

République du Mali  
Un Peuple Un But Une Foi

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO  
**FACULTE DE PHARMACIE**



ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

Thèse N°: .....

**TITRE**

**CONTRÔLE DE QUALITE EXTERNE POUR L'ENUMERATION  
FIABLE DES LYMPHOCYTES PAR LA CYTOMETRIE EN FLUX  
AU MALI**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le ...../...../.....devant la  
Faculté de Pharmacie

**Par M. Mohamed Ambadigné NANTOUME**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie**

**(Diplôme d'Etat)**

**Jury**

**Président : Prof. Souleymane DIALLO**

**Membres : Prof. Aldiouma GUINDO**

**Dr Merepen dite Agnès GUINDO**

**Directeur : Prof. Mahamadou DIAKITE**

**Co-directeur : Dr Djénéba Koumba DABITAO**



République du Mali  
Un Peuple Un But Une Foi

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO  
FACULTE DE PHARMACIE**



ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

Thèse N°: .....

**TITRE**

**CONTRÔLE DE QUALITE EXTERNE POUR L'ENUMERATION  
FIABLE DES LYMPHOCYTES PAR LA CYTOMETRIE EN FLUX  
AU MALI**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le ...../...../.....devant la  
Faculté de Pharmacie

**Par M. Mohamed Ambadigné NANTOUME**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie**

**(Diplôme d'Etat)**

**Jury**

**Président : Prof. Souleymane DIALLO**

**Membres : Prof. Aldiouma GUINDO**

**Dr Merepen dite Agnès GUINDO**

**Directeur : Prof. Mahamadou DIAKITE**

**Co-directeur : Dr Djénéba Koumba DABITAO**

# LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020

## ➤ ADMINISTRATION

**Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur**

**Vice-doyen : Sékou BAH, Maitre de Conférences**

**Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil**

**Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des finances.**

## ➤ PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	H Aidara	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
10	Alou A.	KEITA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie-Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saibou	MAIGA	Législation
16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie
----	-----------------	--------	----------

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

**1. PROFESSEURS /DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
9	Ousmane	KOITA	Biologie Moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**2. MAITRES DE CONFERENCE/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Aldiouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique

<b>6</b>	Ousmane	TOURE	Santé Publique /Santé Environnement
----------	---------	-------	-------------------------------------

### **3. MAITRES ASSISTANTS /CHARGE DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRENOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPECIALITE</b>
<b>1</b>	Mohamed	AG BARAÏKA	Bactériologie-Virologie
<b>2</b>	Charles	ARAMA	Immunologie
<b>3</b>	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biochimie Clinique
<b>4</b>	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
<b>5</b>	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
<b>6</b>	Antoine	DARA	Biologie moléculaire
<b>7</b>	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
<b>8</b>	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
<b>9</b>	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie microbienne
<b>10</b>	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
<b>11</b>	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
<b>12</b>	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
<b>13</b>	Ibrehima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
<b>14</b>	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
<b>15</b>	Birama Apho	LY	Santé publique
<b>16</b>	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
<b>17</b>	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
<b>18</b>	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
<b>19</b>	Oumar	SANGHO	Épidémiologie

#### 4. ASSISTANTS /ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dite Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEÏTA	Santé publique /Santé Environ.
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### ➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

##### 1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

##### 2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

### 3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
6	Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques

11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
12	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

➤ **DER: SCIENCES DU MEDICAMENT**

**1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

**2. MAÎTRES DE CONFERENCES /MAÎTRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie <b>Chef de DER</b>

**3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

#### ➤ **DER: SCIENCES FONDAMENTALES**

##### 1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>Chef de DER</b>
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

##### 2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

### 3. MAÎTRES ASSISTANTS /CHERCHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

#### ➤ CHARGES DE COURS (VACCATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit Commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie Organique
8	Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
9	Modibo	SANGARE	Anglais

<b>10</b>	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
<b>11</b>	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
<b>12</b>	Fana	TANGARA	Maths
<b>13</b>	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et pathologie Médicale
<b>14</b>	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
<b>15</b>	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude en signe de reconnaissance :

- **A ma très chère mère : Mme NANTOUME Fatoumata KASSOGUE**

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Puisse Dieu, le tout puissant te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

- **A mon Père Amadou NANTOUME**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Puisse Dieu, le très haut t'accorder santé, bonheur, longue vie et faire en sorte que jamais je ne te déçoive.

- **A mes chers frères : Ousmane, Fousseini, Allassane et Sadio**

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour vous mes chers frères.

Vous êtes les frères, qui m'ont accompagné dans chaque étape de ma vie. Sans vous ma vie n'aurait pas eu le même goût. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Merci pour tous chers frères, merci pour votre soutien sans faille, j'espère que vous trouvez dans ce modeste travail le témoignage de ma profonde reconnaissance et de tout mon amour.

Que Dieu vous accorde une longue vie pleine de santé, de bonheur et de réussite dans votre vie privée et professionnelle.

- **A mes chères sœurs: Yanaye, Fatoumata, Hawa, Aïchata et Kadidiatou**

Les mots ne sauraient exprimer l'entendu de l'affection que j'ai pour vous et ma gratitude.

J'espère avoir été à la hauteur de vos estimations et que ce travail soit un témoignage de mes sentiments les plus chers que j'ai pour vous.

Que Dieu vous protège et vous accorde un brillant avenir avec une vie pleine de joie, de bonheur et de succès.

- **A tous les membres de ma famille**

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et vos encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

## Remerciements

Je remercie tout d'abord «Allah» de m'avoir donné le courage d'entamer et de finir ce mémoire dans de bonnes conditions.

Mes sincères remerciements à mes Mamans:

- **Mme FOFANA Djénéba OUANE, Mme KABA Tidanke KABA, Mme SIDIBE Nakia TOURE, Mme YALCOUYE Wassa DIAKITE**

Vos bénédictions, votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours tout au long de mon parcours universitaire. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Puisse Dieu, le Tout Puissant vous donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse un jour vous rendre ne serait-ce qu'un peu de ce que vous avez fait pour nous.

A mes ami(e)s

- **Mamadou FOFANA, Mama DAOU, Moustapha DICKO, Moussa COULIBALY, Dialla Marie DIALLO, Djénèba DOUMBIA**

Vous avez toujours fait preuve d'attachement, de sincérité, et de considération envers ma personne.

Je voudrais pouvoir vous apporter ici la chaleur de mon affection et de mon amour. Votre aide, votre générosité extrême, votre soutien, étaient pour moi une source de courage, de conscience et de patience.

Puisse Dieu, le tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

- **Souleymane KABA, Mamadou SIDIBE, Ibrahim BAGAYOKO, Oumar YALCOUYE, Koli DEMBELE, Mamery DOUMBIA, Moussa KOÏTA, Fatou TANDJIGORA, Aïma DIAKITE, Mahamadou TOGOLA, Lamine DOUMBIA, Bilaly KEITA, Aboubacar TRAORE...**

Quoique je dise, je ne saurais exprimer l'amour et la tendresse que j'ai pour vous. Je vous remercie, pour votre soutien, vos encouragements, vos conseils ainsi que vos bénédictions. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé

ensemble, je vous dédie ce travail et que Dieu, le Tout Puissant, vous préserve du mal, vous comble de santé, de bonheur que vos rêves se réalisent.

- **À tous les membres de la 11ème promotion «Promotion Feu Prof. Moussa HARAMA»**

Ensemble, la route a été longue et souvent difficile, je souhaite pour vous tous bon succès sur cette nouvelle route et une vie pleine de bonheur et de réussite.

- **A Docteur Bakary Lamine DOUMBIA**

Si la connaissance n'a pas de prix sachez que je vous serai toujours reconnaissance, merci de m'avoir reçu chez vous et de m'avoir enseigné les principes du métier. Vous êtes un modèle à suivre pour nous aussi bien dans la vie professionnelle que dans la vie sociale. Recevez mon respect et ma profonde gratitude. Que Dieu vous préserve du mal, vous comble de bonheur et de santé.

- **A tout le personnel de la pharmacie Massaman KEÏTA**

Merci pour votre accueil, amour, sympathie, vos conseils, disponibilité et surtout votre soutien indéfectible. En témoignage de mon attachement et de ma grande considération. J'espère que vous trouverez à travers ce travail l'expression de mes sentiments les plus chaleureux.

Les expressions me trahissent, et ne peuvent exprimer mon attachement, mon amour et ma gratitude pour vous. Qu'il me soit permis de vous exprimer à travers ce travail, mon respect et ma vive reconnaissance.

- **Au Docteur Djénéba Koumba DABITAO**

Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions de travail. Je garderai dans mon cœur votre générosité, votre compréhension, votre rigueur et votre efficacité. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié l'apprentissage à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement.

Que Dieu le Tout Puissant, vous préserve du mal, et vous comble de santé, de bonheur afin que vos rêves se réalisent.

- **A l'ImmunoCore du laboratoire: Nadiè COULIBALY, Bourama KONE, Dr Mamadou WAGUE, Dr SARRO, Dr Mariam COULIBALY, Isaac KOLOMA, Mamadou PEROU**

Merci beaucoup pour votre disponibilité, votre soutien et vos conseils qui m'ont été précieux. Merci pour votre tendresse, attention, patience et vos encouragements; merci pour tout.

Que Dieu accomplisse vos vœux, soyez assurés de mon estime.

- **A tout le personnel de l'UCRC**

Je remercie tout d'abord la direction d'avoir accepté ma demande de thèse au sein du laboratoire.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel de recherche (laboratoire et clinique) ainsi que le personnel administratif, pour toutes les aides qu'ils m'ont apporté.

Qu'il me soit permis de vous exprimer à travers ce travail mon respect et ma vive reconnaissance.

J'implore Dieu, qu'il vous apporte bonheur et santé.

- **A tous mes Professeurs de la Faculté de Pharmacie de Bamako**

Une thèse est le fruit de plusieurs années d'études et je ne saurais oublier dans mes dédicaces l'ensemble de mes professeurs et maîtres qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

- **Au peuple Malien**

Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Je crois en toi. Je suis fier d'appartenir à ce peuple fier, digne et brave.

Il me serait difficile de citer tous ceux qui ont de près ou de loin participé à l'élaboration de ce travail sachez que vous êtes dans mon cœur, affectueusement.

# HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

**A notre Maître et Président du jury**

**Professeur Honoraire Souleymane DIALLO**

- ✓ Professeur Honoraire de Bactériologie Virologie à la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB);
- ✓ Ancien Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali (CICM);
- ✓ Ancien Chef de Service du Laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Touré
- ✓ Président du Comité National de Certification de l'Eradication de la Poliomyélite (CNC) pour le Mali;
- ✓ Officier de l'Ordre National du Mali.

Cher Maître,

C'est pour nous un grand honneur de vous voir présider cette thèse.

Ce travail est une occasion pour nous d'apprécier vos qualités humaines et professionnelles.

Qu'il me soit permis de vous remercier et de vous exprimer mon estime et profond respect.

## **A notre Maître et Juge**

### **Professeur Aldiouma GUINDO**

- ✓ PhD, Maître de conférences agrégé en Hématologie;
- ✓ Directeur Général Adjoint du Centre de Recherche et de Lutte Contre la Drépanocytose (CRLD);
- ✓ Chef de service du Laboratoire du Centre de Recherche et de Lutte Contre la Drépanocytose;
- ✓ Secrétaire Général de la Société Malienne d'Hématologie et Oncologie;
- ✓ Chevalier du Mérite de la Santé.

Cher Maître,

Toujours ouvert, disponible, accueillant et bon conseiller durant vos cours, votre rigueur scientifique, nous impose une grande admiration et un profond respect.

Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre infinie gratitude et surtout notre profonde admiration.

## **A notre Maître et Juge**

### **Docteur Merepen dite Agnès GUINDO**

- ✓ Docteur en Pharmacie;
- ✓ Master en Parasitologie;
- ✓ PhD Candidate en Immunologie;
- ✓ Assistante à la Faculté de Pharmacie.

Cher Maître,

C'est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse, nous en sommes très honorés. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer notre travail.

Trouvez ici l'expression nos sincères remerciements.

**A notre Maître et Directeur de Thèse**

**Professeur Mahamadou DIAKITE**

- ✓ Professeur Titulaire d'Immunologie et de Génétique;
- ✓ Vice-recteur de l'USTTB;
- ✓ Directeur Scientifique-Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique de l'USTTB;
- ✓ Responsable du Laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie au MRTC;
- ✓ Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la FMOS/FAPH) ;

Cher Maître,

Vous nous avez accordé un immense honneur et un grand privilège en acceptant de diriger cette thèse. Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous nous avez accueillis. Nous vous prions, cher Maître, d'accepter dans ce travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde reconnaissance et de notre sincère respect.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse**

**Docteur Djénéba Koumba DABITAO**

- ✓ Docteur en Pharmacie;
- ✓ Spécialiste en Biologie Moléculaire et en Immunologie;
- ✓ Maître-Assistant à la Faculté de Pharmacie;
- ✓ Chef du Laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTTB.

Cher Maître,

Ce fût un grand honneur pour moi que d'être encadrée par vous tant pour vos qualités professionnelles incontestables que pour votre soutien. Nous avons pu apprécier l'étendue de vos connaissances, votre disponibilité et vos grandes qualités humaines.

Veillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de ma profonde gratitude et grand respect.

## SIGLES ET ABREVIATIONS

% : Pourcentage

~ : Environ

µl : Microlitre

ABI : « American BioInnovation »

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFREQAS : Schéma régional africain d'évaluation de la qualité externe

APC : Allophycocyanine

ARV : Antirétroviral

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CAP : collège de pathologie américaine

CD : Groupe de Différenciation

Cell : Cellule

CMF : Cytométrie en Flux

CST : Installation du Cytomètre

DN : Double Négative

DP : Double Positive

FACS : Tri des Cellules Activées par Fluorescence

FAPH : Faculté de Pharmacie

FCS : Norme de cytométrie en flux

FITC : Isothiocyanate Fluorescéine

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

FSC : Diffraction en Angle Faible

g : Gramme

GB : Globule Blanc

GR : Globule Rouge

HCT : Hématocrite

HGB : Hémoglobine

HLA : Antigène des Leucocytes Humains

IDR : Intradermo-réaction

ISAC : Société Internationale pour l'Avancement de la Cytométrie

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

MAPSS : Séparation de Dispersion Polarisée Multi-angle

ml : Millilitre

mW : MilliWatts

NFS : Numération Formule Sanguine

NK : « Natural Killers »

nm : Nanomètre

p : Probabilité

PBS : « Phosphate Buffer Saline »

PE : Phycoérythrine

PerCP : Protéine Chlorophylle de Périidine

PLT : Plaquette

PMT : Photomultiplicateurs

r : Corrélation

RETC : Réticulocyte

SD : Standard de Déviation

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

SSC : Diffraction Latérale

UCRC : Centre Universitaire de Recherche Clinique

UKNEQAS : Programme National d'Evaluation Externe de la Qualité du Royaume-Uni

USTTB : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

UV : Ultra-Violet

VGM : Volume Globulaire Moyen

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPM : Volume Plaquettaire Moyen

$\bar{X}$  : Biais Moyen

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Méthodes de traitement des échantillons UKNEQAS au laboratoire UCRC .....	23
<b>Tableau II:</b> Caractéristiques générales du CELL-DYN Ruby* .....	24
<b>Tableau III:</b> Comptage des leucocytes au cours de l'étude .....	32
<b>Tableau IV:</b> Variation des valeurs de pourcentage obtenues entre le Fortessa et le LRII par la méthode de Blant-Altman .....	35
<b>Tableau V:</b> Variation des valeurs absolues obtenues entre le Fortessa et le LRII par la méthode de Blant-Altman .....	37
<b>Tableau VI:</b> Analyse des actions correctives pour les pourcentages .....	41
<b>Tableau VII:</b> Analyse des actions correctives pour les valeurs absolues .....	42

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Photo du Fortessa™ X-20 du Laboratoire UCRC .....	7
<b>Figure 2:</b> Principe de Fonctionnement de la Cytométrie en Flux .....	9
<b>Figure 3:</b> Identification des leucocytes humains dans le sang total selon la taille et la granularité des cellules par CMF.....	10
<b>Figure 4:</b> Exemple de longueur d'ondes des différents fluorochromes utilisés en CMF .....	11
<b>Figure 5:</b> Exemple de configuration du Laser Bleu du Fortessa au Mali.....	13
<b>Figure 6:</b> Identification des sous populations lymphocytaires par immunophénotypage .....	17
<b>Figure 7:</b> Photo du CELL-DYN Ruby de notre laboratoire UCRC .....	24
<b>Figure 8:</b> Méthode CD45/SSC d'analyse des données sur FlowJo.....	29
<b>Figure 9:</b> Performance intra-laboratoire des pourcentages et taux de lymphocytes .....	33
<b>Figure 10:</b> Comparaison intra-laboratoire des pourcentages de lymphocytes .....	34
<b>Figure 11:</b> Comparaison intra-laboratoire des taux de lymphocytes.....	36
<b>Figure 12:</b> Performance inter-laboratoire globale .....	38
<b>Figure 13:</b> Performance inter-laboratoire des taux de lymphocytes T .....	39
<b>Figure 14:</b> Performance inter-laboratoire des taux de lymphocytes non-T.....	40

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1:</b> Exemple de contrôle journalier du bille de contrôle du FORTESSA .....	54
<b>Annexe 2:</b> Exemple de données obtenues à partir de l'analyseur Cell-Dyn Ruby .....	55
<b>Annexe 3:</b> Feuille de calcul d'Immunophénotypage .....	56
<b>Annexe 4:</b> Exemple de résultat d'UKNEQAS de l'échantillon 332 .....	57
<b>Annexe 5:</b> Certificat de l'UKNEQAS .....	64

# Table des matières

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJECTIF.....</b>	<b>3</b>
2.1. Objectif général .....	3
2.2. Objectifs spécifiques.....	3
<b>3. GENERALITE.....</b>	<b>4</b>
3.1. Cytométrie en Flux .....	4
3.1.1. Définition .....	4
3.1.2. Historique .....	4
3.1.3. Description .....	5
3.1.3.1. Système Fluidique.....	6
3.1.3.2. Système Optique .....	6
3.1.3.3. Système Electronique.....	6
3.1.4. Principe de Fonctionnement d'un Cytomètre.....	7
3.1.4.1. Principe Général.....	7
3.1.4.2. Fluorochromes .....	10
3.1.4.3. Lasers .....	12
3.1.5. Caractéristiques du Cytomètre BD LSR Fortessa™ X20 de l'UCRC .....	12
3.1.6. Avantages de la Cytométrie en flux .....	13
3.1.6.1. Analyse quantitative.....	14
3.1.6.2. Sensibilité de détection .....	14
3.1.6.3. Vitesse d'acquisition.....	14
3.1.6.4. Analyse multiparamétrique .....	14
3.1.6.5. Analyse tri-cellulaire.....	14
3.1.7. Limites de la CMF.....	15
3.1.8. Applications de la CMF .....	15
3.2. Technique d'Immunophénotypage .....	16

3.2.1.	Définition et Principe .....	16
3.2.2.	Exemple de populations lymphocytaires par immunophénotypage.....	16
3.3.	Contrôle de Qualité .....	17
3.3.1.	Contrôle de Qualité Interne .....	18
3.3.2.	Evaluation Externe de la Qualité.....	19
3.3.3.	Programme UKNEQAS .....	20
<b>4.</b>	<b>METHODOLOGIE .....</b>	<b>22</b>
4.1.	Cadre et Lieu d'étude .....	22
4.2.	Type d'échantillons .....	22
4.3.	Traitement de l'échantillon au laboratoire ImmunoCore de l'UCRC .....	22
4.4.	Numération Formule Sanguine (NFS).....	23
4.5.	Immunophénotypage .....	25
4.5.1.	Préparation des réactifs .....	25
4.5.2.	Procédures de marquage du sang total .....	26
4.5.3.	Acquisition des échantillons.....	27
4.5.4.	Analyse qualitative des données .....	27
4.5.5.	Analyse quantitative des données .....	28
4.5.6.	Soumission et réception des données en ligne .....	30
4.5.7.	Analyses Statistiques.....	30
<b>5.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Résultats Globaux.....	31
5.2.	Résultats Détaillés .....	32
<b>6.</b>	<b>COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>46</b>
7.1.	CONCLUSION .....	46
7.2.	RECOMMANDATIONS .....	47
<b>8.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>49</b>

<b>9. FICHE SIGNALETIQUE .....</b>	<b>52</b>
<b>10. ANNEXE.....</b>	<b>54</b>
<b>11. SERMENT DE GALIEN .....</b>	<b>65</b>

# 1. INTRODUCTION

Le système immunitaire est composé de plusieurs types de cellules qui exercent des fonctions variées et spécifiques. Ces cellules protègent le corps humain contre les infections diverses et empêchent la croissance des cellules tumorales. La plupart de ces cellules ont des fonctions spécialisées [1]. Cette réponse met en jeu deux catégories de processus : l'immunité spécifique ou acquise caractérisée par la reconnaissance et la mémoire d'antigène (Ag), par opposition à l'immunité non spécifique ou naturelle. La plupart des cellules du système immunitaire sont d'origine lymphoïde et les lymphocytes qui interviennent dans la réponse immunitaire sont: les lymphocytes T (LT) dont la maturation se fait dans le thymus, impliqué dans l'immunité à médiation cellulaire et sont divisés en 2 groupes les LT auxiliaires (LT CD4+) et LT cytotoxiques (LT CD8+), les lymphocytes B (LB) sont des plasmocytes qui produisent des immunoglobulines et sont impliqués dans l'immunité à médiation humorale et les cellules natural killer (NK) sont impliquées dans la réponse immunitaire non spécifique [2].

L'élévation de lymphocytes (lymphocytose) peut être le signe d'une atteinte infectieuse, le plus souvent virale comme l'angine, la bronchite et également le cancer (lymphome) peut provoquer une augmentation des cellules lymphoïdes. La baisse du taux de lymphocyte (lymphopénie) peut entraîner un déficit immunitaire c'est pourquoi l'énumération des lymphocytes et particulièrement des cellules T CD4+ demeure un des outils biologiques reflétant le statut immunitaire du patient. Par exemple, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) à l'origine du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) est un virus qui attaque les lymphocytes T CD4+ mais aussi les monocytes/macrophages [1]. De ce fait le comptage des LT CD4+ est très important pour la compréhension de la physiopathologie et le bon suivi clinique des personnes infectées par le VIH [3]. En effet dans la pratique clinique, le taux des LT CD4+ permet d'évaluer si le patient répond favorablement au traitement antirétroviral (ARV) ou s'il évolue vers le SIDA, généralement accompagné d'infections opportunistes [4]. En recherche clinique, il est utilisé pour déterminer l'efficacité et la tolérance d'un médicament expérimental ayant pour objectif majeur de restaurer la réponse immunitaire ou contrer un agent pathogène qui cible les CD4+ comme dans le cas du VIH [5].

De ce fait, plusieurs méthodes de laboratoires ont été mises au point pour faire une énumération fiable des lymphocytes dans le sang total [6]. Parmi ces techniques de laboratoire, la plus utilisée est l'immunophénotypage par la Cytométrie en Flux (CMF) [7]. Elle permet (1) la

surveillance continue des cas d'immunodéficiences chez les malades mais aussi (2) l'évaluation des réponses aux traitements et aux vaccins expérimentaux [8]. La CMF facilite ainsi une analyse rapide du profil cellulaire par immunophénotypage étendu, permettant ainsi de quantifier de nombreuses sous-populations sanguines circulantes [3].

Vu l'importance de l'énumération fiable des lymphocytes T CD4+ dans la prise en charge des sujets atteints de VIH et dans l'évaluation thérapeutique des nouveaux médicaments, il est impératif pour les laboratoires de participer à des systèmes d'évaluation externe de la qualité pour évaluer la fiabilité des résultats générés afin d'améliorer la qualité des soins fournis aux patients et aussi pour une meilleure évaluation des médicaments et vaccins expérimentaux. Ce contrôle de qualité externe qui fait partie des bonnes pratiques de laboratoire est une nécessité en Afrique où il y a depuis plusieurs années une expansion de la prise en charge des VIH+.

Au niveau du laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) au Mali, nous participons depuis plusieurs années à une évaluation externe de la qualité dénommé UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immune Monitoring). UKNEQAS est un grand programme de contrôle de qualité de plus de 1000 laboratoires dans le monde et cela depuis 50 ans. La mission de UKNEQAS est d'assurer aux laboratoires un système de contrôle de qualité externe et indépendant en offrant aux laboratoires participants (1) une évaluation de la performance intra- et inter-laboratoire, (2) une évaluation de la performance relative des kits et méthodes disponibles, (3) informer sur les facteurs associés aux bonnes et aux mauvaises performances, (4) et un outil pour suivre et améliorer la concordance des données entre laboratoires [9]. En d'autres termes, l'objectif principal de ce réseau de contrôle de qualité est de donner aux participants une plus grande confiance dans les résultats qu'ils transmettent aux cliniciens pour un suivi adéquat des patients mais aussi d'assurer la fiabilité et une reproductibilité des résultats de recherche clinique.

Dans cette thèse, nous proposons d'analyser et de discuter les données de contrôle de qualité UKNEQAS obtenues sur une année (2019-2020) dans notre laboratoire. Cela nous permettra d'examiner la performance de notre laboratoire par rapport à d'autres laboratoires à travers le monde et de faire des recommandations concrètes pour d'autres laboratoires de recherche en Afrique et au Mali en particulier.

## **2. OBJECTIF**

### **2.1. Objectif général**

Analyser la performance de l'énumération des lymphocytes T (CD3, CD4, CD8) et non T (B et NK) sur le sang total par la cytométrie en flux au sein du laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) au Mali.

### **2.2. Objectifs spécifiques**

- Evaluer la performance intra-laboratoire lors de l'énumération des lymphocytes dans le cadre du programme UKNEQAS en comparant les données obtenues au sein de notre laboratoire à l'aide de deux cytomètres différents à savoir le Fortessa et le LSR-II
  
- Evaluer la performance inter-laboratoire de l'énumération des lymphocytes par la cytométrie en flux en comparant nos résultats à ceux des autres laboratoires inscrits au programme UKNEQAS pour l'immunophénotypage sur le sang total.
  
- Identifier les erreurs et proposer des actions correctives afin d'améliorer la performance du laboratoire.

## **3. GENERALITE**

### **3.1. Cytométrie en Flux**

#### **3.1.1. Définition**

Etymologiquement, Shapiro H définit en 1948 la cytométrie comme mesure cellulaire (cyto pour cellule et métrie pour mesure). En effet, la cytométrie en flux (CMF) est une technologie qui permet l'analyse simultanée des paramètres phénotypiques d'une cellule au sein d'une population hétérogène en suspension dans un liquide de gaine. Cette analyse peut-être qualitative et quantitative. Elle est utilisée dans presque tous les domaines de la biologie tel que: la biologie clinique (numération cellulaire), l'immunologie (caractérisation des sous types cellulaires encore appelée l'immunophénotypage ou tri cellulaire), la biologie cellulaire et moléculaire (analyse du cycle cellulaire et de l'abondance du matériel génétique), la cancérologie (mesure de l'apoptose et expression des signaux de dangers), etc. Elle permet de classer les cellules en fonction de leur taille, leur granularité et les protéines exprimées en leur surface permettant de faire ainsi un tri cellulaire fiable.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est de plus en plus multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur est utilisé pour calculer les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et pour les représenter sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes ou plus connu sous le nom de dot plot (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées [1].

#### **3.1.2. Historique**

La CMF est née d'un besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. Le premier cytomètre en flux fut créé par Moldavan en 1934 qui permettait le comptage cellulaire à l'aide d'un microscope et d'un capillaire dans lequel passaient les cellules en suspension [1]. En 1940, l'ingénieur électricien américain, Wallace H Coulter, exposa le principe Coulter et le développa en 1953 pour créer le premier dispositif de comptage cellulaire basé sur la variation d'impédance provoquée par le passage d'une cellule au travers d'un orifice calibré au sein d'un flux [10]. En 1954, le premier cytomètre fut commercialisé par Coulter, un hémocytomètre basé sur le principe de Coulter. De nos jours les automates d'hématologie continuent à être conçus en adoptant le même principe. Six ans après, Gôhde et collaborateurs créa la « Flow Cell », plus précisément en 1960, ceci permettra aux cellules de passer une à une devant un laser à l'intérieur du cytomètre [11]. Cette avancée majeure fut suivie par la mise au

point en 1974 du premier cytomètre en flux de fluorescence appelé FACS-1 (Fluorescence-Activated Cell Sorting) [12]. L'introduction de la plateforme FACS fut suivie par le développement d'anticorps monoclonaux en 1980 par Hoffman et collègues. Dans cette publication séminale, Hoffman réussira à intégrer l'usage des anticorps monoclonaux pour dissocier les sous-populations lymphocytaires T (CD4 et CD8) [13].

L'essor du développement des instruments de CMF continua à avancer jusqu'à la découverte des premiers cas d'infections par le VIH en 1981 [14]. En effet, la CMF fut largement utilisée dans le suivi des personnes infectées par le VIH en faisant l'énumération des taux de lymphocytes T CD4+ et T CD8+. Le premier CMF conçu pour la numération de routine des lymphocytes T fut commercialisé par Becton-Dickinson (BD) sous le nom de FACS Scan [11,14]. Cet automate était composé d'un analyseur à trois couleurs et d'une seule source de laser d'Argon (15 mW) pour accroître la sensibilité de détection. Après le FACS Scan, d'autres sources lumineuses ont été développées comme le laser à diode violette (395 à 415 nm) décrit en 2000 lors du congrès de la Société Internationale pour l'Avancement de la Cytométrie en Flux (ISAC en Anglais : International Society for the Advancement of Cytometry) [11]. En plus des lasers, il y a eu d'autres avancées significatives grâce à la chimie pour la mise au point de nouveaux fluorochromes augmentant la capacité multiparamétrique des instruments de CMF et donc le nombre d'antigène détectable sur une même cellule.

Aujourd'hui la CMF permet une analyse multiparamétrique (jusqu'à 50 paramètres) et individuelle d'un grand nombre de cellules de façon simultanée et rapide. Un des challenges actuels de la CMF est de pouvoir détecter des éléments dont la taille est environ 100 fois inférieure à celles des cellules afin de mesurer les micro et nanoparticules comme les virus [11].

### **3.1.3. Description**

De nos jours, la CMF s'impose comme la méthode standard de quantification et de caractérisation des cellules en biologie. Elle repose ainsi sur une réaction d'immunofluorescence directe; qui grâce au concours des technologies fluidique, optique et informatique au sein du cytomètre, sert à analyser des centaines de milliers de cellules en un temps court. Actuellement les cytomètres de routine permettent une utilisation allant de 10-50 anticorps couplés à des fluorochromes différents [15]. Les cellules sont analysées par le cytomètre en fonction de la taille, la granularité, les molécules exprimées et le contenu.

Le cytomètre est un instrument très complexe composé de 3 systèmes :

### **3.1.3.1. Système Fluidique**

Il sert à introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser. Les cellules en suspension sont introduites dans une veine sous pression (liquide de gaine), qui sert à aligner les cellules pour qu'elles puissent passer une à une devant les lasers. A la fin du parcours de la suspension cellulaire, les cellules peuvent être triées et récupérées ou évacuées vers un flacon de collection des déchets.

### **3.1.3.2. Système Optique**

Il est composé de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques et photomultiplicateurs). Les cellules sont classées en fonction de leur taille et de leur granularité. Le Forward Scatter (FSC) collecté dans l'axe du faisceau (l'axe des abscisses) qui correspond à la lumière diffractée et dont le signal est relatif à la taille de la cellule. Le Side Scatter (SSC) qui fait un angle de  $90^\circ$  (l'axe des ordonnées) avec le faisceau incident à la longueur d'onde 488 nm pour déterminer la granularité ou la structure de la cellule. La présence de plusieurs lasers de type différents permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes. Les détecteurs ou photomultiplicateurs spécifiques d'un intervalle de longueur d'onde transforment la lumière émise en un signal dont l'intensité est proportionnelle à l'énergie lumineuse [16].

### **3.1.3.3. Système Electronique**

Il convertit les signaux optiques (photons) en signaux électroniques (volts) visibles sur l'écran d'un ordinateur. Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs afin d'être amplifiés, numérisés et stockés dans un ordinateur.



**Figure 1: Photo du Fortessa™ X-20 du Laboratoire UCRC**

### **3.1.4. Principe de Fonctionnement d'un Cytomètre**

#### **3.1.4.1. Principe Général**

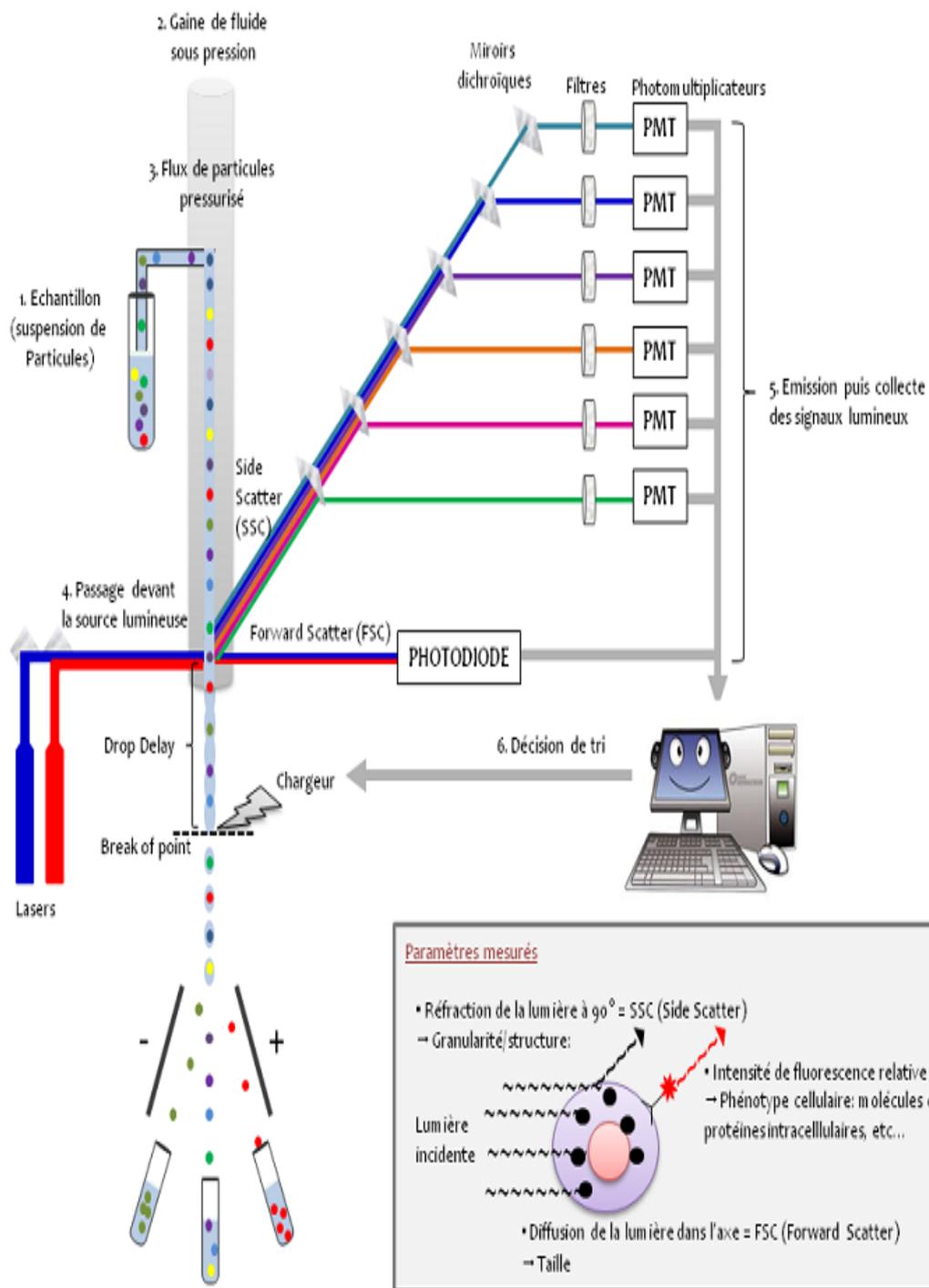
Le principe est basé sur le tri cellulaire qui peut être défini comme une séparation physique de cellules ou de particules en suspension à partir d'une population ou d'un échantillon hétérogène. Les cellules ou les particules sont marquées par des anticorps monoclonaux fluorescents facilitant la détection des différents types de cellules. Les spécialités les plus commercialisées sont les « Clusters of Differentiation » en Anglais (CD : CD3, CD4, CD8, etc..) ou marqueurs de différenciation. Ce tri est effectué en faisant circuler dans l'appareil un liquide de gaine (solution tampon) et l'échantillon. Le passage des cellules les unes les autres, est réalisé par le principe de focalisation hydrodynamique. La progression du liquide contenant les cellules à

travers le cytomètre fait que chaque cellule est excitée par un ou des faisceaux de laser. Chaque cellule émet alors des signaux lumineux qui sont captés par des détecteurs. En général, 3 types de signaux sont détectés :

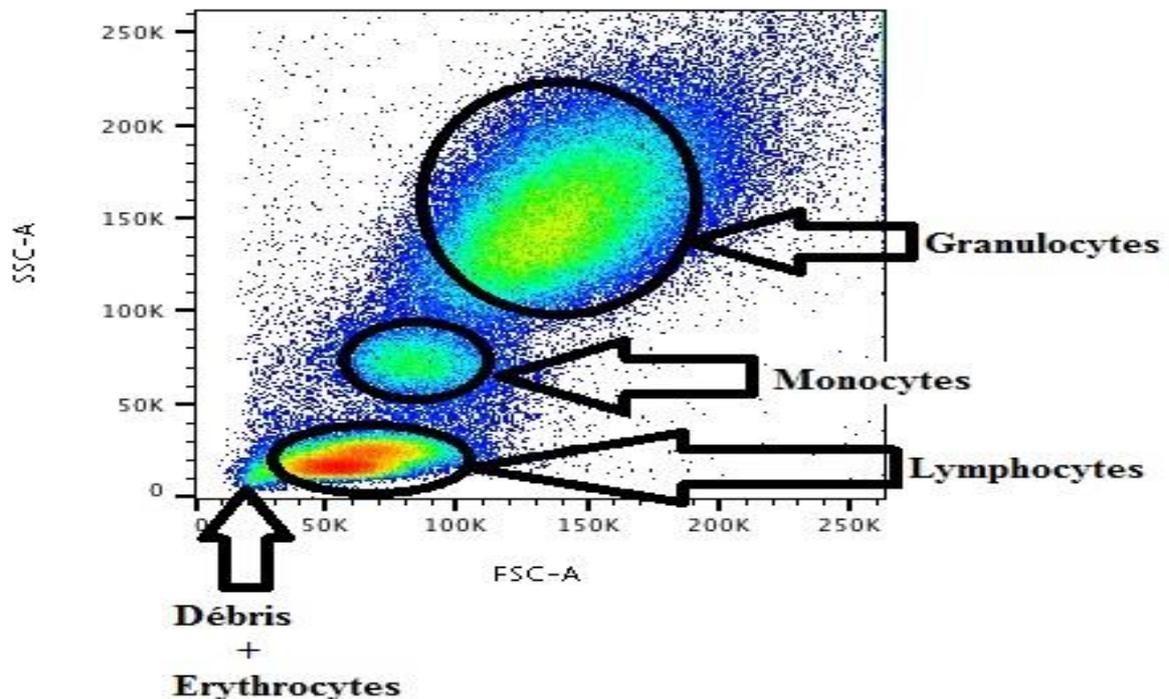
- la lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui informe sur la taille des cellules;
- la lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui donne des spécifications sur la forme, la structure interne et la granularité des particules cellulaires;
- les signaux de fluorescence qui peuvent être de deux sortes: (1) les fluorescences émises par la cellule elle-même (auto fluorescence) et (2) les fluorescences émises par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule en reconnaissant des antigènes particuliers sur la surface de la cellule ou ceux qui sont intracellulairement localisés.

Ces signaux, séparés par des filtres optiques, sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Une fois que les signaux optiques sont convertis de façon proportionnelle en signaux électroniques puis en chiffres, les données sont stockées dans l'ordinateur du cytomètre sous forme de fichier FCS (Flow Cytometry Standard) à l'aide d'un logiciel (FACS DIVA pour le Fortessa et le LSR-II) qui permet aussi d'obtenir des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres identifiés. Le fichier représente une liste de valeurs numériques de chaque paramètre étudié pour chacune des cellules analysées. Les données peuvent être représentées sous forme : (1) d'histogramme mono-paramétrique où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées renseignant sur le nombre de cellules; (2) d'histogrammes bi-paramétriques ou cytogrammes ou « dot plot » en Anglais présentant deux signaux simultanément [3]. La configuration générale d'un cytomètre et le mode d'analyse de chaque particule cellulaire sont représentés dans la Figure 2 ci-dessous. Aussi, le tri cellulaire des leucocytes du sang total selon leur taille et leur granularité est indiqué dans la Figure 3.

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur



**Figure 2: Principe de Fonctionnement de la Cytométrie en Flux** (Source : [17])



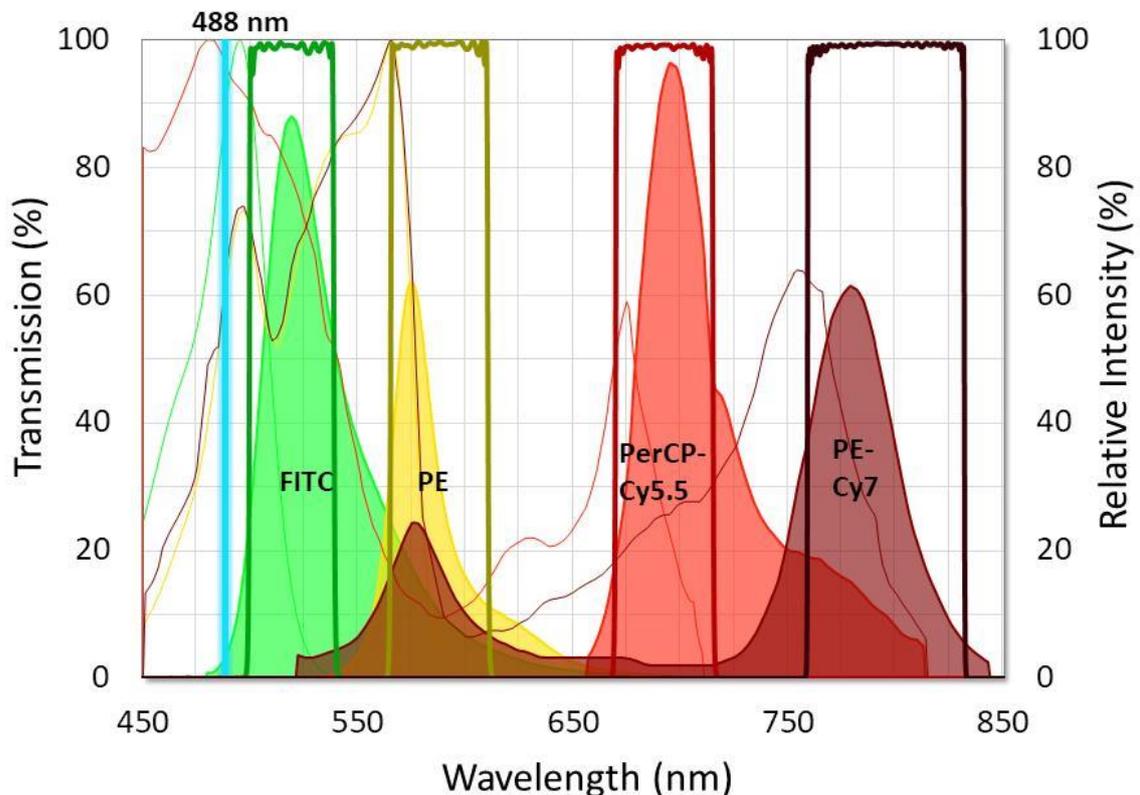
**Figure 3: Identification des leucocytes humains dans le sang total selon la taille et la granularité des cellules par CMF (Source : laboratoire UCRC)**

### 3.1.4.2. Fluorochromes

Les fluorochromes sont des produits chimiques photo-réactifs qui peuvent absorber de l'énergie via l'interaction d'un électron orbital dans la structure atomique de la molécule avec un photon de lumière. En cytométrie en flux, l'énergie lumineuse est généralement dérivée d'un laser monochromatique, qui est utilisé pour produire l'excitation prévisible d'un fluorochrome irradié, suivie de l'émission ultérieure d'un photon lorsque l'électron excité se détend vers son état fondamental d'origine. Les fluorochromes les plus classiques sont généralement excités à 488nm à l'aide du laser appelé Argon [18,19]. Ces fluorochromes sont les suivants :

- l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, fluorescein isothiocyanate en Anglais) est un dérivé de la fluorescéine, utilisé en CMF. Le FITC possède un pic d'excitation et d'émission à 495 nm et 521 nm, respectivement en donnant une coloration verte d'où sa détection au niveau du détecteur FL1;
- la phycoérythrine (PE) est un pigment rouge qui est utilisé comme marqueur fluorescent en CMF. Elle a la propriété d'absorber la lumière verte et bleue (principalement entre 450 et 550 nm). Ce fluorochrome est détecté à l'aide du détecteur FL2;

- le PercP-Cy.5.5 est un fluorochrome en tandem composé de protéine chlorophylle de péricidine (PerCP), qui est excité à 488 nm à l'aide du laser à ion Argon servant de donneur d'énergie. Il est couplé au colorant cyanine (Cy<sup>TM</sup> 5.5), qui agit comme accepteur d'énergie et émet une fluorescence à 695 nm. C'est le fluorochrome typique du détecteur FL3;
- l'allophycocyanine (APC) est un pigment photosynthétique accessoire présent dans les algues bleu-vert. C'est un fluorochrome très brillant détecté au niveau du détecteur FL4 qui convient parfaitement aux applications de la CMF. Il a la même longueur d'émission que le PE-Cy7 ainsi représenté sur la figure ci-dessous.



**Figure 4: Exemple de longueur d'ondes des différents fluorochromes utilisés en CMF**

(Source : [20])

Il y a maintenant près de 30 fluorochromes utilisés, qui peuvent être couplés aux anticorps monoclonaux. Tous les fluorochromes ne peuvent pas être utilisés en même temps, du fait de leur chevauchement spectral. Cependant cela permet de donner un choix plus important au chercheur quand il développe un panel de cytométrie. De plus, les compagnies qui vendent les anticorps monoclonaux les proposent maintenant dans un grand nombre de « couleurs », ce qui évite d'une part d'avoir à conjuguer soi-même les anticorps avec les fluorochromes d'intérêt, et d'autre part cela ajoute une flexibilité supplémentaire, afin d'avoir le meilleur panel possible.

Dernièrement, une nouvelle classe de fluorochromes, les nanocristaux ou QDots, sont apparus et ont contribué à un nouveau bond en avant du nombre de paramètres mesurés. Ces nanocristaux (au nombre de 8, de QD525 à QD800) ont la double particularité d'avoir une large longueur d'onde d'excitation et donc d'être tous excitable par le même laser (le violet) et d'avoir aussi une très petite longueur d'onde d'émission, ce qui minimise les chevauchements de spectre d'émission avec d'autres fluorochromes. Leur intensité de fluorescence est en général très bonne. Ainsi, les QDots sont de parfaits fluorochromes pour l'utilisation dans un panel à plusieurs couleurs, mais il convient de rester prudent car leur utilisation est relativement récente et mérite encore d'être évaluée [1].

#### **3.1.4.3. Lasers**

Aujourd'hui, les lasers sont beaucoup plus petits, ne requièrent plus de système de refroidissement et ils fournissent une excitation stable à diverses longueurs d'onde. Les 3 lasers les plus couramment utilisés de nos jours sont le bleu (488 nm), le violet (405 nm) et le rouge (633 nm). Le laser vert à 532 nm fournit plus de sensibilité, comparé au laser bleu, pour les fluorochromes tel que PE. Le laser UV (350 nm) permet la mesure des colorants Hoechst, pour la mesure de l'ADN et reste en grande partie réservé à cette application. Enfin, récemment le laser jaune (560 nm) et orange (610 nm) viennent combler le « trou » entre le vert (532 nm) et le rouge (633 nm) et permettent de couvrir tout le champ d'excitation de la lumière visible [1].

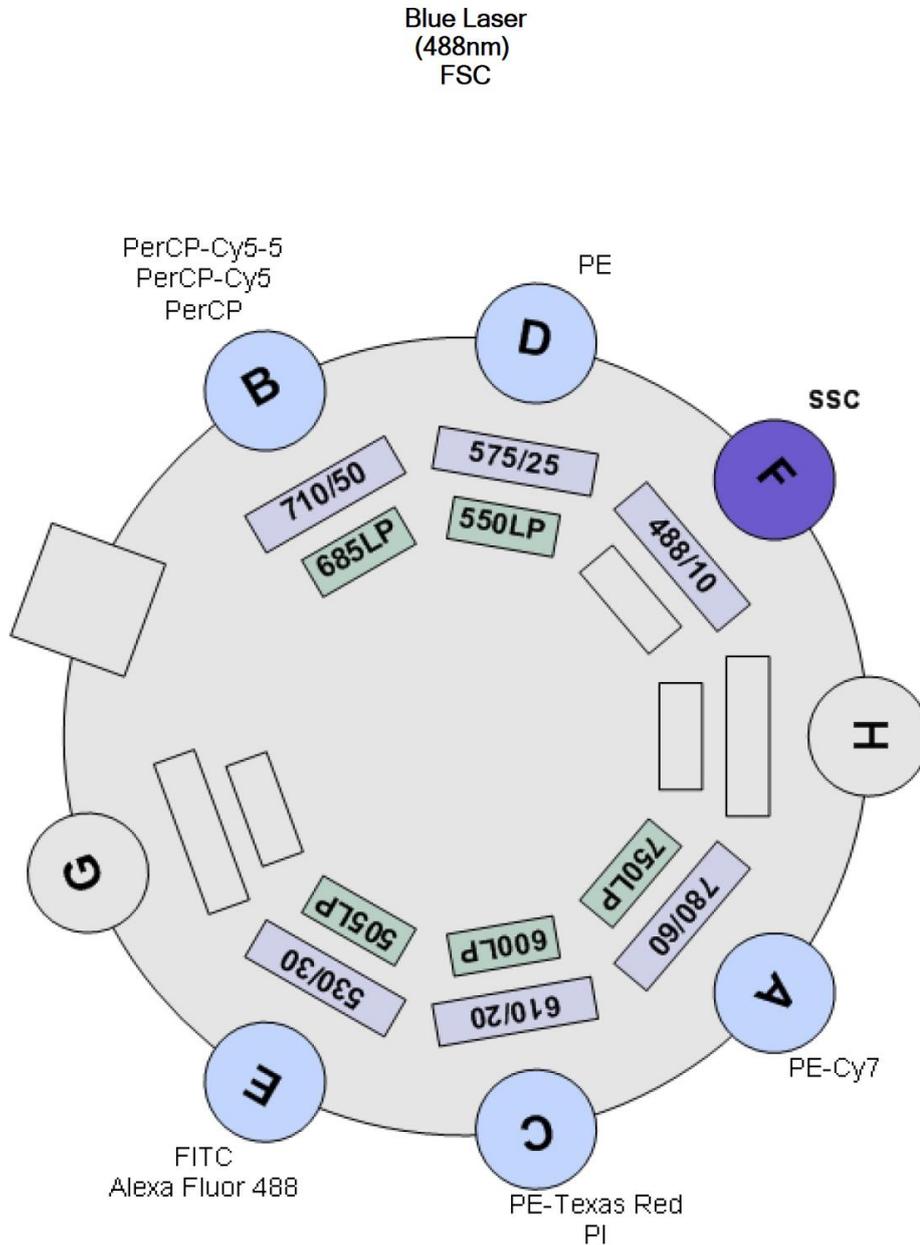
#### **3.1.5. Caractéristiques du Cytomètre BD LSR Fortessa™ X20 de l'UCRC**

Le BD LSR Fortessa™ X-20, communément appelé Fortessa, est l'un des cytomètres de dernière génération de la compagnie Becton Dickinson (BD) et qui fera l'objet de cette thèse. Cet instrument équipé de 5 lasers et de filtres peut simultanément caractériser jusqu'à 20 paramètres dans une seule cellule. L'acquisition et l'analyse des données se font grâce à un logiciel appelé FACS DIVA.

Le Fortessa utilisé pour cette étude au sein du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC est équipé de 4 lasers avec les caractéristiques de configuration suivantes :

- Le laser bleu dont la longueur d'onde est 488 nm (50 nW)
- Le laser rouge dont la longueur d'onde est 640 nm (40 nW)
- Le laser violet dont la longueur d'onde est 405 nm (50 nW)
- Le laser UV dont la longueur d'onde est 355 nm

Il faudra retenir le fait que ce Fortessa n'a que 4 lasers au lieu de 5 est un choix du laboratoire car le besoin n'y était (pour le moment) pas pour le laser orange. Ces quatre lasers et leurs filtres respectifs sont configurés de façon standard comme indiquée au niveau de la Figure 5.



**Figure 5: Exemple de configuration du Laser Bleu du Fortessa au Mali (Source : UCRC)**

### 3.1.6. Avantages de la Cytométrie en flux

La CMF a cinq caractéristiques essentielles : l'analyse quantitative, la sensibilité de détection, la vitesse d'acquisition (rapidité), l'analyse multiparamétrique et le tri cellulaire.

### **3.1.6.1. Analyse quantitative**

Elle est très importante et permet l'analyse d'un très grand nombre de cellules dans un temps relativement court. Cette vitesse de travail permet d'avoir des données bien plus fiables et solides que la microscopie optique, qui ne peut compter que quelques centaines de cellules. Au microscope, il est difficile de classer les cellules en fonction de leur fluorescence. La CMF peut donc classer les cellules en quatre catégories selon leur fluorescence, leur taille (FSC) et leur granularité (SSC) : négative, faible, moyenne et forte sont en général utilisées en microscopie. Par contre, un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier rigoureusement chaque critère optique sur une gamme de 1 à 10 000 unités arbitraires de fluorescence [3,21]. Par exemple, la CMF permet d'avoir quatre populations de cellules en analysant le sang total : érythrocytes ou débris, lymphocytes, monocytes et les granulocytes (**Voir figure 3**).

### **3.1.6.2. Sensibilité de détection**

La CMF permet de discerner le bruit de fond d'une fluorescence réelle. De ce fait, il est possible de différencier une population de cellules lymphoïdes portant environ 1 000 déterminants antigéniques par cellules avec cette méthodologie.

### **3.1.6.3. Vitesse d'acquisition**

La vitesse moyenne d'analyse d'un cytomètre classique est de 1 000 événements par seconde. Il est aussi possible d'atteindre jusqu'à 10 000 événements par seconde de manière fiable en utilisant les instruments modernes tels que le Fortessa.

### **3.1.6.4. Analyse multiparamétrique**

La CMF permet l'analyse de plusieurs paramètres simultanément au niveau des cellules. Actuellement, les meilleurs instruments en cytométrie peuvent voir jusqu'à 18 fluorescences en plus de la taille et la granularité soit un total de 20 paramètres. Aucune autre méthode d'analyse en Biologie n'offre autant d'information sur la cellule et de polyvalence que la CMF [3]. Remarquablement, le dernier instrument de cytomètre mise au point et commercialisé par la compagnie Becton Dickinson (BD) et connu sous le nom de BD FACS Symphony <sup>TM</sup> peut évaluer jusqu'à 50 paramètres par cellule.

### **3.1.6.5. Analyse tri-cellulaire**

La CMF permet d'isoler les cellules avec des taux de pureté de plus de 99% afin de faire un tri cellulaire (aussi connu sous la dénomination de « Sorting » en Anglais). Ces cellules peuvent être cultivées pour gagner en nombre de cellules homogènes à analyser. La plus grande pureté des populations tirées par la CMF ne peut donc être obtenue qu'au prix d'une sérieuse limitation

du nombre de cellules recueillies et d'une surveillance constante lors de la séparation cellulaire [21].

### **3.1.7. Limites de la CMF**

De nos jours, les limites majeures de la CMF sont les suivantes :

- absence d'analyse cinétique portant sur une même cellule car l'acquisition étant effectuée en un temps bien précis;
- difficulté d'analyser ou de quantifier les molécules très faiblement exprimées surtout lorsqu'elles sont intracellulaires;
- besoin d'avoir un nombre conséquent de cellules au départ (quelque centaines de milliers) pour obtenir une analyse fiable;
- variabilité intra et inter laboratoire nécessitant un système de contrôle de qualité interne et externe rigoureux;
- coût élevé des anticorps pour les laboratoires à budget limité.

### **3.1.8. Applications de la CMF**

La CMF couvre un champ d'application très large dans les disciplines très variées comme l'immunologie, l'hématologie, la cancérologie et la génétique autant dans les domaines de la recherche fondamentale que ceux de la recherche clinique et des applications cliniques. En immunologie, la CMF est utilisée pour la détection ou l'identification des sous-types des cellules impliquées dans les réponses immunitaires. Par exemple, on effectue le suivi des patients séropositifs pour le VIH en quantifiant le taux des cellules T CD4+ dans le sang total. De même, l'abondance de polynucléaires basophiles dans le sang périphérique en présence d'un allergène donné est déterminée en utilisant la CMF. De la même façon, la CMF est utilisée en cancérologie pour la détection du contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale ou pour déterminer une prolifération cellulaire inadéquate. En conclusion, les applications de la CMF en biologie et en médecine cliniques sont nombreuses [1,22].

Les plus répandues sont les suivantes:

- le suivi des personnes affectées par une immunodéficience innée ou acquise ;
- le phénotypage des plaquettes;
- le phénotypage du système HLA (Human Leucocytes Antigen en Anglais);
- le diagnostic biologique et le suivi clinique des hémopathies malignes tel que les leucémies aiguës et les hyper-lymphocytoses;
- le test d'activation et de quantification des basophiles en allergologie.

## **3.2. Technique d'Immunophénotypage**

### **3.2.1. Définition et Principe**

L'immunophénotypage ou tri cellulaire est une technique immunologique de CMF qui permet grâce à des anticorps spécifiques marqués par des fluorochromes de faire l'identification et l'énumération des sous-types cellulaires au niveau du sang total ou de cellules congelées ou mise en culture. C'est la technique de base et celle qui est la plus utilisée en CMF.

Cette technique est utilisée en routine au laboratoire grâce à la simplification et à l'amélioration des performances des cytomètres (en particulier les lasers) mais aussi la disponibilité de nombreux anticorps couplés à différents fluorochromes (couramment appelé MultiSet) permettant de faire une analyse multiparamétrique rapide et fiable. En plus, la sophistication des logiciels d'analyse de données telles que FLOWJO a augmenté la capacité de mesurer simultanément de nombreux paramètres cellulaires.

Plusieurs types de prélèvements peuvent être analysés par cette méthodologie. Ces prélèvements sont les suivants [23]:

- le sang total;
- la moelle osseuse;
- le liquide céphalo-rachidien;
- les liquides d'épanchements divers;
- toutes suspensions cellulaires, sous réserve contraintes de conservation des cellules dans ces divers milieux.

Les progrès techniques dans le domaine d'immunophénotypage donc de cytométrie en flux ont eu un impact significatif dans l'énumération des lymphocytes T CD4+. Avant le début de l'épidémie du SIDA, le comptage des cellules T CD4+ était réalisé par microscopie de fluorescence. Grâce à la CMF, on utilise actuellement des anticorps monoclonaux spécifiques pour identifier non seulement les lymphocytes T CD4+ mais aussi celles qui ont des fonctions de cellules auxiliaires et suppresseurs des lymphocytes T CD4 dans le sang total [7].

### **3.2.2. Exemple de populations lymphocytaires par immunophénotypage**

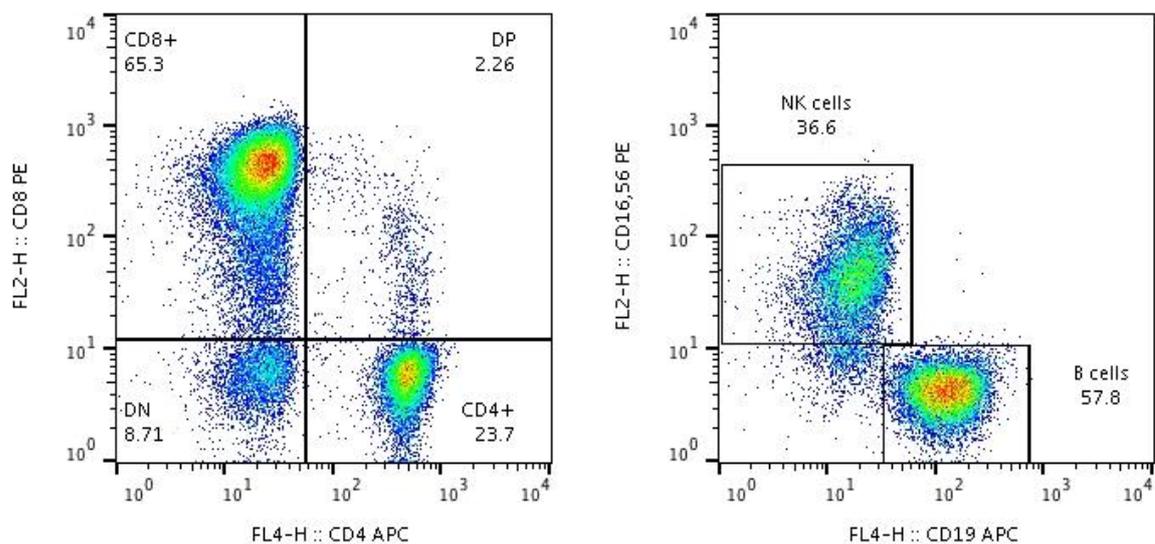
La quantification des sous populations lymphocytaires permet d'explorer à fond l'immunité cellulaire. En général les lymphocytes du sang périphériques identifiés par l'expression du marqueur CD45 sont divisés en 2 grandes sous-populations lymphocytaires : les Lymphocytes T et les Lymphocytes non-T. Ces deux sous-populations sont différenciées par la présence ou l'absence de marqueur CD3.

Parmi les lymphocytes T (CD3+), on peut distinguer quatre sous populations

- CD45+/CD3+/CD4+/CD8-, plus connu sous le nom de lymphocytes T CD4+;
- CD45+/CD3+/CD4-/CD8+, pour les lymphocytes T CD8+;
- CD45+/CD3+/CD4+/CD8+, pour les lymphocytes T doubles positifs;
- CD45+/CD3+/CD4-/CD8-, pour les lymphocytes T immatures ou double négatives.

De même les lymphocytes non T (CD3-) regroupe les cellules B (CD19+) et les cellules Natural Killer communément appelées NK (CD16+CD56+), qui contrairement aux CD3+ sont en général réparties en 2 sous populations :

- CD45+/CD3-/CD19+/CD16-CD56- pour les lymphocytes B
- CD45+/CD3-/CD19-/CD16+CD56+ pour les cellules NK.



**Figure 6: Identification des sous populations lymphocytaires par immunophénotypage**

(Source : laboratoire UCRC)

### 3.3. Contrôle de Qualité

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), le contrôle de qualité peut être comme la partie qui assure la gestion de la qualité des résultats se basant sur les exigences d'Organisation Internationale de la Normalisation (ISO900:2000) [24]. Autrement dit, le contrôle de qualité (CQ) est un ensemble de procédures mises en œuvre pour assurer la fiabilité des résultats jour après jour et sur une longue période de temps [25]. Il s'applique à tous les types de méthodes, soit quantitatifs, semi-quantitatifs ou qualitatifs. Selon le type de la méthode et la catégorie de matériaux de contrôle utilisés, le CQ renseigne sur les indicateurs de performance telle que

l'exactitude, la fidélité et la justesse [25]. De part cette définition, le contrôle de qualité pour les laboratoires de recherche clinique et d'analyses biomédicales est un outil qui permet d'assurer la fiabilité des résultats générés. Le contrôle de qualité a pour but de détecter, d'évaluer et de corriger les erreurs dues à un défaut du système d'analyses, des conditions de l'environnement ou des conditions d'exécution de l'opérateur avant que les résultats du patient ne soient rendus aux cliniciens [24,25].

Les procédures de contrôle de qualité sont exigeant et nécessitent la réalisation de plusieurs étapes primordiales afin d'assurer la confiance dans les résultats transmis. Ces étapes sont indépendantes du type d'analyse réalisé. Spécifiquement, les étapes pour mettre en œuvre et maintenir un programme de contrôle de qualité sont [25]:

- ✓ créer des lignes de conduite et des procédures écrites;
- ✓ inclure les actions correctives;
- ✓ former le personnel du laboratoire;
- ✓ assurer une documentation complète;
- ✓ revoir les données du contrôle qualité.

L'utilisation de la Cytométrie en Flux doit être soumise à un contrôle de qualité afin de garantir la fiabilité et la reproductibilité des analyses. Particulièrement, il est essentiel de faire des contrôles de routine appropriés pour mesurer et de contrôler les chevauchements spectraux des fluorochromes couramment utilisés, les liaisons non spécifiques des réactifs et les variabilités liées aux utilisateurs etc.... Pour ce faire, l'opérateur aura besoin de faire le contrôle de qualité interne et externe pour une énumération précise et de qualité des lymphocytes notamment les cellules T CD4+. Les détails de ces CQ internes et externes sont décrits ci-dessous.

### **3.3.1. Contrôle de Qualité Interne**

Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle de qualité interne dans le but de vérifier que la performance des équipements n'est pas altérée du jour au jour et/ou pour valider la qualification technique de l'opérateur. Il permet de surveiller en continue, tel un film, la qualité des résultats produits en évaluant des indicateurs de performance tel que l'exactitude, la fidélité et la justesse des processus analytiques et en validant la calibration des instruments [25].

Le contrôle de qualité interne des cytomètres se fait en général à l'aide de billes marquées qui sont commercialisées sous différents noms selon les caractéristiques du cytomètre utilisé. Pour le Fortessa, les billes CST « Cytometer Set up Beads » sont recommandées. Ces billes

permettent de vérifier des paramètres du cytomètre afin d'optimiser la performance de l'instrument. Pour ce faire, les billes sont passées sur le cytomètre tous les jours ou avant chaque utilisation de façon à calculer les déviations par rapport à des limites de tolérance déterminées tous les six mois. Cette limite de tolérance, communément appelés « Baseline » est unique pour chaque lot de billes et peut varier selon l'instrument. Un exemple de rapport de contrôle journalier se trouve au niveau de l'annexe de cette thèse.

### **3.3.2. Evaluation Externe de la Qualité**

L'évaluation externe de la qualité est une procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison inter-laboratoires réalisée par un organisateur indépendant respectant substantiellement les exigences de l'Organisation Internationale de la Normalisation (ISO) 43-11 et la réglementation en vigueur à l'aide d'échantillon de contrôles inconnus [9].

Il est aussi connu sous d'autres termes tels que l'Assurance de qualité externe, l'évaluation externe de la qualité, l'essai d'aptitude, le test d'aptitude ou programme d'assurance qualité externe. Quel que soit le terme utilisé, le contrôle de qualité externe permet de faire une évaluation externe, indépendante, ponctuelle ou longitudinale de la qualité des résultats produits. Il permet aussi de vérifier du pré au post-analytique les données générées par un laboratoire ainsi qu'à évaluer et comparer différentes méthodes d'analyses [25]. Il a également un objectif de formation continue et d'éducation. Il améliore la performance des participants et renforce la confiance dans les résultats transmis. Le laboratoire doit aussi participer à des comparaisons inter-laboratoires telles que celles organisées dans le cadre du programme d'évaluation externe de la qualité. L'évaluation externe de la qualité peut aussi servir à démontrer la qualité des résultats à des tiers tels que médecins, collaborateurs, patients, organisme d'agrément, etc.

Pour obtenir une énumération fiable du taux de lymphocytes, spécifiquement les T CD4+, les programmes internationaux d'évaluation externe de la qualité des données d'immunophénotypage ont été mis en place pour les laboratoires. De nos jours, plusieurs programmes de contrôle de qualité internationale existent mais les plus reconnus sont ceux du Royaume-Uni appelé UKNEQAS qui veut dire en Anglais : United Kingdom National External Quality Assesment Scheme ou le Service National d'Evaluation et de Contrôle de Qualité Externe des Royaume-Unis et le College of American Pathologists (CAP) basée aux Etats Unis d'Amérique. Le rôle majeur de ces programmes est d'informer et de conseiller des laboratoires en ce qui concerne la qualité des analyses et l'exécution des tests de performance dans le but

d'une meilleure prise en charge des patients [21]. En effet, la participation aux évaluations externes de la qualité par des programmes agréés tel que l'UKNEQAS ou le CAP est également une condition préalable pour les laboratoires qui cherchent à obtenir une Accréditation aux normes ISO151989 (Organisation Internationale de Normalisation). De ce fait, chaque laboratoire désirant participer au programme doit s'inscrire moyennant un coût annuel par instrument disponible dans le dit laboratoire. Aussi, ce coût de la participation dépend de la localisation du laboratoire car il inclut les frais de transport des échantillons de contrôle à analyser. UKNEQAS est le contrôle de qualité externe utilisé par le laboratoire ImmunoCore de l'UCRC pour les tests d'immunophénotypage réalisés sur les 4 cytomètres disponibles au niveau de ce laboratoire.

Ces cytomètres sont : le Fortessa, le LSR-II, et deux FACS Caliburs.

L'AFREQAS (African Regional External Quality Assessment Scheme) est un organisme Africaine, qui a été mise à œuvre à Johannesburg regroupant une vingtaine de pays et a pour but d'établir un réseau de laboratoires CD4 soutenant les programmes de thérapie antirétrovirale VIH/SIDA et d'améliorer la qualité des tests CD4 régionaux grâce à l'évaluation externe de la qualité [26].

Dans le temps au Mali, l'Institut National de Recherche et de Santé Publique (INRSP) faisait une évaluation externe de qualité des laboratoires mais actuellement, il ne le fait plus.

### **3.3.3. Programme UKNEQAS**

L'UKNEQAS est basé au Royaume-Uni, UKNEQAS est un grand réseau de contrôle de qualité regroupant plus de 1 000 laboratoires dans le monde et cela depuis plus de 50 ans. UKNEQAS a un rôle éducatif et ce rôle éducatif est atteint en soulignant les meilleures pratiques, les erreurs courantes ou les mauvaises pratiques, des conseils à jour et des problèmes de performance cliniquement pertinents [8,9]. Depuis 1969, UKNEQAS fournit des évaluations externes de la qualité aux laboratoires au Royaume-Uni et à l'étranger. Les résultats des programmes de l'UKNEQAS garantissent la solidité, la précision, l'exactitude et par conséquent la valeur clinique des tests cliniques en laboratoire sur des patients et ce quel que soit l'endroit où ils sont effectués. Ces résultats contribuent par ailleurs à l'élaboration de directives nationales et internationales, et constituent le fondement de la génération des résultats de laboratoires cliniques utilisés à des fins de diagnostic et de surveillance des patients tout au long de leur traitement mais aussi pour des fins de recherche clinique.

Sur le plan légal, UKNEQAS est une société à but non lucratif à responsabilité limitée par garantie et un organisme de bienfaisance enregistré au Royaume-Uni. Les programmes de contrôle de qualité dirigés par l'UKNEQAS combinent des programmes qualitatifs, quantitatifs et interprétatifs. Néanmoins, tous ces programmes sont à but non lucratif et sont conçus pour aider à améliorer les participants plutôt que les punir. De plus, le programme UKNEQAS est ouvert à tous types de laboratoires (cliniques, de recherche, industriels) et est accessible dans le monde entier, ce qui en fait probablement l'un des plus grands réseaux d'évaluation de la qualité externe au monde. Le site web officiel de la société est le [www.ukneqas.org.uk](http://www.ukneqas.org.uk).

La mission du programme UKNEQAS est d'assurer l'accès à un niveau de contrôle de qualité externe approprié en fournissant aux participants :

- une évolution des performances intra et inter laboratoires;
- les performances relatives des kits et méthodes disponibles;
- fournir des informations sur les performances relatives des différentes méthodes;
- informer sur les facteurs associés aux bonnes et aux mauvaises performances;

Pour accomplir sa mission, UKNEQAS se concentre sur les tests qui font une différence dans les soins aux patients. Ce programme couvre les tests pour l'ensemble du spectre de maladie, des cancers aux maladies auto-immunes, en passant par la transfusion sanguine et la transplantation, ainsi le suivi des maladies génétiques et l'allergie.

En résumé, l'adhésion au programme UKNEQAS donne aux participants une plus grande confiance dans les résultats qu'ils délivrent aux cliniciens lors des analyses de routine ou pour des protocoles de recherche, et améliore la qualité des soins fournis aux patients.

## **4. METHODOLOGIE**

### **4.1. Cadre et Lieu d'étude**

Notre étude s'est déroulée au Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC), situé au sein de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH), de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) au Mali. Spécifiquement, les analyses étaient effectuées au sein du Laboratoire ImmunoCore, qui est le seul laboratoire au Mali équipé de cytomètres dont un BD LSR Fortessa™ (communément appelé Fortessa), un BD™ LSR-II, et deux BD FACS Calibur™. Remarquablement, ces 4 instruments de cytométrie sont tous inscrits pour l'évaluation de contrôle de qualité externe en immunophénotypage des leucocytes du programme UKNEQAS. Afin d'atteindre nos objectifs, nous nous sommes focalisés sur les cytomètres de dernière génération qui sont disponibles dans notre laboratoire à savoir le Fortessa et le LSR-II.

### **4.2. Type d'échantillons**

Les analyses de laboratoire ont concerné les échantillons de contrôle de qualité en immunophénotypage des leucocytes du programme UKNEQAS, plus précisément les essais: 192001, 192002, 192003, 192004, 192005 et 192006 qui ont commencé de Mai 2019 et ont pris fin en Mars 2020. Par convention, le programme UKNEQAS effectue six envois par an en raison de deux échantillons différents par envoi dont deux aliquots de chaque échantillon par cytomètre à évaluer. Au total 12 échantillons différents, envoyés par série de deux aliquots (24 au total), ont été analysés par notre laboratoire pour chaque instrument à évaluer. Ces échantillons étaient du sang total stabilisé collecté chez des porteurs sains qui ont été testés négatifs pour les pathogènes suivants : le VIH-1, le VIH-2, le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C et celui de la Syphilis. Ces échantillons de sang étaient collectés dans des tubes contenant un anticoagulant suivant une procédure propriétaire de stabilisation pour préserver l'intégrité des sous-populations de lymphocytes circulants [8]. Les valeurs des lymphocytes de chaque échantillon étaient déterminées à l'avance par le personnel du laboratoire du programme UKNEQAS avant l'envoi vers le Mali ou d'autres pays.

### **4.3. Traitement de l'échantillon au laboratoire ImmunoCore de l'UCRC**

Les échantillons ont été traités selon la méthode des « deux plateformes » appelée en Anglais « Dual Platform » qui repose sur le couplage de la Numération Formule Sanguine (NFS) des globules blancs ou leucocytes à l'aide d'un analyseur d'hématologie suivi d'un tri-

cellulaire ou immunophénotypage par la cytométrie en flux. Les données générées à l'aide de la cytométrie étaient analysées en utilisant le logiciel FlowJo™. Les caractéristiques du protocole de préparation, d'acquisition des échantillons et d'analyse des données dans notre laboratoire pour le programme UKNEQAS sont représentés dans le tableau suivant.

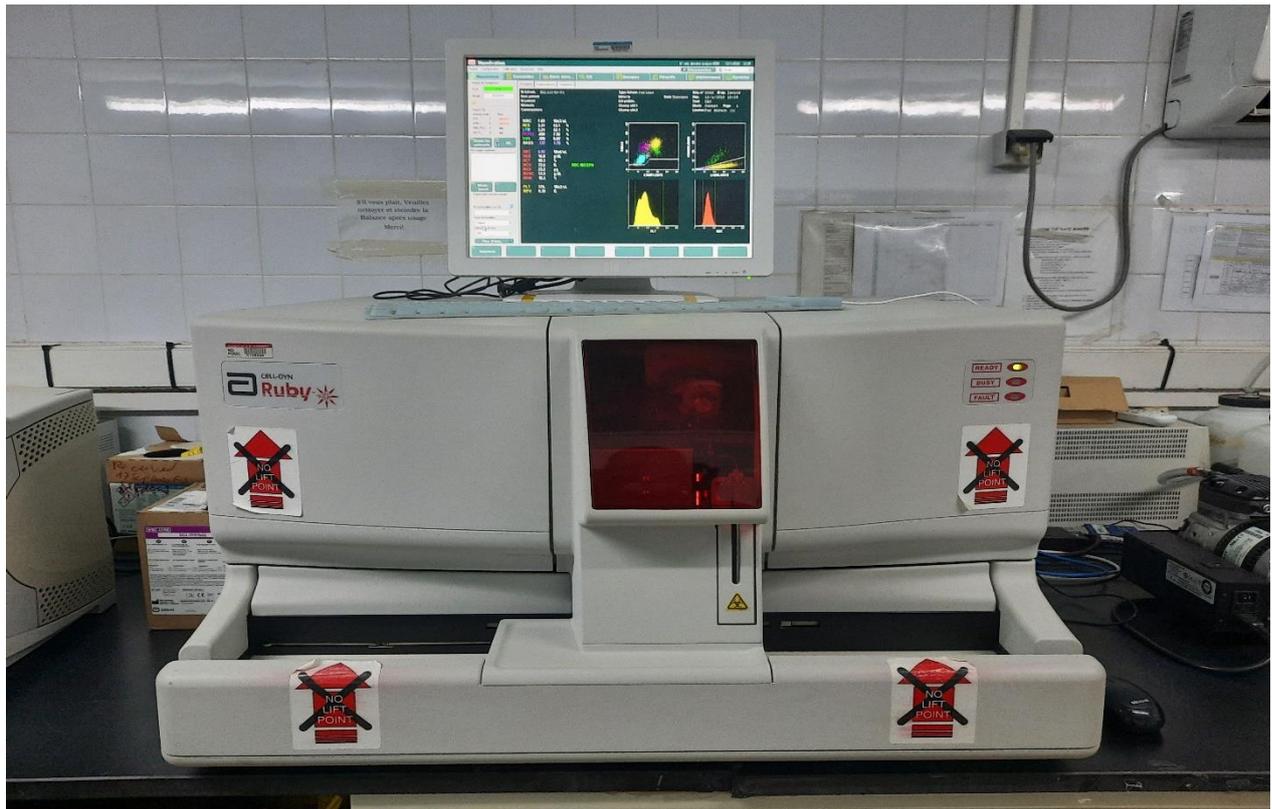
**Tableau I: Méthodes de traitement des échantillons UKNEQAS au laboratoire UCRC**

Caractéristiques	Paramètres
Méthode de préparation des échantillons	Lyse/Lavage
Méthode d'acquisition des échantillons	Deux Plateformes
Méthode d'analyse des échantillons	CD45/SSC

#### 4.4. Numération Formule Sanguine (NFS)

Nous avons utilisé le CELL-DYN Ruby pour déterminer le nombre de leucocytes contenu dans chaque échantillon testé. Le CELL-DYN Ruby est un analyseur d'hématologie automatisé et multiparamétrique conçu pour effectuer une NFS fiable dans les laboratoires cliniques et/ou de recherche de volume moyen. Cet instrument utilise la technologie MAPSS (Multi-Angle Polarized Scatter Separation ou Séparation de Dispersion Polarisée Multi-angle en français) pour effectuer une analyse cellule par cellule à partir d'une seule dilution afin de dénombrer et différencier les leucocytes et fournir les performances nécessaires pour les échantillons à tester [27]. De plus, l'instrument utilise une analyse optique de diffusion de la lumière laser, sans avoir besoin de se reporter à un autre mode de test, pour fournir à la fois le nombre de globules rouges et de plaquettes. Les caractéristiques de cet instrument sont présentes dans le Tableau II.

En effet l'UCRC dispose de deux CELL-DYN Ruby pour assurer le traitement des échantillons de différents protocoles de recherche. La photo de l'appareil, qui se trouve dans notre laboratoire est représentée ci-dessous dans la page suivante. Les échantillons étaient analysés en faisant passer le tube ouvert sous l'aiguille de prélèvement de l'analyseur. La quantité de sang aspirer par l'aiguille passait dans le système fluide pour atteindre le point d'impact au niveau du champ optique. Après, les données étaient visualisées en quelques secondes sur l'ordinateur intégré à l'analyseur. Les résultats étaient ensuite imprimés puis enregistrés sur un fichier Excel. Un exemple de fichier de données obtenues à partir de l'analyseur CELL-DYN Ruby se trouve dans l'annexe de cette thèse.



**Figure 7: Photo du CELL-DYN Ruby de notre laboratoire UCRC**

**Tableau II: Caractéristiques générales du CELL-DYN Ruby\* [27]**

Caractéristiques	Paramètres
Cadence maximale (mode passeur auto)	84 échantillons par heure
Volume d'échantillon	Mode ouvert: 150 µl, Passeur d'échantillon: 230 µl
Réactifs	Quatre (4) réactifs
Plages de mesures analytiques	<b>GB</b> 0,02-246,8 x 10 <sup>3</sup> /µL <b>GR</b> 0,00-7,50 x 10 <sup>6</sup> /µL <b>HGB</b> 0,0-25,0 g/dl <b>HCT</b> 8,3-79,8% <b>VGM</b> 58-139 fl <b>IDR</b> 10,0-29,8% <b>PLT</b> 0,0-3000 x 10 <sup>3</sup> /µL <b>VPM</b> 4,3-17,2 fl <b>RETC</b> 0,2-22,9%
Gestion des données	Système d'exploitation Windows®
Poste de commande	Un seul ordinateur équipé d'un écran tactile couleur, d'un clavier et d'une souris

## 4.5. Immunophénotypage

L'immunophénotypage est la technique de base pour faire le tri-cellulaire dans un échantillon de sang total à l'aide d'anticorps marqués par des fluorochromes, qui émettent des signaux fluorescents lorsqu'ils sont excités par le ou les lasers du cytomètre. Le principe détaillé de cette technique se trouve au niveau du chapitre 3 (Généralités) de cette thèse.

### 4.5.1. Préparation des réactifs

Pour ce protocole nous avons utilisés les solutions suivantes :

- le **BD-Wash** qui est une solution de lavage. Sa composition est la suivante :

- 500 ml de la solution PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) ou Tampon phosphate Saline 1X (Cat#: ABI-102-01 ; ABI American BioInnovation)

- 7,1 ml de la solution BSA (Bovine Saline Albumin) ou Sérum d'Albumine Bovine (Lot#: SLBG6589; SIGMA)

- 0,5 g d'azide de sodium (Cat#: 034K0234 ; SIGMA)

Ce mélange était filtré à l'aide d'un filtre de 500 ml de volume (Cat#: SCGPU05RE, Lot#: MP175008SA Millipore Express). Le BD-Wash préparé était conservé au réfrigérateur pour une durée maximale d'un mois.

- le **FACS-Lyse (10X)** qui est une solution permettant de faire la lyse des globules rouges dans le sang total. Elle était fournie par BD sous une forme concentrée (10X) qui devait être diluée au un dixième (1/10) dans un récipient stérile pour avoir une concentration finale à 1X. Le FACS-Lyse (1X) était conservé à la température ambiante jusqu'à utilisation et pour une durée d'un mois.

- 25 ml de FACS-Lyse (Cat#: 349202 ; BD Biosciences)

- 225 ml d'eau distillée.

- Les **anticorps de marquage**: Pour cette étude nous avons utilisés des anticorps MultiSet qui sont des cocktails composés de 4 anticorps fluorescents. Ces anticorps sont :

- Panel T : CD3/CD8/CD45/CD4 (Cat#: 340499, BD)

- Panel B: CD3/CD45/CD16+CD56/CD19 (Cat#: 340500)

Le premier panel de MultiSet permettait de distinguer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui sont CD3 positifs des autres lymphocytes qui n'expriment pas le CD3. Par contre, le deuxième panel de MultiSet servait à différencier les lymphocytes B et les NK qui sont en général CD3 négatifs. Ces anticorps étaient marqués par des fluorochromes, spécifiquement le FITC, le PE, le PercP Cy5.5, et l'APC. Il faudra savoir que nous avons utilisés des fluorochromes associés à

un anticorps monoclonal anti-CD8 pour les tubes de compensation pour minimiser les chevauchements spectraux lors de l'acquisition, à savoir le CD8-FITC (Cat#: 347313), CD8-PE (Cat#: 340046), CD8-PerCP (Cat#: 341049), et CD8-APC (Cat#: 340659) de la compagnie BD. En effet, il faudra savoir que lorsqu'on utilise plusieurs fluorochromes ensemble, il peut exister des chevauchements entre les spectres d'émissions de ces fluorochromes qui pourront être à l'origine de «faux positifs». Autrement dit, certaines cellules apparaîtront positives pour deux marqueurs alors qu'elles ne sont réellement positives que pour un seul.

En plus des réactifs, les consommables utilisés pour cette procédure étaient les suivants:

- Tubes Polystyrène 12 x 75 mm (5 ml)
- Vortexer Mixer
- Centrifugeuse Eppendorf (Model 5810R)
- Pipette Eppendorf pour Combitips
- Combitips (5 ml, 10 ml, et 25 ml)
- Pipette Aid, Drummond
- Pipettes Sérologiques (5 ml, 10 ml, et 25 ml)
- Gants stériles

#### **4.5.2. Procédures de marquage du sang total**

La procédure décrite en bas a été mise au point au laboratoire pour l'immunophénotypage des lymphocytes, il y a de cela plusieurs années comme indiquée dans la publication de Siddiqui et collaborateurs [28].

- Prendre sept tubes polystyrènes de 5 ml pour chaque échantillon à tester
- Nommer les tubes de la façon suivante:
  - ✓ Tube 1 : Non-marqué
  - ✓ Tube 2 : FTIC,
  - ✓ Tube 3 : PE,
  - ✓ Tube 4 : PERCP,
  - ✓ Tube 5: APC,
  - ✓ Tube 6 : Panel T
  - ✓ Tube 7: Panel B
- Les tubes 1-5 sont les tubes de compensation et les tubes 6-7 sont les tubes d'analyses.

- Ajouter 20 µl d'anticorps (anti-CD8 et MultiSets T et B) dans les tubes indiqués, sauf pour l'APC qui sera utilisé à un volume de seulement 5 µl pour le Tube 5. Le tube non-marqué ne contiendra pas d'anticorps.

- Ajouter 100 µl du sang total dans chaque tube puis vortexer pendant 10 secondes.

- Mettre les tubes en incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 min.

- Ajouter 2 ml de la solution de FAC-Lyse, vortexer pendant 10 secondes, et mettre en incubation à la température ambiante pendant 10 min.

- A la fin de l'incubation, centrifuger à 300g par minutes pendant 5 min.

- Aspirer le surnageant pour conserver le culot au fond du tube.

- Ajouter 2 ml de la solution de lavage (BD-Wash), vortexer pendant 10s et centrifuger à 300g pendant 5 min.

- Aspirer le surnageant et refaire le lavage d'en haut une deuxième fois.

- A la fin du lavage, aspirer le surnageant et ajouter 1 ml de BD-Wash sur le culot cellulaire, vortexer pendant 10 secondes.

- Couvrir les tubes avec du papier aluminium et conserver les tubes dans le réfrigérateur entre 2-8°C jusqu'au moment de l'analyse sur le cytomètre.

#### **4.5.3. Acquisition des échantillons**

L'acquisition a été effectuée sur le Fortessa et le LSR-II à l'aide du logiciel FACS DIVA version 8 selon la procédure standard du fabricant BD. Les cytomètres étaient d'abord soumis à un contrôle de qualité interne en utilisant des billes marquées, notamment les billes marquées CST (Cytometer Set-Up Beads; Cat# 655051, BD) pour vérifier la performance des lasers et du système fluide avant de commencer l'acquisition des échantillons. Cette étape était suivie du passage des tubes de compensation (20 000 événements total par tube) dans le but de soustraire les chevauchements spectraux de façon automatique. Ensuite, 30 000 lymphocytes exprimant le CD3 étaient collectés pour les tubes 6 et 7 (Panel T et B). A la fin de l'acquisition, les fichiers contenant les données (fichiers de type FSC) étaient exportés pour d'ample analyse.

#### **4.5.4. Analyse qualitative des données**

Cette analyse qualitative permet de générer les pourcentages des différentes sous population lymphocytaires dans le sang total. Les données exportées ont été analysées à l'aide du logiciel

FlowJo™ version 10 de la compagnie BD. L'approche d'analyse, qu'on a suivie est la méthode CD45/SSC qui se déroule comme indique le texte en ci-dessous mais aussi sur la Figure 8.

- Exclusion des débris par la sélection des lymphocytes viables.
- Exclusion des « doublets » c'est à dire des cellules collées deux à deux par la sélection des « Singlets ».
- Identification des lymphocytes selon la présence du marqueur CD45 (qui est un marqueur pan-lymphocytaire) et leur faible granularité (SSC faible) par rapport aux autres cellules du sang.
- Séparation des lymphocytes T des non-T par la présence ou l'absence du marqueur CD3.
- Classification des lymphocytes CD3<sup>+</sup> selon la présence ou l'absence des marqueurs CD4 et/ou CD8.
- Classification des lymphocytes CD3<sup>-</sup> selon la présence ou l'absence des marqueurs CD19 pour les lymphocytes B et CD16+CD56 pour les NK.
- Calcul de la fréquence des grands-parents qui permet d'avoir le pourcentage des sous populations CD4, CD8, CD19, et CD16+CD56+ en fonction du nombre de lymphocytes total (CD45) et non en fonction des lymphocytes CD3 directement (qui sont considérées comme les parents direct de ces sous-populations).
- Export des données sur Excel.

#### **4.5.5. Analyse quantitative des données**

L'analyse quantitative consiste à la détermination du taux de lymphocytes. Autrement dit le calcul des valeurs absolues des lymphocytes CD3, CD4, CD8, B, et NK. Ceci a été effectué en multipliant les données de la numération formule sanguine (NFS) à celui des pourcentages obtenus lors de l'analyse qualitative. Pour ce faire nous avons élaboré une feuille de calcul qui se trouve au niveau de l'appendice de ce document. En bas se trouve, l'exemple de calcul standard qu'on a effectué manuellement pour déterminer les valeurs absolues des lymphocytes de l'échantillon 332 de l'essai 192001 sur le Fortessa.

- Taux de leucocytes par NFS =  $2.93 \times 10^3$  cell/ $\mu$ l ce qui correspond à  $2930 \times 10^9$  cell/L
- Pourcentages des lymphocytes obtenus par cytométrie/FlowJo :
  - Lymphocytes (CD45) = 35.65%
  - CD3 = 53.8%
  - CD4 = 4.96%

- CD8 = 43.2%
- CD19 = 20.0%
- CD16+CD56 = 24.8%
- Formule pour calculer du nombre de lymphocytes (CD45) :

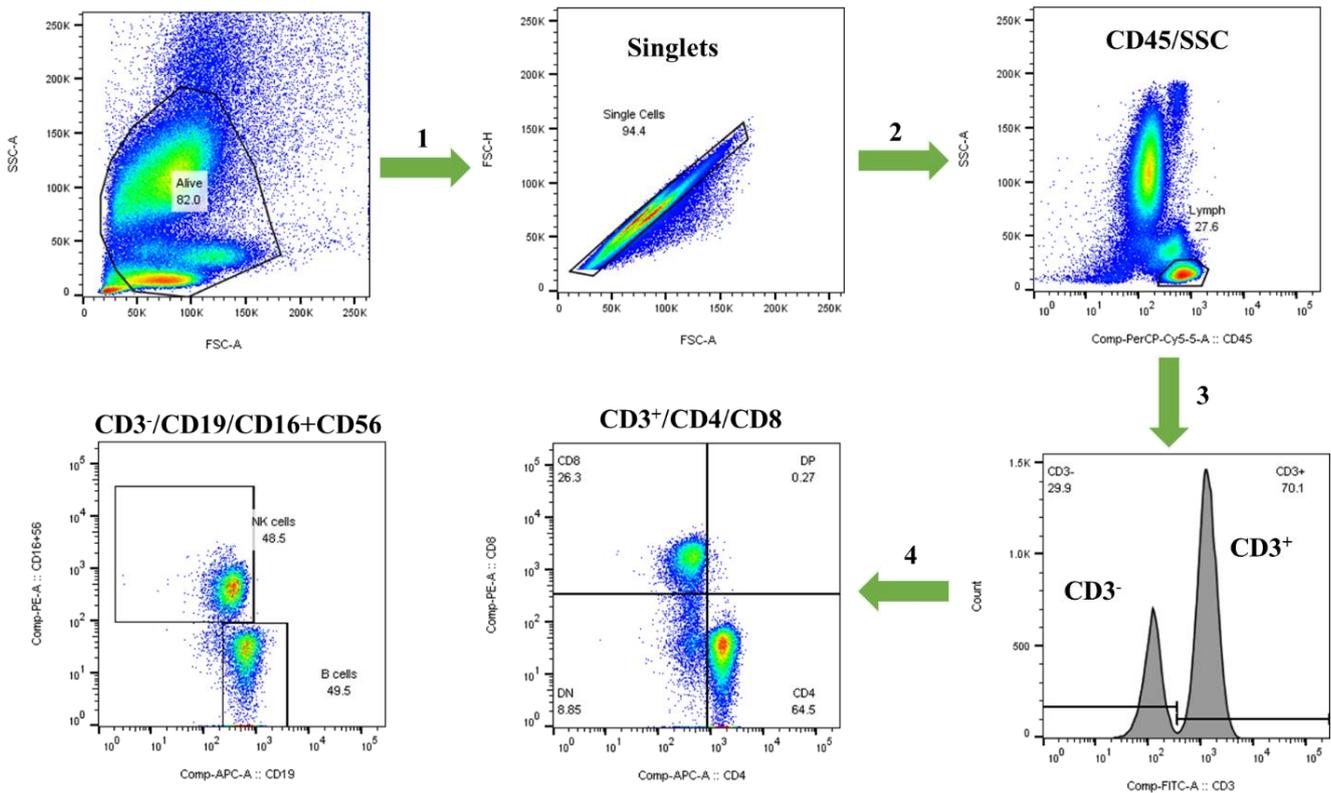
**Taux de leucocytes x Pourcentage de lymphocytes (CD45)**

$$2930 \times 10^9 \text{ cell/L} \times 35.65\% = 1045 \times 10^9 \text{ cell/L}$$

- o Formule pour calculer du nombre des sous-populations lymphocytaires

**Nombre de Lymphocytes x Pourcentage de la sous-population lymphocytaire**

- CD3 :  $1045 \times 10^9 \text{ cell/L} \times 53.8\% = 562 \times 10^9 \text{ cell/L}$
- CD4:  $1045 \times 10^9 \text{ cell/L} \times 4.96\% = 52 \times 10^9 \text{ cell/L}$
- CD8:  $1045 \times 10^9 \text{ cell/L} \times 43.2\% = 451 \times 10^9 \text{ cell/L}$
- CD19:  $1045 \times 10^9 \text{ cell/L} \times 20.0\% = 209 \times 10^9 \text{ cell/L}$
- CD16+CD56:  $1045 \times 10^9 \text{ cell/L} \times 24.8\% = 259 \times 10^9 \text{ cell/L}$



**Figure 8: Méthode CD45/SSC d'analyse des données sur FlowJo (Source : UCRC)**

#### **4.5.6. Soumission et réception des données en ligne**

Les données étaient soumises en ligne avant le délai de soumission en utilisant le lien <http://www.ukneqasli.org/sampleentry/>. Chacun de nos instruments avait un identifiant unique qui lui est propre pour éviter les erreurs entre les laboratoires ou les machines d'un même laboratoire. Après analyses des données de tous les laboratoires participants, la cellule de communication du programme UKNEQAS envoie un email au responsable du laboratoire pour l'informer de la disponibilité des résultats de contrôle de qualité. Un exemple typique de résultats UKNEQAS se trouve dans l'annexe de ce document.

#### **4.5.7. Analyses Statistiques**

Les données exportées sur Excel (Windows) ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism version 7. Les analyses de corrélation ont été effectuées à l'aide du test non-paramétrique de Spearman afin d'obtenir les coefficients de corrélations des pourcentages et des valeurs absolues obtenus sur les deux cytomètres (Fortessa et LSR-II). Les médianes et/ou les moyennes ont été comparées en utilisant le Mann–Whitney *U* test. Aussi, les biais et le niveau d'agrément lors de la comparaison intra et inter-laboratoires ont été déterminées grâce à une analyse de Blant-Altman. Toutes valeurs de probabilité (*p*), calculées en tenant compte des deux côtés de la courbe de distribution des données et étant inférieures ou égales à 0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives.

## 5. RESULTATS

### 5.1. Résultats Globaux

Globalement, les résultats de cette étude peuvent être résumés comme suit :

- Nous avons observé une corrélation positive fortement significative entre les valeurs absolues et les pourcentages des lymphocytes T et non-T générés par les deux différents cytomètres de notre laboratoire;

- Les biais moyens entre les différents instruments de cytométrie (pourcentages et valeurs absolues) n'étaient pas significatifs, ce qui témoigne d'une concordance substantielle entre les données générées par les deux cytomètres (Fortessa et LSR-II). Remarquablement, cet agrément était maintenu de façon longitudinale démontrant ainsi une performance intra-laboratoire satisfaisante;

- Les taux de lymphocytes calculés en utilisant à la fois les fréquences générés par la cytométrie et le taux de cellules blanches obtenues par numération formule sanguine étaient plus variables que les pourcentages obtenus directement par cytométrie seulement;

- Les Z scores obtenus pour les différents marqueurs testés étaient satisfaisants, sauf pour deux échantillons qui étaient potentiellement altérés. L'obtention de Z scores satisfaisant sur 10 des 12 échantillons analysés (soit 83% de succès) suggère que notre laboratoire a une performance inter-laboratoire acceptable;

- La performance du laboratoire n'était pas affectée par le nombre de leucocytes contenu dans l'échantillon, spécifiquement des Z scores similaires ont été obtenues pour des échantillons qui ont des taux de lymphocytes divergeant (faible ou élevé);

- Globalement, le laboratoire UCRC a une performance intra et inter-laboratoire satisfaisante en matière d'énumération des lymphocytes dans le sang total.

## 5.2. Résultats Détaillés

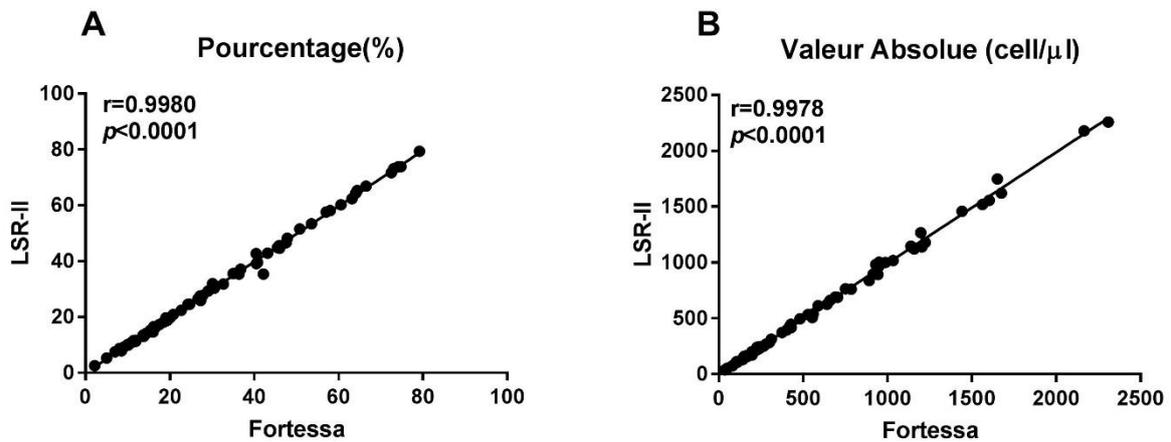
Tableau III: Comptage des leucocytes au cours de l'étude

Date de Mise à Disposition	Identifiant	Comptage Cellulaire
13/05/2019	332	2,75
	333	4,37
30/07/2019	334	4,90
	335	4,29
30/09/2019	336	3,99
	337	<u>2,65</u>
09/12/2019	338	3,75
	339	<u>5,48</u>
06/02/2020	340	4,41
	341	3,02
18/03/2020	342	4,53
	343	4,99
	<b>Moyenne</b>	<b>4,09</b>
	<b>Médiane</b>	<b>4,33</b>

Au total 12 échantillons (332 à 343) ont été traités sur une année pour le contrôle de qualité externe de l'énumération des leucocytes du programme UKNEQAS. Ces échantillons étaient envoyés deux à deux pour un total de 6 envois par an (de mai 2019 à mars 2020).

En utilisant la machine Cell-Dyn Ruby de Abbott, on a pu obtenir les résultats suivants.

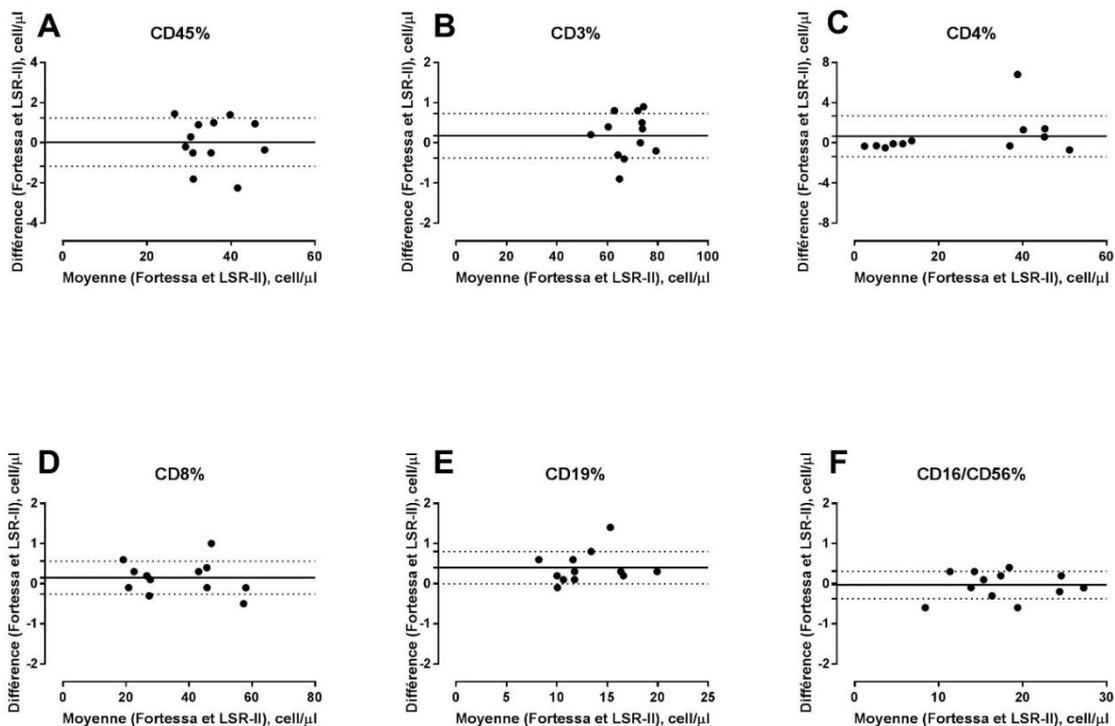
- La moyenne des taux leucocytaires était de  $4,09 \times 10^3$  cell/ $\mu$ l plus ou moins un écart type de 0,90 avec des externes allant de  $2,65 \times 10^3$  cell/ $\mu$ l à  $5,48 \times 10^3$  cell/ $\mu$ l.
- La médiane était similaire à la moyenne avec une valeur de  $4,33 \times 10^3$  cell/ $\mu$ l avec un intervalle interquartile de [3,38-5,48].



**Figure 9: Performance intra-laboratoire des pourcentages et taux de lymphocytes**

Pour examiner la performance intra-laboratoire pour l'énumération des lymphocytes, nous avons combiné toutes les valeurs ou point de données obtenues des 12 échantillons de contrôle de qualité qui ont été analysés sur une année avec des marqueurs phénotypiques classiques, à savoir CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, et le CD56 à l'aide du Fortessa et du LSR-II du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC.

A travers cette approche, nous avons obtenus 72 points de données pour chaque instrument. Ce qui correspond à 6 points de données par échantillon analysé. Les données du Fortessa sont présentées sur l'axe des abscisses et celles du LSR-II sur l'axe des ordonnées de la Figure 9. Nous avons observé une corrélation linéaire positive entre les pourcentages ou fréquences des lymphocytes (Figure 9A) et les valeurs absolues ou taux de lymphocytes (Figure 9B) et cela de manière statistiquement significative ( $p<0.0001$ ). Aucune valeur extrême n'a été observée que ce soit au niveau des pourcentages ou des valeurs absolues de lymphocytes. Les coefficients de corrélation ( $r$ ) ont été obtenus à partir du test de Spearman, qui est un test non paramétrique, et étaient de 0,9980 pour les pourcentages et 0,9978 pour les valeurs absolues.



**Figure 10: Comparaison intra-laboratoire des pourcentages de lymphocytes**

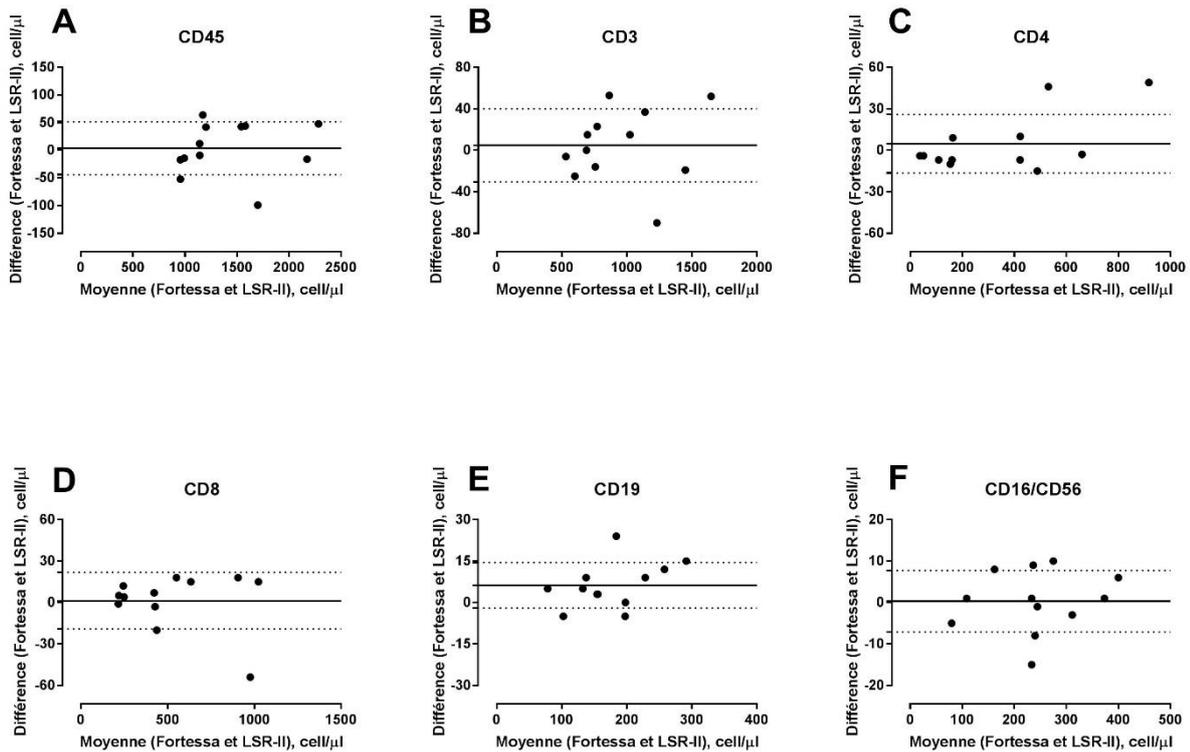
Pour examiner le niveau d’agreement entre les 12 points de données mentionnés plus haut, nous avons utilisé le Graphique de Blant-Altman pour comparer les points de données obtenues des deux cytomètres deux à deux. L’axe des abscisses montre la moyenne obtenue à partir de données générées à l’aide des deux différents cytomètres (Fortessa et LSR-II). L’axe des ordonnées représente la différence entre les points de données. La ligne droite en noir foncé indique le biais moyen ( $\bar{x}$ ) et les lignes pointillées en gris sont +1 et -1 représentant l’écart-type du biais moyen. Les points en dehors de l’intervalle  $\bar{x} \pm 1SD$  étaient considérés comme potentiellement discordants entre les 2 cytomètres (Fortessa et LSR-II).

En effet pour chaque marqueur, la majorité des points des données étaient comprise dans l’intervalle ou limite de confiance. Cependant, quelques points de données (en général pas plus de 3 sur 12 points par marqueur soit ~25%) dépassaient la limite de confiance.

**Tableau IV: Variation des valeurs de pourcentage obtenues entre le Fortessa et le LRII par la méthode de Blant-Altman**

<b>Pourcentage</b>			
<b>Paramètre</b>	<b>Biais Moyen</b>	<b>Ecart-Type</b>	<b>95% Limite de Confiance</b>
<b>CD45</b>	0,03	<u>1,20</u>	[-2,31; 2,38]
<b>CD3</b>	0,18	0,55	[-0,91; 1,27]
<b>CD4</b>	0,67	<u>2,05</u>	[-3,34; 4,67]
<b>CD8</b>	0,15	0,41	[-0,65; 0,95]
<b>CD19</b>	0,40	0,40	[-0,39; 1,20]
<b>CD16/CD56</b>	0,03	0,34	[-0,70; 0,63]

Le tableau IV montre en détail les valeurs des biais moyens, les écart-types et les intervalles de confiance à 95% ( $\bar{x} \pm 1.96SD$ ) pour chaque marqueur. Nous constatons que les biais moyens pour tous marqueurs lymphocytaires utilisés sont négligeables entre le Fortessa et le LSR-II. Cela s'explique par le fait que tous les intervalles de confiance à 95% contiennent 0, démontrant ainsi que les différences entre les pourcentages générés en utilisant les deux machines ne sont pas statistiquement significative. Cependant, les marqueurs qui présentaient le plus de variabilité étaient le CD45 et le CD4.



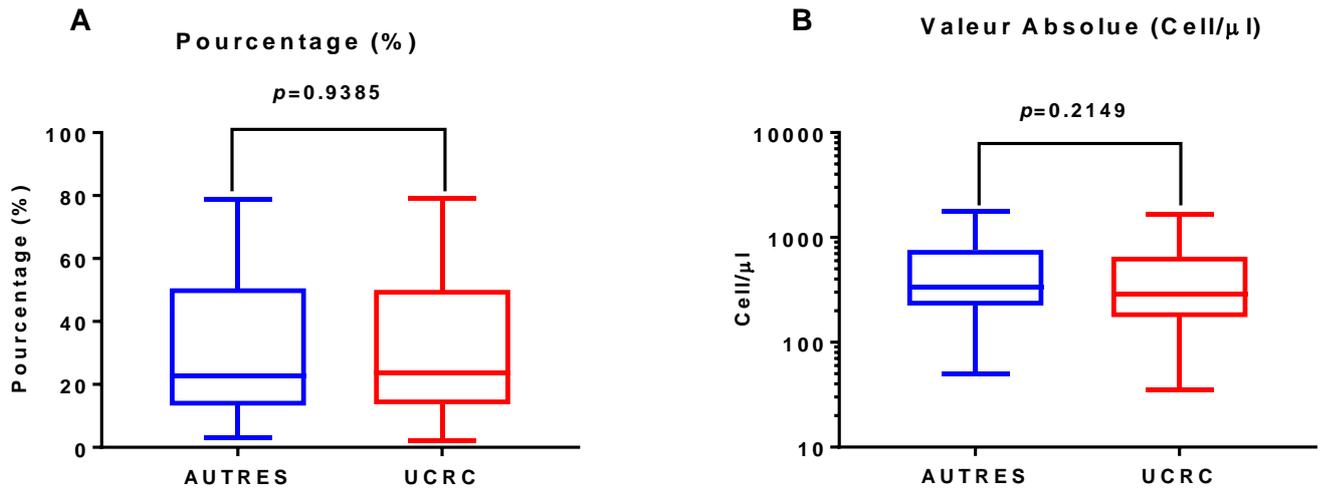
**Figure 11: Comparaison intra-laboratoire des taux de lymphocytes**

Comme pour les pourcentages, la comparaison intra-laboratoire des taux de lymphocytes a montré en moyenne que la plupart des taux de lymphocytes étaient circonscrits entre la limite de confiance ( $\bar{x} \pm 1SD$ ), suggérant un agrément statistiquement significatif entre les deux instruments pour la génération des valeurs absolues.

**Tableau V: Variation des valeurs absolues obtenues entre le Fortessa et le LRII par la méthode de Blant-Altman**

<b>Valeur absolue</b>			
<b>Paramètre</b>	<b>Biais Moyen</b>	<b>Ecart-Type</b>	<b>95% Limite de Confiance</b>
<b>CD45</b>	3,83	47,90	[-90,06; 97,73]
<b>CD3</b>	4,92	35,35	[-64,38; -74,2]
<b>CD4</b>	4,75	21,19	[-36,79; -46,29]
<b>CD8</b>	1,33	20,53	[-38,91; -41,57]
<b>CD19</b>	6,25	8,29	[-10,00; 22,90]
<b>CD16/CD56</b>	0,33	7,42	[-14,22; 14,89]

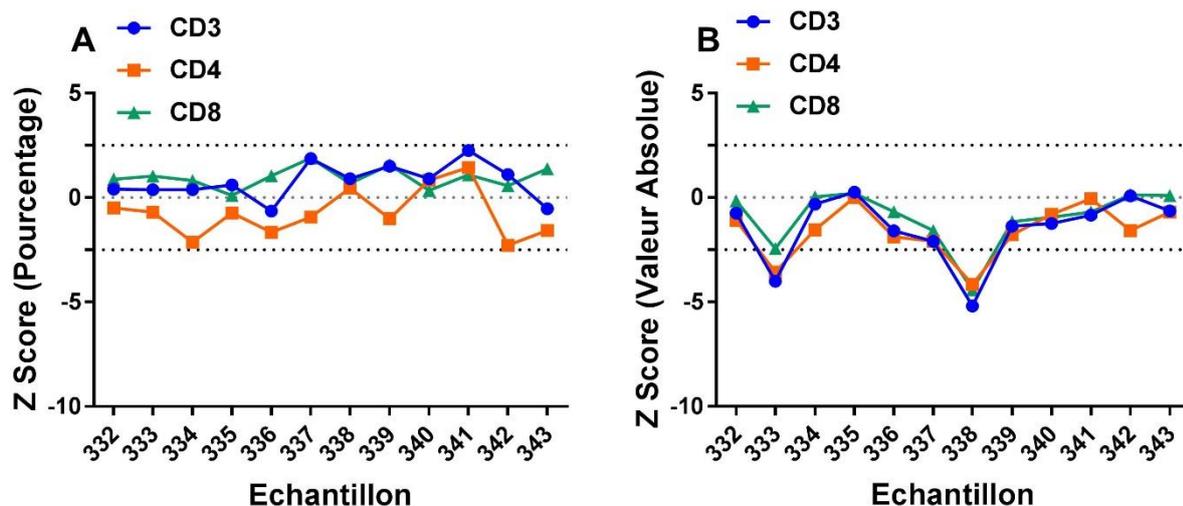
Comme pour le Tableau IV, ce tableau décrit les biais moyens, leur écart-types, et les 95% d'intervalles de confiance des valeurs absolues obtenues au cours de l'étude. Contrairement aux pourcentages, les biais moyens et leurs écart-types étaient plus élevés pour les valeurs absolues ce qui suggère une plus grande variabilité des taux de lymphocytes calculés comparer aux pourcentages. Cependant, la limite de confiance contenait 0 pour chaque marqueur utilisé, ce qui indique que les biais moyens calculés ne sont pas statistiquement significatifs. Il existe donc une bonne concordance entre les valeurs générées à partir du Fortessa et celles obtenues en utilisant le LSR-II.



**Figure 12: Performance inter-laboratoire globale**

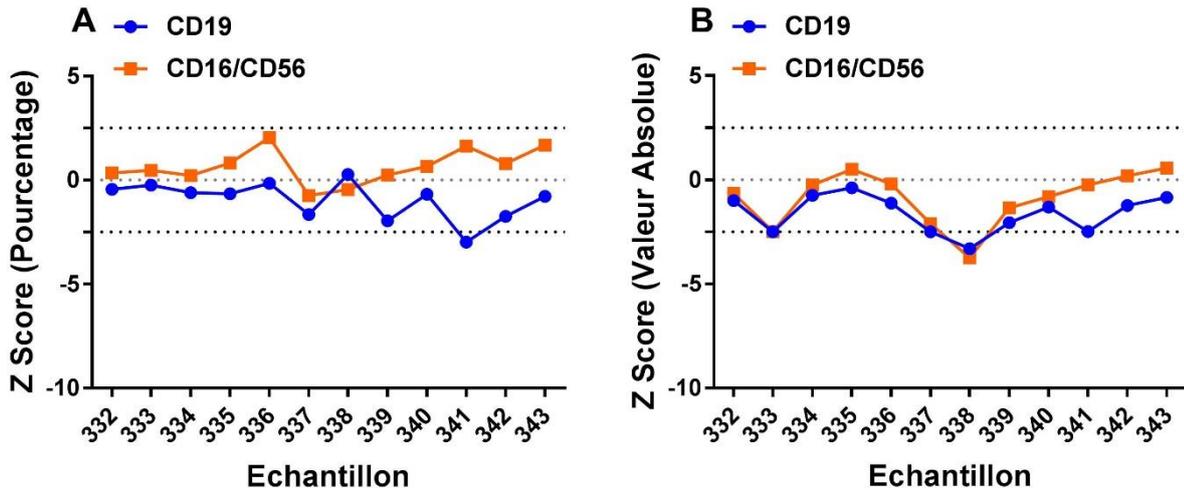
Pour examiner la performance inter-laboratoire globale de notre laboratoire par rapport aux autres laboratoires qui participent au programme UKNEQAS, nous avons utilisé une méthode analytique se basant sur les box plots pour déterminer si la médiane de toutes les données obtenues sur le Fortessa (72 points de donnée au total sur les 12 échantillons traités) était similaire à celle obtenue à partir des moyennes des autres laboratoires. Cette analyse a été faite non seulement pour les pourcentages (Figure 12A) mais aussi pour les valeurs absolues (Figure 12B).

Ensuite, nous avons utilisé le Test de Mann-Whitney, qui est un test non-paramétrique pour voir s'il y a une différence statistiquement significative entre les médianes (UCRC vers Autres laboratoires) pour les pourcentages et aussi les valeurs absolues. Comme indiqué sur les Figures A et B, les valeurs  $p$  sont tous les deux supérieures au seuil ( $p>0.05$ ) indiquant que les médianes ne sont pas statistiquement différentes donc une performance inter-laboratoire satisfaisante du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC.



**Figure 13: Performance inter-laboratoire des taux de lymphocytes T**

Dans l'objectif d'évaluer la performance de notre laboratoire pour la quantification des lymphocytes T (CD3, CD4, et CD8,) nous avons utilisé les Z scores des pourcentages (Figure 13A) et des valeurs absolues (Figure 13B) de lymphocytes T obtenues pour chaque échantillon traité (12 au total). L'axe des abscisses indique les différents échantillons analysés au laboratoire à l'aide du Fortessa. L'axe des ordonnées représente les valeurs de Z scores obtenus en comparant nos données à celui des autres laboratoires (~878 participants) enrôlés dans le programme UKQENAS à travers le monde. Nous constatons que tous les Z scores des pourcentages étaient satisfaisants (valeurs entre -2,5 et 2,5 comme indiquées par les deux lignes en pointillées) pour tous les marqueurs phénotypiques utilisés et pour chaque échantillon analysés. Cependant deux échantillons 333 et 338 avaient des Z scores pour les valeurs absolues qui n'étaient pas satisfaisants. La Figure 13B montre clairement la déviation de ces 2 échantillons soit ~ 17%. La raison de ces 2 déviations sera expliquée dans le chapitre Discussion. Ces résultats obtenus suggèrent qu'en moyenne notre laboratoire est capable de générer des données fiables.



**Figure 14: Performance inter-laboratoire des taux de lymphocytes non-T**

Nous avons adopté la même méthodologie pour évaluer la performance du laboratoire lors de la génération des pourcentages et les valeurs absolues des lymphocytes non T (c'est-à-dire les lymphocytes B (CD19+) et les NK (CD16+CD56+). Les Z scores obtenus étaient majoritairement satisfaisants. Sauf pour deux échantillons testés 338 et 341 dont un était (338) aussi non satisfaisant lors de l'énumération des lymphocytes T. Spécifiquement, le 341 pour le pourcentage des cellules CD19+ et le 338 pour les valeurs absolues de lymphocytes. L'obtention de Z scores non-satisfaisants pour les deux paramètres du 338 pour tous les lymphocytes T et non-T, nous a conduit à mener d'autres investigations qui seront présentées dans le chapitre Discussions.

Ces résultats indiquent une performance adéquate de notre laboratoire lorsqu'elle est comparée à des centaines de laboratoires à travers le monde.

**Tableau VI: Analyse des actions correctives pour les pourcentages**

Paramètre	333		341	
	Z Score avant	Z Score après	Z Score avant	Z Score après
CD3	0.38	-0.3	-1.16	1.30
CD4	-0.69	-1.7	-2.42	1.2
CD8	1.03	-1.23	1.29	1.82
CD19	-0.24	-1.3	-1.01	-2.44
CD16/CD56	0.47	2.5	1.95	2.5

Les actions correctives sont définies selon l'ISO 15189 version 2012 comme étant des procédures de laboratoire ayant pour objectifs d'éliminer la ou les causes réelles des non-conformités avec les valeurs attendues [29]. Une procédure menée pour éliminer la cause profonde d'un résultat non satisfaisant est considérée comme une action corrective. De ce fait les échantillons qui ont dévié de l'intervalle de confiance (-2,5 ; +2,5) lors de la première analyse ont été repris sur un nouveau aliquot envoyé par le réseau UKNEQAS. Pour cette reprise nous avons calculé les Z scores manuellement en utilisant la formule ci-dessous conformément au protocole d'analyse manuelle des données établies par UKNEQAS.

La formule générale pour le calcul du Z score est :  $Z = (x - X)/SD$

x : est la valeur obtenue par le laboratoire

X : est la moyenne robuste de tous les laboratoires participants et calculé par UKNEQAS

SD : est l'écart-type

Les résultats de deux échantillons, notamment le 333 et le 341 sont présentés dans le tableau VI comme exemple. Nous avons observé que les Z scores avant ou après l'action corrective étaient tous dans les normes satisfaisantes entre (-2,5 et +2,5). Les Z scores des pourcentages n'ont pas été affectés, indiquant que les déviations observées lors du premier passage des échantillons ne sont peut-être pas liées à une erreur technique causée par l'opérateur ou un défaut de performance du cytomètre utilisé.

**Tableau VII: Analyse des actions correctives pour les valeurs absolues**

Paramètre	333		341	
	Z Score avant	Z Score après	Z Score avant	Z Score après
CD3	-4.01	-2.2	-0.94	-1.33
CD4	-3.57	-2.2	-1.09	-0.71
CD8	-2.44	-0.9	-0.13	-1.1
CD19	-2.5	-2.02	-1.09	-2.42
CD16/CD56	-2.48	-0.21	0.55	-0.35

La même procédure décrite en dessous du tableau précédant a été adoptée pour l'obtention de Z scores à partir des valeurs absolues obtenues des nouveaux aliquots d'échantillons. Nous avons constaté que les Z scores des deux échantillons (333 et 341) ont connu une forte diminution après la reprise. Tous les Z scores des reprises étaient inférieurs à  $\pm 2,5$ . Ceci suggère une altération de l'échantillon lors du transport des échantillons de sang du Royaume-Uni vers le Mali ayant comme conséquences une déviation des données de numération formule sanguine obtenues à partir de l'analyseur d'hématologie.

## 6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Le contrôle de qualité externe est un moyen efficace pour repérer et solutionner les problèmes et vérifier les performances du laboratoire par rapport à d'autres laboratoires en utilisant des agences externes indépendantes qui ont une expertise reconnue à la matière. Les programmes de contrôle de qualité externes sont multiples et indispensables pour s'assurer de la validité des résultats de laboratoires qui doivent être utilisés pour le suivi clinique des patients et pour l'évaluation des médicaments et vaccins expérimentaux.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons examiné les données obtenues de mai 2019 à mars 2020 à partir du programme de contrôle de qualité externe du programme UKNEQAS pour l'évaluation externe de la qualité de l'énumération des lymphocytes au niveau du laboratoire d'ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) au Mali. La dite thèse avait pour objectif d'analyser la performance intra et inter laboratoire pour l'énumération fiable des lymphocytes T et non T par la cytométrie en flux au Mali.

Au cours de cette étude, nous avons obtenu une performance intra-laboratoire significativement acceptable du faite d'une forte corrélation ( $>0.9$  pour les pourcentages et les valeurs absolues) et un biais moyen négligeable entre les résultats générés à partir du Fortessa et ceux obtenus avec le LSR-II. Ceci suggère que ces deux instruments sont interchangeables au laboratoire au besoin. En ce qui concerne, la performance inter-laboratoire, qui a été effectué en comparant les résultats de notre laboratoire à la moyenne des autres laboratoires participants au programme UKNEQAS, était aussi majoritairement satisfaisante.

La forte corrélation entre les valeurs dérivées du Fortessa et celles obtenues à partir du LSR-II est concordant avec les résultats obtenus par Ceulemans et collaborateurs en 2019 [5] qui ont aussi trouvé un coefficient de corrélation  $r >0.9$  lors de l'évaluation de la performance de l'automate « Muse Auto CD4 » comparé à celle du FACS Calibur pour l'énumération des cellules T CD4+ chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en Belgique. De même, Pattanapanyasat K et collaborateurs en 2005 [4] ont aussi également trouvé une corrélation similaire pour les pourcentages et les valeurs absolues des cellules T CD4 générés pour comparer la performance du TrueCount au FACS Count System en Thaïlande.

Dans cette étude, l'analyse de Bland-Altman a montré que le biais moyen pour tous les marqueurs lymphocytaires utilisés est minime ou négligeable entre le Fortessa et le LSR II. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en Thaïlande en 2018 par Noulsri et collègues [30] lors de la comparaison de la technique avec une seule plateforme à celle de la double plateforme (comme la nôtre). Précisément, ils ont obtenu un biais moyen de -18,07 (+38,61; -74,76) et -12,78 (+43,48; -69,06) pour les pourcentages et les valeurs absolues, respectivement. Au contraire, nos résultats sont différents de ceux publiés par Sagnia et collaborateurs [31] au Cameroun en 2016 dans l'étude de la performance du BD FACS Presto. En effet, ces investigateurs ont trouvé des biais moyens significatives entre le BD-FACS Presto et le PIMA = -126 522 (-161221 à -91822) mais aussi entre le BD-FACS Presto et le FACS Count = -38 708 (-58 935 à -18 482) contrairement au FACS Presto et le FACS Calibur = 0,791 (-11,908 à 13,491) qui n'était pas significatif. La différence entre notre étude et la dernière étude pourrait s'expliquer par le fait que le Fortessa est techniquement plus proche du LSR-II que des autres cytomètres mais aussi de la rigueur et l'uniformité de notre méthode d'analyse sur FLOWJo quel que soit le type d'instrument utilisé. Il est aussi important de noter que notre analyseur Cell-Dyn Ruby, qui est l'instrument utilisé pour la numération formule sanguine, a une performance attestée par le College of American Pathologists (CAP) contrairement à beaucoup de laboratoires en Afrique.

Une plus grande variabilité des valeurs absolues de lymphocytes comparés aux pourcentages des lymphocytes peut s'expliquer par la méthode à deux plateformes utilisées (Numération Formule Sanguine couplée à l'immunophénotypage). En effet, cette variabilité des valeurs absolues n'est pas unique à notre laboratoire car rapportée par d'autres groupes de recherche. Par exemple, la variabilité intra-laboratoire calculée en utilisant le coefficient de variation (%CV) pour les valeurs absolues de CD4 était de 10.9% et de seulement 7.3% pour les pourcentages de CD4 lors d'une étude consacrée à l'évaluation de la performance des laboratoires Africains participants au programme AFREQAS (African Regional External Quality Assessment Scheme) [26]. Les résultats du programme AFREQAS démontrent encore une fois la qualité des résultats du Laboratoire ImmunoCore de l'UCRC.

Les performances inter-laboratoire des taux de lymphocytes T et non-T étaient satisfaisantes en se basant sur les Z scores des pourcentages des douze échantillons testés dans l'année. Cependant les valeurs absolues de trois échantillons (333 et 338 pour les lymphocytes T et 338 et 341 pour les lymphocytes non-T) n'étaient pas dans l'intervalle de satisfaction pour leurs Z

scores (-2,5 et +2,5). Cette déviation pourrait être due à une altération de l'échantillon due à une mauvaise conservation des échantillons lors du transport du Royaume Uni vers le Mali. Nous avons demandé à UKNEQAS de nous renvoyer à nouveau les mêmes échantillons pour reprendre le test. Cette reprise a donné des Z scores satisfaisants, démontrant ainsi notre hypothèse de la non-intégrité de ces échantillons. Plusieurs variables pourraient être responsables de l'altération de nos échantillons mais nous pensons que la cause majeure est la variation de température au cours du transport. En effet, il a été démontré que la température est un variable important pouvant influencer la qualité des données de cytométrie [32]. Une température trop élevée qui dépasse 15-25°C peut augmenter la vitesse de dégradation des échantillons, compromettant ainsi la qualité des données. Hors, les échantillons UKNEQAS sont généralement envoyés à la température ambiante et peuvent faire plus de 24 heures à l'aéroport avant d'être livrés au laboratoire ImmunoCore. Selon les données de la banque mondiale, la température ambiante moyenne au Mali dépasse les 30°C [33].

Ayant cette information utile, on a suggéré à UKNEQAS d'ajouter un thermomètre digital aussi connu sous le nom de « TempTale Temperature Logger » dans le colis pour nous permettre de suivre les variations de température de l'envoi jusqu'à la réception des échantillons à l'aide d'un logiciel intégré dans le thermomètre. Les investigations sont en cours pour déterminer s'il faut envoyer les échantillons dans des récipients contenant un liquide de réfrigération permettant de contrôler la température lors du transport.

### **Limites de l'étude**

Notre étude présente deux limites majeures qu'il faudra discuter. Notre comparaison s'est focalisée sur du sang stabilisé donc nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la performance puisse varier en investiguant du sang frais ou sur du sang prélevé chez les sujets immunodéprimés tels que les personnes infectées par le virus du SIDA. De même, les résultats présentés dans cette thèse ont été effectués en majorité par une seule personne. De ce fait, il est possible que ces résultats puissent changer avec un autre opérateur car à ce jour nous n'avons pas évalué l'effet des variations inter-opérateurs sur les résultats générés. Nonobstant, nos données indiquent une performance adéquate de notre laboratoire en matière de cytométrie lorsqu'elle est comparée à des centaines de laboratoires à travers le monde.

## **7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **7.1. CONCLUSION**

En conclusion, notre analyse a montré une performance intra et inter-laboratoires satisfaisante pour le laboratoire ImmunoCore de l'UCRC. En moyenne, 83% des échantillons testés ont eu un Z score satisfaisant entre -2,5 à +2,5. Nos investigations ont montré que les échantillons qui n'ont pas pu passer au premier test ont été altérés au cours du transport vers le laboratoire, la reprise de l'analyse de nouveaux échantillons envoyés par UKNEQAS, nous a permis d'avoir des résultats satisfaisants. Nous pouvons donc conclure que le laboratoire ImmunoCore de l'UCRC possède des instruments de cytométrie bien maintenus et calibrés ainsi qu'un personnel qualifié pour faire l'énumération fiables des lymphocytes.

## 7.2. RECOMMANDATIONS

### ❖ **Au Ministère de la Santé**

- Mettre en place un programme national d'évaluation externe de la qualité des différents laboratoires au Mali;
- Allouer un budget de fonctionnement au programme d'évaluation externe de la qualité;
- Faire en sorte que tous les laboratoires de Biologie se soumettent à un contrôle de qualité inter-laboratoire;
- Aider financièrement les laboratoires qui n'auront pas de moyens suffisants pour s'inscrire à un système d'évaluation externe de la qualité internationale.

### ❖ **A l'endroit du programme UKNEQAS**

- Améliorer le circuit de distribution des échantillons, en réalisant le suivi de la température grâce à des Thermomètres digitales lors de l'envoi;
- Faire des visites de site pour mieux s'imprégner des réalités sur le terrain surtout pour les laboratoires basés en Afrique;
- Proposer des formations de renforcement des capacités pour le personnel des laboratoires en difficultés.

### ❖ **Au laboratoire ImmunoCore de l'UCRC**

- Mettre en place un système rapide de dédouanement des échantillons dès l'arrivée à l'aéroport Bamako-Senou au Mali afin de veiller à ce que les échantillons soient bien conservés au niveau de la douane des frontières jusqu'à l'acheminement au laboratoire;
- Offrir au personnel UCRC des possibilités de formation courte durée chez BD en Belgique pour faire des cours de mise à niveau et d'apprentissage de nouvelles techniques et instruments de cytométrie en flux;
- Intégrer le programme « African Regional External Quality Assessment Scheme (AFREQAS) » qui est un réseau de laboratoires africains spécialisés dans l'énumération des cellules T CD4+ et qui soutiennent les programmes de traitement antirétroviral contre le VIH/SIDA. L'objectif d'AFREQAS est d'améliorer la qualité des tests CD4 régionaux grâce à une évaluation externe de la qualité des tests effectués dans les laboratoires partenaires, promouvoir l'échange d'expérience, proposer des mesures correctives et une formation technique adaptée au besoin [26];

- Poursuive cette étude en utilisant du sang frais prélevés à la fois chez des volontaires sains mais aussi chez les volontaires malades surtout ceux qui ont une immunodéficience acquise tel que les personnes vivant avec le VIH;

- Evaluer l'effet des différences intra et inter-opérateurs sur la qualité des résultats générés surtout chez les sujets immunodéprimés.

#### ❖ **A la Faculté de Pharmacie**

- Assurer que tous les étudiants en Pharmacie intéressés à faire une carrière en Biologie puissent avoir l'opportunité de faire des travaux pratiques sur la cytométrie en flux avant la fin de leur cycle académique;

- Doter le laboratoire ImmunoCore de l'UCRC, qui est le seul laboratoire équipé en cytomètre de dernières générations au Mali, de réactifs adéquats et suffisants pour l'immunophénotypage afin d'assurer la formation des étudiants stagiaires;

- Promouvoir la collaboration entre les différents laboratoires locaux participant à un contrôle de qualité externe.

## 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Autissier P. Phénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux multiparamétrique : un outil indispensable dans l'immunopathologie du Sida [Thèse de Doctorat]. [France]: Conservatoire National des Arts et Métiers - CNAM; 2010.
2. F. Dignat-George, N. Bardin, C. Brunet. Lymphocyte et réponse immunitaire. In Sébahoun G. Hématologie clinique et biologique. 2<sup>ème</sup> ed. Paris:Arnette; 2006, 255-63.
3. Orabona M. Intérêts diagnostiques et pronostiques d'un immunophénotypage leucocytaire étendu par cytométrie en flux à la phase aiguë de la septicémie : étude septiflux [Thèse en Médecine]. [France]: Université de Limoges Faculté de Médecine; 2011.
4. Pattanapanyasat K, Lerdwana S, Noulisri E et al. Evaluation of a new single-parameter volumetric flow cytometer (CyFlow(green)) for enumeration of absolute CD4+ T lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1-infected Thai patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. déc 2005;12(12):1416-24.
5. Ceulemans A, Bouzahzah C, Prat I, et al. CD4-T cell enumeration in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: A laboratory performance evaluation of Muse Auto CD4/CD4% system by World Health Organization prequalification of in vitro diagnostics. *PloS One*. 23 janv 2019; 14 (1):e0209677.
6. Peeling RW, Sollis KA, Glover S et al. CD4 enumeration technologies: a systematic review of test performance for determining eligibility for antiretroviral therapy. *PloS One*. 19 mars 2015; 10(3):e0115019.
7. Kestens L, Mandy F. Thirty-five years of CD4 T-cell counting in HIV infection: From flow cytometry in the lab to point-of-care testing in the field: thirty-five years of cd4 t-cell counting. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. nov 2017;92(6):437-44.
8. Whitby L, Whitby A, Fletcher M et al. Current laboratory practices in flow cytometry for the enumeration of CD 4(+) T-lymphocyte subsets. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. oct 2015;88(5):305-11..
9. External Quality Assessment Services. UK NEQAS. 2019. <https://ukneqas.org.uk>
10. Histoire de cytométrie de flux. News-Medical.net. 2010. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-History-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-History-(French).aspx)
11. FRITZ Shirley. Cytométrie en flux des microparticules : Application à la thrombopénie induite à l'héparine [Thèse en Pharmacie]. [France]: Aix Marseille Université; 2017.

12. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J et al. Pillars Article: Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence. *Science*. 1969. 166: 747–749. *The Journal of Immunology*. 1 sept 2014; 193(5):2045-7.
13. Hoffman RA, Wood JCS. Characterization of Flow Cytometer Instrument Sensitivity. *Current Protocols in Cytometry*. avr 2007;40(1):1.20.1-1.20.18.
14. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*. 10 déc 1981;305(24):1425-31.
15. Lauren Rigollet. Immunophénotypage : technique et applications en biologie. Eurofins Biomnis. 2013. <https://www.eurofins-biomnis.com/biomnis-live/lumière-sur/immunophenotypage-technique-et-applications-en-biologie>
16. Pont J. Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous-populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire par le sang périphérique [Thèse en Pharmacie]. [France]: Université de Grenoble Alpes; 2015.
17. Cytométrie en flux et Tri cellulaire. BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251. <http://bfa.univ-paris-diderot.fr/cytometrie-en-flux-et-tri-cellulaire>
18. H. Elleuch Zghal. Cytométrie en flux. *Journal d'Information Médicale Sfax*. 2003 2004;1(5/6):1-7.
19. Idziorek T, Cazareth J, Blanc C et al. Évolution de la cytométrie : du conventionnel à la masse (en passant par le spectre). *Médecine/Sciences*. 1 mai 2018;34(5):439-47.
20. Flow Cytometry Filters. Alluxa. 2018. <https://www.alluxa.com/optical-filter-applications/flow-cytometry-filters>
21. Kouanhon Tomaha Michael Audrey. Bilan du programme national d'évaluation externe de la qualité pour la numération des lymphocytes TCD4 en Côte d'Ivoire (2005-2015) [Thèse en Pharmacie]. [Côte d'Ivoire]: Université Félix Houphouet Boigny; 2018.
22. El Hentati F-Z, Iobagiu C, Lambert C. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue Francophone des Laboratoires* 1 mars 2009;2009(410):23-32.
23. Susha Cheriyaedath. What-is-Immunophenotyping? News-Medical.net. 2016 [https://www.news-medical.net/health/What-is-Immunophenotyping-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/What-is-Immunophenotyping-(French).aspx)
24. OMS | Système de gestion de la qualité au laboratoire - Outil de formation. WHO. World Health Organization; [http://www.who.int/ihr/training/laboratory\\_quality/quality/fr/](http://www.who.int/ihr/training/laboratory_quality/quality/fr/)

25. Sergine Lapointe, TM. CONTROLE DE QUALITÉ DANS LES LABORATOIRES DE BIOLOGIE MEDICALE : les conditions gagnantes. *Labexpert la revue des technologistes médicaux du Québec*. déc 2011;1(4):7-18.
26. Glencross DK, Aggett HM, Stevens WS et al. African regional external quality assessment for CD4 T-cell enumeration: Development, outcomes, and performance of laboratories. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008; 74B(S1):S69-79.
27. Système CELL-DYN Ruby | Abbott Core Laboratory  
<https://www.corelaboratory.abbott/int/fr/offerings/brands/cell-dyn/cell-dyn-ruby>
28. Siddiqui S, Sarro Y, Diarra B et al. Tuberculosis specific responses following therapy for TB: Impact of HIV co-infection. *Clinical Immunology*. juill 2015;159(1):1-12.
29. CICERO J. Action de correction, action corrective ou action préventive ? – QUALIBLOG | Le blog du manager QSE. <https://qualiblog.fr/principes-generaux-de-la-qualite/action-de-correction-action-corrective-ou-action-preventive>
30. Noulstri E, Abudaya D, Lerdwana S et al. Corrected Lymphocyte Percentages Reduce the Differences in Absolute CD4+ T Lymphocyte Counts between Dual-Platform and Single-Platform Flow Cytometric Approaches. *Laboratory Medicine*. 5 juill 2018; 49(3):246-53.
31. Sagnia B, Mbakop Ghoms F, Gutierrez A et al. Performance of the BD FACSPresto near to patient analyzer in comparison with representative conventional CD4 instruments in Cameroon. *AIDS Research and Therapy*. 17 août 2020; 17(1):53.
32. Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research - ScienceDirect. 2021.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175919301140?via%3Dihub>
33. World Bank Climate Change Knowledge Portal. 2021.  
<https://climateknowledgeportal.worldbank.org>

## 9. FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom:** NANTOUME

**Prénom:** Mohamed Ambadigné

**E-mail:** [nantoummohamed@yahoo.fr](mailto:nantoummohamed@yahoo.fr)

**Année universitaire:** 2020-2021

**Ville de soutenance:** Bamako

**Lieu de dépôt:** Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie et de la Faculté de Pharmacie, Bamako, Mali.

**Titre de la thèse:** Contrôle de Qualité Externe pour l'Énumération Fiable des Lymphocytes par la Cytométrie en Flux au Mali.

**Secteur d'intérêt:** Biologie et Santé Publique

**Section:** Pharmacie

**Contact Tel:** (+223) 74 74 29 27

### RESUME

De nos jours, il est important pour les laboratoires de se soumettre à une évaluation de la qualité externe afin de vérifier la fiabilité des résultats fournis aux cliniciens praticiens.

L'objectif principal de ce travail était d'analyser la performance de l'énumération des lymphocytes T (CD3+, CD4+, CD8+) et non T (B et NK) sur le sang total par la cytométrie en flux au sein du laboratoire ImmunoCore.

Au total, 12 échantillons de sang stabilisé ont été traités sur une année et selon la méthode de double plateforme en utilisant le CELL-DYN Ruby pour la numération formule sanguine et la Fortessa et le LSR-II pour l'immunophénotypage par cytométrie en flux.

Les résultats de notre étude ont révélé une forte corrélation entre les valeurs générées à partir de deux instruments de cytométrie (Fortessa et LSR-II) mais aussi l'absence de biais entre eux. De la même façon, la performance inter-laboratoire était satisfaisante avec environ 83% de succès.

En conclusion, nos résultats suggèrent que le laboratoire ImmunoCore de l'UCRC est capable de générer des résultats fiables lors de l'analyse des échantillons pour l'énumération des lymphocytes.

**Mots clés:** Cytométrie en Flux, Immunophénotypage, UKNEQAS, UCRC, Evaluation de la Qualité Externe.

**Last Name: NANTOUME**

**First Name: Mohamed Ambadigné**

**E-mail: [nantoummohamed@yahoo.fr](mailto:nantoummohamed@yahoo.fr)**

**Academic Year: 2020-2021**

**City of Defense: Bamako**

**Sector of Interest: Biology and Public Health**

**Section: Pharmacy**

**Nationality: Malian**

**Phone: (+223) 74 74 29 27**

**Place of Deposit:** Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology and the Faculty of Pharmacy, Bamako, Mali.

**Title of the thesis:** External Quality Control for Reliable Enumeration of Lymphocytes by Flow Cytometry in Mali.

### **SUMMARY**

Nowadays, it is important for laboratories to adhere to external quality assessment in order to ensure the reliability of the results provided to clinicians. For this reason, our laboratory ImmunoCore of the University Clinical Research Center (UCRC) participates in an external quality assessment for leukocyte immunophenotyping called UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immune Monitoring).

The main objective of this work was to analyze the performance of T (CD3+, CD4+, CD8+) and non-T (B and NK) lymphocyte enumeration on whole blood by flow cytometry in the UCRC's ImmunoCore laboratory.

In total, 12 stabilized blood samples were processed over a year and using the dual platform method by combining cell blood count obtained from the CELL-DYN Ruby with immunophenotyping data generated from either Fortessa or LSR-II cytometers. The results of our study revealed a strong correlation between the results generated from the two instruments (Fortessa and LSR-II), but also absence of significant bias between them. Similarly, the inter-laboratory performance was satisfactory with approximately 83% success.

In conclusion, our results suggest that the UCRC ImmunoCore laboratory is capable of generating reliable results when analyzing samples for enumeration of lymphocytes.

**Keywords:** Flow Cytometry, Immunophenotyping, UKNEQAS, UCRC, External Quality Assessment.

# 10. ANNEXE

## Annexe 1: Exemple de contrôle journalier du bille de contrôle du FORTESSA

### Cytometer Performance Report

Cytometer:	LSRFortessa	User:	Administrator
Cytometer Name:	LSRFortessa	Institution:	UCRC
Serial Number:	H65822R1007	Software:	BD FACSDiva 8.0.2
Input Device:	Manual	Date:	12/13/2019 12:22 PM
Cytometer Configuration:	X20-5-Blue 3-Red 6-Violet 2-355 UV	Cytometer Baseline:	10/04/2019 01:47 PM
		P/F:	Pass

#### Setup Beads

Bead Product:	CST Setup Beads	Part #:	910858
Lot ID:	90377	Expiration Date:	02/28/2021
Bead Lot Information:	Available		

#### Detector Settings

Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference Target Value	Bright Bead % Robust CV	Mid Bead Median Channel	Mid Bead % Robust CV
Blue	FSC	FSC	125000	126202	0	3.54	126276	3.57
Blue	F	SSC	125000	125037	0	3.86	126161	4.05
Blue	E	FITC	8472	8074	-5	3.91	167	19.41
Blue	D	PE	14791	14476	-3	3.52	297	16.13
Blue	C	PE-Texas Red	12280	11712	-5	3.65	239	18.4
Blue	B	PerCP-Cy5-5	33463	33206	-1	4.29	870	19.82
Blue	A	PE-Cy7	16879	16823	-1	6.28	297	39.25
Red	C	APC	39943	39790	-1	4.39	1050	21.89
Red	B	APC-Alexa 700	24587	24321	-2	4.48	620	17.61
Red	A	APC-Cy7	24617	24277	-2	5.02	559	19.98
Violet	F	BV421	8439	8131	-4	3.07	605	14.37
Violet	E	BV510	28887	28347	-2	2.41	595	14.61
Violet	D	BV605	41148	41384	0	5.86	811	58.95
Violet	C	BV650	55874	55576	-1	5.43	2646	19.5
Violet	B	BV711	22694	22168	-3	5.38	879	17.81
Violet	A	BV785	47635	46968	-2	6.26	694	29.44
355 UV	B	BUV395	8588	8277	-4	4.92	1004	10.75
355 UV	A	INDO-1	11120	10822	-3	4.96	580	31.51

#### Detector Settings (Continued)

Laser	Detector	Parameter	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Robust CV	PMTV	Δ PMTV	Qr	Br	P/F
Blue	FSC	FSC	26488	10.31	383	22	N/A	N/A	Pass
Blue	F	SSC	59395	4.41	260	10	N/A	N/A	Pass
Blue	E	FITC	31	74.13	459	8	0.0327	665	Pass
Blue	D	PE	58	64.17	478	13	0.2305	547	Pass
Blue	C	PE-Texas Red	48	53.91	490	9	0.0157	360	Pass
Blue	B	PerCP-Cy5-5	149	52.89	631	17	0.0069	238	Pass
Blue	A	PE-Cy7	63	97.49	651	18	0.0145	41	Pass
Red	C	APC	207	53.91	631	16	0.0096	156	Pass
Red	B	APC-Alexa 700	148	37.71	573	16	0.0024	638	Pass
Red	A	APC-Cy7	147	46.55	538	16	0.0028	2419	Pass
Violet	F	BV421	214	31.14	461	8	0.0277	2523	Pass

Research Use Only

Page 1 of 2

### Cytometer Performance Report

Cytometer:	LSRFortessa	User:	Administrator
Cytometer Name:	LSRFortessa	Institution:	UCRC
Serial Number:	H65822R1007	Software:	BD FACSDiva 8.0.2
Input Device:	Manual	Date:	12/13/2019 12:22 PM
Cytometer Configuration:	X20-5-Blue 3-Red 6-Violet 2-355 UV	Cytometer Baseline:	10/04/2019 01:47 PM
		P/F:	Pass

Violet	E	BV510	118	53.91	479	11	0.0160	4823	Pass
Violet	D	BV605	176	213.33	742	23	0.0798	71	Pass
Violet	C	BV650	192	96.33	679	16	0.0325	57	Pass
Violet	B	BV711	76	72.23	568	11	0.1137	10	Pass
Violet	A	BV785	133	73.59	657	16	0.0704	8	Pass
355 UV	B	BUV395	112	40.72	526	11	0.1079	92	Pass
355 UV	A	INDO-1	121	120.16	582	11	0.0373	660	Pass

#### Specifications

PMTV Delta from baseline:	50 (BD)
Blue Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
Violet Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
355 UV Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
Red Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)

#### Laser Settings

Laser	Delay (Trigger on FSC)	Delay (Trigger on Fluorescence)	Area Scaling Factor
Blue	0.00	0.00	0.88
Violet	35.89	35.83	0.98
355 UV	68.22	67.62	0.79
Red	102.65	101.27	0.86

Window Extension: 10.00  
FSC Area Scaling Factor: 0.71

#### Threshold

Threshold (FSC): 10675

Comments: \_\_\_\_\_

Research Use Only

Page 2 of 2

## Annexe 2: Exemple de données obtenues à partir de l'analyseur Cell-Dyn Ruby

CELL-DYN Ruby Version du logiciel 2.2 ML 12/23/2020 14:05 Numéro de série de l'analyseur : 70320BG

SEREFU-UCRC UNIERSIY CLINICAL RESEARCH CENTER

FMS-FAPH/NIAD

MANDEKA # 2

Page Routine

ID échant. UKNEQAS332

Nom patient

ID patient

Médecin

Commentaire

Type échant. Patient

Né(e) le

D/H prélèv.

Champ util.1

Champ util.2

Sexe Inconnu

Séq. n° 6472 ID op. Adm. 10

Rép. 8/2/2020 9:15:04

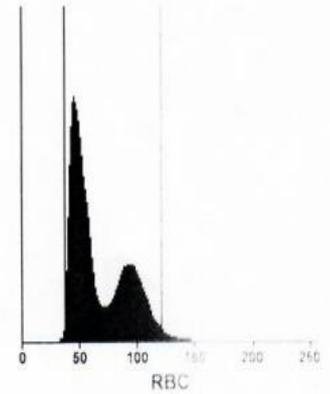
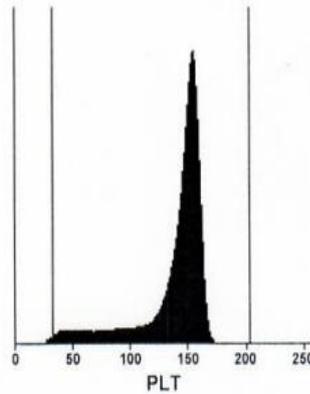
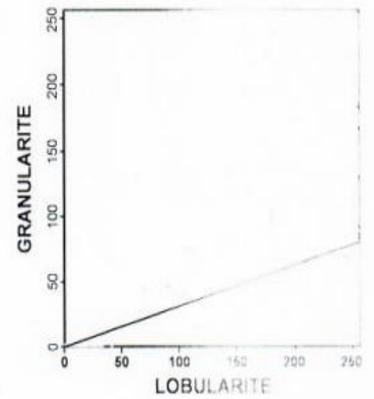
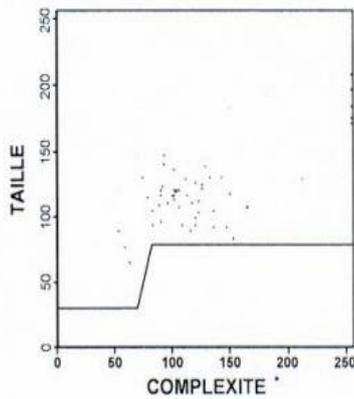
Test CBC

Mode Ouvrir Page

Limites Paramètres

		SUSPECT	
WBC	2.66*	10e3/uL	WBC
NEU	.412*	15.5 %	BAND
LYM	1.89*	71.0*	VAR LYM
MONO	.292*	11.0*	NRBC/RRBC
EOS	.066*	2.49 %	
BASO	0.00*	0.00 %	DFLT (LM)
RBC	1.28*	10e6/uL	
HGB	11.8*	g/dL	
HCT	8.87*	%	
MCV	69.3*	fL	RBC MORPH
MCH	92.3*	pg	
MCHC	133.3*	g/dL	MCHC
RDW	34.5*	%	

PLT	2293*	10e3/uL	
MPV	>>>>	fL	URI



LIMITES				
WBC	3.23-11.9	RBC	3.56-6.17	
NEU	1.04-6.22	39.3-73.7 %	HGB	12.2-17.3
LYM	1.20-3.80	18.0-48.3 %	HCT	37.7-53.7
MONO	.100-.660	4.40-12.7 %	MCV	69.5-97.5
EOS	.030-6.60	.600-7.30 %	MCH	22.3-33.4
BASO	0.00-.080	0.00-1.70 %	MCHC	30.7-34.7
			RDW	11.8-20.4
			PLT	145.-614.
			MPV	5.60-94.0

### INTERPRETATION

-----WBC-----RBC-----PLT-----

#### POPULATIONS ANORMALES SUSPECTEES :

Alarme comptage WBC	Erythroblastes	Données PLT hors limites
Alarme formule WBC	RBC résistants	Interfer. region haute PLT
Bands	Morphologie RBC	
Lymphocytes atypiques	MCHC hors limites	

#### ANOMALIES DEFINIES PAR L'UTILISATEUR :

Leucopénie	Anémie	Thrombocytose
Neutropénie	Microcytose	
	Hyperchromie	
	Anisocytose	

Annexe 3: Feuille de calcul d'Immunophénotypage

**UKNEQAS CALCULATION WORKSHEET**

**SAMPLE ID#:** \_\_\_\_\_

**TRIAL#:** \_\_\_\_\_

**FLOW CYTOMETER USED#:** QWK 1 (#41021) \_\_\_\_ QWK 2 (#41048) \_\_\_\_

**LSR II (#42906)** \_\_\_\_ **LSR FORTESSA (#43618)** \_\_\_\_

**DATE RUN :** \_\_\_\_\_

**WC COUNT** = \_\_\_\_\_  $\times 10^3/\mu\text{l} \times 1000 =$  \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

**(NOTE : WBC Count value from Act-diff must be reported in units of  $\times 10^9/\text{L}$ .\*  
To do this you must multiply the value by 1000)**

**LYMPHO%** = \_\_\_\_\_

**CD3<sup>+</sup> %** = \_\_\_\_\_

**CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> %** = \_\_\_\_\_

**CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> %** = \_\_\_\_\_

**CD19<sup>+</sup> %** = \_\_\_\_\_

**CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> %** = \_\_\_\_\_

**ABSOLUTE LYMPHOCYTE COUNT = WBC COUNT  $\times$  LYMPHO%**

= \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L} \times$  \_\_\_\_\_ % = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

**ABSOLUTE SUBSET VALUE = ABSOLUTE LYMPH COUNT  $\times$  SUBSET%**

**CD3<sup>+</sup> ABS VALUE** = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L} \times$  \_\_\_\_\_ % = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

**CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ABS VALUE** = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L} \times$  \_\_\_\_\_ % = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

**CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ABS VALUE** = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L} \times$  \_\_\_\_\_ % = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

**CD19<sup>+</sup> ABS VALUE** = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L} \times$  \_\_\_\_\_ % = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

**CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> ABS VALUE** = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L} \times$  \_\_\_\_\_ % = \_\_\_\_\_  $\times 10^9/\text{L}$

## Annexe 4: Exemple de résultat d'UKNEQAS de l'échantillon 332

**UK NEQAS**  
Leucocyte Immunophenotyping

Sheffield Teaching Hospitals **NHS**  
NHS Foundation Trust

### Immune Monitoring Programme All Participant Report

Distribution - 192001      Sample - 332      Participant ID - 43618  
Date Issued - 13 May 2019      Closing Date - 03 June 2019      Machine Used - LSRFortessa

**Trial Comments**  
This trial was issued to 780 participants

**Sample Comments**  
This sample was made by UK NEQAS LI using stabilised blood & blood artificially depleted of CD3+/CD4+ lymphocytes

---

#### Absolute Values Results and Performance

Cell Population	Your Results (cells/ $\mu$ L)	Robust Mean (cells/ $\mu$ L)	Robust SD (cells/ $\mu$ L)
CD3+ Lymphocytes	529.00	566.18	50.57
CD3+/CD4+ Lymphocytes	49.00	56.89	7.25
CD3+/CD8+ Lymphocytes	426.00	433.93	49.71
CD19+ Lymphocytes	198.00	223.45	25.44
CD16+/CD56+ Lymphocytes	244.00	262.08	27.65

Cell Population	z Score*	Performance Status for this Sample	Performance Status Classification Over 12 Sample Period		
			Satisfactory	Action	Critical
CD3+ Lymphocytes	-0.74	Satisfactory	11	0	1
CD3+/CD4+ Lymphocytes	-1.09	Satisfactory	11	1	0
CD3+/CD8+ Lymphocytes	-0.16	Satisfactory	11	1	0
CD19+ Lymphocytes	-1.00	Satisfactory	12	0	0
CD16+/CD56+ Lymphocytes	-0.65	Satisfactory	12	0	0

#### Percentage Values Results and Performance

Cell Population	Your Results %	Robust Mean %	Robust SD %
CD3+ Lymphocytes	53.60	52.97	1.56
CD3+/CD4+ Lymphocytes	5.01	5.30	0.58
CD3+/CD8+ Lymphocytes	43.20	40.87	2.65
CD19+ Lymphocytes	20.10	20.64	1.21
CD16+/CD56+ Lymphocytes	24.70	24.27	1.24

Cell Population	z Score*	Performance Status for this Sample	Performance Status Classification Over 12 Sample Period		
			Satisfactory	Action	Critical
CD3+ Lymphocytes	0.40	Satisfactory	12	0	0
CD3+/CD4+ Lymphocytes	-0.50	Satisfactory	12	0	0
CD3+/CD8+ Lymphocytes	0.88	Satisfactory	12	0	0
CD19+ Lymphocytes	-0.45	Satisfactory	12	0	0
CD16+/CD56+ Lymphocytes	0.35	Satisfactory	12	0	0

**\*z Score Limits Definitions**  
Please note the scale below is applicable to the tables above and to the z score histograms and Shewhart control charts that follow. It is not applicable to the Cusum control charts.

Absolute

Percentage

Report Issue Date: 17 Jun 2019; Distribution: IM 192001; Version: 1.0.0  
Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust, a UKAS proficiency testing provider No. 7904, operating UK NEQAS for Leucocyte Immunophenotyping. Page 1 of 25

**UK NEQAS**  
Leucocyte Immunophenotyping

Sheffield Teaching Hospitals **NHS**  
NHS Foundation Trust

### Histograms of Participant z Scores

Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD3+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result

Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD3+/CD4+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result

Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD3+/CD8+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result

Percentage Values (%) - CD3+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result

Percentage Values (%) - CD3+/CD4+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result

Percentage Values (%) - CD3+/CD8+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result

Report Issue Date: 17 Jun 2019; Distribution: IM 192001; Version: 1.0.0  
Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust, a UKAS proficiency testing provider No. 7904, operating UK NEQAS for Leucocyte Immunophenotyping. Page 2 of 25

**Immune Monitoring Programme**  
All Participant Report

Distribution - 192001

Sample - 332

Participant ID - 43618

Date Issued - 13 May 2019

Closing Date - 03 June 2019

Machine Used - LSRFortessa

**Trial Comments**

This trial was issued to 780 participants

**Sample Comments**

This sample was made by UK NEQAS LI using stabilised blood & blood artificially depleted of CD3+/CD4+ lymphocytes

**Absolute Values Results and Performance**

Cell Population	Your Results (cells/ $\mu$ L)	Robust Mean (cells/ $\mu$ L)	Robust SD (cells/ $\mu$ L)
CD3+ Lymphocytes	529.00	566.18	50.57
CD3+/CD4+ Lymphocytes	49.00	56.89	7.25
CD3+/CD8+ Lymphocytes	426.00	433.93	49.71
CD19+ Lymphocytes	198.00	223.48	25.44
CD16+/CD56+ Lymphocytes	244.00	262.08	27.65

Cell Population	z Score*	Performance Status for this Sample	Performance Status Classification Over 12 Sample Period		
			Satisfactory	Action	Critical
CD3+ Lymphocytes	-0.74	Satisfactory	11	0	1
CD3+/CD4+ Lymphocytes	-1.09	Satisfactory	11	1	0
CD3+/CD8+ Lymphocytes	-0.16	Satisfactory	11	1	0
CD19+ Lymphocytes	-1.00	Satisfactory	12	0	0
CD16+/CD56+ Lymphocytes	-0.65	Satisfactory	12	0	0

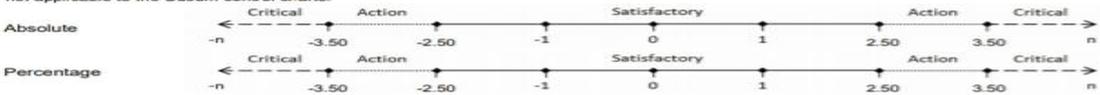
**Percentage Values Results and Performance**

Cell Population	Your Results %	Robust Mean %	Robust SD %
CD3+ Lymphocytes	53.60	52.97	1.56
CD3+/CD4+ Lymphocytes	5.01	5.30	0.58
CD3+/CD8+ Lymphocytes	43.20	40.87	2.65
CD19+ Lymphocytes	20.10	20.64	1.21
CD16+/CD56+ Lymphocytes	24.70	24.27	1.24

Cell Population	z Score*	Performance Status for this Sample	Performance Status Classification Over 12 Sample Period		
			Satisfactory	Action	Critical
CD3+ Lymphocytes	0.40	Satisfactory	12	0	0
CD3+/CD4+ Lymphocytes	-0.50	Satisfactory	12	0	0
CD3+/CD8+ Lymphocytes	0.88	Satisfactory	12	0	0
CD19+ Lymphocytes	-0.45	Satisfactory	12	0	0
CD16+/CD56+ Lymphocytes	0.35	Satisfactory	12	0	0

**z Score Limits Definitions**

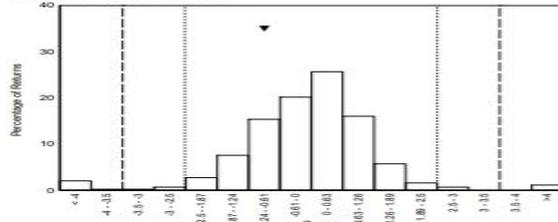
Please note the scale below is applicable to the tables above and to the z score histograms and Shewhart control charts that follow. It is not applicable to the Cusum control charts.



**Histograms of Participant z Scores**

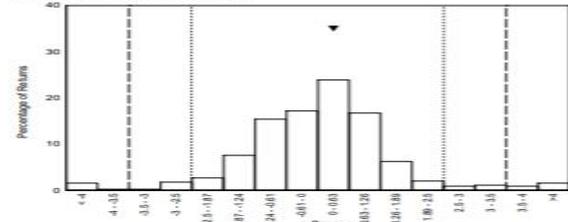
Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD3+ Lymphocytes

Please note ▼ denotes your result



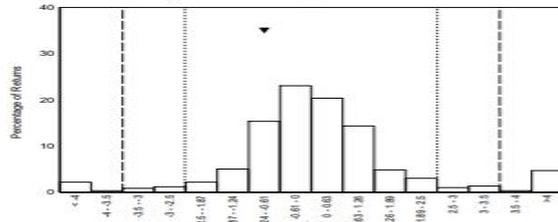
Percentage Values (%) - CD3+ Lymphocytes

Please note ▼ denotes your result



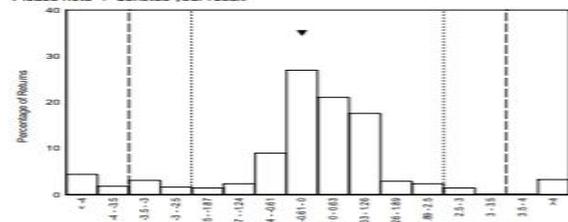
Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD3+/CD4+ Lymphocytes

Please note ▼ denotes your result



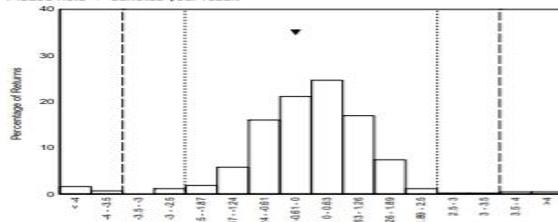
Percentage Values (%) - CD3+/CD4+ Lymphocytes

Please note ▼ denotes your result



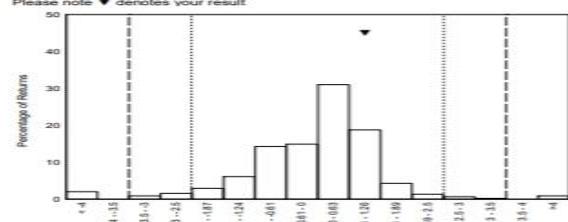
Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD3+/CD8+ Lymphocytes

Please note ▼ denotes your result

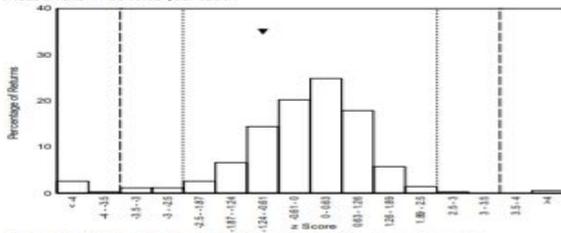


Percentage Values (%) - CD3+/CD8+ Lymphocytes

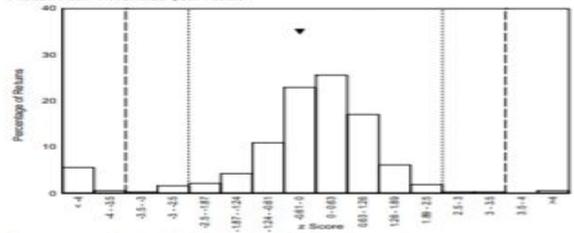
Please note ▼ denotes your result



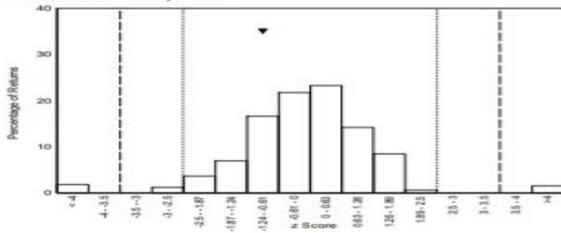
**Histograms of Participant z Scores**  
Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD19+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result



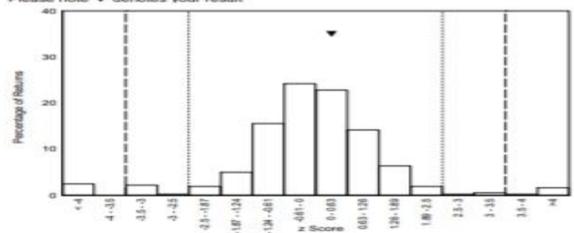
Percentage Values (%) - CD19+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result



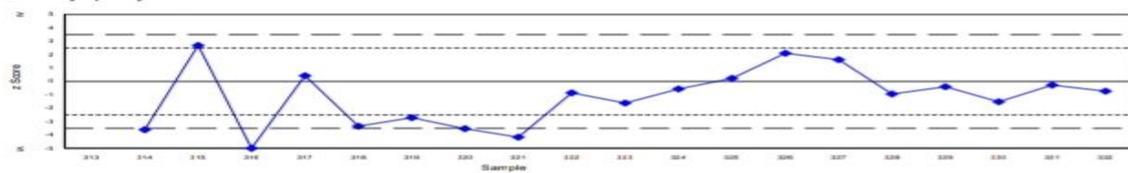
Absolute Values (cells/ $\mu$ L) - CD16+/CD56+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result



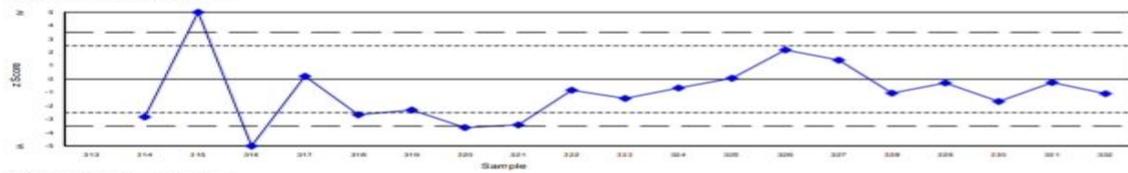
Percentage Values (%) - CD16+/CD56+ Lymphocytes  
Please note ▼ denotes your result



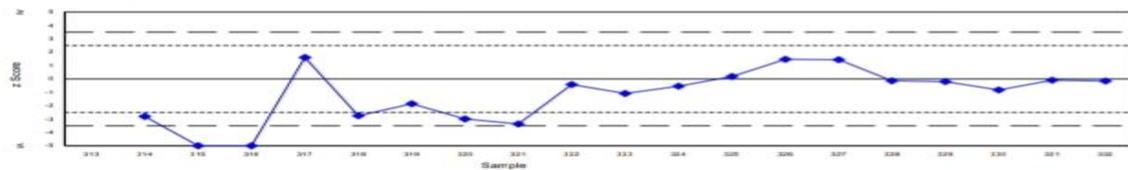
**Shewhart Control Charts**  
(Please note each data point represents a single sample)  
Absolute Values (cells/ $\mu$ L)  
CD3+ Lymphocytes



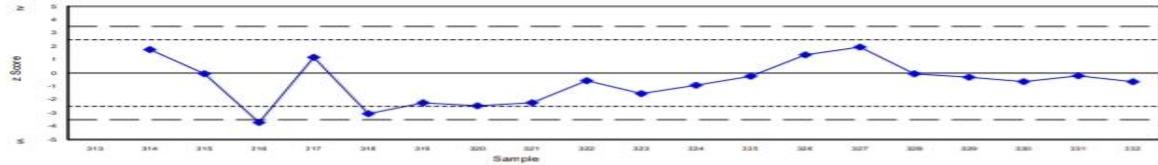
CD3+/CD4+ Lymphocytes



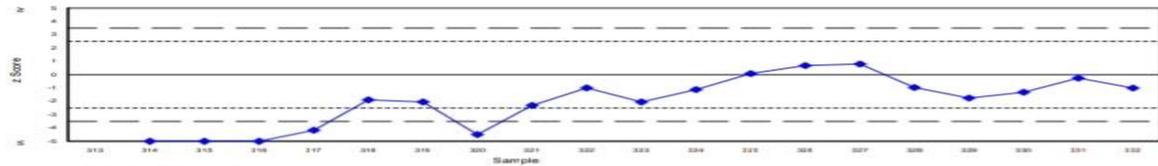
CD3+/CD8+ Lymphocytes



CD16+/CD56+ Lymphocytes



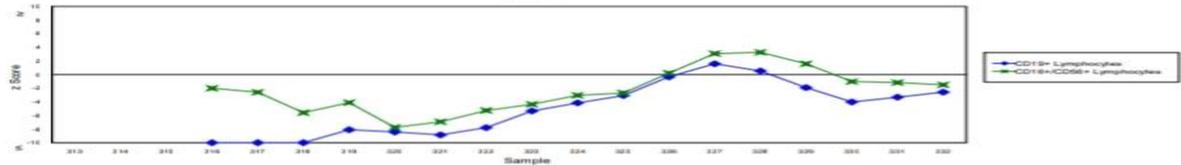
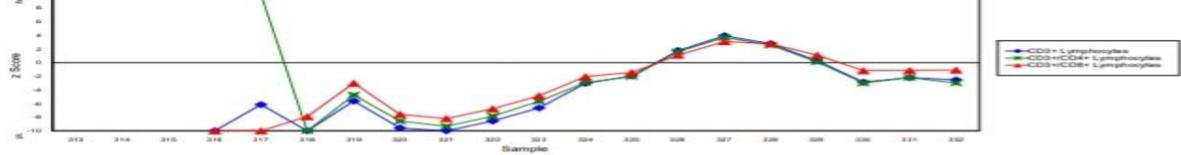
CD19+ Lymphocytes



Cusum Control Charts

(Please note each data point represents the sum of the z scores of the current sample and the two previous samples)

Absolute Values (cells/ $\mu$ L)

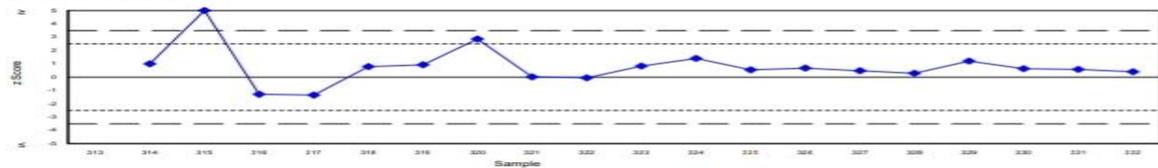


Shewhart Control Charts

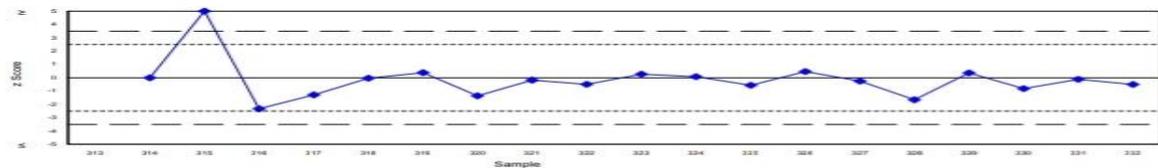
(Please note each data point represents a single sample)

Percentage Values (%)

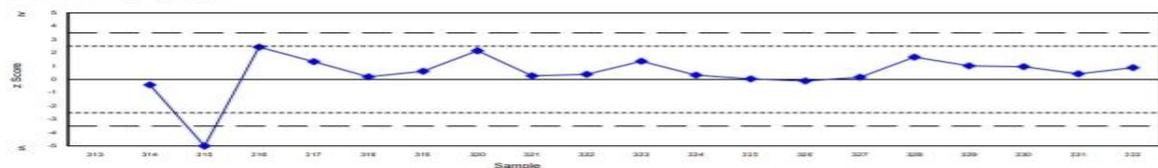
CD3+ Lymphocytes



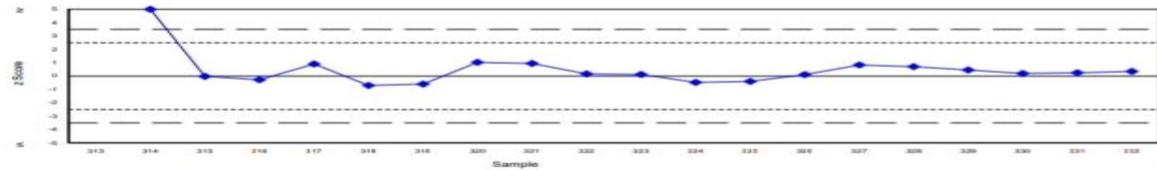
CD3+/CD4+ Lymphocytes



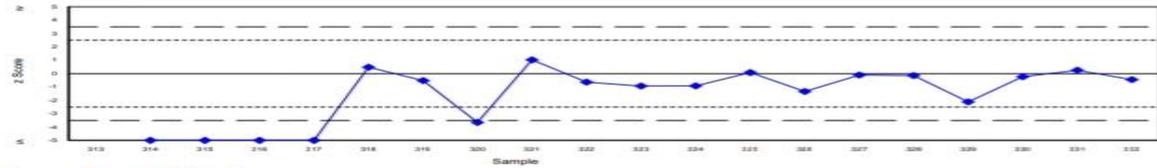
CD3+/CD8+ Lymphocytes



**CD16+/CD56+ Lymphocytes**



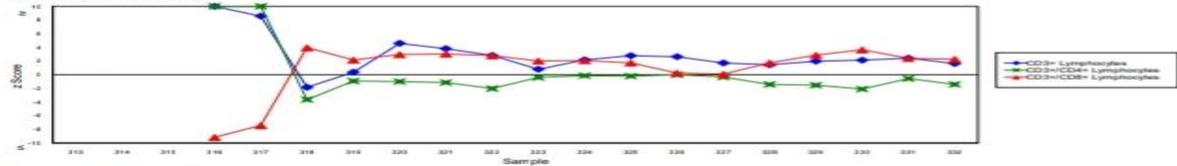
**CD19+ Lymphocytes**



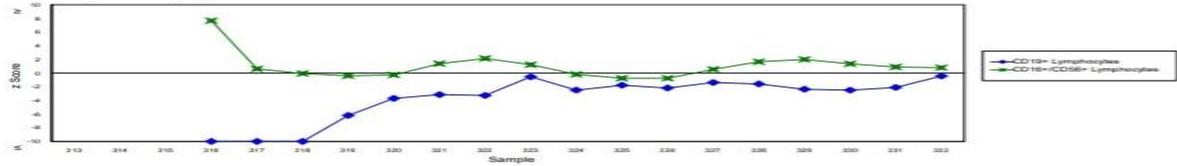
**Cusum Control Charts**

(Please note each data point represents the sum of the z scores of the current sample and the two previous samples)

**Percentage Values (%)**



**Percentage Values (%)**



**Platform Specific Statistics**

(Please note only groups of >20 returns are displayed)

Method	Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
	Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
<b>CD3+ Lymphocytes</b>						
FLOW COUNT	102	533.2	46.8	106	53.3	1.4
HAEM. LYMPH	-	-	-	21	53.1	2.6
HAEM. WBC	24	560.8	54.3	30	53.9	1.2
TRUCOUNT	243	580.6	40.8	238	52.7	1.5
<b>CD3+/CD4+ Lymphocytes</b>						
FACSCOUNT	82	52.0	7.8	60	3.7	0.6
FLOW COUNT	118	55.2	7.1	112	5.5	0.5
HAEM. LYMPH	-	-	-	21	5.4	0.5
HAEM. WBC	24	54.6	7.2	30	5.2	0.3
TRUCOUNT	243	59.0	6.5	235	5.4	0.5
<b>CD3+/CD8+ Lymphocytes</b>						
FLOW COUNT	102	403.0	39.5	105	40.5	2.6
HAEM. LYMPH	-	-	-	21	40.1	2.3
HAEM. WBC	24	438.7	47.7	30	42.6	1.7
TRUCOUNT	238	450.6	41.6	231	41.0	2.5
<b>CD19+ Lymphocytes</b>						
FLOW COUNT	93	200.2	29.3	95	20.0	1.3
HAEM. WBC	23	209.0	23.9	28	19.9	1.2
TRUCOUNT	193	232.5	19.6	190	21.1	1.0
<b>CD16+/CD56+ Lymphocytes</b>						
FLOW COUNT	83	242.0	23.2	85	24.0	1.2
HAEM. WBC	22	250.7	25.2	28	24.6	1.2
TRUCOUNT	193	271.1	23.0	190	24.5	1.2

**Antibody Manufacturer Specific Statistics**  
(Please note only groups of >20 returns are displayed)

CD3+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
BD Biosciences		287	577.9	41.8	284	52.8	1.5
Beckman Coulter		127	536.2	52.3	140	53.3	1.5
CD3+/CD4+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
BD Biosciences		366	57.3	7.1	341	5.2	0.6
Beckman Coulter		136	55.3	7.3	149	5.5	0.5
CD3+/CD8+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
BD Biosciences		285	445.5	44.5	280	41.0	2.6
Beckman Coulter		126	408.1	42.7	140	40.6	2.7
CD19+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
BD Biosciences		217	229.9	21.5	228	20.9	1.1
Beckman Coulter		120	204.6	29.1	135	20.0	1.5
CD16+/CD56+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
BD Biosciences		218	269.1	25.3	229	24.5	1.2
Beckman Coulter		102	243.8	25.4	116	23.9	1.2

**Antibody Fluorochrome Specific Statistics**  
(Please note only groups of >20 returns are displayed)

CD3+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
FITC		272	579.4	42.5	285	52.8	1.5
PC5		57	532.5	43.4	63	53.5	1.3
PE-CY5		44	537.5	53.4	35	53.2	1.7
CD3+/CD4+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
APC		126	57.8	6.4	126	5.4	0.5
FITC		-	-	-	20	5.2	0.5
PE		152	54.0	8.0	132	4.8	1.3
PE-CY7		127	59.2	6.5	130	5.3	0.5
RD1		60	56.1	7.4	61	5.6	0.5
CD3+/CD8+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
APC-Cy7		121	453.6	46.1	126	41.1	2.5
ECD		91	404.4	38.0	98	40.9	2.2
PE		149	442.3	38.1	143	40.9	2.6
CD19+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
APC		207	231.5	21.2	211	21.0	1.0
ECD		76	200.3	31.3	84	20.0	1.4
PE		-	-	-	20	19.7	1.0
CD16+/CD56+ Lymphocytes		Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
		Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
Method							
PE		260	265.2	28.5	280	24.4	1.2
RD1		38	244.0	22.5	40	23.8	1.1

**Flow Cytometer Specific Statistics**  
(Please note only groups of >20 returns are displayed)

Method	Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
	Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
<b>CD3+ Lymphocytes</b>						
Facs Canto II	185	574.7	41.7	195	52.7	1.5
Facscount	58	588.1	41.6	59	53.2	1.8
FC-500	44	541.4	50.4	49	53.2	1.5
Navios	80	539.1	54.1	90	53.5	1.4
<b>CD3+/CD4+ Lymphocytes</b>						
Facs Canto II	184	58.3	6.6	191	5.4	0.5
Facscount	60	60.5	7.9	61	5.3	0.4
FACSPresto	76	51.2	7.2	51	3.6	0.5
FC-500	32	59.4	4.8	-	-	-
Navios	48	55.5	6.0	52	5.4	0.4
Navios	80	55.7	7.7	89	5.5	0.5
<b>CD3+/CD8+ Lymphocytes</b>						
Facs Canto II	184	451.7	40.4	193	41.4	2.4
Facscount	55	451.6	36.0	57	40.9	2.4
FC-500	44	404.4	34.1	48	40.2	3.1
Navios	80	408.7	45.4	90	41.1	2.3
<b>CD19+ Lymphocytes</b>						
Facs Canto II	166	230.6	20.8	174	21.0	1.0
Facscount	22	221.3	23.8	24	20.5	1.1
FC-500	39	197.1	36.0	43	19.5	1.8
Navios	74	207.6	25.5	85	20.2	1.4
<b>CD16+/CD56+ Lymphocytes</b>						
Facs Canto II	165	269.2	23.6	174	24.6	1.2
Facscount	22	264.3	22.4	24	23.9	1.7
FC-500	33	248.1	22.7	37	24.2	1.2
Navios	67	242.0	26.2	78	23.8	1.2

**Gating Strategy Specific Statistics**  
(Please note only groups of >20 returns are displayed)

Method	Absolute Count Values (cells/ $\mu$ L)			Percentage Values		
	Returns	Robust Mean	Robust SD	Returns	Robust Mean	Robust SD
<b>CD3+ Lymphocytes</b>						
CD45/SSC	371	565.2	49.9	399	53.0	1.5
FSC/SSC	23	577.7	69.3	23	52.7	2.5
<b>CD3+/CD4+ Lymphocytes</b>						
CD3	22	55.2	7.2	-	-	-
CD45/SSC	374	57.8	7.0	396	5.4	0.5
Facscount Gating	72	51.4	7.3	56	3.6	0.5
FSC/SSC	28	58.5	8.8	26	5.4	0.6
<b>CD3+/CD8+ Lymphocytes</b>						
CD45/SSC	367	435.0	47.4	393	40.9	2.6
FSC/SSC	23	434.9	69.2	23	41.3	3.0
<b>CD19+ Lymphocytes</b>						
CD45/SSC	318	222.1	25.6	343	20.7	1.2
<b>CD16+/CD56+ Lymphocytes</b>						
CD45/SSC	303	260.6	27.7	329	24.3	1.2

Annexe 5: Certificat de l'UKNEQAS

We certify that the organisation named below is participating in the  
Leucocyte Immunophenotyping Programme for the period  
01-April-2019 to 31-March-2020

43618

*University Research Clinical Center  
Point-G/FMOS/F A P H  
Bamako*

This organisation is registered for :-

Flow Cytometry Programmes

*Immune Monitoring*

Signed :-



Mr Liam Whitby  
Director



Mr Stuart Scott  
Centre Manager

## 11. SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

*d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;*

*d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;*

*de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

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

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !!!*

*Je le jure !!!*

