

Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 22 novembre 2019

Par Guillaume Rateau

Né(e) le 9 avril 1991 à Châteauroux

**Evaluation de nouvelles technologies en hématimétrie : automate
de numération formule sanguine Roche® Cobas M511 et réactif de
désagrégation plaquettaire Horiba® PAF-5**

Thèse dirigée par Dr Franck TRIMOREAU

Examineurs :

M. le Professeur Jean Feuillard
M. le Professeur Franck Saint-Marcoux
M. le Docteur David Rizzo
M. le Docteur Sébastien Hantz
M. le Professeur Frédéric Favreau
M. le Docteur Franck Trimoreau

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité
Membre invité





Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 novembre 2019

Par Guillaume Rateau

Né(e) le 9 avril 1991 à Châteauroux

Evaluation de nouvelles technologies en hématimétrie : automate de numération formule sanguine Roche® Cobas M511 et réactif de désagregation plaquettaire Horiba® PAF-5

Thèse dirigée par Dr Franck TRIMOREAU

Examineurs :

M. le Professeur Jean Feuillard
M. le Professeur Franck Saint-Marcoux
M. le Docteur David Rizzo
M. le Docteur Sébastien Hantz
M. le Professeur Frédéric Favreau
M. le Docteur Franck Trimoreau

Président

Juge

Juge

Juge

Membre invité

Membre invité



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 11 octobre 2018

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VERNEREOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE

DESPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE

MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET
STOMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

BALLOUHEY Quentin

CHIRURGIE INFANTILE

BARRAUD Olivier

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

BOURTHOUMIEU Sylvie

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

BOUTEILLE Bernard

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

DURAND Karine

BIOLOGIE CELLULAIRE

ESCLAIRE Françoise

BIOLOGIE CELLULAIRE

HANTZ Sébastien

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

JACQUES Jérémie

GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE

JESUS Pierre

NUTRITION

LE GUYADER Alexandre

CHIRURGIE THORACIQUE et
CARDIOVASCULAIRE

LIA Anne-Sophie

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

QUELVEN-BERTIN Isabelle

BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE

RIZZO David

HEMATOLOGIE

TERRO Faraj

BIOLOGIE CELLULAIRE

WOILLARD Jean-Baptiste

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel

(Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019)

DUMOITIER Nathalie

(Responsable du département de Médecine
Générale)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan (du 1^{er} septembre 2016 au 31 août 2019)

LAUCHET Nadège (du 1^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule (du 1^{er} septembre 2018 au 31 août 2021)

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01.09.2017 au 31.08.2019

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2018 au 31.08.2020

BESSEDE Jean-Pierre du 01-09-2018 au 31-08-2020

BONNAUD François du 01.09.2017 au 31.08.2019

DE LUMLEY WOODYEAR Lionel du 01.09.2017 au 31.08.2019

DENIS François du 01.09.2017 au 31.08.2019

GAINANT Alain du 01.09.2017 au 31.08.2019

MERLE Louis du 01.09.2017 au 31.08.2019

MOULIES Dominique du 01.09.2017 au 31.08.2019

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2017 au 31.08.2019

VIROT Patrice du 01.09.2018 au 31.08.2019

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2018

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

AUDITEAU Emilie	EPIDEMIOLOGIE (CEBIMER)
BAUDRIER Fabien	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
CHARISSOUX Aurélie	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
DAURIAT Benjamin	HISTOLOGIE, EMBRIOLOGIE ET CYTOGENETIQUE
DERBAL Sophiane	CHIRURGIE ANATOMIE
DOUCHEZ Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
FAYE Piere-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
HUMMEL Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
KONG Mélody	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
MARQUET Valentine	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE
PIHAN Franck	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
RIVAILLE Thibaud	CHIRURGIE-ANATOMIE
TALLA Perrine	BIOLOGIE CELLULAIRE
TCHU HOI NGNO Princia	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ARMENDARIZ-BARRIGA Matéo	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBLANC Mathilde	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AZAÏS Julie	MEDECINE INTERNE A
BAUDONNET Romain	OPHTALMOLOGIE
BEEHARRY Adil	CARDIOLOGIE

BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BOSETTI Anaïs	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
BOUSQUET Pauline	PEDIATRIE
CHAMPIGNY Marie-Alexandrine	PEDIATRIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE
COLOMBIÉ Stéphanie	MEDECINE INTERNE A
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DARNIS Natacha	PEDOPSYCHIATRIE
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE
DIDOT Valérian	CARDIOLOGIE
EL OUAFI Zhour	NEPHROLOGIE
EVARD Bruno	REANIMATION
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
FROGET Rachel	CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE (pédiatrie)
GHANEM Khaled	ORL
GEYL Sophie	GASTROENTEROLOGIE
GOUDELIN Marine	REANIMATION
GUTIEREZ Blandine	MALADIES INFECTIEUSES
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
KRETZSCHMAR Tristan	PSYCHIATRE d'ADULTES
LACOSTE Marie	MALADIES INFECTIEUSES
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAHMADI Sanae	NEUROLOGIE

LEGROS Maxime	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
LEHMANN Lauriane	GASTROENTEROLOGIE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MARTINS Elie	CARDIOLOGIE
MICLE Liviu-Ionut	CHIRURGIE INFANTILE
MOWENDABEKA Audrey	PEDIATRIE
ORLIAC Hélène	RADIOTHERAPIE
ORSONI Xavier	UROLOGIE
PLAS Camille	MEDECINE INTERNE B
PRUD'HOMME Romain	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
QUILBE Sébastien	OPHTALMOLOGIE
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI)
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SANGLIER Florian	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
SIMONNEAU Yannick	PNEUMOLOGIE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
VAIDIE Julien	HEMATOLOGIE CLINIQUE

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE

VITALE Gaetano	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
-----------------------	--

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

CARLESSO-CROUZIL Olivia

SEVE Léa

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE – MEDECINE GENERALE

RUDELLE Karen

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

LERAT Justine

O.R.L. (du 1er mai 2016 au 31 octobre 2020)

MATHIEU Pierre-Alain

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et
TRAUMATOLOGIQUE
(du 1er mai 2016 au 31 octobre 2020)

Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver
Pierre Dac

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean Feuillard. Vous me faites le grand honneur d'accepter d'être le président de ce jury. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Franck Trimoreau. Tu as accepté de diriger ce travail de thèse. Pour ton soutien, ta disponibilité, tes conseils tout au long de ce travail. Pour partager toujours avec enthousiasme et bienveillance tes passions. Reçois ici mes remerciements les plus sincères. Trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux. Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur David Rizzo. Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Trouvez dans celui-ci le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Sébastien Hantz. Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Frédéric Favreau. Vous me faites l'honneur d'accepter mon invitation. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

A Fabrice Vonarx (de Roche®) pour m'avoir éclairé sur les caractéristiques techniques du M511, assuré sa maintenance. A Xavier Orange (de Roche®) pour m'avoir appris l'utilisation du M511. A Emilie Dejean et Dr Eberlé (de Roche®) pour m'avoir guidé dans l'évaluation.

A Christophe Duroux (d'Horiba®) et ses collègues pour leur aide dans l'évaluation du PAF-5.

A chaque biologiste du service, Nathalie Gachard, Estelle Guérin, Jasmine Chauzeix, Magali Donnard ; à Alexia Marcillou, Patrick Archambault à l'ensemble du personnel du service d'hématologie biologique, pour votre accueil, votre sympathie, votre disponibilité et pour avoir partagé vos connaissances au cours des trois stages réalisés pendant mon internat. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

A Marc Labriffe pour son aide, ses précieux conseils et sa bienveillance, à Yohan Darrieux pour ses conseils informatiques, à Maxime Lafontaine pour ses astuces d'accès aux articles scientifiques, à mes co-internes Virginie Pascal, Mylène Gayet, Marine Dupont, Charlotte Rivière, Remy Formento, Cassandra Jadeau, Sarah Nasraddine, François Lamarche, Marie-Céleste Laroque qui m'ont aidé à sélectionner des échantillons intéressants pour mon étude.

A mes parents, mes grands-parents, ma famille merci pour votre patience et soutien pendant ces longues études !

A Marie-Fleur qui m'a accueilli au laboratoire et fait découvrir la biologie médicale ! Et qui n'a cessé de m'accompagner pendant tout l'internat.

A Théo Ceccomarini pour sa générosité et sa bonne humeur permanente, à Cassandra Jadeau pour sa gentillesse et à toutes ces belles rencontres faites pendant ces trois années d'internat qui resteront de très bons souvenirs !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations	24
Introduction	26
I. Evaluation du cobas M511	27
I.1. Généralités	27
I.1.1. Présentation des différentes techniques d'analyses automatisées pour l'hémogramme	27
I.1.1.1. Analyse par impédance	28
I.1.1.2. Diffraction laser	29
I.1.1.3. Courant à haute fréquence	30
I.1.1.4. Cytochimie ou lyse chimique	30
I.1.1.5. Réactif fluorescent	31
I.1.1.6. Anticorps monoclonaux	31
I.1.2. Les analyses mesurées et les analyses calculées	31
I.1.2.1. Analyses mesurées	31
I.1.2.2. Analyses calculées	32
I.1.3. Les artefacts avec les méthodes actuelles	33
I.1.3.1. Artefacts touchant plusieurs paramètres de NFS	33
I.1.3.2. Artefact dans le dosage de l'hémoglobine	34
I.1.3.3. Artefact dans la mesure du VGM	34
I.1.3.4. Artefact dans la numération des hématies	34
I.1.3.5. Artefact dans la numération plaquettaire	35
I.1.3.6. Artefact dans la numération leucocytaire	35
I.1.3.7. Artefact dans la formule leucocytaire	36
I.1.4. Signalement par des alarmes	37
I.1.5. Les nouvelles techniques automatisées pour la formule leucocytaire	37
I.1.6. Présentation technique du M511	38
I.1.6.1. Description générale	39
I.1.6.2. Réalisation de l'impression sur lame	39
I.1.6.3. Coloration	42
I.1.6.4. Microscopie et lecture	42
I.1.6.5. Acquisitions d'images, de valeurs et résultats rendus	43
I.1.6.6. Interférences, artéfacts, interrogations et résultats rendus	46
I.2. Objectifs et méthode	48
I.2.1. Objectifs	48
I.2.2. Protocole	48
I.2.3. Vérification de méthode	49
I.2.3.1. Fidélité	49
I.2.3.1.1. Répétabilité	50
I.2.3.1.2. Reproductibilité intra-laboratoire	50
I.2.3.2. Évaluation de la justesse ou de l'exactitude	50
I.2.3.3. Estimation de l'incertitude de mesure	51
I.2.3.4. Comparaison de méthode	52
I.3. Résultats	53
I.3.1. Résultats de la vérification de méthode dans le cas d'une numération de formule sanguine	53
I.3.1.1. Globules blancs	54
I.3.1.2. Globules rouges	55

I.3.1.3. Hémoglobine.....	56
I.3.1.4. VGM.....	57
I.3.1.5. CCMH.....	58
I.3.1.6. Plaquettes.....	59
I.3.1.7. Erythroblastes.....	60
I.3.2. Comparaison avec les techniques usuelles : points particuliers.....	61
I.3.2.1. Interférences habituelles.....	61
I.3.2.2. Anémie.....	61
I.3.2.3. La numération plaquettaire et les amas plaquettaires.....	63
I.3.2.4. Échantillons de nouveau-nés.....	64
I.3.2.5. Erythroblastose (adulte).....	65
I.3.2.6. Les schizocytes.....	66
I.3.2.7. Formule leucocytaire.....	66
I.3.2.7.1. Anomalies leucocytaires réactionnelles.....	66
I.3.2.7.1.1. Lymphocytose physiologique du nourrisson.....	67
I.3.2.7.1.2. Lymphocytes hyperbasophiles et syndromes mononucléosiques.....	67
I.3.2.7.2. Hémopathies malignes.....	68
I.3.2.7.2.1. Leucémies aigües lymphoblastiques et myéloblastiques.....	68
I.3.2.7.2.2. Lymphomes.....	70
I.3.2.7.2.2.1. Leucémie lymphoïde chronique.....	70
I.3.2.7.2.2.2. Autres lymphomes B.....	71
I.3.2.7.2.2.2.1. Lymphome de la zone marginale splénique (SZML).....	71
I.3.2.7.2.2.2.2. Lymphome B splénique de la pulpe rouge (SRPBL).....	71
I.3.2.7.2.2.2.3. Leucémie à tricholeucocytes.....	72
I.3.2.7.2.2.2.4. Leucémie prolymphocytaire B.....	72
I.3.2.7.2.2.2.5. Lymphome lymphoplasmocytaire (Maladie de Waldenström).....	73
I.3.2.7.2.2.2.6. Lymphome à cellule du manteau.....	73
I.3.2.7.2.2.2.7. Lymphome B de bas grade inclassable.....	73
I.3.2.7.2.2.2.8. Leucémie à plasmocytes malins.....	73
I.3.2.7.2.2.2.9. Lymphome de Burkitt.....	74
I.3.2.7.2.2.3. Lymphomes T.....	74
I.4. Problèmes techniques rencontrés au cours de l'évaluation.....	75
I.5. Discussion.....	75
I.5.1. Particularités techniques du M511.....	75
I.5.1.1. Généralités et temps de réalisation des analyses.....	75
I.5.1.2. La coloration.....	76
I.5.1.3. L'impression sur lame.....	77
I.5.2. Validation de méthode et comparaison de méthode.....	80
I.5.2.1. Analyse quantitative.....	80
I.5.2.2. Comparaison morphologique des GB.....	86
I.6. Conclusion.....	101
II. Évaluation du réactif PAF 5.....	103
II.1. Amas plaquettaires dans la numération plaquettaire.....	103
II.1.1. Définition des amas plaquettaires et de la pseudothrombopénie liée à l'EDTA.....	103
II.1.1.1. Physiologie des amas plaquettaires.....	104
II.1.1.2. Molécules interagissant avec l'agrégation plaquettaire.....	105
II.1.2. Enjeux.....	106

II.1.3. Mesures actuelles en cas d'amas plaquettaires	106
II.2. Objectifs	107
II.3. Méthode et résultats	107
II.3.1. Protocole	107
II.3.1.1. Méthode d'évaluation et place du M511	109
II.3.1.2. Difficultés rencontrées	110
II.3.1.3. Résultats	110
II.4. Discussion	116
II.4.1. Amas plaquettaires rendus par le laboratoire	116
II.4.2. Efficacité du PAF-5	116
II.5. Conclusion.....	118
Références bibliographiques	119
Serment d'Hippocrate	123

Table des illustrations

Figure 1: Mesure par impédance.....	29
Figure 2 : Mesure par diffraction laser.....	30
Figure 3: Cobas M511 et sa station de travail iMac	39
Figure 4: Mode tube ouvert	40
Figure 5: Mode Rack	40
Figure 6: Mode urgent	40
Figure 7: illustration du mécanisme d'impression de lame du M511	41
Figure 8: système de ventouses pour le déplacement des lames.....	41
Figure 9: supports pour la coloration des lames.....	42
Figure 10: affichage des résultats de la NFS d'un échantillon.....	43
Figure 11: Affichage de la galerie de classification des GB d'un échantillon	44
Figure 12: Affichage de la galerie des GR.....	44
Figure 13: Affichage de la galerie des plaquettes (présence ici d'amas plaquettaires)	45
Figure 14: frottis classique, la flèche indique la zone de lecture	46
Figure 15: frottis classique, lecture sur les bords pour repérer certaines cellules dont les blastes.....	46
Figure 16: lame DigiMAC de Roche® imprimée en zigzag et colorée, lecture privilégiée en périphérie de l'impression.....	47
Figure 17: Droite de régression linéaire pour la CCMH.....	63
Figure 18: galerie d'image d'un échantillon avec des amas plaquettaires	64
Figure 19: 3 lames de sang ; à gauche une lame DigiMAC slide de Roche®, au centre une lame issue de l'étaleur-colorateur Sysmex, à droite un frottis classique	78
Figure 20: Aspect de l'impression sur les bords au faible grossissement	78
Figure 21: Aspect de l'impression sur les zones de lectures au faible grossissement	79
Figure 22: Aspect d'un schizocyte sur l'écran du Mac relié au Cobas après impression et coloration par le M511	82
Figure 23: outil de classement par forme des GR sur l'iMac, mettant facilement en évidence la présence de schizocytes	82
Figure 24: Exemple de cellule identifiée comme un amas plaquettaire par le M511	84
Figure 25: Exemple de cellule lysée identifiée comme un amas plaquettaire par le M511	85
Figure 26: lymphocytes hyperbasophiles affichés par le M511 (de grande taille à gauche, non classé), (de petite taille à droite, classé en lymphocyte)	88

Figure 27: lymphocytes hyperbasophiles au microscope avec coloration par le M511	88
Figure 28: capture d'écran du Mac présentant des lames imprimées et colorées par le M511, à gauche un blaste (classé en lymphocyte), à droite un lymphocyte	89
Figure 29: deux types de cellules affichées par un DM: à gauche un blaste lymphoïde, à droite un petit lymphocyte (source: www.cellavision.com).....	89
Figure 30: blastes de LALB sur lames imprimées et colorées par le M511 et photographiés au microscope	90
Figure 31: Blastes de LALB affichés par le Mac après impression et coloration par le M511	90
Figure 32: Blastes de LAM "cup like", sur écran après impression et coloration par le M511	91
Figure 33: Blastes de LAM « cup like », vu au microscope avec des cupules nucléaires bien visibles après impression et coloration par le M511	91
Figure 34: Blastes de LAM2 avec t(8 ;21), avec parfois un unique corps d'Auer vu au microscope après impression par le M511 et coloration MGG.....	92
Figure 35: Blaste de LAM2 avec une translocation t(8 ;21) sur écran du Mac avec coloration de Romanowsky	92
Figure 36: Blastes de LAM3 sur écran Mac après impression et coloration par le M511	93
Figure 37: Blastes avec corps d'Auer affichés par un DM (Source: www.cellavision.com)	93
Figure 38: Blastes de LAM3 au microscope après impression et coloration par le M511	93
Figure 39: Blaste de LAM3 après impression au M511 et coloration MGG	94
Figure 40: Blaste de LAM5 (avec corps d'Auer à gauche) vus au microscope après impression par le M511 et coloration MGG	94
Figure 41: Blaste de LAM5 vu au microscope après impression et coloration par le M511	95
Figure 42: Blastes de LAM4 vus au microscope après impression et coloration par le M511	95
Figure 43: Blastes de LAM 4 (un monocyte avec des vacuoles à droite) vus au microscope après impression par le M511 et coloration au MGG.....	96
Figure 44: plasmocytes observés sur écran Mac classé en monocyte ou non classé	97
Figure 45: 3 plasmocytes et un érythroblaste (à gauche), 2 plasmocytes (à droite) au microscope après impression et coloration par le M511	98
Figure 46: Prolymphocyte T observé sur écran de l'iMac	98
Figure 47: à gauche lymphocyte normal, à droite prolymphocytes-T au microscope après impression et coloration par le M511	99

Figure 48: pro-lymphocytes T au microscope après impression par le M511 et coloration au MGG	99
Figure 49: Tricholeucocyte visible sur l'écran du Mac classé en monocyte (impression et coloration par le M511)	100
Figure 50: image d'un tricholeucocyte affiché par un DM (sources: www.cellavision.com)	100
Figure 51: Tricholeucocytes au microscope après impression et coloration par le M511	100
Figure 52: Tricholeucocytes observés au microscope après impression par le M511 puis coloration au MGG	101
Figure 53: Tricholeucocytes observés au microscope sur des frottis classiques colorés au MGG	101
Figure 54: Protocole d'évaluation du réactif PAF-5	108

Table des tableaux

Tableau 1: Résultats de validation des GB	54
Tableau 2: Résultats de validation des GR	55
Tableau 3: Résultats de validation de l'Hémoglobine.....	56
Tableau 4: Résultats de validation du VGM	57
Tableau 5: Résultats de validation de la CCMH.....	58
Tableau 6: Résultats de validation des plaquettes	59
Tableau 7: Résultats de validation des érythroblastes	60
Tableau 8:différenciation des échantillons avec et sans amas plaquettaires.....	111
Tableau 9:Résultats sur Sapphire et l'Advia du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires	112
Tableau 10 : Résultats sur Sapphire et l'Advia du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires en tenant compte de la dilution	112
Tableau 11:Résultats sur M511 du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires	113
Tableau 12:Résultats sur Sapphire et l'Advia du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires et une thrombopénie <120G/L	114
Tableau 13:Résultats sur M511 du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires et une thrombopénie <120G/L	114

Liste des abréviations

CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CIL : comparaison inter-laboratoire

CIQ : contrôle interne de la qualité

COFRAC : comité français d'accréditation

CPT : trisodium citrate, pyridoxal 5'- phosphate

CTAD : citrate théophylline adenosine dipyridamole

CV : coefficient de variation

DM : digital cell morphology system

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EEQ : évaluation externe de la qualité

Env : environ

FI : fidélité intermédiaire

GR : globule rouge

GB : globule blanc

Hb : hémoglobine

Ht : hématocrite

IG : granuleux immatures

Inf : inférieur

L : lymphocytes

LAL B : leucémie aigüe lymphoblastique B

LB : lymphocytes B

LBM : laboratoire de biologie médicale

LMC : leucémie myéloïde chronique

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LT : lymphocytes T

M : monocytes

MGG : May-Grünwald-Giemsa

NA : non applicable

nRBC : érythroblastes (nucleated red blood cell)

PNB : polynucléaires basophiles

PNE : polynucléaires éosinophiles

Plt : plaquettes

TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

SGL : système de gestion de l'informatique du laboratoire

SMD : syndrome myélodysplasique

SMP : syndrome myéloprolifératif

SZML : lymphome de la zone marginale

VGM : volume globulaire moyen

Introduction

L'hémogramme fait partie aujourd'hui des examens les plus prescrits. Il permet, à partir d'un échantillon de sang total, d'obtenir rapidement plusieurs informations sur l'état du patient. Ces informations sont utiles, voire indispensables, pour faire un diagnostic, dépister des situations urgentes, suivre l'évolution d'un cas sous traitement, évaluer des éventuelles contre-indications à des traitements et/ou des interventions, évaluer les effets indésirables de certains traitements.

Bien que très utile, il ne serait pas autant employé s'il n'avait pas connu des changements technologiques profonds. L'arrivée des automates réalisant de façon standardisée et rapide les examens en a accru l'intérêt. Ils ont permis d'obtenir des résultats plus fiables, plus rapidement.

Actuellement une partie de cet examen, la formule leucocytaire, peut nécessiter pour garantir un résultat exact le recours à des techniques manuelles, de type réalisation de frottis et lecture au microscope, surtout dans les situations pathologiques. De même la morphologie des cellules observable au microscope peut donner des informations pertinentes, voire essentielles au clinicien.

Des sociétés cherchent donc à mettre au point des techniques automatisées pour rendre la formule leucocytaire ainsi que les aspects morphologiques avec la plus grande exactitude possible.

C'est le cas de Roche® qui a créé un automate, le M511, incluant des microscopes et étant capable de réaliser ses propres frottis pour les lire. Il prend des photos des images qu'il obtient et les transmet sur un écran d'ordinateur.

L'hémogramme, tel qu'il est obtenu aujourd'hui n'est pas dénué de quelques artefacts. L'un d'eux, relativement fréquent et probablement un des plus gênants en routine, concerne les amas de plaquettes présents dans certains échantillons, qui vont sous-estimer le nombre réel de plaquettes chez les patients et pouvant donc altérer la prise en charge de ce dernier.

Il n'existe aucun moyen actuellement fiable pour contourner cet artefact et déterminer une valeur juste et précise des plaquettes dans la situation d'amas in vitro. Plusieurs projets des industriels existent. Le M511 est justement capable de réaliser un décompte au niveau des amas eux-mêmes grâce à sa technologie numérique. Une autre approche, celle d'Horiba® est la mise au point d'un réactif permettant de désagréger les plaquettes en amas dans le sang pour ensuite les compter sur les automates.

L'objet de cette thèse est double ; il s'agit d'évaluer le Cobas M511 mis au point par Roche® et de le comparer au Cell-Sapphire d'Abbott® et à l'Advia 2120 de Siemens® présents dans notre laboratoire ; ainsi que d'évaluer l'efficacité du réactif PAF-5 mis au point par Horiba® pour désagréger les plaquettes en amas.

I. Evaluation du cobas M511

I.1. Généralités

L'hémogramme, ou NFS, est un des examens les plus prescrits en médecine de ville ou à l'hôpital. Il comprend plusieurs analyses : nombre de GR, taux d'hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen (VGM), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), nombre de GB, nombre de plaquettes (plt). On y associe la formule leucocytaire (Polynucléaires neutrophiles PNN, éosinophiles PNE, basophiles PNB, lymphocytes L, monocytes M) et parfois la numération des réticulocytes.

Le cobas M511 est un automate de cytologie mis au point récemment par Roche® à Boston aux États-Unis. Il a été conçu pour rendre la NFS. Il ne repose pas sur les techniques actuellement en place sur la majorité des automates de numération : analyse par impédance, diffraction laser, courant à haute fréquence, cytochimie, réactif fluorescent. Il réalise et colore ses propres frottis et intègre deux microscopes à faible et fort grossissement lui permettant de les lire. Les images et les résultats sont transférés à un ordinateur iMac relié à l'automate.

I.1.1. Présentation des différentes techniques d'analyses automatisées pour l'hémogramme

L'hémogramme était obtenu par des techniques manuelles longues et peu reproductibles avant que n'apparaissent les premiers automates. En 1953, le « Coulter » (mis au point par Wallace H. Coulter et Joseph Coulter fondateurs de la société Coultronics) a révolutionné les laboratoires d'hématologie en amenant une technologie capable de compter automatiquement avec rapidité et précision les cellules sanguines(1). Puis des cytomètres en flux se sont développés dans les années 1960. Ces automates se sont progressivement améliorés et ont permis par la suite de rendre en plus la formule leucocytaire, puis la numération des réticulocytes.

Ces différentes méthodes d'analyse peuvent parfois être associées sur le même automate. Généralement les automates utilisent toujours l'impédance ou la diffraction laser pour la mesure des données quantitatives et les autres méthodes y sont ou non associées. L'Advia 2120 de Siemens® associe ainsi plusieurs techniques dont la cytochimie, la diffraction laser et la fluorescence pour le compte des GB notamment(2).

L'utilisation d'appareils numérisant des images de frottis sanguins est apparue relativement tôt. Ils s'appuyaient sur l'attribution de différents seuils de densité optiques pour classer les cellules(2). En effet des appareils comme le Cydac Scanning Microscope System (mis au point en 1966) ou le Corning Larc, suivis de quelques autres machines durant les années 1970 ont finalement été rapidement abandonnés car s'ils permettaient l'analyse morphologique des cellules, ils ne pouvaient pas donner des chiffres de numération à partir de simples frottis (3). En effet le volume et la répartition du sang déposé sur les frottis étaient variables, les étaleurs-colorateurs n'existant pas à cette époque. De plus ils étaient lents, ne permettaient de compter que 100 à 200 cellules, nécessitaient une relecture sur lame par un biologiste pour les cas douteux et restaient coûteux à l'achat. Ils furent ainsi vite remplacés par les automates capables de cytométrie en flux qui se sont développés dans les années 1980. Ces derniers étant capables de faire la

numération des cellules et de différencier les différents globules blancs tout en dosant l'hémoglobine. Ces automates se sont perfectionnés en associant parfois les techniques d'impédance et de diffraction laser. Ainsi le Cell-dyn Sapphire compte les GB à partir de deux canaux par impédance et diffraction laser, ce dernier canal étant également utilisé pour la formule leucocytaire(4). De nos jours les technologies numériques se sont grandement améliorées et commencent désormais à être intégrées dans des instruments de laboratoires.

I.1.1.1. Analyse par impédance

Elle permet le compte de GR, GB, et de plaquettes. C'est la méthode de référence. Elle repose sur le principe Coulter, nom de ses inventeurs (1953), illustré par la Figure 1: Mesure par impédance. Elle reste encore largement utilisée de nos jours. Les cellules sont de mauvais conducteurs électriques en comparaison à une solution saline. Les cellules sont mises en suspension dans une solution saline et passent individuellement à travers de petits orifices entre deux électrodes. A chaque passage de cellule le courant électrique diminue ce qui correspond à une augmentation de la résistance (variation d'impédance) et génère une impulsion électrique. Le nombre d'impulsions électriques correspond au nombre de cellules ayant traversé l'orifice. L'amplitude de l'impulsion est proportionnelle au volume de la cellule. En effet plus le volume de la cellule est élevé plus l'augmentation de l'impédance est importante. On classe ces différentes amplitudes pour avoir un histogramme donnant la distribution volumétrique. Pour différencier les GB des GR, une lyse des GR est effectuée. Les premiers automates permettaient de différencier les GB selon leur taille en 3 groupes : ceux avec le plus grand volume dépassant 160 fL (PNN, PNE), ceux de volume intermédiaire entre 90 et 160 fL (monocytes, cellules neutrophiles et éosinophiles immatures), ceux de petit volume inférieur à 90 fL (lymphocytes et PNB)(2). Lorsque deux ou trois cellules franchissent l'orifice en même temps, on parle de « coïncidence » ; l'impulsion électrique générée est aberrante et ne doit pas être prise en compte pour éviter de fausser les résultats. On peut prévoir statistiquement le nombre de passages en coïncidence selon le nombre total de cellules et corriger ainsi automatiquement ces résultats.

PRINCIPE DE MESURE PAR LA VARIATION D'IMPEDANCE

La valeur de l'impulsion U est proportionnelle au volume cellulaire

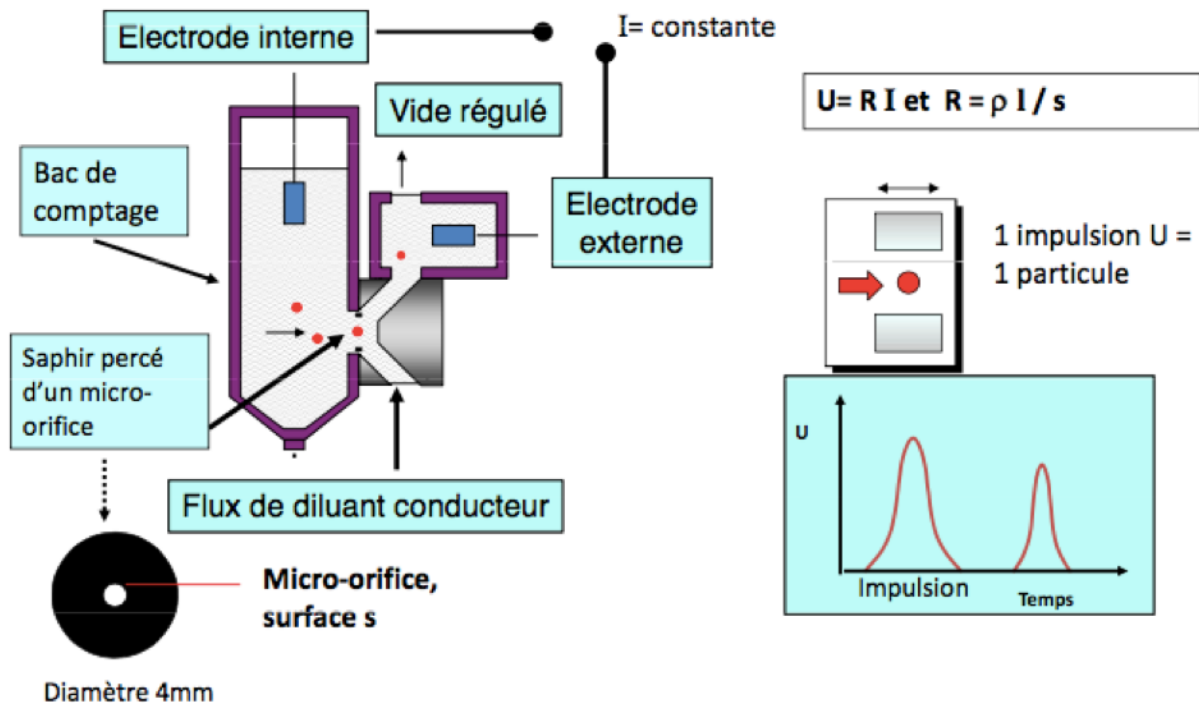


Figure 1: Mesure par impédance

Source : automatisation de l'Hémogramme. Bruno Flamand, IUT de Dijon

I.1.1.2. Diffraction laser

On parle également de mesure optique, reposant sur les principes de cytométrie en flux. Elle permet la numération des GB, des plaquettes, et l'établissement de la formule leucocytaire. Ces principes sont représentés par la Figure 2 : Mesure par diffraction laser. Les cellules sont en suspension et passent à travers une gaine. Elles se retrouvent alignées à l'intérieur de celle-ci par hydrofocalisation (qui consiste à placer les cellules à la queue leu leu, séparées les unes des autres, dans une veine liquide). Chaque cellule passe alors une à une devant un faisceau laser (ou parfois une lampe au tungstène) et en diffracte la lumière. Le nombre de fois où la lumière du laser est interrompue correspond au compte de cellules. Cette lumière diffractée est ensuite analysée aux petits angles et aux grands angles. Aux petits angles ($0-3^\circ$ par rapport à l'axe du faisceau incident, on parle de « forward scatter ») la mesure de la lumière diffractée nous informe sur le volume de la cellule. Aux grands angles (10° à 15° appelé « side scatter » et 90°), la lumière a traversé la membrane cellulaire et est diffusée par les organites intracellulaires ; ce qui nous informe sur la granularité du cytoplasme (90°) et la condensation de la chromatine. On peut ainsi classer au moins 4 sous-types de GB(5). De plus, des cellules anormales ou immatures vont donner, pour chacune, des résultats caractéristiques permettant également de les classer(2). L'étude de la morphologie des noyaux par méthode optique peut également générer certaines alarmes (de type blastes).

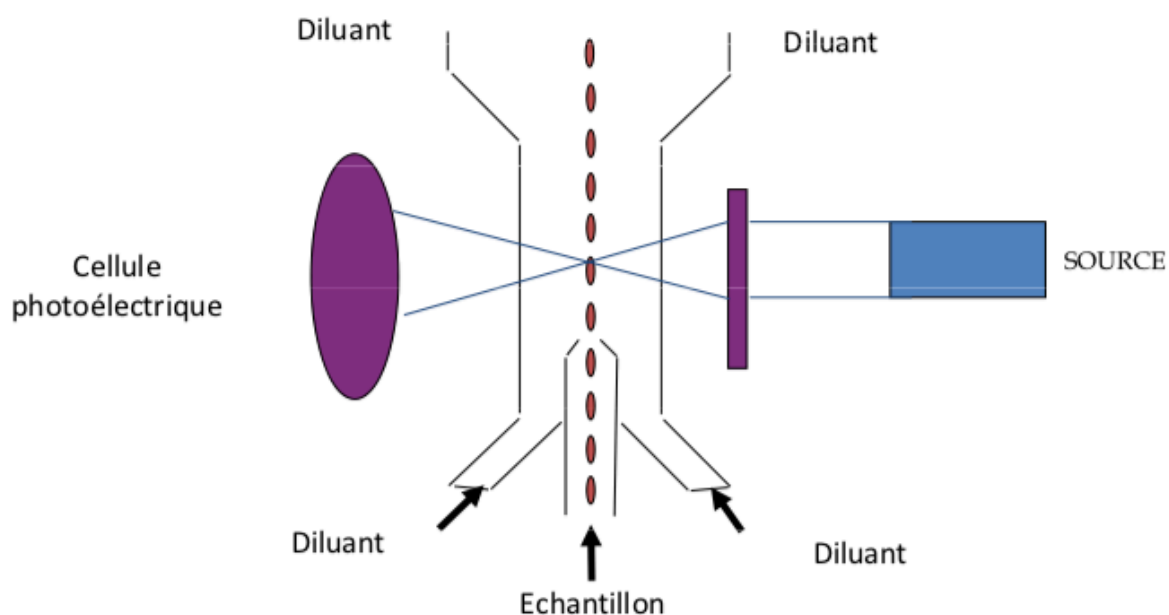


Figure 2 : Mesure par diffraction laser
Source : Automatisation de l'Hémogramme. Bruno Flamand, IUT de Dijon

I.1.1.3. Courant à haute fréquence

Les cellules en suspension passent entre deux électrodes soumises à un courant de haute fréquence. Le passage de chaque cellule déclenche une différence de potentiel variable selon la conductivité cellulaire, c'est-à-dire selon le contenu cytoplasmique, la taille et la structure nucléaire(4). Cette technique a souvent été couplée à l'analyse par impédance de Coulter (informant seulement sur le volume cellulaire) pour mieux classer les GB ; en cas de discordance entre les résultats d'impédance et ceux de la conductivité cellulaire, un signal est généré pour effectuer une revue de l'échantillon en question(5).

I.1.1.4. Cytochimie ou lyse chimique

Elle permet d'identifier les populations leucocytaires. Elle comprend notamment la réaction des myéloperoxydases. La myéloperoxydase est contenue dans les granulations primaires de certains leucocytes et absente pour d'autres comme les lymphocytes. La peroxydase cellulaire, en présence d'eau oxygénée et d'un substrat (4-chloro-1-naphtol) génère un précipité coloré. Ce dernier sera analysé par absorption lumineuse. En effet l'absorbance de la lumière blanche par les cellules colorées est proportionnelle à l'intensité de la réaction des peroxydases(2). Ainsi les cellules possédant des peroxydases (monocytes, PNN, PNE) vont donner des résultats positifs, là où les autres cellules qui en sont dépourvues (PNB, lymphocytes) vont donner un résultat négatif. Les cellules doivent ensuite être différenciées par leur taille pour retrouver les 5 types de GB. De grandes cellules non colorées et donc dépourvues de peroxydase peuvent être mises en évidence ; il peut alors s'agir de lymphocytes activés, de plasmocytes, ou de blastes.

La lyse chimique permet de détruire la membrane des leucocytes, sauf celle des polynucléaires basophiles qui pourront donc être identifiés et comptés. Il s'agit donc d'une lyse différentielle. Sur ce canal une numération des noyaux des leucocytes restant après la lyse est également réalisée permettant un décompte de la leucocytose non impacté par des artéfacts comme les amas plaquettaires (dissous par la lyse).

I.1.1.5. Réactif fluorescent

Il s'agit d'une mesure optique comme dans le cas de la diffraction laser. On fait réagir les cellules avec un fluorochrome qui marque certaines cellules et qui va émettre alors une fluorescence. Les cellules marquées sont souvent les réticulocytes ou les plaquettes. Ainsi des colorants fluorescents comme l'acridine orange ont été utilisés pour leur capacité à se fixer à l'ARN contenu dans les réticulocytes, et ainsi à le différencier des autres GR dépourvus de d'ARN. D'autres colorants comme le iodure de propidium ou la polyméthine permettent de séparer les érythroblastes et réticulocytes des GB(2).

Certains GB sont également capable d'autofluorescence, ce qui apporte une information supplémentaire pour classer les cellules(2).

I.1.1.6. Anticorps monoclonaux

Certains analyseurs utilisent des fluorochromes couplés à des anticorps monoclonaux pour différencier les cellules. C'est le cas du Cell-dyn Sapphire (Abbott®) qui comme un cytomètre en flux utilise les fluorochromes suivants ; fluorescéine isothiocyanate, phycoérythrine, et phycoérythrine-cyanine5 (2). Les anticorps monoclonaux utilisés sont :

- pour les leucocytes : des anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 pour mettre en évidence les LT et avoir un compte des lymphocytes CD4 et des lymphocytes CD8 ;
- pour les plaquettes : des anti-CD61.

I.1.2. Les analyses mesurées et les analyses calculées

Certaines analyses sont mesurées (dosage de l'hémoglobine) et d'autres calculées (hématocrite, TCMH, CCMH). Selon les automates, les données mesurées et calculées ne sont pas les mêmes, nous présentons ici les situations les plus fréquentes.

I.1.2.1. Analyses mesurées

Il s'agit généralement du dosage de l'hémoglobine, du VGM, parfois de la CCMH ; de la numération des plaquettes, des GR, et des GB.

Le dosage de l'hémoglobine s'exprime en g/L dans le système international mais est encore fréquemment rendu en France en g/dL et correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans un volume de sang total. Les automates vont lyser les GR (par hypotonie, pH bas, et addition d'agents accélérants la lyse). L'hémoglobine alors libérée va se transformer en cyanméthémoglobine en présence de ferricyanure de potassium. Un spectrophotomètre va mesurer alors la densité optique à 540 nm (bande d'absorption de la cyanméthémoglobine).

Les automates dotés de diffraction optique peuvent aussi mesurer la quantité d'hémoglobine de chaque GR. On parle de CHCM (concentration hémoglobinique corpusculaire moyenne) superposable (chez le sujet sain) à la CCMH calculée(6).

Le VGM est le volume total des hématies par rapport au nombre d'hématies ; le plus souvent exprimé en fL ou μm^3 . Il est mesuré par impédance ou par diffraction laser, (dans ce dernier cas après sphérisation pour que la taille mesurée soit proportionnelle au volume de la cellule). Selon les automates, les volumes détectés vont de 24-40 fL à 250-360fL dans la mesure par impédance.

L'hématocrite est, sur certains automates fonctionnant par impédance, mesurée : elle correspond alors à la somme des volumes individuels des GR traversant l'orifice en un temps donné.(7) Ainsi sur certains automates le VGM est calculé à partir de l'hématocrite mesurée et du nombre de GR.

Les plaquettes sont comptées par impédance, diffraction laser et parfois par fluorescence à partir de quelques milliers d'éléments.

Les GB sont comptés par impédance ou diffraction laser, après lyse des GR.

La formule leucocytaire, avec les 5 populations leucocytaires repose sur l'analyse d'un nombre élevé de GB ; 5000 à 10000 éléments. Avant l'automatisation, la formule leucocytaire s'établissait au microscope à partir d'un frottis. L'automatisation a apporté, pour les cellules normales, une plus grande précision, une plus grande rapidité d'exécution, une meilleure reproductibilité. Si la répartition des différentes populations n'est pas normale, une alarme est générée par l'automate. Selon l'alarme, un frottis peut être nécessaire pour examiner la morphologie des cellules et orienter le diagnostic. La représentation de ces différentes populations leucocytaires se fait généralement sous forme de cytogrammes. Ce sont des graphiques où chaque population leucocytaire est représentée sous la forme d'un « nuage ».

Certains automates sont capables d'identifier des cellules immatures, en cas de myélémie. C'est le cas d'automates rendant le compte d'IG (granuleux immatures). Les IG comprennent les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes ; mais les blastes en sont exclus. Ces cellules (IG) se retrouvent augmentées en cas d'infections, d'inflammation, de pathologies malignes, de nécroses, d'utilisation de stéroïdes, de grossesses, entre autres.

Certains automates effectuent également le compte de réticulocytes à partir de l'ARN résiduel dans ces hématies venant d'être produites par la moelle.

I.1.2.2. Analyses calculées

Il s'agit le plus souvent de l'hématocrite, de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), de la concentration corpusculaire moyenne (CCMH)

L'hématocrite est le volume des GR par rapport au volume de sang total, exprimé en %. Cette donnée est obtenue par calcul ; c'est le produit du VGM et du nombre de GR par volume de sang. Lorsque l'hématocrite est obtenu par mesure, c'est le VGM qui est obtenu par calcul.

La TCMH est le rapport du taux d'hémoglobine par le nombre de GR ; elle est exprimée en pg/cellule. Dans la TCMH, on ne prend pas en compte le volume des GR, à l'inverse de la CCMH.

La CCMH est obtenue grâce au rapport du taux d'hémoglobine par l'hématocrite (soit le produit du VGM et du nombre de GR), exprimée en g/dL. Ce paramètre est essentiel à la validation technique du résultat car il est sensible à de nombreux artefacts affectant la lignée rouge. De nombreux automates proposent également une mesure directe par la diffraction laser. La comparaison, au mieux par algorithme (application « CBC-O » Sysmex) des « deux » CCMH (calculée et mesurée) permet une analyse rapide des artefacts.

I.1.3. Les artefacts avec les méthodes actuelles

Avec les moyens techniques utilisés certaines valeurs aberrantes peuvent être trouvées par l'automate mais ne correspondent pas à la réalité. Ces artefacts doivent être repérés et pris en compte avant de rendre les résultats. Certains artefacts vont fausser spécifiquement une analyse, ou comme en cas de caillot, altérer plusieurs paramètres de la NFS.

I.1.3.1. Artefacts touchant plusieurs paramètres de NFS

La présence de caillot dans un échantillon se voit le plus souvent en cas de prélèvement difficile, comme les prélèvements chez les prématurés. Il s'agit en effet de prélèvements avec un écoulement sanguin de faible débit, en faible quantité, dans des micro-méthodes.

En cas de caillots plusieurs analyses sont faussées. En effet les caillots vont agréger plusieurs constituants sanguins qui vont apparaître diminués lors de l'analyse. Typiquement un prélèvement coagulé présente une thrombopénie. Ainsi tout échantillon avec une thrombopénie non connue, doit faire l'objet d'une vérification sur la présence ou non de caillots.

Dans certaines situations, il arrive que le prélèvement se fasse près d'une perfusion. L'échantillon obtenu sera alors dilué. Sur ces échantillons l'hémoglobine sera abaissée, le VGM augmenté souvent (par pénétration d'eau dans les GR), la CCMH sera diminuée(8).

Les agglutinines froides, présentes chez certains patients, vont agglutiner les GR quand la température est inférieure à 37°C. Les grands agglutinats ne seront pas pris en compte par l'automate ce qui va sous-estimer le nombre d'hématies. Mais certains agglutinats plus petits seront par contre pris en compte comme de volumineuses hématies ce qui peut donc surestimer le VGM. On aura une CCMH élevée associée. Le maintien de l'échantillon à 37°C pendant 1 heure, permet la désagrégation des agglutinats et la correction des analyses(9). De plus, certaines agglutinines froides peuvent rendre l'échantillon sanguin très visqueux, au point d'induire une aspiration insuffisante(9). Un phénomène semblable peut s'observer avec les cryoglobulines quand elles sont abondantes.

Lors d'une hyperleucocytose, la destruction des GB par des détergents peut être incomplète et entraîner une turbidité excessive dans la cuve de mesure de l'hémoglobine pouvant donc entraîner une surestimation de l'hémoglobine. De plus ces GB non détruits peuvent alors être comptés dans le canal des GR et entraîner une augmentation du VGM et du nombre d'hématies. Ce phénomène peut se voir plus particulièrement en cas d'anémie, et avec des GB de petite taille (lymphocytes de LLC) et d'hyperleucocytose supérieure à 100G/L(6). Dans ces cas la CCMH peut apparaître normale et masquer les interférences. Toutefois certains automates parviennent à déceler ces anomalies par la présence d'une double population

cellulaire sur le graphe des GR. D'autres vont opérer une correction de l'hémoglobine, voire du nombre de GR et du VGM en cas d'hyperleucocytose(9).

En cas d'hémolyse, la numération des GR sera abaissée tandis que la valeur d'hémoglobine et par conséquent la valeur de CCMH seront augmentées.

I.1.3.2. Artefact dans le dosage de l'hémoglobine

Des interférences peuvent se voir dans le dosage de l'hémoglobine en cas d'hyperlipidémie, d'augmentation des protéines plasmatiques (immunoglobulines monoclonales, cryoglobulines), d'hyperleucocytoses qui vont induire une augmentation de la turbidité et par conséquent une mesure par spectrophotomètre faussée avec un taux faussement augmenté d'hémoglobine. La détection en validation technique repose sur la constatation d'une CCMH augmentée (> 36 ou 37 g/dL selon les automates).

I.1.3.3. Artefact dans la mesure du VGM

Dans la mesure par impédance, l'impulsion dépend de la taille et du contenu en hémoglobine ; ainsi une hématie pauvre en hémoglobine (hypochromie) sera plus déformable et générera une résistance moindre au passage entre les électrodes. La variation d'impédance sera plus faible et le volume traduit faussement abaissé (de 5 à 7 fL)(6). Ainsi la CCMH se retrouve également faussée et apparaît faussement normale. Cet artefact n'est pas présent dans le cas de la diffraction laser du fait de la sphérisation préalable des GR qui ne sont alors plus déformables.

Une hypergammaglobulinémie (monoclonale en particulier : maladie de Waldenström, myélome) est une cause classique de surestimation (modérée) du VGM.

En cas d'hyperglycémie, le VGM et donc la CCMH peuvent être faussés(9). En effet dans ces cas les GR sont riches en glucose. Or lors des analyses, sur la plupart des automates, le sang se retrouve dilué à une solution iso-osmotique ; l'eau de cette solution pénètre donc les GR pour équilibrer la concentration en glucose. La conséquence est l'augmentation artéfactuelle du VGM et la diminution artificielle de la CCMH.

Une analyse de l'échantillon 24 heures après son recueil est associée à une augmentation du VGM, s'il n'est pas conservé à +4°C.(9) Cette augmentation est d'environ 1,5% après 24 heures et de 4% après 48 heures, mais certains auteurs signalent des variations plus importantes pouvant atteindre 9% après 24 heures et 16% après 48 heures(6).

I.1.3.4. Artefact dans la numération des hématies

La présence de schizocytes ou de microcytes peut diminuer faussement le nombre de GR car les cellules de moins de 36 fL ne sont, en général, pas pris en compte par les automates(9). Si, comme c'est souvent le cas, les plaquettes et les GR sont énumérés sur le même canal, alors les numérations des plaquettes et des GR seront toutes les deux faussées.

I.1.3.5. Artefact dans la numération plaquettaire

Les artefacts les plus importants et les plus fréquents sont indépendants des automates eux-mêmes car concernant la phase préanalytique. C'est le cas avec la formation in vitro après le prélèvement d'amas plaquettaires chez certains sujets, indépendamment de leur pathologie. Leur détection est essentielle pour éviter de rendre une valeur faussement abaissée. Les automates les détectent généralement sur le canal de la formule. Ces alarmes sont sensibles mais pour assurer une sécurité maximale une règle de validation technique impose la recherche systématique d'éventuels amas dans le cas d'une première occurrence de numération plaquettaire diminuée.(8)

L'autre artefact majeur concerne une difficulté de comptage par l'automate en situation pathologique affectant la morphologie des plaquettes ou des hématies ou se traduisant par la présence de particules anormales. Le volume des plaquettes est compris entre 2-12 fL et 20-40 fL, il suit une distribution normale. Des interférences sont possibles avec de gros débris (généralement < 2 fL, lipides, cryoglobulines), des schizocytes ou microcytes (20 à 40 fL), voire des fragments de GB endommagés (en cas notamment de leucémie aiguë avec une lyse cellulaire massive). La mesure par fluorescence, permet de limiter ces interférences.

I.1.3.6. Artefact dans la numération leucocytaire

Les automates actuels reposent rarement de manière exclusive sur l'impédance. En effet la distinction des différents GB reposant sur leur taille, la présence de cellules anormalement grandes pose problème et pourrait générer un compte anormalement haut de PNE, ou gêner la distinction des différents groupes cellulaires, nécessitant la génération d'alarmes pour avertir l'opérateur(2).

La présence de plaquettes géantes ou d'amas plaquettaires peut également surestimer le compte de GB, en particulier le compte des lymphocytes. On connaît d'autres situations où le compte de GB va être augmenté ; c'est le cas d'échantillons présentant des protéines monoclonales ou des cryoglobulines. Dans ces deux situations, pour signaler une possible interférence, les automates vont déclencher une alarme. Ce signalement aura lieu dès qu'une part trop importante de GB de petite taille est comptée.

Généralement le compte de GB sera faussement diminué si l'échantillon présente de nombreuses cellules lysées (c'est le cas dans la leucémie lymphoïde chronique ou LLC).

Le compte des GB par les automates correspond en fait au compte du nombre d'éléments nucléés dont les érythroblastes. Les érythroblastes ne sont pas des GB mais des précurseurs des GR. Une surestimation des GB est donc possible en cas de présence d'érythroblastes dans l'échantillon, ce qui entraîne des valeurs absolues fausses dans la formule leucocytaire. Les érythroblastes peuvent se retrouver dans le sang dans diverses situations bénignes ou malignes (par exemple en période néonatale, en cas d'hémolyse, en cas d'hémorragies, sepsis, hémopathies malignes, envahissements médullaires). Les automates peuvent générer des alarmes, car en cas d'érythroblastes des anomalies apparaissent sur les cytogrammes (représentations graphiques des différents types de cellules nucléées) dans la zone des lymphocytes et sur les courbes de distribution de volume des GB. Dans ces cas un frottis est nécessaire pour le compte des érythroblastes permettant alors de déduire le vrai nombre de GB. Toutefois plusieurs automates aujourd'hui, sont

capables de distinguer de façon fiable les érythroblastes des GB, grâce à des colorants se fixant à l'ADN. Le M511 propose une approche différente, basée sur la morphologie pour le compte distinct des érythroblastes.

I.1.3.7. Artefact dans la formule leucocytaire

On estime que les automates actuels sont assez sensibles pour de larges populations de cellules anormales, mais que lorsque le pourcentage de cellules anormales est de moins de 5%, le compte devient moins précis et ces cellules peuvent ne pas être détectées(2).

L'établissement de la formule leucocytaire au microscope (manuel ou automatisé avec numérisation) est classiquement considéré comme la technique de référence. La lecture d'un frottis n'est toutefois pas exempte de défauts ; elle est opérateur-dépendante, la distribution cellulaire peut être inégale sur la lame (les grandes cellules étant plus souvent retrouvées en bout de frottis), c'est une technique couteuse en temps et le nombre de cellules analysées est relativement faible. Avec 5000 à 10000 cellules comptées, contre 200 au microscope pour un cytologiste, la formule leucocytaire peut apparaître plus précise avec les automates. Dans le cas de situations physiologiques habituelles, c'est le cas. Mais dans les cas pathologiques où la morphologie des cellules change ou des cellules anormales sont présentes, la reconnaissance des cellules doit passer par l'œil humain, du moins jusqu'à l'heure actuelle. Dans de nombreuses situations (10 à 15% des échantillons du CHU en moyenne), sans lecture de frottis au microscope, le résultat rendu serait faux. Il peut s'agir de blastes, de cellules lymphoïdes atypiques, de cellules immatures, de cellules à la morphologie modifiée ou altérée (hypogranulation, lymphocytes activés). En cas d'alarmes sur la formule leucocytaire faisant suspecter la présence de cellules anormales (et donc d'une formule leucocytaire faussée), un frottis sera effectué et lu par un technicien ou un biologiste habilité. La lecture du frottis permettra de mettre en évidence ces cellules anormales, mais aussi de corriger la formule si des cellules ont été mal classées.

On retrouve souvent un compte de PNB imprécis chez les automates. On peut l'expliquer par un compte souvent bas de ces cellules. De plus beaucoup d'automates reposent sur la lyse différentielle des cellules pour effectuer leur compte, les PNB étant plus résistants à la lyse(2). Or les cellules pathologiques peuvent aussi présenter une résistance à la lyse et ainsi être comptées parmi les PNB (2). D'autres automates, comme le cell-dyn Sapphire, utilise la diffraction laser pour compter les PNB, mais cela nécessite un fenêtrage étroit pour différencier les PNB des lymphocytes, ce qui souvent sous-estime le compte de PNB.

Certains automates (comme l'Advia 2120) classant les cellules dans la catégorie « LUC » (Large Unstained Cells) peuvent y inclure les monocytes ; on se retrouve alors avec un compte abaissé de monocytes. En effet la catégorie « LUC » contient les lymphocytes réactionnels, les plasmocytes, les blastes et d'autres cellules anormales. Il s'agit donc de larges cellules, dépourvues de myéloperoxydases. Or dans certains cas des monocytes ou des PNN peuvent exister sans myéloperoxydases, ils sont alors classés par l'automate dans cette catégorie. La présence de cellules de type « LUC » est généralement un critère de revue avec frottis sanguin.

I.1.4. Signalement par des alarmes

La NFS présente plusieurs paramètres qui peuvent mettre en évidence certaines anomalies. Selon les anomalies présentes, des analyses supplémentaires seront nécessaires, telles qu'une étude morphologique. Des alarmes doivent donc apparaître pour pouvoir réaliser ces analyses supplémentaires. Ces alarmes indiquent souvent la présence de cellules anormales qui ne peuvent pas être classifiées et qui risquent de fausser la formule leucocytaire. On constate que souvent, la traduction des logiciels est incomplète obligeant les utilisateurs à connaître la correspondance des termes suivants : nRBC (nucleated red blood cell, indiquant la présence d'érythroblastes), Clump (pour la présence d'amas plaquettaires), Blast (signalant la présence de blastes), IG (immature granulocytes pour la présence de granuleux immatures), Bands (présence de métamyélocytes ou de PNN non segmentés), left shift (déviation à gauche), atypical lymphocytes (faisant suspecter la présence de lymphocytes atypiques), ainsi que d'autres termes. Ils peuvent être définis par le fournisseur de l'automate ou par le laboratoire lui-même. Les critères choisis doivent permettre d'avoir un nombre de lames de revue le plus bas possible tout en ayant le nombre d'erreurs rendues le plus bas possible. La fixation de ces seuils dépend en grande partie de la population de patients analysée par le laboratoire.

Ainsi les alarmes concernant la présence d'érythroblastes ou d'amas plaquettaires vont se déclencher quand un nombre de lymphocytes est augmenté, en particulier parmi les lymphocytes de petite taille. L'alarme relative à la présence de blastes va apparaître en cas de présence de grands monocytes ou de grands PNN monolobés. Cette même alarme, ainsi que celle associée à la présence de lymphocytes atypiques se verront en cas de cellules lymphoïdes de grande taille.

Si la lame de revue confirme l'anomalie suspectée par l'alarme elle pourra être validée avec certitude. Les études montrent que ces alarmes prédisent rarement la présence d'anomalies spécifiques mais sont assez bien corrélées avec la présence d'une quelconque anomalie. Par exemple une alarme pour des lymphocytes atypiques peut au final révéler des blastes lors de la revue sur une lame au microscope.(2)

I.1.5. Les nouvelles techniques automatisées pour la formule leucocytaire

La technologie reposant sur un analyseur automatisé d'images numériques a été remise au goût du jour avec le développement d'ordinateurs plus puissants permettant d'obtenir des logiciels plus performants pour identifier les cellules et le développement aussi d'étales-colorateurs. Avant l'avènement de ces automates, tout frottis sanguin nécessitait une lecture au microscope. La gamme CellaVision® DM comprend des automates dotés d'un microscope permettant à partir d'un frottis sanguin coloré de classer les GB en 12 catégories (différenciant ainsi, en plus des cinq catégories leucocytaires habituelles, les différents précurseurs de granuleux, également les plasmocytes, et les blastes) et donc de réaliser la formule leucocytaire. Dans le cas du DM1200, l'analyse se fait en plusieurs étapes, la cadence annoncée étant de 20 lames par heure. D'abord les éléments sont localisés sur le frottis à faible grossissement (x10), puis une mise au point est réalisée sur les différents éléments au fort grossissement (x100). Enfin chaque leucocyte, au fort grossissement, est analysé et classé dans une catégorie cellulaire. En effet, l'image de chaque cellule est décomposée en plus de 300 caractéristiques. Le logiciel inclus dans l'automate utilise toutes ces différentes caractéristiques (forme, couleur,

textures notamment) pour proposer un classement à chaque cellule(10). En général sur ces automates, la revue peut se faire directement sur un écran où apparaissent les différentes cellules classées et il est possible de les reclasser manuellement. Des études sur ces types d'automates ont mis en évidence une très bonne corrélation avec la lecture manuelle au microscope par un opérateur humain sur des cas non pathologiques avec cependant une précision moindre dans l'identification des monocytes et des PNB. Dans le cas d'échantillons pathologiques, cette corrélation apparaît moins bonne en particulier pour classer des cellules anormales(2). Cet automate a toutefois une excellente sensibilité dans la détection des cellules anormales circulantes (proposées en cellules non classées ou préclassées dans une catégorie de cellules supposées anormales), sachant que la recommandation du constructeur prévoit que le classement final soit revu par un opérateur.

I.1.6. Présentation technique du M511

On voit donc que les automates actuels présentent de nombreux avantages et rendent des résultats très fiables dans la majorité des cas. Ils ne donnent cependant des informations sur les cellules sanguines que de manière indirecte. Ils n'apportent que très peu d'informations sur la morphologie des cellules. Il s'agit pourtant d'une donnée essentielle en particulier dans les situations pathologiques, où la nécessité d'un résultat précis et rapide peut être vitale. On estime ainsi que 15 à 50% des échantillons (selon les populations)(3) passés en routine nécessitent un contrôle par un frottis sanguin. Dans notre laboratoire ce chiffre est de 10 à 15%.

En comparaison avec les données précédentes, le M511 constitue une approche résolument originale de la double problématique du comptage et de l'étude morphologique des éléments figurés du sang. Par la numérisation et le traitement informatique des images il s'apparente, pour la partie formule leucocytaire, aux automates Cellavision® mais la technologie spécifique de l'étalement des cellules par « impression » et la partie numération sont complètement nouvelles.

On peut attendre a priori d'une telle technologie qu'elle affranchisse enfin l'hématimétrie des artéfacts « historiques » (amas plaquettaires, agglutinines, lactescence notamment) qui lui semblaient liées de façon constitutionnelle. Autres avantages du M511, comme nous allons le voir, l'automate ne requiert pas, contrairement aux autres, ni de circuit fluide, ni de pneumatique. Il n'y a pas de risque de bouchage ou de cristallisation des réactifs. Le M511 n'est pas doté de bloc laser qu'il faudrait aligner, régler ou changer.



Figure 3: Cobas M511 et sa station de travail iMac

Source : www.mpo-mag.com

I.1.6.1. Description générale

Nous allons voir les différentes étapes de cette technique qui est bien à part des techniques automatisées utilisées jusqu'alors.

Nous verrons les avantages que l'on peut attendre de cet automate, les limites qu'il présente également. Puis nous verrons les interrogations qu'il soulève et tenterons d'y répondre en le comparant aux automates actuels.

Le délai de réalisation du frottis avec sa lecture et le rendu de résultats sous forme d'une NFS est de 6 minutes pour chaque échantillon. Il peut être complété par une analyse des réticulocytes qui nécessitera un deuxième prélèvement sur l'échantillon et un nouveau frottis avec une coloration spécifique.

I.1.6.2. Réalisation de l'impression sur lame

Avant d'effectuer l'impression, l'automate doit sélectionner l'échantillon à analyser, l'identifier, l'homogénéiser, et prélever du sang à partir de ce dernier.

L'échantillon peut être passé selon différents modes. Il peut être passé « manuellement », c'est-à-dire en mode tube ouvert. Le technicien va sélectionner à partir de la station de travail la ou les analyses souhaitées (NFS avec lame colorée, et/ou lame imprimée sans coloration, et/ou analyse des réticulocytes nécessitant une lame et une coloration différente) et identifier l'échantillon sur lequel va être réalisée cette analyse. Puis l'automate va déployer une aiguille à partir de laquelle il va prélever le sang du tube, préalablement homogénéisé et dont le bouchon aura été ôté par l'opérateur. Ce mode n'est pas le plus utilisé car il n'est pas automatisé. On le

réserve plutôt pour les micro-méthodes venant de pédiatrie qui ne peuvent pas être traitées dans le mode entièrement automatisé que nous allons décrire.

Dans l'autre mode, « mode rack », les tubes sont placés sur des portoirs qui cheminent jusqu'à la zone de prélèvement. Une fois cette zone atteinte, ils sont identifiés par un lecteur de code barre (le code barre étant présent sur l'étiquette des tubes) puis un bras les prend un par un pour les homogénéiser par retournements successifs. Après cette étape, une aiguille transperce le bouchon du tube et aspire le sang pour faire ensuite l'impression.

Il existe un dernier mode, le mode urgent, où l'on place les tubes en face de la zone de prélèvement. Les tubes ainsi placés sont analysés prioritairement par rapport aux tubes présents sur les portoirs.



Figure 4: Mode tube ouvert

Source : présentation Roche®



Figure 5: Mode Rack

Source : présentation Roche®



Figure 6: Mode urgent

Source : présentation Roche®

30 μL de sang sont ainsi prélevés, dans chaque cas. Mais seulement 1 μL est utilisé pour réaliser l'impression sur la lame. L'impression est réalisée sur une lame en verre spécifique DigiMAC® (de dimensions semblables aux autres types de lames utilisées pour des frottis manuels). Elle se fait par déplacement de la lame le long de l'aiguille libérant les cellules une à une sur la lame à partir d'1 μL de sang total, non dilué. Le déplacement de la lame se fait en zigzag, donnant au frottis un aspect de multiples stries parallèles aux petits bords des lames. On parle bien d'impression sur lame et non d'étalement. En effet, il ne s'agit plus d'un frottis manuel réalisé à partir d'une goutte de sang qu'on étale d'un geste par glissement d'une deuxième lame sur la première. Ici les cellules sont déposées une à une sur la lame formant une véritable impression avec une seule couche de cellules. Contrairement à des appareils de type étaleur-colorateur qui reproduisent le mouvement d'un frottis, la réalisation de la lame par le M511 reste indépendante de l'hématocrite. Les autres étaleurs-colorateurs doivent prendre en compte plusieurs paramètres et notamment l'hématocrite afin de réaliser des frottis comparables les uns aux autres. En effet la réalisation du frottis devra se faire avec une certaine quantité de sang, à une certaine vitesse d'étalement selon un certain angle. Autant de paramètres qui ne sont pas nécessaires pour la technologie du M511. On peut donc penser que les lames réalisées par le M511 ont un caractère reproductible plus marqué que des lames réalisées autrement. La répartition des cellules n'est donc plus la même, les zones de lecture non plus. L'application du sang sur la lame est plus uniforme. Pendant cette coloration et pendant tout son processus jusqu'à la lecture, la lame se déplace de support en support. Elle reste fixée à chaque support par un système d'aspiration constitué d'orifices sur chaque support. Le déplacement de support en support est effectué automatiquement par des bras munis de ventouses.

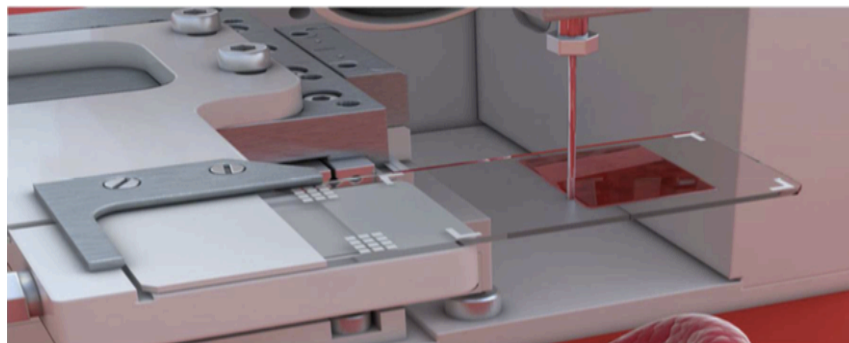


Figure 7: illustration du mécanisme d'impression de lame du M511

Source : présentation Roche®

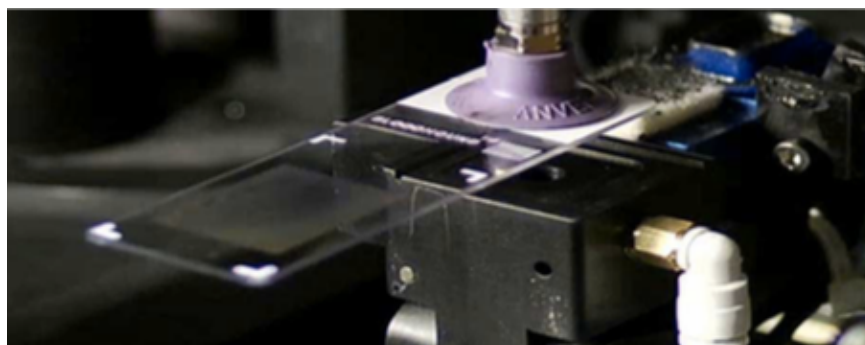


Figure 8: système de ventouses pour le déplacement des lames

I.1.6.3. Coloration

Une fois l'impression sur lame effectuée, la lame est placée sur un nouveau support sur lequel va se faire la coloration. La durée totale de cette coloration est de 80 secondes, contre 15 minutes pour la coloration May Grünwald Giemsa réalisée sur les colorateurs classique. Les étaleurs-colorateurs comme le SP 50 Sysmex désormais utilisé au laboratoire ont une cadence annoncée de 30 lames par heure grâce aux chevauchements des colorations. Sur le M511, il ne s'agit pas d'une coloration de MGG (May-Grünwald Giemsa), mais d'une coloration de Romanowsky modifiée.

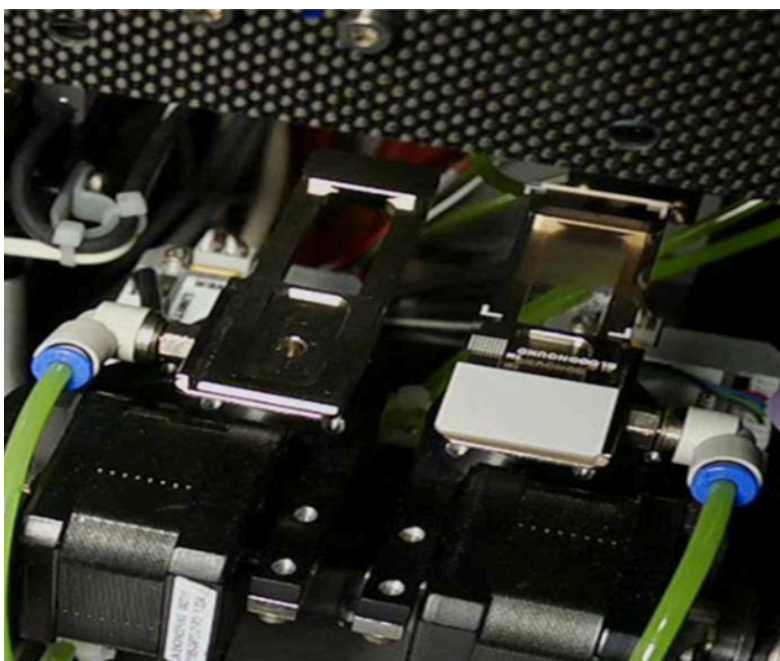


Figure 9: supports pour la coloration des lames

Comme souligné précédemment, le rendu des résultats d'une NFS, se fait à partir d'une seule lame imprimée et colorée. Si on y ajoute le compte des réticulocytes, une deuxième lame doit être imprimée et colorée. En effet dans ce cas, une autre coloration est nécessaire, une coloration de type supra-vitale. Il n'y a pas d'étape de fixation dans cette coloration, l'ARN et les restes de reticulum contenus dans ces cellules peuvent alors être mis en évidence, permettant leur numération.

I.1.6.4. Microscopie et lecture

Le M511 est doté de deux microscopes, l'un à faible grossissement (x10), l'autre à fort grossissement (x50). Chaque lame, après avoir été colorée passe sous l'objectif à faible grossissement puis sous l'objectif à fort grossissement sans utilisation d'huile à immersion. Le faible grossissement va assurer la procédure de focalisation afin d'obtenir des images précises, ainsi que la localisation des GB sur la lame. La lecture de lame par le M511 s'effectue en 2 étapes : l'identification des GR, GB, plaquettes avec localisation de 600 à 700 GB (au faible grossissement) et l'identification des différents GB (au fort grossissement). L'identification des cellules et l'obtention de certaines données se fait grâce au passage de lumières multi-spectrales à travers la lame. Quatre sources lumineuses multi-spectrales sont ainsi utilisées. Selon les caractéristiques de la lumière reçue après passage à travers la lame, le M511 en déduit certaines informations. Plus précisément il s'agit de lumière de type LED de différentes longueurs d'ondes (bleue, verte, rouge, jaune). Ces

lumières passent à travers les cellules et sont en partie absorbées selon la taille, l'épaisseur, le contenu des cellules ; une autre partie traverse entièrement les cellules et rejoint une caméra mesurant alors la densité optique. Ainsi pour l'analyse d'un seul GR, plus de 1000 points de données sont utilisés, permettant au M511 de reproduire numériquement ce GR dans toute sa globalité. Les différentes caractéristiques morphologiques propres aux GB sont prises en compte par le M511 pour les identifier. Ce sont des caractéristiques morphologiques similaires à celles prises en compte par un cytologiste, on retrouve ainsi : la taille et la forme de la cellule, la taille du noyau, le rapport nucléo-cytoplasmique, la forme et la densité du noyau, la segmentation du noyau, la densité du cytoplasme, les granulations au sein du cytoplasme. Ces différents aspects morphologiques sont découpés en plus de 200 caractéristiques d'analyse, pour chaque GB, pour le M511. Concernant le compte des réticulocytes, il est effectué au fort grossissement.

I.1.6.5. Acquisitions d'images, de valeurs et résultats rendus

Chaque paramètre mesuré provient de l'analyse des lumières traversant les cellules. Ainsi le résultat du VGM est la moyenne des différents volumes calculés pour chaque GR identifié par le M511. Pour la TCMH, le principe est identique mais repose uniquement sur la lumière bleue, car c'est avec cette longueur d'onde que le pic d'absorption de l'hémoglobine est le plus précis. Ainsi la teneur en hémoglobine est mesurée pour chaque GR (ce qui nécessite plus de 1500 points de données) sur plus de 20 000 cellules ; puis la valeur moyenne est rendue par l'automate. De même pour le VPM, où cette fois le calcul repose pour chaque plaquette sur quelques centaines de points de données.

Les cellules représentatives de chaque catégorie cellulaire sont prises en photographie par l'automate et ces images sont déployées sur l'écran de la station iMac.

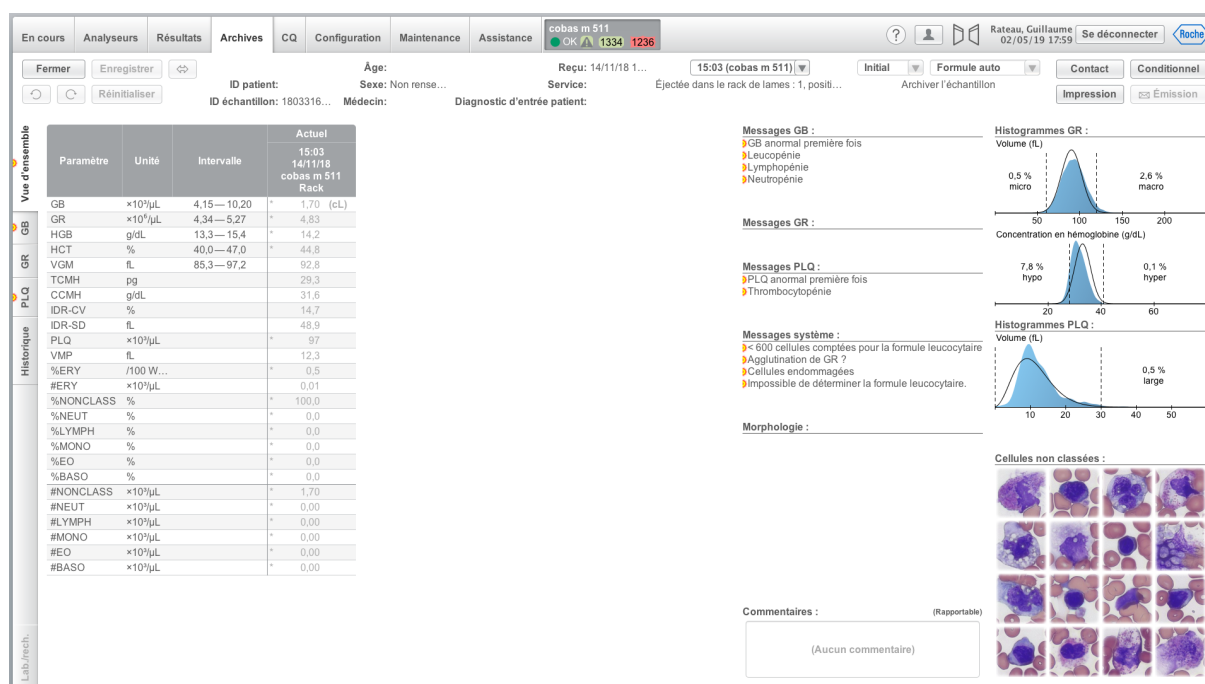


Figure 10: affichage des résultats de la NFS d'un échantillon

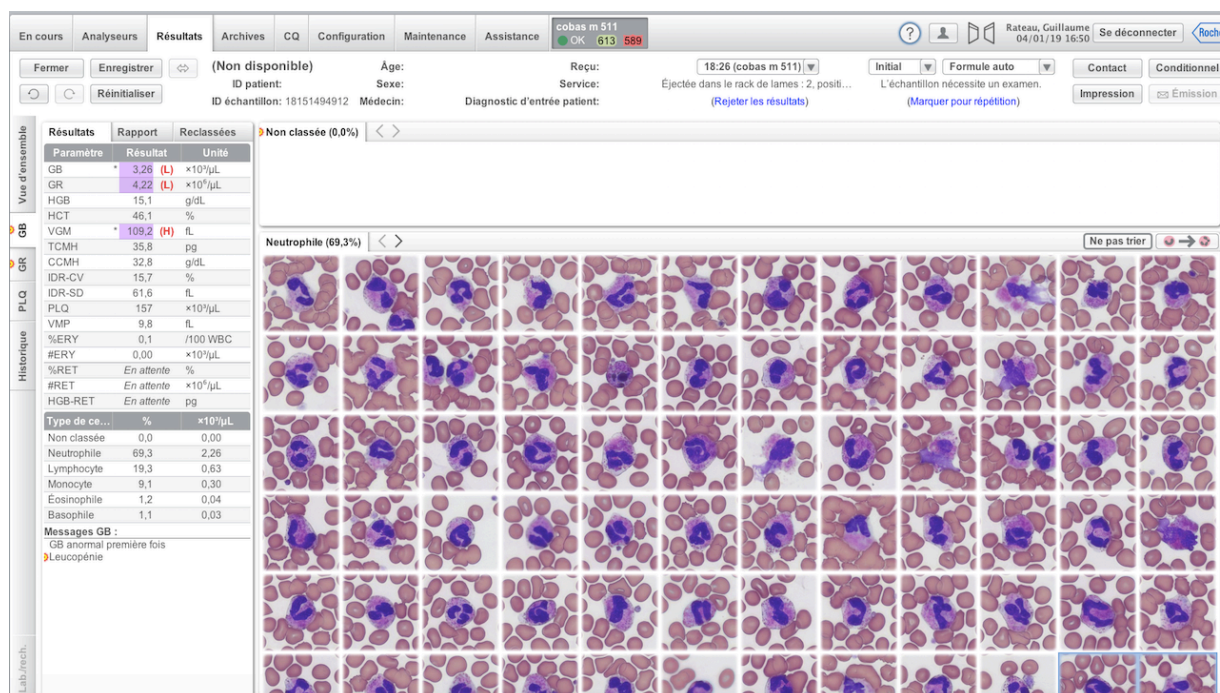


Figure 11: Affichage de la galerie de classification des GB d'un échantillon

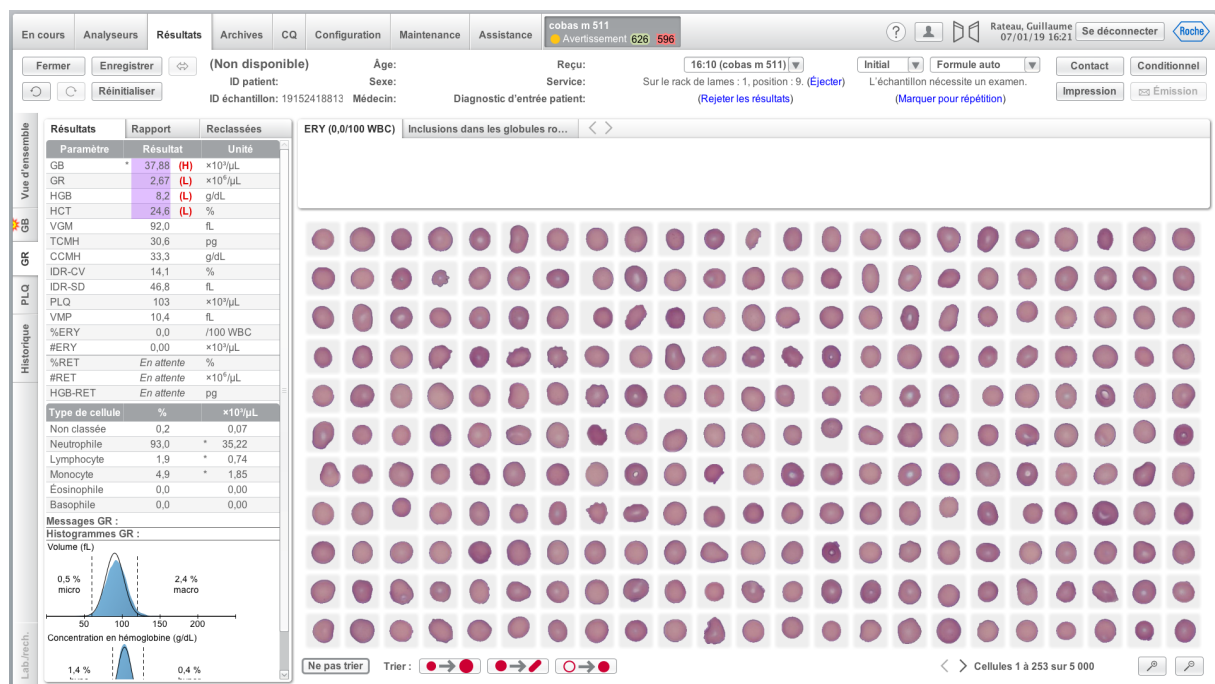


Figure 12: Affichage de la galerie des GR

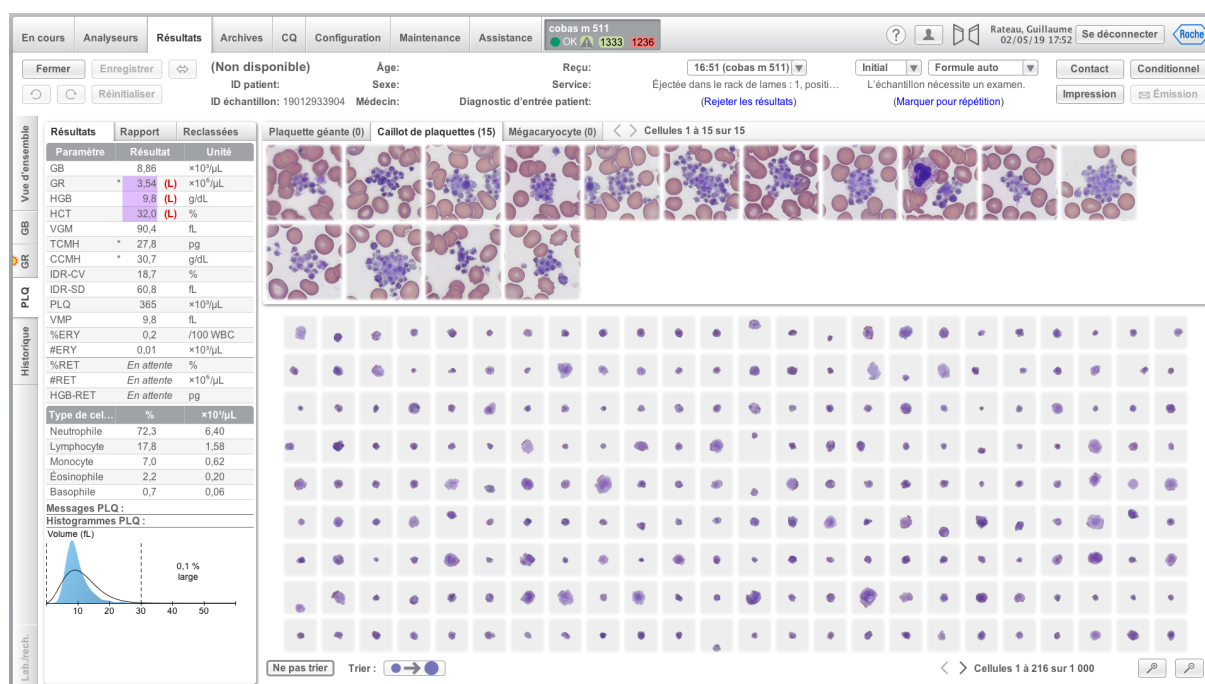


Figure 13: Affichage de la galerie des plaquettes (présence ici d'amas plaquettaires)

L'affichage des résultats sur l'iMac comprend les différents paramètres de la NFS avec le compte d'érythroblastes. Le compte de réticulocytes peut être ajouté et s'affiche également. En plus des résultats numériques, on trouve des courbes et des histogrammes montrant le VGM des différents GR présents sur la lame, la concentration en hémoglobine ainsi que le volume plaquettaire. Une partie de l'affichage est consacrée aux commentaires alarmant sur des situations anormales ou pathologiques. Par exemple il peut s'agir d'amas plaquettaires, de présence de blastes, de microcytose. Enfin une autre partie est constituée d'images représentant les différentes cellules présentes sur la lame. Chaque catégorie de cellule est présente et constituée d'un nombre variable d'images non proportionnelle à la quantité de cellules présentes sur la lame (par exemple, le nombre d'images de PNN n'augmente pas nécessairement même si le nombre de PNN augmente d'un échantillon à l'autre). Les GR sont également représentés sur la galerie d'images et peuvent être classés selon leur formes (plus ou moins ronde) ce qui peut être utile pour mettre en évidence la présence de schizocytes, de drépanocytes ou d'une poikilocytose ; selon leur chromie (mise en évidence d'une hypochromie), et selon leur taille (microcytose, macrocytose, anisocytose). Les différentes plaquettes sont également affichées dans une galerie spécifique. Dans certaines situations, le M511 n'arrive pas à classer des cellules, c'est notamment le cas face à des cellules blastiques ; dans ces situation les cellules rentrent dans la catégorie « cellules non classées ». Certaines catégories d'images sont réservées aux situations anormales ; ainsi on pourra retrouver une galerie d'images spécifique en cas d'amas plaquettaires, d'inclusions dans les GR. Une autre partie des résultats concerne des paramètres réservés pour la recherche, non rapportables et pouvant livrer des informations pertinentes telles que le pourcentage de GR fragmentés, le pourcentage de plaquettes en amas, le pourcentage de GR avec des inclusions, entre autres.

Toutes les cellules prises en compte pour le rendu des résultats de NFS ne sont pas représentées sur la galerie d'images. Le M511 affiche les cellules représentatives de l'ensemble des cellules présentes sur la lame. On peut toujours reclasser les cellules affichées, ce qui va modifier les résultats de NFS. Ces corrections de reclassement ne vont pas être « apprises » par le M511 et s'il se retrouve devant une même cellule (initialement mal classée), il la reclasera de façon erronée à nouveau.

Certains paramètres rapportés ne sont pas mesurés directement, ils sont calculés à partir d'autres résultats transmis. On différencie ainsi les paramètres mesurés et les paramètres calculés. Parmi les paramètres calculés on trouve donc l'hématocrite et la CCMH ; le reste des paramètres est directement mesuré à partir de l'analyse de l'impression sur la lame. L'hématocrite est calculé à partir du produit du VGM et du nombre de GR par volume de sang, tandis que la CCMH est obtenue à partir du rapport entre hémoglobine et hématocrite.

I.1.6.6. Interférences, artéfacts, interrogations et résultats rendus

Sur les frottis manuels la lecture se fait dans la partie subterminale du frottis où les cellules sont bien « étalées », distantes les unes des autres. En raison d'un artéfact lié à la technique du frottis elle-même, la répartition des GB n'est pas homogène avec une concentration de lymphocytes au centre et de polynucléaires et de monocytes aux bords et en fin de frottis. On sait ainsi que le décompte des PNN au microscope est toujours sous-estimé par rapport au compte de l'automate, dans des proportions variables selon la leucocytose. Dans le cas de certaines cellules pathologiques (blastes de leucémies aiguës promyélocytaire, monoblastes, plasmoblastes, grandes cellules de lymphomes) cet artéfact peut être accentué. Il est ainsi recommandé de compléter le décompte (réalisé dans la zone de référence) par l'observation des bords et de l'extrémité du frottis où il faudra tenir compte du sur-étalement des éléments allant jusqu'à des aspects d'ombre cellulaire. Souvent gênant pour la reconnaissance des cellules, cet étalement excessif peut parfois être utile lorsque le contenu cytoplasmique devient plus visible. C'est le cas notamment des corps d'Auer dans les leucémies aiguës myéloblastiques.

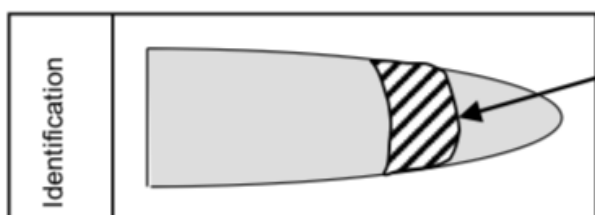


Figure 14: frottis classique, la flèche indique la zone de lecture

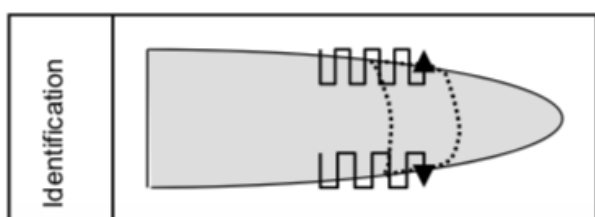


Figure 15: frottis classique, lecture sur les bords pour repérer certaines cellules dont les blastes

Dans le cas des lames imprimées par le M511, cette répartition des cellules n'existe plus et le compte s'effectue plutôt dans les zones périphériques de l'impression. En effet, en fin de coloration, les colorants sont aspirés à partir du centre de la lame, zone où on peut avoir alors des déformations cellulaires.

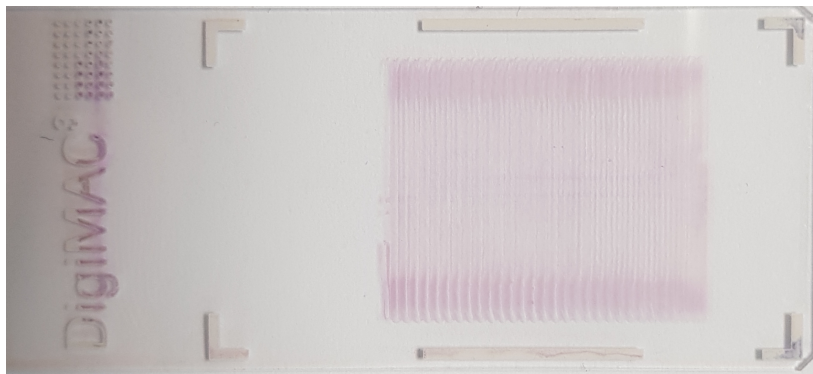


Figure 16: lame DigiMAC de Roche® imprimée en zigzag et colorée, lecture privilégiée en périphérie de l'impression

Avec un frottis manuel, le mouvement de la lame déforme les cellules. En particulier dans certaines pathologies telles que les leucémies à tricholeucocytes ou les lymphomes spléniques à lymphocytes villeux. Dans ces cas, les cellules pathologiques vont présenter une déformation de leur cytoplasme de type villosités. Ces villosités sont parfois de fins prolongements cytoplasmiques donnant un aspect « chevelu » à la cellule, d'où le nom de tricholeucocyte. Avec le M511, on peut se demander quel sera l'aspect de ces cellules et si l'automate sera capable de les différencier ou non. La question se pose également pour la visibilité des nucléoles, des anomalies de forme et du contour nucléaire, du contenu cytoplasmiques (corps d'Auer notamment) qui sont des critères cytologiques importants dans l'identification des cellules anormales. De même, dans certaines situations, les cellules sont parfois fragilisées et l'étalement des frottis classiques les réduit à des ombres nucléaires, parfois caractéristiques en cas notamment de LLC (ombres de Gumprecht) ; il sera donc également intéressant de rechercher leur présence sur les lames du M511.

Dans certains cas où la numération de GB est faible, on peut se retrouver avec très peu de GB déposés sur la lame. Lorsqu'on se retrouve avec moins de 600 GB sur la lame, le M511 ne peut plus effectuer la formule leucocytaire. Il s'agit donc d'échantillons avec moins de 600 GB/mm³ (soit 0,6 G/L). En comparaison, dans notre laboratoire, les échantillons avec moins de 1G/L de GB sont rendus sans la formule, le décompte n'étant plus considéré comme représentatif dans ces cas.

Une grande interrogation concerne la qualité des images de leucocytes obtenues avec la coloration choisie par le constructeur, plus proche a priori d'une coloration « rapide » que d'une véritable coloration de May-Grünwald Giemsa.

I.2. Objectifs et méthode

I.2.1. Objectifs

L'étude du M511 comportait plusieurs objectifs.

Il s'agissait en premier lieu de réaliser une validation de méthode pour la numération et la formule sanguine. Cette validation de méthode comporte pour chaque paramètre de NFS les outils d'évaluation requis par le COFRAC dans le cadre de l'accréditation des laboratoires d'analyse selon la norme NF EN ISO 15189 (fidélité, justesse, incertitude de mesure, comparaisons).

Un second objectif était d'évaluer l'apport de cette nouvelle technologie dans des cas d'interférences analytiques classiques tels que les amas plaquettaires et les CCMH élevées, mais aussi les plasmas lactescents et les échantillons avec hémolyse.

Un dernier objectif consistait à évaluer l'automate sur les anomalies morphologiques concernant les GR et surtout les GB dans le cadre d'hémopathies

I.2.2. Protocole

Les échantillons sur lesquels s'effectuent l'étude proviennent de patients hospitalisés ou en consultation au CHU de Limoges. Ils sont analysés en premier lieu sur le Sapphire (pour les échantillons reçus le matin sans prescription connectée ou pour les échantillons reçus la nuit), ou sur l'Advia (pour les échantillons reçus le matin et saisis en prescription connectée et pour tous les échantillons reçus l'après-midi). Dans certains cas (pour certaines anomalies comme : une forte hyperleucocytose, une cytopénie, une alarme de type blastes, amas plaquettaires, érythroblastes), la formule de l'automate est rejetée et une formule manuelle est réalisée ou effectuée par le DM1200. L'analyse des tubes s'est faite de la mi-novembre 2018 au début du mois de mai 2019, soit plus de 5 mois.

Parmi ces échantillons analysés, certains sont sélectionnés pour être analysés sur le M511, selon les résultats rendus sur le SGL et transmis aux cliniciens. Ainsi pour évaluer le M511 sur des interférences techniques habituellement rencontrées sur l'Advia et/ou le Sapphire ; des échantillons présentant des cytopénies sévères, des anémies sévères, des amas plaquettaires étaient sélectionnés.

On a également sélectionné des échantillons présentant une hémolyse, d'autres avec des plasmas lactescents, à partir des résultats rendus en biochimie ; l'Advia et le Sapphire ne donnant pas d'indice pour ces tubes.

Il n'a pas été possible pendant la durée de l'étude d'obtenir des échantillons présentant un satellitisme plaquettaire (situation relativement rare représentant un cas pour 12000 NFS, soit 0,008%(11)). De même les patients avec des agglutinines froides (générant des CCMH faussement élevées) n'ont pas pu être inclus dans l'étude.

Plus d'une centaine d'échantillons rendus avec des amas plaquettaires ont été repassés sur le M511. Pour ces échantillons plusieurs repasses ont été réalisées afin d'évaluer en même temps le réactif PAF-5 désagrégeant les amas de plaquettes. Nous y reviendrons de façon plus détaillée dans la deuxième partie de la thèse.

Pour remplir le dernier objectif de l'étude qui portait sur l'évaluation morphologique, nous avons dû choisir des échantillons particuliers.

Pour la morphologie des GR, nous avons pu récupérer des échantillons avec des GR hypochromes, hyperchromes, schizocytes, pathologies constitutionnelles des GR (drépanocytoses), microcytoses, aniso-poikilocytoses, macrocytoses, corps de Jolly. Nous avons eu également deux échantillons provenant de patients atteints de paludisme (mais avec une parasitémie faible).

Pour la morphologie des GB nous avons choisi des prélèvements de patients présentant des anomalies leucocytaires réactionnelles (de type mononucléose infectieuse, érythromyélocytose, hyperéosinophilie, hyperplaquettose, monocytose, érythroblastose du nouveau-né, lymphocytose du nourrisson), et des prélèvements de patients avec des hémopathies malignes (leucémies aiguës lymphoblastiques et myéloblastiques, syndromes myéloprolifératifs, syndromes myélodysplasiques et phases leucémiques de lymphomes B et T).

La très grande majorité des échantillons est, après être passée sur l'Advia ou le Sapphire, analysée sur le M511 dans les 24h après le prélèvement.

Les résultats de chaque prélèvement étaient ensuite imprimés en double (résultats rendus dans le SGL et résultats du M511) et classés selon l'interférence ou l'anomalie morphologique qu'ils permettaient d'évaluer. Un tableur Excel était ensuite réalisé pour l'étude statistique avec l'ensemble des résultats issus du SGL et du M511.

I.2.3. Vérification de méthode

Nous nous sommes appuyés sur les outils de validation/vérification de méthode pour évaluer l'automate. Cependant, le M511 n'a pas servi à rendre des résultats aux cliniciens. Nous n'étions pas dans une démarche d'accréditation. Nous n'avons donc pas réalisé une vérification de méthode complète comme attendue par le COFRAC. Nous nous sommes appuyés sur le SH FORM 43, qui est un formulaire à remplir pour la vérification de méthode et qui reprend les différents critères à évaluer.

Dans notre situation, nous parlons de vérification de méthode initiale. En effet la méthode utilisée par le M511 a été mise au point par Roche® ; il s'agit donc même si elle est innovante, d'une méthode reconnue, normalisée considérée comme validée (marquage CE, méthode « fournisseur ») ; on vérifie donc que les performances annoncées par le fournisseur sont atteintes. Elle est dite « initiale » par opposition à « continue », car la méthode n'a pas été mise en place de façon effective dans notre laboratoire.

Pour juger de la performance de l'automate sur chaque processus et dans chaque paramètre évalué, nous nous sommes appuyés sur des valeurs de références et des limites à respecter déterminées par des sociétés savantes. Dans la plupart des cas il s'agit des critères proposés par Ricos(12). Ces critères reposent sur l'étude des coefficients de variation inter et intra-individuelle de chaque analyte.

I.2.3.1. Fidélité

Elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées, dans des conditions précises. Elle caractérise la dispersion des résultats.

Elle peut s'exprimer sous la forme de la répétabilité, ou de la reproductibilité.

I.2.3.1.1. Répétabilité

On l'évalue en analysant un même échantillon avec le même opérateur, le même lot de réactifs, le même instrument, le même étalonnage dans un délai le plus court possible. Ainsi on cherche à caractériser la meilleure performance possible dans des conditions optimales (13). On peut utiliser des échantillons biologiques ou, comme dans notre situation, des contrôles internes de la Qualité (CIQ). Pour un même analyte, la mesure doit se faire à plusieurs niveaux de concentrations, ces niveaux devant être proches des seuils de décision. On détermine ensuite à partir des mesures la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV).

$$CV (\%) = \frac{s}{m} \times 100$$

On compare ensuite les résultats obtenus avec les coefficients de variation limites annoncés par le fournisseur et/ou les sociétés savantes. Ces limites de CV sont égales aux limites des CV de la fidélité intermédiaire multipliées par 0,75(14).

I.2.3.1.2. Reproductibilité intra-laboratoire

On parle également de fidélité intermédiaire. On l'évalue avec des échantillons dont les niveaux sont similaires à ceux utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité. Il s'agit d'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs suivants : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages. Les analyses s'effectuent sur au moins deux niveaux différents, sont répétées 30 fois et sur au moins 15 jours. Comme dans le cas de la répétabilité, on compare ensuite les résultats obtenus avec les coefficients de variation (CV) annoncés par le fournisseur et/ou les sociétés savantes. Si nous nous retrouvons au-delà des limites de conformités pré-établies, on doit juger de la significativité de ces différences, selon le niveau de concentration, le nombre de valeurs mesurées ; et les confronter aux exigences de la clinique(13).

I.2.3.2. Évaluation de la justesse ou de l'exactitude

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et d'une valeur de référence (13). On estime la justesse à partir donc d'une valeur cible (v). L'écart par rapport à cette valeur cible constitue le biais. En pratique on utilise des CIQ externalisés. Ce sont des CIQ, comme ceux utilisés en routine, mais ils sont réalisés dans plusieurs laboratoires équipés du même matériel et il s'agit du même lot d'échantillons. Les valeurs de ces CIQ obtenues dans différents laboratoires sont collectées et constituent les valeurs d'un groupe de pairs. A partir de ces valeurs, une valeur cible (v) est déterminée, permettant le calcul de la justesse. La valeur cible (v) retenue est la moyenne des résultats obtenus avec la même méthode (groupe de pairs), ou la moyenne de l'ensemble des participants si les seuils de décision pour le paramètre sont standardisés (HAS, consensus). On compare la moyenne (m) obtenue lors de l'étude de la fidélité intermédiaire (obtenue à partir des CIQ) avec la valeur cible (v) en calculant le biais.

$$Biais (\%) = \frac{(m - v)}{v} \times 100$$

Un système de CIQ externalisés géré par le fournisseur n'existait pas encore pour le M511. Pour pouvoir estimer la justesse, nous nous sommes procurés les résultats de CIQ provenant d'un laboratoire à Nancy utilisant le M511 en routine. Nous avons pu également obtenir les résultats de CIQ du même lot utilisé sur des M511 à Boston. A partir de l'ensemble de ces valeurs, nous avons pu faire une moyenne des CIQ des différents sites (constituant donc un groupe de pairs) pour chaque analyte. Cette moyenne a été considérée comme notre valeur cible pour le calcul de la justesse.

Nous n'avons pas déterminé l'exactitude, qui est l'écart entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande(13), car cela nécessite le recours à des EEQ (évaluations externes de la Qualité), qui n'existent pas pour le M511. Si nous avions eu des EEQ, on aurait calculé l'écart entre notre dosage (x) et la valeur cible (v), cet écart correspondant à l'inexactitude, ou erreur d'exactitude.

$$Inexactitude (\%) = \frac{(x - v)}{v} \times 100$$

I.2.3.3. Estimation de l'incertitude de mesure

Un autre critère de performance à évaluer concerne l'incertitude de mesure. Comme pour les critères précédents elle se détermine pour au moins deux niveaux. Il existe plusieurs approches. Ainsi notre laboratoire utilise la méthode « CIQ/EEQ ». Cette méthode repose sur l'exploitation des données des CIQ et des données d'EEQ. Ne disposant pas d'EEQ, nous avons pris à la place les données des CIQ externalisés. C'est ce que conseille un document du COFRAC, le SH GTA 14. En effet, l'utilisation de CIQ externalisés est une alternative à l'évaluation d'une justesse quand il n'existe pas d'EEQ satisfaisant (15).

L'incertitude est le résultat de la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et de l'EEQ (pour nous le CIQ externalisé). Elle s'exprime ainsi :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(CIQ_e)}$$

$u^2(CIQ)$ représente la variance (le carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du CIQ. Il s'agit de l'incertitude liée à la fidélité intermédiaire. Elle s'exprime ainsi :

$$u^2(CIQ) = \left(\frac{CV \text{ du CIQ} \times \text{moyenne du CIQ}}{100} \right)^2$$

$u^2(CIQ_e)$ représente la variance liée à la justesse (biais). Elle dépend des résultats des CIQe. On l'exprime ainsi :

$$u^2(CIQ_e) = \left(\sqrt{\left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}} \right)^2 + \hat{\sigma}_E^2} \right)^2$$

$\bar{E}$: écart entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

$\hat{\sigma}_E$: écart-type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

On parle également d'incertitude élargie $U(C)$ qui est l'incertitude à laquelle on applique un facteur d'élargissement k égal à 2 ; pour obtenir un intervalle de confiance d'au moins 95%. Il s'agit du résultat final.

$$U(C) = 2 \times u(C)$$

On compare ensuite cette incertitude aux exigences du laboratoire.

I.2.3.4. Comparaison de méthode

Il s'agit d'analyser au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré. Chaque échantillon est analysé avec chaque méthode dans le délai le plus court possible. Dans notre situation nous avons effectué 3 comparaisons de méthode pour chaque analyse. En effet les échantillons que nous avons analysés sur le M511 étaient analysés auparavant sur un de nos 3 automates (Advia A, Advia B, ou Sapphire). Le M511 a donc été comparé avec chaque automate.

On détermine au préalable des limites de suivi pour détecter des échantillons discordants :

$$\text{Limites de suivi} = \pm \sqrt{(3\sigma_{FI \text{ technique testée}})^2 + (3\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}})^2}$$

$\sigma_{FI \text{ technique testée}}$: écart-type de la fidélité intermédiaire de la technique testée obtenu grâce aux CIQ.

$\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}}$: écart-type de la fidélité intermédiaire de la technique de comparaison obtenu grâce aux CIQ.

Les limites de suivi sont établies pour chaque niveau.

On peut alors construire 3 graphiques. L'un représentant les résultats de la méthode Y (M511) par rapport à ceux de la méthode X (Advia A, Advia B, ou Sapphire). A partir de ce premier graphique on calcule une droite de corrélation. Cette dernière doit avoir une équation proche de $y=x$. Un second graphique est établi avec les différences ($y_i - x_i$) en fonction de x_i . C'est le diagramme des différences sur lequel on applique les limites de suivi. Enfin un dernier graphique est réalisé avec les rapports y_i/x_i en fonction de x_i .

Ces graphiques permettent de mettre en évidence certaines valeurs discordantes.

I.3. Résultats

I.3.1. Résultats de la vérification de méthode dans le cas d'une numération de formule sanguine

Selon qu'une méthode est de type quantitatif ou qualitatif ; les critères à évaluer ne sont pas les mêmes. Dans notre cas, nous avons considéré qu'il s'agissait d'une méthode quantitative. En effet dans une NFS, on quantifie chaque paramètre et chaque catégorie cellulaire. Cependant concernant l'aspect cytomorphologique qui fait partie de nos objectifs, nous ne pouvons appliquer les critères quantitatifs. Nous avons apprécié ces éléments qualitatifs sans suivre tous les critères proposés par le COFRAC.

Enfin la NFS rassemble plusieurs analyses, ce qui en fait une association de méthodes ; on parle donc de processus complexe, constitué de plusieurs sous-processus. Notre évaluation a donc été réalisée sur chaque analyte de la NFS.

Pour chacune des analyses et quand c'était possible, nous avons vérifié la répétabilité, la reproductibilité, la justesse, l'exactitude, les incertitudes de mesures, la comparaison de méthode avec le Sapphire et l'Advia, et avons rentré nos résultats sur un fichier de type SH FORM 43.

Nous allons donc examiner différents paramètres de la NFS et les synthétiser dans des tableaux.

I.3.1.1. Globules blancs

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justesse	Exactitude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode				
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	2 EEQ hors de la cible	±0,3 G/L (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 1x AdviaB/M511 : y= 1x - 0,1 Sapphire/M511 : y= 1x				
	Valeur moyenne (G/L)	2,93	2,99	2,97							
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	4,3	5,7	6,05							
	Résultats (%)	3,75	3,25	1,24							
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		2 EEQ hors de la cible		±0,6 G/L (CIQe) ±0,7 G/L (EEQ)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 1x AdviaB/M511 : y= 1x - 0,1 Sapphire/M511 : y= 1x		
	Valeur moyenne	7,11	7,14	7,15							
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	4,3	5,7	6,05							
	Résultats (%)	2,94	2,82	1,28							
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30				2 EEQ hors de la cible		±1,2 G/L (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 1x AdviaB/M511 : y= 1x - 0,1 Sapphire/M511 : y= 1x
	Valeur moyenne	15,72	15,73	15,78							
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	4,3	5,7	6,05							
	Résultats (%)	2,07	2,48	2,86							

Tableau 1: Résultats de validation des GB

Nous avons passé deux échantillons d'EEQ (fournis par Biologie Prospective). Pour la numération des GB les résultats obtenus étaient hors de la cible avec 5,24 G/L et 5,62 G/L contre 4,46 G/L et 4,69 G/L pour la cible, ce qui correspond à un biais de 17,49 et 19,83% pour une limite de 6,05%.

Les incertitudes obtenues étaient relativement proches de celles de l'Advia et du Sapphire ($\pm 0,2 \text{ G/L}$, $\pm 0,4 \text{ G/L}$ et $\pm 0,7 \text{ G/L}$ avec des CIQe sur le Sapphire).

Les CV de répétabilité sont faibles et bien en dessous des limites mais légèrement supérieurs à ceux de la fidélité intermédiaire.

I.3.1.2. Globules rouges

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justesse	Exac- titude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	2 EEQ, dans la cible	±0,1 T/L (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 1x-0,2 AdviaB/M511 : y=0,9x+0,2 Sapphire/M511 : y=1x+0,1
	Valeur moyenne (T/L)	2,4	2,42	2,41			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	1,2	1,6	1,7			
	Résultats (%)	1,37	1,53	0,41			
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		±0,2 T/L (CIQe) ±0,1 T/L (EEQ)	
	Valeur moyenne	4,16	4,19	4,18			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	1,2	1,6	1,7			
	Résultats (%)	1,48	1,38	0,57			
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30		±0,2 T/L (CIQe) ±0,1 T/L (EEQ)	
	Valeur moyenne	5,45	5,58	5,45			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	1,2	1,6	1,7			
	Résultats (%)	1,50	1,26	1,21			

Tableau 2: Résultats de validation des GR

Les incertitudes obtenues sont proches de celles calculées pour le Sapphire (0,1T/L, 0,2T/L et 0,2T/L pour chaque niveau avec CIQe).

Les CV de répétabilité sont légèrement au-dessus des seuils fixés par Ricos et même supérieurs à ceux obtenus pour la fidélité intermédiaire.

I.3.1.3. Hémoglobine

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justes se	Exac- titude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	2EEQ dans la cible	±0,3 g/dL (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 1,1x-1,2 AdviaB/M511 : y=1,1x-1,9 Sapphire/M511 : Y=1,1x-1,4
	Valeur moyenne (g/dL)	5,58	5,66	5,64			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	1,07	1,43	1,84			
	Résultats (%)	1,49	1,48	1,33			
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		±0,5 g/dL (CIQe) ±0,4 g/dL (EEQ)	
	Valeur moyenne (g/dL)	11,5	11,66	11,6			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	1,07	1,43	1,84			
	Résultats (%)	1,39	1,50	1,01			
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30		±0,7g/dL (CIQe) ±0,4 g/dL (EEQ)	
	Valeur moyenne (g/dL)	17,57	17,61	17,58			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	1,07	1,43	1,84			
	Résultats (%)	1,24	1,69	1,03			

Tableau 3: Résultats de validation de l'Hémoglobine

Les incertitudes obtenues sont également proches de celles calculées sur le Sapphire ($\pm 0,2 \text{ g/dL}$, $\pm 0,4 \text{ g/dL}$, $\pm 0,7 \text{ g/dL}$ avec des CIQe).

Les CV de répétabilité (et dans un degré moindre ceux de fidélité intermédiaire pour les niveaux bas et moyens) sont légèrement au-dessus des limites proposées par Ricos(12).

I.3.1.4. VGM

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justesse	Exac- titude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	2 EEQ hors de la cible	± 2,3 fL (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 1,1x-2,9 AdviaB/M511 : y=1x-1,5 Sapphire/M511 : y=1,1x-2,9
	Valeur moyenne (fL)	66,84	66,97	5,64			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	0,53	0,7	1,26			
	Résultats (%)	0,83	1,19	0,5			
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		± 2,5 fL (CIQe)	
	Valeur moyenne (fL)	78,81	78,98	11,6			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	0,53	0,7	1,26			
	Résultats (%)	0,59	1,12	0,25			
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30		± 3,4 fL (CIQe) ±4,1fL (EEQ)	
	Valeur moyenne (g/dL)	89,37	89,09	17,58			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	0,53	0,7	1,26			
	Résultats (%)	0,53	1,32	0,48			

Tableau 4: Résultats de validation du VGM

Pour l'exactitude, notre calcul repose sur l'analyse de deux EEQ. Les biais obtenus étaient de 4,36 et 4,77% pour une limite de 2,42% proposée par RICOS ; on retrouvait en effet des VGM à 91,7 et 94,4 fL au lieu de 87,7 et 89,9 fL.

Les incertitudes de mesure sont assez proches de celles calculées avec le Sapphire ((± 2 fL, ± 2 fL, ± 2 fL pour chaque niveau) et l'Advia (± 2 fL, ± 2 fL, ± 4 fL pour chaque niveau) grâce aux CIQe.

Les CV de répétabilité et en particulier de reproductibilité sont au-dessus des seuils fixés par Ricos(12). Les CV du fournisseur confirment ce fait, car bien qu'ils soient en dessous de ceux que nous avons calculés, ils se révèlent supérieurs aux limites de Ricos également.

I.3.1.5. CCMH

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justesse	Exac- titude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	2 EEQ hors de la cible	± 1,1 g/dL (CIQe) ± 1,3 g/dL (EEQ)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 0,5x+15 AdviaB/M511 : y=0,4x+18 Sapphire/M511 : y=0,5x+16,7
	Valeur moyenne (g/dL)	34,79	34,95	34,55			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	0,40	0,53	0,4			
	Résultats (%)	0,6	1,06	0,5			
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		± 1,0 g/dL (CIQe)	
	Valeur moyenne (g/dL)	35,06	35,19	35,16			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	0,40	0,53	0,4			
	Résultats (%)	0,5	0,93	0,25			
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30		± 1,1g/dL (CIQe)	
	Valeur moyenne (g/dL)	36,07	36,10	35,73			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	0,40	0,53	0,4			
	Résultats (%)	0,58	1,08	0,48			

Tableau 5: Résultats de validation de la CCMH

Les CV de répétabilité, de reproductibilité et de justesse sont légèrement au-dessus des limites. Les écarts pour la reproductibilité sont toutefois plus importants.

Concernant l'exactitude, les deux échantillons d'EEQ analysés apportent des résultats en dehors des limites de Ricos. On obtient à partir des EEQ les valeurs suivantes : 33,3 g/dL pour une cible à 32,11 g/dL et 33,8 g/dL pour une cible à 31,51 g/dL ; ce qui correspond à des biais de 3,71 et 7,27 %, au-dessus des 1,27% de limite de Ricos(12).

Les droites de régression présentent une équation éloignée de celle qu'on attend ($y=x$ dans un cas parfait). Une étude menée par la FDA (Food and Drug Administration, en français administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments, autorité américaine contrôlant, entre autres, la commercialisation des produits de santé aux Etats-Unis) sur le M511 avant sa commercialisation aux Etats-Unis, retrouve des droites de régressions similaires en le comparant au Sysmex XN-10 sur 1859 échantillons, sur plusieurs sites avec pour la CCMH un coefficient de corrélation à 0,522 et une ordonnée à l'origine à 15,71(16).

I.3.1.6. Plaquettes

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justesse	Exac- titude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	2 EEQ hors de la cible	± 5,1 G/L (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 0,9x+15 AdviaB/M511 : y=1x+13,4 Sapphire/M511 : y=1x+8
	Valeur moyenne (G/L)	68,82	69,94	69,94			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	3,45	4,6	5,9			
	Résultats (%)	3,08	2,69	0,2			
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		± 15,4 G/L (CIQe) ± 20,6 G/L (EEQ)	
	Valeur moyenne (G/L)	216,57	219,09	219,09			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	3,45	4,6	5,9			
	Résultats (%)	2,35	2,47	0,5			
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30		± 26,3 G/L (CIQe)	
	Valeur moyenne (G/L)	466,25	470,47	470			
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	3,45	4,6	5,9			
	Résultats (%)	1,85	1,78	1,37			

Tableau 6: Résultats de validation des plaquettes

Concernant les résultats des plaquettes, tous les paramètres d'évaluation respectent les limites définies, sauf pour l'exactitude. En effet les valeurs retrouvées pour les EEQ sont 262 G /L (pour une cible à 226G/L) et 184 G/L (pour une cible à 202G/L). On note que les variations pour les 2EEQ ne se font pas dans le même sens. Les incertitudes sont équivalentes à celles des Advia et Sapphire. Les équations des droites de régression linéaire sont également satisfaisantes.

I.3.1.7. Erythroblastes

		Répé- tabilité	Fidélité inter- médiaire	Justesse	Exac- titude	Incertitude de mesure	Comparaison de méthode				
Niveau bas	Nombre de valeurs	15	30	30	/	Non pertinent	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 0,3x+4,1 AdviaB/M511 : y=0,4x+3,1 Sapphire/M511 : y=0,4x+1,3				
	Valeur moyenne (%GB)	0,00	0,01	0,01							
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	/	/	/							
	Résultats (%)	Non pertinent									
Niveau moyen	Nombre de valeurs	15	30	30		/		± 2,2% (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 0,3x+4,1 AdviaB/M511 : y=0,4x+3,1 Sapphire/M511 : y=0,4x+1,3		
	Valeur moyenne (%GB)	6,72	6,80	6,94							
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	/	/	/							
	Résultats (%)	10,32	11,23	2,00							
Niveau haut	Nombre de valeurs	15	30	30				/		± 2,5% (CIQe)	Equation de la droite de régression AdviaA/M511 : y= 0,3x+4,1 AdviaB/M511 : y=0,4x+3,1 Sapphire/M511 : y=0,4x+1,3
	Valeur moyenne (%GB)	20,26	20,44	470							
	Limites d'acceptabilité du CV (%)	/	/	/							
	Résultats (%)	4,36	4,35	0,77							

Tableau 7: Résultats de validation des érythroblastes

Ricos ne propose pas de limites d'acceptabilité pour l'analyse des érythroblastes. Nous n'avons pas calculé les CV et l'incertitude de mesure pour le niveau bas car ce dernier correspondait à l'absence (ou la quasi-absence) d'érythroblastes dans les échantillons, il n'apparaissait donc pas pertinent.

Les droites de régression présentent des équations avec un coefficient seulement entre 0,4 et 0,3 ; ce qui témoigne d'une faible corrélation avec les résultats rendus en routine.

I.3.2. Comparaison avec les techniques usuelles : points particuliers

I.3.2.1. Interférences habituelles

Des interférences habituellement retrouvées sur les automates classiques, n'ont pas été notées sur le M511. Ainsi le passage d'échantillons avec un plasma lactescent n'a posé aucun souci, de même que des échantillons hémolysés.

Roche® indique que les échantillons avec un plasma ictérique n'interfèrent pas dans les paramètres de NFS tant que la concentration de bilirubine conjuguée ou de bilirubine libre ne dépasse pas 40 mg/dL (680 µmol/L)(17).

De même avec des échantillons de plasma lactescents et présentant une hyperlipidémie, Roche® signale qu'il n'y a pas d'interférence avec les paramètres de NFS, (sauf pour les GB et les lymphocytes) tant que l'hyperlipidémie ne va pas au-delà de 3000 mg/dL ; la lipidémie ne doit pas dépasser 1646 mg/dL pour le compte des GB et 2459 mg/dL pour le compte des lymphocytes.

Également avec des échantillons de plasma hémolytiques, Roche® signale qu'il n'y a pas d'interférence avec les paramètres de NFS, (sauf pour l'hémoglobine et l'hématocrite), tant que la concentration d'hémoglobine n'excède pas 1000 mg/dL ; et 672 mg/dL pour l'hémoglobine, 792 mg/dL pour l'hématocrite(17).

Ces interférences se voient en particulier sur l'analyse du taux d'hémoglobine avec des automates dont la mesure repose sur la spectrophotométrie. Le M511 n'emploie pas cette technique. Par conséquent, l'absence d'interférence avec les échantillons hémolytiques, ictériques ou lactescents est tout à fait cohérente.

I.3.2.2. Anémie

Globalement, nous n'avons pas constaté de discordance majeure dans les valeurs de numération des GR, du VGM ou de l'hémoglobine. Cependant dans certains cas nous avons observées des valeurs de CCMH discordantes, notamment lors d'anémies hypochromes. Or en juillet 2018, la FDA a publié une note concernant le rappel des automates M511 produits (17 dans le monde, en majorité dans les pays du Sud-Est asiatique)(18). La raison évoquée est la découverte de résultats discordants pour des cas d'anémies microcytaires sévères (notamment en cas de carence en fer ou de thalassémie). Les discordances concerneraient différents paramètres tels que la numération des GR, le VGM, l'hémoglobine, la CCMH, l'hématocrite. Des investigations étaient prévues pour corriger ce problème. Ces discordances seraient liées à un défaut de conception du logiciel. Roche® conseillait alors aux utilisateurs de M511 de ne pas rapporter les valeurs d'hémoglobine, de numération de GR, de VGM, de CCMH, d'hématocrite en cas d'échantillons avec une hémoglobine à moins de 9 g/dL sur le M511.

Nous avons donc vérifié si nous retrouvions ces discordances sur des échantillons avec une anémie à moins de 9g/dL sur le M511. Nous avons fait notre vérification sur 150 échantillons.

Concernant la valeur d'hémoglobine, on constate que sur les 150 échantillons, on trouve en moyenne sur nos automates (Sapphire et Advia) une hémoglobine à 8,14 g/dL, tandis que sur le M511 elle se situe en moyenne autour de 7,67g/dL. La différence moyenne entre nos valeurs et celles du M511 est de 0,47 g/dL alors que l'incertitude de mesures sur des valeurs basses est de 0,3 g/dL pour chacun des automates. Le pourcentage d'erreur entre les deux méthodes est en moyenne de 5,86%. Le rapport des valeurs du M511 sur les valeurs de nos automates est de 0,94. Tous ces résultats concordent avec une légère sous-estimation par le M511 de l'hémoglobine. Cependant cette sous-estimation n'excède pas 18%, observé sur un échantillon ; ou 1,7 g/dL vu sur un autre échantillon (8,9 g/dL rendu par le M511 au lieu de 10,6 g/dL sur notre échantillon). L'équation de la droite de régression est $y = 0,94x - 0,036$ ce qui est plutôt satisfaisant ; avec les valeurs M511 en ordonnées et de nos automates en abscisses. Le test de Wilcoxon (pour la comparaison de variables quantitatives appariées) montre une différence significative entre les valeurs de nos automates et les valeurs du M511, avec une valeur p de $8,73 \times 10^{-25}$. On peut donc considérer que sur ces échantillons, la sous-estimation par le M511 sur ces échantillons est significative mais minime. Cependant, il faut noter que nos échantillons concernent des patients européens, or dans les pays du Sud-Est asiatique où le M511 est plus utilisé, les anémies sont souvent plus fréquentes et plus profondes et souvent liées à des carences en fer ou à des thalassémies(19). Il est donc possible que les différences observées dans ces pays soient plus importantes que celle qu'on observe.

Si l'on s'intéresse aux valeurs de VGM, sur les même 150 échantillons ; comme pour les valeurs d'hémoglobine, on retrouve une différence significative entre les valeurs de nos automates et celles obtenues avec le M511. La valeur p étant de $3,59 \times 10^{-6}$ avec le test de Wilcoxon. Cependant, on note que les moyennes des deux séries sont proches (89,2 fL sur nos automates et 90,8 fL sur le M511), ce qui signifie une différence moyenne de 1,6fL entre le M511 et les autres automates. Or l'incertitude de mesures pour le VGM est située entre 3 et 4 fL. En outre la droite de régression linéaire présente une équation tout à fait satisfaisante, $y = 1,03x - 1,3$ avec les valeurs du M511 en ordonnées. Enfin le pourcentage d'erreur entre le M511 et les autres automates n'est que de 1,69% et n'excède pas 14% sauf pour de rares cas (5 sur 150 et aucun ne dépassant 16%). Ainsi on peut considérer que les valeurs de VGM, bien que surestimées par le M511 sont bien corrélées. Cependant dans les pays où les anémies microcytaires sont plus répandues, les différences observées sont peut-être plus importantes.

En poursuivant sur les valeurs de numération de GR, on observe bien une discordance. Les valeurs du M511 sont plus basses qu'attendues, comme le prouve le test de Wilcoxon avec une différence significative (la valeur p étant de $5,86 \times 10^{-26}$). L'équation de la droite de régression est cependant relativement satisfaisante avec un coefficient directeur à 0,86 et une ordonnée à l'origine de 0,2. La moyenne des pourcentages d'erreur observée est de 6,6 %. La différence la plus grande observée est de 0,6 T/L (5,62 sur nos automates contre 5,02 sur le M511), mais en moyenne les différences sont de 0,2 T/L ce qui correspond à l'incertitude de mesure. On peut donc dire que le M511, sur ces échantillons anémiques, sous-

estime en moyenne de 0,2 T/L le compte de GR. Bien que cette sous-estimation soit significative, elle n'a pas ou peu d'incidence clinique.

Enfin sur les valeurs de CCMH ; on remarque cette fois une nette discordance, comme nous l'avions déjà constatée sur l'ensemble des échantillons. Le test de Wilcoxon met en évidence une différence significative avec une valeur p inférieure à 0,01. La droite de regression linéaire, représentée sur la figure ci-dessous, présente l'équation suivante $y = 0,502x + 15,716$, ce qui témoigne d'un manque de corrélation entre le M511 et les autres automates. Cela confirme les observations précédentes. Les valeurs de CCMH du M511 semblent toutes resserrées autour de 32 g/dL. Cependant en moyenne le pourcentage d'erreur reste relativement faible s'établissant à 0,79%.

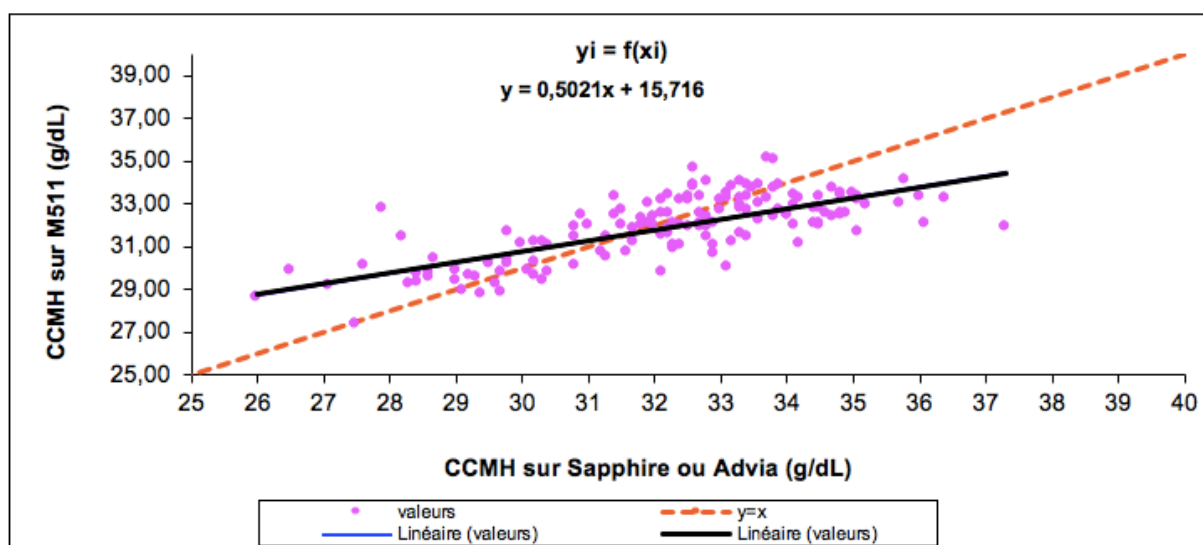


Figure 17: Droite de régression linéaire pour la CCMH

I.3.2.3. La numération plaquettaire et les amas plaquettaires

Une des interférences relativement fréquente (0,07 à 0,2% des individus dans la population générale(20)), observée quel que soit l'automate, est la fausse thrombopénie due à des amas plaquettaires. Ces amas se forment dans les tubes EDTA et ne sont pas comptés comme des plaquettes par les automates, ils peuvent même être parfois comptés comme des GB selon leur forme et leur volume. Avec le M511, cette interférence n'a pas été observée. Elle est même détectée et corrigée par l'automate. En effet, sur le M511 tous les résultats d'analyse dérivent des images obtenues aux microscopes. A partir de ces images, le M511 est capable de détecter les amas de plaquettes et de compter les plaquettes présentes au sein de ces amas. Il en résulte des chiffres de plaquettes inchangés par la présence d'amas plaquettaires. Enfin, un paramètre non rapportable mais informatif indique dans l'échantillon le pourcentage de plaquettes en amas.

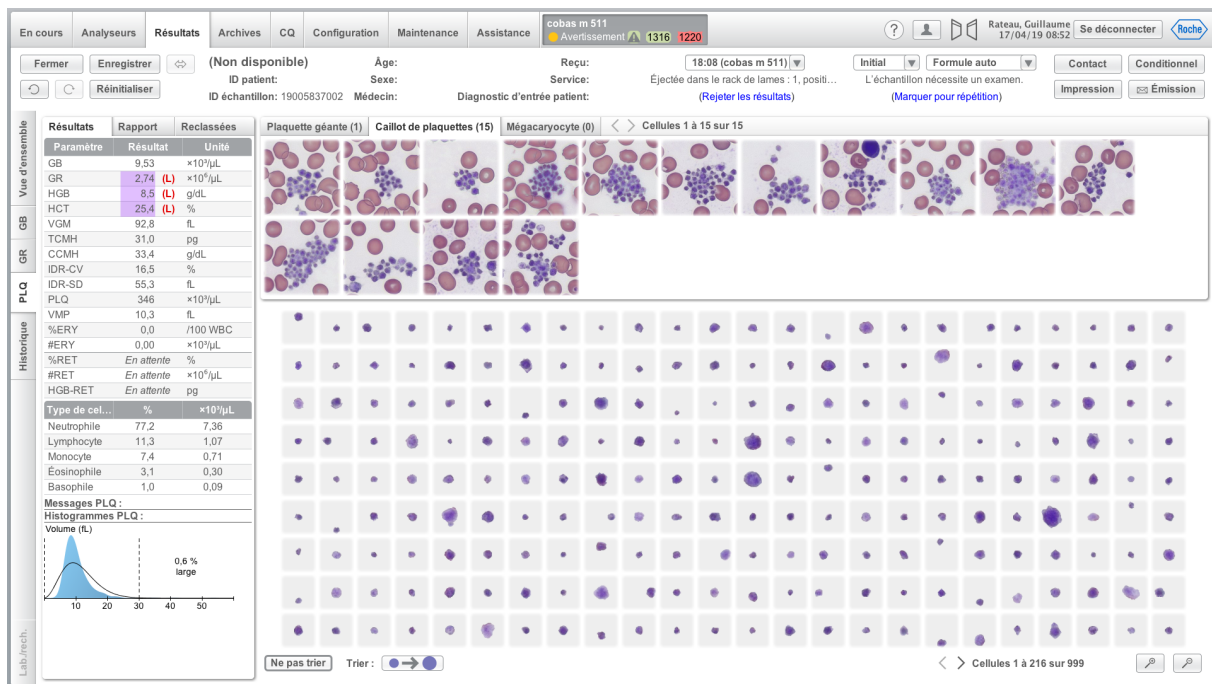


Figure 18: galerie d'image d'un échantillon avec des amas plaquettaires

Par ailleurs, nous avons constaté parfois des discordances sur certains échantillons sans amas entre le chiffre de plaquettes du M511 et celui des autres automates. Ces différences peuvent parfois avoir un impact dans la prise en charge du patient. Ainsi certains échantillons avec une thrombopénie apparaissaient avec une numération plaquettaire normale sur M511.

Dans d'autres situations le phénomène inverse été observé. Certains échantillons avec une numération normale apparaissaient abaissés sur les résultats du M511.

En reprenant l'ensemble des échantillons analysés, le phénomène de surestimation concernerait 55 échantillons sur 1141, soit 4,8%. Sur les automates Sapphire et Advia, on trouve une numération plaquettaire moyenne de 239 G/L et de 290 G/L sur le M511 pour ces 55 échantillons. La surestimation sur ces 55 échantillons varie entre 7% et 84%, et est d'en moyenne 25% et la médiane de ces surestimations est de 18%. Cependant dans la majorité des cas, cela ne concerne pas des valeurs seuils (14 des 55 échantillons présentent une numération plaquettaire autour d'un seuil qui peut être 30G/L, 50G/L, 150G/L ou 450G/L)(21,22). Toutefois cela est gênant pour le suivi des numérations plaquettaires chez un même patient.

Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces discordances observées.

1.3.2.4. Échantillons de nouveau-nés

L'analyse des échantillons pédiatriques est connue pour être délicate :

- Micro-méthodes au lieu des tubes EDTA standards,
- Utilisation du mode ouvert pour les automates
- Volumes très faibles

- Présence fréquente d'érythroblastes circulants

En raison précisément des faibles volumes de sang, nous n'avons pu analyser que 10 échantillons sur le M511.

On remarque que dans 6 cas sur 10 la formule n'est pas rendue par l'automate qui n'arrive pas à classer les différentes cellules.

D'autres différences sont notées. Pour l'hémoglobine, deux échantillons présentent des valeurs d'hémoglobine aberrantes (31 g/dL pour 19,7 g/dL et 32 g/dL pour 21,2 g/dL), et l'alarme « linéarité » s'affiche. Sur ces 10 échantillons l'hémoglobine rendue par le M511 est en moyenne plus élevée de 1 g/dL. On note une différence de 4,5 g/dL pour un échantillon notamment où le M511 livre un résultat de 22,8 g/dL, tandis que l'Advia donne 18,3 g/dL.

Parmi les autres discordances, on trouve les valeurs de VGM où les plus grandes différences sont situées entre 6 et 11 fL. Il s'agit de cas où le VGM du M511 est plus bas.

Pour les plaquettes, on constate un compte du M511 toujours plus bas que celui du Sapphire ou de l'Advia. La différence est en moyenne de 52 G/L et atteint 127 G/L pour un prélèvement (374 contre 247 G/L).

Enfin les érythroblastes circulants sont identifiés par le M511. La présence des érythroblastes est repérable par le résultat de NFS lui-même indiquant un certain nombre d'érythroblastes pour 100 GB, par l'alarme « ERY ? » parfois associée à l'alarme « inclusion de GR ? ». Enfin ils sont visibles dans la partie érythroblastes de la galerie d'images.

Mais les valeurs d'érythroblastes rendues par le M511 sont toujours plus basses que celles rendues en routines, après coloration au MGG et décompte au microscope. En effet les automates Advia et Sapphire ne sont pas assez fiables pour rendre le compte d'érythroblastes ; ils rendent une valeur unique pour les GB et les érythroblastes ensemble. Une partie de ces érythroblastes risquent d'être comptés parmi les GB sans vérification sur un frottis. La lecture au microscope des frottis permet de mieux distinguer les érythroblastes des GB et d'obtenir un vrai compte pour ces deux paramètres. Les différences sont particulièrement significatives pour les valeurs élevées d'érythroblastose (3 cas avec plus de 100 érythroblastes pour 100 GB), par exemple 681 au microscope sur frottis classique contre 183 sur M511. L'équation de la droite de corrélation $y = 0,28x + 17,3$ (y représentant les valeurs du M511) témoigne d'une mauvaise corrélation.

I.3.2.5. Erythroblastose (adulte)

9 cas ont pu être analysés, chez des patients souffrant d'envahissement médullaire métastatique ou présentant une régénération après hémorragie. La valeur moyenne est de 7,5 pour 100 GB avec des valeurs allant de 2,8 à 18,5. On constate les mêmes différences observées sur le compte d'érythroblastes des nouveau-nés. Ainsi les valeurs du M511 sont toujours plus basses pour le compte d'érythroblastes, mais le compte de GB est plus élevé ; tandis que le paramètre « GB+érythroblaste » reste bien corrélé entre M511 et les Advia et Sapphire.

Par contre aucune différence concernant l'hémoglobine ou les plaquettes n'a été constatée sur ces échantillons.

Le VGM apparaissait plus élevé sur le M511 avec une moyenne des différences de 3,4 fL.

I.3.2.6. Les schizocytes

Les schizocytes sont des GR fragmentés. Ils présentent une morphologie caractéristique et bien décrite permettant de différencier les « vrais » fragments, générés par un processus d'hémolyse mécanique, d'anomalies de forme et de taille observées dans d'autres contextes (dysérythropoïèse générant une poikilocytose)

Leur reconnaissance est indispensable pour orienter certains diagnostics nécessitant souvent une prise en charge urgente (microangiopathie thrombotique notamment). Le seuil de positivité est de 5 pour 1000 GR.

Un de nos questionnements concernait l'aspect que pourrait prendre ces cellules sur les lames imprimées par le M511 et sur la galerie d'image du M511.

Nous avons constaté que la morphologie qu'on leur connaissait était conservée. Ils étaient d'ailleurs repérables sur la galerie des GR et par un IDR (indice de distribution des GR) élevé. En effet il est possible de classer les GR selon leurs tailles, leurs chromies ou leurs formes sur la galerie. Avec ce classement la présence de schizocytes est plus facilement repérable. Par contre, le M511 ne semble pas capable de reconnaître ces cellules en tant que schizocytes. Il les classe comme des GR mais n'affiche pas d'alarme. Leur compte n'est donc pas effectué pas l'automate. Il nous semble que le compte ne peut être effectué par l'opérateur à partir des seules cellules photographiées et affichées dans la galerie. En effet le nombre de cellules affichées est variable selon les échantillons.

Le M511 possède un paramètre appelé « %GRfrag », qui correspond au pourcentage de GR fragmentés ; mais qui ne fait pas partie des résultats rapportables. Nous avons constaté que les résultats de ce paramètre restaient bas malgré des nombres de schizocytes élevés sur certains échantillons.

Les échantillons avec des schizocytes analysés avec le M511 avaient des valeurs de GR concordantes avec celles obtenues sur les Sapphire et Advia.

I.3.2.7. Formule leucocytaire

La comparaison des automates doit se faire également sur les résultats de la formule leucocytaire et sur l'aspect des cellules rendu sur lames du M511 par rapport aux Advia et Sapphire, et aux frottis manuels. Les nouveaux automates utilisés pour le rendu de la formule leucocytaire sont plus susceptibles d'afficher des résultats erronés ou inattendus sur des échantillons anormaux que sur des échantillons d'individus sains. Nous avons donc mené notre comparaison sur des échantillons avec des anomalies leucocytaires ; en étudiant d'une part les cas avec des anomalies réactionnelles et d'autre part les cas avec des anomalies pathologiques relevant d'hémopathies malignes.

I.3.2.7.1. Anomalies leucocytaires réactionnelles

Parmi les anomalies réactionnelles, nous avons étudié les situations relativement fréquentes et qui pouvaient être sources d'erreurs. Nous avons donc sélectionné des échantillons chez le nourrisson avec une lymphocytose, et des échantillons évocateurs de syndromes mononucléotiques.

I.3.2.7.1.1. Lymphocytose physiologique du nourrisson

Présente en dehors de toute stimulation infectieuse, la « lymphocytose physiologique » du nourrisson comporte plus de variations morphologiques par rapport aux lymphocytes de l'adulte (taille augmentée, rapport nucléocytoplasmique élevé, nucléole) pouvant poser des problèmes de diagnostic différentiel avec des blastes de leucémie aiguë lymphoblastique. Ces échantillons ont donc constitué notre groupe témoin pour les lymphocytoses réactionnelles infectieuses.

Les automates en flux génèrent très souvent des alarmes face à ce type de cellules. Ces alarmes peuvent signaler la présence de cellules suspectes de type lymphocytes atypiques ou blastes. Nous étions intéressés de voir le résultat rendu par le M511 dans de telles situations.

Ainsi sur 15 échantillons de nourrissons avec une lymphocytose (située en moyenne autour de 7 G/L et entre 6 et 9,3 G/L) on obtient une bonne corrélation. La droite de corrélation est d'équation $y=1x-0,5$ (avec les résultats du M511 en ordonnée). De plus dans 12 cas, aucune alarme n'est générée. Dans les trois autres cas, on observe une alarme « blaste ? » pour un échantillon (avec 0,8% de leucocytes non classés) ; une alarme « lymphocyte atypique » ; une alarme « linéarité ». Cette dernière alarme est liée à une surestimation de l'hémoglobine et non aux lymphocytes.

Face à ce type de prélèvement, le M511 semble donc tout aussi performant que les automates actuels, voire plus performant ; puisqu'il classe bien les cellules en particulier les lymphocytes et génère moins d'alarmes.

I.3.2.7.1.2. Lymphocytes hyperbasophiles et syndromes mononucléosiques

Nous avons pu sélectionner 18 cas avec des lymphocytes hyperbasophiles dont 3 correspondants à une mononucléose infectieuse avec plus de 10% de lymphocytes hyperbasophiles, 1 correspondant à une primo-infection HIV, 1 correspondant à une toxoplasmose congénitale, 5 correspondant à une infection avec plus de 6% de lymphocytes hyperbasophiles et enfin 8 correspondant à des patients en chimiothérapie sans autre cellule anormale circulante. Dans ce dernier cas le pourcentage de lymphocytes hyperbasophiles est plus faible (entre 2 et 5%).

On constate que les 8 cas avec plus de 5% de lymphocytes hyperbasophiles rendus par le laboratoire, généraient un signal sur le M511. Parmi les 8 cas ; dans deux, la formule n'était pas rendue par le M511, l'automate affichant « formule impossible ». Dans les 6 autres cas la formule était rendue avec un pourcentage de « NC » pour « cellules non classées ». Dans 5 cas l'alarme « lymphocytes atypiques » était présente et était accompagnée en plus de l'alarme « blastes ? » pour 3 cas. Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le pourcentage de cellules non classées rendu par le M511 et le nombre de lymphocytes hyperbasophiles. Même si le pourcentage de cellules non classées augmente avec le pourcentage de lymphocytes hyperbasophiles, il reste systématiquement bien inférieur. Ainsi sur les 8 cas avec un pourcentage de lymphocytes hyperbasophiles allant de 5 à plus de 20%, le pourcentage de cellules non classées par le M511 ne dépasse pas 1,5%.

Si l'on regarde dans la galerie la catégorie « cellules non classées », on constate qu'il s'agit principalement des lymphocytes hyperbasophiles les plus grands et les plus basophiles. Les autres lymphocytes hyperbasophiles se retrouvent classés parmi la catégorie des lymphocytes. Leur reconnaissance est d'ailleurs facilitée par le classement des cellules par taille dans cette catégorie.

Concernant les 10 autres cas avec moins de 5% de lymphocytes hyperbasophiles rendus par le laboratoire, on retrouve un cas avec une formule impossible, 6 cas avec un pourcentage de cellules non-classées et 2 cas avec une alarme « lymphocytes atypiques ? ». Ces cas sont donc également signalés, de différentes manières, comme anormaux.

On note dans chacune de ces situations que le pourcentage de monocytes rendu par le M511 est toujours plus élevé que le pourcentage que l'on rend au microscope (en moyenne 9,8% contre 16,4%). Cependant dans la galerie d'images, la catégorie de monocytes ne présente que des monocytes et pas de lymphocytes hyperbasophiles comme on pourrait le suspecter.

I.3.2.7.2. Hémopathies malignes

Il s'agit d'échantillons pour lesquels on peut trouver de grandes variations dans la formule leucocytaire et présentant souvent des cellules atypiques. De plus c'est souvent sur l'aspect de ces cellules qu'un diagnostic peut être posé. Il est donc essentiel qu'un automate de cytologie permette l'identification de ces différentes pathologies ou du moins signale la possibilité d'une hémopathie pour ces échantillons. Nous nous sommes efforcés d'analyser des hémopathies diverses et variées recouvrant les LAL (leucémies aigües lymphoblastiques), LAM (leucémies aigües myéloblastiques), SMD (syndromes myélodysplasiques), SMP (syndromes myéloprolifératifs), et plusieurs lymphomes.

I.3.2.7.2.1. Leucémies aigües lymphoblastiques et myéloblastiques

Nous avons pu étudier 50 échantillons. Dans tous les cas, chaque échantillon présentait des blastes circulants. Les échantillons correspondaient à des pathologies diverses de type LAL B, LAM de novo ou post SMD, transformation de SMP. Les échantillons avaient une leucocytose variable, allant de 0,8 G/L à 56 G/L avec une moyenne à 11G/L. La blastose circulante variait entre 2 et 89% avec une moyenne à 33%.

En comparant les valeurs de numération des échantillons entre celles du M511 et celles de nos automates, on constate globalement une très bonne corrélation bien qu'il s'agisse de prélèvements pathologiques sélectionnés (comportant souvent des thrombopénies, des anomalies morphologiques associées telle que des anisocytoses plaquettaires et érythrocytaires, des dysplasies). Ainsi la leucocytose est très bien corrélée, même si les valeurs du M511 sont en moyenne plus élevées (11,9G/L contre 11,1G/L). Cette différence vient des échantillons comportant une érythroblastose où comme on l'a vu précédemment le paramètre « GB+érythroblastes » est bien corrélé mais avec plus de GB et moins d'érythroblastes rendus par le M511. La numération plaquettaire est particulièrement bien corrélée sur ces échantillons présentant souvent une thrombopénie (la moyenne se situant à 64G/L).

Concernant les valeurs des formules leucocytaires nous remarquons que sur les 50 échantillons, la formule n'est pas rendue dans 32 cas. Les différentes cellules

sont présentes dans la galerie d'images mais non classées. On retrouve les blastes en parcourant la série d'images. De manière générale la formule leucocytaire apparaît comme non mesurable dans 3 situations selon Roche®(23) :

- La première a lieu lorsque plus de 12% des GB identifiés au fort grossissement sont trop endommagés pour figurer dans la bonne galerie.

- La deuxième situation survient lorsque les PNN présentent une morphologie anormale (hypogranulation par exemple).

- Et la troisième lorsque les lymphocytes présentent des anomalies morphologiques, notamment des noyaux irréguliers.

Chacune de ces trois situations s'est présentée à nous avec les échantillons que nous avons sélectionnés. Ces situations sont liées à la pathologie des individus dont les échantillons ont été analysés.

Pour 5 échantillons le M511 affiche comme message « cellules endommagées ». Ce message s'affiche si plus de 15% de cellules apparaissent comme endommagées lors de la lecture au faible grossissement(23). On pourrait supposer que le vieillissement cellulaire lié au délai rallongé de passage sur le M511 par rapport aux autres automates, soit à l'origine de cette altération cellulaire. Or les colorations MGG réalisées après le passage sur le M511 ne montre pas de signes particuliers d'altération, notamment on ne retrouve pas d'échinocyte parmi les GR, témoin d'un échantillon vieillissant. De plus les frottis réalisés auparavant pour ces échantillons pour le rendu des résultats présentent également des cellules endommagées, lysées. Les cellules apparaissent en fait comme endommagées car il s'agit souvent de cellules pathologiques, plus fragiles et souvent plus nombreuses que les cellules normales. Il s'agit d'un élément morphologique utile pour interpréter une lecture cytologique d'un échantillon.

Dans les cas où la formule est rendue, les valeurs des PNN sont très bien corrélées, en particulier sur des valeurs basses ($<1\text{G/L}$ et $<0,5\text{G/L}$). En général, pour les échantillons avec une leucopénie les automates ne peuvent pas rendre de formule. Ce n'est pas le cas du M511, qui même avec des leucopénies inférieures à 1G/L rend une formule. De même pour les rares cas présentant une monocytose, une bonne corrélation a été retrouvée. Dans les 18 cas où la formule est rendue par le M511, il y en a 17 où un certain pourcentage de cellules n'est pas classé parmi les cinq catégories habituelles PNN, PNE, PNB, L, Monocytes. Il s'agit du « %NC ». Ce pourcentage est en moyenne de 5,2% et s'étend de 0,3 à 24%. Parmi ces cellules non classées, on trouve en majorité des blastes et/ou des granuleux immatures en cas de myélémie associée. Cependant tous les blastes ne sont pas regroupés parmi les cellules non classées ; en particulier en cas de LAL où ils vont parfois être classés au sein des lymphocytes. Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre le pourcentage de cellules non classées et le pourcentage de blastes. En effet la valeur du « %NC » est souvent inférieure au pourcentage de blastes sur le frottis. On peut l'expliquer par le classement de certains blastes au sein des lymphocytes. Enfin sur ces 17 cas où la formule est rendue avec un pourcentage de cellules non classées, 16 sont signalés avec l'alarme « Blastes ? ». Le cas sans alarme correspond à une LAL leucopénique avec 4% de blastes au DM. Pour ce cas, le M511 avait rendu 0,3% de cellules non classées. Dans la galerie d'image on remarque qu'il n'y a en effet qu'une seule cellule parmi les non classées, il s'agit en fait d'un myélocyte et non d'un blaste. Cependant en parcourant la galerie d'images de rares lymphoblastes peuvent être visualisés en particulier parmi les monocytes et

plus rarement au sein des lymphocytes. Enfin d'autres alarmes sont apparues avec ces échantillons, telle que « déviation gauche », « lymphocyte atypique ? » et plus souvent « IG ». Cette dernière correspond à une myélémie qui est bien présente à chaque fois. Cependant certains échantillons avec une myélémie ne génèrent pas d'alarme « IG ».

Ainsi les cas de leucémies aigües, bien qu'ils ne se présentent pas tous avec l'alarme « blastes ? » sont malgré tout signalés comme anormaux par différentes alarmes et/ou par l'absence de formule leucocytaire.

La plupart de ces observations concernant les leucémies aigües peuvent s'expliquer morphologiquement. Nous y reviendrons plus longuement dans les paragraphes suivants, et en particulier dans notre discussion et en différenciant les types de leucémies aigües.

I.3.2.7.2.2. Lymphomes

I.3.2.7.2.2.1. Leucémie lymphoïde chronique

Nous avons étudié 43 échantillons de LLC. Ces cas se caractérisent par une leucocytose parfois très élevée. Ainsi, en moyenne, la leucocytose s'établit autour de 53 G/L. Les valeurs se situent entre 8,4 et 216 G/L. Globalement on retrouve une très bonne corrélation entre le M511 et les 3 autres automates (Advia et Sapphire) sur les valeurs de GB. Sur 5 cas avec des valeurs supérieures à 100G/L, 4 présentent des valeurs plus élevées avec le M511. Cependant dans ces 5 situations, la différence moyenne de 17 G/L reste non significative et dans l'incertitude de mesure.

Les autres paramètres tels que l'hémoglobine ou les plaquettes présentent une excellente corrélation.

Concernant la formule leucocytaire, on remarque que sur 43 échantillons, 40 ne présentent pas de formule leucocytaire. En effet pour ces cas les leucocytes sont mis en « non classés », et le résultat s'accompagne du message système « formule leucocytaire non mesurable ». Les messages « neutropénies » et « lymphopénies » se déclenchent également. L'un des facteurs pouvant déclencher ce message est la présence d'éléments caractéristiques de LLC, appelés « ombres de Gumprecht » et correspondant à des noyaux nus issus de cellules éclatés fragiles, bien visibles sur des frottis conventionnels. On peut donc imaginer que ces images de cellules éclatées, endommagées empêchent l'identification des GB par le M511 et donc un rendu de formule (à partir de 12% de GB endommagés selon Roche®(23)); cependant dans un seul cas, l'automate signale des « cellules endommagées ». Pour les cas où les cellules sont classées, la lymphocytose rendue par le M511 est bien corrélée avec nos valeurs et affiche le message « lymphocytose » (à l'exception d'un cas où le M511 retrouve plus de monocytes). Ainsi pour ces échantillons pathologiques, le M511 signale une anomalie principalement par l'absence de formule leucocytaire.

En observant la galerie d'images, on remarque que les ombres de Gumprecht n'apparaissent pas, les éléments numérisés étant surtout des cellules intactes. Morphologiquement, on peut faire certaines remarques. Ainsi la chromatine reste mal

visible (difficile d'apprécier l'hétérochromatine) et la définition sur écran est insuffisante. En observant ces mêmes lames au microscope, les images sont de meilleure qualité mais la basophilie cytoplasmique reste difficile à apprécier. Au microscope on retrouve bien les ombres de Gumprecht avec la coloration de Romanowsky. On a complété notre étude par l'observation des mêmes échantillons colorés au MGG après impression au M511. On n'a pas constaté de variation significative dans la proportion des ombres de Gumprecht. On ne retrouve pas de différences morphologiques par rapport à un frottis conventionnel. La taille et la forme des cellules sont respectées. Les variations morphologiques sont facilement retrouvées lorsqu'elles sont présentes (irrégularités nucléaires, nucléoles, augmentation de la basophilie).

I.3.2.7.2.2.2. Autres lymphomes B

I.3.2.7.2.2.2.1. Lymphome de la zone marginale splénique (SZML)

On a pu sélectionner 5 cas de SZML. Ces échantillons présentaient une lymphocytose moyenne de 25 G/L avec des valeurs s'étendant de 5 à 44 G/L. Mais pour 3 cas le M511 ne rend pas la formule leucocytaire (affichage du message « formule leucocytaire non mesurable »). Dans les deux cas où la formule est rendue, une alarme « lymphocyte atypique » s'affiche ; et de rares cellules (0,2 et 0,1%) font alors partie des cellules non classées. Aucun de ces 5 échantillons n'est donc rendu comme un échantillon normal (soit la formule n'est pas rendue, soit l'alarme « lymphocyte atypique » s'affiche).

On remarque que les cellules lymphomateuses sont classées parmi les lymphocytes ou les monocytes selon le rapport nucléo-cytoplasmique. Lorsqu'on observe les lames colorées au Romanowsky au microscope, on remarque que les cellules lymphomateuses prennent un aspect de monocyte, avec un cytoplasme abondant et des contours irréguliers sans que les villosités soient bien nettes. Lorsqu'on regarde les lames colorées au MGG, on observe des images similaires avec des cellules sans villosités bien définies (même si les contours cytoplasmiques sont irréguliers), par contre les détails nucléaires sont plus nets (nucléoles prolymphocytoïdes visibles).

Pour ce lymphome, le M511 semble repérer que certains lymphocytes sont anormaux. En lisant la lame au microscope on distingue mieux les anomalies morphologiques bien que l'identification exacte des cellules reste difficile.

I.3.2.7.2.2.2.2. Lymphome B splénique de la pulpe rouge (SRPBL)

Un seul cas, parmi nos échantillons étudiés, présentait cette pathologie. Suite à une lecture sur frottis, le résultat rendu par le laboratoire présentait une lymphocytose circulante à 7,2G/L avec 17% de lymphocytes villeux. Avec le M511 nous obtenons 7G/L de lymphocytes. Mais aucune alarme ne s'affiche. Seul 0,1% de cellules se retrouvent non classées et il s'agit en fait d'un myélocyte sur la galerie.

En parcourant la galerie on remarque que les cellules lymphomateuses sont en fait classées dans les lymphocytes. On les devine par leur cytoplasme clair et abondant avec un contour irrégulier mais sans villosité visible. Au microscope en lisant la lame du M511 on retrouve ces cellules sans villosité nette mais on distingue mieux le noyau de petite taille avec une chromatine bien mottée. Aucune alarme morphologique n'est affichée par le M511. Seule l'hyperlymphocytose est signalée par l'automate.

En observant ensuite les lames de frottis conventionnels, les villosités caractéristiques de ces cellules lymphomateuses apparaissent plus nettement de même que leur disposition polaire et la chromatine bien mottée du noyau.

Un tel échantillon apparaît donc comme normal pour le M511 et la morphologie particulière des cellules pathologiques (avec des villosités) n'est pas restituée de façon optimale par le M511 même en relisant la lame au microscope.

I.3.2.7.2.2.3. Leucémie à tricholeucocytes

Un seul cas a pu être passé sur le M511. Le résultat rendu au clinicien comportait 12% de tricholeucocytes avec une monocytopenie à 0,02 G/L. Mais le M511 rend pour ce cas, une formule sans alarme, sans cellule non classée et avec 9% de monocytes. Si l'on regarde sur l'écran, on peut retrouver des cellules lymphoïdes anormales classées comme des monocytes. Leur cytoplasme est clair et abondant sans villosité visible. Les détails de la chromatine ne sont pas nets. En colorant au MGG une lame imprimée par le M511, on retrouve l'aspect abondant et clair du cytoplasme mais sans villosité. Avec le MGG, l'aspect non motté et parfois nucléolé de la chromatine apparaît bien. Par contre sur le frottis conventionnel, les fines villosités caractéristiques apparaissent nettement sur ces cellules.

Comme pour le cas précédent, le M511 rend un résultat normal et faux occultant la présence de tricholeucocytes et de monocytopenie. Aucune alarme ne signale une quelconque anomalie. Seule une lecture attentive de la galerie et de la catégorie des monocytes permet de suspecter une anomalie.

I.3.2.7.2.2.4. Leucémie prollymphocytaire B

On retrouve, pour le seul cas étudié, une lymphocytose à 15G/L composée de 80% de prollymphocytes. Après passage du tube sur le M511, ce dernier ne rend pas de formule et affiche comme message, « formule leucocytaire non mesurable ». Aucune des cellules repérées par le M511 n'est donc classée. Parmi toutes ces cellules, on retrouve des cellules lymphoïdes de taille augmentée mais sans nucléole bien visible à l'écran. Par contre, au microscope, avec les lames imprimées par le M511 et colorées au MGG, on observe bien des cellules monomorphes, de taille augmentée avec une basophilie accrue et un gros nucléole central.

Le passage sur le M511 met donc en évidence une anomalie concernant les cellules lymphoïdes mais l'identification précise de ces prollymphocytes nécessite une coloration au MGG.

I.3.2.7.2.2.5. Lymphome lymphoplasmocytaire (Maladie de Waldenström)

Un seul cas a pu être étudié. Dans cette situation où l'on a une lymphocytose à 9,3 G/L, le M511 ne rend pas de formule. Sur la galerie d'image, on retrouve des cellules lympho-plasmocytaires notamment grâce à la disposition polaire du noyau.

I.3.2.7.2.2.6. Lymphome à cellule du manteau

Un cas a pu être passé. On retrouvait une lymphocytose à 4,6 G/L avec 36% de cellules du manteau circulantes. Sur le M511, les lymphocytes sont estimés à 5,3G/L sans alarme associée et l'automate rend 0,2% de cellules non classées (correspondant à un grand lymphocyte sur la galerie). En regardant la galerie d'images sur l'écran, il n'est pas possible, du fait d'une définition insuffisante, d'évoquer l'hypothèse d'un lymphome à cellules du manteau, même si l'on note quelques éléments avec un noyau de contours irréguliers.

La présence de 0,2% de cellules non classées (et correspondant en fait à des cellules lymphomateuses) nous alerte. Mais ce pourcentage ne correspond pas au pourcentage de cellules lymphomateuses. La reconnaissance des cellules ne peut se faire à partir de la simple lecture de la galerie affichée sur l'écran de l'iMac ; elle nécessite la lecture des lames après impression par le M511 et coloration au MGG.

I.3.2.7.2.2.7. Lymphome B de bas grade inclassable

Deux échantillons avec une lymphocytose élevée (17 et 21G/L) ont été sélectionnés. Pour les deux cas, le M511 n'a pas rendu de formule leucocytaire, probablement du fait de la morphologie particulière des lymphocytes (noyau de contour irrégulier avec parfois des incisures mieux visibles quand on regarde la lame sous microscope).

I.3.2.7.2.2.8. Leucémie à plasmocytes malins

Nous avons trouvé aussi un cas de leucémie avec des plasmocytes malins. Dans cet échantillon, la leucocytose est à 93 G/L et se compose de 90% de plasmocytes. Le M511 ne rend pas de formule pour cet échantillon.

Un autre échantillon correspondant à un myélome avec 11% de plasmocytes circulants dystrophiques et une myélémie à 4% a été passé. Le M511 rend une formule sur cet échantillon, sans alarme associée, sans pourcentage de cellules non classée (bien que quelques cellules non classées apparaissent sur la galerie). En analysant les images des cellules, on constate que les plasmocytes sont classés parmi les cellules non-classées, les lymphocytes et les monocytes. On peut les reconnaître par leur noyau excentré et leur développement polaire du cytoplasme.

Cependant les détails chromatinien ne sont pas assez nets pour préjuger de caractère malin de ces plasmocytes.

On constate donc, en particulier pour ce dernier échantillon, l'importance que l'opérateur doit accorder à la galerie d'image, puisqu'elle est la seule dans ce cas à montrer une anomalie (c'est-à-dire la présence de cellules non classées).

I.3.2.7.2.2.9. Lymphome de Burkitt

Un seul cas avec cette pathologie a été analysé. On trouve 3% de cellules tumorales circulantes et une myélémie à 2%. La formule est rendue par le M511 avec un message d'alarme indiquant « déviation à gauche » témoignant de la myélémie. Le M511 ne donne par contre aucun pourcentage de cellules non classées. En parcourant la galerie, on retrouve les rares cellules malignes avec leur taille augmentée principalement dans la catégorie des lymphocytes. Mais leurs nucléoles et leurs vacuoles étaient difficiles à discerner sur l'écran de l'iMac.

I.3.2.7.2.2.3. Lymphomes T

Un cas a pu être étudié. Il s'agit d'une rechute de leucémie prolymphocytaire T après allogreffe. Il présente une lymphopénie et des prolymphocytes T circulants. Deux échantillons ont été analysés, l'un avec 12% de prolymphocytes T sur 3,5 G/L de GB et l'autre avec 37% de prolymphocytes T parmi 5,6 G/L de GB. On retrouve la lymphopénie, bien corrélée aux valeurs du laboratoire. Dans les deux cas l'alarme « blastes ? » apparaît avec des prolymphocytes classés parmi les lymphocytes. Là aussi, en observant les images sur la galerie, il reste difficile d'apprécier les caractères morphologiques de ces cellules, du fait de la mauvaise visibilité de la chromatine et du manque de définition, liée à numérisation. On note également que la forte basophilie est respectée mais gêne pour visualiser les irrégularités des contours nucléaires.

En regardant les lames imprimées et colorées par le M511, on retrouve des caractères atypiques sur certains éléments (grands noyaux, basophilie augmentée) mais la chromatine reste mal définie (aspect de fausse hétérochromatinisation) et les nucléoles peu visibles pour évoquer des prolymphocytes T.

I.4. Problèmes techniques rencontrés au cours de l'évaluation

Les incidents techniques ont été très rares. La fiabilité de l'automate était très satisfaisante et le support technique a été très efficace et disponible. Cette grande fiabilité provient du mode de fonctionnement du M511, qui ne requiert pas de circuit fluide ou pneumatique ou de bloc laser à régler, ce qui diminue le risque d'incident technique.

Néanmoins deux incidents ont été rencontrés, ne posant pas de problèmes majeurs pour notre étude. L'un s'est manifesté par l'affiche d'un message d'erreur : « temperature out of range ». L'automate ne pouvait alors analyser aucun tube. Il a donc été nécessaire d'arrêter l'automate quelques jours et de faire venir un technicien. Ce dernier a décelé une rupture (sans doute secondaire à une fissure préexistante) d'un tuyau contenant un liquide de refroidissement. Le liquide ne s'écoulant plus, le refroidissement de l'automate n'était plus optimal.

Le deuxième incident était lié à un lot de lames défectueux (le 593762). Ces lames étaient rejetées par l'automate et aucune impression n'était alors réalisée. Un message d'erreur s'affichait : « la lame n'est pas orientée correctement ». Un défaut d'arrondissement des angles des lames de ce lot est donc suspecté.

I.5. Discussion

I.5.1. Particularités techniques du M511

I.5.1.1. Généralités et temps de réalisation des analyses

Le M511 est un automate particulier car il regroupe en une seule unité des modules d'impression, de coloration, de microscopie et d'analyse. Pour un échantillon, il faut donc 6 minutes entre le prélèvement de sang par l'automate et le rendu de résultat. C'est plus long que le temps de rendu de résultats de numération par le Sapphire ou l'Advia. Il en découle une cadence plus faible du M511, estimée à près de 55 échantillons par heure, par rapport à l'Advia ou le Sapphire. Ainsi par comparaison, la cadence du Sapphire est de 105 NFS par heure, pour l'Advia de 120 échantillons par heure(24) et pour le Sysmex XN (nouvel automate actuellement dans le service) 100 échantillons par heure et par module. L'ensemble des étapes par lesquelles passe l'échantillon de sang pour être analysé permet d'expliquer ce délai supérieur ; en effet ni l'Advia, ni le Sapphire ne sont capables de réaliser des frottis et de les colorer. La cadence du M511 est donc réduite par rapport aux autres automates de cytologie, d'autant que le M511 a besoin d'une minute après le début d'analyse d'un échantillon pour commencer l'analyse d'un autre échantillon.

D'autres automates, comme le Sysmex XN sont dotés d'un étaleur-colorateur pour réaliser des frottis. La durée de réalisation des frottis par ces automates avoisine les 15 minutes (pour le Sysmex). Il s'agit donc d'un délai plus long que le M511 (6 minutes).

Mais ces automates présentent cependant un avantage par rapport au M511. En effet, sur ces automates le rendu de résultat est dissocié de la réalisation de frottis ; ainsi les résultats sont rendus (sauf la formule leucocytaire et les plaquettes dans certains cas) en moins de 6 minutes (environ 2 minutes pour le Sysmex XN), contrairement au M511. Pour les cas pouvant présenter des cellules atypiques, la formule leucocytaire n'est pas rendue jusqu'à l'analyse au microscope. Or dans ces cas de cellules atypiques, comme nous allons le voir, le M511 peut nécessiter une relecture par un biologiste au microscope (la galerie d'images ne suffisant pas pour classer et reconnaître certaines cellules) ou la réalisation de lames supplémentaires colorées au MGG voire la réalisation de frottis manuels (quand la qualité de coloration et/ou d'impression des lames du M511 n'est pas suffisante). Ainsi, dans ces cas avec des cellules atypiques (d'origines pathologiques ou réactionnelles), les avantages que pourraient présenter le M511 (rapidité d'obtention de lames colorées et d'images numérisées et rendu de l'ensemble des résultats d'analyse dont la formule leucocytaire) se retrouvent réduits à cause d'une qualité d'images numériques et de coloration insuffisante.

I.5.1.2. La coloration

Actuellement il n'existe aucun automate de cytologie capable de reconnaître, sans erreur, à partir d'images numériques sur lames n'importe quelle cellule sanguine. En effet les cellules pathologiques peuvent prendre des formes variées et impliquent de prendre en compte d'autres paramètres (notamment les autres résultats biologiques, le contexte clinique, les antécédents, le traitement...) pour pouvoir les identifier avec certitude. En attendant une évolution des logiciels de reconnaissance d'images, et une amélioration de la qualité de ces images (notamment à partir de la coloration) ; les automates tel que le M511 doivent pouvoir signaler la présence de ces cellules anormales. Ces situations doivent amener à la relecture par l'œil du biologiste, soit à partir d'images numériques soit à partir de lames de sang colorées. Il est donc nécessaire que ces signalements se fassent de manière justifiée.

Le M511 est conçu pour qu'on puisse classer toutes les cellules repérées sur la lame par l'objectif et affichées sur l'écran. Il est d'ailleurs possible de rajouter certaines catégories rares de cellules non présentes sur des frottis d'individus sains. Toutefois nous rappelons que le M511 est capable de classer les GB dans 6 catégories seulement (PNN, PNE, PNB, L, M et parfois NC), ce qui signifie que seul l'opérateur peut reclasser certains GB dans les catégories qu'il aurait lui-même créées (comme par exemple les myélocytes, les plasmocytes, et d'autres). Cependant il arrive que les cellules soient difficiles à classer, même pour l'opérateur, pour plusieurs raisons. En effet parfois l'image de la cellule n'est pas nette (défaut de focalisation). Dans d'autres cas il est difficile d'apprécier l'état de condensation de la chromatine ; élément important pour estimer le degré de maturité de la cellule. Le contenu cytoplasmique est également difficile à distinguer (grains et mitochondries). Ces problèmes peuvent être en partie résolus en observant ces lames sur un microscope manuel avec un objectif à fort grossissement avec de l'huile à immersion.

Ce qui suggère une qualité d'image diminuée lors de la numérisation. La numérisation des lames de sang est un atout indéniable pour toutes les possibilités qu'elle apporte (stockage, comparaisons rétrospectives d'images, échanges d'images, enseignement), mais n'est pas un atout exclusif du M511, car d'autres appareils le permettent, avec parfois un rendu d'images plus net (notamment les DM de Cellavision® comme nous le précisons dans les paragraphes suivants). De plus elle n'exclut pas la relecture des lames au microscope pour certains échantillons pathologiques.

Par ailleurs, dans certains cas, le classement de certaines cellules reste impossible malgré l'observation au microscope. La cause de cette difficulté est la coloration utilisée par le M511. Bien qu'elle soit rapide (moins de 2 minutes), elle n'apporte pas autant d'informations qu'une coloration de MGG, en particulier concernant les noyaux et la chromatine. Dans ces situations, on peut demander à l'automate de réaliser une nouvelle impression de lame sans coloration (le M511 ne rend donc pas de résultat à partir de cette lame), puis lancer notre propre coloration de MGG sur cette lame. Les lames obtenues étaient alors satisfaisantes, la coloration révélant tous les détails morphologiques des cellules nécessaires à leur classification. Les situations où cette opération est nécessaire concernent les échantillons présentant des cellules immatures et/ou pathologiques. Il s'agit donc de cas présentant des blastes, une myélémie, des lymphocytes activés, des lymphocytes hyperbasophiles, des cellules lymphomateuses ou d'autres cellules anormales.

En effet la coloration de MGG est considérée comme la coloration de référence en hématologie(25). Elle a été mise au point à partir de la coloration de Romanowsky développée initialement à la fin du XIXème siècle. La coloration de MGG se compose de deux mélanges : le mélange May-Grunwald et le mélange Giemsa. Le mélange May-Grunwald est constitué d'éosine et de bleu de méthylène non oxydé qui en solution aqueuse produisent des dérivés azurés colorants. Le mélange Giemsa est constitué de bleu de méthylène, d'éosinate d'azur et de violet de méthylène(25). En comparaison la coloration de Romanowsky est constituée plus simplement d'azur B et d'éosine en solution aqueuse(25). Cette coloration de MGG nécessite un temps de coloration variable ; le souvent d'une quinzaine de minutes et parfois de plusieurs dizaines de minutes. Le M511 repose sur une coloration de Romanowsky modifiée probablement plus simple et plus rapide dans sa réalisation qu'une coloration de MGG mais de moins bonne qualité pour une observation cytologique du sang.

I.5.1.3. L'impression sur lame

Une des particularités remarquables du M511 est sa capacité « d'impression » sur lame. Comme nous l'avons décrit précédemment, il s'agit plus d'une impression cellule par cellule sur lame formant une couche monocellulaire que d'un étalement sur lame. Les contraintes mécaniques exercées sur les cellules ne sont donc pas comparables. Les cellules qu'on observe habituellement sur un frottis ont été poussées voire étirées sur la lame lors de l'exécution, manuelle ou automatisée, du frottis. Ainsi la répartition des cellules sur la lame et leur morphologie n'est pas la même pour une même catégorie de cellules. On va le détailler dans les prochains paragraphes, cette différence de réalisation des lames peut induire des différences

quantitatives dans les formules (lié à la répartition différente des cellules et aux différentes zones de lecture), et qualitative dans la morphologie des cellules.

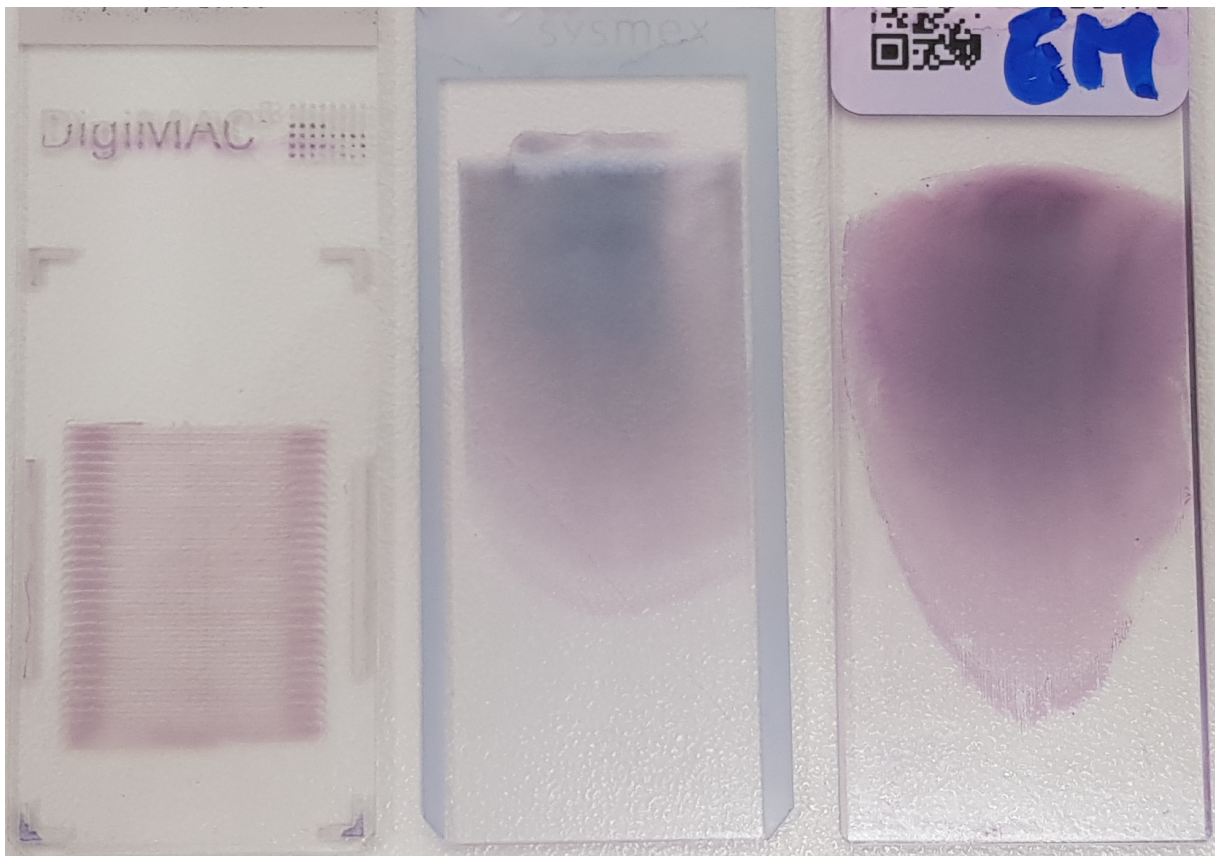


Figure 19: 3 lames de sang ; à gauche une lame DigiMAC slide de Roche®, au centre une lame issue de l'étaleur-colorateur Sysmex, à droite un frottis classique

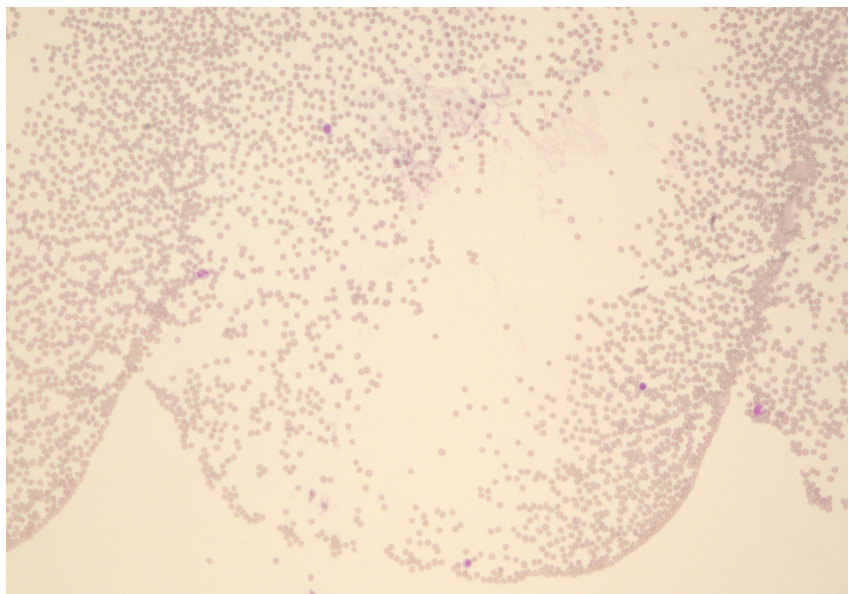


Figure 20: Aspect de l'impression sur les bords au faible grossissement

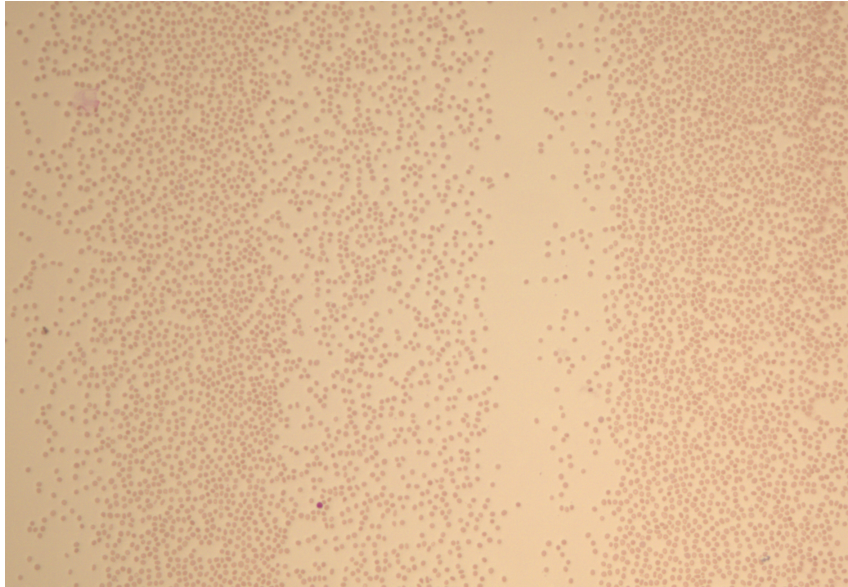


Figure 21: Aspect de l'impression sur les zones de lectures au faible grossissement

On a observé une différence dans le compte des monocytes, dans les cas présentant des lymphocytes hyperbasophiles alors que dans l'ensemble la corrélation était bonne avec les automates en flux. En effet, le M511 rend un pourcentage de monocytes supérieur au compte obtenu au microscope à partir de frottis. Une des hypothèses pour expliquer ces différences pourrait être un classement des lymphocytes hyperbasophiles parmi les monocytes ; or la galerie d'images ne montre pas de lymphocytes hyperbasophiles dans la catégorie des monocytes. L'autre hypothèse serait plutôt une sous-estimation du nombre de monocytes lors du comptage des frottis au microscope. Cette dernière hypothèse s'expliquerait par l'artéfact d'étalement répartissant préférentiellement les monocytes au niveau des bords et de la partie terminale du frottis. Cette dernière hypothèse se confirme par le compte des monocytes sur les lames imprimées par le M511 ; ce compte apparaissant concordant avec le pourcentage de monocytes livré par le M511.

D'un point de vue morphologique, il y a certains aspects qui restent inchangés comme la taille des cellules et le rapport nucléocytoplasmique (en particulier pour des cellules comme les lymphocytes hyperbasophiles). Les cellules en apoptose sont également représentées sur les lames imprimées. Par contre des différences morphologiques s'observent ; parfois liées à la coloration du M511, parfois liées au mode d'impression.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le M511, doit être capable de repérer un échantillon comme anormal, même s'il n'est pas capable d'identifier exactement l'anomalie. On ne doit pas avoir un trop grand nombre de signalements, en particulier sur des cas non pathologiques (qui ferait perdre l'intérêt d'une automatisation). Et il ne faut pas la situation inverse où les signalements n'ont pas lieu ; ce qui risquerait un rendu erroné de résultats et empêcherait le diagnostic dans ces cas. D'une manière générale, le M511 respecte cette règle et signale de différente manière un échantillon anormal. Nous l'avons bien remarqué pour les syndromes mononucléosiques, les leucémies aigües, les LLC, et la majorité des lymphomes. De plus il n'affiche pas d'alarme pour des échantillons non

pathologiques mais pouvant prêter à confusion comme les lymphocytoses de nouveau-nés. Cependant on note que certains échantillons anormaux ne sont pas repérés comme tels par le M511 et peuvent trahir la vigilance de l'opérateur. En effet, on pourrait penser que l'affichage de la galerie d'images permet à l'opérateur de retrouver dans tous les cas les cellules pathologiques mal classées, quand bien même le M511 n'affiche pas d'alarme. Or on constate que pour certaines situations ce n'est pas possible car c'est la morphologie elle-même des cellules pathologiques qui n'est pas restituée par le M511. Il s'agit en particulier des cellules dotées de villosités cytoplasmiques (normalement visibles en cas de lymphomes spléniques ou de leucémie à tricholeucocytes). Ces cellules ne présentent pas de villosités cytoplasmiques sur les impressions réalisées par le M511 (quelle que soit la coloration, Romanowsky ou MGG). Ces cellules se retrouvent alors classées par le M511 principalement parmi les monocytes. Cette différence morphologique semble provenir du mode d'impression des lames du M511 et non de la coloration. Le risque pour ces cas (lymphomes spléniques, leucémie à tricholeucocytes) est donc de ne pas les détecter avec le M511.

I.5.2. Validation de méthode et comparaison de méthode

En reprenant les résultats de validation de méthodes, comportant donc la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la justesse, l'exactitude, l'incertitude de mesure ; nous avons cherché à évaluer les performances d'analyse du M511. Nous l'avons également comparé à l'Advia et au Sapphire à la fois d'un point de vue quantitatif (par rapport aux résultats numériques rendus) mais aussi qualitatif (par rapport aux images des cellules sur les lames réalisées par le M511). Les échantillons utilisés pour la comparaison proviennent de patients présentant souvent des hémopathies, des cytopénies ou des processus réactionnels ce qui nous a permis de préciser les situations pouvant être source d'erreurs pour le M511. A partir des résultats obtenus nous tentons dans les prochains paragraphes d'apporter des explications aux différences observées. Dans un premier temps nous étudions plutôt l'aspect quantitatif de cette comparaison, et dans un second temps nous nous attardons sur les différences morphologiques observées sur les GB.

I.5.2.1. Analyse quantitative

Sur certaines analyses et certains niveaux, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire se retrouve plus bas que le coefficient de variation de répétabilité, ce qui se voit rarement en théorie puisque les conditions d'analyse pour la répétabilité sont censées ne pas différer et se réalisent le même jour à la même heure. Plusieurs éléments permettent d'expliquer cette particularité paradoxale dans notre étude. Premièrement, même s'il arrive que les coefficients de variation de fidélité intermédiaire soient inférieurs dans certains cas à ceux de répétabilité, les écarts entre eux restent faibles. Nous avons utilisé dans les deux cas les mêmes contrôles pour réaliser les analyses, alors que nous aurions pu utiliser des échantillons de vrais patients pour la répétabilité. Le fait d'utiliser donc les mêmes échantillons est un élément de variation en moins. En outre les contrôles que nous utilisions étaient conservés entre 0°C et 4°C. Ils devaient être passés sur le M511 après avoir été réchauffés quelques minutes à température ambiante et homogénéisés convenablement. Pour la reproductibilité les échantillons de contrôle

étaient sortis de la chambre froide à différents moments de la journée par différents opérateurs, analysés dans les minutes suivantes puis replacés dans la chambre froide. Pour la répétabilité les analyses devant s'effectuer le jour même, les contrôles restaient plus longtemps à température ambiante et finissaient par être à des températures trop élevée, altérant leurs résultats au fil des analyses. Cet élément, reposant sur la température des échantillons de contrôles a donc sûrement impacté la répétabilité en induisant une plus forte variation que pour la reproductibilité. De ce fait nous avons calculé la répétabilité à partir de seulement 15 passages contre les 30 recommandés ; pour que les échantillons de contrôles, sensibles à la température, ne soient pas à des températures trop hautes par rapport à leur température optimale d'utilisation. A l'inverse nous avons pu calculer la reproductibilité à partir de 30 passages ; ce qui est un élément supplémentaire favorisant une variabilité moindre pour la reproductibilité par rapport à la répétabilité.

Nous allons décrire plus précisément pour chaque paramètre, les anomalies observées.

Les résultats pour les globules blancs sont satisfaisants et en-dessous des seuils prédéfinis sauf pour l'exactitude. L'exactitude repose sur 2 EEQ et apparaît moins satisfaisante, avec une surestimation du nombre de leucocytes. L'incertitude de mesure est comparable à celle observée pour le Sapphire et l'Advia.

Pour la numération des globules rouges, les résultats sont tous dans les limites d'acceptabilités à l'exception des résultats de répétabilité dépassant légèrement les seuils préconisés par Ricos, mais sans signification clinique.

Pour les GB et les GR, les équations des droites de régression permettant de comparer sur toute l'étendue de mesure les valeurs obtenues sur le M511 avec celles obtenues sur les trois autres automates (Advia et Sapphire) à partir des mêmes échantillons montrent des résultats strictement normaux. Les valeurs obtenues avec le M511 sont superposables à celles observées avec les autres automates. En présence de schizocytes, nous n'avons pas observé de différence notamment dans la numération des GR. On constate en effet que les schizocytes sont bien identifiés comme des GR.

Concernant l'étude morphologique des GR, nous nous sommes concentrés sur l'analyse des schizocytes. Leur reconnaissance étant essentielle pour poser rapidement certains diagnostics (notamment des purpuras thrombotiques thrombocytopéniques dont le traitement est une urgence). Il nous semble que dans le cas de la recherche de schizocytes, l'emploi du M511 seul est insuffisant. Même si la présence de GR de forme suspecte peut être détectée sur la galerie d'image, le recours à une lecture au microscope reste indispensable. Toutefois dans l'ensemble le M511 se révèle supérieur à tous les autres automates dans l'aide au dépistage des schizocytes, DM compris.

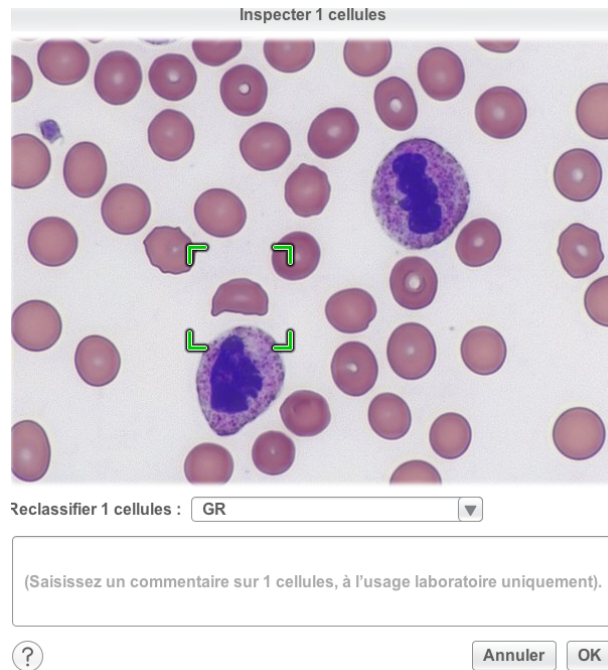


Figure 22: Aspect d'un schizocyte sur l'écran du Mac relié au Cobas après impression et coloration par le M511

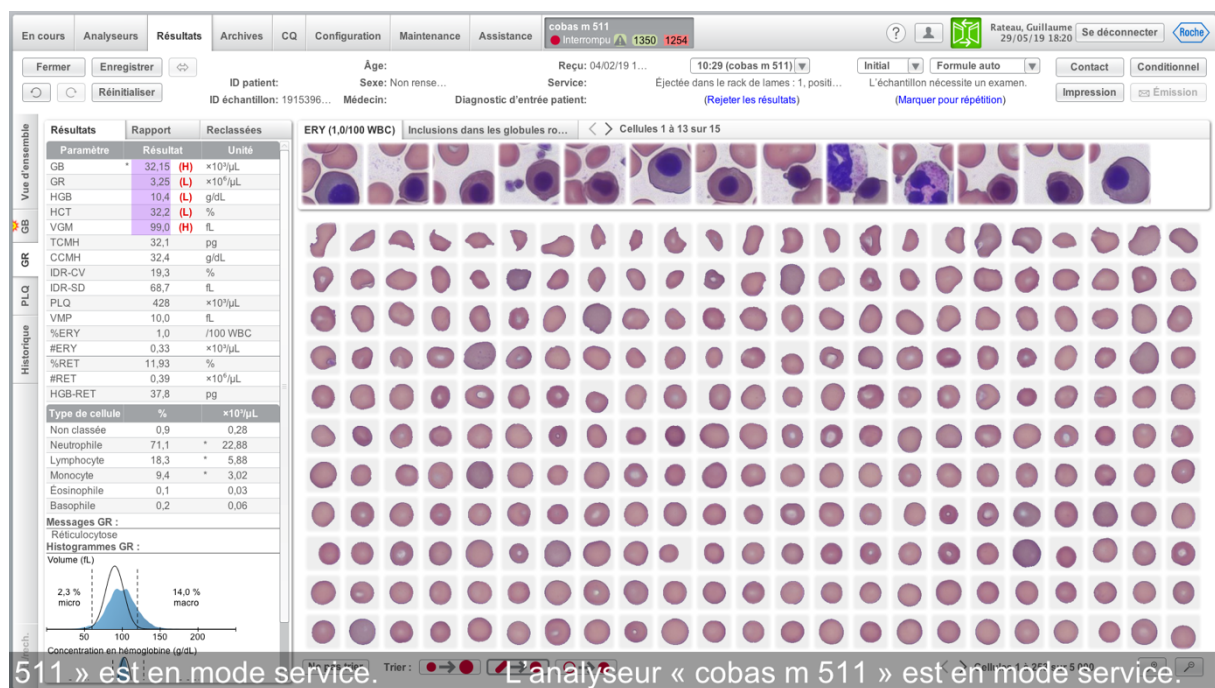


Figure 23: outil de classement par forme des GR sur l'iMac, mettant facilement en évidence la présence de schizocytes

Par ailleurs il n'a pas été constaté de différence significative au microscope entre une lecture sur un frottis standard et une lame imprimée et colorée par le M511 pour la reconnaissance et le compte des schizocytes.

Les résultats concernant l'hémoglobine sont conformes aux attentes, même si les résultats de répétabilité vont au-delà des limites requises. Les valeurs données par le fournisseur lui-même restent au-dessus de la limite de Ricos. Ici aussi ces discrets écarts sont sans conséquence clinique. On remarque d'ailleurs que la cible des deux EEQ est parfaitement atteinte. Les équations de comparaison montrent une différence systématique allant dans le même sens avec les deux Advia et le Sapphire et diminuant légèrement les valeurs du M511 par rapport à ces trois automates.

Dans l'ensemble les résultats du VGM sont satisfaisants mais on remarque que les CV de répétabilité et de reproductibilité dépassent les limites avec des écarts plus importants pour la fidélité intermédiaire. De plus les valeurs d'EEQ ne sont pas celles attendues ; les deux résultats fournis par le M511 étant inférieurs de plus de 4fL aux valeurs cibles. Les comparaisons aux Advia et Sapphire semblent confirmer cette légère tendance à la sous-estimation. Il faut souligner (et ceci est vrai pour tous les paramètres) que les moyennes des groupes de pairs pour les EEQ sont établies par et pour des automates en flux, aucun participant aux enquêtes, par définition, n'ayant répondu avec des valeurs de M511. Concernant le VGM, les équations de comparaison montrent une différence systématique allant dans le même sens avec les deux Advia et le Sapphire. Ces résultats suggèrent une légère sous-estimation du VGM par le M511.

Globalement les résultats obtenus concernant la CCMH sont les moins satisfaisants. On constate que les mesures de répétabilité, reproductibilité, justesse, exactitude n'atteignent pas les objectifs de Ricos. On a l'impression que l'étendue de mesure sur le M511 est plutôt resserrée en particulier sur les valeurs basses. Les échantillons avec des CCMH basses n'apparaissent pas avec des CCMH basses sur le M511. Par ailleurs les contrôles internes fournis par Roche® présentent des niveaux plutôt hauts. Le contrôle avec la valeur la plus basse présente une valeur cible proche de 35 g/dL(17). Les EEQ utilisés avaient des valeurs cibles autour de 31 et 32 g/dL ; or le M511 n'a pas rendu de valeur en dessous de 33g/dL. Au final la comparaison de méthode confirme bien notre hypothèse, avec pour chaque automate une équation de droite de régression similaire et insatisfaisante. En effet le coefficient des droites est autour de 0,5 et l'ordonnée à l'origine est située entre 15 et 18 ; ce qui signifie une mauvaise corrélation avec des résultats obtenus sur le M511 non équivalents aux résultats des trois autres automates. Les valeurs de CCMH obtenues avec le M511 ne sont pas concordantes avec les valeurs du Sapphire ou de l'Advia. De plus nos résultats sont cohérents avec l'étude menée par la FDA qui comparait le M511 au Sysmex XN-10, là aussi la droite de régression présentait un coefficient de 0,52 et l'ordonnée à l'origine était à 15,7(16). Les discordances se voient sous forme de sous-estimation par le M511 pour les valeurs hautes de CCMH et par surestimation sur les valeurs basses, ce qui finit par équilibrer la moyenne des différences et le pourcentage d'erreurs. En conclusion, le M511 masque les hyperchromies et hypochromies. Cela peut donc entraîner une difficulté à détecter des thalassémies, habituellement révélées par des anémies hypochromes. Cependant sur les automates tels que le Sapphire ou l'Advia, les valeurs basses ou hautes de CCMH permettent, comme nous l'avons vu de déceler des interférences qui n'existent plus dans le M511 du fait de son fonctionnement. Ainsi on peut donc s'interroger sur le fait que l'absence ou le faible nombre de valeurs plus extrêmes de CCMH sur le M511 soit finalement lié à une absence de certaines interférences sur le M511 (telles que l'hémolyse, l'hyperglycémie, l'hyperlipémie). On peut également

considérer que l'importance accordée à la CCMH est donc moindre sur le M511 du fait de l'absence d'interférence habituelle. De plus il est intéressant de noter que pour les trois paramètres composant la CCMH : l'hémoglobine, le VGM, le nombre de GR ; on n'observe pas autant de discordances sur le M511.

Pour les plaquettes, concernant la fidélité et la justesse, mesurées à partir de l'analyse de contrôles internes, les performances sont excellentes. Seules les mesures des deux EEQ sont en dehors des cibles avec des biais de plus de 8 et 15%. Comme nous l'avons précisé dans la partie résultat, nous avons constaté parfois des discordances sur certains échantillons entre le chiffre de plaquettes du M511 et celui des autres automates. Ainsi certains échantillons avec une thrombopénie apparaissaient avec une numération plaquettaire normale sur M511. Ce-derniers affichait par contre souvent la présence d'amas plaquettaires. Ces amas plaquettaires étaient en fait absents sur les lames. Les images d'amas plaquettaires affichées par le M511 étaient inexactes. Il s'agissait d'artefacts, de tâches de colorants, de cellules lysées ou de lymphocytes à haut rapport nucléocytoplasmique.

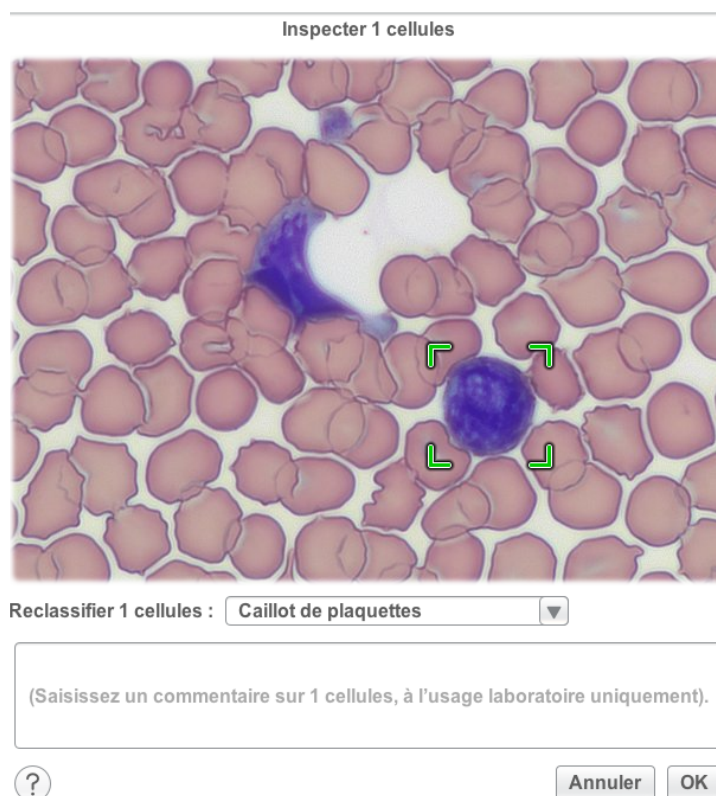


Figure 24: Exemple de cellule identifiée comme un amas plaquettaire par le M511

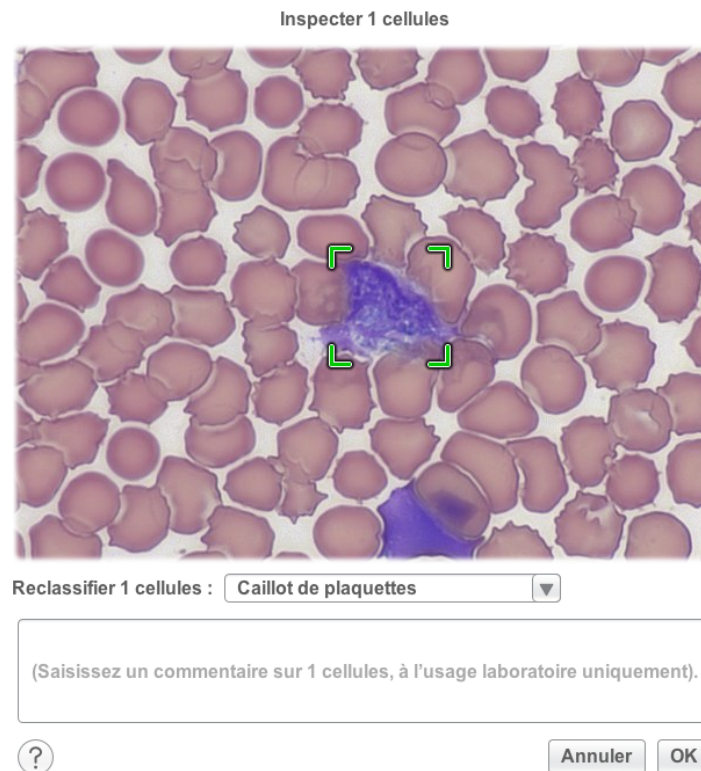


Figure 25: Exemple de cellule lysée identifiée comme un amas plaquettaire par le M511

On peut supposer que dans la numération de plaquettes rendue par le M511 le compte est fait à partir des plaquettes isolées sur les lames imprimées et des plaquettes supposées présentes dans les artefacts reconnus comme des amas par le M511. Ce compte surestime alors la numération plaquettaire. Il s'agit d'une hypothèse pour expliquer ces différences. Si cette hypothèse se vérifie, cela nécessiterait d'être vigilant sur des résultats rendus avec l'alarme « caillot plq » (pour signifier la présence de plaquettes en amas) ou « plq anormal » (pour une anomalie concernant les plaquettes), en particulier si les images d'amas plaquettaires photographiés par le M511 ne sont que des artefacts. Dans d'autres situations le phénomène inverse a été observé. Certains échantillons avec une numération normale apparaissaient abaissés sur les résultats du M511. Pour ces cas, le délai de repasse sur le M511 était souvent de plusieurs heures ce qui a pu induire une baisse de la numération plaquettaire sans sous-estimation donc par le M511.

Pour le compte des érythroblastes, nous obtenons, pour le niveau bas, des coefficients de variation élevés. En effet le niveau bas est particulièrement bas, il représente la quasi-absence d'érythroblastes ; dans ces conditions un coefficient de variation élevé n'est pas surprenant et sans signification clinique. Par contre on remarque que la corrélation avec les mêmes échantillons passés préalablement sur un de nos trois automates est assez faible avec un coefficient de corrélation ne dépassant pas 0,5. Il semble que le M511 sous-estime le nombre d'érythroblastes par rapport aux résultats que l'on rend. Il faut rappeler que dans le cas des érythroblastes, nous ne rendons pas forcément la valeur de l'automate (Advia, Sapphire) en particulier si la proportion d'érythroblastes est importante ; dans ces situations on fait un comptage manuel au microscope. Pour rechercher l'origine de cette différence nous avons recompté au microscope les lames du M511. Nos comptes d'érythroblastes restaient un peu inférieurs à ceux comptés en routine mais

nettement supérieurs aux valeurs initiales du M511. De plus on constate que le compte de GB est lui, à l'inverse toujours plus élevé sur le M511 que les valeurs du laboratoire (déduite après lecture du frottis). Par contre on remarque une très bonne corrélation entre les valeurs « GB+érythroblastes » du laboratoire et du M511. On peut donc dire que le « nombre d'évènements nucléés » (GB+érythroblastes) est similaire pour les prélèvements passés en routine puis analysés sur le M511. Par contre leur répartition est différente entre GB et érythroblastes, avec un compte plus bas d'érythroblastes pour le M511. Ces discordances sont néanmoins à nuancer pour plusieurs raisons. En effet ces prélèvements correspondent souvent à de très faibles volumes de sang (provenant souvent de nouveaux-nés) ; d'autant plus que ces échantillons sont passés en premier sur nos automates de routine. Ce qui signifie que le volume de sang du prélèvement disponible pour le M511 est toujours plus faible et parfois très minime. Pour expliquer les différences observées, on peut proposer plusieurs hypothèses : la répartition différente des érythroblastes entre les lames imprimées et les frottis classiques (les comptes au microscope des lames imprimées restant inférieurs aux comptes sur frottis MGG) ; et une cause plus liée à l'algorithme de reconnaissance du M511. Il a d'ailleurs été constaté de rares erreurs de classement des érythroblastes parmi les lymphocytes.

De manière générale les résultats sont bons pour les différentes analyses qu'il s'agisse de répétabilité, reproductibilité, justesse, exactitude ou incertitude de mesure.

Certains résultats dépassent parfois les limites que nous avons définies à partir des recommandations écrites par Ricos. Toutefois les valeurs obtenues restent proches des valeurs limites et n'ont pas d'incidence pour la clinique. Nous pouvons donc nous interroger sur le degré d'exigence imposé par les limites de Ricos. Nous ne disposons pas pour les analyses de NFS d'objectifs autres que ceux fixés par Ricos et les avons donc choisis par défaut. D'autres fournisseurs d'automates, en plus d'évaluer les performances de leurs machines comme l'a réalisé Roche® (mais en dehors de conditions de laboratoires comme les nôtres) définissent des objectifs de répétabilité, reproductibilité, justesse, exactitude, parfois moins exigeants que Ricos mais tout aussi pertinents et parfois plus adaptés pour leurs automates.

Certains résultats d'EEQ ne sont pas satisfaisants, notamment pour les GB, le VGM, et les plaquettes. Cependant il faut garder à l'esprit que ces EEQ sont constituées pour des analyses sur des automates en flux classiques. Les valeurs cibles ne sont donc peut-être pas représentatives pour le M511.

I.5.2.2. Comparaison morphologique des GB

Le fonctionnement du M511 avec sa lecture automatisée des lames et l'affichage des images sur écran devrait permettre en théorie de se passer d'une lecture au microscope par opérateur. Nous avons vu que dans certains cas, il était impossible pour l'automate de rendre une formule (présentant souvent un nombre excessif de cellules non classées), de classer certaines cellules. Cet automate ne remplace donc pas totalement l'observation au microscope. Les lames qu'il fournit devraient dans certains cas être relues au microscope permettant ainsi d'identifier des cellules non classées sur le M511. Il est difficile d'estimer le pourcentage d'échantillons nécessitant une relecture au microscope après analyse sur le M511. En effet, nous nous sommes concentrés sur l'analyse d'échantillons pathologiques

sélectionnés. Pour répondre avec plus de précisions à cette interrogation nous aurions dû faire une analyse de l'ensemble des échantillons de routine arrivant au laboratoire. Cependant notre étude sur quelques échantillons suggère que le pourcentage d'échantillons nécessitant une relecture au microscope est probablement moindre avec le M511 qu'avec l'Advia ou le Sapphire (qui s'établit autour de 15%). En effet pour plusieurs échantillons nécessitant une relecture après analyse sur Advia ou Sapphire, les résultats et les images du M511 suffiront à apporter une réponse en particulier pour les échantillons avec des amas plaquettaires, ou présentant des leucopénies sans cellule atypique. Les échantillons qui nécessiteraient une relecture au microscope sont signalés par différents types d'alarmes. Cependant, nous avons constaté que des échantillons présentant la même anomalie, n'étaient pas forcément signalés par la même alarme. Il n'y a pas notamment d'alarme spécifique à une situation pathologique. Ainsi, à titre d'exemple, l'alarme « blaste ? » ne s'affiche pas systématiquement en cas de blastes circulants et peut s'afficher en cas de prolymphocytes. L'alarme la plus fréquente quels que soient les échantillons signalés était l'absence de formule leucocytaire. Les autres alarmes (blastés, lymphocytes atypiques, NC) apparaissent bien moins souvent.

Pour les échantillons nécessitant une relecture au microscope, nous avons constaté régulièrement que la lame imprimée et colorée par le M511 ne suffisait pas à apprécier la morphologie et l'identité exacte de certaines cellules. Nous avons donc comparé les images du M511 avec celles au microscope avec la coloration de Romanowsky (effectuée par le M511) et une coloration au MGG. Nous avons également, dans certains cas, évalué ces images avec celles obtenues pour les mêmes patients sur des frottis classiques. Nous aurions voulu étudier l'analyse par le DM1200 des lames imprimées et colorées par le M511 mais nous n'avons pas pu car les lames imprimées par le M511 ne sont pas reconnues par le DM1200. Nous aurions pu mieux comparer les capacités d'analyse et de reconnaissance des cellules ainsi que la numérisation des deux automates. Nous nous sommes contentés d'apprécier et de comparer les images affichées par le DM 1200 et par le M511. Comme nous allons le développer dans les prochains paragraphes, la qualité de numérisation du DM 1200 nous apparaît supérieure au M511, notamment dans la définition de la chromatine.

Comme précisé précédemment dans le paragraphe sur la coloration, la coloration de Romanowsky modifiée du M511 n'atteint pas le niveau de définition d'une coloration classique au MGG. Les lymphocytes hyperbasophiles (caractérisant les syndromes mononucléosiques) se distinguent grâce à leur taille et leur basophilie hétérogène mais la définition de la chromatine et du contenu cytoplasmique est insuffisante sur les images affichées par le M511. Dans l'ensemble la présence de ces cellules est signalée. Mais selon les échantillons il s'agit de différents types d'alarmes telles que : « formule impossible », présence de cellules « NC » (non classées), « lymphocytes atypiques ? » ou « blastés ? ». De plus le pourcentage de cellules non classées n'est pas corrélé et souvent bien inférieur au pourcentage de lymphocytes activés constaté au microscope. En effet en observant la galerie d'image, on constate que les cellules non classées correspondent aux lymphocytes hyperbasophiles les plus grands et les plus basophiles (figure 26). Mais d'autres lymphocytes hyperbasophiles semblent classés parmi les lymphocytes. Bien que l'outil de classement des lymphocytes par taille permette d'aider à la reconnaissance de ces lymphocytes hyperbasophile, leur identification reste difficile du fait de la

coloration. En effet la définition de la chromatine et du contenu cytoplasmique est insuffisante sur les images affichées par le M511 (figure 26), et seule la taille et la basophilie hétérogène permettent de suspecter la présence de ces cellules. En observant les lames imprimées et colorées par le M511 au microscope, on bénéficie d'une meilleure vision des cellules mais la définition de la chromatine reste encore insuffisante (figure 27).

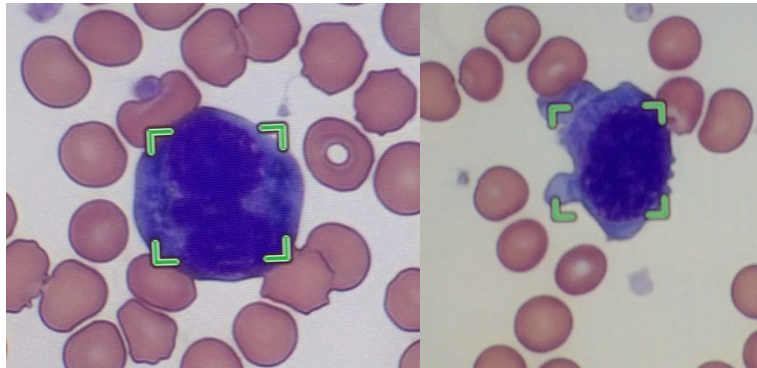


Figure 26: lymphocytes hyperbasophiles affichés par le M511 (de grande taille à gauche, non classé), (de petite taille à droite, classé en lymphocyte)

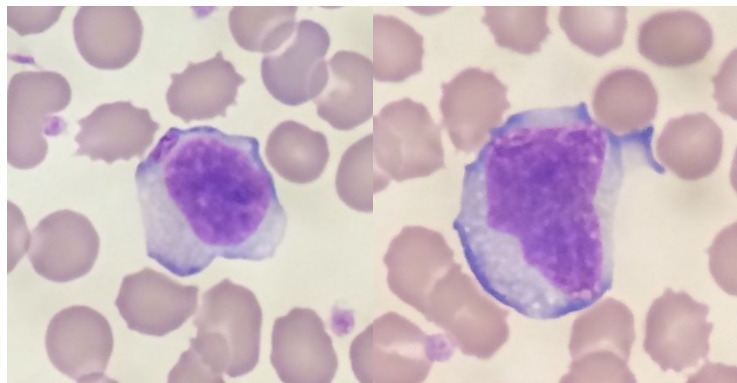


Figure 27: lymphocytes hyperbasophiles au microscope avec coloration par le M511

Certaines cellules, comme les lymphoblastes ont une morphologie parfois proche des lymphocytes. Il a ainsi été constaté des erreurs de classement ; certains lymphoblastes de petite taille étant classés avec les lymphocytes ; comme l'illustre la figure 28. Même pour l'opérateur qui observe ces cellules sur l'écran, la différence n'est pas aisée. En particulier, on ne distingue pas l'état de la chromatine entre les deux cellules. Si on compare ces images à celle affichées par le DM1200, comme le montre la figure 29, on remarque qu'avec ce dernier le rendu de l'aspect de la chromatine est meilleur. Cette moins bonne qualité d'image est probablement due à la différence de coloration mais aussi à la moins bonne numérisation du M511.

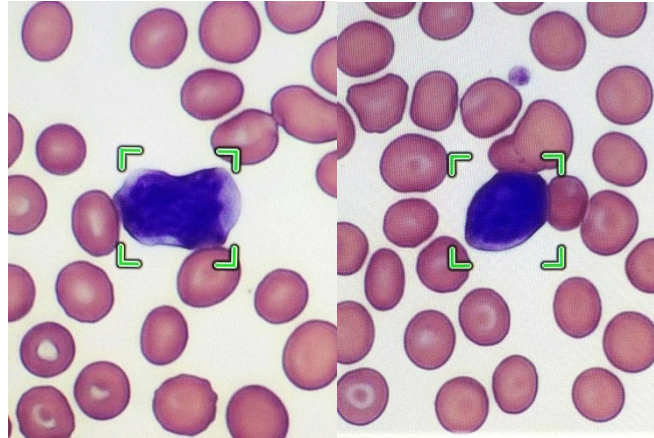


Figure 28: capture d'écran du Mac présentant des lames imprimées et colorées par le M511, à gauche un blaste (classé en lymphocyte), à droite un lymphocyte

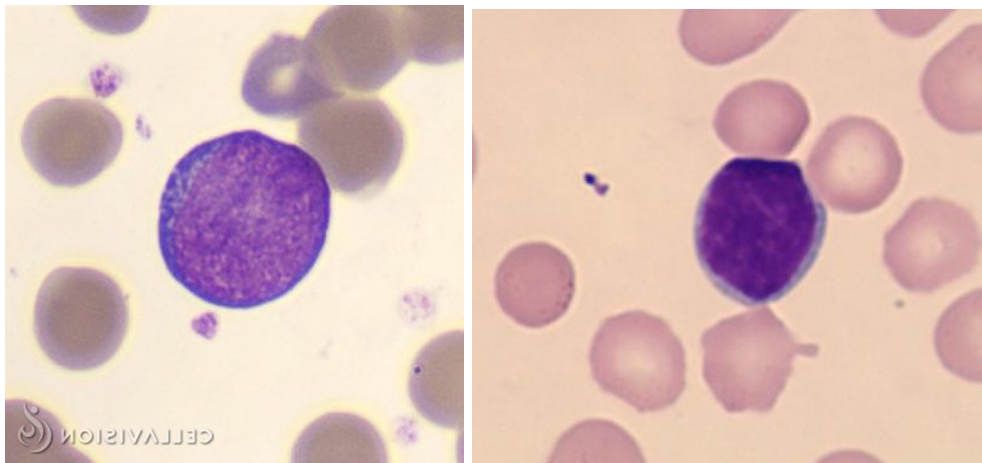


Figure 29: deux types de cellules affichées par un DM: à gauche un blaste lymphoïde, à droite un petit lymphocyte (source: www.cellavision.com)

Pour mieux apprécier l'impact de l'impression, de la coloration de Romanowsky et de l'affichage des galeries d'images sur la morphologie des cellules, nous avons comparé dans des LAL, les images du M511 observées sur l'écran d'ordinateur avec les images des lames du M511 colorées au Romanowsky et observées au microscope (figure 30 et 31). Ainsi en observant les images des cellules sur écran, on constate que la chromatine des noyaux apparaît très condensée. En observant les mêmes lames au microscope on retrouve cet aspect très condensé de la chromatine, même si la numérisation semble accentuer cet effet par rapport au microscope.

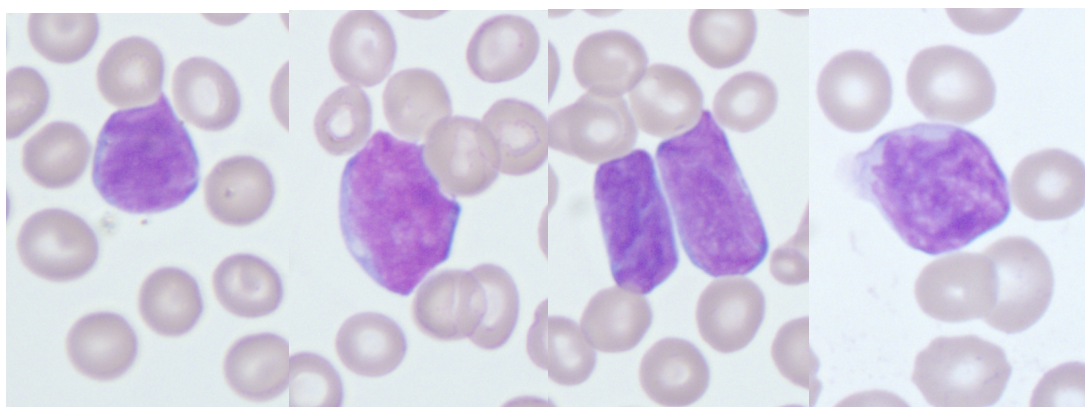


Figure 30: blastes de LALB sur lames imprimées et colorées par le M511 et photographiés au microscope

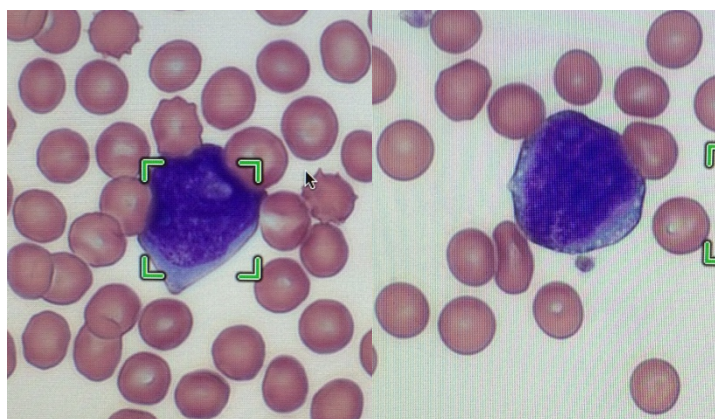


Figure 31: Blastes de LALB affichés par le Mac après impression et coloration par le M511

Cet effet de condensation de la chromatine rend difficile l'identification des blastes puisque le principal critère cytologique de reconnaissance de ces cellules repose sur l'étude de la chromatine. En outre, aussi bien sur écran qu'au microscope, la chromatine n'apparaît pas homogène et « mousseuse », les noyaux des cellules immatures prennent en effet un aspect plus condensé ; et le contenu cytoplasmique (grains, corps d'Auer) n'est pas bien visible.

Dans certains cas de LAM dites « cup like », on ne distingue pas ou difficilement, sur l'écran, les cupules nucléaires caractéristiques (témoins d'une mutation de NPM1 et/ou FLT3) ; alors qu'elles sont mieux visibles en regardant ces mêmes lames au microscope (figures 32 et 33). Plus globalement la numérisation manque de définition ce qui gêne l'étude morphologique des cellules blastiques. Par contre les autres critères de reconnaissance des blastes (taille augmentée des blastes, présence de nucléoles, basophilie homogène du cytoplasme) restent visibles en coloration de Romanowsky aussi bien au microscope que sur l'écran d'ordinateur.

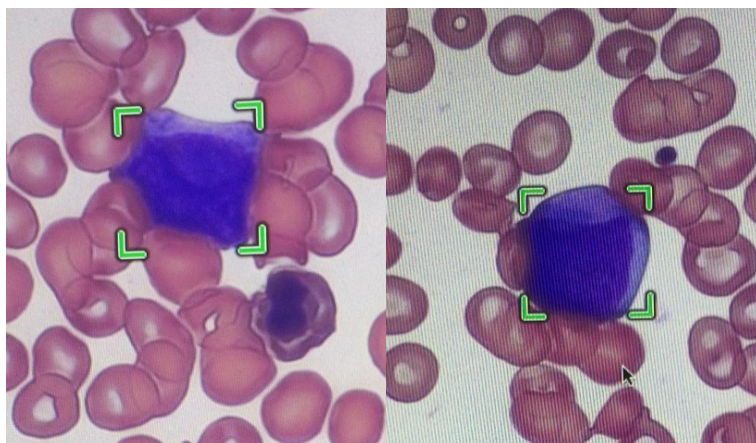


Figure 32: Blastos de LAM "cup like", sur écran après impression et coloration par le M511

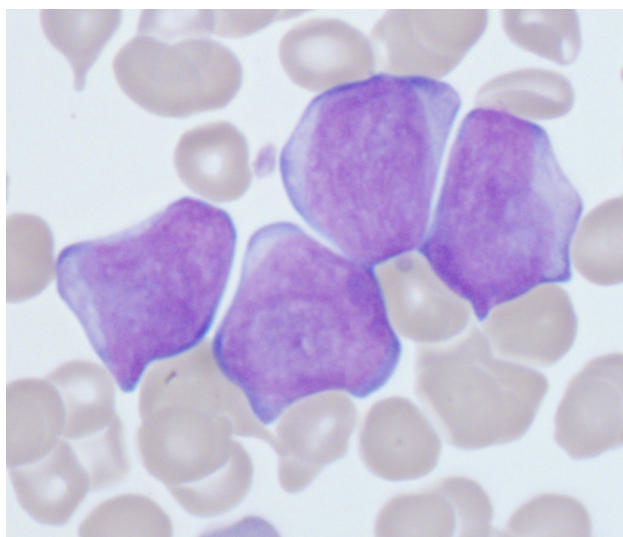


Figure 33: Blastos de LAM « cup like », vu au microscope avec des cupules nucléaires bien visibles après impression et coloration par le M511

Au microscope, même avec la coloration de Romanowsky, les détails de formes du noyau sont bien visibles, notamment les contours nucléaires. Ainsi sur des cas de LAL, les encoches et replis nucléaires sont bien visibles. En observant les lames colorées au Romanowsky (cas de LAL B) on remarque qu'il y a peu de noyaux nus (correspondant à des cellules « éclatées »). De plus il n'existe pas, contrairement aux frottis classiques d'accumulations d'éléments altérés se retrouvant habituellement en bout et bords de lame.

Nous avons poursuivi notre comparaison sur d'autres cas de LAM. Nous avons constaté une meilleure définition de la basophilie cytoplasmique au MGG. Au MGG, les grains et les corps d'Auer sont bien visibles ; c'est particulièrement vrai sur certains cas comme une LAM2 variant avec une $t(8;21)$ (translocation entre le chromosome 8 et 21). Dans ce cas, on retrouve facilement sur des lames colorées au MGG les blastos hypergranulaires avec un corps d'Auer unique (figure 34), ce qui n'était pas le cas à la coloration de Romanowsky (figure 35).

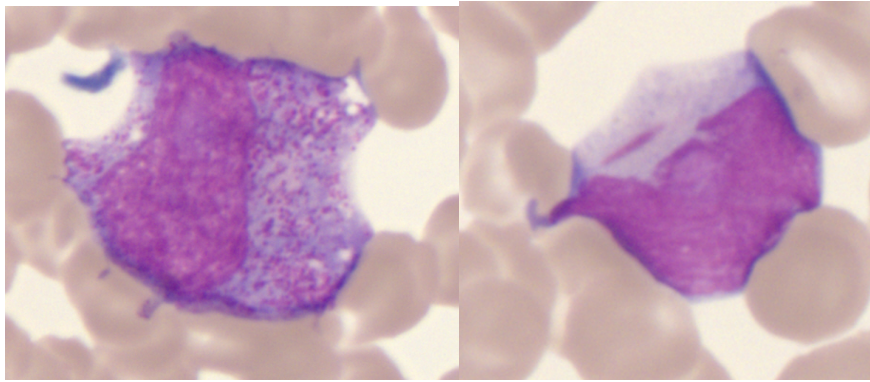


Figure 34: Blastés de LAM2 avec t(8 ;21), avec parfois un unique corps d'Auer vu au microscope après impression par le M511 et coloration MGG

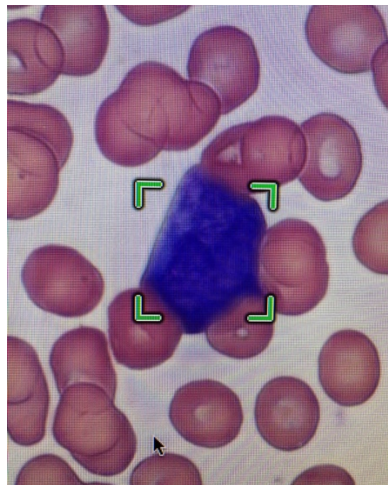


Figure 35: Blaste de LAM2 avec une translocation t(8 ;21) sur écran du Mac avec coloration de Romanowsky

De même sur des échantillons de LAM3, les cellules blastiques ne peuvent être identifiées car le noyau bilobé caractéristique n'est plus visible (à cause de la densité nucléaire trop marquée) en particulier sur l'écran de l'iMac, tout comme le contenu hyper- ou microgranulaire du cytoplasme (figure 36, 37, 38, 39). Cependant on arrive à percevoir certains détails sur une lame colorée en Romanowsky, à condition de bien l'observer au microscope ; mais pas autant que si l'on observait la lame avec une coloration MGG.

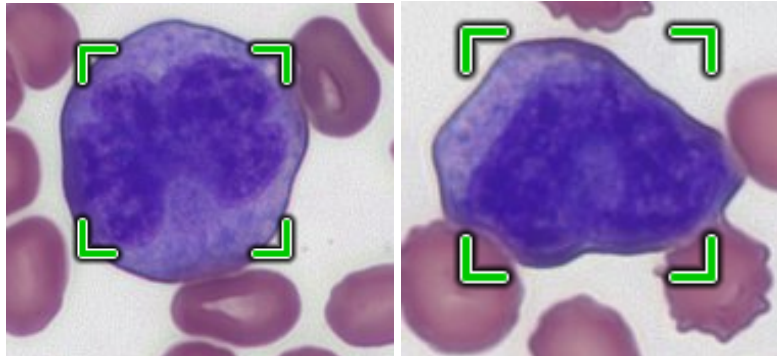


Figure 36: Blastos de LAM3 sur écran Mac après impression et coloration par le M511

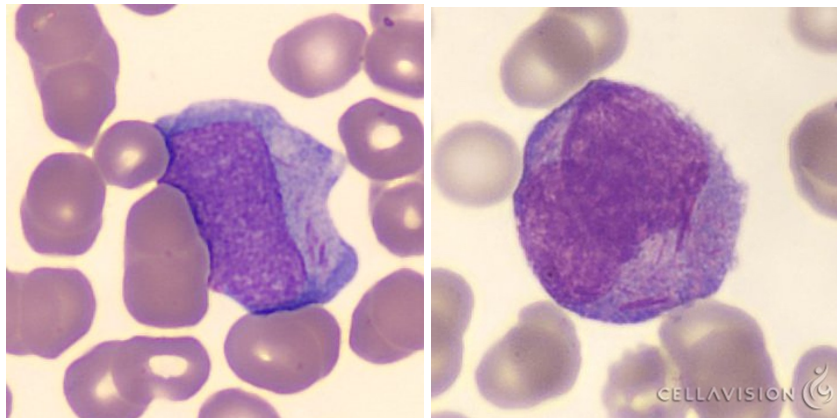


Figure 37: Blastos avec corps d'Auer affichés par un DM (Source: www.cellavision.com)

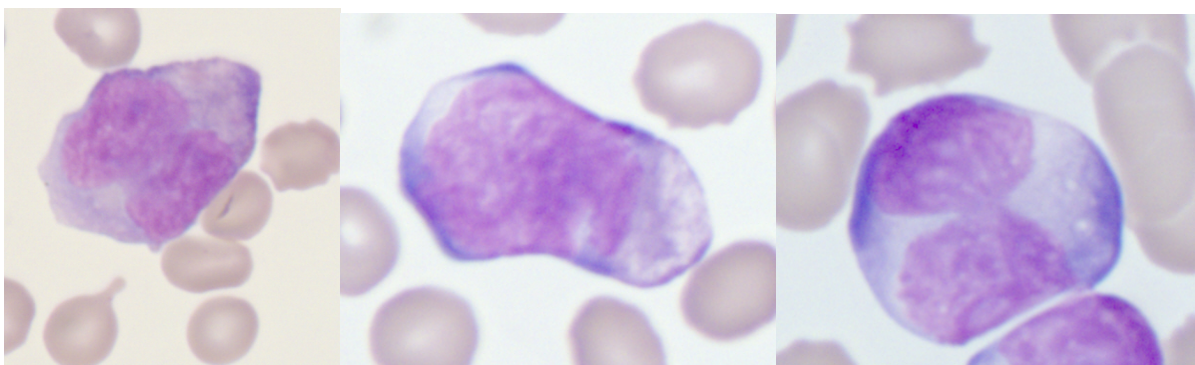


Figure 38: Blastos de LAM3 au microscope après impression et coloration par le M511

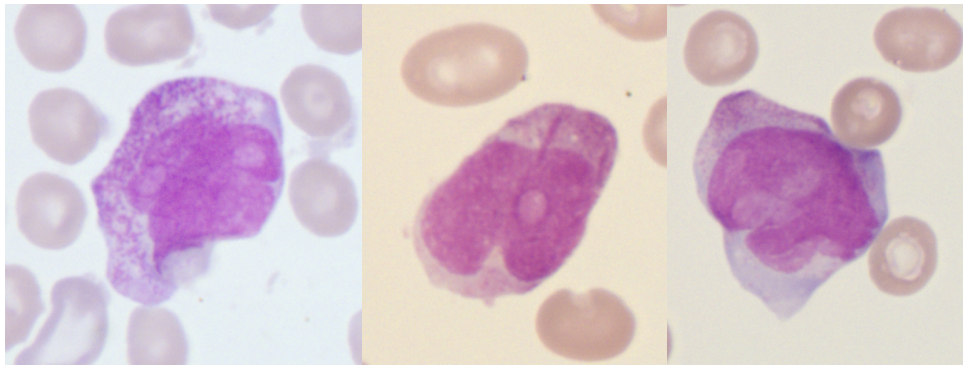


Figure 39: Blaste de LAM3 après impression au M511 et coloration MGG

A l'inverse de la coloration de Romanowsky, l'impression des lames par le M511 ne semble pas modifier grandement les caractéristiques morphologiques des cellules. Cependant on peut noter quelques différences, sur certains échantillons, entre des lames imprimées par le M511 et des lames étalées en frottis (dans les deux cas colorées au MGG). Une de ces différences, déjà évoquée, concerne la répartition des cellules sur la lame, comme les noyaux nus, les blastes se situent préférentiellement en bout et en bords des frottis classiques. Ce phénomène était bien visible pour les blastes de LAM3. Ces blastes de LAM3 peuvent même apparaître éclatés, ce qui rend alors mieux visible leur contenu cytoplasmique et notamment leur corps d'Auer. Avec l'impression du M511, les blastes n'ont pas de position particulière sur la lame, et les cellules restent intactes. Une autre différence, mineure, peut s'observer dans des cas de LAM5 caractérisées par la présence de monoblastes. Pour ces cellules, la majorité des caractéristiques morphologiques sont respectées (grande taille, cytoplasme abondant avec pseudopodes), mais les noyaux apparaissent plus irréguliers sur la lame imprimée que sur la lame étalée manuellement (figures 40 et 41).

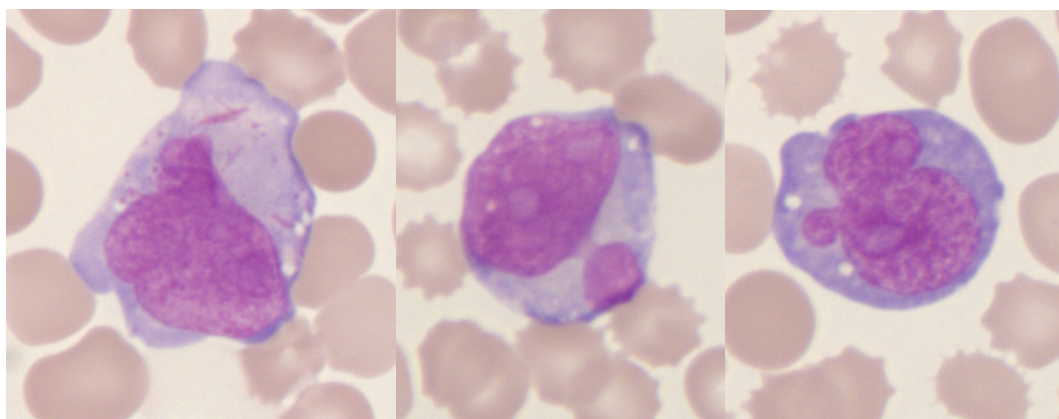


Figure 40: Blaste de LAM5 (avec corps d'Auer à gauche) vus au microscope après impression par le M511 et coloration MGG

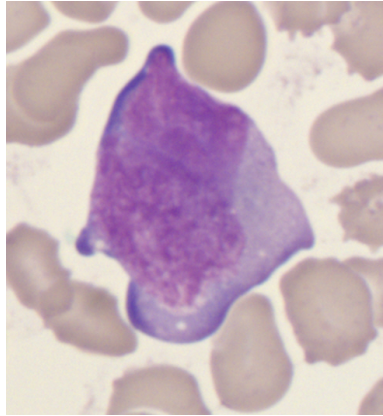


Figure 41: Blaste de LAM5 vu au microscope après impression et coloration par le M511

Pour les LAM4 et LAM5, la coloration de Romanowsky semble atténuer les différences morphologiques entre les blastes et les monocytes. Les nucléoles et l'aspect lâche de la chromatine ne sont pas aussi bien visibles qu'avec la coloration MGG. Les figures 42 et 43 l'illustrent bien.

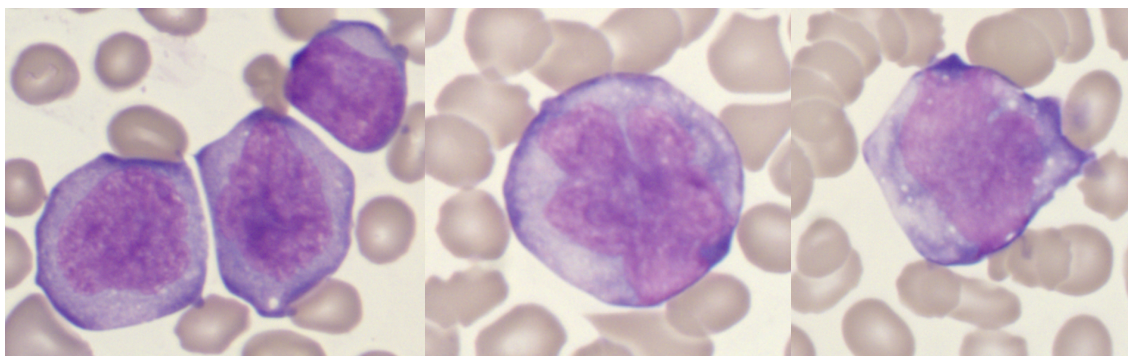


Figure 42: Blastés de LAM4 vus au microscope après impression et coloration par le M511

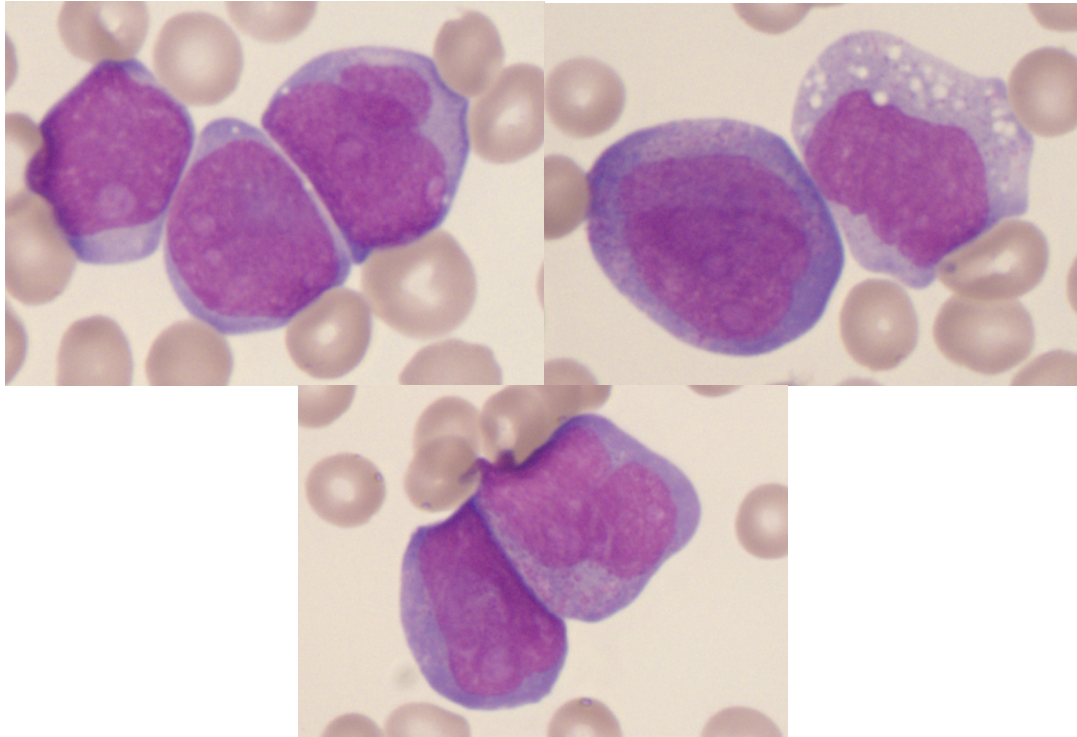


Figure 43: Blastés de LAM 4 (un monocyte avec des vacuoles à droite) vus au microscope après impression par le M511 et coloration au MGG

Pour conclure sur les échantillons de LAM et LAL analysés, les images des blastés obtenus avec le M511 paraissent insuffisantes pour une étude morphologique et pour leur caractérisation. Ce défaut nous paraît surtout lié à la coloration utilisée par le M511. En effet, globalement, sur ces cas de LAM et LAL, des lames imprimées par le M511 mais colorées au MGG nous fournissent une très bonne définition des critères morphologiques aussi bien nucléaires (irrégularités, nucléoles, cupules) que cytoplasmiques (grains, corps d'Auer).

De nombreux cas de pathologies lymphomateuses en phase leucémique ont été inclus dans l'étude. Là aussi globalement, si le signalement de cellules anormales circulantes est satisfaisant dans l'ensemble, celui-ci manque de précision (pas de formule rendue, ou cellules non classées, ou éléments anormaux dans la galerie d'images) et les images obtenues sur le M511 paraissent insuffisantes pour classer et proposer une hypothèse morphologique. La cause principale en est la coloration Romanowsky qui révèle insuffisamment les textures des chromatines, les nucléoles et les basophilies cytoplasmiques.

Dans les leucémies à plasmocytes, on constate que le M511 ne signale pas les plasmocytes circulants et rend une formule sans anomalie, ce qui peut donc poser problème en routine. Le seul élément d'alerte vient de la galerie d'images où les plasmocytes restent visibles (figure 44).

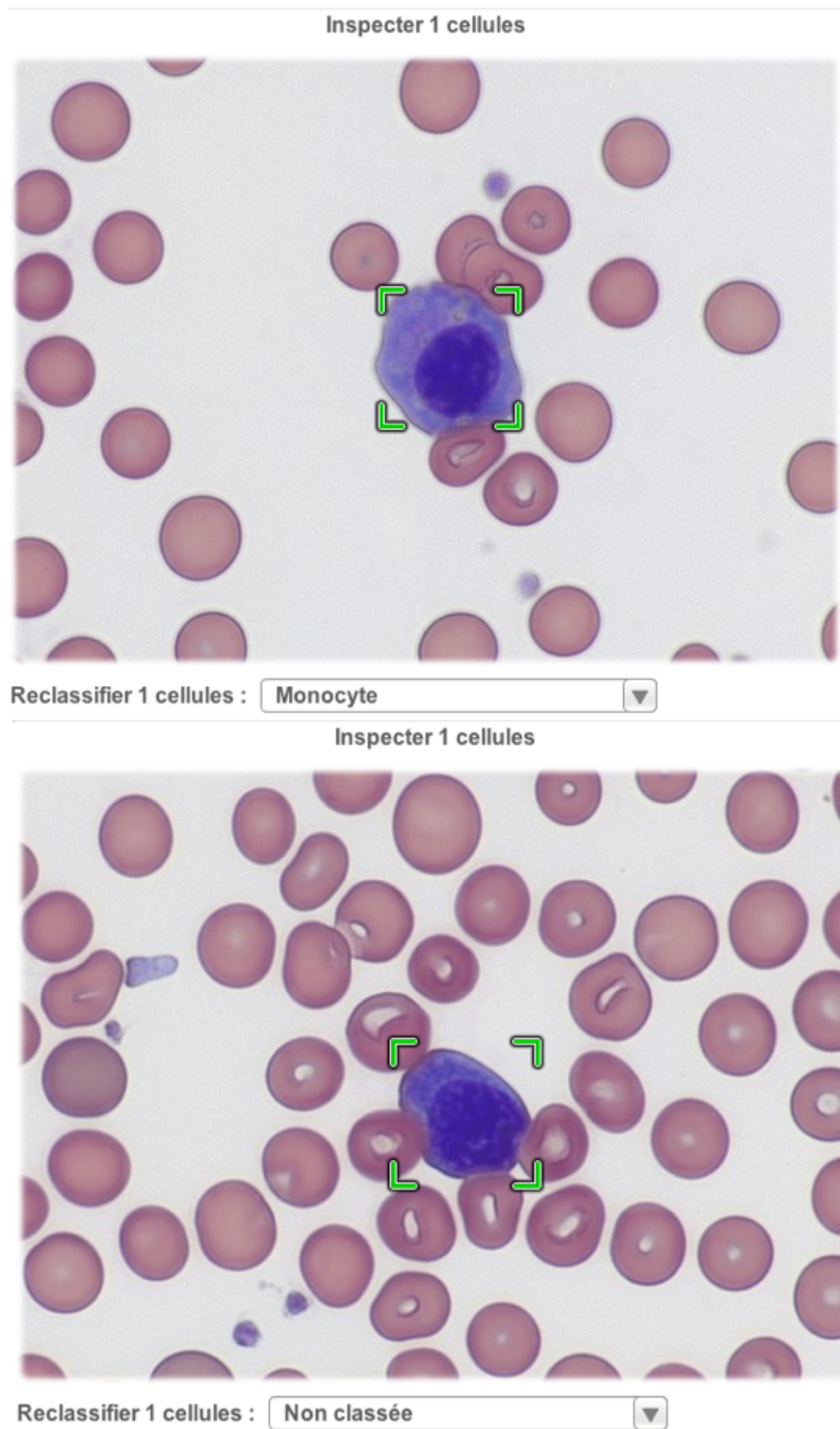


Figure 44: plasmocytes observés sur écran Mac classé en monocyte ou non classé

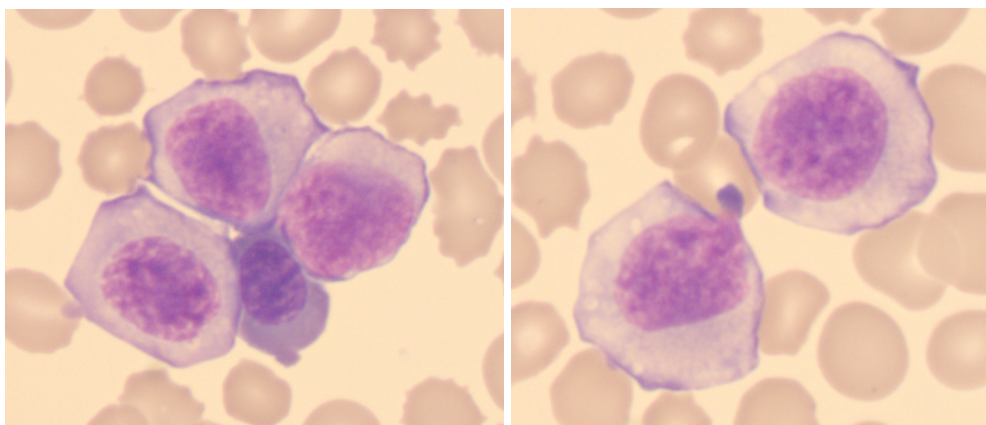


Figure 45: 3 plasmocytes et un érythroblaste (à gauche), 2 plasmocytes (à droite) au microscope après impression et coloration par le M511

L'impression ne semble pas en cause comme le montre l'exemple des leucémies polylmphocytaires T où l'aspect particulier et irrégulier des contours nucléaires, spécifique de cette entité, est particulièrement bien rendu quand on colore la lame au MGG (figure 48).

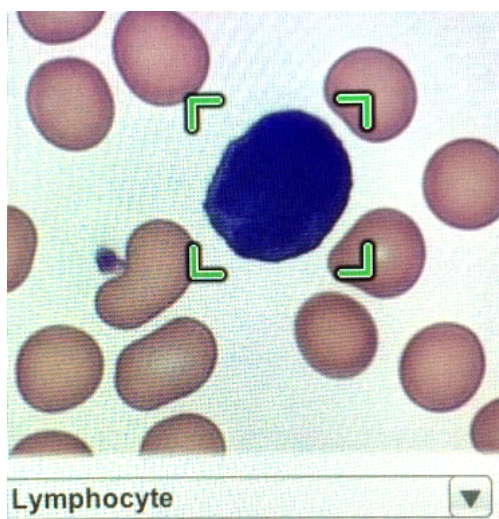


Figure 46: Prolymphocyte T observé sur écran de l'iMac

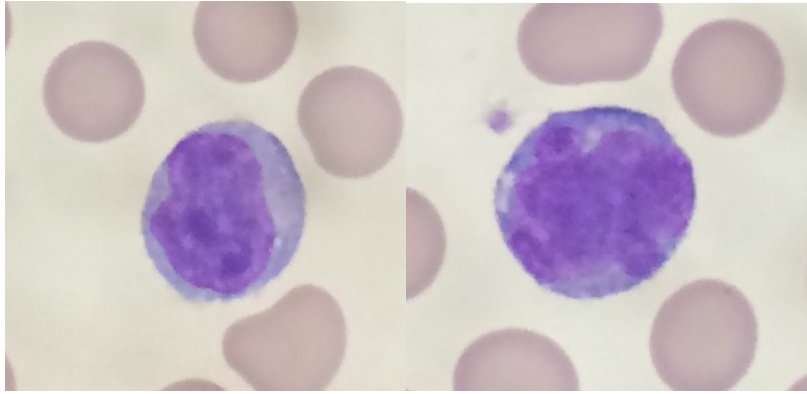


Figure 47: à gauche lymphocyte normal, à droite prolymphocytes-T au microscope après impression et coloration par le M511

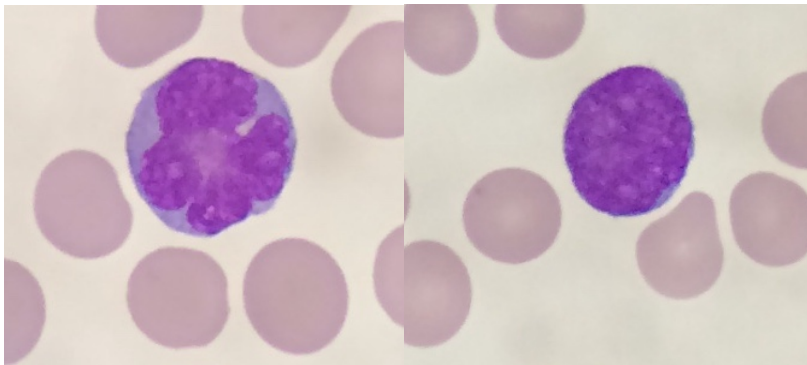


Figure 48: pro-lymphocytes T au microscope après impression par le M511 et coloration au MGG

Il existe toutefois deux exceptions, marquantes car concernant des signes très classiques de la cytologie des lymphomes :

- celle des ombres cellulaires de la LLC, beaucoup moins nombreuses que sur un frottis conventionnel (le compte des lymphocytes est donc certainement plus juste sur le M511)

- celle des villosités (caractéristiques des lymphocytes villeux et des tricholeucocytes) qui ne sont pas apparentes après impression (figures 50 à 54) indépendamment de la coloration. L'aspect cytoplasmique reste cependant particulier. Le classement de ces cellules lymphomateuses, par le M511, en monocytes masque en plus la monocytopenie caractéristique des leucémies à tricholeucocytes. Sur les figures suivantes (de 49 à 53), les cellules villeuses ne sont visibles que sur les figures 50 et 53 issues de frottis obtenus après étalement. Les autres figures (49, 51, 52) montrent les mêmes cellules mais sans villosités (mais avec parfois des prolongements cytoplasmiques) issues de lames imprimées par le M511.

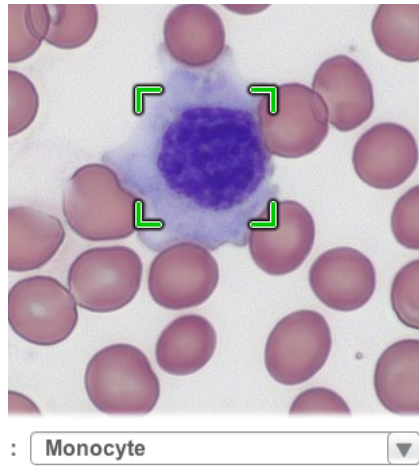


Figure 49: Tricholeucocyte visible sur l'écran du Mac classé en monocyte (impression et coloration par le M511)

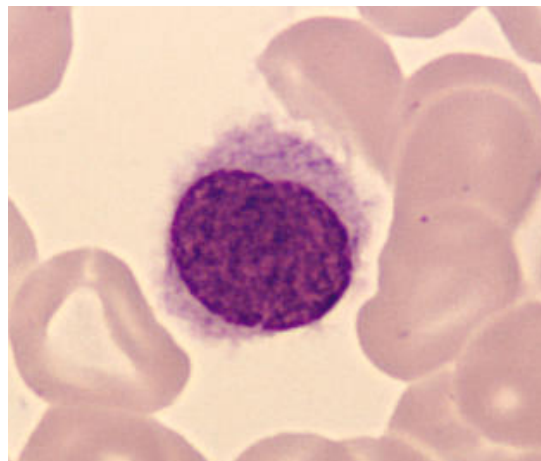


Figure 50: image d'un tricholeucocyte affiché par un DM (sources: www.cellavision.com)

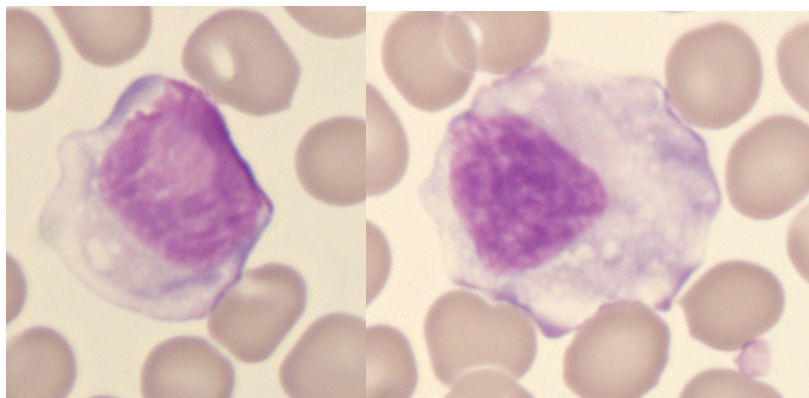


Figure 51: Tricholeucocytes au microscope après impression et coloration par le M511

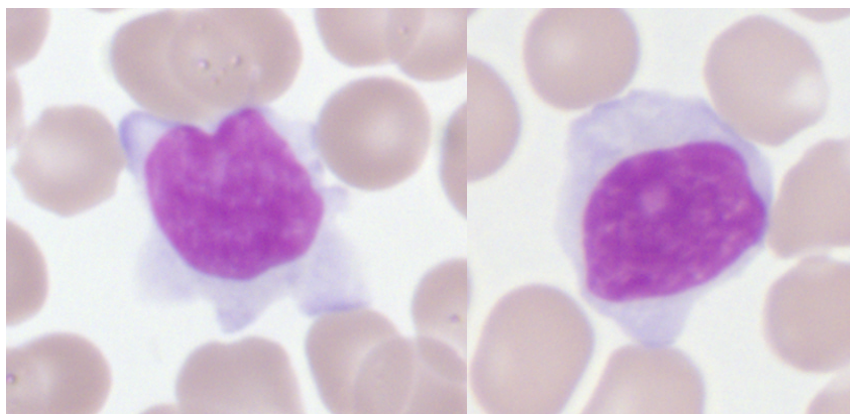


Figure 52: Tricholeucocytes observés au microscope après impression par le M511 puis coloration au MGG

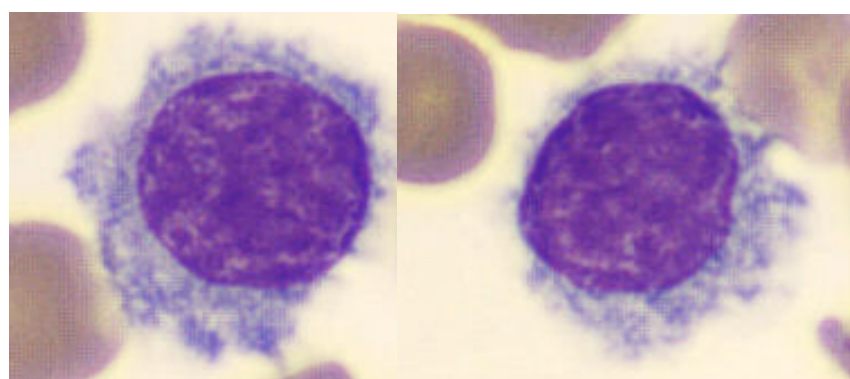


Figure 53: Tricholeucocytes observés au microscope sur des frottis classiques colorés au MGG

I.6. Conclusion

La technologie du M511 présente un certain nombre d'atouts. La numération des plaquettes en fait partie, en particulier en cas d'amas plaquettaires. On peut aussi souligner la visualisation excellente des hématies et la possibilité de les classer selon la forme ou la taille. Cette fonctionnalité permet ainsi de mettre en évidence une anomalie morphologique significative (comme la présence de schizocytes). On peut citer d'autres avantages, comme le fait que le M511 n'est pas impacté dans ses analyses d'échantillons par la lactescence ou des échantillons avec une CCMH élevée contrairement à l'Advia ou le Sapphire. La CCMH ne présente donc plus, avec le M511, la même importance que sur les automates à flux (où elle permet de repérer ces interférences). A côté de ces nombreuses qualités, on a remarqué que le M511 présentait également des limites. Ainsi, certains échantillons pathologiques ne sont pas signalés comme tels par l'automate, c'est notamment le cas en présence des schizocytes pourtant bien visibles sur la galerie d'images. Cela peut être attribué à l'algorithme, peut-être insuffisamment abouti. Enfin, on a pu remarquer que dans le cas de certaines hémopathies la formule pouvait être faussée. Ces cas ont mis en avant certaines limites du M511 concernant la coloration, la numérisation et

l'algorithme de classement des cellules. En effet, dans le cas des hémopathies, la formule leucocytaire n'est souvent pas rendue ; ce qui d'une certaine manière signale ces cas mais empêche de réaliser une étude statistique de sensibilité/spécificité des alarmes morphologiques.

La technologie originale d'impression du M511 s'est révélée très performante. On a pu l'étudier en faisant abstraction de la coloration de Romanowsky (en colorant au MGG des lames imprimées). Dans la majorité des cas les résultats sont analogues, ou supérieurs, avec une morphologie conservée à l'exception des cellules à villosités (lymphomes villeux, leucémie à tricholeucocytes). De plus, l'artefact de répartition des cellules, habituel aux frottis conventionnels, disparaît avec ce nouveau mode d'impression. Il s'agit donc d'un changement d'habitude pour le cytologiste à adopter, notamment dans les cas où les blastes sont recherchés préférentiellement en bout et bords de frottis.

La commercialisation du M511 a cessé en juin 2019. Les raisons exactes n'ont pas été communiquées. Il n'est pas prévu d'amélioration ou de nouveaux automates de cytologie reposant sur les mêmes principes que le M511 avant plusieurs années. Peut-être cet automate est-il trop ambitieux en réalisant des lames colorées pour chaque échantillon alors qu'on cherche actuellement avec nos automates à en réaliser le moins possible. Ce M511 pourrait pourtant, à nos yeux, être l'un des automates d'hématologie les plus performant si le système de coloration pouvait être amélioré avec une coloration plus proche du MGG ainsi qu'avec un système de numérisation des images et des algorithmes de meilleure qualité. Ces améliorations permettraient certainement une meilleure reconnaissance des cellules par le logiciel intégré et une relecture directement à l'écran et donc facilitée pour l'opérateur. Il se placerait alors comme un automate de premier choix.

De nouveaux paramètres sont désormais mesurés par les automates. Par exemple l'index de granularité est rendu par le Sysmex XE-2100 (2) , qui prend en compte les granulations des PNN. En effet, quand la production de PNN est stimulée, ces cellules présentent des granulations azurophiles distinctes. L'aspect hypogranulaire est un signe de dysplasie. Ainsi L'index de granularité couplé aux autres paramètres de NFS peut être utile pour le diagnostic. Un autre exemple est celui de l'index lymphocytaire (2) qui repose sur l'impédance, la radiofréquence et la diffraction laser pour distinguer les différentes populations lymphocytaires. En effet l'impédance donne des informations sur le volume des cellules, la radiofréquence sur le contenu cytoplasmique, le volume nucléaire et la diffraction laser sur la granularité cytoplasmique et la structure nucléaire. L'index lymphocytaire est donc le volume des lymphocytes multiplié par la déviation standard du volume des lymphocytes et divisé par la conductivité des lymphocytes. Ainsi en cas d'infection virale, l'index lymphocytaire se retrouve augmenté par rapport à une infection bactérienne.

Dans le futur, il se mettra peut-être en place des compteurs automatisés in-vivo, qui auraient plusieurs intérêts. Ils seraient en effet non invasifs, et assureraient des mesures quasi en continu. Mais le développement, au lieu de se faire sur la miniaturisation et la portabilité des compteurs, pourrait également s'effectuer sur des compteurs encore plus perfectionnés et plus précis pour le diagnostic(26). Ils pourraient alors être capables de détecter des sous-populations cellulaires ou des cellules présentes en très faible quantité dans le sang.

II. Évaluation du réactif PAF 5

Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, les laboratoires d'hématologie peuvent être confrontés à plusieurs artéfacts lors de l'analyse des échantillons. Parmi eux, la pseudo-thrombopénie en est un important à connaître et à dépister. Il s'agit d'un compte de plaquettes faussement bas, lié à la formation dans le tube EDTA d'amas plaquettaires. Les amas formés ne sont pas reconnus comme des plaquettes par les automates, mais comme des cellules. Seules les plaquettes non prises dans les amas sont comptées.

Les échantillons avec des amas plaquettaires sont relativement fréquents, pour notre laboratoire ils représentent près de 0,2% des échantillons totaux.

En cas d'amas plaquettaires il n'est pas possible de rendre un compte de plaquettes juste. Dans notre service, il est signalé la présence ou non d'amas, en particulier en cas de thrombopénie. En cas d'amas, la valeur trouvée par l'automate est donnée à titre indicatif, pour signaler au clinicien que le compte de plaquettes est supérieur à cette valeur.

Il a été observé que les amas de plaquettes liés à l'EDTA avaient tendance à se répéter pour un même patient. Il est donc conseillé chez ces patients de prélever sur des tubes CTAD. Avec ces tubes CTAD les amas de plaquettes se forment moins souvent. Cependant pour certains patients les amas persistent sur ces tubes. Le dernier recours pour rendre un compte de plaquettes est alors le comptage manuel en cellule de Malassez. Il nécessite un prélèvement capillaire, et le recours à plusieurs opérateurs pour lire la lame. Cette technique présente malheureusement une fidélité faible.

Le réactif PAF-5, mis au point par Horiba®, tente donc d'apporter une solution à ce problème.

II.1. Amas plaquettaires dans la numération plaquettaire

II.1.1. Définition des amas plaquettaires et de la pseudothrombopénie liée à l'EDTA

Les amas plaquettaires correspondent à l'agrégation de plusieurs plaquettes entre elles. Le nombre de plaquettes constituant ces amas est variable. La taille de ces amas est également variable.

Les critères diagnostiques de pseudothrombopénie lié à l'EDTA ont été définis par Lippi et Plebani en 2012. Ils sont au nombre de 5(27) :

- numération plaquettaire anormalement basse (<100 G/L)
- absence ou diminution du nombre de thrombopénies avec des échantillons contenant un autre anticoagulant que l'EDTA et/ou gardés à 37°C.
- Diminution en fonction du temps de la numération plaquettaire avec des échantillons sur EDTA, jusqu'à 4h après le prélèvement
- la mise en évidence d'agrégats plaquettaires (au microscope ou par un automate de cytologie)

-L'absence de signes ou de symptômes évoquant une atteinte de la lignée plaquettaire

Il faut cependant noter que des amas plaquettaires peuvent se former dans certains échantillons à EDTA et induire une diminution de la numération plaquettaire sans conduire jusqu'à la thrombopénie.

II.1.1.1. Physiologie des amas plaquettaires

La formation des amas plaquettaires se fait de manière physiologique lors de l'hémostase primaire. Il s'agit en effet des premières étapes d'hémostase suite à un saignement ; en particulier en cas de saignement cutanéomuqueux. Cela aboutit à la formation d'un agrégat plaquettaire appelé clou plaquettaire blanc.

En cas de saignement, le tissu lésé sécrète de l'adenosine diphosphate. Cette molécule va activer les plaquettes. Elle va agir sur des récepteurs situés sur la membrane des plaquettes. Ces récepteurs vont être à l'origine d'un signal aboutissant à la libération du contenu de granules plaquettaires et à l'expression d'autres récepteurs membranaires tels que GPIIb-IIIa. Enfin, une autre molécule, le fibrinogène (présent naturellement dans le sang, mais aussi contenu dans les granules plaquettaire et donc sécrété lors de leur activation), va se fixer aux récepteurs GPIIb-IIIa exprimés par les plaquettes activées. Ainsi les plaquettes s'agrègent les unes aux autres par l'intermédiaire du fibrinogène et des récepteurs GPIIb-IIIa.

La thrombocytopénie liée à l'EDTA est due à la présence d'auto-anticorps dépendants à l'EDTA chez certains individus. Ces auto-anticorps, en présence d'EDTA, reconnaissent la glycoprotéine membranaire GPIIb-IIIa et induisent alors l'activation et l'agrégation des plaquettes entre elles. Cette interaction est particulièrement optimale entre 0 et 4°C(27). La liaison des anticorps à la protéine GPIIb-IIIa va notamment induire l'expression de la P-selectine, de la glycoprotéine lysosomale de type III (Gp55) et de la thrombospondine puis l'activation de la tyrosine kinase. L'EDTA présent dans les tubes servant à la numération plaquettaire peut chélater ou se complexer à certains ions ce qui permet de former certains complexes souvent utilisés dans les laboratoires tels que Na_2EDTA , K_2EDTA , K_3EDTA . Nos tubes utilisés en hématologie contiennent du K_2EDTA , comme la plupart des pays européens, tandis que le K_3EDTA est utilisé aux Etats-Unis et au Royaume-Uni(27). Dans les deux cas, des amas plaquettaires se forment.

En 1973, Schreiner et Bell ont mis en évidence un nouveau type d'agglutinines plaquettaires chez certains patients (souffrant de maladies cardiovasculaires, d'hépatopathies ou de purpura thrombopénique idiopathique). Ces molécules étaient actives aussi bien à 37°C qu'à température ambiante et semblaient liées à la présence d'EDTA. En effet, après l'ajout de l'EDTA à ces échantillons, on pouvait observer un phénomène d'agglutination. On suppose que l'EDTA joue un rôle en modifiant la conformation stérique de récepteurs membranaires tels que GPIIb-IIIa. L'EDTA en chélatant le calcium va favoriser la dissociation de GPIIb-IIIa, la fraction GPIIb devient accessible à certains auto-anticorps, en particulier à basse température. Des auto-anticorps, présents naturellement chez certains patients induiraient alors une activation et donc une agrégation plaquettaire. La nature exacte de ces auto-anticorps reste encore incertaine. Plusieurs études cherchant à les

identifier ont parfois mis en évidence des IgG, parfois des IgM, parfois des IgA, voire parfois plusieurs types chez un même individu(27).

Il a été prouvé que le nombre et la taille des amas plaquettaire sont directement associés avec la diminution du compte plaquettaire(27).

II.1.1.2. Molécules interagissant avec l'agrégation plaquettaire

Il a été observé et mis en évidence des risques de saignement ou de thromboses accrus dans le cas de l'utilisation de certains médicaments. Ces médicaments ont une action sur les facteurs de la coagulation, sur les plaquettes et donc sur le risque de saignement ou de thrombose(28).

Certains inhibent les fonctions plaquettaires, d'autres les activent. Ces propriétés de désagrégation ont été étudiées en particulier pour les utiliser dans le cas des échantillons avec des amas plaquettaires.

Les propriétés de certains antibiotiques ont été étudiées, en particuliers les aminosides. Il a ainsi été montré que l'amikacine et la gentamicine pouvaient inhiber l'agrégation des plaquettes en bloquant leur activation. Plus précisément ces deux antibiotiques vont bloquer l'exposition du site de liaison au fibrinogène induite par le changement de conformation de GpIIb-IIIa lors de l'activation plaquettaire. Cette inhibition serait dose dépendante. Cet effet antiagrégant n'a par contre pas été observé pour d'autres aminosides testés dans les mêmes conditions (streptomycine, kanamycine)(28).

Ces propriétés ont été également illustrées par un cas décrit en Corée du Sud(29) ; une patiente de 53 ans chez qui une thrombopénie (19 G/L de plaquettes) avait été découverte fortuitement. Les résultats de laboratoire ont confirmé la présence d'amas plaquettaires. Le compte plaquettaire à partir de tubes CTAD était à 45 G/L mais les frottis montraient une persistance des amas plaquettaires, tout comme lors de l'emploi de tubes héparinés. Le laboratoire a alors rajouté à l'échantillon sanguin (dans le tube EDTA) 20 mg de kanamycine. Pour ce cas, le laboratoire a constaté que les amas plaquettaires disparaissaient partiellement pour l'ajout de kanamycine après le prélèvement de sang, et totalement si l'ajout de kanamycine se faisait avant le prélèvement sanguin.

Une étude menée en 2017 sur 66 échantillons sanguins (30), a confirmé que l'ajout d'amikacine (avec une concentration à 20mg/mL) et une incubation des échantillons à 37°C de 2 à 6 heures permettaient d'obtenir une diminution significative des amas plaquettaires avec une augmentation de la numération plaquettaire de plus de 50% pour 90% des échantillons(30).

Cependant une étude de 2015 portant sur 7 échantillons sur lesquels on testait également l'action de l'amikacine sur les amas plaquettaires a montré des résultats moins encourageants, puisque l'ajout d'amikacine à différentes quantités n'avait pas eu d'effets pour 4 des 7 patients. Pour les auteurs de cette étude l'effet de l'amikacine sur les amas plaquettaires ne serait pas dépendant de la concentration d'amikacine et serait propre à chaque cas (31).

II.1.2. Enjeux

Ce phénomène de pseudothrombopénie liée à l'EDTA concernerait 0,07 à 0,2% des individus dans la population générale(27). Il serait plus fréquent chez les personnes hospitalisées. Il n'a pas été montré que ces événements dépendaient de l'âge ou du sexe des sujets. On retrouve ces pseudothrombopénies chez des sujets souffrants d'affections diverses telles que des brûlures, des sepsis, des infections au VIH ou au CMV, des maladies auto-immunes, des pathologies malignes, des chirurgies cardiaques et d'autres pathologies thrombotiques(27). Bien que les sujets atteints n'aient pas de risques hémorragiques accrus, ils peuvent subir des examens inutiles et parfois invasifs tels que des ponctions médullaires ou recevoir des traitements inappropriés comme des transfusions plaquettaires, des prises de corticoïdes, voire des splénectomies. La reconnaissance de ses fausses thrombopénies est donc primordiale. Elle permet d'éviter des errances diagnostiques, qui peuvent induire un retard de prise en charge adaptée pour le patient et des coûts supplémentaires pour les établissements de soin. En effet une pseudothrombopénie liée à l'EDTA non détectée peut alors faire suspecter une thrombopénie induite à l'héparine, une CIVD, une myélodysplasie ou d'autres pathologies. Elle peut aussi retarder inutilement une intervention chirurgicale, ou empêcher l'introduction d'anticoagulants chez des patients.

II.1.3. Mesures actuelles en cas d'amas plaquettaires

Pour repérer une pseudothrombopénie liée à l'EDTA, plusieurs étapes sont nécessaires. Il faut la suspecter dans les premières causes d'une thrombopénie, en particulier si aucune autre cause évidente telle qu'un caillot, un saignement ou un événement thrombotique, ne peut l'expliquer. Certains automates de cytologie sont capables de générer une alarme « plt clump » en cas d'échantillons suspects d'amas. L'examen du frottis sanguins est ensuite primordial. On peut alors, sur la lecture au microscope, apprécier la présence et l'importance des amas plaquettaires.

Plusieurs techniques ont été mises en place pour réduire l'impact des thrombopénies liées à l'EDTA. Ainsi il a été proposé de réchauffer les tubes à 37°C avant de les analyser. Les temps d'incubations recommandés sont variables de plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures. Certains conseillent d'utiliser des tubes différents, ne contenant pas d'EDTA, mais d'autres types de substances et/ou anticoagulants comme l'héparine, le citrate, l'oxalate d'ammonium, la beta-hydroxyethyltheophylline, le fluorure de sodium, le CPT (associant trisodium citrate, pyridoxal 5'-phosphate), des antiagrégants plaquettaires (acide acétylsalicylique, prostaglandine E1, apyrase, ou des anticorps monoclonaux reconnaissant le fibrinogène ou les sites de fixation du facteur von Willebrand), l'azide de potassium, l'amikacine, la kanamycine, d'autres aminosides, du CaCl_2 associé à l'héparine (27). Les options les plus employées dans les laboratoires semblent être l'utilisation de tubes contenant du citrate, du CPT ou du CaCl_2 associé à l'héparine ou de maintenir l'échantillon à 37°C(27). Ces techniques se sont révélées efficaces mais pas sur l'ensemble des échantillons, puisque globalement les amas ont tendance à persister pour 15 à 20% de ces échantillons(27).

II.2. Objectifs

Nos objectifs étaient d'évaluer, sur une centaine d'échantillons avec des thrombopénies liées à l'EDTA, l'apport d'un réactif de désagrégation plaquettaire mis au point par Horiba®. Il s'agissait de montrer si l'ajout de ce réactif permettait faire disparaître les amas plaquettaires et d'obtenir ainsi une numération plaquettaire fiable.

II.3. Méthode et résultats

II.3.1. Protocole

Nous avons donc sélectionné des échantillons de patients présentant des amas plaquettaires. Ces échantillons ont été analysés par les automates Advia et Sapphire et les amas ont été visualisés sur des frottis. Ces échantillons sont contenus dans des tubes EDTA et présentent très majoritairement des thrombopénies inférieures à 120 G/L.

Les tubes sont ensuite passés sur le M511. Comme vu précédemment, le M511 rend une numération plaquettaire que l'échantillon présente ou non des amas plaquettaires. En effet les amas plaquettaires sont repérés par le M511 et les plaquettes au sein des amas sont comptées individuellement. Puis, on prélève 600 µL de chaque échantillon auquel on rajoute 25 µL de réactif PAF-5. On passe ensuite les échantillons sur chaque automate Sapphire, Advia, et M511 ; un frottis manuel est également réalisé. L'ensemble de ces analyses est fait dans un délai relativement court, limité à quelques heures. Une analyse des échantillons au moyen du CD61 sur le Sapphire avant et après ajout de réactif PAF-5 a été réalisée au début de l'étude puis abandonnée. En effet la numération des plaquettes grâce au CD61 apparaîtra diminuée en présence d'amas, au même titre qu'une numération classique. Sur les premiers résultats, cette analyse au CD61 n'apportait pas des valeurs de numération différentes de celles obtenues classiquement avec le Sapphire. De plus elle était couteuse en temps et en réactifs. Les résultats de numération plaquettaire sont collectés pour chaque échantillon sur chaque automate avec ou sans réactif puis analysés.

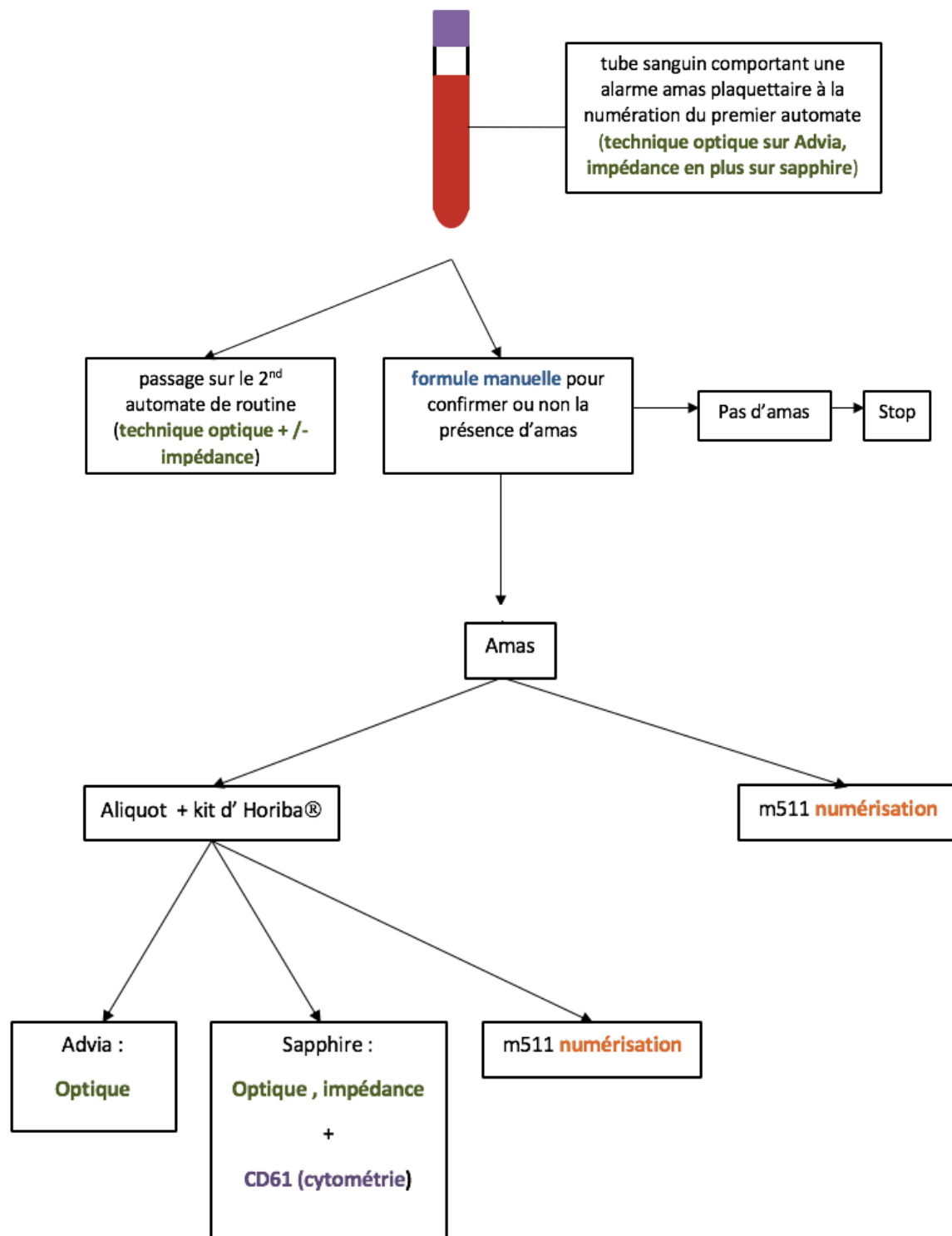


Figure 54: Protocole d'évaluation du réactif PAF-5

II.3.1.1. Méthode d'évaluation et place du M511

Pour évaluer l'efficacité du PAF-5, nous nous sommes appuyés sur plusieurs données.

D'une part nous avons pris en compte le message d'alarme « plt clmp » que peut afficher chacun de nos trois automates, en s'attendant à ce qu'il disparaisse sur les échantillons auxquels le réactif PAF-5 a été ajouté. Cependant même si cette donnée a une valeur indicative, elle n'est pas suffisante pour évaluer précisément l'efficacité.

D'autre part nous avons comparé au microscope les lames avant ajout de PAF-5 et après ajout de réactif. Il est alors possible de constater la présence ou non d'amas. Cependant ces résultats restent dépendants de l'observateur et restent donc assez subjectifs. De plus on ne peut pas quantifier avec précision l'efficacité du PAF-5.

Enfin, nous nous sommes appuyés sur les valeurs numériques des comptes de plaquettes de chaque automate. Rappelons que le M511 n'est pas impacté par la présence d'amas de plaquettes. On s'attend donc à ce que les résultats de numération plaquettaire avant et après ajout de réactif soient similaires sur le M511. Pour les autres automates, on estime que si le réactif se montre efficace sur les échantillons, le compte plaquettaire pour chaque échantillon doit augmenter. La dilution qu'apporte l'ajout de PAF-5 se caractérise par un taux de dilution de 96%. Elle est relativement faible mais nous l'avons pris en compte a posteriori pour corriger les numérations plaquettaires après ajout du PAF-5 afin d'évaluer plus précisément l'efficacité du PAF-5. En effet, pour un échantillon sans amas plaquettaire et présentant une numération plaquettaire à 120 G/L, il présenterait une numération plaquettaire à 115 G/L après ajout de PAF-5 ; de même pour un échantillon à 100G/L on passe à 96 G/L avec le PAF-5 et pour un échantillon à 50 G/L la numération s'abaisse à 48 G/L avec l'effet de la dilution. Le M511 nous a donc servi de référence. De plus, un des paramètres d'analyse du M511, non rapportable mais pouvant être utilisé dans le cadre de la recherche, livre le pourcentage de plaquettes en amas au sein de l'échantillon. Ce paramètre nommé « %caillot » permet d'avoir une autre valeur objective et quantifiable sur les amas plaquettaires. Nous l'avons donc prise en compte dans nos calculs, d'autant que ce paramètre n'est pas influencé par l'état de dilution de l'échantillon.

Ainsi pour évaluer de manière objective l'efficacité du réactif, nous avons calculé pour chaque échantillon l'augmentation du compte de plaquettes après l'ajout de PAF-5, sur chacun des 2 automates (Advia, Sapphire), sous forme de pourcentage, selon la formule suivante :

$$efficacité (\%) = \left(\frac{plt \text{ avec } PAF}{plt \text{ sans } PAF} \right) - 1$$

plt avec PAF : numération plaquettaire après ajout de PAF-5

plt sans PAF : numération plaquettaire sans ajout de PAF-5

On considère donc que plus l'augmentation en pourcentage du nombre de plaquettes est importante, plus l'action du PAF-5 a été efficace. Cependant, cette augmentation est aussi dépendante du nombre de plaquettes amas et de la taille des amas présents au préalable dans l'échantillon avant l'ajout de PAF-5. En effet, s'il y a peu d'amas, on risque moins d'observer une augmentation de la numération

plaquettaire. Ainsi, nous avons également pris en compte le paramètre « %caillots » qui permet d'avoir le pourcentage d'amas. On estime que l'augmentation de la numération plaquettaire, entre l'échantillon avant PAF-5 puis après PAF-5, doit être d'autant plus élevée que le pourcentage de plaquettes en amas avant PAF-5 est important. On a donc également calculé la diminution du pourcentage de plaquette en amas (« %caillot ») selon la formule suivante :

$$\text{diminution amas (\%)} = \left(\frac{\%caillot \text{ avec PAF}}{\%caillot \text{ sans PAF}} \right) - 1$$

%caillot avec PAF : pourcentage de plaquettes en amas après ajout de PAF-5

%caillot sans PAF : pourcentage de plaquettes en amas sans ajout de PAF-5

II.3.1.2. Difficultés rencontrées

La lecture au microscope des lames d'échantillon, avant ajout de réactif, a permis de constater que pour certains cas, la présence d'amas était négligeable. Ainsi, comme précisé précédemment, nous souhaitions sélectionner une centaine d'échantillons avec amas, mais au final parmi les 112 échantillons sélectionnés, on estime qu'un peu plus de la moitié (58 échantillons) présentait réellement de façon significative des amas pouvant influencer sur la numération plaquettaire.

Pour certains échantillons dont le volume sanguin était faible (microméthodes notamment), il n'était pas possible d'avoir une quantité suffisante pour réaliser plusieurs passages ou pour le mélanger avec le PAF-5. De plus, les premiers échantillons avec PAF-5 n'ont pas été passés sur le M511 par précaution. Nous avons préféré commencer par les passer sur les Advia et Sapphire et s'assurer que le réactif ne générât pas d'interférence ou de dysfonctionnement sur ces automates. Ainsi tous les échantillons ne présentent pas l'ensemble des valeurs escomptées (avant et après PAF-5 sur chacun des trois automates).

Il était nécessaire que l'analyse des échantillons avec le PAF-5 se réalise avec le délai le plus faible possible car le nombre plaquettes a tendance à diminuer avec le temps.

II.3.1.3. Résultats

Comme attendu, les prélèvements pour lesquels on ne retrouvait pas ou très peu d'amas, ne montrent pas de changement dans les numérations plaquettaires, ou une légère baisse du compte que l'on peut attribuer à la légère dilution induite par l'ajout de réactif. En confrontant les observations des lames et les résultats « %caillots » du M511, on estime qu'en dessous de 3% de plaquettes en amas trouvées par le M511, les rares amas sont négligeables et ne doivent pas être pris en

compte comme des amas. Ces échantillons que l'on peut considérer sans amas ou avec trop peu d'amas plaquettaires pour influencer sur la numération plaquettaire représentent 43 des 97 échantillons passés sur le M511, soit 44%. 16 autres échantillons n'avaient pas pu être passés sur le M511 (quantité insuffisante, ou M511 stoppé pour une intervention technique), et en observant les lames au microscope, on estime que 4 présentent des amas significatifs. Nous avons donc centré notre étude sur les 54 échantillons passés sur le M511 et présentant plus de 3% de plaquettes en amas, auxquels on ajoute 4 des 16 autres échantillons non passés sur le M511 mais présentant des amas significatifs, soit 58 échantillons.

	Sans amas	Avec amas	Total d'échantillons
Nombre d'échantillons	55	58	113
Pourcentage d'échantillons	48,7	51,3	100%

Tableau 8:différenciation des échantillons avec et sans amas plaquettaires

Parmi ces 58 échantillons, 22 sur 31 vont présenter une numération plaquettaire augmentée sur Sapphire (soit 71%). En moyenne la numération plaquettaire augmente de 50% sur les 31 échantillons passés sur le Sapphire et de 79% sur les 22 échantillons où l'on observe une numération plaquettaire augmentée. Parmi les 58 échantillons étudiés, 32 sur 50 vont présenter une numération plaquettaire augmentée sur Advia (soit 64%). En moyenne cette augmentation est de 28% sur les 50 échantillons passés sur l'Advia et de 54% sur les 32 échantillons avec une numération plaquettaire augmentée.

En parallèle 35 des 44 échantillons passés (soit 80%) vont présenter une diminution de leur pourcentage de plaquettes en amas. Cette diminution est d'environ 27% pour les 44 échantillons et de 54% sur les 35 échantillons où une baisse est constatée. Le pourcentage de plaquettes en amas, bien que diminuant dans la majorité des cas n'est pas toujours proche de 0. Dans certains cas il persiste un pourcentage de plaquettes en amas diminué mais encore relativement haut (>10%). Ces cas correspondent à 18 des 44 échantillons, soit 41%. Parmi ces 18 échantillons, on observe une diminution d'au moins 20% de plaquettes en amas pour 7 échantillons indiquant l'action effective du PAF-5 sur ces échantillons ; parmi ces 7 échantillons, deux présentent même une diminution de plus 50% des plaquettes en amas.

Nous avons ensuite appliqué un test statistique pour vérifier la significativité des résultats obtenus. Il s'agit d'une comparaison de variables quantitatives (séries de numérations plaquettaires, série de pourcentages de plaquettes en amas) avec des échantillons appariés, nous avons donc utilisé le test de Wilcoxon. Ce dernier a permis de montrer une différence significative entre la série de numération plaquettaire avant PAF-5 et après ajout de PAF-5 sur le Sapphire, sur les 31 échantillons avec d'authentiques amas plaquettaires avec une valeur p inférieure à 0,01 ($p < 0,01$). Sur les séries des 50 échantillons passés sur l'Advia et présentant de véritables amas, on retrouve également une différence significative avec une valeur p inférieure à 0,01 ($p < 0,01$). Enfin sur la série des 44 échantillons avec des amas et passés sur le M511, on constate aussi une différence significative avec une valeur p

inférieure à 0,001 ($p < 0,001$) entre le pourcentage de plaquettes en amas avant PAF-5 et le pourcentage après PAF-5.

Ces augmentations de numération plaquettaire sont probablement en réalité encore plus importantes si on prend en compte la dilution induite par l'ajout de PAF-5.

	Sapphire	Advia
Nombres d'échantillons avec amas analysés	31	50
Nombres d'augmentations du nombre de plaquettes avec PAF-5	22	32
Augmentation moyenne de la numération plaquettaire sur l'ensemble des échantillons analysés	50%	28%
Augmentation moyenne de la numération plaquettaire seulement sur les échantillons dont la numération plaquettaire augmente	79%	54%
Significativité de la différence observée entre les numérations sans et avec PAF-5 (Wilcoxon)	$p < 0,01$	$p < 0,01$

Tableau 9: Résultats sur Sapphire et l'Advia du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires

	Sapphire	Advia
Nombres d'échantillons avec amas analysés	31	50
Nombres d'augmentations du nombre de plaquettes avec PAF-5	26	41
Augmentation moyenne de la numération plaquettaire sur l'ensemble des échantillons analysés	62,8%	38,2%
Augmentation moyenne de la numération plaquettaire seulement sur les échantillons dont la numération plaquettaire augmente	83%	54%
Significativité de la différence observée entre les numérations sans et avec PAF-5 (Wilcoxon)	$p < 0,01$	$p < 0,01$

Tableau 10 : Résultats sur Sapphire et l'Advia du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires en tenant compte de la dilution

	M511
Nombres d'échantillons avec amas analysés	44
Nombres de diminution du pourcentage de plaquettes en amas avec PAF-5	35
Diminution moyenne du pourcentage de plaquettes en amas sur l'ensemble des échantillons analysés	27%
Diminution moyenne du pourcentage de plaquettes en amas seulement sur les échantillons dont le pourcentage de plaquette en amas a diminué	54%
Significativité de la différence observée entre les valeurs sans et avec PAF-5 (Wilcoxon)	p<0,001

Tableau 11: Résultats sur M511 du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires

En routine, on peut trouver des échantillons avec des amas plaquettaires et une numération plaquettaire diminuée mais restant haute. Dans ces cas, la présence d'amas plaquettaires va moins influencer sur la prise en charge qu'en cas d'amas plaquettaires avec une numération plaquettaire basse. Le PAF-5 se doit donc d'être particulièrement efficace sur ces cas de fausses thrombopénies. Si on concentre nos observations sur les échantillons avec une thrombopénie, parmi les 58 échantillons avec des amas ; on trouve les résultats suivants :

- Sur le Sapphire 22 échantillons avec des amas significatifs présentaient avant l'ajout de PAF-5 une numération inférieure à 120 G/L. Sur ces 22 échantillons, l'augmentation de la numération plaquettaire est en moyenne de 68% et seulement 4 échantillons présentaient une diminution de leur numération plaquettaire (dont 2 concernaient la même patiente)

- Sur les Advia, 29 échantillons avec des amas significatifs présentaient avant l'ajout de PAF-5 une numération inférieure à 120 G/L. Sur ces 29 échantillons, l'augmentation moyenne de la numération plaquettaire est de 43% et seulement 9 échantillons présentaient une diminution de leur numération plaquettaire (dont 3 correspondant à une même patiente, et 2 autres correspondant à une autre patiente).

- Sur le M511, les échantillons avec des amas plaquettaires significatifs vont présenter une numération plaquettaire non abaissée. Nous avons donc sélectionné les 22 échantillons précédents du Sapphire avec une thrombopénie inférieure à 120 G/L et les 29 de l'Advia. Ainsi sur les 22 échantillons sélectionnés avec le Sapphire, le pourcentage de plaquettes en amas diminuait en moyenne de 44%. Avec l'Advia, 24 avaient été passés sur le M511, le pourcentage de plaquettes en amas diminuait en moyenne de 8% (pour 7 échantillons il augmente, ces 7 échantillons correspondent à 3 mêmes patients). Ainsi en excluant ces 7 échantillons la diminution est en moyenne de 50%. Au total en regroupant l'ensemble des échantillons dont la numération est inférieure à 120G/L sur Sapphire ou sur Advia, on totalise 33 échantillons passés sur le M511 (parmi les 22 passés sur Sapphire et 29

passés sur Advia, certains sont en effet identiques). Sur ces 33 échantillons, on retrouve une diminution moyenne du pourcentage de plaquettes en amas de 20% et de 54% si l'on exclut les échantillons avec une augmentation du pourcentage de plaquettes en amas.

Nous avons également vérifié sur ces échantillons présentant une thrombopénie, la significativité des différences observées entre les numérations plaquettaires sans et avec PAF-5 sur chaque automate et entre les pourcentages de plaquettes en amas sans et avec PAF-5. Une différence significative a été observée dans les deux situations à l'aide du test de Wilcoxon.

	Sapphire	Advia
Nombres d'échantillons avec amas analysés et une thrombopénie	22	29
Nombres d'augmentations du nombre de plaquettes avec PAF-5	18	20
Augmentation moyenne de la numération plaquettaire sur l'ensemble des échantillons analysés avec une thrombopénie	68%	43%
Augmentation moyenne de la numération plaquettaire seulement sur les échantillons dont la numération plaquettaire augmente	96%	74%
Significativité de la différence observée entre les numérations sans et avec PAF-5 (Wilcoxon)	p<0,01	p<0,02

Tableau 12:Résultats sur Sapphire et l'Advia du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires et une thrombopénie <120G/L

	M511
Nombres d'échantillons avec amas analysés et avec thrombopénie	33
Nombres de diminution du pourcentage de plaquettes en amas avec PAF-5	25
Diminution moyenne du pourcentage de plaquettes en amas sur l'ensemble des échantillons analysés avec thrombopénie	20%
Diminution moyenne du pourcentage de plaquettes en amas seulement sur les échantillons dont le pourcentage de plaquette en amas a diminué	54%
Significativité de la différence observée entre les valeurs sans et avec PAF-5 (Wilcoxon)	p<0,01

Tableau 13:Résultats sur M511 du PAF-5 sur des échantillons avec amas plaquettaires et une thrombopénie <120G/L

55 échantillons sur l'ensemble des 112 tubes sélectionnés ne présentent pas d'amas significatifs. On a voulu vérifier que sur ces cas, pour lesquels on avait rajouté le PAF-5, la numération plaquettaire restait inchangée. De la même manière le test de Wilcoxon a été appliqué sur les numérations plaquettaires et le pourcentage de plaquettes en amas.

Les résultats montrent pour le Sapphire que sur 28 échantillons les valeurs sans et avec PAF-5 sont significativement différentes avec une valeur $p < 0,001$. Les valeurs avec PAF-5 étant presque toujours inférieures aux valeurs sans PAF-5. On pourrait l'expliquer par la légère dilution induite par l'ajout de PAF-5. On a donc corrigé les valeurs de numération après ajout de PAF-5 pour s'affranchir de la sous-estimation liée à la dilution. Dans ce cas les résultats montrent qu'il y a certes toujours une différence significative entre les numérations plaquettaires avant et après PAF-5 en tenant compte de la dilution, mais avec une valeur p à 0,04 au test de Wilcoxon. La significativité des différences paraît donc bien moindre. On peut supposer de ce résultat que les valeurs augmentées après l'ajout de PAF-5 sur les échantillons avec amas sont probablement encore plus haute que celles qu'on obtient de fait de la légère dilution. On peut donc considérer que l'efficacité du PAF-5 est meilleure que ce qu'on observe sur les échantillons avec amas et que cela est légèrement masqué par la dilution liée à l'ajout de PAF-5.

Pour les 51 échantillons passés sur Advia, la valeur p est de $1,16 \times 10^{-5}$; en faveur donc également d'une différence très significative entre les valeurs sans et avec PAF-5. De plus, par rapport au Sapphire, il faut noter qu'on a pu passer plus d'échantillons ce qui donne un aspect probablement plus représentatif. Pour ces échantillons la légère dilution induite par l'ajout du réactif semble avoir de la même façon abaissée globalement et significativement le nombre de plaquettes mais de façon inégale selon les échantillons. En corrigeant les numérations plaquettaires pour s'affranchir de la dilution, on a constaté encore une différence significative dans ce cas au test de Wilcoxon (mais avec une valeur p bien plus haute à 0,02).

De même, pour le M511 sur les numérations de plaquettes on retrouve une différence significative, la valeur p étant de $2,99 \times 10^{-5}$ pour la numération. Cette sous-estimation toujours attribuable à la dilution car on n'observe plus de différence significative (test de Wilcoxon avec une valeur p à environs 0,01 après correction des valeurs de numération plaquettaires sur les échantillons avec PAF-5).

Le fait qu'il persiste une différence significative entre les numérations avant et après PAF-5 (en tenant compte de l'effet de dilution), avec une légère baisse du nombre de plaquettes après PAF-5, peut être attribuée au délai d'analyse légèrement supérieur pour les échantillons avec PAF-5. Or plus le délai d'analyse augmente, plus le nombre de plaquettes a tendance à diminuer. On constate d'ailleurs une absence de différence significative, avec une valeur p de 0,38, pour le pourcentage de plaquettes en amas (avant et après PAF-5), paramètre indépendant de la dilution et du délai d'analyse.

Ces résultats sur des échantillons sans amas, montrent donc que les numérations plaquettaires baissent de manière significative après ajout du PAF-5. Cet effet semble en grande partie dû à la dilution induite par l'ajout de PAF-5 mais probablement aussi au délai d'analyse plus long lorsqu'on passe les tubes avec PAF-5. Ces résultats signifient que l'augmentation des numérations plaquettaires

observée après ajout de PAF-5 sur les échantillons avec amas est probablement encore plus nette si on tient compte de la dilution induite par le PAF-5.

Enfin, il a été observé des résultats inattendus où l'ajout de PAF-5 ne diminuait pas le pourcentage de plaquettes en amas sur le M511, et même l'augmentait ; avec en parallèle une diminution du nombre de plaquettes après ajout de PAF-5. Cela concernait huit échantillons, dont certains appartenant au même patient et suggérant donc que le phénomène serait lié à un ou des facteurs individuels. Nous avons donc étudié ces différents cas, en recherchant leurs antécédents, leurs traitements, leurs motifs d'hospitalisation. Nous y reviendrons dans les prochains paragraphes.

II.4. Discussion

II.4.1. Amas plaquettaires rendus par le laboratoire

Ces résultats montrent premièrement que notre laboratoire aurait tendance à surestimer la présence d'amas. Cette surestimation s'explique par le fait qu'il s'agit d'un résultat opérateur-dépendant. De plus la recherche d'amas est relativement fréquente car elle s'effectue face à toute nouvelle thrombopénie inférieure à 120 G/L non connue ou dont les comptes antérieurs datent de plus de 3 mois, même en l'absence d'alarme « plt clmp » générée par l'automate.

Effectivement, en théorie, un échantillon avec une thrombopénie et pour lequel on trouve sur le frottis seulement 3 plaquettes regroupées pourrait être rendu en amas. De plus certains amas peuvent se former lors d'un étalement difficile sur lame.

Le service dispose désormais de nouveaux automates dont les règles de réalisation de frottis sont différentes, notamment en cas de suspicion d'amas. Ces changements devraient permettre de limiter le rendu, peut-être autrefois excessif, d'échantillons en amas.

Nous rendons, en cas d'amas de plaquettes, le résultat « en amas » pour la numération plaquettaire avec le résultat par défaut du compte de plaquettes (faussé, mais qu'on estime plus bas que le compte plaquettaire réel), en commentaire. Il pourrait être discuté de quantifier l'importance de ces amas, afin d'avoir une idée plus précise de la valeur réelle de la numération plaquettaire. Il pourrait s'agir d'apporter une information semi-quantitative supplémentaire. Cependant, on risque de se heurter à des variations inter-opérateurs. On constate donc que dans ce domaine, la technologie du M511 présente un intérêt non négligeable. Effectivement, avec cet automate, la numération plaquettaire n'est pas faussée par la présence d'amas, et il est capable de les quantifier en apportant le pourcentage de plaquettes amas.

II.4.2. Efficacité du PAF-5

Globalement les résultats du réactif mis au point par Horiba® sont encourageants. Bien que notre étude ait porté sur un nombre restreint d'échantillon en amas (58 au total), nous pouvons dégager certaines tendances. D'une part l'ajout

de PAF-5 permet généralement d'augmenter la numération plaquettaire si l'échantillon présente des amas. Ce phénomène est en faveur d'une efficacité du réactif car il suggère que les plaquettes en amas auparavant et non comptées par l'automate se sont désagrégées et peuvent être comptées. La diminution significative du pourcentage de plaquettes en amas, donné par le M511, sur ces échantillons le prouve. De plus cette augmentation du nombre de plaquette de 54% en moyenne sur Advia et de 79% en moyenne sur Sapphire est statistiquement significative. Le réactif, s'il était amené à être utilisé en routine, serait plus souvent utilisé sur des échantillons affichant une thrombopénie. Nous avons donc vérifié que les résultats d'augmentation de plaquettes étaient similaires seulement sur les échantillons avec moins de 120 G/L de plaquettes, ce qui était bien le cas.

Cette augmentation est toutefois diminuée si on inclut certains échantillons pour lesquels la numération n'évolue pas, voire diminue. Or on a remarqué également pour ces échantillons que le pourcentage de plaquettes en amas rendus par le M511 ne diminuait pas, voire augmentait. En étudiant ces échantillons on remarque que certains appartiennent à un même patient. Le fait que cela concerne différents échantillons de mêmes patients permet d'écarter plus facilement l'hypothèse d'une erreur de manipulation (comme l'oubli de rajout de réactif PAF-5). Nous avons tenté de rechercher si un facteur commun à chaque patient pouvait expliquer ce résultat inattendu. Nous avons essayé de prendre en compte un certain nombre d'informations concernant les antécédents, le contexte clinique et le traitement de chacun de ces patients. Mais nous ne sommes pas parvenus à dégager un facteur commun particulier qui serait partagé par chacun de ces patients et expliquerait la persistance et l'accroissement des amas en présence de PAF-5. Aucune de ces informations concernant chacun de ces 7 échantillons n'a pu nous faire évoquer une interférence dans l'action du PAF-5. Une étude plus approfondie et sur plus de patients reprenant systématiquement certaines informations concernant les patients (traitement, antécédents médicaux, motif d'hospitalisation) serait utile afin de mettre en évidence les éléments pouvant interférer dans l'action du PAF-5 et ainsi trouver des contre-indications à l'utilisation du PAF-5.

Enfin nous avons observé que même lorsque le pourcentage de plaquettes en amas diminuait, il n'atteignait pas 0% et restait parfois élevé. En effet sur certains échantillons l'action du PAF-5 semblait avoir bien eu lieu mais de façon incomplète pour éliminer l'ensemble des amas. En effet sur certains échantillons, le pourcentage de plaquettes en amas a diminué mais reste supérieur à 5 voire 10% après l'ajout de PAF-5. Cette différence pourrait signifier que certains échantillons présentant un pourcentage élevé de plaquettes en amas nécessiteraient des volumes plus importants de PAF-5 pour désagréger entièrement les amas. A partir, de nos résultats on peut donc supposer que l'efficacité du PAF-5 serait dose-dépendante. Une autre étude avec plusieurs doses de PAF-5 serait intéressante pour vérifier cette hypothèse.

II.5. Conclusion

Les résultats d'augmentation de la numération plaquettaire par ajout de PAF-5 étaient concordants avec la diminution de plaquettes en amas observé sur le M511 en parallèle et nous conforte sur l'efficacité d'action du réactif. Cependant, pour une petite part des échantillons le PAF-5 n'apparaît pas utile voire contre-productif. Nous n'avons pas été en mesure de déterminer les conditions dans lesquelles le PAF-5 pouvait être inefficace, mais il serait intéressant de poursuivre l'étude à plus grande échelle pour les mettre en évidence. De même il pourrait être utile de compléter l'étude pour rechercher un caractère dose-dépendant à l'efficacité du PAF-5.

Références bibliographiques

1. Kratz A, Brugnara C. Automated Hematology Analyzers: State of the Art. Clin Lab Med. mars 2015;35(1):xiii-xiv.
2. Chabot-Richards DS, George TI. White Blood Cell Counts. Clin Lab Med. mars 2015;35(1):11-24.
3. Digital imaging in hematology [Internet]. Medical Laboratory Observer. [cité 10 juill 2019]. Disponible sur: <https://www.mlo-online.com/home/article/13004427/digital-imaging-in-hematology>
4. Lacombe F, Vial J-P, Belloc F, Praloran V. La cglom Irie en IluH : des automates. :8.
5. Imbert M, Jouault H. Hémogramme : réalisation par un automate. EMC - Biol Médicale. janv 2006;1(3):1-10.
6. Godon A, Genevieve F, Marteau-Tessier A, Zandecki M. Automated hematology analysers and spurious counts; Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes. Ann Biol Clin (Paris). mars 2012;70(2):155-68.
7. Babics et Sanchez - 2015 - Anomalie de la numération sanguine par interférence.pdf [Internet]. [cité 20 sept 2019]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/profile/Carole_Sanchez2/publication/280923363_Anomalie_de_la_numeration_sanguine_par_interference/links/55cb68d608aeca747d6c18bb/Anomalie-de-la-numeration-sanguine-par-interference.pdf
8. Tessier-Marteau A, Geneviève F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. In 2010. Ann Biol Clin 2012 ; 70 (2) : 155-68
9. Babics A, Sanchez C. Anomalie de la numération sanguine par interférence. Feuill Biol. 2015;5.
10. Labriffe M. Validation initiale des performances du microscope automatisé DM1200 et application dans le suivi pronostique du sepsis = Initial validation of the automated microscope DM1200 and application in prognostic follow-up of septic patients [Internet]. Limoges; 2018 [cité 27 juill 2019]. Disponible sur: <http://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/unilim-ori-82722>
11. Debougogne A, Latger-Cannard V, Montagne K, Plénat F, Lecompte TP. [A marginal zone-B cell lymphoma revealed by platelet satellitism and lympho-agglutination phenomenon around atypical lymphocytes]. Ann Biol Clin (Paris). 2007;65(3):287-90.
12. Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard [Internet]. [cité 17 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
13. SH-GTA-04.pdf [Internet]. [cité 27 juill 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
14. Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. :9.
15. SH-GTA-14.pdf [Internet]. [cité 28 juill 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>
16. 510(k) Premarket Notification [Internet]. [cité 18 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm>
17. Diagnostics R. System analytical performance characteristics. :18.
18. Class 2 Device Recall cobas m 511 integrated hematology analyzer [Internet]. [cité 7 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfRES/res.cfm?id=165298>
19. Joly P, Pondarré C, Badens C. [Beta-thalassemias: molecular, epidemiological, diagnostic and clinical aspects]. Ann Biol Clin (Paris). 2014;72(6):639-68.
20. Xiao Y, Yu S, Xu Y. The Prevalence and Biochemical Profiles of EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia in a Generally Healthy Population. Acta Haematol. 2015;134(3):177-80.
21. Cheminant M, Delarue R. Prise en charge diagnostique et thérapeutique d'un patient

- porteur d'une thrombocytose. *Rev Médecine Interne*. août 2013;34(8):465-71.
22. pour le groupe d'experts, Souweine B, Van der Linden T, Dupic L, Soufir L, Meyer P. Prise en charge des thrombopénies en réanimation (pathologies gravidiques exclues). Recommandations formalisées d'experts sous l'égide de la Société de réanimation de langue française (SRLF), avec la participation du Groupe francophone de réanimation et urgences pédiatriques (GFRUP) et du Groupe d'étude hémostasie thrombose (GEHT) de la Société française d'hématologie (SFH). *Réanimation*. mai 2011;20(3):264-70.
 23. Compte rendu m511 - Nancy AtoutBio - Aout 2018 XO .docx.
 24. Harris N, Kunicka J, Kratz A. The ADVIA 2120 Hematology System: Flow Cytometry-Based Analysis of Blood and Body Fluids in the Routine Hematology Laboratory. *Lab Hematol*. 1 mars 2005;11(1):47-61.
 25. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier M-F, Courtade-Saïdi M, Vincent S, et al. Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa : revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. *Ann Pathol*. août 2015;35(4):294-305.
 26. Green R, Wachsmann-Hogiu S. Development, History, and Future of Automated Cell Counters. *Clin Lab Med*. mars 2015;35(1):1-10.
 27. Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 1 janv 2012 [cité 31 août 2019];50(8). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2012.50.issue-8/cclm-2012-0081/cclm-2012-0081.xml>
 28. Chen G, Fei X, Ling J. The Effects of Aminoglycoside Antibiotics on Platelet Aggregation and Blood Coagulation. *Clin Appl Thromb*. sept 2012;18(5):538-41.
 29. Ahn HL, Jo YI, Choi YS, Lee JY, Lee HW, Kim SR, et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. *Korean J Intern Med*. mars 2002;17(1):65-8.
 30. Konstantinidou V, Vagdatli E, Eleftheriou F, Tsikopoulos A, Seremetidou A, Doutsaridou F, et al. Reversal of platelet aggregation by supplementation with amikacin in vitro. *Arch Hell Med*. 1 janv 2017;34:86-90.
 31. Lin J, Luo Y, Yao S, Yan M, Li J, Ouyang W, et al. Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia. *J Clin Lab Anal*. sept 2015;29(5):419-26.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

Evaluation de nouvelles technologies en hématimétrie: automate Roche® M511 et réactif de désagrégation plaquettaire Horiba® PAF-5

Les technologies des automates pour la NFS ne cessent d'évoluer. Les nouvelles, comme l'automate M511, doivent donc être évaluées. En effet il réalise des impressions en monocouche cellulaire à partir d'un échantillon sanguin sur une lame, la colore et l'analyse à l'aide de microscopes intégrés avant de rendre un résultat d'hémogramme complet. Notre étude a montré que ses performances étaient satisfaisantes pour les paramètres de NFS et que la majorité des résultats étaient comparables à ceux obtenus avec le Sapphire (Abbott®) et l'Advia (Siemens®). Une des différences observées concerne les valeurs de CCMH. Notre étude a aussi révélé que les images de cellules atypiques (dans différents contextes cliniques, dont les hémopathies) après impression et coloration par le M511 n'étaient pas assez discriminantes pour identifier ces cellules et donc livrer une information intéressante au clinicien. Cette difficulté provient de la coloration réalisée par le M511. Mais le M511 présente des atouts (dont la mesure du pourcentage de plaquettes en amas) qui nous ont servi à évaluer le PAF-5 (Horiba®). Ce réactif ajouté au sang d'échantillons présentant des amas plaquettaires liés à l'EDTA va désagréger les plaquettes en amas et permettre la numération des plaquettes auparavant sous-estimée par la présence d'amas. Notre étude révèle l'efficacité de ce PAF-5 sur une majorité d'échantillons ; mais aussi une inefficacité chez certains patients sans qu'une cause clinique ou médicamenteuse ne soit trouvée dans ces cas.

Mots-clés : M511, évaluation, NFS, Roche, automate, frottis, cytologie sanguine, coloration, étaleur-colorateur, numérisation, amas plaquettaires, PAF-5, Horiba

Evaluation of new technologies in haematimetry: CBC automated analyser Roche® M511 and platelets clumps disintegration reagent Horiba® PAF-5

Technologies for CBC are constantly evolving. Some news, such as the M511 automated analyser, must be evaluated. In fact, it performs cell monolayer printing from a blood sample on a slide, stains and analyzes it using integrated microscopes before displaying a CBC result. Our study showed that the performance of M511 was satisfactory for CBC parameters and that the vast majority of results were comparable to those obtained with Sapphire (Abbott®) and Advia (Siemens®). One of the differences observed concerns the values of MCHC. Our study also revealed that images of atypical cells (in different clinical contexts, especially blood disorders) after M511 printing and staining were not discriminating enough to identify these cells and thus transmit interesting information to the clinician. This difficulty comes from the coloring done by the M511. But the M511 has assets (such as measuring the percentage of platelets in clumps) that we used to evaluate the PAF-5 (Horiba®). This reagent added to the sample blood in EDTA tube will break up the platelets clumps and thus allow platelet counts. Our study reveals the efficacy of this PAF-5 on a majority of samples; but also an inefficiency in some patients without a clinical or drug cause being found in these cases.

Keywords : M511, evaluation, Roche, automated analyser, smear, blood cytology, staining, stainer-colorator, scannin, platelets clumps, PAF-5, Horiba

