

## COMPARAISONS INTER LABORATOIRES

### RAPPORT GLOBAL

1

## CONTRÔLE VIRTUEL 2023

Ce programme de comparaison inter laboratoires (CIL) a été développé par le groupe CytHem-SMD afin d'améliorer les pratiques et d'aborder différentes situations pouvant conduire à des difficultés d'interprétation du score d'Ogata et du RED-score.

### CARACTERISTIQUES DES BIOLOGISTES PARTICIPANTS

Pour ce contrôle virtuel, les utilisateurs ont choisi les fichiers correspondant à leur plateforme habituelle. La répartition des cytomètres était la suivante : 17 cytomètres de la société Beckman Coulter (fichiers Navios™) et 14 cytomètres de la société BD Biosciences (14 fichiers FACSLytic™).

Concernant l'analyse des données, les logiciels FACSuite, Infinicyt et Kaluza sont ceux utilisés par les 31 centres selon les combinaisons précisées dans le tableau ci-dessous.

Cytomètre	FACSLytic		Navios
Logiciel d'analyse	FACSuite	Infinicyt	Kaluza
Utilisateurs	13	1	17

31 biologistes ont analysé le fichier permettant le calcul du score d'Ogata. 14 centres (45%) ont analysé le fichier issu du FACSLyric (13 centres ont utilisé le logiciel FACSuite et un centre le logiciel Infinicyt) et 17 (55%) ont analysé le fichier issu du Navios à l'aide du logiciel Kaluza. 29 centres ont analysé le fichier permettant le calcul du RED-score. 13 centres (45%) ont analysé le fichier issu du FACS Lyric et 16 (55%) ont analysé le fichier issu du Navios.

Les fichiers FACSLyric ont été préparés au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Ambroise Paré (AP-HP. Paris Saclay) et les fichiers Navios ont été préparés au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Cochin (AP-HP. Paris Centre) le jour du prélèvement de moelle. Pour cette première comparaison inter laboratoires du groupe CytHem SMD, les protocoles d'analyses ont été fournis. L'analyse constituait donc à affiner la stratégie de gating pour permettre le calcul du score d'Ogata et du RED-Score, ainsi que des paramètres associés : pourcentage de progéniteurs érythroïdes CD117+, répartition des sous-populations d'érythroblastes.

## ANALYSE DES CAS VIRTUELS

L'analyse statistique fournie dans le rapport personnalisé (*accessible pour chaque participant dans l'espace « Mon compte »*) a été réalisée par groupe de pairs (par rapport au type de fichiers sélectionnés par le centre participant) pour chacun des cas analysés.

### Cas clinique

Un myélogramme a été pratiqué chez un homme de 79 ans dans le cadre du bilan d'une bicytopenie. Ce patient a pour principal antécédent un asthme connu depuis l'enfance. Voici les résultats de son hémogramme réalisé sur Sysmex-XN™.

3

Leucocytes	7.6 G/L
Hématies	3.21 T/L
Hémoglobine	10.9 g/dL
Hématocrite	32.2%
VGM	100.3 fL
TCMH	34.0 pg
CCMH	33.9 g/dL
Plaquettes	63 G/L
VMP	12.3 fL
Réticulocytes	79.3 G/L
Polynucléaires neutrophiles	5.68 G/L
Polynucléaires éosinophiles	0.10 G/L
Polynucléaires basophiles	0.05 G/L
Lymphocytes	1.34 G/L
Monocytes	0.43 G/L

En parallèle du myélogramme ont été prélevés : caryotype, bilan moléculaire et immunophénotypage dans le cadre d'une suspicion de syndrome myélodysplasique. Quelle est votre interprétation du score d'Ogata et du RED-score ?

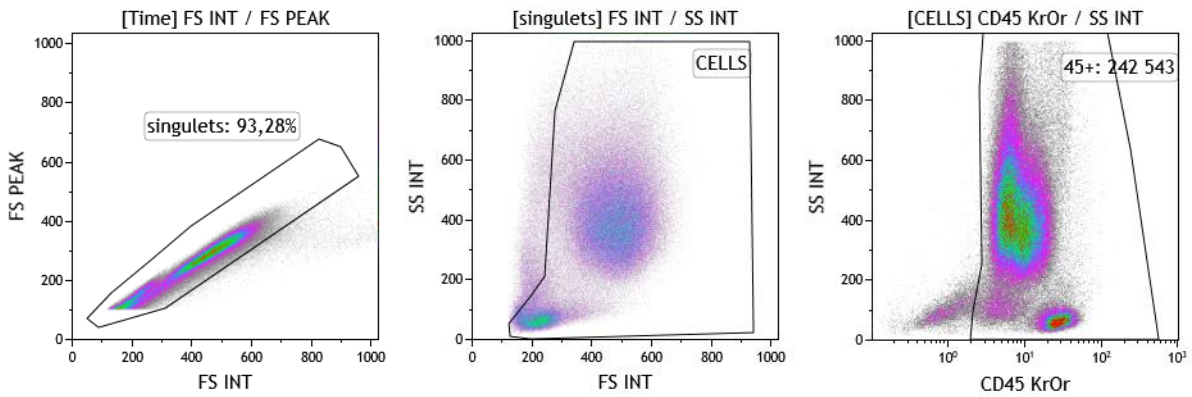
## SCORE d'OGATA

Données	FACSlyric			Navios		
	Moyenne robuste	Ecart-type robuste	CV (%) robuste	Moyenne robuste	Ecart-type robuste	CV (%) robuste
CD45+	459 664	20 883	4,5	234451	26325	11,2
Hg CD34+	77,3	27,5	35,6	45,2	13,9	30,7
Myéloblastes CD34+	10 820	2 206	20,4	5569	1983	35,6
Granuleux	376 066	12 648	3,4	191322	18337	9,6
Lymphocytes	24 172	1 970	8,2	20645	2139	10,4
% MyB CD34+	2,32	0,45	19,4	2,37	0,66	27,8
% Hg CD34+	0,7	0,24	34	0,87	0,39	45,5
Ratio CD45	4,29	0,18	4,1	4,84	0,27	5,5
Ratio SSC	6	0	0	6,27	0,26	4,1
% MyB CD7+	5,46	4,01	73,5	8,80	2,47	28,1
% MyB CD56+	16,44	3,83	23,3	15,33	2,82	18,4
% Monocytes CD56+	60,13	12,54	20,8	53,89	5,7	10,6

### 1- Calcul du score d'Ogata sur le fichier du Navios

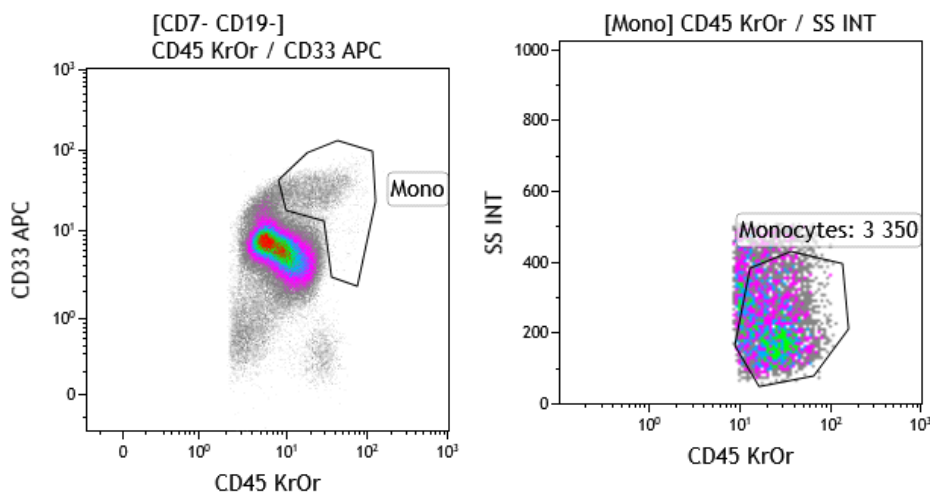
#### A. Analyse du fenêtrage des principales populations cellulaires nécessaires au calcul du score d'Ogata sur 4 ou 6 points

L'analyse du nombre d'évènements constituant les principales populations cellulaires nécessaires au calcul du score d'ogata sur 4 ou 6 points montre que la population CD45+ a été correctement identifiée sur le dotplot CD45/SSC (CV 11.2%). 2 biologistes ont identifié un nombre d'évènements CD45+ < 200 000 (43625 et 196454). L'identification correcte de la population CD45+ est primordiale puisqu'en plus de permettre l'identification des différentes populations leucocytaires, le nombre d'évènement CD45+ sert de dénominateur pour le calcul du % de myéloblastes CD34+ (MyB CD34+). Il est recommandé de placer la fenêtre CD45+ de telle sorte à éliminer au maximum la population d'érythroblastes SSClow CD45+faible/-. Attention à vérifier que l'élimination de cette population n'entraîne pas la perte de myéloblastes CD34+ avec une très faible expression du CD45.



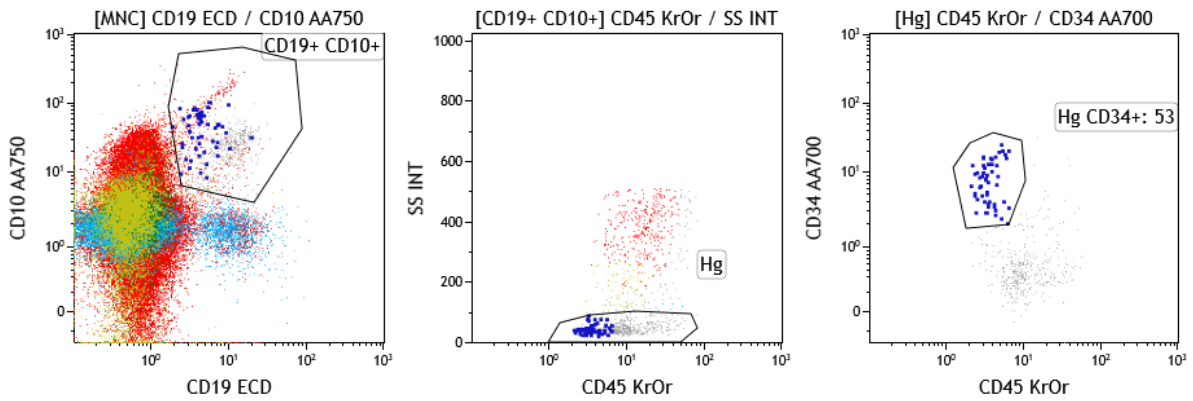
Le nombre d'évènements identifiés dans la fenêtre monocyttaire est très hétérogène selon les biologistes (de 863 à 8966 ; CV 94%).

Dans le fichier analysé, l'expression forte du CD33 et du CD45 puis le fenêtrage sur le dotplot CD45/SSC permet d'identifier une population monocyttaire.

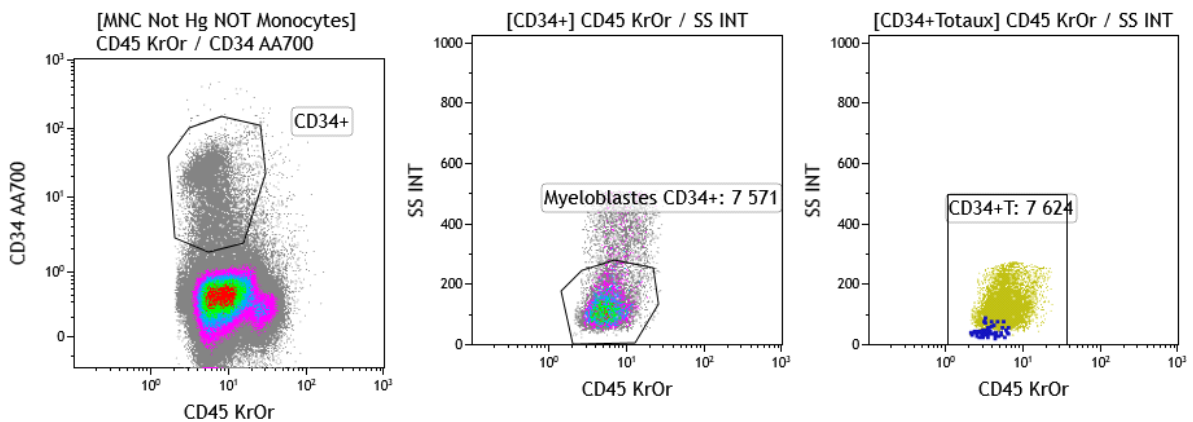


Il est intéressant de noter que les monocytes non classiques sont habituellement CD33+faible. L'absence de monocytes CD33+faible comme chez ce patient peut permettre d'orienter selon les résultats de la NFS vers la réalisation d'un immunophénotypage des monocytes sur un prélèvement de sang pour discuter d'un éventuel diagnostic de LMMC.

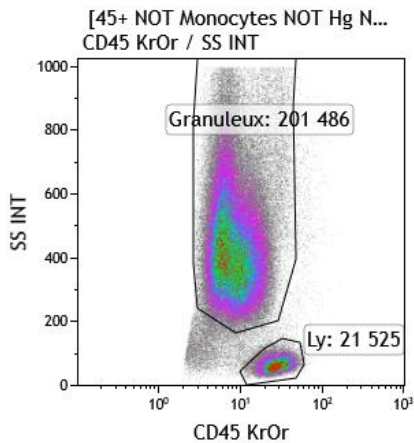
Le nombre d'évènements identifiés dans la fenêtre Hg CD34+ est relativement homogène (CV 31%). Seul un biologiste a fortement surestimé cette population avec une population >300 évènements.



Le nombre d'évènements identifiés dans la fenêtre Myéloblastes CD34+ présente un CV de 36% (2782 – 8213). Les variations sont probablement liées au fenêtrage plus ou moins resserré sur la population CD34+fort. Chez ce patient, il est important d'inclure les cellules CD34+faible puisque celles-ci clustérisent parfaitement avec le reste de la population sur le dotplot CD45/SSC. Comme le montre le résultat du myélogramme (cf conclusion du cas), il existait un excès de blastes à 6% chez ce patient.



Les populations granuleuse et lymphocytaire sont globalement correctement identifiées par l'ensemble des biologistes sur le dotplot CD45/SSC (CV à 9.6% et 10.4% respectivement).



Le ratio de MFI du CD45 a été correctement évalué par l'ensemble des biologistes (CV 5.5%). Il était situé dans l'intervalle de référence (4-7.5).

Le ratio du mode de la SSC qui était  $\geq 6$  a été correctement évalué par 16 biologistes, un seul centre a retrouvé un ratio anormal  $<6$ . Le CV pour ce paramètre est de 4.1%

### **B. Calcul du score d'Ogata 4 points**

1 biologiste a calculé un score d'Ogata à 0 ne permettant pas d'affirmer le diagnostic de SMD.

3 biologistes ont calculé un score à 1 ne permettant pas d'affirmer le diagnostic de SMD.

11 biologistes ont calculé un score à 2 compatible avec le diagnostic de SMD.

2 biologistes ont calculé un score à 3 compatible avec le diagnostic de SMD.

**Chez ce patient, la valeur attendue du score d'Ogata sur 4 points était de 2 :**

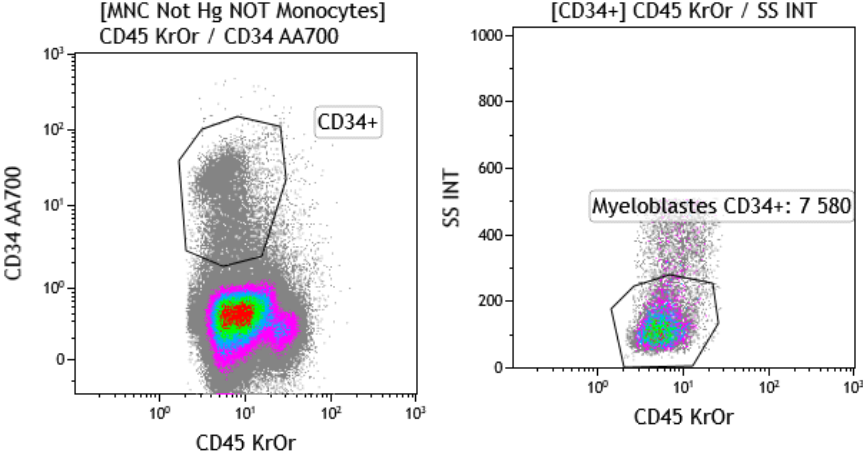
- **Diminution du taux d'hématogones CD34+**
- **Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+**

**ce qui permettait d'orienter vers le diagnostic de SMD.**

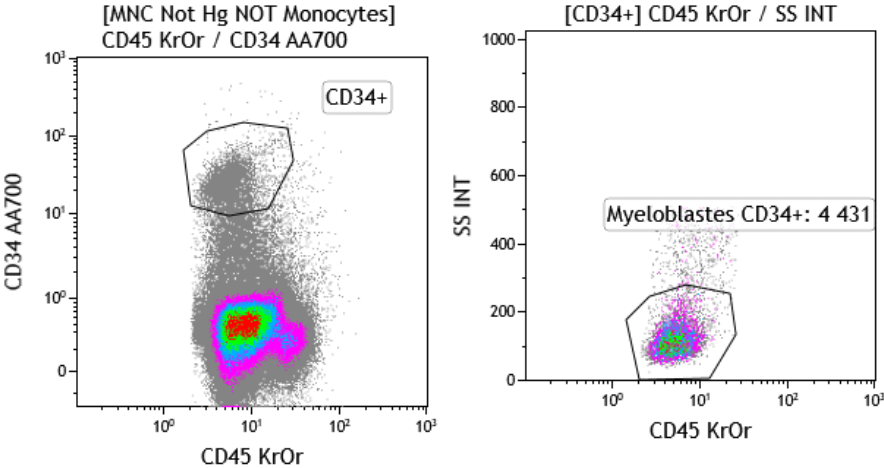
**13 biologistes sur 17 (76%) ont donc correctement orienté vers un diagnostic de SMD.**

A noter que parmi les biologistes ayant calculé un score à 2, un biologiste a compté un point pour la dégranulation cellulaire (ratio SSC  $<6$ ) sans détecter l'augmentation du taux de MyB CD34+.

Parmi les 4 biologistes qui ont rendu un score <2, le % de MyB CD34+ a été sous-estimé probablement en raison d'un gating focalisé uniquement sur les cellules CD34+fort. Chez ce patients, l'inclusion dans la fenêtre CD34+ des cellules CD34+ faible augmentait le nombre de cellules clustérisant dans la fenêtre Myéloblastes CD34+ du dotplot CD45/SSC comme illustré sur les images ci-dessous.



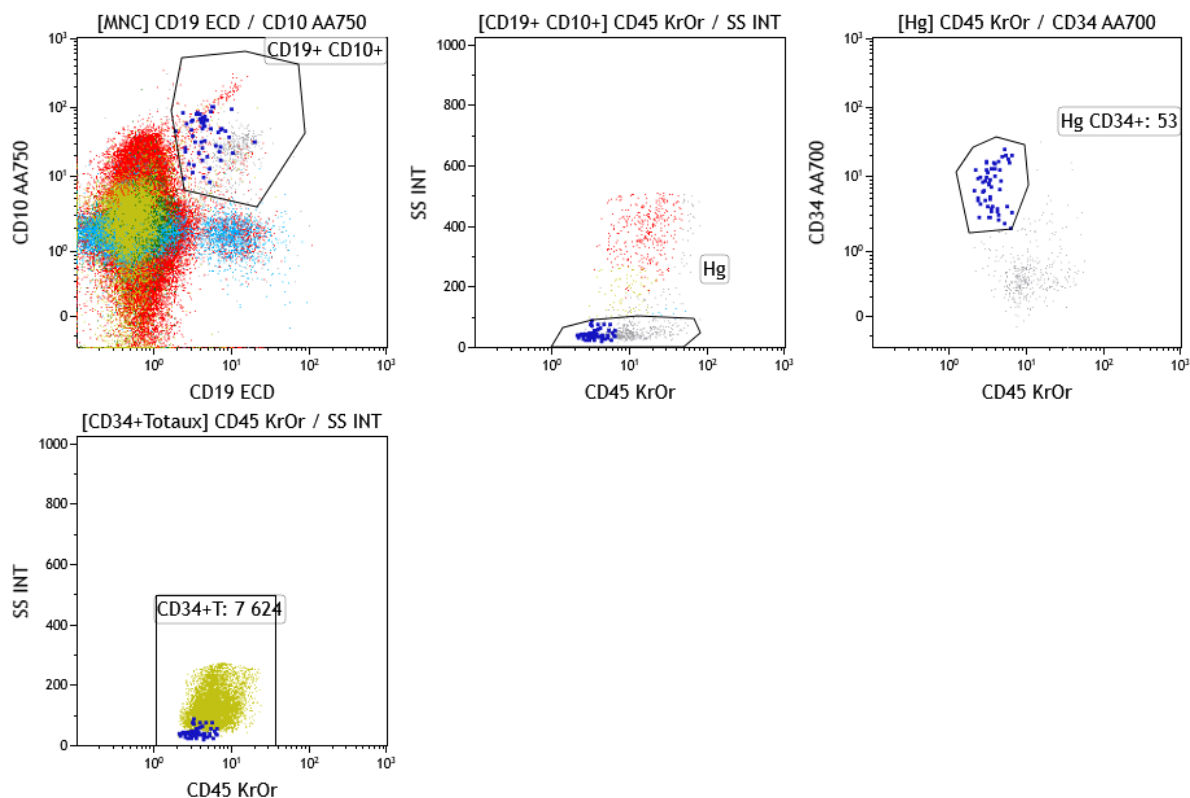
% CD34+/leucocytes = 3.1 (donc 1 point)



% CD34+/leucocytes = 1.8 (donc 0 point)

2 biologistes ont également sur estimé le paramètre % d'HgCD34+/CD34+tot.  
Chez ce patient le taux d'hématogones CD34+ par rapport aux cellules CD34+totales était fortement diminué :





% d'HgCD34+/CD34+tot = 53/7624 soit 0.7% (N>5) (donc 1 point)

2 biologistes ont calculé un score à 3. Pour l'un d'entre eux, il s'agit simplement d'une erreur d'interprétation avec prise en compte d'un paramètre non analysé dans le score sur 4 points (expression du CD56 sur les monocytes). L'autre biologiste a donné le point de la dégranulation cellulaire avec un ratio juste à la limite de la normale (calculé à 6 pour une valeur N >6). Dans ce cas, la prise en compte de ce paramètre n'impacte pas l'interprétation globale du score puisqu'il permet également d'orienter vers le diagnostic de SMD.

**C. Calcul du score d'Ogata 6 points**

Le score d'Ogata étendu sur 6 point inclus 2 paramètres supplémentaires :

- Le % de blastes CD34+ exprimant le CD7 (N<30%)
- Le % de blastes CD34+ et/ou de monocytes exprimant le CD56 (N<30%)

2 biologistes ont calculé un score d'Ogata étendu à 1 ne permettant pas d'affirmer le diagnostic de SMD.

2 biologistes ont calculé un score à 2 compatible avec le diagnostic de SMD.

12 biologistes ont calculé un score à 3 compatible avec le diagnostic de SMD.

1 biologistes a calculé un score à 3 compatible avec le diagnostic de SMD.

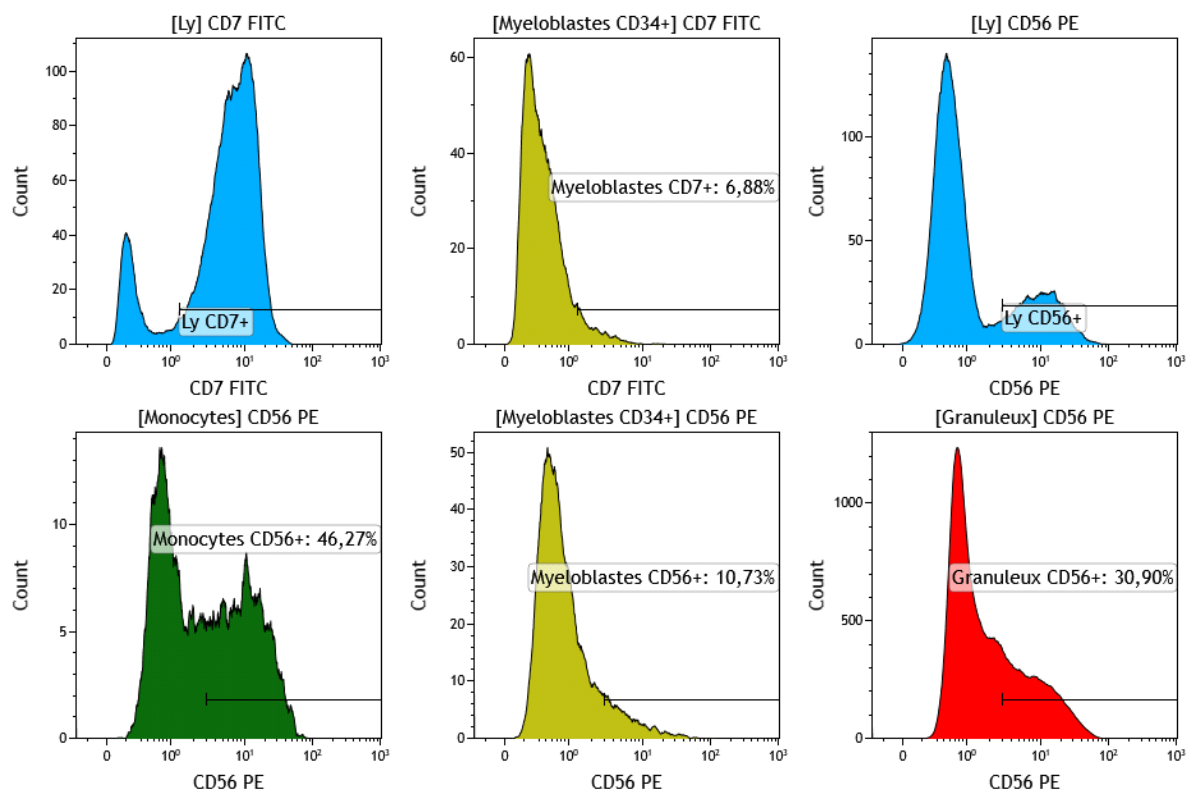
**Chez ce patient, la valeur attendue du score d'Ogata sur 6 points était de 3 :**

- Diminution du taux d'hématogones CD34+
- Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+
- Expression aberrante du CD56 sur les monocytes

10

**15 biologistes sur 17 (88%) ont donc correctement orienté vers un diagnostic de SMD.**

Chez ce patient, les blasts CD34+ étaient CD7- et CD56- tandis qu'une expression partielle de CD56 était observée sur environ 46% des monocytes. Dans le protocole d'analyse les fenêtres Myéloblastes CD7+ et Ly CD7+ sont liées afin de faciliter le gating en fonction de la population lymphocytaire CD7+. De même, les fenêtres Myéloblastes CD56+, Monocytes CD56+ et Ly CD56+ sont liées afin de faciliter le gating en fonction de la population lymphocytaire CD56+.



Tous les biologistes ont correctement rendu une expression de CD7 et de CD56 sur la population de MyB CD34+ <30%. En ce qui concerne l'expression du CD56 sur la population monocytaire, un biologiste a rendu une expression < à 30%. Les 16 autres biologistes ont détecté une expression du CD56 sur la population monocytaire avec des % assez variables (36 à 64%) mais avec un CV à 11%. Cette variation importante est liée au fait que l'expression chez ce patient est partielle (c'est ce qui est fréquemment observé dans les cas de SMD avec expression de CD56 sur la population monocytaire). Afin d'obtenir une meilleure reproductibilité entre les opérateurs, il est recommandé de placer la fenêtre Monocytes CD56+ en fonction de l'expression du CD56 sur la population lymphocytaire CD56+.

Il faut noter chez ce patient, qu'une expression aberrante de CD56 est également observée sur la population granuleuse. Ce paramètre n'est pas inclus dans le calcul du score d'Ogata mais constitue une anomalie qui est fréquemment observée dans les SMD.

#### **D. Evaluation des interprétations**

Parmi les 2 biologistes ayant rendu un score d'Ogata normal, seul un biologiste précise que ce score négatif n'exclut pas le diagnostic de SMD. Il est recommandé en cas de score d'Ogata normal de bien préciser que cela n'exclut pas le diagnostic de SMD compte tenu de la faible sensibilité du test. Le groupe Cythem SMD propose d'utiliser le commentaire suivant :

***Score d'ogata normal (<2). Cependant compte tenu de la faible sensibilité du test notamment pour les SMD de faible risque (environ 54%), ce résultat ne permet pas d'exclure un SMD.***

Parmi les 15 biologistes ayant rendu un score d'Ogata anormal, 3 d'entre eux ne précisent pas les anomalies observées. Le groupe Cythem SMD propose d'utiliser le commentaire suivant :

***Score ≥ 2 : Score d'Ogata anormal***

Et de choisir dans la liste le/les commentaire(s) adapté(s) :

***Diminution du contingent d'hématogones CD34+***

***Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+***

***Augmentation de l'expression du CD45 sur les progéniteurs myéloïdes CD34+***

***Diminution de l'expression du CD45 sur les progéniteurs myéloïdes CD34+***

***Dégranulation cellulaire***

**Phénotypage compatible avec un SMD.**

12

Pour ce patient le commentaire proposé est le suivant :

**Score  $\geq 2$  : Score d'Ogata anormal :**

- ***Diminution du contingent d'hématogones CD34+***
- ***Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+***
- ***Expression aberrante du CD56 sur la population monocyttaire***

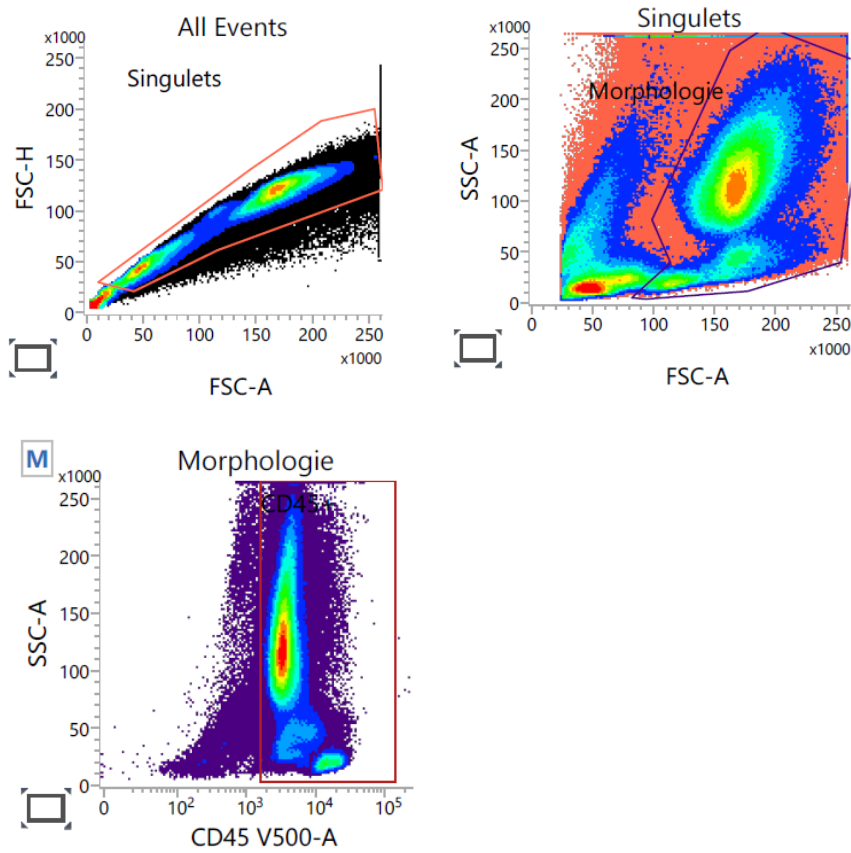
**Phénotypage compatible avec un SMD**

## **2- Calcul du score d'Ogata sur le fichier du FACSLyric**

### **A. Analyse du fenêtrage des principales populations cellulaires nécessaires au calcul du score d'Ogata sur 4 ou 6 points**

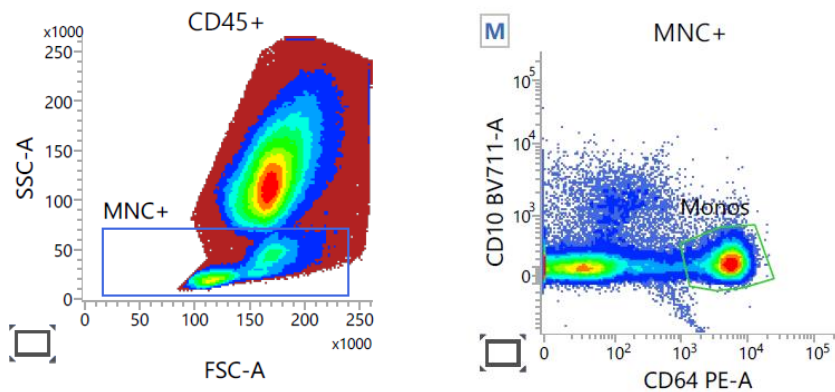
L'analyse du nombre d'évènements constituant les principales populations cellulaires nécessaires au calcul du score d'Ogata sur 4 ou 6 points montre que la population CD45+ a été correctement identifiée sur le dotplot CD45/SSC (CV 4.5%). Aucun biologiste n'a identifié un nombre d'évènements CD45+ < 430 000. L'identification correcte de la population CD45+ est primordiale puisqu'en plus de permettre l'identification des différentes populations leucocytaires, le nombre d'évènement CD45+ sert de dénominateur pour le calcul du % de myéloblastes CD34+ (MyB CD34+). Il est recommandé de placer la fenêtre CD45+ de telle sorte à éliminer au maximum la population d'érythroblastes SSClow CD45+faible/-. Attention à

vérifier que l'élimination de cette population n'entraîne pas la perte de myéloblastes CD34+ avec une très faible expression du CD45.

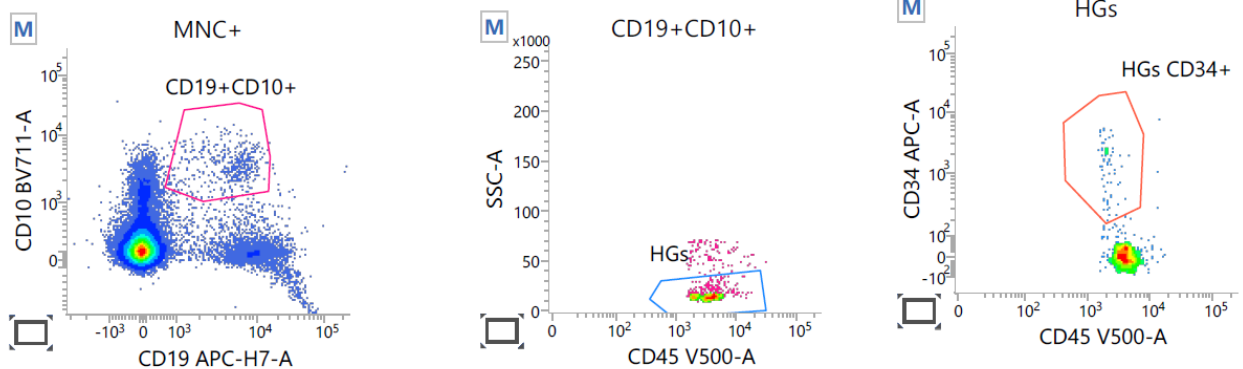


Le nombre d'évènements identifiés dans la fenêtre monocyttaire est un peu plus hétérogène selon les biologistes (de 13 131 à 43 013 ; CV=10%).

Dans le fichier analysé, l'expression forte du CD64 permet d'identifier facilement la population monocyttaire.

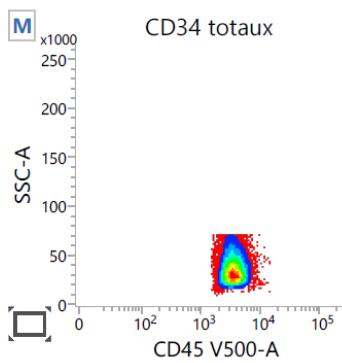
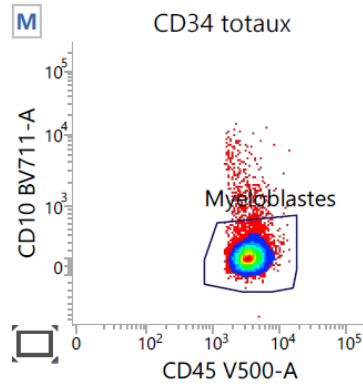
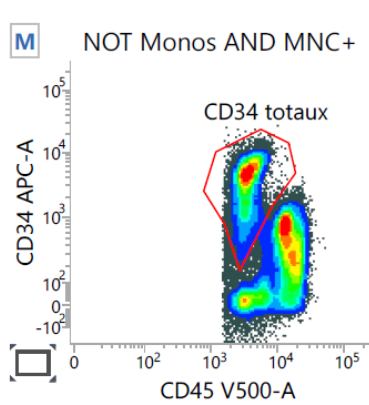


Le nombre d'évènements identifiés dans la fenêtre Hg CD34+ est relativement homogène (CV 35.6%). Seul un biologiste a fortement surestimé cette population avec une population > 500 évènements, conduisant à un pourcentage évalué à 5.1%. 13 biologistes ont correctement attribué le point associé à ce paramètre.



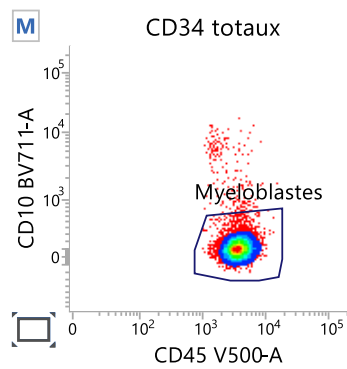
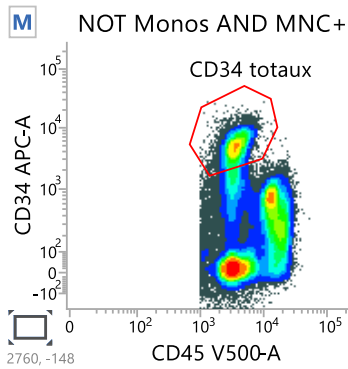
Le nombre d'évènements identifiés dans la fenêtre Myéloblastes CD34+ présente un CV de 19.4% (8 149-12 421). Les variations sont probablement liées au fenêtrage plus ou moins resserré sur la population CD34+fort. Chez ce patient, il est important d'inclure les cellules CD34+faible puisque celles-ci clustérisent parfaitement avec le reste de la population sur le dotplot CD45/SSC. Ceci a engendré une sous-estimation du pourcentage de MyB CD34+, rendu inférieur à 2% pour 4 biologistes (28.5%). Comme le montre le résultat du myélogramme (cf Conclusion du cas) il existait un excès de blastes à 6% chez ce patient.

Fenêtrage attendu de la population CD34+ : 15 812 CD34+

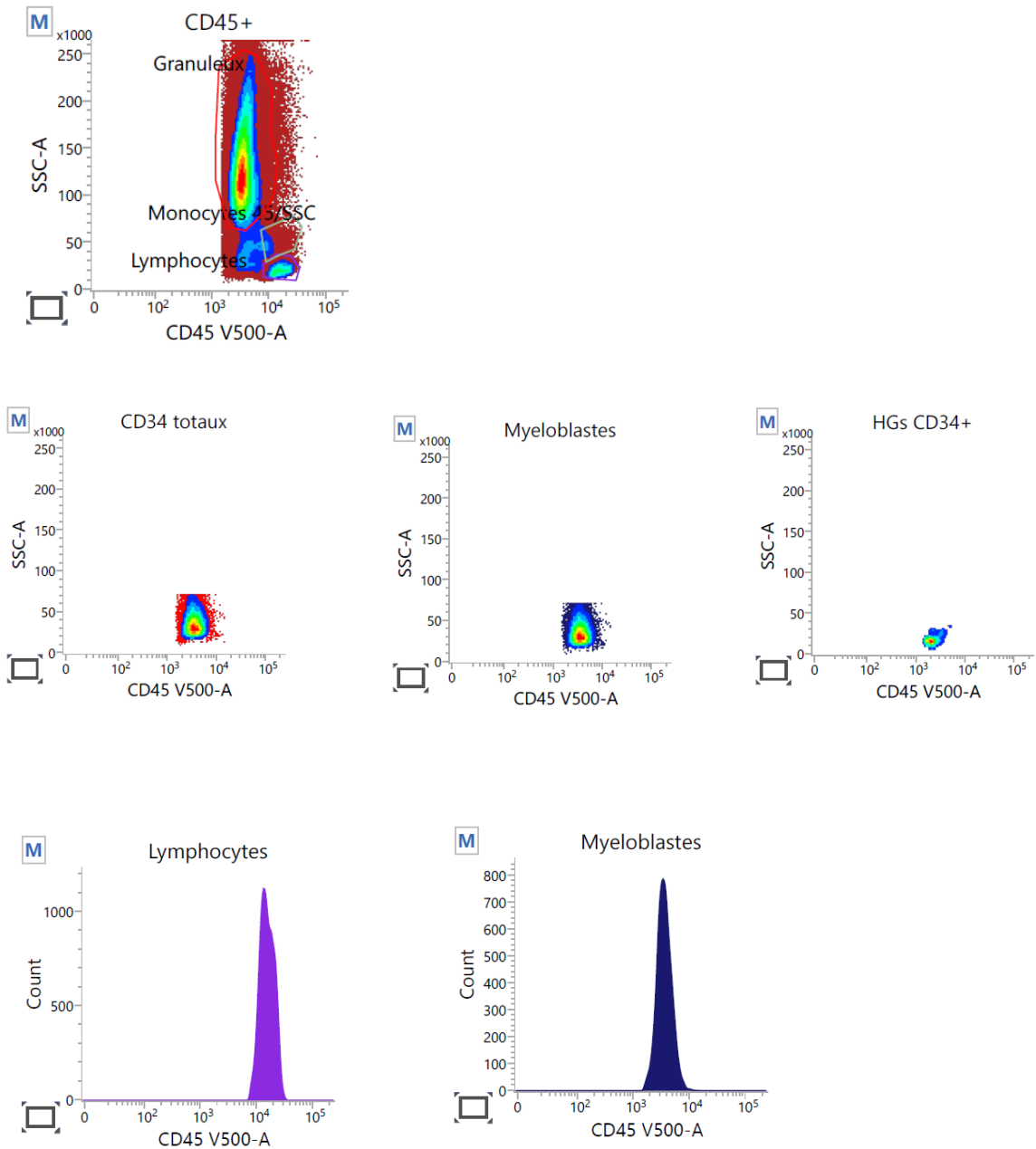


15

Dans l'exemple ci-dessous, le nombre de CD34+ est sous estimé (9 867)

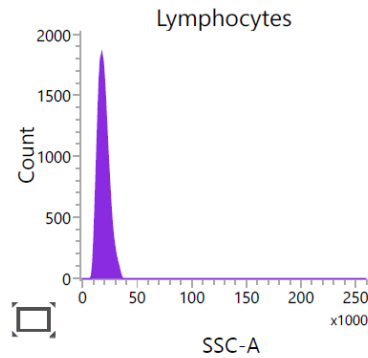
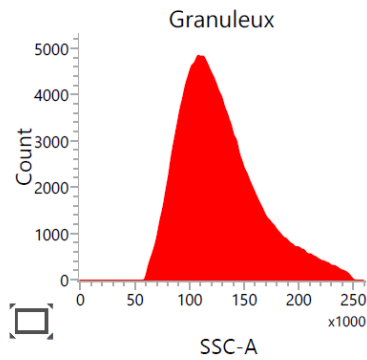


Les populations granuleuse et lymphocytaire sont globalement correctement identifiées par l'ensemble des centres avec des CV de 3.4 % et de 8.2 % respectivement



Le ratio de MFI du CD45 a été correctement évalué par l'ensemble des biologistes, sauf un biologiste qui a trouvé une valeur anormale à 3.9. Il était situé dans l'intervalle de référence (4-7.5).





Le ratio du mode de la SSC qui était  $\geq 6$  a été correctement évalué par 13 biologistes, un seul biologiste a retrouvé un ratio anormal  $<6$ .

### **B. Calcul du score d'Ogata 4 points**

2 biologistes ont calculé un score à 1 ne permettant pas d'affirmer le diagnostic de SMD, alors que les pourcentages analysés d'Hg CD34+ et de myéloblastes CD34+ étaient anormaux, il s'agit donc d'une erreur d'interprétation du seuil, seuil qui est à 2% pour les MyB CD34+.

10 biologistes ont calculé un score à 2 compatible avec le diagnostic de SMD, parmi lesquels 2 biologistes qui avaient évalué un pourcentage de MyB CD34+ inférieur à 2 mais qui ont compté un point pour un ratio SSC à 6. La valeur du ratio du mode de la SSC était le plus souvent retrouvée à égale à 6, ce qui est le seuil bas de la valeur normale. Le point du score est compté pour les valeurs strictement inférieures à 6.

2 biologistes ont calculé un score à 3 compatible avec le diagnostic de SMD. Un biologiste a donné le point de la dégranulation cellulaire avec un ratio juste à la limite de la normale (calculé à 6 pour une valeur  $N \geq 6$ ). La prise en compte de ce paramètre n'impacte pas l'interprétation globale du score puisqu'il permet également d'orienter vers le diagnostic de SMD.

**Chez ce patient, la valeur attendue du score d'Ogata sur 4 points était de 2 :**

- Diminution du taux d'hématogones CD34+
- Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+

**ce qui permettait d'orienter vers le diagnostic de SMD.**

**12 biologistes sur 14 (86%) ont donc correctement orienté vers un diagnostic de SMD.**

### **C. Calcul du score d'Ogata 6 points**

Le score d'Ogata sur 6 point inclut 2 paramètres supplémentaires :

- Le % de blastes CD34+ exprimant le CD7 (N<30%)
- Le % de blastes et/ou de monocytes exprimant le CD56 (N<30%)

18

Tous les biologistes ont bien évalué les myéloblastes comme étant CD7- et CD56-. Tous les biologistes ont bien évalué les monocytes comme exprimant de façon anormale le CD56 avec cependant une variabilité importante (32-72%), le CV restant très correct à 20.8%. Cette variation importante est liée au fait que l'expression chez ce patient est partielle (c'est ce qui est fréquemment observé dans les cas de SMD avec expression de CD56 sur la population monocyttaire). Afin d'obtenir une meilleure reproductibilité entre les opérateurs, il est recommandé de placer la fenêtre Monocyte CD56+ en fonction de l'expression du CD56 sur la population lymphocytaire CD56+.

Il faut noter chez ce patient, qu'une expression aberrante de CD56 est également observée sur la population granuleuse. Ce paramètre n'est pas inclus dans le calcul du score d'Ogata mais constitue une anomalie qui est fréquemment observée dans les SMD.

3 biologistes ont calculé un score à 2 compatible avec le diagnostic de SMD. D'après les valeurs analysées, pour 2 biologistes, ce score aurait dû être égal à 3.

8 biologistes ont calculé un score à 3 compatible avec le diagnostic de SMD.

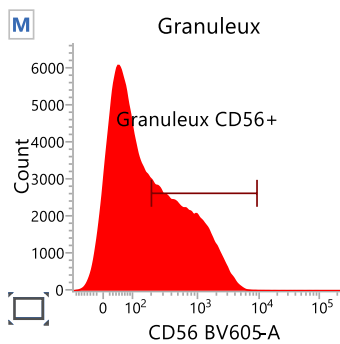
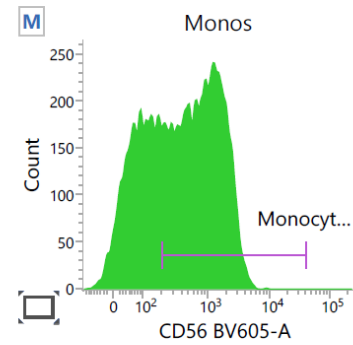
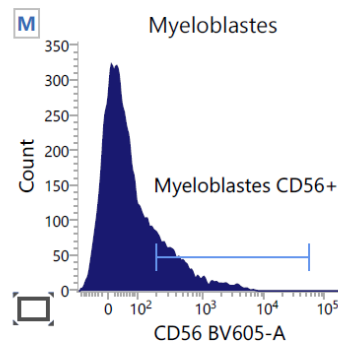
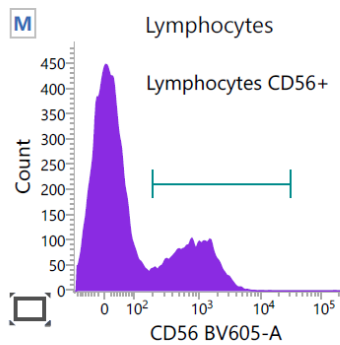
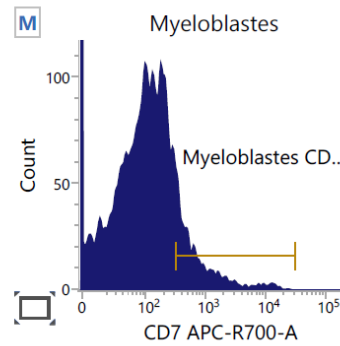
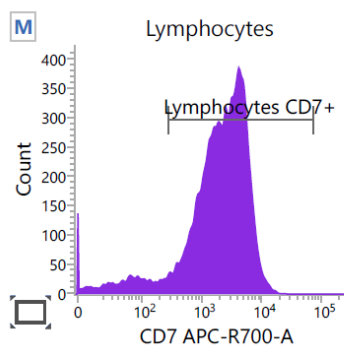
3 biologistes ont calculé un score à 4 compatible avec le diagnostic de SMD, dont un biologiste qui avait un score d'Ogata à 2 sur 4 points.

**Chez ce patient, la valeur attendue du score d'Ogata sur 6 points était de 3 :**

- **Diminution du taux d'hématogones CD34+**
- **Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+**

- **Expression aberrante du CD56 sur les monocytes**

**14 biologistes sur 14 (100 %) ont donc correctement orienté vers un diagnostic de SMD.**



**D. Evaluation des interprétations**

Un biologiste a rendu un score à 2 mais l'a interprété comme étant normal. Tous les autres biologistes ont rendu un score anormal. Un seul biologiste a rendu les deux scores et précisé que le score (sur 4 points) à 1 n'excluait pas le diagnostic de SMD, du fait de sa faible sensibilité. Il est recommandé en cas de score d'Ogata normal (<2) de bien préciser que cela

n'exclut pas le diagnostic de SMD compte tenu de la faible sensibilité du test. Le groupe CytHem-SMD propose d'utiliser les commentaires suivants :

***Score d'Ogata à 4 points normal (<2). Cependant compte tenu de la faible sensibilité du test notamment pour les SMD de faible risque (environ 54%), ce résultat ne permet pas d'exclure un SMD.***

Parmi les 13 biologistes ayant rendu un score d'Ogata anormal, un seul biologiste ne précise pas les anomalies observées. Le groupe CytHem-SMD propose d'utiliser le commentaire suivant :

20

***Score  $\geq 2$  : Score d'Ogata anormal***

Et de choisir dans la liste le/les commentaire(s) adapté(s) :

***Diminution du contingent d'hématogones CD34+***

***Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+***

***Augmentation de l'expression du CD45 sur les progéniteurs myéloïdes CD34+***

***Diminution de l'expression du CD45 sur les progéniteurs myéloïdes CD34+***

***Dégranulation cellulaire***

***Phénotypage compatible avec un SMD.***

Pour ce patient le commentaire proposé est le suivant :

**Score  $\geq 2$  : Score d'Ogata anormal :**

- **Diminution du contingent d'hématogones CD34+**
- **Augmentation du contingent de progéniteurs myéloïdes CD34+**
- **Expression aberrante du CD56 sur la population monocyttaire**

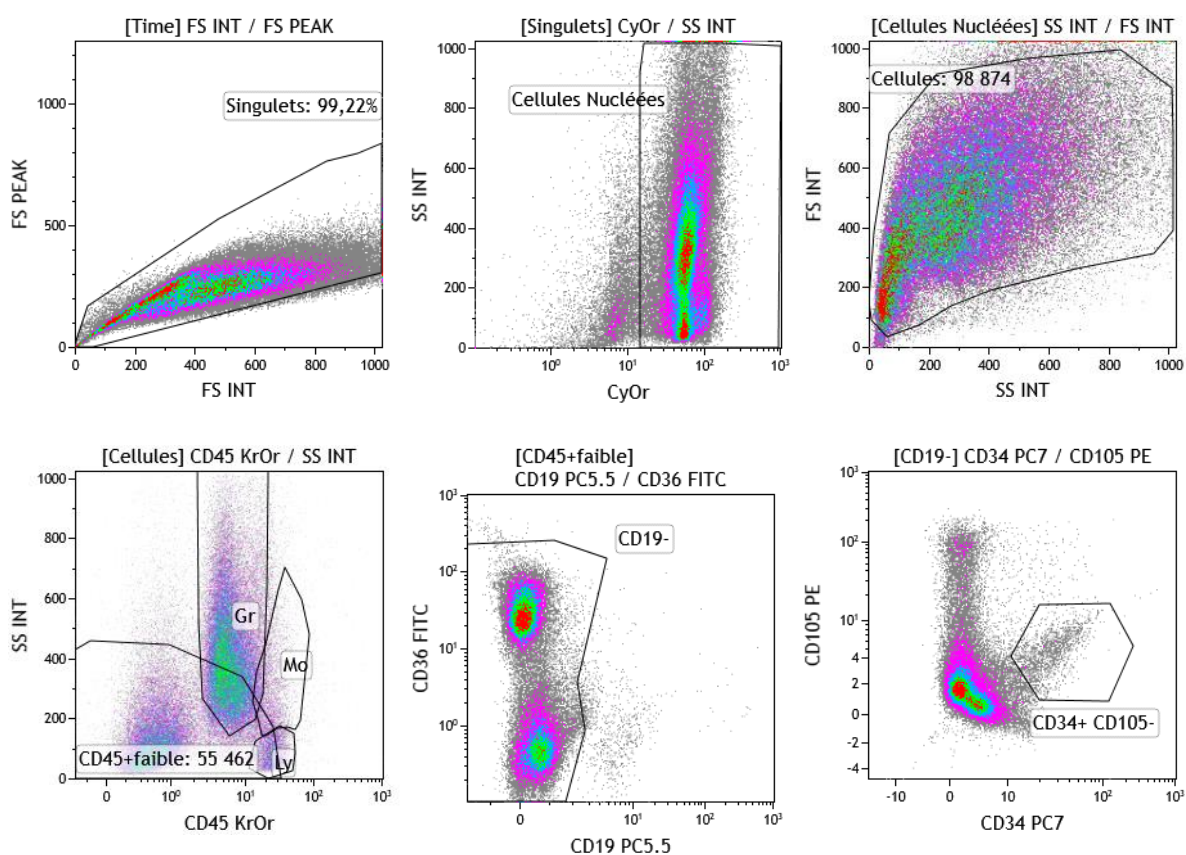
**Phénotypage compatible avec un SMD.**

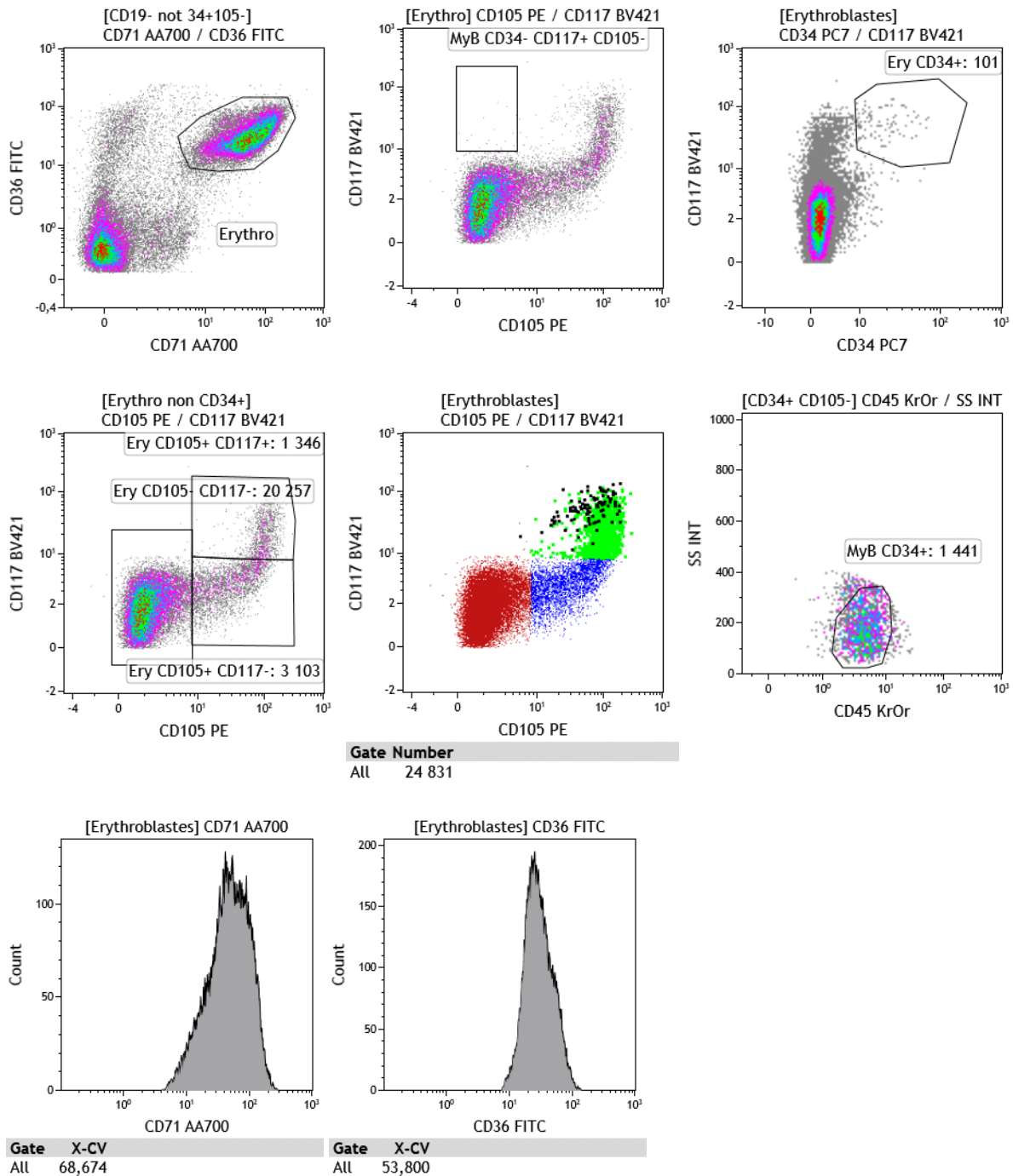
# RED-SCORE

Données	FACSlyric			Navios		
	Moyenne robuste	Ecart-type robuste	CV (%) robuste	Moyenne robuste	Ecart-type robuste	CV (%) robuste
Erythroblastes	21 657	2 787	12,9	17961	9249	51,5
Ery CD34+	30,5	34,1	111,8	71,3	65,2	91,5
Ery CD105+ CD117+	345,5	228,1	66	1108	673,1	60,7
Ery CD105+ CD117-	1 773,9	722,3	40,7	2554,9	1279,3	50,1
Ery CD105- CD117-	19 274,3	2 372,6	12,3	14155,1	7479,9	52,8
MyB CD34+	402,8	354,2	87,9	1060,6	737,3	69,5

## 1- Analyse des érythroblastes sur le fichier du Navios

### A. Calcul du RED-score





L'analyse du fichier a été faite par 16 biologistes.

L'analyse du nombre d'évènements dans la fenêtre Erythroblastes est très variable (5089 – 26497), le CV étant à 40.2%. 3 biologistes ont identifié un nombre d'évènements < 10 000.

Le groupe recommande de calculer le RED-score à partir d'une population d'érythroblastes d'au moins 5000 évènements. Pour l'analyse de la répartition des sous-populations d'érythroblastes, il est recommandé d'analyser une population d'érythroblastes d'au moins

20 000 événements. Les CV du CD71 et du CD36 ont été correctement évalué par tous les biologistes comme étant strictement inférieur aux valeurs normales déterminées sur une cohorte d'échantillons contrôles (93 et 74 respectivement). Le gating présenté de la population érythroblastique retrouvait un CV du CD71 à 69 et un CV du CD36 à 54

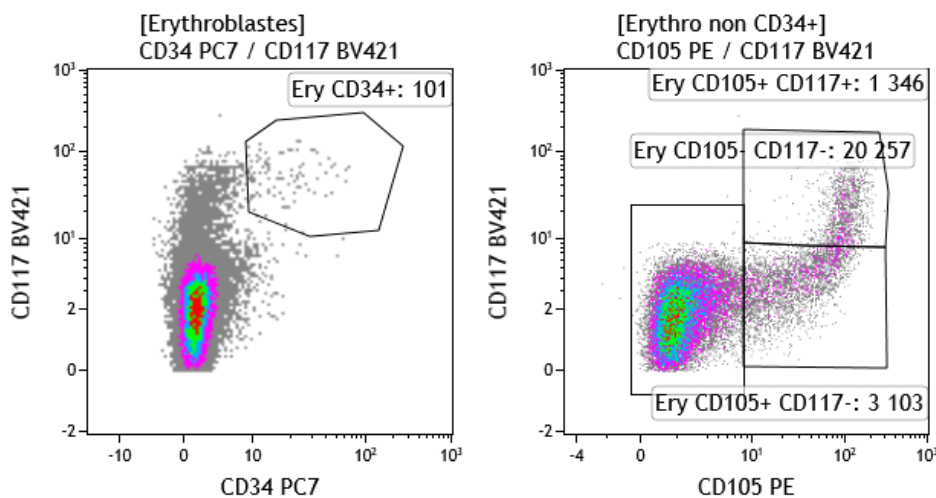
Le patient présentait un taux d'hémoglobine à 10.9 g/dL (<11.5 g/dL), deux points devaient donc être attribués pour ce critère.

Le RED-score a été calculé à 0 par un biologiste en raison d'une mauvaise interprétation du taux d'hémoglobine.

Les 15 autres biologistes ont calculé un RED-score à 2.

**Chez ce patient, la valeur attendue du RED-score était de 2, ce qui ne permettait pas d'orienter vers le diagnostic de SMD.**

### B. Evaluation de la fraction CD117+



La fraction de progéniteurs immatures CD117+ a été correctement évaluée comme étant supérieure ou égale à 3% par tous les biologistes ayant analysés le fichier (4.3 à 8.5%). Dans l'analyse ci-dessus la fraction est évaluée à 5.8%. La quantification de cette population repose sur le gating de la population Ery CD34+ (qui est toujours CD117+) et de la population Ery

CD105+ CD117+ sur le dotplot CD105/CD117 (cf présentation de la stratégie de gating disponible sur le site du CYTHEM) sur la population d'érythroblastes.

### C. Evaluation des interprétations

Le RED-score a été interprété comme normal par 100% des biologistes ayant analysé le fichier. 7 biologistes sur 16 (44%) ont bien précisé dans leur CR la sensibilité du test. 11 biologistes sur 16 (69%) ont précisé les valeurs pathologiques.

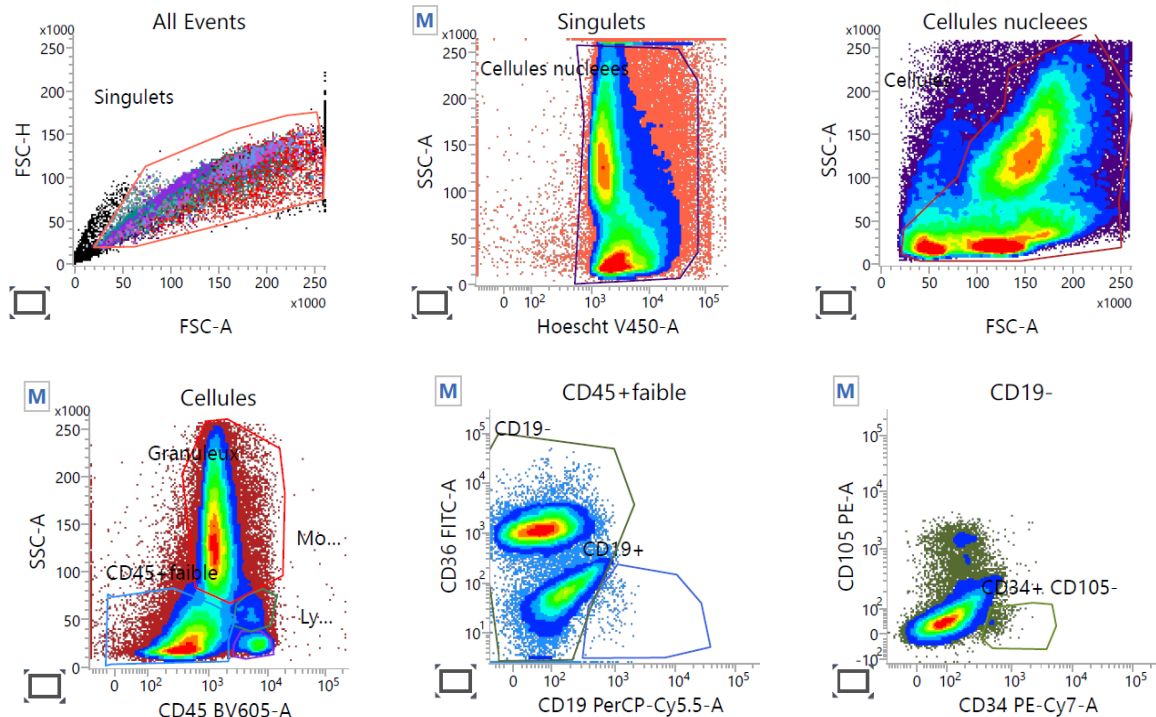
Pour ce patient, le commentaire proposé est le suivant :

**Valeur normale du RED-score (<3).**

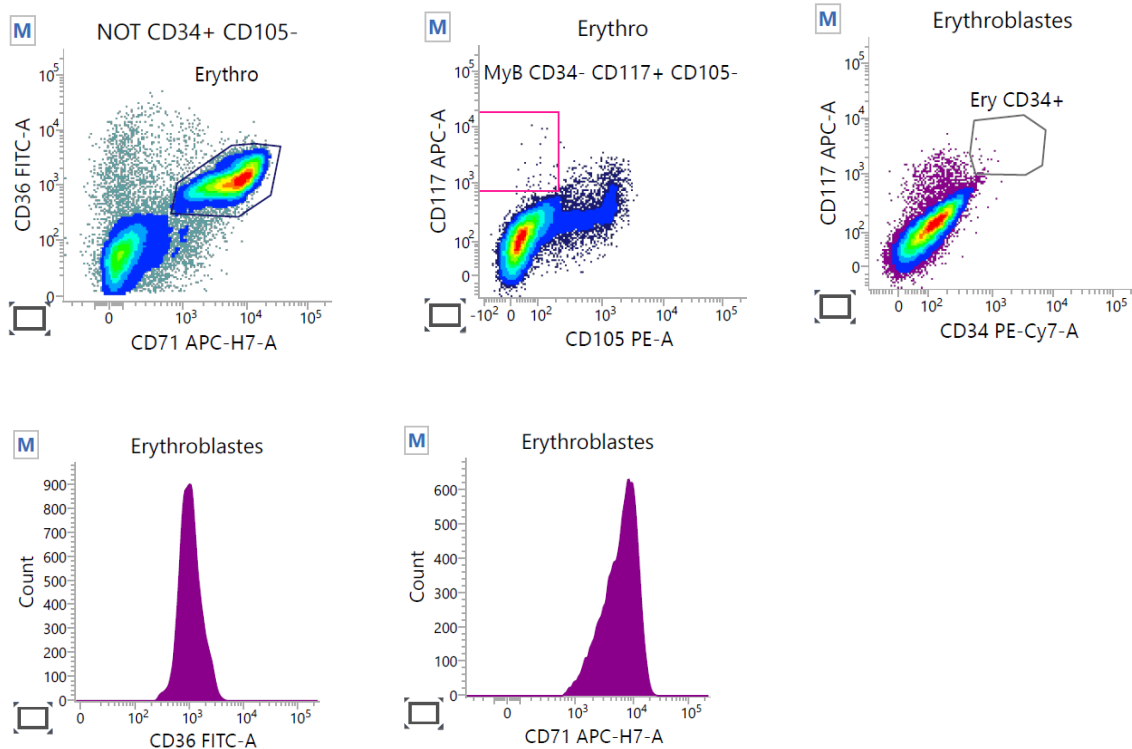
**Pas d'argument phénotypique pour une dysérythropoïèse (sensibilité sur une cohorte de SMD de bas grade : 77%, Mathis S et al, Leukemia, 2013).**

## 2- Analyse des érythroblastes sur le fichier issu du FACSLyric

### A. Calcul du RED-score







L'analyse du fichier a été faite par 13 biologistes.

L'analyse du nombre d'évènements dans la fenêtre Erythroblastes (18 034-28 210) montre que la population a été correctement identifiée après les gating successifs, le CV étant à 12.9%. Aucun biologiste n'a identifié un nombre d'évènements < 10 000. Le groupe recommande de calculer le RED-score à partir d'une population d'érythroblastes d'au moins 5000 évènements. Pour l'analyse de la répartition des sous-populations d'érythroblastes, il est recommandé d'analyser une population d'érythroblastes d'au moins 20 000 évènements.

Le CV du CD71 a été correctement évalué par tous les biologistes comme étant strictement inférieur à la valeur normale déterminée sur une cohorte d'échantillons contrôles (60). Le CV du CD36 a été évalué comme inférieur à la valeur normale (50) par seulement 4 biologistes sur 13. L'interprétation du CV du CD71 est très homogène puisqu'aucun biologiste n'a compté les 3 points de ce paramètre. L'interprétation du CV du CD36 est plus hétérogène, puisque 10 biologistes sur 13 ont attribué les 2 points de ce paramètre. Le gating présenté de la population érythroblastique retrouvait un CV du CD71 à 58 et un CV du CD36 à 49, une valeur limite pouvant expliquer la variation d'interprétation.

Le patient présentait un taux d'hémoglobine à 10.9 g/dL (<11.5 g/dL), deux points devaient donc être attribués pour ce critère.

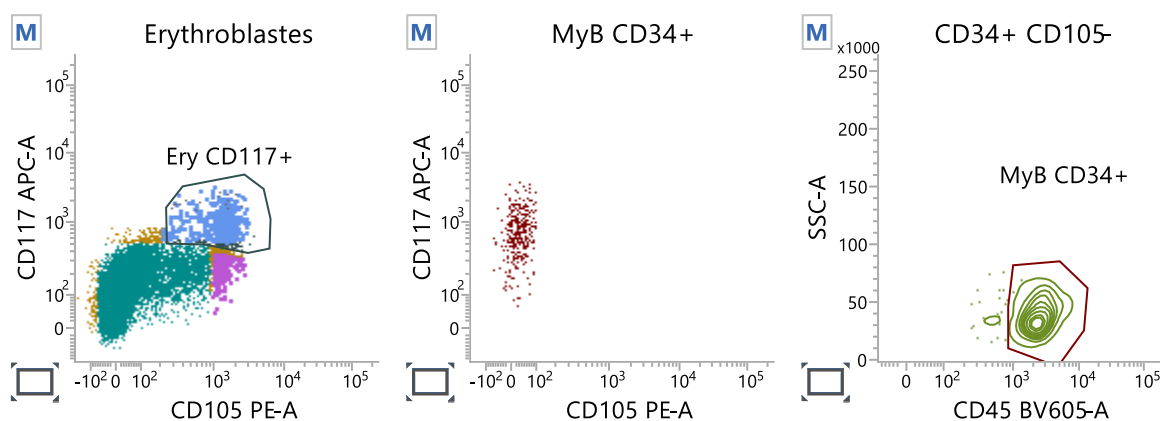
Le RED-score a été calculé à 0 par un biologiste.

Le RED-score a été calculé à 2 par 4 biologistes.

Le RED-score a été calculé à 4 par 8 biologistes.

**Chez ce patient, la valeur attendue du RED-score était de 2, ce qui ne permettait pas d'orienter vers le diagnostic de SMD.**

### **B. Evaluation de la fraction CD117+**



La fraction de progéniteurs immatures CD117+ a été correctement évaluée comme étant supérieure ou égale à 3% par 3 biologiste sur 13 (0-5.2). Dans l'analyse ci-dessus la fraction est évaluée à 3.7%. Le gating le plus aisé est sur un dot plot CD105/CD117 (comme présenté dans la stratégie disponible sur le site du CYTHEM) sur la population Erythroblastes. Ce dot plot n'était pas présent sur l'assay fourni ce qui a pu être source d'erreur pour les participants, avec le masque d'analyse fourni, il fallait additionner les Ery CD34+ (qui sont CD117+) et les Ery CD105+ CD117+. Ce paramètre n'est donc pas évaluable sur cet EEQ virtuel. Pour le seuillage de la population CD117+, les MyCD34+ peuvent être utilisés comme illustré ci-dessus.

### **C. Evaluation des interprétations**

Le RED-score a été interprété comme normal par 6 biologistes sur 13 (46%) en raison de la difficulté d'interprétation de CV du CD36 proches de la valeur seuil. 5/6 biologistes ayant rendu un RED-score normal ont bien précisé la sensibilité du seuil. Tous les biologistes ayant rendu un RED-score anormal ont précisé les valeurs pathologiques.

Pour ce patient, le commentaire proposé est le suivant :

**Valeur normale du RED-score (<3).**

**Pas d'argument phénotypique pour une dysérythropoïèse (sensibilité sur une cohorte de SMD de bas grade : 77%, Mathis S et al, Leukemia, 2013).**

## CONCLUSION DU CAS

**Myélogramme** : Moelle riche. Les trois lignées myéloïdes sont bien représentées. Nombreux mégacaryocytes, le plus souvent dystrophiques (mégacaryocytes à noyaux séparés, mono- ou hypolobés et micromégacaryocytes). Présence de signes de dysplasie très discrets sur les lignées granuleuse et érythroblastique (rars granuleux binucléés, rars érythroblastes à cytoplasme feuilleté et rars caryorrhexies). Présence d'un excès de blastes estimé à 6% (décompte sur 900 cellules). Eosinophile modérée constituée d'éléments à tous les stades de la maturation. Absence d'excès de plasmocytes mais présence de rars plasmocytes nucléolés.

En conclusion, aspect cytologique de syndrome myélodysplasique avec excès de blastes de type 1 (MDS-IB1). A confronter à l'ensemble du bilan.

**Caryotype** : 46,XY,del(11)(q13q24)[19]/46,XY[1]

**NGS** : Présence d'un variant non-sens dans l'exon 18 de CUX1 (c.2857G>T) dont la VAF est à 10%.

## CONCLUSION GENERALE

Le groupe CytHem SMD remercie l'ensemble des biologistes pour leur participation à cette première comparaison inter laboratoire.

Le questionnaire rempli par les participants permet d'avoir une vision globale sur les pratiques actuelles en ce qui concerne l'utilisation de la CMF dans le contexte des SMD. Il est important de noter que la majorité des biologistes (22, 59%) ayant participé à cette comparaison inter laboratoire n'utilisent pas encore la CMF en routine en cas de suspicion de SMD. Cette participation malgré l'absence d'expérience pour ce type d'analyse montre bien l'intérêt porté par de nombreux centres pour la mise en place de ces applications.

Quinze biologistes (41%) avaient déjà l'habitude d'analyser des fichiers de CMF en routine en cas de suspicion de SMD. Quatorze d'entre eux analysent le score d'Ogata ; 4 biologistes le calculent sur 4 paramètres et 10 biologistes le calculent sur 6 paramètres. Seuls 4 biologistes (11%) avaient pour habitude de calculer le RED-score et cette approche était toujours utilisée en association avec le Score d'Ogata. Il est important de noter que l'utilisation combinée du Score d'Ogata et du RED-score permet d'augmenter la sensibilité pour la détection des cas de SMD (Mathis S et al, Leukemia, 2013). En effet, à l'image du cas présenté pour cette comparaison inter laboratoire, seul l'un des deux scores peut être anormal et permettre d'orienter vers le diagnostic de SMD. Un biologiste utilise en routine une approche basée sur l'analyse de la MPO des PNN du sang circulant. Deux biologistes analysent en plus du score d'Ogata, la répartition des cellules CD34+ et recherchent la présence de cellules souches leucémiques. Cette stratégie d'analyse est particulièrement intéressante non seulement pour aider au diagnostic des SMD mais aussi pour en évaluer le pronostic (Van Spronsen MF et al, Leukemia, 2023). Des propositions de panels seront faites prochainement par le groupe pour développer cette thématique.