

Retour d'expérience :

L'Atelier Utilisateur XN 100% virtuel nous a permis de mettre en lumière le travail des équipes du CH de Versailles. Faisons plus ample connaissance.

Canal WDF et COVID-19



Dr. Jennifer Osman

Praticien Hospitalier- CH de Versailles
Service de Biologie, Unité d'Hématologie et de
Biologie moléculaire onco-hématologique.

Pour ce premier numéro de « Sysmex Mag », nous avons le plaisir de vous présenter le Dr Jennifer Osman. De formation pharmacien biologiste, elle vient tout juste d'être nommée Praticien Hospitalier au sein du laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier de Versailles, au sein duquel elle était assistante depuis 2 ans, et qui est dirigé par le Dr Benjamin Manéglier.

Durant sa spécialisation en Hématologie biologique à Paris, elle a réalisé un Master 2 en «Biologie moléculaire et fonctionnelle de l'hématopoïèse», où elle s'est intéressée plus particulièrement aux rechutes de Leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ) à l'INSERM et aux leucémies aigües lymphoblastiques à l'UCSF de San Francisco.

En 2020, grâce à une collaboration étroite entre les secteurs de virologie et d'hématologie du laboratoire du Centre Hospitalier de Versailles, son équipe a remporté le prix de Virologie de la RICAI-ASM (Réunion interdisciplinaire de chimio-

thérapie anti infectieuse et American Society for Microbiology) pour leur travail "Rapid screening of COVID-19 patients using white blood cell scattergrams, a study on 381 patients". Il s'agit d'une étude rétrospective publiée au British Journal of Haematology et réalisée au cours de la première vague de pandémie à SARS-CoV-2.

Dr. Osman, pouvez-vous nous décrire les objectifs et les résultats de votre étude ?

Cette étude rétrospective a été réalisée sur 381 patients symptomatiques de l'hôpital de Versailles (CH André Mignot) entre mars et avril 2020. Elle avait pour objectif de proposer le canal WDF comme outil de dépistage dans le diagnostic de la COVID-19 en complément des tests diagnostiques standards basés sur des techniques moléculaires (RT-PCR) et/ou d'imagerie médicale (scanner thoracique). Le recrutement des patients s'est fait sur la base d'une suspicion de COVID-19 : réalisation d'un test PCR, d'un scanner thoracique et présence de symptômes depuis au moins 3 jours.

Dans cette étude, nous décrivons un aspect spécifique en « sablier » du nuage lymphocytaire (nommé WDF+) sur le scattergramme WDF des patients COVID-19. En effet, la présence de lymphocytes dans la zone des cellules lympho-plasmocytaires, distinct du nuage de lymphocytes par l'absence de lymphocytes activés réactionnels, confère ainsi un aspect en « sablier » du nuage lymphocytaire. Cet aspect marque l'existence d'une population de lympho-plasmocytes circulants, seuls lymphocytes activés visibles au frottis sanguin (contrairement à ce qui est habituellement décrit dans les viroses classiques).

Cet aspect WDF+, défini pour un seuil > 4 événements dans la zone des cellules lympho-plasmocytaires, observe une aire sous la courbe ROC à 0.870, une sensibilité de 85.9%, une spécificité de 83.5%, une VPP de 94.3% et une VPN de 65% sur la cohorte d'apprentissage. Une cohorte de validation multicentrique est actuellement à l'étude pour confirmer ces données (étude NFSCOVID2).

Cet outil simple et non-invasif permet donc de classer rapidement les patients COVID-19 symptomatiques comme probables ou improbables, surtout lorsque les tests standards ne sont pas rapidement disponibles.

- Comment avez-vous remarqué cet aspect en sablier ?

Pour tout vous dire sur la genèse de cette étude : lors de la première vague épidémique, le CH de Versailles a rapidement dû s'adapter au flux de patients COVID-19. Ainsi, la majorité des actes non urgents a été décalée afin de s'occuper principalement des patients atteints de la COVID-19. Ainsi, lors de la validation des NFS des patients admis aux urgences ou hospitalisés, cet aspect en « sablier » du scattergramme WDF est devenu récurrent. De plus, nous (les cytologistes) avons dû prêter main forte au secteur de virologie et à la validation des RT-PCR SARS-CoV2. Un jour, en attendant la série

de RT-PCR, je me suis amusée à prédire les résultats grâce au scattergramme WDF. La concordance des résultats fut impressionnante ! Nous avons donc décidé de vérifier ce constat sur quelques patients supplémentaires puis d'en informer les cliniciens. Ils furent tellement emballés que nous avons finalement décidé d'en faire une étude.

- Existe-t-il des différences en termes de profil cytologique, sur la NFS ou sur les scattergrammes, entre les 57% de patients hospitalisés et les 9% de patients admis en réanimation dans votre étude ?

Nous remarquons très clairement que les patients admis en réanimation pour des formes graves observent un sablier très marqué avec une population importante de lympho-plasmocytes sur le scattergramme ainsi que sur le frottis sanguin. Ceci est logique sachant que les lympho-plasmocytes sont stimulés par les cytokines relarguées lors de l'orage cytokinique décrit dans les formes sévères de la COVID-19. Le liquide pleural avait été analysé en microbiologie pour certains d'entre eux, et était envahi de lympho-plasmocytes.

- Pensez-vous corréler cet aspect en sablier avec la présence de lympho-plasmocytes sur frottis sanguin ou avec la sérologie ou la cytométrie de flux ?

La sérologie est effectivement une option à investiguer mais elle ne répond pas à la même question. Elle informe sur la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre le SARS-CoV-2 et le fait d'avoir rencontré le virus. Le frottis sanguin et la cytométrie de flux ne répondent pas à la même rapidité de rendu, notamment, les patients étant lymphopéniques, ces analyses peuvent s'avérer fastidieuses. L'intérêt du sablier est de suspecter la pathologie COVID-19 de manière plus rapide et d'aider les cliniciens à séparer les patients COVID-19 et non-COVID-19.

- **Au cours d'un symposium britannique Sysmex, l'hypothèse a été soulevée que ces lymphocytes à haute fluorescence que vous évoquez puissent être en réalité des lymphocytes infectés et pour lesquels l'ARN viral serait marqué par le fluorocell WDF. Qu'en pensez-vous ? Avez-vous assez de recul pour affirmer qu'il s'agit bien de lympho-plasmocytes ou pensez-vous qu'il puisse s'agir aussi de lymphocytes infectés ?**

J'ai effectivement eu vent de cette hypothèse. Le virus SARS-COV-2 nécessite la présence du récepteur ACE2 à la surface de sa cellule cible pour l'infecter. Toutefois, il semblerait que ce récepteur ne soit pas présent à la surface des leucocytes. D'autre part, nous observons bien une population de lympho-plasmocytes que nous ne constatons pas dans d'autres contextes de viroses. Il me semble peu probable que le virus n'infecte que les lympho-plasmocytes, et que seuls ceux infectés circulent. Si l'hypothèse était avérée, je pense que nous observerions plutôt un aspect polymorphe de la population lymphoïde, comme celui que l'on observe dans les viroses.

- **Cet aspect en sablier a-t'il déjà été décrit dans d'autres viroses, ou chez des patients infectés en réanimation avant la pandémie ?**

Cet aspect a aussi été décrit dans la dengue. Il est toutefois très facile de faire la différence cliniquement, d'autant que nous ne sommes pas vraiment confrontés au problème en métropole. Nous avons également comparé les scattergrammes WDF des patients COVID-19 et de patients infectés par d'autres virus, les performances restaient comparables (sensibilité de 88,2% ; spécificité de 83,5%).

De plus, toutes les pathologies malignes avec cellules lympho-plasmocytaires circulantes (leucémie à plasmocytes, lymphome lymphoplasmocytaire ou maladie de Waldenström) sont un diagnostic différentiel. Dans cette étude, nous avons donc pris l'initiative d'exclure les patients présentant des hémopathies malignes mais encore une fois, ces patients n'ont pas du tout les mêmes symptomato-

logies que les patients COVID-19.

Dans l'étude multicentrique que nous sommes en train de mener, le groupe témoin est un groupe avec symptômes pseudo-grippaux (hors pandémie SARS-CoV2) afin d'étudier si cet aspect en sablier est bien spécifique de la pathologie COVID-19.

- **Dans certains laboratoires, une polynucléose franche est généralement observée dans les formes symptomatiques de COVID-19. Avez-vous aussi investigué les paramètres de positionnement des neutrophiles ?**

Pour le moment, nous nous focalisons sur cette population de lympho-plasmocytes, mais il serait effectivement pertinent de développer un algorithme plus global qui prendrait en compte le nuage des neutrophiles, la population d'AS-LYMP, etc...

- **Utilisez-vous d'autres paramètres biologiques (D-dimères, fibrinogène...) pour certifier qu'il s'agit bien d'un diagnostic COVID-19 ?**

Nous ne certifions jamais un COVID-19, nous l'évoquons. Ces paramètres d'hémostase sont bien évidemment utilisés, et il est important que le clinicien prenne l'ensemble de ces paramètres en compte. Toutefois, nous priorisons l'aspect en sablier du scattergramme WDF, car nous sommes cytologistes !

- **Rendez-vous les paramètres HFLC et AS-LYMP dans vos comptes rendus ?**

Ces paramètres ne sont pas rendus mais ils sont visibles pour nous. Avec l'Extended IPU, nous faisons apparaître les paramètres RE-LYMP et AS-LYMP dans notre système informatique. De manière empirique, nous constatons que le paramètre AS-LYMP>0 est souvent accompagné d'un aspect en sablier du scattergramme WDF. Toutefois, les cellules saturantes sur l'axe SFL ne semblent pas faire partie du gating de l'AS-LYMP, ce n'est donc pas pour moi le seul paramètre à investiguer pour la construction d'un algorithme de détection du sablier.

- **Quelle serait votre démarche ou quelle serait l'alternative pour le diagnostic des patients dont les symptômes sont inférieurs à 3 jours ? pour les patients souffrant d'hémopathies malignes ?**

Pour l'étude, nous avons effectivement exclu l'ensemble des hémopathies. Ce sont toutefois les hémopathies lymphoïdes à cellules circulantes telles que les lymphomes qui peuvent se révéler gênantes, le scattergramme WDF étant anormal. Mais pour tout vous dire : j'étais de garde un soir, et un patient avec une leucémie aiguë myéloïde et cet aspect en sablier du WDF a été admis aux urgences. Au frottis sanguin, il y avait effectivement des blastes myéloïdes mais aussi des lymphoplasmocytes. J'ai donc prévenu l'hématologue de garde que le patient avait probablement la COVID-19. Le secteur d'hématologie n'accueillant pas encore de patient COVID-19, le patient a été isolé dans un autre service en l'attente des résultats de la PCR (positive le lendemain). Ainsi, cet aspect en sablier est tout à fait utilisable pour les hémopathies myéloïdes ou les lymphomes non-circulants. Cette histoire a aussi contribué au lancement de cette étude !

Nous avons aussi exclu les symptômes précoces pour nous affranchir de la zone grise du scanner thoracique. Toutefois, pour notre étude multicentrique, il n'y a plus de critère de symptômes précoces. Nous pourrions ainsi évaluer le délai d'apparition des lymphoplasmocytes après le début des symptômes.

- **Avez-vous du recul sur la situation en pré-hospitalier, sur la patientèle de ville, en laboratoires privés donc ?**

L'étude a été réalisée en milieu hospitalier afin d'aider à la distinction des patients COVID-19 et non COVID-19, mais ces résultats restent bien sûr extrapolables aux laboratoires de ville.

L'étude ayant été réalisée au cours de la première

vague pandémique, cet aspect permettait à l'époque d'assurer le diagnostic. Il est à présent possible d'imaginer une persistance de ces lymphoplasmocytes à court et/ou moyen terme et donc la persistance de ce sablier après le diagnostic de la COVID-19 (dans ce cas plutôt une valence "sérologique" que diagnostique). Cette expertise est donc maintenant à modérer et à confronter aux données cliniques, pas toujours disponibles au laboratoire, en particulier dans les laboratoires de ville.

- **Donc pas de commentaire pouvant évoquer la suspicion d'une COVID ?**

Effectivement, le commentaire systématique serait trop fastidieux et chronophage pour notre pratique quotidienne. Rien qu'aux urgences, il y a 200 scattergrammes par jour à vérifier. L'idéal serait d'avoir un paramètre quantitatif tel que l'AS-LYMP ou les HFCL, ou bien un algorithme détectant la présence du sablier et en tirer un commentaire systématique, un peu à la manière du Monocytosis Workflow Optimisation (MWO) sur Extended IPU.

Nous avons pour l'heure décidé de ne pas rendre ces résultats aux patients car ils nécessitent d'être interprété avec l'ensemble des données clinico-biologiques. Aujourd'hui, les cliniciens de gériatrie, de médecine interne, des urgences nous appellent tous les jours pour nous demander de vérifier la présence de ce sablier, ce qui les aide dans leur démarche pour renouveler la PCR ou isoler les patients.

- **Certains biologistes observent cet aspect en sablier chez des patients en post-opératoire. L'avez-vous constaté aussi ?**

Il est vrai que nous constatons parfois des lymphocytes activés qui circulent en post-opératoire. Toutefois, l'aspect tranché en sablier avec le nuage discontinu n'est pas si net.

- **Quelles recommandations pour la pédiatrie ? Avez-vous retrouvé cet aspect en sablier sur des cas pédiatriques ?**

Nous avons exclu tous les mineurs de notre étude, aussi bien monocentrique que multicentrique, pour des raisons bioéthiques. Les enfants sont moins symptomatiques et sont sujets à de nombreuses viroses, le résultat serait donc potentiellement différent. Toutefois, lors de viroses, nous observons un nuage lymphocytaire diffus, en comète, différent de l'aspect en "sablier" décrit chez les patients COVID-19. On peut donc penser que ce sablier fonctionne, à moins que leur système immunitaire ne réagisse différemment.

- **Cet aspect particulier « en sablier » des lymphocytes du scattergramme WDF est très convainquant dans une démarche diagnostique. Avez-vous repéré un autre aspect particulier du scattergramme qui pourrait être évocateur du pronostic de la maladie (dans sa sévérité, ou dans la prédiction de la mortalité par exemple) ?**

Même si les patients admis en réanimation ont l'air de présenter une population de lympho-plasmocytes beaucoup plus importante, de nombreux scores cliniques sont déjà publiés et je ne pense pas que le scattergramme WDF ait un réel apport pronostic. L'intérêt du sablier réside vraiment dans l'aide au diagnostic pour bien répartir et isoler les patients, en cas de doute notamment.

- **Pensez-vous que la NFS puisse être à terme aussi indispensable que la RT-PCR pour la prise en charge des patients admis pour suspicion COVID ? Peut-elle la remplacer ?**

Cet aspect en sablier reste un outil de diagnostic indirect : la présence de lympho-plasmocytes permet de suspecter la COVID-19, mais en aucun cas elle ne permet de l'affirmer. Si l'exploitation des scattergrammes est faite sans l'apport de la clinique, il pourrait y avoir de faux-positifs (dengue, paludisme, hémopathies...). Cet outil n'a donc pas vocation à

remplacer les tests standards mais il vient en complément. Lors de la première vague pandémique, la démarche était principalement diagnostique. A présent, il faut déterminer la durée de vie de ces lympho-plasmocytes : s'ils perdurent dans le temps, cet aspect en sablier aura plus une vocation sérologique que diagnostique, et ce problème peut aussi se poser pour les sujets asymptomatiques. Nous tâcherons de répondre à ces questions au cours de l'étude multicentrique.

- **Avez-vous fini le recrutement des patients pour votre étude multicentrique ou êtes-vous déjà dans les premiers résultats préliminaires ? Quid de l'élaboration de votre algorithme prenant en compte certains paramètres quantitatifs ?**

Le recrutement des patients vient tout juste de se terminer. Au total, 19 centres français et belges participent. Nous avons recruté des patients infectés par le SARS-CoV2 sur la base d'une PCR positive, et des patients avec suspicion de grippe (datant d'avant la pandémie). Nous allons à présent passer à la deuxième étape : l'analyse des scattergrammes en aveugle, par les centres participants.

Nous avons parallèlement collecté des paramètres quantitatifs qui pourront nous aider à l'élaboration d'un algorithme automatisable.

Merci pour cet échange et pour cette belle découverte de cet aspect original « en sablier » du nuage lymphocytaire au niveau du scattergramme WDF, qui montre des performances très intéressantes. Il a le mérite d'ouvrir l'horizon et le champ des possibles quant au diagnostic de la COVID-19 : avec une simple NFS, donc un outil non-invasif, peu coûteux et plus rapide que les tests diagnostiques standards. Et toutes nos félicitations pour le prix RICAI-ASM !