



Association des Assistants en Biologie Clinique (AABC)

A.S.B.L.

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux :

expérience Jolimontoise

Travail réalisé dans le cadre de le 5^e année de spécialisation en Biologie Clinique
Centres Hospitaliers Jolimont
Maitre de stage : Gautier Detry

Stephan Frédéric
Pharmacien Biologiste CHR de Huy
Hématologie – Hémostase - Transfusion

26 mai 2016

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

4 sites hospitaliers 942 lits

- Jolimont 572 lits
- Lobbes 142 lits
- Nivelles 144 lits
- Tubize 84 lits

7 Cliniciens hématologues

Laboratoire

- 9 spécialistes biologie clinique
- 2 hémobiologistes
- 190.000 COFO/an

14 polycliniques



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise





Groupe Jolimont
Presents



...

...

Etude du monocyte en cytométrie

...

...

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

❖ Introduction

- Monocyte
- Cytologie
- Hypermonocytoses

❖ Matériel & Méthode

❖ Maturations

❖ Perspectives

❖ Conclusion

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

Phagocyte Mononuclé

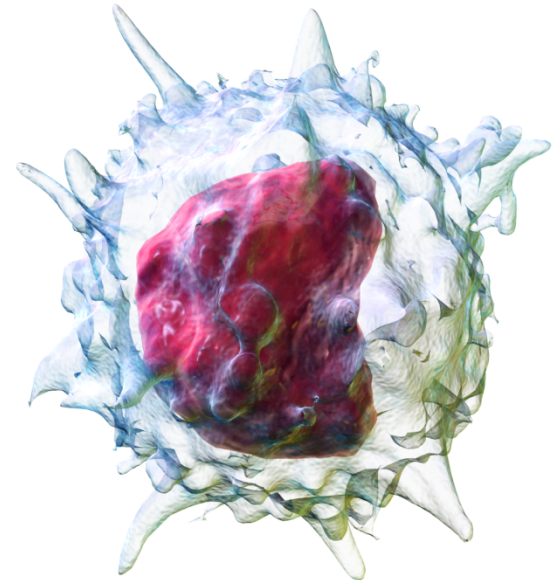
Médullaire / Sanguin / Tissulaire

Migration tissulaire et transformation histiocytes

Monocytopoïèse médullaire rapide

Margination importante

Phagocytose/CPA/Cytokines/Coagulation



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

Grande 20-25 μ m de diamètre

N/C 0,5

Cytoplasme grisâtre, granulations à peine visibles, souvent vacuolisé

Noyau allongé en ruban, réniforme, replié

Chromatine relativement fine, sans nucléole visible

Activité enzymatique : myéloperoxydase, estérases, lysozyme

Formes immatures : Taille similaire voire augmentée, N/C augmenté, cytoplasme moins vacuolisé, Noyaux de plus en plus sphérique, Chromatine de plus en plus fine, Nucléoles de plus en plus visibles



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

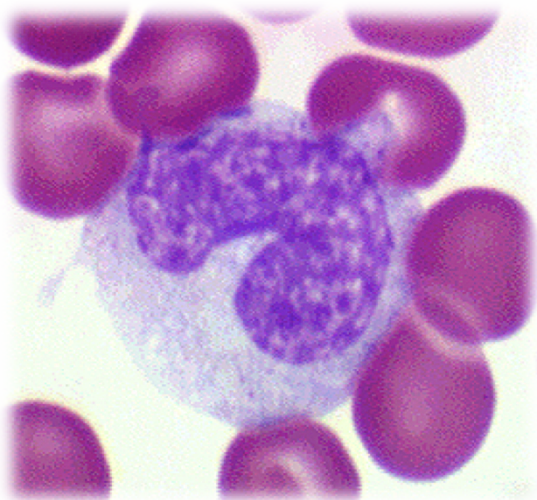
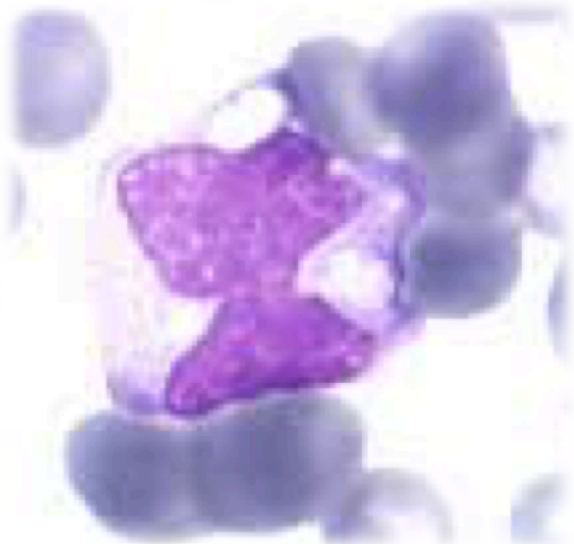
Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

Grande 20-25 μ m de diamètre

N/C 0,5

Cytoplasme grisâtre, granulations à peine visibles, parfois vacuolisé

Noyau allongé en ruban, réniforme, replié

Chromatine relativement fine, sans nucléole visible

Activité enzymatique : myéloperoxydase, estérases, lysozyme

Formes immatures : Taille similaire voire augmentée, N/C augmenté, cytoplasme moins vacuolisé, Noyaux de plus en plus sphérique, Chromatine de plus en plus fine, Nucléoles de plus en plus visibles



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

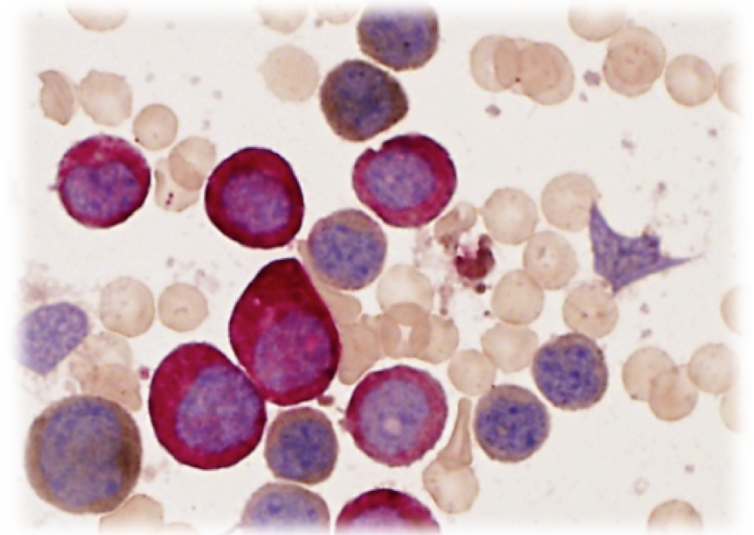
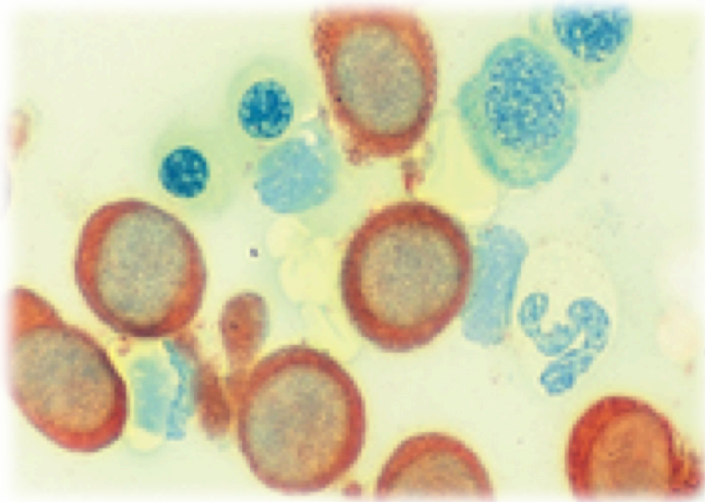
Hypermonocytoses

Cytochimie

Myéloperoxydase

Estérases

- alpha naphthyl butyrate estérase
- Naphtol ASD chloroacétate estérase



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

Grande 20-25 μ m de diamètre

N/C 0,5

Cytoplasme grisâtre, granulations à peine visibles, parfois vacuolisé

Noyau allongé en ruban, réniforme, replié

Chromatine relativement fine, sans nucléole visible

Activité enzymatique : myéloperoxydase, estérases, lysozyme

Formes immatures : Taille similaire voire augmentée, N/C augmenté, cytoplasme moins vacuolisé, Noyaux de plus en plus sphérique, Chromatine de plus en plus fine, Nucléoles de plus en plus visibles



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

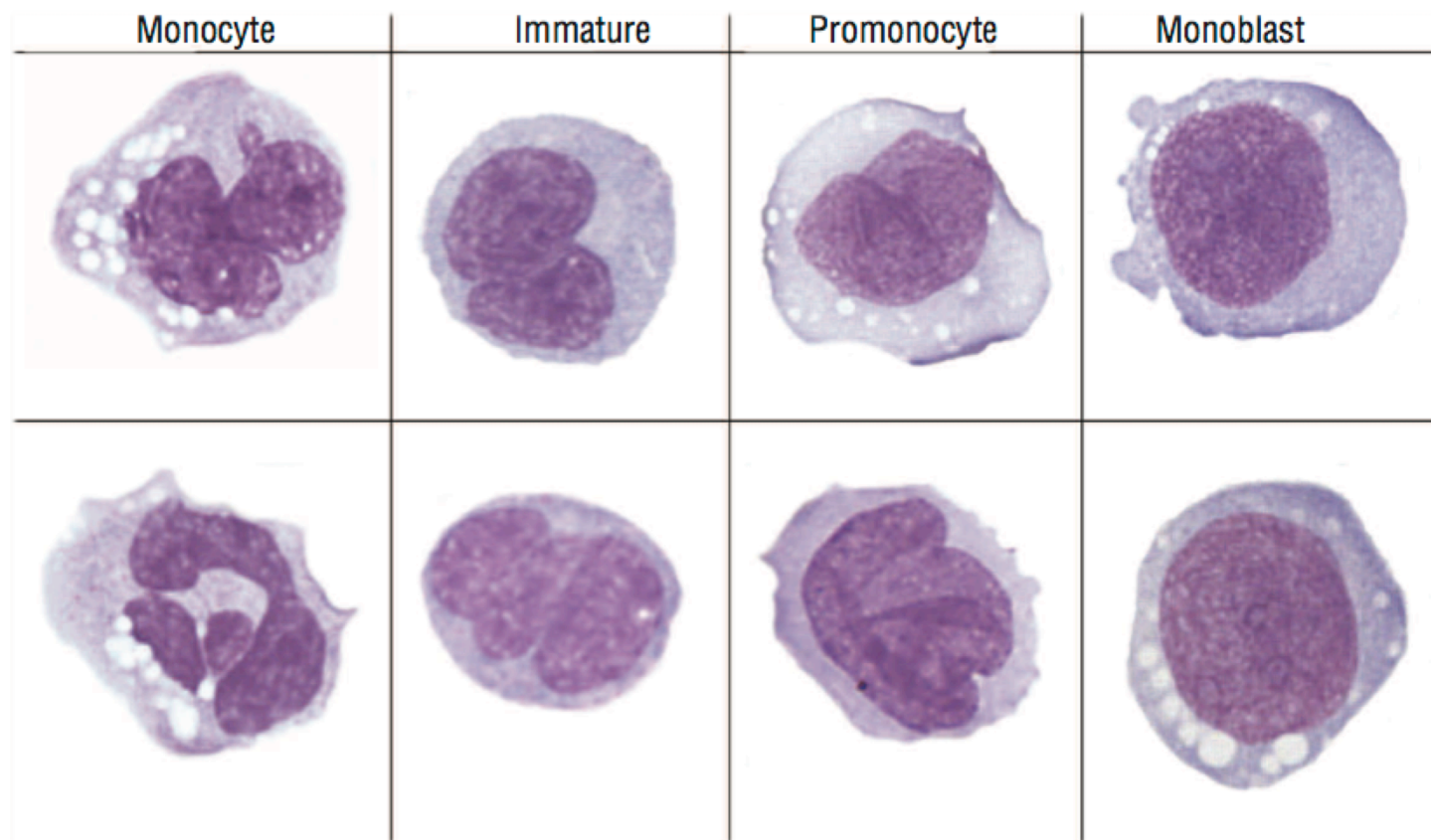
Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

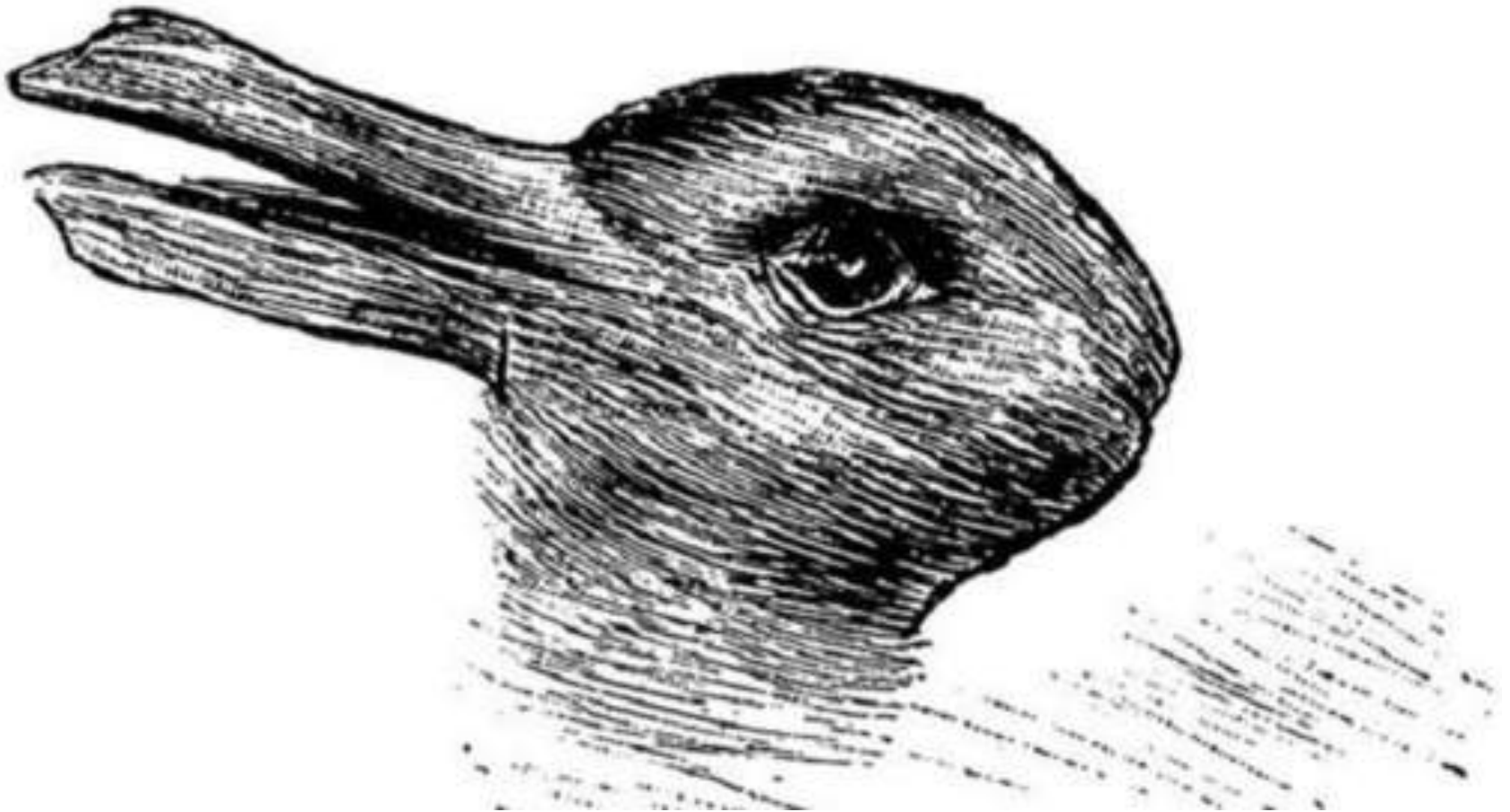
Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

- ❖ Hypermonocytoses non associées à une pathologie hématologique
 - inflammatoire
 - régénérationnelles

- ❖ LMA WHO
 - t(8:21) (q22;q22) Rare composante monocyttaire
 - inv(16) (p13,1;q22) LMA M4eo
 - t(9:11) (p22;q23) LMA M4 ou LMA M5
 - t(6:9) (p23;q34) LMA basophilie

- ❖ Mutation NPM 1 associées à LMA M5

- ❖ LMA FAB M4 et M5

- ❖ LMMC

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Monocyte

Cytologie

Hypermonocytoses

- ❖ Hypermonocytoses non associées à une pathologie hématologique
 - inflammatoire
 - régénérationnelles

- ❖ LMA WHO
 - t(8:21) (q22;q22) Rare composante monocyttaire
 - inv(16) (p13,1;q22) LMA M4eo
 - t(9:11) (p22;q23) LMA M4 ou LMA M5
 - t(6:9) (p23;q34) LMA basophilie

- ❖ Mutation NPM 1 associées à LMA M5

- ❖ LMA FAB M4 et M5

- ❖ LMMC

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

2016 CMML WHO's update



Monocytose	> 1.000/ μ L <u>ET >10%</u>
Exclure LMC BCR-ABL, <u>PV, ET, MFP</u>	NMP historique exclu la LMMC Mutation JAK2, CALR, MPL soutient la NMP
Pas de réarrangement PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 <u>ou PCM1-JAK2*</u>	
< 20% de blastes Moelle et sang périphérique	Myéloblastes, Monoblastes, Promonocytes
Dysplasie dans minimum une lignée	Si pas de dysplasie, il faut une anomalie cytogénétique, une <u>mutation**</u> ou une monocytose persistante >3 mois avec exclusion de toutes les autres causes

- *** LMMC – 0 : <2% SP et <5% moelle
- LMMC – 1 : 2-4% SP et 5-9% moelle
- LMMC – 2 : 5-19% SP et 10-19% Moelle

PROMONOCYTES

=

BLASTES

CHALLENGE

- WHO Update 2016 Chronic Eosinophilic Leukemia
- ** TET2, ASXL1, SRSF2, SETBP1, RAS, RUNX1, EZH2, ...
- *** Pronostic différent

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

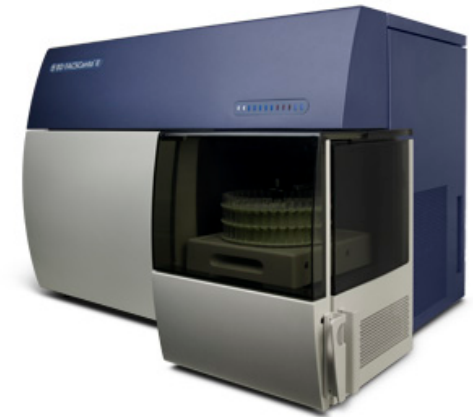
Maturations

Perspectives

Conclusion

1. Pré-analytique

- Prélèvement seringue (EDTA, Héparine, SSPP)
- Cytologie (3 MGG, 1PAS, 1PERLS, 3réserve)
- Passage aiguille fine (24G)
- Ajustement leucocytose
- Lyse et lavages (BD Lyse Wash Assistant, BD Pharmlyse)
- Préparation des panels
- Incubation



2. Cytométrie - Acquisition

- BD FACSCanto II (lasers rouge, bleu, violet)

3. Cytométrie – Traitement

- BD FACSDiva 7
- INFINICYT



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

3 Patients « sains »

6 Patients hémato non LMMC, LMA M4 ou LMA M5

9 Patients pathologiques monocytaires (4 LMMC, 1LMA M4eo, 1 LMA M5a, 3 LMA M5b)

Chromogène	Tube1	Tube2	Euroflow	Chromogène
FITC	CD 35	CD 11b	HLA-DR	PacB
PE	CD 64	CD 64	CD 45	PacO
PerCP Cy5,5	CD 34	CD 34	CD 35	FITC
PE-Cy7	CD 117	CD 117	CD 64	PE
APC	CD 300	CD 300	CD 34	PerCP Cy 5,5
APC-Cy7	HLA-DR	HLA-DR	CD 117	PECy 7
HV450	CD 14	CD 14	CD 300	APC
HV500	CD 45	CD 45	CD 14	APC-H7

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

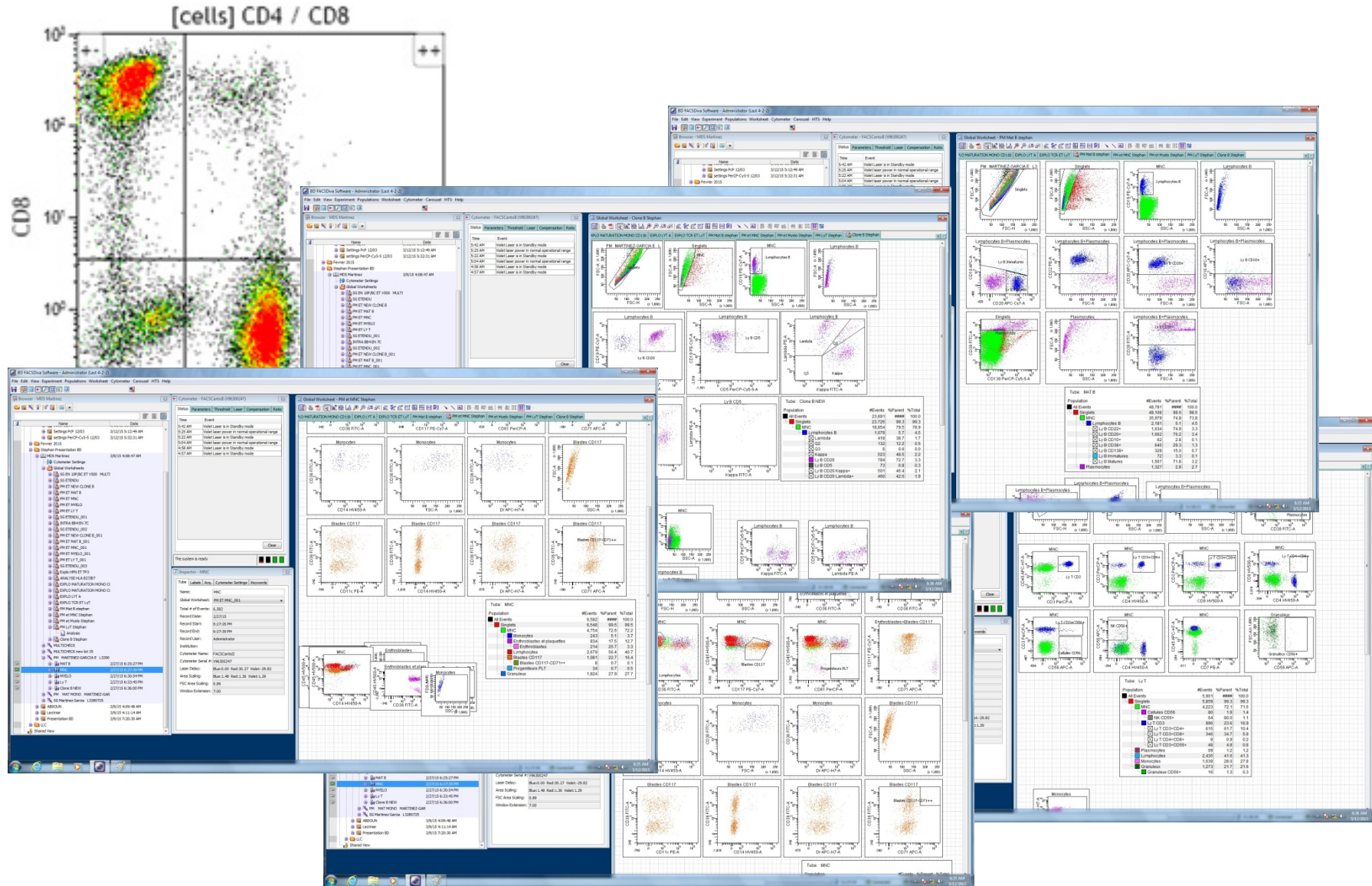
Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion





Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

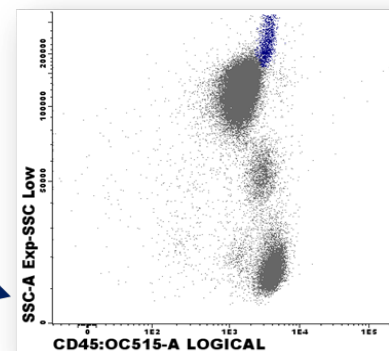
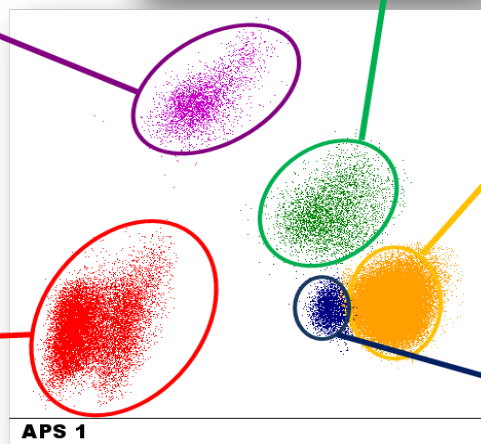
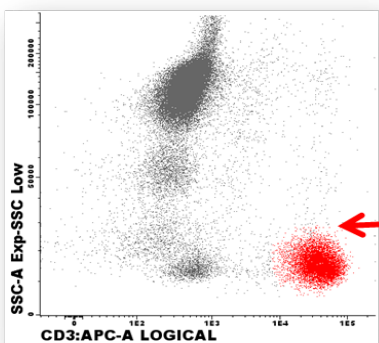
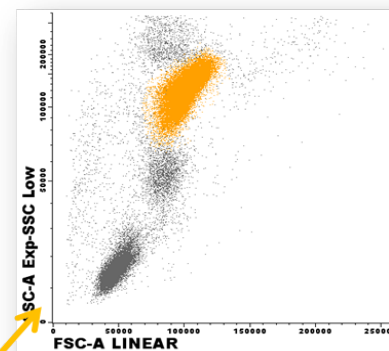
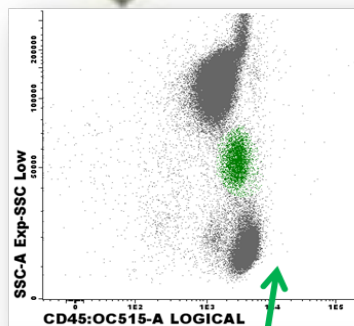
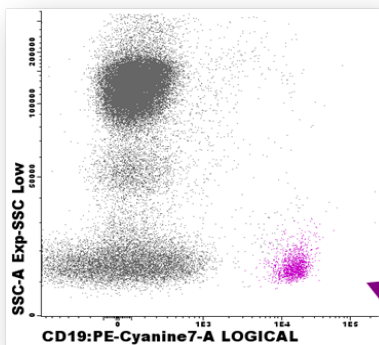
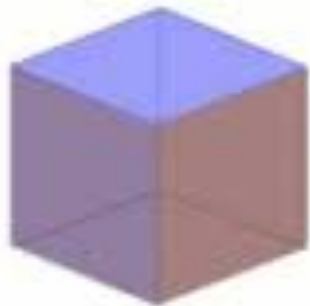
Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

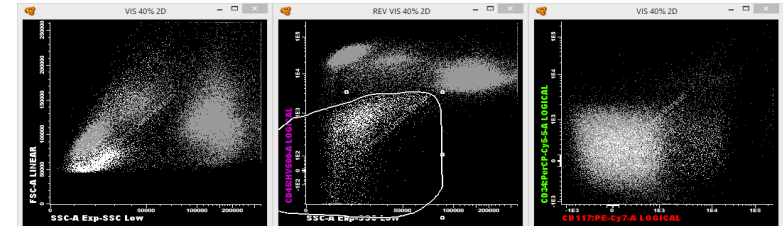
Conclusion

Infinicyt™

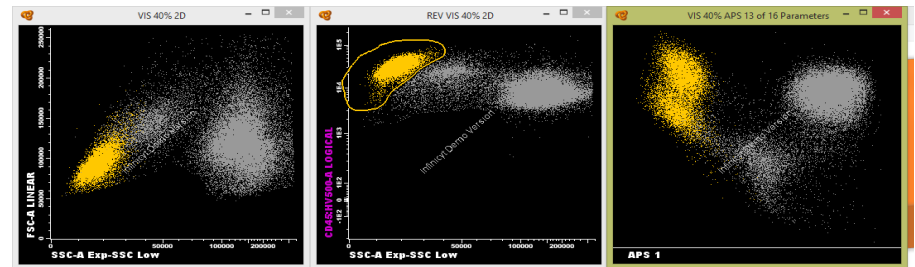


Sélection Compartiment monocytaire complet

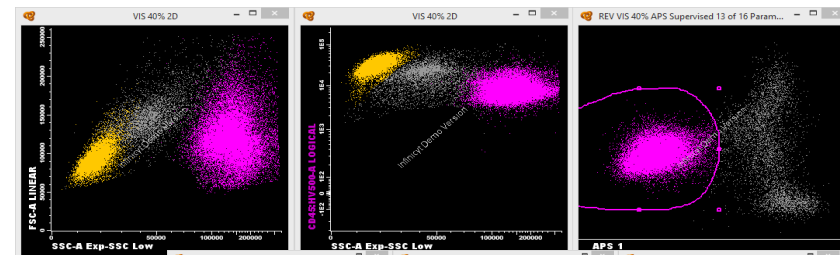
1. Elimination cellules CD 45 négatives



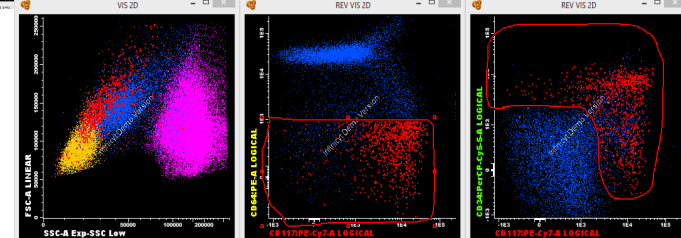
2. Elimination lymphocytes



3. Elimination des granulocytes neutrophiles



4. Elimination cellules blastiques non monocytaires



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

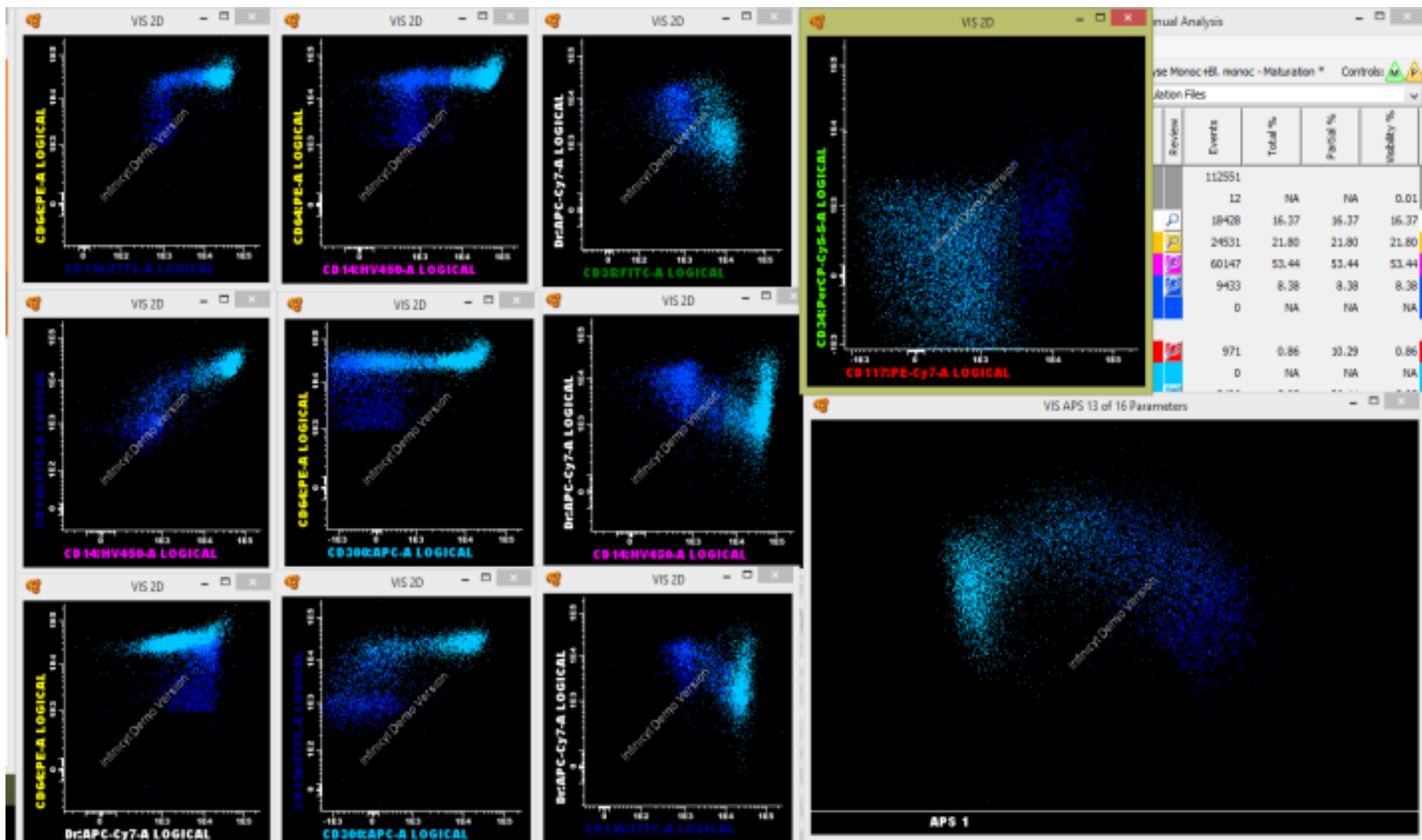
Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion

Etude du Compartiment monocytaire complet



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

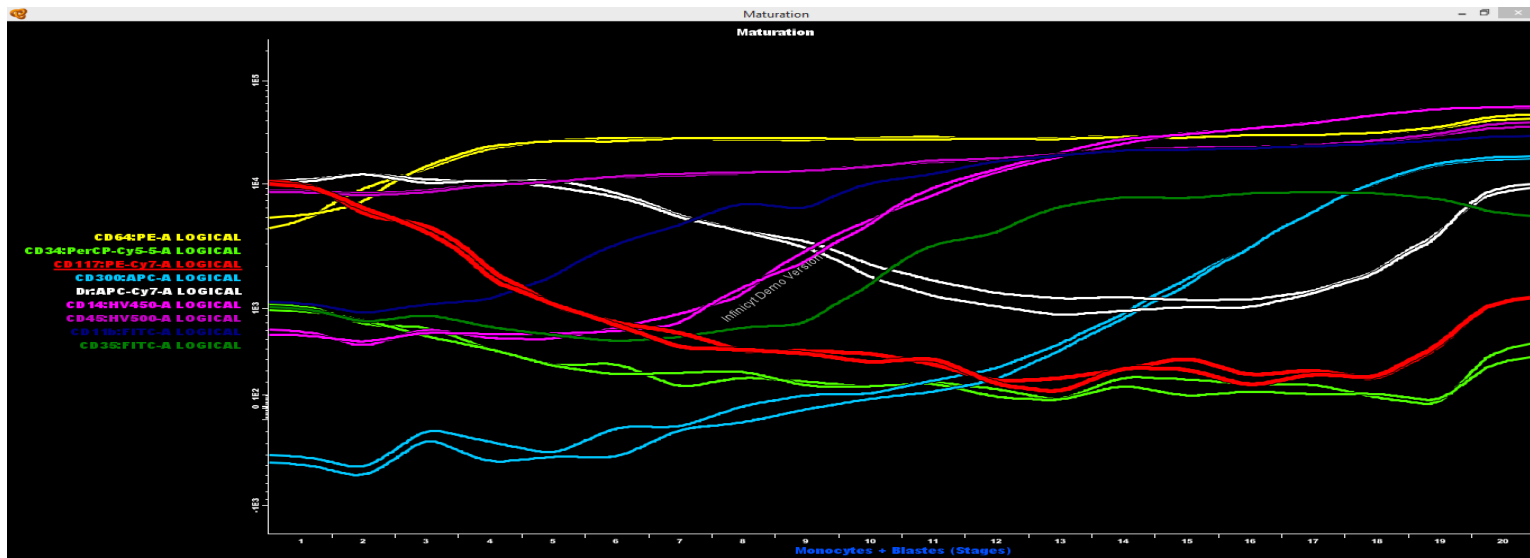
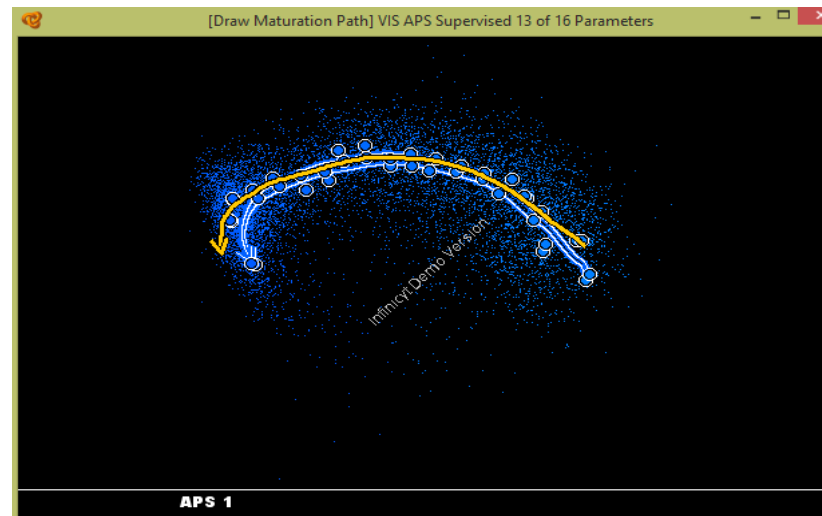
Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

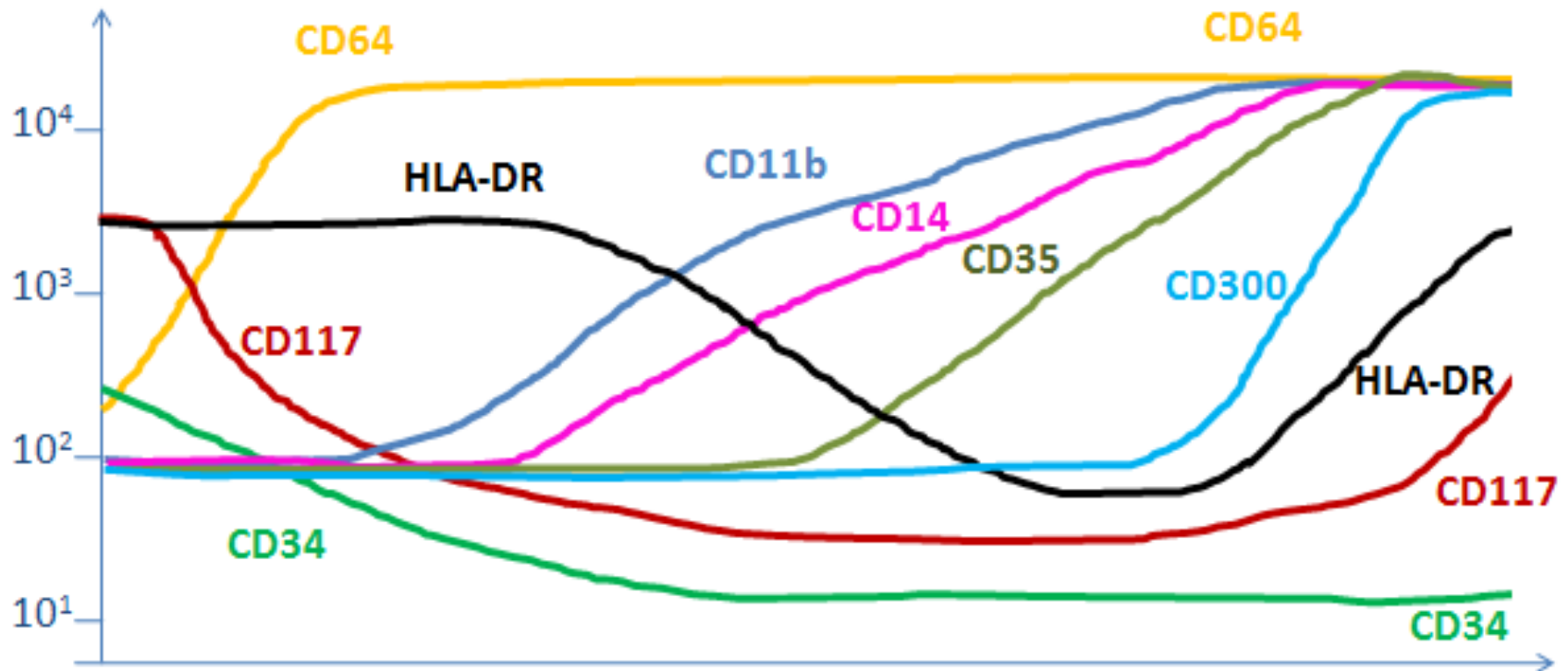
Conclusion

Tracé de maturation monocyttaire



Tracé de maturation monocyttaire

Extrapolation de l'expérience Jolimontoise de maturation monocyttaire à partir moelles de patients non pathologiques



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

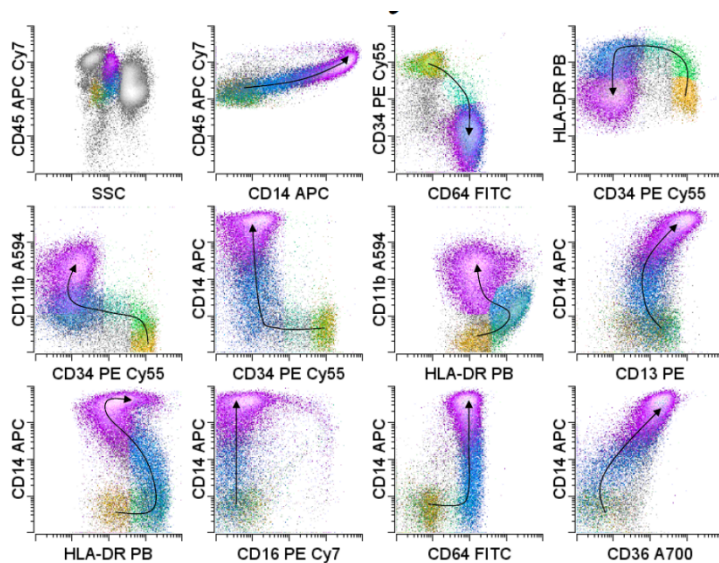
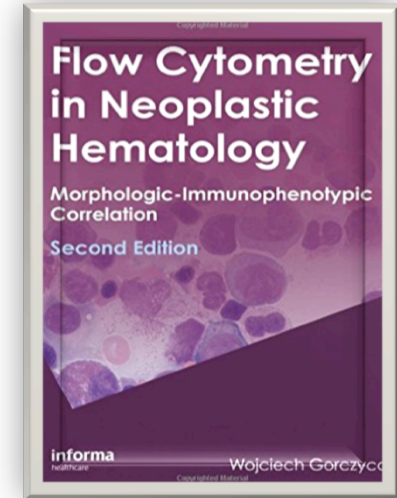
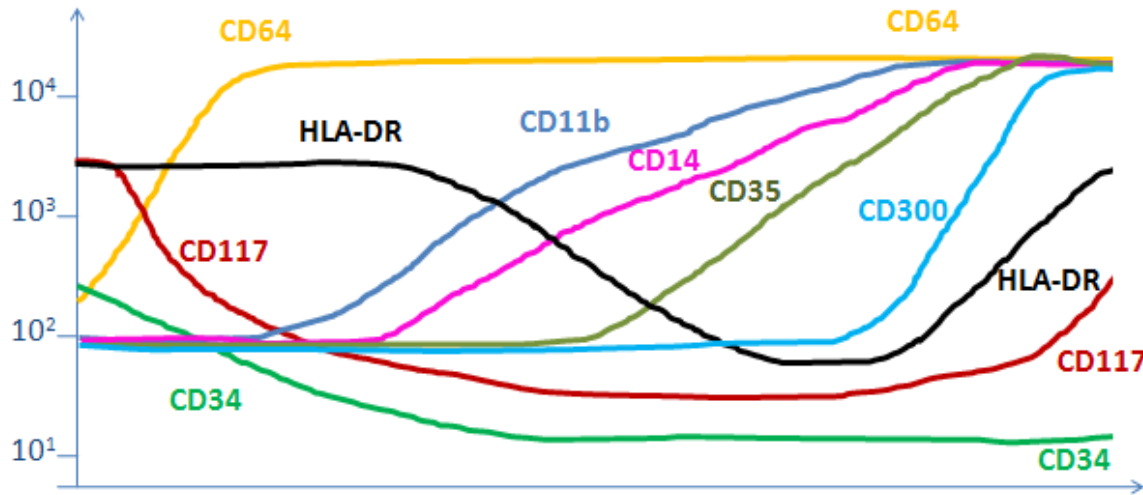
Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion



	Blast	Promonocyte	Monocyte
CD45	High	High	High
CD34	High	High	Low
CD13	High	High	High
CD33	High	High	High
HLA-DR	Low	High	High
CD64	Low	High	High
CD15	Low	High	High
CD11b	Low	High	High
CD36	Low	High	High
CD4	High	High	Low
CD14	Low	High	High
CD16	Low	High	High

Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion



Les maturations monocytaires en cytométrie en flux : expérience Jolimontoise

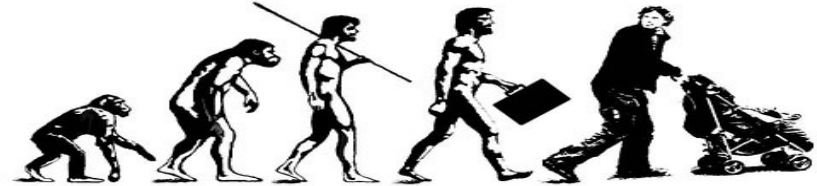
Introduction

Matériel & Méthode

Maturations

Perspectives

Conclusion



❖ Soutien à la cytologie / Blastés, Promono, Mono

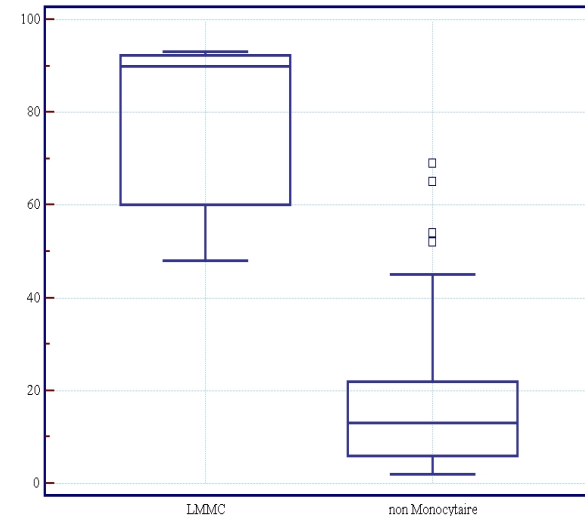
❖ Définition précise des différents stades en CMF ?

Large cohorte / Standardisation

❖ Monocytose réactionnelle vs. Maligne

❖ Monocytes CD56+ (n=87 / 5vs.82 / MW p : 0,0003)

❖ Monocytes CD16-

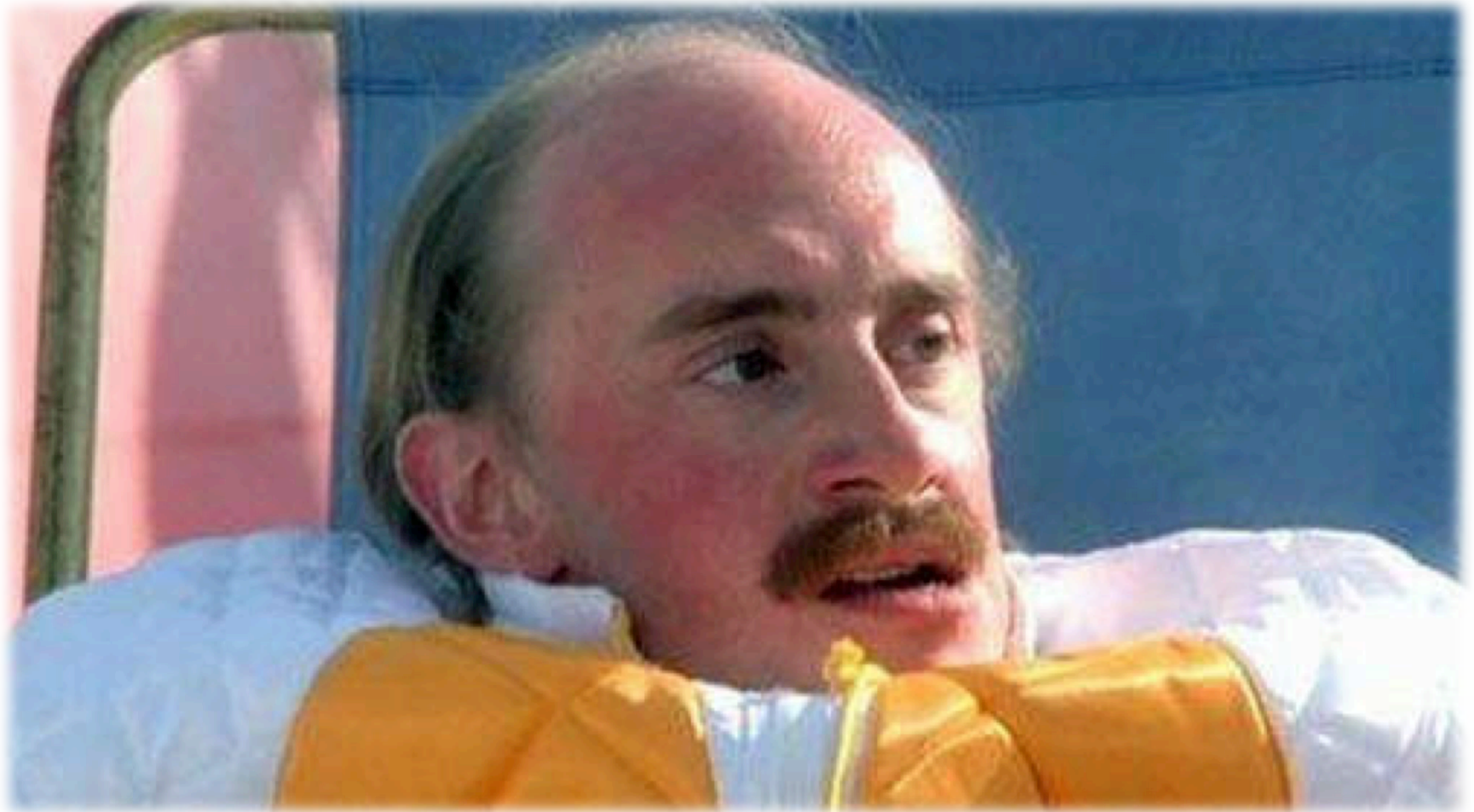


Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia

Dorothee Selimoglu-Buet,^{1,2} Orianne Wagner-Ballon,^{3,4} Veronique Saada,⁵ Valerie Bardet,^{6,7} Raphaël Itzykson,^{1,8} Laura Bencheikh,^{1,2} Margot Morabito,¹ Elisabeth Met,¹ Camille Debord,^{6,7} Emmanuel Benayoun,^{3,4} Anne-Marie Nloga,⁸ Pierre Fenaux,⁸ Thorsten Braun,⁹ Christophe Willekens,¹⁰ Bruno Quesnel,¹¹⁻¹³ Lionel Adès,⁸ Michaela Fontenay,^{6,7} Philippe Rameau,¹⁴ Nathalie Droin,^{1,14} Serge Koscielny,¹⁵ and Eric Solary,^{1,2} on behalf of the Groupe Francophone des Myélodysplasies

¹INSERM U1009, Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Faculty of Medicine, University Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département d'Hématologie et d'Immunologie Biologiques, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; ⁴Faculté de Médecine, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France; ⁵Biological Hematology, Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁶Département of Immuno-Hématologie, Institut Cochin, Paris, France; ⁷Faculty of Medicine, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁸Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hématologie Clinique, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ⁹Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; ¹⁰Clinical Hematology, Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹¹University of Lille Nord de France, Lille, France; ¹²INSERM U837, Team 3, Cancer Research Institute of Lille, Lille, France; ¹³Clinical Hematology Unit, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; and ¹⁴INSERM US23, Unité mixte de service 2635, Analyse moléculaire, Modélisation et Imagerie de la maladie Cancéreuse, and ¹⁵Biostatistics and Epidemiology Service, Gustave Roussy, Villejuif, France

Pour conclure



Etude compartiment monocyttaire en cytologie
+
Différenciation via analyse en cytométrie en flux
+
Autres marqueurs (CD56, CD16)

Stade	CD34 et ou CD117	CD64	CD11b	CD14	CD35	CD300	HLA-DR
Monoblastes	+	+	-	-	-	-	+
Promonocytes ?	-	+	+	f	f/-	-	+
Monocyte immature ?	-	+	+	+	+	-	f
Monocyte mature	-	+	+	+	+	+	+

Remerciements

- G. Detry
- C. Debecker
- B. Husson
- Equipe Jolimont

