthode.

La quantification des sous populations leucocytaires par cytométrie en flux a également été faite par d'autres équipes.

De très nombreuses études sur la quantification des monocytes ont démontré la performance de la cytométrie en flux, alors que le dénombrement de cette catégorie leucocytaire par microscopie est loin d'être parfaite [23,24].

Le principe de l'automate CELL-DYN 4000, se fondant sur l'expression des mêmes antigènes (CD45, CD14 et CD16) et celle de la diffusion de la lumière aux grands angles (SSC) donnent des résultats comparables aux nôtres [32].

Hübl et son équipe en utilisant un panel d'anticorps plus important (anti-CD45, anti-CD14, anti-CD2, anti-CD16 et anti-HLA-DR) obtient de bons résultats pour les formules leucocytaires [25].

Notre technique semble aussi performante que les autres mais présente l'avantage de n'employer que trois (quatre dans certains cas) anticorps monoclonaux.

## **I-2 LIMITES DE LA CYTOMETRIE EN FLUX**

### **I-2-1 Limites liées à la technique**

1- Le mode de préparation des échantillons (avec ou sans phase de lavage) peut intervenir sur la détermination des sous populations leucocytaires [24,25,37].

Les préparations avec hémolyse entraînent l'altération des cellules érythrocytaires et la perte de données sur les érythroblastes sanguins.

2- Le cytomètre utilisé peut également entraîner une petite influence sur les résultats, notamment pour les monocytes et les polynucléaires éosinophiles [23,25].

3- La méthode cytométrique peut manquer de reproductibilité entre les différents laboratoires, il faudrait définir des méthodes de standardisation du recueil des données [25].

#### 4- Délai de conservation des échantillons

Les résultats sont optimaux quand l'échantillon est traité dans les 12 heures qui suivent son prélèvement [25].

Le délai de conservation des échantillons avant leur analyse par cytométrie en flux n'entraîne que peu de modifications :

- ces modifications sont négligeables avant 12 heures
- après 12 heures, les polynucléaires éosinophiles s'altèrent
- à partir de 24 heures, les polynucléaires basophiles commencent à se dégrader
- les polynucléaires neutrophiles sont les plus stables.

Par contre, l'augmentation du taux de cellules mortes donne un marquage non spécifique et une diminution de FSC, surtout pour les polynucléaires neutrophiles et les monocytes d'échantillons âgés.

## **I-2-2 Limites liées aux échantillons : expression antigénique anormale**

### ➤ polynucléaires neutrophiles

L'expression cellulaire du CD16 est proportionnelle au degré de maturation des cellules granuleuses, mais il est difficile de faire correspondre les différents niveaux d'expression du CD16 aux stades morphologiques.

Les polynucléaires neutrophiles peuvent présenter une diminution de leur expression antigénique CD16 tout en gardant une morphologie mature (noyau segmenté). Des difficultés de séparation avec les polynucléaires éosinophiles peuvent alors survenir [26].

Une diminution d'expression du CD16 peut s'observer dans plusieurs situations :

- syndromes inflammatoires

Lors de syndrome inflammatoire, il existe un asynchronisme de maturation entre les aspects morphologiques et antigéniques (retard d'expression du CD16), que l'on peut opposer au développement plus régulier et synchrone dans la moelle osseuse normale [20]. Un tel asynchronisme est aussi montré lors de cultures cellulaires de polynucléaires neutrophiles, où l'on observe une perte du CD16 [14].

- infection (HIV notamment) [16]

- LMC [27]

- les polynucléaires neutrophiles en apoptose voient leur expression du CD16 diminuée [14].

Il faut donc être prudent quant à l'utilisation du CD16, car les polynucléaires neutrophiles matures peuvent perdre cet antigène et il n'y aura alors plus de corrélation entre la méthode microscopique et la CMF.

Les informations visuelles supplémentaires apportées par le microscope comme par exemple l'évaluation de l'équilibre de la pyramide de maturation de la lignée myéloïde, ne sont pour l'instant pas accessibles à la CMF de routine.

### ➤ monocytes

Leur identification peut se faire par leur antigène CD14 [23,24] mais parfois, l'expression CD14 des granuleux augmente, venant interférer avec celle des monocytes [25].

De plus, il a été rapporté que la numération des monocytes basée sur le CD14 peut sous estimer le nombre de monocytes en raison de l'existence de monocytes CD14<sup>+</sup>.

Toutefois, l'étude de HÜBL et d'autres ne montrent pas ou très peu de biais entre le dénombrement des monocytes par la méthode manuelle et par le CD14 [20,22,23].

Dans les leucémies monoblastiques (LAM 4 et LAM 5) on observe un prolongement de la zone des blastes vers les monocytes (intensité CD45 plus élevée) [10].

➤ lymphocytes

Des petits blastes peuvent contaminer les lymphocytes.

Dans certains cas de LAL, les blastes peuvent perdre leur expression du CD45 [44].

➤ Hémopathies malignes

Les maladies hématologiques malignes peuvent influencer l'expression antigénique des cellules sanguines.

Les syndromes myélodysplasiques sont connus pour leurs troubles de la maturation cellulaire. Ces troubles de la granulopoïèse sont nombreux et variés : dysmaturation antigénique, hypogranulation, contenu granulaire déficient, trouble de la segmentation nucléaire, fonctions cellulaires anormales.

L'étude antigénique des cellules granuleuses chez des patients souffrant de syndromes myélodysplasiques montre, dans certains cas, un retard de maturation avec diminution d'expression voire absence du CD16 sur les formes matures [11].

Les hémopathies malignes peuvent également entraîner des aberrations de l'expression antigénique, avec par exemple, acquisition d'antigènes non spécifiques à la lignée.

➤ Les facteurs de croissance en accélérant la maturation normale des cellules, bouleversent l'expression antigénique des cellules hématopoïétiques [22].

### **1-2-3 Valeurs de références**

Les valeurs obtenues par cytométrie en flux, bien que corrélées à celles de la formule manuelle, sont différentes. Différents auteurs ont décrit des valeurs de référence et les polynucléaires basophiles et éosinophiles ainsi que les monocytes auraient des valeurs de référence plus basses [15,18]. Hübl décrit même dans son étude des taux de monocytes chez les hommes supérieurs à ceux des femmes [25].

Dans notre étude portant sur des cas pathologiques, nous observons que les pourcentages de polynucléaires neutrophiles sont moins élevés par cytométrie en flux que par détermination manuelle.

Aussi faudrait-il définir des valeurs de référence pour interpréter les résultats de la formule obtenue par cytométrie en flux.

### **I-2-4 Coût**

Mentionnons que la cytométrie en flux est de coût élevé lorsqu'elle est utilisée ponctuellement. En effet :

- Les automates sont chers et moins facilement rentabilisés que les automates classiques d'hématologie
- Les réactifs (anticorps monoclonaux) sont onéreux
- L'utilisation de tels appareils nécessite un opérateur qualifié.

Cependant, sur de grandes séries, le temps de réalisation des formules par les techniciens est divisé par 2 ou 3 par rapport à la méthode manuelle, pour un rendu des résultats de meilleure qualité.

Des études économiques plus poussées devraient être envisagées, pour évaluer la baisse ou le surcoût engendré par cette technologie.

### **I.3 Les limites de la cytométrie en flux dans notre étude**

La multiplication de ces analyses permet peu à peu de mieux préciser les limites de la cytométrie en flux. Nous avons retrouvé 6% d'échantillons dont l'analyse a donné des résultats discordants avec ceux de la formule manuelle. L'ensemble de ces cas a cependant pu être détecté par l'observation d'anomalies sur les histogrammes et/ou les données cliniques correspondantes ont fourni des explications. En effet, rappelons que la cytométrie en flux est limitée lorsque les cellules présentent une expression antigénique anormale (cellules en apoptose, asynchronisme de maturation, modification maligne de l'expression antigénique...).

Notons également que si les cellules granuleuses immatures sont bien quantifiées par le marquage du CD16, celui-ci ne donne pas de renseignements qualitatifs sur la myélémie. Il serait intéressant de développer d'autres méthodes afin de déterminer le degré de maturation des cellules granuleuses immatures. L'antigène CD16 apparaissant sur les cellules de la lignée myéloïde au fur et à mesure de leur maturation pourrait peut-être servir à établir un coefficient de maturation.

L'utilisation d'autres marqueurs antigéniques de la maturation granuleuse peut également être envisagée.

#### **I-4 Perspectives quant à l'apport de la cytométrie en flux**

La cytométrie en flux permet de corriger de nombreux problèmes inhérents à la formule manuelle (utilisée en routine ou selon les normes du NCCLS).

Elle est :  
Plus objective  
Reproductible (au sein d'un même protocole)  
Précise  
Sensible  
Rapide.

Ces arguments contribuent à faire de la cytométrie en flux une technique de référence pour l'établissement de la formule leucocytaire (identification et quantification des cellules normales, granuleuses immatures et blastiques).

Une méthode de référence plus fiable (pour les cellules présentes en petite quantité ou de morphologie variable) aurait plusieurs conséquences :

- Elle permettrait d'améliorer les capacités des automates de cytologie dans le dénombrement des monocytes et le réglage des alarmes de détection des cellules immatures ou blastiques.

- Elle permettrait de réduire le nombre de formules à recontrôler et un gain de temps. Ce gain de temps pourrait être utilisé pour réaliser les formules manuelles inévitables sur plus de 100 éléments.

Toutefois, il reste à déterminer un protocole très précis servant de référence car il existe des variations selon les différentes préparations des échantillons et les cytomètres utilisés. Les limites de la cytométrie en flux doivent aussi être clairement détaillées.

## **II MATRICE ETENDUE DU PENTRA 120**

### **II.1 Apports de notre étude**

#### **II.1.1 Détection des blastes malins**

Certaines catégories de cellules blastiques ont une taille et un signal en absorbance tels qu'elles se localisent sur la première matrice (matrice LMNE). Ainsi, dans notre étude, les blastes de LAL et de LAM1 sont situés dans la première matrice. Dans ces cas, la matrice étendue n'apporte rien.

Pour d'autres catégories blastiques, une partie de ces cellules est répartie dans la matrice étendue. Cependant, notre étude ayant porté sur un faible nombre d'échantillons blastiques, nous n'avons pas pu porter de conclusion quant à la signification de leur position dans la matrice étendue.

#### **II.1.2 Détection des cellules granuleuses immatures**

Au début de notre étude, nous avons orienté l'étude de la matrice étendue sur différents découpages de la matrice étendue, et des régions « neutro » et « mono » droites de la matrice LMNE. L'étude statistique de ces différentes régions n'a pas montré leur supériorité par rapport à l'alarme « GCI » qui existait déjà sur l'automate, en ce qui concerne les cellules granuleuses immatures.

Par contre l'analyse visuelle de la matrice étendue a montré plus ou moins constamment l'existence de deux nuages de points. Ils correspondent à deux populations cellulaires, toutes les deux de grande taille, mais avec des signaux d'absorbance différents.

L'étude de ces deux nuages cellulaires, (lorsqu'ils sont présents et suffisamment importants), nous laisse supposer qu'ils correspondent à deux catégories différentes de cellules granuleuses immatures.

Le premier nuage est situé dans la région supérieure de la matrice étendue, en continuité avec le nuage des polynucléaires neutrophiles. Il semble correspondre aux cellules granuleuses immatures les « plus matures » et refléter une pyramide de maturation équilibrée.

Nous avons observé un tel nuage dans des cas de LMC et de syndrome inflammatoire.

L'autre nuage identifié est également situé dans la matrice étendue (cellules de très grande taille) mais avec des absorbances plus basses que le premier nuage décrit.

Un tel nuage est rencontré avec des échantillons de cellules granuleuses immatures dont la pyramide de maturation est déséquilibrée. En effet on note dans ces cas un excès de myéloblastes et de promyélocytes.

Ce type de nuage a été observé avec des échantillons provenant de patients traités par facteur de croissance pour accélérer une sortie d'aplasie ou avant une autogreffe.

Il n'est pas possible avec les données actuelles de définir des zones précises dans la matrice correspondant aux différents stades de maturation tels qu'ils sont décrits par la cytologie microscopique. Nous obtenons seulement une estimation qualitative.

## **II.2 Perspectives**

### **II.2.1 Cellules blastiques**

La prochaine étude d'évaluation de la matrice étendue du Pentra 120 devra porter sur un plus grand nombre d'échantillons contenant des cellules blastiques. Des échantillons contenant en particulier des cellules blastiques de grande taille sont à étudier.

### **II.2.2 Cellules granuleuses immatures**

Une étude sur une plus grande série d'échantillons devra être réalisée. En effet, plusieurs points doivent être confirmés ou étudiés sur un plus grand nombre d'échantillons.

Il faut approfondir et définir la signification des deux nuages observés dans la matrice étendue. Cette étude devra tenir compte de façon très précise des différents stades des cellules de la myélémie. Des données cliniques très précises devraient également être intégrées à la nouvelle analyse.

Une nouvelle alarme (GCI bis) pourrait alors être définie, apportant une information qualitative sur la population granuleuse immature. Elle pourrait être établie en divisant le canal de résistivité 127 en deux (la valeur du seuil d'absorbance partageant le canal en deux restant à valider). Elle correspondrait alors au pourcentage de cellules contenues dans la partie supérieure du canal 127. (Figure 1).

La position du seuil séparant la matrice étendue horizontalement doit être réévaluée. En effet, faut-il un seuil fixe (dont la valeur doit être redéfinie) ou redéfinir un seuil mobile calculé pour chaque échantillon en fonction de la répartition cellulaire dans la matrice étendue ? Ce seuil permettrait de calculer la valeur de la nouvelle alarme GCI bis, et de définir précisément sa signification.

La pente de la courbe de distribution de l'absorbance des cellules devra aussi être étudiée sur un plus grand nombre d'échantillons, en intégrant des données cytologiques et cliniques précises. En effet cette pente doit aussi servir à donner des renseignements sur la qualité de la myélémie.

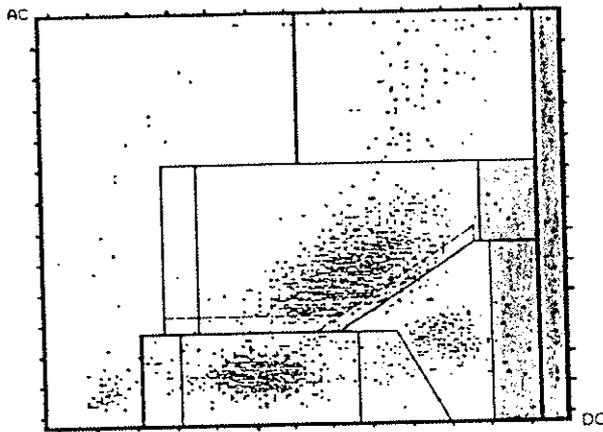
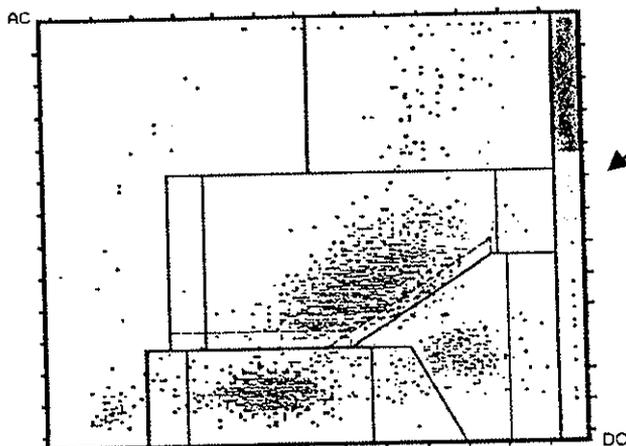


Figure 1A : GCI = somme des cellules contenues dans les 3 régions grises.



Seuil à définir

Figure 1B : GCI bis = somme des cellules contenues dans la partie grise

# CONCLUSION

L'identification et la quantification des leucocytes sanguins normaux et anormaux sont fondamentales dans le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies. La méthode de référence actuelle de la numération formule sanguine est l'analyse par microscopie optique. Les nombreux inconvénients de cette méthode sont connus : durée de l'examen, faibles reproductibilité et sensibilité des mesures.

La méthode de cytométrie en flux avec laquelle nous avons réalisé les formules leucocytaires a fourni de très bons résultats pour la quantification des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes, des cellules granuleuses immatures et des cellules blastiques. Ses avantages sont nombreux : précision, sensibilité et reproductibilité des mesures, gain de temps.

La cytométrie en flux permet donc d'améliorer la qualité des résultats rendus. Le gain de temps obtenu pourrait permettre d'effectuer les quelques formules manuelles inévitables sur un nombre de cellules plus important.

En ce qui concerne les automates de numération formule sanguine, la mise au point et la validation de nouvelles alarmes ainsi que la quantification des cellules anormales peuvent être considérablement améliorées au moyen des résultats fournis par la cytométrie en flux.

Dans le cadre de cette étude sur le PENTRA 120, l'étude de la matrice dite étendue semble montrer de nouvelles capacités d'analyse. En effet, cette première évaluation suggère la possibilité de créer une nouvelle alarme qualitative de l'équilibre de la maturation au sein de la population granuleuse immature. Cette nouvelle évaluation nécessite une analyse sur un échantillonnage important avec des données cytologiques et cliniques très précises.

---

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- 1) ABX Pentra 120  
Manuel d'utilisation. ABX Diagnostics.
- 2) Ardron MJ., Westengard JC., Dutcher TF.  
Band neutrophil counts are unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal total leukocyte counts.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1994 ; **102** : 646-649
- 3) Bentley SA.  
Alternatives to the neutrophil band count.  
*Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1998 ; **112** : 883-884
- 4) Desemery F.  
Apport de la cytométrie en flux à la détection des leucocytes anormaux par les automates de numération-formule sanguine. 76p.  
Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale. Bordeaux, 1999
- 5) Dreyfus B.  
Hématologie  
Flammarion Médecine-Sciences, 1984.
- 6) Belloc F.  
Les principes de la cytométrie en flux  
*RFL*, 1991 ; **218** : 21-27
- 7) Bene MC., Castoldi G., Knapp W. et al.  
Proposals for the immunological classification of acute leukemias.  
*Leukemia*, 1995 ; **9** : 1783-1786
- 8) Bennett JM., Catovsky C., Daniel MT. et al.  
Classification of acute myeloid leukemia.  
*Ann. Intern. Med.*, 1985 ; **103** : 620-624
- 9) Bentley SA., Johnson TS., Bishop CA.  
A parallel evaluation of four automated hematology analysers.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1993 ; **100** : 626-632
- 10) Borowitz M., Guenther KL., Shults KE., Steltzer GT.  
Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometry analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-colour analysis.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1993 ; **100** : 534-540
- 11) Bowen KL., Davis BH.  
Abnormal patterns of expression of CD16 (FcR $\gamma$ III) and CD11b (CR111) antigens by developing neutrophils in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndrome.  
*Lab. Hematol.*, 1997 ; **3** : 292-298
- 12) Buttarello M., Gadotti M., Lorenz C., Toffalori E., Ceschini N., Valentini A., Rizzotti  
Evaluation of four automated hematology analysers.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1992 ; **97** : 345-352

- 13) De Hass M., Kleijer M., Van Zwieten R., Roos D., Von Dem Borne AK.  
Neutrophils Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences : a study of 21 individuals from 14 families.  
*Blood*, 1995 ; **86** : 3999
- 14) Dransfield I., Buckle AM., Savill JS. et al.  
Neutrophil apoptosis is associated with reduction in CD16 (FCγRIII) expression.  
*J. Immunol.*, 1994 ; **153** : 1254-1263
- 15) England JM., Bain BJ.  
Total and differential leukocyte count.  
*Br. J. Haematol.*, 1976 ; **33** : 1-7
- 16) Fliedner TM.  
Granulocytopoiesis. II. Emergence and pattern of labeling of neutrophilic granulocytes in humans.  
*Blood*, 1964 ; **24** : 683-700
- 17) Foon KA., Todd RF.  
Immunological classification of leukemia and lymphoma.  
*Blood*, 1986 ; **68** : 1-31
- 18) Gilbert HS., Ornstein L.  
Basophil counting with new staining method using alcian blue.  
*Blood*, 1975 ; **46** : 279-286
- 19) Glasser L.  
Functionnal differentiation of normal human neutrophils.  
*Blood*, 1987 ; **69** : 937-944
- 20) Goosens W., Van Hove I., Verwilghen RL.  
Monocyte counting : discrepancies in results obtained with different automated instruments.  
*J. Clin. Pathol.*, 1991 ; **44** : 224-227
- 21) Hartnell A., Moqbel R., Walsh GM., Bradley B., Kay AB.  
FC gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils.  
*Immunol.*, 1990 ; **69** : 264-270
- 22) Hübl W., Andert S., Erath A., Lapin A., Bayer PM.  
Peripheral blood monocyte counting : towards a new reference method.  
*Eur. J. Clin. Chem .Clin. Biochem.*, 1995 ; **33** : 839-845
- 23) Hübl W., Hauplorenz S., Tlustos L., Jilch R., Fischer M., Bayer PM.  
Precision and accuracy of monocyte counting.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1995 ; **103** : 167-170
- 24) Hübl W., Tlustos L., Erath A., Andert S., Bayer PM.  
Proposed reference method for peripheral blood monocyte counting using fluorescence labelled monoclonal antibodies.  
*Cytometry*, 1996 ; **26** : 69-74

- 25) Hübl W., Wolfbauer G., Andert S. et al.  
Toward a new reference method for leukocyte five-part differential.  
*Cytometry*, 1997 ; **30** : 72-84
- 26) Hübl W., Andert S., Thum G. et al.  
Value of neutrophil CD16 expression for detection of left shift and acute-phase response.  
*Hematology*, 1997 ; **107** : 187-196
- 27) Kabutomori O., Iwatani Y., Koh T., Yanagihara T.  
CD16 antigen density on neutrophils in chronic myeloproliferative disorders.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1997 ; **107** : 661-664
- 28) Kim JT., Gleich GJ., Kita H.  
Roles of CD9 molecules in survival and activation of human eosinophils.  
*J. Immunol.*, 1997 ; **159** : 926-933
- 29) Koepke JA., Doston MA., Shifman MA.  
A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method.  
*Blood cells*, 1985 ; **11** : 173-186
- 30) Lacombe F., Lacoste L., Briaïs A., Dumain P., Belloc F., Reiffers J and Bernard Ph.  
A flow cytometry reference method for quantifying immature granulocytes in peripheral blood samples.  
*Blood*, 1997 ; **90** : 44b-45b
- 31) Lacombe F., et al.  
A flow cytometry reference method for quantifying immature granulocytes and blast cells in peripheral blood samples : report from the extended differential panel.  
*Lab. Hematol.*, 1998 ; **4** :104. (abstr.)
- 32) Lacombe F., et al.  
Comparaison of the Cell-Dyn® 4000 immuni-differential count to the proposed flow cytometry reference method for the enumeration of blasts and immature granulocytes.  
*Lab. Hematol.*, 1998 ; **4** :114. (abstr.)
- 33) Lacombe F., Cazaux N., Briaïs A., Labroille G ...  
Evaluation of the leukocyte differential flags on an hematologic analyser *the cobas argos 5 diff*.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1995 ; **104** : 495-502
- 34) Lacombe F., Durrieu F., Briaïs A., Dumain P., Belloc F., Bascans E., Reiffers J., Boisseau MR. And Bernard P.  
Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia.  
*Leukemia*, 1997 ; **11** : 1878-1886
- 35) Lacombe F.  
La cytométrie en flux en hématologie  
Précis des maladies du sang, Ellipses, Paris, chap56, 674-689,1995

- 36) Macedo A., Orfao A., Gonzalez M. et al.  
Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis : implications for minimal residual disease studies.  
*Leukemia*, 1995 ; **9** : 993-998
- 37) Macey MG., Carthy DA., Davies C., Newland AC.  
The Q-Prep System : effects on the apparent expression of leucocyte cell surface antigens.  
*Cytometry*, 1997 ; **30** : 67-71
- 38) Mathy KA., Koepke JA.  
The clinical usefulness of segmented vs stab neutrophil criteria for differential leukocyte counts.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1974 ; **61** : 947-958
- 39) Metzzeu P., Miglierina R., Ratinaud MH.  
La cytométrie en flux (guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules)  
Presses de l'Université de Limoges
- 40) NCCLS Approved standard H20-A.  
Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods.  
Villanova, Pa : National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.
- 41) Neame P., Soamboosruo P., Browman G. et al.  
Classifying acute leukemia by immunophenotyping : a combined FAB-immunologic classification of AML.  
*Blood*, 1986 ; **68** : 1355-1362
- 42) Nourbakhsh M., Atwood JG., Raccio J et al.  
An evaluation of blood smears made by a new method using a spinner and diluted blood.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1978 ; **70** : 885-892
- 43) Pierelli L., Teofili L., Menichella G., Rumi C., Paolini A., Iovino S., Puggioni PL., Leone G., Bizzi B.  
Further investigations on the expression of HLA-DR, CD33 and CD13 surface antigens in purified bone marrow and peripheral blood CD34<sup>+</sup> haematopoietic progenitor cells.  
*Br. J. Haematol.*, 1993 ; **84** : 24-30
- 44) Rainer RO., Hodges L., Seltzer GT.  
CD45 gating correlates with bone marrow differential.  
*Cytometry*, 1995 ; **22** : 139
- 45) Rothe G., Schmitz G.  
For the Working Group On Flow Cytometry And Image Analysis.  
Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies.  
*Leukemia*, 1996 ; **10** : 877-895
- 46) Rümke CL.  
The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts : a warning.  
*Blood Cells*, 1985 ; **11** : 137-140

- 47) Shah VO., Civin CI., Loken MR.  
Flow cytometric analysis of human bone marrow : IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hematopoiesis.  
*J. Immunol.*, 1988 ; **140** : 1861-1867
- 48) Sultan C., Priolet G., Beuzard Y., Rosa R., Josso F.  
Techniques en hématologie.  
Flammarion Médecine-Sciences, 2<sup>ème</sup> Edition, 1978hn
- 49) Sutherland DR., Anderson L., Keeney M., Nayar R., Chin-Yee I.  
The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry.  
*J. Hematother.*, 1996 ; **5** : 213-226
- 50) Swain WR.  
Laboratory and clinical evaluation of white blood cell differential counts.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1991 ; **95** : 381-388
- 51) Syrjälä M., Anttila VJ., Ruutu T., Jansson SE.  
Flow cytometric detection of residual disease in acute leukemia by assaying blasts coexpressing myeloid and lymphatic antigens.  
*Leukemia*, 1994 ; **8** : 1564-1570
- 52) Terstappen LWMM. and Loken MR.  
Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials.  
*Cytometry*, 1988 ; **9** : 548-556
- 53) Warner BA., Reardon DM.  
A field evaluation of the Coulter STKS.  
*Am. J. Clin. Pathol.*, 1991 ; **95** : 207-217

---

BLUTEAU Martine - DETECTION DES CELLULES MYELOIDES IMMATURES SANGUINES PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET PENTRA 120.

Th. D. : Pharm. ; Limoges ; 1999; 95 p

---

RESUME:

Le dénombrement des populations leucocytaires sanguines normales et anormales (cellules granuleuses immatures et blastiques) réalisé manuellement - méthode de référence - est sujet à de nombreuses limites entraînant de mauvais résultats. Devant ce problème, des méthodes de cytométrie en flux sont en évaluation pour suppléer la microscopie optique.

La première partie de notre étude a consisté à quantifier les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes, les cellules granuleuses immatures et blastiques par une méthode de cytométrie en flux utilisant les anticorps anti-CD45, anti-CD14 et anti-CD-16. Les résultats ont été comparés à ceux de la formule manuelle et montrent une excellente corrélation entre les deux méthodes. Cette nouvelle étude contribue à valider la méthode de cytométrie en flux dont la qualité d'analyse est nettement supérieure à la formule microscopique.

La seconde partie de notre étude avait pour objet l'évaluation de l'apport de la matrice étendue de l'automate Pentra 120 à la détection des cellules granuleuses immatures et blastiques. En ce qui concerne les populations blastiques, nous avons été limités par le faible nombre et la diversité des échantillons. Par contre en ce qui concerne la mylémie, notre attention a été attirée par la répartition des cellules dans cette seconde matrice. Elle pourrait permettre une détection plus précise des cellules granuleuses immatures et apporter des renseignements qualitatifs sur l'équilibre de maturation.

---

MOTS CLES:

- Cytométrie en flux
- Blastés
- Cellules granuleuses immatures
- Pentra 120
- Formule leucocytaire