

Immunophénotypage du myélome multiple : validation de la méthode

Multiple myeloma immunophenotyping: method validation

Inès Vergnolle

Jean-Baptiste Rieu

Hervé Avet-Loiseau

Jill Corre^a

François Vergez^a

IUC-T laboratoire d'hématologie,
CHU de Toulouse, Toulouse, France
<inesvergnolle@hotmail.fr>

^aco-derniers auteurs

Résumé. La cytométrie en flux est considérée comme un outil incontournable pour le monitoring du myélome multiple (MM) (diagnostic différentiel, détermination du risque de progression des patients atteints de gammopathie monoclonale de signification indéterminée, quantification de la maladie résiduelle). L'immunophénotypage des plasmocytes est réalisé en routine dans le secteur de cytométrie en flux du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse. Afin de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 et de garantir la fiabilité de cette technique dans le monitoring du MM, un travail de validation de la méthode a été réalisé. Comme attendu, la méthode a montré de bonnes performances techniques. Cependant, cette démarche nous a permis de mettre en évidence l'importance de la qualité de l'échantillon ainsi que de la maîtrise des conditions de travail préanalytiques et analytiques. Nous avons ainsi pu optimiser nos pratiques professionnelles dans un objectif d'amélioration continue.

Mots clés : *cytométrie en flux, myélome multiple, validation de méthode*

Abstract. Flow cytometric immunophenotyping has become essential for management of multiple myeloma (assessment of clonality, prognostic information on the risk of progression in gammopathy of undetermined significance, minimal residual disease monitoring). Immunophenotyping of bone marrow plasma cells is routinely used in the haematology laboratory of the University Hospital of Toulouse. To guarantee the reliability of this technique, the laboratory decided to check this method in compliance with the NF ISO EN 15189, standard for medical laboratories requirements. As expected, the method showed good technical performances. However, this initiative has demonstrated the importance of the sample quality and of the control of the preanalytical and analytical conditions. This process led us to maximize our professional practices.

Key words: *flow cytometry, multiple myeloma, method validation*

Article reçu le 27 juillet 2018,
accepté le 08 février 2019

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par une infiltration plasmocytaire de la moelle osseuse (MO) qui résulte de l'accumulation de plasmocytes clonaux pouvant sécréter une immunoglobuline complète ou incomplète. Grâce à l'arrivée de nouveaux médicaments et l'amélioration des stratégies thérapeutiques, la survie médiane des patients s'est considérablement améliorée

durant ces deux dernières décennies [1, 2]. Parallèlement aux options thérapeutiques, les outils diagnostiques ont également évolué pour faciliter un diagnostic rapide, pour déterminer le pronostic du patient et pour permettre le suivi de la maladie notamment grâce à l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD). La MRD permet d'évaluer la qualité de la réponse thérapeutique en particulier chez les patients en réponse complète [3, 4].

Parmi les différents outils biologiques disponibles, la cytométrie en flux (CMF) tient une place importante dans le monitoring du MM [5]. Cette technique permet

Tirés à part : I. Vergnolle

de caractériser phénotypiquement les plasmocytes. Après l'identification de la population plasmocytaire, l'étude de l'expression de marqueurs dits aberrants ou, au contraire, de la perte d'expression de marqueurs physiologiques permet de distinguer les plasmocytes clonaux des plasmocytes normaux. Les applications sont nombreuses : diagnostic différentiel (plasmocytose réactionnelle, aplasie médullaire, lymphome lymphoplasmocytaire), détermination du risque de progression des patients atteints de gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) et quantification de la MRD [5].

L'immunophénotypage des plasmocytes est une analyse réalisée en routine dans le secteur de CMF du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse. La vérification des performances de cette méthode est apparue importante afin, d'une part, de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 et, d'autre part, pour garantir la fiabilité de cette technique dans le monitoring du MM. En effet, l'évaluation de la maladie résiduelle devient incontournable dans la prise en charge du MM et pourrait être utilisée prochainement comme un critère de décision thérapeutique. À ce titre, il est indispensable de pouvoir garantir des résultats fiables y compris à des seuils de quantification très faibles, idéalement de l'ordre de 10^{-5} , soit 1 cellule tumorale sur 100 000 cellules (en cytométrie en flux) [6].

Cette validation de méthode, initiée dans le cadre d'une thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, s'inscrit dans la démarche d'accréditation des laboratoires de biologie médicale. La validation d'une méthode est un processus qui a pour but d'évaluer la méthode employée dans les conditions opératoires du laboratoire, de manière objective, et d'apporter les preuves de la validité des résultats rendus, justifiant ainsi leur utilisation pour les patients. Du fait de l'absence d'échantillons standardisés de type contrôle interne qualité ou évaluation externe de la qualité pour l'ensemble des analyses, de la diversité des panels d'anticorps utilisés, de la complexité de l'analyse et du rendu de résultat ou encore de l'absence de référentiel, la validation d'une méthode de cytométrie en flux selon la norme NF EN ISO 15189 peut s'avérer difficile. Sur le dernier point évoqué, il est à noter qu'il existe un groupe de travail, le groupe ACCREDITATION de l'Association française de cytométrie en flux, dont l'objectif actuel est de récolter des données issues des laboratoires de cytométrie en flux français afin de déterminer des valeurs de référence utilisables pour la mise au point des dossiers d'accréditation en CMF.

Dans le cadre de l'immunophénotypage du MM, la méthode permet de définir un pourcentage de plasmocytes au sein de l'échantillon de moelle osseuse (MO) et surtout, *via* l'étude de leur profil phénotypique, un pourcentage de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes. Il est à noter que le pourcentage de plasmocytes dans l'échantillon est

rendu uniquement à titre indicatif. En effet, l'utilisation de l'immunophénotypage n'est pas recommandée pour la quantification des plasmocytes médullaires (contrairement à la cytologie qui est la méthode de référence). En effet, le pourcentage de plasmocytes mesuré par immunophénotypage est fréquemment très inférieur à celui déterminé lors de la lecture du myélogramme. Cette discordance de résultat résulte principalement de l'hémodilution de l'échantillon utilisé pour la CMF qui provient de la seconde aspiration lors de la réalisation de la ponction médullaire. La validation de méthode a été réalisée en portée B (méthode mise au point au laboratoire). Les différents critères de la méthode à évaluer ont été déterminés grâce à un référentiel édité par le Cofrac, le SH-GTA-04 (*tableau 1*).

Matériel et méthodes

Matériel

Anticorps fluorescents et cytomètre en flux

Le panel d'anticorps (Ac) utilisé au laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse correspond à un panel faisant actuellement l'objet d'un consensus pour l'immunophénotypage du MM et plus particulièrement pour la quantification de la MRD. Il comprend 8 marqueurs : anti-CD38, anti-CD138, anti-CD45, anti-CD19, anti-CD27, anti-CD81, anti-CD56, anti-CD117 [7]. Les fluorochromes qui ont été sélectionnés par le laboratoire sont ceux proposés par EuroFlow, consortium de groupes de cytométristes issus de plusieurs pays d'Europe ayant pour but de participer entre autres à la standardisation de la CMF (*tableau 2*). Les acquisitions sont réalisées sur un cytomètre en flux (10 couleurs) Navios (Beckman Coulter) et analysées avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

Ce panel peut être associé à la réalisation d'un second panel permettant de déterminer la clonalité des plasmocytes à l'aide de marquages intracellulaires. Au laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse, ce second tube est réservé à des cas limités d'interprétation difficile (< 5 % des cas) et ne sera pas détaillé ici.

Il est à noter également qu'il existe d'autres panels d'anticorps utilisables associés à d'autres stratégies de gating (*tableau 3*).

Nature des échantillons

Une validation de méthode nécessite l'utilisation d'échantillons standardisés et qualifiés appelés les contrôles internes de qualité (CIQ) et les évaluations externes de la qualité (EEQ). Il n'existe pas de CIQ pour l'immunophénotypage des plasmocytes dans la MO. Il n'existe pas non plus d'EEQ pour l'immunophénotypage des plasmocytes médullaires. Pour pallier ces lacunes,

Tableau 1. Critères à évaluer pour la validation de la méthode, selon le SH-FORM GTA-04. Liste des différents critères à vérifier dans le cadre d'une validation en portée B

	Description du processus (selon le SH-GTA-04)	
Détermination du % de plasmocytes présents dans l'échantillon et du % de plasmocytes dits « anormaux » parmi les plasmocytes	<input checked="" type="checkbox"/>	Répétabilité (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Fidélité intermédiaire (Essai)
	<input type="checkbox"/>	Variabilité inter-opérateurs (Cf. fidélité intermédiaire)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Justesse (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Exactitude (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Sensibilité et spécificité analytique (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Incertitudes de mesure (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Étendue de mesure (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Comparaison de méthodes (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Interférences (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Contamination (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Robustesse et fiabilité des réactifs (Essai)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Intervalle de référence (Bibliographie)

Tableau 2. Panel immunophénotypage du myélome multiple. Panel recommandé pour l'immunophénotypage des plasmocytes médullaires et l'évaluation de la MRD dans le myélome multiple (MM).

Anticorps	Fournisseurs	Clones	Références	Qté/test
CD38-FITC	Cytognos	LD38	CYT38F	3 µL
CD38-NM	Cytognos	LD38	CYT389I	2 µL
CD56-PE	Cytognos	C5.9	CYT56PE	5 µL
CD45-PerCP5.5	BD Biosciences	HI30	560777	5 µL
CD19-PC7	IOTest	J4.119	IM3628	5 µL
CD117-APC	BD Biosciences	YB5.B8	333233	5 µL
CD81-APCH7	BD Biosciences	JS-81	656647	5 µL
CD138-V450	BD Biosciences	MI15	562098	5 µL
CD27-BV510	BioLegend	O323	0323302835	5 µL

nous avons travaillé sur plusieurs types d'échantillons afin d'évaluer les différents critères cités précédemment :

- échantillons de MO de patients atteints de MM, myélome indolent (SMM) ou MGUS ;
- échantillons de MO de patients non atteints de MM, SMM ou MGUS ;
- échantillons de sang de patients atteints de leucémie à plasmocytes secondaire ;
- échantillons de sang de patients non atteints de MM, SMM ou MGUS.

D'autre part, un essai de mise au point d'un CIQ à partir de la lignée myéломateuse MM1R a été réalisé.

Méthodes

Le principe de la méthode repose sur la quantification des plasmocytes au sein d'un échantillon (paramètre rendu à titre indicatif) et la quantification des plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes ainsi que la détermination de leur phénotype par CMF.

Marquage membranaire

Un échantillon de 100 µL de MO est incubé avec le mix d'Ac (40 µL) pendant 15 minutes à l'obscurité, à température ambiante. Une lyse des globules rouges, réalisée par l'ajout de 2 millilitres (mL) d'une solution de lyse,

Tableau 3. Liste des panels pertinents pour la caractérisation des plasmocytes (d'après Flores-Montero *et al.* [10]).

Study report	Tube	Combination	Main aim of study	Sensitivity
Sarasquete <i>et al.</i> , <i>Haematologica</i> 2005				
	1	CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP Cy5.5/CD45-APC	Comparison with molecular techniques	10 ⁻⁴
	2	CD138-FITC/CD28-PE/CD33-PerCP Cy5.5/CD38-APC		
	3	CD20-FITC/CD117-PE/CD138-PerCP Cy5.5/CD38-APC		
de Tute <i>et al.</i> , <i>Leukemia</i> 2007				
	1	CyIgX-FITC/CD19-PE/CyIgK-PE Cy7/CD138-APC/CD45-APC Cy7	Flow-MRD	10 ⁻⁴
Gupta <i>et al.</i> , <i>Am J Clin Pathol</i> 2009				
	1	CD19-FITC/CD56-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD138-APC	Flow-MRD	10 ⁻⁴
	2	CD45-FITC/CD52-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD138-APC		
	3	CD20-FITC/CD117-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD138-APC		
Paiva <i>et al.</i> , <i>J Clin Oncol</i> 2011, <i>Haematologica</i> 2014 and Puig <i>et al.</i> , <i>Leukemia</i> 2014				
	1	CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP Cy5.5/CD45-APCa	Prognostication evaluation vs. ASO PCR	10 ⁻⁴ to 10 ⁻⁵
	2	CD38-FITC/CD27-PE/CD45-PerCP Cy5.5/CD28-APC		
	3	β2 micro-FITC/CD81-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD117-APC		
Rawstron <i>et al.</i> , <i>J Clin Oncol</i> 2013				
	1	CD27-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP Cy5.5/CD38-PE Cy7/CD138-APC/CD45-APC Cy7	Prognostication	10 ⁻⁴
	2b	CD81-FITC/CD117-PE CD52-FITC/CD200-PE		
Robillard <i>et al.</i> , <i>Blood Cancer J</i> 2013 and Rousell <i>et al.</i> , <i>J Clin Oncol</i> 2014				
	1	Cy7/CyIgK-APC/CD45-APC H7	Flow-MRD prognostication	10 ⁻⁵
EuroFlow 8				
	1	CD138-BV421/CD27-BV510/CD38-FITC/CD56- PE/CD45-PerCP Cy5.5/CD19-PE Cy7/CD117-APC/CD81-APC C750	Flow-MRD	10 ⁻⁵
	2	CD138-BV421/CD27-BV510/CD38-FITC/CD56- PE/CD45-PerCP Cy5.5/CD19-PE Cy7/CyIgK-APC/CyIgX-APC C750		
EuroFlow 10c				
	1	CD138-BV421/CD27-BV510/CD117- BV605/CD38-FITC/CD56-PE/CD45-PerCP Cy5.5/CD19-PE Cy7/CyIgK-APC/CyIgK-APC A700/CD81-APC C750	Flow-MRD	NA

le BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences), pendant 15 minutes à l'obscurité, est ensuite nécessaire. Puis, les cellules sont lavées avec 2 mL d'une solution de lavage, CellWASH (BD Biosciences), à 2 reprises, par centrifugation pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 250 µL de CellWASH.

Stratégie de « gating »

La stratégie de fenêtrage repose sur l'identification des plasmocytes à partir de deux marqueurs spécifiques (CD38 et CD138) à l'aide d'un graphe biparamétrique CD38/CD138 (*figure 1*). Puis, à l'aide de plusieurs graphes biparamétriques, l'étude de l'expression du CD45, CD19, CD27, CD81, CD56 et CD117 sur les événements CD38+ CD138+ est réalisée.

Les plasmocytes tumoraux expriment faiblement voire n'expriment pas le CD45 (CD45-). Les cellules CD45- ne doivent donc pas être exclues du fenêtrage ou « gating » lors de l'analyse des données.

Les deux autres marqueurs indispensables à l'immunophénotypage du MM sont le CD19 et le CD56. L'association de ces marqueurs avec le CD38, CD138 et CD45 permet la caractérisation d'environ 90 % des MM [8, 9].

Le CD19, marqueur B, est l'un des marqueurs le plus informatif, faiblement exprimé par les plasmocytes normaux, il est négatif dans presque 100 % des MM. Cependant, on peut observer jusqu'à environ 30 % de plasmocytes normaux n'exprimant pas le CD19 au sein d'un échantillon.

Dans 78 % des cas de MM (n = 368), les plasmocytes tumoraux expriment le CD56, un marqueur aberrant exprimé normalement par les cellules NK. Longtemps considéré comme un marqueur spécifique du plasmocyte tumoral, il a été montré que les plasmocytes normaux ou réactionnels peuvent également exprimer le CD56. Le pourcentage de plasmocytes normaux exprimant le CD56 au sein d'un échantillon varie selon les articles de 10 % à 45 % [10-13]. Le CD27, marqueur physiologique du plasmocyte normal, est présent chez seulement environ 50 % des cas de MM (n = 146). L'absence d'expression du CD27 est un bon marqueur de malignité. En effet, en moyenne au sein d'un échantillon, moins de 10 % de plasmocytes normaux auront perdu l'expression du CD27. Toutefois, il a été décrit dans certains cas la présence d'environ 40 % de plasmocytes normaux CD27- au sein d'un échantillon [11].

De même, la perte d'expression du CD81 (marqueur B) est un bon indicateur de malignité. Seulement 15 % des plasmocytes normaux d'un échantillon peuvent perdre son expression [10]. Son expression est absente ou diminuée dans environ 50 % des cas de MM [10].

Le CD117 (c-kit) est un marqueur aberrant qui n'est présent que dans un tiers des cas de MM. Néanmoins, ce marqueur

est particulièrement intéressant car l'expression du CD117 n'a jamais été décrite sur des plasmocytes normaux [14, 15]. Il existe donc une hétérogénéité d'expression des différents antigènes cités précédemment par les plasmocytes normaux mais également par les plasmocytes tumoraux. Classiquement, le plasmocyte normal présente le phénotype suivant : CD38 fort, CD138 fort, CD45+, CD19+, CD27+, CD81+, CD56-, CD117-. Des populations minoritaires de plasmocytes normaux représentant en général moins de 30 % des plasmocytes peuvent perdre l'expression de certains marqueurs (CD19, CD45, CD27) ou exprimer des marqueurs aberrants (CD56). Le plasmocyte tumoral est plus souvent CD38 faible, CD138+, CD45-, CD19-, CD27- (ou faible), CD81- (ou faible), CD56+ (voire CD56 fort), CD117+ [13, 16].

Détermination des critères d'acceptabilité des performances de la méthode

Les critères d'acceptabilité permettent de définir la conformité des performances de la méthode à la norme NF EN ISO 15189. Habituellement ces critères d'acceptabilité sont définis par des sociétés savantes ou par le fournisseur. Il n'existe pas de critères d'acceptabilité définis pour l'immunophénotypage des plasmocytes médullaires. Dans ce cas, il appartient donc au biologiste médical de déterminer ses propres critères.

Il est admis que les performances de la CMF dépendent du nombre d'événements acquis. Ainsi le CV d'un paramètre mesuré en CMF varie en fonction du nombre d'événements acquis. Plus le nombre d'événements est important, plus le CV est faible et inversement. En CMF, la variation du CV suit une loi de Poisson [17].

$$\text{Nombre d'événements à acquérir} = \frac{100}{CV^2} * 100$$

CV : coefficient de variation (%)

Après avoir vérifié que la méthode suivait effectivement une loi de Poisson, nous avons ainsi défini différents CV d'acceptabilité en fonction du nombre d'événements d'intérêt acquis (les plasmocytes) selon la loi de Poisson à l'aide des formules de Ricos et al. (*tableau 4 et figure 2*) :

$$\text{CV répétabilité souhaitable} = \frac{1}{1,33} \times 0,5 \times CV_i$$

$$= \sqrt{\frac{100}{\text{Nombre d'événements acquis}}} * 100$$

$$\text{CV répétabilité minimal} = \frac{1}{1,33} \times 0,75 \times CV_i$$

$$\text{CV fidélité intermédiaire souhaitable} = 0,5 \times CV_i$$

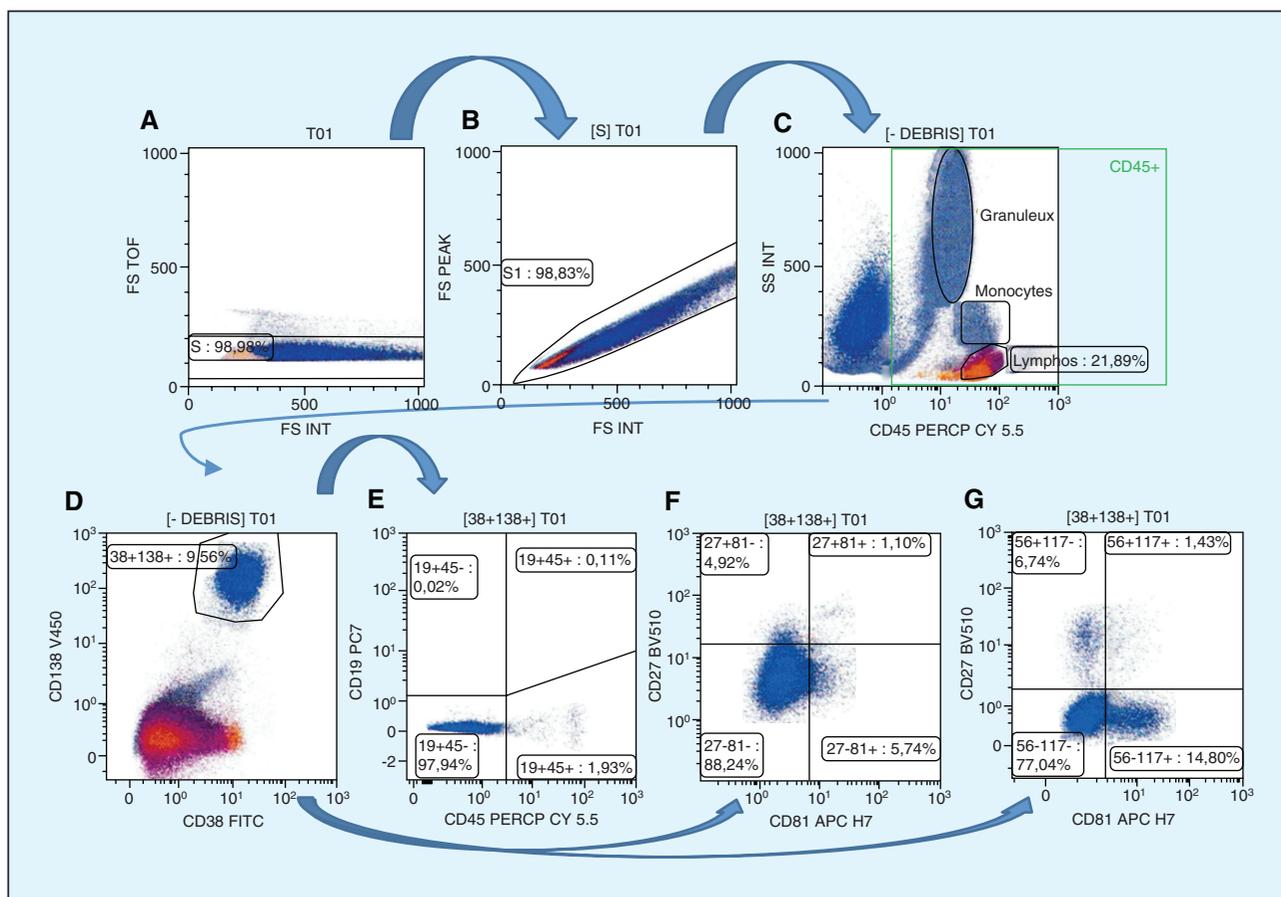


Figure 1. Stratégie de fenêtrage pour l'immunophénotypage du myélome multiple (MM). Élimination des doublets. **C** : Représentation de la structure de la cellule (SS) en fonction de l'expression du CD45 sur l'ensemble des événements acquis excepté les doublets. **D** : Histogramme biparamétrique CD138/CD38. Permet d'identifier les plasmocytes CD38+ CD138+ au sein de l'ensemble des événements acquis excepté les doublets et les débris. **E** : Histogramme biparamétrique CD45/CD19. Permet d'analyser l'expression du CD45 et du CD19 uniquement sur la population CD38+ CD138+ (plasmocytes). **F** : histogramme biparamétrique CD27/CD81. Permet d'analyser l'expression du CD27 et du CD81 sur la population CD38+ CD138+. **G** : histogramme biparamétrique CD56/CD117. Permet d'analyser l'expression du CD56 et du CD117 sur la population CD38+ CD138+.

Tableau 4. Critères d'acceptabilité. Critères d'acceptabilité définis à l'aide la loi de Poisson pour évaluer les performances de la méthode.

Nombre d'évènements acquis	% CV répétabilité souhaitable	% CV fidélité intermédiaire souhaitable
<10	Pas de résultats quantitatifs rendus	Pas de résultats quantitatifs rendus
10-25	30 %	40 %
25-100	20 %	27 %
>100	10 %	13 %
Nombre d'évènements acquis	% CV répétabilité minimal	% CV fidélité intermédiaire minimal
<10	Pas de résultats quantitatifs rendus	Pas de résultats quantitatifs rendus
10-25	45 %	60 %
25-100	30 %	40 %
>100	15 %	20 %

Analyse de risques

L'objectif est de réaliser une identification des points critiques d'une méthode d'analyse susceptibles d'influencer le résultat et d'envisager les mesures de maîtrise à adop-

ter. L'analyse de risques a été réalisée selon la méthode des « 5M » en listant les points critiques et les mesures de maîtrise proposées associées au matériel utilisé, à la main-d'œuvre, à la méthode (technique utilisée), au milieu

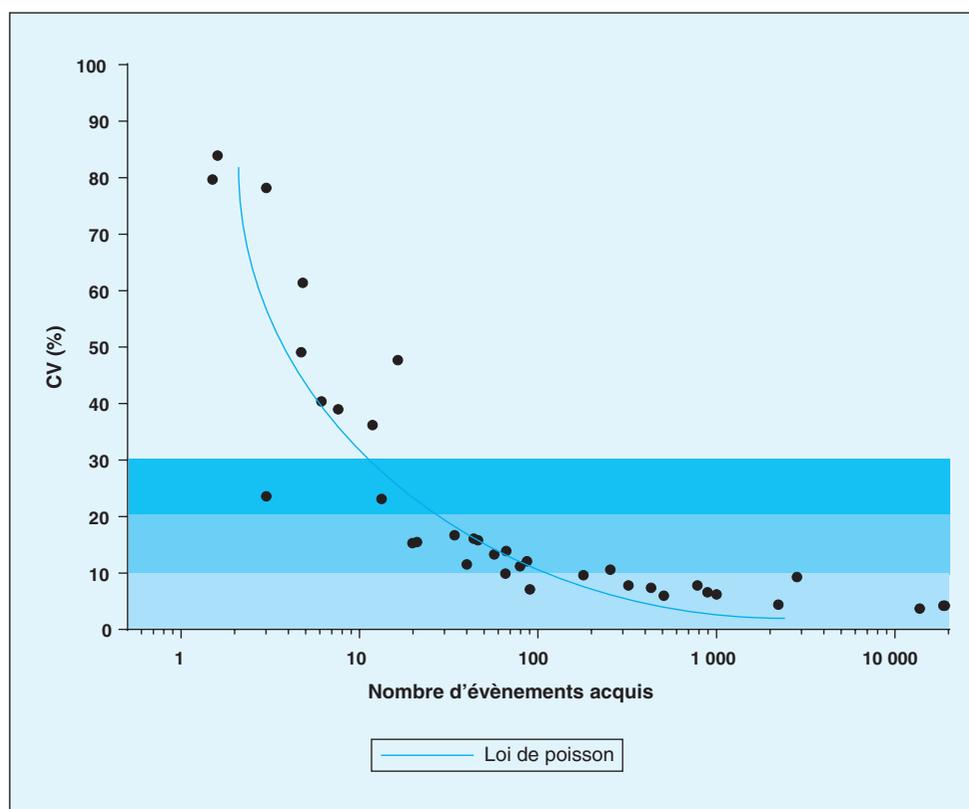


Figure 2. Vérification de l'applicabilité de la loi de Poisson. Calcul du CV à partir de mesures répétées du nombre d'événements d'une même sous-population plasmocytaire et comparaison de la distribution des CV en fonction du nombre d'événements avec la loi de Poisson.

(environnement) et à la matière (échantillon) (résultats non montrés).

Essai de mise au point de CIQ à partir de la lignée myélomateuse MM1R

La lignée MM1R a été établie à partir de plasmocytes circulants issus d'un patient atteint de leucémie à plasmocytes secondaire à un MM à IgA. Un million de plasmocytes issus de la lignée MM1R (pureté 100 %, vérifiée par microscopie optique) ont été lavés avec 2 mL de solution de lavage à 2 reprises, par centrifugation pendant 5 minutes à température ambiante. Puis les plasmocytes ont été fixés dans 100 μ L de fixateur (Intrapep Reagent 1, Beckman Coulter) pendant 15 minutes à l'obscurité puis lavés à 2 reprises dans les mêmes conditions. Les plasmocytes ont été remis en suspension dans 1 mL de CellWASH (BD Biosciences) et leur concentration a été mesurée par impédance par un automate d'hématologie (ABX Micros 60, Horiba). Afin de se placer dans des conditions proches de celles rencontrées en routine, les plasmocytes de la lignée ont été ensuite dilués avec un échantillon de sang de patient sans plasmocytes circulants afin d'obtenir 3 dilutions : 20 %, 2 % et 0,2 % de plasmocytes tumoraux. Une fois les dilutions réalisées, le

protocole de marquage membranaire décrit précédemment a été utilisé.

Fidélité

La fidélité (ou précision) exprime l'étroitesse de l'accord entre les mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées. Pour l'étude de répétabilité, 4 échantillons de MO indépendants ont été analysés entre 4 à 10 fois dans un intervalle de temps court pour limiter les variations. La fidélité intermédiaire consiste à effectuer plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon mais en faisant varier cette fois-ci les conditions analytiques, afin de se placer dans des conditions analytiques proches de celles rencontrées lors de l'utilisation courante de l'appareil. Deux échantillons de MO indépendants ont été utilisés pour déterminer la fidélité intermédiaire : 10 marquages différents, 3 opérateurs.

Justesse, exactitude et incertitudes de mesure

La justesse correspond à la qualité de l'accord entre la moyenne d'une série de mesures et la valeur vraie. L'objectif est d'évaluer l'erreur systématique de la méthode. En l'absence de CIQ externalisé, nous avons

déterminé notre valeur cible du pourcentage de plasmocytes à partir d'un échantillon analysé en microscopie optique (analyse morphologique : méthode de référence). Cependant, comme il existe une sous-estimation du pourcentage de plasmocytes déterminé en CMF par rapport à l'analyse morphologique en raison de l'hémodilution du prélèvement destiné à la CMF, nous avons choisi de travailler sur un échantillon de sang (patient atteint de leucémie à plasmocytes secondaire), ce qui nous permettait de travailler sur le même échantillon à défaut de travailler sur la bonne matrice. L'exactitude correspond à la qualité de l'accord entre le résultat d'un seul essai de mesure « x » et la valeur vraie « v ». Elle permet de déterminer l'erreur totale, résultante de l'erreur systématique et de l'erreur aléatoire. La détermination de l'exactitude nécessite de disposer également d'une valeur de référence ou d'une valeur cible. Si un tel échantillon est indisponible alors un échange interlaboratoire peut être envisagé.

Enfin, nous avons calculé les incertitudes de mesure. Ne disposant pas de toutes les données nécessaires (absence de CIQ, EEQ) pour utiliser une des méthodes proposées dans le référentiel du Cofrac SH-GTA-14, nous avons réalisé le calcul suivant :

$$u = 2 \times \sigma \text{ (fidélité intermédiaire)}$$

$$u = \text{incertitude de mesure ; } \sigma = \text{écart-type}$$

Sensibilité et spécificité analytique

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité de la méthode, nous avons réalisé une étude rétrospective sur l'année 2016 (74 dossiers). Les résultats de l'ensemble des immunophénotypes des plasmocytes réalisés en 2016 ont été comparés aux résultats de l'analyse morphologique des myélogrammes et à l'ensemble du dossier clinico-biologique.

Nous avons défini 4 catégories de résultats :

- vrais positifs (VP) : immunophénotypage en faveur d'une maladie clonale du plasmocyte (MGUS, SMM ou MM) et concordant avec les résultats du myélogramme et de l'électrophorèse des protéines ;
- faux positifs (FP) : immunophénotypage en faveur d'une maladie clonale du plasmocyte (MGUS, SMM ou MM) mais discordant avec les résultats du myélogramme et/ou de l'électrophorèse des protéines ;
- vrais négatifs (VN) : immunophénotypage en faveur de l'absence d'une maladie clonale du plasmocyte (MGUS, SMM ou MM) et concordant avec les résultats du myélogramme et de l'électrophorèse des protéines ;
- faux négatifs (FN) : immunophénotypage en faveur de l'absence d'une maladie clonale du plasmocyte (MGUS,

SMM ou MM) mais discordant avec les résultats du myélogramme et/ou de l'électrophorèse des protéines.

Nous avons ensuite calculé la sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN de la méthode.

$$\text{Se} = \frac{\text{VP}}{\text{VP}+\text{FN}} \quad \text{Sp} = \frac{\text{VN}}{\text{VN}+\text{FP}}$$
$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP}+\text{FP}} \quad \text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN}+\text{FN}}$$

Étendue de la mesure

L'étendue de la mesure comprend la détermination de la limite de détection, de la limite de quantification et de la limite supérieure de linéarité. Pour déterminer la limite de détection (plus petite quantité de plasmocytes détectables dans la MO), dix échantillons de MO non marqués (matrice vierge ou échantillon dépourvu de l'analyte d'intérêt) ont été analysés, 10^6 évènements ont été acquis pour chaque échantillon.

Limite de détection = $3 \times \sigma$ (évènements CD138+CD38+)
 σ (évènements CD38+ CD138+) : écart-type de la moyenne du nombre d'évènements CD38+ CD138+ détectés

La limite de quantification des plasmocytes médullaires (plus petite quantité de plasmocytes mesurable dans la MO) a été déterminée selon le même mode opératoire que la limite de détection.

Limite de quantification = $10 \times \sigma$ (évènements CD138+CD38+)

La linéarité est l'aptitude que présente une méthode à donner des résultats proportionnels à la concentration de l'analyte. L'immunophénotypage des plasmocytes médullaires est réalisé dans des conditions préconisées par le fournisseur (40 μL de mix pour 1.10^6 cellules dans 100 μL de MO). Cependant, nous avons voulu vérifier que nous travaillions effectivement en conditions saturantes en anticorps (excès d'anticorps). Pour déterminer la limite supérieure de linéarité, un échantillon enrichi en plasmocytes devait être utilisé. En effet, les échantillons destinés à la CMF de patients atteints de MM présentent souvent moins de 5 % de plasmocytes. Un échantillon de MO de patient atteint de MM a donc été enrichi en plasmocytes par tri immunomagnétique des cellules médullaires CD138 positives (AutoMACS Miltenyi Biotec, Paris). Cet échantillon enrichi à 99 % (vérification par examen morphologique en microscopie optique, après coloration au May-Grünwald Giemsa d'un cytopspin de la suspension cellulaire obtenue) a ensuite été dilué avec un échantillon de sang de patient sans plasmocytes circulants afin d'obtenir des dilutions à 75, 50 et 25 % de plasmocytes. Chaque

échantillon a été marqué et mesuré une fois afin de comparer les pourcentages de plasmocytes mesurés et théoriques.

Comparaison de méthodes

La comparaison de méthode consiste à évaluer les résultats obtenus avec une méthode par rapport à ceux d'une autre méthode [18]. Nous avons comparé la méthode de l'immunophénotypage des plasmocytes pour la quantification des plasmocytes médullaires avec la méthode de référence, l'analyse morphologique, afin de vérifier le phénomène d'hémomodilution des échantillons destinés à la CMF décrit dans la littérature [19]. Nous avons comparé rétrospectivement les pourcentages de plasmocytes médullaires obtenus en CMF et en analyse morphologique sur 82 dossiers de l'année 2016.

D'autre part, le laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse dispose de 3 cytomètres en flux Navios : NV1 (AW06215), NV2 (AW07217), NV3 (AW10232). Selon le SH-GTA-04, il est nécessaire d'établir une comparaison des différents cytomètres afin d'assurer la cohérence biologique des dossiers patients lorsque les mêmes examens sont traités par plusieurs analyseurs. Cette évaluation permet de maîtriser d'éventuelles discordances entre différents systèmes analytiques disponibles au laboratoire. Trois échantillons de MO de patients atteints de MM ont été marqués une fois et analysés par les 3 cytomètres en flux puis comparés (calcul CV, corrélation, diagramme des différences et des rapports).

Interférences

Les techniques de CMF reposent sur l'utilisation d'anticorps fluorescents. De ce fait, plusieurs interférences sont possibles et décrites : présence d'agglutinines froides, présence d'immunoglobulines polyclonales ou monoclonales, présence de produits fluorescents. Ces interférences peuvent modifier le marquage des cellules (phénomène de compétition vis-à-vis des antigènes membranaires) ou parasiter l'interprétation des résultats.

Dans le contexte de l'immunophénotypage du MM, l'interférence liée à la présence d'une immunoglobuline monoclonale peut s'avérer problématique. Cependant, l'interférence par une immunoglobuline monoclonale circulante a été décrite lorsqu'il existe dans le panel un anticorps dirigé contre la partie Fc des Ig [20]. Le panel utilisé au laboratoire ne comprenant pas d'Ac anti-Ig, la probabilité d'une interférence par une protéine monoclonale peut être écartée.

D'autre part, les traitements par anticorps monoclonaux sont également susceptibles d'interférer avec les techniques de CMF. En effet, une interférence par les traitements anti-CD38, très prometteurs pour le traitement du MM [21], a été décrite. Nous avons testé un échantillon de MO de patient atteint de MM et traité par un anti-CD38 pour le vérifier.

Contamination

La contamination inter-échantillons résulte du transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre tel qu'il produit une modification dont l'effet peut être évalué et quantifié [18]. La contamination des échantillons altère l'exactitude des mesures. L'objet de l'étude de contamination est d'évaluer le transfert d'un échantillon riche en plasmocytes sur un échantillon pauvre ou exempt de plasmocytes. Pour évaluer l'importance de la contamination, un échantillon de sang de patient atteint de leucémie à plasmocyte secondaire (35 % de plasmocytes circulants) a été marqué puis analysé 3 fois de suite. Puis un échantillon de sang non marqué (matrice vierge) a été analysé 3 fois de suite, 10⁶ évènements ont été acquis à chaque passage afin de vérifier l'absence de détection de plasmocytes dans les échantillons non marqués.

Le pourcentage de contamination a été déterminé selon la formule suivante (SH-GTA-04) :

Contamination (%) =

$$\frac{\text{Sang non marqué P1-Sang non marqué P3}}{\text{Moyenne sang marqué-Sang non marqué P3}}$$

La contamination inter-réactif n'a pas été testée en raison de l'absence de système de distribution commun pour les réactifs.

Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations de paramètres internes à la méthode. La robustesse de la méthode est évaluée par les études de fidélité. Cependant, des paramètres supplémentaires peuvent être étudiés en fonction de leur pertinence.

Certains échantillons sont analysés 24 à 48 heures après le prélèvement, il nous a donc paru pertinent de vérifier la stabilité de l'échantillon. Trois échantillons de MO de patients atteints de MM ont été conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière et analysés à J0 (jour du prélèvement), J1 (+24h), J2 (+48h).

De même, nous avons vérifié la stabilité des échantillons après marquage. Un échantillon de MO de patient atteint de MM a été conservé à température ambiante après marquage et analysé 10 fois sur 90 minutes. Un autre échantillon de MO de patient atteint de MM a été conservé à +4 °C après marquage et analysé directement après le marquage puis 1h (H1), 2h (H2) et 3h après (H3).

Résultats

Essai de mise au point d'un CIQ

Afin de pallier l'absence de CIQ, un essai de mise au point d'un échantillon de référence à partir de la lignée MM1R a

été réalisé. Les résultats du premier essai avec la réalisation de trois dilutions à partir de la lignée MM1R récemment mise en culture étaient concluants avec des biais considérés comme acceptables par le laboratoire (*tableau 5*). Cependant, la réalisation d'autres essais n'a pas permis de retrouver de tels résultats. En effet, les cellules étant en culture depuis plusieurs semaines, le phénotype des plasmocytes myélomateux n'était pas stable. De plus, plusieurs nuages de plasmocytes étaient observés correspondant probablement à du marquage non spécifique ou à l'adhésion de plasmocytes entre eux ou aux cellules granuleuses. Ce phénomène ne permettait plus d'interpréter correctement les résultats.

Fidélité

Les études de répétabilité ont montré des résultats de CV inférieurs aux CV acceptables déterminés par le laboratoire pour tous les niveaux (haut, intermédiaire, bas) (*tableau 6*). Les études de fidélité intermédiaire ont montré des résultats de CV inférieurs aux CV acceptables déterminés par le laboratoire pour les deux niveaux d'étude (intermédiaire et bas) quel que soit l'opérateur lorsque les tubes étaient analysés rapidement après leur préparation ou placés à 4 °C avant analyse (*tableau 7*).

Justesse, exactitude et incertitudes de mesure

L'évaluation du biais entre la valeur mesurée et la valeur « vraie » définie par analyse morphologique est de 0,19 % pour le pourcentage de plasmocytes et -0,43 % pour le pourcentage de plasmocytes anormaux. Il n'existe pas de biais limite défini dans la littérature mais le très faible biais (< 1 %) obtenu est considéré comme acceptable par le laboratoire (*tableau 8*).

L'évaluation de l'exactitude de la méthode sera prochainement réalisée lors de la mise en place d'un échange interlaboratoire.

Ne disposant pas de toutes les données nécessaires au calcul d'une incertitude de mesure, nous avons calculé une approximation en utilisant deux types de calculs proposés dans le SH-GTA-14. L'incertitude de mesure du pourcentage de plasmocytes a été calculée pour un niveau intermédiaire (2,6 % de plasmocytes), correspondant au pourcentage moyen retrouvé dans un échantillon de MO. Elle se situe entre 10 et 20 % du résultat mesuré. L'incertitude de mesure du pourcentage de plasmocytes anormaux a été calculée pour un niveau haut (96,8 % de plasmocytes anormaux), correspondant au pourcentage de plasmocytes anormaux moyen au cours d'un MM et proche du seuil décisionnel de 95 % utilisé pour orienter le diagnostic différentiel MM/MGUS. Elle se situe entre 0,5 et 0,75 % (*tableaux 9 et 10*).

Tableau 5. Mise au point d'un CIQ « maison ». Essai de mise au point d'un matériel permettant une évaluation régulière de la méthode à partir de la lignée myélomateuse MM1R.

Échantillons	Paramètre	Valeur Labo	Cible (Valeur vraie)	Biais (%) / valeur vraie	Nombre d'événements acquis	Biais (%) limite ⁴	Conclusion
Mélanges niveau haut : lignée myélomateuse fixée MM1R + sang d'un patient sans plasmocyte circulant	% plasmocytes	17,1	20	-14,5	15 025	/	Conforme
	% plasmocytes anormaux	99,9	100	-0,1	15 001	/	Conforme
Mélanges niveau intermédiaire : lignée myélomateuse fixée MM1R + sang d'un patient sans plasmocyte circulant	% plasmocytes	2,6	2	30,0	2 408	/	Conforme
	% plasmocytes anormaux	99,6	100	-0,4	2 398	/	Conforme
Mélanges niveau bas : lignée myélomateuse fixée MM1R + sang d'un patient sans plasmocyte circulant	% plasmocytes	0,2	0,2	0,0	239	/	Conforme
	% plasmocytes anormaux	98,9	100	-1,1	233	/	Conforme

Tableau 6. Répétabilité de la méthode. Étude de répétabilité de la méthode (% de plasmocytes et % de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes) réalisée sur 4 niveaux différents : 1 seul marquage par niveau, 4 à 10 passages.

Échantillons (MO)	Paramètres	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Nombre d'événements acquis (moyenne)	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Patient niveau haut (MM)	% plasmocytes	10	34,05	1,04	3,04	Absence	19 483	10	Conforme
	% plasmocytes anormaux	10	99,46	0,05	0,05	/	19 106	10	Conforme
Patient niveau intermédiaire (plasmocytose réactionnelle)	% plasmocytes	8	2,45	0,15	6,02	/	1 002	10	Conforme
	% plasmocytes anormaux	8	0	0	0,00	/	0	NA	NA
Patient niveau intermédiaire (MGUS)	% plasmocytes	4	2,31	0,20	8,61	/	525	10	Conforme
	% plasmocytes anormaux	4	47,76	1,98	4,14	/	241	10	Conforme
Patient niveau bas (MRD)	% plasmocytes	5	0,10	0	0,00	/	79	20	Conforme
	% plasmocytes anormaux	5	16,66	5,29	31,75	/	17	45*	Conforme

*CV minimal

Tableau 7. Fidélité intermédiaire de la méthode. Étude de fidélité intermédiaire réalisée sur 2 niveaux (pourcentage de plasmocytes et pourcentage de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes) : préparation de 10 tubes pour chaque marquage par 3 opérateurs différents.

Échantillons (MO)	Paramètres	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Nombre d'événements acquis (moyenne)	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Patient niveau intermédiaire (MM)	% plasmocytes	10	2,58	0,26	10,14	/	2 850	13	Conforme
	% plasmocytes anormaux	10	96,80	0,42	0,43	/	2 420	13	Conforme
Patient niveau bas (MRD)	% plasmocytes	10	0,10	0,00	0,00	/	201	13	Conforme
	% plasmocytes anormaux	10	17,84	2,91	16,29	/	40	40	Conforme

*CV minimal

Tableau 8. Justesse de la méthode. Étude de la justesse de la méthode en comparant les valeurs obtenues en CMF avec les valeurs obtenues par la méthode de référence (microscopie optique) sur un sang de patient atteint de leucémie à plasmocytes.

Échantillons	Paramètres	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (valeur vraie) : formule manuelle	Biais (%)/ valeur vraie	Nombre d'événements acquis (moyenne)	Biais (%) Limite	Conclusion
Sang de patient atteint de leucémie à plasmocytes secondaire	% plasmocytes	3	35,07	35	0,19	16 220	/	Conforme
	% plasmocytes anormaux	3	99,57	100 (théorique)	-0,43	16 149	/	Conforme

Tableau 9. Incertitudes de mesure du pourcentage de plasmocytes. Approximation de l'incertitude de mesure du pourcentage de plasmocytes à partir de deux formules du SH-GTA-14 en fonction des données disponibles au laboratoire.

Incertitudes de mesure du pourcentage de plasmocytes	$u = 2 \times \sigma$ (fidélité intermédiaire)
Approximation de l'incertitude de mesure du pourcentage de plasmocytes à partir de deux formules du SH-GTA-14 en fonction des données disponibles au laboratoire. Mode de calcul	
Calcul de l'incertitude de mesure du % de plasmocytes	2,6 +/- 0,52 % 2,6 +/- 20 %

Tableau 10. Incertitudes de mesure du pourcentage de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes. Approximation de l'incertitude de mesure du pourcentage de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes à partir de deux formules du SH-GTA-14 en fonction des données disponibles au laboratoire.

Mode de calcul	$u = 2 \times \sigma$ (fidélité intermédiaire)
Calcul de l'incertitude de mesure du % de plasmocytes anormaux	96,8 +/- 0,84 % 96,8 +/- 0,9 %

Sensibilité et spécificité

La méthode est sensible (0,96) et spécifique (0,92) ; sur les 82 dossiers analysés, on dénombre deux faux-négatifs, mais aucun faux-positif. La valeur prédictive positive est 0,99 et la valeur prédictive négative est 0,86 (résultats non montrés).

Étendue de la mesure

La limite de détection des plasmocytes dans un échantillon de MO est de 13 plasmocytes pour 10^6 événements acquis ou $1,3 \cdot 10^{-5}$.

La limite de quantification des plasmocytes dans un échantillon de MO est de 43 plasmocytes pour 10^6 événements acquis ou $4,3 \cdot 10^{-5}$. De plus, un nombre minimal de 10 événements d'intérêt doit être acquis quel que soit le nombre d'événements totaux mesuré.

La méthode est linéaire jusqu'à au moins 140 000 plasmocytes présents dans l'échantillon (soit 14 % si acquisition de 10^6 événements) (résultats non montrés).

Comparaison de méthodes

Analyse morphologique

On observe une sous-estimation importante du pourcentage de plasmocytes mesuré en CMF par rapport au pourcentage mesuré par analyse morphologique. Le pourcentage obtenu en CMF est en moyenne égal à environ 40 % de celui obtenu par analyse morphologique (résultat non montré).

Tableau 11. Contamination inter-échantillon. Recherche de l'existence d'une contamination inter-échantillon à l'aide d'un échantillon marqué riche en plasmocytes et un échantillon non marqué (acquisition de 10⁶ évènements).

Échantillons	Nombre d'évènements acquis	Nombre de plasmocytes	Nombre de plasmocytes anormaux	Limite acceptable < limite de détection	Conclusion
Niveau haut (Sg, 7108-0949) P1	50 000	16 333	16 281	/	/
Niveau haut (Sg, 7108-0949) P2	50 000	16 404	16 354	/	/
Niveau haut (Sg, 7108-0949) P3	50 000	15 922	15 857	/	/
Échantillon non marqué P1	1 000 000	6	6 (phénotype ≠ phénotype niveau haut)	13	Conforme
Échantillon non marqué P2	1 000 000	12	11 (phénotype ≠ phénotype niveau haut)	13	Conforme
Échantillon non marqué P3	1 000 000	7	7 (phénotype ≠ phénotype niveau haut)	13	Conforme
Pourcentage de contamination	Contamination (%) = < 0,01 %			Proche de 0	Conforme

Autres cytomètres en flux

Pour chaque patient, les CV du pourcentage de plasmocytes totaux et du pourcentage de plasmocytes anormaux ont été calculés et comparés aux CV d'acceptabilité de fidélité intermédiaire. Les CV sont inférieurs aux CV considérés comme acceptables par le laboratoire. De plus, nous avons vérifié qu'il existait une bonne corrélation entre les différents automates pour le pourcentage de plasmocytes, le pourcentage de plasmocytes anormaux et leur phénotype. On observe des coefficients de corrélation proches de 1, les appareils sont donc corrélés ($r^2 > 0,99$).

Enfin, les résultats ont été représentés sous forme de diagrammes des différences et des rapports, représentations recommandées par le SH-GTA-04. On observe une répartition conforme des points autour de 0 pour le diagramme des différences et autour de 1 pour le diagramme des rapports aussi bien pour le pourcentage de plasmocytes que le pourcentage de plasmocytes anormaux. Aucun point n'est en dehors des limites fixées à partir des écarts-types de fidélité intermédiaire en fonction du pourcentage de plasmocytes et de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes (résultats non montrés).

Interférences

Le traitement par anti-CD38 est responsable d'une interférence importante sur les résultats. On observe une perte de l'expression du CD38 sur les plasmocytes du patient traité par anti-CD38 (figure 3). La perte d'expression du CD38 interfère avec l'identification des plasmocytes basée sur la double positivité CD38+ CD138+ (figure 3).

Contamination

Après le passage d'un échantillon de sang de patient atteint de leucémie à plasmocytes secondaire riche en plas-

mocytes (35 % de plasmocytes), aucune contamination inter-échantillon n'a été mise en évidence (tableau 11).

Robustesse

Stabilité des échantillons non marqués

Dans un premier temps, les CV du pourcentage de plasmocytes et du pourcentage de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes mesurés à J0, J1, J2 ont été calculés pour chaque échantillon. Les CV sont inférieurs aux CV acceptables retenus pour le pourcentage de plasmocytes et le pourcentage de plasmocytes anormaux excepté pour le pourcentage de plasmocytes du niveau bas MGUS (tableau 12). Dans le cas du niveau bas MGUS, on observe que le pourcentage de plasmocytes est très faible (0,23 %) et que le CV est de 24,74 % pour un CV acceptable de 20 %. Ce CV reste acceptable car il ne modifie pas l'interprétation des résultats d'autant plus que le CV du niveau bas MGUS est conforme pour le pourcentage de plasmocytes anormaux et que le phénotype des plasmocytes anormaux reste identique à J0, J1 et J2 (tableau 12). Cependant, l'obligation d'ajuster le fenêtrage de l'histogramme biparamétrique CD38/CD138 pour identifier les plasmocytes, nous a amenés à regarder l'intensité médiane de fluorescence (MFI) des marqueurs fortement exprimés par les plasmocytes tumoraux de chaque échantillon en fonction du temps. On observe une diminution de la MFI pour l'ensemble des marqueurs exprimés par les plasmocytes (figure 4). Les CV varient entre 10 et 30 % pour l'ensemble des marqueurs excepté le CD138. Les marqueurs les plus stables semblent être le CD45 et le CD27. Cependant, on observe que l'expression du CD138 diminue drastiquement au cours du temps pour atteindre 12,5 % de son expression initiale pour l'échantillon bas MM. Ce phénomène semble cependant variable, la demi-vie du CD138 (temps après

Tableau 12. Stabilité dans le temps des échantillons non marqués. Étude de la stabilité dans le temps (48 heures) des échantillons non marqués : calcul du coefficient de variation (CV) de mesures du pourcentage de plasmocytes et du pourcentage de plasmocytes anormaux réalisées à J1, J2, J3 sur 3 échantillons différents.

Échantillons	Paramètres	Moyenne J0, J1, J2	Écart-type	CV	Nombre d'événements acquis (moyenne)	CV (%) retenu par le laboratoire (fidélité intermédiaire)	Conformité
Patient niveau bas (MGUS)	% plasmocytes	0,23	0,06	24,74	157	20*	Non conforme
	% plasmocytes anormaux	61,40	1,91	3,11	96	27	Conforme
Patient niveau bas (MM)	% plasmocytes	0,97	0,15	15,80	598	20*	Conforme
	% plasmocytes anormaux	89,40	4,44	4,97	535	13	Conforme
Patient niveau intermédiaire (MM)	% plasmocytes	2,30	0,40	17,39	1 463	20*	Conforme
	% plasmocytes anormaux	96,83	0,40	0,42	1 416	13	Conforme

*CV minimal

lequel on observe une diminution de 50 % de la MFI varie entre 16 et 40 heures selon les échantillons. La diminution de l'expression du CD138 au cours du temps peut rendre difficile l'identification des plasmocytes et la détermination du pourcentage de plasmocytes, mais n'interfère pas avec la détermination du pourcentage de plasmocytes anormaux parmi les plasmocytes totaux et la détermination de leur phénotype (tableau 13).

Stabilité des échantillons après marquage à température ambiante

De la même façon, nous avons étudié la stabilité d'un échantillon après marquage en étudiant la MFI de chaque marqueur au cours du temps. On observe une décroissance très forte de la MFI du CD138 (demi-vie de 39 minutes pour un échantillon conservé à température ambiante après marquage). Une telle diminution de l'expression du CD138 par les plasmocytes est responsable de difficultés pour l'identification des plasmocytes (figures 5 et 6).

Stabilité des échantillons après marquage à +4 °C

Lorsque l'échantillon est conservé à +4 °C après le marquage, on observe que la MFI du CD38, CD45, CD27, CD81, CD56 et CD117 est stable pendant au moins 3 heures. En revanche, on observe une diminution de l'expression du CD138 qui semble significative avec une diminution de la MFI de 31 % après 3h (H3) de conservation à +4 °C (MFI initiale = 157,6 ; MFI H3 = 109,0). On observe donc une diminution de l'intensité du marquage du CD138 par les plasmocytes y compris lorsque l'échantillon est conservé à +4 °C. Cependant, cette diminution semble moins importante qu'à température ambiante, puisque la demi-vie de CD138 est de 5 heures et 38 minutes pour cet échantillon conservé à +4 °C (figure 7).

Discussion

Après la planification de la validation de méthode de l'immunophénotypage des plasmocytes dans la MO, la détermination des critères d'acceptabilité correspondait à la première étape de cette démarche, indispensable pour l'interprétation des résultats. Il est à noter qu'en CMF, le nombre total d'événements acquis est souvent supérieur à 10^5 événements. La population d'intérêt représente alors souvent plus de 10^3 événements (soit 1 %). Pour l'immunophénotypage du MM, jusqu'à 10^6 événements totaux sont analysés selon la richesse du prélèvement. Cependant, il était important de définir des CV pour un nombre d'événements d'intérêt acquis très faible (10 événements) du fait de la faible représentation de la population plasmocytaire dans la MO et également afin d'évaluer objectivement la méthode pour la quantification de la MRD au seuil de 10^{-5} (soit 10 événements pour 10^6 événements

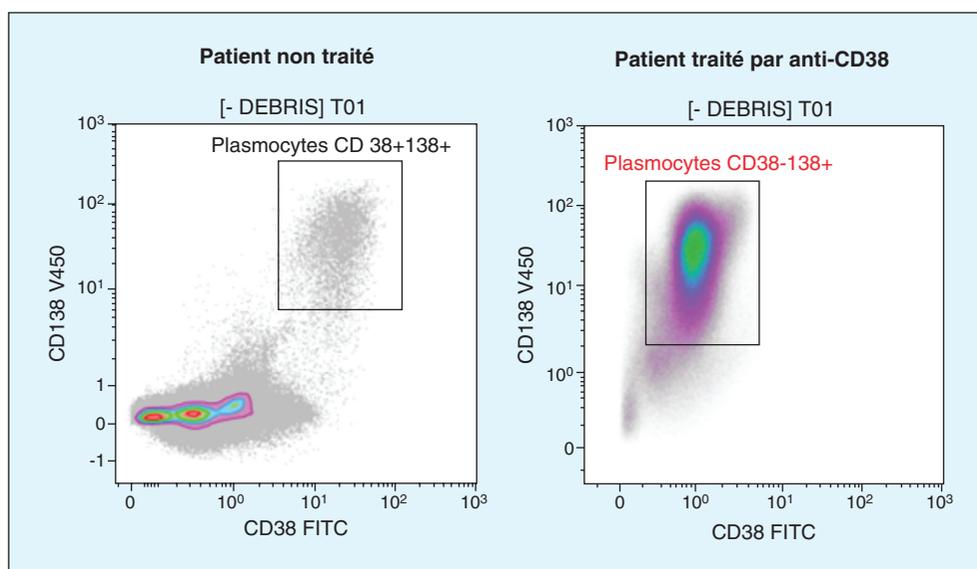


Figure 3. Comparaison graphique d'un patient non traité avec un patient traité par anti-CD38. Les plasmocytes apparaissent CD38+ CD138+ pour le patient non traité et CD38- CD138+ pour le patient traité par anti-CD38, cette interférence rend délicate l'identification des plasmocytes initialement basée sur la double positivité CD38 / CD138 chez le patient traité.

acquis). Des CV limites, variant de 10 à 60 % selon le nombre d'évènements acquis et les conditions analytiques, ont été déterminés.

Ensuite, pour pallier l'absence de matériel de référence, un essai de mise au point d'un CIQ à l'aide de la lignée

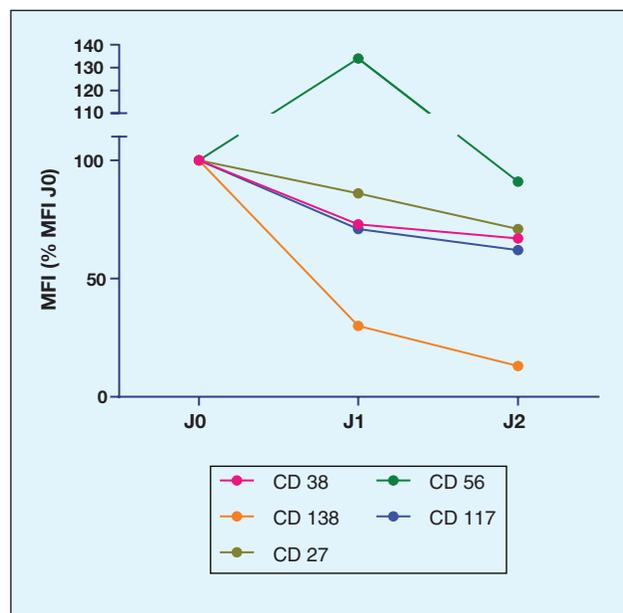


Figure 4. Stabilité des échantillons non marqués. Evolution de la MFI dans le temps des marqueurs exprimés par les plasmocytes clonaux de l'échantillon niveau bas MM conservé à température ambiante non marqué.

MM1R a été réalisé. Malheureusement, l'utilisation de la lignée MM1R comme matériel de référence pour un suivi périodique de la méthode ne peut pas être retenue en raison de son manque de stabilité (variation de l'expression des marqueurs, mortalité cellulaire importante, marquage non spécifique, doublets).

Concernant les performances de fidélité, les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont inférieurs aux CV acceptables définis par le laboratoire et cohérents avec les données de la littérature [22, 23]. Malgré l'absence de CIQ, les performances de fidélité de la méthode ont pu être validées et sont déclarées conformes à la norme NF EN ISO 15189.

Face à l'absence de CIQ, l'étude de la justesse a été réalisée sur un échantillon de sang de patient atteint de leucémie à plasmocytes afin de pouvoir comparer les résultats à ceux d'une analyse morphologique. L'étude de justesse a montré des biais < 1 % pour le pourcentage de plasmocytes et le pourcentage de plasmocytes anormaux. La justesse de la méthode est conforme à la norme NF EN ISO 15189. Cependant, l'étude n'a pu être réalisée que sur un seul échantillon de sang en raison de la très faible incidence des leucémies à plasmocytes : 2,6 à 4 % des patients atteints de MM (leucémie à plasmocytes secondaire) et 0,9 % des patients atteints de leucémie aiguë (leucémie à plasmocytes primaire) [24]. De plus, seulement 3 acquisitions ont été réalisées en raison de la faible cellularité de l'échantillon (patient leucopénique), or un minimum de 5 acquisitions est préconisé pour la réalisation d'une validation de méthode en CMF [25]. De nouveaux échantillons devront être

Tableau 13. Stabilité dans le temps des échantillons non marqués : étude de l'intensité médiane de fluorescence MFI. Comparaison de la MFI à J0, J1, J2 des CD des plasmocytes anormaux pour 3 échantillons.

MFI Patient niveau bas (MGUS)						
Marqueurs exprimés par les plasmocytes anormaux	J1	J2	J3	Moyenne	CV	Demi-vie estimée
CD 38	78,2	49,2	45,8	57,7	30,8	
CD 138	100,1	36,9	15,8	50,9	86,1	18 heures
CD 27	21,8	13,4	14,9	16,7	26,8	
MFI Patient niveau bas (MM)						
Marqueurs exprimés par les plasmocytes anormaux	J1	J2	J3	Moyenne	CV	Demi-vie estimée
CD 38	100,2	72,8	67,5	80,2	21,9	
CD 138	128,7	38,9	16,3	61,3	97,0	16 heures
CD 27	23,2	20	16,5	19,9	16,8	
CD 56	22,6	30,5	20,5	24,5	21,5	
CD 117	6,9	4,9	4,3	5,4	25,4	
MFI Patient niveau intermédiaire (MM)						
Marqueurs exprimés par les plasmocytes anormaux	J1	J2	J3	Moyenne	CV	Demi-vie estimée
CD 38	37	23,5	25,9	28,8	25,0	
CD 138	43,1	32,6	18,8	31,5	38,7	40 heures
CD 45	17	12,9	13,2	14,4	15,9	
CD 27	18,7	15,3	17,6	17,2	10,1	
CD 56	80,3	64,3	50,0	64,9	23,4	

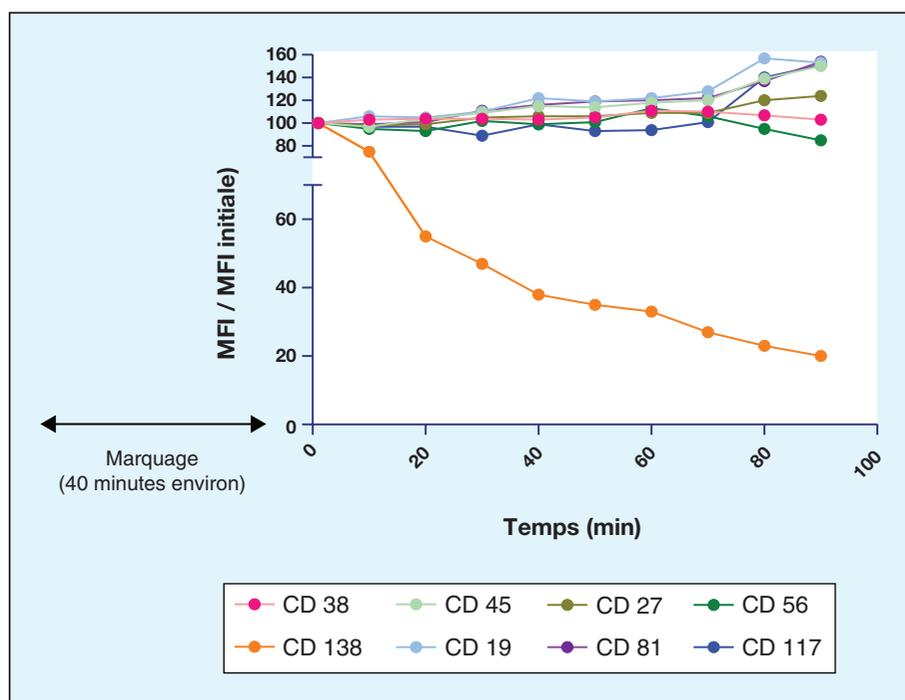


Figure 5. Stabilité des échantillons marqués à température ambiante. Évolution de la MFI au cours du temps des différents marqueurs du plasmocyte après marquage à température ambiante. On observe une diminution drastique de l'expression du CD138.

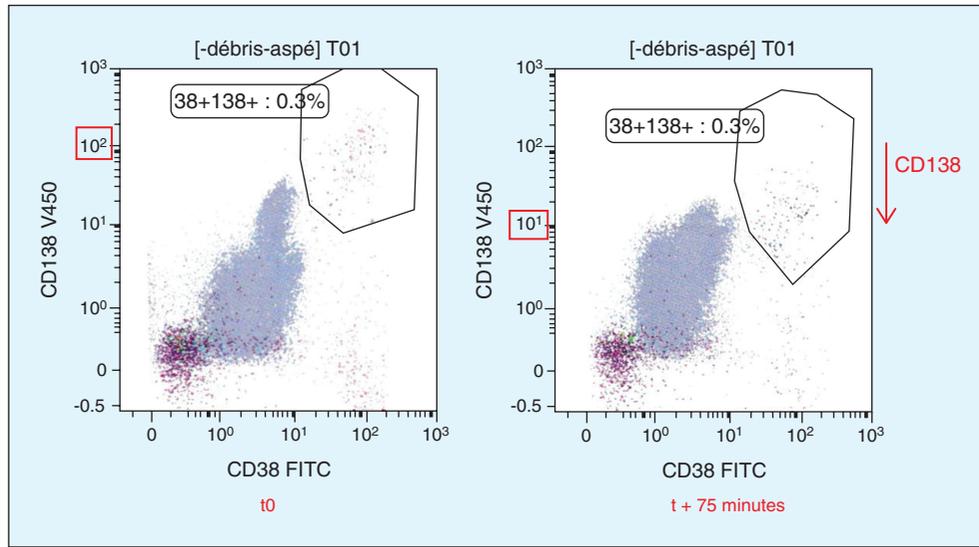


Figure 6. Stabilité des échantillons marqués à température ambiante : problème d'identification des plasmocytes. On observe une diminution de l'expression du CD138 au cours du temps après marquage à température ambiante : les plasmocytes sont difficilement identifiables car moins nettement séparés des autres cellules.

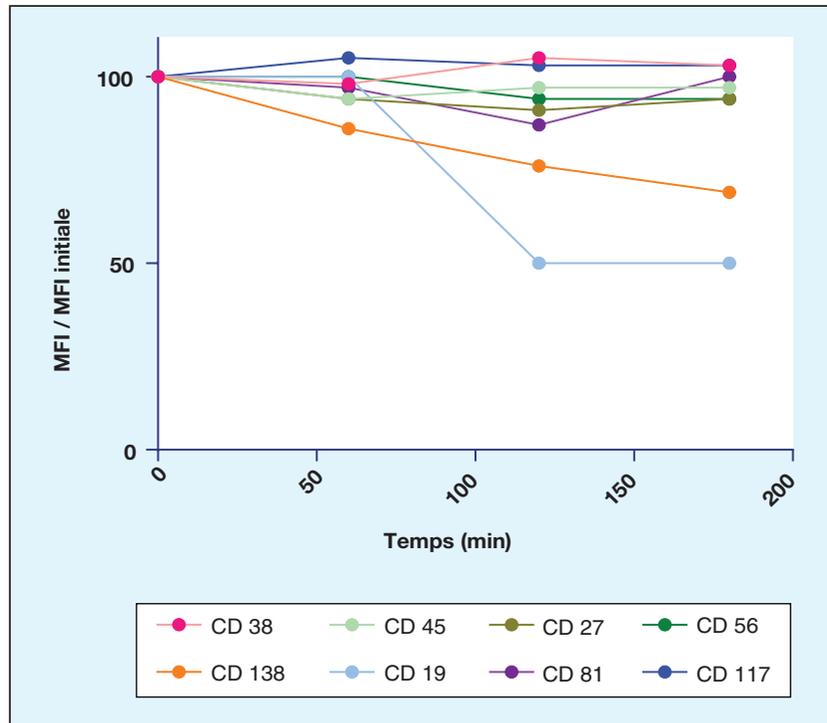


Figure 7. Stabilité des échantillons marqués et conservés à +4°C. Évolution de la MFI des différents marqueurs du plasmocyte au cours du temps après marquage et conservation à +4 °C. On observe une diminution de l'expression du CD138. La diminution d'expression du CD19 n'est pas significative car le marqueur n'était pas initialement exprimé par les plasmocytes anormaux.

analysés pour confirmer la justesse de la méthode et affiner le calcul de l'incertitude de mesure.

Pour l'évaluation de l'exactitude de la méthode, un échange inter-laboratoire devra être mis en place même si sa mise en œuvre sera délicate en raison de la fragilité des plasmocytes que l'on a pu mettre en évidence lors des études de stabilité. En raison de l'absence de CIQ et d'EEQ, le calcul de l'incertitude de mesure n'est pas réalisable. Seule une approximation de l'incertitude a pu être calculée. Les résultats obtenus ne montrent pas d'impact pour l'interprétation des résultats, donc il n'y a pas d'incidence sur la prise en charge du patient. L'incertitude de mesure est conforme à la norme NF EN ISO 15189.

D'autre part, la méthode montre une bonne sensibilité et une bonne spécificité analytique ($> 0,9$). Cependant, il existe quelques rares cas d'interprétation délicate et cette étude a permis de souligner l'importance de l'expertise du biologiste médical pour l'interprétation de ces résultats douteux. Concernant l'étendue de la mesure, la limite de détection de la méthode est 1.10^{-5} et la limite de quantification est 4.10^{-5} pour 10^6 événements acquis. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui décrivent une limite de détection à 10^{-5} lorsque le panel de 8 marqueurs est utilisé [26]. Plus le nombre d'évènements totaux acquis est important, plus la limite de détection est basse. Cependant, l'acquisition de plus de 10^6 évènements peut s'avérer difficile et est limitée par la richesse du prélèvement (impossibilité de travailler sur des volumes trop importants) mais également le temps d'acquisition et la puissance informatique nécessaire pour traiter les données enregistrées.

Lors de la comparaison des méthodes, les résultats obtenus ont confirmé le phénomène d'hémodilution du prélèvement destiné à la CMF rapporté dans la littérature. Suite à cette observation, il nous a paru important de quantifier l'hémodilution et de faire apparaître cette information sur le compte-rendu de résultats, afin de sensibiliser les cliniciens vis-à-vis de la représentativité du prélèvement, notamment pour l'évaluation de la MRD (risque de faux négatifs). Plusieurs formules existent pour quantifier l'hémodilution. La formule désormais utilisée au laboratoire s'appuie sur la numération des leucocytes et des érythrocytes dans le sang périphérique et dans le prélèvement de MO destiné à la CMF [27].

Pureté MO (%) =

$$\left(1 - \left(\frac{\text{Erythrocytes BM}}{\text{Erythrocytes PB}}\right) \times \left(\frac{\text{Leucocytes PB}}{\text{Leucocytes BM}}\right)\right) \times 100$$

BM : bone marrow (moelle osseuse) ; PB : peripheral blood (sang périphérique)

En revanche, aucune différence n'a été mise en évidence entre les différents cytomètres en flux, qui peuvent être utilisés de manière équivalente.

L'interférence sur l'immunophénotypage des plasmocytes par un traitement anti-CD38 a été confirmée. D'une part, l'anticorps thérapeutique est responsable d'une diminution de la disponibilité de l'épitope CD38 pour l'anti-CD38 couplé à un fluorochrome. De plus, le traitement par anti-CD38 est associé à une diminution de l'expression du CD38 sur les plasmocytes restants (mécanisme d'échappement) [28, 29]. Or, l'identification des plasmocytes repose sur la double positivité CD38+ CD138+, il est donc impératif de disposer des informations concernant le traitement du patient afin d'adapter la stratégie de fenêtrage, plus particulièrement pour l'évaluation de la MRD. Cette interférence est observée durant le traitement par anti-CD38 et perdure pendant au moins 6 mois. De plus, afin d'éliminer cette interférence, un nouveau réactif a été développé correspondant à un mix d'anticorps dirigés contre plusieurs épitopes du CD38 permettant de restaurer la détection du CD38 chez les patients traités par anti-CD38. Les données du fournisseur ont été confirmées par un article paru dans la littérature [30]. Cependant, l'anti-CD38 multi-épitope devra être testé dans les conditions d'utilisation du laboratoire avant d'envisager son inclusion dans le panel de routine.

L'étude de contamination a été concluante ; aucune contamination n'a été observée entre les échantillons.

Enfin, l'étude de robustesse de la méthode a montré que cette dernière était limitée par la stabilité des échantillons. En effet, le plasmocyte est une cellule fragile dont l'entrée en apoptose après le prélèvement est rapide. Cette entrée en apoptose s'accompagne notamment d'une diminution de l'expression du CD138. Ce phénomène a été décrit dans un article paru en 1998 qui a étudié l'expression du CD138 en fonction du pourcentage de cellules en apoptose au sein d'une culture cellulaire privée d'IL-6 (cytokine indispensable à la survie des plasmocytes) pendant plusieurs jours [31]. Ces données sont confirmées par une étude dans laquelle le pourcentage de plasmocytes négatifs pour le CD138 est quantifié lorsque l'analyse est réalisée immédiatement après un prélèvement de MO et 4, 24, 48 et 96 heures après [32]. Dans cette étude [31], les plasmocytes CD138 négatif sont tous positifs pour l'annexine V (marqueur d'apoptose), ce qui confirme l'hypothèse de l'association entre l'apoptose du plasmocyte et la perte d'expression du CD138. Le mécanisme impliqué n'est cependant pas décrit. Ainsi, l'étude de stabilité des échantillons avant marquage réalisée au laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse a montré une diminution de l'expression du CD138 dans le temps, cohérente avec les données de la littérature citées précédemment. Idéalement, les échantillons doivent être analysés dans les 4 heures suivant le prélèvement. Nous considérons cependant qu'ils peuvent être analysés jusqu'à 48 heures après le prélèvement puisque la diminution de l'expression du CD138 n'a pas empêché l'identification des plasmocytes. Néanmoins, une réserve doit être émise

sur les résultats quant à la qualité du prélèvement pour les échantillons de plus de 24 heures [23].

Enfin, les études de stabilité après marquage des échantillons ont montré une diminution très rapide de l'expression du CD138 non décrite dans la littérature (diminution de la MFI du CD138 de 80 % après 90 minutes à température ambiante). Cette diminution d'expression du CD138 est moins importante lorsque l'échantillon est placé à +4 °C après le marquage, ce qui nous permet de soulever l'hypothèse d'un phénomène d'internalisation du CD138 après marquage. Il est impératif que les échantillons soient analysés dans les 20 minutes suivant le marquage ou conservés à 4 °C et analysés dans les 2 heures suivant le marquage. L'utilisation du CD138 reste actuellement le « gold standard » pour l'identification des plasmocytes du fait de sa grande spécificité. On observe cependant que l'utilisation du CD138 est à l'origine d'une faible robustesse de la méthode et rend l'exactitude de la méthode très dépendante des conditions pré-analytiques et analytiques (délai et conditions d'acheminement, délai de conservation avant et après marquage). De plus, la diminution ou l'absence d'expression du CD138 est décrite dans d'autres situations que l'apoptose du plasmocyte (cellules initiateuses du MM - apparentées aux cellules souches cancéreuses - [33, 34], plasmocytes circulants [35], traitement par Bortezomib [35-37]). Il serait ainsi pertinent d'étudier d'autres marqueurs plus robustes pour remplacer le CD138 ou d'autres stratégies de fenêtrage [35, 38, 39]. Le CD229 semble le plus prometteur des candidats car les données disponibles indiquent qu'il est exprimé dans tous les cas de MM, et potentiellement par les cellules initiateuses du MM, cependant il apparaît comme moins performant que le CD138 [40].

Conclusion

La méthode d'immunophénotypage des plasmocytes est conforme à la norme NF EN ISO 15189. La démarche de validation de la méthode a permis de vérifier ses performances. Comme attendu, la méthode montre de bonnes performances de fidélité, justesse et exactitude y compris lorsque l'on travaille sur une population cellulaire très peu représentée. En revanche, cette démarche met en évidence l'importance de la qualité de l'échantillon. En effet, il est crucial d'évaluer l'hémodilution du prélèvement pour l'interprétation des résultats, en particulier lorsqu'il s'agit d'évaluer la MRD. De même, le manque de robustesse de la méthode nous a amenés à optimiser nos conditions de travail pré-analytiques et analytiques (traitement des échantillons dans les 24 heures suivant le prélèvement pour l'évaluation de la MRD, acquisition dans les vingt minutes suivant le

marquage). Cette démarche nous a donc permis de préciser les performances de cette méthode et surtout de les améliorer afin de rendre, pour chaque patient, le résultat le plus fiable possible. Enfin, ce travail nous a amenés à réfléchir au choix des marqueurs utilisés pour l'identification du plasmocyte et plus particulièrement sur la pertinence de l'utilisation du CD138. Cependant, à l'heure actuelle, aucun marqueur ne semble réellement en mesure de supplanter ce marqueur.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, *et al.* Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone with transplantation for myeloma. *N Engl J Med* 2017; 376: 1311-20. doi: 10.1056/NEJ-Moa1611750.
2. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, *et al.* Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013; 88: 360-76. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.01.019.
3. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, *et al.* International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; 17: e328-46.
4. Fulciniti M, Munshi NC, Martinez-Lopez J. Deep response in multiple myeloma: a critical review. *Biomed Res Int* 2015; 2015. doi: 10.1155/2015/832049.
5. Paiva B, Merino J, San Miguel JF. Utility of flow cytometry studies in the management of patients with multiple myeloma. *Curr Opin Oncol* 2016; 28: 511-7. doi: 10.1097/CCO.0000000000000331.
6. Arrozo M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, *et al.* Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting: guidelines on myeloma MRD analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90: 31-9. doi: 10.1002/cyto.b.21228.
7. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, *et al.* Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition: guidelines myeloma MRD sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90: 26-30. doi: 10.1002/cyto.b.21249.
8. Jeong T-D, Park C-J, Shim H, Jang S, Chi H-S, Yoon DH, *et al.* Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *Korean J Hematol* 2012; 47: 260-6. doi: 10.5045/kjh.2012.47.4.260.
9. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumba H, *et al.* Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431-8. doi: 10.3324/haematol.11080.
10. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, *et al.* Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: toward

antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma: MM MRD antibody panels. *Cytometry B Clin Cytom* 2016 ; 90 : 61-72. doi: 10.1002/cyto.b.21265.

11. Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, Hasserjian RP, Ferry JA, Dorn ME, *et al.* Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: the diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 ; 78 : 231-8. doi: 10.1002/cyto.b.20517.

12. Robillard N, Wuillème S, Moreau P, Béné MC. Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Front Immunol* 2014 ; 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00137.

13. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, *et al.* Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition: guidelines myeloma MRD sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom* 2016 ; 90 : 26-30. doi: 10.1002/cyto.b.21249.

14. *C-kit receptor (CD117) expression on plasma cells in monoclonal gammopathies.* ResearchGate n.d. <http://dx.doi.org/10.1080/10428190412331283279>.

15. Ocqueteau M, Orfao A, García-Sanz R, Almeida J, Gonzalez M, San Miguel JF. Expression of the CD117 antigen (C-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol* 1996 ; 95 : 489-93. doi: 10.1111/j.1365-2141.1996.tb08993.x.

16. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, *et al.* Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting: guidelines on myeloma MRD analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom* 2016 ; 90 : 31-9. doi: 10.1002/cyto.b.21228.

17. Hedley BD, Keeney M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *Int J Lab Hematol* 2013 ; 35 : 344-50. doi: 10.1111/ijlh.12068.

18. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin (Paris)* 2010 ; 68 : 247-94.

19. Nadav L, Katz B-Z, Baron S, Yossipov L, Polliack A, Deutsch V, *et al.* Diverse niches within multiple myeloma bone marrow aspirates affect plasma cell enumeration. *Br J Haematol* 2006 ; 133 : 530-2. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06068.x.

20. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, *et al.* Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res* 2013 ; 2 : 17. doi: 10.1186/2047-1440-2-17.

21. Sanchez L, Wang Y, Siegel DS, Wang ML. Daratumumab: a first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *J Hematol Oncol* 2016 ; 9. doi: 10.1186/s13045-016-0283-0.

22. Vergnolle I, Allou K, Lacombe F, Mahon FX, Vial J-P. Vérification de méthode quantitative : la formule sanguine par cytométrie en flux, le système HematoFlow® (Beckman Coulter). *Ann Biol Clin (Paris)* 2016 ; 74 : 617-31. doi: 10.1684/abc.2016.1181.

23. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, *et al.* Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res* 2013 ; 2 : 17. doi: 10.1186/2047-1440-2-17.

24. Guièze R, Moreau A-S, Dupire S, Coiteux V, Facon T, Leleu X. Leucémie à plasmocytes. *Hématologie* 2005 ; 11 : 217-25.

25. Cunliffe J, Derbyshire N, Keeler S, Coldwell R. An approach to the validation of flow cytometry methods. *Pharm Res* 2009 ; 26 : 2551-7. doi: 10.1007/s11095-009-9972-5.

26. Paiva B, Merino J, San Miguel JF. Utility of flow cytometry studies in the management of patients with multiple myeloma. *Curr Opin Oncol* 2016 ; 28 : 511-7. doi: 10.1097/CCO.0000000000000331.

27. Broomans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: influence of peripheral blood contamination. *Cytometry B Clin Cytom* 2009 ; 76 : 18-26. doi: 10.1002/cyto.b.20439.

28. van de Donk NW, Moreau P, Plesner T, Palumbo A, Gay F, Laubach JP, *et al.* Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood* 2016 ; 127 : 681-95.

29. Nijhof IS, Casneuf T, van Velzen J, van Kessel B, Axel AE, Syed K, *et al.* CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood* 2016 ; 128 : 959-70. doi: 10.1182/blood-2016-03-703439.

30. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, *et al.* Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017. doi: 10.1038/leu.2017.29.

31. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, *et al.* The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998 ; 100 : 637-46.

32. Christensen JH, Jensen PV, Kristensen IB, Abildgaard N, Lodahl M, Rasmussen T. Characterization of potential CD138 negative myeloma "stem cells". *Haematologica* 2012 ; 97 : e18-20. doi: 10.3324/haematol.2011.043125.

33. Franqui-Machin R, Wendlandt EB, Janz S, Zhan F, Tricot G. Cancer stem cells are the cause of drug resistance in multiple myeloma: fact or fiction? *Oncotarget* 2015 ; 6 : 40496-506.

34. Reid S, Yang S, Brown R, Kabani K, Aklilu E, Ho PJ, *et al.* Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 2010 ; 32 : e190-196. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01222.x.

35. Muz B, de la Puente P, Azab F, Luderer MJ, King J, Vij R, *et al.* A CD138-independent strategy to detect minimal residual disease and circulating tumour cells in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2016 ; 173 : 70-81. doi: 10.1111/bjh.13927.

36. Jung O, Trapp-Stamborski V, Purushothaman A, Jin H, Wang H, Sanderson RD, *et al.* Heparanase-induced shedding of syndecan-1/CD138 in myeloma and endothelial cells activates VEGFR2 and an invasive phenotype: prevention by novel statins. *Oncogenesis* 2016 ; 5 : e202. doi: 10.1038/oncsis.2016.5.

37. Yang Y, MacLeod V, Miao H-Q, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD, *et al.* Heparanase enhances syndecan-1 shedding a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 13326-33. doi: 10.1074/jbc.M611259200.

38. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Pérez JJ, Puig N, Paiva B, *et al.* Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases: CD54, CD229, AND CD319 as plasma cell identification markers. *Cytometry B Clin Cytom* 2016 ; 90 : 91-100. doi: 10.1002/cyto.b.21269.

39. Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, Gattei V, Zucchetto A, Astolfi M, *et al.* Multiple myeloma: new surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents: tumor PCs immunophenotype in the era of novel agents. *Cytometry B Clin Cytom* 2016 ; 90 : 81-90. doi: 10.1002/cyto.b.21279.

40. Atanackovic D, Panse J, Hildebrandt Y, Jadcak A, Kobold S, Cao Y, *et al.* Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 2011 ; 96 : 1512-20. doi: 10.3324/haematol.2010.036814.