UNIVERSITE DE ROUEN
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2018 N°

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Mémoire valant lieu de thèse pour l'obtention du titre de docteur en médecine et du diplôme d'études spécialisées en biologie médicale

Présentée et soutenue publiquement le 29 octobre 2018

Par

RAIS Mustapha

Né le 24 juillet 1982 à Oran (ALGERIE)

Evaluation des performances du paramètre de recherche HFLC sur l'identification et la quantification des lymphocytes activés sur automate à numération Sysmex XN-10 à propos de 180 cas au CHU de Rouen

Présidente du jury : Madame le Professeur Pascale SCHNEIDER

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET

Membres du jury : Monsieur le Professeur Loïc FAVENNEC

Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET

Madame le Docteur Sylvie DALIPHARD

UNIVERSITE DE ROUEN
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2018 N°

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Mémoire valant lieu de thèse pour l'obtention du titre de docteur en médecine et du diplôme d'études spécialisées en biologie médicale

Présentée et soutenue publiquement le 29 octobre 2018

Par

RAIS Mustapha

Né le 24 juillet 1982 à Oran (ALGERIE)

Evaluation des performances du paramètre de recherche HFLC sur l'identification et la quantification des lymphocytes activés sur automate à numération Sysmex XN-10 à propos de 180 cas au CHU de Rouen

Présidente du jury : Madame le Professeur Pascale SCHNEIDER

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET

Membres du jury : Monsieur le Professeur Loïc FAVENNEC

Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET

Madame le Docteur Sylvie DALIPHARD

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ou désapprobation.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **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 Gisèle **APTER**	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal **BENHAMOU**	HCN	Médecine interne
Mr Jacques **BENICHOU**	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
Mme Sophie **CANDON**	HCN	Immunologie
Mr François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe **CHASSAGNE** *(détachement)*	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas **CORNU**	HCN	Urologie
Mr Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
Mr Pierre **CZERNICHOW** *(surnombre)*	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

Mr Stéphane **DERREY**	HCN	Neurochirurgie
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	Hépato-gastro-entérologie
Mr Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric **DURAND**	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
Mr Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
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
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mr Dominique **GUERROT**	HCN	Néphrologie
Mr Olivier **GUILLIN**	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 – Vénéréologie
Mme Bouchra **LAMIA**	Havre	Pneumologie
Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël **LECHEVALLIER**	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	Hépato-gastro-entérologie
M. Benoit **MISSET**	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François **MUIR** *(surnombre)*	HB	Pneumologie
Mr Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
Mr Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan **PREVOST**	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)*	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	Hépato-gastrologie
Mme Céline **SAVOYE–COLLET**	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale **SCHNEIDER**	HCN	Pédiatrie
Mr Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Thérapeutique
Mr Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
Mr Christian **THUILLEZ** *(surnombre)*	HB	Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles **TOURNEL**	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier **TROST**	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER** *(surnombre)*	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 **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure **WELTER**	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	Neurophysiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
Mr Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
Mr Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas **MOUREZ**	HCN	Virologie
Mr Gaël **NICOLAS**	HCN	Génétique
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia **ROLLIN**	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu **SALAUN**	HCN	Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie
Mr David **WALLON**	HCN	Neurologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry **WABLE**	UFR	Communication
Mme Mélanie **AUVRAY-HAMEL**	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
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 **MONTEIL**	Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi **VARIN** (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy **BELLIEN** (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie
Mme Camille **CHARBONNIER (LE CLEZIO)**	Statistiques
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile **CORBIERE**	Biochimie
Mr Eric **DITTMAR**	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 Nejla EL **GHARBI-HAMZA**	Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT**	Botanique
Mr Hervé **HUE**	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF**	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie
M. Jérémie **MARTINET** (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine **MALLETER**	Toxicologie
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 **HOUIVET**	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**	Anglais

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Anne-Sophie **CHAMPY**	Pharmacognosie
M. Jonathan **HEDOUIN**	Chimie Organique
Mme Barbara **LAMY-PELLETER**	Pharmacie Galénique

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
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
Mr Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mr François **ESTOUR**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mr Rémi **VARIN**	Pharmacie clinique
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG)	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG)	UFR	Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**	UFR	Médecine Générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD**	UFR	Médecine générale
Mr Philippe **NGUYEN THANH**	UFR	Médecine générale
Mme Marie Thérèse **THUEUX**	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET**	UFR	Médecine générale
Mr Emmanuel **HAZARD**	UFR	Médecine Générale
Mme Marianne **LAINE**	UFR	Médecine Générale
Mme Lucile **PELLERIN**	UFR	Médecine générale
Mme Yveline **SEVRIN**	UFR	Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **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)
M. Sylvain **FRAINEAU** (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline **GAILDRAT** (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas **GUEROUT** (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel **LETELLIER** (med)	Physiologie
Mme Christine **RONDANINO** (med)	Physiologie de la reproduction
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**

HCN - Hôpital Charles Nicolle	*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*
CB - Centre Henri Becquerel	*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*
CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation	*SJ – Saint Julien Rouen*

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Pascale SCHNEIDER
Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Loïc FAVENNEC
Après m'avoir accueilli chaleureusement dans votre service durant mon premier semestre d'internat, vous me faites l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Sylvie DALIPHARD
En plus de ta disponibilité, ton enseignement et tes conseils, tu me fais l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Merci Sylvie.

A Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET
Je te suis très reconnaissant de m'avoir accordé ta confiance et confié ce travail. Merci pour ta disponibilité permanente, ton enseignement et surtout ton sens pédagogique même dans les sujets hors domaine médical. Merci Gérard.

A Monsieur Bernard LE NORMAND chef du service d'hématologie
Merci de m'avoir accueilli dans votre service durant 3 semestres. Merci pour votre disponibilité et vos conseils. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A tout les chefs du service d'hématologie
Merci à Véronique LECAM-DUCHEZ, Agnès LAHARY, Virginie BARBAY, Marie-Hélène CHRETIEN, Catherine BOUTET, Marielle FRESEL, Pierre CHAMOUNI, Olivier MATRAY. Au plaisir de travailler à vos côtés, merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Aux jeunes chefs du service d'hématologie
Merci à Elsa, Victor et Paul pour votre disponibilité, enseignement et complicité. Je vous souhaite le meilleur avenir.

Aux autres jeunes chefs
Merci à Anaïs et Bénédicte.

A tout les techniciens et cadre du laboratoire d'hématologie
Merci pour votre disponibilité et patience.

A toutes les équipes de l'IBC
Merci aux biologistes, techniciens avec lesquels j'ai travaillé durant mon internat et qui m'ont appris mon métier, merci !

A mes co-internes durant ce dernier semestre
Merci à Gaétan, Louis, Juliette, Anaïs, François, Fiston et Thomas.

A tout les internes des autres secteurs
Merci à Aurélie R, Aurélie G, Aurélie SB, Charline, Cynthia, Maud, Justine, Auriane, Jennifer, Albane, Marion D, Khadija, Rangolie, Céline, Isabelle, Marion C, Pauline, Tania, Ela, Maria, Emilie, Louise, Aurélien, Ferdi, Clément, Benoit, Vincent, Charles, Guillaume, Pierre et Tanguy.

Ah oui, à mes deux co-bicots
Merci à Abdulaziz et Wassim, je vous souhaite le meilleur avenir.

A mes amis
Merci à Mouaad, mémo, Mehdi, Hichem, Ismail, Kada, Zak sghir, Zak kbir, Habib …

A mes Parents
Merci pour votre encouragement et soutien sans faille malgré la distance. Sans vous, je n'en serai pas là.

A mes sœurs
Merci à Soumia, Amina et Néama. Je vous souhaite une vie pleine de bonheurs et réussites. A très bientôt les soirées barbecue.

A ma femme
Ta simple existence dans ma vie me suffit pour être l'homme le plus heureux du monde. Merci ma femme.

A mon fils Yacine qui a 2 mois aujourd'hui
C'est lui l'acteur principal de ce travail de thèse, il m'a donné le courage et la force pour finir la rédaction dans les délais. Merci Yacine.

SOMMAIRE

INTRODUCTION _____ 1

I. Rappel sur la lymphopoïèse B et la réponse immunitaire.....3
   A. La lymphopoïèse B..... ...3
   B. La réponse immunitaire.....5
II. La morphologie lymphocytaire..... . 7
   A. Les lymphocytes typiques..... ..8
   B. Les lymphocytes atypiques d'origine réactionnelle..... 10
III. Le syndrome mononucléosique et intérêt de la morphologie.....14
   A. Définition.....14
   B. Etiologies..... 15
   C. La mononucléose infectieuse MNI..... 16
IV. Identification des lymphocytes activés au Laboratoire d'Hématologie au CHU de Rouen..... 18
   A. Automate XN-10 de Sysmex.....18
      a) Introduction.....18
      b) Principes de reconnaissance cellulaire.....19
      c) Les différentes alarmes..... 22
      d) Les paramètres de recherche..... 26
      e) Le paramètre HFLC..... 29
   B. Règles d'expertise.....31

BUTS DE L'ETUDE_____ 34

MATERIELS ET METHODES_____35

I. Numération formule sanguine.....35
II. Paramètre HFLC.....35
III. Formule sanguine par microscopie optique.....35
IV. Quantification des lymphocytes activés au microscope optique.....36
V. Patients..... .36
VI. Evaluation du paramètre HFLC.....36
VII. Analyses statistiques.....37

RESULTATS_____ 38

I. Données relatives aux patients.....38
II. Données de la NFS du XN-10.....38
III. Paramètre HFLC.....39
IV. Quantification des lymphocytes activés au microscope optique.....40
V. Etude de l'accord entre observateurs.....41
VI. Etude de l'accord entre paramètre HFLC et observateurs.....45

DISCUSSION_____ 48

CONCLUSION ET PERSPECTIVES_____55

BIBLIOGRAPHIES_____56

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AS-LYMP : Lymphocytes synthétisant d'anticorps

BCP : B cell precursor

BCR : B Cell Receptor

CD : Classe de différenciation

CG : Centre germinatif

CMo : Cellule mononucléées

CMV : Cytomégalovirus

CP : Cellule plasmocytaire

CRP : Protéine C-réactive

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSP : Cellule souche pluripotente

CSR : Class Switch Recombination

DC : Cellule dendritique

EBV : Virus d'Epstein Barr

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FO : Cellule B folliculaire

FS : Formule sanguine

FSC : Forward Scattered Light

GFHC : Le groupe francophone d'hématologie cellulaire

HFLC : High Fluorescence Cells

IG : Granulocytes immature

IgS : Immunoglobuline de surface

IPF : Fraction des plaquettes immatures

LCM : lymphome des cellules du manteau

LF : Lymphome folliculaire

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique

LY: Lymphocyte

LZM : Lymphome des zones marginales

MC : cellule B mémoire

MGG : May Grünwald Giemsa

MM : Myélome multiple

MNI : Mononucléose infectieuse

MZ : cellule B de la zone marginale

NFS : Numération formule sanguine

NG : Numération globulaire

NK : Natural Killer

NRBC: Nucleated red blood cells

PC(ASC) : Cellules plasmocytaire sécrétrice d'anticorps

PCR: Polymerase chain reaction

PCT : Procalcitonine

PLC : Progéniteurs lymphocytaires communs

PLP : Progéniteur lymphoïde très précoce

PLT-F : Plaquettes fluorescentes

PM : Progéniteur pluripotent

PNN : Polynucléaires neutrophiles

RE-LYMP : Lymphocytes réactifs

RET-HE : Reticulocyte haemoglobin equivalent

SDRPL : Lymphome splénique diffus de la pulpe rouge avec lymphocytes villeux

Se : Sensibilité

SFL : Side Fluorescent Light

SMD : Syndromes myélodysplasiques

SMN : Syndrome mononucléosique

Sp : Spécificité

SSC : Side Scattered Light

VGM : Volume globulaire moyen

VIH : Immunodéficience humaine

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

WBC : White Blood Cells

WDF: White cell differential channel

WPC : White cell precursor channel

Tableaux

Tableau 1: Éléments diagnostiques devant un syndrome mononucléosique. D'après N. VALIN

Tableau 2: Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire. D'après F. GENEVIÈVE et al.

Tableau 3: Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la formule leucocytaire. D'après F. GENEVIÈVE et al.

Tableau 4 : paramètres d'inflammation hématologique avec leur interprétation immunologique, leurs unités et leurs intervalles de référence.

Tableau 5: Règles de revue microscopique des FS par les biologistes du CHU de Rouen.

Tableau 6: résumé des règles de vérification de la formule leucocytaire au CHU de Rouen.

Tableau 7: Données descriptives de la population totale d'étude.

Tableau 8: Données descriptives des paramètres de la NFS et la répartition des anomalies quantitatives sur la population d'étude.

Tableau 9 : Données descriptives du paramètre HFLC et la répartition sur la population.

Tableau 10: Récapitulatif des anomalies quantitatives et qualitatives et leur répartition sur la population d'étude en fonction du taux d'HFLC.

Tableau 11: statistiques descriptives relatives à la quantification des lymphocytes activés.

Tableau 12: répartition des lymphocytes activés quantifiés par les 3 observateurs sur la population d'étude.

Tableau 13: Etude de corrélation par paires d'observateurs avec les coefficients de corrélation.

Tableau 14: Moyennes des différences et les limites de l'accord avec leurs intervalles de confiance à 95%.

Tableau 15: Moyennes des différences ainsi que les limites de l'accord avec leurs intervalles de confiance à 95%, relatives à l'étude de concordance HFLC vs Ly activés.

Tableau 16: Moyennes des différences (biais observé) ainsi que les limites d'agréments avec leurs intervalles de confiance à 95%, relatives à l'étude de concordance HFLC vs Ly activés.

Tableau 17: Evaluation des performances du paramètre HFLC.

Tableau 18: Extraits des propositions du GFHC de commentaires en fonction des anomalies lymphocytaires (lymphocytes réactionnels). D'après F. TRIMOREAU.

Figures

Figure 1 : La lymphopoïèse d'après G. BUCHONNET .

Figure 2 : Les différents stades de maturations lymphocytaires B en fonction du réarrangement des gènes d'Ig ainsi que l'expression des CD. D'après A.PLONQUET.

Figure 3 : Model résumant le développement lymphocytaire B et la réponse immunitaire. D'après Linssen et al.

Figure 4 : Frottis sanguin montrant de petits lymphocytes. D'après M.ZANDECKI.

Figure 5 : Frottis sanguin montrant de grands lymphocytes. D'après M.ZANDECKI.

Figure 6 : frottis sanguin coloré en MGG montrant deux grands lymphocytes granuleux. D'après M.ZANDECKI.

Figure 7: Aspects morphologiques des SLP B.

Figure 8 : Polymorphisme morphologique des lymphocytes activés au décours d'un syndrome mononucléosique. D'après M.ZANDECKI.

Figure 9 : frottis montrant deux monocytes. D'après M.ZANDECKI.

Figure 10 : frottis de sang montrant de gauche à droite : un lymphocyte normale, un plasmocyte, deux lymphocytes stimulés, un grand lymphocyte granuleux et plasmocyte. D'après M.ZANDECKI.

Figure 11 : Présence de plusieurs lymphocytes lysés sur un frottis sanguins d'un patient infecté par le CMV. (http://www.hematocell.fr/index.php/observations-biocliniques-commentees/213-obs46-angine-et-adenopathies-cervicales-chez-un-homme-de-22-ans).

Figure 12 : Cellules apoptotiques observées sur un frottis sanguin chez un patient infecté par l'EBV (Lesesve JF et Troussard X, Am J Hematol 2001).

Figure 13 : Le scattergramme du canal WNR montrant les zones de globules blancs (GB), de basophiles (BASO), d'érythroblastes (NRBC) et des amas de plaquettes (agrégat) (document Sysmex « XN Présentation et Principes »).

Figure 14 : technique de diffraction lumineuse associée à la fluorocytometrie en flux. (Document Sysmex « XN Présentation et Principes »).

Figure 15 : Le scattergramme du canal WDF avec la distribution des populations cellulaires (Document Sysmex « XN Présentation et Principes »).

Figure 16: scattergramme du canal WDF : le nuage bleu foncé correspond aux PNN hyposegmentés. (N Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013 / J.Hornain).
Figure 17: scattergramme du canal WDF : avec un nuage de cellules suspectes au dessus des monocytes. (N Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013 / J. Hornain).
Figure 18: scattergramme du canal WDF : avec un nuage de cellules au dessus des lymphocytes quantifiées par le paramètre HFLC. (N Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013 / J.Hornain).
Figure 19 : La diffusion latérale de la lumière (SSC) du canal WDF fournit des informations sur la structure interne des cellules représentant leur granularité. (Académie Sysmex).
Figure 20: Scattergramme du canal WDF montrant un nuage de cellules au dessus des lymphocytes quantifiés en RE-LYMP (lymphocytes réactifs) et AS-LYMP (plasmocytes synthétisant d'anticorps).
Figure 21: scattergramme du canal WDF montrant à droite un nuage de cellules au dessus des lymphocytes correspondant aux HFLC.
Figure 22: Modalités de validation de la formule sanguine après lecture au microscope.
Figure 23: Schéma de l'étude avec l'ensemble des études de corrélation menées.
Figure 24: corrélation par paires d'observateurs (R = Coefficient de corrélation).
Figure 25: Graphiques de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre observateurs.
Figure 26: Graphiques de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre HFLC et résultats observateurs.
Figure 27: Graphiques de Bland et Altman : représentant la concordance des mesures entre HFLC et résultats observateurs (CP+CMo).
Figure 28: schéma de l'étude avec la nouvelle règle d'expertise.

INTRODUCTION

Les syndromes inflammatoires représentent un motif de consultation très fréquent dans les services des urgences. L'enjeu majeur en cas de survenu d'un syndrome inflammatoire chez un patient est de faire la distinction entre les inflammations causées par des infections et celles qui ne le sont pas, et déterminer l'agent pathogène responsable et le statut immunitaire du patient en cas d'infection. Ensuite, les médecins doivent déterminer le traitement approprié pour leurs patients et éviter tant que possible la prescription d'antibiotiques.

Une réaction immunitaire faisant suite à l'introduction d'un agent pathogène peut être responsable d'un syndrome infectieux qui se manifeste classiquement par la survenue d'une fièvre. Cette réaction immunitaire s'accompagne ou non d'une hyperlymphocytose sanguine, mais presque toujours du passage dans le sang de lymphocytes dits activés. Habituellement ce sont des grandes cellules hyperbasophiles appelées aussi cellules mononucléées. D'autres cellules peuvent se rencontrer en cas de stimulation antigénique. Il s'agit des lymphocytes B synthétisant des anticorps ou plasmocytes, dont l'activité est principalement dans les tissus lymphoïdes et très peu circulent dans le sang.

La mononucléose infectieuse figure parmi les infections aiguës les plus fréquentes. Elle est responsable d'une réaction immunitaire cellulaire particulièrement intense, c'est le syndrome mononucléosique. Ce syndrome est en réalité un fait biologique et plus particulièrement cytologique. En effet, le diagnostic repose sur une simple numération formule sanguine (NFS) qui mettra en évidence une hyperlymphocytose associée à une population de cellules mononucléées hyperbasophiles. Ces dernières possèdent des caractéristiques morphologiques spécifiques et identifiables par la lecture microscopique d'un frottis sanguin. Cependant, l'identification ainsi que la quantification des lymphocytes activés ne sont pas toujours faciles en raison de la continuité morphologique entre les petits lymphocytes normaux et les grandes cellules hyperbasophiles, caractérisées par un grand polymorphisme cellulaire.

Afin de pallier aux problèmes d'identification et de quantification des lymphocytes activés, les constructeurs d'automates à numération ont développé plusieurs paramètres

dits de recherche. Bien qu'ils ne soient pas encore utilisés en routine, ces paramètres sont obtenus à partir d'une simple NFS.

Les automates à numération construits par Sysmex notamment les séries XE et XN, disposent ainsi d'un paramètre nommé HFLC (High Fluorescence Cells) qui permet d'identifier et de quantifier les cellules plasmocytaires dans le sang. Cela pourrait aider le clinicien sur l'orientation diagnostic du syndrome inflammatoire plus rapidement.

Avec cette étude, nous souhaitons donc évaluer à partir d'une cohorte prospective, les performances du paramètre HFLC sur l'identification et la quantification des lymphocytes activés notamment les plasmocytes et les cellules mononucléées sur l'automate à numération utilisé au laboratoire du CHU de Rouen le XN-10 de Sysmex.

I. Rappel sur la lymphopoïèse B et la réponse immunitaire :

Les lymphocytes peuvent être classés en cellules B, T et NK (natural killer). Ils proviennent de la cellule souche lymphoïde, qui constitue le point de départ de toutes les étapes de développement lymphocytaire (**figure 1**). La maturation lymphocytaire a lieu dans les organes lymphoïdes primaires (cellules T = thymus, cellules B = moelle osseuse). Les cellules effectrices, qui assurent l'immunité adaptée et peuvent être identifiées par des méthodes d'immunophénotypage utilisant des profils d'expression antigénique spécifiques, ont été activées dans les tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, etc.) par contact antigénique. La cellule la plus différenciée de la lignée cellulaire B est la cellule plasmocytaire, elles produisent des immunoglobulines et sont donc porteuses de l'immunité humorale. Les cellules T sont responsables de la défense immunitaire cellulaire.

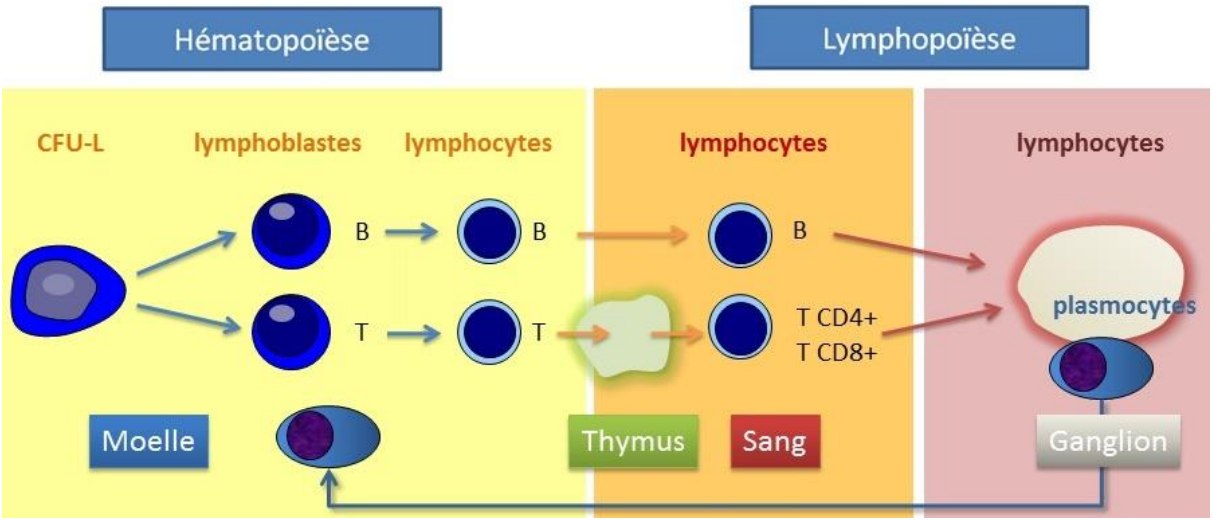


Figure 1 : La lymphopoïèse d'après G. BUCHONNET [1] :
Bien que produits à partir d'un même progéniteur, les lymphocytes T et B maturent différemment. Les Lymphocytes B maturent dans la moelle osseuse et les lymphocytes T dans le thymus. Après maturation et rencontre avec un antigène, les lymphocytes 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.

A. La lymphopoïèse B :

Les lymphocytes B représentent 10 à 15 % des lymphocytes circulants. Leur maturation s'effectue au niveau médullaire à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui possèdent la capacité d'auto-renouvellement et de multipotence (capacité d'engagement dans les voies de différentiation lymphoïde ou myéloïde). Cette maturation a été d'abord décrite chez l'oiseau où elle se fait dans un organe lymphoïde spécifique, la bourse de Fabricius, d'où leur nom de lymphocytes B. Une fois engagées dans la voie de différentiation lymphoïde, favorisée par la combinaison de stimuli du microenvironnement (cytokines, interaction cellules-stroma), les CSH se transforment en cellules lymphoïdes progénitrices (PLC) (ou progéniteurs lymphocytaires communs). Une partie des PLC migre vers le Thymus pour se différencier en progéniteurs lymphoïdes T, l'autre partie reste dans la moelle osseuse et se différencie en progéniteurs lymphoïdes B ou BCP (B cell precursor).

La maturation des lymphocytes B correspond à l'acquisition d'une immunoglobuline de surface (IgS) associée aux anticorps (Igα et Igβ) constituant le récepteur membranaire BCR (B Cell Receptor) qui est l'élément fonctionnel majeur de la lignée B. Le BCR procure aux lymphocytes B la propriété de reconnaitre directement et spécifiquement les peptides antigéniques présents à la surface de l'agent pathogène. Chaque lymphocyte B exprime un seul type de BCR en plusieurs exemplaires (environ 50000) et tous les lymphocytes B de l'organisme se différencient les uns des autres par de petites variations dans la structure de l'Ig du BCR (10^9 à 10^{11} structures d'Ig différentes). L'expression du BCR et de son précurseur, le pré-BCR nécessite la recombinaison génétique d'Ig. Il s'agit de réarrangements successifs des gènes d'Ig notamment des chaines lourdes (H) au niveau des segments V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction) puis au niveau des segments V et J pour les chaines légères (L). Ces étapes de réarrangement caractérisent chaque stade de différentiation lymphocytaire avec l'expression d'autres molécules appelées classe de différentiation (CD). Ces derniers peuvent être utilisés comme marqueurs pour déterminer chaque stade garce aux techniques d'immunophénotypage par cytométrie en flux. Certains CD sont présents à tous les stades de la différenciation notamment le CD19 et le CD22 tandis que d'autres apparaissent plus tardivement [2] (**figure 2**). Le stade ultime de la différentiation lymphocytaire au niveau médullaire est le lymphocyte B mature naïf, appelés ainsi car ils n'ont jamais rencontré l'antigène complémentaire de leur Ig de surface. Ces lymphocytes naïfs quittent ensuite la

moelle osseuse pour gagner la circulation sanguine puis lymphatique à la recherche de l'antigène correspondant.

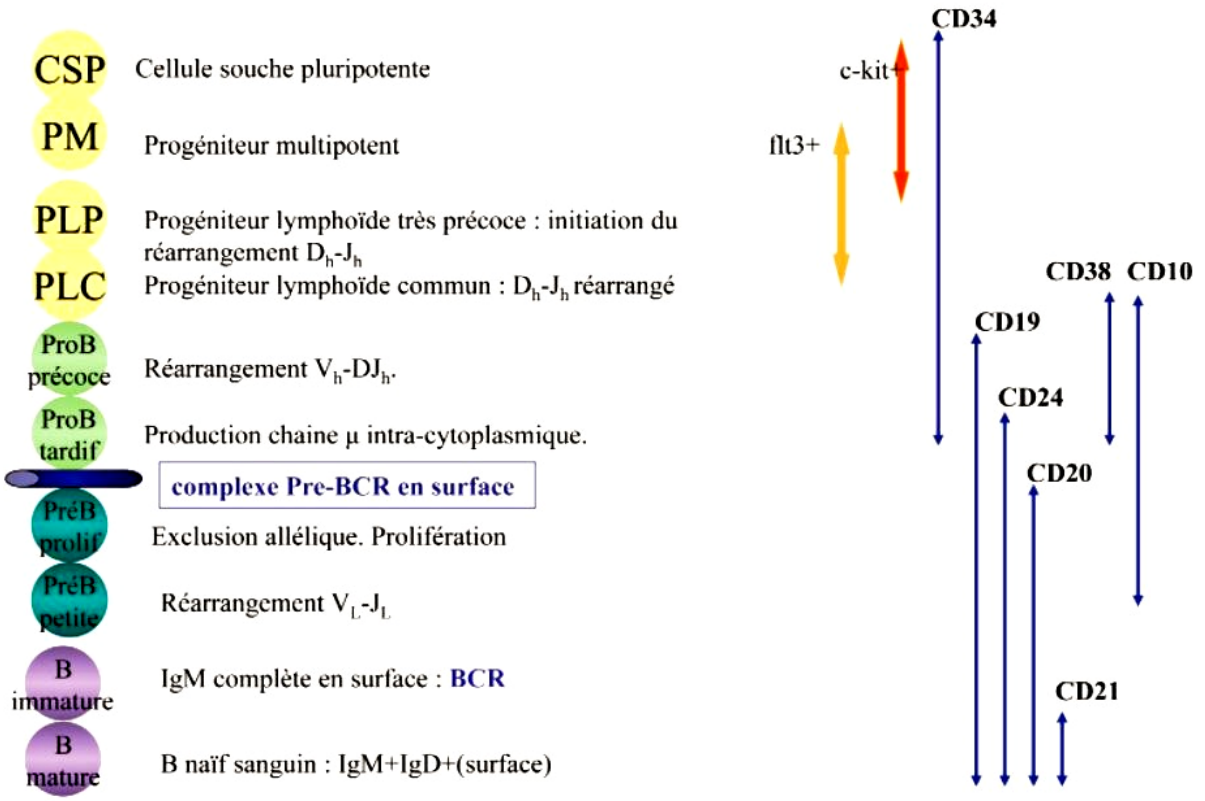


Figure 2 : Les différents stades de maturations lymphocytaires B en fonction du réarrangement des gènes d'Ig ainsi que l'expression des CD. D'après A.PLONQUET [1]

B. La réponse immunitaire :

a) La réponse immunitaire indépendante d'antigène :

La différentiation lymphocytaire se poursuit au niveau splénique. Certains lymphocytes B naïfs, les cellules B1 (figure 3), développent un phénotype unique de surface cellulaire et une capacité d'auto-régénération principalement responsable de la production d'anticorps naturels dirigés contre des auto-antigènes (lipides oxydés) et des antigènes exprimés des cellules apoptotiques (phosphatidylcholine, annexine V) accélérant ainsi leur élimination. Ce sont des cellules plasmocytaires sécrétrices d'IgM naturelles principalement dans les cavités péritonéale et pleurale et des IgA au niveau intestinal. Ces anticorps sont sécrétés en l'absence de toute stimulation microbienne et indépendamment de l'intervention des lymphocytes T [3].

b) La réponse immunitaire dépendante d'antigène :

Une proportion relativement faible de cellules B dites conventionnelles (cellules B2) (**figure 3**) reste dans la zone marginale splénique en tant que cellules B naïves de la zone marginale non circulantes. La plus grande partie de la population cellulaire B2 se transforme en cellules B folliculaires circulantes de longue durée de vie qui empruntent essentiellement la voie T dépendante [4, 5].

i. La réponse T- indépendante :

Les cellules B de la zone marginale reconnaissent les antigènes sans interaction des lymphocytes T. Ils se déplacent ensuite vers la pulpe rouge de la rate et se différencient en plasmocytes secrétant d'anticorps (IgM) (**Figure 3**).

ii. La réponse T- dépendante :

Les cellules B folliculaires vont rencontrer l'antigène. Cette rencontre induira des modifications moléculaires des gènes d'Ig, grâce aux mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation de classe ou CSR (Class Switch Recombination), sous la dépendance des lymphocytes T. Ces mécanismes sont indispensables à l'augmentation de la spécificité de la réaction immunitaire et la spécificité vis-à-vis de l'antigène. En réponse à cette stimulation antigénique, les follicules primaires se transforment en follicules secondaires avec formation d'un centre germinatif (CG). Cela va aboutir à la formation de cellules plasmocytaires sécrétrices d'anticorps de longue durée de vie (IgG, IgA ou IgE) ou des cellules mémoires de haute affinité. D'autres cellules empruntent la voie extrafolliculaire et migrent vers la pulpe rouge de la rate ou dans les ganglions lymphatiques, donnant naissance à des plasmocytes de courte durée de vie qui produisent des anticorps de faible affinité (IgM).[3]

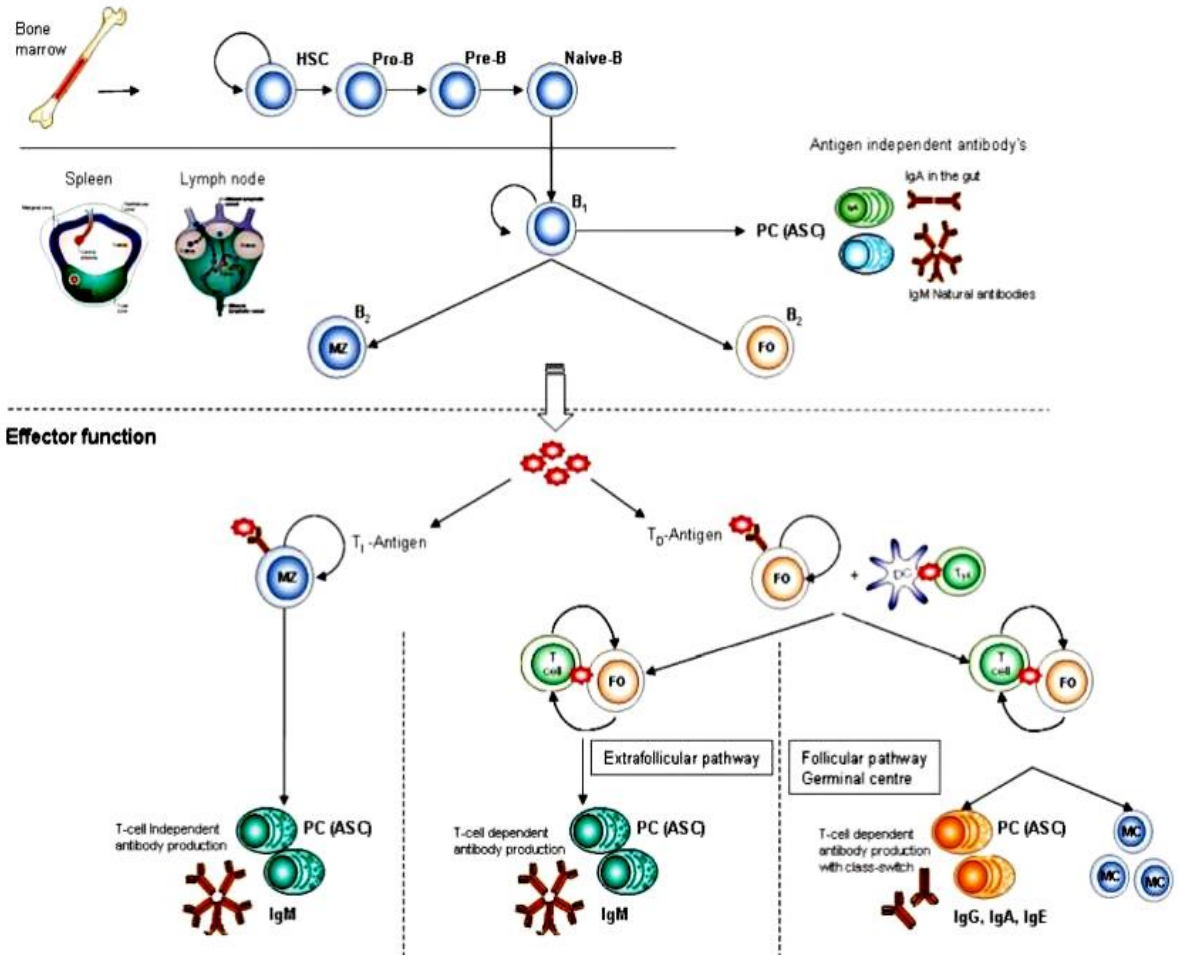


Figure 3 : Model résumant le développement lymphocytaire B et la réponse immunitaire. D'après Linssen et al [5]**.** PC(ASC) : cellules plasmocytaire sécrétrice d'anticorps. FO : cellule B folliculaire. DC : cellule dendritique. MZ : cellule B de la zone marginale. MC : cellule B mémoire.

II. La morphologie lymphocytaire :

L'un des plus grands défis en cytologie est la différenciation des cellules lymphoïdes dans les frottis sanguins. En effet, l'interprétation de la morphologie lymphocytaire reste imprécise, la seule cytologie ne permet pas à l'heure actuelle de typer avec certitude une cellule lymphocytaire, ni de reconnaitre son degré de différentiation ou encore son état d'activité biologique. Seules des techniques immunologiques, notamment d'immunophénotypage par cytométrie en flux, permettent ces distinctions.

Chez un adulte sain, les lymphocytes représentent environ 1/3 des leucocytes sanguins, 55-83% d'entre eux sont des lymphocytes T naïfs, 6-19% sont des lymphocytes B naïfs et 7-31% sont des cellules NK [6].

Au point de vue morphologique, la coloration des frottis sanguins par la méthode de May Grünwald Giemsa (MGG) utilisée en pratique, nous permet de classer les lymphocytes circulants en deux catégories, les lymphocytes « typiques » et les lymphocytes « atypiques ».

A. Les lymphocytes typiques :

Se sont des lymphocytes normaux. Il en existe, deux tailles et deux aspects différents, les petits et les grands lymphocytes, mais cette distinction est sans intérêt pratique puisque les diverses activités biologiques des lymphocytes ne sont pas corrélées à leur morphologie.

a) Les petits lymphocytes:

Ils ont un diamètre comparable à celui d'un globule rouge (environ 8-10µm). Leur cytoplasme est peu abondant, bien délimité, avec une légère basophilie (couleur bleu) et dépourvu de granulation. Le noyau est rond ou légèrement ovale avec une chromatine dense hétérogène faite de grosses mottes et sans nucléoles (**figure 4**). Parfois ils apparaissent un peu plus grands en raison d'un léger accroissement du cytoplasme, mais ils gardent les mêmes caractéristiques morphologiques [7].

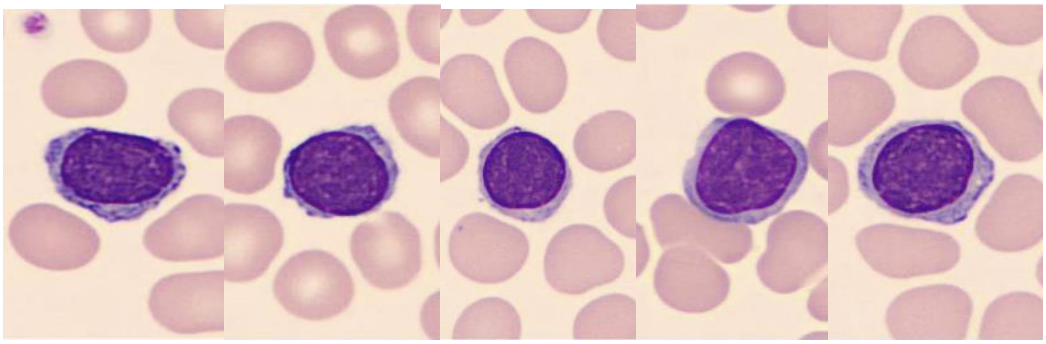


Figure 4 : Frottis sanguin montrant de petits lymphocytes. D'après M.ZANDECKI [8].

b) les grands lymphocytes :

Les lymphocytes de taille plus grande (9 à 15 lm de diamètre) ont un noyau central ou légèrement excentré de couleur violet foncé avec des masses chromatiniennes disposées en blocs compacts entrecoupés de zones claires mais sans démarcations nettes. Le cytoplasme plus étendu que celui des petits lymphocytes, entoure complètement le noyau. Il est clair, hyalin ou légèrement basophile (**figure 5**). Un petit nombre d'entre eux ont des grains

intracytoplasmiques (3 à 5 granulations de coloration violacée de 0,3 à 0,6 lm de diamètre, parfois contenues dans de petites vacuoles) [9].

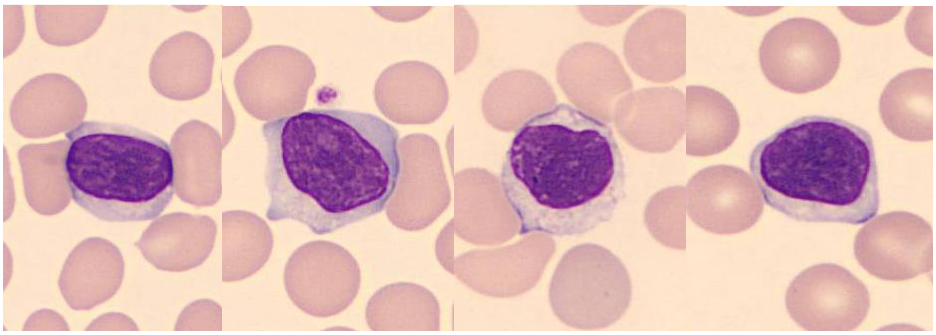


Figure 5 : Frottis sanguin montrant de grands lymphocytes. D'après M.ZANDECKI [8].

c) les grands lymphocytes granuleux :

En plus des lymphocytes standards, on peut observer dans un frottis sanguin des grands lymphocytes granuleux (**figure 6**). Biologiquement, ces cellules sont soit des cellules NK, soit des cellules T cytotoxiques (avec un phénotype CD8 positif). Morphologiquement, ils sont un peu plus volumineux que les petits lymphocytes (environ 10-12µm), avec un cytoplasme basophile clair et large, contenant peu de granulation grossière, irrégulièrement répartie et azurophile (couleur rouge pourpre). Les grands lymphocytes granuleux peuvent représenter jusqu'à 10% des leucocytes chez un individu en bonne santé, au delà de 10%, elles seront classées comme «lymphocytes atypiques» [6].

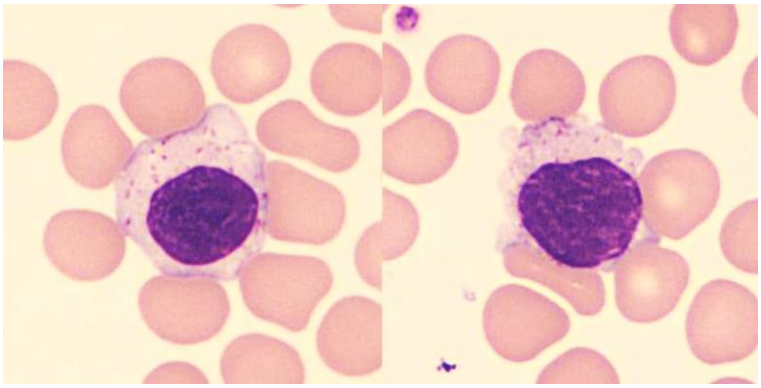


Figure 6 : frottis sanguin coloré en MGG montrant deux grands lymphocytes granuleux. D'après M.ZANDECKI [8].

B. Les lymphocytes atypiques d'origine réactionnelle :

En pratique, les lymphocytes ne pouvant pas être attribués à une de ces formes typiques sont considérés comme étant atypiques. Ces lymphocytes sont caractérisés par une morphologie inhabituelle suite à des modifications en termes de taille cellulaire, de structure de la chromatine ou de coloration du cytoplasme. Ces modifications surviennent soit de manière réactive par des infections virales ou en rapport avec une pathologie néoplasique dans le cadre de syndromes lymphoprolifératifs (**figure 7**). Ces lymphocytes peuvent être libérés dans le sang. En se basant sur leurs aspects morphologiques, la distinction entre origine réactive et néoplasique n'est pas toujours possible. Ainsi, il faut souvent recourir à des examens complémentaires tels que les sérologies infectieuses ou un immunophénotypage lymphocytaire pour poser un diagnostic précis.

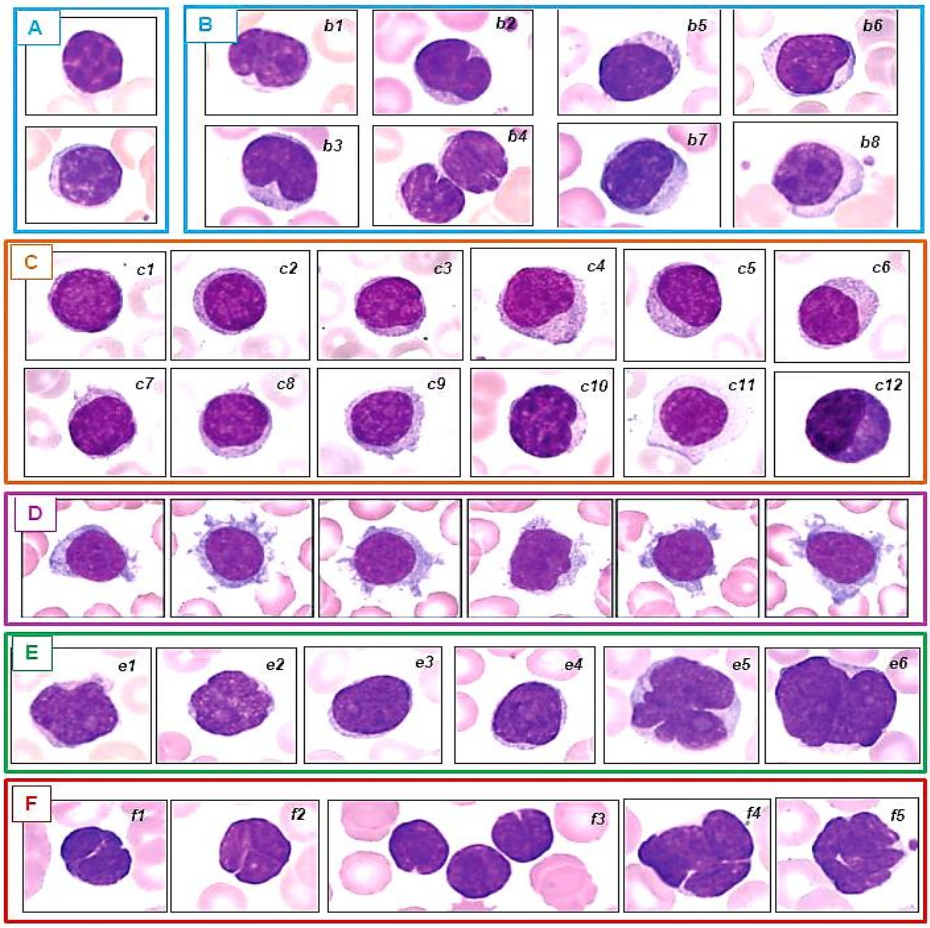


Figure 7: Aspects morphologiques des SLP B :
A : LLC typique, B : LLC atypique, C : LZM splénique, D : SDRPL , E : LCM, F : LF,(LLC leucémie lymphoïde chronique, LZM lymphome des zones marginales, SDRPL lymphome diffus de la pulpe rouge de la rate, LCM lymphome des cellules du manteau, LF lymphome folliculaire (Basegio L, RFL 2009)[10].

En cas de stimulation antigénique, la morphologie lymphocytaire se transforme en rapport avec des cellules stimulées ou activées qui exercèrent une activité immunitaire spécifique. Ils prennent ainsi deux aspects différents, soit celui d'un lymphocyte activé ou celui d'un plasmocyte.

a) Les lymphocytes activés :

Il s'agit d'une population lymphocytaire T suppresseur de nature CD8 positive et rarement NK, dont le caractère activé ou stimulé se traduit par une basophilie cytoplasmique parfois très forte correspondant à une grande quantité d'acide ribonucléique (ARN), une augmentation de la taille cellulaire allant jusqu'à trois fois la taille d'un lymphocyte normal et la persistance d'une texture chromatinienne mature avec de rares nucléoles. Le niveau d'activation variable des cellules amène un grand polymorphisme cellulaire se traduisant après la coloration de MGG par un polymorphisme de taille, d'intensité, de basophilie cytoplasmique (du bleu ciel au bleu intense, avec distribution irrégulière de la basophilie dans la cellule) et de forme nucléaire (arrondi ou contourné) : on observe tous les aspects allant du lymphocyte discrètement bleuté à la grande cellule (jusqu'à 30 µm) intensément basophile (**figure 8**)[11].

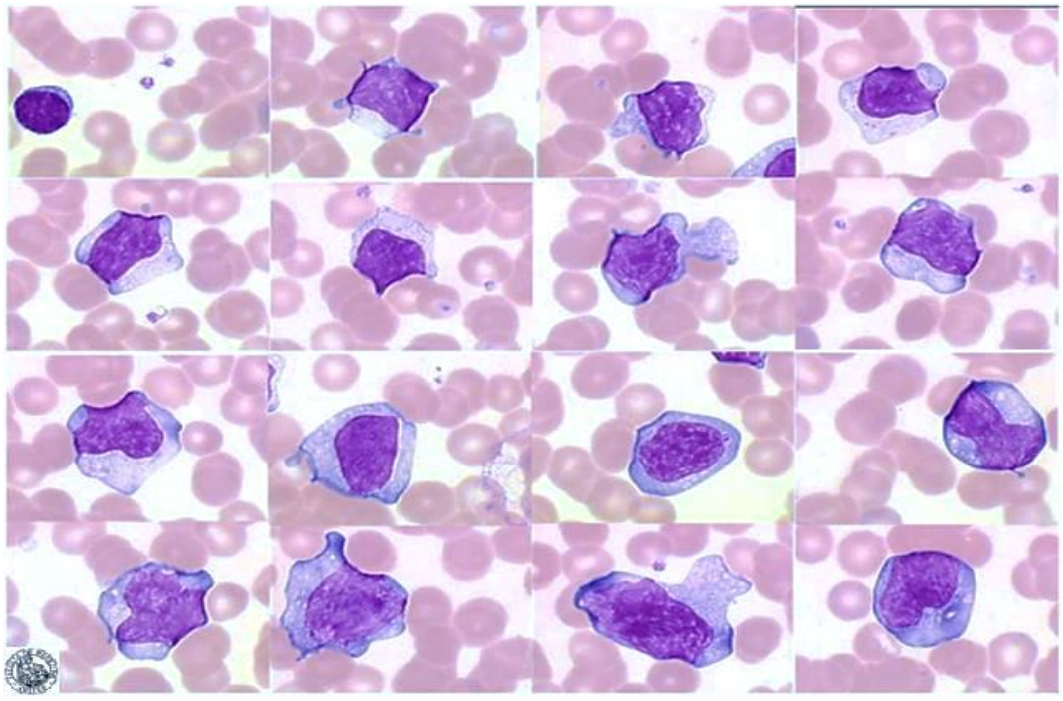


Figure 8 : Polymorphisme morphologique des lymphocytes activés au décours d'un syndrome mononucléosique. D'après M.ZANDECKI [11].

Les lymphocytes stimulés ont diverses autres appellations: lymphocytes activés ou immunostimulés, grands lymphocytes bleus, grands lymphocytes hyperbasophiles, grandes cellules mononucléées bleutées, lymphocytes atypiques [11].

Par ailleurs, il est important de ne pas confondre les lymphocytes réactionnels avec des monocytes. Les monocytes sont des cellules de morphologie très variable en ce qui concerne la taille (de modérée à grande), la basophilie cytoplasmique (de faible à franchement basophile). Les contours cytoplasmiques irréguliers peuvent parfois être observés. Le cytoplasme est généralement abondant et renferme souvent de très fines granulations azurophiles. Le noyau présente une chromatine modérément condensée qui laisse parfois percevoir la présence de un ou plusieurs nucléoles (**figure 9**).

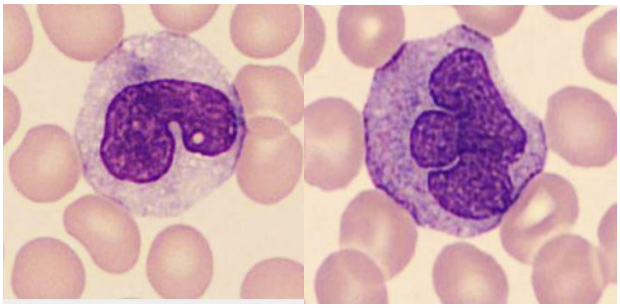


Figure 9 : frottis montrant deux monocytes. D'après M.ZANDECKI. [8]

- Principales étiologies des hyperlymphocytoses réactionnelles:

Toute pénétration d'agent infectieux ou de protéine allergisante déclenche une réaction immunitaire. Cette réaction s'accompagne souvent d'un passage dans le sang de lymphocytes activés avec ou sans hyperlymphocytose.

Les hyperlymphocytoses immunitaires sont transitoires avec un polymorphisme cellulaire caractéristique contrairement aux hyperlymphocytoses d'origine néoplasique qui sont monomorphes et persistantes.

Les causes des hyperlymphocytoses immunitaires sont multiples :

- infections aiguës,
- infections chroniques (tuberculose, brucellose),
- toxiques (réactions allergiques, notamment médicamenteuses),
- maladies auto-immunes,
- rejet de greffe.

Parmi les infections aiguës, il faut souligner l'importance de celle qui entraine une réaction immunitaire cellulaire spectaculaire et très intense, il s'agit du syndrome mononucléosique (SMN) en particulier dans la mononucléose infectieuse (MNI) due au virus *d'Epstein Barr* (EBV).

b) les plasmocytes:

Les cellules plasmocytaires ou lymphoplasmocytaires sont des cellules effectrices non proliférantes à différenciation terminale de la lignée B et les productrices uniques d'anticorps. Elles peuvent être trouvées dans la moelle osseuse sous le nom de «plasmocytes de longue durée de vie» ou dans le ganglion, mais elles sont rarement observées dans le sang périphérique d'individus normaux en bonne santé. Pour cette raison, la présence de plasmocytes dans un échantillon sanguin d'un patient peut indiquer une réponse immunitaire à la suite d'infections [5] ou des pathologies malignes tels qu'un myélome multiple (MM).

Les cellules plasmocytaires ont des caractéristiques morphologiques très spécifiques qui les rendent reconnaissables entre toutes. Apres la coloration de MGG les plasmocytes s'observent avec un aspect ovalaire et de taille variable (20-30 µm de grand axe et 10-15µm de petit axe), avec un petit noyau (un rapport nucléocytoplasmique = 0.3) dont la chromatine est densément mottée avec un aspect dit « en rayon de roue », le cytoplasme est très basophile (très riche en ARN), près du noyau on trouve une zone claire appelée archoplasme qui correspond à l'appareil de Golgi (**figure 10**) [12].

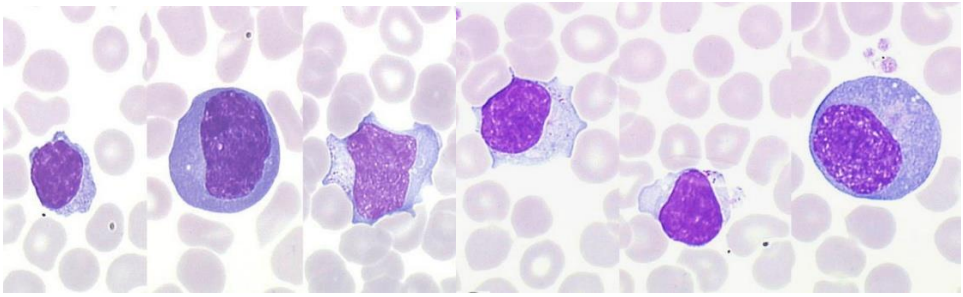


Figure 10 : frottis de sang montrant de gauche à droite : un lymphocyte normale, un plasmocyte, deux lymphocytes stimulés, un grand lymphocyte granuleux et plasmocyte. D'après M.ZANDECKI. [12]

- Principales étiologies des plasmocytoses sanguines :

Comme décrit précédemment, les plasmocytes sont absents du sang périphérique chez le sujet sain, quel que soit l'âge. Leur présence dans le sang, même avec des taux relativement faibles, nous oriente vers des pathologies majoritairement réactionnelles [12] :

- dans infections bactériennes sévères avec un taux de plasmocytes entre 1-15% souvent accompagnés d'une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles,
- dans tous types d'infections virales avec un taux de 1-5% plus particulièrement fréquente en cas de rubéole avec un taux de 2-15%.
- dans les SMN, quelque soit l'étiologie, avec un taux de 1-5%,
- dans certaines parasitoses notamment le paludisme et la leishmaniose avec un taux de 1-3%,
- en post greffe avec parfois un taux dépassant les 15%.

La présence de plasmocytes dans le sang peut également être en rapport avec une pathologie maligne [12]. Nous pouvant citer :

- le MM avec quelques plasmocytes (1-3%) dans le sang dans 15% des MM au diagnostic,
- la Leucémie à plasmocytes avec une plasmocytose supérieure à 2G/L ou 20% des leucocytes,
- la lymphadénopathie angio-immunoblastique ou le lymphome non hodgkinien T à grandes cellules, caractérisé par une plasmocytose sanguine polyclonale, morphologiquement hétérogène (5 à 15% du total leucocytaire), dans 1/3 des cas.

III. Le syndrome mononucléosique et intérêt de la morphologie :

A. Définition :

La définition du SMN est purement cytologique. Elle se base sur le résultat de l'hémogramme et la lecture d'un frottis sanguin coloré au MGG. En effet, en cas de survenu d'un SMN, l'hémogramme objective classiquement une hyperleucocytose associées à une hyperlymphocytose et parfois une neutropénie.

Cependant, tout SMN doit présenter deux particularités sur la formule leucocytaire après lecture du frottis sanguin :

- un taux de lymphocytes > 50%,
- avec au moins 10 % de lymphocytes activés.

D'autres particularités cytologiques peuvent caractériser le SMN notamment [13] :

- une grande hétérogénéité morphologique des lymphocytes activés,
- la présence fréquente d'un petit nombre de petits plasmocytes réactionnels (2-5 %, rarement plus), signant une synthèse d'IgM.

B. Etiologies :

Les principales étiologies à rechercher sont la MNI, la primo-infection à cytomégalovirus (CMV), la toxoplasmose acquise et la primo-infection due au virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le **tableau 1** illustre les éléments diagnostiques devant un SMN selon l'étiologie [14].

Agent infectieux	**Epstein -Barr virus MNI**	**Cytomégalovirus**	**Toxoplasma gondii**	**Virus de l'immunodéficience humaine**
Population	Adolescent, jeune adulte	Adolescent, jeune adulte	Adolescent, jeune adulte	Tout âge
Incubation	De 4 à 6 semaines	De 6 à 8 semaines	De 5 jours à 3 semaines	De 2 à 6 semaines
Examen clinique	Fièvre Asthénie Angine pseudomembraneuse Polyadénopathie Exanthème après prise d'amoxicilline	Fièvre Syndrome pseudogrippal Exanthème Adénopathies cervicales	Adénopathies cervicales	Fièvre Exanthème, énanthème Polyadénopathies Pharyngite Arthralgies, myalgies Céphalées
Diagnostic	Sérologie EBV + virémie quantitative	Sérologie CMV + virémie quantitative	Sérologie toxoplasmose	Antigénémie p24, sérologie VIH

Tableau 1: Éléments diagnostiques devant un syndrome mononucléosique. D'après N. VALIN [14]

C. La mononucléose infectieuse MNI :

La MNI est la forme la plus typique et la plus fréquente des SMN. Elle correspond à une primo-infection par le virus EBV. La pénétration de l'EBV dans les cellules B est responsable de la prolifération des lymphocytes cytotoxiques. Le virus reste ensuite à l'état latent dans les lymphocytes B du sang circulant. À l'âge adulte, plus de 90 % de la population est immunisée.

Le diagnostic positif de primo-infection EBV repose sur la sérologie spécifique EBV, réalisée le plus souvent systématiquement en cas de suspicion clinico-biologique. Le diagnostic direct en biologie moléculaire par PCR (polymerase chain reaction) permet de quantifier la charge virale EBV. Son utilisation dans le diagnostic de la primo-infection est intéressante, mais cette technique n'est pas utilisée dans tous les laboratoires [14].

a) L'hémogramme :

Les résultats de l'hémogramme en cas de MNI sont caractéristiques. On retrouve de principe le SMN biologique dans 80% des cas avec principalement :

- Une hyperleucocytose (10 - 20 Giga/L parfois jusque 30 Giga/L) transitoire qui disparait avec signes cliniques (en 3-6 semaines),
- Une hyperlymphocytose de 5 – 10 Giga/L,
- Avec en plus 20 à 50 % de lymphocytes stimulés avec un grand polymorphisme cellulaire (figure 8),

D'autres particularités cytologiques caractérisent la MNI et on peut observer dans un frottis sanguin :

- de nombreuses cellules lysées témoignant de la fragilité des cellules immunostimulées [15] (**figure 11**). Ce phénomène se produit lors de la réalisation des frottis sanguins (les cellules s'éclatent lors de l'étalement), il pourrait altérer la précision du décompte cellulaire et donc le résultat de la formule sanguine. Afin de pallier à ce problème, il convient de regarder les cellules au lieu de dépôt de la goutte de sang sur la lame, si l'observation est possible à cet endroit, et rechercher les cellules hyperbasophiles caractéristiques du SMN,
- quelques plasmocytes,

- des cellules en apoptose qui seraient spécifiques de la MNI et représentant jusqu'à 20% des leucocytes (**figure 12**). [16]

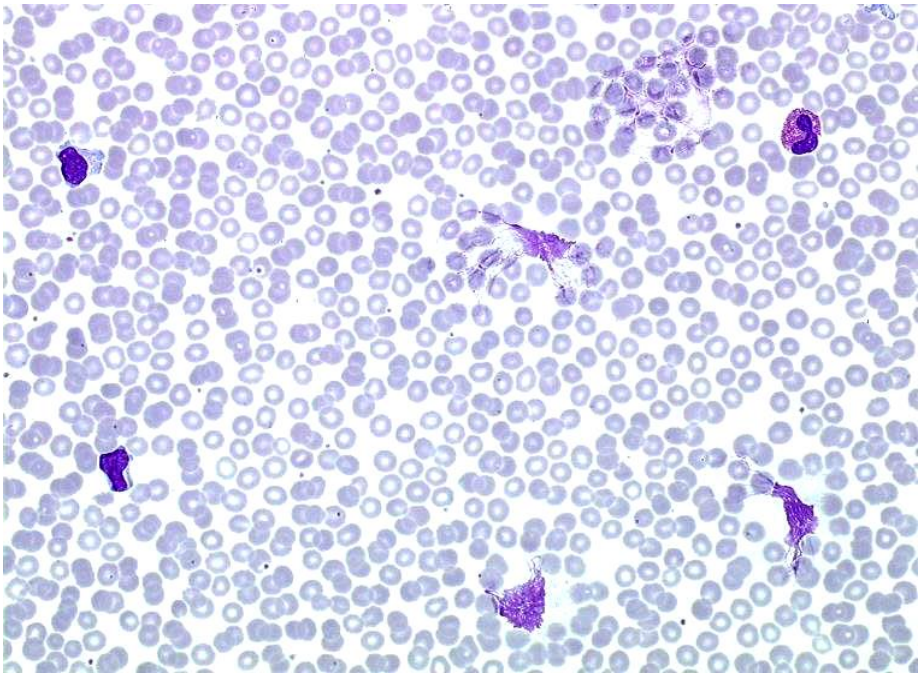


Figure 11 : Présence de plusieurs lymphocytes lysés sur un frottis sanguins d'un patient infecté par le CMV. D'après M.ZANDECKI[15]

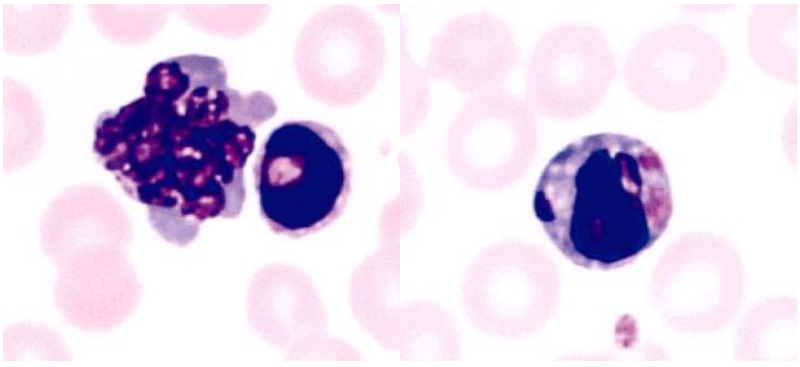


Figure 12 : Cellules apoptotiques observées sur un frottis sanguin chez un patient infecté par l'EBV (Lesesve JF et Troussard X, Am J Hematol 2001) [16]

D'autres manifestations hématologiques sont possibles, se traduisant par une anémie hémolytique auto-immune dans 0.5-3% des cas, et une thrombopénie modérée dans 50% des cas (taux de 100-150 Giga/L).

IV. Identification des lymphocytes activés au Laboratoire d'Hématologie au CHU de Rouen :

A. Automate XN-10 de Sysmex :

a) Introduction :

Rendre un résultat d'hémogramme rapide et précis est l'objectif principal des laboratoires d'hématologie. Pour répondre à ce besoin, des progrès considérables ont été réalisés dans les analyseurs d'hématologie automatisés, capables de traiter un grand nombre d'échantillons sanguins avec une performance analytique élevée. Néanmoins, d'autres techniques d'identification telles que l'analyse microscopique du frottis sanguin ainsi que la cytométrie en flux restent indispensables pour les échantillons avec des cellules anormales ou avec un faible nombre de cellules, plus particulièrement dans le diagnostic et le suivi des pathologies onco-hématologiques. L'analyse microscopique du frottis sanguin est généralement déclenchée lorsque ces automates génèrent des alarmes portant sur la présence d'éventuelles anomalies morphologiques (présence de blastes, de lymphocytes anormaux, de lymphocytes atypiques, de granulocytes immatures, etc…).

La série Sysmex XN (Sysmex Corporation, Kobe, Japon) est la nouvelle génération d'analyseurs d'hématologies automatisés (qui succède à la série Sysmex XE). Ces derniers sont conçus pour améliorer à la fois la précision des résultats des NFS avec un faible nombre d'éléments sanguins et la spécificité des indicateurs de cellules anormales. Nous utilisons au laboratoire d'hématologie du CHU de ROUEN l'automate à numération XN-10 (existe aussi le XN-20) avec un système modulaire (chaine XN-9000) se composant de trois analyseurs combinés à un système pré-analytique de tri et transport d'échantillons, ainsi qu'un étaleur/ colorateur automatique des frottis sanguins (le SP-10). La mesure de la vitesse de sédimentation automatisée est également intégrée dans ce système.

Les automates de la série XN sont caractérisés par l'introduction de plusieurs nouveaux canaux de mesure basés sur la technique de cytométrie en flux avec fluorescence :

- un canal WNR (white cell nucleated channel) pour la numération des leucocytes et des érythroblastes ou NRBC (nucleated red blood cells),
- un canal WDF (white cell differential channel) pour la formule leucocytaire avec la détection des cellules anormales,

- un canal de détection de précurseur des globules blancs WPC (white cell precursor channel), uniquement pour le XN-20, qui permet une spécification du type de cellules anormales (blastes/ lymphocytes atypiques ou anormaux),
- un canal des plaquettes fluorescentes (PLT-F).
- une innovation supplémentaire est l'introduction du mode low WBC (White Blood Cells) permettant de réaliser la formule avec une grande précision sur les échantillons leucopéniques (globules blancs < 0.5 Giga/L) [17].

b) Principes de reconnaissance cellulaire :

Les analyseurs Sysmex de la série XN utilisent la fluoro-cytométrie en flux comme principale méthode de détection pour la formule leucocytaire, la numération des réticulocytes et des érythroblastes. Cette technique permet d'analyser les propriétés physiologiques et chimiques des cellules. Elle donne des informations sur la taille et la structure des cellules ainsi que des informations sur l'intérieur des cellules.

Avec la cytométrie en flux, les cellules examinées passent par une chambre de flux très étroite. Dans un premier temps, un échantillon de sang est aspiré et proportionné, puis dilué pour atteindre une teneur prédéfinie. Il est ensuite marqué à l'aide d'un fluorochrome se liant de façon spécifique aux acides nucléiques des cellules.

i. La numération leucocytaire par le canal WNR :

Ce canal permet une mesure quantitative des globules blancs, des érythroblastes et des polynucléaires basophiles. Tout d'abord un agent tensio-actif à PH acide (Lysercell WNR) induit la lyse des érythrocytes, des plaquettes et du cytoplasme des globules blancs. Les polynucléaires basophiles résistent à cette lyse à pH acide et restent donc intacts. Un marqueur de fluorescence (Fluorocell WNR) se lie aux acides nucléiques des globules blancs et des érythroblastes (NRBC). Les cellules passent ensuite devant un faisceau laser et selon le principe de diffraction lumineuse, la numération leucocytaire est obtenue après une répartition, en fonction de la fluorescence et la taille. Cette répartition est représentée dans un graphique appelé scattergramme de distribution (**figure 13**).

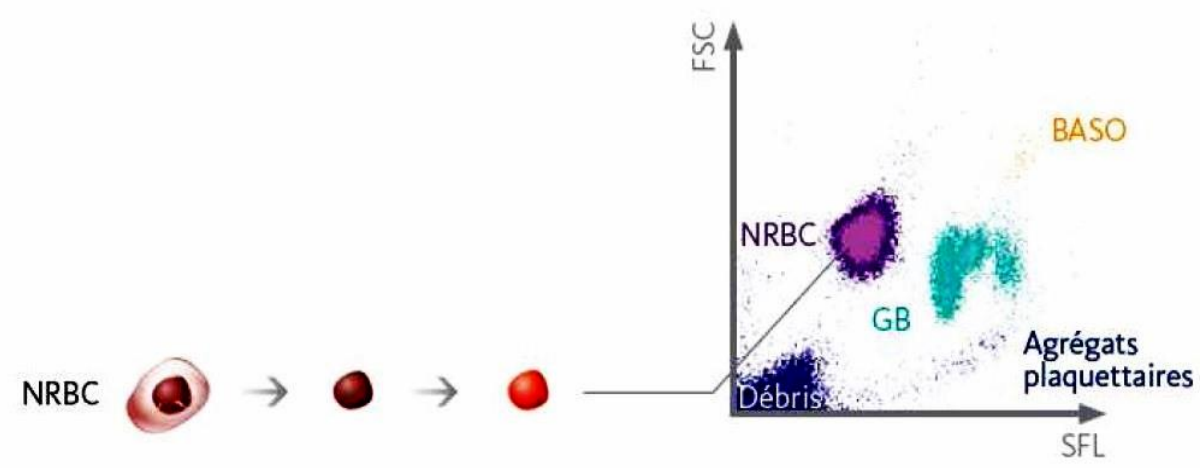


Figure 13 : Le scattergramme du canal WNR montrant les zones de globules blancs (GB), de basophiles (BASO), d'érythroblastes (NRBC) et des amas de plaquettes (agrégat) (document Sysmex « XN Présentation et Principes »).[18]

ii. La formule leucocytaire par le canal WDF :

La détermination de la formule leucocytaire complète par le canal WDF est basée sur le principe de mesure optique associant la technique de diffraction lumineuse et la fluorocytometrie en flux.

Un agent tensio-actif (Lysercell WDF) induit la lyse des érythrocytes. Parallèlement, les membranes cellulaires des leucocytes sont perforées et donc perméabilisées. Les pores ultramicroscopiques permettent au marqueur de fluorescence (Fluorocell WDF) de migrer et de se lier aux acides nucléiques. L'échantillon est transporté par la suite dans la chambre de flux puis illuminé par un faisceau laser semi-conducteur, capable de séparer les cellules au moyen de trois signaux différents, permettant une analyse tridimensionnelle avec une très bonne détection des cellules anormales circulantes, déclenchant ainsi des alarmes qualitatives avec une sensibilité accrue pour les blastes et les lymphocytes anormaux. Ces 3 signaux sont (figure 14) :

- une diffusion frontale de la lumière ou la lumière diffractée à petit angle (FSC : forward scattered light) fournissant des informations sur la taille des cellules,
- une diffusion latérale de la lumière ou la lumière diffractée à grand angle (SSC : side scattered light), fournissant des informations sur la structure cellulaire interne,
- une fluorescence latérale de la lumière (SFL : side fluorescent light), dont l'intensité fournit des informations sur le contenu nucléique de la cellule.

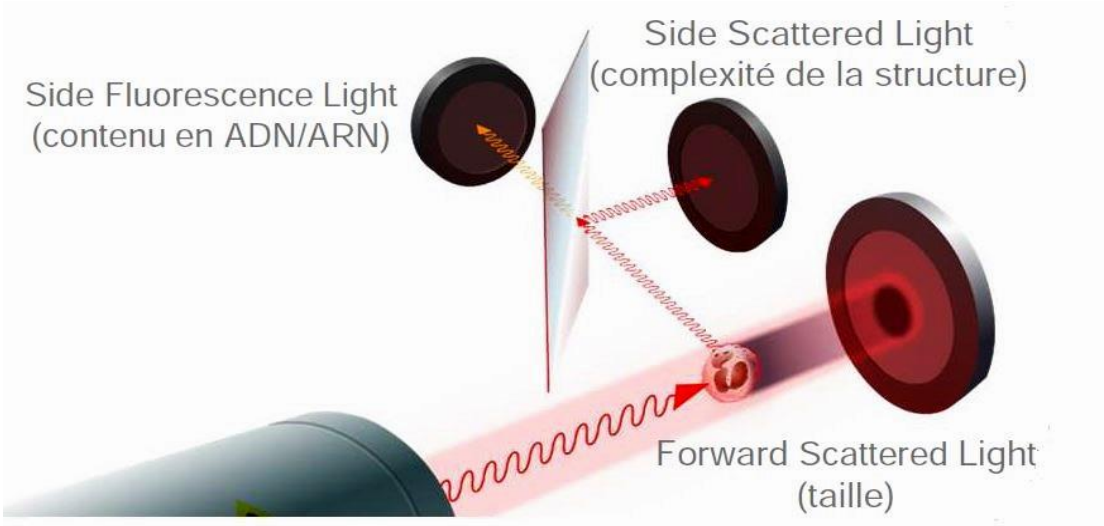


Figure 14 : Technique de diffraction lumineuse associée à la fluorocytometrie en flux. (Document Sysmex « XN Présentation et Principes »).[18]

Les cellules aux propriétés physiques et chimiques similaires forment un agrégat dans le scattergramme de distribution (figure 15). Le canal WDF réalise un deuxième comptage des leucocytes et fournit alors une formule leucocytaire à huit paramètres qui sont :

- les polynucléaires neutrophiles (PNN),
- les polynucléaires éosinophiles,
- les polynucléaires basophiles,
- les lymphocytes,
- les monocytes,
- les granulocytes immatures (IG) correspondant à la myélemie sans distinction de catégories cellulaires regroupant les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes,
- HFLC (High Fluorescence Cells) correspondent aux lymphocytes à haute fluorescence notamment les plasmocytes secrétant d'anticorps,
- Neutro-SSC : indice de granularité des polynucléaires neutrophiles. Aide au diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) et les syndromes myélodysplasiques (SMD).

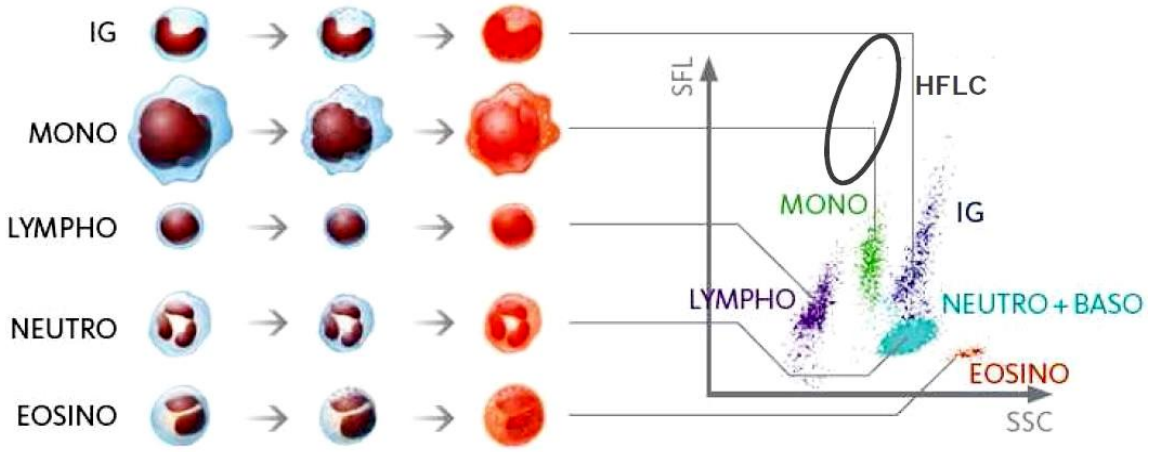


Figure 15 : Le scattergramme du canal WDF avec la distribution des populations cellulaires (Document Sysmex « XN Présentation et Principes »).[18]

c) Les différentes alarmes :

En plus d'une NFS complète fournie par l'automate XN-10, des alarmes peuvent être générées par celui-ci. Ce sont des messages qui alertent l'utilisateur sur la présence éventuelle d'anomalies quantitatives ou qualitatives, en rapport avec la numération globulaire (NG) ou la formule sanguine (FS). Ces alarmes qu'elles soient quantitatives ou qualitatives, nécessitent le plus souvent des vérifications techniques, voir un recours à l'examen du frottis sanguin au microscope optique, avant de procéder à la validation technique da la NFS.

Les vérifications techniques consistent le plus souvent, à contrôler la bonne identité du patient (en cas de résultats discordants avec les antériorités ou le reste de la biologie…), à vérifier la qualité du prélèvement (délai, quantité, présence de coagulum, aspect du plasma, etc…), à s'assurer du bon fonctionnement de l'automate.

Cependant, le recourt à l'examen du frottis sanguin au microscope optique est le plus souvent recommandé en cas d'alarmes. C'est une étape indispensable du processus analytique avant la validation technique du résultat. Son indication dépend, non seulement de la présence d'alarme quantitative ou qualitative, mais aussi de l'ensemble du résultat de la NFS fourni par l'automate, et dans un contexte particulier (âge, le service prescripteur, antériorité, etc…). L'examen du frottis sanguin permet de confirmer ou d'infirmer une anomalie quantitative (exemple : plaquettes sous évaluées en cas d'amas, ou surévaluées en

cas de débris cellulaires), ou de rechercher des cellules anormales en cas d'alarmes qualitatives (exemple : rechercher de blaste en cas d'alarme « Lymphocytes anormaux ? », « Blastes ?», dans un contexte).

i. Les alarmes quantitatives :

Ces alarmes peuvent concerner tous les paramètres de la NFS (NG et FS). Elles sont déclenchées si le taux d'un paramètre donné se situe en dehors des valeurs de référence (anémie, thrombopénie, hyperleucocytose, etc...). Ces valeurs sont paramétrables sur l'automate par l'utilisateur référent. Les tableaux 2 et 3 illustrent les indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire (**tableau 2**) et de la FS (**tableau 3**), selon les propositions du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC).[19]

Leucocytes (G/l)	Adulte/Enfant	Patients atteints d'hémopathie maligne, en sortie d'aplasie (leucocytes ≥ 1,0 G/l sur le résultat actuel et < 1,0 sur le résultat précédent)
Plaquettes (G/l)	Adulte	< 100, en situation initiale > 450, en situation initiale
	Enfant	< 150, en situation initiale
Volume plaquettaire moyen (fl)	Adulte/Enfant	< 7, en situation initiale avec plaquettes < 150 G/l > valeur limite supérieure (fournisseur), en situation initiale avec plaquettes < 150 G/l
Hémoglobine (g/dl)	Adulte	< 8, en situation initiale < 10, en situation initiale avec réticulocytes > 120 G/l
	Enfant	< 9, en situation initiale
Volume globulaire moyen (fl)	Adulte	> 105, en situation initiale < 75, en situation initiale
	Enfant	> 85 (6 mois à 2 ans), > 95 (2 à 15 ans), en situation initiale < 70 (6 mois à 2 ans), < 72 (2 à 6 ans), < 75 (au-delà de 6 ans), en situation initiale
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dl)	Adulte/Enfant	> limite normale supérieure, en absence d'interférence
Index de distribution volumétrique des globules rouges (CV %)	Adulte/Enfant	> 22 %, en situation initiale, hors contexte connu de transfusion de globules rouges
Réticulocytes (G/l)	Adulte/Enfant	> 120, en situation initiale

Tableau 2: Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire. D'après F. GENEVIÈVE et al [19].

Résultat précédent	Adulte/Enfant	Présence de cellules malignes sur le résultat précédent Présence d'érythroblastes sur le résultat précédent (si non énumérés automatiquement par l'analyseur)
Érythroblastes	Adulte/Enfant	Présence d'érythroblastes détectée par l'analyseur, en situation initiale ou à chaque fois si non énumérés automatiquement par l'analyseur
Polynucléaires neutrophiles	Adulte/Enfant	< 1,5 G/l, en situation initiale
Polynucléaires éosinophiles	Adulte/Enfant	> 1,5 G/l, en situation initiale
Polynucléaires basophiles	Adulte/Enfant	> 0,3 G/l et/ou > 3 %, en situation initiale
Lymphocytes	Adulte	> 5 G/l, en situation initiale
	Enfant	> 9 G/l (2 à 6 ans), > 6 G/l (6 à 12 ans), > 4 G/l (> 12 ans), en situation initiale
Monocytes	Adulte/Enfant	> 1,5 G/l, en situation initiale > 1,5 G/l, persistant plus de 30 jours > seuil à définir par chaque laboratoire en cas de monocytose survenant en cours d'hospitalisation

Tableau 3: Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la formule leucocytaire. D'après F. GENEVIÈVE et al [19].

ii. Les alarmes qualitatives :

Ces alarmes sont générées sous forme de messages accompagnés de graphes (courbe ou scattergramme de distribution). Elles sont paramétrables uniquement par le fournisseur. Leur maitrise indispensable, permet d'identifier la nature de l'anomalie qui concernera la NG ou la FS. Cela signifie, dans certains cas, un problème de discrimination entre deux populations ou la présence éventuelle de cellules potentiellement anormales que l'automate serait incapable d'identifier ou de quantifier avec précision. Devant ces alarmes, les données rendues par l'automate doivent être interprétées avec vigilance, afin d'éviter la validation d'un résultat erroné ou passer à côté d'une pathologie grave (bien que rare).

Parmi ces alarmes nous pouvons citer ceux en rapport avec la FS, en particulier les alarmes dites « de suspicion ». Elles sont identifiables sur le scattergramme de distribution du canal WDF (qui fournit la FS). Un contrôle de la FS par une lecture microscopique du frottis sanguin (selon les règles d'expertises) est souvent nécessaire avant la validation de la FS.

- **Alarme « Déviation gauche ? » :**

Elle correspond à l'apparition de cellules identifiées juste au dessus de la zone des PNN, ou un déplacement du nuage des PNN. Cela signifie la présence probable de PNN en segmentation, ou des PNN hypo-segmentés (**figure 16**) [20]. Ces derniers peuvent êtres confondus avec les granulocytes immatures (myélemie). La lecture microscopique du frottis sanguin permettra de lever la confusion.

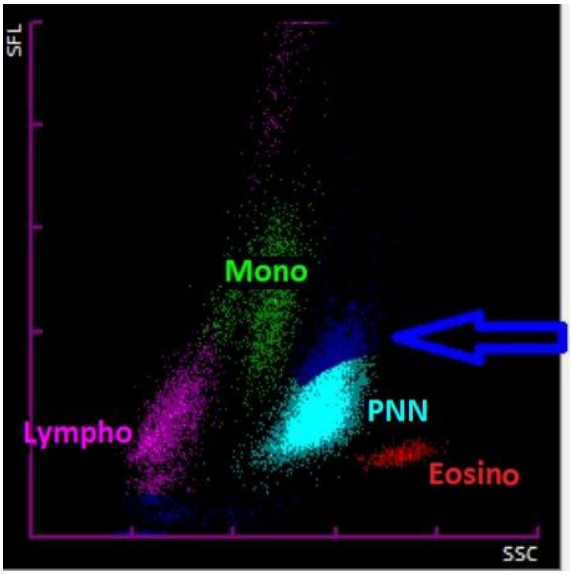


Figure 16: scattergramme du canal WDF : le nuage bleu foncé correspond aux PNN hyposegmentés. (N Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013 / J.Hornain)[20]

- **Alarme « Blasts/Abn Lympho ?» :**

Elle correspond à l'apparition de cellules à fluorescence très élevée au dessus du nuage des monocytes. Ces cellules peuvent êtres d'origine tumorale et correspondre notamment à des blastes (**figure 17**).[20]

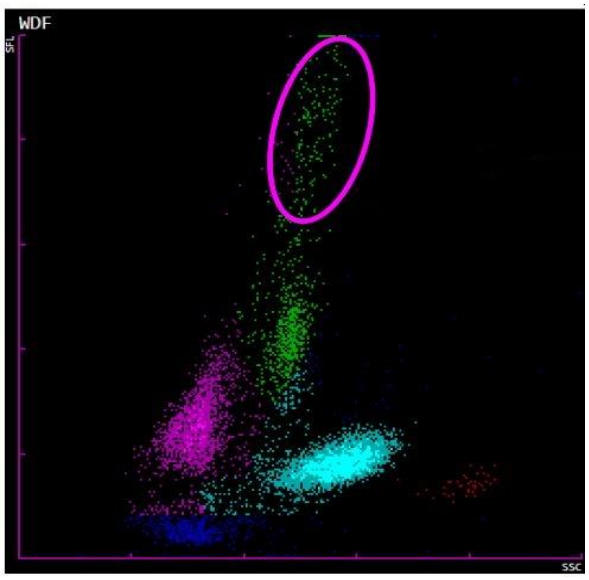


Figure 17: scattergramme du canal WDF : avec un nuage de cellules suspectes au dessus des monocytes. (N Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013 / J. Hornain) [20]

- **Alarme « Lympho Atyp ? » ou lymphocyte atypique :**

Elle signale l'apparition de cellules à fluorescence très élevée au dessus du nuage des lymphocytes (**figure 18**). Cette fluorescence reflète une teneur élevée en ARN. Ces cellules peuvent correspondre à des lymphocytes activés (hyperbasophiles) d'origine réactionnelle (cellules mononucléées et/ou plasmocytes). Le paramètre HFLC permet de les quantifier au même titre que les autres paramètres de la FS. Cependant il n'est pas rendu en pratique courante. Le contrôle de la FS sur frottis sanguin reste actuellement la règle.

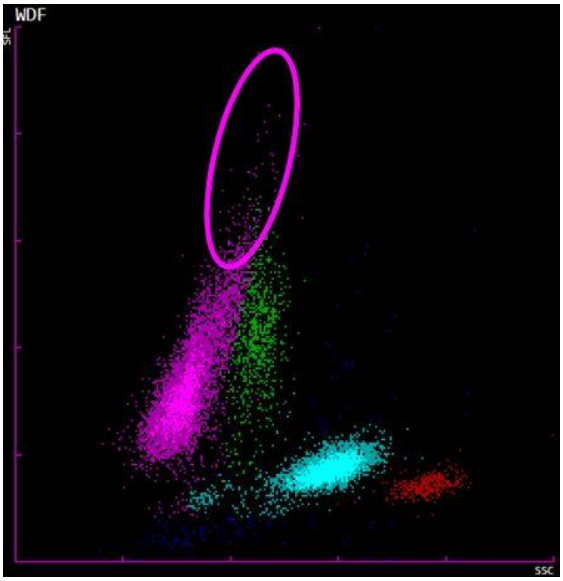


Figure 18: scattergramme du canal WDF : avec un nuage de cellules au dessus des lymphocytes quantifiées par le paramètre HFLC. (N Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013 / J.Hornain) [20]

d) Les paramètres de recherche :

En plus des paramètres classiques de la NFS, les automates de dernière génération notamment le XN-10, fournissent d'autres paramètres dits de recherche. Ces paramètres, surnommés aussi « paramètres cliniques avancés », ont été développés par les fournisseurs afin de répondre aux besoins de la recherche clinico-biologique, mais ne sont pas encore utilisés en routine. En pratique, ces paramètres sont disponibles pour toutes les lignées cellulaires (globules rouges, plaquettes et globules blancs).

Ainsi, concernant les globules rouges, les populations microcytaires et macrocytaires peuvent être déterminées grâce aux paramètres de recherche (MicroR) et (MacroR). Ils sont fournis en pourcentages des globules rouges. Dans certaines maladies (par exemple pour les SMD), les patients peuvent avoir une valeur de VGM (volume globulaire moyen) qui est dans

la plage de référence malgré une augmentation des MicroR ou MacroR. Les paramètres MicroR et MacroR sont donc utiles pour affiner les causes possibles de l'anémie [21]. D'autres paramètres érythrocytaires sont intéressants, notamment le paramètre RET-HE (reticulocyte haemoglobin equivalent) qui reflète la concentration en hémoglobine des réticulocytes et renseigne sur la biodisponibilité du fer. Leur intérêt est démontré dans le diagnostic et le contrôle de l'anémie ferriprive quand les marqueurs biochimiques (fer, ferritine) sont perturbés ou difficilement interprétable en raison d'une inflammation chronique.

Le paramètre plaquettaire IPF (fraction des plaquettes immatures) permet de mesurer les plaquettes réticulées (contenant de l'ARN). Leur mesure donne une évaluation de la production de plaquettes par la moelle osseuse à partir d'un échantillon de sang périphérique. Il possède une utilité clinique dans le diagnostic et le traitement de la thrombocytopénie (niveaux élevés d'IPF corrélés avec une augmentation de la destruction des plaquettes périphériques). Ceci est particulièrement utile pour différencier les thrombopénies périphériques des thrombopénies d'origine centrale. Dans ce dernier cas, la valeur du %IPF serait faible [22].

Concernant la lignée leucocytaire, le paramètre NEUTRO-SSC (NEUT-X et NEUTY sur l'ancienne génération le XE) mesure l'indice de granularité des neutrophiles qui dépend du contenu en acides nucléiques (**figure 19**). En effet, les neutrophiles hyper-granulés ont une valeur élevée de NEUTRO-SSC tandis qu'une valeur faible est indicative d'une hypogranularité. La détection des neutrophiles hypo-granulés est d'une grande valeur diagnostique dans la différenciation entre SMD et les causes réactives bénignes et héréditaires de neutrophilie [23]. D'autres paramètres, dits d'inflammation, sont également disponible sur l'automate XN. Il s'agit des paramètres HFLC, RE-LYMP (lymphocytes réactifs) et AS-LYMP (lymphocytes synthétisant d'anticorps) (**figure 18 et 20**). Ils permettent une évaluation quantitative des lymphocytes activés et fournissent des informations supplémentaires sur l'activation cellulaire et la réponse immunitaire. Cela peut aider les cliniciens à distinguer les inflammations causées par les infections et celles qui ne le sont pas, et permet donc d'orienter la prise en charge du patient (**tableau 4**) [24].

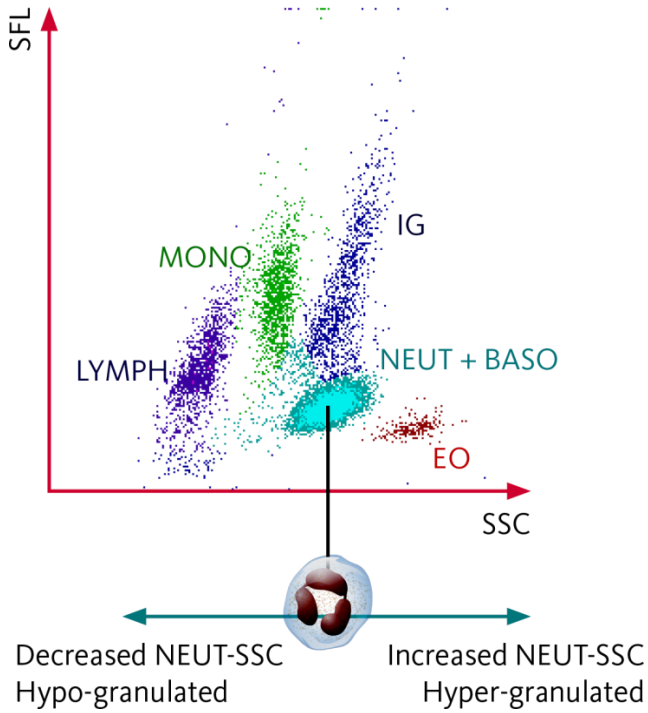


Figure 19 : La diffusion latérale de la lumière (SSC) du canal WDF fournit des informations sur la structure interne des cellules représentant leur granularité. (Académie Sysmex) [23]

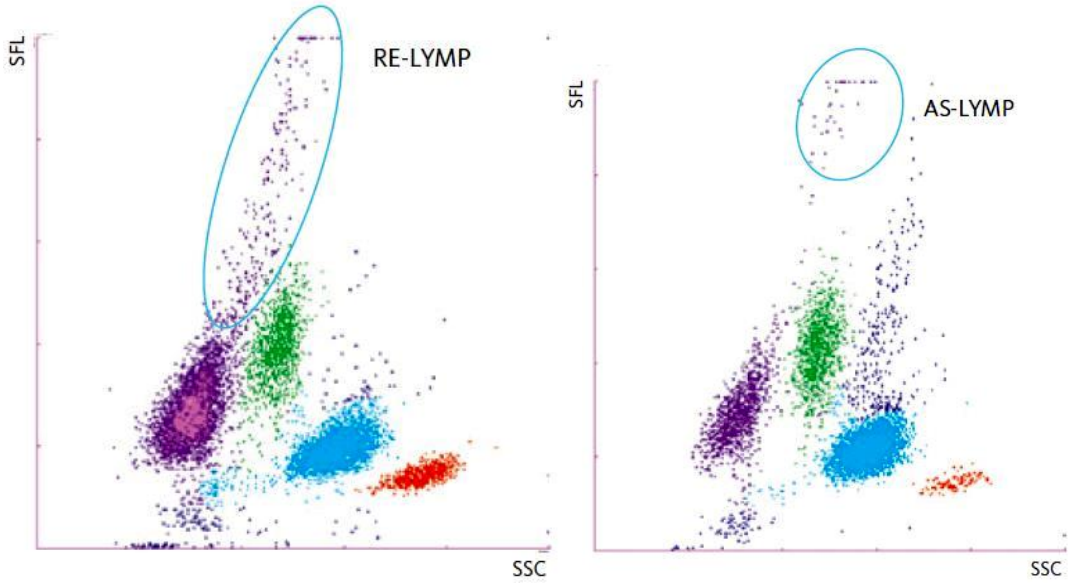


Figure 20: Scattergramme du canal WDF montrant un nuage de cellules au dessus des lymphocytes quantifiés en RE-LYMP (lymphocytes réactifs) et AS-LYMP (plasmocytes synthétisant d'anticorps).[24]

Cell populations and / or their characteristics	Description	Immunological interpretation	Parameter	Unit	Reference interval
Total reactive lymphocytes	This includes activated B and T lymphocytes recognised by an increased fluorescence intensity compared to that of common lymphocytes.	Increased in innate and adaptive cell-mediated immune response	RE-LYMP# RE-LYMP%[i]	Cells/L %	0 – 0.5 x 10^9/L 0 – 5%
Antibody-synthesizing lymphocytes[ii]	These are exclusively activated B lymphocytes recognised by the markedly increased fluo-rescence intensity compared to that of common lymphocytes.	Increased in innate and adaptive humoral immune response	AS-LYMP# AS-LYMP%[i]	Cells/L %	0 Cells/L 0%

Tableau 4 : paramètres d'inflammation hématologique avec leur interprétation immunologique, leurs unités et leurs intervalles de référence [24].

e) Le paramètre HFLC :

i. Définition :

Le paramètre HFLC est un paramètre de recherche quantifié par le canal WDF. Il indique la présence de cellules à haute fluorescence, reflétant une teneur élevée en ARN, correspondant à des cellules activées (lymphocytes B sécrétant des anticorps ou plasmocytes) [25]. Ces cellules à haute fluorescence forment un agrégat dans le scattergramme de distribution du canal WDF au niveau de la zone utilisée pour le marquage des lymphocytes atypiques (**figure 18 et 21**).

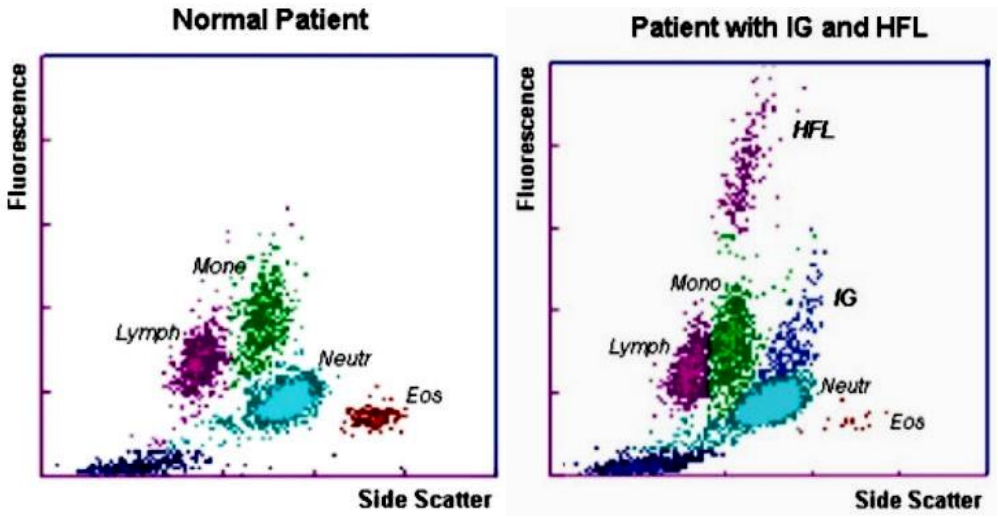


Figure 21: scattergramme du canal WDF montrant à droite un nuage de cellules au dessus des lymphocytes correspondant aux HFLC [5].

ii. Intervalles de référence :

Les valeurs de référence du HFLC fournies par le fournisseur (Sysmex) ont été établies suite à une étude portant sur l'analyse sanguine de 309 volontaires sains âgés de 16 à 63 ans (176 femmes et 133 hommes) [26]. Plusieurs paramètres de recherche ont été évalués dans cette étude en utilisant un automate de l'ancienne génération (XE-2100 et 5000). Ce dernier possède un canal WDF se basant sur le même principe de mesure que le XN. L'intervalle de référence obtenu pour le HFLC était de 0 - 0.4 % correspondant à une valeur absolue de 0 – 0.03 giga/L (chez homme et femme).

iii. Intérêts:

En cas de maladie infectieuse, la concentration sanguine en cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes) n'est pas toujours élevée et par conséquent, leur présence dans le sang périphérique reflète une réponse précoce du système immunitaire [4].

Les paramètres d'inflammation ont été développés pour offrir aux laboratoires de nouvelles possibilités de dépistage rapide et fiable d'un syndrome inflammatoire. Ces paramètres font l'objet de plusieurs études d'évaluation dans le but de valider leur utilisation en routine.

Une étude de comparabilité évaluant le paramètre HFLC (rendu par le XE), l'immunophénotypage par cytométrie en flux et la lecture microscopique du frottis sanguin, a permis de conclure que les HFLC étaient identifiés et quantifiés en tant que cellules synthétisant des anticorps ou des plasmocytes. Un taux élevé d'HFLC indiquerait donc une réponse immunitaire à une maladie infectieuse [5].

L'étude du paramètre HFLC, a également démontré son intérêt dans la distinction entre l'infection par le virus de la dengue et d'autres maladies thrombocytopéniques fébriles telles que la leptospirose et la fièvre entérique [27]. En effet, ces infections partagent de nombreuses caractéristiques cliniques rendant le diagnostic difficile et les tests de diagnostic rapide souffrent d'une sensibilité limitée dans les régions fortement endémiques.

Par ailleurs, sa fiabilité a été évaluée dans la détection des cellules plasmocytaires sanguines circulantes en comparaison avec la technique d'immunophénotypage par cytométrie en flux [28]. Les résultats montraient une bonne corrélation entre les deux

techniques mais avec une sensibilité et spécificité seulement modérées à bonnes (Se= 88,9%, Sp= 87,8%).

En fin, le pourcentage d'HFLC pourrait être un bon marqueur, à la fois rapide et simple, de la septicémie chez les patients atteints de tumeurs. En effet, le pourcentage d'HFLC, la CRP (protéine C-réactive) et la PCT (procalcitonine), ont été évalués dans le diagnostic des septicémies chez 130 patients atteints de tumeurs (60 patients septicémiques et 70 non-septicémiques) et 80 témoins sains. Le pourcentage d'HFLC et la valeur de la CRP étaient significativement plus élevées dans le groupe septicémie avec une sensibilité 71,7% et une spécificité 58,7% pour le HFLC et une sensibilité 96,7% et une spécificité 82,0% pour la CRP [29].

iv. Limites :

Il existe peu d'études évaluant l'utilité clinique du paramètre HFLC dans le diagnostic des maladies d'origine infectieuse. A l'heure actuelle, les études menées démontrent que l'utilité du paramètre HFLC dans le dépistage des lymphocytes activés synthétisant les anticorps (plasmocytes), mais la quantification proprement dite doit cependant être confirmée par la lecture microscopique du frottis sanguin ou par immunophénotypage par cytométrie en flux [5]. De plus, une étude a démontré que le taux d'HFLC pourrait inclure les cellules plasmocytaires mais également d'autres cellules lymphocytaires avec une teneur élevée en ARN [28]. En effet, Linssen et al ont rapporté une corrélation entre les lymphocytes T CD4+ et le taux d'HFLC, ce qui suggère qu'à côté des plasmocytes, la zone HFLC contient également une partie des lymphocytes T [5].

B. Règles d'expertise

La validation biologique des résultats de la NFS impose la mise en place des règles dites d'expertise. Ce sont des règles de vérifications techniques ainsi que des critères conduisant à l'examen du frottis sanguin. Elles sont indispensables lorsque les données fournies par l'automate sont qualitativement ou quantitativement anormales ou demandent une confirmation. Au laboratoire du CHU de Rouen, les règles d'expertises sont rédigées sous forme de mode opératoire [30] [31] [32], et mises à jour régulièrement selon principalement les recommandations du GFHC et les préconisations du fournisseur d'automate (Sysmex)[33].

La mise en place de ces règles est une démarche qui s'intègre dans l'application de la norme ISO 15189 à la qualité en biologie médicale imposée aux laboratoires.

La plupart des critères conduisent *in fine* à l'examen du frottis sanguin. En effet certaines anomalies de la NFS, en particulier de la FS, requièrent une analyse cytomorphologique du frottis sanguin au microscope optique (**tableau 5**). Des modalités de validation de la formule sanguine après lecture au microscope ont été ainsi définies (**figure 22**). Ce contrôle microscopique est initialement entrepris par le technicien au poste de formule, cela aboutit dans certains cas à la validation technique de la FS. Cependant, l'œil du biologiste est régulièrement sollicité en cas de difficultés ou systématiquement dans les cas de diagnostic, de suivi des pathologies onco-hématologiques et dans certaines anomalies de la NFS (**tableau 6**) [30].

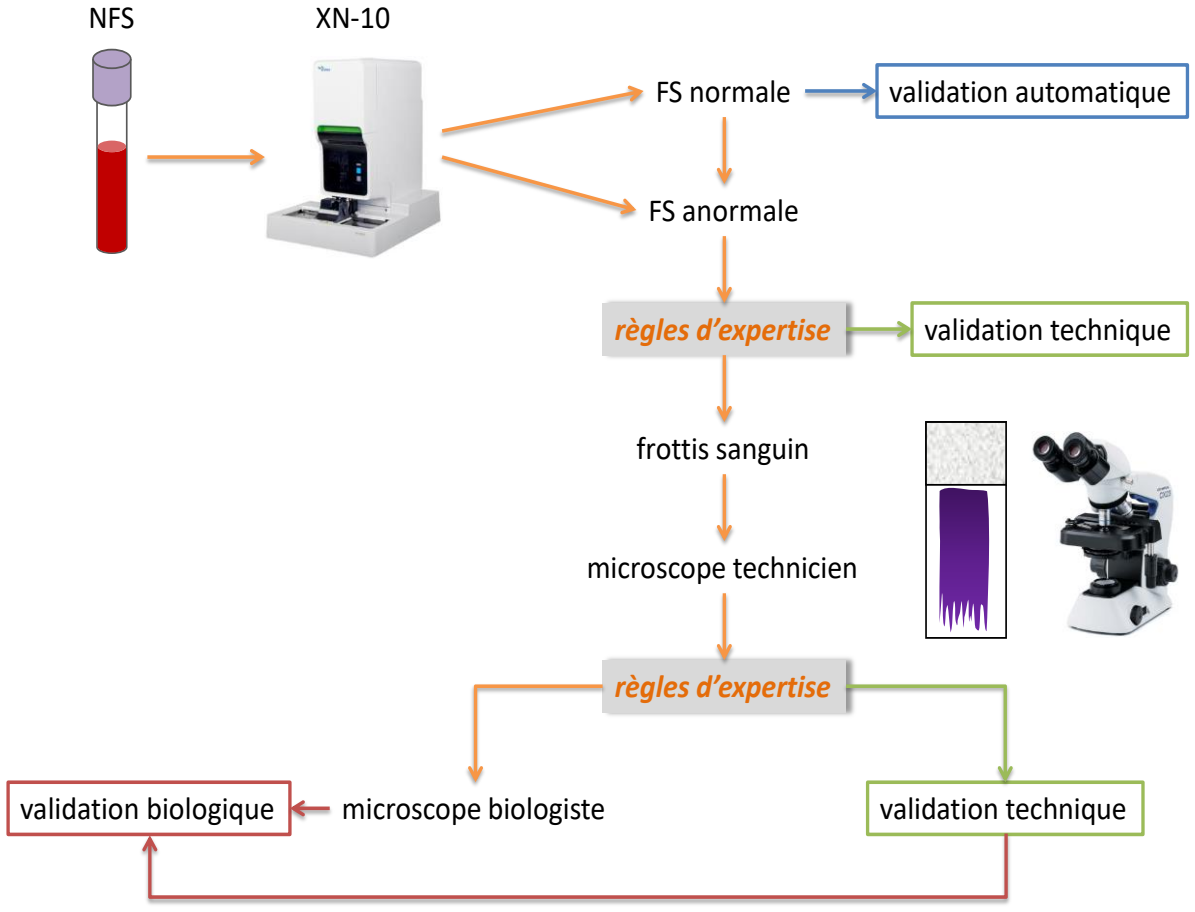


Figure 22: Modalités de validation de la formule sanguine après lecture au microscope

Lames données au Biologiste ou interne niveau 2 pour contrôle de FS
- Découverte ou rechute de leucémie - Présence de blastes ou cellules anormales - Neutropénie non connue et sans traitement (chimio, immunosuppresseurs…) : * PNN < 1,5 G/L avec une autre alarme associée * PNN < 1 G/L sans autre alarme associée - Eosinophilie > 5 G/L - Basophilie > 0,5 G/L ou 5% - Lymphocytose non connue (> 5 G/L) - Monocytose > 3 G/L - Cellules mononucléées et/ou plasmocytaires > 5% - Doute sur un type de cellule - Pancytopénie non connue sans chimio, avec ou sans cellules anormales.

Tableau 5: Règles de revue microscopique des FS par les biologistes du CHU de Rouen [32]

GB / FORMULE					
GB	< 3 G/L ou > 30G/L	et NGP		+ FS	
GB	<3 G/L et/ou Hb <11 g/dL	et/ou thrombop.	Lame		Faire formule
GB	< 0,8 G/L	Onco péd		Répondre IE sur FS	
GB	< 0,8 G/L	Autre service	Lame	1ère fois	Recherche cellules anormales
GB anormal scatter	Graphe WNR ou WDF incorrect	… à la FS, ≠ baso WNR/WDF		XN switche GB WDF si besoin = GB fond orange	Faire formule si graphe incorrect
Si NGP Erythoblastes (NRBC)	Et GB + 100% ou - 50% > 10%	et NGP		+ FS + FS systématiquement	**NRBC > 600% ou …. ⇒ ne pas valider GB et faire FS sur lame**
PN #	< 1,5G/L **+ alarme** ou < 1G/L **sans alarme**		Lame	1ère fois	Faire formule
EOS ##	> 1,5 G/L ou f (âge)	1ère fois	Lame		Faire formule
Poly Baso	> 0,2 G/L	Chaque fois	Lame		Faire formule
Lympho #	> 4 G/L ou f (âge)	1ère fois	Lame		Faire formule
Lympho #	> 5 G/L	1ère fois	Lame		Faire formule
Mono ##	> 1,5G/L et Ig >2%	1ère fois	Lame		Faire formule
Mono ##	> 2	1ère fois	Lame		Faire formule
Lympho atypiques		Chaque fois	Lame		Faire formule
IG % ##	> 4% et ≤ 10%	1ère fois	Lame		Faire formule
IG %	> 10 %	Chaque fois	Lame		Faire formule
PN ou Lympho ou Mono	< 0,1 G/L	Chaque fois	Lame		Faire formule
AbnLy / Lymphobl ?		Chaque fois	Lame		Faire formule
PN hyposegmentés		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 6: résumé des règles de vérification de la formule leucocytaire au CHU de Rouen [31]

BUTS DE L'ETUDE :

Les automates à numération de dernière génération utilisent conjointement plusieurs technologies (cytométrie en flux par diffraction laser, fluorescence …) et leur perfectionnement ne cesse de progresser. En effet, les progrès apportés sur les automates d'hématologie, permettent d'obtenir des résultats d'hémogramme de plus en plus précis avec une grande fiabilité, et cela dans des délais assez courts. La formule leucocytaire, ainsi obtenue, est plus élargie. Cela constitue une aide considérable dans l'interprétation des résultats et le choix des autres explorations.

Néanmoins, l'examen du frottis sanguin au microscope optique reste indispensable en cas d'anomalies quantitatives ou qualitatives sur la NFS. Cela a pour conséquence un engagement considérable des ressources en matière de personnels, de temps et de coût. Pour limiter le recours à l'examen du frottis sanguin, des paramètres de recherches ont été développés par les constructeurs d'automates. Ils font l'objet de plusieurs études de fiabilité et d'utilité clinico-biologique, dans le but de valider leur utilisation au quotidien.

Nous utilisons au CHU de Rouen l'automate à numération de dernière génération le XN-10 de Sysmex. Ce dernier dispose d'un paramètre appelé HFLC qui est destiné à identifier et quantifier les lymphocytes activés notamment les cellules plasmocytaires sécrétrices d'anticorps. Ces cellules sont généralement absentes de la circulation sanguine et leur présence indique dans certains cas une réaction immunitaire faisant suite à l'introduction d'un pathogène. A l'heure actuelle, l'identification et la quantification des lymphocytes activés se font par examen du frottis sanguin au microscope optique selon les règles d'expertises. Le paramètre HFLC pourrait donc être un bon marqueur rapide dans l'orientation diagnostique en cas de syndrome inflammatoire limitant la prescription d'autres examens inutiles et plus onéreux.

Nous souhaitons à travers cette étude, évaluer la performance du paramètre HFLC dans l'identification et la quantification des plasmocytes et également des cellules mononucléées hyperbasophiles sur l'automate XN-10. Nous avons donc comparé ce paramètre avec la méthode manuelle qui consiste à l'examen du frottis sanguin au microscope optique.

MATERIELS ET METHODES

Les performances du paramètre HFLC dans l'identification et la quantification des cellules mononucléées et des plasmocytes sur l'automate XN-10, au CHU de Rouen, ont été évaluées à partir des échantillons sanguins prélevés des patients de routine provenant de différents services. Ces prélèvement ont été effectués sur tube EDTA dont l'indication était la réalisation d'une NFS.

I. Numération formule sanguine :

La NFS a été réalisée par l'automate XN-10 et nous avons obtenu, pour chaque échantillon, une numération globulaire ainsi qu'une formule sanguine complète selon les principes de mesure décrits précédemment. Les anomalies quantitatives de la NFS sont déterminées selon les normes issues de plusieurs publications et qui constituent les valeurs de références du laboratoire en fonction de l'âge.[34]

II. Paramètre HFLC :

En plus des paramètres classiques de la FS (PNN, éosinophiles, basophiles, lymphocytes (Ly), monocytes) le paramètre HFLC a également été rendu par l'automate en pourcentage des globules blancs.

III. Formule sanguine par microscopie optique :

Pour chaque échantillon, un frottis sanguin, avec une coloration au MGG, a été réalisé, soit automatiquement par le SP-10® (étaleur-colorateur de lames de la chaîne automatisée Sysmex®), soit manuellement selon un mode opératoire bien défini.

Ensuite, un examen du frottis sanguin au microscope optique a été réalisé afin de contrôler la formule sanguine suite à l'existence d'anomalies quantitatives et/ou qualitatives et selon les règles d'expertises établies au laboratoire. Ces règles ont été appliquées pour la validation technique puis biologique des résultats.

IV. Quantification des lymphocytes activés au microscope optique :

Le contrôle microscopique de la FS a été réalisé par trois observateurs en trois temps successifs avec une quantification des cellules mononucléées et/ou cellules plasmocytaires (**figure 23**) :

- Une 1ère lecture effectuée par des techniciens habilités au poste de formule,
- Une 2ème lecture effectuée par un interne niveau 2 (Mustapha RAIS : MRA),
- Une 3ème lecture effectuée par un biologiste expert (Dr Gérard BUCHONNET : GB).

V. Patients

Des échantillons sanguins issus de 180 patients ont été inclus prospectivement dans cette étude pendant un période allant de décembre 2017 au mai 2018. Ces patients proviennent de différents services du CHU de Rouen.

L'inclusion des échantillons reposait donc sur les critères suivants :

- une NFS réalisée par l'automate XN-10 avec :
  - au moins une alarme qualitative de type « lymphocyte atypique »,
  - un paramètre HFLC rendu en pourcentage des globules blancs.
- une formule sanguine réalisée au microscope optique par les trois observateurs

(Techniciens, interne puis biologiste) selon les règles d'expertises, incluant une quantification des cellules mononucléées et/ou plasmocytaires rendue en pourcentage des globules blancs.

VI. Evaluation du paramètre HFLC :

Nous avons procéder par la suite à l'évaluation du paramètre HFLC. Pour cela nous avons réalisé une étude de l'accord entre le paramètre HFLC et le taux de cellules mononucléées et/ou cellules plasmocytaires quantifiées par chaque observateur au microscope optique. Nous avons également étudié l'accord entre les trois observateurs dans la quantification des lymphocytes activés (figure 23).

VII. Analyses statistiques :

L'ensemble des tests statistiques a été réalisé avec le logiciel Microsoft Excel 2010® (Microsoft, Redmond, WA). L'accord inter-observateur a été évalué par une étude de corrélation par régression linéaire avec le calcul d'un coefficient de corrélation. La variabilité inter-observateur a également été évaluée par la méthode graphique de Bland et Altman. Avec cette même méthode nous avons évalué l'accord entre le paramètre HFLC et les résultats observateurs.

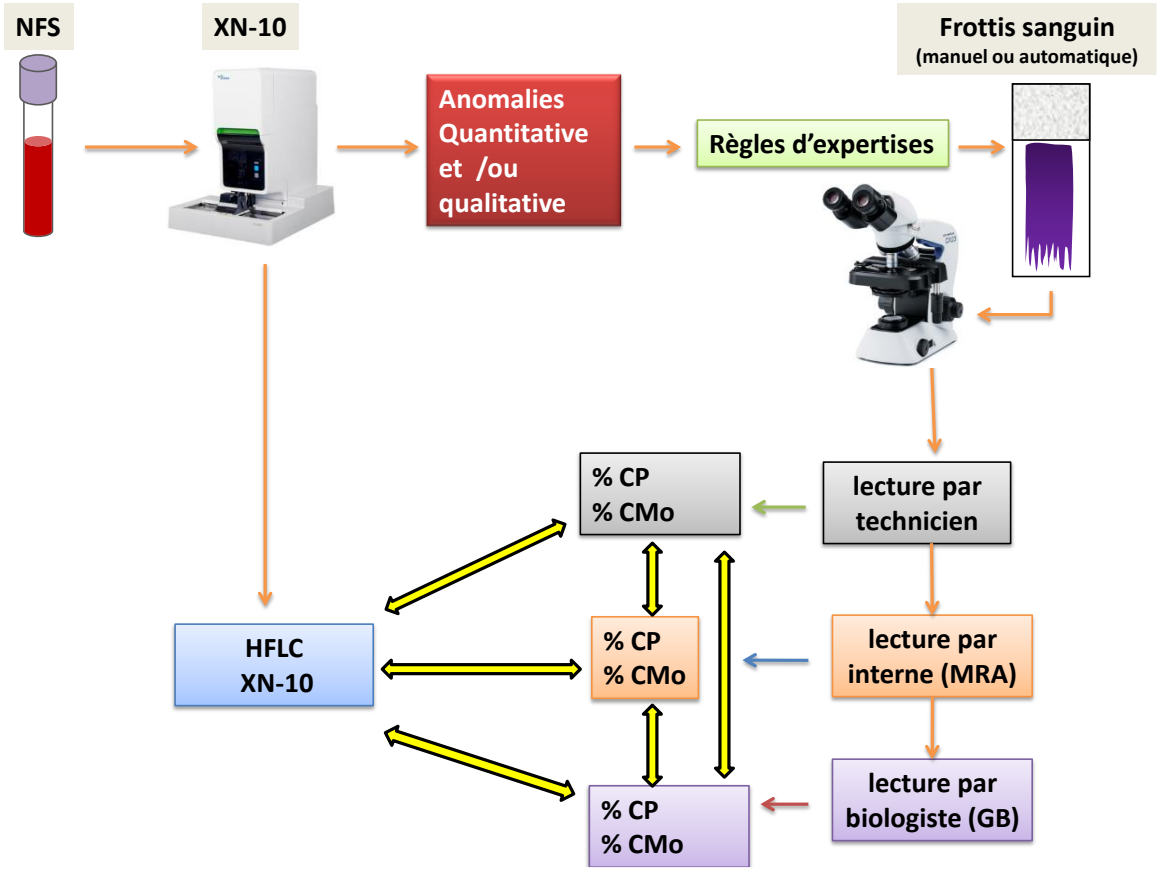


Figure 23: Schéma de l'étude avec l'ensemble des études de corrélation menées.
- Les flèches doubles sens indiquent les études de corrélation menées.
- % CP : pourcentage des cellules plasmocytaires.
- % CMo : pourcentage des cellules mononucléées.

RESULTATS

I. Données relatives aux patients :

La population d'étude est composée de 180 patients. Tous ont bénéficiés d'une NFS au CHU de Rouen réalisée par l'automate XN-10 dont les résultats incluent le paramètre HFLC en pourcentage des globules blancs. Un examen du frottis sanguin au microscope optique par les 3 observateurs a permis d'obtenir une FS incluant une quantification des lymphocytes activés (cellules mononucléées et/ou plasmocytaires) en pourcentages des globules.

Cette population est composée de 111 adultes (61%) âgés de 16 à 96 ans, et 69 enfants (39%) âgés de 3 mois à 15 ans. La médiane et la moyenne d'âge sont respectivement de 32 et 34,6. Sur les 180 patients inclus, on dénombre 102 individus de sexe masculin (57%) et 78 de sexe féminin (43%). Les données relatives aux patients sont résumées dans le **tableau 7**.

Patients	**Total**	**Enfants**			**Adultes**			
Tranches d'âge (an)	**0-96**	**0-3**	**4-6**	**7-15**	**16-30**	**31-50**	**51-70**	**> 70**
Effectifs (%)	180 (100)	43 (24)	16 (9)	10 (6)	20 (11)	29 (16)	35 (19)	27 (15)
Médiane d'âge	32	3			55			
Moyenne d'âge	34,36	3,68			53,43			
Age minimum	0	0			16			
Age maximum	96	15			96			

Tableau 7: Données descriptives de la population totale d'étude

II. Données de la NFS du XN-10 :

A. Anomalies quantitatives

Pour les 180 patients nous avons obtenus un hémogramme complet avec une numération globulaire et une formule sanguine rendues par le XN-10 dont les résultats sont exprimés en pourcentage et en valeur absolue (Giga/L). Des anomalies quantitatives ont été ainsi déterminées en se basant sur les valeurs de références du laboratoire. On remarque alors que 21% des patients présentent une hyperleucocytose pouvant atteindre 45G/L et une neutropénie est présente chez 15% des patients. Une lymphocytose jusqu'à 40G/L est

observée chez 27% des patients (tableau 8). En pratique, ces deux anomalies quantitatives (neutropénie, lymphocytose) motivent le contrôle de la FS au microscopie selon les règles d'expertise du laboratoire.

Paramètres NFS	Données statistiques				Anomalies quantitatives effectifs (%)	
	Moyenne	Médiane	Min	Max	Taux bas	Taux élevé
Leucocytes (G/L)	8,57	7,1	0,8	44,9	44 (24)	37 (21)
PNN (G/L)	4,18	3,2	0,13	19	46 (26)	33 (18)
Lymphocytes (G/L)	3,16	2,22	0,12	40	62 (34)	27 (15)

Tableau 8: Données descriptives des paramètres de la NFS et la répartition des anomalies quantitatives sur la population d'étude.

B. Anomalies qualitatives :

Deux types d'anomalies qualitatives relatives aux résultats de la FS, ont été générées par le XN-10, il s'agit des alarmes « lymphocytes atypiques » et « Blasts/Abn Lympho » (lymphocytes anormales/blastes). Les 180 FS comportent au moins une alarme « lymphocytes atypiques » (critère d'inclusion), cette alarme est associée à l'alarme « abn ly-blasts » chez 75 patients (42%).

L'existence de l'une de ces alarmes fait partie des critères exigeant la réalisation d'un frottis sanguin pour contrôler la FS, selon les règles d'expertises du laboratoire.

III. Paramètre HFLC :

Ce paramètre est obtenu au même titre que les paramètres de la FS. Il est rendu par le XN-10 en pourcentage des globules blancs (**tableau 9**). Selon les valeurs de références des paramètres recherche établies par le fournisseur Sysmex (0-0.4% pour le HFLC), 92% des FS comportent un taux d'HFLC supérieur à 0,4%. Dans 67% des cas, le taux d'HFLC est compris entre 0.5 et 5%, il dépasse les 5% dans 26% des cas avec une valeur maximale de 20.3% d'HFLC (**Tableau 8**). Nous avons également catégorisé deux groupes de patients selon le taux d'HFLC (groupe <5%, groupe >= 5%) dans le but d'étudier la répartition des anomalies quantitatives et qualitatives sur la population d'étude (**tableau 10**). Nous remarquons ainsi que la majorité des patients (72%) ont un taux d'HFLC <5 % dont prés de la moitié (48%) ne présente aucune anomalie associée à l'alarme lymphocyte atypique. D'autre part, 28% des patients ont un taux d'HFLC supérieur ou égale à 5% dont la majorité (75%) présente

d'autres anomalies (Blasts/Abn Lympho et/ou neutropénie et/ou lymphocytose) associées à l'alarme lymphocyte atypique.

HFLC (%)	Effectifs (%)		HFLC (%)	Valeurs
0-0,4	14 (8)		**Moyenne**	3,55
0,5-5	120 (67)		**Médiane**	2,45
5-10	27 (15)		**Min**	0,1
>10	19 (11)		**Max**	20,3

Tableau 9 : Données descriptives du paramètre HFLC et la répartition sur la population d'étude.

	Anomalies qualitatives	Anomalies quantitatives effectif (%)				Total
		Lymphocytose	Neutropénie	Lymphocytose + Neutropénie	Aucune des 2	
HFLC < 5%	**Ly atypique**	8(6)	20(15)	0(0)	61(48)	129(72)
	Ly atypique + Blasts/Abn Lympho	12(9)	15(12)	3(2)	10(8)	
HFLC >= 5%	**Ly atypique**	1(2)	2(4)	0(0)	13(25)	51(28)
	Ly atypique + Blasts/Abn Lympho	3(6)	6(12)	0(0)	26(51)	

Tableau 10: Récapitulatif des anomalies quantitatives et qualitatives et leur répartition sur la population d'étude en fonction du taux d'HFLC.

IV. Quantification des lymphocytes activés au microscope optique

Les 180 FS ont été contrôlées par un examen du frottis sanguin au microscope optique par les 3 observateurs. Nous avons obtenu pour chaque FS une quantification des cellules mononucléées et des cellules plasmocytaires en pourcentage des globules blancs. Les données statistiques sont représentées dans le **tableau 11**. Le pourcentage des patients en fonction du taux des lymphocytes activés est détaillé dans le **tableau 12**.

Un taux de cellules mononucléées et/ou cellules plasmocytaires > 5% (quantifié initialement par un technicien) fait partie des critères de revu de lame par un biologiste ou interne niveau 2. La quantification effectuée par le technicien montre que 77% à 95% des patients présente un taux de lymphocytes activés (CP ou CMo ou CP+CMo) inferieur à 5%.

Quantification des Ly activés		Moyenne	Médiane	Min	Max
CP	Technicien	2,17	1,55	0	11
	Interne	2,57	2	0	14
	Biologiste	2,89	2	0	15
CMo	Technicien	1,1	0	0	20
	Interne	0,96	0	0	18
	Biologiste	0,91	0	0	18
CP+CMo	Technicien	3,26	2	0	22
	Interne	3,53	2	0	18
	Biologiste	3,8	3	0	20

Tableau 11: Données relatives à la quantification des lymphocytes activés

		Technicien	Interne	Biologiste
Lymphocytes activés		Effectifs (%)		
CP	0-5%	160(89)	159(88)	157(87)
	5-10%	18(10)	17(10)	19(11)
	>10%	2(1)	4(2)	4(2)
CM	0-5%	169(94)	171(95)	170(94)
	5-10%	7(4)	4(2)	9(5)
	>10%	4(2)	5(3)	1(1)
CP+CM	0-5%	139(77)	143(79)	140(78)
	5-10%	29(16)	25(14)	28(15)
	>10%	12(7)	12(7)	12(7)

Tableau 12: répartition des lymphocytes activés quantifiés par les 3 observateurs sur la population d'étude.

V. Etude de l'accord entre observateurs :

A. Etude de corrélation inter-observateur :

Afin d'évaluer la performance du paramètre HFLC nous avons d'abords étudié la corrélation entre les 3 observateurs dans la quantification des lymphocytes activés avec le calcul d'un coefficient de corrélation. Pour cela nous avons procédé à une comparaison par paire d'observateurs (technicien vs interne, technicien vs biologiste, interne vs biologiste) et en fonction du type de lymphocytes activés (CP, CMo, CP+CMo) (**figure 24 et tableau 13**).

Les résultats montrent que l'ensemble des quantifications corrèlent entre 2 observateurs quels que soient le type de lymphocyte activé étudié (CP ou CMo ou CP+CMo) avec des coefficients de corrélation calculés variant de 0,6224 (CMo) à 0,886 (CP+CMo).

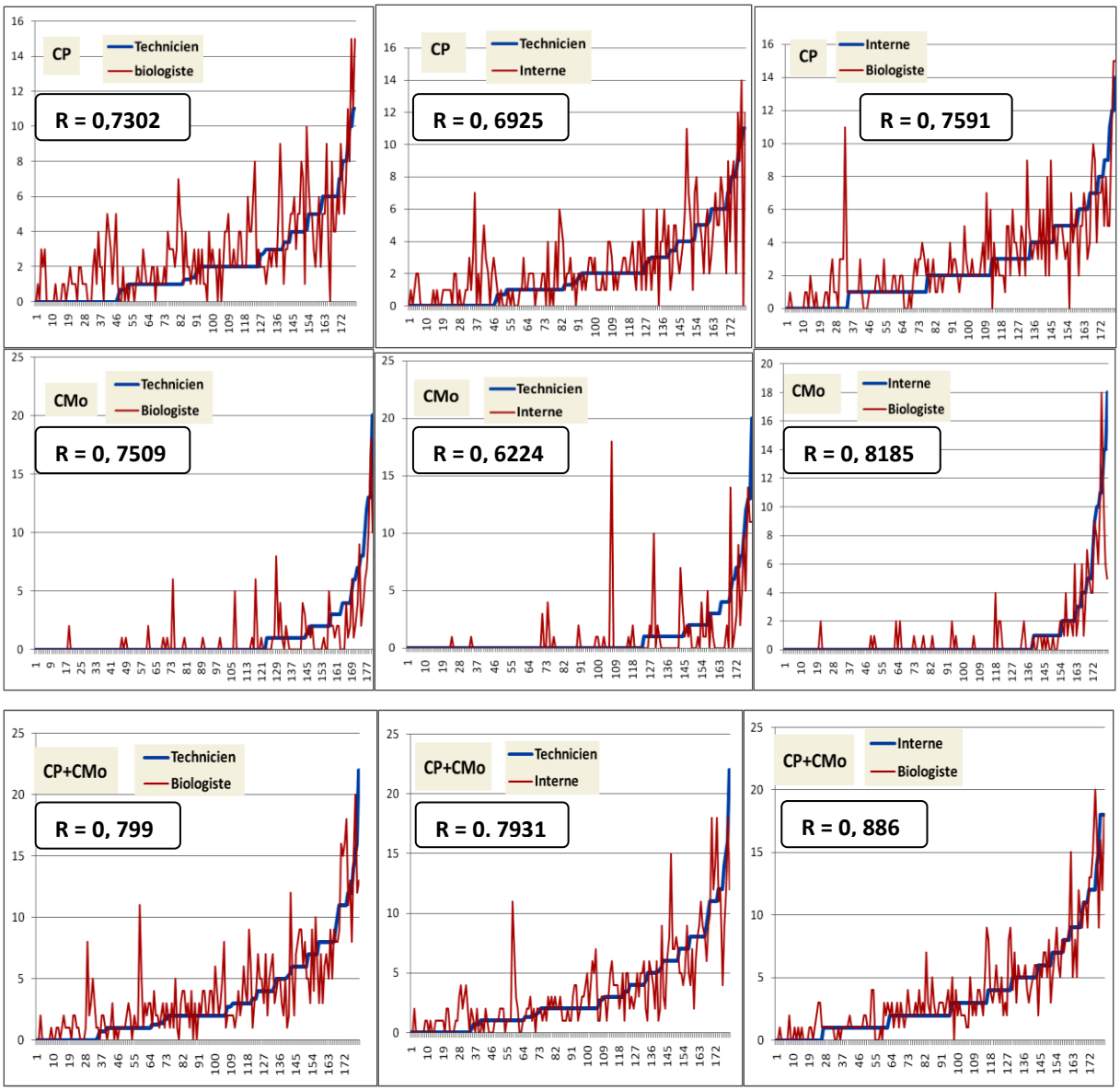


Figure 24: corrélation par paires d'observateurs (R = Coefficient de corrélation)
- Axe des abscisses : numéro du cas patient
- Axe des ordonnées : taux des Ly activés en %

Observateurs	Ly Activés	Coefficient de corrélation	Intervalle de confiance à 95%
Tech vs Int	**CP**	0,6925	[0.6078 ; 0.7617]
	CMo	0,6224	[0.5239 ; 0.7046]
	CP+CMo	0,7931	[0.7318 ; 0.8418]
Tech vs Bio	**CP**	0,7302	[0.6538 ; 0.7919]
	CMo	0,7509	[0.6793 ; 0.8084]
	CP+CMo	0,799	[0.7392 ; 0.8464
Int vs Bio	**CP**	0,7591	[0.6894 ; 0.8149]
	CMo	0,8185	[0.7637 ; 0.8616]
	CP+CMo	0,886	[0.8499 ; 0.9139]

Tableau 13: Etude de corrélation par paires d'observateurs avec les coefficients de corrélation

B. Etude de concordance par la méthode graphique de Bland et Altman :

La variabilité inter-observateur dans la quantification des lymphocytes activés (CP+CMo) a également été évaluée. Pour cela nous avons réalisé une étude de concordance en utilisant la méthode graphique de Bland et Altman. En règle générale, pour deux séries de mesures (A) et (B), cette méthode compare les moyennes de mesures (A+B/2) à leurs différences (B-A). Dans notre étude nous avons 3 séries de mesures (technicien, interne et biologiste), nous avons donc étudié la concordance par paire d'observateurs. Les différents graphes sont représentés dans la **figure 25** et les données relatives à chaque étude par paire d'observateurs sont représentées dans le **tableau 14**.

Les résultats montrent que les « biais observés », c'est-à-dire les moyennes des écarts de mesures entre observateurs varient de -0,3 à +0,5. Cela signifie qu'en moyenne, un observateur sous-estime ou surestime le taux de lymphocytes activés (CP+CMo) de 0,3% à 0.5% par apport à un autre observateur. Les limites d'agrément à 95% varient de -5 (limite inferieure) à +5 (limite supérieure). Cette zone d'agrément estimée, définie par les valeurs de ces limites d'agrément à 95%, s'interprète de la façon suivante : la méthode de Bland et Altman estime que 95% des 180 écarts de mesures entre observateurs sont compris entre -5% et +5%.

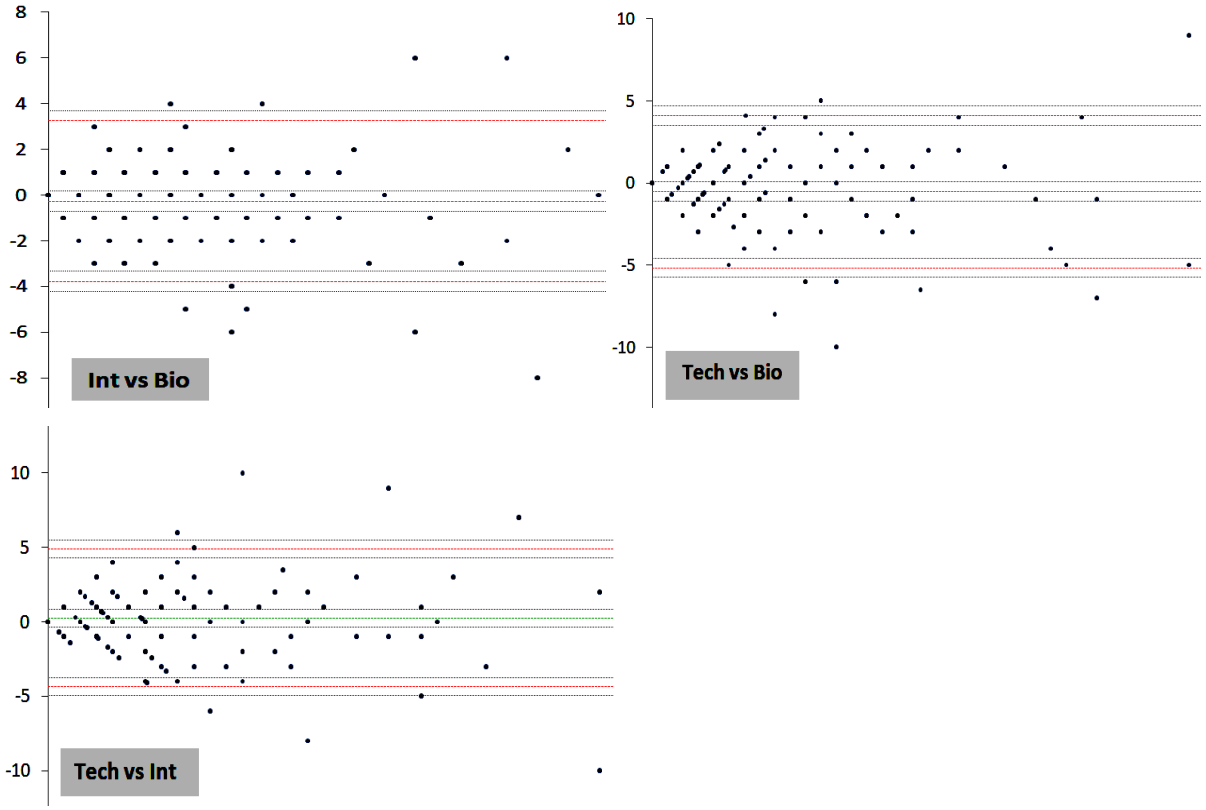


Figure 25: Graphiques de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre observateurs. En abscisse, les moyennes des 2 mesures. En ordonné les différences des 2 mesures. La ligne verte représente la moyenne des différences (biais observé). Les 2 lignes rouges représentent les limites supérieure et inferieure de l'accord ou limites d'agréments (+/- 2 déviations standards).

Concordance inter-observateurs CP+CMo		Limite inferieure de l'accord	Moyenne des différences	Limite supérieure de l'accord
Int vs Bio	**Estimation**	-3,774	-0,267	3,241
	Limite inferieure IC95%	-4,221	-0,714	2,794
	Limite supérieure IC95%	-3,327	0,180	3,688
Tech vs Bio	**Estimation**	-5,158	-0,524	4,110
	Limite inferieure IC95%	-5,749	-1,115	3,520
	Limite supérieure IC95%	-4,567	0,067	4,701
Tech vs Int	**Estimation**	-4,355	0,257	4,869
	Limite inferieure IC95%	-4,943	-0,331	4,282
	Limite supérieure IC95%	-3,767	0,845	5,457

Tableau 14: Moyennes des différences et les limites de l'accord avec leurs intervalles de confiance à 95%

VI. Etude de l'accord entre paramètre HFLC et observateurs :

Afin d'évaluer la performance du paramètre HFLC, nous avons ensuite comparé les résultats d'HFLC rendus par le XN-10 avec les résultats de la quantification des lymphocytes activés rendus par les trois observateurs. Il s'agit d'une comparaison de deux variables quantitatives (A et B) issues de deux méthodes de mesure différentes. Une est basée sur la cytométrie en flux (paramètre HFLC), et l'autre se repose sur l'examen du frottis sanguin au microscope optique (quantification par observateurs). Nous avons ainsi procédé à une étude de concordance entre les deux mesures en utilisant la méthode graphique de Bland et Altman. Dans notre étude, les valeurs de la série (A) correspondent aux valeurs d'HFLC, et les valeurs de la série (B) représentent les moyennes des résultats obtenues par les trois observateurs. Nous avons donc étudié le degré de concordance du paramètre HFLC avec la quantification des cellules mononucléées, des cellules plasmocytaires et l'ensemble des deux, estimée par les trois observateurs. Les différents graphes sont représentés dans la **figure 26**. Les données de chaque graphe sont représentées dans le **tableau 15**.

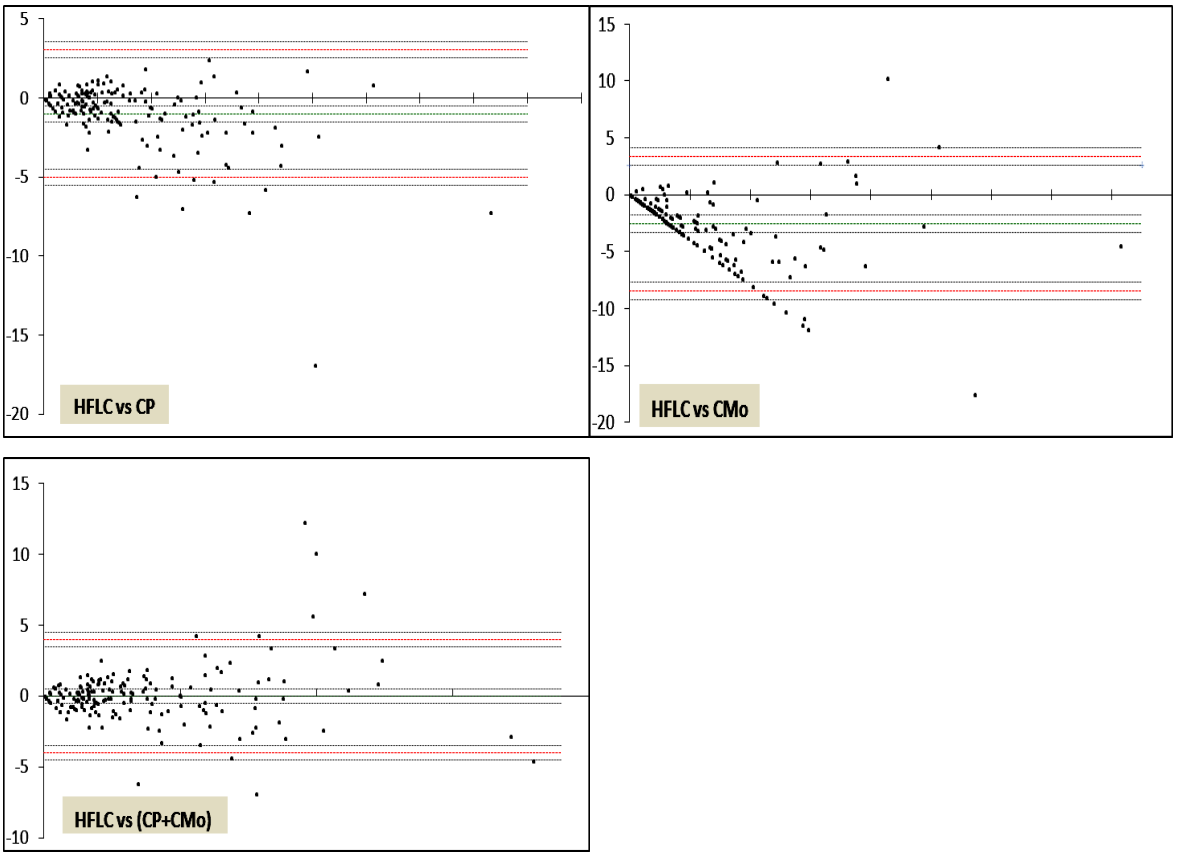


Figure 26: Graphiques de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre HFLC et résultats observateurs avec les biais observés (lignes vertes) et les limites d'agréments (lignes rouges).

Concordance HFLC vs observateurs		Limite inferieure de l'accord	Moyenne des différences	Limite supérieure de l'accord
HFLC vs CP	Estimation	-5,007	-0,993	3,02
	Limite inferieure IC95%	-5,519	-1,505	2,508
	Limite supérieure IC95%	-4,495	-0,482	3,531
HFLC vs CMo	Estimation	-8,462	-2,553	3,356
	Limite inferieure IC95%	-9,215	-3,306	2,603
	Limite supérieure IC95%	-7,709	-1,799	4,109
HFLC vs CP+CM	Estimation	-3,99	-0,005	3,979
	Limite inferieure IC95%	-4,498	-0,513	3,471
	Limite supérieure IC95%	-3,482	0,502	4,487

Tableau 15: Moyennes des différences ainsi que les limites de l'accord avec leurs intervalles de confiance à 95%, relatives à l'étude de concordance HFLC vs Ly activés.

L'étude de concordance entre le paramètre HFLC et la quantification des plasmocytes par les observateurs met en évidence un biais observé de -1 avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de +3 et -5. Le biais observé est plus important en ce qui concerne la concordance entre le paramètre HFLC et la quantification des cellules mononucléées, il est de l'ordre de -2.55 avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de + 3,5 et -8,5. Quant à la concordance entre le paramètre HFLC et la quantification de l'ensemble CP+CMo par les observateurs, le biais observé est très proche de zéro avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de +5 et -5.

Au final, dans le but d'adapter les règles d'expertises en ce qui concerne les critères de vérifications de la FS, nous avons sélectionné les patient dont la FS ne présente que l'anomalie qualitative de type « lymphocytes atypiques » c'est-à-dire sans l'alarme « Blasts/Abn Lympho » et sans lymphocytose ni neutropénie, soit 74 patients (41%). L'étude de concordance avec la quantification des lymphocytes activés (CP+CMo) montre un biais observé proche de zéro avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de +1.82 et -1.86 (**figue 27 et tableau 16)**. Nous en avons déduit ensuite une sensibilité et une spécificité (**tableau 17**). Le seuil de 5% de plasmocytes ou cellules mononucléées a été choisi pour discriminer les « malades » et les « non malades ». Les résultats montrent une sensibilité (Se) et une valeur prédictive positive (VPP) égalent à

84.62. La spécificité (Sp) et la valeur prédictive négative (VPN) sont égalent à 96.62 (tableau 17). En pratique cela veut dire qu'un taux d'HFLC < 8% chez ces patients correspond avec une probabilité élevé à un taux réel de lymphocyte activé < 10% (CP ou CMo ou CP+CMo). Un seuil d'HFLC < 8% peut donc être discuté pour établir une nouvelle règle d'expertise relative aux critères de vérification de la FS.

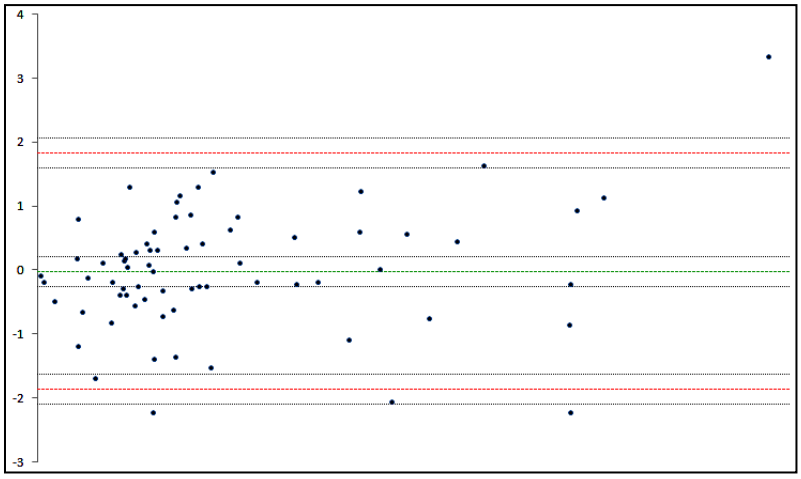


Figure 27: Graphiques de Bland et Altman : représentant la concordance des mesures entre HFLC et résultats observateurs (CP+CMo) avec les biais observés (lignes verts) et les limites d'agréments (lignes rouges).

(HFLC vs CP+CMO)< 5% sans alarmes	Limite inferieure de l'accord	Moyenne des différences	Limite supérieure de l'accord
Estimation	-1,865	-0,019	1,826
Limite inferieure IC95%	-2.100	-0,254	1,591
Limite supérieure IC95%	-1,630	0.215	2.061

Tableau 16: Moyennes des différences (biais observé) ainsi que les limites d'agréments avec leurs intervalles de confiance à 95%, relatives à l'étude de concordance HFLC vs Ly activés (CP+CMo).

Paramètre	Sensibilité	spécificité	VPP	VPN
HFLC	84,62	96,72	84,62	96,72

Tableau 17: Evaluation des performances du paramètre HFLC
VPP = Valeur Prédictive Positive ; VPN = Valeur Prédictive Négative

DISCUSSION

Afin d'encadrer les indications du recours à l'examen du frottis sanguin pour contrôler une FS, des règles d'expertises ont été établies dans chaque laboratoire. Il s'agit d'un ensemble de critères basés sur l'existence des anomalies qualitatives et ou quantitatives détectées par l'automate. D'autre part, les constructeurs d'automates ont développé de nouveaux paramètres appelés « paramètres de recherche » en rapport avec la numération globulaire et la formule sanguine. Ces paramètres permettent d'obtenir plus de précisions sur les anomalies quantitatives ou qualitatives orientant ainsi la démarche diagnostique et le choix d'autres explorations. Le paramètre HFLC en fait partie. Il est disponible sur les automates à numération des séries XE et XN de Sysmex, entre autres, le XN-10 utilisé au laboratoire d'hématologie du CHU de Rouen. Des études évaluant ce paramètre [5] [4] ont démontré son intérêt dans l'identification et la quantification des cellules plasmocytaire sécrétrices d'anticorps rencontrées habituellement en cas de réaction immunitaire suite à l'introduction d'un agent pathogène. Nous avons donc souhaité évaluer les performances de ce paramètre dans l'identification et la quantification des plasmocytes et cellules mononucléées afin d'optimiser son utilisation en routine et adapter *in fine* les règles d'expertises relatives au contrôle du FS au microscope optique.

Dans ce travail, nous avons étudié une cohorte de 180 patients issus de différents services du CHU de Rouen ayant tous bénéficié d'un hémogramme complet avec un contrôle de la FS au microscope optique selon les règles d'expertises du laboratoire (tableau 6) [31]. La FS sanguine ainsi obtenue comporte les paramètres classiques avec un taux d'HFLC rendu par le XN-10 en pourcentage des globules blancs et une quantification des lymphocytes activés (plasmocytes et ou cellules mononucléées) évaluées par trois observateurs (technicien, interne et biologiste).

D'après les résultats des FS rendus par l'automate, des anomalies quantitatives et qualitatives ont été relevées, en particulier celles exigeant le recours à l'examen du frottis sanguin selon nos règles d'expertises. Il s'agit des anomalies quantitatives de type « neutropénie » et « lymphocytose » dont le caractère anormal est défini selon les valeurs de référence du laboratoire [34]. En cas de neutropénie < 1,5 G/l observée en situation initiale, l'examen microscopique du frottis sanguin est impératif, afin de détecter les fausses

neutropénies par agglutination, de rechercher la présence de cellules pathologiques ou de détecter des anomalies morphologiques [19]. La revue du frottis sanguin est également recommandée pour la recherche de cellules anormales (réactionnelles ou malignes) en cas de lymphocytose [19]. Quant aux anomalies qualitatives, il s'agit de l'alarme « Lymphocytes Atypiques » et l'alarme « Abn Lympho/L-blastes ? », Ces deux alarmes imposent, à chaque fois, la réalisation du frottis sanguin pour rechercher des cellules anormales (réactionnelles Ou malignes) [19]. Dans notre étude 59% des FS comportent au moins une des anomalies décrites (neutopénie, lymphocytose et alarme «Abn Lympho/L-blastes ») associée à l'alarme « lymphocytes atypique » et donc 41% ne possèdent que l'alarme « lymphocytes atypiques ».

De plus, les mesures d'HFLC obtenues pour les 180 patients montrent que la majorité des patients (72%) ont un taux d'HFLC <5 % dont prés de la moitié (48%) ne présente aucune anomalie associée à l'alarme « lymphocytes atypiques ». Ce dernier est donc le seul critère imposant, en pratique quotidienne, le contrôle de la FS par l'examen du frottis sanguin selon les règles d'expertises actuellement en vigueur au laboratoire. D'autre part, les 28% de patients qui ont un taux d'HFLC ≥5% présentent majoritairement (75%) d'autres anomalies (Blasts/Abn Lympho et/ou neutropénie et/ou lymphocytose) associées à l'alarme lymphocyte atypique. Pour ces patients, en pratique quotidienne, la seule présence de ces anomalies impose l'examen du frottis sanguin indépendamment du taux d'HFLC.

Par ailleurs, les quantifications réelles des lymphocytes activés évaluées par les trois observateurs confirment également que la majorité des patients (77% à 95%) présentent un taux de lymphocytes activés > 5% avec une distribution comparable entre les 3 opérateurs quelque soit le type cellulaire évalué (CP ou CMo ou CP+CMo) (tableau 12). En pratique, Un taux de cellules mononucléées et ou cellules plasmocytaires > 5% (quantifié initialement par un technicien) fait partie des critères de revu de lame par un biologiste ou interne niveau 2. Cependant, dans notre étude nous remarquons que le technicien a rendu un taux de plasmocytes > 5% chez 11% des patients et que le contrôle par l'interne et biologiste retrouve la même proportion (12% et 13% des patients respectivement). Concernant les cellules mononucléées, le technicien a répondu un taux > 5% chez 6% des patients. L'interne et biologiste ont rendu le même taux (5% et 6% des patients respectivement). Quant a l'ensemble (CP+CMo), 23% des patients possèdent un taux >5% selon le technicien, 21% selon l'interne et 22% selon le biologiste. L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure

que le seuil de 5% de lymphocytes activés imposant le contrôle de la FS par un biologiste, pourrait être discuté et revu à la hausse.

Ensuite nous avons procédé à l'évaluation du paramètre HFLC en étudiant son accord avec le taux réel des lymphocytes activés quantifié par les observateurs au microscope optique. Pour cela nous avons tout d'abord évalué la variabilité inter-observateur par le calcul d'un coefficient de corrélation (R) dont les résultats sont en faveur de l'existence d'une association significative entre observateurs. Néanmoins, les valeurs de R varient selon le couple d'observateurs et en fonction du type cellulaire étudié (tableau 13). En effet la corrélation est meilleure dans la quantification de l'ensemble CP+CMo avec un R maximal égal à 0.886 (IC 95% [0.8499 ; 0.9139]) observé chez le couple interne/biologiste. En revanche, la corrélation est moins bonne quand il s'agit de la quantification isolée des CP ou CMo avec un R minimal égal à 0.6224 (IC 95% [0.5239 ; 0.7046]) observé chez le couple technicien/interne dans la quantification des cellules mononucléées. Afin d'évaluer le désaccord entre observateurs dans la quantification de l'ensemble CP+CMo, nous avons réalisé ensuite une étude de concordance à l'aide de la méthode graphique de Bland et Altman. Les résultats montrent que les « biais observés », c'est-à-dire les moyennes des écarts de mesures sont bien du même ordre chez les 3 couples d'observateurs, variant de -0,5 à +0,3. Cela signifie qu'on peut observer une sous-estimation ou une surestimation des lymphocytes activés de seulement 0.3% à 0.5% chez un observateur par rapport à un autre, ce biais est donc très faible. Cependant, les limites d'agrément à 95% varient de -5 (limite inferieure) à +5 (limite supérieure), cela veut dire que 95% des 180 écarts de mesures entre observateurs sont compris entre -5% et +5%. Ce désaccord observé entre observateurs est principalement secondaire aux difficultés d'identification des lymphocytes activés.

En effet, Win van der Meer et al [35] ont démontré que parmi une population de cytologistes experts, l'accord, sur la reconnaissance des lymphocytes et leur classification en lymphocytes activés étaient très mauvais. De plus, la variabilité intra-observateur dans cette étude a montré que 31% des cytologistes n'ont pas été en mesure de reproduire leur classification précédente. Cette difficulté d'identification est secondaire à plusieurs facteurs liés soit à l'observateur de la cellule soit aux variations morphologiques des cellules en particulier de la lignée B. En effet, l'un des inconvénients majeurs de la lecture d'un frottis sanguin est celui de l'expérience de l'observateur, nous ne sommes effectivement capables de reconnaître que ce que nous connaissons et ce que nous avons déjà vu. Autrement dit,

les variations morphologiques des cellules lymphocytaires rendent leur identification plus difficile, et la distinction entre origine réactionnelle et néoplasique n'est pas toujours simple d'où le recours fréquent à d'autre explorations plus onéreuses tels que l'immunophénotypage. D'autre part, identifier et quantifier 10% ou plus de cellules mononucléées est un argument fort en faveur d'un SMN. Hors leurs morphologies hétérogènes, caractérisées par un polymorphisme de taille (cellule, noyau), de basophilie cytoplasmique et de l'aspect de la chromatine, justifient en grande partie les écarts importants intra et inter-observateur. Cela est également dû à l'absence de nomenclature standardisé en particulier dans les cas d'altérations lymphocytaires [6]. D'ailleurs, le GFHC a publié en 2016 des recommandations en rapport avec l'harmonisation du compte rendu de l'hémogramme [36]. Il préconise de renoncer à identifier et donner des pourcentages de cellules mononucléées, plasmocytes ou autres sous catégories en estimant que ces comptages ne sont pas pertinents et que tout doit ici être inclus dans la ligne des lymphocytes. Ainsi, le cytologiste doit se contenter de mettre des commentaires en fonction des anomalies lymphocytaires observées (**tableau 18**). Ces ambigüités nous amènent à poser la question, faut il revoir la définition du syndrome mononucléosique qui est purement cytologique.

Commentaire niveau 1	Présence de lymphocytes hyperbasophiles
Commentaire niveau 2	Syndrome mononucléosique
Commentaire niveau 3	Absence de commentaire ou recommandation de sérologie virale ou suivi, ou immunophénotypage si doute

Tableau 18: Extraits des propositions du GFHC de commentaires en fonction des anomalies lymphocytaires (lymphocytes réactionnels). D'après F. TRIMOREAU[38]

Par ailleurs, d'autres facteurs peuvent gêner l'observateur dans la reconnaissance d'une cellule, notamment la qualité du microscope en matière de réglage, de luminosité et de maintenance, la qualité des frottis et des colorants et l'entretien des étaleur-colorateurs automatisés. Pour remédier à ces difficultés d'identifications, le laboratoire d'hématologie du CHU de Rouen met en place une stratégie évolutive qui consiste à maintenir un niveau de compétences aux personnels et d'assurer la formation des nouveaux arrivants (techniciens, internes). Cela est assuré par des cours théoriques et pratiques (microscope multi-tête) dispensés par des biologistes experts. Ce maintien de compétences est également assuré par

des procédures d'habilitation et de maintien d'habilitation du personnel en accord avec l'accréditation des laboratoires. Des contrôles de qualité internes et externes permettent aussi de vérifier la comparabilité des connaissances et de d'entreprendre les mesures nécessaire en cas de désaccord significatif observé. Toutes ces mesures s'intègrent dans l'application de la norme ISO 15189 à la qualité en biologie médicale imposée aux laboratoires.

La deuxième partie de notre étude consiste à évaluer la concordance entre le paramètre HFLC et la quantification réelle des lymphocytes activés répondus par les trois observateurs. Nous avons donc choisi la méthode graphique de Bland et Altman pour évaluer le degré de concordance. Les résultats obtenus mettent en évidence une meilleur concordance entre le paramètre HFLC et la quantification de l'ensemble CP+CMo, le « biais observé » dans ce cas est très proche de zéro et non significatif (-0,005 avec IC à 95% [-0,513 ; 0,502]). Cependant, les limites d'agrément à 95% varient de -5 (limite inferieure) à +5 (limite supérieure), cela veut dire que 95% des 180 écarts de mesures entre les deux méthodes sont compris entre -5% et +5%. Nous pouvons conclure que les limites de désaccord entre le paramètre HFLC et la quantification des lymphocytes activés (CP+CMo) sont du même ordre que ceux observées entre les observateurs. Par ailleurs, l'évaluation de la concordance entre le paramètre HFLC et la quantification des plasmocytes par les observateurs met en évidence un « biais observé » significatif de -1 (IC à 95% [-1,505; -0,482]) avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de +3 et -5. Le biais observé est plus important en ce qui concerne la concordance entre le paramètre HFLC et la quantification des cellules mononucléées, il est significativement de l'ordre de -2.55 (IC à 95% [-3,306; -1,799]) avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de + 3,5 et -8,5. D'une manière globale, ces résultats signifient que le paramètre HFLC détecte comme attendu essentiellement les cellules plasmocytaires et seulement une partie des cellules mononucléées. Cette conclusion rejoint celle de l'étude effectuée par Linssen et al qui suggèrent qu'à côté des plasmocytes, la zone HFLC contient également une partie des lymphocytes T [5] . De plus, une autre étude a démontré que le taux d'HFLC pourrait inclure les cellules plasmocytaires mais également d'autres cellules lymphocytaires présentant une teneur élevée en ARN [28] . Cette hypothèse est confortée par l'examen des valeurs aberrantes (*outlier*) pour lesquels la différence entre le paramètre HFLC et la quantification réelle des lymphocytes activés est supérieure à l'intervalle donné par

Bland et Altman. En effet, un taux supérieur à 10% de cellules mononucléées (15%,13%,15% et 16%) est observé chez 4 patients dont le HFLC est inferieur à 9% (5%, 7%, 8% et 3% respectivement). Cela nous oblige à dire que ces patients auraient des pertes de chance sans une vérification de la FS au microscope, hors les 4 patients avaient tous par ailleurs au moins une anomalie quantitative de type lymphocytose qui aurait nécessité un examen systématique du frottis sanguin selon nos règles d'expertises. Par ailleurs, le paramètre HFLC semble incapable d'identifier les cellules hyperbasophiles d'origine néoplasique notamment dans le cadre des syndromes lymphoprolifératifs, cela a été observé chez une patiente suivie pour un lymphome diffus à grandes cellules B dont la FS contenait un taux élevé de cellules lymphomateuses avec un taux d'HFLC égal à zéro, cette patiente n'a pas été incluse dans l'étude car les critères d'inclusions n'étaient pas respectés. En revanche, deux patients avec un diagnostic de leucémie aigue ont été inclus dans notre étude, leurs FS montrent un pourcentage de blastes de 79% et 80% alors que le taux d'HFLC est respectivement de 0.9% et 6.6%. Cette limite est d'ailleurs décrite par le fournisseur de l'automate Sysmex qui, à travers une étude [5], préconise d'exclure les pathologies lymphoprolifératives ou d'autres maladies systémiques qui montreraient également des signaux dans la zone des lymphocytes atypiques mais ce paramètre ne discriminera pas une population HFLC distincte.

Finalement, pour donner un sens pratique à notre étude et optimiser l'utilisation du paramètre HFLC au quotidien malgré les limites annoncées, nous avons sélectionné les patient dont la FS ne présente que l'anomalie qualitative de type « lymphocytes atypiques » c'est-à-dire sans l'alarme « Blasts/Abn Lympho » et sans lymphocytose ni neutropénie, soit 74 patients (≈41%). Puis nous avons réalisé une étude de concordance avec la quantification des lymphocytes activés (CP+CMo). Les résultats montrent alors que le degré de concordance est nettement amélioré par rapport à l'ensemble de la population. En effet le biais observé est très proche de zéro (-0,019) et non significatif (IC à 95% [-0,254 ; 0,215]) avec des limites d'agréments supérieures et inferieures respectivement de +1.8 et -1.8 (contre +5 et -5 dans l'ensemble de la population). De plus aucune cellule anormale de type tumoral n'a été détectée chez ce groupe de patients. D'un point de vue pratique, un diagnostic de SMN (basé sur un taux de cellules mononucléées ≥ 10%) peut être exclu si le taux d'HFLC est strictement < 8% puisque la quantification réelle sera < 10 % selon les limites de variabilité estimées par Bland et Altman. Ainsi, la spécificité et la VPN calculées sont en

faveur de cette hypothèse, elles sont égales à 96,72. Nous pouvons finalement conclure que le contrôle de la FS au microscope apparait injustifié chez les patients ne présentant aucune anomalie quantitative ou qualitative mis à part une alarme « lymphocytes atypiques » avec un taux d'HFLC < 8%.

A l'issue de cette étude, il semble donc possible de proposer une nouvelle règle d'expertise relative à l'examen du frottis sanguin qui diminuera certainement le nombre de FS à contrôler (**Figure 28**).

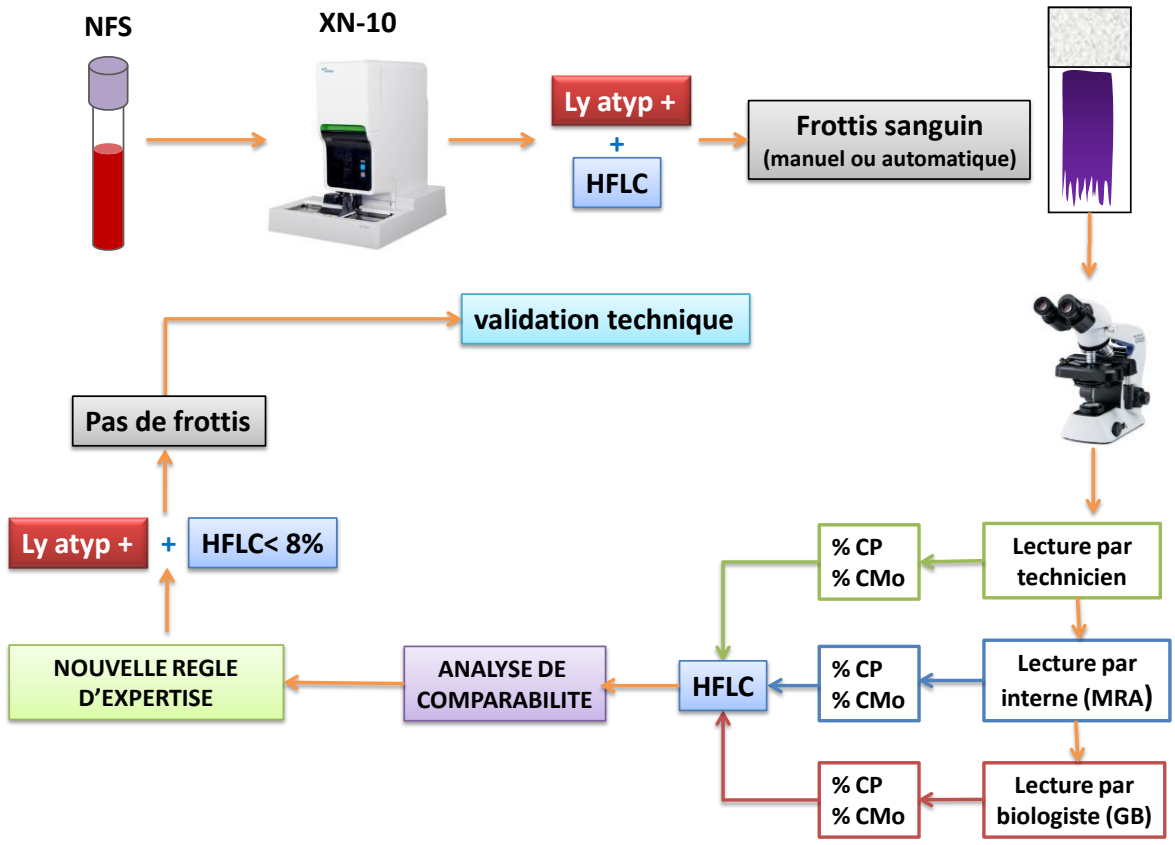


Figure 28: schéma de l'étude avec la nouvelle règle d'expertise

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, nous concluons que le paramètre de recherche HFLC permet d'identifier et de quantifier les lymphocytes activés sans une réelle distinction entre les plasmocytes et les cellules mononucléées dont la quantification précise doit toujours passer par un examen du frottis sanguin au microscope. De plus, l'interprétation du taux d'HFLC doit obligatoirement tenir compte de l'existence ou non des anomalies quantitative et/ou qualitative de la NFS. En effet, notre étude montre que le paramètre HFLC est plus performant quand une FS ne contient que l'alarme « lymphocytes atypiques ». D'autre part, nous avons montré que le contrôle microscopique de la FS est vraisemblablement inutile chez les patients ne présentant que l'alarme « lymphocytes atypiques » avec un taux d'HFLC < 8%. De ce fait, une nouvelle règle d'expertise peut être proposée diminuant significativement le nombre de FS à contrôler. Cela permettra à la fois de rendre une NFS plus rapidement et de diminuer la charge de travail du personnel du laboratoire, techniciens, internes et biologistes.

Cependant, les fournisseurs d'automates continuent leurs avancées en introduisant de nouvelles technologies de mesure et en développant de nouveaux paramètres. Ces derniers sont amenés à remplacer le paramètre HFLC lors d'une prochaine mise à jour de l'automate XN-10. En effet, des paramètres dits « d'inflammation » sont déjà disponible avec certains automates. Il s'agit des paramètres « RE-LYMP » et « AS-LYMP » qui fournissent des informations supplémentaires sur l'activation de la réponse immunitaire. Ainsi, il sera nécessaire d'étudier les performances de ces nouveaux paramètres afin d'évaluer correctement leur éventuelle utilisation au quotidien.

Au final, chaque laboratoire doit avoir conscience de la nécessité de connaitre les performances des automates qu'il possède et d'étudier les nouveaux paramètres que les constructeurs développent. Cela leur permettra de participer activement à la prise en charge des patients en orientant correctement les médecins dans leurs choix des autres explorations à prescrire et des décisions thérapeutiques à prendre à l'issue.

BIBLIOGRAPHIE

1. G. Buchonnet. Hématopoïèse - Définition et méthodes d'exploration - cours DES Biologie médicale.
2. A.Plonquet. Differenciation lymphocytaire B normale. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - MAI 2013 - N°452.
3. Carola G. Vinuesa, Stuart G. Tangye, Bernhard Moser and Charles R. Mackay. follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. Nature reviews | immunology volume 5 | november 2005.
4. Sysmex academy. Counting of highly fluorescent lymphocytes (HFLC) as antibody-producing plasma cells on XE-5000. Sysmex Xtra Online | March 2011.
5. J. Linssen, V. Jennissen, J. Hildmann, E. Reisinger, J. Schindler, G. Malchau, A. Nierhaus, et K. Wielckens - Identification and Quantification of High Fluorescence-Stained Lymphocytes as Antibody Synthesizing/Secreting Cells Using the Automated Routine Hematology Analyzer XE-2100. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 72B:157–166 (2007).
6. Sysmex academy. Lymphocyte differentiation update – helpful or dispensable?. Sysmex educational enhancement and development. February 2016.
7. A.Steiger, R. Fried. Lymphocytes. MQZH 2014-03.
8. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. les cellules du sang normal [Internet]. Available from:http://www.hematocell.fr/index.php/les-cellules-du-sang/apprendre-a-identifier-les-diverses-cellules-du-sang-normal/10-enseignements/49-morphologie-des-leucocytes-du-sang-normal.
9. F. Valensi. Morphologie des cellules sanguines normales. EMC-Hématologie 2 (2005) 1-13.
10. L. Baseggioa, P. Felman. Diagnostic des lymphocytoses hors LLC-typique. Hématologie : Hémopathies lymphoïdes b matures. Revue francophone des laboratoires - mai 2013 - n°452.

11. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Syndromes mononucléosiques [Internet]. Available from: http://www.hematocell.fr/index.php/observations-biocliniques-commentees/213-obs46-angine-et-adenopathies-cervicales-chez-un-homme-de-22-ans.
12. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Plasmocytes, morphologie et synthèse des immunoglobulines [Internet]. Available from : http://www.hematocell.fr /index.php/ enseignement – de- lhematologie-cellulaire / leucocytes-et-leur-pathologie/97-plasmocytes-morphologie-synthese-des-immunoglobulines.
13. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Lymphocytes activés et syndromes mononucléosiques. [Internet]. Available from : http://www.hematocell.fr/index.php/ anomalies-cytolologiques/23-principales-anomalies-quantitatives-etou-qualitatives-de-lhemogramme/principales-anomalies-cyto-hematologiques-sang-moelle-osseuse-au-cours-de-ou-associees-a/190-lymphocytes-actives-et-syndromes-mononucleosiques.
14. N.Valin. Conduite à tenir devant un syndrome mononucléosique. EMC - Maladies infectieuses 1 Volume 11 > n◦2 > mai 2014.
15. Laboratoire d'Hématologie - CHU d'Angers. Observation 46. [Internet]. Available from : http://www.hematocell.fr/index.php/observations-biocliniques-commentees/213-obs46-angine-et-adenopathies-cervicales-chez-un-homme-de-22-ans.
16. J.F. Lesesve, x. Troussard. Apoptotic Cells in a Peripheral Blood Smear in the Context of EBV Infection. American Journal of Hematology 67:147–149 (2001).
17. V.T.P. Nguyena, P. Vanclesb, L. Rozena, D. Noubouossiea, A. Demulder. Évaluation de l'automate d'hématologie Sysmex XN-2000® pour une utilisation en routine : comparaison avec l'Advia 2120i®. Immuno-analyse et biologie spécialisée (2013) 28, 125—132. Elsevier Masson.
18. Documentation Sysmex. XN Présentation et Principes. CBC / DIFF / RET / PLT-F / BF.
19. F. Geneviève, A.C. Galoisy, D. Mercier-Bataille, O. Wagner-Ballon, f. Trimoreau, O. Fenneteau, F. Schillinger, V. Leymarie, S. Girard, C. Settegrana, S. Daliphard, V. Soenen-Cornu, M. Cividin, J.F. Lesesve, B. Châtelain, X. Troussard, V. Bardet. Revue microscopique du frottis sanguin : propositions du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC). VOL LVI N° 317 - MARS 2014.
20. J.Hornain. XN Alarmes CBC-DIFF-RET-PLT-F / Version-02 / Septembre 2013.

21. Sysmex academy. MicroR et macroR. [Internet]. Available from : http://www.sysmex.fr/academie/centre-dexpertise/parametres-sysmex/microcytes-et-macrocytes.html
22. Sysmex academy. Le paramètre plaquettaire IPF. [Internet]. Available from : http://www.sysmex.fr/academie/centre-dexpertise/parametres-sysmex/fraction-de-plaquettes-immatures-ipf.html.
23. Sysmex academy. le paramètre NEUTRO-SSC. Available from : http://www.sysmex.fr/academie/centre-dexpertise/parametres-sysmex/indice-de-granularite-des-neutrophiles.html.
24. Sysmex academy. Novel haematological parameters for rapidly monitoring the immune system response. Sysmex white paper Infection/inflammation. October 2017.
25. Sysmex academy. Le parametre HFLC. [Internet]. Available from : http://www.sysmex.fr/academie/bibliotheque/glossaire/hflc-numeration-des-lymphocytes-a-haute-fluorescence-1019.html.
26. J. M. Pekelharing, O. Hauss, R. de Jonge, J. Lokhoff, J. Sodikromo, M. Spaans, R. Brouwer, S. de Lathouder, R. Hinzmann. Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. Diagnostic Perspectives|Volume 1. 2010.
27. A. Oehadian, M. Michels, Q. De Mast, D. Prihatni, M. Puspita, Y. Hartantri, S. Sinarta, A. J. A. M. Van Der Ven, B. Alisjahbana. New parameters available on Sysmex XE-5000 hematology analyzers contribute to differentiating dengue from leptospirosis and enteric fever. 2015 John Wiley & Sons Ltd, Int. Jnl. Lab. Hem. 2015, 37.
28. Edwin van Mirre, Gert Jan Vrielink, Nicole Tjon-a-Tsoi, Henriet Hendriks, Wim de Kieviet and Edwin ten Boekel. Sensitivity and specificity of the high fluorescent lymphocyte count-gate on the Sysmex XE-5000 hematology analyzer for detection of peripheral plasma cells. Clin Chem Lab Med 2011;49(4).
29. Luo YL, Xu PG, Peng SG, Li JP, Kuang MH. Value of percentage of highly fluorescent lymphocytic cells for rapidly assessing septicemia in tumor patients. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2013 Juin 25;93(24):1894-6.
30. M. GELLE et S. DALIPHARD. Cytologie du quotidien : règles de vérification technique aux postes des formules (CN) et d'Hématologie (SJ). Réf GEDI n° 12738. 2018.
31. M. GELLE et G. Buchonnet. Cytologie du quotidien : règles de vérification technique au poste des numérations. Réf GEDI n° 1757. 2018.

32. M. GELLE et S. DALIPHARD. Cytologie du quotidien : revues de lames au microscope. Réf GEDI n° 1574. 2018.
33. Documentation Sysmex. Proposition de gestion des résultats pour sil externes. Pour automates de la classe XN. DO-0346-3.426/01/2016.
34. L.IGOUT et G. Buchonnet. Cytologie du quotidien: Valeurs de référence et bornes de la validation biologique en Hématologie cytologique. Réf GEDI n° 4921. 2017.
35. Wim Van Der Meer, Warry Van Gelder, Ries de Keijzer, Hans Willems. The divergent morphological classification of variant lymphocytes in bood smears. Doi: 10.1136/jcp.2005.033787. December 2005.
36. F. Trimoreau, A.C Galoisy, F.Geneviève, V.Bardet, E.Cornet, J-P.Hurst, J-F.Lesesve, V.Leymarie, D.Lusina, B.Perez, J-Y.Cahn, G.Damaj, V.Ugo, X.Troussard. Harmonisation of full blood count reports, recommendations of the French-speaking cellular haematology group (GFHC). J Clin Pathol 2016.

UNIVERSITE DE ROUEN
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances.

Je ne prolongerai pas abusivement les agonies.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences.

Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Mustapha RAIS

Titre : Evaluation des performances du paramètre de recherche HFLC sur l'identification et la quantification des lymphocytes activés sur automate à numération Sysmex XN-10 à propos de 180 cas au CHU de Rouen

Résume : Introduction : L'identification et la quantification des plasmocytes (CP) et/ou cellules mononucléées (CMo), reposent actuellement sur l'examen du frottis sanguin au microscope. Hors, l'automate à numération le XN-10 utilisé au laboratoire du CHU de Rouen dispose d'un paramètre de recherche appelé HFLC (lymphocytes à hautes fluorescence) capable d'identifier et quantifier les cellules plasmocytaires synthétisant des anticorps en cas de réaction immunitaire. Avec ce travail, nous souhaitions évaluer ses performances afin d'adapter son utilisation au quotidien et diminuer les recours à l'examen du frottis sanguin. **Matériels et Méthodes :** Au total 180 patients ont bénéficié d'un hémogramme complet réalisé par le XN-10 incluant un taux d'HFLC. Une FS a également été effectuées au microscope par 3 observateurs (technicien, interne puis biologiste), selon les règles d'expertises du laboratoire, incluant une quantification des lymphocytes activés. Ainsi, en plus des alarmes qualitatives générées par le XN-10, les anomalies quantitatives, imposant le contrôle de la FS au microscope, ont été prises en compte selon les valeurs de référence du laboratoire. Ensuite, nous avons réalisé une étude comparative évaluant, à la fois l'accord entre observateurs et l'accord entre le paramètre HFLC et observateurs, dans l'identification et la quantification des lymphocytes activés. **Résultats :** Une meilleure concordance est obtenue entre HFLC et la quantification de l'ensemble CP+CMo. Le biais observé dans ce cas est égal à -0,005 (IC à 95% [-0,513 ; 0,502]) avec des limites d'agrément à 95% variant de -5 à +5. Chez les patients ne présentant que l'alarme qualitative de type « lymphocytes atypiques » le degré de concordance est meilleur avec un biais observé égal à -0,019 (IC à 95% [-0,254 ; 0,215]) et des limites d'agréments à 95% variant de +1.8 et -1.8. **Conclusion :** Le paramètre HFLC permet d'identifier et de quantifier les lymphocytes activés sans réelle distinction entre les CP et les CMo dont la quantification précise doit toujours passer par un examen du frottis sanguin au microscope. Néanmoins, les FS ne présentant que l'alarme « lymphocytes atypiques » avec un taux d'HFLC < 8% pourront être validées sans recours au microscope.

Mots-clés : XN-10, HFLC, microscope, plasmocytes (CP), cellules mononucléées (CMo)

Jury : **Président :** Pr Pascale SCHNEIDER

Membres : Pr Loïc FAVENNEC

Dr Gérard BUCHONNET

Dr Sylvie DALIPHARD

Date de soutenance : 29 octobre 2018