



HAL
open science

Évaluation du DM96[®] dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes

Stephanie David

► **To cite this version:**

Stephanie David. Évaluation du DM96[®] dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01496032

HAL Id: dumas-01496032

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01496032>

Submitted on 27 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2015-2016

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
et le Mémoire de D.E.S de Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement le 14 octobre 2016

par Stéphanie DAVID

(née BOULANGER)

Née le 20 décembre 1986 à Rouen

**Evaluation du DM96[®] dans l'identification et la
quantification des cellules anormales circulantes**

Président du jury : Pr. Loïc FAVENNEC PU-PH de Parasitologie

Directeur de Thèse : Dr. Gérard BUCHONNET MCU-PH d'Hématologie

Membres du jury : Pr. Fabrice JARDIN PU-PH d'Hématologie Clinique

Dr. Sylvie DALIPHARD PH d'Hématologie

Dr. Marion DAVID PH Centre Henri BECQUEREL

Remerciements

A Monsieur le Professeur Loïc FAVENNEC,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Fabrice JARDIN,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime.

A Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET,

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide et votre écoute tout au long de ce travail.

Je vous remercie également pour votre participation active à ce projet notamment par la relecture des frottis sanguins.

Un grand merci pour tout ce que vous m'avez appris tout au long de ces années. Je garderai un souvenir heureux de mon passage en Hématologie.

A Madame le Docteur Sylvie DALIPHARD,

Je te remercie de participer à ce jury de thèse.

Un grand merci pour ta participation active dans cette aventure.

Nous ne manquerons pas de rester en contact notamment par l'intermédiaire du réseau ANDRAL quand je ne parviendrai pas à identifier une cellule.

Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour ta disponibilité.

PS : J'espère ne pas avoir fait de fautes d'orthographe, sinon tu vas me le dire.

A Madame le Docteur Marion DAVID,

Je te remercie de participer à ce jury de thèse et pour m'avoir autorisé à récupérer des échantillons sanguins de patients avec lesquels j'ai fait les trois quarts de la thèse.

A tous les autres biologistes, techniciens et secrétaires avec qui j'ai travaillé durant ces cinq années,

Un grand merci pour votre accueil et pour tout ce que vous m'avez appris.

Je remercie en particulier Monsieur Danny BIGOT pour m'avoir formé à être une bonne technicienne pour pouvoir prendre des gardes (enfin j'espère) et pour m'avoir formé à l'utilisation du DM96®.

Je remercie aussi les techniciens du laboratoire de Biologie médicale du centre Henri BECQUEREL, Caroline, Céline et Pierre pour votre disponibilité et votre gentillesse d'avoir mis de côté des échantillons de sang tous les jours pour ma thèse.

A tous mes collègues internes (devenus chef pour certains),

Je vous remercie pour les bons moments passés ensemble.

Même si je pars de l'autre côté de la Seine, donnez moi de vos nouvelles !

Un merci à Paul. Nous avons commencé notre internat ensemble et même si tu m'embêtes souvent, nous avons bien rigolé.

Merci aussi à Jovani. Quel dommage pour tu partes au Liban. J'espère que tu seras heureux chez ta maman ! Tu vas me manquer.

A mon mari,

Je te remercie pour ces huit années passées ensemble (j'ai recompté, le compte doit être correct !) et toutes celles à venir bien sûr.

Je ne sais pas ce que je ferais sans toi.

A mes amis,
A ma famille,
A mes parents,
A ma sœur et mon beau-frère,

Merci beaucoup d'être à mes côtés.

J'ai beaucoup de chances.

**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen
n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans
cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs ».**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumaya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOV	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>sumembre</i>)	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOV	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (<i>sumembre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire

Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANNOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>sumorbre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE (<i>sumorbre</i>)	HCN	Urologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GULLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Jean-François MUR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Dider PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Me Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMON	HCN	Réanimation Médicale
Mr Luc THIBERMILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VTTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mme Rachel MARION-LETELLIER	UFR	Physiologie
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Christine RONDANINO	UFR	Physiologie de la Reproduction
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEAIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdesslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER	Statistiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE-BOUCHER	Pharmacologie

Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Sandrine DAHOT	Bactériologie
---------------------------	---------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Souleymane ABDOUL-AZIZE	Biochimie
Mme Hanane GASMI	Galénique
Mme Caroline LAUGEL	Chimie organique
Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUMARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Sergueï FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GALDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HON - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BCS GULLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPFR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

Table des matières

Liste des tableaux	16
Liste des figures	17
Table des abréviations.....	20
Introduction.....	22
1. Définition des cellules anormales circulantes	23
2. Origine des cellules anormales circulantes	28
2.1. Brève présentation des hémopathies à l'origine des cellules anormales circulantes.....	28
2.1.1. Les hémopathies myéloïdes	28
2.1.2. Les hémopathies lymphoïdes	29
2.2. Hémopathies à l'origine de cellules blastiques circulantes.....	30
2.3. Hémopathies à l'origine de cellules lymphoïdes anormales.....	34
3. Intérêt de l'identification des cellules anormales circulantes.....	36
4. Méthodes d'identification des cellules anormales circulantes au laboratoire	38
4.1. Place des analyses automatisées.....	38
4.2. Principe de l'impédance	38
4.3. Principe de la mesure optique par cytométrie en flux.....	39
4.4. Place de la microscopie	43
4.4.1. Qualité du frottis	43
4.4.2. Qualité de la coloration	45
4.4.2.1. Aspect morphologique des leucocytes normaux	48
4.4.2.2. Aspect morphologique des cellules blastiques	51
4.4.2.3. Aspects morphologiques des cellules lymphoïdes anormales	55
4.4.2.3.1. Aspects morphologiques des SLP-B.....	56
4.4.2.3.2. Aspects morphologiques des SLP-T	63
4.4.3. Bonnes pratiques de lecture d'un frottis sanguin	65
4.4.4. Règles de revue microscopique des frottis sanguins	66
4.5. Place des systèmes experts	70
4.5.1. Présentation de l'Hématoflow®.....	70
4.5.2. Les microscopes automatisés	73
4.5.2.1. Le DM96® de Cellavision.....	74
4.5.2.2. Place du DM96® au CHU de Rouen	82
4.6. Place des techniques d'analyses complémentaires	86
5. Matériels et Méthodes.....	87
5.1. Design de l'étude.....	87
5.2. Patients.....	89

5.3.	Etudes statistiques.....	89
6.	Résultats	90
6.1.	Evaluation des performances du DM96® brut.....	90
6.2.	Evaluation du DM96® après reclassement.....	96
6.3.	Variations de performances d'un cytologiste naïf entre le microscope et le DM96.....	99
7.	Discussion	101
8.	Conclusion et perspectives	106
9.	Annexe.....	107
9.1.	Annexe 1 : Corrélation entre un cytologiste naïf et des cytologistes experts avec le DM96®.....	107
9.2.	Annexe 2 : Corrélation entre un cytologiste naïf et des cytologistes experts avec la microscopie conventionnelle.....	112
10.	Références bibliographiques	117

Liste des tableaux

Tableau n°I : Tableau récapitulatif des principales hémopathies à l'origine de la diffusion de cellules blastiques dans le sang

Tableau n°II : Classification OMS des LA d'après D. A. ARBER

Tableau n°III : Classification FAB des LAM d'après A. STEIGER

Tableau n°IV : Tableau récapitulatif des principales hémopathies à l'origine de la diffusion de cellules lymphoïdes anormales dans le sang d'après SH. SWERDLOW

Tableau n°V : Intérêts et limites des analyses automatisées

Tableau n°VI : Coloration des éléments cellulaires au MGG d'après A. STEIGER

Tableau n°VII : Règles de revue microscopique des frottis sanguins par les techniciens du laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen

Tableau n°VIII : Intérêts et limites de l'analyse microscopique

Tableau n°IX : Table de Rümke

Tableau n°X : Intérêts et limites de l'Hématoflow®

Tableau n°XI : Intérêts et limites du DM96®

Tableau n°XII : Cohorte utilisée pour l'étude de corrélation des anomalies quantitatives de la formule sanguine entre le XE 5000®, le DM96® et l'analyse microscopique

Tableau n°XIII : Cohorte de patients utilisée dans cette étude

Tableau n°XIV : Evaluation des performances brutes du DM96®

Tableau n°XV : Evaluation des performances brutes du DM96® dans le cas particulier des LAM et des LAL

Tableau n°XVI : Etude de corrélation entre le DM96® et le microscope

Liste des figures

- Figure n°1** : Aspects morphologiques de cellules blastiques
- Figure n°2** : L'hématopoïèse et la lymphopoïèse
- Figure n°3** : Aspects morphologiques de cellules lymphoïdes anormales
- Figure n°4** : Aspect morphologique d'érythroblastes circulants
- Figure n°5** : Aspects morphologiques de la myélémie
- Figure n°6** : Aspects morphologiques des cellules mononucléées
- Figure n°7** : Aspects morphologiques de leucocytes issus du processus de dysgranulopoïèse
- Figure n°8** : Schéma récapitulatif des principales hémopathies myéloïdes
- Figure n°9** : Schéma récapitulatif des principales hémopathies lymphoïdes
- Figure n°10** : Aspects morphologiques des LAL
- Figure n°11** : Aspects morphologiques des LAM
- Figure n°12** : Aspect morphologique de la leucémie aiguë à cellules dendritiques plasmacytoïdes d'après M. IMBERT
- Figure n°13** : Aspects morphologiques des SLP-B
- Figure n°14** : Aspects morphologiques des SLP-T
- Figure n°15** : Principe de la détermination du taux de leucocytes par impédance
- Figure n°16** : Principe de la formule sanguine par mesure optique
- Figure n°17** : Réalisation d'un frottis de couche mince en manuel
- Figure n°18** : Exemple de frottis sanguins de bonne et de mauvaise qualité
- Figure n°19** : Description morphologique d'une cellule avec le critère « taille » d'après A. STEIGER
- Figure n°20** : Description morphologique d'une cellule avec le critère « forme du noyau » d'après A. STEIGER
- Figure n°21** : Description morphologique d'une cellule avec le critère « densité de la chromatine » d'après A. STEIGER
- Figure n°22** : Description morphologique d'une cellule avec le critère « couleur du cytoplasme » d'après A. STEIGER
- Figure n°23** : Description morphologique d'une cellule avec le critère « inclusion cytoplasmique » d'après A. STEIGER
- Figure n°24** : Aspect morphologique du PNN
- Figure n°25** : Aspect morphologique du PNE
- Figure n°26** : Aspect morphologique du PNB
- Figure n°27** : Aspect morphologique du monocyte
- Figure n°28** : Aspects morphologiques du lymphocyte
- Figure n°29** : Aspect morphologique des lymphocytes chez le nouveau-né et l'enfant d'après E. LAINEY
- Figure n°30** : Aspect morphologique des cellules mononucléées
- Figure n°31** : Aspect morphologique des cellules plasmocytaires
- Figure n°32** : Caractéristiques morphologiques générales des cellules blastiques
- Figure n°33** : Aspects morphologiques des LAL
- Figure n°34** : Distinction entre un petit lymphoblaste et un lymphocyte

Figure n°35 : Aspects morphologiques des LAM

Figure n°36 : Aspect morphologique d'une leucémie aiguë à monoblastes d'après M. IMBERT

Figure n°37 : Distinction entre une cellule blastique et une cellule mononucléée

Figure n°38 : Aspect morphologique d'un micromégacaryocyte d'après O. WAGNER-BALLON

Figure n°39 : Caractéristiques morphologiques générales des cellules lymphoïdes anormales

Figure n°40 : Aspects morphologiques des SLP- B

Figure n°41 : Aspect morphologique de la LLC d'après L. BASEGGIO

Figure n°42 : Distinction entre un lymphocyte de LLC et un lymphocyte normal

Figure n°43 : Aspect morphologique des ombres de Gumprecht

Figure n°44 : Aspect morphologique de la LLC atypique d'après L. BASEGGIO

Figure n°45 : Aspect morphologique de la LPL-B

Figure n°46 : Aspect morphologique du LCM d'après L. BASEGGIO

Figure n°47 : Aspect morphologique du LF d'après L. BASEGGIO

Figure n°48 : Aspect morphologique du LZM d'après L. BASEGGIO

Figure n°49 : Aspect morphologique de lymphocytes villeux d'après L. BASEGGIO

Figure n°50 : Aspect morphologique de la LT

Figure n°51 : Aspect morphologique du LB d'après H. MOSSAFA

Figure n°52 : Aspect morphologique du DLBCL

Figure n°53 : Aspects morphologiques des SLP-T

Figure n°54 : Aspect morphologique de la LGL

Figure n°55 : Aspect morphologique de la LPL-T

Figure n°56 : Aspect morphologique de la ATLL

Figure n°57 : Aspect morphologique du SS

Figure n°58 : Aspect morphologique du lymphome T anaplasique

Figure n°59 : Méthodologie utilisée pour l'analyse d'un frottis sanguin

Figure n°60 : Règles de revue microscopique des frottis sanguins par les biologistes du CHU de Rouen

Figure n°61 : Modalités de validation de la formule sanguine après lecture au microscope

Figure n°62 : Principe de la cytométrie en flux d'après M. BROWN

Figure n°63 : Principe de l'identification et de la quantification des populations leucocytaires par l'Hématoflow® d'après A. KIM

Figure n°64 : Principe de l'identification des leucocytes par les microscopes automatisés d'après JM. PREWITT

Figure n°65 : Le DM96®

Figure n°66 : Pré-classement des leucocytes par le DM96®

Figure n°67 : Classement des leucocytes par l'opérateur

Figure n°68 : Morphologie érythrocytaire avec le DM96®

Figure n°69 : Dénombrement du taux plaquettaire par l'opérateur avec l'aide du DM96®

Figure n°70 : Zoom numérique d'une cellule blastique par le DM96®

Figure n°71 : Propositions de classement du DM96®

Figure n°72 : Étude de corrélation des anomalies quantitatives de la formule sanguine entre le XE 5000®, le DM96® et l'analyse microscopique

Figure n°73 : Place du DM96® dans la chaîne analytique

Figure n°74 : Modalités de validation de la formule sanguine après lecture au DM96®

Figure n°75 : Aspect morphologique de la positivité de la myéloperoxydase

Figure n°76 : Aspect morphologique de la positivité de la butyrate estérase

Figure n°77 : Design de l'étude

Figure n°78 : Ensemble des études de corrélation menées

Figure n°79 : Catégories regroupant les faux-négatifs des cellules blastiques circulantes

Figure n°80 : Catégories regroupant les faux-négatifs des cellules blastiques lymphoïdes

Figure n°81 : Catégories regroupant les faux-négatifs des cellules blastiques myéloïdes

Figure n°82 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux

Figure n°83 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du LCM

Figure n°84 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du LZM

Figure n°85 : Catégories regroupant les faux-négatifs des ombres de Gumprecht

Figure n°86 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du LF

Figure n°87 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du lymphome T anaplasique

Figure n°88 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du SS

Figure n°89 : Corrélation entre le DM96® et le microscope

Figure n°90 : Suivi des performances du DM96® : exemple d'une LAM 2

Figure n°91 : Corrélation entre les lectures au microscope et au DM96® de SBD, GB et SD.

Figure n°92 : Corrélation entre toutes les lectures effectuées

Figure n°93 : Difficultés d'individualisation des cellules en cas de leucocytose importante

Figure n°94 : Différences d'aspect morphologique entre le DM96® et le microscope

Figure n°95 : Identification aisée des atypies cellulaires

Table des abréviations

AREB	: Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes
ATLL	: Leucémie / Lymphome T de l'Adulte
CIVD	: Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
DLBCL	: Lymphome Diffus à Grandes Cellules B
EDTA	: Éthylène Diamine Tétra-Acétique
FAB	: Franco Américano Britannique
GB	: Dr. Gérard BUCHONNET
GFHC	: Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire
LAI-T	: Lymphome T Angio-Immunoblastique
LAL	: Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM	: Leucémie Aiguë Myéloïde
LA pDC	: Leucémie Aiguë à Cellules Dendritiques Plasmocytoïdes
LB	: Lymphome de Burkitt
LCM	: Lymphome à Cellule du Manteau
LDPRR	: Lymphome diffus de la pulpe rouge de la rate
LF	: Lymphome Folliculaire
LGL	: Leucémie à Grands Lymphocytes granuleux
LLC	: Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC	: Leucémie Myéloïde Chronique
LMMC	: Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
LPL	: Leucémie à Pro-Lymphocytes
LT	: Leucémie à Tricholeucocytes
LZM	: Leucémie de la Zone Marginale
MFP	: MyéloFibrose Primitive
MM	: Myélome Multiple
MMG	: May-Grünwald Giemsa
NFS	: Numération Formule Sanguine
NK	: <i>Natural Killer</i>
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PNB	: PolyNucléaire Basophile
PNE	: PolyNucléaire Eosinophile
PNN	: PolyNucléaire Neutrophile
PV	: Polyglobulie de Vaquez
SBD	: Stéphanie DAVID
SD	: Dr. Sylvie DALIPHARD
SLP	: Syndrome Lympho-Prolifératif
SMD	: Syndrome MyéloDysplasique
SMD/MP	: Syndrome MyéloDysplasique / MyéloProlifératif
SMP	: Syndrome MyéloProlifératif

SMZL : Lymphome Splénique de la Zone Marginale

SS : Syndrome de Sézary

TE : Thrombocytémie Essentielle

Introduction

Depuis l'essor de la microscopie initié à la fin du XVII^e siècle par Antoni Van Leeuwenhoek, de nombreux éléments qui jusqu'alors n'étaient pas accessibles, devinrent observables. Avec un microscope, il devient ainsi aisé d'étudier les éléments figurés du sang que sont les plaquettes, les globules rouges et les globules blancs. L'étude des globules blancs passe notamment par l'établissement de la formule sanguine qui permet de décrire, de manière quantitative et qualitative, l'ensemble des populations normales du sang (monocytes, lymphocytes, PNN, PNE et PNB) mais aussi les potentielles cellules anormales circulantes. Par cellules anormales circulantes, nous entendons toutes les cellules non présentes à l'état normal. Il s'agit des cellules immatures que sont les blastes et des cellules matures comme les cellules lymphoïdes anormales. L'hémogramme ou NFS (Numération Formule Sanguine) a ainsi une place primordiale dans le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies telles que les leucémies aiguës et les hémopathies à lymphocytes matures. Le biologiste a par conséquent le rôle capital de mettre en évidence les cellules anormales circulantes. Pour cela, il dispose de différentes techniques que sont l'analyse automatisée de la formule sanguine, l'analyse microscopique du frottis sanguin ainsi que l'utilisation éventuelle de techniques complémentaires telles que la cytométrie en flux.

Devant l'importance de la formule sanguine au microscope, qui reste pour une part importante un examen empirique, les contraintes budgétaires et l'application de la norme NF EN ISO 15189, des systèmes experts ont été développés. Deux catégories ont été déployées. Il s'agit des microscopes automatisés et des automates de routine équipés de module, utilisant la technologie de la cytométrie en flux. Au CHU de Rouen, nous utilisons en routine depuis quelques années, le DM96[®]. Il s'agit d'un automate équipé d'un microscope qui photographie les leucocytes. Il les pré-classe pour établir une formule sanguine brute à partir laquelle un technicien ou un biologiste doit reclasser les éventuelles cellules mal classées. Jusqu'à aujourd'hui, nous n'utilisons cet automate que pour établir la formule sanguine de patients présentant des anomalies quantitatives, c'est-à-dire exempt de cellules anormales circulantes. Avec ce travail, nous souhaitons donc évaluer les performances du DM96[®] dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes.

Pour mener à bien cette évaluation, nous allons nous intéresser tout d'abord à la définition des cellules anormales circulantes, leurs origines et à l'intérêt de les identifier. Puis, nous allons décrire l'ensemble des méthodes d'identification et de quantification des cellules anormales circulantes utilisées au laboratoire. A cet effet, nous allons présenter le DM96[®], ses intérêts, ses limites et l'usage que nous en faisons. Enfin, nous allons étudier à l'aide d'une cohorte prospective les performances du DM96[®] dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes.

1. Définition des cellules anormales circulantes

Par définition, les cellules anormales circulantes concernent toutes les cellules non présentes à l'état normal dans le sang. Leur présence est en général synonyme d'hémopathie maligne. Deux types de cellules anormales peuvent être identifiés : les blastes et les cellules lymphoïdes anormales. Ces cellules sont produites des suites d'anomalies apparues lors des processus d'hématopoïèse et de lymphopoïèse. Au cours de chacune des étapes de ces processus, les cellules prolifèrent intensément. Des anomalies géniques (mutation, réarrangement chromosomique, ...) peuvent cependant survenir. En général, la présence d'une anomalie génique conduit à la mort de la cellule. Néanmoins, lorsque ces anomalies géniques procurent un avantage sélectif, des cellules anormales peuvent être identifiées.

Les blastes peuvent prendre différents aspects morphologiques (figure n°1). Ces cellules sont immatures. Elles sont bloquées à un stade de maturation précoce (figure n°2).

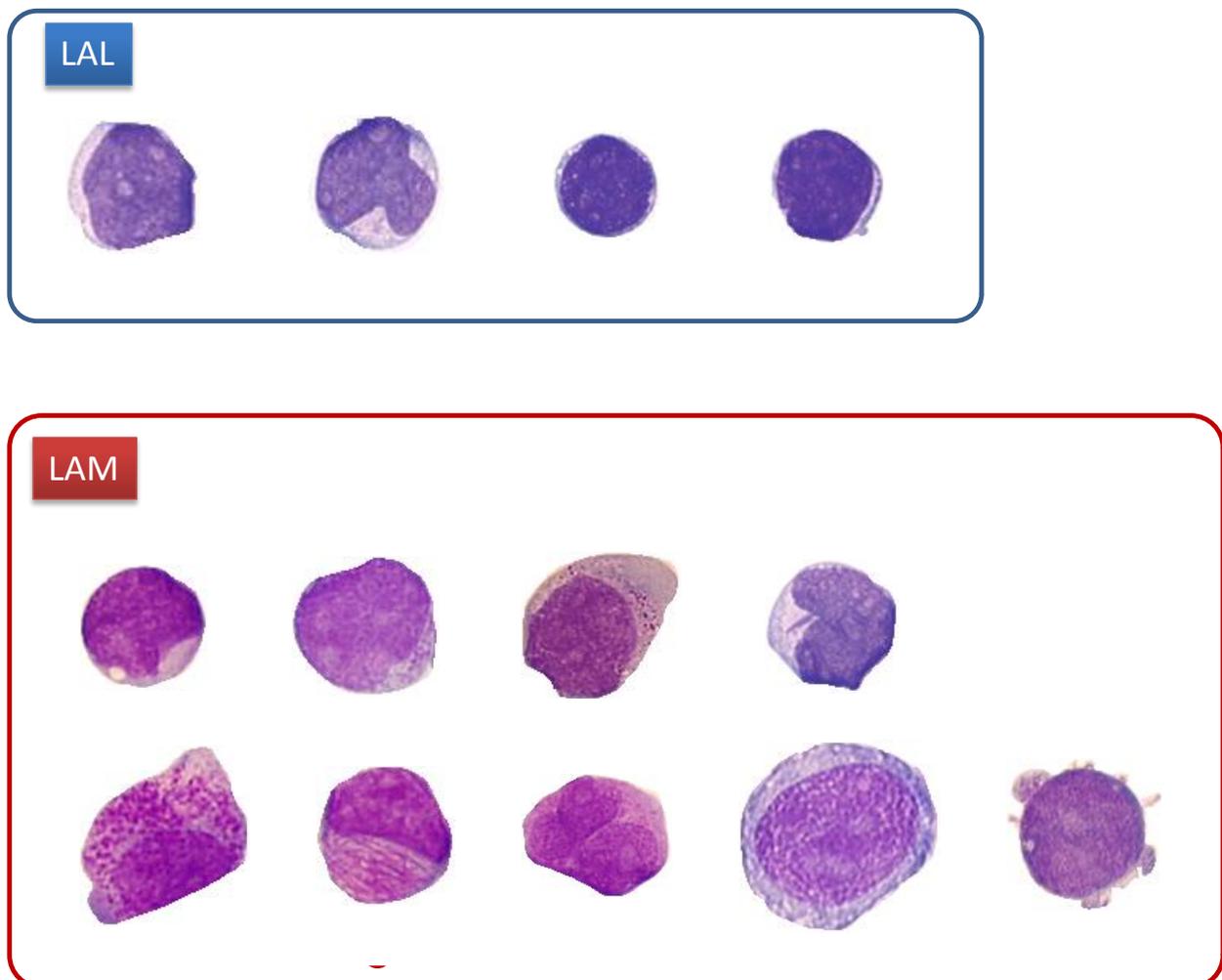
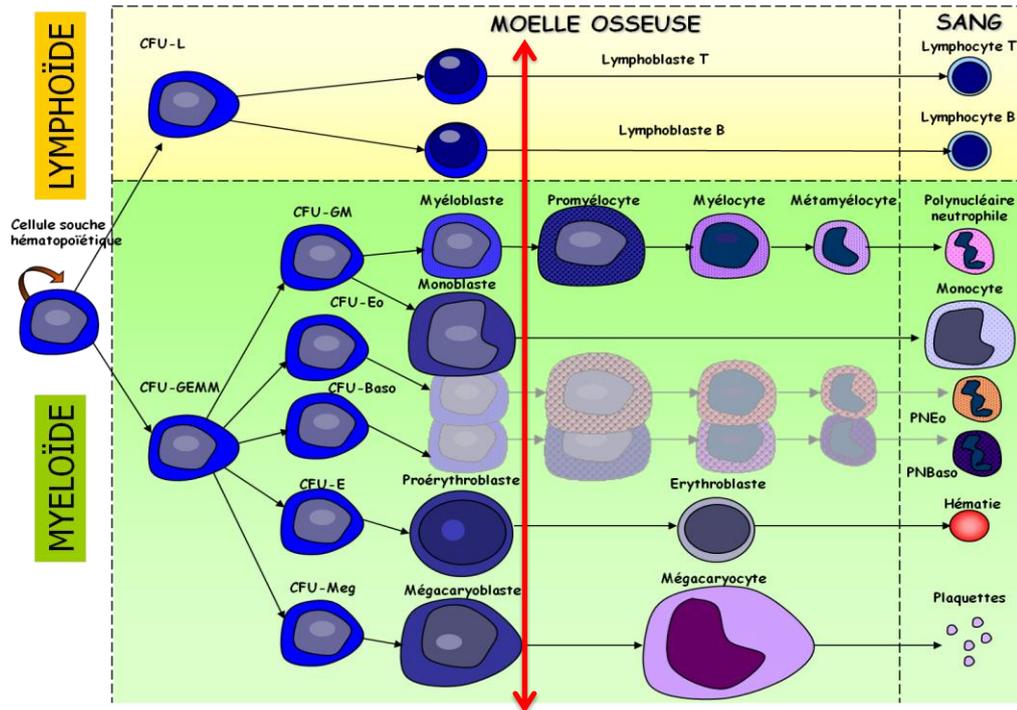


Figure n°1 : Aspects morphologiques de cellules blastiques

A



B

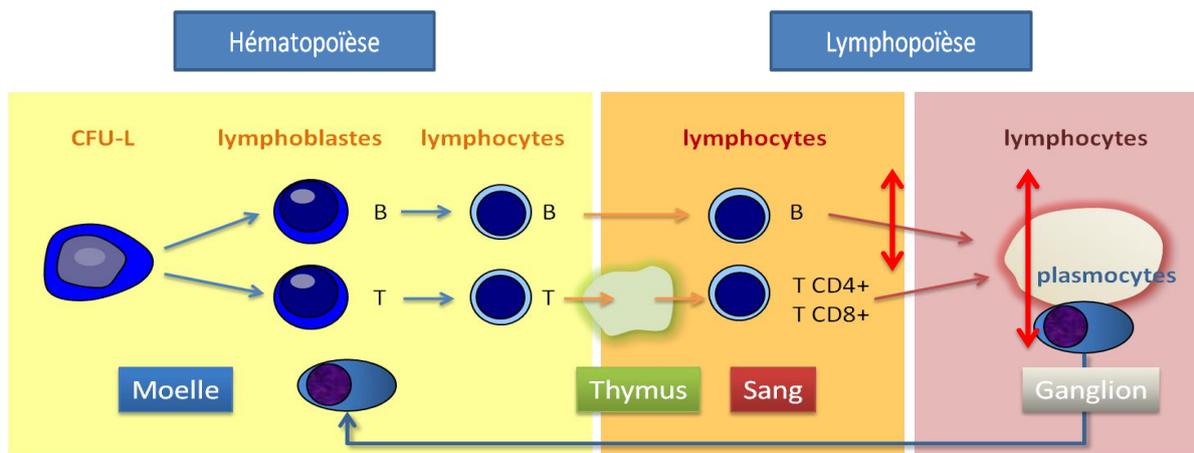


Figure n°2 : L'hématopoïèse et la lymphopoïèse (1)

A : L'hématopoïèse - A partir d'une seule et même cellule souche pluripotente CD34+, tous les éléments figurés du sang sont produits. Cette cellule souche s'auto-renouvelle et se différencie en progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes. Les progéniteurs se différencient ensuite en précurseurs puis en éléments matures. La lignée lymphoïde donne les lymphocytes T, B ainsi que les cellules NK (*Natural Killer*). La lignée myéloïde donne les PNN, les PNE, les PNB, les monocytes, les globules rouges et les plaquettes. Une hématopoïèse normale est définie par un équilibre entre la production de cellule souche par auto-renouvellement et la perte par différenciation.

NB : La flèche rouge représente le blocage de maturation à un stade immature des cellules blastiques.

B : La lymphopoïèse – Bien que produits à partir d'un même progéniteur, les lymphocytes T et B mûrissent différemment. Les Lymphocytes B mûrissent dans la moelle osseuse et les lymphocytes T dans le thymus. Après maturation et rencontre avec un antigène, les lymphocytes T et B développent ensemble la réponse immunitaire dans des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques. Le lymphocyte B activé peut alors se différencier en plasmocyte.

NB : Les flèches rouges représentent le blocage de maturation à un stade mature des cellules lymphoïdes anormales.

Les cellules lymphoïdes anormales sont des cellules matures. Le blocage de maturation est plus tardif (figure n°2). Comme les cellules blastiques, elles peuvent prendre différents aspects morphologiques (figure n°3).

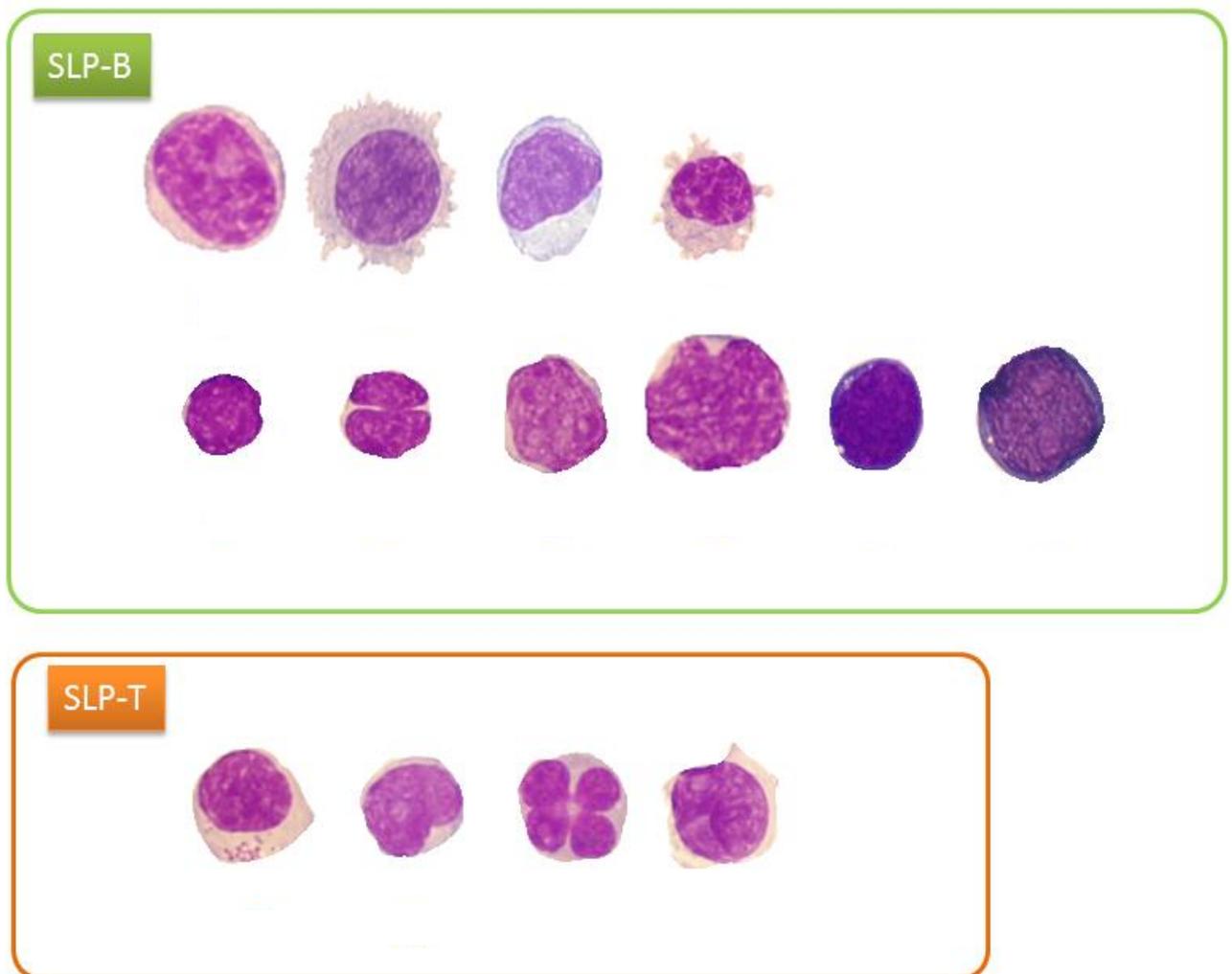


Figure n°3 : Aspects morphologiques de cellules lymphoïdes anormales

Le critère de rareté dans le sang circulant ne suffit pas à caractériser une cellule d'anormale. En effet, d'autres cellules comme les érythroblastes, la myélémie, les cellules mononucléées et les leucocytes anormaux issus du processus de dysgranulopoïèse n'entrent pas dans la définition de cellules anormales circulantes.

La présence d'érythroblastes dans le sang peut résulter de diverses situations (figure n°4). En effet, il n'est pas rare d'identifier des érythroblastes chez le nouveau-né ou en cas de régénération médullaire (exemple du patient drépanocytaire majeur). De plus, des suites d'une érythropoïèse inefficace au cours de la maladie de Biermer ou d'une carence sévère en folates, nous pouvons identifier ces cellules dans le sang.

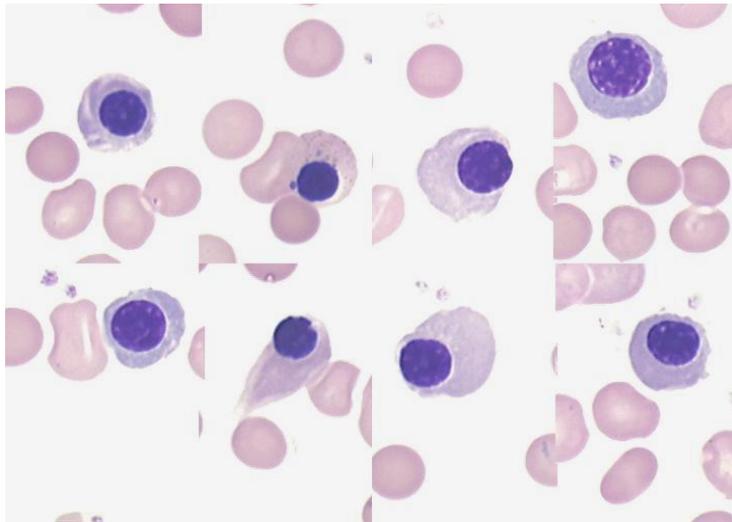


Figure n°4 : Aspect morphologique d'érythroblastes circulants (2)

La myélémie est définie par la présence de promyélocytes, de myélocytes et de métamyélocytes circulants (figure n°5). Il s'agit des précurseurs du PNN. La myélémie s'observe lors d'épisodes de régénération médullaire, d'un syndrome infectieux ou après l'administration de facteur de croissance médullaire.

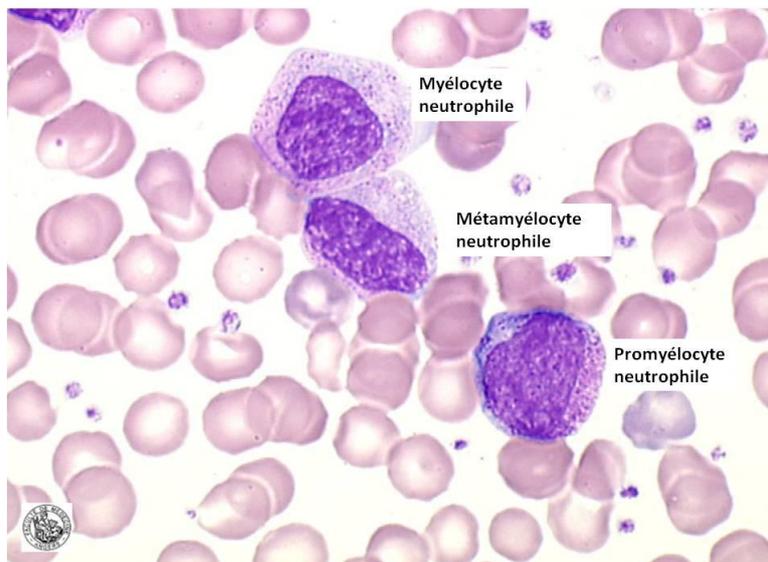


Figure n°5 : Aspects morphologiques de la myélémie (3)

Les cellules mononucléées correspondent à de grandes cellules lymphoïdes activées (figure n°6). Elles sont secondaires à une réaction immunitaire de l'organisme face à différents pathogènes. Les pathogènes généralement en cause sont le virus d'Epstein-Barr, le cytomégalovirus, la toxoplasmose ou bien le VIH au stade de primo-infection.

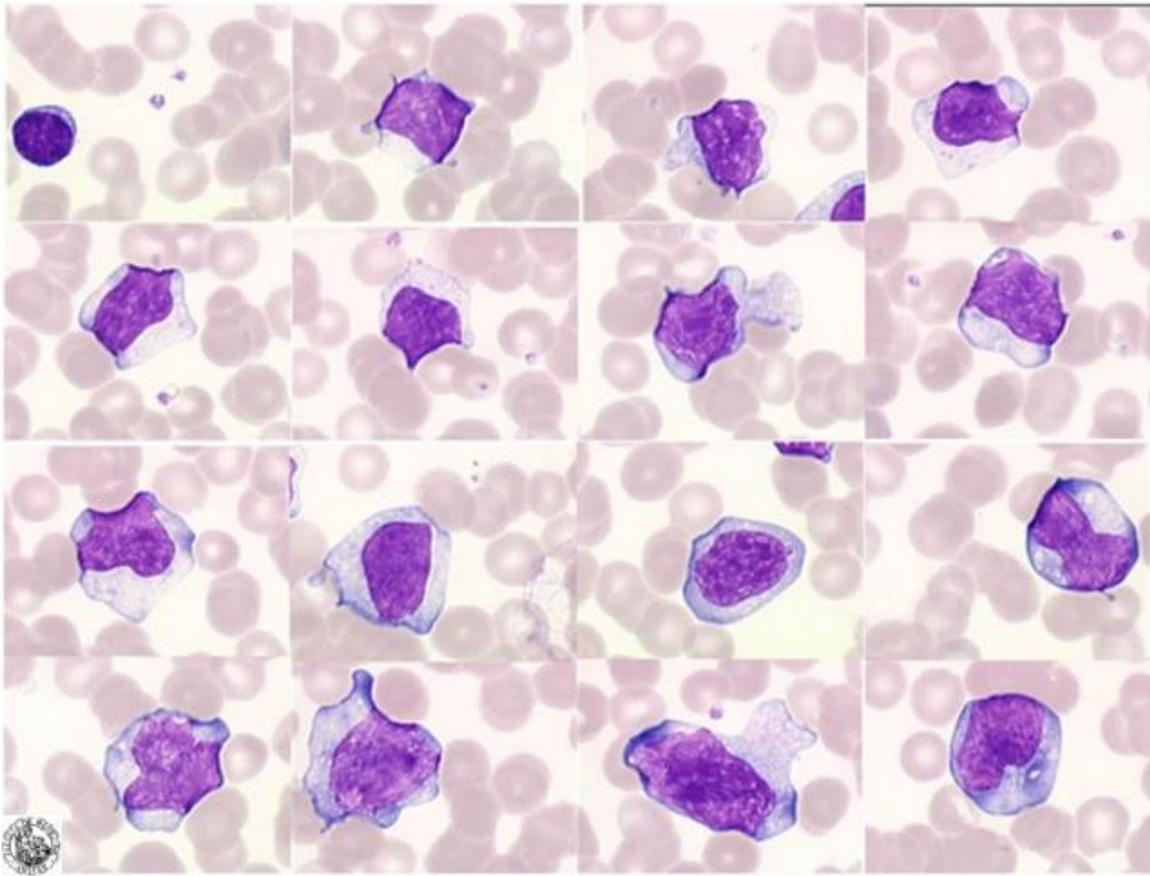


Figure n°6 : Aspects morphologiques des cellules mononucléées (4)

Enfin, les leucocytes anormaux issus du processus de dysgranulopoïèse ne figurent pas dans la définition des cellules anormales circulantes car ils peuvent résulter de diverses situations réactionnelles (figure n°7). En effet, une carence en vitamine B12 et/ou en folates, un syndrome infectieux ou bien la prise de médicament comme le mycophénolate mofétil (Cellcept®) peuvent être à l'origine d'une dysgranulopoïèse.

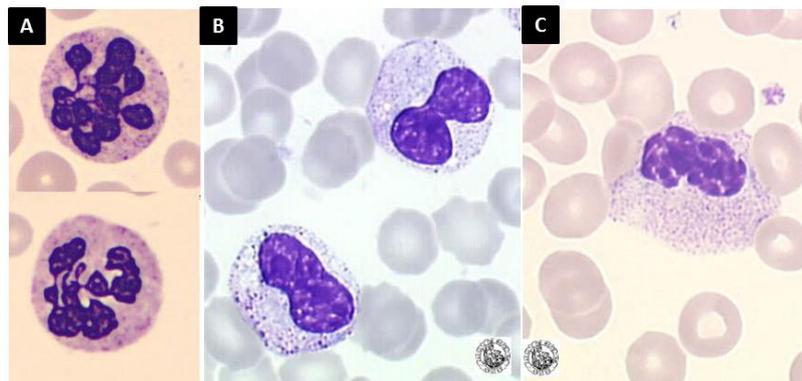


Figure n°7 : Aspects morphologiques de leucocytes issus du processus de dysgranulopoïèse (5)

A : PNN avec un noyau hypersegmenté (carence en vitamine B12)

B : PNN hyposegmenté (sepsis)

C : PNN avec une condensation chromatiniennne excessive (traitement par Cellcept®)

Au final, les cellules anormales circulantes correspondent à une population spécifique à ne pas confondre avec d'autres cellules non couramment observées. Elles correspondent ainsi à des populations hétérogènes rattachées à la notion d'hémopathie.

2. Origine des cellules anormales circulantes

Plusieurs hémopathies peuvent donner des cellules anormales circulantes. Dans ce chapitre, nous présenterons brièvement les hémopathies à l'origine des cellules anormales circulantes. Puis, nous verrons plus en détails, dans quelles hémopathies, nous pouvons les identifier.

2.1. Brève présentation des hémopathies à l'origine des cellules anormales circulantes

2.1.1. Les hémopathies myéloïdes

Dans la lignée myéloïde, quatre grands types d'hémopathies sont décrites. Il s'agit des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), des syndromes myéloprolifératifs (SMP), des syndromes myélodysplasiques (SMD) et des syndromes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs (SMD/MP) (figure n°8).

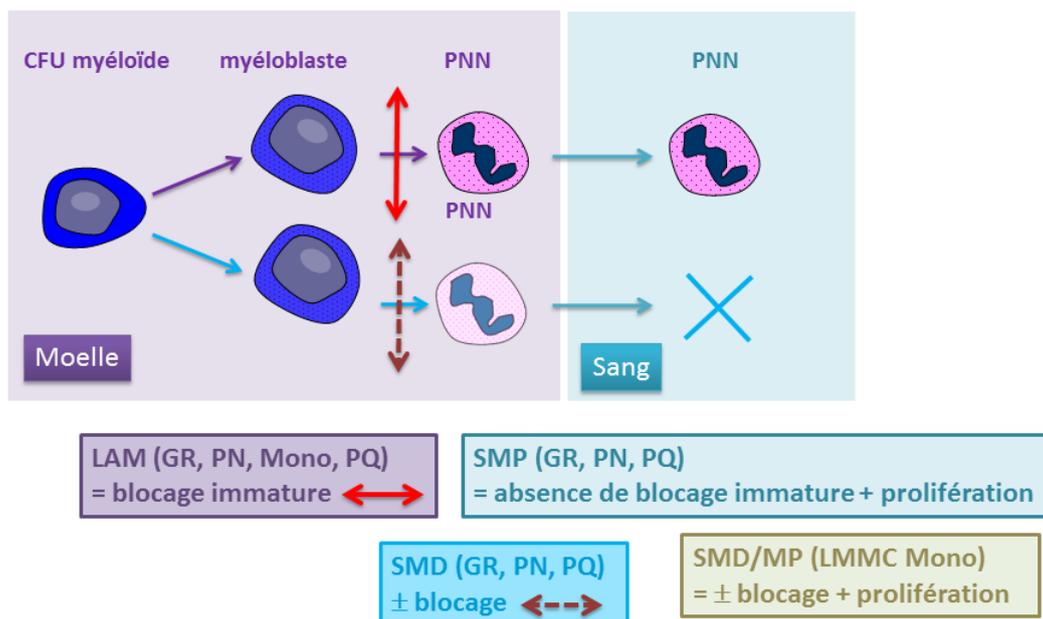


Figure n°8 : Schéma récapitulatif des principales hémopathies myéloïdes

Les myéloblastes correspondent aux progéniteurs ou bien aux précurseurs des lignées correspondantes.

Légende :

GR : Globule rouge ; LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique ; Mono : Monocyte ; PN : Polynucléaire ; PQ : Plaquette

Les LAM sont marquées par un blocage de maturation précoce conduisant à la prolifération de cellules blastiques. Les SMP sont caractérisés, au contraire par l'absence de blocage de

maturation. Les cellules de la lignée concernée, prolifèrent intensément. Dans les SMD, une anomalie de la cellule souche hématopoïétique peut conduire à un défaut de maturation à l'origine de la production de cellules myéloïdes dysplasiques. Ces dernières n'entrent pas dans la définition des cellules anormales circulantes. Enfin, les SMD/MP sont marqués par un défaut de maturation et un excès de prolifération. Au cours de chacune de ces hémopathies, des cellules blastiques peuvent être identifiées.

2.1.2. Les hémopathies lymphoïdes

A l'instar de la lignée myéloïde, plusieurs types d'hémopathies lymphoïdes sont identifiées : les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), les syndromes lymphoprolifératifs (SLP) et le myélome (figure n°9).

Les LAL résultent d'un blocage de maturation précoce à l'origine de la prolifération de cellules blastiques qui sont identifiées au myélogramme.

Les SLP sont caractérisés par l'absence de blocage de maturation à un stade immature. Des cellules lymphoïdes matures et anormales prolifèrent. Suivant le lieu du blocage de maturation, différents SLP sont décrits comme la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et les lymphomes. L'hémopathie porte le nom de lymphome quand la prolifération clonale de lymphocytes se produit au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques. Les lymphomes portent en général le nom de la région de laquelle leurs lymphocytes dérivent ou bien de la morphologie des lymphocytes concernés.

Le myélome résulte d'une prolifération anormale de plasmocytes généralement au sein de la moelle osseuse.

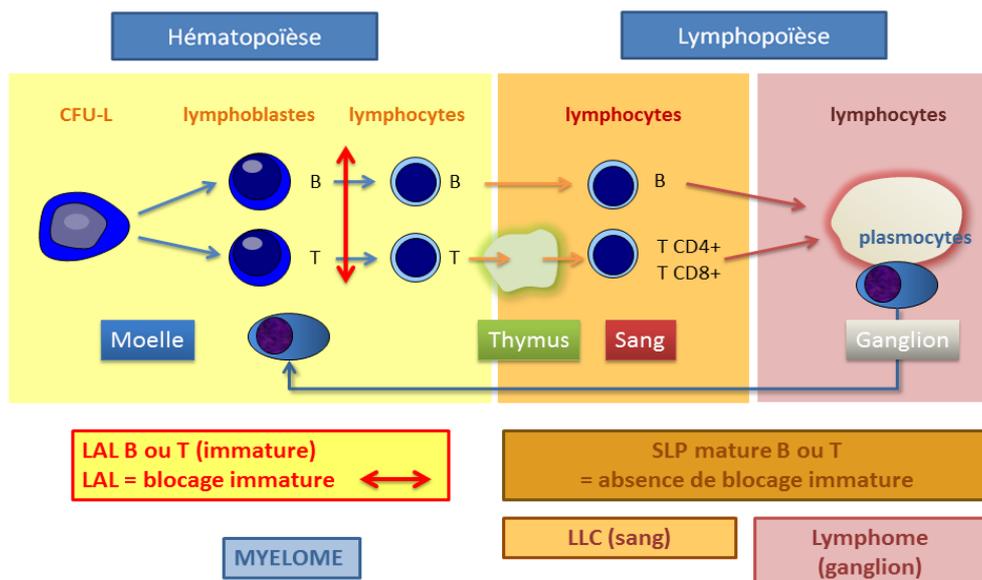


Figure n°9 : Schéma récapitulatif des principales hémopathies lymphoïdes

Les lymphoblastes correspondent aux progéniteurs ou bien aux précurseurs des lignées correspondantes.

2.2. Hémopathies à l'origine de cellules blastiques circulantes

De nombreuses hémopathies sont à l'origine de cellules blastiques circulantes (tableau n°I). En effet, mis à part les leucémies aiguës, des blastes peuvent être identifiés dans certains SMD, dans les SMP et dans certains SMD/MP.

Leucémies aiguës
LAM
LAL
LA pDC
LA biphénotypique
LA indifférenciée
LA biclonale
SMD
AREB
SMP
Accélération LMC
Evolutivité PV/TE/MFP
SMD/MP
LMMC

Tableau n°1 : Tableau récapitulatif des principales hémopathies à l'origine de la diffusion de cellules blastiques dans le sang (6)

Légende :

LA pDC : leucémie aiguë à cellules dendritiques plasmacytoïdes ; AREB : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes ; LMC : Leucémie Myéloïde Chronique ; PV : polyglobulie de Vaquez ; TE : thrombocytémie essentielle ; MFP : myélofibrose primitive

Une révision de la classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) des LA a récemment été publiée (7). Cette révision tient compte de la présence de dysplasie et des antécédents thérapeutiques du patient (cas particulier de l'induction d'une leucémie aiguë par les traitements cytostatiques utilisés antérieurement). Elle intègre de nouvelles connaissances en termes de cytogénétique et de biologie moléculaire sur les hémopathies (tableau n°II).

LAM
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes
ex : t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX1-RUNX1T1
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies
Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie
LAM sans autre spécification par ailleurs (NOS)
LA myéloblastique avec différenciation minimale
LA myéloblastique sans maturation
LA myéloblastique avec maturation
LA myélomonocytaire
LA monoblastique / monocytaire
LA érythroïde pure
LA mégacaryoblastique
LA myéloblastique à composante basophile
LA avec myélofibrose
Sarcome granulocyttaire
Prolifération myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle
Leucémie aiguë à cellules dendritiques plasmacytoïdes
LA de classification ambiguë
LA indifférenciées
LA biphénotypiques
LA biclonales
LA / Lymphomes lymphoblastiques B
LA / Lymphome lymphoblastique B sans autre spécification
LA / Lymphome lymphoblastique B avec anomalies cytogénétiques récurrentes
ex : t(9;22)(q34.1;q11.2) ; BCR-ABL1
LA / Lymphome lymphoblastique T

Tableau n°II : Classification OMS des LA d'après D. A. ARBER (7)

Nous distinguons en général, les leucémies aiguës suivant qu'elles concernent la lignée lymphoïde ou myéloïde. La distinction entre ces deux grands types d'hémopathies se réalise à la fois sur des critères morphologiques et par la technique de cytométrie en flux.

La morphologie des blastes identifiés dans les LAL est celle de blastes assez monomorphes avec un noyau irrégulier (figure n°10). L'identification microscopique de ces cellules anormales est difficile et demande de l'expérience. Il n'existe que peu de différences morphologiques entre un blaste appartenant à la lignée B ou T. Pour classer les LAL, nous nous basons exclusivement sur la cytométrie en flux.

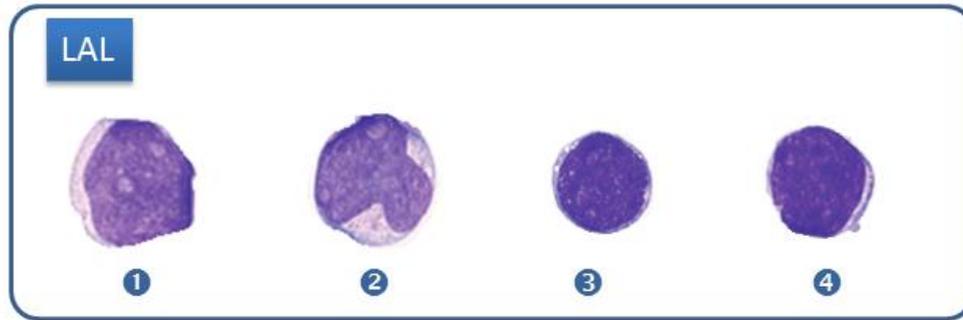


Figure n°10 : Aspects morphologiques des LAL

1-2 : Aspect morphologique de grands lymphoblastes

3-4 : Aspect morphologique de petits lymphoblastes

Les blastes identifiés dans les LAM ont une morphologie plus variable et plus facilement appréhendable microscopiquement (figure n°11). Ils sont petits ou grands, granuleux ou agranuleux. La présence de corps d'Auer signe l'origine myéloïde de l'hémopathie. L'aspect morphologique de certains blastes peut être caractéristique d'une LAM donnée (exemple de la LAM 3 ; figure 11 : 5-7). Pour classer les leucémies aiguës myéloïdes, nous utilisons encore au laboratoire, la classification FAB (Franco Américano Britannique), établie en 1976 car elle se base essentiellement sur des critères morphologiques et permet d'orienter en urgence le diagnostic (tableau n°III) (6).

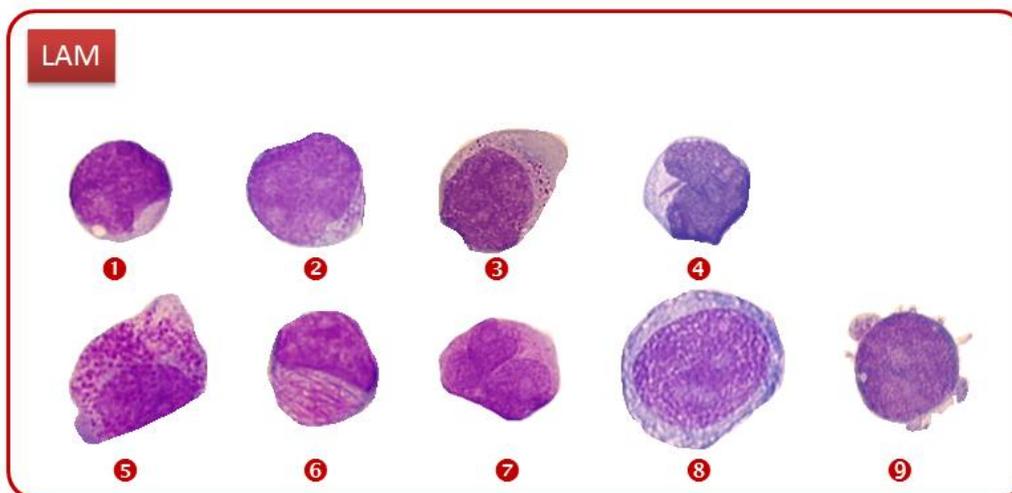


Figure n°11 : Aspects morphologiques des LAM

1 : Myéloblaste agranuleux

2-4 : Myéloblaste granuleux

5-7 : Promyélocyte (LAM 3)

8 : Monoblaste

9 : Mégacaryoblaste

Morphologie de la LAM selon FAB	
LAM 0	Indifférenciée
LAM 1	Myéloblastique sans différenciation
LAM 2	Myéloblastique avec différenciation
LAM 3	Promyélocytaire
LAM 4	Myélomonocytaire
LAM 5a	Monoblastique sans différenciation
LAM 5b	Monoblastique avec différenciation
LAM 6	Erythroblastique
LAM 7	Mégacaryoblastique

Tableau n°III : Classification FAB des LAM d'après A. STEIGER (8)

Cette classification distingue huit leucémies aiguës myéloïdes. Elle tient compte de la présence (LAM 1 à 3) ou non (LAM 0) d'une différenciation myéloïde, monocytaire (LAM 4 et 5), érythroblastique (LAM 6) ou bien mégacaryoblastique (LAM 7)

Dernièrement, une nouvelle catégorie de leucémie aiguë myéloïde a été définie. Il s'agit de la leucémie aiguë à cellules dendritiques plasmacytoïdes (figure n°12). Les cellules dendritiques constituent une véritable population cellulaire hétérogène d'origine myéloïde. A partir d'un progéniteur myéloïde commun avec la lignée monocytaire, le progéniteur des cellules dendritiques génèrent des cellules dendritiques myéloïdes ou bien des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ces dernières tirent leur nom en raison de leur ressemblance morphologique avec les plasmocytes.

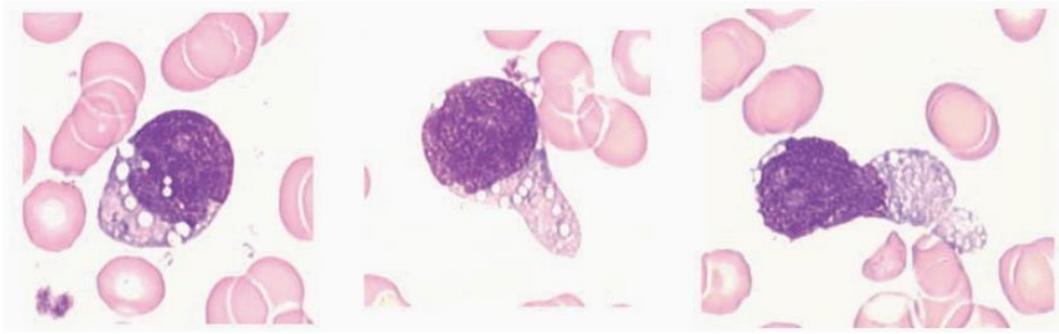


Figure n°12 : Aspect morphologique de la leucémie aiguë à cellules dendritiques plasmacytoïdes d'après M. IMBERT (6)

D'autres catégories plus rares de leucémies aiguës ont été décrites récemment. Il s'agit des leucémies aiguës biphénotypiques, indifférenciées et biclonales qui sont identifiées grâce à la cytométrie en flux et à la morphologie des blastes. Les leucémies aiguës biphénotypiques présentent à la fois des caractéristiques myéloïdes et lymphoïdes contrairement aux leucémies aiguës indifférenciées. Les LA biclonales résultent de la prolifération de deux clones distincts.

Enfin, la présence de blastes est aussi décrite dans des hémopathies autres que les leucémies aiguës. Des blastes sont en effet, identifiés dans certains SMD comme les AREB. Ces cellules peuvent aussi être retrouvées dans les SMP et ce notamment en cas d'accélération de la LMC ou en cas d'évolutivité de la MFP, de la PV et de la TE. Enfin, elles peuvent être observées dans les SMD/MP avec la LMMC.

Cependant, au-delà donc de l'aspect anormal de ces cellules, il convient toujours d'avoir les renseignements clinico-biologiques adéquats et d'étudier l'hémogramme dans son ensemble. Il faut en effet savoir s'il y a des cytopénies associées (anémie, thrombopénie, neutropénie) car il n'est pas rare d'observer des blastes circulants lors d'une régénération médullaire après une chimiothérapie. Des blastes peuvent aussi être identifiés chez un enfant prématuré du fait de la perméabilité de la barrière médullaire et du transfert de l'hématopoïèse du foie fœtal vers la moelle osseuse (9). Dans ces deux dernières situations, l'identification de cellules blastiques circulantes n'est pas anormale et n'est pas associée à une hémopathie sous-jacente.

2.3. Hémopathies à l'origine de cellules lymphoïdes anormales

De nombreuses entités sont à l'origine de la diffusion de cellules lymphoïdes anormales dans le sang. Leur morphologie est très hétérogène et plus ou moins facile à appréhender. Pour nous aider, nous disposons de la cytométrie en flux, des techniques de biologie moléculaire et de cytogénétique. On distingue deux sortes d'hémopathies à lymphocytes matures selon qu'elle touche les lymphocytes B ou T/NK (tableau n°IV).

SLP B
LLC / Lymphome lymphocytaire
Leucémie prolymphocytaire B (LPL-B)
Lymphome de la zone marginale (LZM)
<i>Lymphome splénique de la zone marginale (SMZL)</i>
<i>Lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL)</i>
<i>Lymphome diffus de la pulpe rouge de la rate (LDPRR)</i>
Leucémie à tricholeucocytes (LT)
Myélome multiple (MM)
Lymphome folliculaire (LF)
Lymphome à cellules du manteau (LCM)
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)
Lymphome de Burkitt (LB)
SLP T/NK
Leucémie prolymphocytaire T (LPL-T)
Leucémie à grands lymphocytes granuleux (LGL)
Leucémie / lymphome T de l'adulte (ATLL)
Syndrome de Sézary (SS)
Leucémie agressive à cellules NK
Lymphome T angio-immunoblastique (LAI-T)

Tableau n°IV : Tableau récapitulatif des principales hémopathies à l'origine de la diffusion de cellules lymphoïdes anormales dans le sang d'après SH. SWERDLOW (10)

Les hémopathies B les plus fréquemment rencontrées sont la LLC, le LCM et le LZM (figure n°13. D'autres entités sont décrites comme la LPL-B, la LT ou bien le MM. Bien que les lymphomes résultent de prolifération clonale de lymphocytes B au niveau de ganglions lymphatiques, certains d'entre eux peuvent disséminer dans le sang (=phase leucémique). Ainsi, des cellules lymphoïdes anormales circulantes peuvent être identifiées pour le LZM, le LCM et plus rarement pour le DLBCL, le LF et le LB (11).

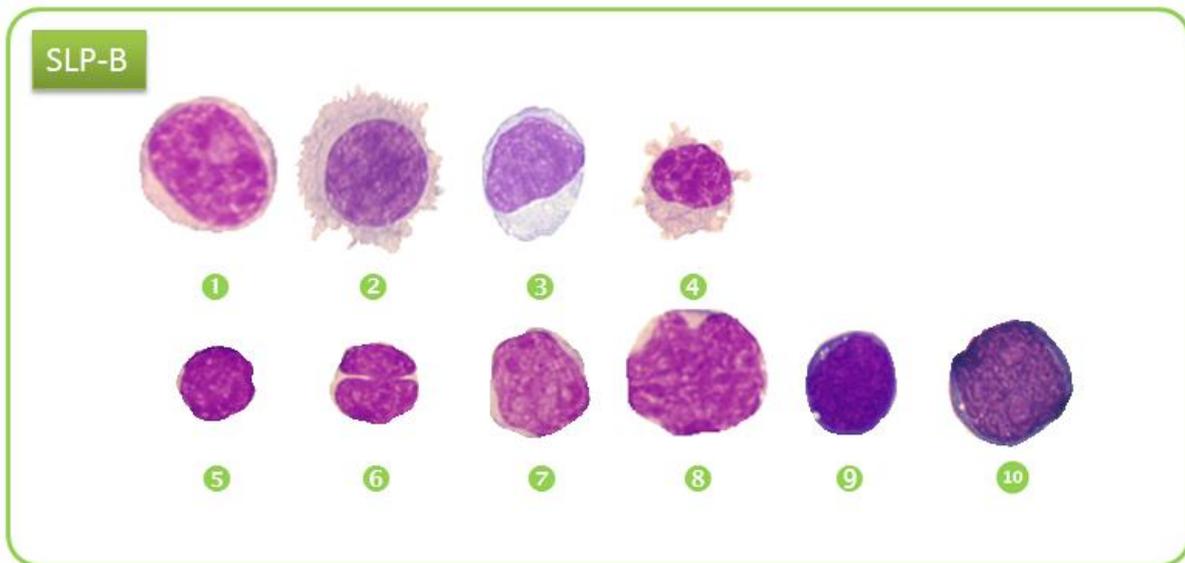


Figure n°13 : Aspects morphologiques des SLP-B

1 : LPL-B ; 2 : LT ; 3 : LZM ; 4 : SLVL ; 5-6 : LF ; 7-8 : LCM ; 9 : LB ; 10 : DLBCL

Les hémopathies à lymphocytes T/NK sont plus rares que celles à lymphocytes B (figure n°14). La plus connue est le SS. Cependant, d'autres entités ont été identifiées comme le LAI-T, la LPL-T et la ATLL.

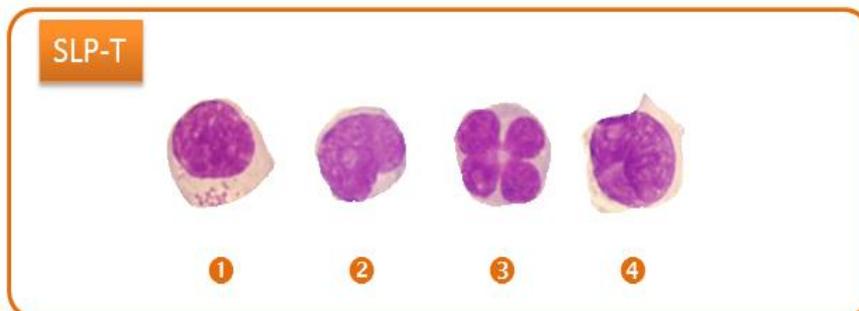


Figure n°14 : Aspects morphologiques des SLP-T

1 : LGL ; 2 : LPL-T ; 3 : ATLL ; 4 : SS

En conclusion, plusieurs hémopathies sont à l'origine de cellules anormales circulantes qui se distinguent par leur morphologie et par leurs circonstances d'identification.

3. Intérêt de l'identification des cellules anormales circulantes

En raison du manque de spécificité de certains signes cliniques associés aux hémopathies (altération de l'état général, adénopathie, splénomégalie), les signes biologiques dont l'hémogramme (sang, moelle, ganglion) revêtent un véritable intérêt notamment en termes de dépistage.

→ Les leucémies aiguës

La NFS possède différents intérêts dans les LA avec en particulier un rôle diagnostique. En effet, il n'est pas rare de mettre en évidence des cellules blastiques circulantes de manière inopinée. De même, comme nous l'avons vu précédemment, la morphologie des blastes permet d'orienter la classification de l'hémopathie. Ceci permet alors d'optimiser la prise en charge. L'exemple est celui de la LAM 3 pour laquelle une recherche de CIVD (Coagulation IntraVasculaire Disséminée) est entreprise.

La NFS possède de plus, un rôle pronostique. Dans le cas particulier des LAL de l'enfant, l'hémogramme conditionne en partie, la chimiothérapie utilisée. En effet, si après huit jours de corticothérapie, plus de 1 G/L de blastes persistent dans le sang, une intensification du traitement médicamenteux est instaurée. Nous comprenons alors l'importance de mettre en évidence et de quantifier correctement les blastes car cela conditionne le pronostic de la LAL et des leucémies aiguës de manière générale.

Enfin, la NFS est utilisée dans le cadre du suivi. Il s'agit effectivement d'un examen peu invasif et peu onéreux permettant de surveiller le risque de rechute par l'identification de blastes.

→ Les SMD, les SMP et les SMD/MP

Dans le cas des SMD, des SMP et des SMD/MP, l'hémogramme possède essentiellement un intérêt diagnostique. L'exemple est celui de l'AREB. Elle est en effet, définie en partie, par la présence de plus de 2% de blastes circulants.

L'hémogramme peut participer aussi au pronostic de certaines pathologies. Le pourcentage de cellules blastiques circulantes est effectivement intégré dans le score pronostic de la LMC, SOKAL.

Enfin, la NFS a un rôle dans le suivi de ces pathologies pouvant acutiser en LAM, ce qui peut être dépisté sur un hémogramme par l'apparition d'une augmentation du taux de blastes.

→ Les syndromes lympho-prolifératifs

L'hémogramme participe au diagnostic des SLP B/T. Des cellules lymphoïdes anormales sont parfois mises en évidence de manière fortuite. La morphologie quelquefois typique de ces hémopathies, permet d'affiner le classement de l'hémopathie. Le choix des techniques d'analyses complémentaires est alors orienté.

La NFS peut participer au pronostic de l'hémopathie. Ainsi, une faible proportion d'ombres de Gumprecht est de mauvais pronostic dans la LLC. Il permet aussi le suivi de l'évolutivité de la pathologie. Le temps de doublement de la population lymphocytaire et l'apparition de prolymphocytes sont évalués dans la LLC. Enfin, la NFS permet là encore de surveiller le risque de rechutes.

Au total, il apparaît que l'identification des cellules anormales circulantes a une place primordiale dans le diagnostic et le suivi de nombreuses hémopathies. Le biologiste a donc un rôle capital dans la mise en évidence ces cellules. Il a pour cela à sa disposition plusieurs techniques d'analyses que sont les analyses automatisées, la lecture au microscope du frottis sanguin ainsi que des techniques complémentaires telles que la cytométrie en flux.

4. Méthodes d'identification des cellules anormales circulantes au laboratoire

4.1. Place des analyses automatisées

Depuis la mise au point des premiers automates dans les années 1940 par Wallace H. Coulter, des progrès importants en termes d'automatisation ont été réalisés par les fabricants d'automates. Les premiers automates ne comptabilisaient que les globules rouges. Pour répondre aux besoins croissants d'analyses demandées par les cliniciens, ils se sont ouverts à l'analyse d'autres paramètres (globules blancs, plaquettes, réticulocytes, érythroblastes et myélémie) (12). Ils ont notamment permis la réalisation d'une formule leucocytaire approchée (lymphocyte, monocyte et lignée granuleuse) puis complète. Ils ont ensuite été programmés pour réaliser de manière automatisée des frottis sanguins. Des logiciels d'aide à la validation technique ont vu le jour pour augmenter la cadence des analyses. Les automates, ayant gagné en spécificité et en précision, ont ainsi permis de diminuer le taux de relecture des frottis sanguins. Deux grands principes sont utilisés à ce jour de manière simultanée, pour déterminer le taux de leucocytes. Il s'agit des principes de l'impédance et de celui de la mesure optique par cytométrie en flux. L'automate utilisé au CHU de Rouen est le XE 5000® de chez Sysmex.

4.2. Principe de l'impédance

La notion d'impédance est définie par la mesure de l'opposition d'un circuit électrique au passage d'un courant (résistance électrique). Le principe Coulter repose sur cette notion pour déterminer le taux de leucocytes (figure n°15). Tout d'abord, une solution de lyse cellulaire puissante est utilisée. Elle détruit les globules rouges, rétrécit les plaquettes et modifie la morphologie des leucocytes hormis celles des PNB. De plus, cette solution de lyse dilue le prélèvement selon le principe de la focalisation hydrodynamique, de manière à ce que les leucocytes puissent passer individuellement au travers d'un orifice sur lequel une charge électrique est appliquée. Les éléments figurés, étant de mauvais conducteurs, augmentent alors la résistance électrique de manière proportionnelle à leur volume. L'automate comptabilise ainsi le nombre de leucocytes selon leur volume et par rapport à des seuils préétablis et caractéristiques des globules blancs. Les PNB sont décomptés à part du reste des leucocytes car ils possèdent un volume différent. Ainsi, chaque élément de taille supérieure à celle d'une plaquette et qui n'est pas détruit par la solution de lyse, est considéré *a priori* comme un leucocyte. Nous accédons alors, avec cette technique au taux des PNB et au nombre total de leucocytes circulants.

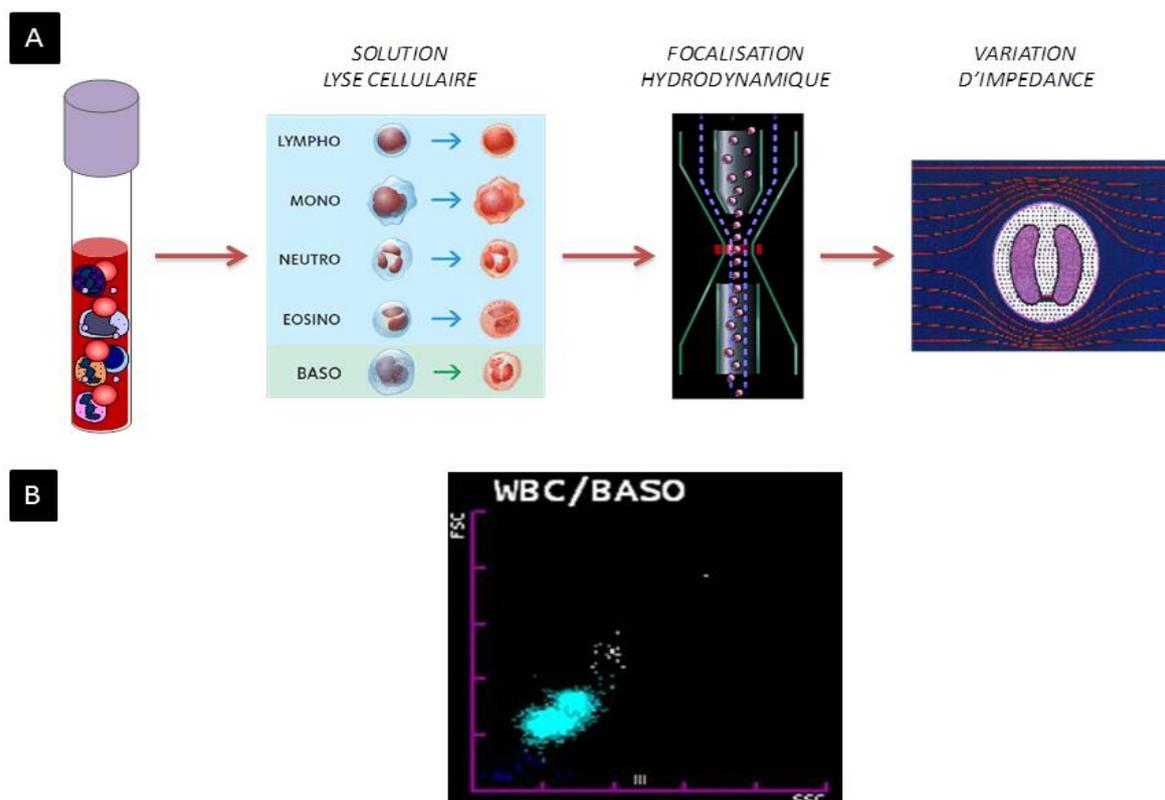


Figure n°15 : Principe de la détermination du taux de leucocytes par impédance

A : Différentes étapes de la technique par impédance

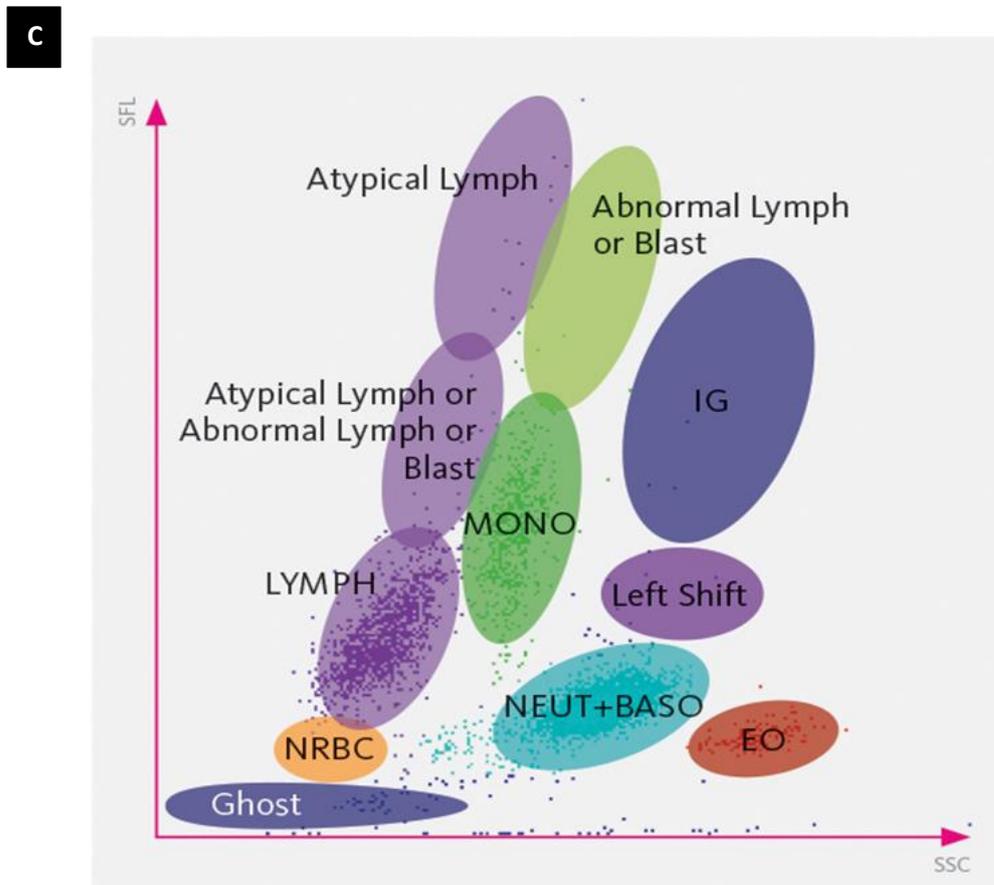
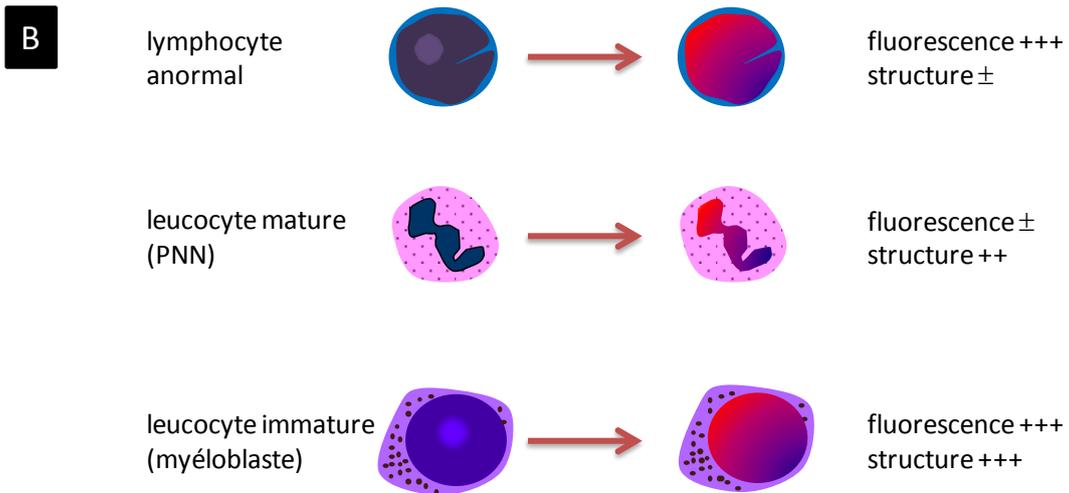
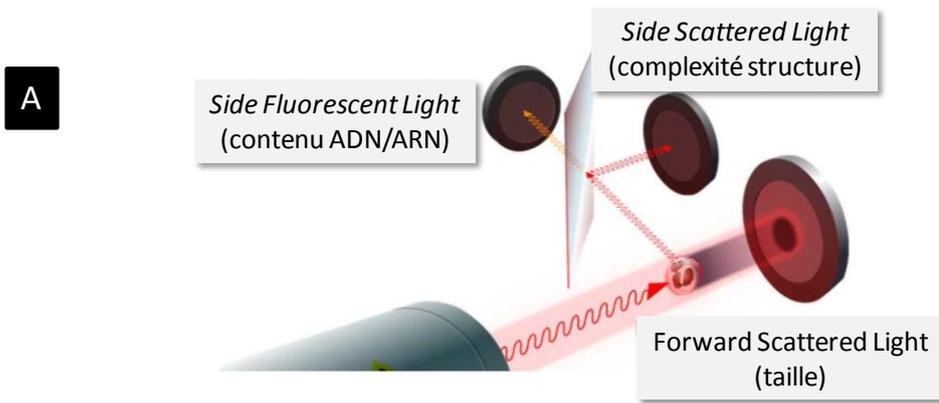
B : Graphique « Leucocyte – PNB » (Scattergram WBC/BASO) permettant la détermination du taux des PNB (en blanc) et du reste des leucocytes (en bleu cyan).

Légende :

FSC = Forward Scattered Light (Volume); SSC = Side Scattered Light (Structure)

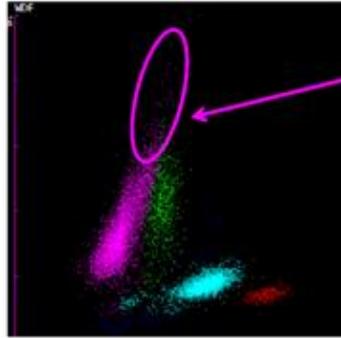
4.3. Principe de la mesure optique par cytométrie en flux

Le second principe, la mesure optique par cytométrie en flux, repose sur la notion de diffraction lumineuse (figure n°16). Dans cette technique, les cellules après une lyse modérée (lyse uniquement des globules rouges), passent une à une devant un faisceau laser. Elles diffractent de manière spécifique la lumière selon leur taille, leur structure et selon leur contenu en acides nucléiques (ADN et ARN). Un fluorochrome se lie en effet, aux acides nucléiques de la cellule. Plus la cellule est active, plus son contenu en acides nucléiques est important et plus la fluorescence de la cellule est forte. La diffraction selon la structure permet d'identifier les cellules riches en granulations. De cette manière, les cellules anormales circulantes peuvent être individualisées par cette technique (figure n°16-B). L'étude des leucocytes par mesure optique permet ainsi, de distinguer chaque population leucocytaire sous la forme de nuages de points afin d'établir la formule sanguine (figure n°16C). Un décompte en valeurs relative et absolue est effectué (des PNN, des PNB, des PNE, des lymphocytes, des monocytes). Des alarmes peuvent alors être dégagées. Elles portent sur la présence d'éventuelles anomalies sur les positions des nuages de points et/ou sur l'apparition de nuages de points supplémentaires (présence de blastes, de lymphocytes anormaux ; figure n°16D).



D

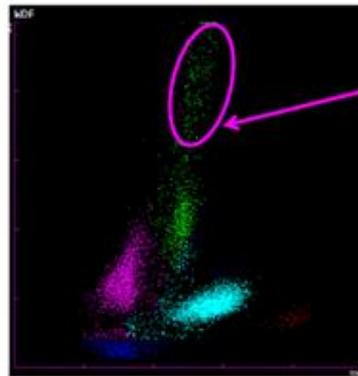
Lymphocytes atypiques ?



Canal WDF:
apparition de cellules à fluorescence très élevée au
dessus du nuage des lymphocytes

Prédominance dans cette zone de cellules réactives.

Blastes / Abnormal lympho?



Canal WDF:
Apparition de cellules à fluorescence très élevée au
dessus du nuage des monocytes

Prédominance dans cette zone de cellules d'origine
tumorale plutôt que réactionnelles

Figure n°16 : Principe de la formule sanguine par mesure optique

A : Principe de la mesure optique par cytométrie en flux

B : Principe de l'individualisation des cellules anormales circulantes

Les cellules anormales circulantes possèdent une taille, une structure et un contenu en acides nucléiques différents des cellules normales.

C : Graphique « formule » (Scattergram DIFF) permettant l'individualisation de chaque population leucocytaire afin d'établir la formule sanguine (13)

Seul un décompte des lymphocytes, des monocytes, des PNN, des PNB et des PNE est entrepris. La présence d'éventuels blastes ou de cellules lymphoïdes anormales est seulement soulignée par des alarmes qualitatives.

D : Exemple de graphiques « formule » de lymphocytes anormaux et de blastes

Légende :

IG = myélémie ; NRBC = érythroblastes

→ Au final, en utilisant ces automates, certaines limites et certains avantages se dégagent (tableau n°V) (14),(15). Parmi ces limites, nous pouvons citer celles inhérentes à de mauvaises conditions pré-analytiques. En effet, un délai maximal de six heures entre le prélèvement et l'analyse a été défini au laboratoire comme critère d'acceptation des demandes d'hémogramme (16). Ce délai a été défini selon des recommandations établies par les sociétés savantes (17). Au-delà de ce délai, des perturbations tant qualitatives que quantitatives peuvent apparaître. De plus,

en cas de prélèvement difficile, le sang peut être partiellement coagulé. La présence d'un coagulum fausse la détermination du taux de leucocytes par l'automate car ceux-ci peuvent y être piégés. De même, le taux de leucocyte peut être sous-estimé par une dilution du prélèvement sanguin (prise de sang dans une veine perfusée).

De plus, des limites analytiques sont possibles. L'exemple est celui de la présence d'agrégats plaquettaires en présence d'EDTA (Éthylène Diamine Tétracétique). Dans cette situation, le taux de leucocytes rendu par les deux techniques peut-être différent. Les agrégats plaquettaires sont en effet lysés de manière différente par les solutions de lyse utilisées. Dans la technique d'impédance, la solution de lyse cellulaire puissante, lyse totalement les agrégats plaquettaires. Elle réalise une numération correcte des leucocytes contrairement à la technique de cytométrie en flux. Dans cette dernière technique, les agrégats plaquettaires insuffisamment lysés sont confondus avec des leucocytes. Le même raisonnement s'applique pour les patients présentant des plaquettes géantes ou un grand nombre d'érythroblastes circulants.

De manière comparable, la présence de cryoglobulines pose plusieurs problèmes à l'analyse des leucocytes par l'automate. En effet, les cryoglobulines entraînent d'une part une difficulté d'aspiration du sang total par l'automate. Les tubulures peuvent alors se boucher. D'autre part, elles peuvent précipiter sous la forme de cristaux pouvant atteindre la taille d'un globule blanc. Ces cristaux peuvent par conséquent, être aisément confondus avec des leucocytes.

Au cours de certaines leucémies aiguës ou de certains lymphomes, certaines cellules anormales peuvent être identifiées comme des PNB par l'automate. Ces grandes cellules peuvent effectivement être insuffisamment lysées par la solution de lyse utilisée avec la technique d'impédance. Enfin, l'inconvénient majeur à l'utilisation des automates est celui du manque de sensibilité et de sensibilité des alarmes.

→ Néanmoins, l'automatisation de la NFS présente de nombreux intérêts qui supplantent les techniques manuelles de comptage historiquement utilisées. Le nombre de cellules analysées est bien supérieur à celui des techniques manuelles. Les automates comptent en moyenne 10 000 leucocytes contre 100 avec la formule manuelle. Les automates sont plus fiables lorsque le patient présente des variations quantitatives de faible importance de son hémogramme. Un dernier avantage à l'utilisation des automates est celui de limiter l'analyse microscopique du frottis sanguin aux seuls prélèvements ayant déclenché des alarmes quantitatives et/ou qualitatives.

Limites	Pré-analytique	Non-respect des délais préconisés d'acheminement et d'analyse des prélèvements
		Prélèvement difficile (coagulum, agrégation plaquettaire)
		Dilution du prélèvement
	Analytique	Agrégation plaquettaire à l'EDTA
		Présence de plaquettes géantes ou d'érythroblastes
		Présence de cryoglobulines
		Confusion de grandes cellules avec les PNB
		Manque de spécificité/sensibilité des alarmes
		Aucun décompte des cellules anormales circulantes
Intérêts	Grande nombre de cellules analysés	
	Gain de temps	
	Rationalisation des ressources humaines	
	Déclenchement d'alarmes	

Tableau n°V : Intérêts et limites des analyses automatisées

L'analyse automatisée de l'hémogramme présente de nombreux intérêts. Cependant, à cause du manque de spécificité et de sensibilité des alarmes, une analyse microscopique du frottis sanguin peut être entreprise.

4.4. Place de la microscopie

L'analyse microscopique du frottis sanguin revêt une importance considérable dans la mise en évidence de cellules anormales circulantes. Pour entreprendre une analyse de qualité du frottis, plusieurs conditions sont indispensables. Il faut disposer d'un frottis étalé et coloré correctement qui sera lu par un personnel technique et biologique expérimenté.

4.4.1. Qualité du frottis

Pour la réalisation d'un frottis de bonne qualité (18),(19), il convient tout d'abord de respecter un délai de six heures entre le moment du prélèvement et la réalisation du frottis. Deux techniques peuvent être entreprises pour la réalisation d'un frottis de couche mince : la méthode automatisée et la méthode manuelle.

La technique manuelle nécessite un certain savoir-faire à acquérir (figures n°17 et 18).

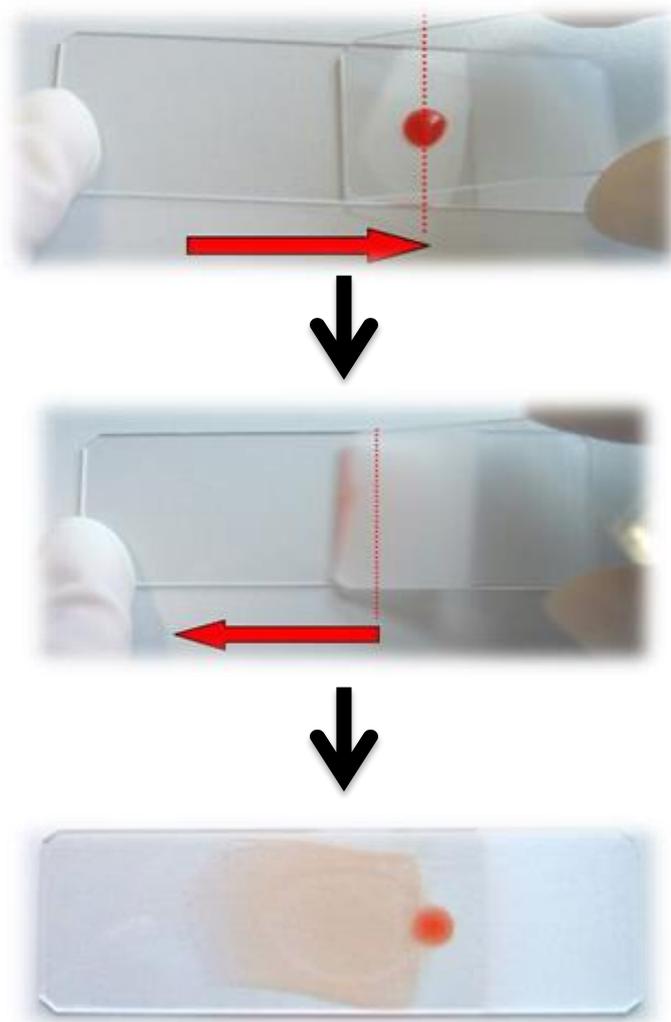


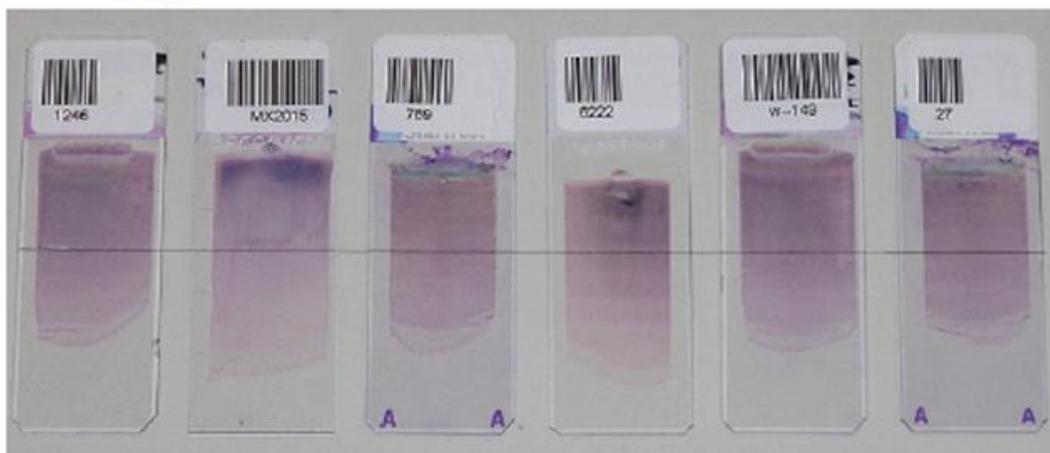
Figure n°17 : Réalisation d'un frottis de couche mince en manuel

Une goutte de sang de volume prédéterminé est étalée sur une lame de verre à l'aide d'une lame à bords rodés (propre et dégraissée) selon un angle et une vitesse d'exécution définis. Une zone d'observation homogène dans laquelle aucunes cellules ne se chevauchent est obtenue. Dans cette zone, nous pouvons apprécier la biconcavité des hématies. L'étalement doit donc être régulier, sans à-coups, sans bulles et sans espaces. Pour ne pas avoir d'artéfacts d'étalement, il convient de sécher la lame à l'air libre.

La technique manuelle est utilisable chez les enfants. En cas d'importantes leucocytoses, il est préférable d'étaler les frottis sanguins en manuel. En effet, une importante leucocytose provoque un sur-étalement des leucocytes et un enserrement de ceux-ci sur les globules rouges. L'aspect de la chromatine peut alors être modifié.

La méthode automatisée est réalisée avec un étaleur de lame. Au CHU de Rouen, nous utilisons le SP-1000® de chez Sysmex. Il présente l'avantage d'être standardisé et de tenir compte de la valeur de l'hématocrite. La viscosité du prélèvement est alors prise en considération. Le frottis obtenu est ainsi ni trop fin, ni trop long et sans franges. Cette méthode n'est cependant pas utilisable pour les très jeunes enfants. Cette technique nécessite en effet, un volume mort important ce qui impossible en raison du faible volume du sang prélevé chez les enfants.

Acceptées



Non acceptées

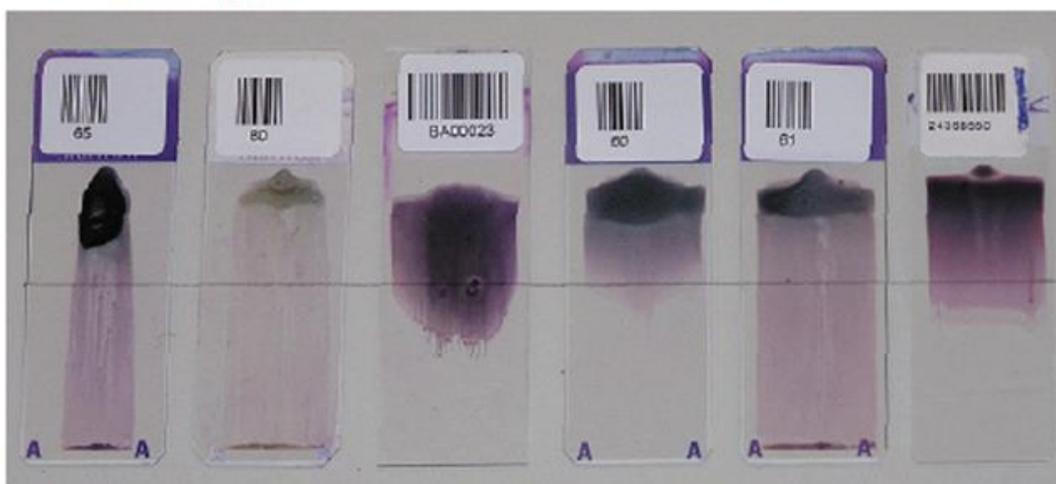


Figure n°18 : Exemple de frottis sanguins de bonne et de mauvaise qualité (20)

4.4.2. Qualité de la coloration

Le frottis sanguin doit être coloré de manière à faire ressortir les détails cytoplasmiques et nucléaires propres à chaque cellule. Un frottis est considéré comme étant bien coloré dès lors que nous pouvons apprécier la couleur rosé des hématies. En utilisant la coloration May-Grünwald Giemsa (MGG ; combinaison d'éosine et de bleu de méthylène), les constituants cellulaires vont suivant leur pH se colorer de manière différente. Les constituants acides comme les granulations des PNB vont interagir avec le colorant basique (ici, le bleu de méthylène) et vont être colorés en noir-magenta. Les constituants basiques comme les granulations des PNE vont interagir avec l'éosine (un colorant acide) et être colorés en rouge-orangé (tableau n°VI).

Colorant, terme technique		Exemple
bleu = «basophile»	 basophile clair	Cytoplasme des lymphocytes
	 basophile foncé	
rouge clair, orange = «acidophile», «éosinophile»	 rouge clair	Membrane d'érythrocytes matures
	 orange	Granulation des granulocytes éosinophiles
violet = «azurophile»	  violet	Chromatine nucléaire, terme principalement utilisé pour la granulation, p.ex. des lymphocytes ou promyélocytes.
rose pâle, brunâtre = «neutrophile»	 rose-brunâtre	Cytoplasme des granulocytes neutrophiles.

Tableau n°VI : Coloration des éléments cellulaires au MGG d'après A. STEIGER (21)

Avec la coloration, nous pouvons alors apprécier la forme, la taille et le rapport nucléocytoplasmique de la cellule (figure n°19). La taille d'une cellule est comparée à celle d'une hématie.

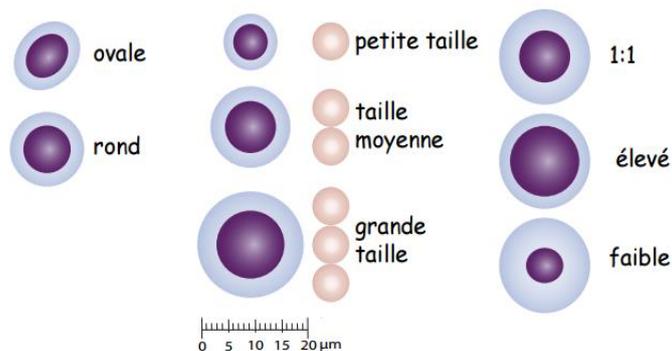


Figure n°19 : Description morphologique d'une cellule avec le critère « taille » d'après A. STEIGER (21)

Une cellule peut aussi être décrite en fonction de la forme de son noyau (figure n°20). Le noyau peut-être segmenté, encoché, rond ou ovale.

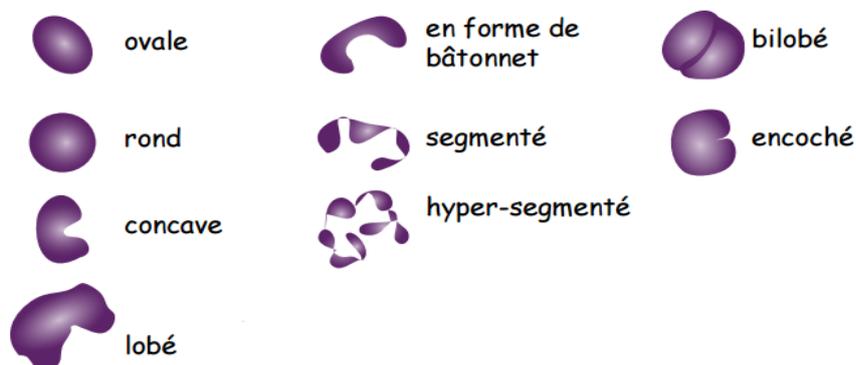


Figure n°20 : Description morphologique d'une cellule avec le critère « forme du noyau » d'après A. STEIGER (21)

La texture de la chromatine est notée. Elle peut-être fine ou compacte. Elle peut présenter un ou plusieurs nucléoles (figure n°21).



Figure n°21 : Description morphologique d'une cellule avec le critère « densité de la chromatine » d'après A. STEIGER (21)

Le cytoplasme peut prendre différentes colorations (figure n°22). Il peut être basophile ou acidophile. Les limites cytoplasmiques sont régulières ou bien vilieuses.

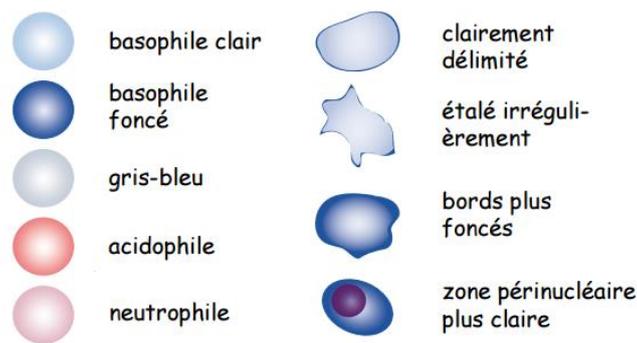


Figure n°22 : Description morphologique d'une cellule avec le critère « couleur du cytoplasme » d'après A. STEIGER (21)

Enfin, des inclusions cytoplasmiques comme des granulations ou des vacuoles, peuvent caractériser des cellules (figure n°23).

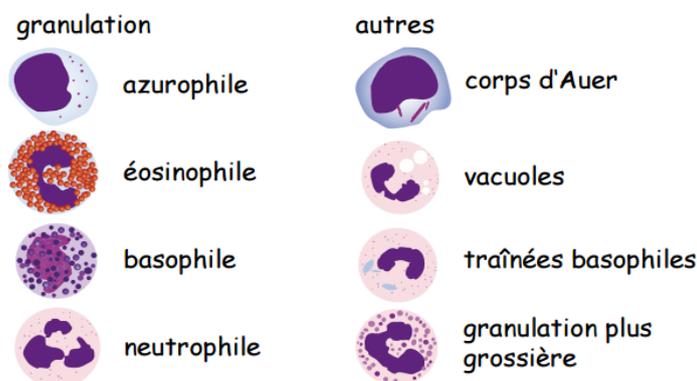


Figure n°23 : Description morphologique d'une cellule avec le critère « inclusion cytoplasmique » d'après A. STEIGER (21)

Le pH des colorants revêt une importance considérable pour une coloration de bonne qualité. A cet effet, une attention particulière doit être portée sur une éventuelle contamination bactérienne. Les colorants doivent être ainsi changés quotidiennement. Ce changement quotidien permet aussi de se prémunir du dépôt de tâches de colorants sur les lames. Les dépôts gênent la lecture au microscope. Enfin, les conditions environnementales devront être suivies pour éviter l'évaporation du méthanol (agent fixateur des colorants).

4.4.2.1. *Aspect morphologique des leucocytes normaux*

L'ensemble des caractéristiques cellulaires et subcellulaires précédemment définies permet de reconnaître un leucocyte (22), (23).

→ Le polynucléaire neutrophile

Ainsi, un PNN est caractérisé par une taille de deux globules rouges environ. Son noyau est polylobé (trois à cinq lobes). Sa chromatine est assez dense. Son cytoplasme contient de nombreuses granulations fines de couleur beige rosé (figure n°24).

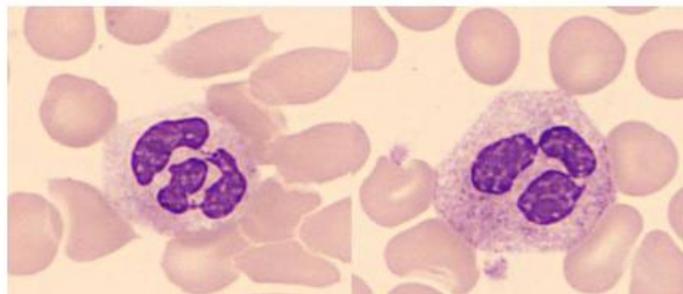


Figure n°24 : Aspect morphologique du PNN (24)

→ Le polynucléaire éosinophile

Un PNE a une taille de deux globules rouges, un noyau bilobé et des granulations de couleur rouge-orangé (figure n°25).

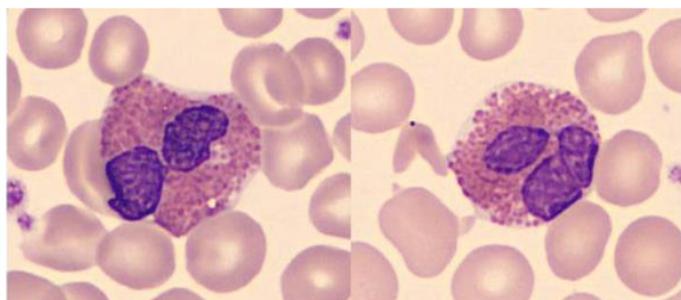


Figure n°25 : Aspect morphologique du PNE (24)

→ Le polynucléaire basophile

Un PNB possède de grosses granulations de couleur noir-magenta masquant le plus souvent, le noyau bilobé. Il a une taille de deux globules rouges (figure n°26).

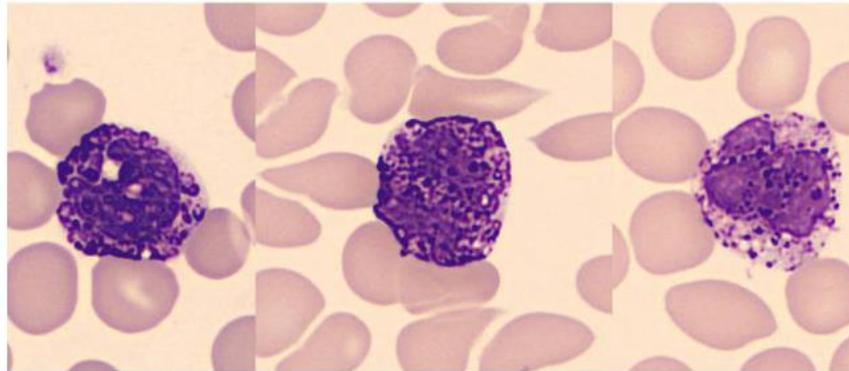


Figure n°26 : Aspect morphologique du PNB (24)

→ Le monocyte

Le monocyte est la cellule la plus difficilement identifiable au microscope en raison des différents aspects que peut prendre son noyau. Le noyau peut en effet être arrondi, ovalaire, réniforme ou très irrégulier. La chromatine est classiquement mottée. Les monocytes sont des cellules de grande taille (trois voire quatre hématies). Ils possèdent un cytoplasme gris-bleuté dans lequel sont dispersés de fines granulations rosées et parfois de rares vacuoles. Néanmoins, en cas de syndrome infectieux ou de régénération médullaire, le cytoplasme peut être légèrement basophile (figure n°27).



Figure n°27 : Aspect morphologique du monocyte (24)

→ Le lymphocyte

Enfin, pour les lymphocytes, nous distinguons deux aspects morphologiques différents. Cette distinction morphologique repose essentiellement sur une différence de taille cellulaire et non sur une distinction fonctionnelle (lymphocyte B ou T). Les lymphocytes de petite taille (taille

équivalente à celle d'une hématie) se démarquent par un noyau arrondi. Leur chromatine est assez dense et de couleur violet foncé. Le cytoplasme est peu étendu.

Les lymphocytes de grande taille sont caractérisés par une taille équivalente à celle de deux globules rouges. Leur noyau assez dense, est de couleur violet foncé. Leur cytoplasme est clair, hyalin ou légèrement basophile (figure n°28).

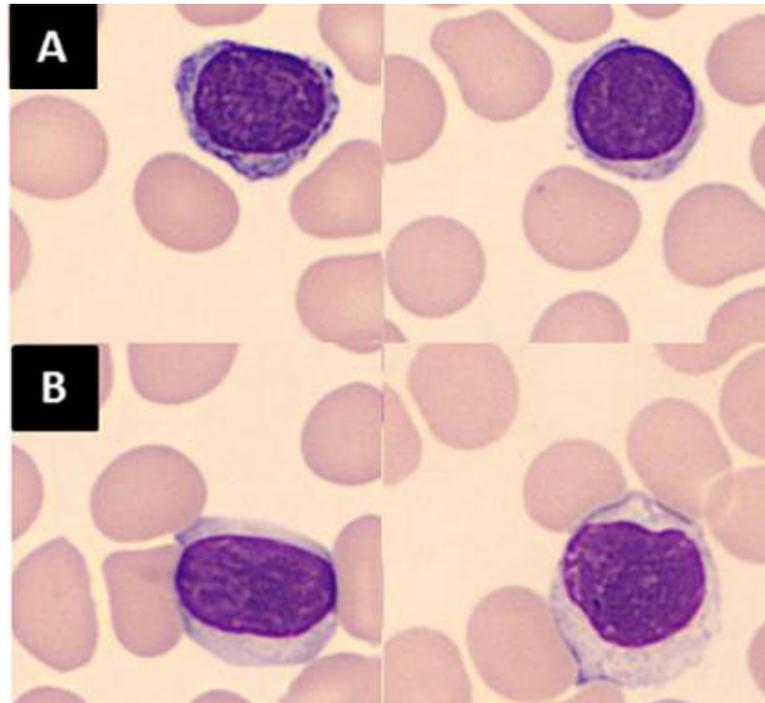


Figure n°28 : Aspects morphologiques du lymphocyte

A : Lymphocytes de petite taille

B : Lymphocytes de grande taille

Chez l'enfant, la morphologie des lymphocytes est plus diversifiée (9),(25). Il existe en effet, une grande diversité à la fois de la taille cellulaire et de la texture de la chromatine. Le contour nucléaire peut être irrégulier. La chromatine est en général, plus fine. Cet aspect témoigne d'une activation du système immunitaire plus intense que chez l'adulte (figure n°29).

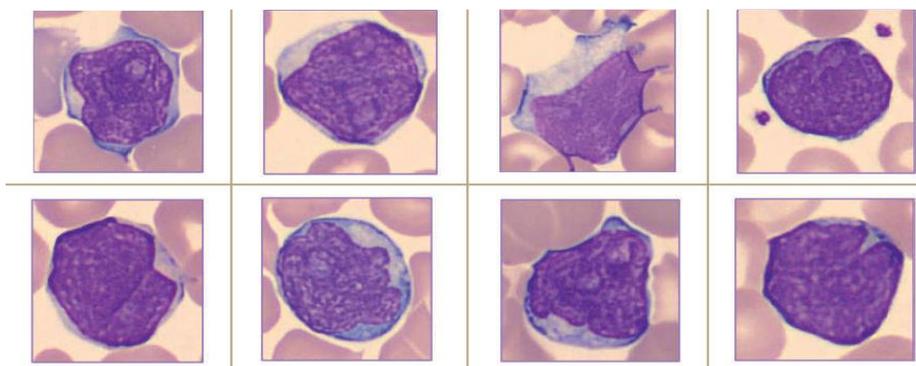


Figure n°29 : Aspect morphologique des lymphocytes chez le nouveau-né et l'enfant d'après E. LAINEY (9)

Au cours d'infections, les lymphocytes peuvent prendre différents aspects. Certains d'entre eux peuvent présenter de rares grains intra-cytoplasmiques. D'autres peuvent être de grande taille avec un cytoplasme très basophile. Ces dernières portent le nom de cellules mononucléées (voir figure n°30). Il s'agit d'un contingent de cellules d'aspect polymorphe et dont la basophilie est en général retrouvée sur le pourtour du cytoplasme. Nous avons vu précédemment, qu'elles n'entraient pas dans la définition des cellules anormales circulantes.

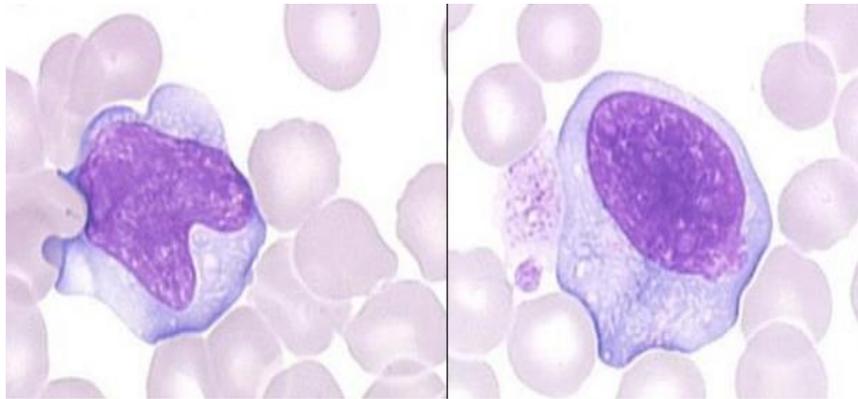


Figure n°30 : Aspect morphologique des cellules mononucléées (26)

Des cellules plasmocytaires peuvent être observées des suites d'un syndrome infectieux. Elles sont caractérisées par une taille équivalente à une ou deux hématies. Le noyau est excentré et rond. La chromatine est dense, mottée et de couleur violet foncé. Le cytoplasme est très basophile avec une zone périnucléaire claire. Cette zone périnucléaire correspond à l'appareil de Golgi (voir figure n°31).

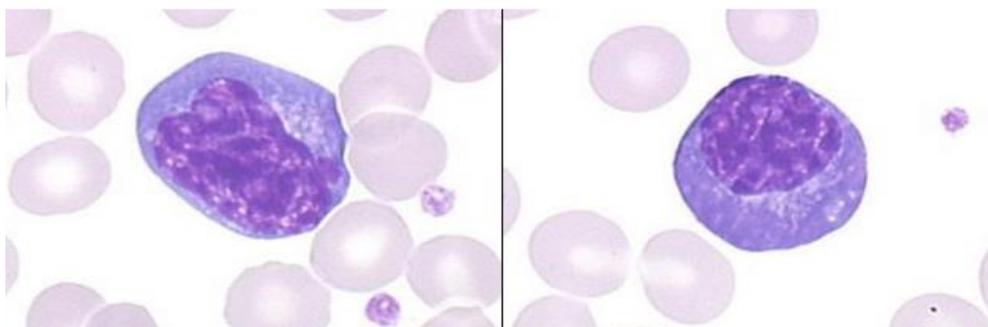


Figure n°31 : Aspect morphologique des cellules plasmocytaires (26)

4.4.2.2. Aspect morphologique des cellules blastiques

A l'instar des diverses origines des cellules blastiques (myéloïde, lymphoïde), plusieurs aspects morphologiques sont décrits. Néanmoins, quelques caractéristiques morphologiques sont en général partagées par de nombreuses cellules blastiques (figure n°32).

Les cellules blastiques ont souvent un aspect monomorphe. Elles possèdent une chromatine très fine souvent associée à la présence d'un ou plusieurs nucléoles. Les différences d'aspect reposent

ainsi essentiellement sur la taille de la cellule, la forme du noyau (régulier, encoché, plié, sinueux) ainsi que sur le rapport nucléo-cytoplasmique. Le cytoplasme est d'abondance variable. Il est fréquemment basophile. Il peut renfermer quelques vacuoles ou quelques granulations.

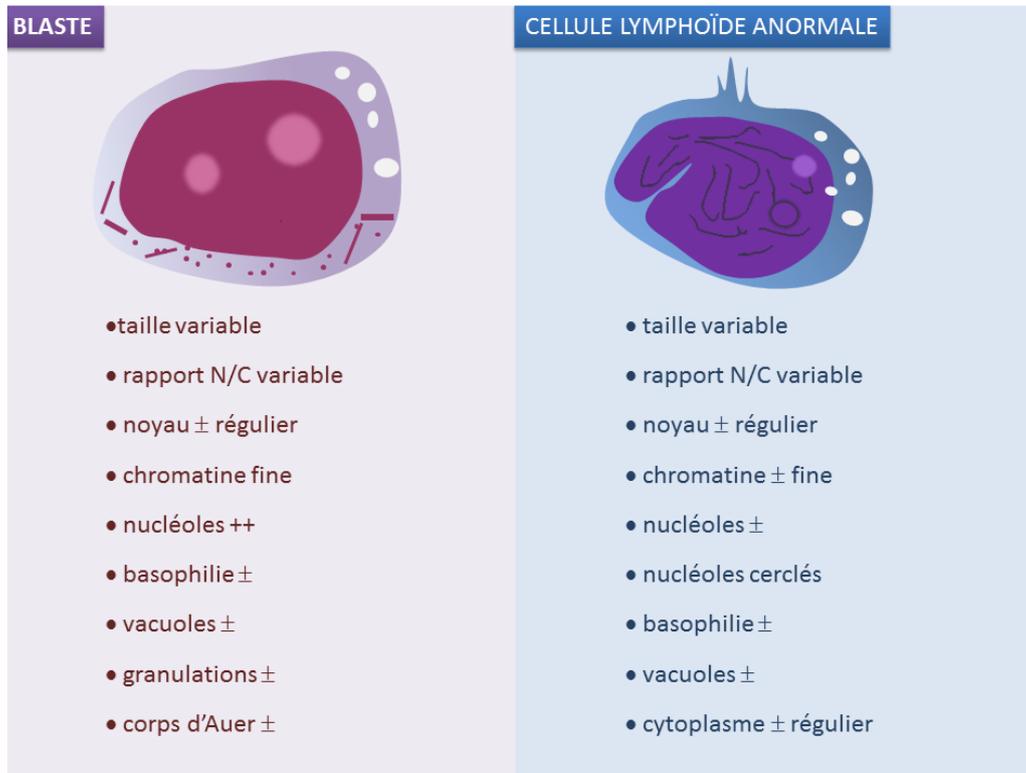


Figure n°32 : Caractéristiques morphologiques générales des cellules blastiques

→ Les leucémies aiguës lymphoblastiques

Les cellules blastiques les plus difficilement identifiables au microscope sont celles des LAL (figure n°33). Leur identification requiert de l'expérience. Les automates de cytologie manquent de sensibilité dans la détection de ces cellules. Deux aspects de lymphoblastes sont décrits. La distinction ne repose pas sur la fonction de ces cellules mais plutôt sur leur taille.

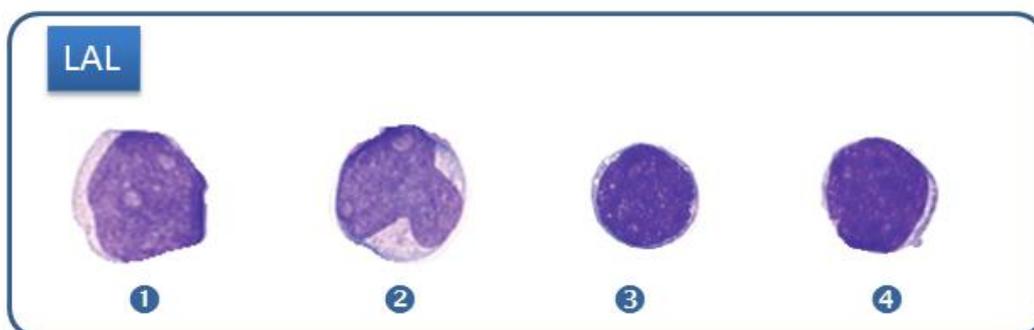


Figure n°33 : Aspects morphologiques des LAL

1-2 : Aspect morphologique de grands lymphoblastes

3-4 : Aspect morphologique de petits lymphoblastes

Les lymphoblastes de grande taille sont plutôt décrits chez l'adulte. Leur chromatine est fine. Elle contient un ou plusieurs nucléoles. Le contour du noyau est irrégulier.

Les lymphoblastes de petite taille présentent une morphologie très proche des lymphocytes (figure n°34). La chromatine est plus ou moins fine. Les nucléoles ne sont pas distinguables. Le contour du noyau est irrégulier et le cytoplasme est légèrement basophile. Ces lymphoblastes sont majoritairement retrouvés chez les enfants.

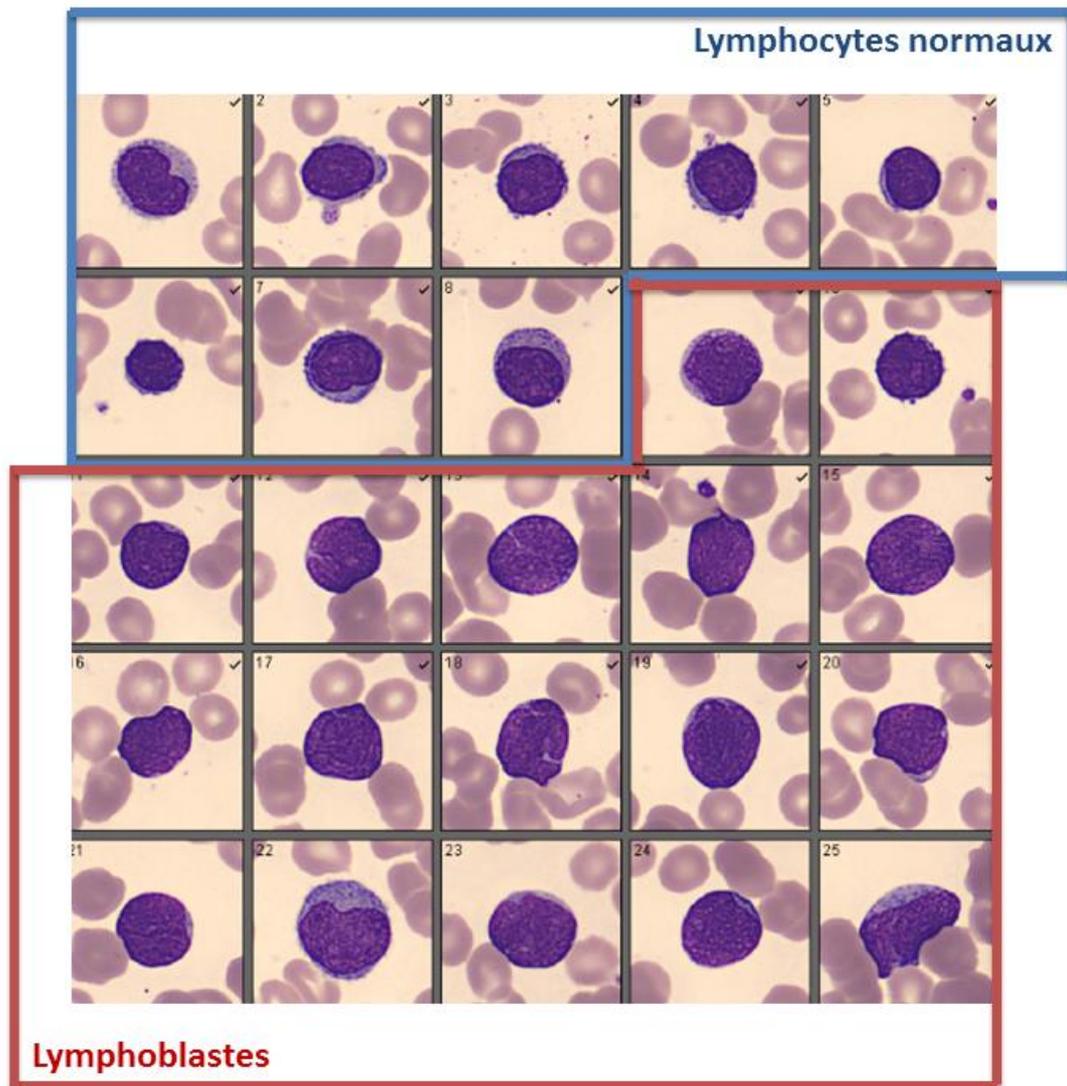


Figure n°34 : Distinction entre un petit lymphoblaste et un lymphocyte

La distinction entre ces deux cellules repose essentiellement sur la texture de la chromatine.

→ Les leucémies aiguës myéloblastiques

Les LAM sont plus variées morphologiquement (figure n°35). Certaines granulations sont évocatrices d'un type de LAM en particulier. L'exemple le plus connu est celui de la LAM 3. Elle associe la présence de corps d'Auer en fagots, de nombreuses granulations ou de noyaux bilobés (figure n°35 – 5 à 7).

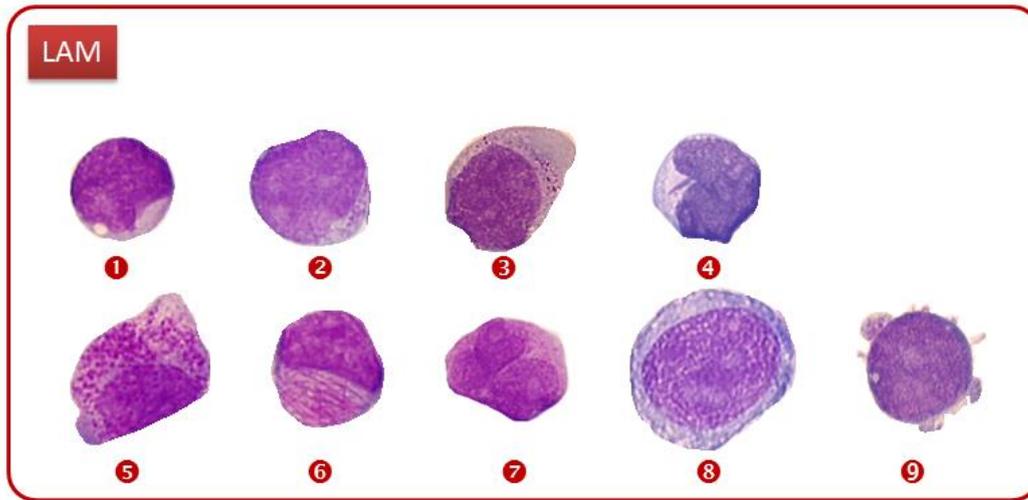


Figure n°35 : Aspects morphologiques des LAM

1 : Myéloblaste agranuleux - La cellule est de taille variable avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Le contour nucléaire est souvent régulier. La chromatine est fine avec quelques nucléoles. Le cytoplasme est basophile.

2-3 : Myéloblaste granuleux - Présence de fines granulations azurophiles

4 : Myéloblaste granuleux - Présence d'un corps d'Auer

5 : Promyélocyte avec présence de très nombreuses granulations azurophiles

6 : Promyélocyte avec présence de corps d'Auer en fagots

7 : Promyélocyte avec présence d'un noyau bilobé

8 : Monoblaste - La cellule est de grande taille. Le cytoplasme est abondant et basophile avec parfois des granulations et des vacuoles. La chromatine est fine avec un nucléole proéminent. Le noyau est ovalaire et plus ou moins irrégulier.

9 : Mégacaryoblaste - La cellule est de taille réduite ou moyenne. Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé. Des bourgeons cytoplasmiques ressemblant aux plaquettes sont parfois visibles.

Une différenciation monocyttaire est suspectée quand les noyaux présentent des replis et que le cytoplasme est abondant et très légèrement basophile (figure n°36).

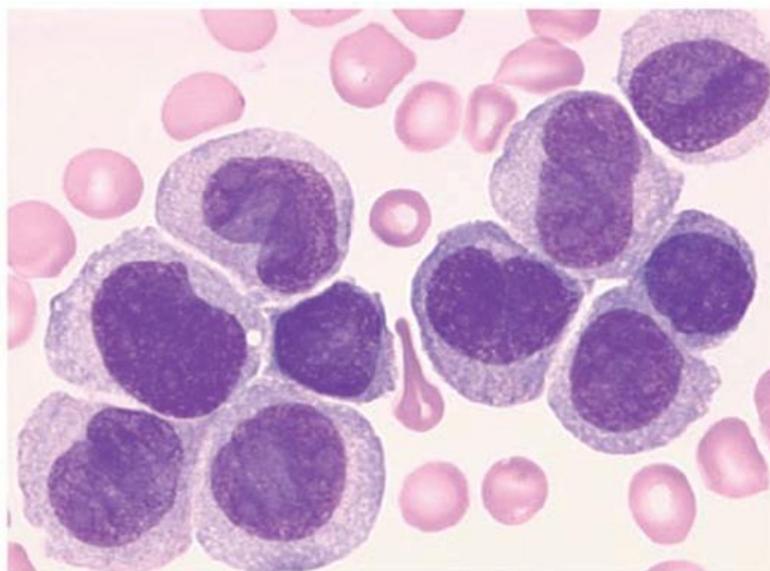


Figure n°36 : Aspect morphologique d'une leucémie aiguë à monoblastes d'après M. IMBERT (6)

Il convient cependant de ne pas confondre les cellules blastiques avec les cellules mononucléées (figure n°37). Cette confusion est souvent faite car ces cellules partagent de nombreux points communs. Elles ont toutes les deux un cytoplasme basophile et un noyau avec quelques nucléoles. Néanmoins, les cellules mononucléées possèdent une chromatine plus condensée que celles des blastes et contrairement à l'aspect monomorphe des cellules blastiques, elles peuvent prendre différents aspects morphologiques chez un même patient.

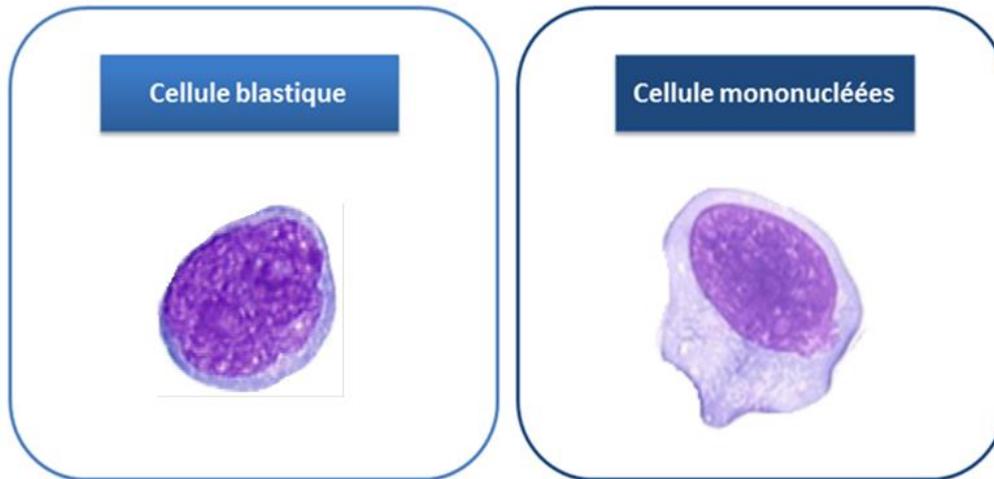


Figure n°37 : Distinction entre une cellule blastique et une cellule mononucléée

Enfin, les blastes peuvent aisément être confondus avec d'autres cellules comme les micromégacaryocytes. Il s'agit de petites cellules avec un noyau rond à chromatine condensée. Il n'y a pas de nucléole. Le cytoplasme est très réduit avec parfois des granulations ressemblant aux plaquettes (figure n°38).

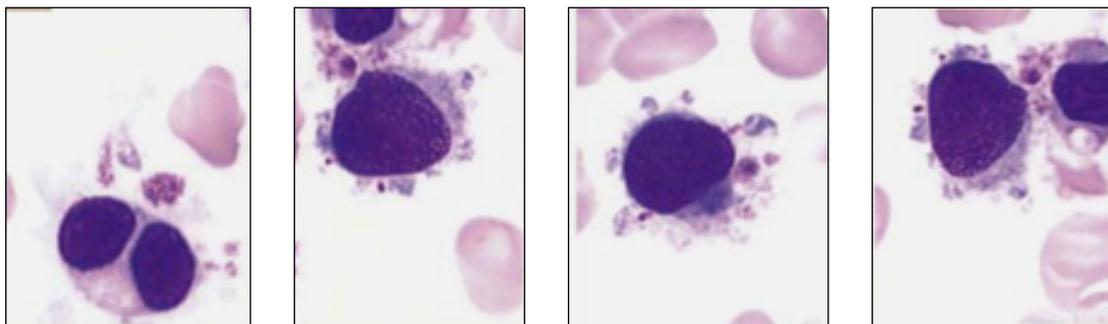


Figure n°38 : Aspect morphologique d'un micromégacaryocyte d'après O. WAGNER-BALLON (28)

4.4.2.3. Aspects morphologiques des cellules lymphoïdes anormales

La reconnaissance des lymphocytes anormaux repose essentiellement sur des caractéristiques cellulaires parfois subtiles (figure n°39). Elle tient compte de la texture de la chromatine, du type d'encoques nucléaires et de l'intensité de la basophilie. L'aspect d'éventuelles irrégularités du contour cytoplasmique est apprécié. La cellule est qualifiée en fonction de sa taille et de son rapport nucléo-cytoplasmique.

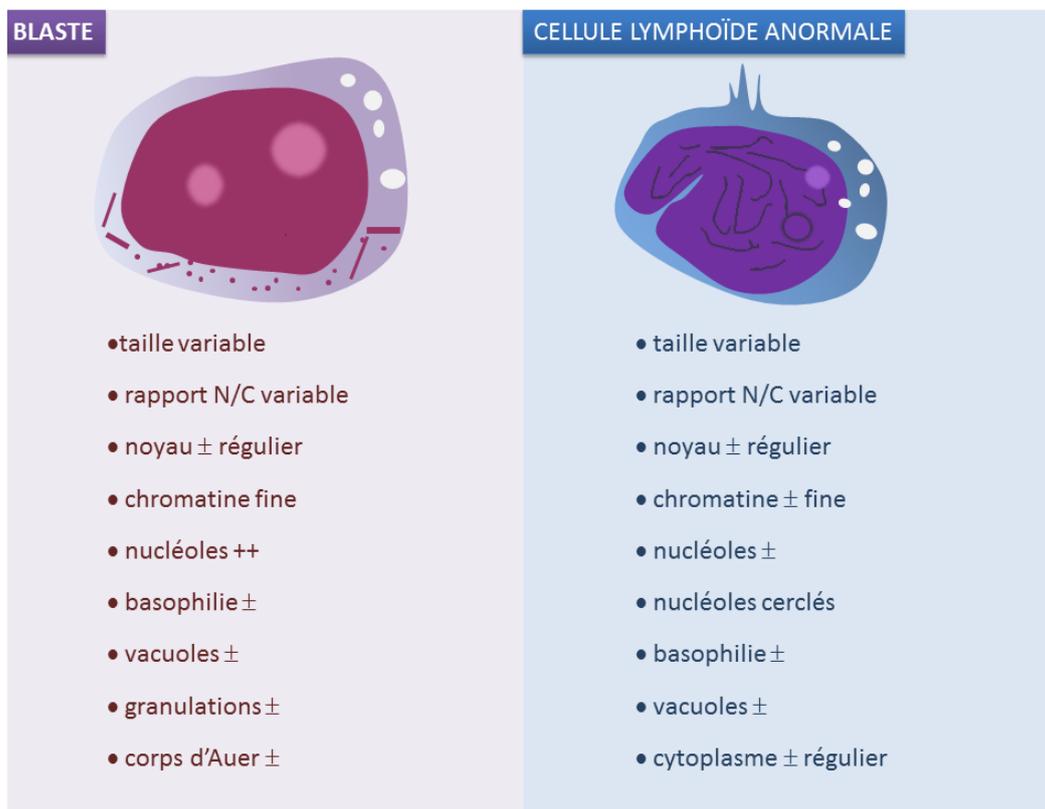


Figure n°39 : Caractéristiques morphologiques générales des cellules lymphoïdes anormales

Les lymphocytes anormaux ont souvent un caractère monotone. La combinaison des différents critères permet ainsi de proposer le plus souvent une orientation diagnostique sur la seule cytologie. L'aspect morphologique des cellules lymphoïdes anormales peut aussi se distinguer selon que la cellule est d'origine B ou T.

4.4.2.3.1. Aspects morphologiques des SLP-B

Dans ce chapitre, nous allons décrire l'aspect morphologique de plusieurs SLP-B (figure n°40) parmi lesquels :

- la LLC
- la LLC atypique
- le LPL-B
- le LCM
- le LF
- le LZM
- la LT
- le LB
- et le DLBCL.

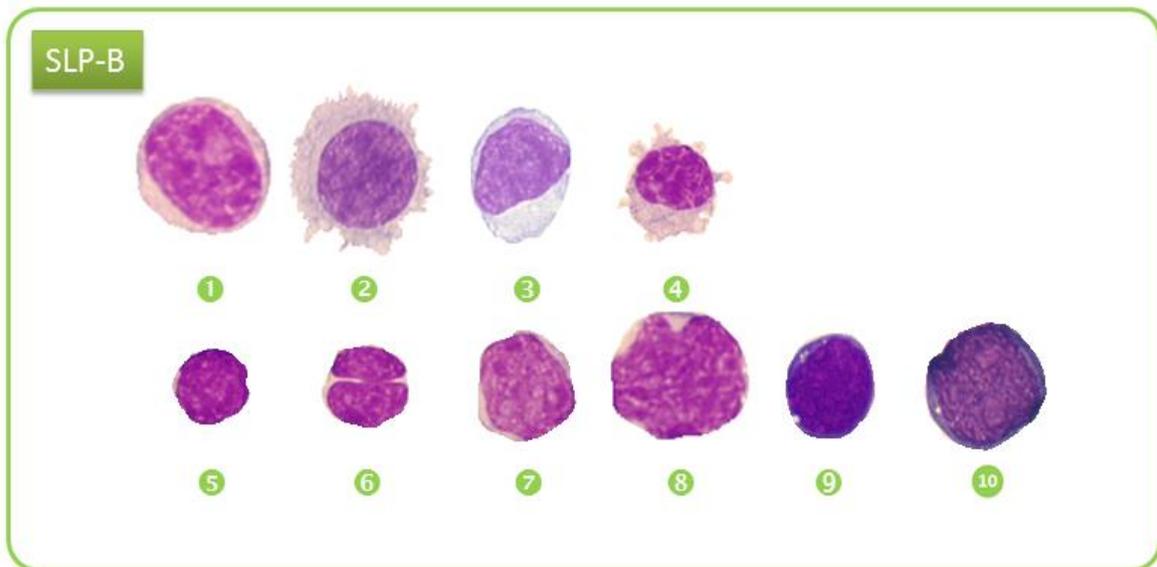


Figure n°40 : Aspects morphologiques des SLP- B

1 : LPL-B ; 2 : LT ; 3 : LZM ; 4 : SLVL ; 5-6: LF ; 7-8 : LCM ; 9 : LB ; 10 : DLBCL

→ La leucémie lymphoïde chronique

L'aspect typique de la LLC correspond à une population monomorphe de petits lymphocytes. Ils sont caractérisés par un noyau rond avec une chromatine très condensée en aspect en damier. Le cytoplasme est peu abondant (figure n°41). Sa morphologie est proche d'un lymphocyte normal, c'est pourquoi ils sont en pratique décomptés avec ces derniers (figure n°42).

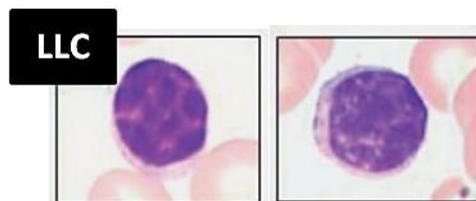


Figure n°41 : Aspect morphologique de la LLC d'après L. BASEGGIO (11)

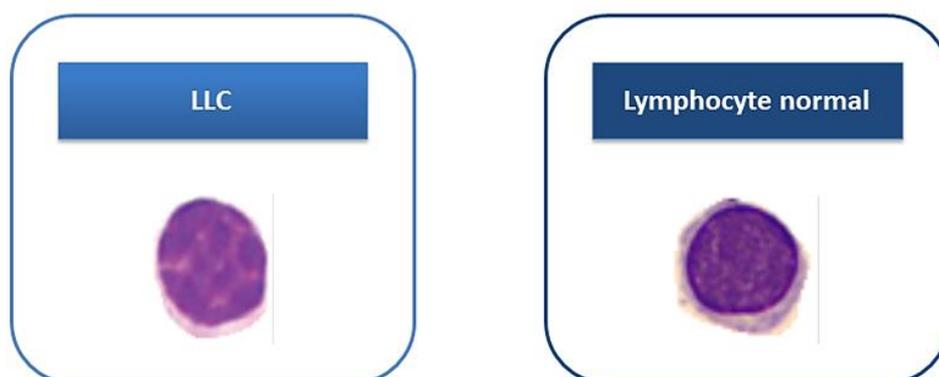


Figure n°42 : Distinction entre un lymphocyte de LLC et un lymphocyte normal

De nombreuses ombres de Gumprecht sont retrouvées sur le frottis (figure n°43). Ces ombres sont des artéfacts d'étalement. Il s'agit de lymphocytes qui ont éclaté sous l'effet de la pression de la lame d'étalement. Il convient donc d'identifier ces ombres et de les compter pour éviter une sous-estimation de la lymphocytose, mais il est cependant préférable de les décompter à part en raison du caractère pronostique de leur proportion relative. Il faut néanmoins les distinguer des cellules lysées que nous pouvons observer lorsque le plasma est lipémique ou que le frottis est réalisé tardivement.

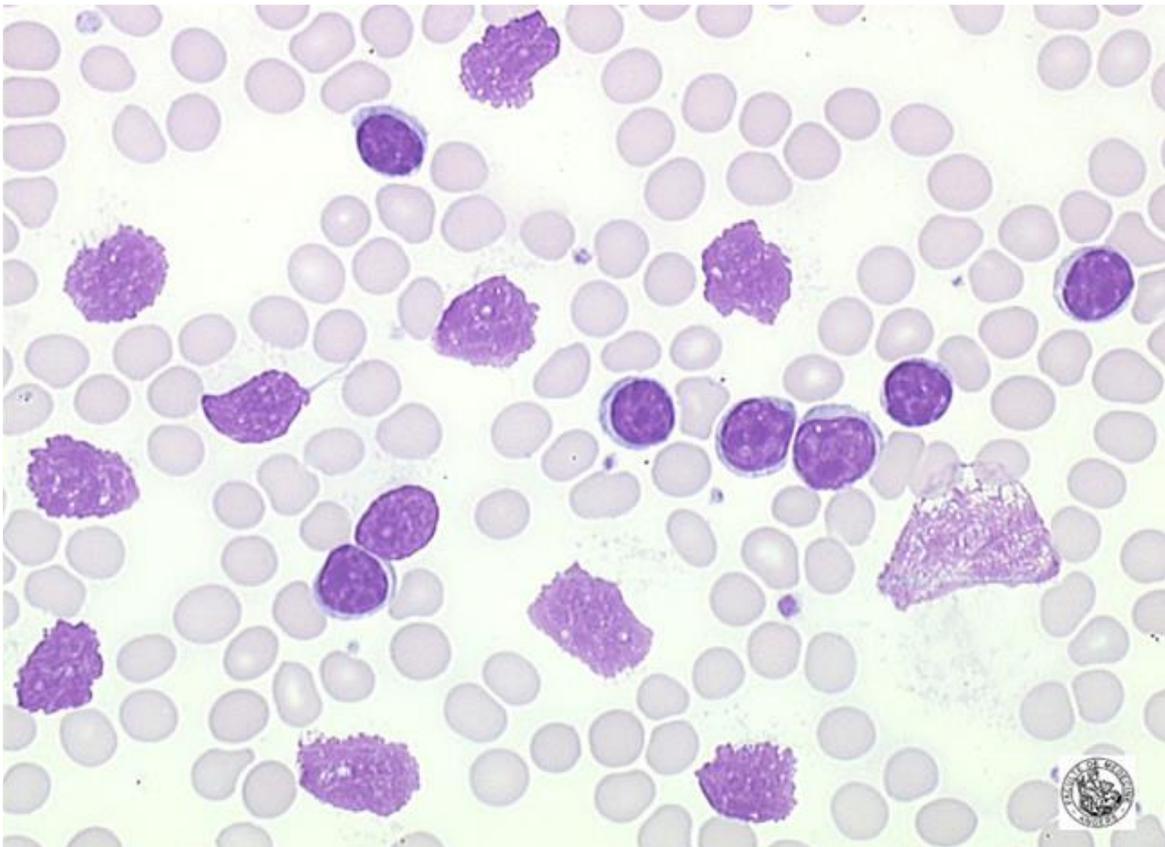


Figure n°43 : Aspect morphologique des ombres de Gumprecht (29)

Il est important dans le suivi des LLC de noter la présence de pro-lymphocytes afin de dépister une éventuelle évolution en LPL-B.

→ La LLC atypique

La LLC atypique correspond à une population monomorphe de petits lymphocytes avec un noyau encoché et une chromatine très dense. Certaines cellules peuvent avoir un aspect lymphoplasmocytoïde et sont reconnaissables du fait d'un noyau à chromatine dense excentré dans un cytoplasme basophile plus ou moins abondant (figure n°44).

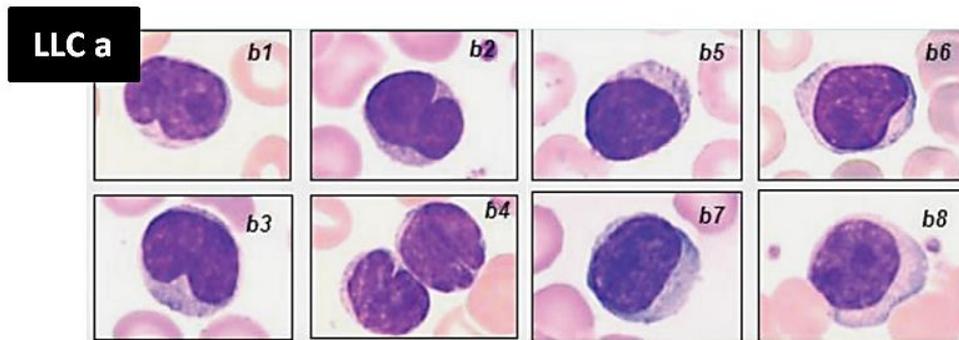


Figure n°44 : Aspect morphologique de la LLC atypique d'après L. BASEGGIO (11)

→ La leucémie pro-lymphocytaire B

Les pro-lymphocytes B sont un peu plus grands que les lymphocytes. Leur cytoplasme est clair et plus ou moins abondant. Leur noyau a une chromatine dense marquée par un nucléole proéminent (figure n°45).

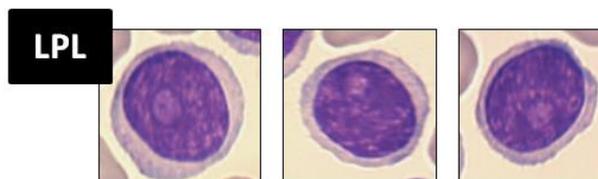


Figure n°45 : Aspect morphologique de la LPL-B

→ Le lymphome du manteau

L'aspect typique du LCM correspond, en général, à une population monomorphe de lymphocytes avec des noyaux plus ou moins irréguliers. La chromatine est dispersée avec un nucléole proéminent. Le cytoplasme est peu abondant et peu basophile (figure n°46).

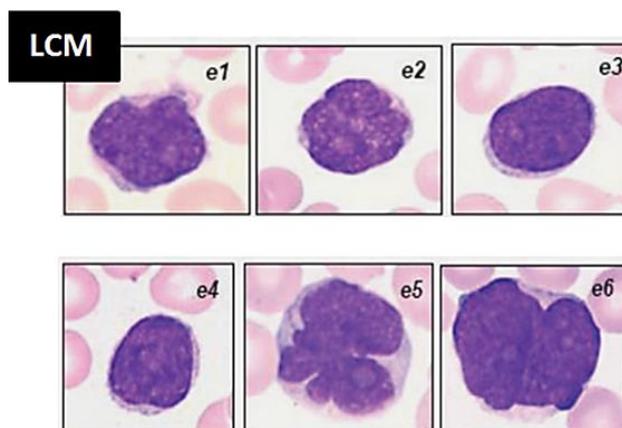


Figure n°46 : Aspect morphologique du LCM d'après L. BASEGGIO (11)

→ Le lymphome folliculaire

L'aspect typique du LF est celui de lymphocytes de petite taille. Le noyau présente une encoche profonde. La chromatine est dense et sans nucléole visible. Le cytoplasme est très réduit (voir figure n°47).

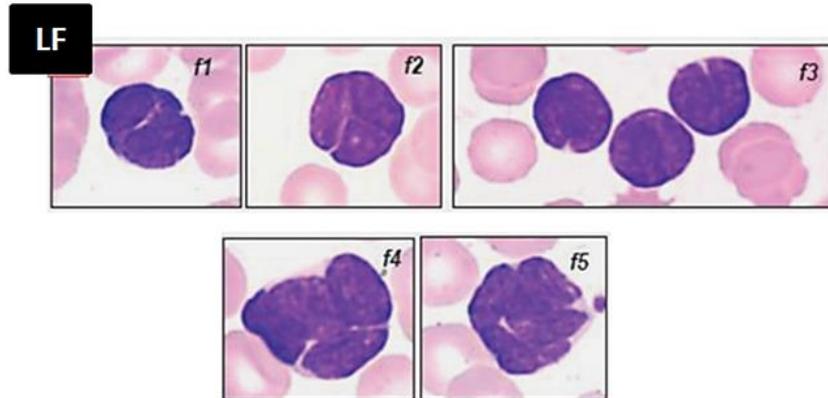


Figure n°47 : Aspect morphologique du LF d'après L. BASEGGIO (11)

→ Le lymphome de la zone marginale

L'aspect morphologique des lymphocytes du LZM est difficile à appréhender en raison de l'aspect polymorphe des lymphocytes (voir figure n°48). A des cellules lympho-plasmocytoïdes sont associées de petits lymphocytes à chromatine dense. Certains de ces petits lymphocytes comportent de fines villosités cytoplasmiques réparties de manière polaire.

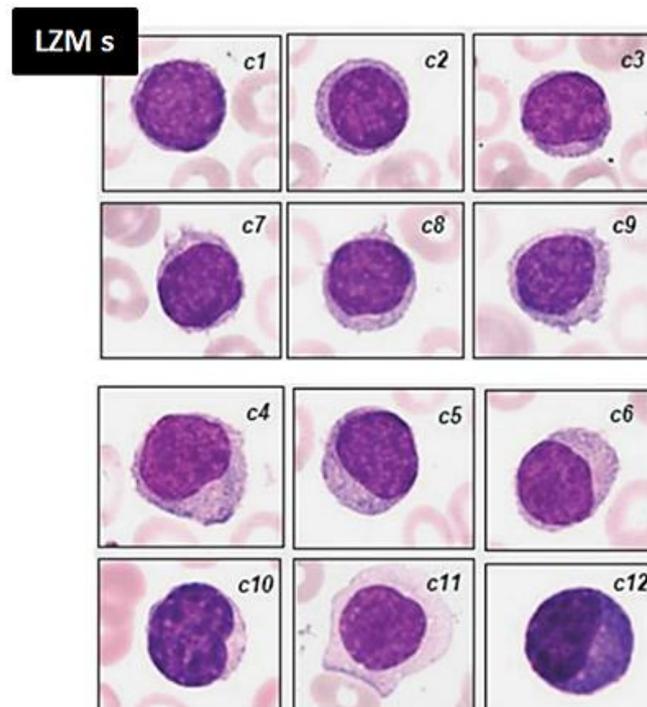


Figure n°48 : Aspect morphologique du LZM d'après L. BASEGGIO (11)

Différents types de LZM sont décrits comme le lymphome splénique à lymphocytes vilieux ou bien le lymphome diffus de la pulpe rouge splénique avec lymphocytes vilieux. Les lymphocytes vilieux sont caractérisés par un noyau à chromatine mottée. Le cytoplasme est basophile avec des villosités réparties à un ou deux pôles de la cellule (figure n°49). La présence de villosités est très dépendante de la qualité de l'étalement. En effet, lorsque la pression de la lame d'étalement est trop forte, les villosités peuvent disparaître.

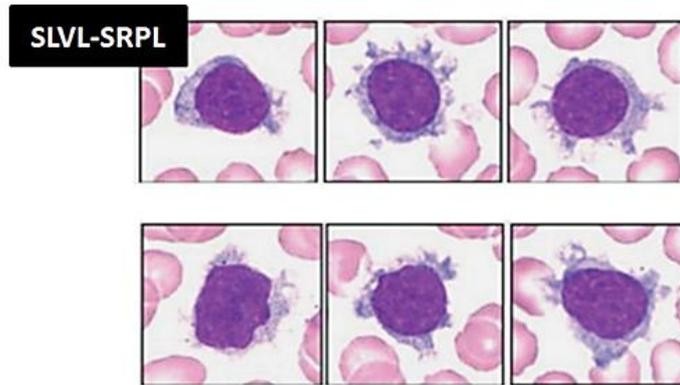


Figure n°49 : Aspect morphologique de lymphocytes vilieux d'après L. BASEGGIO (11)

→ La leucémie à tricholeucocytes

L'aspect typique des cellules de la LT est celui de cellules de petite taille (figure n°50). La chromatine est fine et sans nucléole. Le cytoplasme est assez abondant, gris-bleuté et spumeux. Son contour est mal défini avec de fines villosités parfois.

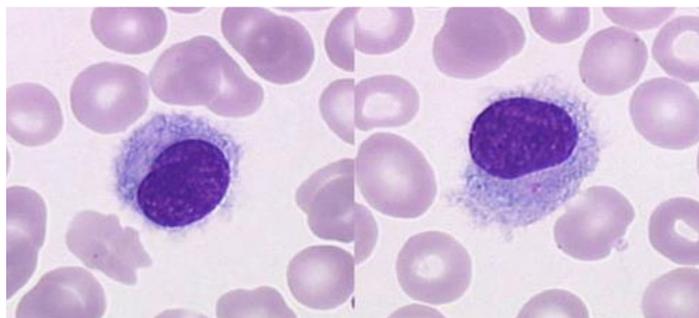


Figure n°50 : Aspect morphologique de la LT (30)

→ Le lymphome de Burkitt

Les cellules du lymphome de Burkitt sont de taille moyenne. Le noyau est arrondi. La chromatine est dense avec quelques nucléoles présentant un aspect cerclé. Le cytoplasme est très basophile et peut contenir des vacuoles (figure n°51).

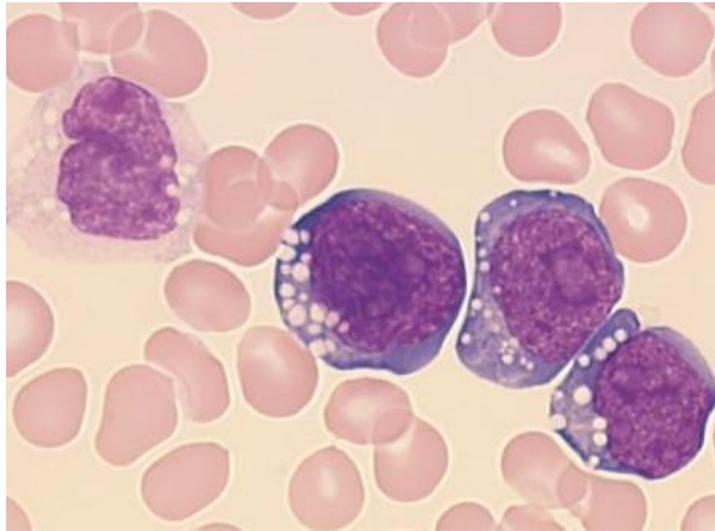


Figure n°51 : Aspect morphologique du LB d'après H. MOSSAFA (31)

→ Le lymphome diffus à grandes cellules B

Les lymphocytes du DLBCL ont une taille variable, mais souvent un peu augmentée. Le cytoplasme est relativement abondant et franchement basophile. Le noyau souvent irrégulier, présente de volumineux nucléoles (figure n°52).

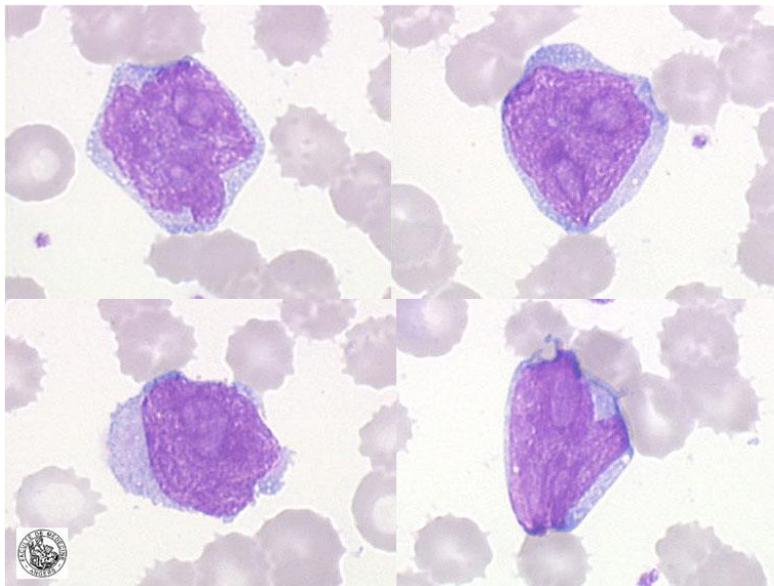


Figure n°52 : Aspect morphologique du DLBCL (32)

4.4.2.3.2. Aspects morphologiques des SLP-T

Les SLP-T que nous allons décrire par la suite sont (figure n°53) :

- le LGL
- le LPL-T
- la ATLL
- le SS
- et le lymphome T anaplasique.

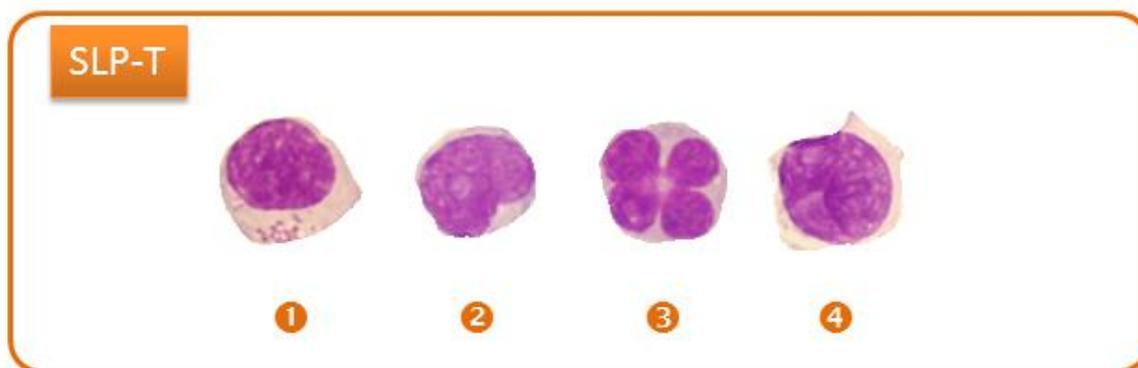


Figure n°53 : Aspects morphologiques des SLP-T
1 : LGL ; 2 : LPL-T ; 3 : ATLL ; 4 : SS

→ La leucémie à grands lymphocytes granuleux

Il s'agit de lymphocytes avec un cytoplasme abondant dans lequel des granulations azurophiles sont visibles (figure n°54).

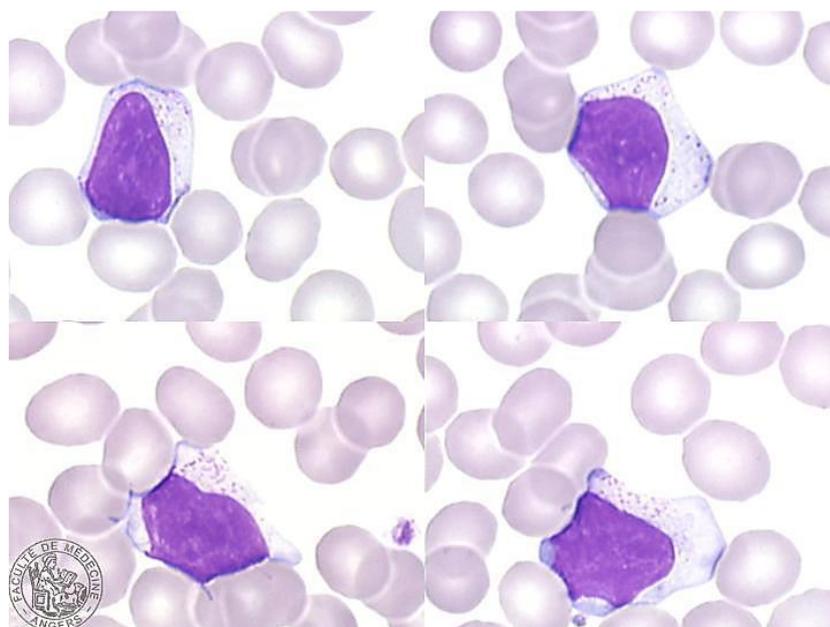


Figure n°54 : Aspect morphologique de la LGL (33)

→ La leucémie pro-lymphocytaire T

L'aspect de cette leucémie est proche de celui de la LPL-B (figure n°55). On distingue ces deux leucémies par le contour du noyau. Les lymphocytes anormaux de la LPL-B ont un noyau régulier contrairement au noyau généralement irrégulier de la LPL-T. Le contour cytoplasmique peut ne pas être régulier. Des blebs (protrusions cytoplasmiques) peuvent être visibles.

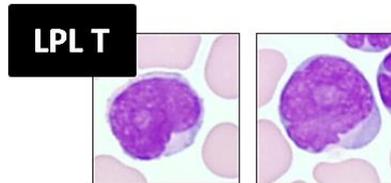


Figure n°55 : Aspect morphologique de la LPL-T

→ La leucémie/lymphome T de l'adulte

L'aspect des lymphocytes de la ATLL est celui de petit lymphocytes avec une chromatine dense (figure n°56). Le noyau présente de nombreuses scissures (aspect d'une fleur). Le cytoplasme est réduit et légèrement basophile.

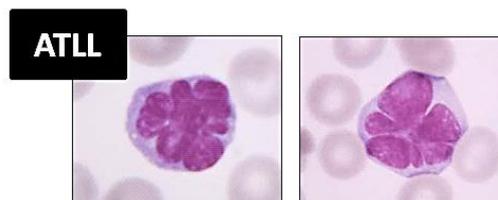


Figure n°56 : Aspect morphologique de la ATLL

→ Le syndrome de Sézary

Ces cellules de petite taille, sont caractérisées par la présence d'un ou de plusieurs replis nucléaires en "coup d'ongle" (figure n°57). Ces replis donnent un aspect cérébriforme. Ces lymphocytes sont difficiles à identifier par les automates de cytologie. D'où, la nécessité d'entreprendre une analyse microscopique du frottis à chaque demande de recherche de cellules de Sézary.

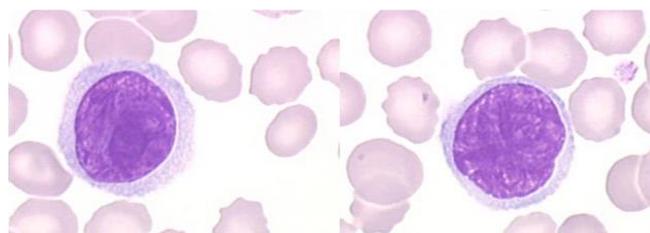


Figure n°57 : Aspect morphologique du SS (34)

→ Le lymphome T anaplasique

Le lymphome T anaplasique est caractérisé par des cellules de taille variable, mais souvent augmentée. La chromatine est dense et peut contenir quelques nucléoles. Le cytoplasme est d'abondance variable et très basophile. Il peut être marqué par la présence de quelques vacuoles et de blebs.

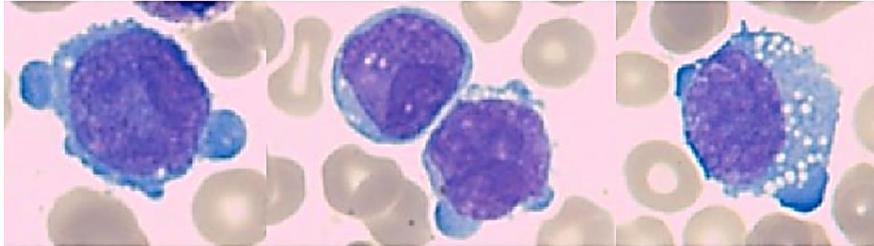


Figure n°58 : Aspect morphologique du lymphome T anaplasique

4.4.3. Bonnes pratiques de lecture d'un frottis sanguin

Concrètement, à l'aide d'un microscope bien entretenu et d'une illumination adéquate de la lame, il convient tout d'abord d'effectuer un repérage des leucocytes. Ce repérage s'effectue au faible grossissement (objectif x10). Il permet d'apprécier l'hétérogénéité des populations leucocytaires étudiées et de repérer une zone de lecture adéquate (monocouche). Puis, une formule sanguine sur 100 éléments est entreprise à un fort grossissement (objectifs x50 ou 100 ; figure n°59). Durant le décompte des 100 leucocytes, il convient par la même occasion, d'observer attentivement les hématies et les plaquettes.

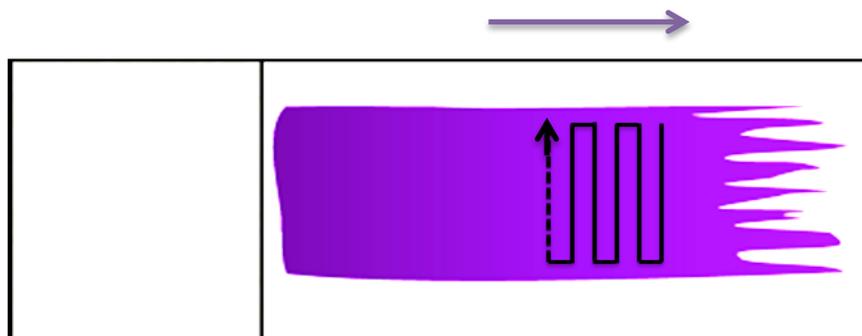


Figure n°59 : Méthodologie utilisée pour l'analyse d'un frottis sanguin

La lecture d'un frottis sanguin s'effectue selon le principe de la marche en avant où il convient de décompter 100 cellules successives (suivi de la flèche noire). Cette méthodologie a pour but de limiter le biais de lecture.

Légende :

La flèche violette représente le sens d'étalement du frottis.

4.4.4. Règles de revue microscopique des frottis sanguins

Afin de ne pas méconnaître la présence de cellules anormales circulantes, des règles de revue microscopique des frottis sanguins ont été établies au CHU de Rouen. Ces règles ont été établies selon des recommandations de sociétés savantes (35). La lecture du frottis s'effectue alors en deux temps. Une première lecture est effectuée par les techniciens (tableau n°VII). Puis, une seconde est entreprise par les biologistes (figure n°60).

GB / FORMULE					
GB	<3 G/L ou >30G/L	et NGP		+ FS	
GB	<3 G/L	Hb <11 g/dL ou plaq < 130 G/L	Lame		Faire formule
GB	<1 G/L	Onco péd		Répondre IE sur FS	
GB	<1 G/L	Autre service	Lame	1 ^{ère} fois	Chercher anormales
GB anormal scatter	Graphé baso anormal			Valider GB diff	
GB anormal scatter	Graphé diff anormal à la FS	Lame		Faire formule
Si NGP	GB + 100% ou - 50%		Lame	+ FS	
Erythroblastes (NRBC)	>10%	et NGP		+ FS systématiquement	NRBC>464% vérif FS et GB
PN #	<1,5 G/L	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
EOS ##	>1,5 G/L ou f(age)	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
Baso	>0,2 G/L	Chaque fois	Lame		Faire formule
Ly f(age) #	>4 G/L ou f(age)	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
Ly #	>5 G/L	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
Mono ##	>1,5G/L et l g >2%	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
Mono ##	>2	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
HFLC	>2 %	Chaque fois	Lame		Faire formule
IG % ##	>4% et 10%	1 ^{ère} fois	Lame		Faire formule
IG %	>10 %	Chaque fois	Lame		Faire formule
PN ou Ly ou Mono	< 0,1 G/L	Chaque fois	Lame		Faire formule
Blastes ?		Chaque fois	Lame		Faire formule
AbnLy / Lybl?		Chaque fois	Lame		Faire formule
Dév gauche/PN hyposeg		et GB<3 G/L	Lame	SMD?	Faire formule
@ GB	GB> 440G/L	WBC-BF>10		Diluer sang / liquide divers	

à contrôler sur lame si antériorité > 1 mois

à contrôler sur lame si antériorité > 1 an

Tableau n°VII : Règles de revue microscopique des frottis sanguins par les techniciens du laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen (36)

8 Frottis de sang à faire contrôler aux Biologistes

Pour les critères suivants, imprimer le résultat de la NF et noter les initiales du technicien sur la feuille. Essuyer délicatement la lame avec un chiffon et donner cette feuille et la lame aux Biologistes de cytologie ou au Biologiste d'astreinte. Sur MPL, assigner le dossier au poste des Biologistes ★

- découverte ou rechute de leucémie
- présence de blastes ou cellules anormales
- neutropénie non connue (<1,5 G/L) sans ttt (chimio, immunosuppresseurs...)
- éosinophilie > 5 G/L
- basophilie > 0,5 G/L ou 5%
- lymphocytose non connue (>5 G/L)
- monocytose > 3 G/L avec myélémie et/ou thrombopénie (<130 G/L)
- monocytose > 5 G/L
- cellules mononucléées et/ou plasmocytaires > 5%
- doute sur un type de cellule
- doute sur la présence de schizocytes
- schizocytes rares ou plus la 1^{ère} fois
- morphologie érythrocytaire (voir chapitre 7-3)
- cytophèreses, moelle, lymphocytes vacuolés, hématies ponctuées, cellules de Sézary
- Kleihauer douteux ou positif ≥ 9/10 000 (labo CN)
- Pancytopenie non connue sans chimio, avec ou sans cellules anormales
- Morphologie plaquettaire anormale ou analyse demandée (MPL)
- Méga plaquettes (plus de 10 % des plaquettes de taille > taille GR) avec thrombopénie

Figure n°60 : Règles de revue microscopique des frottis sanguins par les biologistes du CHU de Rouen (37)

Des modalités de validation de la formule sanguine après lecture au microscope ont été définies (figure n°61). Ces règles dépendent de l'alarme ayant motivée l'analyse microscopique. L'alarme peut être soit de nature quantitative, soit de nature qualitative.

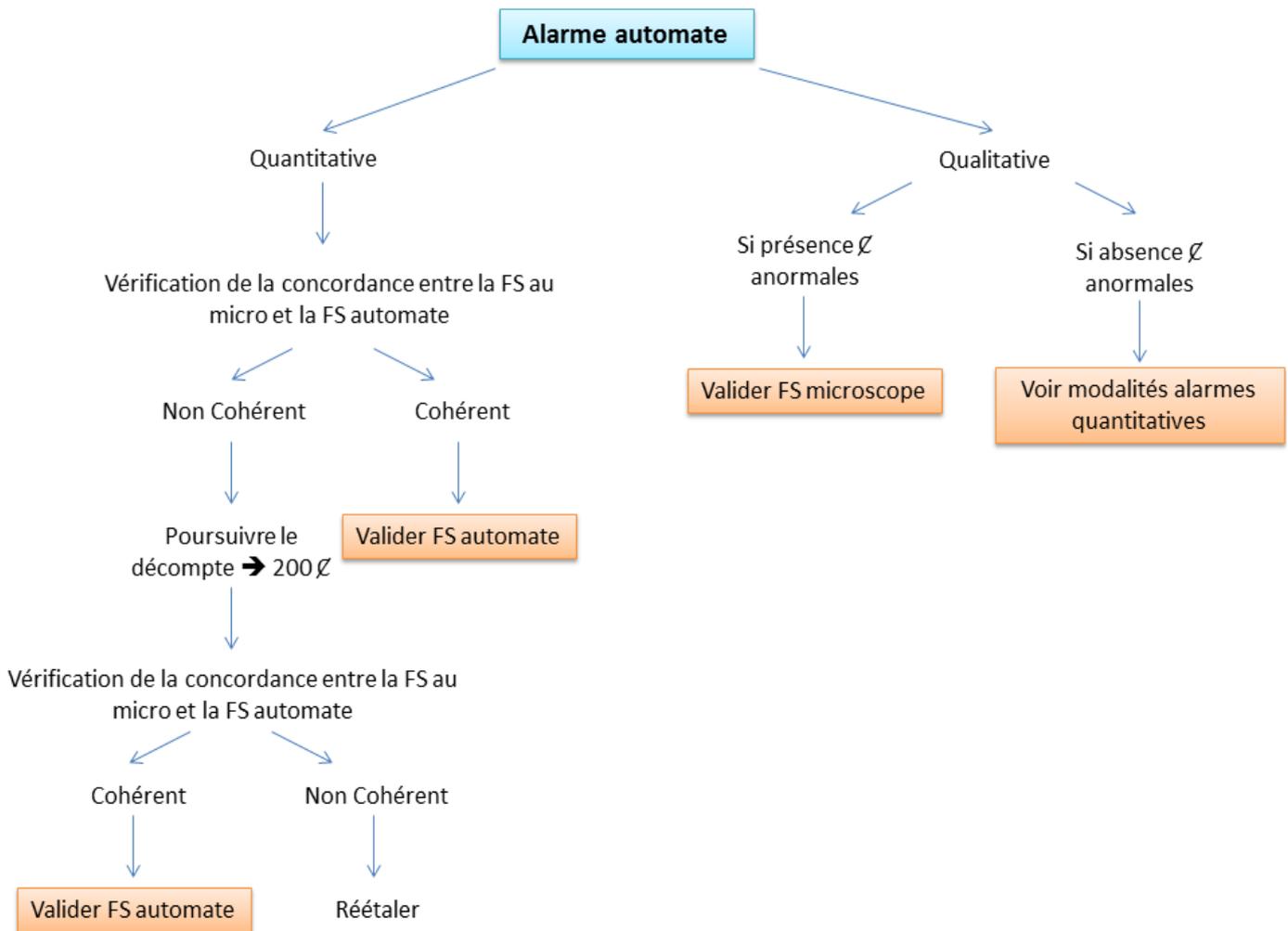


Figure n°61 : Modalités de validation de la formule sanguine après lecture au microscope (37)

En cas d'alarme quantitative, si aucune cellule anormale n'est identifiée au microscope et que les comptes sont cohérents, la formule sanguine de l'automate est rendue.

En cas de discordance entre les deux formules, nous devons poursuivre le décompte sur 200 leucocytes. Si la discordance persiste, il faut réétaler un frottis.

En cas d'alarme qualitative, si aucune cellule anormale n'est identifiée, il faut suivre la même démarche que celle décrite pour les alarmes quantitatives.

Par contre, si des cellules anormales sont identifiées, la formule sanguine obtenue après lecture au microscope est rendue.

Par ailleurs, si l'automate ne parvient pas à rendre une formule sanguine, il faut décompter 200 cellules au microscope.

Légende :

ℓ = Cellules ; FS = formule sanguine

Au final, la lecture du frottis sanguin au microscope présente des limites et des avantages (tableau n°VIII).

Limites	Expérience de l'observateur
	Importante variabilité intra et inter-individuelle
	Répartition hétérogène des cellules sur la lame
	Faible nombre de cellules décomptées
	Temps (technicien et biologiste)
	Coût
	Difficultés d'archivage
Intérêts	Interprétation de l'observateur
	Spécificité de l'analyse
	Sensibilité de l'analyse
	Décompte de toutes les populations leucocytaires, analyse globale

Tableau n°VIII : Intérêts et limites de l'analyse microscopique

→ L'inconvénient majeur de la lecture d'un frottis est celui de l'expérience même de l'observateur. Il s'agit d'une technique empirique qui nécessite une formation longue tant pratique que théorique. Nous ne sommes effectivement capables de reconnaître que ce que nous connaissons et ce que nous avons déjà vu.

De plus, l'analyse du frottis sanguin au microscope est soumise à une importante variation inter et intra-observateurs (38), (39). La puissance statistique de ce décompte est assez faible comparativement à celles des automates (tableau n°IX). Pour augmenter la puissance statistique de l'analyse, nous pouvons compter au-delà de 100 cellules. Cette faible puissance statistique est à prendre en considération notamment pour des valeurs proches de valeurs seuils. L'exemple est celui des leucémies aiguës qui sont définies en partie par la présence de plus de 20% de blastes circulants.

a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1.000	n = 10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 1.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38.0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0
55	44.7 - 65.0	47.8 - 62.0	50.5 - 59.4	51.9 - 58.1	54.0 - 56.0
60	49.7 - 69.7	52.9 - 66.8	55.6 - 64.3	56.9 - 63.1	59.0 - 61.0
65	54.8 - 74.3	58.0 - 71.6	60.6 - 69.2	62.0 - 68.0	64.0 - 66.0
70	60.0 - 78.8	63.1 - 76.3	65.8 - 74.0	67.1 - 72.8	69.0 - 70.9
75	65.3 - 83.1	68.4 - 80.8	71.0 - 78.7	72.2 - 77.7	74.1 - 75.9
80	70.8 - 87.3	73.8 - 85.3	76.2 - 83.4	77.4 - 82.4	79.2 - 80.8
85	76.5 - 91.4	79.3 - 89.6	81.6 - 88.0	82.6 - 87.2	84.2 - 85.7
90	82.4 - 95.1	85.0 - 93.8	87.0 - 92.5	88.0 - 91.8	89.3 - 90.6
91	83.6 - 95.8	86.1 - 94.6	88.1 - 93.4	89.1 - 92.7	90.4 - 91.6
92	84.8 - 96.5	87.3 - 95.4	89.3 - 94.2	90.1 - 93.6	91.4 - 92.6
93	86.1 - 97.1	88.5 - 96.1	90.4 - 95.1	91.2 - 94.5	92.4 - 93.5
94	87.4 - 97.8	89.8 - 96.9	91.5 - 95.9	92.3 - 95.4	93.5 - 94.5
95	88.7 - 98.4	91.0 - 97.6	92.7 - 96.7	93.5 - 96.3	94.5 - 95.5
96	90.1 - 98.9	92.3 - 98.3	93.9 - 97.5	94.6 - 97.1	95.5 - 96.4
97	91.5 - 99.4	93.6 - 98.9	95.1 - 98.3	95.7 - 98.0	96.6 - 97.4
98	93.0 - 99.8	95.0 - 99.4	96.4 - 99.0	96.9 - 98.8	97.7 - 98.3
99	94.6 - 99.9	96.4 - 99.9	97.7 - 99.7	98.2 - 99.5	98.7 - 99.2
100	96.4 - 100	98.2 - 100	99.3 - 100	99.6 - 100	99.9 - 100

Tableau n°IX : Table de Rümke

Exemple : Soit un élément (sous-type leucocytaire) connu avec une valeur vraie de 5% :

Quand nous décomptons 100 leucocytes au microscope, nous décomptons cet élément avec une fréquence de 1.6 à 11.3% (valeur expérimentale).

Quand nous décomptons 200 leucocytes, nous décomptons cet élément avec une fréquence de 2.4 à 9%.

...

Plus nous comptons de leucocytes, plus la variabilité de l'analyse diminue.

En outre, la répartition des cellules sur la lame n'est pas homogène même si le frottis a été bien réalisé. En effet, les cellules volumineuses (blastes et monocytes) sont principalement retrouvées en bords de frottis et au niveau des franges. Il convient néanmoins d'éviter de lire ces zones car à ces endroits, les cellules peuvent être sur-étalées et déformées.

En réalisant des formules au microscope, nous sommes confrontés à différents inconvénients matériels. Il est difficile en effet, d'archiver les lames en raison de leur volume et du risque de bris. De plus, elles s'altèrent au fil du temps à cause de l'huile à immersion.

→ L'intérêt majeur de la lecture d'un frottis est celui de l'interprétation de l'observateur. Il participe au diagnostic et au suivi des hémopathies par la mise en évidence de cellules anormales circulantes. Pour suppléer au manque d'expérience, un réseau d'hématologistes experts a été développé ces dernières années. Il s'agit du réseau ANDRAL qui porté par le Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC) propose une aide de télé-expertise rapide en cas de mise en évidence de cellules anormales circulantes.

De plus, l'analyse au microscope permet d'améliorer la sensibilité de l'identification des cellules anormales circulantes ayant des caractéristiques morphologiques et structurelles proches des cellules normales. En effet, ces cellules peuvent parfois ne pas être détectées par l'automate. L'exemple est celui des cellules du SS.

De même, cette analyse permet de pallier au manque de spécificité des automates. Beaucoup d'alarmes sont déclenchées en raison de la probable présence de cellules anormales circulantes alors que le frottis n'en contient pas. En outre, seule une lecture du frottis au microscope permet de donner un compte précis des blastes, de la myélémie et des lymphocytes anormaux. C'est pourquoi depuis quelques années, des systèmes experts ont été développés pour proposer une approche plus fine de la formule sanguine que celle des automates de cytologie.

4.5. Place des systèmes experts

Un système expert est un système d'aide au diagnostic pouvant pallier le manque d'expérience de l'utilisateur. Il est utilisé en vue de réduire le nombre de frottis sanguin devant être lus au microscope conventionnel. Deux catégories de systèmes experts ont été développées ces dernières années. Il s'agit des microscopes automatisés (exemple du DM96®) et des automates de routine équipés de module de cytométrie en flux (exemple de l'Hématoflow®).

4.5.1. Présentation de l'Hématoflow®

L'HéματοFlow® est un automate de routine dans lequel est intégré un module de cytométrie en flux. Cet automate réalise l'analyse automatisée de l'hémogramme et le contrôle par cytométrie en flux des formules anormales.

→ Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux repose sur le principe de l'identification des antigènes membranaires d'une cellule (CD) par des anticorps monoclonaux (porteurs de fluorochromes). Dans cette technique, les cellules passent une à une devant un faisceau laser. Elles diffractent la lumière selon leur taille, leur structure et selon l'intensité de la fluorescence émise par les éventuels anticorps monoclonaux s'étant liés aux CD. L'utilisation de plusieurs anticorps monoclonaux permet de décrire sur le plan antigénique la cellule anormale afin de connaître sa nature : cellule blastique ou mature, lignée myéloïde ou lymphoïde (figure n°62).

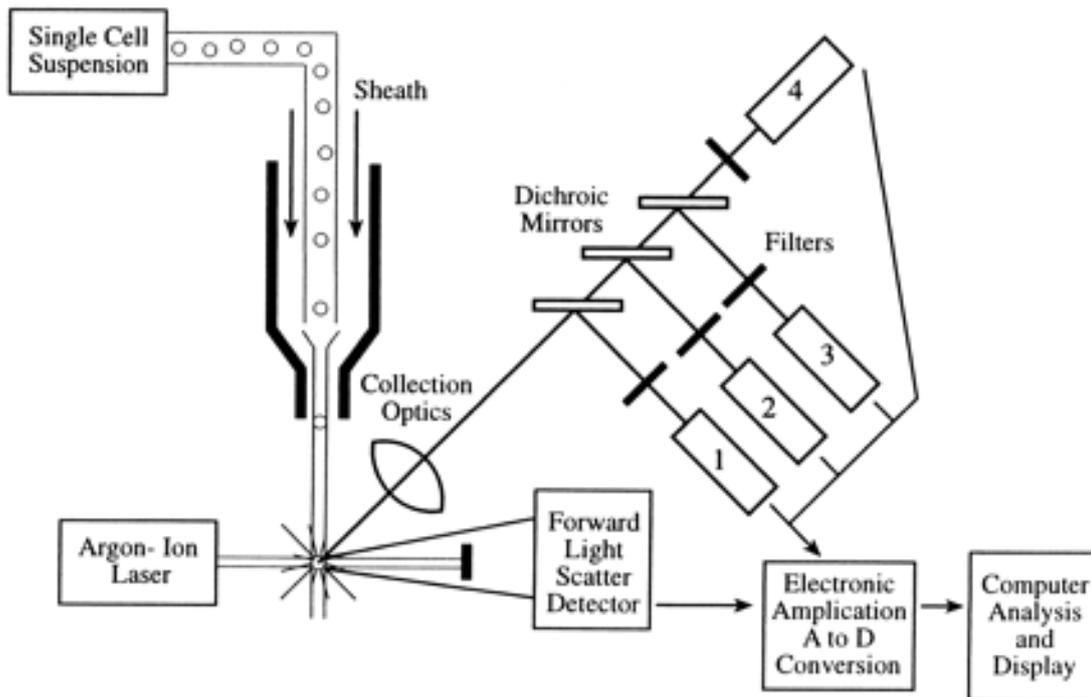


Figure n°62 : Principe de la cytométrie en flux d'après M. BROWN (40)

Les antigènes peuvent être exprimés en intra-cytoplasmique.

→ Principe de l'Hématoflow®

En utilisant six anticorps monoclonaux, il permet l'identification :

- des PNN
- des PNB
- des PNE
- des lymphocytes (B, T, cellules NK)
- des monocytes
- de la myélémie
- et des cellules blastiques (B, T et non B-non T).

Un logiciel permet d'identifier et de quantifier les populations leucocytaires (figure n°63). L'analyse est effectuée rapidement sur au moins 10 000 cellules.

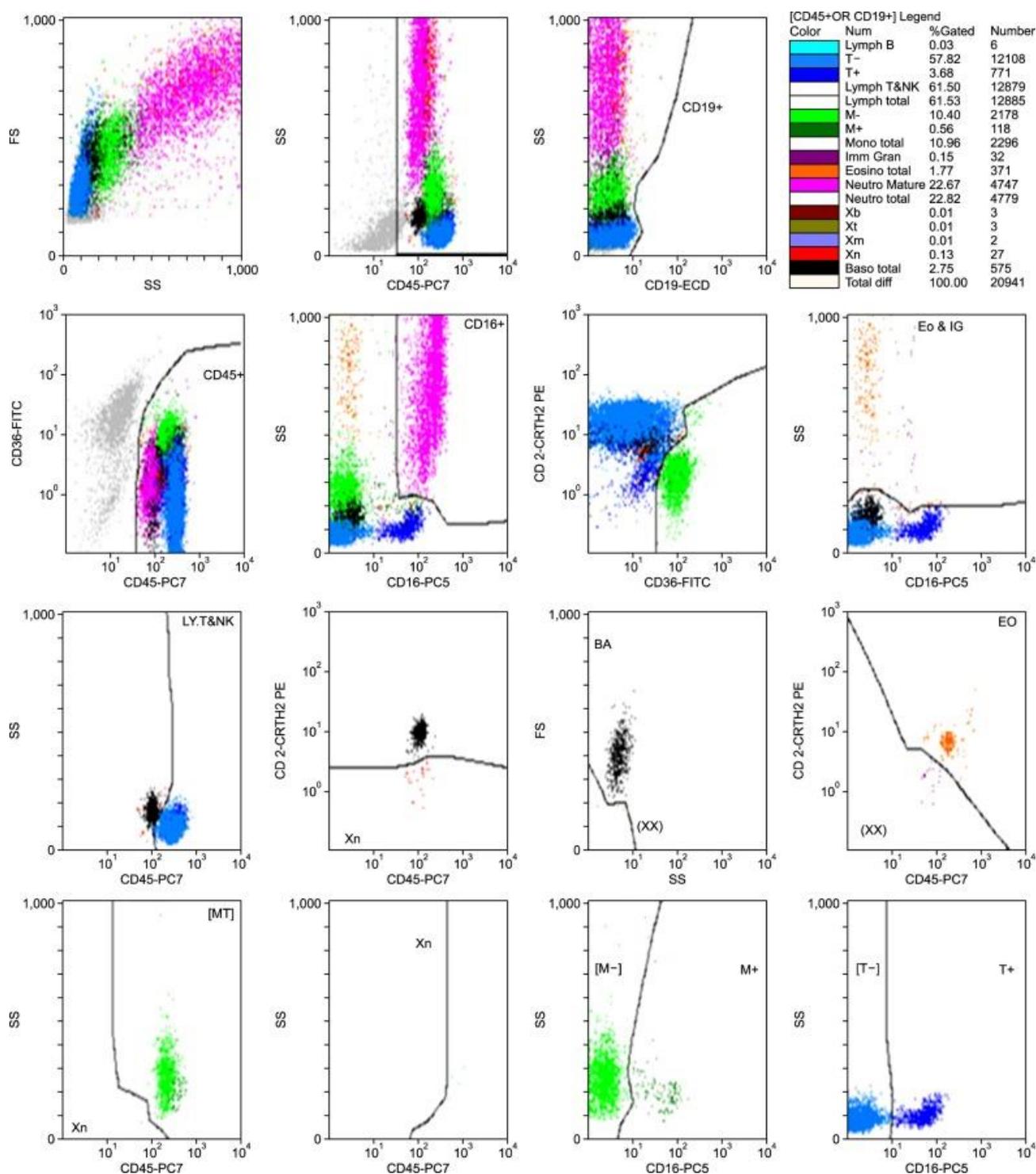


Figure n°63 : Principe de l'identification et de la quantification des populations leucocytaires par l'Hématoflow® d'après A. KIM (41)

Cet automate est ainsi plus sensible et plus spécifique que les automates de routine conventionnels. Le nombre de frottis sanguins analysés au microscope diminue considérablement. Cependant, ce type d'automate n'a pas été retenu par le CHU de Rouen car il implique la perte des compétences empiriques de l'analyse microscopique (tableau n°X) (42).

Limites	Coût
	Perte des compétences empiriques de l'analyse microscopique
	Problème en cas de panne et de changement d'automate
Intérêts	Rapidité de l'analyse
	Spécificité et sensibilité de l'analyse
	Traçabilité
	Standardisation
	Accréditation (CIQ/EEQ)

Tableau n°X : Intérêts et limites de l'Hématoflow®

4.5.2. Les microscopes automatisés

De manière concomitante à l'évolution des dispositifs informatiques, des microscopes automatisés se sont développés au cours de ces trente dernières années. Ces automates réalisent une analyse automatisée du frottis sanguin afin de proposer une formule sanguine. Ils sont munis d'un microscope et d'un ordinateur. Ils permettent de localiser puis de pré-classer les leucocytes à partir de caractéristiques cellulaires quantifiables. Peu de choses sont connues quant aux algorithmes utilisés pour pré-classer les leucocytes car il s'agit de technologies brevetées. Néanmoins, en se basant sur l'article fondateur de cette technologie (43), la reconnaissance d'un leucocyte serait fondée sur la mesure de la densité optique (voir figure n°64). Cette mesure permet de délimiter informatiquement la cellule, son cytoplasme et son noyau. Ces données rationnelles utilisables par l'ordinateur sont alors déduites pour identifier *a priori* la nature d'un leucocyte. Par extrapolation, il est aisé de supposer que les algorithmes de pré-classification se basent aussi sur d'autres paramètres comme : les granulations, la forme du noyau, la texture de la chromatine, le nombre de lobes, la forme et la coloration de la cellule.

Le pionnier d'entre eux est le système Hematrak®. D'autres automates ont été développés comme le Cydac Scanning Microscope System® (1966), le Micro 21®, le diffmaster octavia®, le Medica EasyCell Assistant® et le DI-60®. Le DI-60 fait partie intégrante d'une chaîne automatisée de cytologie. Aujourd'hui, l'automate principalement utilisé est le DM96®. Nous utilisons le DM96® au CHU de Rouen, depuis 2011.

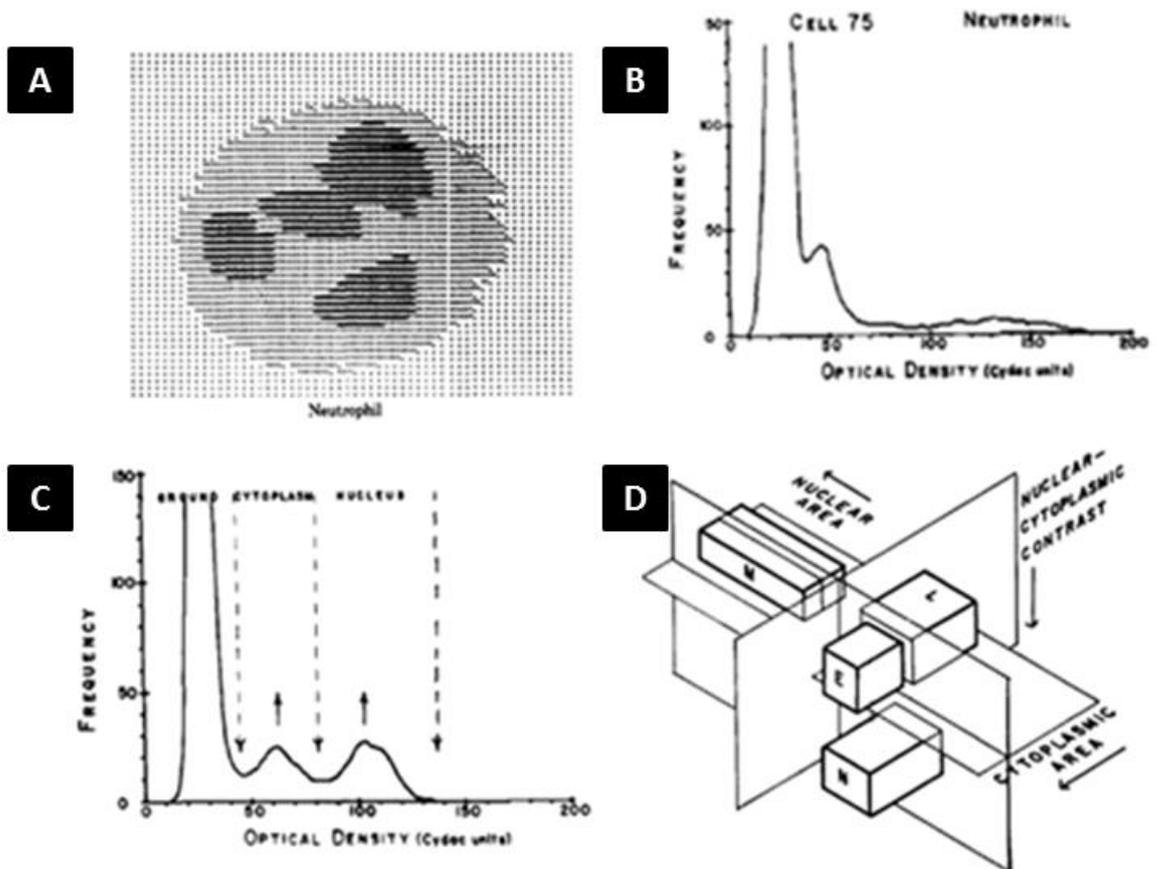


Figure n°64 : Principe de l'identification des leucocytes par les microscopes automatisés d'après JM. PREWITT (43)

- A :** Analyse d'un PNN par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde donnée
- B :** Mesure des densités optiques de la cellule entière (ici, PNN) à différentes longueurs d'onde
- C :** Individualisation du noyau et du cytoplasme du PNN par les mesures de densité optique - Ces mesures permettent d'obtenir les volumes du noyau et du cytoplasme du PNN.
- D :** Application de ces mesures à l'ensemble des leucocytes (ici : PNN, PNE, Monocytes et lymphocytes) et obtention d'une formule sanguine

4.5.2.1. Le DM96® de Cellavision

Le DM96® est un automate équipé d'un microscope qui photographie les leucocytes (figure n°65). Il les pré-classe pour établir une formule sanguine brute qu'un opérateur doit visualiser et corriger au besoin. Cet automate a été développé dans le but de diminuer le taux de relecture des frottis parfois conséquent dans certains laboratoires. En effet, le taux de relecture peut atteindre entre 15 et 30% des prélèvements selon les règles de vérification technique des formules sanguines établies localement (44), (45), (46). Mis à part, la réalisation de formules sanguines, le DM96® a été programmé pour proposer une étude de la morphologie érythrocytaire ainsi pour vérifier le taux de plaquettes.

→ L'automate

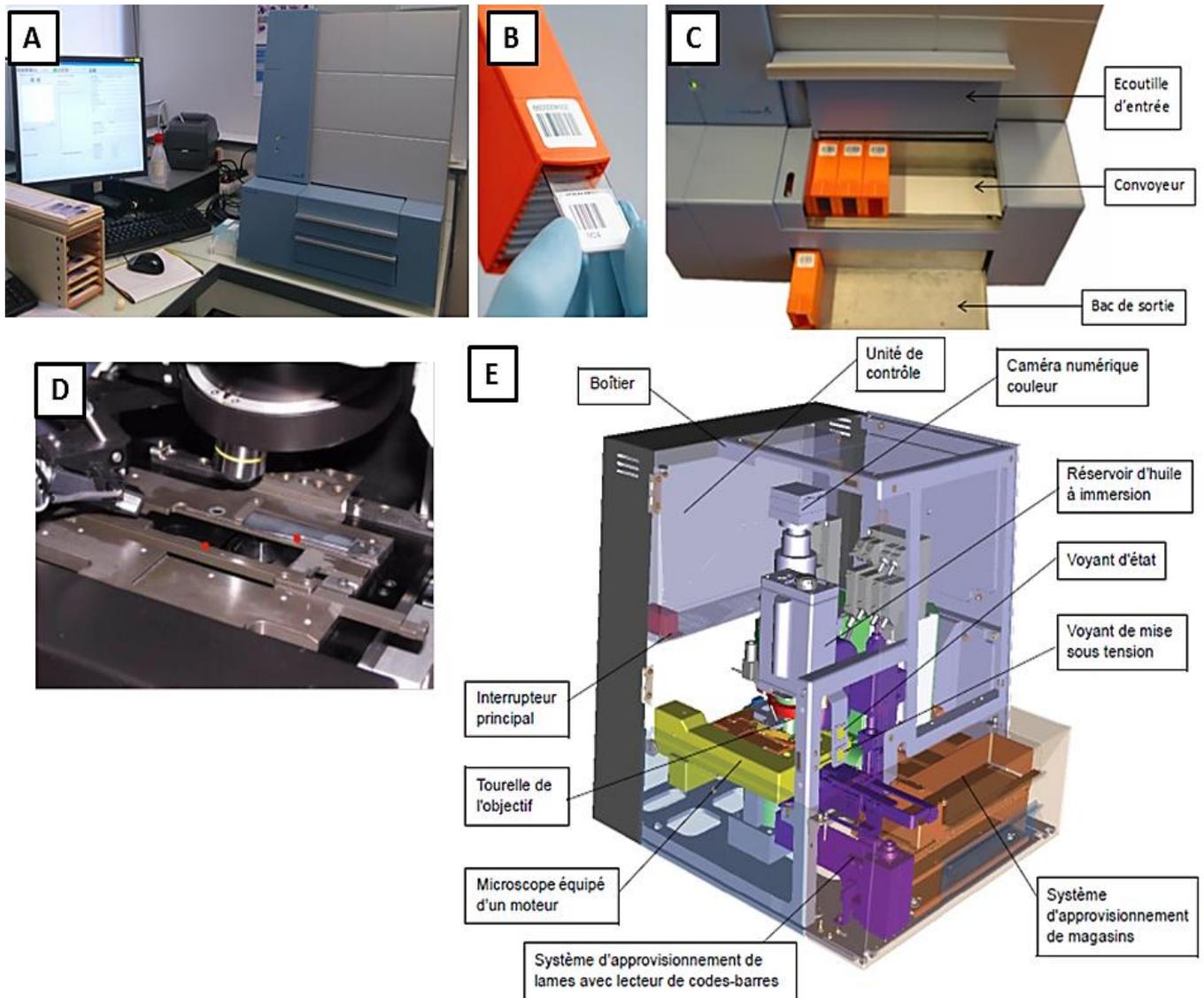


Figure n°65 : Le DM96® (20)

A : Station de lecture des frottis sanguins, moniteur et ordinateur

L'ordinateur est piloté avec le logiciel Cellavision Blood Differential software V.1.1.2.

B : Portoir de lames

C : Chargement des portoirs

Jusqu'à huit portoirs de douze lames peuvent être chargés en continu.

D : Objectifs x10, x50 et x100 du microscope

E : Unité de numérisation des lames

Le dépôt de l'huile à immersion sur les lames est automatisé.

La numérisation des leucocytes est réalisée à l'aide d'une caméra.

→ *Formule sanguine automatisée*

Le DM96[®] est programmé pour lire des frottis sanguins colorés au MGG et étalés avec le SP-1000[®] (étaleur-colorateur de lames de la chaîne automatisée Sysmex[®] du CHU de Rouen).

Pour entreprendre une formule sanguine automatisée, le DM96[®] effectue tout d'abord, une lecture du frottis sanguin avec l'objectif x10. Cette lecture permet de choisir une zone d'analyse adéquate (monocouche de globules rouges). Il repère les leucocytes à l'objectif x50. Puis, il les photographie à l'objectif x100. A l'aide d'un algorithme neuronal breveté et d'une bibliothèque de cellules constituée au fur et à mesure son utilisation, le DM96[®] pré-classe les leucocytes (figure n°66). Les différentes catégories de pré-classement disponibles sont :

- les PNN
- les PNE
- les PNB
- les lymphocytes
- les monocytes
- les promyélocytes
- les myélocytes
- les métamyélocytes
- les cellules blastiques
- les lymphocytes anormaux
- les cellules plasmocytaires
- et les cellules non-identifiées par l'automate.

Une autre catégorie de pré-classement est proposée par l'automate. Il s'agit des précurseurs des PNN (*band cells*). Cette dernière catégorie n'est pas utilisée en France contrairement aux pays anglo-saxons. Il s'agit en fait, d'un intermédiaire entre le PNN et le métamyélocyte. Il est particulièrement identifié au décours d'un syndrome infectieux.

En pratique, le nombre de leucocytes pré-classés par l'automate est programmé par l'utilisateur. Au CHU de Rouen, le DM96[®] a été programmé de telle sorte que 150 leucocytes soient décomptés pour un taux de leucocytes inférieur à 10 G/L et 300 leucocytes pour une leucocytose supérieure à 10 G/L.

Le DM96[®] dispose d'autres catégories de pré-classement pour les cellules ou éléments non-leucocytaires. Ces catégories sont :

- les érythroblastes
- les thrombocytes géants
- les agrégats plaquettaires
- les cellules à corbeilles (cellules lysées)
- et les artéfacts (dépôts de colorant).

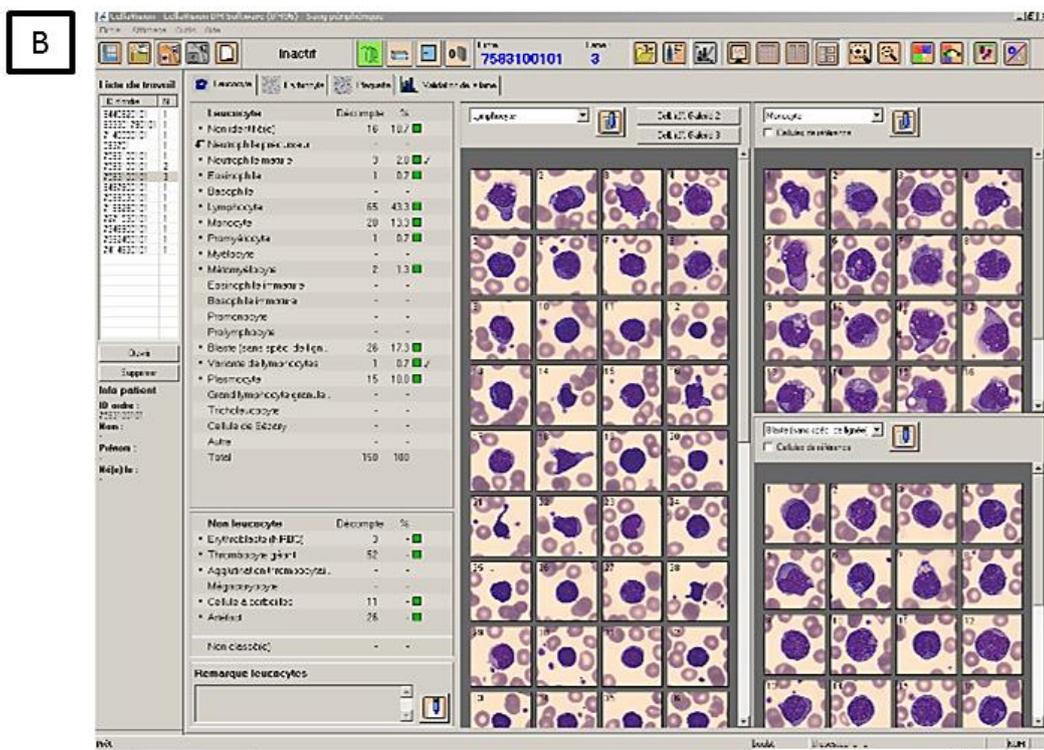
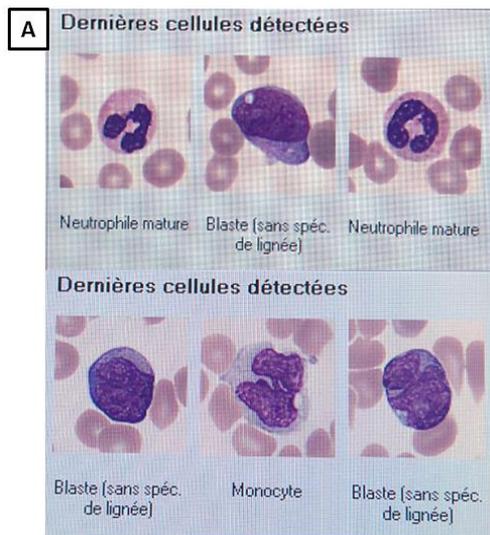


Figure n°66 : Pré-classement des leucocytes par le DM96®

A : Photographie des leucocytes en cours de pré-classement

Les Blastes sans spécificité de lignée sont en fait des lymphocytes anormaux.

B : Formule brute proposée

L'automate n'est pas parvenu à séparer une cellule blastique d'un PNN.

La pré-classification est ensuite contrôlée par un personnel technique et/ou biologique expérimenté. Ils peuvent reclasser les cellules éventuellement mal identifiées, apposer des commentaires ou affiner la pré-classification. Le reclassement s'effectue très simplement avec la souris en « glissant-déposant » la cellule (figure n°67).

Nous disposons pour cela de 24 catégories de reclassement :

- les PNE immatures
- les PNB immatures
- les promonocytes
- les prolymphocytes
- les grands lymphocytes granuleux
- les tricholeucocytes
- les cellules de Sézary
- les mégacaryocytes
- les cellules non classées par l'utilisateur
- et 15 autres catégories définies par l'utilisateur comme les cellules de lymphomes, les ombres de Gumprecht ... (20).

Les leucocytes sont visualisés par sous-types ce qui permet aisément de mettre en évidence d'éventuelles atypies cellulaires. De plus, lorsqu'un observateur ne parvient pas à identifier une cellule présentée par l'automate, il est aisé et rapide de confronter les opinions de chacun. Il s'agit en effet de cellules photographiées et non à retrouver sur tout un frottis sanguin comme avec la technique manuelle.

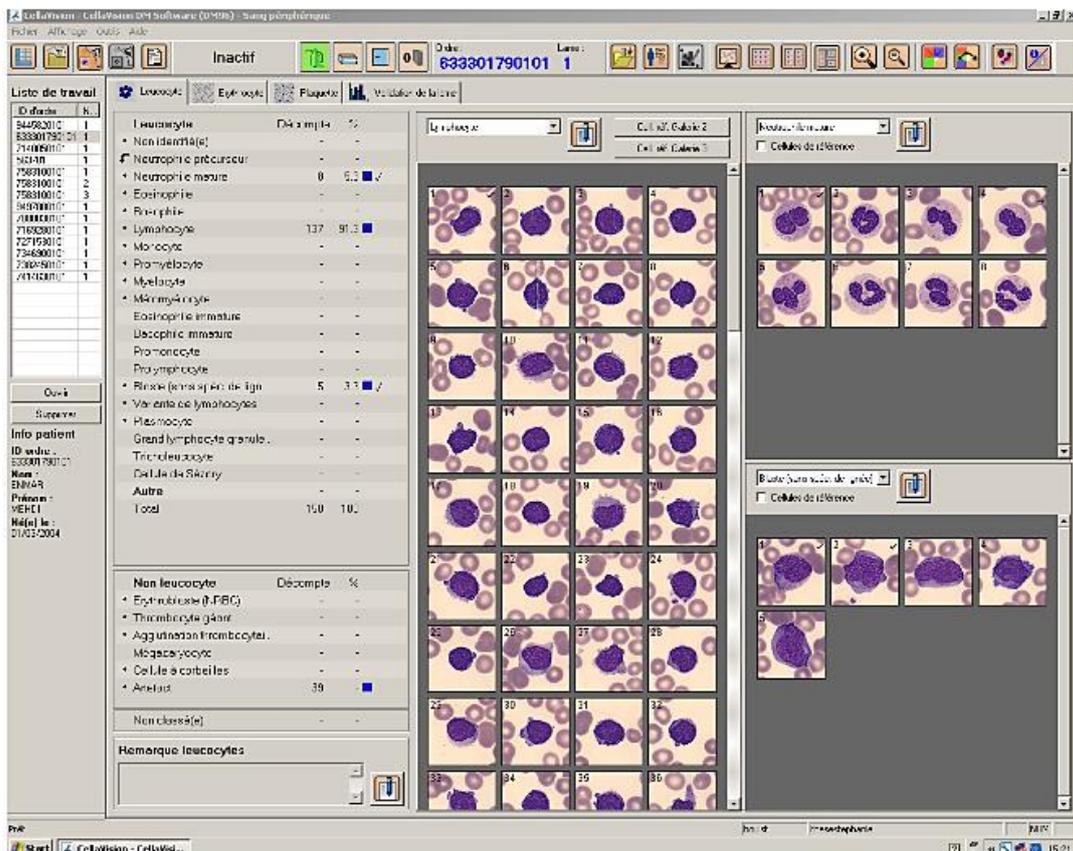


Figure n°67 : Classement des leucocytes par l'opérateur

Plusieurs équipes ont démontré la corrélation entre le DM96® et le microscope pour les formules sanguines normales ou celles présentant des anomalies quantitatives. La précision du DM96® est même supérieure par rapport à un décompte sur un frottis manuel effectué sur 100 leucocytes (44), (45), (39), (47), (48), (49).

Le DM96® peut aussi lire des frottis de fluides organiques comme le liquide céphalo-rachidien. Cette fonction n'est pas utilisée au CHU de Rouen. Elle permet d'éviter le recours au cytopspin® (technique de concentration cellulaire par centrifugation) qui, en outre, a l'inconvénient de déformer les cellules ce qui peut rendre leur identification difficile (50).

- *Morphologie érythrocytaire*

En plus de pré-classer les leucocytes, le DM96® propose d'effectuer une morphologie érythrocytaire sous la forme d'un score pour six anomalies :

- la polychromasie
- l'hypochromie
- l'anisocytose
- la microcytose
- la macrocytose
- et la poïkilocytose (figure n°68).

De la même manière que pour les leucocytes, l'opérateur peut modifier les scores. Il peut affiner la morphologie érythrocytaire avec des anomalies supplémentaires :

- les hématies cibles
- les schizocytes
- les drépanocytes
- les sphérocytes
- les elliptocytes
- les ovalocytes
- les dacryocytes
- les stomatocytes
- les acanthocytes
- les échinocytes
- les corps de Howell-Jolly
- les corps de Pappenheimer
- les hématies ponctuées
- les hématies parasitées
- et 10 autres catégories que le laboratoire peut définir selon ses besoins (20).

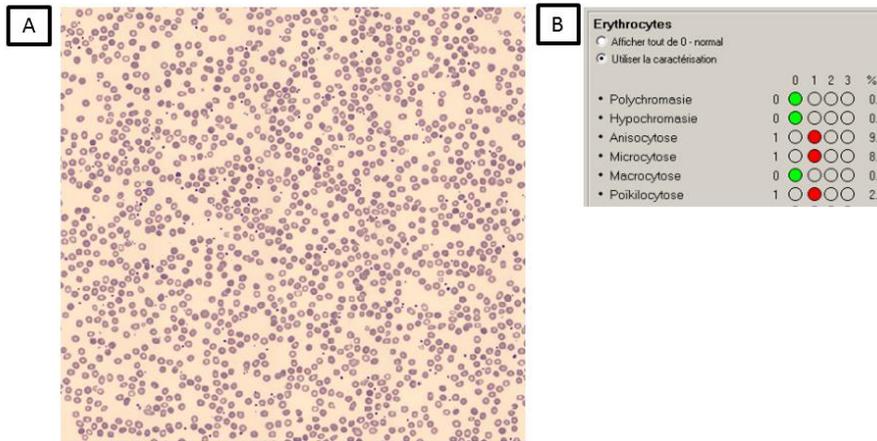


Figure n°68 : Morphologie érythrocytaire avec le DM96®

A : Photographie d'une zone du frottis

B : Étude de la morphologie érythrocytaire par le DM96®

Ici, le patient présente une légère anisocytose ainsi qu'une légère macrocytose.

- *Contrôle du taux de plaquettes*

Enfin, cet automate permet aussi un contrôle du taux plaquettaire. Il détecte les agrégats plaquettaires et photographie une zone de lecture adéquate au dénombrement par l'opérateur (figure n°69).

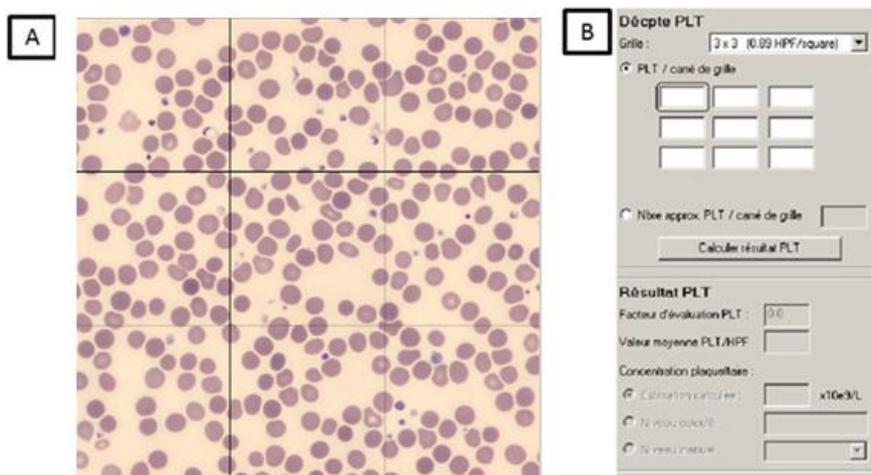


Figure n°69 : Dénombrement du taux plaquettaire par l'opérateur avec l'aide du DM96®

A : Photographie d'une zone du frottis

B : Grille de décompte plaquettaire

L'opérateur décompte les plaquettes et rentre les valeurs dans la grille afin d'avoir une estimation du taux plaquettaire.

Au final, le DM96® présente de nombreux avantages et quelques limites (tableau n°XI).

Intérêts
Confrontation des résultats
Disposition des leucocytes par sous-type
Gain de temps
Standardisation de la formule sanguine
Puissance statistique de l'analyse
Reproductibilité
Traçabilité, sauvegarde et archivage des résultats
Formation
Limites
Pas de sélection des leucocytes sur les bords du frottis
Observation uniquement des leucocytes sélectionnés
Difficulté de lecture des frottis réalisés en manuel
Pas de variation de la mise au point
Pas de variation de la luminosité
Zoom de qualité limitée

Tableau n°XI : Intérêts et limites du DM96®

En effet, il faut avoir à l'esprit que le DM96® ne photographie pas les bords d'un frottis. Il pourrait ainsi sous-estimer le taux de certaines cellules anormales de grande taille comme les blastes.

De plus, contrairement à un microscope traditionnelle, nous ne pouvons observer que ce que l'automate a sélectionné. Nous ne pouvons pas faire varier la mise au point ou la luminosité de la lame. Le zoom sur une cellule est possible mais de moins bonne qualité qu'avec un microscope. Il s'agit effectivement d'un zoom numérique à nombre de pixels fixe (figure n°70) (51).

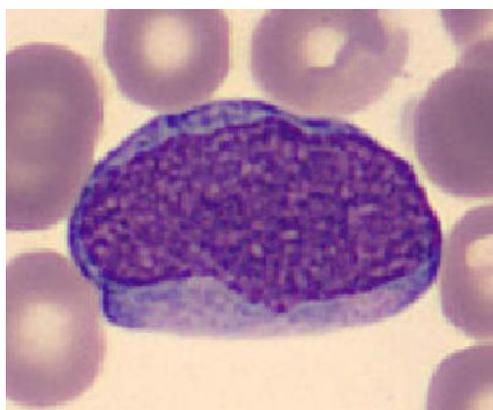


Figure n°70 : Zoom numérique d'une cellule blastique par le DM96®

Le zoom sur cette cellule blastique est de qualité moyenne. Nous apprécions difficilement la texture de la chromatine. Les nucléoles sont peu visibles.

Cependant, il permet d'automatiser une tâche manuelle chronophage et de dégager du temps technicien et/ou biologique. En effet, plusieurs études ont montré un gain de temps de 30 à 50% entre le DM96® et la technique de référence (microscope) (52).

Il permet aussi une certaine standardisation de la formule leucocytaire. Il en améliore la puissance statistique puisqu'il est programmé pour identifier d'avantage de leucocytes qu'avec la méthode manuelle. Les résultats sont reproductibles (44).

Il améliore la traçabilité des analyses du fait d'une connexion bidirectionnelle et d'une sauvegarde des clichés. De plus, il permet une confrontation des résultats avec l'historique du patient. Enfin, dans un contexte de télé-expertise avec le réseau d'experts ANDRAL, il améliore le transfert des données en raison d'un échange plus aisé de données. Il représente donc un outil pédagogique et ce notamment en période de permanence des soins (figure n°71).

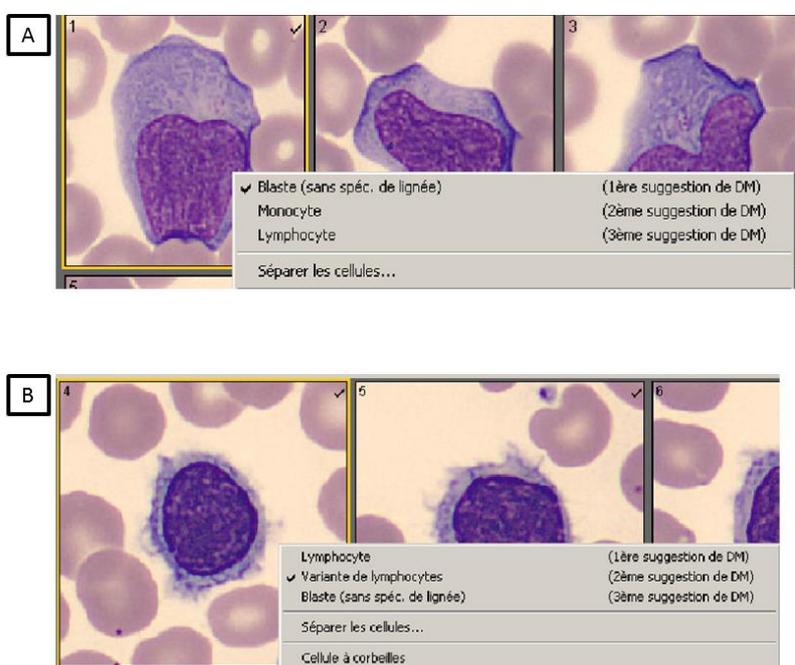


Figure n°71 : Propositions de classement du DM96®

A : Cellule blastique

L'automate propose 3 suggestions. Il est parvenu à identifier la cellule blastique.

B : Pour une cellule lymphoïde anormale

L'automate propose 3 suggestions. Il n'est pas parvenu à identifier le lymphocyte anormal.

4.5.2.2. Place du DM96® au CHU de Rouen

Le DM96® n'a été que peu utilisé pendant plusieurs années à cause d'un manque de formation du personnel et de plusieurs pannes. Par la suite, plusieurs études de corrélation en interne, ont été effectuées afin d'étudier la robustesse et ainsi de mieux définir sa place dans le processus analytique.

Ces études ont comparé la corrélation entre le XE 5000® (automate des NFS), le DM96® et l'analyse microscopique de 160 prélèvements présentant des anomalies quantitatives (tableau

n°XII) (53). L'analyse microscopique des frottis a été entreprise par un technicien référent (Mr. Danny BIGOT) et par un biologiste expert (Dr. Gérard BUCHONNET).

Anomalie quantitative	Nombre de prélèvement
Neutropénie	16
Lymphocytose	15
Monocytose	49
Myélémie	46
Eosinophilie	14
Basocytose	5
Présence de cellules plasmocytaires et/ou de cellules mononuclées	15
TOTAL	160

Tableau n°XII : Cohorte utilisée pour l'étude de corrélation des anomalies quantitatives de la formule sanguine entre le XE 5000®, le DM96® et l'analyse microscopique

Au final, en prenant en considération la table de RUMKE (39), la corrélation entre ces différentes techniques est bonne quel que soit le paramètre étudié (figure n°72) ce qui nous a permis d'utiliser de manière documentée cet automate quotidiennement.

Néanmoins, afin de ne pas méconnaître la présence de cellules blastiques, une analyse microscopique est entreprise pour toutes les agranulocytoses mises en évidence avec le XE 5000®. Le DM96® peut être utilisé en cas de monocytose > 2G/L et de myélémie > 4%. Cependant, comme le DM96® sous-estime légèrement la monocytose et la myélémie, seule la formule sanguine de l'automate (XE 5000®) est prise en considération. Une raison à la sous-estimation de la monocytose par le DM96® est celle de la non prise en compte des bords du frottis par cet automate. Les monocytes en tant que grandes cellules, sont souvent retrouvés au niveau de ces zones.

Etant donné que les myélémies supérieures à 10% n'ont pas été évaluées lors de cette étude de corrélation, le DM96® n'est pas utilisé dans ce cadre précis. Une analyse microscopique est donc toujours réalisée dans ce cas précis.

Nous utilisons ainsi en routine le DM96® quel que soit le type d'anomalie quantitative mise en évidence avec le XE 5000® sauf dans deux cas précis : l'agranulocytose et la myélémie > 10%. Le DM96® ne dispense pas de l'analyse microscopique de la lame par les biologistes selon les critères définis dans la figure n°58. Il ne remplace que la vérification microscopique du frottis sanguin faite par les techniciens (figure n°73).

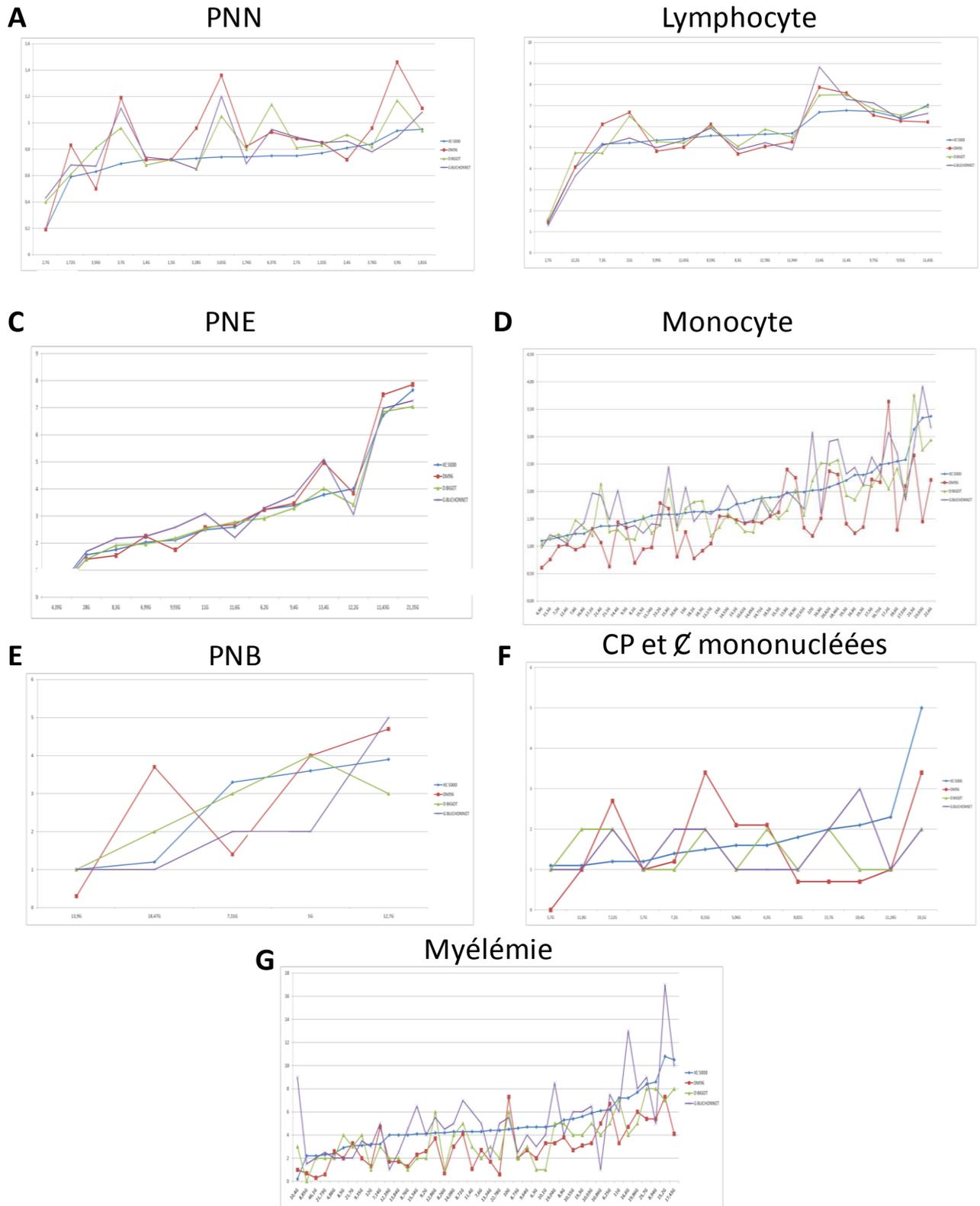


Figure n°72 : Étude de corrélation des anomalies quantitatives de la formule sanguine entre le XE 5000®, le DM96® et l'analyse microscopique

Légende :

En abscisse : Taux de leucocytes (en G/L)

En ordonnée : Taux de la cellule étudiée (en G/L)

CP = cellules plasmocytaires

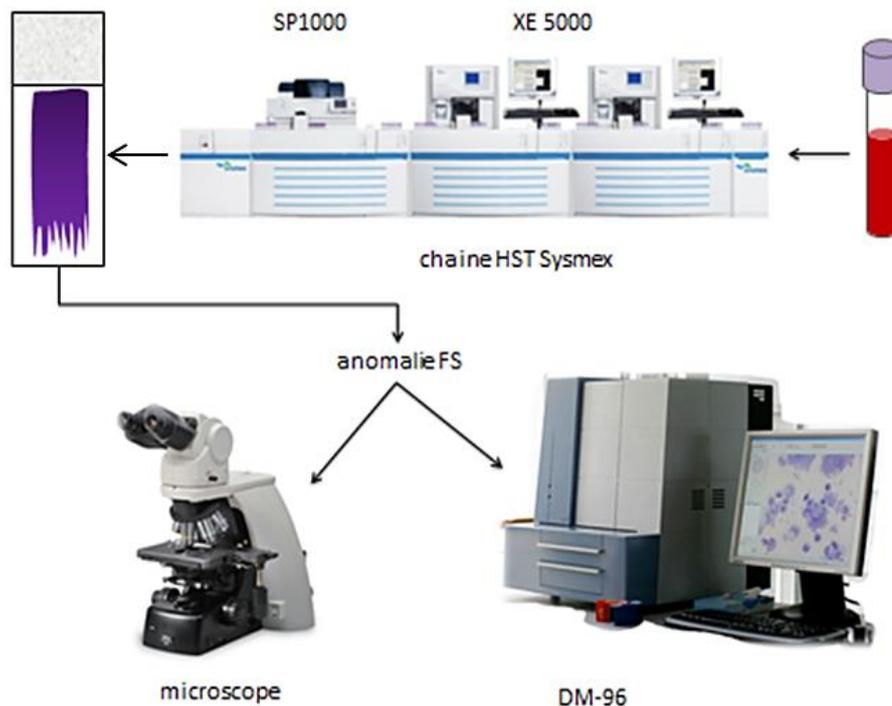


Figure n°73 : Place du DM96® dans la chaîne analytique

De la même façon que pour l'analyse microscopique, des modalités de validation de la formule sanguine au DM96® ont été établies (figure n°74).

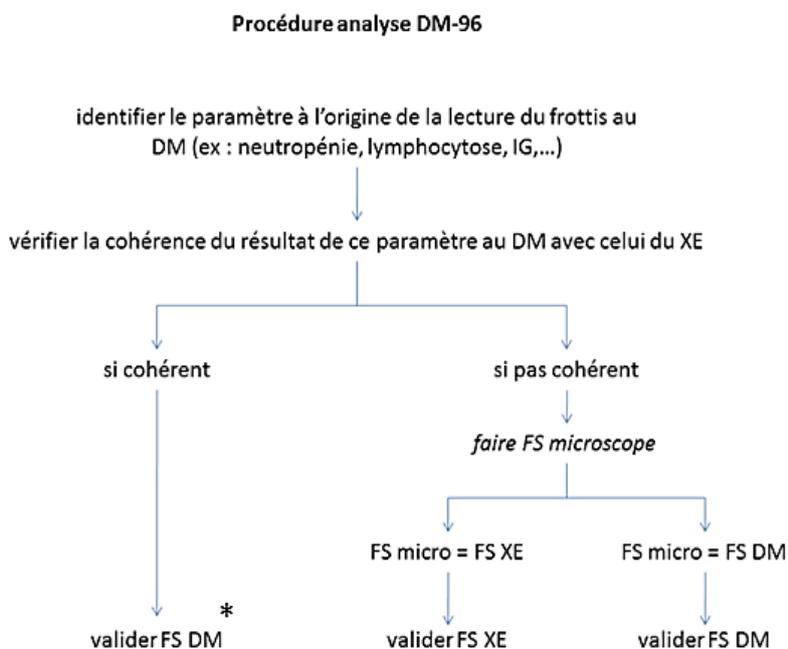


Figure n°74 : Modalités de validation de la formule sanguine après lecture au DM96® (53)

* = Cas particulier d'une monocytose > 2G/L, utilisation du DM96® mais validation de la valeur du XE 5000®

Légende :

IG = myélémie, DM = DM96®, XE = XE 5000® et FS = formule sanguine

Le DM96® est un automate qui présente comme nous l'avons vu de nombreux avantages. Preuve en ait qu'il est implanté dans de nombreux laboratoires. L'ensemble des techniques précédemment décrites apportent un faisceau d'arguments sur la nature de l'éventuelle cellule anormale mise en évidence. Cependant, afin de confirmer ou de soulever un éventuel doute sur une hypothèse diagnostique, nous pouvons être amené à entreprendre des techniques d'investigation complémentaires comme la cytométrie en flux.

4.6. Place des techniques d'analyses complémentaires

Plusieurs techniques d'analyses complémentaires peuvent être utilisées au laboratoire selon le type d'anomalies mises en évidence. Parmi ces techniques, nous pouvons citer la cytométrie en flux, les études de cytochimie et de cytogénétique.

- *Cytométrie en flux conventionnelle – 10 couleurs*

La cytométrie en flux (10 couleurs) propose une étude des cellules avec un panel de 10 anticorps monoclonaux utilisés de manière simultanée. Ce panel permet alors de décrire la cellule anormale sur le plan antigénique afin de préciser sa nature : mégacaryoblaste, cellule lymphomateuse d'un lymphome du manteau ...

En dépit de son coût et de son manque de disponibilité (pas d'analyse en 24h/24, ni le week-end), elle est régulièrement utilisée pour caractériser les cellules en raison ses qualités analytiques (bonnes sensibilité et spécificité). Elle est d'ailleurs souvent entreprise afin de détecter la maladie résiduelle de certaines hémopathies.

- *Etudes cytochimiques*

En présence d'un grand nombre de cellules blastiques circulantes et en l'absence de myélogramme disponible, des études cytochimiques peuvent être réalisées sur les frottis sanguins. Deux types d'études cytochimiques sont possibles au laboratoire. Elles permettent de mettre en évidence la myéloperoxydase et/ou la butyrate estérase. La myéloperoxydase est caractéristique en général, de la lignée myéloïde (voir figure n°75). La butyrate estérase est exprimée dans les blastes appartenant à la lignée monocyttaire (voir figure n°76).

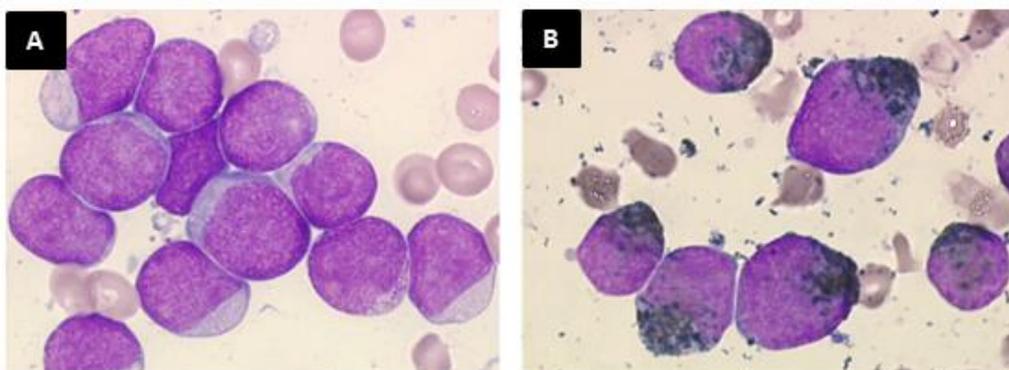


Figure n°75 : Aspect morphologique de la positivité de la myéloperoxydase

A : LAM -1 ; B : Positivité de la myéloperoxydase

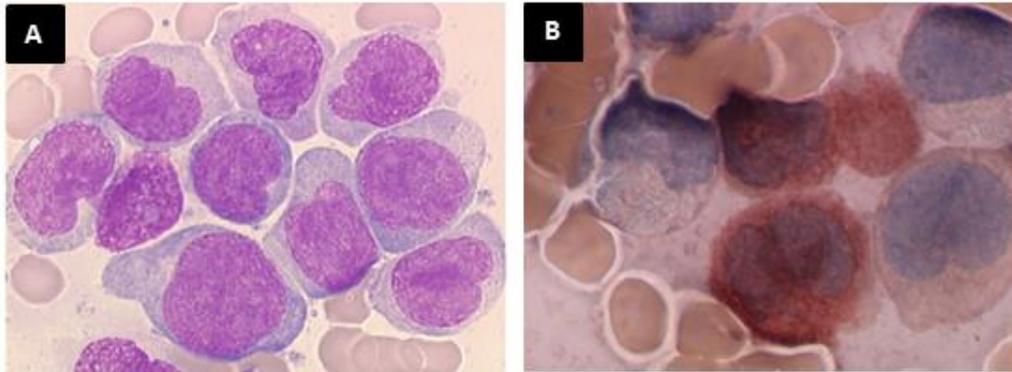


Figure n°76 : Aspect morphologique de la positivité de la butyrate estérase

A : LAM -5 ; B : Positivité de la butyrate estérase

Ces techniques, rapides ne sont pas automatisées. Elles n'offrent qu'une orientation diagnostique et nécessitent l'utilisation d'autres techniques d'analyses complémentaires.

- *La cytogénétique*

Des études de cytogénétique peuvent aussi être entreprises. Certains réarrangements chromosomiques sont caractéristiques en effet, d'une hémopathie donnée. L'exemple est celui de la translocation spécifique $t(8;14)(q24;q32)$ du lymphome de Burkitt. Ces réarrangements peuvent ainsi aider à l'identification des cellules anormales circulantes. Néanmoins, il s'agit d'une technique chère, peu disponible et longue à mettre en œuvre.

Au final, pour identifier les cellules anormales circulantes, nous disposons de plusieurs techniques avec leurs avantages et leurs limites. De précédentes études menées dans le service ont permis d'intégrer le DM96® dans la phase analytique. Il est en effet, utilisé en cas de mise en évidence d'anomalies quantitatives de la formule sanguine (avec le XE 5000®) afin d'éviter le recours à la technique de référence chronophage (analyse microscopique). Néanmoins, pour répondre à des contraintes de fiabilité, de rapidité, de coût et réglementaires, nous souhaitons évaluer le DM96® dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes.

5. Matériels et Méthodes

5.1. Design de l'étude

Afin d'évaluer le DM96® dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes, nous avons réalisé une étude prospective (DM96® : CellaVision, AB, Lund, Suède). Cette étude porte notamment sur la corrélation entre l'analyse microscopique du frottis sanguin et celle effectuée avec le DM96®.

Concrètement, nous avons récupéré des échantillons de sang de patients présentant des cellules anormales circulantes. Nous les avons passés sur le XE 5000® ou le XN 9000® (remplacement du XE 5000® par le XN 9000® en juillet 2016 ; Sysmex®, Japon) afin d'obtenir si possible, une formule

sanguine. Puis, nous avons réalisé un frottis sanguin de manière automatisée avec le SP-1000® ou le SP-10® (remplacement du SP-1000® par le SP-10® en juillet 2016 ; Sysmex®, Japon). Il a été analysé à la fois par le DM96® (Cellavision®) et au microscope.

La lecture sur le DM96® s'est déroulée en plusieurs étapes :

- une lecture brute par le DM96®
- un reclassement des leucocytes (par Stéphanie DAVID : SBD)
- puis une correction des éventuelles erreurs de reclassement (par le Dr. Gérard BUCHONNET et le Dr. Sylvie DALIPHARD : GB et SD).

Le DM96® a été paramétré de telle sorte que 150 leucocytes soient décomptés pour un taux de leucocytes inférieur à 10 G/L et que 300 leucocytes soient décomptés pour une leucocytose supérieure à 10 G/L.

Une lecture au microscope a été effectuée par SBD, GB et SD (figure n°77). Le décompte a été effectué sur 100 leucocytes lorsque cela était possible (problème des patients leucopéniques).

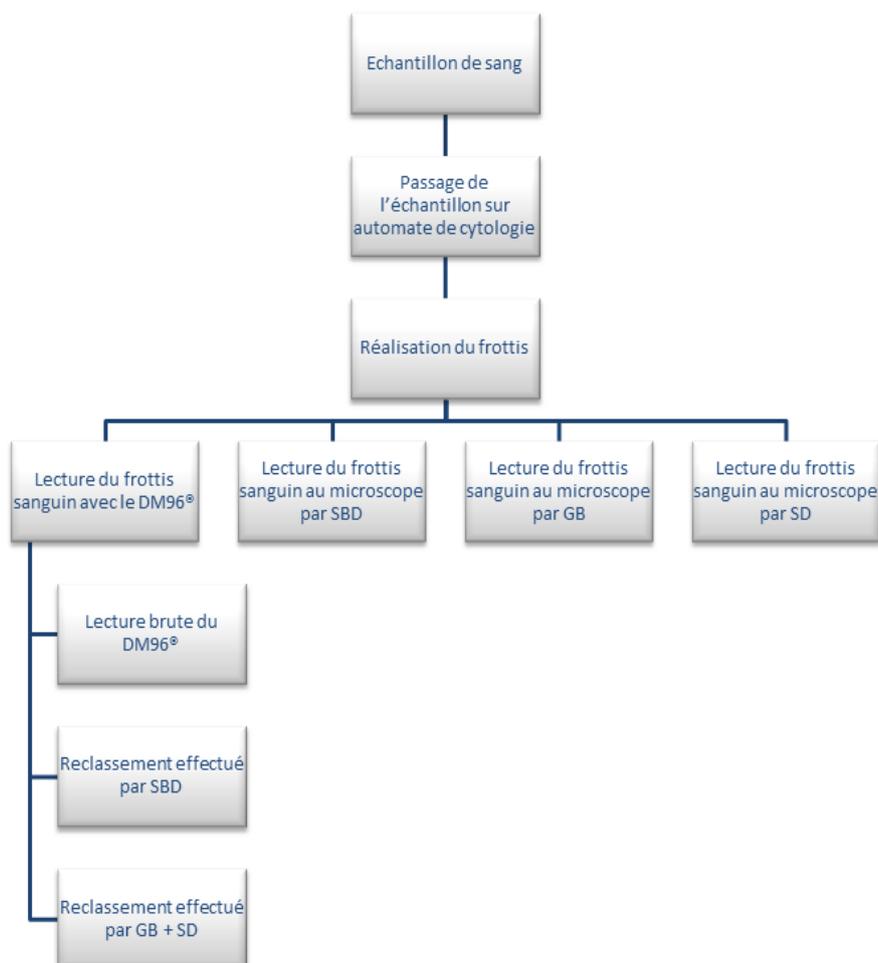


Figure n°77 : Design de l'étude

5.2. Patients

Les échantillons de sang proviennent soit du CHU de Rouen soit du laboratoire d'analyses de biologie médicale du centre H. BECQUEREL. Au total, nous avons obtenu 75 échantillons de sang EDTA entre les mois de novembre et de mai 2016 (tableau n°XIII). Ces échantillons de sang ont été sélectionnés parmi les patients connus pour avoir des cellules anormales circulantes.

Diagnostic	Nombre de patients
<i>Présence de cellules blastiques</i>	
LAL	6
LAM	21
LA pDC	1
LA non étiquetée	1
AREB	2
MFP	1
Suivi d'une LAM 2	4
<i>Présence de cellules lymphoïdes anormaux</i>	
LLC	19
LLC + leucémie à plasmocytes	1
LCM	2
LZM	7
LF	1
SLP B non étiquetés	4
Lymphome T anaplasique	1
SS	3
Lymphocytes granuleux monoclonaux	1
TOTAL	75

Tableau n°XIII : Cohorte de patients utilisée dans cette étude

Les patients ont été choisis de telle sorte à n'être sélectionnés qu'une seule fois. Un seul patient a été sélectionné plusieurs fois (n=4). Il s'agit d'un patient présentant une LAM 2. Ce patient a été choisi afin d'évaluer le DM96® dans le suivi des leucémies aiguës.

5.3. Etudes statistiques

L'ensemble des études statistiques a été réalisé avec le logiciel Microsoft Excel 2010® (Microsoft, Redmond, WA).

Au cours de cette étude, nous avons étudié la corrélation entre les formules sanguines obtenues avec les différentes techniques (DM96® brut, DM96® classé par SBD, DM96 reclassé par GB + SD, lecture microscopique par SBD, GB et SD ; figure n° 78).

La table de Rümke basée sur 200 éléments a été utilisée pour étudier la corrélation.

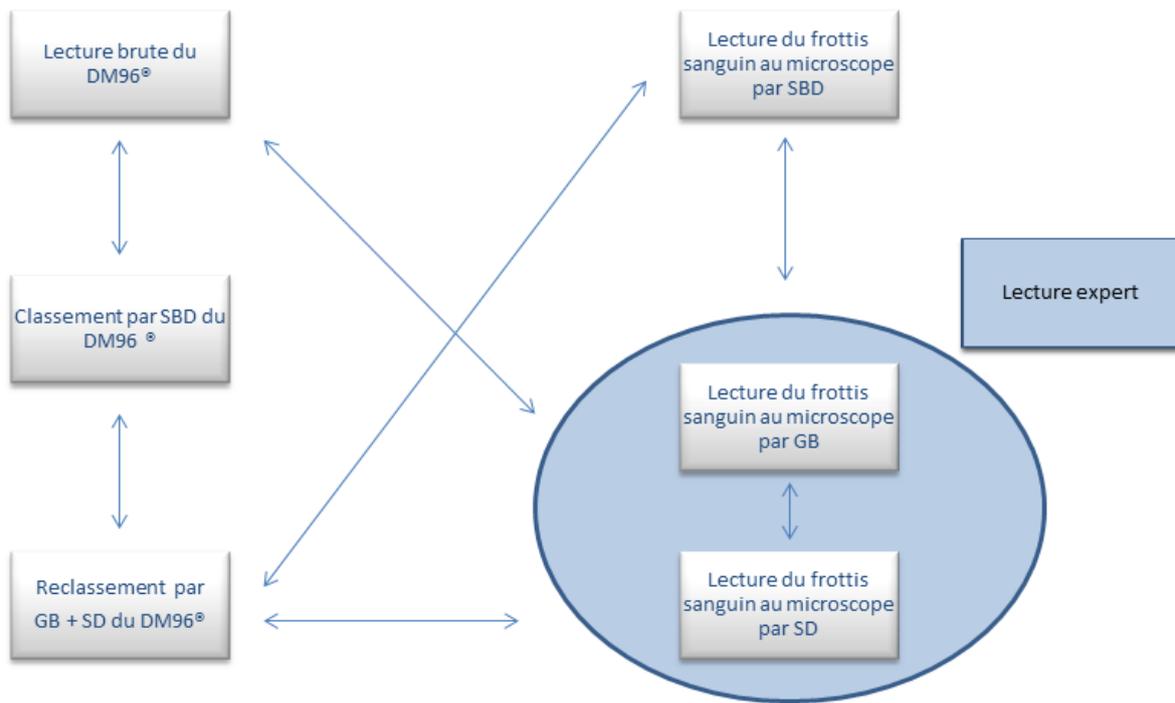


Figure n°78 : Ensemble des études de corrélation menées

Légende :

Les flèches indiquent les études de corrélation entreprises.

La lecture expert désigne la moyenne des formules sanguines obtenues par GB et SD après lecture du frottis sanguin au microscope.

6. Résultats

Trois axes de comparaison ont été menés. Le premier a été entrepris de manière à évaluer les performances du DM96® brut. Puis, nous avons souhaité étudier les performances de l'automate après reclassement des leucocytes par rapport à la microscopie. Enfin, nous allons nous intéresser aux variations de performances d'un cytologiste naïf (SBD) entre la technique de référence (le microscope) et le DM96®.

6.1. Evaluation des performances du DM96® brut

Au final, au cours de cette étude, 25 140 cellules ou artéfacts ont été étudiés avec le DM96®. Cet automate n'est pas parvenu à identifier 448 cellules (soit 1,78% de cellules classées dans la catégorie « cellules non identifiées »).

En comparant les formules sanguines obtenues entre le DM96® brut et le reclassement effectué par les cytologistes experts, des sensibilités et des spécificités ont été déduites (tableau n°XIV).

Leucocytes	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP	VPN	Exactitude
PNN	92,35	99,52	97,92	98,15	90,57
PNE	84,87	99,5	50,39	99,91	46,57
PNB	80,3	99,66	38,13	99,95	34,87
Lymphocytes	68,34	82,21	66,51	83,39	50,84
Monocytes	82,94	97,18	65,15	98,90	57,45
Métamyélocytes	42,50	99,67	16,83	99,91	13,71
Myélocytes	7,91	99,69	15,38	99,35	5,51
Promyélocytes	50,00	97,10	0,14	100	0,14
Blastes	53,66	98,32	81,57	93,87	47,86
L. anormaux	1,33	99,07	17,00	87,49	1,25
TOTAL	62,60	97,66	71,57	96,52	50,13

Tableau n°XIV : Evaluation des performances brutes du DM96®

Légende :

L = Lymphocyte ; VPP = Valeur Prédictive Positive ; VPN = Valeur Prédictive Négative

Le degré d'exactitude est variable selon la lignée leucocytaire concernée. Elle varie entre 0.14% (promyélocytes) et 90.57% (PNN). L'exactitude globale toute lignée leucocytaire confondue, est de 50.13%. La sensibilité d'identification des lymphocytes anormaux et des blastes est faible (1.33% et 53.66%).

De plus, en fonction de la nature lymphoïde ou myéloïde de la cellule blastique, la sensibilité diffère (tableau n°XV). La sensibilité d'identification des cellules blastiques lymphoïdes est de 42.40% contre 60.35% dans le cas des LAM.

Hémopathie	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP	VPN	Exactitude
LAL	42,40	99,68	99,40	58,48	42,29
LAM	60,35	99,19	96,12	88,29	58,92

Tableau n°XV : Evaluation des performances brutes du DM96® dans le cas particulier des LAM et des LAL

Par ailleurs, en fonction des pathologies considérées, les cellules anormales circulantes non-identifiées par l'automate sont retrouvées dans différentes catégories (faux-négatif). Les blastes non reconnus sont en majorité classés parmi les lymphocytes, les monocytes et les promyélocytes (figure n°79).

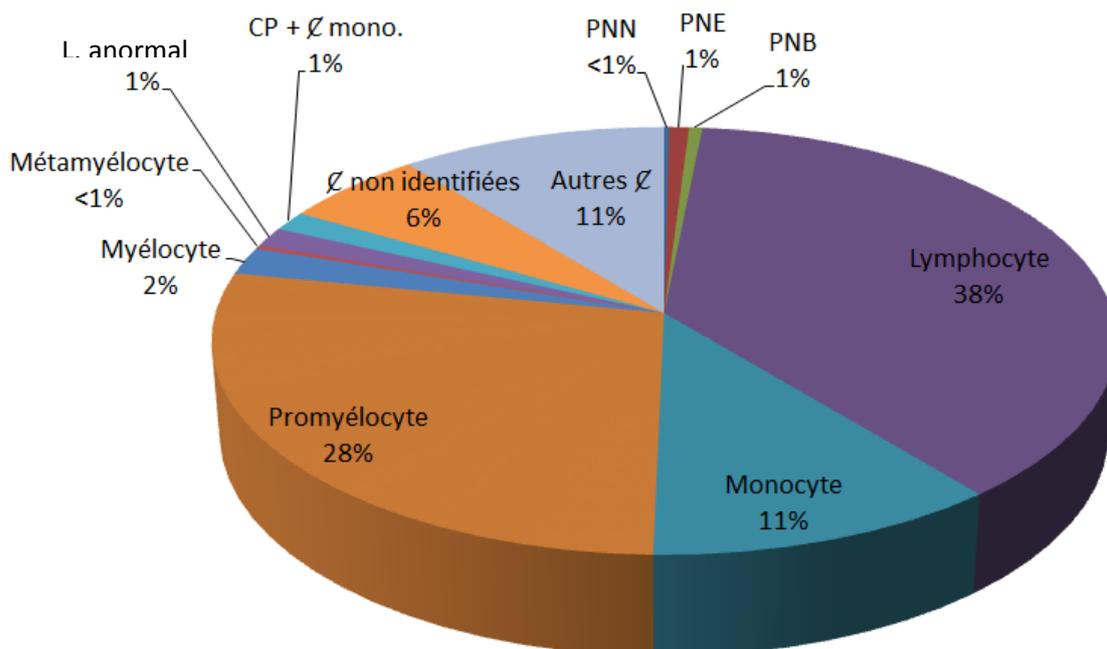


Figure n°79 : Catégories regroupant les faux-négatifs des cellules blastiques circulantes
 Identification des différentes catégories (leucocytes et autres cellules) où sont retrouvées les cellules blastiques faussement-négatives.
 Légende :
 ζ = Cellule ; L = Lymphocyte ; CP = Cellules Plasmocytaires ; ζ mono = Cellules Mononuclées

En fonction du type de LA (LAL ou LAM), les faux-négatifs correspondant aux blastes sont retrouvés dans des catégories différentes. Dans le cas des LAL, les faux-négatifs sont principalement identifiés parmi les lymphocytes (figure n°80). Dans le cas des LAM, les faux-négatifs sont majoritairement retrouvés dans la catégorie des promyélocytes (figure n°81).

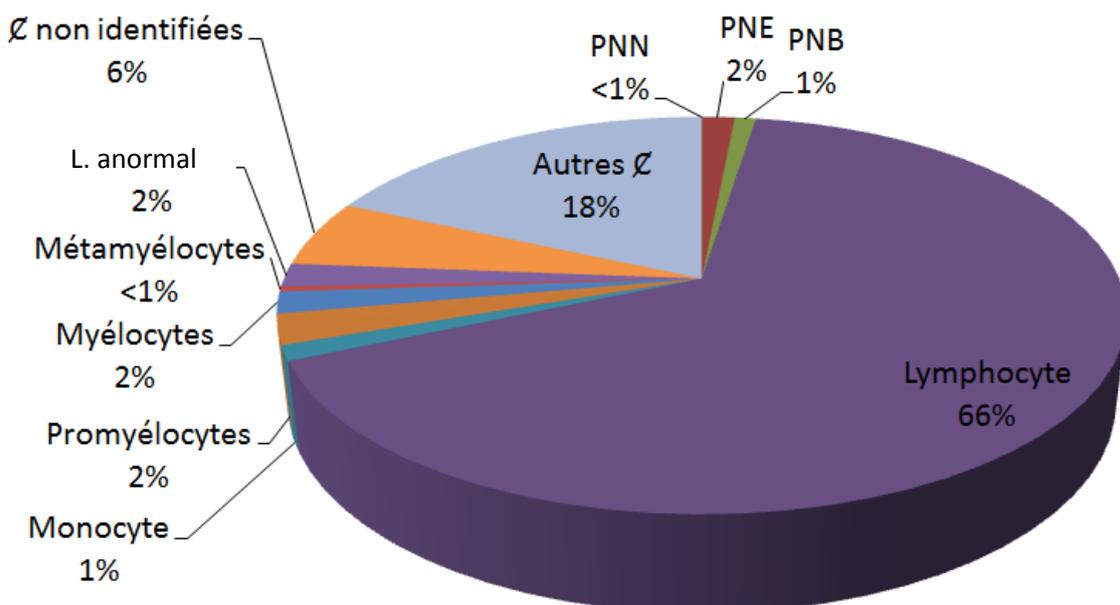


Figure n°80 : Catégories regroupant les faux-négatifs des cellules blastiques lymphoïdes

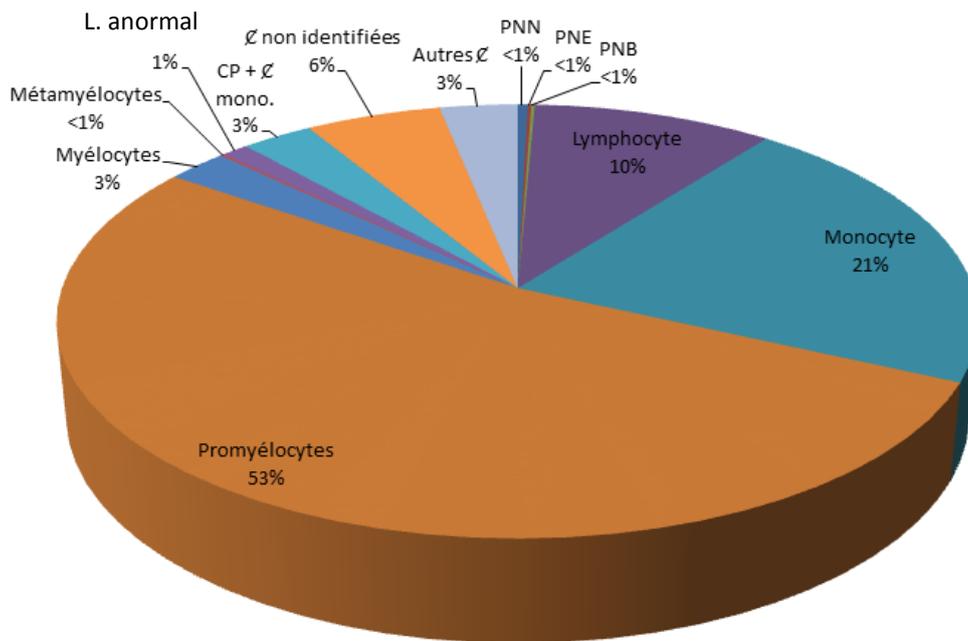


Figure n°81 : Catégories regroupant les faux-négatifs des cellules blastiques myéloïdes

Pour les SLP, les faux-négatifs sont principalement identifiés dans la catégorie des lymphocytes (figure n°82).

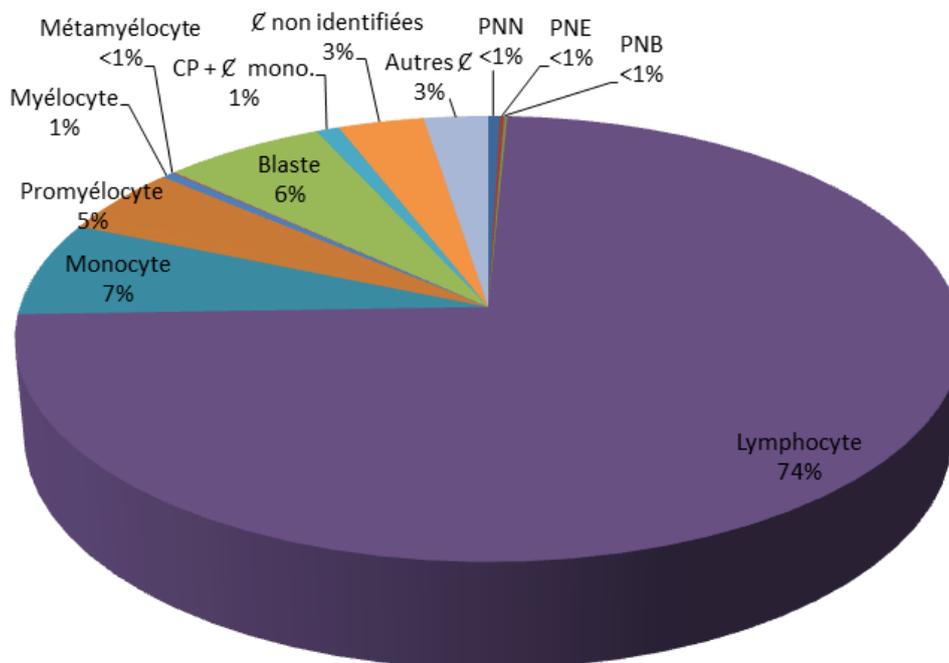


Figure n°82 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux

Les lymphocytes anormaux faussement-négatifs du LCM et du LZM sont majoritairement identifiés parmi les lymphocytes (figures n°83 et 84).

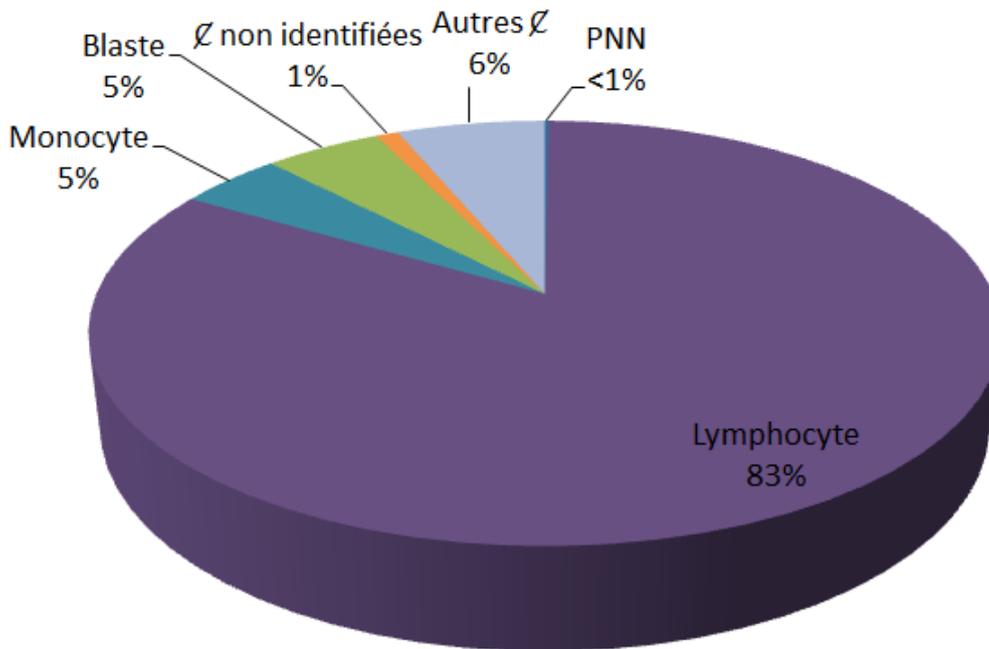


Figure n°83 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du LCM

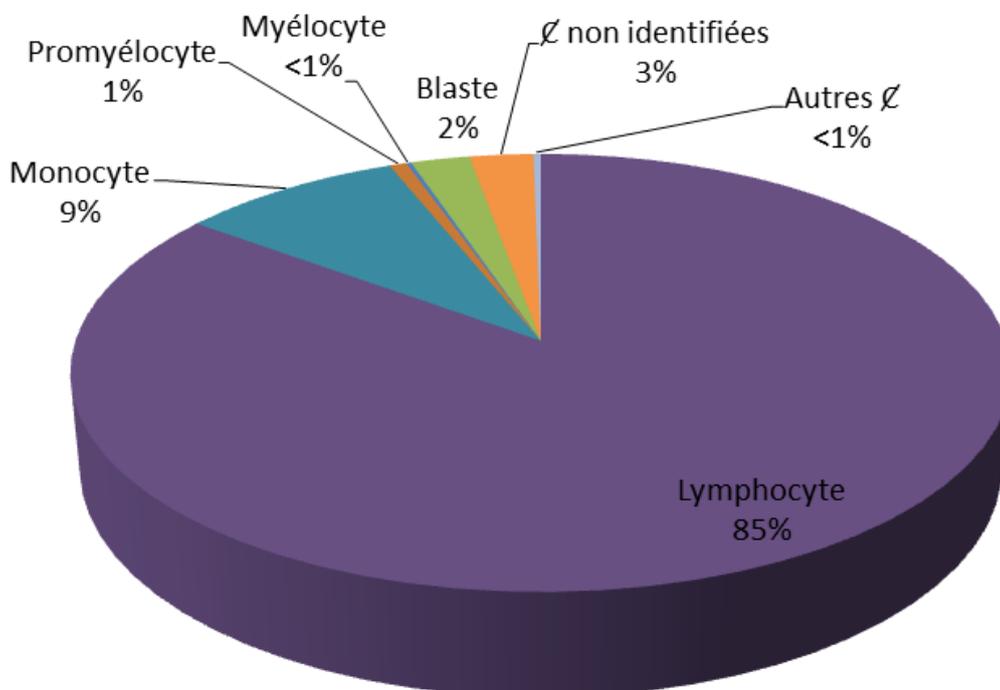


Figure n°84 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du LZM

Les ombres de Gumprecht sont identifiées dans la catégorie des « autres cellules » (figure n°85, LLC).

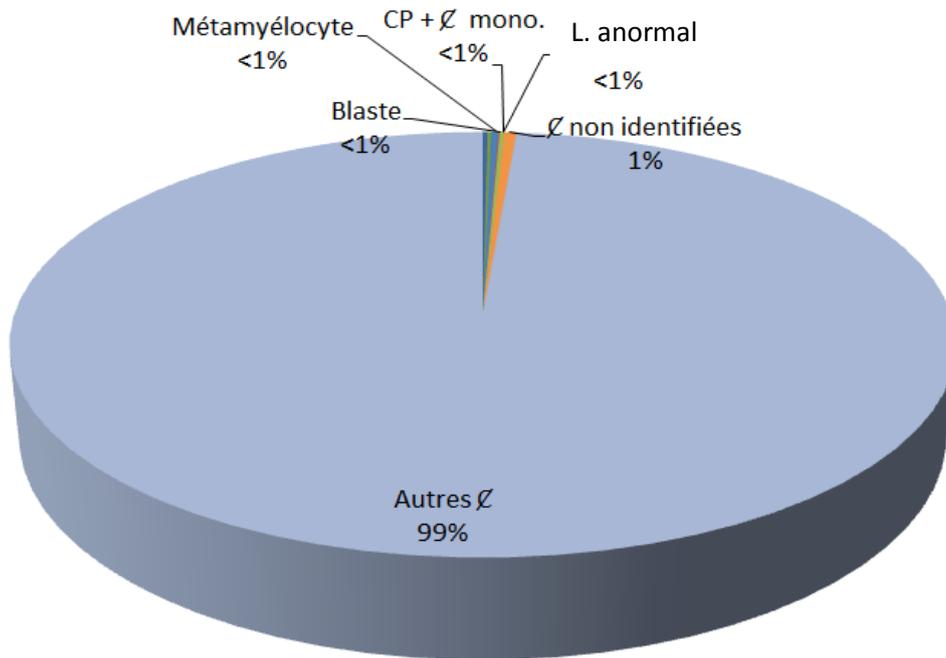


Figure n°85 : Catégories regroupant les faux-négatifs des ombres de Gumprecht

Les faux-négatifs du LF sont principalement identifiés dans la catégorie des promyélocytes (figure n°86).

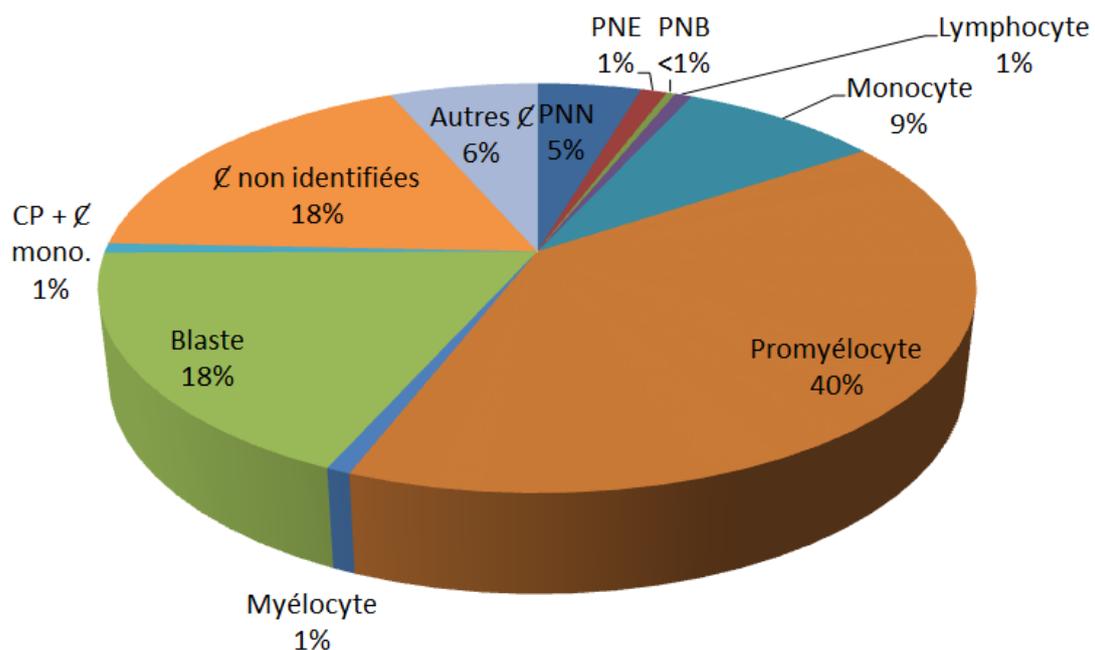


Figure n°86 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du FL

Les lymphocytes anormaux du lymphome T anaplasique sont majoritairement retrouvés dans la catégorie des blastes (figure n°87).

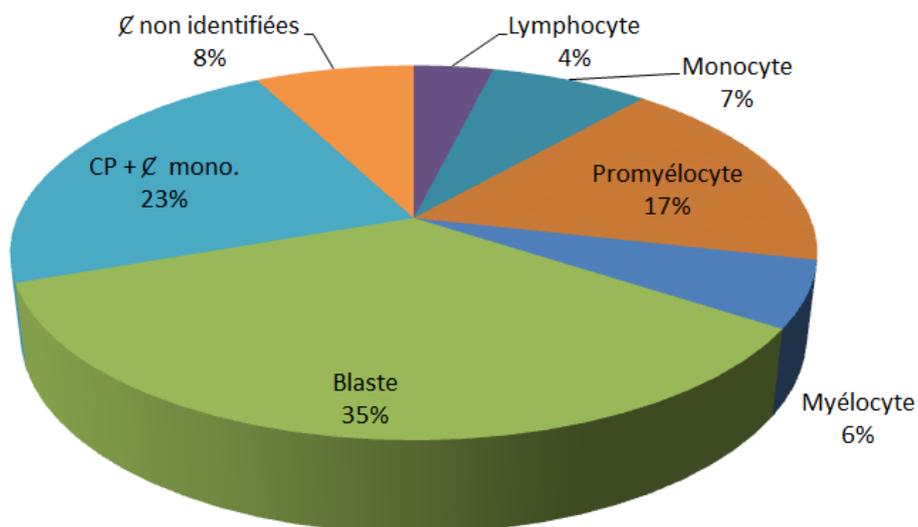


Figure n°87 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du lymphome T anaplasique

Les lymphocytes anormaux du SS sont identifiés exclusivement parmi les lymphocytes (figure n°88).

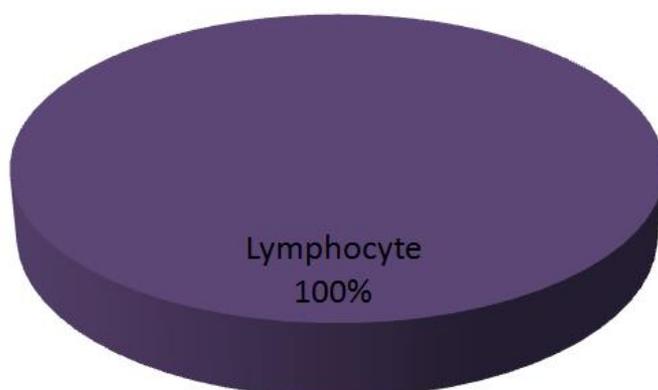


Figure n°88 : Catégories regroupant les faux-négatifs des lymphocytes anormaux du SS

Ainsi, il apparaît qu'avant reclassement des leucocytes mal identifiés par le DM96®, la sensibilité d'identification des cellules anormales circulantes est globalement faible (blaste : 53.66% ; lymphocytes anormaux 1.33%) et que les cellules non identifiées sont retrouvées dans différentes catégories selon l'origine de la cellule anormale.

6.2. Evaluation du DM96® après reclassement

Puis, nous avons étudié la concordance entre la lecture sur l'automate après reclassement par les cytologistes experts et la microscopie (figures n°89 et tableau n°XVI) afin d'évaluer l'influence de l'identification numérique sur écran par rapport à celle conventionnelle sur lame au microscope.

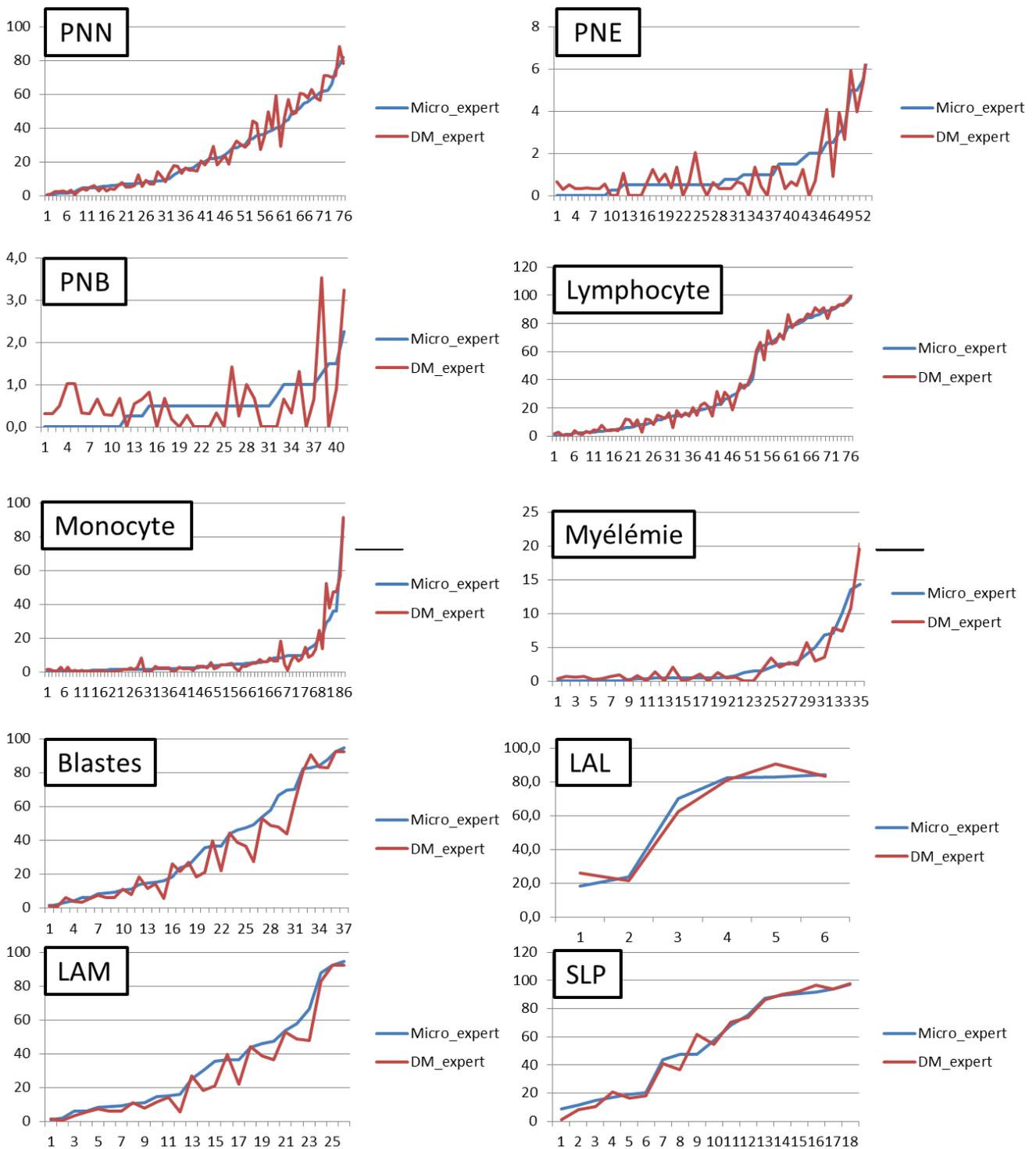


Figure n°89 : Corrélation entre le DM96® et le microscope

Légende :

En abscisse : numéro du cas patient

En ordonnée : taux de la cellule considérée (en %)

Micro = Microscope

	Notre étude	Lee <i>et al.</i>	Briggs <i>et al.</i>	Kratz <i>et al.</i>	Ceelie <i>et al.</i>	Yu <i>et al.</i>
PNN	0.9798	N/A	0.9859	0.9536	N/A	0.9134
PNE	0.8908	0.8821	0.672	0.73	0.846	0.7671
PNB	0.4658	0.7637	0.0534	N/A	N/A	0.5592
Lymphocyte	0.9943	0.9547	0.9591	0.9393	0.9405	0.901
Monocyte	0.96	0.8316	0.805	0.6658	0.7004	0.8176
IG	0.92	0.9064	N/A	N/A	N/A	N/A
Blastes	0.9673 (LAL : 0.9188) (LAM : 0.9788)	0.9861	0.9953	N/A	0.984	0.9769
L. anormaux	0.9893	N/A	N/A	N/A	N/A	0.9326

Tableau n°XVI : Etude de corrélation entre le DM96® et le microscope

Comparaison des coefficients de corrélation avec d'autres études (45), (47), (52), (54), (55)

L'analyse comparative avec les études publiées montre que l'ensemble des lectures concordent quels que soit les paramètres étudiés. Les coefficients de corrélation calculés dans cette étude varient entre 0.4658 (PNB) et 0.9943 (lymphocyte).

Par ailleurs, dans ce travail, nous avons voulu évaluer les performances de l'automate dans le suivi des LA en prenant l'exemple d'un patient présentant une LAM 2 (patient n°72 à 75 de la figure n°90). Ce patient ne possède qu'un taux faible de blastes circulants. Cependant, la corrélation entre les résultats obtenus avec les deux techniques est correcte en considérant la table de Rümke sur 200 éléments et le calcul des coefficients de corrélation (J1 : 6.1% avec le DM96® contre 9% au microscope ; J2 : 5.8% contre 8.5% ; J3 : 3.3% contre 6% ; J4 : 5.3% contre 6%).

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + C mono	C. sézary	TOTAL
72	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	6,8			86,5	0,7		0,0	0,0	6,1				100,0
72	EXPERT	LAM 2	8			77,25	4,5		0,5	0,75	9				100
		Rumke	4,6-12,7			68,4-85,3	2,4-9		0-3,6	0-3,6	5,4-13,9				Non conforme
		R ²													0,998853471
73	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	5,8		0,6	87,0	0,0			0,0	5,8		0,6		100,0
73	EXPERT	LAM 2	6,5		0,3	84	0,5			0,25	8,5		0		100
		Rumke	3,9-11,5		0-1,8	73,8-89,6	0-3,6			0-1,8	5,4-13,9		0-1,8		Conforme
		R ²													0,999310958
74	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	5,3			91,3	0,0				3,3				100,0
74	EXPERT	LAM 2	7,5			85,5	1				6				100
		Rumke	4,6-12,7			79,3-93,8	0-3,6				3,1-10,2				Conforme
		R ²													0,999775332
75	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	3,3			91,3	0,0		0,0		5,3				100,0
75	EXPERT	LAM 2	1,75			90,75	1,25		0,3		6				100
		Rumke	0,6-5			86,1-94,6	0-3,6		0-1,8		3,1-10,2				Conforme
		R ²													0,999646014

Figure n°90 : Suivi des performances du DM96® : exemple d'une LAM 2

Au final, l'automate donne ainsi, après reclassement, un décompte comparable à la microscopie conventionnelle pour les cellules blastiques et les lymphocytes anormaux.

6.3. Variations de performances d'un cytologiste naïf entre le microscope et le DM96

Pour savoir si l'utilisation de l'automate entraîne des difficultés d'identification des cellules par rapport à la microscopie, nous avons mené une analyse des performances entre un cytologiste naïf (SBD) et des cytologistes experts (GB et SD). Deux études de corrélations ont été réalisées : une entre les lectures faites avec le DM96® et l'autre entre les lectures faites au microscope.

La première étude de corrélation faite entre les reclassements effectués par SBD et GB+SD sur le DM96® peut permettre de mettre en évidence quelques différences (pour 3/75 patients soit 4% des patients ; annexe n°1). Ces différences reposent sur :

- la distinction lymphocyte-monocyte (pour 1 /75 patients soit 1.33% des patients ; patient n°7 ; LAM 2)
- ou encore sur la distinction lymphocytes normaux-anormaux (pour 2/75 patients soit 2.67% des patients ; patients n°12; SLP non étiqueté ; patient n°43 ; lymphocytes granuleux monoclonaux).

Une seconde étude de corrélation faite entre les lectures au microscope de SBD, SD et GB a été réalisée (annexe n°2). Les mêmes erreurs de classement ont été observées (pour 7/75 patients soit 9.33% des patients). L'ensemble de ces différentes lectures (reclassement sur le DM96® par SBD ou GB+SD ; lecture au microscope par SBD, GB et SD) a été représentée sur un même graphique pour apprécier leur concordance (figure n° 91).

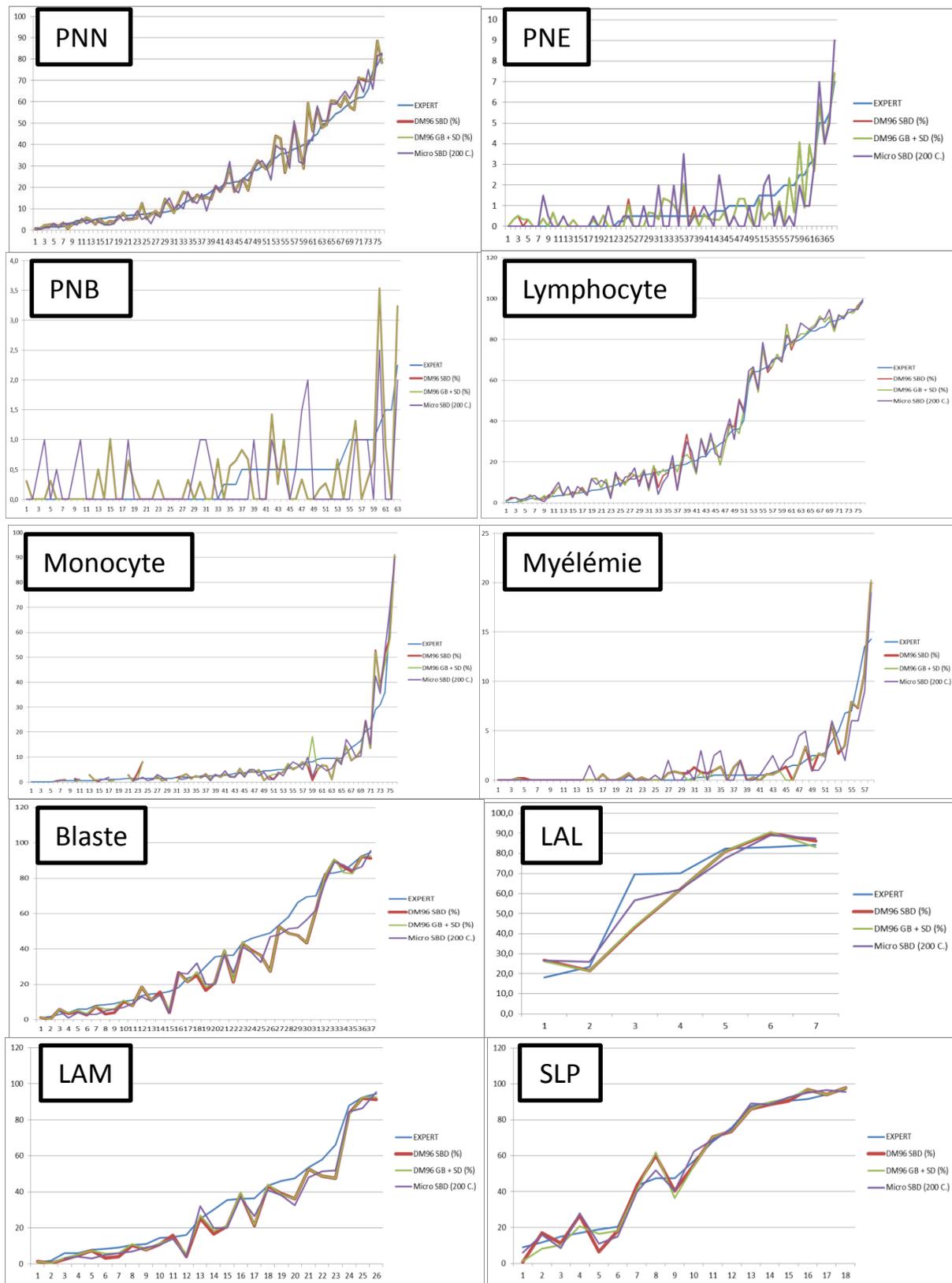


Figure n°91 : Corrélation entre les lectures au microscope et au DM96® de SBD, GB et SD

Légende :

En abscisse : numéro du cas patient

En ordonnée : taux de la cellule considérée (en %)

Micro = Microscope

Toutes les lectures faites sur l'automate et au microscope concordent. Néanmoins, pour savoir si les variations observées entre SBD et GB+SD sont similaires quelle que soit la technique utilisée (DM96® ou microscope), nous avons calculés les coefficients de corrélations moyens (figure n°92).

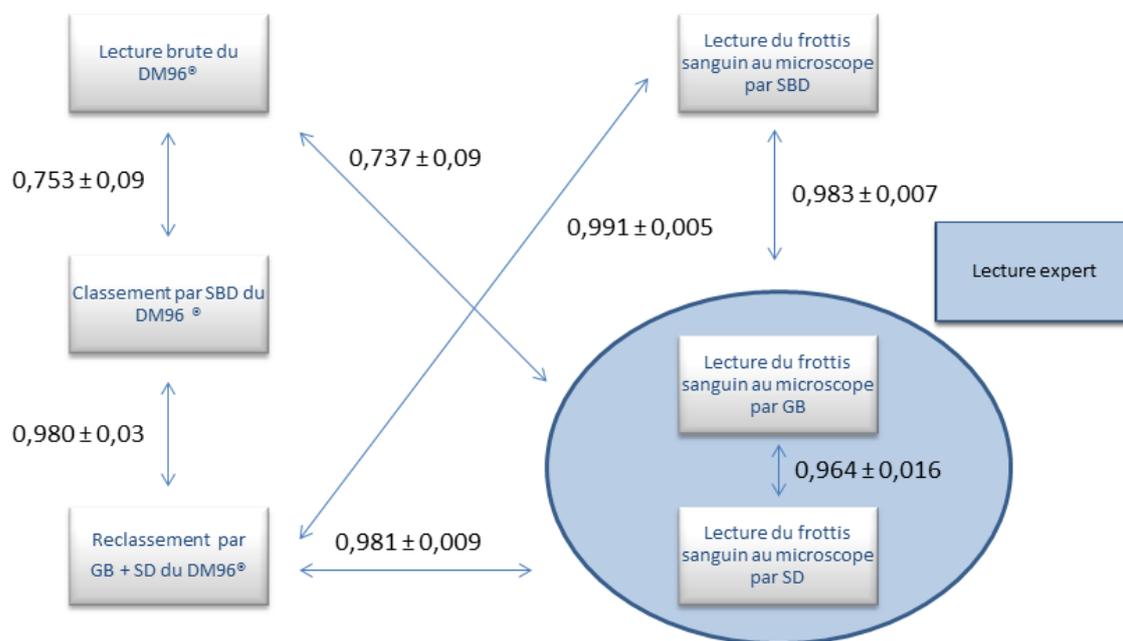


Figure n°92 : Corrélation entre toutes les lectures effectuées

Bien que quelques différences aient été observées entre SBD et GB + SD sur le DM96®, les lectures concordent dans la majorité des cas (coefficient de corrélation moyen de 0.980 ± 0.03). Une corrélation correcte est également observée entre les lectures effectuées au microscope (coefficient de corrélation moyen de 0.983 ± 0.007). Les variations observées entre ces techniques sont donc comparables. Ainsi, quelle que soit la technique utilisée, un cytologiste naïf classe de la même façon.

7. Discussion

La formule sanguine permet de décrire de manière quantitative et qualitative, l'ensemble des populations normales du sang ainsi que les éventuelles cellules anormales circulantes. L'hémogramme a donc une place primordiale dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës et les hémopathies à lymphocytes matures. Néanmoins, en raison des contraintes budgétaires, de la norme NF EN ISO 15189 et du caractère empirique de la formule sanguine au microscope, des systèmes experts ont été développés. Ainsi, au laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen, nous utilisons en routine depuis quelques années, un microscope automatisé : le DM96®. Il pré-classe les leucocytes et un technicien et/ou un biologiste modifie au besoin le classement. Jusqu'à aujourd'hui, nous n'utilisons cet automate que pour établir la formule sanguine de patients présentant des anomalies quantitatives. Avec ce travail, nous souhaitons évaluer les performances du DM96® dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes.

Trois axes d'études ont été suivis lors de ce travail. Le premier d'entre eux a consisté à évaluer les performances du DM96® brut c'est-à-dire sans reclassement des cellules éventuellement mal identifiées par l'automate. Cette approche du DM96® est originale puisqu'elle n'a jamais été abordée dans la littérature.

- *Evaluation des performances du DM96® brut*

Nous avons vu que les sensibilités et spécificités sont variables en fonction des leucocytes considérés. En présence de cellules anormales circulantes, seule une population leucocytaire est facilement identifiée par l'automate. Il s'agit des PNN (sensibilité : 92.35%).

Les autres sous-populations leucocytaires ne sont que faiblement identifiées par l'automate. La sensibilité d'identification des cellules blastiques n'est, par exemple, que de 53.66%. De nombreux blastes sont ainsi incorrectement identifiés par l'automate. Ils sont pré-classés par erreur dans des catégories de leucocytes avec lesquelles, ils partagent de nombreuses caractéristiques morphologiques. En effet, de la même manière qu'il est parfois difficile de distinguer les lymphoblastes des lymphocytes, de nombreux lymphoblastes sont classés par l'automate parmi les lymphocytes (sensibilité : 42.40%).

La détection plus facile des cellules blastiques myéloïdes au microscope est vérifiée par une sensibilité statistiquement plus élevée de 60.35% du DM96®. Les cellules blastiques myéloïdes qui partagent quelques caractéristiques en commun avec les promyélocytes (chromatine fine, présence de granulations) sont cependant régulièrement identifiées parmi ces dernières (53% des myéloblastes faux-négatifs sont retrouvés dans la catégorie des promyélocytes). C'est un élément à prendre en considération, en particulier lorsque une myélémie est associée à la présence de blastes circulants.

Par ailleurs, la sensibilité d'identification des cellules lymphoïdes anormales par l'automate est très faible (sensibilité : 1.33%). L'automate a des difficultés à distinguer les lymphocytes anormaux des lymphocytes normaux. L'exemple est celui des cellules du SS qui sont exclusivement retrouvées parmi les lymphocytes et non dans la catégorie des lymphocytes anormaux.

Les lymphocytes anormaux du lymphome T anaplasique peuvent être pré-classés parmi les blastes. Cette pré-classification est attendue en raison de leurs caractéristiques morphologiques communes (chromatine fine et basophilie du cytoplasme). Néanmoins, cette partie de l'étude nécessite d'être vérifiée sur un plus grand effectif (1 seul patient a été étudié, ici).

De plus, en utilisant l'automate pour des patients présentant une LLC, il convient de réattribuer les ombres de Gumprecht dans la catégorie des lymphocytes afin de ne pas en sous-estimer le décompte. Les ombres de Gumprecht peuvent être cependant confondues avec des cellules lysées. Il n'est donc pas étonnant de les retrouver pré-classées avec les artéfacts.

Les lymphocytes anormaux du LF ont principalement été identifiés parmi les promyélocytes. Cette pré-classification est surprenante étant donné le peu de caractéristiques morphologiques communes. Néanmoins, en raison de l'importante leucocytose du patient (216 G/L), l'automate a eu des difficultés à séparer les lymphocytes les uns des autres (figure n°93). Plusieurs cellules ont donc été photographiées par l'automate en lieu et place d'une cellule. La taille importante de ce conglomérat de cellules peut être une explication à cette pré-classification (par rapport à la taille relativement grande d'un promyélocyte). Les difficultés d'individualisation des cellules par l'automate semblent dues avant tout à la réalisation automatisée du frottis sanguin. Cependant, cette conclusion est à nuancer en raison du faible effectif sur lequel, elle repose. Elle n'a en effet été réalisée qu'avec un seul patient puisque la dissémination sanguine du LF est rare et qu'il s'agit d'une étude prospective, limitée dans le temps.

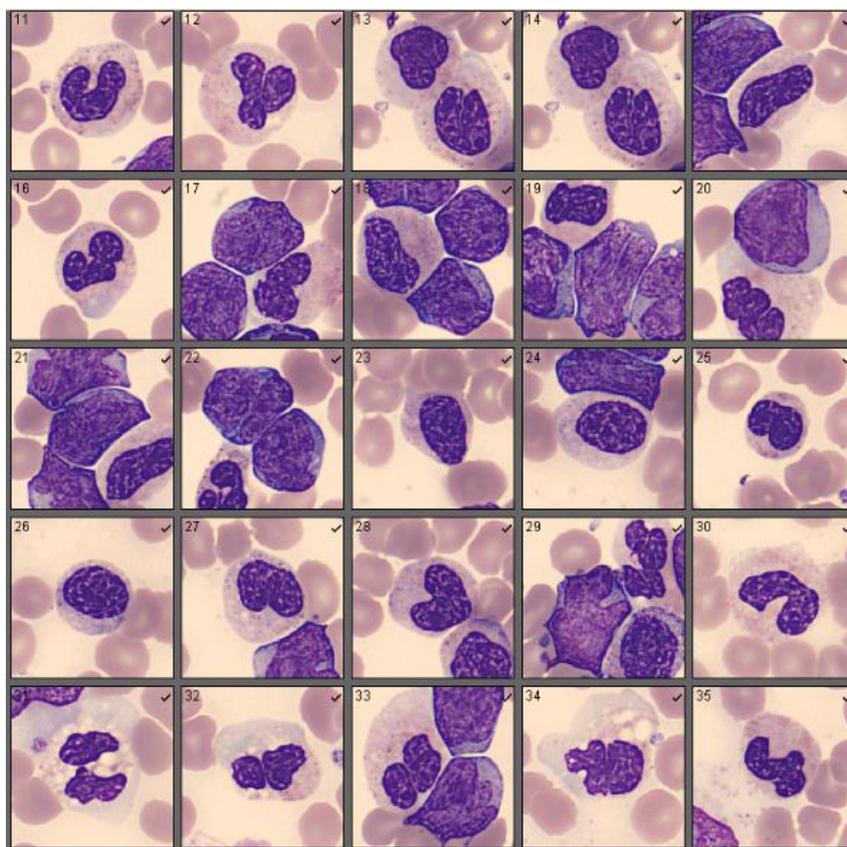


Figure n°93 : Difficultés d'individualisation des cellules en cas de leucocytose importante

Plusieurs cellules ont été photographiées à la place d'une seule cellule (une case correspond normalement à une cellule).

De plus, pour les patients présentant d'importantes leucocytoses, nous préférons la technique manuelle à la technique automatisée. La technique manuelle a l'avantage de bien individualiser chaque cellule et d'éviter une possible modification de l'aspect morphologique (modification morphologique non observée avec la technique automatisée dans cette étude). Cependant, le DM96® ne peut pas analyser les lames étalées en manuel.

D'une manière générale, il apparaît que le DM96® seul ne parvient pas facilement à identifier les cellules anormales circulantes. A cet effet, des logiciels sont programmés pour implémenter de manière prospective, l'algorithme neuronal du DM96®. L'exemple est celui d'Alvarez *et al.* qui améliore la sensibilité de détection des cellules lymphoïdes anormales comme celles de la LT en étudiant la couleur de la cellule, la texture du noyau et du cytoplasme, la basophilie et le contour du cytoplasme (56).

Au final, il s'agit de la première étude évaluant les capacités réelles du DM96® à pré-classer correctement les cellules anormales circulantes. Cette étude nous a semblé nécessaire pour étudier les performances de l'automate en termes de formation. Mais au final, la détection des cellules blastiques n'est que partielle et l'automate est incapable d'identifier les lymphocytes anormaux. Un technicien et/ou un biologiste expérimenté doit nécessairement effectuer le reclassement et doit avoir un esprit critique puisque l'automate pré-classe les cellules anormales dans des catégories présentant des similarités morphologiques avec ces dernières. Le DM96® permet de cette façon de conserver les compétences empiriques des opérateurs.

- *Evaluation des performances du DM96® après reclassement*

La seconde étude a consisté à étudier les performances de l'automate après reclassement par des cytologistes experts. Dans cette étude, il s'agissait d'évaluer la corrélation entre les décomptes réalisés au microscope et sur l'automate. Pour un seul paramètre, la corrélation entre les deux techniques n'était pas observée : les PNB. En effet, dans le cas particulier des PNB, la corrélation est faible (0.4658) même si elle est tout à fait conforme aux données publiées (47), (54), (55). Néanmoins, elle s'explique par les faibles taux de PNB des patients inclus dans cette étude. Les PNB sont une population rare dans le sang. L'identification de légères variations inter-opérateurs du taux de PNB dans une formule sanguine effectuée sur 100 éléments se traduit par une forte variation relative. Si un opérateur décompte 1% de PNB et qu'un autre en décompte 2%, la variation relative est de 100%. D'où le manque de corrélation observé. Ces variations observées sont conformes si nous nous référons à la table de Rümke. De plus, elles n'ont aucun impact d'un point de vue clinique.

De ce fait, contrairement à l'étude de Cornet *et al.* (46) qui rapporte une sous-estimation du taux des lymphoblastes avec le DM96®, les corrélations pour l'ensemble des paramètres étudiés sont bonnes et similaires à celles publiées dans de nombreux articles (45), (47), (52), (54), (55). La sous-estimation du taux de lymphoblastes rapportée par Cornet *et al.* (46) est à mettre en relation avec le fait que l'étude n'ait pas été réalisée en aveugle. Nous avons connaissance des diagnostics. Une étude sur un plus grand nombre d'échantillons est ainsi nécessaire pour conclure sur la quantification correcte des lymphoblastes par l'automate.

Néanmoins, ayant connaissance de l'importance de la quantification du taux de blastes circulants au décours du suivi d'une LA, il est judicieux de penser que l'automate ne sera jamais utilisé pour décompter ces cellules et ce d'autant plus s'il s'agit de lymphoblastes (J8 de la cure d'induction des LAL chez l'enfant). En effet, le classement des leucocytes sur le DM96® peut être difficile puisque l'aspect morphologique des cellules y est différent en termes de densité de la chromatine et de basophilie du cytoplasme (figure n°94).

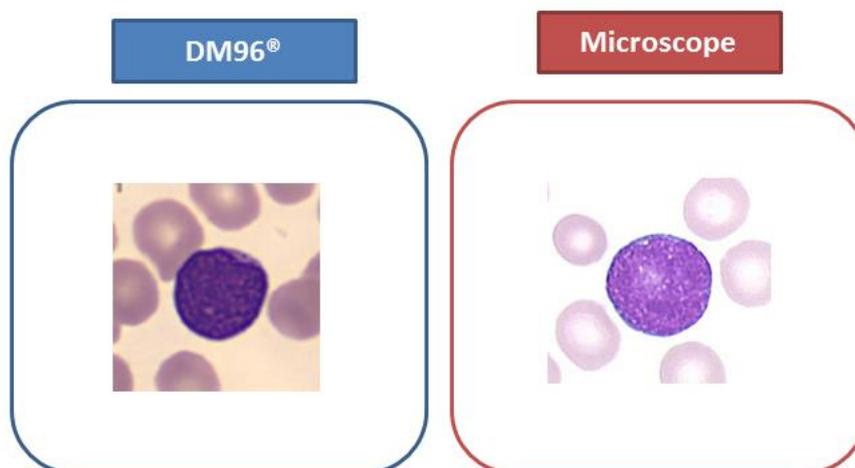


Figure n°94 : Différences d'aspect morphologique entre le DM96® et le microscope

Cependant, nous avons apprécié la lecture des leucocytes par galeries pré-classées qui permet à l'opérateur de mettre plus facilement en évidence les cellules anormales et notamment les lymphocytes anormaux (46). Les granulations des lymphocytes granuleux monoclonaux sont, par exemple, plus aisément identifiées et la récurrence de la présence de villosités lymphocytaires est mise en relief par cette présentation (figure n°95).

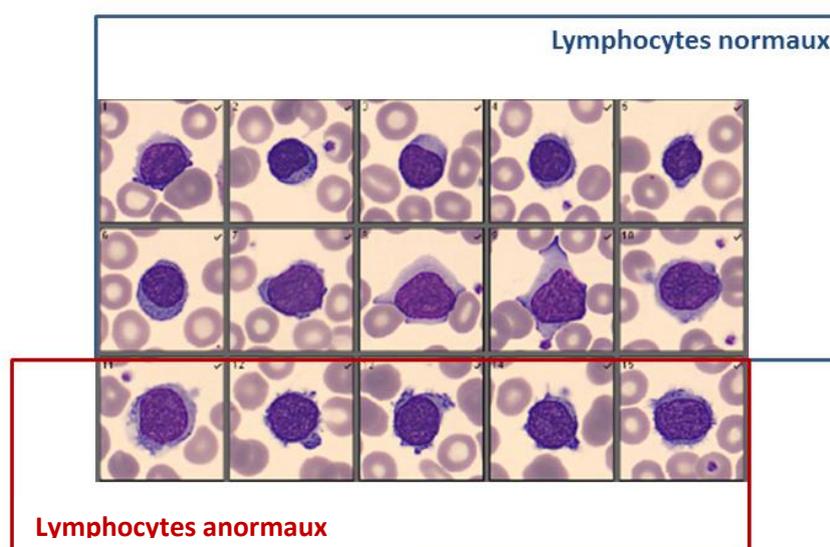


Figure n°95 : Identification aisée des atypies cellulaires

Distinction facilitée ici des lymphocytes villosus du SLVL par rapport aux lymphocytes normaux

Enfin, nous avons pu constater que la lecture d'un frottis sanguin sur le DM96® ne s'accompagne pas obligatoirement d'un biais de lecture. En effet, sachant que l'automate ne photographie pas les bords du frottis, nous pouvions nous attendre à une sous-estimation des grandes cellules (blastés et monocytes). Le décompte des cellules anormales circulantes par des cytologistes experts est donc comparable quelle que soit la technique utilisée et l'utilisation de l'automate peut faciliter l'identification des cellules anormales, en particulier celle des lymphocytes anormaux. Néanmoins, contrairement au gain de temps décrit avec l'utilisation du DM96® en cas d'anomalie quantitative, son utilisation en cas d'anomalie qualitative s'accompagne d'une perte de temps en raison des nombreux retraitements à faire avant reclassement.

- *Variation de performance d'un cytologiste naïf entre l'automate et la microscopie*

Dans cette dernière partie de l'étude, nous voulions savoir si l'utilisation de l'automate rendait plus difficile l'identification des leucocytes par un cytologiste naïf en comparaison avec la microscopie conventionnelle. A cet effet, nous avons étudié la corrélation entre un cytologiste naïf et les cytologistes experts à la fois sur l'automate et avec la microscopie.

Etant donné que l'ensemble des lectures concordent et que les coefficients de corrélation moyens sont similaires, l'utilisation de l'automate par un cytologiste naïf n'entraîne pas d'avantages de difficultés d'identification des leucocytes. Il semble donc possible de réaliser une formule sanguine à partir d'images acquises par le DM96® à la condition que le reclassement soit réalisé par un biologiste qu'il soit expert ou non.

8. Conclusion et perspectives

Pour conclure, avec cette étude nous montrons qu'en utilisant le DM96® nous pouvons mettre en évidence et quantifier de manière globalement fiable le taux des cellules anormales circulantes. Néanmoins, il ne s'agit pas d'utiliser cet automate sans reclassement du technicien et/ou du biologiste. En effet, nous avons vu avec la première étude évaluant les capacités réelles du DM96® seul, qu'il est peu sensible pour identifier ces cellules. Le DM96® est un microscope automatique mais un microscope tout de même qui nécessite toujours un contrôle hématologique.

Malgré les quelques limites de l'étude (petite cohorte, étude non réalisée en aveugle), des perspectives pourraient être envisagées comme celle d'une éventuelle validation de méthode selon la norme NF EN ISO 15189. Cette validation permettrait d'envisager un nouveau mode d'organisation des lectures des frottis sanguins dans le but de libérer du temps technicien et/ou biologiste et d'améliorer la traçabilité de l'analyse exigée par la norme notamment en termes d'archivage. Il serait intéressant de refaire l'étude avec des techniciens car ils réalisent la majorité des formules sanguines du laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen.

9. Annexe

9.1. Annexe 1 : Corrélation entre un cytologiste naïf et des cytologistes experts avec le DM96®

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + ϵ' mono	ϵ' sézary	TOTAL
1	DM96 SBD (%)	LCM	14,4			11,8	0,3					73,5			100
1	DM96 GB + SD (%)	LCM	14,4			11,5	0,3					73,8			100,0
		Rumke	6,2-20,7			6,2-20,7	0-1,8					63,1-80,8			Conforme
		R ²													1,0000
2	DM96 SBD (%)	LLC	20,7		0,8	74,7	3,9								100
2	DM96 GB + SD (%)	LLC	20,7		0,8	77,1	1,4								100,0
		Rumke	14,7-31,6		0,1-3,6	68,4-85,3	0,1-3,6								Non conforme
		R ²													0,9995
3	DM96 SBD (%)	LF	21,4	1,3		1,3	3,2		2,4			70,4			100
3	DM96 GB + SD (%)	LF	21,7	1,1		1,3	3,2		2,4			70,3			100,0
		Rumke	14,7-31,6	0,1-3,6		0,1-3,6	1,1-6,4		0,6-5			63,1-76,3			Conforme
		R ²													1,0000
4	DM96 SBD (%)	LAM 5A	18,7		0,3	4,3	52,8		0,9	1,8	21,2				100,0
4	DM96 GB + SD (%)	LAM 5A	18,7		0,3	4,0	52,1		1,2	1,8	21,8				100,0
		Rumke	10,4-26,2		0-1,8	1,7-7,7	42,9-62		0,1-3,6	0,6-5	14,7-31,6				Conforme
		R ²													0,9998
5	DM96 SBD (%)	LAM 4	7,9	0,3		38,4	13,6	0,7	0,3		38,7		0,0		100,0
5	DM96 GB + SD (%)	LAM 4	7,9	0,3		37,1	13,6	0,7	0,3		39,7		0,3		100,0
		Rumke	4,6-12,7	0-1,8		28,4-47,1	6,2-20,7	0,1-3,6	0-1,8		33,2-47,1		0-1,8		Conforme
		R ²													0,9993
6	DM96 SBD (%)	LAM 2	29,3			14,0	4,0				52,7				100
6	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	29,3			14,0	4,0				52,7				100
		Rumke	19,2-36,9			6,2-20,7	1,7-7,7				42,9-62				Conforme
		R ²													1,0000
7	DM96 SBD (%)	LAM 2	8,1	0,7	0,7	50,7	0,7				39,2				100
7	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	8,1	0,7	0,7	33,8	18,2				38,5				100
		Rumke	4,6-12,7	0,1-3,6	0,1-3,6	23,7-42	10,4-26,2				28,4-47,1				Non conforme
		R ²													0,8861
8	DM96 SBD (%)	LLC	4,0	0,3		92,9	2,8								100,0
8	DM96 GB + SD (%)	LLC	4,0	0,3		92,9	2,8								100
		Rumke	1,7-7,7	0-1,8		88,5-96,1	1,1-6,4								Conforme
		R ²													1,0000
9	DM96 SBD (%)	LAM 5B	3,4			5,0	90,6		0,6		0,3				100,0
9	DM96 GB + SD (%)	LAM 5B	3,4			4,4	91,2		0,6		0,3				100,0
		Rumke	1,1-6,4			1,7-7,7	86,1-94,6		0,1-3,6		0-1,8				Conforme
		R ²													1,0000
10	DM96 SBD (%)	LLC	18,1	0,5	0,2	80,4	0,7		0,2						100
10	DM96 GB + SD (%)	LLC	18,1	0,5	0,2	80,4	0,7		0,2						100
		Rumke	10,4-26,2	0,1-3,6	0-1,8	73,8-85,3	0,1-3,6		0-1,8						Conforme
		R ²													1,0000
11	DM96 SBD (%)	LLC	34,8	1,2		60,5	3,2		0,2						100,00
11	DM96 GB + SD (%)	LLC	34,9	1,2		60,7	3,2		0,0						100,00
		Rumke	28,4-42	0,1-3,6		52,9-71,6	1,1-6,4		0-1,8						Conforme
		R ²													1,0000
12	DM96 SBD (%)	SLP NON ETIQUETE	14,6	0,0		3,6	1,7					80,1			100,00
12	DM96 GB + SD (%)	SLP NON ETIQUETE	14,3	0,3		83,7	1,7					0,0			100,00
		Rumke	6,2-20,7	0-1,8		73,8-89,6	0,6-5					0-1,8			Non conforme
		R ²													-0,3014
13	DM96 SBD bis (%)	LLC	60,4	0,5	0,3	27,9	6,4		2,7	0,8			1,1		100,00
13	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	60,4	0,5	0,3	27,9	6,4		2,7	0,8			1,1		100,0
		Rumke	52,9-66,8	0,1-3,6	0-1,8	19,2-36,9	3,1-10,2		1,1-6,4	0,1-3,6			0,1-3,6		Conforme
		R ²													1,0000
14	DM96 SBD (%)	SDRPL-VL	69,9	0,3	0,7	15,2	2,3					11,3	0,3		100,00
14	DM96 GB + SD (%)	SDRPL-VL	69,9	0,3	0,7	16,2	2,3					10,3	0,3		100
		Rumke	63,1-76,3	0-1,8	0,1-3,6	10,4-26,2	0,6-5					6,2-15	0-1,8		Conforme
		R ²													0,9997

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + Z mono	Z sézary	TOTAL
15	DM96 SBD (%)	LZM	30,4	7,4	3,5	10,2	4,9					43,5			100,00
15	DM96 GB + SD (%)	LZM	30,4	7,4	3,5	12,7	4,9					41,0			100,00
		Rumke	23,7-36,9	3,9-11,5	1,7-7,7	6,2-20,7	2,4-9					33,2-52,2			Conforme
		R ²													0,9970
16	DM96 SBD (%)	SS	57,7	1,3		7,4	6,7							26,8	100,00
16	DM96 GB + SD (%)	SS	57,7	1,3		13,4	6,7							20,8	100,00
		Rumke	47,8-66,8	0,1-3,6		6,2-20,7	3,9-11,5							14,7-31,6	Conforme
		R ²													0,9831
17	DM96 SBD (%)	LAM 2	21,4	0,3	3,2	13,6	24,6		19,7	0,3	16,5		0,3		100,00
17	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	21,0	0,3	3,2	12,0	24,6		19,7	0,6	18,4		0,0		100
		Rumke	14,7-31,6	0-1,8	1,1-6,4	6,2-20,7	19,2-31,6		19,2-31,6	0,1-3,6	10,4-26,2		0-1,8		Conforme
		R ²													0,9959
18	DM96 SBD (%)	LLC	16,4			82,5	1,1								100,00
18	DM96 GB + SD (%)	LLC	16,4			82,5	1,1								100,00
		Rumke	10,4-26,2			73,8-89,6	0,1-3,6								Conforme
		R ²													1,0000
19	DM96 SBD (%)	LLC	0,9			99,1									100,00
19	DM96 GB + SD (%)	LLC	0,9			99,1									100
		Rumke	0,1-3,6			96,4-99,9									Conforme
		R ²													1,0000
20	DM96 SBD (%)	LLC	57,7	0,3	0,3	36,9	4,7								100,00
20	DM96 GB + SD (%)	LLC	57,7	0,3	0,3	36,9	4,7								100,00
		Rumke	47,8-66,8	0-1,8	0-1,8	28,4-47,1	2,4-9								Conforme
		R ²													1,0000
21	DM96 SBD (%)	LZM	39,8	0,7		2,3	2,3					54,8			100,00
21	DM96 GB + SD (%)	LZM	39,8	0,7		2,7	2,3					54,5			100,00
		Rumke	33,2-47,1	0,1-3,6		1,1-6,4	0,6-5					47,8-62			Conforme
		R ²													1,0000
22	DM96 SBD (%)	LA NON ETIQUETE	59,3			11,3	0,7		0,7	0,7	27,3				100,00
22	DM96 GB + SD (%)	LA NON ETIQUETE	59,3			11,3	0,7		0,7	0,7	27,3				100,00
		Rumke	47,8-66,8			6,2-20,7	0,1-3,6		0,1-3,6	0,1-3,6	19,2-36,9				Conforme
		R ²													1,0000
23	DM96 SBD (%)	AREB 2	28,9	5,9		45,4					18,4		1,3		100,00
23	DM96 GB + SD (%)	AREB 2	28,9	5,9		45,4					18,4		1,3		100
		Rumke	19,2-36,9	3,1-10,2		38-52,2					10,4-26,2		0,1-3,6		Conforme
		R ²													1,0000
24	DM96 SBD (%)	SS	71,1	5,4		14,8	8,1							0,7	100,00
24	DM96 GB + SD (%)	SS	71,1	5,4		14,1	8,1							1,3	100,00
		Rumke	63,1-80,8	2,4-9		6,2-20,7	4,6-12,7							0,1-3,6	Conforme
		R ²													0,9999
25	DM96 SBD (%)	LAM 1	2,3		0,3	11,8	1,0		1,0		83,6				100,00
25	DM96 GB + SD (%)	LAM 1	2,3		0,3	11,8	1,0		2,0		82,6				100,00
		Rumke	0,6-5		0-1,8	6,2-20,7	0,1-3,6		0,6-5		73,8-89,6				Conforme
		R ²													0,9999
26	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	14,9			7,8	37,6		3,4		36,3				100,00
26	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	14,9			7,8	37,6		3,4		36,3				100
		Rumke	10,4-20,7			4,6-12,7	28,4-47,1		1,1-6,4		28,4-47,1				Conforme
		R ²													1,0000
27	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	2,7			3,8	1,4				92,1				100,00
27	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	2,7			3,8	1,0				92,4				100,00
		Rumke	1,1-6,4			1,7-7,7	0,1-3,6				87,3-95,4				Conforme
		R ²													1,0000
28	DM96 SBD (%)	LLC	2,8	0,4		96,6	0,2								100,00
28	DM96 GB + SD (%)	LLC	2,8	0,4		95,8	0,9								100,00
		Rumke	1,1-6,4	0,1-3,6		92,3-98,3	0,1-3,6								Conforme
		R ²													1,0000
29	DM96 SBD (%)	AREB 1	71,1		1,3	7,2	6,6		7,9		5,9				100,00
29	DM96 GB + SD (%)	AREB 1	71,1		1,3	7,2	6,6		7,9		5,9				100,00
		Rumke	63,1-80,8		0,1-3,6	3,9-11,5	3,9-11,5		4,6-12,7		3,1-10,2				Conforme
		R ²													1,0000

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L atypique	CP + ζ mono	ζ sézary	TOTAL
30	DM96 SBD (%)	LLC	15,2			82,6	2,2								100,0
30	DM96 GB + SD (%)	LLC	15,2			82,6	2,2								100,0
		Rumke	10,4-20,7			73,8-89,6	0,6-5								Conforme
		R ²													1,0000
31	DM96 SBD (%)	LAM 5B	17,9	0,7		11,5	57,8		1,0	0,3	10,8				100,0
31	DM96 GB + SD (%)	LAM 5B	17,9	0,7		11,5	57,1		1,0	0,3	11,5				100,0
		Rumke	10,4-26,2	0,1-3,6		6,2-20,7	47,8-66,8		0,1-3,6	0-1,8	6,2-20,7				Conforme
		R ²													0,9999
32	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	60,3			20,5	4,8		2,7		10,3		1,4		100,0
32	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	60,3			20,5	4,8		2,7		11,0		0,7		100
		Rumke	52,9-66,8			14,7-31,6	2,4-9		1,1-6,4		6,2-20,7		0,1-3,6		Conforme
		R ²													0,9998
33	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	30,9	0,7	0,3	11,6	51,5				4,0		1,0		100,0
33	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	30,9	0,7	0,3	14,6	47,2				5,6		0,7		100
		Rumke	23,7-42	0,1-3,6	0-1,8	10,4-20,7	38-57,1				3,1-10,2		0,1-3,6		Conforme
		R ²													0,9959
34	DM96 SBD (%)	LYMPHOME T ANAPLASIQUE	56,9			1,7	1,0					40,3			100,0
34	DM96 GB + SD (%)	LYMPHOME T ANAPLASIQUE	56,9			3,4	3,1					36,6			100,0
		Rumke	47,8-66,8			1,1-6,4	1,1-6,4					28,4-47,1			Non conforme
		R ²													0,9970
35	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	42,9			4,7	1,3		2,0		48,8		0,3		100,0
35	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	42,9			4,7	1,3		2,0		48,8		0,3		100,0
		Rumke	33,2-52,2			2,4-9	0,1-3,6		0,6-5		38-57,1		0-1,8		Conforme
		R ²													1,0000
36	DM96 SBD (%)	SLP NON ETIQUETE	0,6	0,3		0,6	0,6					97,8			100,0
36	DM96 GB + SD (%)	SLP NON ETIQUETE	0,6	0,3		0,6	0,6					97,8			100,0
		Rumke	0,1-3,6	0-1,8		0,1-3,6	0,1-3,6					95-99,4			Conforme
		R ²													1,0000
37	DM96 SBD (%)	LAM 0	11,4	1,3		31,5	8,1				47,7				100,0
37	DM96 GB + SD (%)	LAM 0	11,4	1,3		31,5	8,1				47,7				100,0
		Rumke	6,2-20,7	0,1-3,6		23,7-42	4,6-12,7				38-57,1				Conforme
		R ²													1,0000
38	DM96 SBD bis (%)	LLC	43,9		0,6	54,1	0,6		0,8						100,0
38	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	43,9		0,6	54,1	0,6		0,8						100,0
		Rumke	33,2-52,2		0,1-3,6	42,9-62	0,1-3,6		0,1-3,6						Conforme
		R ²													1,0000
39	DM96 SBD bis (%)	LLC	28,3	1,3	0,5	66,8	3,0						0,3		100,0
39	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	28,3	1,3	0,5	66,8	3,0						0,3		100,0
		Rumke	19,2-36,9	0,1-3,6	0,1-3,6	58-76,3	1,1-6,4						0-1,8		Conforme
		R ²													1,0000
40	DM96 SBD (%)	SLP NON ETIQUETE	4,9		0,7	2,6	3,3					88,5			100,0
40	DM96 GB + SD (%)	SLP NON ETIQUETE	4,9		0,7	1,6	3,0					89,8			100,0
		Rumke	2,4-9		0,1-3,6	0,6-5	1,1-6,4					85-93,8			Conforme
		R ²													0,9999
41	DM96 SBD (%)	LAL B COMMUNE	0,5			13,2					86,3				100,0
41	DM96 GB + SD (%)	LAL B COMMUNE	0,5			16,3					83,2				100,0
		Rumke	0,1-3,6			10,4-26,2					73,8-89,6				Conforme
		R ²													0,9991
42	DM96 SBD bis (%)	LLC + L PLASMO	4,9			75,2							19,9		100,0
42	DM96 GB + SD bis (%)	LLC + L PLASMO	4,9			75,0							20,1		100,0
		Rumke	2,4-9			68,4-80,8							14,7-26,2		Conforme
		R ²													1,0000
43	DM96 SBD (%)	L GRANULEUX MONOCLONAUX	48,0	3,9		33,6	7,9					6,6			100,0
43	DM96 GB + SD (%)	L GRANULEUX MONOCLONAUX	48,0	3,9		23,7	7,9					16,4			100,0
		Rumke	38-57,1	1,7-7,7		14,7-31,6	4,6-12,7					10,4-26,2			Non conforme
		R ²													0,9367
44	DM96 SBD (%)	LZM	9,0	0,6		3,8	0,3					86,2			100,0
44	DM96 GB + SD (%)	LZM	9,0	0,6		3,9	0,3					86,2			100,0
		Rumke	5,4-13,9	0,1-3,6		1,7-7,7	0-1,8					79,3-93,8			Conforme
		R ²													1,0000

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + ζ mono	ζ sézary	TOTAL
45	DM96 SBD (%)	LZM	27,0	1,0	1,0	7,8	2,4		0,3	0,3		60,1			100,0
45	DM96 GB + SD (%)	LZM	27,2	1,0	1,0	5,8	2,4		0,3	0,3		61,9			100,0
		Rumke	19,2-36,9	0,1-3,6	0,1-3,6	3,1-10,2	0,6-5		0-1,8	0-1,8		52,9-71,6			Conforme
		R ²													0,9994
46	DM96 SBD (%)	MYELOFIBROSE PRIMITIVE	70,1	0,3		10,1	8,7		3,1	4,2	3,5				100,0
46	DM96 GB + SD (%)	MYELOFIBROSE PRIMITIVE	71,1	0,4		8,5	8,8		3,2	4,2	3,9				100
		Rumke	63,1-80,8	0-1,8		5,4-13,9	5,4-13,9		1,1-6,4	1,7-7,7	1,7-7,7				Conforme
		R ²													0,9996
47	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	18,0			24,5	14,4				43,2				100,0
47	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	18,1			23,2	14,5				44,2				100,0
		Rumke	10,4-26,2			14,7-31,6	10,4-20,7				33,2-52,2				Conforme
		R ²													0,9980
48	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	49,3	1,4		31,1	10,1				7,4		0,7		100,0
48	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	49,3	1,4		31,1	10,1				7,4		0,7		100,0
		Rumke	38-57,1	0,1-3,6		23,7-42	6,2-15				3,9-11,5		0,1-3,6		Conforme
		R ²													1,0000
49	DM96 SBD (%)	LAM 2	2,2	0,3		5,3			0,3		91,3		0,6		100,0
49	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	2,2	0,3		4,1			0,3		92,5		0,6		100,0
		Rumke	0,6-5	0-1,8		1,7-7,7			0-1,8		88,5-96,1		0,1-3,6		Conforme
		R ²													0,9999
50	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	88,4		0,3	1,7	1,0		0,7		7,9				100,0
50	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	88,4		0,3	1,7	1,0		0,7		8,0				100,0
		Rumke	79,3-93,8		0-1,8	0,6-5	0,1-3,6		0,1-3,6		4,6-12,7				Conforme
		R ²													1,0000
51	DM96 SBD bis (%)	LLC	4,3	4,0	1,4	88,4	2,0								100,0
51	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	4,3	4,0	1,4	88,4	2,0								100,0
		Rumke	1,7-7,7	1,7-7,7	0,1-3,6	79,3-93,8	0,6-5								Conforme
		R ²													1,0000
52	DM96 SBD (%)	LCM	5,2			3,9			0,3			90,6	0		100,0
52	DM96 GB + SD (%)	LCM	5,2			2,1			0,3			92,1	0,3		100,0
		Rumke	2,4-9			0,6-5			0-1,8			87,3-95,4	0-1,8		Conforme
		R ²													0,9998
53	DM96 SBD (%)	LALB COMMUNE	5,8			72,7					21,4				100
53	DM96 GB + SD (%)	LALB COMMUNE	5,8			72,7					21,4				100
		Rumke	3,1-10,2			63,1-80,8					14,7-31,6				Conforme
		R ²													1,0000
54	DM96 SBD bis (%)	LLC	5,1	0,5		91,2	3,2								100,0
54	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	5,1	0,5		91,2	3,2								100,0
		Rumke	2,4-9	0,1-3,6		86,1-94,6	1,1-6,4								Conforme
		R ²													1,0000
55	DM96 SBD bis (%)	LLC	3,7		0,3	93,2	2,8								100,0
55	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	3,7		0,3	93,2	2,8								100,0
		Rumke	1,7-7,7		0-1,8	88,5-96,1	1,1-6,4								Conforme
		R ²													1,0000
56	DM96 SBD (%)	LAM 2	17,1	0,7	0,7	63,8	2,0				15,8				100,0
56	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	17,2	0,7	0,7	65,6	2,0				13,9				100,0
		Rumke	10,4-26,2	0,1-3,6	0,1-3,6	58-76,3	0,6-5				6,2-20,7				Conforme
		R ²													0,9993
57	DM96 SBD bis (%)	LLC	7,1	0,4	0,3	91,0	1,2								100,0
57	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	7,0	0,4	0,3	91,1	1,2								100,0
		Rumke	3,9-11,5	0-1,8	0,1,8	86,1-94,6	0,1-3,6								Conforme
		R ²													1,0000
58	DM96 SBD bis (%)	LLC	23,7	2,0	0,3	68,9	4,8						0,3		100,0
58	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	23,8	2,1	0,3	68,7	4,9						0,3		100,0
		Rumke	14,7-31,6	0,6-5	0-1,8	58-76,3	2,4-9						0-1,8		Conforme
		R ²													1,0000
59	DM96 SBD (%)	LALB COMMUNE	13,3	1,0		20			0,6		61,9		3,2		100,0
59	DM96 GB + SD (%)	LALB COMMUNE	13,4	0,6		20,1			0,6		62,1		3,2		100,0
		Rumke	6,2-20,7	0,1-3,6		14,7-26,2			0,1-3,6		52,9-71,6		1,1-6,4		Conforme
		R ²													1,0000

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + \bar{E} mono	\bar{E} sézary	TOTAL
60	DM96 SBD bis (%)	LLC	13,2	0,5	0,3	85,4	0,5								100,0
60	DM96 GB + SD bis (%)	LLC	13,2	0,5	0,3	85,4	0,5								100,0
		Rumke	6,2-20,7	0,1-3,6	0-1,8	79,3-89,6	0,1-3,6								Conforme
		R ²													1,0000
61	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	49,3	0,7		22,3	6,1		0,7		20,9				100,0
61	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	49,7	0,7		21,8	6,1		0,7		21,1				100,0
		Rumke	42,9-57,1	0,1-3,6		14,7-31,6	3,1-10,2		0,1-3,6		14,7-31,6				Conforme
		R ²													0,9999
62	DM96 SBD (%)	LC DENDRITIQUE PLASMO	78,3	2,3	1,0	4,0	7,3		2,7	3,0	1,3				100,0
62	DM96 GB + SD (%)	LC DENDRITIQUE PLASMO	78,2	2,3	1,0	4,0	7,4		2,7	3,0	1,3				100,0
		Rumke	68,4-85,3	0,6-5	0,1-3,6	1,7-7,7	3,9-11,5		1,1-6,4	1,1-6,4	0,1-3,6				Conforme
		R ²													1,0000
63	DM96 SBD (%)	LAL PRO B	5,8			3,2	1,0				90,1				100,0
63	DM96 GB + SD (%)	LAL PRO B	5,8			2,6	1,0				90,7				100,0
		Rumke	3,1-10,2			1,1-6,4	0,1-3,6				86,1-94,6				Conforme
		R ²													1,0000
64	DM96 SBD (%)	LAL T MATURE	46,5	2,7	0,7	18,4	2,7		1,3	0,3	26,8		0,7		100,0
64	DM96 GB + SD (%)	LAL T MATURE	46,5	2,7	0,7	18,4	2,7		1,3	0,3	26,1		1,3		100,0
		Rumke	38-57,1	1,1-6,4	0,1-3,6	10,4-26,2	1,1-6,4		0,1-3,6	0-1,8	19,2-36,9		0,1-3,6		Conforme
		R ²													0,9998
65	DM96 SBD (%)	LAL B MATURE	2,9			13,7	1,6		0,6	0,3	80,9				100,0
65	DM96 GB + SD (%)	LAL B MATURE	2,9			13,7	1,3		0,6	0,3	81,2				100,0
		Rumke	1,1-6,4			6,2-20,7	0,1-3,6		0,1-3,6	0-1,8	73,8-89,6				Conforme
		R ²													1,0000
66	DM96 SBD (%)	SS	62,6	4,1		6,1	9,5			0,7				17,0	100,0
66	DM96 GB + SD (%)	SS	62,6	4,1		15,0	9,5			0,7				8,2	100,0
		Rumke	52,9-71,6	1,7-7,7		10,4-20,7	6,2-15			0,1-3,6				4,6-12,7	Non conforme
		R ²													0,9707
67	DM96 SBD (%)	LLC	28,5	0,6		64,6	3,9		0,3				2,1		100,0
67	DM96 GB + SD (%)	LLC	28,5	0,6		66,4	3,9		0,3				0,3		100,0
		Rumke	19,2-36,9	0,1-3,6		58-76,3	1,7-7,7		0-1,8					0-1,8	Non conforme
		R ²													0,9996
68	DM96 SBD (%)	LAM SECONDAIRE	32,4	0,9	0,9	27,9	1,8		10,8		25,2				100,0
68	DM96 GB + SD (%)	LAM SECONDAIRE	32,4	0,9	0,9	27,9	0,0		10,8		27,0				100,0
		Rumke	23,7-42	0,1-3,6	0,1-3,6	19,2-36,9	0-1,8		6,2-20,7		19,2-36,9				Conforme
		R ²													0,9980
69	DM96 SBD (%)	SLP NON ETIQUETE	2,8			0,3						96,9			100,0
69	DM96 GB + SD (%)	SLP NON ETIQUETE	2,8			0,3						96,9			100,0
		Rumke	1,1-6,4			0-1,8						93,6-98,9			Conforme
		R ²													1,0000
70	DM96 SBD (%)	LZM	56,4	1,3	0,7	18,1	5,4					18,1			100,0
70	DM96 GB + SD (%)	LZM	56,4	1,3	0,7	18,1	5,4					18,1			100,0
		Rumke	47,8-66,8	0,1-3,6	0,1-3,6	10,4-26,2	2,4-9					10,4-26,2			Conforme
		R ²													1,0000
71	DM96 SBD (%)	SDRPL-VL	1,7	0,3		1,4	2,4					94,1			100,0
71	DM96 GB + SD (%)	SDRPL-VL	1,7	0,3		1,4	2,4					94,1			100,0
		Rumke	0,6-5	0-1,8		0,1-3,6	0,6-5					89,8-96,9			Conforme
		R ²													1,0000
72	DM96 SBD (%)	LAM 2	6,8			87,2	0,7		0,7	0,7	4,1				100,0
72	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	6,8			86,5	0,7		0,0	0,0	6,1				100,0
		Rumke	3,9-11,5			79,3-93,8	0,1-3,6		0-1,8	0-1,8	3,1-10,2				Conforme
		R ²													0,9996
73	DM96 SBD (%)	LAM 2	5,8		0,6	87,0	1,3			1,3	3,2		0,6		100,0
73	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	5,8		0,6	87,0	0,0			0,0	5,8		0,6		100,0
		Rumke	3,1-10,2		0,1-3,6	79,3-93,8	0-1,8			0-1,8	3,1-10,2		0,1-3,6		Conforme
		R ²													0,9992
74	DM96 SBD (%)	LAM 2	5,3			91,3				0,7	2,7				100,0
74	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	5,3			91,3				0,0	3,3				100,0
		Rumke	2,4-9			86,1-94,6				0-1,8	1,1-6,4				Conforme
		R ²													0,9999
75	DM96 SBD (%)	LAM 2	3,3			91,3			0,7		4,7				100,0
75	DM96 GB + SD (%)	LAM 2	3,3			91,3			0,0		5,3				100,0
		Rumke	1,1-6,4			86,1-94,6			0-1,8		2,4-9				Conforme
		R ²													0,9999

9.2. Annexe 2 : Corrélation entre un cytologiste naïf et des cytologistes experts avec la microscopie conventionnelle

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + E mono	ƒ sézary	Conclusion
1	Micro SBD (200 C.)	LCM	16			9	0,5					74,5			
1	EXPERT	LCM	18			6,3	0,25					75,5			
		Rumke	10,4-26,2			3,1-10,2	0-1,8					68,4-85,3			Conforme
		R ²													0,998503364
2	Micro SBD	LLC	20,5		0	78,5	1								
2	EXPERT	LLC	19,8		0,5	78,3	1,5								
		Rumke	14,7-26,2		0-3,6	68,4-85,3	0,6-5								Conforme
		R ²													0,99989621
3	Micro SBD (200 C.)	LF	22,5	0,5	0	2	4			1	1	69			
3	EXPERT	LF	22	0,5	0,8	1	5			2,8	0	68			
		Rumke	14,7-31,6	0-3,6	0-3,6	0-3,6	2,4-9			1,1-6,4	0-1,8	58-76,3			Non conforme
		R ²													0,999179068
4	Micro SBD (200 C.)	LAM5A	23	0,5	0	3,5	42,5			1,5	2,5	26,5			
4	EXPERT	LAM5A	26	0	0,0	3,5	29			4,0	1	36,5			
		Rumke	19,2-36,9	0-1,8	0-1,8	1,7-7,7	19,2-36,9			1,7-7,7	0-3,6	28,4-47,1			Non conforme
		R ²													0,95298201
5	Micro SBD (200 C.)	LAM4	4,5	0	0	41	15			1,5	1	37			
5	EXPERT	LAM4	6,75	0,75	0,3	34	21,5			0,5	0	36,25			
		Rumke	3,9-11,5	0-3,6	0-1,8	23,7-42	14,7-31,6			0-3,6	0-1,8	28,4-47,1			Non conforme
		R ²													0,977165506
6	Micro SBD (100 C.)	LAM2	32			15	5					48			
6	EXPERT	LAM2	22			20,5	4					53,5			
		Rumke	14,7-31,6			14,7-31,6	1,7-7,7					42,9-62			Non conforme
		R ²													0,935098088
7	Micro SBD (100 C.)	LAM2	10		0	50	2					38			
7	EXPERT	LAM2	9,5		0,5	36	8					46			
		Rumke	6,2-15	0-1,8	0-3,6	28,4-47,1	4,6-12,7					38-57,1			Non conforme
		R ²													0,926224384
8	Micro SBD bis	LLC	5,5			94,5	0								
8	EXPERT	LLC	4,5			94	1,5								
		Rumke	2,4-9	0-1,8		89,8-96,9	0,6-5								Conforme
		R ²													0,999727978
9	Micro SBD (200 C.)	LAM5B	2,5	0		6,5	89,5			1,5	0	0			
9	EXPERT	LAM5B	4,5	0,5		3	89,75			0,3	0,25	1,75			
		Rumke	2,4-9	0-3,6		1,1-6,4	85-93,8			0-1,8	0-1,8	0,6-5			Non conforme
		R ²													0,998403268
10	Micro SBD	LLC	18,5		0	80,5	1								
10	EXPERT	LLC	20		0,5	79,0	0,5								
		Rumke	14,7-26,2	0-1,8	0-3,6	68,4-85,3	0-3,6								Conforme
		R ²													0,999640407
11	Micro SBD	LLC	29	1	1	64,5	4,5								
11	EXPERT	LLC	36,5	1,8	0,5	58,5	2,8								
		Rumke	28,4-47,1	0,6-5	0-3,6	47,8-66,8	1,1-6,4								Conforme
		R ²													0,984373953
12	Micro SBD (200 C.)	SLP NON ETIQUETE	12		0,5	85,5	2								
12	EXPERT	SLP NON ETIQUETE	8,5		0,0	89	2,5								
		Rumke	5,4-13,9	0-1,8	0-1,8	79,3-93,8	1,1-6,4								Conforme
		R ²													0,998947006
13	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	59	0,5	0	33	4,5			1	1			1	
13	EXPERT	LLC	52	1	0,5	30,3	9,5			3,3	3,5			0	
		Rumke	42,9-62	0-3,6	0-3,6	23,7-36,9	6,2-15			1,1-6,4	1,7-7,7			0-1,8	Non conforme
		R ²													0,994700306
14	Micro SBD (200 C.)	SDRPL-VL	75		0	15,5	1					8,5			
14	EXPERT	SDRPL-VL	66		1,0	13,5	4,5					15			
		Rumke	58-76,3	0-1,8	0-3,6	6,2-20,7	2,4-9					10,4-20,7			Non conforme
		R ²													0,993852275

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + E mono	ℓ sézary	Conclusion	
15	Micro SBD (200 C.)	LZM	32,5	9	2,5	8	8					40				
15	EXPERT	LZM	29,8	7	1,3	13	5,5					43,5				
		Rumke	23,7-36,9	3,9-11,5	0-3,6	6,2-20,7	3,1-10,2					33,2-52,2			Conforme	
		R ²													0,979731008	
16	Micro SBD (100 C.)	SS	62	0	0	4	6								28	
16	EXPERT	SS	55,5	1,5	1,5	15	9,5								17	
		Rumke	47,8-66,8	0,6-5	0,6-5	10,4-20,7	6,2-15								10,4-26,2	Non conforme
		R ²														0,958979791
17	Micro SBD (200 C.)	LAM 2	17,5	2	2	15	24,5		19	0	20					
17	EXPERT	LAM 2	22,8	1,5	2,3	8,5	20,5		12,8	1,5	30,3					
		Rumke	14,7-31,6	0,6-5	0,6-5	5,4-13,9	14,7-31,6		6,2-20,7	0,6-5	23,7-36,9					Non conforme
		R ²														0,852151698
18	Micro SBD	LLC	12,5		0,5	86	1									
18	EXPERT	LLC	16		0,5	82	1,5									
		Rumke	10,4-26,2		0-3,6	73,8-89,6	0,6-5									Conforme
		R ²														0,998803497
19	Micro SBD (200 C.)	LLC	0,5	0		99,5	0									
19	EXPERT	LLC	0,5	0,5		98,5	0,5									
		Rumke	0-3,6	0-3,6		96,4-99,9	0-3,6									Conforme
		R ²														0,999988738
20	Micro SBD (200 C.)	LLC	61,5	2,5		31	5									
20	EXPERT	LLC	59,3	0,8		36	4									
		Rumke	47,8-66,8	0-3,6	0-1,8	28,4-47,1	1,7-7,7									Conforme
		R ²														0,992633206
21	Micro SBD (200 C.)	LZM	32	1	0	2,5	2					62,5				
21	EXPERT	LZM	38,5	0,8	0,5	0	3					57,3				
		Rumke	28,4-47,1	0-3,6	0-3,6	0-1,8	1,1-6,4					47,8-66,8				Non conforme
		R ²														0,988226972
22	Micro SBD (100 C.)	LA NON ETIQUETE	42			8	0		1	2	47					
22	EXPERT	LA NON ETIQUETE	40			9,5	1		0,5	0	49					
		Rumke	33,2-47,1			6,2-15	0-3,6		0-3,6	0-1,8	38-57,1					Non conforme
		R ²														0,996826761
23	Micro SBD (100 C.)	AREB 2	31	7		44					13			5		
23	EXPERT	AREB 2	40	5		40,5					13,5			1		
		Rumke	33,2-47,1	2,4-9		33,2-52,2					6,2-20,7			0-3,6		Non conforme
		R ²														0,963016065
24	Micro SBD (100 C.)	SS	70	5	1	13	5		0						6	
24	EXPERT	SS	62	5,5	0,0	16	7		0,5						9	
		Rumke	52,9-71,6	3,1-10,2	0-1,8	10,4-26,2	3,9-11,5		0-3,6						5,4-13,9	Conforme
		R ²														0,995985725
25	Micro SBD (200 C.)	LAM 1	1		1	11,5	0,5		1		84,5			0,5		
25	EXPERT	LAM 1	1,5		1,0	6	0,5		2,5		88			0,5		
		Rumke	0,6-5		0-3,6	3,1-10,2	0-3,6		1,1-6,4		79,3-93,8			0-3,6		Non conforme
		R ²														0,99719829
26	Micro SBD (200 C.)	LAM SECONDAIRE	17			10	35,5		5		32,5					
26	EXPERT	LAM SECONDAIRE	16			3,5	31		2,0		47,5					
		Rumke	10,4-26,2			1,7-7,7	23,7-42		0,6-5		38-57,1					Non conforme
		R ²														0,921522596
27	Micro SBD (200 C.)	LAM SECONDAIRE	3	0,5		8	2				86,5					
27	EXPERT	LAM SECONDAIRE	1,5	0		4	2				92,5					
		Rumke	0,6-5	0-1,8		1,7-7,7	0,6-5				88,5-96,1					Non conforme
		R ²														0,999036708
28	Micro SBD (200 C.)	LLC	3,5	1,5	0	94,5	0,5									
28	EXPERT	LLC	3,5	0	0,5	95	1									
		Rumke	1,7-7,7	0-1,8	0-3,6	91-97,6	0-3,6									Conforme
		R ²														0,999807812
29	Micro SBD (100 C.)	AREB 1	66	1	1	11	10		6	0	5					
29	EXPERT	AREB 1	74	0,5	1,0	6,5	8		5,5	1,5	3					
		Rumke	63,1-80,8	0-3,6	0-3,6	3,9-11,5	4,6-12,7		3,1-10,2	0,6-5	1,1-6,4					Non conforme
		R ²														0,995810017

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + E mono	E sézary	Conclusion
30	Micro SBD (200 C.)	LLC	9	0		88	3								
30	EXPERT	LLC	16,5	2		80	1,5								
		Rumke	10,4-26,2	0,6-5		73,8-85,3	0,6-5								Non conforme
		R ²													0,994062854
31	Micro SBD (200 C.)	LAM SB	10	0		9,5	69,5		0		10,5			0,5	
31	EXPERT	LAM SB	12,5	0,5		7,5	64,5		0,5		14,5			0	
		Rumke	6,2-20,7	0-3,6		4,6-12,7	58-71,6		0-3,6	0-1,8	10,4-20,7			0-1,8	Conforme
		R ²													0,995595251
32	Micro SBD (100 C.)	LAM SECONDAIRE	59	0	1	25	7			1	0	7		0	
32	EXPERT	LAM SECONDAIRE	54,5	1	1,0	20,5	9		2,0	0,5	10,5			1	
		Rumke	47,8-62	0-3,6	0-3,6	14,7-31,6	5,4-13,9		0,6-5	0-3,6	6,2-20,7			0-3,6	Conforme
		R ²													0,995352807
33	Micro SBD (200 C.)	LAM SECONDAIRE	23,5	2,5	1,5	13	53			2,5		4			
33	EXPERT	LAM SECONDAIRE	33	1,5	0,5	11,5	36			1,5		16			
		Rumke	23,7-42	0,6-5	0-3,6	6,2-20,7	28,4-47,1		0,6-5		10,4-26,2				Non conforme
		R ²													0,870510023
34	Micro SBD (200 C.)	LYMPHOMET ANAPLASIQUE	58			0,5	1					40,5			
34	EXPERT	LYMPHOMET ANAPLASIQUE	45			2,8	4,8					47,5			
		Rumke	38-52,2			1,1-6,4	2,4-9					38-57,1			Non conforme
		R ²													0,95752951
35	Micro SBD (200 C.)	LAM SECONDAIRE	38			8	0,5		1,5	0,5	51,5				
35	EXPERT	LAM SECONDAIRE	35,5			4,5	1,5		0,5	0	58				
		Rumke	28,4-47,1			2,4-9	0,6-5		0-3,6	0-1,8	47,8-66,8				Non conforme
		R ²													0,992379554
36	Micro SBD (200 C.)	SLP NON ETIQUETE	3			1	0,5					95,5			
36	EXPERT	SLP NON ETIQUETE	2,5			0	0,5					97			
		Rumke	1,1-6,4			0-1,8	0-3,6					93,6-98,9			Conforme
		R ²													0,999962966
37	Micro SBD (100 C.)	LAM 0	15	0		31	2				52				
37	EXPERT	LAM 0	8,8	1		22,5	1,5				66,3				
		Rumke	5,4-13,9	0-3,6		14,7-31,6	0,6-5				58-76,3				Non conforme
		R ²													0,959119563
38	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	39,5		0	55,5	2			3					
38	EXPERT	LLC	33,8		0,3	64,3	1,5			0,3					
		Rumke	23,7-42		0-1,8	52,9-71,6	0,6-5			0-1,8					Non conforme
		R ²													0,985506327
39	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	27	0		70	3								
39	EXPERT	LLC	28	0,5		69	2,5								
		Rumke	19,2-36,9	0-3,6		58-76,3	1,1-6,4								Conforme
		R ²													0,999693718
40	Micro SBD (200 C.)	SLP NON ETIQUETE	5,5	0	0	2	2,5			1,5		88,5			
40	EXPERT	SLP NON ETIQUETE	6,8	0,3	1,0	0	2,5			0		89,5			
		Rumke	3,9-11,5	0-1,8	0-3,6	0-1,8	1,1-6,4			0-1,8		85-93,8			Non conforme
		R ²													0,99934844
41	Micro SBD (200 C.)	LAL B COMMUNE	1	0,5	0,5	10					87,5			0,5	
41	EXPERT	LAL B COMMUNE	0	0,3	0,0	15,5					84,3			0	
		Rumke	0-1,8	0-1,8	0-1,8	10,4-26,2					73,8-89,6			0-1,8	Non conforme
		R ²													0,997032217
42	Micro SBD bis (200 C.)	LLC + L PLASMO	4			78,5								17,5	
42	EXPERT	LLC + L PLASMO	4,5			65,5								30	
		Rumke	2,4-9			58-76,3								23,7-36,9	Non conforme
		R ²													0,966813015
43	Micro SBD (100 C.)	L GRANULEUX MONOCLONAUX	51	1		30	7					11			
43	EXPERT	L GRANULEUX MONOCLONAUX	49,5	3		19	9,5					19			
		Rumke	42,9-57,1	1,1-6,4		10,4-26,2	6,2-15					10,4-26,2			Non conforme
		R ²													0,941660207
44	Micro SBD (200 C.)	LZM	7,5	0	0	3	0,5					89			
44	EXPERT	LZM	8	0,5	0,5	2	1,5					87,5			
		Rumke	4,6-12,7	0-3,6	0-3,6	0,6-5	0,6-5					79,3-93,8			Non conforme
		R ²													0,999815792

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + E mono	E sézary	Conclusion
45	Micro SBD (200 C.)	LZM	38	2		7	1					52			
45	EXPERT	LZM	36	0,5		14	2					47,5			
		Rumke	28,4-47,1	0-3,6		6,2-20,7	0,6-5					38-57,1			Non conforme
		R ²													0,98705224
46	Micro SBD (200 C.)	MYELOFIBROSE PRIMITIVE	64,5	2		12,5	14		2,5	3,5	1				
46	EXPERT	MYELOFIBROSE PRIMITIVE	62,3	0,5		9,5	13,8		5,8	4,3	4				
		Rumke	52,9-71,6	0-3,6		6,2-15	6,2-20,7		3,1-10,2	1,7-7,7	1,7-7,7				Non conforme
		R ²													0,995226595
47	Micro SBD (100 C.)	LAM SECONDAIRE	19			23	17				41				
47	EXPERT	LAM SECONDAIRE	22,5			22,5	11,5				43,5				
		Rumke	14,7-31,6			14,7-31,6	6,2-20,7				33,2-52,2				Conforme
		R ²													0,964333965
48	Micro SBD (100 C.)	LAM SECONDAIRE	51	0	1	34	10				3			1	
48	EXPERT	LAM SECONDAIRE	50	0,5	0,0	26	15				8			0,5	
		Rumke	42,9-57,1	0-3,6	0-1,8	19,2-36,9	10,4-20,7				4,6-12,7			0-3,6	Non conforme
		R ²													0,977935722
49	Micro SBD (200 C.)	LAM 2	1	0,5		2,5	0,5				95,5				
49	EXPERT	LAM 2	1	0		4,5	0				94,5				
		Rumke	0-3,6	0-1,8		2,4-9	0-1,8				91-97,6				Conforme
		R ²													0,999687915
50	Micro SBD (200 C.)	LAM SECONDAIRE	81,5			3,5	5,5		0,5		9				
50	EXPERT	LAM SECONDAIRE	77,5			2	9,5		0,0		11				
		Rumke	68,4-85,3			0,6-5	6,2-15		0-1,8		6,2-20,7				Non conforme
		R ²													0,997548676
51	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	2,5	4	1	90	2,5								
51	EXPERT	LLC	6	5	0,5	86	2,5								
		Rumke	3,1-10,2	2,4-9	0-3,6	79,3-93,8	1,1-6,4								Non conforme
		R ²													0,99910541
52	Micro SBD (200 C.)	LCM	3,5			3	1				92,5				
52	EXPERT	LCM	5,5			3	1				90,5				
		Rumke	3,1-10,2			1,1-6,4	0-3,6				86,1-94,6				Conforme
		R ²													0,999756752
53	Micro SBD (100 C.)	LAL B COMMUNE	3			71	0				26			0	
53	EXPERT	LAL B COMMUNE	4,5			71	0,5				23,5			0,5	
		Rumke	2,4-9			63,1-80,8	0-3,6				14,7-31,6			0-3,6	Conforme
		R ²													0,99880136
54	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	5,5	0	0,5	92	1,5		0,5						
54	EXPERT	LLC	7	1,5	0,0	89,5	2		0,0						
		Rumke	3,9-11,5	0,6-5	0-1,8	85-93,8	0,6-5		0-1,8						Non conforme
		R ²													0,99962616
55	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	3	0		94,5	2,5								
55	EXPERT	LLC	6	0,5		93	0,5								
		Rumke	3,1-10,2	0-3,6		88,5-96,1	0-3,6								Non conforme
		R ²													0,998984524
56	Micro SBD (100 C.)	LAM 2	18	0	1	65	2		0		14			0	
56	EXPERT	LAM 2	13,5	0,5	0,0	66,5	3,5		0,5		15			0,5	
		Rumke	6,2-20,7	0-3,6	0-1,8	58-76,3	1,7-7,7		0-3,6		10,4-20,7			0-3,6	Conforme
		R ²													0,996207392
57	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	3	1	1	94,5	0,5								
57	EXPERT	LLC	8	1	0,0	88,5	2,5								
		Rumke	4,6-12,7	0-3,6	0-1,8	79,3-93,8	1,1-6,4								Non conforme
		R ²													0,998126134
58	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	24,5	3,5	0,5	69	2,5								
58	EXPERT	LLC	24	0,5	0,5	71	4								
		Rumke	14,7-31,6	0-3,6	0-3,6	63,1-80,8	1,7-7,7								Conforme
		R ²													0,998442387
59	Micro SBD (200 C.)	LAL B COMMUNE	12	0,5		23	0		2,5		62				
59	EXPERT	LAL B COMMUNE	10	0,5		17,3	1,5		0,8		70				
		Rumke	6,2-15	0-3,6		10,4-26,2	0,6-5		0-3,6		63,1-76,3				Non conforme
		R ²													0,990737958

Patient	Technique	Patient	PNN	PNE	PNB	L	M	Promyélo.	Myélo.	Méta.	Blaste	L. atypique	CP + E mono	ℓ sézary	Conclusion
60	Micro SBD bis (200 C.)	LLC	13,5			84,5	2								
60	EXPERT	LLC	15			84	1								
		Rumke	10,4-20,7			73,8-89,6	0-3,6								Conforme
		R ²													0,999574987
61	Micro SBD (100 C.)	LAM SECONDAIRE	51	0	1	19	7		2		20				
61	EXPERT	LAM SECONDAIRE	38	2	0,0	18,5	6		0,0		35,5				
		Rumke	28,4-47,1	0,6-5	0-1,8	10,4-26,2	3,1-10,2		0-1,8		28,4-47,1				Non conforme
		R ²													0,888559394
62	Micro SBD (200 C.)	LC DENDRITIQUE PLASMO	82,5	0,5	0,5	3,5	6		2,5	3,5	1				
62	EXPERT	LC DENDRITIQUE PLASMO	82	2	0,5	5	5,5		2,0	2	1				
		Rumke	73,8-89,6	0,6-5	0-3,6	2,4-9	3,1-10,2		0,6-5	0,6-5	0-3,6				Non conforme
		R ²													0,999355322
63	Micro SBD (200 C.)	LAL PRO B	9	0		2	0				89			0	
63	EXPERT	LAL PRO B	7	1		8	0,5				83			0,5	
		Rumke	3,9-11,5	0-3,6		4,6-12,7	0-3,6				73,8-89,6			0-3,6	Non conforme
		R ²													0,997044306
64	Micro SBD (200 C.)	LAL T MATURE	42	3	0	22	2		3,5	1	26,5			0	
64	EXPERT	LAL T MATURE	43,8	3,3	0,5	28,8	3,8		1,0	0,5	18,3			0,3	
		Rumke	33,2-52,2	1,1-6,4	0-3,6	19,2-36,9	1,7-7,7		0-3,6	0-3,6	10,4-26,2			0-1,8	Non conforme
		R ²													0,967641726
65	Micro SBD (200 C.)	LAL B MATURE	5	0,5	0	17					77,5				
65	EXPERT	LAL B MATURE	5	0,5	0,5	11,5					82,5				
		Rumke	2,4-9	0-3,6	0-3,6	6,2-20,7					73,8-89,6				Conforme
		R ²													0,996418447
66	Micro SBD (100 C.)	SS	65	2	2	6	9								16
66	EXPERT	SS	57,5	2,5	0,5	18,25	9,5								11,75
		Rumke	47,8-56,8	1,1-6,4	0-3,6	10,4-26,2	6,2-15							6,2-20,7	Non conforme
		R ²													0,965683932
67	Micro SBD (200 C.)	LLC	29,5	1	0,5	66,5	2,5		0						
67	EXPERT	LLC	30	0,5	0,0	64	5		0,5						
		Rumke	23,7-36,9	0-3,6	0-1,8	52,9-71,6	2,4-9		0-3,6						Conforme
		R ²													0,999861708
68	Micro SBD (100 C.)	LAM SECONDAIRE	31	1	0	24	2		7	2	32			1	
68	EXPERT	LAM SECONDAIRE	28	2,5	1,5	27	2		11,0	2,5	25			0,5	
		Rumke	19,2-36,9	1,1-6,4	0,6-5	19,2-36,9	0,6-5		6,2-20,7	1,1-6,4	19,2-31,6			0-3,6	Non conforme
		R ²													0,975109978
69	Micro SBD (200 C.)	SIP NON ETIQUETE	2,5			1,5	0,5		0,5					95	
69	EXPERT	SIP NON ETIQUETE	5,5			1	1,5		0,5					91,5	
		Rumke	3,1-10,2			0-3,6	0,6-5		0-3,6					87,3-95,4	Non conforme
		R ²													0,999417522
70	Micro SBD (100 C.)	LZM	66	0		15	4							15	
70	EXPERT	LZM	60,8	1		14,3	3,5							20,5	
		Rumke	52,9-71,6	0-3,6		6,2-20,7	1,7-7,7				14,7-31,6				Conforme
		R ²													0,993017181
71	Micro SBD (200 C.)	SDRPL-VL	1	0,5	0,5	1,5	0							96,5	
71	EXPERT	SDRPL-VL	1,5	0,5	0,0	2	2							94	
		Rumke	0,6-5	0-3,6	0-1,8	0,6-5	0,6-5							89,8-96,9	Conforme
		R ²													0,99975942
72	Micro SBD (100 C.)	LAM 2	6			82	4		1	1	6				
72	EXPERT	LAM 2	8			77,25	4,5		0,5	0,75	9				
		Rumke	4,6-12,7			68,4-85,3	2,4-9		0-3,6	0-3,6	5,4-13,9				Conforme
		R ²													0,99874656
73	Micro SBD (100 C.)	LAM 2	7		0	86	1			0	5			1	
73	EXPERT	LAM 2	6,5		0,3	84	0,5			0,25	8,5			0	
		Rumke	3,9-11,5		0-1,8	73,8-89,6	0-3,6			0-1,8	5,4-13,9			0-1,8	Non conforme
		R ²													0,998809401
74	Micro SBD (100 C.)	LAM 2	6			90	0			1	3				
74	EXPERT	LAM 2	7,5			85,5	1			0	6				
		Rumke	4,6-12,7			79,3-93,8	0-3,6			0-1,8	3,1-10,2				Non conforme
		R ²													0,999166362
75	Micro SBD (100 C.)	LAM 2	3	1		90	2		0		4				
75	EXPERT	LAM 2	1,75	0		90,75	1,25		0,3		6				
		Rumke	0,6-5	0-1,8		86,1-94,6	0-3,6		0-1,8		3,1-10,2				Conforme
		R ²													0,999469717

10. Références bibliographiques

1. Dr. Gérard Buchonnet. Hématopoïèse - Définition et méthodes d'exploration - cours DES Biologie médicale.
2. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2013-2/4: Anémie hémolytique auto-immune à auto-anticorps chaud [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=162>
3. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2012-1/1: Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) (code N° 32) [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/demo/index.html>
4. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Syndromes mononucléosiques [Internet]. Available from: <http://hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/62-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-lymphoide/120-syndromes-mononucleosiques>
5. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Polynucléaires neutrophiles : le noyau et ses anomalies [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/les-cellules-du-sang/65-les-cellules-du-sang-et-de-la-moelle-osseuse/anomalies-morphologiques-des-leucocytes-sanguins/170-polynucleaires-neutrophiles-le-noyau-et-ses-anomalies>
6. Imbert M, Ballon OW-. Place du biologiste dans la prise en charge des leucémies aiguës : de l'hémogramme à la classification OMS. Rev Francoph Lab. 2015 Apr;2015(471):83–90.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391–405.
8. A. Steiger. Leucémie myéloïdes aiguës [Internet]. MQZH; 2014. Available from: http://www.mqzh.ch/cm/images/mq20141/pdf/bph2014_1_f.pdf
9. Lainey E, Boirie M, Fenneteau O. Hémogramme en pédiatrie : variations physiologiques. Rev Francoph Lab. 2009 Nov;2009(416):49–59.
10. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016 May 19;127(20):2375–90.
11. L. Baseggio, P. Felman. Diagnostic des lymphocytes hors LLC-typique. Revue francophone des laboratoires, n°452; 2013.
12. M.P. Callat. Automates en cytologie hématologie. Cours DES Biologie médicale;
13. Le Système Hématologique Automatisé XE-2100MC de Sysmex [Internet]. 2016. Available from: <https://www.sysmex.com/ca/fr/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>
14. M. Imbert, H. Jouault. Difficultés de validation d'un hémogramme sur automate : indications de recours à des techniques manuelles. Revue française des laboratoires; 2005.
15. Geneviève F, Godon A, Marteau-Tessier A, Zandecki M. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 2. Leukocyte count and differential]. Ann Biol Clin (Paris). 2012 Apr;70(2):141–54.

16. M. GELLE et S. DALIPHARD. Critères d'acceptabilité en cas de repasse d'un échantillon en Hématologie - Référence GEDI 12925.
17. F. Trimoreau, N. Gachard, V. Leymarie, E. Frébet, P. Perroud, J. Feuillard. Étapes préanalytiques pour la numération et cytologie sanguine. EMC- Biologie médicale; 2011.
18. M. Imbert. Difficultés de détection et d'interprétation de cellules anormales circulantes. Revue francophone des laboratoires; 2008.
19. Développement et perfectionnement des connaissances [Internet]. SEED Hématologie N° 5; 2012. Available from: http://www.sysmex.co.za/fileadmin/media/f112/SEED/French/Sysmex_SEED_5_2012_-_FR-ROLE_OF_PERIPHERAL__BLOOD_SMEARS_150_DPI.pdf
20. Manuel d'utilisation - CellaVision® DM96. 2012.
21. A. Steiger. Morphologie hématologique [Internet]. Point de vue hématologie - MQZH; 2011. Available from: http://www.mqzh.ch/cm/images/bph/bp_2011_4_2.pdf
22. Valensi F. Morphologie des cellules sanguines normales. EMC - Hématologie. 2006 Jan;1(1):1-12.
23. X. Troussard, E. Cornet. Aspects morphologiques des cellules sanguines normales. EMC - Hématologie; 2015.
24. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Les cellules du sang et de la moelle osseuse [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/les-cellules-du-sang>
25. Fenneteau O, Hurtaud-Roux M-F, Schlegel N. [Normal and abnormal cytological aspects of peripheral blood cells in neonates and young children]. Ann Biol Clin (Paris). 2006 Feb;64(1):17-36.
26. Laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2008-2/3: Syndrome mononucléosique au cours d'une primo-infection à cytomégalovirus [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=86>
27. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2009-4/4: Leucémie aiguë lymphoblastique de type T [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=85>
28. O. WAGNER-BALLON et M. IMBERT. Dysmyélopoïèse et syndromes myélodysplasiques : description - démarche diagnostique. Revue francophone des laboratoires; 2009.
29. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2011-4/1: Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) typique avec nombreuses cellules éclatées (ombres de Gumprecht) [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=128>
30. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2011-3/3: Leucémie à tricholeucocytes [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=124>
31. Hossein Mossafa, Diane Damotte, Arash Jenabian, Richard Delarue, Anne Vincenneau, Isabelle Amouroux, Roland Jeandel, Eli Khoury, Jean-Michel Martelli, Thierry Samson, Georges Flandrin, Xavier Troussard. Les lymphomes malins non hodgkiniens avec amplification de c-MYC ont un mauvais pronostic. Hématologie - Cas anatomoclinique; 2007.

32. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2008-2/2: Dissémination sanguine d'un lymphome diffus à grandes cellules [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=47>
33. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2009-3/2: Lymphoprolifération à grands lymphocytes granuleux [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=73>
34. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Confrontations ABP en cytologie hématologique - Dossier 2010-4/2: Syndrome de Sezary [Internet]. Available from: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=101>
35. F. GENEVIÈVE et al. Revue microscopique du frottis sanguin : propositions du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC). feuillets de Biologie - VOL LV N° 317; 2014.
36. M. GELLE et S. DALIPHARD. Cytologie du quotidien : règles de vérification technique au poste HST et XT 4000i - Réf GEDI n° 1757. 2016.
37. M. GELLE et S. DALIPHARD. Mode opératoire Cytologie du quotidien : règles de vérification technique aux postes des formules (CN) et d'Hématologie (SJ) - réf. GEDI n°12738. 2016.
38. Koepke JA, Dotson MA, Shifman MA. A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. *Blood Cells*. 1985;11(2):173–86.
39. Rümke CL. [The unreliability of the determination of the blood lymphocyte count]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1985 Mar 16;129(11):493–5.
40. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000 Aug;46(8 Pt 2):1221–9.
41. Kim AH, Lee W, Kim M, Kim Y, Han K. White blood cell differential counts in severely leukopenic samples: a comparative analysis of different solutions available in modern laboratory hematology. *Blood Res*. 2014 Jun;49(2):120–6.
42. Allou K, Vial J-P, Béné MC, Lacombe F. The routine leukocyte differential flow cytometry HematoFlow™ method: A new flagging system for automatic validation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015 Dec;88(6):375–84.
43. Prewitt JM, Mendelsohn ML. The analysis of cell images. *Ann N Y Acad Sci*. 1966 Jan 31;128(3):1035–53.
44. Park SH, Park C-J, Choi M-O, Kim M-J, Cho Y-U, Jang S, et al. Automated digital cell morphology identification system (CellaVision DM96) is very useful for leukocyte differentials in specimens with qualitative or quantitative abnormalities. *Int J Lab Hematol*. 2013 Oct;35(5):517–27.
45. Kratz A, Bengtsson H-I, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY, et al. Performance evaluation of the CellaVision DM96 system: WBC differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. *Am J Clin Pathol*. 2005 Nov;124(5):770–81.
46. Cornet E, Perol J-P, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases: CELLAVISION™ DM96 SYSTEM IN ROUTINE ANALYSIS. *Int J Lab Hematol*. 2007 Dec 7;30(6):536–42.

47. Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, et al. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. *Int J Lab Hematol*. 2009 Feb;31(1):48–60.
48. Smits SM, Leyte A. Clinical performance evaluation of the CellaVision Image Capture System in the white blood cell differential on peripheral blood smears. *J Clin Pathol*. 2014 Feb;67(2):168–72.
49. Naugler C, Wood B, Lee L, Mansoor A, Nelson H, Higa D. Performance of CellaVision DM96 in leukocyte classification. *J Pathol Inform*. 2013;4(1):14.
50. Riedl JA, Dinkelaar RB, van Gelder W. Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96. *J Clin Pathol*. 2010 Jun 1;63(6):538–43.
51. Surcouf C, Delaune D, Samson T, Foissaud V. Analyse d'image en cytologie hématologique: automate CellaVision DM96TM. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009 Jul;(4):419–424.
52. Ceelie H, Dinkelaar RB, van Gelder W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol*. 2007 Jan 1;60(1):72–9.
53. G. Buchonnet. Bilan de l'utilisation du DM-96 - Directoire IBCore. 2014.
54. Lee LH, Mansoor A, Wood B, Nelson H, Higa D, Naugler C. Performance of CellaVision DM96 in leukocyte classification. *J Pathol Inform*. 2013;4:14.
55. Yu H, Ok CY, Hesse A, Nordell P, Connor D, Sjostedt E, et al. Evaluation of an automated digital imaging system, Nextslide Digital Review Network, for examination of peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Jun;136(6):660–7.
56. Alférez S, Merino A, Mujica LE, Ruiz M, Bigorra L, Rodellar J. Automatic classification of atypical lymphoid B cells using digital blood image processing. *Int J Lab Hematol*. 2014 Aug;36(4):472–80.

SERMENT DE GALIEN

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

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

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



Stéphanie DAVID née BOULANGER

Evaluation du DM96® dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes

Th. D. Pharm., Rouen, 2016, 121 pages.

RESUME

La formule sanguine décrit quantitativement et qualitativement, l'ensemble des leucocytes y compris les éventuelles cellules anormales circulantes : les blastes et les lymphocytes anormaux. L'hémogramme a une place primordiale dans le diagnostic et le suivi des hémopathies. Néanmoins, en raison des contraintes budgétaires, normatives et du caractère empirique de la formule sanguine au microscope, des systèmes experts ont été développés. Ainsi, au CHU de Rouen, nous utilisons en routine depuis quelques années, un microscope automatisé : le DM96®. Il pré-classe les leucocytes et un technicien et/ou un biologiste modifie au besoin le classement. Jusqu'à aujourd'hui, nous n'utilisons cet automate que pour établir des formules sanguines avec anomalies quantitatives. Avec ce travail, nous souhaitons évaluer ses performances dans l'identification et la quantification des cellules anormales circulantes avant et après reclassement.

L'étude réalisée de manière prospective, a consisté à étudier la corrélation entre la lecture de 75 frottis sanguins au microscope et sur le DM96®.

La sensibilité d'identification des cellules anormales circulantes par le DM96® seul est faible (blaste : 53.66% et lymphocyte anormal : 1.33%). Après reclassement, la corrélation entre le DM96® et l'analyse sur le microscope est bonne ($R^2 = 0.981 \pm 0.009$).

Au final, il s'agit de la première étude évaluant les capacités réelles du DM96® à pré-classer correctement les cellules anormales circulantes. A cause de son manque de sensibilité, le reclassement par un personnel expérimenté est nécessaire et corrobore avec l'analyse microscopique.

MOTS CLES : DM96® - performance - morphologie - blastes - lymphocytes anormaux

JURY

Président : Pr. Loïc FAVENNEC

Membres : Pr. Fabrice JARDIN

Dr. Gérard BUCHONNET

Dr. Sylvie DALIPHARD

Dr. Marion DAVID

DATE DE SOUTENANCE : 14 octobre 2016