



HAL
open science

Évaluation de l'application Red Blood Cell Advanced Software de CellaVision® et apports de l'automatisation pour la recherche et la quantification des schizocytes

Morgane Moulis

► To cite this version:

Morgane Moulis. Évaluation de l'application Red Blood Cell Advanced Software de CellaVision® et apports de l'automatisation pour la recherche et la quantification des schizocytes. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-02016003

HAL Id: dumas-02016003

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02016003>

Submitted on 12 Feb 2019

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

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

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
U.F.R. DE PHARMACIE
Année universitaire 2017/2018

MEMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement à Amiens le 5 Avril 2018 par
Morgane MOULIS
Née le 25 Août 1991 à Toulouse (31)

Conformément aux dispositions du décret du 23 janvier 2003
Tient lieu de
Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

**Evaluation de l'application Red Blood Cell Advanced
Software de CellaVision® et apports de l'automatisation
pour la recherche et la quantification des schizocytes**

Directeur de thèse :
M. Eric GUIHENEUF, Docteur, Praticien Hospitalier

Membres du jury

Président : M. Loïc GARCON, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Assesseurs : M. Gilles DUVERLIE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Mme Valérie BARDET, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Mme Magalie JORIS, Docteur, Chef de Clinique-Assistant

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
U.F.R. DE PHARMACIE
Année universitaire 2017/2018

MEMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement à Amiens le 5 Avril 2018 par
Morgane MOULIS
Née le 25 Août 1991 à Toulouse (31)

Conformément aux dispositions du décret du 23 janvier 2003
Tient lieu de
Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

**Evaluation de l'application Red Blood Cell Advanced
Software de CellaVision® et apports de l'automatisation
pour la recherche et la quantification des schizocytes**

Directeur de thèse
M. Eric GUIHENEUF, Docteur, Praticien Hospitalier

Membres du jury

Président : M. Loïc GARCON, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Assesseurs : M. Gilles DUVERLIE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Mme Valérie BARDET, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Mme Magalie JORIS, Docteur, Chef de Clinique-Assistant

Remerciements

A mon président de jury :

Professeur Loïc GARCON

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Service d'Hématologie Biologique – Centre de Biologie Humaine
Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie*

Qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour le soutien que vous m'avez apporté en toutes circonstances.

Un grand merci aussi pour votre dévouement envers les internes, pour votre écoute et votre détermination, qui font de vous un chef de service exceptionnel. Permettez-moi de vous exprimer toute mon estime et mon admiration.

A mon directeur de thèse :

Docteur Eric GUIHENEUF

*Praticien Hospitalier
Service d'Hématologie Biologique – Centre de Biologie Humaine
Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie*

Je te dois tout mon parcours d'interne. Pour tout le temps que tu as consacré à mon apprentissage et mon travail, pour ton soutien face aux difficultés que j'ai pu rencontrer et pour toutes les valeurs humaines et professionnelles que tu défends, je t'adresse ma plus profonde reconnaissance et te souhaite la plus grande réussite pour la suite de ta carrière.

A mes assesseurs :

Professeur Gilles DUVERLIE

*Directeur de l'UFR de Pharmacie d'Amiens
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire de Virologie
Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie*

Vous m'avez accordé votre confiance dans les aspects professionnels, associatifs comme humains de ma vie d'interne, et vous m'avez soutenue dans toutes mes démarches au cours de ces années. Vous proposer de participer à mon jury de thèse était une évidence et je vous remercie sincèrement de l'avoir accepté. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Professeur Valérie BARDET

*Présidente du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Service d'Hématologie-Immunologie-Transfusion
Centre Hospitalier Universitaire Ambroise Paré - APHP*

Je vous remercie pour le grand honneur que vous m'accordez en participant à mon jury de thèse et en acceptant d'apporter votre expérience à la critique de ce travail. Tous les internes passionnés d'hématologie n'ont pas cette chance. Veuillez recevoir l'expression de toute ma gratitude.

Docteur Magalie JORIS

*Chef de Clinique-Assistant
Service d'Hématologie clinique et thérapie cellulaire
Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie*

Je vous prie de recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Il est important à mes yeux de pouvoir le présenter à un clinicien, prescripteur de cet examen. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

Aux techniciens du laboratoire d'hématologie du CHU Amiens-Picardie :

Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre compréhension qui m'ont permis de m'épanouir dans ce service. Ce fut un bonheur de travailler et d'apprendre à vos côtés. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite dans vos projets tant professionnels que personnels.

A mes co-internes du CHU Amiens-Picardie:

Mes chers confrères et amis,

Malgré des différences de culture, vous m'avez toujours permis de rester moi-même et de faire mes propres choix. Je vous adresse un grand merci pour toutes ces années passées ensemble, en particulier aux nordistes qui m'ont fait découvrir leur région, alliant traditions, respect et authenticité.

A vous mes amis de la fac de pharma de Toulouse

La pharmacie a toujours été ma vocation et rencontrer des gens aussi formidables que vous dans ce milieu est une grande chance. Nos années d'amitié, malgré les grandes distances qui nous séparent le prouvent. Je vous adresse mes vœux les plus sincères de réussite pour votre carrière et j'espère pouvoir vous retrouver très vite dans une nouvelle destination.

A vous membres des bureaux 2016/2017 et 2017/2018 de la Fédération Nationale des Syndicats d'Internes en Pharmacie et Biologie Médicale (FNSIP-BM)

Mes chers amis et frères d'action, vous m'avez fait découvrir la très large palette des qualités humaines et la puissance que peut avoir un mouvement collectif. Vous m'avez permis de mettre en valeur mes atouts, et ce au service du plus grand nombre. Je vous remercie pour ces deux années magiques, mélanges de rencontres enrichissantes, d'investissement sur des projets captivants et de grands moments de convivialité. La FNSIP-BM et vous avez changé ma vie.

A vous mes deux anges

Tant d'années passées ensemble, tant d'années qui m'ont permis d'arriver ici aujourd'hui. Une amitié de toujours, et ce malgré mon départ de Toulouse. Une évidence et un naturel qui montrent que rien ne bouge. Merci d'être toujours là pour moi, tout simplement.

A vous mes chers parents

Je vous remercie pour votre patience, et ce depuis le premier jour, et pour votre dévouement sans failles. Vous m'avez appris le respect, la justice et la cohérence, dans les paroles comme dans les actes.

Papa, grâce à toi, je mesure la part d'inné qu'il y a en chacun de nous, mais tu m'as démontré que le chemin n'est pas tout tracé et que l'avenir dépend aussi des choix que nous faisons ou des décisions que nous prenons chaque jour.

Maman, évidemment, je te dédie toute ma scolarité, mes études et mon parcours professionnel. Je te remercie de m'avoir transmis tes valeurs de persévérance, de rigueur et d'ambition qui font de moi ce que je suis aujourd'hui. Tes encouragements et ton soutien indéfectible m'ont été très précieux. Tu n'as jamais cessé d'être mon modèle et ta fierté a toujours été la raison de mon plus grand bonheur.

A Fabien, mon complice et confident

Depuis bientôt six ans, nous nous sommes engagés dans une relation basée sur le partage, la communication et la compréhension. Ton grand cœur et ta confiance me permettent de m'épanouir dans notre vie à deux.

Avec tout mon amour.

Et à tous les autres que je n'ai pas mentionné, et qui j'espère ne m'en tiendront pas rigueur...

Table des matières

Liste des abréviations	8
Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Introduction	11
I- Les schizocytes	11
II- Les micro-angiopathies thrombotiques	12
A- Le syndrome hémolytique et urémique	13
B- Le purpura thrombotique thrombocytopénique	14
C- Les formes secondaires	15
D- La prise en charge des micro-angiopathies thrombotiques.....	16
III- Les moyens de recherche des schizocytes	17
A- La microscopie classique et les recommandations de l'International Council for Standardization in Haematology	17
1- Identification des schizocytes	18
2- Numération des schizocytes.....	19
B- Les microscopes automatisés	20
1- La morphologie cellulaire digitale automatisée	20
2- Aspects techniques de l'automate	20
3- La classification des globules rouges	21
C- Les données des analyseurs d'hématologie cellulaire automatisés.....	23
1- Le paramètre Globules Rouges Fragmentés	23
2- Le paramètre HYPER	25
IV- Objectifs de l'étude	25
Matériel et méthodes	26
I- Echantillons	26
II- Analyse de la qualité d'étalement des frottis sanguins	26

III- Décompte des schizocytes par microscopie manuelle	26
IV- Décompte des schizocytes par microscopie automatisée	27
V- Statistiques	27
VI- Extraction des données	27
Résultats	28
I- Recensement des demandes de recherche de schizocytes des 4 premiers mois de l'année 2017	28
II- Evaluation des performances du DM9600 pour le décompte des schizocytes	30
A- Etude de répétabilité	30
B- Etude de reproductibilité	31
C- Demandes non significatives	32
D- Patients hospitalisés pour micro-angiopathie thrombotique	33
E- Etude de la sensibilité et de la spécificité	35
III- Comparaison des technologies d'étalement des frottis sanguins	35
IV- Influence des paramètres d'étalement sur le nombre de globules rouges comptés par le DM9600	37
V- Etape de reclassification des globules rouges	39
A- Temps de reclassification.....	39
B- Nature des cellules déplacées	40
VI- Utilisation des données des analyseurs d'hématologie cellulaire automatisés pour la détermination du nombre de schizocytes	42
A- Le paramètre Globules Rouges Fragmentés	42
B- Le paramètre HYPER	43
C- Hémoglobine et numération plaquettaire	44
Discussion	45
Conclusion et perspectives	52
Bibliographie	53

Liste des abréviations

AHAI: Anémie Hémolytique Auto-Immune

CCMH: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CIVD: Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CMV: CytoMégaloVirus

CV: Coefficient de Variation

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétracétique

GFHC: Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire

GRF: Globules Rouges Fragmentés

GvH: Graft versus Host (greffon contre l'hôte)

HELLP syndrome: Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count syndrome

ICSH: International Council for Standardization in Haematology

IRA: Insuffisance Rénale Aigue

LDH: Lactico-DésHydrogénases

LES: Lupus Erythémateux Systémique

MAT: Micro-Angiopathie Thrombotique

MGG: May-Grünwald Giemsa

NFS: Numération-Formule Sanguine

PTT: Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

SAPL: Syndrome des Anti-PhosphoLipides

SHU: Syndrome Hémolytique et Urémique

SMD: Syndromes MyéloDysplasiques

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPP: Valeur Prédictive Positive

VPN: Valeur Prédictive Négative

vWF: von Willebrand Factor

Liste des figures

Figure 1. Production des schizocytes	11
Figure 2. Formes typiques pour l'identification des schizocytes	19
Figure 3. Pré-classification des globules rouges par le DM9600.....	22
Figure 4. Principes de décompte des GRF	24
Figure 5. Répétabilité du DM9600.....	30
Figure 6. Reproductibilité du DM9600	31
Figure 7. Comparaison du pourcentage de schizocytes entre microscopie manuelle et automatisée (demandes non significatives).....	32
Figure 8. Comparaison du pourcentage de schizocytes entre microscopie manuelle et automatisée (patients présentant une MAT)	33
Figure 9. Evolution du pourcentage de schizocytes, des LDH et de la numération plaquettaire au cours de l'épisode de MAT des patients (1), (2) et (3).....	34
Figure 10. Comparaison du nombre de globules rouges comptés entre les deux types d'étalement.....	36
Figure 11. Exemples de frottis « conforme » et « non conforme » d'après l'analyse par le SmearChecker®	38
Figure 12. Exemple d'erreurs de pré-classification des globules rouges.....	41
Figure 13. Comparaison du paramètre GRF	42
Figure 14. Comparaison du paramètre HYPER	43
Figure 15. Variation de l'hémoglobine et des plaquettes en fonction de la schizocytose.....	44
Figure 16. Prise en charge des demandes de recherche de schizocytes	50

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères diagnostiques des MAT	13
Tableau 2. Modes de présentation des PTT et SHU	15
Tableau 3. Médicaments responsables de la survenue d'une MAT	15
Tableau 4. Nombre de demandes et valeur moyenne des paramètres biologiques pour chaque catégorie de schizocytes	28
Tableau 5. Nombre de demandes par service prescripteur.....	29
Tableau 6. Nombre de demandes quotidiennes de recherche de schizocytes	29
Tableau 7. Sensibilité et spécificité du DM9600	35
Tableau 8. Variation du nombre de globules rouges comptés en fonction des paramètres d'étalement (échantillon à hémocrite normal).....	37
Tableau 9. Variation du nombre de globules rouges comptés en fonction des paramètres d'étalement (échantillon à hémocrite bas).....	38
Tableau 10. Temps de reclassification des globules rouges en fonction de la schizocytose ...	39
Tableau 11. Temps de décompte des schizocytes par microscopie manuelle.....	40

Introduction

I- Les schizocytes

Les schizocytes ou schistocytes (du grec « schizo » signifiant fractionnement, fissure [1]) sont des fragments d'hématies circulants. Ils sont produits dans la majorité des cas par un dommage mécanique extrinsèque dans la circulation sanguine [2-3], notamment par fragmentation sur des filaments de fibrine, mais une anomalie membranaire du cytosquelette ou un dommage thermique peuvent aussi entraîner leur formation [4] (Figure 1).

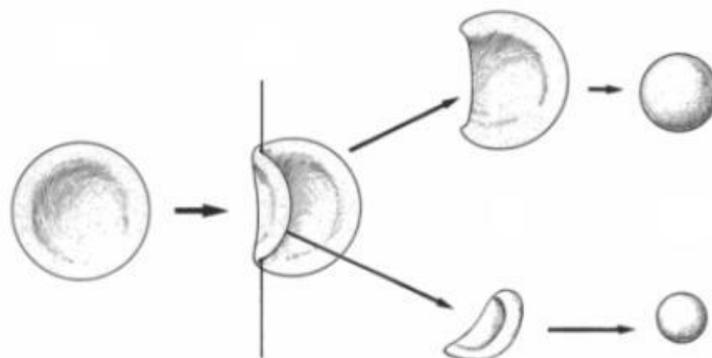


Figure 1. Production des schizocytes (d'après [3])

Ils sont habituellement absents ou très rares chez les individus sains : ce sont alors des artefacts dûs au prélèvement ou à l'étalement [4]. La présence d'un nombre augmenté de schizocytes dans le sang périphérique, particulièrement en l'absence d'autres anomalies morphologiques sévères du globule rouge, est considérée comme anormale et doit faire évoquer en première hypothèse une anémie hémolytique mécanique, et avant tout une MAT, dont le pronostic est défavorable si un traitement n'est pas instauré rapidement [5].

Au cours des MAT, leur formation est souvent secondaire à la présence de thromboses disséminées des artérioles et capillaires et ils sont alors à l'origine de l'anémie hémolytique qui accompagne ces syndromes [6]. La présence des schizocytes est visible dans la majorité des cas mais il faut savoir qu'elle peut manquer, en particulier au début de la maladie [7] et qu'il faudra répéter la recherche. L'apparition des schizocytes peut en effet être retardée de quelques jours par rapport aux autres signes cliniques et biologiques. Dans de rares cas, la recherche de schizocytes a été rapportée négative tout au long de la maladie [8-9]. Les raisons

de l'absence de schizocytes ne sont pas claires. Ainsi, la schizocytose ne doit pas être considérée comme constante au cours des MAT (sensibilité < 100%).

La présence des schizocytes n'est pas pathognomonique des MAT (spécificité < 100%) : elle peut survenir au cours des macroangiopathies, conséquence typique de dommage mécanique due à une anomalie structurelle du cœur et des gros vaisseaux [10], essentiellement après chirurgie cardiaque (schizocytose modérée, transitoire de 24h)[11] ou dans le cadre de valvulopathies. Une schizocytose chez les bénéficiaires de valve cardiaque prothétique est une preuve de dysfonctionnement de celle-ci [12].

En dehors de la pathologie cardiovasculaire, les schizocytes peuvent également être présents dans des circonstances très particulières (liste non exhaustive) : CIVD [13], anémie mégalo-blastique [14], thalassémies, brûlures, myélofibroses primitives, splénectomisés, nouveau-nés. Il est à noter que, dans ces cas, les schizocytes ont des formes très variables et sont associés à une aniso-poïkilocytose marquée, non spécifique du diagnostic du MAT [10]. Leur présence n'est pas alors considérée comme significative [4].

Enfin, la quantification de schizocytes a été aussi proposée comme critère pour la définition d'un système de classification pour les MAT relatives à la transplantation de cellules souches [15], et elle est souvent nécessaire de manière itérative pour le suivi des transplantés [16].

La recherche de schizocytes, parfois avec quantification (pourcentage) est donc un examen prescrit fréquemment, d'intérêt majeur, urgent pour le diagnostic de MAT, et souvent répété dans le cadre du suivi de la pathologie [6].

II- Les micro-angiopathies thrombotiques

MAT ou micro-angiopathie thrombotique est un nom regroupant toutes les variétés de purpura thrombotique thrombocytopénique et de syndrome hémolytique et urémique, qui constituent les deux formes principales. Ce sont des maladies rares mais graves [11].

D'un point de vue histologique, ce terme décrit toutes les anomalies caractéristiques de ces pathologies: anomalies des capillaires et artérioles, avec thromboses microvasculaires qui résultent en une anémie hémolytique et une thrombopénie [17].

Cliniquement, les MAT sont définies par l'association à divers degrés de 5 signes reflétant des lésions vasculaires généralisées : fièvre, signes neurologiques variés d'origine centrale, signes traduisant une insuffisance rénale, anémie hémolytique avec schizocytose et thrombopénie [18] mais l'association de ces signes est inconstante (5 à 40% des patients présentent la pentade diagnostique, selon les sources [17][19-20]).

Critères majeurs (suffisants pour établir un diagnostic présomptif et démarrer le traitement)

Thrombopénie

Anémie hémolytique périphérique non immunologique avec fragmentation (présence de schizocytes, test de Coombs direct négatif, augmentation des réticulocytes et des LDH)

Absence d'autre cause évidente d'anémie ou de thrombopénie

Critères accessoires

Asthénie marquée

Fièvre (si importante avec frissons: évoque plutôt une infection)

Signes neurologiques (troubles de la conscience, céphalées, convulsions...)

Atteinte rénale (protéinurie, hématurie, IRA, oligurie)

Signes digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales)

Tableau 1. Critères diagnostiques des MAT (d'après [5])

A- Le syndrome hémolytique et urémique

Le SHU a été décrit pour la première fois par Gasser en 1955 [21]. Il touche principalement le jeune enfant et représente la cause la plus fréquente d'IRA chez ce dernier [22].

Il est toujours caractérisé par l'association des 3 signes suivants : anémie hémolytique, thrombopénie et insuffisance rénale [22].

Le terme de SHU typique est relatif à l'étiologie infectieuse de ce syndrome. En effet, la majorité des SHU de l'enfant est causée par un *Escherichia coli* producteur de Shiga toxine (STEC) [23], le plus souvent de sérotype O157:H7 [22]. L'enfant se contamine généralement à partir de viande insuffisamment cuite ou de lait non pasteurisé [11]. La voie hydrique et la transmission interindividuelle sont les autres modes de contamination [22].

Le SHU débute par une diarrhée, aqueuse puis sanglante, accompagnée de douleurs abdominales, précédant généralement l'anémie, la thrombopénie et l'insuffisance rénale [22].

La fièvre est inconstante.

Très rares, les infections systémiques à pneumocoque sont aussi une étiologie possible du SHU. L'infection est sévère et disséminée, avec une grande mortalité (30-50%) mais les diarrhées sont absentes [22].

Beaucoup moins souvent, les patients présentent l'anémie, la thrombopénie et l'insuffisance rénale, sans prodrome de diarrhée : c'est le SHU atypique [17]. Les causes les plus courantes de SHU atypiques semblent être liées à des anomalies de régulation du complément. Un déficit est décrit pour plusieurs protéines de la voie alterne et de la C3 convertase. Le déficit est principalement dû à une mutation de gènes mais la présence, dans certains cas, d'anticorps dirigés contre la protéine déficitaire a été prouvée [24]. Ces patients ont souvent des épisodes récurrents de SHU.

Il existe de rares formes familiales de SHU [11].

L'incidence est estimée à 3,3 cas par million et par an pour le SHU typique et 1 cas par million et par an pour le SHU atypique (données de 2012) [25].

B- Le purpura thrombotique thrombocytopenique

Le PTT est décrit par Moschcowitz en 1924 [26]. Il est présent à tous les âges mais touche habituellement l'adulte jeune, avec une légère prédominance chez les femmes (3:2) [18]. Son incidence est estimée à moins de 4 cas par million et par an (données de 2014) [25].

Le PTT est un désordre multisystémique caractérisé par des lésions microvasculaires généralisées. Le tableau clinique chez l'adulte associe une anémie hémolytique micro-angiopathique, une thrombopénie et des signes neurologiques, avec présence ou non d'une insuffisance rénale et de fièvre, et sans aucune autre cause de MAT. La thrombopénie est toujours le premier signe [20] et son association à une anémie hémolytique doit immédiatement faire évoquer un PTT, sans attendre l'arrivée des autres signes cliniques.

Les enfants présentant un tableau clinique de MAT sans insuffisance rénale sont aussi décrits dans la catégorie de PTT [17].

Le PTT est associé à un déficit de la protéine de clivage du vWF, appelée ADAMTS 13 (activité inférieure à 10% de l'activité normale). Du fait de ce déficit, des multimères de vWF de très haut poids moléculaire, libérés par l'endothélium s'accumulent et entraînent la formation d'agrégats plaquettaires spontanés [19]. L'occlusion thrombotique se produit dans de nombreux organes (cerveau, rein, cœur...).

Mais cette déficience n'est pas retrouvée chez tous les patients atteints de PTT [17]. Le PTT est presque toujours acquis, avec la présence d'auto-anticorps dirigés contre ADAMTS 13 [27]. Le PTT congénital, causé par une mutation du gène ADAMTS 13, est rare.

C- Les formes secondaires

Environ 40% des MAT sont idiopathiques (données de 2010) [17]. Les autres MAT surviennent dans des contextes physiologiques ou pathologiques existants, parfois très controversés (Tableaux 2 et 3).

<p>Formes idiopathiques ou primitives (40%)</p> <p>Formes secondaires (60%)</p> <p>Greffe de moelle allogénique et/ou traitement par ciclosporine</p> <p>Grossesse/post-partum (HELLP syndrome, pré-éclampsie, éclampsie)</p> <p>Prise de médicaments (cf. Tableau 3)</p> <p>Maladies auto-immunes (LES, sclérodermie, SAPL)</p> <p>Infections systémiques (VIH, CMV, E. coli, streptocoques, aspergillose,...)</p> <p>Cancer systémique métastaté</p> <p>Hypertension maligne</p> <p>Thrombopénie induite par l'héparine</p>

Tableau 2. Modes de présentation des PTT et SHU (d'après [5] et [20])

<p>Immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus)</p> <p>Anticancéreux (gemcitabine, mitomycine C, cisplatine,...)</p> <p>Quinine</p> <p>Antiagrégants plaquettaires (ticlopidine, clopidogrel)</p> <p>Hypocholestérolémiant (pentostatine, simvastatine)</p> <p>Triméthoprim-sulfaméthoxazole</p> <p>Interféron pégylé</p>
--

Tableau 3. Médicaments responsables de la survenue d'une MAT (d'après [17] et [19], liste non exhaustive)

D- La prise en charge des micro-angiopathies thrombotiques

Le diagnostic de PTT primitif est une indication au traitement par échanges plasmatiques, impliquant une confiance suffisante dans le diagnostic du fait de possibles complications majeures (en majorité liées aux abords veineux, mais infections systémiques, arrêt cardiaque et décès possible) [17]. Avant cette ère de l'échange plasmatique, le PTT était de très mauvais pronostic avec une survie de seulement 10% [18], malgré les différents traitements proposés (antiagrégants plaquettaires, corticoïdes, splénectomie [20]).

Le taux de survie est aujourd'hui de 80%. La plasmathérapie est le traitement de référence [28], avec un double mécanisme d'action : un effet transfusionnel (la transfusion plasmatique apporte la protéine déficitaire) et un effet soustractif (élimination des multimères de vWF et des éventuels auto-anticorps par plasmaphérèse) [20]. Les corticoïdes et le rituximab peuvent être aussi être utilisés de nos jours, mais toujours en association avec les échanges plasmatiques [19][29].

Malgré un traitement efficace, la mortalité reste importante. Les taux de plaquettes et de LDH sont les marqueurs les plus sensibles de la réponse au traitement. Le risque de rechute est de 30% environ, rechute favorisée notamment par une chirurgie, une grossesse ou encore une infection virale [30]. Pour les rechutes à répétition, un traitement par splénectomie est proposé [20].

Concernant le SHU typique, la prise en charge consiste en des soins de support (apports hydro-électrolytiques, dialyse...). Dans certains cas, la transplantation rénale peut être envisagée. L'utilisation d'antibiotique n'est pas recommandée [22]. La grande majorité des enfants récupèrent complètement et de manière spontanée mais 25% développent une atteinte rénale, avec 5% de mortalité.

Dans les SHU atypiques, en particulier quand une anomalie de régulation du complément est suspectée, la plasmathérapie est le traitement de première ligne [24]. Si des anticorps anti-Facteur H sont présents, une corticothérapie associée aux échanges plasmatiques est indiquée. L'eculizumab, un anticorps monoclonal anti-C5, a aussi démontré son efficacité dans le traitement des SHU atypiques [22].

Les formes secondaires de MAT impliquent un traitement étiologique (immunosuppresseurs, anti-infectieux, arrêt d'un médicament...) en plus de l'échange plasmatique [20].

III- Les moyens de recherche des schizocytes

A- La microscopie classique et les recommandations de l'International Council for Standardization in Haematology

Actuellement, la recherche et le décompte de schizocytes sont réalisés en routine par lecture au microscope optique, de frottis de sang périphérique colorés selon des protocoles standard (coloration de type Romanovsky : MGG, Wright-Giemsa...).

En 2005, le GFHC décrit dans un de ses articles un manque de reproductibilité de l'examen avec une variabilité inter-observateur élevée [6]. L'identification morphologique est difficile avec une variation importante des critères suivant les observateurs pour le choix des fragments à assimiler comme schizocytes. De plus, cette variabilité peut aussi dépendre de la méthode de comptage (vue d'ensemble ou numération précise), la zone de frottis évaluée, le nombre de globules rouges comptés et l'hétérogénéité du compte-rendu aux cliniciens (présent/absent, évaluation qualitative ou quantitative) [10]. Enfin, une haute imprécision existe dans le décompte à cause de leur faible concentration [31].

Or, le manque de standardisation peut mener à une information diagnostique contradictoire, affectant le traitement et l'issue clinique. Et les biologistes sont parfois mal sensibilisés à l'importance de cette recherche et aux conséquences de leur réponse dans le diagnostic puis la prise en charge thérapeutique du malade [32].

Pour diminuer cette variabilité et améliorer la précision et la reproductibilité, le GFHC a essayé de mettre en place des règles de consensus national pour l'identification et le décompte de schizocytes [4].

Au niveau international, le groupe de travail de l'ICSH [10] a été le premier à publier en novembre 2011 des recommandations concernant l'identification et la numération des schizocytes, que nous détaillons dans les paragraphes suivants.

1- Identification des schizocytes (d'après [10])

Les schizocytes doivent être identifiés sur la base de critères morphologiques positifs spécifiques.

Selon l'ICSH, les schizocytes sont toujours de taille plus petite que les globules rouges intacts et sont définis de la manière suivante (Figure 2):

- croissants ou triangles: petits fragments de forme variable, avec parfois des angulations ou des spicules (triangles), avec des bords droits ou parfois un côté convexe (croissants), plus ou moins déformés, habituellement denses à la coloration MGG ou occasionnellement pâles résultant d'une déshémoglobination au moment de la fragmentation ; les croissants doivent être distingués par leur taille des drépanocytes.

- cellules helmet ou casques: érythrocytes endommagés par une seule, ou plus rarement une double, zone amputée soulignée par un bord droit, avec des coins à angles pointus ; la portion cellulaire manquante correspond à des fragments qui ont été séparés à la suite d'une coupure sur un brin de fibrine.

- kératocytes ou cellules à cornes: cellules endommagées, plus grosses que les petits fragments, avec une paire de spicules séparées par un segment membranaire semi-circulaire concave, parfois même deux ou trois paires de spicules ; ils apparaissent dans les mêmes conditions que les triangles, les croissants et les casques et sont formés par la rupture d'une ou plusieurs pseudo-vacuoles périphériques et la fusion de la membrane cellulaire. Des cellules de morphologie identique apparaissent dans les anémies hémolytiques à corps de Heinz (ex : déficit en G6PD), en résultat d'un retrait d'un corps de Heinz par un macrophage : on les distingue en évaluant le contexte d'apparition.

- microsphérocytes ou sphéro-schizocytes: érythrocytes hyperdenses (zone centrale pâle absente) de petite taille, avec une forme ronde et une coloration augmentée ; ils sont une manifestation secondaire de la fragmentation et doivent être inclus dans le décompte de schizocytes seulement en présence des formes de schizocytes mentionnées précédemment ; ils sont probablement formés lorsque la scission réduit la surface membranaire et le volume cytoplasmique restant ou en résultat d'un changement de forme des schizocytes ; ils sont présents dans les zones plus aplaties du frottis, proche du côté frangé du frottis ; ils ne doivent pas être confondus avec les sphérocytes de la sphérocytose héréditaire ou de l'hémolyse d'origine immune, qui ont un diamètre diminué mais ne sont pas aussi petits, bien qu'un chevauchement partiel entre les deux morphologies et terminologies existe.

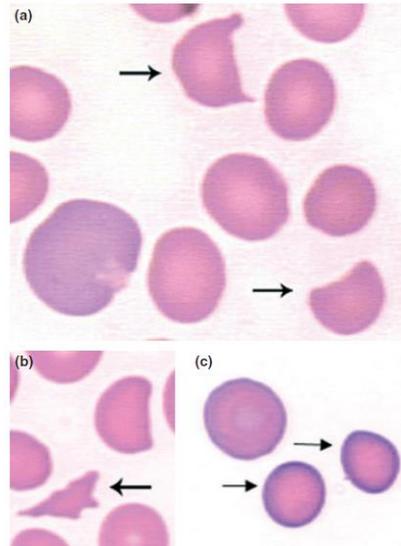


Figure 2. Formes typiques pour l'identification des schizocytes : (a) kératocyte et cellule casque, (b) triangle, (c) microsphérocyte (d'après [10])

Non évoqués dans la publication de l'ICSH, les schizocytes doivent être aussi distingués des pyknocytes: retrouvés en période néonatale, ce sont des hématies très déformées, hyperdenses, plus petites que les autres globules rouges, présentant de courtes projections [33].

2- Numération des schizocytes (d'après [10])

Les schizocytes doivent être évalués sur des frottis de sang périphérique en utilisant un microscope optique au grossissement moyen et estimés en pourcentage après avoir compté au moins 1000 hématies.

Un décompte de schizocytes doit être demandé et effectué quand on suspecte un diagnostic de MAT causée par des dommages mécaniques des globules rouges, habituellement chez les patients présentant une thrombopénie.

Ils doivent être identifiés avec des critères morphologiques spécifiques positifs (cf. plus haut).

Un décompte de schizocytes est cliniquement significatif s'ils représentent la principale anomalie morphologique des hématies sur le frottis (autre que les signes de régénération érythropoïétique). Chez les adultes, un pourcentage de schizocytes supérieur à 1% doit être considéré comme un argument morphologique important pour le diagnostic d'anémie relative à une MAT.

En revanche, l'ICSH ne propose pas de seuil précis de significativité clinique.

B- Les microscopes automatisés

Des systèmes automatisés de microscopie optique sont en plein développement, comme le DM9600 de CellaVision®.

1- La morphologie cellulaire digitale automatisée

Dans la dernière décennie, les analyseurs de morphologie cellulaire digitale automatisés ont contribué à la standardisation de l'évaluation microscopique. La morphologie cellulaire digitale automatisée est un processus par lequel les cellules sont automatiquement localisées sur un frottis de sang ou de liquide biologique coloré, puis pré-classées au sein de différentes catégories. Elles sont ensuite présentées à l'observateur qui peut confirmer le classement ou apporter des corrections (reclassification) en déplaçant les cellules une par une : on obtient un résultat dit « post-reclassification » [34].

Le DM9600 (ou DM96) est un automate qui permet l'analyse de sang et de liquides biologiques [35]. Sur le sang, son système de morphologie digitale lui permet de réaliser:

- la numération différentielle des leucocytes
- la pré-caractérisation de la morphologie des globules rouges
- une estimation de la numération plaquettaire.

2- Aspects techniques de l'automate

La partie optique du DM9600 est constituée d'un microscope motorisé et d'une caméra, tous deux pilotés par un logiciel d'acquisition d'image et de classification installé sur ordinateur. Le microscope est équipé de 2 objectifs (10 et 100), le dernier est à immersion avec distribution d'huile automatique. Il possède aussi des instruments optiques intermédiaires capables de passer de 1,0x à 0,5x afin d'obtenir des agrandissements. La caméra numérique couleur est à transfert de charge et à balayage progressif. L'ensemble est placé à l'abri de la poussière sous carrosserie métallique [35].

Le système est conçu pour lire des frottis minces étalés et colorés au MGG par un étaleur-colorateur ou des frottis manuels si leur minceur est suffisante.

L'informatique pilote le microscope en 2 temps :

- 1) détermination au grossissement 10 d'une zone « monocouche » d'hématies et repérage des éléments à photographier
- 2) retour sur chaque élément pour une photographie au grossissement 100.

3- La classification des globules rouges

Durant les premières années d'utilisation de ces plateformes automatisées, les applications se sont principalement concentrées sur la pré-classification et différenciation des leucocytes [36-37]. Plusieurs études ont démontré une très bonne corrélation entre la méthode microscopie et la méthode automatisée, et ce pour les différentes lignées de leucocytes. De plus, l'automate a prouvé son efficacité supérieure à la méthode manuelle en cas d'aplasie [38].

Récemment, une nouvelle application logicielle pour l'analyse morphologique des hématies sur les microscopes automatisés Cellavision®, est arrivée sur le marché : l'application Red Blood Cell Advanced Software™. Ce logiciel délivre une identification et un classement des hématies en 21 catégories morphologiques, incluant les schizocytes (Figure 3).

Tout d'abord, la morphologie des globules rouges est automatiquement pré-caractérisée pour la mise en évidence de polychromatophilie, hypochromie, anisocytose, micro et macrocytose, et poikilocytose.

Les cellules sont aussi classées en différentes catégories morphologiques précises : acanthocytes, schizocytes, cellules helmet, dacryocytes, échinocytes, forme normale, drépanocytes, ovalocytes, elliptocytes, hématies cibles, sphérocytes et stomatocytes.

Enfin, les cellules contenant des inclusions sont aussi répertoriées : corps de Howell-Jolly, corps de Pappenheimer, hématies ponctuées et hématies parasitées [35].

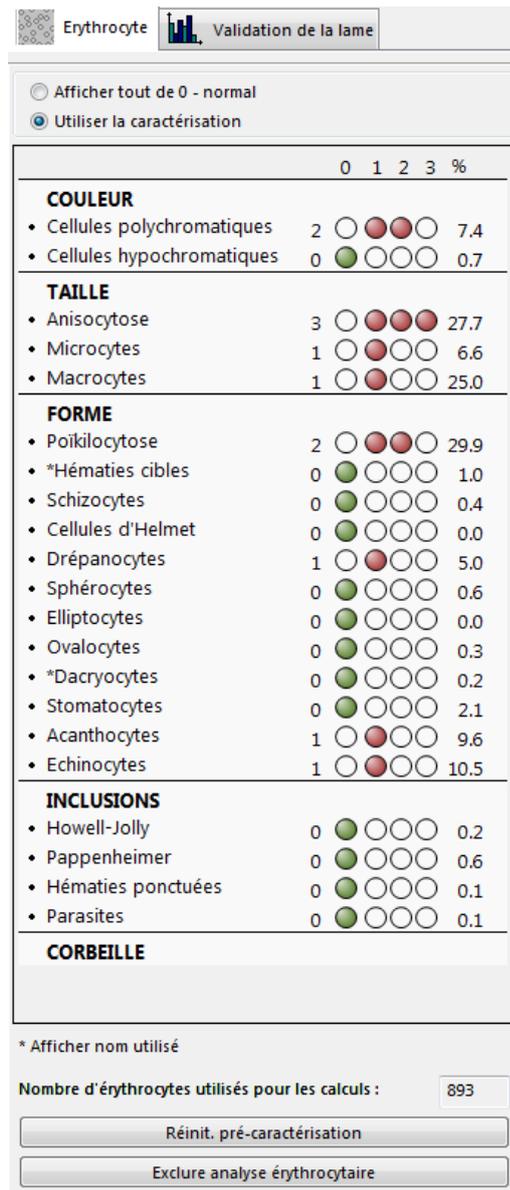


Figure 3. Pré-classification des globules rouges par le DM9600 (copie d'écran à partir du logiciel Red Blood Cell Advanced Software™)

Pour la reclassification, le DM9600 propose au lecteur une image équivalente à environ 8 champs microscopiques au grossissement 100 [35]. De plus, l'application dispose d'une fonction zoom suffisante pour étudier la morphologie unitaire de chaque cellule [38].

Toutes les catégories de globules rouges, dont les schizocytes, sont rendues en valeurs semi-quantitatives (0, 1, 2 ou 3) et en pourcentages.

C- Les données des analyseurs d'hématologie cellulaire automatisés

Les analyseurs automatiques d'hématologie cellulaire, par leur capacité à analyser les propriétés physiques et chimiques de milliers de cellules, permettent actuellement des décomptes cellulaires précis dans une pratique de routine et d'urgence. Concernant les schizocytes, certains paramètres de ces analyseurs semblent être une alternative au décompte par microscopie classique.

1- Le paramètre Globules Rouges Fragmentés

Un certain nombre d'analyseurs de dernière génération délivre maintenant un paramètre original appelé « fragmented red cells » ou « globules rouges fragmentés » [39].

Les prémices de l'utilisation de ce paramètre vient d'une équipe japonaise [40] qui, en utilisant la technologie Sysmex®, a étudié les petits globules rouges exempts d'ARN par le canal réticulocyte (RET). Sur la base du nombre d'événements dans cette zone, la modélisation a permis la détermination du nombre probable de schizocytes.

Actuellement, deux constructeurs, Siemens® et Sysmex®, présentent des automates capables de discriminer et compter de manière directe et non subjective les GRF, sur une base urgente et de routine, dans l'objectif d'être équivalent au décompte microscopique. La détermination du nombre de GRF est analyseur dépendant et les procédures techniques sont spécifiques à chaque fournisseur (Figure 4).

Avec la technologie Siemens®, les GRF sont mesurés directement par une analyse optique à deux dimensions, qui combine une analyse intégrée des hématies et des plaquettes. Les GRF correspondent aux cellules de très faible volume, en-dessous du seuil de 30fL, et avec un indice de réfraction > 1.4 (le contenu en hémoglobine permet de les différencier des plaquettes). Les GRF sont mentionnés s'ils sont présents au-dessus du seuil de 10 000 événements par microlitre [41].

Sysmex® utilise toujours le système de détection du canal réticulocyte (RET) décrit dans l'étude japonaise. Après coloration par un colorant de polyméthine fluorescent, l'analyse du forward scatter (FSC) et de l'intensité de fluorescence permet à l'appareil de détecter les événements dans une zone d'hématies avec un plus petit volume que les globules rouges normaux et avec un contenu en ARN plus faible que les plaquettes, et qui correspondent aux

GRF. Une zone supplémentaire (Gate-1) est incorporée pour minimiser les effets de globules rouges normaux de petite taille (observés en cas d'anémie par carence martiale ou d'autres pathologies). 30 000 cellules sont analysées et un signal se produit automatiquement s'il y a présence de GRF [40][42].

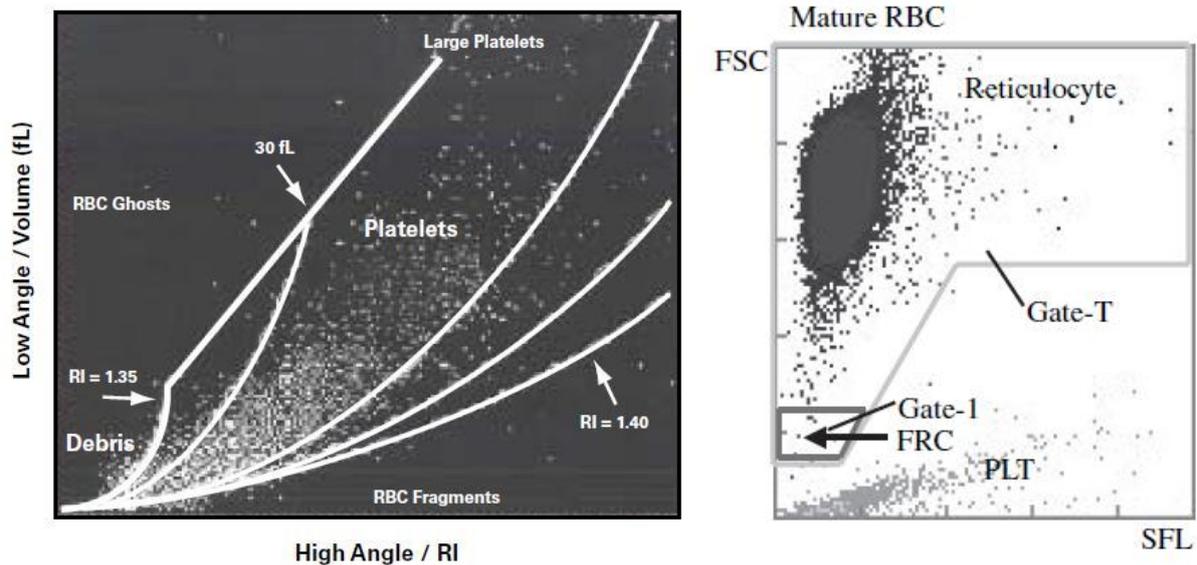


Figure 4. Principes de décompte des GRF (à gauche : technologie Siemens®, d'après [41] ; à droite : technologie Sysmex® d'après [43])

Diverses études ont évalué ce paramètre et montrent globalement une bonne corrélation entre les données automate et le décompte microscopique de schizocytes (coefficient de corrélation moyen de 0,67 pour Siemens® et 0,77 pour Sysmex®), bien qu'il y ait une tendance générale à la surestimation du nombre de schizocytes (environ 0,5% pour Siemens® et 0,8% pour Sysmex®) [39].

De plus, elles démontrent une bonne sensibilité mais une pauvre spécificité du paramètre GRF. En effet, pour les deux types d'analyseurs, les GRF sont identifiés seulement sur la base de la taille et du contenu en hémoglobine, indépendamment de leur forme. Donc d'autres particules comme les petits globules rouges ou des fragments de membrane peuvent être inclus dans le décompte. Et les résultats faussement positifs correspondent le plus souvent à des échantillons avec une poikilocytose importante que l'on retrouve dans diverses circonstances : anémie microcytaire sévère par carence martiale, hémoglobinopathies, grands brûlés, néoplasies myéloprolifératives [39]. La faible spécificité du paramètre est aussi majorée par une contamination courante par les plaquettes : cette notion est prouvée par la présence de pics de GRF succédant les transfusions de plaquettes chez les patients transplantés médullaires aplasiques [39].

Les rares cas de faux négatifs correspondent eux à un contexte de macrocytose, anémies mégaloblastiques ou SMD, où les fragments peuvent avoir un volume plus important que d'habitude [39].

Concernant le seuil de positivité, les études proposent un seuil de 0,2-0,3% pour Siemens® et 0,3-0,5% pour Sysmex®.

Il est important de noter que le paramètre GRF est un paramètre peu coûteux et disponible immédiatement. La méthode est observateur-indépendante et montre une bonne reproductibilité.

Ainsi, le paramètre GRF peut être utilisé comme un outil de dépistage pour la détection des schizocytes dans le cadre des MAT mais une évaluation microscopique des résultats positifs est nécessaire pour confirmer leur présence [44].

2- Le paramètre HYPER

Le paramètre HYPER, pour hyperchromie, est aussi un paramètre érythrocytaire retrouvé chez les analyseurs Siemens® qui quantifie les cellules dites « hyperchromes ». Un signal se déclenche en cas de pourcentage supérieur ou égal à 4% d'hématies présentant une CCMH supérieure à 41g/dL. Parmi les étiologies possibles de déclenchement du signal, on retrouve la sphérocytose héréditaire, la drépanocytose et le SHU [45].

Aucune étude sur ce paramètre n'est actuellement disponible dans la littérature dans le cadre de schizocytoses.

IV- Objectifs de l'étude

Nous avons voulu étudier les performances du DM9600 à partir de frottis sanguins étalés par la technologie Siemens®. De plus, nous avons souhaité savoir si une utilisation combinée de la microscopie manuelle, automatisée et des données des analyseurs d'hématologie cellulaire automatisés nous permettait d'optimiser la prise en charge quotidienne des demandes de recherche de schizocytes.

Matériel et méthodes

I- Echantillons

169 tubes de sang veineux périphérique avec anticoagulant EDTA (BD Vacutainer®) ont été utilisés. Les frottis sanguins ont été étalés sur lame (FF-100, Matsunami®) et colorés au MGG par l'Autoslide de l'analyseur d'hématologie cellulaire Advia2120i (Siemens®). Certains frottis ont été colorés en double par le système SP-10 de l'analyseur d'hématologie cellulaire XN3000 (Sysmex®). La lecture des frottis (décompte des hématies et des schizocytes) a été réalisée soit au microscope manuel considéré comme la technique de référence, soit par analyse microscopique automatisée.

II- Analyse de la qualité d'étalement des frottis sanguins

La qualité des frottis est évaluée par analyse des lames à l'aide du logiciel SmearChecker (CellaVision®). Le logiciel évalue l'étalement des frottis, en colorant l'image d'un frottis virtuel en vert (qualité acceptable de la monocouche de cellules), jaune (qualité intermédiaire de la monocouche) ou en rouge (qualité non acceptable de la monocouche, trop fine ou trop épaisse).

III- Décompte des schizocytes par microscopie manuelle

Le décompte est réalisé via un microscope (Leica DMRB®), selon les recommandations de l'ICSH concernant les critères morphologiques des schizocytes, sur 6 champs au grossissement 100 à l'aide d'un compteur de cellules sanguines (Counter Diff 15, Labomoderne®). Le nombre de globules rouges totaux présents sur 6 champs est déterminé en comptant le nombre de globules rouges présents sur le quart d'un champ microscopique multiplié par 24. Le pourcentage de schizocytes, correspondant au rapport du nombre de schizocytes sur le nombre de globules rouges totaux, est déterminé pour chaque frottis.

Lorsque le pourcentage de schizocytes a été rendu antérieurement à la réalisation de ce mémoire, celui-ci a été déterminé en comptant le nombre de schizocytes présents sur 6 champs au grossissement 100.

IV- Décompte des schizocytes par microscopie automatisée

Le décompte de schizocytes est réalisé par le système automatisé d'analyse d'images DM9600 (CellaVision®). L'application Advanced Red Blood Cell Software™ permet une classification des globules rouges et rend un décompte de schizocytes. On obtient un premier pourcentage « pré-reclassification ». Après vérification par un opération et déplacement si nécessaire des cellules (reclassification), on obtient un deuxième pourcentage « post-reclassification ». La phase de reclassification est réalisée pour tous les frottis par un seul et même opérateur.

Le logiciel fait la distinction entre cellules helmet et schizocytes. Nous avons fait le choix de regrouper ces deux catégories pour obtenir un seul pourcentage de schizocytes totaux.

Pour chacun des deux types de lecture (microscopie manuelle et automatisée), nous avons choisi de ne pas tenir compte du nombre de microsphérocytes, qui ont donc été exclus des décomptes de schizocytes.

V- Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels Microsoft Excel® version 2007 et GraphPad Prism® version 7.04.

La reproductibilité et la répétabilité ont été évaluées avec le coefficient de variation (CV).

La sensibilité, spécificité, VPP et VPN des résultats obtenus ont été déterminées par dénombrement des vrais/faux positifs/négatifs.

La comparaison de deux moyennes d'échantillons appariés ou non a été réalisée avec un test de Student.

VI- Extraction des données

Le recensement des paramètres biologiques, pour les demandes antérieures de recherche de schizocytes et les demandes traitées au cours de la réalisation de ce mémoire, est effectué avec une extraction de données du logiciel DxLab (Mediasys®) réalisée à l'aide du logiciel Crystal Report®.

Pour les paramètres GRF et HYPER, les valeurs sont récupérées à partir des données archivées sur l'analyseur Advia2120i®.

Résultats

I- Recensement des demandes de recherche de schizocytes des 4 premiers mois de l'année 2017

Nous avons recensé, de manière rétrospective, toutes les demandes de recherche de schizocytes entre le 1^{er} janvier et le 30 avril 2017. Pour chacune des demandes, nous avons reporté la date de la demande et le service prescripteur, ainsi que la mesure de plusieurs paramètres de l'hémogramme (hémoglobine, hématicrite, numération des plaquettes et des réticulocytes) et plusieurs paramètres témoins du processus d'hémolyse (LDH, bilirubine et haptoglobine).

En premier lieu, nous avons classé ces demandes en fonction du nombre de schizocytes rendu sur 6 champs microscopiques. Nous avons donc défini 4 catégories selon les critères suivants :

- Absence de schizocytes : 0 schizocyte (0%)
- Présence de rares schizocytes : entre 1 et 9 schizocytes (entre 0,01 et 0,49%)
- Présence de quelques schizocytes : entre 10 et 19 schizocytes (entre 0,50 et 0,99 %)
- Présence de schizocytes : à partir de 20 schizocytes (à partir de 1%)

Pour chaque catégorie, nous avons déterminé la valeur moyenne des paramètres hématologiques et biochimiques cités ci-dessus (Tableau 4).

Catégories	Nombre de demandes	Hémoglobine (g/dL)	Hématocrite (%)	Plaquettes (G/L)	Réticulocytes (G/L)	LDH (UI/L)	Bilirubine (µmol/L)	Haptoglobine (g/L)
Absents	551	10,9	32,6	215	74	862,6	20,9	1,35
Rares	206	9,5	28,7	182	90	1209,3	26,0	1,05
Quelques	32	8,4	24,9	149	104	1084,4	12,3	0,58
Présents	15	8,5	24,0	115	158	1977,9	12,9	0,43
TOTAL	804							

Tableau 4. Nombre de demandes et valeur moyenne des paramètres biologiques pour chaque catégorie de schizocytes

On recense 804 demandes dont 47 (5,8%) ont été rendues significatives (pourcentage de schizocytes $\geq 0.5\%$). De plus, on observe une corrélation proportionnelle entre l'augmentation de la schizocytose, l'augmentation du nombre de réticulocytes et la diminution de l'hématocrite, de la numération plaquettaire et de l'haptoglobine.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux services prescripteurs et avons répertorié toutes les demandes par service (Tableau 5).

Prescripteur	Nombre de demandes
Néphrologie	247
Gynécologie-obstétrique	122
Réanimation	111
Onco-hématologie	110
Urgences (adultes et pédiatrie)	53
Médecine interne / Path. infectieuses	46
Cardiologie	17
Autres services	98
TOTAL	804

Tableau 5. Nombre de demandes par service prescripteur

La néphrologie arrive en tête des services prescripteurs, suivie par la gynécologie-obstétrique (surveillance de grossesse), la réanimation et l'oncohématologie.

Enfin, nous avons déterminé le volume quotidien de recherche de schizocytes (Tableau 6).

Moyenne [min;max]	Ecart-type
7 [1;16]	3,60

Tableau 6. Nombre de demandes quotidiennes de recherche de schizocytes

II- Evaluation des performances du DM9600 pour le décompte des schizocytes

A- Etude de répétabilité

Pour étudier la répétabilité du DM9600, nous avons sélectionné deux échantillons : le premier avec une schizocytose comprise entre 0,5 et 1%, le deuxième avec une schizocytose supérieure à 1%. Chaque frottis des deux échantillons est lu 10 fois par le DM9600. Nous obtenons le nombre total de globules rouges comptés par le DM9600 sur un champ de lecture ainsi que le pourcentage de schizocytes mesuré avant et après reclassification par un observateur (Figure 5).

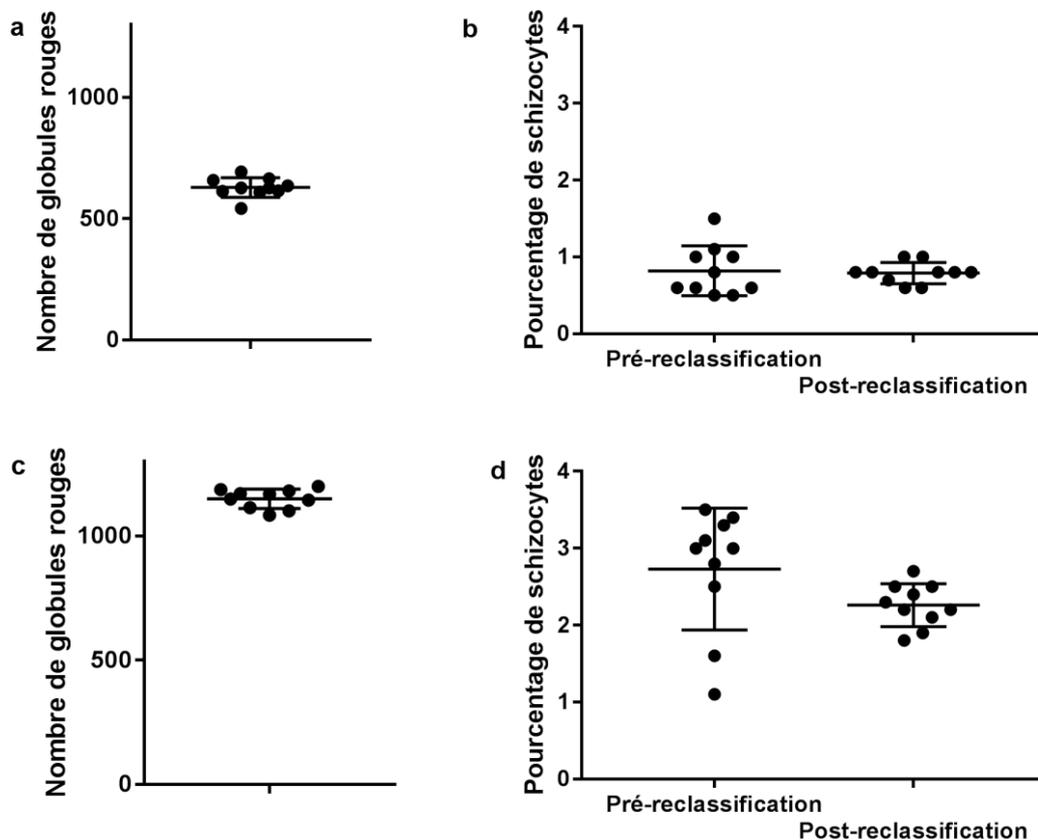


Figure 5. Répétabilité du DM9600 (a. et b. Nombre de globules rouges comptés et pourcentage de schizocytes mesuré pour l'échantillon avec la schizocytose comprise entre 0,5 et 1% ; c. et d. Nombre de globules rouges comptés et pourcentage de schizocytes mesuré pour l'échantillon avec la schizocytose > 1%)

Concernant l'échantillon avec un pourcentage de schizocytes compris entre 0,5 et 1%, le CV du nombre de globules rouges comptés est assez bon (6,43%). En revanche, celui du pourcentage de schizocytes pré-reclassification est élevé (39,75%). L'étape de reclassification améliore la valeur du CV mais celle-ci reste bien supérieure à 10% (17,35%).

Concernant l'échantillon avec un résultat significatif, le CV du nombre de globules rouges comptés est encore meilleur (3,38%). Celui du pourcentage de schizocytes pré-reclassification reste élevé (29,00%) et celui post-reclassification se rapproche de la valeur de 10% (12,38%).

B- Etude de reproductibilité

Pour étudier la reproductibilité du DM9600, nous avons choisi un échantillon avec un pourcentage de schizocytes supérieur à 1% et nous avons étalé 10 frottis successifs avec les mêmes paramètres d'étalement. Les 10 frottis sont ensuite lus par le DM9600. Nous avons déterminé le nombre de globules comptés et le pourcentage de schizocytes mesuré avant et après reclassification par un observateur. En parallèle, nous avons réalisé un décompte de schizocytes par lecture microscopique classique par le même observateur (Figure 6).

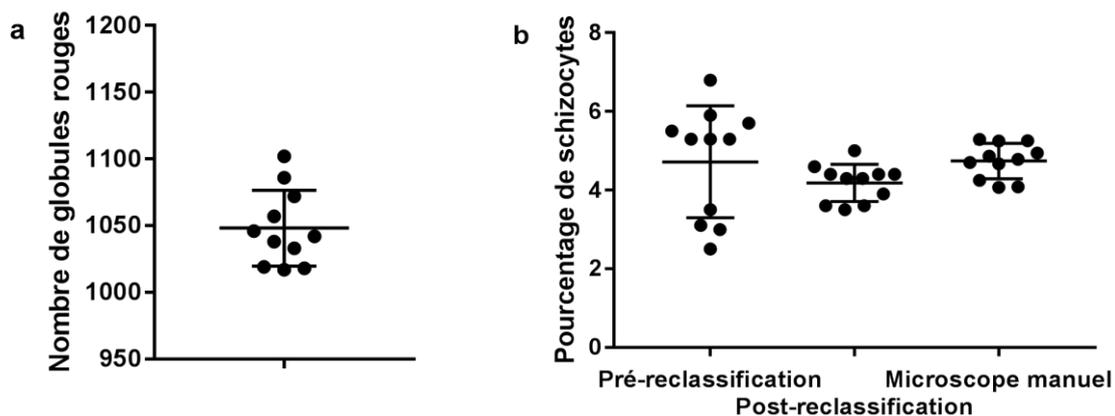


Figure 6. Reproductibilité du DM9600 (a. Nombre de globules rouges comptés ; b. Pourcentage de schizocytes)

Le CV du nombre moyen de globules rouges comptés est de 2,99%. L'automate est donc très reproductible pour ce paramètre.

En revanche, le CV du pourcentage de schizocytes avant reclassification est élevé (30,19%). L'étape de reclassification par le lecteur, comme pour la répétabilité, améliore la reproductibilité (CV de 11,24%) et se rapproche de celle du microscope manuel (CV de 9,49%).

C- Demandes non significatives

Nous avons sélectionné 100 frottis sanguins correspondant à 100 demandes de recherche de schizocytes qui ont été rendues au prescripteur non significatives (schizocytose < 0,5%) au cours d'une lecture antérieure. Au départ, l'objectif était d'exploiter un certain nombre de frottis (seuil maximal fixé à 100). Pour cela, nous avons récupéré et utilisé les frottis de toutes les demandes quotidiennes rendues non significatives. Mais nous avons mis en évidence la présence de demandes successives pour plusieurs mêmes patients que nous avons choisi d'exclure, en ne conservant que la première demande.

Ces frottis ont été lus par le DM9600 et nous avons déterminé le nombre de globules rouges comptés, le pourcentage de schizocytes mesuré avant et après reclassification par un observateur. Enfin, nous avons défini en parallèle le pourcentage de schizocytes par lecture microscopique classique.

Nous avons comparé le pourcentage de schizocytes rendu par microscopie manuelle avec le pourcentage pré-reclassification de la méthode automatisée d'une part, et le pourcentage post-reclassification d'autre part (Figure 7).

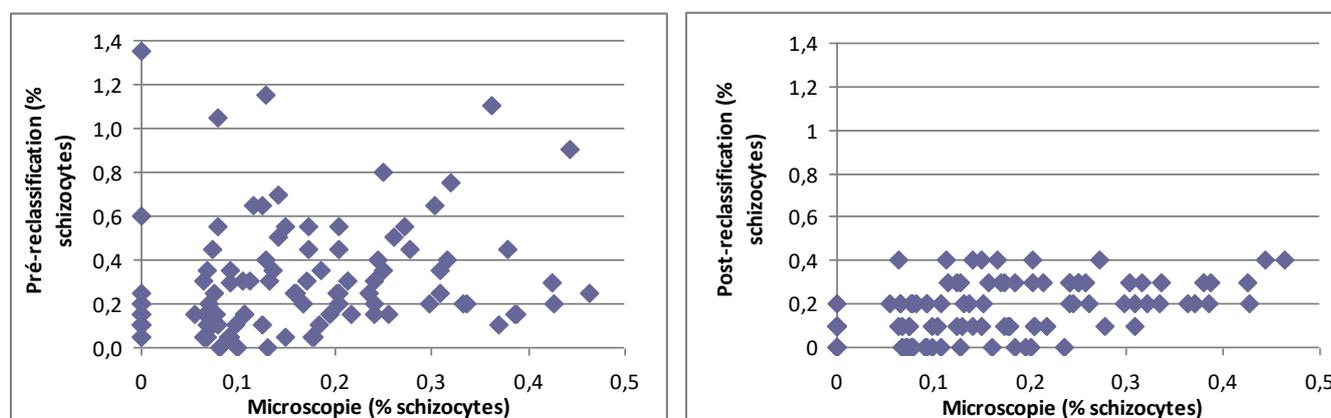


Figure 7. Comparaison du pourcentage de schizocytes entre microscopie manuelle et automatisée (à gauche : pré-reclassification ; à droite : post-reclassification)

Concernant la comparaison avec l'étape de pré-reclassification, on observe une grande dispersion des points en lien avec la mauvaise reproductibilité de l'automate lors de cette étape.

En revanche, la corrélation est meilleure entre l'étape de post-reclassification et la microscopie manuelle, bien qu'elle ne soit pas optimale.

De plus, visuellement, en considérant un intervalle comprenant 95% des valeurs obtenues, nous en déduisons un seuil de positivité de $> 0,8\%$ pour l'étape de pré-reclassification et de $> 0,4\%$ pour l'étape de post-reclassification.

D- Patients hospitalisés pour micro-angiopathie thrombotique

Nous avons recensé toutes les demandes de recherche de schizocytes pour 3 patients hospitalisés avec un diagnostic de micro-angiopathie thrombotique :

- femme de 72 ans présentant un SHU typique post-infectieux (1)
- enfant de 2 ans présentant un SHU atypique (2)
- femme de 42 ans présentant un SHU typique post-infectieux (3).

Comme précédemment, tous les frottis sanguins correspondant à ces demandes ont été lus par le DM9600 et nous avons déterminé le nombre de globules rouges comptés, le pourcentage de schizocytes mesuré avant et après reclassification par un observateur. Enfin, nous avons défini le pourcentage de schizocytes par lecture microscopique classique (Figure 8).

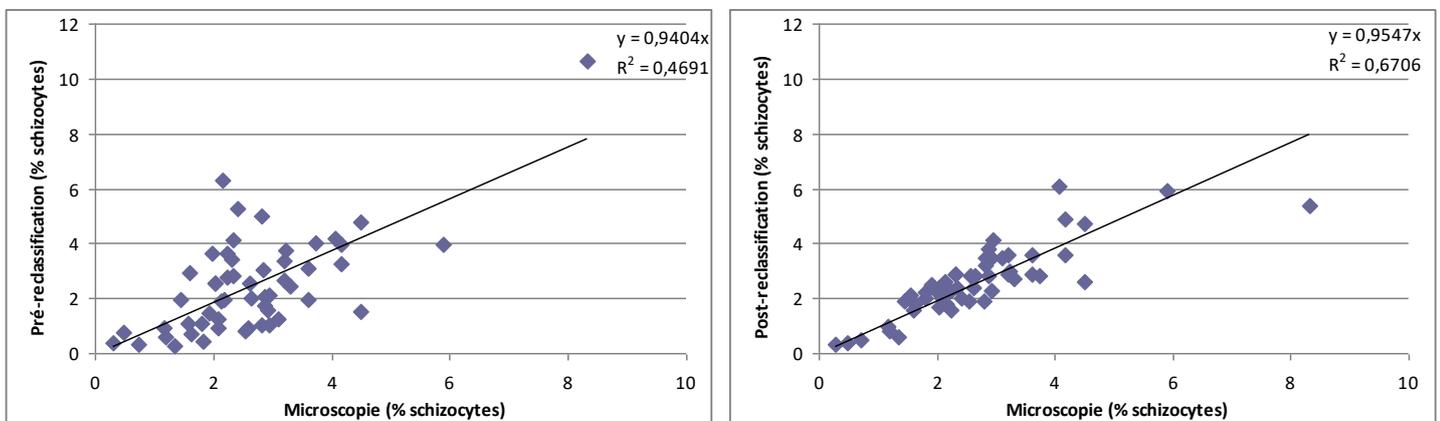
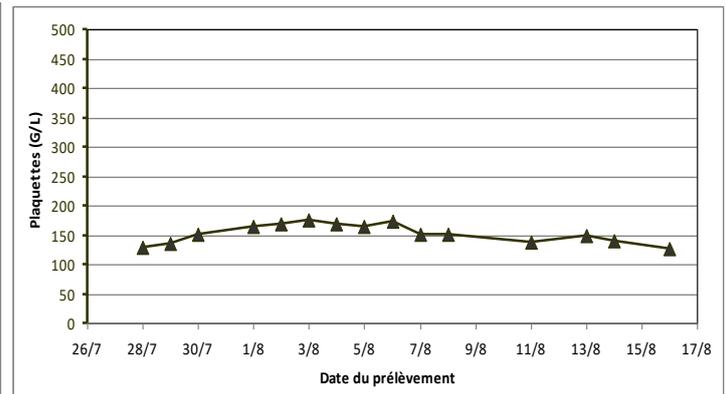
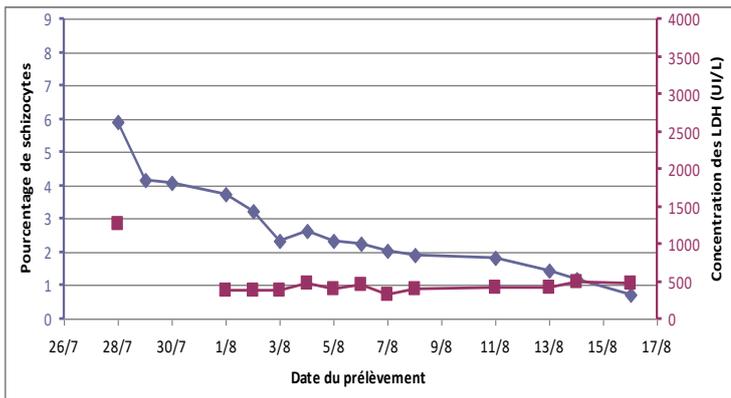


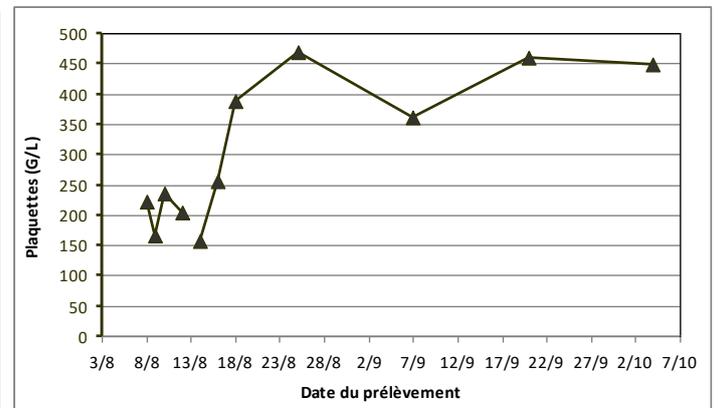
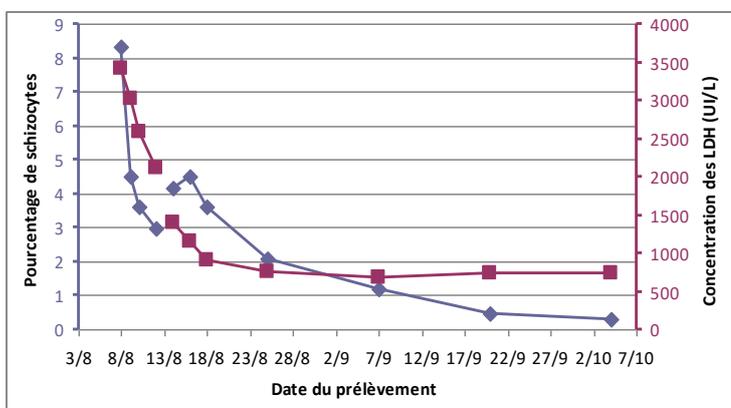
Figure 8. Comparaison du pourcentage de schizocytes entre microscopie manuelle et automatisée (à gauche : pré-reclassification ; à droite : post-reclassification)

Pour les 3 patients, nous avons voulu évaluer l'évolution du pourcentage de schizocytes, des LDH et de la numération plaquettaire tout au long de l'épisode de MAT (Figure 9).

(1)



(2)



(3)

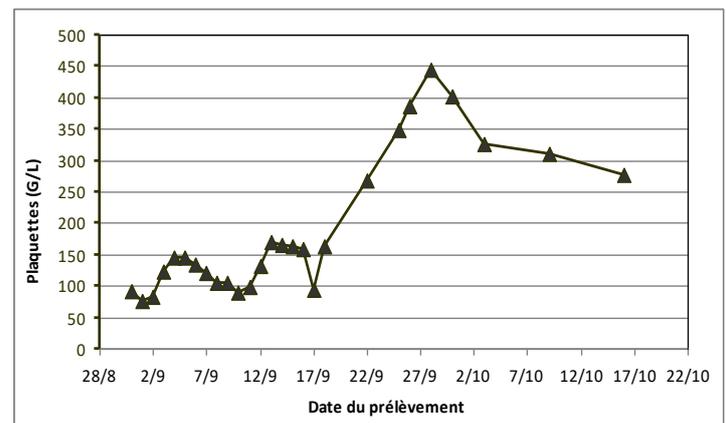
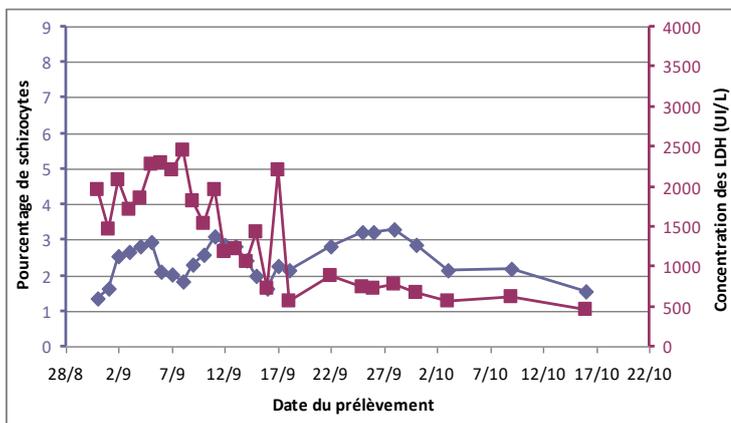


Figure 9. Evolution du pourcentage de schizocytes, des LDH et de la numération plaquettaire au cours de l'épisode de MAT des patients (1), (2) et (3) (à gauche : pourcentage de schizocytes et LDH ; à droite : numération plaquettaire)

Pour les deux premiers patients (1 et 2), l'évolution du pourcentage de schizocytes et des LDH est semblable avec une diminution et normalisation des LDH en parallèle de celle des schizocytes. Concernant les plaquettes, la numération est relativement stable pour le patient (1) et elle est inversement corrélée au pourcentage de schizocytes pour le patient (2).

Pour le patient (3), l'évolution de ces trois paramètres est plus irrégulière bien que les LDH et les plaquettes tendent à se normaliser sur la fin de la période évaluée.

E- Etude de la sensibilité et de la spécificité

A partir des seuils de positivité déterminés avec les demandes non significatives (cf. II-C), nous avons calculé la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et négative pour les étapes de pré et post-reclassification en se rapportant au seuil de positivité de 0,5% pour la microscopie manuelle. (Tableau 7).

	Pré-reclassification	Post-reclassification
Sensibilité	0,88	1,00
Spécificité	0,94	1,00
VPP	0,88	1,00
VPN	0,94	1,00

Tableau 7. Sensibilité et spécificité du DM9600

III- Comparaison des technologies d'étalement des frottis sanguins

Nous avons sélectionné 10 échantillons de sang périphérique du jour en fonction de plusieurs critères :

- 5 demandes de recherche de schizocytes

- 4 demandes avec un résultat rendu non significatif

Contexte clinique : - anémie avec ictère, dyspnée et hémoglobinurie : diagnostic de AHAI

- suspicion de réaction GvH chez allogreffé après maladie de Hodgkin

- pré-éclampsie

- anémie avec ictère : diagnostic de pancréatite aigue

- une demande avec un résultat rendu significatif > 1% : patient présentant un PTT

- 5 demandes de NFS seule (pas de recherche de schizocytes associée)

- 3 demandes avec hémoglobine rendue > 12g/dL

- une demande avec hémoglobine comprise entre 9 et 10 g/dL

- une demande avec hémoglobine rendue < 7g/dL.

Pour chaque échantillon, 2 frottis sont étalés, l'un par le système Autoslide de notre automate Advia2120i Siemens® et l'autre par le système SP-10 de l'automate Sysmex® XN3000. Ces paires de frottis sont lues par le DM9600 et nous avons déterminé le nombre de globules rouges comptés. Nous avons comparé les résultats obtenus pour les deux méthodes d'étalement (Figure 10).

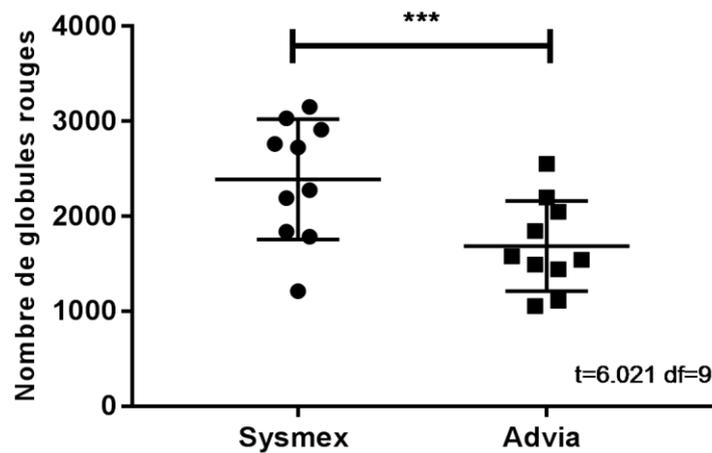


Figure 10. Comparaison du nombre de globules rouges comptés entre les deux types d'étalement

Une différence significative du nombre de globules rouges apparaît entre les deux types d'étalement.

Afin de confirmer nos résultats, nous avons réalisé un test de Student de comparaison de 2 moyennes dépendantes (échantillons appariés) pour chaque échantillon : les deux méthodes d'étalement donnent des résultats significativement différents.

De plus, pour chaque technologie, nous avons comparé le nombre de globules rouges comptés lors de deux passages différents du même frottis: il n'y a pas de différence significative entre les deux passages des frottis (résultats non présentés).

IV- Influence des paramètres d'étalement sur le nombre de globules rouges comptés par le DM9600

Nous avons évalué l'influence des paramètres d'étalement des frottis sanguins sur la qualité de lecture des éléments figurés, notamment le nombre de globules rouges comptés par le DM9600.

Pour cela, nous avons fait varier plusieurs paramètres d'étalement pour deux échantillons : le premier avec un hémocrite normal (33,6%), le deuxième avec un hémocrite faible (19,6%).

Les paramètres évalués sont les suivants :

- l'angle avec lequel le film d'étalement va étaler le dépôt de sang sur le frottis (valeurs possibles : la valeur 0 correspond à un angle de 40° et la valeur 1 correspond à un angle de 45°)
- la temporisation : temps pendant lequel le film d'étalement est maintenu au niveau du dépôt afin que le sang se répartisse sur la totalité de la longueur du frottis
- la vitesse d'étalement : plus la vitesse sera grande et plus le frottis sera court (forces de cisaillement)
- le volume de la goutte de dépôt.

Chaque changement de paramètre entraîne l'étalement d'un nouveau frottis. Chaque frottis est lu par le DM9600 qui rend un nombre total de globules rouges détectés (Tableaux 8 et 9).

Volume (µL)	Angle	Vitesse (pas/s)	Temporisation (ms)	Nombre de globules rouges
3,0	1	3200	1000	1839
2,7	1	3200	1000	1773
3,0	1	3400	1000	1852
2,7	1	3400	1000	1865
3,0	0	3000	1000	1785
3,0	0	3200	1000	1667
3,0	1	3000	1400	1860
3,0	1	3200	1400	1917

Tableau 8. Variation du nombre de globules rouges comptés en fonction des paramètres d'étalement (échantillon à hémocrite normal)

Volume (µL)	Angle	Vitesse (pas/s)	Temporisation (ms)	Nombre de globules rouges
4,6	1	3500	590	1245
4,0	1	3500	590	1356
4,6	1	3000	590	1141
4,6	0	3500	590	1553
4,0	0	3500	590	1574
4,6	1	3500	700	1335
4,0	1	3500	700	1443
4,3	1	3000	590	1162

Tableau 9. Variation du nombre de globules rouges comptés en fonction des paramètres d'étalement (échantillon à hématoците bas)

Pour l'échantillon à hématoците normal, le DM9600 détecte un nombre moyen de 1819,8 globules rouges par champ avec un CV de 4,22%. Pour l'échantillon à hématoците faible, le DM9600 détecte un nombre moyen de 1351,1 globules rouges par champ avec un CV de 12,20%.

La variation des paramètres d'étalement ne semble pas avoir de conséquences sur le nombre de globules rouges comptés par l'automate donc n'influe pas sur le décompte de schizocytes. Nous avons voulu confirmer ces résultats par l'utilisation du SmearChecker®. Après analyse de la qualité d'étalement des frottis, le résultat est identique pour tous les frottis : « non conforme » (Figure 11). Ce qui confirme nos conclusions précédentes.

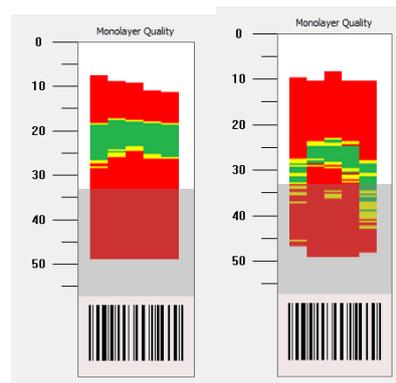


Figure 11. Exemples de frottis « conforme » et « non conforme », d'après l'analyse par le SmearChecker®

V- Etape de reclassification des globules rouges

A- Temps de reclassification

Afin de définir en pratique le temps de reclassification des globules rouges via l'application Red Blood Cell Advanced Software™ du DM9600 et ce, en fonction de la schizocytose, nous avons sélectionné 15 frottis pour lesquels le pourcentage de schizocytes avait été précédemment défini par le DM9600 :

- 5 frottis avec un pourcentage de schizocytes < 0.5%
- 5 frottis avec un pourcentage compris entre 0.5% et 1%
- 5 frottis avec un pourcentage > 1%.

Une nouvelle lecture des frottis a été réalisée par le DM9600 et pour chaque frottis, nous avons procédé à une reclassification des cellules en nous focalisant seulement sur les schizocytes : nous avons reclassé les schizocytes initialement placés dans d'autres catégories, et déplacé les cellules rangées initialement à tort parmi les schizocytes. Le temps était chronométré. Nous avons ainsi pu relever le temps de reclassification et le nombre de cellules déplacées, et définir le temps moyen par cellule déplacée.

Pour chacune des 3 catégories de schizocytose, nous avons calculé la moyenne des 5 frottis pour chaque paramètre et défini les valeurs minimale et maximale (Tableau 10).

Catégories	Nombre total de cellules déplacées	Temps (s)	Temps / cellule déplacée (s)
Schizocytes < 0,5%	8,4 [3;15]	107 [90;121]	17,1 [8,1;37,0]
Schizocytes 0,5-1%	16,6 [8;27]	166 [137;215]	11,6 [8,2;20,6]
Schizocytes > 1%	37 [29;53]	226 [196;276]	6,24 [5,2;7,4]

Tableau 10. Temps de reclassification des globules rouges en fonction de la schizocytose (moyenne [minimum ; maximum])

On note que le nombre de cellules déplacées ainsi que le temps de reclassification augmentent avec le pourcentage de schizocytes rendus. En revanche, le temps par cellule déplacée diminue.

En parallèle, nous avons mesuré le temps de décompte des schizocytes par microscopie manuelle pour un frottis de chacune des 3 catégories de schizocytose précédemment citées (Tableau 11).

Catégories	Temps (s)
Schizocytes < 0,5%	65
Schizocytes 0,5-1%	80
Schizocytes > 1%	98

Tableau 11. Temps de décompte des schizocytes par microscopie manuelle

Quel que soit le pourcentage de schizocytes, le temps de décompte par microscopie manuelle est inférieur au temps de décompte par microscopie automatisée.

B- Nature des cellules déplacées

Nous nous sommes intéressés à la morphologie des cellules déplacées lors de la reclassification. Au cours de l'ensemble des reclassifications que nous avons réalisées, nous avons noté d'une part les catégories de globules rouges considérés à tort comme schizocytes (faux positifs), et d'autre part les catégories où étaient pré-classés initialement les vrais schizocytes (faux négatifs).

Les cellules faussement positives correspondaient le plus souvent à des cellules de forme normale ou des cellules « poubelle ». Pour les faux négatifs, les schizocytes étaient pré-classés parmi les drépanocytes, acanthocytes et les cellules de forme normale, et plus rarement dans les catégories dacryocytes et échinocytes.

Un exemple d'erreurs de pré-classification est présenté ci-dessous (Figure 12).



Figure 12. Exemple d'erreurs de pré-classification des globules rouges : faux positifs (cerclage rouge) et de faux négatifs (cerclage vert) (copie d'écran à partir du logiciel Red Blood Cell Advanced Software™)

VI- Utilisation des données des analyseurs d'hématologie cellulaire automatisés pour la détermination du nombre de schizocytes

A- Le paramètre Globules Rouges Fragmentés

Nous avons évalué l'utilité du paramètre GRF rendu par l'analyseur pour le décompte des schizocytes.

Pour cela, nous avons tout d'abord défini le « bruit de fond » de l'appareil. Nous avons donc sélectionné 50 NFS d'adultes sains réalisées dans la même journée présentant des valeurs « normales » pour les paramètres suivants : hémoglobine, hématocrite et numération plaquettaire. Nous avons ensuite recensé les valeurs du paramètre GRF mesuré sur l'Advia2120i®, pour ces 50 numérations. Enfin, nous en avons déduit le pourcentage de GRF à partir du nombre total d'érythrocytes mesurés par l'analyseur.

Nous avons fait de même pour nos 100 demandes avec un résultat rendu non significatif et les demandes de nos 3 patients présentant une MAT. Nous en avons déduit comme précédemment le pourcentage de GRF.

Enfin, nous avons comparé le pourcentage de GRF entre le « bruit de fond », les demandes non significatives et les demandes-patients pour établir un éventuel lien entre l'importance de la schizocytose et le paramètre GRF (Figure 13).

Pour un des patients, nous avons obtenu une valeur du paramètre GRF bien supérieure aux autres demandes. De par son incohérence, nous avons choisi de l'exclure des résultats.

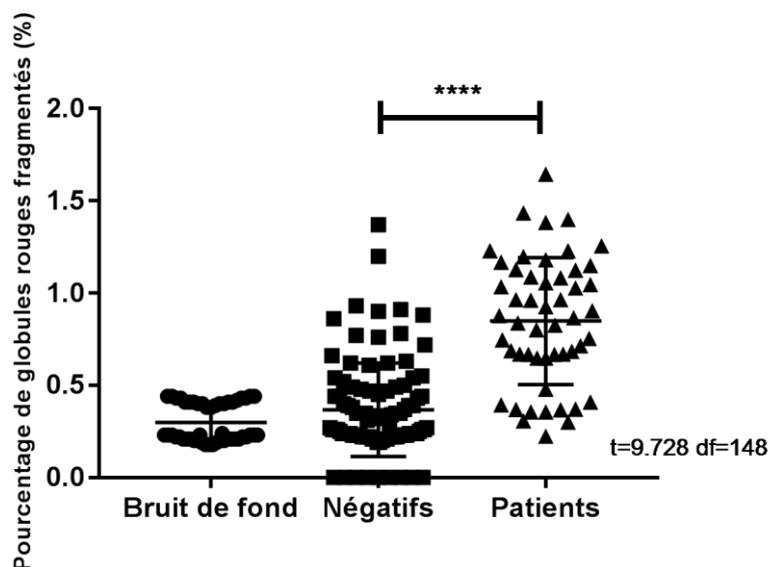


Figure 13. Comparaison du paramètre GRF

On note un bruit de fond important et permanent de l'analyseur concernant ce paramètre. De plus, on observe une grande dispersion des points pour les catégories « négatifs » et « patients ».

Cependant, il semble y avoir une différence significative entre ces deux dernières catégories. Afin de confirmer nos résultats, nous avons réalisé un test de Student de comparaison de deux moyennes indépendantes (échantillons différents) pour les demandes non significatives et les demandes-patients : les moyennes sont significativement différentes.

Enfin, à partir des demandes non significatives, on déduit une valeur prédictive positive : en effet, le pourcentage de GRF de ces demandes est toujours inférieur à 1%, hormis deux exceptions.

B- Le paramètre HYPER

De la même manière, nous avons étudié l'utilité du paramètre HYPER rendu par l'Advia2120i®.

Pour cela, nous avons fait exactement la même démarche que pour le paramètre GRF et nous avons comparé le pourcentage de cellules HYPER entre le « bruit de fond », les demandes non significatives et les demandes des patients présentant une MAT (Figure 14).

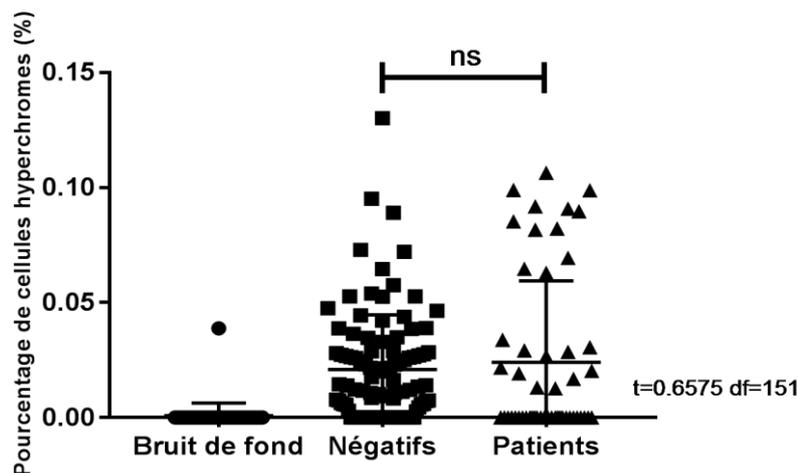


Figure 14. Comparaison du paramètre HYPER

Concernant ce paramètre, on note une absence de bruit de fond de l'analyseur.

De plus, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les catégories « négatifs » et « patients ».

Afin de confirmer nos résultats, nous avons réalisé une fois de plus un test de Student de comparaison de deux moyennes indépendantes (échantillons différents) pour les demandes non significatives et les demandes-patients : les moyennes ne sont pas significativement différentes.

C- Hémoglobine et numération plaquettaire

Nous avons évalué les variations de l'hémoglobine et de la numération plaquettaire en fonction de l'importance de la schizocytose. Nous avons donc classé, en 3 séries, nos 100 demandes non significatives et les demandes des 3 patients avec une MAT en fonction du pourcentage de schizocytes déterminé par microscopie classique :

- pourcentage de schizocytes < 0,5%
- pourcentage de schizocytes compris entre 0,5 et 1%
- pourcentage de schizocytes > 1%.

Pour chaque demande, nous avons répertorié les valeurs d'hémoglobine et de numération plaquettaire mesurées par l'Advia2120i® (Figure 15).

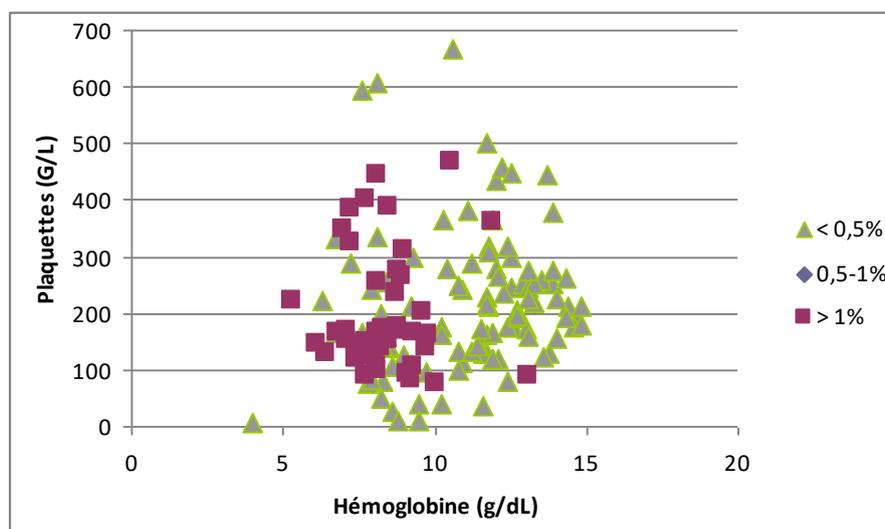


Figure 15. Variation de l'hémoglobine et des plaquettes en fonction de la schizocytose

On n'observe pas de corrélation entre l'hémoglobine et la numération plaquettaire : il y a une grande dispersion des points en particulier pour les demandes non significatives (schizocytose < 0,5%).

Cependant, pour la série avec une schizocytose > 1%, il semble y avoir une valeur prédictive positive de l'hémoglobine : plus de 90% des échantillons de cette catégorie ont une hémoglobine < 10g/dL.

Discussion

Pour les 4 premiers mois de l'année 2017, nous avons recensé 804 demandes dont 47 (5,8%) ont été rendues significatives (pourcentage de schizocytes $\geq 0.5\%$). Il y a donc peu de résultats significatifs et un grand nombre de demandes inutiles.

Concernant les services prescripteurs, la néphrologie arrive en haut de la liste, ce qui s'explique par la présence systématique de recherche de schizocytes dans tous les bilans de consultation des patients avec une pathologie rénale ou transplantés rénaux. En deuxième position, on retrouve le service de gynécologie obstétrique qui comprend la surveillance des grossesses avec le diagnostic et suivi de l'éclampsie, pré-éclampsie et du HELLP syndrome.

Il convient de noter la présence des services de réanimation ainsi que les urgences (adultes comme pédiatriques) qui, bien que plus bas dans le classement donc plus faibles en termes de nombre de demandes, reflètent l'importance de la recherche de schizocytes en termes d'orientation diagnostique et l'urgence de la prise en charge, en particulier dans le contexte de suspicion de MAT.

Le DM9600 montre une excellente répétabilité concernant le nombre de globules rouges détectés. Cependant, il est important de noter que la moyenne des valeurs obtenues pour l'échantillon avec une schizocytose comprise entre 0,5 et 1% est faible (628,4 globules rouges détectés), ce qui s'explique par une mauvaise qualité de l'étalement de cet échantillon menant à des amas de globules rouges non détectés par l'automate. Mais le CV reste très bon.

Le fournisseur nous indique que le DM9600 a tendance, pour plusieurs passages d'un même frottis, à choisir la même zone de lecture. Cet aspect technique est donc l'une des raisons expliquant la faible valeur de ces CV.

Dans les deux séries de mesures, le CV du pourcentage de schizocytes avant reclassification est mauvais (39,75%) avec parfois, pour l'échantillon avec la schizocytose comprise entre 0,5 et 1%, des différences importantes en termes d'impact clinique (ex : 1,5% de schizocytes rendus avant reclassification et 0,8% après reclassification).

Bien que non optimales, les valeurs des CV après reclassification n'ont pas d'impact clinique. La valeur plus élevée du CV pour l'échantillon avec la schizocytose comprise entre 0,5 et 1% peut s'expliquer en partie, par un pourcentage moyen de schizocytes plus faible que pour l'échantillon cliniquement significatif.

La reproductibilité du DM9600 avant reclassification n'est pas bonne. Les mesures étant réalisées par le même observateur, nous pouvons émettre l'hypothèse que la mauvaise qualité de l'étalement a entraîné, dans une certaine mesure, une hétérogénéité entre les différents frottis.

En comparant avec les résultats obtenus par Hervent *et al.* [34], les valeurs des CV sont globalement plus basses donc meilleures que les nôtres. Cependant, nous en arrivons à la même conclusion de similitude entre les CV du pourcentage après reclassification et par microscopie manuelle. Or, l'étude hollandaise obtient cette comparabilité aussi avec le décompte avant reclassification ce qui en fait notre principale divergence.

Concernant nos seuils de positivité, ils sont similaires à ceux obtenus par Hervent (0,7% avant reclassification, 0,6% après reclassification) [34].

Cependant, pour les demandes significatives, les coefficients de corrélation entre microscopie manuelle et automatisée sont beaucoup plus bas (pré-reclassification : 0,47 ; post-reclassification : 0,67) que ceux d'Hervent (respectivement 0,78 et 0,98) [34], bien que la conclusion concernant la corrélation entre microscopie manuelle et automatisée avant reclassification soit la même (différence non systématique mais considérable). Au contraire, après reclassification, on conclut à une différence négligeable (aucun impact clinique) entre les deux méthodes mais proportionnelle à la schizocytose.

Concernant les paramètres de sensibilité et de spécificité, ceux obtenus pour la microscopie automatisée avant reclassification, bien que non optimaux, sont très bons. Ceci est attendu du fait de la présence d'un faible nombre d'échantillons avec une schizocytose comprise entre 0,5 et 1%, le panel étant constitué de demandes non significatives et de demandes de patients ayant une MAT).

La qualité de ces mêmes paramètres pour l'étape de post-reclassification s'explique surtout par la réalisation des mesures par le même opérateur.

Avant reclassification, le DM9600 a tendance à mal identifier les schizocytes : certains ne sont pas comptés comme tels et d'autres cellules (autres formes) sont répertoriées à tort comme schizocytes.

Comme nous, Hervent [34] a évalué les proportions de cellules faussement positives et faussement négatives que rend le DM9600 avant reclassification :

- 67% de globules rouges classés initialement comme schizocytes par le logiciel ont dû être reclassés dans d'autres catégories : 29% de forme normale, 37% de cellules « poubelles », et le 1% restant composé de dacryocytes, d'acanthocytes et d'échinocytes.

- 26% des globules rouges finalement classés comme schizocytes par l'opérateur proviennent d'autres catégories : 8% des dacryocytes, 6% des échinocytes, 11% des formes normales, et le 1% restant issu des catégories de drépanocytes, acanthocytes et stomatocytes.

Concernant les faux positifs, nous obtenons les mêmes erreurs de pré-classification que l'équipe hollandaise (majorité de forme normale et de cellules « poubelle »). Cependant, pour les faux négatifs, nous avons retrouvé les schizocytes principalement dans les catégories drépanocytes, acanthocytes et de forme normale, et en plus faible proportion parmi les dacryocytes et échinocytes.

Ces aspects techniques sont à l'origine d'une augmentation du temps de correction avant validation et du nombre de cellules à déplacer, variation qui se fait en parallèle de l'augmentation du pourcentage de schizocytes rendus à la fin, comme nous le montrons dans nos mesures.

De plus, la différence d'évolution observée entre le nombre de cellules déplacées et le temps de reclassification d'une part, et le temps par cellule déplacée d'autre part, trouve son explication dans l'aspect des globules rouges. Dans le cas de fortes schizocytoses, l'aspect des schizocytes est souvent très caractéristique et l'observateur a davantage de facilité à les repérer dans une population importante. Au contraire, pour des échantillons non significatifs, l'œil ne voyant pas de forme caractéristique, va peut-être s'attarder sur certaines formes douteuses, avec parfois la nécessité de faire appel à la fonction zoom du logiciel.

Enfin, le temps moyen de correction pour les échantillons significatifs est important (3min 46s). En tenant compte du temps de préparation du frottis pour son passage dans le DM9600 (édition et collage de l'étiquette) et du temps d'analyse et de pré-classification par l'automate, nous constatons que le temps total de recherche de schizocytes par méthode automatisée est plus important que le décompte manuel, où le temps de recherche de schizocytes comprend seulement le temps de lecture par l'observateur (1min38).

Comme nous venons de l'évoquer, le temps de correction donc du décompte automatisé se réduit proportionnellement à la schizocytose. Et la différence de temps entre décompte automatisé et manuel diminue aussi en parallèle de la schizocytose (respectivement 1min47 et 1min05 pour une schizocytose < 0,5%). En prenant en compte le fait que le temps d'analyse par le DM9600 est en partie du temps que le lecteur peut utiliser pour la reclassification

d'autres frottis, nous pouvons conclure qu'approximativement, le temps d'un décompte automatisé et d'un décompte manuel est le même pour les frottis avec un pourcentage de schizocytes < 0.5%.

Tous ces résultats et ces conclusions sont à nuancer du fait de l'expertise assez élevée de l'opérateur qui a réalisé les mesures.

La comparaison du nombre de globules rouges comptés par le DM9600 entre les deux méthodes d'étalement Siemens® et Sysmex® montre systématiquement un nombre supérieur pour Sysmex®. Ceci s'explique par une différence des technologies d'étalement. Alors qu'avec la méthode Siemens®, une goutte de sang est déposée sur le frottis puis étalé avec un film plastique, la technologie Sysmex® utilise une lamelle en verre pour étaler le dépôt. La série de mesures que nous avons réalisée montre que l'étalement Sysmex® est de meilleure qualité et rend une répartition plus homogène des globules rouges sur le frottis.

Cependant la différence de pourcentages de schizocytes mesurés avant et après reclassification est plus importante avec la technologie Sysmex® que Siemens®. En effet, après correction, on s'aperçoit que le DM9600 a tendance, pour les frottis étalés avec la méthode Sysmex®, à identifier des plaquettes comme des schizocytes, entraînant à plusieurs reprises, des résultats faussement significatifs. Cette remarque peut être nuancée par le fait que l'étalement façon Sysmex® des frottis a été réalisé après transport des échantillons vers un autre plateau technique (1h de transport) ce qui a impacté la conservation et l'état de l'échantillon donc l'aspect des hématies après étalement. De plus, le protocole de coloration Sysmex® fait dans le laboratoire extérieur n'était pas adapté à l'utilisation du DM9600.

Nous observons également que, pour la plupart des échantillons, les pourcentages de schizocytes après reclassification sont plus élevés avec l'étalement type Sysmex®. La question se pose de savoir si ceci est en partie lié au nombre total de globules rouges comptés plus élevé avec cette technologie.

Concernant la variation des paramètres d'étalement Siemens®, on n'observe pas de différence significative du nombre de globules rouges comptés par le DM9600 (CV < 5%) pour l'échantillon avec l'hématocrite normal. Pour l'échantillon avec l'hématocrite plus faible, le CV est un peu plus élevé mais les différences restent modérées. Ceci s'explique en partie par la valeur plus basse de l'hématocrite, qui implique des valeurs de globules rouges plus faibles ce qui a un impact, dans une certaine mesure, sur le CV.

De plus, comme pour l'étude de comparaison des technologies d'étalement, on constate que le nombre de globules rouges comptés est toujours inférieur à 2500, ce qui est bien plus faible que les valeurs de la littérature (entre 2000 et 4000 globules rouges pour Egele *and al.* [46], qui utilisent un étalement Sysmex®). A nouveau, ceci est principalement dû à la technique d'étalement de l'Autoslide de Siemens® et est confirmé par les résultats médiocres de qualité des frottis obtenus par analyse par le SmearChecker®.

Concernant le paramètre GRF, malgré une différence significative du paramètre entre les demandes non significatives et les demandes-patients ayant une MAT, la dispersion des points et la présence d'un bruit de fond important nous poussent à remettre en cause l'utilité directe de ce paramètre pour la recherche de schizocytes. D'ailleurs, les valeurs obtenues pour ce bruit de fond et les demandes non significatives sont bien supérieures au seuil de positivité de la littérature (0,2-0,3% d'après [39]).

Par la présence d'une poïkilocytose pour les deux demandes non significatives avec d'exceptionnelles valeurs hautes de GRF, on peut définir la valeur de 1% comme seuil prédictif positif. Mais un trop grand nombre de demandes-patients ont une valeur de GRF inférieure à 1% (faible sensibilité). On peut donc considérer le paramètre GRF seulement comme un outil de détection de la présence de schizocytes, comme cela a été mentionné dans les études qui ont travaillé sur le sujet [39].

Concernant le paramètre HYPER, la dispersion des valeurs et l'absence de différence significative entre les catégories « négatifs » et « patients » nous permettent d'exclure définitivement la possibilité d'utiliser ce paramètre dans la recherche de schizocytes.

Concernant nos mesures sur la variation de l'hémoglobine et des plaquettes en fonction de la schizocytose, la dispersion des points pour les demandes non significatives est attendue. Elle s'explique par la diversité des contextes de prescription des demandes de recherche de schizocytes, notamment dans le cadre de bilans systématiques, où l'hémoglobine et la numération plaquettaire sont parfois dans les valeurs normales.

Cependant, pour une schizocytose > 1%, il semble y avoir une valeur prédictive positive de l'hémoglobine à 10g/dL. Cette notion pourrait être prise en compte pour la prise en charge des demandes de schizocytes.

Enfin, au fil des reclassifications effectuées, nous avons observé certains manquements du DM9600 que ce soit dans le choix de la zone de lecture comme dans l'analyse des cellules.

D'une part, nous avons observé à de nombreuses reprises que la zone de lecture choisie n'était pas optimale : zones partiellement vides d'hématies dues à l'étalement, présence de rayures sur le frottis faussant considérablement les résultats de pré-reclassification en augmentant artificiellement le nombre de fragments de globules rouges, choix d'une zone en queue de frottis où les globules rouges apparaissent déformés.

D'autre part, nous avons remarqué la présence de cellules comptées par le DM9600 deux ou trois fois selon les cas, et apparaissant donc en doublon ou triplet lors de la pré-classification.

Malgré des résultats mitigés concernant les performances du DM9600, nous avons souhaité développer une procédure de gestion des demandes de recherche de schizocytes, au vu du nombre de demandes traitées quotidiennement par notre laboratoire (Figure 16).

Pour chaque demande de recherche de schizocytes, nous vérifions s'il s'agit d'une première demande :

- si aucune antériorité n'est retrouvée, le frottis est lu par le DM9600.
- si une antériorité existe, nous regardons l'importance de la schizocytose rendue. Si celle-ci est $\geq 0,5\%$, un nouveau décompte est réalisé par microscopie manuelle et on privilégie la lecture de ce frottis par rapport aux autres demandes. Si le pourcentage de schizocytes rendu antérieurement est $< 0,5\%$, le frottis est lu par le DM9600.

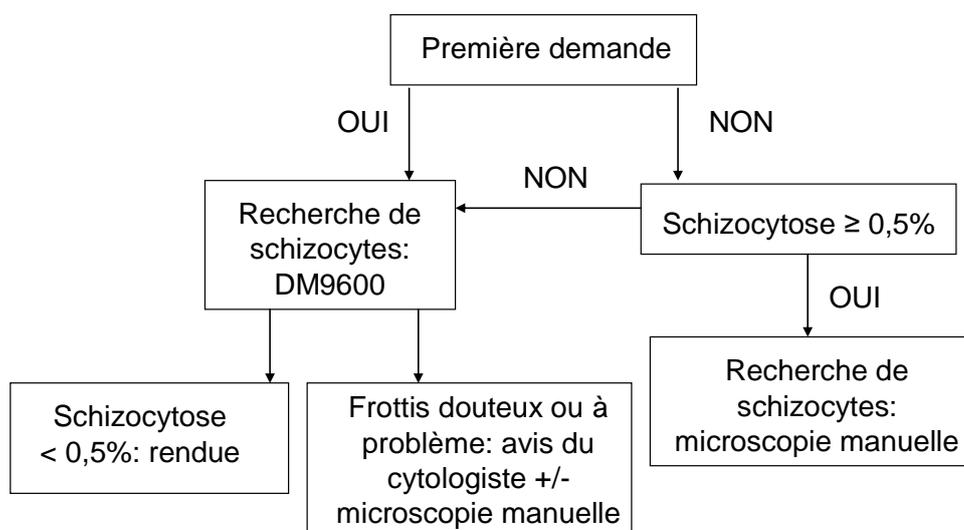


Figure 16. Prise en charge des demandes de recherche de schizocytes

Après lecture du frottis par le DM9600 et vérification rapide de la classification par le technicien, le pourcentage de schizocytes est validé s'il est inférieur à 0,5%.

En revanche, un avis du cytologiste est demandé dans les cas suivants :

- la visualisation du champ de lecture principal met en évidence des anomalies d'étalement (rayures, vides, amas de cellules...)
- le nombre total de globules rouges comptés par le DM9600 est inférieur à 1000
- la pré-classification montre la présence d'un pourcentage important de plusieurs formes pathologiques
- le pourcentage de schizocytes après reclassification est $\geq 0,5\%$.

Le cytologiste évalue alors rapidement, d'après la classification présentée à l'écran, si une lecture par microscopie classique est nécessaire. Si c'est le cas, le frottis est lu manuellement. Sinon, le décompte proposé par la méthode automatisée est validé.

Ainsi, la majorité de nos demandes de recherche de schizocytes, qui sont non significatives, seront traitées de manière efficace et fiable. Et un temps plus important pourra être consacré pour des échantillons possiblement positifs et/ou avec une cytologie érythrocytaire complexe qui nécessitent une évaluation microscopique et globale du frottis sanguin.

Bien évidemment, les étapes de cette procédure devront être confirmées par de futures expérimentations impliquant un plus grand nombre d'échantillons et devront être adaptées aux éventuelles difficultés rencontrées lors de la mise en pratique.

Concernant les paramètres des analyseurs automatisés d'hématologie cellulaire, nous faisons le choix de ne pas les utiliser pour le moment. En effet, de par leur faible sensibilité, les prendre en compte n'ajouterait que de la complexité à notre démarche.

Conclusion et perspectives

Le DM9600 montre de grosses faiblesses pour l'identification des schizocytes sur un frottis sanguin. Une correction de la classification par un observateur nous permet d'obtenir des performances de décompte comparables à une évaluation microscopique. Mais cette correction est chronophage, tout particulièrement lorsque la schizocytose est importante. On pourrait espérer qu'une formation adéquate du personnel à l'utilisation du DM9600 ainsi qu'une intégration de celui-ci dans une chaîne robotique couplée à l'analyseur automatisé d'hématologie cellulaire et à l'étaleur-colorateur puissent réduire les temps de rendu de résultats.

Au vu du nombre de globules rouges comptés par le DM9600, le rendu de pourcentage de schizocytes semble plus précis que le décompte manuel. Ceci est d'autant plus vrai avec la technologie d'étalement des analyseurs Sysmex®.

Ainsi, si des améliorations techniques du logiciel Red Blood Cell Advanced Software™ sont réalisées dans les années à venir afin d'améliorer la pré-classification, il serait alors possible d'envisager une prise en charge des recherches de schizocytes en utilisant seulement la microscopie automatisée ou éventuellement en la couplant aux données d'analyseurs automatisés d'hématologie cellulaire (et tout particulièrement l'hémoglobine et les GRF).

Enfin, le nombre de recherches de schizocytes finalement non significatives est important. On pourrait penser qu'une analyse des prescriptions, avec l'aide d'un système de prescription connectée, ainsi que la mise en place d'un contrat clinico-biologique mentionnant les différents examens à réaliser dans le cadre d'une suspicion de MAT pourrait réduire le nombre de recherches effectuées et ainsi économiser du temps technicien et biologiste, si précieux par les temps qui courent.

Bibliographie

- [1] Lesesve JF, Salignac S, Bordigoni P, Lecompte T, Troussard X et le GFHC. Rôle du biologiste confronté à une recherche de schizocytes. *Hématologie* 2007;13(3):193-204.
- [2] Bull BS, Rudenberg ML, Dacie JV, Brain MC. Red blood cell fragmentation in microangiopathic haemolytic anemia: in vitro studies. *Lancet*. 1967;2:1123-5.
- [3] Bessis M. Réinterprétation des frottis sanguins. Paris : Masson Springer, 1976.
- [4] Lesesve JF, Fenneteau O, Cynober T, Lecompte T, *et al.*, et le GFHC. Rôle du biologiste confronté à la recherche de schizocytes. *Ann. Biol. Clin.* 2003;61(5):505-12.
- [5] George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2000;96(4):1223-9.
- [6] Lesesve JF, Lecompte T, Alla F, Fenneteau O, Cynober T, Siest JP, Troussard X, Flandrin G et le GFHC. Schizocytes : reproductibilité du diagnostic morphologique et intérêt de méthodes observateur-indépendantes. *Ann. Biol. Clin.* 2005;63(3):279-89.
- [7] Lau DH, Wun T. Early manifestation of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Med.* 1993;95:544-5.
- [8] Fava S, Galizia AC. Thrombotic thrombocytopenic purpura-like syndrome in the absence of schistocytes ; *Br. J. Haematol.* 1995;89:643-44.
- [9] Akiyama H, Yoshinaga H, Endou M *and al.* Microangiopathy without hemolysis in a patient following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplant* 1997;20:261-3.
- [10] Zini G, d'Onofrio G, Briggs C, *et al.* ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantification of schistocytes. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2012;24:107-16.
- [11] Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Diagnostic des anémies hémolytiques mécaniques: contribution de l'hémogramme. *Ann. Biol. Clin.* 2001;59(5):551-7.
- [12] Marsh GW, Lewis SM. Cardiac haemolytic anemia. *Semin. Hematol.* 1969;6:133-49.
- [13] Lesesve JF, Martin M, Banasiak C, André-Kerneis E, Bardet V, *et al.* Schistocytes in disseminated intravascular coagulation. *Int. J. Lab. Hem.* 2014;36:439-43.
- [14] Bain BJ. Schistocytes in megaloblastic anemia. *Am. J. Haematol.* 2010;85:599.
- [15] Zeigler ZR, Shaddock RK, Nemunaitis J *et al.* Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy: a case series. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15:247-53.
- [16] Zomas A, Saso R, Powles R, *et al.* Red cell fragmentation (schistocytosis) after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:777-80.

- [17] George J.N. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010; *Blood* 2010;116(20):4060-9.
- [18] Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine*. 1966;45(2):139-59.
- [19] Scully M, Beverley JH, Benjamin S, Liesner R, Rose P, *et al.* Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br. J. Haematol.* 2012;158:323–35.
- [20] Retornaz F, Soubeyrand J. Le purpura thrombotique thrombocytopénique : physiopathologie et traitement. *Réanimation* 2002;11:333-40.
- [21] Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hämolytisch–urämische syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien. *Schweiz Med Woch.* 1955;85:905-9.
- [22] Salvadori M, Bertoni E. Update on hemolytic uremic syndrome: Diagnostic and therapeutic recommendations. *World. J. Nephrol.* 2013;2(3):56-76.
- [23] Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H.. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1985;151(5):775-82.
- [24] Frémeaux-Bacchi F, Fakhouri F, Roumenina L, Dragon-Durey MA, Loirat C. Syndrome hémolytique et urémique lié à des anomalies du complément. *Rev. Med. Int.* 2011;32 :232-40.
- [25] Buffet M. Données épidémiologiques du CNR-MAT: site www.cnr-mat.fr.
- [26] Moschowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch. Intern. Med.* 1925;36:89-93.
- [27] Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lämmle B. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1998;91(8):2839-46.
- [28] Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, Spasoff RA. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1991;325(6):393-7.
- [29] Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: clinical experience in 108 patients. *N. Engl. J. Med.* 1991;325:398-403.
- [30] Ridolfi R, Bell W. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine* 1981;60(6):413-28.
- [31] Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts : state of the art. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008;130:104-16.

- [32] Lesesve JF, Crepin O, Siest JP, Régnier F, Zeltner S, et le GFHC. Evaluation de recommandations concernant l'identification et la numération des schizocytes: une enquête du Groupe francophone d'hématologie cellulaire. *Ann. Biol. Clin.* 2012;70(5):605-13.
- [33] Eysette-Guerreau S, Bader-Meunier B, Garçon L, Guitton C, Cynober T. Infantile pyknocytosis: a cause of haemolytic anaemia of the newborn. *Br. J. Haem.* 2006;133:439-42.
- [34] Hervent AS, Godefroid M, Cauwelier B, *et al.* Evaluation of schistocyte analysis by a novel automated digital cell morphology application. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2015;37:588-96.
- [35] CellaVision® DM9600 – Manuel d'utilisation 6.0.
- [36] Cornet E, Perol JP, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int. J. Lab. Hem.* 2008;30:536-42.
- [37] Lee LH, Mansoor A, Wood B, Nelson H, Higa D, Naugler C. Performance of CellaVision DM96 in leukocyte classification. *J. Pathol Inform.* 2013;1:14.
- [38] Surcouf C, Delaune D, Samson T, Foissaud V. Analyse d'image en cytologie hématologique: automate CellaVision DM96™. *Ann. Biol. Clin.* 2009;67(4):419-24.
- [39] Lesesve JF, Asnafi V, Braun F, Zini G. Fragmented red blood cells automated measurement is a useful parameter to exclude schistocytes on the blood film; *Int. J. Lab. Hem.* 2012;34:566-76.
- [40] Jiang M, Saigo K, Kumagai S, Imoto S, Kosaya Y, Matsumoto I, Fujimoto K. Quantification of red blood cell fragmentation by automated haematology analyser XE-2100; *Clin. Lab. Haem.* 2001;23:167-72.
- [41] Kunicka JE, Fischer G, Murphy J, Zelmanovic D. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000;114:283-89.
- [42] Saigo K, Jiang M, Tanaka C, Fujimoto K, Kobayashi A, Nozu K *and al.* Usefulness of automatic detection of fragmented red cells using a haematology analyzer for diagnosis of thrombotic microangiopathy ; *Clin. Lab. Haem.* 2002;24:347-51.
- [43] Banno S, Ito Y, Tanaka C, Hori T, Fugimoto K, Suzuki T *and al.* Quantification of red blood fragmentation by the automated haematology analyser XE-2100 in patients with living donor liver transplantation. *Clin. Lab. Haem.* 2005;27:292-6.
- [44] Lesesve JF, Salignac S, Alla F, Defente M, Benbih M, Bordigoni P, Lecompte T. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004;121:739-45.
- [45] Advia®2120/2120i Hematology Systems-Guide de l'opérateur. Siemens, 2008.
- [46] Egele A, van Gelder W, Jurgen R. Automated detection and classification of schistocytes by a novel red blood cell module using digital imaging/microscopy. *J.Hematol.* 2015;4:184-6.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE - U.F.R. DE PHARMACIE
Année universitaire 2017/2018
MEMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE
MEDICALE
(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)

Nom : MOULIS Morgane

Titre du mémoire : Evaluation de l'application Red Blood Cell Advanced Software de CellaVision® et apports de l'automatisation pour la recherche et la quantification des schizocytes

Mots clés : schizocytes, DM9600, performances, globules rouges fragmentés

Résumé

Les schizocytes sont des fragments d'hématies circulants, dont la présence, considérée comme anormale, doit avant tout faire suspecter une MAT. Actuellement, leur recherche s'effectue par microscopie manuelle classique mais des alternatives semblent envisageables avec le développement de la microscopie automatisée (DM9600 de Cellavision®) ou l'utilisation de données d'analyseurs cellulaires.

Nous avons évalué les performances analytiques du DM9600 à partir de frottis de sang périphérique étalés avec la technologie Siemens® pour des demandes non significatives et de patients présentant une MAT. Le DM9600 montre une bonne répétabilité et reproductibilité pour le nombre de globules rouges totaux mesurés mais présente une grande variabilité dans le décompte de schizocytes lors de l'étape de pré-classification. Une étape de reclassification par le lecteur permet de se rapprocher des valeurs de la microscopie manuelle. Nous obtenons une très bonne sensibilité et spécificité pour ces 2 étapes. Cependant, une comparaison avec la technologie Sysmex® nous démontre les faiblesses liées à l'étalement Siemens®. Et le grand nombre de cellules déplacées rend la méthode très chronophage.

De futures améliorations techniques permettront probablement au DM9600 d'être un outil de choix pour le décompte de schizocytes, notamment en le couplant à d'autres paramètres biologiques (GRF et hémoglobine).

Abstract

Schistocytes are circulating fragments of red blood cells. Their presence is abnormal and associated with thrombotic microangiopathy. At present, enumeration of schizocytes is performed by visually counting during microscopic examination. Whereas, automated digital cell morphology (DM9600, CellaVision®) and automated haematology analyzers seem to be alternatives to the "gold standard".

To evaluate the schistocyte analysis by the DM9600, we used blood smears of controls and of hospitalized patients, made on an Autoslide Siemens®. The DM9600 shows good within-run and between-run variabilities for the count of red cells, but during pre-reclassification, there is a considerable variability for the count of schizocytes. A reclassification is mandatory to obtain comparable results to the manual microscopic analysis. We calculated a very high sensitivity and specificity for the two steps. A comparison with the Sysmex® technology showed the weakness of Siemens® blood films. And the reclassification of many red cells is cumbersome.

Further technical improvements will probably make the DM9600 more performing and a good tool for the schistocyte enumeration, especially in association with parameters of automated cells analyzers (RFC and haemoglobinemia).